

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Síntesis, Caracterización y Estudio de las Propiedades Catalíticas y de
Asociación de un Receptor Molecular con Esqueleto de Cromano

Synthesis, Characterization and Study of the Catalytic and Association
Properties of a Molecular Receptor with Chromane Scaffold

Marta González Santos

2020-2021

Índice

Abreviaturas y Símbolos	i
Summary	ii
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes en el Grupo de Trabajo	8
2. Objetivos	12
3. Metodología y Resultados	13
3.1. Diseño del receptor 1	13
3.2. Síntesis del receptor 1	14
3.3. Estudios de asociación con el receptor 1	16
3.4. Resolución de la mezcla racémica del receptor 1	23
3.5. Estudio de catálisis con el receptor 1 : Reacción de acilación	27
3.6. Estudio de catálisis con el receptor 1 : Reacción de desacilación	30
4. Conclusiones	33
5. Desarrollo Experimental	34
5.1. Técnicas instrumentales y cromatográficas	34
5.2. Preparación y caracterización de los compuestos	35

Abreviaturas y Símbolos

$[\alpha]_{\lambda}^t$	Poder rotatorio
Ac	Acetilo ($\text{CH}_3\text{CO}-$)
AcOH	Ácido acético (CH_3COOH)
AcOEt	Acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)
AcOMe	Acetato de metilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_3$)
Ac ₂ O	Anhidrido acético [$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$]
Ala	Alanina
DCM	Diclorometano o cloruro de metileno (CH_2Cl_2)
DNB	Grupo DiNitroBenzoílo
EM	Espectrometría de Masas
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
ESI	ElectroSpray Ionization (Ionización por electrospray)
LAH	Lithium Aluminum Hydride (Hidruro de aluminio y litio, LiAlH_4)
Leu	Leucina
NBH	Sodium Borohydride (Borohidruro sódico, NaBH_4)
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
THF	Tetrahidrofurano ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$)

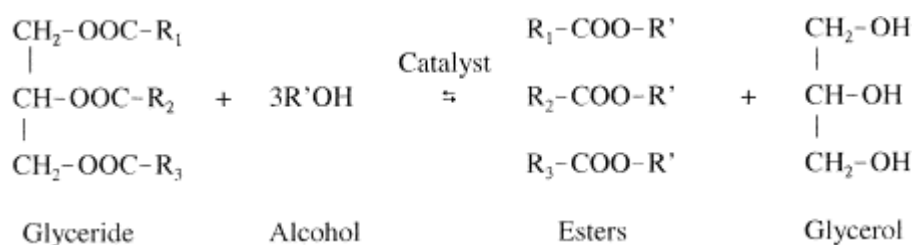
Summary

In the actual society, the increase of the energy demand along with the renewed concerns about the negative effects caused by the fuels derived from petrol have led us to look for energetic alternatives that contaminate less.

The current combustion engines work with fossil fuels and they generate a great amount of pollutants, such as carbon and nitrogen oxides, and many other small particles very toxic and difficult to reduce or eliminate. In opposition to this, biofuels come up as an appealing solution to substitute petrol and lower its negative effects on the environment.

Currently, the most used biofuels are biodiesel and bioethanol, and it is the process of obtaining biodiesel the one we are interested in. Biodiesel is made from renewable biological sources such as vegetable oils and animal fats. It is biodegradable and nontoxic and has low emission profiles. The cost of biodiesel, however, is the main hurdle to the commercialization of the product.

There are four primary ways to make biodiesel: direct use and blending, microemulsions, thermal cracking (pyrolysis) and transesterification. The most commonly used method is transesterification of vegetable oils and animal fats.



The transesterification process (also called alcoholysis) is the reaction of a fat or oil with an alcohol to form esters and glycerol. It is a reversible reaction and a catalyst is usually used to improve both the reaction rate and the yield.

The aim of this work is the design, synthesis, characterization and study of a new molecular receptor that can be used as a catalyst in the industrial process of biodiesel production, since the catalysts currently used present some problems, being these problems one of the causes of the high price of the final product.

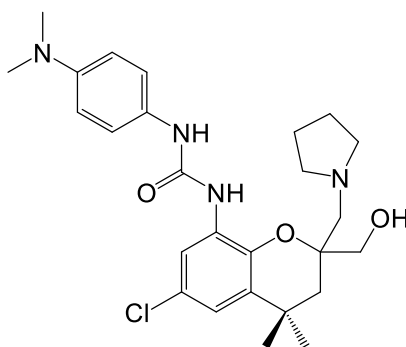
Our molecular receptor has a chromane skeleton that mimics the oxyanion hole of the chymotrypsin enzyme, which is the molecule that catalyzes transesterification in nature. The catalytic center of chymotrypsin is formed by several amino acid residues. The essential role

corresponds to the "catalytic triad", which consists of the lateral carboxyl group of an aspartate residue, the imidazole ring of a residue of histidine and the side hydroxyl group of a serine.

The study of chymotrypsin's mechanism of action shows that if we want to mimic it with a simple organic receptor, it is important for this molecule to have a functional group which stabilizes the oxyanionic tetrahedral intermediate through hydrogen bonds. It is also important for the receptor to bear a nucleophile hydroxyl group and a basic group that mimics the imidazole group of histidine.

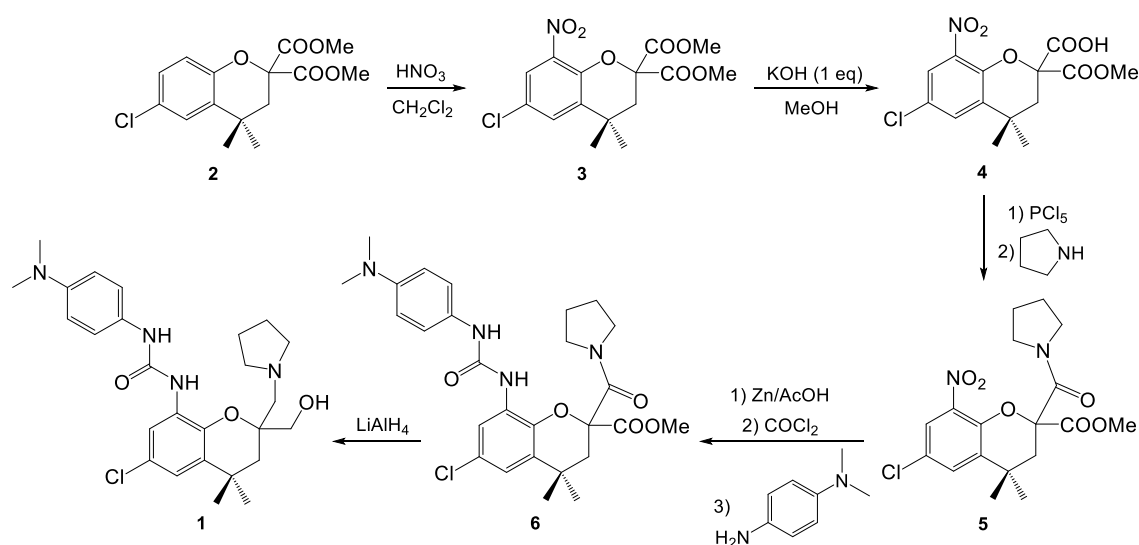
We have chosen a chromane scaffold as the basis for the construction of our receptor because of the optimization of its synthesis, already carried out in the workgroup, and the good results that have been obtained in previous studies with other catalysts based on this structure.

In addition to that, if we are able to isolate at least one of the enantiomers of our receptor, we would also like to study its possible use for the resolution of racemic mixtures of amino acids, by the association between them. In order to do that, the urea moiety present in the receptor structure (used for the stabilization of the tetrahedral intermediate state in the transesterification reaction by hydrogen bond forming) allows in this case the association of the amino acid carbonyl group by hydrogen bonds. Nevertheless, we won't be able to study free amino acids because the ammonium group of free amino acids would have required the introduction in our receptor of a group like a crown ether, which would have been incompatible with its use as a catalyst in the biodiesel production. Considering this problem, we have studied dinitrobenzoyl derivatives of amino acids and, in order to strengthen the association between the receptor and these derivatives, we have included in the urea function an electron rich aromatic ring that enables charge transfer interactions with the electron poor aromatic ring of the dinitrobenzoyl group.



The preparation of our receptor starts with the molecule **2**, which has already been characterized and its synthesis has already been described and optimized in previous studies of the

Research Group. The first step is the nitration of this compound to obtain product **3**. Then, we hydrolyze one of the esters of compound **3** using one equivalent of potassium hydroxide. After that, we have to transform the obtained monoacid (compound **4**) in the corresponding pyrrolinamide (compound **5**) by consecutively treatment with PCl_5 and with pyrrolidine. Coming up next, the reduction of the nitro group to amine with zinc and the incorporation of the urea function take place, giving rise to the compound **6**. The last step of the synthesis is the reduction of the carbonyl groups of both the ester and the amide with lithium and aluminium hydride, to obtain our final product (receptor **1**).



Since the main goal of this receptor is to act as a catalyst in the industrial process of biodiesel production, we need to carry out kinetic studies about its catalytic effect in the acylation and deacylation processes. For the acylation reaction, we obtained a half-reaction time of 18 minutes, while the half-reaction time for the deacylation reaction was of 17 hours. We followed the reactions progression by the integration in the corresponding ^1H NMR spectra of the signals from the starting materials and the resulting products of the reactions.

The half-reaction times observed for both reactions (acylation and deacylation) are slightly better than those obtained in previous works with other prepared catalysts. Nevertheless, they are not what we expected because the half-reaction time for de deacylation process is still too high. Thus, we have to conclude that this receptor cannot be used as a catalyst in the industrial transesterification process for biodiesel production.

Despite the obtained results were not the expected ones, they are useful to improve the understanding of the reaction mechanism of our receptor and can provide information for the

Research Group to continue with the investigation of new molecular receptors for the catalysis of the biodiesel production process by transesterification.

On the other hand, as we mentioned above, we conducted a study of association between chiral dinitrobenzoyl derivatives of some (*L*)-amino acids and our receptor. We chose these amino acid derivatives because the experience obtained in previous studies of the Research Group with other similar receptors show that the dinitrobenzoyl group provides additional anchor points with the receptor. This fact facilitates the formed associates to be more stable and, therefore, there is a greater difference between both of the diastereomeric associates, creating a bigger contrast between the association constants of each enantiomer.

We carried out assessments with the derivatives of alanine, phenylalanine, leucine and proline. Observing the ^1H NMR spectra of the mixtures of the receptor with the different guests, we could see the unfolding of the signals of the receptor with the addition of increasing amounts of the corresponding guest. This unfolding was bigger for dinitrobenzoyl (*L*)-proline.

Each of the unfolded signals include the signal associated with a kind of hydrogen in the free receptor and the signal associated with the same kind of hydrogen in the compound formed between the receptor and the chiral guest. The greater is the unfolding, the greater will be the ratio of the association constants of the diastereomers formed between the receptor and the guest, and this means that the geometry and energy of the associates between the chiral derivative and each of the enantiomers of the receptor are different. This is, the corresponding dinitrobenzoyl derivative of the amino acid will have more affinity for one of the enantiomers of the receptor above the other.

In conclusion, according to the observed results for the association studies carried out with our receptor, we can say than the diastereomeric associates formed between dinitrobenzoyl (*L*)-proline and our receptor present very different geometry and energy, and consequently, the association of the chiral derivate with one of the enantiomers will be better with respect to the other one and show therefore a bigger association constant. This will allow us to use our receptor in the resolution of racemic mixtures of this amino acid, after separating both enantiomers of our receptor.

1.- Introducción y Antecedentes

Debido a la creciente demanda de energía a nivel mundial, se ha vuelto indispensable encontrar fuentes de energía alternativas a los combustibles fósiles. Ante este panorama, los biocombustibles se presentan como una solución para sustituir al petróleo y disminuir los efectos negativos que tiene éste sobre el medio ambiente, reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero que sobrecalientan la superficie terrestre y aceleran el cambio climático.

Se entiende por biocombustible aquellos combustibles que se obtienen de cualquier tipo de materia orgánica que haya tenido su origen inmediato en el proceso biológico de organismos recientemente vivos. Tanto su investigación como su producción han estado presentes desde el siglo XIX, siendo el Dr. Rudolf Diesel quién, en el año 1895, desarrolló el primer motor diésel cuyo prototipo ya estaba previsto que funcionara con aceites vegetales.¹

Los biocombustibles más desarrollados y usados son el bioetanol y el biodiésel. En los últimos años, la industria del biodiésel ha experimentado un crecimiento continuo, ampliándose el espectro de materias primas y países productores. La tendencia actual es la búsqueda de fuentes renovables de triglicéridos diferentes a los aceites vegetales tradicionales.

En concordancia con el desarrollo mundial de la industria del biodiésel, el interés de la comunidad científica por los diferentes aspectos de su cadena productiva ha crecido exponencialmente en los últimos años. Existen diferentes métodos para la obtención de biodiésel, todos ellos basados en el tratamiento de aceites vegetales, grasas animales o aceites de microalgas; como son el craqueo térmico, el empleo de microemulsiones o la transesterificación de triglicéridos, siendo éste último el más empleado.

Desde el punto de vista químico, los triglicéridos son ésteres de glicerol (glicerina) con tres ácidos grasos con largas cadenas hidrocarbonadas, lo que les confiere una elevada viscosidad.

La explotación industrial de los aceites y las grasas se basa en la modificación química de los sitios más reactivos de los ácidos grasos: el grupo carboxilo, los dobles enlaces y otros grupos funcionales presentes. Las reacciones más importantes son aquellas que involucran la conversión de ésteres en ácidos grasos o viceversa, y el intercambio de los grupos ligados a los ésteres.

¹ Salinas Callejas, E. y Gasca Quezada, V. "Los biocombustibles" *El cotidiano*, 2009, 157, 75-82.

La alcoholólisis (Figura 1) y en especial la metanolólisis han sido objeto de numerosas investigaciones dado que el biodiésel que hasta la actualidad ha alcanzado nivel comercial corresponde fundamentalmente a metilésteres de ácidos grasos.²

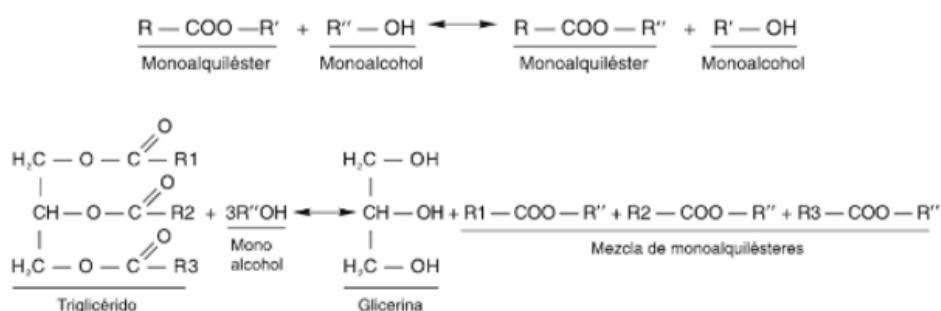


Figura 1. Alcoholólisis de un monoalquiléster (arriba); de un triglicérido (abajo).²

La transesterificación de triglicéridos es un proceso que consiste en tres reacciones de alcoholólisis consecutivas, mediante las cuales el triglicérido se transforma sucesivamente en diglicérido, monoglicérido y, finalmente, glicerol. Se trata de reacciones reversibles, en las que, para desplazar el equilibrio hacia la formación de productos, se emplea un exceso de alcohol. Entre los alcoholes que pueden ser utilizados en esta reacción, se encuentran el metanol, el etanol, el propanol o el butanol; siendo el metanol el utilizado más frecuentemente debido a su bajo coste y a sus ventajas tanto físicas como químicas (ya que se trata de un compuesto polar de cadena corta).

Normalmente, para acelerar esta reacción y mejorar su rendimiento, se emplea un catalizador, pudiendo tratarse de un catalizador ácido o básico. La naturaleza del catalizador utilizado juega un importante papel en la transformación de triglicéridos a biodiésel, por lo que hay que ser cuidadoso a la hora de elegirlo. A nivel comercial, se suele emplear un catalizador básico, ya que la reacción es en torno a unas 4000 veces más rápida que si se emplea un catalizador ácido. Los catalizadores básicos más comunes son los alcóxidos de sodio y potasio, aunque también se emplean con frecuencia sus correspondientes carbonatos e hidróxidos debido a que, aunque son menos activos, los hidróxidos de sodio³ y potasio son más baratos que sus correspondientes alcóxidos.

