



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LÍPIDOS PARA LA
FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS**

**Autora: Alicia Margarita Montero Csanady
Tutores: Héctor Barbero San Juan
Alberto Diez de la Varga
Año 2022/2023**

Contenido

ABREVIATURAS.....	4
1. RESUMEN	6
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1. Nanopartículas de lípidos para liberación de mRNA: Organización estructural 9	
3.1.1. Interacciones de las LNP's con el mRNA	10
3.1.2. Modelos de organización estructural de los complejos LNP's-mRNA... 10	
3.2. Liberación del mRNA por las nanopartículas lipídicas.....	11
3.3. Técnicas de preparación de LNP's.....	12
3.4. Complejos mRNA-LNP's en la vacuna contra el COVID-19.....	13
3.4.1. Estabilidad de los complejos mRNA-LNP's	13
3.5. Aplicaciones en inmunoterapia contra el cáncer	14
4. OBJETIVOS	15
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	16
5.1. Síntesis de 3-(benciloxi)-1,2-propanodiol.....	17
5.2. Síntesis de éteres alquílicos (4)	18
5.3. Síntesis de 2,3-bis(dodeciloxi)- <i>N,N</i> -dimetil-1-propanamina	21
5.3.1. Grupo saliente: bromuro.....	21
5.3.2. Grupo saliente: metanosulfonato.....	23
5.3.3. Síntesis de 2,3-bis(dodeciloxi)- <i>N,N</i> -dimetil-1-propanamina.....	23
5.4. Formación de nanopartículas lipídicas.....	25
6. CONCLUSIONES.....	28
7. PARTE EXPERIMENTAL	29
7.1 Metodología Sintética.....	29
7.2 Métodos de Purificación.....	29
7.3 Caracterización de Compuestos	29
7.3.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	29
7.3.2 Espectrometría de Masas.....	30
8. BIBLIOGRAFÍA.....	72
9. FIGURAS Y ESQUEMAS	74

ABREVIATURAS

DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
DODAP	1,2-dioleoil-3-dimetilamonio
DOTAP	1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano
DOTMA	1-(2,3-dioleoloxi)propil- <i>N,N,N</i> -trimetilamonio)
ESI	Ionización por Electrospray (<i>Electrospray Ionization</i>)
Et₂O	Éter
EtOAc	Acetato de etilo
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
LNP	Nanopartículas lipídicas (<i>Lipid nanoparticles</i>)
Pd/C	Paladio soportado sobre carbono
PEG	Polietilenglicol
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
TBAB	Bromuro de tetrabutilamonio
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
THF	Tetrahidrofurano
TOF	Tiempo de Vuelo (<i>Time Of Flight</i>)

Respecto a Resonancia Magnética Nuclear (RMN):

br	Señal ancha (<i>broad</i>)
COSY	COrrrelation SprectroscopY
DQF COSY	<i>Double Quantum Filtered COSY</i>
d	Doblete
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hercio
J	Constante de acoplamiento en RMN
m	Multiplete
ppm	Parte por millón
s	Singlete
t	Triplete

δ

Desplazamiento químico

sept

Septuplete

1. RESUMEN

En este Trabajo de Fin de Grado (TFG) se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de lípidos catiónicos para la posterior formación de nanopartículas lipídicas. Las nanopartículas lipídicas son sistemas moleculares capaces de encapsular el ácido ribonucleico y tienen una gran aplicación en el campo de la farmacología, empleándose en terapias contra el cáncer y la vacuna contra el COVID-19. A lo largo del TFG se ha diseñado y realizado la síntesis de estos lípidos, en los que su arquitectura está compuesta por diferentes cadenas alifáticas y distintas cabezas ionizables $\text{NH}_x\text{R}_{(3-x)}$. Se han elegido cadenas lineales con un número creciente de átomos de carbono (12, 14, 16 y 18 carbonos). Una vez finalizada la síntesis de los lípidos, se obtuvo el hidrocloreto, dado que es más estable. La parte final del proyecto en la que se preparan las nanopartículas lipídicas se realizó en colaboración con un grupo de investigación de la Universidad de País Vasco dirigido por el Dr. José Luis Pedraz (estudios preliminares).

En esta memoria, se comienza presentando las aplicaciones de estas moléculas y los sistemas que forman. Posteriormente, se plantean los objetivos del trabajo y se discute el proceso de síntesis de los ácidos grasos. A continuación, se detallan las conclusiones y en la parte final del trabajo se incluye la parte experimental en la que se refleja toda las etapas sintéticas y la caracterización de las especies.

2. ABSTRACT

The synthesis and characterization of cationic lipids has been carried out in this Final Degree Project for the subsequent formation of lipid nanoparticles. Lipid nanoparticles are molecular systems that encapsulate ribonucleic acid (RNA) and have a wide application in the field of pharmacology, such as various cancer therapies and the COVID-19 vaccine. Throughout this project, the synthesis of these lipids has been developed whose architecture is composed of different aliphatic chains and ionizable heads $\text{NH}_x\text{R}_{(3-x)}$. Linear chains have been chosen so that they possess an increasing number of carbon atoms (12, 14, 16 and 18 carbons). Once the lipid synthesis is finished, its corresponding hydrochloride is obtained given that it is more stable. The final stage of the study deals with the lipid nanoparticles preparation and has been carried out in collaboration with a research group from the University of the Basque Country led by Dr. José Luis Pedraz (preliminary studies).

In this dissertation, we begin by presenting the applications of these molecules and the systems they form. Subsequently, the aims of this project are stated and the process of synthesis of fatty acids is discussed. Then, the conclusions are detailed, and the final part of the project includes the experimental part in which all the synthetic stages and the characterization of the species are reflected.

3. INTRODUCCIÓN

Los ácidos desoxirribonucleico (DNA) y ribonucleico (RNA) son los principales tipos de ácidos nucleicos esenciales para la vida. La mayoría de las moléculas de RNA son cadenas compuestas por ribonucleótidos, que contienen un grupo fosfato, ribosa y una base nitrogenada que puede ser adenina, citosina, guanina o uracilo¹ Hay varios tipos de RNA, incluyendo el mRNA (mensajero) que traduce la información genética del DNA a proteínas. Por otro lado, también existen otras moléculas de RNA que no codifican dicha información genética, tales como rRNA (ribosómico), tRNA (de transferencia), microRNA o siRNA (*small interfering*). El siRNA, por ejemplo, inhibe la expresión genética en células de mamíferos e induce la degradación del mRNA complementario.

Gracias al riguroso estudio y comprensión de este tipo de moléculas a lo largo de la última década, el RNA ha resultado ser una potencial herramienta en el desarrollo de nuevos tratamientos contra diversas enfermedades. El mRNA se emplea en farmacología para transferir un mensaje genético a las células del paciente con el fin de prevenir una enfermedad. En comparación con otras biomoléculas, como los plásmidos de DNA o las proteínas recombinantes, el RNA presenta una serie de beneficios. Para empezar, el RNA es más seguro dado que se sintetiza en un sistema libre de células.² Además, el RNA no necesita penetrar en el núcleo de la célula dado que cumple su función en el compartimento citoplasmático. Finalmente, su producción es relativamente simple, rápida y económicamente viable dado que se sintetizan sin medios celulares y su preparación se puede realizar en condiciones estándares y controladas.³

Para incrementar el potencial terapéutico del RNA, las nanopartículas de lípidos son los sistemas de encapsulamiento líderes tanto en su liberación como su activación. En su ausencia, dicho RNA es susceptible a la hidrólisis y poco estable. Estos sistemas no son tóxicos y han demostrado un efecto antitumoral en estudios preclínicos y clínicos. Han sido utilizados en terapias contra el cáncer y vacunas, como la vacuna contra el COVID-19.⁴

Tras el éxito de la vacuna contra el COVID-19 basada en nanopartículas lipídicas, esta tecnología ha avanzado muy rápido. Un campo de estudio emergente es la síntesis de nuevos componentes lipídicos para la construcción de nanopartículas capaces de encapsular RNA, que puedan prolongar la actividad del RNA, mejorar la selectividad celular y potenciar la inmunogenicidad. ¹ Otro posible ámbito de estudio es la relación entre la estructura de los componentes lipídicos y las propiedades finales de la nanopartícula, para lo que es necesario disponer de diferentes lípidos.

3.1. Nanopartículas de lípidos para liberación de mRNA: Organización estructural

La encapsulación del mRNA es esencial para aprovechar al máximo su poder terapéutico, protegiéndolo de la degradación extracelular y promoviendo la captación celular de forma simultánea. Para llevar a cabo la encapsulación, protección y transfección del mRNA, los nanomateriales que contienen grupos amina son utilizados comúnmente como plataformas no virales. Por tanto, las formulaciones basadas en lípidos se encuentran entre las herramientas más desarrolladas para la liberación de mRNA.

Las primeras nanopartículas en desarrollarse fueron los lipoplexos: liposomas que contienen un lípido catiónico sintético capaz de interactuar electrostáticamente con las cargas negativas de los fosfatos de las cadenas del mRNA. Sin embargo, estas moléculas presentaban problemas tales como inestabilidad o poca eficiencia de transfección, por lo que se abandonó la investigación por esta vía. Posteriormente, se demostró que los lipoplexos con DOTMA (cloruro de [1-(2,3-dioleiloxi)propil-*N,N,N*-trimetilamonio] o DOTAP (1,2-dioleil-3-trimetilamonio-propano) entre los componentes de su formulación, eran capaces de proteger el mRNA de ribonucleasas extracelulares y liberar el mRNA en el interior celular (Figura 1).

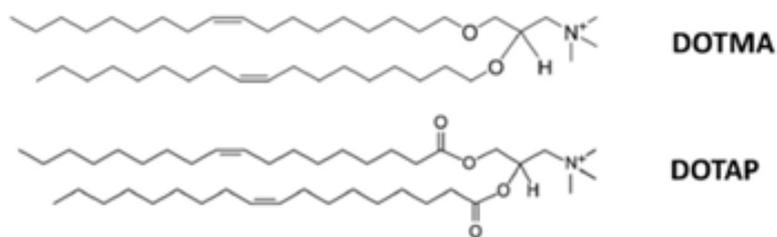


Figura 1. Estructuras de DOTAP y DOTMA.

Una formulación típica de nanopartículas lipídicas para encapsular el mRNA polianiónico (también denominadas LNP's (*lipidic nanoparticles*)) se compone, entre otros, de lípidos sensibles al pH o de lípidos catiónicos con aminas terciarias o cuaternarias. También contienen un fosfolípido neutro, colesterol y polietilenglicol (PEG). La superficie externa de las nanopartículas se compone de lípidos PEG, que están unidos a las cabezas lipídicas. Estos lípidos controlan el tamaño de la partícula y actúan como barrera estérica, por tanto, previenen de la agregación de las LNP's y mejora su estabilidad. Además, el peso molecular de los PEG, las cadenas alquílicas de los lípidos a los que van anclados y la densidad de los PEG en la superficie de la LNP pueden modular las propiedades de las LNP's y por tanto ejercer una gran influencia en la actividad del RNA.³

3.1.1. Interacciones de las LNP's con el mRNA

Los lípidos catiónicos son moléculas anfifílicas consistentes en la unión entre un grupo cargado positivamente y cadenas alquílicas hidrofóbicas, que en medios acuosos se organizan espontáneamente en distintos tipos de agregados (por ejemplo, micelas). Gracias a los grupos amino catiónicos, interactúan electrostáticamente con los grupos fosfato cargados negativamente de las moléculas de mRNA, permitiendo que se queden atrapadas en las nanopartículas.

Aparte de que los lípidos protegen al mRNA de su posible degradación y forman complejos con los ácidos nucleicos, poseen propiedades inmunogénicas debidas a la interacción con componentes inmunes (sirven como adyuvantes inmunes que mejoran la inmunogenicidad de las formulaciones). Esta actividad ha sido atribuida a la superficie cargada positivamente y su habilidad para interactuar y estabilizar antígenos por interacciones iónicas.⁵

3.1.2. Modelos de organización estructural de los complejos LNP's-mRNA

A diferencia de los liposomas, algunos estudios han demostrado que las LNP's presentan simultáneamente lípidos y agua en el núcleo.⁶ Dependiendo de la aplicación de las LNP's, la estructura y composición exactas pueden variar. Por ejemplo, para las formulaciones empleadas en las vacunas, la fracción de mRNA con respecto a la de lípidos es muy baja. Se han propuesto tres modelos para la estructura de los complejos mRNA-LNP's ⁶ (Figura 2).

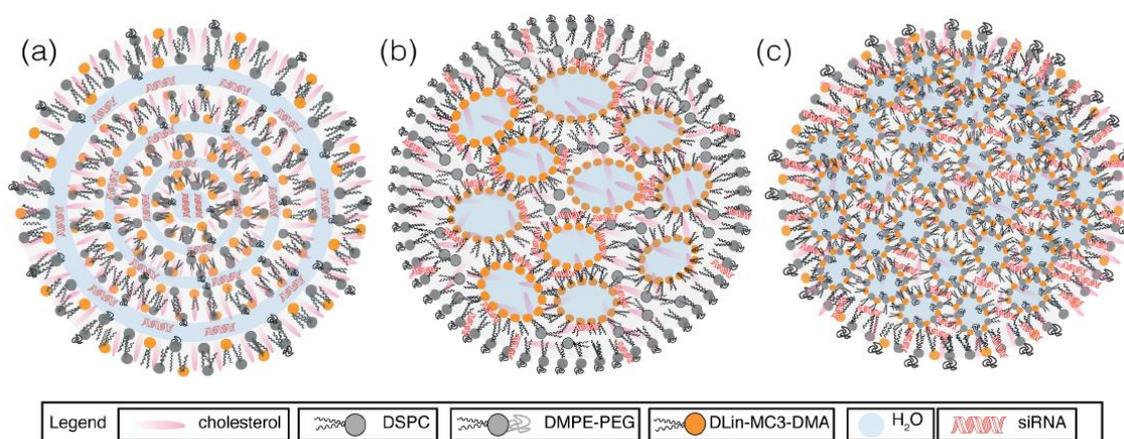


Figura 2. Representación esquemática de mRNA-LNP's y siRNA-LNP's.⁷

El primer modelo consiste en una vesícula multilamelar (Figura 2a). El complejo está formado por múltiples capas concéntricas de tal forma que la más externa está formada sólo por lípidos, y a continuación se van alternando capas que contienen el mRNA en medio acuoso y capas lipídicas.⁷

En la actualidad, las investigaciones se han decantado más por otros dos tipos de modelos, en los que las nanopartículas tienen una capa superficial y un núcleo amorfo. En uno de estos modelos (Figura 2b), el núcleo está nanoestructurado, presentando núcleos hidrofóbicos rodeados de capas de PEG. El núcleo se compone de lípidos catiónicos invertidos que se separan por poros de agua durante la síntesis de LNP's, junto con colesterol y otros lípidos ionizables dispersados homogéneamente.⁷

El otro modelo destacable, es un modelo con el núcleo homogéneo (Figura 1c), con todos los surfactantes dispersos homogéneamente en la partícula formando una capa fina y el interior compuesto de pequeñas micelas invertidas que forman "bolsillos" de agua. En este caso, el mRNA está disperso homogéneamente alrededor de la estructura.⁷

3.2. Liberación del mRNA por las nanopartículas lipídicas

En un entorno ácido, las LNP's catiónicas forman complejos estables con los ácidos nucleicos. Sin embargo, en condiciones neutras, las LNP's son neutras y por tanto interaccionan peor con los componentes del suero. Una vez que los complejos mRNA-LNP llegan a la membrana celular, los fosfolípidos catiónicos se fusionan con ella y la desestabilizan, promoviendo la entrada del complejo a la célula (Figura 3). Una vez en el interior de la célula, el complejo es almacenado por endosomas y como el ambiente de estos acidifica los lípidos ionizables, se permite la fusión con los lisosomas primarios de la membrana. La integridad de la LNP se ve alterada, liberándose el mRNA que directamente va a la síntesis de proteínas.⁸ Este mecanismo indica la necesidad de disponer de lípidos ionizables sensibles al pH, como por ejemplo aminolípidos.

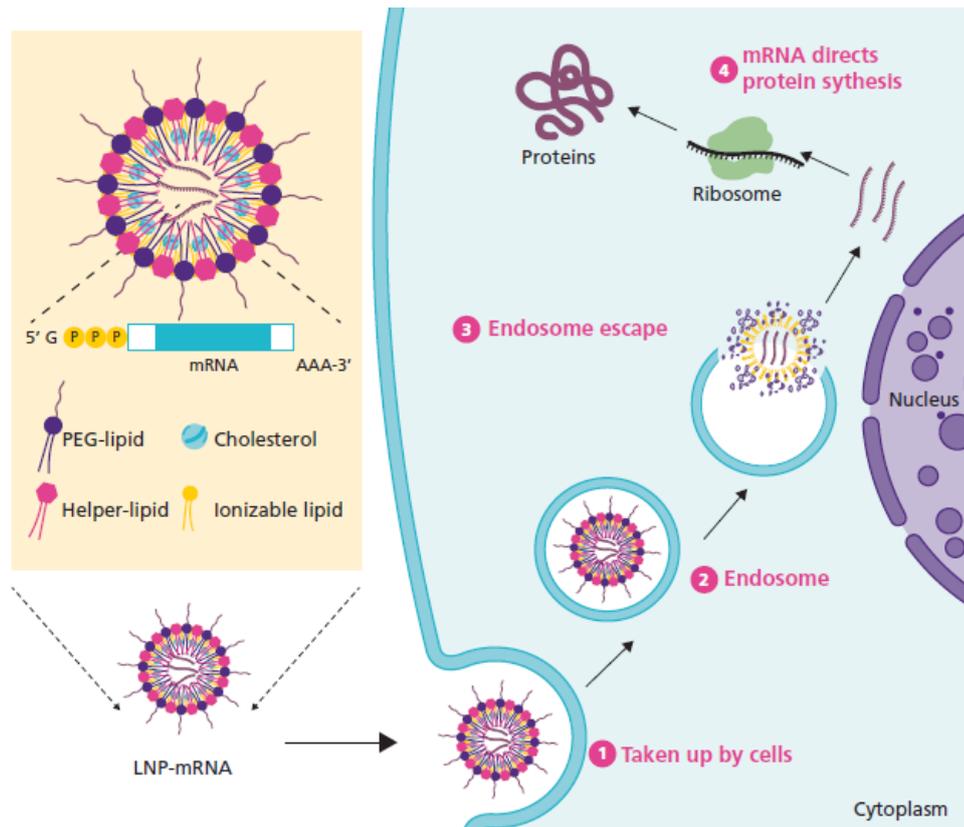


Figura 3. Proceso de liberación de mRNA en la célula.⁸

3.3. Técnicas de preparación de LNP's

El uso de sistema LNP para la liberación de fármacos, especialmente los genéticos, es una tecnología relativamente madura. Su procesado y almacenamiento son delicados: su estabilidad es de un año aproximadamente a muy bajas temperaturas para evitar la adsorción de proteínas del suero.

La introducción de lípidos catiónicos ionizables, como el 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DODAP), combinada con la adición de etanol, ha dado lugar a métodos que consiguen alta eficiencia con baja carga superficial. Los DODAP tienen un pK_a menor que 7, por lo que se pueden emplear especialmente para una encapsulación eficiente de polímeros cargados negativamente en LNP a bajo pH, donde los lípidos ionizables están cargados positivamente.⁹

Para su preparación (Figura 4), primero, se mezclan los lípidos ionizables con los demás lípidos ayudantes (PEG, colesterol, etc) y los oligonucleótidos en presencia de altas concentraciones de etanol. Esto da lugar a una gran cantidad de LNP de diámetro pequeño encapsulando ácidos nucleicos. Para eliminar el etanol, la dispersión de LNP's se tampona a

pH 4 y después a pH 7.4 para elevar el pH a valores fisiológicos.¹⁰ El material resultante se liofiliza para obtener las nanopartículas aisladas.

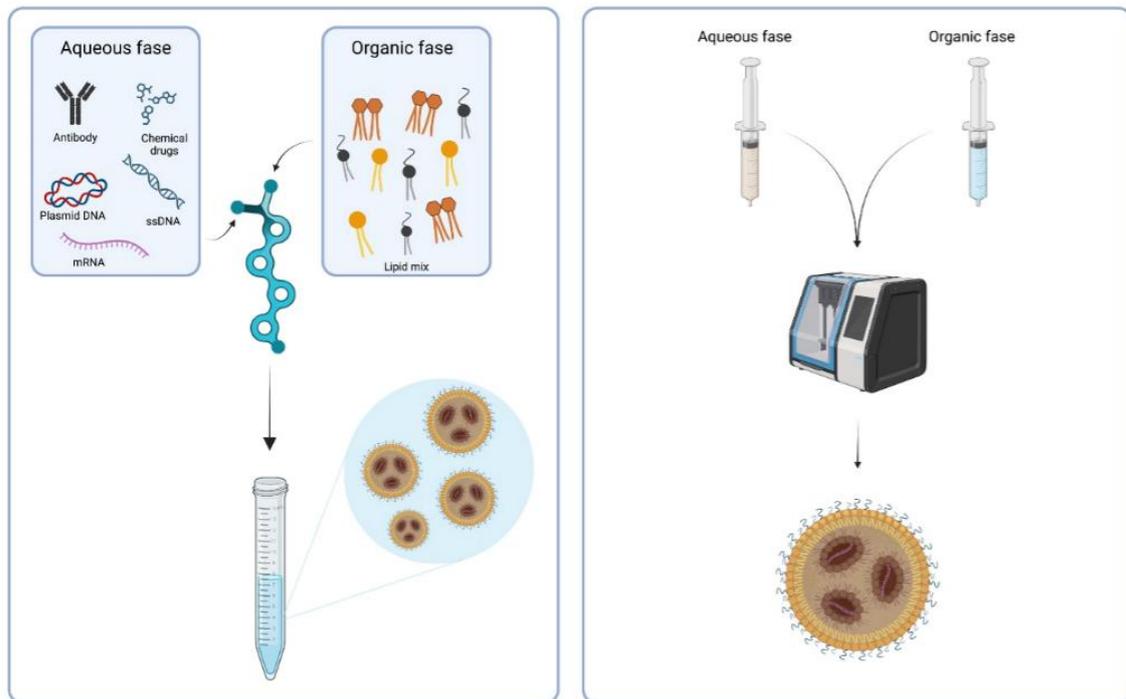


Figura 4. Esquema de preparación de nanopartículas lipídicas.

3.4. Complejos mRNA-LNP's en la vacuna contra el COVID-19

Como se ha mencionado al comienzo de la introducción, las principales aplicaciones para este tipo de nanovesículas son de tipo farmacológico. La más popular hoy en día es la vacuna contra el COVID-19. Uno de los obstáculos que se ha encontrado a la hora de desarrollar y distribuir esta vacuna es su estabilidad, dado que tiene que mantenerse a temperaturas muy bajas (2-8 °C) y es estable durante un período inferior a un año.⁷

3.4.1. Estabilidad de los complejos mRNA-LNP's

Existen diversas formas a través de las que se pueden degradar las moléculas de mRNA. Puede ser por degradación química (oxidación o hidrólisis) o física (desnaturalización del mRNA). La hidrólisis afecta principalmente a los grupos fosfodiéster que forman la cadena de RNA, como se muestra en la Figura 5.¹¹ Por otro lado, la oxidación afecta a las bases nitrogenadas y altera la estructura secundaria del mRNA.¹¹

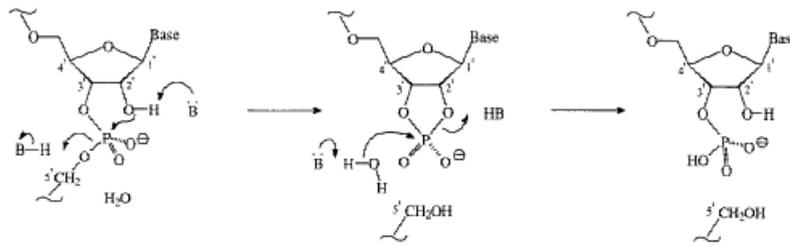


Figura 5. Hidrólisis intramolecular del enlace fosfodiéster en RNA.¹¹

En resumen, las moléculas de mRNA por sí solas son muy poco estables y aguantan escasos días a 4 °C sin sufrir procesos de degradación. Sin embargo, el mRNA dentro de la LNP está protegido por los lípidos ionizables a través de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y enlaces de hidrógeno. Por esto, el mRNA encapsulado es mucho más estable que en un medio acuoso.⁶

3.5. Aplicaciones en inmunoterapia contra el cáncer

La inmunoterapia contra el cáncer es el campo con la historia más larga de investigación del RNA en farmacología. Las terapias con ácidos nucleicos son muy prometedoras contra el cáncer de hígado y otras enfermedades, dada su alta eficacia y selectividad.¹²

El mRNA regula la expresión genética afectando en una serie de procesos biológicos propios del cáncer que comprenden la proliferación, apoptosis, angiogénesis, invasión y metástasis. Por tanto, el mRNA puede actuar como supresor de genes tumorales.¹³

Sin embargo, la liberación de RNA todavía se enfrenta a una serie de retos con respecto a la comprensión y control de la liberación a genes específicos. Se han hecho progresos muy significativos en liberación hepática, por ejemplo, se han desarrollado LNP's que identifican selectivamente los órganos controlando la liberación de RNA al hígado o a los pulmones. Comprender el destino celular de las LNP's en el órgano es importante en el contexto terapéutico dado que puede provocar efectos adversos o ineficacia a la hora de suministrar el fármaco.¹²

4. OBJETIVOS

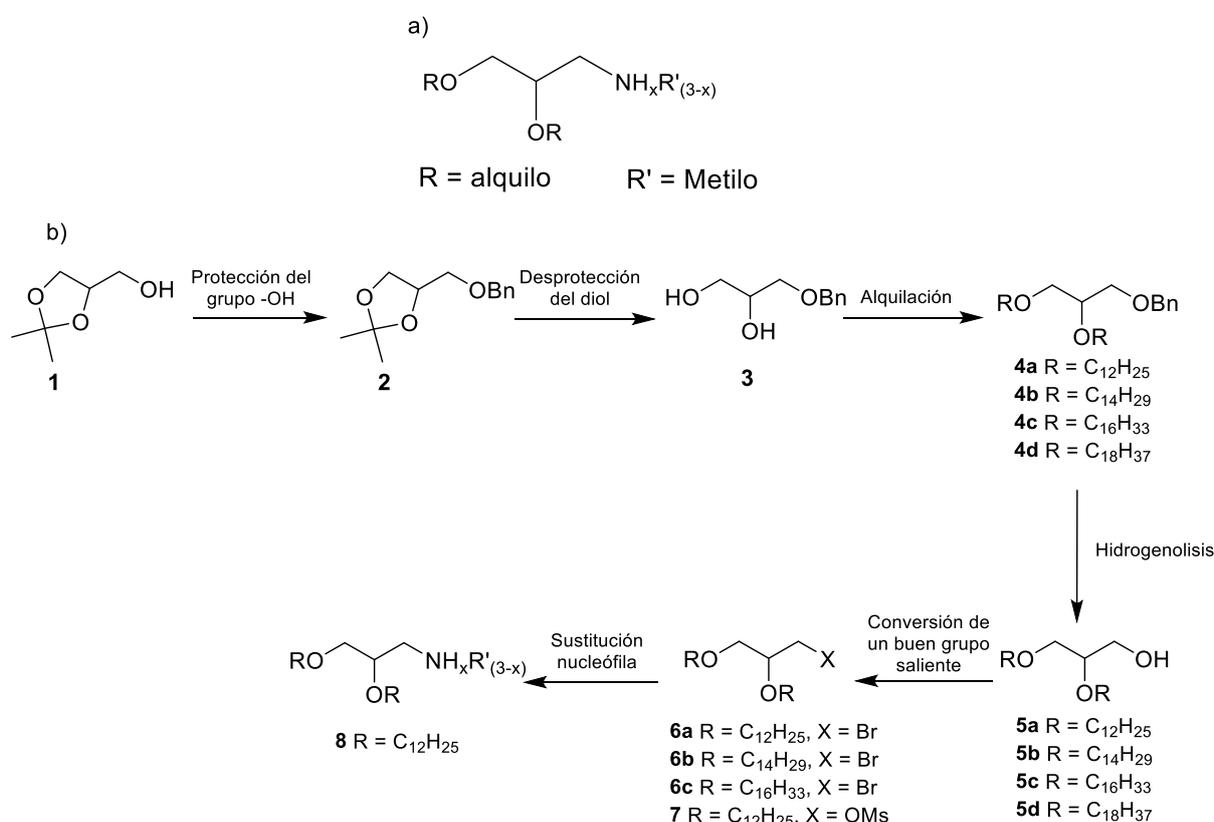
En este Trabajo de Fin de Grado se busca como objetivo general una metodología adecuada y general para la síntesis de lípidos catiónicos basados en aminas que posteriormente se puedan emplear en la formación de nanopartículas lipídicas que encapsulen material genético. Este trabajo se enmarca dentro de una nueva línea de investigación del grupo orientada a la obtención de nanopartículas lipídicas que encapsulen mRNA de forma más selectiva.

Para obtener estas moléculas objetivo y lograr la consecución de este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar una ruta de síntesis eficaz para los compuestos objetivo.
- Probar la síntesis con diferentes longitudes de cadena, de doce, catorce, dieciséis y dieciocho átomos de carbono.
- Optimizar todos los pasos sintéticos.
- Caracterizar todos los compuestos obtenidos.
- Testear alguno de los lípidos respecto a la formación de LNP's.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este apartado se describe la metodología sintética y los resultados obtenidos experimentalmente, así como su discusión. La arquitectura general de los lípidos ionizables objetivo se muestra en el Esquema 1a. Es una estructura versátil que nos permite introducir dos tipos de modificaciones que pueden afectar a la encapsulación de mRNA: diferentes cadenas alifáticas **R** (que variarán las propiedades lipofílicas del compuesto final) y distintas cabezas ionizables/iónicas **NH_xR'_(3-x)** (que permiten modular la parte ionizable/iónica del lípido). Las posibles rutas sintéticas dependen principalmente del grado de sustitución de la amina. Para el caso de aminas primarias y secundarias, la ruta sería la misma y es en la que nos hemos centrado (Esquema 1b). Respecto a las cadenas **R**, por simplicidad hemos elegido cadenas lineales con un número creciente de átomos de carbono (12, 14, 16 y 18 carbonos).



Esquema 1. Arquitectura general de lípidos catiónicos ionizables (a) y esquema de síntesis (b).

La estrategia racional que hemos diseñado para la síntesis de los lípidos ionizables que posteriormente formarán parte de las nanopartículas lipídicas se lleva a cabo a partir del solketal (**1**), una molécula que contiene en su estructura un alcohol y un acetal que protege un diol. El primer paso es una protección de dicho alcohol como éter bencílico, seguido de la hidrólisis del acetal en medio ácido. Al romper el acetal se genera el 1,2-diol (**3**), a partir del cual se forman los éteres alifáticos (**4**). Una vez formados, se procede a desproteger el éter

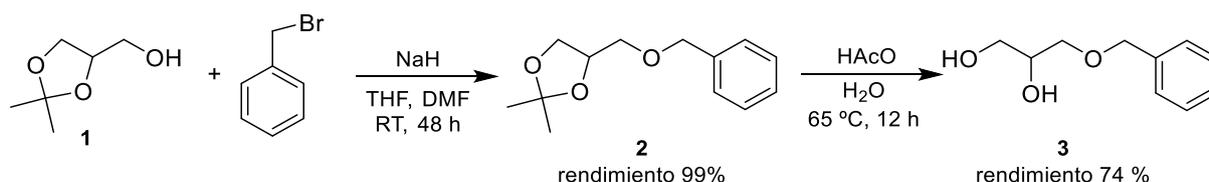
bencílico mediante hidrogenación catalítica heterogénea. El siguiente objetivo es sustituir el alcohol por una amina secundaria, pero como el OH es mal grupo saliente, es necesario transformarlo en otro grupo funcional que sí sea buen grupo saliente como el metanosulfonato o el bromuro. A partir de estos, se produce la sustitución nucleofílica con dimetilamina para obtener el compuesto final (**8**). Este compuesto final se hace reaccionar con cloruro de hidrógeno, para obtener el hidrocloruro correspondiente, que es más estable. Una vez obtenido, será empleado para preparar las nanopartículas lipídicas que encapsulen el RNA. Esta parte final del proyecto se ha realizado en colaboración con un grupo de investigación de la Universidad del País Vasco dirigido por el Dr. José Luis Pedraz.

5.1. Síntesis de 3-(benciloxi)-1,2-propanodiol

El primer objetivo es sintetizar el diol (**3**), que es el reactivo común al que vamos a introducir las diferentes cadenas alquílicas de doce, catorce, dieciséis y dieciocho carbonos. El compuesto inicial es el solketal (**1**), que es un reactivo comercial. El primer paso que se debe realizar es la protección del alcohol del solketal (primera reacción del Esquema 1b).¹⁴

La protección consiste en la conversión del alcohol en un éter bencílico mediante una reacción S_N2 del alcóxido sobre un alquilo primario con un buen grupo saliente, en este caso bromuro de bencilo. Como base se ha usado hidruro de sodio, que es una base muy fuerte. Primero se hace reaccionar el NaH con el solketal para formar un ión alcóxido que es mucho mejor nucleófilo que el grupo -OH. Es una reacción exotérmica con aparición de burbujas (hidrógeno), por lo que hay que realizarla en baño de hielo y atmósfera inerte. Después se añade la disolución de bromuro de bencilo para que se produzca la sustitución. Tras una extracción con éter y lavado con cloruro de sodio, se pudo obtener el derivado **2** sin necesidad de más purificación.

Cuando se ha protegido el alcohol, el siguiente paso es romper el acetal cíclico, mediante la adición de ácido acético a temperatura elevada para liberar el diol (**3**). Hay que tener cuidado con el pH antes de la extracción (neutralizar con bicarbonato sódico), puesto que, si se añade un exceso, se generan los alcóxidos que podrían transferirse a la fase acuosa en la extracción, dificultando la purificación.



Esquema 2. Protección del grupo alcohol y posterior ruptura del acetal del solketal.

La obtención de este producto, que servirá como reactivo de partida para la introducción de las diferentes cadenas alquílicas, requiere de una etapa final de purificación que se realiza mediante cromatografía en columna. Se obtuvieron buenos rendimientos tras esta purificación (74%).

