



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Síntesis de fosfolípidos de glicerilfosforilcolina (16:0/16:1)

Autor: Luis Jaggs Vallejo

Tutor/es: Alfonso Pérez Encabo

Índice

1. Abreviaturas	4
2. Resumen	5
3. Introducción	6
4. Objetivos y plan de trabajo	9
5. Antecedentes bibliográficos	10
5.1 Síntesis de los ácidos grasos (Z)-7-hexadecenoico, (Z)-6-hexadecenoico y (Z)-9-hexadecenoico:	10
5.2 Síntesis de 1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC):	15
5.3 Síntesis de 1-Palmitoil-2-palmitoleico-glicero-3-fosfocolina, 1-Palmitoil-2-sapienil-glicero-3-fosfocolina y 1-Palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina:	17
6. Resultados y discusión	19
6.1 Síntesis del ácido graso (Z)-7-hexadecenoico:	19
6.2 Síntesis del ácido graso (Z)-6-hexadecenoico:	21
6.3 Síntesis del ácido graso (Z)-9-hexadecenoico:	22
6.4 Síntesis de 1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC):	24
7. Conclusiones	26
8. Materiales y métodos	27
8.1 Síntesis del ácido graso Z-7- hexadecenoico (4):	28
8.2 Síntesis del ácido graso Z-6- hexadecenoico (8):	30
8.3 Síntesis del ácido graso Z-9- hexadecenoico (15):	32
8.4 Síntesis 1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC) (20):	36
8.5 Síntesis fosfolípido final (21, 22 23):	38
9. Anexos	39

1. Abreviaturas

PC	glicerofosfolípido de colina
PE	glicerofosfolípido de etanolamina
PI	fosfatidilinositol
PS	fosfatidilserina
16:1 n-9	ácido (Z)-7-hexadecenoico
16:1 n-10	ácido (Z)-6-hexadecenoico
16:1 n-7	ácido (Z)-9-hexadecenoico
2-lyso-16-PC	1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
GPC	L- α -glicerilfosforilcolina
DBTO	óxido de dibutil estaño
TEA	triethylamina
FA	ácido graso
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DMAP	4,4-dimetilaminopiridina

2. Resumen

Este trabajo ha permitido abordar la síntesis de fosfolípidos diferentemente sustituidos. Más concretamente, en este TFG, se ha optado por la preparación de un fosfolípido derivado de los ácidos (Z)-7, 6 y 9-hexadecenoico y palmítico en glicerilfosforilcolina. La primera parte del trabajo se centra en la preparación de estos ácidos. Posteriormente se procedió a la construcción de un fosfolípido intermedio que permitiera la introducción regioselectiva de los ácidos para lograr obtener los fosfolípidos finales deseados con la mayor pureza posible.

This work provides an approach to synthesize differentially substituted phospholipids. Specifically, this project has opted to prepare a phospholipid derived from Z-7, 6 and 9 hexadecenoic acids and palmitic acid in phosphatidylcholine. The first part of the work focuses on preparing these acids. Subsequently, an intermediate phospholipid was produced to enable regioselective introduction of the acids in order to obtain the final phospholipid with the greatest possible purity.

3. Introducción

El planteamiento de este trabajo esta englobado dentro de una investigación más amplia en la cual se pretende poder observar el mecanismo de actuación de los ácidos grasos *cis*-7-hexadecenoico (16:1 n-9), *cis*-6-hexadecenoico (16:1 n-10) y *cis*-9-hexadecenoico (16:1 n-7) en el organismo, introducido de diferentes formas químicas.

El interés científico que despierta el ácido graso (Z)-7-hexadecenoico (16:1 n-9) surgió durante el estudio del mecanismo de defensa del organismo contra la enfermedad de la aterosclerosis. En ella, el ácido graso (Z)-7-hexadecenoico (16:1 n-9) aparece como respuesta antiinflamatoria en procesos de activación anormal de células endoteliales (inicio de la aterosclerosis). En este estudio reciente¹ se ha destacado el papel del ácido palmitoleico [16: 1n-7 (ácido *cis*-9-hexadecenoico)] como una hormona lipídica que coordina la diafonía entre el hígado y el tejido adiposo y ejerce efectos protectores antiinflamatorios en esteatosis hepática y señalización de insulina en modelos murinos con enfermedades metabólicas. Más recientemente, un isómero del 16: 1n-7, ácido *cis*-7-hexadecenoico (16: 1n-9), que también posee marcado efectos antiinflamatorios, ha sido descrito en monocitos y macrófagos derivados de monocitos en humanos.

Utilizando el análisis de cromatografía de gases / espectrometría de masas de derivados dimetil-disulfuros de ésteres metílicos de los ácidos grasos, se han descrito en este estudio la presencia de un tercer isómero del 16: 1, el ácido sapiénico [16: 1n-10 (ácido 6-*cis*-hexadecenoico)], en células fagocíticas. Los niveles celulares del 16: 1n-10 parecen depender no solo del contenido celular del ácido linoleico, sino también en del nivel de expresión de la ácido graso desaturasa 2, lo que revela una regulación compleja tanto a nivel enzimático, a través competencia del sustrato de los ácidos grasos, y directamente a nivel del gen.

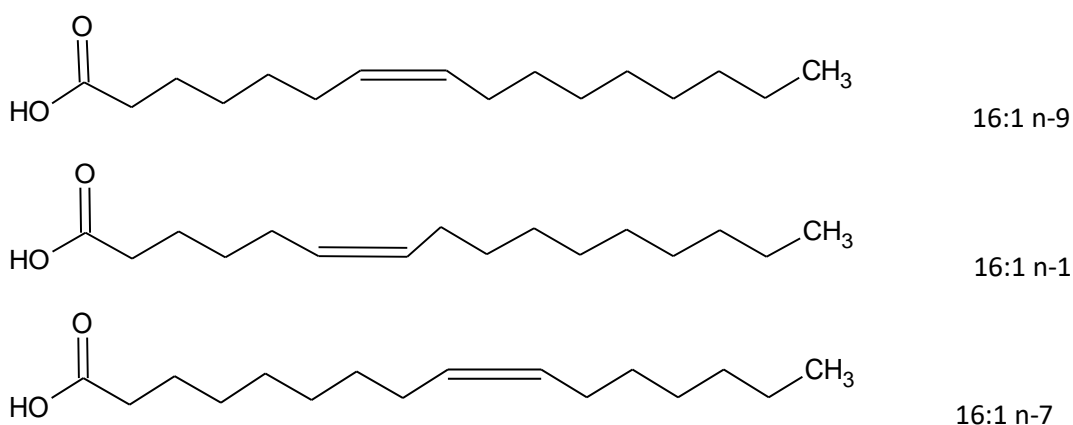


Imagen 1: Ácidos grasos *cis*-7-hexadecenoico (16:1 n-9), *cis*-6-hexadecenoico (16:1 n-10) y *cis*-9-hexadecenoico (16:1 n-7) respectivamente

¹ : Guijas et al., *Foamy Monocytes Are Enriched in cis-7-Hexadecenoic Fatty Acid (16:1n-9), a Possible Biomarker for Early Detection of Cardiovascular Disease*, Cell Chemical Biology (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.04.012>

Sin embargo, a diferencia del 16: 1n-7 y del 16: 1n-9, los niveles del 16: 1n-10 no están regulados por el estado de activación de la célula.

Por otra parte, mientras que el 16: 1n-7 y el 16: 1n-9 manifiesta fuerte actividad antiinflamatoria cuando se agrega a las células a bajas concentraciones, se requieren concentraciones notablemente más altas del 16: 1n-10 para que se observe un efecto comparable.

Colectivamente, estos resultados sugieren la presencia en células fagocíticas de una inesperada variedad de isómeros del 16: 1, que se pueden distinguir en base de su actividad biológica y regulación celular².

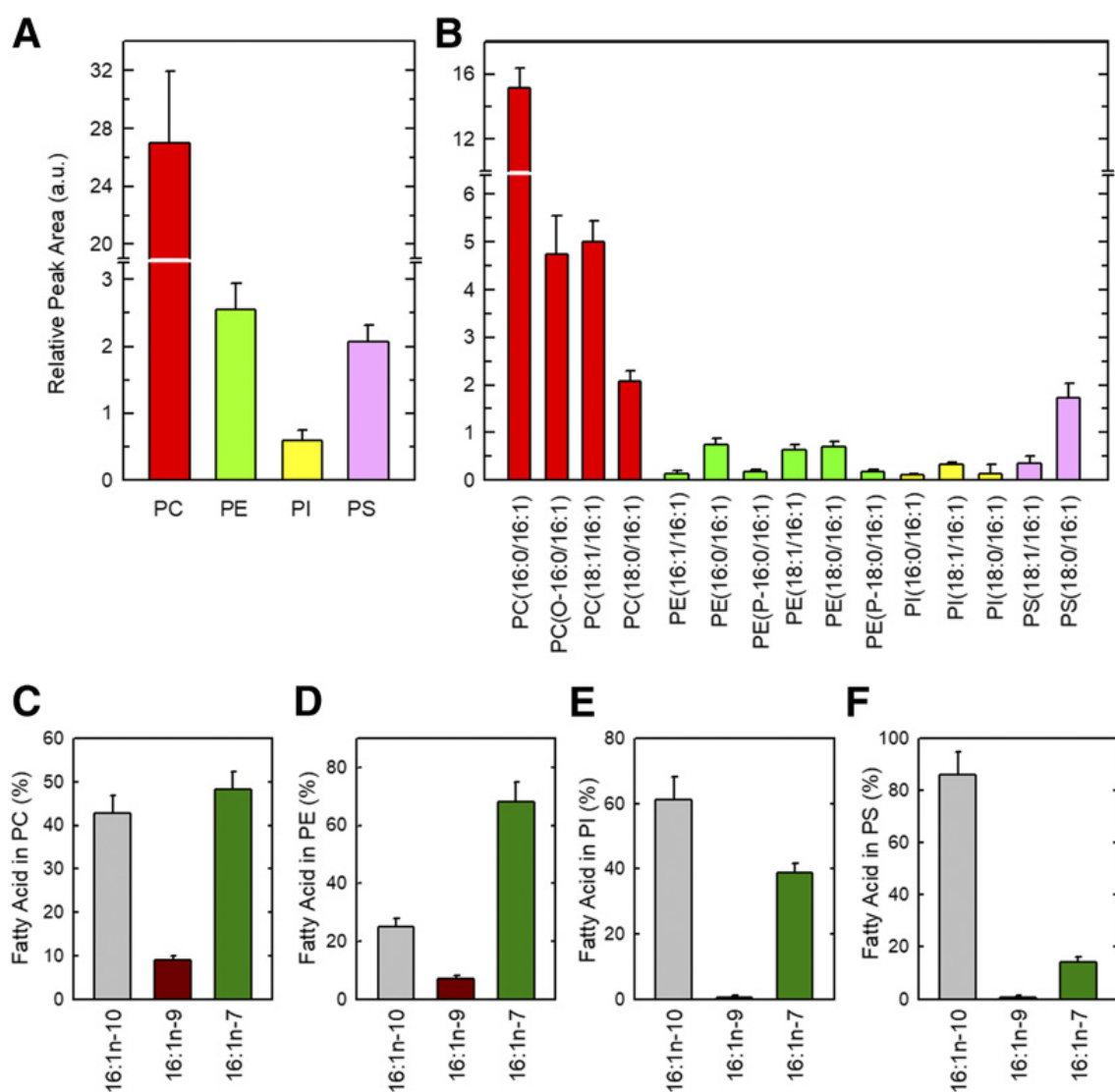


Imagen 2: Distribución de ácidos grasos 16:1 en fosfolípidos. A: Contenido total de ácidos grasos 16:1 en fosfolípidos. B: Perfil de las distintas especies de 16:1 contenidas en PC (rojo), PE (verde), PI (amarillo), y PS (rosa) en células de estudio no estimuladas, determinado por HPLC-MS. Los datos de A son la suma de las distintas especies mostradas en B. C-F: Identificación de los distintos isómeros de 16:1 en cada fosfolípido indicado en el eje de ordenadas.

² : Alma M. Astudillo, Clara Meana, Carlos Guijas, Laura Pereira, Patricia Lebrero, María A. Balboa and Jesús Balsinde. Occurrence and biological activity of palmitoleic acid isomers in phagocytic cells 2017

Para poder clarificar el mecanismo de actuación de estos ácidos grasos se van a elaborar diferentes rutas sintéticas de estos compuestos, en concreto de fosfolípidos de PC, puesto que son los más abundantes (imagen 2), para poder posteriormente incorporarlos a las diferentes formas lipídicas presentes en las células.

4.Objetivos y plan de trabajo

Este trabajo se ha llevado a cabo teniendo en cuenta los siguientes objetivos:

1. Poner a punto un método para la síntesis de los ácidos grasos (Z)-7-hexadecenoico, (Z)-6-hexadecenoico y (Z)-9-hexadecenoico.
2. Obtener un intermedio del fosfolípido final que permita incorporar los ácidos grasos en las posiciones deseadas.
3. Introducir los ácidos grasos sintetizados en la posición 2 del fosfolípido final.

Para poder llevar a cabo los objetivos descritos, se ha desarrollado el siguiente plan de trabajo:

1. Estudiar y optimizar un método para sintetizar los ácidos (Z)-7-hexadecenoico y (Z)-6-hexadecenoico a partir de los reactivos comerciales disponibles.
2. Estudiar y desarrollar un método para sintetizar el ácido (Z)-9-hexadecenoico a partir de 1,9-nonanodiol.
3. Investigar la síntesis de un fosfolípido monosustituido que permita la síntesis regioselectiva de diacilcolinas.
4. Estudiar y optimizar la síntesis regioselectiva de diacilcolinas en las que se encuentren los ácidos n-9, n-10 y n-7 en la posición sn2 y el ácido graso palmítico en la sn1, dando mayor prioridad a la pureza del fosfolípido obtenido.

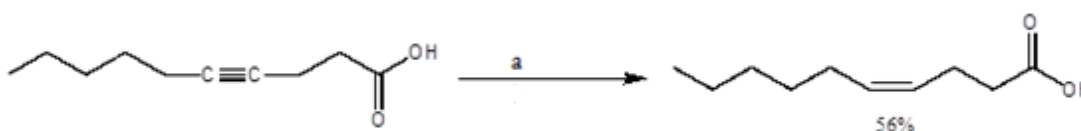
5. Antecedentes bibliográficos

5.1 Síntesis de los ácidos grasos (Z)-7-hexadecenoico, (Z)-6-hexadecenoico y (Z)-9-hexadecenoico:

La síntesis de ácidos grasos con estereoquímica (Z) ha sido abordada empleando diferentes estrategias. A continuación se exponen dos de ellas:

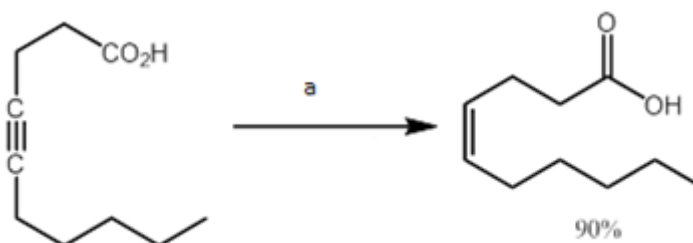
5.1.1 Hidrogenación de alquinos:

El grupo del profesor Kai³, obtienen el ácido (Z)-4-decenoico por hidrogenación del ácido 4-decinoico en presencia de paladio al 5% sobre carbonato de calcio (catalizador de Lindlar). (esquema 1)



Esquema 1: Hidrogenación de alquinos a) $H_2/1\text{ atm}$, Pd 5 % $CaCO_3$, Quinoleína

Esta misma estrategia ha sido empleada en la síntesis del Leukotrieno B₄, donde la estereoquímica del doble enlace en las posiciones 6 y 14 se controla por hidrogenación en presencia de boruro de níquel⁴. (esquema 2)



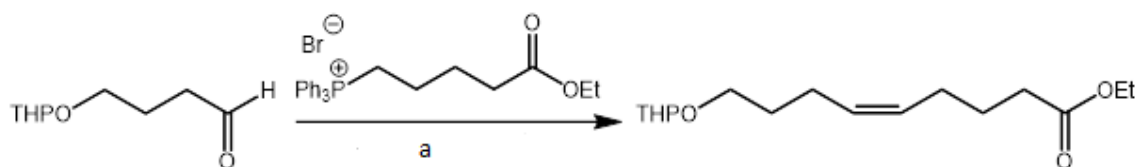
Esquema 2: Hidrogenación de alquinos a) $H_2/1\text{ atm}$, NiB, EtOH

³ Kai, K.; Kasamatsu, K. and Hayashi, H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 5441-5444.

⁴ Djuric, S.W.; Miyashiro, J.M.; Penning, T.D.; Keith, R.H.; Villani-Price, D. and Tsai, B-S. *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **1991**, 1, 179-182

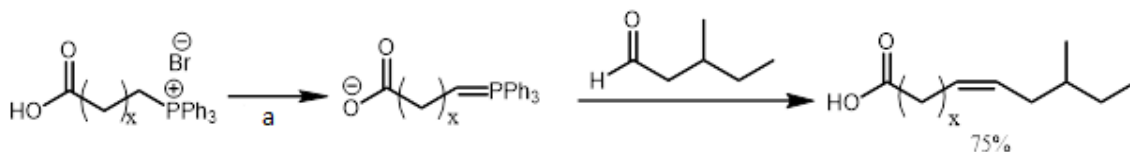
5.1.2 Reacción de Wittig:

La utilización de iluros de fósforo no estabilizados constituye un buen procedimiento en la obtención de (Z)-alquenos⁵. Matikainen⁶ y colaboradores han conseguido de forma satisfactoria la preparación de 9-(tetrahidropiran-2-iloxi)-(5Z)-nonanoato de etilo por reacción de la sal de fosfonio derivada de 5-bromopentanoato de etilo y el aldehído correspondiente. (esquema 3)



Esquema 3: Reacción de Wittig. a) K_2CO_3 /dioxano/ H_2O

La (Z)-selectividad se encuentra también cuando se utilizan aldehídos más ramificados⁷ como es el caso de la síntesis del ácido 12-metiltetradecenoico y 14-metilhexadecenoico, que son ácidos grasos presentes en diversos alimentos como la leche de cabra o la mantequilla. Este grupo de ácidos grasos ramificados se han preparado por ejemplo por reacción de 3-metilpentanal y un iluro de fosfonio generado con n-BuLi como base. (esquema 4)



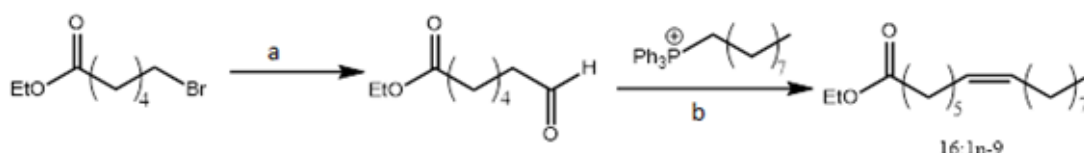
Esquema 4: Reacción de Wittig con aldehidos ramificados a) n-BuLi, THF

⁵ Maryanoff, B.E.; Reitz, A.B. *Chem. Rev.* **1989**, 89, 863-927.

⁶ Kaltia, S.; Matikainen, J.; Ala-Peijari, M. and Hase, T. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2008**, 85, 561-565.

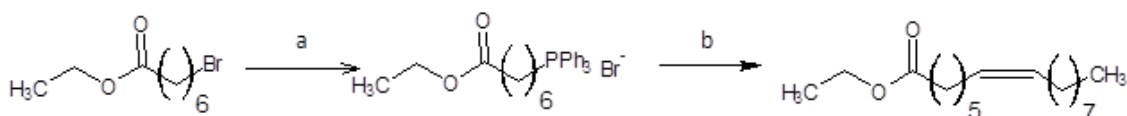
⁷ Thurnhofer, S.; Vetter, W. *Tetrahedron.* **2007**, 63, 1140-1145.

La obtención del ácido (Z)-7-hexadecenoico (16:1 n-9) se encuentra descrita en la bibliografía⁸ recientemente, si bien el procedimiento es algo laborioso. Los autores parten de 6-bromohexanoato de etilo, que una vez transformado en el 7-oxoheptanoato de etilo, se hace reaccionar con el iluro de fósforo para obtener el ácido graso monoinsaturado (esquema 5).



Esquema 5: Síntesis del (Z)-7-hexadecenoico a) NaCN, Raney Ni, NaHPO₄, 40°C 2h b) NaN(TMS)₂

La síntesis del ácido (Z)-7-hexadecenoico ha sido abordada y resuelta con gran éxito por nuestro grupo de investigación⁹ mediante una reacción tipo Wittig entre el bromuro de (7-etoxi-7-oxoheptil)trifenilfosfonio y nonanal. La calefacción a reflujo con DCM en presencia de carbonato de cesio proporciona la (Z)-olefina con un excelente rendimiento (esquema 6).

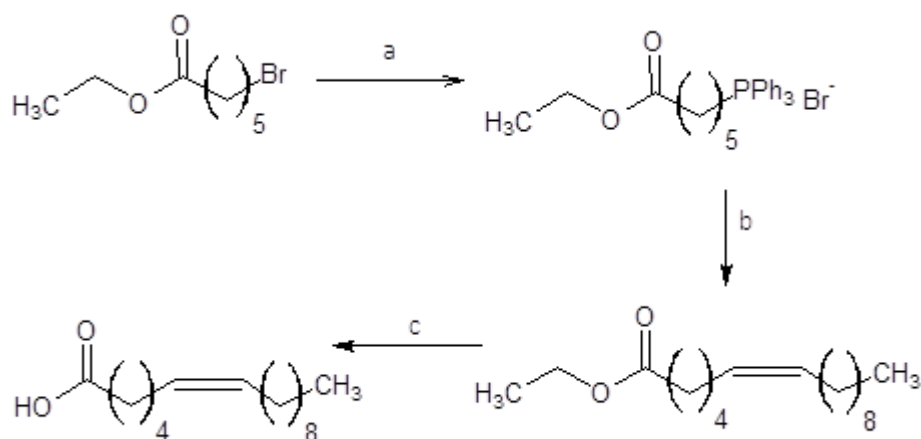


Esquema 6: Reacción de Wittig para la formación de (Z)-7-hexadecenoico a) PPh₃, K₂CO₃, CNCH₃ b) nonanal, Cs₂CO₃ CH₂Cl₂

La obtención del ácido (Z)-6-hexadecenoico (16:1 n-10) se ha llevado a cabo de forma análoga a la del 16:1 n-9, partiendo del 6-bromohexanoato de etilo para formar el iluro de fósforo con el objetivo de hacerlo reaccionar posteriormente con decanal en presencia de carbonato de cesio y finalmente llevar a cabo la saponificación.

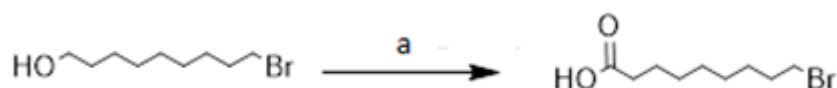
⁸ Mostyn, S.N.; Carland, J.E.; Shimmon, S.; Ryan, R.M.; Rawling, T. and Vandenberg R.J. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**.

⁹ Resultados sin publicar.



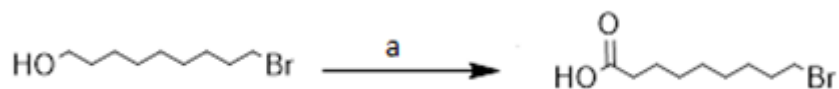
Esquema 7: Síntesis del (Z)-6-hexadecenoico a) PPh_3 , K_2CO_3 , CNCH_3 b) decanal, Cs_2CO_3 , CH_2Cl_2 c) 1. LiOH 2. HCl , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$

Sin embargo, dada la falta del éster comercial para la formación del ácido (Z)-9-hexadecenoico (16:1 n-9), se ha tenido que considerar una ruta de síntesis mayor partiendo desde reactivos más simples. Dicha ruta ha sido descrita por el grupo del profesor Nanda¹⁰ para la síntesis de leukotrienos y octadecenoides.

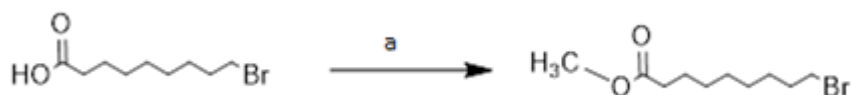


Esquema 8: halogenación del 1,9-nonanodiol a) HBr , tolueno

Este alcohol se oxida para obtener un ácido monohalogenado del que posteriormente se llegará a un éster bromado, análogo a los empleados para la síntesis de los ácidos n-9 y n-10.



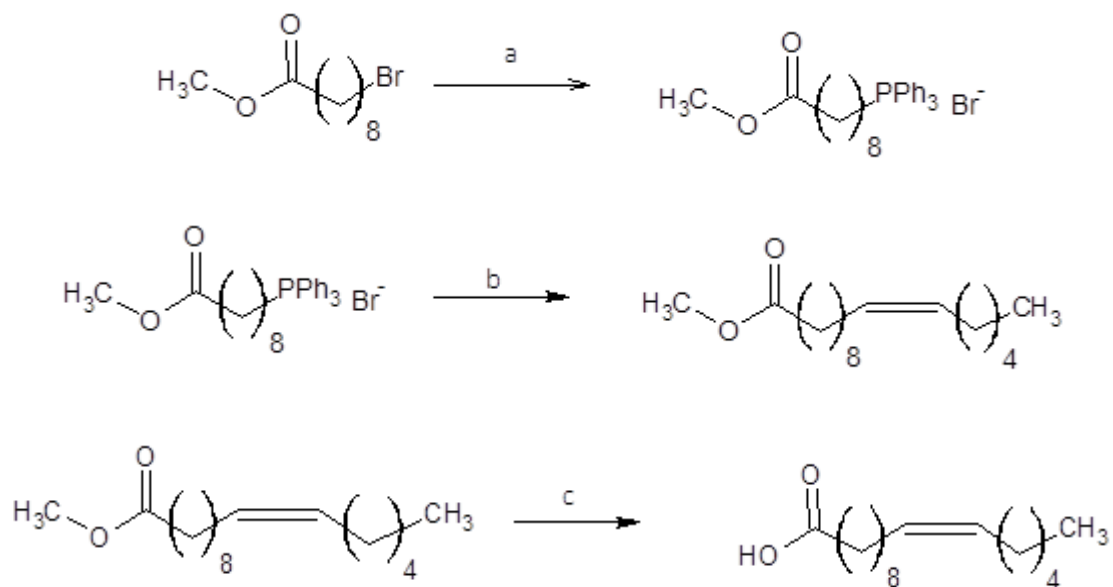
Esquema 9: oxidación del 9-bromo-1-nonanol a) CrO_3 , H_2SO_4 (reactivo de Jones), acetona



Esquema 10: metilación del ácido 9-bromononanoico a) MeOH , ClCOCH_3

¹⁰ S. Nanda and J. S. Yadav *Tetrahedron: Asymmetry* 14 (2003) 1799-1806

Dentro de las posibles formas de oxidación, se optó por una oxidación crómica tipo Jones puesto que ofrecía mejores resultados que otras oxidaciones testadas, como es el empleo de hipoclorito¹¹ como agente oxidante.



Esquema 11: Síntesis del (Z)-9-hexadecenoico a) PPh_3 , K_2CO_3 , CNCH_3 b) heptanal, Cs_2CO_3 , CH_2Cl_2 c) 1. LiOH 2. HCl , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$

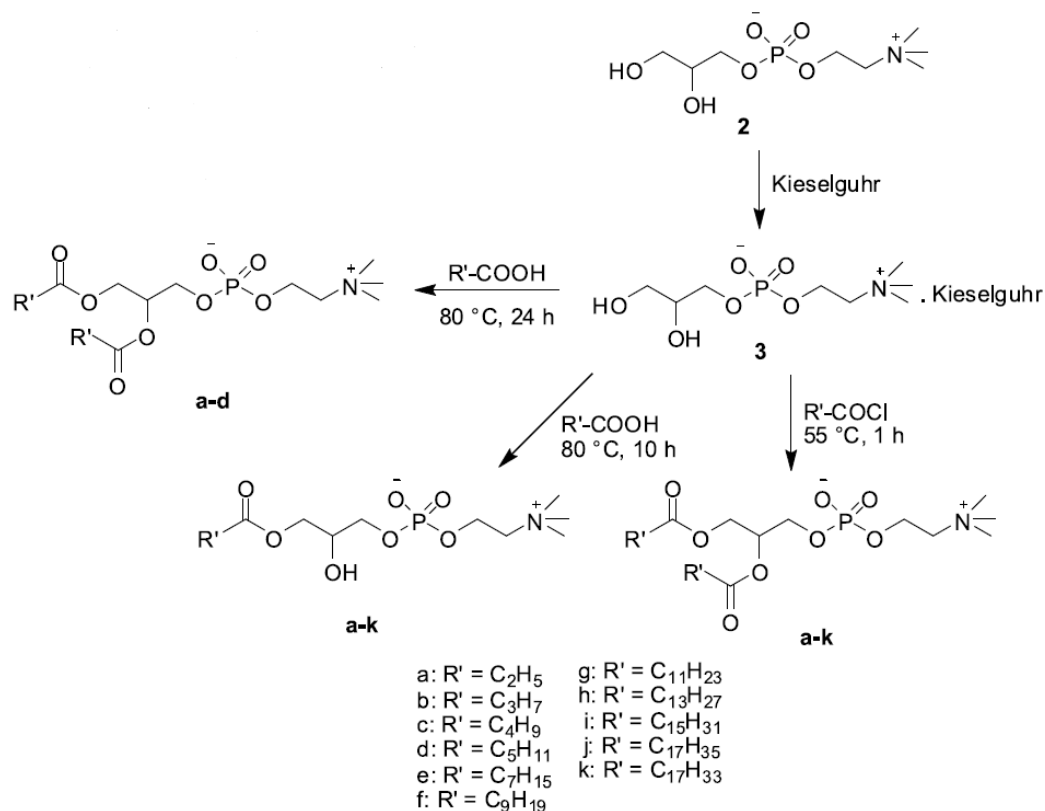
¹¹ Osada, Satoshi et. al. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2010** 18(2), 605-611;

5.2 Síntesis de 1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC):

Para que en el fosfolípido final se puedan incorporar de forma selectiva dos ácidos grasos diferentes en las posiciones 1,2 de forma respectiva, se requiere primero la formación de un intermedio de monoacilcolina en el que se haya incorporado un de los ácidos en la posición deseada, que en este caso resulta ser el ácido palmítico en la posición 1. Para ello se proponen diversas formas:

5.2.1 Inserción directa

Como posibilidad, tenemos la opción de insertar el ácido palmítico directamente sobre la glicerofosfocolina, que, en las condiciones de reacción adecuadas, nos proporcionará la monoacilcolina deseada, según se muestra en el siguiente esquema¹²



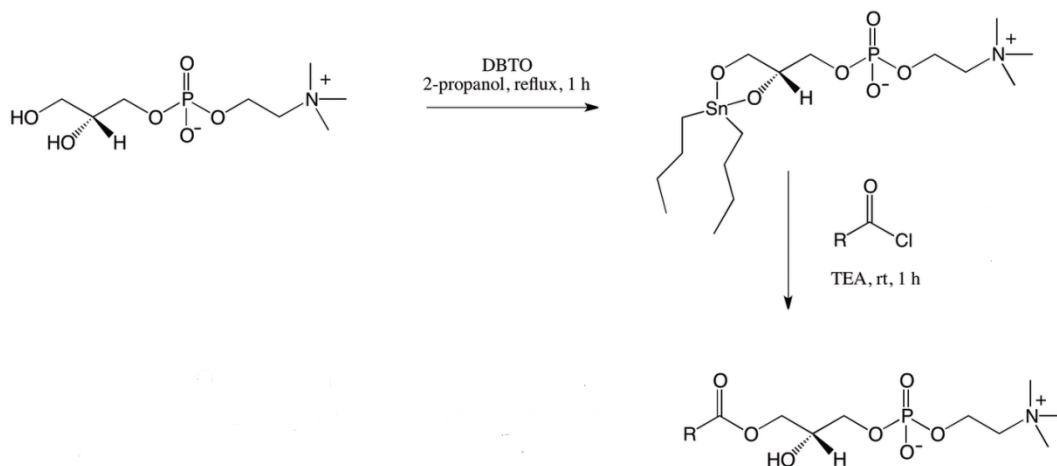
Esquema 12: Síntesis de monoacil y diacilfosfocolinas

5.2.2 Formación de organoestannano

Las ventajas de formar previamente un intermedio con estaño son que se acorta mucho el tiempo de reacción y que evitamos la posibilidad de que se formen mezclas

¹² Balakrishna Marrapu et al *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, 116, 0000-0000

de productos¹³, únicamente se produce 1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC) como producto de la reacción. Empleando óxido de dibutil estaño¹⁴, formamos el compuesto del esquema, para luego introducir el ácido palmítico como cloruro de ácido



Esquema 13: Síntesis del 1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC)

Debido a las ventajas que presenta este procedimiento, es el que se lleva a cabo para obtener el compuesto.

