



Enantioselectivitat de derivats de prolina com a selectors quirals en cromatografia en contracorrent

Anna Maria Pérez Montero

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA
PROGRAMA DE DOCTORAT: QUÍMICA ORGÀNICA EN LA
INDÚSTRIA QUÍMICO-FARMACÈUTICA
BIENNI 2005-2007

**“Enantioselectivitat de derivats de
prolina com a selectors quirals en
cromatografia en contracorrent”**

**Memòria presentada per Anna Maria Pérez Montero per optar al
títol de doctor per la Universitat de Barcelona**

Directora: Dra. Cristina Minguillón Llombart

Doctorand: Anna María Pérez Montero

ANNA MARIA PÉREZ MONTERO, 2012

Els estudis que es presenten en aquesta Tesi Doctoral han estat duts a terme en el període de 2005 a 2009 al Grup de Peptidomimètics i Heterocicles Bioactius (Biosyner) de l'Institut de Recerca Biomèdica al Parc Científic de Barcelona.

La recerca ha estat finançada pel *Ministerio de Ciencia y Tecnologia* (Proyecto n. PPQ2003-00970 i CTQ 03378/PPQ). La doctoranda ha gaudit d'una beca de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB-PCB).

Els treballs han donat lloc a un article i d'altres que estan en preparació:

A.M. Pérez, C. Miguillón, "Retention of fluorinated chiral selectors in biphasic fluorinated solvent systems and its application to the separation of enantiomers by countercurrent chromatography" *J. Chromatogr A*, 1217 (2010) 1094-1100.

Agraïments

En aquestes línies voldria agrair a totes aquelles persones que han fet possible el desenvolupament d'aquest treball.

Primer de tot, a la Dra. Cristina Minguillón per haver-me donat la possibilitat de realitzar aquest treball, haver confiat en mi i per tots els coneixements adquirits durant aquests anys.

Al Dr. Miguel Feliz i el personal del Servei de Ressonància Magnètica Nuclear (IRB-PCB). Al Dr. Isidre Casals (unitat de espectroscòpia de masses), a la Maria Reixac (unitat de cromatografia líquida i electroforesis capil·lar), a la Dra. Eliandre de Oliveira (unitat de proteòmica) i tot el personal dels Serveis Científic-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

També voldria agrair a tots els companys de laboratori que han passat durant aquests anys per les hores pasades i les bones estones que hem viscut. En especial a la Núria, la Míriam, el Dani, el Jordi i el Nicola. Desitjant poder compartir amb tots ells encara molt més moments especials!

Com no donar les gràcies a tots els nois i noies de pràctiques que han ajudat en la realització d'aquest treball: la Patricia, la Cristina, el Rami, el Jan, la Marta i la Rand.

Agraeixo la seva amistat, energia, ànims i suport durant tots aquests anys, a la Vero. Espero que continuem compartint molts bons moments els Albertos, tu i jo.

Com no agrair la paciència i l'interès mostrat per tots els meus amics i amigues durant aquests anys, a més dels companys de Lacer, Almirall i Novartis.

A l'Albert per donar-me suport i ànims durant tots aquests anys, pels bons moments que hem compartit i els que encara han de venir.

Per últim, a la meva família, en especial als meus pares pel suport incondicional que sempre he rebut, pels seus bons consells i els ànims que m'han donat en tot moment.

Als meus pares

A l'Albert

Índex

| | |
|---|-----------|
| Abreviatures | v |
| 1 Introducció | 1 |
| 1.1. Aspectes generals | 3 |
| 1.2. Mètodes preparatius per a l'obtenció d'enantiòmers | 5 |
| 1.3. Cromatografia en contracorrent (CCC) | 8 |
| 1.3.1. Instrumentació | 9 |
| 1.3.2. Sistema de dissolvents | 12 |
| 1.3.3. Utilització de la CCC amb finalitat enantioselectiva | 13 |
| 1.4. Enantioreconeixement en dissolució. Aspectes teòrics | 14 |
| 1.5. Selectors quirals utilitzats en CCC/CPC | 18 |
| 1.5.1. Modes d'elució en CCC | 22 |
| 1.6. Aplicació dels derivats de l'aminoàcid L-prolina com a selectores quirals en la separació cromatogràfica d'enantiòmers | 25 |
| 1.7. Tècniques utilitzades en l'estudi del mecanisme de reconeixement quiral d'aplicació en el disseny de nous selectores | 35 |
| 2 Objectius | 41 |
| 3 Selectors quirals monomèrics derivats de L-prolina | 51 |
| 3.1. Introducció d'una cadena alifàtica sobre l'anell aromàtic | 56 |
| 3.1.1. Síntesi dels SQs 7, 8 i 9 | 56 |
| 3.1.2. Determinació de la solubilitat dels compostos 7, 8 i 9 i recerca de condicions pel seu ús en CPC | 57 |
| 3.1.3. Assaig de la capacitat d'enantioreconeixement de 8 i 9 en CPC | 59 |
| 3.2. Incorporació de la unitat de L-prolina en un sistema rígid | 63 |
| 3.2.1. Síntesi dels SQs 16-19 | 65 |
| 3.2.2. Estudis de solubilitat dels compostos 16-19 i recerca de condicions pel seu ús en CPC | 75 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.3. | Assaig de la capacitat d'enantioreconeixement de 16, 18 i 19 en CPC | 76 |
| 3.2.3.1. | Avaluació de la capacitat d'enantiodiscriminació de 16 envers altres derivats d'aminoàcids racèmics | 78 |
| 3.2.3.2. | Intents de millora de la enantioselectivitat de 16 a través de l'aplicació de modes d'elució alternatius | 80 |
| 3.3. | Variació del factor d'enantioselectivitat en funció de la concentració de selector quirals present en la fase estacionària | 85 |
| 3.3.1. | Síntesi de 1 | 85 |
| 3.3.2. | Planificació i realització dels experiments per tal de calcular el valor del factor d'enantioselectivitat d' 1, 16, 18 i 19 | 86 |
| 3.3.3. | Estudi d'altres aplicacions del SQ 16 | 88 |
| 4 | Disseny de SQs que contenen dues unitats de L-prolina | 93 |
| 4.1. | SQs dimèrics que contenen un connector entre les dues unitats quirals | 99 |
| 4.1.1. | Síntesi dels SQs 21, 22 i 23 | 99 |
| 4.1.2. | Síntesi dels SQs 24 | 100 |
| 4.1.3. | Síntesi del SQ 25 | 101 |
| 4.1.4. | Solubilitat dels compostos 21, 22, 23 i 24 i recerca de condicions pel seu ús en CCC | 108 |
| 4.1.5. | Assaig de la capacitat d'enantioreconeixement de 21, 22 i 23 en CCC | 110 |
| 4.1.6. | Estudi de la capacitat de saturació del SQ 22 vers el SQ 1 | 113 |
| 4.2. | Biselectors units de forma directa | 118 |
| 4.2.1. | Síntesi del SQ 26 | 118 |
| 4.2.2. | Síntesi del SQ 27 | 119 |
| 4.2.3. | Assaig de 26 i 27 en CCC | 120 |
| 4.2.4. | Recapitulació | 122 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5 | Sistemes de dissolvents fluorats i la seva aplicació en CCC | 125 |
| 5.1. | Selecció d'un dissolvent fluorat | 127 |
| 5.1.1. | Característiques de l'ENFB | 129 |
| 5.2. | Disseny d'un selector quiral fluorat | 130 |
| 5.2.1. | Síntesi del SQ 35 a partir de L-prolina | 130 |
| 5.2.2. | Síntesi del SQ 35 a partir de la <i>N</i> -(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida | 131 |
| 5.2.3. | Ús de hexafluorofosfat de cloro- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilformamidini (TCFH) com a agent d'acoblament | 132 |
| 5.3. | Construcció del sistema de dissolvents ternari | 135 |
| 5.4. | Selecció de la composició dels sistemes de dissolvents i estudi de la seva estabilitat a temperatura ambient | 138 |
| 5.5. | Experiments de cromatografia en contracorrent (CCC) | 141 |
| 5.6. | Estudi mitjançant membranes líquides | 145 |
| 5.6.1. | Membranes líquides enantioselectives | 145 |
| 5.6.2. | Estudi de l'enantioselectivitat a través de BLM | 146 |
| 5.6.2.1. | Enantioconeixement en cloroform | 146 |
| 5.6.2.2. | Enantioconeixement en metil <i>tert</i> -butil èter (MTBE) | 149 |
| 5.6.2.3. | Enantioconeixement en sistemes fluorats | 150 |
| 6 | Experimental | 161 |
| 6.1. | Dades generals | 163 |
| 6.2. | Procediments experimentals | 165 |
| 6.2.1. | Síntesi dels SQs | 165 |
| 6.2.2. | Síntesi dels racèmics | 190 |
| 6.3. | Construcció dels sistemes de dissolvents ternaris | 192 |
| 6.4. | Preparació dels sistemes de dissolvents | 195 |
| 6.4.1. | Sistemes de dissolvents binaris | 195 |
| 6.4.2. | Sistemes de dissolvents ternaris | 196 |
| 6.4.3. | 6.4.3. Sistemes de dissolvents quaternaris | 197 |
| 6.5. | Estudi qualitatiu de la distribució dels racèmics en els sistemes de dissolvents | 198 |

| | | |
|----------|---|--------------|
| 6.6. | Condicions de control analític dels assajos de separació per CPC/CCC i membranes líquides | 201 |
| | 6.6.1. Condicions d'anàlisi | 201 |
| | 6.6.2. Preparació de les mostres | 202 |
| 6.7. | Condicions experimentals en cromatografia en contracorrent | 204 |
| | 6.7.1. Condicions experimentals de CPC | 204 |
| | 6.7.2. Condicions experimentals de CCC | 206 |
| 6.8. | Assajos en mode clàssic en cromatografia en contracorrent | 208 |
| | 6.8.1. Assajos de CPC | 208 |
| | 6.8.2. Assajos experimentals de CCC | 210 |
| 6.9. | Assajos amb membranes líquides | 211 |
| | 6.9.1. Assajos en tubs amb forma d'U | 213 |
| | 6.9.2. Assajor en tubs amb forma d'H | 213 |
| | 6.9.3. Optimització del mètode analític | 214 |
| | 6.9.4. Representació de l'enantioselectivitat i del transport | 215 |
| 7 | Conclusions | 219 |
| 8 | Referències | 225 |
| | Annex I. Espectres RMN* | AI-1 |
| | Annex II. Taules experiments CPC/CCC* | AII-1 |

* Es troben en format digital en el CD que acompanya la tesis doctoral.

Abreviatures

| | |
|-------------------------------|---|
| α | Factor d'enantioselectivitat |
| 1-BuOH | 1-butanol |
| 2-PrOH | 2-propanol o isopropanol |
| ACN | Acetonitril |
| AcOEt | Acetat d'etil |
| AE | Anàlisi elemental |
| AINEs | Antiinflamatoris no-esteroídics |
| ASQ | Agent de solvatació quirals |
| Boc | <i>tert</i> -Butoxicarbonil |
| (Boc)₂O | Dicarbonat de <i>di</i> <i>tert</i> -butil |
| CCC | Cromatografia en contracorrent |
| CCF | Cromatografia en capa fina |
| CG | Cromatografia de gasos |
| COSY | CORrelation SpectroscopY |
| CPC | <i>Centrifugal Partition Chromatography</i> o Cromatografia de repartiment centrífug |
| δ | Desplaçament químic (ppm) |
| DIPCDI | Diisopropilcarbodiimida |
| DIPE | Diisopropilèter |
| DIPEA | Diisopropiletilamina |
| DM | <i>Dual mode</i> o mode dual |
| DMAP | <i>N,N</i> -4-Dimetilaminopiridina |
| DMF | <i>N,N</i> -dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfòxid |
| DNA | Àcid desoxiribonucleic |
| DNB | Dinitrobenzoïl |
| DNB-(±)-Leu | (±)- <i>N</i> -(3,5-dinitrobenzoïl)-(±)-leucina |
| DNB-(±)-<i>t</i>Bu-Leu | (±)- <i>N</i> -(3,5-dinitrobenzoïl)- <i>tert</i> -butilleucinamida |

| | |
|-------------------------|---|
| EC | Electroforesi capil·lar |
| ee | Excés enantiomèric |
| EEDQ | 1-Etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleïna |
| EG | Etilenglicol |
| ENFB | Etoxinonafluorbutà |
| eq. | Equivalent |
| FE | Fase estacionària |
| FEQ | Fase estacionària quiral |
| FM | Fase mòbil |
| FN | Fase normal |
| FR | Fase reversa |
| h | Hora |
| HOBt | 1-Hidroxibenzotriazole |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography o Cromatografia Líquida d'Alta Ressolució |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence |
| IR | Infrarroig |
| K_D | Coeficient de distribució |
| LEC | Liquid-exchange chromatography o Cromatografia de bescanvi iònic |
| MALDI-TOF | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight</i> |
| MDM | Multiple dual-mode o Mode múltiple dual |
| MeOH | Metanol |
| MIBK | Metil isobutil cetona |
| min | Minut |
| mL | Mil·lilitre |
| ML | Membranes líquides |
| MTBE | Metil <i>tert</i> -butil èter |
| NOESY | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy |
| ppm | Parts per milió |
| PTFE | Politetrafluoroetileno o Teflon® |

| | |
|-------------|--|
| rpm | Revolucions per minut |
| RMN | Ressonància magnètica nuclear |
| SMB | Simulating Moving Bed Cromatografia de Llit Mòbil Simulat |
| SQ | Selector quirial |
| t.a. | Temperatura ambient |
| TCFH | Hexafluorofosfat de cloro- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilformamidini |
| TQ | Transportador quirial |

1 Introducció

Introducció

1.1. Aspectes generals

L'enantioselectivitat no és un fet anecdòtic de la natura, ja que tots els organismes vius estan constituïts per molècules quirals (α -aminoàcids, àcids nucleics, sucres,...) i en molts processos aquesta característica juga un paper clau. Així per exemple, en processos mediat per catàlisi enzimàtica només es desencadena la resposta en unir-se al centre actiu de l'enzim la molècula que presenta una estereoquímica determinada.¹

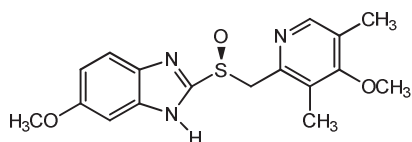
En les últimes dècades, el fenomen de l'enantioselectivitat ha anat adquirit una importància creixent per a la indústria farmacèutica a l'hora del desenvolupament de nous fàrmacs. Això és degut a la observació d'una diferent resposta per part de l'organisme en funció de l'estereoquímica de la molècula exògena administrada, ocasionada per l'elevada estereoselectivitat dels processos fisiològics. Diferents exemples es poden trobar a la literatura a partir del desastre produït pel fàrmac anomenat *talidomida*, en què es va responsabilitzar la forma *S* de l'efecte teratogen mentre s'assignà l'acció sedant a la *R*. Molts altres fàrmacs quirals presenten una dicotomia d'efectes pels enantiòmers. A mode d'exemple l'anestèsic prilocaïna presenta diferències d'activitat entre enantiòmers. En aquest cas la forma de configuració *S* posseeix majoritàriament l'acció anestèsica, mentre que la *R* és responsable dels efectes tòxics del fàrmac, que pot produir metahemoglobinèmia.

Així doncs, l'administració, i per tant la comercialització de fàrmacs enantiomèricament purs, simplifica aspectes farmacològics, farmacocinètics, terapèutics i toxicològics de l'acció dels fàrmacs. Altres avantatges que s'aconsegueixen amb aquest procedir són la disminució de la dosi de fàrmac requerida per a produir l'efecte desitjat i la menor variabilitat interpersonal de l'efecte produït per una determinada dosi.

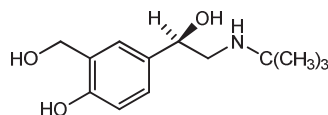
Tot i això, no es va plantejar l'administració de nous fàrmacs quirals com a enantiòmers únics fins a la dècada dels anys 80. Va ser en aquest període que es desenvoluparen mètodes analítics altament selectius que van permetre detectar i quantificar la presència dels dos enantiòmers en mostres, i mètodes de síntesi

enantioselectiva i de separació amb els quals s'aconseguí fer de la producció d'enantiòmers aïllats un procés assequible.²

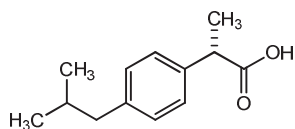
Degut a les diferències farmacològiques originades pels enantiòmers i els avenços tecnològics realitzats per a la seva producció separada, l'any 1992 les autoritats sanitàries establiren condicions per al desenvolupament de nous fàrmacs quirals, essent més estrictes els requeriments exigits pel registre i comercialització de les noves formes farmacèutiques.³ Així, tot i no prohibir la comercialització de nous fàrmacs com a barreja racèmica, es promogué el desenvolupament dels nous fàrmacs quirals enantiomèricament purs. També, es va dinamitzar la comercialització de *chiral switches*, és a dir, la posada al mercat de l'enantiòmer més actiu de fàrmacs que anteriorment havien estat comercialitzats en la seva forma racèmica (Figura 1.1).⁴



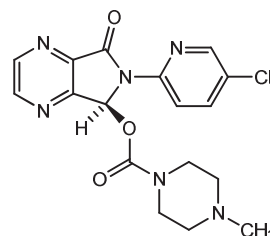
Esomeprazol
(antisecretor gàstric)



Levalbuterol
(broncodil.lataador)



Dexibuprofèn
(antiinflamatori)



Eszopiclona
(ansiolític)

Figura 1.1. Exemples de fàrmacs, comercialitzats inicialment com a racèmics, dels que ara es comercialitza el seu eutòmer (enantiòmer més actiu) (*chiral switches*).

En paral·lel, en els últims anys s'ha observat un increment important de nous principis actius comercialitzats com a formes enantiomèricament pures, respecte a formes racèmiques (Figura 1.2).⁵

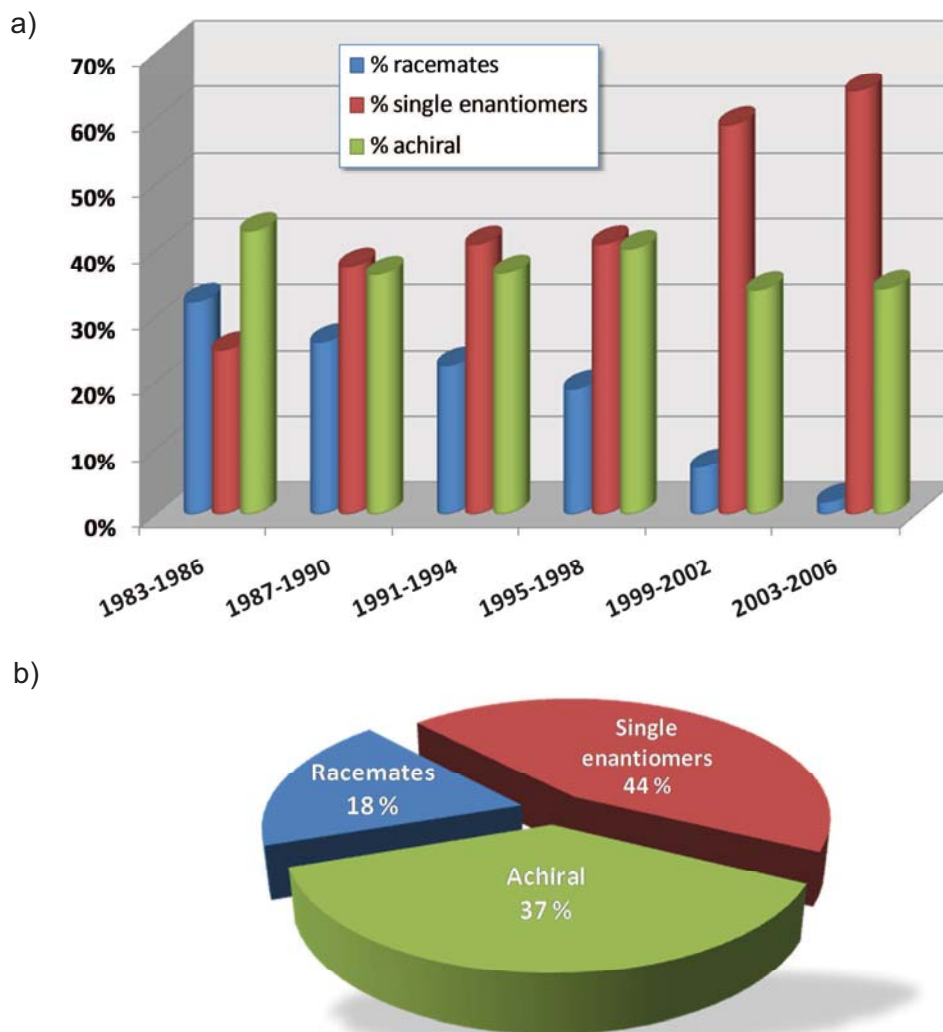


Figura 1.2. a) Evolució del percentatge de fàrmacs comercialitzats com a racèmics i enantiomericament purs de l'any 1983 al 2006 b) percentatge de fàrmacs comercialitzats de cada tipus en l'actualitat.

1.2. Mètodes preparatius per a l'obtenció d'enantiòmers

A l'hora de produir substàncies enantiomèricament pures en grans quantitats es poden abordar dues aproximacions: la síntesi estereoselectiva de l'isòmer desitjat, o bé, la separació dels dos enantiòmers d'una barreja racèmica.

La síntesi estereoselectiva, tot i implicar l'obtenció majoritària de l'enantiòmer desitjat, suposa un procés sovint costós i laboriós. A més, el producte obtingut acostuma a requerir d'una posterior fase d'enriquiment de la forma desitjada, ja que la puresa enantiomèrica obtinguda no sol assolir els requeriments estipulats per les autoritats reguladores.

Per contra, la separació d'enantiòmers a partir d'una barreja racèmica suposa un rendiment limitat al 50% en l'etapa en què es realitza la separació, cosa que redueix el rendiment global del procés de producció. No obstant, l'enantiòmer no desitjat se sol racemitzar i així es recicla i es millora el rendiment. Tot i així, no sempre l'obtenció de la mescla racèmica és un inconvenient, ja que en els primers estadis del desenvolupament dels nous fàrmacs, s'han de realitzar assajos amb els dos enantiòmers per separat⁶ i aquí la síntesi del racèmic combinada amb l'ús de les tècniques separatives són la primera elecció.

Una de les tècniques de separació més emprades a nivell industrial és la resolució per cristal·lització fraccionada dels propis enantiòmers, si aquests formen un conglomerat o, més correntment, la cristal·lització de derivats diastereomèrics dels enantiòmers. Aquest procediment es basa en la interacció que es produeix entre una mescla racèmica amb un material òpticament actiu (agent de resolució) per a donar dos derivats diastereomèrics, normalment sals, tal i com es mostra (Figura 1.3).⁷

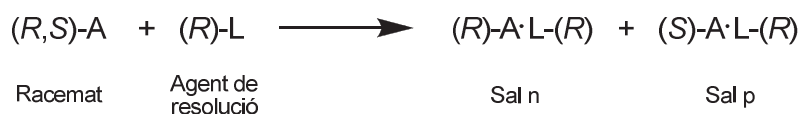


Figura 1.3. Derivatització d'una barreja d'enantiòmers amb un agent de resolució quiral per tal de formar derivats diastereomèrics. Posteriorment la barreja de diastereòmers es podrà separar utilitzant mètodes diversos, entre ells un dels més utilitzats és la cristal·lització.

Els derivats que es formen tenen diferents propietats físico-químiques i poden separar-se per diferents mètodes, per exemple, per cromatografia, tot i que el mètode més eficient per a separar diastereòmers quan es tracta de sals és la cristal·lització. Aquest és el procediment utilitzat en la obtenció de molts fàrmacs. Així es realitza la cristal·lització selectiva dels diastereòmers obtinguts a partir del propi fàrmac o un dels seus intermedis amb un agent de resolució. Aquest és el cas de fàrmacs com la rivastigmina, la setralina, l'orlistat, el benazepril o la fosfomicina, entre molts d'altres (Figura 1.4).

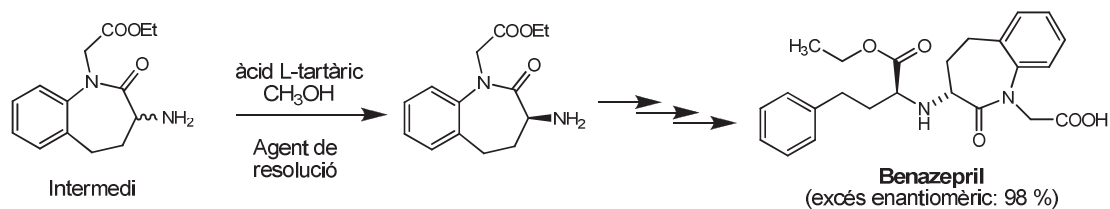


Figura 1.4. Obtenció del benazepril per cristal·lització diastereoselectiva de la sal formada entre el seu intermedi i l'àcid L-tartàric utilitzat com a agent de resolució.⁸

Existeixen procediments enzimàtics que s'utilitzen amb la mateixa finalitat. Com en el cas anterior, acostuma a realitzar-se en primer lloc una derivatització del compost per tal que posteriorment hi actuï de forma estereoselectiva l'enzim seleccionat. D'aquesta manera s'obté un dels antiinflamatoris no esteroides (AINE) més dispensats com a forma enantiomèricament pura, el dexketoprofèn trometamol (Enantyum[®]) (Figura 1.5).⁹

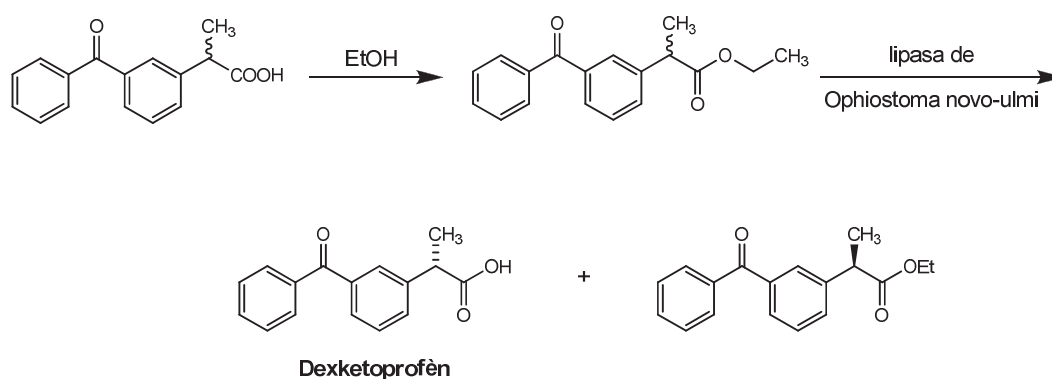


Figura 1.5. Procediment de resolució enzimàtica utilitzat per a l'obtenció del dexketoprofèn.

Tot i això, les tècniques cromatogràfiques de separació directa dels enantiòmers s'utilitzen cada cop més. Tenen al seu favor el fet de ser d'aplicació per compostos de diversa estructura sense el requeriment d'una derivatització prèvia o la condició d'aplicació a materials sòlids, i per tant, es tracta de procediments molt generals. No obstant, es poden utilitzar de forma exclusiva o en combinació amb les tècniques de separació o de síntesi enantioselectiva. De totes les modalitats de cromatografia, la de *simulated moving bed* o cromatografia de llit mòbil simulat (SMB) és la més usada a escala preparativa.¹⁰ Un dispositiu de SMB està format per múltiples columnes quirals disposades en forma anular entre les que es canvia de forma periòdica mitjançant vàlvules l'entrada i la sortida de dissolvents, el punt d'injecció de barreja i de recol·lecció de derivats purificats (Figura 1.6). Amb aquest canvi, realitzat sempre en la mateixa direcció en la que circula la fase mòbil líquida, es simula el moviment

de la fase sòlida en direcció contrària, aconseguint així un procés continu que permet millorar l'aprofitament de la fase estacionària (FE) i disminuir el consum de dissolvent emprat, respecte la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) convencional.¹¹

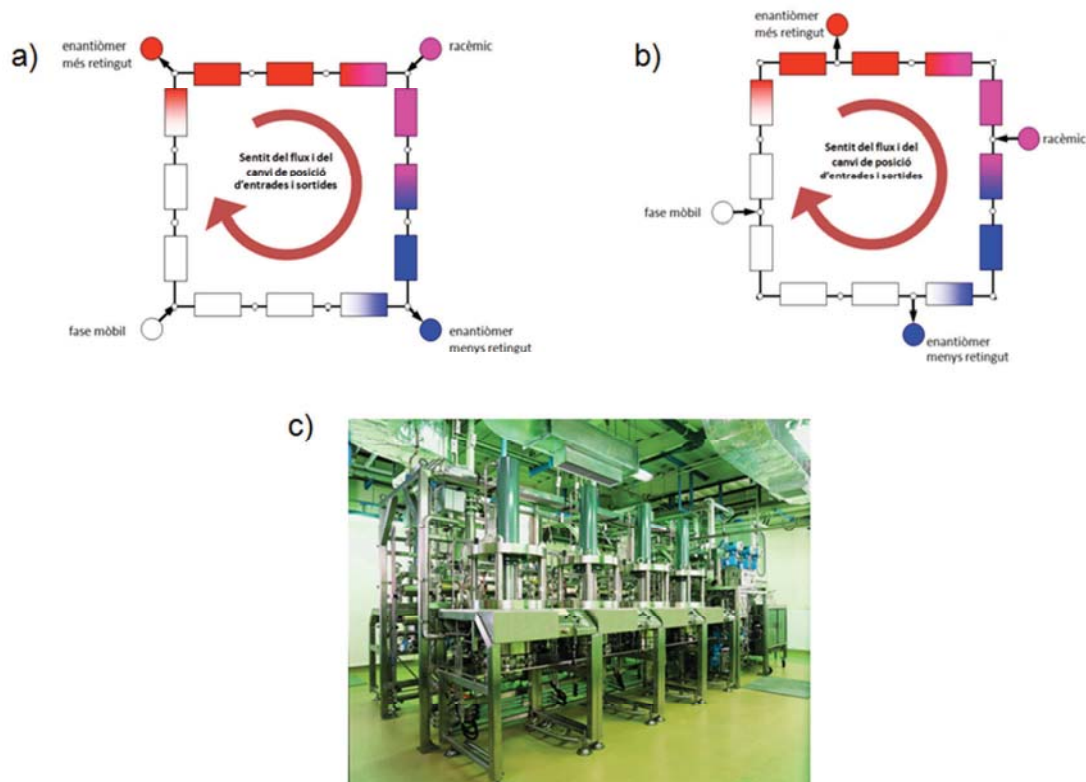


Figura 1.6. a i b) Esquema del funcionament d'un sistema SMB. c) Sistema SMB de vuit columnes de 30 cm de diàmetre intern. (Daicel Corporation, Arai, Japó).

L'inconvenient d'aquesta metodologia és l'elevat preu de l'equipament, que requereix de cinc bombes per tal de fer circular la fase líquida per les quatre entrades i sortides i pel sistema anular de columnes. Per això, el desenvolupament de noves tècniques per a la separació d'enantiòmers a gran escala encara esdevé un repte. En aquest camp noves tècniques emergents com les membranes líquides o les metodologies d'extracció líquid-líquid, entre les que podríem destacar la cromatografia en contracorrent (CCC), constitueixen aproximacions molt prometedores.

1.3. Cromatografia en contracorrent (CCC)

La cromatografia en contracorrent (CCC) és una variant de la cromatografia líquida, en la que la fase mòbil i la fase estacionària estan formades per dos líquids

immiscibles entre sí. La fase estacionària queda retinguda dins del dispositiu com a conseqüència de la força centrífuga que aquest genera, mentre la fase mòbil es bombeja a través d'aquesta.^{12,13,14} Així, el fenomen responsable de la separació dels components d'una barreja en CCC és el repartiment diferenciat d'aquests entre les dues fases líquides que ve determinat pel seu respectiu coeficient de repartiment.

La CCC presenta certs avantatges respecte als mètodes cromatogràfics líquid-sòlid convencionals com l'HPLC. Així, en no existir un suport sòlid no es produeixen ni fenòmens d'absorció irreversible de la mostra, ni pèrdues d'analit, entre d'altres. A més, la CCC presenta una capacitat de càrrega singularment elevada que, juntament amb un reduït consum de dissolvents, fa que el procés de separació sigui més rendible en termes econòmics. La CCC és una tècnica molt versàtil, ja que permet utilitzar un gran nombre de barreges de dissolvents immiscibles, treballar indistintament en condicions de fase normal (FN) o de fase inversa (FI), i utilitzar modes d'elució que només són possibles gràcies a l'absència de suport sòlid.¹⁵

Tot i això, la CCC també presenta inconvenients. Un d'ells és la baixa eficiència que presenta respecte a l'HPLC, tot i que aquest fet podria quedar compensat per l'elevada capacitat de càrrega i la particular selectivitat i versatilitat de la tècnica.¹⁶

1.3.1. Instrumentació

Com per HPLC, en CCC es necessita una bomba, un injector, un detector d'UV, un col·lector de fraccions i un software per controlar l'evolució de l'experiment. A més cal afegir l'equipament particular de la tècnica que constitueix l'equivalent a la columna cromatogràfica (Figura 1.7).



Figura 1.7. Exemple d'un dispositiu de CCC en el que la columna de cromatografia de repartiment centrífug (CPC) està acoblada a un sistema d'HPLC convencional (bomba, injector i detector).

Pel que fa als aparells de CCC, els sistemes que serveixen per a mantenir un dels líquids estacionari, i que fan el paper de columnes cromatogràfiques, es poden classificar en dos grups:

A. Columnes hidrodinàmiques

Aquest tipus de columnes van ser desenvolupades a la dècada dels 60 per Yoichiro Ito,¹⁷ i les més utilitzades són les de moviment planetari tipus J (*Type-J synchronous planetary motion*) en dispositius de HSCCC (*High Speed CCC*). La principal característica d'aquestes columnes és que estan formades per bobines constituïdes per tub de PTFE (politetrafluoroetilè o Teflon[®]) enrotllat sobre un suport. Un dispositiu amb dos eixos de rotació origina un moviment planetari de la bobina i genera una força centrífuga variable en l'interior del tub (Figura 1.8). Aquest tipus de dispositiu fa que es produeixi el fenomen cromatogràfic com a conseqüència de la barreja i decantació successives de les dues fases de dissolvents dins del tub, una d'aquestes fases es manté estacionària degut principalment a l'efecte d'Arquímedes.¹⁸ Aquests aparells no requereixen juntes de rotació per a connectar les conduccions mòbils en rotació amb les estàtiques.

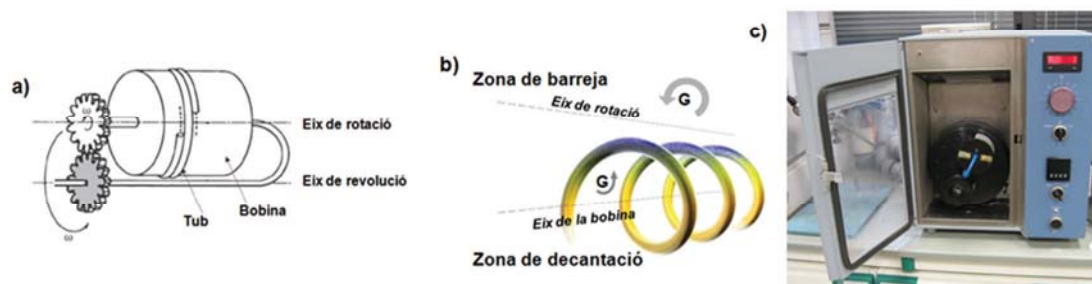


Figura 1.8. Esquema d'un aparell CCC hidrodinàmic: a) esquema d'una columna moviment planetari tipus J sincrònic. Els dos eixos de rotació, el central al rotor i el de rotació de la bobina, generen un moviment sincrònic de tipus planetari; b) La rotació de la bobina genera en el tub zones de barreja i de decantació de les dues fases; c) Dispositiu de CCC format per una única bobina, Sobre el rotor s'observa també el contrapès.

A la bobina distingim dues parts, el cap (principi de la bobina situat en la zona més interna d'aquesta) o *head* i la cua (final del tub enrotllat a la zona més externa de la bobina) o *tail*. En funció de la densitat dels dissolvents aquests es distribuiran preferentment cap a un lloc o un altre. Així, mentre els dissolvents menys densos tendeixen a anar cap al cap, el més densos ho fan cap a la cua. Per tant, en realitzar un experiment de CCC es podran establir dos modes de treball principals. Quan s'utilitza com a fase mòbil el dissolvent menys dens (fase superior) aquest entrarà a la columna per la cua, per tant el *modus operandi* serà de cua a cap o *T-to-H* (*Tail-to-Head*). Per contra, si el dissolvent més dens (fase inferior) s'utilitza com a fase mòbil, es treballarà de cap a cua o *Head-to-Tail* (*H-to-T*), on el dissolvent més dens entrarà a la columna de CCC pel cap i passarà a través de la fase estacionària formada pel dissolvent menys dens, fins a sortir de la columna per la cua.

B. Columnes hidrostàtiques

Les columnes hidrostàtiques van ser desenvolupades principalment per Nunogaki a principis dels anys 80; aquests tipus d'instruments s'anomenen cromatògrafs de repartiment centrífug o *Centrifugal Partition Chromatography* (CPC) *apparatus* (Figura 1.7). Es diferencien dels equips d'HSCCC pel fet de tenir un únic un eix de rotació que genera un camp gravitacional constant. La columna està formada per una sèrie de cel·les o canals connectats per conductes disposats de forma regular al voltant del rotor, les quals estan sotmeses a una acceleració centrífuga constant generada per la rotació.¹⁹ La separació té lloc per les diferències de densitat existents entre les dues fases. Mentre el rotor de la centrífuga està en moviment, la

fase mòbil es introduïda cap a les cel·les i aquesta va cap a una direcció o una altra, a través de la FE en funció de la seva densitat degut a la força centrífuga (Figura 1.9).

Cal remarcar que els conductes que comuniquen els canals només contenen fase mòbil, la qual cosa és desfavorable en el bescanvi de soluts entre fases, ja que la seva gruixària repercuteix en un eixamplament del pic durant el procés cromatogràfic. A més, es genera un petit augment de pressió en passar d'un canal al següent, cosa que no passa en les columnes de CCC.



Figura 1.9. Esquema d'un aparell CPC (Sanki, Japó): a) Detall del rotor del dispositiu de CPC. El rotor té un sol eix de rotació perpendicular al rotor; b) Imatge d'un dels discs que constitueixen el rotor; c) Representació esquemàtica dels canals i conductes excavats en aquests discs.

Com en el cas de les columnes hidrodinàmiques, en funció de la densitat del líquid seleccionat com a fase mòbil s'utilitzarà un mode de treball ascendent o descendent. Així, si la fase menys densa (fase superior) s'usa com a fase mòbil, aquesta entrarà en el dispositiu per la part inferior de l'últim canal per moure's a través de la FE que és la més densa, per tant, es treballa en mode ascendent, equivalent a *T-to-H* en columnes de CCC. Per contra, si la fase més densa (fase inferior) es selecciona com a FM, aquesta ha d'entrar per dalt a través del primer canal per moure's a través de la FE constituïda pel líquid més dens, així el mode de treball és descendent.¹²

1.3.2. Sistema de dissolvents

El sistema de dissolvents seleccionat per a dur a terme l'experiment és clau per tal d'aconseguir uns resultats satisfactoris. A diferència del que es fa en HPLC, on es selecciona independentment una FE en funció de l'analit a separar i una FM adequada per resoldre el problema, en CCC la tria de la FM i FE s'ha de considerar de forma conjunta. Ja que, quan es pretén separar una barreja de productes s'ha de

produir la distribució d'aquests entre les dues fases (FM i FE) i en funció de la diferent polaritat dels compostos, tindran més afinitat per una o altra fase.

El gran nombre de sistemes de dissolvents dels que es pot disposar, fa que es converteixi en una tècnica separativa d'àmplia versatilitat, ja que només modificant el sistema de dissolvents emprat es pot aconseguir separar des de molècules orgàniques simples, fins a cèl·lules sanguínies senceres.¹²

A l'hora de seleccionar un sistema de dissolvents s'ha de tenir en compte en primer lloc la polaritat i la solubilitat de la mostra. Posteriorment, s'ajustarà la composició del sistema de dissolvents per tal que els coeficients de repartiment de les substàncies a separar siguin diferents entre ells. Quan el que es pretén és realitzar una separació quiral, atès que aquesta s'ha de produir en un entorn quiral líquid, serà necessària l'addició d'un selector quiral (SQ) que ha de ser soluble en una de les fases del sistema que generalment s'utilitza com a fase estacionària (FE). Per contra, el racèmic o analit a separar s'haurà de repartir en ambdues fases, ja que per entrar en contacte amb el SQ haurà de passar de la fase mòbil a la fase estacionària, per tornar a passar a la fase mòbil per tal de ser eluït.

Les barreges que constitueixen els sistemes de dissolvents han de complir certs requeriments, com ésser estables a temperatura ambient i dins del dispositiu. És a dir, cal que una de les fases quedi retinguda dins del dispositiu en una considerable proporció, cosa que s'aconsegueix gràcies a la diferència de densitats dels dos líquids del sistema ja que aquest s'ha de sotmetre a una força centrífuga durant la realització de l'experiment. També la formació d'emulsions com a resultat de l'agitació a la que se sotmet la barreja ens faria descartar la utilització del sistema de dissolvents considerat en CCC.

1.3.3. Utilització de la CCC amb finalitat enantioselectiva

La utilització d'aquesta tècnica està àmpliament extesa pel que fa a la separació de productes naturals. Nombrosos exemples es descriuen a la literatura en relació amb aquest camp del coneixement. Es pot indicar com a prova d'això el fet que en els últims quatre anys el nombre d'articles publicats on s'utilitza aquesta tècnica ha augmentat molt, apareixent una mitjana de més de 100 publicacions per any. Per contra, poques són les publicacions que fan referència a la separació d'enantiòmers utilitzant aquesta tècnica, essent la data de la publicació de la primera separació a la

dècada dels 80.⁵ El baix nombre de publicacions, es degut a la dificultat de trobar unes condicions adequades per tal què es produeixi la separació. Ja que, com s'ha esmentat anteriorment, la separació d'enantiòmers s'ha de produir en un entorn quiral, per tant serà necessària l'addició d'un SQ. Per tal d'evitar que aquest es vagi perdent cap a l'eluat a mesura que es realitza la prova, només hauria de ser soluble en una de les dues fases del sistema, la que s'utilitza com a fase estacionària que anomenarem FE. A la vegada, l'analit a separar s'haurà de repartir entre les dues fases, ja que si només fos soluble en la fase mòbil (FM) aquest no podria entrar en contacte amb el SQ. Per contra, si només fos soluble en la FE, quedaria retingut en aquesta fase, obtenint-se experiments de durades molt elevades (Figura 1.10).

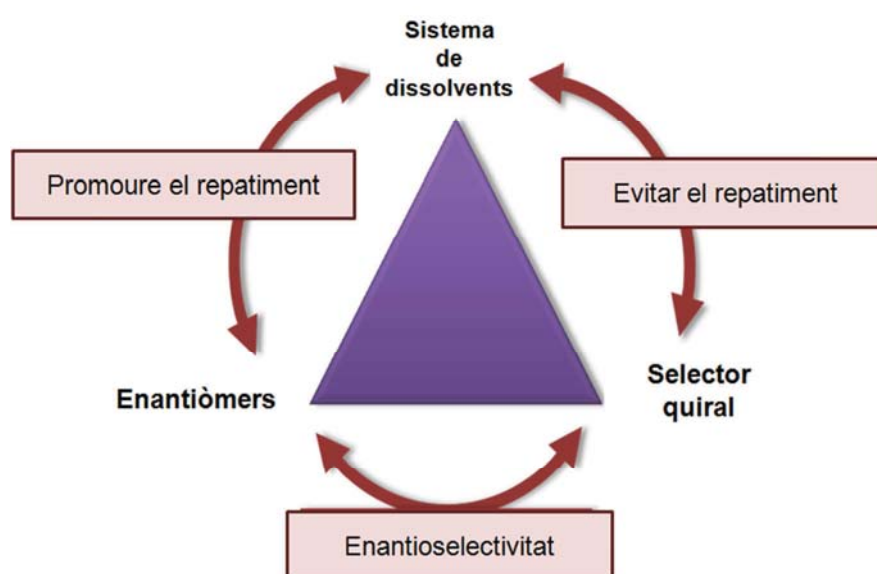


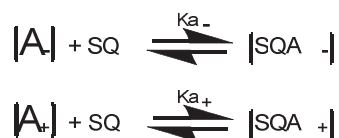
Figura 1.10. Relació entre el sistema de dissolvents el SQ i el racèmic per assolir la separació dels enantiòmers d'aquest.

1.4. Enantioconeixement en dissolució. Aspectes teòrics

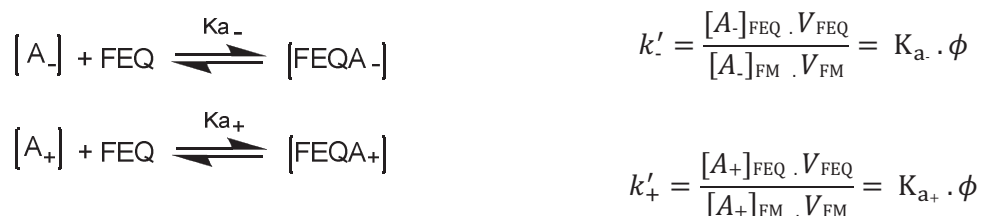
En tractar-se d'un tipus de cromatografia de repartiment líquid-líquid, a la CCC se li apliquen els mateixos conceptes que a l'HPLC. L'enantioconeixement en HPLC es produeix en interaccionar la FEQ amb el racèmic. Per contra, en CCC el SQ està dissolt, per tant la inexistència d'una matriu farà que l'analit no pugui quedar retingut com a resultat de l'absorció d'aquest en el suport. Així, la separació en aquest cas depèn fonamentalment de dos factors, el coeficient de distribució (K_D) de l'analit en el sistema de dissolvents triat, que es defineix com: (eq 1.1)¹⁴

$$K_D = [A]_{FE} / [A]_{FM} \quad (\text{eq 1.1.})$$

I també de l'estabilitat dels complexos diastereomèrics que es formen entre cada enantiòmer i el SQ, ja que les diferències d'estabilitat d'aquests fan possible la seva separació.



Per tal de quantificar l'enantioselectivitat en un sistema d'HPLC s'utilitza el factor d'enantioselectivitat, α , que es defineix com el quocient de factors de retenció per a dos pics consecutius. El factor de retenció k' , es pot definir com la relació existent entre la quantitat de solut que es troba a la fase líquida i el que està a la fase sòlida del sistema cromatogràfic.¹⁵ Aquest es pot expressar en funció de les constants d'associació per als dos equilibris, essent ϕ la relació de volums entre la fase estacionària i la mòbil.



En aquest cas, si considerem A. com el pic més retingut i llavors $K_{a-} > K_{a+}$, el factor de selectivitat:

$$\alpha_{\text{HPLC}} = \frac{k'_-}{k'_+} = \frac{K_{a-} \phi}{K_{a+} \phi} = \frac{K_{a-}}{K_{a+}} \quad (\text{eq 1.2.})$$

Segons aquesta expressió, α_{HPLC} només depèn de la relació entre les constants d'associació dels dos isòmers amb el SQ ancorat a la fase estacionària sòlida.

A més, com que l'afinitat entre el SQ i els enantiòmers ve determinada per la diferència d'estabilitat entre els estats lliures i associats d'ambdós isòmers es pot expressar,

$$\alpha = \frac{\{1+[SQ]_{org}K_a\}}{\{1+[SQ]_{org}K_{a+}\}} \quad (\text{eq 1.4.})$$

A l'eq 1.4. es pot veure la dependència existent entre el factor d'enantioselectivitat i la concentració de SQ que roman lliure a la FE en presència dels enantiòmers. D'aquí es pot deduir que a concentracions més elevades de SQ en la FE, el valor del factor d'enantioselectivitat serà major fins arribar a un valor màxim coincident amb la relació de les constants d'associació amb els dos enantiòmers (Figura 1.11). Addicionalment aquesta dependència entre l'enantioselectivitat i la concentració de SQ està modulada per la magnitud de les pròpies constants d'associació. Els valors de les constants d'associació d'aquest tipus de complexes, basats en interaccions febles, van del rang de 4 a 6000 M⁻¹.²² Així, per a enantioselectivitats elevades i valors de les constants d'associació petites, l'efecte de la concentració de SQ lliure serà més significatiu. La qual cosa resulta encara més interessant si es considera que no sempre complexes més estables (constants d'associació grans) són sinònim de valors d'enantioselectivitat elevats.

No obstant, en tractar-se la CCC d'una tècnica bàsicament preparativa i amb una baixa eficàcia, serien preferibles SQs que originessin valors d'enantioselectivitat elevats, cosa que no sempre és assolible. Així, generalment el valor de la relació de constants d'associació acostuma a estar en l'interval de 1,1-4,0.

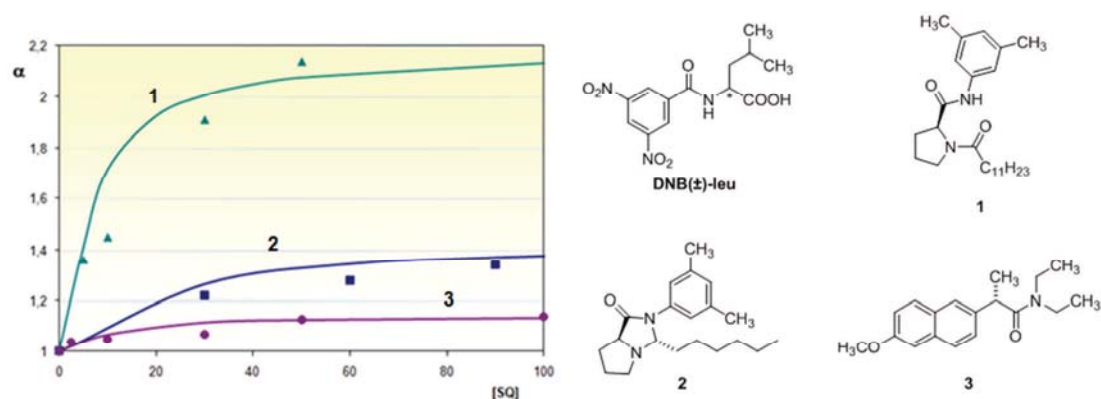


Figura 1.11. Relació entre el valor de α observat per a la separació dels enantiòmers de DNB(±)-Leu per CCC i la concentració dels SQs 1, 2 i 3. S'observa la major importància de la concentració de SQ en la separació que mostra una enantioselectivitat més gran.

Un altre factor important que cal considerar en una separació és la resolució dels pics, R_s . Considerant l'amplada del pics a la seva base, la resolució en HPLC es pot calcular sobre el propi cromatograma en base a la següent expressió en la que t_{Ri} es

refereix al temps de retenció del component i mentre que w_{bi} correspon a l'amplada del pic i sobre la línia de base:

$$R_s = \frac{(\sqrt{N}) \propto k'}{4 (\alpha - 1) (1 - k')}$$

En CCC la resolució es pot expressar en funció del factor de distribució de l'analit, la qual cosa posa de manifest la importància del volum de fase estacionària, V_{FE} , en la separació que s'obté.

$$R_s = \frac{1}{4} Sf \frac{K_{a-} - K_{a+}}{1 - Sf \left(1 - \frac{K_{a-} + K_{a+}}{2}\right)}$$

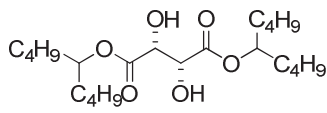
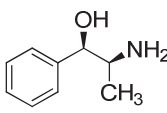
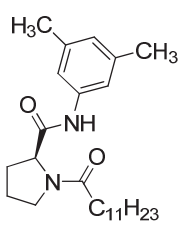
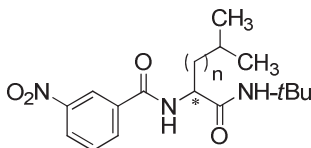
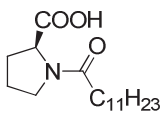
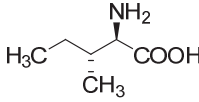
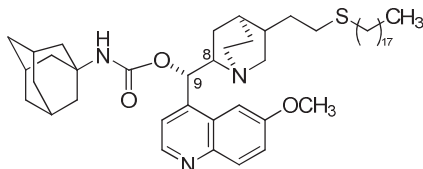
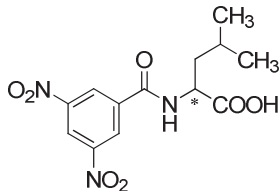
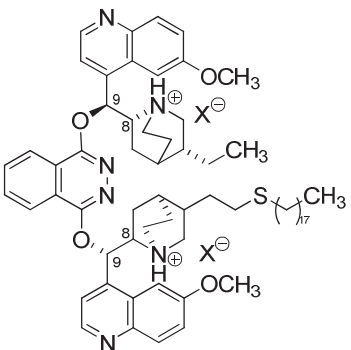
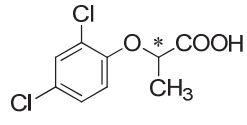
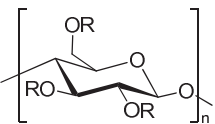
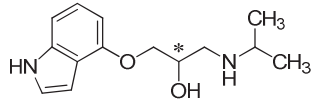
Aquí, N fa referència a l'eficàcia, determinada principalment per característiques de la columna, tot i que la viscositat del sistema de dissolvents i el flux també influeixen el seu valor. Així, un augment en la viscositat del sistema provoca una disminució d' N .

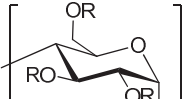
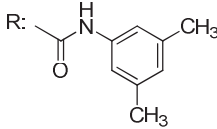
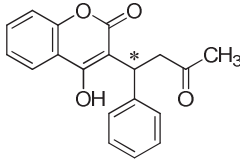
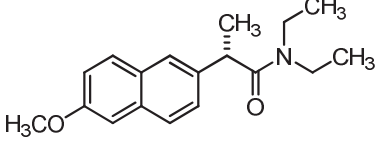
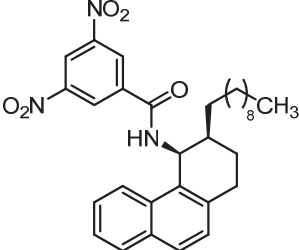
1.5. Selectors quirals utilitzats en CCC/CPC

En general, en CCC/CPC quiral, s'han avaluat aquells SQs que anteriorment havien estat utilitzats en altres tècniques separatives, com HPLC o electroforesi capil·lar (EC), en les quals s'havien obtingut resultats d'enantioselectivitat satisfactoris.¹⁶

Una classificació que ha estat molt útil a l'hora d'agrupar els diferents SQs utilitzats en CCC resulta de considerar la naturalesa de la FE en què s'incorporen. Donat que la circumstància més freqüent en CCC consisteix en utilitzar un sistema bifàsic de dissolvents orgànic/aquós, es consideren els SQs solubilitzats en una fase majoritàriament aquosa o en una fase primordialment orgànica. En tractar-se de molècules orgàniques amb un major o menor grau de complexitat estructural, els SQs solen ser solubles en dissolvents orgànics. A continuació (Taula 1.1.), es mostren els SQs emprats en medi orgànic amb els que s'han obtingut resultats satisfactoris en el camp de les separacions d'enantiòmers.

Taula 1.1. SQs utilitzats en la separació d'enantiòmers per CCC/CPC que es mantenen en la fase orgànica d'un sistema de dissolvents orgànic/aquós.

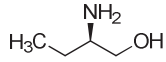
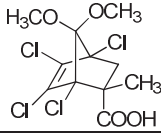
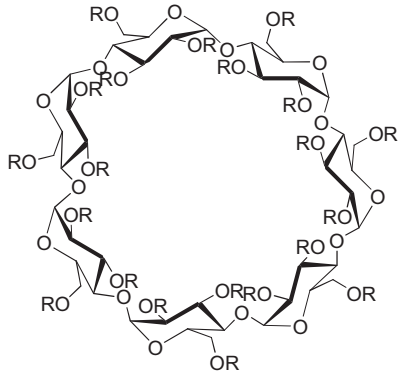
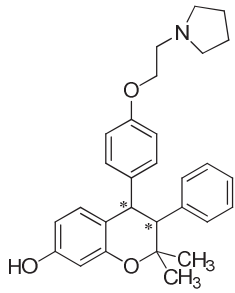
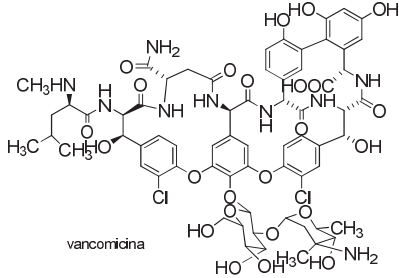
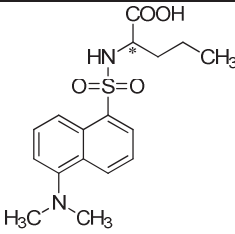
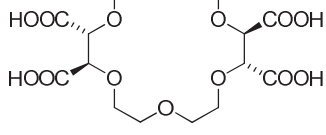
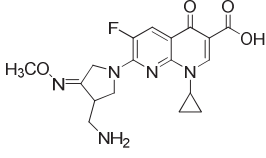
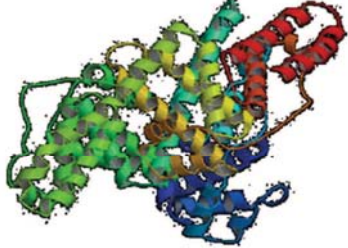
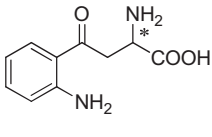
| Selector quiral | Racèmic | Sistema de dissolvents | Ref. |
|---|--|--|----------------------|
|  <p>(2R,3R) tartrat de di(5-nonil)</p> |  <p>(±)-norefedrina</p> | 1,2-dicloroetà/aigua | 23 |
|  <p>N'-(3,5-dimetilfenil)-N-dodecanoil-L-prolinamida</p> |  <p>n:0, derivat de valina n:1, derivat de leucina</p> | Heptà/AcOEt/ MeOH/aigua (3:1:3:1, v/v) Hexà/AcOEt/ MeOH/10 mM HCl (8:2:5:5, v/v) | 21 24 25 26 |
|  <p>N-(n-dodecil)-L-prolina</p> |  <p>(±)-isoleucina</p> | Butanol/solució aquosa de Cu (II) | 27 |
|  <p>DNB-(±)-Leu</p> |  <p>DNB-(±)-Leu</p> | MIBK/acetona/ tampó acetat amònic 0,1 M pH 8,0 (2:1:2) | 28 |
|  <p>(DHQD)₂-PHAL</p> |  <p>(±)-diclorprop</p> | MTBE/tampó fosfat sòdic 100 mM pH 8,0 | 29 |
|  <p>derivat de cel·lulosa</p> |  <p>(±)-pindolol</p> | MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 7,0 | 30 |

| | | | | |
|--|---|---|---|----|
|  derivat d'amilosa |  R: |  (±)-warfarina | MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 9,0 | 31 |
|  |  | Heptà/AcOEt/ MeOH/aigua (9:1:9:1, v/v) | 32 | |

Tal i com es pot observar a la Taula 1.1., els SQs que s'han utilitzat dissolts en un medi orgànic són molècules lipòfiles amb grups polars. Per tant, la fase orgànica ha de tenir un cert grau de polaritat per tal de dissoldre correctament el SQ,^{33,34} encara que aquesta propietat pot ésser contraproductiu per la separació ja que el dissolvent pot interferir en les interaccions que s'estableixen entre el SQ i l'analit. Per això, per tal d'augmentar la solubilitat del SQ en la fase orgànica sense haver d'incrementar notablement la polaritat, s'acostuma a introduir una cadena lipòfila sobre l'estructura d'aquest. Tal és el cas de diversos derivats de polisacàrids com la cel·lulosa i l'amilosa^{30,31}, derivats de l'L-prolina^{21,24,25,26} o derivats d'alcaloides com la quinina.^{28,29} Cal destacar que en la primera separació d'enantiòmers realitzada per CCC l'any 1982, s'utilitzà com a SQ per a la resolució de la (±)-norefedrina el (2R,3R)-tartrat de di-(5-nonil), compost de considerable lipofilia, en un medi orgànic.²³

Mentre que la majoria dels SQs solubles en fase orgànica s'inspiren en SQs utilitzats en HPLC, els que s'utilitzen en la fase aquosa d'un sistema de dissolvents orgànic/aquós solen haver-se utilitzat abans en electroforesi capil·lar (EC), tècnica que, com la CCC, no requereix de suport sòlid. En la Taula 1.2. es mostra la relació de SQs utilitzats en la fase més polar, sovint aquosa, del sistema de dissolvents.

Taula 1.2. SQs utilitzats en la separació d'enantiòmers per CCC/CPC que es mantenen en la fase aquosa d'un sistema de dissolvents orgànic/aquós.

| Selector quiral | Racèmic | Sistema de dissolvents | Ref. |
|---|--|---|------|
|  <p>(R)-2-aminobutanol</p> |  | Cloroform/MeOH/ tampó fosfat | 35 |
|  <p>S-β-CD R: SO₃H (7-11) H (10-14)</p> |  <p>(-)-(3R, 4R) (+)-(3S, 4S) 7-DMO</p> | AcOEt/MeOH/tampó acetat de trietilamoni (TEAA) (10:1:9) | 36 |
|  <p>vancomicina</p> |  <p>DNS-(±)-Nle</p> | Toluè/solució aquosa pH 4,7 | 37 |
|  <p>18C6H4</p> |  <p>(±)-gemifloxacina</p> | 1-butanol/AcOEt/ (Bis-Tris) tampó acetat pH 6,0 | 38 |
|  <p>BSA</p> |  <p>(±)-kinurenina</p> | (ATPS) 10% PEG i 5% fosfat sòdic dibàsic en aigua | 39 |

Generalment els SQs utilitzats en medi aquós són molècules amb estructures complexes que presenten un nombre elevat de grups hidròfils. Entre ells trobem des d'antibiòtics³⁷ fins a proteïnes com l'albumina de sèrum boví (BSA).³⁹

Aquí el reconeixement enantioselectiu es dona en la fase aquosa o més polar del sistema de dissolvents. No obstant, l'enantiodiscriminació es produeix en cavitats lipòfiles d'una sola molècula de SQ o en els microambients que generen dues o més unitats, on les interaccions hidrofòbiques resulten reforçades.¹⁶

1.5.1. Modes d'elució en CCC

Un avantatge que presenta la CCC front altres tècniques cromatogràfiques és la possibilitat d'utilitzar indistintament una o altre fase del sistema de dissolvents com a fase mòbil o estacionària. Normalment, en HPLC l'elecció d'una columna específica ens determina el tipus de fase mòbil que s'haurà d'emprar. Per contra, la CCC permet treballar en diferents modes, cosa que sovint només suposa el canvi de posició d'una vàlvula. Així, podem intercanviar el paper de les fases durant un experiment per facilitar la sortida de l'analit.

El mode de clàssic d'elució ens permet treballar *H-to-T* o *T-to-H* si s'utilitza un dispositiu de CCC, o de forma *ascendent* o *descendent* si es treballa amb una columna de CPC; en funció de la densitat de la fase seleccionada com a estacionària. Així, quan la fase menys densa s'utilitza com a FM en CCC treballarem de *T-to-H* o en mode *ascendent* en CPC. Per contra, en emprar la fase més densa del sistema com a FM el mode de treball serà *H-to-T* en CCC o *descendent* en CPC.

L'absència de fase estacionària sòlida permet altres modes d'elució. Alternatives al mode de treball clàssic són el mode dual (*dual mode*, DM) i el mode multidual (*multiple dual-mode*, MDM) consistents en el canvi de la fase líquida que actua com a fase mòbil en un moment determinat de l'experiment, que passa a ser utilitzada com a fase estacionària, i la que actuava com a fase estacionària ara ho fa com a fase mòbil. Mitjançant aquest procediment s'aconsegueix reduir el temps d'anàlisi per a analits que tenen molta afinitat per la FE original. A més, es pot millorar la separació en comparació a l'obtinguda en el mode clàssic (Figura 1.12).⁴⁰ Quan es realitzen diverses inversions del cicle es realitza el MDM.⁴¹ Per tant, es succeeixen alternativament els dos modes de treball: fase normal i fase inversa.

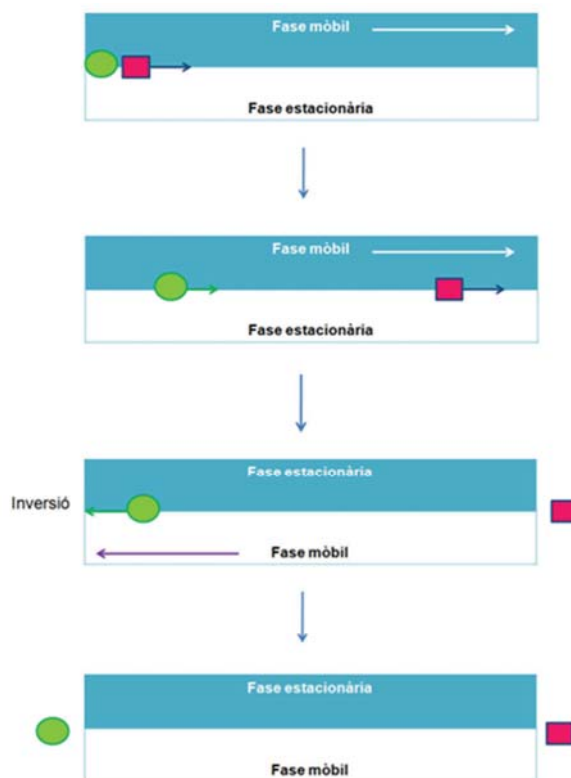


Figura 1.12. Mode dual: La columna s'elueix en un sentit fins a la sortida de l'analit menys retingut. Llavors, ja que el segon analit es troba molt retingut, per tal d'escurçar el temps d'anàlisi, es realitza la inversió de fases que produeix la sortida d'aquest per l'altre extrem de la columna.

El DM també s'ha utilitzat en les separacions d'enantiòmers. Així, cal destacar l'ús de vancomicina com a SQ en la separació del racèmic dansil-norleucina, on s'utilitzà el DM per tal de poder eluir l'enantiòmer D fortament retingut pel SQ a la FE.³⁷ Actualment, també s'ha aplicat el MDM a la separació de mesclures racèmiques utilitzant com a SQ la dietilamida de l'(S)-naproxen, separació per la que es va produir una millora important en la resolució dels enantiòmers respecte als resultats obtinguts amb el mode clàssic.³²

Una altra de les alternatives al mode de treball clàssic és el denominat "*pH-zone-refining mode*" introduït per Ito.⁴² Es tracta d'una cromatografia de desplaçament només aplicable a analits ionitzables, en la que aquests elueixen en blocs en funció del seu pKa. El mecanisme que produeix aquesta elució en blocs es basa en el diferent repartiment de l'analit ionitzable en funció de si es troba ionitzat o en la seva forma neutra. Aquest procés s'aconsegueix mitjançant l'addició d'un agent de retenció a la fase estacionària juntament amb l'analit. Aquest és un àcid fort si el que es pretén separar és un analit de caràcter àcid o d'una base forta quan el que es

vol separar és un compost bàsic. L'agent de retenció actua retenint l'analit en la seva forma no ionitzada a la FE al principi de l'experiment. D'altra banda, s'utilitza un agent de desplaçament, una base forta per analits àcids o un àcid fort pels bàsics, afegit a la FM. L'agent de desplaçament produeix l'elució seqüencial dels analits en funció del seu pKa.^{18,43} Amb l'ús d'aquest mode d'elució s'aconsegueix incrementar la capacitat de càrrega d'aquesta tècnica fins a unes deu vegades; a més, les fraccions que s'obtenen tenen una concentració elevada d'analit, que elueixen en funció del seu pKa i la seva lipofilia (Figura 1.13).

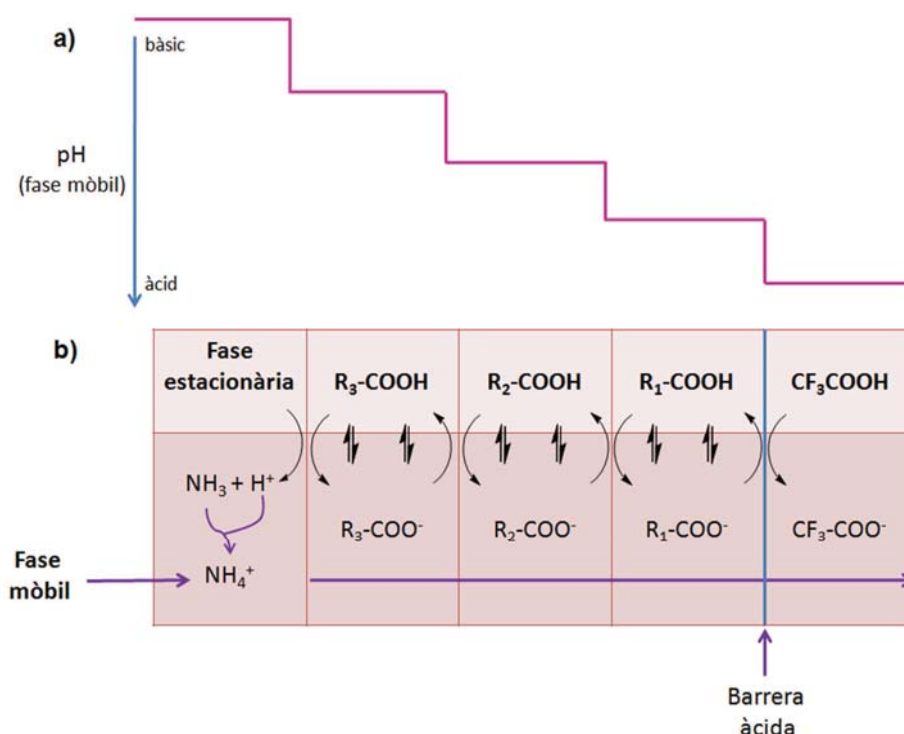


Figura 1.13. Esquema del procés d'elució en el mode de *pH-zone-refining* per a la separació d'analits àcids. a) Evolució del pH de la fase mòbil al llarg de l'experiment. b) Ordenació de l'analit al darrere de la barrera àcida, en funció del seu pKa (pK_a de R₁-COOH < pK_a de R₂-COOH < pK_a de R₃-COOH, considerant compostos de lipofilia similar).

El mode *pH-zone-refining* també s'ha aplicat a la separació d'enantiòmers utilitzant SQs de diferent naturalesa com derivats de L-prolina,⁴³ alcaloides *Cinchona*²⁸ i derivats de cel·lulosa i amilosa.^{30,31} En aquest cas el SQ participa en l'equilibri de distribució de racèmic, ja que, en funció de l'estabilitat de l'associació de l'enantiòmer amb el SQ eluirà un primer que l'altre. Tot i que el fet que el pH evolucioni durant l'experiment en facilita el seu seguiment, aquest canvi de pH també suposa un inconvenient, ja que per a repetir una separació resulta necessari recuperar les condicions inicials una vegada s'ha finalitzat l'experiment anterior.

1.6. Aplicació dels derivats de l'aminoàcid L-prolina com a selectors quirals en la separació cromatogràfica d'enantiòmers.

L'L-prolina és un aminoàcid no essencial que es forma a partir de l'àcid glutàmic i que participa de forma activa en la síntesi del col·lagen, entre d'altres proteïnes. Una característica que aquest aminoàcid posseeix i que el diferencia de la resta d'aminoàcids proteínogènics, és el fet de ser l'únic que conté una amina secundària i una estructura cíclica rígida.

Aquesta estructura li confereix unes propietats que s'han aprofitat en múltiples ocasions per a induir enantioselectivitat en diversos processos. Entre altres, la L-prolina s'ha utilitzat com a catalitzador orgànic en reaccions de síntesi asimètrica,⁴⁴ o en el disseny d'agents de resolució utilitzats en diverses tècniques separatives, de la qual cosa són nombrosos els exemples que es troben en la literatura.^{45,46}

En cromatografia líquida, l'aminoàcid s'utilitzà primerament com a SQ en cromatografia de bescanvi de lligands formant complexos amb metalls. Aquest tipus de cromatografia es basa en la formació de complexos diastereomèrics làbils entre l'analit a separar, un catió metàl·lic bivalent, que acostuma a ser coure (Cu^{2+}), níquel (Ni^{2+}), o bé, cadmi (Cd^{2+}), que s'afegeix a la fase mòbil, i un lligand quiral enantiomèricament pur bidentat, fixat sobre un suport inert, que constitueix la fase estacionària quiral. Aquesta fixació pot ser física, per intercalació de cadenes lipòfiles incorporades sobre el selector sobre sílice C18, o covalent sobre una resina de poliestirè o bé una matriu de sílice.

Amb aquest tipus de fases estacionàries, que Davankov i col·laboradors varen descriure,⁴⁷ s'aconseguí resoldre amb èxit diversos α -aminoàcids no derivatitzats (Figura 1.14). Posteriorment, els mateixos autors realitzaren estudis utilitzant altres aminoàcids (valina, leucina,...) com a SQ, obtenint-se els millors resultats amb els aminoàcids prolina, hidroxiprolina i derivats d'aquests. A més, per tal de millorar els resultats obtinguts s'assajaren altres tipus de resina, d'ions metàl·lics i diversos tipus de unió de la entitat quiral a la matriu.

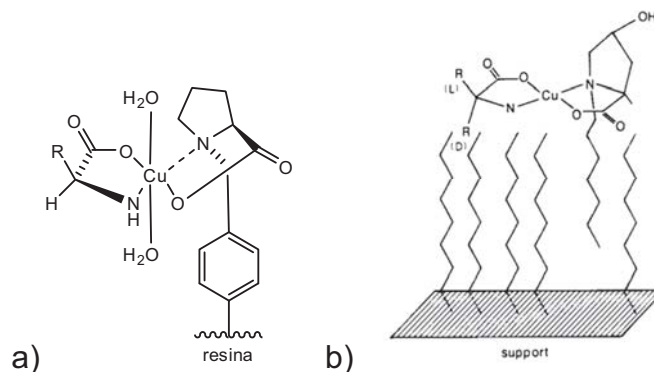


Figura 1.14. Esquema del complex que es forma entre el SQ (L-prolina), el metall i un dels enantiòmers de l'analit a separar, un α -aminoàcid en a) una fase en la que el SQ està covalentment unit a la matriu de poliestirè; b) una fase en la que el SQ s'incorpora a través de la intercalació física de cadenes lipòfiles sobre una sílice C18.

Tot i obtenir uns bons resultats, la lenta transferència de massa, l'elevada durada dels temps d'anàlisi i la baixa resistència del polímer a la pressió, feu que a principis de la dècada dels 80 es plantejés la unió del SQ sobre sílice en lloc de sobre un polímer orgànic. Així s'obtingueren FEQs amb les que es milloraren els aspectes abans esmentats.⁴⁸

De forma paral·lela, N.Ôi i col·laboradors⁴⁹ varen descriure una família de FEQ per a cromatografia de gasos (CG) que incorporaven el SQ de forma física per intercalació de cadenes lipòfiles sobre la sílica de base (Figura 1.15). Aquest selectors inclouen dues entitats quirals, una provinent de l'1-(α -naftil)etilamina i l'altre de prolina o d'àcid mandèlic. Aquestes FEQ s'aplicaren a la resolució de esters d'aminoàcids N-protegits, t-butilamides i esters d'àcids carboxílics o nitrils, entre altres. Cal destacar que aquest és un dels primers exemples de l'ús de prolina en cromatografia en la que aquesta no forma cap complex amb un metall.