5.2. Síntesis de éteres alquílicos (4)

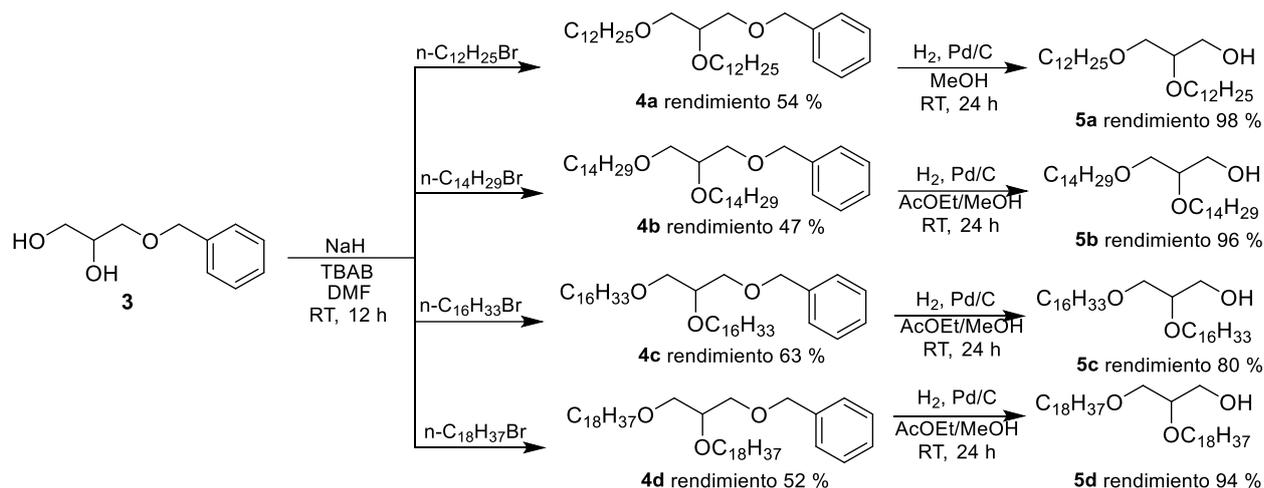
El siguiente paso de nuestra ruta sintética es la obtención de los alcoholes con los éteres alquílicos (5).¹⁵ De nuevo, el proceso consta de dos etapas (Esquema 2), la primera es una reacción de eterificación y la segunda la desprotección del OH.

La reacción de formación de los éteres es de nuevo una sustitución nucleófila S_N2. Las mejores condiciones fueron emplear DMF como disolvente, NaH como base (es una base muy fuerte y no interacciona con el resto de la molécula) y el bromuro correspondiente como sustrato. En este caso fue necesario utilizar bromuro de tetrabutilamonio (TBAB), que es un catalizador de transferencia de fase e incrementa la solubilidad de especies iónicas en disolventes orgánicos, haciendo que la reacción transcurra mucho más rápida.

La mezcla resultante se extrae con diclorometano y se lava con cloruro sódico, para eliminar el exceso de NaH y las sales formadas. Esta extracción se complicó, dado que cuando hacía más frío se formaba un precipitado blanco en la interfase que dificultaba la extracción. El precipitado podría ser nuestro producto, que presentará un punto de fusión bajo (se observó que a medida que las cadenas eran más largas, la aparición de precipitado era mayor, así como que al realizar la extracción en días más fríos la complicación era mayor que en días más calurosos, cuando podía extraer sin problema). Para solucionarlo, primero se optó por dejar un par de horas para que se estabilizaran las fases o a realizar la extracción en caliente.

La purificación final se llevó a cabo en cromatografía en columna con gel de sílice como fase estacionaria. Para la fase móvil se probó con mezclas de hexano/EtOAc 1:15 y 1:20, y se vio mediante TLC que la separación mejoraba con la mezcla 1:20. En la purificación, disminuyó ligeramente el rendimiento.

Una vez más, se observó que a medida que aumentaba la longitud de las cadenas alquílicas, el producto puro se solidificaba con más rapidez, de hecho, el compuesto (4d) era sólido, dado que las cadenas hidrocarbonadas eran de dieciocho carbonos, mientras que el (4a) (con cadenas de doce) era un aceite.



Esquema 3. Síntesis de éteres alquílicos y posterior desprotección del alcohol.

Una vez sintetizados los éteres alquílicos (**4**), se procedió a desproteger el alcohol. Esto se realizó mediante hidrogenolisis del éter bencílico,¹⁶ utilizando como catalizador paladio sobre carbono, por lo que se trata de una catálisis heterogénea. La hidrogenación se llevó a cabo introduciendo H_2 mediante unos globos en el matraz Schlenk. En esta reacción, es importante que la agitación sea fuerte para que haya la máxima cantidad de hidrógeno posible en contacto con la suspensión. Como disolvente, se empleó en todos los casos metanol, dado que era necesario que hubiera un medio prótico.

Para obtener el compuesto (**5a**) no hubo problemas al llevar a cabo la hidrogenación catalítica, pero a medida que aumentaba el número de carbonos de las cadenas alquílicas de los compuestos, los substratos de partida se disolvían peor en metanol, con un dramático descenso de la conversión (ver la Figura 6). Este hecho motivó que hubiera que sustituir el metanol por otro disolvente como el acetato de etilo. El problema ahora fue que al haber ausencia de un medio prótico, no se observó reacción. Por último, se probaron mezclas de metanol y acetato de etilo. En los compuestos con cadenas alquílicas más largas se necesitaba añadir más acetato de etilo, con un incremento de la conversión de la reacción (ver la Figura 7).

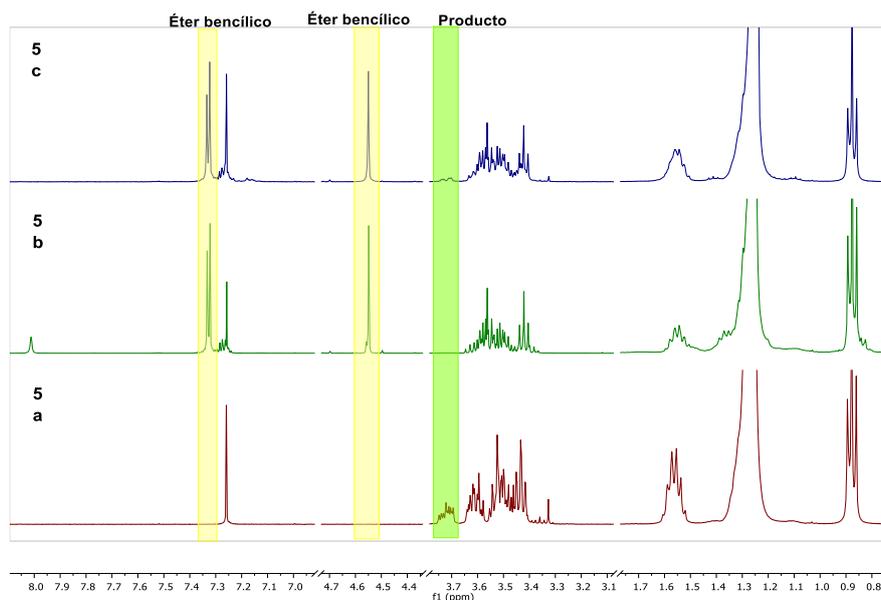


Figura 6. Espectros apilados de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del crudo de reacción para los casos 5a, b y c, empleando únicamente MeOH como disolvente (el resto de condiciones de reacción como tiempo, temperatura, concentración, etc se mantuvieron constantes).

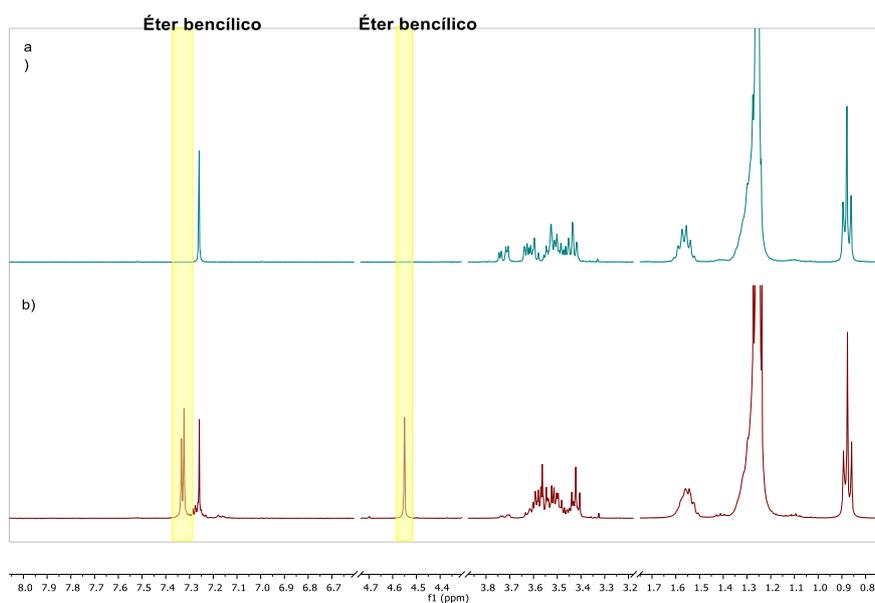


Figura 7. Espectros apilados de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de la reacción 5c empleando diferentes disolventes: (a) en MeOH/AcOEt y (b) en MeOH (el resto de condiciones de reacción como tiempo, temperatura, concentración, etc se mantuvieron constantes).

Para la síntesis del compuesto (**5d**), la reacción se llevó a cabo con bastante cantidad de acetato de etilo. Aun así, pasadas 24 horas de reacción (que es el tiempo promedio de reacción para el resto de casos) la reacción no había sido completa. En este caso no fue por problemas de solubilidad (el sustrato estaba totalmente disuelto), por lo que se rellenaron los dos globos de H_2 y se dejó otras 24 horas reaccionando. Por tanto, para la hidrogenolisis del

éter bencílico del compuesto (**5d**) hubo que variar las condiciones de reacción aumentando hasta 48 horas el tiempo de reacción y añadiendo un mayor exceso de H₂.

Una vez transcurrida la reacción de hidrogenación, la purificación del compuesto final consistió en una filtración en tierra de diatomeas para eliminar el Pd/C empleado en la reacción catalítica. En el caso del compuesto (**5a**) la filtración fue sencilla y se realizó lavando con acetato de etilo, obteniéndose un sólido blanco tras eliminar el disolvente en el rotavapor. Pero en el caso de los compuestos (**5b**), (**5c**) y (**5d**), los compuestos obtenidos no eran tan solubles en acetato de etilo y se obtuvieron escasos miligramos del producto final. Para solucionarlo, la filtración se realizó con diclorometano en caliente.

Esta reacción no requirió de purificación en columna y los rendimientos obtenidos tras las purificaciones con las condiciones optimizadas fueron buenos (80-98%).

5.3. Síntesis de 2,3-bis(dodeciloxi)-*N,N*-dimetil-1-propanamina

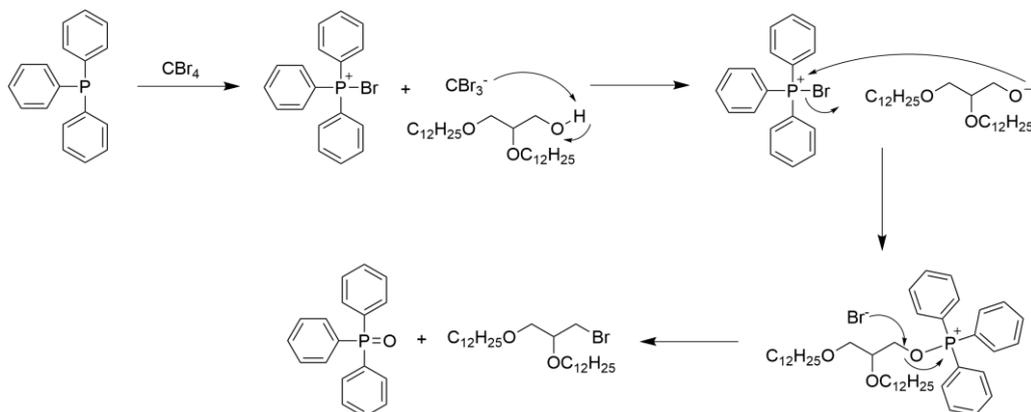
Para llegar al compuesto final (**8**) del Esquema 1b, primero hay que realizar una transformación del grupo alcohol de la molécula en otro que sea un buen grupo saliente, dado que el -OH es muy mal grupo saliente y no reaccionará bien con la dimetilamina (nuestro nucleófilo). Se propusieron dos opciones de grupo saliente: bromuro y mesilo (metanosulfonato).

5.3.1. Grupo saliente: bromuro

La primera opción en realizarse fue una S_N2 en la que se sustituye el -OH por bromo.¹⁷ Las condiciones de reacción que se utilizaron fueron CBr₄ y PPh₃ como reactivos, y el disolvente empleado fue diclorometano, dado que era en el que los reactivos eran solubles, como se había observado previamente en la hidrogenación. El procedimiento experimental se llevó a cabo en un Schlenk, en el que previamente se habían añadido una mezcla del alcohol junto con el tetrabromuro de carbono disueltos en diclorometano. Por otro lado, en un matraz se disolvió la trifenilfosfina en diclorometano y se añadió gota a gota sobre el Schlenk. Este último proceso se debe hacer a una temperatura inferior a 15 °C y es importante añadir la trifenilfosfina lentamente (durante un período de 30 minutos aproximadamente), dado que si no se formaría bromuro de trifenilfosfina en exceso.

La trifenilfosfina cumple dos funciones: activación del CBr₄ y transformación del OH en mejor grupo saliente para que sea sustituido posteriormente por el ion bromuro más fácilmente. El mecanismo se muestra en el Esquema 3. Primero el CBr₄ reacciona con la trifenilfosfina, dando lugar a CBr₃⁻ y BrPPh₃⁻. Se produce una desprotonación del alcohol y como subproducto se forma CHBr₃. Posteriormente, el alcóxido ataca al bromotrifenilfosfonio, formándose el alcóxitrifenilfosfonio. Finalmente, se lleva a cabo el ataque nucleofílico del

bromuro sobre el carbono que soporta el alcóxido, dando como productos finales el bromuro alquílico y óxido de trifenilfosfina.



Esquema 4. Mecanismo de reacción para la sustitución del alcohol por bromo, utilizando de ejemplo la síntesis del compuesto (6a).

La masa de reacción obtenida se lavó con hexano y se decantó el líquido, dado que el producto deseado es soluble en hexano. Por otro lado, quedó un residuo sólido insoluble en hexano. Se comprobó por ^1H RMN que era el óxido de trifenilfosfina que se había formado como subproducto de la reacción (Figura 8). Hubo que centrifugar tras el lavado, para eliminar todos los restos del sólido en suspensión.

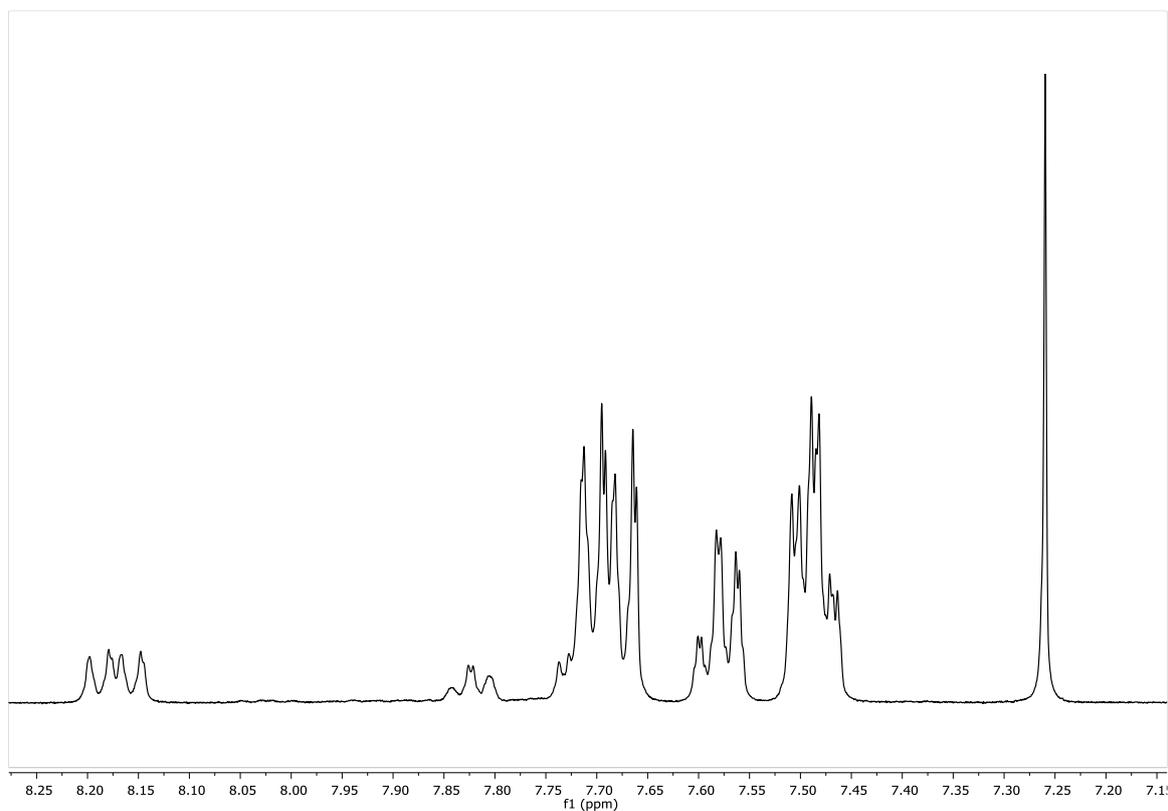
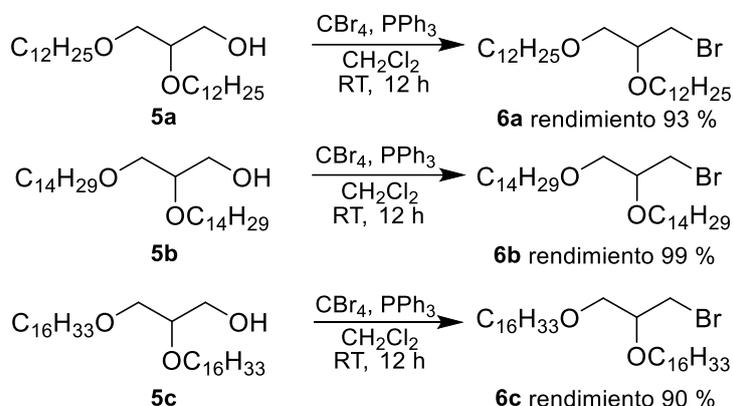


Figura 8. Espectro ampliado de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del sólido obtenido en las síntesis de los compuestos (6a), (6b) y (6c).

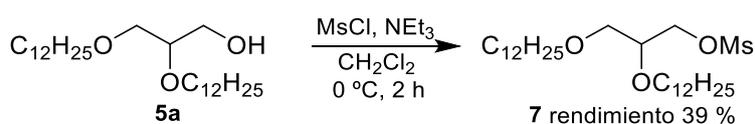
En esta reacción se utilizaron los compuestos (**5a**), (**5b**) y (**5c**), tal y como se indica en el Esquema 5. En todos los casos, los rendimientos obtenidos por este método fueron cuantitativos. Una desventaja de esta estrategia es la etapa de extracción del producto, dado que el procedimiento de lavado es complicado.



Esquema 5. Síntesis de los compuestos (**6a**), (**6b**) y (**6c**).

5.3.2. Grupo saliente: metanosulfonato

La segunda propuesta fue emplear un metanosulfonato como grupo saliente. Para la síntesis del compuesto (**7**) se añadió una base al alcohol (**5a**), que en este caso fue trietilamina, y posteriormente el cloruro de mesilo. La reacción se realiza a 0 °C y dura dos horas. Se utiliza una base para desprotonar el alcohol y que este ataque al sulfonato. Una vez finalizada la reacción, se lava con bicarbonato sódico y cloruro de sodio, obteniéndose el derivado deseado cuantitativamente sin necesidad de purificación adicional.



Esquema 6. Síntesis del 1-propanol-2,3-bis(dodeciloxi)-1-metanosulfonato (**7**).

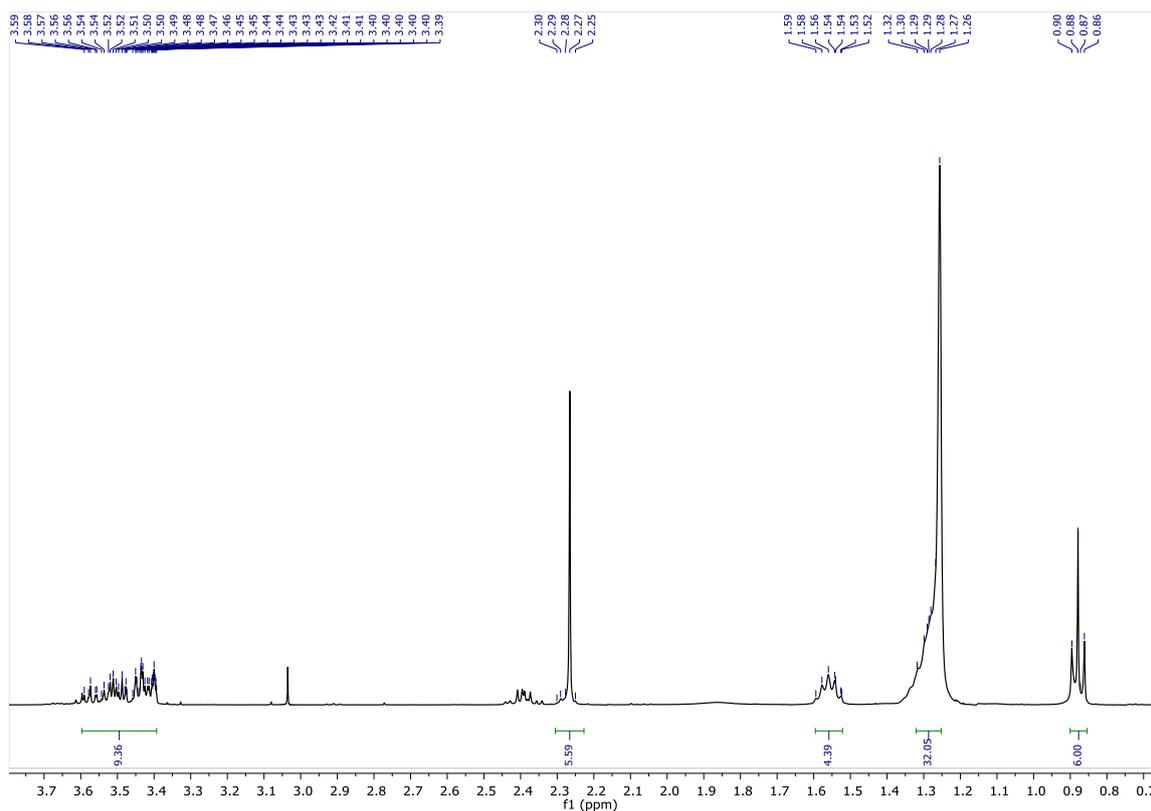
5.3.3. Síntesis de 2,3-bis(dodeciloxi)-N,N-dimetil-1-propanamina

Para llevar a cabo la obtención del compuesto objetivo (**8**), se partió de los compuestos (**6a**) y (**7**). La reacción (dura dos días y se hace a 80 °C) presenta una serie de complejidades que fue necesario resolver. La dimetilamina es un reactivo muy volátil y suele ir acompañada de agua. En las primeras pruebas, se hizo la reacción en un matraz esférico, pero no fue bien en términos de rendimiento, así que se probó a hacer en un Schlenk y el rendimiento mejoró. El volumen de reacción era muy pequeño con respecto al volumen total del matraz, por lo que la amina probablemente pasó a fase gas. Sin embargo, en el caso del Schlenk, el espacio de cabeza era muy inferior, lo que mejoró el proceso. Como disolvente se empleó etanol seco.

Es importante que sea en seco porque en este caso el agua es un nucleófilo competitivo menos volátil que la amina.

Con respecto a los grupos salientes empleados, hubo mejores resultados con el metanosulfonato. Se observan en el ^1H RMN menos subproductos que en el caso del derivado bromado. Por tanto, si se realiza a partir del compuesto (**6a**) sería necesaria la purificación por columna cromatográfica y se perdería rendimiento en el proceso.

Al obtener el compuesto (**8**) se observaban dos fases en su composición, una sólida y otra líquida. El ^1H RMN que se realizó para comprobar la reacción mostraba algunas impurezas, aunque menos que si se realizaba a partir del compuesto (**6a**). Para purificar el producto, se hizo una extracción disolviendo todo en diclorometano y lavando con una disolución saturada de bicarbonato sódico. Con esto eliminamos todas las impurezas, como se puede observar en el ^1H RMN de la Figura 9 y en el HRMS de la Figura 10.



Esquema 7. Espectro ampliado de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto final (**8**) obtenido.

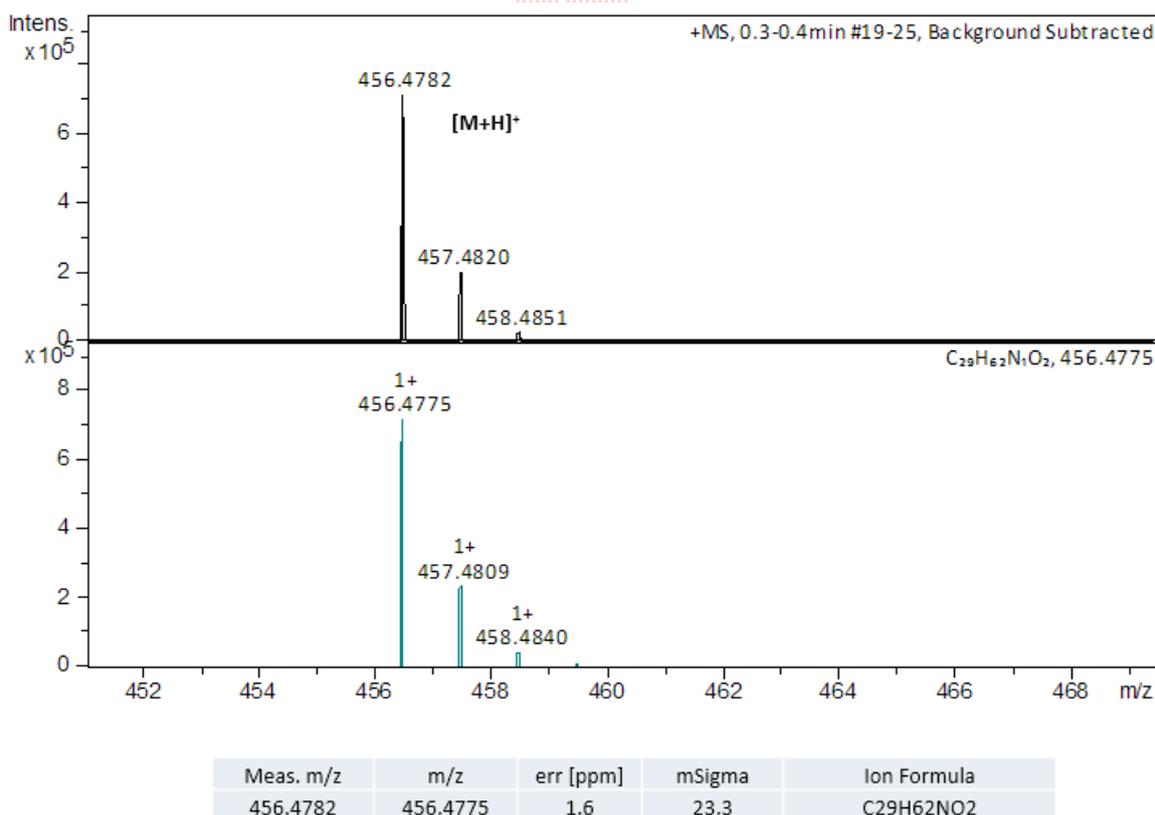
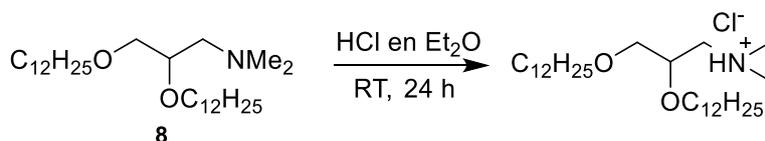


Figura 9. Espectro de masas del compuesto (8).

5.4. Formación de nanopartículas lipídicas

Como último paso de la ruta sintética, se preparó el hidrocloreto correspondiente del derivado (8). Al adicionar (8) sobre una disolución de HCl en éter, precipita un sólido blanco que es la sal de amonio. Tras filtrar y lavar con éter, se obtiene el producto final bastante puro, en una forma estable y con buen rendimiento.



Esquema 8. Formación del hidrocloreto final del lípido ionizable (8).

El hidrocloreto del lípido obtenido es el que posteriormente se ha empleado en la formación de nanopartículas lipídicas, de las que se ha hablado previamente en la introducción. Las nanopartículas fueron preparadas por nuestros colaboradores de la Universidad del País Vasco y se obtuvieron tal y como se ha indicado en la introducción. La composición de la formulación preparada para la evaluación de las propiedades de las LNP's fue de un 50% del lípido (8), 38% de colesterol, 10% de DPPC y 2% del lípido DMG-PEG2K para la fase lipídica, y una disolución de mRNA en un tampón ácido acuoso (Figura 10).

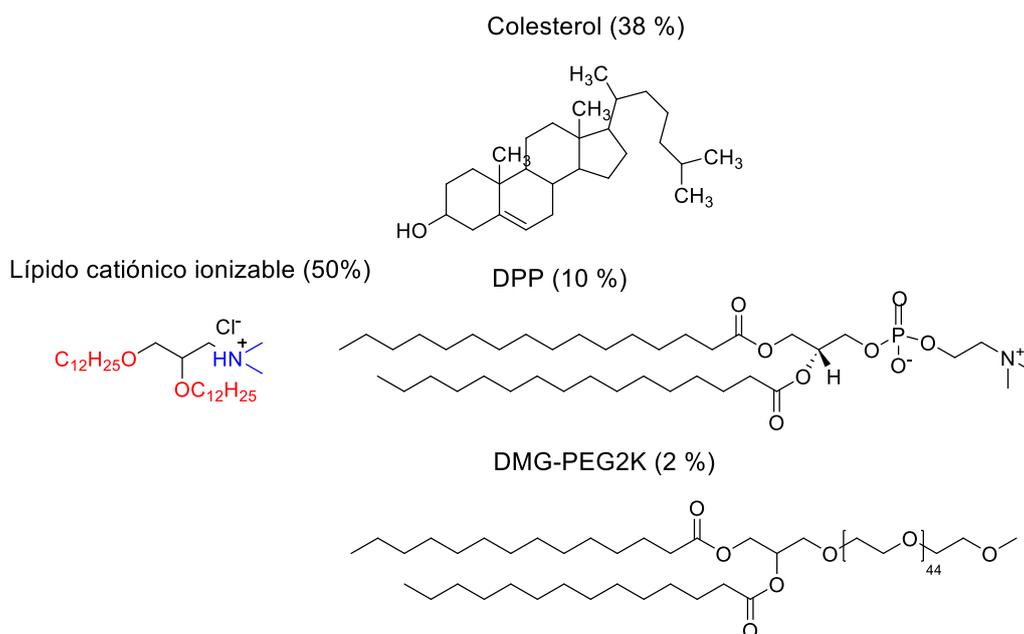


Figura 10. Componentes de la formulación testada para la obtención de LNP's.

Una vez obtenidas las LNP's, se midió su tamaño por microscopía TEM (Figura 11 a). Finalmente, se realizó una prueba de transfección en células CuFi-1 (células epiteliales de un paciente con fibrosis quística) (Figura 11 b). Los resultados preliminares obtenidos con este compuesto han mostrado ser positivos y prometedores.

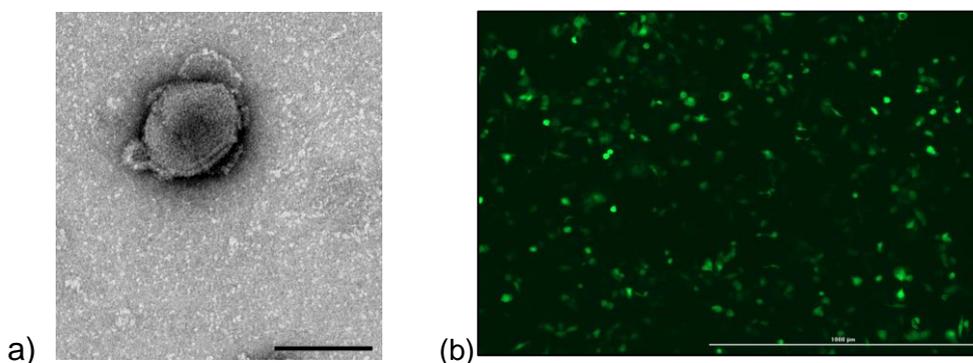


Figura 11. (a) Imagen TEM de la nanopartícula obtenida. (b) Fotografía obtenida por microscopía confocal del cultivo celular tratado con las nanopartículas lipídicas. En verde brillante las células que encapsularon LNP's.

Está previsto realizar un conjunto de experimentos adicionales de eficiencia de encapsulamiento (cantidad de mRNA incluida en las cavidades de cada partícula), transfección (cantidad de material genético transferido a la célula) y viabilidad celular (supervivencia de la célula por la mera presencia de los lípidos exógenos) en función de distintos parámetros como son la concentración de mRNA o la cantidad de nanopartículas lipídicas suministradas.

Por otro lado, se prevé también preparar los otros miembros de la familia (aminas primarias, secundarias y sales de amonio cuaternarias alquílicas) para realizar el estudio completo y analizar el efecto de las cabezas polares en la formación de las nanopartículas lipídicas y su capacidad de transfección. En una etapa posterior se variará la naturaleza de la cadena alifática introduciendo insaturaciones.

6. CONCLUSIONES

Del trabajo de Fin de Grado expuesto en esta memoria se puede concluir:

- Se ha diseñado una ruta sintética eficiente para la obtención de lípidos ionizables con estructura general (**8**), en la que se puede modificar la longitud de las cadenas alifáticas **R**.
- Se ha sintetizado un lípido catiónico con cadenas alifáticas de doce carbonos que posee una cabeza iónica ionizable $N(CH_3)_2$ con un buen rendimiento. Precipitando con cloruro de hidrógeno en éter se obtiene el hidrocloreto correspondiente, suficientemente estable como para ser transportado y poder realizar estudios preliminares en colaboración con el grupo de investigación de la Universidad del País Vasco dirigido por el Dr. José Luis Pedraz.

Con respecto a la optimización de las diferentes etapas sintéticas:

- El empleo del éter bencílico como grupo protector es una buena opción en la primera parte de la síntesis, dada su estabilidad. Su proceso de síntesis es muy sencillo y se obtiene con un buen rendimiento.
- En la preparación de los éteres alquílicos y la posterior hidrogenólisis del éter bencílico, se ha comprobado que cuando aumentan el tamaño de las cadenas hidrocarbonadas, el proceso de síntesis se complica, por lo que es preciso cambiar ciertas condiciones tales como el disolvente o el tiempo de reacción. Además, la ruta es mejor cuando en la última etapa se emplea el grupo metanosulfonato como grupo saliente.
- Los rendimientos obtenidos en el proceso de síntesis son muy buenos, pero en las etapas que se requiere purificación mediante columna cromatográfica, éste disminuye ligeramente.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Metodología Sintética

Las reacciones que constituyen este Trabajo Fin de Grado han sido llevadas a cabo empleando técnicas convencionales de síntesis en un laboratorio de investigación. En los casos en los que los compuestos son sensibles al oxígeno o al agua se han utilizado matraces Schlenk y líneas de vacío usando atmósfera de nitrógeno.

Los disolventes empleados han sido adquiridos en casas comerciales, de calidad de análisis o sintética y en algunos casos (DCM, MeOH, hexano y AcOEt) destilados para evitar la presencia de posibles impurezas o estabilizantes. También se han utilizado disolventes secos (DMF, DCM, THF) que han sido secados previamente con zeolitas activadas.

Todos los reactivos de partida usados han sido adquiridos en casas comerciales convencionales y se utilizaron sin previa purificación.

