

Departament de Química Orgànica

FACULTAT DE QUÍMICA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Programa de Doctorat de Química Orgànica

Bienni 2001-2003

**ESTUDIS SOBRE ELS DERIVATS DEL
3-(N-FENILAMINO)-1,2-PROPANDIOL (PAP),
COMPOSTOS RELACIONATS AMB LA SÍNDROME DE L'OLI TÒXIC**

Memòria presentada per

Jordi Escabrós Cuberes

per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Director:

Àngel Messeguer i Peypoch

Professor d'Investigació

Dept. de Química Orgànica Biològica

IIQAB-CSIC

Tutor:

Anna Grandas Sagarra

Professor Titular

Dept. de Química Orgànica

Facultat de Química, UB

*The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery every day. **Never lose a holy curiosity.***

Albert Einstein (1879-1955)

A la meva germana

AGRAÏMENTS

Això ja arriba al final i és l'hora de tancar una etapa molt important de la meua vida i obrir-ne una de nova, espero que com a mínim igual o millor que aquesta. Per aquest motiu és el moment d'expressar els meus agraïments a tots aquells que m'han recolzat i que han fet possible que aquest treball arribés a la seva fi, i no voldria oblidar-me de ningú. Tot aquells que em coneixeu sabreu que escriure les següents línies m'ha estat relativament difícil, ja que sóc una persona més de fets que de paraules.

En primer lloc voldria mostrar el meu sincer agraïment al director de la Tesi, el Dr. Àngel Messeguer, per haver-me donat l'oportunitat, en el seu dia, de formar part d'un grup de recerca com "el 309", donant-me un vot de confiança. Moltes gràcies per haver estat disponible sempre que hi ha hagut dificultats (habituals en el món de la química), gràcies per escoltar i atendre els meus problemes i dubtes, gràcies en definitiva per ser el meu mestre. No voldria oblidar-me de les teves qualitats personals, que són aquelles que fan que siguis com ets, únic.

A la Dra. Anna Grandas del Departament de Química Orgànica per haver acceptat amb molta amabilitat ser la meua tutora.

Aquest treball s'ha desenvolupat a l'Institut d'Investigacions Químiques i Ambientals de Barcelona durant els anys 2002-2006 i ha estat possible gràcies al finançament rebut del Comitè WHO-TOS.

Al Dr. Joaquín Abian per haver fet possible l'anàlisi d'un nombre elevat de mostres tot i les dificultats.

A la Dra. M^a Victoria Ruiz per haver-me acollit durant un breu període de temps en el seu grup, suficient per gaudir de la seva hospitalitat i simpatia. Així com per haver-me permès descobrir alguns indrets de Sevilla.

Al Dr. Ramón Crehuet per iniciar-me i permetre'm compartir amb ell, els meus dubtes i qüestions sobre els càlculs teòrics, tan difícils i complexos.

A en Dr. Josep Carilla per permetre la utilització sense inconvenients del Servei d'anàlisis termogavimètriques del CID-CSIC.

Al Dr. Albert Manich per ajudar-me tan amablement en l'estudi del disseny d'experiments.

Al Dr. Jordi Bujons per estar sempre disposat a donar un cop de mà en temes tan diversos com la química teòrica i la bioquímica.

Al Dr. Francisco Sánchez Baeza per disposar sempre d'un moment i més, per resoldre qüestions sobretot relacionades amb la RMN.

A la Dra. M^a Rosa Infante per ajudar-me a fer un pas més i endinsar-me en el món laboral, tot i escriure la tesi a la vegada.

A la Josefina per facilitar molts tràmits amb la seva simpatia i atenció, i estar sempre disposada a donar un cop de mà quan faci falta. A la Maria Àngels per la seva ajuda mostrada en el seu moment i per compartir uns "ribeiros" en un poblet fantàstic de Galícia.

A tots aquells "eliseros" que hem compartit sopars, equips de futbol, bàsquet, vòlei i xerrades: l'Héctor, el Dani, el Javi, la Carme, el Roger, el Xavi. I faltaria més, al Pablo un xicot sempre disposat a fer conya.

I com no, també voldria agrair a tots els companys del lab 309 amb els quals he compartit bons moments tan a dins com a fora del laboratori.

A aquells que en el moment que vaig entrar en el laboratori, eren per tots uns veterans, els qual van ser una referència per a mi, i alhora em van ajudar molt en el treball del dia a dia: la Susana, la Maia i el Marc. Com a veterana especial, l'Anna Morató amb qui a més de compartir un tema d'investigació tan interessant com poc comú, comparteixo uns orígens pallaresos, dels quals tots dos n'estem orgullosos. La seva feina ha estat la base d'aquesta Tesi i sense aquesta no hauria tingut lloc. Moltes gràcies per ajudar-me en tot moment, sobretot en la meua arribada al laboratori facilitant la meua integració. A la Isabel Masip per poder gaudir de la seva professionalitat i capacitat per controlar tot un laboratori de química orgànica (et vam trobar a faltar quan vas marxar). A aquells que han passat de forma més esporàdica pel 309 com l'Oscar, el Jordi Gibergans tot un químic polític i el Raulito un bon amic al que li agraden molt els calçots. No em voldria oblidar d'en Rafa un altre gran company al qui admiro, per la seva capacitat de tirar endavant en situacions complicades i amb qui hem compartit moments autèntics i irrepetibles com les "big mountains d'Ohio". A la Noemí la "professora bacterio" que ha anat als E.E.U.U. a provar sort, espero que et vagi molt bé per allà, t'ho mereixes. A la Cristina una noia gallega que s'ha adaptat sense problemes al ritme del laboratori, tot i que li queda pendent llançar-se a parlar el català. A l'Aida una de les últimes adquisicions del lab 309, una xicota que festeja a cal Cabus de Torregrossa.

A la Glorieta per ser una persona que desprèn optimisme, alegria i simpatia per totes bandes. Persones com tu són difícils de trobar. Moltes gràcies pels teus sopars tot i saber que faran empenyar els teus veïns.

A la Sandrita, una galleguiña que ha sabut integrar-se de “fàbula” al laboratori, i ens ha mostrat de què són capaces les gallegues. Moltes gràcies per la teva hospitalitat i permetre’ns conèixer de primera mà un lloc tan especial com Galícia.

A l’Annita, l’última del clan, per ser una noia lluitadora, intel·ligent i amb un caràcter capaç de posar els punts sobre les i a qualsevol que li porti la contrària. Ah, per cert, tot i no sortir escollida “miss fashion”, segurament ets la més “cool” del lab.

A la Núria, una molt bona amiga, amb moltes qualitats: senzillesa, simpatia i intel·ligència, amb qui sempre podré compartir una estona per xerrar de temes diversos. Moltes gràcies per compartir bons moments al laboratori, en sopars i en viatges. Ah, i moltes gràcies també pels teus “bon dia” tan riallers.

Al Quim, un company fabulós com els que n’hi ha pocs i amb qui he compartit molts bons moments i altres de no tant. Encara recordo el dia que ens vam conèixer al laboratori d’OBL, com hem canviat des de llavors. Espero que no perdem l’amistat durant molt de temps.

Tampoc voldria oblidar-me d’aquelles parelles respectives: l’Uri, el Josep i el Fran, sempre disposats a fer broma en els sopars rotatoris, tot aguantant estoicament l’explicació repetitiva d’anècdotes del laboratori.

No voldria oblidar-me de l’Andreu, un “baenià” que des de la distància ha seguit els meus passos i ha sabut establir conversa sobre la tesi cada cop que coincidim.

A l’Edgard i el Javi els meus amics de tota la vida que tot i portar camins divergents sempre hem estat en contacte i heu mostrat interès per com m’anaven les coses.

A la família Gómez Gomà per mostrar sempre interès per com anaven les coses i tractar-me amb tant carinyo i per cuidar-me tant. En especial a la Padrina de Torregrossa, la més “yeye”, tot i els seus 90 anys, que ho sigui per molt més temps.

Als meus Pares, a ells em costa més donar-los gràcies ja que són moltes les coses que han fet per mi. Sobretot vull agrair-vos la cura que sempre heu tingut per la meva persona, així com el recolzament incondicional per tirar endavant els meus estudis. Moltes gràcies per estimar-me tant i per gaudir dels bons moments i encoratjar-me en els dolents. Sense la vostra ajuda aquestes línies no s’haurien escrit mai. També vull agrair tota l’ajuda i recolzament que m’ha donat la meva germana. Amb ella vull compartir de forma especial aquest treball, ella ens ha ensenyat a lluitar com pocs saben fer-ho.

A la Carme, una persona única per a mi. No podria parar d’agrair-te infinitat de frases, infinitat de fets, infinitat de moments, infinitat de vivències...durant els últims set anys, que ha

sabut fer-me veure la realitat des de punts de vista molt enriquidors. Moltes gràcies per tenir la paciència que has tingut durant molt de temps i compartir amb mi totes les hores dedicades a aquest treball. No perdis mai la teva mirada i somriure que m'ha acompanyat durant aquest temps, i espero que per sempre.

SUMARI GENERAL

Abreviatures	xi
PART 0. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	1
PART I. DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL D'OLI TÒXIC	13
Sumari part I	15
1.0. CRITERI ESTABLERT PER A LA NOMENCLATURA DE DERIVATS DEL PAP	17
1.1. INTRODUCCIÓ	21
1.2. DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL D'OLI TÒXIC	37
1.3. VALIDACIÓ D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ D'ANILINA	57
1.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	75
PART II. SÍNTESI DE DERIVATS ESPECÍFICS DEL PAP I ESTUDI DELS PROCESOS DE MIGRACIÓ D'ACIL	83
Sumari part II	85
2.1. SÍNTESI DE DERIVATS DEL PAP	89
2.2. ESTUDIS DE LA MIGRACIÓ D'ACIL EN DERIVATS DEL PAP	101
2.3. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	119
PART III. ESTUDIS DE REACTIVITAT DELS DERIVATS DEL PAP	133
Sumari part III	135
3.1. INTRODUCCIÓ	137
3.2. ESTUDI DE LES INTERRELACIONS ENTRE TRIGLICÈRIDS, DERIVATS DEL PAP I ANILIDES	139
3.3. ESTUDIS TÈRMICS I ANÀLISI DE L'ESTABILITAT DE DERIVATS DEL PAP	169
3.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	177
PART IV. ESTUDI DEL MECANISME DE FORMACIÓ D'ANILIDES A PARTIR DEL dPAP EN UN PROCÉS DE DESODORITZACIÓ	185
Sumari part IV	187
4.1. ESTUDIS EXPERIMENTALS DEL MECANISME DE FORMACIÓ D'ANILIDES A PARTIR DEL dPAP EN UN PROCÉS DE DESODORITZACIÓ	189
4.2. ESTUDIS TEÒRICS DEL MECANISME DE FORMACIÓ D'ANILIDES A PARTIR DEL dPAP	203
4.3. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	219

CONCLUSIONS GENERALS **225**

BIBLIOGRAFIA **231**

ABREVIATURES

ac	absorció complexa
ACN	acetonitril
AcOEt	acetal d'etil
AE	anàlisi elemental
ANOVA	anàlisi de la variància
APCI	ionització química a pressió atmosfèrica
ba	banda ampla
bias	error
CIDASAL	Centro de Investigación y Desarrollo Aplicado S.A.L.
CCF	cromatografia de capa fina
CD8 T	clúster de diferenciació 8
CD23	receptor IgE
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CG	cromatografia de gasos
CL-EM	cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses
CG-EM	cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
δ	desplaçament químic
d	doblet
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiïmida
DCM	diclorometà
DCU	diciclohexilurea
dd	doblet doblet
ddd	doble doblet doblet
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DIEA	diisopropiletilamina
DFT	teoria del funcional de la densitat
dPAP	nom genèric del derivat diacilat del PAP
EI	impacte electrònic
EM	espectrometria de masses
EMAR	espectroscòpia de masses d'alta resolució
Et ₃ N	triètilamina
Et ₂ O	èter dietílic
H	àcid hexanoic
H _{Ar}	hidrogen aromàtic
HA	hexanoanilida
HPLC	cromatografia líquida d'alta pressió

IgE	inmunoglobulina E
IL-2	interleucina 2
IPA	alcohol isopropílic
IR	espectroscòpia d'infraroig
ITH	Industria Trianera de Hidrogenación
L	àcid linoleic
La	àcid làuric
LA	linoleanilida
Ln	àcid linolènic
M ⁺	pic molecular
m/z	unitat de relació massa/càrrega
m(i)PAP	nom genèric del derivat monoacilat del PAP on i és la posició esterificada (1 o 2)
mPCBA	àcid m-cloroperoxibenzoic
NaTDC	taurodesoxicolat de sodi
NIMH	National Institute of Mental Health
m	multiplet
O	àcid oleic
OA	oleanilida
OMS	Organització Mundial de la Salut
P	pressió
PAA	3-(<i>N</i> -fenilamino)alanina
PAP	3-(<i>N</i> -fenilamino)-1,2-propandiol
p.f.	punt de fusió
ppm	parts per milió
psi	pounds per square inch
q	quadruplet
qu	quintuplet
rpm	revolucions per minut
SCX	columna d'intercanvi catiònic
SEM	Síndrome de l'Eosinofília Miàlgia
sIL-2R	receptor interleucina-2
S _N 2	substitució nucleòfila bimolecular
SOT	Síndrome de l'Oli Tòxic
t	triplet
tBuOMe	èter terbutil metílic
TEA	triètilamina
T _m	temperatura màxima interna
t _m	temps de rampa

t_v	temps de manteniment
THF	tetrahidrofur
TFM	trifluorometanol
tPAP	nom genèric del derivat triacilat del PAP
t_r	temps de retenció
tris-HCl	tampó tris ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})\text{-HCl}$)
TS	estat de transició
UV	espectroscòpia d'ultraviolat
μT	valor real
x	valor calculat

PART 0. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

0. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

La majoria de les intoxicacions causades per la ingestió d'aliments són degudes a agents bacteriològics, només una petita proporció tenen el seu origen en agents químics. Dins d'aquest últim grup es pot classificar la SOT,^{1,2,3,4} una intoxicació massiva que va ocórrer fa 25 anys. Tot i haver passat aquest temps, encara romanen per identificar l'agent causant i la seva fisiopatologia.

Durant la primavera de l'any 1981 i localitzada en el centre d'Espanya, hi hagué una intoxicació massiva fins aleshores desconeguda, anomenada la Síndrome de l'Oli Tòxic (SOT). Aquesta intoxicació tingué lloc en una regió ben delimitada. Concretament, en un total de 14 províncies distribuïdes entre el centre i el nord d'Espanya, excepte tres casos que van ser enregistrats a Sevilla.⁵ Clínicament es caracteritzà per intenses miàlgies, marcada eosinofília i infiltracions pulmonars. Després de l'inici de la intoxicació, un total de 20.000⁶ persones es van veure afectades, 300 moriren a la fase aguda i un nombre elevat van desenvolupar discapacitats cròniques.⁷

El fet que l'epidèmia aparegués de forma sobtada va provocar un desconcert general. Degut al quadre clínic que presentaven els malalts, molt similar a les infeccions causades per

diferents agents com podien ser la legionel·la o els micoplasmes, en un inici s'atribuí l'origen de l'epidèmia a un bacteri. Per aquest motiu, pacients van ser tractats amb antibiòtics sense observar cap tipus de reacció favorable a la medicació. A partir del moment que s'adonaren que els antibiòtics no eren efectius i que no es produïa contagi entre persones sorgí la hipòtesi que la intoxicació podia haver estat deguda a la ingestió d'algun tipus de contaminant. Llavors començà a guanyar terreny la creença en l'existència d'un tipus de vehicle que hagués facilitat la distribució del tòxic, segurament algun tipus de producte alimentari. Es van tenir en consideració diversos vehicles de l'agent tòxic, entre ells: cebes, maduixes, espàrrecs, i fins i tot pollastres.

Pel que fa el vessant clínic de la SOT, es diferenciaren tres fases:^{8,9}

- La fase aguda (entre el 1r i 2n mes) amb la presència de pneumònia atípica en els afectats, es caracteritzà per infiltracions intersticials (que afecten al teixit de suport i als vasos que envolten l'òrgan) i eosinofília (augment del nombre d'eosinòfils en sang)

- La fase subaguda o intermitja (del 2n al 4t mes), soferta pel 10-20% dels afectats, es caracteritzà per tromboembolisme (trastorn en el qual les artèries o venes estan bloquejades per la presència d'un èmbol que es desplaça des del punt de formació d'un coàgul), hipertensió pulmonar (augment de la pressió en els vasos sanguinis), rampes i miàlgies (dolors musculars) severes.

- Finalment la tercera fase o crònica (a partir del 4t mes), present avui en dia en molts dels supervivents, es caracteritzà per hepatopatia (terme general per a la malaltia del fetge), esclerodèrmia (pell endurida), hipertensió pulmonar i neuropatia (terme general per a les afeccions nervioses).⁴ L'esclerodèrmia és una malaltia generalitzada del teixit connectiu caracteritzada clínicament per l'enduriment i la fibrosi de la pell, i per diferents formes d'afecció d'alguns òrgans interns o vísceres com el cor, pulmons, ronyons i tracte gastrointestinal.

Fins que aparegué la SOT, no es tenia coneixement de cap altra malaltia amb aquests símptomes. El seu desconeixement encara és palès avui en dia, ja que no es sap quina serà la seva evolució en el futur. En canvi, un dels factors que sí ha estat descrit és l'índex d'afecció segons el sexe, on s'observà un major nombre de dones afectades, concretament una relació 2: 1 (dones :home). L'existència d'escleroderma i canvis neurològics també fou més evident en el sexe femení que en el masculí, fins dos o tres cops més. Amb tot, la raó per la qual la SOT afectà més dones que homes encara és desconeguda.

Després que l'oli fos identificat definitivament com el vehicle de l'agent causant de la SOT, solament quedaven en consideració algunes altres teories. Entre elles la més destacada i persistent era la que mantenia que l'epidèmia era el resultat de la contaminació de tomàquets i altres productes de l'horta d'origen andalús, els quals podrien estar contaminats amb compostos organofosforats. Aquesta teoria es va descartar perquè la toxicitat clàssica dels organofosforats estava descrita i no coincidia amb la de la SOT.

Paper de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) en la SOT

La situació creada per la magnitud de la intoxicació, la complexitat i el desconeixement de l'agent causant va crear una situació de descontrol en el govern espanyol, el qual va necessitar la col·laboració d'un organisme extern com és l'OMS, en concret la seva Oficina Regional per Europa. Per aquest motiu l'any 1987, la WHO i el govern espanyol van formalitzar una col·laboració internacional amb la finalitat de clarificar la etiologia i la fisiopatologia de la SOT. D'aquest acord, va sorgir anys més tard, al 1996, el Centro de Investigación para el Síndrome del Aceite Tóxico, CISAT, situat al Institut de Salut Carlos III de Madrid.

El continu assortiment d'estàndards i compostos de referència que les investigacions toxicològiques, bioquímiques i analítiques han necessitat al llarg d'aquests anys, han fet que la Comissió Internacional coordinés aquestes demandes per tal que els compostos tinguessin un únic origen. D'aquesta manera seria més fàcil establir comparacions entre els resultats dels diferents laboratoris i s'obtidria un control més fiable de les referències utilitzades. En aquest context, el nostre laboratori fou escollit des del 1987 com a lloc per sintetitzar els derivats considerats com a sospitosos de causar la intoxicació (vegeu Figura 0.2) d'anilides, primer, i de PAP més tard, els quals s'emprarien com a patrons o substrats d'assaigs biològics. La relació entre el nostre laboratori i la OMS ha continuat fins ara.

A mitjans dels anys 80 el CISAT fou l'encarregat de crear un cens molt exhaustiu de la gent afectada per la SOT. Aquest cens ha estat la base de determinats estudis sobre la síndrome, ja que en ell es detallava la identificació dels pacients i la descripció dels casos. A més, es recolliren mostres biològiques de sèrum i teixits que es trobaven disperses per diversos laboratoris i hospitals. D'altra banda, durant els últims anys també s'ha realitzat un banc d'ADN, en el qual es pot trobar tant cèl·lules dels pacients de la SOT com dels seus familiars.

L'oli de colza, el vehicle del tòxic

Fruit dels estudis d'epidemiològics coordinats i supervisats per una Comissió Internacional i el propi govern espanyol, es va poder associar la malaltia a una intoxicació alimentària

causada per un oli de colza fraudulent destinat al consum humà, el qual havia estat desnaturalitzat amb anilina, refinat il·legalment, barrejat amb altres olis i venut com a comestible de forma ambulant. La principal empresa associada amb l'oli causant de la intoxicació va ser la refinaria ITH de Sevilla.¹⁰ L'oli havia estat venut de manera ambulant en ampolles de 5 litres no etiquetades. Aquest oli desnaturalitzat havia de ser emprat per a diverses aplicacions industrials. Però en aquells temps era comú realitzar una pràctica il·legal, la qual consistia en refinar aquest oli per poder-lo vendre com a oli comestible.

Va ser el juny de l'any 1981, tres setmanes després dels primers casos arribats als hospitals, quan les autoritats espanyoles van decidir prendre mesures preventives i van anunciar públicament que tota persona que tingués emmagatzemat a casa seva algun tipus d'oli d'origen sospitós seria intercanviat per oli d'oliva comestible. Aquest fet va permetre que es pogués recollir centenars d'olis casos i fer un gran banc d'olis sospitosos de la intoxicació. També va permetre detectar els distribuïdors i refinadors que van participar en aquest frau, els quals van ser detinguts, interrogats i algun d'ells empresonats. Però malauradament la informació recollida no va ser suficient per reconstruir el procés que va tenir lloc durant el refinament de l'oli.

Tot i que de manera general l'oli responsable de la intoxicació se l'anomena oli de colza, les anàlisis d'aquest oli mostraren la presència d'altres tipus d'olis com era oli d'oliva i altres olis animals. Per tant, l'anomenat oli de colza estava format per una barreja d'olis.

L'oli involucrat en la SOT va ser produït a França com a oli industrial, ja que es tractava d'un oli adulterat mitjançant l'addició d'un 2% d'anilina, d'acord amb la regulació espanyola. La informació facilitada pels treballadors de les dues refineries franceses on s'havia produït l'oli de colza adulterat va permetre determinar que un estoc d'aquest oli, prèviament a la seva desnaturalització, havia estat distribuït i venut a França, sense provocar cap cas d'intoxicació. A més, la importació de l'oli es realitzà mitjançant cubes de transport, les quals havien emmagatzemat amb anterioritat productes químics industrials, la naturalesa dels quals era desconeguda, i es desconeix si havien estat netejades. Per tant, podia ser que existís algun contaminant químic de naturalesa desconeguda en l'oli. Cap de les anàlisis realitzades no mostrà la presència significativa d'algun producte químic que no fos un derivat anilínic. Un cop l'oli adulterat abandonà l'estat francès, entrà a Espanya seguint dues rutes diferenciades, una cap a Catalunya i l'altra al sud d'Espanya, més concretament a Sevilla.

Principals compostos químics relacionats amb la SOT

Un cop quedà clar que la SOT era un fenomen toxicològic degut a la ingestió d'un oli adulterat, tots els ulls es van centrar en el compost emprat per desnaturalitzar-lo, l'anilina. Les

anàlisis que es van fer sobre mostres d'oli associats amb la intoxicació mostraren nivells d'anilina força baixos (50-100 ppm^{4,11,12}), dada lògica si es té en compte que s'havia realitzat un procés d'extracció mitjançant una refinació per tal d'eliminar l'anilina. Tot i que es coneix que l'anilina és un compost tòxic, els seus efectes en humans són coneguts i no tenen relació amb la simptomatologia presentada per la SOT. S'ha observat que l'anilina és mutagènica *in vivo* i responsable de l'aparició de càncers de bufeta. Per tant, cap dels símptomes de la fase aguda de la SOT es podia relacionar amb la toxicitat de l'anilina. Era difícil pensar que l'anilina



Figura 0.1. Esquema on es mostra la ruta seguida per l'oli de colza adulterat amb anilina importat a Espanya i que va ser el responsable de la SOT.

podia arribar a ser el principal responsable etiològic de la intoxicació; per això es plantejà adreçar els esforços de les investigacions cap a altres components dels olis tòxics. Cal esmentar que l'anilina era d'una puresa industrial, i podria ser també que el lot estigués contaminat. Per aquesta raó es van realitzar anàlisis per intentar identificar altres contaminants alimentaris, com ara metalls pesants i organofosforats, però en cap cas els resultats mostraren la presència d'aquests productes.

Un altre punt que podria introduir sospites de toxicitat era la presència de l'àcid erúic en l'oli de colza. Aquest és un àcid gras que produeix trastorns de miocardi en diverses espècies, però els seus efectes tòxics en humans són desconeguts. Aquesta hipòtesi quedà descartada en determinar que el contingut d'àcid erúic de les llavors de colza emprades per a obtenir l'oli era mínima.^{12,13,14,15}

Un conjunt de productes derivats de l'anilina van ser detectats tant en els olis catalans com en els de Sevilla els quals foren considerats com a biomarcadors dels olis adulterats. Aquests eren, com es podia preveure, les anilides d'àcids grassos (àcid oleic, àcid linoleic,

àcid palmític...) les quals es trobaren presents en concentracions entre 500-2000 mg/l.^{4,11,16} Els resultats van mostrar una estreta relació entre la presència de la SOT en una família i els nivells d'aquests derivats d'anilina en l'oli emmagatzemat per la família afectada. No obstant, tot i el caràcter de marcadors toxicològics que aquestes anilides exerciren durant alguns anys, la seva toxicitat *in vivo* i *in vitro*, fent servir una àmplia varietat de sistemes model, no s'ha pogut provar fins ara.

Altres derivats d'anilina descoberts ja l'any 1983 pel grup del Dr. Vázquez-Roncero de l'"Instituto de la Grasa" de Sevilla (IGS-CSIC), van ser els derivats del 3-(*N*-fenilamino)-1,2-propandiol (PAP), concretament monoesters (mPAP), diesters (dPAP) i diesters-amida (tPAP) acilats amb àcids grassos (vegeu la Figura 0.2).^{17,18,19,20,21} Aquests derivats de l'anilina s'haurien originat en el procés de refinació, però no va ser fins l'any 1995 que van guanyar importància quan es va descobrir que només estaven presents, juntament amb les anilides, en els olis tòxics que s'havien refinat a Sevilla.²² Com ja s'ha esmentat anteriorment, la partida d'oli fraudulent provinent de França es va separar en dues partides: una que va anar a Sevilla i l'altra a Catalunya. Ambdues partides es varen refinar, però emprant metodologies diferents, de manera que els olis catalans no van ser tòxics, tot i que contenien anilides, però no derivats del PAP. Per tant, hi va haver algun tipus de variació en el procediment de refinació de Sevilla que havia de ser el responsable de la formació dels derivats del PAP. Per aquest motiu s'establí una associació entre la intoxicació i la presència d'aquests derivats. Aquest fet va dur a considerar els derivats del PAP com a biomarcadors de l'oli tòxic.

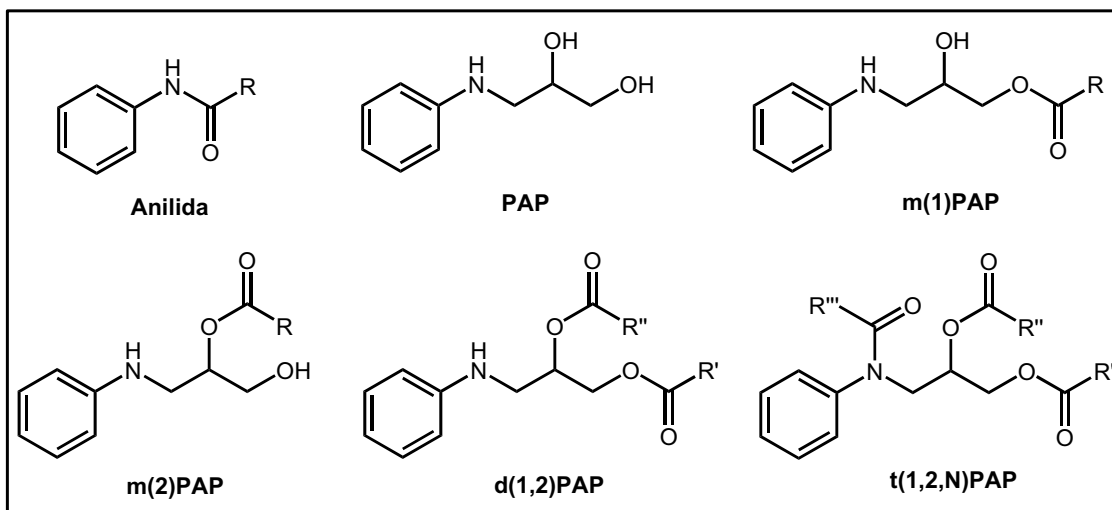


Figura 0.2. Compostos relacionats amb la Síndrome de l'Oli Tòxic: les anilides, considerades biomarcadors dels olis adulterats, i els derivats de la família del PAP, com a biomarcadors de l'oli tòxic. *R* és un residu de cadena d'àcid gras.

Relació entre la SOT i SEM

A finals de l'any 1989 als EEUU va aparèixer un malaltia desconeguda, la qual va afectar 1500 persones i provocà 30 morts. Anomenada síndrome de la eosinofília miàlgia (SEM), presentava moltes analogies amb la SOT. Ambdues estaven relacionades amb el consum de productes alimentaris, els quals tenien contaminants no identificats. La SEM fou deguda a la ingestió de L-triptofan, emprat com a component d'aliments suplementaris i medicines. Aquest additiu era produït per la companyia Japonesa Showa Denko Company,²³⁻²⁵ la qual utilitzava un bacteri modificat genèticament en la seva producció. Les dues síndromes semblaven derivar d'un mateix desordre fisiològic, ja que mostraven respostes immunològiques així com simptomatologia i lesions semblants: manifestacions reumàtiques, hipertensió pulmonar, neuropaties perifèriques, contractures musculars, lesions vasculares similars i fibrosi en els teixits. Igual que la SOT, la SEM va afectar de manera més marcada al sexe femení, però en canvi no es va limitar a una determinada àrea geogràfica dels EEUU. Principalment es caracteritzà per eosinofília intensa, miàlgia severa i problemes sistèmics amb complicacions a llarg termini.

El maig de l'any 1991 va sorgir una col·laboració entre diferents organitzacions: l'OMS, la *Food and Drug Administration*, el *National Institute of Health (NIH)*, el *National Institute of Mental Health (NIMH)* i el *Center for Disease Control and Prevention (CDC)* aquests quatre últims organismes pertanyents als EEUU. Gràcies a aquest acord, científics i metges de tot el món intercanviaren informació sobre les dues malalties, arribant així a proposar possibles relacions químiques entre la SEM i la SOT.^{26,27} Els primers estudis de la SEM es centraren en el EBT, un contaminant derivat del triptòfan que es trobava present en les partides relacionades amb la intoxicació de L-triptofan, però la manca d'evidències toxicològiques d'aquest compost van centrar l'atenció en un altre contaminant del L-triptofan, la 3-(N-fenilamino)alanina (PAA), compost amb notables analogies estructurals amb el PAP (vegeu Figura 0.3). Mayeno i col·laboradors emprant PAP radioactiu²⁶ van mostrar que només són necessàries dues reaccions enzimàtiques per a la conversió del PAP a PAA en hepatòcits humans i de rata. Per tant, aquest podria ser el punt d'unió entre la SEM i la SOT, ja que identificaria un agent etiològic comú, el PAA. Tot i que els derivats del PAP havien estat descrits anys abans pel grup de Vázquez-Roncero¹⁷ l'aparició del SEM i el seu paral·lelisme amb la SOT, va obrir nous interrogants i vies d'estudi sobre els possibles agents responsables de la Síndrome Tòxica. I és llavors quan els derivats de PAP passaren a considerar-se marcadors toxicològics dels olis a potencials tòxics.

L'existència de la SEM indica que la SOT no es tracta d'una malaltia aïllada, sinó que pot pertànyer a un tipus d'alteració immunològica no descrita fins ara. Per això és important el seu

la relació amb la susceptibilitat genètica de les persones davant del tòxic

La primera característica immunològica descrita en la SOT va ser la eosinofília i el nombre reduït de les cèl·lules CD8 T i basòfils³¹ presents en els afectats. A més es va observar nivells alts del receptor sIL-2R (receptor interleucina-2), que és el receptor de membrana per a la IL-2, una limfocina que regula la proliferació dels limfòcits T activats en sèrum durant la fase aguda de la SOT. Per tant, aquests nivells de sIL-2R indicaren que s'havia produït l'activació de les cèl·lules T. A més, estudis al marge de la SOT indiquen que el sIL-2R es troba en quantitats elevades en determinats processos immunològics com són: la esclerosi múltiple, el lupus i la artritis reumatoide. Altrament, en pacients de la SEM també es van trobar continguts elevats de sIL-2R.³² En conclusió, nivells alts del receptor sIL-2R, IgE i CD23 detectats en pacients de la SOT, constitueixen les primeres evidències indirectes d'una activació de les cèl·lules T. Això permet explicar algunes característiques de la fase aguda de la malaltia.

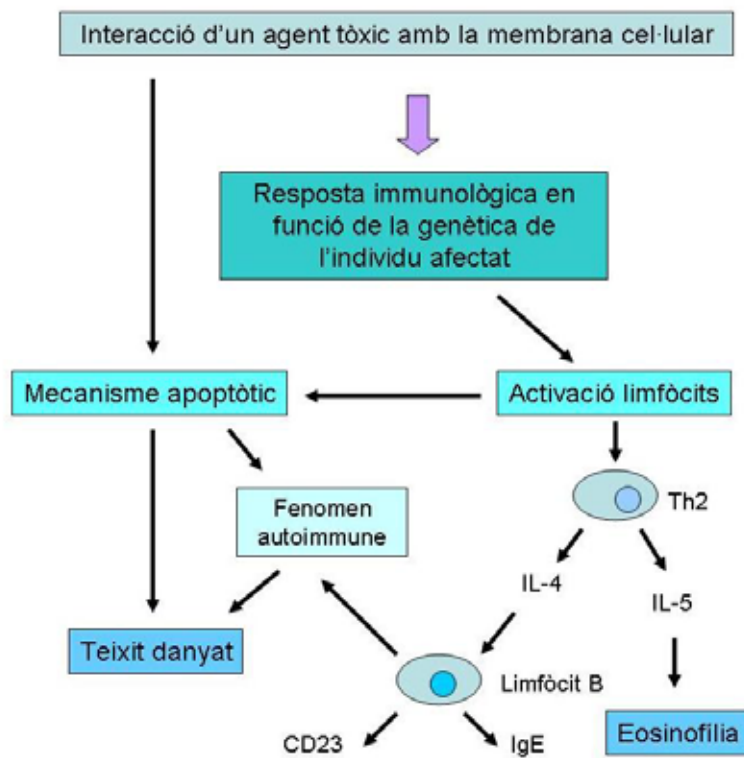


Figura 0.4. Hipotètic mecanisme immunològic involucrat en la SOT.

Un altre fet que fa suposar l'existència d'un mecanisme immunològic en la patogènesi de la SOT és que només una petita proporció dels casos aguts van evolucionar a la fase crònica. El fet que únicament una fracció de la població afectada sigui sensible als efectes adversos de

l'exposició a un agent és característic de les toxicitats produïdes per mecanismes immunològics.

Estudis metabòlics i de toxicitat animal

En general els estudis en aquesta línia són difícils d'unificar. La majoria d'investigacions presenten un conjunt interessant de resultats, però sense conclusions que els relacionin i que permetin explicar l'etiopatogènesi de la SOT.

La principal dificultat amb la qual s'han trobat les diverses investigacions orientades a la cerca de l'agent etiològic ha estat la falta d'un model animal que reproduïxi la simptomatologia de la SOT. Una de les possibles raons per les qual no s'ha trobat un model animal podria ser que la intoxicació fos específica dels humans.

Cap dels estudis *in vivo* o *in vitro* duts a terme amb els compostos específics de l'oli tòxic (les anilides dels àcids grassos i els esters del PAP) han donat evidències que aquests marcadors estan involucrats en la patogènesi de la SOT.^{33,34,35} Com a conseqüència, assumint com a hipòtesi de treball la via dels derivats del PAP com la possible causant de la generació de l'agent tòxic, es van proposar fer uns assaigs *in vivo* dirigits a la recerca d'un mecanisme indirecte de toxicitat, amb la participació del grup de la Dra. Margarita G. Ladona.^{36,37} En aquests estudis es pretenia veure si el PAP es metabolitzava, i identificar els principals metabòlits formats per discernir les vies implicades en la biotransformació. Els resultats d'aquests estudis van permetre observar que el PAP pot experimentar una extensa biotransformació. El metabòlit principal era l'àcid 2-hidroxi-3-(*N*-fenilamino)propanoic format a través de l'oxidació de l'àtom de carboni terminal del PAP. No obstant, també es van detectar espècies oxidades a l'anell aromàtic. Igualment es va detectar la presència de 4-aminofenol i del paracetamol.

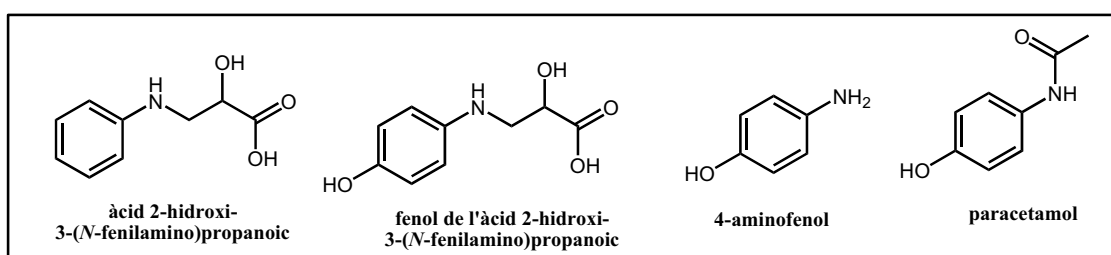


Figura 0.5. Metabòlits identificats en l'orina després de l'administració del PAP en dues soques de ratolí.

Posteriorment es van realitzar estudis de biotransformació *in vitro* del PAP els quals van mostrar una oxidació del PAP a 3-(4'-hidroxifenilamino)-1,2-propandiòl el qual pot derivatitzar en compostos potencialment tòxics com són les iminoquinones degut al seu elevat caràcter electròfil. Aquestes iminoquinones podrien presentar la possibilitat d'unir-se covalentment a macromolècules o components cel·lulars, fet que podria tenir efectes toxicològics. Per aquest motiu es realitzaren estudis on s'analitzà la capacitat d'unió d'aquestes iminoquinones amb determinats nucleòfils presents en el cos humà com són la *N*-acetilcisteïna i el glutatió. Els resultats obtinguts han mostrat l'elevada reactivitat de les iminoquinones formades a partir dels metabolits del PAP i la formació d'aductes tant del p-aminofenol com del 3-(4'-hidroxifenilamino)-1,2-propandiòl.³⁸ Aquests estudis s'han combinat amb altres d'hidròlisi amb lipasa pancreàtica humana dels derivats de PAP,³⁹ els quals confirmaren en primer lloc, que els derivats del PAP se'ls pot considerar mimètics dels lípids, i en segon lloc, que es pot formar PAP per la hidròlisi dels derivats mono i diesterificats.

Estratègies de futur

Després de més de 25 anys d'investigacions encara resten diverses incògnites prou importants per resoldre, entre elles la identificació inequívoca de l'agent causant i el mecanisme biològic de la intoxicació. Aquest període de temps podria considerar-se excessiu, però cal tenir present que moltes malalties han necessitat molt temps perquè s'arribi a conèixer la seva etiologia i n'hi ha que encara romanen sense solució. És per això, que actualment s'estan realitzant nous estudis per intentar esbrinar les incògnites restants. Entre els punts pendents d'aclariment destaquen:

- la confirmació de l'agent causant responsable de la SOT
- la identificació d'un model animal que reproduceixi la malaltia
- l'estudi dels mecanismes immunològics i del metabolisme del possible agent causant de la intoxicació
- la relació de la SOT amb altres malalties o trastorns immunològics

Objectius

L'objectiu principal d'aquesta Tesi ha estat realitzar noves aportacions relacionades amb la SOT, les quals es poden resumir en tres punts:

- Obtenció d'un model d'oli tòxic el qual reproduís de la forma més fidel els olis causants de la intoxicació. Aquests olis haurien de presentar concentracions d'anilides i de derivats del PAP de l'ordre dels associats amb la SOT. Per tal d'obtenir els nivells desitjats d'anilides i de derivats del PAP, s'hauria de desenvolupar un procés model de

desodorització mitjançant el qual es controlaria l'efecte de les diverses variables que influeixen en la formació d'aquests derivats anilínics.

- Un segon objectiu fou la síntesi d'estàndards de compostos de la família dels derivats del PAP els quals havien estat identificats en els olis models realitzats en el nostre laboratori.
- El tercer objectiu fou l'estudi de la formació dels derivats anilínics en olis models, així com la seva interrelació i reactivitat en les condicions de desodorització i d'emmagatzematge, amb la finalitat de trobar una explicació a les diferències observades entre els olis tractats a Catalunya i els de Sevilla pel que fa a la seva composició química.

**PART I. DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL
D'OLI TÒXIC**

SUMARI PART I

1.0. CRITERI ESTABLERT PER A LA NOMENCLATURA DE DERIVATS DEL PAP	17
1.1. INTRODUCCIÓ	21
1.1.1. Ruta de l'oli de colza relacionat amb la SOT	21
1.1.2. Composició química dels olis relacionats amb la SOT	22
1.1.3. Procés de refinació d'un oli comercial	24
1.1.3.1. <i>Desgomatge</i>	25
1.1.3.2. <i>Neutralització</i>	26
1.1.3.3. <i>Winterització</i>	26
1.1.3.4. <i>Decoloració</i>	27
1.1.3.5. <i>Desodorització</i>	27
1.1.4. Especulacions sobre el procés que va tenir lloc en els olis de la SOT	29
1.1.4.1. <i>Refinació amb el coneixement del tractament amb anilina</i>	29
1.1.4.2. <i>Refinació de l'oli sense el coneixement del tractament amb anilina</i>	29
1.1.4.3. <i>Experiments per establir el probable procés de refinació</i>	29
1.1.5. El procés de desodorització, un pas clau en la formació dels derivats del PAP	31
1.1.6. Disseny d'experiments	34
1.1.6.1. <i>Anàlisi de les respostes del disseny d'experiments</i>	35
1.1.7. Objectius de la part I	36
1.2. DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL D'OLI TÒXIC	37
1.2.1. Reproducció dels estudis de desodorització emprats al CDC	37
1.2.1.1. <i>Primers experiments de desodorització d'un oli en un muntatge de destil·lació en el nostre laboratori</i>	38
1.2.1.2. <i>Escala de treball en la desodorització</i>	39
1.2.2. Disseny d'experiments aplicat al desenvolupament d'un model d'oli	40
1.2.2.1. <i>Factors a estudiar en la desodorització</i>	40
1.2.2.2. <i>Interpretació dels resultats</i>	43
1.2.3. Experiments de desodorització d'un oli a escala de 400 g	45
1.2.3.1. <i>Primera fase d'obtenció d'olis model</i>	45
1.2.3.2. <i>Segona fase d'obtenció d'olis model</i>	47
1.2.3.3. <i>Tercera fase d'obtenció d'olis model</i>	49
1.2.4. Assaigs d'extracció d'anilina de l'oli de colza	51
1.2.4.1. <i>Assaigs d'extracció líquid-líquid</i>	51

1.2.4.2. Assaigs d'extracció mitjançant destil·lador molecular	52
1.3. VALIDACIÓ D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ D'ANILINA	57
1.3.1. Desenvolupament d'un mètode analític per a la determinació d'anilina en models d'oli	58
1.3.1.1. Selecció d'un patró extern per realitzar la validació del mètode	61
1.3.1.2. Síntesi i anàlisi de l'oleat del patró extern	62
1.3.2. Validació de diversos paràmetres del mètode analític per a la determinació d'anilina	63
1.3.2.1. Selectivitat/Especificitat	64
1.3.2.2. Precisió	65
1.3.2.3. Exactitud	67
1.3.2.4. Linealitat i interval	68
1.3.2.5. Límit de detecció i límit de quantificació	70
1.3.2.6. Estabilitat	71
1.3.3. Determinació d'anilina en models d'oli tòxic realitzats al laboratori	72
1.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	75
1.4.1. Generalitats	75
1.4.2. Procediment experimental per als assaigs de desodorització model	78
1.4.3. Experiments a diferents escales	78
1.4.4. Desodorització a escala de 400 g	78
1.4.5. Procediment experimental del disseny d'experiments	79
1.4.5.1. Experiments per a l'estudi d'un possible catalitzador extern	79
1.4.6. Assaigs d'extracció d'anilina mitjançant un destil·lador molecular	79
1.4.7. Desenvolupament d'un mètode per quantificar i analitzar anilina en models d'oli	79
1.4.8. Síntesi i anàlisi de l'oleat del patró extern	80
1.4.9. Procediment experimental per a la validació del mètode per determinar anilina	80
1.4.9.1. Validació de la selectivitat	81
1.4.9.2. Validació de la precisió	81
1.4.9.3. Validació de l'exactitud	81
1.4.9.4. Validació de la linealitat	82
1.4.9.5. Validació del límit de detecció i quantificació	82
1.4.9.6. Validació de l'estabilitat dels analits	82
1.4.10. Procediment experimental per a la quantificació d'anilina	82

1.0. CRITERI ESTABLERT PER A LA NOMENCLATURA DE DERIVATS DEL PAP

Amb la finalitat de facilitar la comprensió i el treball entre diferents grups relacionats amb la SOT, la comissió internacional de seguiment de la SOT adoptà una nomenclatura genèrica per als compostos relacionats amb aquestes investigacions.⁴⁰ Aquesta nomenclatura és la que s'ha emprat en aquesta tesi.⁴¹ A continuació es descriuen els criteris i les recomanacions d'aquesta.

Noms genèrics de les estructures bàsiques:

Distingirem principalment entre dos grups de fenilaminopropanols. Les seves estructures bàsiques s'anomenaran de la següent manera:

El 3-(*N*-fenilamino)-1,2-propandiòl s'anomenarà com a PAP.

Els difenilaminopropanols s'anomenaran genèricament com a bisPAP. Hi ha dos tipus d'isòmers posicionals del bisPAP. Per indicar-ne un d'específic, s'utilitzaran les següents nomenclatures: bis(1,3)PAP i bis(2,3)PAP.

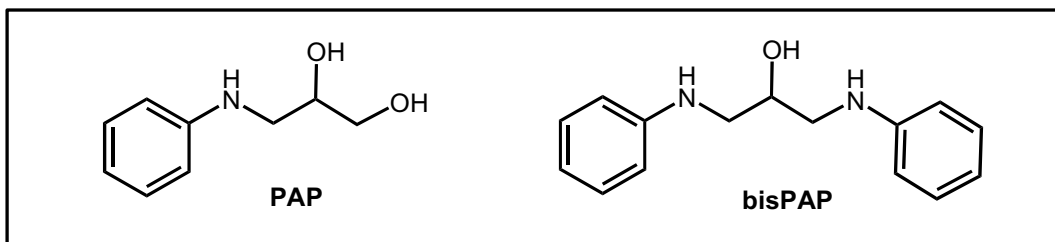


Figura 1.1. Estructura del 3-(N-fenilamino)-1,2-propandiol (PAP) i del 1,3-(bisfenilamino)-2-propanol(bis(1,3)PAP).

Noms genèrics per als derivats del PAP i bisPAP:

El PAP i el bisPAP poden presentar diferents substituents d'acil en la posició 1 i 2, així com en el nitrogen de l'arilamina. Per tal de cobrir totes les possibilitats de nomenclatura s'estableixen les diferents regles:

- Derivats monoacilats:

S'anomenaran genèricament mPAP i mbisPAP als derivats monoacilats del PAP i del bisPAP. S'utilitzarà m(i)PAP per especificar que el grup acil es troba en la posició $i = 1$ o 2 del PAP, m(N)PAP per especificar que el grup acil es troba en el nitrogen de la fenilamina del PAP, m(N)bisPAP quan el grup acil es troba en el nitrogen en la posició 3 i m(N')bisPAP quan el grup acil es troba en el nitrogen de la fenilamina en la posició 1 o 2.

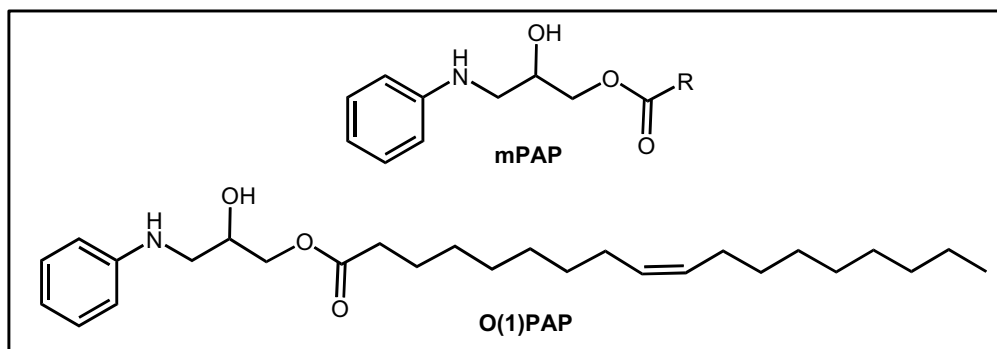


Figura 1.2. Estructura genèrica (mPAP) i específica (O(1)PAP)* de l'oleat del 2-hidroxi-3-(fenilamino)propil.

*En totes les figures s'utilitzarà la mateixa nomenclatura referent als àcids grassos: $R_1\text{COOH}$ serà l'abreviació d'àcid oleic, $R_2\text{COOH}$ la d'àcid linoleic, $R_3\text{COOH}$ de l'àcid hexanoic i $R_4\text{COOH}$ de l'àcid palmític.

- Derivats diacilats

Es posarà dPAP i dbisPAP per referir-nos genericament als derivats diacilats del PAP i del bisPAP respectivament, d(i,j)PAP quan els dos grups acil estan en la posició i i j, d(i,N)PAP quan un grup acil es troben en la posició i, i l'altre en el nitrogen del grup fenilamina.

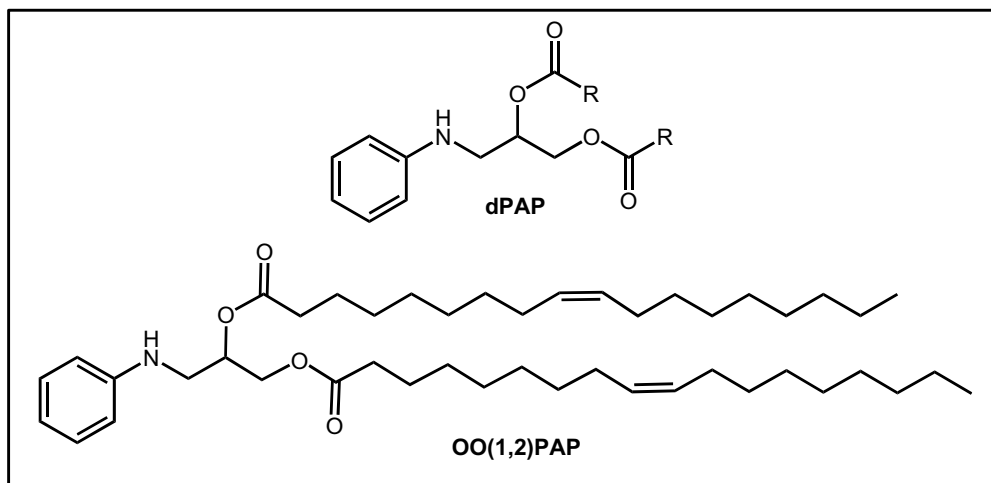


Figura 1.3. Estructura genèrica (dPAP) i específica (OO(1,2)PAP) de l'oleat de l'oleïloxi-3-(fenilamino)propil.

- Derivats triacilats:

Es posarà tPAP i tbisPAP per als compostos amb tres grups acil en la posició 1, 2 i N o en la 1, N' i N.

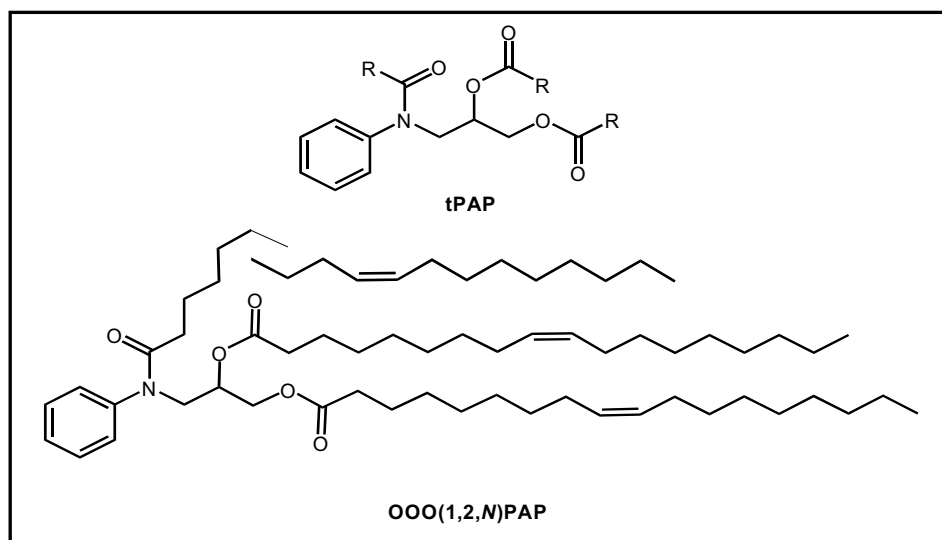


Figura 1.4. Estructura genèrica (tPAP) i específica (OOO(1,2,N)PAP) d'un derivat triacilat del PAP.

Noms específics per als derivats del PAP i del bisPAP:

Per tal d'identificar la naturalesa dels diferents residus d'acil s'utilitzarà la següent nomenclatura:

Es posarà la primera lletra del nom de l'àcid gras en majúscula, seguida per la posició en la qual es troba, entre parèntesis (1, 2, *N* o *N'*) i després el nom PAP o bisPAP. Quan la lletra inicial coincideix en dos àcids grassos, s'utilitza una segona, com per exemple: àcid Linoleic (L) i àcid Linolènic (Ln). La presència de grups acil en diferents àtoms de nitrògens ha d'estar indicada amb *N* i *N'*.

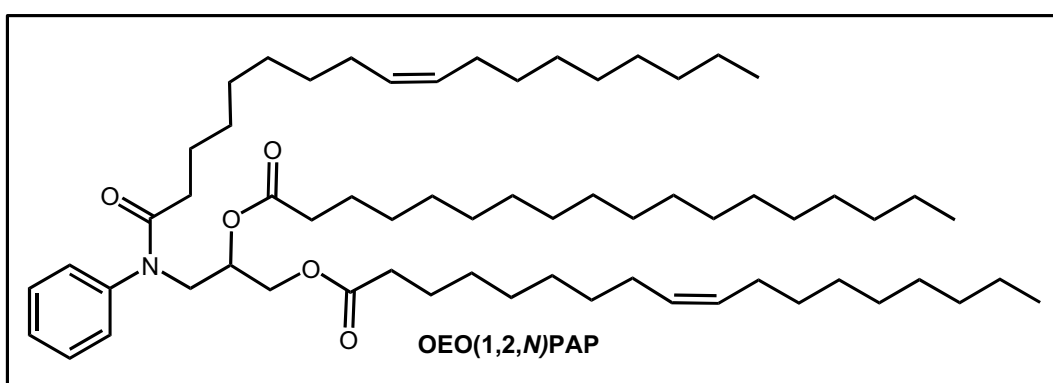


Figura 1.5. Estructura d'un tPAP amb el següent nom específic: OEO(1,2,N)PAP.

1.1. INTRODUCCIÓ

1.1.1. RUTA DE L'OLI DE COLZA RELACIONAT AMB LA SOT

L'oli de colza involucrat en la SOT fou importat des de França a través de dues empreses que es dedicaven a l'obtenció i refinació d'oli de colza en aquest país. Aquestes empreses es dedicaven principalment a l'obtenció d'oli de colza per a consum humà. L'oli de colza que van subministrar als importadors espanyols provenia dels mateixos estocs d'oli de colza que es van distribuir a França per al consum humà i els quals no van provocar cap cas d'intoxicació. Abans de ser importat a Espanya, l'oli va ser desnaturalizat amb un 2% d'anilina, moment en el qual les empreses franceses van deixar de tractar-lo com a oli comestible. És llavors quan aquest oli va ser transportat en camions on podien haver quedat restes d'altres productes químics. En resum, l'oli importat a Espanya tenia clarament dues diferències significatives amb l'oli de colza que s'havia venut a França. La primera era el contingut d'un 2% d'anilina com a agent desnaturalitzant, percentatge afegit perquè es pensava que era un requeriment de la llei espanyola. Segon, la possibilitat que durant el transport de l'oli s'hagués pogut mesclar amb algun tipus de contaminant químic.

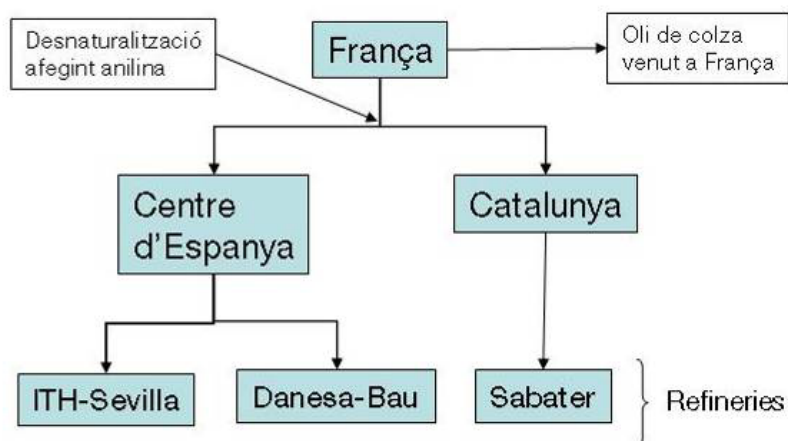


Figura 1.6. Principals rutes de distribució de l'oli de colza, originari de França, i indústries involucrades en el procés de refinació.²⁴

L'oli de colza distribuït a Catalunya no va enregistrar ni un sol cas d'intoxicació, mentre que el 99% dels casos de la SOT van tenir lloc en el centre i nord-oest de la península. També es van enregistrar tres casos aïllats al sud d'Espanya com a resultat de la ingestió d'oli provinent de la refinaria ITH (Industria Trianera de Hidrogenación) de Sevilla.¹⁰

1.1.2. COMPOSICIÓ QUÍMICA DELS OLIS RELACIONATS AMB LA SOT

Els olis comestibles poden provenir de diferents fonts. La composició lipídica és molt semblant entre ells, però poden presentar certes diferències qualitatives i quantitatives en funció de si el seu origen és animal o vegetal. L'oli de colza està format principalment per triglicèrids i per àcids grassos lliures, essent la trioleïna el triglicèrid més abundant. Pel que fa als àcids grassos lliures es caracteritza per tenir un baix nivell en saturats i un alt nivell en insaturats. D'aquests un 60% és àcid oleic, un 25% àcid linoleic i un 10% linolènic.

El patró d'àcids grassos i d'esterols de 50 mostres d'olis implicats en la SOT analitzats a l'"Instituto de la Grasa" de Sevilla va poder determinar que aquests olis procedien de diferents orígens.¹² Fins i tot, en algun cas, es van observar mesclades que contenien fins a cinc olis diferents. Les anàlisis realitzades al "Centro Nacional de Alimentación y Nutrición" indicaven que la composició bàsica era principalment oli de colza i greixos animals, amb una petita quantitat d'oli d'oliva residual de baixa qualitat.¹²

Present en quantitats de desenes de ppm (< 30 ppm), l'anilina va ser un dels primers compostos detectats en olis sospitosos d'haver causat la SOT. Actualment s'ha acceptat el fet que aquesta anilina prové del 2% (20000 ppm) de l'anilina afegida per desnaturalitzar l'oli. El baix contingut d'anilina en l'oli venut indicava que havia estat eliminada en gran part en el

procés de refinació i en reaccions amb constituents propis de l'oli. A més, també s'ha demostrat que aquest oli havia estat diluït amb altres olis, tot disminuint així la concentració dels possibles contaminants i/o tòxics formats.

Un altre tipus de compostos detectats en els olis van ser les amides de l'anilina amb àcids grassos, anomenades anilides. La seva concentració en les barreges d'oli oscil·lava entre 500 i 2000 ppm. Principalment es tractava d'anilides de l'àcid oleic, àcid gras majoritari en els olis relacionats amb la SOT. En el cas de les anilides passava el mateix que amb l'anilina: mostres d'oli abans de la refinació en contenien fins a 20000 ppm. Per tant, el procés de refinació havia fet minvar el seu nivell. Diferents dades experimentals han demostrat que les anilides es poden formar de manera espontània, durant el transport i emmagatzemament en els olis adulterats amb anilina. Segons el treball descrit per Vázquez-Roncero,⁴² des del punt de vista químic, l'anilina en l'oli hauria de reaccionar preferentment amb els triglicèrids per donar la corresponent anilida d'àcid gras. Aquest procés hauria de ser el més favorable i per tant més eficient que la reacció directa de l'anilina amb l'àcid gras. Altres estudis com el de Koch i col·laboradors⁴³ van arribar a la conclusió que el 90% de les anilides provenien de la reacció dels triglicèrids i només el 10% dels àcids grassos lliures.

En un estudi molt extens dels olis-casos es va trobar una correlació epidemiològica entre les anilides i els olis relacionats amb la SOT, correlació també observable amb l'anilina. Semblava haver-hi un efecte de dosi-resposta.⁴⁴ Gairebé des de l'inici es va pensar que el paper de les anilides era força important en la intoxicació.⁴ Així doncs, durant molts anys es van fer un elevat nombre d'estudis emprant diversos models animals (ratolins, conills, embrions de gallina, etc.), amb l'objectiu de confirmar la toxicitat d'aquests compostos, sense obtenir resultats positius. No obstant, les anilides es van considerar uns bons biomarcadors dels olis adulterats.

Va ser poc després de l'epidèmia, quan Vázquez-Roncero va descobrir una nova família de compostos presents en els olis.^{17,18} Es tractava de derivats del 3-(N-fenilamino)-1,2-propandiòl (PAP), més concretament monoesters (mPAP) i diesters (dPAP) amb àcids grassos. No ha estat fins aquesta última dècada quan s'ha aprofundit més en l'estudi d'aquests compostos. Estudis com els realitzats en el centre de recerca CDC (Centers for Disease Control and Prevention) d'Atlanta van identificar fins a 20 nous derivats del PAP gràcies a la utilització de tècniques com l'espectrometria de masses mitjançant ionització atmosfèrica acoblada a HPLC. La quantificació d'aquests derivats va donar valors de 44 i 150 ppm d'OPAP i OOPAP, respectivament.²² Aquestes concentracions baixaven considerablement en mostres d'olis casos (1.4 i 53 ppm), degut a que aquests olis havien estat mesclats i diluïts amb altres olis per tal de vendre'ls en mercats. Més recentment s'ha encarregat a diversos

laboratoris (Mayo Clinic de Rochester, USA i a l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona del CSIC) un estudi exhaustiu per tal de poder identificar i quantificar tots els components estranys presents en els olis relacionats amb la SOT. De moment, aquest ha estat l'estudi més ampli dut a terme fins ara, s'ha realitzat amb el tractament de més de 2600 mostres. L'estudi s'ha desenvolupat mitjançant una extracció en fase sòlida utilitzant una columna d'intercanvi catiònic (SCX) i la posterior quantificació per HPLC-APCI MS/MS.^{45,46}

La diferència de toxicitat existent entre la ruta dels olis catalans i la ruta sevillana va quedar aclarida quan es va observar en els olis refinats a Sevilla, els quals causaren la intoxicació, la presència d'anilides i derivats del PAP, mentre que partides d'oli de la mateixa importació fraudulenta i que havien estat refinades a Catalunya, contenien únicament anilides i no causaren intoxicats.^{22,23, 24} Aquest fet va portar a considerar els esters del PAP com a biomarcadors dels olis tòxics, ja que apareixien només en els olis refinats per la refinaria ITH, companyia relacionada amb la intoxicació.²² A més s'ha de tenir en compte que els derivats del PAP, contràriament a les anilides, no es formen de manera espontània en els olis.²² Aquests derivats no eren presents en els olis crus abans del procés de refinació, fet que permet associar la seva formació amb la refinació de l'oli.

Aquests resultats donaven suport a la hipòtesi que la família dels derivats del PAP podrien ser un dels agents causals de la intoxicació. Per contra, s'ha d'esmentar que tots els estudis toxicològics publicats fins ara en models animals no han mostrat cap resultat satisfactori.³⁴ En aquest sentit cal subratllar que un dels motius més importants que han fet molt difícil les investigacions sobre la SOT ha estat la falta d'un model animal que reproduís la simptomatologia de la intoxicació. Aquest fet contrasta amb la fiabilitat que tenen els estudis epidemiològics portats a terme sobre la SOT.^{34,47}

1.1.3. PROCÉS DE REFINACIÓ D'UN OLI COMERCIAL

Com tot oli destinat al consum humà, l'obtenció d'oli de colza segueix un determinat procés d'elaboració. El procés s'inicia amb les llavors de la colza i mitjançant un tractament apropiat s'arriba al producte final: un oli suau, estable i lleugerament decolorat. Un oli apte per al consum humà.

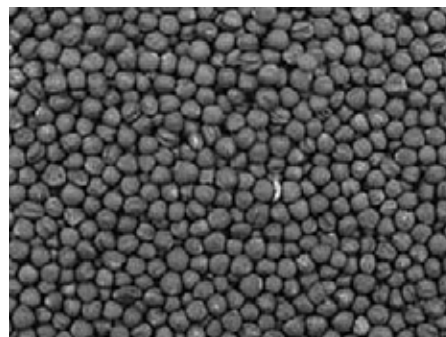


Figura 1.7. Imatge de llavors de colza.

Les etapes que se seguien en una refinaria d'oli l'any 1981 eren les següents:^{23, 24}

1) Primer es premsaven les llavors en un molí, a 100 °C durant 15-30 minuts. S'obtenia un primer oli, el qual es centrifugava per separar-lo de l'aigua i de sòlids retinguts, es filtrava i es guardava. Aquest oli corresponia aproximadament al 80% de la producció de l'empresa i era destinat per a l'ús de consum humà, sense sotmetre'l al procés de refinació. Salvant les diferències, aquest oli es podria equiparar a l'anomenat oli d'oliva verge.

2) A continuació es reunien els sòlids de la primera premsada i es posaven en un extractor en contacte amb hexà, per tal de realitzar una extracció sòlid-líquid en continu. Tot seguit s'obtenia una altra producció d'oli, després d'eliminar el dissolvent en un evaporador. Aquest oli residual representava un 20% de la producció i s'havia de sotmetre a refinació, mentre que el 0.5% d'oli restant es desnaturalitzava i per tant es destinava a l'ús industrial.

El procés de refinació d'olis destinats al consum humà té com a objectiu principal l'eliminació de les impureses presents en els olis. Aquestes impureses han de ser eliminades per diversos motius: poden presentar certa toxicitat, poden aportar característiques de color, olor i gust no aptes per al seu consum, o bé poden afectar l'estabilitat del producte. L'objectiu del procés de refinació és extreure les impureses amb la mínima manipulació dels glicèrids i la mínima pèrdua d'oli. Per dur a terme aquest procés és necessari sotmetre l'oli a una sèrie d'etapes. Aquestes etapes corresponen al desgomatge, neutralització, winterització i decoloració. A continuació, degut a la relació directa entre el procés de refinació i la SOT, s'ha cregut convenient descriure cadascuna de les etapes del procés.

1.1.3.1. Desgomatge

L'objectiu d'aquesta etapa és l'eliminació dels fosfolípids. Aquests compostos són molècules de glicerol esterificat en la posició 1,2 amb diferents àcids grassos i en la posició 3 amb àcid fosfòric el qual, a la vegada, normalment està unit a un grup polar de naturalesa variada. Aquest procés és un prerrequisit a l'hora de realitzar una refinació física de l'oli. Si els fosfolípids romanen abans de la desodorització o de la refinació física, l'oli tindrà un color més fosc i unes característiques organolèptiques pitjors, a més de ser menys estable.

L'eliminació dels fosfolípids es realitza mitjançant l'addició d'àcid fosfòric (un 0,1-0,2% d'àcid fosfòric del 20-60%), el que permet hidrolitzar els fosfolípids, facilitant la seva precipitació en presència d'aigua i la seva posterior separació mitjançant centrifugació. En la indústria alimentària solament es permet l'ús d'àcid cítric i fosfòric, essent aquest últim el més utilitzat pel seu baix cost.

En l'eficàcia del procés de desgomatge intervenen diversos factors, com són la concentració d'àcid, la temperatura i el temps de transcurs del procés. L'augment del factor de la temperatura permet que tingui lloc la precipitació dels fosfolípids, els quals es separen posteriorment durant la neutralització. Quant al temps de tractament, la precipitació dels fosfolípids arriba al màxim entre 15-30 min. Amb tot això, la reacció entre l'oli i l'àcid és ràpida, de manera que temps de tractament excessivament llargs poden facilitar la formació de compostos no hidrolitzables.

1.1.3.2. Neutralització

El procés de neutralització té com a objectiu eliminar els àcid grassos lliures i altres impureses presents en els olis. Es duu a terme mitjançant l'addició de sosa, intentant que les pèrdues d'oli neutre siguin mínimes. En general aquest procés consta de tres etapes: neutralització, rentat i assecat.

Un dels principals problemes de la refinació química és la producció de pastes. Aquestes consisteixen principalment en sals sòdiques dels àcids grassos neutralitzats. Però també contenen triglicèrids, proteïnes, pigments i altres compostos eliminats de l'oli cru, com esterols i tocoferols. Generalment, per afavorir la reacció de saponificació s'afegeix un excés del 10-20% de la quantitat estequiomètrica de sosa requerida. Tot i així, és inevitable que s'originin una sèrie de reaccions secundàries, com és ara la saponificació d'una petita part dels triglicèrids. Aquesta reacció està més afavorida en la mesura que es perllongui el temps de contacte entre l'oli i la sosa.

L'oli separat per centrifugació té un contingut residual en sabons entre 200-500 ppm. Aquesta quantitat és molt alta perquè l'oli pugui ser directament decolorat, ja que els sabons actuarien com a inhibidors de les terres decolorants. Per minimitzar el contingut en sabons fins a 50 ppm com a màxim, es fan una o dues etapes de rentat amb un 8-10% d'aigua calenta (90-95 °C). Aquesta aigua afegida es separa amb els sabons diluïts per mitjà d'una segona centrifugació.

1.1.3.3. Winterització

Es denomina així a l'etapa de cristal·lització mitjançant refredament. Té com a objectiu eliminar aquells compostos que cristal·litzen a temperatures baixes, com són les ceres i els triglicèrids saturats, els quals enterboleixen l'oli refinat i provoquen el rebuig del consumidor. Bàsicament el procés suposa un refredament de l'oli a una temperatura al voltant dels 5 a 8 °C, tot deixant que la fracció sòlida cristal·litzi durant 24-48 h. Finalment es separen les dues fases per filtració o centrifugació.

1.1.3.4. Decoloració

La decoloració és l'etapa en la qual es redueix el color de l'oli degut a l'adsorció dels pigments sobre terres decolorants. Durant la decoloració també s'adsorbeixen: productes primaris i secundaris d'oxidació, metalls, sabons, compostos fosfàtids i hidrocarburs policíclics aromàtics, així com certs components beneficiosos, com és el cas dels tocoferols.

Terres naturals decolorants, naturals o activades, són les més emprades per decolorar. Solen ser bentonites i montmoril·lonites amb una dimensió de partícula entre 20-80 µm. Les propietats que s'han de tenir en compte en les terres des del punt de vista de l'adsorció, són tant físiques (àrea superficial, centres actius en la superfície, mida de porus), com químiques (acidesa i humitat). Un altre tipus important d'adsorbent és el carbó actiu. La isoterma de Freundlich permet veure quins són els principals factors que influeixen en l'adsorció d'un solut en dissolució, sobre una superfície sòlida. Més concretament, la isoterma de Freundlich indica que l'adsorció, a una temperatura fixa i propietats fixes dels adsorbents, depèn de la concentració de solut i la concentració d'adsorbent. Per tant, l'elecció de la temperatura és un factor important ja que no solament influeix en l'equilibri, sinó que la seva disminució fa augmentar la viscositat de l'oli. Això implica que el contacte entre l'oli i la terra és menys eficaç i alhora augmenta el temps de filtració.

$$C^* = K[V(C_0 - C^*)]^n$$

Equació 1. *Isoterma de Freundlich.*

La decoloració s'ha de fer sempre al buit per evitar en la mesura del possible els efectes de l'oxidació, i es pot realitzar tant en continu com discontinu.

1.1.3.5. Desodorització

La desodorització és l'última etapa important en el procés de refinació química dels olis. Tots els olis contenen, a més de triglicèrids, un elevat nombre de compostos minoritaris, entre els quals es troben els àcids grassos lliures. També de manera minoritària es troben els compostos responsables de l'olor i el gust, com són els aldehids, cetones, alcohols i hidrocarburs, normalment originats per la descomposició tèrmica i autoxidativa de peròxids, pigments i estabilitzants naturals de l'oli. L'objectiu de la desodorització és eliminar aquests compostos.