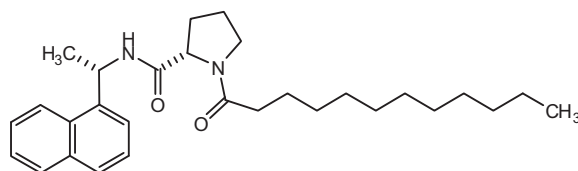


Figura 1.15. Estructura del SQ utilitzat en CG.⁴⁹

La demanda creixent per part de la indústria química i farmacèutica de tècniques que permetessin separar enantiòmers, feu que a principis dels noranta es tornés a plantejar la utilització de L-prolina unida de forma directa sobre gel de sílice. Així, es

descrigué una de les primeres aplicacions d'una FEQ derivada d'L-prolina en HPLC (Figura 1.16. a)) a la separació de diferents fàrmacs β -blocants i els seus anàlegs. També, s'estudià l'efecte del dissolvent utilitzat en la fase mòbil, així com el dels modificadors addicionats a aquesta, obtenint-se valors d'enantioselectivitat de l'ordre de 1,1-1,3.⁵⁰ Si bé en aquestes FEQ l'aminoàcid es troba unit a la matriu a través de la funció amino, deixant lliure el grup carboxilat, simultàniament es descriueren FEQs en les que la unió de l'aminoàcid L-prolina a la matriu de sílice tenia lloc a través del grup carboxilat, deixant l'amina derivatitzada. Es realitzaren estudis sobre la influència d'espaiadors de diferents longituds o la composició de la fase mòbil entre d'altres sobre la separació de diversos tipus d'analits. Tot i aconseguir separar diversos derivats d'aminoàcids contenint grups π -acceptors, els valors d'enantioselectivitat van resultar ser inferiors (valor màxim descrit per l'ester de N-(3,5-dinitrobenzoil)valina utilitzant isoactà/diclorometà (90:10) com a fase mòbil: $\alpha = 1,17$) dels obtinguts pel grup de M. Ohwa ($\alpha = 1,37$ per un isòmer del pindolol utilitzant diclorometà/metanol (98:2), amb 1mM DEA, com a fase mòbil) (Figura 1.16. b)).⁵¹

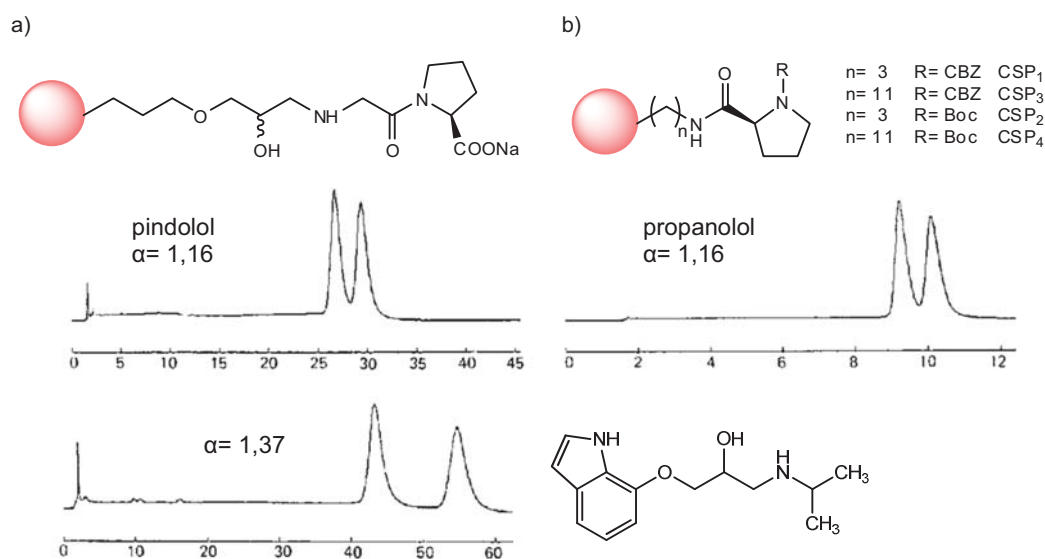


Figura 1.16. a) FEQ descrita per M. Ohwa, M. Akiyoshi, S. Mitamura, *J. Chromatogr.* 521 (1990)122-127⁵⁰; b) Estructura de les FEQs descrites per C. Daban Haurou i col·laboradors.⁵¹ c) Es mostren alguns exemples de separació d'aminoalcohols amb la FEQ d'Ohwa. Condicions: fase mòbil diclorometà/metanol (97:3) amb 1,0 mM DEA; flux: 1 mL/min; detecció UV: 280 nm.⁵⁰

Posteriorment, Pirkle i col·laboradors varen descriure FEQs de múltiple interacció basades en L-prolina amb un grup 3,5-dimetilanilino sobre el grup carboxilat, per a la separació de N-(3,5-dinitrobenzoil) derivats d'aminoàcids (Figura 1.17). Una de les

FEQs descrites en aquest treball va originar factors d'enantioselectivitat (α) inusualment elevats que van de l'ordre de 30 a 80 en la separació de diferents amides de l'*N*-(3,5-dinitrobenzoil)leucina racèmica (Figura 1.17).⁵² Com en casos anteriors s'investigà l'efecte de la longitud de la cadena que uneix el SQ sobre la matriu de sílice. Es va determinar que la FEQ de la Figura 1.17, amb un *linker* d'unió curt i, sobre tot, ramificat mostra uns valors d'enantioselectivitat més elevats que la FEQ que té com a *linker* d'unió sobre el sílice una cadena alifàtica de 10 carbonis. Així l'elevada enantioselectivitat es va atribuir, al menys parcialment, als efectes estèrics produïts pel grup ramificat.⁵³

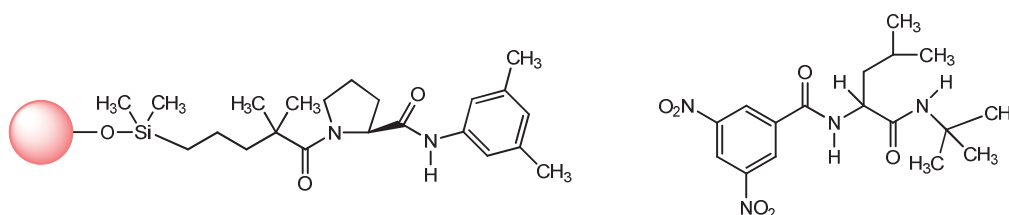


Figura 1.17. FEQ derivada de L-prolina que origina valors d'enantioselectivitat elevats per a la separació d'amides de *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-(\pm)-leucina com la de la figura.⁵²

Degut als elevats valors d'enantioselectivitat obtinguts en la separació de determinats analits, es decidí utilitzar aquestes FEQs, no tant sols com a eina d'anàlisi, sinó també per a la separació preparativa d'enantiòmers. Per això, aplicant el principi de reciprocitat, es seleccionà el derivat de L-prolina millor resultat en una columna quiral contenint un SQ sintètic, per posteriorment poder obtenir de manera preparativa aquest selector a partir del racemat. Així, un cop triat, es va preparar una FEQ amb el derivat de L-prolina seleccionat i, controlant la composició de la FM, s'aconseguí separar l'analit desitjat tot mantenint l'enantioselectivitat exhibida a nivell analític també a nivell preparatiu.⁵⁴

Amb la idea d'avaluar la utilitat de les tècniques combinatòries per a facilitar la localització de selectors quirals d'elevada enantioselectivitat, es va realitzar un estudi en el que es tractava de seleccionar aquelles molècules més enantioselectives front quatre racèmics *N*-(3,5-dinitrobenzoil)derivats de leucina i valina d'entre una sèrie d'anilides d'aminoàcids. Així, es sintetitzaren 36 derivats de L-valina, L-fenilalanina i L-prolina amb diverses amines aromàtiques. En aquest estudi els derivats de L-prolina i, en particular l'L-prolina-1-indanilida ($\alpha > 23$), resultaren ser els més

enantioselectius. Cosa que torna a posar de manifest l'elevada capacitat enantioselectiva d'aquest aminoàcid (Figura 1.18).⁵⁵

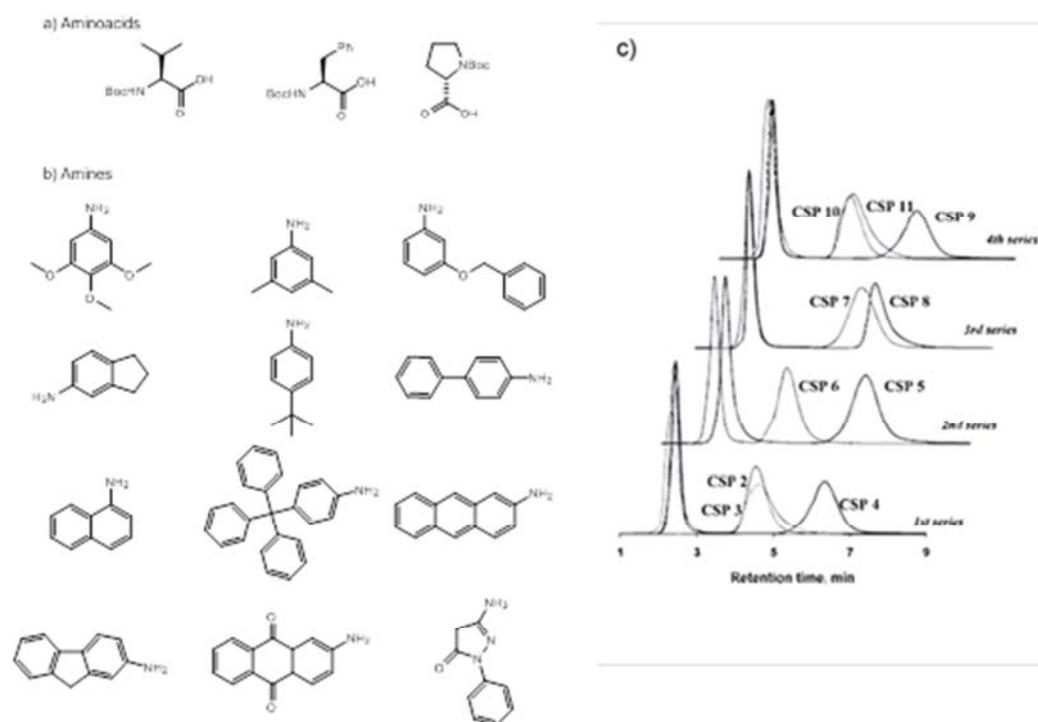


Figura 1.18. Estructura dels L-aminoàcids (a) i les anilines (b) utilitzats en l'estudi combinatori de la referència 55; c) Cromatogrames obtinguts per a la separació de la diastereomèrica de N-(3,5-dinitrobenzoil)-(±)-leucina seguint un procés de desconvolució conduent a la identificació del millor SQ constituït per una amida dels aminoàcids del grup (a) amb una de les amines del grup (b). 1^a Sèrie: derivats de valina (CSP2), derivats de fenilalanina (CSP3), derivats de prolina (CSP4) amb totes les anilines de la col·lecció. 2^a Sèrie: derivats de prolina amb amines de la 1 a la 6 (CSP5), de la 7 a la 12 (CSP6). 3^a Sèrie: derivats de prolina amb amines de la 1 a la 3 (CSP7), de la 4 a la 6 (CSP8). 4^a Sèrie: derivats de prolina amb l'amina 4 (CSP9), la 5 (CSP10) o la 6 (CSP11).

En un treball posterior els mateixos autors d'aquest treball prepararen FEQs per fixació d'unitats independents del SQ així com per fixació d'unitats de SQ prèviament organitzades en estructura dendrítica (2, 4, 8 o 10 unitats del derivat de prolina). En aquest darrer cas es varen utilitzar dues aproximacions sintètiques diferents en la seva preparació, una aproximació convergent (s'inicia la síntesi dels nous SQ unint primer els derivats de prolina sobre el nucli per posteriorment unir aquest sobre la silicagel) i una divergent (es parteix de la silicagel derivatitzada i sobre la qual s'uneixen els derivats de prolina). En estudiar la capacitat de càrrega de l'analit a separar i enantioselectiva de les FEQs resultants es va poder observar que les FEQs provinents de l'aproximació divergent mostraven capacitats de càrrega dels racemats i valors d' α més elevats (de l'ordre d' α igual o superior a 20) front les FEQs provinents de l'aproximació convergent (Figura 1.19).⁵⁶

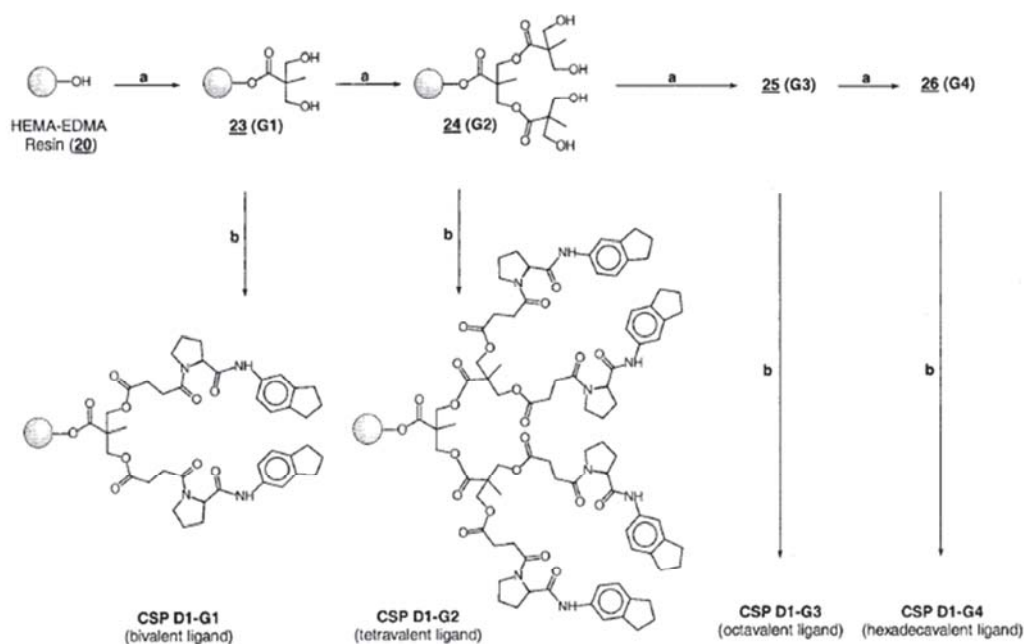


Figura 1.19. Procediment utilitzat per a l'obtenció de les diferents FEQs a partir de *linkers* dendrítics per la via divergent, a través de la qual s'obtingueren valors més elevats d'enantioselectivitat.⁵⁶

A més de l'anterior, diversos són els casos en que s'incorporen varies unitats d'L-prolina sobre el mateix punt d'ancoratge a la matriu cromatogràfica. En destaquen els estudis realitzats per Li i col·laboradors. D'aquests cal esmentar que en augmentar el nombre d'unitats d'aquest aminoàcid, augmenta la diversitat de compostos quirals que és capaç de discriminar la FEQ que s'obté. Els autors comparen els resultats obtinguts amb la columna que conté un selector de quatre unitats de L-prolina amb la columna Whelk-O, considerada entre les FEQ de múltiple interacció una de les que posseeix un ventall més ampli d'aplicació.^{57,58,59}

En el nostre grup s'ha estudiat el comportament de columnes de poli-L-hidroxi-prolina, en les que el grup hidroxil es substituï per un grup π -donador (3,5-dimetilfenilcarbamoïloxi), anàleg al present en els selectors derivats de cel·lulosa i/o amilosa en els que el grup polar del carbamat resulta ser un dels llocs més importants d'interacció amb els analits per a la discriminació quiral.⁶⁰

Com per estudis anteriors, es comprovà que la FEQ que contenia el pèptid presentava un camp d'aplicació més ampli que la FEQ en la que el selector contenia una única unitat de l'aminoàcid, fet que podria ser degut a la conformació helicoidal que adopta el pèptid.

Així, es coneix que les estructures de poliprolina poden adoptar dues conformacions, PPI o PPII, en funció de la naturalesa del medi on es trobin, tot i que són necessàries almenys sis unitats per poder detectar aquesta conformació helicoidal (Figura 1.20).

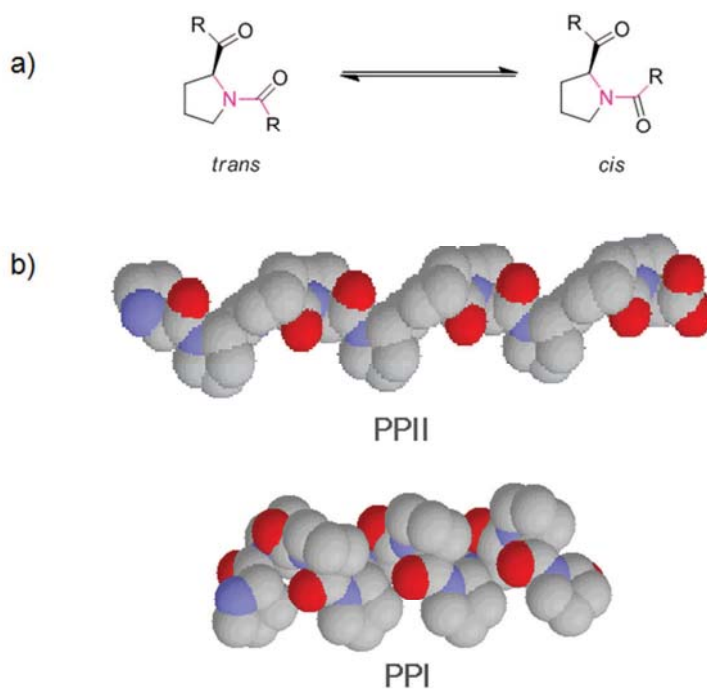


Figura 1.20. a) Isòmers (confòrmers) *cis* i *trans* que pot adoptar l'aminoàcid prolina incorporat en una cadena peptídica; b) Estructura secundària que adopten els pèptids rics en prolina: PPII (en medi aquós, en la què els enllaços amida estan en disposició *trans*) i PPI (en dissolvents apolars com alcohols alifàtics, on els enllaços amida es troben en disposició *cis*).

S'assajaren diferents FEQ de poli-L-hidroxiprolina i del monòmer corresponent en diferents medis, comprovant-se que en utilitzar determinats dissolvents comuns en la separació d'enantiòmers, com el cloroform, l'enantioselectivitat es veia disminuïda. Gràcies a l'estudi dels espectres de dicromisme circular i de RMN en diversos dissolvents es va poder atribuir el diferent comportament en un o altre medi a la diferent conformació que adopta el pèptid en aquest entorn (Figura 1.21).^{61,62}

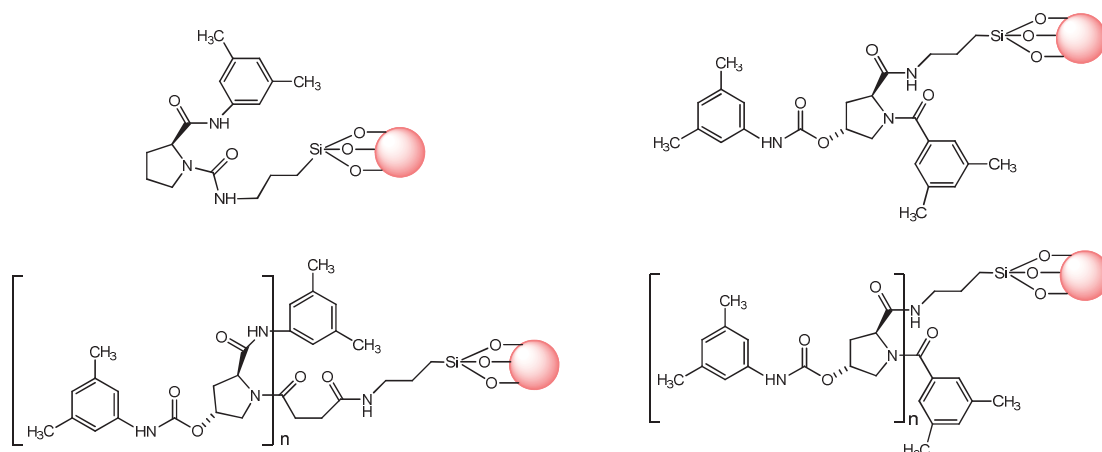


Figura 1.21. FEQs monomèriques i de poli-L-hidroxiprolina estudiades en el nostre grup en el procés d'enantioreconeixement.

L'aminoàcid L-prolina i els seus derivats també s'han utilitzat com a selectors quirals en electroforesi capil·lar (EC), en membranes enantioselectives o en cromatografia en contracorrent (CCC). En EC, trobem descrits exemples en els que s'utilitza com a surfactant quiral un derivat de prolina, aprofitant la capacitat per formar complexos amb metalls com el coure d'aquest aminoàcid.^{63,64} D'altra banda, la *N*-decyl-(L)-hidroxiprolina s'ha utilitzat com a transportador enantioselectiu tant en membranes líquides emulsionades com en membranes líquides suportades.⁶⁶ A més, del seu ús en membranes sòlides en la separació de fàrmacs, com el propranolol (Figura 1.22).^{67,68}

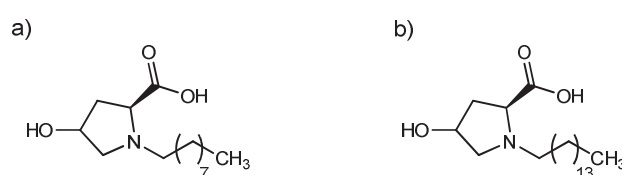


Figura 1.22. Estructures dels transportadors enantioselectius utilitzats en les referències a) 66 i b) 67.

Pel que fa al seu ús en CCC, tot i que no són gaires els exemples en el camp de les separacions quirals atesa la dificultat que comporta trobar unes condicions en que es produeixi l'enantiodiscriminació, l'L-prolina també s'ha utilitzat com a selector quiral. Així, ja l'any 1984 l'*N*-(n-dodecil)-L-prolina es va utilitzar en la separació de (\pm)-isoleucina.²⁷ No es torna a trobar cap altre exemple fins l'any 1994 en què es va descriure separació completa dels enantiòmers de

l'*N'*-(3,5-dinitrobenzoil)-*tert*-butil-(±)-leucinamida utilitzant l'*N'*-(3,5-dimetilfenil)-*N*-dodecanoil-L-prolinamida (**1**) com a selector quiral (Figura 1.23).²⁴ L'addició de la cadena lipòfila sobre la prolina es feu per tal de retenir el SQ a la fase més lipòfila del sistema de dissolvents que actua com a FE. Es tracta de la primera separació d'enantiòmers d'un racèmic no ionitzable, la qual cosa implica la dificultat afegida de poder determinar un sistema de dissolvents i condicions cromatogràfiques adients per a produir un repartiment diferenciat de selector (retingut primordialment a la fase estacionaria) i analit (repartit entre les dues fases del sistema de dissolvents).

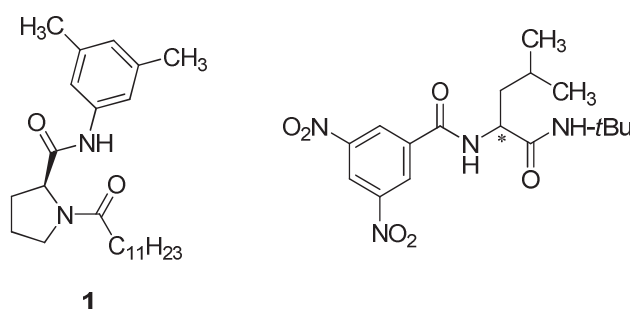


Figura 1.23. Estructura del SQ utilitzat en CCC per a la resolució de la *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-*tert*-butil-(±)-leucinamida .

Més tard, Ito va aplicar el mateix selector a analits ionitzables (DNB-derivats d'aminoàcids) i comprovà la relació existent entre la separació de l'analit i la concentració de SQ present en la fase estacionària. A més, es va poder comprovar que un augment en la lipofilia del sistema acostuma a originar un augment de la separació.²¹

A més, **1** va ser un dels primers SQs assajat en el mode d'elució anomenat *pH-zone-refining*, desenvolupat per Ito.^{18,43} Es realitzà també un estudi comparatiu de la capacitat de càrrega entre el mode d'elució normal i el *pH-zone-refining*. Es va determinar que amb aquest últim es pot resoldre una quantitat major d'analit en un temps menor, respecte al mode d'elució normal.²⁶

Per últim, l'enantioselectivitat de cinc derivats de L-prolina front els racèmics DNB-Leu i ketoprofen (Figura 1.24) va ser estudiada en el nostre grup utilitzant un aparell CPC.

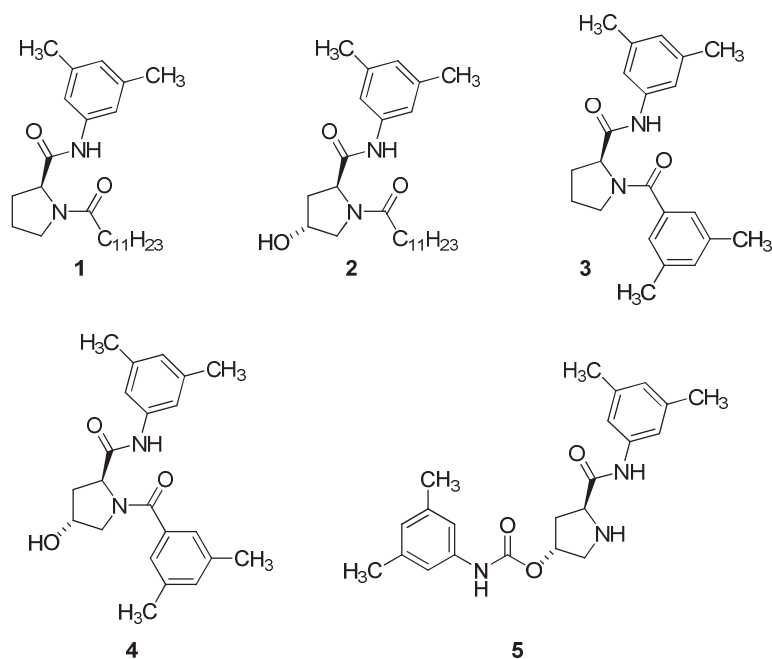


Figura 1.24. Estructura dels SQs derivats d'L-prolina utilitzats en l'estudi de la referència 25.

En aquest treball s'aprofundí en l'estudi de la influència de la naturalesa del tampó i del pH de la FM en la separació d'enantiòmers. També, s'avaluà la influència de la naturalesa de la FE, utilitzant dos medis diferents, un de més hidròfil (MIBK) i un altre de més lipòfil (MTBE). Un dels factors limitats, a l'hora d'utilitzar MTBE, resulta ser la baixa solubilitat d'alguns SQs (**3**), la qual cosa en limita la seva aplicabilitat preparativa malgrat que a concentracions baixes mostressin una bona enantioselectivitat (Figura 1.25).

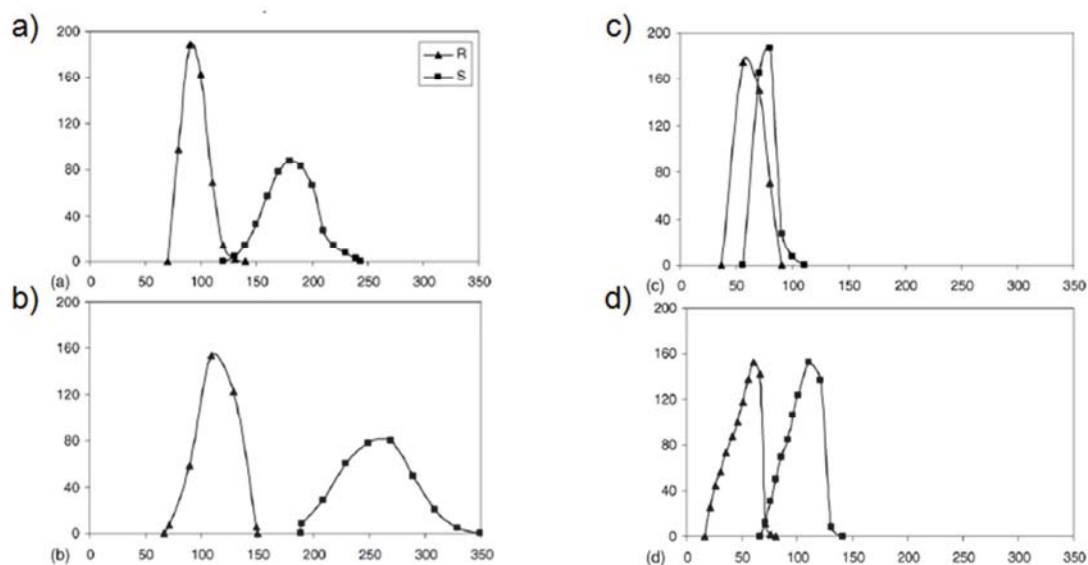


Figura 1.25. Perfils d'elució obtinguts en la separació dels enantiòmers de DNB-(±)-leucina utilitzant com a SQ el derivat 1. a) MTBE/tampó fosfat sòdic 0,1M pH 6; b) MTBE/ tampó acetat amònic 0,1M pH 6; c) MTBE/ tampó fosfat sòdic 0,1M pH 6,7; d) MTBE/ tampó acetat amònic 0,1M pH 6,7.

1.7. Tècniques utilitzades en l'estudi del mecanisme de reconeixement quiral d'aplicació en el disseny de nous selectors

Molts dels avenços realitzats en el camp del disseny de fases estacionàries quirals han estat basats en la intuïció química. No obstant, el disseny racional de nous selectors quirals o fases estacionàries quirals amb un ampli espectre d'aplicació, així com la comprensió del mecanisme íntim pel que es produeix el reconeixement enantioselectiu ha esdevingut un gran repte durant anys. Dues són les tècniques que més s'han utilitzat en aquest context quan això ha estat possible. Es tracta de l'estudi d'associació per ressonància magnètica nuclear (RMN) entre derivats solubles del SQ i de l'analít corresponent i de l'estudi dels cristalls obtinguts entre aquestes espècies per cristal·lografia de raigs X.^{69,70,71,72} De manera complementària a aquests estudis experimentals també s'han realitzat en ocasions estudis computacionals per tal de racionalitzar com es produeix la discriminació quiral. La finalitat d'aquesta recerca és l'aplicació dels resultats al disseny de selectors quirals millorats. En l'extrem oposat al disseny racional, tal com ja s'ha comentat, també la química combinatòria ha estat aplicada en la recerca de noves estructures enantioselectives.⁵⁵

Els avenços realitzats amb les eines computacionals han permès el desenvolupament de diversos programes informàtics per intentar postular les interaccions que es produeixen entre dues espècies. Existeixen dos tipus d'aproximacions a aquest problema. D'una banda trobem els mètodes de regressió en els quals s'intenta relacionar diversos tipus de "descriptors moleculars", en general propietats relacionades amb la estructura (CMTD -*Chirality Molecular Topological Descriptors*, entre altres), amb els valors de retenció relativa dels enantiòmers o el seu quocient (α). Són els mètodes anomenats de QSERR (*Quantitative Structure Enantioselective Retention Relationships*), procediments anàlegs als QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationships*) d'aplicació en el disseny de fàrmacs. D'altra banda cal considerar els mètodes de modelatge que apliquen camps de força empírics (o mètodes computacionals quàntics) en els que es calculen les energies relatives dels dos complexos diastereomèrics generats a partir del SQ amb cadascun dels enantiòmers. No obstant, aquests darrers sempre s'han utilitzat per a explicar un comportament enantioselectiu "a posteriori", ja que la seva validesa predictiva és molt limitada.⁷³

Pel seu interès en relació al treball que es presenta comentarem sobre dues de les parelles SQ-enantiòmers, l'associació dels quals es va estudiar per RMN. En concret Pirkle i col·laboradors varen realitzar l'estudi d'associació entre els dos enantiòmers del N-(2-naftil)alaninat de metil i la (S)-N'-(3,5-dinitrobenzoil)-N-(n-propil)leucinamida en base a l'observació de l'efecte nOe entre grups d'una i altre espècie. Segons els resultats cromatogràfics, el complex més estable (enantiòmer més retingut) s'estableix entre els compostos de configuració absoluta S. En aquest complex es va postular el paper fonamental de la interacció entre els anells aromàtics pobre en electrons (π -deficient) d'una espècie amb el ric en electrons (π -excedent) de l'altre (Figura 1.26).⁷⁴ En el mateix model es postulen un primer pont d'hidrogen entre el protó lleugerament àcid de la 3,5-dinitrobenzamida i el grup carbonil de l'ester de l'alaninat de metil, i un segon entre el grup carbonil de la propilamida i l'àtom d'hidrogen de la naftilamina. Aquest hipotètic complex es va modelitzar aplicant tant mètodes de mecànica molecular (Chemlab II) i semiempírics (AM1) com *ab initio* (STD-3G amb el programa GAUSSIAN 80).⁷⁵ Inesperadament la diferència energètica calculada pels complexos basats en aquestes interaccions amb cadascun dels enantiòmers no sembla explicar l'enantioselectivitat observada. Es més, els dos enantiòmers poden establir interaccions de força similar.⁷⁶ Llavors, la diferent estabilitat que origina la separació cromatogràfica podria ser deguda a altres factors, entre elles la dimerització dels analits.⁷⁴

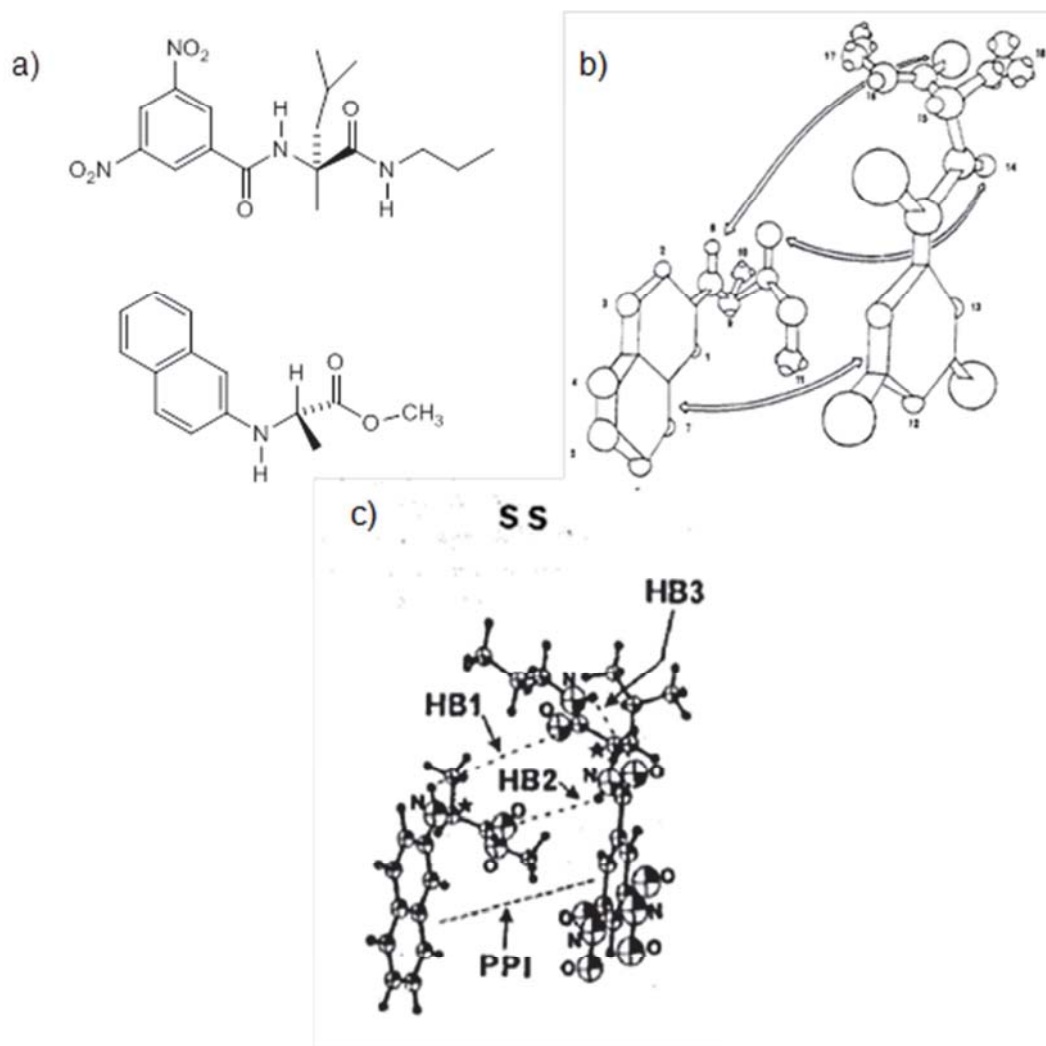


Figura 1.26. Representació de les interaccions que s'estableixen entre l'enantiòmer S del *N*-(2-naftil)alaninat de metil, com a model de SQ, i l'(*S*)-*N'*-(3,5-dinitrobenzoil)-*N*-(*n*-propil)-leucinamida. a) estructura de les espècies implicades. b) model en base als efectes nOe observats entre les dues espècies.⁷⁴ c) modelització del mateix model.⁷⁶

Atesos els elevats valors d'enantioselectivitat assolits per la FEQ el selector de la qual és una *N*-(3,5-dimetilfenil)prolinamida front certs *N*-(3,5-dinitrobenzoil)derivats de leucinamida, aquest parell SQ/enantiòmers s'estudià aplicant les mateixes tècniques de RMN que l'anterior (estudi del nOe intermolecular).⁶⁹ Aquest estudi es va acompanyar de l'anàlisi per difracció de raigs X dels cristalls del mateix complex.⁷⁷ Els resultats obtinguts permetien referendar la hipòtesi segons la qual les interaccions π - π cara-a-cara i els ponts d'hidrogen establerts entre els grups amida de SQ i enantiòmers hi jugarien un paper clau (Figura 1.27).

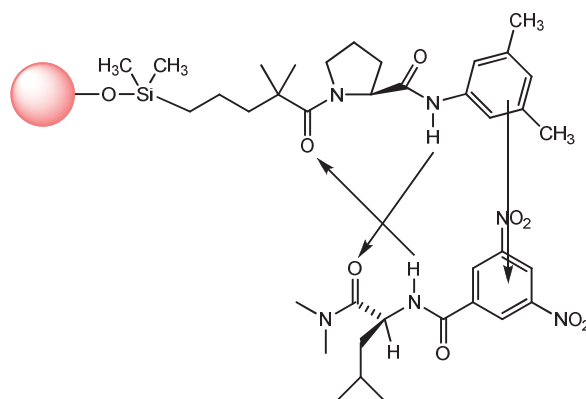


Figura 1.27. Interaccions que es postulen pel procés de reconeixement enantioselectiu entre *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-*N'*,*N'*-dimetil-(±)-leucinamida i es SQ de la FEQ descrita a la ref 52.

Atès que en cromatografia en contracorrent no hi ha suport sòlid, l'aplicació dels procediments de RMN és directa sobre les pròpies molècules implicades en la separació. No és necessari utilitzar models simplificats. Per tant, en el nostre grup de treball s'havia abordat un estudi similar a l'anterior. El parell seleccionat SQ-racèmic fou l'*N*-(3,5-dimetilbenzoil)-*N'*-(3,5-dimetilfenil)-*L*-prolinamida i l'enantiòmer més retingut del racèmic (±)-*N*-(3,5-dinitrobenzoil)-*tert*-butilleucinamida de configuració absoluta *S* (Figura 1.28). No obstant, atesa la difícil accessibilitat d'alguns dissolvents deuterats, els experiments es registraren utilitzant cloroform deuterat.

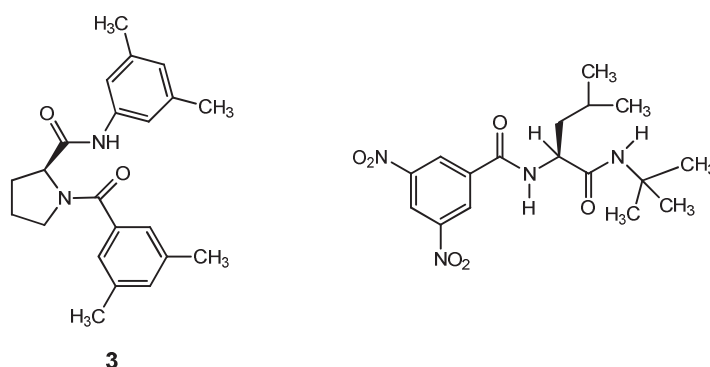


Figura 1.28. Estructura de les espècies utilitzades en l'estudi d'associació per RMN.⁷⁸

Després de comprovar l'estequiometria 1:1 dels complexos, gràcies als experiments NOESY es pogueren establir les zones de les dues molècules que es troben pròximes entre si. Atesa la presència de dos grups 3,5-dimetilbenzoil en **3**, calia esbrinar quin dels dos intervé en la interacció amb el 3,5-dinitrobenzoil de l'altre molècula. A través de l'anàlisi de la zona aromàtica es va poder determinar que l'anell 3,5-dimetilanilino de **3** és el que intervé en el reconeixement (Figura 1.29). Així ho demostra la observació d'efecte nOe entre el senyal corresponent als grups CH₃

de l'anell de 3,5-dimetilanilino de **3** (δ 2,3) i els corresponents als protons de l'anell de 3,5-dinitrobenzoil del derivat de leucina (δ 8,9 i 9,1). També presenten nOe entre altres el senyal del grup t-butil del derivat de leucinamida amb el corresponent als protons de les posicions 2 i 6 de l'anell de 3,5-dimetilbenzoil de **3** (δ 7,2). Aquest resultat es va confirmar enregistrant l'espectre NOESY d'una barreja de **3** amb el derivat de leucina racèmic. En aquest espectre en el que s'observaren duplicats els senyals corresponents al derivat de leucina, es va poder observar que només alguns dels senyals de l'enantiòmer *S* experimentaven efecte nOe en presència de l'enantiòmer *R* del derivat de leucinamida.

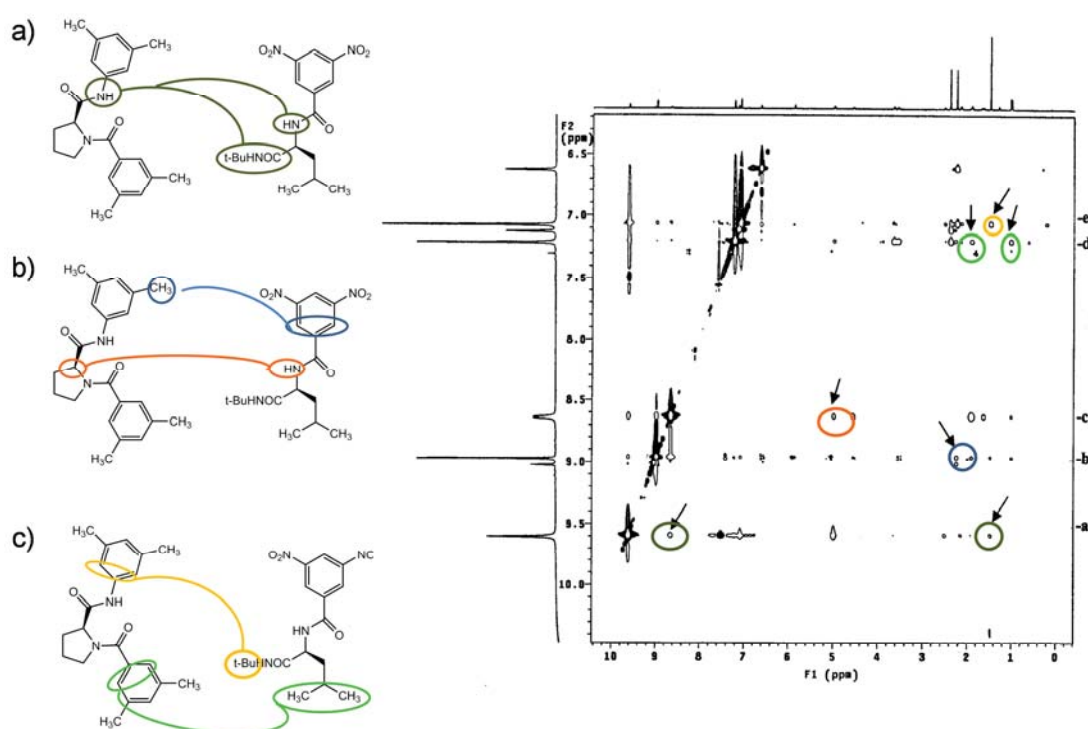


Figura 1.29. Representació on es mostren els efectes nOes que es produeixen en una barreja (1:1) entre el SQ **3** i la (\pm)-*N*-(3,5-dinitrobenzoil)-*tert*-butilleucinamida (CDCl_3 , 600 MHz). Posant-se de manifest l'associació del grup dinitrofenil del racemat amb l'anell de dimetilfenil que es troba sobre l'amina de l'aminoàcid. Aquesta interacció fa que al llarg dels treballs realitzats en el nostre grup es mantinguin aquests dos grups en les estructures dels racemats i SQs, respectivament.²⁵

Així doncs, totes les dades experimentals disponibles apunten al fet que el grup 3,5-dimetilanilino sobre l'extrem carboxilat de l'aminoàcid intervé en el reconeixement enantioselectiu. Per aquest motiu en la present tesi doctoral ens hem plantejat fer diverses modificacions estructurals sobre l'estructura base de 3,5-dimetilfenil-L-prolinamida i assajar-ne la seva aplicabilitat per CCC.

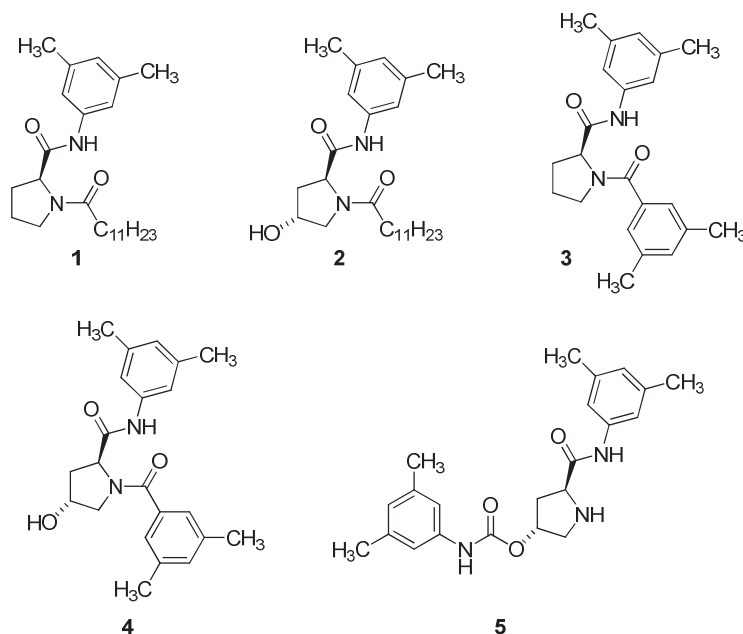
2 Objectius

2. Objectius

En el camp de les diferents tècniques cromatogràfiques, el desenvolupament de nous selectors quirals i/o fases estacionàries quirals amb un ampli espectre d'aplicació ha esdevingut un gran repte durant anys. Els resultats dels estudis realitzats mitjançant tècniques de RMN o cristal·logràfiques per tal d'entendre i confirmar les interaccions que es produeixen entre el SQ i l'analit s'han utilitzat en el disseny de FEQs, tal i com s'ha descrit a la introducció.^{50,70,71,72} També la química combinatòria ha estat aplicada amb al finalitat de contribuir a la identificació d'esquelets bàsics en certes famílies de compostos que presentin uns valors d'enantioselectivitat més elevats. No obstant, sovint els avenços aconseguits han estat basats en la intuïció química.⁷³

Així, en la present tesi doctoral, es pretén desenvolupar nous SQs per esser utilitzats en CCC/CPC, prenent com a esquelet fonamental el de l'aminoàcid L-prolina. Les característiques específiques que li confereix la seva estructura rígida i el seu ús amb èxit en altres tècniques cromatogràfiques (valors d'enantioselectivitat inusualment elevats), va fer que aquest aminoàcid es seleccionés com a nucli de partida sobre el que es realitzarien les modificacions pertinents que haurien de portar-nos a l'obtenció de nous SQs.^{21,44,48,51} A més, l'experiència prèvia del nostre grup en el desenvolupament de SQs derivats d'aquest aminoàcid per a la seva posterior aplicació a la CCC/CPC i els bons resultats obtinguts amb alguns d'ells en ha fet dirigir el nostre treball en aquesta direcció.^{24,25}

Així doncs, es prengué com a punt de partida l'estudi de l'enantioselectivitat de cinc derivats de L-prolina i L-hidroxiprolina amb la característica comuna de contenir en la seva estructura un anell π -donador (3,5-dimetilfenil).²⁵ En aquest estudi, després de realitzar-ne la síntesi, se'n avaluà la capacitat enantioselectiva en CPC front els racèmics DNB-(\pm)-Leu i ketoprofèn, posant-se de manifest una capacitat d'enantiodiscriminació més elevada vers al primer, que conté un anell π -deficient (DNB-(\pm)-Leu), que front el segon racemat.



D'aquesta manera amb la finalitat de poder aconseguir desenvolupar nous SQs aplicables a la separació d'enantiòmers mitjançant la cromatografia en contracorrent (CCC/CPC) superant algun dels inconvenients que ja es podien posar de manifest i intentant millorar els resultats obtinguts anteriorment en el nostre grup amb els derivats de la L-prolina, en la present Tesi Doctoral ens vàrem plantejar els següents objectius:

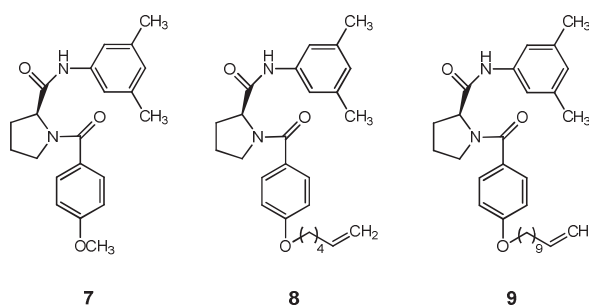
1. En l'estudi realitzat per B. Delgado i col·laboradors, i tal i com s'ha esmentat anteriorment, s'observà que l'enantioselectivitat front la DNB-Leu racèmica millorava amb la incorporació d'un segon anell π -donador sobre el nucli de l'*N*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida (SQ 3), tot i que aquest selector va resultar ser menys soluble en els sistemes de dissolvents utilitzats.²⁵

La finalitat preparativa que presenta la CCC/CPC fa que ens interressi dissoldre la màxima quantitat de SQ en la FE per tal de tenir una elevada capacitat de càrrega. Així, la baixa solubilitat del SQ en el sistema de dissolvents seleccionat pot comprometre la quantitat de racèmic a processar donat que hi hauran poques molècules de SQ disponibles per a interaccionar amb l'analit. D'altra banda, el factor d'enantioselectivitat (α) es veu influenciat per la quantitat de SQ solubilitzat en la fase estacionaria. Una baixa solubilitat pot originar una baixa enantioselectivitat. Per contra, una elevada solubilitat del SQ en la FE assegura un valor màxim d' α . No obstant, cal que el SQ presenti un cert grau d'enantioselectivitat front al racèmic seleccionat, ja que

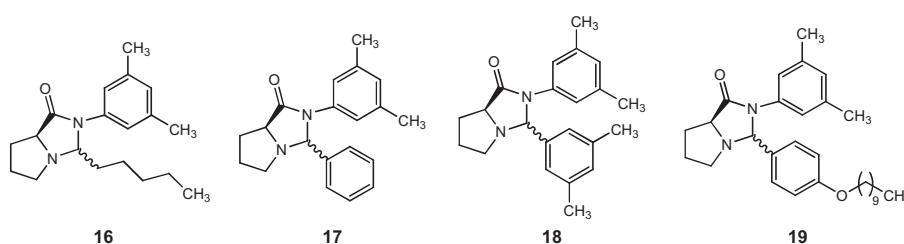
moltes vegades tot i que el SQ presenta una elevada solubilitat en la FE, aquest no ressol l'anàlit per la seva manca de capacitat d'enantiodiscriminació vers el racemat.

Així, prenent com a model **3**, es vol millorar la seva solubilitat en els sistemes de dissolvents seleccionats, a través de la síntesi de noves estructures, prenent com a estructura bàsica l' *N'*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida.

- Introduint una cadena carbonada sobre un dels anells aromàtics, la qual cosa hauria de resultar en molècules més lipòfiles.



- Eliminant una de les funcions amida, sovint origen de la insolubilitat dels compostos en determinats dissolvents. No obstant, el caràcter planar de les funcions amida ajuda a mantenir una rigidesa estructural. Per tal de no perdre aquest factor, sovint considerat significant en l'enantioreconeixement, es va optar per introduir un anell addicional a la estructura que l'hauria de dotar d'una rigidesa estructural incrementada.

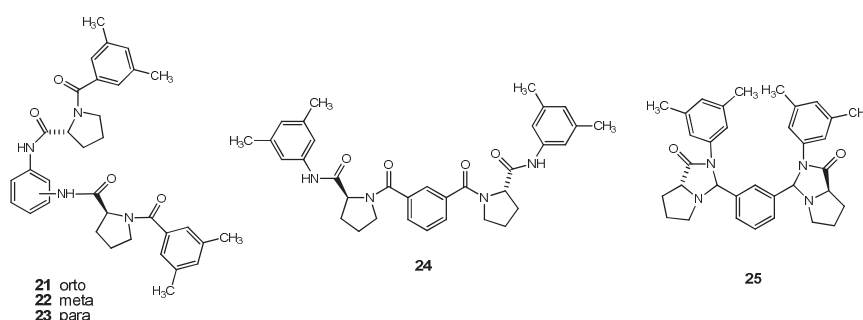


- Una vegada sintetitzades i caracteritzades les noves estructures obtingudes es vol estudiar la solubilitat i la capacitat enantioselectiva front el racèmic DNB-(±)-Leu en CCC/CPC en els sistemes de dissolvents més utilitzats en el nostre grup. La selecció correcta del sistema de dissolvents en ser aquest el medi on es produirà el fenomen d'enantioreconeixement és fonamental. Així, el SQ haurà de solubilitzar-se en una de les fases del sistema, la qual s'utilitzarà com a FE, mentre que el racèmic seleccionat s'haurà de repartir entre les dues fases. En aquest context, les diferències

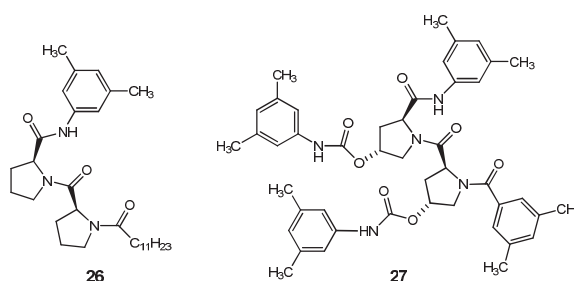
d'associació entre el SQ/Racèmic seran les responsables de l'enantiodiscriminació. Així, en funció de la composició i la naturalesa del sistema de dissolvents seleccionat es podrà veure afectat des del comportament del SQ o la retenció del racemat, fins a l'associació d'ambdós.

2. Per tal d'estudiar l'efecte de la presència de diverses unitats de prolina en el SQ, es volen preparar SQ que incorporin almenys dues unitats en l'estructura dels nous SQs. A l'hora d'unir les dues entitats quirals es seguiran dues estratègies diferents per veure com s'afecta la capacitat enantioselectiva:

- SQ que contenen un connector entre les dues unitats quirals



- SQ units de forma directa



- Com en el cas dels SQ monomèrics, es vol estudiar la solubilitat i el repartiment dels SQs en els sistemes de dissolvents seleccionats, per a continuació estudiar la seva capacitat enantioselectiva en CCC/CPC.

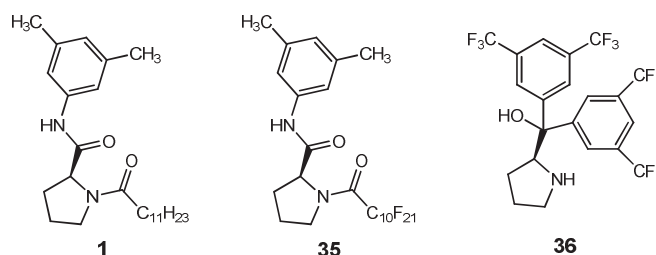
- En el cas d'obtenir separació seria d'interès comprovar si en l'enantiodiscriminació participen les dues unitats de prolina de forma independent o cooperativa. Així, s'estudiaran els SQ dimèrics, envers al seus anàlegs monomèrics.

3. Un dels problemes que presenta la separació d'enantiòmers utilitzant sistemes líquids bifàsics és el possible repartiment del SQ cap a la fase que es fa servir com a

fase mòbil. Aquest repartiment redueix la capacitat d'enantioreconeixement del sistema a mesura que es fa servir, a l'hora que contamina els enantiòmers que se separen. Per aquest motiu ens vàrem plantejar la utilització conjunta d'un dissolvent fluorat, l'etoxinonafluorobutà (ENFB), com a integrant del sistema de dissolvents, amb un SQ que contingui una cadena perfluorada. Es la primera vegada que s'aborda aquesta aproximació a la separació per CCC. Atesa l'elevada lipofilia del dissolvent fluorat caldrà introduir un tercer dissolvent de polaritat mitja com a integrant del sistema de dissolvents bifàsic. Per això es considerarà la idoneïtat de diversos candidats com el 2-propanol o l'acetonitril.

- Una vegada construïts els sistemes de dissolvents s'estudiarà la seva estabilitat en les condicions de treball imposades per la tècnica.

- Paral·lelament es sintetitzarà un nou SQ que contingui elements fluorats en la seva estructura (**35**). A més, s'estudiarà la disponibilitat comercial de derivats de L-prolina fluorats comercials (**36**). També s'estudiarà el comportament dels tres SQs tant en un medi fluorat, com en un medi no fluorat per veure si existeixen diferències remarcables.



- A l'hora d'estudiar l'enantioselectivitat dels SQs 1, 35 i 36 s'utilitzarà com a racemat a separar un analit ionitzable (DNB-(±)-Leu) i un altre de no ionitzable (DNB-(±)-Leu-tBu), en els sistemes de dissolvents fluorats que resultin aptes per a realitzar aquests estudis. La utilització d'un analit no ionitzable ha de fer palesa l'efectivitat del sistema de dissolvents, ja que, contràriament al cas dels analits ionitzables, en aquest cas no es pot controlar l'elució variant el pH de la fase mòbil.

4. En tots els casos s'intentarà la optimització de les separacions abordant les diverses possibilitats que el caràcter líquid de la fase estacionaria del sistema permet.

- L'absència de suport sòlid que presenta la CCC/CPC ens permet aplicar modes d'elució alternatius al mode clàssic. Així, amb la finalitat de poder millorar els resultats obtinguts en la separació d'enantiòmers, ens plantejem la utilització d'altres modes de treball, com són el mode dual múltiple (MDM), en el que l'intercanvi entre

fase mòbil i estacionària només suposa el canvi de posició d'una vàlvula, i el pH-zone-refining, en el que s'estableix un gradient de pH.

- La dependència entre el valor d'enantioselectivitat (α) i la concentració de SQ utilitzat en la separació és coneguda en CCC/CPC²¹:

$$\alpha = \frac{\{1 + [SQ]_{org}K_{a-}\}}{\{1 + [SQ]_{org}K_{a+}\}}$$

Aquesta dependència és creixent i arriba al seu valor màxim coincidint amb el quocient de les constants d'associació de cadascun dels enantiòmers amb el SQ. Així, per aquells SQs que es produeixi enantioselectivitat es vol realitzar un estudi per tal d'establir si s'assoleix l'enantioselectivitat màxima en les condicions emprades.

**3 Selectors quirals
monomèrics derivats
de L-prolina**

3. Selectors quirals monomèrics derivats de L-prolina

En aquest capítol es presenten totes aquelles molècules que contenen una única unitat de L-prolina. Tal com s'ha comentat en els objectius, en analitzar les estructures dels SQs utilitzats en un estudi anterior del nostre grup²⁵ (Figura 3.1) s'observà que la introducció d'un segon anell π -donador sobre l'*N'*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida es tradueix en un increment de l'enantiodiscriminació front DNB-Leu racèmica en les condicions comparables. No obstant, aquest canvi determina una reducció de la solubilitat del SQ que en resulta, cosa que limita el seu ús amb finalitats preparatives en dissolvents de lipofilia considerable com MTBE (metil *tert*-butil èter) (Figura 3.2).

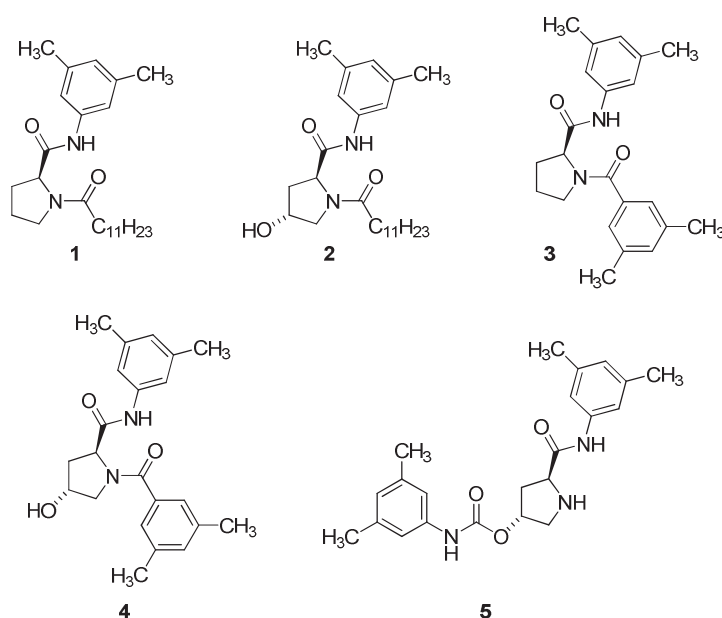


Figura 3.1. Estructures dels SQs derivats de la L-prolina utilitzats en l'estudi de la ref 25.

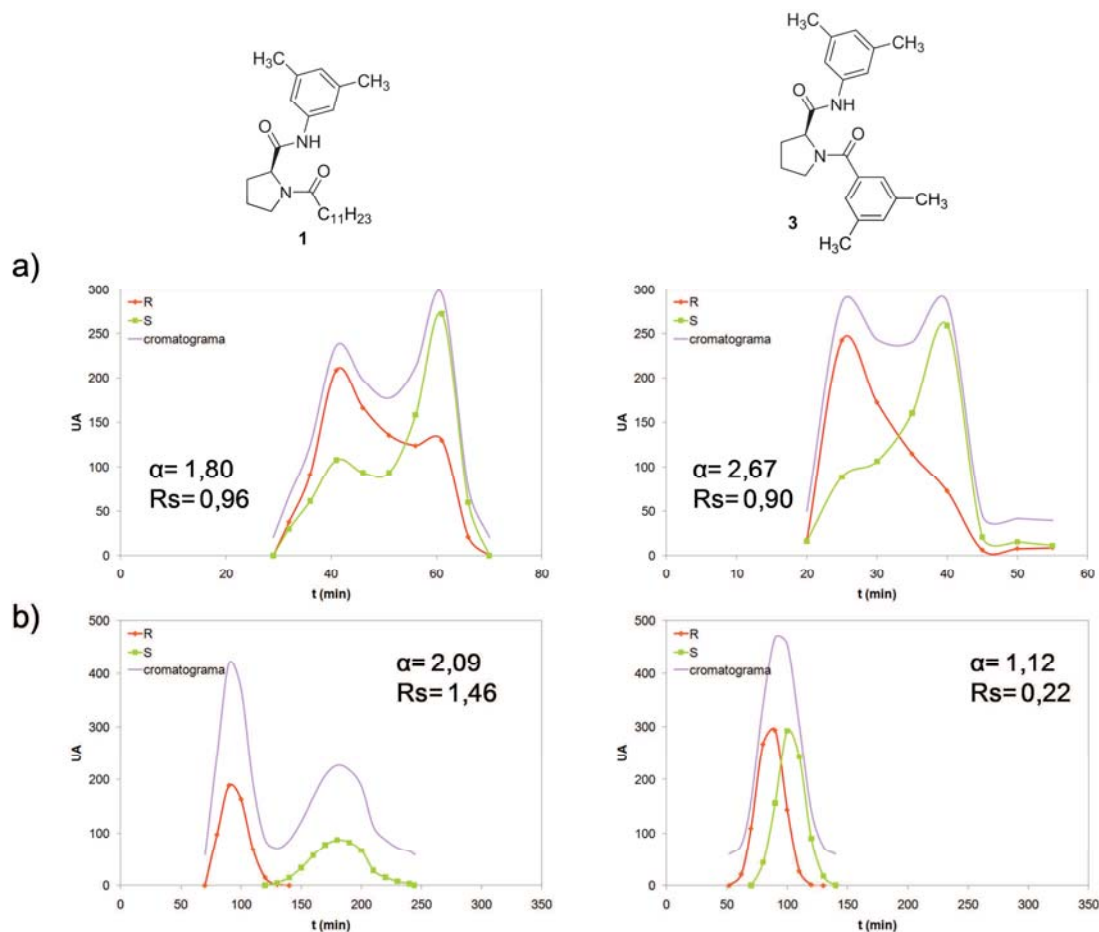
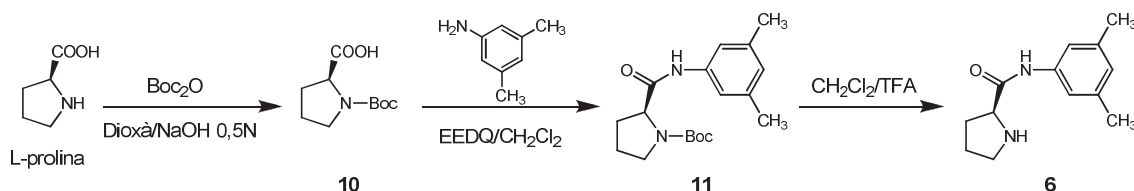


Figura 3.2. SQs utilitzats i perfils d'elució obtinguts en la ref 25 en què es comparen els resultats obtinguts en la separació de la DNB-(±)-leucina en MIBK (metil isobutil cetona)/tampó fosfat sòdic 0,2 M pH 8 (a) i MTBE (metil *tert*-butil èter)/tampó fosfat sòdic 0,1 M pH 6 (b) utilitzant una concentració 10 mM de SQ en el primer cas ($\alpha_{ccc} = 1,80$ i $2,67$) i de 30 mM per **1** ($\alpha_{ccc} = 2,09$) i 6,14 mM per **2** ($\alpha_{ccc} = 1,12$).

Així, ens plantegem la introducció de diverses modificacions sobre el nucli de l'*N'*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida per tal d'aconseguir derivats de solubilitat incrementada en els sistemes de dissolvents binaris, sense comprometre la seva enantioselectivitat.

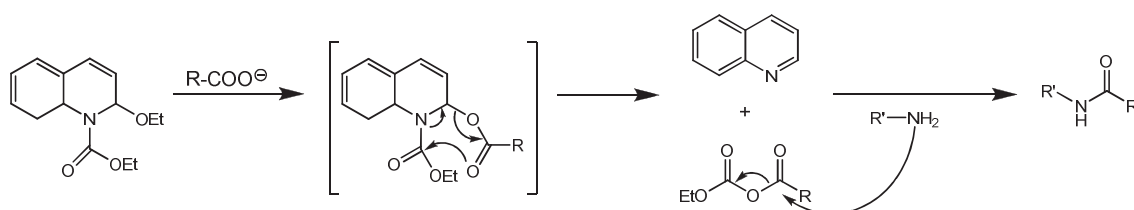
Tots els derivats que ens proposem estudiar procedeixen sintèticament del mateix intermedi clau **6** que es va preparar prèviament. Així, es va seguir la metodologia descrita per Pirkle⁵² i utilitzada anteriorment en el nostre grup per a l'obtenció de l'*N'*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida (**6**) que ens havia de permetre la introducció de la substitució sobre l'àtom de nitrogen de l'aminoàcid.



Es partí de L-prolina que es va protegir en el grup amino com a *t*-butoxicarbonil (Boc) derivat per reacció amb dicarbonat de di-*tert*-butil (Boc_2O) en medi bàsic.⁷⁹ La Boc-L-prolina (**10**) es va obtenir amb un elevat rendiment i s'utilitzà en el següent pas sense prèvia purificació. A l'espectre de $^1\text{H-RMN}$ de **10** cal destacar la presència d'un singlet a δ 1,49 cosa que confirma la incorporació del grup *tert*-butoxicarbonil (Boc).

Atès que els SQs que ens plantegem tenen en comú la presència d'un anell de 3,5-dimetilfenil (π -excedent) sobre la funció àcida de l'aminoàcid, l'àcid **10** es feu reaccionar amb 3,5-dimetilanilina utilitzant l'1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleïna (EEDQ) com agent d'acoblament, de manera que s'obté l'*N'*-(3,5-dimetilfenil)-*N*-Boc-L-prolinamida (**11**) amb un rendiment elevat (85%). La seva obtenció inequívoca es va confirmar per la presència a l'espectre de $^1\text{H-RMN}$ dels senyals corresponents als protons de les posicions *orto* i *para* de l'anell aromàtic a 7,15 (s, 2H, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$) i 6,73 ppm (s, 1H, C^4H), respectivament. A continuació, l'amida **11** es tractà amb àcid trifluoroacètic per tal de procedir a la desprotecció del grup amino. L'amina resultant **6** es purificà per cristal·lització del seu hidroclozur (90%). L'amina **6** s'utilitza com a producte de partida en la preparació dels SQs proposats.

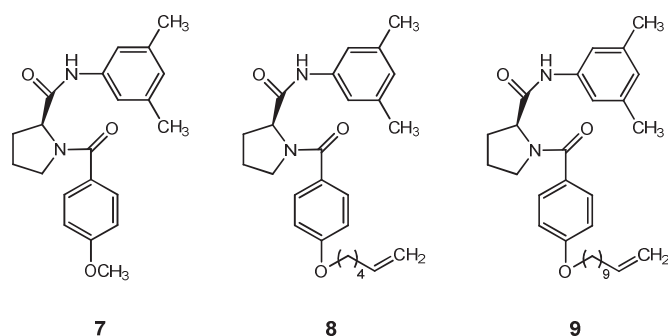
L'EEDQ, utilitzat en l'acoblament de l'amina amb l'àcid, permet la formació de l'enllaç desitjat gràcies a la formació d'un anhidrid intermedi entre l'agent d'acoblament i l'àcid. Aquest anhidrid, forma activada de l'àcid original, reacciona amb l'amina per a formar l'amida desitjada.



3.1. Introducció d'una cadena alifàtica sobre l'anell aromàtic

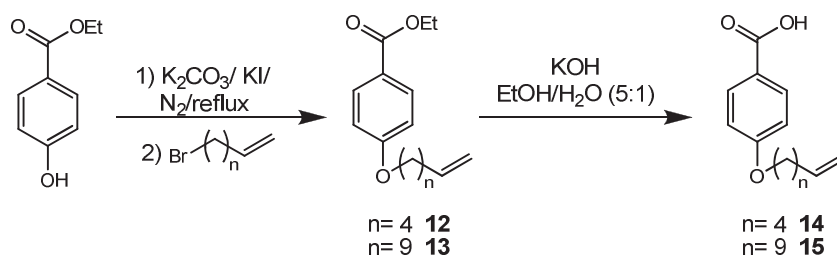
La introducció d'una cadena alquíllica d'una llargada considerable sobre el SQ hauria de produir un augment de lipofília que es traduiria en un increment de la solubilitat en la fase lipòfila i una reducció de la seva afinitat per la fase polar. A més, aquesta modificació ha de permetre incrementar la diferència de polaritat entre SQ i l'analit, la qual cosa facilita el seu comportament diferenciat en el mateix sistema de dissolvents.

^{21,26,27} Amb aquesta idea ens varem proposar la síntesi dels següents derivats.



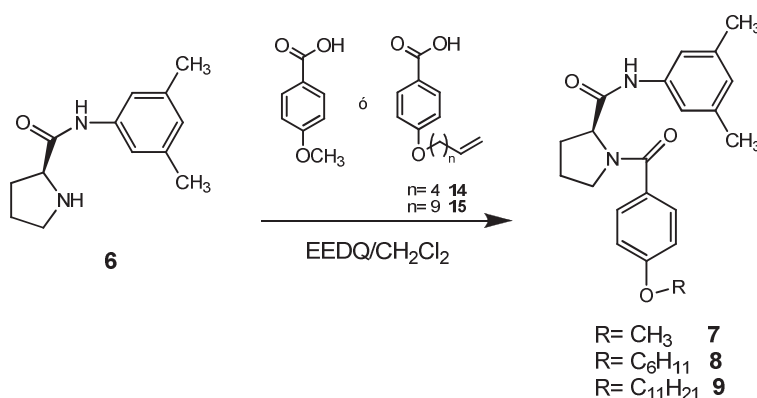
3.1.1. Síntesi dels SQs 7, 8 i 9

Per a l'obtenció dels SQs **8** i **9** fou necessari sintetitzar prèviament els corresponents àcids alcoxibenzoïcs **14** i **15** per alquilació del 4-hidroxibenzoat d'etil amb l'halur d'alquil adient.



La incorporació de la cadena alifàtica en els compostos **12** i **13** es confirmà per ¹H-RMN, on s'observa la presència de senyals pels protons alifàtics i la de senyals corresponents als protons de doble enllaç a 5,00 i 5,80 ppm. Tot seguit, s'hidrolitzà l'ester en medi bàsic obtenint-se els àcids 4-(5-hexenoxi)benzoic (**14**) i 4-(10-undecenoxi)benzoic (**15**), respectivament, que es van purificar per cristal·lització d'etanol.

Els àcids **14** i **15**, es van utilitzar en la preparació dels selectores **8** i **9**. Tanmateix, l'àcid *p*-anísic s'utilitzà per a obtenir **7**, un selector que ens ha de permetre avaluar l'efecte de la introducció de la cadena alifàtica sobre els primers, ja que, a diferència de **3**, manté el mateix patró de substitució (grup 4-alcoxi) sobre el segon anell aromàtic de la molècula. Com en el cas anterior, es va utilitzar EEDQ com a agent d'acoblament per a formar l'enllaç amida entre **6** i els àcids considerats.



Els compostos **7**, **8** i **9** es purificaren per cromatografia en columna sobre gel de sílice eluint amb barreges d'hexà i acetat d'etil de polaritat creixent, obtenint-se els SQ desitjats amb rendiments que van del 54% al 77%.

3.1.2. Determinació de la solubilitat dels compostos **7**, **8** i **9** i recerca de condicions pel seu ús en CPC

Una vegada poguérem disposar dels compostos **7-9** desitjats, es procedí a estudiar la seva solubilitat en els sistemes de dissolvents binaris utilitzats anteriorment en l'estudi de **3**.²⁵ Es tracta de sistemes bifàsics de dissolvents formats únicament per dos components immiscibles entre sí. Com a fase aquosa del sistema es va utilitzar una solució tampó de fosfat sòdic 50 mM saturada prèviament del dissolvent orgànic.

Amb aquests nous compostos que incorporen cadenes carbonades de diferent longitud es pretenia millorar la baixa solubilitat de **3** en MTBE. No obstant, mentre **7**, preparat com a referència, resultà pràcticament insoluble en MTBE, MIBK i DIPE (diisopropilèter), prèviament saturats amb la dissolució de tampó fosfat (< 1 mg/mL), fou **9** el que presentà uns valors de solubilitat més elevats en els dos primers dissolvents (Taula 3.1.). Tant per **8** com per **9**, s'aconseguien uns valors de solubilitat més elevats respecte al valor obtingut per a **3**.

Taula 3.1. Solubilitat dels SQs en els sistemes binaris de dissolvents.

| SQ | MIBK | MTBE | DIPE |
|----|-----------|-----------|-----------|
| 3 | 1,4 mg/mL | 3,6 mg/mL | - |
| 7 | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 8 | 33 mg/mL | 20 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 9 | 42 mg/mL | 21 mg/mL | < 1 mg/mL |

Atesa la baixa solubilitat dels compostos en DIPE, aquest dissolvent es descartà per als posteriors desenvolupaments. Així doncs, els sistemes de dissolvents seleccionats per dur a terme els experiments de CPC amb aquests selectors foren MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM i MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM en els que el SQ s'addicionava a la fase estacionària a una concentració 10 mM. També, degut a la baixa solubilitat de 7, es descartà l'assaig d'aquest com a SQ en cap de les condicions considerades.

Abans de realitzar l'assaig dels SQs seleccionats se'n va comprovar la retenció en la fase orgànica del sistema de dissolvents, analitzant per cromatografia en capa fina les dues fases del sistema en equilibri. En cap cas es va detectar la presència de SQ a la aquosa que haurà d'actuar com a FM. També es va comprovar l'estabilitat del sistema de dissolvents en el dispositiu en les condicions establertes en el treball anterior. Així, es treballà a una velocitat de rotació de la centrífuga (ω) de 1100 rpm i a un flux de 3 mL/min en utilitzar un dispositiu de CPC amb una columna de 190 mL de volum total.

El racèmic a separar és el mateix utilitzat en l'estudi del SQ 3,²⁵ la qual cosa hauria de permetre comparar els resultats amb els obtinguts prèviament. A l'hora de fixar la quantitat d'analit a injectar cal evitar la possible saturació del SQ. En base a estudis realitzats amb SQs de baix pes molecular es va poder determinar que, en SQ d'elevada enantioselectivitat, aquesta es produeix a una relació molar SQ/analit (1:1).¹⁰ Considerant que, la quantitat molar de SQ en l'aparell en els diferents experiments podria oscil·lar entre 10 i 20 mmol segons el cas, es decidí injectar 75 mg (0,23 mmol) de racèmic, quantitat llunyana a la de saturació teòrica.