7.2 Métodos de Purificación

La purificación, en los casos que ha sido necesario, se ha llevado a cabo mediante cromatografía en columna preparativa. Para ello, se ha empleado como fase estacionaria gel de sílice (tamaño de partícula 0,040-0,063 mm; 230-400 mesh). La fase móvil se optimizó para cada uno de los compuestos y está detallada a lo largo del apartado de Parte Experimental. Tanto los crudos de reacción como las fracciones cromatográficas se han analizado mediante cromatografía en capa fina (TLC) con gel de sílice 60 con indicador fluorescente F254 soportado en placas de aluminio de 0,25 mm de espesor. El método de revelado ha sido habitualmente la exposición a una lámpara de UV (254 nm y 365 nm). En la mayoría de los casos, había presencia de compuestos no cromóforos, por lo que se realizó un revelado bañando la placa de TLC en anisaldehído.

7.3 Caracterización de Compuestos

La identidad y pureza de los compuestos sintetizados ha sido analizada mediante el uso de técnicas instrumentales que se presentan a continuación

7.3.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

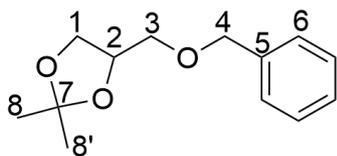
Los espectros de RMN fueron adquiridos en espectrómetros Agilent MR 400, DD2 500 equipado con sonda fría y VRMNS 500 ubicados en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid (LTI-UVa). Los disolventes deuterados utilizados fueron adquiridos de fuentes comerciales y usados sin tratamiento previo. Los tubos de precisión para RMN empleados fueron de 5 mm de sección y de vidrio en todos los casos.

Los desplazamientos químicos (δ) se dan en partes por millón (ppm) referenciados a TMS usando la señal residual del disolvente no deuterado como referencia interna. La multiplicidad de las señales se da de acuerdo con la abreviación estándar: s=singlete, d=doblete, t=tripleto, m=multiplote, br=señal ancha. Las constantes de acoplamiento (J) en ^1H -RMN están indicadas en hercios (Hz). Adicionalmente, se proporciona el valor de las integrales relativas de los picos en ^1H -RMN y la asignación completa, tanto de ^1H -RMN como de ^{13}C -RMN. La asignación de picos se realizó gracias a una combinación de los espectros monodimensionales (^1H -RMN y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -RMN) con los bidimensionales convencionales: ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC. Todos los espectros fueron analizados mediante los programas MestreNova 9.0 y VRMNj (Agilent NRMNJ3.2).

7.3.2 Espectrometría de Masas

Los análisis de masas de alta resolución (HRMS) fueron obtenidos por el servicio de Espectrometría de Masas de la Universidad de Valladolid. Se utilizó un equipo MS-TOF, (MS-TOF Bruker Maxis Impact), en el que la fuente de ionización es por electrospray (ESI).

Compuesto 2: 2,2-Dimetil-4-[(fenilmetoxi)]-1,3-dioxolano



Solketal (2.0 g, 15 mmol) se disuelve en THF (4 ml). Por otro lado, en un Schlenk, se prepara una suspensión de NaH al 60% en aceite mineral (0.81 g, 20 mmol) en THF (11 mL), completando tres ciclos de llenado y vaciado de N₂, esto se realiza en baño de hielo debido a que la reacción es muy exotérmica. La disolución de Solketal se añade lentamente sobre la suspensión de NaH y se observa la aparición de burbujas, por lo que se deja el baño de hielo. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 min. El bromuro de bencilo (3.1 g, 18 mmol) se disuelve en DMF (2 mL) y se añade sobre la suspensión de NaH y Solketal. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante el fin de semana. Se añade agua (20 mL) al producto color crema obtenido para disolver las sales. Se realiza la extracción con éter dietílico (60 mL), se lava con disolución saturada de cloruro de sodio y se seca con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se seca en el rotavapor. Se obtiene un sólido aceitoso de color marrón claro (3.6 g, 16 mmol, rendimiento 99%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36 – 7.27 (m, H⁶, 5H, CH arílicos), 4.58 (d, *J* = 5.5 Hz, H⁴, 2H), 4.34 – 4.28 (m, H², 1H), 4.07 – 4.03 (m, H¹, 1H), 3.77 – 3.73 (m, H^{1'}, 1H), 3.59 – 3.46 (m, H³, 2H), 1.37 (s, H⁸, H^{8'}, 3H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 138.0 (C⁵), 128.2 (CH arílicos), 127.7 (C⁶), 109.3 (C⁷), 74.7 (C²), 73.4 (C⁴), 71.1 (C³), 66.9 (C¹), 26.8 (C⁸), 25.4 (C^{8'}). **HRMS (ESI+):** *m/z* = 245.1149 [M + Na]⁺ (Calculado 245.1148 para C₁₃H₁₅NaO₃).

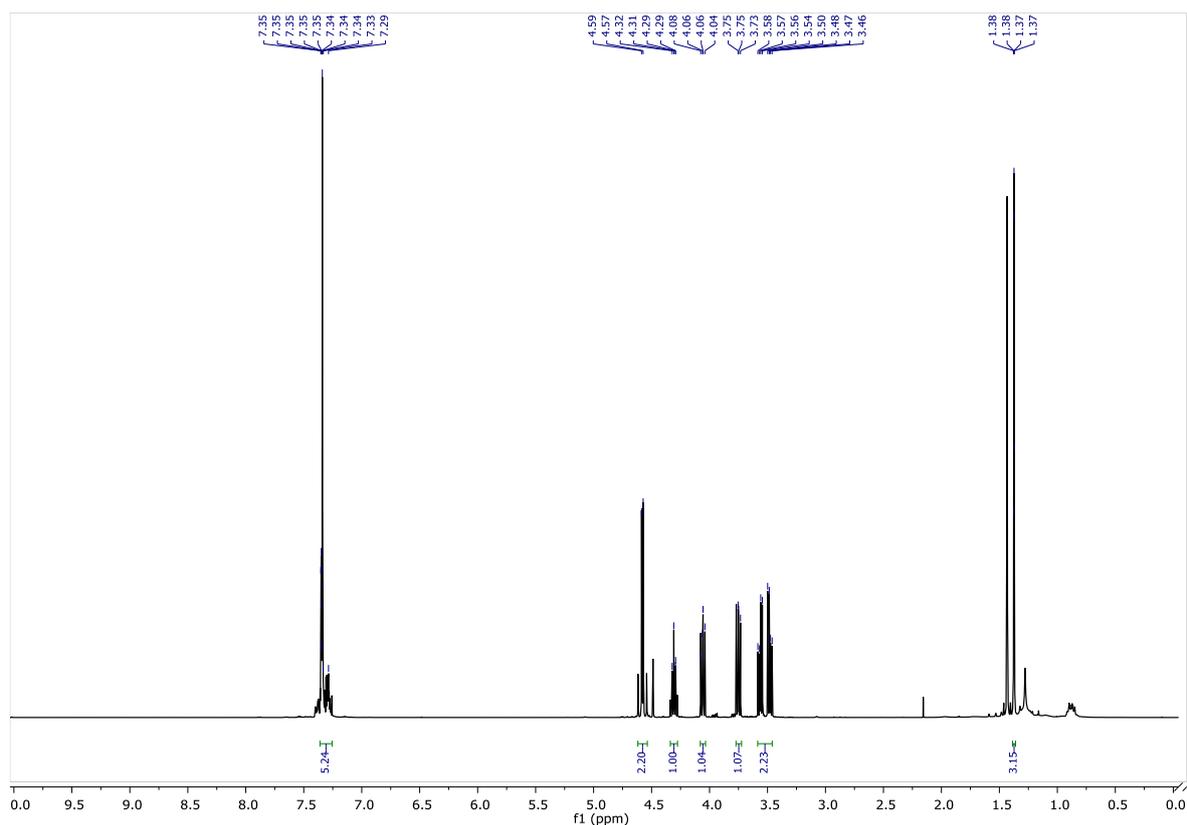


Figura 12. Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (2).

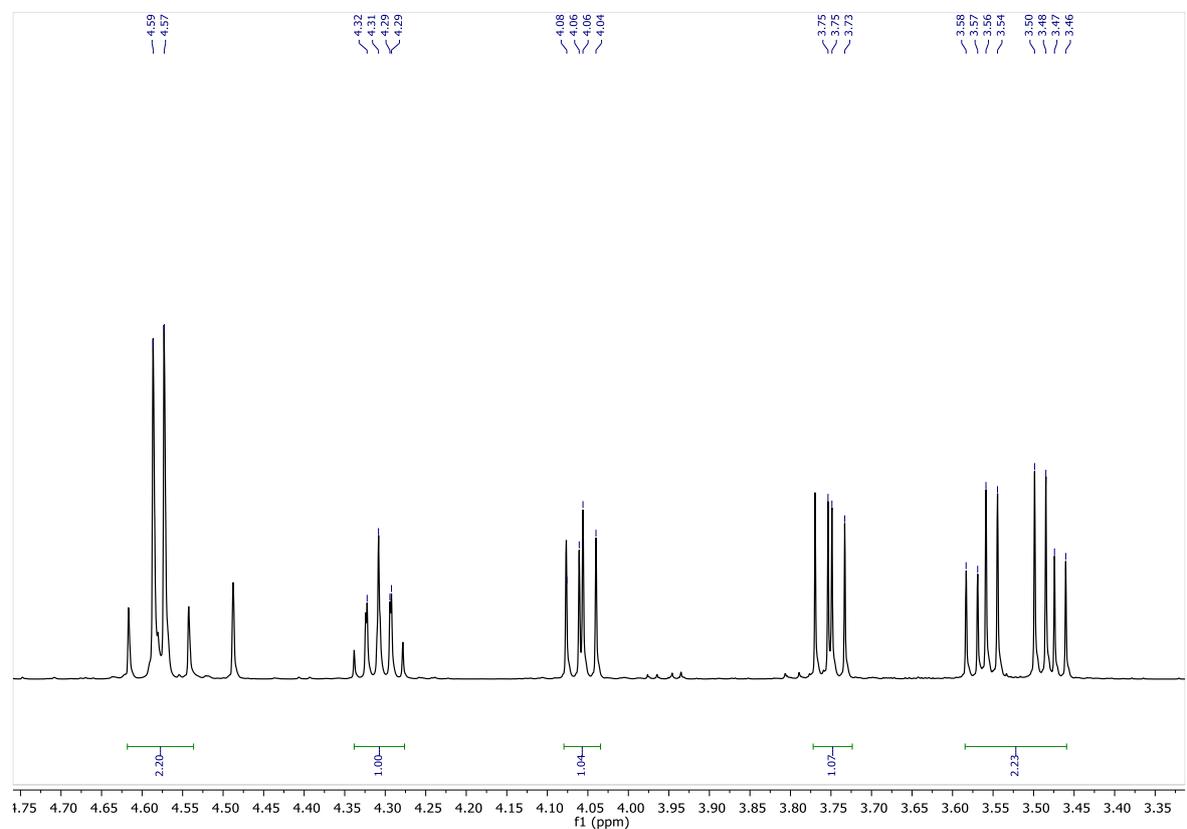


Figura 13. Espectro ampliado de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (2).

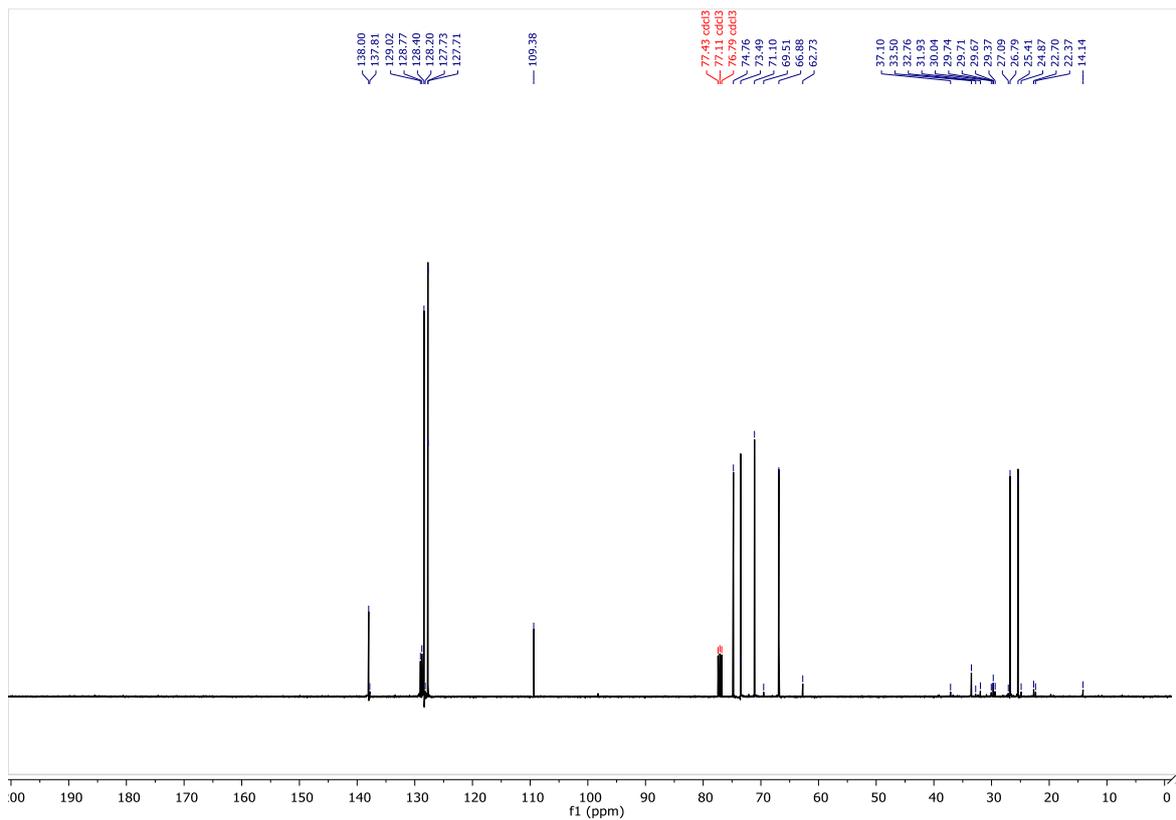


Figura 14. Espectro de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (2).

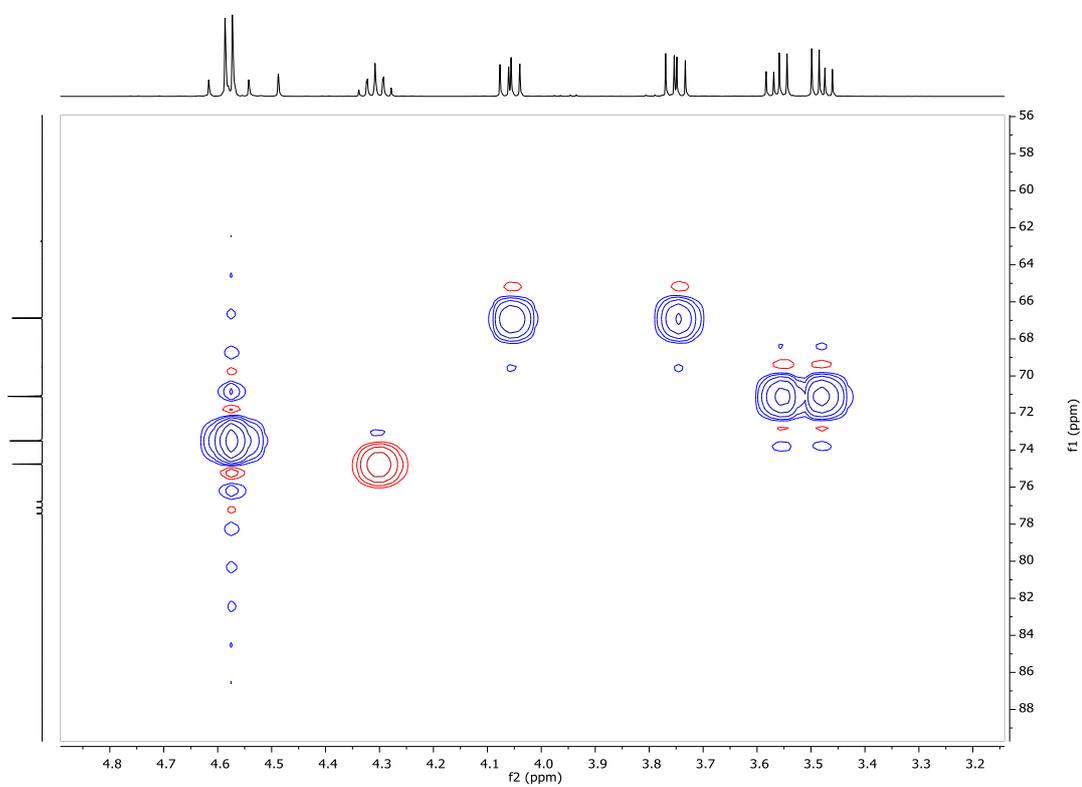


Figura 15. Espectro bidimensional de ^1H - ^{13}C -gHSQCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (2).

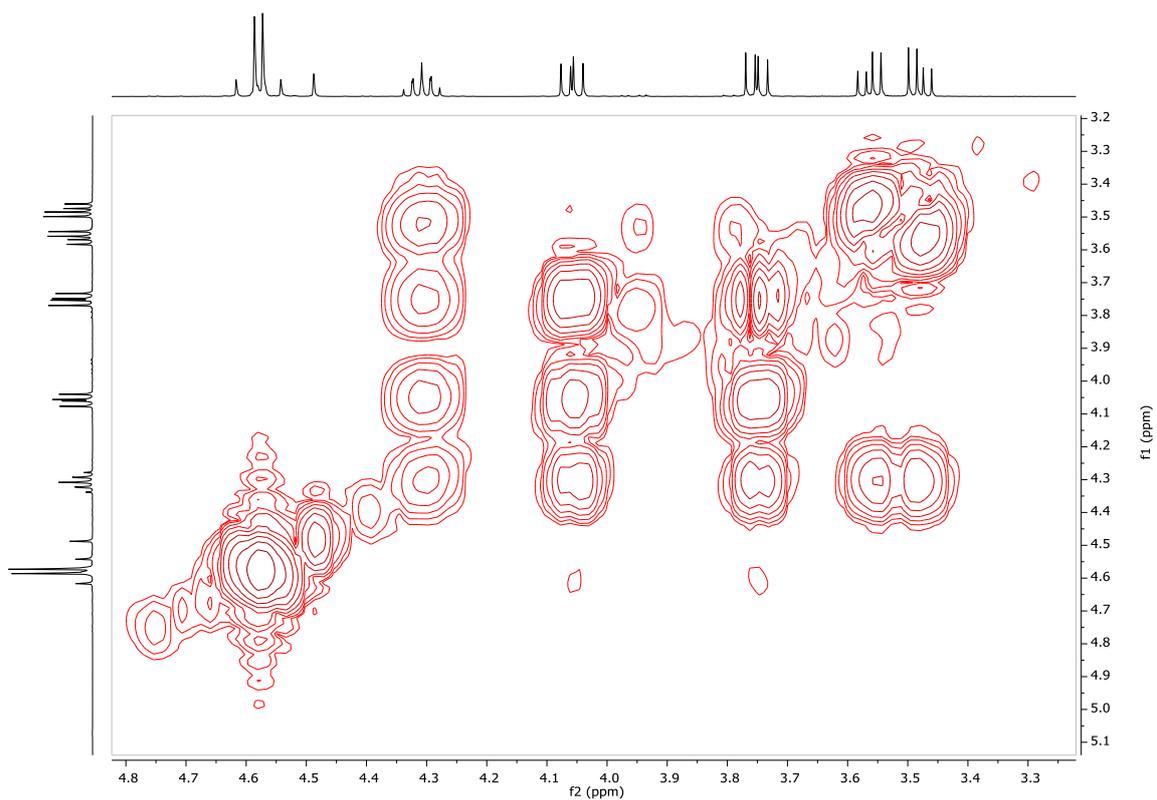


Figura 16. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -gDQCOSY ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (2).

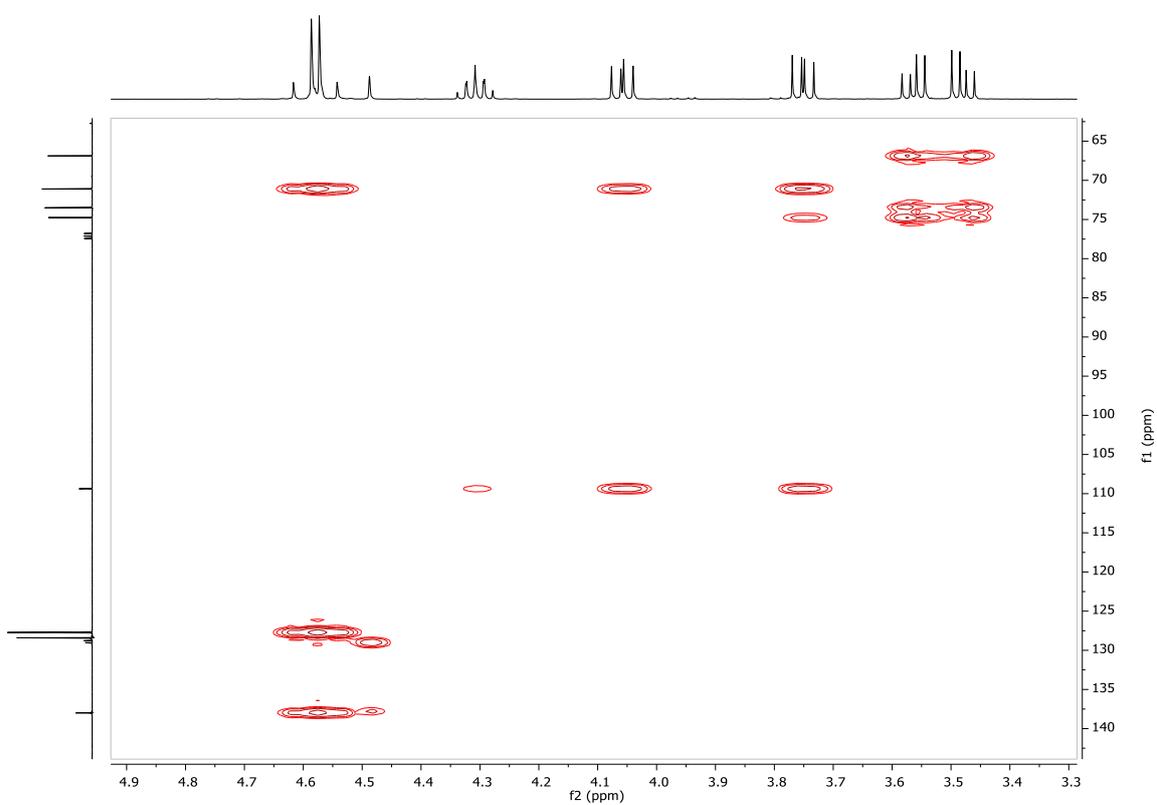
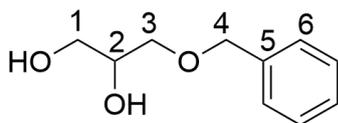


Figura 17. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (2).

Compuesto 3: 3-(Benciloxi)-1,2-propanodiol



En un matraz que contiene el compuesto (2), se añade ácido acético (24.5 g, 408 mmol) y agua (10 mL). Se agita a 65 °C durante 2 h. A la mezcla resultante, se le agrega una disolución saturada de bicarbonato potásico para neutralizar hasta que deja de burbujear. La extracción se realiza con diclorometano y se lava con disolución saturada de cloruro sódico. Se seca con sulfato magnésico anhidro, se filtra y se evapora. Se obtiene un sólido aceitoso color amarillo oscuro. La purificación se realiza por cromatografía en columna (L = 14.5, Ø = 5 cm) de sílica con hexano/AcOEt 1:1 como fase móvil. Se obtiene un sólido aceitoso color amarillo (2.2 g, 12 mmol, rendimiento 74 %)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.26 (m, H^6 , 5H, CH arílicos), 4.52 (s, H^4 , 2H), 3.90 – 3.84 (m, H^2 , 1H), 3.65 (dd, $J = 11.5, 3.7$ Hz, H^1 , 1H), 3.57 (dd, $J = 11.5, 6.0$ Hz, $\text{H}^{1'}$, 1H), 3.54 – 3.46 (m, H^3 , 2H). **$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3)** δ 137.7 (C^5), 128.5 (CH arílicos), 127.8 (C^6), 73.5 (C^4), 71.7 (C^3), 70.8 (C^2), 64.0 (C^1). **HRMS (ESI+):** $m/z = 205.0841$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calculado 205.0835 para $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NaO}_3$).

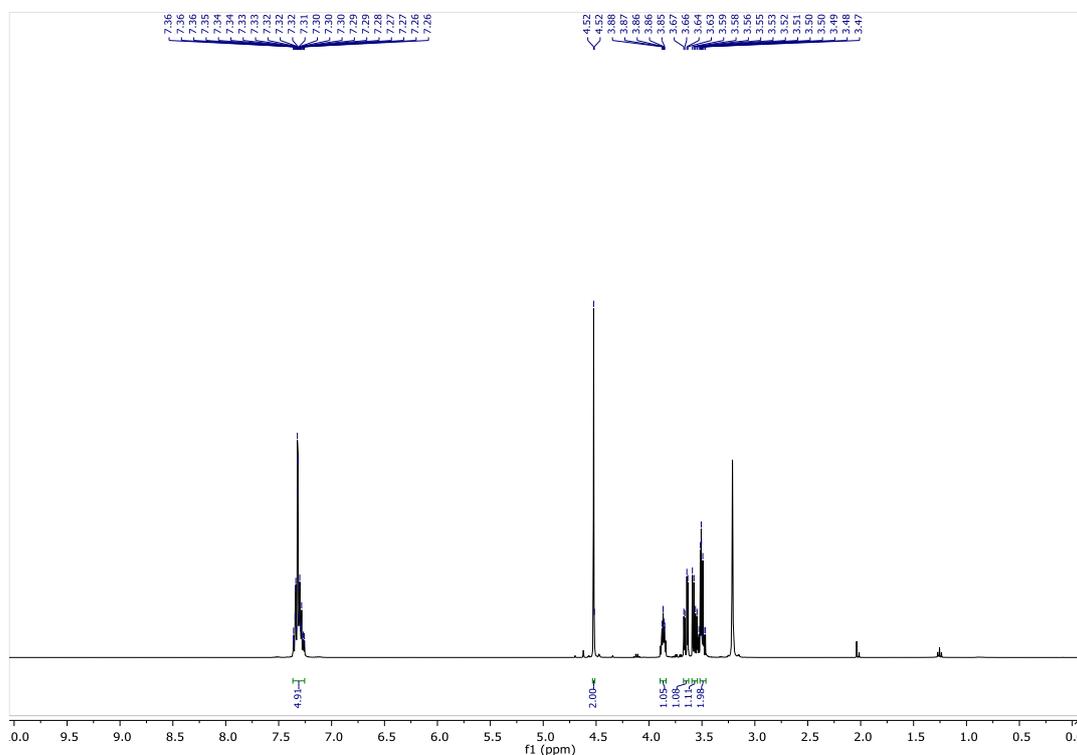


Figura 18. Espectro de $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (3).

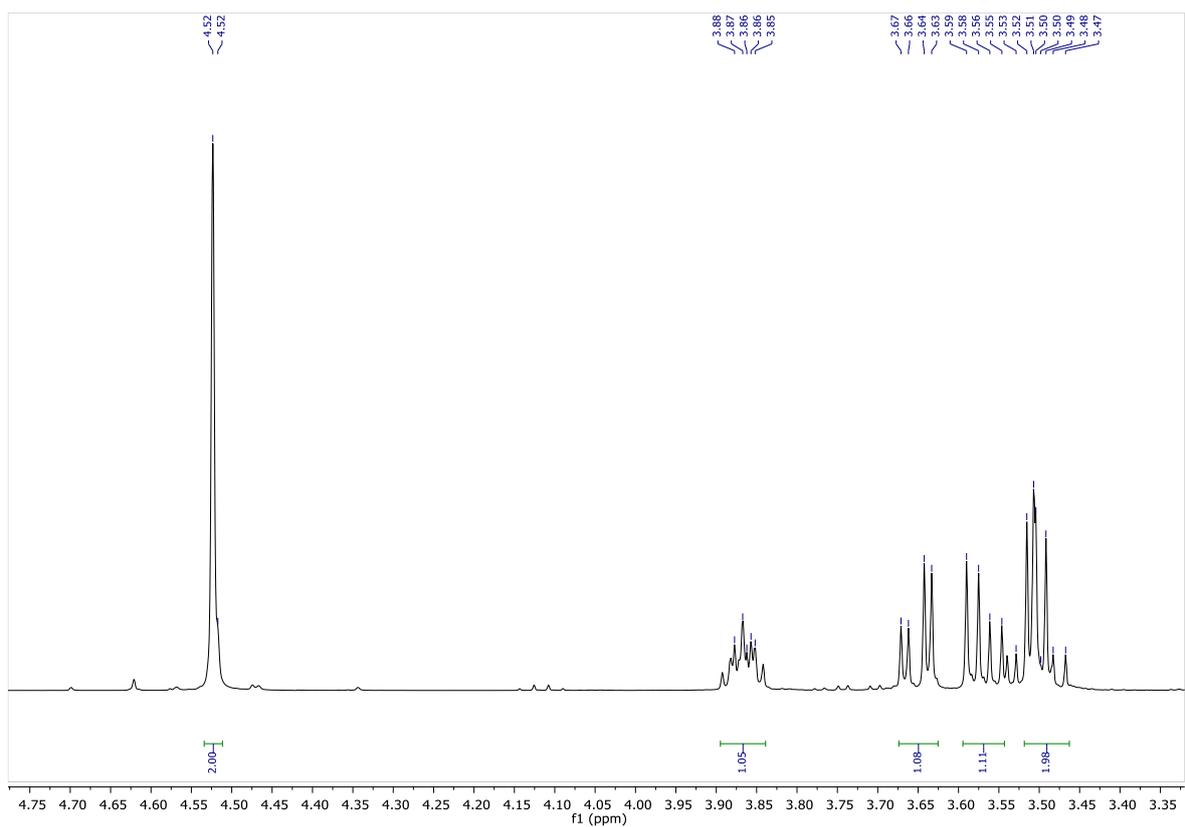


Figura 19. Espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (3).

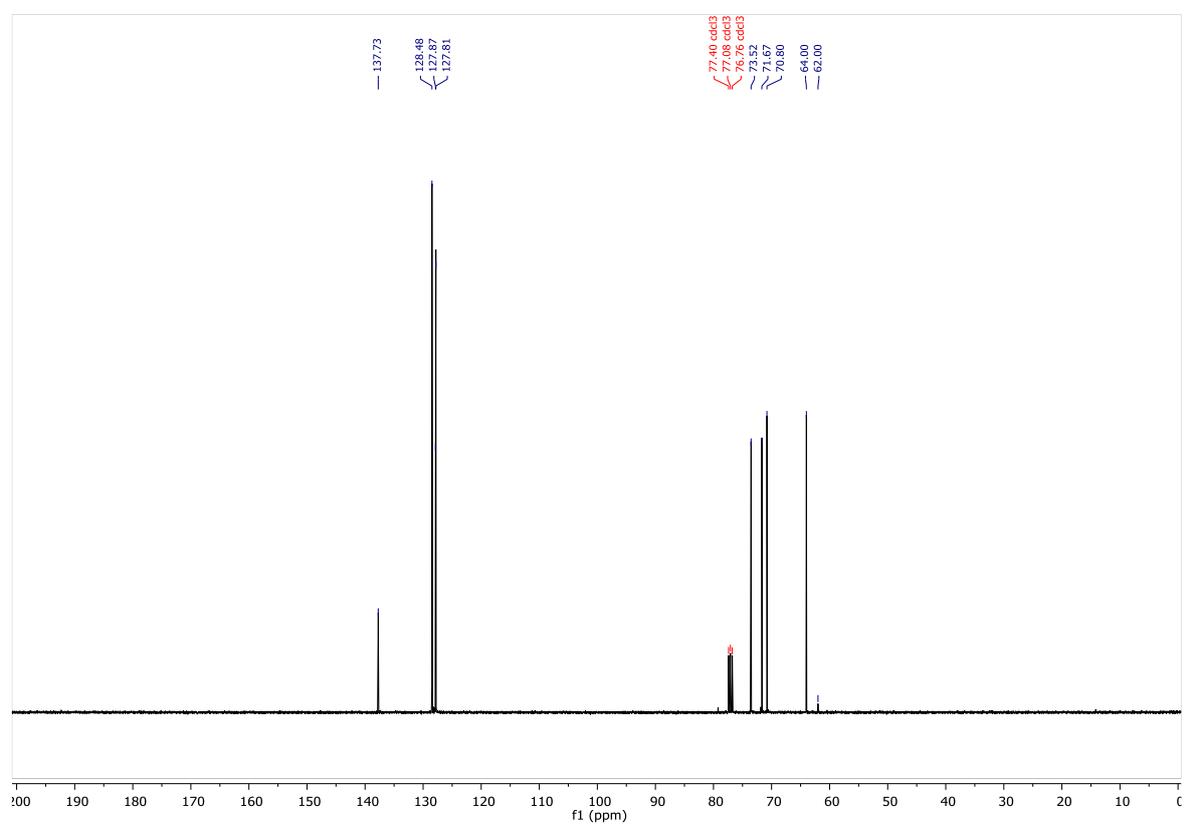


Figura 20. Espectro de ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (3).

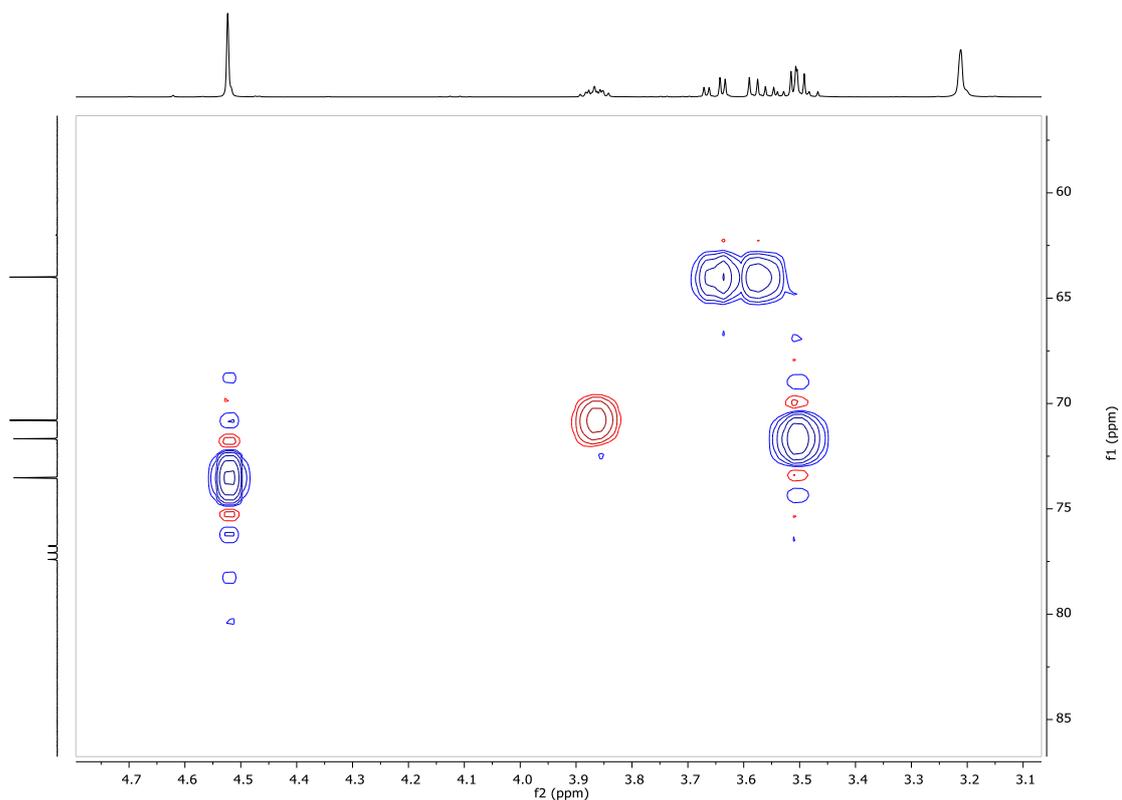


Figura 21. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQC ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (3).