Es tracta d'un procés de destil·lació a temperatura alta i buit, que es duu a terme mitjançant arrossegament de vapor d'aigua, encara que en els últims anys ha sorgit com a alternativa l'arrossegament per nitrogen. La desodorització i la destil·lació d'àcids grassos són

possibles gràcies a la gran diferència de volatilitat entre els triglicèrids i les substàncies que els acompanyen. Les cetones són les que presenten pressions de vapor més elevades, entre 500 i 2200 Torr a 250 °C, seguits d'alguns hidrocarburs insaturats, entre 100 i 600 Torr, mentre que els punts d'ebullició més alts corresponen als àcids grassos lliures de cadena llarga, ja que a 250 °C, la pressió de vapor d'aquests compostos està entre 20 i 200 Torr. Altrament, els triglicèrids a la citada temperatura mostren tan sols valors entre 10^{-3} i 10^{-4} Torr. Donada la diferència de volatilitat entre els compostos, és inevitable una pèrdua de part dels components valuosos de l'oli, com és el cas dels tocoferols. La introducció d'un gas d'arrossegament per desodoritzar està justificada perquè la destil·lació comença quan la suma de les pressions parcials dels components arriba a la pressió que hi ha en la superfície de l'oli. Segons la llei de Raoult, a temperatura constant, la pressió de vapor d'un solut volàtil és proporcional a la seva fracció molar per un volum donat de dissolució. Per tant, si s'introdueix una pressió artificial, mantenint constant la pressió total, s'aconsegueix que la resta de les pressions parcials es redueixin, i en definitiva, aquest fet provoca que la destil·lació comenci a menor temperatura.

Les temperatures utilitzades per a la desodorització es troben compreses entre 180 °C-270°C. Aquests límits de temperatura venen establerts per les reaccions químiques de descomposició i hidròlisi que es produeixen durant aquesta etapa. És recomanable utilitzar temperatures superiors a 200°C quan es desitja obtenir un efecte decolorant addicional, ja que a aquestes temperatures té lloc una ràpida descomposició de peròxids i pigments.

Aquesta etapa de desodorització es desenvolupa en quatre fases:

- a) Desaireig de l'oli, ja que l'oxigen és molt reactiu amb l'oli a altes temperatures de desodorització i pot afectar de manera molt nociva l'estabilitat del producte final.
- b) Escalfament i manteniment de la temperatura de l'oli durant el procés, amb calefacció de vapor a pressió o bé amb fluids tèrmics.
- c) Distribució del gas d'arrossegament en el seu si.
- d) Refredament, per impedir que l'oli es deteriori un cop desodoritzat. Aquest procés es pot realitzar de forma contínua, discontinua o semicontínua.

Actualment hi ha en estudi altres mètodes de refinació com són l'eliminació d'àcids grassos mitjançant destil·lació molecular^{48,49} o la utilització de fluids supercrítics. De les tècniques proposades recentment, la que ha tingut una àmplia acceptació és la substitució de vapor d'aigua per nitrogen en l'etapa de desodorització. Les importants millores en els sistemes de buit han permès l'ús d'aquest gas amb rendiments millors, tant pel que fa al consum d'aigua i energia, com en la quantitat de gas utilitzada.

1.1.4. ESPECULACIONS SOBRE EL PROCÉS QUE VA TENIR LLOC EN ELS OLIS DE LA SOT

1.1.4.1. Refinació amb el coneixement del tractament amb anilina

La presència d'anilina com a agent desnaturalitzant podia haver plantejat diverses maneres d'eliminació. Es podia haver aplicat un rentat àcid amb un excés d'àcid fosfòric o clorhídric. Aquesta possibilitat va ser explorada per Koch i col·laboradors.⁴³ La majoria d'anilina (80%) va ser eliminada en un sol rentat; un segon rentat amb aigua per eliminar l'àcid residual la va disminuir de 1400 a 600 ppm. Una altra manera d'eliminar l'anilina hauria estat desodoritzar directament l'oli sense un tractament previ. Es va demostrar que en aquestes condicions l'anilina s'eliminava totalment i si s'augmentava més la temperatura, s'eliminaven també els àcids grassos.⁴³

Així doncs, una refinaria que hagués comptat amb l'anilina en els olis hauria pogut eliminar-la amb major o menor facilitat. Tanmateix, les anilides haurien restat als nivells trobats en els olis causants de la SOT i els compostos derivats del PAP com es veurà més endavant en quantitats variables en funció del tractament aplicat.

1.1.4.2. Refinació de l'oli sense el coneixement del tractament amb anilina

En el cas que les refineries on es va produir el tractament de l'oli no haguessin estat coneixedores de la presència d'anilina en els olis, s'hauria procedit de forma rutinària aplicant la seqüència de processos descrits anteriorment: és a dir, el desgomatge, neutralització, winterització, decoloració i desodorització. Si l'oli ja hagués arribat desgomat, haurien evitat el procés de desgomatge, tot i que podrien haver dut a terme un desgomatge amb aigua o un desgomatge àcid típic amb àcid fosfòric. En aquest procés s'hauria eliminat poca anilina, com van demostrar també a l'"Instituto de la Grasa".⁴² En definitiva, l'anilina hauria entrat en una seqüència d'etapes en els quals, en tot moment, estaria en contacte directe amb la matriu d'oli de colza i per tant susceptible d'intervenir involucrada en algun tipus de reacció amb components de l'oli.

1.1.4.3. Experiments per establir el probable procés de refinació

Estudis de l'"Instituto de las Grasas y Derivados", amb el suport de les autoritats judicials, van arribar a concloure que la situació probable en la refinaria de Sevilla on es van processar els olis, va ser la següent:

- Possibilitat de realitzar un desgomatge, seguit d'un rentat amb un 0.1- 0.2% d'àcid fosfòric a 80 °C.

- Neutralització a 80-85 °C amb hidròxid sòdic, seguit de rentats en aigua per eliminar les emulsions.
- Decoloració amb un 2-6% de terres decolorants a 80-120 °C al buit, seguida d'una filtració per eliminar les terres.
- Desodorització a 200-240 °C amb buit.

A la Taula 1.1 es mostren els primers treballs sobre simulació de procediments de refinació de mostres d'oli de colza realitzats al Laboratori d'Investigacions Unilever,⁴³ els quals es basaven en l'addició d'anilina marcada amb ³H.

S'observà que la neutralització de l'oli a 80-85 °C per rentat amb aigua eliminava el 20% de l'anilina afegida, mentre que el blanqueig a uns 80-120 °C sota pressió, seguida de la filtració, eliminava la major part de la radioactivitat, quedant només un 7.5% en l'oli. La desodorització següent a 220 °C i 1-3 Torr durant 3 hores no va eliminar més anilina. En canvi, la desodorització directa eliminà tota l'anilina lliure amb una eficàcia del 100%, tot indicant que el 7% de radioactivitat que romanía després del blanqueig podia atribuir-se a productes de reacció de l'anilina.

Taula 1.1. Eliminació de l'anilina per un procés convencional del refinació d'un oli (500 g d'oli contenint 500 μ Ci de ³H-anilina).⁴³

Passos del procés	³ H residual en el oli (%)
Desgomatge amb un 7% d'aigua i 0.1% H ₃ PO ₄ , Addició de l'anilina	100
Neutralització amb 3 mol/l NaOH, 0.1 mol/l NaOH i rentats amb aigua	80
Decoloració amb un 5% d'àcid-rentat Tonsil ACCFF (0.5 h a 100 °C) + filtració	7.4
Desodorització (3 h a 220 °C i 1-3 Torr)	7

L'equip especial d'investigació de la Comissió Internacional patrocinada per l'OMS,⁵⁰ va indicar que les diferents refineries que tractaven l'oli de colza cru destinat a la distribució, practicaven la desodorització a temperatures de 170-230 °C sota una pressió de 2-20 Torr. Aquestes condicions podien fer que alguns compostos volàtils no s'eliminassin del tot. Així doncs, no es pot descartar la presència d'algunes ppm d'anilina en els olis refinats. En l'oli refinat a la ITH, el contingut d'anilina era entre 40 i 80 ppm, i això concorda amb les condicions de major temperatura, menor pressió i desodorització més prolongada que s'aplicaven en aquesta refinaria. Estudis de 36 mostres d'olis relacionats amb el SOT i refinats a la ITH,

mostren que aquests olis contenien anilides en concentracions entre els 3 i 2037 ppm i només < 0.5-1.1 ppm d'anilina lliure.¹²

Altres estudis centrats en l'eliminació de l'anilina van mostrar que la concentració d'anilina disminuïa gradualment durant la neutralització i el blanqueig, mentre que la d'anilides es mantenia més o menys estable.⁴² Durant la desodorització a 220-280 °C, l'anilina desapareixia gairebé del tot i les anilides quedaven reduïdes al 15% de la seva concentració original.

1.1.5. EL PROCÉS DE DESODORITZACIÓ, UN PAS CLAU EN LA FORMACIÓ DELS DERIVATS DEL PAP

Durant els primers anys després de l'esclat de la SOT, alguns laboratoris espanyols i estrangers van intentar desenvolupar un mètode amb la finalitat de reproduir les característiques químiques de l'oli de colza responsable de la síndrome. Tots aquests intents van estar basats en el procés estàndard de refinació d'un oli, sense tenir en compte el que realment va passar amb aquest oli.⁵¹ Tot i que durant l'any 1981 es van realitzar diverses visites a les empreses implicades en el refinació de l'oli relacionat amb la SOT, hi va haver un gran buit d'intercanvi d'informació entre els científics i els treballadors de les companyies. Els primers estudis de desenvolupament d'un procés de refinació tenien com a objectiu l'obtenció d'anilides, principalment la oleanilida.⁴² No va ser fins a finals dels anys 80 quan les investigacions van fer un gir considerable gràcies a diferents factors:

- Una millor caracterització dels olis cas gràcies al primer estudi tòxico-epidemiològic.¹³
- Un aprofundiment en el coneixement del què va passar exactament a les refineries involucrades i els camins de distribució de l'oli desnaturalitzat.^{23, 24}

L'any 1995 Hill i col·laboradors van realitzar un conjunt d'experiments centrats en el procés de desodorització, considerant que aquest procés podia ser el pas clau en la formació de derivats del PAP.²² Aquests estudis es van realitzar mitjançant la utilització d'oli de canola (una varietat d'oli de colza que presenta un contingut baix en àcid erúdic) amb un 1% d'anilina, el qual es va sotmetre al buit a 300 °C durant 4 hores. Alhora, es va realitzar el mateix procediment amb olis de la ruta catalana, però sense afegir-hi anilina, els quals contenien anilides però no derivats del PAP. Emprant aquestes condicions, en ambdós experiments, es van formar derivats del PAP, concretament 360 ppm i 42 ppm d'OOPAP, respectivament. D'aquests estudis es van obtenir resultats que suggerien la necessitat de temperatures elevades per tal que es formessin els esters del PAP. No obstant, el procés de desodorització dut a terme per Hill i col·laboradors presentava dues diferències importants respecte a un

procés convencional: la primera era l'ús de temperatures més elevades i la segona l'absència d'agitació mitjançant vapor.

Si es considera el procés de desodorització de la refinaria ITH, el qual es realitzava en tancs en discontinu d'una capacitat de 10 tones, amb un buit de 10 Torr, i que l'escalfament dels tancs es realitzava mitjançant uns serpentins de tubs en el fons dels recipient que contenien oli a una temperatura de 160 °C, el qual a continuació s'escalfava fins a temperatures de 180-260 °C, les dues diferències anteriorment esmentades no arribarien a ser importants si s'hagués produït algun tipus d'anomalia del sistema d'agitació dels tancs. En el cas que l'agitació no funcionés correctament, l'oli ubicat al voltant del serpentí hauria assolit fàcilment temperatures superiors als 300 °C, fent possible així reaccions secundàries, com ara la formació de derivats del PAP.

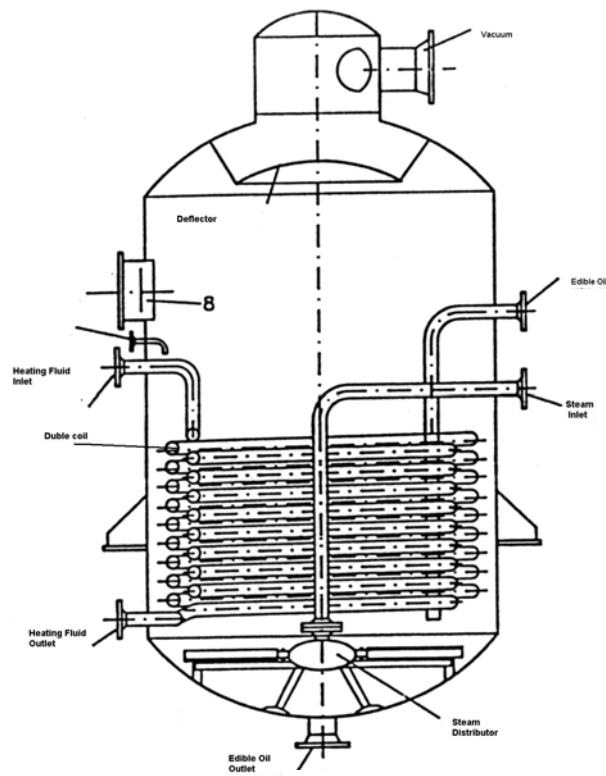


Figura 1.8. Esquema d'un reactor de desodorització on es mostra el serpentí de calefacció que escalfa l'oli.

Durant un cert temps es van intentar reproduir aquests resultats, però sense sort, fins que al 1998 B. Blount, al CDC d'Atlanta, va aconseguir replicar els experiments, així com estudiar

diferents factors que influïen en la formació dels derivats del dPAP.⁵² Aquests estudis van posar de manifest aspectes importants a l'hora d'obtenir derivats del PAP en models d'olis:

- La desodorització en presència de buit durant tot el procés produïa un baix contingut d'OOPAP.

- La velocitat d'escalfament era un dels paràmetres més importants, així com la temperatura màxima a la qual es realitzava el procés. El gradient entre la temperatura i el temps havia de ser molt brusc, el que es traduïa en un escalfament molt ràpid. Alhora, un preescalfament del baló on tenia lloc el procés afavoria la formació de dPAP.

- No es va observar cap augment en la formació de derivats del PAP degut a algun tipus de catalitzador present en l'oli.

Les hipòtesis de Blount, aplicades al que havia pogut passar a la refineria ITH, augmentaven la possibilitat d'una errada en el sistema de buit. Aquesta errada hauria causat que l'anilina no s'eliminés fins arribar a la temperatura d'uns 200 °C ($T^{\text{aebull.}} = 184 \text{ °C}$). Pel que fa a l'escalfament brusc, podrien haver afegit l'oli a un tanc de desodorització pre-escalfat, de manera que una part de l'oli augmentaria ràpidament la temperatura en entrar en contacte amb la superfície escalfada.

M.V. Ruiz-Méndez i col·laboradors van realitzar uns nous estudis que es van centrar en les temperatures elevades que s'assolien en la proximitat del serpentí de calefacció i en el temps d'emmagatzematge dels olis amb l'anilina.⁵³ Els resultats obtinguts constataren que la concentració dels esters del PAP augmentava considerablement quan l'oli s'escalfava entre 250 i 300 °C, però aquest contingut disminuïa en sotmetre l'oli més temps a aquesta temperatura. A més, el nivell d'OOPAP obtingut en les mostres que es van emmagatzemar durant tres setmanes era superior a les emmagatzemades durant una setmana. Un altre fet important és que la quantitat d'OPAP augmentava més durant el període d'escalfament que la dels altres derivats, tot suggerint que el monoester podia estar jugant un paper d'intermediari en la formació o descomposició dels derivats diacilats.

En resum, tots aquests antecedents semblaven apuntar en la mateixa direcció. Probablement era en l'etapa de desodorització on s'havien format els biomarcadors de l'oli fraudulent (les anilides), i els derivats del PAP, biomarcadors de l'oli tòxic. En aquest sentit, factors com les temperatures assolides, particularment en alguns punts del reactor, la velocitat d'escalfament o el buit aplicat, podien ser determinants per explicar la formació d'anilides i derivats del PAP, així com la seva possible evolució o descomposició. D'acord amb els nostres objectius, aquests factors i potser altres, s'haurien de tenir en compte a l'hora d'estudiar la fabricació d'un model d'oli tòxic. Per aquesta finalitat, es considerarà adient la

realització d'un disseny d'una matriu d'experiments, per tal d'estudiar les variables que podien influenciar en la formació d'aquests derivats d'anilina en el procés de desodorització.

1.1.6. DISSENY D'EXPERIMENTS

La majoria de les investigacions científiques i dels processos industrials involucren un nombre de variables controlades que, conjuntament, influeixen en la resposta d'interès. El disseny d'experiments permet assegurar, mitjançant tècniques estadístiques, quin és l'efecte d'incontrolats, controlables constants i controlables no constants, mentre s'aplica l'experiment. D'altra banda, els factors poden ser quantitativs com ara la temperatura, o bé qualitativs, com la presència d'un catalitzador. La resposta, com es mostra en la Figura 1.9, és la conseqüència induïda per la influència dels factors sobre el sistema.

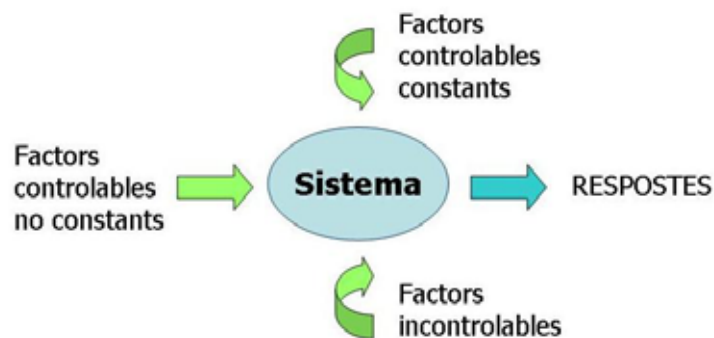


Figura 1.9. Esquema model d'un experiment on es mostren els factors que influeixen en un sistema i com es tradueix en les respostes obtingudes.

A l'hora de sistematitzar un procés, hi ha un tipus de plantejament racional basat en les tècniques del disseny d'experiments, les quals estalvien una bona quantitat d'esforç, ja que s'aconsegueix modificar les variables d'una manera dirigida i amb un mínim nombre d'experiments, per obtenir la informació necessària. Amb aquest objectiu, primer es planteja un pla detallat d'un conjunt d'experiments que permeti variar simultàniament tot el conjunt de les variables que es volen estudiar. Això farà possible distingir de forma ràpida quines són les variables essencials de les no essencials; a més, es podrà indicar la direcció cap al resultat òptim, així com detectar possibles interaccions que puguin existir entre les variables estudiades.

Per fer l'estudi del disseny factorial complet s'haurien de realitzar n^f combinacions d'experiments, on n és el nombre de nivells emprats per a cada factor i f els factors estudiats. Com es pot veure, el nombre d'experiments augmenta ràpidament en fer-ho el nombre de factors i encara més, en incrementar el nombre de nivells. Això és un inconvenient, perquè el

nombre d'assajos necessari per estimar tots els efectes principals i les interaccions, augmenta molt ràpidament. Atès que en la majoria de situacions experimentals els efectes principals tendeixen a ser més grans que les interaccions de segon ordre, i aquestes més que les interaccions de tercer ordre, a partir d'un cert punt les interaccions poden menysprear-se.

Així doncs, en una primera fase de la recerca s'empren els dissenys factorials parcials, els quals permeten avaluar els efectes principals, les interaccions entre dues variables i les interaccions multivariables, treballant amb una fracció del disseny complet. Els resultats que s'obtenen a partir de l'anàlisi estadística permeten obtenir una funció polinòmica depenent de cada variable essencial. Aquesta funció model permet descriure el procés i dona una resposta (R) del tipus:

$$R = b_0 + \sum_{i=1}^f b_i \chi_i + \sum_{i=1}^f \sum_{j=1}^f b_{ij} \chi_i \chi_j$$

On f són el nombre de factors a estudiar i χ_i representen cadascun dels nivells dels factors estudiats:

$$R = \underbrace{b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + a_3 x_3 + \dots + b_m x_1^2 + b_n x_2^2 + b_0 x_3^2 + \dots}_{\substack{\text{termes} \\ \text{lineals}}} + \underbrace{\dots + b_t x_1 x_2 + b_u x_1 x_3 + \dots}_{\substack{\text{termes} \\ \text{quadràtics} \\ \text{creuats}}}$$

D'aquesta manera, es veu una relació de la resposta dels factors a través d'uns coeficients que mostren la importància de cada factor estudiat i les interaccions entre les variables. S'aconseguiran els termes lineals, els termes quadràtics i els termes d'interacció de segon ordre, i a partir d'aquesta funció es podrà buscar el valor màxim i el mínim, segons convingui.

En el tractament de les dades per a cada resposta s'empren programes d'anàlisi estadística, com el Statgraphics Any,⁵⁴ els quals donen les taules ANOVA. En aquestes taules s'observa el canvi provocat en la resposta per efecte d'un factor en passar del nivell baix al nivell alt.

1.1.6.1. Anàlisi de les respostes del disseny d'experiments

El disseny d'experiments aplicat al desenvolupament d'un procés de desodorització model ens proporcionarà un conjunt de respostes. Aquestes respostes ens ajudarien a entendre millor la sistemàtica del procés. Per poder analitzar les respostes fou necessària la col·laboració del grup del Dr. Joaquín Abian del IIBB-CSIC (Institut d'Investigacions Biomèdiques de

Barcelona), laboratori de referència en l'anàlisi de mostres d'olis tòxics relacionats amb la SOT. Aquest laboratori ha demostrat una precisió i una robustesa pel que fa al procediment de determinació d'anilides i de derivats del PAP després d'analitzar durant més de quatre anys unes 3000 mostres d'oli provinents del CISAT. Les respostes que s'analitzaren foren la concentració d'anilina, la d'anilides i de derivats del PAP. Tot i els resultats proporcionats per aquest laboratori se'ns plantejà la necessitat d'obtenir resultats ràpids i fiables pel que fa al coneixement de la concentració d'anilina present en els models d'oli sintetitzats en el nostre laboratori. La finalitat d'aquests models d'oli era administrar-los en assajos toxicològics en animals; per tant, era necessària la determinació de la concentració d'anilina durant el procés de síntesi per tal d'obtenir models d'oli reproduïbles. Per poder disposar d'aquests resultats fou convenient posar a punt un mètode per a la determinació d'anilina en els models d'olis sintetitzats.

1.1.7. OBJECTIUS DE LA PART I

Amb aquests antecedents, els objectius d'aquesta primera part de la Tesi doctoral van ser els següents:

1- Desenvolupament d'un procés optimitzat amb la finalitat d'obtenir un oli de colza model que mimetitzés els olis tòxics refinats que van donar lloc a l'episodi del la SOT.

2- Desenvolupament i validació d'un mètode per determinar l'anilina lliure en mostres d'oli de colza model preparades al nostre laboratori.

1.2. DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL D'OLI DE COLZA

Aquesta primera part de la tesi doctoral centrada en el desenvolupament d'un model d'oli de colza es va realitzar amb col·laboració de la Dra. Anna Morató,⁵⁵ i va desenvolupar diferents aspectes inicials de la modelització, com el disseny d'experiments, la realització d'un procés de desodorització amb anilina marcada radioactivament i els primers assajos de modelització del procés de desodorització en el nostre laboratori. Amb la finalitat de presentar els resultats de forma clara i entenedora, tot seguit es presenten els resultats obtinguts al nostre laboratori de manera unificada.

1.2.1. REPRODUCCIÓ DELS ESTUDIS DE DESODORITZACIÓ EMPRATS AL CDC

El primer pas que es plantejà en el nostre laboratori va ser reproduir els resultats obtinguts per Blount al CDC d'Atlanta,⁵² amb la finalitat d'adquirir experiència en el muntatge del sistema involucrat en el procés de desodorització. Per poder adaptar correctament la seva metodologia fou necessari la incorporació d'algunes modificacions. Primerament calia decidir l'utilitatge necessari per dur a terme la desodorització. Es pensà en un muntatge de destil·lació típic de laboratori, el qual es mostra en la Figura 1.10:

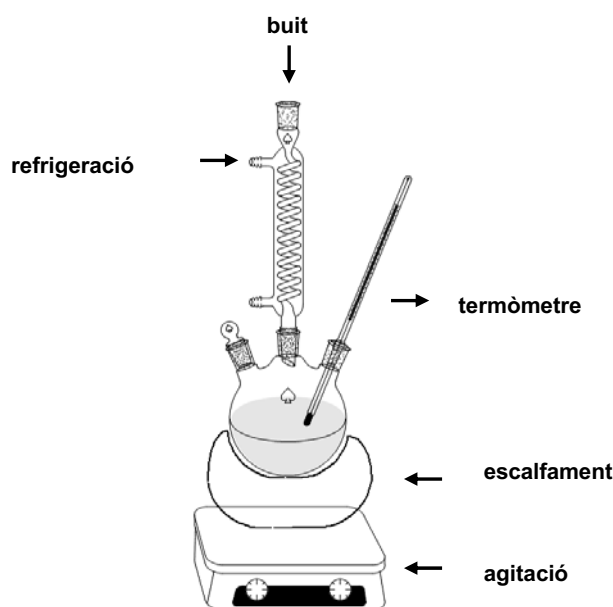


Figura 1.10. Representació gràfica del muntatge emprat per reproduir la desodorització d'un oli a escala de laboratori.

1.2.1.1. Primers experiments de desodorització d'un oli en un muntatge de destil·lació en el nostre laboratori

Com estava descrit pel CDC i com es mostra en la Figura 1.10, s'emprà un matràs de fons rodó de tres boques de 250 ml de capacitat. En una boca, mitjançant un termòmetre, es mesurava la temperatura de l'oli. En la boca del mig es connectava un refrigerant per condensar els elements més volàtils, el qual estava connectat a un sistema de buit originat per una trompa d'aigua. En el sistema de buit es posaven dues trampes en un bany de nitrogen líquid, per recollir els vapors condensats. Per la tercera boca s'hi adicionava l'oli de colza comercial barrejat amb un 1% d'anilina. Es van realitzar 10 assaigs diferents emprant 100 g d'oli, els quals es van sotmetre a un mateix tractament.

En aquests experiments es van reproduir paràmetres claus, com l'augment ràpid de la temperatura, ja que s'aconseguien rampes d'uns 15-18 minuts, similars a la descrita per Blount, de 12 minuts.⁵² S'aconseguia arribar a temperatures elevades fent servir una manta calefactors, tant en el preescalfament com en l'escalfament de l'oli. Els resultats de les anàlisis de derivats de PAP d'aquests 10 experiments es mostren a la Taula 1.1. Aquestes anàlisis dels residus de destil·lació es varen dur a terme al laboratori del Dr. J. Abian de l'IIBB de Barcelona fent servir la tècnica HPLC-MS.⁴⁵

Taula 1.1. Continguts d'OPAP, OOPAP, LOPAP i LLPAP, en ppm, determinats per HPLC-MS en mostres d'oli de colza després de l'addició d'1% d'anilina, seguida de la destil·lació al buit (20 Torr) a temperatures elevades ($T_M = 280$ °C).

Mostra	OPAP	OOPAP	LOPAP	LLPAP
1	217	1195	1230	585
2	177	845	857	350
3	334	881	1150	557
4	298	976	1262	634
5	307	894	1124	631
6	307	877	1195	533
7	410	1066	1352	623
8	293	684	738	307
9	379	1154	1436	688
10	351	1054	1185	524
MITJANA	307	963	1153	543

Com es pot veure, es van aconseguir quantitats considerables de derivats del PAP, 963 ppm de mitjana (1.3% de l'anilina de partida), 307 ppm de l'OPAP (0.6% de l'anilina), 1153 ppm de LOPAP (1.5% de l'anilina) i 543 ppm de LLPAP (0.7% de l'anilina). Quantitats més elevades inclús que les trobades en els olis tòxics, els quals van ser diluïts i venuts amb concentracions d'OOPAP de 150 ppm i de LOPAP de 300 ppm.²¹ Un altre punt positiu de l'estudi va ser la bona reproduïbilitat que van presentar els diferents experiments.

1.2.1.2. Escala de treball en la desodorització

Una vegada es va assolir l'objectiu de reproduir la desodorització dels olis perquè donés lloc a la formació dels derivats de PAP en les concentracions desitjades, calia plantejar si aquests resultats podien arribar a extrapolar-se als resultats de la refinaria ITH, i per tant, arribar a extreure hipòtesis del que havia passat durant aquell procés. Amb aquesta finalitat es va decidir avaluar l'escala de treball, tot variant la quantitat d'oli emprada en el procés. Així doncs, es van plantejar experiments de desodorització modificant la quantitat d'oli des de 25 g fins a 150 g, la qual cosa va comportar determinades modificacions en el sistema, com són la capacitat del baló i la manta d'escalfament. Aquestes modificacions comportaven canvis en el procediment experimental. Per exemple, a menor quantitat, el temps d'escalfament necessari per assolir la temperatura màxima fixada disminuïa considerablement. Per això, calia ajustar la potència d'escalfament per disposar de procediments reproduïbles i sistematitzats. Els resultats replicats d'aquests estudis es mostren a la Taula 1.2.

Taula 1.2. Quantitats d'OO(1,2)PAP dels experiments de desodorització d'un oli de colza a diferents escales de treball.

Quantitat d'oli (g)	OO(1,2)PAP (ppm)	OO(1,2)PAP (ppm)	OO(1,2)PAP (ppm) (mitjana)
25	1416	930	1173 ± 344
40	1395	1531	1463 ± 96
80	1624	1436	1530 ± 133
150	711	1233	972 ± 369

Els tractaments amb 40 g i 80 g d'oli donaven els millors resultats pel que fa a la formació d'OO(1,2)PAP i a la reproduïbilitat. Aquests resultats van aconsellar el procés de 40 g com el preferible a seguir de manera habitual.

D'altra banda, la rampa d'escalfament era un dels paràmetres que variava més en funció de la quantitat d'oli. Es pot veure que en disminuir molt aquesta quantitat, l'oli s'escalfava massa ràpid i això feia que entre experiments similars hi hagués quantitats molt variables d'OO(1,2)PAP. Per contra, en augmentar la quantitat d'oli, costava més escalfar-lo, fet que podia minvar la uniformitat tèrmica de tot l'oli obtenint així quantitats variables d'OO(1,2)PAP. Aquests resultats mostraren que paràmetres no tinguts en compte estaven influint en el sistema.

Fins aquí, s'havia aconseguit un procediment de desodorització que conduïa a models d'oli de colza amb continguts elevats en anilides i derivats de PAP, similars als descrits en els olis tòxics. El principal inconvenient era la baixa reproduïbilitat entre els resultats dels experiments, motiu que feia necessari un estudi més detallat per trobar les condicions que permetessin sistematitzar el procediment. Així doncs, es plantejà estudiar el sistema mitjançant un disseny d'experiments.

1.2.2. DISSENY D'EXPERIMENTS APLICAT AL DESENVOLUPAMENT D'UN MODEL D'OLI

Aquest disseny hauria de permetre obtenir informació de les condicions experimentals en les quals la reacció entre l'anilina i els glicèrids presents en l'oli dona lloc als derivats del PAP: mPAP i dPAP i també a les anilides. Cal esmentar que tot aquest procés fou realitzat amb la col·laboració del Dr. Albert Manich del departament d'Ecotecnologies del nostre Institut i expert en aquesta metodologia.

1.2.2.1. Factors a estudiar en la desodorització

La base establerta per determinats treballs realitzats anteriorment^{22,52,53} va permetre escollir els paràmetres claus per a la formació dels derivats de l'OOPAP. Ruiz-Méndez⁵³ i col·laboradors van descriure que la temperatura jugava un paper molt important, tant pel que feia a la formació dels derivats d'anilina com en la seva degradació. Altres factors, com la pressió i el temps que es triga a arribar a la temperatura màxima, també van mostrar la seva importància. Amb tot això, els factors que es van decidir estudiar varen ser: la temperatura màxima (T_M), el temps per assolir la temperatura màxima (t_M), la pressió interna de buit que s'aplica al procés (P), i el temps que es manté el sistema a 200 °C per tal d'eliminar l'anilina (t_v) (Figura 1.11).

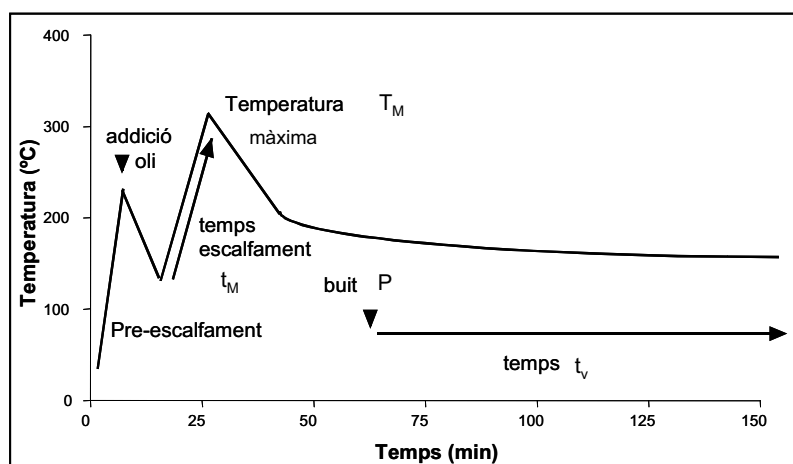


Figura 1.11. Representació gràfica d'un procés model de desodorització d'oli de colza.

Com s'indica a la Taula 1.3, la influència de cadascuna de les variables va ser investigada en tres nivells: baix (-1), mitjà (0) i alt (+1). El nivell mig fou escollit a partir d'antecedents que mostraven la formació dels derivats de PAP per aquests valors.

Taula 1.3. Valors a tots els nivells estudiats per a cada variable en el disseny d'experiments per modelitzar la desodorització de l'oli de colza dopat amb un 2% d'anilina.

Variable	Nivell		
	Baix (-1)	Mitjà (0)	Alt (+1)
Temps per assolir la T_M (t_M , min)	8	14	20
Temperatura màxima (T_M , °C)	260	280	300
Pressió interna de buit (P, Torr)	60	70	80
Temps de manteniment del buit (t_v , min)	45	60	90

Taula 1.4. Resultats dels 27 experiments del disseny d'experiments parcial corresponent al procés model de desodorització d'un oli de colza adulterat amb un 2% d'anilina.

Exp.	t_m (min)	T_M (°C)	P (Torr)	t_v (min)	OPAP (ppm)	OO(1,2)PAP (ppm)	OA (ppm)
1	14	300	80	67.5	603	1989	8369
2	14	280	80	90	523	1678	3481
3	14	280	70	67.5	563	1776	3895
4	8	300	70	67.5	740	2269	9005
5	14	280	60	90	513	1534	3470
6	14	260	60	67.5	298	326	1462
7	14	260	70	90	318	345	1643
8	20	280	70	45	600	1802	4551
9	8	280	80	67.5	463	1361	3177
10	8	280	70	90	475	1281	3888
11	20	300	70	67.5	581	2028	10153
12	14	280	70	67.5	522	1507	1565
13	8	260	70	67.5	320	124	2121
14	20	260	70	67.5	298	351	1392
15	14	260	80	67.5	308	447	1709
16	20	280	70	90	670	1874	5167
17	20	280	80	67.5	573	1960	5100
18	14	280	80	45	592	1605	3680
19	14	260	70	45	290	321	1450
20	14	280	60	45	560	1718	13031
21	14	300	70	45	644	2194	4188
22	8	280	70	45	604	1766	3678
23	14	280	70	67.5	471	1483	3666
24	8	280	60	67.5	514	1596	1351
25	20	280	60	67.5	558	1854	5251
26	14	300	70	90	656	2044	7715
27	14	300	60	67.5	654	2034	7197

En el nostre cas, es va plantejar un disseny d'experiments parcial segons la metodologia establerta per Box-Behnken.⁵⁶ El nostre estudi constà de 3 nivells i 4 factors; per tant, es van realitzar un total de 27 experiments segons estableix la fórmula n^{f-1} del disseny factorial parcial de Box-Behnken. Aquests 27 experiments de desodorització van aportar valors d'OPAP,

OO(1,2)PAP, i OA continguts entre els següents: 290-740, 124-2269, i 1351-13031 ppm, respectivament (Taula 1.4).

1.2.2.2. Interpretació dels resultats

L'anàlisi dels resultats dels 27 experiments obtinguts es va realitzar mitjançant el programa Stargraphics, el qual va permetre obtenir les taules d'ANOVA per a cadascuna de les respostes. Com a respostes del disseny experimental es va analitzar la formació d'OO(1,2)PAP, d'OPAP i d'OA.

Per facilitar l'estudi, es van codificar les variables obtenint la següent transformació:

$$\text{Temps de rampa} \quad C(t_m) = \frac{t_m - 14}{6}$$

$$\text{Temperatura màxima} \quad C(T_M) = \frac{T_M - 280}{20}$$

$$\text{Pressió interna} \quad C(P) = \frac{P - 70}{10}$$

$$\text{Temps de buit} \quad C(t_v) = 2 \left(1.5 - \frac{90}{t_v} \right)$$

A partir de l'estudi de les dades experimentals, s'obtingué la influència en el sistema de les quatre variables seleccionades pel que fa a la formació d'OO(1,2)PAP. Aquesta influència queda reflectida en la següent equació:

$$OO(1,2)PAP = 1653 + (122.7C(t_m)) + (887.0C(T_M)) - (447.0C(T_M)^2)$$

Per tant, la formació del diester OOPAP es pot descriure mitjançant una funció polinòmica de segon ordre, la qual inclou l'efecte lineal de t_m i els efectes lineals quadràtics de T_M . La funció ens permet explicar un 95.9% de la variabilitat, on els factors que influeixen en la formació de l'OO(1,2)PAP són T_M en un 94.3%, i t_m en un 1.6%, amb un error estàndard dels valors estimats de 142.9 ppm.

De la mateixa manera, es van analitzar els factors que influeixen la formació del monoester OPAP. Aquí la relació entre l'OPAP i les quatre variables estudiades ve donada per la següent equació:

$$OPAP = 546.7 + (170.5C(T_M)) - (70.9C(T_M)^2)$$

En aquest cas, l'OO(1,2)PAP es va considerar com un factor potencial variable, ja que l'OPAP pot derivar de l'OO(1,2)PAP per hidròlisi. Amb aquestes consideracions, el model proposat per a la formació d'OPAP es pot ajustar a la següent equació:

$$OPAP = 238.55 + (0.19OO(1,2)PAP)$$

Llavors, considerant l'efecte de l'OO(1,2)PAP, aquest model explica el 93.1% de la formació d'OPAP. D'altra part aquesta equació suggereix que la generació d'aquest monoester està lligada a la presència d'OO(1,2)PAP, essent l'error estàndard del valor estimat de 35.0 ppm.

Seguint el mateix procediment, s'obtenen els factors que influeixen en la formació de l'anilida OA i que s'ajusten a la funció polinòmica següent:

$$OA = 4494.63 + 3070.8C(T_M) + 2340(C(P)C(t_v))$$

En aquest cas, els quatre factors experimentals estudiats expliquen el 57.7% de la variabilitat de l'OA, la T_M explica el 48.3% de la variabilitat i el 9.4% restant ve determinat per l'efecte combinat de P i t_v . L'error estàndard estimat és 2030.7 ppm.

Es pot observar, que tant per a l'OO(1,2)PAP com l'OPAP, els resultats són satisfactoris, mentre que per al cas de l'OA no ho són. L'equació de l'OA mostra que hi pot haver altres factors importants en la formació o l'evolució d'aquesta anilida. Per tal d'aprofundir més en aquest aspecte es van realitzar una nova sèrie d'experiments en els quals es van afegir dues variables addicionals: la relació d'oli de colza:trioleïna pura (1:0, 0:1) i el percentatge d'anilina afegida (1, 2 i 4%). Les quatre variables inicials van ser utilitzades en els seus nivells mitjans, i els resultats obtinguts es mostren en la Taula 1.5.

Com era d'esperar, quan es van utilitzar concentracions altes d'anilina es va observar un progressiu increment d'OO(1,2)PAP, OPAP i OA. Però el fet més rellevant d'aquests experiments va ser l'elevada formació d'OPAP, OO(1,2)PAP i OA quan la trioieïna pura es va utilitzar com a substitut de l'oli. Aquest resultat va indicar per primera vegada en les investigacions de la SOT, que per a la formació dels derivats anilínics majoritaris presents en les mostres d'oli solament era necessària la presència de trioieïna i anilina.

Aquest resultat va permetre excloure hipòtesis que plantejaven que durant l'emmagatzematge i transport de França a Sevilla o fins i tot durant la refinació, existís algun tipus d'impuresa que hagués pogut afavorir la reacció entre els triglicèrids de l'oli i l'anilina per tal de formar derivats del PAP.

Taula 1.5. Continguts d'OPAP, OO(1,2)PAP, i OA (ppm) determinats en experiments de desodorització duts a terme en la presència variable de quantitats d'oli de colza, trioleïna, i anilina.

Experiment	OPAP	OO(1,2)PAP	OA
Oli de colza + 1% anilina	271	658	689
Oli de colza + 2% anilina	570	1412	2139
Oli de colza + 4% anilina	541	1617	6096
Trioleïna + 1% anilina	414	2084	3816
Trioleïna + 2% anilina	311	4053	8997
Trioleïna + 4% anilina	648	5495	26094

1.2.3. EXPERIMENTS DE DESODORITZACIÓ D'UN OLI A ESCALA DE 400 G

En aquest punt de l'estudi, les bases per realitzar un model d'oli tòxic en el nostre laboratori estaven clarament establertes, gràcies principalment als resultats obtinguts pel disseny d'experiments, el qual va permetre establir les quatre variables que influencien en el procés de desodorització per tal d'obtenir uns determinats valors d'OO(1,2)PAP, OPAP i OA en diferents models d'oli.

Durant l'any 2002, el nostre laboratori va rebre per primer cop l'encàrrec del comitè WHO/CISAT de preparar 7 litres d'oli de colza adulterat amb anilina i sotmès a un procés de desodorització. La finalitat d'aquest encàrrec era disposar d'un oli model que intentés reproduir el més fidelment els olis que van ser responsables de les intoxicacions. Si més no, aquest model d'oli tòxic, hauria de presentar quantitats similars d'OA i derivats del PAP als olis responsables de la síndrome tòxica. El destí final d'aquest oli era l'administració en diferents models animals, entre els quals hi havia primats, ratolins i gats. L'estudi *in vivo* es va realitzar a una empresa especialitzada en estudis d'animals, anomenada CIDASAL (Centro de Investigación y Desarrollo Aplicado S.A.L.). L'estudi, com s'ha esmentat, es va iniciar el juny del 2002 i ha constatat de tres fases, dos de les quals ja s'han acabat, mentre que l'última es troba en el procés final d'anàlisi de dades.

1.2.3.1. Primera fase d'obtenció d'olis model

El primer problema que va plantejar aquest model d'oli, va ser l'escala de treball. Fins aquell moment, la quantitat màxima d'oli de colza emprada durant un procés de desodorització havia estat uns 150 g, però en aquest punt, per poder preparar-ne 7 litres, era

necessari augmentar la quantitat d'oli al màxim per tal de realitzar el mínim nombre d'experiments possibles. Llavors calia veure que l'escalatge no era un problema per obtenir l'oli model.

Per controlar el procés de desodorització, es van escollir les mateixes variables que fins ara (t_M , t_m , t_v i P). El principal canvi en el procés va ser l'utilatge emprat, no pas en la forma sinó en la dimensió. Foren necessaris un total de 17 experiments de 400 g per tal d'obtenir 7 litres d'oli model. L'oli de colza utilitzat com a matriu fou de la marca "Bouton d'Or (Huile Nouveau de Colza)", comprat en un supermercat francès.

Com es podria esperar, la principal diferència que s'observà entre aquest model d'oli i els anteriors, fou l'augment d'inèrcia del sistema en ser escalfat. Això es va traduir en l'augment del temps d'escalfament, el qual va passar de 10' a 25'. Mostres d'alíquotes d'aquests 17 experiments van ser enviades al laboratori del Dr. Joaquín Abian on es van determinar l'OA, LA, OO(1,2)PAP, l'OPAP, LL(1,2)PAP i OLPAP. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 1.6.

Un cop es van rebre els resultats de les anàlisis es va observar que en treballar en una escala superior a la que s'havia treballat fins ara, la dispersió en els valors de determinats derivats del PAP, com és el cas del dPAP, era gran. Tot i això, els resultats es trobaven dins de l'interval adequat. Per això es va procedir a agrupar les 17 fraccions corresponents en una sola. Un cop feta aquesta barreja es va tornar a analitzar la composició d'aquest oli el qual es va anomenar JEC i va ser enviat en flascons d'1 litre a l'empresa CIDASAL.

La sorpresa va arribar quan es van rebre els resultats de l'administració d'aquesta partida d'oli en animals. Es van observar respostes toxicològiques, analítiques i histològiques reproduïbles i congruents. Respostes que en algun cas es van arribar a considerar compatibles amb les observades en la SOT. Era la primera vegada en més de 20 anys que s'obtenien uns resultats com aquests.

Taula 1.6. Resultats dels 17 experiments corresponents al primer assaig de mostres de 400 g d'oli de colza adulterades amb un 2% d'anilina i sotmeses a desodorització ($t_m = 20$ min, $T_M = 280$ °C, $t_v = 60$ min i $P = 60$ Torr).

	OA	LA	OPAP	OO(1,2)PAP	LL(1,2)PAP	OLPAP
Exp1	6071	2424	566	955	356	421
Exp2	9788	3959	405	610	667	550
Exp3	6730	2794	375	376	486	501
Exp4	6513	2835	485	607	393	405
Exp5	6743	2670	470	796	858	986
Exp6	6352	2675	387	719	571	646
Exp7	6820	2763	600	571	706	682
Exp8	6528	2452	464	534	325	357
Exp9	7703	3140	653	1331	1601	1489
Exp10	7104	2872	544	592	396	441
Exp11	6402	2581	488	737	976	1038
Exp12	6139	2382	465	565	358	356
Exp13	6833	2540	491	766	855	988
Exp14	7120	2743	417	842	1013	1093
Exp15	6557	2473	676	596	494	592
Exp16	6104	2302	607	560	619	547
Exp17	7311	2834	469	655	494	613
Mitjana	6872	2732	504	695	657	689

1.2.3.2. Segona fase d'obtenció d'olis model

Gràcies als resultats obtinguts en la primera fase, l'OMS va decidir continuar l'estudi amb una segona comanda d'olis models. L'objectiu d'aquesta nova remesa d'olis era completar i aprofundir l'estudi iniciat l'any 2002. Aquest fet va tenir lloc aproximadament un any després dels primers assaigs i en aquest cas la quantitat requerida fou novament de 7 litres. La

preparació d'aquests olis es va fer seguint la mateixa metodologia emprada en la primera fase, tot i que hi va haver un petit canvi en el mecanisme de buit. En el primer cas el buit s'assolia mitjançant una trompa d'aigua. En aquesta segona fase es va emprar una bomba de membrana, per tal de controlar el buit de forma més fiable.

Un cop realitzats els diferents models d'oli, es va procedir a aplegar en diverses fraccions els experiments realitzats. La finalitat era obtenir un nombre menor de mostres, fet que facilitaria la seva anàlisi posterior. L'agrupació es feu en quatre fraccions, diferenciades entre si pel seu contingut d'anilina. L'anàlisi de les mostres mitjançant HPLC ens va facilitar una orientació qualitativa de l'anilina present en cadascun dels experiments realitzats. Aquestes quatre fraccions i la corresponent barreja van ser enviades a analitzar al laboratori del Dr. Abian i els resultats obtinguts es mostra a la Taula 1.7.

Taula 1.7. Resultats de la segona fase d'experiments de mostres de 400 g d'oli de colza adulterades amb un 2% d'anilina i sotmeses a desodorització.

Oli model	Mostra	OA	LA	OPAP	OO(1,2)PAP	LL(1,2)PAP	OLPAP
RSMO	Bidó 1	4377	1596	374	1476	695	1012
RSMO	Bidó 2	4738	1578	384	1715	892	1218
RSMO	Bidó 3	4675	2002	443	1563	845	1147
RSMO	Bidó 4	4563	1839	362	1689	791	1138
RSMO	Barreja bidons	4864	1850	394	1532	1219	1264

Els resultat de les anàlisis van donar llum verda a la barreja del les quatre fraccions, ja que no hi havia diferències significatives entre cadascun dels bidons. Un cop obtinguda la barreja, aquesta va ser enviada novament a l'empresa CIDASAL, on es va procedir a l'administració en gats i primats. Aquest oli model es va anomenar RSMO. Els resultats van ser inesperats, ja que en aquest cas no es va observar un empitjorament en cap de les dues espècies animals, primats i gats, les quals no van mostrar els símptomes del primer estudi. Aquests resultats van plantejar la possibilitat que existís algun tipus de diferència entre l'oli JEC i el RSMO. Per intentar esbrinar aquesta diferència es van comparar les concentracions d'anilides i de derivats del PAP entre els dos tipus d'olis. Tot i observar que l'oli que no havia donat resposta presentava uns nivells de dPAPs i anilides superiors i inferiors respectivament, es plantejà la determinació de l'anilina lliure d'aquests dos models d'oli. En les anàlisis realitzades fins ara no es quantificava l'anilina de manera rutinària. Per això es va realitzar una nova anàlisi dels olis JEC i RSMO en el laboratori de l'IIBM per quantificar l'anilina lliure. Aquesta anàlisi va anar lligada amb el desenvolupament i validació d'un mètode per quantificar anilina en models d'oli

en el nostre laboratori, el qual tenia com a objectiu facilitar les anàlisis rutinaries dels models d'oli, tal com s'explica detalladament en el punt 1.3. Els resultats indicaren que hi havia una diferència significativa pel que fa a la concentració d'anilina en l'oli JEC i l'oli RSMO. Per tant podia ser que l'anilina lliure que havia quedat en l'oli JEC tingués algun tipus de relació amb les resultats toxicològics observats.

Taula 1.8. Concentració d'anilina, d'OA, LA, OPAP, OOPAP, LLPAP i OLPAP present en l'oli JEC i RSMO, segons anàlisis realitzades en el laboratori del Dr. Joaquín Abian.

Mostra	[Anilina] ppm	OA	LA	OPAP	OO(1,2)PAP	LL(1,2)PAP
Oli JEC	11066	7311	2834	469	655	494
Oli RSMO	5858	4864	1850	394	1532	1219

Aquest fet va donar lloc a un nou estudi on es plantejà un conjunt d'incògnites al voltant de la concentració d'anilina present en els models d'oli sintetitzats en el nostre laboratori.

1.2.3.3. Tercera fase d'obtenció d'olis model

Com s'ha esmentat anteriorment, els estudis duts a terme amb primats, gats i ratolins emprant els olis JEC i RSMO, van mostrar en els animals respostes clíniques, analítiques i histològiques clarament relacionades amb l'administració de l'oli JEC. En alguns casos aquestes respostes s'ha considerat compatible relacionar-les amb les produïdes per la SOT. D'altra banda el model d'oli RSMO no va provocar cap tipus de resposta. En aquest punt la diferència entre l'oli JEC i l'oli RSMO era clara. Amb l'objectiu de confirmar la diferència de composició entre l'oli JEC i el RSMO es va plantejar un estudi més precís i acurat. Els resultats de les anàlisis de l'oli JEC i RSMO (Taula 1.8) van mostrar que hi havia diferències entre ambdós olis: la diferència en valor absolut no era significativa si es considerava el contingut d'anilides i esters del PAP; en canvi, pel que fa al contingut d'anilina lliure en l'oli JEC era el doble que en l'oli RSMO. Aquestes dades van plantejar una sèrie de preguntes que fins ara no s'havien considerat i que s'intentarien respondre en aquest estudi:

- És la concentració d'anilina la principal diferència entre els dos olis?
- Juga l'anilina lliure un paper directe o indirecte en la SOT?
- L'anilina lliure ens indica algun fet no controlat de forma rutinària en els olis tòxics?

La síntesi d'aquesta nova remesa d'olis va implicar l'obtenció de tres tipus d'olis models: JEC2, JEC3 i RSMO+anilina. L'oli JEC2 consistiria en oli model que intentès mimetitzar de la

mera més fidel possible l'oli JEC, d'aquest es sintetitzà un total de 1.6 l dels quals es necessitarien 1.57 l per a l'estudi *in vivo*. L'oli JEC3 havia de presentar les mateixes concentracions d'esters del PAP i d'anilides que l'oli JEC, però en referència a la concentració d'anilina aquest hauria de presentar el mínim contingut possible. D'aquest oli se'n prepararen 1.6 l dels quals es necessitarien un total de 1 l per a l'estudi. Finalment l'oli RSMO+anilina consistiria en l'oli resultant de l'estudi de la fase dos sobre el qual s'hi afegiria un 2% d'anilina. Tant l'oli JEC2 com el JEC3 es van sintetitzar seguint el mateix procediment ($t_M=20$ min, $T_M=280$ °C, $t_v=60$ min i $P=60$ Torr) i emprant com a font de buit la trompa d'aigua de forma idèntica a la realitzada en la fase I. Després de la síntesi de l'oli JEC2 i JEC3 en diverses fraccions, com s'indica en la Taula 1.9, es procedí a l'anàlisi de les anilides i els derivats del PAP.

Taula 1.9. Resultats de les anàlisis de les diferents fraccions dels olis JEC2 i JEC3, realitzats a partir de 400 g d'oli de colza adulterades amb un 2% d'anilina i sotmeses a desodorització ($t_M=20$ min, $T_M=280$ °C, $t_v=60$ min i $P=60$ Torr).

Oli model	Fracció	OA	LA	OPAP	OOPAP	LLPAP	OLPAP
JEC2	O1AB05F1	6616	2368	611	1550	665	976
	O1AB05F2	7079	2650	689	1758	819	1146
	O2AB05	6826	2524	606	1455	687	996
	O3AB05	7617	2844	634	1683	792	1108
	O4AB05	8339	3045	661	1782	818	1163
JEC3	O1JN05	9129	3564	777	1400	649	914
	O2JN05	8602	3337	773	1307	643	880
	O3JN05	8505	3152	788	1835	927	1284
	O4JN05	11862	4824	1071	1964	895	1300

Aquest estudi, el qual encara no ha estat completat des del punt de vista toxicològic, s'ha dut a terme en tres laboratoris diferents:

- En el nostre laboratori es realitzà la nova síntesi d'olis models, els quals es podien classificar en dos tipus: per una banda la síntesi d'un oli model (JEC3) que presentés característiques similars a l'oli JEC (concentracions similars d'anilides i esters del PAP), i per altra la síntesi d'un oli que presentés igualment característiques similars a l'oli JEC, però amb un nivell menor d'anilina, el qual s'anomenaria JEC2. A més, un dels altres

objectius d'aquest estudi fou el desenvolupament d'un mètode que ens permetés quantificar l'anilina lliure de qualsevol oli model de forma eficaç i correcta en el nostre laboratori.

➤ En el laboratori del Dr. Joaquín Abian es determinarà el perfil de derivats d'anilina, incloent possibles dímers i polímers de derivats del PAP.

➤ En el laboratori de la Dra. Ruiz Méndez s'encarregarà la determinació de la composició general dels olis (esterols, àcids grassos, tocoferols, etc).

Si es comparen els resultats de la Taula 1.9 amb els de la Taula 1.6 es pot observar com les concentracions d'anilides obtingudes en els olis JEC2 i JEC3 són similars a les concentracions obtingudes en l'oli JEC. D'altra banda, pel que fa a la concentració de derivats del PAP, també s'observà com els olis JEC2 i JEC3 presentaven concentracions similars al JEC. Per tant, es considerarà satisfactòria l'obtenció d'aquests nous olis ja que podrien equiparar-se en continguts d'anilides i de derivats del PAP a l'oli JEC que fou el que donà resultats toxicològics en proves *in vivo*.

1.2.4. ASSAIGS D'EXTRACCIÓ D'ANILINA LLIURE D'OLIS DE COLZA MODELS

La presència de quantitats elevades d'anilina lliure en determinats olis models podia esdevenir un factor important a l'hora d'obtenir resultats en els assajos amb animals. Per això, es va plantejar la necessitat d'obtenir un model d'oli on la quantitat d'anilina lliure fos nul·la o quasi nul·la, però, que mantingués els nivells d'anilides i derivats del PAP similars al presents en els olis JEC. A la vegada, era important que l'oli experimentés les mínimes variacions possibles en la composició química de la fracció no anilínica.

Per tal de poder obtenir un oli que respongués a aquests criteris, es van plantejar dues possibles estratègies. Per una banda, intentar-ho a través d'una extracció líquid-líquid i per una altra mitjançant una destil·lació de l'anilina lliure emprant un destil·lador molecular.

1.2.4.1. Assaigs d'extracció líquid-líquid

El fet que l'anilina sigui un producte més polar que no pas les anilides i els derivats del PAP va fer pensar que part de l'anilina lliure podia ésser extreta mitjançant extraccions amb aigua. Els assaigs es van realitzar amb oli de colza comercial al qual se li havia afegit un 2% d'anilina. Les primeres extraccions es van fer afegint un 20%, 30%, 40% de volum d'aigua a temperatura ambient. La formació d'una emulsió entre l'aigua i l'oli fou el principal problema de les extraccions. Aquesta emulsió era difícilment separable en dues fases, tot i intentar separar-les per centrifugació. Per intentar minvar la formació de l'emulsió oli-aigua, es realitzà un nou assaig emprant un 20% d'aigua a una temperatura de 50 °C. En aquest cas l'emulsió

es formà igualment, però no de manera tant marcada. L'eficàcia de les extraccions es va mirar mitjançant l'anàlisi per HPLC en fase directa. Així mateix les anàlisis van indicar que el rendiment d'extracció d'anilina era molt baix.

1.2.4.2. Assaigs d'extracció mitjançant un destil·lador molecular

A continuació es plantejà eliminar l'anilina lliure mitjançant un destil·lador molecular. Aquest procés es realitzà en el laboratori de la Dra. Maria Victoria Ruiz de l'"Instituto de la Grasa de Sevilla IG-CSIC".

El procés de destil·lació molecular consisteix en la separació i purificació de compostos d'alt pes molecular sensibles a canvis tèrmics, evitant llur descomposició tèrmica. Aquest procés es caracteritza per l'assoliment d'un buit elevat en el seu interior, una exposició curta del líquid a destil·lar amb la font de calor del destil·lador i una distància mínima entre l'evaporador i el condensador (20-50 mm).⁵⁷ La combinació d'una distància petita entre l'evaporador i el condensador (2 cm) i un elevat buit, permet una transferència de massa específica amb evaporacions que poden arribar als 20-40 g m⁻² s⁻¹.⁵⁷ Sota aquestes condicions: temps de residència curt i temperatura baixa, la destil·lació de materials tèrmicament sensibles pot tenir lloc sense la seva descomposició. En definitiva, aquest mètode presenta avantatges en front altres tècniques que empenen dissolvent com a agents separadors, evitant així problemes de toxicitat. L'aparell emprat fou un destil·lador molecular model KDL 5, GmbH UIC (Alzenau, Alemanya) com el que es mostra en la Figura 1.12.

Per tal de realitzar una eliminació òptima de l'anilina, es van haver d'optimitzar diverses variables del sistema. Entre aquestes hi havia: el buit (1 mbar o 10⁻³ mbar), la temperatura nombre de passades a través del sistema (1 o 2). L'oli en el procés de destil·lació era important que experimentés el mínim tractament possible, ja que era necessari obtenir mostres amb la mínima variació pel que fa a components no anilínics i en derivats anilínics.

La velocitat del rotor va ser fixada a 200 rpm. Quan el cru va ser sotmès al procés de destil·lació, aquest es va separar en dues fraccions, part del material d'alimentació es recollí en fracció destilada (D, en aquest cas anilina) i part en la fracció del residu (R, en aquest cas l'oli). La relació R/D és un paràmetre important per tal d'avaluar l'eficàcia del procés de destil·lació molecular. Augmentant la velocitat del flux d'alimentació, el coeficient de repartició va disminuir. Quan la velocitat del flux d'alimentació va augmentar, el volum d'oli en l'interior de l'evaporador era superior, així com l'eficiència de la transferència de calor, entre l'oli i l'evaporador, va ser reduït degut al poc contacte amb les parets de l'evaporador, per tant el coeficient de repartició va disminuir.



Figura 1.12. Destil·lador molecular on es va realitzar l'eliminació de l'anilina en models d'oli de colza.

Taula 1.10. Assajos preliminars per establir les millors condicions d'eliminació de l'anilina present en els olis models JEC2.

Assaig	Temperatura (°C)	Pressió (mbar)	Flux d'alimentació (g/min)
1	80	1	6,7
2	100	0,001	16,7
3	80	0,001	3,6
4	100	0,001	3,6
5	120	0,001	3,6
6	120	0,001	3,6

Un cop realitzats aquest conjunt d'assaigs es va observar que les condicions òptimes per tal d'eliminar l'anilina eren les següents: $P = 10^{-3}$ mbar, $T = 120$ °C, Flux = 6.6 i 3.6 g/min en la primera i la segona passada respectivament.

Taula 1.10. Condicions emprades en el destil·lador molecular en cada una de les passades de les mostres d'oli model en les quals s'havia de disminuir la concentració d'anilina inicial.

Assaigs	Passada	Temperatura (°C)	Pressió (mbar)	Flux d'alimentació (g/min)
O1AB05F1	1°	120	0,001	6,7
	2°	120	0,001	3,6
O1AB05F2	1°	120	0,001	6,7
	2°	120	0,001	3,6
O2AB05	1°	120	0,001	6,7
	2°	120	0,001	3,6
O3AB05	1°	120	0,001	6,7
	2°	120	0,001	3,6
O4AB05	1°	120	0,001	6,7
	2°	120	0,001	3,6

Aquests assaigs duts a terme a Sevilla es van controlar de forma qualitativa sense la utilització de cap patró intern mitjançant HPLC en fase directa (mètode OLIS2, vegeu punt 1.4.1), tot i que els olis van ser reanalitzats de forma quantitativa a Barcelona tant pel laboratori del Dr. Joaquín Abian com pel nostre (Taula 1.15).

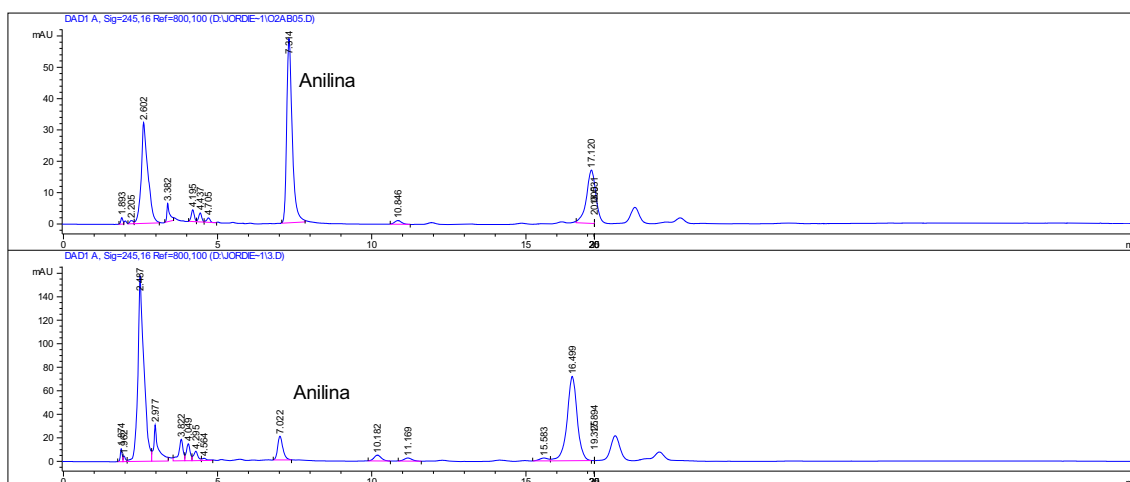


Figura 1.13. Cromatogrames abans i després d'eliminar anilina en un model d'oli tòxic mitjançant un destil·lador molecular.

Aquestes condicions van permetre eliminar l'anilina de forma satisfactòria, tal com es va observar mitjançant HPLC. Tot i que aquests resultats eren qualitius, la disminució de la quantitat d'anilina lliure en els olis models fou significativa, com es pot observar en la Figura 1.13.

En definitiva, la quantitat d'anilina va ser eliminada de forma considerable durant el procés de destil·lació molecular. Ara solament feia falta quantificar exactament quina havia estat la pèrdua. Aquesta quantificació es realitzà després de posar a punt en el nostre laboratori un mètode per quantificar anilina en models d'oli tòxic, tal com s'indica en el punt 1.3. A més els resultats obtinguts es podrien comparar amb els facilitats pel laboratori del Dr. Joaquín Abian on s'analitzà la concentració d'anilina lliure, anilides, i esters del PAP dels olis models JEC2 i JEC3.

1.3. VALIDACIÓ D'UN MÈTODE PER A LA DETERMINACIÓ D'ANILINA

Per dur a terme aquest objectiu es va plantejar posar a punt un mètode analític validat per determinar anilina en l'oli de colza, això sí, tenint sempre com a referència els resultats proporcionats pel laboratori del Dr. Joaquín Abian. A l'hora de validar el mètode s'hauria de tenir en compte la inexperiència del nostre laboratori en aquest tipus de tasques, ja que no es tracta d'un laboratori especialitzat en processos analítics.

La finalitat del procés de validació de qualsevol mètode d'anàlisi química és poder obtenir resultats constants, fidedignes, exactes i precisos. Llavors, és important preparar un protocol de validació que indiqui els procediments a realitzar i les dades a recollir. Els processos de validació estan àmpliament establerts en diferents àmbits de la indústria química, sobretot en indústries farmacèutiques i en indústries alimentàries. Per a un laboratori la importància dels processos de validació és tal, que donar resultats incorrectes pot influir molt negativament en la seva confiança.

Algunes organitzacions públiques i privades han publicat diferents guies en les quals s'intenta sistematitzar els processos de validació. Entre aquestes organitzacions hi ha la FDA (U.S. Food and Drug Administration), la EPA (U.S. Environmental Protection Agency), la AOAC (The Association of Official Analytical Chemists), ISO (International Standards Organization), la PMA (The U.S. Pharmaceutical Manufacturers Association), la PASG (The UK Pharmaceutical Analysis Science Group) i la LGC (Laboratory of the Government Chemist).^{58,59,60,61,62,63}

Els paràmetres dels mètodes de validació han estat definits per grups de treball nacionals i internacionals, i estan descrits en la literatura. Malauradament, algunes de les definicions varien entre diferents organitzacions; un intent unificador ha estat realitzat per la ICH (International Conference for Harmonization) on representants de la indústria i d'agències reguladores dels Estats Units, Europa i el Japó han definit els paràmetres, els requeriments, i alguna metodologia per a la validació de mètodes analítics.

De forma general, l'activitat de validació ha d'incloure el següent procediment analític:

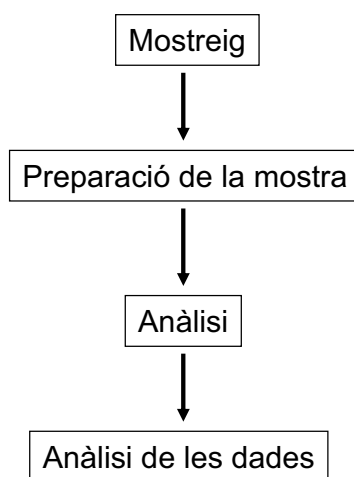


Figura 1.14. Etapes per realitzar un procés de validació complet.

Els mètodes han de ser validats o revalidats:

- abans de presentar una rutina de realització
- quan les condicions varien respecte a les considerades quan el mètode ha estat validat
- quan el mètode es canvia i el canvi representa una nova finalitat respecte a l'original

1.3.1. DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE ANALÍTIC PER A LA DETERMINACIÓ D'ANILINA EN MODELS D'OLI

L'objectiu de qualsevol mètode analític és donar uns resultats consistents, fiables i exactes. Com ja s'ha esmentat, ens interessava validar un mètode que pogués quantificar la concentració d'anilina present en els models d'oli preparats en el laboratori. D'aquesta manera ens permetia obtenir una orientació de la quantitat d'anilina present en els diferents models d'oli realitzats, més concretament en els relacionats amb els estudis *in vivo*.

Per dur a terme una validació completa és necessari analitzar diferents aspectes del mètode, com és la recollida de la mostra, la preparació de la mostra, l'anàlisi i l'obtenció dels resultats. En el nostre cas es va adaptar el procés de validació a les nostres necessitats. Això fa que diferents aspectes d'un procés estàndard de validació no es tinguin en compte i que el procés de validació s'adapti fins on creiem que és necessari. Interessava que el mètode que es volia validar donés una orientació de la concentració d'anilina present en els olis i que no és produís un tractament de la mostra degut a la dificultat de manipulació de l'oli i a la presència d'altres compostos que podrien veure afectada la seva concentració en els olis.

L'objectiu del mètode i el criteri de validació ha de ser definit a priori en el procés. Aquest inclou les següents qüestions:

Quins analits han de ser detectats?	En el nostre cas l'anilina.
Quines han de ser les concentracions esperades?	Es poden esperar concentracions majorment entre 5000-10000 ppm, tot i que hi pot haver casos amb quantitats inferiors a les 1000 ppm.
Quina és la matriu de la mostra?	L'anilina es troba dissolta en una matriu d'oli de colza refinat, formada majorment per triglicèrids i àcids grassos.
Hi ha algun tipus de substància que pugui interferir en el mètode? Pot ser detectada i quantificada?	Podria haver interferències degudes a altres derivats de l'anilina com són les anilides. Es pot detectar i quantificar.
Hi ha alguna legislació específica o requeriments reguladors?	No se n'ha trobat cap descrita.
La informació ha de ser qualitativa o quantitativa?	Es necessita obtenir una quantificació de l'anilina present en els models d'oli generats.
Quins són els requisits de detecció i els límits de quantificació?	Interessaria detectar fins a quantitats d'anilina inferiors a 1000 ppm.
Quin és l'interval esperat?	S'esperen concentracions entre 100- 10000 ppm.
Quina és la precisió i l'exactitud esperada?	Una precisió del > 5,3% i una exactitud >

	10%.
Quina és la robustesa del mètode?	En el nostre cas la robustesa del mètode no fou determinada al dur-se a terme en un únic laboratori.
Quin tipus d'equipament s'ha d'utilitzar? És el mètode específic d'un únic instrument, o ha de ser utilitzat sempre per instruments del mateix tipus?	L'instrument utilitzat ha estat un aparell de cromatografia líquida amb detector d'UV, ja que aquest permetia realitzar de forma més correcta l'anàlisi dels olis models.
El mètode ha de ser utilitzat en un laboratori específic o ha de ser aplicat en més laboratoris?	A priori, solament ha de ser emprat en el nostre laboratori.
No és sempre necessari validar tots els paràmetres analítics que hi ha disponibles per una tècnica específica?	Certs paràmetres analítics no han estat validats degut a que no es creien necessaris. Pel que fa al nostre cas, un exemple és la robustesa.

L'experiència del nostre laboratori en la determinació qualitativa de derivats del PAP i anilides va ajudar a l'hora d'optimitzar un mètode per a la determinació d'anilina lliure en models d'oli. Aquest mètode es basava en l'anàlisi mitjançant HPLC en fase directa. El mètode OLIS2 (vegeu punt 1.4.1) va permetre una bona separació de derivats de PAP, d'anilides i de l'anilina, tal com es veu més detalladament en el cromatograma de la Figura 1.15.

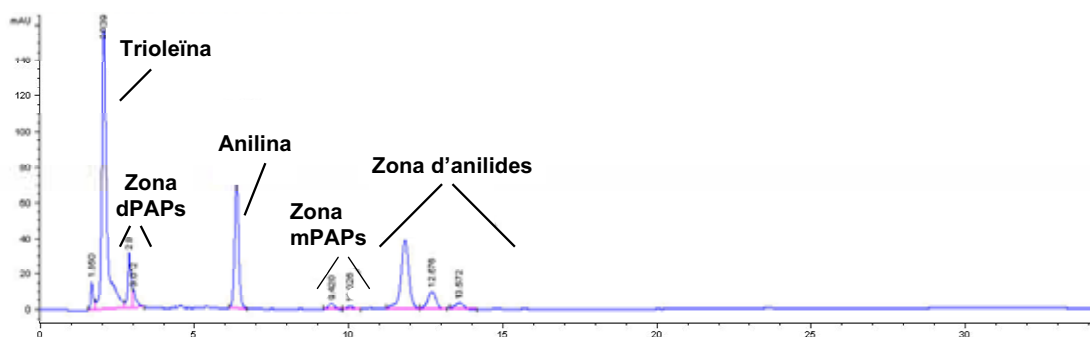


Figura 1.15. Perfil cromatogràfic d'HPLC d'un model d'oli tòxic realitzat amb el mètode OLIS2.

A grans trets es pot observar com en la zona inicial del cromatograma compresa entre 2-4 min apareixen els compostos més lipòfils, com ara els triglicèrids i els diversos dPAPs. A continuació s'observa l'anilina a aproximadament 6 min i posteriorment s'observa l'aparició de les diferents anilides i mPAPs. Cal destacar que l'eficàcia de la columna permet inclús distingir diversos tipus de dPAPs. Per tant, el cromatograma semblava prou satisfactori per quantificar l'anilina dins la família de derivats de PAP i anilides.

1.3.1.1. Selecció d'un patró extern per realitzar la validació del mètode

El primer punt a l'hora de validar el mètode va ser escollir un patró extern, per tal de dur a terme una correcta selecció d'aquest patró extern, el qual havia de satisfer un conjunt de condicions:

- hauria de contenir un grup cromòfor que facilités la seva detecció mitjançant un detector d'UV,
- hauria de presentar un temps de retenció que no es superposés amb cap dels altres components detectables per UV en els models d'oli,
- hauria de ser estable en la matriu i en les condicions d'emmagatzematge,
- no hauria de presentar cap grup funcional susceptible de reaccionar amb els compostos de l'oli de colza, ni amb els derivats del PAP anilides, ni l'anilina (un grup totalment adequat a aquestes característiques seria un èter).

Com es pot deduir, cercar un producte així no va ser una feina fàcil, ja que havia de presentar un conjunt de requisits difícils d'obtenir en un únic producte. L'inici de la cerca es va plantejar a partir de productes com el metoxibenzè, tot passant per productes com la piridina, el fenol i l'alcohol benzílic. La Figura 1.16 il·lustra la sèrie de compostos que es van assajar com a possibles patrons externs.