El pH de les solucions amortidores utilitzades com a fase mòbil es va fixar a 8 pel sistema format per MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM i 6 en utilitzar MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM. Atès que l'analit té caràcter àcid, es troba més ionitzat a valors de pH més elevats, cosa que facilita el seu repartiment cap a la fase més polar del sistema de dissolvents (solució aquosa) i en redueix el temps de retenció en el cas d'emprar un

dissolvent de polaritat destacable com ho és el MIBK. Contràriament, a valors de pH més baixos la menor ionització fa que l'analit es comporti com a més lipòfil i, per tant, es facilita la seva solubilitat en el dissolvent de baixa polaritat (MTBE), i la seva retenció quan aquest dissolvent constitueix la fase estacionaria. D'aquesta manera, com a conseqüència del control del repartiment de l'analit en el sistema de dissolvents es controla el temps de retenció de l'analit en el sistema i s'eviten els experiments excessivament llargs.

Una vegada establertes les condicions de treball per als SQs seleccionats, es procedí a l'assaig de la seva capacitat d'enantiodiscriminació en els dos sistemes de dissolvents binaris escollits.

3.1.3. Assaig de la capacitat d'enantioconeixement de **8** i **9** en CPC

Els primers experiments es realitzaren en MIBK/ tampó fosfat 50 mM pH 8 ja que, com **3**, també **8** i **9** mostraren una solubilitat més elevada en aquest sistema de dissolvents. Així, s'inicià l'estudi avaluant la capacitat enantioselectiva de **8** a una concentració 10 mM en la fase orgànica del sistema injectant 75 mg (0,23 mmol) de DNB-(±)-Leu.

En aquest punt la necessitat d'un mètode analític enantioselectiu per a avaluar la separació és crucial, ja que les separacions poden no ser completes i per tant difícilment detectables sense un mètode quiral de control. Per això, les fraccions recollides de l'eluat varen ser analitzades per HPLC quiral. En l'anàlisi per HPLC s'utilitzà una columna contenint *N*-(3,5-dimetilfenil)-(4*R*)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolinamida com a SQ, i una barreja d'heptà/2-propanol/TFA (80:20:0,5) com a FM. En aquestes condicions s'aconsegueix la separació completa dels enantiòmers de l'analit (k'_1 , 33; α , 1,6; R_s , 1,7) (Figura 3.3).⁶²

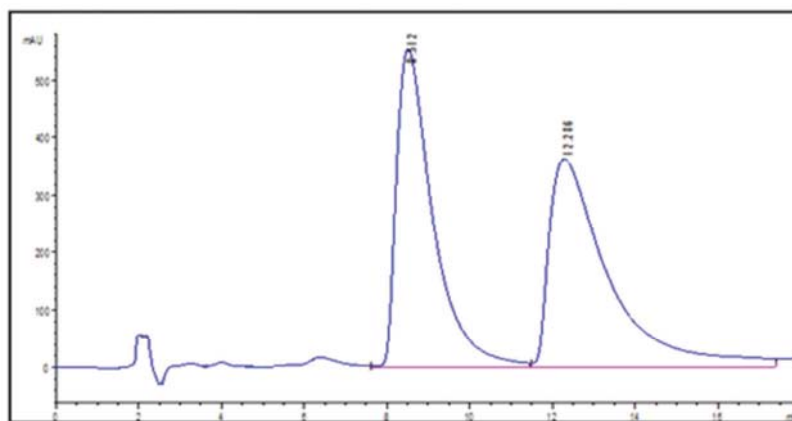


Figura 3.3. Separació analítica dels dos enantiòmers de la DNB-(±)-Leu sobre una columna quiral contenint *N*-(3,5-dimetilfenil)-(4*R*)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolinamida com a SQ. Aquestes condicions es varen utilitzar pel control dels experiments de CPC. Volum d'injecció: 5 μ L; fase mòvil: d'heptà/2-propanol/TFA (80:20:0,5); flux: 1 mL/min; λ = 254 nm.

No obstant, atès que l'eluat de l'experiment de CPC era de naturalesa aquosa i per l'anàlisi de les fraccions s'utilitzaven condicions de fase normal, es va haver de procedir a un tractament d'extracció en medi àcid d'aquestes fraccions previ a la seva anàlisi. A partir del contingut enantiomèric determinat per a cadascuna d'elles es va procedir a la construcció dels perfils d'elució de cada experiment. Com a exemple en la Figura 3.4. s'observa una separació parcial de l'analít (Taula 3.2.).

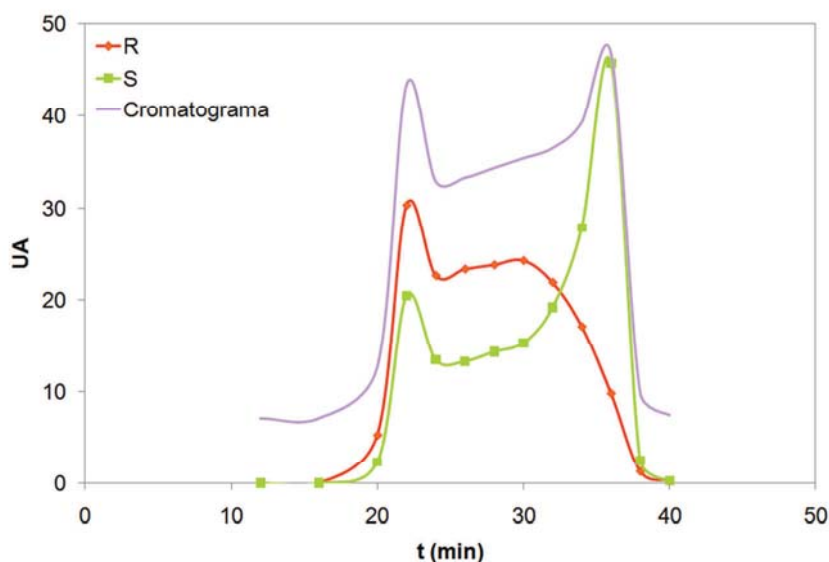


Figura 3.4. Perfil d'elució per a la separació de DNB-(±)-Leu (75 mg, 0,023 mmol) obtingut amb el SQ **8** a una concentració 10 mM en el sistema MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 8. Flux: 3 mL/min, ω 1100 rpm.

La forma no gaussiana dels pics obtinguts es va atribuir a la coexistència de formes ionitzades i neutres de l'analit. De fet aquest resultat resultava concordant amb altres prèviament obtinguts en el grup on s'observava el mateix efecte. No obstant, considerant els màxims dels dos pics es va poder calcular un valor de α_{CCC} de 1,42, lluny del 2,67 prèviament obtingut per **3** en les mateixes condicions. Malauradament, la manca de solubilitat de **7** en aquestes condicions ens va impedir comprovar si aquesta inferior enantioselectivitat era deguda a la modificació de la substitució del segon anell aromàtic introduït sobre l'estructura fonamental de L-prolina.

Taula 3.2. Separacions dutes a terme en el dispositiu de CPC utilitzant **8** i **9** com a SQ en la fase estacionària orgànica del sistema de dissolvents.

| Exp. | SQ | F.E. | V_{st} (mL) | SQ_{st} (mmol) | $r_{\text{SQ/R}}$ | t_1 (min) | t_2 (min) | α_{CCC}^a | R_s^a | oe |
|------|----------|------|------------------|---------------------|-------------------|----------------|----------------|-------------------------|---------|----|
| 1 | 8 | MIBK | 142 | 1,42 | 6,17 | 22 | 36 | 1,42 | - | R |
| 2 | 8 | MTBE | 134 | 1,34 | 6,17 | 115 | 145 | 1,41 | 0,63 | R |
| 3 | 9 | MTBE | 134 | 1,34 | 6,17 | 120 | 165 | 1,43 | 0,83 | R |
| 4 | 9 | MTBE | 134 | 2,68 | 11,52 | 120 | 170 | 1,45 | 0,98 | R |

Concentració del SQ: 10 mM, excepte per l'experiment 4 (20 mM). F.E., dissolvent utilitzat en la fase estacionària; V_{st} , volum (mL) de FE retingut dins l'aparell; t_i , temps de retenció de cada enantiòmer (min) corresponent a la màxima intensitat del pic; α , factor d'enantioselectivitat; R_s , resolució; oe, ordre d'elució: enantiòmer que surt primer. ^a Valors calculats sobre el perfil d'elució.

Tot seguit, es procedí a assajar **9** en les mateixes condicions. Malauradament no s'aconseguí l'estabilització del sistema. Així, en iniciar la rotació de l'aparell en lloc de produir-se la sortida d'una part de la fase que ha d'actuar com a estacionària, s'observà l'emulsió de les dues fases en actuar **9** com a agent surfactant. Aquest fet ens feu descartar la utilització de **9** en aquest medi.

A continuació, es passà a avaluar la capacitat d'enantioreconeixement de **8** i **9** en el sistema de dissolvents MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6. Es va utilitzar la mateixa concentració de SQ que la utilitzada prèviament en MIBK, 10 mM. D'aquesta manera, tot i obtenir-se un valor de α_{CCC} molt similar a l'obtingut en utilitzar **8** en MIBK, la forma dels pics va resultar ser més propera a la gaussiana cosa que permet una separació quasi completa dels enantiòmers (Figura 3.5 a).

Tot seguit, es procedí a l'assaig de **9** en les mateixes condicions. A diferència del que succeí en MIBK, en MTBE s'aconseguí establir el sistema sense detectar la

formació d'emulsions i l'experiment es pogué realitzar amb èxit. En utilitzar una dissolució 10 mM en **9** es va obtenir un valor d' α_{CCC} de 1,43 (R_s : 0,83). L'experiment es va repetir preparant una dissolució de concentració de SQ superior, 20 mM, per tal d'observar si s'havia assolit el màxim d'enantioseparació per aquest racèmic en les condicions assajades o si encara era possible millorar la separació. Si bé el valor d'enantioselectivitat obtingut d'aquesta manera va ser sensiblement igual a l'obtingut anteriorment (α_{CCC} : 1,45), s'aconseguí pràcticament la completa separació dels pics corresponents als dos enantiòmers (R_s : 0,98), (Figura 3.5 c).

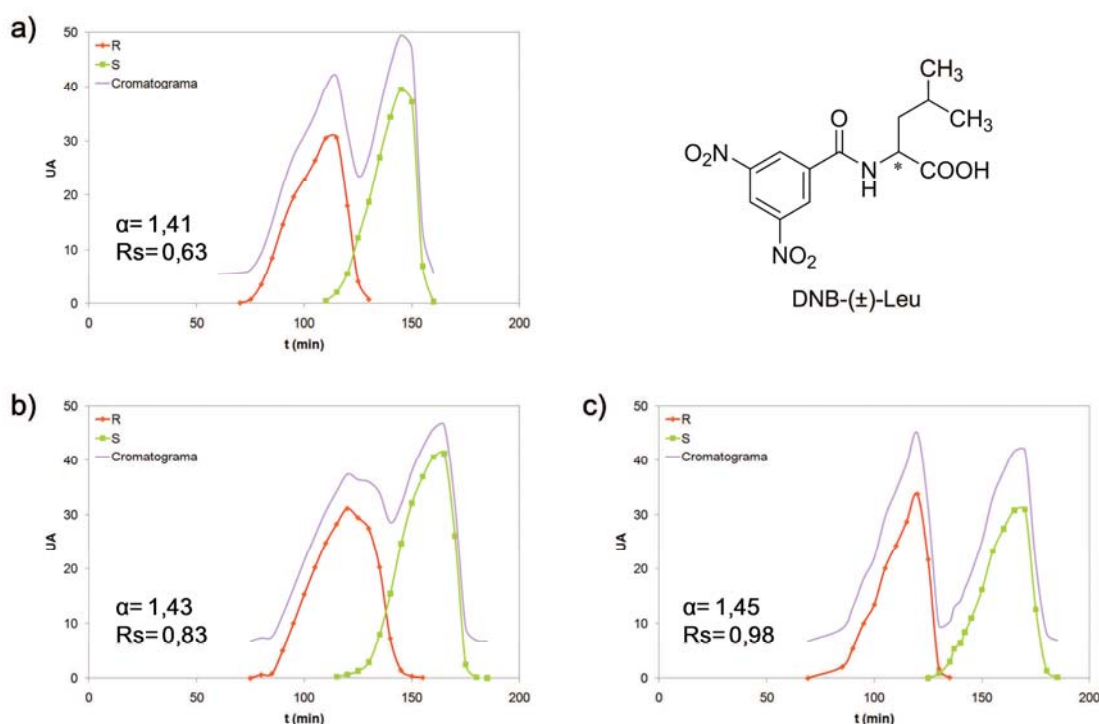


Figura 3.5. Perfils d'elució en la separació de DNB-(±)-Leu (75 mg; 0,23 mmol) en MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6, flux: 3 mL/min, ω 1100 rpm. a) 10 mM de **8**; b) 10 mM de **9** i c) 20 mM de **9**.

En comparar els resultats obtinguts en els dos sistemes de dissolvents, s'observa la clara millora produïda per la utilització de la dissolució tampó a pH 6. Considerant la possibilitat de realitzar un experiment en el sistema MIBK/tampó fosfat a pH 6, es va realitzar una prova en absència de SQ. La durada superior a les 4h d'aquest experiment ens va fer descartar la realització del mateix amb el SQ.

3.2. Incorporació de la unitat de L-prolina en un sistema rígid.

La capacitat preparativa de la cromatografia en contracorrent i les seves variants en la separació d'enantiòmers està determinada fonamentalment per dos factors. D'una banda, l'enantioseparació que el SQ mostra envers el racèmic. D'altra banda, la quantitat de SQ que es pot incorporar a la FE. Així, com més gran sigui l'enantioselectivitat (més diferència d'estabilitat entre els adsorbats formats entre el SQ i cadascun dels enantiòmers) més quantitat de racèmic es podrà processar en una sola operació. Aquest supòsit presenta com a límit el requeriment d'una relació equimolecular entre SQ i racèmic per compostos la separació dels quals transcorre a través de la formació d'adsorbats transitoris d'estequiometria (1:1). També, i com a conseqüència de l'anterior, la quantitat de SQ que es pot incorporar a la FE pot resultar limitant a l'hora de processar una gran quantitat de racèmic en una sola operació.

De forma paral·lela a la síntesi anterior es va intentar modificar la solubilitat dels nous compostos a través d'eliminar una de les funcions amida presents en els SQs estudiats, en particular, en **1**. Es decidí seguir aquesta nova estratègia tot i aconseguir compostos com **8** i **9**, de solubilitat incrementada respecte a la de **3** en els dos sistemes de dissolvents assajats i la resolució completa en la separació de l'analit seleccionat en MTBE/tampó fosfat sòdic. Per això es va pensar en realitzar la introducció de una cadena lipòfila sobre l'estructura bàsica **6** a través d'una alquilació reductiva (Figura 3.6). Això hauria de permetre, a l'hora que aconseguir compostos de lipofília incrementada, mantenir el caràcter bàsic del SQ final. Aquesta característica podria resultar d'interès per a la posterior separació de racèmics de caràcter àcid amb els quals els SQs podrien establir parells iònics lipòfils.

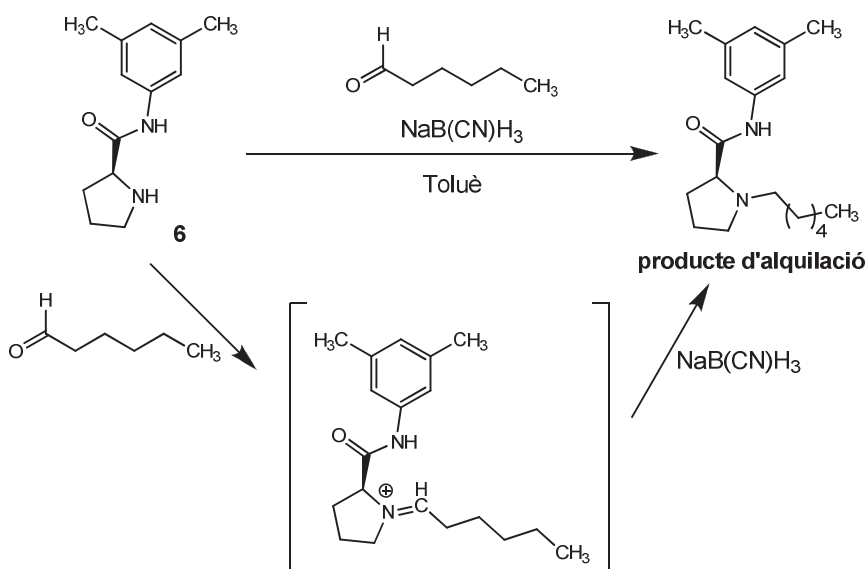


Figura 3.6. Reacció d'alquilació reductiva de **6**

Així, l'alquilació reductiva de **6** es va dur a terme amb hexanal en presència de cianoborohidrur sòdic en el si de toluè anhidre. La purificació per cromatografia en columna del cru de reacció va conduir a dos productes que es van aïllar amb un 69 i un 26% de rendiment, respectivament. No obstant, l'espectre de ¹H-RMN del producte majoritari no es corresponia amb el producte N-alquilat esperat. En aquest espectre en lloc del senyal que hauria de correspondre al nou grup N-CH₂, es va observar un senyal a δ 4,66 corresponent a un únic protó. El producte es va caracteritzar com a 3-pentil-2-(3,5-dimetilfenil)-hexahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-2-ona gràcies als espectres de RMN bidimensionals (COSY i HSQC). El producte minoritari de la reacció va resultar ser el producte d'alquilació esperat. S'havia format doncs un sistema bicíclic inicialment no previst.

Un dels factors que sovint s'ha relacionat amb l'obtenció d'enantioselectivitats elevades és la rigidesa del SQ.^{56,57} Per aquest motiu, a la vista de l'anterior resultat es considera d'interès explorar l'enantioselectivitat d'aquest tipus d'esquelet i, per tant, ens plantejarem la síntesi i avaluació com a SQ de molècules en les que l'esquelet de prolina quedés incorporat en un sistema bicíclic d'aquest tipus (Figura 3.7). La modificació esmentada implica addicionalment l'eliminació d'una de les funcions amida de la molècula, la qual cosa pot contribuir també a incrementar la solubilitat dels productes resultants en reduir-ne la polaritat. Tot i així, l'eliminació d'aquesta funció podria comprometre la capacitat d'enantioreconeixement dels selectors resultants ja que, tal i com s'ha vist en diferents estudis, l'establiment d'un pont d'hidrogen amb el

racemat a separar,^{54,77} sembla jugar un paper clau en el procés de reconeixement quiral

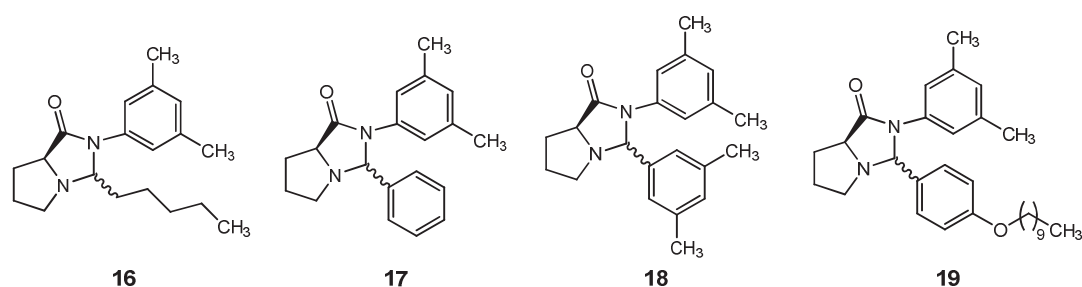


Figura 3.7. Estructura dels SQ proposats.

No obstant, en una petita recerca bibliogràfica realitzada sobre aquestes estructures es va poder veure que, malgrat l'absència de protó en la funció amida en derivats de L-prolina anàlegs als proposats, aquests compostos mantenen la seva capacitat per a actuar com a catalitzadors enantioselectius en diferents tipus de reaccions, tant com a catalitzadors orgànics propiament⁸⁰ o com a lligands quirals formant complexos metàl·lics amb metalls com el pal·ladi (Figura 3.8).^{81,82}

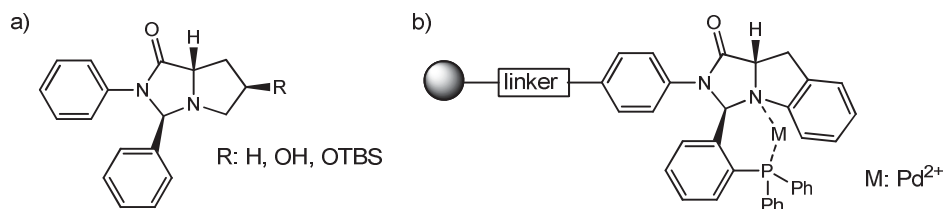


Figura 3.8. Estructura química dels derivats de L-prolina utilitzats com a catalitzadors enantioselectius en a) organocatàlisi i b) com a lligands quirals en complexos metàl·lics.

3.2.1. Síntesi dels SQs 16-19

Per tal de sintetitzar els SQs del títol s'utilitzà com a producte de partida l'amida **6**, precursor comú de tots els SQs descrits en aquest capítol. El primer derivat d'aquesta sèrie s'obtingué per reacció de **6** amb hexanal en el si de toluè anhidre durant 4 h a la temperatura de reflux. Així doncs, en absència de cianoborohidruir sòdic i condicions anàlogues a les indicades anteriorment es va obtenir únicament el producte de ciclació. Una vegada purificat per cromatografia en columna sobre gel de sílice **16** s'obtingué amb un 87% de rendiment.

Després de confirmar un valor de 301,03 m/z, corresponent a M+1 en el seu espectre de masses, l'estructura bicíclica de **16** es va poder confirmar gràcies a l'anàlisi acurada dels espectres de RMN. Així, en l'espectre de ^1H -RMN els senyals determinants per a constatar la presència de **16** foren les de δ 3,98 i 4,66 i que s'assignaren a les posicions C^{7a}H i C³H del sistema bicíclic (Figura 3.9).

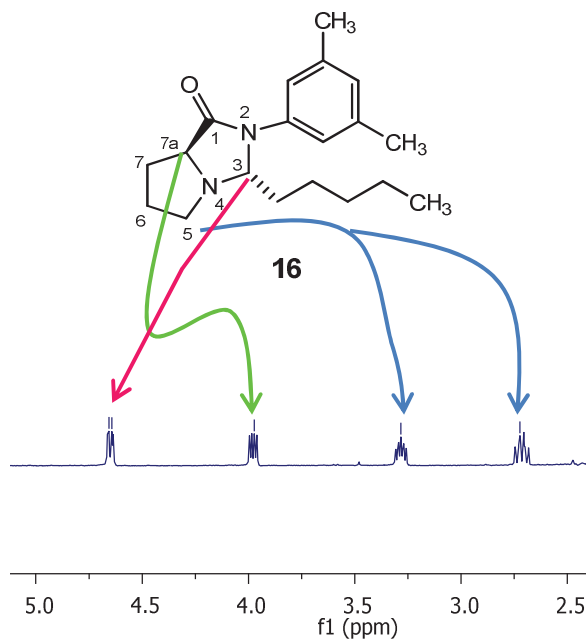


Figura 3.9. Espectre de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) de **16**.

Gràcies als espectres de 2D-RMN (gCOSY i gHSQC) es va poder confirmar l'estructura bicíclica de **16**. Així, en l'experiment gHSQC (Figura 3. 10) en el que s'observen pics correlació entre protó i carboni, s'observa la presència de dos grups CH un dels quals correspon a la posició α de l'aminoàcid, mentre que l'altre prové del nou centre estereogènic, corresponent a la posició 3 del sistema bicíclic.

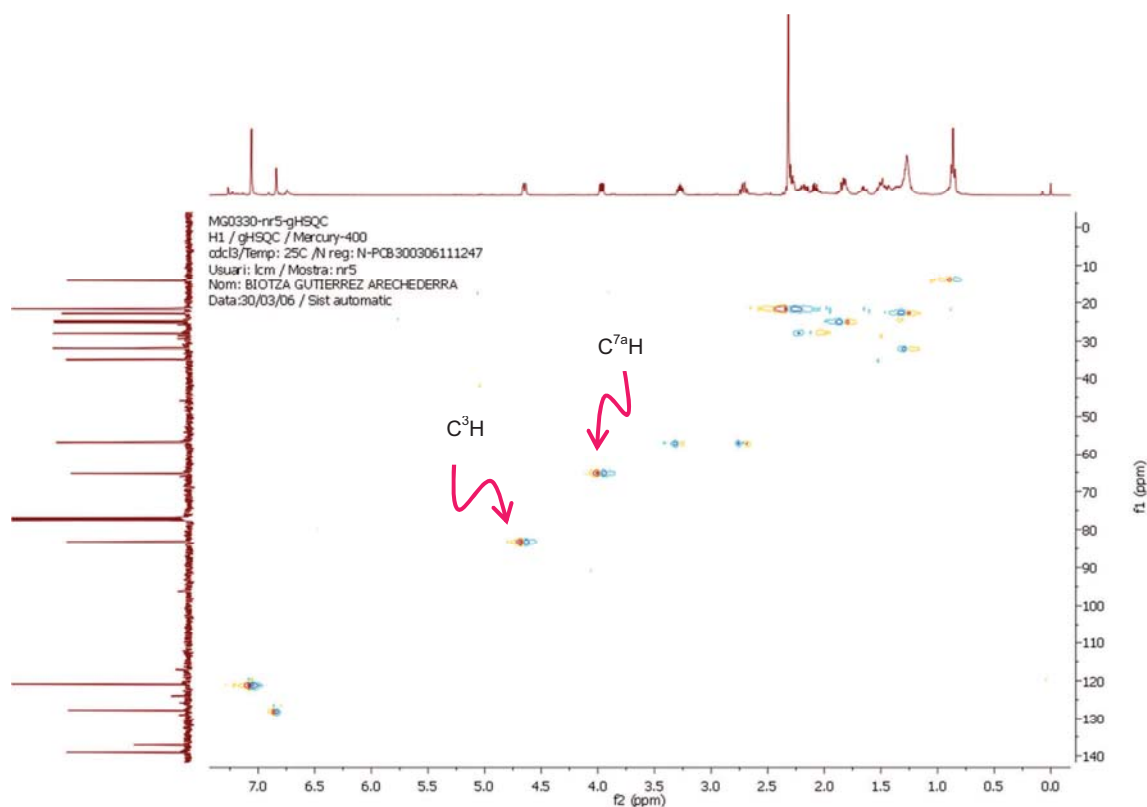


Figura 3.10. Espectre de gHSQC de **16** que ens permet distingir els diferents tipus de carbonis que conté la molècula obtinguda.

D'altra banda, l'experiment gCOSY (Figura 3.11) ens permet correlacionar els senyals que acoblen entre ells. D'aquesta manera es confirma que el senyal a δ 4,66, assignat a la posició 3 del sistema bicíclic, es troba acoblat amb senyals a δ 1,27-1,54 de la cadena alifàtica.

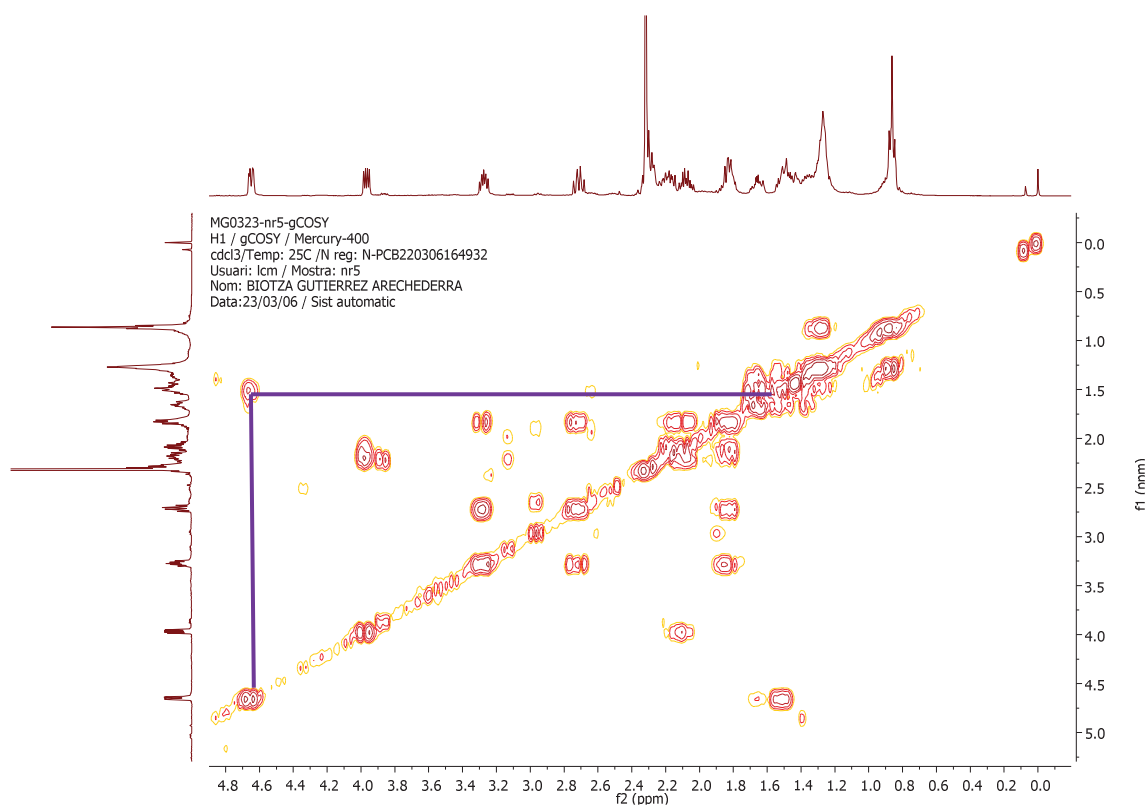
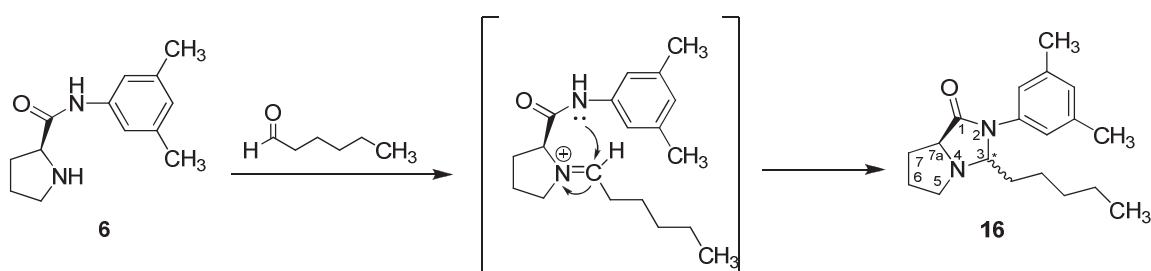


Figura 3.11. Espectre de gHSQC de **16** que ens permet determinar els protons acoblen entre ells.

El mecanisme de reacció que podria donar origen a **16** passaria a través d'un intermedi de tipus sal d'imini, originat per la reacció de l'amina amb l'aldehid, que reaccionaria posteriorment amb el parell d'electrons de l'àtom de nitrogen de l'amida, tal i com es mostra a continuació.



En aquesta reacció es forma un nou centre estereogènic a la posició 3. Atès que es coneix la configuració del centre estereogènic de la posició 7a (*S*), que es correspon amb el que aporta l'aminoàcid L-prolina, podem proposar una configuració *R* per aquest nou centre en base al mecanisme pel qual tindria lloc la reacció de ciclació. Així, és pot esperar que el parell d'electrons de l'àtom de nitrogen ataquí al catió imini

intermedi per la mateixa cara on es troba l'amida. Atesa la natura oliosa de **16** no se'n va poder confirmar l'estereoquímica en aquest moment.

Per a l'obtenció de **17**, amb la idea d'introduir un segon anell aromàtic a l'estructura, es feu reaccionar **6** amb benzaldehyd en el si de toluè anhidre en les mateixes condicions en les que es va originar **16**. A les 3h de reacció es realitzà un espectre de ^1H -RMN per tal de controlar l'evolució de la reacció. L'espectre va resultar ser més complicat que el que s'esperava (Figura 3.12). Així, es detectaren dos singlets un a δ 5,65 i un altre a un desplaçament químic de 6,35 ppm, amb una relació d'integració 1:2. Com que es podia detectar el senyal corresponent al protó de l'aldehyd de partida, es decidí continuar la reacció durant 12h. Al final d'aquest període l'espectre de ^1H -RMN només presentava un dels senyals abans esmentats, el de 5,65 ppm.

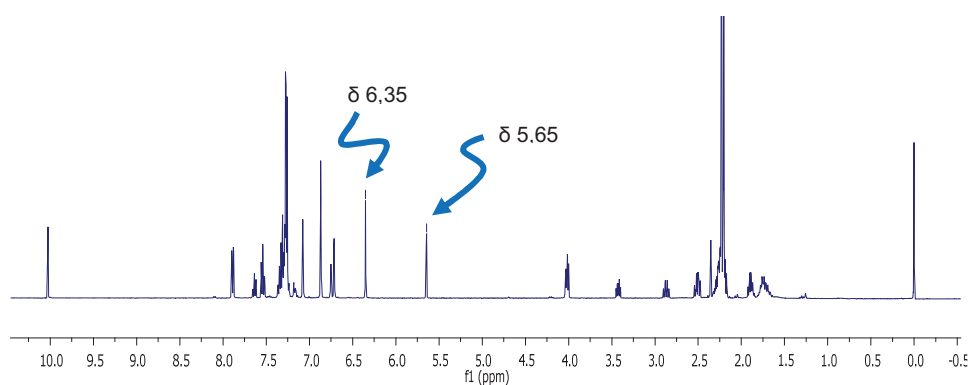


Figura 3.12. Espectre de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) del cru de reacció en la formació de **17** obtingut a les 3 h de reacció, on s'observen els dos senyals assignables al protó de la posició 3 a més del senyal de l'aldehyd indicant que la reacció no s'havia completat.

Per tal de procedir a l'aïllament del que podrien ser els dos diastereòmers de **17**, es repetí la reacció amb una durada de 3 h. Tot i que s'aconseguien aïllar compostos separats per columna de gel de sílice després de diversos intents, quedava clar que un dels compostos, el que presenta un singlet a δ 6,35, resultava inestable (Figura 3.13. a i b).

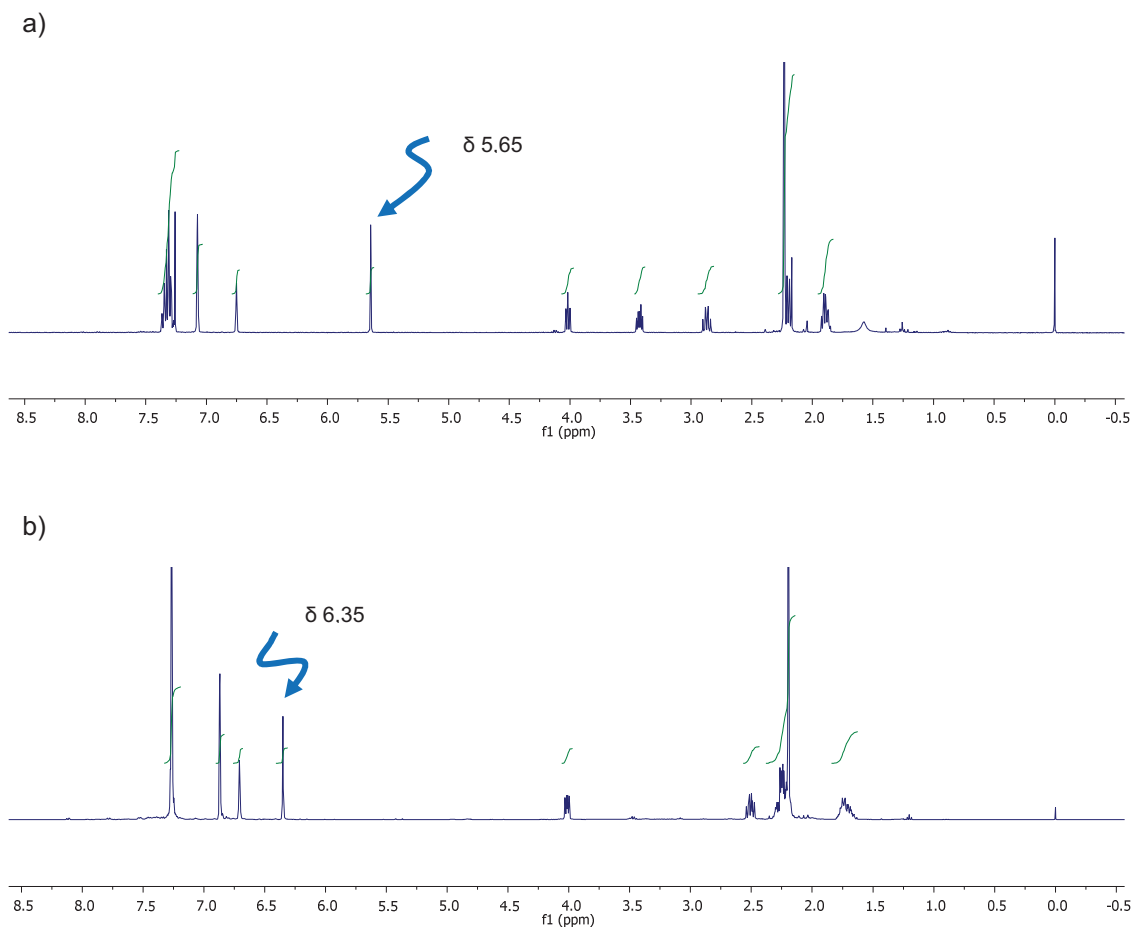
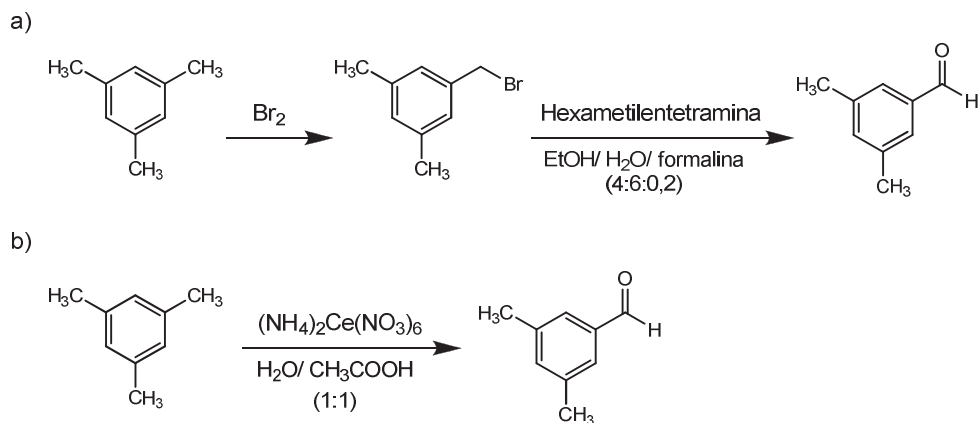


Figura 3.13. Espectres de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) dels diastereòmers de **17** a) producte majoritari i b) producte minoritari.

Malgrat la diferència observada pel que fa als senyals que s'haurien de correspondre a l'anell de pirrolidina de la prolina en els dos cassos, la natura d'isòmers dels dos compostos es va poder confirmar en base al seu espectre de masses, en els que es va determinar en cada cas un pic corresponent a $M+1$ de m/z 307,04 i 307,11, respectivament. Novament, el fet de tractar-se d'olis en va impedir determinar l'estructura per cristal·lografia de raigs X.

A continuació, es procedí a la síntesi de **18**, veritable anàleg rígid de **3**, per reacció derivat de L-prolina **6** amb el 3,5-dimetilbenzaldehyd en el si de toluè anhidre. Tot i esser comercial, atesa la fàcil oxidació, es va decidir preparar prèviament el 3,5-dimetilbenzaldehyd just abans de realitzar la reacció. S'assajaren dos procediments alternatius prèviament descrits. En primer lloc la bromació del mesitilè seguida d'oxidació ens hauria de conduir a l'aldehyd desitjat.⁸³ Malauradament, en la reacció de

bromació seguint les condicions descrites s'obtingueren, a més del producte desitjat, productes de polibromació de difícil separació. Alternativament, la formació de l'aldehid estava descrita a partir del mesitilè per oxidació amb $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ en medi àcid.⁸⁴ D'aquesta manera s'aconseguí obtenir el producte desitjat en una única etapa de síntesi i amb un rendiment del 77%.



El 3,5-dimetilbenzaldehid es feu reaccionar amb el derivat de L-prolina **6**. Com s'havia fet anteriorment, a les 3 h de reacció es realitzà un espectre de ^1H -RMN per controlar l'evolució de la reacció. S'observà la presència de dos singlets a desplaçaments químics similars als detectats en el cas de la reacció de **6** amb benzaldehid. El període de reacció s'allargà fins a les 12 h i en realitzar l'espectre de ^1H -RMN només es detectà el senyal a un desplaçament de 5,57 ppm (Figura 3.14). Després de la seva purificació per cromatografia en columna sobre gel de sílice, el producte s'obtingué amb un 85% de rendiment. Malgrat els intents d'aïllar l'altre isòmer, aturant la reacció abans de la conversió completa i cromatografiant la barreja obtinguda, en cap cas s'aconseguí.

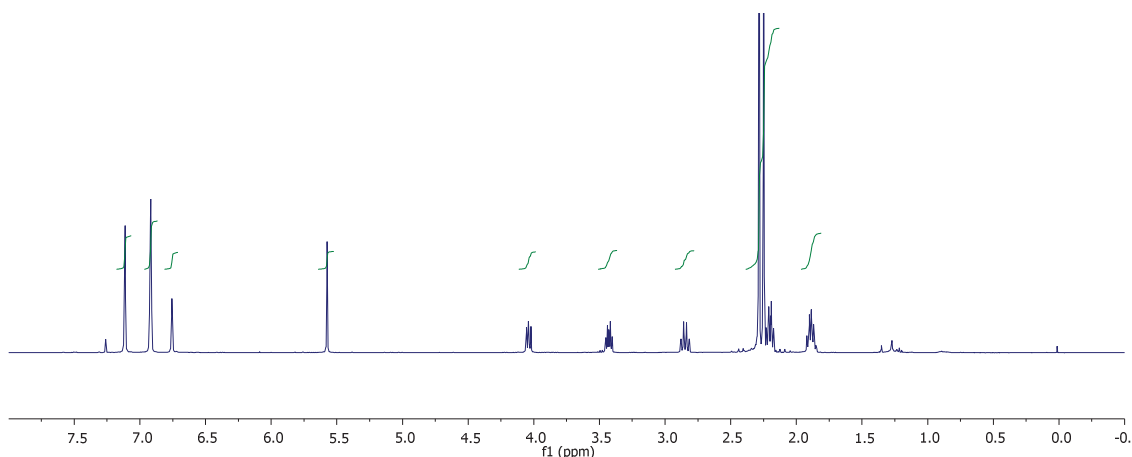


Figura 3.14. Espectre de ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) del producte **18**.

Afortunadament **18** va resultar ser un producte sòlid que es va poder cristal·litzar d'etanol/aigua. Els cristalls s'analitzaren per difracció de raigs X. D'aquesta manera es va poder determinar que el protó de la posició C³H es troba per sobre del pla de l'heterocicle, i el grup 3,5-dimetilfenil queda per sota del pla, confirmant-se que la configuració del nou centre estereogènic format és *R* en aquest isòmer (Figura 3.15).

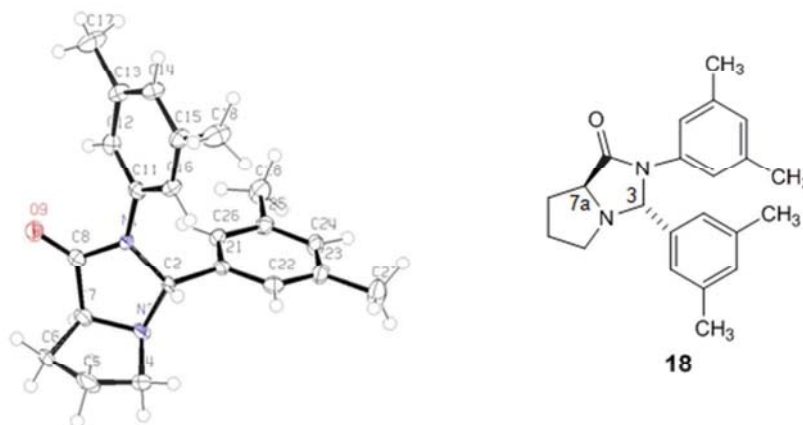


Figura 3.15. Estructura obtinguda per difracció de raigs X pel compost **18** on es mostra la configuració de la posició 3.

La confirmació de la configuració absoluta de la posició 3 en **18**, i el coneixement del desplaçament químic del senyal corresponent a aquesta posició en el espectre de ^1H -RMN, ens va permetre fer una estimació de la configuració del centre estereogènic anàleg en els compostos **16** i **17** (Taula 3.3). Així, es determinà que en **16** i **17b**

l'estereoquímica d'aquest centre era *R*, mentre que, probablement **17a** era l'isòmer de configuració *S* en aquesta posició (Taula 3.3).

Taula 3.3. Desplaçaments químics dels senyals corresponents a les posicions 7a i 3 dels anàlegs bicíclics en els espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN.

| SQ | δ ^1H -RMN (ppm) | | δ ^{13}C -RMN (ppm) | |
|------------|----------------------------------|------|-------------------------------------|------|
| | 7a | 3 | 7a | 3 |
| 16 | 3,98 | 4,66 | 65,0 | 83,0 |
| 17a | 4,02 | 6,35 | 65,8 | 79,2 |
| 17b | 4,02 | 5,64 | 64,6 | 83,9 |
| 18 | 4,03 | 5,57 | 64,5 | 84,0 |

En revisar els resultats obtinguts en la síntesi de **16** es va veure que també en l'espectre de ^1H -RMN realitzat a les 3h de reacció s'observaven dues senyals corresponents pel protó de la posició 3. Malauradament tampoc en aquest cas es va poder aïllar més que un sol dels isòmers.

Aquests resultats en el seu conjunt ens varen portar a proposar una hipòtesi pel mecanisme de formació dels dos diastereòmers que corrobora l'existència d'un intermedi de tipus sal d'imini format per reacció entre l'amina de **6** i l'aldehid corresponent en cada cas. Les dues formes isòmeres d'aquesta, *E* i *Z*, estarien en equilibri en les condicions de la reacció. Llavors, l'atac del parell d'electrons del nitrogen de l'amida sobre la sal d'imini es produiria, tal com s'ha indicat, per la cara on es troba aquest grup. D'aquesta manera s'originaria una barreja d'isòmers de configuració *R* o *S* en la posició 3, depenent de l'isòmer de la sal d'imini que rep l'atac del parell d'electrons (Figura 3.16). Si la reacció és d'equilibri i suposem una diferència d'estabilitat significativa entre els dos diastereòmers, es justificaria que a temps llargs de reacció només s'observés la formació del isòmer més estable de configuració *R* en la posició 3. Només en el cas de la síntesi de **17** s'aconseguien aïllar dos diastereòmers **17a** i **17b**, tot i que, en incrementar el temps de reacció només es detectà **17b** (Figura 3.17).

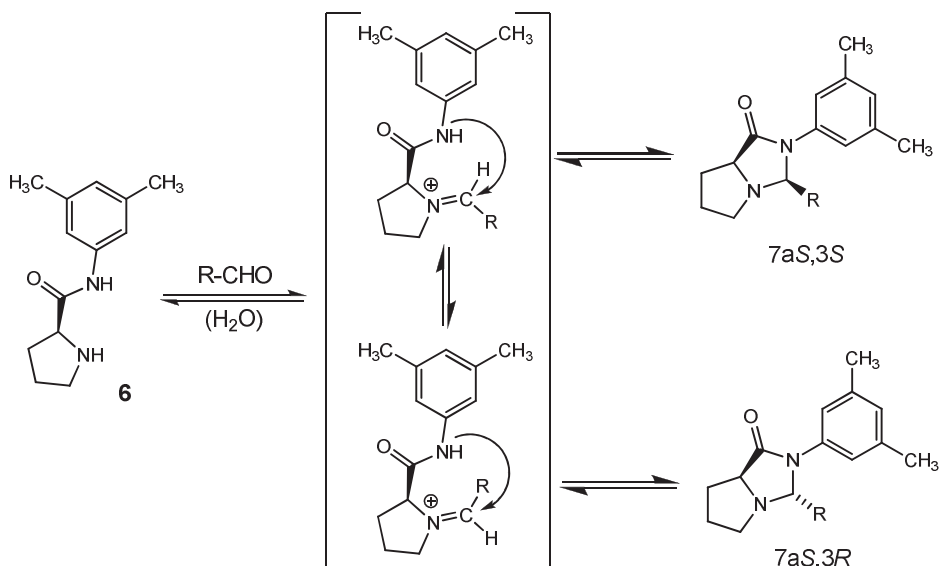


Figura 3.16. Mecanisme proposat per a la formació dels isòmers en els sistemes bicíclics estudiats.

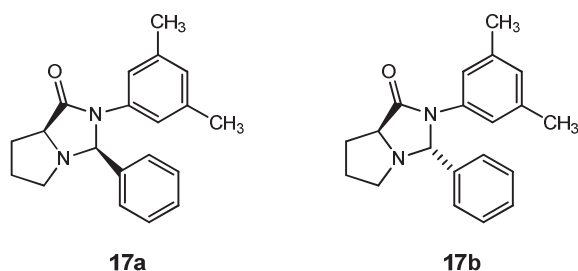
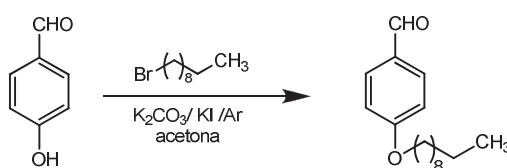


Figura 3.17. Estructures proposades pels isòmers 17.

El mecanisme de formació d'aquests derivats bicíclics implica l'existència d'un equilibri entre isòmers que difereixen en la configuració d'un centre estereogènic. Aquest equilibri podria resultar afavorit per la presència d'aigua. Atès que aquest fet podria afectar les seves propietats com a selectors enantioselectius en les condicions comunes per CCC (sistemes de dissolvents orgànic/aquós en que cadascuna de les fases està saturada per l'altra), es realitzà una prova en què **17b** es va sotmetre a aquestes condicions. Així, en un tub d'assaig que contenia 1 mL de MTBE i 1 mL de tampó fosfat sòdic 50 mM se li addicionaren 2 mg de **17b**, s'agità i es deixà a temperatura ambient durant 12 h. Passat aquest temps s'agafà una alíquota de cada fase i s'analitzà el contingut per HPLC. Únicament es detectà la presència de **17b**, fet que demostra la seva estabilitat en dissolució.

Per últim, tenint en compte els resultats cromatogràfics obtinguts amb el SQ **9**, es decidí sintetitzar un anàleg amb una cadena alquílica de 10 àtoms de carboni. Primerament es sintetitzà el 4-(deciloxi)benzaldehid per alquilació del

4-hidroxibenzaldehyd amb 1-bromodecà en acetona anhidra. El producte desitjat s'obtingué amb un 84% de rendiment.



L'aldehyd alquilat obtingut es feu reaccionar en el si de toluè anhidre amb el derivat de L-prolina **6**. Com en les anteriors ocasions s'enregistraren els espectres ^1H -RMN a les 3h i les 12 h de reacció. La purificació del cru de reacció obtingut per cromatografia en columna fou difícil. Tot i que es detectava la presència de **19** al cru de reacció, el producte es degradava durant el procés de purificació. Atès que la inestabilitat del producte durant la purificació s'atribuí al caràcter àcid del gel de sílice, es decidí tractar-lo prèviament amb dietilamina. Prenent aquestes precaucions s'aconseguí finalment aïllar el producte desitjat. L'obtenció de **19** es confirmà gràcies a l'espectre de ^1H -RMN en què s'identificaren els senyals provinents de la cadena alifàtica introduïda addicionalment. La configuració del nou centre estereogènic s'establí per comparació amb els resultats obtinguts anteriorment, ja que el desplaçament químic del protó de la posició 3 va resultar ser de 5,59 ppm, que es correspon a la forma *R*.

3.2.2. Estudis de solubilitat dels compostos 16-19 i recerca de condicions pel seu ús en CPC

Tal i com s'ha descrit anteriorment, una vegada sintetitzats i caracteritzats els nous SQs, se'n estudià primerament la solubilitat en els sistemes de dissolvents binaris: MTBE/tampó fosfat, MIBK/tampó fosfat i DIPE/tampó fosfat. Així, es volgué comparar la solubilitat de **16**, **17**, **18** i **19**, vers als valors obtinguts per als altres derivats de l'aminoàcid L-prolina que contenien l'hidrogen de l'enllaç amida. La solubilitat de **16**, **17** i **19**, de naturalesa oliosa, va ser superior als 100 mg/mL en els sistemes de dissolvents estudiats, essent la viscositat de les dissolucions obtingudes l'únic factor limitant en el seu ús. En CPC, en tractar-se d'una cromatografia líquid-líquid, la fase mòbil líquida ha de passar a través de la fase estacionària també líquida. La qual cosa fa que la viscositat d'ambdues fases sigui un element que cal tenir en compte. En estudis realitzats anteriorment en el nostre grup amb derivats de polisacàrids, s'establí que valors de viscositat superiors als 4 cP no resultaven adequats, essent els valors de viscositat acceptables a la pràctica els compresos entre 1 i 2 cP.⁸⁵

Així, es prepararen dissolucions de **16**, **17** i **19** de concentració coneguda, 100 mM, i es mesuraren les viscositats d'aquestes, que resultaren inferiors a 1 cP en tots els casos. D'aquesta manera, ens vam assegurar que la concentració de SQ en la FE que podia ésser utilitzada en els experiments cromatogràfics es trobava en uns nivells acceptables ja que, com s'ha vist, concentracions baixes de SQ poden arribar a comprometre l'enantioselectivitat.

En aquest punt de l'estudi es decidí no incloure el sistema de dissolvents format per DIPE/tampó fosfat sòdic, en mostrar els compostos anteriors una solubilitat molt baixa i no poder obtenir resultats comparatius amb les diferents famílies de SQs sintetitzats en el present treball.

Pel que fa a la solubilitat de **18**, es determinà en els dos sistemes de dissolvents seleccionats, obtenint valors de solubilitat més elevats en MIBK que en MTBE (Taula 3.4). Així, mentre en MIBK es podien dissoldre 63 mg/mL, en MTBE només es pogueren dissoldre 48 mg/mL. Tot i això, els valors aconseguits representen un augment considerable respecte als obtinguts per **3**, en les mateixes condicions.

Taula 3.4. Valors de solubilitat obtinguts pels SQs **16**, **17**, **18** i **19** en els sistemes de dissolvents seleccionats per a dur a terme l'estudi.

| SQ | MIBK | MTBE |
|-----------|-------------|-------------|
| 16 | > 100 mg/mL | > 100 mg/mL |
| 17 | > 100 mg/mL | > 100 mg/mL |
| 18 | 63 mg/mL | 48 mg/mL |
| 19 | > 100 mg/mL | > 100 mg/mL |

A continuació, es procedí a comprovar per CCF que els nous SQs sintetitzats quedaven retinguts exclusivament a la FE del sistema de dissolvents. Només s'observà repartiment en el cas de **17**, motiu pel qual no va ser inclòs en l'estudi de la seva capacitat enantiodiscriminativa per CPC, ja que el pas del SQ cap a la FM provoca una pèrdua d'aquest durant la realització de l'experiment.

3.2.3. Assaig de la capacitat d'enantioreconeixement de **16**, **18** i **19** en CPC

S'utilitzaren les mateixes condicions de treball que en l'apartat 3.1.3, per tal d'obtenir resultats comparatius. Per tant, els experiments amb els tres nous SQs es realitzaren en els sistemes de dissolvents MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 8 i MTBE/tampó

fosfat sòdic 50 mM pH 6, coincidint amb els pHs seleccionats en l'estudi anterior amb el mateix analit, la DNB-(±)-Leu.

En primer lloc es va utilitzar el sistema de dissolvents MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 utilitzant una concentració de SQ de 30 mM en els tres casos. Malgrat estar encara lluny de saturar la capacitat de càrrega dels compostos, ja que la relació molar entre el SQ i el racemat ($r_{SQ/R}$) és de l'ordre de 18 en els tres casos (Taula 3.5), no es va poder incrementar la quantitat de racèmic injectat degut a la baixa solubilitat que aquest presenta en MTBE. Per aquest motiu la injecció es realitzà en forma de suspensió en una barreja 1:1 de fase mòbil i fase estacionària.

Taula 3.5. Resum dels valors experimentals.

| Exp. | SQ | F.E. | V_{st} (mL) | SQ_{st} (mmol) | $r_{SQ/R}$ | t_1 (min) | t_2 (min) | α_{CCC}^a | R_s^a | oe |
|------|-----------|------|------------------|---------------------|------------|----------------|----------------|------------------|---------|----|
| 6 | 16 | MTBE | 138 | 4,14 | 18,00 | 150 | 160 | 1,07 | - | S |
| 7 | 18 | MTBE | 137 | 4,11 | 17,87 | 125 | - | - | - | - |
| 8 | 19 | MTBE | 136 | 4,08 | 17,74 | 135 | 140 | 1,04 | - | S |

F.E., dissolvent utilitzat en la fase estacionària; V_{st} , volum (mL) de FEQ retintut; t_i , temps de retenció de cada enantiòmer (min) corresponent a la màxima intensitat del pic; α , factor d'enantioselectivitat; R_s , resolució; oe, ordre d'elució enantiòmer que elueix en primer lloc. ^a Valors calculats sobre el perfil d'elució obtingut a través de la integració de les àrees dels cromatogrames.

En comparar els resultats obtinguts no s'observà que cap dels nous compostos presentés uns valors d' α_{CCC} destacables tot i que la durada dels experiments fos superior a les 2 h. El valor més elevat es va obtenir per al compost **16** ($\alpha_{CCC} = 1,07$). No obstant, va resultar interessant observar la inversió en l'ordre d'elució que aquests nous compostos produïen. Tots els SQs derivats de la L-prolina utilitzats fins el moment en el nostre grup per la separació de la DNB-(±)-Leu mostraven una afinitat més elevada per l'enantiòmer S, que conseqüentment resulta més retintut. En canvi en aquest cas, tal i com es pot veure en la Figura 3.18, es detecta en primer lloc la forma S. La qual cosa implica una interacció més forta entre el SQ i la forma R. Aquest fenomen ens indica que el mecanisme d'enantioreconeixement és diferent en els nous SQs més rígids.

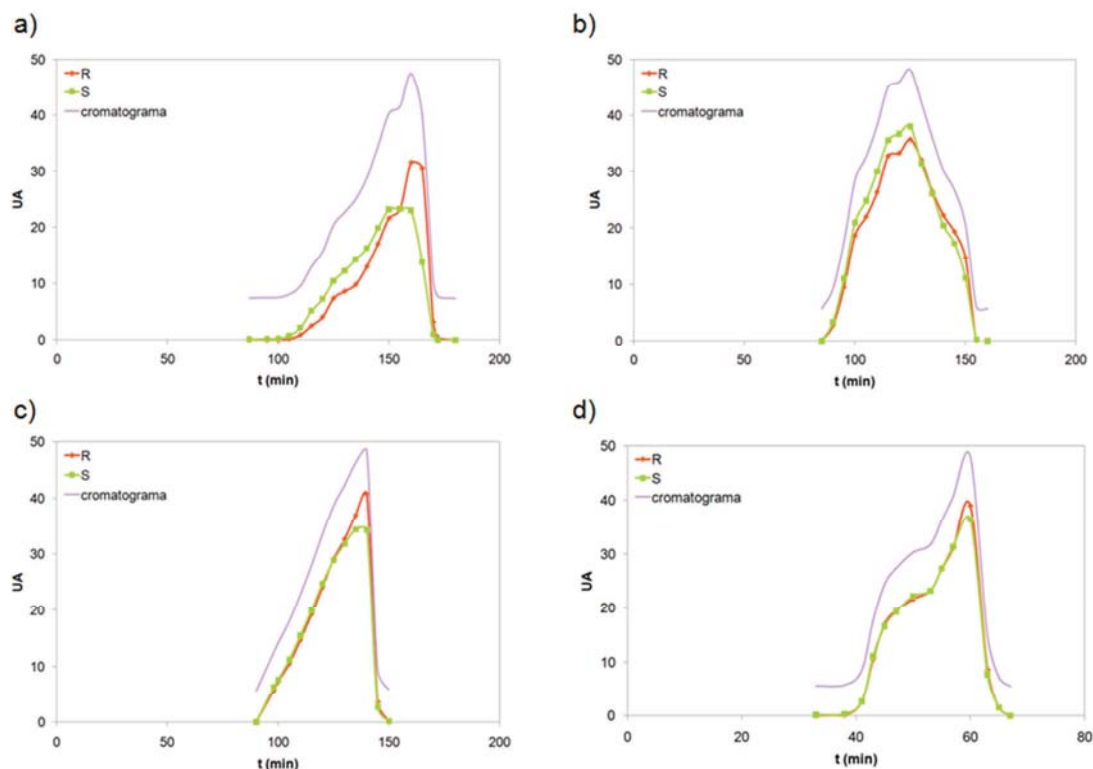


Figura 3.18. Perfils d'elució de **16** a), **18** b) i **19** c) en MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 i **16** d) en MIBK/tampó fosfat sòdic pH 8 en la separació de 75 mg (0,23 mmol) de DNB-(±)-Leu, flux: 3 mL/min, ω 1100 rpm a una concentració de 30 mM de SQ.

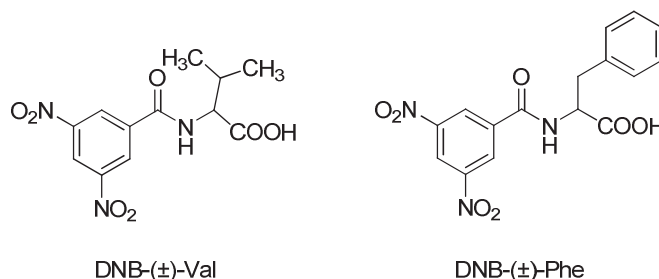
Atesa la baixa enantioselectivitat observada en MTBE/tampó fosfat, només **16** es va assajar en MIBK/tampó fosfat, medi en el que aquest SQ perd completament la capacitat enantioselectiva (Figura 3.18 d).

3.2.3.1. Avaluació de la capacitat d'enantiodiscriminació de **16** envers altres derivats d'aminoàcids racèmics.

En base als resultats obtinguts establirem dues noves línies de treball que es desenvoluparen de forma paral·lela amb objectius diferents. D'una banda, es volgué esbrinar si la inversió en l'ordre d'elució que produïen aquests nous compostos era un fet aïllat, o si per contra, també s'observava a l'estudiar altres analits. D'altra banda, mitjançant l'aplicació de diferents modes de treball en CCC/CPC alternatius al mode clàssic, es volgué intentar millorar la capacitat d'enantioreconeixement de **16**.

Així, en la primera línia de treball s'incloueren en l'estudi dos nous racèmics la *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-(±)-valina (DNB-(±)-Val) i la *N*-(3,5-dinitrobenzoïl)-(±)-fenilalanina

(DNB-(±)-Phe). Els dos compostos, conserven l'anell de 3,5-dinitrobenzoïl que previsiblement podria interaccionar amb l'anell de 3,5-dimetilfenil del SQ. Així, s'abordà la separació d'aquests racèmics en les mateixes condicions utilitzades per DNB-(±)-Leu.



La necessitat d'analitzar les fraccions obtingudes de l'experiment de CPC fa necessari disposar d'unes condicions d'anàlisi dels enantiòmers. A l'igual que en el cas de la DNB-(±)-Leu, es realitzà una recerca per tal de trobar unes condicions analítiques per HPLC que ens permetin separar fins a la línia de base els enantiòmers dels analits seleccionats. Així, s'utilitzà la mateixa columna que en el cas anterior, és a dir, la que conté l'*N*-(3,5-dimetilfenil)-(4*R*)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolinamida com a FEQ i la barreja d'heptà/2-propanol/TFA (90:10:0,5) com a FM amb la que s'aconseguí una separació total dels dos pics en ambdós cassos (Taula 3.6).

Taula 3.6. Resultats cromatogràfics, utilitzant la columna que conté com a FEQ l'*N*-(3,5-dimetilfenil)-(4*R*)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolinamida.

| Racemat | K'_1 | α | R_s |
|-------------|--------|----------|-------|
| DNB-(±)-Val | 0,29 | 14,45 | 11,04 |
| DNB-(±)-Phe | 1,10 | 1,59 | 3,10 |

Com la cromatografia líquida convencional, la CCC/CPC permet fer anàlisis consecutives sense haver buidar o modificar el contingut de l'aparell. Així, els dos racèmics s'injectaren consecutivament. El més destacable d'aquests experiments és la forma irregular dels pics en les condicions de l'assaig que fan difícil calcular un valor concret tant per la retenció com per l'enantioselectivitat

Tal i com succeí per la DNB-(±)-Leu, **16** presenta uns valors d' α_{CCC} molt poc significatius, no mostrant cap enantioselectivitat front la DNB-(±)-Val i molt poca envers la DNB-(±)-Phe. Si es consideren els temps de retenció, el derivat de l'aminoàcid

valina és el que presenta un valor més baix, molt proper a t_0 ($t_0 = 15,6$). La baixa retenció podria ser l'origen de la baixa enantioselectivitat com a conseqüència de la poca interacció que es produiria entre el SQ i l'analit. No obstant, aquest no és el cas per DNB-(±)-Phe, molt més retinguda però que també presenta una enantioselectivitat molt baixa.

Tot i no aconseguir separar cap dels dos analits, pel derivat de fenilalanina es pot entreveure que l'enantiòmer que elueix primer és el de configuració S, la qual cosa confirmaria que el mecanisme d'enantioreconeixement d'aquests compostos és diferent al de la resta de SQs estudiats precedentment.

3.2.3.2. Intents de millora de la enantioselectivitat de 16 a través de l'aplicació de modes d'elució alternatius

Per tal d'intentar millorar la baixa separació obtinguda amb **16** es va considerar l'aplicació de modes d'elució alternatius al clàssic. Un d'ells es l'anomenat "*pH-zone-refining*" aplicable si els analits són ionitzables.^{28,30,31,43} També el mode dual (DM) o de la seva variant mode dual múltiple (MDM) s'ha utilitzat en ocasions per a incrementar la separació entre pics.^{32,37,40,41}

a) *pH-zone-refining*

Tal i com s'ha vist en la introducció, el mode "*pH-zone-refining*" fou introduït per Ito i es basa en el diferent repartiment de l'analit en funció de si està ionitzat o en la seva forma neutra. El nostre grup ja hi tenia experiència ja que s'havia aplicat anteriorment en la separació de racemats ionitzables utilitzant com a SQs derivats d'alcaloides *Cinchona* i de polisacàrids.^{28,30,31} En pretendre separar DNB-(±)-Leu, compost de caràcter àcid, a la FE orgànica s'addiciona un àcid fort (TFA, 10 mM) que actuarà retenint l'analit en aquesta fase en la seva forma no ionitzada al inici de l'experiment. D'aquesta manera es perllonga la interacció amb el SQ. Com a agent de desplaçament es seleccionà NH₄OH (5 mM) que s'afegí a la fase mòbil aquosa.

Les quantitats addicionades d'agent de desplaçament i de retenció es determinaren en base a l'estudi realitzat per Eva Pérez en la seva tesi doctoral, on observà que per a valors majors de la relació agent de retenció/desplaçament, augmenta la retenció de l'analit i millora la resolució dels enantiòmers.⁸⁵

Les condicions de treball foren les mateixes que en els experiments realitzats amb elució clàssica. Com en el cas anterior, el primer enantiòmer en eluir és el de configuració S. En comparar els experiments en mode clàssic i *pH-zone-refining* es va observar que la durada de l'experiment disminueix en el segon tot i obtenir-se una separació similar a l'obtinguda en mode clàssic.

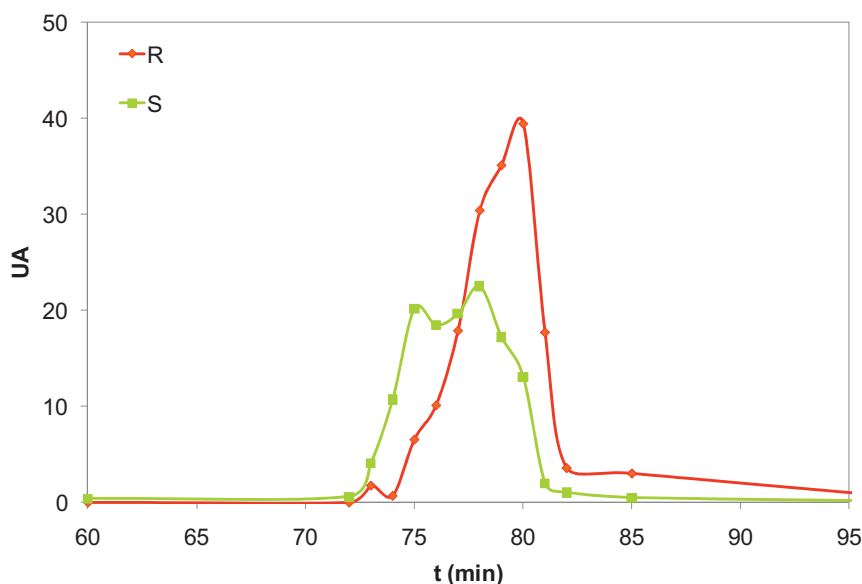


Figura 3.19. Perfil d'elució corresponent a la separació de DNB-(±)-Leu utilitzant el mode *pH-zone-refining*, en MTBE + TFA (10 mM)/H₂O + NH₄OH (5 mM), flux: 3 mL/min, ω 1100 rpm, concentració de SQ **16**: 30 mM

b) Mode dual múltiple (MDM)

El mode dual múltiple (MDM) consisteix en l'alternança de fases. Així, la fase estacionària en un moment determinat passa a actuar com a fase mòbil, i a l'inrevés. Si aquest procés d'inversió es realitza una sola vegada, es parla de mode dual (DM), mentre que si es realitza més de d'una inversió, llavors es parla de MDM. El mode DM és útil quan l'afinitat dels analits a separar en la fase estacionària és molt elevada. llavors aquesta tècnica ens permet reduir la durada de l'experiment. Aquesta metodologia ha estat utilitzada en la separació de compostos per CCC/CPC ja siguin enantiòmers o no.^{32,37,40,41}

En el nostre cas, no es tracta d'escurçar la durada de l'experiment sinó de perllongar el contacte de l'analit amb el SQ. A l'hora de dissenyar el nombre de cicles a realitzar i tenint en compte els resultats obtinguts en el mode clàssic, es va treballar fins al minut

100 en mode descendent, és a dir, en condicions normals (fase superior lipòfila com a fase mòbil). Cal tenir en compte que el que aquí es descriu és una modificació del que correntment es considera DM, ja que la inversió de les fases es produeix abans de que tingui lloc l'elució de cap analit. Així, es realitzà una inversió als 115 min, treballant en mode ascendent i introduint en el sistema una dissolució de SQ en MTBE de la mateixa concentració a la que s'ha omplert el dispositiu, realitzant un total de tres cicles de 15 min. A partir del minut 175, es va tornar a treballar en mode descendent (Figura 3.20).

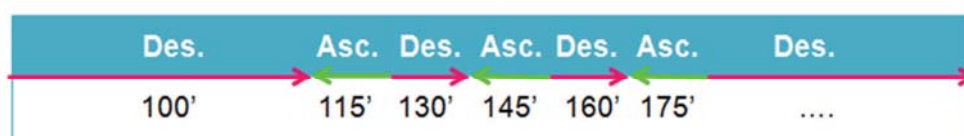


Figura 3.20. Representació dels cicles que es realitzaran en l'experiment de MDM.

Taula 3.7. Valors experimentals obtinguts en la separació de la DNB-(±)-Leu utilitzant MDM.

| Exp. | SQ | Mode | V_{st} mL | SQ_{st} mmol | $r_{SQ/R}$ | t_1 min | t_2 min | α_{CCC}^a | R_s^a | oe |
|------|----|------|----------------|-------------------|------------|--------------|--------------|------------------|---------|----|
| 12 | 16 | MDM | 149 | 4,47 | 19,43 | 261 | 286 | 1,10 | - | S |

En dur a terme l'assaig utilitzant aquestes condicions (Figura 3.20) s'aconseguí retardar la sortida de l'analit gràcies a l'alternança dels cicles, fet que provocà un augment del temps en què l'analit pogué interaccionar amb el SQ, i com a conseqüència d'aquest increment es millorà en la resolució dels seus enantiòmers. S'observa que el producte comença a sortir 30 minuts després d'instaurar el mode de treball descendent clàssic (Figura 3.21).

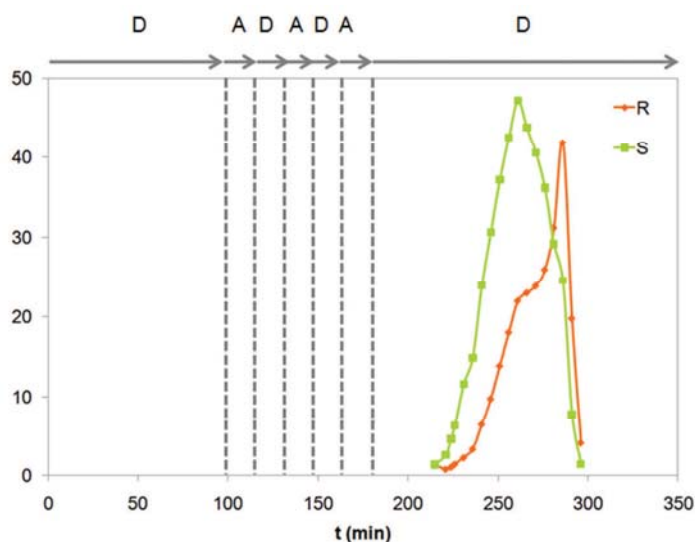


Figura 3.21. Perfil d'elució obtingut en la separació de la DNB-(±)-Leu en MDM utilitzant el SQ 16 realitzant tres cicles. D: mode de treball descendent; A: mode de treball ascendent.

Tot i semblar haver obtingut una millora de la resolució del racemat amb l'aplicació del MDM, cal destacar, l'augment en la durada de l'experiment que s'observà respecte a la durada dels altres experiments realitzats en els diferents modes d'elució, tal i com es pot veure en la gràfica comparativa arribant-se inclús a triplicar (Figura 3.22).

Per confirmar, que realment es produeix una millora en la resolució dels dos enantiòmers en MDM (Figura 3.23), s'amplià la zona dels tres perfils d'elució i es comprovà que els valors obtinguts eren similars en els tres casos. Així, es pot determinar que en obtenir resolucions similars, el mode de *pH-zone-refining* és en aquesta ocasió el més òptim al tenir una durada inferior a la des altres dos modes i obtenir-se una resolució similar.

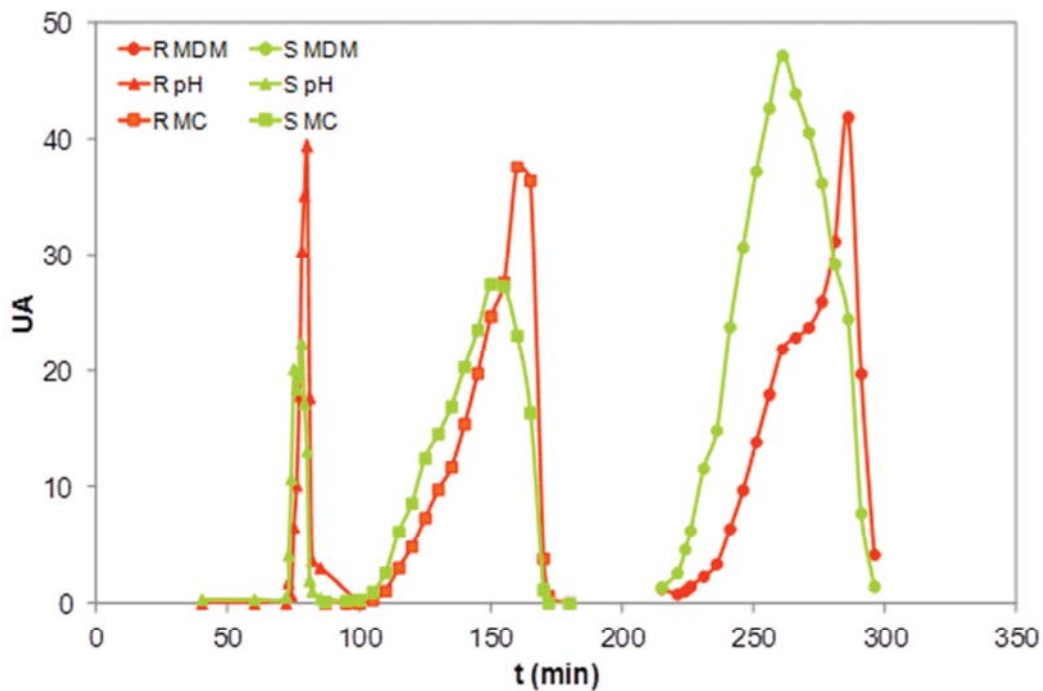


Figura 3.22. Comparació dels perfils d'elució obtinguts a l'aplicar els següents modes d'elució d'esquerra a dreta en funció de com apareixen en la gràfica en funció de la durada de l'experiment: pH (*pH-zone-refining*), MC (Mode Clàssic) i MDM (Mode Dual Múltiple).