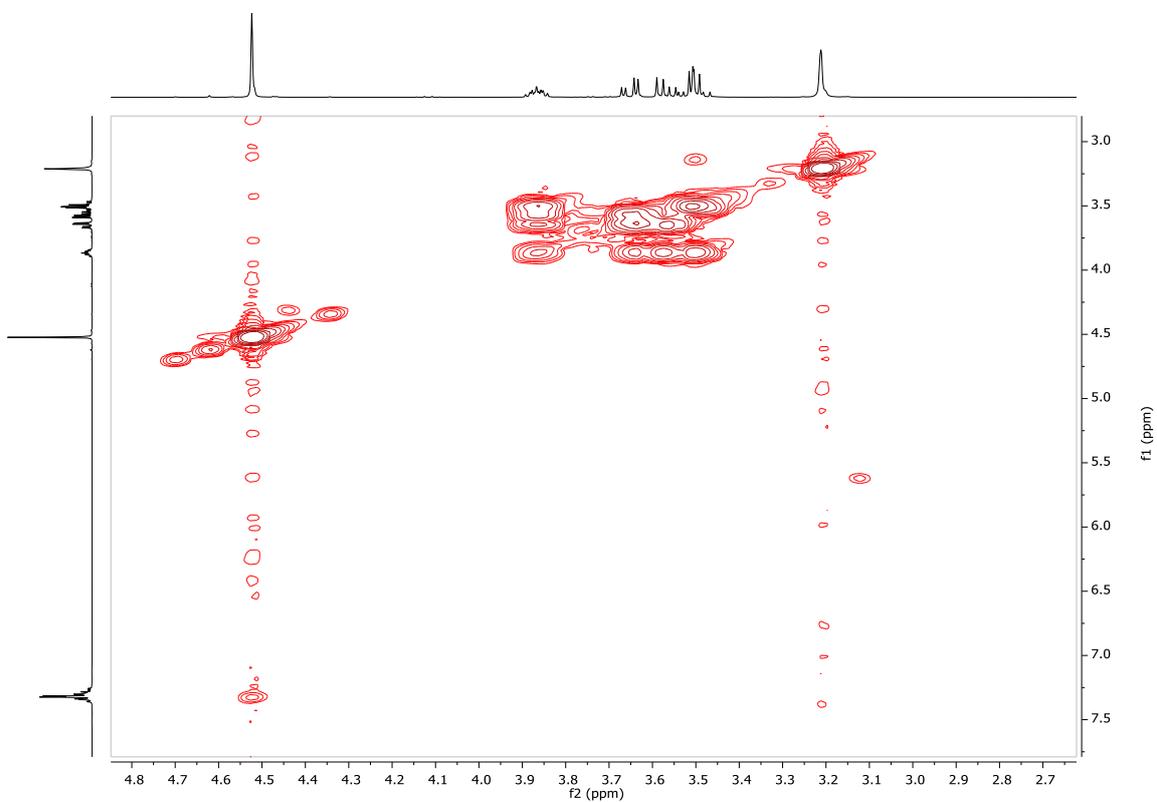


Figura 22. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -gDQCOSY ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (3).

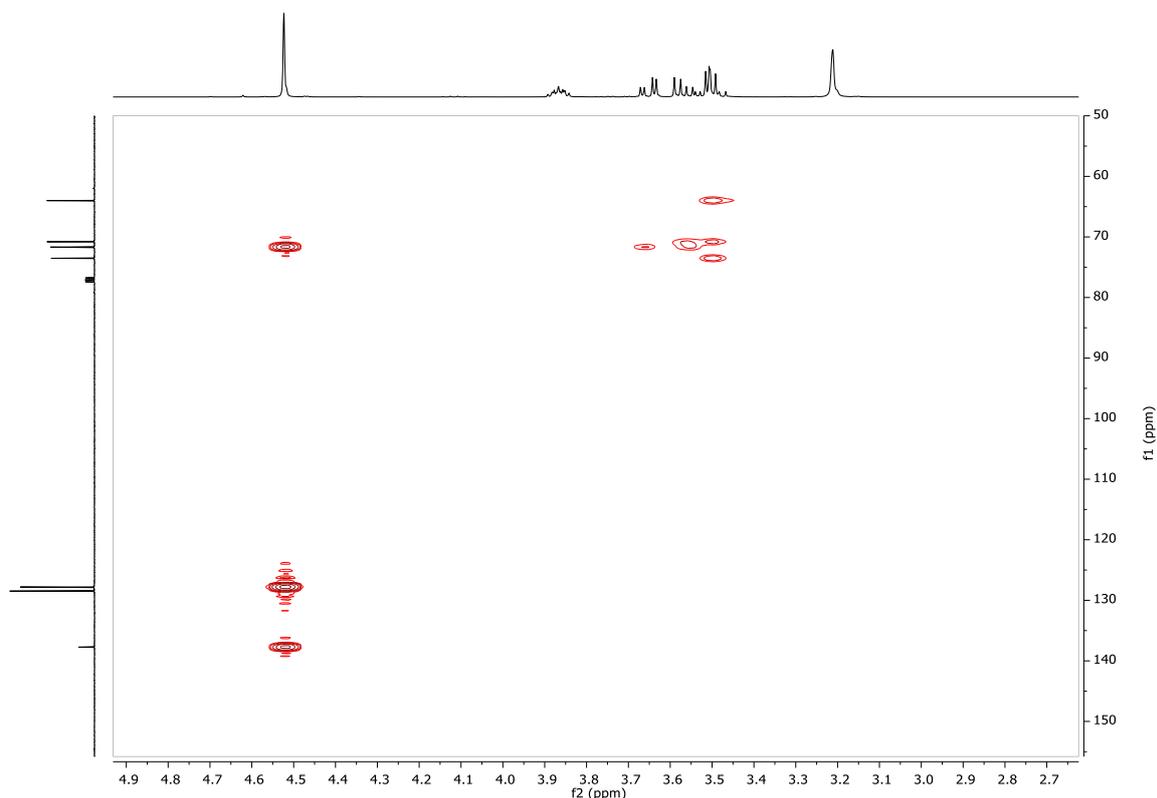
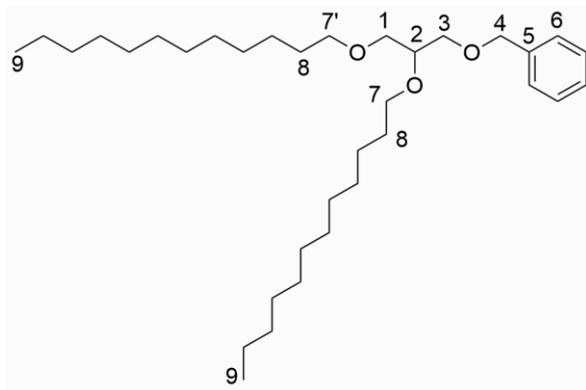


Figura 23. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (3).

Compuesto 4a: [[2,3-Bis(dodeciloxi)propoxi]metil]benceno



En un matraz que contiene el compuesto (3) (1.0 g, 5.5 mmol), se añade TBAB, completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 . Se disuelve en DMF (20 mL) y se añade 1-bromododecano (4.1 g, 16 mmol). Finalmente, NaH al 60% en aceite mineral (1.1 g, 28 mmol) se agrega y se observa burbujeo. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A la mezcla grisácea resultante se le añade acetato de etilo cuidadosamente, dado que reacciona vigorosamente y después se añade algo de disolución saturada de cloruro sódico. El producto final se extrae y se lava con disolución saturada de cloruro sódico. Se seca con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se evapora en el rotavapor. El producto sólido aceitoso amarillo se purifica por cromatografía en columna (L = 14.5, \varnothing = 5 cm) de sílica,

empleando hexano/AcOEt 20:1 como fase móvil. Se obtiene un sólido aceitoso amarillo (1.5 g, 3.0 mmol, rendimiento 54 %)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.34 – 7.25 (m, H^6 , 5H, CH arílicos), 4.56 (s, H^4 , 2H), 3.61 – 3.48 (m, H^1 , H^2 , H^3 , $\text{H}^{7'}$, 7H), 3.43 (t, $J = 6.7$ Hz, $\text{H}^{7'}$, 2H), 1.56 (m, $J = 7.4$ Hz, H^8 , 4H), 1.26 (s, 36H CH_2 alquílicos), 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, H^9 , 6H). **$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3)** δ 138.5 (C^5), 127.6 (C^6), 127.5 (CH arílicos), 77.9 (C^2), 73.4 (C^4), 71.7 (C^7), 70.7 (C^1 , C^3 , $\text{C}^{7'}$), 70.6 (C^1 , C^3 , $\text{C}^{7'}$), 70.3 (C^1 , C^3 , $\text{C}^{7'}$), 31.9 (CH_2 alquílicos), 30.1 (C^8), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.5 (CH_2 alquílicos), 29.4 (C^8), 26.1 (CH_2 alquílicos), 26.1 (CH_2 alquílicos), 22.7 (CH_2 alquílicos), 14.1 (C^9). **HRMS (ESI+):** $m/z = 519.4762$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (Calculada 519.4772 para $\text{C}_{34}\text{H}_{63}\text{O}_3$).

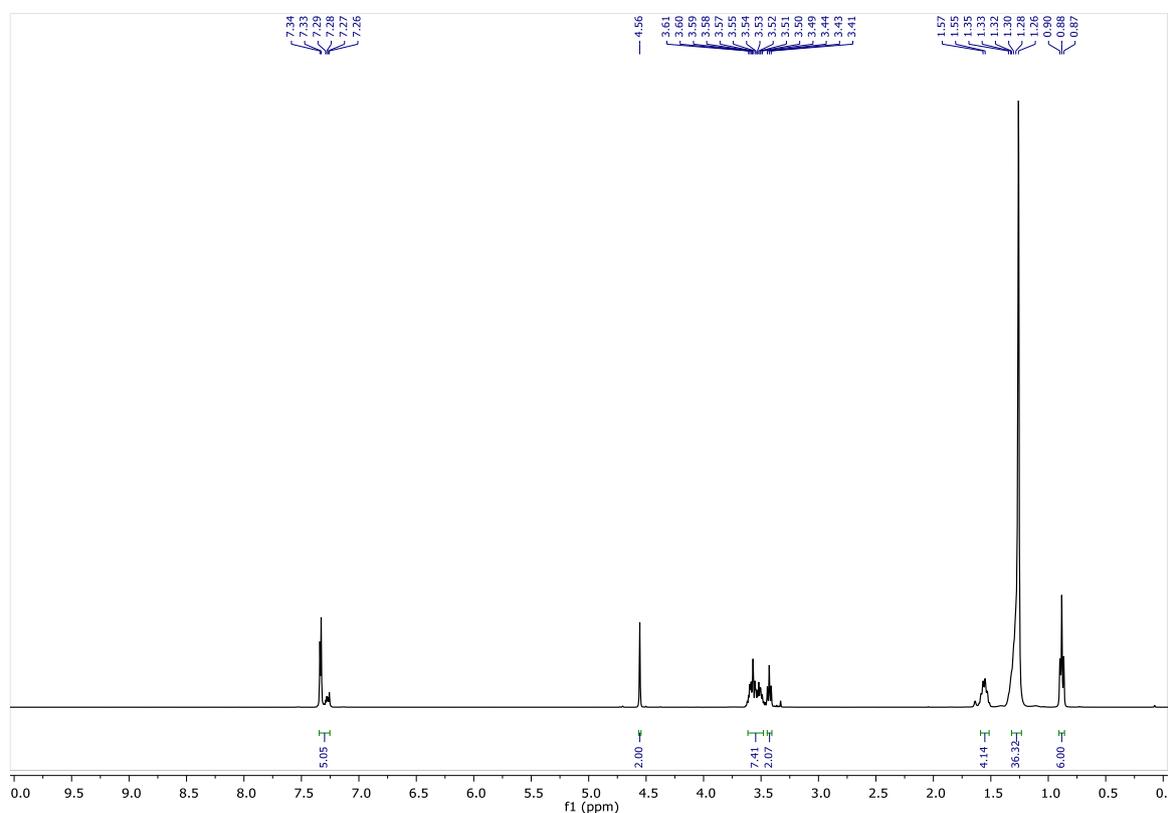


Figura 24. Espectro $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4a).

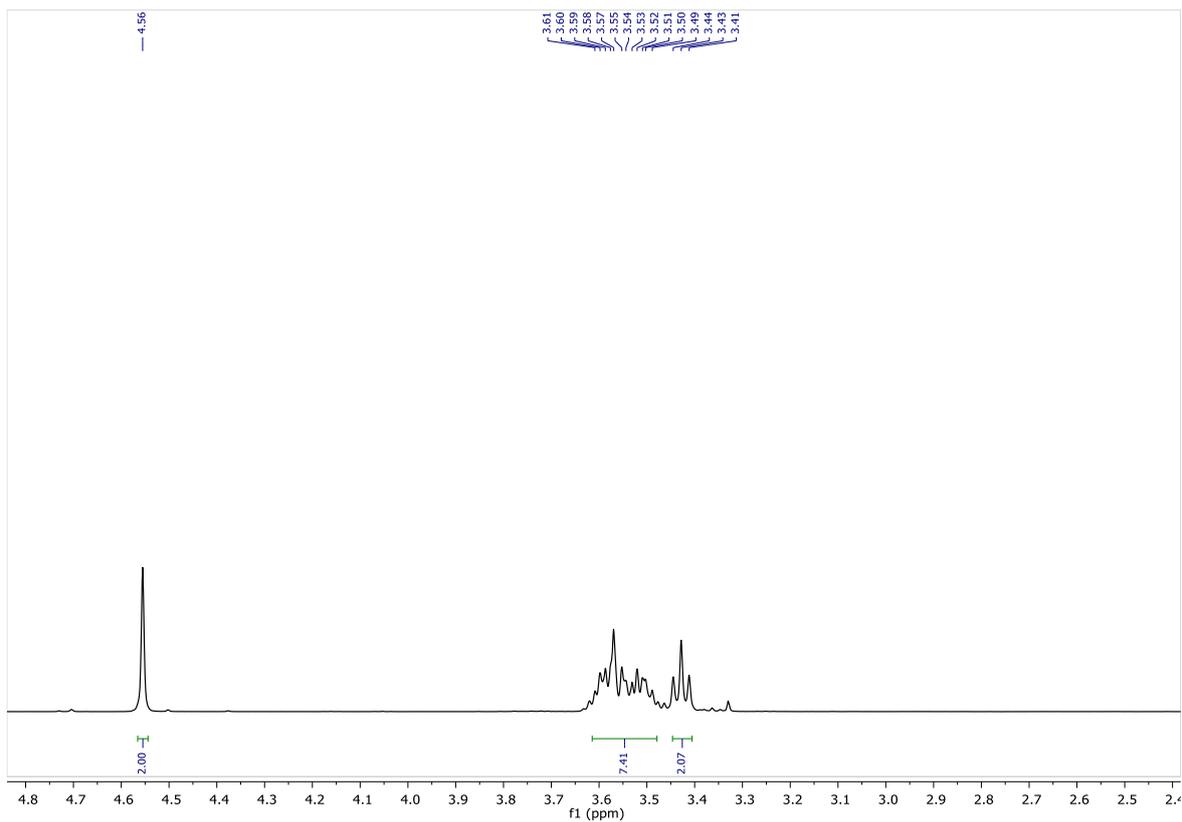


Figura 25. Espectro ampliado ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4a).

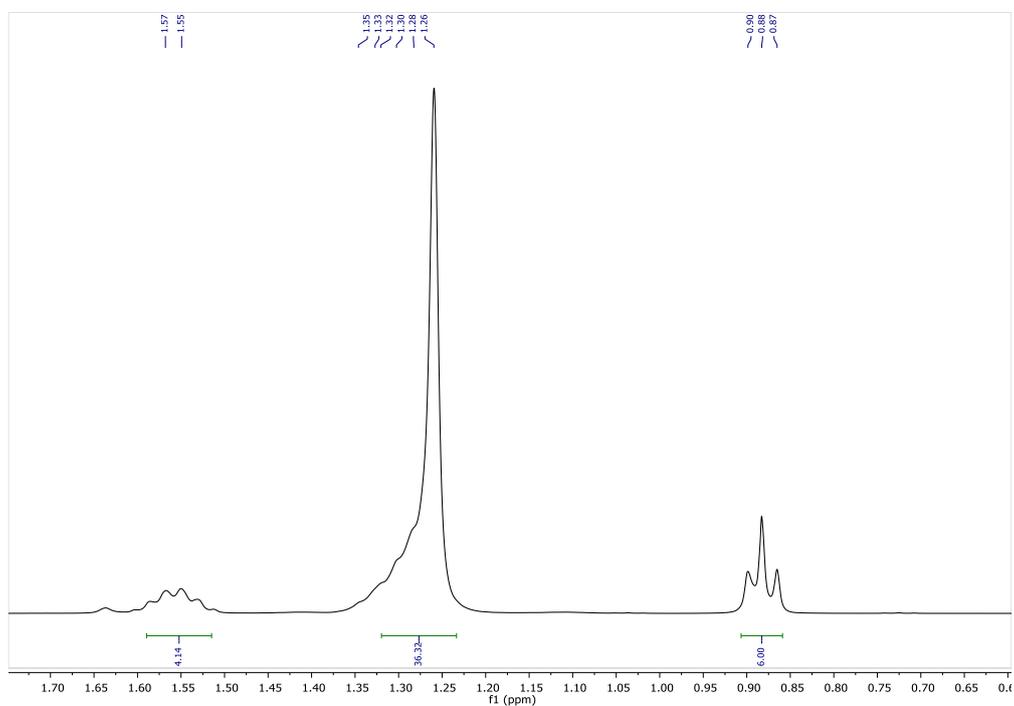


Figura 26. Espectro ampliado ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4a).

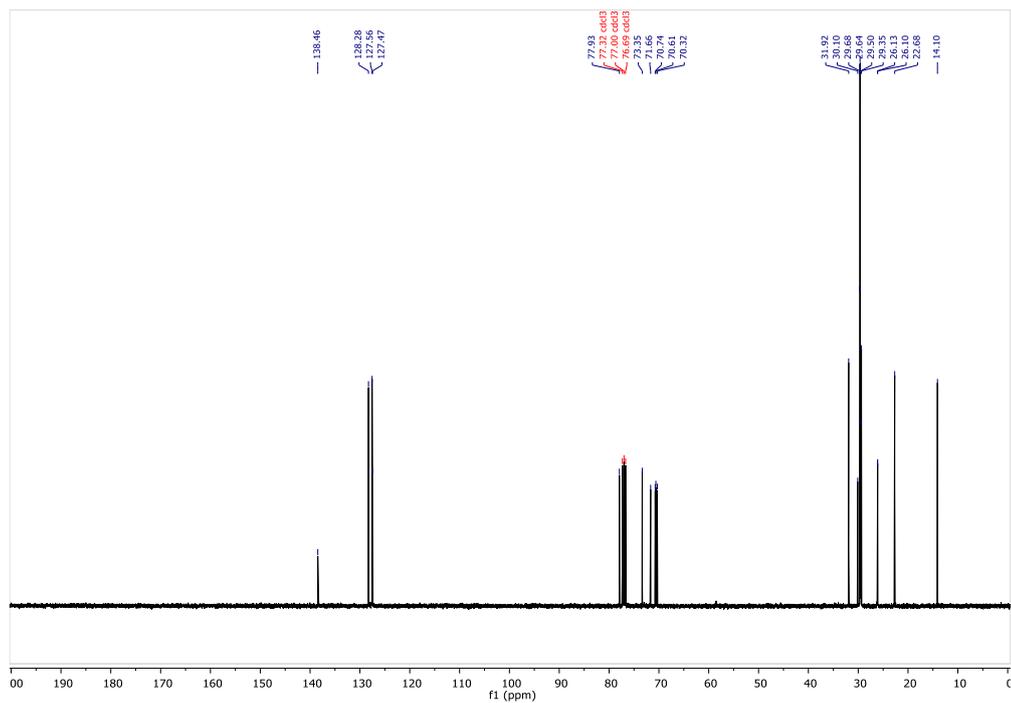


Figura 27. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (4^a).

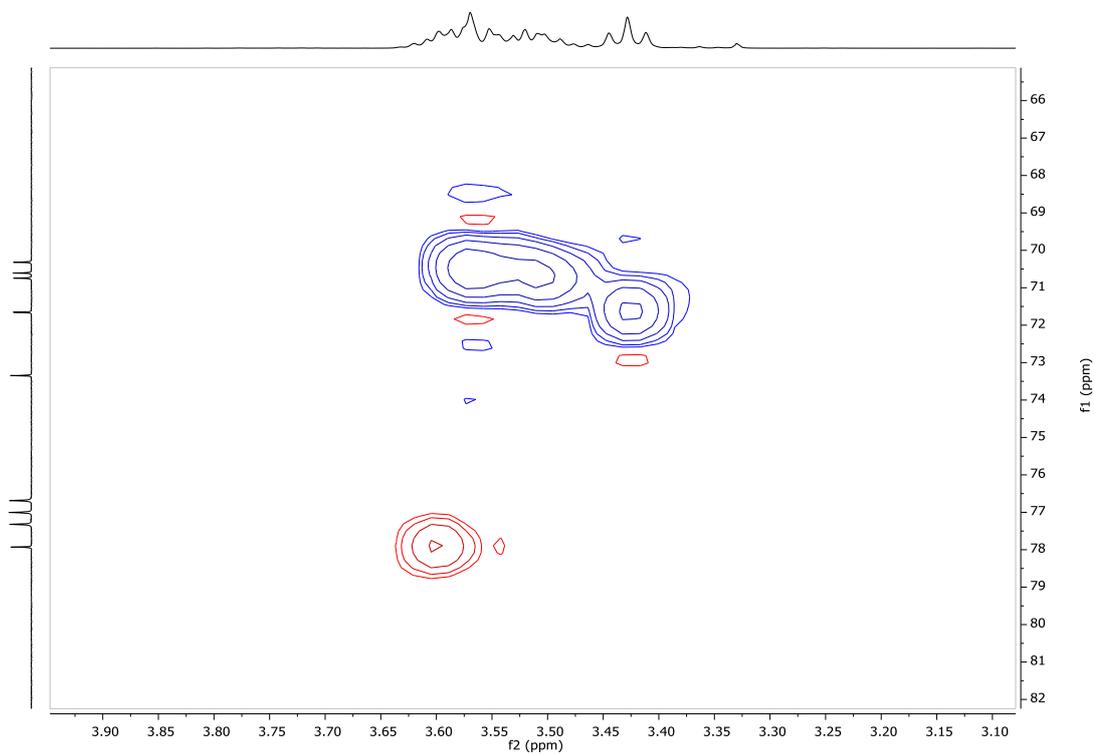


Figura 28. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQC ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4^a).

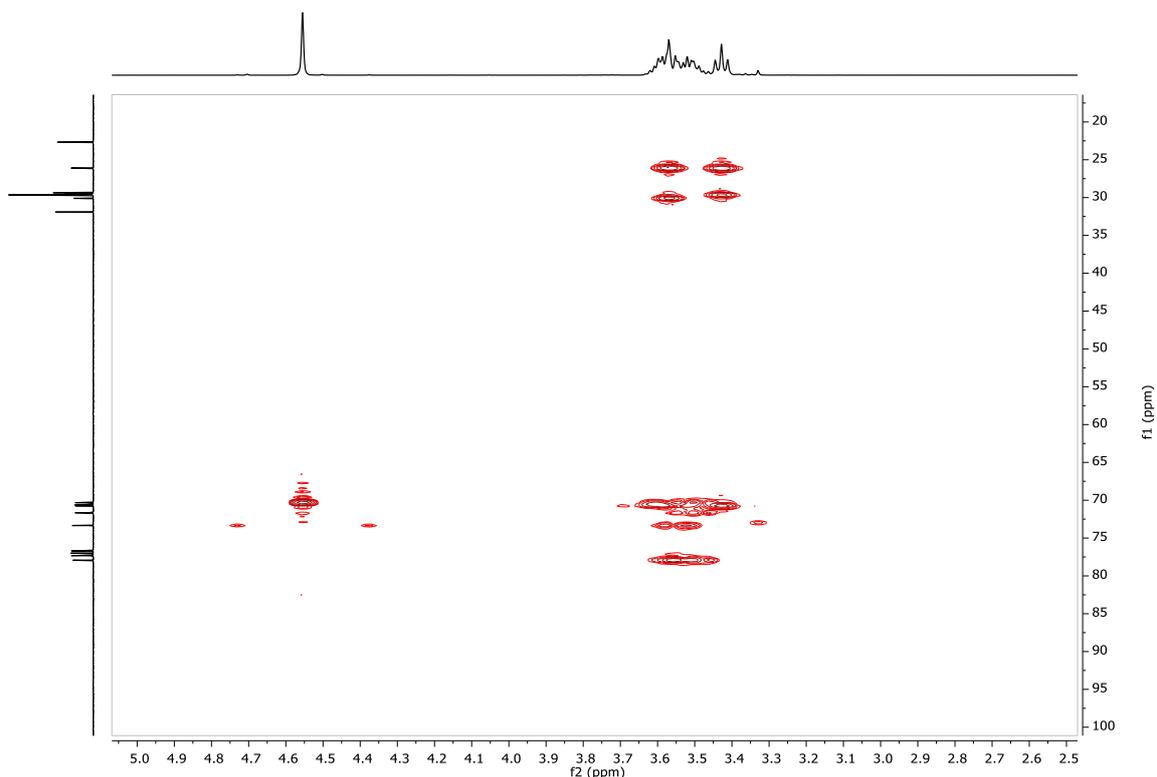
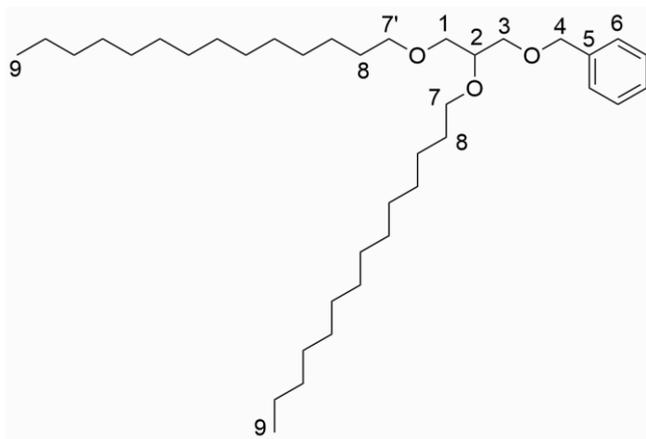


Figura 29. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4a).

Compuesto 4b: [[2,3-Bis(tetradeciloxi)propoxi]metil]benceno



En un matraz que contiene el compuesto (3) (1.0 g, 5.5 mmol), se añade TBAB, completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 . Se disuelve en DMF (20 mL) y se añade 1-bromotetradecano (4.6 g, 16 mmol). Finalmente, NaH al 60% en aceite mineral (1.1 g, 28 mmol) se añade y se observa burbujeo. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A la mezcla grisácea resultante se le añade acetato de etilo cuidadosamente, dado que reacciona vigorosamente y después se añade algo de disolución saturada de cloruro sódico. El producto final se extrae y se lava con disolución saturada de cloruro sódico. Se seca con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se evapora en el rotavapor. El producto sólido

aceitoso amarillo se purifica por cromatografía en columna (L = 14.5, Ø = 5 cm) de sílica, empleando hexano/AcOEt 20:1 como fase móvil. Se obtiene un sólido amarillo aceitoso (1.5 g, 2.6 mmol, rendimiento 47 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 – 7.25 (m, H⁶, 5H, CH arílicos), 4.56 (s, H⁴, 2H), 3.62 – 3.45 (m, H¹, H², H³, H⁷, 7H), 3.43 (s, H⁷, 2H), 1.56 (d, J = 7.5 Hz, H⁸, 4H), 1.26 (s, 44H, CH₂ alquílicos), 0.88 (t, J = 6.7 Hz, H⁹, 6H). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 138.5 (C⁵), 127.6 (C⁶), 127.5 (CH arílicos), 77.9 (C²), 73.5 (C⁴), 71.7 (C⁷), 70.7 (C¹, C³, C^{7'}), 70.6 (C¹, C³, C^{7'}), 70.3 (C¹, C³, C^{7'}), 31.9 (CH₂ alquílicos), 30.1 (CH₂ alquílicos), 29.7 (CH₂ alquílicos), 29.7 (CH₂ alquílicos), 29.7 (CH₂ alquílicos), 29.6 (CH₂ alquílicos), 29.5 (CH₂ alquílicos), 29.4 (CH₂ alquílicos), 26.1 (CH₂ alquílicos), 26.1 (CH₂ alquílicos), 22.7 (CH₂ alquílicos), 14.1 (C⁹). **HRMS (ESI+):** m/z = 597.5219 [M + Na]⁺ (Calculada 597.5217 para C₃₈H₇₀NaO₃).

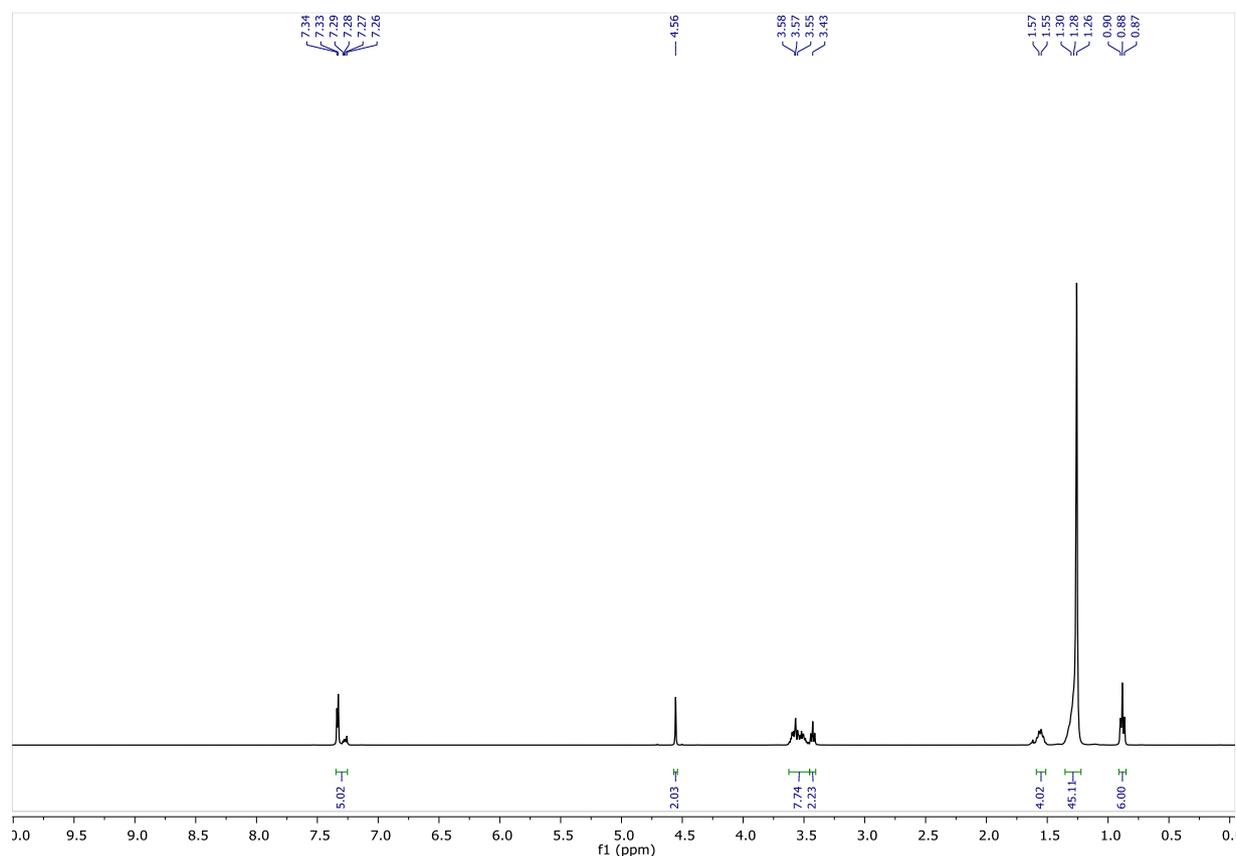


Figura 30. Espectro ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) del compuesto (4b).

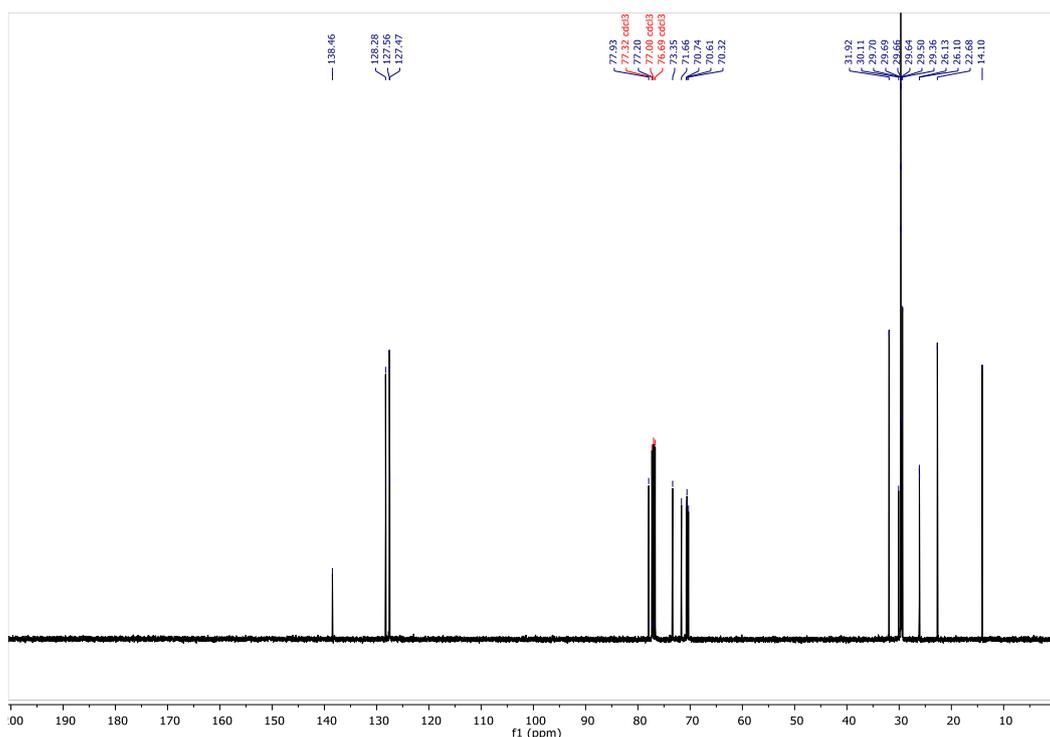
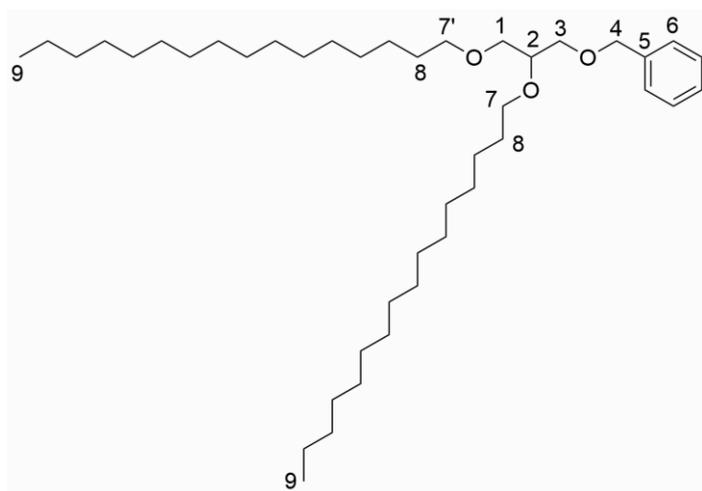


Figura 29. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (**4b**).