Por otra parte, el empleo de un catalizador básico presenta algunos inconvenientes. El primero es que la presencia de agua en el medio de reacción produce una reacción secundaria

² Benjumea Hernández, P. N.; Agudelo Santamaría, J. R. y Alberto Ríos, L. "Biodiésel: Producción, calidad y caracterización" *Medellín: Universidad de Antioquia*, 2009.

³ Agarwal, M.; Chauhan, G.; Chaurasia, S. P. y Singh, K. "Study of catalytic behavior of KOH as homogeneous and heterogeneous catalyst for biodiesel production" *J. Taiwan Inst. Chem. Engin.* 2012, 43, 89-94.

indeseada que genera sales alcalinas de los ácidos grasos liberados en el proceso (jabones), lo cual disminuye el rendimiento de la reacción principal. Otro inconveniente es que, debido precisamente a la formación de jabones, se dificulta la purificación del biodiésel, encareciéndose con ello sus costes. Por último, es necesario que los triglicéridos de partida tengan una baja acidez y un bajo contenido en ácidos grasos libres, teniendo que ser sometidos a un pretratamiento en caso contrario. Este factor supone en realidad un inconveniente bastante grande, ya que la producción de biodiésel se abarataría notablemente empleando como materia prima aceites de baja calidad no aptos para el consumo humano, pero dado que dichos aceites suelen contener un elevado porcentaje de ácidos libres, no pueden emplearse para el proceso industrial de producción de biodiésel si va a utilizarse un catalizador básico.

Para evitar estos problemas, se puede hacer uso de catalizadores ácidos, entre los cuales se encuentran el ácido sulfúrico, el ácido clorhídrico y los ácidos sulfónicos.⁴ Un estudio reveló que el etanol y el ácido sulfúrico son adecuados para llevar a cabo reacciones de esterificación directa y de transesterificación simultáneamente, transformando eficazmente el aceite de cocina usado con un elevado contenido en ácidos grasos libres (entre el 3% y el 40%) en biodiésel. Sin embargo, su uso también presenta algunos problemas como son la corrosión del reactor y la necesidad de recurrir a grandes descargas de agua para la neutralización del ácido.⁵

En este sentido, también se ha estudiado la posibilidad de emplear catalizadores ácidos heterogéneos⁶ intentando esquivar los inconvenientes de la versión homogénea de los catalizadores ácidos, observándose que las conversiones y los rendimientos alcanzados en el proceso dependen en gran medida del método de preparación del catalizador, del soporte empleado y de las condiciones de reacción. También los catalizadores básicos y las enzimas que se mencionan a continuación se han estudiado en sus versiones heterogéneas.⁷

⁴ (a) Ma, F. y Hanna, M. A. "Biodiesel production: a review" *Biores. Technol.* **1999**, *70*, 1-15. (b) Fuentes de Arriba, Á. L.; Simón, L.; Alcázar, V.; Cuéllar, J.; Lozano-Martínez, P. y Morán, J. R. "A Twitchell Reagent Revival: Biodiesel Generation from Low Cost Oils" *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2681-2690.

⁵ Atadashi, I. M.; Aroua, M. K.; Abdul Aziz, A. R. y Sulaiman, N. M. N. "The effects of catalysts in biodiesel production: A review" *J. Ind. Engineer. Chem.* **2013**, *19*, 14-26.

⁶ (a) Sharma, Y. C. y Singh, B. "Advancements in solid acid catalysts for eco-friendly and economically viable synthesis of biodiesel" *Biofuels Bioprod. Bioref.* **2011**, *5*, 69-92. (b) Sani, Y. M.; Wan Daud, W. M. A. y Aziz, A. R. A. "Activity of solid acid catalysts for biodiesel production: A critical review" *Appl. Catal. A General* **2014**, *470*, 140-161.

⁷ (a) Hara, M. "Environmentally Benign Production of Biodiesel Using Heterogeneous Catalysts" *Chem. Sus. Chem.* **2009**, *2*, 129-135. (b) Zabeti, M.; Wan Daud, W. M. A. y Aroua, M. K. "Activity of solid catalysts for biodiesel production: A review" *Fuel Process. Technol.* **2009**, *90*, 770-777.

Otra opción serían las enzimas,⁸ que debido a su elevado carácter específico se convierten en una alternativa muy atractiva para catalizar procesos de transesterificación. Generalmente, el proceso se lleva a cabo mediante el empleo de enzimas secas en polvo en disolventes orgánicos, aunque cabe destacar que este método fue precedido por un método basado en la utilización de enzimas inmovilizadas, en el que las enzimas atrapadas en soportes porosos trabajaban con mezclas bifásicas de disolventes.⁹

Sin embargo, a pesar de las ventajas que presentan, las enzimas no siempre son apropiadas para procesos a gran escala, ya que presentan un elevado coste y una baja disponibilidad y, además, son unas moléculas muy sensibles a las condiciones de reacción, pudiendo sufrir procesos de desnaturalización. Aquí es donde entran en juego los receptores orgánicos del tipo del propuesto en este trabajo, ya que se trata de pequeñas moléculas orgánicas fácilmente accesibles por síntesis química y adecuadamente funcionalizadas para poder simular en su estructura y geometría el agujero oxianiónico de la quimotripsina, que es la enzima que cataliza el proceso natural de transesterificación, buscando de esta forma lograr un efecto catalítico similar al enzimático sin encarecer los costes del proceso y esquivando los inconvenientes de las enzimas.

La quimotripsina es una enzima digestiva que cataliza la hidrólisis de las proteínas ingeridas, en el intestino delgado. También cataliza la hidrólisis de los ésteres de aminoácidos y de otros derivados de ácidos carboxílicos. Por ello, es la enzima que hemos tomado como modelo para el diseño de nuestro receptor en su posible utilización como catalizador para el proceso de producción de biodiesel.

El mecanismo global por el cuál la quimotripsina cataliza las reacciones de hidrólisis de los derivados de ácidos carboxílicos (Figura 2) se basa en la formación de un complejo no covalente

⁸ (a) Fjerbaek, L; Christensen, K. V. y Norddahl, B. "A Review of the Current State of Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification" *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 1298-1315. (b) Liu, Y.; Yan, Y.; Hu, F.; Yao, A.; Wang, Z. y Wei, F. "Transesterification for Biodiesel Production Catalyzed by Combined Lipases: Optimization and Kinetics" *Am. Inst. Chem. Eng. J.* **2010**, *56*, 1659-1665. (c) Guldhe, A.; Singh, B.; Mutanda, T.; Permaul, K. y Bux, F. "Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches" *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *41*, 1447-1464. (d) Amini, Z.; Ilham, Z.; Ong, H. C.; Mazaheri, H. y Chen, W.-H. "State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production" *Energy Convers. Manag.* **2017**, *141*, 339-353.

⁹ (a) Otera, J. "Transesterification" *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 4, 1449-1470. (b) Ghaly, A. E.; Dave, D.; Brooks, M. S. y Budge, S. "Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review" *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *6*, 54-76. (c) Gog, A.; Roman, M.; Toşa, M.; Paizs, C. e Irimie, F. D. "Biodiesel production using enzymatic transesterification—Current state and perspectives" *Renew. En.* **2012**, *39*, 10-16. (d) Wang, X.; Qin, X.; Li, D.; Yang, B. y Wang, Y. "One-step synthesis of high-yield biodiesel from waste cooking oils by a novel and highly methanol-tolerant immobilized lipase" *Biores. Technol.* **2017**, *235*, 18-24. (e) Moazeni, F.; Chen, Y.-C. y Zhang, G. "Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review" *J. Clean. Prod.* **2019**, *216*, 117-128.

entre la enzima y el sustrato (complejo de Michaelis-Menten), que es característico de todas las reacciones de sustratos específicos catalizados por enzimas. El mecanismo de la reacción también implica la formación de un intermediario acilo-enzima, siendo en el segundo paso de la reacción, denominado paso de acilación, cuando se produce la transferencia del grupo acilo del sustrato a la enzima para la formación de dicho intermedio acilo-enzima. Finalmente, el último paso de la catálisis consiste en la desacilación de la enzima, que queda de esta forma regenerada para iniciar un nuevo ciclo catalítico.¹⁰

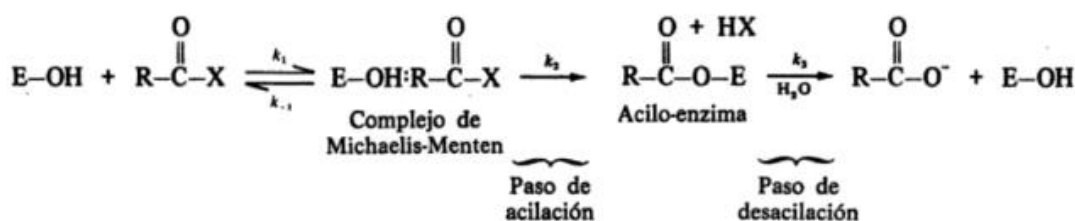


Figura 2. Mecanismo global de la reacción catalizada por la enzima quimotripsina.^{10a}

El sitio activo o centro catalítico de la quimotripsina está formado por varios residuos de aminoácidos, entre los cuales el papel esencial corresponde a la "triada catalítica", que consiste en el grupo carboxilo lateral de un residuo de aspartato, el anillo de imidazol de un residuo de histidina y el grupo hidroxilo lateral de una serina.

El mecanismo de acción de la quimotripsina es el descrito a continuación (Figura 3). En primer lugar, el sustrato se une con la enzima para formar un complejo reversible enzima-sustrato típico según el modelo de Michaelis-Menten, donde la "triada catalítica" facilita el ataque nucleofílico al activar el grupo hidroxilo del residuo de serina. Después del ataque nucleofílico, el grupo carboxilo se convierte en un intermediario oxianión tetraédrico, el cual es estabilizado por dos enlaces de

¹⁰ (a) Bender, M. L. y Brubacher, L. J. "Catálisis y acción enzimática" *Reverte*, **1977**, págs. 67-76. (b) Cassidy, C. S.; Lin, J. y Frey, P. A. "A New Concept for the Mechanism of Action of Chymotrypsin: The Role of the Low-Barrier Hydrogen Bond" *Biochemistry* **1997**, *36*, 4576-4584. (c) Belyaeva, E. A.; Gra, D. V. y Eremeev, N. L. "On the Mechanism of Interaction of Organic Solvents With the Active Site of α -Chymotrypsin" *Biochemistry (Moscow)* **2002**, *67*, 1032-1036 (version traducida del artículo original en ruso *Biokhimiya* **2002**, *67*, 1246-1251). (d) Hedstrom, L. "Serine Protease Mechanism and Specificity" *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4523. (e) Ishida, T. y Kato, S. "Theoretical Perspective on the Reaction Mechanism of Serine Proteases: The Reaction Free Energy Profiles of the Acylation Process" *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12035-12048. (f) Ishida, T. y Kato, S. "Role of Asp102 in the Catalytic Relay System of Serine Proteases: A Theoretical Study" *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7111-7118. (g) Ishida, T. "Low-Barrier Hydrogen Bond Hypothesis in the Catalytic Triad Residue of Serine Proteases: Correlation between Structural Rearrangement and Chemical Shifts in the Acylation Process" *Biochemistry* **2006**, *45*, 5413-5420. (h) Miño, G. y Contreras, R. "On the Role of Short and Strong Hydrogen Bonds on the Mechanism of Action of a Model Chymotrypsin Active Site" *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 5769-5772. (i) Blai, V. y Pei, D. "Serine proteases: how did chemists tease out their catalytic mechanism?" *ChemTexts* **2019**, *5*, artículo 19, 7 págs.

hidrógeno. El oxianión se reacomoda espontáneamente y se forma un intermediario enzimático, al cual se le ha añadido un grupo acilo. La reacción continúa con la entrada de una molécula de agua al sitio activo, lo que promueve un nuevo ataque nucleofílico que resulta en la formación de un segundo intermediario tetraédrico, que también es estabilizado por enlaces de hidrógeno. Por último, la reacción finaliza cuando este segundo intermediario se reacomoda nuevamente y forma otra vez el complejo enzima-sustrato, donde el sitio activo de la enzima está ocupado por el producto que contiene el grupo carboxilo.¹¹

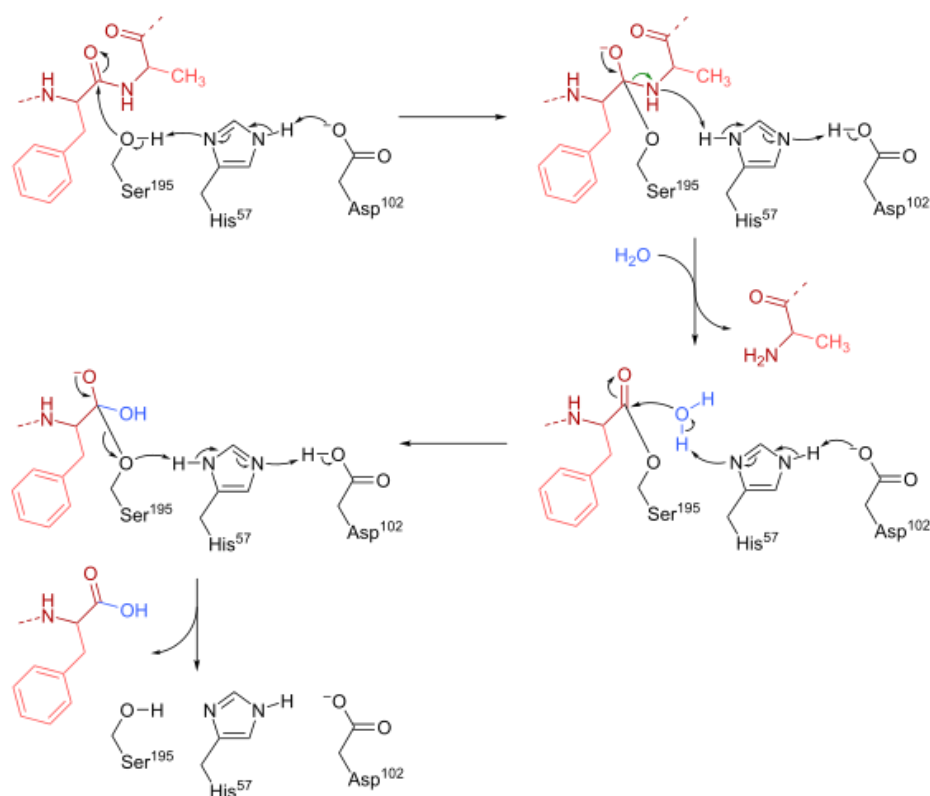


Figura 3. Mecanismo de acción de la enzima quimotripsina.¹²

Por lo tanto, lo que pretendemos conseguir con nuestro receptor es catalizar la reacción de acilación de forma similar a la enzima. Para ello, proponemos un compuesto con esqueleto de cromano, que hemos funcionalizado con grupos que estabilizan el oxianión mediante enlaces de hidrógeno, un hidróxilo nucleofílico y una especie básica que imita el grupo imidazol de la histidina.

¹¹ (a) Westheimer, F. H. "Hypothesis for the mechanism of action of chymotrypsin" *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1957**, *43*, 969-975. (b) Blow, D. M. "6 The Structure of Chymotrypsin" *The enzymes* **1971**, *3*, 185-212. (c) Bender, M. L.; Killheffer, J. V. y Cohen, S. "Chymotrypsin" *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1973**, *1*, 149-199. (d) Blow, D. M. "Structure and Mechanism of chymotrypsin" *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 145-152. (e) Appel, W. "Chymotrypsin: Molecular and catalytic properties" *Clin. Biochem.* **1986**, *19*, 317-322.

¹² González Mora, R. D. "Quimotripsina: características, estructura, funciones, mecanismo de acción" *Lifeder*, <https://www.lifeder.com/quimotripsina/> (consultada por última vez el 10-06-2021).

Por otra parte, además del posible uso del receptor preparado como posible catalizador para el proceso de producción de biodiésel, también estamos interesados en su posible utilización, una vez resuelta su mezcla racémica, para la resolución de mezclas racémicas de aminoácidos. Así pues, deberemos tener también en cuenta las características necesarias para cumplir dicha función durante el diseño del receptor, tal como resumimos a continuación.