¹³ Natalia Niezgoda et al *Synthesis of Phosphatidylcholine with Conjugated Linoleic Acid and Studies on Its Cytotoxic Activity Aust. J. Chem.* **2013**, 66, 354–361

¹⁴ Gliszczyńska A, Niezgoda N, Gładkowski W, Czarnecka M, Świtalska M, Wietrzyk J *Synthesis and Biological Evaluation of Novel Phosphatidylcholine Analogues Containing Monoterpene Acids as Potent Antiproliferative Agents.* (2016) PLoS ONE 11(6): e0157278. doi:10.1371/journal.pone.0157278

5.3 Síntesis de 1-Palmitoil-2-palmitoleico-glicerol-3-fosfocolina, 1-Palmitoil-2-sapienil-glicerol-3-fosfocolina y 1-Palmitoil-2-oleoil-glicerol-3-fosfocolina:

El objetivo final del trabajo es sintetizar los fosfolípidos de glicerofosfocolina en los que la posición 1 está ocupada por ácido palmítico y la posición 2 está ocupada por los ácidos n-7, n-9 y n-10 en cada caso. El principal requisito, aparte de que cada ácido graso se encuentre en la posición deseada, es que se logre aislar el fosfolípido final con la mayor pureza, dado que va a emplearse para investigación biológica en un proyecto mayor.

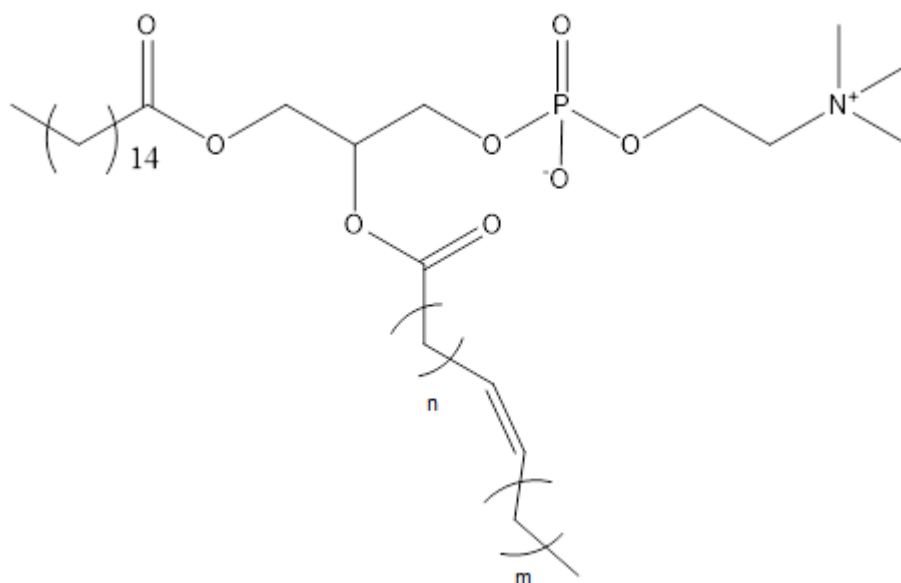


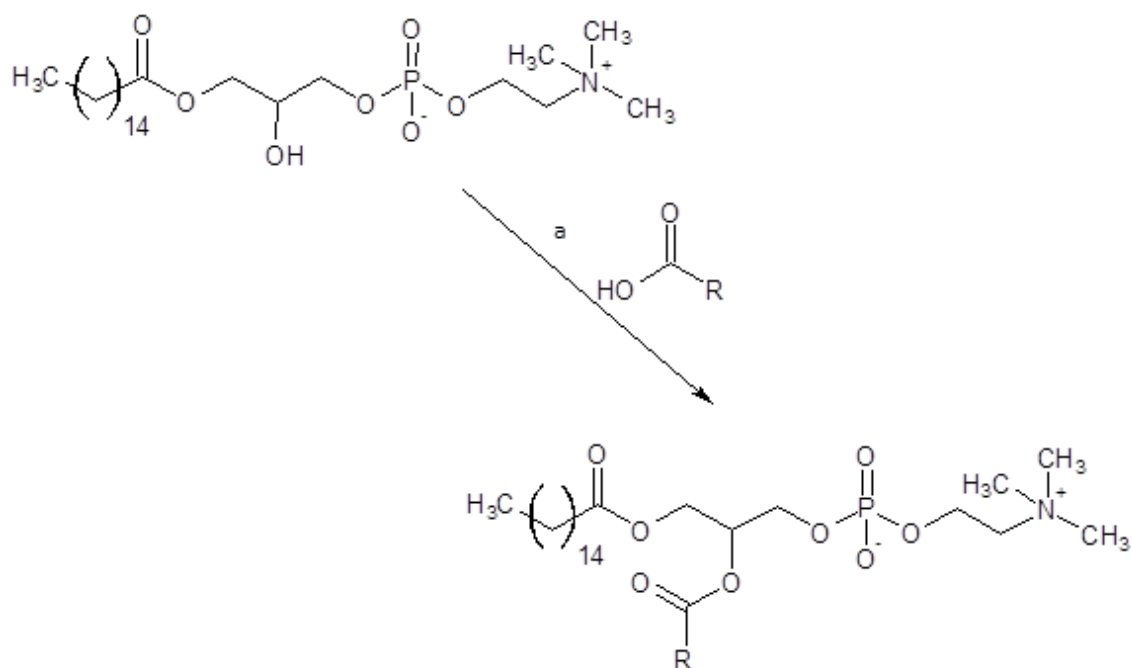
Imagen 3: Fosfolípido final, donde $n = 4, 5, 7$ y $m = 8, 7, 5$ respectivamente

Para lograr la acilación del último ácido con el fosfolípido se han investigado varias opciones, siendo algunas prometedoras disponer del ácido como anhídrido para su reacción¹⁵. Sin embargo, se descartó emplear este procedimiento debido a que la propia síntesis de los ácidos grasos reduce la disponibilidad de los mismos.

Los primeros resultados que permitieron obtener el fosfolípido final puro se obtuvieron siguiendo la síntesis posterior descrita para la obtención del 2-lyso-16-PC en el mismo grupo de investigación.¹²

Pero este procedimiento presenta los inconvenientes de un bajo rendimiento y dificultad en el aislamiento y purificación del compuesto debido sobre todo a las pérdidas de compuesto al tratar de eliminar la DMAP y la coelución de ésta con el fosfolípido en una separación cromatográfica.

¹⁵ P. D'Arrigo, E. Fasoli, G. Pedrocchi-Fontoni, C. Rossi, C. Saraceno, D. Tessaro, S. Servi, Chem. Phys. Lipids **2007**, 147, 113. doi:10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2007.03.008



Esquema 14: Síntesis del fosfolípido final, donde R representa las cadenas monoinsaturadas de los ácidos correspondientes a) DCC, DMAP, CH₂Cl₂, reflujo 72h

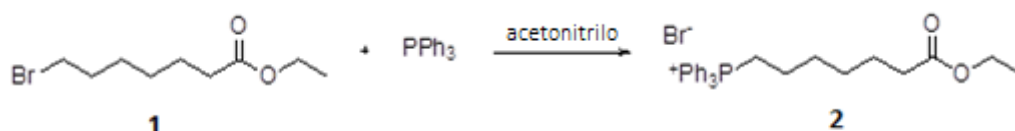
Tras realizar varias pruebas cambiando la base de la reacción (DMAP) por otros reactivos que cumplan la misma función y alternando las condiciones, se halló que la forma más eficaz de obtener el fosfolípido era con la misma reacción empleando un baño de ultrasonidos¹⁶ para mejorar el rendimiento de la reacción y eliminar la DMAP con las mínimas extracciones necesarias de KHSO₄ sat., minimizando así la pérdida de rendimiento.

¹⁶ Journal of Lipid Research, Volume 31, , An efficient synthesis of phosphatidylcholines, Note on methodology, **1990**, 1522

6. Resultados y discusión

6.1 Síntesis del ácido graso (Z)-7-hexadecenoico:

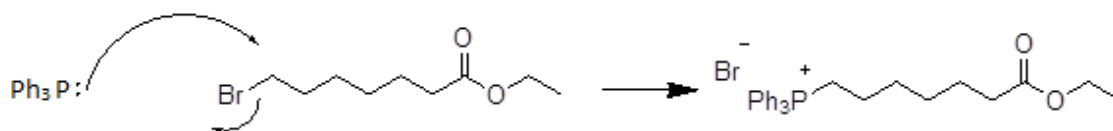
La síntesis del ácido graso (Z)-7-hexadecenoico ha sido abordada y resuelta por nuestro grupo de investigación de manera exitosa. De las posibles vías propuestas, se optó por formar el iluro de fósforo a partir del 7-bromoheptanoato de etilo (esquema 7).



Esquema 7: Formación de la sal de Wittig

Un paso clave es la utilización de trifenilfosfina anhidra, ya que en humedad la reacción no ocurre de manera exitosa, por lo cual, debe ser sometida a un proceso de secado antes de ser utilizada.

La reacción se entiende que ocurre a través de un ataque nucleofílico del átomo de fósforo de la trifenilfosfina sobre el átomo de carbono enlazado al bromo, produciendo la sustitución y por tanto la formación del bromuro de fosfonio correspondiente (esquema 8).



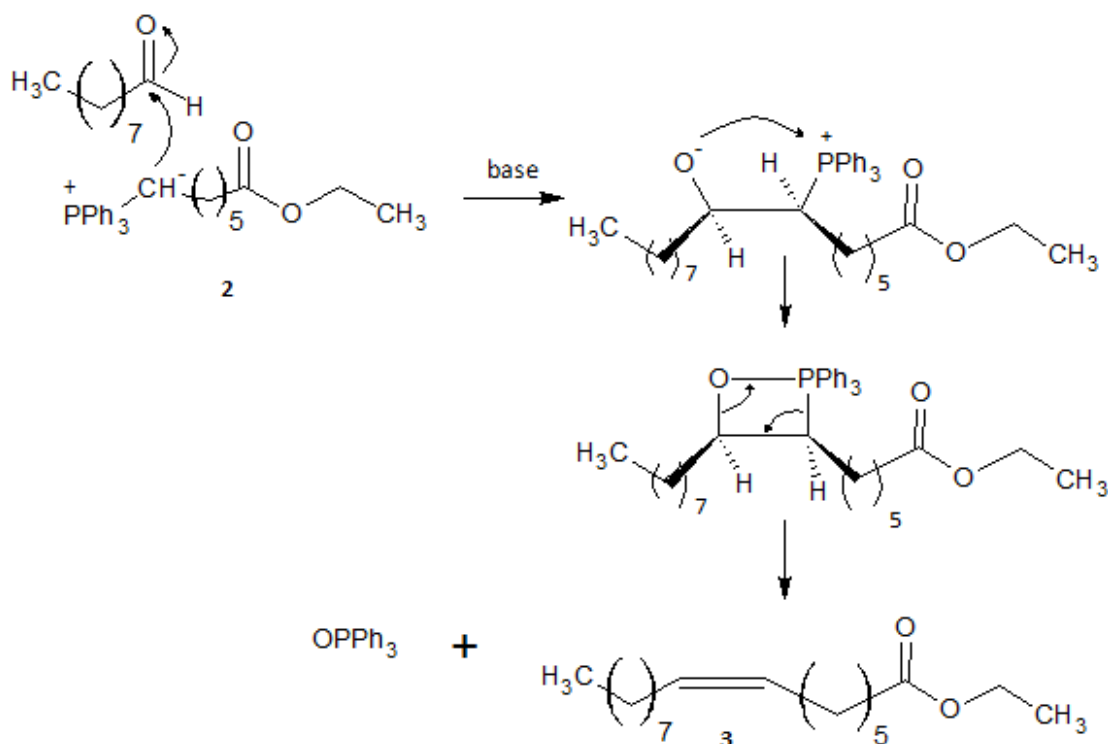
Esquema 8: Ataque nucleofílico de la fosfina al átomo de carbono bromado.

Debido a que en la reacción se añade trifenilfosfina en exceso, lo que ha quedado sin reaccionar ha de ser eliminado. El proceso más efectivo para llevarlo a cabo es disolver la masa de reacción en MeOH. La sal se disuelve, mientras que la mayor parte de la trifenilfosfina precipita, por lo que puede separarse por filtración.

En los espectros de esta reacción se ha observado la presencia de una mezcla de los ésteres etílico y metílico. Esto se debe a que se produce una transesterificación durante la cromatografía promovida por la sílica utilizada como fase estacionaria y el metanol presente en la fase móvil. La formación del bromuro de fosfonio mediante este método alcanza altos rendimientos (**94%**).

La sal de fosfonio se trata in situ con una base para desprotonar el átomo de carbono enlazado a la trifenilfosfina, formándose así el iluro de fósforo correspondiente.

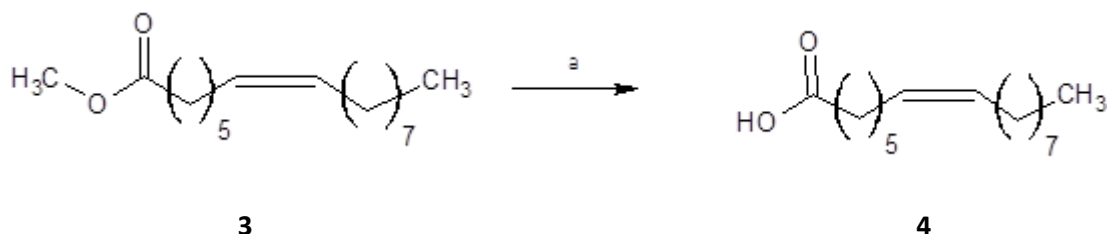
La reacción del iluro de fósforo con aldehídos alifáticos conduce al alcano de estereoquímica Z. Esta reacción transcurre a través de un ataque nucleofílico del átomo de carbono negativo del iluro sobre el átomo de carbono carbonílico del aldehído. Se forma un intermedio en el cual, el átomo de oxígeno ataca al átomo de fósforo de la trifenilfosfina, dando lugar a un intermedio cíclico derivado del oxafosfetano. Por último y a través de una β -eliminación, se libera óxido de trifenilfosfina y se forma el enlace doble deseado (esquema 9).



Esquema 9: Representación del mecanismo de la reacción de Wittig

Se formará el doble enlace en configuración Z debido a que se emplea un iluro no estabilizado.

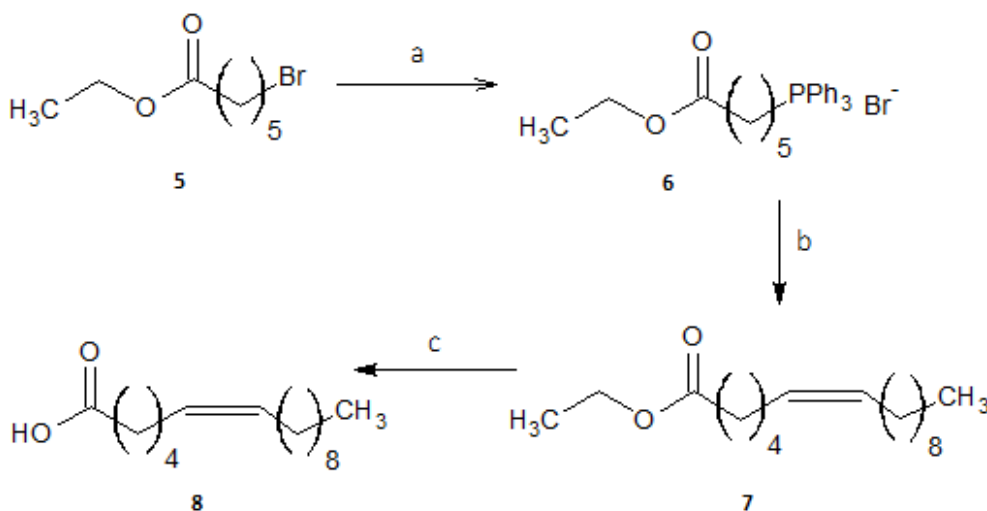
Para la separación del ácido graso formado en la saponificación, se procede a una extracción ácido-base y, donde se logra aislar mediante la acidificación del medio, quedando este en la fase orgánica y todas las sales formadas durante el proceso en la fase acuosa.



Esquema 17: Saponificación del éster metílico a) 1.LiOH 2.HCl, MeOH/H₂O

6.2 Síntesis del ácido graso (Z)-6-hexadecenoico:

La síntesis del ácido graso (Z)-6-hexadecenoico ha sido abordada y resuelta por nuestro grupo de investigación de manera exitosa y de forma análoga a la síntesis del ácido (Z)-7-hexadecenoico, empleando 6-bromohexanoato de etilo como reactivo de partida.

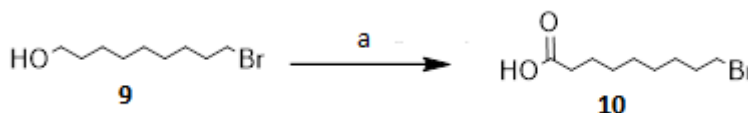


Esquema 18: Ruta de síntesis del ácido n-10 a) PPh₃, K₂CO₃, CNCH₃ b) decanal, Cs₂CO₃, CH₂Cl₂ c) 1.LiOH 2.HCl, MeOH/H₂O

De nuevo, se ha observado en espectros de ^1H RMN la mezcla de ésteres etílicos y metílicos, por lo que de cara a la síntesis del ácido n-7 se procederá a través de los ésteres metílicos.

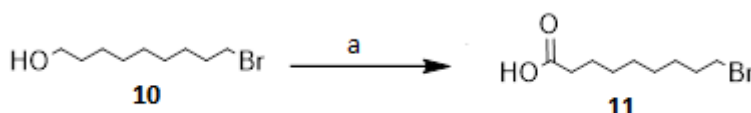
6.3 Síntesis del ácido graso (Z)-9-hexadecenoico:

Dada la falta del éster comercial para la formación del ácido (Z)-9-hexadecenoico (16:1 n-9), se ha tenido que poner a punto una ruta de síntesis partiendo desde reactivos más simples, en este caso del 1,9-nonanodiol. El primer paso de la síntesis es la monohalogenación del alcohol. Esto es posible mediante un sistema de extracción Dean-Stark, la reacción proporciona el compuesto monohalogenado **10** con altos rendimientos (**97%**).



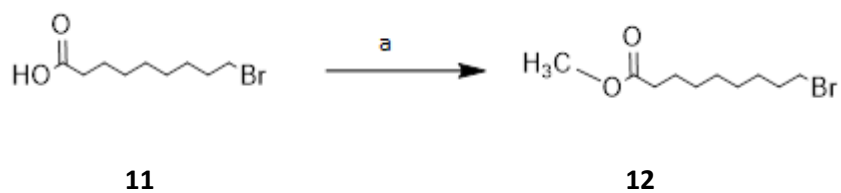
Esquema 19: halogenación del 1,9-nonanodiol a) HBr, tolueno

Este alcohol permite obtener el éster **12** mediante una oxidación con CrO_3 y posterior esterificación de Fischer, análogo a los empleados para la síntesis de los ácidos n-9 y n-10. La oxidación más efectiva empleada para esta reacción ha sido la oxidación crómica tipo Jones, que, seguida de un proceso de extracción ácido-base, permite obtener el ácido deseado con alto rendimiento (**92%**).



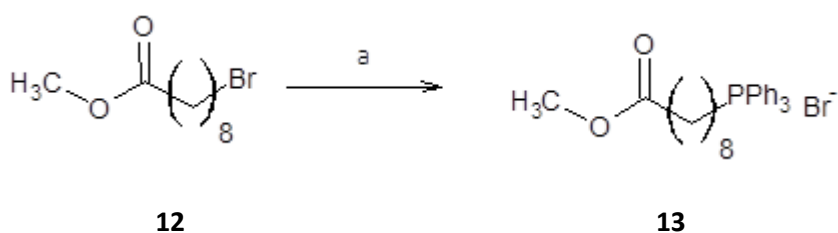
Esquema 20: oxidación del 9-bromo-1-nonanol a) CrO_3 , H_2SO_4 (reactivo de Jones), acetona

La esterificación tipo Fischer del ácido, se completó empleando metanol con cloruro de acetilo como generador del ácido necesario. Se ha escogido el uso de metanol con el fin de obtener ésteres metílicos, y así evitar formar mezclas de productos en reacciones posteriores. La reacción transcurre de forma rápida y sin la formación de subproductos, con rendimientos elevados (**94%**).

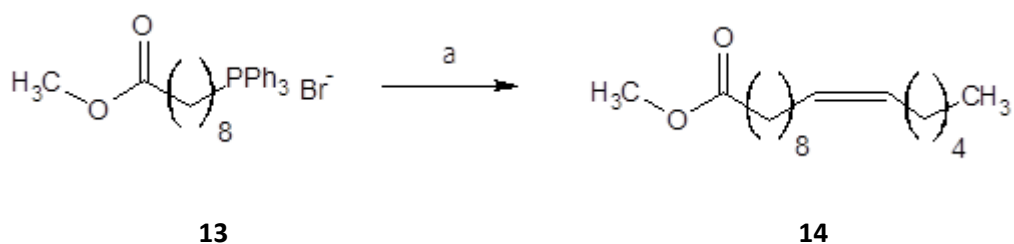


Esquema 21: metilación del ácido 9-bromononanoico a) ClCOCH_3 , MeOH

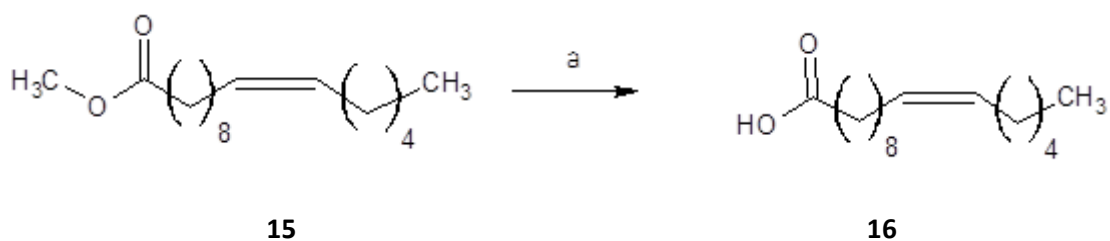
El resto de la ruta de síntesis transcurre de forma similar a las síntesis de los ácido n-9 y n-10, mediante la formación de la sal de fosfonio seguida por la reacción de Wittig y, finalmente, por la saponificación del éster para obtener el ácido graso n-7.



Esquema 22: Síntesis la sal de fosfonio a) PPh_3 , K_2CO_3 , CNCH_3



Esquema 23: Reacción de Wittig a) heptanal, Cs_2CO_3 , CH_2Cl_2

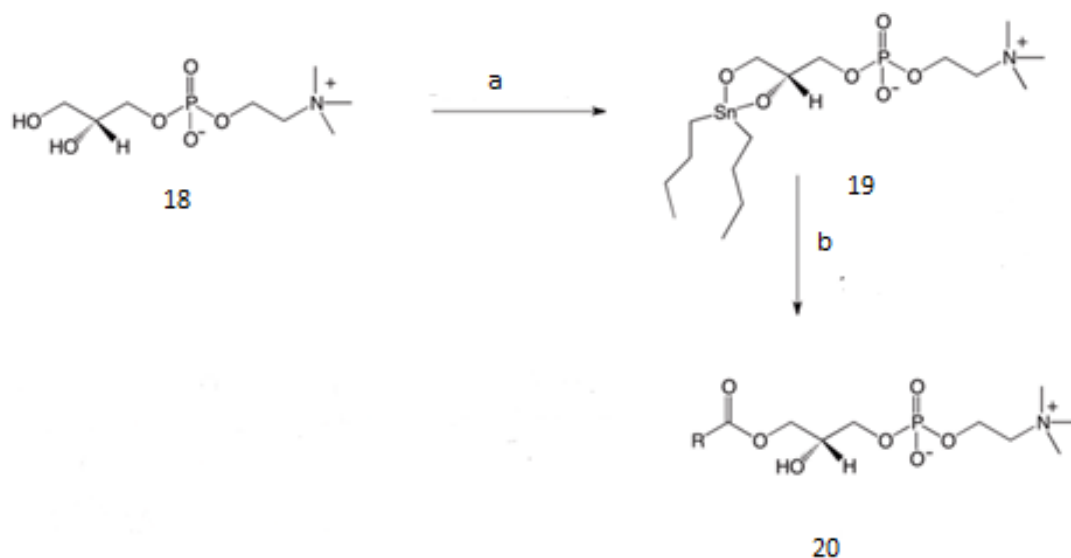


Esquema 24: Síntesis del (Z)-9-hexadecenoico a) 1. LiOH 2. HCl , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$

6.4 Síntesis de 1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC):

Previa a la reacción de formación del organoestannano, se necesita sintetizar el cloruro de ácido palmítico para formar el fosfolípido intermedio. La formación del cloruro de ácido tiene lugar de forma rápida al calentar ácido palmítico en presencia de cloruro de tionilo sin la necesidad de emplear disolvente. El producto se purifica destilándolo a presión reducida.

El organoestannano se obtiene por calefacción de la glicerofosfocolina con óxido de dibutil estaño (DBTO) en isorpopanol, y, sin aislarlo del medio de reacción, se produce la adición del cloruro de ácido en presencia de trietilamina (TEA), logrando así la incorporación del ácido palmítico de forma regioselectiva en la posición sn1.



Esquema 24: Síntesis del 1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC) a) DBTO, 2-propanol, reflujo 1h
b) RCOCl, TEA, 30 min

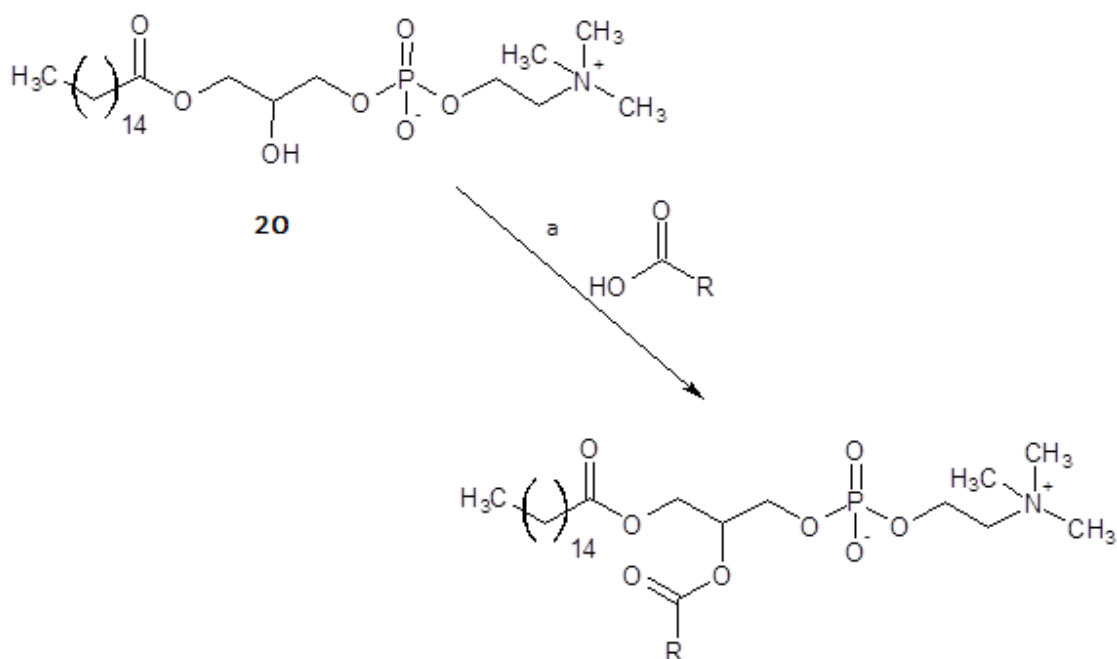
Este fosfolípido de monoacilcolina se ha logrado aislar y caracterizar con éxito.

6.5 Síntesis de 1-Palmitoil-2-palmitoleico-glicerol-3-fosfocolina, 1-Palmitoil-2-sapienil-glicerol-3-fosfocolina y 1-Palmitoil-2-oleoil-glicerol-3-fosfocolina

De cara a la síntesis del fosfolípido final, prioriza antes que el rendimiento la pureza del producto, ya que es indispensable que los productos estén completamente puros .

Una vez que se ha obtenido el fosfolípido intermedio según la descripción previa, queda introducir los distintos ácidos grasos sintetizados en la posición sn2. Tras la búsqueda bibliográfica, se concluyó que la mejor manera de abordar este paso era realizar la reacción entre la monoacilcolina y el ácido graso en presencia de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4,4-dimetilaminopiridina en condiciones de atmósfera inerte y ausencia de luz, seguido de extracciones con HCl diluido y NaOH diluido, finalizando con una cromatografía en columna.

Este método proporcionó los primeros resultados al lograr obtener el fosfolípido final que, tras diversas extracciones líquido-líquido y cromatografía en columna, se pudo aislar puro.



Esquema 25: Síntesis del fosfolípido final, donde R representa las cadenas monoinsaturadas de los ácidos correspondientes a) DCC, DMAP, CH₂Cl₂, reflujo 72h

Aunque en un principio el rendimiento de la reacción era bajo el método pudo mejorarse introduciendo varios cambios. El primer cambio fue emplear un baño de ultrasonidos para facilitar la reacción. En estas condiciones, aumenta el rendimiento de la reacción, y reduce el tiempo necesario para completar la reacción (de 72h a 6h de reacción), por lo que las pérdidas que se producen durante el proceso de purificación tienen menos impacto de cara al aislamiento del fosfolípido. El segundo cambio fue realizar lavados de la fase orgánica con una disolución saturada de KHSO_4 , lo que permite eliminar por completo la presencia de DMAP. Gracias a éste método se lograron obtener los tres fosfolípidos finales con la pureza requerida y en cantidades suficientes para su posterior experimentación.

7. Conclusiones

1. Se han logrado sintetizar los ácidos grasos (Z)-7-hexadecenoico, (Z)-6-hexadecenoico y (Z)-9-hexadecenoico con altos rendimientos.
2. La síntesis del fosfolípido intermedio se ha llevado a cabo con éxito.
3. La síntesis de los fosfolípidos finales se ha logrado realizar y optimizar para la obtención de los mismos con la pureza requerida para los estudios biológicos.
4. Durante el proceso de obtención del ácido (Z)-9-hexadecenoico, se ha desarrollado una ruta de síntesis aplicable a toda la variedad de ácidos grasos monoinsaturados con estereoquímica (Z).

8. Materiales y métodos

Los procedimientos representativos se describen a continuación detalladamente.

Los reactivos utilizados durante esta síntesis están comprados en ACROS ORGANICS y en Aldrich. Los disolventes anhidros se secaron mediante el uso de tamices moleculares introduciéndolos en el disolvente y generando una atmosfera inerte en el mismo con N₂.

Los análisis TLC se llevaron a cabo en placas de sílica gel L x W 5cm x 20cm con indicador fluorescente 254nm utilizando diversos eluyentes.

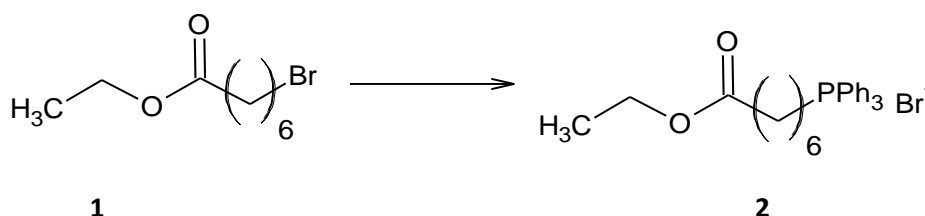
Los espectros de RMN se adquirieron en un instrumento RMN 400 de Agilent Technologies con consola MR 400 de Agilent y sonda One NMR (¹H, 400,123 MHz; ¹³C, 100.611 MHz; ³¹P, 162 MHz). Los desplazamientos químicos se expresan como partes por millón utilizando tetrametilsilano como estándar interno.

Dichos espectros fueron obtenidos en el Laboratorio de técnicas experimentales de Valladolid. Los valores de J están en Hz. También se obtuvieron espectros bidimensionales, HSQC, referidos al acoplamiento que existe entre los átomos de carbono y los hidrógenos en la molécula.

Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron en el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (MS-TOF) Bruker Maxis Impact del laboratorio de técnicas experimentales de Valladolid. Fuente de ionización: electrospray (ESI).