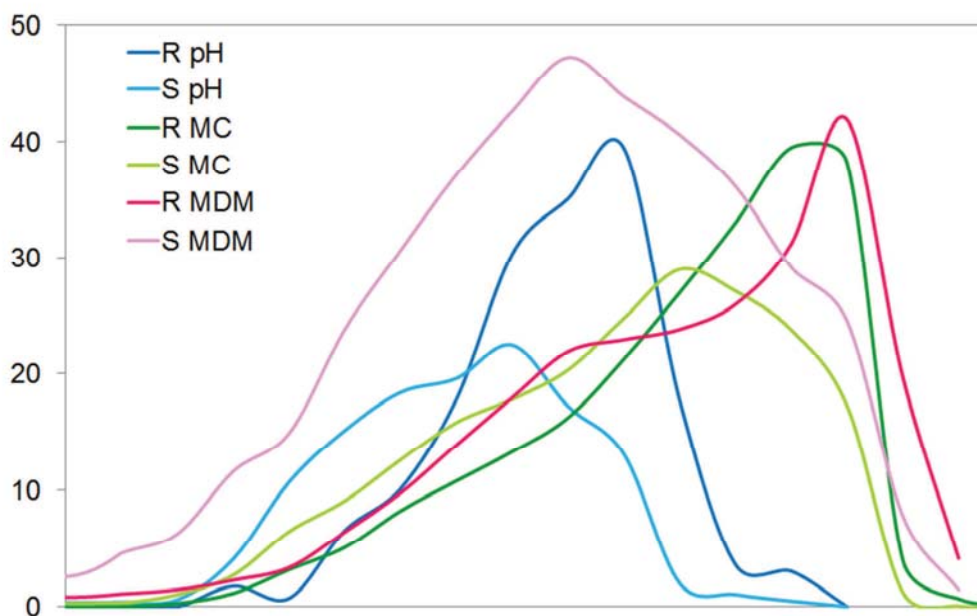


Figura 3.23. Ampliació dels perfils d'elució obtinguts aplicant els diferents modes: mode clàssic (MC); *pH-zone-refining* (pH) i mode dual múltiple (MDM).

Al realitzar la superposició dels perfils d'elució obtinguts en els tres modes d'elució estudiats per a la separació de la DNB-(±)-Leu, l'amplada dels pics és molt semblant en el cas del MC i MDM, tot i que en aquest últim mode es veuen més separats. Per contra, en el cas de l'elució en *pH-zone-refining* s'observen pics més estrets, a l'hora que la durada de l'experiment és més curta en comparació amb els altres dos experiments.

Per tant, es pot concloure que el *pH-zone-refining* és sens dubte el millor i que, en aquest cas, MDM tot i que incrementa lleugerament la separació, aquesta millora es discutible ja que s'allarga la separació, a la vegada que incrementa el consum de dissolvent.

3.3. Variació del factor d'enantioselectivitat en funció de la concentració de selector quiral present en la fase estacionària

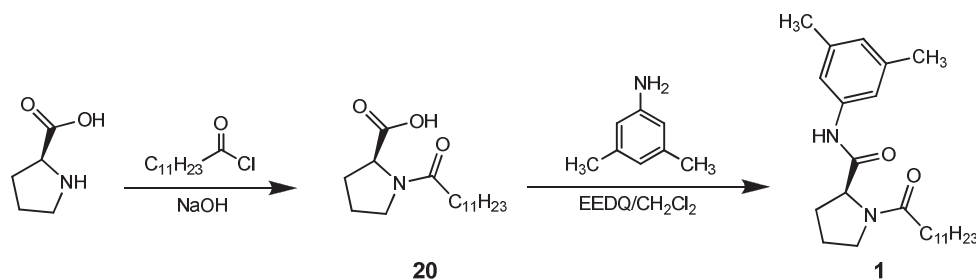
Es coneguda la dependència entre el valor de enantioselectivitat i la concentració de SQ emprat en la separació.²¹ Aquesta dependència és creixent i arriba al seu valor màxim coincidint amb el quocient de les constants d'associació de cadascun dels enantiòmers amb el SQ.

$$\alpha = \frac{\{1 + [SQ]_{org}K_{a-}\}}{\{1 + [SQ]_{org}K_{a+}\}}$$

Per tal de veure si s'havia assolit el valor màxim d'enantioselectivitat a la concentració utilitzada amb els SQ **16**, **18** i **19**, Es va realitzar la separació de DNB-(±)-Leu utilitzant concentracions creixents d'aquests selectores quirals. Amb finalitat comparativa s'incloué en el treball el SQ **1**, el qual ha estat àmpliament utilitzat en CCC/CPC en la separació de la DNB-(±)-Leu i amb el que s'ha obtingut la seva resolució fins a línia de base.^{21,24,25,26}

3.3.1 Síntesi de **1**

La síntesi de **1** es realitzà seguint l'esquema que es mostra a continuació:²⁴



Així, en primer lloc es procedí a la formació de l'enllaç amida per reacció del clorur de dodecanoïl amb L-prolina en medi bàsic per donar **20**. Aquest es feu reaccionar després amb la 3,5-dimetilfenilaniolina en presència d'EEDQ com a agent d'acoblament per a obtenir *N*-dodecanoïl-*N'*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida (**1**).

3.3.2. Planificació i realització dels experiments per tal de calcular el valor del factor d'enantioselectivitat d'**1**, **16**, **18** i **19**

En aquest estudi s'establí 2,5 mM com a concentració mínima de la dissolució de SQ, mentre que la concentració màxima es fixà en funció de la solubilitat que presenten els diferents compostos en el sistema de dissolvents seleccionat (Taula 3.8). Així, s'utilitzà MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6. La quantitat d'analit injectada es mantingué constant al llarg de tot l'estudi (75 mg, 0,23 mmol). Les altres condicions de treball foren les utilitzades amb anterioritat.

Taula 3.8. Concentracions dels SQ utilitzades en la determinació del factor d'enantioselectivitat (α).

| Concentració (mM) | SQ |
|----------------------|----------------------|
| 2,5 | 1, 16, 18, 19 |
| 5 | 1, 16, 18, 19 |
| 10 | 1, 16, 18, 19 |
| 30 | 1, 16, 18, 19 |
| 50 | 1, 16 |
| 100 | 16 |

Tal i com es pot comprovar en la Figura 3.24, en el cas de **1** en augmentar la concentració de la dissolució de SQ s'incrementa clarament el valor del factor

d'enantioselectivitat, essent 100 mM la dissolució més concentrada utilitzada en el present treball. Així, a concentracions baixes, la resolució dels dos enantiòmers no es completa, cosa que si succeeix a concentracions superiors a 10 mM.

Aquest increment en el valor d' α_{CC} , és molt més moderat per **16**, ja que tot i arribar a utilitzar una concentració de 100 mM el màxim d'enantioselectivitat s'assoleix a una concentració molt més baixa. El mateix succeeix en l'avaluar **19**. Per contra, no s'observa cap millora en incrementar la concentració de **18** que no mostra enantioselectivitat front l'analit seleccionat.

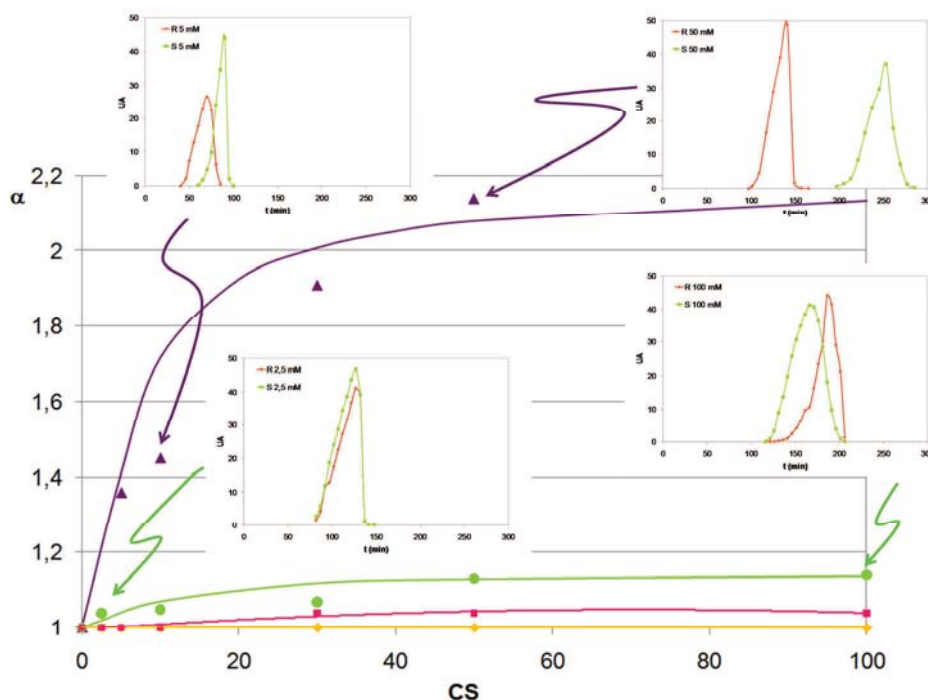


Figura 3.24. Representació gràfica dels valors del factor d'enantioselectivitat (α) obtinguts experimentalment per CPC: lila, **1**; verd, **16**; rosa, **19** i groc **18**.

En incrementar la concentració de SQ present en la FE, no només s'observa un augment en el valor d' α_{CC} , sinó que també s'incrementa el temps de retenció de l'analit en el sistema estudiat. Aquest fet es produït com a conseqüència de l'augment de SQ disponible per interaccionar amb l'analit (Figura 3.25).

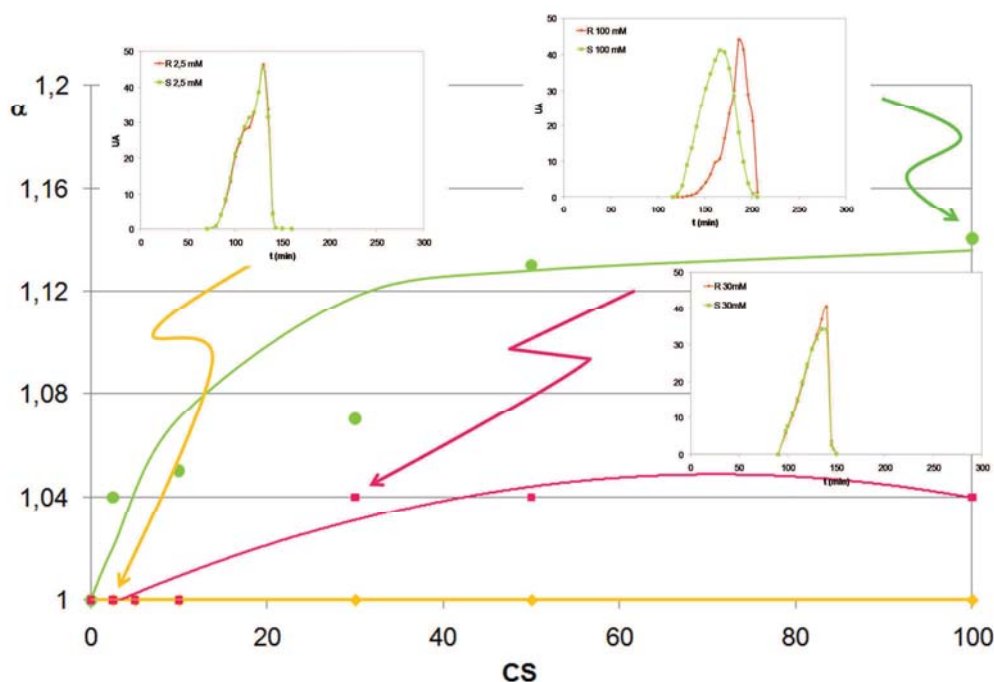


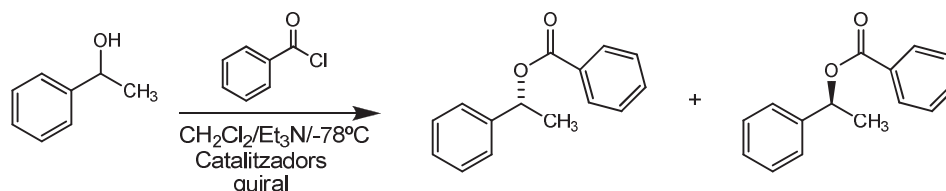
Figura 3.25. Ampliació de la representació gràfica dels valors del factor d'enantioselectivitat (α) obtinguts experimentalment per CPC: verd, **16**; rosa, **19** i groc **18**.

No obstant, aquest increment en el temps de retenció no és general. Així, malgrat incrementar la concentració del SQ **18**, es detecta l'inici de l'aparició del primer enantiòmer a eluir sobre el minut 80. La qual cosa sembla indicar que no només la interacció de l'analit amb aquest SQ no és enantioselectiva, sinó que també és molt feble, raó per la qual la disponibilitat de més quantitat de SQ no produeix l'efecte esmentat. El cas contrari s'observa pel SQ **1**, pel qual es produeix l'increment del temps d'aparició del primer enantiòmer a eluir en incrementar-ne la concentració.

3.3.3. Estudi d'altres aplicacions del SQ **16**

Degut a l'analogia de **16** amb les estructures descrites per Uozumi i col·laboradors com a catalitzadors quirals en síntesi enantioselectiva, es va voler estudiar la seva possible utilitat en aquest camp.^{80,86}

Per aquest motiu es seleccionà la reacció de benzoïlació d'alcohols. Es tracta de la benzoïlació d'un alcohol secundari mitjançant un procés d'organocatàlisi seguint les condicions descrites a la bibliografia.⁸⁷



Una vegada s'obtingueren les condicions de separació quiral per HPLC del (\pm)-1-feniletanol i del (\pm)-benzoat d'1-feniletil es procedí a l'assaig de la capacitat de **16** com a catalitzador quiral en aquesta reacció (Figura 3.26).

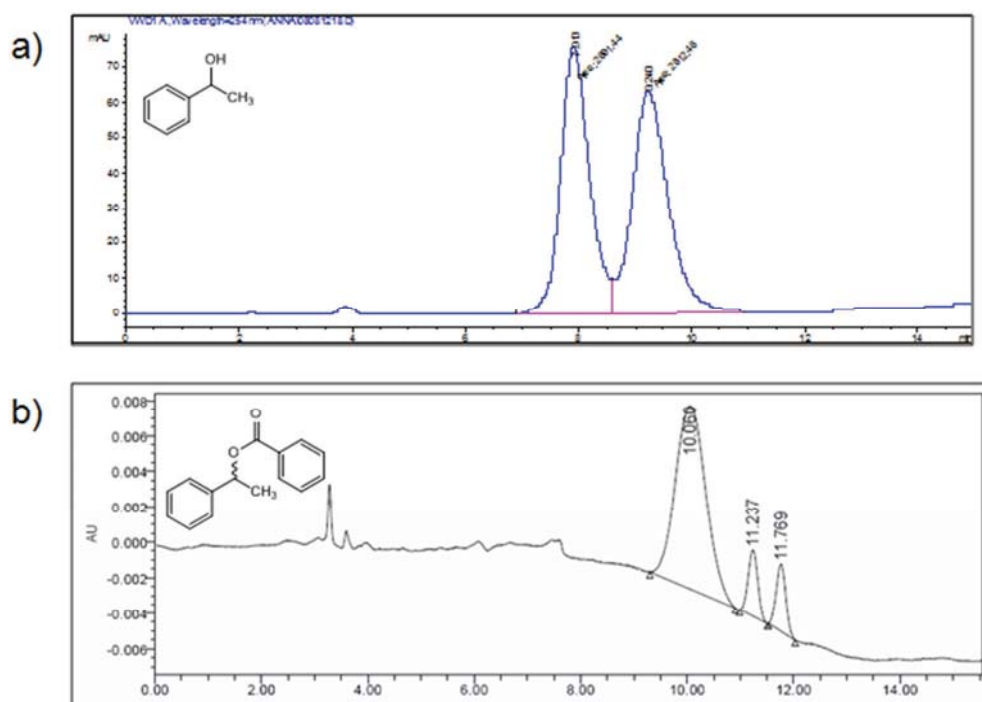


Figura 3.26. Cromatogrames obtinguts per a la separació quiral mitjançant HPLC de : a) (\pm)-1-feniletanol utilitzant com a fase estacionària quiral: CHIRALCEL[®] OD (3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa). Fase mòbil: heptà/isopropanol/dietilamina (95:5:0,2). Flux: 1mL/min. Longitud d'ona: 254nm; b) (\pm)-Benzoat d'1-feniletil fase estacionària quiral: CHIRALCEL[®] IA (3,5-dimetilfenilcarbamat de cel·lulosa). Fase mòbil: heptà/isopropanol/dietilamina (98:5:0,2). Flux: 1mL/min. Longitud d'ona: 254nm.

A continuació, es procedí a la realització de la reacció en la que es va seleccionar l'alcohol descrit anteriorment, i com a catalitzador, la (7aS)-2-(3,5-dimetilfenil)-3-pentilhexahidro-1H-pirrolo[1,2-c]1-imidazolona (un anàleg rígid de la L-prolina).

Primer de tot es va preparar una dissolució de 0,05 mmol del catalitzador seleccionat en 1 mL de diclorometà i es va afegir el tamís molecular de 4Å activat. Es fa atmosfera

inert d'argó i es va portar la barreja de reacció a -78 °C. Un cop es va assolir la temperatura desitjada es va addicionar seguint sempre el mateix ordre, 1 mmol de l'1-feniletanol dissolt en 1 mL de diclorometà i 0,5 mmol de trietilamina també dissolta en 1 mL de diclorometà.

Per tal d'establir el temps òptim de reacció, es van extreure alíquotes de 100 µL del medi de reacció a les 2h, 3h, 4h i 6h. Es va realitzar el *work-up* afegint tampó fosfat 0,5 M de pH=7 i es va fer una extracció amb diclorometà de la fase aquosa. La fase orgànica es va analitzar per HPLC quiral utilitzant les condicions analítiques descrites anteriorment.

En analitzar els resultats obtinguts per HPLC quiral no es va observar cap excés enantiomèric. A més, es va observar que la benzoïlació de l'1-feniletanol en aquestes condicions era molt lenta, ja que a les 24 hores només es va detectar un 10% de producte benzoïlat de forma racèmica.

Tot seguit, es va procedir a realitzar la mateixa reacció, però utilitzant com a dissolvent toluè i acetonitril. Els resultats obtinguts van ser similars. Es va observar que només es detectava la forma racèmica de l'èster i en un percentatge igual a l'obtingut anteriorment.

Així doncs, **16** no va resultar enantioselectiu com a catalitzador quiral en la benzoïlació d'alcohols en les condicions assajades.

**4. Disseny de SQs
que contenen dues unitats
de L-prolina**

4. Disseny de SQs que contenen dues unitats de L-prolina

Tot i aconseguí SQs derivats de L-prolina de solubilitat incrementada respecte als existents amb anterioritat a aquesta tesi, la major part mostren una estereoselectivitat reduïda respecte a la dels originals. Una aproximació utilitzada en ocasions per tal d'incrementar l'enantioselectivitat de diversos selectors quirals ha consistit en la utilització repetida en la mateixa unitat quiral considerada. Així, ja en el nostre grup en el marc d'un treball en col·laboració amb el grup del Prf. W. Lindner (Viena), s'havien utilitzat SQs dimèrics derivats d'alcaloides de tipus *Cinchona* (Figura 4.1) d'estructura similar al conegut catalitzador quiral de Corey.⁸⁸ En concret, en utilitzar aquests compostos en CPC per a la separació de l'herbicida diclorprop²⁹ s'aconseguí un notable increment en l'enantioselectivitat produïda respecte a la obtinguda amb el corresponent selector monomèric.²⁸

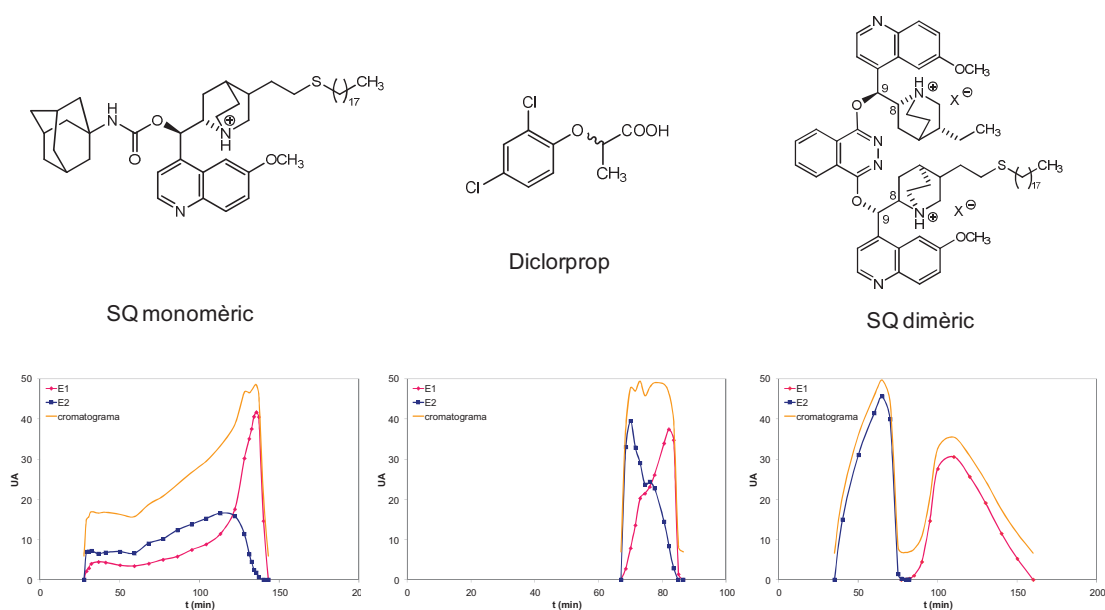


Figura 4.1. Separació dels enantiòmers de l'herbicida diclorprop per CPC: a) SQ monomèric (10 mM). Condicions: eluïció clàssica en mode descendent, sistema de dissolvents: DIPE / 2-PrOH/ NH_4AcO 0,1 M, $\text{pH} = 6,85$ (21:19:60). Racèmic: 108,5 mg; a') Eluïció en mode pH-zone refining, Sistema de dissolvents: DIPE/ 2-PrOH/ aigua, la fase estacionària conté TFA (10 mM) i la fase mòbil conté NH_4OH (20 mM). Racèmic: 108,5 mg; b) SQ dimèric (10 mM). Condicions: eluïció clàssica en mode descendent, sistema de dissolvents: MTBE/ tampó fosfat sòdic 0,1 M, $\text{pH} = 8,0$. Racèmic: 366 mg.

Pel que fa a l'aminoàcid L-prolina, Li i col·laboradors, estudiaren la capacitat d'enantiodiscriminació en HPLC de diferents FEQs el SQ de les quals era constituït per una, dues, quatre, sis o deu unitats de prolina. L'enantioselectivitat va resultar ser

linealment dependent del nombre d'unitats de l'aminoàcid incorporades en el selector, observació que reforça la validesa de l'aproximació que ara plantegem emprendre (Figura 4.2. a)).^{57, 58, 59}

També, en un estudi elaborat per Fréchet i col·laboradors s'utilitzaren dendrímers sobre els que uní un derivat de L-prolina. A més, realitzà un estudi comparatiu entre les FEQs amb SQs constituïts pel monòmer, dímer, tetràmer, octàmer i hexadecàmer en el que s'observà que l'enantioselectivitat millorava en incrementar el nombre d'unitats de L-prolina incorporades (Figura 4.2. b)).⁵⁶

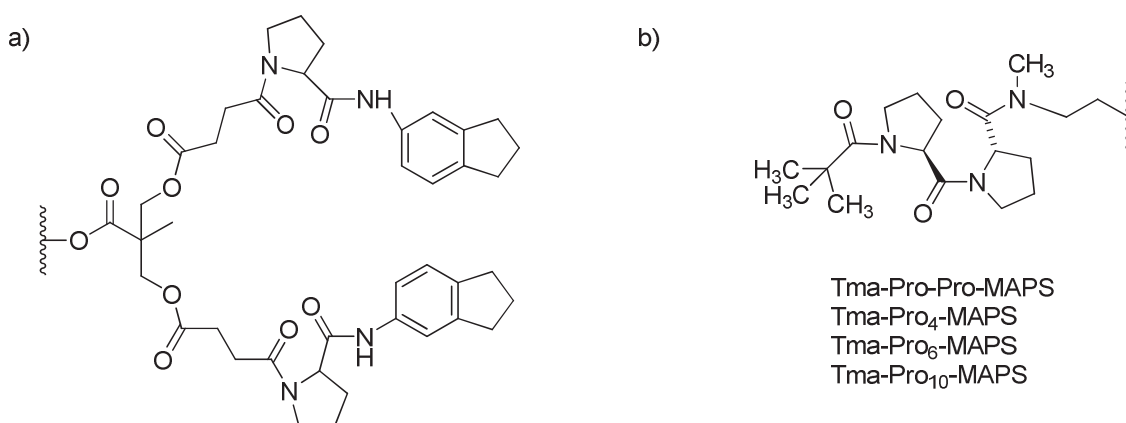


Figura 4.2. Representació esquemàtica de l'estructura dels SQs utilitzats en HPLC que contenen més d'una unitat de l'aminoàcid prolina: a) ref. 56; b) ref. 59.

Així doncs ara, ens plantegem la síntesi i l'estudi de nous SQs formats per dues unitats de l'aminoàcid prolina amb la finalitat d'incrementar-ne l'enantioselectivitat. Per tant, els resultats obtinguts en CCC es compararan amb els dels seus anàlegs amb una sola unitat de l'aminoàcid.

Classifiquem les noves estructures en dos grups. Tots els compostos tenen en comú la presència d'almenys un anell π -donador, que hauria de jugar un paper clau en la interacció amb els enantiòmers de DNB-(\pm)-Leu, el racèmic utilitzat per assajar la seva enantioselectivitat. En un dels grups es contempla l'existència d'un connector entre les dues unitats quirals (Figura 4.3). Mentre que en un segon grup, l'acoblament entre les dues unitats de L-prolina té lloc directament (Figura 4.4). Es a dir, es tracta de diprolines.

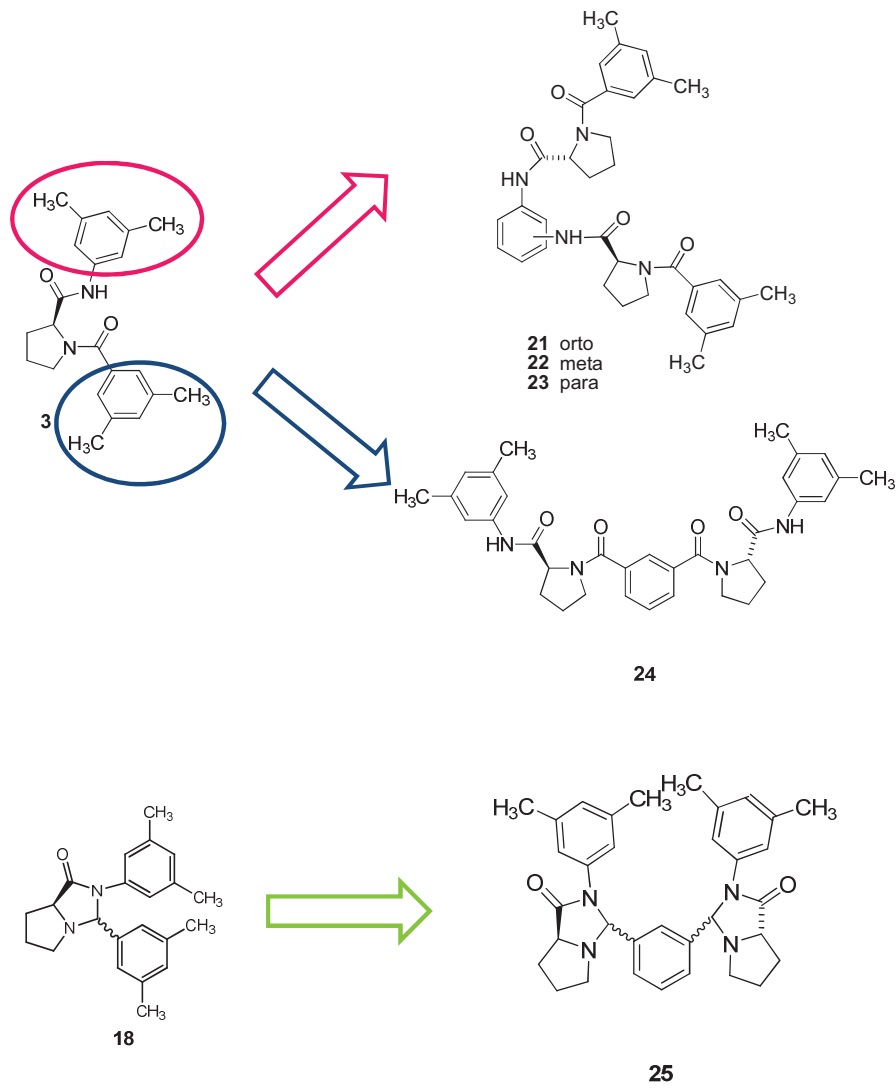


Figura 4.3. Estructures dels SQs que es proposen en els que la unió entre les dues unitats quirals es produeix a través d'un connector.

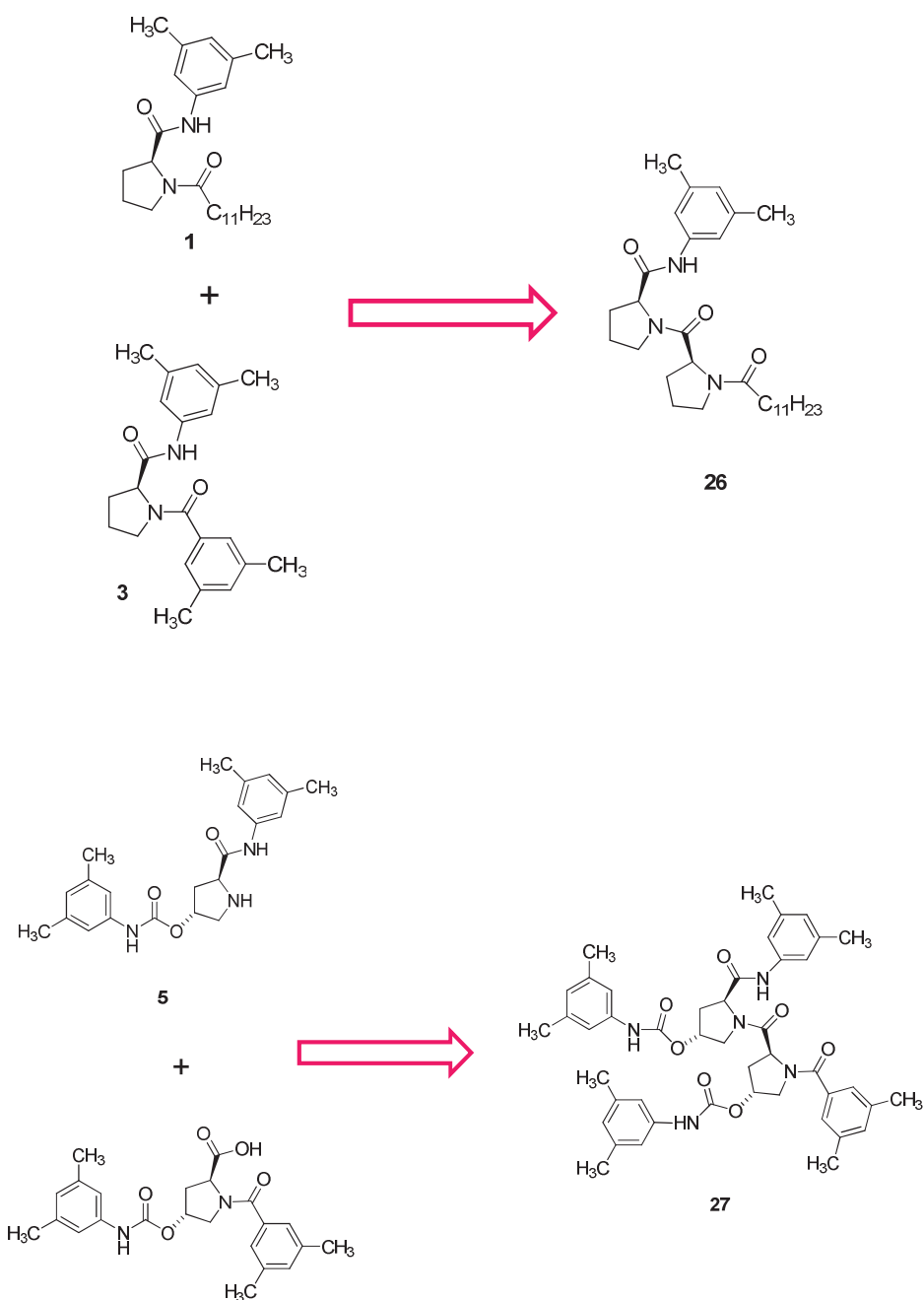


Figura 4.4. Estructures dels SQs que es proposen en els que la unió entre les dues unitats de L-prolina és directe.

El compost **25** és un anàleg dimèric dels compostos **16-19** descrits al capítol 3. Així, aquest dímer s'assembla als compostos utilitzats per Uozomi i col·laboradors com a catalitzadors quiral en diferents tipus de reaccions d'organocatàlisi o com a lligand quiral aprofitant la seva capacitat de formar complexos amb metalls com el pal·ladi en addicions de Michael (Figura 4.5).^{80,89,90,91}

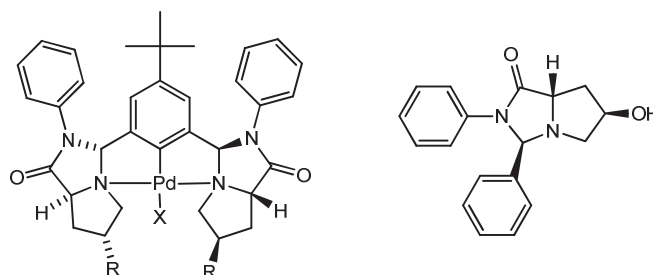
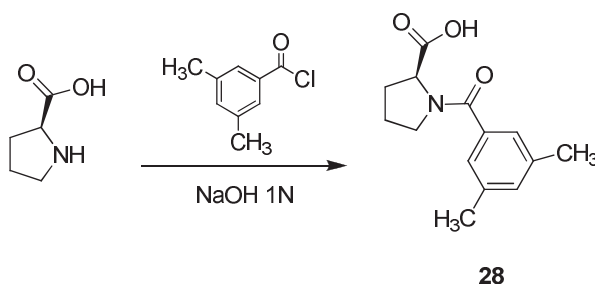


Figura 4.5. Estructura química dels derivats de la L-prolina utilitzats com a inductors de quiralitat per Uozumi i col·laboradors.⁸⁹⁻⁹¹

4.1. SQs dimèrics que contenen un connector entre les dues unitats quirals

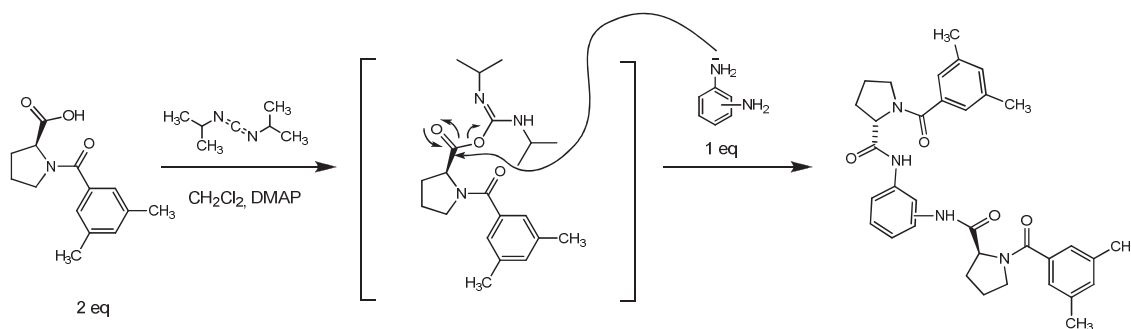
4.1.1. Síntesi dels SQs 21, 22 i 23

Per a la síntesi dels dímers **21**, **22** i **23**, es va preparar en primer lloc la *N*-3,5-dimetilbenzoïl-L-prolina (**28**) per acilació de l'aminoàcid en condicions de Schotten-Bauman. El precursor monomèric **28** s'obtingué amb un alt rendiment.⁹²



Un cop obtingut, **28** es va fer reaccionar amb la fenilendiamina adequada utilitzant EEDQ com a agent d'acoblament. Malauradament, no s'aconseguien rendiments superiors al 50% de dímer després de cinc dies de reacció. En tots els casos el producte de monoderivatització era el majoritari.

Es decidí utilitzar diisopropilcarbodiïmida (DIPCDI) en lloc de EEDQ com a agent d'acoblament en presència de *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP). La reacció té lloc a través de la formació de la *O*-acilurea que experimenta l'aminòlisi per part de l'amina donant lloc a l'enllaç amida. Cal considerar, que la reacció es portà a terme utilitzant un excés de 3 eq. d'àcid per 1 eq. de diamina per tal d'afavorir la doble reacció.



A l'igual que l'EEDQ la DIPCDI és un agent d'acoblament àmpliament utilitzat en el camp de la síntesi de pèptids en fase sòlida per a la formació de l'enllaç peptídic o enllaç amida amb rendiments satisfactoris. En el nostre cas la utilització de DIPCDI va conduir a l'obtenció dels dímers desitjats amb bons rendiments. La diferència observada en la reactivitat amb els dos agents d'acoblament, es va atribuir al volum més gran de l'EEDQ front la DIPCDI, cosa que dificulta en el cas de la primera l'obtenció del derivat activat de l'àcid i, per tant, la seva reacció posterior amb una amina voluminosa.

El rendiment obtingut per a cada un dels tres dímers fou de l'ordre del 80%, tot i que durant el procés de purificació per cromatografia en columna també s'aïllà el producte de monoreacció (< 5%). La caracterització de **21**, **22** i **23** es va realitzar mitjançant l'espectre de ¹H-RMN, observant-se diferències destacables que ens van permetre diferenciar els tres compostos pels senyals de la zona aromàtica. Mentre que en el dímer procedent de la fenilendiamina 1,4-disubstituida en aquesta zona només apareix un sol senyal procedent d'aquest anell, atès que tots els protons son equivalents (δ 7,26 ppm), en els compostos procedents de la substitució en 1,2 i 1,3, aquesta zona esdevé més complicada d'interpretar al presentar diferents desplaçaments químics els protons de les anilines. En el cas del dímer substituït en 1,2, observem dos nous senyals, ja que els protons provinents de l'anilina son iguals dos a dos, mentre que en el cas del dímer 1,3, l'aparició d'un singlet a δ 7,84 ppm ajuda a diferenciar-lo dels altres dímers sintetitzats. Aquest senyal prové del protó que es troba entre les dues unitats de L-prolina.

4.1.2. Síntesi del SQ 24

Per a la síntesi del compost **24**, es va utilitzar l'intermedi **6** preparat prèviament (Apartat 3.1.1).⁵² Així, per a l'obtenció de **24**, es seleccionà com a connector el diclorur d'isofaloiïl que es feu reaccionar amb el precursor sintetitzat, utilitzant 1 eq. del diclorur

i 2,1 eq. del derivat de prolina **6**. Aquest excés del derivat de L-prolina s'afegí per tal de potenciar la formació del producte disubstituit. A més, s'assajaren dues estratègies diferents.

En primer lloc, s'aplicaren condicions de Schotten-Bauman a temperatura ambient en medi bàsic bifàsic, obtenint el producte desitjat amb un 37 % de rendiment un cop purificat per cromatografia en columna. El baix rendiment ens va fer plantejar la utilització de condicions alternatives.

Així, la reacció es dugué a terme en piridina anhidra a 90 °C durant 27 h. Un cop purificat per cromatografia en columna **24** es va obtenir amb un rendiment del 45 %. A l'hora de caracteritzar el dímer desitjat, cal destacar de l'espectre de ^1H -RMN l'aparició dels senyals corresponents als protons provinents del diclorur d'isoftaloïl a δ 7,49, 7,61 i 7,74 ppm (Figura 4.6).

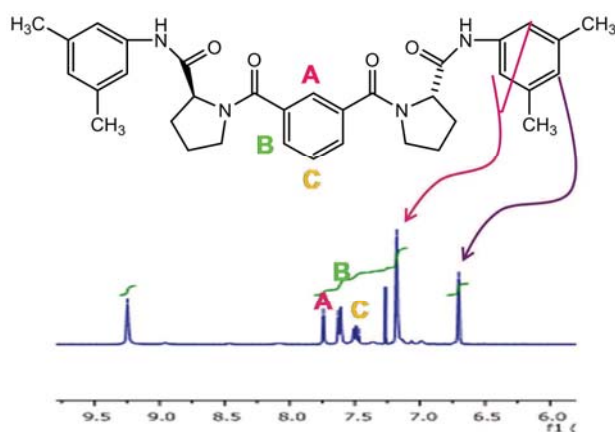


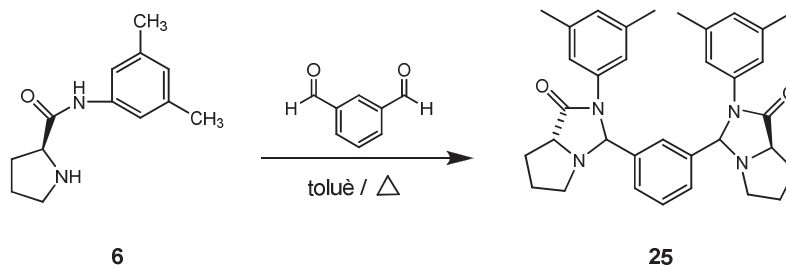
Figura 4.6. Ampliació de la zona aromàtica de l'espectre de protó, ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) del dímer **24**.

El moderat rendiment assolit en aquesta reacció aconseguit per aquest dímer, ens va fer assajar primerament la solubilitat del dímer obtingut i la seva capacitat enantioselectiva, abans de procedir a sintetitzar els anàlegs de posició corresponents.

4.1.3. Síntesi del SQ 25

Per tal de sintetitzar el compost **25**, es seguí la metodologia descrita al capítol anterior (Apartat 3.2) per a l'obtenció de **16-19**.

Així, 2,1 eq. de **6** es feren reaccionar amb 1 eq. de l'aldehid isoftàlic en el sí de toluè anhidre. A més, es decidí perllongar la reacció durant 24 h, atesa la formació d'isòmers detectada en la preparació de **16-19** en condicions anàlogues.



Tot i això, en enregistrar l'espectre de ^1H -RMN del material obtingut després de la purificació per cromatografia en columna del cru de reacció, es detectaren senyals al voltant de 10 ppm, cosa que indica la presència de grups carbaldehid romanents. En analitzar el material per HPLC s'observaren quatre pics majoritaris que podrien atribuir-se temptativament a diferents diastereòmers.

Tal i com s'ha vist en el capítol 3, els compostos epímers en el carboni de la posició 3 es poden diferenciar pel desplaçament químic del senyal corresponent al protó d'aquesta posició. No obstant, donada la complexitat de la mostra i la presència de diversos senyals en la zona de 5 a 6 ppm de l'espectre de protó, es va decidir procedir a la separació dels components per tal de caracteritzar-los.

En primer lloc, es procedí a desenvolupar un mètode adient d'anàlisi per HPLC. Després de diversos intents, es va seleccionar un procediment en fase inversa en el que es realitzava un gradient bilineal. La separació obtinguda en aquestes condicions es va considerar prou adequada per a abordar l'aïllament i posterior caracterització dels isòmers (Figura 4.7).

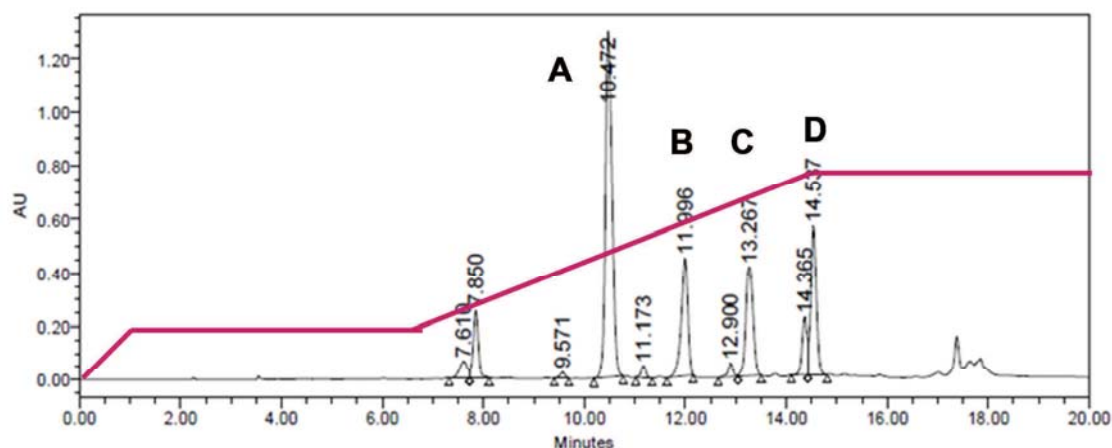


Figura 4.7. Cromatograma corresponent a la separació de **25** utilitzant el gradient bilineal: La quantitat d'ACN s'incrementa de 0 a 15 % en un minut, per en una segona fase, arribar al 50 % d'ACN al minut 14 (flux 1mL/min; UV 254 nm).

S'identificaren 4 pics majoritaris, que es designen amb les lletres A-D sobre el cromatograma. Es van recollir fraccions dels 4 pics i es va determinar el pes molecular per espectrometria de masses (MS-MALDI-TOF). Es va observar que les masses obtingudes pels 4 pics coincidien amb la massa teòrica de **25** (m/z : 535,32 i m/z : 557,31 ($M + Na$)⁺), cosa que ens indica la natura d'isòmers dels quatre compostos. (Figura 4.8).

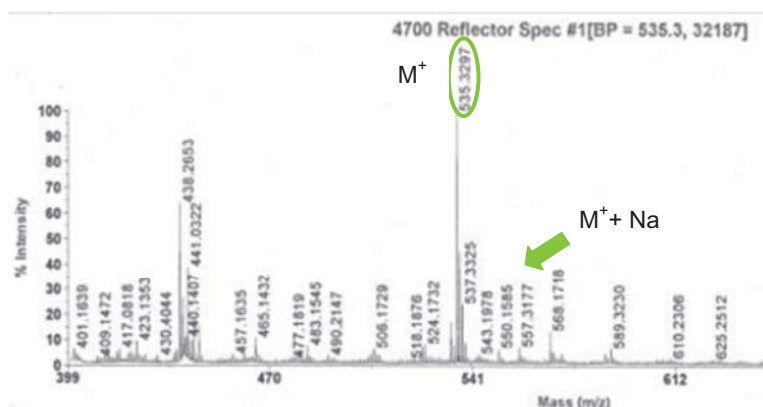


Figura 4.8. Espectre de masses de MALDI-TOF obtingut pel pic D.

Un cop confirmada la formació dels isòmers, es varen intentar aïllar en quantitat suficient mitjançant HPLC-semipreparatiu, per tal de poder caracteritzar-los posteriorment. D'aquesta manera es recuperen els 4 pics segons el perfil d'elució indicat a la Figura 4.9.

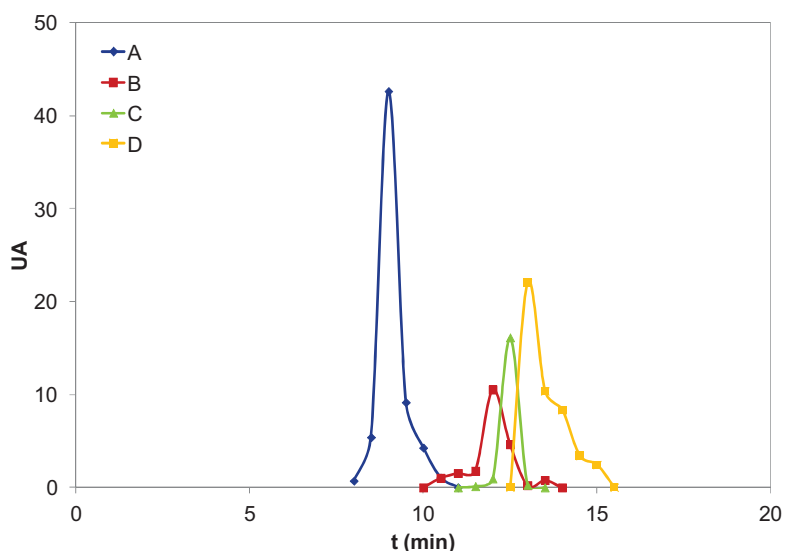


Figura 4.9. Perfil d'elució corresponent a la separació semipreparativa de la mescla de diastereòmers **25**. El perfil es construeix gràcies a l'anàlisi de les fraccions recollides. Utilitzant com a fase mòbil ACN/TFA (0,5%) i H₂O/TFA (0,5 %) un gradient en el que en un minut passava de 0 % a 15 % d'ACN en un minut i de 15-50 % d'ACN al minut 14 per retornar a condicions inicials al minut 20. Es treballà amb la columna Symmetry C₁₈ (19 x 100mm, amb sílice de tamany de partícula 5µm, Waters) i a un flux de 15 mL/min. El cromatograma s'enregistrà a dues longituds d'ona 210 i 254 nm.

En concentrar les diverses fraccions de cada pic aïllat, es va observar per **A** l'aparició de dos nous components a t_R 7,0 i 7,5. Es va comprovar que es tractava de productes de degradació, ja que es van injectar els precursors sintètics del dímer en les mateixes condicions (Figura 4.10).

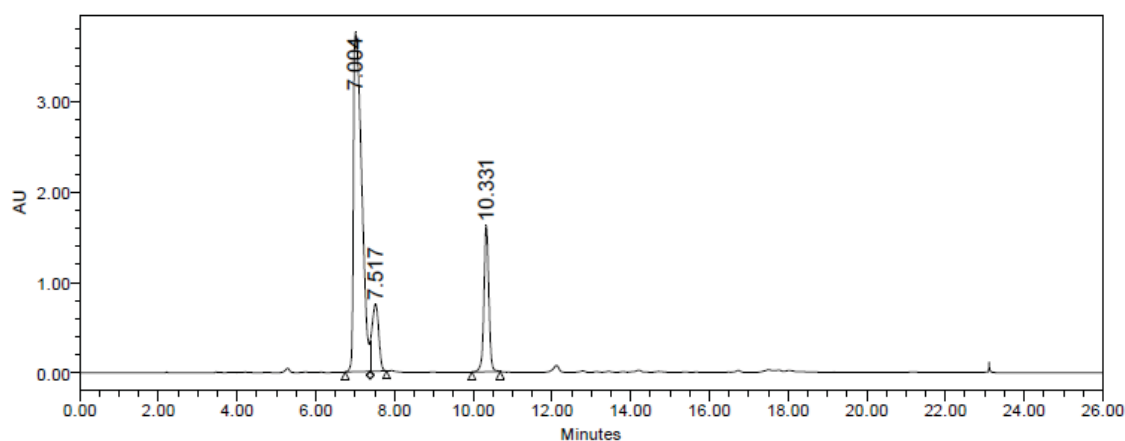
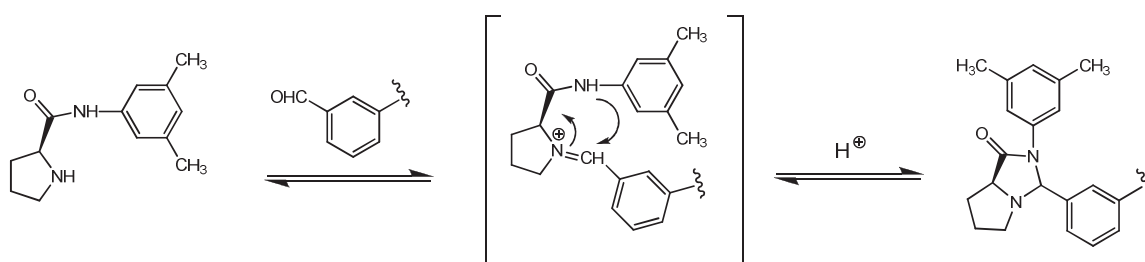


Figura 4.10. Cromatograma on s'observa la degradació del pic **A**, utilitzant el gradient descrit.

Aquests dos nous compostos es van poder assignar als productes de partida de la reacció, l'amida **6** (t_R 7,1) i el dialdehid (t_R 7,5). Així doncs, es comprova que el producte format durant la reacció és inestable en les condicions de fase inversa de l'aïllament, tot i que no s'havia observat aquest efecte durant l'anàlisi per HPLC condicions anàlogues. Aquest efecte es va atribuir a la presència de TFA en la fase mòbil utilitzada en la separació preparativa i al manteniment d'aquestes condicions durant l'eliminació del dissolvent per evaporació a pressió reduïda. En el medi àcid mantingut durant el procés d'evaporació de les mostres un dels anells de imidazolina formats podria obrir-se en un procés d'equilibri, tal i com es mostra en el següent esquema:



Així doncs, es va repetir el procés de purificació dels components de la barreja mantenint les condicions anteriors, però sense addicionar TFA a la fase mòbil. L'absència de l'àcid va provocar que els pics co-eluïssin. Per tant, es va tornar a purificar per HPLC en presència de TFA, però una vegada recollides les fraccions, s'anaven neutralitzant amb dietilamina fins a pH bàsic. Un cop neutralitzades i concentrades totes les fraccions, es va tornar a comprovar la seva puresa per descartar la seva degradació durant aquest procés.

D'aquesta manera, es va aconseguir aïllar els pics **A** i **B** amb una puresa del 90 % (Figura 4.11).

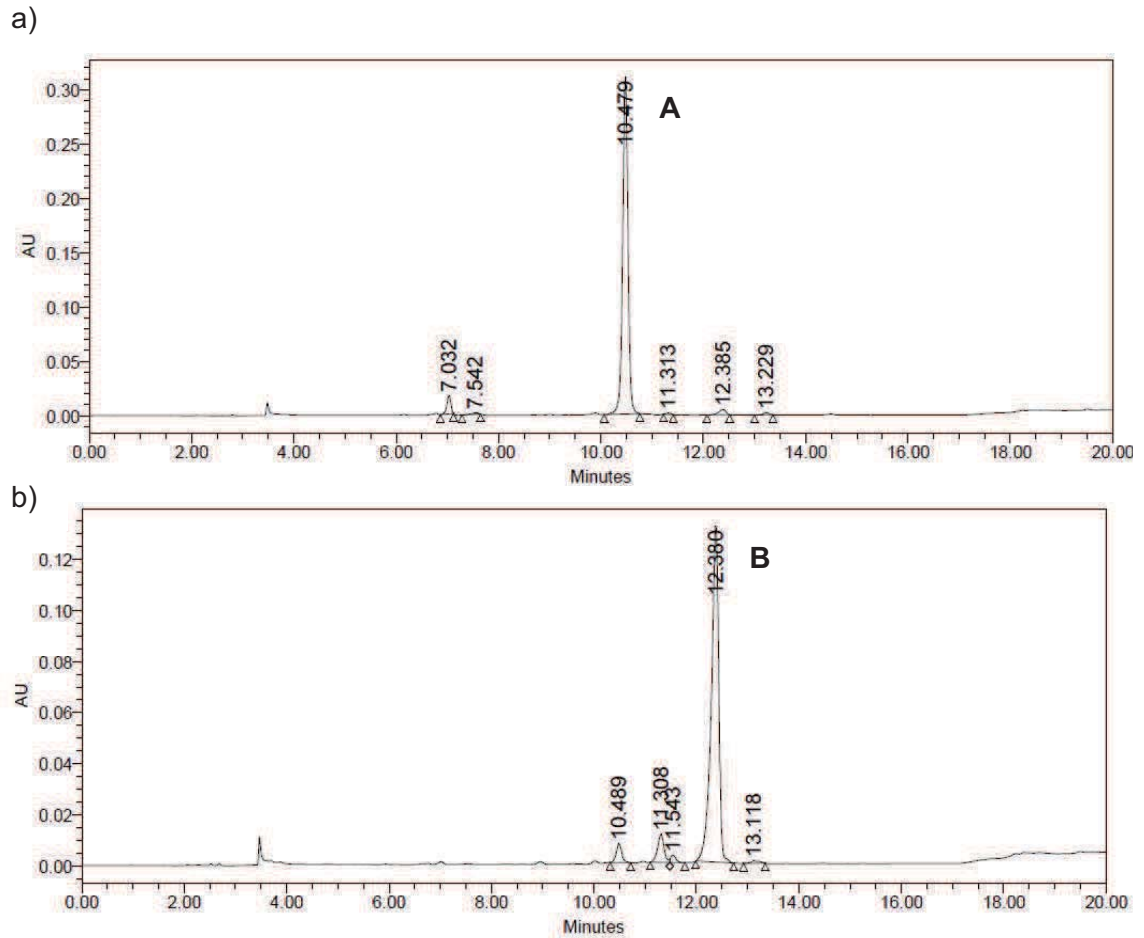


Figura 4.11. Cromatogrames obtinguts per HPLC analític després de la purificació per HPLC semipreparatiu dels pics: a) pic **A**; b) pic **B**. Utilitzant el gradient descrit.

No va ser aquest el cas pels productes **C** i **D**. Per a aïllar **D** es va haver de procedir a una purificació addicional de la que s'aïllà amb un 98 % de puresa (Figura 4.12).

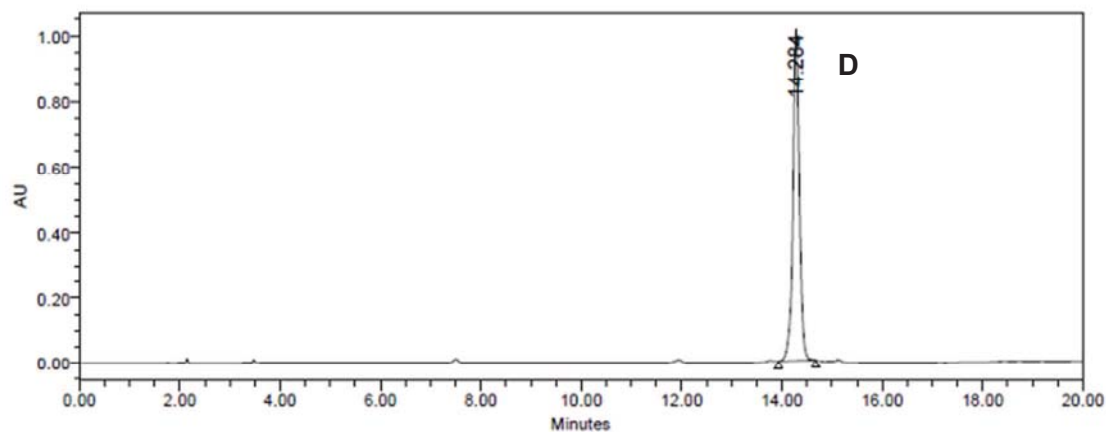


Figura 4.12. Cromatograma obtingut per HPLC analític després de la purificació per HPLC semipreparatiu del pic **D** utilitzant el gradient anteriorment descrit.

En canvi, es va observar que **C** es degradava en les successives operacions de purificació (Figura 4.13), convertint-se, parcialment en **D**.

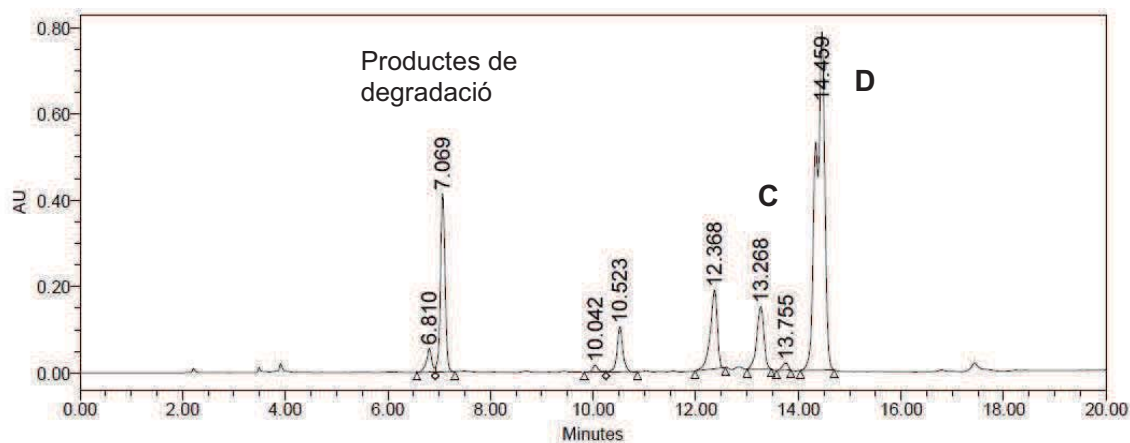
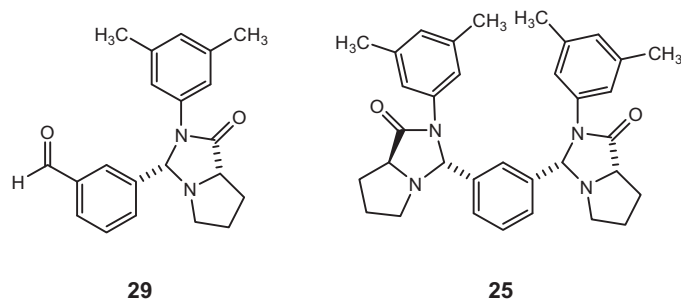


Figura 4.13. Cromatograma obtingut per HPLC analític després de la purificació per HPLC semipreparatiu del pic **C** (t_R 13,2 min) utilitzant el gradient descrit.

Per tal de caracteritzar els productes aïllats, es realitzaren els espectres de resonància magnètica nuclear de protó i carboni 13, a més dels experiments de dos dimensions gCOSY i gHSQC.



A l'espectre de RMN-¹H de **B** apareix un senyal corresponent a un aldehyd a δ 9,9. Fet pel qual s'assigna l'estructura **29** a aquest compost com a component majoritari. El que de què en l'estudi de la massa d'aquesta fracció ens aparegués la massa del dímer es pot explicar per una contaminació de la fracció **B**, ja que elueixen ambdós pics en una part del cromatograma (Figura 4.9). El desplaçament del senyal corresponent a la posició 3 (δ 5,73) ens indica que el nou centre estereogènic té configuració *R*.

Pel que fa al pic **D**, es determinà que es tractava majoritàriament del producte de di-reacció **25**. Per a les fraccions **A** i **B** es determinà que es tractaven de dímers isòmers entre ells. La baixa estabilitat de **C** ens plantejà la possibilitat de què es tractés del dímer de configuració *R* en les dues posicions 3. Per contra, l'estabilitat que presenten **A** i **B** ens fa pensar que son isòmers de rotació restringida respecte a **D**.

4.1.4. Solubilitat dels compostos **21**, **22**, **23** i **24** i recerca de condicions pel seu ús en CCC

La solubilitat dels compostos **21**, **22**, **23** i **24** es va avaluar en els sistemes de dissolvents estudiats amb anterioritat. Així es seleccionaren els sistemes formats per MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM, MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM i DIPE/tampó fosfat sòdic 50 mM, obtenint els valors que es mostren a continuació (Taula 4.1):

Taula 4.1. Solubilitat dels SQs en els sistemes binaris de dissolvents expressat en mg/mL.

| SQ | MIBK | MTBE | DIPE |
|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 21 | 92 mg/mL | 2,8 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 22 | 46 mg/mL | 5,8 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 23 | 35 mg/mL | 4,5 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 24 | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL |

El compost **24** que resultà insoluble en tots els sistemes seleccionats, es va assajar en un sistema de la família Arizona. Aquesta família de dissolvents està formada per vint-i-tres barreges d'heptà, acetat d'etil, metanol i aigua en diferents proporcions, partint de mescles molt polars fins a altres molt apolars.⁹³ Així, es decidí preparar diferents mescles de diferents polaritats (C, L, R, W, Y) resultant en tots els casos pràcticament insoluble (solubilitat inferior a 1 mg/mL), motiu pel qual es va descartar la seva utilització en CCC.

Malgrat l'esforç, **24** no es solubilitzà en cap de les mescles estudiades, fet que ens feu descartar aquest compost pel seu estudi en CCC. A l'igual, que es descartà la síntesi dels seus anàlegs utilitzant el diclorur d'àcid substituït en *orto* i *para*.

Un altre aspecte a destacar és la diferent solubilitat que mostren els compostos **21**, **22** i **23** al comparar-se els resultats obtinguts en MIBK front MTBE. **21** és el que mostra un valor de solubilitat més alt en MIBK, a la vegada que és el menys soluble en MTBE. En canvi, **22** és el SQ que presenta una solubilitat més elevada en el sistema format per MTBE/ tampó fosfat sòdic 50 mM.

Tenint en compte aquestes dades es decidí utilitzar MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM amb una concentració de SQ de 15 mM. Pel que fa al sistema de dissolvents format per MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM es va decidir avaluar la capacitat d'enantioreconeixement de cada SQ a la seva màxima concentració en aquest sistema. És a dir 2,8 mM per **21**, 9 mM per **22** i 4,6 mM per **23**.

Alternativament, per tal d'incrementar la solubilitat d'aquests compostos en MTBE/tampó fosfat es va decidir afegir un volum conegut de MIBK al sistema arribant-se a preparar una dissolució 25 mM de SQ en una barreja de MTBE/MIBK (75:25)/tampó fosfat sòdic 50 mM.

La capacitat enantioselectiva d'aquests compostos es va assajar en un dispositiu de CCC, les diferències tècniques entre aquest i els aparells de CPC s'analitzen a la introducció a l'apartat 1.3. En aquest cas, el menor volum de la columna de l'instrument de CCC fou determinant a l'hora de seleccionar-lo (17,8 mL front als 190 mL que presenta l'aparell de CPC). El menor volum es tradueix en experiments més curts amb menys consum de dissolvent i SQ.

4.1.5. Assaig de la capacitat d'enantioreconeixement de 21, 22 i 23 en CCC

Una vegada establertes les condicions experimentals es va procedir, a la realització dels experiments en el sistema MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6. El pH del tampó es va haver de rebaixar respecte a l'utilitzat en els experiments previs (pH 8) degut a la baixa retenció de l'analit en realitzar experiments de control utilitzant **1** (30 mM) com a SQ.

Així, es pot veure que la disminució del pH provoca un increment de la durada de l'experiment i com a conseqüència, una millora en la resolució (Figura 4.14).

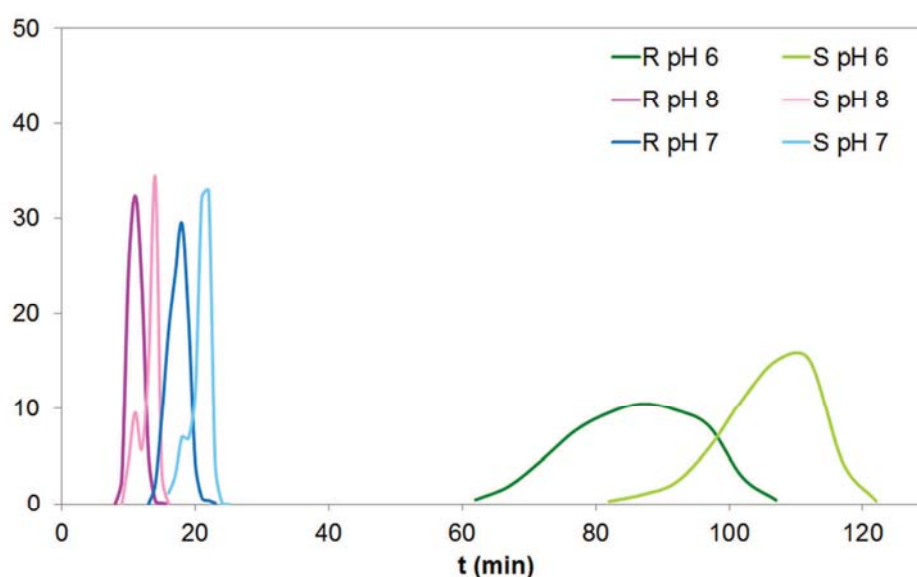


Figura 4.14. Perfils d'elució on es compara l'efecte del pH de la solució amortidora utilitzada en el t_R de la DNB-(±)-Leu a l'utilitzar una dissolució de 30 mM de **1** en el sistema de dissolvents MIBK/ tampó fosfat sòdic 50 mM.

Una vegada establertes les condicions experimentals en el nou dispositiu es va procedir a assajar **21-23**. La dissolució de SQ que es va utilitzar va ser de 15 mM considerant que es tracta de dímers amb dues unitats de prolina en la molècula. El volum de FEQ retingut en el dispositiu es va situar entre el 83 i el 87 % en els tres casos (Taula 4.2). Tot i la considerable retenció de l'analit en el sistema no es va aconseguir una separació satisfactòria del racemat. Obtenint-se únicament separacions insuficients en els tres casos (Figura 4.15).

Taula 4.2. Resum dels valors experimentals.

| Exp. | SQ | F.E. | V_{st} mL | SQ_{st} mmol | $r_{SQ/R}$ | t_1 min | t_2 min | α_{ccc}^a | R_s^a | oe |
|------|-----------|------|----------------|-------------------|------------|--------------|--------------|------------------|---------|----|
| 13 | 21 | MIBK | 14,9 | 0,22 | 9,71 | 96 | 100 | 1,04 | - | R |
| 14 | 22 | MIBK | 15,8 | 0,23 | 10,30 | 92 | 100 | 1,08 | - | R |
| 15 | 23 | MIBK | 15,9 | 0,23 | 10,36 | 92 | 96 | 1,04 | - | R |

F.E., dissolvent utilitzat en la fase estacionària; V_{st} , volum (mL) de FEQ retint; t_i , temps de retenció de cada enantiòmer (min) corresponent a la màxima intensitat del pic; α , factor d'enantioselectivitat; R_s , resolució; oe, ordre d'elució enantiòmer que surt primer.^a Valors calculats sobre el perfil d'elució obtingut a través de la integració de les àrees dels cromatogrames.

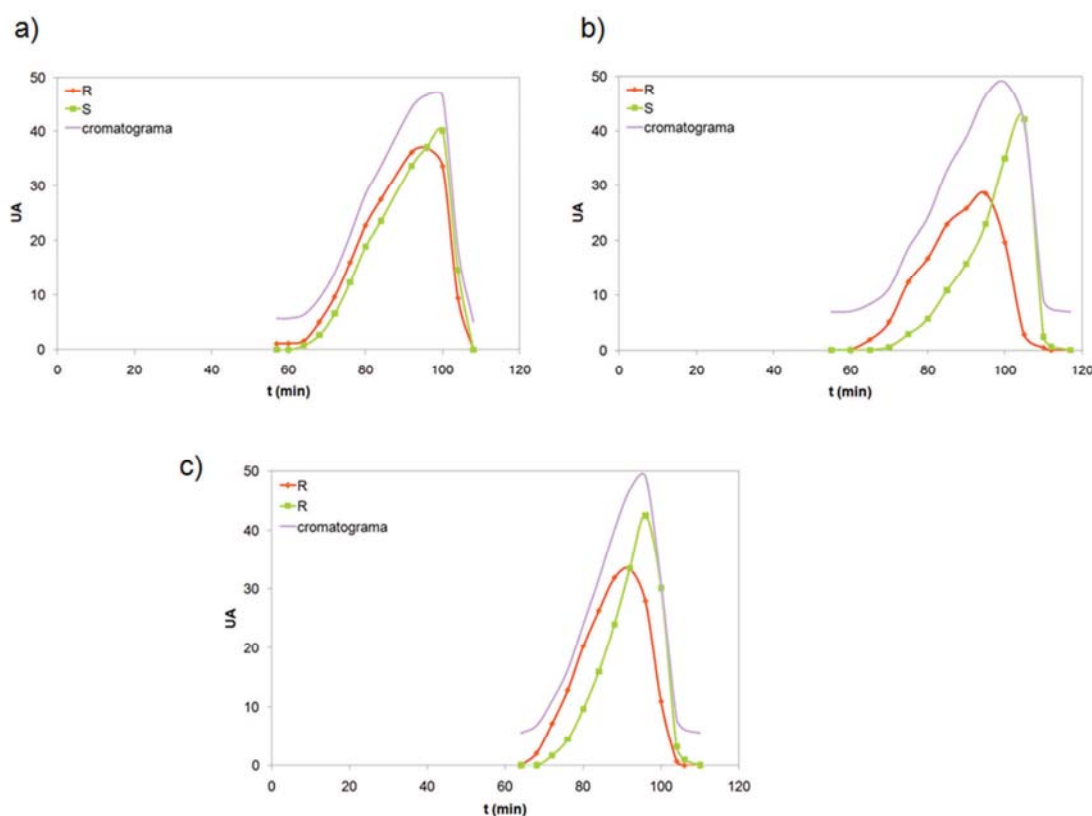


Figura 4.15. Perfils d'elució obtinguts utilitzant una dissolució de 15 mM de: a) **21**, b) **22** i c) **23** en MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 en la separació de 7mg de DNB-(±)-Leu (0,023 mmol), flux: 1 mL/min, ω 2100 rpm.

A continuació, es va realitzar l'assaig utilitzant MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 com a sistema de dissolvents. Cada SQ s'assajà a la seva concentració de saturació en aquest sistema de dissolvents. El valor més elevat d' α_{ccc} es va obtenir en aquest cas amb **22** ($\alpha = 1,27$). Aquest és també el SQ que també es va utilitzar a una

concentració més elevada atesa la seva solubilitat més elevada en aquest sistema (Taula 4.3). La DNB-Leu racèmica es va resoldre pràcticament per complet en utilitzar **22**, situant-se els excessos enantiomèrics en els màxims de cada pic entorn del 91 i 100 %, respectivament. Si es compara aquest resultat amb l'obtingut precedentment en utilitzar MIBK en el sistema de dissolvents es comprova que, tot i que la concentració del SQ és inferior s'obté una separació més important en el dissolvent més lipòfil, fet que ja s'havia observat en altres casos.

Taula 4.3. Resum dels valors experimentals obtinguts a l'assajar els SQs **21**, **22** i **23** en MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6.

| Exp. | SQ | F.E. | V_{st} mL | SQ_{st} mmol | $r_{SQ/R}$ | t_1 min | t_2 min | α_{CCC}^a | R_s^a | oe |
|------|-----------|------|----------------|-------------------|------------|--------------|--------------|------------------|---------|----------|
| 16 | 21 | MTBE | 14,6 | 0,04 | 1,77 | 44 | - | 1,00 | - | - |
| 17 | 22 | MTBE | 12,7 | 0,11 | 4,96 | 38 | 47 | 1,27 | - | <i>R</i> |
| 18 | 23 | MTBE | 15,8 | 0,07 | 3,16 | 145 | 150 | 1,03 | - | <i>R</i> |

El SQ **21** amb la solubilitat més baixa, no va exhibir cap mena d'enantiodiscriminació front la DNB-(±)-Leu, tot i retenir de forma similar l'analit a **22** en el sistema estudiat. Pel que fa al SQ **23**, tot i retenir de forma molt perllongada la DNB-(±)-Leu, aquesta no s'aconseguí resoldre, obtenint un valor molt discret d' α_{CCC} , 1,03 (Figura 4.16). Aquest fet ens demostra, que temps d'experiments elevats, no son sinònim de millors resultats tal i com es pot comprovar en aquest cas.

L'ordre d'elució observat en tots els cassos va ser el mateix. Així, l'enantiòmer *S* resulta ser el més retingut i, per tant, el que interacciona més fortament amb el SQ.