En primer lugar, para que la unión con los aminoácidos sea selectiva, es importante tener en cuenta que el receptor debe presentar en su estructura grupos capaces de asociarse con los diferentes grupos funcionales de los aminoácidos. La segunda cuestión importante hace referencia a la conformación del receptor, la cual debe ser lo suficientemente flexible para que el receptor pueda acomodar al aminoácido en su estructura con sólo pequeños cambios conformacionales, pero tampoco demasiado flexible, ya que, en ese caso, el asociado presentaría poca estabilidad debido a la gran cantidad de energía empleada en los cambios conformacionales requeridos para su formación. Además, como queremos que la asociación sea enantioselectiva, ya que pretendemos que el receptor sea capaz de asociar únicamente uno de los dos enantiómeros del aminoácido en cuestión para separar la mezcla racémica del aminoácido, el receptor deberá presentar obligatoriamente centros quirales en su estructura, de tal forma que si tenemos, a su vez, resuelta la mezcla racémica del receptor, podremos emplear cada uno de sus enantiómeros para asociar un enantiómero del aminoácido en cuestión y separar así los dos enantiómeros del aminoácido. Finalmente, teniendo en cuenta que los enlaces de hidrógeno son direccionales, lo que introduce una cierta rigidez en la unión, y presentan una especial fortaleza dentro de las interacciones dipolo-dipolo en particular y de las interacciones no covalentes en general, el receptor diseñado se basará precisamente en su capacidad para formar dicho tipo de interacciones con los aminoácidos.

Es por ello que el receptor diseñado para su síntesis y estudio en el presente trabajo incluye en su estructura una función urea, que permite la asociación del carbonilo del grupo ácido del aminoácido mediante la formación de enlaces de hidrógeno. No obstante, no se han estudiado aminoácidos libres sino derivados de aminoácidos, concretamente dinitrobenzoil derivados, debido a que la asociación del grupo amonio de los aminoácidos libres (que se encuentran en su forma zwitteriónica) habría requerido la introducción en la estructura del receptor de algún elemento estructural como un éter corona, que no habría resultado adecuado para su posible uso como catalizador en el proceso de producción de biodiésel. No obstante, para reforzar la asociación entre el receptor y este tipo de derivados, se ha incluido en la función urea del mismo un anillo aromático

rico en electrones, que introduce la posibilidad de que se establezcan interacciones de transferencia de carga con el anillo aromático pobre en electrones del grupo dinitrobenzoílo, así como interacciones de tipo pi con otros sistemas aromáticos presentes en la cadena lateral de algunos aminoácidos como la fenilalanina.

1.1 Antecedentes en el Grupo de Investigación

Las enzimas son los catalizadores más eficientes conocidos, pero su utilización a nivel industrial para procesos como el de la producción de biodiésel que nos ocupa en este trabajo presenta inconvenientes, según se ha mencionado ya previamente. El primero de ellos es el elevado coste de las enzimas y el segundo, es la gran sensibilidad que presentan las enzimas a las condiciones de reacción, ya que no son adecuadas para su utilización en disolventes orgánicos (siendo los medios acuosos como los medios biológicos los más óptimos para su funcionamiento) y, a elevada temperatura, sufren procesos de desnaturalización, que suponen la pérdida de su estructura tridimensional en la que se basan sus propiedades catalíticas.

Por lo tanto, nuestro grupo de trabajo del Departamento de Química Orgánica viene planteándose desde hace tiempo la posibilidad de obtener biodiésel mediante la transesterificación de triglicéridos con alcoholes de cadena corta empleando pequeñas moléculas orgánicas como catalizadores, de tal forma que dichas moléculas imiten en su estructura el centro activo de las enzimas que catalizan el proceso de forma natural. De esta manera, podría incrementarse notablemente la eficiencia del proceso industrial de forma semejante a lo conseguido utilizando enzimas como catalizadores, sin encarecer sus costes y evitando a la vez los inconvenientes mencionados para las enzimas.

En este sentido, se han diseñado en trabajos anteriores diferentes receptores con distintos esqueletos rígidos (xantona,¹³ carbazol¹⁴ o cromanona¹⁵) (Figura 4) adecuadamente funcionalizados, obteniéndose en algunos casos resultados bastante prometedores. Los catalizadores **A** y **B**, con esqueleto de xantona, proporcionaron, por ejemplo, buenos resultados en la catálisis de la reacción de adición nucleofílica de pirrolidina sobre lactonas insaturadas. Para el

¹³ Simón, L.; Muñoz, F. M.; Sáez, S.; Raposo, C.; Sanz, F. y Morán, J. R. "Xanthone receptors as oxyanion-hole mimics in artificial enzymes" *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 1682-1701.

¹⁴ Aguilar Oyuela, P. D. "Receptores moleculares con agujero oxianiónico y estudio de su reactividad" *Trabajo de Fin de Máster*, Universidad de Salamanca **2015**.

¹⁵ Velasco Rubio, Á. "Desarrollo de catalizadores supramoleculares para la obtención de biodiesel" *Trabajo de Fin de Grado*, Universidad de Salamanca **2015**.

caso del catalizador **C**, con esqueleto de carbazol, se obtuvieron resultados comparables con el efecto del agujero oxianiónico de la enzima quimotripsina en la catálisis de la reacción de acilación del grupo hidroxilo del catalizador con anhídrido acético como agente acilante. Sin embargo, tanto este catalizador como el compuesto **D**, con esqueleto de cromanona, carecen en su estructura de una especie básica que pueda simular el residuo de histidina presente en la triada catalítica de la enzima natural, por lo que se necesita en ambos casos la utilización de una base auxiliar para que tenga lugar la reacción de acilación del grupo hidroxilo del catalizador.

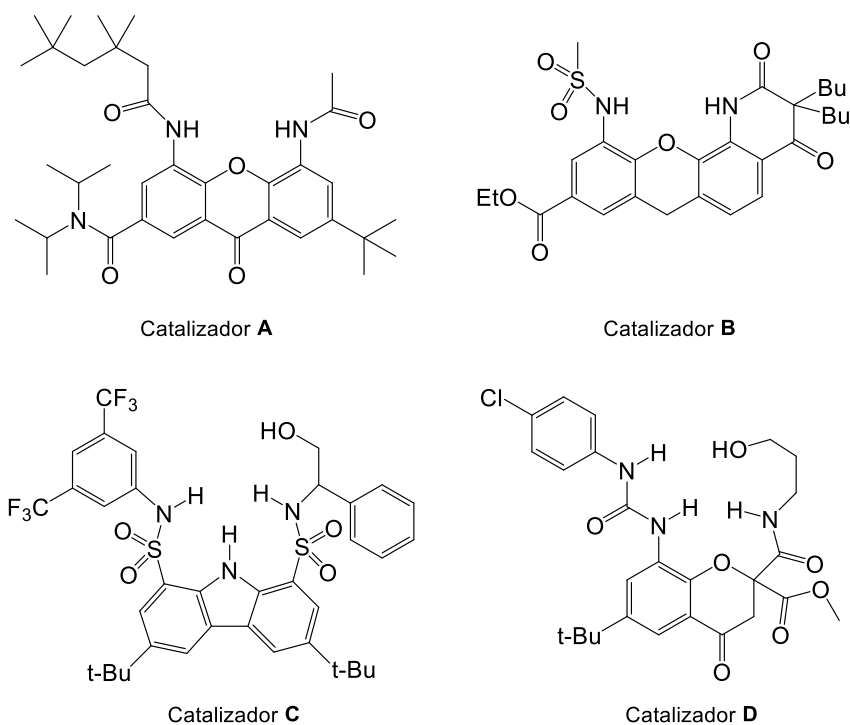


Figura 4. Diferentes catalizadores preparados en trabajos anteriores basados en esqueletos de xantona (A y B), carbazol (C) o cromanona (D).

Es por ello que, en trabajos posteriores, se sintetizaron catalizadores que contasen en su estructura con una especie básica, además de los grupos que simulan el agujero oxianiónico de la enzima natural, buscando simular mejor el mecanismo catalítico de la quimotripsina. Se prepararon de esta forma distintos compuestos con esqueleto de cromano diferentemente funcionalizado (Figura 5).

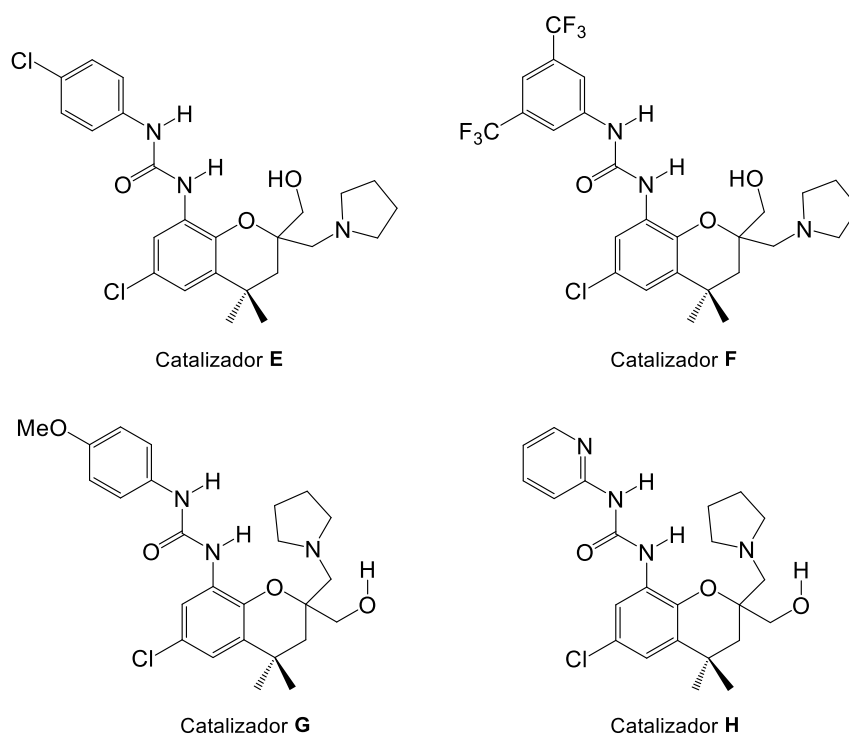


Figura 5. Diferentes catalizadores con un esqueleto de cromano preparados en trabajos anteriores.

En todos estos nuevos catalizadores se incluyó una función urea y los estudios catalíticos llevados a cabo con ellos permitieron constatar la importancia del segundo NH de la urea en la actividad catalítica del receptor, gracias a su participación clave en la formación del asociado con el agente acilante. Los catalizadores **E**¹⁶ y **F**¹⁷ proporcionaron resultados parecidos en la reacción de acilación de su grupo hidroxilo con anhídrido acético, pese a que esperábamos un incremento de la actividad en el caso del catalizador **F** como consecuencia de la mayor estabilización del asociado en ese caso por el incremento de la acidez del sustituyente de la urea. Creemos que este resultado se debe a que adquiere más importancia el aumento de impedimento estérico que se produce al pasar del catalizador **E** al **F** que el incremento de la acidez mencionado. Los catalizadores **G** y **H**,¹⁸ por el contrario, resultaron ser más lentos que los anteriores. Sin embargo, aunque con los catalizadores **E** y **F** se consiguieron altísimas velocidades para la reacción de acilación del hidroxilo del catalizador (comparables a las alcanzadas en presencia de la enzima natural), en todos los casos (catalizadores

¹⁶ (a) del Mazo Borrego, S. "Desarrollo de catalizadores biomiméticos para la obtención de biocombustibles" *Trabajo de Fin de Grado*, Universidad de Salamanca **2016**. (b) Rubio, O. H.; Borrego, S. M.; Monleón, L. M.; Simón, L.; Temprano, Á. G. y Morán, J. R. "A cleft type receptor which combines an oxyanion hole with electrostatic interactions" *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 4571-4578.

¹⁷ Sánchez Escudero, J. "Receptores supramoleculares con esqueleto de cromano" *Trabajo de Fin de Grado*, Universidad de Salamanca **2017**.

¹⁸ Martínez Laguna, J. "Síntesis y estudio de receptores moleculares biomiméticos que simulan un agujero oxianiónico" *Trabajo de Fin de Grado*, Universidad de Salamanca **2018**.

E-H), los tiempos de vida media registrados para la reacción de desacilación de los catalizadores en presencia de metanol deuterado resultaron ser demasiado elevados como para que estos catalizadores puedan ser útiles a la hora de catalizar el proceso de obtención de biodiésel a nivel industrial.

Este problema ha sido resuelto recientemente de forma brillante en nuestro Grupo de Investigación empleando otro tipo de esqueletos orgánicos adecuadamente funcionalizados para imitar el centro activo del a quimotripsina.¹⁹

Teniendo en cuenta todos estos resultados previos obtenidos en nuestro Grupo de Investigación con los receptores con esqueleto de cromano, en el presente trabajo, buscando completar el estudio con dichos receptores, planteamos el diseño, síntesis y estudio de un nuevo receptor con esqueleto de cromano, modificando nuevamente el patrón de sustitución en el segundo NH de la función urea para intentar comprender el mecanismo de actuación del receptor como catalizador y, si es posible, buscar nuevas aplicaciones del mismo en la separación de mezclas racémicas de aminoácidos, tal como se ha descrito previamente.

¹⁹ Garrido-González, J. J.; Iglesias Aparicio, M. M.; Martínez García, M.; Simón, L.; Sanz, F.; Morán, J. R. y Fuentes de Arriba, Á. L. "An Enzyme Model Which Mimics Chymotrypsin and N-Terminal Hydrolases" *ACS Catal.* **2020**, *10*, 11162-11170.

2.- Objetivos

El objetivo fundamental de este trabajo es la preparación y caracterización de un receptor molecular orgánico con esqueleto de cromano, con el fin de que posteriormente funcione como catalizador en el proceso industrial de producción de biodiésel, para lo cual, realizaremos su estudio catalítico en los procesos de metanólisis y acetilación.

Como objetivo secundario, se pretende realizar su estudio de asociación de dicho receptor molecular con derivados de aminoácidos, para determinar la relación de constantes de ambos enantiómeros. De obtenerse resultados positivos en dicho estudio, podríamos aplicar el resultado a una doble vertiente. Por un lado, sería posible llevar a cabo la separación de la mezcla racémica de nuestro receptor mediante una prueba de cristalización con algún aminoácido o derivado adecuado, como la *p*-clorofenilurea de la (*L*)-fenilalanina. Ello nos permitiría determinar el poder rotatorio de ambos enantiómeros del receptor. Y, por otra parte, quedaría abierta la puerta para la posible utilización de ambos enantiómeros de nuestro receptor para la separación de mezclas racémicas de aminoácidos.

3.- Metodología y Resultados

3.1 Diseño del receptor 1

Para el diseño del receptor planteado en este trabajo, partimos de la idea principal de que la estructura del mismo contenga una funcionalización adecuada para que la molécula resultante pueda simular el sitio activo de enzimas hidrolíticas naturales como la quimotripsina.

Se ha optado por diseñar el receptor tomando como base un esqueleto de cromano debido a la optimización de la síntesis de dicho esqueleto lograda en el grupo de trabajo en estudios anteriores y teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos con dicho esqueleto en esos estudios previos.¹⁶⁻¹⁸ Este esqueleto ha sido funcionalizado en este caso con diferentes grupos susceptibles de imitar de la mejor manera posible el centro activo de la enzima natural, que incluye, por un lado, los enlaces de hidrógeno formados en el agujero oxianiónico y, por otra parte, el hidroxilo nucleófilo y la especie básica presentes en su triada catalítica. Buscamos que el mecanismo catalítico del receptor diseñado sea lo más parecido posible al de la enzima.

Además, gracias a la presencia de la función urea en el receptor, pensamos que puede resultar también útil para la asociación de derivados de aminoácidos. Y, al tratarse de un compuesto quiral, si conseguimos resolver su mezcla racémica, podremos emplearlo para resolver a su vez las mezclas racémicas de dichos derivados de aminoácidos.

Adicionalmente, con el objetivo de reforzar la asociación entre el receptor y los derivados de aminoácidos estudiados, decidimos incluir en la función urea del receptor una unidad de dimetilaminoanilina, en la que la conjugación del par de electrones no enlazante del nitrógeno del grupo dimetilamino conduce a un anillo aromático rico en electrones capaz de establecer una interacción por transferencia de carga con el anillo aromático del grupo dinitrobenzoílo (pobre en electrones) presente en los derivados de aminoácidos elegidos. Y dicho grupo dimetilaminoanilina podrá también establecer interacciones de tipo pi con otros sistemas aromáticos presentes en la cadena lateral de algunos aminoácidos como la fenilalanina, estabilizando aún más la interacción en el asociado.