8.1 Síntesis del ácido graso (Z)-7- hexadecenoico (4):

- Síntesis de bromuro de (7-etoxi-7-oxoheptil)trifenilfosfonio (2):



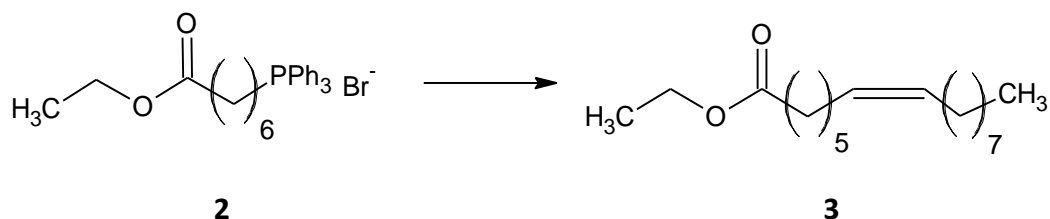
Primero, para asegurarnos que la trifenilfosfina (PPh_3) está seca, la ponemos a la bomba una hora antes de realizar la reacción. Se prepara una disolución del 7-bromoheptanoato de etilo **1** (5mL, 22.28mmol) en CH_3CN anhidro (90mL) y se añade la PPh_3 (14.61g, 55.7mmol), y el K_2CO_3 (10% en peso, 20.7g). La disolución se deja en agitación y a reflujo durante durante 24 horas. Se realiza un seguimiento de la reacción por TLC utilizando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1) y siendo el $R_f = 0.10$. Una vez la reacción haya terminado, la disolución se concentra para eliminar el disolvente, quedando como resultado una pasta pegajosa marrón. Para eliminar la PPh_3 en exceso, se disuelve la masa de reacción en MeOH, precipitando la PPh_3 como un polvo blanco que se filtra. Se cromatografía en una columna con sílica gel utilizando como eluyente una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1). La fracción de interés se concentra, dando como resultado una grasa marrón **2** (8.34g, 16.71mmol, **75%**).

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 7.7-7.51 (m, 15H), 3.93 (m, 2H), 3.56 (m, 3H), 2.28 (m, 2H), 2.11 (m, 2H), 1.51 (m, 4H), 1.4 (m, 2H), 1.19 (m, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm), 174, 173, 135, 133.5, 133, 130.51, 130, 118, 117, 77, 60, 51, 34, 33.5, 20, 29, 28, 24, 22, 14.

HRMS m/z calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{PBr}([\text{M}+\text{H}]^+)$: 497.878

- *Síntesis del (Z)-7-hexadecenoato (3):*



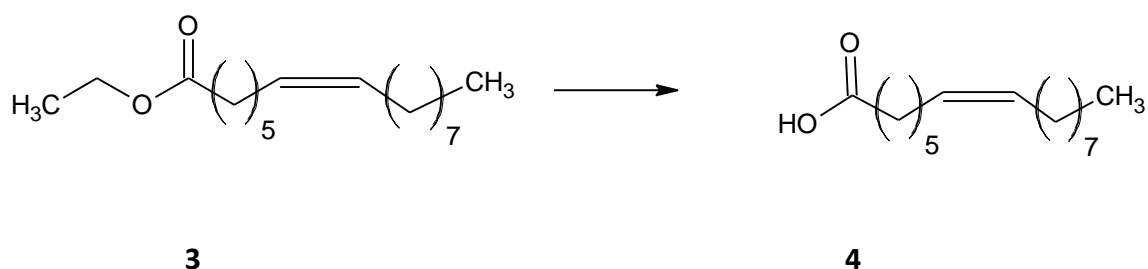
Se disuelve la sal de Wittig **2** (2g, 4mmol) en CH_2Cl_2 (50mL), y se añade el aldehído (nonanal) (0.69ml, 4mmol). La disolución resultante se lleva a atmosfera inerte de N_2 y se añade CsCO_3 (5.21g, 16mmol). Lo dejamos en agitación a 60°C durante 24 h. Se realiza un seguimiento en TLC utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt/Heptano (1:10) dando un $R_f=0.23$. Se añade celita (1g) y dejamos en agitación durante 15 minutos. Dejamos que la disolución se enfríe y lo filtramos lavándolo con CH_2Cl_2 . Una vez esté concentrado, el sólido se cromatografía en una columna con silica gel utilizando como eluyente una mezcla AcOEt/heptano (1:25). La fracción de interés se concentra, resultando un líquido viscoso incoloro **3**. (0.781g, 2.77mmol, **78%**).

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 5.28 (m, 2H), 4.10-3.87 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 2H), 1.96 (m, 4H), 1.57 (m, 3H), 1.21 (m, 18H), 0.82 (t, $J=6.85\text{Hz}$, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm), 174, 60, 34, 32, 30, 29.5, 29, 28, 27, 26, 24, 22, 14

HRMS m/z calc. para $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 282.18

- *Síntesis del ácido graso(Z)-7-hexadecenoico (4):*



Se prepara una disolución del éster **3** (2.476g, 8.77mmol) en 80mL de MeOH. Por otra parte, se prepara una disolución del hidróxido de litio (3.46g, 0.144mol) en agua destilada (90mL). Ambas disoluciones se juntan en un mismo matraz y se deja durante 24 horas a temperatura ambiente en agitación. Pasado este tiempo, se elimina la fase orgánica en el rotavapor. La fase acuosa se somete a una extracción líquido-líquido realizada con (3x75mL) de éter. Posteriormente, a la fase acuosa se le va añadiendo

HCl hasta un PH en torno a 1 y se extrae de nuevo con (3x75mL) de éter. Se seca la fase orgánica con una disolución de NaCl saturada y con MgSO₄ y se concentra quedando como resultado un líquido viscoso totalmente incoloro **4** (2.106g, 8.28mmol, **94%**).

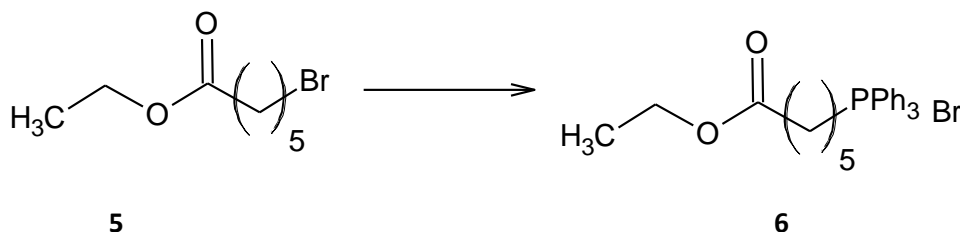
¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 5.33 (m, 2H), 2.33 (t, J= 7.5Hz, 2H), 2.00 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.39-1.20 (m, 18H), 0.87 (t, J=7.7Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 180, 130, 129 77, 34, 31, 29.5, 29, 28, 27, 26, 24.5, 22, 14.

HRMS m/z calc. para C₁₆H₃₀O₂ ([M+H]⁺): 254.2145

8.2 Síntesis del ácido graso (Z)-6- hexadecenoico (**8**):

- Síntesis de bromuro de (6-etoxi-6-oxohexil)trifenilfosfonio (**6**):



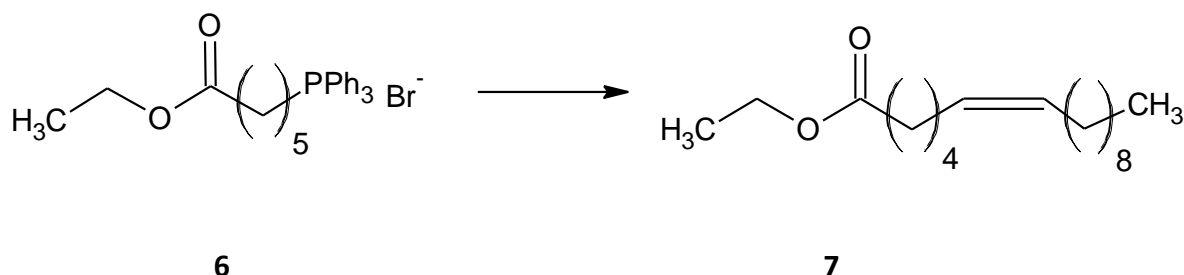
Primero, para asegurarnos que la trifenilfosfina (PPh₃) está seca, la ponemos a la bomba una hora antes de realizar la reacción. Se prepara una disolución del 6-bromohexanoato de etilo **5** (5mL, 28.1mmol) en CH₃CN anhidro (90mL) y se añade la PPh₃ (14.61g, 56.2mmol), y el K₂CO₃ (10% en peso, 20.7g). La disolución se deja en agitación y a reflujo durante durante 24 horas. Se realiza un seguimiento de la reacción por TLC utilizando como eluyente CH₂Cl₂/MeOH (20:1) y siendo el R_f = 0.10. Una vez la reacción haya terminado, la disolución se concentra para eliminar el disolvente, quedando como resultado una pasta pegajosa anaranjada. Para eliminar la PPh₃ en exceso, se disuelve la masa de reacción en MeOH, precipitando la PPh₃ como un polvo blanco que se filtra. Se cromatografía en una columna con sílica gel utilizando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (20:1). La fracción de interés se concentra, dando como resultado una grasa naranja **6** (7.78g, 15.59mmol, **70%**).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 7.7-7.51 (m, 15H), 3.65 (dd, J= 6.81Hz, 2H), 3.47 (s, 3H), 2.15 (t, 2H), 1.51 (m, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 174, 173, 135, 133.5, 133, 130.51, 130, 118, 117, 77, 60, 51, 34, 33.5, 20, 29, 28, 24, 22, 14

HRMS m/z calc. para C₂₆H₂₉O₂PBr ([M+H]⁺): 483.878,

- *Síntesis del (Z)-6-hexadecenoato (7):*



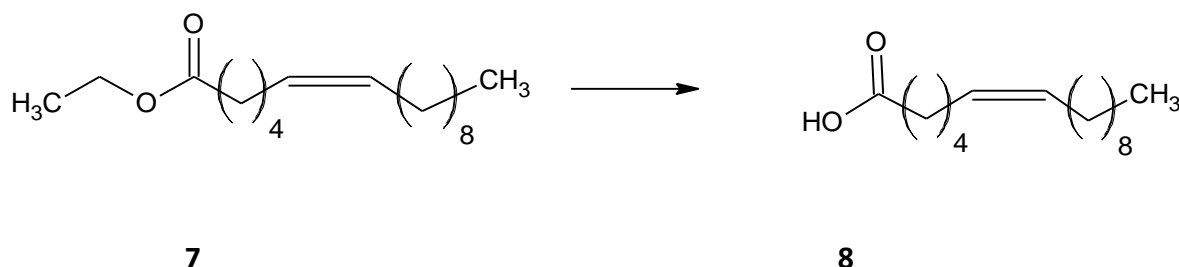
Se disuelve la sal de Wittig **6** (2g, 4.12mmol) en CH_2Cl_2 (50mL), y se añade el aldehído (decanal) (0.78mL, 4.12mmol). La disolución resultante se lleva a atmosfera inerte de N_2 y se añade CsCO_3 (5.37g, 16.48mmol). Lo dejamos en agitación a 60°C durante 24 h. Se realiza un seguimiento en TLC utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt/Heptano (1:10) dando un $R_f=0.23$. Se añade celita (1g) y dejamos en agitación durante 15 minutos. Dejamos que la disolución se enfríe y lo filtramos lavándolo con CH_2Cl_2 . Una vez esté concentrado, el sólido se cromatografía en una columna con silica gel utilizando como eluyente una mezcla AcOEt/heptano (1:25). La fracción de interés se concentra, resultando un líquido viscoso amarillento **7**. (0.750g, 2.77mmol, **78%**).

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 5.28 (m, 2H), 3.65 (s, 3H), 2.25 (m, 2H), 1.96 (m, 4H), 1.57 (m, 3H), 1.21 (m, 18H), 0.82 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 3H). Se aprecia la formación de éster metílico en su mayoría

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm), 174, 60, 34, 32, 30, 29.5, 29, 28, 27, 26, 24, 22, 14

HRMS m/z calc. para $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 268.18,

- *Síntesis del ácido graso Z-6-hexadecenoico (8):*



Se prepara una disolución del éster **7** (2.476g, 8.77mmol) en 80mL de MeOH. Por otra parte, se prepara una disolución del hidróxido de litio (3.46g, 0.144mol) en agua destilada (90mL). Ambas disoluciones se juntan en un mismo matraz y se deja durante

24 horas a temperatura ambiente en agitación. Pasado este tiempo, se elimina la fase orgánica en el rotavapor. La fase acuosa se somete a una extracción líquido-líquido realizada con (3x75mL) de éter. Posteriormente, a la fase acuosa se le va añadiendo HCl hasta un PH en torno a 1 y se extrae de nuevo con (3x75mL) de éter. Se seca la fase orgánica con una disolución de NaCl saturada y con MgSO₄ y se concentra quedando como resultado un líquido viscoso amarillento **8** (2.106g, 8.28mmol, **94.5%**).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 5.33 (m, 2H), 2.33 (t, J= 7.5Hz, 2H), 2.00 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.39-1.20 (m, 18H), 0.87 (t, J=7.7Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 180, 130, 129 77, 34, 31, 29.5, 29, 28, 27, 26, 24.5, 22, 14.

HRMS m/z calc. para C₁₆H₃₀O₂ ([M+H]⁺): 254.2145

8.3 Síntesis del ácido graso (Z)-9- hexadecenoico (15):

- Síntesis de 9-bromo-1-nonanol (10):



Se disuelve el 1,9-nonanodiol (25g, 156 mmol) en 150 mL de HBr al 47% (1.3 mol). Se adapta un separador Dean-Stark y se llena el matraz de la reacción con tolueno. En el matraz de recogida se sitúan 200 mL de tolueno. El matraz de la reacción se pone a 75°C y el de recogida a 250°C para asegurar la evaporación vigorosa y continua de tolueno. Tras 24h se retira el matraz de recogida y se sustituye por otro con tolueno limpio, dejándolo otras 24h en las mismas condiciones. Los matraces de recogida se concentran, dando lugar a un líquido **10** marrón que acaba solidificando a temperatura ambiente.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 3.6 (t, J=6.6Hz 2H), 3.4 (t, J=6.9Hz, 2H), 2.15 (s, 1H), 1.5 (m, 2H), 1.36 (m, 2H), 1.25 (m, 8H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 63, 34, 32.5, 29.5, 28.5, 28, 25.9.

HRMS m/z calc. para C₉H₁₉OBr([M+H]⁺): 222.062,

- Síntesis de ácido 9-bromo-nonanoico (11):



Se disuelve el bromoalcohol 10 (8.16, 36.57 mmol) en 100 mL de acetona a 0°C. Se añade el reactivo de Jones gota a gota a la misma temperatura, hasta que la disolución pasa de tener un color verde a un color marrón-naranja. Se deja que la reacción alcance temperatura ambiente y se pone en agitación 30 minutos. Pasado el tiempo, se añaden 100 mL de agua y se extrae con éter (100x3 mL). La fase orgánica se trata y extrae con NaOH 10 % (100mL) y agua (2x100mL), observándose decoloración en la fase orgánica. La nueva fase acuosa se lleva a pH ácido (1~2) con HCl y se extrae con éter (3x100mL). La nueva fase orgánica se seca con MgSO₄ y se concentra, resultando en un líquido verde que solidifica a temperatura ambiente.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 3.4 (t, J=6.8Hz 2H), 2.35 (t, J=7.5Hz 2H), 1.85 (m, 2H), 1.65 (q, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.35 (m, 8H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 180, 34, 32.5, 29.5, 28.5, 28, 25.9.

HRMS m/z calc. para C₉H₁₇O₂Br([M+H]⁺): 236.041,

- *Síntesis de 9-bromo-nonanoato de metilo (12):*



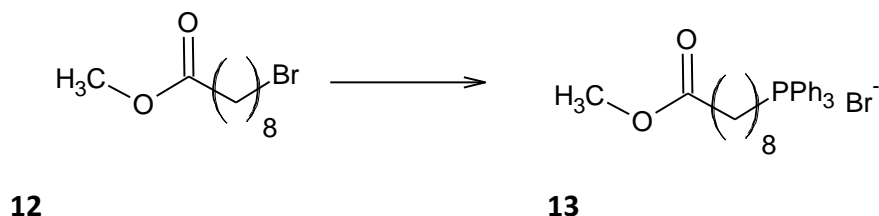
Se prepara una disolución en 50 mL de MeOH del cloruro de acetilo (2 mL) añadido gota a gota a 0°C. Se disuelve el ácido **11** (2.5g, 10.5 mmol) en 10 ml de MeOH y se añade gota a gota a la disolución previa a la misma temperatura y en agitación. Una vez hecho, la reacción se pone a reflujo durante 2h. Finalizado el tiempo, se elimina el disolvente y la masa se disuelve en éter, mientras que el ácido sobrenadante se neutraliza con NaHCO₃ saturado. Al concentrar la fase orgánica se obtiene un líquido viscoso incoloro.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 3.55 (s, 3H), 3.27 (t, J=6.8Hz 2H), 2.18 (t, J=7.2Hz 2H), 1.72 (m, 2H), 1.5 (m, 2H), 1.31 (m, 2H), 1.2 (m, 6H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 174, 52, 34, 33, 29.5, 28.5, 28, 25.9.

HRMS m/z calc. para C₂₇H₃₁O₂PBr([M+H]⁺): 250.057,

- *Síntesis del bromuro de (9-metoxi-9-oxononil)trifenilfosfonio (13):*



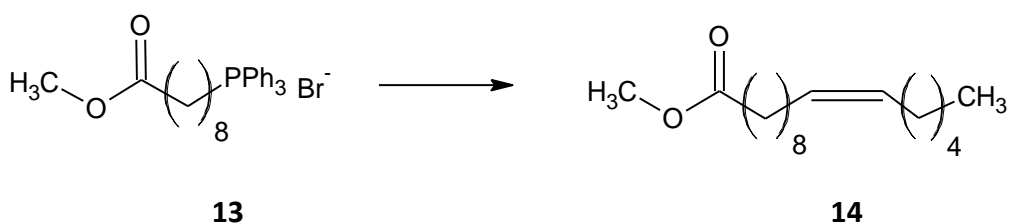
Primero, para asegurarnos que la trifenilfosfina (PPh_3) está seca, la ponemos a la bomba una hora antes de realizar la reacción. Se prepara una disolución del 7-bromononanoato de metilo **12** (2.35g, 9.38mmol) en CH_3CN anhidro (30mL) y se añade la PPh_3 (5g, 18.76mmol), y el K_2CO_3 (10% en peso, 3.15g). La disolución se deja en agitación y a reflujo durante durante 24 horas. Se realiza un seguimiento de la reacción por TLC utilizando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1) y siendo el $R_f = 0.10$. Una vez la reacción haya terminado, la disolución se concentra para eliminar el disolvente, quedando como resultado una pasta pegajosa amarillenta. Para eliminar la PPh_3 en exceso, se disuelve la masa de reacción en MeOH, precipitando la PPh_3 como un polvo blanco que se filtra. Se cromatografía en una columna con sílica gel utilizando como eluyente una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1). La fracción de interés se concentra, dando como resultado una grasa amarilla **12** (3.8g, 7.54mmol, **80%**).

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 7.7-7.51 (m, 15H), 3.65 (s, 3H), 2.15 (m, 2H), 1.51 (m, 12H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm), 174, 173, 135, 133.5, 133, 130.51, 130, 118, 117, 77, 60, 51, 34, 33.5, 20, 29, 28, 24, 22, 14.

HRMS m/z calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{PBr}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 513.556,

- *Síntesis del (Z)-9-hexadecenoato (14):*



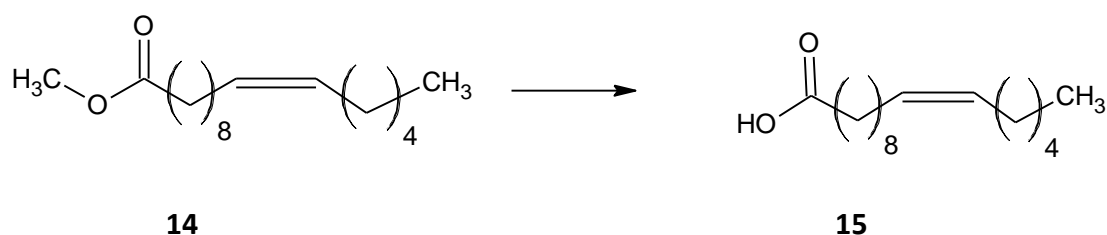
Se disuelve la sal de Wittig **13** (2g, 3.82mmol) en CH₂Cl₂ (50mL), y se añade el aldehído (hepanal) (0.53mL, 3.82mmol). La disolución resultante se lleva a atmosfera inerte de N₂ y se añade CsCO₃ (5g, 3.82mmol). Lo dejamos en agitación a 60°C durante 24 h. Se realiza un seguimiento en TLC utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt/Heptano (1:10) dando un R_f=0.23. Se añade celita (1g) y dejamos en agitación durante 15 minutos. Dejamos que la disolución se enfríe y lo filtramos lavándolo con CH₂Cl₂. Una vez esté concentrado, el sólido se cromatografía en una columna con silica gel utilizando como eluyente una mezcla AcOEt/heptano (1:25). La fracción de interés se concentra, resultando un líquido viscoso amarillento **14**. (0.706g, 2.64mmol, **69%**).

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 5.28 (m, 2H), 3.6 (s, 3H), 2.30-2.20 (m, 2H), 1.96 (m, 4H), 1.57 (m, 2H), 1.21 (m, 18H), 0.82 (t, J= 6.8Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm), 174, 60, 34, 32, 30, 29.5, 29, 28, 27, 26, 24, 22, 14

HRMS m/z calc. para C₁₇H₃₂O₂ ([M+H]⁺): 268.18,

- Síntesis del ácido graso (Z)-9-hexadecenoico (15):*



Se prepara una disolución del éster **14** (2.476g, 8.77mmol) en 80mL de MeOH. Por otra parte, se prepara una disolución del hidróxido de litio (3.46g, 0.144mol) en agua destilada (90mL). Ambas disoluciones se juntan en un mismo matraz y se deja durante 24 horas a temperatura ambiente en agitación. Pasado este tiempo, se elimina la fase orgánica en el rotavapor. La fase acuosa se somete a una extracción líquido-líquido realizada con (3x75mL) de éter. Posteriormente, a la fase acuosa se le va añadiendo HCl hasta un PH en torno a 1 y se extrae de nuevo con (3x75mL) de éter. Se seca la fase orgánica con una disolución de NaCl saturada y con MgSO₄ y se concentra quedando como resultado un líquido viscoso amarillento **15** (2.106g, 8.28mmol, **94%**).

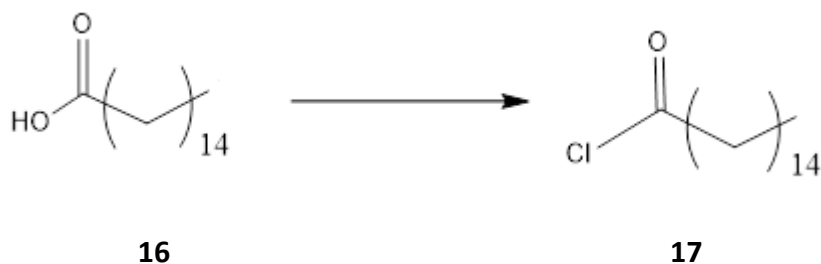
¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 5.33 (m, 2H), 2.33 (t, J= 7.5Hz, 2H), 2.00 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.39-1.20 (m, 18H), 0.87 (t, J=7.7Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 180, 130, 129 77, 34, 31, 29.5, 29, 28, 27, 26, 24.5, 22, 14.

HRMS m/z calc. para C₁₆H₃₀O₂ ([M+H]⁺): 254.2145

8.4 Síntesis 1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC) (20):

- Síntesis del cloruro de ácido palmítico (17):



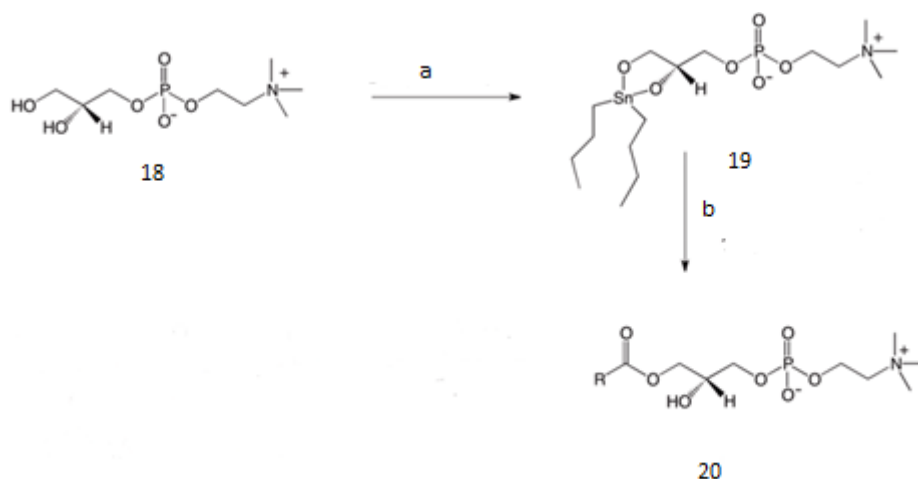
Sobre 20 g de ácido palmítico **16** se añaden 11.4 mL de cloruro de tionilo. La reacción se deja a reflujo sin disolvente durante 2h. Pasado el tiempo, el crudo se somete a presión reducida para eliminar el SOCl₂ sobrante. El cloruro de ácido se purifica destilándolo a presión reducida (80°C, 0.2 torr) en un horno de bolas.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 2.85 (t J=7.4Hz 2H), 1.98 (m, 2H), 1.25 (m, 24H), 0.85 (t, J=6.9Hz 3H)

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ (ppm), 174, 47, 32, 30, 29.5, 29, 28, 25, 23, 4.

HRMS m/z calc. para C₁₆H₃₀O₂ ([M+H]⁺): 254.2145

- Síntesis del 1-Palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC) (**20**):



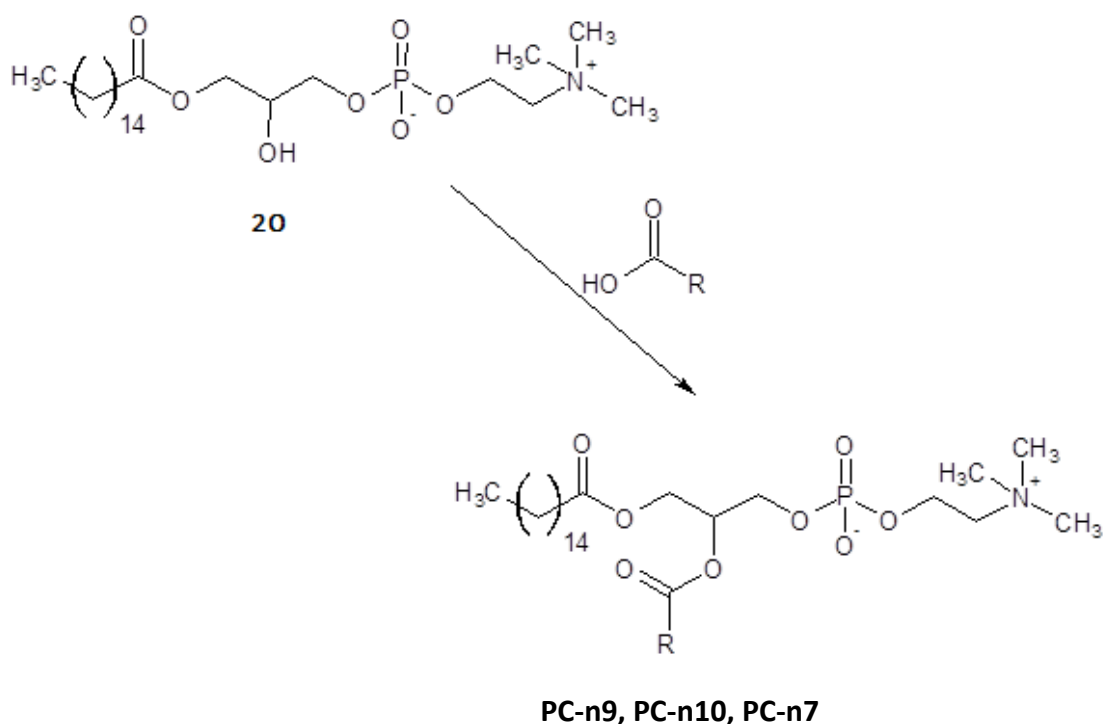
En 40 mL de isopropanol se suspenden la GPC **18** (1g, 3.9mmol) y el DBTO (1.1g, 3.9mmol), y se pone a reflujo durante 1h. Pasado el tiempo, se deja que la reacción alcance temperatura ambiente y se añade la TEA (0.65mL, 4.7mmol) y el cloruro de ácido **17** (1.28g, 4.7mmol), y se deja en agitación durante 30 min. Se hace un seguimiento de la reacción por TLC empleando como eluyente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65/25/4 ($r_f=0.3$). Pasado el tiempo, la reacción se junta con 40 mL de agua y se extrae con heptano (3x40mL). La fase acuosa se concentra y se procede a la separación cromatográfica por columna en el eluyente previo. Se concentra la fracción de interés y se obtiene un precipitado blanco **20**.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ (ppm), 4.3 (m, 2H), 4.15 (m, 2H), 3.95 (m, 1H), 3.9 (m, 2H), 3.6 (m, 2H), 3.2 (s, 9H), 2.35 (t, $J=7.5\text{Hz}$ 2H), 1.6 (m, 2H), 1.3 (m, 22H), 0.9 (t, $J=6.8\text{Hz}$ 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ (ppm), 173.8, 38.5, 67, 66, 65, 59.5, 54, 34, 32, 29.3, 25, 22.5, 14.

HRMS m/z calc. para $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 496.51

8.5 Síntesis fosfolípido final (PC-n9, PC-n10, PC-n7):



Disolvemos en un matraz topacio el 2-lyso-16-PC **20** (0.25g, 0.49mmol), el FA (n-9, n-10 o n-7) en cuestión (0.5g, 1.96 mmol) y la DMAP (0.12g, 0.98 mmol) en 14 mL de CH₂Cl₂ anhidro. Preparamos una disolución de DCC (0.404g, 1.96mmol) en 2 mL de CH₂Cl₂ anhidro. Juntamos las disoluciones en atmósfera inerte y ponemos la reacción en baño de ultrasonidos a reflujo durante 6-8h. Pasado el tiempo, se añaden 20 ml de CH₂Cl₂ y se extrae con (2x20 mL) de KHSO₄ saturado y 20 mL de NaHCO₃ saturado. La fase orgánica se seca con MgSO₄ y se procede a la separación por columna en CHCl₃/MeOH/H₂O 65/25/4 (rf=0.6) como eluyente.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ (ppm), 5.3 (m, 2H), 5.2 (m, 1H), 4.4 (dd, J=12Hz, 3Hz, 1H), 4.25 (d, J=2.4Hz 2H), 4.15 (dd, J=12Hz, 7Hz 1H), 3.95 (t, J=6Hz 2H), 3.6 (m, 2H), 3.2 (s, 9H), 2.35 (dt, J=10.5Hz, 7.4Hz 4H), 2 (t, J=11Hz 4H), 1.6 (m, 4H), 1.3 (m, 42H), 0.9 (t, J=7.2Hz 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ (ppm), 174, 173.8, 129.5, 129, 38.5, 67, 66, 65, 59.5, 54, 34, 32, 29.3, 25, 22.5, 14.