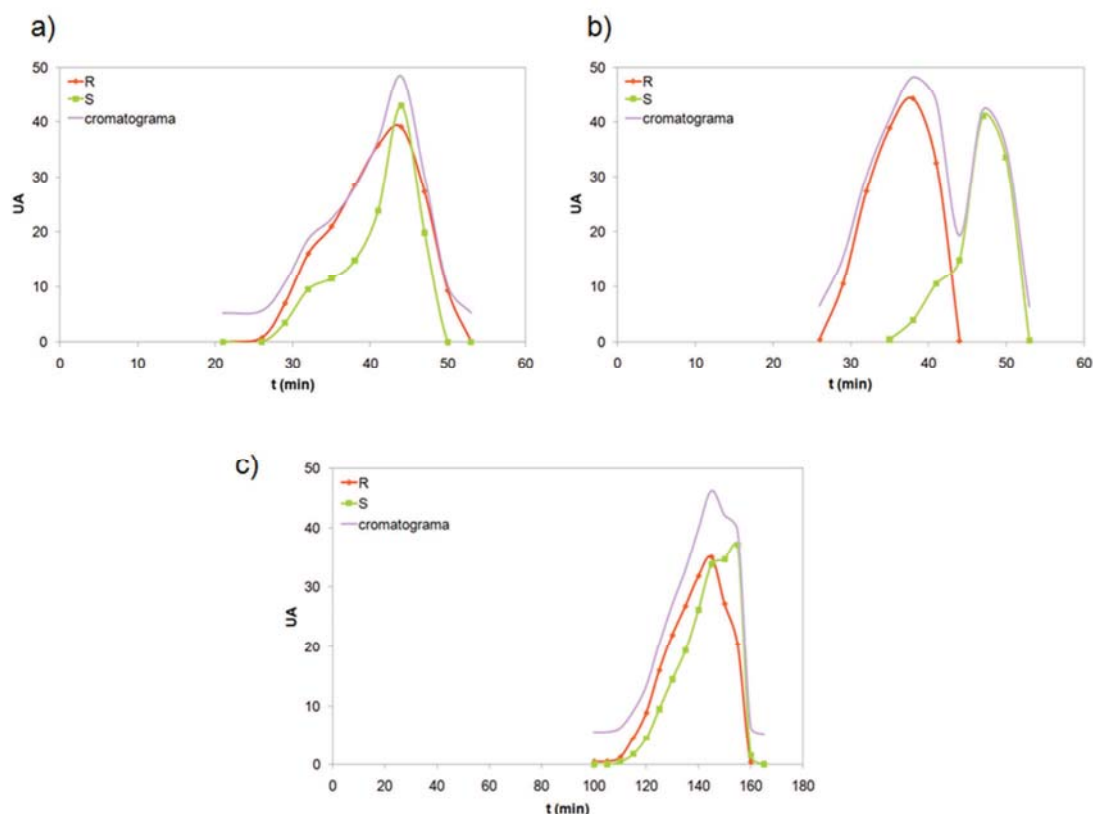


Figura 4.16. Perfils d'elució obtinguts utilitzant una dissolució de SQ: a) 2,8 mM de **21**, b) 9 mM de **22** i c) 4,6 mM de **23** en MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 en la separació de 7mg de DNB-(±)-Leu (0,023 mmol), flux: 1 mL/min, ω 2100 rpm.

4.1.6. Estudi de la capacitat de saturació del SQ **22** vers el SQ **1**

Per tal de comprovar si en el mecanisme de reconeixement **22** participen les dues unitats de L-prolina de forma independent, o no, es va voler estudiar la seva capacitat de saturació. Així, es van comparar els resultats obtinguts amb el SQ dimèric front als provinents del SQ monomèric **1**.

La diferent solubilitat que exhibeix **22** en els dos sistemes de dissolvents estudiats, ens va fer plantejar l'addició sobre el MTBE d'un percentatge de MIBK conegut per tal de poder incrementar la seva solubilitat en el sistema més lipòfil. La quantitat de MIBK addicionada ha de ser petita, ja que no es vol arribar a interferir en el procés d'enantioreconeixement. L'estudi es va iniciar afegint percentatges creixents de MIBK (0,5 %) sobre el MTBE. A cada mescla es va mesurar l'augment de solubilitat de **22**, tot i que aquest fou considerable fins a l'addició d'un 25 % de MIBK. Així, la composició seleccionada per tal d'estudiar la capacitat de saturació va ser la formada per: MTBE 75 %/ MIBK 25 %/ tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6. La quantitat de

DNB-(±)-Leu injectada es va incrementar de forma progressiva per tal d'intentar saturar el sistema. Per a què participin el mateix nombre d'unitats de L-prolina en el procés es va preparar una dissolució el doble de concentrada quan s'utilitzà el monòmer (**1**), respecte al dímer (**22**).

Els experiments es van realitzar utilitzant una concentració de **22** de 10 mM i 25 mM, respectivament, mentre que els experiments amb **1** es realitzaren a 20 mM i 50 mM, tal i com es mostra en la Taula 4.4.

Taula 4.4. Resum de les condicions experimentals en què es realitzaren els experiments de CCC pels SQs **1** i **22**.

| SQ | Sistema de dissolvents | Concentració | Analit |
|-----------|-----------------------------------|--------------|--------|
| | | mg/mL | mg |
| 22 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 10 | 7 |
| 22 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 10 | 14 |
| 22 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 10 | 30 |
| 1 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 20 | 7 |
| 1 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 20 | 14 |
| 1 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 20 | 30 |
| 22 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 25 | 17,5 |
| 22 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 25 | 35 |
| 22 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 25 | 75 |
| 22 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 25 | 100 |
| 1 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 50 | 17,5 |
| 1 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 50 | 35 |
| 1 | MTBE/MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 50 | 75 |

Així, en primer lloc es van realitzar els experiments amb SQ **1** per determinar la possible interferència de l'MIBK en la separació. Es va comprovar que l'analit es resolía igual utilitzant la nova composició del sistema de dissolvents. A mesura que es va incrementar la quantitat d'analit injectat, va augmentar la durada de l'experiment. Tot i això, injectant 30 mg de DNB-(±)-Leu, encara no es produeix la saturació el sistema tal i com es pot comprovar a la figura 4.17.

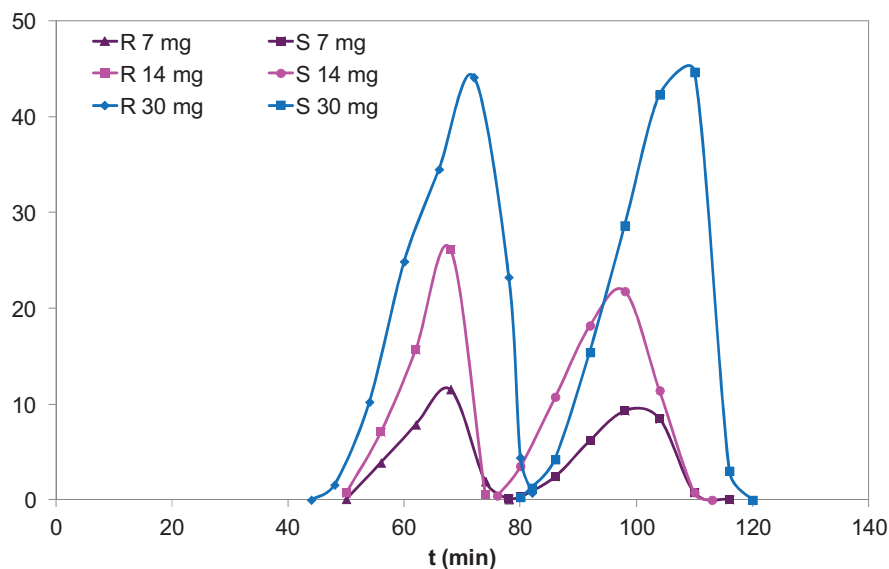


Figura 4.17. Superposició dels perfils d'elució obtinguts en l'estudi de saturació a 20 mM de SQ **1** en la separació de quantitats creixent de DNB-(±)-Leu en el sistema de dissolvents format per MTBE 75 %/MIBK 25 %/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6.

En realitzar els experiments anàlegs amb el SQ **22**, també es va observar l'increment de la durada de l'experiment en incrementar la quantitat d'analit, tot i que en aquest cas l'efecte es fa més pronunciat. En realitzar l'experiment injectant 30 mg de DNB-(±)-Leu, es va produir la saturació del sistema. Cal considerar que ja ens trobàvem a valors molt propers a la relació 1:1 SQ/analit (Figura 4.18). Aquest resultat, sembla indicar que en el mecanisme de reconeixement enantioselectiu pel qual **22** es capaç de discriminar entre les dues formes del racemat hi intervenen les dues unitats quirals de la molècula.

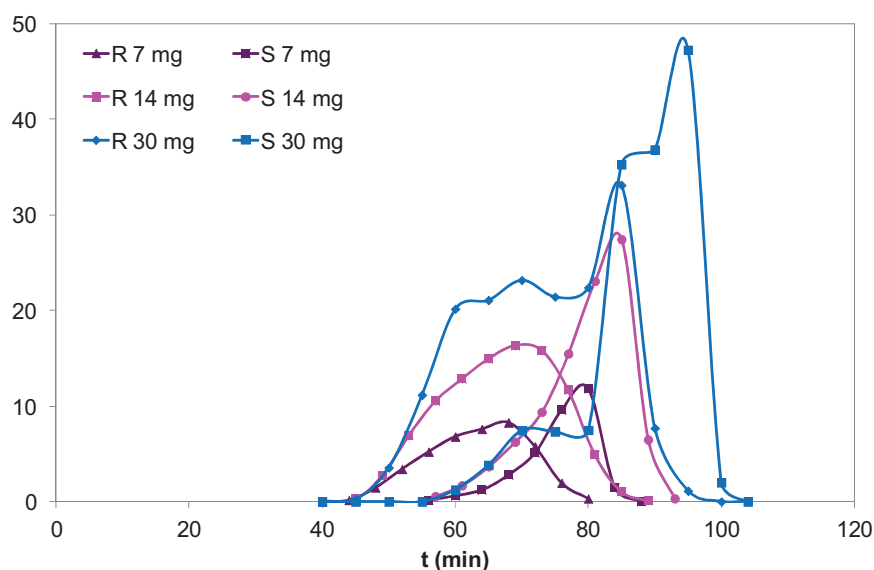


Figura 4.18. Superposició dels perfils d'elució obtinguts en l'estudi de saturació a 10 mM de SQ **22** en la separació de quantitats creixent de DNB-(±)-Leu en el sistema de dissolvents format per MTBE 75 %/MIBK 25 %/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6.

Per tal de confirmar els resultats obtinguts, es va decidir treballar a la concentració de saturació d'ambdós SQs, és a dir, a 25 mM en el cas del SQ **22** i 50 mM pel SQ **1**. En treballar a concentracions de SQ més elevades, la quantitat d'analit injectat es va re-calcular per tal de mantenir les relacions SQ/analit anteriors, tal i com es pot comprovar a la taula 4.4.

Al realitzar els estudis amb el SQ **1** a la seva concentració de saturació es va posar encara més de manifest, la diferència en la durada de l'experiment a l'incrementar la quantitat d'analit injectat (Figura 4.19). A més, es comença a detectar un principi de saturació del sistema. Es va observar que els pics es van deformant, desviant-se de la seva forma gaussiana habitual, fet que no es produeix quan la quantitat injectada de DNB-(±)-Leu és de 17,5 mg i la relació SQ/analit és de 15,56. En canvi, quan aquesta relació molar és de 3,52 es comença a observar un solapament dels pics.

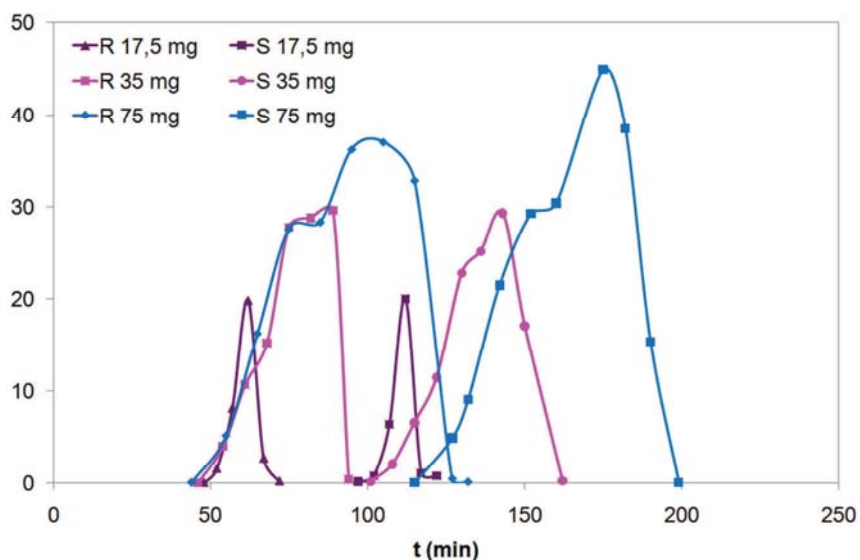


Figura 4.19. Superposició dels perfils d'elució obtinguts en l'estudi de saturació a 50 mM de SQ **1** en la separació de quantitats creixent de DNB-(±)-Leu en el sistema de dissolvents format per MTBE 75 %/MIBK 25 %/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6.

Per últim, es van realitzar els experiments anàlegs amb el SQ **22** a una concentració de 25 mM, la seva concentració de saturació en el sistema de dissolvents utilitzat. En aquestes condicions es van obtenir uns resultats anàlegs als obtinguts en realitzar els experiments a una concentració inferior de SQ (Figura 4.20).

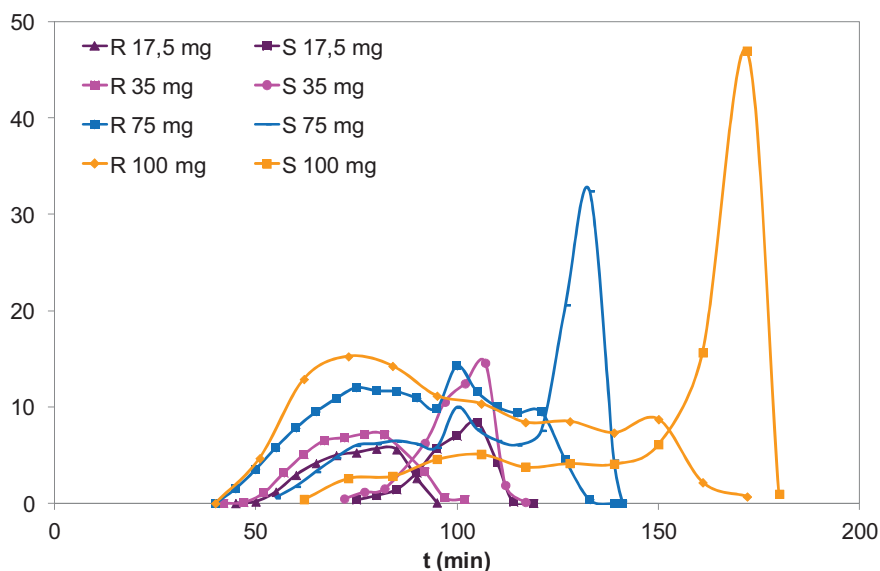
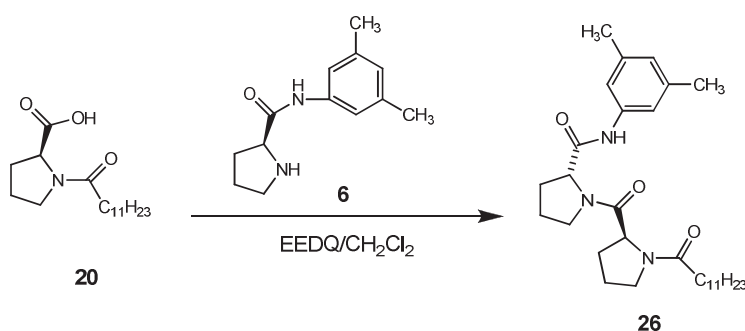


Figura 4.20. Superposició dels perfils d'elució obtinguts en l'estudi de saturació a 25 mM de SQ **22** en la separació de quantitats creixent de DNB-(±)-Leu en el sistema de dissolvents format per MTBE 75 %/MIBK 25 %/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6.

4.2. Biselectors units de forma directa

4.2.1 Síntesi del SQ 26

Per a l'obtenció del compost **26** es van sintetitzar de forma paral·lela **6** i **20**. D'una banda, es va sintetitzar el monòmer **6** seguint la metodologia descrita a l'**apartat 3.1.1**. Així es va partir de la L-prolina, primer es va protegir la funció amina amb el grup Boc₂O, per posteriorment substituir el grup àcid amb la 3,5-dimetilfenilamina mitjançant la utilització de l'agent d'acoblament EEDQ i finalment es va eliminar el grup protector introduït anteriorment per tal d'obtenir el precursor desitjat **6**.



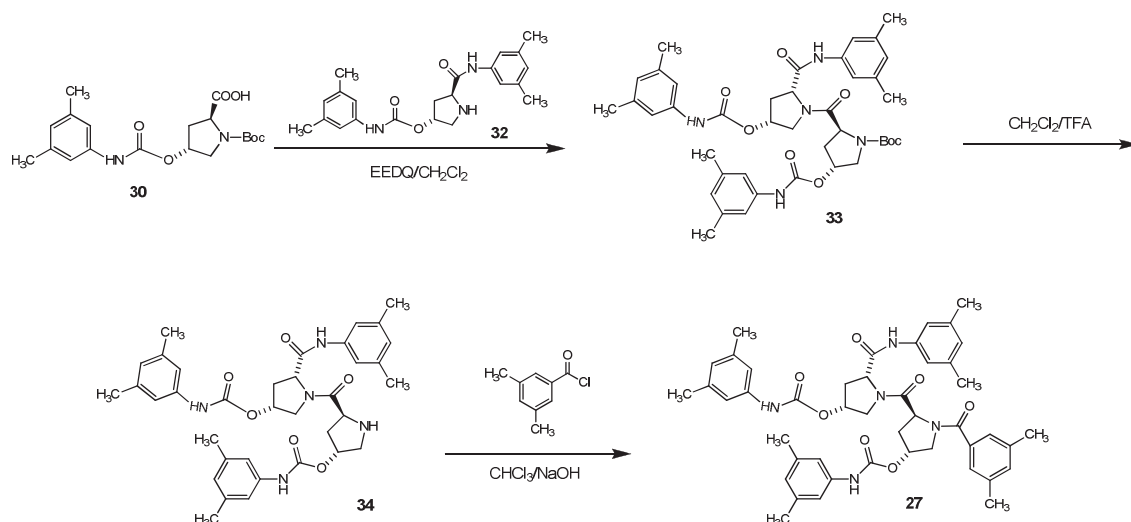
D'altra banda, s'obtingué **20** tal i com es detalla a l'**apartat 3.3.1**. La L-prolina que es va fer reaccionar amb el clorur d'undecenoïl en medi bàsic donant lloc a l'enllaç amida.

Una vegada obtinguts els dos monòmers desitjats, es va procedir a la formació de l'enllaç amida que ens va proporcionar el dímer **26**. Es va seleccionar com a agent d'acoblament l'EEDQ. Així, es va incorporar sobre **20**, la unitat de L-prolina que conté la zona aromàtica rica en electrons (π -donador) i que fa que el dímer sintetitzat tingui les mateixes propietats electròniques que **1**.

Després de 48 h de reacció, es va aïllar del medi de reacció un sòlid que es va purificar per cromatografia en columna. Aquest sòlid es va identificar com **26** gràcies a l'espectre de RMN-¹H, on es poden diferenciar clarament els senyals corresponents als protons C²H i C⁵H₂ de cada anell de L-prolina, a més de detectar la presència de rotàmers.

Tot i la formació del producte desitjat, aquest es va obtenir amb un rendiment moderat (49 %).

El precursor **33** es va obtenir amb èxit (72 %) després de purificar-lo per cromatografia en columna. Tot seguit, es va procedir a l'eliminació del grup protector de l'amina en les condicions descrites amb anterioritat, aïllant **34**. Per últim, es va incorporar el clorur de 3,5-dimetilbenzoil, prèviament sintetitzat a partir de l'àcid 3,5-dimetilbenzoïc. La incorporació del clorur d'àcid es va realitzar en un medi bifàsic, seguint les condicions de Schotten-Baumann on s'utilitza una dissolució de NaOH i cloroform, obtenint **27** en forma de sòlid després de purificar-lo per cromatografia en columna.



El dímer desitjat es va caracteritzar per tècniques de RMN, i amb ajuda dels experiments de dues dimensions d'homocorrelació i heterocorrelació (gCOSY, NOESY i gHSQC) es va poder assignar cada senyal. Així, a l'espectre de RMN-¹H es diferenciaven clarament els senyals provinents de cadascun dels anells de pirrolidina.

4.2.3. Assaig de 26 i 27 en CCC

Una vegada sintetitzats i caracteritzats els dos dímers, es va procedir a avaluar la seva solubilitat en els sistemes de dissolvents binaris seleccionats, tal i com s'ha realitzat en els casos anteriors (Taula 4.5).

Taula 4.5. Solubilitat dels SQs en els sistemes binaris de dissolvents expressat en mg/mL.

| SQ | MIBK* | MTBE* | DIPE* |
|-----------|-----------|------------|-----------|
| 26 | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 27 | 67 mg/mL | 42,5 mg/mL | < 1 mg/mL |

*En tots els casos el dissolvent orgànic es troba saturat amb tampó fosfat sòdic 50 mM a pH 6.

El selector **26** va resultar altament insoluble en tots els sistemes de dissolvents. Aquest fet, ens va fer descartar el seu ús en CCC. Així, només es va poder assajar **27**, el qual si es solubilitzà en dos dels tres sistemes estudiats.

A continuació, mitjançant CCF es va comprovar que **27** quedava retingut a la fase orgànica. En base a l'elevada solubilitat que **27** va mostrar tant en MTBE, com en MIBK es va decidir assajar la seva capacitat enantioselectiva a 25 mM i 50 mM, respectivament (Taula 4.6).

Taula 4.6. Resum de les condicions experimentals en què es realitzaren els experiments de CCC amb **27**.

| SQ | Sistema de dissolvents | Concentració | ω | Flux |
|-----------|------------------------------|--------------|----------|--------|
| | | mg/mL | rpm | mL/min |
| 27 | MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 25 | 2100 | 1 |
| 27 | MTBE/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 25 | 2100 | 1 |
| 27 | MIBK/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 50 | 2100 | 1 |
| 27 | MTBE/fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 50 | 2100 | 1 |

Si bé, en utilitzar **27** en MIBK (25 mM i 50 mM) en el sistema de dissolvents els resultats foren negatius, en utilitzar MTBE (25 mM) s'aconseguí una resolució parcial del racèmic (Figura 4.21). Malauradament, no va ser possible fer l'assaig a una concentració de 50 mM de **27** degut a la baixa retenció de fase estacionària en l'aparell.

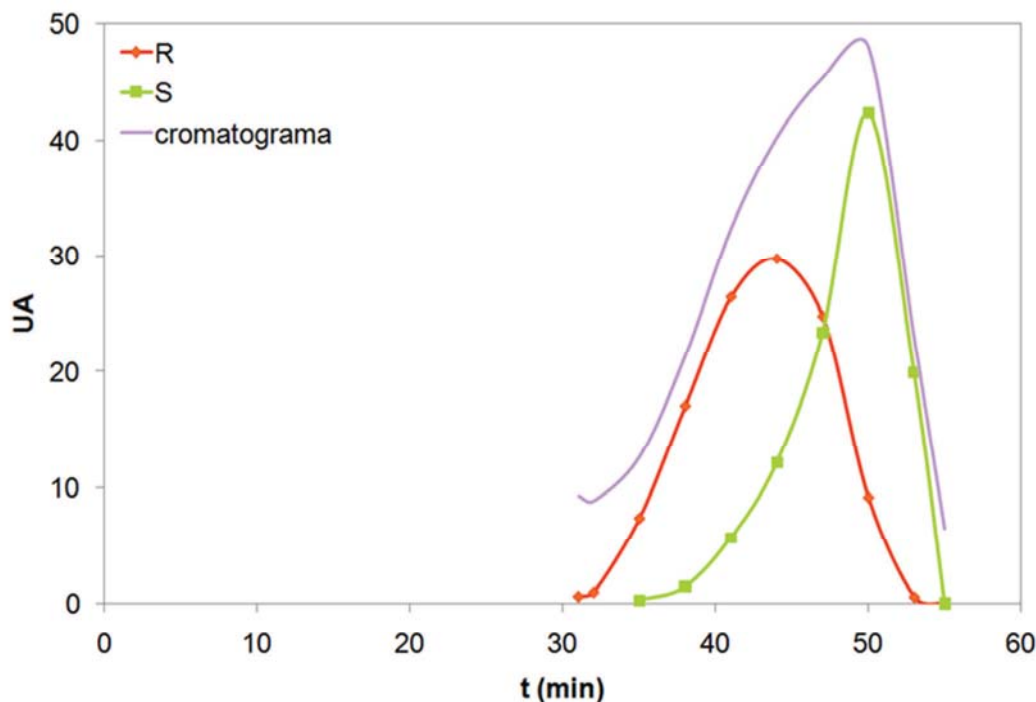


Figura 4.21. Perfil d'elució obtingut amb el SQ **27** en la separació de la DNB-(±)-Leu (7 mg, 0,023 mmol) a una concentració de 25 mM en MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6, flux: 1 mL/min, ω 2100 rpm

4.3. Recapitulació

Una vegada sintetitzats els SQs **21-23** en quantitat suficient s'assajà la seva solubilitat en els dos sistemes de dissolvents seleccionats. Detectant-se una elevada solubilitat d'aquests en el sistema format per MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM, en comparació amb el format per MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM. Tot i la baixa solubilitat en aquest últim sistema, a l'assajar els diferents SQs es detectà que l'enantioseparació de la DNB-(±)-Leu era millor, tot i no resoldre's fins a línia de base. Així, es decidí avaluar la capacitat enantiosdiscriminativa de **22** en un sistema format per MTBE/MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM. A més, s'estudià el seu mecanisme d'enantioreconeixement comparant els resultats obtinguts amb el **1**. Així, s'establí que en el SQ dimèric les dues entitats de l'aminoàcid L-prolina actuen conjuntament i no per separat tal i com es pensava en un primer moment.

Pel que fa a **25** es decidí no utilitzar-lo com a SQ degut als problemes trobats durant la seva síntesi. La impossibilitat d'aïllar la quantitat necessària amb la puresa desitjada ens va fer pensar també en la seva inestabilitat en el sistema cromatogràfic.

El compost **26** no s'utilitzà en CCC com a conseqüència de la seva insolubilitat. Per contra, el derivat de la L-hidroxiprolina, **27**, resultà altament soluble en els medis estudiats, arribant a una obtenir una resolució parcial del racèmic estudiat. A més, s'aconsegueix un valor d' α_{CCC} superior a l'obtingut en estudis anteriors pel SQ monomèric **5** en el mateix medi.

**5. Sistemes de dissolvents
fluorats i la seva aplicació en CCC**

5. Sistemes de dissolvents fluorats i la seva aplicació en CCC

La utilització de la CCC per a la separació d'enantiòmers requereix l'ús d'un selector quiral que cal que quedi retingut a una de les fases mentre l'analit es reparteix. Això implica que hi ha d'haver una diferència notable de polaritat entre tots dos. Per tal d'incrementar aquesta diferència s'acostumen a incorporar cadenes lipòfiles sobre l'estructura del SQ.^{25,26,27} D'aquesta manera, s'incrementa la lipofília del SQ en la FE. Per aquest motiu, normalment, les fases més lipòfiles solen utilitzar-se com a FEQ en CCC, tot i que no sempre modificacions sobre el SQ eviten pèrdues d'aquest cap a la fase mòbil.²⁴

En aquest punt és quan també s'ha de tenir en compte la composició del sistema de dissolvents utilitzat. A la literatura es poden trobar diverses recopilacions de sistemes ternaris de dissolvents (cal destacar la realitzada per Sørensen and Artl).⁹⁴ Aquestes poden ser de gran ajuda a l'hora de buscar noves condicions per dur a terme els experiments, ja que inclouen una gran varietat de dissolvents. Tot i això, en ocasions es fa difícil trobar condicions en les que SQ i analit es comportin diferentment. Per aquest motiu es va pensar en la utilització d'un dissolvent fluorat. Tot i la gran varietat de solvents emprats en aquests sistemes, només s'ha trobat un exemple que inclogués un dissolvent fluorat.¹³

5.1. Selecció d'un dissolvent fluorat

A la dècada dels noranta P. Curran va tenir un paper clau en el desenvolupament de les tecnologies relacionades amb el fluor en la síntesi de llibreries de compostos orgànics. Les característiques especials mostrades pels compostos fluorats van fer que es plantegessin noves estratègies sintètiques. D'aquesta manera es va desenvolupar una química en solució similar a la química sobre fase sòlida en què l'addició d'una cadena perfluorada equivaldria a la resina.⁹⁵

D'aquesta manera, l'addició d'una cadena perfluorada sobre el producte de partida desitjat, permet purificar mitjançant extraccions líquid-líquid utilitzant dissolvents fluorats,

evitant l'ús d'altres tècniques que implicaven un increment de temps en el procés sintètic o costos.

A principis del 2000, Kagan, va introduir l'ús de nous dissolvents fluorats en cromatografia líquida. D'aquesta manera, va aconseguir substituir l'*n*-hexà, dissolvent àmpliament utilitzat en cromatografia, la utilització del qual es vol reduir per temes mediambientals, per l'etoxinonafluorobutà (ENFB o HFE-7200) en HPLC analític. Es tracta d'una barreja d'èters de baixa volatilitat, i per tant poc contaminants, utilitzat per a la neteja de circuits electrònics. Kagan va utilitzar aquest dissolvent per la separació de barreges de diferents tipus de molècules com benzodiazepines, antiinflamatoris no-esteroídics (AINEs), antidepressius tricíclics i bases púriques i piridíniques emprant indistintament HPLC en fase normal utilitzant com a FEQ va emprar un gel sílice ciano.

D'altra banda, també va descriure les primeres separacions d'enantiòmers en què s'utilitzava un dissolvent fluorat a la fase mòbil. Així, es seleccionaren com a FEQs: Chiralpak AD[®] i Chiralpak OJ[®] i com a racèmics l'òxid de *trans*-estilbè, la base de Tröger i la guaifenesina, dels quals es disposava de condicions per a la seva resolució en aquestes FEQ. D'aquesta manera, s'observà la separació completa d'aquests analits, tot i que la substitució de l'*n*-hexà, pel dissolvent fluorat provoca un increment en el temps de retenció.⁹⁶

Posteriorment, Kagan i col·laboradors també van demostrar que aquest dissolvent es podia utilitzar en l'HPLC acoblat a l'espectrometria de masses per ionització química a pressió atmosfèrica⁹⁷, utilitzant una gran varietat de compostos i gradients de metanol i ENFB. Recentment, s'han optimitzat i comparat diferents metodologies en HPLC en fase normal per a la separació de compostos que presenten en la seva estructura amines primàries, secundàries o terciàries utilitzant diferents tipus de FEQs Kromasil[®] com: ciano o diol, entre d'altres. Tornant a demostrar que aquest dissolvent fluorat pot esser utilitzat com a alternativa a l'*n*-hexà amb resultats igual de satisfactoris.⁹⁸

Degut a tota la informació que es va trobar a la literatura sobre dissolvents fluorats utilitzats amb èxit en tècniques cromatogràfiques es va decidir seguir els nostres estudis amb l'ENFB.

5.1.1. Característiques de l'ENFB

L'ENFB és un dissolvent altament lipòfil fabricat per 3M. Es comercialitza com a barreja de dos isòmers inseparables (perfluoroisobutil etil èter i perfluorobutil etil èter) que pràcticament tenen les mateixes propietats físico-químiques. Es tracta d'un líquid transparent, sense color i pràcticament inodor, de punt d'ebullició més alt que l'hexà (Taula 5.1). Es tracta d'un dissolvent considerat respectuós amb l'ambient ja que, té una vida mitja atmosfèrica molt curta, no malmet la capa d'ozó, no és inflamable i es pot reciclar fàcilment. Es altament miscible amb els dissolvents orgànics més utilitzats incloent el DMSO, l'ACN i el MeOH. A més, s'ha vist que és compatible amb materials diversos com metalls, plàstics i elastòmers, dels quals ens cal destacar el PTFE o Teflon[®], material del qual està constituïda la columna de l'aparell de CCC en el que posteriorment es realitzaran els experiments.

Taula 5.1. Comparativa de les propietats de l'*n*-hexà i l'ENFB.

| | <i>n</i> -hexà ⁹⁹ | ENFB ¹⁰⁰ |
|--|------------------------------|---------------------|
| Punt d'ebullició (°C) | 68,7 | 76 |
| Viscositat (cP) | 0,313 | 0,61 |
| Densitat (g/mL) | 0,65 | 1,43 |
| Massa molecular | 195 | 264 |
| Cutoff UV (nm) | 191,5 | 220 |
| Inflamabilitat | Si | No |
| <i>Solubilitat de l'aigua en el dissolvent (ppm)</i> | 100 | 92 |
| <i>Força dissolvent en sílice</i> | 0,01 | 0,012 ^a |

a Calculat a la referència 96

Com s'ha dit, aquest dissolvent es va dissenyar per a substituir dissolvents que malmeten la capa d'ozó, com els halogenats (CFC-113 o CHCl₃) en diverses aplicacions. Entre elles en destaquen la neteja de materials electrònics, eliminació de greix o petjades dactilars de material quirúrgic, entre d'altres. El procés de neteja es pot realitzar per immersió, vaporització o com a co-solvent.

També cal remarcar que es tracta d'un dissolvent segur, és a dir, que els nivells d'exposició de la persona exposada al llarg de la jornada laboral de 8 hores, és més

baix (200 ppm) que els nivells que es detecten amb els dissolvents utilitzats anteriorment (CFC-113, 1000 ppm).^{101,102}

5.2. Disseny d'un selector quirals fluorat

En plantejar el disseny de sistemes de dissolvents fluorats calia també modificar el SQ. Així, un SQ fluorat hauria de quedar més retingut en la fase que conté el dissolvent fluorat (ENFB), que un que no conté cap àtom de fluor en la seva estructura.

Degut als bons resultats obtinguts prèviament en el nostre grup utilitzant el SQ **1** en la separació del racèmic DNB-(±)-Leu^{24,25} es va decidir seleccionar-lo com a model pel nou SQ. Per aquest motiu es va decidir substituir la cadena hidrocarbonada per una cadena de similar longitud perfluorada, mantenint el resta de la molècula. Igualment es va introduir en l'estudi un tercer SQ d'estructura propera i accessible comercialment (Figura 5.1).

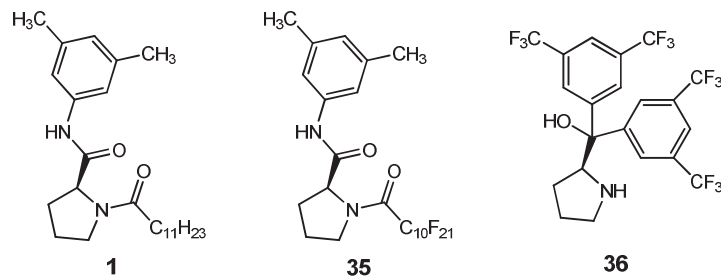


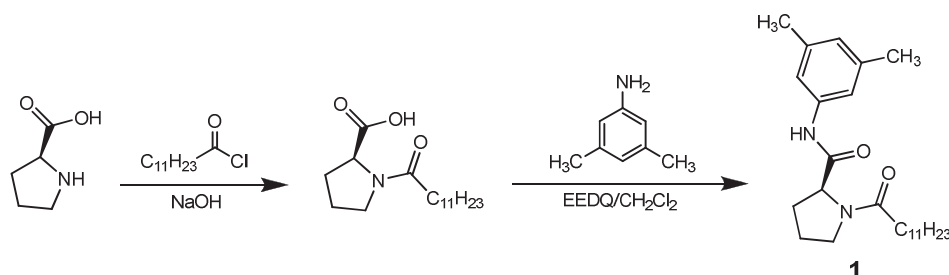
Figura 5.1. Estructura química dels selectors quirals seleccionats.

5.2.1. Síntesi del SQ 35 a partir de L-prolina.

A l'igual que en els capítols anteriors es seleccionà la L-prolina com a material de partida. La incorporació d'una cadena perfluorada ha estat descrita seguint diferents metodologies.^{103,104} Al nostre grup s'havia establert un procediment per a la incorporació de cadenes alifàtiques sobre L-prolina amb bons resultats. A més, incorporant en primer lloc la cadena perfluorada sobre l'aminoàcid s'aconseguia obtenir el producte final en

dos etapes menys, ja que s'evitaven les etapes de protecció del nitrogen amb el grup Boc i la seva posterior eliminació.

Es va decidir sintetitzar **35** seguint la mateixa metodologia grup per a l'obtenció de **1**.²⁴



Per a la síntesi del SQ fluorat, en primer lloc, es va procedir a la preparació del clorur de l'àcid perfluorundecenoïl en clorur de tionil a reflux. La formació del producte desitjat es va poder comprovar per espectrometria de masses.

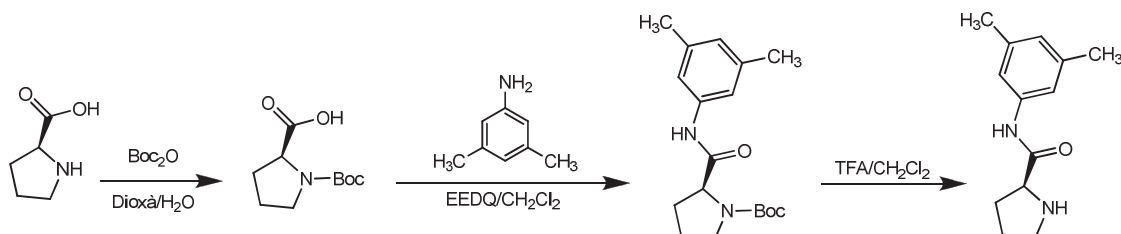


A continuació, s'addicionà el clorur de perfluorundecenoïl sobre L-prolina en medi bàsic. No obstant, no es va poder detectar la formació del producte desitjat ni en les condicions anteriorment utilitzades en l'acilació de L-prolina amb clorur de dodecanoïl (NaOH/ clorur d'àcid de la cadena fluorada), ni en condicions de Schotten-Bauman (medi bifàsic NaOH/cloroform), ni utilitzant THF a temperatura ambient i tampoc en piridina escalfant a la temperatura de reflux (90°C).

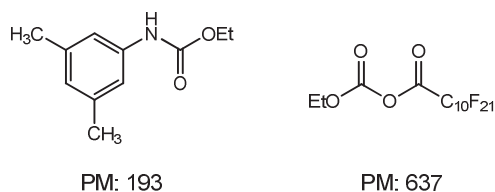
5.2.2. Síntesi del SQ 35 a partir de la *N*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida

En comprovar que cap de les metodologies assajades ens van conduir cap a l'obtenció del intermedi desitjat, es va decidir sintetitzar **35** seguint una estratègia alternativa. Així, es va partir de *N*-Boc-L-prolina. A continuació, s'introduí la 3,5-dimetilanilina utilitzant com a agent d'acoblament l'EEDQ, metodologia descrita anteriorment. Una vegada format el derivat d'àcid desitjat es va procedir a l'eliminació del grup protector sobre el nitrogen per tot seguit, incorporar la cadena perfluorada. A l'hora d'incorporar la cadena

perfluorada es van seguir dues vies diferents: la incorporació de l'àcid perfluorundecanoïc amb un agent d'acoblament o bé, l'addició del clorur de perfluorundecenoïl.



Quan es va utilitzar EEDQ com agent d'acoblament seguint les condicions ja utilitzades per a la síntesi de **35** es varen detectar (MS i $^1\text{H-RMN}$) com a productes majoritaris els procedents de la incorporació d'un grup etoxicarbonil sobre la 3,5-dimetilanilina i el carbonat intermedi activat en l'acilació.



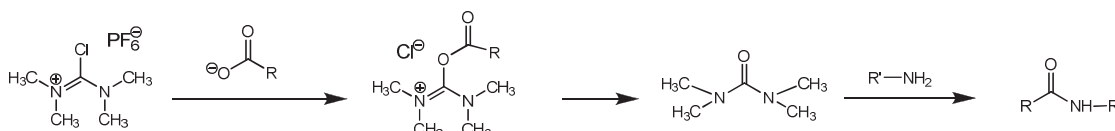
El resultat es va atribuir a la baixa nucleofilia de l'àtom de nitrogen de la prolina i el volum de la cadena lipòfila que es volia incorporar.

Quan es va utilitzar diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) en presència de hidroxibenzotriazole (HOBt) en dimetilformamida (DMF) tampoc es va detectar la formació de l'amida desitjada. L'acilació directa amb el clorur de perfluorundecanoïl en piridina anhidra a 90°C durant 2 hores va conduir al producte esperat, però amb un 5% de rendiment que no augmentava en allargar la reacció fins les 12 h.

5.2.3 Ús de hexafluorofosfat de cloro-*N,N,N',N'*-tetrametilformamidini (TCFH) com a agent d'acoblament

A la bibliografia es va trobar descrit l'ús d'agents d'acoblament basats en sals d'amidini amb bons resultats en productes impeditos esteriantment.¹⁰⁵ El TCFH (hexafluorofosfat de

cloro-*N,N,N',N'*-tetrametilformamidini) es un agent d'acoblament d'aquest tipus. El seu mecanisme d'activació es basa en l'atac del grup carboxilat sobre el carboni electro-deficient de la sal d'amidini per donar la corresponent sal d'aciloxiamidini que, en ser altament inestable, reacciona amb el grup sortint per donar l'espècie activada. Així, via aminòlisi dona l'amida desitjada, essent clau en aquest procés la formació de l'urea.¹⁰⁶



Es va decidir assajar aquesta metodologia en el nostre cas. Així, es va utilitzar la següent relació molar 1 eq d'amina: 1,5 eq d'àcid carboxílic: 2 eq de TCFH i base (s'escollí la dietilamina) en CH_2Cl_2 anhidre a temperatura ambient. L'evolució de la reacció es va seguir per CCF, controlant la disminució del producte de partida (amina). A les 18 h es va decidir aturar la reacció, tot i encara detectar la presència de producte de partida. En realitzar l'espectre de MS del producte es va detectar la massa desitjada més 23 uma, m/z (Na^+): 787,1321. Per tal d'optimitzar el rendiment d'aquesta reacció, es va allargar el temps de reacció. No obstant, sempre es van obtenir rendiments més baixos (de l'ordre del 40%). Així es va mantenir un temps de reacció de 18 hores.

Tot seguit, es va purificar **35** per cromatografia en columna, per posteriorment caracteritzar-lo amb ajuda de les tècniques espectroscòpiques disponibles (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ^{19}F -RMN, $g\text{COSY}$ i $g\text{HSQC}$). La presència de senyals corresponents a grups etil en l'espectre de ^1H -RMN del cru de reacció es va atribuir a la possible interferència de la dietilamina utilitzada com a base en la reacció. Així, aquesta es va substituir per la diisopropiletilamina.

Malgrat que el grup incorporat sobre la molècula és invisible a la ^1H -RMN, en comparar els desplaçaments químics dels senyals corresponents a la L-prolina en l'espectre de protó de **35** s'observà que tots es trobaven desapantallats respecte als mateixos senyals en la *N'*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida. A més, es va observar la duplictat de senyals en la zona aromàtica i en les de les posicions C^2 i C^5 en l'espectre de ^1H -RMN i de ^{13}C -RMN del derivat fluorat. La presència d'aquesta duplicació de senyals es deu a la

presència de confòrmers de rotació restringida. Aquest fenomen es dona de forma freqüent en els derivats de *N*-acil-L-prolina.

Pel que fa al ^{13}C -RMN, la observació dels senyals corresponents a la cadena perfluorada es veu dificultada per l'acoblament ^{13}C - ^{19}F . Tot i això, es va intuir que el grup de senyals assenyalats que van de 106 a 116 ppm pertanyien als carbonis d'aquest grup (Figura 5.2).

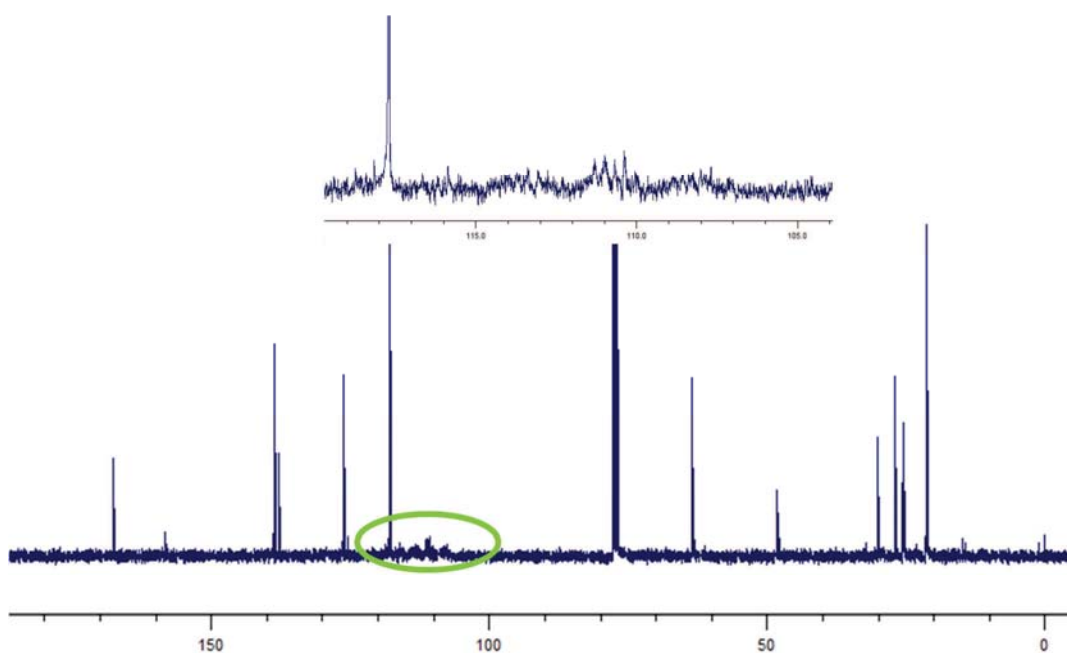


Figura 5.2 ^{13}C -RMN de **35** on s'assenyala la senyal corresponent als carbonis de la cadena perfluorada.

La confirmació de la preparació de **35** es va obtenir en realitzar l'experiment de ^{19}F -RMN (Figura 5.3) s'observen els senyals corresponents als àtoms de fluor de la cadena. El rendiment de la reacció es va calcular en un 70 %.

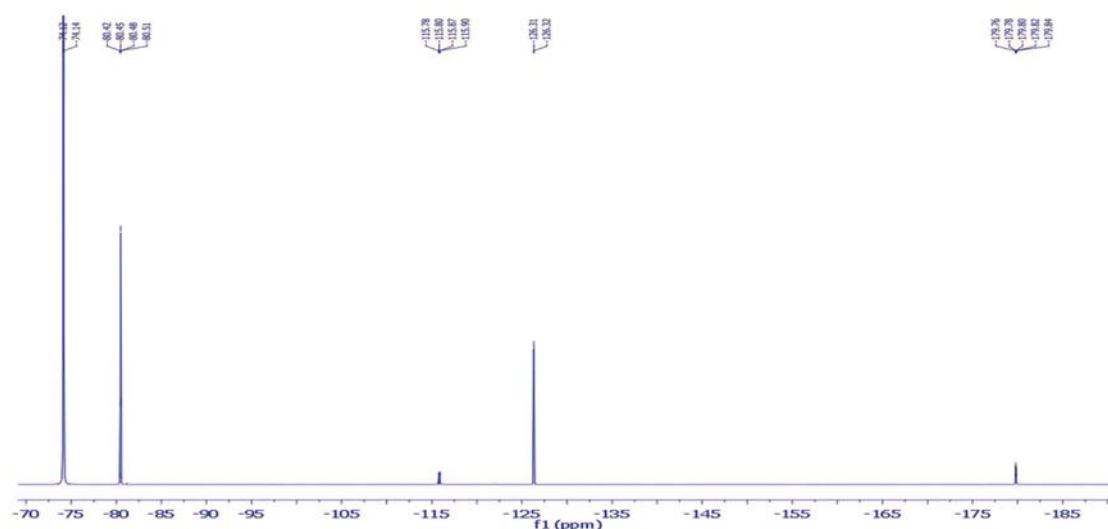


Figura 5.3 ^{19}F -RMN del **35** on es veuen les senyals corresponents al fluor.

5.3. Construcció del sistema de dissolvents ternari

L'únic sistema de dissolvents bifàsic que es va trobar descrit a la literatura en què participava un dissolvent fluorat va ser el format per: perfluorohexà/hexà/benzè.¹³ Degut a l'alta lipofília d'aquest sistema es va desestimar, ja que no permetria el repartiment del racèmic entre les dues fases. Per aquest motiu es va considerar l'ENFB més adient en tractar-se d'un èter.

En un primer moment, es va plantejar la possibilitat d'un sistema binari format per l'ENFB/ H_2O , però la gran diferència de polaritat entre els dos components dificulta trobar analits que es reparteixin en ambdues fases. Per tant, es va procedir a considerar sistemes de dissolvents ternaris. Els sistemes més utilitzats en CCC solen estar formats per dos dissolvents immiscibles entre ells, més un tercer que és soluble en els altres dos. L'addició d'aquest tercer dissolvent modulador és fa necessària i important en CCC quiral, ja que es necessita una certa polaritat a la fase més lipòfila per poder dissoldre el SQ i permetre alhora el repartiment dels analits en les dues fases. Aquests tipus de sistemes s'anomenen de *tipus I*.

Existeixen altres tipus de sistemes de dissolvents, com els de *tipus 0* que son aquells formats per tres dissolvents miscibles entre sí, dos a dos, i en determinades proporcions originen dues fases. Els sistemes integrants per dos solvents miscibles entre sí i un tercer immiscible amb els anteriors, son els anomenats de *tipus II* (Figura 5.4).

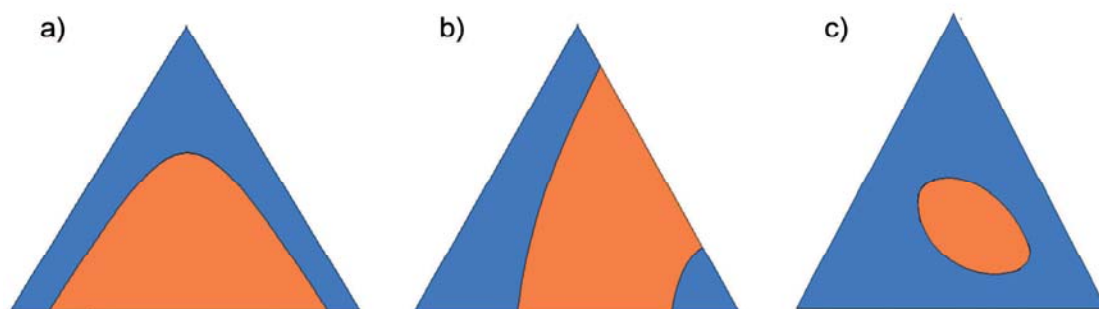


Figura 5.4. Diagrames de fases per sistemes de dissolvents de tipus: a) I: dos dels components son immiscibles entre si i el tercer és miscible en tots dos; b) II: dos components immiscibles entre si i el tercer miscible només en un d'ells; c) 0: tots els dissolvents miscibles entre si en determinades proporcions.

Així, per tal de tenir dos dissolvents de polaritat extrema es seleccionà la parella ENFB (dissolvent lipòfil) i H_2O (dissolvent hidròfil). Com a solvents de polaritat intermèdia solubles parcialment en ambdues fases foren seleccionats: 2-PrOH, MeOH i ACN. Un altre sistema que es plantejà fou el format per ENFB/etilenglicol, com a parella de solvents de polaritat extrema, i l'1-BuOH com a dissolvent de polaritat intermèdia o modulador.

Una vegada seleccionats els components dels sistemes ternaris de dissolvents que es volgueren construir, es seleccionà la metodologia descrita per Berthod en l'elaboració d'un sistema aquós bifàsic de dissolvents a temperatura ambient on els components eren líquids iònics amb lleugeres modificacions.¹⁰⁷ D'aquesta manera s'aconseguí determinar les composicions que formarien la línia bimodal que separa les composicions que originen una sola fase de les que n'originen dues (Taula 5.2).

Taula 5.2. Composició de les barreges límit (que formen una sola fase o terbolesa) ENFB/2-PrOH/aigua expressada en mL i en percentatge (part esquerra de la taula) i de les barreges que formen dues fases expressades en mL i en percentatge de ENFB/2-PrOH/aigua (part dreta de la taula).

| ENFB (mL/%) ^a | H ₂ O (mL/%) ^a | 2-PrOH (mL/%) ^a | H ₂ O (mL/%) ^b | 2-PrOH (mL/%) ^b | ENFB (mL/%) ^b |
|-----------------------------|---|-------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------|
| 2,5/39,7 | 0,5/7,9 | 3,3/52,4 | 0,5/2,0 | 5/19,8 | 19,7/78,2 |
| 2/25,3 | 1/12,6 | 4,9/62,0 | 0,25/0,3 | 5/5,7 | 82,3/94,0 |
| 1,5/17,8 | 1,5/17,8 | 5,4/64,3 | 1/25,6 | 2,5/64,1 | 0,4/10,2 |
| 1/11,6 | 2/23,2 | 5,6/65,1 | 1,5/35,3 | 2,5/58,8 | 0,25/5,9 |
| 0,5/6,7 | 2,5/33,3 | 4,5/60,0 | 2/43,0 | 2,5/53,8 | 0,15/3,2 |
| - | - | - | 5/89,8 | 0,5/9,0 | 0,07/1,2 |
| - | - | - | 5/94,9 | 0,25/4,7 | 0,02/0,4 |

^a Es parteix de d'una barreja de dos dissolvents que formen dues fases i s'addiciona el tercer fins a obtenir una sola fase; ^b Es parteix d'una barreja de dissolvents que forma una sola fase i s'addiciona el tercer fins a obtenir dues fases.

La representació gràfica dels sistemes de dissolvents formats per tres components (A, B i C) es sol realitzar en dues dimensions, podent expressar les composicions en percentatges individuals per a cada component. Així, aquest percentatge es pot expressar en % de volum, % molar o % de massa, essent aquesta última la manera més senzilla.¹³ Una vegada es disposaren de totes les dades experimentals necessàries, es procedí a la construcció dels gràfics dels sistemes de dissolvents. Pel que fa al nostre cas, atès que es coneix el contingut exacte de cada dissolvent a cada tub, expressat en volum, i el volum total es decidí representar el percentatge en volum/volum (v/v). D'aquesta manera, s'obtingueren les 4 gràfiques que es mostren a continuació (Figura 5.5). Tal i com es pot observar, en les gràfiques només es mostren les proporcions de dos dels dissolvents integrants dels sistemes de dissolvents. El tercer, que en el nostre cas sempre es tracta de l'ENFB es calcula per diferència una vegada coneguts els percentatges dels altres dos components. Totes les combinacions realitzades per sota de la línia bimodal donen lloc a dues fases, mentre que per sobre d'aquesta línia només s'obtenen barreges que donen lloc a una sola fase.

Tot i que ens els gràfics que s'adjunten no es mostren, també es calcularen les *tie-lines*, de cada sistema desenvolupat. Una *tie-line* és una recta que uneix dos punts oposat de la corba (línia bimodal) i indica una sèrie de composicions que donen lloc a un mateix

sistema de dissolvents en equilibri, però amb diferents proporcions de cadascun dels dissolvents.

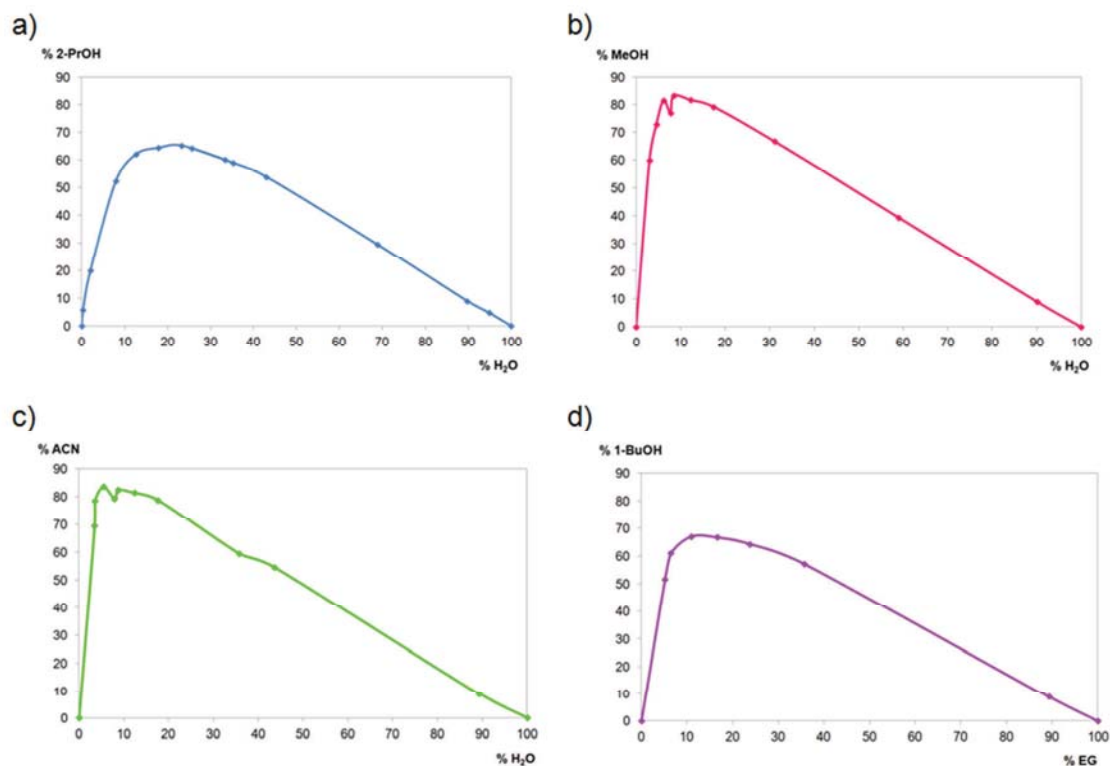


Figura 5.5. Diagrames ternaris dels sistemes de dissolvents a) ENFB/2-PrOH/H₂O; b) ENFB/MeOH/H₂O; c) ENFB/ACN/H₂O i d) ENFB/1-BuOH/etilenglicol.

5.4. Selecció de la composició dels sistemes de dissolvents i estudi de la seva estabilitat a temperatura ambient

Un cop obtingudes les representacions gràfiques dels quatre sistemes de dissolvents construïts, es procedí a la preparació de diverses mescles bifàsiques per tal d'avaluar la seva estabilitat a temperatura ambient i corroborar la no formació d'emulsions amb l'agitació, ja que el sistema de dissolvents ha d'ésser estable dins de la columna de CCC. S'observà que totes les mescles preparades es separaven ràpidament després d'agitar-les en un embut de decantació, fet que fa que es puguin utilitzar en CCC.

A continuació, es determinà la concentració de saturació dels SQ **1**, **35** i **36** en totes les composicions preparades, així com en MTBE/tampó fosfat 50mM pH 6, ja que es vol fer un estudi comparatiu del selector fluorat en un medi fluorat i no fluorat. La insolubilitat presentada pels SQ en el sistema format per l'ENFB/MeOH/H₂O ens va fer descartar aquest sistema per a posteriors estudis. Pel que fa al sistema que conté ACN, el SQ **1** es mostrà pràcticament insoluble a l'igual que el **36** (< 1 mg/mL), i només es pogué assajar el **35** (Taula 5.3).

Taula 5.3. Concentració de saturació dels tres SQ en els medis assajats.

| Composició del sistema de dissolvents | Proporcions (v/v) | Solubilitat | | |
|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 1 | 35 | 36 |
| ENFB/ACN/H ₂ O | 17:43:40 | Insoluble | 11 mg/mL (14 mM) | No calculat |
| ENFB/MeOH/H ₂ O | 21:33:40 | Poc soluble (<1 mg/mL) | Poc soluble (<1 mg/mL) | Poc soluble (<1 mg/mL) |
| ENFB/MeOH/H ₂ O | 46:295:40 | Insoluble | Poc soluble (<1 mg/mL) | Poc soluble (<1 mg/mL) |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 48:12:40 | Poc soluble (<1 mg/mL) | 48 mg/mL (60 mM) | No calculat |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 90:35:40 | Poc soluble (<1 mg/mL) | 17 mg/mL (20 mM) | No calculat |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 25:35:40 | 31 mg/mL (70 mM) | 62 mg/mL (80 mM) | 23 mg/mL (40 mM) |
| MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 | - | 42 mg/mL (100 mM) | 57 mg/mL (70 mM) | 202 mg/mL (380 mM) |

Pel que fa al comportament dels diferents SQ en els sistemes que contenen 2-PrOH, s'observà que **35** es solubilitzà en totes les composicions preparades. Per contra el SQ **1** només es solubilitzà en la composició que contenia més 2-PrOH. Aquest fet ens indica que a més contingut de dissolvent fluorat en el sistema disminueix la solubilitat de tots els SQs. Respecte al comportament en MTBE/tampó fosfat, s'observa que tots els SQs son altament solubles, fins i tot el SQ **35** és molt soluble en aquestes condicions. En base als resultats obtinguts es decidí assajar els tres SQs en dos medis diferents un de fluorat (ENFB/2-PrOH/H₂O (25:35:40)), i un de no fluorat (MTBE/tampó fosfat sòdic

50mM pH 6). A més, es pensà en substituir l'aigua per tampó fosfat sòdic pH 6, per així aconseguir tenir el racèmic ionitzable seleccionat, DNB-(±)-Leu en el medi, repartint entre les dues fases. A més, s'introduí en l'estudi un analit no ionitzable, la DNB-Leu-*t*Bu, ja que per a aquest analit no es pot controlar la seva retenció modificant el pH de la fase mòbil. És en aquestes condicions en les que podrem observar si els nous sistemes de dissolvents son efectius i útils.

Per a totes les composicions estudiades es comprovà per mitjà de CCF que el SQ quedés retingut en la fase més lipòfila (FE) i no es repartís cap a la fase hidròfila (FM). Aquesta prova es realitzà agafant una alíquota de cada fase a la que s'afegí una quantitat determinada del SQ. En assajar el repartiment en els sistemes de dissolvents fluorats, s'aconseguí que cap dels tres SQs es reparteix cap a la fase hidròfila amb el sistema que contenia un percentatge més elevat 2-PrOH (25:35:40). També es va observar que només **35** es va retenir en la FE, quan aquesta tenia un elevat contingut en ENFB la qual cosa confirma l'afinitat per la fase fluorada de les molècules que contenen àtoms de fluor (Taula 5.4).

A més, com ja s'ha dit anteriorment, en CCC quiral una altra condició que s'ha de complir és la partició del racèmic seleccionat entre les dues fases, per aquesta raó s'efectuà la mateixa prova, però ara addicionant un dels racèmics seleccionats en el present estudi, un d'ionitzable (DNB-(±)-Leu) i un altre de no ionitzable (DNB-(±)-*t*Bu-Leu). Al realitzar el control qualitatiu per CCF s'observà que la DNB-(±)-Leu es repartí entre les dues fases, excepte en les barreges del sistema que contenia MeOH. Tot i que aquest sistema ja s'havia descartat anteriorment per la baixa solubilitat que presentaven els SQs. En cap de les composicions estudiades la DNB-*t*Bu-Leu es repartí, detectant-ne només la seva presència en la fase lipòfila. Malgrat aquest fet, es decidí incloure en l'estudi aquest últim racèmic.

Taula 5.4. Repartiment entre les dues fases dels sistemes de dissolvents estudiats dels SQs i del racèmics. R: repartiment; NP: no repartiment. ^a Determinat de forma qualitativa per CCF.

| Composició del sistema de dissolvents | Proporcions (v/v) | 1 | 35 | 36 | DNB-Leu | DNB- <i>t</i> Bu-Leu |
|---------------------------------------|-------------------|----------------|----|----|---------|----------------------|
| ENFB/ACN/H ₂ O | 17:43:40 | R ^a | NR | R | R | NR |
| ENFB/MeOH/H ₂ O | 21:33:40 | NR | NR | NR | NR | NR |
| ENFB/MeOH/H ₂ O | 46:295:40 | NR | NR | NR | NR | NR |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 48:12:40 | R | NR | R | R | NR |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 90:35:40 | R | NR | R | R | NR |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 25:35:40 | NR | NR | NR | R | R |
| MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 50:50 | NR | NR | NR | R | R |

5.5. Experiments de cromatografia en contracorrent (CCC)

Una vegada seleccionades les composicions dels sistemes de dissolvents a estudiar, els SQs i els racèmics, es realitzà la cerca de les condicions de treball idònies per tal de realitzar els experiments. Es procedí a realitzar assaigs en blanc amb l'aparell de CCC per tal d'establir el volum de fase estacionària retingut al dispositiu en funció de la velocitat de rotació, el flux de la fase mòbil, el volum de la mostra i la concentració d'aquesta.¹⁰⁸ S'aconseguí retenir entre un 80-89 % de FE mantenint una rotació de 2100 rpm i un flux de fase mòbil de 0,5 mL.

A continuació, s'estudià el temps de retenció de l'analit sense addicionar el SQ a la fase estacionària. Atès que el racèmic DNB-(±)-Leu no es retingué en el sistema format per ENFB/2-PrOH/tampó fosfat sòdic 50mM pH 6 (25:35:40), es decidí utilitzar l'ENFB/2-PrOH/H₂O (25:35:40) el temps de retenció fou de 28 minuts a un flux de fase mòbil de 0,5 mL/min. Aquest mateix flux s'utilitzà quan el **35** s'assajà en el sistema ENFB/ACN/H₂O (17:43:40), on el racèmic es retingué 32 min. Per contra, quan s'assajà el sistema de l'ENFB/2-PrOH/ H₂O (25:35:40) amb DNB-(±)-*t*Bu-Leu com a racèmic es va augmentar el flux fins a 1 mL/min, per a obtenir un temps de retenció de 27 min.

Cal recordar que la fase fluorada que s'utilitza com a FE és la fase més densa del sistema. Es treballa, per tant, en el mode *T-to-H* (*Tail-to-Head, ascending*); és a dir, si es realitza una analogia amb l'HPLC equivaldria a treballar en condicions de fase normal. Per contra, a l'utilitzar el sistema clàssic MTBE/tampó fosfat s'utilitza el mode *H-to-T* (*Head-to-Tail, descending*) que seria com treballar en fase inversa.

En el sistema MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH6, utilitzant una concentració de 30 mM de SQ s'aconseguí la separació del racèmic DNB-(±)-Leu amb els tres SQs (**1**, **35**, **36**) (Figura 5.6), tot i que aquesta només és completa per **1**. Es de destacar la inversió en l'ordre d'elució dels enantiòmers produïda per **36**.

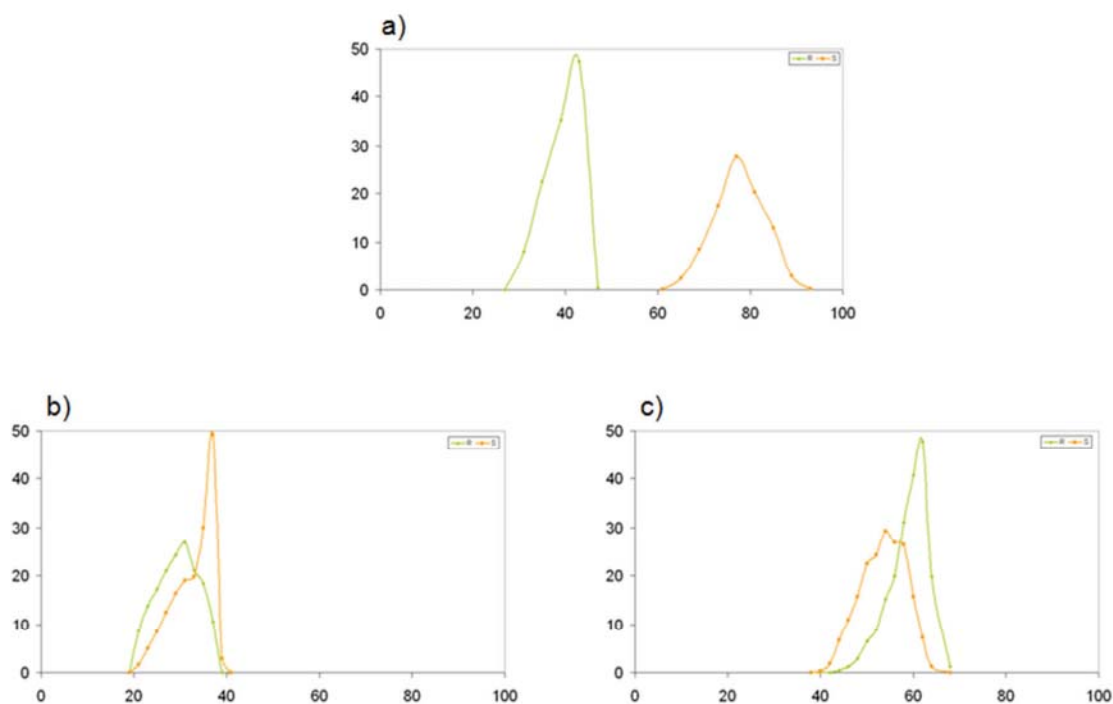


Figura 5.6. Perfils d'elució obtinguts en la separació de 0,023 mmol de DNB-Leu en el sistema MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 a una concentració de SQ de 30 mM utilitzant els SQs: a) **1**; b) **35**; c) **36**.

Quan es va assajar el sistema de dissolvents fluorat, tot i obtenir-se un valor del factor d'enantioselectivitat comparable amb el del primer sistema de dissolvents estudiat ($\alpha_{\text{CCC}} = 1,80$), es detectà una pèrdua continua de SQ de la fase estacionària cap a la fase mòbil al llarg de tot l'experiment. Quan s'assajà **35**, i es millorà el valor d' α_{CCC}

respecte a l'obtingut en MTBE ($\alpha_{\text{CCC}} = 1,40$), aconseguint-se quasi una separació total de l'analit ($\alpha_{\text{CCC}} = 1,83$). Al llarg de l'experiment no s'observaren pèrdues de SQ cap a la fase mòbil. Amb el SQ **36** tampoc s'observaren pèrdues d'aquest cap a la fase mòbil, però tampoc s'aconseguí separar completament. Altra vegada, s'observà una inversió en l'ordre d'elució (Figura 5.7).

Aquest sistema resulta avantatjós respecte a l'anterior ja que treballant a un flux de 0,5 mL/min en menys de 30 min s'aconsegueix una resolució quasi total del racèmic. Contràriament, en el sistema format per MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH6 son necessaris quasi 100 min per aconseguir uns valors d' α comparables. A més, es disminueix el consum de dissolvents emprat, alhora que s'introdueix l'ús d'un solvent menys contaminant pel fet de ser reciclable.

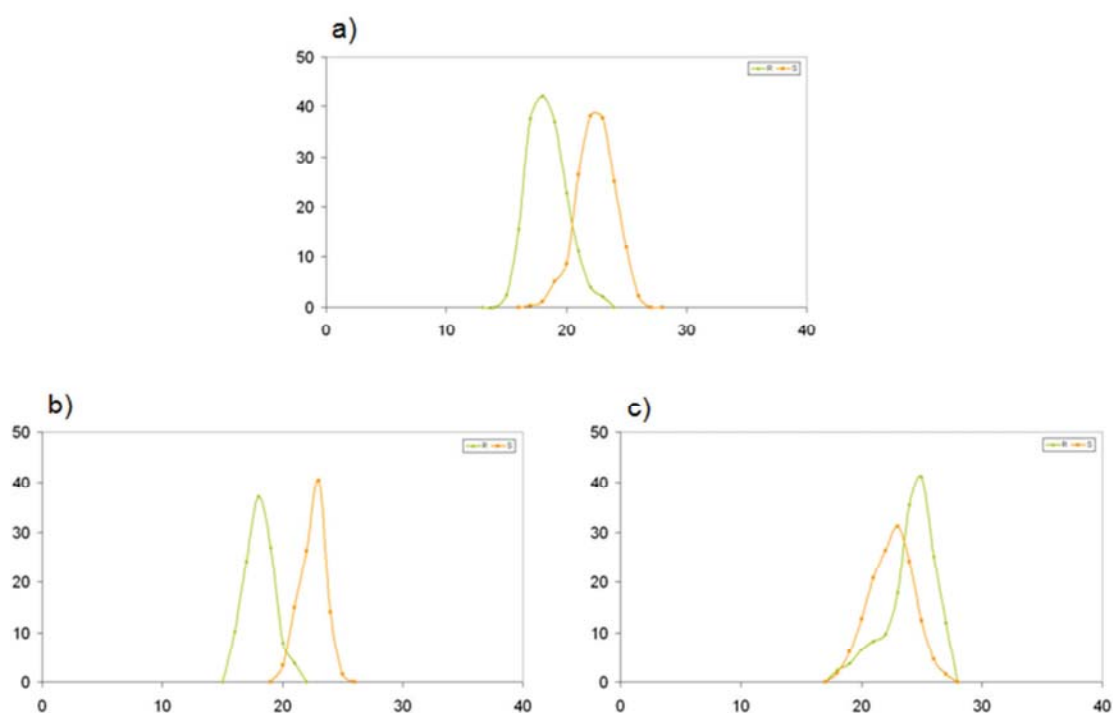


Figura 5.7. Perfils d'elució obtinguts en la separació de 0,023 mmol de DNB-Leu en el sistema ENFB/2-PrOH/H₂O (25:35:40) a una concentració de SQ de 30 mM utilitzant els SQs: a) **1**; b) **35** i c) **36**.

Per últim es decidí utilitzar el sistema fluorat, per a la separació d'un racèmic no ionitzable, la DNB-Leu-*t*Bu. Es en la separació d'aquests tipus de racèmics on es

comprovarà l'efectivitat del nou sistema de dissolvents, ja que la retenció no es pot controlar variant el pH de la fase mòbil.

Tot i detectar-se pèrdues del SQ **1**, es decidí assajar la seva enantioselectivitat front al nou racèmic seleccionat. A l'assajar-lo en el sistema fluorat a una concentració de 30 mM, s'observà una pèrdua quasi total de l'enantioselectivitat en aquest medi ($\alpha_{\text{CCC}}=1,16$), tot i que en el sistema *n*-heptà/AcOEt/MeOH/H₂O (3:1:3:1) s'havia aconseguit la separació fins a la línia de base. Per contra, amb el SQ **35** s'obtingué una separació completa de l'analit no ionitzable en poc més d'una hora, obtenint un valor d' α_{CCC} de 1,75. Malauradament, **36** no es va mostrar enantioselectiu front el racèmic en aquestes condicions (Figura 5.8).

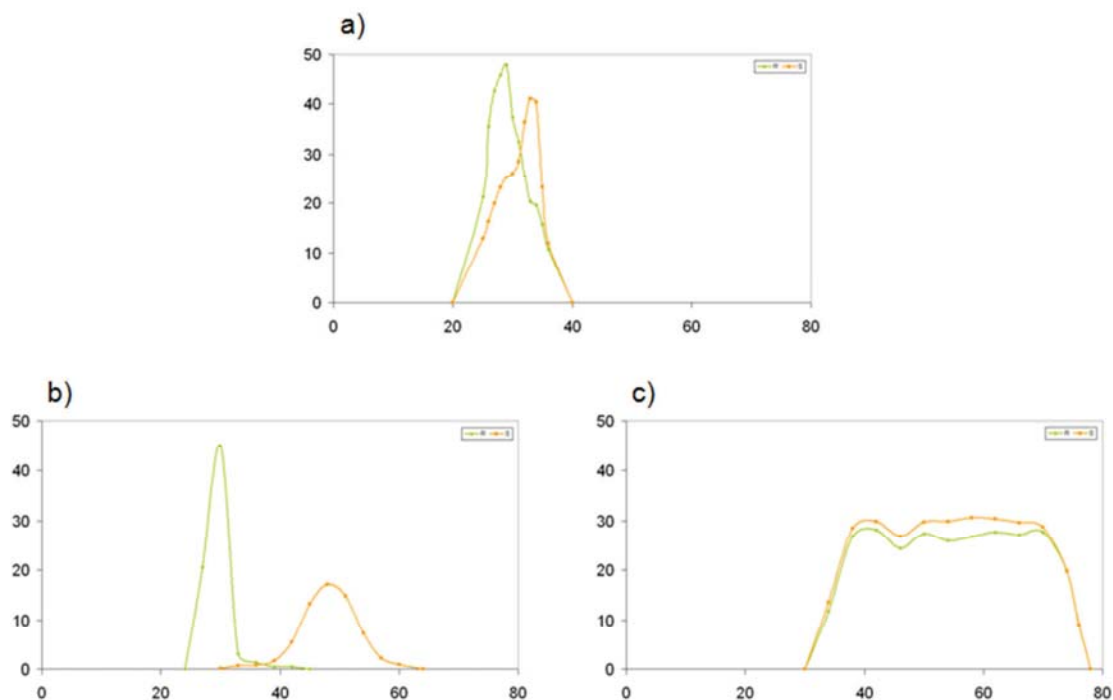


Figura 5.8. Perfils d'elució obtinguts en la separació de 0,023 mmol de DNB-*t*-Bu-Leu en el sistema ENFB/2-PrOH/H₂O (25:35:40) a una concentració de SQ de 30 mM: a) **1**; b) **35** i c) **36**.