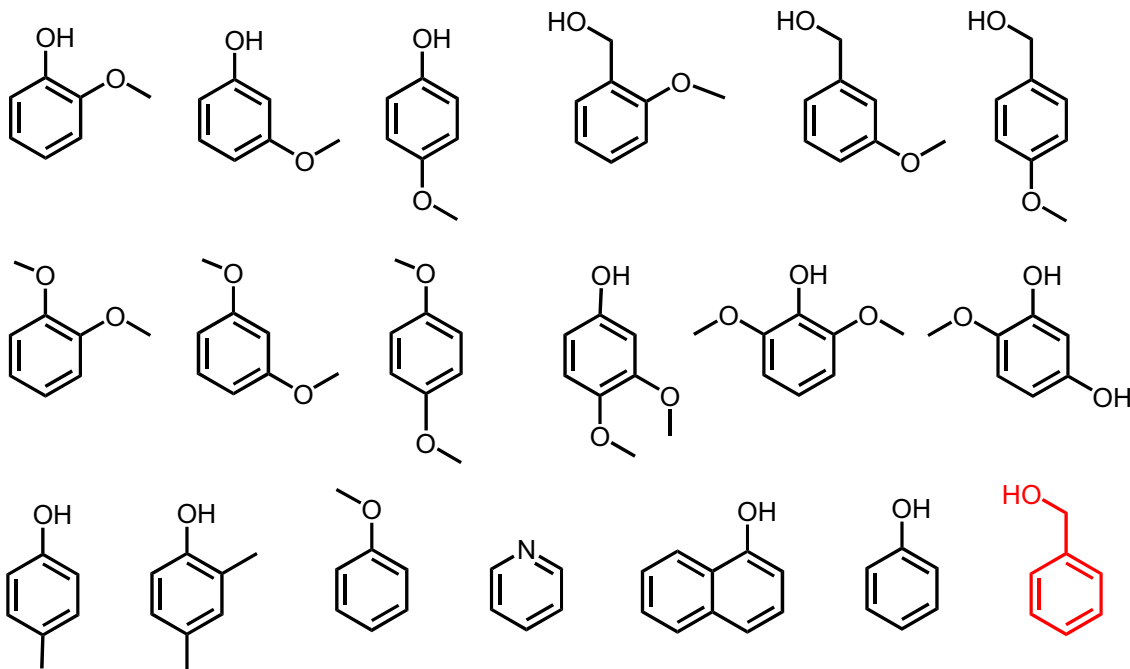


Figura 1.16. Compostos analitzats per HPLC en fase directa per utilitzar-los com a possibles patrons externs en el mètode per determinar anilina en models d'oli de colza.

De tots aquests, el compost que es va ajustar millor a les necessitats de l'estudi va ser l'alcohol benzílic. Aquest compost presentava una sèrie de característiques idònies per a escollir-lo com a patró extern. Entre les quals destacaven:

- un temps de retenció de 8 minuts en les condicions del cromatograma de la Figura 1.17. (mètode OLIS2, vegeu punt 1.4.1), temps idoni ja que es trobava entre el temps de retenció de l'anilina i el de les anilides, és a dir, en una zona on no hauria d'interferir amb cap altre producte,
- la presència d'un anell aromàtic que garantia la facilitat de detecció mitjançant UV.

Tanmateix, com a punt negatiu no es tractava d'un producte amb l'estabilitat que pot presentar, per exemple, un èter. Aquest fet podia ser un possible inconvenient. La presència d'un grup alcohol podria fer que aquest compost estigués involucrat en algun tipus de transesterificació amb algun àcid gras present en l'oli. Per això, calia realitzar, a més, un estudi que demostrés la seva estabilitat en l'oli.

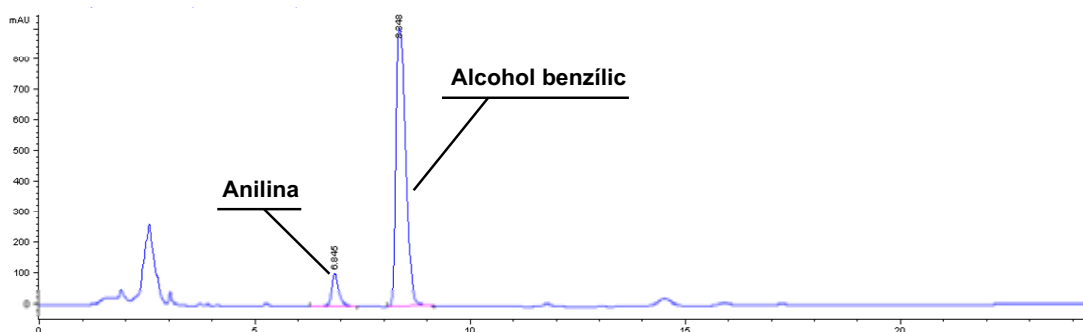


Figura 1.17. Perfil cromatogràfic d'HPLC que contenia l'alcohol benzílic en un model d'oli tòxic, fent servir el mètode OLIS2.

1.3.1.2. Síntesi i anàlisi de l'oleat del patró extern

Un cop escollit el patró extern, calia demostrar experimentalment que presentava estabilitat en la matriu d'oli de colza. Un risc podia ser l'esterificació de l'alcohol per un àcid gras present en el medi. Per això, es va procedir a realitzar la síntesi de l'oleat de benzil. Com en altres estudis anteriors s'escollí com a àcid gras, representatiu de l'oli de colza, l'àcid oleic.

El control de l'estabilitat de l'alcohol benzílic en el si de la matriu d'oli de colza es va realitzar de la següent manera: es va dissoldre una quantitat d'aquest en oli de colza i es va mantenir la dissolució a temperatura ambient durant dos dies. Els resultats dels controls mitjançant HPLC en cap moment van mostrar l'aparició del derivat esterificat, confirmant així

que l'alcohol benzílic era estable en el si de la matriu, si més no durant un període de temps suficient per als nostres objectius.

1.3.2. VALIDACIÓ DE DIVERSOS PARÀMETRES DEL MÈTODE ANALÍTIC PER A LA DETERMINACIÓ D'ANILINA

En aquest punt es discutiran els diferents paràmetres que s'han de validar del mètode per a la determinació d'anilina en models d'oli tòxic. La validació d'un mètode és el procés utilitzat per confirmar que el procediment analític emprat per a un test específic és apropiat per a l'ús desitjat. Els resultats d'una validació poden ser utilitzats per jutjar la qualitat, la fiabilitat, i la consistència dels resultats analítics, i es tracta d'una part important de qualsevol bona pràctica analítica.

La validació d'un mètode específic ha de ser demostrada mitjançant experiments en el laboratori utilitzant mostres similars a les desconegudes. La preparació i l'execució ha de seguir un protocol de validació, preferiblement escrit pas a pas.

Per un mètode en cromatografia líquida com és el nostre, la següent seqüència de paràmetres pot ser adequada a l'hora de validar el mètode:

- Selectivitat/Especificitat.
- Precisió i reproducció.
- Exactitud a diferents concentracions.
- Linealitat i interval.
- Límit de quantificació i límit de detecció.
- Estabilitat.

Per altra banda s'aconsella que els compostos químics utilitzats per determinar paràmetres de la validació siguin:

- Disponibles en quantitats suficients.
- Identificats amb exactitud.
- Suficientment estables.
- Analitzada la seva composició i puresa.
- Altres materials com les columnes han de ser noves. Els operadors han de ser experimentats i estar familiaritzats amb la tècnica i la instrumentació. Per mètodes quantitius, el factor de resolució entre dos pics ha de ser 2.5 o superior, sinó cal optimitzar-lo.

En el nostre cas tant l'anilina com l'alcohol benzílic presentaven les característiques anteriorment esmentades.

1.3.2.1. Selectivitat/Especificitat

De vegades aquests dos termes s'utilitzen indistintament. El terme específic fa referència a un mètode que dona resposta a un únic analit, mentre que el terme selectiu es refereix a un mètode que dona resposta a un grup de compostos químics que poden ser distingits entre ells. Si la resposta es diferencia de les altres respostes, el mètode és selectiu. Una altra manera de definir la selectivitat d'un mètode analític seria la capacitat de mesurar amb exactitud un analit en presència d'interferències.

La selectivitat en cromatografia líquida s'obté a partir d'escollir de manera adequada una columna i d'aconseguir unes condicions cromatogràfiques òptimes, com són una fase mòbil adequada, la temperatura i la longitud d'ona del detector. A més de la separació cromatogràfica, la preparació de la mostra pot ser optimitzada per aconseguir una millor selectivitat, fet que no era necessari en el nostre cas.

Saber si en un cromatograma els pics observats són purs o no, és relativament fàcil, gràcies als detectors d'UV-visible i als detectors d'espectrometria de masses, els quals permeten enregistrar *on line* els cromatogrames. Els espectres adquirits durant l'elució dels pics són normalitzats i representats de forma gràfica. El nivell d'impureses que es pot detectar en determinats mètodes depèn de la diferència espectral, del detector i de l'algoritme del software, però a priori es poden detectar impureses de l'ordre de 0,05-0,1%.

El mètode OLIS2 permet obtenir un cromatograma on es poden separar de forma correcta anilides, derivats del PAP i l'anilina. Aquest mètode juntament amb el software proporcionat per la casa Agilent permet veure si el pic de l'anilina té una puresa determinada, és a dir, si el pic que s'observa en el cromatograma correspon exactament a un únic compost. Aquest fet queda confirmat tal com s'observa en el cromatograma adjunt. En ell, l'anilina apareix amb un color verd, fet que indica que solament es produeix un tipus d'absorció en aquesta zona del pic corresponent a l'anilina. En el cas que s'observessin més absorcions, el software ens ho indicaria mitjançant un color vermell. D'acord amb això, es pot considerar que el nostre mètode era capaç de determinar selectivament l'anilina.

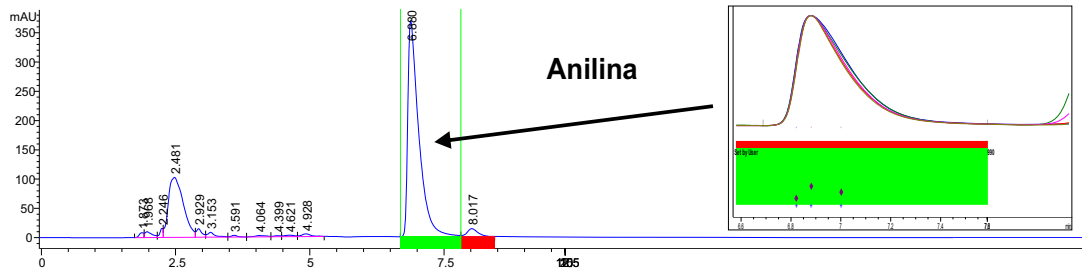


Figura 1.18. Perfil cromatogràfic d'HPLC on es mostra la selectivitat del mètode mitjançant l'anàlisi de la puresa del pic de l'anilina emprant el mètode OLIS2.

1.3.2.2. Precisió

La precisió és la qualitat de fer correspondre amb exactitud el resultat d'una mesura experimental d'una magnitud amb el seu valor real. La precisió es calcula a partir de la desviació estàndard que resulta de la múltiple injecció d'una sèrie de mostres. La mesura de la desviació estàndard es pot dividir en tres categories: repetició, precisió intermèdia i reproducció.

La repetició s'obté quan l'anàlisi té lloc en un mateix laboratori per un operador i amb el mateix aparell en un període curt de temps. La desviació estàndard es pot calcular amb 6 o més determinacions de 3 matrius diferents, a 2 o 3 concentracions diferents. En el nostre cas, la repetibilitat es va calcular en mostres de 100, 1000 i 10000 ppm. Per tal de preparar aquestes mostres, s'agafaren 0,5 µl de dissolucions de 200, 2000 i 20000 ppm d'anilina i es van barrejar amb 0,5 µl de la dissolució de patró extern (10000 ppm). A continuació la mescla es va sotmetre a agitació amb vòrtex i es van punxar consecutivament deu cops cadascuna de les mostres. Aquest procés es va repetir de la mateixa manera durant tres dies. En la Taula 1.11, es mostra l'absorbància de l'anilina respecte l'absorbància del patró extern per cadascuna de les concentracions indicades i en diferents dies.

En tots els casos s'observa com la desviació estàndard recomanada per la ICH està per sobre de la calculada. Això indica que el nostre mètode es precís quan es realitza una mesura consecutiva d'una mateixa mostra. Solament en la mostra de 100 ppm del dia 1 s'observa una desviació estàndard lleugerament superior a la recomanada.

La precisió intermèdia s'ha descrit com un terme de variabilitat amb el temps del procés de mesura. Es determina per comparació dels resultats d'un mètode executat en un mateix laboratori durant un nombre determinat de dies. La precisió intermèdia pot reflectir discrepàncies en els resultats obtinguts per culpa de: diferents operadors, per un treball erroni

de l'operador, per culpa de diferents instruments, amb estàndards i reactius de diferents proveïdors, de columnes de diferents partides, o una combinació d'entre aquests factors.

Taula 1.11. Resultats on es mostra l'absorbància de l'anilina respecte l'absorbància del patró extern de mostres d'oli de colza de 100, 1000 i 10000 ppm d'anilina en diferents dies i per decapiclat.

[Anilina] ppm	Dia 1			Dia 2			Dia 3		
	100	1000	10000	100	1000	10000	100	1000	10000
Punxada1	0,269	2,949	36,363	0,300	2,933	36,231	0,291	3,141	36,492
Punxada 2	0,252	2,941	34,401	0,267	2,980	33,993	0,268	2,988	37,386
Punxada 3	0,243	3,029	36,586	0,263	2,982	35,953	0,262	3,014	37,331
Punxada 4	0,241	2,990	36,608	0,258	2,987	36,352	0,272	3,019	38,495
Punxada 5	0,248	2,981	36,220	0,258	3,032	36,620	0,273	3,041	37,383
Punxada 6	0,243	3,005	37,256	0,258	2,985	36,122	0,277	3,052	35,777
Punxada 7	0,235	2,940	35,880	0,267	3,080	36,733	0,269	3,156	36,831
Punxada 8	0,237	2,944	36,246	0,277	3,156	36,933	0,281	3,058	37,144
Punxada 9	0,225	2,888	36,781	0,265	3,127	34,062	0,278	3,027	36,740
Punxada 10	0,221	2,866	36,143	0,274	3,153	36,608	0,260	3,021	35,984
RSD	0,013	0,050	0,753	0,012	0,081	1,060	0,009	0,054	0,783
RSD (%)	5,640	1,703	2,079	4,740	2,672	2,949	3,345	1,794	2,119
RSD recomanat (%)	5,3	3,7	2,7	5,3	3,7	2,7	5,3	3,7	2,7

L'objectiu de la precisió intermèdia és verificar que en el mateix laboratori un mètode ens donarà els mateixos resultats.

Els resultats, tot i que dos d'ells (els corresponents a 100 i 1000 ppm) estan lleugerament per sobre la desviació estàndard recomanada, es poden considerar que donen lloc a un mètode amb una precisió intermèdia.

La reproducció representa la precisió obtinguda entre diferents laboratoris. L'objectiu és verificar que el mètode doni els mateixos resultats en diferents laboratoris. En el nostre cas

aquest punt no es va tractar, ja que el mètode emprat s'havia de dur a terme solament en el nostre laboratori.

Taula 1.12. Resultats on es mostra l'absorbància de l'anilina respecte l'absorbància del patró extern en cadascuna de les concentracions indicades i en diferents dies.

[Anilina] ppm	100	1000	10000
Dia 1	0,269	2,949	36,363
Dia 2	0,300	2,933	36,231
Dia 3	0,291	3,141	36,492
Mitjana	0,287	3,008	36,362
RSD	0,015	0,115	0,130
RSD%	5,4808	3,843	0,359
RSD% recomanat	5,3%	3,7%	2,7%

1.3.2.3. Exactitud

L'exactitud és la qualitat d'una mesura que dona de la magnitud mesurada un valor proper al real. Consisteix en analitzar una mostra i comparar el resultat obtingut amb el valor real.

El valor real de l'exactitud es pot obtenir de diverses maneres. Una d'elles és comparar els resultats del mètode amb els resultats d'un mètode de referència. Aquesta aproximació assumeix que la incertesa del mètode de referència és coneguda. I l'altra, que és la que emprarem nosaltres, consisteix en analitzar una mostra amb concentracions conegudes i comparar el valor mesurat amb el valor real.

L'exactitud es calcula en un nivell prop del límit de quantificació, en un nivell intermedi i finalment en un nivell alt. Es recomana que l'exactitud es calculi utilitzant un mínim de 9 determinacions, com a mínim en tres nivells de concentració. Els nivells que s'analitzen són 100, 1000 i 10000 ppm d'anilina. Per tal de preparar aquestes mostres s'agafa 0,5 µl de les dissolucions de 200, 2000 i 20000 ppm d'anilina i es barregen amb 0,5 µl de la dissolució de patró extern (10000 ppm). A continuació es sotmeten a agitació amb vòrtex i s'analitzen per HPLC consecutivament deu cops cada una de les mostres. Els resultats obtinguts es mostren a continuació:

Taula 1.13. Resultats de les anàlisis realitzades en tres mostres de 100, 1000 i 10000 ppm per decaplicat, amb l'objectiu de determinar l'exactitud del mètode.

[Anilina] ppm	100	1000	10000
μT (valor calculat)	106,062	1023,879	12292,412
x (valor real)	106,362	1063,620	10636,200
bias%	-0,281	-3,736	15,571

En aquest cas s'observa que tant a 100 com 1000 ppm l'exactitud és acceptable ja que està dins la desviació recomanada del 10%; en canvi, a 10000 ppm el mètode no és molt exacte, ja que sobrepassa el valor de *bias* recomanat del 10%. Per tant, els resultats que estiguin al voltant de 10000 ppm no presentaran una exactitud adequada.

1.3.2.4. Linealitat i interval

La linealitat d'un mètode analític és la capacitat per obtenir resultats que són directament proporcionals a la concentració d'analits de la mostra dins d'un interval. La linealitat es determina mitjançant sèries de 3 o 6 injeccions de 5 o més estàndards, de concentració entre el 80-120 % de l'interval de concentració esperada. La resposta ha de ser directament proporcional a la concentració dels analits. L'equació de la regressió lineal aplicada als resultats ha de tenir un punt d'intercepció no significativament diferent de zero. Si s'obté un punt significativament diferent de zero, s'ha de demostrar que no té efecte en l'exactitud del mètode. De vegades és difícil observar desviacions de la linealitat. Alhora de determinar la linealitat, es recomana que es donin els valors del coeficient de correlació lineal, el punt d'intercepció amb l'eix, el pendent de la línia de regressió i el residual de la suma de quadrats.

Quan es parla de l'interval d'un mètode analític es refereix al tram comprès entre els nivells alt i baix, incloent aquests dos, els quals s'ha demostrat que es poden determinar amb precisió, exactitud i linealitat, utilitzant el mètode descrit. L'interval de linealitat escollit per a l'estudi va ser el comprès entre 100 i 10000 ppm d'anilina en una dissolució d'oli de colza. Els diferents punts escollits per realitzar la recta de calibratge i estudiar la linealitat van ser: 100, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 ppm. Cadascun d'aquests nivells s'analitzà un cop al dia durant 3 dies. Les dissolucions per realitzar la corba de calibratge es van preparar agafant 0,5 ml de la dissolució mare de patró extern (10000 ppm) i 0,5 ml de cadascuna de les dissolucions següents: 200, 1000, 2000, 5000, 10000 i 20000 ppm d'anilina. Un cop preparades les mostres, es van agitar en el vòrtex i es van preparar en el líquid per tal d'injectar-hi 1 μ l en

l'HPLC. Aquest procés es va repetir durant tres dies consecutius, per obtenir els resultats que es mostren en la gràfica següent:

Taula 1.14. Resultats per triplicat i la seva corresponent mitjana on es mostra l'absorbància de l'anilina respecte la del patró extern a diferents concentracions.

[Anilina] ppm*1000	0,106	0,531	1,063	2,659	5,318	10,636
An/P.e. (A)	0,150	1,446	3,082	8,511	15,865	31,028
An/P.e. (B)	0,211	1,426	3,039	7,977	14,774	29,565
An/P.e. (C)	0,271	1,371	3,062	7,942	15,396	33,6641
Mitjana	0,211	1,414	3,061	8,143	15,345	31,419

La regressió lineal amb el seu coeficient de correlació que resulten de la Figura 1.19 són:

$$y = 2,9547x - 0,0715$$

$$r^2 = 0,9997$$

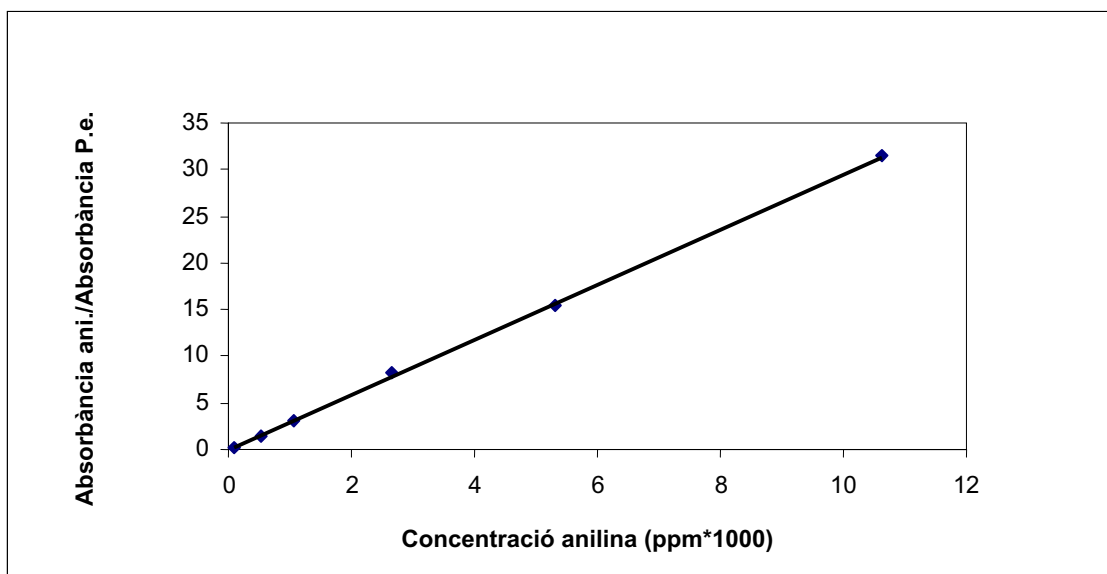


Figura 1.19. Representació gràfica on es mostra l'interval de linealitat comprés entre 100 i 10000 ppm d'anilina en oli de colza.

La recta de calibratge d'aquestes dades s'obté en representar la relació entre les àrees obtingudes d'anilina i de patró extern davant de la concentració coneguda d'anilina. Tal com

es mostra en la gràfica, el conjunt de punts s'ajusta a una línia recta que té un coeficient de correlació de 0,9997. Per tant, es pot afirmar que l'interval estudiat presenta linealitat.

1.3.2.5. Límit de detecció i límit de quantificació

El límit de detecció és la concentració més baixa d'anàlit en la mostra que pot ser detectada, però no necessàriament quantificada. El límit de detecció sovint es confon amb la sensibilitat del mètode. La sensibilitat d'un mètode analític és la capacitat del mètode de discriminar petites diferències de concentració del test analític. En cromatografia, el límit de detecció és la mínima concentració d'anàlit que produeix resposta en el cromatograma d'HPLC, considerada com a dos o tres vegades el nivell de senyal/soroll.

Pel que fa al límit de quantificació, és la mínima concentració d'anàlit que es pot mesurar en el sistema amb una exactitud i precisió acceptables. Es calcula en el moment que la relació senyal/soroll és igual a 10.

Per tal de calcular el límit de detecció i de quantificació, es prepararen 50 ml d'una dissolució de 100 ppm d'anilina (25 ml d'una dissolució de 200 ppm d'anilina i 25 ml d'una dissolució de 10000 ppm de patró extern). A partir d'aquesta dissolució es prepararen tres mostres més: una de 75 ppm, una de 50 ppm i una de 25 ppm d'anilina. Un cop preparades s'agitaren amb el vòrtex i s'analitzen sis cops mitjançant HPLC.

Segons la Figura 1.20 i 1.21 es pot considerar que el límit de detecció és 50 ppm ja que a aquesta concentració es pot observar una relació senyal/soroll= $(1,9-1,1)/(1,2-1)=4$ (aproximadament 3). El límit de quantificació és 75 ppm senyal/soroll= $(2,2-0,9)/(1-0,1)=13$ (aproximadament 10). En definitiva, el mètode podrà quantificar quantitats superiors a 75 ppm i detectar de forma fiable concentracions per sobre de 50 ppm d'anilina.

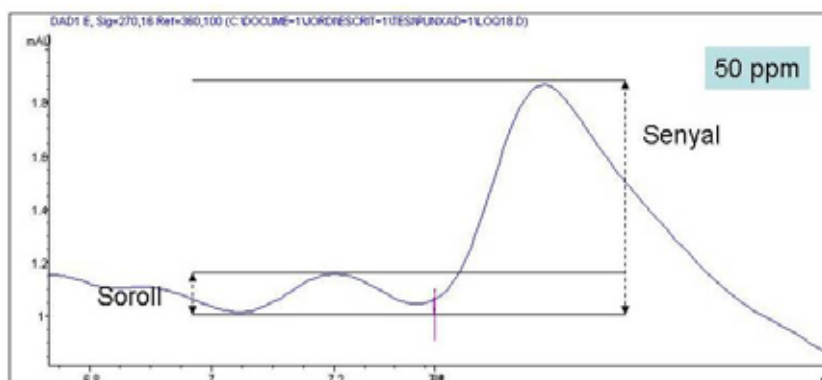


Figura 1.20. Cromatograma d'HPLC en fase directa on s'observa una relació senyal/soroll d'aproximadament 3 magnituds en una mostra d'oli de colza que conté 50 ppm d'anilina.

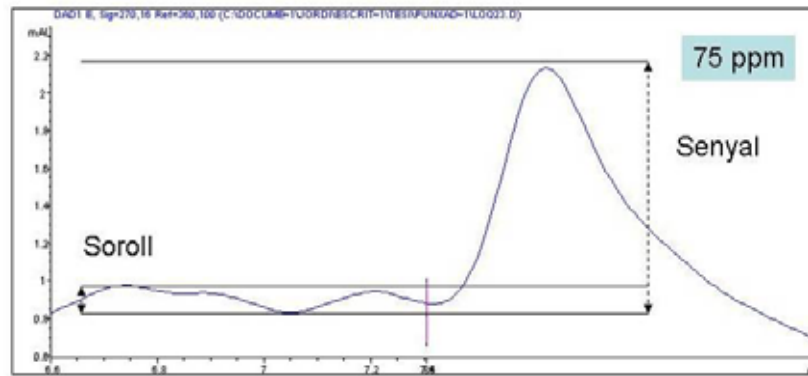


Figura 1.21. Cromatograma d'HPLC en fase directa on s'observa una relació senyal/soroll d'aproximadament 10 magnituds en una mostra d'oli de colza que conté 75 ppm d'anilina.

1.3.2.6. Estabilitat

Alguns compostos poden arribar a descompondre en diferents moments abans de realitzar les anàlisis cromatogràfiques. Per exemple, durant la preparació de les mostres en solució, en la realització d'extraccions, durant la transferència de fase o en l'emmagatzemament en vials. Degut a aquestes circumstàncies, el desenvolupament del mètode ha de determinar l'estabilitat dels anàlits i estàndards. L'estabilitat correspon a la mesura de la *bias* en els resultats dels assaigs generats durant un interval de temps preseleccionat, per exemple, cada hora fins a les 46 hores, utilitzant una única dissolució. El sistema es considera estable quan la desviació estàndard calculada en els resultats obtinguts de l'assaig a intervals de diferents temps, no excedeix més del 20% del corresponent valor de la precisió del sistema.

En l'estudi del paràmetre de l'estabilitat es pretén determinar, si tant el producte que es vol analitzar, com el patró extern, no descomponen ni reaccionen entre ells, o amb la matriu d'oli de colza. Per fer l'anàlisi es preparen 100 ml d'una dissolució de 10000 ppm, agafant 50 ml de la dissolució de 20000 ppm d'anilina i 50 ml de la dissolució de patró extern. A continuació aquesta mostra es deixà a temperatura ambient i s'agafaren alíquotes d'1 ml a diferents temps ($t= 0$ min, $t= 6$ h, $t= 24$ h, $t= 30$ h, $t= 48$ h). Cadascuna d'aquestes alíquotes s'analitza per triplicat per HPLC.

% RSD del mètode	% RSD calculada al llarg del temps
2.95	3.65

Els resultats obtinguts van permetre obtenir una desviació estàndard durant el transcurs del temps del 3.65%, mentre que si tenim en compte el valor recomanat per la ICH

l'acceptable pel mètode no hauria d'excedir en un 20% al recomanat, un 2,95%. La diferència observada (0,11%) en l'àmbit del nostre treball es podria considerar mínima i per tant establir que les dissolucions d'anilina i alcohol benzílic presenten una estabilitat suficient per evitar introduir errors en les anàlisis realitzats durant períodes curts de temps.

1.3.3. Determinació d'anilina en models d'oli tòxic realitzats al laboratori

Un cop validats tots els paràmetres anteriors, es van analitzar una sèrie de mostres d'oli per tal de quantificar l'anilina que hi era present. Per preparar les mostres es van agafar 0,5 ml dels olis i es van barrejar amb 0,5 ml d'una dissolució de 10000 ppm de patró extern. Les mostres d'oli analitzades es poden classificar en tres grups, segons quina ha estat la seva fase d'obtenció: olis JEC obtinguts en la primera fase, olis RSMO corresponents a la segona fase i per últim, en la tercera fase es poden distingir dos tipus d'olis: per una banda els olis sotmesos a destil·lació molecular amb la finalitat d'eliminar part de l'anilina anomenats JEC3 (O1AB05F1, O1AB05F2, O2AB05, O3AB05, O4AB05) i per altra els olis sense eliminació d'anilina anomenats JEC2 (O1JN05, O2JN05, O3JN05, O4JN05).

Taula 1.15. Concentració en ppms d'anilina lliure en diferents models d'oli, quantificada mitjançant el mètode validat en el nostre laboratori.

Tipus d'oli model	Referència	[Anilina]	[Real]	[Laboratori Referència]
JEC3	O1AB05F1	396	792	688
JEC3	O1AB05F2	288	576	560
JEC3	O2AB05	393	786	725
JEC3	O3AB05	315	630	603
JEC3	O4AB05	254	508	462
JEC2	O1JN05	7169	14338	14759
JEC2	O2JN05	7402	14804	14349
JEC2	O3JN05	6759	13518	n.d.
JEC2	O4JN05	6619	13238	12567
JEC	JECbotella7	4771	9542	9872
JEC	JECbotella8	4990	9980	9462
RSMO	RSMO	3390	6780	6780

Cal indicar que la concentració d'anilina que es troba en les anàlisis no és la real, sinó que aquesta s'ha de multiplicar per dos per tal de compensar el factor de dilució que es fa en el moment de preparar les mostres. A més en la Taula 1.15 es mostra la concentració d'anilina determinada en el laboratori d'anàlisi de referència.

Els resultats ens van mostrar com en els olis JEC2 la quantitat d'anilina lliure era superior a la present en els olis JEC, els primers tenien de l'ordre de 4000 ppm més. Tot i no tenir concentracions idèntiques es podien considerar olis similars pel que fa al contingut d'anilina lliure, ja que el que es buscava era obtenir un oli amb nivells alts d'anilina. Referent als olis JEC3 s'observà que la concentració d'anilina era molt menor que la dels olis originaris, els olis JEC2. Per tant, l'eliminació de l'anilina mitjançant destil·lació molecular s'havia produït de manera satisfactòria. En resum, els olis JEC2 tenien concentracions d'anilina entre 13000 i 15000 ppm, els olis JEC entre 9000 i 12000 i finalment els JEC3 entre 500 i 800 ppm. Per tant, les diferències pel que fa a la concentració d'anilina lliure d'aquests olis ens hauria de permetre després d'administrar-los en proves toxicològiques *in vivo* qüestions anteriorment plantejades al voltant de la relació entre l'anilina lliure i la SOT. Els resultats toxicològics encara no han estat confirmats.

1.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

1.4.1. GENERALITATS

Tots els reactius comercials es van emprar sense purificació prèvia. Els dissolvents utilitzats van ser de qualitat per a síntesi, excepte en la manipulació de productes finals, on es van emprar dissolvents de qualitat per a anàlisi de residus. Els dissolvents anhidres es van preparar seguint els procediments descrits a la literatura.⁶⁴ L'evolució de les reaccions en dissolució es va seguir mitjançant cromatografia de gasos (CG), cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) o cromatografia en capa prima (CCF). Les anàlisis per CCF es van realitzar sobre cromatofolis de sílica de 0.2 mm de gruix sobre suport d'alumini Merck Kieselgel 60 F254. La detecció dels productes es va dur a terme mitjançant l'exposició de les plaques a llum UV de $\lambda = 254$ i 360 nm, o bé mitjançant la immersió de les plaques en una dissolució reveladora de H₂SO₄ conc., anisaldehyd i etanol (2:2:100) o d'àcid fosfomolíbdic al 1% en etanol i posterior escalfament. Aquesta tècnica es va emprar també a nivell preparatiu sobre cromatoplaques Merck Kieselgel 60 F254 de 0.5 o 2 mm de gruix, en funció de la quantitat de mostra a purificar.

Les anàlisis per CG es van realitzar en un aparell Hewlett Packard 5890 Series II amb detector d'ionització de flama (FID), amb un integrador HP3396 Series II i columnes capil·lars

SPB-5 (diàmetre intern 0.25 mm, diàmetre de partícula 0.25 µm) de 12 a 15 m de longitud, emprant heli com a gas portador.

Els espectres de masses (EM) d'alguns compostos es van obtenir en un espectrofotòmetre Fisons MD800 acoblat a un cromatògraf de gasos model 8000 Series i proveït d'una columna capil·lar Hewlett Packard HP-5 de 25 m i un detector d'ions positius de tipus quadrupolar. Els espectres es van enregistrar emprant ionització per impacte electrònic (IE) a 70 eV, i els fragments obtinguts s'indiquen amb la seva relació massa/càrrega (m/z) i entre parèntesis la seva proporció relativa (%). Altres espectres de masses es realitzaren mitjançant l'acoblament de cromatografia líquida-espectrometria de masses (HPLC-EM) amb un aparell HP1100 LC/MSD amb detector de tipus quadrupol per a la detecció d'ions positius i emprant una interfase d'electrosprai-ionization (ESI). L'anàlisi quantitativa per HPLC-MS de les mostres d'oli es realitzà al laboratori del Dr. J. Abian de l'IIBB (Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona).

Els espectres d'infraroig (IR) es van realitzar amb un aparell de Bomem model MB120 FT-IR i les absorcions s'expressen en cm^{-1} .

Per a les anàlisis d'HPLC s'utilitzà un aparell Hewlett-Packard 1100, equipat amb una columna analítica Nucleosil 100-5CN o Luna 5µ CN 100 Å (150x4.60 mm) de Phenomenex utilitzades en fase directa. Els estudis en fase inversa es realitzaren en el mateix aparell utilitzant una columna C-18 XTerra de Waters 5 µm (150x4.6 mm) o una C-18 Lychrocart de Merck 5 µm, Lychrospher 100 RP-18 (12.5x0.4 cm). La detecció es feu a $\lambda = 220, 245$ i 270 nm depenent del cas. Com a mètodes per a l'elució es van emprar principalment els tres següents:

Mètode NOCR6: mètode d'anàlisi d'HPLC en fase directa emprant com a dissolvents hexà i alcohol isopropílic amb un flux 1 ml/min.

t (min)	IPA %	Hexà %
2	1	99
17	20	80
20	20	80
25	1	99

Mètode OLIS2: mètode d'anàlisi d'HPLC en fase directa emprant com a dissolvents hexà i alcohol isopropílic amb un flux 1 ml/min.

t (min)	IPA %	Hexà %
10	1	99
29	4	96
30	4	96
35	1	99

Mètode TETROL: mètode d'anàlisi d'HPLC en fase inversa emprant com a dissolvents metanol i aigua amb un flux 1 ml/min.

t (min)	MeOH %	H ₂ O %
5	45	55
7	55	45
12	55	45
14	45	55
25	45	55

Els espectres de ¹H-RMN i ¹³C-RMN es van enregistrar en els següents aparells: en un Varian Gemini 200 (200 MHz per ¹H i 50 MHz per a ¹³C), en un Varian Unity 300 (299.949 MHz per ¹H i 75.4 MHz per a ¹³C) i en un Varian Unity 500 (¹H-500 MHz, ¹³C-125 MHz). El desplaçament químic dels senyals (δ) s'expressa en parts per milió (ppm) respecte el senyal del tetrametilsilà per a ¹H i respecte el CDCl₃ per a ¹³C. Les constants d'acoplament protó-protó (*J*) s'expressen en Hz. Per indicar les multiplicitats observades s'utilitzen les abreviacions següents: s (singlet), d (doblet), dd (doble doblet), ddd (doble doblets de doblets), t (triplet), td (triple doblet), qu (quintuplet), m (multiplet), ac (absorció complexa) i ba (banda ampla).

Les cromatografies en columna van fer-se, emprant l'aparell Biotage de la companyia Biotage Inc. utilitzant columnes de dos dimensions diferents, depenent de la quantitat a purificar, empaquetades amb sílica-gel Kp-sil, (32-63 μ m, 60 Å). Per altres compostos es va realitzar una purificació per HPLC a escala semipreparativa mitjançant un sistema de dues bombes Waters 510, un detector-controlador de gradients d'Applied Biosystems (783 Programable Absorbance Detector) i fent servir una columna de tipus Kromasil 100 C8 de 5 μ m (250 x 20 cm) de Scharlau.

Les anàlisis elementals (AE) es realitzaren en el Servei de Microanàlisi del C.I.D., emprant un aparell Carlo Erba 1108. Les mesures de masses d'alta resolució (EMAR) es van realitzar a la Unidade de Espectrometría de Masas de la Universidade de Santiago de Compostela.

L'oli de colza de la marca "Bouton d'Or (Huile Nouveau de Colza)" que es va utilitzar en la realització d'olis models va ser adquirit en un supermercat francès, degut a la impossibilitat d'adquirir-lo en comerços espanyols.

1.4.2. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER ALS ASSAIGS DE DESODORITZACIÓ MODEL

S'afegeixen sobre un baló preescalfat a 200-220 °C 100 g d'oli amb un 2% d'anilina, fet que provoca una davallada de la temperatura fins a 120-130 °C. Llavors es tapa la boca d'entrada de l'oli i es procedeix a realitzar una rampa d'escalfament fins a 280 °C en uns 15-18 minuts, tot mantenint agitació constant amb l'ajuda d'un nucli magnètic de vidre. A continuació, la manta calefactora es regula fins a arribar a 200 °C, temperatura a la qual es manté l'experiment fins al final del procediment (2 h). Després d'una hora, el sistema es connecta al buit (20 Torr) i els compostos volàtils es recollen mitjançant dues trampes fredes.

1.4.3. EXPERIMENTS A DIFERENTS ESCALES

En aquest cas el procediment que es realitza és el mateix descrit en l'apartat anterior (1.4.2.), però variant la quantitat d'oli de 25 g, 40 g, 80 g i 100 g. Aquestes variacions de quantitat d'oli implica certs canvis en el sistema, com són el volum del baló i la manta calefactora. Cadascun d'aquests experiments es realitza per duplicat.

1.4.4. DESODORITZACIÓ A ESCALA DE 400 g

El procediment dut a terme és el mateix que el descrit a l'apartat 1.4.2, però fent servir 400 g d'oli amb un 2% d'anilina i emprant un baló d'1 litre i una manta calefactora adaptada al baló. Els 400 g d'oli amb el 2% d'anilina s'afegeixen al baló preescalfat a 220 °C i això causa una davallada de la temperatura fins a 90-100 °C. Aleshores es tapa la boca i es procedeix a l'escalfament ràpid de l'oli fins a 280 °C (T_M) en uns 22-25 minuts (t_M). Es recobreix el baló amb un aïllant format per llana de vidre i paper d'alumini. El procés es realitza amb agitació constant mitjançant l'ajuda d'un nucli magnètic de vidre. Després, es deixa refredar el sistema fins a 200 °C, traient l'aïllant tèrmic instal·lat amb anterioritat. A 200 °C s'estabilitza el sistema fins al final de l'experiment, 2 hores (t_v). Després d'una hora a 200 °C, en el sistema es connecta el buit a una pressió (P) de 70 Torr i els compostos volàtils es recullen mitjançant dues trampes fredes.

1.4.5. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL DEL DISSENY D'EXPERIMENTS

El procediment experimental utilitzat per al disseny d'experiments fou l'emprat en l'apartat 1.4.2. Es procedí amb 40 g d'oli de colza tot variant els factors dels quals es volia estudiar l'efecte i mantenint constant altres paràmetres que poguessin modificar el resultat.

1.4.5.1. Experiments per a l'estudi d'un possible catalitzador extern

Es procedí igual que en el procediment general descrit per al disseny d'experiments 1.4.6, però s'empraren 20 g de matriu total que foren: 20 g de trioleïna, 20 g d'oli de colza o 10 g d'oli + 10 g de trioleïna. A cadascuna d'aquestes matrius s'hi addicionà un 1%, un 2% i un 4% d'anilina i se n'estudià l'efecte de cada resposta per a cada mescla durant la desodorització. Els paràmetres emprats en la desodorització varen ser els de nivell mig: $t_M = 14$ min, $T_M = 280$ °C, $P = 70$ Torr i $t_v = 60$ min.

1.4.6. ASSAIGS D'EXTRACCIÓ D'ANILINA MITJANÇANT UN DESTIL·LADOR MOLECULAR

El procés de destil·lació de l'anilina dels models d'oli es va realitzar mitjançant un destil·lador molecular model KDL 5, GmbH UIC (Alzenau, Germany). La major part de l'equip està format per material de vidre. El sistema d'escalfament de la mostra consisteix en una camisa a través de la qual hi circula oli calent provinent d'un bany. El sistema de buit està format per una bomba de difusió i una de mecànica. L'àrea superficial de l'evaporador és 0.048 m² i l'àrea del condensador és 0.065 m².

Les variables que es van controlar durant el procés van ser: la temperatura d'escalfament, el buit i el flux. Les quals es van fixar respectivament en 120 °C, 0.001 mbar i $6,7$ g/min en la primera passada i $3,7$ g/min en la segona.

1.4.7. DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE PER QUANTIFICAR I ANALITZAR ANILINA EN MODELS D'OLI

Es procedí a realitzar un mètode per determinar i quantificar anilina en models d'oli mitjançant HPLC. S'utilitzà un aparell de la casa Agilent HP1100, en fase directa, emprant com a dissolvents hexà i alcohol isopropílic. Com a fase estacionària s'utilitzà una columna analítica Luna 5 μ CN 100 Å (150x4.60 mm) de Phenomenex. S'emprà el mètode cromatogràfic OLIS2 (vegeu punt 1.4.1).

1.4.8. SÍNTESI I ANÀLISI DE L'OLEAT DEL PATRÓ EXTERN

Sobre una dissolució d'alcohol benzílic 100 mg (0.93 mmol) en 10 ml de CH_2Cl_2 s'addicionen 208 mg (1.01 mmol) de DCC, 11 mg (0.09 mmol) de DMAP i 273 mg (0.97 mmol) d'àcid oleic. La dissolució restant es deixa reaccionar a temperatura ambient i amb agitació. Els controls de la reacció es realitzen mitjançant HPLC en fase directa emprant el mètode OLIS2. Al cap de dues hores de l'inici de la reacció aquesta s'atura, ja que no s'observa producte de partida. Després d'evaporar el dissolvent, s'elimina la DCU per precipitació amb hexà en fred, procés que es repeteix tres vegades. Finalment, la purificació del residu per HPLC a escala semipreparativa utilitzant com a eluent 100% ACN forní un oli corresponent al producte desitjat.

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): 7.35 (s, 5 H; CH_{Ar}), 5.34 (m, 2 H; 2 $\text{CH}=\text{}$), 5.11 (s, 2 H; ArCH_2), 2.35 (t, $^2J(\text{H,H})=7.5$ Hz, 2 H; CH_2CO), 2.00 (m, 4 H; 2 $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 1.63 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.40-1.20 (ac, 20 H; CH_2), 0.88 (t, $^2J(\text{H,H})=6$ Hz, 3 H; CH_3).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): 173.6 (CO), 136.1 (C_{Ar}), 129.9 (CH_{Ar}), 129.7 (CH_{Ar}), 128.5 (CH_{Ar}), 128.1 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 66.0 (PhCH_2O), 34.3 (COOCH_2), 29.7 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.1 (CH_2), 29.0 (CH_2), 27.2 (CH_2), 27.1 (CH_2), 24.9 (CH_2), 22.7 (CH_2), 14,1 (CH_3).

EI-MS m/z (%): 372.16 (5) pic molecular, 281.14 (10), 263.12 (20), 245.11 (15), 90.88 (100).

1.4.9. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER A LA VALIDACIÓ DEL MÈTODE PER DETERMINAR ANILINA

Per a la validació del mètode eren necessàries un conjunt de dissolucions amb el fi d'obtenir una sèrie de patrons que ens permetessin estudiar els diferents paràmetres.

Primerament es van pesar 1019.7 mg d'alcohol benzílic en 100 ml d'oli de colza per tal d'obtenir una dissolució d'aproximadament 10000 ppm. A continuació es va preparar una dissolució mare d'anilina, en la qual es van afegir 1900 μL d'anilina en 100 ml d'oli de colza. Tot seguit, a partir d'aquesta dissolució es va realitzar un arbre de dissolucions com el que s'indica en la Figura 1.22.

1.4.9.1. Validació de la selectivitat

Es va preparar 1 ml d'una dissolució formada per 0,5 ml de la dissolució d'alcohol benzílic (10000 ppm) i 0,5 ml de la dissolució de 1000 ppm d'anilina. La dissolució resultant es va injectar (1 µl) en l'HPLC mitjançant fase directa emprant el mètode OLIS2. Un cop enregistrat el cromatograma, es va determinar la puresa del pic mitjançant el software proporcionat per la casa Agilent.

1.4.9.2. Validació de la precisió

Es van preparar 3 dissolucions de 10000, 1000, 100 ppm d'anilina, a base d'afegir 0,5 ml de les dissolucions de 20000, 2000, i 200 ppm d'anilina sobre 0,5 ml de la dissolució d'alcohol benzílic (10000 ppm). A continuació es van sotmetre a agitació vigorosa i la dissolució resultant es va injectar per decuplicat (1 µl) en l'HPLC en fase directa emprant el mètode OLIS2. Aquest procediment es va realitzar per triplicat en tres dies diferents.

1.4.9.3. Validació de l'exactitud

En aquest cas s'empraren resultats obtinguts del procediment descrit en el paràgraf anterior.

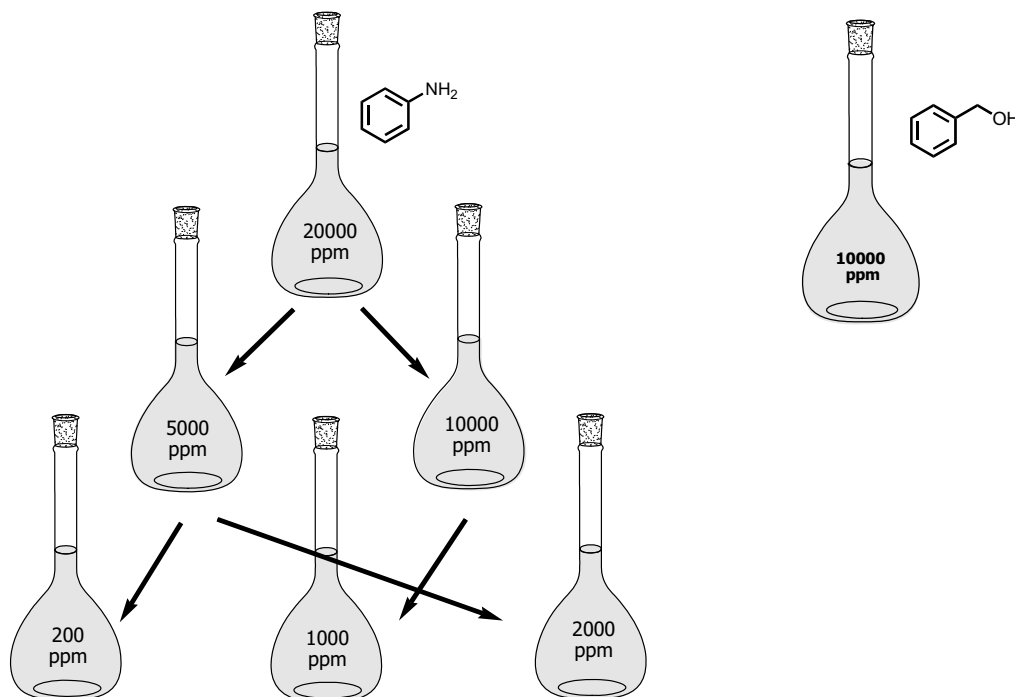


Figura 1.22. Arbre de dissolucions realitzat per a la validació d'un mètode per a la determinació d'anilina en una matriu d'oli de colza.

1.4.9.4. Validació de la linealitat

Es van preparar 6 dissolucions de 10000, 5000, 2500, 1000, 500, 100 ppm d'anilina. Aquestes es van fer afegint 0,5 ml de les dissolucions de 20000, 10000, 5000, 2000, 1000 i 200 ppm d'anilina sobre 0,5 ml de la dissolució d'alcohol benzílic (10000 ppm). A continuació es van sotmetre a agitació vigorosa i la dissolució resultant es va injectar (1 µl) en l'HPLC mitjançant fase directa emprant el mètode OLIS2. Aquest procediment es va realitzar per triplicat en tres dies diferents.

1.4.9.5. Validació del límit de detecció i quantificació

Es van preparar 4 dissolucions d'1 ml de 100, 75, 50 i 25 ppm d'anilina. Aquestes es van fer afegint 500 µl de la dissolució d'alcohol benzílic (10000 ppm) sobre quatre dissolucions que contenien les següent quantitats d'oli de colza i de dissolució de 200 ppm d'anilina respectivament (0 µl + 500, 125 µl + 375 µl, 250 µl + 250 µl, 375 µl + 125 µl). A continuació es van sotmetre a agitació vigorosa, i les dissolucions resultants es van injectar (1 µl) en l'HPLC mitjançant fase directa emprant el mètode OLIS2.

1.4.9.6. Validació de l'estabilitat dels anàlits

Es va preparar 1 dissolució de 5000 ppm d'anilina. Aquesta es va fer afegint 0,5 ml de la dissolució 10000 ppm d'anilina sobre 0,5 ml de la dissolució d'alcohol benzílic (10000 ppm). A continuació es va sotmetre a agitació vigorosa i la dissolució resultant es va injectar (1 µl) en l'HPLC mitjançant fase directa emprant el mètode OLIS2 a diferents temps (0, 6, 24, 30 i 48 h). La dissolució es va mantenir a temperatura ambient durant el transcurs de l'estudi.

1.4.10. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL PER A LA QUANTIFICACIÓ D'ANILINA

L'anàlisi del contingut d'anilina en diferents models d'oli es va realitzar preparant 1 ml de dissolució a partir de 0,5 ml de la dissolució d'alcohol benzílic (10000 ppm) i 0,5 ml de l'oli a determinar. A continuació es va sotmetre a agitació vigorosa i la dissolució resultant es va injectar (1 µl) en l'HPLC mitjançant fase directa emprant el mètode OLIS2.

**PART II. SÍNTESI DE DERIVATS ESPECÍFICS DEL
PAP I ESTUDI DELS PROCESSOS DE MIGRACIÓ
D'ACIL**

SUMARI PART II

2.1. SÍNTESI DE DERIVATS DEL PAP	89
2.1.1. Síntesi d'estàndards de productes minoritaris trobats en olis tòxics	90
2.1.1.1. Obtenció del LOO(2,N',M)bisPAP	90
2.1.1.1.1. Síntesi del bisPAP	91
2.1.1.1.2. Síntesi de l'OO(N',M)bisPAP	92
2.1.1.1.3. Síntesi del LOO(2,N',M)bisPAP1	92
2.1.1.2. Obtenció de l'OL(1,M)PAP	93
2.1.1.2.1. Síntesi de l'OOL(1,2,M)PAP	93
2.1.1.2.2. Hidròlisi de l'OOL(1,2,M)PAP mitjançant lipases	94
2.1.1.2.3. Primer assaig de la hidròlisi química de l'OOL(1,2,M)PAP	95
2.1.1.2.4. Segon assaig de la hidròlisi química de l'OOL(1,2,M)PAP	95
2.1.1.2.5. Síntesi de l'OL(1,M)PAP	96
2.1.2. Obtenció de derivats del PAP per activació de microones	97
2.1.2.1. Síntesi del dPAP de l'àcid làuric	98
2.1.2.2. Optimització de la síntesi del PAP amb activació de microones	98
2.2. ESTUDIS DE LA MIGRACIÓ D'ACIL EN DERIVATS DEL PAP	101
2.2.1. Obtenció de derivats del PAP per a l'estudi de migració d'acil	102
2.2.1.1. Síntesi de l'O(M)PAP	103
2.2.1.2. Síntesi de l'OO(1,M)PAP	104
2.2.1.3. Preparació del mPAP de l'àcid hexanoic	105
2.2.1.4. Obtenció de l'hexanoat del 3-(fenilamino)propil (1)	106
2.2.1.4.1. Síntesi del 3-(fenilamino)propanol	106
2.2.1.4.2. Síntesi de l'hexanoat del 3-(fenilamino)propil (1)	107
2.2.1.5. Obtenció de l'N-hexanoil-3-(fenilamino)propanol (2)	108
2.2.1.6. Síntesi de l'hexanoat de l'N-hexil-3-(fenilamino)propil (3)	108
2.2.1.7. Obtenció de l'hexanoat del 2-hidroxi-4-fenilbutil (4)	109
2.2.1.7.1. Síntesi del 4-fenil-1,2-epoxibutà	109
2.2.1.7.2. Síntesi del 4-fenil-1,2-butandiol	110
2.2.1.7.3. Síntesi de l'hexanoat del 2-hidroxi-4-fenilbutil (4)	110

2.2.2.	Estudi de la migració d'acil en derivats del PAP acilats amb residus d'àcid oleic	111
2.2.2.1.	Estabilitat de l'O(1)PAP, O(2)PAP, O(M)PAP i OO(1,M)PAP en dissolució d'hexà i dissolució aquosa	112
2.2.2.2.	Estabilitat de l'O(1)PAP, O(2)PAP, O(M)PAP i OO(1,M)PAP en dissolució de MeOH:H ₂ O (90:10)	113
2.2.2.3.	Estabilitat dels mPAPs en condicions de resina àcida amberlyst 15, resina bàsica Florisil® i MeOH:H ₂ O (90:10, pH= 1.1)	114
2.2.3.	Estudis de la migració d'acil en derivats del PAP acilats amb residus d'àcid hexanoic	114
2.2.4.	Estudis de la migració en derivats del PAP acilats amb modificacions estructurals	115
2.3.	PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	119
2.3.1.	Síntesi d'estàndards de productes minoritaris trobats en olis tòxics	119
2.3.1.1.	Obtenció del LOO(2,N',M)bisPAP	119
2.3.1.1.1.	Síntesi del bisPAP	119
2.3.1.1.2.	Síntesi de l'OO(N',M)bisPAP	120
2.3.1.1.3.	Síntesi del LOO(2,N',M)bisPAP	120
2.3.1.2.	Obtenció de l'OL(1,M)PAP	121
2.3.1.2.1.	Síntesi de l'OOL(1,2,M)PAP	121
2.3.1.2.2.	Hidròlisi de l'OOL(1,2,M)PAP mitjançant lipases	122
2.3.1.2.3.	Primer assaig de la hidròlisi química de l'OOL(1,2,M)PAP	123
2.3.1.2.4.	Segon assaig de la hidròlisi química de l'OOL(1,2,M)PAP	123
2.3.1.2.5.	Síntesi de l'OL(1,M)PAP	123
2.3.1.3.	Obtenció de derivats del PAP per activació de microones	124
2.3.1.3.1.	Síntesi del dPAP de l'àcid làuric per activació de microones	124
2.3.1.3.2.	Optimització de la síntesi del PAP per activació de microones	125
2.3.2.	Obtenció de derivats del PAP per a l'estudi de migració d'acil	125
2.3.2.1.	Síntesi de l'OO(1,M)PAP	125
2.3.2.2.	Síntesi de l'O(M)PAP	126
2.3.2.3.	Obtenció de l'hexanoat del 3-(fenilamino)propil	126

2.3.2.3.1.	Obtenció del 3-(fenilamino)propanol	126
2.3.2.3.2.	Obtenció de l'hexanoat del 3-(fenilamino)propil	127
2.3.2.4.	Síntesi de l' <i>N</i> -hexanoïl-3-(fenilamino)propanol	128
2.3.2.5.	Síntesi de l'hexanoat de l' <i>N</i> -hexil-3-(fenilamino)propil	128
2.3.2.6.	Obtenció de l'hexanoat del 2-hidroxi-4-fenilbutil	129
2.3.2.6.1.	Síntesi del 4-fenil-1,2-epoxibutà	129
2.3.2.6.2.	Síntesi del 4-fenil-1,2-butandiol	129
2.3.2.6.3.	Síntesi de l'hexanoat del 2-hidroxi-4-fenilbutil	130
2.3.3.	Estudi de la migració d'acil en derivats del PAP acilats amb residus d'àcid oleic	131
2.3.3.1.	Estabilitat de l'O(1)PAP, O(2)PAP, O(<i>N</i>)PAP i OO(1, <i>N</i>)PAP en dissolució d'hexà	131
2.3.3.2.	Estabilitat de l'O(1)PAP, O(2)PAP i O(<i>N</i>)PAP en dissolució aquosa	131
2.3.3.3.	Estabilitat de l'O(1)PAP, O(2)PAP, O(<i>N</i>)PAP i OO(1, <i>N</i>)PAP en dissolució de MeOH:H ₂ O (90:10)	131
2.3.3.4.	Estabilitat dels mPAPs en condicions de resina àcida amberlyst 15, Florisil® i MeOH:H ₂ O (90:10, pH= 1.1)	132
2.3.4.	Estudi de la migració d'acil en derivats del PAP acilats amb residus d'àcid hexanoic	132
2.3.5.	Estudi de la migració d'acil en derivats estructurals del PAP acilats amb residus d'àcid hexanoic	132

2.1. SÍNTESI DE DERIVATS DEL PAP

Degut al desconeixement sobre la naturalesa de l'agent causant de la SOT, era important la identificació de tots els possibles derivats d'anilina formats durant la desodorització. Així doncs, en el nostre laboratori es plantejà obtenir una mostra d'oli desodoritzat afegint anilina marcada amb ^{14}C , per tal d'identificar de manera fàcil la formació dels productes obtinguts. Aquest treball es va dur a terme per la Dra. Anna Morató en col·laboració amb el grup del Dr. Joaquín Abian. Un cop realitzats els experiments amb producte radioactiu, els residus de la destil·lació s'enviaren al laboratori del Dr. Joaquín Abian, on s'han realitzat una sèrie d'anàlisis exhaustius per identificar el màxim nombre de derivats anilínics presents en els olis refinats. Els resultats d'aquest estudi han permès determinar un nombre elevat de derivats del PAP, alguns coneguts i altres desconeguts fins ara.^{45,47,65} Per tal d'ajudar en la identificació i confirmació d'alguns d'aquests compostos, el nostre laboratori va sintetitzar diversos productes de referència derivats de la família del PAP que havien estat descoberts en aquest estudi. En aquesta primera part del capítol II es descriu la síntesi dels compostos obtinguts en el laboratori amb aquesta finalitat.

2.1.1. SÍNTESI D'ESTÀNDARDS DE PRODUCTES MINORITARIS TROBATS EN ELS OLIS TÒXICS

Com s'ha esmentat en el capítol anterior i en la introducció, cal distingir la presència de dues famílies de productes en els olis tòxics. Per una banda, la família de les anilides i per l'altra la dels derivats del PAP. Precisament és d'aquesta última on s'han identificat una sèrie de productes minoritaris en anàlisis realitzades en el laboratori del Dr. Joaquín Abian en mostres model d'oli tòxic preparades al nostre laboratori emprant anilina marcada radioactivament. Per tal de poder identificar i caracteritzar inequívocament alguns d'aquests compostos, es proposà al nostre grup la síntesi de dos estàndards, els quals es mostren a la Figura 2.1. Com es pot veure, es tracta de derivats del PAP, concretament un és el derivat monoesterificat del PAP amb un residu d'acil en el grup amino (OL(1,N)PAP) i l'altre el derivat *N',N'*-diacilat esterificat en la posició 2 de l'anomenat bisPAP (LOO(2,N',N)bisPAP).

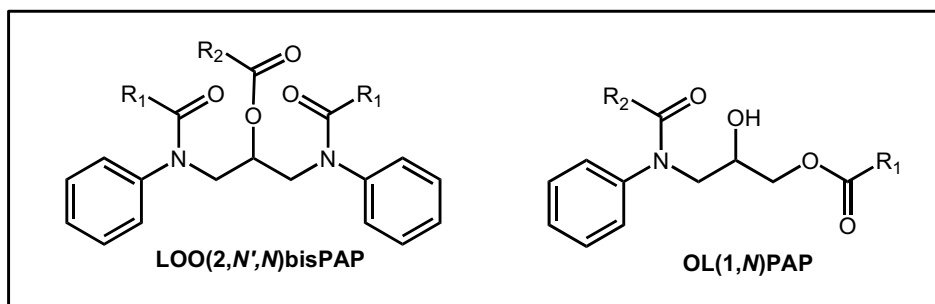


Figura 2.1. Estructures del LOO(2,N',N)bisPAP i l'OL(1,N)PAP, estàndards sintetitzats en el nostre laboratori per a la seva identificació en olis tòxics.

2.1.1.1. Obtenció del LOO(2,N',N)bisPAP

Com a ruta sintètica per a l'obtenció del LOO(2,N',N)bisPAP es plantejà utilitzar reaccions conegudes en la síntesi de derivats del PAP, com l'esterificació de l'alcohol, en aquest cas secundari, i l'acilació de l'amina (Figura 2.2). L'obtenció del bisPAP es faria a partir de la reacció de l'anilina i la clorhidrina (1-cloro-2-hidroxi-3-fenilaminopropà, disponible al laboratori), obtinguda a partir de la reacció de l'epiclorhidrina amb l'anilina.⁶⁶ Cal esmentar que el bisPAP és un altre dels productes de la família del PAP que han estat identificats en olis tòxics.

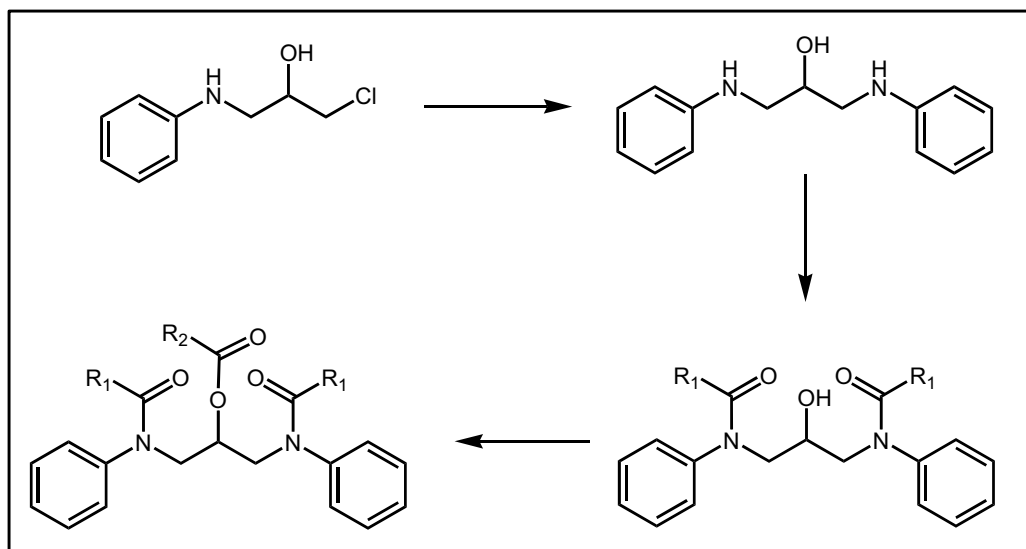


Figura 2.2. Ruta sintètica per a l'obtenció del LOO(2,N',N)bisPAP.

2.1.1.1.1. Síntesi del bisPAP

Per a l'obtenció del bisPAP s'emprà com a producte de partida la clorhidrina precursora, la qual es feu reaccionar amb l'anilina a 180 °C (Figura 2.3). L'anilina mateixa s'utilitzà com a dissolvent de la reacció per tal de maximitzar la reacció de l'amina primària respecte la secundària de la clorhidrina de partida. La reacció es controlà per CCF.

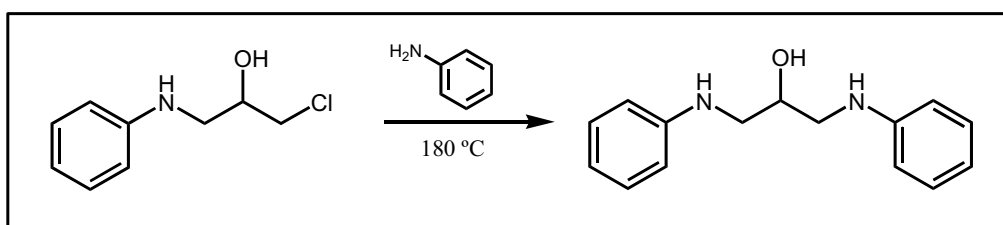


Figura 2.3. Síntesi del bisPAP a partir de la clorhidrina derivada del PAP i l'anilina.⁶⁶

A continuació, per disminuir la quantitat de cru que calia purificar, s'eliminà l'excés d'anilina per destil·lació a pressió reduïda. La purificació del cru es realitzà mitjançant CCF a escala preparativa. S'obtingué un rendiment del 40% del producte, ja que a la temperatura de la reacció augmentava la possibilitat de generació de subproductes, els quals donen al cru una textura que en complicava la purificació.

La caracterització espectroscòpica per ¹H-RMN del producte mostrà un espectre simplificat degut a la simetria del bisPAP. S'observà a 4.12 ppm un multiplet corresponent al CHOH. Per altra banda, a 3.36 i 3.20 ppm aparegueren dos dobles dobles corresponents als protons diastereotòpics del CHH(NHPh).

2.1.1.1.2. Síntesi de l'OO(N',M)bisPAP

El pas següent fou l'acilació de les dues amines del bisPAP utilitzant el clorur de l'àcid oleic amb trietilamina i benzè com a dissolvent (Figura 2.4).

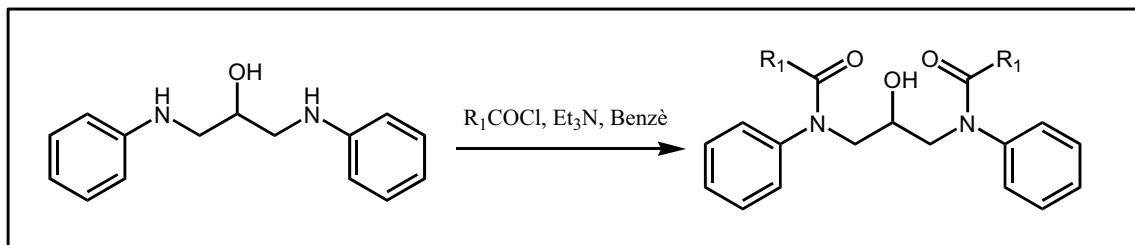


Figura 2.4. Síntesi de l'OO(N',N)bisPAP, a partir del bisPAP i del clorur de l'àcid oleic.

La reacció es dugué a terme a temperatura ambient i es controlà per CCF, on s'observà la formació de diversos productes més apolars que el bisPAP, alhora que també es veié que quedava producte de partida. La purificació del cru per columna de sílica-gel flaix conduí a una fracció, l'anàlisi per $^1\text{H-RMN}$ de la qual mostrà els protons CHHNHPh (3.48 i 3.20 ppm) i els CHHNCO (3.83 i 3.71 ppm), tot establint la presència de CH_2NH de producte que no havia estat totalment diacilat. Per tal d'obtenir únicament el derivat diacilat, aquesta fracció es tractà amb més clorur d'àcid, per acilar completament l'amina restant. D'aquesta manera es va obtenir el producte desitjat amb un rendiment del 70%.

La caracterització del producte final posà de manifest que l'acilació sobre les amines havia estat satisfactòria, ja que en l'espectre de $^1\text{H-RMN}$ aparegueren els dos dobles doblets corresponents als dos CHH(NCO) a camps més baixos que els corresponents sense acilar. Més concretament a 3.83 i 3.71 ppm, com a conseqüència de l'apantallament sofert per l'amida. En el cas del CH(OH) , l'addició dels grups acil sobre els NH provocà un desplaçament de 4.12 ppm fins a 3.95 ppm. La simetria de la molècula quedà confirmada en l'espectre de ^{13}C , ja que solament aparegué un únic senyal corresponent al CHHNCO a 54.1 ppm, així com també s'observà un únic senyal dels carbonis del residu d'àcid oleic i dels de l'anell aromàtic de l'anilina.

2.1.1.1.3. Síntesi del LOO(2,N',M)bisPAP

L'últim pas d'aquesta síntesi consistí en l'esterificació de l'alcohol secundari, fent servir 1.1 equivalents d'àcid linoleic i utilitzant com a agent condensant la DCC i com a catalitzador la DMAP (Figura 2.5).

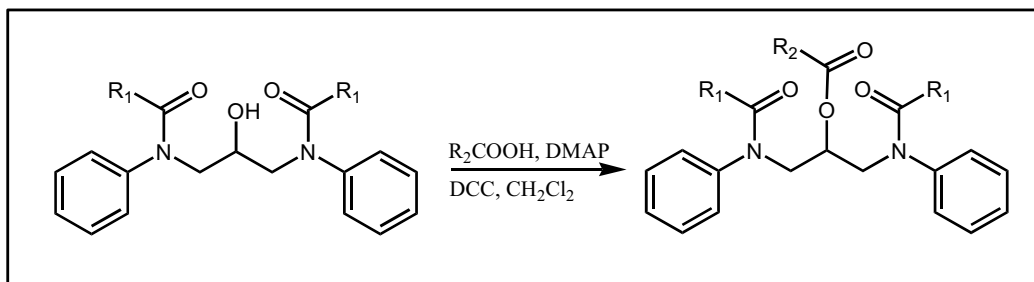


Figura 2.5. Esterificació de l'OO(N',N)bisPAP amb àcid linoleic per obtenir el LOO(2,N',N)bisPAP.

La reacció es controlà per CCF. Seguidament es feu el tractament del cru, amb l'evaporació del dissolvent i posterior eliminació de la DCU per precipitació en hexà fred. La purificació es dugué a terme per columna de sílica-gel flaix per obtenir el compost amb un rendiment del 89%. L'espectre de $^1\text{H-RMN}$ del derivat triacilat mostrà un multiplet a 5.15 ppm, el qual integrà un protó, corresponent al $\text{CH}(\text{OCOR}_2)$. Aquest desplaçament era més alt que l'observat en el CH del PAP. En tractar-se d'una molècula simètrica, a 3.95 ppm s'observà un multiplet corresponent als dos grups CHHNCO. En l'espectre de $^{13}\text{C-RMN}$ aparegueren a 173.5 ppm els dos carbonis quaternaris corresponents als NCOR_1 i a 173.1 ppm el carboni quaternari de l'ester OCOR_2 .

2.1.1.2. Obtenció de l'OL(1,N)PAP

Un cop obtingut el LOO(2,N',N)bisPAP, el següent producte a sintetitzar fou l'OL(1,N)PAP. Per a l'obtenció d'aquest es pensà en la ruta que emprés l'OO(1,2)PAP com a producte de partida, el qual s'acilaria sobre el nitrogen amb el residu de linoleïl, per obtenir el derivat triacilat. Un cop es tingués aquest, s'utilitzaria una lipasa pancreàtica per hidrolitzar el diester i obtenir el monoester. Una altra ruta més curta per obtenir l'OL(1,N)PAP seria la reacció directa del clorur de linoleïl amb l'O(1)PAP. Malgrat la primera ruta era la més llarga, ens interessava assajar-la perquè també es volia tenir producte de referència del triacilat. També volíem assajar la hidròlisi enzimàtica i química d'aquest compost, tot observant si el producte monoesterificat que s'obtingria experimentaria migració d'acil.

2.1.1.2.1. Síntesi de l'OOL(1,2,N)PAP

El primer pas consistí en la *N*-acilació de l'OOPAP. Aquesta reacció es realitzà igual que en l'apartat 2.1.1.1.2 (Figura 2.6).

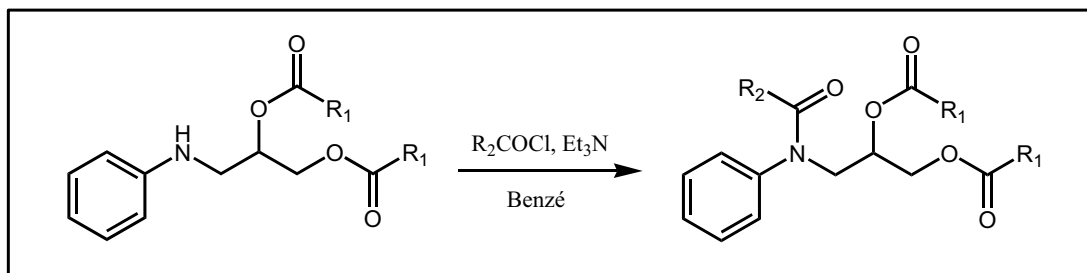


Figura 2.6. Reacció d'*N*-acilació de l'OOPAP per obtenir l'OOL(1,2,*N*)PAP.

Els controls de reacció per CCF mostraren la presència d'un compost majoritari més polar, just per sota de l'OOPAP, indicant que l'acilació de l'amina no conduïa a una variació important en la lipofília de l'OOPAP. La reacció s'aturà al cap de 16 hores i es purificà per columna de sílica-gel flaix. Un cop obtinguda la fracció purificada, s'aïllà el producte desitjat amb un rendiment del 89%.