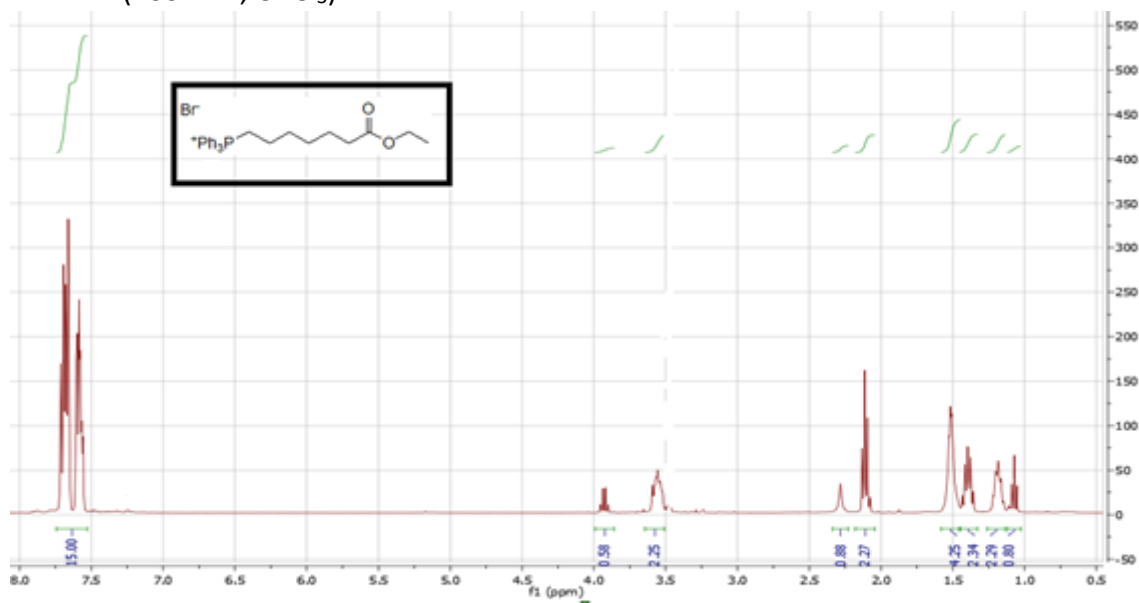
HRMS m/z calc. para C₁₆H₃₀O₂ ([M+H]⁺): 732,5545

9.Anexos

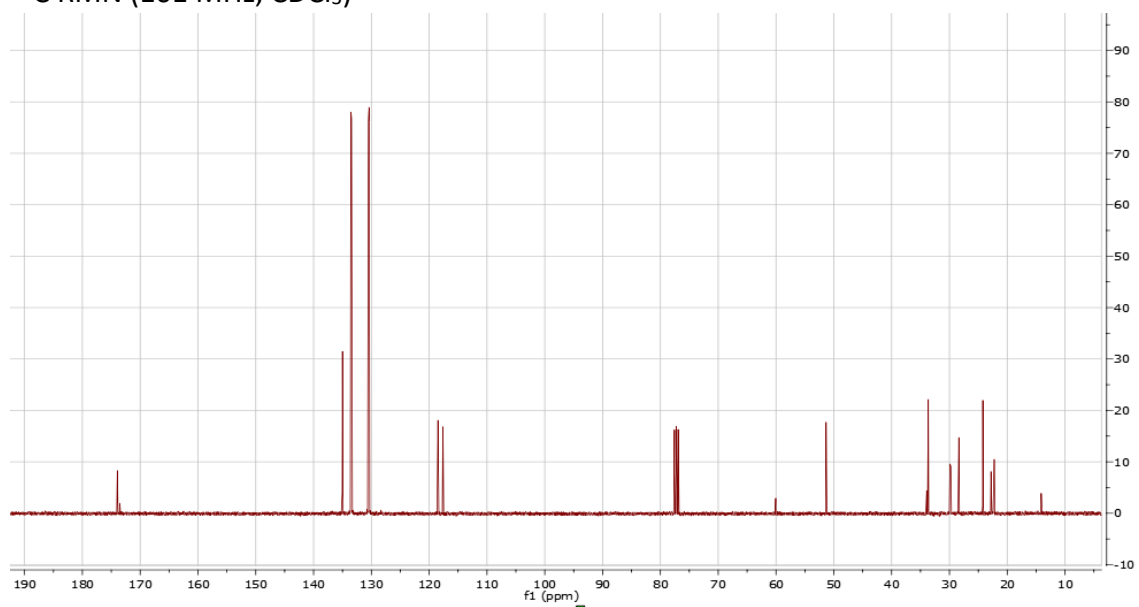
Espectros de ^1H RMN (400MHz), ^{13}C RMN (101 MHz), COSY, HSQCAD, ^{31}P RMN (162 MHz), MS

(7-etoxi-7-oxoheptil)trifenilfosfonio (2)

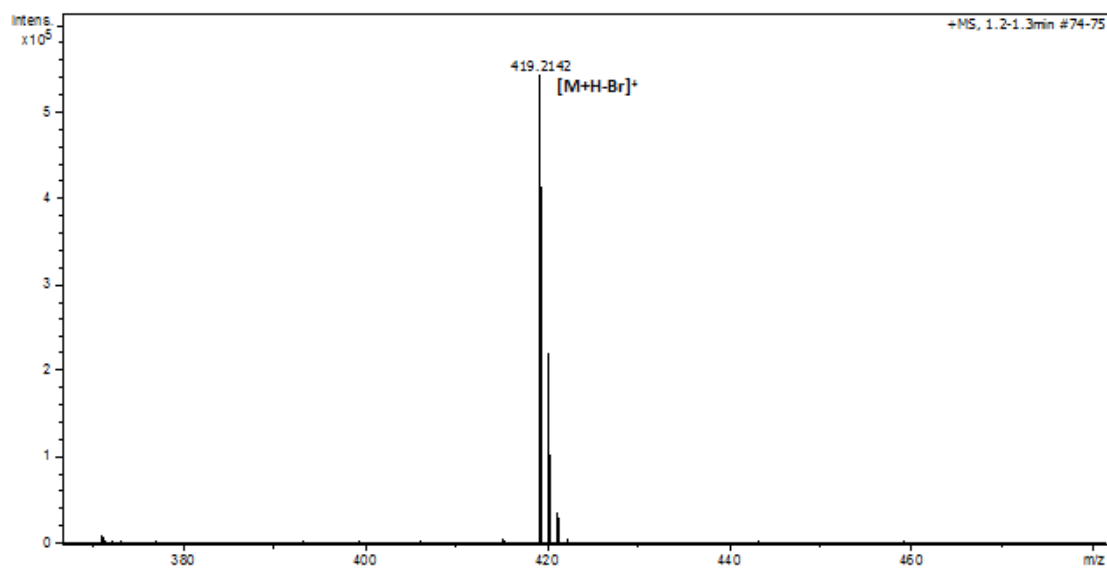
^1H RMN (400MHz, CDCl_3)



^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)



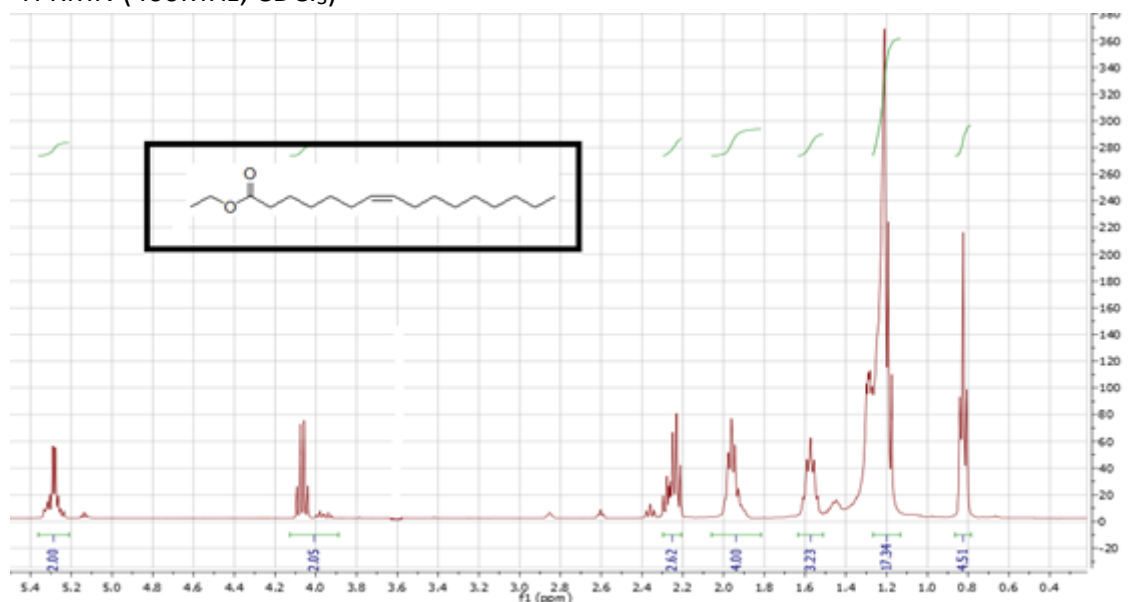
MS



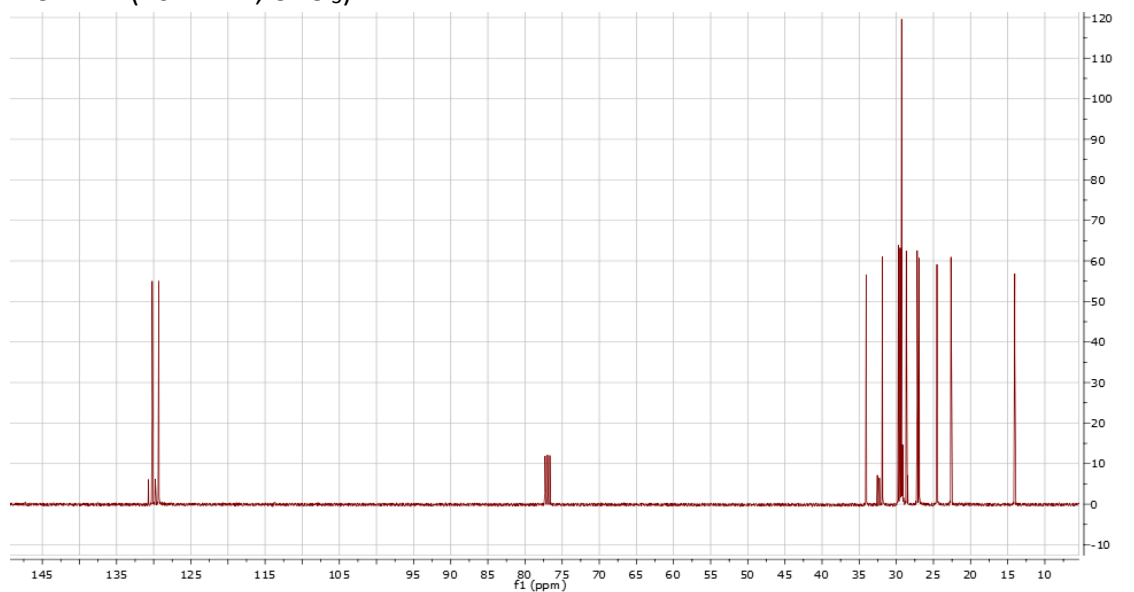
Meas. m/z	m/z	err [ppm]	mSigma	Ion Formula
419,2142	419,2134	-1.8	55.2	C27H32O2P

(Z)-7-hexedecenoato de etilo (3)

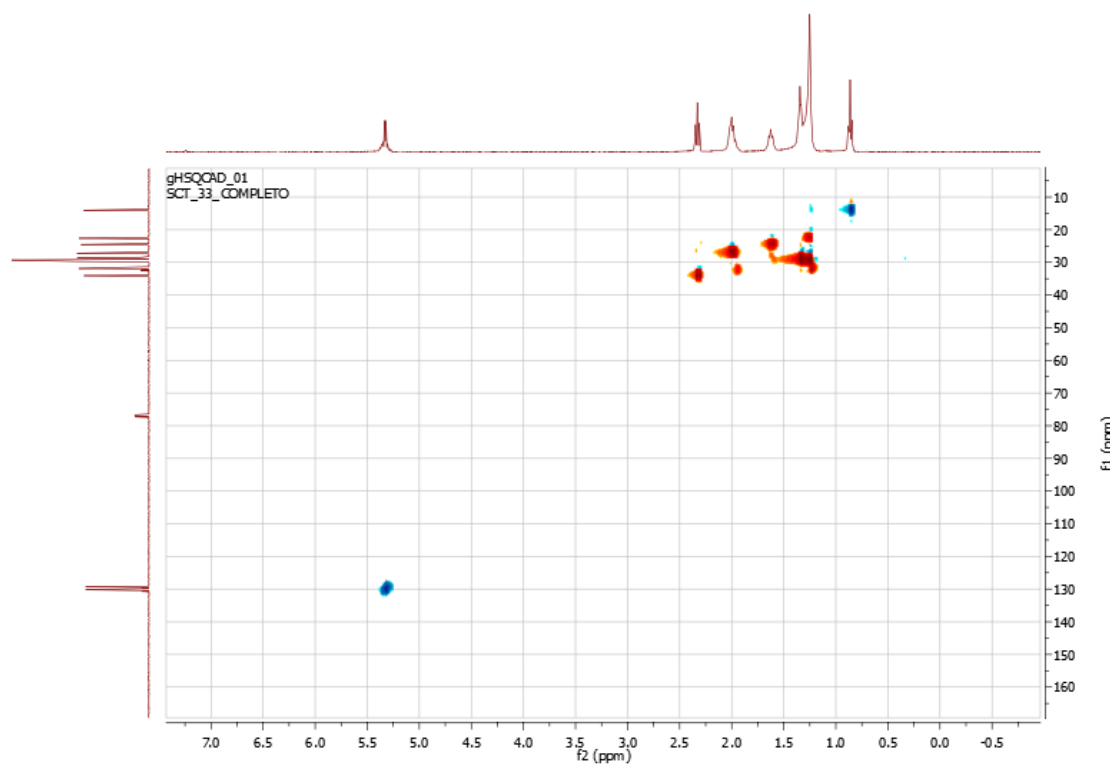
¹H RMN (400MHz, CDCl₃)



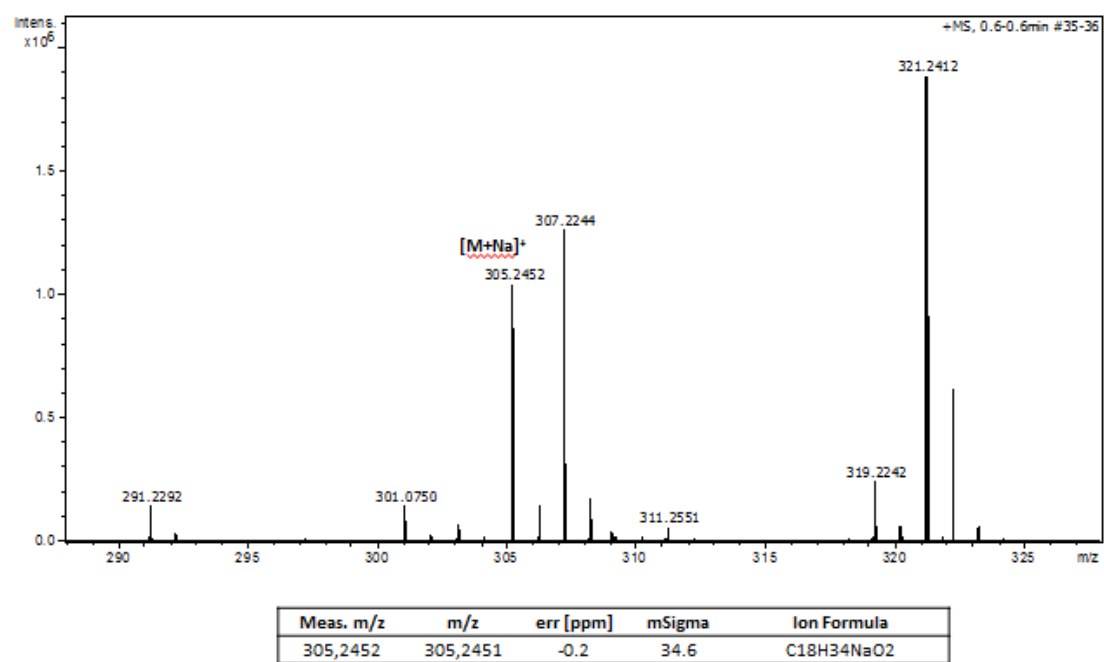
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)



HSQCAD

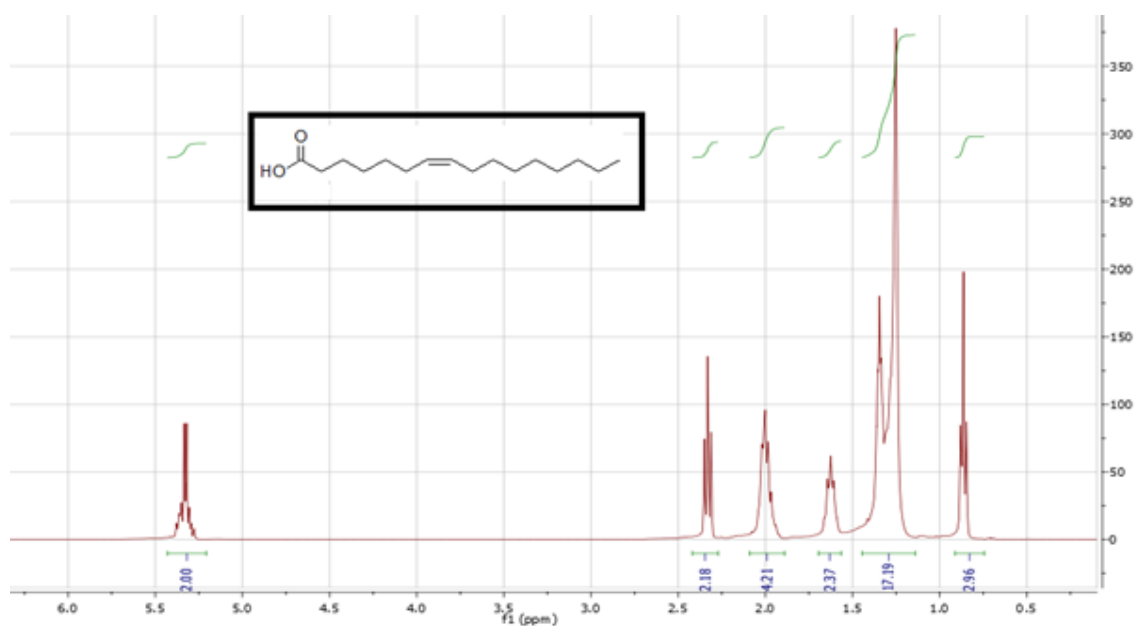


MS

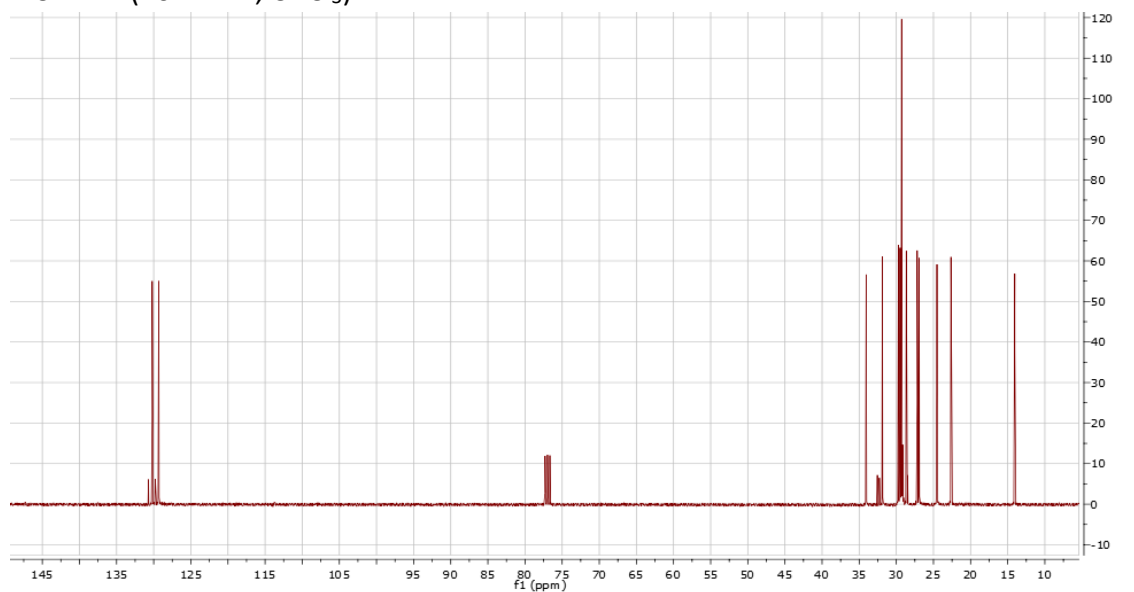


Ácido (Z)-7-hexadecenoico (4)

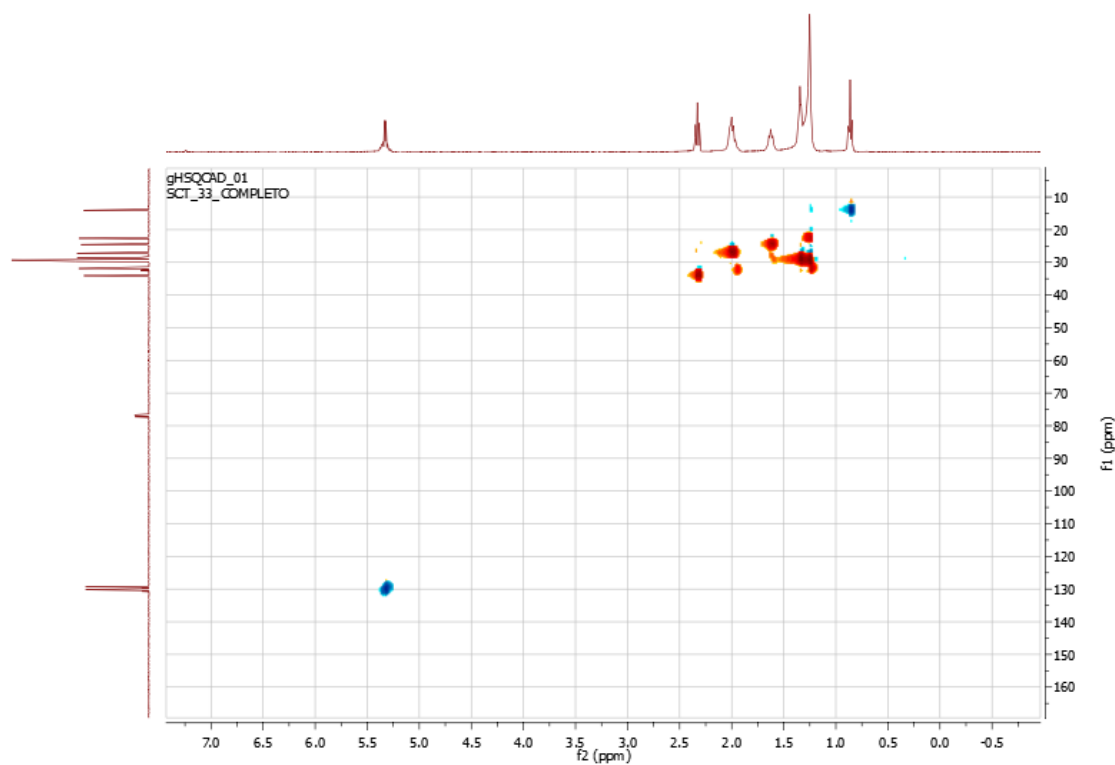
¹H RMN (400MHz, CDCl₃)



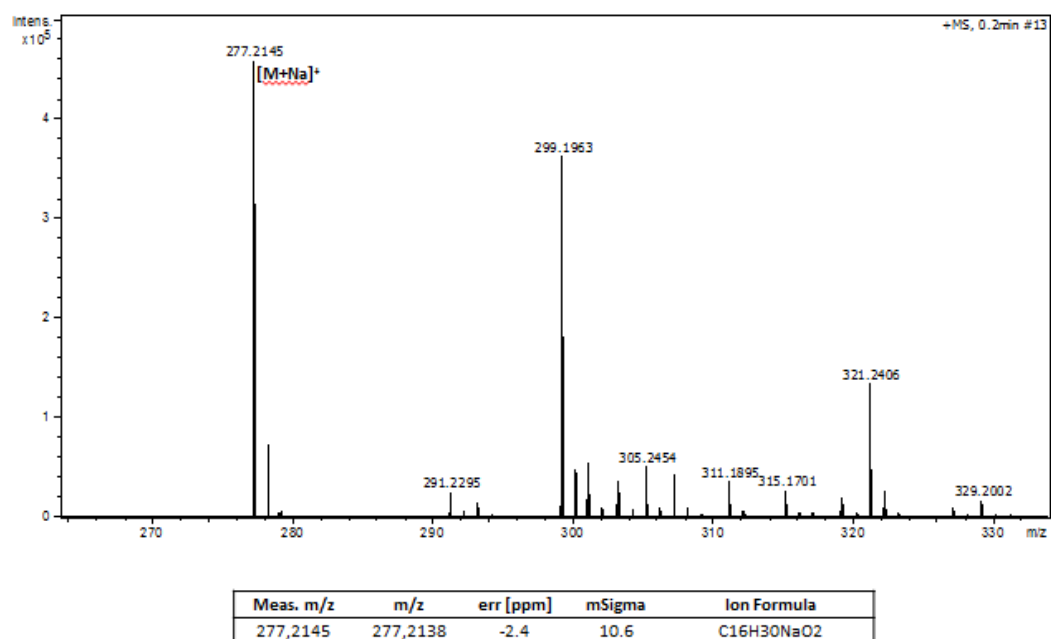
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)



HSQCAD

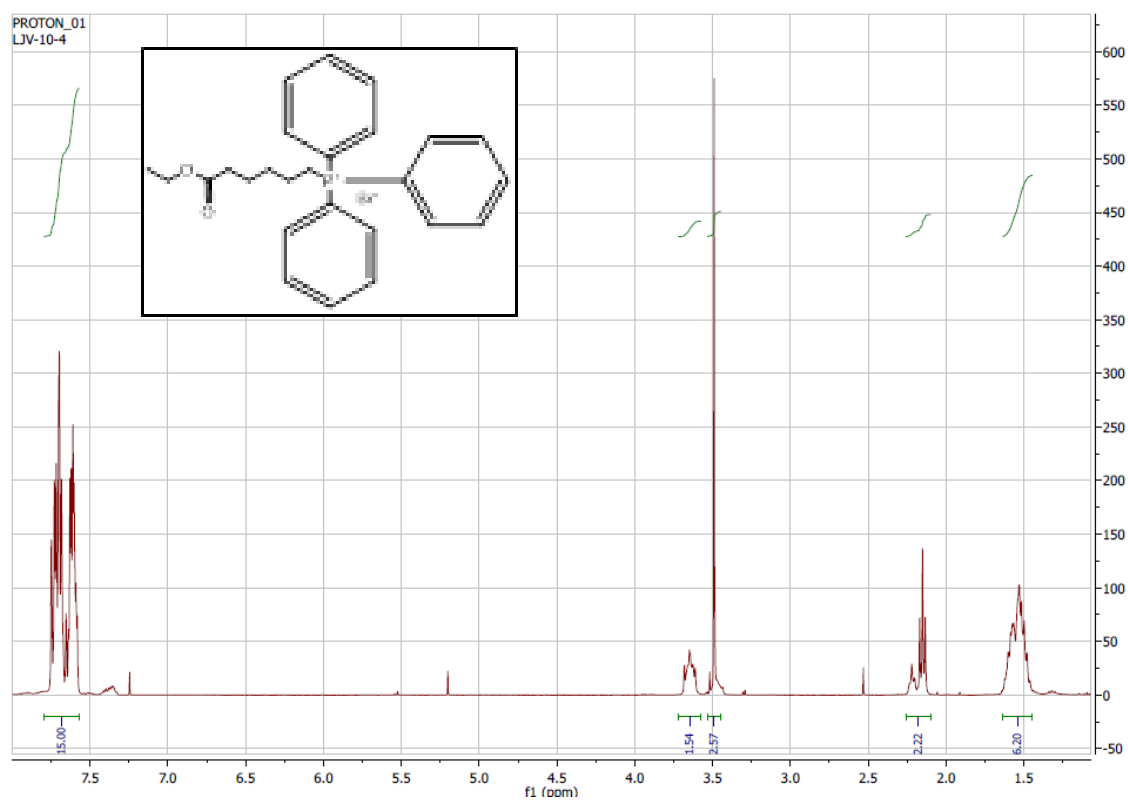


MS

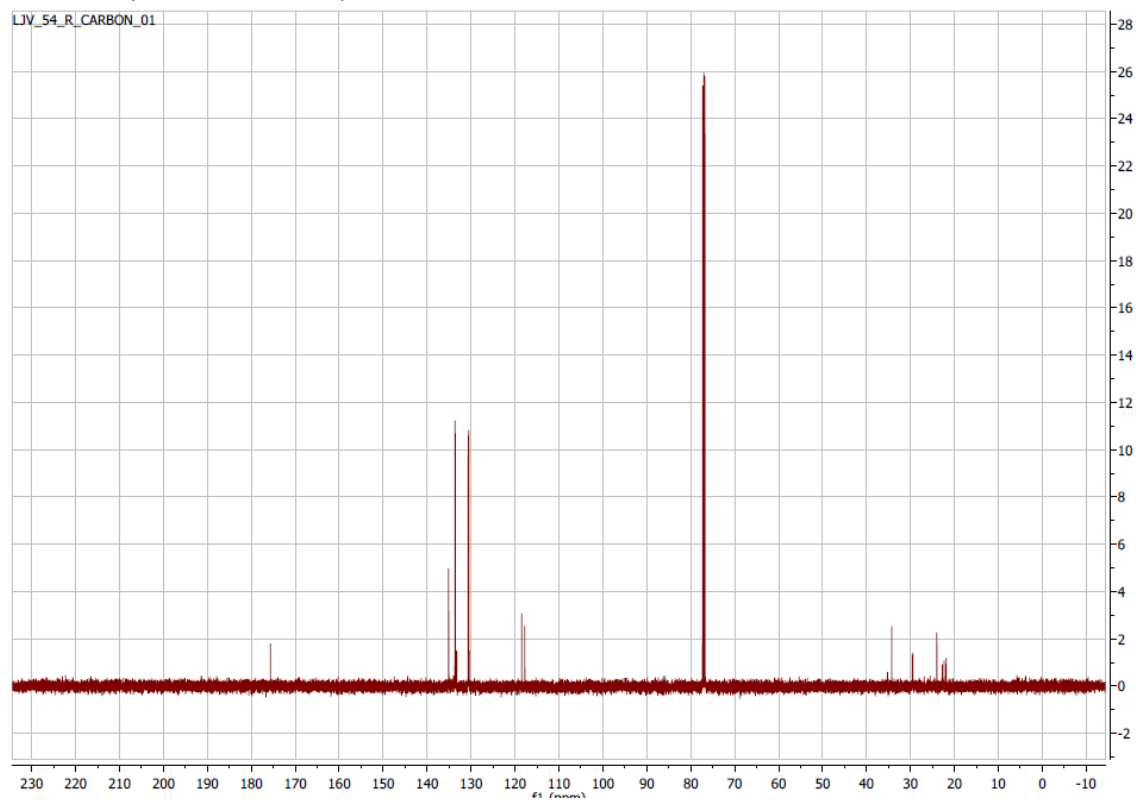


(6-metoxi-6-oxohexil)trifenilfosfonio (6)

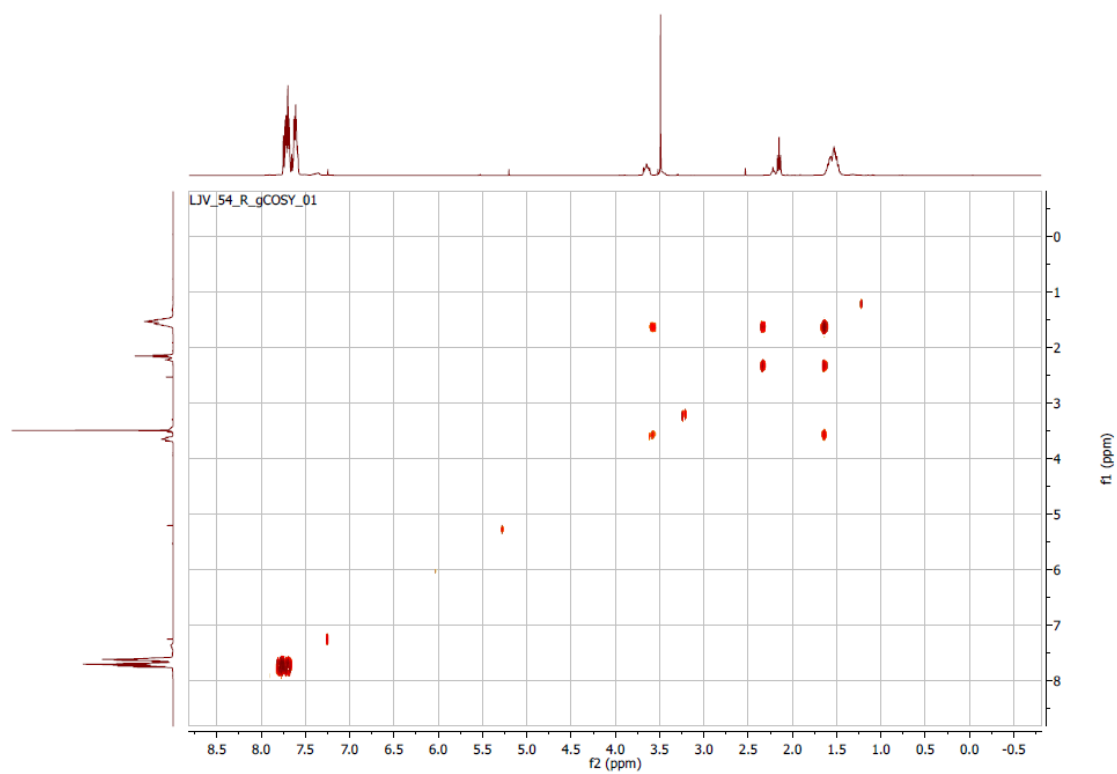
¹H RMN (400MHz, CDCl₃)