Compuesto 4c: *[[2,3-Bis(hexadeciloxi)propoxi]metil]benceno*



En un matraz que contiene el compuesto (**3**) (750 g, 4.1 mmol), se añade TBAB, completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 . Se disuelve en DMF (15 mL) y se añade 1-bromohexadecano (3.8 g, 12 mmol). Finalmente, NaH al 60% en aceite mineral (840 mg, 21 mmol) se añade y se observa burbujeo. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A la mezcla grisácea resultante se le añade acetato de etilo cuidadosamente, dado que reacciona vigorosamente y después se añade algo de disolución saturada de cloruro sódico. El producto final se extrae y se lava con disolución saturada de cloruro sódico. Se seca con sulfato de magnesio anhidro, se filtra y se evapora en el rotavapor. El producto sólido aceitoso amarillo se purifica por cromatografía en columna ($L = 14.5$, $\varnothing = 5$ cm) de sílica,

empleando hexano/AcOEt 20:1 como fase móvil. Se obtiene un sólido amarillo aceitoso (1.6 g, 2.5 mmol, 63 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.34 – 7.25 (m, H^6 , 5H, CH arílicos), 4.55 (s, H^4 , 2H), 3.62- 3.46 (m, H^1 , H^2 , H^3 , $\text{H}^{7'}$, 7H), 3.43 (t, $J = 6.7$ Hz, H^7 , 2H), 1.56 (s, H^8 , 4H), 1.25 (s, 52H, CH_2 alquílicos), 0.88 (s, H^9 , 6H). **$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3)** δ 138.5 (C^5), 128.3 (CH arílicos), 127.6 (C^6), 77.9 (C^2), 71.7 (C^7), 70.7 (C^1 , C^3 , $\text{C}^{7'}$), 70.6 (C^1 , C^3 , $\text{C}^{7'}$), 70.3 (C^1 , C^3 , $\text{C}^{7'}$), 31.9 (CH_2 alquílicos), 30.1 (C^8), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.5 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 26.1 (CH_2 alquílicos), 26.1 (CH_2 alquílicos), 22.7 (CH_2 alquílicos), 14.1 (C^9). **HRMS (ESI+):** $m/z = 709.6493$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Calculada 709.6469 para $\text{C}_{46}\text{H}_{86}\text{NaO}_3$).

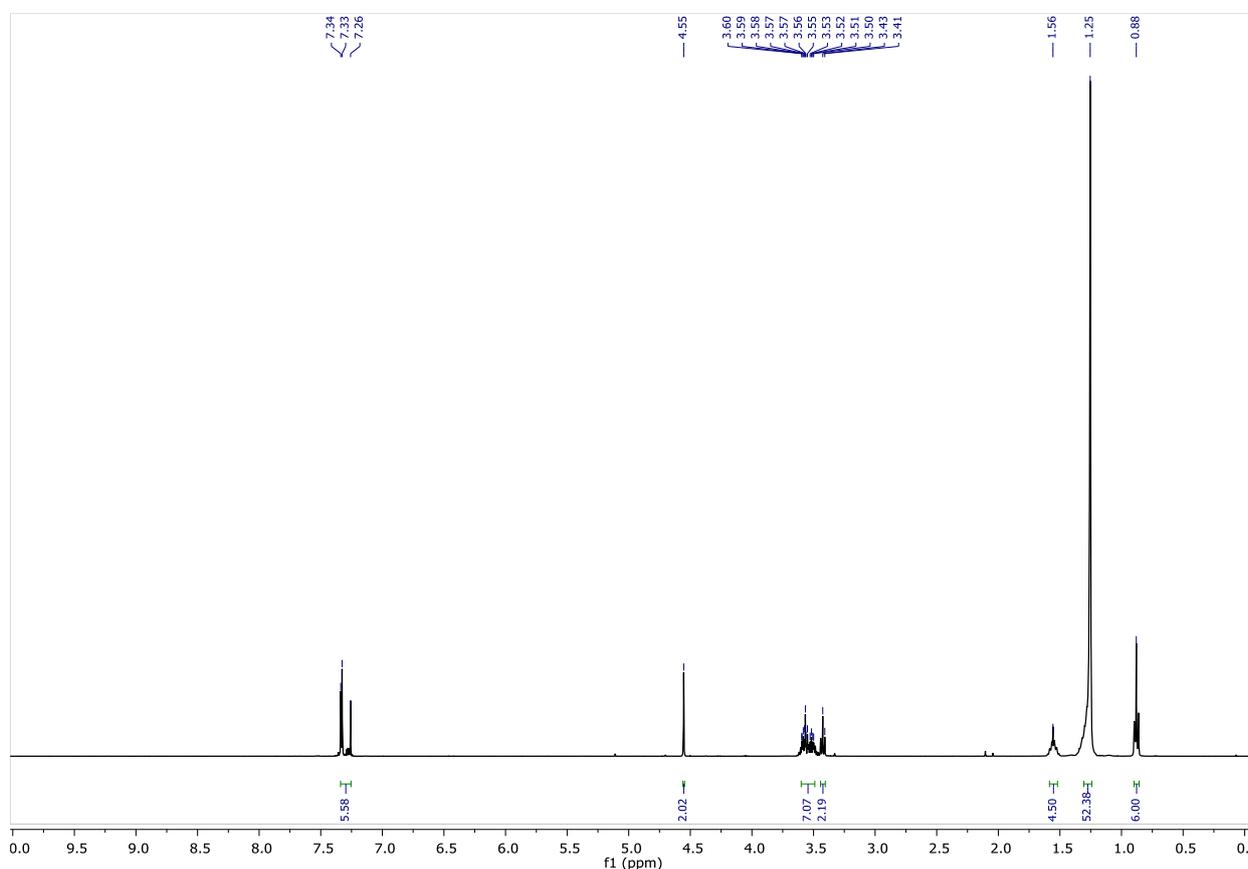


Figura 30. Espectro $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (**4c**).

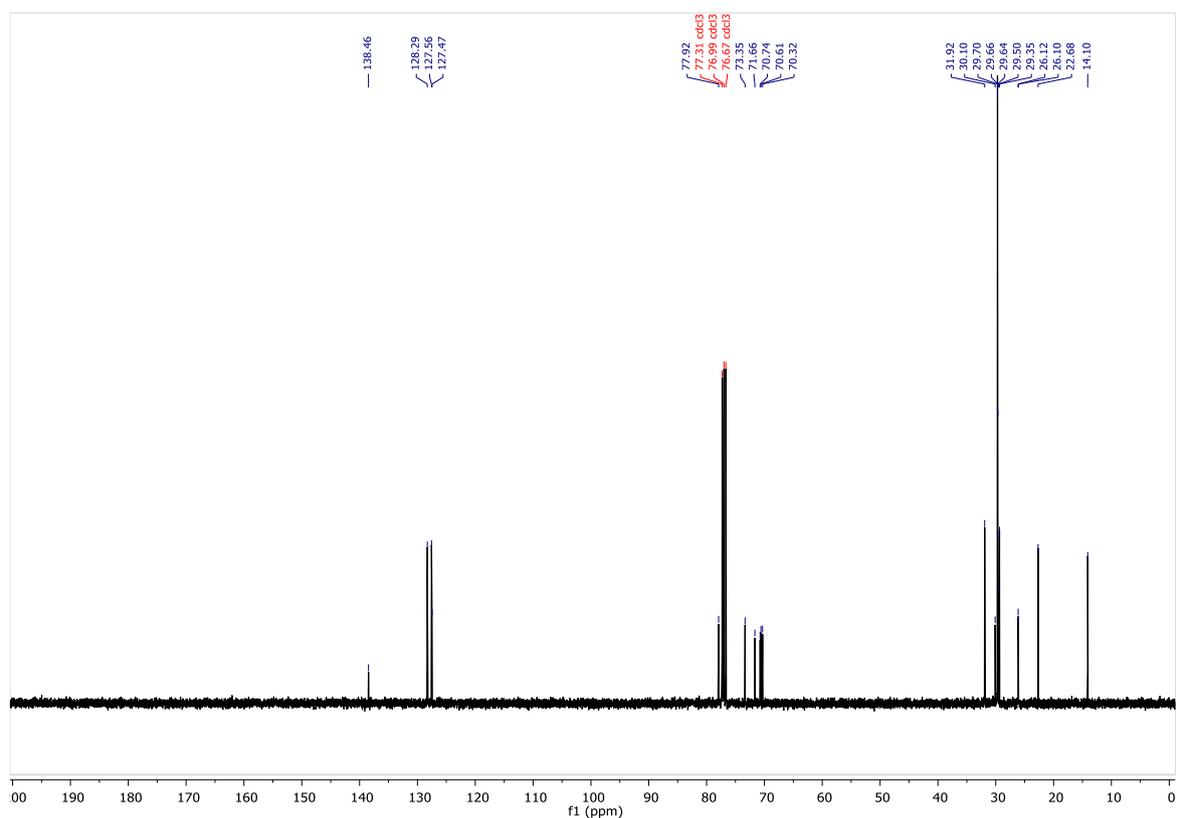
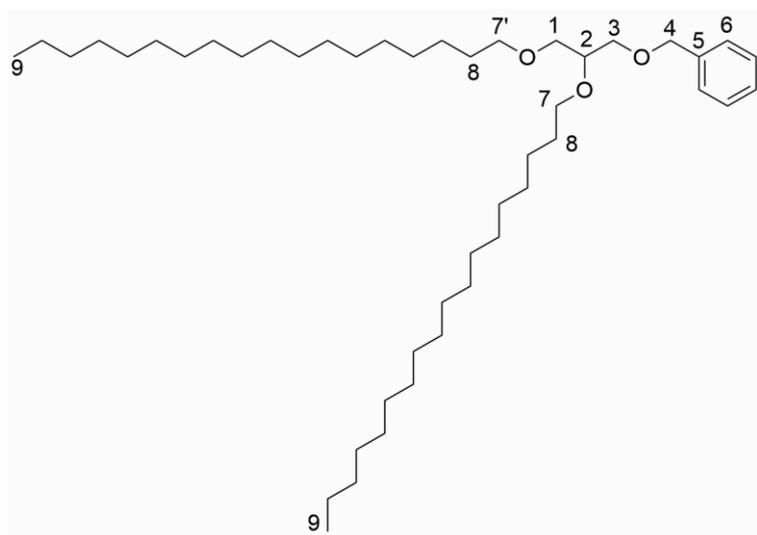


Figura 31. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (4c).

Compuesto 4d: $[[2,3\text{-Bis}(\text{octadeciloxi})\text{propoxi}]\text{metil}]\text{benceno}$



En un matraz que contiene el compuesto (3) (1.8 g, 9.9 mmol), se añade TBAB (0.31 g, 1.0 mmol), completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 . Esto se disuelve en DMF (36 mL) y se añade 1-bromooctadecano (9.9 g, 30 mmol). Finalmente, NaH al 60% en aceite mineral (2.1 g, 50 mmol) se añade y se observa burbujeo. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A la mezcla grisácea resultante se le añade acetato de etilo cuidadosamente, dado que reacciona vigorosamente y después se añade algo de disolución

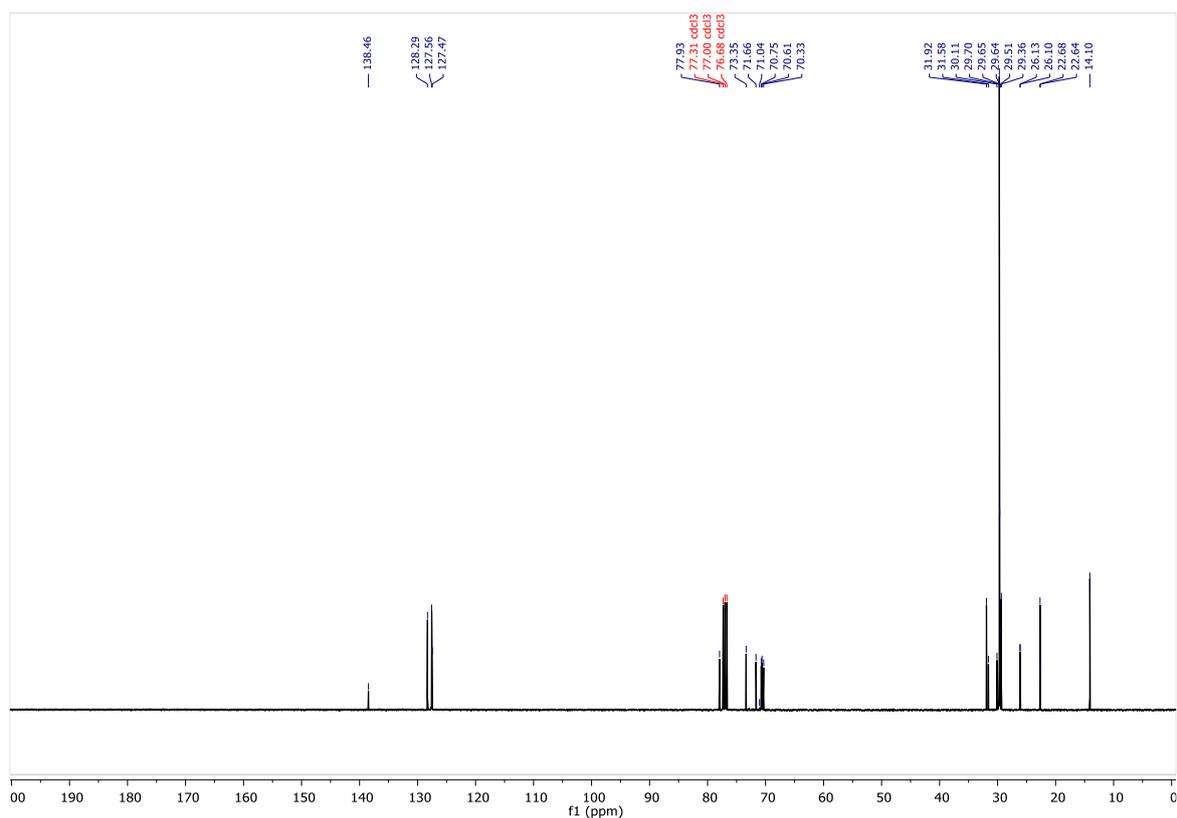
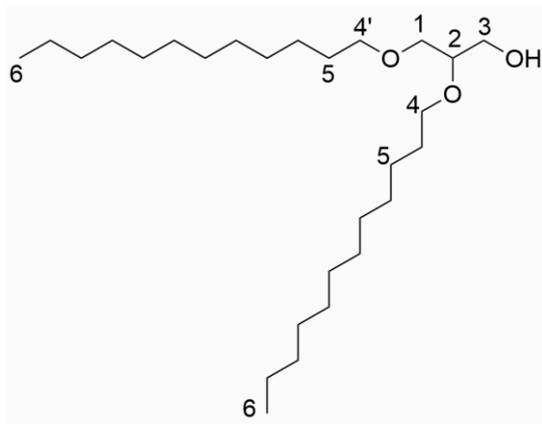


Figura 33. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (4d).

Compuesto 5a: 2,3-Bis(dodeciloxi)-1-propanol



El compuesto (4a) (0.53 g, 1.0 mmol) se añade a un Schlenk, completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 . Se disuelve en MeOH (2 mL) y después se añaden 50 mg por mmol de Pd/C (48 mg). Se llenan dos globos con H_2 y se inyectan a través de un septum de goma en el Schlenk. La mezcla se agita durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla final se filtra en celita, lavando con acetato de etilo. Se obtiene un sólido blanco como producto final (0.41 g, 0.90 mmol, rendimiento 98 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.75 – 3.68 (m, H^3 , 1H), 3.64 – 3.39 (m, H^1 , H^2 , $\text{H}^{3'}$, $\text{H}^{4'}$, 6H), 3.44 (d, $J = 6.4$ Hz, H^4 , 2H), 2.19 (d, $J = 6.0$ Hz, OH), 1.56 (q, $J = 7.0$ Hz, H^5 , 4H), 1.25 (s, 32H, CH_2 alquílicos), 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, H^6 , 6H). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 78.2 (C^2), 71.8 (C^4), 70.9, 70.4 (C^1 , $\text{C}^{4'}$), 63.1 (C^3 , $\text{C}^{3'}$), 31.9 (CH_2 alquílicos), 30.1 (CH_2 alquílicos), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.4 (CH_2 alquílicos), 29.3 (CH_2 alquílicos), 26.1 (CH_2 alquílicos), 22.7 (CH_2 alquílicos), 14.1 (C^6). **HRMS (ESI+):** $m/z = 451.4125$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Calculada 451.4122 para $\text{C}_{27}\text{H}_{56}\text{NaO}_3$).

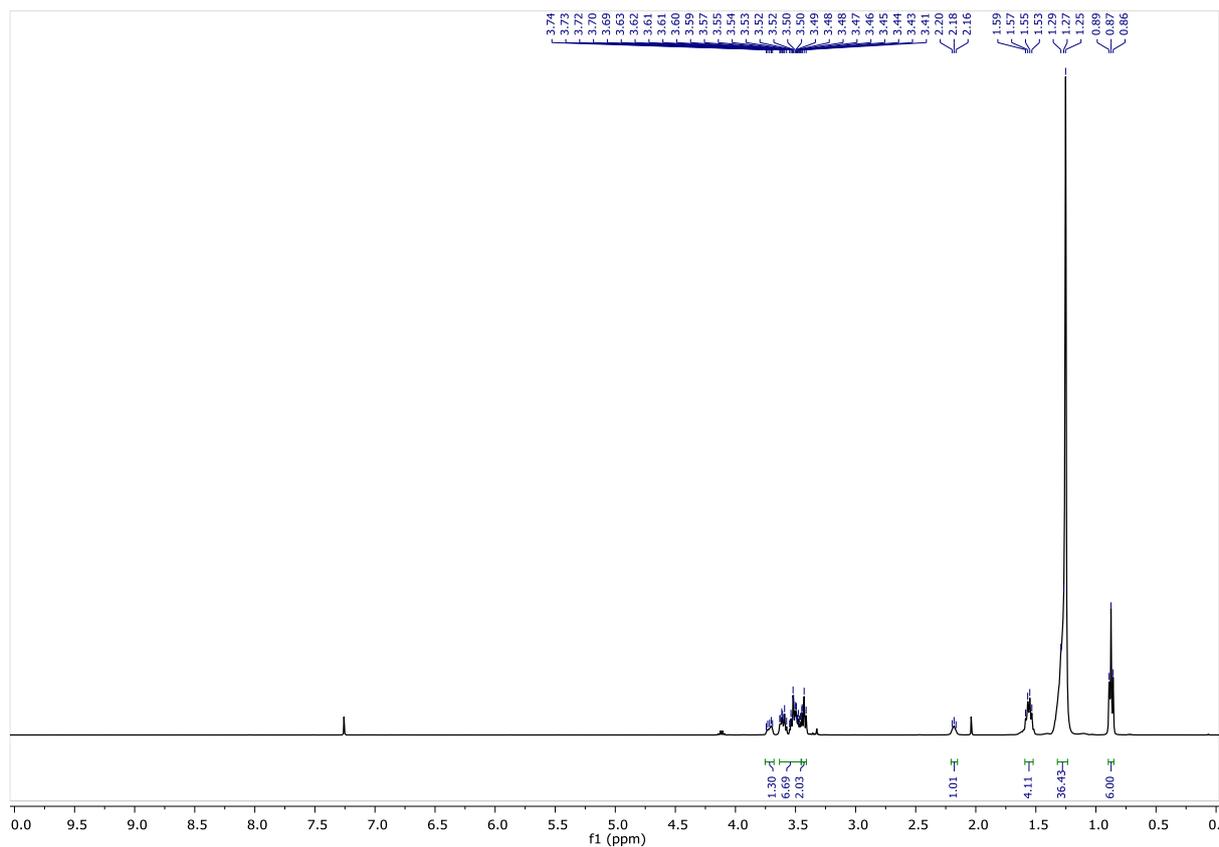


Figura 34. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5a).

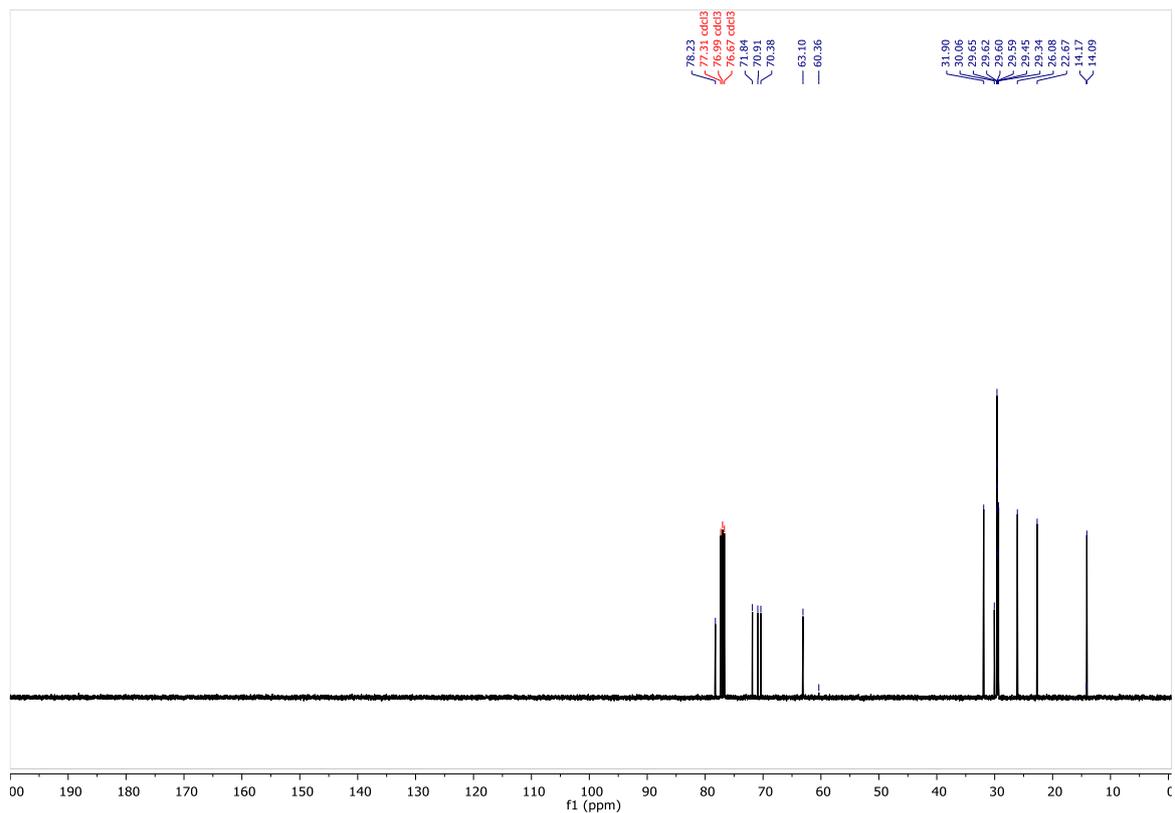


Figura 35. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (5a).

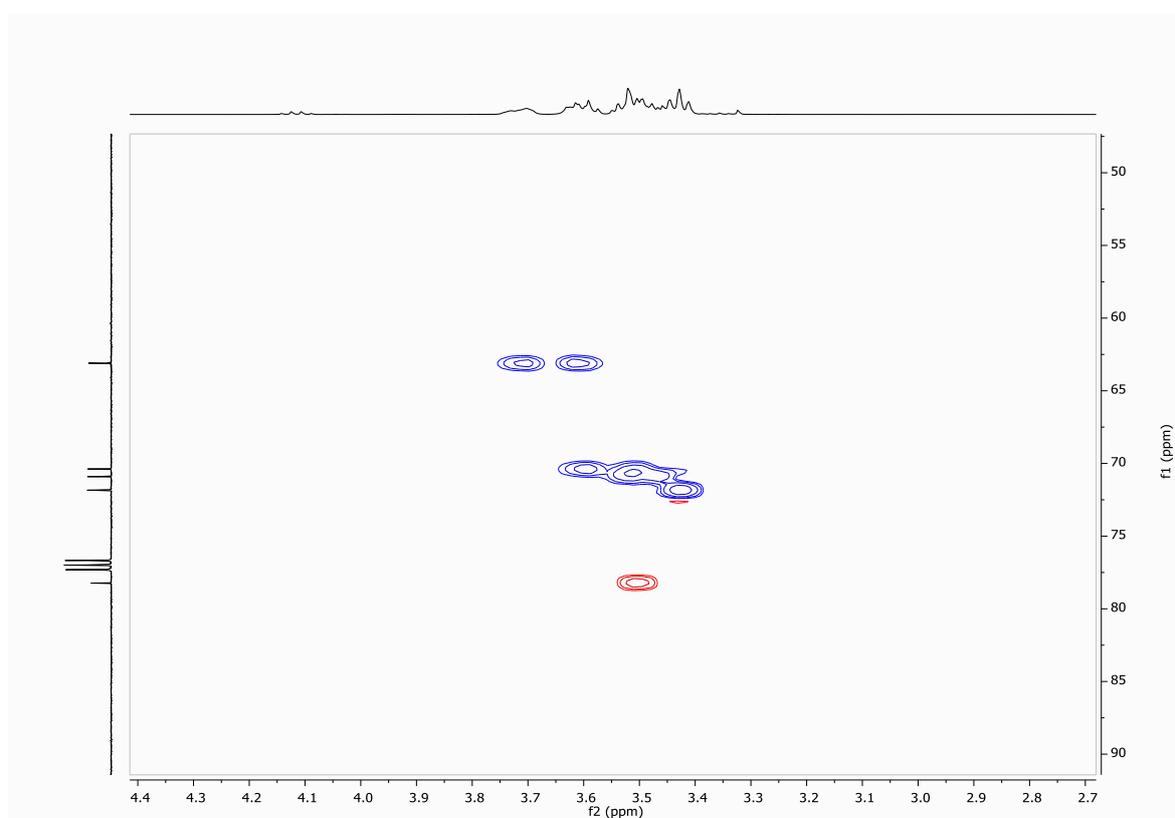


Figura 36. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQC ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5a).

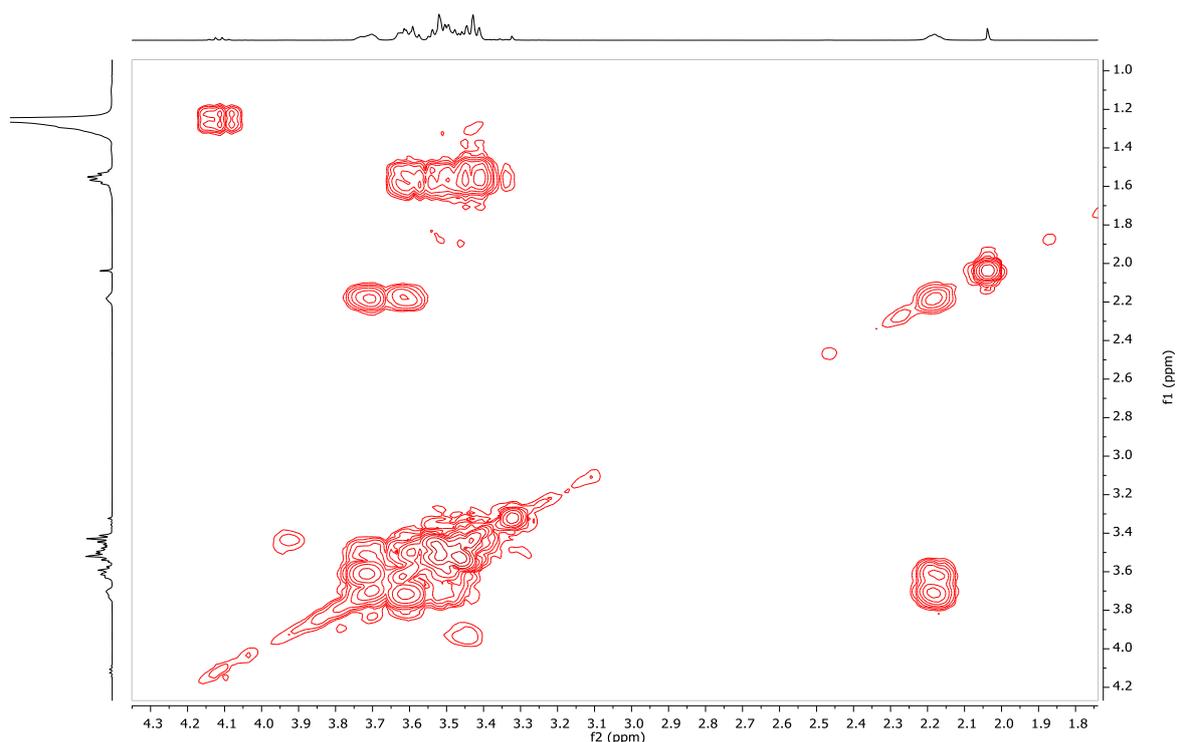
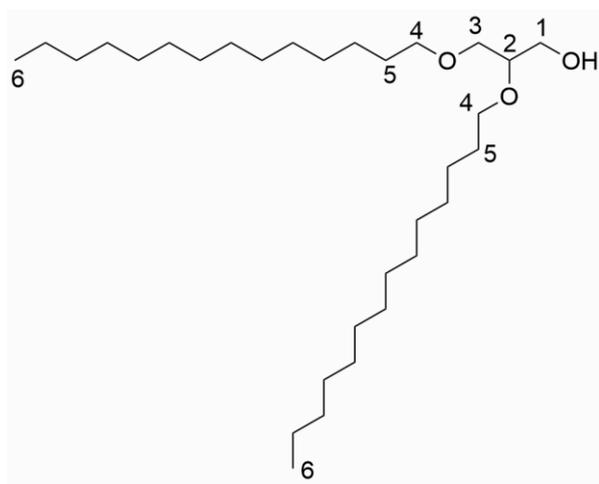


Figura 37. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -gQCOSY ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5a).

Compound 5b: 2,3-Bis(tetradecyloxy)-1-propanol



El compuesto (4b) (0.42 g, 0.60 mmol) se añade a un Schlenk, completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 . Se disuelve en acetato de etilo (8 mL) y después se añaden MeOH (3 mL) y 50 mg por mmol de Pd/C (31 mg). Se llenan dos globos con H_2 y se inyectan a través de un septum de goma en el Schlenk. La mezcla se agita durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla final se filtra en celita, lavando con diclorometano. Se obtiene un sólido blanco como producto final (0.28 g, 0.57 mmol, rendimiento 96 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.72 (dd, $J = 11.2, 3.5$ Hz, H^3 , 1H), 3.63 – 3.46 (m, $\text{H}^1, \text{H}^2, \text{H}^3, \text{H}^4$, 6H), 3.43 (t, $J = 6.8$ Hz, H^4 , 2H), 1.56 (q, $J = 6.9$ Hz, H^5 , 4H), 1.25 (s, 44H, CH_2 alquílicos), 0.87 (d, $J = 7.1$ Hz, H^6 , 6H). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 78.2 (C^2), 71.8 (C^4), 70.9 (C^1, C^4), 70.4 (C^1, C^4), 63.1 (C^3, C^3), 31.9 (CH_2 alquílicos), 30.1 (C^5), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.5 (CH_2 alquílicos), 29.3 (CH_2 alquílicos), 26.1 (CH_2 alquílicos), 22.7 (CH_2 alquílicos), 14.1 (C^6). **HRMS (ESI+):** $m/z = 507.4748$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Calculado 507.4753 $\text{C}_{31}\text{H}_{64}\text{NaO}_3$).

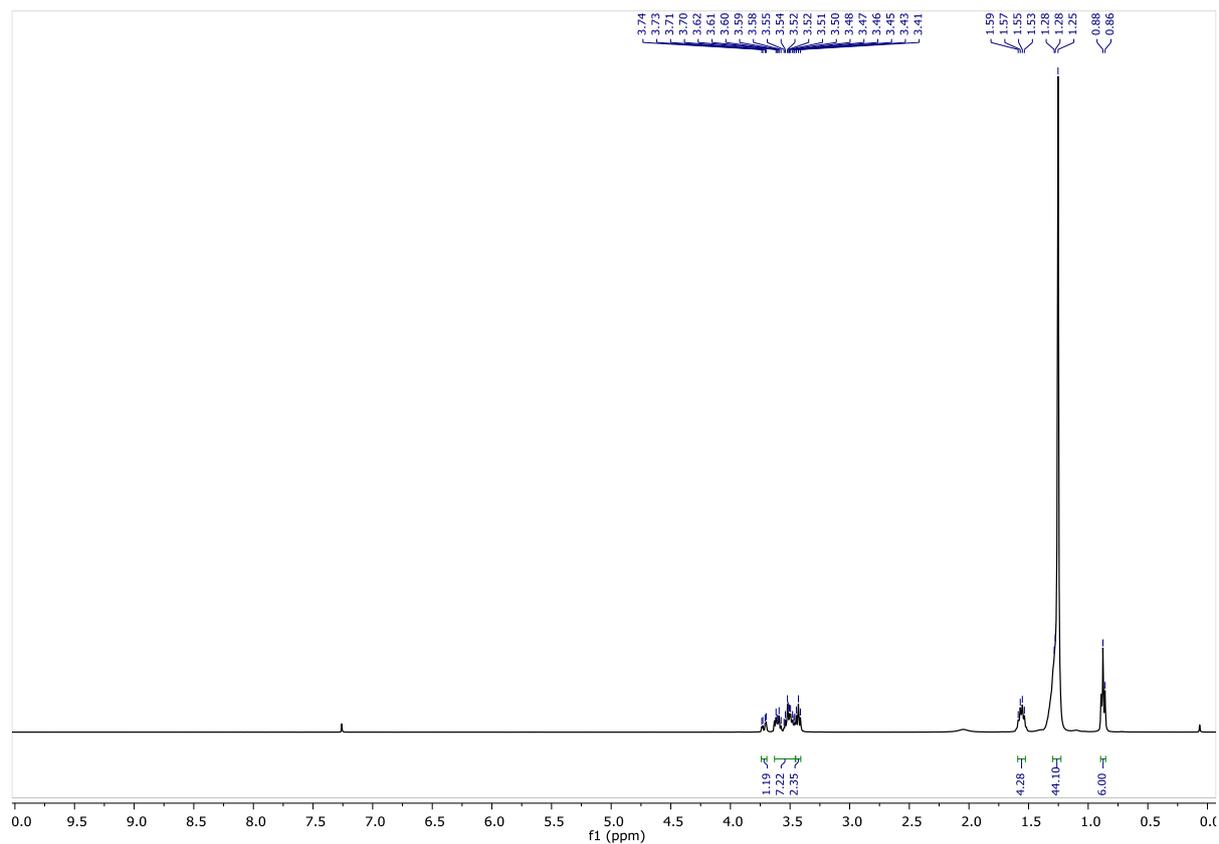


Figura 38. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (**5b**).