5.6. Estudi mitjançant membranes líquides

Els resultats satisfactoris obtinguts amb l'avaluació de la capacitat enantioselectiva de SQ 1 i SQ 35 en els sistemes bifàsics fluorats, ens feu plantejar l'estudi del seu comportament a través d'una tècnica alternativa a la CCC, les membranes líquides (ML).

La tecnologia de membranes en els processos separatius presenta una sèrie d'avantatges respecte altres tècniques. Entre elles destaquen el baix cost, el fet de poder treballar en continu, de tractar-se d'un procés fàcilment escalable en el que se sol treballar a temperatura ambient, fet que evita la formació de subproductes i genera menys despesa energètica.¹⁰⁹

5.6.1. Membranes líquides enantioselectives

Com la cromatografia en contracorrent, les membranes líquides (MLs) es podrien definir com una tècnica de separació líquid-líquid entre dos líquids immiscibles. Mentre que en CCC, la fase que es manté retinguda dins del dispositiu s'anomena fase estacionària i la que flueix a través d'ella i arrossega l'analit, fase mòbil, en el cas de les MLs un dels dissolvents actua de membrana i separa dos líquids que són immiscibles amb la membrana, la fase donadora o *feed* i la fase receptora o *stripping*. Aquest tipus de membranes líquides es denominen *Bulk Liquid Membranes* (BLM). De manera anàloga a la descrita en CCC si la finalitat d'aquesta metodologia consisteix en la separació d'enantiòmers, s'ha d'afegir un transportador quiral (TQ) o *chiral carrier* al líquid que actuarà com a membrana. El fenomen del reconeixement enantioselectiu també té lloc en dissolució, i la separació, en cas de produir-se, tindrà lloc per la diferent afinitat de cada enantiòmer amb el SQ.

Són nombrosos els exemples descrits en la literatura on s'utilitzen BLM amb una finalitat enantioselectiva. Així, Cram va descriure el primer cas on utilitzà com a SQ un èter corona. Es va observar que en absència del SQ el transport era menor al que es produïa amb l'addició d'aquest.¹¹⁰ A més, Cram realitzà estudis per tal d'augmentar el transport dels enantiòmers establint un gradient de pH. Més endavant, per a millorar els valors d'enantioselectivitat obtinguts, s'acoblaren dos membranes de selectivitat

contrària que treballaven en continu, d'aquesta manera s'aconseguien millors pureses de cada enantiòmer.¹¹¹

5.6.3. Estudi de l'enantioselectivitat a través de BLM

En estudis realitzats prèviament en el nostre grup s'establiren la relació SQ/racèmic i el gradient de pH òptim entre el *feed* i l'*stripping* (pH 7 i pH 8, respectivament). Els SQ seleccionats per a l'estudi foren SQ **1** i SQ **35** i com a analit la sal sòdica de la DNB-Leu. A l'utilitzar uns SQs altament lipòfils, aquests es solubilitzaren en dissolvents orgànics, així els dispositius utilitzats son aquós-orgànic-aquós.

D'aquesta manera, cloroform, MTBE i ENFB es seleccionarem com a integrants de les membranes estudiades. Els dispositius utilitzats per a realitzar els experiments diferien en funció de la densitat del dissolvent constituent de la membrana respecte a l'aigua. En assajar les membranes formades per cloroform o ENFB, al ser més densos que l'aigua s'utilitzà el dispositiu en forma de U, mentre que a l'utilitzar el MTBE com a component de la membrana s'utilitzà el dispositiu en forma d'H (Figura 5.9).

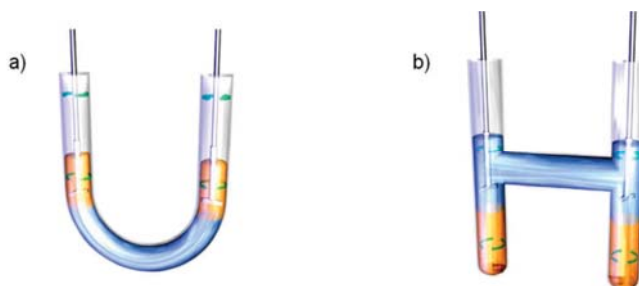


Figura 5.9. Esquema dels dispositius utilitzats en la realització de les MLs a) dispositiu en forma de U i b) dispositiu en forma d'H.

5.6.3.1. Enantioconeixement en cloroform

Els primers assajos de BLMs es realitzaren en cloroform, es seleccionà aquest dissolvent ja que s'havia utilitzat prèviament en estudis d'enantioselectivitat de derivats de L-prolina en el nostre grup. Aquesta tria ens assegura poder solubilitzar la quantitat de SQs desitjada (2 mM; 10 mmol en 10 mL de dissolvent), ja que son altament solubles en cloroform. El racèmic (0,2 M; 0,4 mmol en 2 mL) es dissolgué en el *feed* constituït per la solució de tampó fosfat sòdic 50 mM de pH 7. Essent el diàmetre de la zona de

contacte entre fases de 1,12 cm i la superfície de contacte de 0,98 cm. Per tal de seguir l'experiment es prengueren mostres de l'*stripping* a diferents temps que foren analitzades per HPLC quiral.

La concentració de SQ en la membrana i la selecció del gradient de pHs entre el *feed* i l'*stripping* es realitzà en base a un estudi anterior descrit a la Tesi Doctoral de Biotza Gutiérrez. Així, es va establir 1 mM com la concentració utilitzada en els experiments, i que prèviament havia estat descrita en la literatura.¹¹² Pel que fa a l'establiment del gradient de pHs, es mantingué entre pH 7 i 8 pel *feed* i l'*stripping*, respectivament.

Els experiments en blanc, és a dir, sense l'addició del SQ a la membrana, van permetre determinar que existia transport passiu en aquestes condicions de treball. Tot seguit, es procedí a l'estudi de les membranes quirals, per tal de comprovar si l'addició dels SQs inclosos en l'estudi a la fase orgànica, provoca un enriquiment enantiomèric en la fase receptora o *stripping* (Figura 5.10).

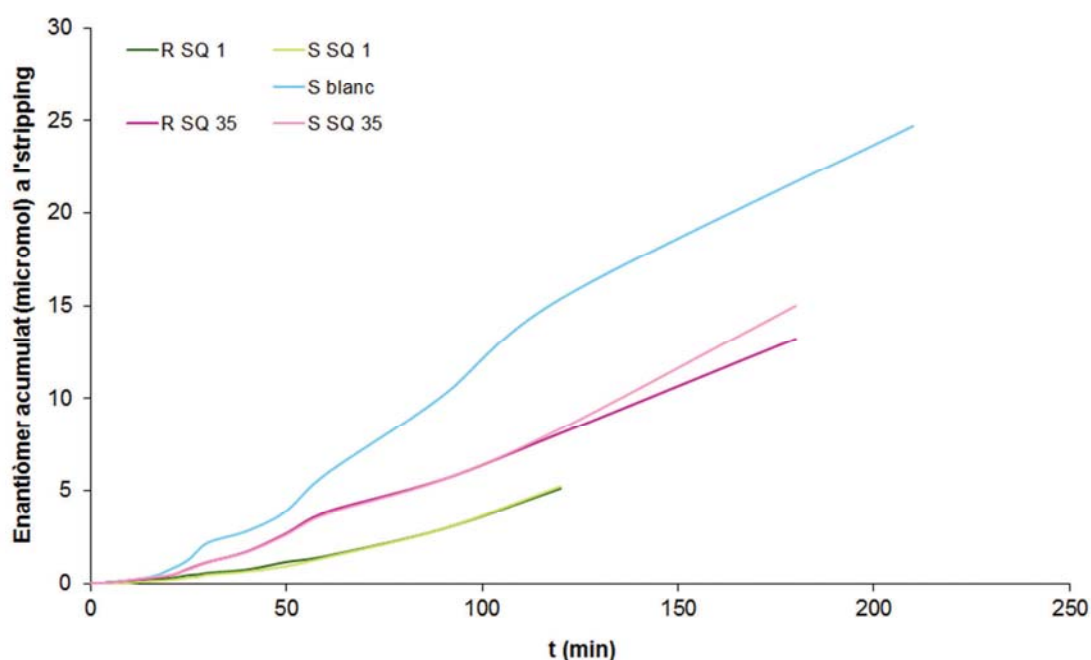


Figura 5.10. Transport dels enantiòmers de la DNB-Leu en cloroform dels SQs 1 i 35 enfront del temps

Es va comprovar que en absència de SQ no es produeix cap enriquiment. Així, a l'*stripping* es detecta en tot moment la mescla racèmica (Figura 5.11).

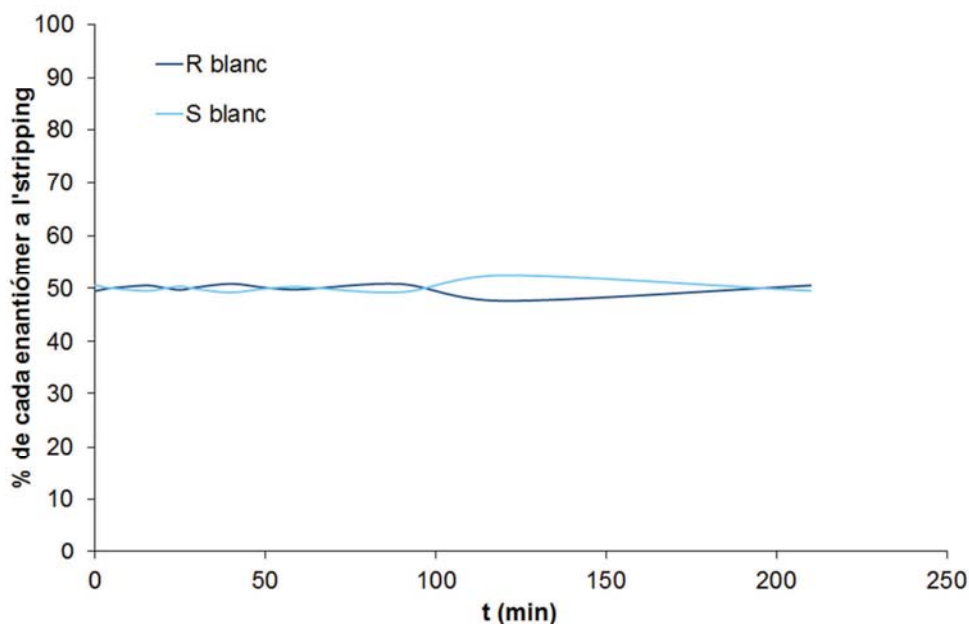


Figura 5.11. Percentatge de cada enantiòmer de la DNB-Leu detectat al *stripping* de la membrana clorofòrmica sense afegir SQ a la fase orgànica.

Es va observar que el transport en presència tant de SQ **1** com de SQ **35** era inferior al que es dona en el blanc. Així doncs, es dona una retenció dels enantiòmers de l'analític en la membrana, cosa que produeix un retard en la detecció dels enantiòmers de la DNB-Leu en l'*stripping*. Malauradament, aquest alentiment en el transport no és sinònim d'un increment de l'enantioselectivitat, ja que aquesta només es mantingué menys de 10 minuts en el cas de SQ **1**. A les 2 h es va donar l'experiment per acabat.

Per contra, en estudiar el comportament del SQ **35**, a les tres hores encara existia enantioselectivitat en la membrana, i l'experiment es perllongà durant 6 dies. Si es compara el transport als mateixos temps, s'observa que és més elevat en el cas de SQ **35**

Un altre fet a remarcar en el cas de SQ **35**, és el transport més elevat de la forma S de la DNB-Leu respecte a la R. L'enantiòmer S resulta més retingut en els experiments de CCC utilitzant tant SQ **1** com SQ **35**. Aquesta major retenció està en concordança amb una constant d'associació més gran amb l'enantiòmer S del DNB-derivat de leucina (determinada per RMN en un treball precedent per SQ **1**).⁷⁸ Atesa la similitud estructural

entre SQ1 i SQ 35 i l'ídem ordre d'elució observat en CCC pels dos SQs, es fa difícil explicar la inversió en l'ordre del transport que ara s'observa.

5.6.3.2. Enantioconeixement en metil *tert*-butil èter (MTBE)

A continuació, es prosseguí a realitzar l'experiment en MTBE on s'utilitzà un dispositiu en forma d'H, al fer servir un dissolvent menys dens que l'aigua. S'utilitzaren les condicions experimentals descrites en l'apartat anterior.

A l'analitzar els resultats obtinguts (Figura 5.12), es comprovà que en utilitzar el SQ 1 el transport dels enantiòmers és menor respecte al blanc, provocant aquest un alentiment en els transport dels enantiòmers de la (\pm)-DNB-Leu. Per contra, la permeabilitat d'aquests a l'utilitzar SQ 35 fou de la mateixa magnitud a l'obtinguda en el blanc. Així, mentre que SQ 1 actua retardant el pas de l'analit de la membrana a l'*stripping*, SQ 35 quasi no l'altera. Al comparar el transport obtingut en cloroform i en MTBE, s'observà que era molt més ràpid en MTBE, sent unes 25 vegades més gran al comparar els resultats obtinguts per l'experiment en blanc.

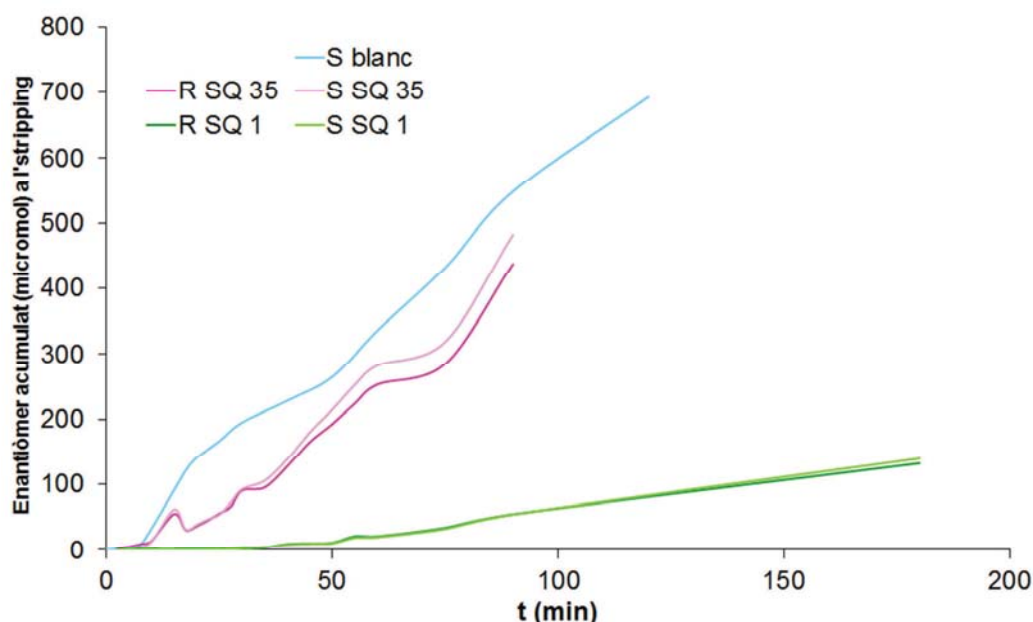


Figura 5.12. Transport dels enantiòmers de la DNB-Leu en MTBE enfront del temps

SQ **1** presenta una elevada enantioselectivitat front a l'enantiòmer *S* de la DNB-Leu. Així, l'excés enantiomèric de *R* a l'*stripping* és del 100% durant els 20 primers minuts de l'experiment, i aquesta disminueix dràsticament fins a desaparèixer al cap de tres hores. Per contra, en utilitzar SQ **35** als 15 minuts es detecta la barreja racèmica (Figura 5.13). Això juntament amb un ordre d'elució igual al de SQ **1** ens indica un comportament convencional pel SQ **35** en MTBE.

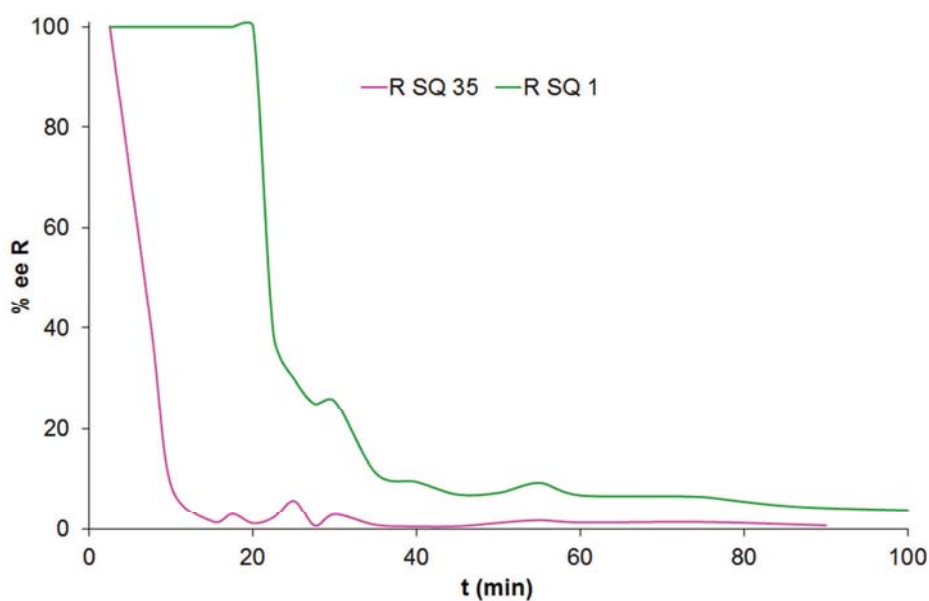


Figura 5.13. Evolució de l'excés enantiomèric (ee) durant els experiments amb membranes que contenen MTBE.

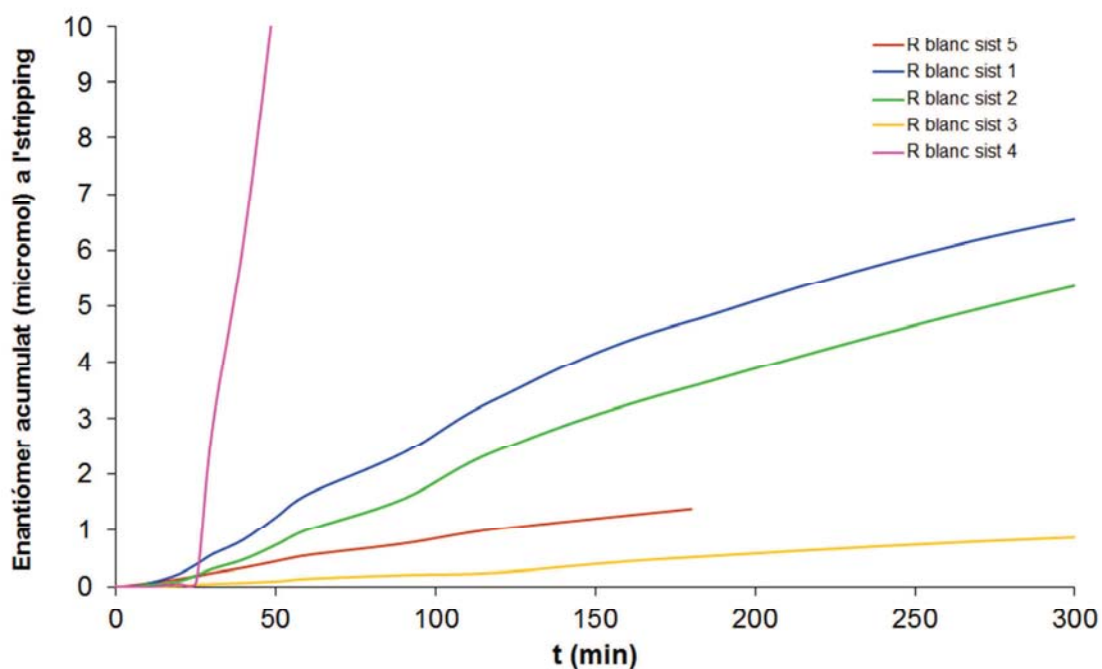
5.6.3.3. Enantioreconeixement en sistemes fluorats

Una vegada construïts els diferents sistemes de dissolvents fluorats i assajada la seva capacitat enantioselectiva en CCC, es procedí a realitzar un petit estudi d'aquests sistemes en membranes líquides. Així, per dur a terme aquest treball es decidí utilitzar el sistema format per ENFB/2-PrOH/H₂O. Es seleccionaren cinc composicions diferents per tal de veure si l'enantioselectivitat es modificava a l'estar el SQ en medis amb diferents proporcions dels dissolvents integrants. Així, les composicions estudiades van ser les que s'especifiquen a la Taula 5.5.

Taula 5.5. Composició dels diferents sistemes de dissolvents expressats en percentatge de volum de cada dissolvent integrant del sistema (%).

| | Composició | | |
|-----------|------------|----------|--------------------|
| | % ENFB | % 2-PrOH | % H ₂ O |
| Sistema 1 | 35 | 45 | 20 |
| Sistema 2 | 25 | 35 | 40 |
| Sistema 3 | 18 | 22 | 60 |
| Sistema 4 | 16 | 64 | 20 |
| Sistema 5 | 78 | 20 | 2 |

La velocitat de transport de la DNB-Leu en aquests sistemes és més gran que en cloroform o MTBE en absència del SQ. També cal destacar que la velocitat de transport depèn molt de la composició dels sistemes de dissolvents. Aquests canvis són encara més accentuats en alguns casos amb l'addició del SQ a la membrana (Figura 5.14).

Figura 5.14. Transport de l'enantiòmer *R* de la DNB-Leu en els diferents sistemes de dissolvents fluorats assajats.

Així, en el sistema 1 el transport en presència del SQ 1 era més ràpid que el blanc mentre que la velocitat disminuïa en utilitzar el SQ 35 (Figura 5.15). Pel que a fa a l'ordre en què els enantiòmers són transportats a la fase *stripping*, primer es detecta l'enantiòmer S, observant-se una inversió en l'ordre d'elució respecte als experiments realitzats en CCC/CPC.

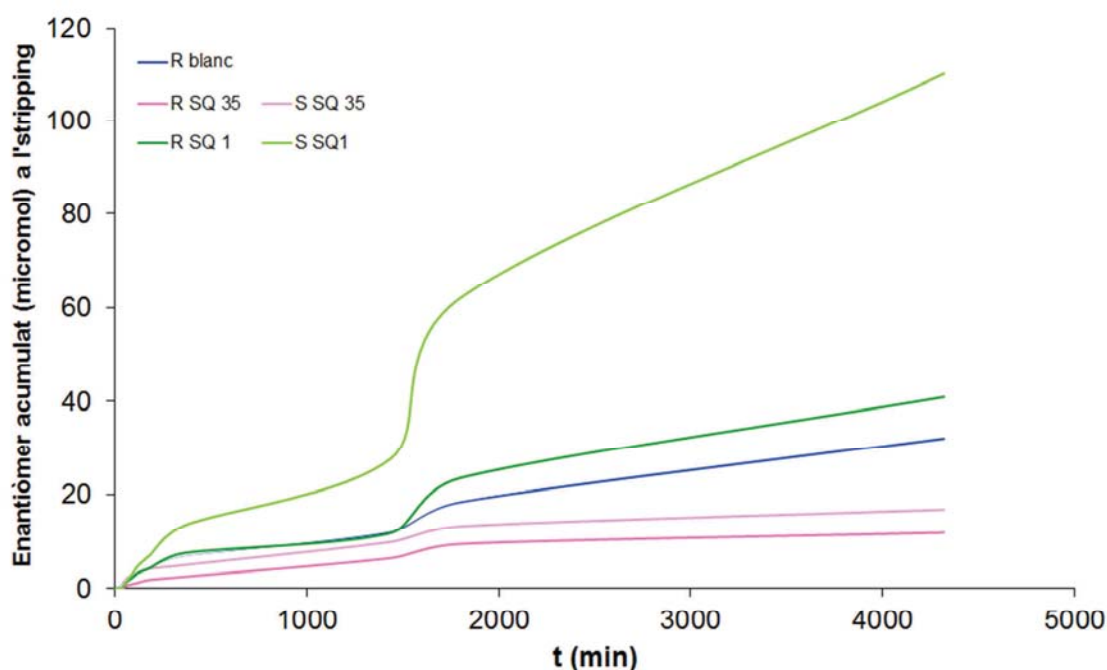


Figura 5.15. Representació gràfica on es mostra el transport del racèmic DNB-(±)-Leu en absència i en presència dels SQ 1 i 35 utilitzant el sistema de dissolvents fluorat 1 (ENFB/2-PrOH/H₂O; 35:45:20).

En el sistema 2, en el que es redueix la proporció de dissolvent fluorat respecte a la del 2-propanol (ENFB/2-PrOH/H₂O (25:35:40)), també utilitzat en els experiments de CCC descrits anteriorment, s'observà el fenomen invers. En presència del SQ 35 el transport és més ràpid que en presència de SQ 1. Fins i tot, l'enantiòmer transportat més ràpidament amb 35 ho fa molt més depressa que en absència del SQ. Cosa que apuntaria cap a un paper de veritable transportador (molècula que facilita el transport a través de la membrana) pel SQ 35. L'ordre d'enantiòmers també estaria d'acord amb aquesta hipòtesi. En ambdós casos la forma S de la DNB-Leu fou la transportada més ràpidament, mentre que la forma R difongué de manera més lenta cap a l'*stripping*. Per

contra, el pas de l'analit amb SQ 1 en aquestes condicions és més lent que el blanc, tot i que també es pot entreveure que el transport de S es produeix més ràpidament que el de R (Figura 5.16).

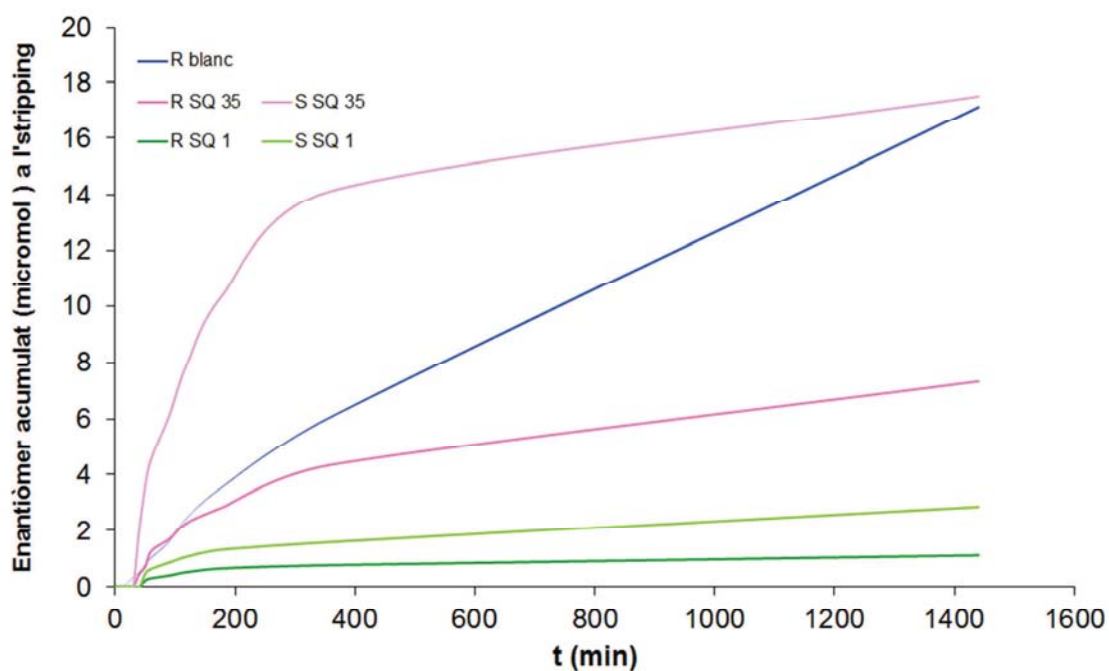


Figura 5.16. Representació gràfica on es mostra el transport del racèmic DNB-(±)-Leu en absència i en presència dels SQ 1 i 35 utilitzant el sistema de dissolvents fluorats 2 (ENFB/2-PrOH/H₂O; 25:35:40).

En assajar el sistema 3, en que encara es redueix més la proporció de dissolvent fluorat (ENFB/2-PrOH/H₂O (18:22:60)) la forma S continua sent transportada més ràpidament que la R tant per SQ 1 com per SQ 35. Mentre que l'enantiòmer S amb el SQ 35 accedeix més ràpidament a l'stripping que en l'assaig sense SQ, el pas de R a la fase receptora va ser de la mateixa magnitud (Figura 5.17). Novament, la tendència que s'observa de transportar de forma més ràpida l'enantiòmer amb el que forma el complex més estable fa pensar que el SQ actua com a *carrier* o transportador.

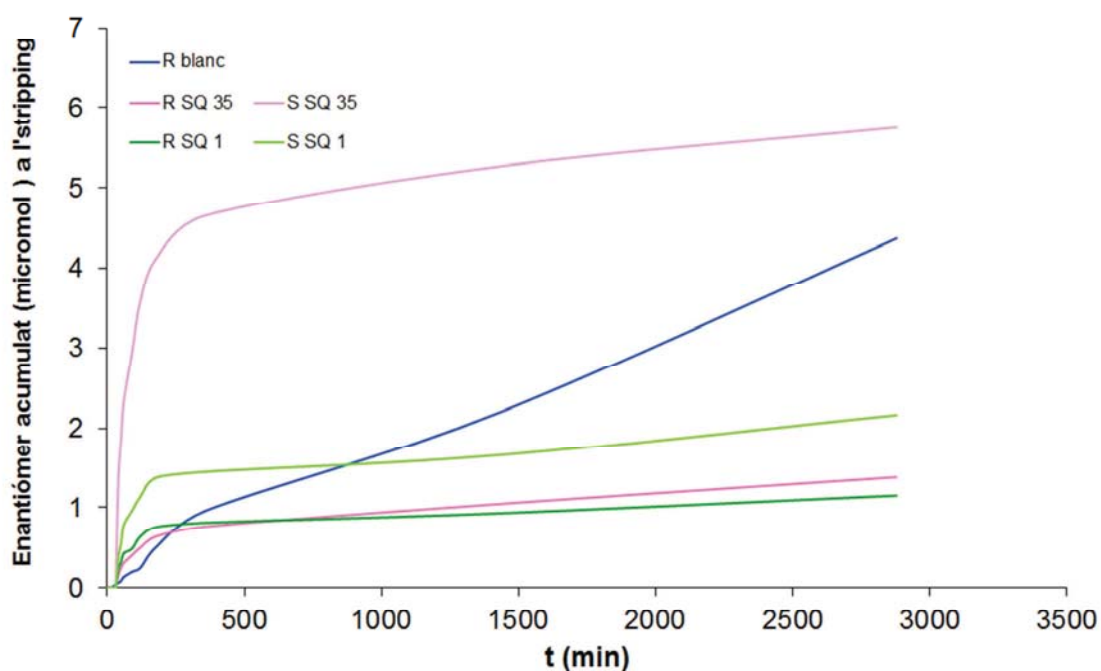


Figura 5.17. Representació gràfica on es mostra el transport del racèmic DNB-(±)-Leu en absència i en presència dels SQ 1 i 35 utilitzant el sistema de dissolvents fluorats 3 (ENFB/2-PrOH/H₂O; 18:22:60).

En l'estudi del sistema constituït per ENFB/2-PrOH/H₂O (16:64:20), semblant a l'anterior pel que fa al contingut en dissolvent fluorat però amb molta més proporció de 2-propanol que hauria d'originar un sistema de dissolvents més lipòfil i amb menys diferència de polaritat entre les dues fases líquides, el comportament dels SQs fou similar al detectat en les membranes clorofòrmiques, tot i que el transport fou més ràpid (Figura 5.18). Així, la composició de la membrana pot modificar el comportament del SQ, a l'igual que la velocitat de transport dels analits.

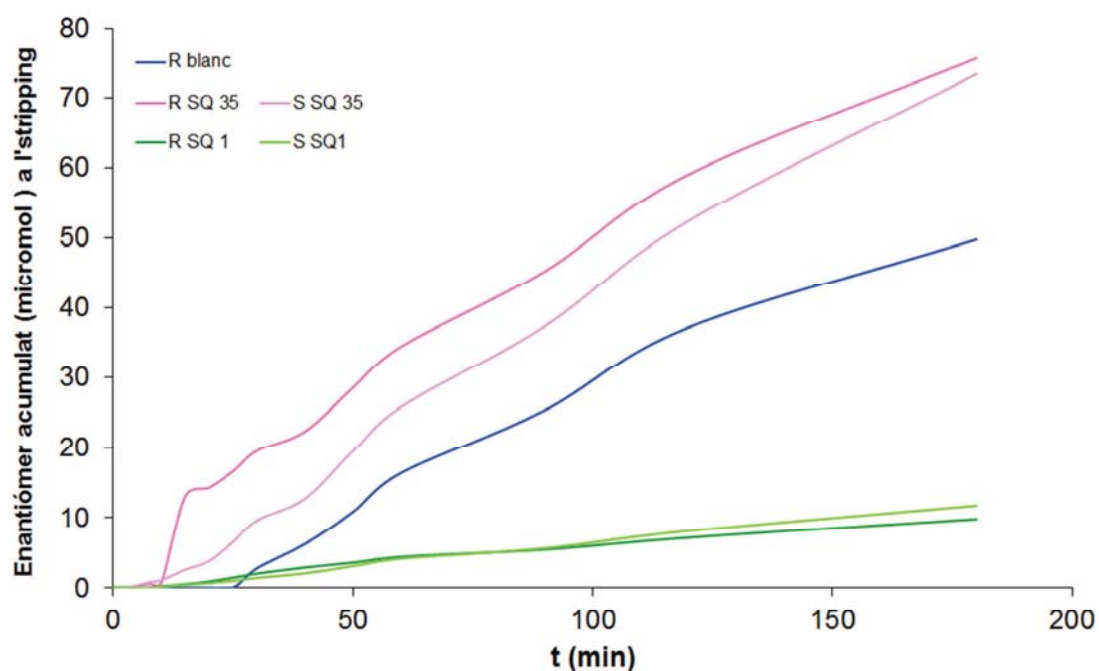


Figura 5.18. Representació gràfica on es mostra el transport del racèmic DNB-(±)-Leu en absència i en presència dels SQ 1 i 35 utilitzant el sistema de dissolvents fluorats 4 (ENFB/2-PrOH/H₂O; 16:64:20).

Finalment es va decidir utilitzar un sistema amb molta més proporció de dissolvent fluorat (ENFB/2-PrOH/H₂O (78:20:2)) i, per tant, encara molt més lipòfil. Es va veure que en aquestes condicions els dos SQs augmentaven el transport dels analits respecte al blanc, accentuant-se més aquest efecte en el cas del SQ 1. L'enantiòmer S el que passa de forma més ràpida (Figura 5.19), actuant ambdós SQ com a transportadors actius dels analits.

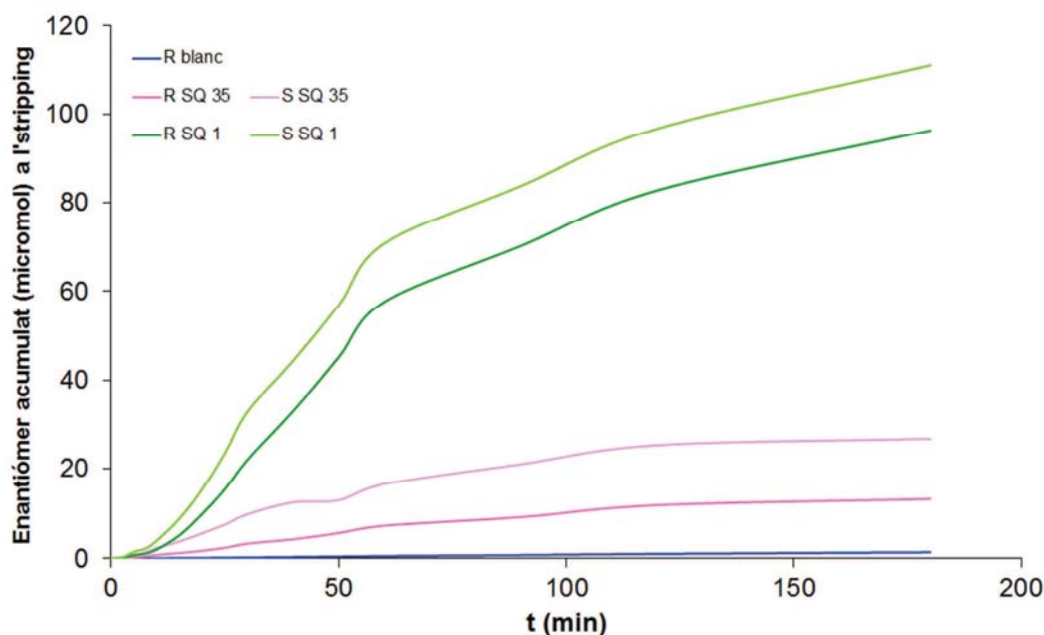


Figura 5.19. Representació gràfica on es mostra el transport del racèmic DNB-(±)-Leu en absència i en presència dels SQ 1 i 35 utilitzant el sistema de dissolvents fluorats 4 (ENFB/2-PrOH/H₂O; 16:64:20).

Pel que fa al transport, sembla que la presència del dissolvent fluorat promou l'actuació dels SQs (fluorat o no) com a transportador veritable, paper que contrasta amb l'observat en experiments precedents ¹¹³ en els que en tots els casos el SQ que s'afegeix a una membrana líquida actua, no facilitant el transport, sinó contràriament retardant el transport de l'enantiòmer més associat.

Adicionalment a l'estudi del transport del racemat en les diferents sistemes de dissolvents considerats, també s'estudià la variació de l'excés enantiomèric al llarg del temps.

Els tres sistemes de composició intermèdia (sistemes 1,2 i 3 a la taula 5.4) varen mostrar un comportament similar. Així, pel SQ 35 s'observen enriquiments inicials de l'ordre del 60% en S que cauen ràpidament arribant al racèmic en 2-3 hores. En canvi, per SQ 1 si bé en un principi, l'enriquiment de la forma S és baix, a les 24 hores s'observa un enriquiment de l'*stripping* que es manté sobre el 50% al llarg de 15 dies (Figura 5.20 i 5.21).

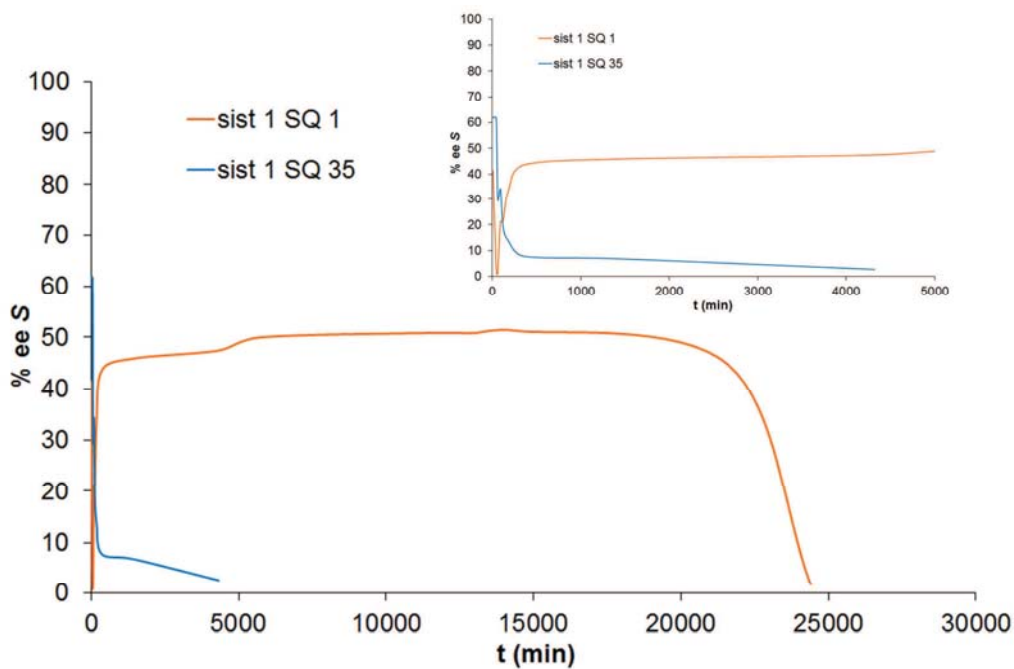


Figura 5.20. Excés enantiomèric de l'enantiòmer S en el sistema 1, a la part superior es mostra una ampliació del gràfic.

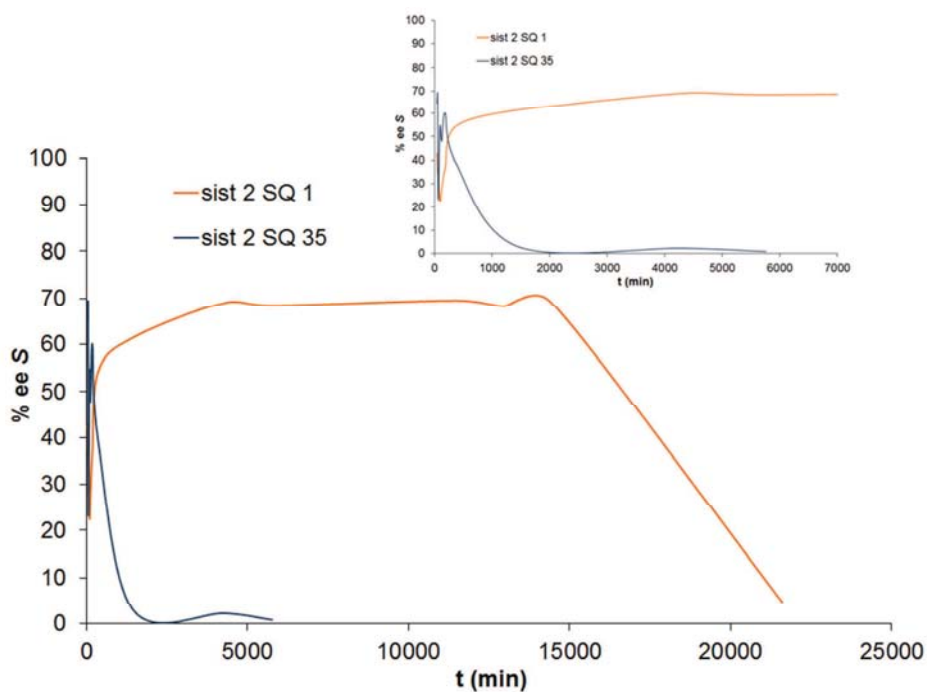


Figura 5.21. Excés enantiomèric de l'enantiòmer S en el sistema 2, a la part superior es mostra una ampliació de la zona inicial.

En el cas dels sistemes amb un alt contingut en 2-propanol (sistema 4) i amb alt contingut en dissolvent fluorat (sistema 5) es detecta la mescla racèmica als 30 minuts després d'iniciar l'experiment, tant en utilitzar el SQ 1, com el **35** (Figura 5.22).

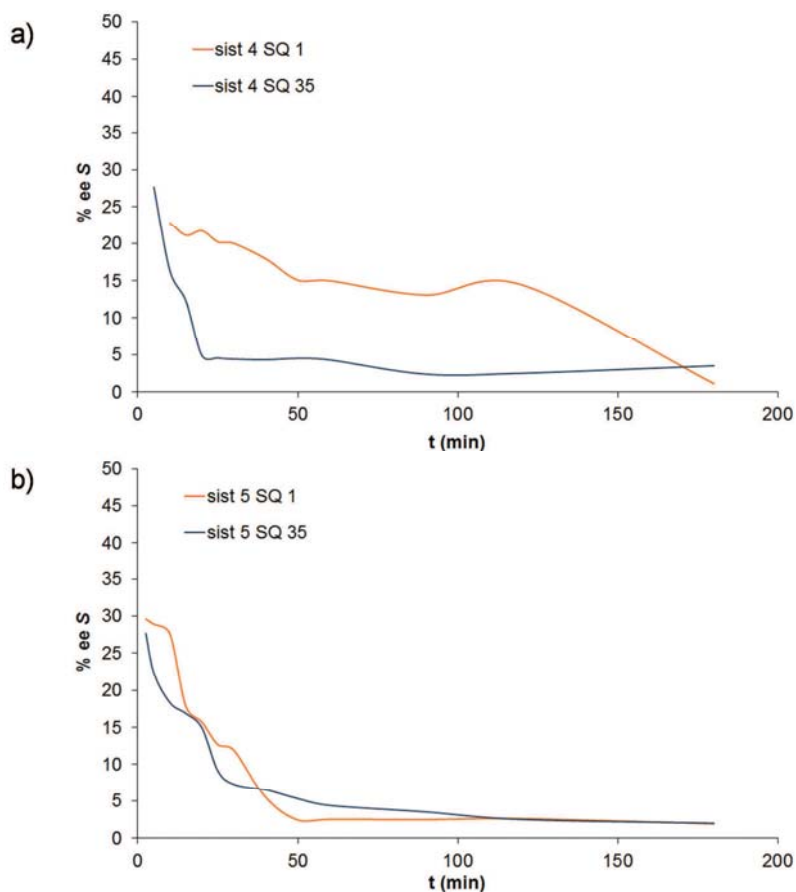


Figura 5.22. Excés enantiomèric de l'enantiòmer S en el sistema 4 (ENFB/2-PrOH/H₂O; 16:64:20) i 5 (ENFB/2-PrOH/H₂O; 78:20:2), respectivament.

Els experiments realitzats fins al present no es consideren suficients com per arribar a proposar una hipòtesi de treball sobre el paper del dissolvent fluorat en la membrana i la seva interacció amb el selector quiral. Els efectes que, no només en relació a la polaritat, sinó també pel que fa a la solvatació de les diferents entitats en joc, pot tenir sobre el resultat dels experiments podrien resultar essencials per a poder racionalitzar el comportament observat. No obstant, resulta altament interessat l'observació d'enantioselectivitat en experiments tant llargs, cosa del tot anòmla en membranes d'aquest tipus.

6. Experimental

6.1. Dades generals

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de protó dels diferents compostos obtinguts, s'han registrat amb un espectròmetre Varian Mercuri (400 MHz). El dissolvent utilitzat s'indica en cada cas. Els desplaçaments químics es donen en valors δ en parts per milió (ppm). El propi dissolvent s'ha utilitzat com a referència interna. Les abreviatures emprades en l'assignació dels senyals han estat: s, singulet; d, doblet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet; dd, doble doblet; dt, doble triplet; ba, banda ampla.

Els espectres d'infraroig s'han registrat en un espectrofotòmetre Perkin-Elmer FT-IR 1600. Les abreviatures utilitzades en l'assignació de bandes són: st, stretching; sym, simètric.

Les polarimetries s'han realitzat en un polarímetre Perkin Elmer 241 proveït d'una làmpada de Na (D). I els punts de fusió es realitzaren amb un equip Büchi Melting point B-540.

Per a la cromatografia en columna s'ha utilitzat gel de sílice SDS 60 ACC (60-200 nm) com a adsorbent. O bé, el dispositiu CombiFlash[®]R_f 200 amb un detector de longitud d'ona UV dual (λ 200-360 nm) i columnes de silicagel esfèrica empaquetades de 40 g per purificar de mostres de 200 mg a 4g. Per a la cromatografia en capa fina s'han utilitzat cromatofolis de gel de sílice 60 F 254 (Merck), localitzant els senyals per exposició a la llum UV a 254 nm.

La recerca de condicions analítiques per a la caracterització de les mostres s'ha realitzat amb un equip Waters constituït per una bomba quaternària (Mod. 2965), un injector automàtic i un detector UV tipus *diode array* (Mod. 2998). Les condicions estàndards de treball van ser a un flux d'1 mL/min de fase mòbil utilitzant un gradient format per barreges d'ACN/H₂O. Es va utilitzar una columna Symmetry C₁₈ (4,6 x 150 mm, 5 μ m, Waters). El volum d'injecció va ser de 10 μ L que prèviament va ser filtrada amb un filtre de 0,45 μ m.

La purificació del compost **25** s'ha efectuat en un aparell de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) semipreparatiu Waters Delta Prep. 400, constituït per una unitat de

control Waters Prep LC Controller, un detector de longitud d'ona dual model 2487, un col·lector de fraccions Waters Fraction Collector II i un programa de control MassLynx versió 3.5. Les condicions estàndards de treball van ser a fluxos de 15 mL/min de fase mòbil i registre dels cromatogrames a 220 i 254 nm de λ . Es va utilitzar una columna Symmetry C₁₈ (19 x 100mm, amb sílice de mida de partícula 5 μ m, Waters). El volum d'injecció va ser de 7,5 mL d'una dissolució de l'analit de 5 mg/mL de concentració que prèviament va ser filtrada amb un filtre de 0,45 μ m. El gradient utilitzat es descriu a la pàgina 101 del capítol 4.

Els assaigs de cromatografia de repartiment centrífug (*Centrifugal Partition Chromatography*, CPC), s'han dut a terme en un aparell HP-CPC sèrie 1000 (Sanki Eng. Ltd., Kyoto, Japó). Les dimensions de la centrífuga són 31x47x50 cm. La capacitat total del sistema és de 190 mL. L'HP-CPC està connectat a un sistema de cromatografia líquida Hewlett-Packard, HP sèrie 1100, constituït per una bomba quaternària, un injector manual Rheodyne amb un loop de 2,4 mL i un detector d'UV de longitud d'ona variable. Les fraccions eluïdes s'han recollit en un col·lector de fraccions Gilson FC 203B. Els experiments de cromatografia en contracorrent (CCC) es van realitzar en un dispositiu HPLC Mini-DE (Dynamic Extractions, Slough, UK). L'aparell té una bobina d'un volum de 17,8 mL constituïda per un tub de teflon de 0,8 mm de diàmetre. Al igual que en el cas anterior està connectat al mateix sistema de cromatografia i el loop té un volum de 0,34 mL.

Les anàlisis elementals s'han efectuat en un analitzador Carlo Erba model EA1108, en condicions estàndard, als Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

El control analític per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) s'ha dut a terme en un equip Hewlett-Packard, HP sèrie 1100, constituït per una bomba quaternària, un injector automàtic i un detector d'ultraviolat de longitud d'ona variable. Les condicions estàndard de treball han estat 1 mL/min de flux de fase mòbil i registre dels cromatogrames a 254 nm de λ .

Per a la identificació dels productes amb masses petites s'ha utilitzat un aparell HPLC-MS API 150 (Applied Biosystems). Les condicions estàndard de treball s'han basat en flux d' 1 mL/min de fase mòbil (acetonitril/aigua 0,1% d'àcid acètic). Es va

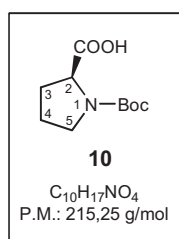
utilitzar una columna C₁₈ Nucleosil 120 (25 x 0,46 cm, Teknokroma®). I per la identificació de productes de massa superior a 500 per espectrometria de masses MALDI-TOF es va emprar un aparell model 4700 Proteomics analyzer (Applied Biosystems).

6.2. Procediments experimentals

6.2.1. Síntesi dels SQs

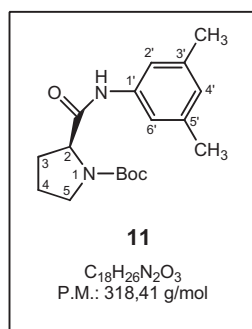
A continuació es detallen els procediments experimentals per a l'obtenció dels compostos descrits en la present Tesi doctoral, seguint l'ordre de numeració dels compostos.

Boc-L-prolina (10)



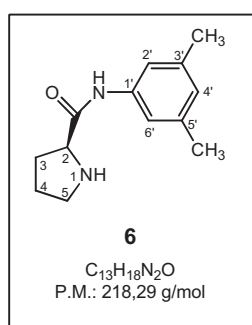
En un matràs proveït d'agitació magnètica es disposa 6 g (52,2 mmol) de L-prolina dissolts en 224mL d'una barreja de dioxà i hidròxid sòdic 0,5N (40:60 v/v). Es col·loca en un bany de gel a 0 °C i s'addicionen 12,54 g (43,86 mmol) de dicarbonat de di-*tert*-butil durant un període de 30 minuts. Un cop finalitzada l'addició la reacció es deixa 48 hores a temperatura ambient. Passat aquest temps, s'evaporà el dioxà a pressió reduïda i s'acidificà la mescla amb bisulfat sòdic 1N fins a pH 1-2. La solució àcida resultant es va extreure amb CH₂Cl₂ i els extreus orgànics s'agruparen, s'assecaren amb Na₂SO₄ i s'evaporaren fins a sequedat, rendint 7,26 g (92%) d'un sòlid blanc, corresponent a l'aminoàcid protegit **10**.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,49 (s, 9H, CH₃*t*Bu); 1,92 (m, 2H, C⁴H₂); 2,07 (m, 1H, C³H_a); 2,31 (m, 1H, C³H_b); 3,46 (m, 2H, C⁵H₂); 4,35 (t, 1H, C²H); 8,0 (ba, 1H, OH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 28,1 (3 CH₃*t*Bu); 26,2 (C⁴H₂); 30,8 (C³H₂); 47,7 (C⁵H₂); 61,1 (C²H); 81,4 (C_q*t*Bu); 152,6 (NCOO*t*Bu); 175,2 (COOH).
- **IR (KBr):** 3150 cm⁻¹ (-OH *st*); 2977 cm⁻¹ (COO-H *st*); 1751 cm⁻¹ (C=O *st*, -HN-C=O-O-); 1247 cm⁻¹ (C-N *st*).
- **[α]_D²⁰** = -11 (c=1, cloroform)
- **Punt de fusió:** 136°C.

N'-(3,5-dimetilfenil)-N-Boc-L-prolinamida (11)

En un matràs proveït d'agitació magnètica i protegit de la humitat ambiental amb un tub de CaCl₂ es dissolgué l'*N*-Boc-aminoàcid **10** (10 g, 46,5 mmol) en 400 mL de CH₂Cl₂ i s'hi addicionà 1,1 eq d'EEDQ (12,6 g, 51,1 mmol) i 1,1 eq de 3,5-dimetilanilina (6,0 mL, 51,1 mmol). La solució s'agità durant 24 h a t.a. i a continuació es rentà el cru de reacció amb HCl 2N, NaHCO₃ al 5% i H₂O. Les fases orgàniques es recol·lectaren, s'assecaren amb Na₂SO₄ i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà mitjançant una columna cromatogràfica (hexà:AcOEt) i proporcionà 12,6 g (85%) del producte desitjat **11** en forma de sòlid blanc.

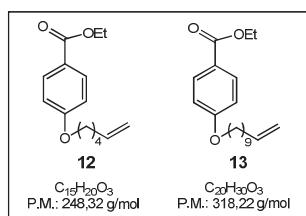
- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,49 (ba, 9H, CH₃tBu); 1,93 (m, 2H, C⁴H₂); 2,13+2,52 (m+m, 1H+1H, C³H_b+C³H_a); 2,29 (s, 6H, 2CH₃Ar); 3,42 (m, 2H, C⁵H₂); 4,43 (m, 1H, C²H); 6,73 (s, 1H, C⁴H); 7,15 (s, 2H, C^{2',6'}H), 9,28 (ba, 1H, NH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,6 (2CH₃Ar); 28,3 (3CH₃tBu); 26,2 (C⁴H₂); 30,8 (C³H₂); 47,7 (C⁵H₂); 61,1 (C²H); 81,4 (Cq tBu); 117,2 (C^{2',6'}H); 125,8 (C⁴H); 137,9 (C¹); 138,6 (C^{3',5'}); 152,6 (NCOO tBu); 172,8 (CONH).
- **IR (NaCl)**: 3305 cm⁻¹ (NH i OH st); 1700 cm⁻¹ (CO st, N-C=O); 1670 cm⁻¹ (C=O st); 1563 cm⁻¹ (N-C=O st si).
- **[α]_D²⁰** = -3,2 (c=1, etanol 96%).
- **Punt de fusió**: 116,2°C.

N'-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida (6)

Es dissolgué 4,5 g (14,13 mmol) del Boc derivat **11** en 180 mL de la barreja TFA/CH₂Cl₂ (30:70 v/v) i es deixà agitar durant 1 h a t.a. i protegit de la humitat ambiental amb un tub de CaCl₂ anhidre. A continuació la mescla de reacció es va neutralitzar amb NH₄OH refredant exteriorment amb un bany de gel. Seguidament s'extragué 3 vegades amb CH₂Cl₂. Les fases orgàniques obtingudes s'ajuntaren, s'assecaren amb Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a pressió reduïda. D'aquesta manera s'obtingué un oli marronós, per tal de purificar-lo es va realitzar la cristal·lització de l'hidroclorur de l'amina utilitzant EtOH/H₂O. Així s'obtingueren 3,28 g (90%) d'uns cristalls blancs de l'hidroclorur de **6**.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,75 (m, 2H, C⁴H₂); 2,04 (m, 2H, C³H_a+NH); 2,17 (m, 1H, C³H_b); 2,30 (s, 6H, 2CH₃Ar); 2,98 (m, 1H, C⁵H_a); 3,06 (m, 1H, C⁵H_b); 3,86 (m, 1H, C²H); 6,72 (s, 1H, C⁴H); 7,22 (s, 2H, C^{2',6'}H); 9,51 (ba, 1H, NH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,2 (2CH₃Ar); 25,3 i 26,3 (C³H₂ i C⁴H₂); 50,5 (C⁵H₂); 60,5 (C²H); 117,4 (C^{2',6'}H); 125,6 (C⁴H); 137,9 i 138,1 (C¹ i C^{3',5'}); 172,5 (NHCO).
- **IR (NaCl)**: 3269 cm⁻¹ (NH st); 1687 cm⁻¹ (C=O st); 1546 cm⁻¹ (N-C=O sim st).
- **[α]_D²⁰** = +1,7 (c=1, cloroform).

Alqueniloxibenzoats derivats (12, 13)



A una dissolució de 4-hidroxibenzoat d'etil (2,45 g, 14,76 mmol) en acetona anhidra (18 mL); se li afegixen sota atmosfera d'argon K₂CO₃ (5,04 g 36,9 mmol) i KI (0,030 g, 0,18 mmol). A la mescla s'hi addiciona gota a gota el 6-bromo-1-hexè o 11-bromo-1-undecè (2,65 g o 3,79 g, 16,26

mmol). La suspensió es deixà agitar 12 h a reflux i a continuació la mescla es deixà refredar fins a t.a. La suspensió es filtrà en una placa de vidre fritat del n_o 4 i el líquid resultant s'assecà sobre Na₂SO₄ anhidre, es filtrà i s'evaporà a pressió reduïda. D'aquesta manera s'obtingueren 13,66 g (93%) del producte desitjat **12**, en forma d'oli marronós, o bé, 13,13 g (89%) del producte **13** en forma d'oli groguenc segons el reactiu alquilant utilitzat. El cru obtingut s'utilitza sense prèvia purificació en la següent reacció.

4-(5-hexeniloxi)benzoat d'etil (**12**):

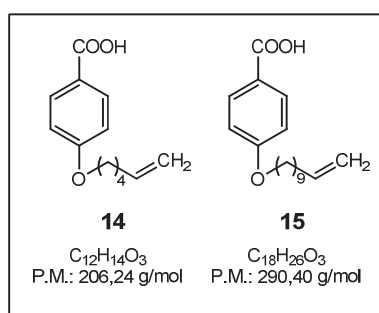
- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,37 (t, 3H, C^{2''}H₃); 1,57 (m, 2H, C³H₂); 1,82 (m, 2H, C²H₂); 2,13 (dd, 2H, C⁴H₂); 4,01 (t, 2H, C¹H₂); 4,34 (q, 2H, C^{1''}H₂); 5,01 (m, 1H, C⁶H₂); 5,80 (m, 1H, C⁵H); 6,89 (d, 2H, C^{6,2}H); 7,98 (d, 2H, C^{3,5}H).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 14,5 (C^{2''}H₃); 25,4 (C³H₂); 28,7 (C²H₂); 33,5 (C⁴H₂); 60,8 (C^{1''}H₂); 68,1 (C¹H₂); 114,23 (C^{3,5}H); 115,0 (C⁶H₂); 122,8 (C¹); 131,7 (C^{2,6}H); 138,5 (C⁵H); 163,0 (C⁴); 166,7 (C=O).
- **IR (NaCl)**: 3068 cm⁻¹ (=CH₂ st); 2979 cm⁻¹ (-CH= st); 1712 cm⁻¹ (C=O èster); 1606 cm⁻¹ (C=C st); 1275-1254 cm⁻¹ (C-O èter).

4-(10-undeceniloxi)benzoat d'etil (**13**):

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,34 (m, 13H, C^{4',5',6',7',8'}H₂, C^{2''}H₃); 1,45 (m, 2H, C³H₂); 1,79 (m, 2H, C²H₂); 2,04 (m, 2H, C⁹H₂); 4,00 (t, 2H, C¹H₂); 4,34 (q, 2H

- $C^{1''}H_2$); 4,93+4,99 (m+m, 2H, $C^{11'}H_2$); 5,81 (m, 1H, $C^{10'}H$); 6,89 (d, 2H, $C^{2,6}H$); 7,98 (d, 2H, $C^{3,5}H$).
- **^{13}C -RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ : 14,6 ($C^{2''}H_3$); 26,2 (C^3H_2); 29,3-29,6 ($C^{2',4',5',6',7',8'}H_2$); 34,0 (C^9H_2); 60,7 ($C^{1''}H_2$); 68,4 (C^1H); 114,2 ($C^{3,5}H$); 122,8 (C^1); 131,7 ($C^{2,6}H$); 139,4 ($C^{10'}H$); 163,0 (C^4); 166,6 (C=O).
 - **IR (NaCl):** 3075 cm⁻¹ (=CH₂ st); 2926 cm⁻¹ (-CH= st); 2835 cm⁻¹ (-O-CH₂ st); 1714 cm⁻¹ (C=O èster); 1640 cm⁻¹ (C=C st); 1366 cm⁻¹ (C-O èter).

Àcids alqueniloxibenzoïcs (14, 15)



En un matràs acoblat a un refrigerant, es van disposar 7,31 mmol de l'èster corresponent **12** o **13** i es van afegir la barreja 39 mmol de KOH dissolts en 60mL de la barreja d'EtOH/H₂O (5:1). La suspensió s'escalfà a 75°C durant 6 h. Després de refredar la barreja es neutralitza amb HCl 6N i s'extreu amb acetat d'etil. El residu es purifica per cromatografia en columna sobre gel de sílice.

Àcid 4-(5-hexeniloxi)benzoic (**14**):

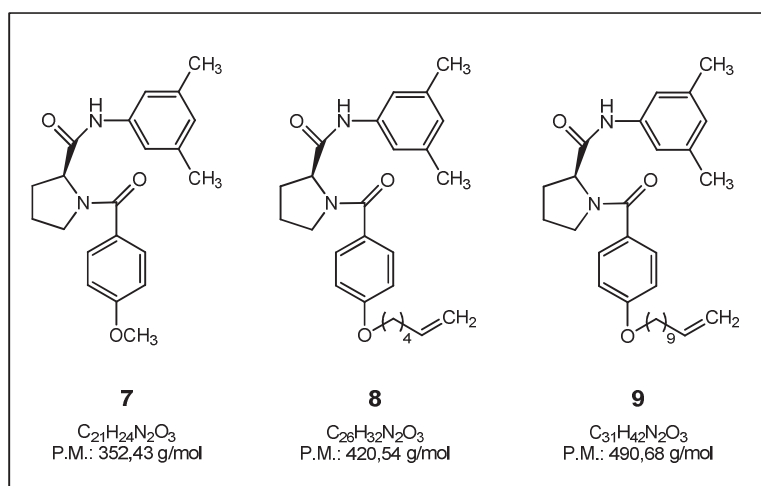
- **1H -RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ : 1,58 (m, 2H, C^3H_2); 1,83 (dt, 2H, C^2H_2); 2,14 (m, 2H, C^4H_2); 4,03 (t, 2H, C^1H_2); 5,01 (m, 2H, C^6H_2); 5,83 (m, 1H, C^5H); 6,93 (d, 2H, $C^{3,5}H$); 8,05 (d, 2H, $C^{2,6}H$).
- **^{13}C -RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ : 25,4 (C^3H_2); 28,7 (C^2H_2); 33,5 (C^4H_2); 68,2 (C^1H_2); 114,4 ($C^{3,5}H$); 115,0 (C^6H_2); 121,6 (C^1); 132,5 ($C^{2,6}H$); 138,5 (C^5H); 163,8 (C^4); 172,1 (C=O).
- **IR (NaCl):** 2923 cm⁻¹ (COO-H st); 1674 cm⁻¹ (C=O st, Ar-COOH); 1257 cm⁻¹ (C-O-C st, as, ArC-O-Cal).
- **Punt de fusió:** 99-100 °C

Àcid 4-(10-undeceniloxi)benzoic (**15**):

- **1H -RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ : 1,33 (m, 10H, $C^{4',5',6',7',8'}H_2$); 1,46 (m, 2H, C^3H_2); 1,80 (m, 2H, C^2H_2); 2,04 (q, 2H, C^9H_2); 4,02 (t, 2H, C^1H_2); 4,93+4,99 (m+m, 2H, $C^{11'}H_2$); 5,81 (m, 1H, $C^{10'}H$); 6,93 (d, 2H, $C^{3,5}H$); 8,05 (d, 2H, $C^{2,6}H$).
- **^{13}C -RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ : 26,1 (C^3H_2); 29,3-29,6 ($C^{2',4',5',6',7',8'}H_2$); 34,0 (C^9H_2); 68,5 (C^1H_2); 114,34 (C^1); 114,4 ($C^{3,5}H$); 121,5 ($C^{11'}H_2$); 132,5 ($C^{2,6}H$); 139,4 ($C^{10'}H$); 163,8 (C^4); 172,0 (C=O).

- **IR (NaCl):** 2923 cm^{-1} (COO-H *st*); 1680 cm^{-1} (C=O *st*, Ar-COOH); 1254 cm^{-1} (C-O-C *st*, *as*, ArC-O-Cal).
- **Punt de fusió:** 88-89 °C

***N*-(4-alcòxibenzoil)-*N'*-(3,5-dimetilfenil)-*L*-prolinamides (7, 8, 9)**



Es dissolgué 1,5 mmol de l'àcid *p*-anísic o l'alqueniloxibenzoïc corresponent **14** o **15** en CH_2Cl_2 (25mL) i a continuació s'hi afegí el derivat de prolina **3** (0,76g, 3 mmol) i EEDQ (0,74g, 3 mmol). La mescla es deixà en agitació a t.a. durant 24h

i protegida de la humitat ambiental per un tub de CaCl_2 . A continuació s'aturà la reacció rentant el cru de reacció amb HCl 2N, NaHCO_3 al 5% i H_2O . Les fases orgàniques es recol·lectaren, s'assecaren amb Na_2SO_4 i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. El cru obtingut en ambdós casos es purificà mitjançant una columna cromatogràfica fent servir una mescla de CHCl_3 :MeOH (9:1) com a eluent. D'aquesta manera s'obtingueren 0,57 g (54%) del producte **7** en forma de sòlid blanc; 0,918g (63%) del producte desitjat **8** en forma de sòlid blanc i 1,14 g (77%) del producte desitjat **9** en forma de sòlid blanc, segons l'àcid utilitzat com a producte de partida.

***N*-(4-metoxibenzoil)-*N'*-(3,5-dimetilfenil)-*L*-prolinamida (7):**

- **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz)** δ : 1,87 (m, 1H, C^4H_a); 2,07 (m, 2H, $\text{C}^3\text{H}_a + \text{C}^4\text{H}_b$); 2,26 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{Ar}$); 2,65 (m, 1H, C^3H_b); 3,58 (m, 2H, C^5H_2); 3,84 (s, 3H, OCH_3); 4,97 (m, 1H, C^2H); 6,71 (s, 1H, $\text{C}^4\text{H Ar}$); 6,92 (d, 2H, $\text{C}^{3',5''}\text{H}$); 7,20 (s, 2H, $\text{C}^{2',6''}\text{H}$); 7,51 (d, 2H, $\text{C}^{2',6''}\text{H}$).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz)** δ : 21,3 ($2\text{CH}_3\text{Ar}$); 25,4 (C^4H_2); 26,4 (C^3H_2); 50,7 (C^5H_2); 55,3 (OCH_3); 60,7 (C^2H); 113,5 ($\text{C}^{3',5''}\text{H}$); 117,4 ($\text{C}^{2',6''}\text{H}$); 125,5 (C^4H); 127,9 ($\text{C}^{1''}$); 129,2 ($\text{C}^{2',6''}\text{H}$); 138,4 ($\text{C}^{3',5''}$); 161,2 (C^4); 168,8 (NCO); 171,3 (HNCO).

- **IR (NaCl):** 3300 cm^{-1} (NH *st*); 1704 cm^{-1} (C=O *st*, amida I); 1609 cm^{-1} (N-C=O *st sym*, amida II); 1253 cm^{-1} (ArC-O-Calif, *st as*).
- $[\alpha]_D^{20} = -16,1$ ($c=1$, cloroform).
- **Punt de fusió:** 210-211 °C
- **EM-ES:** m/z 375,0 (M + Na)⁺, 353,3 (M + H)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 71,57; H, 6,86; N, 7,95. Trobat: C, 70,87; H, 6,88; N, 7,84.

***N*-(4-(5-hexeniloxi)benzoil)-*N'*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida (8):**

- **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ :** 1,56 (m, 2H, C^cH_2); 1,81 (m, 2H, C^dH_2); 1,92+2,07 (m+m, 2H, C^3H_2); 2,12 (dt, 2H, C^bH_2); 2,28 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{Ar}$); 2,53+2,66 (m+m, 2H, $\text{C}^3\text{H}_a+\text{C}^3\text{H}_b$); 3,42+3,59 (m+m, 2H, $\text{C}^5\text{H}_a+\text{C}^5\text{H}_b$); 3,99 (t, 2H, C^aH_2); 4,46 (ba, 1H, C^2H); 5,00 (m, 2H, C^fH_2); 5,82 (m, 1H, C^eH); 6,68 (s, C^4H rot. min) 6,73 (s, 1H, C^4H); 6,90 (d, 2H, $\text{C}^{5',3'}\text{H}$); 7,17 (s, 2H, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$ rot); 7,18 (s, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$ rot. min); 7,50 (d, 2H, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz) δ :** 21,5 ($2\text{CH}_3\text{Ar}$); 24,8 (C^4H_2); 25,4 (C^cH_2); 26,8 (C^3H_2); 28,7 (C^dH_2); 33,5 (C^bH_2); 47,2 (C^5H_2); 61,2 (C^2H); 68,1 (C^aH_2); 114,3 ($\text{C}^{3',5'}\text{H}$); 115,0 (C^fH_2); 117,7 ($\text{C}^{2',6'}\text{H}$); 125,9 (C^4H); 127,9 ($\text{C}^{1'}$); 129,5 ($\text{C}^{2',6'}\text{H}$); 138,5 ($\text{C}^{1'}$); 138,6 ($\text{C}^{3',5'}$); 138,7 (C^eH); 161,0 ($\text{C}^{4'}$); 169,2 (NCO); 171,6 (HNCO).
- **IR (NaCl):** 3300 cm^{-1} (NH *st*); 1710 i 1700 cm^{-1} (C=O *st*, amida I); 1614 i 1564 cm^{-1} (N-C=O *st sym*, amida II); 1207 cm^{-1} (ArC-O-Calif, *st as*).
- $[\alpha]_D^{20} = -20,1$ ($c=1$, cloroform).
- **Punt de fusió:** 125-126 °C
- **EM-ES:** m/z 443,1 (M + Na)⁺, 421,1 (M + H)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 74,26; H, 7,67; N, 6,66. Trobat: C, 74,24; H, 7,69; N, 6,79.

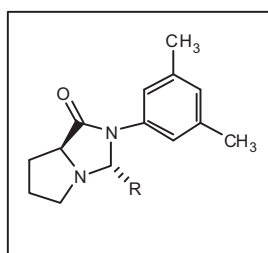
***N*-(4-(10-undeceniloxi)benzoil)-*N'*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida (9):**

- **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ :** 1,32 (m, 10H, $\text{C}^{d,e,f,g,h}\text{H}_2$); 1,45 (m, 2H, C^cH_2); 1,79 (m, 2H, C^bH_2); 1,94 (m, 2H, C^4H_2); 2,04 (m, 2H, C^iH_2); 2,27 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{Ar}$); 2,50 + 2,62 (m+m, 1H+1H, $\text{C}^3\text{H}_a+\text{C}^3\text{H}_b$); 3,48+3,61 (m+m, 1H+1H, $\text{C}^5\text{H}_a+\text{C}^5\text{H}_b$); 4,01 (t, 2H, C^aH_2); 4,47 (1H, ba, C^2H); 4,96 (m, 2H, C^kH_2); 5,81 (m, 1H, C^jH); 6,70 (s, C^4H rot min); 6,72 (1H, C^4H rot); 6,92 (d, 2H, $\text{C}^{3',5'}\text{H}$); 7,17 (s, 2H, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$ rot); 7,20 (s, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$ rot min); 8,04 (d, 2H, $\text{C}^{2',6'}\text{H}$).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz) δ :** 21,55 ($2\text{CH}_3\text{Ar}$); 25,79 (C^4H_2); 26,19 (C^cH_2); 26,62 (C^3H_2); 29,31 ($\text{C}^{b,d,e,f,g,h}\text{H}_2$); 34,01 (C^iH_2); 47,29 (C^5H_2); 61,19 (C^2H); 68,47

(C^aH₂); 114,36 (C^jH₂, C^{3'',5''}H); 117,74 (C^{2',6'}H); 125,99 (C⁴H); 129,55 (C^{1''}); 134,44 (C^{2'',6''}H); 138,34 (C^{1'}); 138,81 (C^{3',5'}); 139,40 (C^kH₂); 163,70 (C^{4''}); 170,63 (N-C=O); 171,84 (HN-C=O).

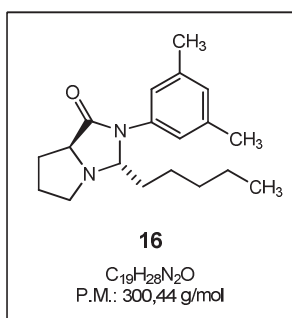
- **IR (NaCl):** 3300 cm⁻¹ (NH *st*); 1690 i 1679 cm⁻¹ (C=O *st*, amida I); 1607 i 1564 cm⁻¹ (N-C=O *st*, amida II); 1254 cm⁻¹ (ArC-O-Calif *st as*).
- **[α]_D²⁰** = -4.93 (c=1, cloroform).
- **Punt de fusió:** 136-137 °C
- **EM-ES:** m/z 513,6 (M + Na)⁺, 491,5 (M + H)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per C₃₁H₄₂N₂O₃: C, 75,87; H, 8,63; N, 5,71. Trobat: C, 75,44; H, 8,57; N 6,47.

Compostos amb l'estructura base de 4-oxo-1,3-diazabicclo[3.3.0]octà (16, 17, 18, 19)



A un matràs amb el derivat de L-prolina **6** (1 eq) dissolt en 320 mL de toluè i equipat amb un Dean-Stark, s'hi afegí 2 eq de l'aldehid corresponent. Es deixà agitant i a reflux durant 12 h. Es deixà refredar a t.a. i a continuació la fase orgànica es va rentar amb H₂O. Finalment, la fase orgànica s'assecà sobre Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà a pressió reduïda. El cru obtingut en cada cas es purificà mitjançant cromatografia en columna obtenint els següents productes:

(7a*S*)-2-(3,5-dimetilfenil)-3-pentilhexahidro-1*H*-pirrolo[1,2-*c*]imidazol-1-ona (**16**):



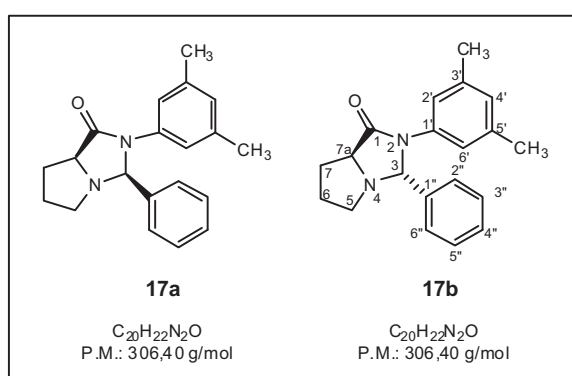
Amb l'addició de l'hexanal (1,25 mL, 10 mmol) es va obtenir un oli grogós que es purificà per cromatografia en columna, fent servir com a eluent 9:1 de CHCl₃:MeOH. D'aquesta manera, s'obtingueren 1,3 g (87%).