Este tipo de interacción de transferencia de carga obtenido por la combinación de anillos aromáticos pobres y ricos ya ha sido utilizada con éxito en nuestro Grupo de Investigación.²⁰

Teniendo en cuenta todas estas premisas y tomando como base otros receptores previamente sintetizados en el Grupo de Investigación, nos planteamos para el presente trabajo la propuesta de receptor mostrada en la figura 6.

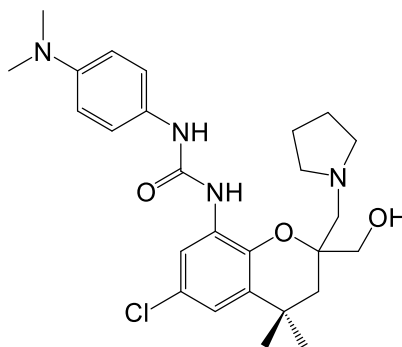


Figura 6. Estructura del receptor propuesto para este trabajo.

3.2 Síntesis del receptor 1

Para llevar a cabo la síntesis del receptor que nos proponemos estudiar en el presente trabajo, nos planteamos la ruta sintética mostrada en la figura 7.

La ruta sintética parte del compuesto **2**, previamente caracterizado y cuya síntesis ya ha sido descrita y optimizada en estudios previos del Grupo de Investigación. El primer paso es la nitración de dicho compuesto para obtener el producto **3**, reacción que se produce muy fácilmente, y prácticamente de forma cuantitativa debido a que el anillo aromático está fuertemente activado por el éter, al estar la posición *para* ocupada por el cloro, sólo es posible la nitración en la posición *orto*.

Procedemos a continuación a hidrolizar uno de los ésteres del compuesto **3** utilizando un equivalente de potasa en metanol, controlando estrictamente el tiempo de reacción para evitar el inicio de la hidrólisis del segundo éster. En esta reacción, empleamos hidróxido de potasio en lugar del de sodio, ya que éste se disuelve mejor en el metanol. Obtenemos de esta forma el monoácido **4**,

²⁰ (a) Oliva González, A. I. "Receptores enantioselectivos con esqueleto de tetrahidrobenzoxanteno para derivados de aminoácidos" *Tesis Doctoral*, Universidad de Salamanca **2003**. (b) de Juan Fernández, L. "Receptores benzofuránicos para la discriminación quiral de derivados de aminoácidos" *Trabajo de Grado*, Universidad de Salamanca **2013**. (c) de Juan Fernández, L.; Fuentes de Arriba, Á. L.; Monleón, L. M.; Rubio, O. H.; Alcázar Montero, V.; Simón Rubio, L.; Rodríguez Morán, J. "An Enantioselective Benzofuran-Based Receptor for Dinitrobenzoyl-Substituted Amino Acids" *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 1541-1547.

que transformamos en la pirrolinamida correspondiente (compuesto **5**) a través del cloruro de ácido intermedio por tratamiento consecutivamente con PCl_5 y con pirrolidina.

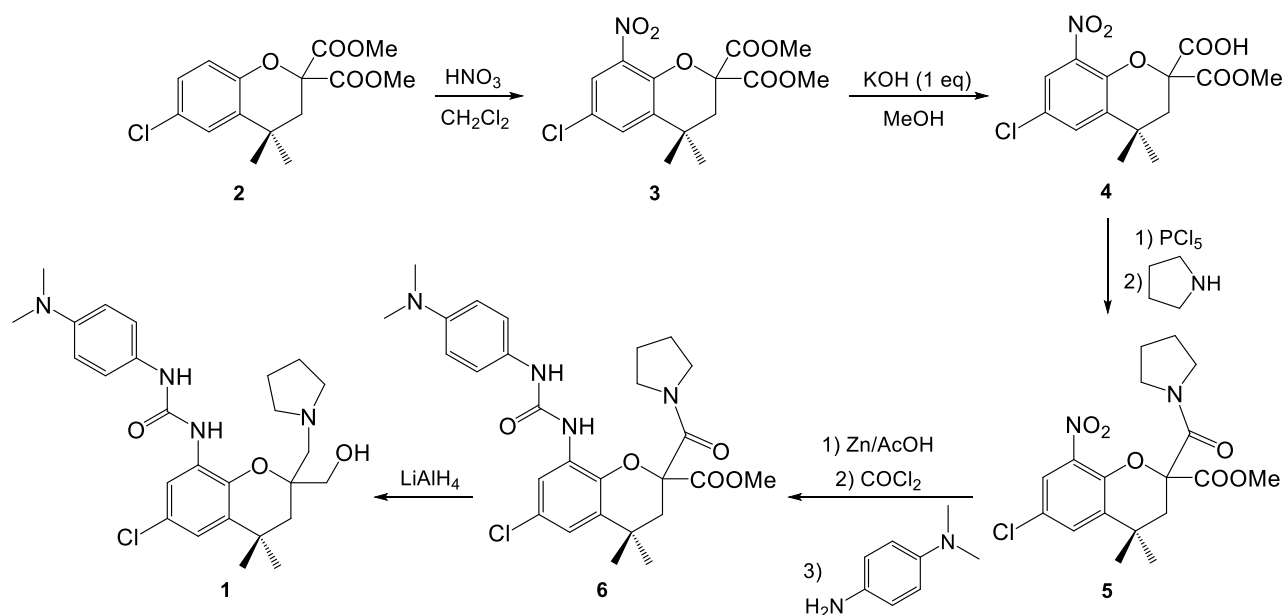


Figura 7. Esquema sintético del receptor.

El siguiente paso de la síntesis sería la reducción del grupo nitro a amina con zinc y la incorporación de la amina aromática al esqueleto en forma de función urea. Realizamos la reducción con zinc debido a que, si la realizáramos con plomo o con cloruro de estaño, se perdería mucho producto al quedar adsorbido a éstos. Tampoco podemos llevar a cabo la reducción con NBH_3 ni con LAH , ya que, de esta manera también reduciríamos el éster. La amina aromática intermedia obtenida resulta sumamente inestable, por lo que se hace reaccionar en la formación de la urea inmediatamente tras su obtención para evitar su degradación. Se transforma dicha amina en isocianato por tratamiento con fosgeno y, a continuación, se genera la urea **6** por tratamiento con *p*-dimetilaminoanilina. Cabe destacar que dicha amina aromática debe purificarse por sublimación antes de emplearla en dicha reacción debido a su alta reactividad con el aire. Esta urea **6** se purifica por cromatografía en columna (Figura 8) antes de su utilización para el paso final de la síntesis.

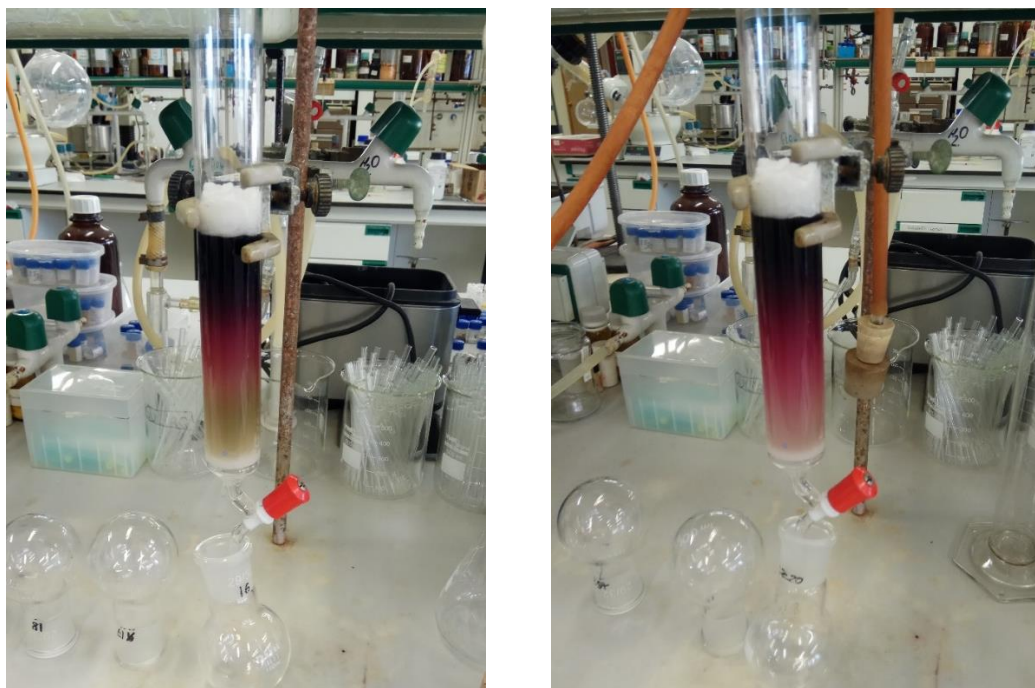


Figura 8. Imagen de la purificación de la urea 6 por cromatografía en columna.

El último paso de la síntesis es la reducción de los grupos carbonilos del éster y de la amida por tratamiento con LAH para la obtención de nuestro receptor final, el compuesto **1**. El LAH reacciona con el agua de manera violenta, de manera que el disolvente empleado para la reacción debe estar rigurosamente seco. Se intentó llevar a cabo la purificación del receptor mediante cristalización, pero dado que no se consiguió la obtención de cristales de buena calidad, ya que sólo obtuvimos precipitados de distinto tamaño de partícula, se decidió realizar dicha purificación mediante cromatografía en columna.

3.3 Estudios de asociación con el receptor **1**

Para llevar a cabo el estudio de asociación con nuestro receptor, elegimos distintos dinitrobenzoil derivados de aminoácidos como huéspedes porque la experiencia obtenida en estudios previos del Grupo de Investigación con otros receptores semejantes nos dice que los grupos dinitrobenzoilo presentes en estos huéspedes proporcionan puntos adicionales de anclaje con el receptor, tal como ya se ha descrito previamente, lo cual facilita que los asociados formados sean más estables y que exista, por tanto, mayor diferencia entre ambos asociados diastereoméricos, observándose, en consecuencia, una mayor diferencia entre las constantes de asociación de cada uno de los enantiómeros del receptor con el correspondiente huésped quiral.

Para ello, realizaremos una valoración en la que ambos enantiómeros de nuestro compuesto competirán por asociarse con dinitrobenzoil derivados de alanina, fenilalanina, leucina y prolina. El cambio de color hacia tonalidades anaranjadas (que hacen que la muestra, inicialmente de color verdoso, adquiera un color parduzco) a medida que añadimos el dinitrobenzoil derivado correspondiente (Figura 9) nos indica la formación del compuesto de asociación, debido a la interacción por transferencia de carga que tiene lugar entre los anillos aromáticos del dinitrobenzoílo del aminoácido (pobre en electrones) y del dimetilamino del receptor (rico en electrones).

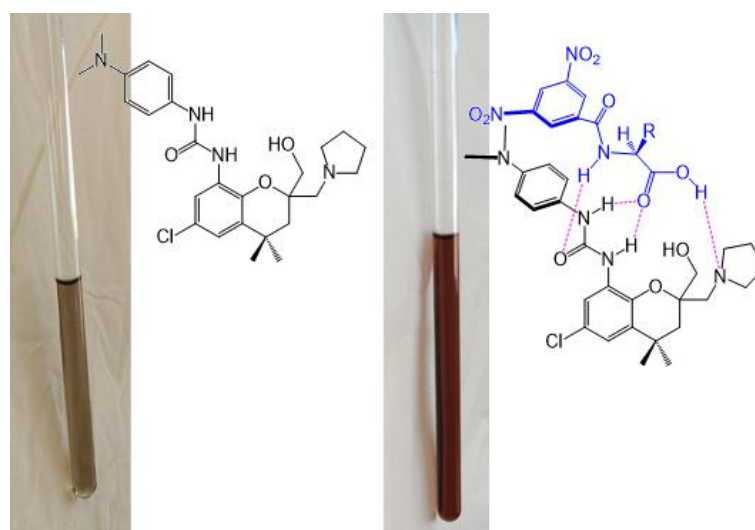


Figura 9. Variación del color de la disolución del receptor (izquierda) al formarse los asociados con los dinitrobenzoil derivados de aminoácidos estudiados (derecha).

Al analizar los espectros de RMN ¹H de las mezclas del receptor con los diferentes derivados, observamos un desdoblamiento de las señales del receptor debido a la formación de los complejos diastereoméricos (Figura 10). Esto es así porque la formación del asociado provoca una variación en el desplazamiento químico de los protones del receptor, de tal forma que se observan señales desdobladas en el espectro, estando relacionado el grado del desdoblamiento con la mayor o menor influencia del huésped con el protón que ocasiona dicha señal. Y cada una de las señales desdobladas comprenderá la señal asociada al tipo de hidrógeno en el receptor libre y la señal asociada al mismo tipo de hidrógeno en el asociado con el huésped.

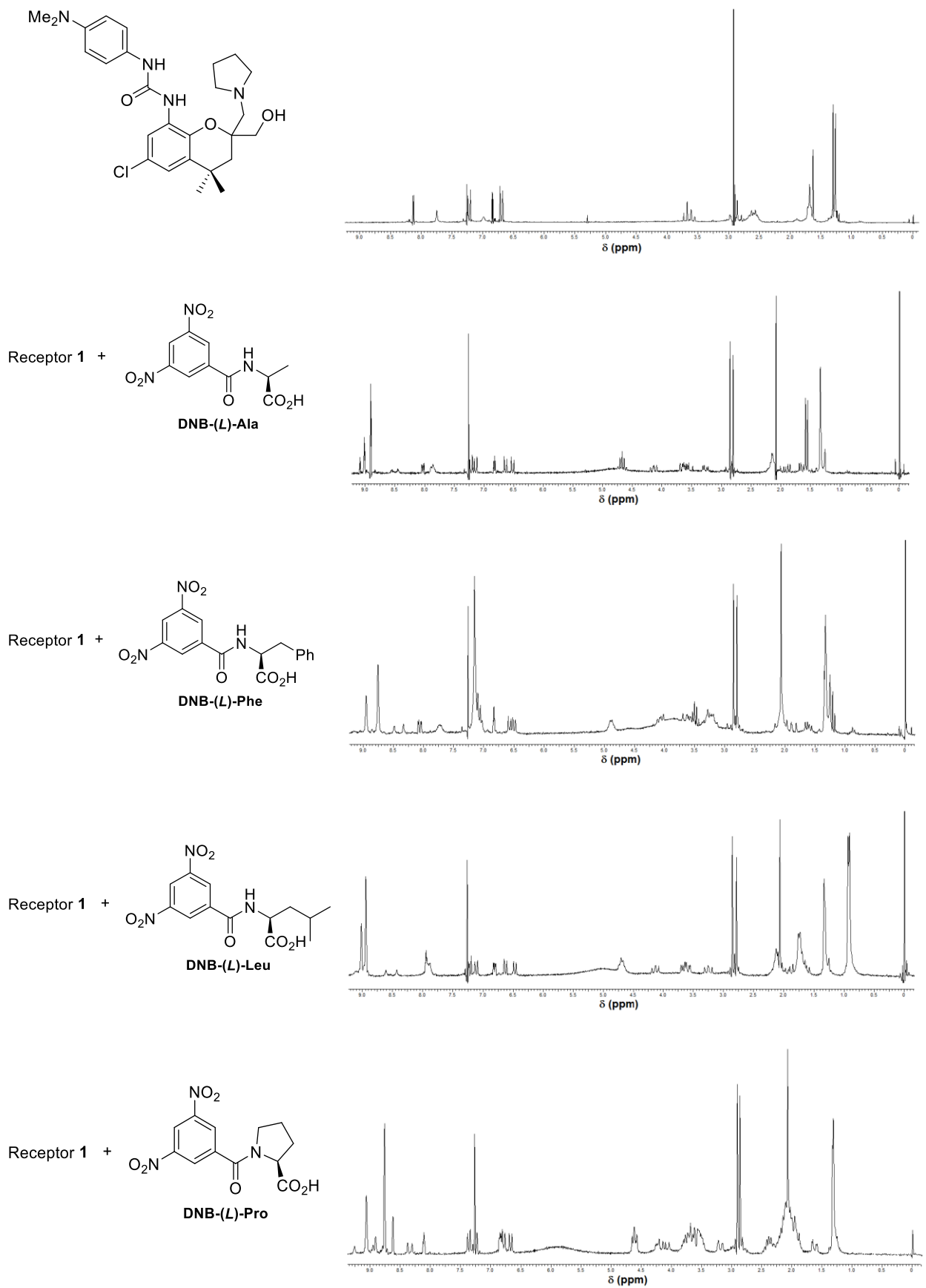


Figura 10. Comparativa de los espectros de RMN ^1H del receptor 1 y sus asociados con los diferentes dinitrobenzoil derivados de aminoácidos estudiados.