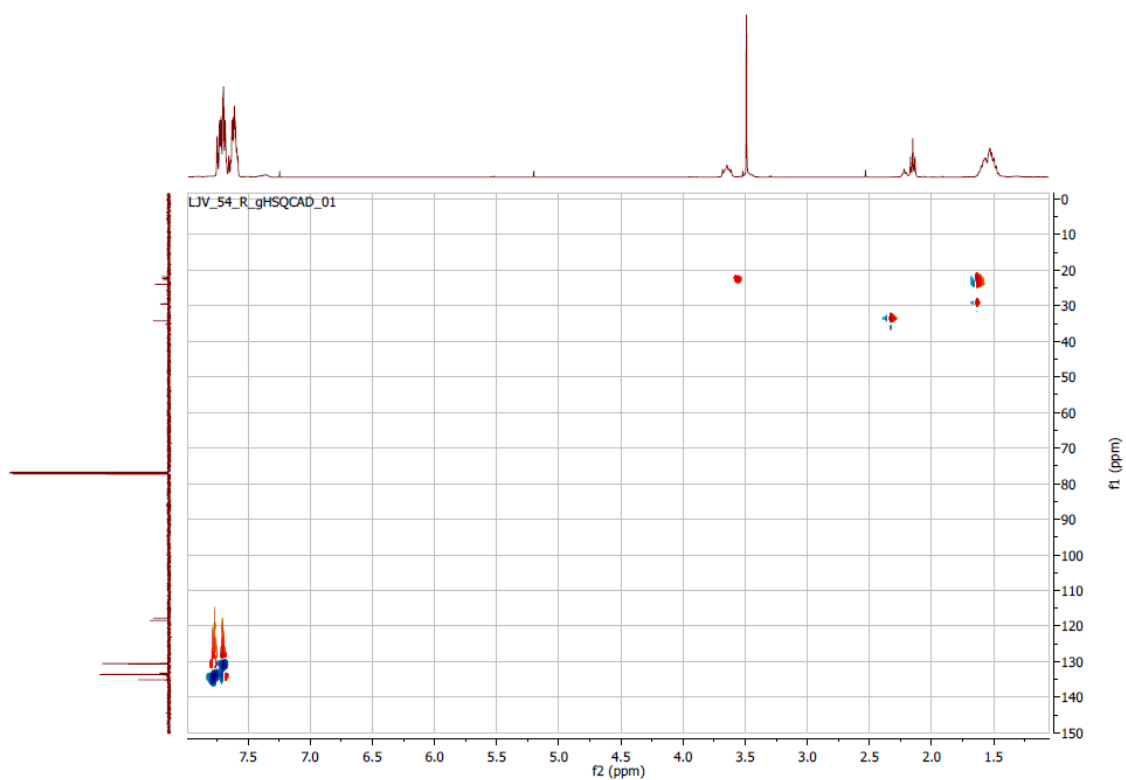
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)



COSY

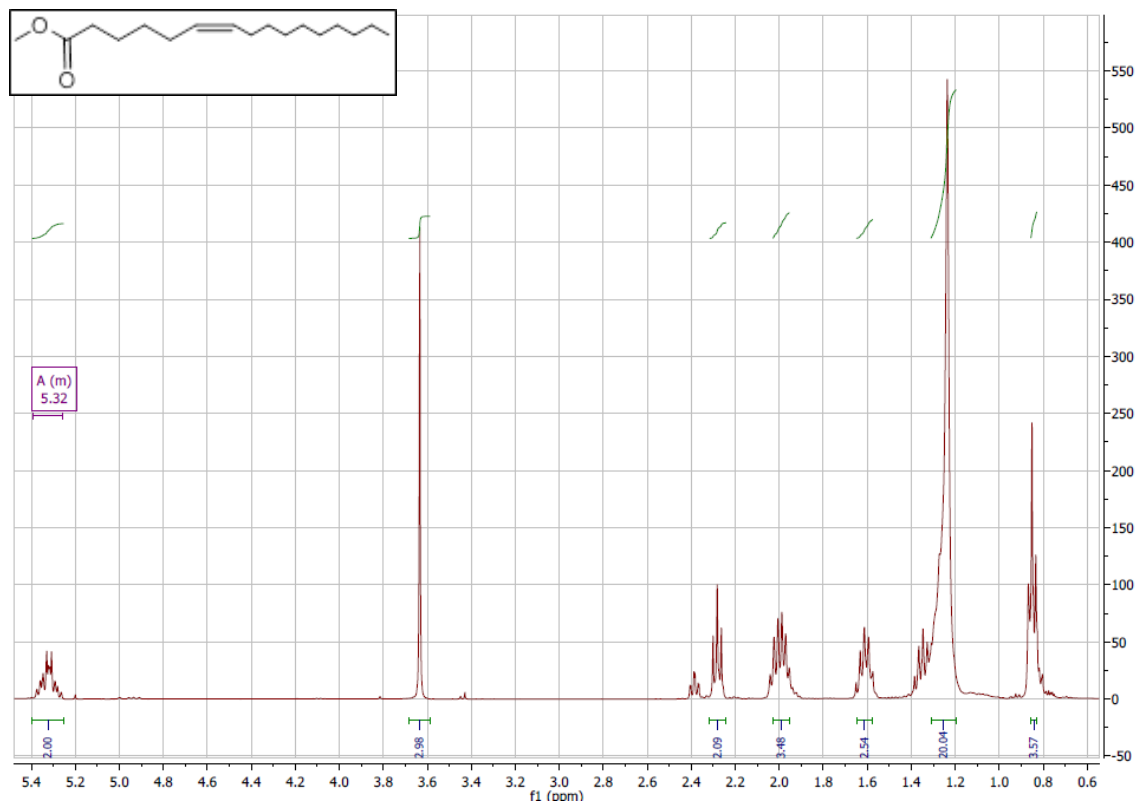


HSQCAD

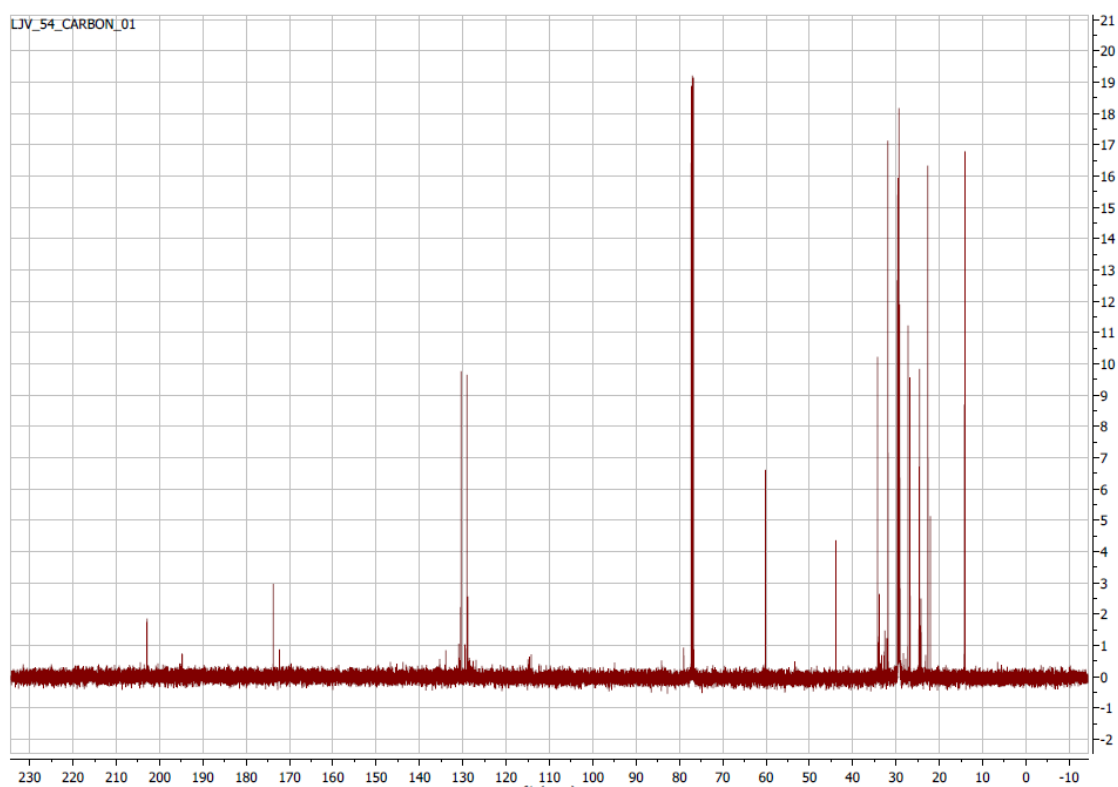


(Z)-6-hexedecenoato de metilo (7)

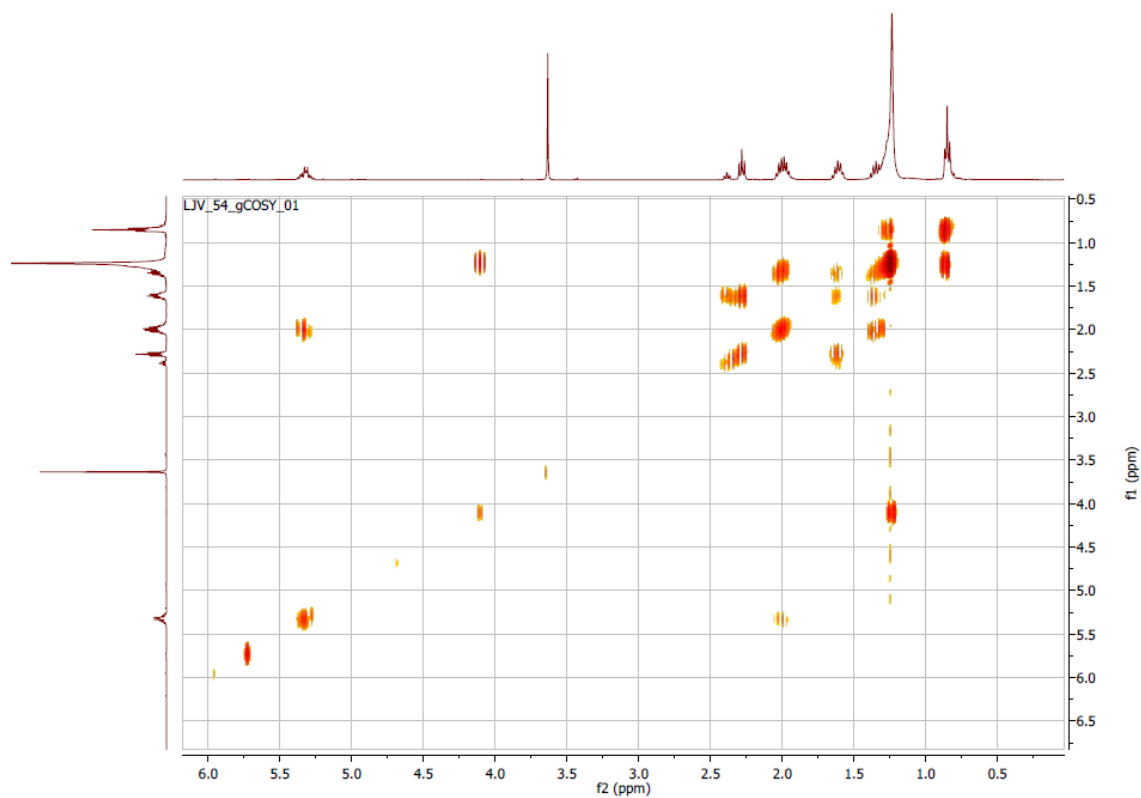
^1H RMN (400MHz, CDCl_3)



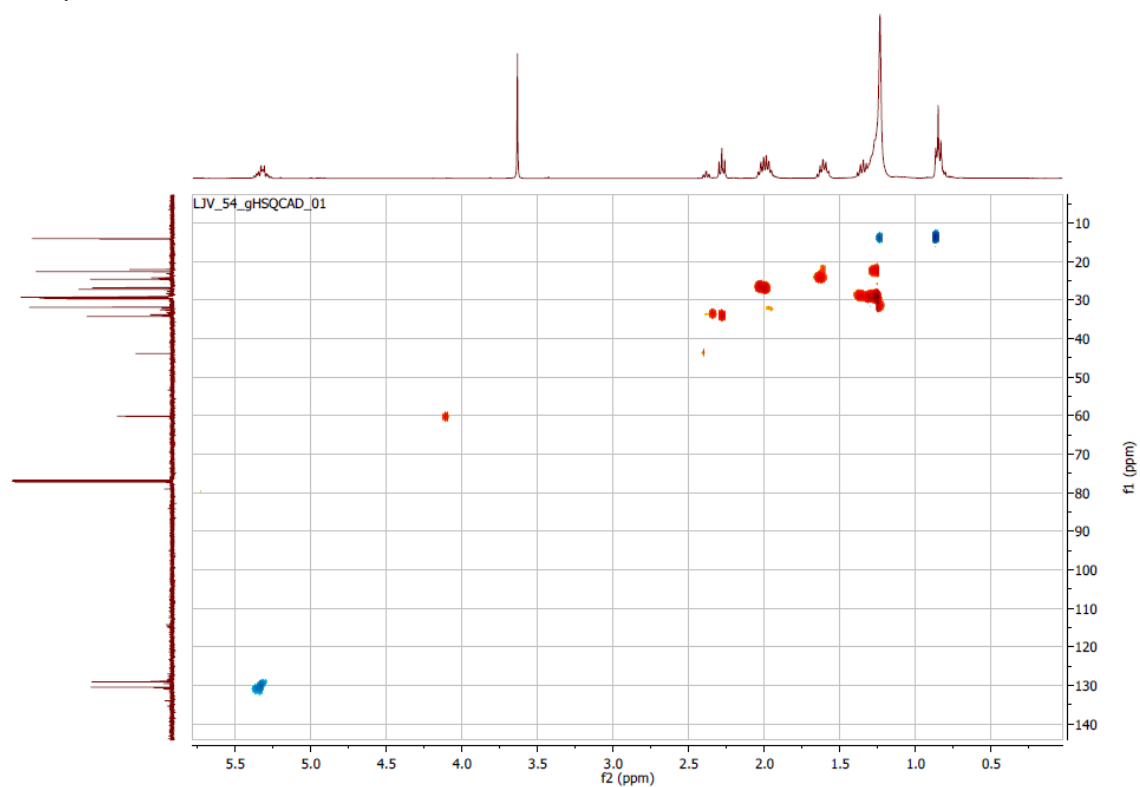
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)



COSY

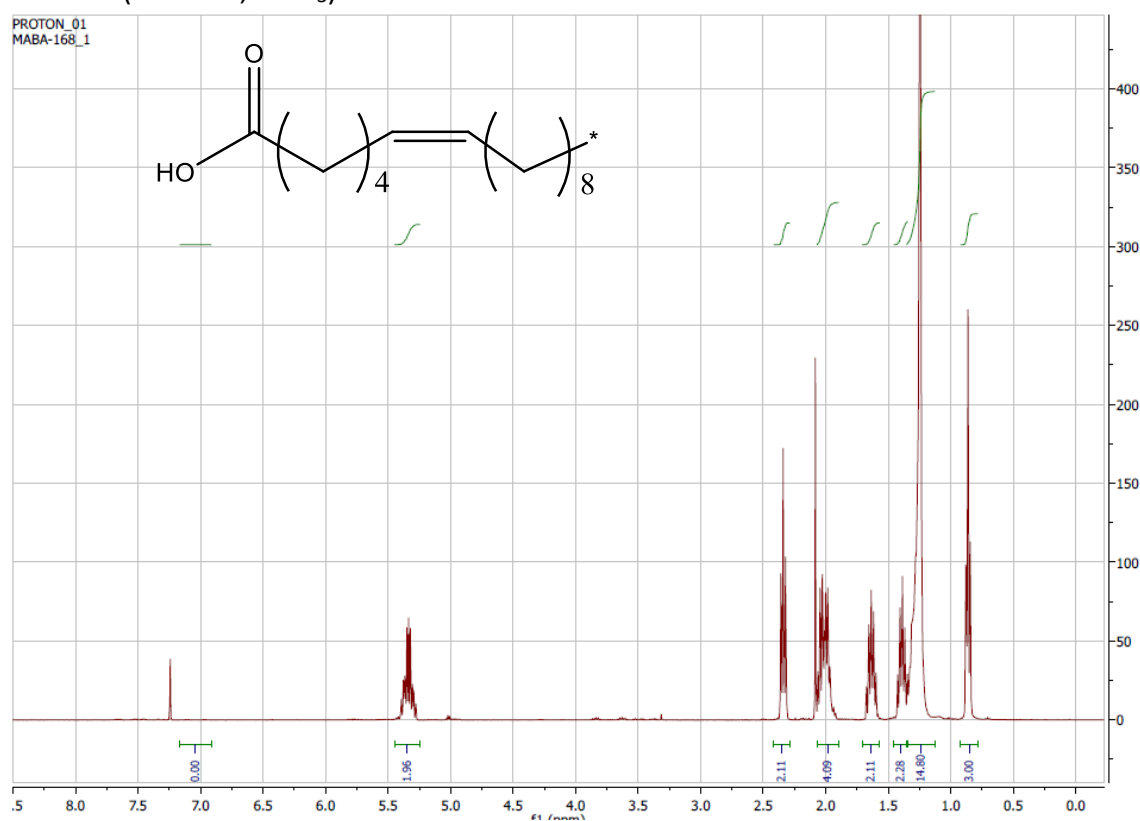


HSQCAD

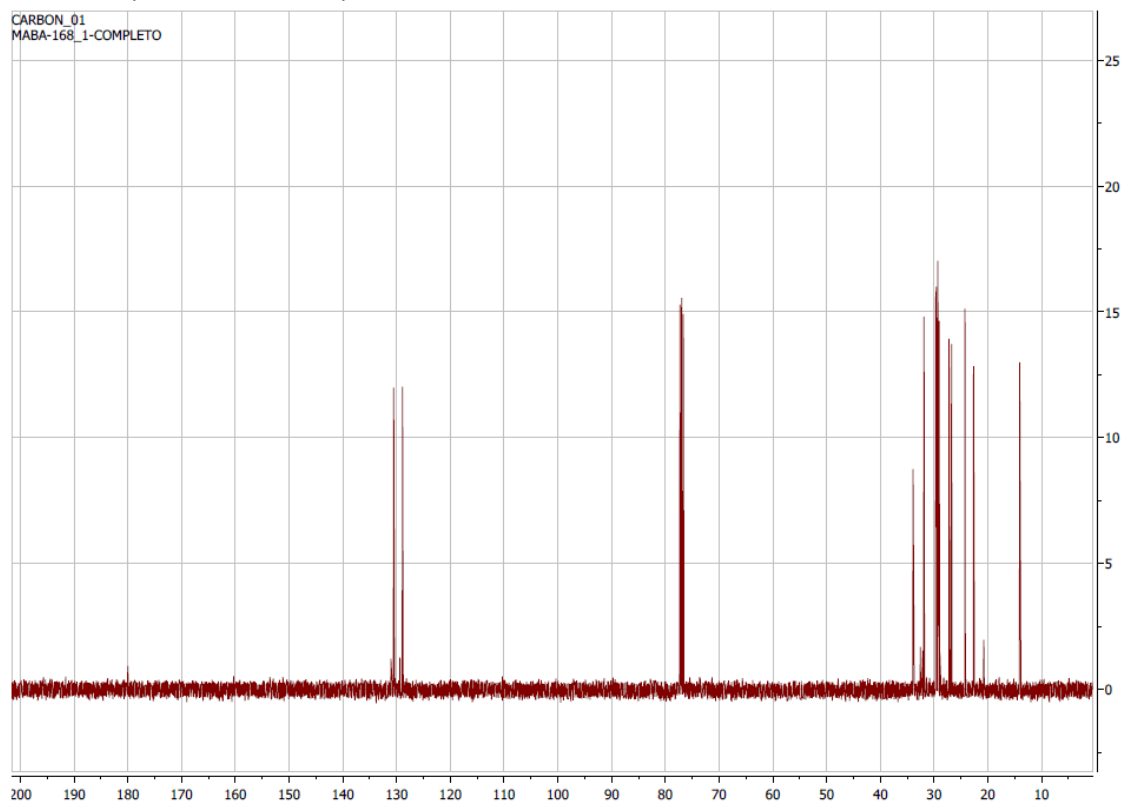


Ácido (Z)-6-hexadecenoico (8)

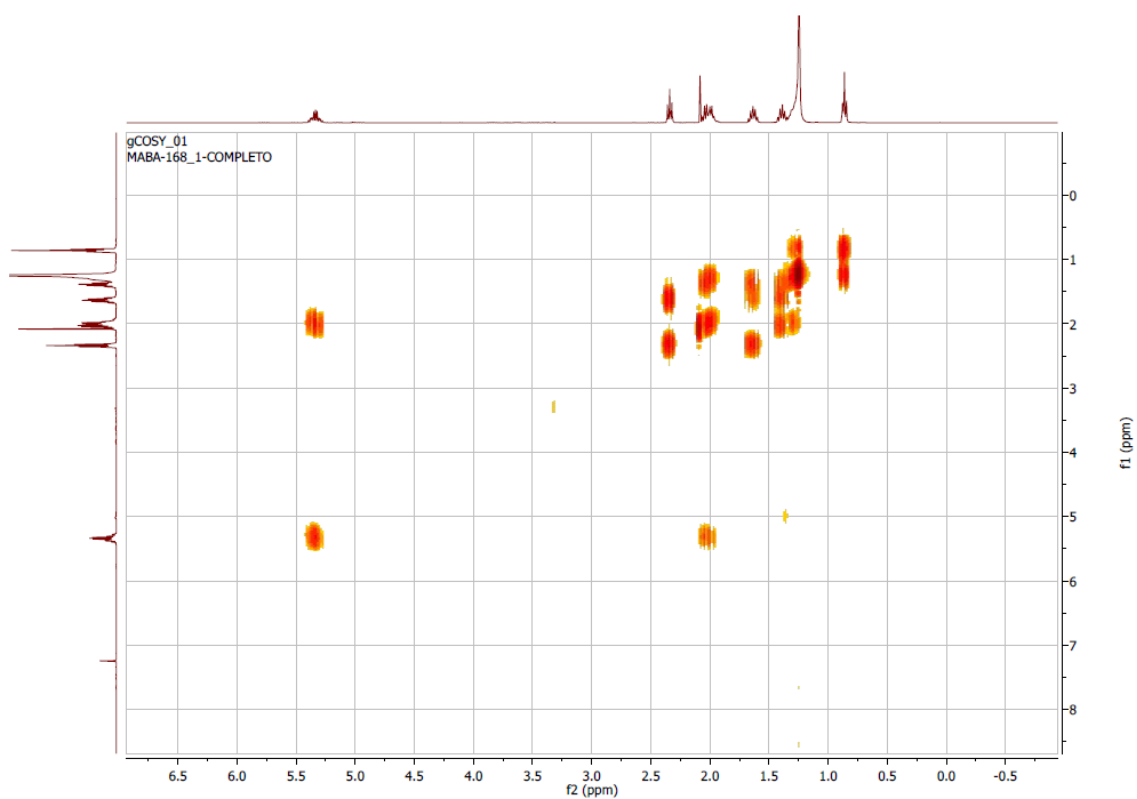
^1H RMN (400MHz, CDCl_3)



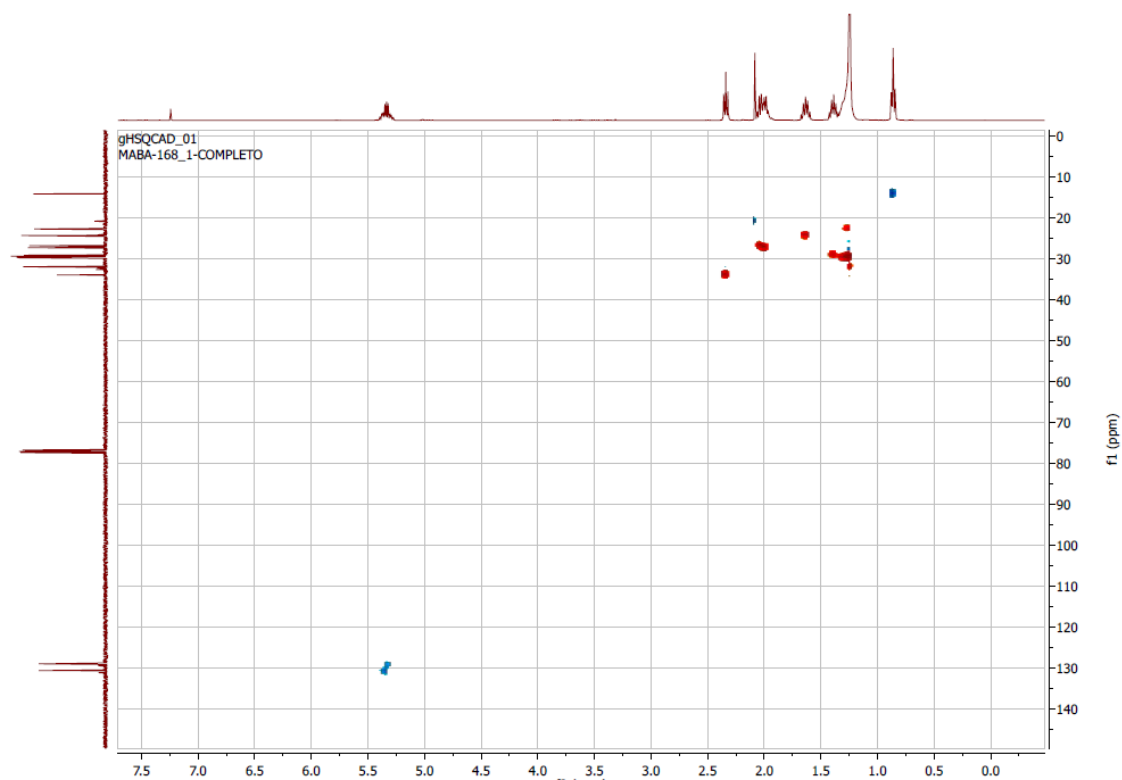
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)



COSY

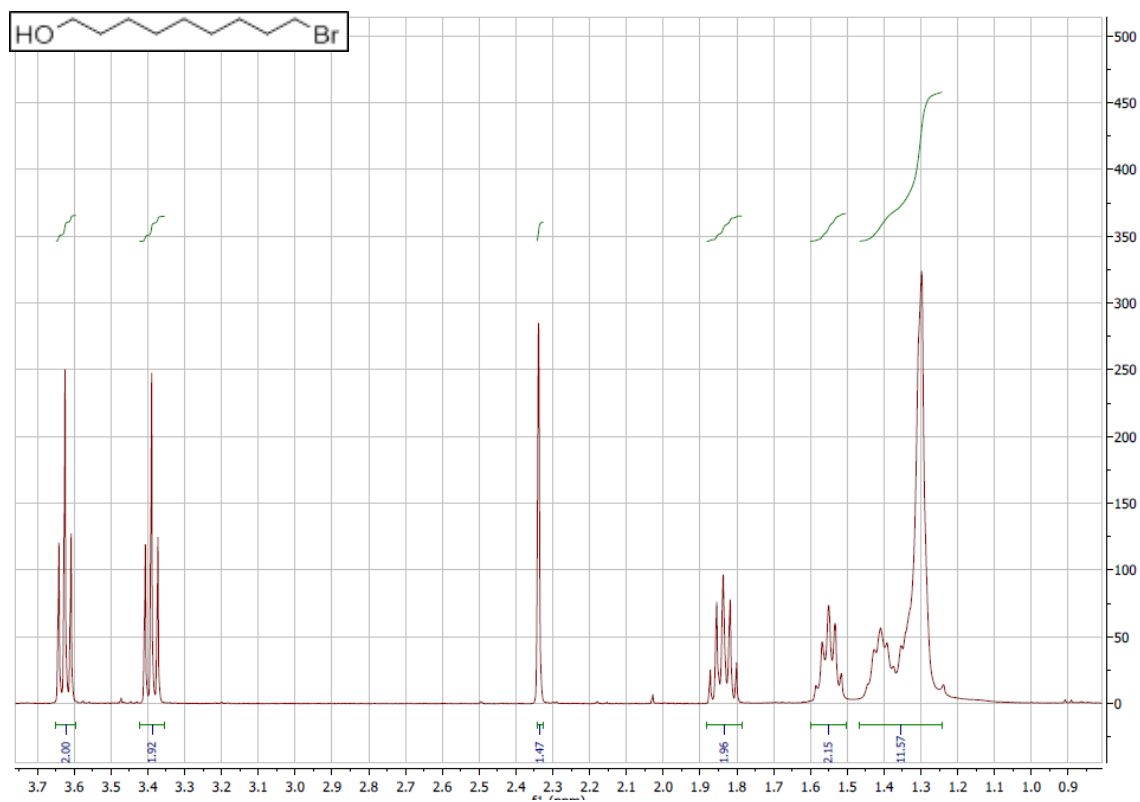


HSQCAD

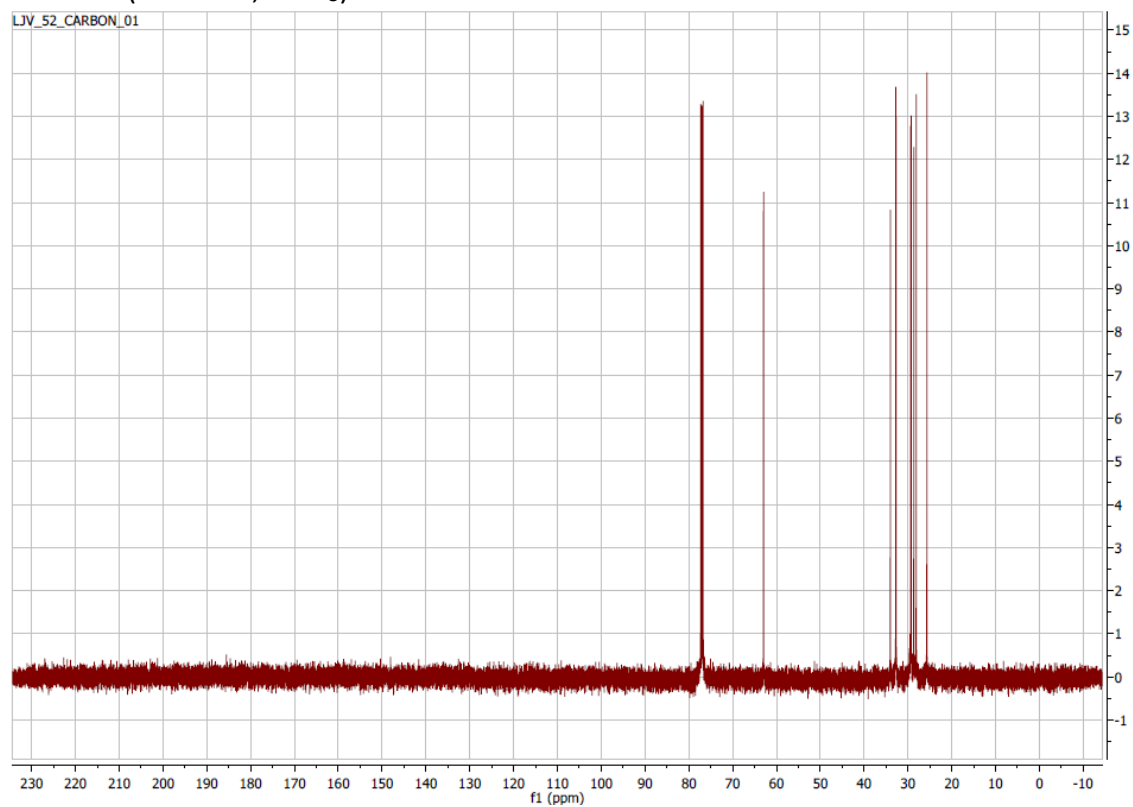


9-bromo-1-nonanol (10)

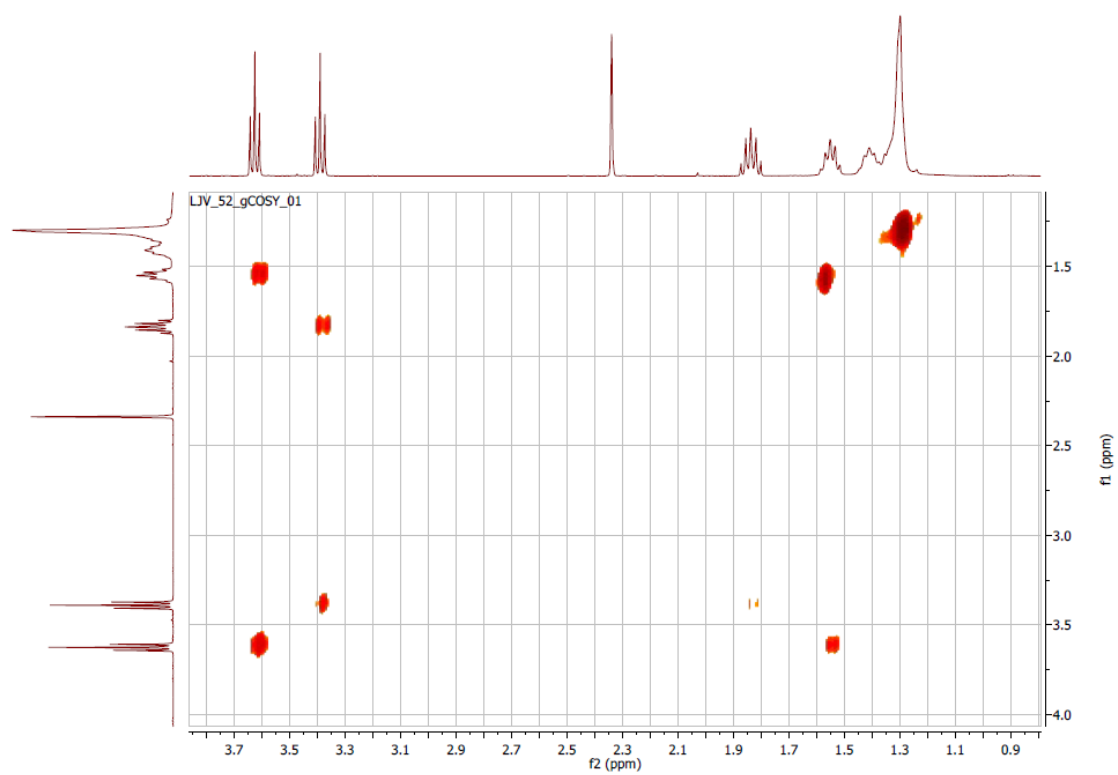
^1H RMN (400MHz, CDCl_3)