En l'espectre de 1H -RMN de l'OOL(1,2,*N*)PAP s'observà que els protons del CH_2N experimentaren un canvi en el seu desplaçament químic respecte als de l'OOPAP. En l'OO(1,2)PAP s'observen a 3.35 ppm i en l'OOL(1,2,*M*)PAP a 3.93 ppm. També s'observaren a 2.7 ppm els Hs contigus als dos dobles enllaços de l'esquelet carbonat de l'àcid linoleic. La integració de la part dels àcids confirmava les dues unitats d'àcid oleic i una d'àcid linoleic. La presència de tres carbonis quaternaris corresponents als grups carboxi quedà confirmada en l'espectre de ^{13}C : 173.6 (CO), 173.3 (CO) i 173.0 (CO) ppm.

2.1.1.2.2. Hidròlisi de l'OOL(1,2,*M*)PAP mitjançant lipases

En estudis realitzats en laboratori³⁹ s'ha observat que les lipases pancreàtiques són capaces d'hidrolitzar els esters d'alcohols primaris en molècules com l'OO(1,2)PAP o l'O(1)PAP, de la mateixa manera que ocorre amb els triglicèrids naturals (Figura 2.7).

Basant-nos en aquest fet, es pensà que es podrien utilitzar lipases per hidrolitzar l'OOL(1,2,*M*)PAP. Es prepararen dues mostres on es posà en cadascuna el compost triacilat, la lipasa pancreàtica i la colipasa necessària. Una tercera mostra s'utilitzà com a blanc, on solament hi havia el substrat sense lipasa ni colipasa, per tal d'observar-ne l'estabilitat en aquestes condicions. Totes les mostres es dissolgueren en un tampó (tris-HCl) a pH=8.0. Per tal de controlar l'evolució de la reacció, s'analitzaren mostres que havien estat extretes amb CH_2Cl_2 :IPA (90:10) amb un 0.1% de NH_4OH , condicions optimitzades anteriorment.

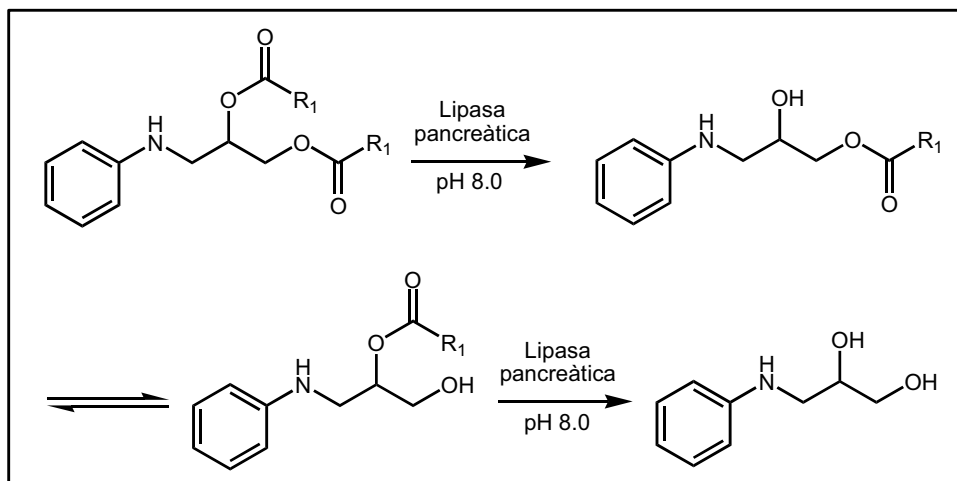


Figura 2.7. Hidròlisi enzimàtica del dPAP mitjançant lipasa pancreàtica.

De l'anàlisi per HPLC en fase directa d'aquestes extractes s'observà que en totes tres mostres el producte de partida es mantenia sense canvis. No apareixia cap producte més polar, que és el que es podria esperar s'hi s'hagués produït la hidròlisi d'un o dels dos grups ester de l'OOL(1,2,M)PAP. En definitiva, és possible que el nitrogen de l'anilina acilat hagués creat un impediment sobre l'enzim que impossibilités la seva acció, o també que la gran lipofília del substrat no afavorís la dissolució d'aquest en el medi esmentat.

2.1.1.2.3. Primer assaig de la hidròlisi química de l'OOL(1,2,M)PAP

En no observar-se hidròlisi de l'OOL(1,2,M)PAP utilitzant la lipasa pancreàtica, es decidí realitzar un assaig utilitzant NaOH 0.1 M, per tal de veure si la via química era més efectiva. L'assaig consistí en la dissolució del triacilat en THF que contenia un 10% de NaOH 0.1 M (v/v). Els controls per HPLC (eliminant el dissolvent orgànic, afegint-hi aigua i extraient amb hexà), mostraren que el compost triacilat tampoc havia reaccionat.

2.1.1.2.4. Segon assaig de la hidròlisi química de l'OOL(1,2,M)PAP

El pas següent fou la realització d'un segon assaig també amb NaOH, però aquest cop de concentració més elevada (0.7 M). En aquest assaig s'utilitzà com a dissolvent dioxà en un 20% (v/v). La reacció durant les primeres quatre hores fou a temperatura ambient, escalfant-se lleugerament a 45°C durant les tres hores següents. Els controls de la reacció es feren per CCF (hexà:AcOEt, 2:1), tot observant l'aparició de tres taques més polars per sota del substrat de partida, dues consecutives, amb r_f aproximats de 0.5 i una tercera que quedava just a la base. Les dues primeres corresponien presumiblement als productes monohidrolitzats i la inferior al diol.

En acabar la reacció, s'eliminà el dissolvent i s'hi afegí aigua per poder realitzar una extracció amb hexà i poder analitzar les mostres per HPLC en fase directa. El cromatograma que s'obtingué mostrà la presència d'un pic majoritari molt polar a 12.2 min, amb UV de derivat *N*-acilat (absorció a 230 nm), corresponent al producte hidrolitzat per les posicions 1 i 2, ja que presentà temps de retenció similars al patró de PAP, tenint en compte que l'acilació del nitrogen no provocà una variació molt significativa del temps de retenció en el gradient utilitzat. En el cromatograma també s'observà la presència de producte de partida i en menor quantitat, gairebé inapreciable, la presència de producte monohidrolitzat amb $t_r = 7.9$ min (Figura 2.8), també amb t_r semblant al dels mPAPs.

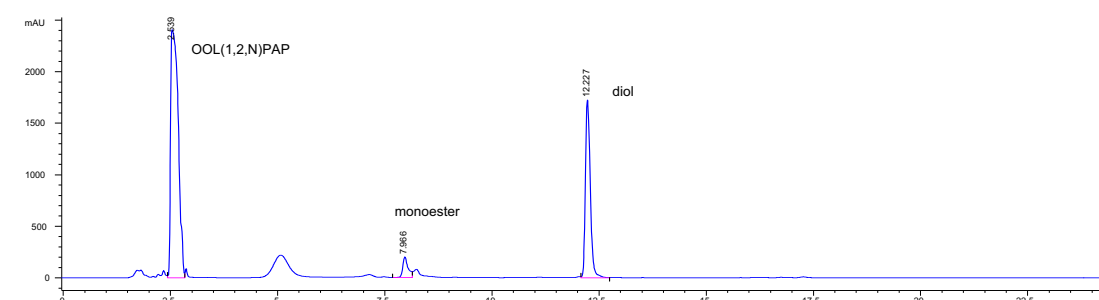


Figura 2.8. Control per HPLC en fase directa de la hidròlisi química de l'OOL(1,2,N)PAP amb NaOH 0.7 M.

Per tant, la utilització de NaOH més concentrada no ens proporcionà els productes monoesterificats, sinó que donà majoritàriament el producte amb els dos esters hidrolitzats. Per aquest motiu es procedí a realitzar l'obtenció de l'OL(1,M)PAP a partir d'una nova via.

2.1.1.2.5. Síntesi de l'OL(1,M)PAP

Degut als resultats obtinguts en els experiments anteriors, es plantejà una via més ràpida per obtenir l'OL(1,M)PAP. La reacció consistí en afegir el clorur de l'àcid linoleic sobre una dissolució d'O(1)PAP (assequible al laboratori), en benzè i trietilamina (Figura 2.9).

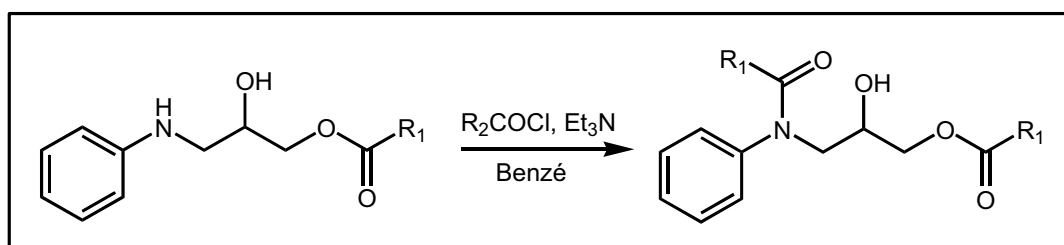


Figura 2.9. Síntesi de l'OL(1,N)PAP a partir de l'O(1)PAP i el clorur de l'àcid linoleic.

El seguiment de la reacció per CCF mostrà l'aparició d'un producte més apolar just per sobre de l'O(1)PAP, el qual fou purificat per columna de sílica-gel flaix per donar el producte desitjat amb un rendiment del 80%.

En l'espectre de ^1H -RMN de l'OL(1,N)PAP s'observà un banda d'absorció complexa a 4.07 ppm en la qual apareixien els protons CHHN, CH(OH) i CHH(OCOR). A 5.34 ppm apareixien els senyals dels protons dels dobles enllaços, els quals integraren 6, corresponents als dos residus d'àcid gras: 4 de l'àcid linoleic i dos de l'oleic. En l'espectre de ^{13}C -RMN aparegueren a 69.4, 65.9 i 54.1 ppm els carbonis corresponents al CH(OH), $\text{CH}_2(\text{O}_2\text{CR}_1)$ i CHH(NCO) respectivament. Una banda ampla a 3407 cm^{-1} en l'espectre d'IR va permetre confirmar la presència d'un grup alcohol en la nostra molècula.

En resum, els següents derivats del PAP: LOO(2,N',M) i OL(1,M)PAP es van sintetitzar i caracteritzar a partir de la metodologia prèviament optimitzada en el nostre laboratori. Els rendiments van ser acceptables, ja que les reaccions transcorregueren sense la formació important de subproductes importants. Aquest productes es van enviar al grup Dr. Joaquín Abian.⁶⁵

2.1.2. OBTENCIÓ DE DERIVATS DEL PAP PER ACTIVACIÓ DE MICROONES

Fins ara, la principal manera de subministrar energia a les reaccions químiques ha estat mitjançant l'aplicació de calor als recipients de reacció. S'han emprat diverses eines, com són: les mantes tèrmiques, els banys d'oli i altres utensilis. Però no ha estat fins en els últims anys quan s'ha començat a introduir la radiació de microones com a mètode per activar les reaccions químiques. Aquesta nova tècnica està passant de ser utilitzada com una simple novetat a esdevenir poc a poc una eina més en els laboratoris. L'eficiència de l'activació mitjançant microones en els temps de reacció és la principal qualitat d'aquesta tècnica, capaç de reduir els temps de reacció de dies i hores, a minuts i segons.

En l'última dècada la síntesi per microones ha experimentat una gran millora, la qual ha permès desenvolupar aparells tecnològicament avançats i alhora ha afavorit la incorporació d'aquests aparells en els laboratoris de química com a eines rutinàries i imprescindibles. Aquest és el cas del nostre laboratori, on recentment s'ha incorporat un aparell de microones per tal de realitzar diverses tasques de síntesi de compostos. Aquest fet facilità la realització d'una sèrie de proves per veure quina podia ser l'aplicació de l'aparell de microones per obtenir derivats del PAP. Com a model inicial s'escollí una reacció prou coneguda per nosaltres com era la formació del derivat diesterificat.

2.1.2.1. Síntesi del dPAP de l'àcid làuric

Com a model s'escollí el derivat diesterificat amb àcid làuric. Com s'ha esmentat, la esterificació del PAP mitjançant un àcid gras, DCC i DMAP com a catalitzador era una reacció coneguda i emprada al laboratori; per això es va voler veure si utilitzant aquestes mateixes condicions es podia optimitzar el temps de reacció (aproximadament 3-4 h) i si més no, els rendiments, els quals que oscil·laven entre 70-90%.

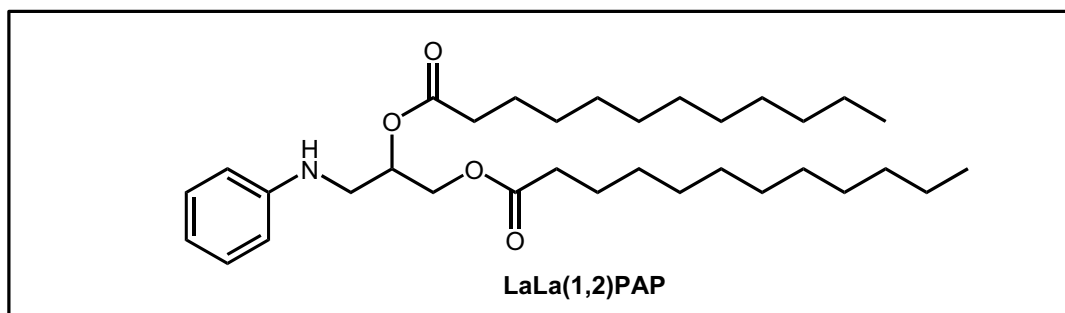


Figura 2.10. Estructura del LaLa(1,2)PAP.

Per millorar les condicions anteriorment esmentades es va assajar la reacció en un tub tancat adient per acoblar-lo a l'aparell de microones, on s'hi posà el PAP, l'àcid làuric, la DCC, la DMAP i com a dissolvent diclorometà. Les condicions que es van establir van ser: 5 minuts a 50 °C. Durant la reacció es van assolir pressions que no van superar en cap cas les 3 psi. El cru de la reacció es va analitzar per HPLC i es va observar que la conversió va ser quasi completa. La purificació mitjançant columna de sílica-gel flaix emprant hexà:AcOEt (9:1) va permetre obtenir el producte desitjat amb un rendiment del 80%.

Així doncs, la utilització de la radiació de microones per a la síntesi d'esters del PAP és un procediment avantatjós respecte la síntesi tradicional en dissolució, ja que permet reduir els temps de reacció d'hores a pocs minuts, obtenint el producte desitjat amb rendiments similars i el que és més important, sense formació de productes secundaris.

2.1.2.2. Optimització de la síntesi del PAP amb activació de microones

Un cop observada la millora substancial observada en l'obtenció de derivats diesterificats del PAP, es va estudiar quina influència presentava la radiació de microones en la formació del PAP, una altra de les reaccions més utilitzades i optimitzades en el laboratori com a pas clau per preparar derivats del PAP i com a font d'obtenció del mateix PAP.

Com a productes de partida per obtenir el PAP es van utilitzar els mateixos que en la síntesi convencional, és a dir, anilina, glicidol (en excés) i TEA. En canvi, es van emprar tres

dissolvents diferents: MeOH, IPA i TFM, per tal de veure si la seva diferència d'acidesa tenia alguna influència en la reacció. En la síntesi convencional en dissolució la reacció té lloc a 80°C durant 5 hores i 30 min. Per adaptar aquestes condicions a l'aparell de microones es va escollir realitzar la reacció en un tub tancat a 105 °C durant 10 min. El principal problema d'aquesta reacció consisteix en la formació d'un subproducte resultant de la reacció del PAP amb el glicidol, ja que l'amina del PAP es tan reactiva o més que l'anilina. Per això en les anàlisis dels crus es va determinar tant el producte de partida (anilina), com el producte desitjat (PAP) i finalment el subproducte.

Taula 2.1. Resultats obtinguts en les diferents condicions de dissolvent emprades en assajos de 10 min per obtenir PAP mitjançant radiació de microones.

	Anilina %	PAP %	Subproducte %
MeOH	32	50	14
IPA	62	26	12
TFM	17	57	21

Com es pot observar en els resultats anteriors amb la utilització de TFM, la conversió a PAP és més gran que en els altres casos però, també és la reacció en la qual es forma més subproducte. D'altra banda, en el cas de la utilització del IPA s'observa una menor formació de subproducte, però, també menys formació de PAP. Per tant, de tots els dissolvents, el que presenta la millor relació PAP:subproducte és el MeOH.

A continuació es van forçar una mica les condicions per veure com evolucionava cadascun dels crus. Per això es van posar a reaccionar durant 10 min més a 105 °C, obtenint els resultats que es mostren a la Taula 2.2:

Taula 2.2. Resultats obtinguts en les diferents condicions de dissolvent emprades en assajos per obtenir PAP mitjançant radiació de microones durant 20 min.

	Anilina %	PAP %	Subproducte %
MeOH	5	69	20
IPA	38	33	19
TFM	20	51	22

El fet d'allargar 10 min més la reacció en el cas del metanol va causar una major conversió i una major formació de subproducte. Amb alcohol isopropílic va passar el mateix. Pel que fa al TFM, la reacció no va reflectir cap canvi significatiu.

Per tant, els resultats ens van mostrar que la millor relació PAP/subproducte s'obtenia quan s'utilitzava com a dissolvent el MeOH durant 20 min a 105°C.

Tots aquests resultats suggereixen que l'activació amb microones és útil per a les reaccions de formació del PAP i dels seus derivats.

2.2. ESTUDIS DE LA MIGRACIÓ D'ACIL EN DERIVATS DEL PAP

Els triglicèrids constitueixen la major fracció dels lípids neutres en la majoria dels organismes vius. Segons la nomenclatura tradicional dels triglicèrids, els hidroxils primaris es troben en la posició α i α' , mentre que l'hidroxil secundari es troba en la posició β . Normalment els grups hidroxil es troben esterificats amb cadenes d'àcids grassos i són aquestes les que poden experimentar una propietat descrita des de fa temps en els triglicèrids: la migració d'acil. La migració d'acil en els glicèrids s'entén com la transferència intramolecular d'un àcid gras d'un grup hidroxil a un altre adjacent, que segons Serdarevich⁶⁷ pot tenir lloc via la formació d'un intermedi cíclic, com es mostra a la Figura 2.11. La migració d'acil en glicèrids pot tenir lloc tant en els diglicèrids com en els monoglicèrids. En el cas dels monoglicèrids el grup acil és més estable en la posició α ; per tant, l'acil en la posició β migra espontàniament a la posició α . En conseqüència, els 1-monoglicèrids i els 1,3-diglicèrids són els glicèrids termodinàmicament més estables. La composició en equilibri dels monoglicèrids és aproximadament del 90% d'1-monoglicèrid i del 10% de 2-monoglicèrid. En canvi, per als diglicèrids és del 40% d'1,2(2,3)-diglicèrid i del 60% d'1,3-diglicèrid.⁶⁷ Les diferències en la concentració d'equilibri entre monoglicèrids i diglicèrids es poden explicar gràcies a les

interaccions de van der Waals i hidrofòbiques entre les cadenes d'àcid gras adjacents. En els 1,2-diglicèrids les dues cadenes d'àcid gras estan molt pròximes estabilitzant així el diglicèrid.

Quan es parla de diglicèrids el procés és el mateix que en els monoglicèrids, però en aquest cas una posició terminal està ocupada per un grup acil, produint-se la migració a l'únic alcohol lliure del glicèrid. La migració de grups acil pot tenir lloc en condicions àcides, bàsiques, en resines d'intercanvi iònic o amb calor⁶⁸ i a més, s'han descrit altres factors que poden influenciar en la migració d'acil en els triglicèrids, com és la llargada de la cadena del grup acil.⁶⁹ Un possible mecanisme de transferència de grups acil es mostra en la Figura 2.11. Fisher (1920) va postular que la migració de grups acil té lloc mitjançant un intermedi cíclic resultant de l'atac nucleòfil de l'oxigen de l'hidroxil sobre el grup carbonil veí. La formació de l'isomer termodinàmicament més estable té lloc en una segona etapa mitjançant un nou atac del grup hidroxil sobre el carbonil.

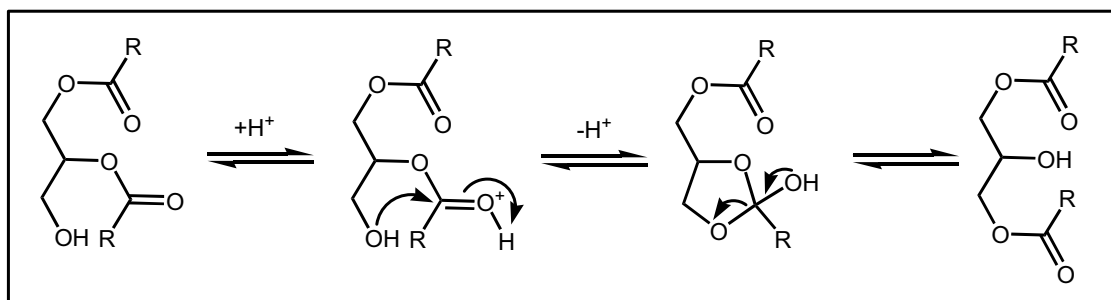


Figura 2.11. Mecanisme proposat per a la migració d'acil d'un 2,3-diglicèrid.^{70,71,67}

Amb el coneixement de la migració d'acil en els triglicèrids ens vam plantejar investigar si aquesta migració també ocorria en els derivats del PAP, compostos estructuralment similars als triglicèrids. En referència a la migració d'acil es pretenia identificar quin era el grau de mimetisme entre aquests dos grups de compostos. L'estudi de la migració d'acil en derivats del PAP era important per diversos motius. Primer, per conèixer l'estabilitat d'aquests derivats en determinades condicions, ja que aquesta podria influenciar durant el procés de síntesi, així com en l'obtenció dels compostos purs. Alhora, també era important conèixer la possibilitat de migracions d'acil en els derivats del PAP per comprendre millor algunes possibles interrelacions entre diferents derivats del PAP en el si de la matriu d'oli.

2.2.1. OBTENCIÓ DE DERIVATS DEL PAP PER A L'ESTUDI DE MIGRACIÓ D'ACIL

Per realitzar l'estudi de migració d'acil se'ns va plantejar la necessitat de sintetitzar determinats productes model. En aquests compostos es distingeixen principalment dos grups: un on hi ha derivats del PAP acilats amb diferent nombre de grups acil i diferents tipus de residus d'àcid gras; entre aquests hi ha: l'O(N)PAP, l'OO(1,N)PAP, l'OOO(1,2,N)PAP i

l'H(1)PAP. En l'altre hi ha compostos estructuralment similars als derivats del PAP però amb determinades modificacions, com són l'eliminació de l'alcohol secundari i l'eliminació de l'amina (compostos **1**, **2**, **3** i **4**, vegeu Figura 2.12). L'objectiu d'aquestes modificacions era veure la influència dels grups eliminats en el procés de migració d'acil. En l'estudi també s'utilitzaren els derivats monoesterificats en la posició 1 i en la posició 2 (O(1)PAP, O(2)PAP). Aquest darrers compostos eren disponibles ja que formen part del grup de substàncies que el laboratori sintetitza com a estàndards per a diferents estudis de la SOT.

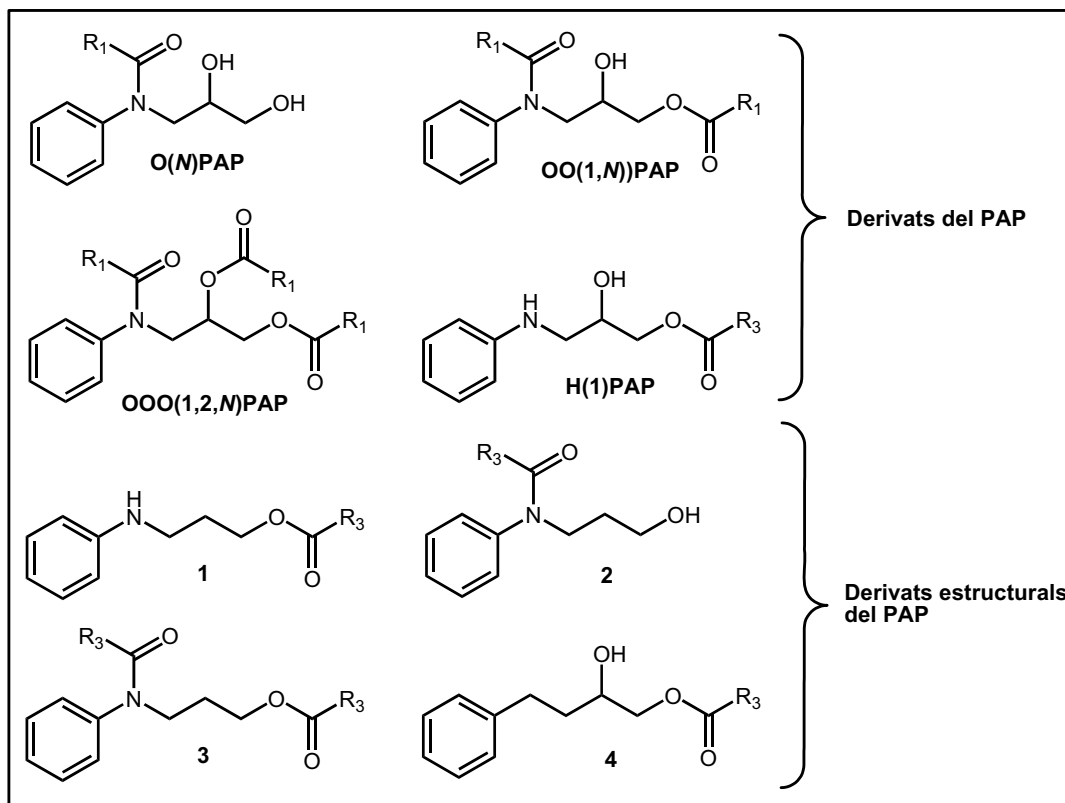


Figura 2.12. Compostos model emprats en l'estudi de migració d'acil en derivats del PAP.

2.2.1.1. Síntesi de l'O(N)PAP

L'interès en aquest compost anava encaminat a estudiar la capacitat migradora del grup acil de l'amina del PAP quan hi havia els dos grups alcohols lliures. Per tant, es volia observar si el grup acil en determinades condicions podia migrar fins a l'alcohol secundari i si un cop en aquest fins i tot podia arribar a migrar a l'alcohol primari.

La preparació del PAP *N*-acilat es realitzà a partir de la reacció del PAP sobre un clorur d'àcid, en aquest cas concretament el clorur de l'àcid oleic. La purificació es realitzà per columna de sílica-gel flaix, obtenint el producte final amb un rendiment del 50%. El rendiment fou relativament baix ja que el clorur d'àcid va reaccionar en part amb l'alcohol primari.

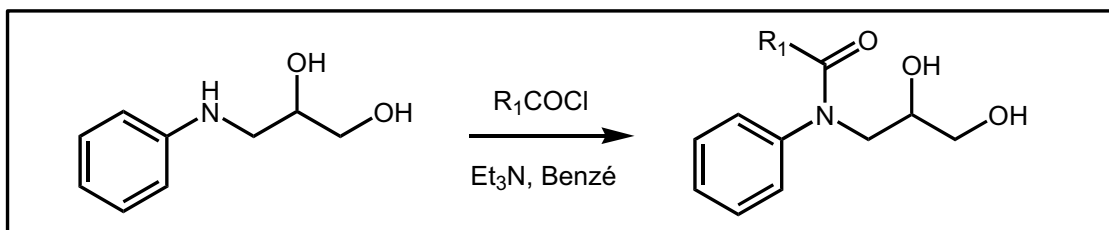


Figura 2.13. Obtenció de l'O(N)PAP a partir del PAP i el clorur d'àcid oleic.

L'espectre de ^1H -RMN de l'amida desitjada va permetre observar com la introducció del grup acil s'havia produït correctament, ja que els protons diastereotòpics del CH_2 en α a l'amina havien experimentat un desplaçament fins a 3.81-3.70 ppm. A més, l'espectre de ^{13}C -RMN mostrà la presència del carboni corresponent a l'amida a 175.7 ppm, així com els tres carbonis principals de l'esquelet a 70.3 ppm, 63.7 ppm i 52.7 ppm. Això mostrà com el carboni corresponent al CH_2N experimentà un desplaçament de 46.6 ppm, on surt en el PAP, fins a 52.7 ppm en el cas del O(N)PAP. Finalment, l'espectre de HPLC-MS mostrà l'ió molecular més sodi a m/z 454.3, confirmant la presència del compost desitjat.

2.2.1.2. Síntesi de l'OO(1,N)PAP

L'OO(1,N)PAP es va escollir com un altre compost per estudiar les propietats de migració dels seus grups acil, ja que era interessant alhora de veure si qualsevol dels seus dos grups acils, tant el present en l'alcohol primari, com en l'amina secundària podien migrar cap a l'únic grup alcohol lliure del compost, el secundari.

L'obtenció de l'OO(1,N)PAP es realitzà a partir de la *N*-acilació de l'O(1)PAP. Es procedí de manera igual que en l'apartat 2.2.1.1. La purificació del cru es realitzà per columna de sílica-gel flaix. S'obtingueren 42 mg d'un oli groc amb un rendiment del 82%, un rendiment més elevat que en el cas anterior ja que l'alcohol primari en aquest cas es trobava esterificat.

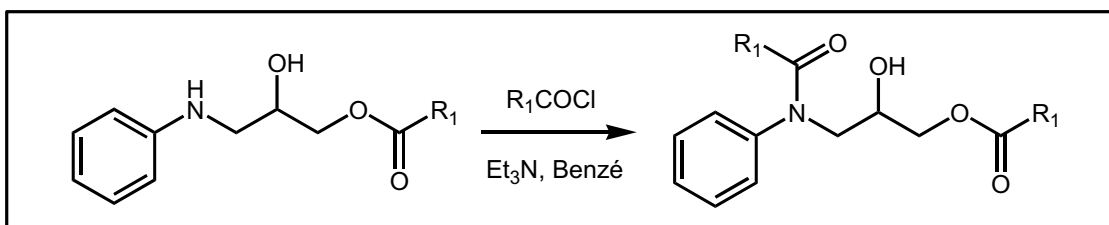


Figura 2.14. Preparació de l'OO(1,N)PAP a partir de la reacció de l'O(1)PAP amb el clorur d'àcid oleic.

En l'espectre de ^1H -RMN d'aquest derivat diacilat s'observà una banda d'absorció complexa a 4.06 ppm en la qual es solaparen els següents protons CHHN, CH(OH) i CHH(OCOR), ja que els protons del grup CH_2N van experimentar un desplaçament cap a ppm's superiors respecte al O(1)PAP. A més, a 5.34 ppm apareixen els senyals dels protons dels dobles enllaços, els quals integraren un total de 4. Respecte a l'espectre d'HPLC-MS, ens mostrà l'ió molecular més sodi a 718.5.

2.2.1.3. Preparació del mPAP de l'àcid hexanoic

L'estudi que es pretenia realitzar per a determinar les característiques de migració presents en els derivats del PAP no solament es va centrar en el fet de si existia o no existia algun tipus de migració, sinó que també es volia observar si aquest migració estava influenciada d'alguna manera per la llargada de la cadena carbonada dels residus d'àcids grassos. Per això, es plantejà la síntesi d'alguns derivats en els quals els substituents haurien de ser un àcid amb una cadena carbonada més curta. L'àcid que es va escollir va ser l'hexanoic.

Per a l'obtenció de l'H(1)PAP es va utilitzar la mateixa metodologia emprada en la síntesi de l'O(1)PAP.

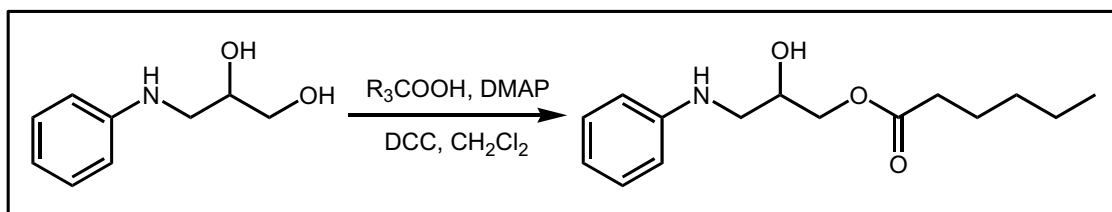


Figura 2.15. Obtenció de l'H(1)PAP a partir del PAP i l'àcid hexanoic.

El control de la reacció es va realitzar mitjançant HPLC en fase directa (mètode NOCR6). Aquesta tècnica, com en el cas de l'obtenció de l'OPAP, va permetre observar la formació del derivat monoesterificat en la posició 1 i en menor quantitat el derivat monoesterificat en la posició 2. Un cop eliminades la urea per filtració i mentre es tenia el cru de la reacció en dissolució d'hexà, es va veure com apareixien uns cristalls prims i allargats incoloros, els quals corresponien al producte desitjat. El cru es va purificar per cristal·lització, emprant hexà.

L'anàlisi per HPLC i CG va mostrar la presència d'un únic pic que corresponia a l'H(1)PAP. A més l'espectre de ^1H -RMN va facilitar l'assignació dels pics al producte esperat. Calia destacar el desplaçament del CH_2 continu a l'alcohol primari fins a 4.20 ppm degut a la esterificació amb l'àcid hexanoic, característica comú en tots els derivats monoesterificats del PAP. L'esterificació del PAP també va quedar palesa en l'espectre de ^{13}C -RMN en observar els

tres carbonis de l'esquelet principal que sortiren a 68.56, 66.42 i 46.57 ppm, desplaçaments que coincideixen amb els de l'O(1)PAP.

2.2.1.4. Obtenció de l'hexanoat del 3-(fenilamino)propil (1)

Com s'ha esmentat anteriorment, per realitzar l'estudi de migració d'acil es va plantejar la necessitat de sintetitzar determinats derivats del PAP amb unes certes diferències estructurals. Aquest era el cas de l'hexanoat de 3-(fenilamino)propil, on la diferència estructural en el producte que es volia obtenir era la substitució de l'alcohol secundari del PAP per un protó (Figura 2.16). Amb aquesta modificació es volia veure si aquest grup hidroxil tenia algun tipus d'intervenció en els processos de migració en els derivats del PAP.

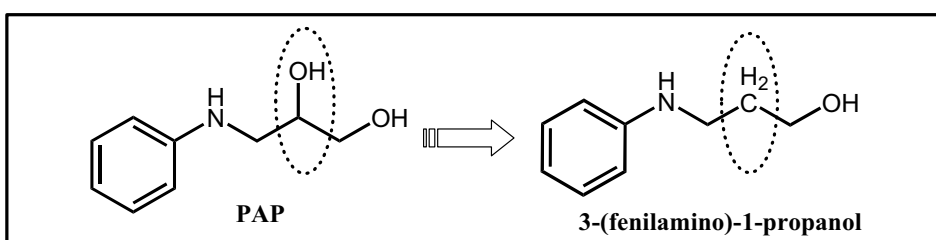


Figura 2.16. Canvis estructurals introduïts en el C2 del PAP per estudiar la seva influència en els processos de migració d'acil d'aquests compostos.

L'obtenció d'aquest producte es va realitzar en dues etapes. Primer es va fer l'addició de l'anilina sobre el 3-cloro-1-propanol i tot seguit es va esterificar l'alcohol primari.

2.2.1.4.1. Síntesi del 3-(fenilamino)propanol

La preparació d'aquest producte es feu a partir del 3-cloro-1-propanol i anilina. La reacció de substitució del clor per l'anilina es va realitzar utilitzant la pròpia anilina com a dissolvent i a reflux.

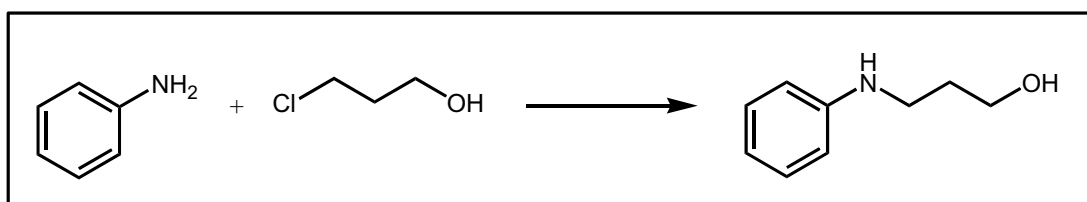


Figura 2.17. Formació del 3-(fenilamino)propanol⁷² a partir de la reacció entre l'anilina i el 3-cloro-1-propanol.

L'anàlisi del cru mitjançant HPLC en fase directa va permetre controlar la reacció, la qual finalitzà al cap de 10 h. El cromatograma, a més de la desaparició d'anilina i l'aparició d'un producte majoritari a 10 min corresponent al producte desitjat, va permetre veure la formació d'un subproducte corresponent a l'anilina dialquilada, amb un temps de retenció de 13.8 min en les condicions d'elució emprades (mètode TETROL, vegeu punt 1.4.1), i que era consistent amb la polaritat més gran del producte degut a la presència de dos grups hidroxil.

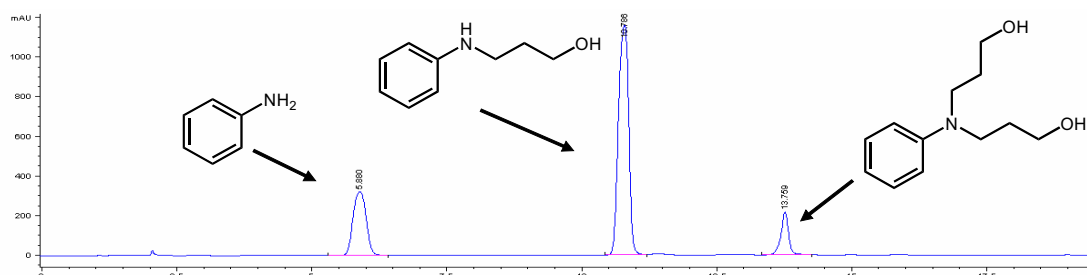


Figura 2.18. Perfil d'HPLC en fase directa del cru de la reacció d'obtenció del 3-(fenilamino)propanol a partir de l'anilina i del 3-cloro-1-propanol.

Finalment, la purificació per columna de sílica-gel eluint amb una barreja Et₂O:CH₂Cl₂ (9:1), va conduir al producte desitjat amb un rendiment del 12%. L'estructura de l'aminoalcohol desitjat es va confirmar per ¹H-RMN, en observar el desplaçament del CH₂ continu al nitrogen fins a 3.23 ppm dels 3.68 ppm del producte de partida. També es va poder observar un lleuger desplaçament del CH₂ de la posició 2 de 2.86 ppm a 1.83 ppm.

2.2.1.4.2. Síntesi de l'hexanoat del 3-(fenilamino)propil (1)

El pas que es va seguir a continuació va ser l'esterificació del 3-(fenilamino)propanol amb àcid hexanoic, DCC, DMAP com a catalitzador i com a dissolvent CH₂Cl₂.

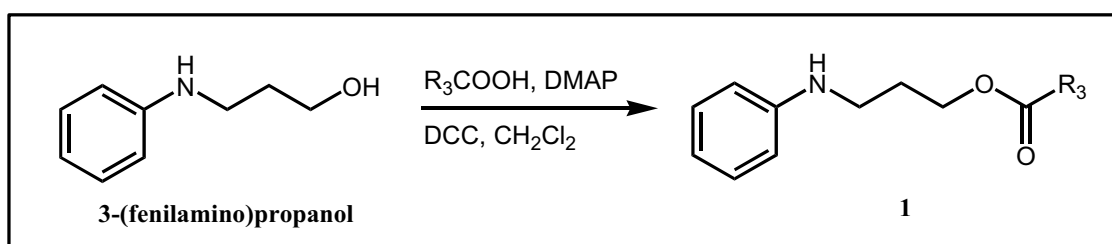


Figura 2.19. Obtenció del compost **1** a partir del 3-(fenilamino)propanol

La reacció es va controlar per CCF i HPLC en fase directa, el que va permetre observar que el producte de partida es va consumir al cap de 3 h. El producte desitjat es va obtenir amb un 70% de rendiment després d'una purificació per columna de sílica-gel flaix. L'espectre de ¹H-RMN va mostrar com l'esterificació de l'alcohol s'havia produït de forma satisfactòria, ja

que el CH₂ continu a l'alcohol en el producte de partida havia experimentat un desplaçament des de 3.7 ppm fins a 4.2 ppm. A més l'espectre de GS-MS mostra el pic molecular del compost **1** a 249.13.

2.2.1.5. Obtenció de l'*N*-hexanoïl-3-(fenilamino)propanol (**2**)

Aquest compost presentava la mateixa modificació estructural present en el compost de l'apartat anterior, però amb la diferència que el grup acil es troba sobre el nitrogen. Amb això, es volia determinar si existia algun tipus de possibilitat de migració del grup acil des del nitrogen fins a l'alcohol primari, sense la presència de l'alcohol en la posició 2.

Aquest compost es va sintetitzar a partir de la reacció del 3-(fenilamino)propanol amb un excés d'equivalents del clorur de l'àcid hexanoic, en presència d'un equivalent de TEA, tot dissolt en CH₂Cl₂.

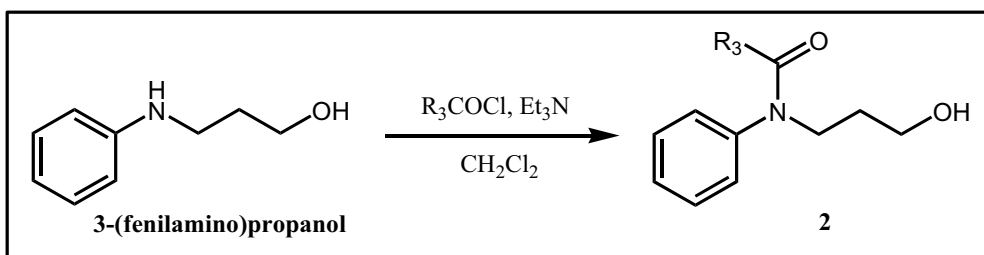


Figura 2.20. Obtenció del compost **2** a partir del 3-(fenilamino)propanol.

El control de la reacció es va realitzar per HPLC en fase directa (mètode NOCR6, vegeu punt 1.4.1), el que va permetre observar la desaparició del producte de partida de forma molt ràpida. En aquest cas la purificació es va realitzar mitjançant HPLC a escala preparativa, en condicions isocràtiques amb un 85% d'ACN i un 15% d'aigua. El rediment final de la reacció va ser del 40%. L'observació del pic molecular a 250.2 (M+H)⁺ i de l'adducte 272.2 (M+Na)⁺ per HPLC-MS així com l'assignació per RMN de ¹H i ¹³C ens confirmà la presència del producte desitjat.

2.2.1.6. Síntesi de l'hexanoat de l'*N*-hexil-3-(fenilamino)propil (**3**)

L'obtenció d'aquest compost es va realitzar durant la purificació del cru de la reacció realitzada en l'apartat 2.2.1.5, ja que l'hexanoat de l'*N*-hexil-3-(fenilamino)propanol es va obtenir com a un subproducte de la reacció. L'espectre de ¹H-RMN va permetre determinar l'acilació de l'amina i l'esterificació de l'alcohol del 3-(fenilamino)propanol, gràcies a

l'observació del CH_2CO a 4.1 ppm i el CH_2NCO a 3.7 ppm. Altrament, l'anàlisi per HPLC-MS mostrarà el pic molecular esperat a 348.3 $(\text{M}+\text{H})^+$ així com el pic molecular més sodi a 370.3.

2.2.1.7. Obtenció de l'hexanoat del 2-hidroxi-4-fenilbutil (4)

Un altre dels compostos considerats per a l'estudi de migració d'acil va ser el producte **3**. L'estructura d'aquest compost té una cadena formada per 4 àtoms de carboni on el C1 i el C2 presentaven dos grups hidroxil, mentre que C4 es troba unit a un fenil. Com s'observa en l'esquema, la principal diferència amb el PAP es troba en l'absència del nitrogen anilínic.

La síntesi es va plantejar de la següent manera: s'escollí com a producte de partida el 4-fenilbutè, fàcilment assequible. Aquest alquè es podria oxidar al corresponent epòxid, el qual es podria derivatitzar a diol mitjançant una hidròlisi. Finalment, el darrer pas seria la formació de l'ester de l'alcohol primari.

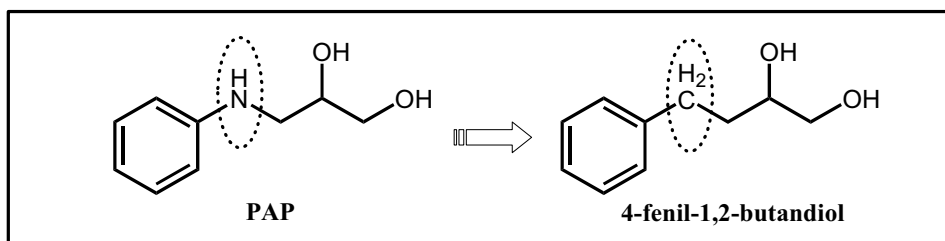


Figura 2.21. Canvis estructurals introduïts en el nitrogen del PAP per tal d'estudiar la seva influència en els processos de migració d'acil d'aquests compostos.

2.2.1.7.1. Síntesi del 4-fenil-1,2-epoxibutà

Aquesta reacció es realitzà mitjançant l'oxidació del doble enllaç utilitzant l'àcid m-perclorobenzoic (mCPBA), un dels peroxiàcids més emprats alhora de forma epòxids.

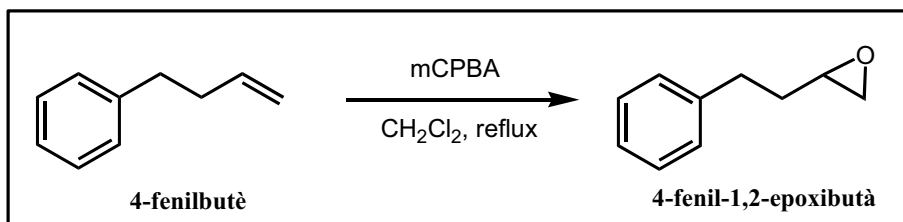


Figura 2.22. Obtenció de l'epòxid del 4-fenilbutè a partir del 4-fenilbutè.

La reacció va tenir lloc a reflux de CH_2Cl_2 i es va controlar mitjançant cromatografia de gasos. La purificació del cru va permetre obtenir l'epòxid desitjat amb un rendiment del 65%. En l'espectre de ^1H -RMN es va observar l'aparició del CH com un multiplet a 2.95 ppm; a més,

no s'observà cap senyal de l'olefina de partida. L'espectre de ^{13}C -RMN va permetre assignar els quatre tipus de carboni presents en l'esquelet alifàtic de la molècula: 51.7 ($\text{PhCH}_2\text{CHOCH}_2$), 47.2 ($\text{PhCH}_2\text{CHOCH}_2$), 34.3 ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CHOCH}_2$) i a 32.2 ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CHOH}$). Finalment per cromatografia de CG-EM es va confirmar el producte en observar el pic molecular a 148.09.

2.2.1.7.2. Síntesi del 4-fenil-1,2-butandiol

El pas següent va consistir en la formació del diol de l'epòxid del 4-fenil-1,2-butè mitjançant una hidròlisi catalitzada per l'àcid perclòric.

La reacció es va realitzar a temperatura ambient i es va controlar per CG i per CCF, ja que el producte de la reacció, un diol, no es detectava en l'aparell de cromatografia de gasos. La reacció es va donar per finalitzada un cop transcorregudes 4 hores. La purificació del cru es va realitzar per columna de sílica-gel flaix (hexà:AcOEt, 1:1), tot obtenint 100 mg de producte amb un rendiment del 55%.

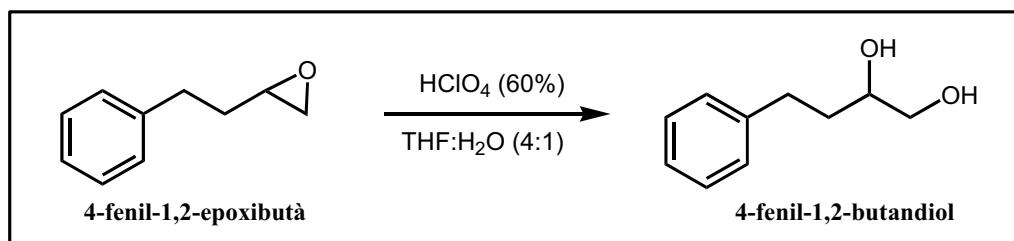


Figura 2.23. Obtenció del 4-fenil-1,2-butandiol a partir de l'epòxid del 4-fenilbutè.

L'obertura de l'epòxid ens va permetre observar com desplaçava el CH de l'epòxid de 2.95 ppm a 3.67 ppm en el cas del diol. A més, a 3.59 ppm i 3.42 ppm s'observaren els protons diastereotòpics de C1. L'espectre de ^{13}C -RMN va servir per confirmar l'obertura de l'epòxid, en observar a 71.5 ppm el carboni de l'alcohol secundari i a 66.6 ppm el de l'alcohol primari.

2.2.1.7.3. Síntesi de l'hexanoat del 2-hidroxi 4-fenilbutil (4)

Un cop obtingut el diol, el següent pas era l'esterificació de l'alcohol primari amb l'àcid hexanoic. El procediment que es va realitzar va ser el mateix que s'ha descrit en l'apartat 2.2.1.3.

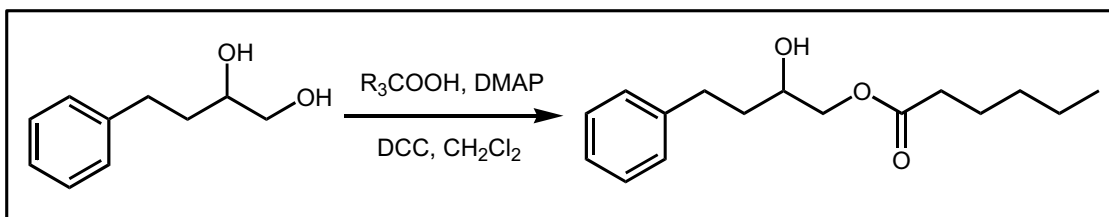


Figura 2.24. Esterificació del 4-fenil-1,2-butandiol per tal d'obtenir l'hexanoat del 2-hidroxi-4-fenilbutil.

En aquest cas la purificació es va realitzar per columna de sílica-gel flaix amb una barreja hexà:AcOEt (4:1), la qual va permetre obtenir el producte desitjat en forma d'oli, amb un rendiment del 70%. El producte s'identificà mitjançant l'espectre de 1H -RMN, on s'observà l'esterificació de l'alcohol primari, ja que els protons en posició α a aquest l'alcohol van experimentar una variació del seu desplaçament, fins a 4.14 i 4.00 ppm, respecte als 3.59 i 3.42 ppm del CH_2OH del producte de partida. Una altra evidència va ser el pic molecular més sodi a 287.1 mitjançant l'anàlisi per l'HPLC-MS.

2.2.2. ESTUDI DE LA MIGRACIÓ D'ACIL EN DERIVATS DEL PAP ACILATS AMB RESIDUS D'ÀCID OLEIC

Els primers estudis que es van realitzar de la migració d'acil en els derivats del PAP es van centrar en quatre compostos, els quals es trobaven acilats amb residus d'àcid oleic. Els compostos escollits van ser l'O(1)PAP, l'O(2)PAP, l'O(N)PAP i l'OO(1,N)PAP. En principi, es volia observar la capacitat migradora del residu oleïl en diferents condicions de dissolució.

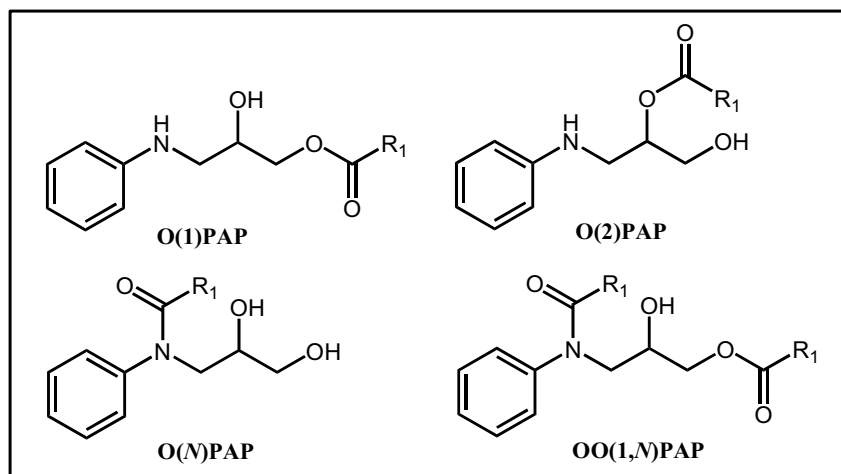


Figura 2.25. Conjunt de compostos derivats del PAP substituïts amb residus d'àcid oleic, escollits per a analitzar els possibles fenòmens de migració d'acil en determinades condicions de dissolvents.

La migració en els derivats O(1)PAP i O(2)PAP havia estat observada repetidament en el nostre laboratori. Per una banda, quan es volia sintetitzar el derivat monoesterificat del PAP en la posició 2 resultava molt difícil obtenir-lo de forma pura, ja que de manera habitual s'observava la presència, en major o menor quantitat, del derivat monoesterificat en C1. Un fet paral·lel, però en menor extensió, es produïa en el cas de la síntesi de l'O(1)PAP. La migració en derivats monoesterificats també es va observar quan es van realitzar estudis on s'empraven els mPAPs com a substrats de la lipasa pancreàtica.³⁹ Aquest fet està relacionat amb la propietat anteriorment esmentada dels triglicèrids: la migració d'acil entre diferents posicions esterificades del glicerol. Tot això ens portà a realitzar un estudi més detallat d'aquest fenomen en els productes monoesterificats derivats del PAP.

2.2.2.1. Estabilitat de l'O(1)PAP, O(2)PAP, O(N)PAP i OO(1,N)PAP en dissolució d'hexà i en dissolució aquosa

Les condicions mitjançant les quals es va controlar l'estabilitat dels compostos van ser diverses. Per una banda es realitzà l'estudi emprant com a medi de dissolució hexà, un dissolvent lipòfil i apròtic que afavoreix la dissolució de tots els compostos. Un altre sistema on es volgué estudiar la migració fou un medi que mimetitzés un sistema més proper a la situació real en la qual es podien trobar aquests compostos en l'interior d'un organisme viu. En aquest cas s'emprà dissolució aquosa formada per aigua a pH= 7.4, utilitzant un 20% de MeOH com a codissolvent. En aquest estudi es prescindí del compost OO(1,N)PAP, ja que no era soluble en la barreja aigua:MeOH 80:20.

L'estudi consistí en preparar dissolucions de concentració 1 mM de cadascun dels compostos en els dos medis de dissolució. Les dissolucions resultants es mantingueren durant 7 hores a 30 °C. El control es va fer mitjançant HPLC en fase directa en el cas que s'emprava hexà com a medi de dissolució; en el cas de les dissolucions aquoses, el control es va fer en fase inversa (MeOH:H₂O, 95:5). En cap dels quatre productes s'observà migració del grup acil. Els perfils cromatogràfics dels controls a diferents temps mostraven la presència d'un únic producte, l'inicial. Es proposà veure si la presència d'àcid afavoria la migració d'acil en l'O(1)PAP i en l'O(2)PAP. Per aquest motiu s'afegí sobre aquestes dissolucions HCl 1 N fins a arribar a un pH= 5. Els controls fets posteriorment a l'addició d'àcid mostraren ràpidament la hidròlisi dels respectius esters sense observar la migració d'acil. Cal destacar que en el cas de l'O(1)PAP aquesta hidròlisi fou més ràpida.

que l'O(1)PAP isomeritzava en O(2)PAP de forma més ràpida que en cas d'O(2)PAP a O(1)PAP. Finalment, l'estudi mostrava l'assoliment de l'equilibri entre les dues espècies, el qual constava d'un 76% d'O(1)PAP i un 24% d'O(2)PAP a 25 °C.

2.2.2.3. Estabilitat dels mPAPs en condicions de resina àcida amberlyst 15, resina bàsica Florisil® i MeOH:H₂O (90:10, pH=1.1)

Per tal d'aprofundir en les possibles condicions de catàlisi que podrien afectar la migració en els mPAPs es van estudiar altres possibles catalitzadors com van ser: un de tipus bàsic i dos de tipus àcid. El catalitzador bàsic que s'escollí fou la resina Florisil®, i pel que fa als àcids, van ser la resina Amberlyst 15® i el pH de 1.1 aconseguit gràcies a l'addició d'un àcid inorgànic com l'HCl.

Per dur a terme l'estudi es prepararen tres dissolucions d'O(1)PAP en MeOH:aigua 90:10. En una d'elles s'hi afegí resina àcida amberlyst 15, en l'altra s'hi posà Florisil®, i per últim en la darrera s'ajustà el pH a 1.1 amb HCl. En la suspensió que contenia Florisil® es produí la migració molt ràpidament, ja que en el primer control per HPLC ja s'observaren els mPAPs en la proporció d'equilibri (O(1)PAP:O(2)PAP, 3:1). En la dissolució on es posà resina àcida també s'observà migració, però a una velocitat més lenta i finalment en la dissolució on s'ajustà el pH a 1.1 l'O(1)PAP aquesta va romandre sense experimentar migració, tot i que una certa quantitat s'hidrolitzà.

Aquests resultats indiquen que condicions àcides o bàsiques donades per suports com la sílica-gel o el Florisil® afavoreixen la migració d'acil en derivats del PAP amb el grup NH lliure. Per tant, la migració d'acil es veié afavorida pel grup NH, ja sigui formant alguna interacció de tipus pont d'hidrogen o intervenint directament en el mecanisme de transacilació. Aquests resultats mostraven la semblança química que mantenen els glicèrids i els derivats del PAP des del punt de vista de migració d'acil. Ambdós capaços d'experimentar migracions d'acil en compostos monoacilats en un grup alcohol.⁶⁸ Aquest resultat també posà de manifest que la composició dels mPAPs generats en el procés de desodorització de l'oli de colza en presència d'anilina i condicions extremes de temperatura, podria veure's afectada per aquests fenòmens de migració. Això podria passar també durant el tractament de mostres per a l'anàlisi, sobretot si involucren processos cromatogràfics en suports com ara sílica-gel.

2.2.3. ESTUDIS DE LA MIGRACIÓ D'ACIL EN DERIVATS DEL PAP ACILATS AMB RESIDUS D'ÀCID HEXANOIC

Fins aquí s'havia vist que la migració en els derivats monoesterificats del PAP amb àcids grassos de cadena llarga era evident. Però no es sabia si existia algun altre tipus de factor que

pogué intervenir en aquesta migració. Per això, es plantejà si podia ser que la naturalesa del residu d'àcid gras present en l'alcohol podia influenciar la migració entre les dues posicions alcoholiques. En aquest estudi s'utilitzà l'H(1)PAP, monoèster del PAP substituït en la posició 1 per un residu d'àcid hexanoic.

L'estudi es realitzà a partir de tres dissolucions 1 mM del producte en tres condicions diferents: una on el dissolvent era hexà, una altra on es tenia una barreja hexà:IPA 9:1 i finalment una altra formada per tampó tris-HCl a pH 8.0. Es va procedir com en l'apartat anterior a l'hora de controlar l'estabilitat del producte, realitzant un control cromatogràfic per HPLC a diferents temps. Els resultats van mostrar que tant en les condicions d'hexà i hexà:IPA el producte era estable. En canvi, sí que s'observà migració en el cas on es trobava dissolt en un medi aquós. Per tant, la migració observada en l'OPAP es veia reproduïda en el cas de l'H(1)PAP. En aquesta situació igualment s'assolí un equilibri entre els dos productes acilats, arribant a un 75% d'H(1)PAP i un 25% d'H(2)PAP.

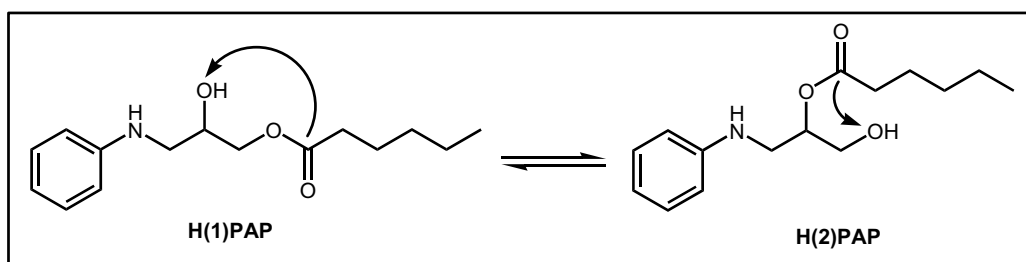


Figura 2.27. Migració d'acil observada en el derivat del PAP monoesterificat amb àcid hexanoic en condicions aquoses.

Aquest resultat suggereix que la variació del residu d'àcid gras present en els derivats del PAP no sembla establir diferències importants en el procés de migració observat.

2.2.4. ESTUDIS DE LA MIGRACIÓ EN DERIVATS DEL PAP ACILATS AMB MODIFICACIONS ESTRUCTURALS

Un cop establertes les condicions de migració en els derivats del PAP, es va voler anar un pas més enllà. Es pretenia estudiar la influència dels diferents grups funcionals de l'esquelet principal del PAP en la migració d'acil. Per aprofundir en aquest fet, es van escollir els compostos indicats en la Figura 2.28.

En aquest estudi les condicions van ser similars a les realitzades en l'apartat anterior 2.2.3. Per una banda, unes condicions on el medi de dissolució era principalment format per

components orgànics, en un cas hexà i en l'altre cas amb hexà:IPA (9:1). I unes condicions aquoses, les quals consistien en un tampó tris-HCl a pH= 8.0.

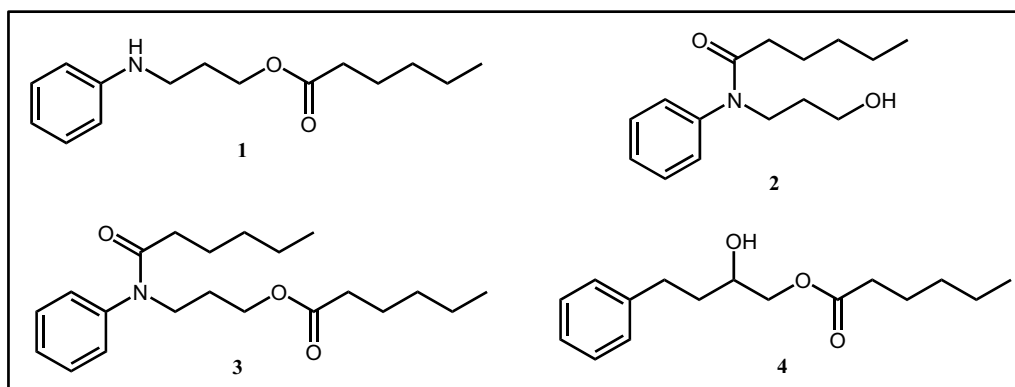


Figura 2.28. Conjunt de compostos amb diferències estructurals amb el PAP, escollits per a analitzar-ne l'estabilitat en diferents dissolucions.

L'estudi es va realitzar de forma similar a l'apartat anterior. Els resultats que es van obtenir, van mostrar que tots els compostos on s'havia introduït la modificació estructural que corresponia a l'eliminació formal de l'alcohol secundari eren estables durant el transcurs del procés. Per tant, l'absència d'aquest alcohol no permetia el procés de migració del grup acil de l'alcohol primari a l'amina, ni a la inversa, la migració del grup acil de l'NH a l'alcohol primari. Per altra part, la migració sí que tenia lloc en el derivat on s'havia eliminat el nitrogen. Aquesta migració passava en totes les condicions estudiades. Les diferents dissolucions van evolucionar fins al punt d'arribar a un equilibri entre els dos isòmers, format per un 20% del ester en la posició 1 i un 80% de l'ester en la posició 2. En aquest cas, la proporció observada en l'equilibri era la inversa que l'observada en els derivats monoesterificats del PAP. Aquest resultat fa pensar que el NH del PAP no juga un paper imprescindible en la migració d'acil entre els grups alcohol, sinó que podria ser que el nitrogen, quan es troba acilat, dificulta estàticament la migració dels grups acil presents en els alcohols.

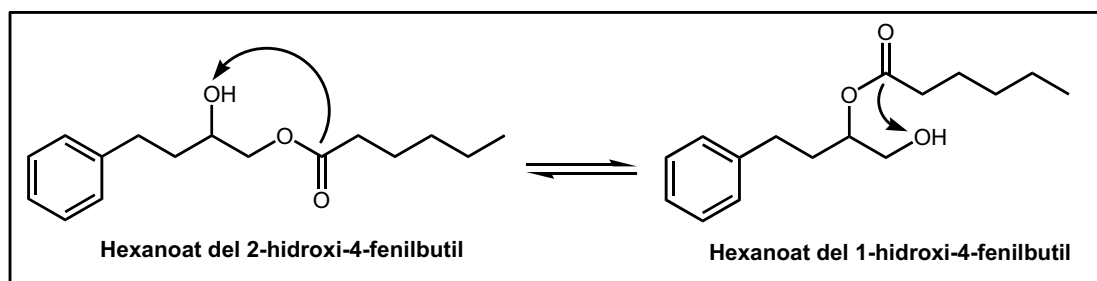


Figura 2.29. Migració d'acil observada en el derivat monoesterificat amb àcid hexanoic del 4-fenil-1,2-butadiol en condicions aquoses.

En resum, els derivats del PAP presenten migració d'acil com és el cas dels triglicèrids. Ara bé, aquesta migració es produeix entre els grups alcohols presents en C1 i C2, tenint lloc sempre que l'amina anilínica no es trobi acilada. A més, la llargada de la cadena carbonada del residu d'àcid gras no influeix en el procés de migració observat. Finalment, en les condicions estudiades no s'ha observat en cap cas migració entre el grup acil present en l'NH i els alcohols de la posició 2 i 1 respectivament. Així doncs, la migració d'acil observada en els derivats del PAP hauria de ser una propietat a tenir en compte alhora de considerar l'estabilitat dels productes en determinats processos. Processos com poden ser la síntesi de derivats del PAP o la realització de processos de desodorització en les quals hi són presents.

2.3. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

2.3.1. SÍNTESI D'ESTANDARDS DE PRODUCTES MINORITARIS TROBATS EN OLIS TÒXICS

2.3.1.1. Obtenció del LOO(2,N',N)bisPAP

2.3.1.1.1. Síntesi del bisPAP⁶⁷

Una dissolució del 1-cloro-2-hidroxi-3-fenilaminopropà (2.4 g, 12.9 mmol) en 2.4 ml d'anilina s'escalfà a 180 °C, amb controls mitjançant CCF. Un cop acabada la reacció (3.5 h), l'excés d'anilina s'eliminà per destil·lació al buit. El residu es dissolgué en CHCl₃ i es filtrà abans de purificar-lo per capa fina preparativa (hexà:AcOEt, 2:1), per obtenir 1.25 g de bisPAP⁶⁶, amb un rendiment del 40%.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 7.19 (t, ³J (H,H)= 6.8 Hz, 4 H; CH_A), 6.75 (t, ³J (H,H)= 7.3 Hz, 4 H; CH_{A'}), 6.67 (d, ³J (H,H)= 8.1 Hz, 2 H; CH_{A''}), 4.12 (m, ³J (H,H)= 7.6 Hz, ³J (H,H)= 4 Hz, 1 H; CHOH), 3.36 (dd, ²J (H,H)=

13 Hz, $^3J(\text{H,H}) = 4$ Hz, 2 H; *CHHNPh*), 3.20 (dd, $^2J(\text{H,H}) = 13$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.6$ Hz, 2 H; *CHHNPh*).

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3): 148.0 (C-1 anilina), 129.3 (C-3, C-5 anilina), 118.1 (C-4 anilina), 113.3 (C-2, C-6 anilina), 68.8 (CHOH), 47.9 (2 CH_2NPh).

2.3.1.1.2. Síntesi de l'*OO(N',N)bisPAP*⁶⁵

A una dissolució de 114 mg de bisPAP (0.47 mmol) en 4 ml de benzè, s'hi adicionaren lentament 320 mg de clorur d'oleïl (1.06 mmol) i 72 μl (0.51 mmol) de Et_3N . La reacció es controlà per CCF. Després de mantenir-la 4 hores a temperatura ambient i amb agitació, el cru es purificà per columna de sílica-gel flaix, utilitzant com a eluent una barreja hexà:AcOEt 3:1, per obtenir 250 mg de producte en forma d'oli marronós, amb un rendiment del 70%.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 7.33 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, 6 H; CH_A), 7.08 (d, $^3J(\text{H,H}) = 6.3$ Hz, 4 H; CH_A), 5.36-5.24 (ac, 4 H; $\text{CH}=\text{}$), 4.23 (d, $^3J(\text{H,H}) = 2.8$ Hz, 1 H; CHOH), 3.95 (m, $^3J(\text{H,H}) = 2.8$ Hz, 1 H; CHOH), 3.84 (dd, $^2J(\text{H,H}) = 9.4$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 5$ Hz, 2 H; *CHHN*), 3.71 (dd, $^2J(\text{H,H}) = 9.4$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 2.8$ Hz, 2 H; *CHHN*), 2.02-1.92 (ac, 12 H; 2 CH_2CO , 4 $\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 1.50-1.46 (ac, 4 H; 2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.30-1.08 (40 H; CH_2), 0.85 (t, $^3J(\text{H,H}) = 4.8$ Hz, 6 H; CH_3).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): 174.8 (CO), 143.0 (C-1 anilina), 129.8 ($\text{CH}=\text{}$), 129.6 ($\text{CH}=\text{}$), 129.6 (C-3, C-5 anilina), 128.0 (C-4 anilina), 127.8 (C-2, C-6 anilina), 69.9 (CHOH), 54.1 (CH_2NPh), 34.1 (CH_2CO), 31.7 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.4 (CH_2), 29.2 (CH_2), 29.0 (CH_2), 29.0 (CH_2), 28.9 (CH_2), 27.0 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 27.0 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 25.2 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{}$), 22.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 14.0 (CH_3).

IR (film): 3392 (OH) i 1647 (C=O).

2.3.1.1.3. Síntesi del *LOO(2,N',N)bisPAP*⁶⁵

A una dissolució de 47 mg d'*OO(N',N)bisPAP* (0.06 mmol) en 400 μl de CH_2Cl_2 , se li afegí, gota a gota, 19 mg d'àcid linoleic (0.07 mmol), 15 mg de DCC (0.07 mmol), 1 mg de DMAP (0.007 mmol) i el cru es deixà amb agitació a temperatura ambient durant 3.5 h (control per CCF). Després d'evaporar el dissolvent, s'eliminà la DCU per precipitació amb hexà en fred, procés que es repetí tres vegades. Finalment, la purificació del residu per CCF a escala

preparativa utilitzant com a eluent hexà:AcOEt 3:1 forní 56 mg d'un oli marró amb un rendiment global del 89%.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.41-7.32 (ac, 6 H; CH_A), 7.17 (d, ³J(H,H)= 4.6 Hz, 4 H; CH_A), 5.40-5.28 (ac, 8 H; 8 CH=), 5.15 (m, 1 H; CHOH), 3.98 (dd, ²J(H,H)= 9.4 Hz, ³J(H,H)= 3.2 Hz, 2 H; 2 CHHN), 3.92 (dd, ²J(H,H)= 9.6 Hz, ³J(H,H)= 4.6 Hz, 2 H; 2 CHHN), 2.76 (t, 2 H; =CHCH₂CH=), 2.08-1.88 (ac, 18 H; 3 CH₂CO, 6 CH₂C=), 1.68 (2 H; CH₂CH₂CO), 1.53-1.49 (ac, 4 H; 2 CH₂CH₂CO), 1.40-1.08 (54 H; CH₂), 0.87 (t, ³J(H,H)= 4.8 Hz, 9 H; 3 CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 173.5 (CO), 173.1 (CO), 142.8 (C-1 anilina), 130.2 (CH=), 129.9 (CH=), 129.8 (CH=), 129.7 (CH=), 129.6 (C-3, C-5 anilina), 128.3 (C-4 anilina), 128.0 (C-2, C-6 anilina), 127.8 (CH=), 70.9 (CHOH), 49.8 (CH₂NPh), 34.2 (CH₂CO), 34.0 (CH₂CO), 31.8 (CH₂), 31.4 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂C=), 27.1 (CH₂), 25.5 (CH₂C=), 25.3 (CH₂C=), 24.4 (=CH₂CH₂CH₂=), 22.6 (CH₂CH₂CO), 22.5 (CH₂CH₂CO), 14.0 (CH₃).

IR (film): 3007 (C_{sp2}), 2925 (C_{sp3}), 1733 (C=O) i 1647 (C=O).

AE per C₆₉H₁₁₂N₂O₄: Calculada: C 80.18%, H 10.92%, N 2.71%

Determinada: C 79.83%, H 11.28%, N 2.89%

2.3.1.2. Obtenció de l'OL(1,M)PAP

2.3.1.2.1. Síntesi de l'OOL(1,2,N)PAP⁶⁵

Sobre una dissolució d'OO(1,2)PAP (215 mg, 0.31 mmol) en 4 ml de benzè, s'addicionà clorur de linoleïl (143 mg, 0.48 mmol) i Et₃N (0.06 ml, 0.43 mmol). El cru es deixà reaccionar a temperatura ambient amb agitació. Al cap de 16 h, la reacció s'aturà (control CCF) i el cru es purificà per columna de sílica-gel flaix, utilitzant com a eluent una barreja hexà:AcOEt (10:1), per obtenir 260 mg del producte esperat amb un rendiment del 89%.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 7.46-7.33 (ac, 3 H; CH_A), 7.20 (d, ³J(H,H)= 8.2 Hz, 2 H; CH_A), 5.38-5.29 (ac, 8 H; 8 CH=), 5.26 (m, 1 H; CHOH), 4.31 (dd, ²J(H,H)= 12 Hz, ³J(H,H)= 3.4 Hz, 1 H; CHHOCO), 4.07 (dd,

$^2J(\text{H,H})= 12 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H,H})= 6.4 \text{ Hz}$, 1 H; CHHOCO), 3.93 (d, $^3J(\text{H,H})= 6 \text{ Hz}$, 2 H; CHHN), 2.72 (t, $^3J(\text{H,H})= 5.8 \text{ Hz}$, 2 H; =CHCH₂CH=), 2.23 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.2 \text{ Hz}$, 2 H; CH₂CO), 2.16-1.90 (ac, 16 H; 6 CH₂CH=, 2 CH₂CO), 1.55-1.47 (ac, 6 H; 3 CH₂CH₂CO), 1.40-1.10 (54 H; CH₂), 0.85 (t, $^3J(\text{H,H})= 4.8 \text{ Hz}$, 9 H; 3 CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 173.6 (CO), 173.3 (CO), 173.0 (CO), 142.8 (C-1 anilina), 130.1 (CH=), 130.0 (CH=), 129.9 (CH=), 129.7 (CH=), 129.6 (C-3, C-5 anilina), 128.1 (C-4 anilina), 127.9 (C-2, C-6 anilina), 127.8 (CH=), 69.9 (CHOCO), 63.3 (CH₂OCO), 49.1 (CH₂NCO), 34.1 (CH₂CO), 34.1 (CH₂CO), 34.0 (CH₂CO), 31.8 (CH₂), 31.4 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 27.1 (CH₂C=), 27.1 (CH₂C=), 25.5 (CH₂), 25.3 (CH₂), 24.7 (CH₂), 24.6 (CH₂), 22.6 (CH₂), 22.5 (CH₂CH₂CO), 14.0 (CH₃), 14.0 (CH₃).