Observaremos un mayor desdoblamiento de las señales cuanto mayor sea la relación de constantes de asociación de cada enantiómero del receptor con el huésped. Posteriormente, la representación del desplazamiento químico de alguna de las señales de cada pareja de asociados diastereoméricos, a medida que aumentamos la cantidad del dinitrobenzoil derivado, nos permite calcular los valores de la relación de constantes de asociación para cada caso, tras el ajuste no lineal con un programa informático basado en un algoritmo de Monte Carlo (Figuras 11-14).²¹

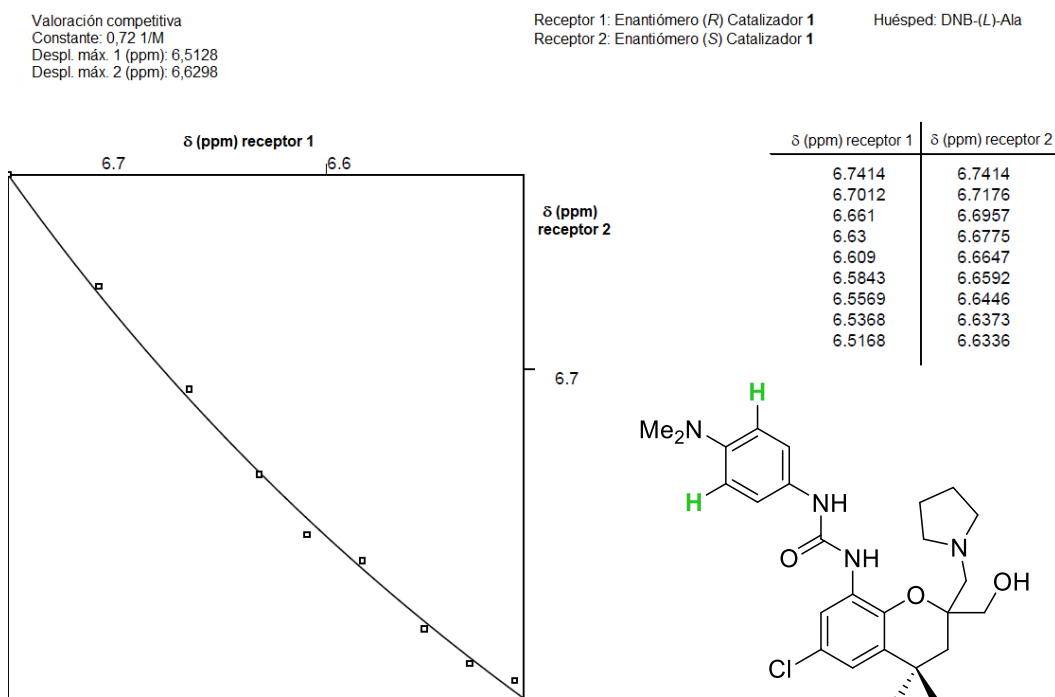


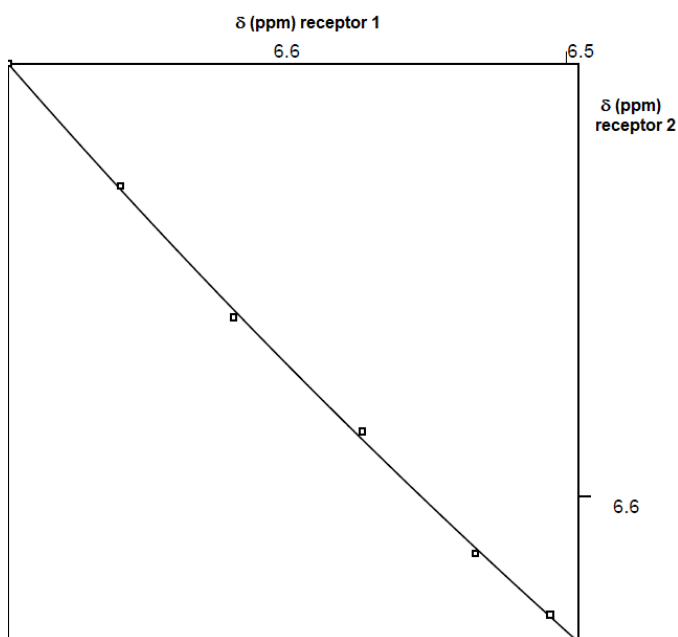
Figura 11. Representación gráfica de la variación de los desplazamientos químicos de los hidrógenos aromáticos indicados correspondiente a la valoración competitiva entre los enantiómeros del receptor 1 y la DNB-(L)-alanina.

²¹ (a) Lackman, M. L.; Sternell, S. en *Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*, Pergamon Press, London, **1969**. (b) Connors, K. A. en *Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley-Interscience, New York, **1987**. (c) Clare, J. P.; Ayling, A. J.; Joos, J.-B.; Sisson, A. L.; Magro, G.; Pérez-Payán, M. N.; Lambert, T. N.; Shukla, R.; Smith, B. D.; Davis, A. P. "Substrate Discrimination by Cholapod Anion Receptors: Geometric Effects and the 'Affinity-Selectivity Principle'" *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10739-10746.

Valoración competitiva
 Constante: 0,88 1/M
 Despl. máx. 1 (ppm): 6,4961
 Despl. máx. 2 (ppm): 6,5694

Receptor 1: Enantiómero (R) Catalizador 1
 Receptor 2: Enantiómero (S) Catalizador 1

Huésped: DNB-(L)-Phe



δ (ppm) receptor 1	δ (ppm) receptor 2
6.6902	6.6902
6.6519	6.6647
6.6135	6.6373
6.5697	6.6135
6.5314	6.588
6.5058	6.5752

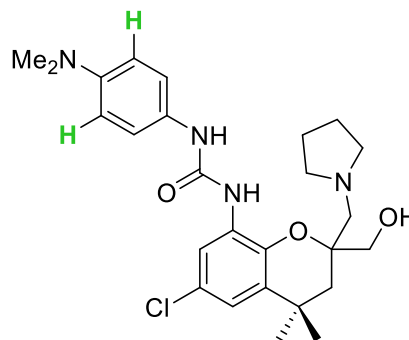
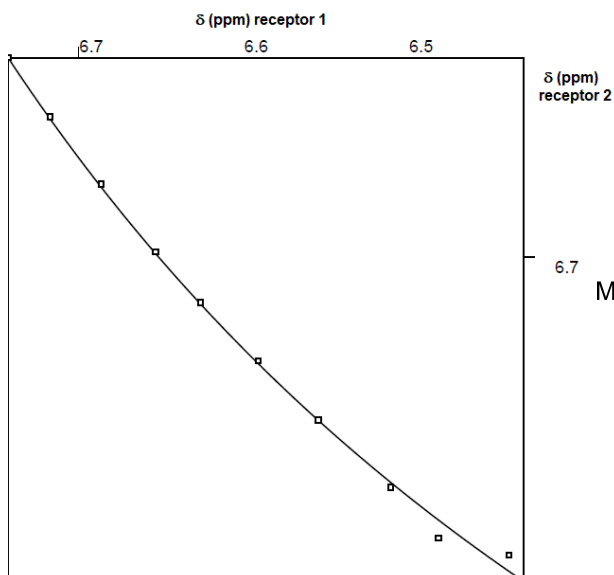


Figura 12. Representación gráfica de la variación de los desplazamientos químicos de los hidrógenos aromáticos indicados correspondiente a la valoración competitiva entre los enantiómeros del receptor 1 y la DNB-(L)-fenilalanina.

Valoración competitiva
 Constante: 0,67 1/M
 Despl. máx. 1 (ppm): 6,4303
 Despl. máx. 2 (ppm): 6,6297

Receptor 1: Enantiómero (R) Catalizador 1
 Receptor 2: Enantiómero (S) Catalizador 1

Huésped: DNB-(L)-Leu



δ (ppm) receptor 1	δ (ppm) receptor 2
6.7432	6.7432
6.7176	6.7304
6.6866	6.7158
6.6537	6.7012
6.6263	6.6902
6.5916	6.6775
6.5551	6.6647
6.5113	6.6501
6.4821	6.6391
6.4393	6.6355

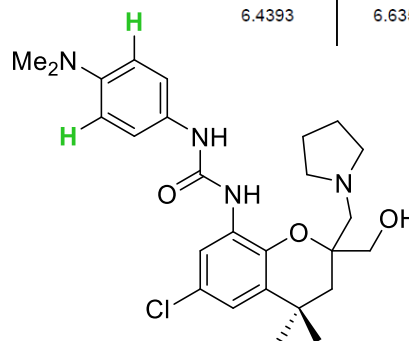


Figura 13. Representación gráfica de la variación de los desplazamientos químicos de los hidrógenos aromáticos indicados correspondiente a la valoración competitiva entre los enantiómeros del receptor 1 y la DNB-(L)-leucina.

Valoración competitiva
Constante: 11 1/M
Despl. máx. 1 (ppm): 6,6515
Despl. máx. 2 (ppm): 6,7415

Receptor 1: Enantiómero (R) Catalizador 1
Receptor 2: Enantiómero (S) Catalizador 1

Huésped: DNB-(L)-Pro

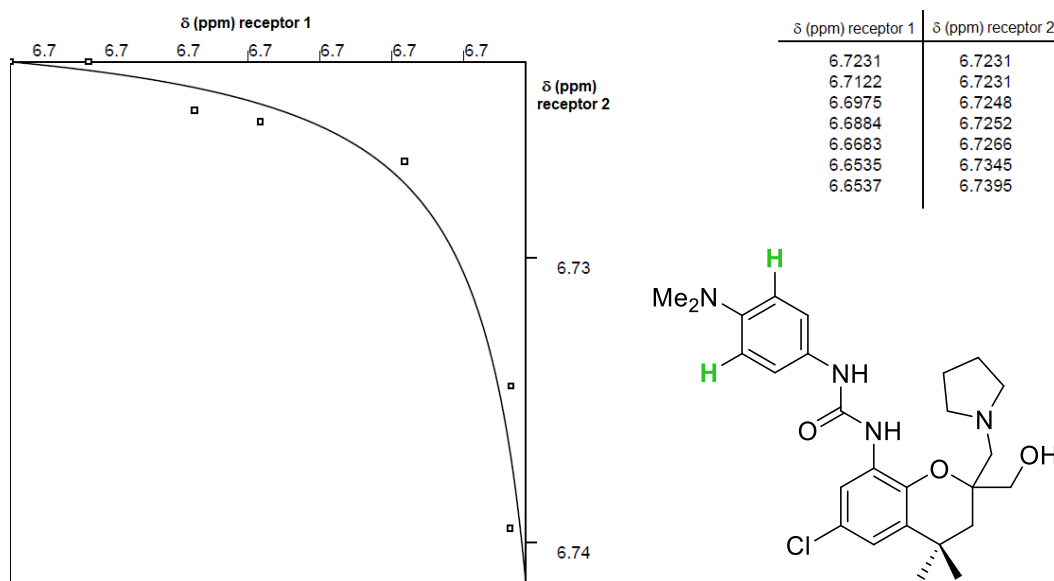


Figura 14. Representación gráfica de la variación de los desplazamientos químicos de los hidrógenos aromáticos indicados correspondiente a la valoración competitiva entre los enantiómeros del receptor 1 y la DNB-(L)-prolina.

Para describir lo que ocurre en cada caso, nos fijaremos en la señal de los hidrógenos aromáticos próximos al grupo dimetilamino de nuestro receptor, que es el doblete que sale alrededor de las 6,7 ppm, dado que es la señal elegida para la representación gráfica debido a que es la que experimenta un mayor movimiento. Como podemos observar en los espectros RMN ¹H obtenidos (Figura 10), el desdoblamiento que se produce en la señal (generando lo que parece un doblete, pero que son realmente dos dobletes) para los tres primeros casos no es demasiado grande, lo que indicaría la formación de asociados con geometrías y energías similares. Esto es debido a que las interacciones que se establecen entre el huésped y cada uno de los enantiómeros del receptor en esos casos son similares. Entonces, podemos deducir que los dinitrobenzoil derivados de la alanina, la fenilalanina y la leucina no presentan prácticamente preferencia de asociación por ninguno de los enantiómeros de nuestro receptor, como queda claro al observar que en esos tres casos la relación entre las constantes de asociación del huésped quiral con los dos enantiómeros del receptor está próxima a la unidad.

En el caso del dinitrobenzoil derivado de la prolina, al observar el espectro RMN ¹H, vemos que la señal correspondiente a estos hidrógenos se desdobra bastante más. La diferencia observada con respecto a los otros derivados quirales se debe, por un lado, a que el grupo amino de la prolina está desprovisto de protones y, por lo tanto, no se pueden establecer interacciones por puentes de

hidrógeno en esta región que estabilicen el asociado. A esto se le añade que la cadena lateral del aminoácido forma un ciclo, el cual le confiere cierta rigidez al compuesto e introduce cierto impedimento estérico, que puede tener más influencia en uno de los dos asociados diastereoméricos que en el otro, generando la mayor diferencia entre las dos constantes de asociación. Es por ello que, en este caso, se observa una relación de constantes de asociación 10 veces superior a la obtenida con los otros dinitrobenzoil derivados estudiados.

A continuación, se presenta una tabla resumen con los valores de la relación de constantes de asociación para cada uno de los huéspedes estudiados.

Tabla 1. Relación de las constantes de asociación de ambos enantiómeros del receptor 1 con cada uno de los dinitrobenzoil derivados de aminoácidos estudiados.

Huésped	K_{rel}
DNB-(L)-Ala	1,39
DNB-(L)-Phe	1,14
DNB-(L)-Leu	1,49
DNB-(L)-Pro	11

Esta constante relativa indicada en la Tabla 2 no es más que la relación de constantes de asociación del correspondiente huésped quiral con cada uno de los dos enantiómeros del receptor, y para su cálculo, tomamos como referencia, en todos los casos, la señal de los hidrógenos aromáticos próximos al grupo dimetilamino de nuestro receptor, ya que tal como comentamos anteriormente, es la señal elegida para la representación gráfica debido a que es la que experimenta un mayor movimiento. Este valor será el cociente de las constantes de asociación de cada uno de los enantiómeros del receptor con el huésped quiral, por lo que, cuanto mayor sea la constante relativa, mayor será la asociación del huésped con uno de los enantiómeros del receptor respecto al otro.

Tal como se ha comentado previamente en la discusión de los resultados de desdoblamiento de señales observados en los espectros de RMN ¹H obtenidos en las valoraciones llevadas a cabo con cada uno de los huéspedes quirales, los valores obtenidos para la constante relativa con cada uno de ellos son totalmente compatibles y concordantes con los espectros observados.

A la vista de estos resultados, podríamos concluir que nuestro receptor podría ser utilizado en la resolución de mezclas racémicas de prolina o derivados, pero no sería adecuado para otros aminoácidos, ya que las relaciones de constantes observadas son demasiado bajas. No obstante, no

llevados a cabo en el grupo de trabajo con receptores similares nos indica que los asociados obtenidos con este huésped son adecuados para nuestro objetivo y porque, según acabamos de observar en el estudio de asociación realizado con el receptor, la utilización de derivados de aminoácidos como huéspedes implica la formación de complejos diastereoméricos con geometrías más o menos bien definidas, como queda patente por los desdoblamientos de las señales del receptor observados en los espectros de RMN ^1H de los asociados. De esta forma, podríamos llegar a separar esos complejos diastereoméricos por cristalización con el huésped adecuado en el que esté favorecida la cristalización única o preferente de uno de los asociados. Y la experiencia previa nos dice que el huésped elegido puede ser el adecuado.

Además, contamos con la ventaja de que esa experiencia previa de nuestro Grupo de Investigación en la resolución de mezclas racémicas de receptores similares mediante este método, nos ha permitido optimizar las condiciones experimentales más favorables para que el proceso tenga éxito, que son el empleo de medio equivalente del huésped para que esté favorecida la formación del complejo diastereomérico más estable y la utilización de cloruro de metileno como disolvente y dietil éter como agente de difusión cuando se emplea como huésped el derivado de la fenilalanina elegido.

La formación de complejos diastereoméricos entre nuestro receptor y la urea de la fenilalanina queda demostrada al comparar entre sí los espectros del receptor y los asociados y observar la aparición de desdoblamientos en prácticamente todas las señales del receptor (Figura 16).