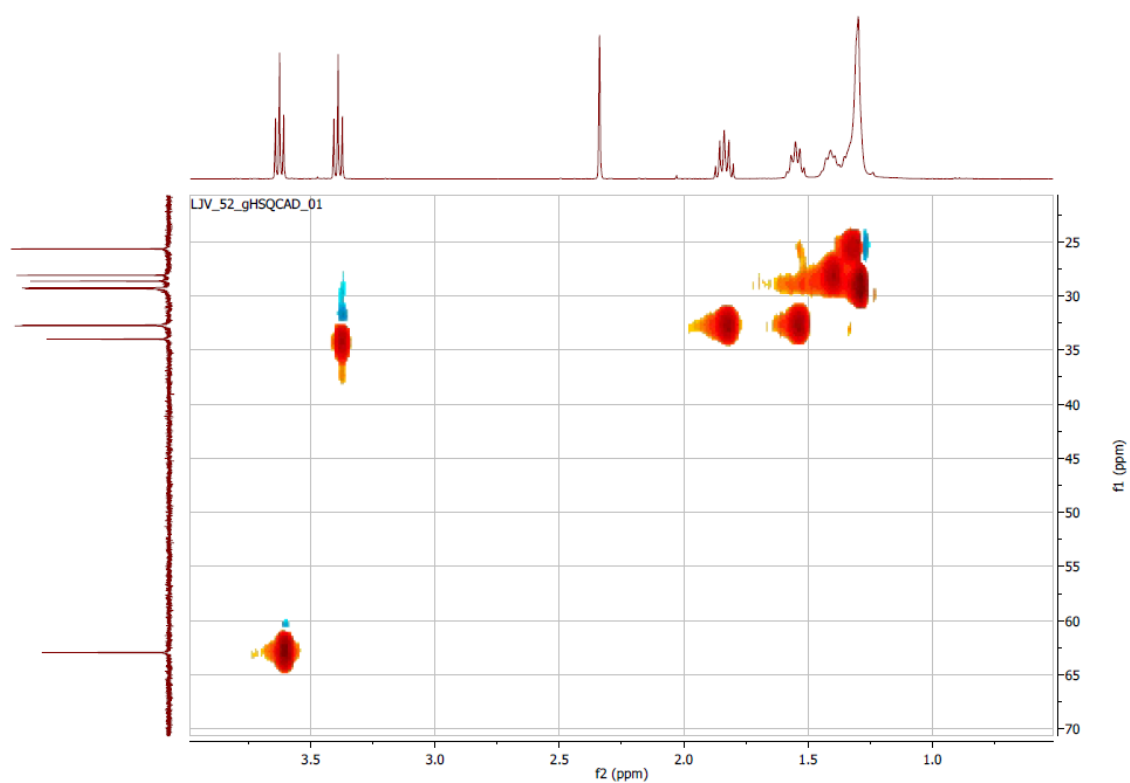
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)



COSY

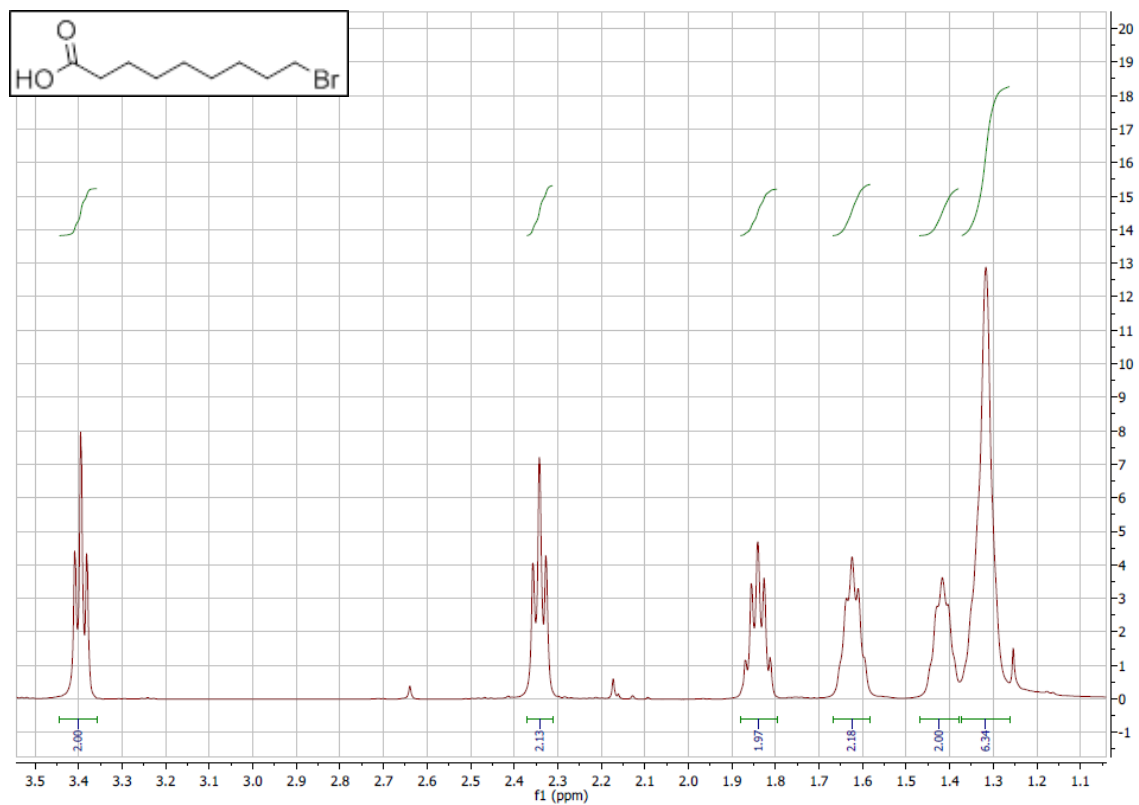


HSQCAD

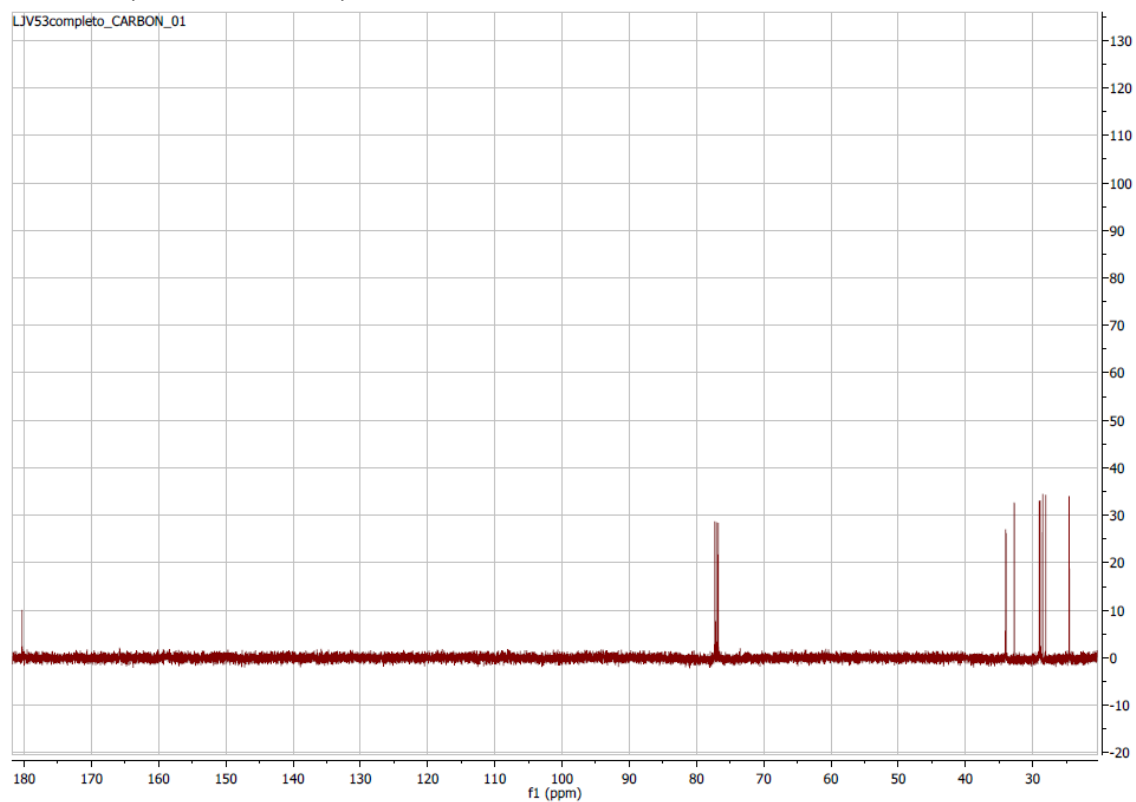


Ácido -9-bormononanoico (11)

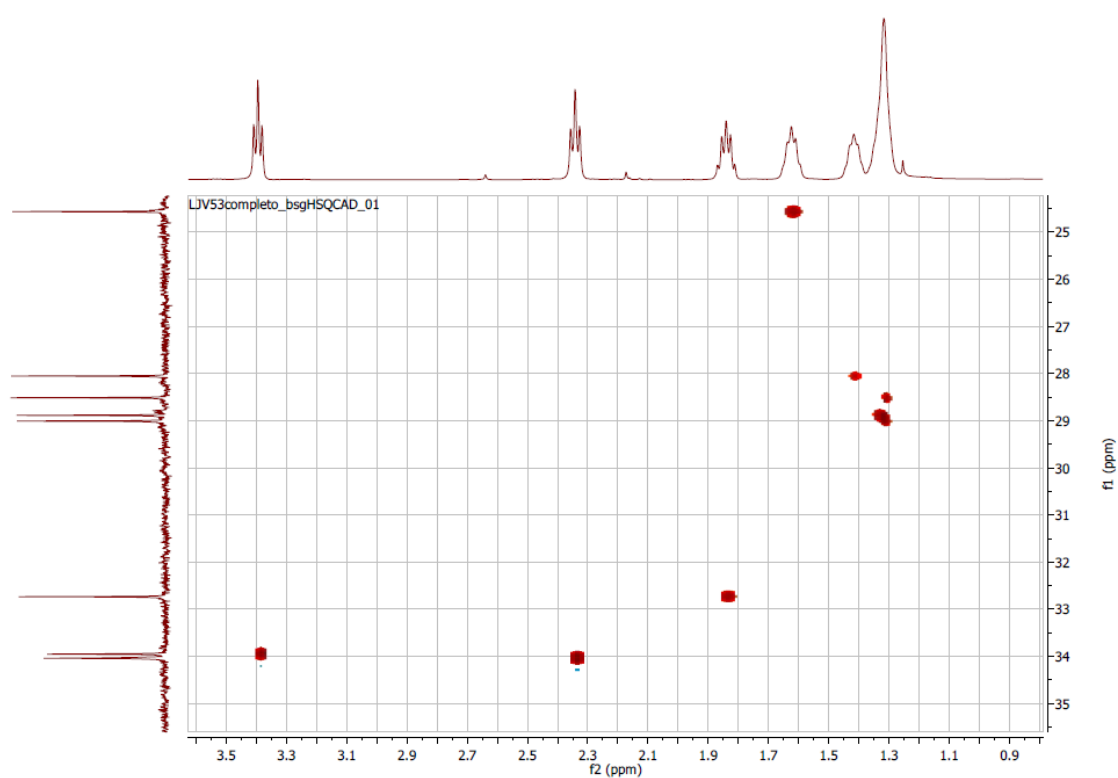
^1H RMN (400MHz, CDCl_3)



^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)

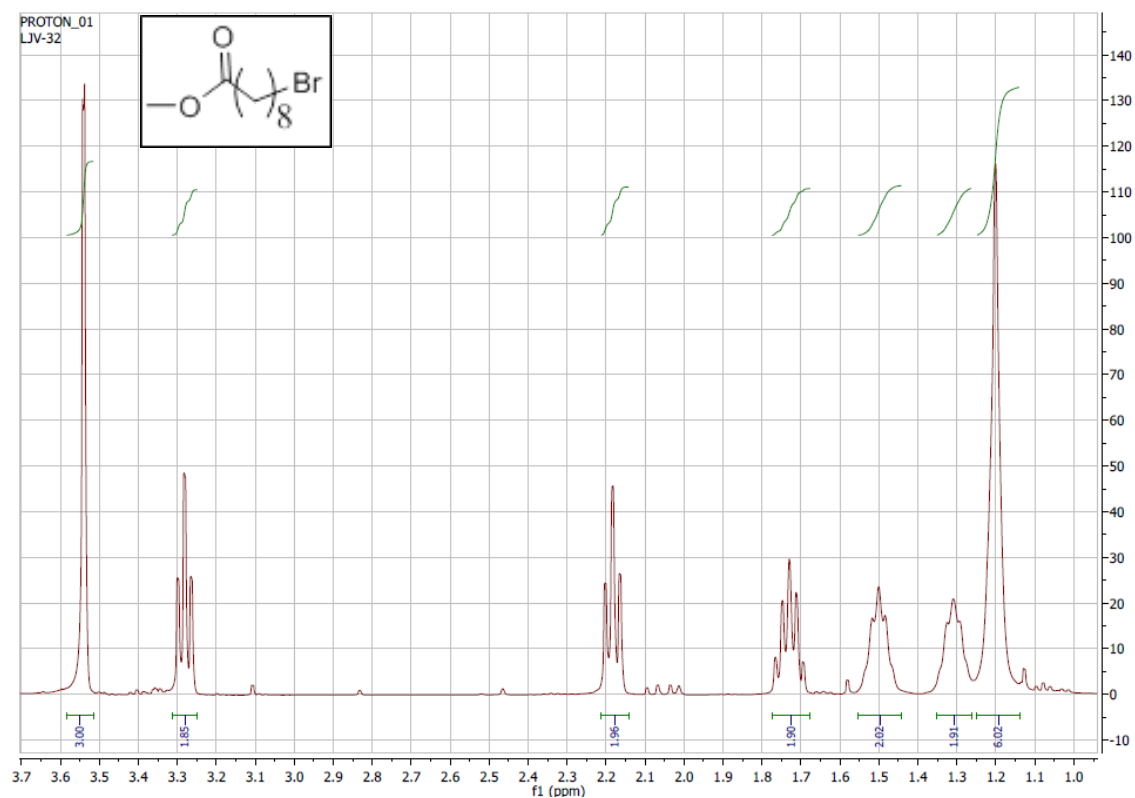


HSQCAD

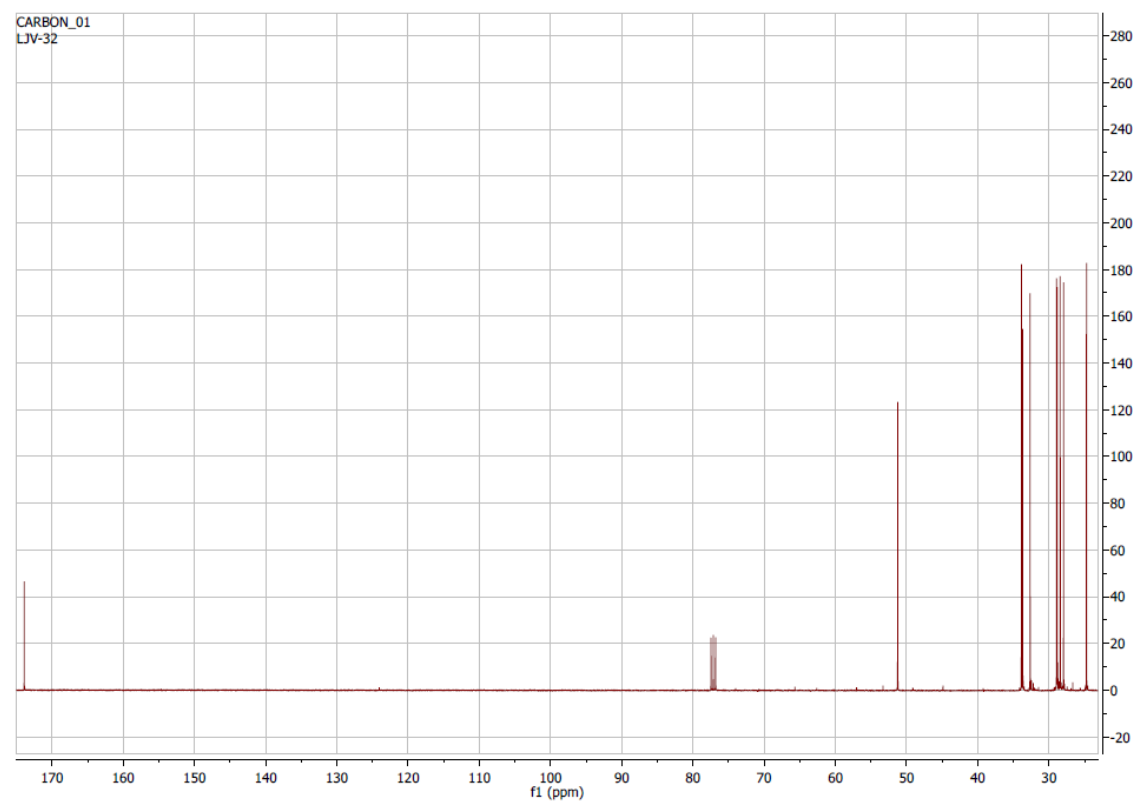


9-bromo-nonanoato de metilo (12)

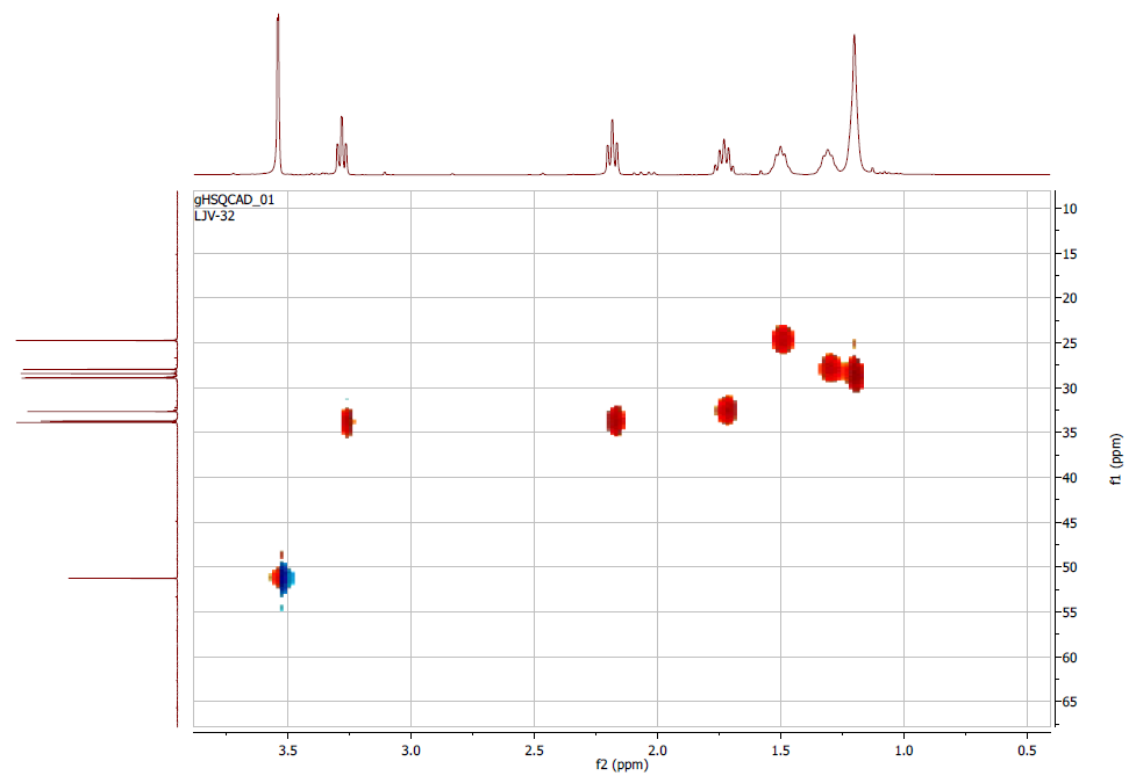
^1H RMN (400MHz, CDCl_3)



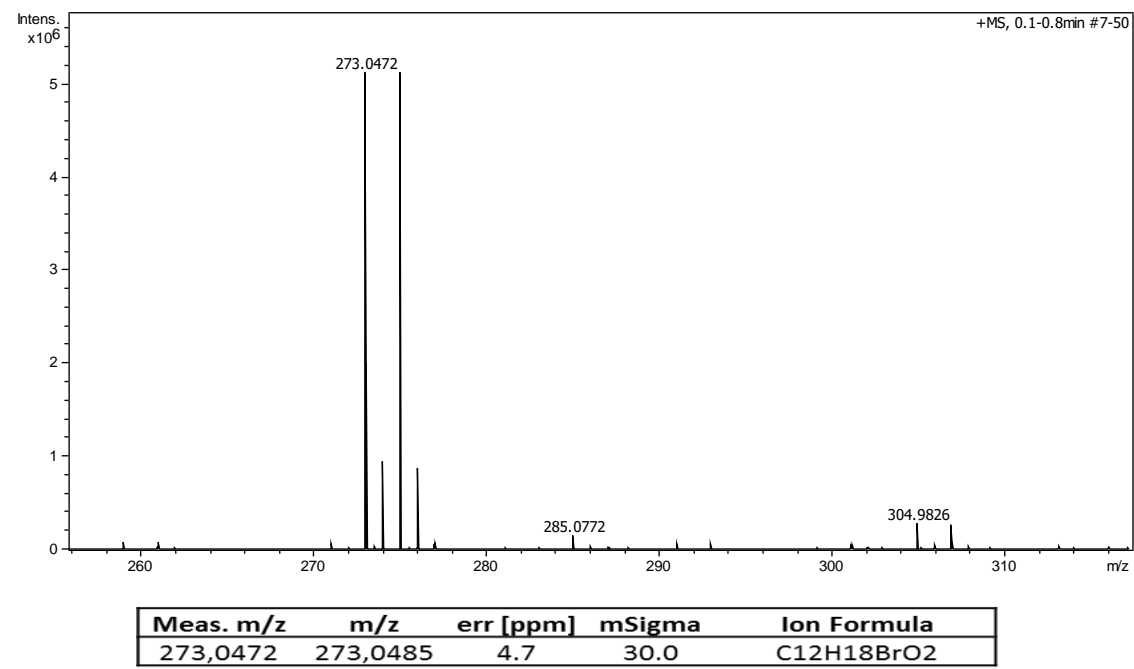
C^{13}NMR



HSQCAD

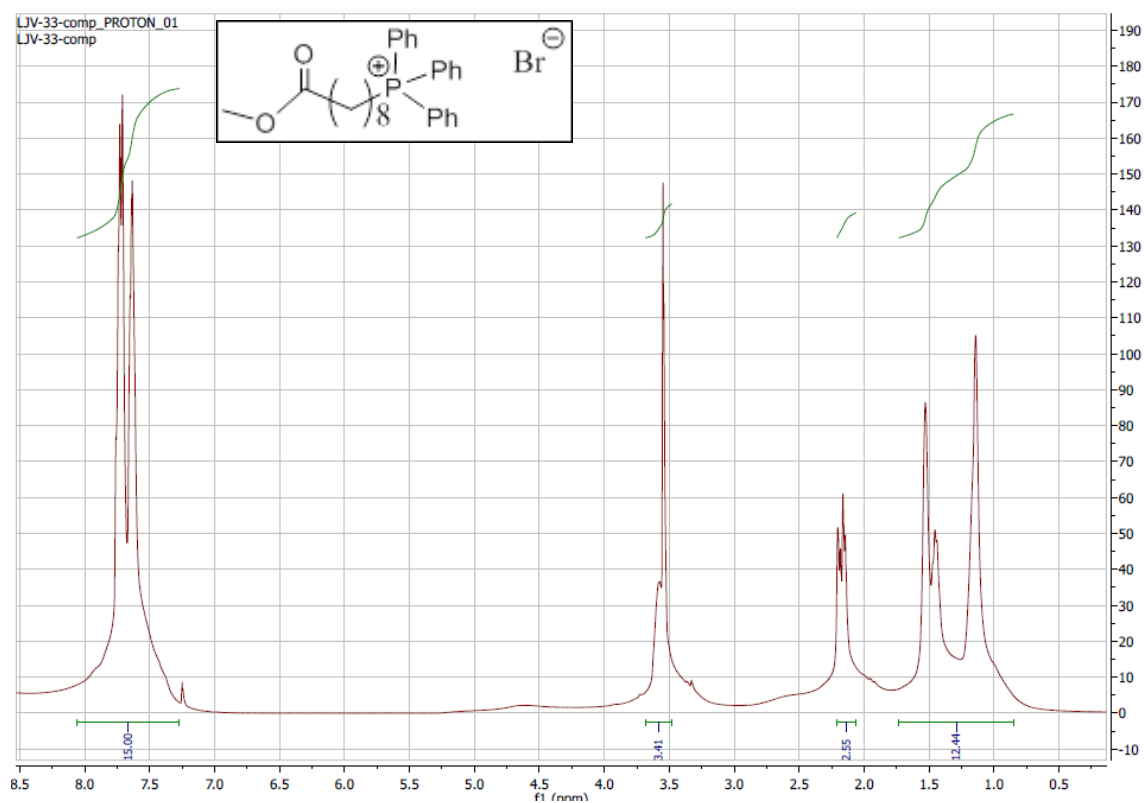


MS

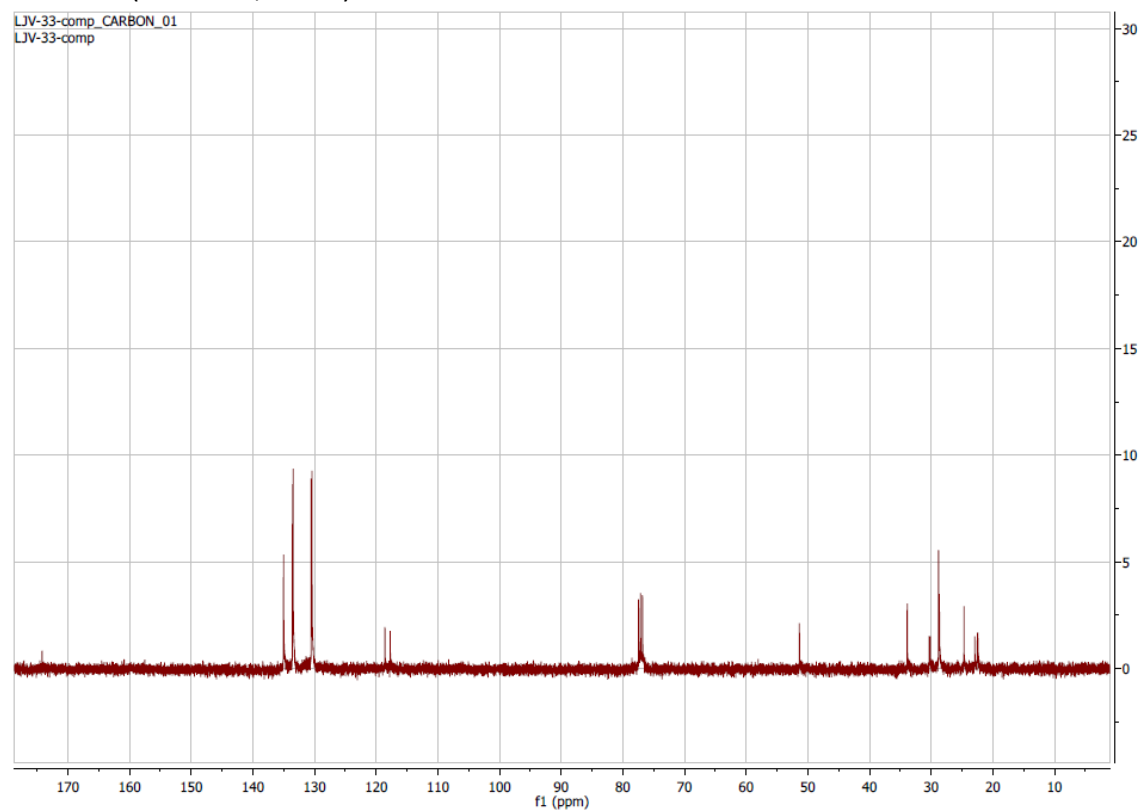


(9-metoxi-9-oxononil)trifenilfosfonio (13)

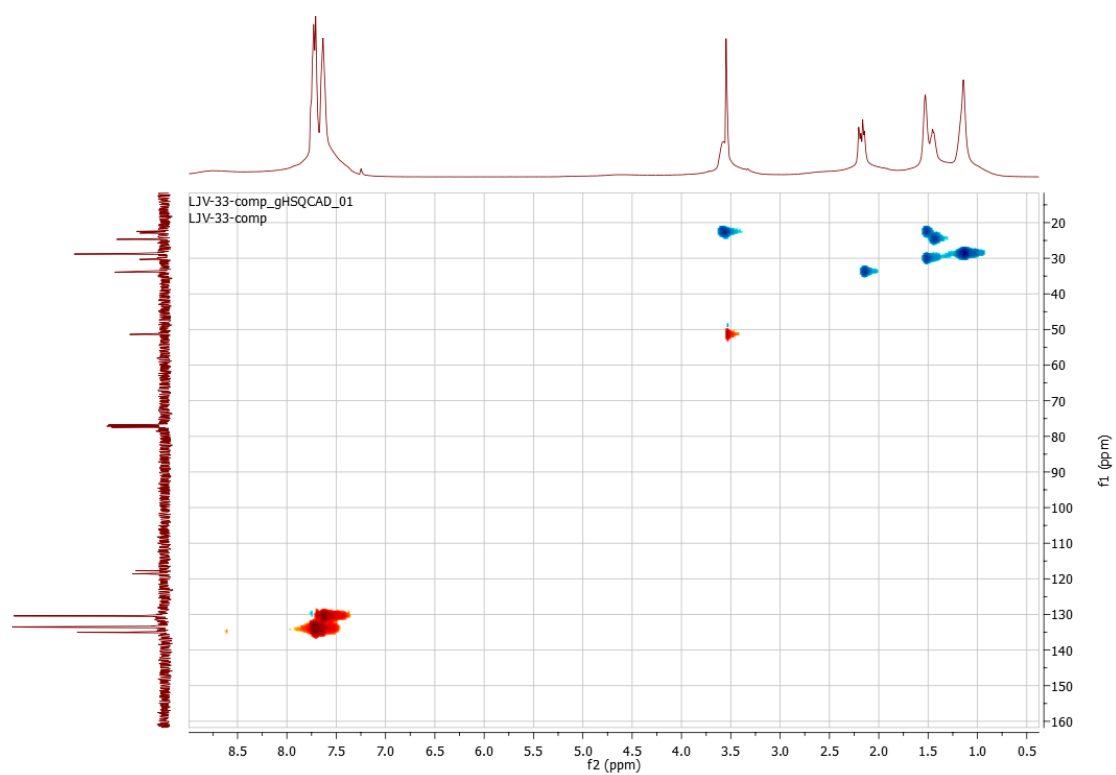
^1H RMN (400MHz, CDCl_3)



^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)