IR (film): 3012 (C_{sp2}), 2923 (C_{sp3}), 1742 (C=O) i 1666 (C=O).

2.3.1.2.2. Hidròlisi de l'OOL(1,2,N)PAP mitjançant lipases

Dissolucions i reactius emprats:

- Dissolució tampó 100 mM Tris-HCl (pH = 8), 150 mM NaCl i 4 mM NaTDC.
- Dissolució de colipasa (Sigma) 1000 µg/ml en A.
- Dissolució de lipasa pancreàtica (Sigma) de porc 2000 u/ml en A.
- Dissolució d'OOL(1,2,N)PAP 20.3 mM en hexà.
- CH₂Cl₂: IPA (9:1) amb un 0.1% NH₄OH.

Es van realitzar incubacions a 37 °C en tubs de vidre en un volum total de 2 ml, els quals contenien 100 µl de la dissolució D, a continuació aquests s'evaporaren a sequedat sota pressió de nitrogen. Al residu s'hi afegiren 1.94 ml de dissolució tampó A i la mescla s'agità al vòrtex per formar una emulsió. Després s'hi afegiren 40 µl de la dissolució de colipasa B (concentració final de colipasa 20 µg/ml) i 20 µl de la dissolució de lipasa C (concentració final de lipasa 20 u/ml i concentració final d'OOL(1,2,N)PAP 1 mM). Es varen agafar alíquotes de 250 µl a 30 min, 1 h, 2 h i 3 h. La reacció es va aturar addicionant 750 µl de la dissolució E i centrifugant a 10000 rpm durant 5 min. La part orgànica de l'extracció s'evaporà i es redissolgué en hexà:IPA 90:10 i s'analitzà mitjançant HPLC en fase directa, utilitzant un flux de 1 ml/min amb el gradient creat pel mètode NOCR6 (vegeu punt 1.4.1). En aquestes condicions,

el producte triacilat eluí a 2.7 min. El procediment es realitzà per triplicat, un dels quals fou un blanc al qual no s'addicionà ni colipasa ni lipasa.

2.3.1.2.3. Primer assaig de la hidròlisi química de l'OOL(1,2,N)PAP

A una dissolució d'OOL(1,2,N)PAP (5.4 mg, 0.0056 mmol) en THF (500 µl), s'afegiren 52 µl de NaOH 0.1M i la mescla es mantingué en agitació durant 2 h a temperatura ambient. La reacció es controlà per HPLC utilitzant el mètode NOCR6. Per als controls de la reacció s'agafaren alíquotes de 100 µl, a les quals s'eliminà el dissolvent orgànic, s'hi afegí aigua i es realitzà una extracció amb hexà.

2.3.1.2.4. Segon assaig de la hidròlisi química de l'OOL(1,2,N)PAP

Es preparà una dissolució d'OOL(1,2,N)PAP (5.2 mg, 0.005 mmol) en 200 µl d'una barreja 90:10 dioxà:NaOH (0.68 M). La dissolució resultant es mantingué en agitació durant 8 h, les 4 primeres a temperatura ambient i les altres escalfant a 45°C. La reacció es seguí per CCF. Al cru resultant s'hi afegí HCl (7 µl, 1 N) i s'eliminà el dissolvent. Finalment s'hi afegí 1 ml d'una barreja hexà:aigua (1:1) per realitzar una extracció i analitzar per HPLC la fase orgànica igual que en l'apartat anterior, obtenint els resultats indicats en l'apartat 2.2.1.2.4.

2.3.1.2.5. Síntesi de l'OL(1,N)PAP⁶⁵

A una dissolució de 33 mg d'O(1)PAP (0.08 mmol) se li afegiren 32.2 mg de clorur de linoleïl (0.11 mmol) i 14 µl de Et₃N (0.10 mmol) en 1 ml de benzè. La reacció es controlà per CCF i durà 4 h. La purificació del cru es realitzà amb columna de sílica-gel flaix utilitzant com a eluent una barreja d'hexà:AcOEt (5:1), per obtenir 43 mg d'OL(1,N)PAP, amb un rendiment del 80%.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): 7.46-7.36 (ac, 3 H; CH_{Ar}), 7.20 (d, ³J(H,H)= 6.9 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 5.40-5.27 (ac, 6 H; 6 CH=), 4.20-4.00 (ac, 5 H; CHHN, CHOH, CHHOCO), 3.54 (d, ²J(H,H)= 13.8 Hz, 1 H; CHOH), 2.75 (t, ³J(H,H)= 5.8 Hz, 2 H; =CHCH₂CH=), 2.23 (t, ³J(H,H)= 8.1 Hz, 2 H; CH₂CO), 2.12-1.98 (ac, 10 H; CH₂CO, 4 CH₂CH=), 1.58-1.51 (ac, 4 H; 2 CH₂CH₂CO), 1.40-1.10 (34 H; CH₂), 0.87 (t, ³J(H,H)= 6.9 Hz, 6 H; 2 CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 176.1 (CO), 173.6 (CO), 143.0 (C-1 anilina), 130.1 (CH=), 130.0 (CH=), 129.9 (CH=), 129.9 (CH=), 129.7 (C-3, C-5 anilina), 128.2 (C-4 anilina), 127.9 (C-2, C-6 anilina), 127.8 (CH=), 127.8

(CH=), 69.4 (CHOH), 65.9 (CH₂OCO), 54.1 (CH₂NCO), 34.3 (CH₂CO), 34.0 (CH₂CO), 31.8 (CH₂), 31.4 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 27.2 (CH₂C=), 25.5 (CH₂), 25.3 (CH₂), 24.7 (CH₂), 22.6 (CH₂CH₂CO), 22.5 (CH₂CH₂CO), 14.0 (CH₃), 14.0 (CH₃).

IR (film): 3407 (OH), 3006 (C_{sp2}), 2926 (C_{sp3}), 1738 (C=O) i 1645 (C=O).

AE per C₄₅H₇₅NO₄: Calculada: C 77.87%, H 10.89%, N 2.02%

Determinada: C 78.13%, H 11.25%, N 1.94%

2.3.1.3. Obtenció de derivats del PAP per activació de microones

2.3.1.3.1. Síntesi del dPAP de l'àcid làuric per activació de microones

A una dissolució de 207 mg de PAP (1.2 mmol) en 3 ml de CH₂Cl₂, se li afegí, 524 mg d'àcid làuric (2.6 mmol), 554 mg de DCC (2.7 mmol), 5.3 mg de DMAP (0.04 mmol) i el cru es posà sota radiació de microones durant 5 minuts a 50°C amb agitació (control per HPLC en fase directa, mètode OLIS2, vegeu punt 1.4.1). Després d'evaporar el dissolvent, s'eliminà la DCU per precipitació amb hexà en fred, procés que es repetí tres cops. Finalment, la purificació del residu es realitzà mitjançant sílica-gel flaix emprant una barreja d'hexà:AcOEt (10:1), per obtenir 421 mg d'un oli amb un rendiment del 80%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.16 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.71 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 6.63 (d, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 5.23 (q, ³J(H,H)= 5.5 Hz, 1 H; CHOCO), 4.29 (dd, ³J(H,H)= 12.0 Hz, ³J(H,H)= 4 Hz, 1 H; CHHOCO), 4.23 (dd, ³J(H,H)= 12.0 Hz, ³J(H,H)= 5.5 Hz, 1 H; CHHOCO), 3.36 (dd, ³J(H,H)= 14.0 Hz, ³J(H,H)= 7 Hz, 1 H; CHHNH), 3.28 (dd, ³J(H,H)= 14.0 Hz, ³J(H,H)= 5.5 Hz, 1 H; CHHNH), 2.30 (dd, ²J(H,H)= 15.0 Hz, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 4 H; 2 COCH₂), 1.60 (dd, ²J(H,H)= 14.5 Hz, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 4 H; 2 COCH₂CH₂), 1.38-1.20 (ac, 36 H; CH₂), 0.86 (t, ²J(H,H)= 7 Hz, 3 H; CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 173.5 (CO), 173.3 (CO), 147.4 (C-1 anilina), 129.3 (C-3, C-5 anilina), 117.8 (C-4 anilina), 112.8 (C-2, C-6 anilina), 70.1 (CH₂OH), 62.9 (CH₂OCO), 44.0 (CH₂NH), 34.2 (CH₂), 34.0 (CH₂),

31.9 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 24.9 (CH₂), 22.6 (CH₂CH₂CO), 14,1 (CH₃).

AE per C₃₃H₅₇NO₄: Calculada: C 74.53%, H 10.80%, N 2.63%

Determinada: C 74.61%, H 11.00%, N 2.27%

2.3.1.3.2. Optimització de la síntesi del PAP per activació de microones

Es preparà una dissolució de 50 µl d'anilina, 175 µl de glicidol i 75 µl de Et₃N en 3 ml de tres dissolvents diferents: MeOH, IPA i TFM. Tot seguit es procedí a l'escalfament de cadascun dels crus mitjançant radiació de microones durant 20 min a 105°C. Finalment els crus s'analitzaren mitjançant HPLC emprant el mètode NOCR6. La purificació dels crus no es va fer degut a que ens interessava solament estudiar el progrés de la reacció.

2.3.2. OBTENCIÓ DE DERIVATS DEL PAP PER A L'ESTUDI DE MIGRACIÓ D'ACIL

2.3.2.1. Síntesi de l'OO(1,M)PAP

A una dissolució d'O(1)PAP (32 mg, 0.07 mmol) en 1 ml de benzè se li afegixen, gota a gota 33 mg de clorur d'oleïl (0.11 mmol) i 12 µl de Et₃N (0.09 mmol). La mescla resultant es deixà reaccionar amb agitació, a temperatura ambient durant 2 h (control per CCF). A continuació s'eliminà el dissolvent i el cru resultant es purificà per columna de sílica-gel flaix, eluint amb hexà:AcOEt (5:1), per obtenir 42 mg d'un oli de color groc amb un rendiment del 82%.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 7.40 (t, ³J(H,H)= 7.4 Hz, 3 H; CH_{Ar}), 7.20 (d, ³J(H,H)= 7.6 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 5.37-5.29 (m, 4 H; 4 CH=), 4.22-4.00 (ac, 5 H; CHHN, CH(OH), CHHOCO), 3.54 (d, ²J(H,H)= 12.0 Hz, 1 H; CHOH), 2.40-1.90 (ac, 12 H; 2 CH₂CO, 4 CH₂CH=), 1.60-1.48 (ac, 4 H; 2 CH₂CH₂CO), 1.40-1.10 (44 H; CH₂), 0.87 (t, ³J(H,H)= 6.8 Hz, 6 H; 2 CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): 176.2 (CO), 173.7 (CO), 143.1 (C-1 anilina), 130.0 (CH=), 129.9 (CH=), 129.7 (C-3, C-5 anilina), 128.2 (C-4 anilina), 127.8 (C-2, C-6 anilina), 69.4 (CHOH), 65.9 (CH₂OCO), 54.1 (CH₂NCO), 34.3 (CH₂CO), 34.0 (CH₂CO), 31.9 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 27.2 (CH₂C=),

27.1 (CH₂C=), 25.3 (CH₂), 24.7 (CH₂), 22.7 (CH₂CH₂CO), 14.1 (CH₃).

HPLC-EM: 696.5 (M+H)⁺.

2.3.2.2. Síntesi de l'O(N)PAP⁷³

A una dissolució de PAP (28 mg, 0.17 mmol) en 1 ml de benzè, se li afegixen 62 mg de clorur d'oleïl (0.21 mmol) i 28 µl de Et₃N (0.20 mmol). La mescla resultant es deixà reaccionar amb agitació a temperatura ambient durant 3.5 h (controls per CCF). A continuació s'eliminà el dissolvent i el cru resultant es purificà per cromatografia de sílica-gel flaix, eluint amb hexà:AcOEt (3:2), per obtenir 34 mg d'un oli de color groc intens amb un rendiment del 50%.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): 7.50-7.37 (ac, 3 H; CH_{Ar}), 7.17 (d, ³J(H,H)= 7.6 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 5.35-5.29 (ac, 2 H; 2 CH=), 3.88-3.70 (ac, 3 H; CHHN, CHOH), 3.70-3.50 (ac, 2 H; CHHOCO), 2.25-1.90 (ac, 6 H; 3 CH₂CO, 2 CH₂CH=), 1.58-1.51 (ac, 2 H; CH₂CH₂CO), 1.40-1.10 (20 H; CH₂), 0.87 (t, ³J(H,H)= 6.6 Hz, 3 H; CH₃).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): 175.7 (CO), 142.8 (C-1 anilina), 129.9 (CH=), 129.7 (C-3, C-5 anilina), 128.3 (C-4 anilina), 127.7 (C-2, C-6 anilina), 70.3 (CHOH), 63.6 (CH₂OH), 52.7 (CH₂NPh), 34.2 (CH₂CO), 31.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 28.2 (CH₂), 27.2 (CH₂C=), 27.1 (CH₂C=), 25.4 (CH₂), 22.6 (CH₂CH₂CO), 14.0 (CH₃).

HPLC-EM: 454.3 (M+Na)⁺.

2.3.2.3. Obtenció de l'hexanoat del 3-(fenilamino)propil

2.3.2.3.1. Obtenció del 3-(fenilamino)propanol⁷²

Sobre el 3-cloro-1-propanol (410 mg, 4.33 mmol) s'addicionen 400 µl d'anilina (4.38 mmol) i la mescla es deixa reaccionar amb agitació i reflux. La reacció es controla per HPLC en fase directa emprant el mètode NOCR6 i s'atura al cap de 11 hores. A continuació el cru de color negre es purificà per cromatografia de sílica-gel flaix utilitzant com a eluent Et₂O:CH₂Cl₂ (9:1). Finalment es van obtenir 80 mg d'un oli amb un rendiment del 12%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.17 (t, ³J(H,H)= 7 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.71 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 1 H; CH_{Ar}), 6.62 (d, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 3.75 (t, ³J(H,H)= 6 Hz, 2 H; CH₂OH), 3.23 (t, ³J(H,H)= 6.5 Hz, 2 H; CH₂NHPh), 1.83 (q, ³J(H,H)= 6 Hz, 2 H; CH₂CH₂OH).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 142.2 (C-1 anilina), 129.2 (C-3, C-5 anilina), 117.6 (C-4 anilina), 113.1 (C-2, C-6 anilina), 61.3 (CH₂OH), 41.8 (CH₂NHPh), 31.7 (CH₂CH₂OH).

HPLC-EM: 152.1 (M+H)⁺

2.3.2.3.2. Obtenció de l'hexanoat del 3-(fenilamino)propil

Sobre una dissolució de 3-(fenilamino)propanol (39 mg, 0.25 mmol) en 2 ml de CH₂Cl₂ s'afegeixen successivament 328 mg d'àcid oleic (0.28 mmol), 61 mg de DCC (0.29 mmol) i 5 mg de DMAP (0.04 mmol). La reacció es deixà amb agitació a temperatura ambient durant 3 h. El control de la reacció es va realitzar per CCF. A continuació s'eliminà el dissolvent i tot seguit s'eliminà la DCU per precipitació amb hexà en fred, procés que es repetí tres cops. Finalment, la purificació del residu per columna de sílica-gel flaix utilitzant com a eluent hexà:AcOEt 8:1 forní 46 mg d'un oli marró amb un rendiment global del 72%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.17 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.70 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 1 H; CH_{Ar}), 6.61 (d, ³J(H,H)= 8.5 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 4.20 (t, ³J(H,H)= 6.5 Hz, 2 H; CH₂OCO), 3.77 (ba, 1 H; NH), 3.22 (t, ³J(H,H)= 6.5 Hz, 2 H; CH₂NH), 2.32 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH₂CO), 1.94 (q, ³J(H,H)= 6.5 Hz, 2 H; CH₂CH₂CO), 1.63 (q, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH₂CH₂CH₂CO), 1.34-1.29 (ac, 4 H; CH₂), 0.90 (t, ³J(H,H)= 7 Hz, 3 H; CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 173.9 (CO), 148.0 (C-1 anilina), 129.3 (C-3, C-5 anilina), 117.4 (C-4 anilina), 112.8 (C-2, C-6 anilina), 62.1 (CH₂OCO), 40.7 (CH₂NHPh), 34.3 (CH₂CO), 31.7 (CH₂CH₂OH), 28.6 (CH₂), 24.7 (CH₂), 22.3 (CH₂), 13.9 (CH₃).

HPLC-EM: 250.1 (M+H)⁺.

EI-MS m/z (%): 249.13 (50) pic molecular, 132.04 (20), 106.04 (100), 77.03 (30).

2.3.2.4. Síntesi de l'*N*-hexanoïl-3-(fenilamino)propanol

Sobre una dissolució de 3-(fenilamino)propanol (52 mg, 0.34 mmol) en 1 ml de CH₂Cl₂ s'addicionen 45 µl de TEA (0.32 mmol) i 95 µl de clorur de l'àcid hexanoic (0.60 mmol). La dissolució es deixa a temperatura ambient i amb agitació. El control de la reacció es realitza mitjançant HPLC en fase inversa emprant condicions isocràtiques (15% H₂O i 85% ACN). Un cop transcorreguda 1 hora de reacció, el cru es filtra per tal d'eliminar les sals de la TEA i es procedeix a purificar el filtrat mitjançant HPLC a escala semipreparativa. Finalment, s'obtenen 32 mg de producte amb un rendiment del 40%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.44 (t, ³J(H,H)= 9.5 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 7.38 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 1 H; CH_{Ar}), 7.14 (d, ³J(H,H)= 4.5 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 3.87 (t, ²J(H,H)= 6.0 Hz, 2 H; CH₂OH), 3.65 (ba, 2 H; CH₂NCO), 2.05 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH₂CO), 1.66 (qu, ³J(H,H)= 5.5 Hz, 2 H; CH₂CH₂CON), 1.57 (qu, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH₂CH₂OH), 1.25-1.14 (ac, 4 H; CH₂CH₂CH₂CON), 0.83 (t, ³J(H,H)= 7 Hz, 3 H; CH₃),

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 174.8 (CO), 142.0 (C-1 anilina), 129.9 (C-3, C-5 anilina), 128.1 (C-4 anilina), 128.0 (C-2, C-6 anilina), 58.1 (CH₂OH), 45.6 (CH₂NH), 34.1 (CH₂CON), 31.3 (CH₂CH₂OH), 29.9 (CH₂), 25.2 (CH₂), 22.3 (CH₂), 13.9 (CH₃).

HPLC-EM: 521.5 (M+M+Na)⁺, 272.2 (M+Na)⁺, 250.2 (M+H)⁺.

2.3.2.5. Síntesi de l'hexanoat de l'*N*-hexil-3-(fenilamino)propil

Aquest compost es va aïllar a partir de la purificació del cru de la reacció de l'apartat anterior (2.3.2.4.), on es va obtenir com a subproducte.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.43 (t, ³J(H,H)= 7.0 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 7.36 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 1 H; CH_{Ar}), 7.17 (d, ³J(H,H)= 8.0 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 4.10 (t, ³J(H,H)= 7.0 Hz, 2 H; CH₂OCO), 3.78 (t, ³J(H,H)= 6.5 Hz, 2 H; CH₂NCO), 2.24 (t, ³J(H,H)= 7 Hz, 2 H; CH₂CO), 2.01 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH₂CON), 1.87 (q, ³J(H,H)= 6.5 Hz, 2 H; CH₂CH₂CON), 1.59-1.52 (ac, 2 H; CH₂CH₂CH₂OCO), 1.30-1.14 (ac, 4 H; CH₂CH₂CH₂CH₂CON), 0.88 (t, ³J(H,H)= 5.5 Hz, 3 H; CH₃), 0.82 (t, ³J(H,H)= 7 Hz, 3 H; CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 173.8 (CO), 173.1 (CO), 142.6 (C-1 anilina), 129.7 (C-3, C-5 anilina), 128.2 (C-2, C-6 anilina), 128.0 (C-4 anilina), 61.9 (CH₂OCO), 46.2 (CH₂NPh), 34.3 (CH₂COO), 34.1 (CH₂CON), 31.4 (CH₂CH₂OCO), 31.2 (CH₂), 27.1 (CH₂), 25.1 (CH₂), 24.5 (CH₂), 22.3 (CH₂), 22.2 (CH₂), 13.9 (CH₃), 13.8 (CH₃).

HPLC-EM: 717.7 (2M+Na)⁺, 370.3 (M+Na)⁺, 348.3 (M+H)⁺.

2.3.2.6. Obtenció de l'hexanoat del 2-hidroxi-4-fenilbutil

2.3.2.6.1. Síntesi del 4-fenil-1,2-epoxibutà⁷⁴

A una dissolució de 4-fenilbutè (231 mg, 1.73 mmol) en 15 ml de CH₂Cl₂ se li afegixen 440 mg de mCPBA (1.86 mmol). La mescla resultant es deixà reaccionar amb agitació, a reflux durant 4 h (control per CG). A continuació s'elimina el dissolvent, i es realitza una extracció emprant aigua i tBuOMe per tal d'eliminar l'àcid que es forma a partir del mCPBA; aquest procediment es repeteix tres cops. Es recull la fase orgànica i s'asseca amb MgSO₄ anhidre, després d'assecar es filtra i s'elimina el dissolvent. Tot seguit es procedeix a purificar el cru resultant per columna de sílica-gel flaix, eluint amb hexà:AcOEt (8:1), per obtenir 162 mg d'un oli de color groc amb un rendiment del 65%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.29 (t, ³J (H,H)= 8.0 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 7.20 (d, ³J (H,H)= 7.5 Hz, 3 H; CH_{Ar}), 2.95 (m, 1 H; CH₂CHOCH₂), 2.85-2.73 (ac, 3 H; CH₂CHOCH₂, CHHCHOCH₂), 2.47 (dd, ²J (H,H)= 5.5 Hz, ³J (H,H)= 3.0 Hz, 1 H; CHHCHOCH₂), 1.91-1.79 (ac, 2 H; PhCH₂CH₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 141.2 (C-1 anilina), 128.4 (C-3, C-5 anilina), 128.3 (C-2, C-6 anilina), 126.0 (C-4 anilina), 51.7 (PhCH₂CHOCH₂), 47.2 (PhCH₂CHOCH₂), 34.3 (PhCH₂CH₂CHOCH₂), 32.2 (PhCH₂CH₂CHOH).

EI-MS m/z (%): 148.09 (30) pic molecular, 130.09 (70), 117.08 (90), 90.98 (100).

2.3.2.6.2. Síntesi del 4-fenil-1,2-butandiol⁷⁵

Sobre una dissolució de 4-fenil-1,2-epoxibutà (162 mg, 1.10 mmol) en 4 ml d'una barreja THF:H₂O (4:1) s'addicionen 130 µl de HClO₄ al 60%. La dissolució es deixà a temperatura ambient i amb agitació. La reacció es controlà mitjançant cromatografia de capa fina amb una

barreja hexà:AcOEt (4:1). Un cop transcorregudes 4 hores des de l'inici, es procedeix a purificar el filtrat per columna de sílica-gel flaix, eluint amb hexà:AcOEt (1:1). Finalment s'obtenen 100 mg de producte amb un rendiment del 55%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.24 (t, ³J(H,H)= 7.0 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 7.16 (t, ³J(H,H)= 8.0 Hz, 3 H; CH_{Ar}), 3.67 (m, 1 H; CH₂CH(OH)CH₂OH), 3.59 (dd, ²J(H,H)= 11.5 Hz, ³J(H,H)= 3.0 Hz, 1 H; CH₂CH(OH)CHHOH), 3.42 (dd, ²J(H,H)= 11.5 Hz, ³J(H,H)= 8.0 Hz, 1 H; CH₂CH(OH)CHHOH), 2.80-2.74 (ac, 1 H; CHHCH(OH)CH₂OH), 2.67-2.61 (ac, 1 H; CHHCH(OH)CH₂OH), 1.75-1.65 (ac, 2 H; PhCH₂CH₂).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 141.7 (C-1 anilina), 128.3 (C-3, C-5 anilina), 128.3 (C-2, C-6 anilina), 125.8 (C-4 anilina), 71.5 (PhCH₂CH(OH)CH₂), 66.6 (PhCH₂CH(OH)CH₂OH), 34.5 (PhCH₂CH₂CHOH), 31.7 (PhCH₂CH₂CHOH).

2.3.2.6.3. Síntesi de l'hexanoat del 2-hidroxi-4-fenilbutil

A una dissolució de 65 mg de 4-fenil-1,2-butandiòl (0.39 mmol) en 5 ml de CH₂Cl₂, se li afegeix, gota a gota, 51 mg d'àcid hexanoic (0.44 mmol), 83 mg de DCC (0.40 mmol), 6 mg de DMAP (0.05 mmol) i el cru es deixa amb agitació a temperatura ambient durant 3.5 h (control per HPLC en fase directa). Després d'evaporar el dissolvent, s'elimina la DCU per precipitació amb hexà en fred, procés que es repeteix tres cops. Finalment, la purificació del residu per columna de sílica-gel flaix, eluint amb hexà:AcOEt (4:1) forní 71 mg d'un oli amb un rendiment del 70%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.28 (t, ³J(H,H)= 7.0 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 7.19 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 3 H; CH_{Ar}), 4.14 (dd, ²J(H,H)= 11.5 Hz, ³J(H,H)= 3.0 Hz, 1 H; CH(OH)CHHOCO), 4.00 (dd, ²J(H,H)= 11.5 Hz, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 1 H; CH(OH)CHHOCO), 3.84 (m, 1H; CH₂CH(OH)CH₂OCO), 2.85-2.79 (ac, 1 H; CHHCH(OH)CH₂), 2.73-2.67 (ac, 1 H; CHHCH(OH)CH₂), 2.33 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH₂CO), 1.82-1.76 (ac, 2 H; PhCH₂CH₂), 1.63 (t, ³J(H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH₂CH₂CO), 1.32-1.25 (ac, 4 H; CH₂), 0.89 (t, ³J(H,H)= 7 Hz, 3 H; CH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 174.0 (CO), 141.4 (C-1 anilina), 128.4 (C-3, C-5 anilina), 128.3 (C-2, C-6 anilina), 125.9 (C-4 anilina), 69.1 (PhCH₂CHOHCH₂OCO), 68.4 (PhCH₂CHOHCH₂OCO), 34.8

(PhCH₂CH₂CHOH), 34.1 (CHOHCH₂OCOCH₂), 31.5
(PhCH₂CH₂CHOH), 31.2 (CH₂), 24.6 (CH₂), 22.2 (CH₂), 13.8
(CH₃).

HPLC-EM: 287.1 (M+Na)⁺.

AE per C₁₆H₂₄O₃: Calculada: C 72.69%, H 9.15%

Determinada: C 73.19%, H 9.31%

2.3.3. ESTUDI DE LA MIGRACIÓ D'ACIL EN DERIVATS DEL PAP ACILATS AMB RESIDUS D'ÀCID OLEIC

2.3.3.1. Estabilitat de l'O(1)PAP, O(2)PAP, O(N)PAP i OO(1,N)PAP, en dissolució d'hexà

Es prepararen dissolucions d'O(1)PAP, d'O(2)PAP, d'O(N)PAP i d'OO(N,O(1))PAP: 4.1 mg, 4.5 mg, 4.6 mg i 4.4 mg, respectivament, en 10 ml d'hexà. D'aquestes dissolucions s'agafaren 3 ml i es posaren en agitació a 30°C durant 7h. Els controls es realitzaren mitjançant HPLC utilitzant el mètode NOCR6, agafant alíqüotes de 100 µl a diferents temps (1.5 h, 3 h, 5 h i 7 h). Els temps de retenció dels productes foren: t_r(O(1)PAP)= 7.7 min, t_r(O(2)PAP)= 8.6 min, t_r(O(N)PAP)= 12.0 min i t_r(OO(1,N)PAP)= 6.8 min.

2.3.3.2. Estabilitat de l'O(1)PAP, O(2)PAP i O(N)PAP en dissolució aquosa

Es procedí igual que en l'apartat 2.3.3.1, però utilitzant les següents quantitats de productes: O(1)PAP, O(2)PAP, O(N)PAP (4.2 mg, 4.2 mg, 4.2 mg) i com a dissolvent una barreja 20:80 de MeOH:H₂O a pH= 7.4. Els controls es realitzaren per HPLC en fase inversa utilitzant condicions isocràtiques 95:5 MeOH:H₂O, amb un flux de 1 ml/min. Els compostos eluïren als següents temps: t_r(O(1)PAP)= 8.5 min, t_r(O(2)PAP)= 8.0 min i t_r(O(N)PAP)= 6.6 min.

2.3.3.3. Estabilitat de l'O(1)PAP, l'O(2)PAP, l'OO(1,N)PAP i l'O(N)PAP en dissolució de MeOH:aigua (90:10)

Es pesaren les següents quantitats d'O(1)PAP, d'O(2)PAP, d'OO(1,N)PAP i d'O(N)PAP (1.5, 14.4, 1.3 mg) i es dissolgueren en 3 ml d'una barreja MeOH:H₂O (90:10). Es deixaren en agitació a 30 °C durant 31 h. Anàlogament es prepararen 1.3 mg d'O(1)PAP i 1.2 mg d'O(2)PAP en 3 ml de MeOH:H₂O, tot afegint 133 mg de sílica-gel a cada dissolució, deixant-les en agitació a 30°C durant 31 h. L'estudi de les diferents dissolucions es realitzà mitjançant

diferents alíquotes a diferents temps analitzades per HPLC, igual que en l'apartat 3.3.2.2 ($t_r(\text{OO}(1,\text{M})\text{PAP})= 23.7 \text{ min.}$

2.3.3.4. Estabilitat dels mPAPs en condicions de resina àcida amberlyst 15, resina bàsica Florisil® i MeOH:H₂O (90:10, pH=1.1)

Es prepararen tres dissolucions 1 mM d'O(1)PAP, cadascuna de les quals es dissolgué en MeOH:H₂O (90:10), tot afegint per separat resina àcida amberlyst 15, Florisil® i ajustant el pH a 1.1 amb HCl. Els controls es feren per HPLC, igual que s'indica en l'apartat 2.3.3.1. a $t= 0,1 \text{ h}$ i 3 h.

2.3.4. ESTUDI DE LA MIGRACIÓ D'ACIL EN DERIVATS DEL PAP ACILATS AMB RESIDUS D'ÀCID HEXANOIC

Es preparà una dissolució de 1.6 mg d'H(1)PAP en 20 ml d'hexà. D'aquesta dissolució s'agafaren 5 ml i es posaren en tres reactors on s'eliminà el dissolvent. A continuació s'hi afegí 1 ml d'hexà, hexà:IPA (9:1) i tampó-tris (pH= 8), respectivament. Aquestes dissolucions es van deixar amb agitació a 37°C durant 4 h. Els controls es realitzaren mitjançant HPLC utilitzant el mètode NOCR6, agafant alíquotes de 100 µl a diferents temps (15 min, 1 h, 2 h i 4 h). El temps de retenció del H(1)PAP va ser: $t_r(\text{H}(1)\text{PAP})= 8.3 \text{ min.}$

2.3.5. ESTUDI DE LA MIGRACIÓ D'ACIL EN DERIVATS ESTRUCTURALS DEL PAP ACILATS AMB RESIDUS D'ÀCID HEXANOIC

Es prepararen dissolucions dels compostos **1**, **2**, **3** i **4**: 1.6 mg, 1.2 mg, 1.2 mg i 1.6 mg, respectivament, en 20 ml d'hexà. D'aquestes dissolucions s'agafaren 5 ml i es posaren en tres reactors on s'eliminà el dissolvent. A continuació s'afegí 1 ml d'hexà, hexà:IPA (9:1) i tampó-tris (pH= 8) respectivament. Aquestes dissolucions es van deixar amb agitació a 37°C durant 4 h. Els controls es realitzaren mitjançant HPLC utilitzant el mètode NOCR6, agafant alíquotes de 100 µl a diferents temps (15 min, 1 h, 2 h i 4 h). Els temps de retenció dels compostos **1**, **2**, **3** i **4** foren respectivament: 3.3 min, 12.3 min, 9.9 min i 5.1 min.

**PART III. ESTUDIS DE REACTIVITAT DELS
DERIVATS DEL PAP**

Sumari part III

3.1. INTRODUCCIÓ	137
3.1.1. Antecedents i objectius de la part III	137
3.2. ESTUDI DE LES INTERRELACIONS ENTRE TRIGLICÈRIDS, DERIVATS DEL PAP I ANILIDES	139
3.2.1. Relació entre l'OO(1,2)PAP i l'OA en el conjunt d'experiències del disseny d'experiments	140
3.2.2. Comparació de la reactivitat del dPAP respecte a la dels triglicèrids	147
3.2.3. Comparació de la reactivitat de la posició 1 respecte la posició 2 del dPAP	148
3.2.4. Reactivitat del mPAP en la formació d'anilides a partir dels dPAPs	150
3.2.5. Síntesi i identificació de productes complexos de condensació de derivats del PAP	152
3.2.5.1. <i>Obtenció del compost model de tipus I</i>	152
3.2.5.2. <i>Obtenció del compost model de tipus II</i>	154
3.2.5.3. <i>Obtenció del compost model de tipus III</i>	156
3.2.6. Estudi de l'estabilitat dels derivats del PAP en un procés de desodorització sense l'addició d'anilina	156
3.2.7. Estabilitat dels derivats del PAP en condicions diluïdes	159
3.2.8. Estudi del balanç de matèria en diferents models d'oli	160
3.2.8.1. <i>Cerca dels compostos model tipus I, II i III en un model d'oli</i>	164
3.2.9. Estudi de l'evolució amb el temps d'un model de desodorització d'oli de colza	165
3.2.10. Reactivitat en models d'oli a temperatura ambient	167
3.3. ESTUDIS TÈRMICS I ANÀLISI DE L'ESTABILITAT DE DERIVATS DEL PAP	169
3.3.1. Síntesi dels compostos 5 i 6, nous derivats del PAP	169
3.3.2. Estudis calorimètrics i termogravimètrics de derivats del PAP	170
3.3.3. Estudis d'estabilitat tèrmica realitzats en un forn de gasos de l'O(1)PAP, H(1)PAP, HH(1,2)PAP, 5 i 6	173
3.3.4. Conclusions	174
3.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	177
3.4.1. Generalitats	177

3.4.2.	Relació entre l'OO(1,2)PAP i l'OA en el conjunt d'experiències del disseny d'experiments	177
3.4.3.	Comparació de la reactivitat del dPAP i els triglicèrids, i de la reactivitat del C1 vs el C2 del dPAP	178
3.4.4.	Síntesi i identificació de productes complexos de condensació de derivats del PAP	179
3.4.4.1.	Obtenció del compost model tipus I a partir del PAP i glicidol	179
3.4.4.2.	Obtenció del compost model tipus II a partir del bisPAP i glicidol	179
3.4.5.	Estudi de l'estabilitat dels derivats del PAP en un procés de desodorització sense l'addició d'anilina	180
3.4.6.	Estabilitat dels derivats del PAP en condicions diluïdes	181
3.4.7.	Estudi de l'evolució amb el temps d'un model de desodorització d'oli de colza	181
3.4.8.	Reactivitat en models d'oli a temperatura ambient	181
3.4.9.	Síntesi del compost 5	181
3.4.10.	Síntesi del compost 6	182
3.4.11.	Estudis d'estabilitat tèrmica realitzats en un forn de cromatografia de gasos de l'O(1)PAP, H(1)PAP, HH(1,2)PAP, 5 i 6	183
3.4.12.	Estudis calorimètrics i termogravimètrics de derivats del PAP	183

3.1. INTRODUCCIÓ

3.1.1. Antecedents i objectius de la part III

Durant més de 20 anys d'investigacions de la SOT, s'han estudiat diverses línies d'investigació encaminades a esbrinar el possible agent causant de la síndrome. Entre elles destaquen:

- l'extens estudi epidemiològic realitzat per identificar l'origen de la intoxicació,
- estudis toxicològics per intentar reproduir la síndrome en models animals,
- estudis immunològics per esbrinar quin tipus de mecanisme intervé en la SOT,
- estudis clínics per controlar l'evolució de la malaltia en els pacients
- i finalment estudis químics on s'ha intentat descriure de la forma detallada la composició del olis causants de la intoxicació.

Aquest últim punt és el que ha centrat molts esforços amb el propòsit d'identificar tots els possibles components dels olis adulterats amb un 2% d'anilina i sotmesos a un procés fraudulent de refinació. Més concretament en la identificació dels derivats anilínics: tant

anilides com derivats del PAP. Fins ara, la majoria d'estudis vinculats amb l'anàlisi dels olis casos s'han centrat en la identificació del màxim nombre de derivats del PAP i en els diferents tipus d'anilides. Però és a partir del disseny d'experiments realitzat en el nostre laboratori on s'obtingueren indicis que tant l'anilina, les anilides i els derivats del PAP presentaven algun tipus de relació més enllà de les observades fins aquell moment. Aquests indicis van fer plantejar una sèrie d'estudis per aprofundir més detalladament en la interrelació entre aquells compostos. Aquest plantejament obria una nova orientació química que no s'havia tingut en compte en les investigacions de la SOT.

Per altra banda, l'existència d'aquestes interrelacions va posar de manifest determinats comportaments dels derivats del PAP davant de temperatures elevades que fins ara no s'havien considerat. És aquest fet el que ens portà a investigar més a fons l'estabilitat tèrmica d'aquests derivats en diverses condicions. Es va creure que era molt important conèixer aquests tipus de processos que podien tenir lloc durant l'obtenció dels olis tòxics. Aquesta informació podria arribar a ser important ja que permetria explicar la diferència entre els olis anomenats catalans i els de la refinaria ITH de Sevilla.

Per tant, l'objectiu principal d'aquesta part de la Tesi fou l'aprofundiment en les interrelacions existents entre l'anilina, les anilides i els derivats del PAP, així com la determinació de nous possibles productes que sorgiren de l'estudi d'aquestes interrelacions.

Un altre objectiu complementari ha estat l'estudi tèrmic de l'estabilitat dels derivats del PAP i la relació entre les dades extretes i les del primer objectiu esmentat.

3.2. ESTUDI DE LES INTERRELACIONS ENTRE TRIGLICÈRIDS, DERIVATS DEL PAP I ANILIDES

La reactivitat dels derivats del PAP ha estat un factor clau a l'hora d'arribar a entendre les possibles interrelacions entre l'anilina, les anilides i els derivats del PAP, tots ells compostos presents en els olis causants de la intoxicació. En l'apartat que es descriurà a continuació s'explica quins han estat els assajos realitzats per aprofundir en les propietats químiques dels derivats del PAP. La majoria d'experiments s'han centrat en la realització de models d'oli de colza sotmesos a processos de desodorització.

L'anilina que fou introduïda com agent desnaturalitzant no fou l'únic compost anilínic trobat en els olis casos; altres compostos identificats foren les anilides i els derivats del PAP. El primer punt d'unió que es plantejà entre aquests compostos fou la relació observada a partir de la reactivitat de l'anilina en la matriu d'oli de colza, reactivitat que conduí a la formació de dos famílies de productes: els dPAPs i les anilides.

Com ja s'ha esmentat en el primer capítol, el dPAP es forma en els models d'oli tòxic durant el procés de desodorització (a causa de les temperatures elevades). Per tant, es pot imaginar que el dPAP sorgeix de la reacció entre l'anilina i un triglicèrid (Figura 3.1.camí b). En

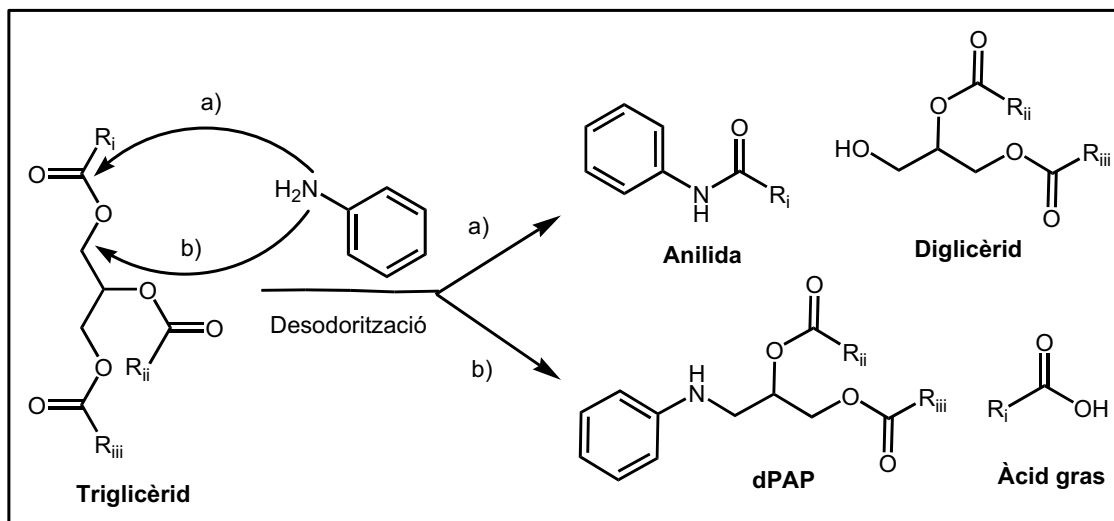


Figura 3.1. Camins postulats per a la reacció de formació dels derivats dPAP i de les anilides per l'atac nucleòfil de l'anilina sobre el triglicèrid durant el procés de desodorització, on R_i , R_{ii} i R_{iii} són residus de diferents àcids grassos que poden formar part dels triglicèrids.

aquest procés l'anilina reacciona sobre l'esquelet del triglicèrid per donar el corresponent dPAP. La formació del dPAP va acompanyada per l'alliberament d'un àcid gras. Una altra reacció en la qual es pot involucrar l'anilina amb els triglicèrids és la transacilació amb qualsevol dels tres residus d'àcid gras, tot conduint així a l'anilida corresponent i com a part no anilínica, a un diglicèrid (Figura 3.1.camí a). En definitiva, el triglicèrid es pot considerar com un substrat ambidentat de l'anilina.

L'oli de colza es tracta d'una barreja complexa diversos àcids grassos i glicèrids. Tant en el cas dels àcids grassos com en els residus dels glicèrids l'àcid oleic és el més abundant. Per aquest motiu aquest àcid fou l'escollit com a residu d'àcid gras model per a dur a terme bona part dels estudis detallats a continuació.

3.2.1. RELACIÓ ENTRE L'OO(1,2)PAP I L'OA EN EL CONJUNT D'EXPERIÈNCIES DEL DISSENY D'EXPERIMENTS

La possible relació entre l'OO(1,2)PAP i l'OA va ser un dels primers punts a investigar en aquest context. El treball es va centrar en la realització d'un disseny d'experiments. Com s'explica en l'apartat 1.2.2, s'estudià la formació de derivats del PAP i d'anilides així com la

seva interconversió durant la desodorització model d'oli de colza tractat amb anilina. El resultat més rellevant de l'estudi fou l'observació d'una dependència entre l'OO(1,2)PAP i l'OA.

L'estudi dels primers 27 experiments realitzats en el disseny d'experiments va permetre correlacionar dues respostes: l'OO(1,2)PAP i l'OA, de manera que s'ajustessin a una funció polinòmica, amb les següents variables codificades: $C(t_M)$ i $C(P)$, les quals es troben detallades en l'apartat 1.2.2.2. Aquesta relació va permetre establir la següent equació, amb la finalitat de descriure el model:

$$OA = 106 / (720.0 - 0.264 * OOPAP + 130.3(C(t_M))C(P))$$

Amb aquesta expressió, la variabilitat de l'OA pot ser explicada en un 69.02%. L'OO(1,2)PAP explica un 63.5% de la variabilitat i el 5.5% restant és explicat per una combinació de la P i t_M (vegeu 1.2.3.1.). L'error estàndard estimat va ser 2400 ppm.

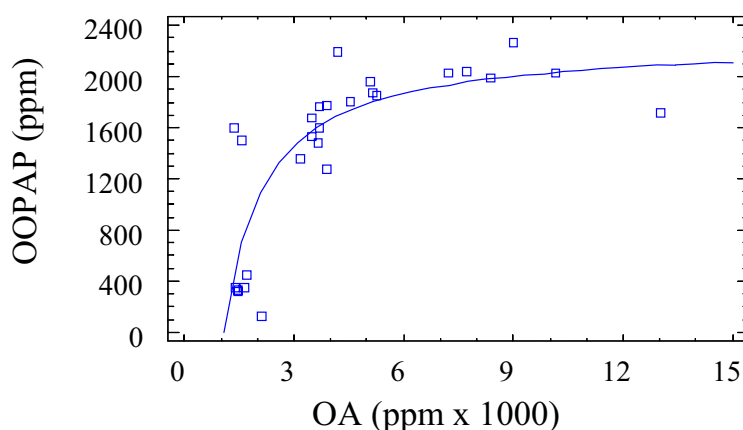


Figura 3.2. Relació entre la resposta d'OO(1,2)PAP i d'OA dels 27 primers experiments de desodorització. La línia contínua indica l'ajust del model dels experiments a una hipèrbola.

Així doncs, la relació entre les respostes de l'OO(1,2)PAP i l'OA era clara, però calia trobar-ne l'explicació a nivell químic. Per aquest motiu es van plantejar dues hipòtesis i els experiments corresponents que les confirmessin o no.

Podien existir dues possibles explicacions per aclarir la relació entre l'OO(1,2)PAP i l'OA. La primera plantejava que l'OA podia actuar com un catalitzador afavorint la formació d'OO(1,2)PAP en el si de l'oli. Per confirmar aquesta hipòtesi es van realitzar experiments dopant l'oli amb OA (1500 ppm). Els resultats van mostrar quantitats menors d'OO(1,2)PAP

comparant-les amb el blanc, un experiment de desodorització sense dopatge. Així doncs, la presència d'anilides no incrementava la formació de l'OO(1,2)PAP.

La segona hipòtesi consistia en considerar que l'anilina pot reaccionar amb els dPAPs mitjançant una transacilació per donar anilides. Si aquest fos el cas, l'OA podria ser generada a partir dels triglicèrids (Figura 3.1.a) i també dels dPAPs. Aquesta observació plantejà una nova via de formació d'anilides (Figura 3.3). Per tant, en el cas que la hipòtesi fos certa, caldria veure si la reacció de l'anilina amb el dPAP era més afavorida que amb un triglicèrid. Per tant, es pensaren un conjunt d'experiments en els quals es prepararien una sèrie de models d'olis, els quals es sotmetrien a un procés de desodorització.

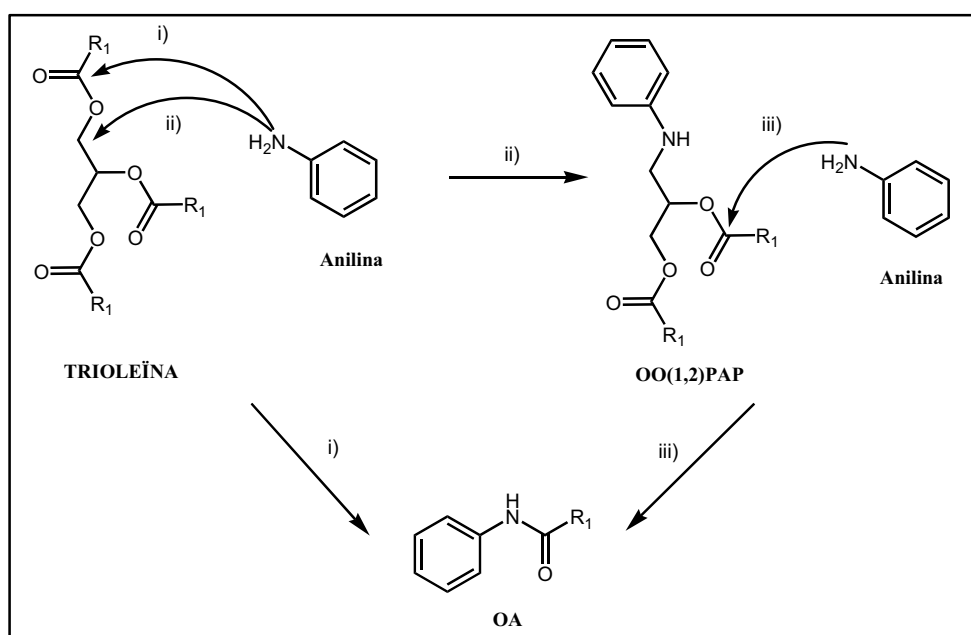


Figura 3.3. Vies plantejades per a la formació d'anilides a partir dels dos possibles substrats: els triglicèrids i els dPAPs.

En primer terme, per trobar l'explicació entre la relació de l'OO(1,2)PAP i l'OA es va replantejar l'anàlisi de la corba de la Figura 3.2, tot suposant una relació de dependència a la inversa entre les dues respostes (Figura 3.4).

L'estudi de la corba de dependència d'OO(1,2)PAP i OA a la inversa, va fer pensar en fer experiments dopant les mostres inicialment amb OO(1,2)PAP i no amb OA. Així doncs, es van dopar amb OO(1,2)PAP mostres d'oli de colza, amb posterior determinació de les quantitats d'OA generades. Es van fer quatre experiments de desodorització: dos blancs i dos assajos

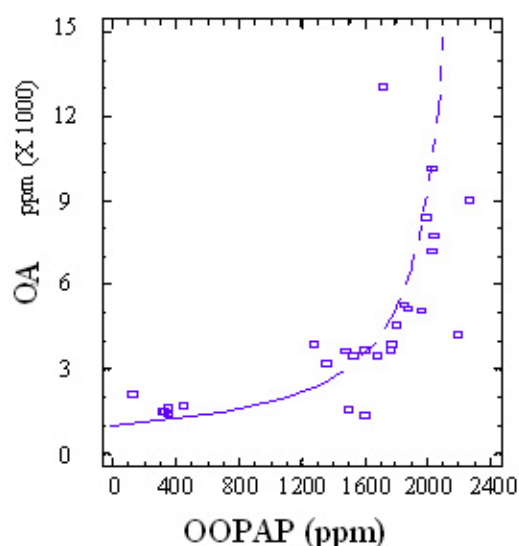


Figura 3.4. Representació alternativa de la corba de dependència de l'OA vs l'OO(1,2)PAP a partir de les dades dels 27 primers experiments de desodorització.

amb 800 ppm d'OO(1,2)PAP de dopatge. Els quatre experiments van tenir lloc sota les condicions del residual 0 ($t_M = 15.5$ min, $T_M = 267$ °C, $P = 73$ Torr i $t_v = 69$ min), perquè es volia seguir treballant amb el model matemàtic trobat en la relació entre OO(1,2)PAP i OA i per tant, que les respostes no estiguessin influïdes per les condicions experimentals. El terme residual 0 s'ha d'entendre com les condicions experimentals en les quals la relació entre OO(1,2)PAP i OA és la del model trobat. En aquest cas els residuals, diferències entre els valors predits i observats, no estan influïts per les condicions experimentals. Els resultats obtinguts van mostrar que el dopatge amb OO(1,2)PAP causava un augment en l'OA i l'OPAP en comparació amb els experiments sense dopatge (Taula 3.1).

Taula 3.1. Contingut d'OPAP, d'OO(1,2)PAP i OA (ppm), determinats en quatre experiments de desodorització de mostres d'oli de colza, dos blancs i dos dopats amb 800 ppm d'OO(1,2)PAP. En tots els casos es va afegir un 2% d'anilina a l'oli i es va operar en les següents condicions: $t_M = 15.5$ min, $T_M = 267$ °C, $P = 73$ Torr, $t_v = 69$ min.

Experiment	OPAP	OO(1,2)PAP	OA
Blanc	252	566	1639
Blanc	324	707	2099
OO(1,2)PAP dopat (800 ppm)	1474	1036	3595
OO(1,2)PAP dopat (800 ppm)	917	895	3543

El nivell d'OA va augmentar de 1639-2099 ppm fins a 3500 ppm en els dopats. Això es podia explicar considerant que l'OO(1,2)PAP és un substrat per a la generació d'OA. Aquesta reactivitat pot ser explicada acceptant unes millors propietats de donador d'acil de l'OO(1,2)PAP en comparació a les del triglicèrid.

Com es mostra en la Figura 3.5, els valors d'OA (rectangles vermells) obtinguts en els experiments dopats amb OO(1,2)PAP són més elevats que els esperats si l'OO(1,2)PAP no jugués cap paper en la formació d'anilides. La inserció d'aquests experiments en la corba on es mostra la relació entre OA i OO(1,2)PAP permet veure que els blancs es situen propers a la corba del model. Agafats conjuntament, els experiments amb dopatge mostraren la interrelació entre OO(1,2)PAP i OA. Segons això, les anilides poden ser generades de la reacció de l'anilina amb els triglicèrids, però també de la reacció de la anilina amb els dPAPs.

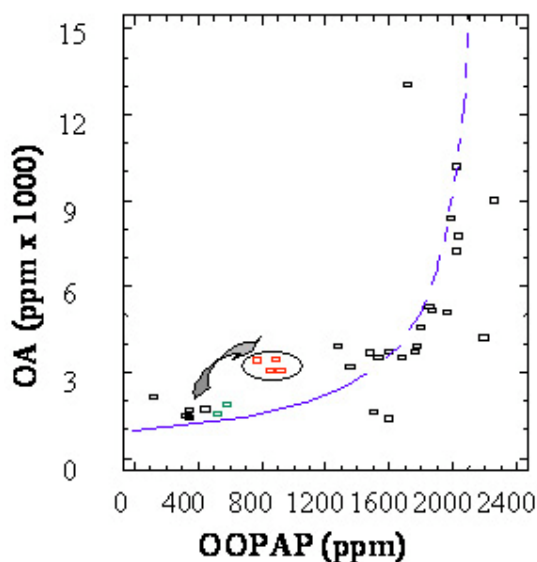


Figura 3.5. Relació entre el contingut d'OO(1,2)PAP respecte el d'OA en els experiments del model de desodorització realitzats amb i sense dopatge d'OO(1,2)PAP. Els experiments dopats amb OO(1,2)PAP es mostren en vermell i els corresponents experiments blancs es mostren en color verd.

D'altra banda, es va estudiar la relació entre les respostes d'OA i d'OPAP, atès que aquest compost seria un subproducte de la reacció de formació d'OA a partir de l'OO(1,2)PAP (Figura 3.6).

Caldria esperar una relació lineal entre l'OA i l'OPAP en el cas que l'única via de formació fos la indicada en la Figura 3.6. Però, com s'ha comentat anteriorment, l'OA també es pot formar a partir de la reacció de l'anilina amb un triglicèrid. A més, l'OPAP pot ser que es generi

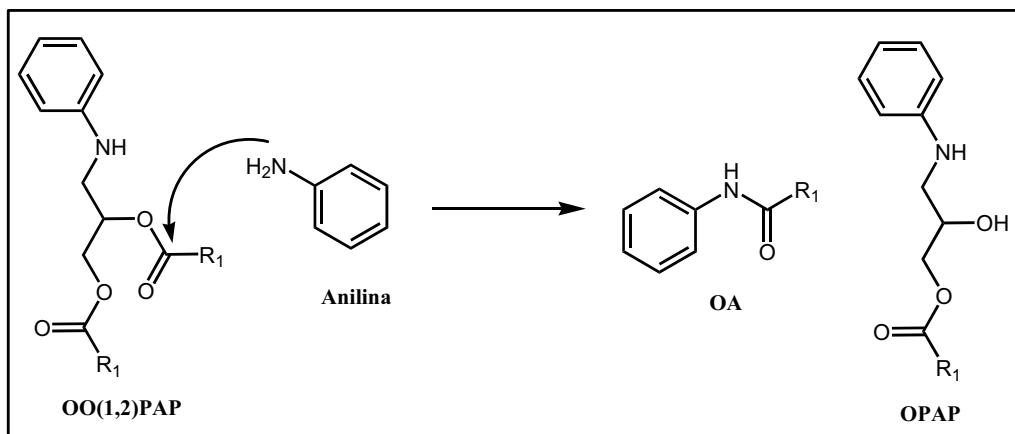


Figura 3.6. Formació de l'OA i de l'OPAP a partir de la reacció de transacilació de l'OO(1,2)PAP amb anilina.

gràcies a la hidròlisi de l'OO(1,2)PAP, situació possible si es tenen en compte les condicions extremes de l'etapa de desodorització. Per tal de mostrar gràficament aquesta relació, es representaren la relació OA-OPAP, i la relació OO(1,2)PAP-OPAP dels experiments dopats i sense dopar (Figura 3.7).

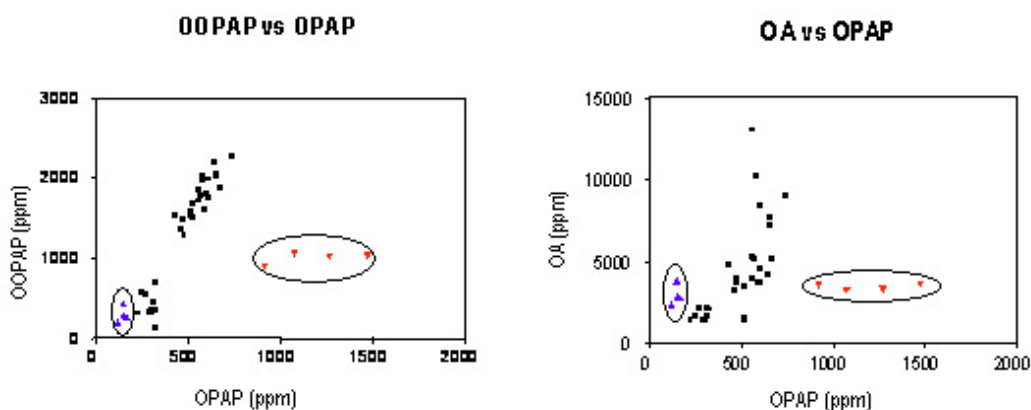


Figura 3.7. Representació de cadascuna de les respostes OO(1,2)PAP i OA en funció de la resposta OPAP. a) OO(1,2)PAP vs OPAP, b) OA vs OPAP, en els experiments de desodorització realitzats sense dopatge i amb dopatge (dopats amb OO(1,2)PAP en vermell i dopats amb OA en blau).

En la gràfica on es representa la relació OO(1,2)PAP vs OPAP, es pot veure com els 27 experiments inicials s'ajusten a una dependència lineal incloent els experiments dopats amb OA. En canvi, els experiments dopats amb OO(1,2)PAP surten fora de la linealitat. Pel que fa a la gràfica OA vs OPAP, la desviació respecte als 27 experiments inicials dels dopats amb OA és evident. A més, en els experiments dopats amb OO(1,2)PAP, les respostes d'OPAP i d'OA

també es desvien de la linealitat observada en les dues representacions, ja que es forma molt més OPAP i OA que per als experiments del disseny.

En resum, el recull de tots aquests resultats conduí a proposar una nova via de formació d'anilides: la reacció directa de l'anilina amb el dPAP (Figura 3.8).

La possibilitat d'aquestes dues vies d'obtenció d'anilides plantejà un conjunt de qüestions que s'haurien d'aclarir per comprendre millor la formació i interconversió dels derivats anilínics formats durant el procés de desodorització de l'oli de colza adulterat amb un 2% d'anilina:

- Es podrien considerar velocitats de formació diferents de les anilides, si es té en consideració els dos substrats de partida (triglicèrid i dPAP). En el cas que una d'aquestes reaccions fos més ràpida, es podria determinar de quin ordre de magnitud es parla?
- Si la reacció de l'OO(1,2)PAP fos més ràpida que en el cas dels triglicèrids, es podrien determinar diferències de reactivitat entre els grups acil en la posició C1 i C2 de l'OO(1,2)PAP?
- S'ha observat que les anilides es poden formar de forma espontània a partir dels triglicèrids, sense necessitar el procés de desodorització. Es podria reproduir aquest fet en el cas dels dPAP?
- Segons la hipòtesi plantejada, un augment de la concentració d'anilides hauria d'anar acompanyat d'un increment d'OPAP en els 27 experiments del disseny. Per quin motiu no es produeix aquest augment? Pot ser que el mPAP estigui reaccionant mitjançant una transacilació per donar més anilides i com a subproducte PAP? O bé, aquest mPAP pot estar involucrat en altres reaccions que el fan desaparèixer?
- Quina és la dinàmica global de formació i interconversió dels derivats anilínics durant el procés de desodorització?
- Presenten estabilitat els derivats anilínics en el procés de desodorització?
- El coneixement de les interrelacions existents entre els derivats anilínics podria arribar a explicar les diferències existents entre els de la ruta catalana i la de Sevilla, i per tant les característiques toxicològiques dels olis?

Es va intentar resoldre aquest conjunt de preguntes plantejant una sèrie d'experiments que es discutiran a continuació.

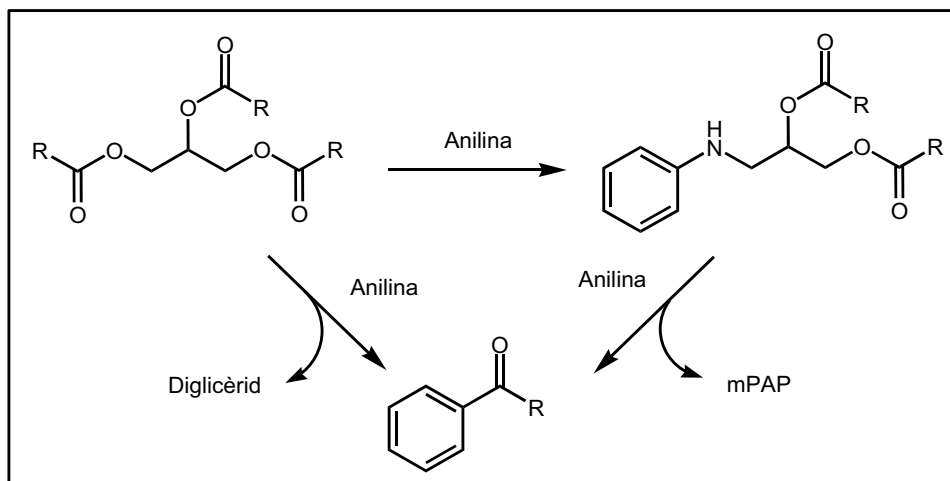


Figura 3.8. Dues vies de generació d'anilides en un oli de colza sotmès a un procés de desodorització model.

3.2.2. COMPARACIÓ DE LA REACTIVITAT DEL dPAP RESPECTE A LA DELS TRIGLICÈRIDS

Així doncs, la primera qüestió a resoldre va ser si la reacció de l'anilina amb els dPAPs era més ràpida que amb els triglicèrids i de quin ordre de magnitud es tractava. Per això, es realitzà un model de desodorització emprant com a matriu 250 mg d'una barreja de LL(1,2)PAP i trioleïna en una relació molar 1:1, afegint-hi un 2% d'anilina. La disponibilitat limitada de substrats aconsellaren realitzar els experiments a una escala petita, amb la conseqüent variació del temps de rampa, la qual fou una mica més curta que en els experiments de 400 g comentats a la part I, degut a la menor inèrcia del sistema. Els paràmetres de desodorització foren: $t_M = 10$ min, $T_M = 280$ °C, $P = 80$ Torr, $t_v = 60$ min i la temperatura de preescalfament 220 °C. La utilització del dPAP d'àcid linoleic tenia com a finalitat diferenciar les anilides formades a partir del dPAP (linoleanilides, LA), de les anilides formades a partir de la trioleïna (oleanilides, OA).

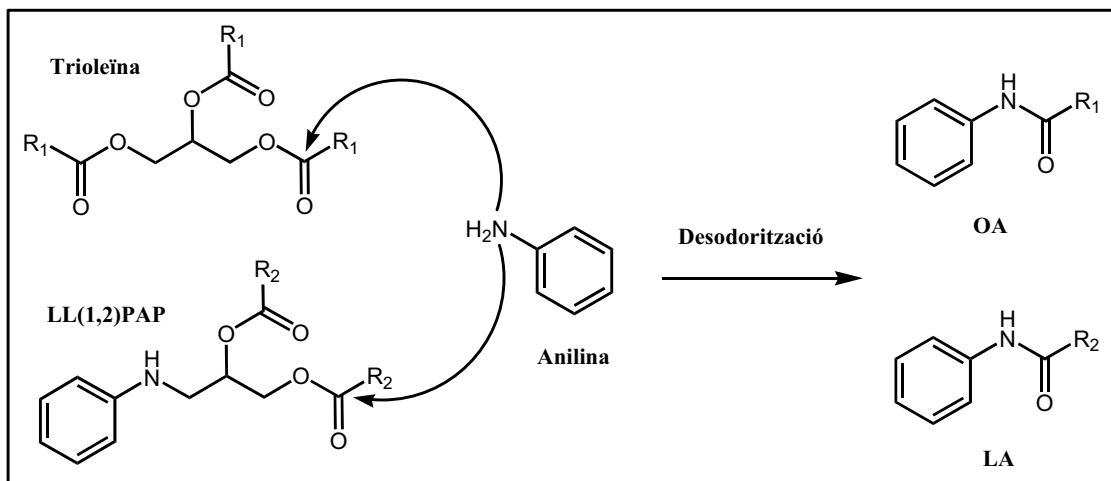


Figura 3.9. Reacció que pot experimentar l'anilina sobre dos grups donadors d'acil com són la trioleïna i el LL(1,2)PAP.

Els resultats mostraren la formació de 7669 ppm de linoleanilida i 509 ppm d'oleanilida. S'obtingueren fins a 14 vegades més de LA que d'OA, una relació gens menyspreable per a la consideració del dPAP com un punt d'elevada reactivitat en els olis tòxics. D'acord amb aquests resultats, els dPAPs es podien considerar millors donadors de grups acil que els triglicèrids, si més no en les condicions de desodorització.

3.2.3. COMPARACIÓ DE LA REACTIVITAT DE LA POSICIÓ 1 RESPECTE LA POSICIÓ 2 DEL dPAP

Per tal d'aprofundir en la reacció afavorida sobre els dPAPs, calia determinar si l'atac de l'anilina al dPAP tenia lloc preferentment al grup acil unit al grup alcòxid primari o bé al secundari. O fins i tot, plantejar-se si això podria dependre del residu d'àcid gras del dPAP. Amb aquesta finalitat es plantejaren els següents models d'olis, sotmesos a desodorització.

Primer es prepararen dos mostres, una amb 250 mg del diester mixt OL(1,2)PAP, i en l'altra el diester invers LO(1,2)PAP, ambdues amb un 2% d'anilina. La utilització de diferents àcids grassos permetria distingir quina de les dues posicions presentaria major facilitat a experimentar la transacilació.

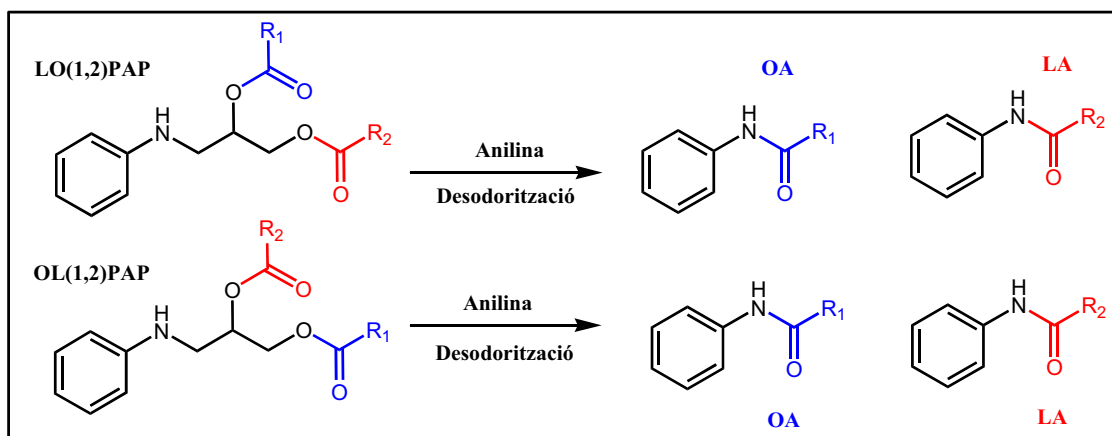


Figura 3.10. Formació d'anilides a partir de dPAPs mixtos per tal de diferenciar la reactivitat de la posició 1 respecte a la de la posició 2.

Taula 3.2. Resultats de les anàlisis de mostres de dPAPs mixtos sotmeses a desodorització amb un 2% d'anilina.

	OA (ppm)	LA (ppm)
OL(1,2)PAP	9048	16466
LO(1,2)PAP	13842	7278

Els resultats mostraren la reactivitat més elevada sobre la posició 2 (Taula 3.2). Cal puntualitzar que el 100% de les anilides, tant en el primer cas com en el segon, no provenen de la reacció directa de l'anilina amb el residu d'àcid gras del diester, sinó que una part podria venir de la reacció de l'anilina amb un residu d'àcid que hagués migrat de la seva posició inicial.

En aquest sentit, per poder veure si la variació del residu d'àcid gras del dPAP influïa en la reactivitat d'aquest diester, es realitzà un altre experiment, en el qual es prepararen 250 mg d'una matriu formada per una relació 1:1 OO(1,2)PAP:LL(1,2)PAP, amb el seu corresponent 2% d'anilina. Els resultats obtinguts foren: OA= 14071 ppm i LA= 16611 ppm, els quals suggereixen una lleugera preferència sobre el linoleic.

En resum, la principal característica química del dPAP revelada en aquests experiments, fou la reactivitat més gran sobre la posició 2. D'altra banda, no semblava que hi hagués una diferència significativa entre el linoleic i l'oleic. La major reactivitat de la posició 2 podria tenir una explicació en l'estabilitat conformacional aportada per la presència d'un pont d'hidrogen

entre el protó de l'amina i l'oxigen de l'alcoxi secundari. La formació d'aquest pont d'hidrogen podria facilitar una transferència del grup acil.

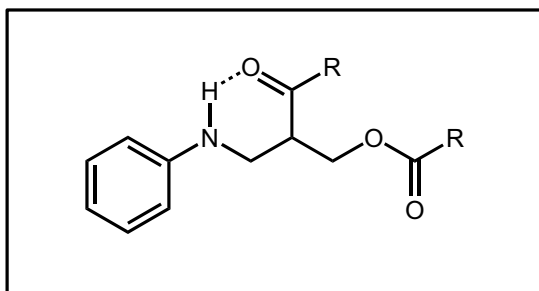


Figura 3.11. Pont d'hidrogen intramolecular proposat per a la molècula de dPAP per explicar la reactivitat més elevada de la posició 2.

En conclusió, tot i assumint que la quantitat de triglicèrid en l'experiment de desodorització d'un oli és extremadament superior a la del dPAP, podrien considerar-se velocitats de formació molt diferenciades entre els substrats de partida. Per al cas de la formació d'anilida a partir del dPAP, la velocitat seria superior a la de formació a partir del triglicèrid.

3.2.4. REACTIVITAT DEL mPAP EN LA FORMACIÓ D'ANILIDES A PARTIR DELS dPAPs

L'obtenció d'anilides a partir de la transacilació observada en el dPAP deixava un punt sense resoldre: la formació del mPAP en quantitats no proporcionals a les obtingudes d'anilides. Les hipòtesis referents al que li podia estar passant al mPAP van ser diverses.

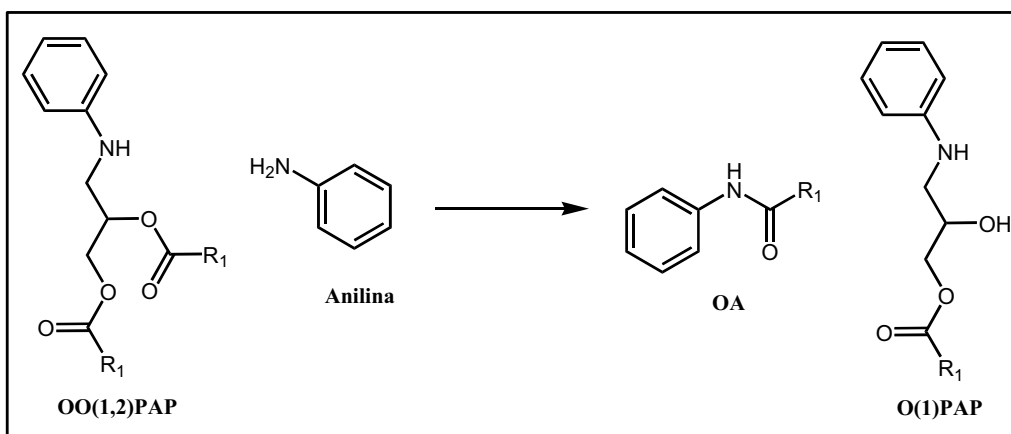


Figura 3.12. Formació de l'O(1)PAP i l'OA a partir de la reacció nucleòfila de l'anilina sobre un residu d'àcid oleic de l'OO(1,2)PAP.