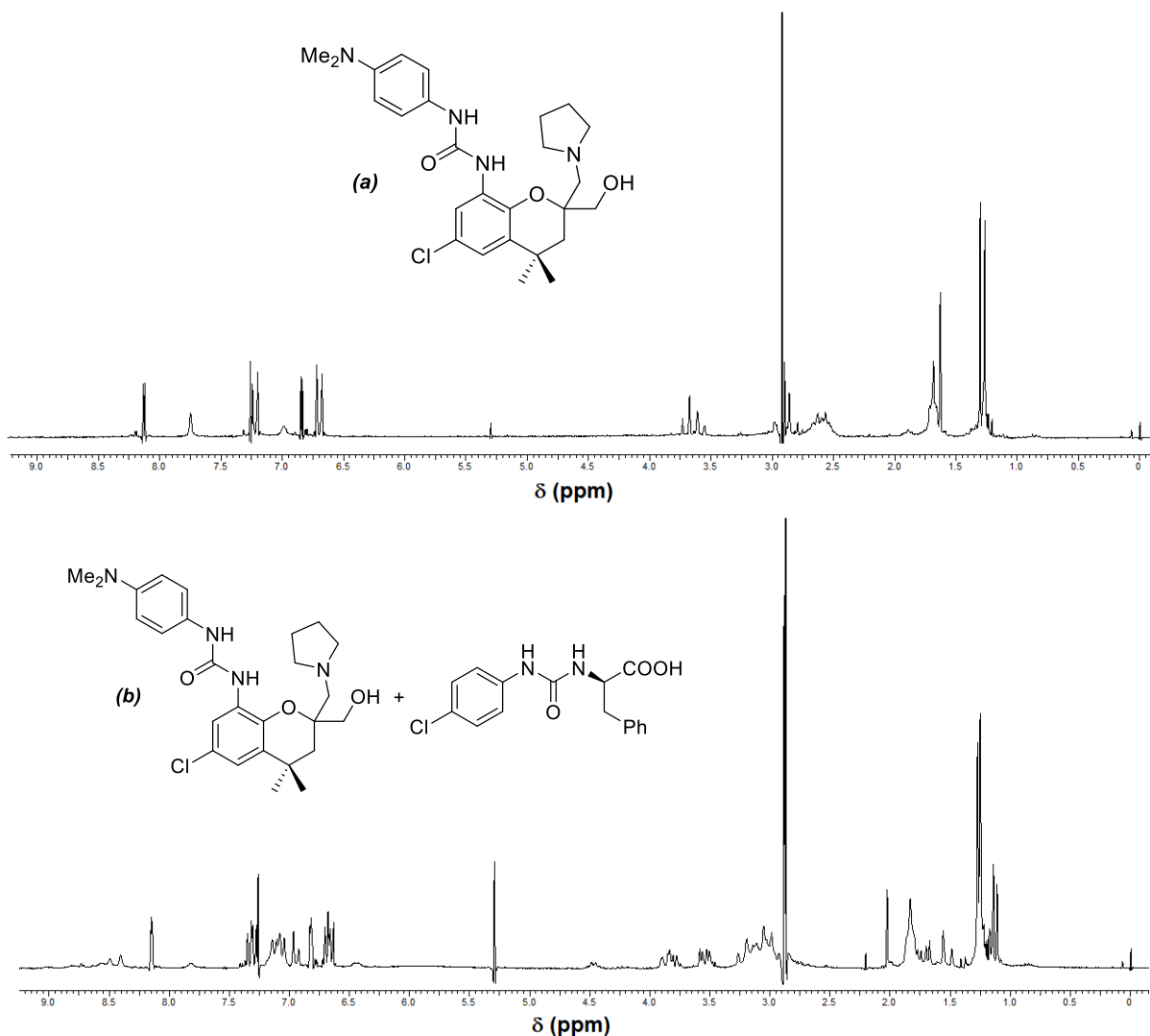


Figura 16. Comparativa de los espectros de RMN ¹H del receptor 1 (a) y de su asociado con la p-clorofenilurea de la (L)-fenilalanina (b).

Así pues, para llevar a cabo la prueba de cristalización, disolvimos 50 mg del receptor en DCM y añadimos 0,5 equivalentes de la urea de la (L)-fenilalanina. Una vez disuelto, colocamos la disolución, dotada de un agitador magnético, dentro de un recipiente cerrado con éter, de modo que, a medida que éste se vaya incorporando a la mezcla por difusión, se produzca la cristalización (Figura 17). Posteriormente, una vez que damos por terminado el proceso de cristalización, deberemos lavar tanto las aguas de cristalización como el compuesto cristalizado con una base para romper el asociado formado entre cada uno de los enantiómeros del receptor y el derivado de aminoácido y así aislar dichos enantiómeros.



Figura 17. Montaje experimental utilizado para la resolución de la mezcla racémica del receptor 1 por cristalización con la *p*-clorofenilurea de la (*L*)-fenilalanina.

Antes de la ruptura del asociado, realizamos el espectro RMN ^1H del compuesto que cristalizó y, al no observar desdoblamiento en ninguna de las señales, concluimos que únicamente había cristalizado el asociado del derivado del aminoácido con uno de los enantiómeros del receptor. Con este procedimiento, tras la ruptura del asociado según se ha indicado previamente, habremos conseguido, por tanto, uno de los enantiómeros del receptor de forma pura. De forma ideal, las aguas de cristalización contendrían el asociado formado entre el derivado del aminoácido y el otro enantiómero del receptor. Sin embargo, en nuestro caso, aunque dichas aguas estaban enriquecidas en el asociado formado por el enantiómero del receptor que no cristaliza, no se encontraba dicho asociado de forma pura sino mezclado con una pequeña proporción del asociado que cristaliza, por lo que solo pudo aislarse de forma pura uno de los enantiómeros del receptor.

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{a}{l \cdot c} \cdot 100 \qquad [\alpha]_{\lambda}^t = \frac{-0,041}{0,1} \cdot 100 = -41$$

Figura 18. Fórmula empleada para el cálculo del valor de poder rotatorio a partir de la medida experimental realizada (a), donde l es la longitud de la cubeta empleada (1 dm) y c representa la concentración de la disolución (en g/100 mL). La medida se llevó a cabo a temperatura ambiente ($t = 20^{\circ}\text{C}$) y utilizando la línea D del sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$).

Procedimos a continuación a realizar la medida del poder rotatorio para el enantiómero del receptor aislado de forma pura a partir del asociado que cristaliza. Para ello, teniendo en cuenta la intensa coloración verdosa que presenta la disolución de dicho compuesto, nos vimos obligados a emplear en la medida una disolución de concentración baja (0,1 g/100 mL), para minimizar la interferencia de la coloración del receptor en la medida. Observando el resultado obtenido en la medida, vemos que el enantiómero del receptor aislado de forma pura es el levógiro.

3.5 Estudio de catálisis con el receptor 1: Reacción de acilación

Tal como venimos describiendo a lo largo del trabajo, el objetivo principal del receptor preparado es que pueda servir como catalizador para el proceso industrial de obtención de biodiésel, para lo cual, deberá ser capaz de catalizar eficientemente, de forma lo más parecida posible a las enzimas naturales, los procesos de acilación y desacilación o metanólisis.

Según hemos indicado previamente, la idea sería poder emplear aceites de bajo coste como materia prima en el proceso de producción de biodiesel, pero como el estudio que vamos a llevar a cabo con nuestro receptor no es más que una fase preliminar, no utilizaremos triglicéridos como materiales de partida, sino que elegimos el anhídrido acético como agente acilante por ser una molécula más sencilla y reactiva.

Por otra parte, hay que tener también en cuenta que para facilitar el seguimiento de la evolución de la reacción, se ha empleado un patrón interno de referencia, que es el alcohol bencílico, el cual se elige de acuerdo a las siguientes características que presenta: es un alcohol primario (como el alcohol de nuestro receptor), es un líquido no volátil (lo que permitirá la medida de su masa de forma sencilla y con gran precisión), el estado de transición de su reacción de acilación no puede estabilizarse mediante la formación de enlaces de hidrógeno y la señal de su grupo metileno geminal al oxígeno hidroxílico en el espectro de RMN ^1H no produce interferencias con ninguna de las señales de nuestro receptor.

El mecanismo de la reacción de acilación que proponemos para nuestro receptor se puede describir en una serie de etapas análogas a las descritas para la quimotripsina, tal como se muestra en la figura 19. Como podemos observar, se forma inicialmente un complejo intermedio tras el ataque nucleofílico del hidroxilo del receptor sobre el grupo carbonilo del agente acilante, el cual está favorecido gracias a que el agente acilante se encuentra asociado en la cavidad del receptor a través de la formación de enlaces de hidrógeno con los NHs de la función urea. La formación de este intermedio provoca que el oxígeno carbonílico del agente acilante adquiera carga negativa, la cual se estabilizará mediante esos enlaces de hidrógeno con los NHs de la urea y servirá, además, para que los enlaces de hidrógeno se fortalezcan. Posteriormente, se produce la transferencia del protón desde el hidroxilo nucleofílico del receptor hasta el oxígeno del agente acilante, pero no de forma directa sino a través de un intermedio en el cual el nitrógeno básico de la pirrolidina actúa como transportador de protón, ya que dicho protón es sustraído inicialmente por ese átomo de nitrógeno, que es quien lo cede a continuación al oxígeno del agente acilante. Finalmente, el intermedio

anterior evoluciona de forma exotérmica hasta la formación del acetato del receptor, el cual sería el equivalente al complejo acilo-enzima formado durante la etapa inicial de la reacción catalizada por la enzima natural quimotripsina.

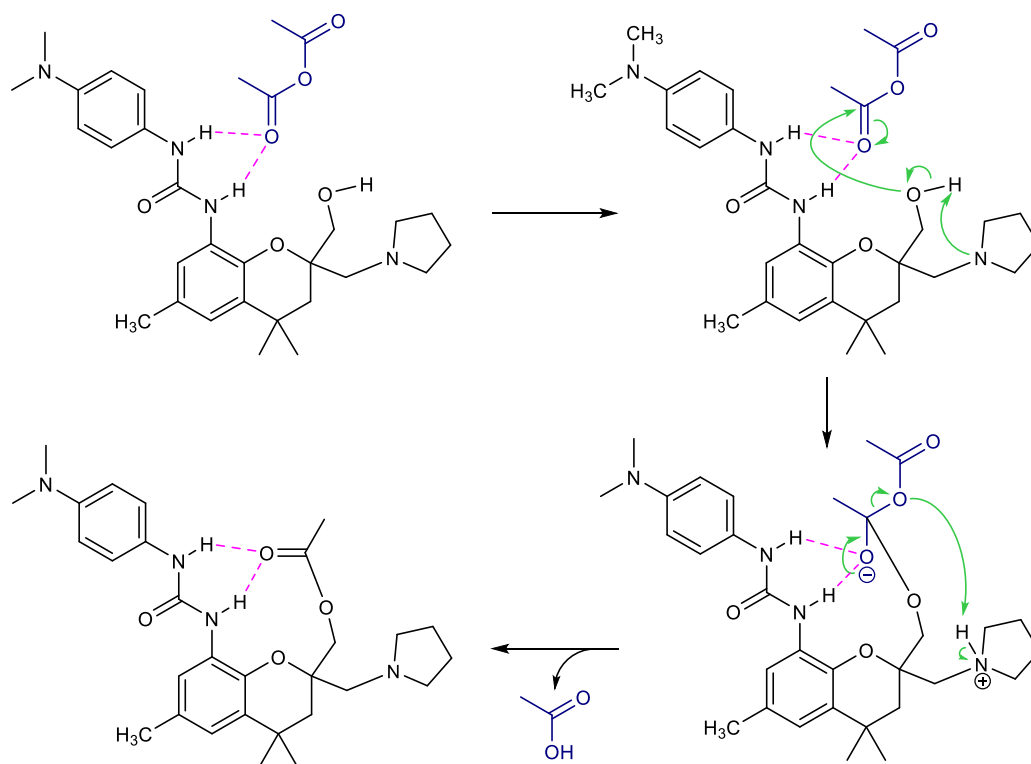


Figura 19. Mecanismo propuesto para la reacción de acilación del receptor 1.

Para llevar a cabo el estudio de la reacción de acilación, tratamos una disolución 10^{-2} M de nuestro receptor en cloroformo deuterado con una gota de anhídrido acético como agente acilante. Empleamos sólo una gota debido a que al realizar el estudio con una mayor cantidad de anhídrido acético observamos que la reacción se producía muy rápidamente y no nos daba tiempo a seguirla adecuadamente. No obstante, esta pequeña cantidad de anhídrido acético ya supone la utilización de un exceso de reactivo, lo cual es importante para facilitar el estudio, ya que implica la transformación del orden de la reacción de 2 a pseudo-1, haciendo que la velocidad de la misma ya solo dependa de la concentración del otro reactivo (nuestro receptor).

Utilizamos un equivalente de alcohol bencílico como referencia para el estudio y para seguir el avance de la reacción, registramos los espectros RMN ^1H a distintos tiempos. Es importante confirmar, antes de llevar a cabo el estudio, que nuestro receptor se encuentra en su forma neutra y no como clorhidrato, ya que, necesitamos que el par libre de electrones del nitrógeno básico de

la pirrolidina se encuentre libre para poder actuar como transportador del protón, tal como se ha descrito previamente (Figura 19).

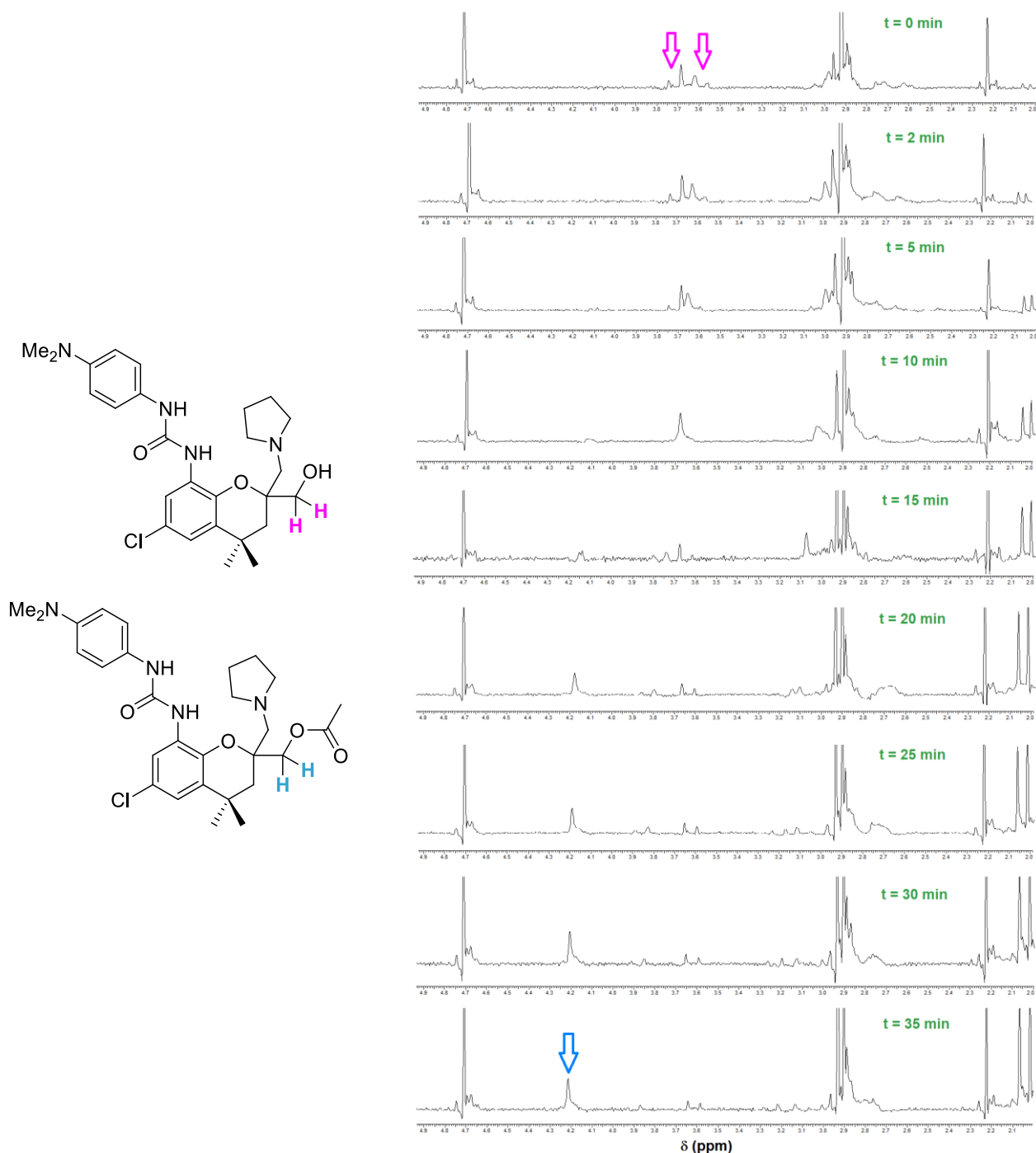


Figura 20. Evolución de la reacción de acetilación del receptor 1 con anhídrido acético.