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 0,86 (m, 3H, C⁵H₃); 1,27-1,54 (m, 8H, C^{1'-4'}H₂); 1,65-1,83 (m, 2H, C⁶H₂); 2,09-2,12 (m+m, 2H, C⁷H₂); 2,32 (m, 6H, 2CH₃Ar); 2,70 (dt, 1H, C⁵H_a); 3,28 (dt, 1H, C⁵H_b); 3,98 (dd, 1H, C^{7a}H); 4,66 (dd, 1H, C³H); 6,84 (s, 1H, C^{4''}H); 7,06 (s, 2H, C^{2'',6''}H).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 13,9 (C⁵H₃); 21,4 (2CH₃Ar); 22,6 (C⁴H₂); 24,5 (C³H₂); 24,9 (C²H₂); 27,7 (C⁶H₂); 31,5 (C⁷H₂); 34,5 (C¹H₂); 56,5 (C⁵H₂); 65,0

(C^{7a}H); 83,0 (C³H); 120,6 (C^{2',6'}H); 127,5 (C⁴H); 138,2 (C¹); 138,8 (C^{3',5'}); 173,4 (N-C=O).

- **IR (KBr):** 1700 cm⁻¹ (CO *st*, amida I); 1598 cm⁻¹ (N-C=O *st*, sym, amida II).
- **[α]_D²⁰** = -38,4 (c=1, cloroform).
- **EM-ES:** m/z 323,2 (M + Na)⁺, 301,03 (M + H)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per C₁₉H₂₈N₂O: C, 75,96; H, 9,39; N, 9,32. Trobat: C, 75,66; H, 9,71; N, 9,32.

(7aS)-2-(3,5-dimetilfenil)-3-fenilhexahidro-1H-pirrol[1,2-c]imidazol-1-ona (17a, 17b):



Quan es va addicionar benzaldehid (180 μL, 1,83 mmol) a la solució del derivat de L-prolina **6** (0,2 g, 0,91 mmol) en 42,5 mL de toluè es deixà agitar a la temperatura de reflux durant 4 hores. A continuació, la fase orgànica es va rentar amb H₂O. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna,

fent servir un gradient d'hexà:EtOAc de 9:1 a 3:7. D'aquesta manera, s'obtingueren 70 mg (23%) del producte desitjat **17b** i 4,3 mg (14%) del producte **17a**. En canvi, al deixar la reacció 12 hores es van obtenir 300 mg (98%) del derivat de L-prolina **17a** en forma d'oli transparent.

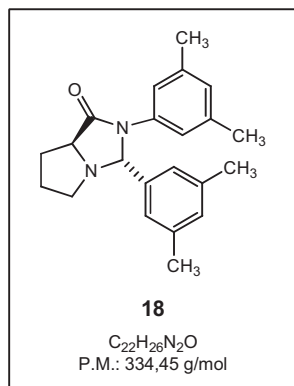
Producte 17b:

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,91 (m, 2H, C⁶H₂); 2,19 (m, 2H, C⁷H₂); 2,23 (s, 6H, 2CH₃Ar); 2,87 (dd, 1H, C⁵H_a); 3,43 (dt, 1H, C⁵H_b); 4,02 (t, 1H, C^{7a}H); 5,64 (s, 1H, C³H); 6,75 (s, 1H, C⁴H); 7,07 (s, 1H, C^{4',6'}H); 7,33 (m, 5H, C^{2'',3'',4'',5'',6''}H).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,64 (2CH₃Ar); 25,01 (C⁶H₂); 27,69 (C⁷H₂); 56,23 (C⁵H₂); 64,61 (C^{7a}H); 83,99 (C³H); 119,39 (C^{2',6'}H); 126,31 (C^{2'',6''}H); 127,27 (C⁴H); 128,67 (C^{4''}H); 129,18 (C^{3'',5''}H); 137,69 (C^{1''}); 138,84 (C^{3',5'}); 139,82 (C¹); 175,12 (N-C=O).
- **IR (KBr):** 1701 cm⁻¹ (C=O *st*, amida I); 1597 cm⁻¹ (N-C=O *st*, sym, amida II).
- **[α]_D²⁰** = -4,2 (c=1, cloroform).
- Punt de fusió: 106-107 °C
- **EM-ES:** m/z 329,5 (M + Na)⁺, 307,1 (M + H)⁺

- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per $C_{20}H_{22}N_2O$: C, 78,40; H, 7,24; N, 9,14. Trobat: C, 77,99; H, 7,23; N, 8,99.

Producte **17a**:

- **1H -RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ : 1,72 (m, 2H, C⁶H₂); 2,20 (s, 6H, 2CH₃Ar); 2,25 (m, 2H+1H, C⁷H₂+C⁵H_a); 2,51 (dt, 1H, C⁵H_b); 4,02 (dd, 1H, C^{7a}H); 6,35 (s, 1H, C³H); 6,71 (s, 1H, C⁴H); 6,86 (s, 2H, C^{3',5'}H); 7,27 (s, 5H, C^{2',3',4',5',6'}H).
- **^{13}C -RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ : 21,57 (2CH₃Ar); 25,05 (C⁶H₂); 27,43 (C⁷H₂); 49,05 (C⁵H₂); 65,88 (C^{7a}H); 79,28 (C³H); 120,57 (C^{2',6'}H); 127,29 (C⁴H); 128,53 (C^{4'}H); 128,64 (C^{2',6''}H); 128,87 (C^{3',5''}H); 134,68 (C^{1''}); 137,43 (C^{3',5'}); 138,39 (C^{1'}); 176,85 (CONH).
- **IR (KBr):** 1711 cm⁻¹ (C=O *st*, amida I); 1597 cm⁻¹ (N-C=O *st*, *sym*, amida II).
- **$[\alpha]_D^{20}$** = +0,55 (c=1, cloroform).
- **EM-ES:** m/z 329,2 (M + Na)⁺, 307,5 (M + H)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per $C_{20}H_{22}N_2O$: C, 78,40; H, 7,24; N, 9,14. Trobat: C, 78,11; H, 7,20; N, 9,04.

(3R,7aS)-2,3-bis(3,5-dimetilfenil)hexahidro-1H-pirrol[1,2-c]-1-ona (18):

Es van addicionar 0,92 g (6,87 mmol) de l'aldehyd **36** sobre la dissolució de 1,00 g (4,58 mmol) del derivat **6** en 210 mL de toluè. I es va deixar amb agitació a la seva temperatura de reflux. Passades 12 hores, es va aturar la reacció i es va rentar la fase orgànica amb H₂O. Aquesta es va assecar sobre Na₂SO₄ anhidre i es va evaporar a pressió reduïda obtenint un oli groc. El cru obtingut es va columnar per cromatografia en columna utilitzant un gradient d'hexà:AcOEt de 100% hexà a 7:3. D'aquesta manera s'obtingueren 1,3 g (85%) del producte

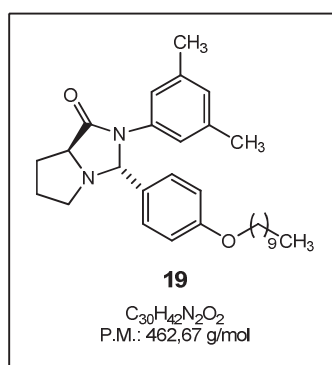
desitjat **18** en forma de sòlid groguenc.

- **1H -RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ : 1,88 (m, 2H, C⁶H₂); 2,20 (m, 2H, C⁷H₂); 2,24 (s, 6H, 2CH₃Ar^{''}); 2,28 (s, 6H, 2CH₃Ar[']); 2,84 (dd, 1H, C⁵H_a); 3,42 (m, 1H, C⁵H_b); 4,03 (dd, 1H, C^{7a}H); 5,57 (s, 1H, C³H); 6,75 (s, 1H, C⁴H); 6,91 (3H, C^{2',4',6'}H); 7,11 (2H, C^{2',6'}H).
- **^{13}C -RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ : 21,6 (4CH₃Ar); 25,0 (C⁶H₂); 27,6 (C⁷H₂); 56,2 (C⁵H₂); 64,5 (C^{7a}H); 84,0 (C³H); 119,1 (C^{2',6'}H); 123,8 (C^{2',6''}H); 127,1 (C⁴H); 130,4 (C^{4'}H); 137,9 (C^{1'}); 138,8 (C^{3',5',3'',5''}); 139,7 (C^{1''}); 175,3 (N-C=O).

- **IR (NaCl):** 1694 cm^{-1} (C=O *st*, amida I); 1597 cm^{-1} (N-C=O *st*, sym, amida II).
- $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2,00$ ($c=1$, cloroform).
- **Punt de fusió:** 132-133 °C
- **EM-ES:** m/z 357,2 (M + Na)⁺, 335,0 (M + H)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$: C, 79,00; H, 7,84; N, 8,38.
Trobat: C, 78,03; H, 8,01; N, 8,09.
- **Raig X:** Una mostra de **18** es cristal·litza d'etanol/aigua i es va registrar cristal·lografia per raig X.

(3R,7aS)-3-(4-(deciloxi)fenil)-2-(3,5-dimetilfenil)hexahidro-1H-pirrol[1,2-c]-1-ona

(19):



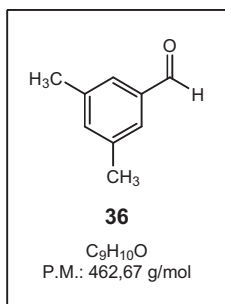
A una dissolució del derivat de la L-prolina **6** (1,00 g, 4,58 mmol) en toluè anhidre (210 mL) se li addicionà l'aldehid **37** (1,20 g, 6,86 mmol) i es deixà amb agitació a la seva temperatura de reflux durant 12 h. La reacció s'aturà fent rentats amb H_2O de la fase orgànica. La fase orgànica s'assecà sobre Na_2SO_4 , es filtrà i s'evaporà. Obtenint un oli que es purificà per cromatografia en columna utilitzant un gradient d'hexà:AcOEt de 9:1 a 7:3. D'aquesta manera

s'obtingueren 2,072 g (94%) del producte desitjat **19** en forma d'oli grogós.

- **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ :** 0,87 (dd, 3H, C^iH_3); 1,30 (ba, 14H, $\text{C}^{c,d,e,f,g,h,i}\text{H}_2$); 1,40 (m, 2H, C^3H_2); 1,74 (m, 2H, C^bH_2); 1,87 (m, 2H, C^6H_2); 2,18 (m, 2H, C^7H_2); 2,23 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{Ar}$); 2,84 (dd, 1H, C^5H_a); 3,39 (dt, 1H, C^5H_b); 3,90 (m, C^aH_2); 4,01 (m, 1H, C^7aH); 5,59 (s, 1H, C^3H); 6,74 (s, 1H, C^4H); 6,84 (d, 2H, $\text{C}^{2',6''}\text{H}$); 7,07 (s, 2H, $\text{C}^{2',6''}\text{H}$); 7,20 (d, 2H, $\text{C}^{3',5''}\text{H}$).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz) δ :** 14,3 (C^iH_3); 21,6 ($2\text{CH}_3\text{Ar}$); 22,8 (C^hH_2); 24,98 (C^6H_2); 26,2 (C^eH_2); 27,6 (C^7H_2); 29,4 a 29,7 ($\text{C}^{b,d,e,f,g}\text{H}_2$); 32,1 (C^hH_2); 56,0 (C^5H_2); 64,6 (C^7aH); 68,2 (C^aH_2); 83,6 (C^3H); 115,1 ($\text{C}^{2',6''}\text{H}$); 119,4 ($\text{C}^{2',6''}\text{H}$); 127,2 (C^4H); 127,5 ($\text{C}^{3',5''}\text{H}$); 131,6 (C^4H); 137,7 (C^1); 138,7 ($\text{C}^{3',5''}$); 159,4 (C^4); 175,0 (N-C=O).
- **IR (NaCl):** 2841 cm^{-1} (O-CH₂ *st*, èter); 1707 cm^{-1} (C=O *st*, amida I); 1508 cm^{-1} (N-C=O *st*, sym, amida II).
- $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9,3$ ($c=1$, cloroform).
- **EM-ES:** m/z 485,5 (M + Na)⁺, 463,8 (M + H)⁺

- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per $C_{30}H_{42}N_2O_2$: C, 77,88; H, 9,15; N, 6,05. Trobat: C, 77,69; H, 9,17; N, 6,01; O, 7,13.

3,5-dimetilbenzaldehyd (36)



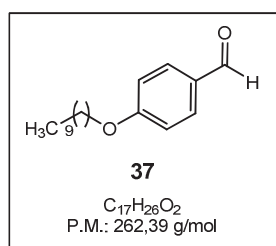
MÈTODE A:

A 4 mL (28,75 mmol) de mesitilè se li va fer passar un corrent de Br₂ durant 4 h a reflux (140 °C). Passat aquest temps, es deixà refredar la dissolució vermellosa fins a t.a. i es purificà per destil·lació en un forn de boles. D'aquesta manera s'obtingueren 3,57 g (62%) d'un oli transparent. A continuació, a una dissolució del bromur de 3,5-dimetilbenzil (1,60 g, 8,00 mmol) en 4 mL de la barreja d'EtOH/H₂O/formalina (4:6:0,2), se li afegí 1,23 g (8,80 mmol) d'hexametilentetramina i la mescla s'agità durant 12 hores a reflux. Passat aquest temps, es deixà refredar la dissolució fins a t.a. i es purificà per destil·lació per arrossegament de vapor. Al començar a destil·lar l'aigua sola aquesta es va aturar. El cru resultant s'extragué amb èter i les fases orgàniques s'agruparen i es rentaren amb H₂SO₄ 1N, NaOH 1N i H₂O successivament. La fase orgànica s'assecà sobre Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà a sequedat. D'aquesta manera s'obtingueren 0,64 g (59%) de l'aldehyd **36** en forma d'oli transparent.

MÈTODE B:

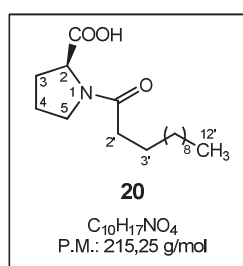
A una dissolució de mesitilè (1,00 g, 8,32 mmol) en 41,6 mL de la barreja d'H₂O/àcid acètic (1:1), s'hi afegí a 80 °C gota a gota 18,24 g (33,20 mmol) de (NH₄)₂Ce(NO₃)₆ dissolt en 84 mL de la barreja d'H₂O/àcid acètic (1:1) i la mescla s'agità durant 2 h a 80 °C. Es deixà refredar fins a t.a. i el cru s'extragué amb la barreja èter-pentà (1:1). Les fases orgàniques s'agruparen, i es rentaren amb Na₂CO₃ a saturació i H₂O amb gel. La fase orgànica s'assecà sobre Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà a pressió reduïda. D'aquesta manera, s'obtingueren 0,87 g (77%) de **36** en forma d'un oli grogós.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 2,38 (s, 3H, 2CH₃Ar); 7,25 (s, 1H, C⁴H); 7,47 (s, 2H, C^{2,4}H).

4-(deciloxi)benzaldehyd (37)

A una dissolució de 4-hidroxibenzaldehid (1,80 g, 14,76 mmol) en acetona anhidra (18 mL); se li afegeixen sota atmosfera d'argó K₂CO₃ (5,04 g 36,9 mmol) i KI (0,030 g, 0,18 mmol) i s'hi addiciona gota a gota 1-bromodecà (3,48 mL, 16,26 mmol). La suspensió es deixa agitar 12 h a reflux i a continuació la mescla es deixa refredar fins a t.a. La suspensió es filtra en una placa de vidre fritat del n_o 4 i el líquid resultant s'asseca sobre Na₂SO₄ anhidre, es filtra i s'evapora a pressió reduïda. L'oli resultant es purifica per cromatografia en columna, fent servir una mescla d'hexà:AcOEt (95:5) com a eluent. D'aquesta manera s'obtingueren 5,58 g (84%) d'un oli groc que es conserva sota atm inert.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 0,88 (t, 3H, CⁱH₃); 1,31(m, 12H, C^{d,e,f,g,h,i}H₂); 1,46 (dt, 2H, C^cH₂); 1,80 (m, 2H, C^bH₂); 4,02 (t, 2H, C^aH₂); 6,98 (d, 2H, C^{5,6}H); 7,81 (d, 2H, C^{2,6}H); 9,87 (s, 1H, CHO).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 14,3 (CⁱH₃); 22,8 (CⁱH₂); 26,1 (C^cH₂); 29,2 (C^bH₂); 29,5 a 29,7 (C^{d,e,f,g}H₂); 32,1 (C^hH₂); 68,6 (C^aH₂); 114,9 (C^{5,3}H); 129,1 (C¹); 132,1(C^{2,6}H); 164,4 (C⁴); 190,9 (CHO).

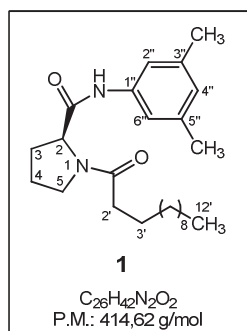
N-dodecanoïl-L-prolina (20)

A una dissolució de L-prolina (0,5 g, 4,3 mmol) en NaOH 1N (5 mL), se li addicionaren a 0 °C clorur de dodecanoïl (1,03 g, 4,7 mmol) dissolts en NaOH 1N (7 mL) durant 20 min. La barreja s'agità a t.a. durant 45 min i a continuació s'acidificà el medi amb HCl concentrat fins a pH 2-3. La mescla de reacció s'extragué amb èter dietílic. Les fases orgàniques s'agruparen i es rentaren amb la dissolució de NaCl 12%, s'assecaren sobre Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a pressió reduïda fins a proporcionar un oli groguenc, corresponent al producte desitjat **20** (1,25g, 97%), que s'utilitzà sense posterior purificació en la següent reacció.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 0,88 (t, 3H, C^{12'}H₃); 1,26 (m, 16H, C^{4'-11'}H₂); 1,65 (m, 2H, C^{3'}H₂); 2,04 i 2,33 (m+m, 6H, C^{2'}H₂, C^{4'}H₂, C^{3'}H₂); 3,47 (m, 1H, C^{5'}H_a); 3,59 (m, 1H, C^{5'}H_b); 4,55 (m, 1H, C^{2'}H); 6,80 (ba, 1H, COOH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 14,0 (C^{12'}H₃); 22,6 (C^{11'}H₂); 24,5 (C^{3'}H₂ i C^{3'}H₂); 28,2 (C^{4'}H₂); 29,5 (C^{4'-9'}H₂); 31,8 (C^{10'}H₂); 34,4 (C^{2'}H₂); 47,5 (C^{5'}H₂); 59,5 (C^{2'}H); 174,0 i 174,2 (COOH i CON).

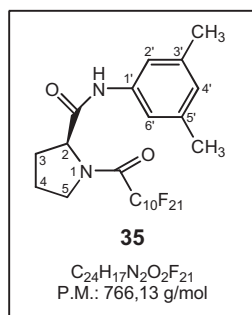
- **IR (NaCl):** 2926 cm^{-1} (COO-H *st*); 1736 cm^{-1} (CO *st*, amida I).

***N*-dodecanoil-*N'*-(3,5-dimetilfenil)-*L*-prolinamida (1)**



A una dissolució de **20** (5 g, 16,66 mmol) i de 3,5-dimetilanilina (2,16 g, 18 mmol) en THF (66 mL), se li addicionà una dissolució d'EEDQ (4,20 g, 16,66 mmol) en THF (33 mL). La solució s'agità a t.a. durant 24 h fins a la desaparició del producte de partida. A continuació s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va redissoldre en CH₂Cl₂ i la fase orgànica es rentà amb àcid o-fosfòric 1%, NaOH 0,2M i H₂O. La fase orgànica s'assecà sobre Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà a pressió reduïda. El cru resultant es purificà per cristal·lització d'EtOH-H₂O, obtenint 5,86 g (88%) d'un sòlid blanc corresponent al producte desitjat **1**.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 0,88 (t, 3H, C^{12'}H₃); 1,25 (m, 14H, C^{5'-11'}H₂); 1,64 (m, 4H, C^{3'}H₂ i C^{4'}H₂); 1,78 (m, 1H, C⁴H_a); 2,05 (m, 1H, C⁴H_b); 2,17 (m, 1H, C³H_a); 2,27 (s, 6H, 2CH₃Ar); 2,34 (t, 2H, C^{2'}H₂); 2,60 (m, 1H, C³H_b); 3,54 (dt, 1H, C⁵H_a); 3,68 (dt, 1H, C⁵H_b); 4,79 (t, 1H, C²H); 6,71 (s, 1H, C^{4''}H); 7,17 (s, 2H, C^{2'',6''}H); 9,60 (ba, 1H, NH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 14,0 (C^{12'}H₃); 21,2 (2CH₃Ar); 22,6 (C^{11'}H₂); 24,7 (C^{3'}H₂); 25,0 (C^{3'}H₂); 26,4 (C^{4'}H₂); 29,4 (C^{4'-9'}H₂); 31,8 (C^{10'}H₂); 34,6 (C^{2'}H₂); 47,6 (C^{5'}H₂); 60,4 (C²H); 117,3 (C^{2'',6''}H); 125,5 (C^{4''}H); 138,1 (C^{1''}); 138,4 (C^{3'',5''}); 169,0 (CONH); 174,3 (CON).
- **IR (NaCl):** 3325 cm^{-1} (NH *st*); 1626 cm^{-1} (CO *st*, amida I); 1476 cm^{-1} (N-C=O *st sym*, amida II).
- **[α]_D²⁰** = -66,9 (c=1,2, etanol 96°).
- **Punt de fusió:** 63-65 °C

***N*-(perfluoroundecanoïl)-*N'*-(3,5-dimetilfenil)-*L*-prolinamida (35)****MÈTODE A:**

En un matràs acoblat a un refrigerant, es dissolgué l'àcid perfluoroundecenoïc (282 mg, 0,5 mmol) en clorur de tionil (2mL). La dissolució s'escalfà a 80 °C durant 3 h, s'eliminà l'excés de clorur de tionil per destil·lació i s'obtingué un sòlid blanc corresponent al clorur de perfluoroundecenoïl. Aquest sòlid és dissolgué en 10 mL de piridina anhidra, s'addicionà la dissolució

de **6** en 5 mL de piridina anhidra i es deixà 12 h a reflux. A continuació, s'aturà la temperatura i es deixà refredar-se fins a t.a. Al cru de reacció se li adicionà CH₂Cl₂ i es rentà la fase orgànica successivament amb HCl 6N, solució de NaHCO₃ al 5% i H₂O. La fase orgànica s'assecà sobre Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà a sequedat. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna utilitzant una mescla de CH₂Cl₂:MeOH (9:1) com a eluent. D'aquesta manera s'obtingueren 81 mg (18%) d'un sòlid groc.

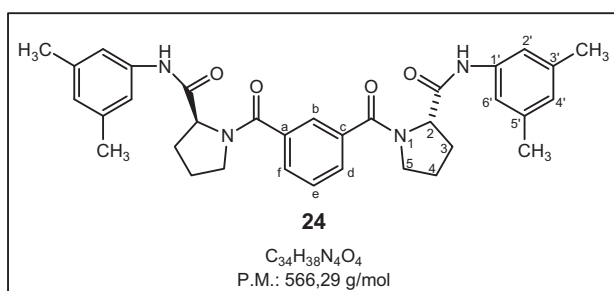
MÈTODE B:

Es dissolgué l'àcid perfluoroundecenoïc (320 mg, 0,6 mmol) en CH₂Cl₂ anhidre (5mL), s'hi afegí sota atmosfera d'argó hexafluorofosfat de cloro-*N,N,N',N'*-tetrametilformamidini (TCFH) (320 mg, 0,7 mmol) dissolt en CH₂Cl₂ anhidre (2mL) i es deixà una hora agitant. A continuació s'afegí lentament el derivat de prolina **6** (100 mg, 0,46 mmol) i DIPEA (100 µL, 0,7 mmol) en CH₂Cl₂ anhidre (2mL) i es deixà agitar a t.a. durant 18 h. Passat aquest temps la fase orgànica es rentà amb la solució de NaHCO₃ al 5% i H₂O. La fase orgànica s'assecà sobre Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà obtenint un sòlid que es purificà per cromatografia en columna fent servir una mescla de CH₂Cl₂:MeOH (9:1) com a eluent. D'aquesta manera s'obtingueren 245 mg (70%) d'un sòlid groc.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 2,02 (m, 2H, C⁴H₂); 2,20 (s, 6H, CH₃ Ar); 2,34 (m, 2H C³H₂); 3,83+3,97 (m+m, 2H, C⁵H_a+ C⁵H_b); 4,78 (m, 1H, C²H₂); 6,69 (s, 1H, C⁴H); 7,06 (s, 2H, C^{2',6'}H); 8,50 (ba, 1H, NHCO).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21.42 (2CH₃ Ar); 25.66 (C⁴H₂); 27.14 (C³H₂); 48.32 (C⁵H₂); 63.76 (C²H); 117.64 (C^{2',6'}H); 126.13 (C⁴H); 137.62 (C¹H); 138.58 (C^{3',5'}H); 157,95 (CON); 167,77 (CONH).
- **¹⁹F-RMN (CDCl₃, 376 MHz)** δ: -74.12 (12F); -80.17 (3F); -115.73 (2F); -126.30 (2F); -179,78 (2F).

- **IR (NaCl):** 3297 cm^{-1} (NH *st*); 1669 cm^{-1} (C=O *st*, amida I); 1545 cm^{-1} (N-C=O *st*, amida II); 1201 cm^{-1} (Alif-CF₃); 1154 cm^{-1} (Alif-CF₂).
- **$[\alpha]_D^{20}$** = -4,5 (*c*=1, cloroform).
- **Punt de fusió:** 138-139 °C
- **EM-ES:** *m/z* 787,4 (M + Na)⁺, 765,3 (M + H)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per C₂₄H₁₇N₂O₂F₂₁: C, 37,71; H, 2,24; N, 3,66. Trobat: C, 37,39; H, 2,26; N, 3,53.

***N,N*-Isoftaloil-bis(*N'*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida (24)**



MÈTODE A:

A un suspensió de *N'*-(3,5-dimetilfenil)-L-prolinamida (**6**) (100 mg, 0,45 mmol) en NaOH 2N (4 mL), s'hi afegí gota a gota a 0 °C la solució del diclorur d'isoftaloil (43 mg,

0,21 mmol) en CHCl₃ (5 mL). La mescla es deixà agitar tota la nit, deixant pujar la temperatura gradualment fins a t.a. La barreja resultant, s'acidificà amb HCl concentrat a 0 °C fins a pH 1-2 i s'extragué el cru amb CHCl₃. Els extrems orgànics s'assecaren sobre Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a sequedat. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna utilitzant CHCl₃:MeOH (9:1) com a eluent. D'aquesta manera s'obtingueren 93 mg (37%) d'un sòlid blanc.

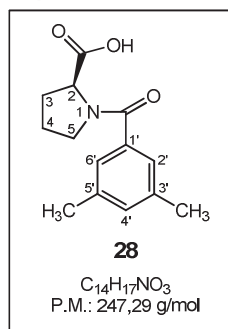
MÈTODE B:

En un matràs acoblat a un refrigerant, es dissolgué el derivat de L-prolina **6** (100 mg, 0,45 mmol) en piridina (3 mL) i s'hi addicionà el clorur d'isoftaloil (43 mg, 0,21 mmol). La dissolució s'escalfà a 90 °C durant 27 h i a continuació s'aturà la reacció. La mescla de reacció deixà refredar fins a t.a., s'abocà sobre 6 g de gel, s'acidificà amb HCl concentrat fins a pH 1-2, se separaren les fases i la fase aquosa s'extragué amb CHCl₃. Les fases orgàniques agrupades es rentaren amb HCl 6N, amb una dissolució de NaHCO₃ al 5% i H₂O. S'assecaren sobre Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna utilitzant CHCl₃:MeOH (9:1) com a eluent. D'aquesta manera s'obtingueren 115 mg (45%) d'un sòlid blanc.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,88 (m, 2H, 2C⁴H_a); 1,90 (m, 4H, 2C³H_a+2C⁴H_a); 2,24 (s, 12H, 4CH₃Ar); 2,57 (m, 2H, 2C³H_b); 3,47+3,59 (m+m, 4H, C⁵H₂); 4,91

- (dd, 2H, C²H); 6,70 (s, 2H, C⁴H); 7,17 (s, 4H, C^{2',6'}H); 7,49 (t, 1H, C^eH); 7,61 (d, 2H, C^{d,f}H); 7,74 (s, 1H, C^bH); 9,24 (s, 2H, NH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,5 (4CH₃Ar); 25,6 (C⁴H₂); 27,1 (C³H₂); 50,8 (C⁵H₂); 61,1 (C²H); 117,7 (C^{2',6'}H); 126,0 (C⁴H); 126,2 (C^eH); 128,8 (C^bH); 129,2 (C^{d,f}H); 136,6 (C^a); 138,1 (C¹); 138,7 (C^{3',5'}); 168,8 (NCO); 170,6 (HNCO).
 - **IR (NaCl):** 3289 cm⁻¹ (NH *st*); 1696 cm⁻¹ (CO *st*, C-C=O); 1618 cm⁻¹ (CO *st*, amida I); 1565 cm⁻¹ (N-C=O *st* sym, amida II).
 - **[α]_D²⁰** = -16.1 (c=1, cloroform).
 - **Punt de fusió:** 191-192 °C
 - **EM-ES:** m/z 589,5 (M + Na)⁺, 567,5 (M + H)⁺
 - **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per C₃₄H₃₈N₄O₄: C, 72,06; H, 6,76; N, 9,89. Trobada C, 72,68; H, 6,70; N, 8,80.

N-(3,5-dimetilbenzoil)-L-prolina (28)



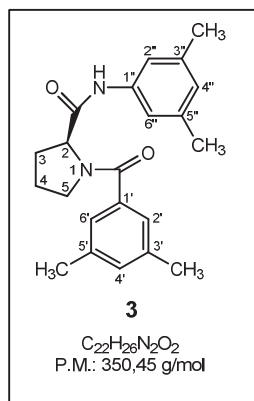
S'afegí L-prolina (1g, 8,7 mmol) a la dissolució de NaOH 1N (10 mL). Es refredà la solució a 0 °C i s'hi addicionà el clorur de 3,5-dimetilbenzoil (1,61 g, 9,6 mmol) dissolt en la dissolució de NaOH 1N i la mescla s'agità durant 90 min, deixant que assolís la t.a. La reacció s'aturà acidificant el medi amb HCl concentrat fins a pH 2-3, en què s'observà la formació d'un precipitat blanc, es filtra per separa el sòlid del líquid i la fase aquosa s'extragué amb AcOEt.

Els extractes orgànics s'agruparen i s'assecaren sobre Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a sequedat. El sòlid resultant es purificà per cristal·lització d'EtOH:H₂O. D'aquesta manera s'obtingueren 0,91 mg (69%) d'un sòlid blanc.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,90 (m, 1H, C⁴H_a); 2,00 (s, 1H, C⁴H_b); 2,22 (m, 1H, C³H_a); 2,34 (s, 6H, CH₃Ar); 2,40 (m, 1H, C³H_b); 3,57 (m, 2H, C⁵H₂); 3,77 (m, C⁵H₂ rot. min); 4,32 (m, C²H rot. min); 4,75 (m, 1H, C²H); 7,09 (s, 1H, C⁴H); 7,15 (s, 2H, C^{2',6'}H); 8,7 (ba, 1H, COOH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,1 (2 CH₃Ar); 22,4 (C⁴H₂ rot. min); 25,0 (C⁴H₂); 28,6 (C³H₂); 31,1 (C³H₂ rot. min); 46,3 (C⁵H₂ rot. min); 50,3 (C⁵H₂); 59,3 (C²H); 61,4 (C²H rot. min); 124,1 (C^{2',6'}H rot. min); 124,7 (C^{2',6'}H); 131,3 (C⁴H rot. min); 132,0 (C⁴H); 135,3 (C¹); 138,0 (C^{3',5'}); 171,5 (CON); 174,6 (COOH).
- **IR (KBr):** 3500-2300 cm⁻¹ (COO-H *st*); 1741 cm⁻¹ (CO *st*, COOH); 1589 cm⁻¹ (CO *st*, sym, amida I); 1454 cm⁻¹ (N-C=O *st*, sym, amida II); 1178 cm⁻¹ (C-O *st*).

- $[\alpha]_D^{20} = -74,1$ ($c=1$, etanol absolut).
- **Punt de fusió:** 143-144°C

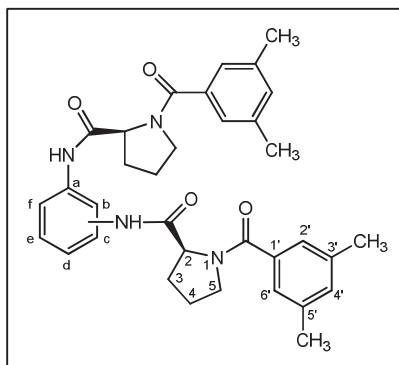
***N*-(3,5-dimetilbenzoïl)-*N'*-(3,5-dimetilfenil)-*L*-prolinamida (3)**



A una dissolució del derivat de la *L*-prolina **28** (247 mg, 1 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) s'hi addicionà EEDQ (272 mg, 1,1 mmol) i 3,5-dimetilanilina (137 µL, 1,1 mmol) i es deixà agitant 24 h a t.a. protegit de la humitat ambiental per un tub de CaCl₂ anhidre. S'aturà la reacció rentant la fase orgànica amb dissolució HCl 6N, dissolució NaHCO₃ al 5% i H₂O. La fase orgànica s'assecà sobre Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà fins a sequedat. El cru resultant es purificà per cristal·lització d'EtOH:H₂O, rendint d'aquesta manera 231 mg (66%) d'un sòlid blanc.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,80-2,10 (m+m+m, 3H, C³H_a i C⁴H₂); 2,27 (s, 6H, CH₃Ar'); 2,33 (s, 6H, CH₃Ar''); 2,67 (m, 2H, C³H_b); 3,52 (m, 2H, C⁵H₂); 4,97 (m, C⁴H); 6,72 (s, 1H, C^{4''}H); 7,07 (s, 1H, C^{4''}H); 7,10 (s, 2H, C^{2',6'}H); 7,22 (s, 2H, C^{2'',6''}H); 9,50 (ba, 1H, NH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,2 i 21,3 (4CH₃Ar); 25,3 i 26,3 (C³H₂ i C⁴H₂); 50,5 (C⁵H₂); 60,5 (C²H); 117,4 (C^{2'',6''}H); 124,6 (C^{2',6'}H); 125,6 (C⁴H); 131,6 (C^{4''}H); 135,9 (C¹H); 138,1 i 138,5 (C^{1''}H, C^{3',5',3'',5''}); 168,6 (CON); 172,3 (CONH).
- **IR (KBr):** 3260 cm⁻¹ (NH *st*); 1665 i 1628 cm⁻¹ (CO *st*, amida I); 1451 cm⁻¹ (N-C=O *st*, sym).
- $[\alpha]_D^{20} = -129,0$ ($c=1$, etanol absolut)
- **Punt de fusió:** 204-205°C

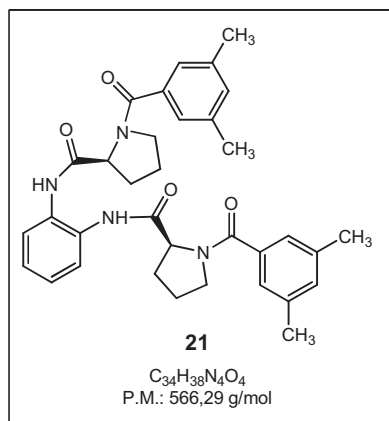
bis(*N*-(3,5-dimetilbenzoïl)-*L*-prolil)-*N,N'*-fenilendiamina (21, 22, 23)



A una dissolució de *N*-(3,5-dimetilbenzoïl)-*L*-prolina (**28**) (0,74 g, 3,0 mmol) en CH₂Cl₂ (30mL) s'hi addicionà DIPCDI (464 µL, 3 mmol), la dianilina corresponent (0,11g, 1,0 mmol) i DMAP (0,036g, 0,30 mmol) i es deixà agitar protegit de la humitat per un tub de CaCl₂ anhidre a t.a. durant 48 h. La mescla de reacció es rentà amb la dissolució de HCl 2N i H₂O. La fase orgànica s'assecà sobre Na₂SO₄, es

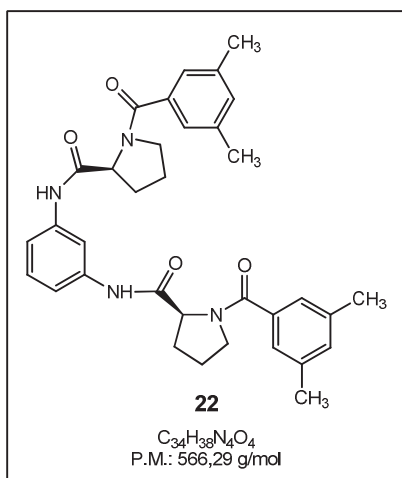
filtrà i s'evaporà a pressió reduïda. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna, fent servir un gradient d'hexà:AcOEt de 70:30 al 100% d'AcOEt. D'aquesta manera s'obtingueren els productes desitjats.

bis(N-(3,5-dimetilbenzoil)-L-prolil)-1,2-fenilendiamina (21)



Quan s'addicionà la 1,2-fenilendiamina es van obtenir 0,45g (79%) d'un sòlid blanc corresponent al producte desitjat **21**.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,77 (m, 2H, 2C⁴H_a); 2,03 (m, 2H, 2C⁴H_b); 2,14 (m, 2H, 2C³H_a); 2,24 (m, 2H, 2C³H_b); 2,30 (s, 12H, 4CH₃Ar); 3,48+3,62 (m+m, 2H+2H, 2C⁵H_a+2C⁵H_b); 4,91 (t, 2H, 2C²H); 7,04 (s, 2H, 2C⁴H); 7,12 (m, C^{d,e}H); 7,15 (s, 4H, C^{2',6'}H); 7,63 (dd, 2H, C^{c,f}H); 9,32 (ba, 2H, NH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,4 (4CH₃Ar); 25,7 (2C⁴H₂); 29,0 (2C³H₂); 50,9 (2C⁵H₂); 61,1 (2C²H); 125,1 (C^{c,f}H); 125,3 (C^{d,e}H); 125,9 (4C^{2',6'}H); 130,5 (C^{a,b}); 131,9 (2C⁴H); 136,5 (2C¹); 138,0 (4C^{3',5'}); 171,0 (NCO); 171,4 (HNCO).
- **IR (KBr):** 3296 cm⁻¹ (NH *st*); 1617 cm⁻¹ (CO *st*, amida I); 1547 cm⁻¹ (N-C=O *st*, *sym*, amida II), 775 cm⁻¹ (o-disubstituit, aromàtic).
- **[α]_D²⁰** = -3,87 (c=1, cloroform)
- **Punt de fusió:** 121-122 °C
- **EM-ES:** m/z 589,1 (M + Na)⁺, 567,7 (M + H)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per C₃₄H₃₈N₄O₄: C, 72,06; H, 6,76; N, 9,89. Trobat: C, 72,04; H, 6,53; N, 9,65.

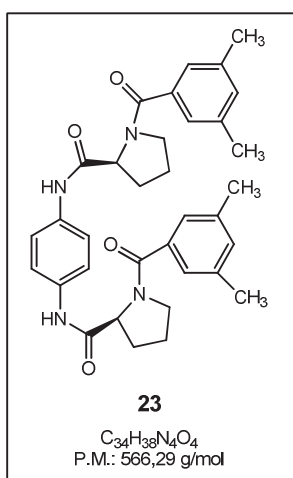
bis(N-(3,5-dimetilbenzoil)-L-prolil)-1,3-fenilendiamina (22)

A l'addicionar la 1,3-fenilendiamina s'obtingueren 0,42 g (75%) d'un sòlid blanc corresponent al producte **22**.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,81 (m, 2H, 2C⁴H_a); 2,10 (m, 4H, 2C³H_b + 2C³H_a); 2,25 (m, 2H, 2C⁴H_b); 2,32 (s, 12H, 4CH₃Ar); 3,50 (td, 2H, C⁵H_a); 3,64 (td, 2H, C⁵H_b); 4,91 (dd, 2H, C²H); 7,05 (s, 2H, C⁴H); 7,12 (m, 1H, C^eH); 7,16 (s, 4H, 2C^{2,4}H); 7,22 (s, 2H, 2C^{d,f}H); 7,84 (s, 1H, C^bH); 9,76 (ba, 2H, 2NH).

- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,4 (4CH₃Ar); 25,5 (2C⁴H₂); 28,9 (2C³H₂); 50,8 (2C⁵H₂); 61,2 (2C²H); 111,0 (C^bH); 124,9 (C^eH); 125,1 (4C^{2,6}H); 131,8 (2C⁴H); 136,4 (2C¹); 138,0 (4C^{3,5}); 139,0 (C^{a,c}); 170,2 (NCO); 171,1 (HNCO).

- **IR (KBr):** 3288 cm⁻¹ (NH st); 1616 i 1616 cm⁻¹ (CO st, amida I); 1550 i 1428 cm⁻¹ (N-C=O st, sym, amida II); 859, 757 i 689 cm⁻¹ (m-disubstituït, aromàtic).
- **[α]_D²⁰** = -14,07 (c=1, cloroform)
- **Punt de fusió:** 127-128 °C
- **EM-ES:** m/z 589,2 (M + Na)⁺, 567,6 (M + H)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per C₃₄H₃₈N₄O₄: C, 72,06; H, 6,76; N, 9,89. Trobat: C, 72,18; H, 6,78; N, 9,56.

bis(N-(3,5-dimetilbenzoil)-L-prolil)-1,4-fenilendiamina (23)

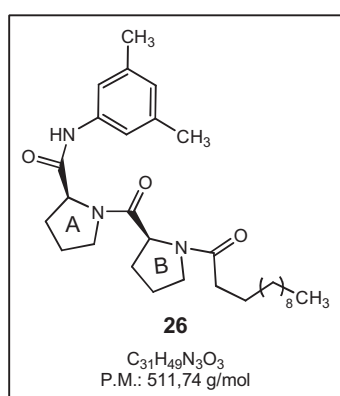
Amb l'addició de la 1,4-fenilendiamina s'obtingueren 0,46 g (80%) d'un sòlid blanc corresponent al compost **23**.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,83 (m, 2H, 2C⁴H_a); 2,11 (m, 2H, 2C⁴H_b); 2,20 (m, 4H, C⁴H₂); 2,33 (s, 12H, 4CH₃Ar); 3,52 (m, 2H, 2C⁵H_a); 3,69 (m, 2H, 2C⁵H_b); 4,92 (t, 2H, C²H); 7,04 (s, 2H, 2C⁴H); 7,18 (s, 4H, 2C^{2,6}H); 7,26 (s, 4H, C^{b,c,d,e}H).

- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,4 (4CH₃Ar); 25,5 (2C⁴H₂); 29,6 (2C³H₂); 50,9 (2C⁵H₂); 61,2 (2C²H); 119,7 (C^{b,c,e,f}H); 124,8 (4C^{2,6}H); 131,8 (2C⁴); 134,6 (C^{a,d}); 136,7 (2C¹); 138,2 (4C^{3,5}); 170,2 (NCO); 170,7 (HNCO).

- **IR (KBr):** 3293 cm^{-1} (NH *st*); 1689 i 1617 cm^{-1} (CO *st*, amida I); 1597 i 1514 cm^{-1} (N-C=O *st*, *sym*, amida II); 858 cm^{-1} (p-substituït, aromàtic).
- $[\alpha]_D^{20} = -6,89$ ($c=1$, cloroform)
- **Punt de fusió:** 197-198 °C
- **EM-ES:** m/z 589,2 (M + Na)⁺, 567,6 (M + H)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_4$: C, 72,06; H, 6,76; N, 9,89. Trobat: C, 72,26; H, 6,99; N, 9,34.

N-undecanoil-(L)-prolil-(3,5-dimetil)-(L)-prolinanilida (**26**)



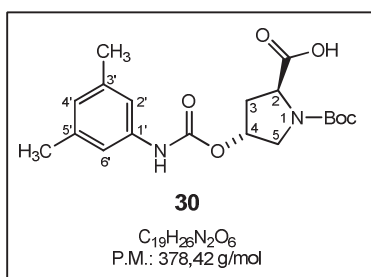
Es dissolgué el derivat de L-prolina amb l'àcid lliure **20** (0,89 g, 4,16 mmol) en 40 mL de CH_2Cl_2 i s'hi addicionà 1,1 eq d'EEDQ (4,58 mmol, 1,24 g) i del derivat de prolina amb l'amina lliure **6** (1,00 g, 4,58 mmol). Es protegí de la humitat per un tub de CaCl_2 i es deixà amb agitació a t.a. durant 48 h. A continuació, es rentà el cru de reacció amb la dissolució de HCl 2N, la dissolució de NaHCO_3 al 5% i H_2O . Les fases orgàniques es recol·lectaren, s'assecaren amb Na_2SO_4 i s'evaporà el dissolvent a pressió reduïda. El

cru obtingut es purificà mitjançant una columna cromatogràfica (hexà:AcOEt) i proporcionà 1,05 g (49 %) d'un sòlid blanc, corresponent amb el producte desitjat **26**.

- **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ :** 0,87 (t, 3H, $\text{C}^{12'}\text{H}_3$); 1,28 (m, 14H, $\text{C}^{4'-11'}\text{H}_2$); 1,63 (m, 2H, C^3H_2); 1,94 (m, 4H, $2\text{C}^4\text{H}_2$); 2,15 (m, 4H, $2\text{C}^3\text{H}_2$); 2,22 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{Ar}$); 2,28 (s, CH_3Ar rot. min.); 2,37 (m, 2H, C^2H_2); 2,68 (dd, C^3H_2 rot. min.); 3,60 (m, 5H, $\text{C}^{5\text{A}}\text{H}_2 + \text{C}^{5\text{B}}\text{H}_a$); 3,85 (dd, 1H, $\text{C}^{5\text{B}}\text{H}_b$); 4,34 (t, $\text{C}^{2\text{A}}\text{H}$ rot. min.); 4,41 (d, $\text{C}^{2\text{B}}\text{H}$ rot. min.); 4,66 (dd, 1H, $\text{C}^{2\text{B}}\text{H}$); 4,74 (dd, 1H, $\text{C}^{2\text{A}}\text{H}$); 6,65 (s, 1H, $\text{C}^{4'}\text{H}$); 6,74 (s, $\text{C}^{4'}\text{H}$ rot. min.); 7,12 (s, 2H, $\text{C}^{2',6''}\text{H}$); 7,57 (s, $\text{C}^{2',6''}\text{H}$ rot. min.); 9,44 (ba, 1H, NH); 9,69 (ba, NH rot. min.).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz) δ :** 14,3 ($\text{C}^{12'}\text{H}_3$); 21,5 ($2\text{CH}_3\text{Ar}$); 22,8 ($\text{C}^{11'}\text{H}_2$); 24,6 (C^3H_2); 24,8 ($2\text{C}^4\text{H}_2$); 25,0 ($2\text{C}^3\text{H}_2$); 27,1 (C^2H_2); 29,88 ($\text{C}^{4'-9'}\text{H}_2$); 32,1 ($\text{C}^{10'}\text{H}_2$); 32,3 (C^3H_2 rot. min.); 34,6 (C^2H_2); 47,0 (C^5H_2 rot. min.); 47,5 ($2\text{C}^5\text{H}_2$); 57,9 ($\text{C}^{2\text{B}}\text{H}_2$); 59,0 ($\text{C}^{2\text{A}}\text{H}_2$ rot. min.); 61,0 ($\text{C}^{2\text{A}}\text{H}_2$); 62,0 ($\text{C}^{2\text{B}}\text{H}_2$ rot. min.); 117,6 ($\text{C}^{2',6''}\text{H}$); 118,4 ($\text{C}^{2',6''}\text{H}$ rot. min.); 125,6 ($\text{C}^{4''}\text{H}$); 126,1 ($\text{C}^{4''}\text{H}$ rot. min.); 138,1 ($\text{C}^{1''}$); 138,5 ($\text{C}^{3'',5''}$); 169,5 (CON); 172,2 (CONH); 172,9 (CON).

- **IR (NaCl):** 3335 cm^{-1} (NH *st*); 1638 cm^{-1} (CO *st*, amida I); 1565 cm^{-1} (N-C=O *st sym*, amida II).
- $[\alpha]_D^{20} = -11,3$ ($c=1$, cloroform).
- **Punt de fusió:** 93-95 °C
- **EM-ES:** m/z 534,7 ($M + \text{Na}$)⁺, 512,3 ($M + \text{H}$)⁺
- **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 72,76; H, 9,65; N, 8,21. Trobat: C, 72,47; H, 9,70; N, 8,27.

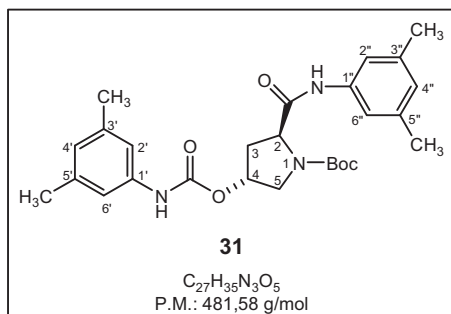
N-(*tert*-butoxicarbonil)-(4*R*)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolina (**30**)



Es dissolgué *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-(4*R*)-hidroxi-L-prolina (2,00 g, 8,65 mmol) en 60 mL de piridina anhidra, s'hi afegí l'isocianat de 3,5-dimetilfenil (1,95 g, 13,2 mmol) i s'escalfà a temperatura de reflux durant 22 h. Es deixà refredar fins a t.a. i s'afegí AcOEt. A continuació, la fase orgànica es rentà amb la dissolució de HCl 6N i amoníac al 50%. La fase aquosa bàsica es neutralitzà (pH 7) amb la dissolució de HCl 6N en un bany de gel. La dissolució aquosa resultant es s'extragué amb AcOEt. Els extractes orgànics s'agruparen, s'assecaren sobre Na_2SO_4 , es filtraren, s'evaporaren a sequedat obtenint un sòlid que es purificà d'EtOH/ H_2O . D'aquesta manera s'obtingueren 2,4 g (86%) del carbamat **30** en forma de sòlid blanc.

- **^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz)** δ : 1,45+1,48 (s+s, 9H, 3 CH_3); 2,29 (s, 6H, 2 CH_3 Ar); 2,40-2,60 (m+m, 2H, C^3H_2); 3,60-3,80 (m, 2H, C^5H_2); 4,40 (m, C^2H , rot. min.); 4,50 (m, 1H, C^2H); 5,32 (m, 1H, C^4H); 6,64 (ba, 1H, NH); 6,73 (s, 1H, C^4H); 6,99 (s, 1H, $\text{C}^{2,6}\text{H}$)
- **^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100,6 MHz)** δ : 21,3 (CH_3Ar); 28,2 i 28,3 (3 CH_3tBu); 35,2 i 36,7 (C^3H_2); 52,0 i 52,7 (C^5H_2); 57,6 i 57,8 (C^2H); 72,7 i 73,2 (C^4H); 81,0 i 81,4 (Cq-tBu); 116,4 ($\text{C}^{2,6}\text{H}$); 125,4 (C^4H); 137,2 (C^1); 138,7 i 138,8 ($\text{C}^{3,5}$); 152,6 (NCO Boc); 153,8 i 155,4 (HNCOO); 175,2 i 177,4 (COOH).
- **IR (KBr):** 3293 cm^{-1} (NH *st*); 3300-2000 cm^{-1} (COO-H *st*); 1750 cm^{-1} (C=O *st*, COOH); 1716 i 1693 cm^{-1} (C=O *st*, NCOO).
- $[\alpha]_D^{20} = -40,2$ ($c=1$, etanol 96°).
- **Punt de fusió:** 185-186°C

***N*-(*tert*-butoxicarbonil)-*N'*-(3,5-dimetilfenil)-(4*R*)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)
L-prolinamida (**31**)**

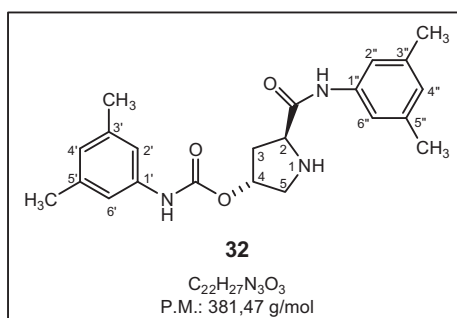


A una dissolució del carbamat **30** (1,44 g, 3,8 mmol) i EEDQ (1,03 g, 4,18 mmol) en CH₂Cl₂ (57 mL), s'hi afegí la 3,5-dimetilanilina (0,52 mL, 4,18 mmol). La mescla es deixà agitar a t.a. 24 h. A continuació, es rentà la fase orgànica amb la dissolució de HCl 2N, la dissolució de NaCO₃ al 5% i H₂O. La fase orgànica s'assecà sobre

Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà a pressió reduïda. El cru resultant es purificà per cromatografia en columna, fent servir com a eluent una barreja d'hexà:AcOEt 75:25. D'aquesta manera, s'obtingueren 1,47 g (80%) del derivat de prolina desitjat **31**.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,47 (s, 9H, CH₃tBu); 2,26 (s, 12H, 4CH₃Ar); 2,30 (m, 1H, C³H_a); 2,78 (m, 1H, C³H_b); 3,67 (m, 2H, C⁵H₂); 4,58 (m, 1H, C²H); 5,31 (m, 1H, C⁴H); 6,60 (s, 2H, C^{4'}H); 6,73 (s, 2H, C^{4''}H i NHCOO); 7,00 (s, 2H, C^{2'',6''}H); 7,14 (s, 2H, C^{2',6'}H); 9,09 (ba, 1H, CONH).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,3 (2CH₃Ar); 28,3 (3CH₃tBu); 33,6 (C³H₂); 52,8 (C⁵H₂); 62,0 (C²H); 73,5 (C⁴H); 81,4 (CqfBu); 116,5 i 117,5 (C^{2',6'}H i C^{2'',6''}H); 125,5 i 125,9 (C^{4'}H i C^{4''}H); 137,3 i 137,7 (C^{1'} i C^{1''}); 138,6 i 138,8 (C^{3',5'} i C^{3'',5''}); 152,7 i 156,1 (HNCOO i NCOOtBu); 168,8 (COONH).
- **IR (KBr):** 3301 cm⁻¹ (NH *st*); 1682 cm⁻¹ (CO *st*, C-C=O); 1616 cm⁻¹ (CO *st*, amida I); 1557 cm⁻¹ (N-C=O *st* sym, amida II).
- **[α]_D²⁰** = -51,1 (c=1, cloroform).
- **Punt de fusió:** 115°C

***N*-(3,5-dimetilfenil)-(4*R*)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolinamida (**32**)**



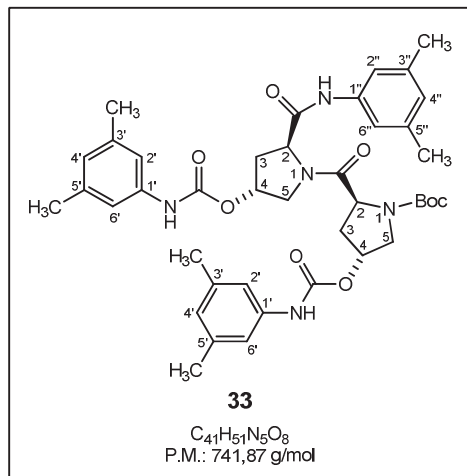
A una dissolució del derivat de prolina **31** (1 g, 2,07 mmol) en la barreja d'àcid trifluoroacètic:CH₂Cl₂ 30:70 (52 mL) es deixà agitar a t.a. durant 1 h. Passat aquest temps, la solució es refredà a 0 °C i es neutralitzà (pH 7) amb NH₄OH. La fase aquosa s'extragué amb CH₂Cl₂. Finalment, s'assecaren sobre Na₂SO₄, es

filtraren i s'evaporaren a sequedat. El cru obtingut es purificà per cromatografia en

columna, fent servir una mescla d'hexà:AcOEt 25:75. D'aquesta manera, s'obtingueren 730 mg (90%) d'un sòlid blanc.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 2,21 (m, 1H, C³H_a); 2,28 (s, 12H, CH₃Ar); 2,32 (ba, 1H, NH); 2,55 (m, 1H, C³H_b); 3,08 (dd, 1H, C⁵H_a); 3,33 (dd, 1H, C⁵H_b); 4,18 (dd, 1H, C²H); 5,30 (m, 1H, C⁴H); 6,72 i 6,75 (s+s, 1H+1H, C^{4''}H i C^{4'}H); 7,01 i 7,23 (s+s, 2H+2H, C^{2'',6''}H i C^{2',6'}H); 9,59 (ba, 1H, NH amida).
- **¹³C-RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ: 21,3 (4CH₃Ar); 36,8 (C³H₂); 53,3 (C⁵H₂); 60,6 (C²H); 76,9 (C⁴H); 116,4 i 117,0 (C^{2',6'}H i C^{2'',6''}H); 125,0 i 125,9 (C^{4'}H i C^{4''}H); 137,2 i 137,9 (C^{1'} i C^{1''}); 138,6 (C^{3',5'} i C^{3'',5''}); 153,1 (CONH carbamat); 172,5 (CONH amida).
- **IR (KBr)**: 3318, 3276 i 3273 cm⁻¹ (NH *st*); 1718 cm⁻¹ (C=O *st*, NCOO); 1650 cm⁻¹ (CO, *st*, amida I); 1558 cm⁻¹ (N-C=O *st* sym, amida II).
- **[α]_D²⁰** = -0,7 (c=1, cloroform).
- **Punt de fusió**: 159-160°C

***N*-tert-butoxicarbonil-4(R)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-(L)-prolil-(3,5-dimetil)-4(R)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-(L)-prolinanilida (33)**



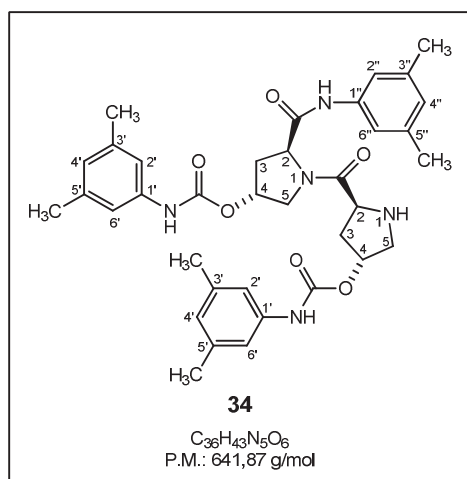
A una dissolució del Boc derivat de prolina **30** (0,97 g, 2,55 mmol) i EEDQ (1,13 g, 4,60 mmol) en THF (63 mL), s'hi afegí el **32** (1,75 g, 4,60 mmol). La mescla es deixà agitar a t.a. 48 h. Passat aquest temps, s'eliminà el dissolvent fins a sequedat i es redissolgué en CH₂Cl₂. A continuació, es rentà la fase orgànica amb la dissolució de HCl 2N i H₂O. La fase orgànica s'assecà sobre Na₂SO₄, es filtrà i s'evaporà a pressió reduïda. El cru resultant es purificà per cromatografia en columna, fent servir com a

eluent un gradient hexà 100% a hexà:AcOEt 30:70. D'aquesta manera, s'obtingueren 1,39 g (72%) del dímer de prolina desitjat **33**.

- **¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ: 1,46 (s, 9H, CH₃tBu); 2,28 (s, 18H, 6CH₃Ar); 2,46 (m, 2H, 2C³H_a); 2,78 (m, 2H, 2C³H_b); 3,65 +3,75 (m+m, 2H+2H, 2C⁵H_a+2C⁵H_b); 4,18 (m, 2H, 2C²H); 4,60 (m, C²H rot. min.); 5,23 (m, 2H, C⁴H); 6,71 (ba, 4H,

- $2C^4H + C^4H + NH$); 7,01 i 7,16 (s+s, 4H+2H, $2C^{2,6'}H + C^{2'',6''}H$); 8,94 (ba, 1H, NH).
- **^{13}C -RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ : 21,5 (6CH₃Ar); 28,5 (3CH₃tBu); 33,6 ($2C^3H_a$); 35,7 ($2C^3H_b$); 53,0 ($2C^5H_2$); 57,3 (C^2H rot. min.); 59,9 ($2C^2H$); 73,8 ($2C^4H$); 81,0 (CqfBu); 116,7 i 117,8 ($2C^{2,6'}H + C^{2'',6''}H$); 125,6 i 126,1 ($2C^4H + C^4H$); 137,6 i 137,8 ($C^1 + C^{1''}$); 138,8 i 139,0 ($C^{3,5'} + C^{3'',5''}$); 153,0 (CONH carbat); 154,7 (NCOOtBu); 169,1 (CON); 172,1 (CONH amida).
 - **IR (KBr)**: 3294 cm⁻¹ (NH st); 1635 cm⁻¹ (CO, st, amida I); 1562 cm⁻¹ (N-C=O st sym, amida II).
 - **$[\alpha]_D^{20}$** = -36,43 (c=1, cloroform)
 - **Punt de fusió**: 101-103 °C

4(R)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-(L)-prolil-(3,5-dimetil)-4(R)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-(L)-prolinanilida (34)



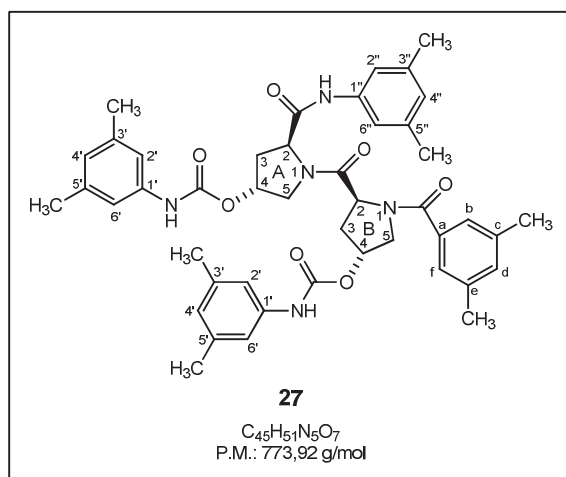
A una dissolució del dímer de prolina **33** (0,77 g, 1,04 mmol) en la barreja d'àcid trifluoroacètic:CH₂Cl₂ 30:70 (31 mL) es deixà agitar a t.a. durant 1 h. Passat aquest temps, la solució es refredà a 0 °C i es neutralitzà (pH 7) amb NH₄OH. La fase aquosa s'extragué amb CH₂Cl₂. Finalment, s'assecaren sobre Na₂SO₄, es filtraren i s'evaporaren a sequedat. El cru obtingut no es purificà i s'utilitzà en el següent pas, al no detectar-se presència del grup Boc en

1H -RMN. D'aquesta manera, s'obtingueren 0,52 g (76%) d'un sòlid blanc.

- **1H -RMN (CDCl₃, 400 MHz)** δ : 2,27 i 2,28 (s+s, 18H, 6CH₃Ar); 2,81 (m, 4H, $2C^3H_2$); 3,67 (m, 2H, $2C^5H_a$); 3,85 (m, 2H, $2C^5H_b$); 4,19 (m, 2H, C^2H); 4,61 (m, C^2H rot. min.); 5,34 (m, 2H, C^4H); 6,71, 6,73 i 6,74 (ba+s+s, 4H, $2C^4H + C^4H + NH$); 7,00 i 7,16 (s+s, 4H+2H, $2C^{2,6'}H + C^{2'',6''}H$); 8,95 (ba, 1H, NH).
- **^{13}C -RMN (CDCl₃, 100,6 MHz)** δ : 21,5 (6CH₃Ar); 33,8 ($2C^3H_2$); 52,9 ($2C^5H_2$); 59,8 (C^2H rot. min.); 62,5 ($2C^2H$); 73,9 ($2C^4H$); 116,7 i 117,8 ($2C^{2,6'}H + C^{2'',6''}H$); 125,7 i 126,3 ($2C^4H + C^4H$); 137,5 ($C^1 + C^{1''}$); 137,9 i 139,0 ($C^{3,5'} + C^{3'',5''}$); 152,9 (CONH carbat); 169,0 (CON i CONH amida).

- **IR (KBr):** 3303 cm^{-1} (NH *st*); 1689 cm^{-1} (CO, *st*, amida I); 1615 cm^{-1} (N-C=O *st* sym, amida II).
- **$[\alpha]_D^{20}$** = -5,47 ($c=1$, cloroform)
- **Punt de fusió:** 109-110 °C

***N*-(3,5-dimetilbenzoil)-4(*R*)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-(L)-prolil-(3,5-dimetil)-4(*R*)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-(L)-prolinanilida (27)**



A una dissolució del dímer de prolina desprotegit **34** (2,29g, 3,09 mmol) en 15 mL de CHCl_3 , s'hi afegí a 0 °C el clorur de 3,5-dimetilbenzoil en la dissolució de NaOH 1N (57 mL). La mescla es deixà agitant 90 min a t.a. Passat aquest temps, la mescla de reacció s'acidificà fins a pH 1-2 amb HCl concentrat i la fase aquosa es rentà amb CHCl_3 . Els extractes orgànics s'assecaren sobre

Na_2SO_4 , es filtraren i s'evaporaren a sequedat. El cru obtingut es purificà per cromatografia en columna utilitzant un gradient d'hexà:AcOEt. D'aquesta manera, s'obtingueren 1,59 g (63%) d'un sòlid grogós corresponent al producte desitjat **27**.

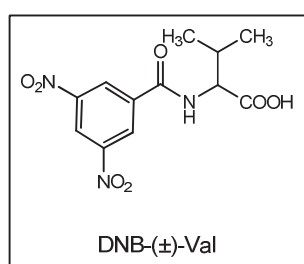
- **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz)** δ : 2,03 (s, 6H, 2 CH_3 Ar anell B); 2,13 (s, 6H, 4 CH_3 Ar); 2,25 (s, 6H, 2 CH_3 Ar anell A); 2,34 + 2,51 (m + dd, 3H + 1H, C^3H_2 i $\text{C}^3\text{H} + \text{C}^3\text{H}$); 3,66 + 3,89 + 3,98 + 4,51 (d + dd + dd + d, 1H + 1H + 1H + 1H, C^5H_a anell B + C^5H_b anell A + C^5H_b anell B + C^5H_a anell A); 4,80 + 4,95 (dd + dd, 1H + 1H, C^2H anell B + C^2H anell A); 5,15 + 5,32 (t + t, 1H + 1H, C^4H anell A + C^4H anell B); 6,44 + 6,51 + 6,69 + 6,93 (s + s + s + s, 1H + 1H + 1H + 1H, CHAr); 6,86, 6,95, 7,07 (s + s + s, 2H + 4H + 2H, CHAr); 6,58 (s, CONH); 8,56 (s, 1H, CONH); 9,88 (s, 1H, CONH).
- **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz)** δ : 21,0 + 21,5 (8 CH_3 Ar); 34,8 + 35,5 (C^3H_2 + C^3H_2); 54,6 (C^5H_2 anell A); 56,5 (C^5H_2 anell B); 57,3 (C^2H anell A); 60,5 (C^2H anell B); 72,9 (C^4H anell B); 74,4 (C^4H anell A); 116,2 + 116,6 + 117,4 ($\text{C}^{2',6'}\text{H} + \text{C}^{2'',6''}\text{H} + \text{C}^{2''',6'''}\text{H}$); 124,3 + 125,3 + 125,7 + 132,7 ($\text{C}^4\text{H} + \text{C}^{4''}\text{H} + \text{C}^{4'''}\text{H} + \text{C}^{4''''}\text{H}$); 134,4 ($\text{C}^{1''}$); 137,0 (2C^1); 138,00 + 138,01 + 138,1 + 138,2 + 138,4 + 139,0 ($\text{C}^{3''}$,

- $5''$, $C^{1''}$, $3'';5''$, $2C^{3;5''}$; 152,5 + 153,2 (CONH); 169,2 (NCO); 170,8 + 171,5 (2 HNCO).
- **IR (KBr):** 3298 cm^{-1} (NH *st*); 1681 cm^{-1} (CO *st*, amida I); 1558 cm^{-1} (N-C=O *st*, *sym*, amida II).
 - $[\alpha]_D^{20} = -20,65$ ($c=1$, cloroform).
 - **Punt de fusió:** 124-125 °C
 - **EM-ES:** m/z 796,7 (M + Na)⁺, 774,7 (M + H)⁺
 - **Anàlisi elemental:** Resultat calculat per $C_{45}H_{51}N_5O_7$: C, 69,84; H, 6,64; N, 9,05. Trobat: C, 69,35; H, 6,52; N, 9,52.

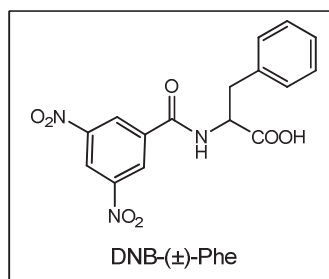
6.2.2. Síntesi dels racèmics

Per a la síntesi dels racèmics utilitzats en el present estudi, s'utilitzaren els aminoàcids: valina i fenilalanina, on es dissolgué en 50 mL de NaOH 1N 23 mmol de l'aminoàcid racèmic seleccionat i es refredà amb un bany de gel. A aquesta dissolució s'afegí gota a gota durant 20 minuts la dissolució formada pel clorur de 3,5-dimetilbenzoïl (23 mM) en 50 mL de la dissolució de NaOH 1N. Una vegada realitzada l'addició es deixà reaccionar durant 90 min a t.a. Passat aquest temps, el medi s'acidificà fins a pH 2 amb la dissolució de HCl 2N on precipità un sòlid que fou rentat amb H_2O i es cristal·litzà d'etanol/aigua.¹¹⁴

N-(3,5-dinitrobenzoïl)-(±)-valina (DNB-(±)-Val)



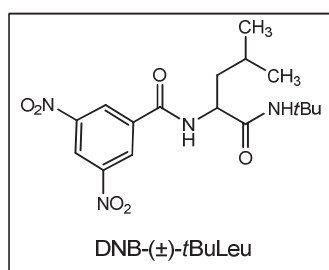
- **$^1\text{H-RMN}$ ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, 400 MHz) δ :** 1,08-1,10 (m, 6H, 2CH₃); 2,43 (m, 1H, CH(CH₃)₂); 4,90 (d, 1H, CHN); 6,80 (d, NH); 8,98 (d, 1H, C^{2,6}HAr); 9.20 (t, 1H, C⁴HAr).
- **IR (KBr):** 3099 cm^{-1} (NH *st*); 1711 cm^{-1} (C=O, COOH); 1629 cm^{-1} (CO, amida I); 1545 cm^{-1} (N=CO, amida II i NO₂); 1345 cm^{-1} (NO₂).

***N*-(3,5-dinitrobenzoil)-(±)-fenilalanina (DNB-(±)-Phe)**

II i NO₂); 1344 cm⁻¹ (NO₂).

- **¹H-RMN (CDCl₃/CD₃OD, 400 MHz)** δ: 3,31 (dd, 1H, C^bHAr'); 3,42 (m, 1H, C^aHAr'); 5,17 (m, 1H, CHN); 6,72(NH); 7,21-7,33 (m, 5H, CHAr'), 8,85 (d, 1H, C^{2,6}HAr); 9,17 (t, 1H, C⁴HAr).

- **IR (KBr):** 3096 cm⁻¹ (NH st); 1726 cm⁻¹ (C=O, COOH); 1649 cm⁻¹ (CO, amida I); 1543 cm⁻¹ (N=CO, amida

(±)-*N*-(3,5-dinitrobenzoil)-*tert*-butilleucinamida (DNB-(±)-*t*BuLeu)

A una dissolució de 9,6 mmol de *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-(±)-leucina i 10 mmol (2,5 g) d'EEDQ, dissolts en THF se li addicionen 10 mmol (0,7 g) de *tert*-butilamina, a temperatura ambient. La mescla de reacció es manté durant 18 h a reflux. Finalment, la dissolució resultat s'evaporà i el residu es va dissolgué en diclorometà i rentat successivament amb una dissolució de bicarbonat sòdic al 5 %, una d'HCl 1N i H₂O. Una vegada seca sobre sulfat sòdic, s'evaporà i el residu es cristal·litzà d'EtOH:H₂O, donant lloc a un sòlid, rendint un sòlid blanc en un 84 %.

- **¹H-RMN (CDCl₃/CD₃OD, 400 MHz)** δ: 0,97 (t, 6H, 2CH₃); 1,34 (s, 9H, *t*-Bu); 1,67 (m, 3H, CHCH₂); 4,61 (m, 1H, CHN); 7,1 (s, 1H, NH); 8,9 (d, 1H, NHCOAr); 9,08 (d, 2H, C^{2,6}H); 9,17 (m, 1H, C⁴H).
- **IR (KBr):** 3294 cm⁻¹ (NH st); 1644 cm⁻¹ (CO, amida I); 1556 cm⁻¹ (N=CO, amida II); 1342 cm⁻¹ (NO₂).

6.3. Construcció dels sistemes de dissolvents ternaris

Per tal de construir els diferents sistemes de dissolvents ternaris, tal i com es descriu l'apartat 5.3 del capítol 5, es seleccionaren dos dissolvents de polaritat oposada, l'ENFB i l'H₂O, més un tercer de polaritat intermèdia i que es solubilitza en els dos anteriors, triant-se 2-PrOH, MeOH i ACN. Un altre sistema que es volgué construir fou el format per tres dissolvents orgànics essent aquests ENFB, etilenglicol i 1-BuOH. D'aquesta manera es volgué obtenir un medi altament lipòfil on no participava l'H₂O, essent l'etilenglicol (EG) el dissolvent més hidròfil.

Una vegada seleccionats els dissolvents participants en l'estudi, es procedí a la preparació de cinc barreges en tubs de vidre proveïts de rosca, on es disposaren diferents volums dels dissolvents de polaritat oposada, obtenint d'aquesta manera dues fases. A continuació, s'afegiren petits volums i coneguts (100 µL) del dissolvent de polaritat intermèdia, s'agità enèrgicament i s'observà visualment. En observar-se terbolesa o la desaparició de les dues fases s'aturà l'addició del dissolvent i s'anotà la quantitat afegida. El valors experimentals obtinguts es mostren en les següents taules:

Taula 6.1. Composició de les barreges que formen una sola fase o terbolesa expressades en mL i en percentatge realitzades per a la construcció del diagrama de fases ternari amb 2-PrOH i MeOH.

| ENFB (mL/%) | H ₂ O (mL/%) | 2-PrOH (mL/%) | ENFB (mL/%) | H ₂ O (mL/%) | MeOH (mL/%) |
|----------------|----------------------------|------------------|----------------|----------------------------|----------------|
| 2,5/39,7 | 0,5/7,9 | 3,3/52,4 | 2,5/22,7 | 0,5/4,5 | 8/72,7 |
| 2/25,3 | 1/12,6 | 4,9/62,0 | 2/12,3 | 1/6,2 | 13,2/81,5 |
| 1,5/17,8 | 1,5/17,8 | 5,4/64,3 | 1,5/8,4 | 1,5/8,4 | 14,8/83,1 |
| 1/11,6 | 2/23,2 | 5,6/65,1 | 1/6,1 | 2/12,3 | 13,3/81,6 |
| 0,5/6,7 | 2,5/33,3 | 4,5/60,0 | 0,5/3,5 | 2,5/17,3 | 11,4/79,2 |

Taula 6.2. Composició de les barreges que formen una sola fase o terbolesa expressades en mL i en percentatge realitzades per a la construcció del diagrama de fases ternari amb ACN i 1-BuOH.

| ENFB (mL/%) | H ₂ O (mL/%) | ACN (mL/%) | ENFB (mL/%) | H ₂ O (mL/%) | 1-BuOH (mL/%) |
|----------------|----------------------------|---------------|----------------|----------------------------|------------------|
| 2,5/17,9 | 0,5/3,6 | 11/78,6 | 2,5/32,5 | 0,5/6,5 | 4,7/61,0 |
| 2/10,9 | 1/5,5 | 15,3/83,6 | 2/22,0 | 1/11,0 | 6,1/67,0 |
| 1,5/8,8 | 1,5/8,8 | 14,1/82,4 | 1,5/16,7 | 1,5/16,7 | 6/66,7 |
| 1/6,2 | 2/12,3 | 13,2/81,5 | 1/11,9 | 2/23,8 | 5,4/64,3 |
| 0,5/3,5 | 2,5/17,6 | 11,2/78,9 | 0,5/7,1 | 2,5/35,7 | 4/57,1 |

Tot seguit, es procedí a la preparació de diferents barreges formades pel dissolvent més polar, H₂O o etilenglicol, i el de polaritat intermèdia obtenint barreges que formen una sola fase. El número de barreges preparades fou diferent en cada cas, ja que en funció dels resultats obtinguts en el cas anterior es decidiren realitzar més o menys experiments. De manera inversa, a l'operació realitzada anteriorment, s'addicionà un volum conegut d'ENFB (10 µL) fins a l'obtenció de dues fases, s'anotà el volum en què apareixia terbolesa o l'aparició de la segona fase. Les dades experimentals, a l'igual que en el cas anterior es mostren en les següents taules:

Taula 6.3. Composició de les barreges que formen dues fases expressades en mL i en percentatge realitzades per a la construcció del diagrama de fases ternari amb 2-PrOH i MeOH.

| H ₂ O (mL/%) | 2-PrOH (mL/%) | ENFB (mL/%) | H ₂ O (mL/%) | MeOH (mL/%) | ENFB (mL/%) |
|----------------------------|------------------|----------------|----------------------------|----------------|----------------|
| 0,25/0,3 | 5/5,7 | 82,3/94,0 | 0,25/3,0 | 5/59,9 | 3,1/37,1 |
| 0,5/2,0 | 5/19,8 | 19,7/78,2 | 0,5/7,7 | 5/77,0 | 1/15,3 |
| 1/25,6 | 2,5/64,1 | 0,4/10,2 | 5/90,1 | 0,5/90,0 | 0,05/0,9 |
| 1,5/35,3 | 2,5/58,8 | 0,25/5,9 | - | - | - |
| 2/43,0 | 2,5/53,8 | 0,15/3,2 | - | - | - |
| 5/89,8 | 0,5/9,0 | 0,07/1,2 | - | - | - |
| 5/94,9 | 0,25/4,7 | 0,02/0,4 | - | - | - |

Taula 6.4. Composició de les barreges que formen dues fases expressades en mL i en percentatge realitzades per a la construcció del diagrama de fases ternari amb ACN.

| H ₂ O (mL/%) | ACN (mL/%) | ENFB (mL/%) | H ₂ O (mL/%) | 1-BuOH (mL/%) | ENFB (mL/%) |
|----------------------------|---------------|----------------|----------------------------|------------------|----------------|
| 0,25/3,5 | 5/69,4 | 1,95/27,1 | 0,5/5,1 | 5/51,5 | 4,2/43,3 |
| 0,5/7,9 | 5/79,4 | 0,8/12,7 | 5/89,3 | 0,5/8,9 | 0,1/1,8 |
| 0,15/35,7 | 0,25/59,5 | 0,02/4,8 | - | - | - |
| 5/89,3 | 0,5/8,9 | 0,1/1,8 | - | - | - |

Una vegades recopilades totes les dades experimentals obtingudes es procedí a la representació gràfica dels quatre diagrames. Per tal de realitzar la representació ortogonal en dos dimensions, s'utilitzaren els percentatges dels volums adicionats de dos dels tres dissolvents i el tercer es calcula per diferència, en el nostre cas es decidí que aquest fora l'ENFB. Així, les representacions que es mostren, corresponen al dissolvent més polar en l'eix d'ordenades i el de polaritat intermèdia a l'eix d'abscisses, tal i com es pot veure en els diagrames que es mostren a continuació (Figura 6.1).