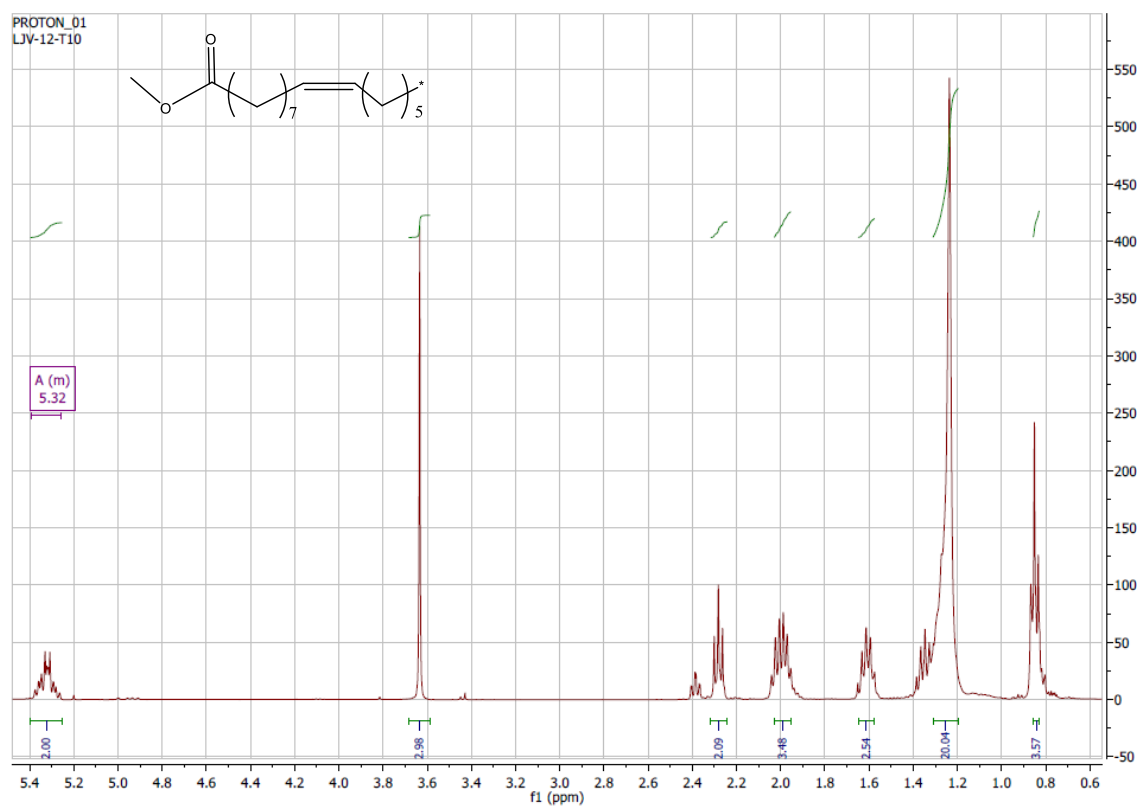


HSQCAD

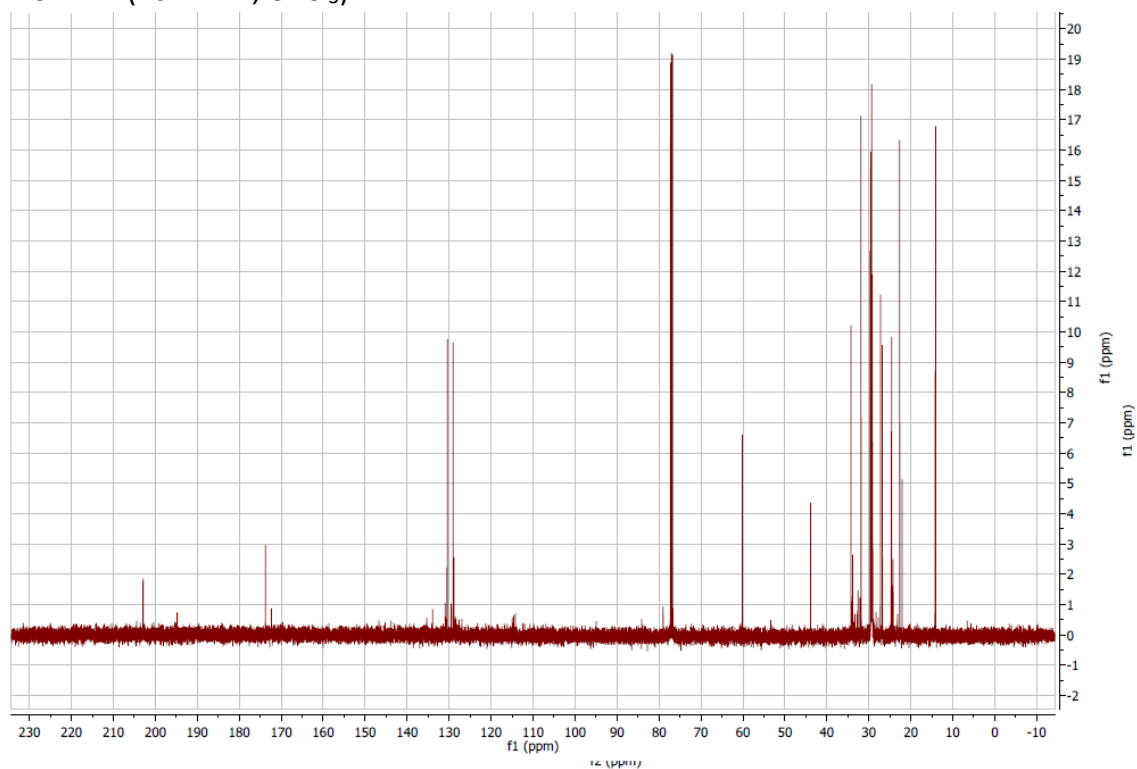


(Z)-9-hexadecenoato de metilo (14)

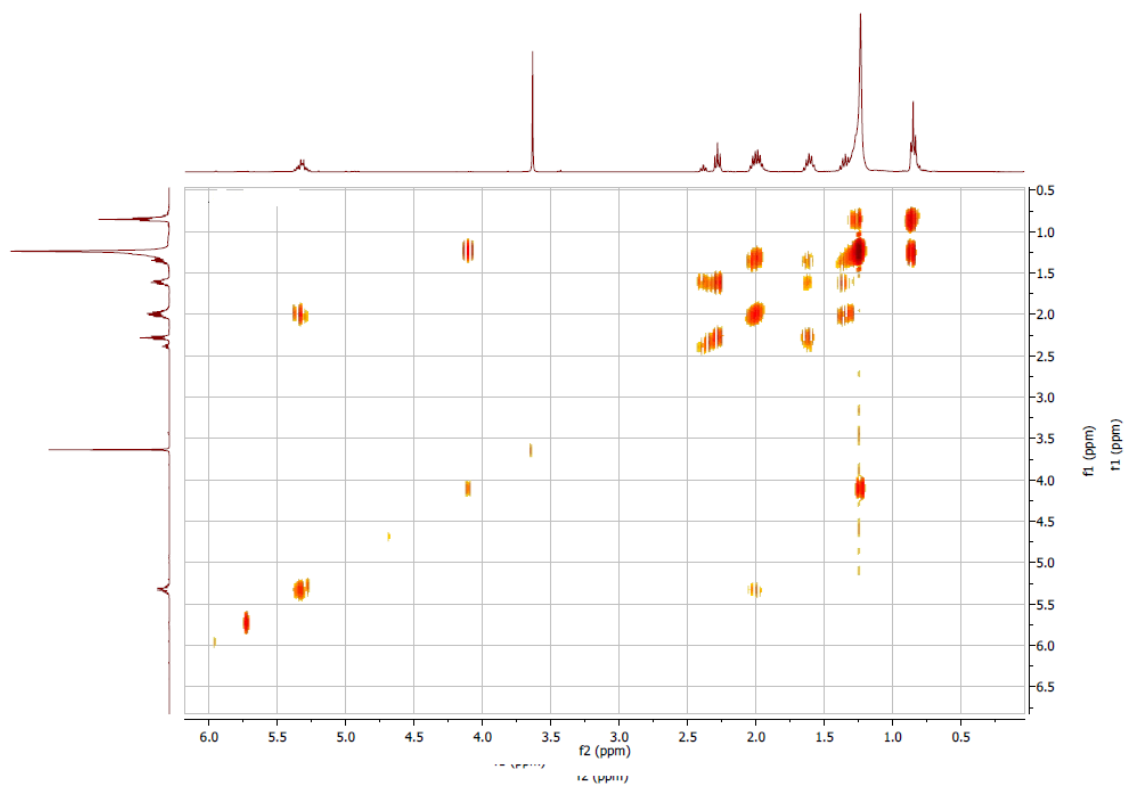
^1H RMN (400MHz, CDCl_3)



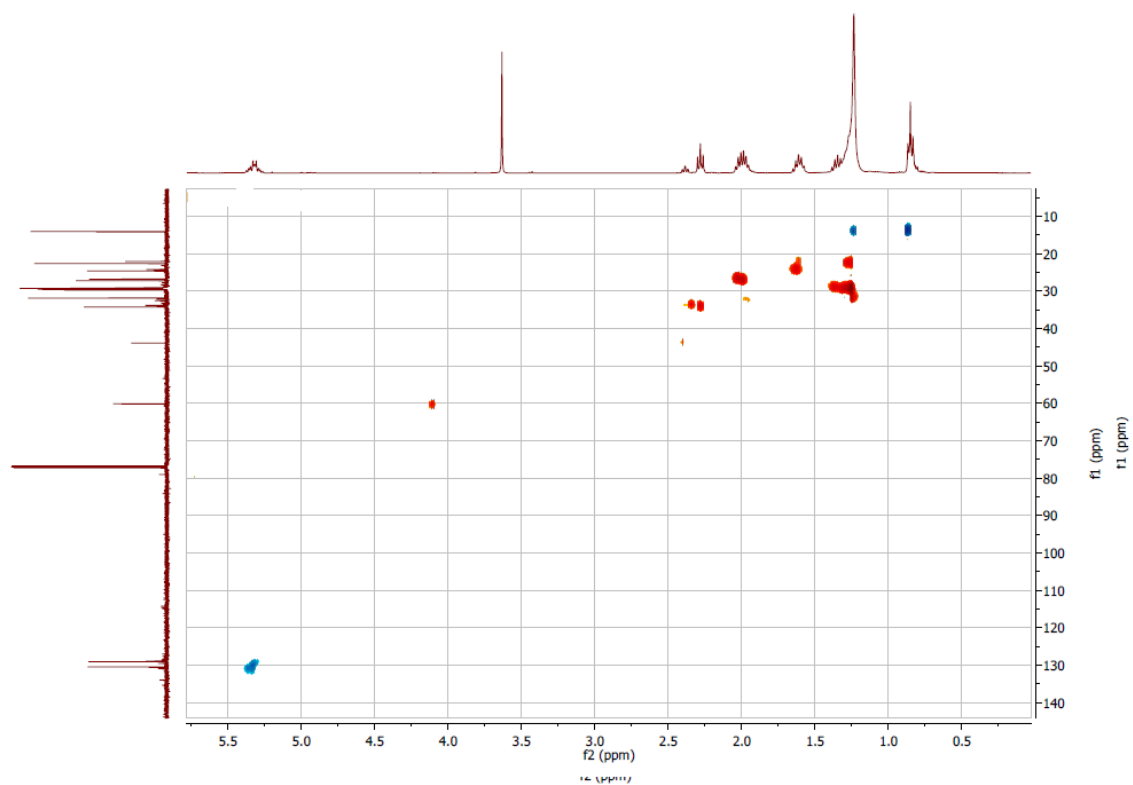
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)



COSY

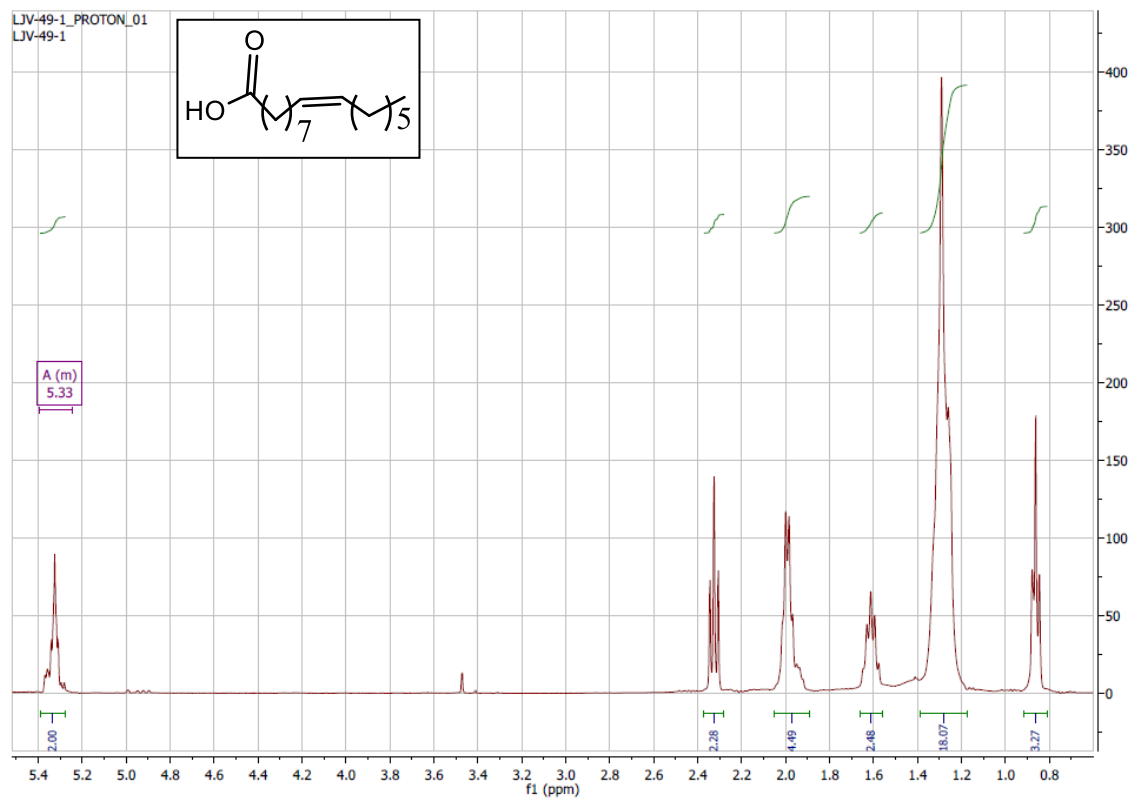


HSQCAD

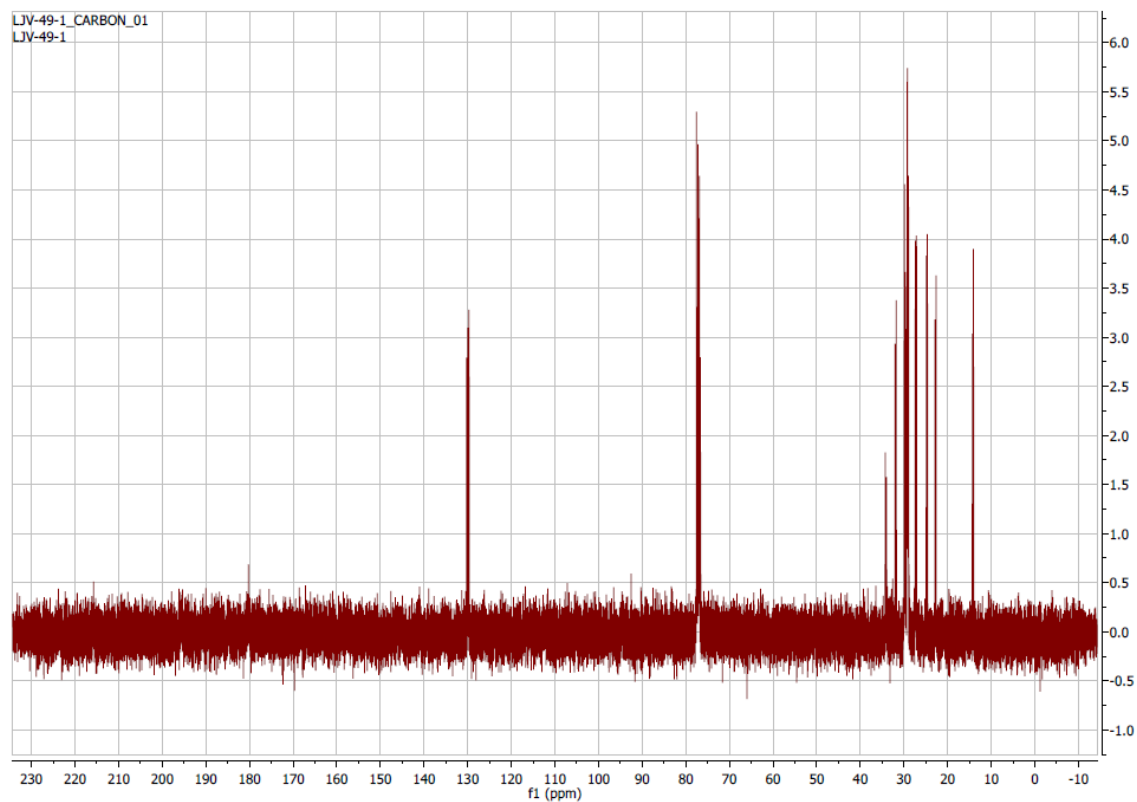


Ácido (Z)-9-hexadecenoico (15)

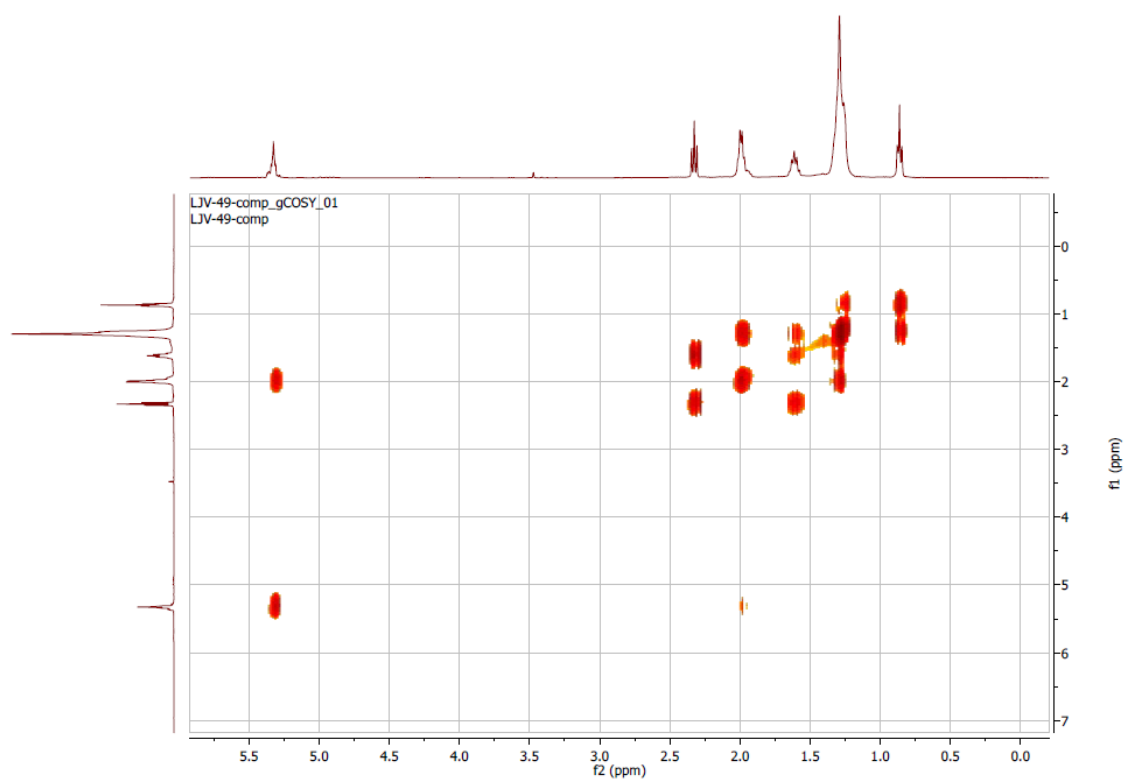
^1H RMN (400MHz, CDCl_3)



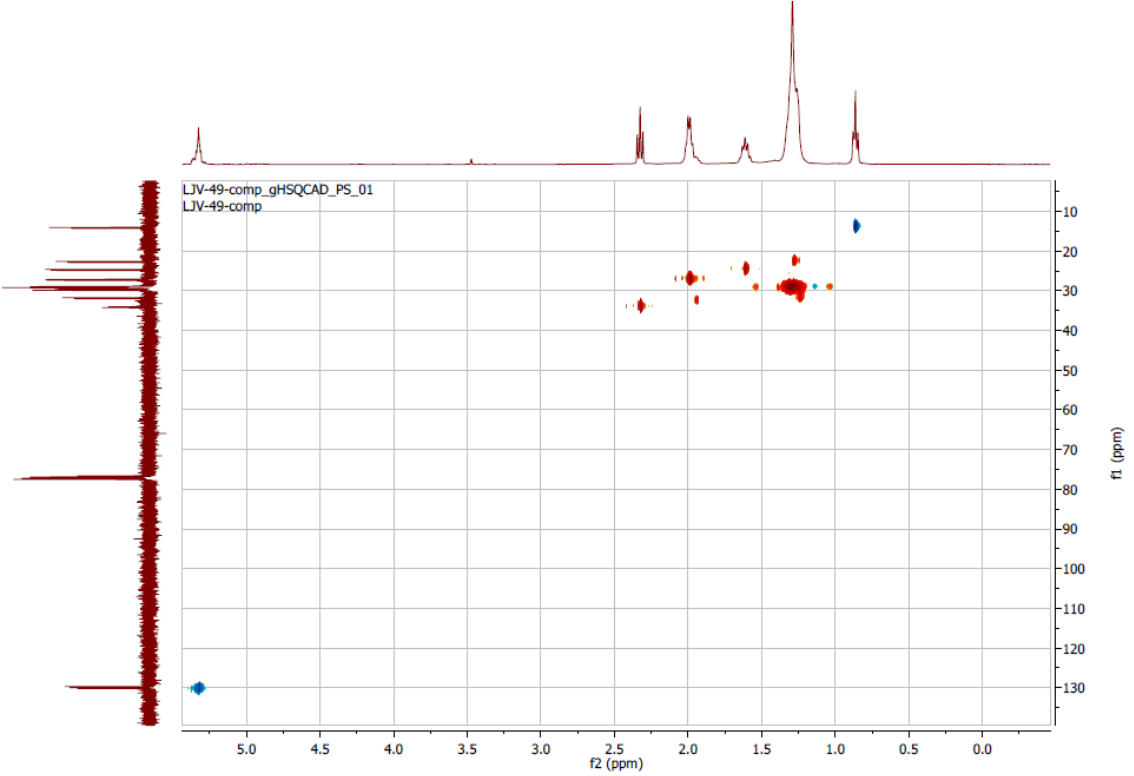
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)



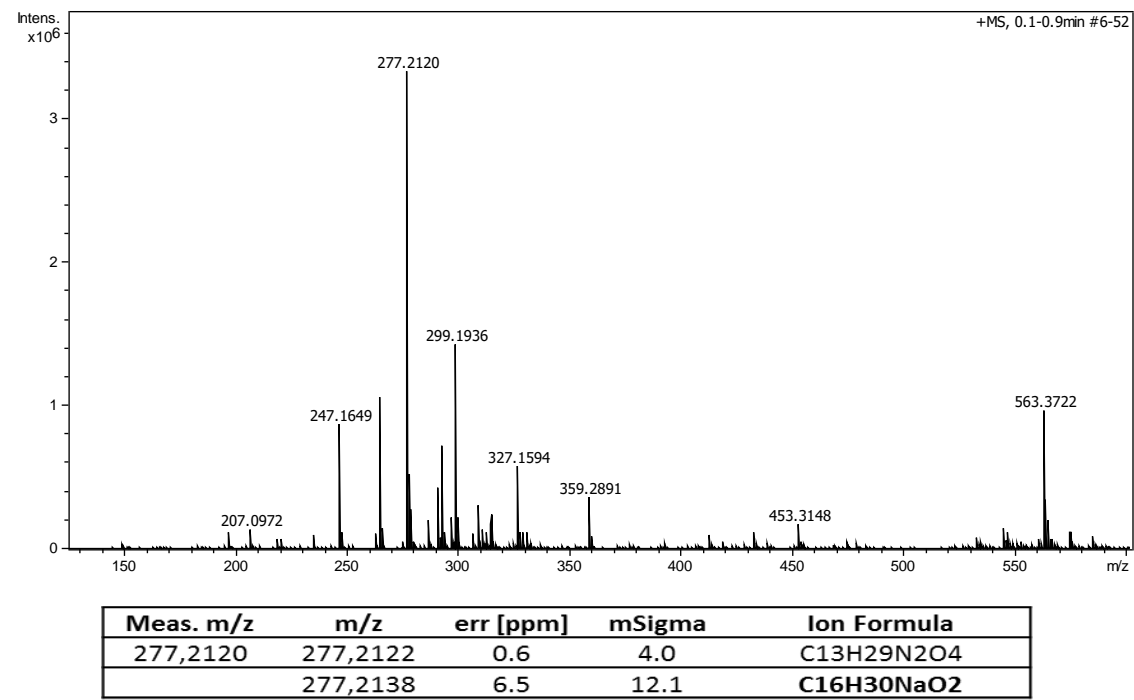
COSY



HSQCAD

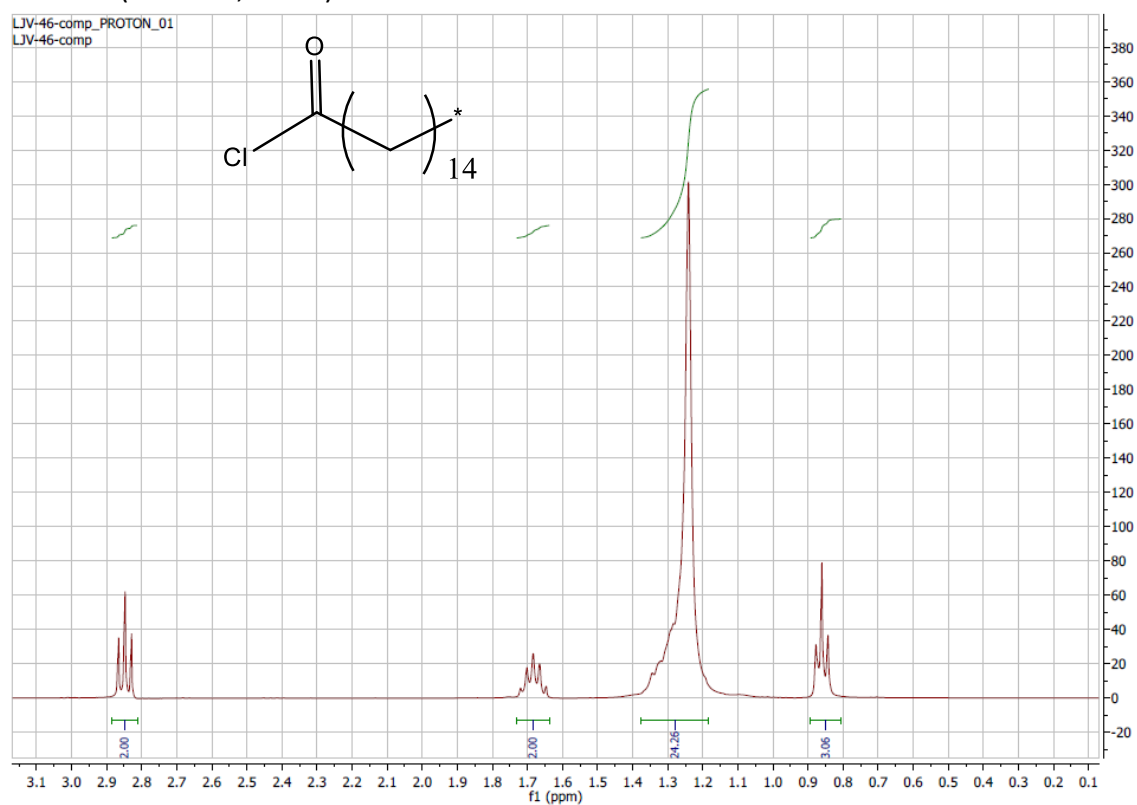


MS

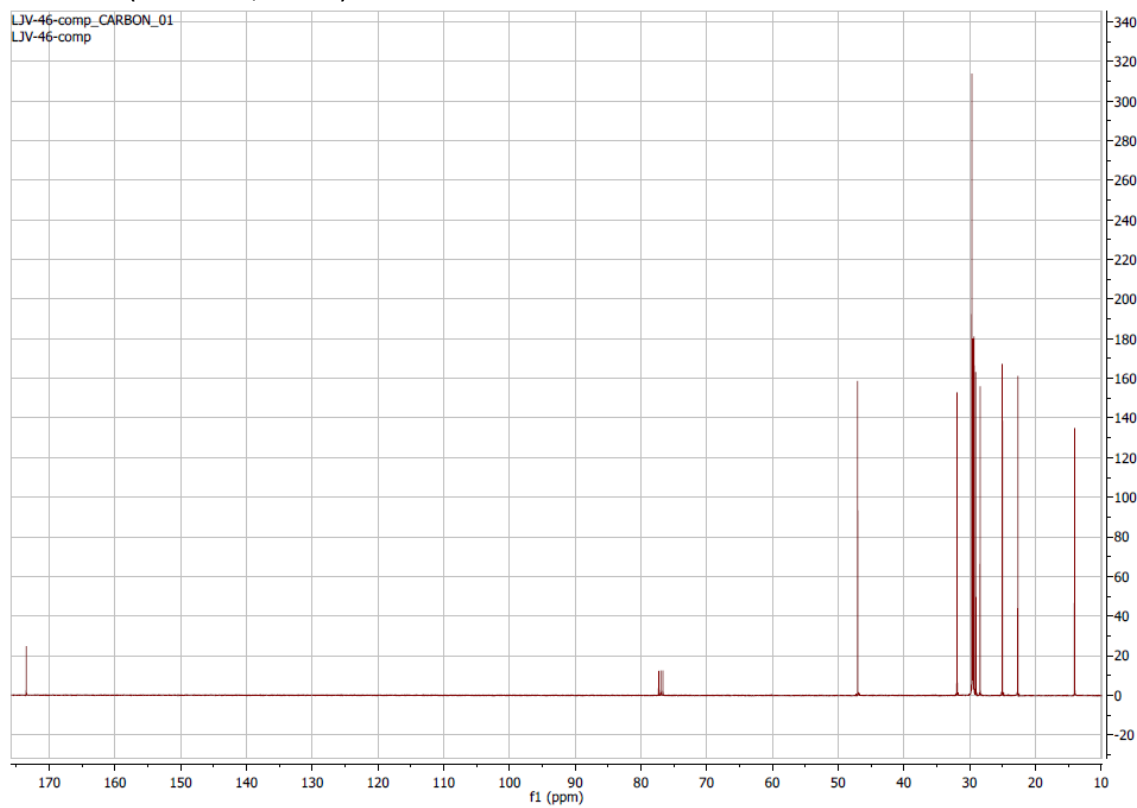


Cloruro de ácido palmítico (17)

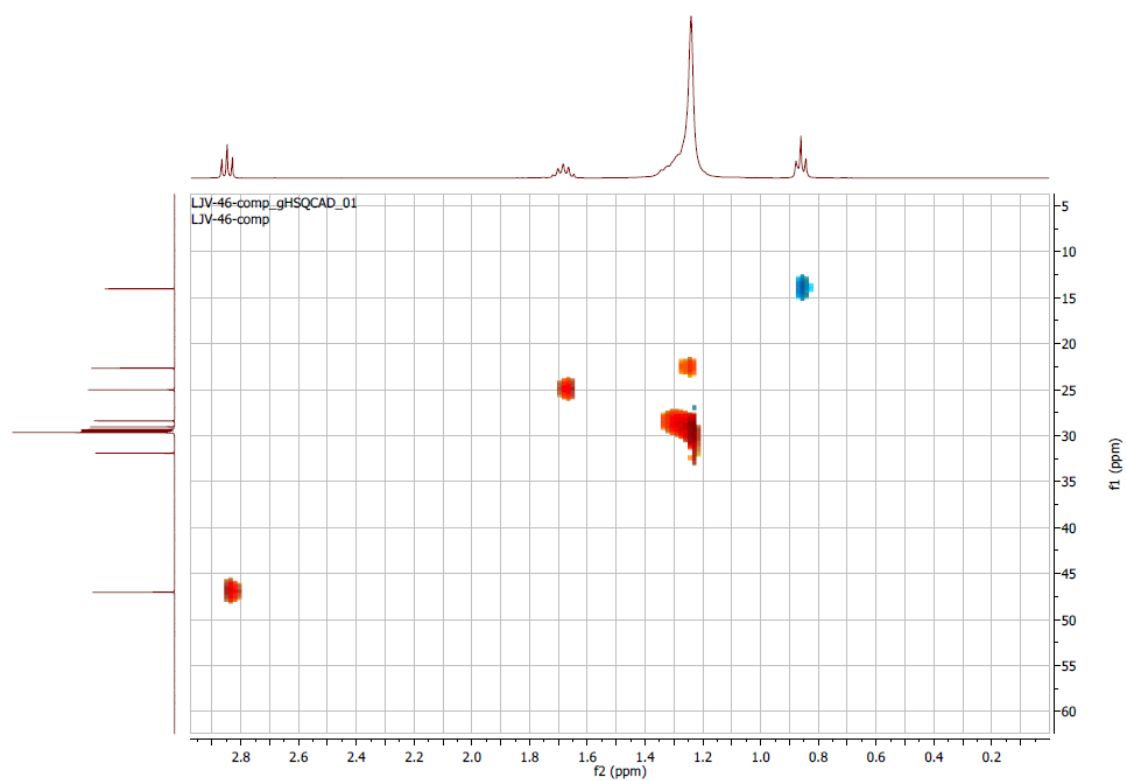
^1H RMN (400MHz, CDCl_3)



^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3)