Registramos inicialmente el espectro de la mezcla de reacción formada por la disolución del receptor y el alcohol bencílico en deuteriocloroformo para poder identificar las señales que vamos a seguir durante la reacción de acilación, que no son otras que las del grupo metileno geminal al oxígeno hidroxílico del receptor. Posteriormente, añadimos el exceso de anhídrido acético y vamos

registrando de nuevo el espectro a distintos tiempos de reacción, de tal forma que la integración de las señales del citado grupo metileno en el receptor y en su acetato nos permite seguir el avance de la reacción (Figura 20).

Mediante la integración de estas señales que aparecen en el espectro, somos capaces de calcular las concentraciones de nuestro catalizador y de su acetato a medida que transcurre la reacción, observando que a los 35 minutos se alcanza prácticamente la conversión completa (Figura 20). En estas condiciones, realizamos el cálculo del tiempo de vida media del receptor y obtenemos un valor de 18 minutos. Este valor es bastante bueno, aunque ya se habían obtenido previamente valores similares o incluso inferiores en el Grupo de Investigación.

3.6 Estudio de catálisis con el receptor 1: Reacción de desacilación

Como hemos visto, para poder utilizar nuestro receptor como catalizador, no basta únicamente con estudiar el proceso de acilación, sino que es necesario también que el receptor acetilado pueda transferir el grupo acetato a otro alcohol. Por ello, llevamos a cabo el estudio de la reacción de desacilación, con la esperanza de obtener resultados prometedores con este nuevo receptor, ya que los propuestos en trabajos anteriores por este Grupo de Investigación presentaron tiempos de vida media muy elevados para esta reacción.

Al igual que en el proceso de acilación, podemos proponer un mecanismo de reacción para el proceso de desacilación de nuestro receptor (Figura 21), que es similar al mecanismo de ruptura del intermedio acilo–enzima en las reacciones de hidrólisis catalizadas por la quimotripsina. Según podemos observar, se produce en primer lugar el ataque nucleofílico del alcohol que va a recibir el grupo acetato sobre el grupo carbonilo del acetato de nuestro receptor, lo que da lugar a la formación de un intermedio tetraédrico con el oxígeno carbonílico cargado negativamente. Esta carga negativa se encuentra estabilizada a través de la formación de enlaces de hidrogeno con los NHs de la urea del receptor, los cuales son especialmente fuertes precisamente por la presencia de la carga. A continuación, se transfiere el protón desde el hidroxilo nucleofílico del alcohol hasta el nitrógeno básico de la pirrolidina y se regenera la estructura carbonílica, de manera que, por un lado, se rompe el complejo acilo–receptor y se desprende el acetato del nuevo alcohol y, por otra parte, tiene lugar un equilibrio ácido–base en el que hay una transferencia de protón desde el nitrógeno protonado de la pirrolidina al grupo alcoxilo del receptor para regenerarlo y cerrar el ciclo catalítico.

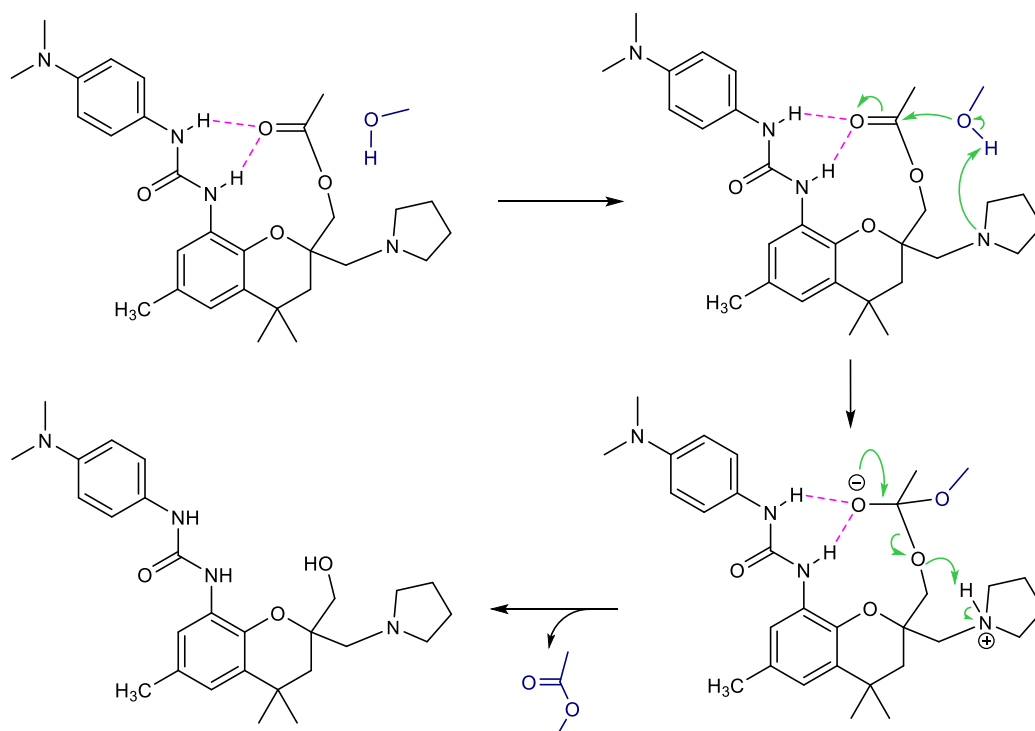


Figura 21. Mecanismo propuesto para la reacción de desacilación del receptor 1.

Para llevar a cabo el estudio de la reacción de desacilación, hicimos reaccionar una disolución 10^{-2} M del acetato de nuestro receptor con metanol deuterado directamente en un tubo de RMN para facilitar el estudio de la evolución del proceso. Al emplear el metanol como disolvente, tenemos un exceso del mismo y de nuevo podemos tratar la reacción como de pseudo primer orden en lugar de segundo orden, lo que simplifica mucho el análisis de los resultados.

Al igual que en el caso anterior, realizamos el seguimiento de la reacción mediante el registro de espectros RMN ^1H al inicio de la reacción y a distintos tiempos, y por integración de las señales del acetato del receptor y del receptor libre (Figura 22).

Observamos que, aunque sí se produce la transferencia del grupo acetato del receptor, ocurre de manera muy lenta, no alcanzándose una conversión muy avanzada hasta las 27 horas y 25 minutos, y obteniéndose un tiempo de vida media para el receptor acetilado de 16 horas. Estos resultados son algo mejores que los proporcionados por los catalizadores sintetizados con anterioridad, pero, aun así, el tiempo de vida media sigue siendo demasiado elevado como para poder considerar viable el uso de nuestro receptor como catalizador en el proceso industrial de producción de biodiesel.

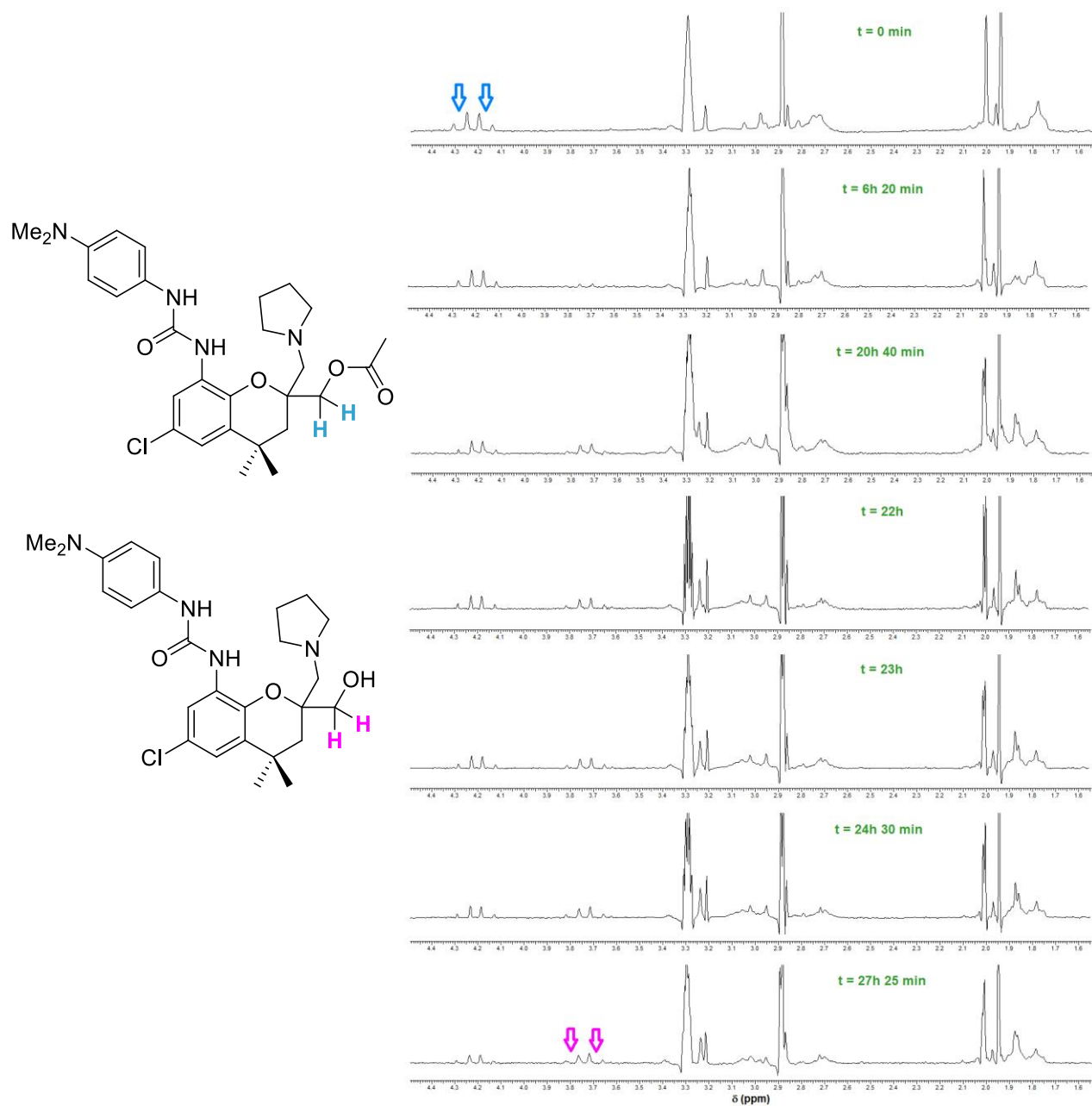


Figura 22. Estudio de la reacción de metanólisis del acetato del receptor 1.

4.- Conclusiones

Teniendo en cuenta los datos y los resultados expuestos en este trabajo, así como los resultados obtenidos previamente por el Grupo de Investigación, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. Para la imitación de la actividad catalítica de la enzima quimotripsina, es necesario que la molécula propuesta contenga en su estructura un grupo básico que simule el grupo imidazol de la histidina y un hidroxilo nucleófilo que simule el de la serina, además de un átomo de oxígeno capaz de formar un oxianión como el que forma el ácido aspártico en la enzima natural. También hemos observado que la presencia de grupos capaces de formar enlaces de hidrógeno que estabilicen el intermedio de reacción favorece la actividad catalítica.
2. Se ha diseñado un receptor con esqueleto de cromano funcionalizado para catalizar la transesterificación de triglicéridos mediante un mecanismo similar al mecanismo de acción de la quimotripsina.
3. Se ha llevado a cabo la síntesis del receptor **1**.
4. Se ha resuelto la mezcla racémica del receptor **1** mediante la cristalización preferente del asociado formado entre el receptor y un compuesto quiral, aunque únicamente se pudo aislar el enantiómero levógiro.
5. Se han llevado a cabo estudios de asociación del receptor **1** con una serie de derivados de aminoácidos, con el objetivo de poder emplear este receptor para la resolución de mezclas racémicas de aminoácidos, aunque únicamente se han obtenido resultados satisfactorios en el caso de la prolina.
6. Se ha realizado un estudio cinético de la reacción de acilación de receptor **1** con anhídrido acético como agente acilante, obteniéndose un tiempo de vida media para el receptor **1** de 18 minutos, que, aunque se traduce en una buena actividad catalítica, no mejora los resultados obtenidos previamente por el Grupo de Investigación.
7. De la misma manera, se ha estudiado la reacción de desacilación del receptor **1** en presencia de metanol deuterado (metanólisis del acetato del receptor), obteniéndose un tiempo de vida media para el acetato del receptor de 16 horas, lo que resulta demasiado elevado para emplear el receptor **1** en la práctica.

5.- Desarrollo Experimental

5.1 Técnicas instrumentales y cromatográficas

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se registraron en un espectrómetro *Bruker WP-200-SY* (200 MHz para ^1H) (Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas) y *Varian 200 Mercury VS 2000* (50 MHz para ^{13}C) y *Avance Neo con criosonda* (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C) (Servicio de Resonancia Magnética de la Universidad de Salamanca). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) empleando la señal del disolvente (CDCl_3 7,26 ppm) y del tetrametilsilano (TMS 0,0 ppm) como estándares internos. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz) y, para indicar las multiplicidades, se han empleado las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), dd (doblete de dobletes) y m (multiplete).

Los espectros de masas se realizaron en el Servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca, a cargo del Dr. D. César Raposo Funcia. Los espectros fueron registrados con espectrómetros cuadrupolo-tiempo de vuelo (TOF) *Applied Biosystems QSTAR XL* (dedicado a la identificación y elucidación estructural) y *Waters ZQ 4000* (dedicado a la identificación de compuestos de alto peso molecular y alta polaridad) empleando ionización por electrospray (ESI).

Los poderes rotatorios (α) se midieron en un polarímetro Perkin Elmer 341 con cubetas de 10 cm de paso óptico, usando la línea D del Na a una longitud de onda de 589 nm.

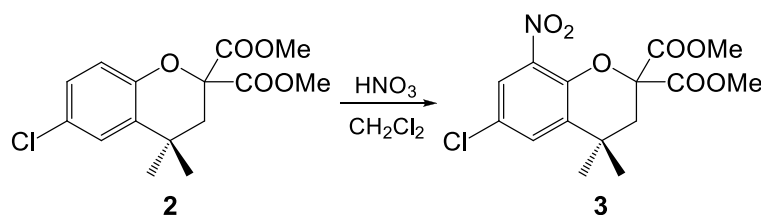
Los espectros de infrarrojo (IR) fueron realizados en forma de película, con una ventana de NaCl, y se registraron en un espectrofotómetro *Nicolet IR100*. Las bandas se expresan en cm^{-1} .

La cromatografía de capa fina (CCF) se realizó en placas de 0.2 mm de gel de sílice 60 F₂₅₄ soportado sobre aluminio (*Merck*), empleando una lámpara ultravioleta de 254 nm de longitud de onda para su revelado.

Para la cromatografía en columna, se empleó gel de sílice *Chromagel 60 A. C. C.* 70-200 μm como fase estacionaria.