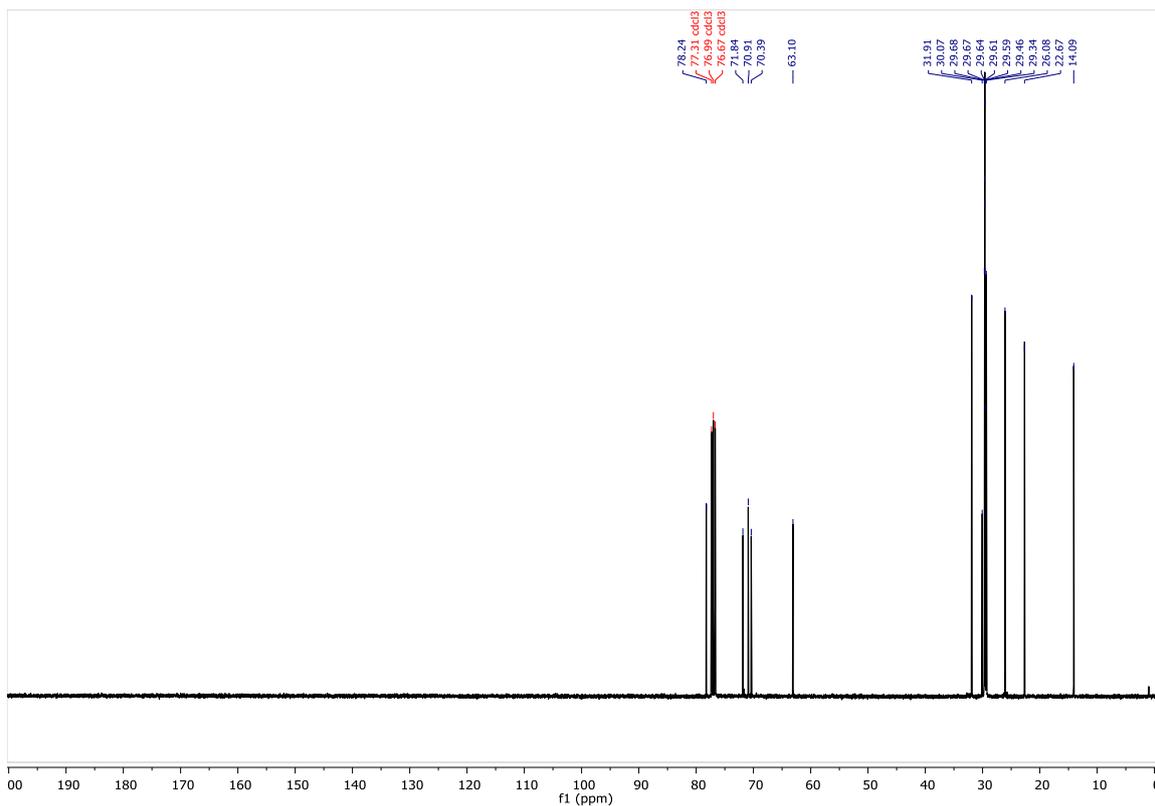
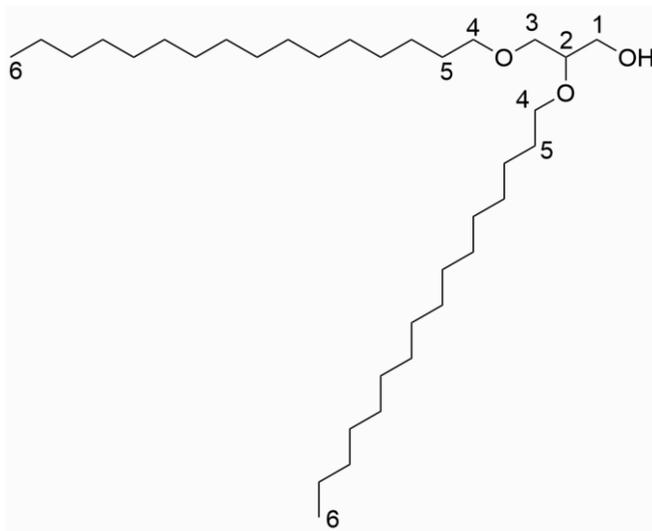


Figura 39. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (5b).

Compuesto 5c: 2,3-Bis(hexadeciloxi)-1-propanol



El compuesto (4c) (0.32 g, 0.50 mmol) se añade a un Schlenk, completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 . Se disuelve en acetato de etilo (8 mL) y después se añaden MeOH (3 mL) y 50 mg por mmol de Pd/C (23 mg). Se llenan dos globos con H_2 y se inyectan a través de un septum de goma en el Schlenk. La mezcla se agita durante 24 h a temperatura ambiente. La mezcla final se filtra en celita, lavando con diclorometano. Se obtiene un sólido blanco como producto final (0.20 g, 0.40 mmol, rendimiento 80 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.75 – 3.70 (m, H^3 , 1H), 3.64 – 3.45 (m, H^1 , H^2 , $\text{H}^{3'}$, $\text{H}^{4'}$, 6H), 3.43 (t, $J = 6.8$ Hz, H^4 , 2H), 1.56 (q, $J = 6.9$ Hz, H^5 , 4H), 1.25 (s, 52H, CH_2 alquílicos), 0.90 – 0.84 (t, H^6 , 6H). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 78.2 (C^2), 70.9 (C^1 , C^4), 70.4 (C^1 , C^4), 63.1 (C^3), 31.9 (CH_2 alquílicos), 30.1 (C^5), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.5 (CH_2 alquílicos), 29.4 (CH_2 alquílicos), 29.3 (CH_2 alquílicos), 26.1 (CH_2 alquílicos), 22.7 (CH_2 alquílicos), 14.1 (C^6). **HRMS (ESI+):** $m/z = 563.5374$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Calculado 563.5379 para $\text{C}_{35}\text{H}_{72}\text{NaO}_3$).

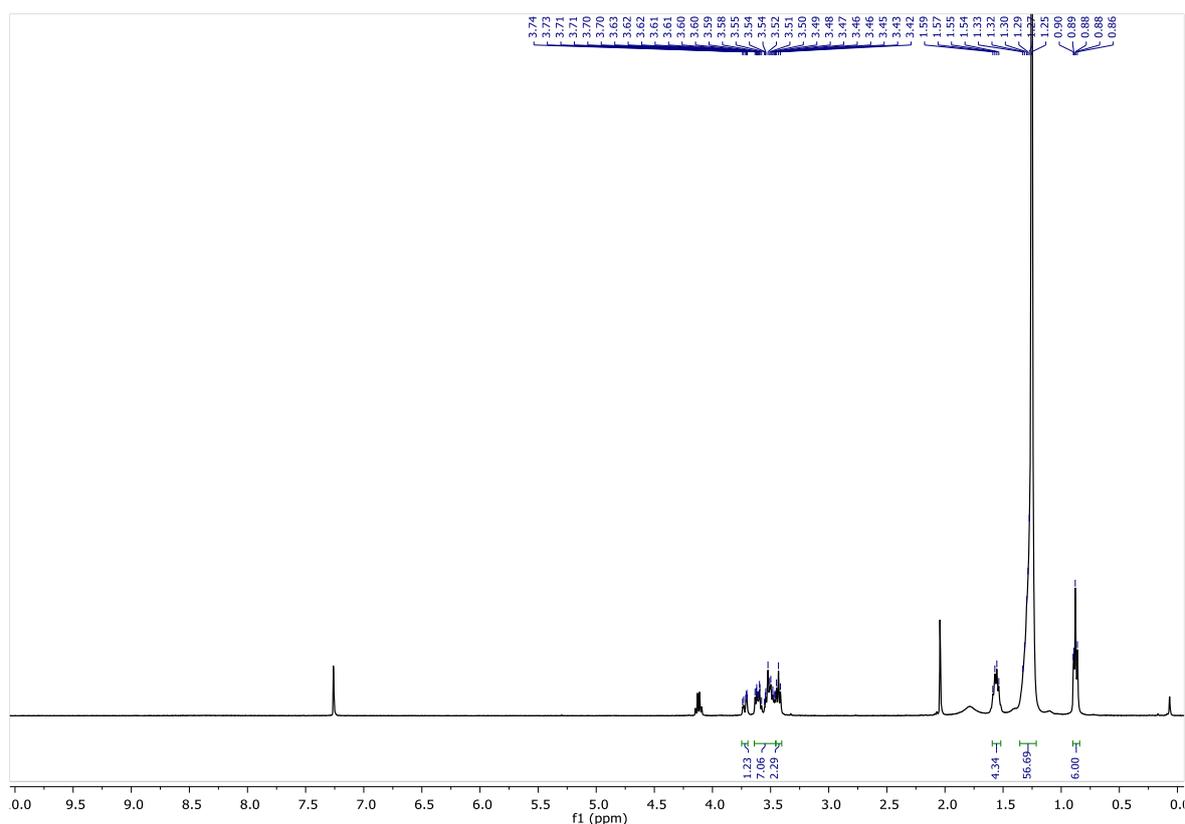


Figura 40. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5c).

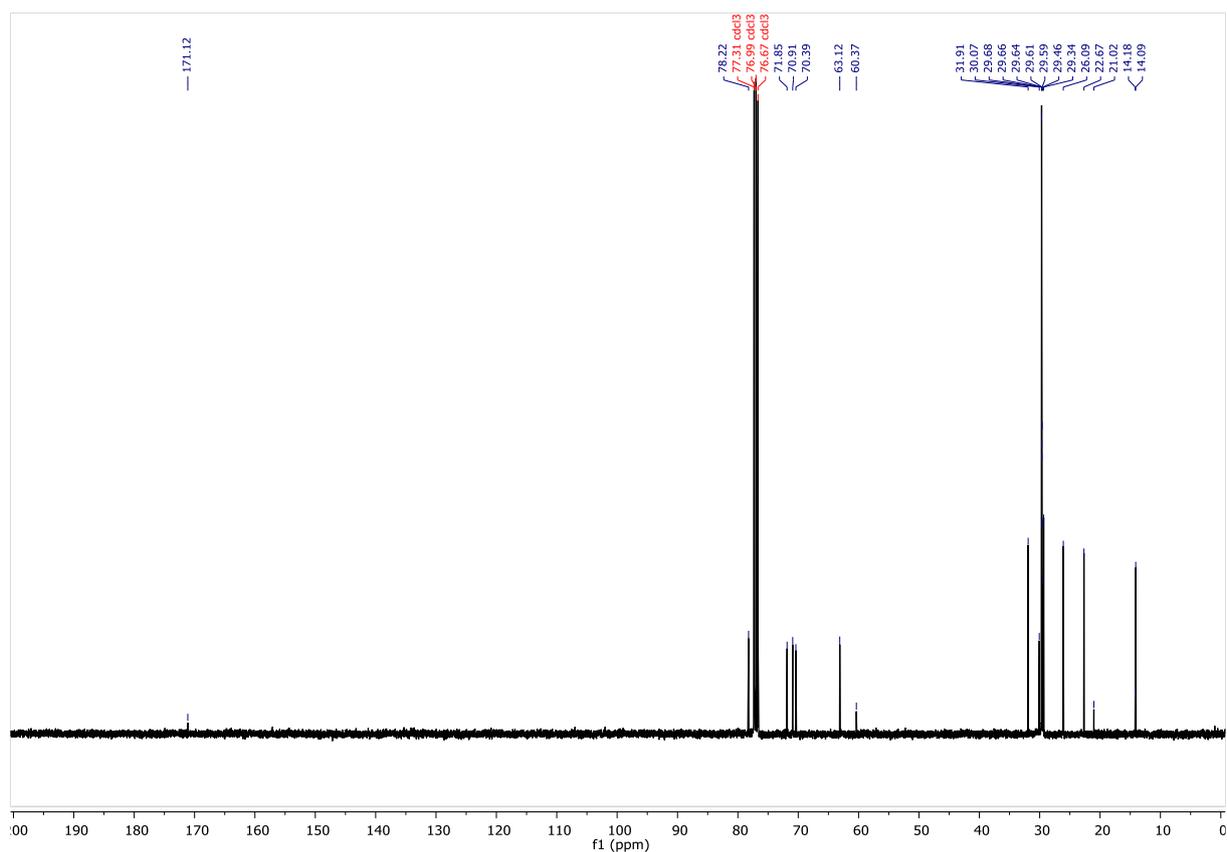
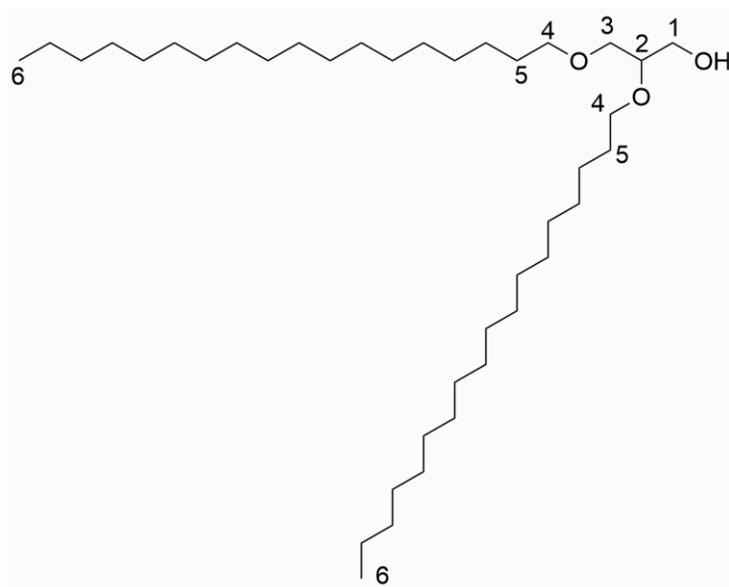


Figura 41. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (5c).

Compuesto 5d: 2,3-Bis(octadecyloxy)-1-propanol



El compuesto (5d) (0.43 g, 0.60 mmol) se añade a un Schlenk, completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 . Se disuelve en acetato de etilo (10 mL) y después se añaden MeOH (5 mL) y 50 mg por mmol de Pd/C (30 mg). Se llenan dos globos con H_2 y se inyectan a través de un septum de goma en el Schlenk. La mezcla se agita durante 48 h a temperatura

ambiente. La mezcla final se filtra en celita, lavando con diclorometano. Se obtiene un sólido blanco como producto final (0.31 g, 0.57 mmol, rendimiento 94 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.75 – 3.70 (m, H^3 , 1H), 3.65 – 3.41 (m, H^1 , H^2 , $\text{H}^{3'}$, H^4 , 6H), 1.59 – 1.53 (m, H^5 , 4H), 1.25 (s, 60H, CH_2 alquílicos), 0.90 – 0.83 (t, H^6 , 6H). **$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3)** δ 78.23 (C^2), 71.85 (C^4), 70.91, 70.39 (C^1 , C^4), 63.11 (C^3), 32.81 (CH_2 alquílicos), 31.91 (CH_2 alquílicos), 30.07 (C^5), 29.69 (CH_2 alquílicos), 29.67 (CH_2 alquílicos), 29.64 (CH_2 alquílicos), 29.61 (CH_2 alquílicos), 29.59 (CH_2 alquílicos), 29.46 (CH_2 alquílicos), 29.42 (CH_2 alquílicos), 26.09 (CH_2 alquílicos), 22.67 (CH_2 alquílicos), 14.09 (C^6). **HRMS (ESI+):** m/z = 619.6012 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Calculada 619.6 para $\text{C}_{39}\text{H}_{80}\text{NaO}_3$).

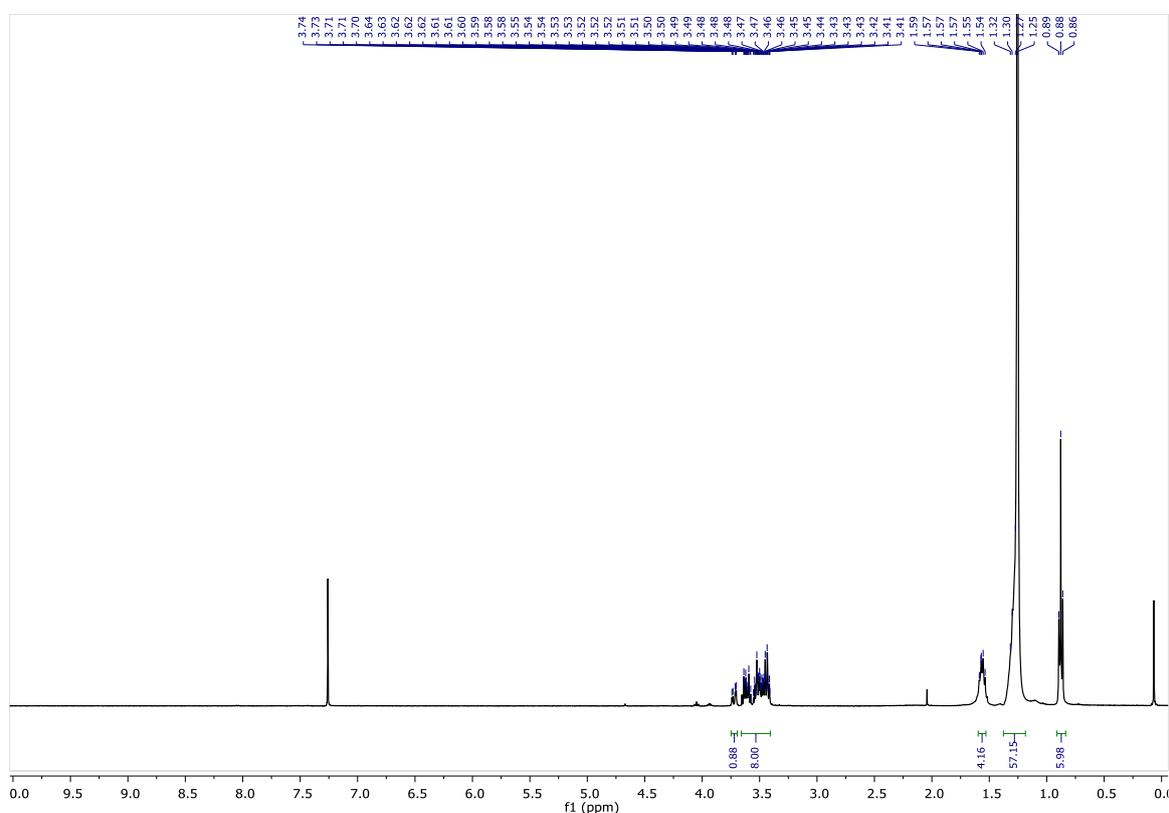


Figura 42. Espectro $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5d).

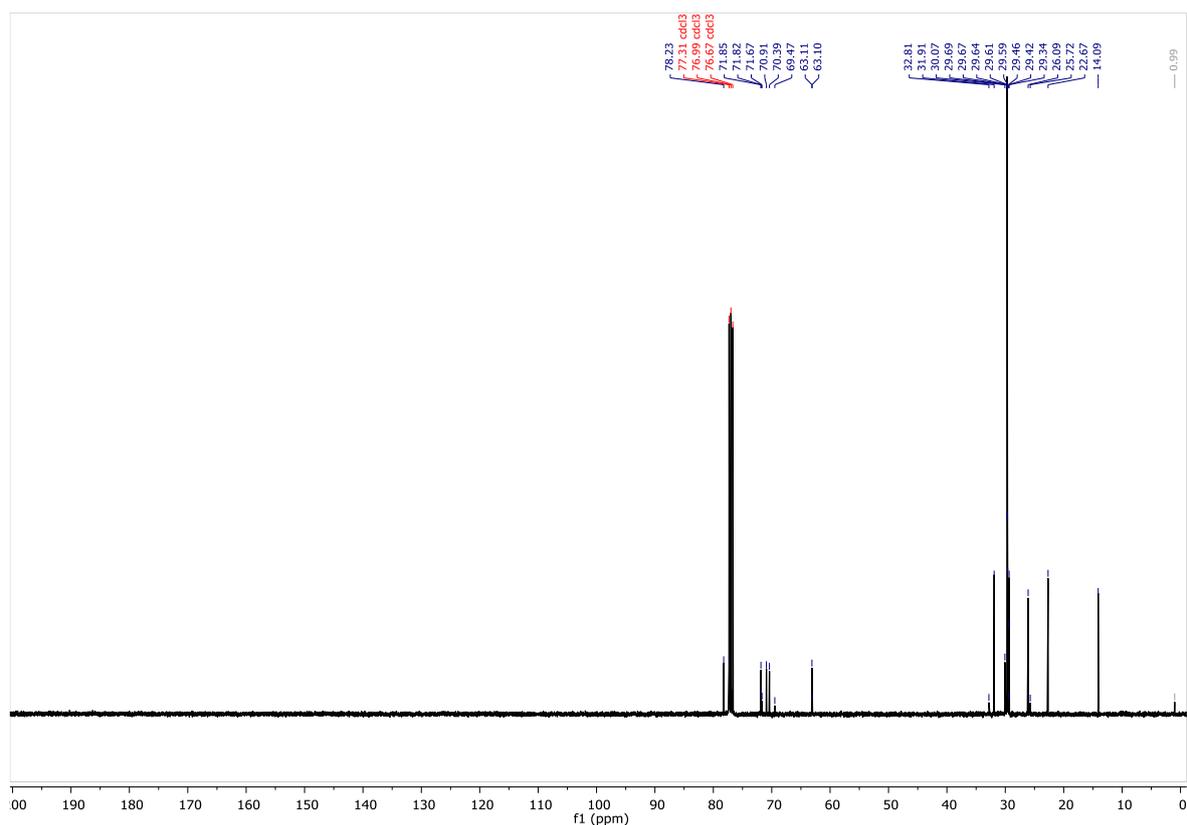
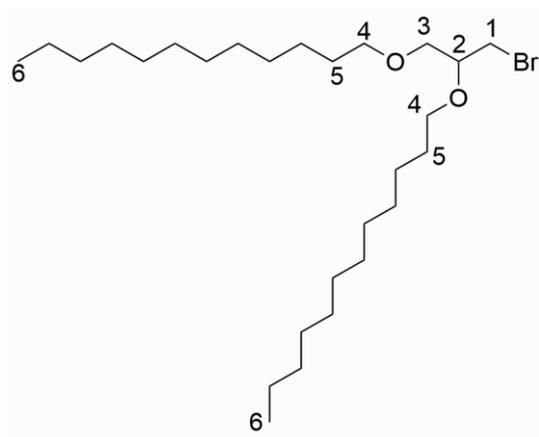


Figura 43. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (5d).

Compuesto 6a: 1-Bromo-2,3-dodeciloxipropano



En un Schlenk se añade el compuesto (5a) (0.52 g, 1.2 mmol) y tetrabromuro de carbono (0.81 g, 2.3 mmol), completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 y se disuelven en diclorometano en seco (4 mL). Por otro lado, en un matraz se añade trifenilfosfina (0.52 g, 1.8 mmol) completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 y se disuelve en diclorometano seco (1 mL). A la disolución agitada del compuesto (5a) y CBr_4 a $\sim 15^\circ\text{C}$, se le añade gota a gota la disolución de PPh_3 en un período de 30 min. La mezcla de la reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Se elimina el diclorometano en el rotavapor y se extrae el producto con hexano. Aparece un sólido blanco en suspensión, se centrifuga, se vierte el líquido en un

matraz y se seca en el rotavapor. Se obtiene un producto amarillo sólido aceitoso (0.51 g, 1.1 mmol, rendimiento 93 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.63 – 3.41 (m, H^1 , H^2 , H^3 , H^4 9H), 1.57 (ddt, $J = 14.8, 8.2, 6.4$ Hz, H^5 , 4H), 1.37 – 1.22 (m, 36H, CH_2 alquílicos), 0.90 – 0.85 (t, H^6 , 6H). **$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3)** δ 77.9 (C^2), 71.8 (C^4), 70.7 (C^4), 70.5 (C^1), 32.7 (C^3), 31.9 (CH_2 alquílicos), 31.6 (CH_2 alquílicos), 29.9 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.5 (CH_2 alquílicos), 29.4 (CH_2 alquílicos), 29.3 (CH_2 alquílicos), 26.1 (CH_2 alquílicos), 26.0 (CH_2 alquílicos), 22.7 (CH_2 alquílicos), 22.6 (CH_2 alquílicos), 14.1 (C^6). **HRMS (ESI+)**: $m/z = 456.4771$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Calculada 456.4775 para $\text{C}_{27}\text{H}_{55}\text{BrNaO}_3$).

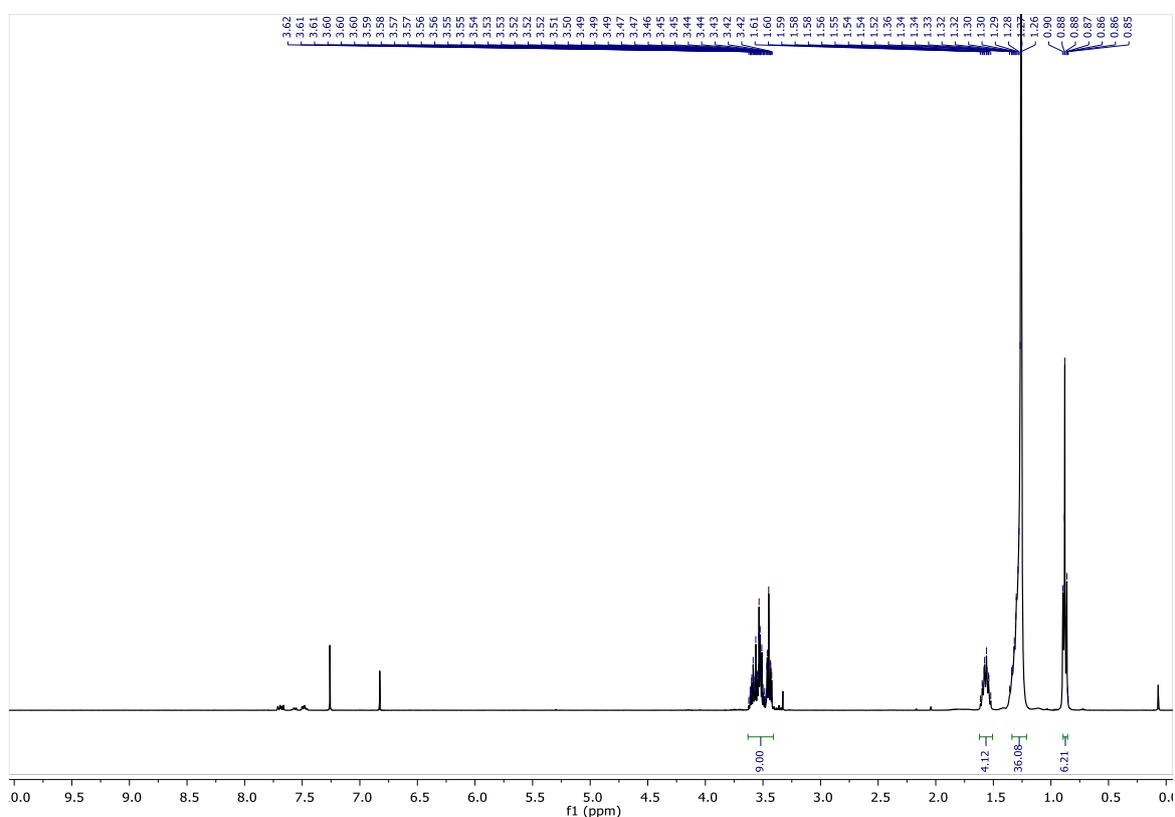


Figura 44. Espectro $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (6a).

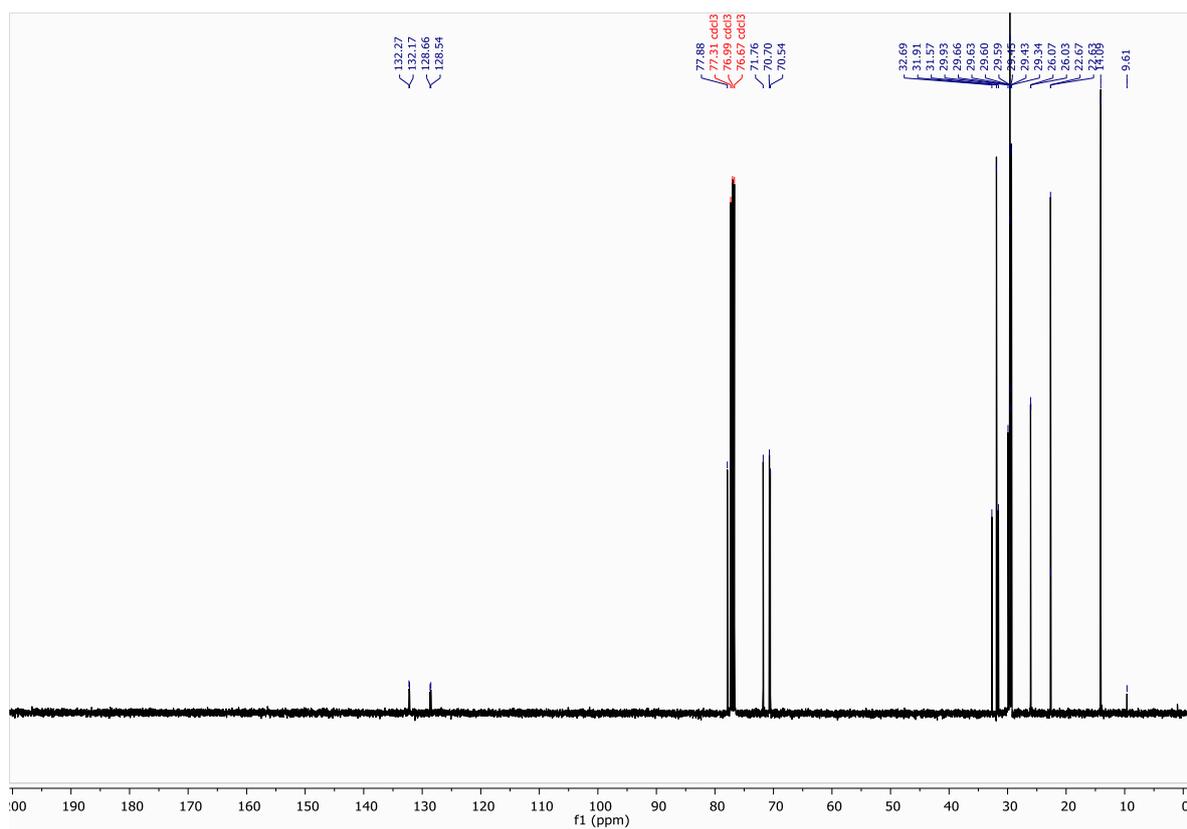


Figura 45. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (6a).

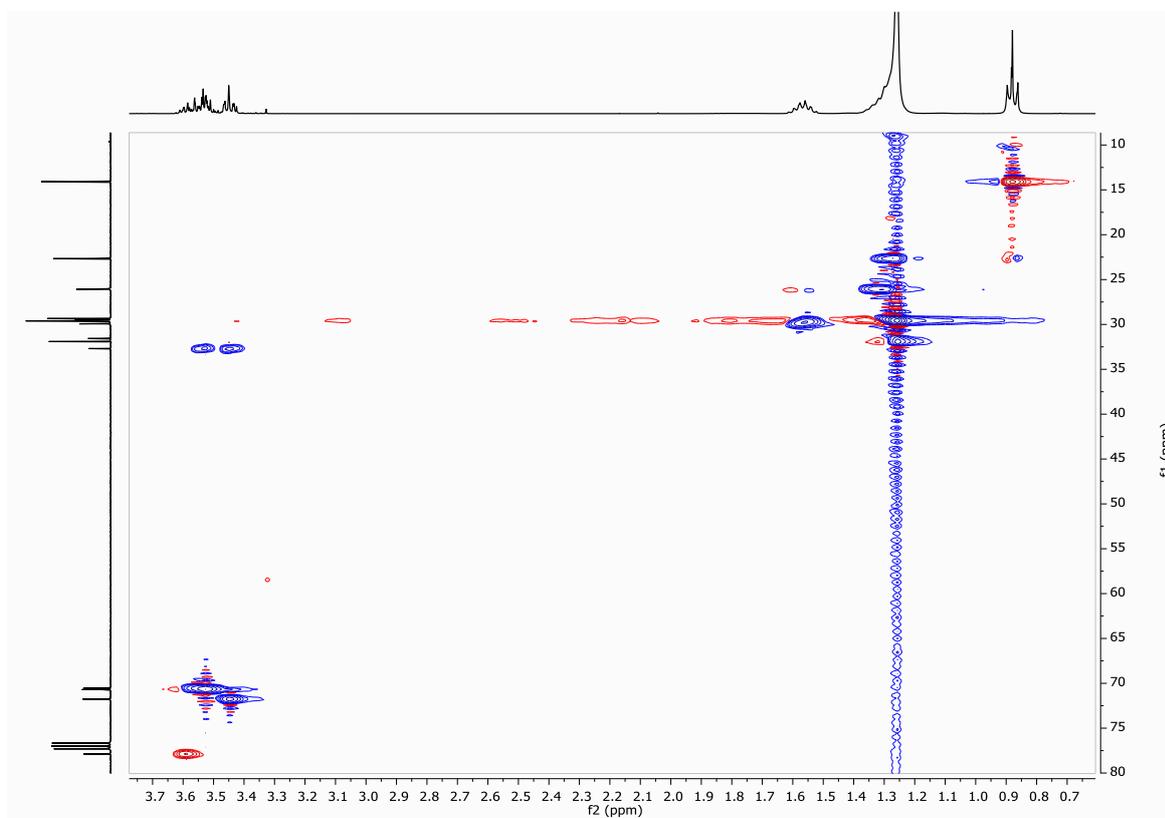


Figura 46. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQC ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (6a).