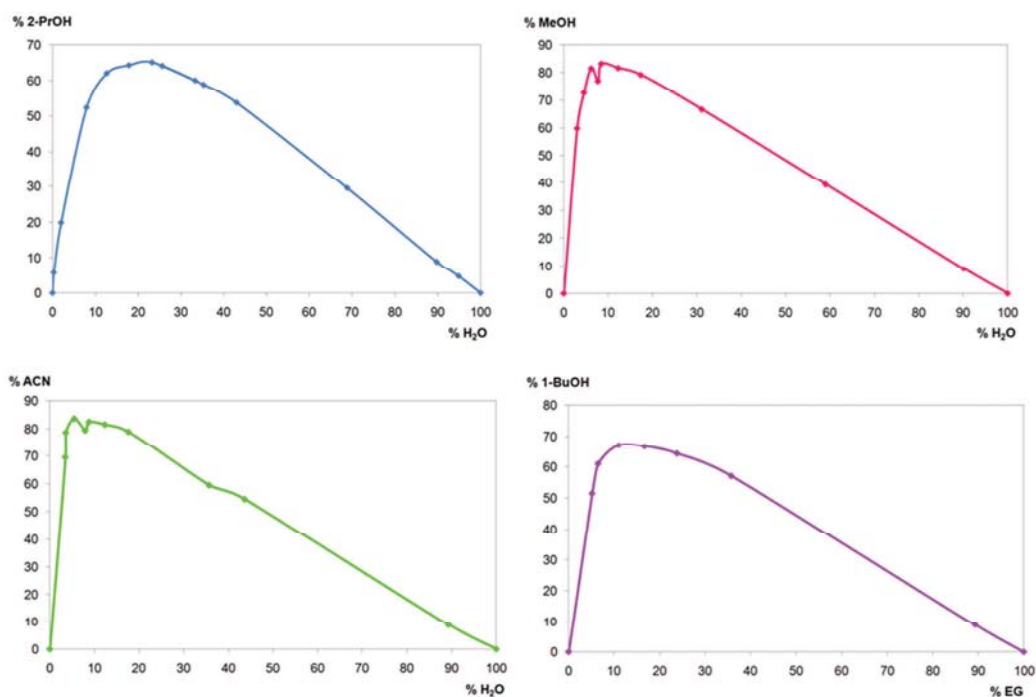


Figura 6.1. Diagrames ternaris dels sistemes de dissolvents ENFB/2-PrOH/H₂O; ENFB/MeOH/H₂O; ENFB/ACN/H₂O i ENFB/1-BuOH/etilenglicol.

El següent pas fou decidir els sistemes a estudiar, la preparació d'aquests i les composicions de cadascun assajades, aquestes operacions es detallen més endavant en el present capítol.

6.4. Preparació dels sistemes de dissolvents

Tant com per a la realització del estudis de solubilitat i de repartiment, com per a la realització dels experiments de CPC/CCC en mode clàssic o en mode de pH-zone refining es preparen diferents sistemes de dissolvents bifàsics formats per dos o més components.

6.4.1. Sistemes de dissolvents binaris

A l'hora de preparar els sistemes de dissolvents per tal de realitzar els experiments de CPC/CCC, aquests es preparen barrejant en un embut de decantació el dissolvent orgànic seleccionat amb la dissolució tamponada de fosfat sòdic 50 mM del pH seleccionat. Després d'agitar enèrgicament la mescla es deixà equilibrar durant 12 h, per tal de saturar ambdues fases. Tot seguit, es procedí a la seva decantació i filtració per tal de desgasar les dues fases abans d'esser utilitzades. En tots els casos en què s'utilitzà un sistema de dissolvents binaris, el selector quiral s'incorporà a la fase orgànica del sistema, sent aquesta la fase estacionaria, mentre que la fase més densa o aquosa fou utilitzada com a fase mòbil.

Taula 6.5. Sistemes binaris utilitzats en els experiments de CPC/CCC.

| Dissolvent orgànic | Dissolució aquosa | pH |
|--------------------|--------------------|------------------|
| MIBK | Fosfat sòdic 50 mM | 6,00; 7,00; 8,00 |
| MTBE | Fosfat sòdic 50 mM | 6,00 |
| DIPE | Fosfat sòdic 50 mM | 6,00 |

Quan els experiments es realitzaren en el mode de *pH-zone refining* de manera anàloga a la descrita anteriorment, en un embut de decantació es disposaren el dissolvent

orgànic, MTBE, i l'aigua Mili-Q. La barreja s'agità i es deixà durant 12 h per tal de què es saturessin les fases. Tot seguit, es separaren i filtraren les dues fases, i es procedí a l'addició de l'agent de retenció sobre la fase estacionaria i l'agent de desplaçament sobre la fase mòbil. Al separar-se un analit de caràcter àcid s'utilitzà com a agent de retenció el TFA i com a agent de desplaçament l'amoníac. A l'igual que en el cas anterior el selector quiral s'afegeix sobre la fase més lipòfila, essent aquesta la formada pel dissolvent orgànic MTBE.

6.4.2. Sistemes de dissolvents ternaris

A l'hora de seleccionar la composició assajada sistemes de dissolvents ternaris, aquesta es determinà a partir de la representació ortogonal d'aquests diagrames. Així, tant a l'eix d'abscisses, com al d'ordenades es representà la composició en tant per cent de dos dels tres dissolvents que conformen el sistema ternari, el tercer es calculà per diferència, $\% D3 = 100 - (\% D1 + \% D2)$. Tal i com s'ha explicat en el capítol cinquè, en el diagrama es representa una corba binodal, és a dir, les composicions que se situen per sota d'aquesta corba mantenen el caràcter bifàsic de la mescla, mentre que les composicions que es troben per sobre estan formades per una sola fase (Figura 6.2.).

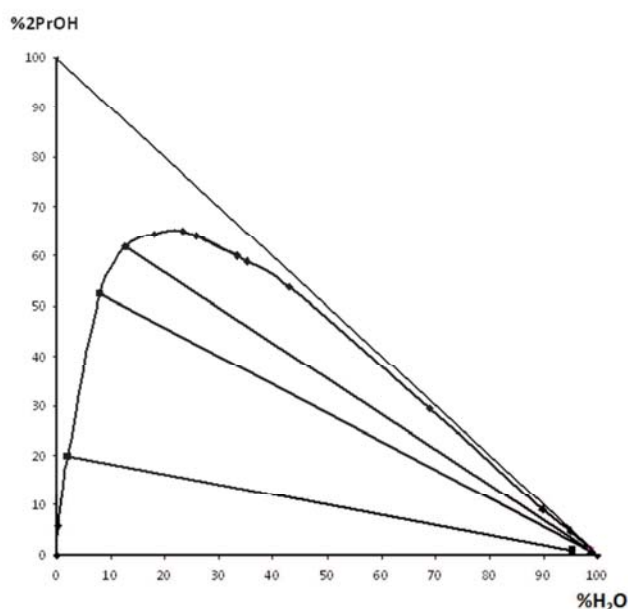


Figura 6.2. Exemple de diagrama ternari de dissolvents format per ENFB/H₂O/2-PrOH.

Les rectes que uneixen dos punts de la corba binodal constitueix composicions que formen un mateix sistema de dissolvents de dues fases en equilibri. A l'hora de seleccionar les composicions d'aquests sistemes, no s'han volgut avaluar mescles formades per composicions properes a les línies binodals. Així, les composicions seleccionades i assajades es mostren a continuació (Taula 6.6):

Taula 6.6. Sistemes de dissolvents ternaris assajats en CCC.

| Dissolvent 1/ dissolvent 2/ dissolvent 3 | Proporció |
|--|-----------|
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 25:35:40 |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 48:12:40 |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 90:35:40 |
| ENFB/MeOH/H ₂ O | 46:295:40 |
| ENFB/MeOH/H ₂ O | 21:33:40 |
| ENFB/ACN/H ₂ O | 17:43:40 |

Una vegada seleccionades les composicions dels sistemes de dissolvents ternaris es procedí a la seva preparació, mesclant en un embut de decantació les proporcions de cada dissolvent per separat. Tot seguit s'agità i es deixà equilibrar el sistema de dissolvents 12 h, i les dues fases resultants es decanten i filtren de la mateixa manera que en el cas anterior. A l'hora de preparar la fase estacionària, en aquesta ocasió es selecciona la que conté el dissolvent fluorat, tractant-se aquesta de la més densa. I com a fase mòbil es seleccionà la menys densa, és a dir, la formada per l'H₂O i el dissolvent de polaritat intermèdia.

6.4.3. Sistemes de dissolvents quaternaris

Els sistemes de dissolvents quaternaris més utilitzats tant en CCC com en CPC és el sistema Arizona. Aquesta família està formada per vint-i-tres barreges d'heptà, acetat d'etil, metanol i aigua en diferents proporcions, trobant des de mescles molt polars, fins a molt apolars. Aquesta àmplia varietat de composicions fa que sigui tant utilitzat.

Per tal de preparar els sistemes de dissolvents, primer de tot es seleccionaren cinc composicions diferents que presentaven diferents polaritats, tal i com es mostra en la següent taula (Taula 6.7):

Taula 6.7. Composició del sistema de dissolvents Arizona assajats.

| Dissolvents | Proporció |
|-----------------------------------|---------------|
| Heptà/AcOEt/MeOH/H ₂ O | 1:9:1:9 (C) |
| Heptà/AcOEt/MeOH/H ₂ O | 2:3:2:3 (L) |
| Heptà/AcOEt/MeOH/H ₂ O | 2:1:2:1 (R) |
| Heptà/AcOEt/MeOH/H ₂ O | 6:1:6:1 (W) |
| Heptà/AcOEt/MeOH/H ₂ O | 19:1:19:1 (Y) |

A continuació, es procedí a la seva preparació mesurant de forma individual les proporcions de cada dissolvent i s'afegiren a un embut de decantació que s'agità enèrgicament i es deixà equilibrar el sistema 12 h, per tal que les dues fases es saturessin.

6.5. Estudi qualitatiu de la distribució dels racèmics en els sistemes de dissolvents

A l'hora de seleccionar els racèmics utilitzats en el present treball, es tingueren en compte els estudis realitzats anteriorment en el nostre grup amb derivats de l'aminoàcid L-prolina, escollint aquells amb els que s'obtingueren millors resultats.^{24,25} Així, tot i conèixer la seva distribució en alguns dels sistemes seleccionats, es decidí repetir la determinació qualitativa del seu repartiment.

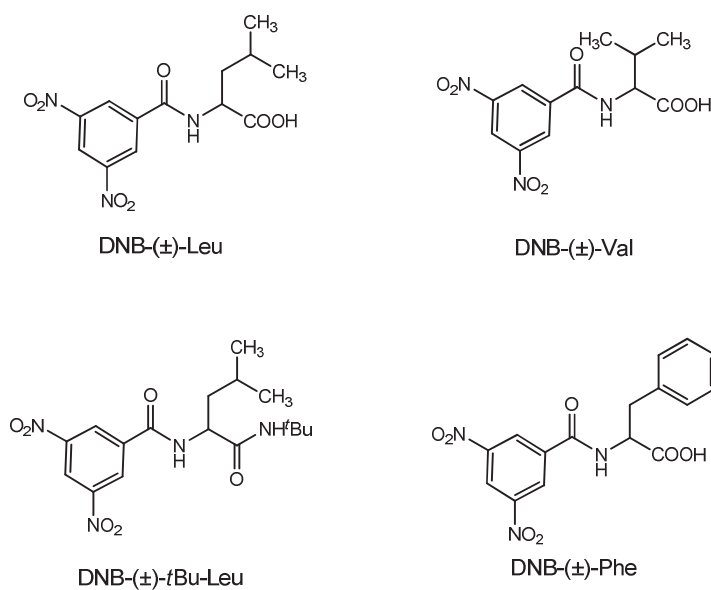


Figura 6.3. Estructura química dels racèmics utilitzats en el present estudi.

Per tal de realitzar la determinació qualitativa de la distribució dels analits es seguí el mètode d'extracció líquid-líquid.¹¹⁵ Així, en primer lloc es prepararen els sistemes de dissolvents seleccionats i es deixaren equilibrar. A continuació, es pesaren 2 mg de racèmic i es van disposar en un tub proveït amb tap de rosca, al que s'addicionaren 2 mL de cada fase del sistema de dissolvents i s'agità durant 2 minuts. Una vegada les dues fases es tornaren a equilibrar, mitjançant CCF es determinà de forma qualitativa la distribució de l'analit, utilitzant com a eluent la barreja de cloroform/metanol (9:1). Si s'observa la distribució del racèmic en ambdues fases, es repeteix aquesta operació, però addicionant aquesta vegada 5 mg de selector quiral a cada tub. Selecció així, les condicions en què el racèmic es reparteix entre les dues fases i el selector quiral queda retingut només en una de les fases, per ésser assajades en CCC/CPC.

Taula 6.8. Concentració dels SQs en els sistemes de dissolvents estudiats.

| SQ | MIBK | MTBE | DIPE |
|-----------|-------------|-------------|-------------|
| 3 | 1,4 mg/mL | 3,6 mg/mL | - |
| 7 | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 8 | 33 mg/mL | 20 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 9 | 42 mg/mL | 21 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 16 | > 100 mg/mL | > 100 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 17 | > 100 mg/mL | > 100 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 18 | 63 mg/mL | 48 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 19 | > 100 mg/mL | > 100 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 21 | 92 mg/mL | 2,8 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 22 | 46 mg/mL | 5,8 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 23 | 35 mg/mL | 4,5 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 24 | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 26 | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL | < 1 mg/mL |
| 27 | 67 mg/mL | 42,5 mg/mL | < 1 mg/mL |

Taula 6.9. Concentració dels SQs en sistemes de dissolvents fluorats estudiats.

| Composició del sistema de dissolvents | Proporcions (v/v) | Solubilitat | | |
|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 1 | 35 | 36 |
| ENFB/ACN/H ₂ O | 17:43:40 | Insoluble | 11 mg/mL (14 mM) | No calculat |
| ENFB/MeOH/H ₂ O | 21:33:40 | Poc soluble (<1 mg/mL) | Poc soluble (<1 mg/mL) | Poc soluble (<1 mg/mL) |
| ENFB/MeOH/H ₂ O | 46:295:40 | Insoluble | Poc soluble (<1 mg/mL) | Poc soluble (<1 mg/mL) |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 48:12:40 | Poc soluble (<1 mg/mL) | 48 mg/mL (60 mM) | No calculat |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 90:35:40 | Poc soluble (<1 mg/mL) | 17 mg/mL (20 mM) | No calculat |
| ENFB/2-PrOH/H ₂ O | 25:35:40 | 31 mg/mL (70 mM) | 62 mg/mL (80 mM) | 23 mg/mL (40 mM) |
| MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 | - | 42 mg/mL (100 mM) | 57 mg/mL (70 mM) | 202 mg/mL (380 mM) |

6.6. Condicions de control analític dels assajos de separació per CPC/CCC i membranes líquides

Per tal de poder controlar analíticament el que succeeix a cada temps durant l'experiment de CPC/CCC i durant la realització de les membranes líquides, es desenvoluparen mètodes de control per HPLC enantioselectiva, gràcies a això es pogué conèixer la composició enantiomèrica de cada fracció seleccionada.

6.6.1. Condicions d'anàlisi

Per tal de poder establir un mètode analític per a cada racèmic emprat en el present estudi es procedí de la següent manera. Primer de tot es prepararen mostres que contenen 1 mg/mL de patró de cada racèmic utilitzat en els experiments de CPC/CCC dissolts en cloroform. Pel que fa a l'anàlisi de DNB-(±)-Val i DNB-(±)-Phe en CPC/CCC i

de DNB-(±)-Leu en el cas de l'estudi de l'enantiselectivitat en membranes líquides, es preparen en la barreja metanol/aigua (95:5). El flux de fase mòbil utilitzat fou de 1 mL/min i el volum d'injecció de 5 μ L. Així, es seleccionaren diferents FEQs i s'utilitzaren les condicions que permeteren la separació dels racèmics fins a línia de base. Essent els selectors quirals que conformen les FEQs utilitzades en les anàlisis de les fraccions recollides durant els experiments realitzats (Figura 6.4).

Essent les FEQ seleccionades, FEQ 1 la formada per l'*N*-(3,5-dimetilfenil)-(4*R*)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolinamida com a selector quiral i disposat en una columna d'acer inoxidable de 150 mm x 4,6 mm de diàmetre intern.⁶² La FEQ 2 es la formada per un derivat de l'(*S*)-naproxè immobilitzat sobre gel de sílice.¹¹⁶ I la FEQ 3 és la que conté un derivat de quinina com a selector quiral unit de forma covalent sobre el gel de sílice.¹¹⁷ Cal destacar que les FEQ 1 i 2 has estat preparades anteriorment en el nostre grup, mentre que la FEQ 3 (Chiralpak-QN-AX) que s'ha adquirit a Chiral Technologies.

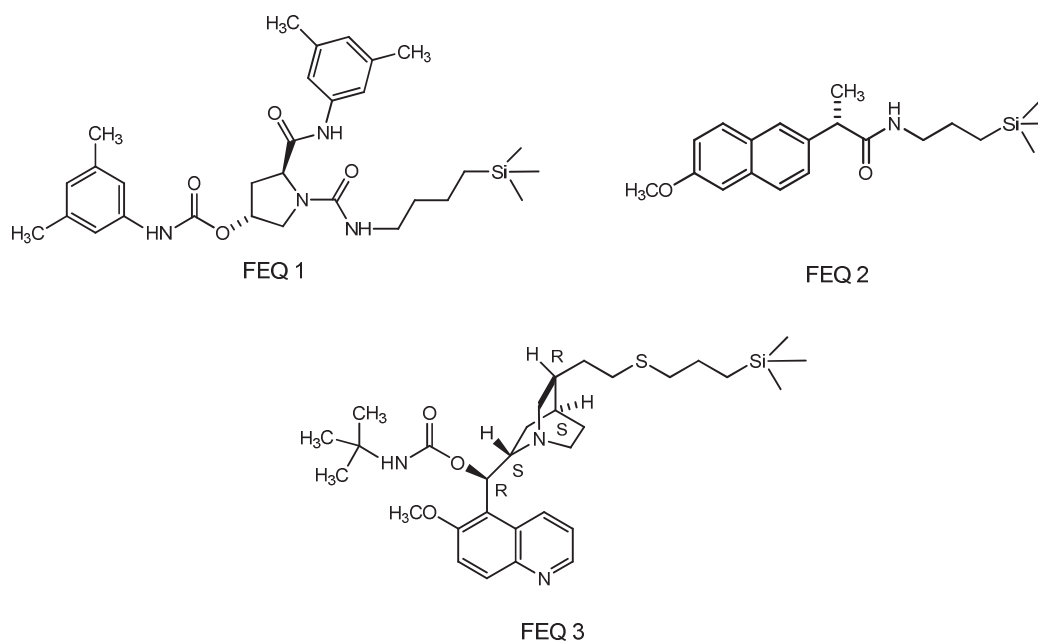


Figura 6.4. Estructura de les FEQs utilitzades en l'anàlisi de les fraccions.

6.6.2. Preparació de les mostres

A l'utilitzar com a fase mòbil durant els experiments de CPC/CCC i en les membranes líquides la fase aquosa, a l'hora d'analitzar l'eluat es seguiren dos procediments

diferents, en funció de si es realitzava l'anàlisi directe de les fraccions utilitzant un gradient en fase reversa, o bé, si es feia un procés d'extracció líquid-líquid previ al seu anàlisi en condicions de fase normal.

Així, tal i com s'ha indicat en l'anàlisi de la DNB-(±)-Val i DNB-(±)-Phe procedents dels experiments de CPC i en el cas de mostres que contenen DNB-(±)-Leu provinents dels assaigs de membranes líquides, es procedí al seu anàlisi directe amb la FEQ 3, només necessitant diluir la mostra amb la fase mòbil, prèvia filtració amb filtres de membrana de 0,45 µm, per tal d'evitar que precipités la mostra durant el seu anàlisi, al contenir aquesta tampó fosfat i la fase mòbil estar constituïda principalment per metanol.

Pel que fa a les mostres sobre les que es realitza un procés previ d'extracció, si l'analit presenta caràcter àcid, cal addicionar unes gotes de la dissolució d'àcid clorhídric 0,4 N, per afegir a continuació 1 mL de cloroform, mentre que si el racèmic és neutre no cal modificar el medi i s'afegeix directament el mateix volum de cloroform. Tot seguit, s'agita enèrgicament, s'agafen 750 µL de la fase orgànica i es dipositen en un vial d'HPLC, per tal d'esser analitzat en les condicions que es descriuen. En tots els casos el volum d'injecció fou el mateix, 50 µL i la longitud d'ona utilitzada fou la mateixa per a tots els analits, 254 nm.

Taula 6.10. Condicions d'anàlisi utilitzades per a cada racèmic.

| Racèmic | k'_1 | α | R_s | FEQ | Fase mòbil |
|------------------------------|--------|----------|-------|-----|-----------------------------------|
| DNB-(±)-Leu | 3,3 | 1,6 | 1,7 | 1 | Heptà/2-PrOH/TFA (80:20:0,5) |
| DNB-(±)-Val | 2,5 | 10,0 | 14,2 | 3 | MeOH/AcONH ₄ (95:5) |
| DNB-(±)-Phe | 2,3 | 14,1 | 14,8 | 3 | MeOH/AcONH ₄ (95:5) |
| DNB-(±)- <i>t</i> Bu- Leu | 0,6 | 3,4 | 3,4 | 2 | Heptà/2-PrOH (95:5) |

k'_1 , factor de capacitat; α , factor d'enantioselectivitat, R_s , resolució. AcONH₄, solució d'acetat amònic 0,5 M pH 6.

6.7. Condicions experimentals en cromatografia en contracorrent

Al realitzar experiments en diferents dispositius de cromatografia en contracorrent, el condicionament en cada cas era diferent, al tractar-se en el cas de CPC d'un dispositiu hidrostàtic, mentre que el CCC és hidrodinàmic. A més, els aparells amb els que s'ha treballat tenen volums de columna diferents, essent el de CCC 10 vegades menor que el de CPC.

6.7.1. Condicions experimentals de CPC

Tal i com s'ha vist a la introducció, el dispositiu de cromatografia de repartiment centrífug o CPC, està format per una centrífuga, a l'interior de la qual es troben una sèrie de discs apilats que tenen excavats canals i conductes, i és aquí on es produeix la separació. El mode de treball emprat en tots els experiments realitzats en aquest treball és el mode descendent, és a dir, aquell on la fase orgànica, que és la menys densa, s'utilitza com a fase estacionària i l'aquosa es fa servir com a fase mòbil. Així el condicionament de l'aparell es realitza tal i com es descriu a continuació:

1. *Ompliment de la centrífuga*

Abans d'iniciar un experiment, la centrífuga es troba plena amb metanol, per tant, s'ha de desplaçar amb la fase mòbil que s'introdueix de forma ascendent i amb el dispositiu aturat. Una vegada es troba plena de la fase mòbil, es procedeix a desplaçar aquesta per la fase estacionària, en mode descendent.

2. *Estabilització del sistema*

Una vegada la centrífuga es troba omplerta per la fase estacionària, es fa rotar la centrífuga fins a assolir la velocitat de rotació adequada en la que s'ha de desenvolupar l'experiment. Una vegada s'ha arribat a la aquesta velocitat, es bombeja al fase mòbil al flux seleccionat en mode descendent. D'aquesta manera es desplaça un volum de fase estacionària, que ens indica el volum de fase estacionària que queda retingut a l'interior de la centrífuga, i que és característic per a cada combinació de dissolvents i s'assoleix una situació de l'equilibri.

3. Realització de l'experiment

Una vegada s'ha estabilitzat el sistema, ja es pot procedir a la injecció de l'analit. El racèmic es dissol en una barreja de fase mòbil/fase estacionària (1:1).

El flux utilitzat en tots els experiments s'establí en 3 mL/min per a tots els sistemes de dissolvents assajats, mentre que la velocitat de rotació de la centrífuga varià segons el sistema utilitzat, per tal de retenir la màxima quantitat de FEQ dins del dispositiu i intentant no sobrepassar els 90 bar de pressió. En aquestes condicions la quantitat de FEQ retinguda dins dels sistema es situa al voltant del 80%, ja que el V_{st} s'ha calculat a partir del volum de la centrífuga i del volum de fase estacionària que es desplaça al principi de l'experiment (V_D). Per tant, en funció del V_{st} i de la concentració de selector quiral en la fase estacionària ens ha permès calcular en cada cas la concentració de SQ que ha participat en el procés de separació. Cal recordar, que abans de realitzar els experiments addicionant el SQ a la fase estacionària s'han realitzat experiments en blanc.

Taula 6.11. Condicions experimentals per a cada SQ en CPC.

| Selector | Sistema de dissolvents | Conc. (mmol) | P (bar) | Vol FE (mL) |
|-----------------|-------------------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|
| 1 | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM | 2,5 | 85 | 129 |
| | | 5 | 88 | 141 |
| | | 10 | 88 | 147 |
| | | 30 | 86 | 138 |
| | | 50 | 88 | 152 |
| 8 | MIBK/ fosfat sòdic 50 mM | 10 | 74 | 142 |
| | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM | 10 | 78 | 142 |
| 9 | MIBK/ fosfat sòdic 50 mM | 10 | 65 | 134 |
| | | 10 | 79 | 134 |
| | | 20 | 78 | 134 |
| 16 | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM | 2,5 | 86 | 141 |
| | | 5 | 81 | 130 |
| | | 10 | 82 | 132 |

| | | | | |
|-----------|--------------------------|-----|----|-------|
| | | 30 | 86 | 143 |
| | | 50 | 80 | 121 |
| | | 100 | 85 | 141 |
| 18 | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM | 2,5 | 79 | 144,5 |
| | | 5 | 79 | 137 |
| | | 10 | 78 | 136 |
| | | 30 | 80 | 137 |
| 19 | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM | 2,5 | 79 | 146 |
| | | 5 | 79 | 138 |
| | | 10 | 79 | 138 |
| | | 30 | 79 | 136 |
| 16 | MTBE/H ₂ O | 30 | 80 | 142 |

El experiments es realitzen utilitzant com a fases mòbils: MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 o MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 8 i a una rotació de 1100 rpm.

La mostra es prepara pesant la quantitat necessària de racèmic que es dissol en 2,4 mL de la barreja de fase mòbil/fase estacionària (3:2), al realitzar els experiments en el mode de CPC clàssic o de mode dual múltiple (MDM), per contra en els experiments de *pH-zone refining* la mostra es solubilitza completament en la fase estacionària. La injecció de la mostra en el mode clàssic es realitza una vegada s'ha estabilitzat el sistema, mentre que en *pH-zone refining* la injecció es realitza una vegada s'ha omplert la centrifuga.

Es vol recordar que al realitzar els experiments en mode dual múltiple, no es pot conèixer amb exactitud la concentració de SQ que participa en el procés d'enantiodiscriminació, només podent-se conèixer la quantitat que intervé a l'inici de l'experiment, tal i com ja s'ha esmentat al capítol 3.

6.7.2. Condicions experimentals de CCC

El dispositiu de cromatografia en contracorrent està format per una bobina sobre la que està enrotllada un tub de PTFE o Teflon[®] enrotllat sobre aquesta bobina i un contrapès. La bobina té un moviment planetari que fa que es puguin distingir diferents zones de

barreja. A més, podem diferenciar dues zones el cap o *head* i la cua o *tail*, en funció de la fase del sistema utilitzada com a fase estacionària treballarem en un mode diferent que poden ser *H-to-T* o *T-to-H*, aquests es diferencien en la part que es troba connectada a la bomba.

A l'igual que en el cas anterior, els passos a seguir per tal de condicionar el sistema, seran els mateixos. Tenint en compte que a l'utilitzar el dissolvent més dens com a fase mòbil treballarem *H-to-T*, mentre que quan s'empra el dissolvent menys dens com a fase mòbil el mode de treball serà *T-to-H*. Així, ho podem resumir:

1. Ompliment de la columna

A l'inici de l'experiment, la columna es troba en metanol i aquest es desplaçarà amb la fase mòbil, per a continuació introduir la fase estacionària amb el dispositiu en repòs. En funció de la densitat del dissolvent utilitzat com a fase mòbil estarà connectat d'una o altra manera a la bomba.

2. Estabilització del sistema

Una vegada tenim la columna plena amb la fase estacionària, es fa rotar el dispositiu de forma gradual fins a arribar a la velocitat de rotació desitjada. En assolir-la, es fa passar la fase mòbil i es calcula el volum desplaçat de fase estacionària que queda retingut dins del dispositiu i que participa en l'enantioseparació.

3. Realització de l'experiment

Al tenir el sistema estabilitzat, es procedeix a la injecció del racèmic, que a l'igual que en el cas anterior es dissol en la barreja de fase estacionària/fase mòbil (1:1).

En primer de tot es realitzaren els experiments en blanc (sense selector quiral) amb els sistemes de dissolvents seleccionats i s'injectà el racèmic seleccionat per tal de tenir una idea sobre el temps de retenció d'aquest en les condicions seleccionades. A més, amb l'aparell de CCC no es genera sobrepressió fet que es donava amb el de CPC.

Taula 6.12. Condicions experimentals per a cada SQ en CCC.

| Selector | Sistema de dissolvents | Conc. | Vol FE |
|----------|--|--------|--------|
| | | (mmol) | (mL) |
| 21 | MIBK/ fosfat sòdic 50 mM pH 8 | 15 | 14,9 |
| | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 2,8 | 14,6 |
| 22 | MIBK/ fosfat sòdic 50 mM pH 8 | 15 | 15,8 |
| | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 9 | 12,7 |
| | MTBE/MIBK/ fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 10 | 15,4 |
| | | 25 | 15,6 |
| 23 | MIBK/ fosfat sòdic 50 mM pH 8 | 15 | 15,9 |
| | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 4,6 | 15,8 |
| 1 | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 30 | 16,5 |
| | MTBE/MIBK/ fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 20 | 16,4 |
| | | 50 | 16,1 |
| 27 | MIBK/ fosfat sòdic 50 mM pH 8 | 30 | 15,7 |
| | | 50 | 15,8 |
| | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 30 | 16,0 |
| 35 | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 30 | 14 |
| 36 | MTBE/ fosfat sòdic 50 mM pH 6 | 30 | 16,9 |
| 1 | ENFB/2-PrOH/ H ₂ O (25:35:40) | 30 | 16,6 |
| 35 | ENFB/2-PrOH/ H ₂ O (25:35:40) | 30 | 14 |
| | ENFB/ACN/H ₂ O (17:43:40) | 14 | 14 |
| 36 | ENFB/2-PrOH/ H ₂ O (25:35:40) | 30 | 14,7 |

El experiments es realitzen a una rotació de 2100 rpm.

6.8. Assajos en mode clàssic en cromatografia en contracorrent

A l'igual que en l'apartat anterior es realitzà una classificació dels experiments realitzats en mode clàssic en els diferents aparells utilitzats en el present estudi.

6.8.1. Assajos de CPC

Tot seguit, es descriuen de forma esquemàtica els assajos realitzats en el dispositiu de CPC, en què el racèmic utilitzat és la DNB-Leu, a menys que s'indiqui el contrari:

Taula 6.13. Condicions experimentals per a cada selector quirals.

| SQ | Conc_{SQ} (mM) | mg_{rac} (mg) | Sistema dissolvents | V_{st} (mL) | t₀ (min) | t₁ (min) | t₂ (min) | α_{ccc}^a |
|-----------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 8 | 10 | 75 | MIBK ^c | 142 | 16 | 22 | 36 | 1,42 |
| | 10 | 75 | MTBE ^d | 142 | 16 | 115 | 145 | 1,41 |
| 9 | 10 | 75 | MIBK ^c | 134 | 18,6 | - | - | - |
| | 10 | 75 | MTBE ^d | 134 | 18,6 | 120 | 165 | 1,43 |
| | 20 | 75 | MTBE ^d | 134 | 18,6 | 120 | 170 | 1,45 |
| 16 | 2,5 | 75 | MTBE ^d | 141 | 16,3 | 130 | - | 1 |
| | 5 | 75 | MTBE ^d | 130 | 20 | 139 | - | 1 |
| | 10 | 75 | MTBE ^d | 132 | 19,3 | 127 | - | 1 |
| | 30 | 75 | MTBE ^d | 138 | 17,3 | 150 | 160 | 1,07 |
| | 30 | 75 ^a | MTBE ^d | 143 | 15,6 | 52 | - | 1 |
| | 30 | 75 ^b | MTBE ^d | 143 | 15,6 | 110 | 115 | 1,05 |
| | 50 | 75 | MTBE ^d | 121 | 23 | 261 | 286 | 1,10 |
| | 100 | 75 | MTBE ^d | 141 | 16,3 | 166 | 186 | 1,13 |
| 18 | 2,5 | 75 | MTBE ^d | 144,5 | 15,1 | 140 | - | 1 |
| | 5 | 75 | MTBE ^d | 137 | 17,6 | 130 | - | 1 |
| | 10 | 75 | MTBE ^d | 136 | 18 | 130 | - | 1 |
| | 30 | 75 | MTBE ^d | 137 | 17,6 | 125 | - | 1 |
| 19 | 2,5 | 75 | MTBE ^d | 146 | 14,6 | 104 | - | 1 |
| | 5 | 75 | MTBE ^d | 138 | 17,3 | 105 | - | 1 |
| | 10 | 75 | MTBE ^d | 138 | 17,3 | 140 | - | 1 |
| | 30 | 75 | MTBE ^d | 136 | 18 | 135 | 140 | 1,04 |
| 1 | 2,5 | 75 | MTBE ^d | 129 | 20,3 | 50 | 68 | 1,60 |
| | 5 | 75 | MTBE ^d | 141 | 16,3 | 70 | 90 | 1,69 |
| | 10 | 75 | MTBE ^d | 147 | 14,3 | 70 | 95 | 1,45 |
| | 30 | 75 | MTBE ^d | 138 | 17,3 | 96 | 187 | 2,15 |
| | 50 | 75 | MTBE ^d | 152 | 12,6 | 141 | 253 | 1,87 |

^a DNB-Val, ^b DNB-Phe, ^c MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 8, ^d MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6.

6.8.2. Assajos experimentals de CCC

En la següent taula es mostren els valors experimentals obtinguts de forma esquemàtica en utilitzar el dispositiu de CCC:

Taula 3.14. Condicions experimentals per a cada selector quiral

| SQ | Conc_{SQ} (mM) | mg_{rac} (mg) | Sistema dissolvents | V_{st} (mL) | t₀ (min) | t₁ (min) | t₂ (min) | α_{ccc}^a |
|-----------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| 21 | 15 | 7 | MIBK/pH 6 ^e | 14,9 | 3 | 96 | 100 | 1,04 |
| | 2,8 | 7 | MTBE ^f | 14,6 | 3,3 | 44 | - | 1,00 |
| 22 | 15 | 7 | MIBK/pH 6 ^e | 15,8 | 2,1 | 92 | 100 | 1,08 |
| | 15 | 7 | MIBK/pH 7 ^g | 15 | 2,9 | 18 | 24 | 1,39 |
| | 15 | 7 | MIBK/pH 8 ^h | 14,3 | 3,6 | 15 | 16 | 1,08 |
| | 9 | 7 | MTBE ^f | 12,7 | 5,2 | 38 | 47 | 1,27 |
| | 10 | 7 | MTBE/MIBK ^d | 15,1 | 2,8 | 68 | 80 | 1,18 |
| | 10 | 14 | MTBE/MIBK ^d | 15,4 | 2,5 | 69 | 85 | 1,24 |
| | 10 | 30 | MTBE/MIBK ^d | 15,8 | 2,1 | 80 | 95 | 1,19 |
| | 25 | 17,5 | MTBE/MIBK ^d | 15,8 | 2,1 | 80 | 105 | 1,32 |
| | 25 | 35 | MTBE/MIBK ^d | 15,6 | 2,3 | 77 | 107 | 1,40 |
| | 25 | 75 | MTBE/MIBK ^d | 15,7 | 2,2 | 100 | 133 | 1,33 |
| | 25 | 100 | MTBE/MIBK ^d | 12,7 | 5,2 | 73 | 172 | 2,46 |
| 23 | 15 | 7 | MIBK/pH 6 ^e | 15,9 | 2 | 92 | 96 | 1,04 |
| | 4,6 | 7 | MTBE ^f | 15,8 | 2,1 | 145 | 150 | 1,03 |
| 1 | 20 | 7 | MTBE/MIBK ^d | 15,8 | 2,1 | 68 | 98 | 1,45 |
| | 20 | 14 | MTBE/MIBK ^d | 16,4 | 1,5 | 68 | 98 | 1,45 |
| | 20 | 30 | MTBE/MIBK ^d | 16,8 | 1,1 | 72 | 110 | 1,53 |
| | 50 | 17,5 | MTBE/MIBK ^d | 16,5 | 1,4 | 62 | 112 | 1,82 |
| | 50 | 35 | MTBE/MIBK ^d | 16,1 | 1,8 | 89 | 143 | 1,61 |
| | 50 | 75 | MTBE/MIBK ^d | 16,2 | 1,7 | 105 | 175 | 1,67 |
| | 30 | 7 | MTBE ^f | 16,5 | 1,4 | 43 | 77 | 1,89 |
| | 30 | 7 | Sist fluor 1 ^a | 16,6 | 1,3 | 18 | 22 | 1,80 |
| 30 | 8,7 ^b | Sist fluor 1 ^a | 16 | 1,9 | 29 | 33 | 1,16 | |

| | | | | | | | | |
|-----------|----|------------------|---------------------------|------|-----|----|----|------|
| 27 | 30 | 7 | MIBK/pH 6 ^e | 15,7 | 2,2 | 32 | | 1,00 |
| | 30 | 7 | MTBE ^f | 16 | 1,8 | 44 | 50 | 1,15 |
| | 50 | 7 | MIBK/pH 6 ^e | 15,8 | 2,1 | 38 | | 1,00 |
| 35 | 30 | 7 | MTBE ^f | 14 | 3,9 | 29 | 37 | 1,40 |
| | 30 | 7 | Sist fluor 1 ^a | 14 | 3,9 | 18 | 23 | 1,83 |
| | 30 | 8,7 ^b | Sist fluor 1 ^a | 14 | 3,9 | 30 | 48 | 1,75 |
| | 14 | 7 | Sist fluor 1 ^c | 14 | 3,9 | 20 | - | 1,00 |
| 36 | 30 | 7 | MTBE ^f | 16,9 | 1,0 | 54 | 62 | 1,15 |
| | 30 | 7 | Sist fluor 1 ^a | 14,7 | 3,2 | 23 | 25 | 1,21 |
| | 30 | 8,7 ^b | Sist fluor 1 ^a | 14,7 | 3,2 | 62 | - | 1,00 |

^a Sist fluor 1: ENFB/2-PrOH/H₂O (25:35:40); ^b Analit: DNB-*t*Bu-Leu; ^c Sist fluor 2: ENFB/ACN/H₂O (17:43:40); ^d Sist de dissolvents: MTBE (75 %)/MIBK (25 %)/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6; ^e MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6; ^f MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6; ^g MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 7; ^h MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 8

6.9. Assajos amb membranes líquides

Les membranes líquides son aquelles formades per dos líquids immiscibles, normalment un sistema bifàsic orgànic-aquós. En funció de la densitat relativa del dissolvent que integra la membrana, el dispositiu en el que es realitzen els experiments son diferents, així els dos dissolvents utilitzats son el CHCl₃ i el MTBE. Mentre que quan s'utilitza el CHCl₃ s'utilitza un tub amb forma d'U, quan la membrana estava formada per MTBE el dispositiu tenia forma d'H (Figura 6.5). Per contra, mentre que la naturalesa de les membranes podia variar al llarg dels experiments, la fase aquosa utilitzada fou la mateixa en tots els casos, és a dir, la formada per tampó fosfat al pH necessari a cada extrem de la membrana, per tal que es generi un gradient de pHs que permeti el transport del racèmic.

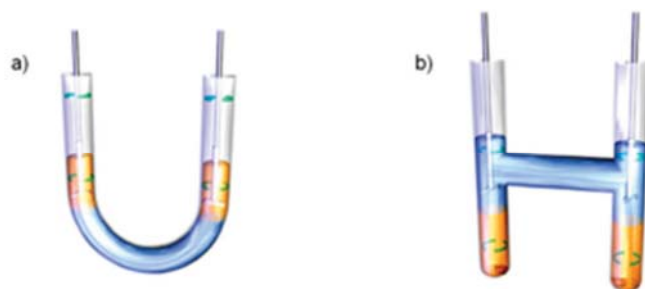


Figura 6.5. Esquema dels dispositius utilitzats en els experiments de membranes utilitzats: a) en forma d'U a l'utilitzar membranes formades per CHCl_3 ; b) en forma d'H en usar MTBE.

Les solucions tamponades es prepararen dissolent la quantitat adequada de fosfat monosòdic o di en el volum d'aigua MilliQ determinant. El pH s'ajustà, fins a pH 7 i/o 8 quan fou necessari, amb la dissolució d'hidròxid sòdic 0,5 N. Posteriorment, la dissolució es filtrà amb filtres Durapore[®] d'HV de diàmetre 0,45 μm de tamany de por. Abans d'iniciar els experiments, i tal i com es feu en els experiments de CPC/CCC, la fase aquosa, en aquest cas les solucions tamponades de pH 7 i 8 es saturaren amb el dissolvent orgànic corresponent amb el que posteriorment es realitzarien els experiments, CHCl_3 , MTBE o ENFB.

El selector quiral es dissol en el dissolvent que integra la membrana, és a dir el dissolvent orgànic, excepte en la realització dels blancs, en què s'avaluà el comportament del sistema sense addicionar el selector quiral. La solució on es solubilitza el racèmic s'anomenà fase donadora o *feed*, mentre que la solució que rep el racèmic que difon a través de la membrana s'anomenarà fase receptora o *stripping*, sobre aquesta fase serà on es realitzarà la presa de mostra, ja que serà la composició d'aquesta la que variarà al llarg de l'experiment, no detectant-se la presència de racèmic i o enantiòmers a temps 0 i aquesta anirà incrementant a mesura que transcorre els temps.

La concentració de SQ utilitzada en la membrana fou de 1 mM en el volum utilitzat (10,0 mL) en la membrana, mentre que la concentració de racèmic a la fase donadora (2,0 mL) fou de 2 mM. Cal recordar que per tal de poder solubilitzar el racèmic en una fase aquosa, primer es feu la sal sòdica.

6.9.1. Assajos en tubs amb forma d'U

Els experiments amb els sistemes de dissolvents fluorats i amb cloroform es realitzaren en tubs en U al ser aquests dissolvents més densos que les fases donadores i receptores, que son de naturalesa aquosa. Aquests dispositius estan formats per un tub de vidre en forma d'U amb un diàmetre intern de 4,5 cm. Els extrems dels tubs no estan tancats, per tal de facilitar l'agitació mecànica mitjançant unes barres agitadores i la recollida de les mostres. Les dues fases estan en continua agitació al llarg de tot l'experiment, evitant les turbulències.

Els SQs es dissolgueren en 10 mL de la fase orgànica (CHCl_3 o ENFB/2-PrOH) la quantitat necessària d'aquest per tal d'obtenir la concentració abans esmentada d'1 mM. La fase donadora o *feed* està formada per 2 mL de tampó fosfat sòdic 50 mM a pH 7, mentre que la fase receptora està constituïda per 2 mL de tampó fosfat sòdic 50 mM a pH 8. La fase orgànica que forma la membrana, té una àrea de superfície de contacte de $1,58 \text{ cm}^2$ i aquesta se situa entre ambdós fases aquoses. L'analit es transporta de la fase donadora cap a la receptora a través de la membrana. Aquest transport dels analits es veié afavorit pel gradient de pHs i de concentracions que es dona entre les dues fases.

El procediment seguit a l'hora de realitzar els experiments fou el següent, primer de tot s'introduí en el dispositiu la membrana formada per la fase orgànica. A continuació, es diposità la fase receptora en un dels extrems de la membrana i finalment en l'extrem oposat es posà la fase donadora, en el moment en què aquesta s'acabà de posar l'experiment començava ($t=0$).

6.9.1. Assajos en tubs amb forma d'H

Aquest tipus de dispositiu només s'utilitzaren quan la densitat del dissolvent en la membrana era menor a l'aigua, tal i com succeeix en el cas del MTBE. El dispositiu del tub en H, tal i com indica el seu nom, està format per un tub de vidre en forma d'H amb un diàmetre intern de 4,5 cm i una membrana amb un àrea de contacte d' $1,58 \text{ cm}^2$.

A l'hora de realitzar els experiments, la preparació d'aquests dispositius difereix respecte als realitzats amb els tubs amb forma d'U, ja que primer s'introdueix la fase donadora en un dels braços del tub, és a dir, la fase que conté la mescla racèmica. A continuació, en el braç de l'extrem oposat es diposita la fase receptora. Per últim, s'introdueix la fase orgànica formada per la dissolució del selector quirals en MTBE. Aquesta s'ha d'introduir amb molta cura per tal d'evitar la formació de turbulències que podrien barrejar les dues fases aquoses i que invalidarien l'experiment, ja que la membrana a l'igual que en el cas anterior actua connectant les dues fases la donadora i la receptora. Les concentracions de selector quirals i de racèmic utilitzades són les mateixes que en el cas dels tubs en U. Tot i que, la dificultat a l'hora d'agafar les mostres de la fase receptora en aquest dispositiu, fa que els volums utilitzats siguin el doble que en cas anterior, així es preparen 4 mL de fase donadora i receptora i 20 mL de la fase orgànica.

6.9.3. Optimització del mètode analític

Tot i que en els experiments realitzats en CCC/CPC, les anàlisis de les mostres es realitzaren majoritàriament en fase normal, les mostres extretes de les membranes líquides s'analitzaren en fase reversa. Així, aquest mode de treball evita que la manipulació de la mostra i la realització d'extraccions ens pugui conduir a l'obtenció de resultats erronis.

Per tal d'evitar la manipulació de la mostra, es seleccionà la fase estacionària quirals que té el derivat de quinina unit de forma covalent sobre sílica gel Chiralpak® QN-AX (15 cm x 4,5 cm; 5 µm). Amb aquesta fase estacionària quirals es pogué resoldre fins a línia de base la DNB-(±)-Leu.

La fase mòbil utilitzada en l'anàlisi de les mostres fou la formada per la barreja de metanol/tampó acetat amònic (AcONH₄) 0,5 M pH 6 (95:5). En aquestes condicions s'aconseguí resoldre DNB-(±)-Leu obtenint un valor d' α 22,47; k_R' 2,01; k_S' 18,15 i R_s 16,7.

A l'hora d'avaluar la capacitat enantioselectiva i el transport de l'analit a través de la membrana, s'agafaren mostres a intervals de temps constants al llarg de l'experiment de la fase receptora. El volum de mostra agafat fou de 50 µL cada 2,5 min durant la

primera mitja hora i cada 5 minuts durant la primera hora de l'experiment i cada hora si la durada de l'experiment es inferior a 24 hores. Quan la durada es superior es mostreja cada 24 h, fins a la detecció del racèmic. La mostra es diposita en un tub eppendorf, sobre el que s'afegeixen 700 μL . Tot seguit, la mostra es filtra amb filtres de 0,45 μm de por. De la solució filtrada s'agafaren 150 μL que es dipositaren en vials d'HPLC proveïts d'un insert de polipropilè injectant-ne un volum de 100 μL per tal de tenir un bon senyal.

6.9.4. Representació de l'enantioselectivitat i del transport

Per tal d'avaluar la capacitat enantioselectiva de les membranes líquides, s'utilitzà el percentatge d'excés enantiomèric (% ee), determinat a partir de les àrees dels pics de cada enantiòmer.^{118,119} O bé, la relació entre el flux permeat de l'enantiòmer menys retingut dividit pel flux de l'enantiòmer més retingut a la fase receptora, en funció de quina és la forma més o menys retinguda.

Per tal de quantificar la quantitat d'analit acumulat a la fase receptora o *stripping*, fou necessari la realització d'una sèrie de rectes de calibrat, on es representà l'absorbància front la concentració de l'analit. Per a DNB-(\pm)-Leu, la recta es realitzà utilitzant la columna Chiralpak[®], QN-AX com a fase estacionària i la barreja de MeOH/ACONH₄, 0,5M, pH 6 (95:5, v/v) com a fase mòbil a un flux d'1mL/min, i mesurant l'absorbància a 254 nm, obtenint la representació que es mostra a continuació (Figura 6.6):

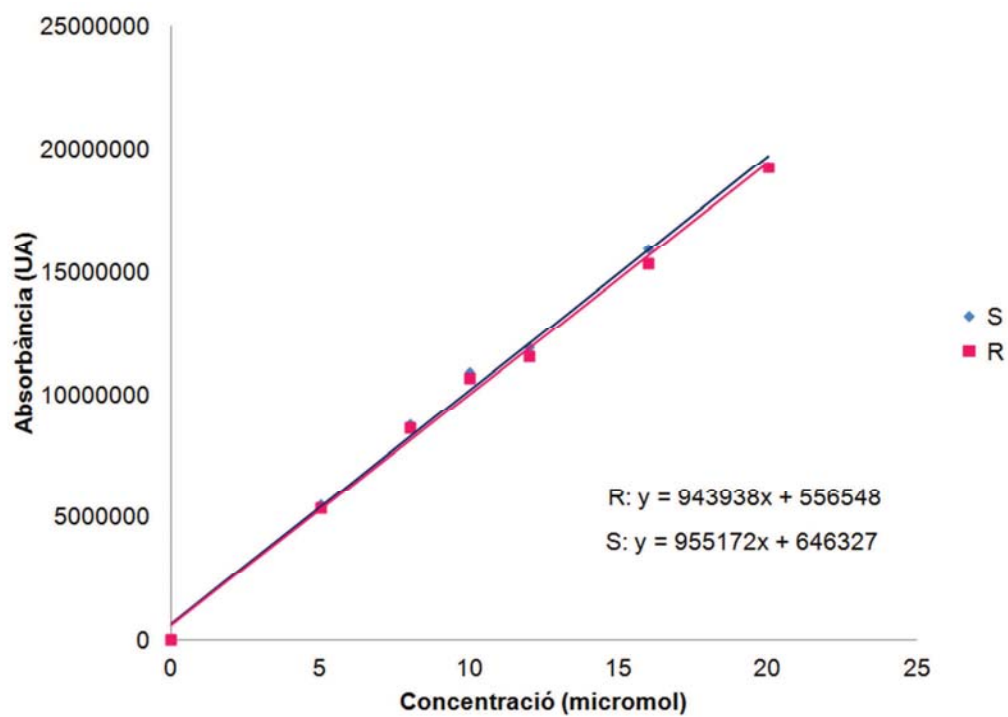


Figura 6.6. Recta de calibrat del racèmic DNB-(±)-Leu.

7. Conclusions

7. Conclusions

Del treball realitzat en la present tesi doctoral s'han extret les següents conclusions:

1. S'han sintetitzat els SQs monomèrics **7**, **8** i **9** amb èxit. Excepte, en el cas de **7**, que ha resultat completament insoluble, s'ha aconseguit incrementar la solubilitat en els sistemes de dissolvents seleccionats respecte als valors obtinguts anteriorment amb **3**.²⁵ Aquest fet ens ha posat de manifest de què la cadena carbonada ha de tenir un mínim nombre d'àtoms de carboni per aconseguir incrementar la solubilitat en MTBE i/o MIBK.

2. S'han aconseguit bons resultats en la separació de la DNB-(±)-Leu amb **8** (10 mM, $\alpha_{\text{CCC}} = 1,41$) i **9** (10 mM, $\alpha_{\text{CCC}} = 1,43$ i 20 mM, $\alpha_{\text{CCC}} = 1,45$) en MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6. En MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 8 només es pogué assajar **8** (10 mM, $\alpha_{\text{CCC}} = 1,42$), ja que **9** produeix l'emulsificació de la FE amb la FM durant l'estabilització del sistema en CPC.

3. S'han sintetitzat els SQs monomèrics **16**, **17**, **18** i **19** amb èxit, en els què s'ha eliminat una de les funcions amida, aconseguint incrementar la rigidesa de l'estructura, a l'hora que s'ha incrementat la solubilitat d'aquests en els dos sistemes de dissolvents considerats. Els nous SQs contenen un nou centre quiral, i s'ha aconseguit establir la configuració *R* d'aquest per difracció de raigs X del derivat 3,5-dimetilfenil (**18**). La configuració d'aquest nou centre en els altres derivats sintetitzats es va assignar per comparació dels espectres de RMN amb els del derivat anterior.

Es va descartar la utilització de **17** com a SQ, ja que es distribueix en les dues fases dels dos sistemes de dissolvents estudiats. Malgrat, l'elevada solubilitat dels SQs no s'ha aconseguit resoldre completament els enantiòmers dels 3,5-dinitrobenzoil derivats dels aminoàcids leucina, valina i fenilalanina racèmics utilitzant **16**.

4. Tot i que l'aplicació de modes d'elució alternatius per a la utilització de **16** com a SQ, com són el mode *pH-zone refining* i el mode *dual múltiple* (MDM), milloren la separació, en cap cas resulta completa. En comparar els resultats obtinguts amb els tres modes d'elució, s'ha observat que els millors resultats són els aconseguits en condicions de *pH-zone refining*, ja que la durada de l'experiment és menor, tot i que la separació és similar.

5. Aprofitant l'elevada solubilitat de **16**, **18** i **19**, considerant la baixa enantioselectivitat observada, s'ha realitzat l'estudi de la variació del factor d'enantioselectivitat en funció de la concentració de SQ present en la fase estacionaria en comparació amb **1**. S'ha pogut observar que tot i incrementar considerablement la concentració, la millora d'enantioselectivitat no és suficient com per permetre la separació completa dels enantiòmers.

6. S'ha estudiat l'efecte en l'enantioreconeixement de la participació de dues unitats de L-prolina en el mateix selector quiral i s'han aconseguit sintetitzar amb èxit **21**, **22**, **23**, **24**. Aquestes estructures es caracteritzen pel connector entre les dues unitats de L-prolina. Pel que fa a **25**, s'ha constatat la dificultat de síntesi i d'aïllament que s'ha atribuït a la presència d'isòmers de rotació restringida. Addicionalment, l'ús de **24** com a SQ es va haver de descartar per la seva baixa solubilitat en els sistemes de dissolvents considerats. Aquest fet ens ha fet contemplar l'addició d'un 25% de MIBK en el sistema que incorpora MTBE (75%) amb tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6. No obstant, els millors valors d'enantioselectivitat front la DNB-(±)-Leu han estat amb **22** i en MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6.

7. S'ha estudiat la capacitat de càrrega comparada de **1** i **22** que ha permès posar de manifest que el mecanisme d'enantioreconeixement de **22** es fa a través de la intervenció de les dues unitats de L-prolina de forma conjunta i no separatament.

8. S'han aconseguit sintetitzar amb èxit els SQ dimèrics en els que les dues unitats de L-prolina estan unides de forma directa **26** i **27**. Es va descartar la utilització de **26** per la seva baixa solubilitat en els sistemes de dissolvents estudiats. Quan s'ha estudiat la capacitat d'enantioreconeixement de **27** en MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 i MIBK/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6 s'han obtingut uns valors d' α_{CC} molt propers a 1.

9. S'han preparat sistemes de dissolvents ternaris en els que s'ha inclòs el dissolvent fluorat ENFB com a un dels seus components, a l'hora que s'han construït els diagrames de fases corresponents.

10. S'ha sintetitzat amb èxit **35**, un anàleg fluorat de **1**, i s'ha avaluat la capacitat d'enantioreconeixement en sistemes de dissolvents fluorats i en MTBE/tampó fosfat

sòdic 50 mM pH 6. Abans de procedir a l'assaig s'ha estudiat el repartiment dels SQs en sistemes de dissolvents fluorats constituïts per diverses proporcions dels components per tal d'aconseguir el repartiment dels racèmics DNB-(±)-Leu i DNB-*t*-Bu-(±)-Leu.

11. S'ha posat de manifest que la capacitat d'enantioreconeixement del SQ fluorat **35** front els racèmics assajats és més elevada en un entorn fluorat que en el sistema de dissolvents format per MTBE/tampó fosfat sòdic 50 mM pH 6. Per contra, l'enantioselectivitat de **1** és més elevada en aquest últim sistema de dissolvents. S'ha aconseguit resoldre de manera completa la DNB-*t*-Bu-(±)-Leu amb **35** en el sistema fluorat ENFB/2-PrOH/H₂O (25:35:40) a una concentració de SQ de 30 mM. També s'ha posat de manifest la baixa capacitat d'enantioreconeixement de **36**.

12. S'ha estudiat la capacitat de transport enantioselectiu de **1** i **35** en membranes líquides aprofitant la similitud que presenta aquesta tècnica amb la CCC/CPC pel fet de produir-se entre dos líquids immiscibles. Així, s'ha estudiat la seva capacitat enantiodiscriminativa en cloroform, MTBE i en el sistema fluorat format per ENFB/2-PrOH/H₂O.

En comparar els resultats obtinguts amb les membranes clorofòrmiques s'ha vist que mentre que amb **1** a les 3 hores ja es detecta el racèmic a la fase receptora o *stripping* en el cas de **35**, l'enriquiment perdura durant 6 dies. S'ha comprovat que **35** actua alentint el transport. També, s'ha de destacar que s'observa una inversió en l'ordre de transport entre els dos SQs mentre que en utilitzar **1** primer es detecta la forma *R*, en el cas de **35** l'enriquiment a l'*stripping* es produeix de la forma *S*.

13. Pel que fa a l'estudi en els sistemes fluorats, en cap dels cinc casos d'estudi s'ha detectat una de les formes enantiomèricament pura. No obstant, el efecte més interessant és la llarga durada dels enriquiments aconseguits, qualitat inusual en aquet tipus de sistemes.

8. Referències

8. Referències

- ¹ H.Y. Aboul-Enein (ed.), *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*, Chemical Analysis Series, Vol. 142. Wiley, New York, 1997.
- ² E. Francotte, H. Kubinyi, G. Folkers, R. Mannhold, W. Lindner, *Chirality in Drug Research*. Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- ³ International Conference on Harmonisation, <http://www.ich.org> (Q6A)
- ⁴ I. Agranat, H. Caner, J. Caldwell, *Nature Rev. Drug Disc.* 1(2002) 753-768.
- ⁵ A. Berthod en "Chiral Recognition Mechanisms in Enantiomers Separation: a General View", *Chiral Recognition in Separation Methods Mechanisms and Applications*, A. Berthod (ed.). Springer, Heidelberg, 2010. Capítol 1, pp 1-32.
- ⁶ P. Franco, C. Minguillón en *Chiral Separation Techniques, A Practical Approach*, G. Subramanian, (ed.). Wiley-VCH, Weinheim, 2001. Capítol 1, pp 1-23.
- ⁷ A.N. Collins, G.N. Sheldrake, J. Crosby en *Chirality in Industry I: the commercial manufactured and applications of active compounds*. Wiley, Chichester, 1995.
- ⁸ J. W. H. Watthey, J. L. Stanton, M. Desai, J. E. Babiarz, B. M. Finn, *J. Med. Chem.* 28 (1985) 1511-1516.
- ⁹ http://www.e-analgesia.com/pdf-zip/mono_enan.pdf
- ¹⁰ N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 3-33.
- ¹¹ A. E. Rodrigues, L. S. Pais, en *Chiral Separation Techniques, A Practical Approach*, G. Subramanian, (ed.). Wiley-VCH, Weinheim, 2001. Capítol 9, pp 219-251.
- ¹² A. Berthod, en *Countercurrent Chromatography, The Support-Free Liquid Stationary Phase*, A. Berthod, (ed), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 38. Elsevier, Amsterdam, 2002. Capítol 1, pp 1-20.
- ¹³ A.P. Foucault (Ed.), *Centrifugal Partition Chromatography (Chromatographic Science Series)*, 68, Marcel Dekker, New York, 1995.

- ¹⁴ W.D. Conway, *Countercurrent Chromatography, Apparatus. Theory and Applications*, VCH Publishers, New York, 1990.
- ¹⁵ A. Berthod, T. Maryutina, B. Spivarov, O. Shpigun, I.A. Sutherland, *Pure Appl. Chem.* 81 (2009) 335-387.
- ¹⁶ E. Pérez, C. Minguillón, "Counter-current chromatography in the separation of enantiomers", en G. Subramanian (ed.), "Chiral Separation Techniques, a Practical Approach. 3rd completely revised and updated edition". Wiley-VCH, Weinheim, 2006. Capítol 11, pp. 369-397.
- ¹⁷ Y. Ito, M. Weinstein, I. Aoki, R. Harada, E. Kimura, K. Nunogaki, *Nature* 212 (1966) 985-987.
- ¹⁸ Y. Ito, *J. Chromatogr. A* 1065 (2005) 145-168.
- ¹⁹ L. Marchal, O. Intes, A. Foucault, J. Legrand, J.M. Nuzillard, J.H. Renault, *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 51-62.
- ²⁰ M. Lämmerhofer, W. Lindner, en *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*, K. Valkó (ed), Handbook of Analytical Separations, Vol. 1. Elsevier, Amsterdam, 2000. Capítol 9, pp. 337-437.
- ²¹ Y. Ma, Y. Ito, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3069-3074.
- ²² K.N. Houk, A.G. Leach, S.P. Kim, X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 4872-4897.
- ²³ B. Domon, K. Hostettmann, K. Kovacevic, V. Prelog, *J. Chromatogr.* 250 (1982) 149-151.
- ²⁴ L. Oliveros, P. Franco, C. Minguillón, E. Camacho-Frias, A. Foucault, F. LeGoffic, *J. Liq. Chromatogr.* 17 (1994) 2301-2318.
- ²⁵ B. Delgado, E. Pérez, M.C. Santano, C. Minguillón, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 36-42.
- ²⁶ Y. Ma, Y. Ito, A. Foucault, A., *J. Chromatogr. A* 704 (1995) 75-81.
- ²⁷ T. Takeuchi, R. Horikawa, T. Tanimura, *J. Chromatogr.* 284 (1984) 285-288.

- ²⁸ P. Franco, J. Blanc, W.R. Oberleitner, N.M. Maier, W. Lindner, C. Minguillón, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4175-4183.
- ²⁹ E. Gavioli, N.M. Maier, C. Minguillón, W. Lindner, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5837-5848.
- ³⁰ E. Pérez, M.J. Santos, C. Minguillón, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 165-174.
- ³¹ E. Pérez, C. Minguillón, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1379-1389.
- ³² N. Rubio, S. Ignatova, C. Minguillón, I.A. Sutherland, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8505-8511.
- ³³ W.H. Pirkle, C.J. Welch, *J. Chromatogr.* 582 (1992) 45-51.
- ³⁴ C. Perrin, N. Matthijs, D. Mangelings, C. Granier-Loyaux, M. Maftouh, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 119-134.
- ³⁵ S. Oya, J.K. Snyder, *J. Chromatogr.* 370 (1986) 333-338.
- ³⁶ J. Breinholt, S.V. Lehmann, A.M. Varming, *Chirality* 11 (1999) 768-771.
- ³⁷ P. Duret, A. Foucault, R. Margraff, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.* 23 (2000) 295-312.
- ³⁸ K. Shinomiya, K. Kabasawa, Y. Ito, *J. Liq. Chromatogr.* 21 (1998) 135-141.
- ³⁹ E. Kim, Y.M. Koo, D.S. Chung, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 119-124.
- ⁴⁰ M. Agnely, D. Thiébaud, *J. Chromatogr. A* 790 (1997) 17-30.
- ⁴¹ E. Delannay, A. Toribio, L. Boudesocque, J.M. Nuzillard, M. Zèches-Hanrot, E. Dardennes, G. Le Dour, J. Sapi, J.H. Renault, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 45-51.
- ⁴² A. Weisz, A.L. Seher, K. Shinomiya, M. Fales, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 704-708.
- ⁴³ Y. Ito, Y. Ma, *J. Chromatogr. A* 753 (1996) 1-36.
- ⁴⁴ G. Guillena, C. Najera, D.J. Ramón, *Tetrahedron: Asymmetry* 18 (2007) 2249-2293.
- ⁴⁵ L. Benjamin, *Tetrahedron* 58 (2002) 5573-5590.
- ⁴⁶ S. Sulzer-Mossé, A. Alexakis, *Chem. Commun.* 32 (2007) 3123-3135.

- ⁴⁷ V.A. Davankov, "Ligand-exchange phases", en "Chiral Separations by HPLC, applications to pharmaceutical compounds" A.M. Krstulović (ed.), Ellis Horwood Limited, Chichester, 1989. Capítol 15, pp 446-475.
- ⁴⁸ A. Pryde, "Chiral liquid chromatography: past and present", en "Chiral Liquid Chromatography" W.J. Lough (ed.), Blackie and Son Ltd, London, 1989. Capítol 3, pp 23-38.
- ⁴⁹ N. Ôi, H. Kitahara, Y. Inada, T. Doi, *J. Chromatogr.* 237 (1982) 297-302.
- ⁵⁰ M. Ohwa, M. Akiyoshi, S. Mitamura, *J. Chromatogr.* 521 (1990) 122-127.
- ⁵¹ C. Daban Haurou, G. Declercq, P. Ramiandrasoa, J.L. Millet, *J. Chromatogr.* 547 (1991) 31-44.
- ⁵² W.H. Pirkle, P.G. Murray, *J. Chromatogr.* 641 (1993) 11-19.
- ⁵³ W.H. Pirkle, P.G. Murray, *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 299-305.
- ⁵⁴ W.H. Pirkle, M.E. Koscho, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 151-158.
- ⁵⁵ P. Murer, K. Lewandowski, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1278-1284.
- ⁵⁶ F.H. Ling, V. Lu, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *J. Org. Chem.* 67 (2002) 1993-2002.
- ⁵⁷ J. Huang, P. Zhang, H. Chen, T. Li, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3301-3308.
- ⁵⁸ J. Huang, H. Chen, P. Zhang, T. Li, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 307-311.
- ⁵⁹ J. Huang, H. Chen, T. Li, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 109-115.
- ⁶⁰ E. Yashima, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 105-125.
- ⁶¹ R. Sancho, A.M. Pérez, C. Minguillón, *J. Sep Sci.* 29 (2006) 905-914.
- ⁶² R. Sancho, C. Minguillón, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 93-101.
- ⁶³ O. Lecnik, M.G. Schmid, A. Presser, G. Gübitz, *Electrophoresis* 23 (2002) 3006-3012.
- ⁶⁴ A.A. Adoubel, C.J. Morin, N. Mofaddel, G. Dupas, P.L. Dèsbene, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 597-608.

- ⁶⁵ P.J. Pickering, J.B. Caudhuri, *Chirality* 9 (1997) 261-267.
- ⁶⁶ J.D. Clark, B. Han, A.S. Bhowan, S.R. Wickramasinghe, *Sep. Purif. Technol.* 42 (2005) 201-211.
- ⁶⁷ T. Gumí, C. Minguillón, C. Palet, *Polymer* 46 (2005) 12306-12312.
- ⁶⁸ C.M. Heard, J. Hadgraft, K.R. Brain, *Bioseparations* 4 (1994) 111.
- ⁶⁹ W.H. Pirkle, P.G. Murray, D.J. Rausch, S.T. McKenna, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 4769-4774.
- ⁷⁰ W.H. Pirkle, T.C. Pochapsky, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 352-354.
- ⁷¹ W.H. Pirkle, T.C. Pochapsky, G.S. Mahler, D.E. Corey, D.S. Reno, D.M. Alessi, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 4991-5000.
- ⁷² W.H. Pirkle, C.J. Welch, B. Lamm, *J. Org. Chem.* 57 (1992) 3854-3860.
- ⁷³ K. Lipkowitz, "Analysis of Chiral Chromatographic separation by molecular modeling" a Chiral Analysis Ed. K. W. Busch I M. A. Busch. Elsevier, Amsterdam, 2006. Capitol 5 pp. 97-129.
- ⁷⁴ W.H. Pirkle, T.C. Pochapsky, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 5975-5982.
- ⁷⁵ S. Topiol, M. Sabio, J. Moroz, W. B. Caldwell, *J. Am. Chem. Soc.*, 110 (1988) 8367-8376.
- ⁷⁶ S. Topiol, M. Sabio, *J. Chromatogr.* 461 (1989) 129-137.
- ⁷⁷ W.H. Pirkle, P.G. Murray, S.R. Wilson, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 4775-4777.
- ⁷⁸ C. Santano, Tesi doctoral "Preparación y estudio de la enantioselectividad de derivados de L-prolina como selectores quirales en sistemas líquidos mono y bifásicos". Universitat de Barcelona, 2001.
- ⁷⁹ P.F. Schuda, W.F. Greenlee, P.K. Chakravarty, P. Eskola, *J. Org. Chem.* 53 (1988), 873-875.
- ⁸⁰ Y. Uozumi, K. Mizutani, S. Nagai, *Tet. Letters* 42 (2001) 407-410.
- ⁸¹ Y. Uozumi, K. Takenaka, K. Shibatomi, *Org. Lett.* 6 (2004) 281-283.

- ⁸² Y. Uozumi, K. Shibatomi, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2919-2920.
- ⁸³ J.Y. Thépot, C. Lapinte, *Journal of Organometallic Chemistry* 627 (2001) 179-188.
- ⁸⁴ Y. Ishii, S. Kato, T. Iwahama, S. Sakaguchi, *Tet. Letters* 37 (1996) 4993-4996.
- ⁸⁵ E. Pérez, Tesi doctoral "Preparació de derivats de polisacàrids i la seva aplicabilitat com a selectores quirals en la separació d'enantiòmers per cromatografia de repartiment centrífug (CPC)". Universitat de Barcelona, 2006.
- ⁸⁶ S. Kobayashi, M. Oribe, *J. Am. Chem. Soc.* 116 (1994) 9805-9806.
- ⁸⁷ T. Sano, K. Imai, K. Ohashi, T. Oriyama, *Chem. Lett.* (1999) 265-266.
- ⁸⁸ E. J. Corey, M. C. Noe, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 11038-11053.
- ⁸⁹ Y. Uozumi, K. Yasoshima, T. Miyachi, S. Nagai, *Tet. Letters* 42 (2001) 411-414.
- ⁹⁰ K. Takenaka, Y. Uozumi, *Org. Lett.* 6 (2004) 1833-1835.
- ⁹¹ K. Takenaka, M. Minakawa, Y. Uozumi, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 12273-12281.
- ⁹² T. González, O. Abad, M.C. Santano, C. Minguillón, *Synthesis* 8 (2004) 1171-1182.
- ⁹³ A. Berthod, M. Hassoun, M.J. Ruiz-Angel, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 327-340.
- ⁹⁴ J.M Sørensen, W. Arlt, *Liquid-Liquid Equilibrium Data Collection*; Dechema; Frankfurt/Main 1980; Vol. V, Part 2 i 3.
- ⁹⁵ D.P. Curran, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 1174-1196.
- ⁹⁶ M.Z. Kagan, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 293-302.
- ⁹⁷ M. Kagan, M. Chlenov, C.M. Kraml, *J. Chromatogr A* 1033 (2004) 321-331.
- ⁹⁸ M. Kagan, M. Chlenov, S. Melnikov, A. Greenfield, J. Gross, R.C. Bernotas, *J. Chromatogr A* 1194 (2008) 80-89.
- ⁹⁹ J.L. Glajch, J.J. Kirkland, W.G. Schindel, *Anal. Chem.* 54 (1982) 1276.
- ¹⁰⁰ <http://www.3m.com/market/industrial/fluids/library/prodinfo/7200/7200.html>
- ¹⁰¹ http://www.galladechem.com/specs/3m/novec_elec_cleaning.pdf

- ¹⁰² http://www.galladechem.com/specs/3m/hfe_cleaning.pdf
- ¹⁰³ D.P. Curran, Z. Luo, *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (1999) 9069-9072.
- ¹⁰⁴ C. Timmons; G. Li, *Tetrahedron Letters* 46 (2005) 6949-6952.
- ¹⁰⁵ L.A. Carpino, A. El-Faham, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (2005) 5401-5402.
- ¹⁰⁶ A. El-Faham, F. Albericio, *J. Org. Chem.* 73 (2008) 2731-2737.
- ¹⁰⁷ M.J. Ruiz-Angel, V. Pino, S. Carda-Broch, A. Berthod, *J. Chromatogr A* 1151 (2007) 65-73.
- ¹⁰⁸ Q. Du, C. Wu, G. Qian, P. Wu, Y. Ito, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 231-235.
- ¹⁰⁹ M.F. Kemmere, J.T.F. Keurentjes, *Chiral Separations Techniques. A Practical Approach*, G. Subramanian (ed.), Willey-VCH, Weinheim, 2001.
- ¹¹⁰ M. Newcomb, R.C. Helgeson, D.J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* 96(1974) 7367-7369.
- ¹¹¹ M. Newcomb, J.L. Toner, R.C. Helgeson, D.J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* 101(1979) 4941-4947.
- ¹¹² J.D. Lamb, J.J. Christensen, J.L. Oscarson, B.L. Nielsen, B.W. Asay, R.M. Izatt, *J. Am. Chem Soc.* 102, 1980, 6820-6824.
- ¹¹³ B. Gutiérrez, Tesi doctoral "L-proline derivatives as chiral carriers in enantioselectives membranes". Universitat de Barcelona, 2009.
- ¹¹⁴ L. Oliveros, C. Minguillón, B. Desmazières, P.L. Desbène, *J. Chromatogr.* 543 (1991) 277-286
- ¹¹⁵ A. Berthod, S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 3-14.
- ¹¹⁶ L. Oliveros, C. Minguillón, B. Desmazières, P.L. Desbène, *J. Chromatogr.* 589 (1992) 53-59.
- ¹¹⁷ N.M. Maier, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *Chirality* 11 (1999) 522-528.
- ¹¹⁸ C. Thoelen, M. De Bruyn, E. Theunissen, Y. Kondo, I.F.J. Vankelecom, P. Grobet, M. Yoshikawa, P.A. Jacobs, *J. Membr. Sci.* 186 (2001) 153-163.
- ¹¹⁹ J.H. Kim, J. Jegal, K.-H. Lee, *J. Membr. Sci.* 213 (2003) 273-283.