Una possible reacció pot ser la transacilació promoguda per l'anilina, com ocorre en l'OO(1,2)PAP. Aquesta reacció donaria PAP com a subproducte. Totes les anàlisis fetes fins ara en els olis models i casos han indicat continguts de PAP < 10 ppm. Per tant, sembla clar que tot i que aquest procés podria passar, no seria el preferent. Una altra possibilitat seria que el monoèster fos reactiu sota les condicions de desodorització. Igual que ho fa l'anilina, el mateix mPAP o fins i tot el dPAP podrien actuar com a nucleòfils sobre altres molècules de dPAP o sobre els triglicèrids, tot conduint a la formació de productes més complexos. Aquesta hipòtesi té com a punts a favor el fet que el mPAP és una alquilarilamina secundària, les quals són nucleòfils més reactius que les amines aromàtiques primàries. Cal esmentar que aquestes reaccions són extensibles al dPAP. Un esquema simplificat d'aquests processos es mostra en el següent esquema (Figura 3.13).

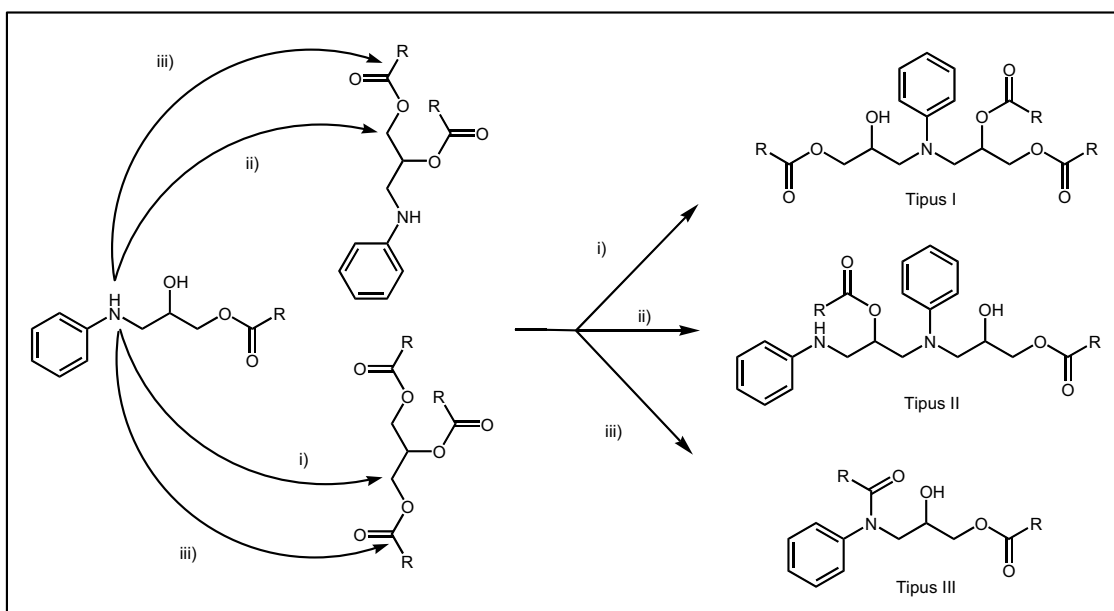


Figura 3.13. Possibles reaccions que pot experimentar el mPAP actuant com a nucleòfil amb altres molècules de dPAP o triglicèrids, extensibles al derivat dPAP.

Per tant, com a productes d'aquestes reaccions s'obtidrien fins a tres famílies de compostos. En una d'elles, la de tipus III) sorgiria de la reacció de l'amina d'un mPAP o un dPAP sobre un residu d'àcid gras d'un triglicèrid o dPAP, obtenint així un derivat N-acilat. Cal esmentar que en anàlisis d'olis casos s'han pogut determinar la formació de derivats N-acilats, com els tPAPs.⁶⁵ Uns altres tipus de compostos que es podrien formar són els derivats bisanilínics (tipus II), els quals es formarien de la reacció de substitució nucleòfila de l'amina d'un dPAP o mPAP sobre l'esquelet carbonat del dPAP. Finalment, un altre tipus de compostos que es formarien serien els de tipus I, que ho farien a partir de la reacció nucleòfila de l'amina d'un mPAP o dPAP sobre un triglicèrid. En tots aquests tipus de compostos,

depenent del grau d'esterificació dels reactius, s'obtidrien compostos amb més o menys alcohols esterificats. La situació encara es podria complicar més si cadascun d'aquests compostos s'involucrès en altres reaccions similars, actuant com a donadors d'acil, o com a nucleòfils.

L'estudi de la possible formació d'aquests subproductes es discutirà de forma més detallada en els apartats 3.2.5 i 3.2.8.

En resum, la introducció d'aquesta hipòtesi considera els derivats del PAP com a molècules molt reactives, les quals alhora poden actuar com a nucleòfiles a través del grup amino i com a electròfiles degut a la reactivitat que presenta en els grups acil. Aquesta reactivitat podria tenir certa rellevància toxicològica en el marc de la SOT, ja que el dPAP podria actuar com un agent reactiu davant de diversos components biològics cel·lulars.

3.2.5. SÍNTESI I IDENTIFICACIÓ DE PRODUCTES COMPLEXOS DE CONDENSACIÓ DE DERIVATS DEL PAP

La complexitat d'algunes reaccions en les quals podrien estar involucrats els derivats del PAP (mPAP i dPAP) era evident en la hipòtesi plantejada sobre la formació de subproductes de condensació, com els que es mostren en la Figura 3.13. Per tant, es pensà en aprofundir en la identificació d'alguns d'aquests compostos (tipus I, tipus II i tipus III).⁷⁶ La seva identificació hauria de permetre confirmar aquesta hipòtesi, així com la presència de nous compostos a tenir en compte des del punt de vista toxicològic. Per dur a terme la identificació, es plantejà la síntesi d'aquests compostos i la posterior cerca en models d'oli.

3.2.5.1. Obtenció del compost model de tipus I

El primer compost que es procedí a sintetitzar va ser el de tipus I, en la seva forma més senzilla, és a dir com a tetrol. Es plantejaren diverses vies, entre les quals hi havia l'obtenció a través de la reacció del PAP amb el glicidol (Figura 3.14) i la reacció es realitzà a reflux, controlant la seva evolució per HPLC.

El cru es purificà successivament per cromatografia de sílica-gel flaix i per cromatografia preparativa, sense arribar a obtenir el producte de forma pura, tal com mostraven els espectres de RMN. El cru resultant de les purificacions semblava presentar, a més de la barreja de diastereoisòmers esperada, impureses que no havien pogut ser eliminades mitjançant les tècniques de purificació utilitzades. En veure que aquest procediment no permetia obtenir el resultat desitjat en forma prou pura, es plantejà realitzar algun canvi en els reactius de partida per millorar el resultat obtingut.

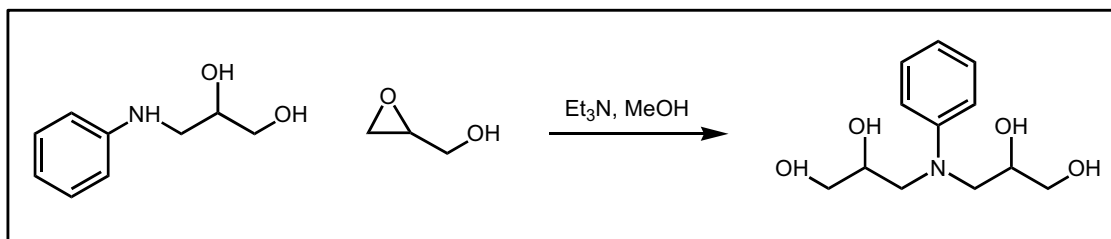


Figura 3.14. Obtenció del derivat tetrahidroxílic a partir del PAP i el glicidol.

El següent procediment d'obtenció del tetrol que es plantejà fou la síntesi a partir de la reacció del PAP sobre el 3-cloro-1,2-propanol (Figura 3.15). La reacció es va fer a reflux i es controlà per HPLC en fase inversa emprant el mètode analític TETROL. El control a les 7 hores mostrà un únic pic, corresponent al producte de partida.

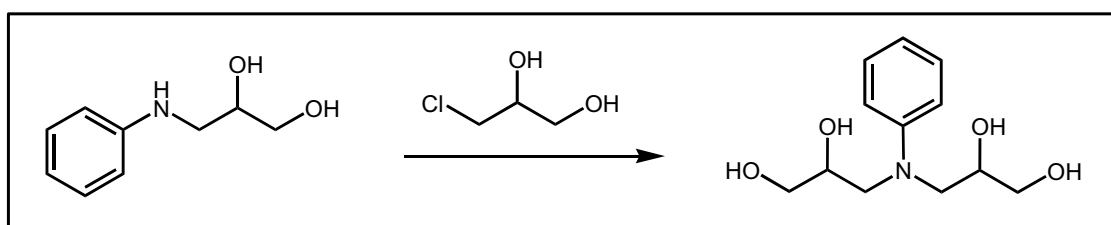


Figura 3.15. Obtenció del tetrol a partir del PAP i el 3-cloro-1,2-propanol.

Així doncs, es tornà a assajar l'obtenció del tetrol a partir de la reacció d'obertura del glicidol amb el PAP, però en aquest cas s'hi afegí ZnBr_2 com a catalitzador (Figura 3.16). Els cromatogrames d'HPLC mostraren la formació de quantitats significatives dels diastereoisòmers del tetrol esperat.

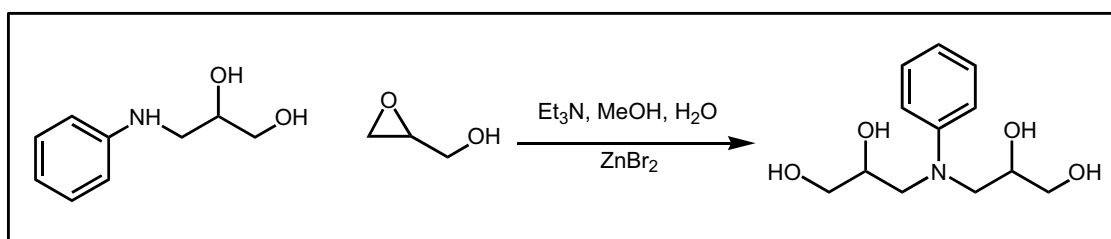


Figura 3.16. Obtenció del tetrol a partir del PAP i el glicidol, emprant ZnBr_2 com a catalitzador.

Tanmateix, després de realitzar la purificació mitjançant cromatografia de sílica-gel flaix, es va continuar obtenint el producte sense la puresa desitjada tal com s'observà en l'espectre de ^{13}C -RMN, on aparegueren senyals entre 70 i 75 ppm no corresponents als carbonis del

tetrol. En canvi, el cromatograma d'HPLC ens mostrava únicament la presència dels dos diastereoisòmers del tetrol ja que en les condicions d'elució, les impureses no van ser resoltes.

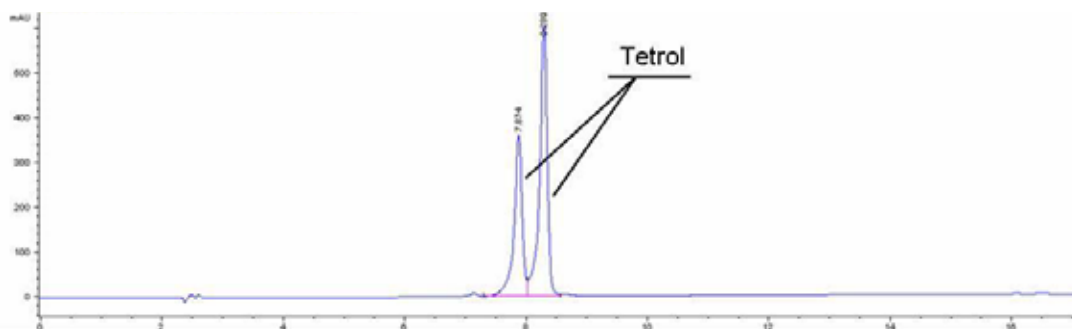


Figura 3.17. Perfil d'HPLC obtingut després de la purificació del cru de la reacció del PAP amb el glicidol en presència de $ZnBr_2$.

Amb tot, es conclougué que la puresa obtinguda del compost tipus I a partir del primer procediment era suficient per dur a terme els estudis d'identificació del producte en els models d'oli.

3.2.5.2. Obtenció del compost model de tipus II

El compost de tipus II consistia en un derivat format per dos unitats anilíniques i tres grups hidroxil. Per a l'obtenció d'aquest compost es van emprar dues estratègies paral·leles a les esmentades en l'apartat anterior.

La primera plantejava l'obtenció del compost tipus II a partir de l'obertura del glicidol mitjançant el bisPAP. La presència de dues amines no era un problema a l'hora d'obtenir el compost tipus II, perquè el bisPAP és simètric i per tant no es produiria distinció del producte format, fos quina fos l'amina que reaccionés sobre el glicidol. La reacció es realitzà emprant les mateixes condicions utilitzades per a la formació del PAP (a partir d'anilina i el glicidol).

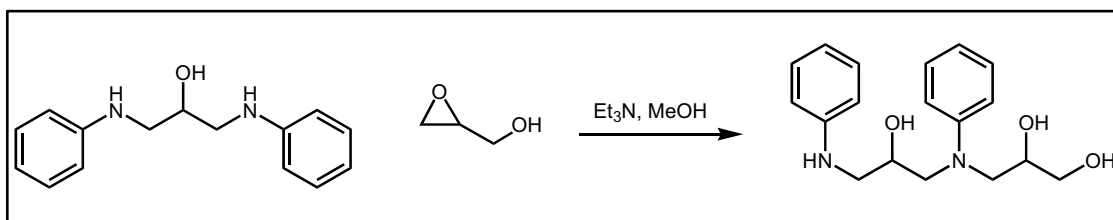


Figura 3.18. Obtenció del compost tipus II emprant com a productes de partida bisPAP i glicidol.

Tant en aquest cas com en el de l'obtenció del compost tipus I, en tractar-se de compostos molt polars, es dugué a terme el control mitjançant HPLC en fase inversa.

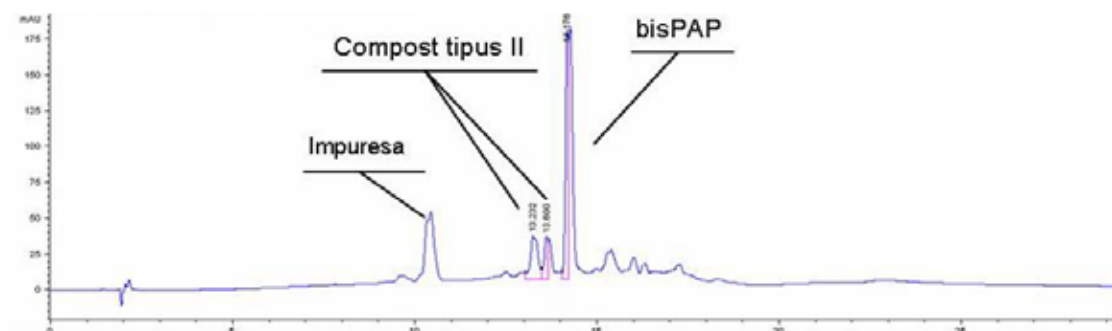


Figura 3.19. Cru de la reacció de formació del compost tipus II a partir del bisPAP i el glicidol.

En el cromatograma d'HPLC es pot observar com la formació dels dos diastereoisòmers del compost tipus II no és important; a més, hi ha la presència de diverses impureses que complicarien el procés d'obtenció del producte desitjat. El cru de la reacció es purificà per CCF preparativa seleccionant un conjunt de fraccions, degut a la parcial superposició entre els productes constituents del cru. Solament en una de les diferents fraccions analitzades per HPLC-MS es va poder observar la presència majoritària del derivat bisanilínic. Es van intentar successives purificacions per CCF, les quals tampoc van donar el producte desitjat de forma pura.

Per millorar el rendiment del procés es plantejà l'obtenció del derivat tipus II a través de la reacció del PAP amb l'1-cloro-3-(fenilamino)-2-propanol. En aquestes condicions i després d'haver transcorregut més de 12 hores de reacció, s'observà que els productes de partida romanien intactes.

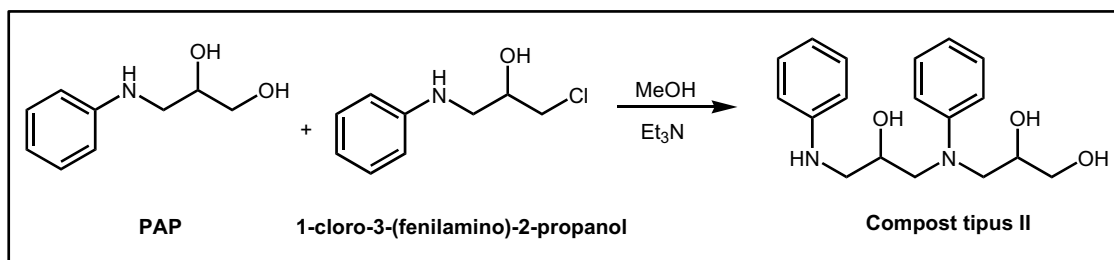


Figura 3.20. Intent de reacció del PAP amb l'1-cloro-3-(fenilamino)-2-propanol per obtenir el derivat de tipus II.

Per tant, un altre cop com en el cas de la reacció per obtenir el compost tipus I, la S_N2 d'una amina sobre un halogenat no funcionà. Per això, tot i no tenir el compost de tipus II amb una puresa elevada, la mostra disponible seria suficient per realitzar l'estudi.

3.2.5.3. Obtenció del compost model de tipus III

Els compostos de tipus III, com s'observa en la Figura 3.13, tenen com a estructura principal la del PAP, la qual es troba *N*-acilada per un residu d'àcid gras. A més, els grups alcohol es troben monoesterificats o diesterificats depenent del producte involucrat en la reacció amb un triglicèrid. Per tant, compostos com l'OL(1,*M*)PAP, l'OO(1,*M*)PAP i l'OOO(1,2,*N*)PAP pertanyen a aquesta família. Per aquest motiu no feu falta la síntesi d'aquest tipus de compostos, ja que en el laboratori es tenien quantitats d'aquests compostos. Aquests derivats, conjuntament amb els esmentats més amunt, s'empraren com a patrons en els assaigs amb models d'oli (vegeu apartat 3.2.8).

3.2.6. ESTUDI DE L'ESTABILITAT DELS DERIVATS DEL PAP EN UN PROCÉS DE DESODORITZACIÓ SENSE L'ADDICIÓ D'ANILINA

Una altra qüestió a estudiar era l'estabilitat dels esters del PAP sota les condicions tèrmiques del procés de desodorització. S'intentà aportar respostes a aquesta qüestió amb un seguit d'experiments, els quals agafaren cos conforme la investigació avançava. El primer d'ells, conseqüència de les sospites de la possible inestabilitat dels derivats del PAP en condicions extremes, consistí en preparar una mostra per duplicat, formada per una matriu d'OO(1,2)PAP sotmesa a desodorització. Cal indicar que en el model d'oli assajat no hi havia anilina lliure. Inesperadament, els resultats mostraren l'absència quasi completa d'OO(1,2)PAP al final de l'experiment, concretament menys de 40 ppm en ambdós duplicats. Aquesta va ser la primera evidència que mostrava que els derivats del PAP durant el procés de desodorització són inestables. A més, el fet que cridà més l'atenció no fou la desaparició de l'OO(1,2)PAP, sinó la detecció de quantitats gens menyspreables d'OA, en una matriu on prèviament no s'havia incorporat cap font d'anilides coneguda. Aquest experiment feu replantejar evidències establertes en estudis realitzats amb anterioritat en el nostre laboratori, com ara la creença que totes les anilides formades en un procés de desodorització provenen de l'anilina lliure. L'observació va fer replantejar també la hipòtesi sobre el paper d'aquests productes com a bons grups donadors d'acil i que aquesta fos la relació clau deduïda del disseny d'experiments. Cal esmentar que els resultats obtinguts s'haurien de validar en diferents condicions, ja que aquest experiment implicava una situació força allunyada de la qual podia arribar a passar realment en una matriu d'oli. La utilització d'una matriu pura de producte podia arribar a magnificar els resultats, afavorint així reaccions intermoleculares que en un medi

més diluït seria molt difícil que arribessin a tenir lloc. A continuació es decidí observar si aquests resultats s'extrapolaven a altres derivats del PAP sota les mateixes condicions. Les mostres que s'escolliren foren mostres pures d'O(1)PAP, OOL(1,2,N)PAP i de diferents diesters del PAP (LO(1,2)PAP, i OL(1,2)PAP), les quals van ser novament sotmeses a desodorització igualment amb l'absència d'anilina. Tant en les mostres anteriors com en les mostres d'OO(1,2)PAP, la concentració inicial de producte seria d'1000000 ppm, al tractar-se de mostres les quals solament contenien els productes purs. Els resultats obtinguts (Taula 3.3) indicaren novament que els derivats del PAP són tèrmicament inestables en les condicions de desodorització.

Taula 3.3. Continguts finals d'OPAP, OO(1,2)PAP, LLPAP, OA i LA, en ppm, de mostres de dPAP, dPAP mixtes, mPAP i del derivat triacilat sotmesos al procés de desodorització model sense la presència del 2% d'anilina.

	OPAP	OO(1,2)PAP	OA	LA
O(1)PAP	68352	114056	34402	---
OO(1,2)PAP	5310	84548	54494	---
OO(1,2)PAP	5744	121435	30777	---
LO(1,2)PAP	3360	35912	26173	11600
OL(1,2)PAP	3295	36126	8489	14211
OOL(1,2,N)PAP	nd	2460	8888	7969

D'aquests resultats el fet més rellevant era que en determinats derivats del PAP com el mPAP, dPAP i tPAP, no era necessària l'anilina perquè es formessin anilides. Per tant, la hipòtesi que aquests esters eren millors grups donadors d'acil que no pas els triglicèrids es posava en qüestió. Però tot i això, la idea de l'existència d'una relació clara entre anilides i dPAPs continuava sent vàlida, ja que aquests poden descomposar tèrmicament per donar anilides.

Amb la finalitat d'aclarir una mica més aquesta qüestió, es plantejà un experiment que consistí en una mostra pura d'OO(1,2)PAP amb un 2% d'anilina perdeuterada sotmesa a un procés de desodorització. Aquest experiment permetria confirmar si el diester és veritablement més bona font d'anilides per descomposició que no pas per transacilació. En el cas que tota l'anilida d'oleic que s'obtingués estès formada per anilina perdeuterada indicaria que la reacció de transacilació estaria afavorida; en canvi, l'anilida d'oleic no marcada només podria provenir de la transformació de l'OO(1,2)PAP de partida.

Els resultats obtinguts van mostrar un total de 78371 ppm d'OA no marcada i 392 ppm d'OA-deuterada. Aquests resultats indicaven que el dPAP presenta capacitat de formació d'anilides per dos mecanismes, per una banda per transacilació amb l'anilina i per l'altra per descomposició tèrmica, essent aquesta 200 vegades més abundant.

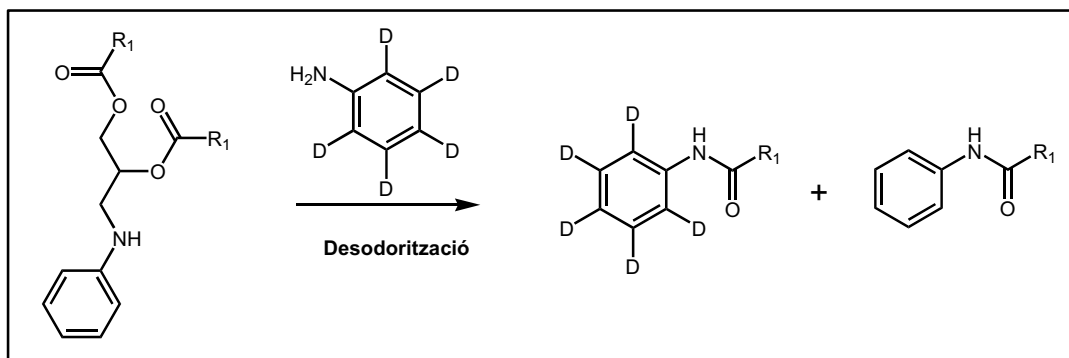


Figura 3.21. Formació d'anilides marcades amb anilina deuterada en un model d'oli format per OO(1,2)PAP amb un 2% d'anilina perdeuterada.

En definitiva, aquest conjunt d'experiments van apuntar en la direcció que no es necessitava anilina lliure perquè el dPAP generés l'anilida. Aquesta troballa no era però la solució definitiva a les qüestions plantejades, sinó que el coneixement d'aquest procés de descomposició dels derivats del PAP introduïa una nova qüestió prou interessant. Mitjançant quin mecanisme o via tenia lloc en aquest procés de descomposició tèrmica del dPAP per tal que es formessin les anilides? Tenint en compte que la única font d'anilina en aquests experiments era els derivats esterificats del PAP, es pensà en la possibilitat que existís un mecanisme de trencament d'aquestes molècules. Caldria doncs, plantejar experiments que permetessin clarificar aquest mecanisme de formació, així com identificar el subproducte de formació, sempre mirant-ho de relacionar amb la rellevància toxicològica d'aquests compostos en la SOT. Aquest punt es discutirà més àmpliament en el següent capítol.

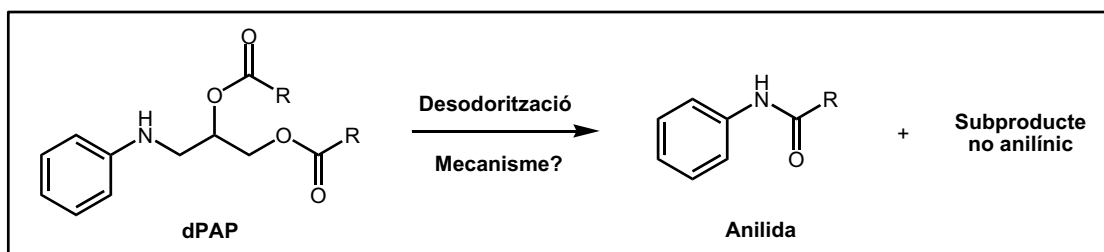


Figura 3.22. Descomposició de dPAPs per donar anilides durant el procés de desodorització.

Recapitulant tots els aspectes d'aquest punt es pot afirmar que en les condicions de desodorització, el dPAP dona més anilides que els triglicèrids. L'explicació d'aquest fet no roman en unes millors propietats de donador de grup acil, sinó en un mecanisme que acaba donant l'anilida sense que l'anilina actuï com a reactiu. Sense deixar de banda que la reacció d'acilació de l'anilina per part del dPAP pot ocórrer, sembla ser una via minoritària de formació d'anilides a partir del dPAP. Aquesta nova hipòtesi permetria explicar també per quina raó no es generava més quantitat de mPAP o bé de PAP en la formació d'anilides, ja que aquests productes serien el resultat de la transferència d'acil a partir del dPAP, com ja hem indicat en l'apartat anterior. De fet, el subproducte en el qual descompon el dPAP hauria de ser un compost que no contindria el residu anilínic (Figura 3.22), i que per tant, en cap cas no s'havia buscat en els olis. La cerca d'aquest compost era del nostre interès per entendre millor el procés d'obtenció d'anilides a partir del dPAP. Per aquest motiu es proposà la seva identificació com es detalla en el punt 4.1.1. En segon lloc, no es descarten les reaccions que s'han esmentat en l'apartat 3.2.4. basades en la nucleofília d'aquestes arilamines secundàries (Figura 3.13) alhora d'observar la poca formació de mPAP i PAP en els processos de desodorització. Per tant, en aquest punt de l'estudi calia introduir una nova relació en l'esquema general que mostra la relació entre triglicèrids, dPAPs i anilides (Figura 3.23).

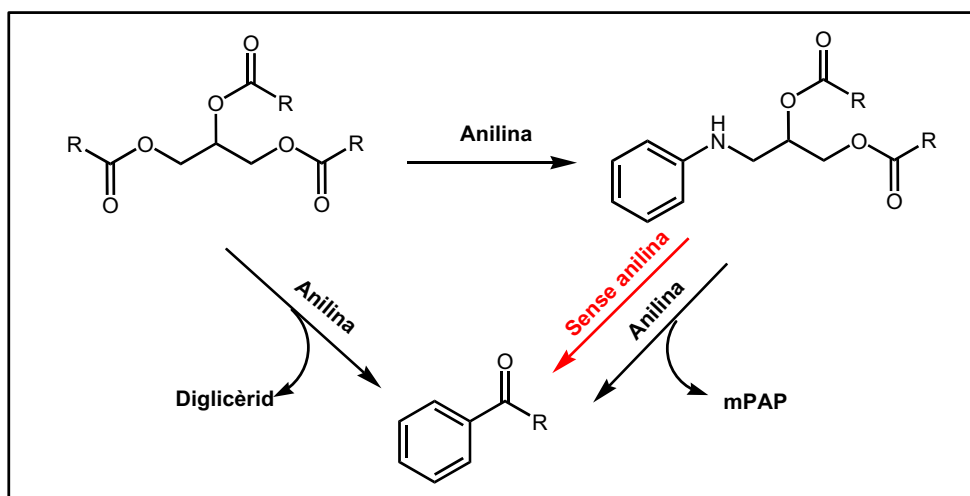


Figura 3.23. Noves relacions entre els diferents components trobats en model d'oli de colza sotmès a un model de desodorització en presència d'anilina.

3.2.7. ESTABILITAT DELS DERIVATS DEL PAP EN CONDICIONS DILUÏDES

S'ha esmentat anteriorment que en els models realitzats amb derivats del PAP purs, sotmesos a desodorització, i sense la presència d'anilina, podria ser que l'alta concentració de producte afavorís algun tipus de mecanisme de descomposició. Per això, amb la finalitat d'observar si en un medi més diluït es continuava produint la descomposició tèrmica dels

derivats del PAP, es realitzaren tres nous models de desodorització. S'empraren com a matrius de dilució trioleïna i l'oli de colza. Amb la matriu d'oli de colza es van realitzar dos experiments, un amb 800 ppm de LO(1,2)PAP i l'altre amb 800 ppm d'OO(1,2)PAP. Per altra banda, en l'experiment amb la matriu de trioleïna es dopà amb 800 ppm d'OO(1,2)PAP. Els resultats s'analitzaren de la mateixa manera que en els casos anteriors i es mostren a la Taula 3.4.

Taula 3.4. Resultats en ppm dels models de desodorització d'una matriu d'oli de colza amb 800 ppm d'LO(1,2)PAP i d'OO(1,2)PAP per separat i una altra de trioleïna amb 800 ppm d'OO(1,2)PAP.

	OA	LA	OPAP	OO(1,2)PAP	LOPAP
Oli de colza + 800 ppm LO(1,2)PAP	12	n.d.	3,2	< 40 ppm	12.5
Oli de colza + 800 ppm OO(1,2)PAP	n.d.	---	<40 ppm	< 40 ppm	---
Trioleïna + 800 ppm OO(1,2)PAP	n.d.	---	<40 ppm	< 40 ppm	---

En els resultats s'observà que els dPAPs que havien estat afegits en les matrius d'oli de colza i trioleïna presentaven una concentració inferior a 40 ppm (límit detecció del mètode emprat en laboratori de referència). En definitiva, la introducció d'un medi que diluís el LO(1,2)PAP i l'OO(1,2)PAP no afavoria l'estabilitat del compostos en les condicions de desodorització. Pel que fa a l'anàlisi dels possibles productes de descomposició, en aquest cas fou molt difícil treure'n cap conclusió, ja que l'addició inicial de producte era de l'ordre de 800 ppm, massa baix per poder identificar amb garanties productes de descomposició.

3.2.8. ESTUDI DEL BALANÇ DE MATÈRIA EN DIFERENTS MODELS D'OLI

La realització d'un estudi del balanç de matèria obtingut durant el procés de desodorització de determinats models d'oli ens hauria de facilitar comprendre millor l'evolució i la reactivitat dels derivats del PAP. Per això s'analitzà el balanç dels tres principals productes derivats del PAP, l'OO(1,2)PAP, l'OPAP i l'OA. Aquest estudi es realitzà concretament en tres models d'oli, en dos dels quals no s'afegí el 2% d'anilina (matriu d'OO(1,2)PAP i d'OPAP) i un format per una matriu d'OO(1,2)PAP, però amb un 2% d'anilina.

En els tres casos s'observà com el producte de partida desapareixia majoritàriament en el procés de desodorització, observant quantitats finals d'aquests productes que es troben al

voltant del 8%. Un dels resultats que cridà més l'atenció fou que en analitzar els continguts, d'OO(1,2)PAP, d'OPAP i OA aquests representaren com a molt el 20% del total de la massa inicial. Per tant, en els tres casos coincidí el fet que més del 80% del procés de descomposició dels productes de partida romania sense explicar. Una possible explicació era que part d'aquest 80% no determinat podria estar format per les estructures complexes, com les que s'han esmentat en l'apartat 3.2.4, més concretament les estructures bis-anilíniques de tipus II, ja que en aquests casos no es disposa de trioleïna en les matrius de desodorització perquè es poguessin formar estructures del tipus I. Tot i això, cal tornar a tenir en compte que en aquestes condicions s'estan afavorint processos intermoleculars ja que la concentració dels productes implicats en aquestes reaccions és elevada.

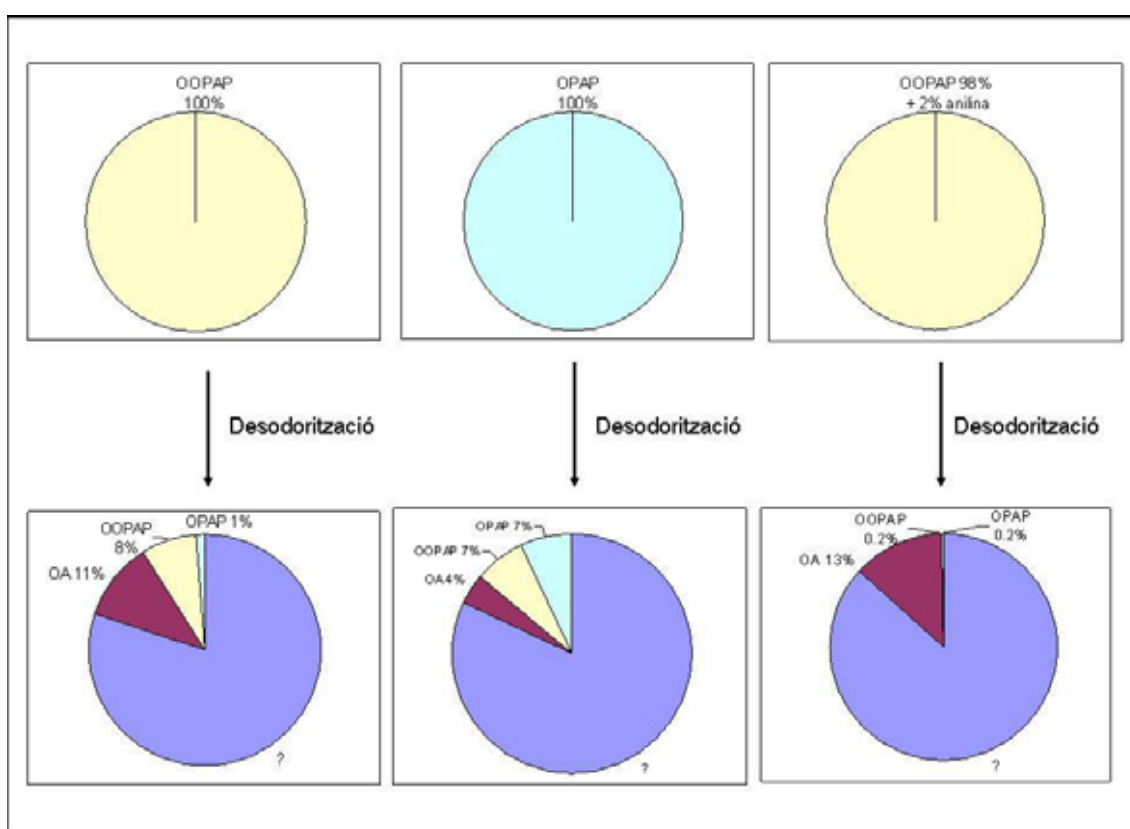


Figura 3.24. Balanç de matèria en tres models d'oli: OO(1,2)PAP i OPAP sense anilina i OO(1,2)PAP amb un 2% d'anilina.

Paral·lelament a les anàlisis quantitatives realitzades en els experiments anteriors, es dugué a terme una anàlisi qualitativa mitjançant HPLC, amb la finalitat d'esbrinar si es formava algun subproducte el qual podia passar desapercebut en les determinacions rutinàries. En la Figura 3.25 es mostren els cromatogrames obtinguts just abans de començar el procés de desodorització i en finalitzar el procés, de la mostra formada per OO(1,2)PAP pur sense la presència d'anilina.

En aquests cromatogrames a més de confirmar la formació d'anilides i la presència d'OO(1,2)PAP un cop finalitzat el procés de desodorització, es pot veure la presència d'un compost força abundant, caracteritzat per tenir un temps de retenció molt similar a l'OO(1,2)PAP i un espectre d'UV diferent al dels derivats diesters del PAP. Més concretament, aquest espectre coincidia amb el d'un derivat *N*-acilat. Per tant, l'espectre d'UV de derivat *N*-acilat i els temps de retenció feu sospitar que aquest producte podia correspondre al compost triacilat OOO(1,2,*N*)PAP. Finalment, les sospites foren confirmades quan es va comparar el cromatograma amb el del patró OOO(1,2,*N*)PAP.

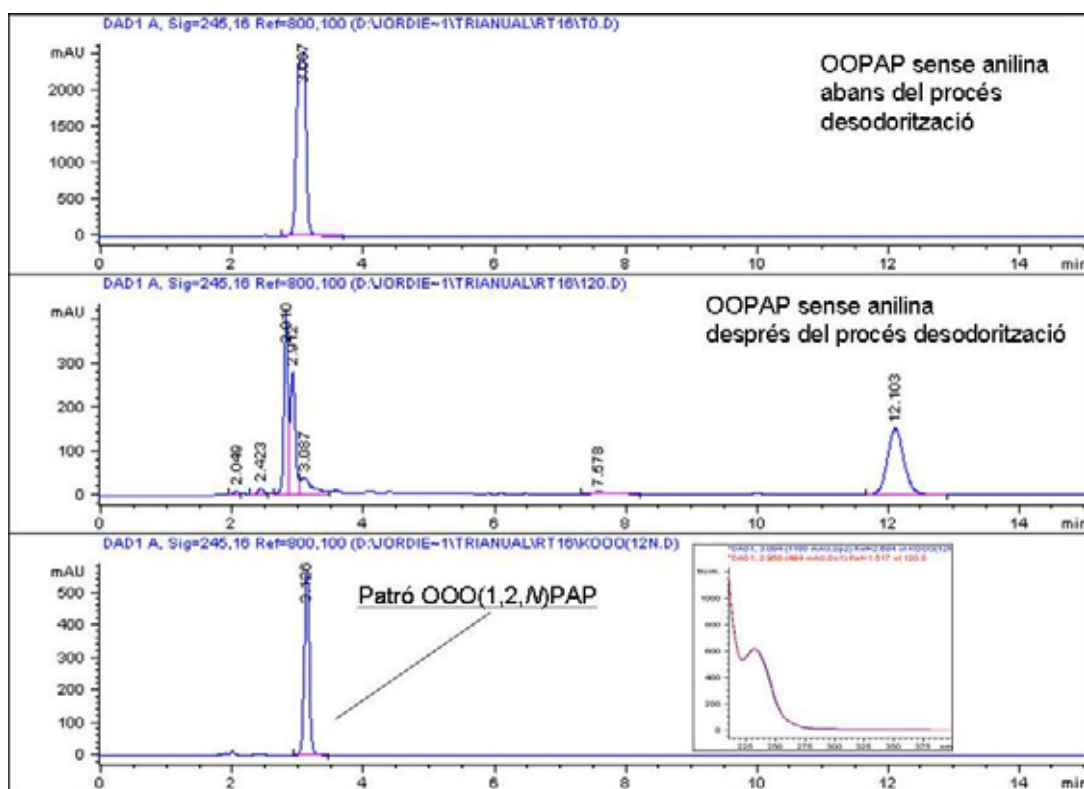


Figura 3.25. Cromatogrames on es mostra un model d'OO(1,2)PAP pur, sense la presència d'anilina, sotmès a desodorització abans i després del procés, juntament amb un patró del derivat triacilat OOO(1,2,*N*)PAP.

La detecció del derivat triacilat permeté identificar compostos del tipus III en models d'oli. Aquesta formació del derivat triacilat es podria explicar per la reacció d'una molècula d'OO(1,2)PAP sobre el grup acil d'una altra molècula d'OO(1,2)PAP, essent la reacció afavorida per la concentració elevada d'OO(1,2)PAP. En referència al balanç de matèria, si es té en compte la quantificació d'aquest substrat triacilat, conjuntament amb l'OO(1,2)PAP, l'OPAP i l'OA, es pot arribar a tenir un balanç més coherent. En definitiva, la consideració de la formació de quantitats significatives del derivat triacilat ens permetria recalculer el balanç de

matèria, arribant així a l'explicació d'un 55% dels derivats anilínics formats. D'aquesta manera, el balanç de matèria en el cas del model format per OO(1,2)PAP sense anilina quedaria com es mostra en la Figura 3.26.

Per tant, aquest derivat triacilat podria ser el primer derivat en què l'OO(1,2)PAP es transforma en les condicions de desodorització, treballant amb compostos purs. És en aquest context, on el derivat triacilat podria donar una reacció com la descrita per amides,⁷⁷ la qual es mostra en la Figura 3.27.

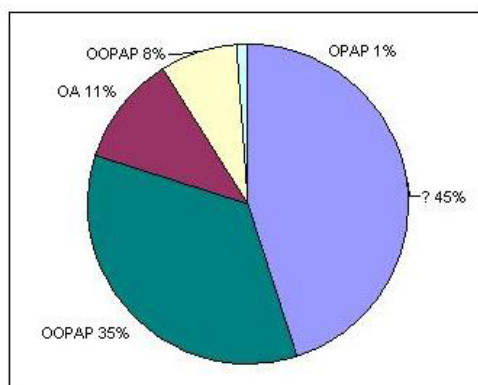


Figura 3.26. Esquema on s'explica la formació dels 55% dels derivats anilínics en el model d'oli format per OO(1,2)PAP sense la presència d'anilina.

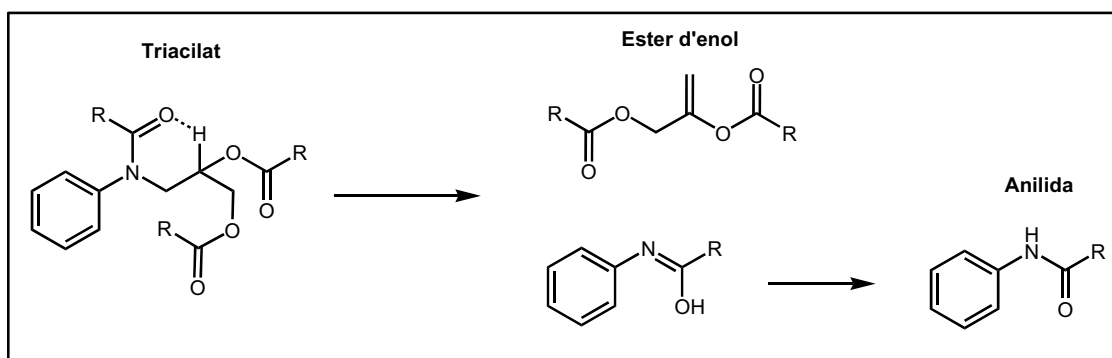


Figura 3.27. Reacció postulada de formació d'anilides a partir del derivat triacilat per destil·lació a elevades temperatures.

D'altra banda, anàlisis que es van realitzar en l'oli model format per OPAP pur sense la presència d'anilina i sotmès a desodorització, també van permetre identificar el derivat triacilat del PAP. Aquests resultats semblaven indicar que el derivat triacilat realitzava un paper d'intermedi en l'evolució del diester PAP durant la desodorització. Aquest intermedi seria

també inestable a aquestes condicions i generaria en part les anilides, constituint així una altra font d'anilides en la mescla de desodorització.

3.2.8.1. Cerca dels compostos model tipus I, II i III en un model d'oli

Paral·lelament a la determinació del derivat triacilat en un model d'oli, es procedí a la identificació dels compostos models de tipus II i III. El model d'oli que s'escollí fou el format per una mostra d'OO(1,2)PAP sense anilina, sotmès a desodorització. Aquest hauria d'afavorir la formació del compost II degut a l'alta concentració d'OO(1,2)PAP en el medi. La identificació es dugué terme mitjançant la comparació dels espectres d'UV d'aquests compostos models amb els dels diferents pics observats en el cromatograma d'oli model. Tot i que el compost tipus II no es trobava esterificat, el seu UV és el mateix tant si es troba esterificat com si no.

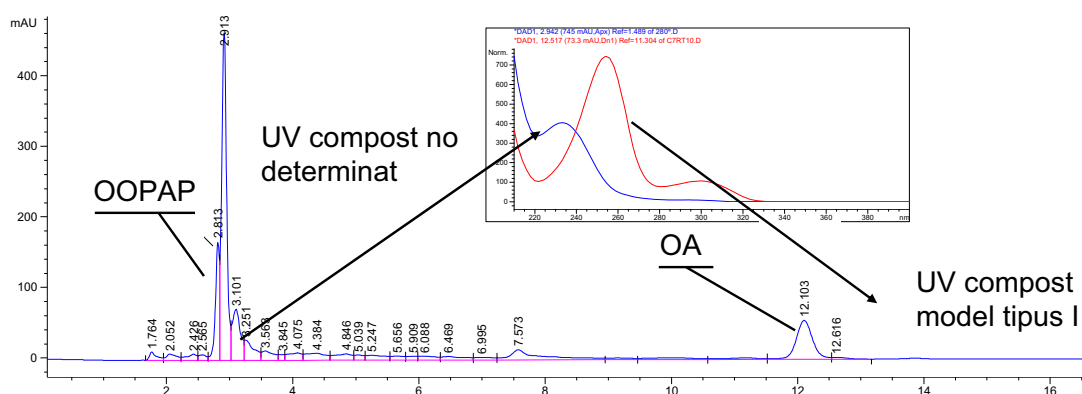


Figura 3.28. Cromatograma on es mostra la comparació de l'espectre d'UV del compost model tipus II amb un pic no determinat en un model d'oli format per OO(1,2)PAP, sense la presència d'anilina, sotmès a desodorització.

L'estudi de cadascun dels pics observats en el cromatograma de la Figura 3.28. no va permetre identificar cap compost amb un espectre d'UV similar al dels compostos II. En canvi, com ja s'havia establert anteriorment, sí que s'observaren el derivat triacilat (tipus III) i la formació d'anilides. Per tant, la identificació dels compostos II no es pogué confirmar. Això indicava que compostos d'aquests tipus no es troben, si més no, en el model d'oli estudiat. D'altra banda la identificació mitjançant el mateix procediment de compostos del tipus I en un model d'oli realitzat amb anterioritat i format per una relació trioleïna:LL(1,2)PAP (1:1) tampoc fou satisfactòria. Per tant la hipòtesi de la formació d'aquest derivat quedava limitada, quedant vigent la possible formació de compostos més complexos en forma d'oligòmers. Aquests oligòmers podrien estar formant part de la fracció residual no soluble que s'obté al final de determinats processos de desodorització, més abundant en processos realitzats amb derivats del PAP en forma pura. Aquest fet suggereix que compostos del tipus II no haurien de

presentar rellevància toxicològica, ja que aquests no haurien estat ingerits, en no formar part de la matriu dels olis tòxics.

3.2.9. ESTUDI DE L'EVOLUCIÓ AMB EL TEMPS D'UN MODEL DE DESODORITZACIÓ D'OLI DE COLZA

L'observació d'aquest panorama d'interrelacions tan complexes portà a estudiar l'evolució en el transcurs del temps d'un model d'oli sotmès a la desodorització, amb l'objectiu d'observar l'evolució dels principals derivats anilínics com ara les anilides, dPAPs i mPAPs. Per aquest estudi s'escollí una mostra de 40 g d'oli de colza que contenia un 2% d'anilina, la qual es sotmeté a un procés de desodorització mantenint les següents variables: $t_M = 15$ min, $T_M = 280$ °C, $P = 65$ Torr, $t_v = 60$ min i temperatura de preescalfament 220°C. L'estudi consistí en el mostreig de diferents alíquotes a diferents temps ($t = 1$ min, $t = 15$ min, $t = 23$ min, $t = 29$ min, $t = 60$ min, $t = 90$ min, $t = 120$ min, $t = 24$ h). Els resultats, expressats en ppm, de les anàlisis es mostren a la figura 3.29 i la taula 3.5.

Taula 3.5. Continguts d'OA, OPAP, OO(1,2)PAP (en ppm) de mostres alíquotes provinents d'una mostra d'oli de colza en presència d'un 2% d'anilina sotmesa al procés de desodorització.

t(min)	OA	OPAP	OOPAP
1	49	< 40	< 40
15	425	105	97
23	117	245	785
29	147	313	400
60	214	368	249
90	307	294	381
120	338	258	439
24h	336	280	418

D'aquest estudi en resultaren principalment tres observacions. Primer, les anilides augmenten considerablement al llarg de les dues hores d'experiment (Figura 3.29). Les fonts d'aquestes anilides, com fins ara es coneix, poden ser diverses: per una banda, la reacció de l'anilina amb els triglicèrids; per una altra, la reacció de l'anilina amb els grups acil del dPAP, per la reacció de l'anilina amb els àcids grassos lliures en l'oli¹⁷ i finalment per la descomposició tèrmica del dPAP.

sotmesos a un procés desodorització, sempre han mostrat quantitats de PAP molt baixes, inferiors a les 10 ppm.

Per últim, el dPAP presentà un augment significatiu coincidint amb el final de la rampa d'escalfament, amb una posterior disminució fins a uns nivells més o menys constants de 400 ppm. Aquest nivell estable d'OO(1,2)PAP està justificat pel manteniment de l'equilibri, entre l'OO(1,2)PAP que desapareix formant anilides, tant per transacilació, per descomposició o per formació de productes de polimerització i el que es formà a partir de l'anilina i els triglicèrids.

En resum, la situació cada cop quedava més definida. D'aquest estudi s'extreia que, en la matriu d'un oli de colza sotmès a desodorització, hi ha diverses fonts que faciliten l'obtenció d'anilides durant el procés. A més, la formació i desaparició del dPAP quedà vinculada a l'assoliment de la temperatura màxima del procés. En canvi, pel que fa al paper del mPAP, l'estudi no aportà novetats significatives, si més no continuava essent vàlida la hipòtesi de l'oligomerització.

3.2.10. REACTIVITAT EN MODELS D'OLI A TEMPERATURA AMBIENT

Deixant de banda aquests últims experiments centrats en l'estabilitat dels derivats del PAP, un altre punt que es volgué aclarir fou el que relacionava la transacilació del grup acil per part del dPAP. Podia ocórrer solament a altes temperatures o també podia ocórrer a temperatura ambient? Aquesta hipòtesi tenia com a referència l'observació de la formació d'anilides a temperatura ambient durant la conservació de mostres d'oli de colza que contenien anilina.⁷⁸ Amb aquest objectiu es preparen les següents mostres d'oli: 250 mg d'oli de colza, 250 mg de trioleïna, 250 mg de LL(1,2)PAP i finalment 250 mg d'una barreja trioleïna:LL(1,2)PAP 1:1. Sobre totes aquestes mostres s'hi afegí el corresponent 2% d'anilina. Totes aquestes mostres es deixaren reposar sense agitació a temperatura ambient, durant 75 dies. Un cop transcorregut aquest període, s'analitzaren els mPAPs, els dPAPs i les anilides mostrant els resultats de la Taula 3.6.

Tant la mostra que solament tenia oli de colza, com les mostres amb trioleïna, LL(1,2)PAP i trioleïna:LL(1,2)PAP (1:1), confirmaren la formació d'anilides a temperatura ambient. En el cas de l'oli de colza, les més abundants foren les d'oleic, coincidint amb la major abundància d'aquest àcid gras en l'oli de colza. Pel que fa a la mostra amb la barreja trioleïna:LL(1,2)PAP, no mostrà un resultat com en l'experiment de l'apartat 3.2.2, on es sotmetia a la mateixa barreja a un procés de desodorització. La proporció d'anilides de l'àcid linoleic no era superior a les d'oleic, sinó aproximadament del mateix ordre. Per altra banda, en les mostres de trioleïna pura es van formar 87 ppm d'OA i en la mostra de LL(1,2)PAP es van formar 567 ppm de LA, establint així que l'anilina reaccionava de forma espontània amb la trioleïna i el dPAP

per formar anilides. Aquests resultats van permetre observar la major capacitat per donar anilides per part del dPAP respecte a la trioleïna. Si introduïm el factor de correcció corresponent a que la trioleïna té tres grups acils per donar i el dPAP solament 2, es pot determinar que la capacitat donadora del dPAP en aquestes condicions és 10 cops superior a la de la trioleïna. Pel que fa a la detecció de derivats del PAP, els resultats mostren en tots els casos que la seva presència era inferior al límit de detecció del mètode, quedant confirmat el fet que per poder-se formar derivats del PAP es requereixen temperatures elevades.

Taula 3.6. Concentració en ppm dels derivats OA, LA, OPAP i OO(1,2)PAP en diferents models d'oli els quals han estat 75 dies en repòs amb presència d'un 2% d'anilina.

	OA	LA	OPAP	OO(1,2)PAP
Oli de colza (2% anilina)	312	85	< 40	< 40
Trioleïna (2% anilina)	87	---	< 40	< 40
LL(1,2)PAP (2% anilina)	---	567	---	---
Trioleïna:LL(1,2)PAP (1:1) (2% anilina)	136	86	< 40	< 40

3.3. ESTUDIS TÈRMICS I ANÀLISI DE L'ESTABILITAT DE DERIVATS DEL PAP

Amb la finalitat d'aportar noves dades sobre l'estabilitat tèrmica dels derivats del PAP es va plantejar realitzar estudis termogravimètrics, calorimetries i escalfaments isotèrmics en diversos medis.

3.3.1. SÍNTESI DELS COMPOSTOS 5 I 6, NOUS DERIVATS DEL PAP

Per dur a terme aquests nous estudis tèrmics i d'estabilitat es plantejà la síntesi de dos nous derivats del PAP. La modificació estructural respecte al PAP d'aquests compostos consistia en l'eliminació del C1 inclòs el seu substituent, per obtenir així, un compost amb un àtom de carboni menys, format per dos àtoms de carboni que enllacen el grup amino i l'alcohol. Tanmateix, aquest alcohol en els derivats proposats estaria esterificat per dos residus d'àcids grassos diferents, un corresponent a l'oleic i l'altre a l'hexanoic. La finalitat d'aquesta modificació estructural era observar si la formació d'anilides seria possible en aquests compostos.

La síntesi dels esters d'hexanoic i d'oleic del 2-(fenilamino)etanol es va fer de la forma habitual (DCC, DMAP i CH_2Cl_2). La seva purificació per cromatografia de sílica-gel flaix va

permetre obtenir els productes desitjats. L'espectre de ^1H -RMN del compost **5** va permetre observar el CH_2 contigu a l'ester a 4.29 ppm i el CH_2 contigu al grup amino a 3.40 ppm. D'altra banda, la integració dels protons del residu d'àcid gras va coincidir amb els esperats. Pel que fa al compost **6** l'espectre de ^1H -RMN també va mostrar el CH_2 contigu l'ester a 4.29 ppm i el CH_2 contigu al grup amino a 3.40 ppm. A més l'espectre de ^{13}C -RMN va mostrar la presència del residu d'àcid oleic, en observar els 18 àtoms de carboni units de la cadena.

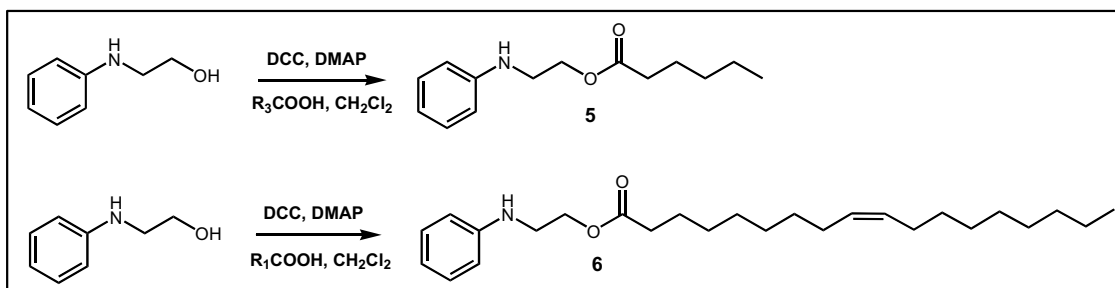


Figura 3.31. Síntesi dels compostos **5** i **6** a partir de l'esterificació del 2-(fenilamino)etanol.

3.3.2. ESTUDIS CALORIMÈTRICS I TERMOGRAVIMÈTRICS DE DERIVATS DEL PAP

Uns dels estudis que es pensà que es podia realitzar per determinar les propietats tèrmiques dels derivats del PAP foren la calorimetria i la termogravimetria. L'objectiu fonamental d'aquestes tècniques consisteix en estudiar els processos físico-químics que tenen lloc en un material quan aquest es refreda o s'escalfa. Aquests processos vénen determinats per canvis de diferents paràmetres amb la temperatura. Depenent del paràmetre a mesurar s'utilitza una o altra tècnica. En el cas de calorimetria, es determina canvis de calor i en el cas de la termogravimetria, els de massa. Més concretament, la calorimetria és una tècnica d'anàlisi tèrmica que permet mesurar els canvis energètics d'una substància en presència d'un material de referència. Aquesta aplicació resulta d'especial interès en productes farmacèutics, polímers i aliments. L'anàlisi termogravimètrica és una tècnica que mesura la variació de massa en funció de la temperatura. Les variacions de temperatura no sempre impliquen un canvi en la massa de la mostra; en canvi, existeixen canvis tèrmics que van acompanyats d'un canvi de massa, com ara la descomposició, la sublimació, la reducció, la desorció, l'absorció i la vaporització. Aquests canvis es poden mesurar amb l'analitzador termogravimètric.

Entre els diferents compostos escollits per fer els estudis tèrmics es seleccionaren els següents: HA, OA, PAP, O(1)PAP, H(1)PAP, OO(1,2)PAP, HH(1,2)PAP, **1**, **2**, **3**, **4**, **5** i **6** (Figura 3.32). S'escolliren dos anilides, dos dPAPs i dos mPAPs, diferenciats pel substituent que els forma. El motiu era poder confirmar si la llargada de la cadena carbonada tenia algun tipus

d'influència a l'hora de determinar l'estabilitat d'aquests compostos. D'altra banda s'escolliren derivats estructurals del PAP com són els compostos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** i **6** alguns dels quals havien estat emprats en els estudis de migració. Finalment el PAP s'escollí com a producte de referència.

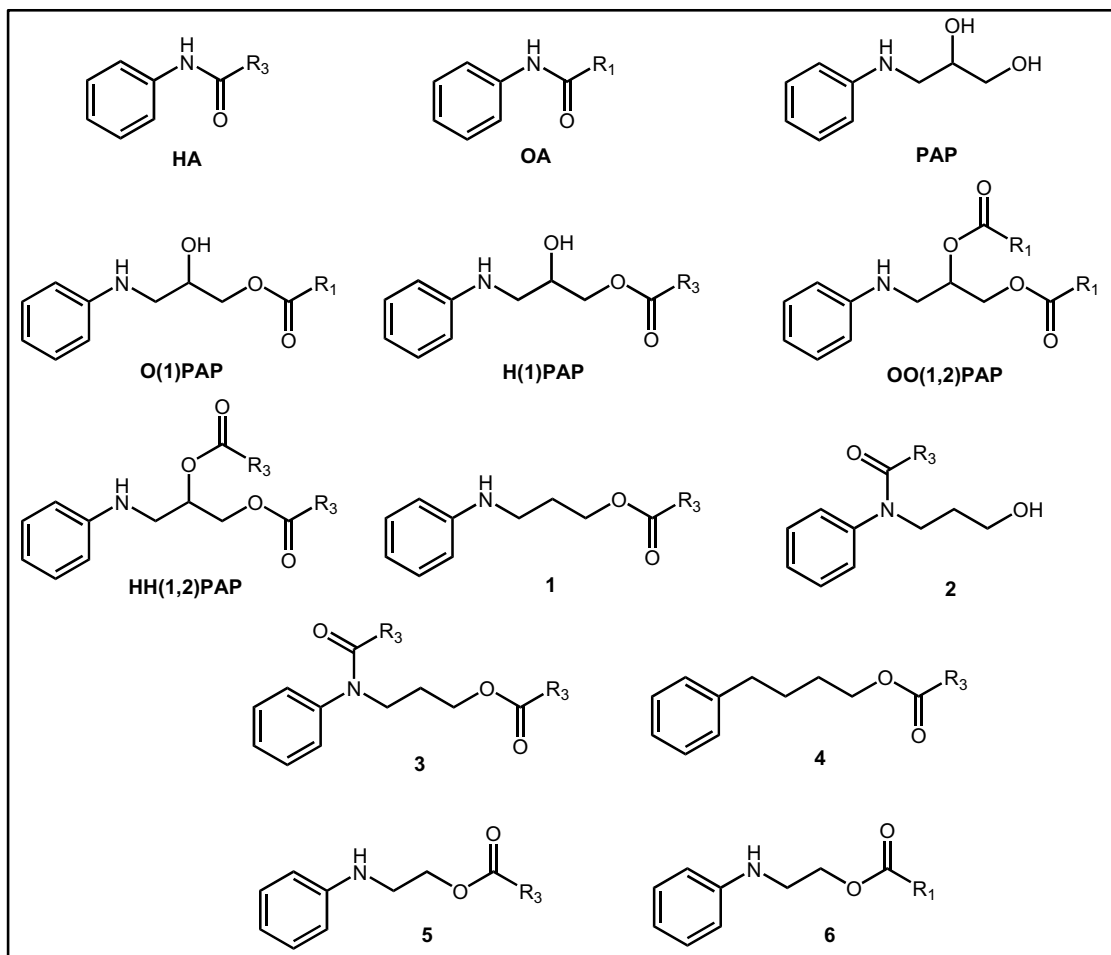


Figura 3.32. Conjunt de compostos sobre els quals es realitzaren estudis termogravimètrics i calorimètrics amb la finalitat de determinar la seva estabilitat tèrmica.

En la figura 3.33 es mostren algunes de les anàlisis termogravimètriques més rellevants d'aquest estudi. Els estudis termogravimètrics mostraren que l'OA i el PAP eren termostables fins a 300°C. Aquesta estabilitat era determinada per l'observació d'un únic gradient en la corba de descomposició tèrmica d'aquests compostos. En canvi en compostos com l'HH(1,2)PAP i l'O(1)PAP s'observà clarament com el gràfic on apareixia la variació de massa respecte a l'augment de temperatura presentava dos pendents clarament diferenciats. Aquests pendents indicaven que la descomposició tèrmica dels compostos tenia lloc en dues etapes. La primera coincidiria amb el trencament de la molècula per obtenir anilides i la segona

amb la pròpia evaporació del compost estudiat. Es podria extreure una observació similar en el cas de l'H(1)PAP i l'OO(1,2)PAP, però el perfil obtingut no va ser tan clar com en els casos anteriors. A més, experiments addicionals amb els compostos **5** i **6** permeteren observar un comportament similar a l'HH(1,2)PAP i l'O(1)PAP, el que va suggerir la possibilitat que aquests derivats estructurals del PAP poguessin experimentar un trencament tèrmic conduït a la formació d'anilides.

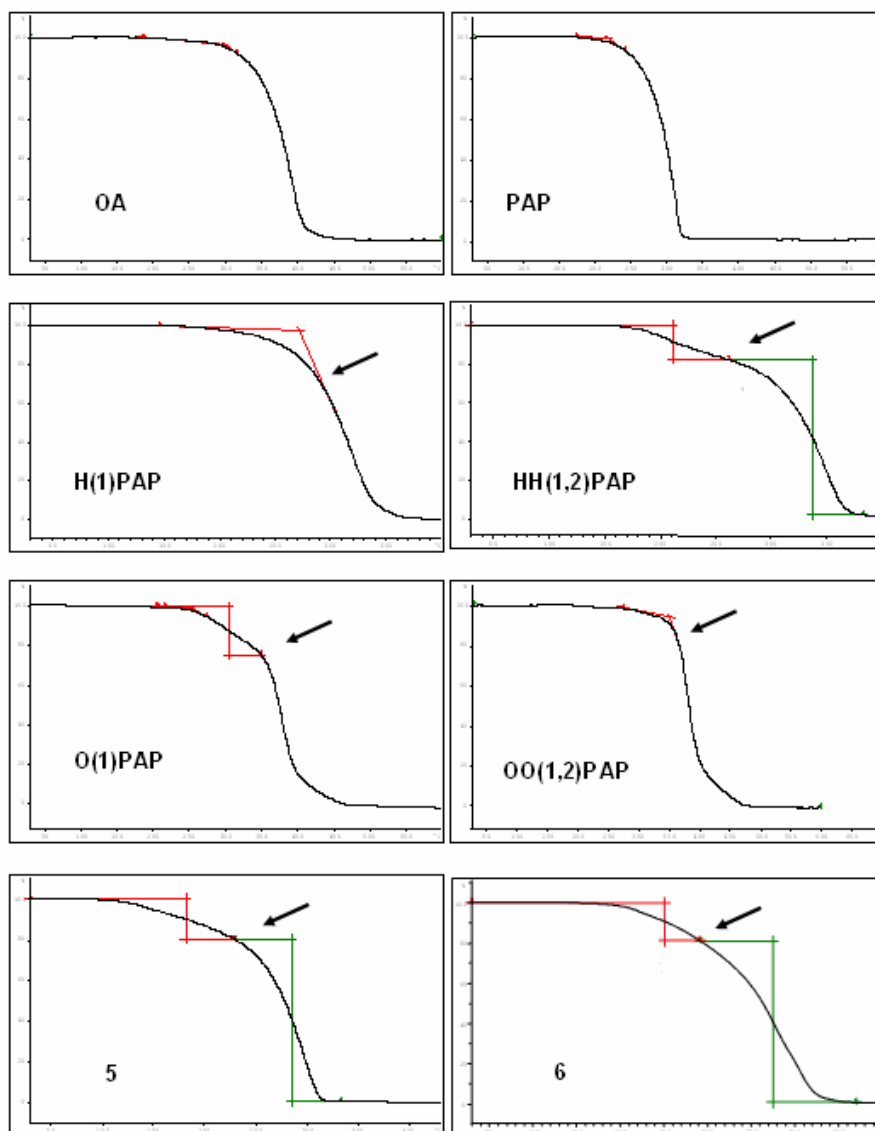


Figura 3.33. Anàlisis termogravimètriques on es mostra la variació de massa en funció de la temperatura aplicada sobre mostres de: OA, PAP, H(1)PAP, O(1)PAP, HH(1,2)PAP, OO(1,2)PAP, **5** i **6**.

3.3.3. ESTUDIS D'ESTABILITAT TÈRMICA REALITZATS EN UN FORN DE GASOS DE L'O(1)PAP, H(1)PAP, HH(1,2)PAP, 5 I 6

En aquest estudi es realitzà l'anàlisi de l'estabilitat tèrmica d'un conjunt de compostos (l'O(1)PAP, H(1)PAP, HHPAP, **5** i **6**) després de ser sotmesos a diverses temperatures constants durant un temps determinat. La variació de la temperatura tingué lloc entre 200 i 280 °C en intervals de 20 °C. La finalitat d'aquest estudi era observar mitjançant anàlisis d'HPLC i CG la formació d'anilides degut a la inestabilitat tèrmica dels compostos esmentats, ja que tots aquests presentaren mostres d'inestabilitat en l'estudi realitzat en l'apartat anterior.

Taula 3.7. Anàlisi mitjançant HPLC on es mostra la detecció d'anilides en diferents compostos sotmesos a condicions isotèrmiques en un forn de cromatografia de gasos a diferents temperatures.

	O(1)PAP	H(1)PAP	HH(1,2)PAP	5	6
200 °C	---	---	---	---	---
220 °C	---	---	---	---	---
240 °C	---	---	---	---	---
260 °C	OA	HA	HA	HA	OA
280 °C	OA	HA	HA	HA	OA

En totes les anàlisis realitzades mitjançant CG s'observà la formació d'anilides, tant de l'àcid hexanoic com de l'oleic. L'explicació a aquesta observació era que en tots els casos el compost s'introduïa a través de l'injector el qual es trobava a 280 °C, temperatura a la qual tots aquests compostos es descomponien tèrmicament formant anilides.

D'altra banda, en l'anàlisi mitjançant HPLC s'observà que en cadascun dels compostos tenia lloc, en major o menor quantitat, la formació d'anilides. Aquesta formació es produïa en cop s'assolien els 260 °C.

En definitiva, es confirmà la inestabilitat tèrmica dels derivats del PAP: mPAP i dPAP. Inestabilitat evident a temperatures superiors a 260 °C. D'altra banda, s'observà com els derivats **5** i **6** presentaven el mateix comportament tèrmic que els derivats del PAP. Per tant aquests últims compostos, tot i presentar una simplificació estructural respecte als derivats del PAP, podrien experimentar un mecanisme similar de formació d'anilides per descomposició tèrmica que els derivats del PAP.

3.3.4. CONCLUSIONS

De tota la sèrie d'estudis descrits en aquest capítol es poden extreure un conjunt de conclusions interessants en relació als aspectes químics dels olis de la SOT entre les quals destaquen les següents:

A partir del disseny d'experiments relacionats amb la desodorització, es va veure una relació clara entre la concentració d'anilides i la de dPAPs exemplificada en el cas dels derivats de l'àcid oleic. En principi s'atribuí aquesta relació a la reactivitat de l'anilina sobre els grups acil dels derivats del PAP. Aquests productes actuarien com a substrats millor donadors de grup acil que els triglicèrids, per donar finalment les anilides.

D'altra part, s'han descrit diferents aspectes químics dels dPAPs no coneguts fins ara:

El dPAP és una molècula potencialment reactiva, ja sigui com a nucleòfil mitjançant el grup amino i com a electròfil degut a la reactivitat que presenta en els grups acil. La nucleofília dels derivats del PAP podria tenir la seva importància en la formació de determinats oligòmers que sorgirien de la reacció amb altres derivats del PAP o triglicèrids. Tota aquesta reactivitat podria manifestar-se també a nivell de components de teixits i òrgans, i tenir així rellevància toxicològica en el marc de la SOT.

Un altre aspecte químic important ha estat la inestabilitat tèrmica dels derivats de PAP durant el procés de desodorització. El fet que cridà més l'atenció fou que la descomposició del dPAP anava acompanyada de la formació d'anilides. Per tant, el dPAP s'establia com una nova font d'anilides no tinguda en compte fins ara. Aquest resultat replantejava situacions determinades amb anterioritat, com la hipòtesi en la qual s'establia que els derivats del PAP eren millors donadors de grups acil que els triglicèrids.

Aquesta inestabilitat tèrmica dels derivats del PAP ha estat suportada per estudis termogravimètrics i d'estabilitat tèrmica, tot observant en aquests processos la formació d'anilides en determinats derivats del PAP.

La inestabilitat observada dels derivats del PAP per donar anilides hauria d'explicar-se mitjançant un mecanisme, l'estudi del qual es descriu en el següent capítol. La formació d'anilides hauria d'anar acompanyada per la presència d'una part no anilínica, la qual podria tenir importància en els aspectes toxicològics de la síndrome.

El conjunt global dels resultats obtinguts ha permès establir un seguit d'equilibris, interrelacions i descomposicions molt complexes en el conjunt format per anilides, derivats del

PAP i triglicèrids il·lustrats a la Figura 3.34. No obstant, la complexitat d'aquest procés global, la baixa estabilitat i la interconversió entre els productes dificulta estudis de toxicitat associats a aquests olis passat el temps. Per això, es fa imperatiu que els estudis de toxicitat que es realitzin amb aquests olis model es facin a partir de mostres conservades en fred i que hagin experimentant les mínimes variacions tèrmiques possibles.

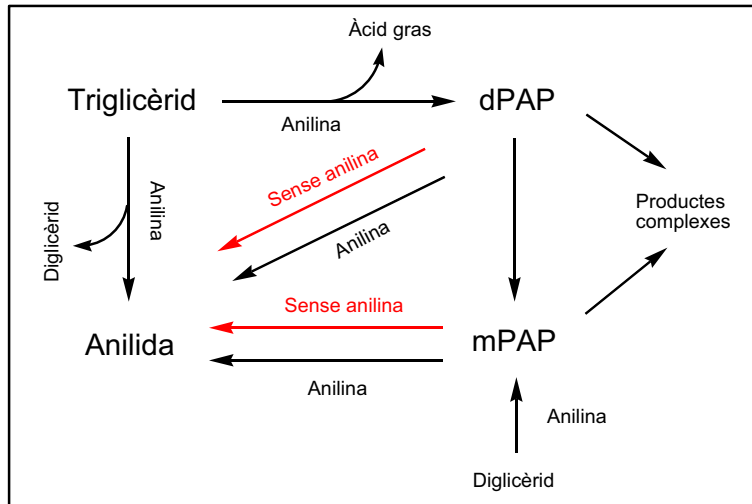


Figura 3.34. Interrelacions establertes entre triglicèrids, derivats del PAP i anilides, principals components presents en mostres d'oli de colza sotmeses a desodorització en presència d'anilina.

3.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

3.4.1. GENERALITATS

Com s'ha esmentat en el punt 1.4.1, l'oli de colza utilitzat en tots aquests experiments fou adquirit a un supermercat en el sud de França i l'anàlisi quantitativa per HPLC-MS de les anilides i derivats del PAP de les mostres d'oli, es realitzà al laboratori del Dr. J. Abian de l'IIBB de Barcelona.