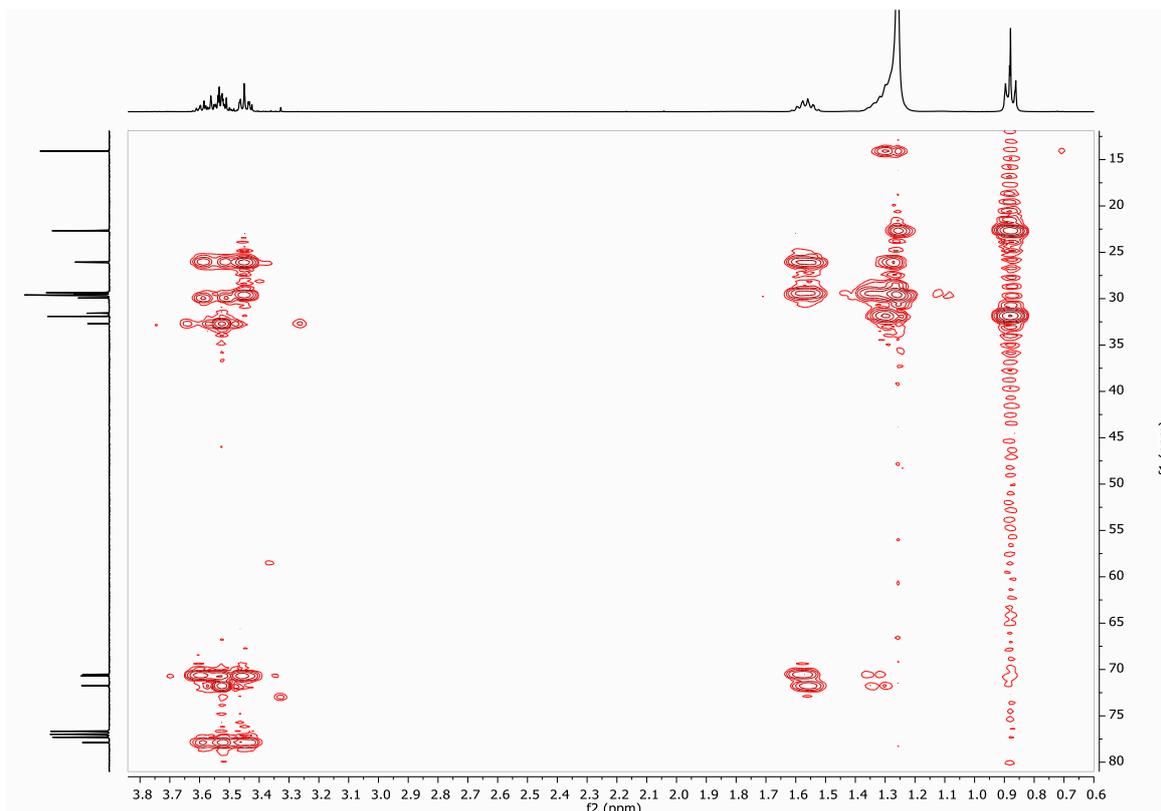
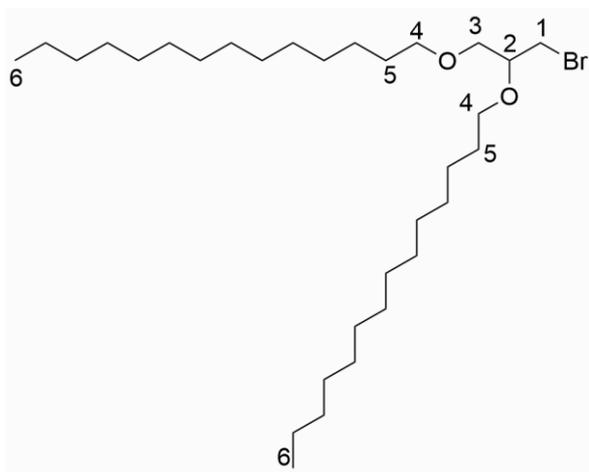


Figura 47. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (6a).

Compuesto 6b: 1-Bromo-2,3-tetraciloxipropano



En un Schlenk se añade el compuesto (5b) (0.50 g, 1.0 mmol) y tetrabromuro de carbono (0.62 g, 2.1 mmol), completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 y se disuelven en diclorometano en seco (4 mL). Por otro lado, en un matraz se añade trifenilfosfina (0.41 g, 1.5 mmol) completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 y se disuelve en diclorometano seco (1 mL). A la disolución agitada del compuesto (5b) y CBr_4 a $\sim 15^\circ\text{C}$, se le añade gota a gota la disolución de PPh_3 en un período de 30 min. La mezcla de la reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Se elimina el diclorometano en el rotavapor y se extrae el producto

con hexano. Aparece un sólido blanco en suspensión, se centrifuga, se vierte el líquido en un matraz y se seca en el rotavapor. Se obtiene un producto amarillo sólido aceitoso (0.68 g, 1.2 mmol, rendimiento >99%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.61 – 3.42 (m, H^1 , H^2 , H^3 , H^4 , 9H), 1.61 – 1.50 (m, H^5 , 4H), 1.26 (s, 44H, CH_2 alquílicos), 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, H^6 , 3H). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 77.9 (C^2), 71.8 (C^1), 70.7 (C^4), 70.5 (C^4), 32.7 (C^3), 31.9 (CH_2 alquílicos), 29.9 (C^5), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.5 (CH_2 alquílicos), 29.4 (CH_2 alquílicos), 29.3 (C^5), 26.1 (CH_2 alquílicos), 26.0 (CH_2 alquílicos), 22.7 (CH_2 alquílicos), 14.1 (C^6). **HRMS (ESI+):** $m/z = 569.3911$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Calculada 569.3904 para $\text{C}_{31}\text{H}_{63}\text{BrNaO}_2$).

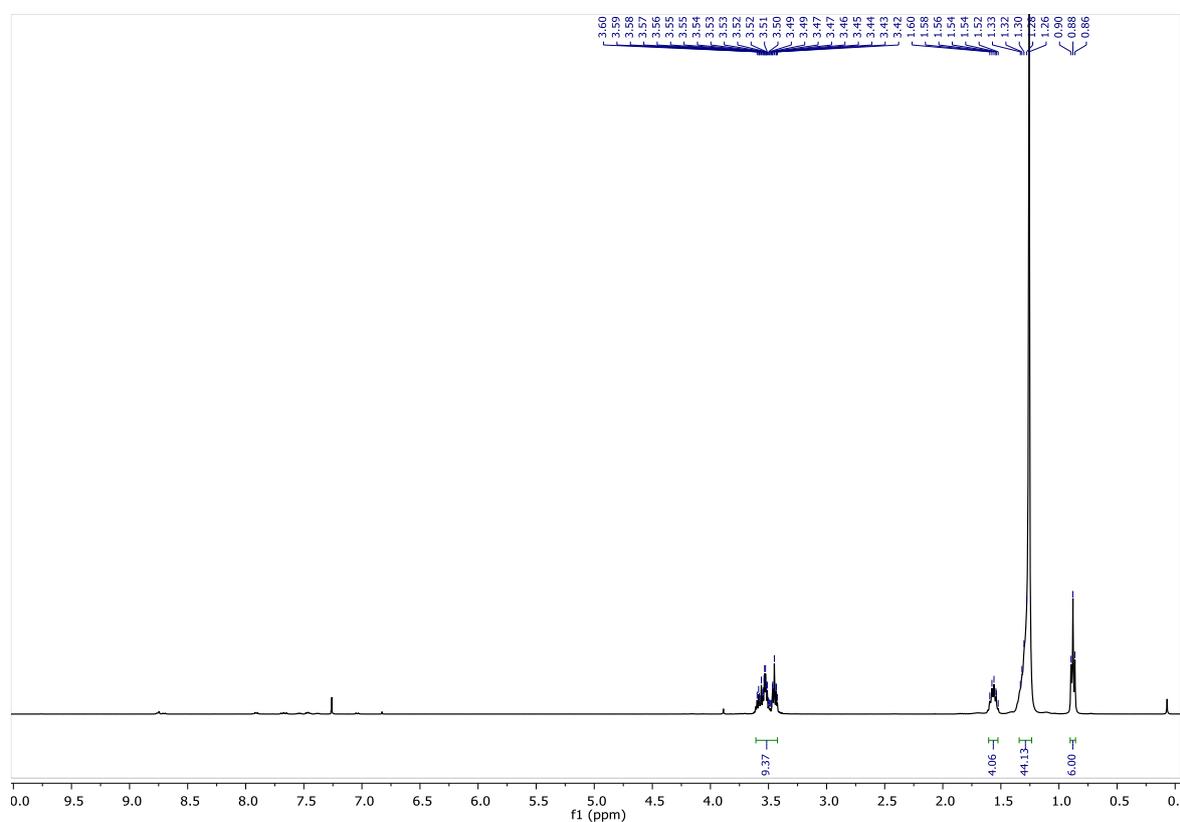


Figura 48. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (6b).

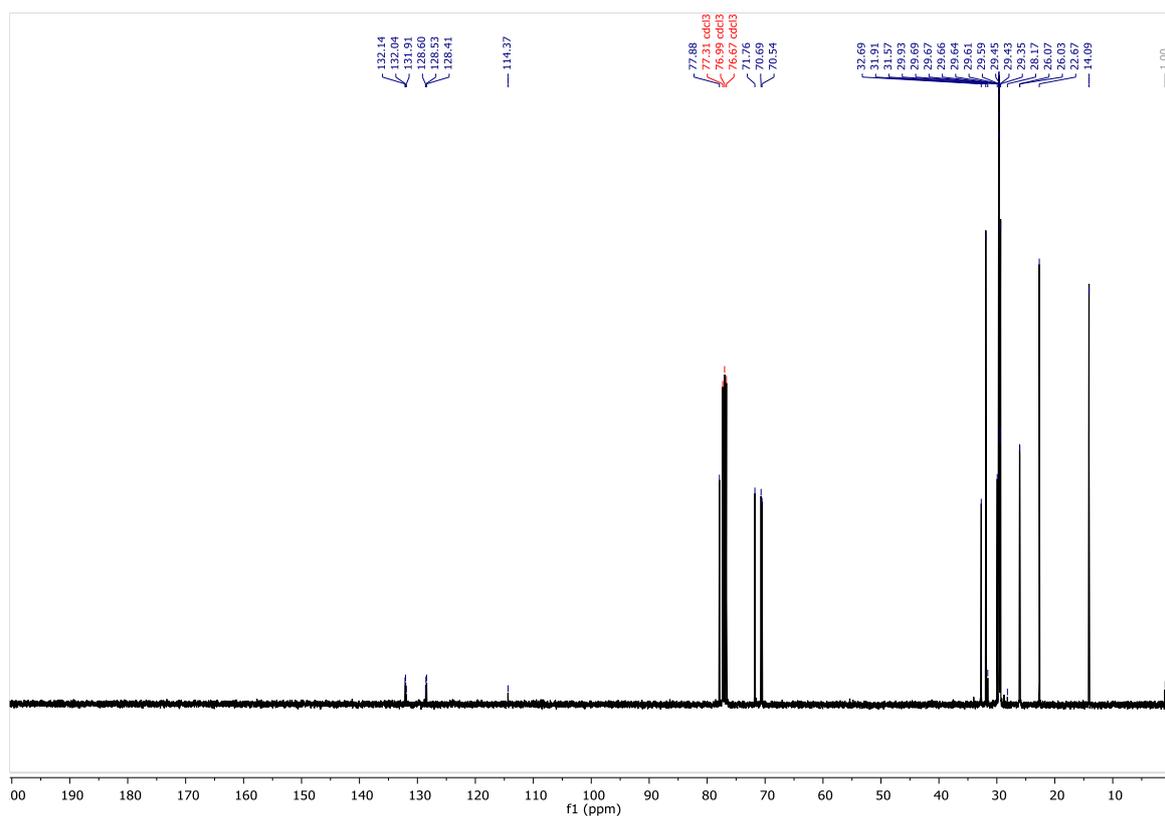
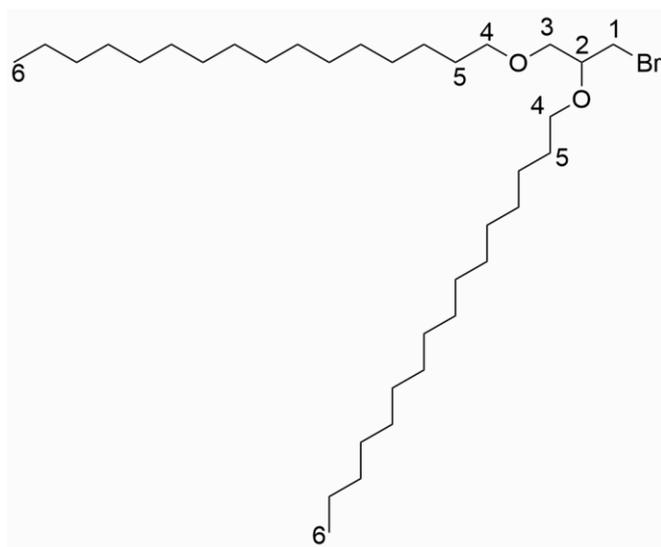


Figura 49. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (6b).

Compuesto 6c: 1-Bromo-2,3-hexaciloxipropano



En un Schlenk se añade el compuesto (5c) (0.51 g, 0.90 mmol) y tetrabromuro de carbono (0.62 g, 1.8 mmol), completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 y se disuelven en diclorometano en seco (4 mL). Por otro lado, en un matraz se añade trifetilfosfina (0.41 g, 1.4 mmol) completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 y se disuelve en diclorometano seco (1 mL). A la disolución agitada del compuesto (5c) y CBr_4 a $\sim 15^\circ\text{C}$, se le añade gota a gota la disolución de PPh_3 en un período de 30 min. La mezcla de la reacción se agita a temperatura

ambiente durante 12 h. Se elimina el diclorometano en el rotavapor y se extrae el producto con hexano. Aparece un sólido blanco en suspensión, se centrifuga, se vierte el líquido en un matraz y se seca en el rotavapor. Se obtiene un producto amarillo sólido aceitoso (0.51 g, 0.80 mmol, rendimiento 90 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 3.61 – 3.42 (m, H^1 , H^2 , H^3 , H^4 , 9H), 1.57 (q, $J = 7.1$, 6.6 Hz, H^5 , 4H), 1.25 (s, 52H, CH_2 alquílicos), 0.88 (t, $J = 6.6$ Hz, H^6 , 6H). **$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3)** δ 77.9 (C^2), 71.8 (C^1), 70.69 (C^4), 70.5 (C^4), 32.7 (C^3), 31.9 (CH_2 alquílicos), 29.9 (C^5), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.4 (CH_2 alquílicos), 29.3 (C^5), 26.1 (CH_2 alquílicos), 26.0 (CH_2 alquílicos), 22.7 (CH_2 alquílicos), 22.6 (CH_2 alquílicos), 14.1 (C^6). **HRMS (ESI+):** $m/z = 625.454$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Calculada 625.453 para $\text{C}_{35}\text{H}_{71}\text{BrNaO}_2$).

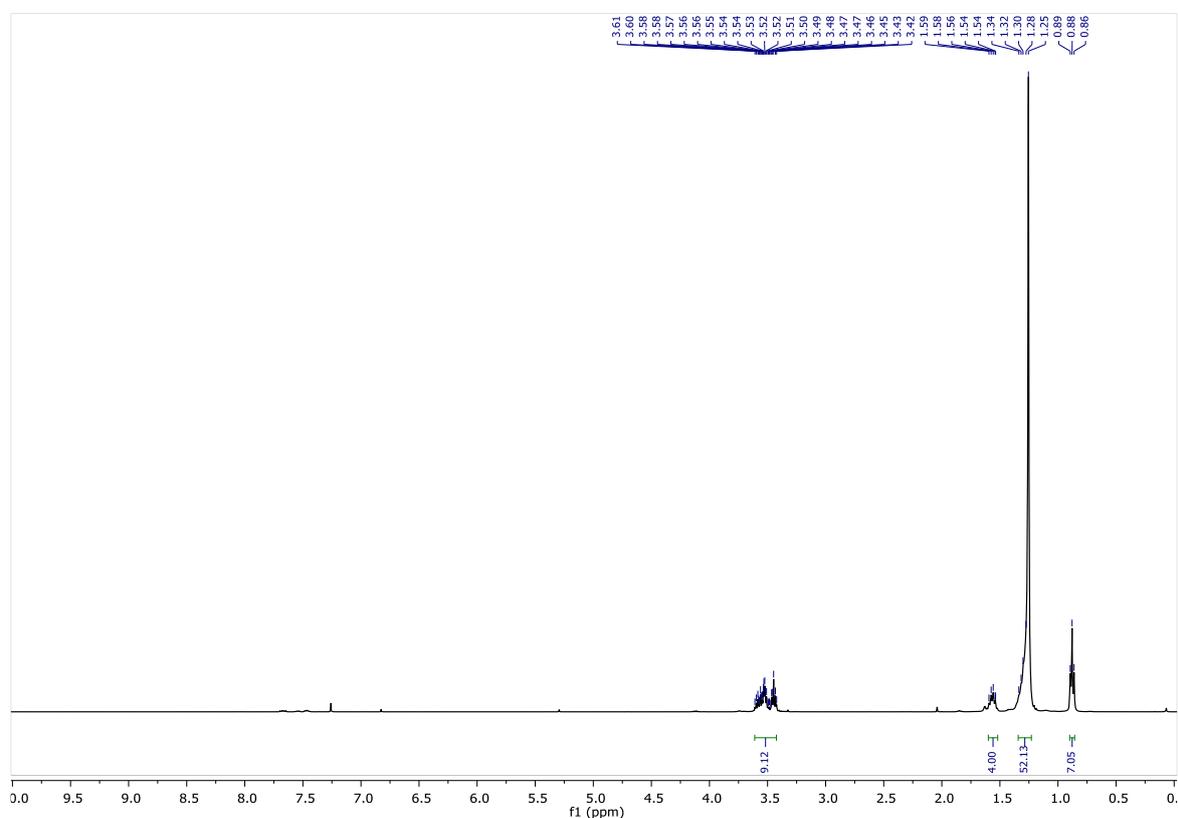


Figura 50. Espectro $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (**6c**).

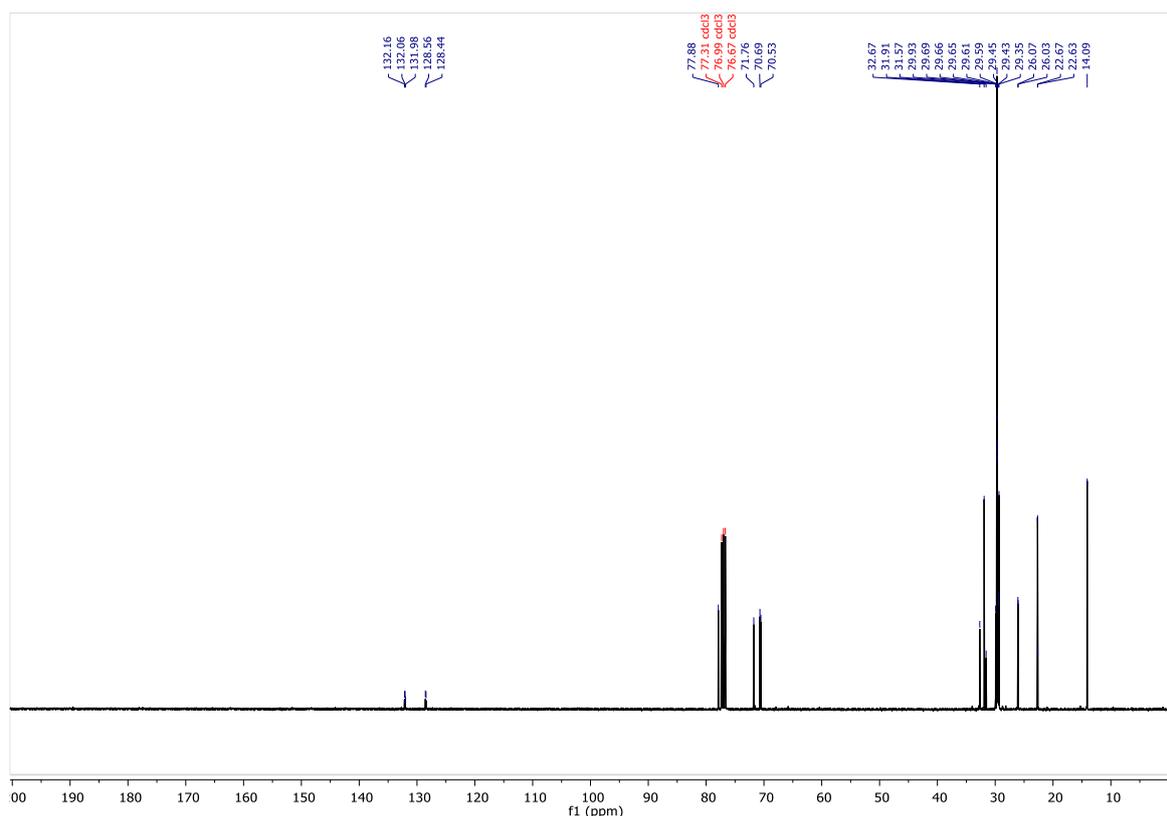
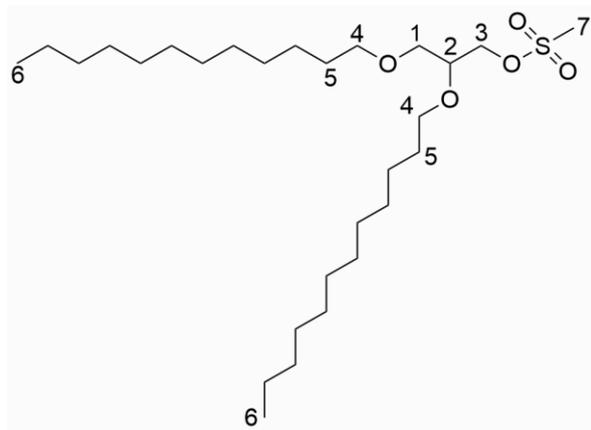


Figura 51. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (6c).

Compuesto 7: 1-Propanol, 2,3-bis(dodeciloxi)-, 1-metanosulfonato



En un Schlenk se añade el compuesto (5a) (0.32 g, 0.70 mmol), completando tres ciclos de llenado y vaciado de N_2 . Se disuelve en diclorometano seco (28 mL). A esta disolución se le añade trietilamina (0.16 mL, 1.1 mmol) y después se añade poco a poco cloruro de metanosulfonato (0.11 mL, 1.1 mmol). Se deja la reacción en agitación durante 2 h a 0°C . Cuando la reacción ha finalizado, la mezcla se lava sucesivamente con disolución saturada de bicarbonato sódico y disolución saturada de cloruro de sodio. La fase orgánica se seca con sulfato magnésico anhidro, se filtra y se evapora en el rotavapor. Se obtiene un producto final amarillo aceitoso (0.31 g, 0.60 mmol, rendimiento 80 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.37 (dd, $J = 10.9, 3.6$ Hz, H^3 , 1H), 4.24 (dd, $J = 10.9, 5.8$ Hz, H^3 , 1H), 3.67 (d, $J = 1.8$ Hz, H^2, H^7 , 4H), 3.55 (t, $J = 6.7$ Hz, H^4 , 2H), 3.53 – 3.45 (m, H^1 , 2H), 3.45 – 3.40 (m, $\text{H}^{4'}$, 2H), 1.54 (qd, $J = 6.9, 3.9$ Hz, H^5 , 4H), 1.25 (s, 36H, CH_2 alquílicos), 0.89 – 0.85 (m, H^6 , 6H). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 76.4 (C^2), 71.9 ($\text{C}^{4'}$), 70.8 (C^4), 69.7 (C^3), 69.1 (C^1), 52.5 (C^7), 31.9 (CH_2 alquílicos), 29.9 (CH_2 alquílicos), 29.6 (C^5), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.5 (CH_2 alquílicos), 29.4 (CH_2 alquílicos), 29.3 (CH_2 alquílicos), 26.1 (CH_2 alquílicos), 26.0 (CH_2 alquílicos), 22.7 (CH_2 alquílicos), 14.1 (C^6). **HRMS (ESI+):** $m/z = 529.3887$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Calculada 529.3897 para $\text{C}_{28}\text{H}_{58}\text{NaO}_5\text{S}$).

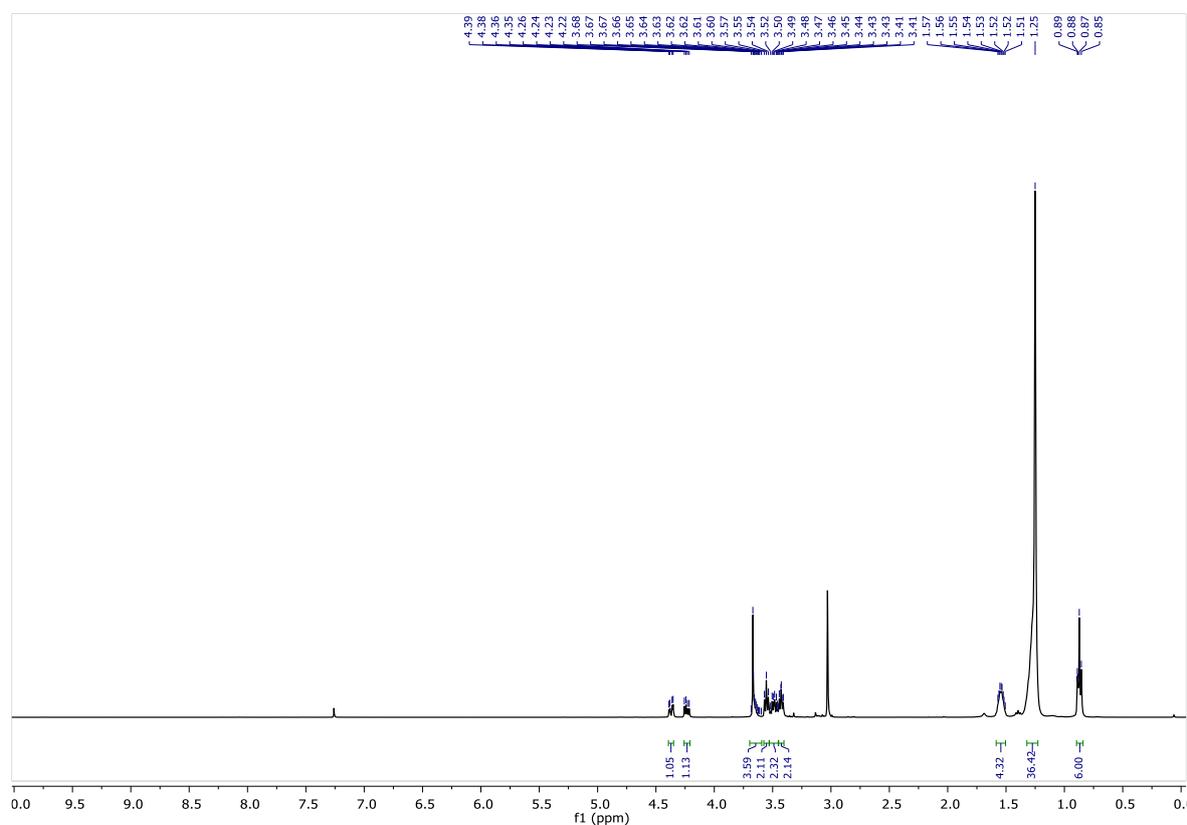


Figura 52. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (**7**).

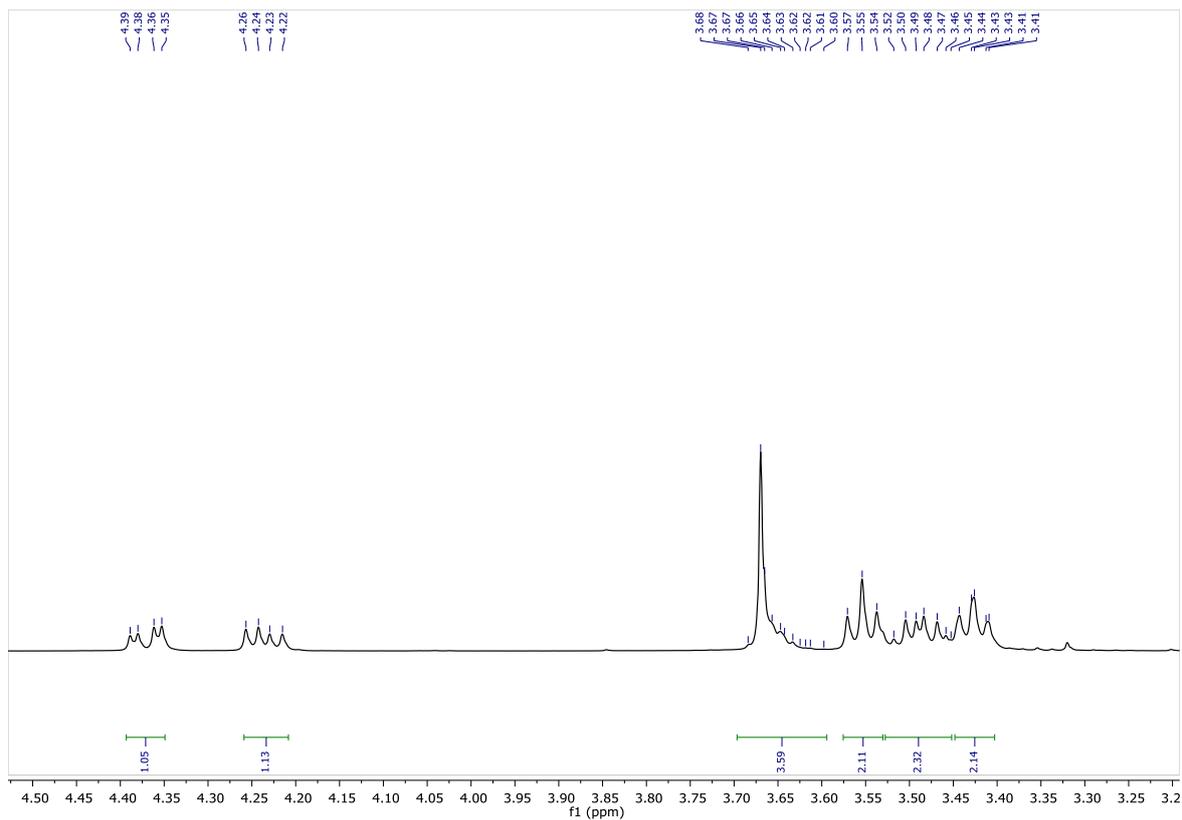


Figura 53. Espectro ampliado ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).

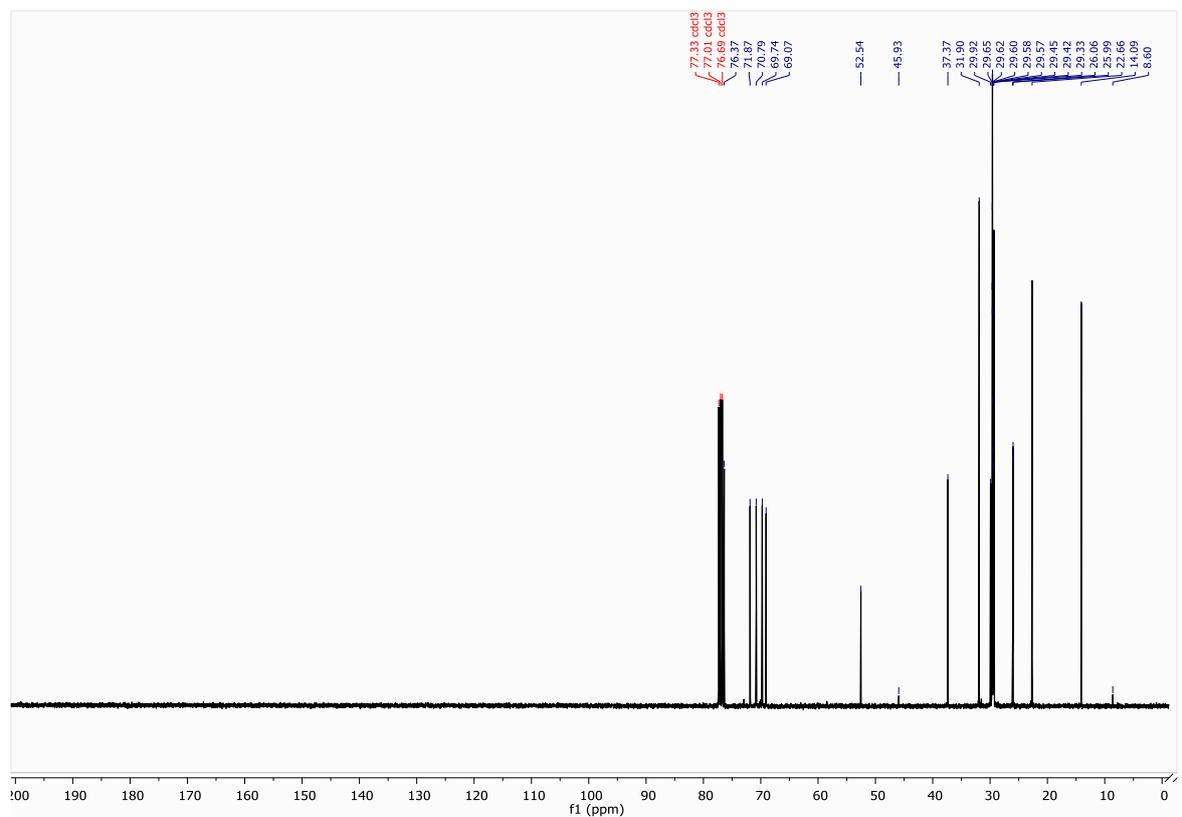


Figura 54. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).

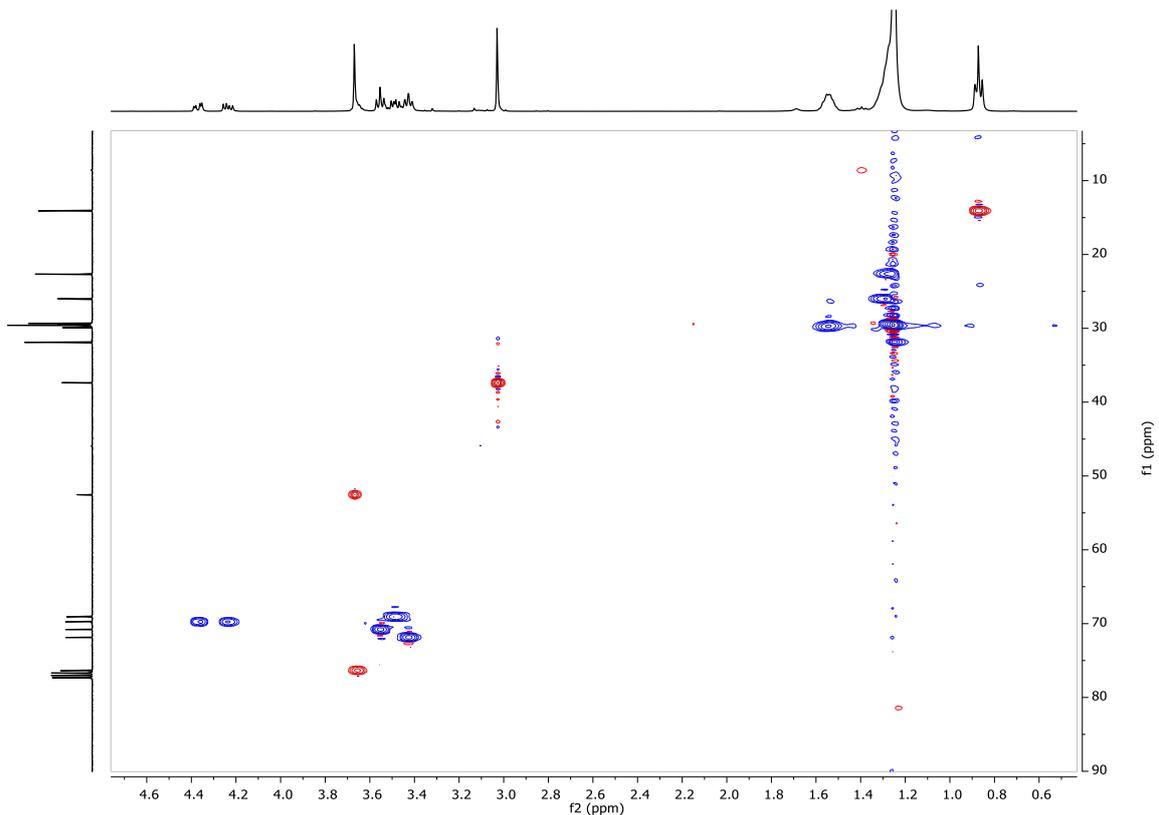


Figura 55. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQC ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).