5.2 Preparación y caracterización de los compuestos

6-Cloro-4,4-dimetil-8-nitrocroman-2,2-dimetilester (**3**)



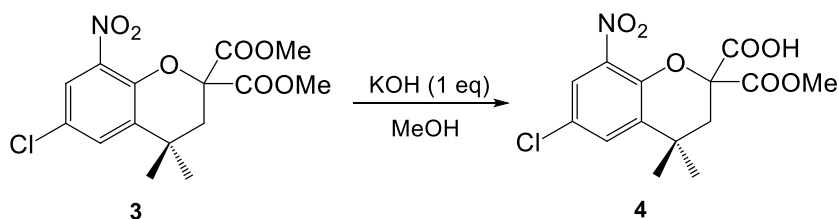
Sobre una suspensión del compuesto **3** (2,5 g; 8,0 mmol) en CH₂Cl₂ (4,8 mL), se añade HNO₃ (1,7 mL; 40,0 mmol) gota a gota en una vitrina de gases desde un embudo de adición. Acabada la adición, se observa por espectro de RMN ¹H de una alícuota tomada directamente del medio que la reacción ha finalizado, por lo que se vierte la mezcla de reacción sobre agua con hielo para enfriarla y se transfiere a un embudo de decantación, donde se decantan las fases y se extrae la fase acuosa con DCM (2 x 15 mL). La fase orgánica se seca a continuación sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se elimina el disolvente por destilación a presión reducida en el rotavapor, aislándose el producto **3** en forma de sólido amarillo (2,7 g; 93%).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,30 (6H, s); 2,52 (2H, s); 3,82 (6H, s); 7,41 (1H, d, *J* = 2,6 Hz); 7,68 (1H, d, *J* = 2,6 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 30,7 (2CH₃); 31,3 (C); 40,3 (CH₂); 53,9 (2CH₃); 81,1 (C); 123,7 (CH); 126,5 (C); 130,5 (CH); 136,0 (C); 144,0 (C); 152,5 (C); 167,5 (2C).

EMAR (ESI): 358,0690 (M+H)⁺; 380,0508 (M+Na)⁺; calculado para C₁₅H₁₆ClNO₇Na: 380,0507.

Ácido 6-cloro-2-metoxicarbonil-4,4-dimetil-8-nitrocroman-2-carboxílico (**4**)



Sobre una disolución del compuesto **3** (2,7 g; 7,5 mmol) en metanol (15,0 ml), se añade una disolución de hidróxido potásico (495 mg; 7,5 mmol) en metanol (13,0 ml) y la mezcla resultante se calienta durante 10 minutos a reflujo en un baño de silicona. A continuación, añadimos ácido

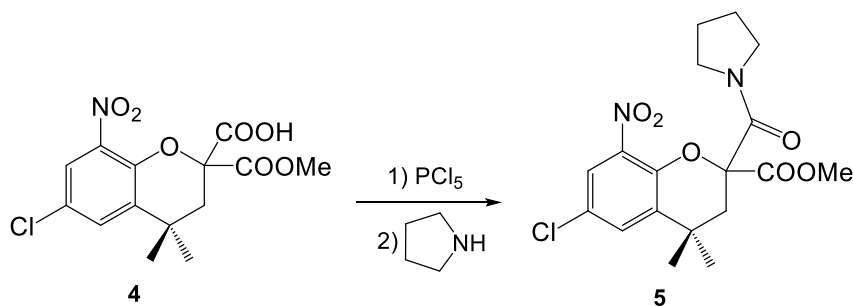
clorhídrico concentrado a la disolución hasta conseguir medio ácido, y eliminamos el metanol por destilación a presión reducida en el rotavapor. Extraemos la disolución obtenida con AcOEt (2 x 15 ml) y la fase orgánica resultante se extrae con una disolución acuosa de Na₂CO₃ al 4%, que transforma el ácido en su correspondiente sal soluble en agua y nos permite separarla del producto de partida que ha quedado sin reaccionar. La fase acuosa obtenida de esta extracción se acidula con ácido clorhídrico concentrado y se extrae de nuevo con AcOEt (2 x 10 ml). Finalmente, secamos la disolución orgánica así obtenida con sulfato de sodio anhidro, filtramos y evaporamos el disolvente por destilación a presión reducida, obteniendo 1,7 g (64%) del compuesto **4** en forma de sólido amarillento.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,28 (3H, s); 1,37 (3H, s); 2,42 (1H, d, *J* = 14,3 Hz); 2,73 (1H, d, *J* = 14,3 Hz); 3,85 (3H, s); 7,46 (1H, d, *J* = 2,7 Hz); 7,55 (1H, s ancho); 7,75 (1H, d, *J* = 2,7 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 30,0 (CH₃); 30,1 (CH₃); 31,3 (C); 39,9 (CH₂); 54,0 (CH₃); 81,0 (C); 123,7 (CH); 126,8 (C); 130,6 (CH); 136,0 (C); 139,6 (C); 143,3 (C); 166,6 (C); 170,2 (C).

EM (ESI): 344,05 (M + H)⁺; 366,03 (M + Na)⁺; calculado para C₁₄H₁₅ClNO₇: 344,05.

6-Cloro-4,4-dimetil-8-nitro-2-(pirrolidin-1-carbonil)croman-2-carboxilato de metilo (5)



Sobre una disolución del compuesto **4** (1,7 g; 4,8 mmol) en CH₂Cl₂ (9,0 ml) añadimos, en vitrina, PCl₅ (1,2 g; 5,9 mmol) en pequeñas porciones y con continua agitación hasta la completa disolución del reactivo y el cese del desprendimiento de gases. A continuación, eliminamos el CH₂Cl₂ y el POCl₃, que se forma como producto secundario, mediante destilación a presión reducida en el rotavapor. Suponemos que esta reacción es cuantitativa, es decir, que todo el reactivo se transforma en el cloruro de ácido correspondiente.

Seguidamente, disolvemos este cloruro de ácido (de color rojizo) en la mínima cantidad posible de CH₂Cl₂ y añadimos gota a gota y en vitrina, mediante un embudo de adición, un exceso

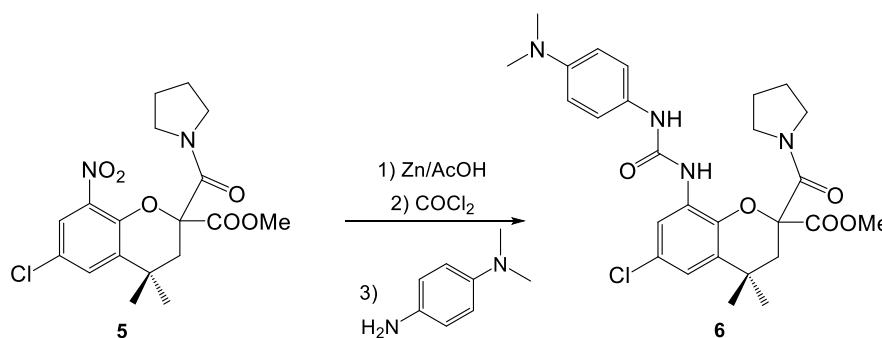
de pirrolidina (0,9 mL; 10,9 mmol), observando un fuerte calentamiento y un gran desprendimiento de gases. Una vez que la mezcla acaba de reaccionar y se enfría, añadimos una disolución acuosa de ácido clorhídrico 2M hasta conseguir un pH ácido para neutralizar el compuesto. Realizamos en ese momento dos extracciones consecutivas del producto con CH₂Cl₂ (10 ml) y, a continuación, una más con AcOEt (10 ml). Por último, añadimos sulfato de sodio anhidro para secar la disolución orgánica obtenida, la filtramos y eliminamos el disolvente mediante destilación a presión reducida en el rotavapor, obteniendo el compuesto **5** (1,7 g; 90%) en forma de sólido de color amarillo intenso, el cual puede purificarse por cristalización con mezclas de DCM/hexano.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,25 (3H, s); 1,36 (3H, s); 1,80-1,88 (4H, m); 2,41 (1H, d, *J* = 14,8 Hz); 2,77 (1H, d, *J* = 14,8 Hz); 3,16-3,25 (2H, m); 3,74-3,53 (2H, m); 3,74 (3H, s); 7,42 (1H, d, *J* = 2,7 Hz); 7,68 (1H, d, *J* = 2,7 Hz).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 23,2 (CH₂); 26,6 (CH₂); 30,0 (CH₃); 31,1 (C); 31,2 (CH₃); 41,0 (CH₂); 46,6 (CH₂); 47,9 (CH₂); 53,1 (CH₃); 81,7 (C); 123,3 (CH); 126,1 (C); 130,7 (CH); 136,4 (C); 139,8 (C); 144,3 (C); 162,8 (C); 169,4 (C).

EM (ESI): 397,15 (M + H)⁺; 419,09 (M + Na)⁺; calculado para C₁₈H₂₂ClN₂O₆: 397,11.

6-Cloro-8-(3-(4-dimetilaminofenil)ureido)-4,4-dimetil-2-(pirrolidin-1-carbonil)croman-2-carboxilato de metilo (6)



Comenzamos añadiendo el compuesto **5** (1,7 g; 4,3 mmol) poco a poco y con constante agitación, sobre una suspensión de Zn (2,1 g; 32,3 mmol) en ácido acético (7,0 ml). Una vez acabada la adición, comprobamos que ha reaccionado todo el producto mediante cromatografía de capa fina de una alícuota tomada del medio de reacción y trabajada sobre agua y extrayendo con acetato de etilo. Eliminamos entonces el Zn mediante filtración a vacío, lavándolo con acetato de etilo para

asegurarnos de recuperar todo el producto que pueda haber quedado adherido a éste. A continuación, se elimina el acetato de etilo y la mayoría del ácido acético por destilación a presión reducida en el rotavapor y la mezcla bruta resultante se vierte sobre agua para conseguir la precipitación del producto de reacción, que es un sólido de color amarillento que se recupera por filtración a vacío. Las aguas de filtración se extraen posteriormente con acetato de etilo (2 x 10 mL) para recuperar los posibles restos del producto sin cristalizar, obteniéndose en total entre las dos fracciones (sólido + extracto) 1,5 g (93%) de la amina intermedia deseada, la cual se emplea inmediatamente para la siguiente reacción.

Disolvemos esta amina obtenida (1,5 g; 4,0 mmol) en tolueno (33,0 ml) y enfriamos esta disolución a 0°C en un baño de hielo. Una vez fría, le añadimos una disolución de Na₂CO₃ (1,2 g; 10,9 mmol) en agua (6,7 ml) mientras mantenemos una agitación constante. Seguidamente, adicionamos sobre esta mezcla una disolución comercial de fosgeno al 20% en tolueno (4,1 ml; 6,3 mmol) y dejamos reaccionar durante un par de minutos. La disolución obtenida se decanta, y la fase orgánica se lava con agua (2 x 20 ml) y se seca con sulfato de sodio anhidro. A continuación, filtramos y eliminamos el disolvente mediante destilación a presión reducida, obteniendo el isocianato correspondiente en forma de aceite de color ámbar (1,44 g; 91%), que se hace reaccionar tal cual en el siguiente proceso.

Para el paso final de la reacción, sobre una disolución de este isocianato (1,44 g; 3,7 mmol) en DCM (4,0 mL), añadimos con agitación constante *p*-dimetilaminoanilina (500 mg; 3,7 mmol), previamente sublimada para su purificación. Una vez disuelta la amina aromática, eliminamos el disolvente por destilación a presión reducida. Para purificar la urea obtenida, realizamos una cromatografía en columna, empleando como fase móvil mezclas de CH₂Cl₂/AcOEt de polaridad creciente, lo que nos permitió obtener el compuesto **6** (1,4 g; 62%) en forma de sólido de color amarillento.

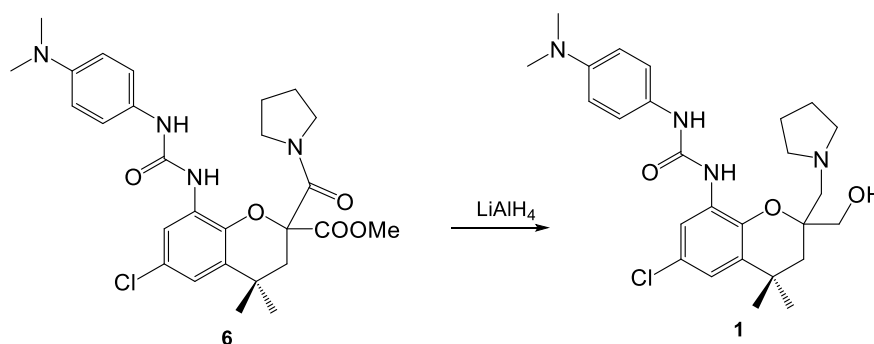
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,30 (3H, s); 1,33 (3H, s); 1,73-1,88 (4H, m); 2,77 (1H, d, *J* = 14,3 Hz); 2,82 (1H, d, *J* = 14,3 Hz); 2,98 (6H, s); 3,23-3,28 (1H, m); 3,41-3,62 (1H, m); 3,78 (3H, s); 6,75 (2H, d, *J* = 9,0 Hz); 6,96 (1H, s, d, *J* = 2,5 Hz); 7,18 (1H, s ancho); 7,27 (2H, d, *J* = 9,0 Hz); 7,59 (1H, s ancho); 8,15 (1H, d, *J* = 2,5 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 22,9 (CH₂); 26,8 (CH₂); 29,7 (CH₃); 30,1 (CH₃); 30,9 (C); 40,6 (2CH₃); 41,0 (C); 46,8 (CH₂); 48,2 (CH₂); 53,2 (CH₃); 82,5 (C); 113,1 (2CH); 115,6 (CH); 116,6 (CH); 125,1 (2CH); 126,3 (C); 127,0 (C); 128,9 (C); 133,4 (C); 139,2 (C); 148,5 (C); 154,1 (C); 164,5 (C); 169,7 (C).

IR (película) ν (cm⁻¹): 722,3; 832,9; 1214,1; 1446,2; 1529,1; 1667,2; 1750,1; 2877,3; 2949,1; 3335,9.

EM (ESI): 529,23 (M + H)⁺; calculado para C₂₇H₃₄ClN₄O₅: 529,21.

1-(6-Cloro-2-hidroximetil-4,4-dimetil-2-(pirrolidin-1-carbonil)croman-8-il)-3-(4-dimetilaminofenil)urea (1)



Sobre una suspensión de LiAlH₄ (262 mg; 6,8 mmol) en THF anhidro (6,8 ml), en la que hemos colocado un globo de argón para mantener una atmósfera inerte, vamos añadiendo poco a poco y mediante un embudo de adición, una disolución del compuesto **6** (1,2 g; 2,3 mmol) en THF anhidro (4,5 ml). Acabada la adición, se calienta a reflujo la mezcla durante 30 segundos con una pistola de aire caliente y a continuación, tras comprobar que la reacción ha finalizado mediante una cromatografía en capa fina de una alícuota tomada del medio de reacción y trabajada sobre agua y extrayendo con acetato de etilo, se enfría la mezcla y se añade agua muy poco a poco para formar el hidróxido de aluminio, que es un sólido blanco, y de esta forma poder eliminarlo mediante filtración a vacío. Este filtrado se extrae con AcOEt (3 x 10 ml), y las fases orgánicas resultantes se secan con sulfato de sodio anhidro y se filtran. Por último, para purificar el compuesto obtenido, realizamos una cromatografía en columna empleando como fase móvil disoluciones de CH₂Cl₂, AcOEt, MeOH y NH₃, de manera que su polaridad vaya en aumento. Tras la eliminación del disolvente mediante destilación a presión reducida, obtenemos nuestro receptor **1** en forma de sólido de color verdoso oscuro (960 mg; 87%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1,26 (3H, s); 1,31 (3H,s); 1,62 (2H, s ancho); 1,62-1,71 (4H, m); 2,49-2,59 (2H, m); 2,61-2,71 (2H, m); 2,84 (1H, d, *J* = 13,3 Hz); 2,97 (1H, dd, *J* = 1,2; 13,3 Hz); 2,84 (1H, dd, *J* = 1,6; 11,7 Hz); 3,73 (1H, d, *J* = 11,7 Hz); 6,71 (2H, d, *J* = 9,0 Hz); 6,84 (1H, d, *J* = 2,5 Hz); 7,12 (1H, s ancho); 7,24 (2H, d, *J* = 9,0 Hz); 7,81 (1H, s ancho); 8,15 (1H, d, *J* = 2,5 Hz).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 23,8 (2CH₂); 31,2 (C+CH₃); 32,0 (2CH₃); 40,9 (2CH₃); 43,3 (CH₂); 56,0 (2CH₂); 63,5 (CH₂); 69,9 (CH₂); 78,3 (C); 113,3 (2CH); 117,1 (CH); 118,5 (CH); 123,8 (2CH); 126,7 (C); 127,4 (C); 130,3 (C); 133,2 (C); 138,3 (C); 148,2 (C); 153,7 (C).

IR (película) ν (cm⁻¹): 733,1; 837,9; 1212,8; 1323,1; 1449,9; 1521,5; 1543,6; 1609,8; 2960,6; 3335,5.

EMAR (ESI): 487,2470 (M + H)⁺; calculado para C₂₇H₃₆ClN₄O₅: 487,2470.