El procediment emprat per a la realització de la desodorització dels olis models fou l'indicat en el punt 1.4.2, tot variant la quantitat de la matriu i els valors de les variables del procés en funció de l'oli model a realitzar

3.4.2. RELACIÓ ENTRE L'OO(1,2)PAP I L'OA EN EL CONJUNT D'EXPERIÈNCIES DEL DISSENY D'EXPERIMENTS

Dopatge d'OA:

El procediment experimental realitzat en aquest estudi va ser a partir de 40 g d'oli, als quals s'afegiren 1500 ppm d'OA (60 mg, 168 μ mol). La mescla s'agità en un bany d'ultrasons i

s'hi addicionà el 2% d'anilina. La nova mescla es deixà en agitació durant 10 minuts, moment en el qual es començà la desodorització. Les condicions de la desodorització foren les següents: $t_M = 15.5$ min, $T_M = 267$ °C, $P = 73$ Torr, $t_V = 69$ min.

Dopatge d'OO(1,2)PAP:

Seguint el mateix procediment, s'hi addicionaren 800 ppm d'OO(1,2)PAP (32 mg, 46 μ mol) i es realitzà la desodorització en les següents condicions: $t_M = 15.5$ min, $T_M = 267$ °C, $P = 73$ Torr i $t_V = 69$ min.

3.4.3. COMPARACIÓ DE LA REACTIVITAT DEL dPAP I ELS TRIGLICÈRIDS, I DE LA REACTIVITAT DEL C1 vs EL C2 DEL dPAP

S'emprà un procés model per realitzar una sèrie d'experiments dirigits a l'estudi de la interrelació de derivats del PAP. Aquests experiments es diferenciaren per la composició de la matriu i es dugueren a terme de la següent manera:

Es preparà un model d'oli amb un 2% d'anilina. Aquest oli s'agità sota ultrasons durant 1 minut. Prèviament a l'addició del model d'oli s'escalfà un matràs de 10 ml fins a 220 °C. Un cop s'arribà a aquesta temperatura, s'hi afegí l'oli model i es realitzà una rampa d'escalfament fins a una temperatura màxima de 280 °C, moment en el qual es refredà el matràs fins a 200 °C, temperatura a la qual es dugué a terme la resta de l'experiment. Un cop transcorreguts 60 min després de l'addició, es connectà el buit (80 Torr) fins a un total de dues hores d'experiment. En finalitzar l'experiment, es transvasà l'oli amb l'ajuda d'hexà, el qual fou eliminat per evaporació al buit.

Taula 3.9. Diferents matrius emprades en el model d'oli amb un 2% d'anilina.

Matriu	Quantitat de matriu
Trioleïna:LLPAP	(138 μ mol : 141 μ mol)
OO(1,2)PAP:LLPAP	(180 μ mol : 180 μ mol)
OL(1,2)PAP	(360 μ mol)
LO(1,2)PAP	(356 μ mol)

3.4.4. SÍNTESI I IDENTIFICACIÓ DE PRODUCTES COMPLEXOS DE CONDENSACIÓ DE DERIVATS DEL PAP

3.4.4.1. Obtenció del compost model tipus I a partir del PAP i glicidol

Sobre una dissolució de PAP (123 mg, 0.74 mmol) en MeOH (25 ml) s'afegiren gota a gota 330 mg de glicidol (4.45 mmol). A continuació es deixà la reacció amb agitació i reflux durant 3 h, controlant-la per CCF. Un cop finalitzada la reacció, s'eliminà el dissolvent i el cru es purificà per cromatografia de sílica-gel flaix emprant una mescla 6:1 de CHCl_3 :MeOH. La purificació va permetre obtenir el producte desitjat com una barreja de diastereoisòmers (120 mg, 71%).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): 7.16 (t, $^3J(\text{H,H})= 8.0$ Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.80 (dd, $^3J(\text{H,H})= 17.1$ Hz, $^3J(\text{H,H})= 8.4$ Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.62 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.2$ Hz, 1 H; CH_{Ar}), 4.13 (m, 1 H, CHOH), 3.97 (m, 1 H; CHOH), 3.81 (dd, $^2J(\text{H,H})= 8$ Hz, $^3J(\text{H,H})= 4.5$ Hz, 1 H; CHHOH), 3.66-3.53 (ac, 5 H; CHHOH , CHHOH , CHHOH , CHHN , CHHN), 3.47 (dd, $^1J(\text{H,H})= 15.5$ Hz, $^2J(\text{H,H})= 8.0$ Hz, 1 H; CHHNH), 3.32 (dd, $^1J(\text{H,H})= 15.5$ Hz, $^2J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, 1 H; CHHN).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): 148.7 (C), 129.3 (CH), 117.3 (CH), 113.4 (CH), 70.1 (CH), 64.3 (CH_2), 56.6 (CH_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): 147.7 (C), 129.1 (CH), 116.8 (CH), 112.3 (CH), 69.8 (CH), 64.1 (CH_2), 54.8 (CH_2).

HPLC-EM: 260.1 (100) $[\text{M} + \text{H}_3\text{O}^+]$.

3.4.4.2. Obtenció del compost model tipus II a partir del bisPAP i glicidol

Sobre una dissolució de bisPAP (197 mg, 0.81 mmol) en MeOH (200 μl) s'afegiren gota a gota, 60 μl de glicidol (0.90 mmol). A continuació es deixà la reacció en agitació sota reflux durant 7 h (controls per CCF). Llavors s'eliminà el dissolvent i el cru resultant es purificà mitjançant CCF preparativa (2:1 hexà/AcOEt), per donar majoritàriament el compost tipus II com una mescla de diastereoisòmers (88 mg, 31%).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): 7.17 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.0$ Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.83 (d, $^3J(\text{H,H})= 8$ Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.65 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.0$ Hz, 1 H; CH_{Ar}), 4.13 (m, 1 H; CHOH), 3.97 (m, 1 H; CHOH), 3.81 (dd, $^2J(\text{H,H})= 8$ Hz, $^3J(\text{H,H})= 4.5$ Hz,

1 H; *CHHOH*), 3.66-3.53 (ac, 5 H; *CHHN*, *CHHN*, *CHHN*, *CHHN*, *CHHOH*), 3.47 (dd, $^2J(\text{H,H}) = 15.5$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.0$ Hz, 1 H; *CHHNH*), 3.32 (dd, $^2J(\text{H,H}) = 15.5$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, 1 H; *CHHN*).

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): 7.17 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.79 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8$ Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.64 (t, $^3J(\text{H,H}) = 7.0$ Hz, 1 H; CH_{Ar}), 4.08 (m, 1 H; *CHOH*), 3.92 (m, 1 H; *CHOH*), 3.78 (dd, $^2J(\text{H,H}) = 8.5$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 4.5$, 1 H; *CHHOH*), 3.66-3.53 (ac, 5 H; *CHHN*, *CHHN*, *CHHN*, *CHHN*, *CHHOH*), 3.40 (dd, $^2J(\text{H,H}) = 15$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 7.5$ Hz, 1 H; *CHHNH*), 3.32 (dd, $^2J(\text{H,H}) = 15.5$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 8.5$ Hz, 1 H; *CHHN*).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): 149.5 (C), 130.1 (2 CH), 117.7 (CH), 114.1 (2CH), 70.9 (CH), 70.0 (CH), 65.2 (CH_2), 57.4 (CH_2), 56.6 (CH_2), 48.2 (CH_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125.67 MHz, CDCl_3): 149.1 (C), 130.1 (2 CH), 117.6 (CH), 113.7 (2 CH), 70.7 (CH), 69.9 (CH), 65.2 (CH_2), 57.2 (CH_2), 56.1 (CH_2), 48.0 (CH_2).

HPLC-EM: 338 (100) [$\text{M} + \text{Na}^+$], 316 (17) [$\text{M} + \text{H}^+$]

3.4.5. ESTUDI DE L'ESTABILITAT DELS DERIVATS DEL PAP EN UN PROCÉS DE DESODORITZACIÓ SENSE L'ADDICIÓ D'ANILINA

El procés a realitzar en aquests estudis fou el mateix que l'indicat en l'apartat 3.4.3, però en aquest cas no s'afegí el corresponent 2% d'anilina sobre les diferents matrius:

Matriu	$\mu\text{mol de matriu}$
OO(1,2)PAP	353 μmol
OO(1,2)PAP	360 μmol
O(1)PAP	552 μmol
LO(1,2)PAP	353 μmol
OL(1,2)PAP	353 μmol
OOL(1,2,N)PAP	260 μmol

3.4.6. ESTABILITAT DELS DERIVATS DEL PAP EN CONDICIONS DILUÏDES

El procés a realitzar en aquests estudis fou el mateix que l'indicat en l'apartat 3.4.3, però en aquest cas no s'afegí el corresponent 2% d'anilina sobre les següents matrius: oli de colza + 800 ppm de LO(1,2)PAP, oli de colza + 800 ppm d'OO(1,2)PAP i trioleïna + 800 ppm d'OO(1,2)PAP.

3.4.7. ESTUDI DE L'EVOLUCIÓ AMB EL TEMPS D'UN MODEL DE DESODORITZACIÓ D'OLI DE COLZA

Es procedí igual que en l'apartat 3.4.3. però en aquest cas s'empraren 40.2 g d'oli de colza i 800 µl d'anilina. També es variaren els següents paràmetres: $t_M = 15$ min i $P = 65$ Torr. Es realitzaren diferents controls al llarg de l'experiment ($t = 1, 15, 23, 29, 60, 90, 120$ minuts i 24 h).

3.4.8. REACTIVITAT EN MODELS D'OLI A TEMPERATURA AMBIENT

Es preparà una sèrie de models d'oli que contenien un 2% d'anilina. Aquests olis s'agitaren amb el bany d'ultrasons durant 1 minut i es deixaren a temperatura ambient sense agitació durant 75 dies, moment en què foren analitzats. Les matrius que s'empraren per realitzar els experiments foren: LL(1,2)PAP (180 mg), trioleïna (193 mg), oli de colza (301 mg), LL(1,2)PAP:trioleïna 1:1 (93.9 mg, 127 mg) amb les següents quantitats d'anilina: 5.1 mg, 3.8 mg, 7.7 mg, 4.3 mg respectivament.

3.4.9. SÍNTESI DEL COMPOST 5

En un matràs de 10 mL s'addicionaren 202 mg (1.46 mmol) de 2-(fenilamino)etanol sobre els quals s'afegiren 332 mg de DCC (1.61 mmol), 16 mg de DMAP (0.13 mmol) i 180 mg (1.55 mmol) d'àcid hexanoic, tot dissolt en 4 ml de CH_2Cl_2 . La dissolució es deixà reaccionar a temperatura ambient i amb agitació durant 3 h i mitja. Al cap d'una estona s'observà l'aparició d'un precipitat de color blanc corresponent a la DCU. El control de la reacció es realitzà mitjançant HPLC en fase directa (mètode NOCR6). Després d'evaporar el dissolvent, s'eliminà la DCU per precipitació amb hexà en fred, procés que es repetí tres cops. A continuació es purificà el cru mitjançant cromatografia de sílica-gel flaix utilitzant una barreja d'hexà:AcOEt 9:1. Finalment s'obtingueren 273 mg d'un oli, amb un rendiment del 80%.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3): 7.19 (t, 3J (H,H)= 7.5 Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.73 (t, 3J (H,H)= 7.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 6.64 (d, 3J (H,H)= 7.5 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 4.29 (t,

$^3J(\text{H,H})= 5.5 \text{ Hz}$, 2 H; CHHOR), 3.89 (s, 1 H; CNHAr), 3.40 (q, $^3J(\text{H,H})= 5.5 \text{ Hz}$, 2 H; CHHN), 2.32 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.5 \text{ Hz}$, 2 H; COCH₂), 1.60-1.64 (ac, 2 H; COCH₂CH₂), 1.40-1.20 (ac, 4 H, CH₂), 0.88 (t, $^3J(\text{H,H})= 6.5 \text{ Hz}$, 3 H, CH₃).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl₃): 173.9 (CO), 147.6 (CH_{Ar}), 129.3 (2 CH_{Ar}), 117.8 (CH_{Ar}), 112.9 (2 CH_{Ar}), 62.8 (CH₂OCOR), 42,9 (CH₂NH), 34.1 (CH₂), 31.3 (CH₂), 24.6 (CH₂), 22.3 (CH₂), 13,9 (CH₃).

Anàlisi Elemental: C₁₄H₂₁NO₂ Calculada: C 71.46%; H 8.99%; N 5.95%

Experimental: C 71.49%; H 9.15%; N 6.13%

3.4.10. SÍNTESI DEL COMPOST 6

En un baló de 10 mL s'addicionaren 210 mg (1.53 mmol) de 2-(fenilamino)etanol sobre els quals s'afegiren 354 mg de DCC (1.72 mmol), 22 mg de DMAP (0.18 mmol) i 412 mg (1.46 mmol) d'àcid oleic tot dissolt en 4 ml de CH₂Cl₂. La dissolució es deixà reaccionar a temperatura ambient i amb agitació durant 3 h i mitja. Al cap d'una estona s'observà l'aparició d'un precipitat de color blanc corresponent a la DCU. El control de la reacció es realitzà mitjançant HPLC en fase directa (mètode NOCR6). Després d'evaporar el dissolvent, s'eliminà la DCU per precipitació amb hexà en fred, procés que es repetí tres cops. A continuació es purificà el cru mitjançant cromatografia de sílica-gel flaix utilitzant una barreja d'hexà: AcOEt 9:1. Finalment s'obtingué 552 mg d'un oli, amb un rendiment del 90%.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl₃): 7.19 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.5 \text{ Hz}$, 2 H; CH_{Ar}), 6.73 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.5 \text{ Hz}$, 1 H, CH_{Ar}), 6.64 (d, $^3J(\text{H,H})= 7.5 \text{ Hz}$, 2 H, CH_{Ar}), 5.34 (m, 2 H; 2 CH=), 4.29 (qu, $^3J(\text{H,H})= 5.5 \text{ Hz}$, 2 H; CHHOR), 3.89 (s, 1 H; CNHAr), 3.40 (q, $^3J(\text{H,H})= 5.5 \text{ Hz}$, 2 H; CHHNH), 2.32 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.0 \text{ Hz}$, 2 H; COCH₂), 1.99-2.03 (ac, 4 H; 2 CH₂CH=), 1.60-1.62 (ac, 2 H; COCH₂CH₂), 1.40-1.20 (ac, 20 H; CH₂), 0.88 (t, $^2J(\text{H,H})= 7.0 \text{ Hz}$, 3 H; CH₃).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl₃): 173.9 (CO), 147.6 (CH_{Ar}), 130.0 (CH=), 129.7 (CH=), 129.3 (2 CH_{Ar}), 117.8 (CH_{Ar}), 112.9 (2 CH_{Ar}), 62.9 (CH₂OCOR), 42,9 (CH₂NH), 34.5 (CH₂), 31.9 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 27.2 (CH₂), 27.1 (CH₂), 24.9 (CH₂), 22.7 (CH₂), 14,1 (CH₃).

Anàlisi Elemental: $C_{26}H_{43}NO_2$ Calculada: C 77.75%; H 10.79%; N 3.49%

Experimental: C 77.71%; H 11.05%; N 4.26%

3.4.11. ESTUDIS D'ESTABILITAT TÈRMICA REALITZATS EN UN FORN DE CROMATOGRÀFIA DE GASOS DE L'O(1)PAP, H(1)PAP, HH(1,2)PAP, 5 I 6

Les diverses mostres indicades en la Taula 3.10. es sotmeteren en un matràs aforat a diverses temperatures durant 15 min. Al finalitzar aquest temps, es deixà reposar el recipient i es realitzà una extracció del producte mitjançant una barreja d'hexà:IPA. S'agafà una alíquota de l'extracció i s'analitzà mitjançant l'HPLC emprant el mètode NOCR6.

Taula 3.10. *Quantitat en mg dels diversos compostos emprats en l'estudi de l'estabilitat tèrmica a diferents temperatures.*

°C/mg	O(1)PAP	H(1)PAP	H(1,2)PAP	5	6
200	11	5	12	6	5
220	8	5	8	8	7
240	10	6	10	5	7
260	11	5	13	5	7
280	9	4	11	10	5

3.4.12. ESTUDIS CALORIMÈTRICS I TERMOGRAVIMÈTRICS DE DERIVATS DEL PAP

Els estudis termogravimètrics es van realitzar en un aparell de mettler toledo TG50 amb termobalança emprant gresols estàndards d'alumini perforats de 100 µl i les calorimetries en un aparell de la mateixa casa comercial model DSC821 emprant gresols estàndards d'alumini de 40 µl.

**PART IV. ESTUDI DEL MECANISME DE
FORMACIÓ D'ANILIDES A PARTIR DEL dPAP EN
UN PROCÉS DE DESODORITZACIÓ**

SUMARI PART IV

4.1. ESTUDIS EXPERIMENTALS DEL MECANISME DE FORMACIÓ D'ANILIDES A PARTIR DEL dPAP EN UN PROCÉS DE DESODORITZACIÓ	189
4.1.1. Estudi de la formació de la part no anilínica provinent de la descomposició tèrmica del dPAP	189
4.1.1.1. Obtenció de l'oleat del 2-oxo-propil (7)	190
4.1.1.2. Identificació de l'oleat del 2-oxo-propil en una matriu d'oli de colza sotmesa a desodorització	191
4.1.2. Estudi experimental del mecanisme de descomposició del dPAP en el procés de desodorització emprant dPAP marcat amb ¹³ C	192
4.1.2.1. Proves preliminars per a l'obtenció del dPAP marcat amb ¹³ C	193
4.1.2.1.1. Síntesi de l'epòxid 10 a partir de l'aldehid 8 mitjançant un ilur de sofre	194
4.1.2.1.2. Obtenció de l'alquè 9 a partir del 2-benziloxi-acetaldehid mitjançant una reacció de Wittig	195
4.1.2.1.3. Obtenció de l'epòxid 10 a partir de l'alquè 9	195
4.1.2.1.4. Obtenció del compost 11 a partir del compost 10	196
4.1.2.1.5. Desprotecció de l'èter benzílic del compost 11	197
4.1.2.1.6. Desprotecció de l'èter benzílic del compost 10	197
4.1.2.2. Síntesi de l'OO(1,2)PAP marcat amb ¹³ C	198
4.1.2.3. Estudi de l'estabilitat tèrmica del ¹³ COO(1,2)PAP en un procés de desodorització	200
4.2. ESTUDIS TEÒRICS DEL MECANISME DE FORMACIÓ D'ANILIDES A PARTIR DEL dPAP	203
4.2.1. Estudi de la formació d'anilides a través d'un procés intramolecular	205
4.2.2. Estudi de la formació d'anilides a través d'un procés intermolecular	212
4.2.3. Conclusions	216
4.3. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	219
4.3.1. Síntesi de l'oleat del 2-oxo-propil (7)	219
4.3.1.1. Identificació del compost 7 en una matriu d'oli de colza sotmesa a desodorització	220
4.3.2. Síntesi del [¹³ C-3]-oleat de 2-oleïloxi-3-(<i>N</i> -fenilamino)propil	220

4.3.2.1. Síntesi de 1-((¹³ C-3-alliloxi)metil)benzè) (9)	220
4.3.2.2. Síntesi del [¹³ C-1]-2-((benziloxi)metil)oxirà (12)	221
4.3.2.3. Síntesi del [¹³ C-3]-2,3-epoxi-1-propanol	221
4.3.2.4. Síntesi del [¹³ C-3]-3-(<i>N</i> -fenilamino)-1,2-propandiol	222
4.3.2.5. Síntesi del [¹³ C-3]-oleat de 2-oleïloxi-3-(<i>N</i> -fenilamino)propil	222
4.3.3. Estudi de l'estabilitat tèrmica del l'OO(1,2)PAP marcat amb ¹³ C en un procés de desodorització	223
4.3.4. Estudis teòrics del mecanisme de formació d'anilides a partir del dPAP	223

4.1. ESTUDIS EXPERIMENTALS DEL MECANISME DE FORMACIÓ D'ANILIDES A PARTIR DEL dPAP EN UN PROCÉS DE DESODORITZACIÓ

L'últim aspecte que romania pendent d'estudi era el mecanisme de formació d'anilides a partir dels derivats del PAP, quan aquests compostos eren sotmesos a un procés de desodorització. Aquest aspecte ha estat introduït en l'apartat 3.2.6. L'estudi es centrà en la formació d'anilides a partir del derivat diesterificat del PAP, el qual s'escollí com a model, ja que havia mostrat diverses evidències experimentals de la seva inestabilitat tèrmica, com es descriu en la part III. Per determinar aquest mecanisme, es van realitzar estudis de tipus experimentals i teòrics de forma complementària.

4.1.1. ESTUDI DE LA FORMACIÓ DE LA PART NO ANILÍNICA PROVINENT DE LA DESCOMPOSICIÓ TÈRMICA DEL dPAP

Per tal d'explicar el procés de formació d'anilides a partir del dPAP, una de les hipòtesis era l'obtenció d'anilides a partir d'una reacció intramolecular en la qual es produeix l'atac

nucleòfil de l'amina del dPAP sobre el carbonil de l'èster secundari del mateix dPAP, com mostra la Figura 4.1. Si tingués lloc la formació d'anilides a partir del dPAP, hauria d'anar acompanyada de l'obtenció d'una part no anilínica, la qual correspondria a un cetoèster com l'indicat en la Figura 4.1. Per confirmar aquesta hipòtesi, es plantejà la síntesi d'aquesta fracció no anilínica i la seva posterior identificació en un model d'oli.

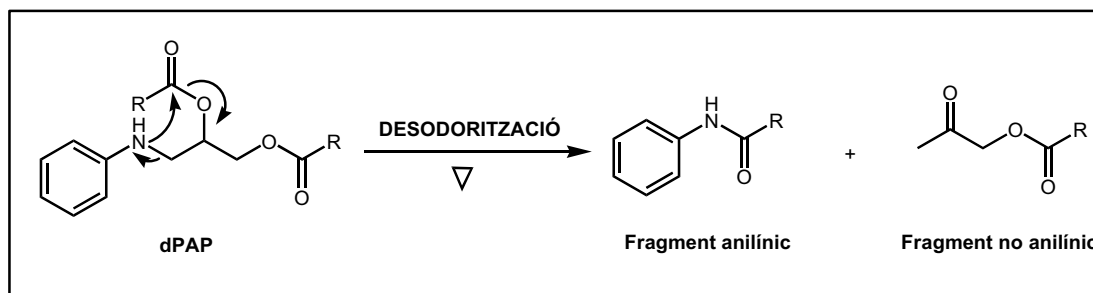


Figura 4.1. Hipòtesi de la formació d'anilides a partir de la molècula de dPAP, on es suggereix la formació d'una fracció no anilínica.

4.1.1.1. Obtenció de l'oleat del 2-oxo-propil (7)

La síntesi de l'oleat de 2-oxo-propil⁷⁹ es plantejà a partir de l'acetol, el qual s'esterificà emprant àcid oleic, DCC i DMAP. El tractament del cru i la seva posterior purificació va dur a obtenir el producte desitjat amb un rendiment del 76%.

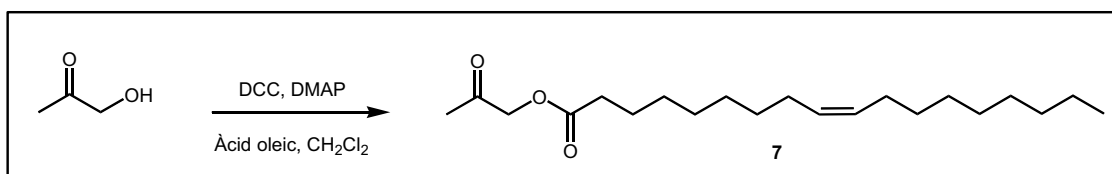


Figura 4.2. Esterificació de l'acetol mitjançant DCC, DMAP i àcid oleic.

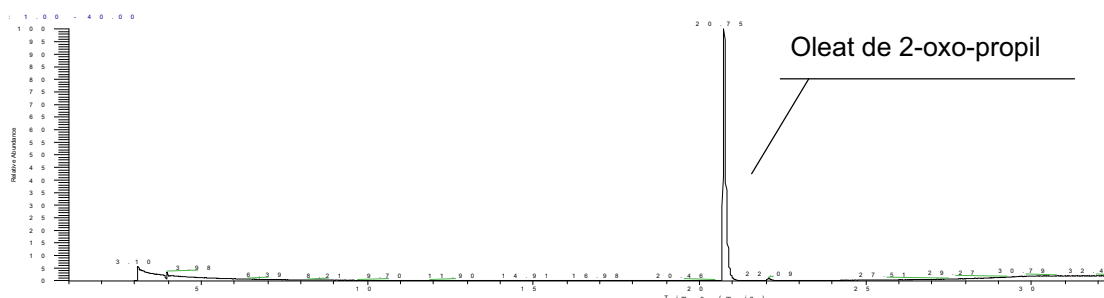


Figura 4.3. Cromatograma de gasos on es mostra el pic de l'oleat de 2-oxo-propil.

L'espectre de ¹³C-RMN de **7** va mostrar que l'esterificació de l'alcohol s'havia produït correctament, ja que el CH₂ en alfa al grup alcohol de l'acetol va variar el seu desplaçament de

73.9 ppm a 68.1 ppm. A més, es va observar el grup de carbonis corresponents a l'àcid oleic conjuntament amb els tres carbonis de l'esquelet principal del cetoester. D'altra banda per CG-MS s'observà el pic molecular a 338.

4.1.1.2. Identificació de l'oleat del 2-oxo-propil en una matriu d'oli de colza sotmesa a desodorització

Un cop obtingut el cetoester, es procedí a identificar-lo en un model d'oli de colza amb un 2% d'anilina sotmès a desodorització. Abans de procedir a aquesta identificació es volgué determinar l'estabilitat del cetoester **7** sota les condicions assolides en el procés de desodorització. Per aquest motiu es realitzà un assaig on es posà oli de colza comercial juntament amb un 2% del cetoester **7** i es procedí al procés de desodorització.

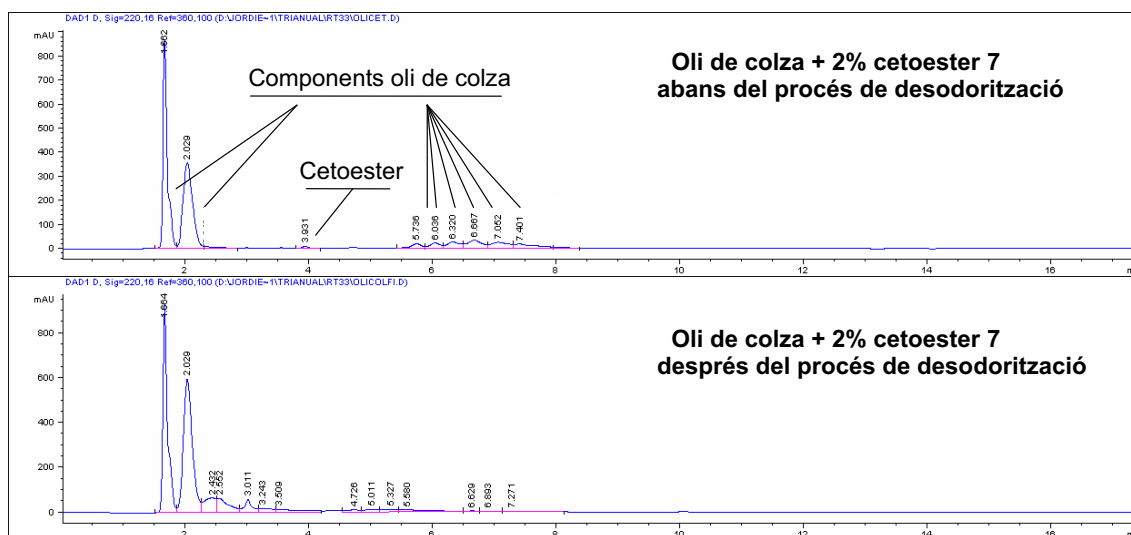


Figura 4.4. Perfils d'HPLC on es mostren la presència i absència del compost **7** abans i després del procés de desodorització en un model format per oli de colza amb un 2% del cetoester.

La comparació dels cromatogrames d'HPLC obtinguts abans i després del procés de desodorització va mostrar l'instabilitat tèrmica del cetoester **7** en aquestes condicions. En el cromatograma corresponent al final de la desodorització no s'observà el 2% afegit inicialment. Aquest compost va desaparèixer del medi, ja sigui per instabilitat tèrmica o per la possible transacilació del residu d'àcid gras amb algun altre compost present amb grups alcohol en la matriu d'oli de colza. Tot i aquest resultat, s'optà per cercar el cetoester en un dels models d'oli descrit en l'apartat 3.2.6, on es posà OO(1,2)PAP sense anilina a desodorització. Malauradament els resultats d'identificació mitjançant comparació de cromatogrames no van

permetre identificar el cetoester en aquest últim model. Aquest resultat fou coherent amb la inestabilitat determinada del producte en el cas anterior.

Aquests resultats indicaren que trobar un compost amb una part no anilínica resultaria difícil, ja que si aquesta es formés no es trobaria com a tal, sinó que evolucionaria a causa de la seva inestabilitat tèrmica en les condicions de l'assaig.

4.1.2. ESTUDI EXPERIMENTAL DEL MECANISME DE DESCOMPOSICIÓ DEL dPAP EN EL PROCÉS DE DESODORITZACIÓ EMPRANT dPAP MARCAT AMB ^{13}C

Els resultats obtinguts fins ara no aportaven noves dades respecte a la formació d'una part no anilínica en el procés de descomposició del dPAP. Per aquest motiu, es pensà en emprar el marcatge amb ^{13}C per tal de poder aprofundir més en la investigació de la formació d'aquesta part no anilínica. Es pensà en introduir un marcatge amb ^{13}C en la molècula d'OO(1,2)PAP. De totes les possibles opcions de marcatge s'escollí la que situava el ^{13}C sobre el C3 de l'OO(1,2)PAP (Figura 4.5). Aquest marcatge era idoni, ja que el seguiment del procés de desodorització mitjançant diverses tècniques ens hauria de permetre observar l'evolució d'aquest isòtop del grup CH_2 .

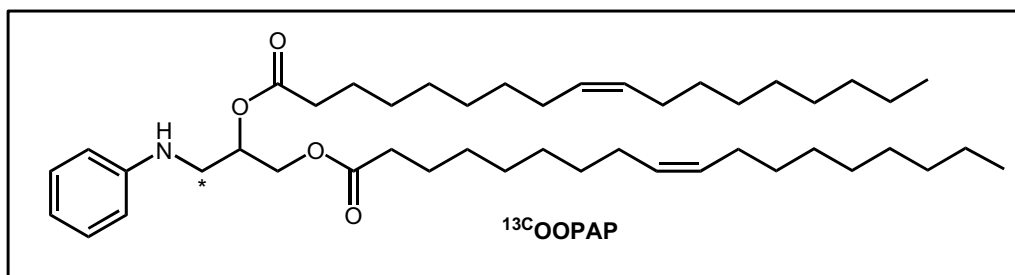


Figura 4.5. Derivat de l'OO(1,2)PAP marcat amb ^{13}C sobre C3 emprat per a l'estudi experimental del mecanisme de formació d'anilides a partir de l'OO(1,2)PAP en un procés de desodorització.

La síntesi de l'isotopòmer es plantejà seguint l'esquema retrosintètic indicat a la Figura 4.6. En aquest plantejament es partia del 2-benziloxi-acetaldehid (**8**), al qual se li introduïa el marcatge isotòpic. Una reacció amb un ilur de sofre ens hauria de permetre obtenir directament l'epòxid corresponent **10**. A continuació, aquest epòxid podria ser obert, emprant anilina per obtenir el ^{13}C PAP i finalment es realitzaria l'esterificació dels dos grups alcohol, per obtenir el ^{13}C OO(1,2)PAP.

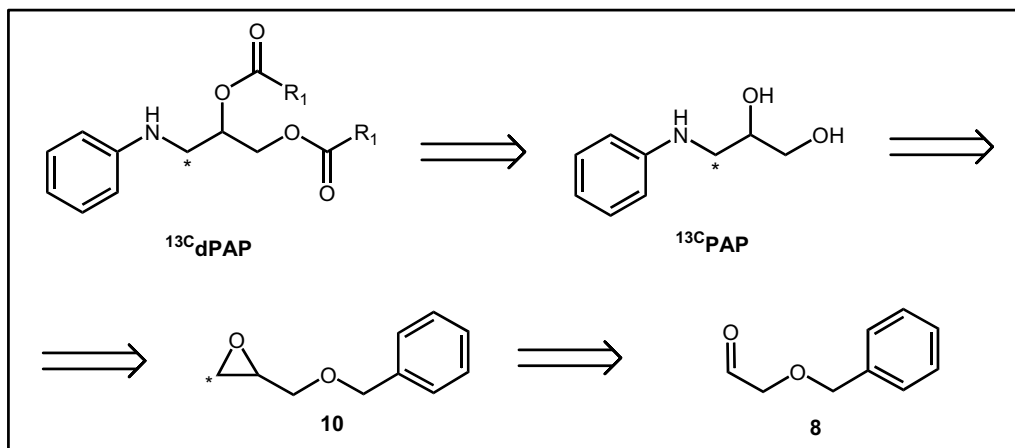


Figura 4.6. Anàlisi retrosintètica de l'obtenció de l'OO(1,2)PAP marcat amb ^{13}C a partir del 2-benziloxi-acetaldehid.

4.1.2.1. Proves preliminars per a l'obtenció del dPAP marcat amb ^{13}C

Degut al preu dels productes marcats, abans d'iniciar la síntesi era convenient realitzar proves emprant els mateixos productes per a l'obtenció de l'OO(1,2)PAP marcat amb ^{13}C , però sense la presència del marcatge.

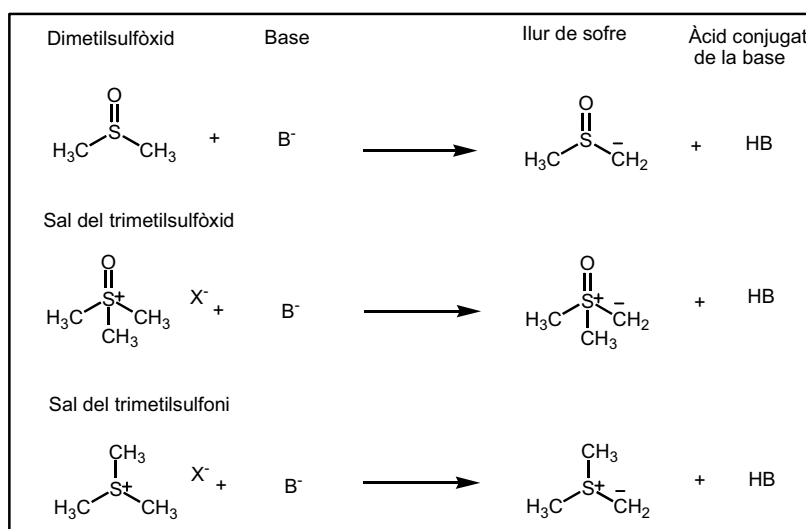


Figura 4.7. Representació de diferents ilurs de sofre amb propietats alquilants sobre dobles enllaços, entre els quals hi ha els grups carbonil.

El primer pas era obtenir el compost **10** a partir del **8**, emprant com a reactiu un il·lur de sofre. L'elecció de l'il·lur de sofre com a reactiu fou deguda al coneixement de la capacitat

alquilant de compostos com són els ilurs del dimetilsulfòxid, del trimetilsulfòxid i del trimetilsulfoni.^{80,81,82}

Aquests ilurs són bons nucleòfils capaços de reaccionar sobre dobles enllaços com són els carbonils, sulfonils, imines, i fins i tot, a dobles enllaços carboni carboni. S'escollí la sal del trimetilsulfoni en vers la sal del trimetilsulfòxid com a reactiu per diversos motius.⁸³ Primer, perquè la sal de trimetilsulfoni presenta major capacitat nucleòfila que la sal del trimetilsulfòxid, i en segon lloc, per la seva millor capacitat reactiva en front a grups carbonil. Com a inconvenient, resulta que la primera sal és menys estable que la segona. El mecanisme de reacció sobre dobles enllaços electròfils es descriu més detalladament en la Figura 4.8:

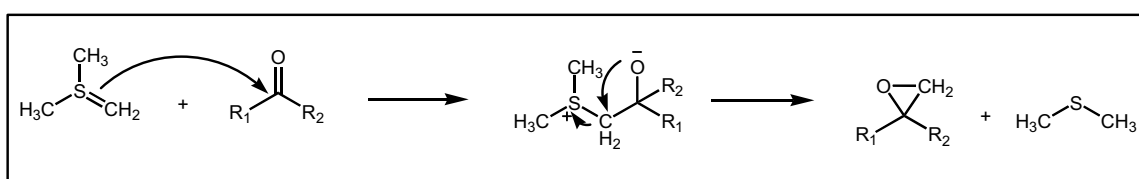


Figura 4.8. Mecanisme de reacció d'un ilur de sofre en front un grup carbonil que porta a la formació del corresponent epòxid del carbonil.⁸⁰

4.1.2.1.1. Síntesi de l'epòxid **10** a partir de l'aldehid **8** mitjançant un ilur de sofre

Es provà la síntesi del compost **10** mitjançant l'ilur del trimetilsulfoni. Per disposar de la sal de trimetilsulfoni es partí del iodur de metil i del sulfur de dimetil. Un cop observada la formació de la sal, es procedí a la seva utilització en la síntesi de l'epòxid **10**. Per tal de formar l'ilur s'emprà com a base el KOH.⁸⁴ La reacció amb el compost **8** es controlà mitjançant CG i CCF, i en cap moment s'observà la formació del corresponent epòxid.

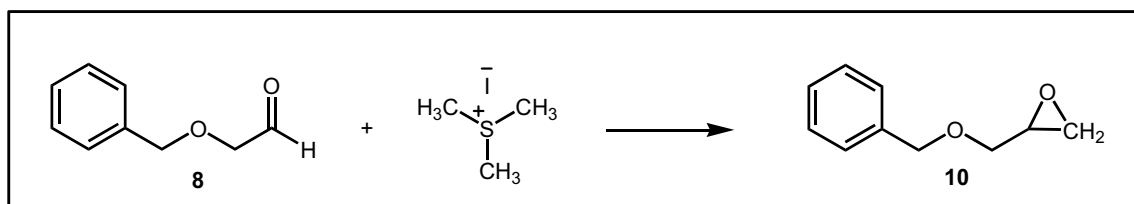


Figura 4.9. Formació de l'epòxid **10** a partir del aldehid **8** i la sal de trimetilsulfoni.

Es va concloure que l'ilur de sofre no era prou reactiu per atacar a l'aldehid **8**. Per aquest motiu es decidí observar si aquest tipus de reacció tenia lloc en un aldehid model com el metoxibenzaldehid, producte del qual es trobava descrita la formació del seu corresponent epòxid.⁸⁵ La prova que es va realitzar emprant la sal de trimetilsulfoni, el 2-benziloxiacetaldehid

i KOH va permetre observar per CG-MS la formació del corresponent epòxid. Per tant, aquest resultat indicava que el reactiu de trimetisulfoni es trobava en bones condicions per formar el corresponent ilur i era capaç de reaccionar amb un electròfil. En definitiva, el plantejament que s'havia realitzat d'obtenció de l'epòxid a partir del 2-benziloxi-acetaldehid hauria de ser reconduït, ja que aquest aldehid no era suficientment reactiu davant dels ilurs de sofre.

4.1.2.1.2. Obtenció de l'alquè 9 a partir del 2-benziloxiacetaldehid mitjançant una reacció de Wittig

La nova via plantejada d'obtenció de l'epòxid 10 a partir del compost 8 es va fer en dos etapes. El primer pas consistiria en la formació del corresponent alquè i el segon en la formació de l'epòxid. Per realitzar la transformació de l'aldehid en alquè s'emprà la reacció de Wittig. L'elecció d'aquesta reacció fou motivada pel fet que el reactiu de Wittig ($\text{Ph}_3\text{P}^{13}\text{CH}_3\text{Br}$) es trobava disponible comercialment amb un metil marcat amb ^{13}C . Novament, abans de realitzar la síntesi definitiva calia fer proves amb el reactiu de Wittig sense marcar i veure si es podia arribar a l'obtenció final de l'OO(1,2)PAP.

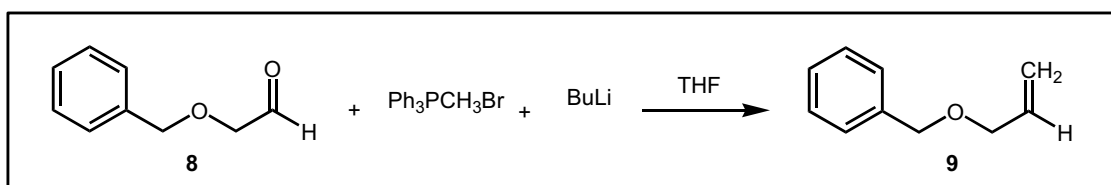


Figura 4.10. Obtenció de l'alquè 9 a partir del reactiu de Wittig i el compost 8.

El procés de reacció es controlà per CG i CCF i mostrà la formació d'un cru complex del qual s'obtingueren 4 fraccions després de la purificació per CCF. L'anàlisi per CG-MS va determinar quina era la fracció més rica en l'alquè 9. Finalment, el compost desitjat s'obtingué amb un rendiment del 15%. L'espectre de ^1H -RMN va mostrar la presència de tres protons olefínics, entre els quals hi havia un multiplet a 5.9 ppm, corresponent al protó enllaçat al carboni no terminal del doble enllaç. L'espectre de ^{13}C -RMN també va aportar evidències de la formació del doble enllaç, en observar els dos àtoms de carboni olefínics a 138.3 i 134.7 ppm, respectivament.

4.1.2.1.3. Obtenció de l'epòxid 10 a partir de l'alquè 9

El següent pas era la formació de l'epòxid 10. El procediment d'epoxidació es realitzà mitjançant un peroxiàcid com és el mPCBA.

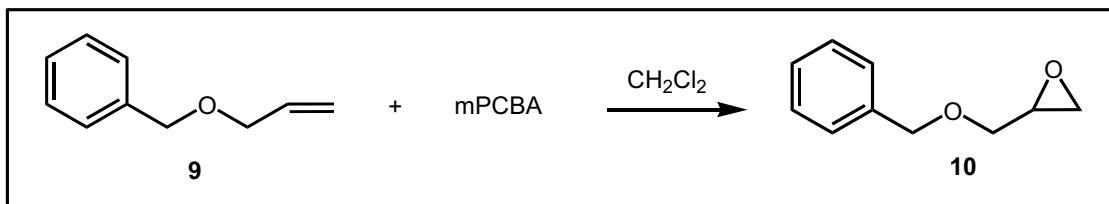


Figura 4.11. Formació de l'epòxid **10** a partir de l'alquè **9**.

Aquesta reacció es controlà per CG i CCF. La conversió fou lenta, però quasi completa, obtenint després de la purificació el producte desitjat amb un rendiment del 82%. L'espectre de ^{13}C -RMN de **10** va mostrar la desaparició dels carbonis olefínics i l'aparició de dos àtoms de carboni alquílics a 50.8 ppm i 44.2 ppm de l'oxirà. Els altres dos àtoms de carboni aparegueren a 77.3 ppm i 70.7 ppm. D'altra banda la desaparició dels protons olefínics també fou evident en l'espectre ^1H -RMN, observant-se a 3.75 un dd i a 3.45 ppm un altre dd corresponents als dos protons diastereotòpics del CH_2 terminal. A més per CG-MS s'observà el pes molecular del compost **10** a 168.

4.1.2.1.4. Obtenció del compost **11** a partir del compost **10**

Un cop format l'epòxid **10**, el següent pas fou l'obertura per l'anilina amb la finalitat d'obtenir l'èter benzílic del compost **10**. Aquesta reacció era similar a la reacció que es realitzava en el laboratori quan es volia obtenir el PAP mitjançant glicidol i anilina. Per aquest motiu s'empraren les mateixes condicions.

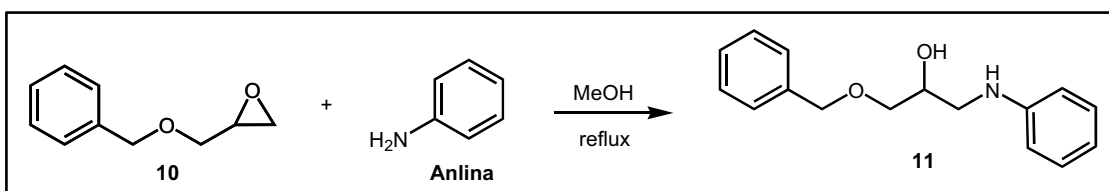


Figura 4.12. Obtenció de l'èter benzílic **11** a partir del compost **10** i anilina.

La reacció es controlà per CG. L'espectre de ^1H -RMN del producte purificat va mostrar la presència de dos anells aromàtics, a més dels senyals característics dels 5 protons de l'esquelet del PAP. Entre ells destacà el protó del CHOH a 4.06 ppm i a 3.62 ppm i 3.55 ppm els dos protons diastereotòpics del CH_2O .

4.1.2.1.5. Desprotecció de l'èter benzílic del compost 11

L'últim que restava abans de realitzar l'esterificació dels dos grups alcohol del PAP era la desprotecció de l'alcohol primari. La desprotecció de l'èter benzílic mitjançant hidrogenació s'assajà amb catalitzador de Pd/C.

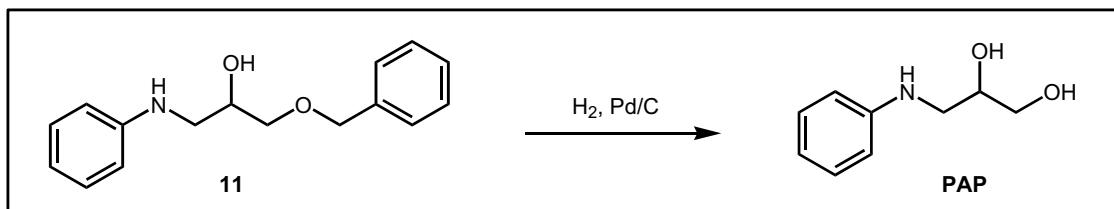


Figura 4.13. Obtenció del PAP a partir de la desprotecció de l'èter benzílic del compost **11**.

Malauradament, els controls que es van dur a terme mitjançant CCF no van mostrar la desaparició de l'èter **11**. Es van provar dos dissolvents (MeOH i EtOH) per veure si tenien algun tipus d'influència en el procés, però en cap dels dos casos la reacció va avançar. Aquests resultats no coincidien amb l'experiència del nostre laboratori en la desprotecció d'èters benzílics en derivats del PAP, com es descriu en la tesi de la Dra. Anna Morató. Semblava que per algun motiu el compost **11** desactivava la capacitat catalítica del Pd/C.

4.1.2.1.6. Desprotecció de l'èter benzílic del compost 10

La nova variació que es proposà per tal de solucionar el problema de desprotecció de l'èter benzílic, consistí en la desprotecció abans d'introduir l'anilina sobre el glicidol protegit. Aquest plantejament hauria de permetre obtenir el glicidol, compost a partir del qual la ruta sintètica fins al dPAP havia estat experimentada en el nostre laboratori. Ara bé, aquesta variació ens portaria un inconvenient de manipulació degut a la volatilitat que presenta el glicidol. Per tant, la desprotecció de l'èter hauria d'anar acompanyada de l'obertura del glicidol mitjançant anilina. El tractament del cru hauria de ser mínim, solament una filtració per eliminar el catalitzador.

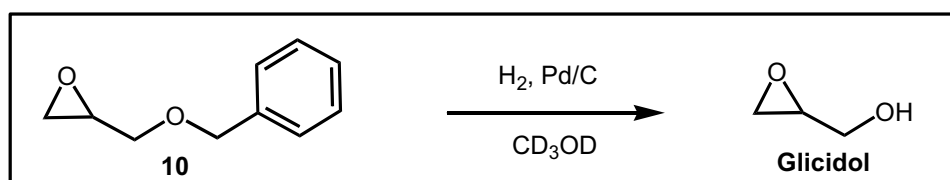


Figura 4.14. Desprotecció de l'èter benzílic del glicidol **10** mitjançant hidrogenació catalítica.

En aquest cas la reacció sí que funcionà de forma satisfactòria ja que s'observà per CCF com desapareixia el compost **10**, i a més, l'anàlisi per ^1H -RMN mostrà la presència dels protons corresponents al glicidol. Entre ells calia destacar el protó del CH a 3.07 ppm i a 3.79 ppm i 3.46 ppm els dos protons diastereotòpics CHHOCH . Per tant, en aquest punt es tenia llum verda per poder procedir a la síntesi del compost marcat amb ^{13}C . Tot i que els rendiments no havien estat optimitzats, partint d'un gram del reactiu de Wittig marcat es podria arribar a obtenir una quantitat suficient d'OO(1,2)PAP marcat amb ^{13}C per als nostres objectius.

4.1.2.2. Síntesi de l'OO(1,2)PAP marcat amb ^{13}C

Després de les diferents proves realitzades, la ruta sintètica que s'emprà per a l'obtenció de l'OO(1,2)PAP marcat amb ^{13}C fou la mostrada en la Figura 4.15.

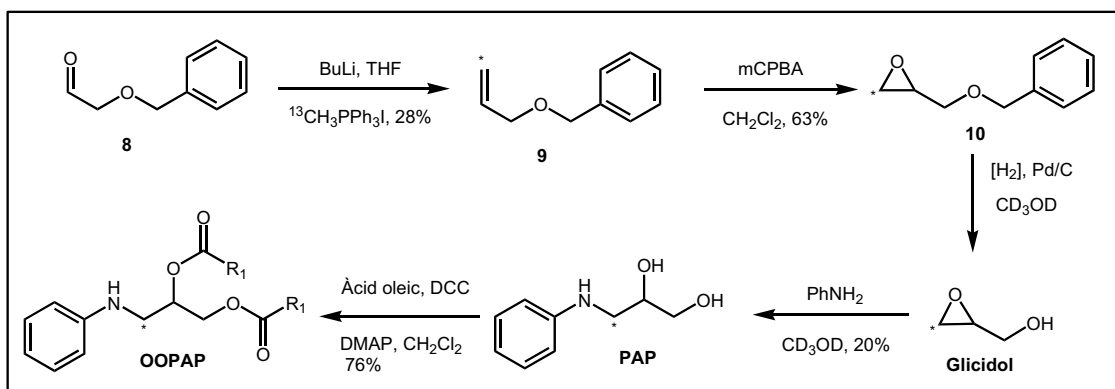


Figura 4.15. Ruta sintètica per a l'obtenció del ^{13}C OO(1,2)PAP a partir del compost **10**.

En resum, la ruta sintètica partí de l'aldehid **8** sobre el qual s'introduí el metilè marcat amb ^{13}C mitjançant una reacció de Wittig. L'espectre de ^1H -RMN va mostrar la introducció del metilè ja que a 5.32 ppm i 5.23 ppm s'observà un ddq corresponent als protons del C1 de l'olefina. Aquests protons mostraren fins a tres acoblaments, un amb el ^{13}C , l'altre amb el corresponent H en *cis* i finalment amb el H en *trans*. Un altre fet que indicà la formació de l'alquè **9** fou l'espectre de ^{13}C -RMN, mostrant a 97.1 ppm el senyal del ^{13}C de l'alquè **9**.⁸⁶ A continuació es realitzà l'oxidació de l'alquè **9** al corresponent epòxid **10**.⁸⁷ La reacció funcionà correctament, com indicaren els espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN. Calia destacar l'observació del ^{13}C que aparegué a 44.2 ppm, indicant la formació de l'epòxid **10**. Tot seguit es procedí a l'eliminació del grup protector mitjançant una hidrogenació catalítica emprant com a dissolvent metanol deuterat. Aquest ens hauria de servir per realitzar un espectre de RMN del cru de desprotecció per analitzar la conversió de la reacció, ja que en ser el producte resultant de la desprotecció volàtil, no era aconsellable l'eliminació del dissolvent. La desprotecció funcionà correctament,

en observar que en l'espectre de ^1H -RMN els protons diastereotòpics corresponents al CHHO contigu al grup èter van variar el seu desplaçament, tot passant el compost d'èter a alcohol de 3.63 ppm i 3.38 ppm a 3.78 ppm i 3.47 ppm, respectivament. La desprotecció va anar acompanyada de l'obertura del glicidol, mitjançant l'addició de l'anilina⁷³ sobre el cru de la reacció anterior dissolt en CD_3OD . Diverses evidències van permetre mostrar la formació del ^{13}C PAP, entre elles l'espectre de ^1H -RMN i el ^{13}C -RMN. En aquest cas, el senyal del $^{13}\text{CH}_2\text{NH}$ apareixia amb una intensitat superior a la dels altres carbonis, a 46.6 ppm; a més, s'observà com un doblet a 70.3 ppm el CH contigu al $^{13}\text{CH}_2\text{NH}$. Finalment, solament restava esterificar els dos grups alcohols, mitjançant el procediment convencional emprat al nostre laboratori. L'esterificació del PAP⁷³ fou satisfactòria ja que per HPLC-MS s'observà els pes molecular del ^{13}C OOPAP a 697 ($\text{M}+\text{H}^+$). Altres trets característics de l'OO(1,2)PAP observats per ^{13}C -RMN van ser el $^{13}\text{CH}_2\text{N}$ a 44.0 ppm de forma intensa (Figura 4.16), a 70.1 ppm un doblet corresponent al CHOCOR i a 62.8 ppm el CH_2OCOR . L'espectre de ^1H -RMN també mostrà l'esterificació dels dos grups alcohols del ^{13}C PAP, en observar a 5.24 ppm el CHOCOR i a 4.31 ppm (ddt) i a 4.24 PPM (ddd) els protons diastereotòpics del CHHOCOR , els quals mostraren acoblament amb el carboni del $^{13}\text{CH}_2\text{NH}$.

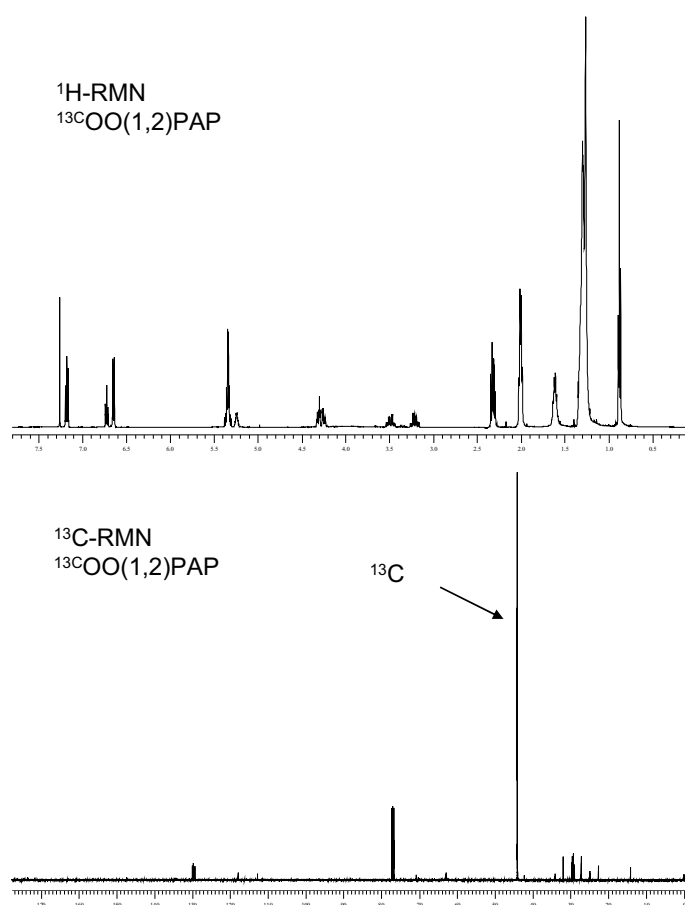


Figura 4.16. Espectres de ^1H -RMN i ^{13}C -RMN de l'OO(1,2)PAP marcat amb ^{13}C .

Així doncs, es pogué disposar de ^{13}C OO(1,2)PAP amb una puresa elevada i la quantitat suficient per dur a terme el procés model de desodorització.

4.1.2.3. Estudi de l'estabilitat tèrmica del ^{13}C OO(1,2)PAP en un procés de desodorització

La finalitat de la síntesi de l'OO(1,2)PAP marcat amb ^{13}C era l'estudi del mecanisme de trencament de l'OO(1,2)PAP en un procés de desodorització. El marcatge del carboni 3 era estratègic a l'hora d'observar els possibles subproductes de trencament tèrmic del substrat marcat. Per tant, la utilització de diferents tècniques com són la ^{13}C -RMN i l'HPLC-MS, haurien d'ajudar a determinar l'evolució d'aquest $^{13}\text{CH}_2$ al final del procés de desodorització. Concretament, la ^{13}C -RMN ens ajudaria a determinar el desplaçament químic del ^{13}C en el final de la desodorització i alhora donaria informació de quin tipus de carboni s'hauria format.

L'experiment model que es proposà fou trioleïna pura, sense la presència d'anilina, sotmesa a desodorització, sobre la qual s'afegí un 5% en pes d'OO(1,2)PAP: ^{13}C OO(1,2)PAP en una relació 1:1. La introducció d'aquesta fracció d'OO(1,2)PAP marcat era suficient per poder observar amb claredat la presència del marcatge, tal com s'observa en la Figura 4.18.

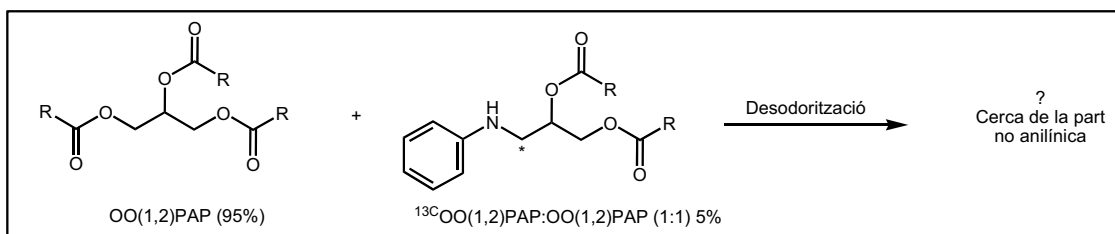


Figura 4.17. Procés model de desodorització format per un 95% de trioleïna i un 5% d'OO(1,2)PAP: ^{13}C OO(1,2)PAP (1:1).

Un cop realitzat el procés de desodorització s'analitzaren exhaustivament tant el cru de reacció, com diverses fraccions recuperades en trapes fredes. En totes es va realitzar primer una extracció amb hexà, la qual permetria extreure els components més apolars, seguida d'una amb acetat d'etil, per tal d'extreure possibles productes polars que no haguessin pogut ser extrets amb l'hexà. En ambdós casos les diferents fraccions van ser analitzades per ^{13}C -RMN i HPLC-MS.

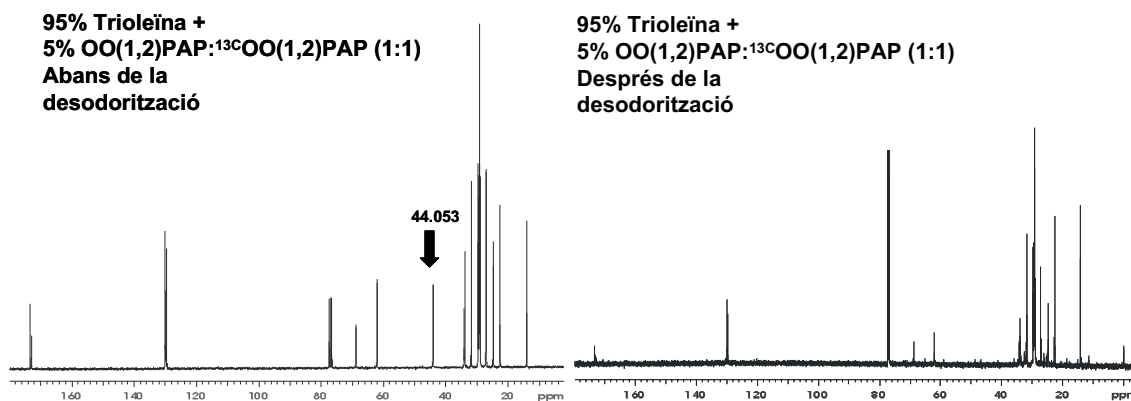


Figura 4.18. Espectres de ^{13}C -RMN abans i després del procés de desodorització del model d'oli format per OO(1,2)PAP amb un 5% de ^{13}C OO(1,2)PAP.

La principal conclusió d'aquest experiment fou la deduïda de l'anàlisi realitzat per RMN, més concretament el de ^{13}C . En aquest espectre es va observar com desapareixia el $^{13}\text{CH}_2$ de l'OO(1,2)PAP, tal com es veu en la Figura 4.18. A més, la desaparició no anà acompanyada per l'aparició de cap altre pic corresponent a un nou tipus de ^{13}C . Això feia pensar que la desaparició del ^{13}C OO(1,2)PAP pogués anar acompanyada per la formació d'un compost volàtil, el qual no quedava atrapat en la trampa freda, o bé podria formar-se un compost que podria quedar retingut en el residu resinós romanent a les parets del matràs, formant possiblement polímers insolubles (Figura 3.13). Aquest residu insoluble i fosc es generava de forma sistemàtica en cadascun dels processos models de desodorització, i era més abundant quan es tractava de models de derivats del PAP i menys quan s'utilitzava trioleïna o oli de colza com a matriu.

Per tal d'aprofundir en la possibilitat de la formació d'un compost volàtil, es va realitzar l'anàlisi dels compostos volàtils originats en la descomposició d'una mostra d'OO(1,2)PAP sense anilina, i sense marcar isotòpicament, a 275 °C. Aquesta anàlisi es va realitzar per cromatografia de gasos emprant una columna i una xeringa recol·lectora especialment dissenyada per a compostos volàtils. Els resultats no van permetre identificar la formació d'un producte majoritari, sinó que s'observà la presència de diversos pics cromatogràfics, entre els quals es podia identificar majoritàriament petits fragments de la cadena carbonada de l'àcid oleic, a més d'anilina i quantitats petites d'acroleïna. Amb tot això, aquest experiment reafirmava un altre cop la inestabilitat de l'OO(1,2)PAP en un procés de desodorització, sense observar la formació majoritària d'un o més productes volàtils corresponent a la part no anilínica, però, tot plegat semblava indicar que el fragment de carboni ^{13}C podia romandre en la fracció resinosa no soluble. Per aquest motiu es procedí a realitzar un anàlisi elemental d'una alíquota del residu insoluble retingut a les parets del recipient on es realitzà aquest model d'oli. L'anàlisi va permetre observar una relació $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ superior a la present en una

mostra de referència, la qual estava formada per trioleïna més un 5% d'OO(1,2)PAP sense marcar i sotmesa a un procés de desodorització.

Aquest resultat suggeria que la part no anilínica provinent del trencament tèrmic del dPAP s'incorporava en el residu insoluble. Per tant, tot i que la formació d'aquesta part no anilínica era interessant per comprendre millor el mecanisme de formació d'anilides, no presentava tanta rellevància a l'hora de tenir-la en compte des del punt de vista toxicològic. De fet, aquesta part no es trobaria present en la matriu dels olis suposadament tòxics, sinó que es trobaria dipositada en els serpentins o les parets dels tancs de desodorització. És a dir, la probabilitat que aquest tipus de compostos haguessin estat ingerits pels consumidors d'oli tòxic era difícil d'imaginar.

4.2. ESTUDIS TEÒRICS DEL MECANISME DE FORMACIÓ D'ANILIDES A PARTIR DEL dPAP

Amb la finalitat de complementar els estudis experimentals esmentats en l'apartat anterior, es plantejà la realització d'un estudi teòric del mecanisme de formació d'anilides a partir del dPAP. L'estudi es dugué a terme amb la col·laboració del Dr. Ramon Crehuet del grup de Química Teòrica i Computacional del IIQAB-CSIC. Aquest consistí en realitzar una proposta de diversos camins de reacció acompanyada del càlcul energètic de cadascun dels productes involucrats en els diferents camins, així com dels reactius, estats de transició (TS), intermedis i productes. El càlcul energètic es va realitzar en fase gas mitjançant mètodes basats en la teoria del Funcional de la densitat (DFT) utilitzant la funció híbrida B3LYP.

S'ha observat que el mecanisme de descomposició del dPAP presenta analogies amb el mecanisme que s'observa en l'aminòlisi d'esters.^{88,89,90} Altrament aquest mecanisme presenta similituds amb la hidròlisi d'amides, essent aquest un mecanisme important alhora d'estudiar l'activitat proteolítica de determinats enzims.⁹¹ Els estudis mecanístics no es posen d'acord en els intermedis involucrats en ambdós reaccions, però el que sí que està clar és la possibilitat de que existeixin diferents mecanismes de reacció. En l'aminòlisi té lloc la formació d'un enllaç

amida a partir d'una amina⁹⁰ i d'un ester o àcid gras, mitjançant la formació d'un intermedi zwitteriònic (Figura 4.19). Aquest mecanisme no és nou i ha estat estudiat en els processos de formació d'amides en solució aquosa,⁹⁹ més concretament en l'aminòlisi d'esters alquilics.

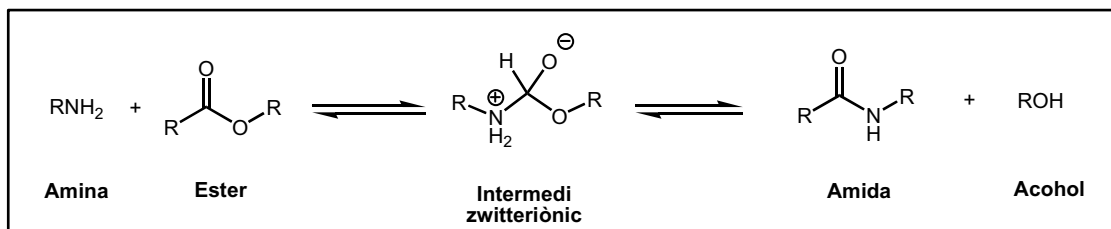


Figura 4.19. Obtenció d'una amida a partir de l'aminòlisi d'un ester, a través d'un intermedi zwitteriònic.

Aquest tipus de reacció és important ja que es tracta de la reacció model per a la síntesi de pèptids a partir d'aminoàcids en condicions pre-biòtiques. Els estudis mecanístics d'aquest tipus de reacció discrepen dels intermedis involucrats, però tots coincideixen en l'existència de diferents camins. Els resultats computacionals no presenten una solució evident, ja que l'existència de l'intermedi zwitteriònic s'ha demostrat en determinats treballs i en d'altres ha estat refusada. El que sembla clar és que aquest intermedi és inestable i que la seva existència no altera la majoria de camins de reacció. Hi ha dos tipus de mecanismes reconeguts per a la reacció. En el primer, que té lloc de forma concertada, es produeix la formació de l'enllaç amida i l'eliminació d'aigua. En el segon camí el qual es produeix per etapes, es forma un intermedi *gem*-diol. El primer pas consisteix en l'addició del grup amino més la transferència del protó a l'alcoxi per donar el *gem*-diol, el qual descompon en el següent pas mitjançant l'eliminació d'aigua. Tots dos mecanismes poden ser catalitzats per molècules d'aigua, les quals juguen un paper important en la transferència de protó.

Pel que fa a la hidròlisi d'amides, els principals camins de reacció inclouen una transferència de protó acompanyada de la formació de l'enllaç $\text{C}-\text{O}_{\text{aigua}}$. Igualment que en el cas anterior hi ha dos mecanismes possibles, un de concertat i un altre per etapes que té lloc per un intermedi *gem*-diol (Figura 4.20). El mecanisme concertat i el de per etapes són catalitzats per molècules d'aigua, les quals estan involucrades en el procés de transferència de protó. L'aigua ajuda a generar estats de transició formats per anells de 5 o 6 baules els quals tenen poca tensió. Per tot això, aquests processos foren escollits com a models a l'hora de realitzar l'estudi teòric.

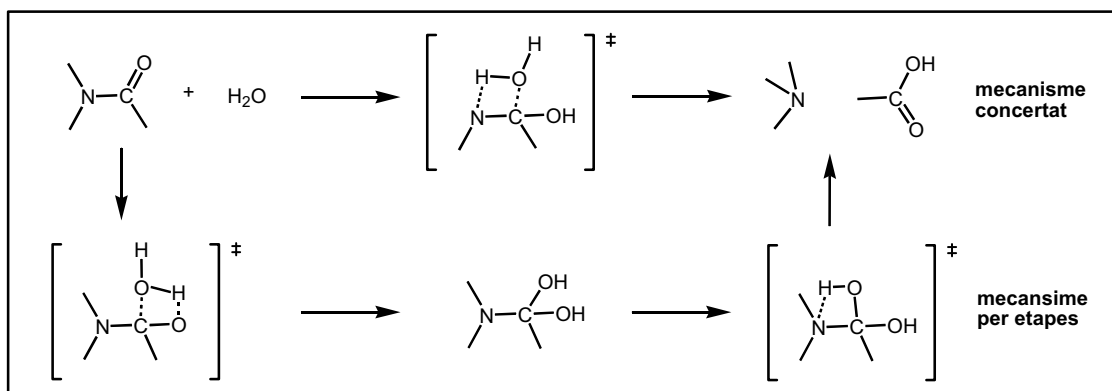


Figura 4.20. Dos mecanismes possibles per al procés d'hidròlisi d'amides, un de concertat i un per etapes.

Abans de començar l'estudi calia proposar una simplificació per a la molècula de dPAP. La finalitat d'aquesta simplificació era obtenir un compost de dimensió més reduïda per disminuir el cost computacional. Es van realitzar dues simplificacions: la primera fou l'eliminació de l'ester primari, mentre que la segona fou la substitució del residu d'àcid gras de l'ester secundari per un grup metil, obtenint així el compost **12** (Figura 4.21). D'altra banda, aquestes simplificacions també afectaren la formació de l'anilida, la qual es representaria com la *N*-fenilacetamida (**13a**).

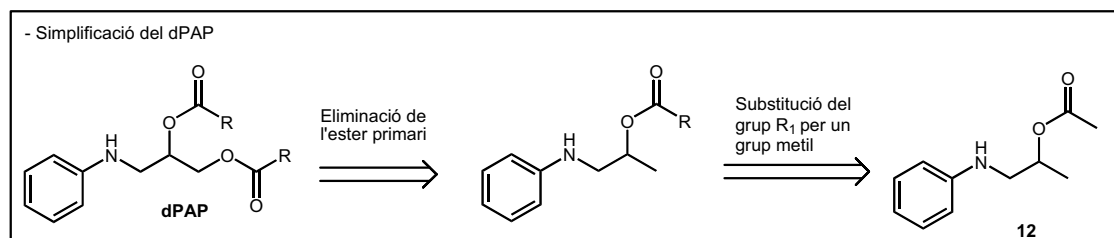


Figura 4.21. Simplificacions realitzades en la molècula de dPAP per a l'estudi teòric del mecanisme d'obtenció d'anilides a partir del dPAP.

4.2.1. Estudi de la formació d'anilides a través d'un procés intramolecular

Els primers esforços de l'estudi es van centrar en la formació d'anilides mitjançant un mecanisme intramolecular. Seguint com a referència l'analogia amb el procés d'amidòlisi d'esters i d'hidròlisi d'amides, es va descriure un conjunt de camins de reacció que es podien diferenciar en dos tipus: el concertats i els que transcorren per etapes. Aquests camins de reacció foren resultat d'una proposta teòrica mitjançant la qual es relacionava la formació de **13a** (anilida) a partir de **12** (dPAP). La interrelació i la nomenclatura de cadascun dels

mecanismes, així com els estats de transició (TS), intermedis i productes finals pels quals té lloc cadascun d'ells es detalla en les Figures 4.22 i 4.23. Un cop plantejats aquests camins, es procedí al seu estudi energètic, mitjançant l'optimització de tots els compostos involucrats.

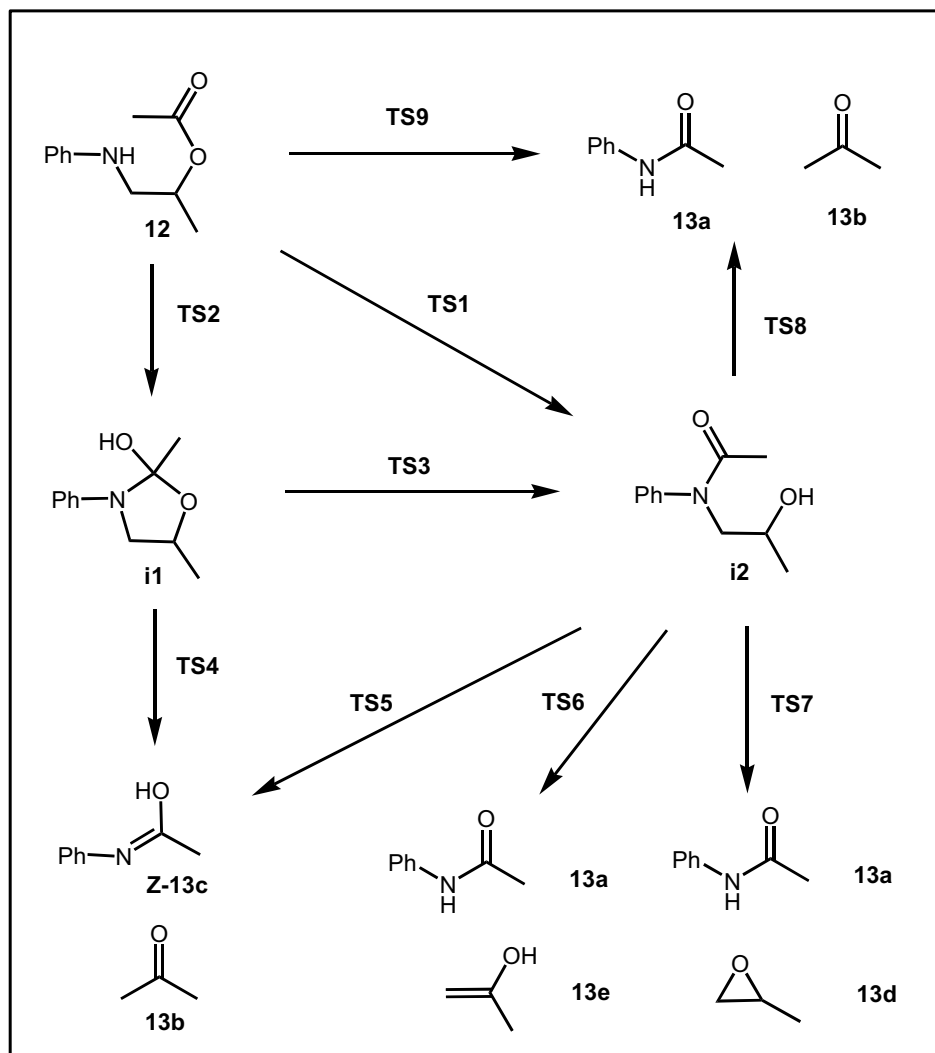


Figura 4.22. Representació esquemàtica dels diversos camins de reacció intramoleculars mitjançant els quals es proposa la formació de **13a** (d'anilida) a partir de **12** (dPAP).