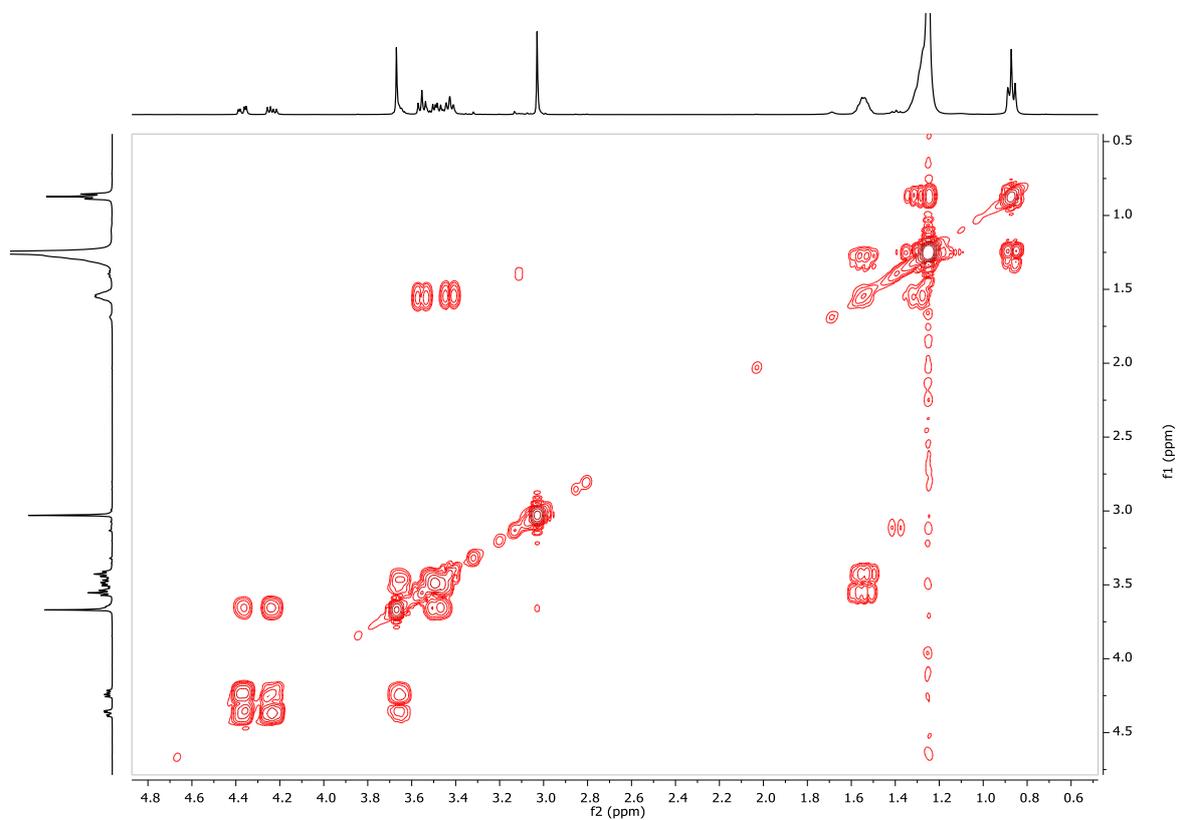


Figura 56. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -gDQCOSY ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).

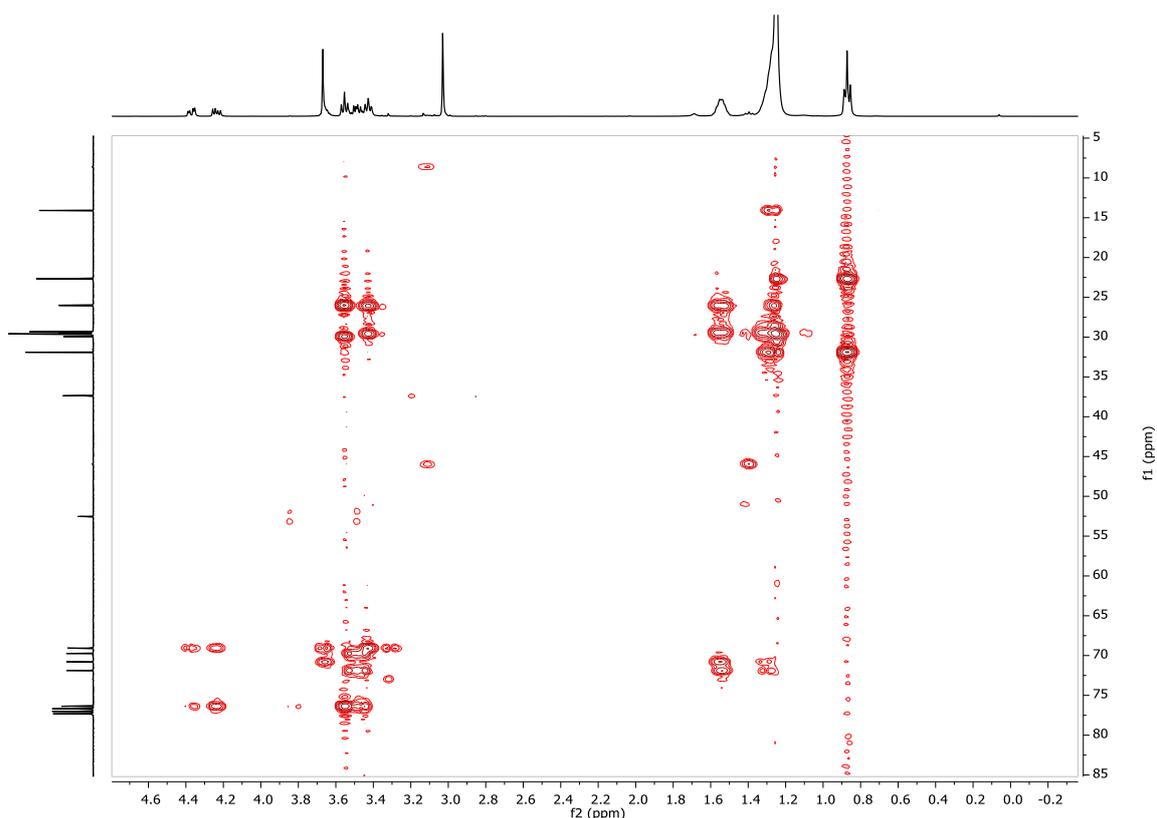
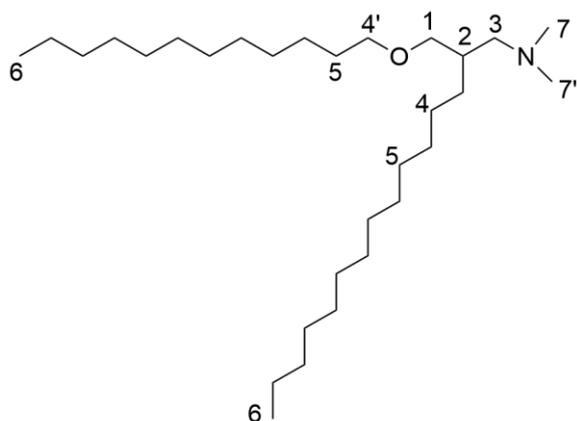


Figura 57. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).

Compuesto 8: 2,3-Bis(dodeciloxi)-N,N-dimetil-1-propanamina



En un Schlenk, se añade el compuesto (7) (0.32 g, 0.60 mmol), realizando dos ciclos de vaciado y llenado de N_2 . Se disuelve en etanol seco (1 mL) y seguidamente se añade una disolución de dimetilamina en metanol 2 M (1.0 mL, 42 mmol). Se deja la reacción en agitación durante 48 h. Se obtiene un sólido amarillo amarronado. Se realiza una extracción disolviendo todo en diclorometano y lavando tres veces con disolución saturada de NaHCO_3 . Se obtiene un sólido aceitoso amarillo (0.22 g, 0.50 mmol, rendimiento 82 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.60 – 3.39 (m, H^1 , H^2 , H^4 , H^4' , 7H), 2.44 – 2.34 (m, H^3 , 2H), 2.27 (s, H^7 , 6H), 1.56 (h, $J = 6.0, 5.5$ Hz, H^5 , 4H), 1.26 (d, $J = 4.3$ Hz, 36H, CH_2 alquílicos), 0.90 – 0.85 (m, H^6 , 6H). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 77.2 (C^2), 72.1 (C^4), 71.6 (C^4'), 70.2 (C^1), 61.1 (C^3), 46.3 (C^7), 31.9 (CH_2 alquílicos), 30.2 (CH_2 alquílicos), 29.9 (CH_2 alquílicos), 29.7 (CH_2 alquílicos), 29.6 (CH_2 alquílicos), 29.5 (CH_2 alquílicos), 29.4 (CH_2 alquílicos), 29.3 (CH_2 alquílicos), 26.2 (CH_2 alquílicos), 26.1 (CH_2 alquílicos), 26.0 (CH_2 alquílicos), 22.7 (CH_2 alquílicos), 14.1 (C^6). **HRMS (ESI+):** $m/z = 456.4782$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (Calculada 456.4775 para $\text{C}_{29}\text{H}_{62}\text{NO}_2$).

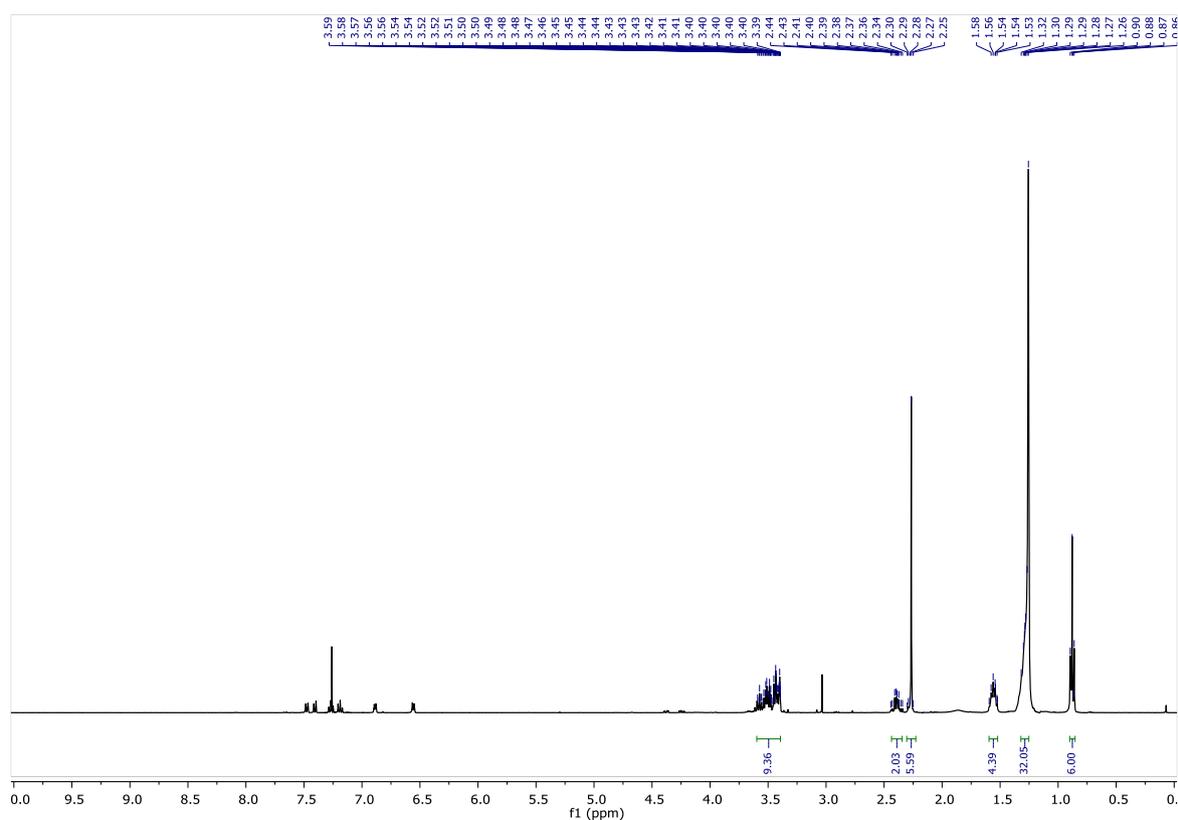


Figura 58. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (8).

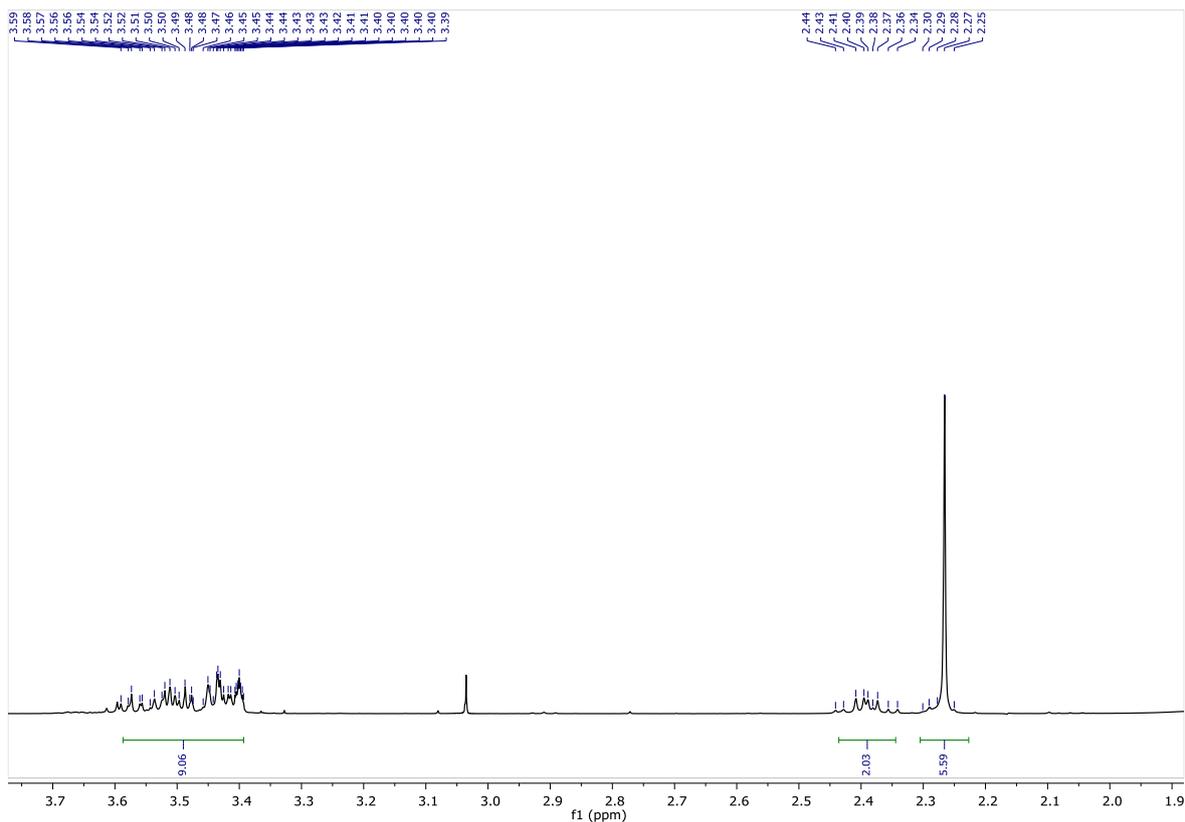


Figura 59. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) ampliado del compuesto (8).

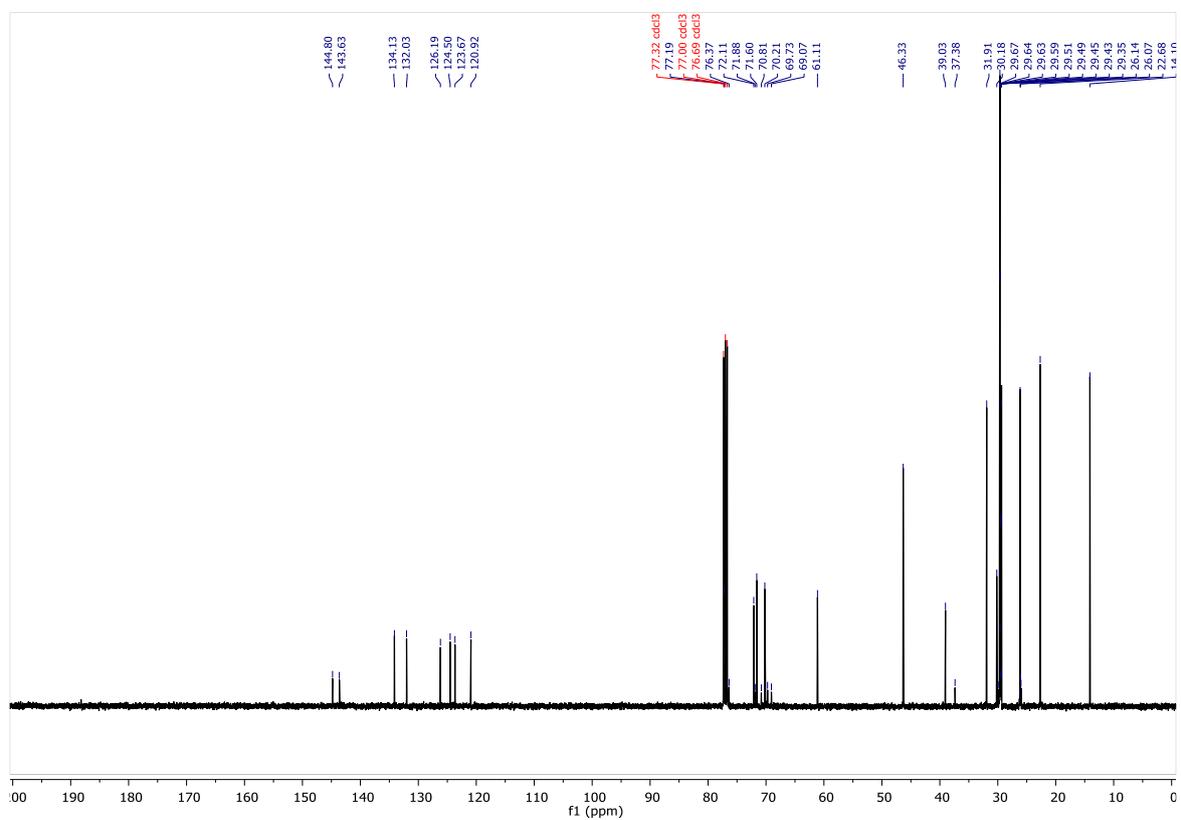


Figura 60. Espectro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (8).

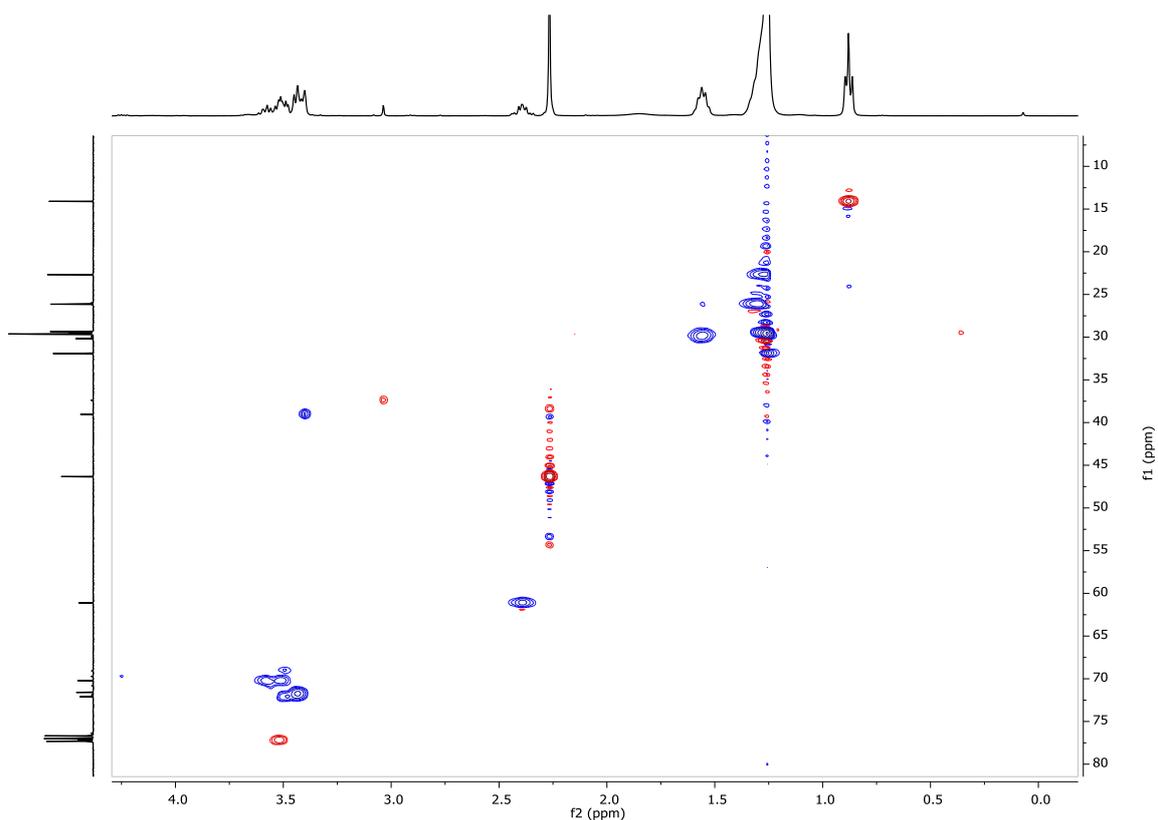


Figura 61. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQC ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (8).

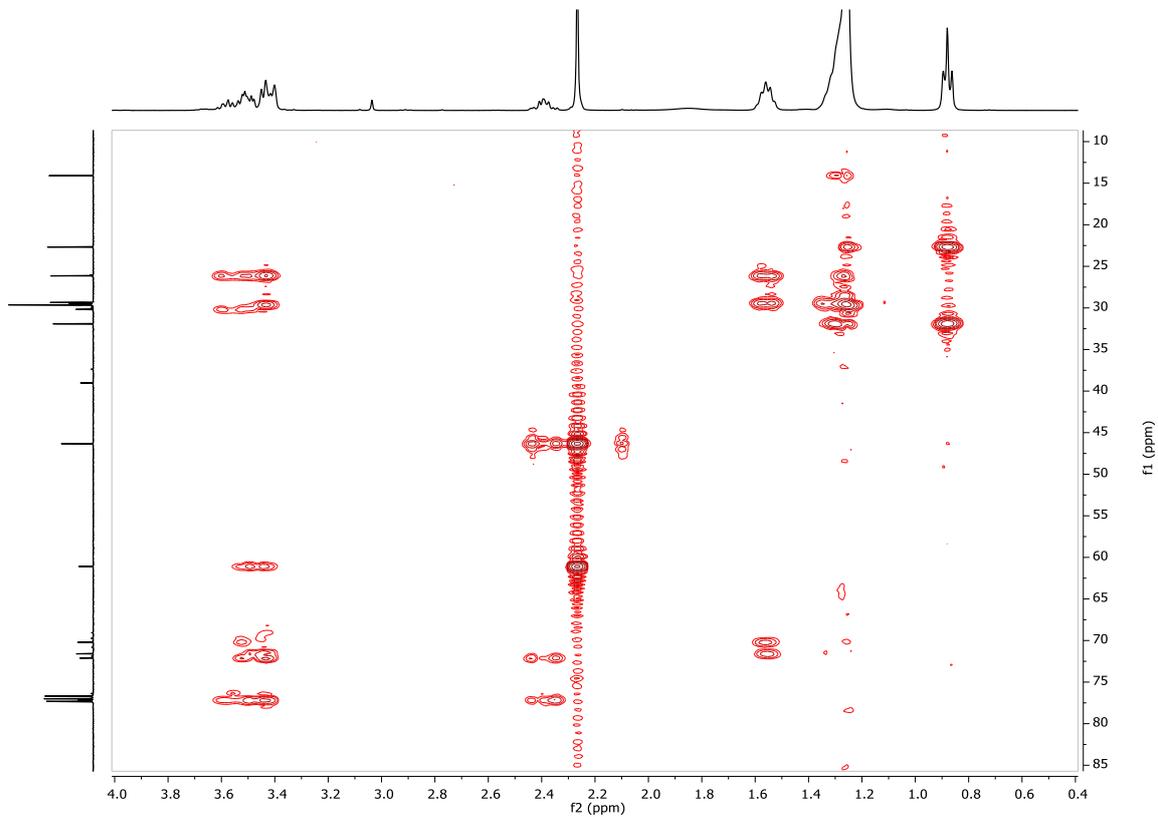


Figura 62. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBC ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (8).

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Zhang, Y.; Sun, C.; Wang, C.; Jankovic, K. E.; Dong, Y. Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery. *Chemical Reviews*. American Chemical Society October 27, 2021, pp 12181–12277. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00244>.
- (2) Sahin, U.; Karikó, K.; Türeci, Ö. mRNA-Based Therapeutics-Developing a New Class of Drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group January 1, 2014, pp 759–780. <https://doi.org/10.1038/nrd4278>.
- (3) Guevara, M. L.; Persano, F.; Persano, S. Advances in Lipid Nanoparticles for mRNA-Based Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Chemistry*. Frontiers Media S.A. October 23, 2020. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.589959>.
- (4) Baden, L. R.; El Sahly, H. M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S. A.; Rouphael, N.; Creech, C. B.; McGettigan, J.; Khetan, S.; Segall, N.; Solis, J.; Brosz, A.; Fierro, C.; Schwartz, H.; Neuzil, K.; Corey, L.; Gilbert, P.; Janes, H.; Follmann, D.; Marovich, M.; Mascola, J.; Polakowski, L.; Ledgerwood, J.; Graham, B. S.; Bennett, H.; Pajon, R.; Knightly, C.; Leav, B.; Deng, W.; Zhou, H.; Han, S.; Ivarsson, M.; Miller, J.; Zaks, T. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *New England Journal of Medicine* **2021**, 384 (5), 403–416. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035389>.
- (5) Leung, A. K. K.; Hafez, I. M.; Baoukina, S.; Belliveau, N. M.; Zhigaltsev, I. V.; Afshinmanesh, E.; Tieleman, D. P.; Hansen, C. L.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. Lipid Nanoparticles Containing siRNA Synthesized by Microfluidic Mixing Exhibit an Electron-Dense Nanostructured Core. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, 116 (34), 18440–18450. <https://doi.org/10.1021/jp303267y>.
- (6) Schoenmaker, L.; Witzigmann, D.; Kulkarni, J. A.; Verbeke, R.; Kersten, G.; Jiskoot, W.; Crommelin, D. J. A. mRNA-Lipid Nanoparticle COVID-19 Vaccines: Structure and Stability. *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V. May 15, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>.
- (7) Viger-Gravel, J.; Schantz, A.; Pinon, A. C.; Rossini, A. J.; Schantz, S.; Emsley, L. *Structure of Lipid Nanoparticles Containing siRNA or mRNA by Dynamic Nuclear Polarization Enhanced NMR Spectroscopy*.
- (8) *LIPIDOMICS Volume 3 Lipid Nanoparticles for Drug Delivery Use*; 2023.

- (9) Jeffs, L. B.; Palmer, L. R.; Ambegia, E. G.; Giesbrecht, C.; Ewanick, S.; MacLachlan, I. A Scalable, Extrusion-Free Method for Efficient Liposomal Encapsulation of Plasmid DNA. *Pharm Res* **2005**, *22* (3), 362–372. <https://doi.org/10.1007/s11095-004-1873-z>.
- (10) Cullis, P. R.; Hope, M. J. Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Molecular Therapy*. American Society of Gene and Cell Therapy July 5, 2017, pp 1467–1475. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.013>.
- (11) Pogocki, D.; Scho"neich, C.; Scho"neich, S. *Chemical Stability of Nucleic Acid-Derived Drugs*; 2000; Vol. 89.
- (12) Johnson, L. T.; Zhang, D.; Zhou, K.; Lee, S. M.; Liu, S.; Dilliard, S. A.; Farbiak, L.; Chatterjee, S.; Lin, Y. H.; Siegwart, D. J. Lipid Nanoparticle (LNP) Chemistry Can Endow Unique in Vivo RNA Delivery Fates within the Liver That Alter Therapeutic Outcomes in a Cancer Model. *Mol Pharm* **2022**, *19* (11), 3973–3986. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00442>.
- (13) Zhang, G.; Wang, Q.; Xu, R. *Therapeutics Based on MicroRNA: A New Approach for Liver Cancer*; 2010; Vol. 11. <http://microrna>.
- (14) Holzheimer, M.; Sinninghe Damsté, J. S.; Schouten, S.; Havenith, R. W. A.; Cunha, A. V.; Minnaard, A. J. Total Synthesis of the Alleged Structure of Crenarchaeol Enables Structure Revision**. *Angewandte Chemie International Edition* **2021**, *60* (32), 17504–17513. <https://doi.org/10.1002/anie.202105384>.
- (15) Lee, J.-D.; Ueno, M.; Miyajima, Y.; Nakamura, H. Synthesis of Boron Cluster Lipids: Closo-Dodecaborate as an Alternative Hydrophilic Function of Boronated Liposomes for Neutron Capture Therapy. *Org Lett* **2007**, *9* (2), 323–326.
- (16) Kotsovolou, S.; Verger, R.; Kokotos, G. Synthesis of Lipophilic Aldehydes and Study of Their Inhibition Effect on Human Digestive Lipases. *Org Lett* **2002**, *4* (16), 2625–2628. <https://doi.org/10.1021/ol026039l>.
- (17) Bajaj, A.; Paul, B.; Kondaiah, P.; Bhattacharya, S. Structure-Activity Investigation on the Gene Transfection Properties of Cardiolipin Mimicking Gemini Lipid Analogues. *Bioconjug Chem* **2008**, *19* (6), 1283–1300. <https://doi.org/10.1021/bc700474r>.

9. FIGURAS Y ESQUEMAS

Figura 1. Estructuras de DOTAP y DOTMA.	9
Figura 2. Representación esquemática de mRNA-LNP's y siRNA-LNP's. ⁷	10
Figura 3. Proceso de liberación de mRNA en la célula. ⁸	12
Figura 4. Esquema de preparación de nanopartículas lipídicas.	13
Figura 5. Hidrólisis intramolecular del enlace fosfodiéster en RNA. ¹¹	14
Figura 6. Espectros apilados de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) del crudo de reacción para los casos 5a, b y c, empleando únicamente MeOH como disolvente (el resto de condiciones de reacción como tiempo, temperatura, concentración... se mantuvieron constantes).	20
Figura 7. Espectros apilados de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) de la reacción 5c empleando diferentes disolventes: (a) en MeOH/AcOEt y (b) en MeOH (el resto de condiciones de reacción como tiempo, temperatura, concentración... se mantuvieron constantes).	20
Figura 8. Espectro ampliado de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) del sólido obtenido en las síntesis de los compuestos (6a), (6b) y (6c).	22
Figura 9. Espectro de masas del compuesto (8).	25
Figura 10. Componentes de la formulación testada para la obtención de LNP's.	26
Figura 11. (a) Imagen TEM de la nanopartícula obtenida. (b) Fotografía obtenida por microscopía confocal del cultivo celular tratado con las nanopartículas lipídicas. En verde brillante las células que encapsularon LNP's.	26
Figura 12. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto (2).	32
Figura 13. Espectro ampliado de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto (2).	32
Figura 14. Espectro de ¹³ C { ¹ H} RMN (101 MHz, CDCl ₃) del compuesto (2).	33
Figura 15. Espectro bidimensional de ¹ H- ¹³ C-gHSQCAD ampliado (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto (2).	33
Figura 16. Espectro bidimensional ¹ H- ¹ H-gDQCOSY ampliado (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto (2).	34
Figura 17. Espectro bidimensional ¹ H- ¹³ C-gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto (2).	34
Figura 18. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto (3).	35
Figura 19. Espectro de ¹ H RMN (400 MHz, CDCl ₃) del compuesto (3).	36
Figura 20. Espectro de ¹³ C { ¹ H} RMN (101 MHz, CDCl ₃) del compuesto (3).	36

Figura 21. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (3)	37
Figura 22. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -gDQCOSY ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (3)	37
Figura 23. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (3)	38
Figura 24. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4a)	39
Figura 25. Espectro ampliado ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4a)	40
Figura 26. Espectro ampliado ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4a)	40
Figura 27. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (4a)	41
Figura 28. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4a)	41
Figura 29. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4a)	42
Figura 30. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4b)	43
Figura 31. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (4c)	46
Figura 32. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (4d)	47
Figura 33. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (4d)	48
Figura 34. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5a)	49
Figura 35. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (5a)	50
Figura 36. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5a)	50
Figura 37. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -gDQCOSY ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5a)	51
Figura 38. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5b)	52
Figura 39. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (5b)	53
Figura 40. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5c)	54
Figura 41. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (5c)	55
Figura 42. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (5d)	56
Figura 43. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (5d)	57
Figura 44. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (6a)	58
Figura 45. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (6a)	59
Figura 46. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (6a)	59

Figura 47. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (6a).....	60
Figura 48. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (6b).....	61
Figura 49. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (6b).	62
Figura 50. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (6c).	63
Figura 51. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (6c).....	64
Figura 52. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).	65
Figura 53. Espectro ampliado ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).	66
Figura 54. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).....	66
Figura 55. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).....	67
Figura 56. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -gDQCOSY ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).....	67
Figura 57. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (7).....	68
Figura 58. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (8).	69
Figura 59. Espectro ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) ampliado del compuesto (8).....	70
Figura 60. Espectro ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ RMN (101 MHz, CDCl_3) del compuesto (8).....	70
Figura 61. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHSQCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (8).....	71
Figura 62. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C -gHMBCAD ampliado (400 MHz, CDCl_3) del compuesto (8).....	71
Esquema 1. Arquitectura general de lípidos catiónicos ionizables (a) y esquema de síntesis (b).....	16
Esquema 2. Protección del grupo alcohol y posterior ruptura del acetal del solketal.	17
Esquema 3. Síntesis de éteres alquílicos y posterior desprotección del alcohol.	19
Esquema 4. Mecanismo de reacción para la sustitución del alcohol por bromo, utilizando de ejemplo la síntesis del compuesto (6a).	22
Esquema 5. Síntesis de los compuestos (6a), (6b) y (6c).....	23
Esquema 6. Síntesis del 1-propanol-2,3-bis(dodeciloxi)-1-metanosulfonato (7).....	23
Esquema 7. Espectro ampliado de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) del compuesto final (8) obtenido.....	24
Esquema 8. Formación del hidrocloreuro final del lípido ionizable (8).....	25