D'altra banda en la Taula 4.1 es mostren les energies relatives (ΔE), les entalpies relatives (ΔH) i les energies lliures de Gibbs (ΔG) calculades al nivell B3LYP/6-311G(d,p) dels compostos involucrats en els diferents mecanismes intramoleculars.

Taula 4.1. Energies, entalpies i energies lliures de Gibbs relatives (Kcal/mol) dels estats de transició, intermedis, reactius i productes involucrats en els camins de reacció intramoleculars calculades en el nivell B3LYP/6-311G(d,p) de la formació de l'anilida **13a** a partir de **12**.

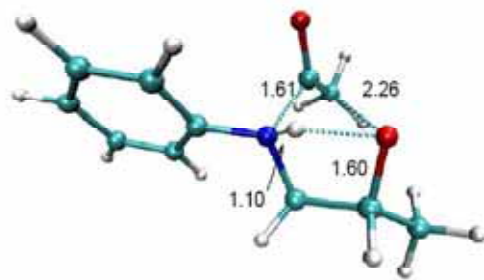
	ΔE	ΔH	ΔG
12	0	0	0
13a+13b	-8.5	-17.8	-4.3
13b+13c	0.8	-7.8	4.9
13a+13e	7.1	-0.8	11.8
13a+13d	22.2	14.1	28.0
TS1	56.6	52.9	58.3
TS2	41.6	37.4	42.6
TS3	41.8	39.0	45.2
TS4	87.2	82.8	85.3
TS5	60.1	53.4	54.7
TS6	80.1	74.0	74.2
TS7	82.6	77.3	77.3
TS8	66.8	62.5	64.3
TS9	79.6	75.4	77.3
i1	11.1	9.6	17.8
i2	-5.8	-6.1	-5.6

Un primer pas en la descomposició del compost **12** passaria per la formació d'un estat de transició en forma de zwitterió resultat de l'atac nucleòfil del grup amino de **12** sobre el corresponent grup carbonil. Tenint en compte aquest mecanisme intramolecular, es podria formar un intermedi **i2** en forma d'amida després de produir-se una transferència de protó en el zwitterió format (**TS1**). Aquest TS té una geometria particular, amb dos anells de 5 baules, el que fa que el protó i el grup acil que experimenten la transposició estiguin en direccions oposades, i que per tant aquest pas sigui asincrònic amb una barrera energètica massa alta per explicar la formació d'**i2**. D'altra banda, **i2** es podria obtenir a partir d'un procés en dos passos el qual implicaria la formació d'un intermedi en forma d'hemiactal **i1**, menys estable des del punt de vista entròpic i entàlpic que els reactius i que per tant seria difícil detectar en

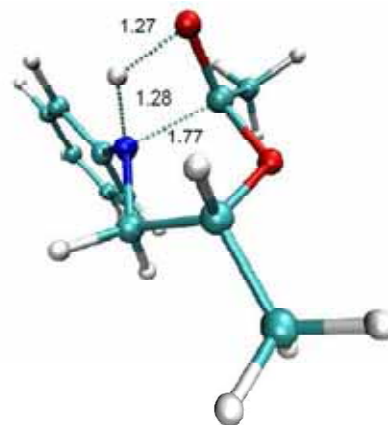
les condicions experimentals. Aquest intermedi es formaria de forma concertada a partir del **TS2** (41.6 Kcal/mol) i alhora evolucionaria cap a l'amida **i2** després de produir-se el trencament de l'enllaç C-O passant pel **TS3**. En ambdós TSs la transferència de protó es realitza mitjançant un anell de 4 baules, a més, les barreres energètiques d'aquests són del mateix ordre (**TS2**= 41.6 Kcal/mol i **TS3**= 41.8 Kcal/mol) i inferiors a les observades pel **TS1**.

Els dos camins proposats fins ara per a l'obtenció de l'amida **i2** són aproximadament del mateix ordre, però en els dos casos són més grans que les obtingudes en el procés d'amidòlisi descrit en la literatura. Això pot ser degut principalment al fet que la reacció d'estudi té lloc mitjançant una única molècula, fet que implica major tensió, mentre que en el cas de l'amidòlisi es tracta de dues molècules independents. Això és especialment veritat per al mecanisme concertat; de fet, aquest pas té una major barrera que el d'etapes.

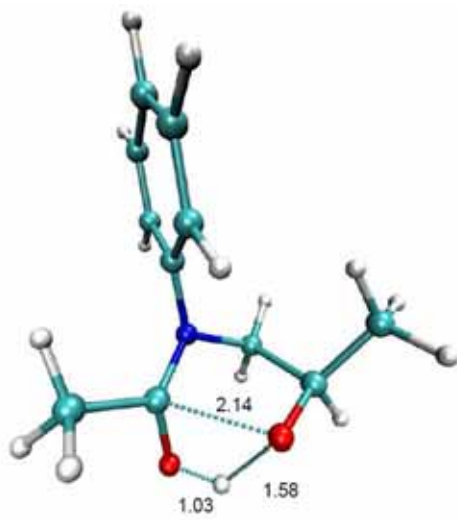
L'existència de l'**i2** va permetre plantejar altres vies per obtenir l'anilida **13a**. Una d'aquestes implicava la formació mitjançant el **TS4** de la cetona **13b** i un tautòmer de l'amida **13a**, l'àcid imídic **13c** en la forma d'isomer Z. Aquest camí energèticament no era favorable (85.3 Kcal/mol) i per tant no servia per explicar la formació de **13a**. Una altra via d'obtenció de **13c** i **13b** implicaria la formació del **TS5** amb una barrera energètica de 54.7 kcal/mol, més favorable que en el cas anterior. Un TS similar on es produeix una transferència de H al N seria el **TS6**. Aquest TS evita la tensió d'un anell de 3 baules i porta a la formació de l'enol **13e** en lloc de la cetona **13b**. En aquest cas la barrera energètica continua essent molt elevada, 74.2 Kcal/mol. Si en lloc de considerar la transferència del protó unit al carboni es proposa la transferència del H del grup hidroxil, es pot observar la formació de l'anilida **13a** i l'oxirà **13d** a través del **TS7**. En aquest cas la barrera determinada fou elevada, 77.3 Kcal/mol. L'últim TS que explicava la descomposició de l'**i2** fou el **TS8**. Per aquest camí s'ha determinat una barrera de 64.3 Kcal/mol. En definitiva tots aquests camins tindrien una barrera energètica massa elevada per explicar la formació de **13a**. L'explicació d'aquestes energies elevades no roman en el procés de transeferència del protó sinó en l'energia necessària per trencar l'enllaç C-N i reorganitzar els electrons d'un sistema σ a un sistema π .



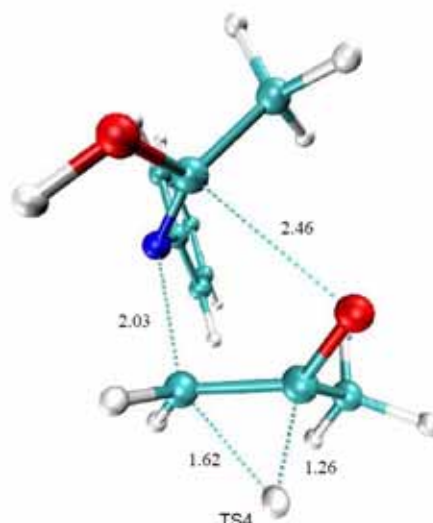
TS1



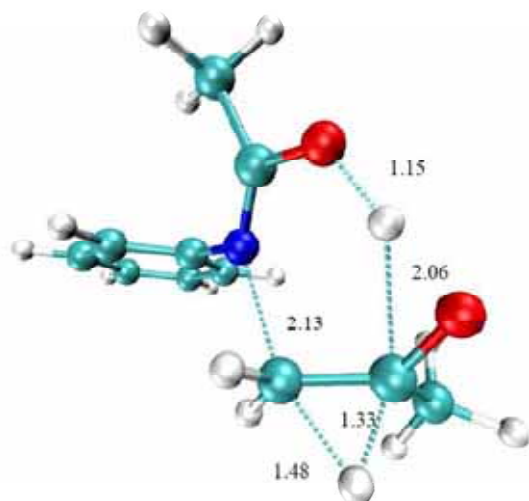
TS2



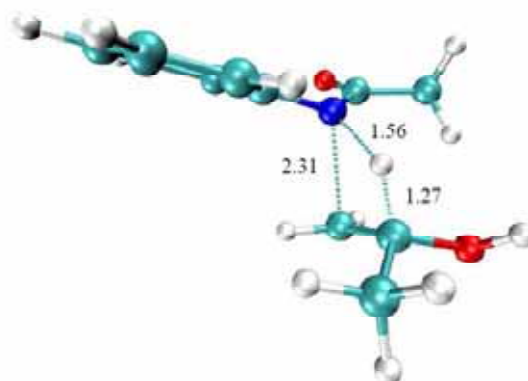
TS3



TS4



TS5



TS6

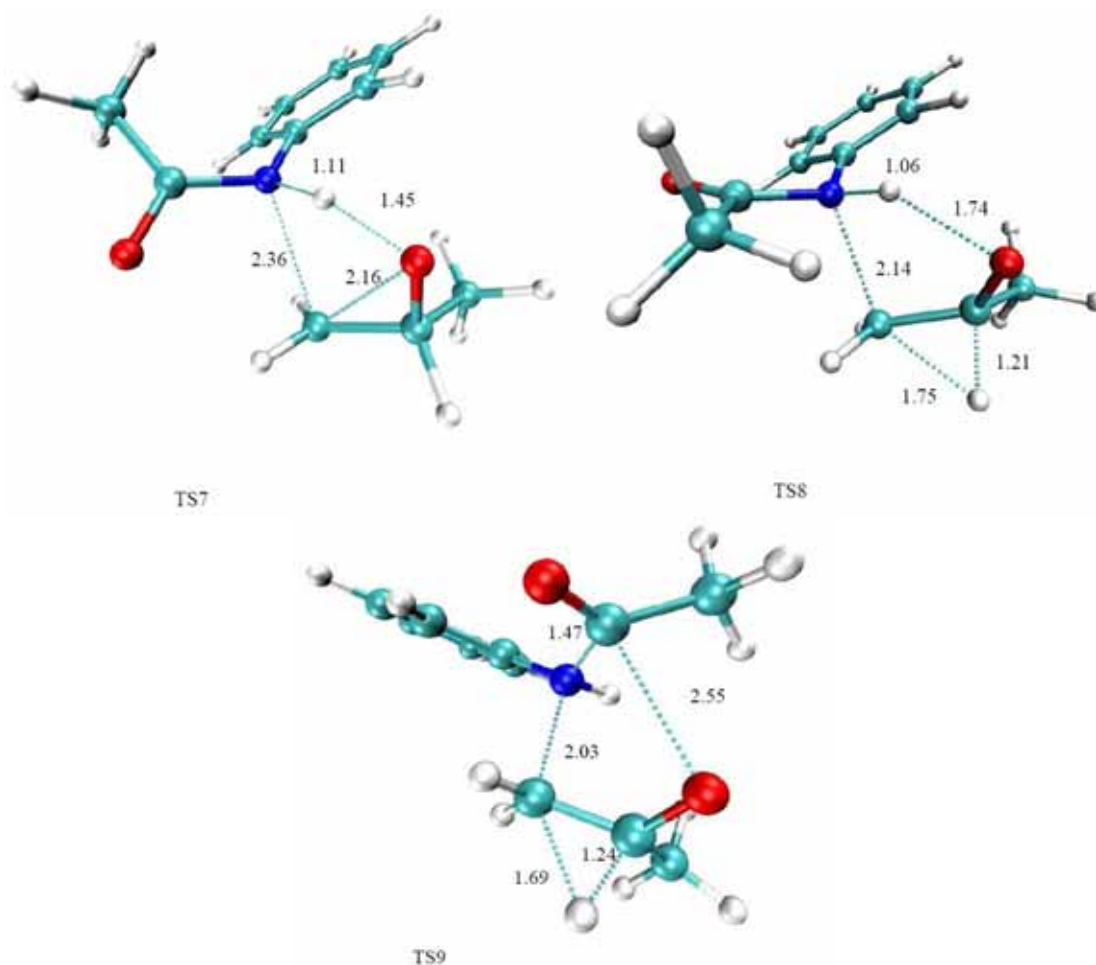


Figura 4.23. Estats de transició optimitzats amb el nivell B3LYP/6-311G(d,p) pertanyents als camins de reacció intramoleculars indicats en la Figura 4.22.

Si es té en compte que el temps de reacció és invers a la constant de velocitat, aquest es podria calcular a partir de l'equació 4.1, on h és la constant de Planck, T la temperatura de reacció, K_b la constant de Boltzman, R la constant dels gasos i ΔG l'energia d'activació. Per tant, temperatures de 262 °C i barreres energètiques de 35, 40 i 45 Kcal/mol donarien temps de reacció de 0.005, 0.55 i 60 h. En canvi, a 282 °C els temps es reduïren fins a 0.0015, 0.13 i 12 h. Aquests resultats indiquen que energies superiors a 45 Kcal/mol no permetrien explicar la formació de l'anilida, i inferiors a 35 Kcal/mol no permetrien detectar el compost desitjat degut a la seva inestabilitat. En definitiva, energies aproximadament entre 35-45 Kcal/mol presentarien temps de reacció més raonables.

$$k(T) = \frac{K_B T}{hc^0} \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right)$$

Equació 4.1. Determinació de la constant de velocitat a partir de l'energia d'activació i la temperatura de reacció.

Com s'ha esmentat anteriorment, el paper de la solvatació mitjançant molècules d'aigua durant el procés d'amidòlisi és molt important, ja que aquestes poden disminuir la barrera energètica, tant en el cas del mecanisme concertat com en el d'etapes. En canvi, en un medi lipòfil com és el dels olis model, la carència de molècules d'aigua es evident i per tant el seu efecte no es pot tenir en compte. Es podria pensar que el dPAP, com a derivat de l'anilina, actués com a donador-acceptor de protons; en aquest cas es formaria un TS amb un nitrogen carregat positivament, situació improbable en un medi apolar com el que s'estudia. Tot i que aquest efecte catalític tingués lloc, no canviaria el procés global de la reacció. De fet, la formació de l'**i2** és el camí més favorable, de manera que si tingués lloc el procediment catalític, aquest continuaria essent el principal producte de formació en la primera part de la descomposició del dPAP.

Com a alternativa al mecanisme que donava lloc a la formació de l'intermedi en forma d'amida, es proposa un altre tipus de mecanisme concertat. En aquest es formava el **TS9**, el qual donava lloc als compostos **13a** i **13b** de forma concertada. Aquest TS és complex ja que en ell es trenquen tres enllaços (C-H, C-O i C-N) i s'en formen dos (C-H i CN_{amida}). Aquest camí presenta una barrera de 77.3 Kcal/mol, essent així un camí intramolecular amb una barrera més alta que no pas l'obtingut a través de l'**i2** i el **TS8**.

Un altre aspecte que calia tenir en compte és la possibilitat que en el dPAP tingués lloc un altre tipus de mecanisme intramolecular. Aquest consistiria en l'atac del grup amino del dPAP sobre l'èster primari. Per tant, aquest entraria amb competència amb el mecanisme descrit anteriorment, formant-se així anilides provinents de l'èster primari i anilides del secundari. La formació d'una o altra estaria en funció dels factors entàlpics i entròpics del mecanisme. Com es troba descrit, la formació de cicles petits està afavorida per aspectes entròpics, ja que aquests presenten menys graus de llibertat entre els dos grups reactius i estan més propers en l'espai. En contra, com més petit és l'anell, més tensió té i per tant més desafavorit està des del punt de vista energètic. Els anells de 5 baules i els més grans tenen poca tensió i per tant estan afavorits entàlpicament, però l'augment de la llargada de l'anell fa augmentar alhora la entropia. Això condueix a fer un balanç entre el factor entàlpic i entròpic a l'hora de determinar si és més favorable la formació d'un anell de 5 o 6 baules. Com es discuteix en el punt 3.2.3, experimentalment es va observar que la formació d'anilides provinents de l'atac sobre l'èster

secundari del dPAP era encara no el doble que les provinents de l'ester primari. Aquest resultat indicava que les constants de velocitat entre la formació d'un anell de 5 o 6 baules presentaven una relació 2:1. Per tant, aquesta diferència poc significativa de constants de velocitat i els valors de ΔE similars en els anells de 5 i 6 baules, fan pensar que els factors entròpics serien similars en els ambdós casos. En definitiva, la formació dels anells de 5 o 6 baules estaria afavorida d'igual manera.

4.2.2. Estudi de la formació d'anilides a través d'un procés intermolecular

Des del punt de vista teòric, els resultats obtinguts establien que cap dels camins proposats no era energèticament favorable perquè pogués tenir lloc la formació del compost **13a** (anilida). Si més no en les condicions de desodorització emprades en el nostre laboratori, procés on s'assoleixen temperatures que arriben fins a 280 °C. Per a poder superar energies de l'ordre de 70 Kcal/mol, es necessitarien temperatures molt més elevades, situació que no es produeix durant la desodorització. Calia veure si era possible trobar un mecanisme que permetés trobar una barrera energètica menor que les obtingude fins ara.

Tots els camins de reacció proposats fins ara tenien energies elevades. Aquests valors eren deguts a dos motius: al fet que es tracta d'uns mecanismes intramoleculars amb estat de transició molt tensionats, i a la reorganització que han d'experimentar els electrons a un sistema π . L'experiència de diversos estudis teòrics ha determinat que la presència de dissolvent, en el nostre cas el propi reactiu, pot actuar com a catalitzador de la reacció, arribant a disminuir les barreres energètiques entre 15-20 Kcal/mol. Per aquest motiu s'escolli estudiar quina seria la influència d'una molècula de reactiu que fes el paper de dissolvent. Aquesta introducció permetria obtenir barreres les quals podrien arribar a explicar la cinètica de la descomposició.

La introducció d'un procés bimolecular representaria que sobre l'**i2** tindria lloc l'atac nucleòfil d'una altra molècula de reactiu, que en el cas d'estudi seria el compost **12**. La nova molècula de reactiu representaria una dificultat a l'hora de realitzar els càlculs energètics, ja que aquests serien més llargs i complexos. Per aquest motiu es tornà a proposar una simplificació de **12**. La simplificació consistí en la substitució de **12** per una molècula d'anilina, la qual conservava l'amina com a grup reactiu i perdia la part *N*-alquílica, no necessària per a l'estudi (Figura 4.24).

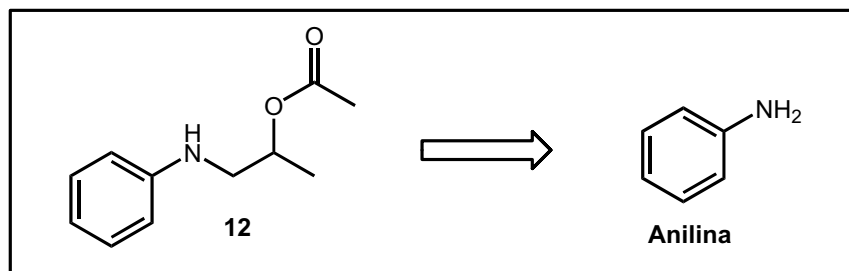


Figura 4.24. Simplificació de la molècula **12** en anilina realitzada en l'estudi del mecanisme intermolecular.

Per tant, aquest mecanisme intermolecular d'obtenció d'anilides permetria plantejar dos nous camins de reacció, en els quals intervindria l'anilina i l'**i2**.

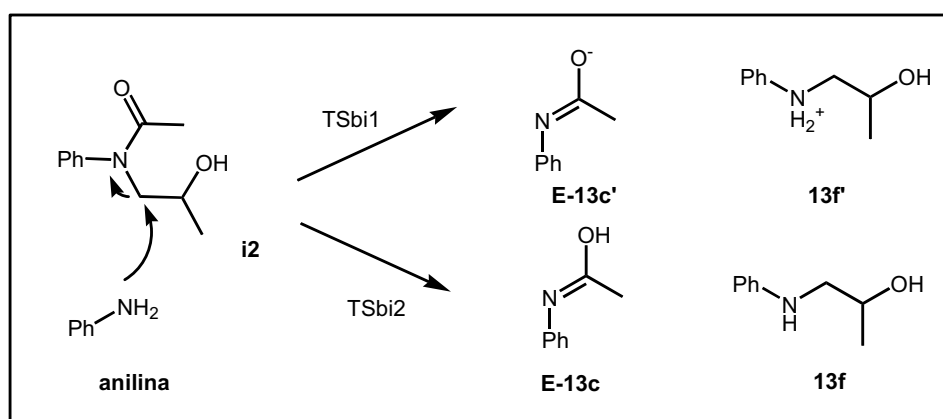


Figura 4.25. Representació esquemàtica dels diversos camins de reacció intermoleculars mitjançant els quals té lloc la formació de l'anilida a partir de l'intermedi **i2**.

El primer camí de reacció intermolecular es caracteritzaria per un procés del tipus S_N2 , on l'anilina actuaria com a nucleòfil sobre el carboni contigu al nitrogen de l'**i2** tot desplaçant així a l'amida. L'atac d'un nucleòfil neutre amb una altra molècula neutra generaria dos productes amb càrrega en el cas que no es produeixi cap altre procés. Aquesta reacció donaria lloc al **TSbi1**, a partir del qual es produiria una transferència de protó de l'anilina protonada cap a l'oxigen del grup sortint, l'imidat. Tot i que aquesta reacció s'ha seguit en fase gas, la presència de dissolvent estabilitzaria els zwitterions abans de produir-se la transferència de protó. En definitiva, aquest camí continua presentant una barrera energètica elevada, 54.0 Kcal/mol (Taula 4.2).

La generació d'aquest parell iònic en el TS anterior es pot evitar si la S_N2 va acompanyada d'una transferència de protó en el mateix. Aquest procés pot tenir lloc si els reactius es troben

en una conformació diferent, tot obtenint el **TSbi2** amb una barrera energètica més favorable que en el cas anterior (41.3 Kcal/mol). La geometria d'aquest TS és similar a la del **TSbi1**, però amb la diferència que la distància C-N del grup sortint és menor. Aquest fet es pot explicar per l'atracció que genera el pont d'hidrogen existent entre el grup carbonil i l'hidroxil. La transferència de protó en el TS dóna lloc a la formació de l'àcid imídic en forma de l'isomer E, el qual presenta el grup hidroxil en posició cis respecte al parell d'electrons solitari del nitrogen.

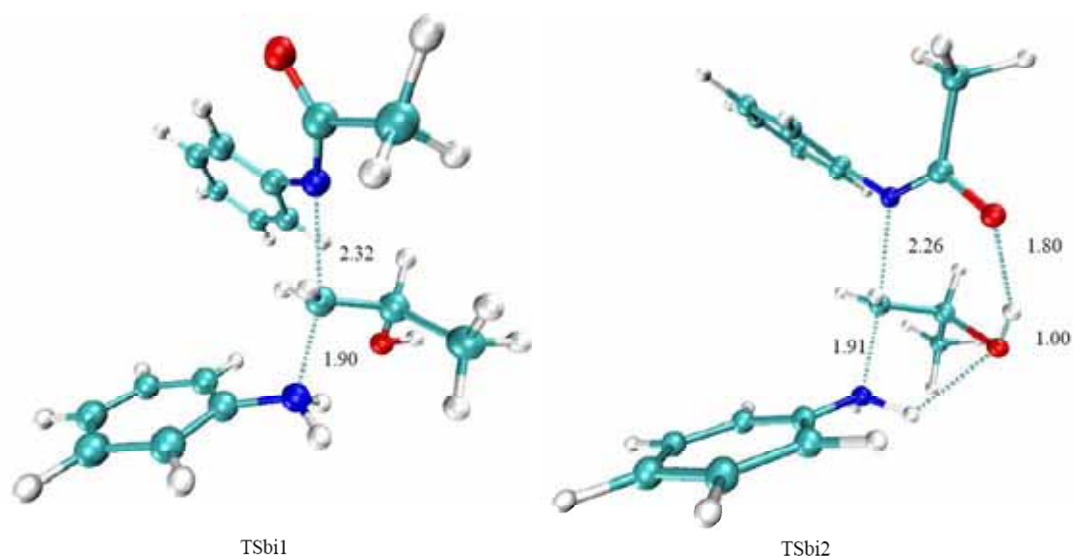


Figura 4.26. Estats de transició optimitzats amb el nivell B3LYP/6-311+G(d,p) pertanyents als camins de reacció intermoleculars indicats en la Figura 4.25.

Taula 4.2. Energies, entalpies i energies lliures de Gibbs relatives (Kcal/mol) dels estats de transició, intermedis, reactius i productes involucrats en els camins de reacció intermoleculars calculades en el nivell B3LYP/6-311+G(d,p) de la formació de l'anilida **13a** a partir de l'anilina i l'**i2**.

	ΔE	ΔH	ΔG
Anilina+i2	0	0	0
TSbi1	63.6	67.6	54.0
E-13c'+13f'	3.5	2.9	5.3
TSbi2	49.7	54.8	41.3
E13c+13f	12.0	12.4	13.9

Com es pot observar, alguns dels camins de reacció tant intramoleculars com intermoleculars donen lloc a la formació de l'àcid imídic **13c**. Aquest compost mitjançant un equilibri tautomèric pot donar lloc a la corresponent anilida. El mecanisme de transformació entre l'àcid imídic i l'amida ha estat àmpliament estudiat^{92, 93} i estableix que perquè es produeixi l'equilibri, cal que el parell d'electrons solitaris del nitrogen i l'oxigen es trobin en l'orientació *cis*, com és el cas del compost format a partir de **TSbi2**. En canvi, el **TS4** i **TS5** donen lloc a la formació de la configuració trans (**Z-13c**). En canvi, el pas de l'isòmer Z al E de l'àcid imídic té una barrera molt alta degut al caràcter de doble enllaç del N-C, el que significa que és necessari un mecanisme catalític perquè tingui lloc l'equilibri àcid imídic-amida. En el cas d'estudi, l'anilina dels derivats del PAP podria ajudar alhora de catalitzar l'obtenció de l'isòmer E a partir del Z.

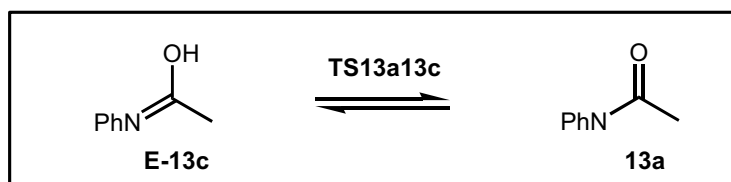


Figura 4.27. Equilibri tautomèric entre l'àcid imídic **13c** i l'anilida **13a**.

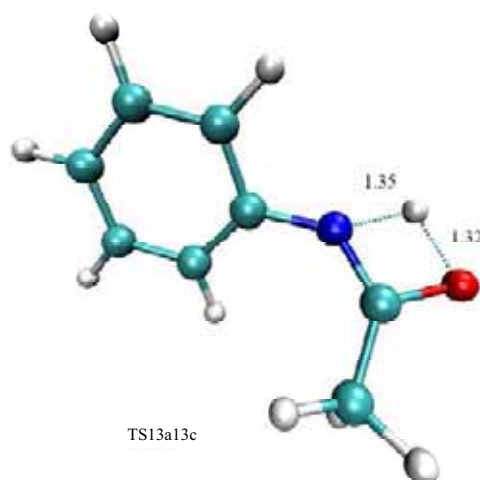


Figura 4.28. Estat de transició **TS13a13c** optimitzat amb el nivell **B3LYP/6-311G(d,p)** pertanyents als camins de reacció que uneix la formació de l'anilida **13a** a partir de l'àcid imídic **E-13c**.

L'obtenció de **13a** a partir de **E-13c** passaria per la formació del **TS13a13c**, en el qual es produiria una transferència de protó i una reorganització dels electrons a través d'un sistema π . La barrera energètica calculada per aquest procés seria de 33.0 Kcal/mol, indicant que en les

condicions experimentals l'àcid imídic **E-13c** podria evolucionar cap a **13a**, sense la necessitat d'un catalitzador com podria ser el dissolvent. Aquest resultat era similar als observats en altres àcids imídics com són la formamida⁹⁴ i l'àcid formohidroxàmic⁹⁵ els quals presenten barreres de 33.6 Kcal/mol i 35.0 Kcal/mol respectivament. La identificació en particular del compost **13c** no s'ha dut a terme en cap model de desodorització, però sí que ha tingut lloc l'anàlisi exhaustiva de la formació de nous compostos durant la descomposició tèrmica del dPAP, sense observar la formació majoritària d'algun tipus de compost no identificat. Per tant, tot semblaria indicar que si es produís l'àcid imídic **13c**, en la forma E, aquest podria evolucionar cap a la formació de l'anilida.

4.2.3. Conclusions

En resum, s'ha descrit un mecanisme energèticament favorable per a la formació d'anilides. Aquesta ruta implicaria la combinació d'un procés intramolecular i un d'intermolecular. Primer, a partir del dPAP, es formaria un intermedi en forma d'amida, **i2**. Aquest intermedi seria resultat de la reacció intramolecular de l'amina del dPAP amb l'ester secundari del mateix dPAP. Un cop format aquest intermedi i després que es produís una reacció S_N2 per una altra molècula amb capacitat nucleòfila, com podria ser qualsevol derivat del PAP, es formaria l'àcid imídic en forma d'isòmer E. Aquest finalment permetria obtenir mitjançant un equilibri tautomèric l'anilida i un subproducte anilínic (**13f**).

Aquests resultats donarien suport a la identificació experimental de la formació d'anilides a partir del dPAP durant el procés de desodorització. A més, aquest estudi indica que la formació d'anilides es veuria afavorida en processos on la concentració de dPAP fos més elevada, fet que s'observa quan es realitzen desodoritzacions amb dPAP pur i sense anilina. Pel que fa al subproducte anilínic obtingut, podria passar a formar part de la fracció resinosa no soluble amb facilitat, ja que en disposar de l'amina anilínica, aquesta podria reaccionar amb altres molècules de dPAP. És a dir, aquest subproducte es podria involucrar en reaccions de polimerització com les esmentades en l'apartat 3.2.4. Aquests resultats són coherents amb els obtinguts experimentalment, els quals apunten que el subproducte resultant de la formació de l'anilida resta en la part resinosa insoluble.

Aquest mecanisme confirmaria la nova via d'obtenció d'anilides coneguda en la present Tesi. Via que podria arribar a donar explicacions de les diferències entre els olis catalans i els de Sevilla, ja que en els olis catalans podria ser que haguessin tingut lloc unes condicions de desodorització dràstiques, les quals afavorissin el mecanisme de formació d'anilides obtenint així la desaparició dels possible derivats del PAP que s'haguessin format. Alhora, aquestes condicions podrien haver tingut lloc mitjançant l'eliminació completa d'anilina lliure i per tant

evitant així una nova formació de derivats del PAP. En canvi en els olis de Sevilla la desodorització podria ser que no hagués tingut lloc de manera similar a la ocorreguda a Catalunya, quedant en els olis quantitats significatives de derivats del PAP, principals sospitosos de ser els responsables de la SOT.

4.3. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

4.3.1. SÍNTESI DE L'OLEAT DEL 2-OXO-PROPIL (7)

Sobre una dissolució d'acetol (58 mg, 0.80 mmol) en 8 ml de CH_2Cl_2 s'afegí àcid oleic (174 mg, 0.62 mmol), DCC (157 mg, 0.76 mmol), i DMAP (8 mg, 0.07 mmol). La reacció es deixà a temperatura ambient i amb agitació. Un cop finalitzada (3 h, control per CCF), el dissolvent va ser eliminat fins a sequedat i el cru resultant es va dissoldre en hexà per tal d'induir la precipitació de la DCU, procediment que es realitzà tres vegades. Finalment la purificació del cru mitjançant HPLC a escala semipreparativa va permetre obtenir el compost **7** (160 mg, 76%).

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): 5.34 (m, 2 H; 2 CH=), 4.65 (s, 2 H; COCH_2O), 2.42 (t, $^3J(\text{H,H})=7.5$ Hz, 2 H; CH_2CO), 2.16 (s, 3 H; CH_3CO), 2.01 (m, 4 H; 2 $\text{CH}_2\text{C=}$), 1.66 (m, 2 H; $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.40-1.20 (20 H; CH_2), 0.88 (t, $^3J(\text{H,H})=5.4$ Hz, 3 H; CH_3).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): 201.7 (CO), 173.0 (CO), 129.9 (CH=), 129.7 (CH=), 68.1 (OCH_2CO), 33.7 (CH_2COO), 31.8 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.6 (CH_2),

29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂, COCH₃), 29.1 (CH₂), 29.0 (CH₂), 29.0 (CH₂), 27.1 (CH₂CH=), 27.1 (CH₂CH=), 26.0 (CH₂), 24.8 (CH₂), 22.6 (CH₂), 14.1 (CH₃).

EI-MS *m/z* (%): 338 (2) pic molecular, 264 (34), 151(26), 112 (38), 98 (100).

Anàlisi Elemental: C₂₁H₃₈O₃ Calculada: C 74.51%; H 11.31%

Experimental: C 74.40%; H 11.33%

4.3.1.1. Identificació del compost 7 en una matriu d'oli de colza sotmesa a desodorització

Es prepararen 20 g d'oli, als quals si afegiren 43 mg del cetoester **7** (0.13 mmol). La mescla s'agità en un bany d'ultrasons i es sotmeté a un procés de desodorització. Les condicions de la desodorització foren les següents: $t_M = 21$ min, $T_M = 280$ °C, $P = 80$ Torr, $t_V = 60$ min.

4.3.2. SÍNTESI DEL [¹³C-3]-OLEAT DE 2-OLEÏLOXI-3-(*N*-FENILAMINO)PROPI

El diester de l'àcid oleic del PAP marcat amb ¹³C en el C-3 fou preparat a partir del compost **8** (Figura 4.15).

4.3.2.1. Síntesi de 1-((¹³C-3-alliloxi)metil)benzè⁸⁶ (**9**)

Sobre una dissolució de ¹³CH₃PPh₃I (1 g, 2.5 mmol) en 20 ml de THF anhidre, mantinguda sota atmosfera d'argó i agitació, es van afegir gota a gota 2.1 ml de BuLi (3.4 mmol). A continuació s'afegí gota a gota el compost **8** (360 μL, 2.6 mmol) al cru de la reacció i la mescla es deixà amb agitació durant 30 min a temperatura ambient control per CG. Després d'eliminar el dissolvent, el cru resultant es purificà mitjançant cromatografia de sílica-gel flaix (20:1 hexà:AcOEt) per obtenir el compost desitjat **9** (104 mg, 28%).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.38-7.28 (5 H; CH_{Ar}), 5.97 (m, 1 H; CH=), 5.32 (ddq, ¹J(H, ¹³C)= 155.5 Hz, ²J(H,H)= 17.5 Hz, ³J(H,H)= 1.5 Hz, 1 H; ¹³CHH=), 5.23 (ddq, ¹J(H, ¹³C)= 158.5 Hz, ²J(H,H)= 10.5 Hz, ³J(H,H)= 1 Hz, 1 H; ¹³CHH=), 4.54 (s, 2 H; OCH₂Ph), 4.04 (tt, ³J(H,H, ¹³C)= 5.5 Hz, ⁴J(H,H)= 1.5 Hz, 2 H, CH₂O).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 138.3 (C_{Ar}), 134.7 (¹J(C, ¹³C)= 69.0 Hz, CH=), 128.4 (2 CH_{Ar}), 127.7 (CH_{Ar}), 127.6 (2 CH_{Ar}), 117.1 (¹³CH₂=), 72.1 (OCH₂Ph), 71.2 (CH₂CH=).

EI-MS m/z (%): 149 (3) pic molecular, 119 (8), 105 (66), 91 (100).

4.3.2.2. Síntesi del [¹³C-1]-2-((benziloxi)metil)oxirà (12)⁸⁷

A una dissolució de 73 mg de **9** (0.5 mmol) en 8 ml de CH₂Cl₂, se li afegeix lentament 211 mg d'àcid *m*-cloroperoxibenzoic (0.85 mmol), deixant el cru amb agitació i reflux durant 12 h (control per CG). Després d'evaporar el dissolvent, la purificació del residu mitjançant CCF preparativa, eluint amb hexà:AcOEt (4:1), permeté obtenir 50 mg del compost **10** amb un rendiment del 63%.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7.38-7.28 (5 H; CH_{Ar}), 4.62 (d, ²J(H,H)= 11.7 Hz, 1 H; OCHHPh), 4.56 (d, ²J(H,H)= 12 Hz, 1 H; OCHHPh), 3.77 (dt, ²J(H,H)= 11.4 Hz, ³J(H,H, ¹³C)= 2.7 Hz, 1 H; CHHOCH₂Ph), 3.44 (ddd, ²J(H,H)= 11.7 Hz, ³J(H,H)= 6 Hz, ³J(H, ¹³C)= 3 Hz, 1 H; CHHOCH₂Ph), 3.19 (m, 1 H; CHCH₂O), 2.80 (dt, ¹J(H, ¹³C)= 176.1 Hz, ^{2,3}J(H,H, ¹³C)= 4.8 Hz, 1 H; ¹³CHH), 2.62 (ddd, ¹J(H, ¹³C)= 174.9 Hz, ²J(H,H)= 4.8 Hz, ³J(H,H)= 2.4 Hz, 1 H; ¹³CHH).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): 137.8 (C_{Ar}), 128.4 (2CH_{Ar}), 127.7 (2 CH_{Ar}, CH_{Ar}), 73.3 (CHCH₂O), 70.8 (OCH₂Ph), 50.8 (d, ¹J(C, ¹³C)= 28.5 Hz; CHCH₂OCH₂Ph), 44.2 (¹³CH₂).

EI-MS m/z (%): 166 (4) pic molecular, 107 (44), 91 (100).

4.3.2.3. Síntesi del [¹³C-3]-2,3-epoxi-1-propanol

Una dissolució de **10** (50 mg, 0.30 mmol) i de Pd/C (35 mg, 10% Pd) en CD₃OD (3 mL) es deixà en agitació a temperatura ambient sota atmosfera d'hidrogen durant 15 min (control per CCF). Un cop finalitzada, el cru es centrifugà i filtrà tot obtenint el corresponent epòxid, el qual s'emprà en la següent etapa sense cap més tractament.

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): 3.78 (dt, ²J(H,H)= 12.6 Hz, ³J(H,H, ¹³C)= 2.7 Hz, 1 H; CHHOH), 3.47 (ddd, ²J(H,H)= 12.3 Hz, ³J(H,H)= 4.5 Hz, ³J(H, ¹³C)) 2.4 Hz, 1 H; CHHOH), 3.06 (m, 1 H; CHCH₂OH), 2.75 (ddd, ¹J(H, ¹³C)=

175.5 Hz, $^2J(\text{H,H})= 5.1$ Hz, $^3J(\text{H,H})= 4.2$ Hz; 1 H, $^{13}\text{CHHO}$), 2.62 (ddd, $^1J(\text{H},^{13}\text{C})= 174.9$ Hz, $^2J(\text{H,H})= 4.2$ Hz, $^3J(\text{H,H})= 3$ Hz, 1 H; $^{13}\text{CHHO}$).

^{13}C -RMN (75 MHz, CD_3OD): 62.0 (CH_2OH), 46.8 (CHCH_2OH), 44.8 ($^{13}\text{CH}_2$).

4.3.2.4. Síntesi del [^{13}C -3]-3-(*N*-fenilamino)-1,2-propandiòl⁷³

Sobre una dissolució de [^{13}C -3]-2,3-epoxi-1-propanol en CD_3OD s'addicionaren 46 mg d'anilina (0.5 mmol). La dissolució es deixà a reflux i amb agitació durant 3 h. El control de la reacció es realitzà per CCF. Un cop finalitzada la reacció, s'eliminà el dissolvent i el residu fou purificat mitjançant cromatografia de sílica-gel flaix emprant una barreja CHCl_3 :MeOH (6:1). Finalment, s'obtingueren 10 mg de ^{13}C PAP amb un rendiment del 20% a partir del compost **10**.

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): 7.18 (t, $^3J(\text{H,H})= 8.7$ Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.74 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.2$ Hz, 1 H; CH_{Ar}), 6.65 (d, $^3J(\text{H,H})= 8.4$ Hz, 2 H; CH_{Ar}), 3.95 (m, 1 H; CHOH), 3.76 (dt, $^2J(\text{H,H})= 11.4$ Hz, $^3J(\text{H,H},^{13}\text{C})= 3.6$ Hz, 1 H; CHHOH), 3.62 (ddd, $^2J(\text{H,H})= 11.1$ Hz, $^3J(\text{H,H})= 6.3$ Hz, $^3J(\text{H},^{13}\text{C})= 2.1$ Hz, 1 H; CHHOH), 3.27 (ddd, $^1J(\text{H},^{13}\text{C})= 134.7$ Hz, $^2J(\text{H,H})= 12.9$ Hz, $^3J(\text{H,H})= 3.9$ Hz, 1 H; $^{13}\text{CHHNHPh}$), 3.16 (ddd, $^1J(\text{H},^{13}\text{C})= 135.6$ Hz, $^2J(\text{H,H})= 13.2$ Hz, $^3J(\text{H,H})= 7.5$ Hz, 1 H; $^{13}\text{CHHNHPh}$).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): 148.0 (C_{Ar}), 129.3 (2 CH_{Ar}), 118.1 (CH_{Ar}), 113.3 (2 CH_{Ar}), 70.3 (d, $^1J(\text{C},^{13}\text{C})= 39.6$ Hz, CHOH), 64.8 (CH_2OH), 46.6 ($^{13}\text{CH}_2\text{NHPh}$).

EI-MS *m/z* (%): 168 (34) pic molecular, 107 (100).

4.3.2.5. Síntesi del [^{13}C -3]-oleat de 2-oleïloxi-3-(*N*-fenilamino)propil⁷³

Una barreja de 10 mg de ^{13}C PAP (0.063 mmol), 38 mg d'àcid oleic (0.14 mmol), 33 mg de DCC (0.16 mmol), 2.5 mg de DMAP (0.02 mmol), en 4 ml de CH_2Cl_2 , s'agità a temperatura ambient fins que la reacció finalitzà (control per CCF). Després d'evaporar el dissolvent, el residu es purificà per CCF preparativa utilitzant com a eluent hexà:AcOEt (4:1) obtenint el producte desitjat amb un rendiment del 76% (28 mg).

^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3): 7.18 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.5$ Hz, 2 H; CH_{Ar}), 6.72 (t, $^3J(\text{H,H})= 7.5$ Hz, 1 H; CH_{Ar}), 6.64 (d, $^3J(\text{H,H})= 8.5$ Hz, 2 H; CH_{Ar}), 5.34 (m, 4 H; CH=), 5.24 (m, 1 H; CHOCO), 4.31 (dt, $^2J(\text{H,H})= 12$ Hz,

$^3J(\text{H,H},^{13}\text{C})= 4 \text{ Hz}$, 1 H; *CHHOCO*), 4.24 (ddd, $^2J(\text{H,H})= 12 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H,H})= 5.5 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H},^{13}\text{C})= 2.5 \text{ Hz}$, 1 H; *CHHOCO*), 3.37 (ddd, $^1J(\text{H},^{13}\text{C})= 137.5 \text{ Hz}$, $^2J(\text{H,H})= 13.5 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H,H})= 6 \text{ Hz}$, 1 H; *CHHN*), 3.32 (ddd, $^1J(\text{H},^{13}\text{C})= 136 \text{ Hz}$, $^2J(\text{H,H})= 13.5 \text{ Hz}$, $^3J(\text{H,H})= 5.5 \text{ Hz}$, 1 H; *CHHN*), 2.32 (ac, 4 H; 2 CH_2CO), 2.00 (q, $^3J(\text{H,H})= 7 \text{ Hz}$, 8 H; 4 $\text{CH}_2\text{CH=}$), 1.61 (m, 4 H; 2 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.35-1.24 (36 H; CH_2), 0.87 (t, $^3J(\text{H,H})= 7 \text{ Hz}$, 6 H; 2 CH_3).

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): 173.3 (CO), 173.1 (CO), 147.4 (C_{Ar}), 130.0 (CH=), 129.6 (CH=), 129.3 (2 CH_{Ar}), 117.9 (C_{Ar}), 112.8 (2 CH_{Ar}), 70.1 (d, $^1J(\text{C},^{13}\text{C})= 40.7 \text{ Hz}$, *CHOCO*), 62.8 (CH_2OCO), 44.0 ($^{13}\text{CH}_2\text{NHPh}$), 34.2 (CH_2CO_2), 34.1 (CH_2CO_2), 31.8 (CH_2), 29.7 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.1 (CH_2), 29.1 (CH_2), 29.0 (CH_2), 27.2 ($\text{CH}_2\text{CH=}$), 27.1 ($\text{CH}_2\text{CH=}$), 24.8 (CH_2), 22.6 (CH_2), 14.0 (CH_3).

HPLC-MS: 697 ($\text{M} + \text{H}^+$).

4.3.3. Estudi de l'estabilitat tèrmica de l'OOPAP marcat amb ^{13}C en un procés de desodorització

Es prepararen 114 mg de trioleïna, als quals s'afegiren 2.5 mg d'OO(1,2)PAP i 2.2 mg de l'OO(1,2)PAP marcat amb ^{13}C . La mescla s'agità en un bany d'ultrasons i es sotmeté a un procés de desodorització. Les condicions de la desodorització foren les següents: $t_{\text{M}} = 11 \text{ min}$, $T_{\text{M}} = 280 \text{ }^\circ\text{C}$, $P = 70 \text{ Torr}$, $t_{\text{V}} = 60 \text{ min}$. Un cop finalitzat l'experiment, la fracció volàtil recollida en una trampa freda fou analitzada per HPLC-MS i RMN. El cru de la reacció fou extret primer amb hexà i a continuació amb AcOEt. Totes dues extraccions s'analitzaren per HPLC i RMN. D'altra banda, la part insoluble que romangué en les parets del matràs rodó s'analitzà per EA-IRMS.

4.3.4. Estudis teòrics del mecanisme de formació d'anilides a partir del dPAP

Tots els càlculs s'han dut a terme emprant la funció híbrida B3LYP (Becke three-parameter hybrid functional combined with Lee, Yang, and Parr correlation functions)⁹⁶ basada en la teoria del Funcional de la densitat (DFT), la qual és àmpliament utilitzada i reconeguda per a càlculs geomètrics i energètics. Tots els punts estacionaris han estat localitzats i caracteritzats mitjançant un càlcul de freqüències, comprovant que tots els mínims tinguessin totes les freqüències positives i que els estats de transició (TS) tinguessin solament una freqüència imaginària. La base utilitzada per a la optimització fou la 6-31G(d), mentre que per obtenir resultats més reals es realitzaren càlculs puntuals de les geometries optimitzades amb

la base 6-311G(d,p). El mecanisme bimolecular implica la formació d'espècies carregades, per tant es va realitzar càlculs puntuals amb la funció polaritzada 6-311+G(d,p). Els càlculs termoquímics de l'entalpia i de la correcció de l'energia lliure es realitzaren amb els resultats obtinguts amb la base B3LYP/6-31G(d), ja que es considerà oportú l'aproximació amb els resultats que s'obtidrien amb la base B3LYP/6-311+G(d,p). Aquesta aproximació era vàlida, ja que la diferència entre les energies calculades entre les dos bases era mínima, indicant així que la superfície d'energia potencial descrita per les dues bases era similar.

El software utilitzat per als càlculs energètics ha estat el PC GAMESS v. 7.0⁹⁷ (<http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>) i GAUSSIAN 98.

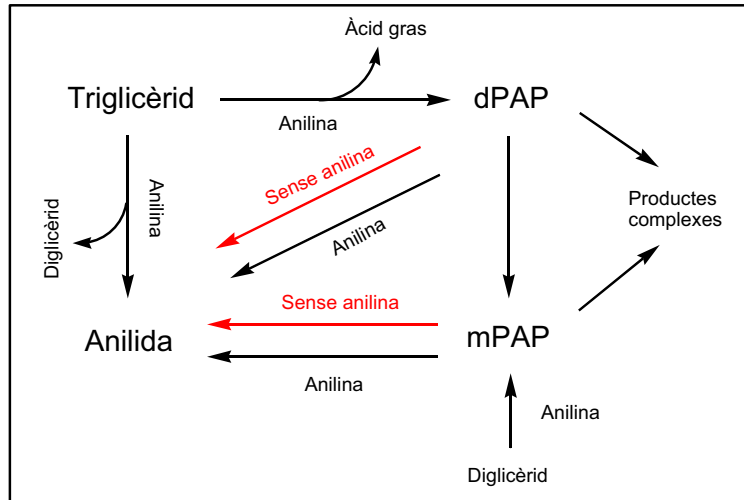
CONCLUSIONS GENERALS

Els resultats obtinguts en el conjunt de les investigacions relacionades amb la SOT, que s'han dut a terme en el nostre laboratori, han permès establir nous aspectes químics dels quals fins ara no es tenia coneixement. Entre ells cal remarcar:

- 1- S'ha pogut desenvolupar de forma sistemàtica i reproduïble la síntesi d'olis models adulterats amb anilina, els quals mimetitzen els olis relacionats amb la SOT. Aquests olis s'han reproduït a escala de laboratori, mitjançant la realització d'un procés de desodorització en el qual s'han controlat diverses variables. En definitiva, s'han obtingut olis models amb concentracions d'anilides i de derivats del PAP similars a les dels olis causants de la intoxicació, els quals s'han administrat en experiments *in vivo* per tal de poder reproduir la SOT. Aquests resultats estan pendents de finalització.
- 2- La necessitat de poder determinar la concentració d'anilina en determinats models d'oli ha permès desenvolupar i validar un mètode analític per quantificar l'anilina lliure en matrius d'oli. El mètode ha mostrat una selectivitat, exactitud, precisió i linealitat en l'interval desitjat. A més, els valors de concentració d'anilina determinats amb aquest mètode han estat confirmats per un laboratori analític de referència.
- 3- S'han sintetitzat satisfactòriament estàndards de diverses famílies de derivats del PAP. La síntesi d'aquests compostos ha permès confirmar la identificació de nous derivats anilínics i per tant nous possibles agents tòxics presents en un model d'oli obtingut al nostre laboratori.
- 4- Estudis de l'estabilitat dels grups acil presents en derivats del PAP han permès descriure la capacitat de migració d'aquests en determinades condicions catalítiques, tant àcides com bàsiques, establint així una altra propietat en comú amb els triglicèrids, a més d'altres com la capacitat de ser hidrolitzats mitjançant les lipases. Aquestes similituds podrien tenir rellevància toxicològica alhora de tenir en compte els derivats del PAP, ja que aquests podrien alterar determinats processos metabòlics relacionats amb els triglicèrids.
- 5- Des del punt de vista químic dels derivats anilínics relacionats amb la SOT, s'ha pogut establir un conjunt d'observacions interessants pel que fa al seu comportament durant el procés de desodorització. Entre aquestes cal destacar:
 - a. S'ha detectat que el dPAP és una molècula reactiva, ja sigui com a nucleòfil mitjançant el grup amino i com a electròfil degut a la reactivitat que presenta

en els grups acil. La nucleofília dels derivats del PAP podria tenir la seva importància en la formació de determinats oligòmers que sorgirien de la reacció amb altres derivats del PAP o triglicèrids. Aquesta reactivitat podria manifestar-se també a nivell de components de teixits i òrgans, i tenir així rellevància toxicològica en el marc de la SOT.

- b. S'ha pogut constatar la inestabilitat tèrmica dels derivats del PAP durant el procés de desodorització. La descomposició d'aquests derivats implicaria la formació d'anilides. Per tant, els dPAPs s'estableixen com una nova font d'anilides no tinguda en compte fins ara.
 - c. S'ha determinat que la formació d'anilides a partir de derivats del PAP aniria acompanyada de la formació d'un fragment no anílic. Aquest fragment ha estat cercat sense resultats satisfactoris en matrius d'olis tot indicant que aquest podria romandre en la fracció insoluble que es forma durant els processos de desodorització.
 - d. S'han establert un conjunt d'equilibris, interrelacions i descomposicions molt complexes en el conjunt format per anilides, derivats del PAP i triglicèrids il·lustrats en la figura que es mostra tot seguit. Aquesta complexa interrelació podria establir una explicació de la diferència existent entre els olis obtinguts a Catalunya i els obtinguts a Sevilla. L'absència de derivats del PAP en els olis catalans es podria explicar per l'assoliment de temperatures suficientment elevades que permetessin la descomposició dels derivats del PAP per tal de donar anilides o bé productes insolubles més complexes.
- 6- S'ha establert un mecanisme de reacció que explica la formació d'anilides a partir de la descomposició tèrmica dels derivats del PAP. Aquest mecanisme ha estat determinat mitjançant estudis teòrics suportats per resultats experimentals. A més de la formació d'anilides mitjançant aquest mecanisme explicaria la formació de subproductes en forma d'oligòmers que podrien restar en la part resinosa insoluble dels olis desodoritzats.



En resum, tots els resultats obtinguts permeten reafirmar i consolidar la conclusió que els derivats del PAP són els principals sospitosos causants de la SOT. A més, les propietats químiques observades en els derivats del PAP explicarien les diferències de toxicitat observades entre els olis catalans i els de Sevilla. Ja que les condicions de desodorització realitzades a Catalunya haurien permès la desaparició dels derivats del PAP, evitant així que aquests fossin ingerits pels consumidors d'oli de colza. En canvi a Sevilla, les condicions de desodorització haurien afavorit la formació dels derivats del PAP amb les conseqüents implicacions toxicològiques.

BIBLIOGRAFIA

1. Posada de la Paz, M.; Philen, R. M.; Abaitua Borda, I., Toxic Oil Syndrome: The Perspective After Twenty Years. *Epidemiol. Reviews* **2001**, *23*, 231-247.
2. Diggle, G. E., The toxic oil syndrome: 20 years on. *Int. J. Clin. Pract.* **2001**, *55*, 371-375.
3. Gelpí, E.; et al., The spanish toxic oil syndrome 20 years after its onset: a multidisciplinary review of scientific knowledge. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110*, 457.
4. Gradjean, P.; Tarkowski, S. *In Toxic Oil Syndrome: Mass food poisoning in Spain*; WHO Regional office for Europe: Copenhagen, Denmark, 1984; 3-16.
5. Rigau-Pérez, J. G.; et al., Epidemiological investigation of an oil associated pneumonitic paralytic eosinophilic syndrome in Spain. *Am. Epidemiol.* **1984**, *119*, 250.
6. Tabuenca, J. M., Toxic-allergic syndrome caused by ingestion of rapeseed oil denatured with aniline. *Lancet* **1981**, *ii*, 567.
7. Abaitua Borda, I.; Philen, R. M.; Posada de la Paz, M.; Gómez de la Cámara, A.; Díez-Ruíz Navarro, M.; Jiménez Ribota, O.; Alvargonzález Soldevilla, J.; Terracini, B.; Severiano Pena, S.; Fuentes Leal, C.; Kilbourne, E. M., Toxic oil syndrome mortality: the first 13 years. *Int. J. Epidemiol.* **1998**, *27*, 1057.
8. Martínez Tello, F. J.; et al., Pathology of a new syndrome caused by the ingestion of adulterated oil in Spain. *Virchows Arch. A. Pathol. Pathol. Anat.* **1982**, *392*, 261.
9. Gómez de la Cámara, A.; et al., Health status measurement in toxic oil syndrome. *J. Clin. Epidemiol.* **1998**, *51*, 867.
10. Posada de la Paz, M.; et al., Toxic oil syndrome: case report associated with the ITH oil refinery in Sevilla. *Food Chem. Toxicol.* **1987**, *25*, 87-90.
11. Pestaña, A.; Muñoz, E., Anilides and the Spanish toxic oil syndrome. *Nature* **1982**, *298*, 608.
12. Ventura Díaz, L., Análisis convencional de las muestras disponibles de aceites supuestamente tóxicos (composición en ácidos grasos, esteroides, insaponificables, etc.). *Grasas y Aceites* **1982**, *33*, 73-78.

13. Bernert, J. T.; Kilbourne, J. E. M.; Akins, J. R.; Paz, M. P. d. I.; Meredith, N. K.; Borda, I. A.; Wages, S., Compositional analysis of oil samples implicated in the Spanish Toxic Oil Syndrome. *J. Food Sci.* **1987**, 52, 1562-1569.
14. Guitart, R. Estudio de aceites implicados en el Síndrome Tóxico y de los efectos que las anilidas tienen sobre el metabolismo lipoxigenásico del ácido araquidónico. Universidad Autónoma de Barcelona, **1984**.
15. Martínez-Suárez, J. M., Actividades del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.) sobre los aceites relacionados con el "Síndrome Tóxico". *Instituto de la Grasa* **1981**, Informe N° 1, 1-10.
16. Posada de la Paz, M., Factors associated with pathogenicity of oils related to toxic oil syndrome epidemic in Spain. *Epidemiology* **1994**, 5, 404-409.
17. Vázquez-Roncero, A.; Valle, C. J. d.; Durán, R. M.; Constante, E. G., New aniline derivatives in cooking oils associated with the toxic oil syndrome. *Lancet* **1983**, ii, 1024-1025.
18. Vázquez-Roncero, A.; Durán, R. M.; Gutiérrez, R., New aniline derivatives in oils related to the toxic oil syndrome: I. fatty esters of 3-phenylamino-1,2-propanediol. *Grasas y Aceites* **1984**, 35, 15-21.
19. Vázquez Roncero, A.; Gómez Gómez, R., Esteres grasos de 3-amilamino-1,2-propanodiol. *Grasas y Aceites* **1987**, 38, 87-92.
20. Posada de la Paz, M.; Philen, R. M.; Schurz, H.; Hill, R. H. J.; Giménez Ribota, O.; Gómez de la Cámara, A.; Kilbourne, E. M.; Abaitua Borda, I., Epidemiologic evidence for a new class of compounds associated with toxic oil syndrome. *Epidemiol.* **1999**, 10, 130.
21. Schurz, H. H.; Hill, R. H.; Posada de la Paz, M.; Philen, R. M.; Borda, I. A.; Bailey, S. L.; Needham, L. L., Products of aniline and triglycerides in oil samples associated with the Toxic Oil Syndrome. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 1001-1006.
22. Hill, R. H.; Schurz, H. H.; Posada de la Paz, M.; Abaitua Borda, I.; Philen, R. M.; Kilbourne, E. M.; Head, S. L.; Bailey, S. L.; Driskell, W. J.; Barr, J. R.; Needham, L. L., Possible etiologic agents for Toxic Oil Syndrome: Fatty acid esters of 3-(N-phenilamino)-1,2-propanediol. *Environm. Contam. Toxicol.* **1995**, 28, 259-264.
23. Philen, R. M.; Posada, M., Toxic Oil Syndrome and Eosinophilia-Myalgia Syndrome. *World Health Organization meeting report Semin. Arthritis Rheum.* **1993**, 23, 104-124.

24. Posada de la Paz, M.; Philen, R. M.; Abaitua Borda, I.; Bernert, J. T. J.; Bada Gancedos, J. C.; Duclos, P. J.; Kilbourne, E. M., Manufacturing processes at two french rapeseed oil companies: possible relationships to toxic oil syndrome in Spain. *Food Chem. Toxic.* **1991**, 29, 797-803.
25. Kilbourne, E., Eosinophilia-myalgia syndrome: coming to grips with a new illness. *Epidemiol. Rev.* **1992**, 14, 16-36.
26. Mayeno, A. N.; Benson, L. M.; Naylor, S.; Colberg-Beers, M.; Puchalski, J. T.; Gleich, G. J., Biotransformation of 3-(phenylamino)-1,2-propanediol to 3-(phenylamino)alanine: a chemical link between Toxic Oil Syndrome and Eosinophilia-Myalgia Syndrome. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, 8, 911-916.
27. Philen, R.; Ortiz, D.; Auerbach, S.; Falf, H., Survey of advertising for nutritional supplements in health and bodybuilding magazines. *JAMA* **1992**, 268, 1008-1011.
28. Yoshida, S., The toxic oil syndrome: a perspective on immunotoxicological mechanisms. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1994**, 19, 60-79.
29. Lahoz, C., Immunological aspects of the toxic oil syndrome. *Arch. Toxicol.* **1997**, 19, 65-73.
30. Posada de la Paz, M.; Gelpi, E., Toxic oil syndrome (SOT). Foreword. *Human Experim. Toxicol.* **2000**, 19, 155-157.
31. Toxic oil syndrome and eosinophilia-myalgia syndrome: pursuing parallels in pathogenesis. *Report on a WHO meeting* **1991**.
32. McKinley, M., Chronic immune activation in the eosinophilia-myalgia syndrome. *Muscle and Nerve* **1993**, 16, 947-951.
33. Maestro Durán, R.; Ruíz Gutiérrez, V.; Vázquez Roncero, A., Estudio toxicológico en ratones de nuevos derivados de la anilina presentes en aceites tóxicos. *Revista de Toxicología* **1985**, 2, 168-183.
34. Vázquez-Roncero, A.; Durán, R. M.; Gutiérrez, V. R., New aniline derivatives in toxic oil syndrome: toxicity in mice of 3-phenylamino-1,2-propanediol and its fatty acid mono- and diesters. *Grasas y Aceites* **1984**, 35, 330-331.
35. Ruíz-Gutiérrez, V.; Maestro-Durán, R., Lymphatic absorption of 3-phenylamino-1,2-propanediol and its esters. *Exp. Toxic. Pathol.* **1992**, 44, 29-33.

36. Ladona, M. G.; Bujons, J.; Messeguer, A.; Ampurdanés, C.; Morató, A.; Corbella, J., Biotransformation and clearance of 3-(phenylamino)propane-1,2-diol, a compound present in samples related to Toxic Oil Syndrome, in C57BL/6 and A/J mice. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 1127-1137.
37. Bujons, J.; Ladona, M. G.; Messeguer, A.; Morató, A.; Ampurdanés, C., Metabolism of (R)- and (S)-3-(phenylamino)propane-1,2-diol in C57BL/6 and A/J-strain mice. Identification of new metabolites with toxicological significance to the toxic oil syndrome. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1097-1106.
38. Martínez-Cabot, A.; Morató, A.; Messeguer, À., Synthesis and Stability Studies of the Glutathione and N-Acetylcysteine Adducts of an Iminoquinone Reactive Intermediate Generated in the Biotransformation of 3-(N-Phenylamino)propane-1,2-diol: Implications for Toxic Oil Syndrome. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, (11), 1721-1728.
39. Morató, A.; Martínez-Cabot, A.; Escabrós, J.; Bujons, J.; Messeguer, A., Studies on Toxic Oil Syndrome: Stereoselective Hydrolysis of 3-(Phenylamino)propane-1,2-diol Esters by Human Pancreatic Lipase. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 889-895.
40. Abian, J.; Gelpí, E.; Messeguer, A., *In Toxic Oil Syndrome. Ten Years of Progress*. WHO Regional Office for Europe: Copenhagen, **2004**; 141.
41. World Health Organization, *Toxic oil syndrome. Ten years of progress*. WHO Regional Office for Europe: **2004**.
42. Vázquez-Roncero, A., Aceites vegetales desnaturalizados con anilina III. Reacciones de la anilina durante el almacenamiento y transporte de los aceites. *Programa del CSIC para el estudio del Síndrome Tóxico: trabajos reunidos y comunicaciones solicitadas*. **1983**, Vol. 1, 29-46.
43. Koch, G. K., Analysis and refining of aniline-denatured rapeseed oil. *In: Toxic Oil Syndrome. Mass food poisoning in Spain 1984*, Report of a WHO meeting: Madrid 21-25 March 1983 Edited by P. Grandjean and S. Tarkowski, 75-84.
44. Kilbourne, E. M.; John T. Bernert, J.; Paz, M. P. d. I.; Robert H. Hill, J.; Borda, I. A.; Kilbourne, B. W.; Zack, M. M., Chemical correlates of pathogenicity of oils related to the toxic oil syndrome epidemic in Spain. *Am. J. Epidemiol.* **1988**, *127*, 1210-1227.

45. Calaf, R. E.; Peña, J.; Paytubi, S.; Blount, B. C.; Posada de la Paz, M.; Gelpí, E.; Abian, J., Determination of aniline derivatives in oils related to the toxic oil syndrome by atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2001**, 16, 3828-3837.
46. Calaf, R. E.; et al., Automated strong cation exchange extraction of fatty acid esters of 3-(*N*-phenylamino)-1,2-propanediol from oil samples for routine quantification by HPLC-APCI/MS/MS. *Agric. Food Chem.* **2001**, 41, 5085-5091.
47. Aldridge, W. N., The toxic oil syndrome (TOS 1981) from the disease towards a toxicological understanding of its chemical aetiology and mechanism. *Toxicol. Lett.* **1992**, 64/65, 59-70.
48. Lutisan, J.; Cvendros, J.; Micov, M., Heat and mass transfer in the evaporating film of a molecular evaporator. *Chem. Eng. J.* **2002**, 85, 225-234.
49. Cvendros, J.; Lutisan, J.; Micov, M., Feed temperature influence on the efficiency of a molecular evaporator. *Chem. Eng. J.* **2000**, 78, 61-67.
50. WHO/FIS Scientific Committee for the Toxic Oil Syndrome, *Toxic Oil Syndrome. Current knowledge and future perspectives*. Copenhagen, Denmark, **1992**.
51. Kochhar, S. P.; Rosell, J. B., The Spanish toxic oil syndrome. *Nutrition and Food Science* **1984**, 90, 14-15.
52. Blount, B.; Schurz, H. *Laboratory investigations of the TOS-progress report*; WHO Regional Office for Europe: Copenhagen, **1998**.
53. Ruíz-Méndez, M. V.; Posada de la Paz, M.; Abian, J.; Calaf, R. E.; Blount, B.; Castro-Molero, N.; Philen, R.; Gelpí, E., Storage time and deodorization temperature influence the formation of aniline-derived compounds in denatured rapeseed oils. *Food Chem. Toxicol.* **2001**, 39, 91-96.
54. StargraphicsPlus, Manugistics, Inc.: Rockville, Maryland. USA **1995**.
55. Morató, A. La síndrome de l'oli tòxic. Noves aportacions dirigides a la cerca dels agents responsables de la intoxicació. Universidad de Barcelona, **2004**.
56. Box, G. E. P.; Behnken, D. W., Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics* **1960**, 2, 455-475.

57. Lutisan J.; Cvengros J.; Micov M., Heat and mass transfer in the evaporating film of a molecular evaporator. *Chem. Eng. J.* **2002**, 85, 225.
58. Huber, L., Validation and Qualification in Analytical Laboratories.
59. U.S. FDA, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and research (CDER). *Technical Review Guide* **1993**.
60. Eurachem-UK LGC-VAM, Guidance on Equipment Qualification of Analytical Instruments. **1996**.
61. U.S. FDA; 211, C. P., Current Good Manufacturing Practice of Certain Requirements for Finished Pharmaceuticals. **1996**.
62. U. S. FDA, Ghide to inspection of Pharmaceutical Quality Control Laboratories. **1993**.
63. ICH, Validation of analytical procedures: definitions and terminology. **1996**.
64. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. L., *Purification of Laboratory Chemicals*. **1980**.
65. Reig, N.; Calaf, R. E.; Messeguer, A.; Morató, A.; Escabrós, J.; Gelpí, E.; Abian, J., LC-MS ions maps for the characterization of aniline derivatives of fatty acids and tryglicerides in laboratory-denatured rapeseed oil. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, 42, 000-000.
66. Oustromova, G. I., Preparation of 1,3-bis(phenylamino)-2-propanol from aniline and epichlorohydrin. *Plast. Massy* **1968**, 2, 59.
67. Serdarevich, B., Glyceride Isomerizations in Lipid Chemistry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1967**, 44, 381-393.
68. Bloomer, S.; Adlercreutz, P.; Mattiasson, B., Kilogram-scale ester synthesis of acyl donor use in lipase-catalyzed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, 69, 966-973.
69. Boswinkel, G.; Derksen, J. T. P.; Riet, K. v. t.; Cuperus, F. P., Kinetics of acyl migration in monoglycerides and dependence on acyl chainlength. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, 73, 707-711.
70. Murgia, S.; Caboi, F.; Monduzzi, M.; Ljusberg-Wahren, H.; Nylander, T., Acyl migration and hydrolysis in monoolein-based systems. *Prog. Coll. Polym. Sci.* **2002**, 120, 41-46.

71. Hancock, A. J.; Lister, M. D., Synthesis of all-cis-1,3-diacylcyclopentane-1,2,3-triol-2-phosphate via acyl group migration in a cyclic diglyceride analog. *Journal of Lipid Research* **1979**, 20.
72. Shivarkar, A. B.; Gupte, S. P.; Chaudhari, R. V., Synthesis of β -amino alcohols from aromatic amines and alkylene carbonates using Na-Y zeolite catalyst. *Synlett*. **2006**, 9, 1374-1378.
73. Ferrer, M.; Galceran, M.; Sánchez-Baeza, F.; Casas, J.; Messegueur, A., Synthesis of aniline derivatives with potential toxicological implications to the Spanish Toxic Oil Syndrome. *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 507-511.
74. Forbes, D. C.; Amin, S. R.; Bean, C. J.; Standen, M. C., Aryl-Substituted Sulfonium Betaines: Preparation and Use in the Epoxidation of Aldehydes. *J. Org. Chem.* **2006**, 71.
75. Park, J.; Pedersen, S., Practical hydroxymethylation of aldehydes and ketones via pinacol cross-coupling reactions with paraformaldehyde. *Tetrahedron* **1992**, 48, (11).
76. Morató, A.; Escabrós, J.; Manich, A.; Reig, N.; Castaño, Y.; Abian, J.; Messegueur, A., On the Generation and Outcome of 3-(N-Phenylamino)propane-1,2-diol Derivatives in Deodorized Model Oils Related to Toxic Oil Syndrome. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18, 665-674.
77. Taylor, R., *The chemistry of functional groups. Suppl. B.* J. Wiley & Sons: Chichester, **1979**; 867.
78. Ruíz-Méndez, M. V.; Posada de la Paz, M.; Blount, B.; Schurz, R., H.; Castro-Molero, N.; Philen, R. M., Características del aceite de colza desnaturalizado durante los procesos de almacenamiento y refinación. *Grasas y Aceites* **2000**, 51, 355-360.
79. McCalley, D. V.; Thomas, C. W., Analysis of Carboxylic Acids by Gas Chromatography. Derivatisation using Chloroacetone. *Chromatographia* **1984**, 18, 309-312.
80. Corey, E. J.; Chaykovsky, M., Dimethyloxosulfonium Methylide $((\text{CH}_3)_2\text{SOCH}_2)$ and Dimethylsulfonium Methylide $((\text{CH}_3)_2\text{SCH}_2)$. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 87, 1353-1364.
81. Corey, E. J.; Chaykovsky, M., Methylsulfinyl Carbanion $(\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2)$. Formation and Applications to Organic Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 87, 1345-1352.
82. Hatch, M. J., The synthesis of oxiranes from aqueous solutions of simple alkyl, allyl, and benzylium salts. *J. Org. Chem.* **1968**, 34, 2133-2137.

83. Bermand, C.; Comel, A.; Kirsch, G., Trimethylsulfonium and trimethylsulfoxonium as versatile epoxidation reagents. A comparative study. *ARKIVOC* **2000**, 1, 128-132.
84. Borredon, E.; Clavellinas, F.; Delmas, M.; Gaset, A.; Sinisterra, J. V., Epoxide synthesis in interfacial solid-liquid conditions. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 501-504.
85. Borredon, E.; Delmas, M.; Gaset, A., Epoxidation d'aldehydes et de cétones par un procédé de transfert solide-liquide. *Tetrahedron Let.* **1982**, 23, 5283-5286.
86. Menicagli, R.; Malanga, C.; Dell'Innocenti, M.; Lardicci, L., Triisobutylaluminum-assisted reductive rearrangement of alkyl 1-alkenyl acetals: An easy synthesis of beta-alkoxy alcohols. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 5700-5704.
87. Muehlbacher, M.; Poulter, C. D., Regioselective opening of simple epoxides with diisopropylamine trihydrofluoride. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1026-1030.
88. Gresser, M. J.; Jencks, W. P., Ester aminolysis. Partitioning of the tetrahedral addition intermediate, T₊₋, and the relative leaving ability of nitrogen and oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 6970-6980.
89. Chalmet, S.; Harb, W.; Ruiz-López, M. F., Computer Simulation of Amide Bond Formation in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem* **2001**, 105, 11574-11581.
90. Yang, C. C.; Jencks, W. P., The aminolysis of methyl formate with aniline: evidence for catalysis by a trapping mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2972-2973.
91. Gorb, L.; Asensio, A.; Tuñón, I.; Ruiz-López, M. F., The Mechanism of Formamide Hydrolysis in Water from Ab Initio Calculations and Simulations. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 6743-6753.
92. Ciarkowski, J.; Chen, F. M. F.; Benoiton, N. L., Reaction mechanisms in peptide synthesis. Part 2. Tautomerism of the peptide bond. *J. Computer-Aided Molecular Design* **1991**, 5, 599-616.
93. Eriksson, M. A.; Hard, T.; Nilsson, L., On the pH dependence of amide proton exchange rates in proteins. *Biophysical* **1995**, 69, 329-339.
94. Adamo, C.; Cossi, M.; Barone, V., Catalytic and bulk solvent effects on proton transfer: Formamide as a case study. *J. Comput. Chem.* **1997**, 18, 1993-2001.

95. Hwa, D. H.; Ho, J. J., Ab Initio Study of Intramolecular Proton Transfer in Formohydroxamic Acid. *J. Phys. Chem.* **1998**, 102, 3582-3586.
96. Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact change. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5652.
97. Schmidt, M. W.; Baldridge, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A., General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem.* **1993**, 14, 1347-1363.