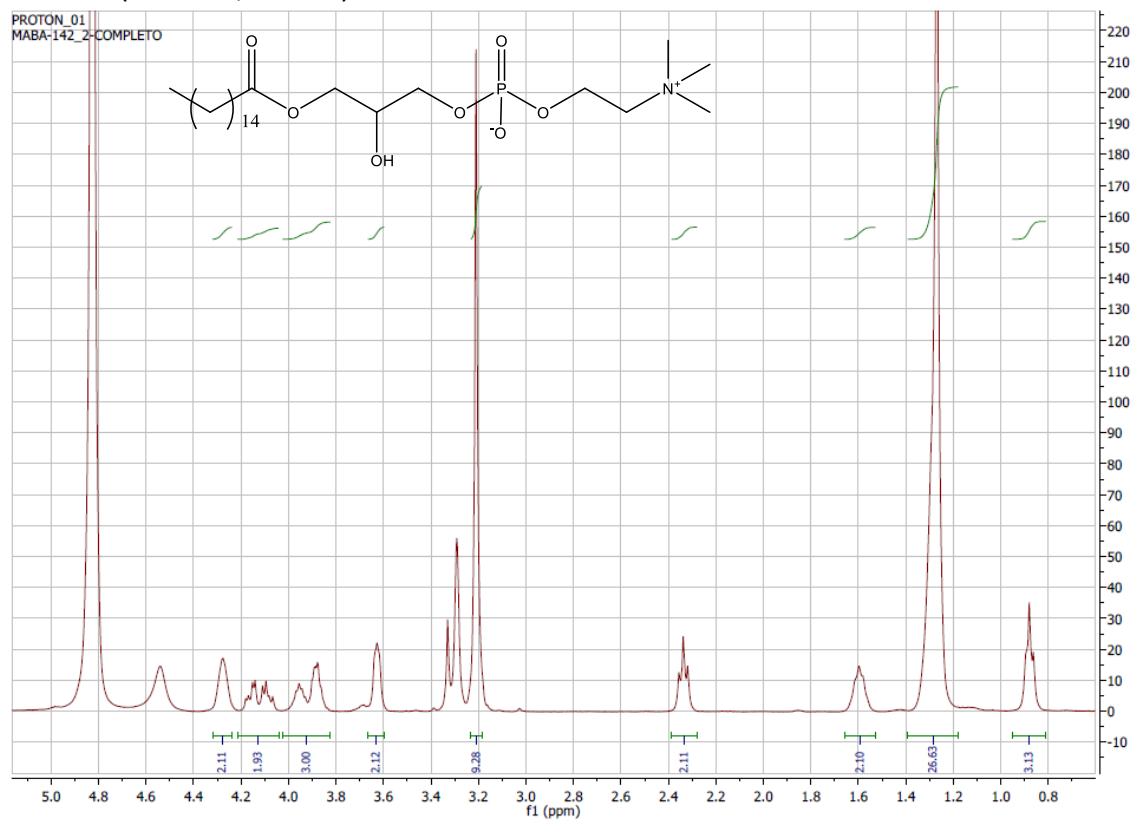


HSQC

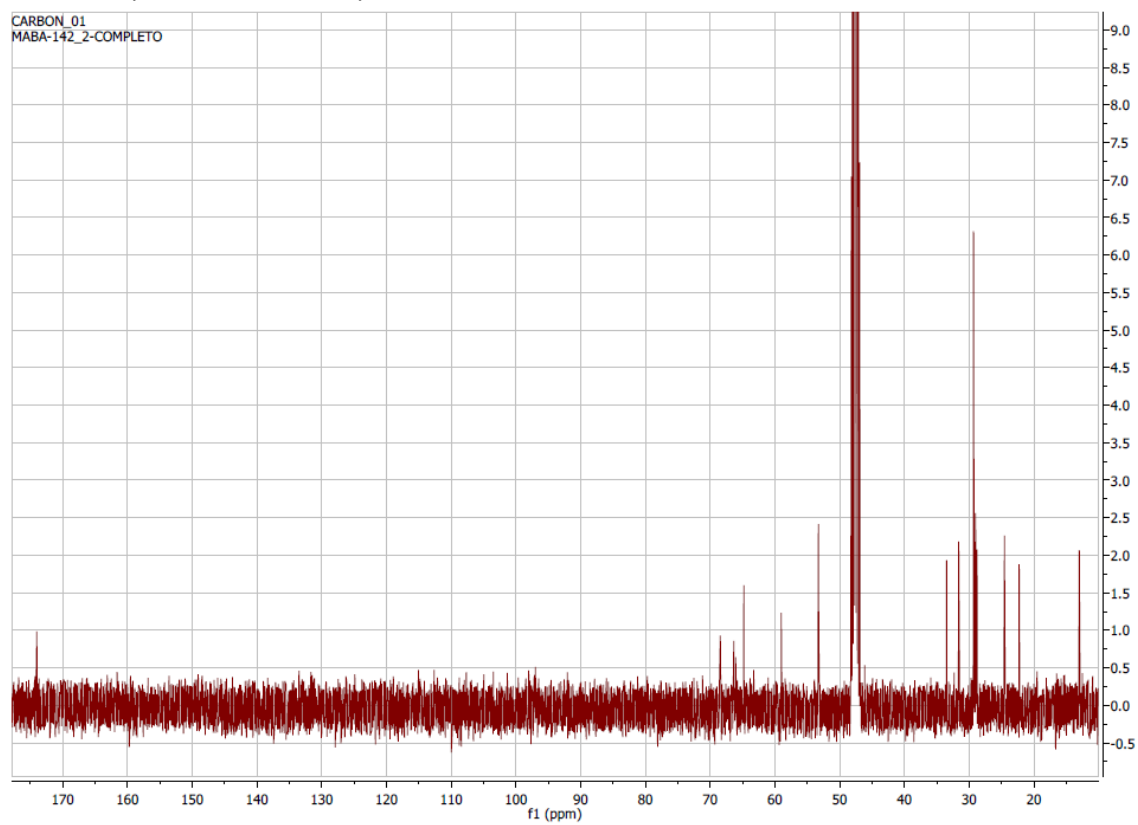


1-Palmitoil-sn-glicer-3-fosfocolina (2-lyso-16-PC) (20)

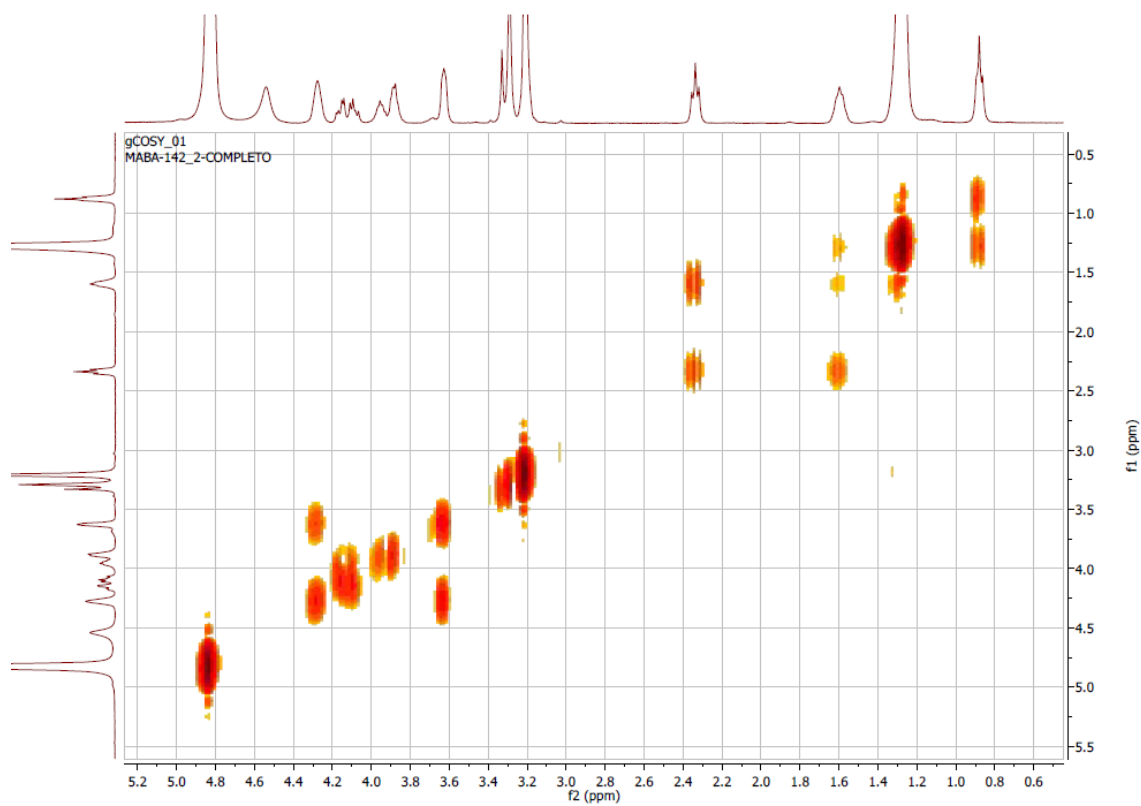
^1H RMN (400MHz, CD_3OD)



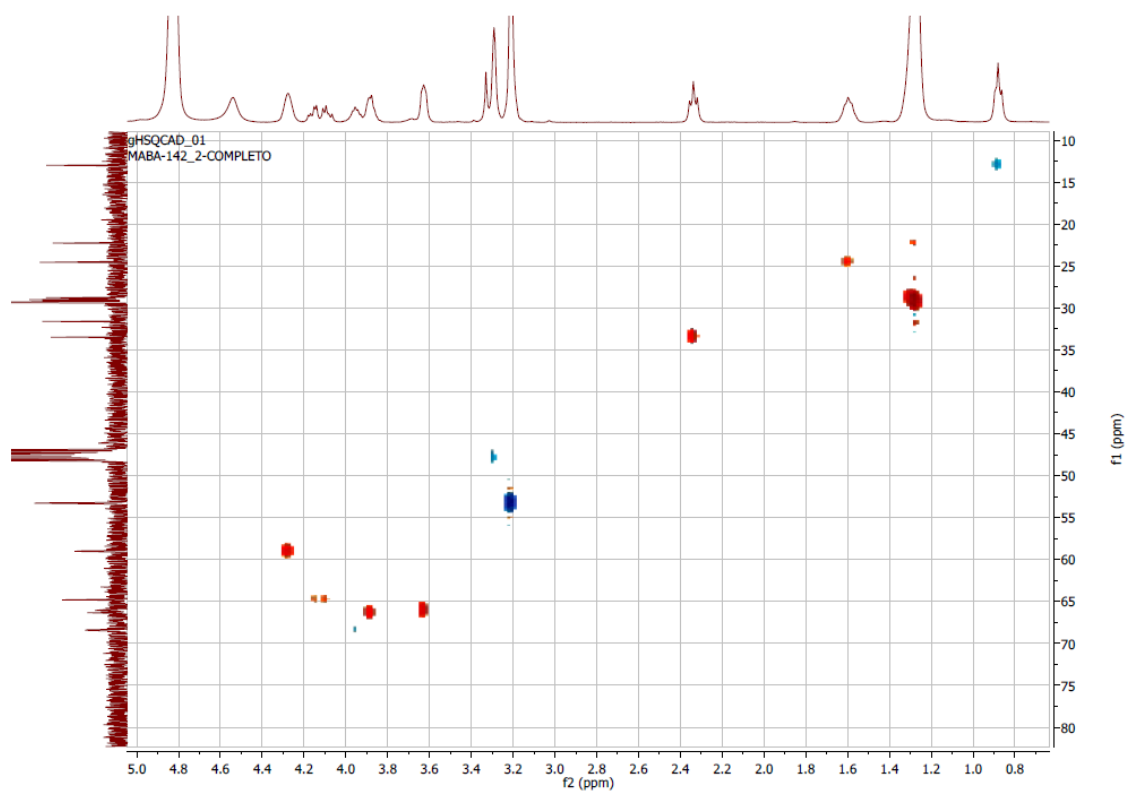
^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD)



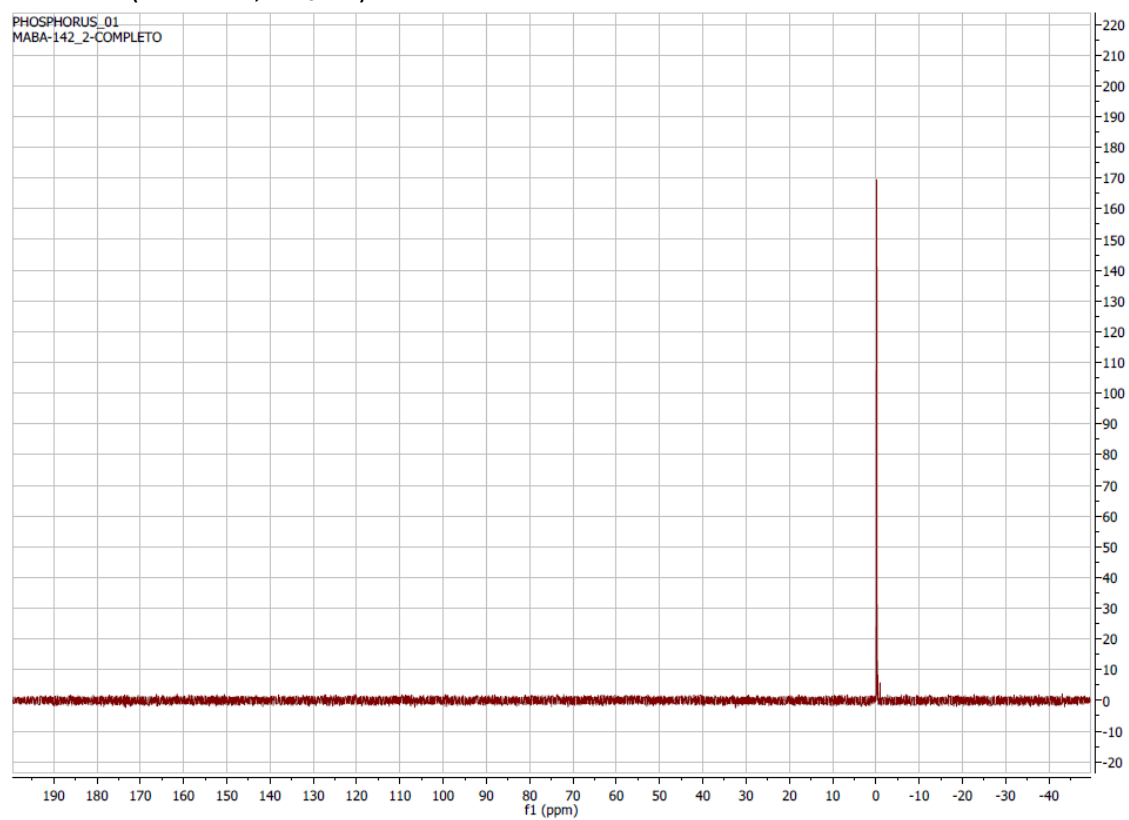
COSY



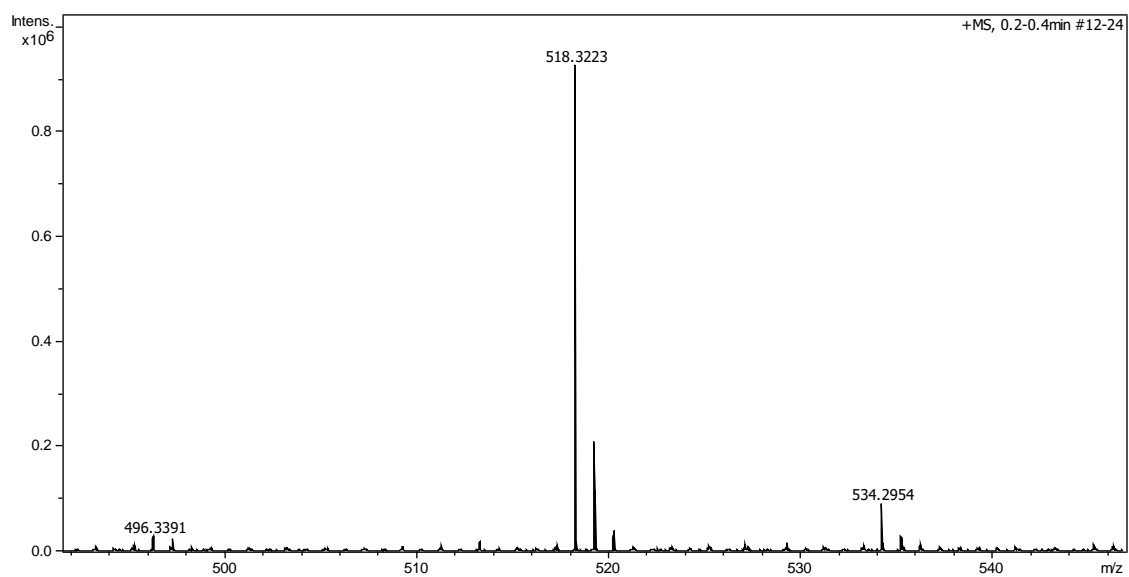
HSQCAD



^{31}P RMN (162 MHz, CD_3OD)



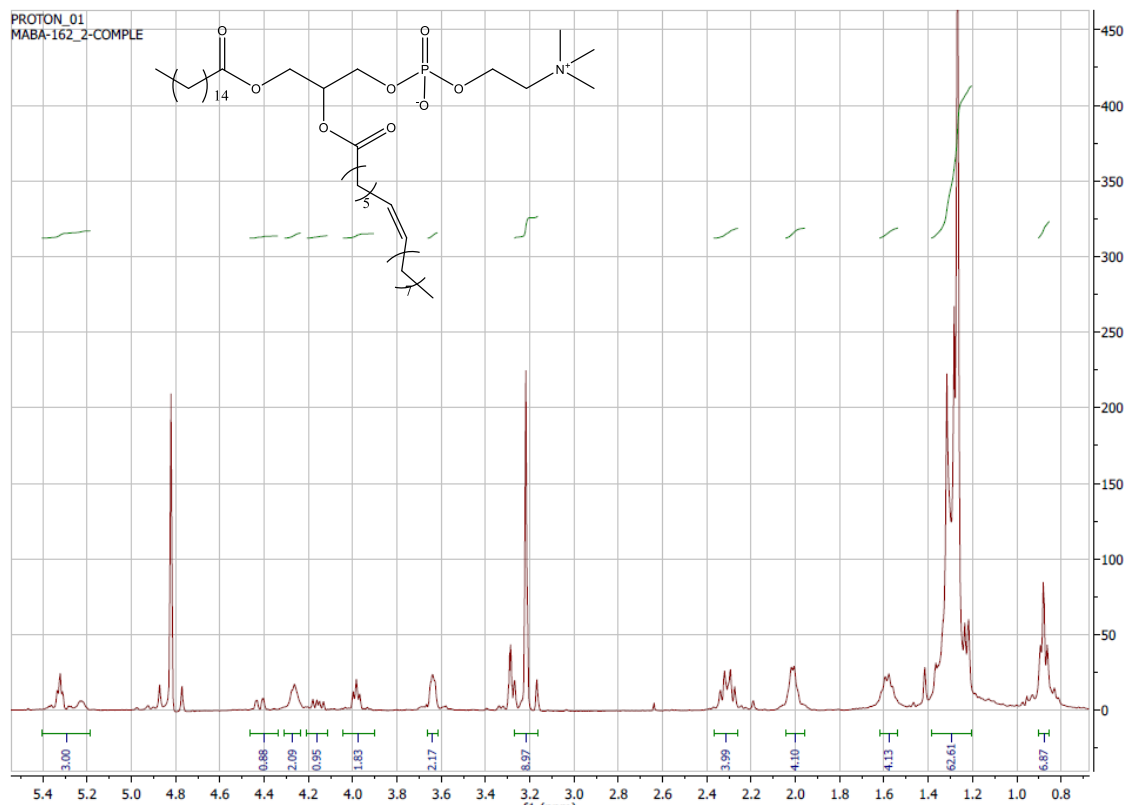
MS



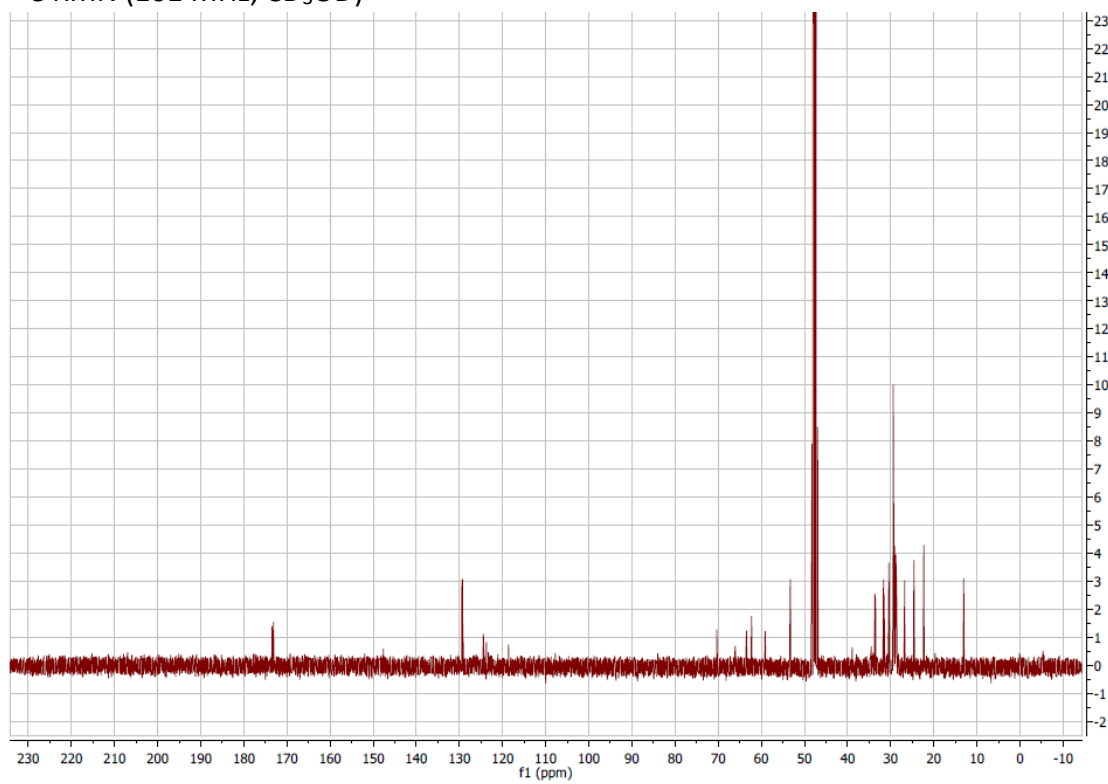
Meas. m/z	m/z	err [ppm]	mSigma	Ion Formula
518,3223	518,3217	-1.2	23.1	C ₂₄ H ₅₀ NNaO ₇ P
534,2954	534,2956	0.4	39.3	C ₂₄ H ₅₀ KNO ₇ P

PC-n9

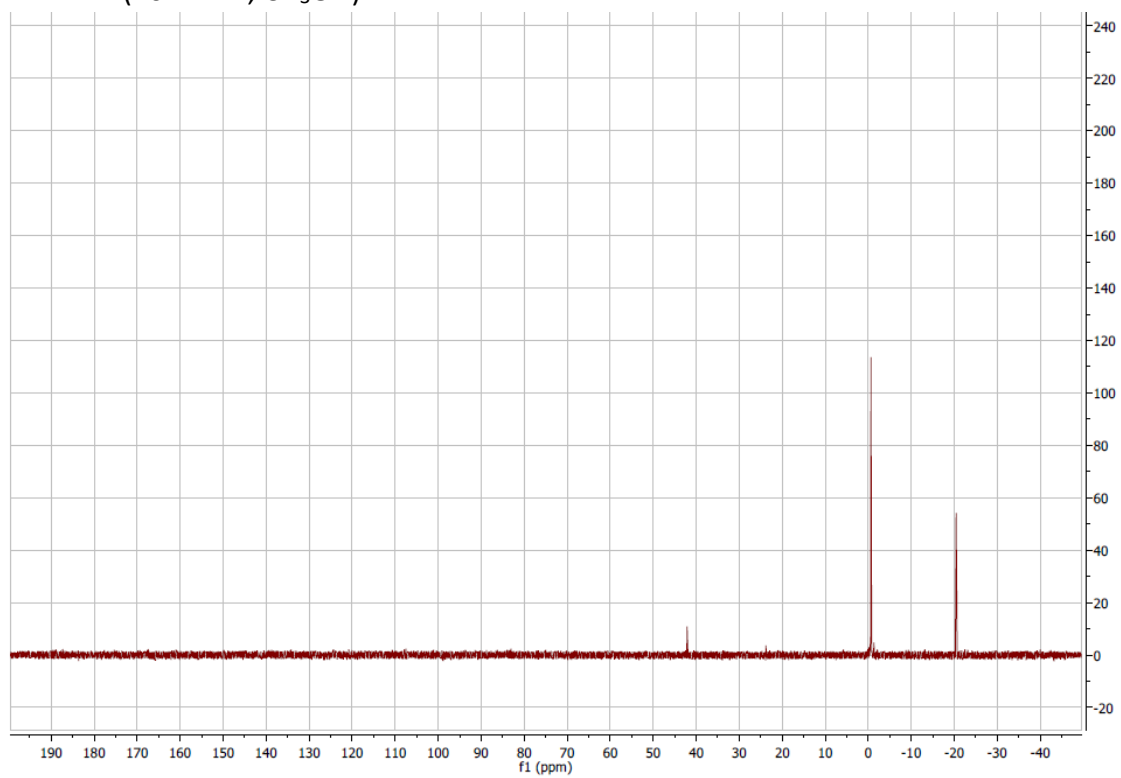
^1H RMN (400MHz, CD_3OD)



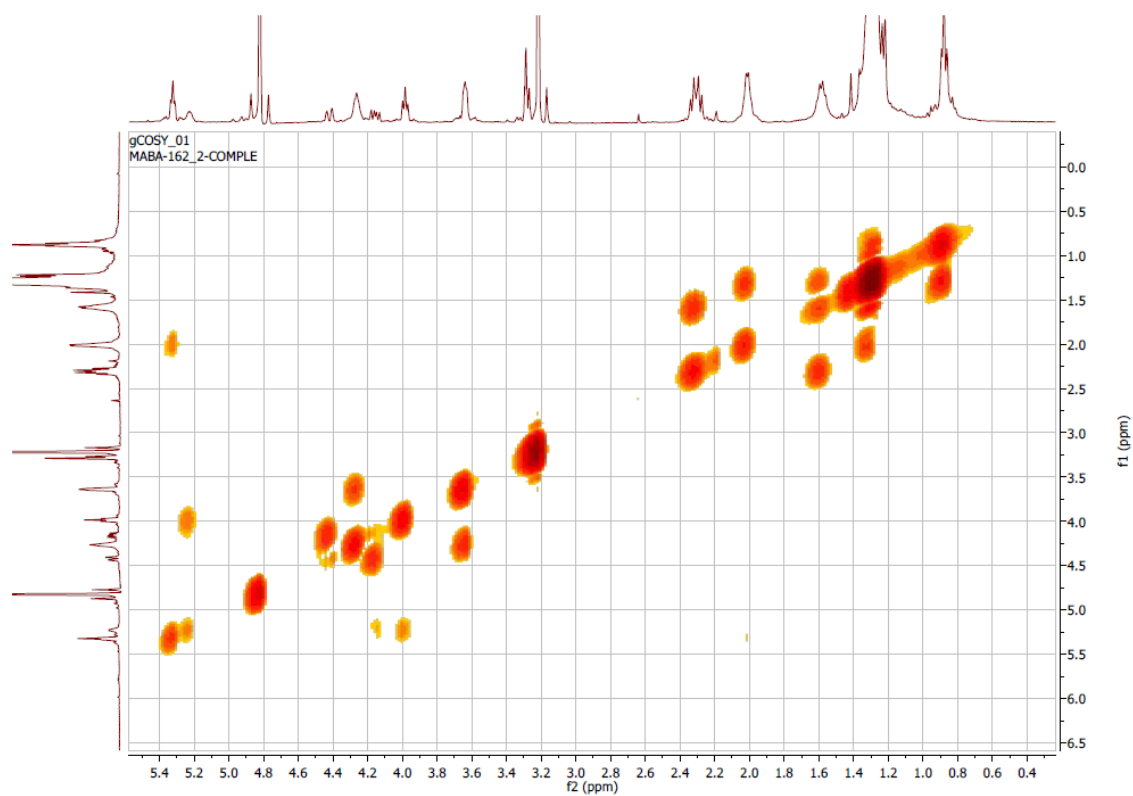
^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD)



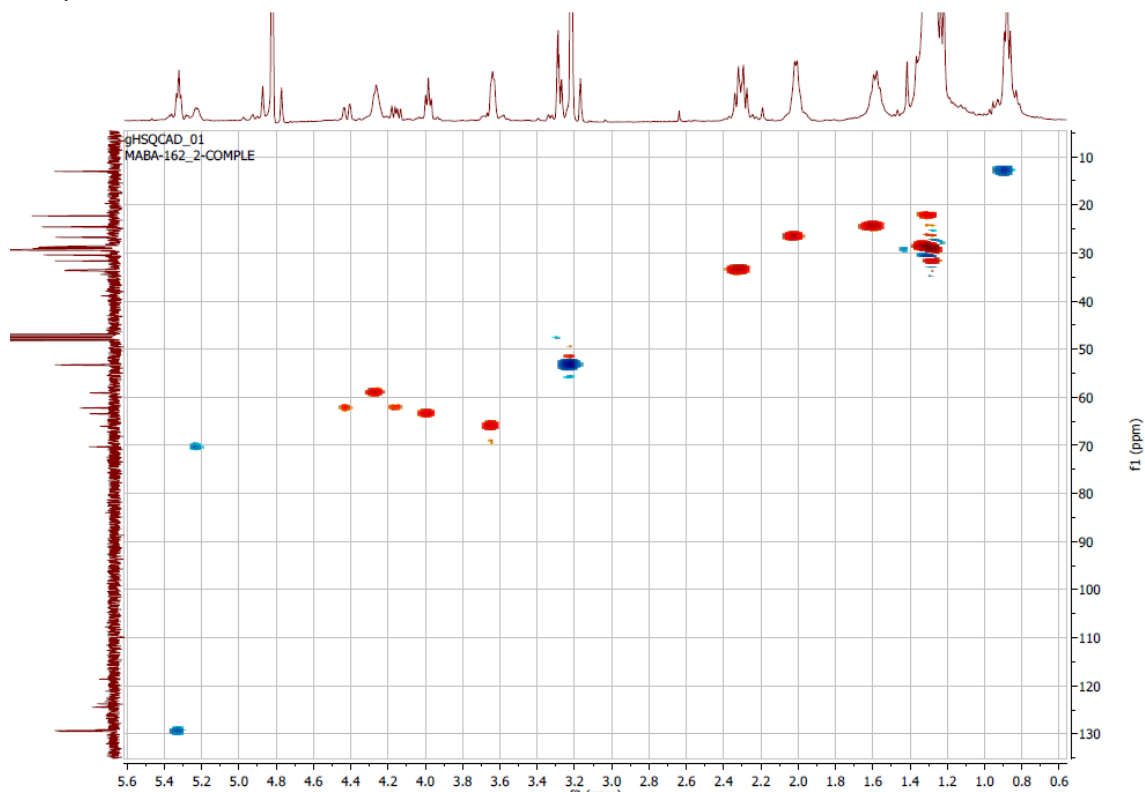
^{31}P RMN (162 MHz, CD_3OD)



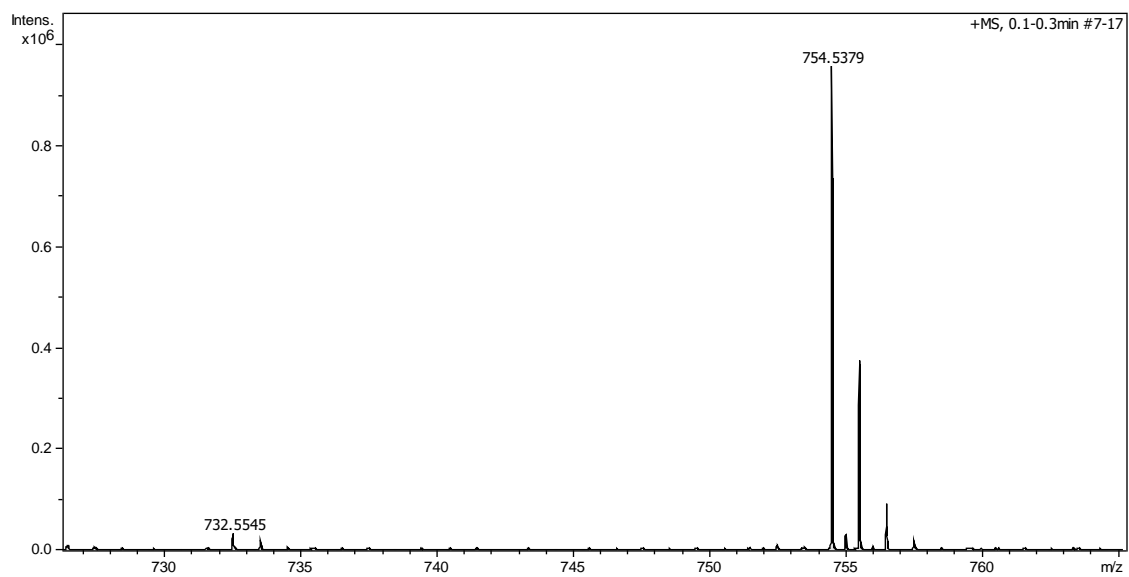
COSY



HSQCAD



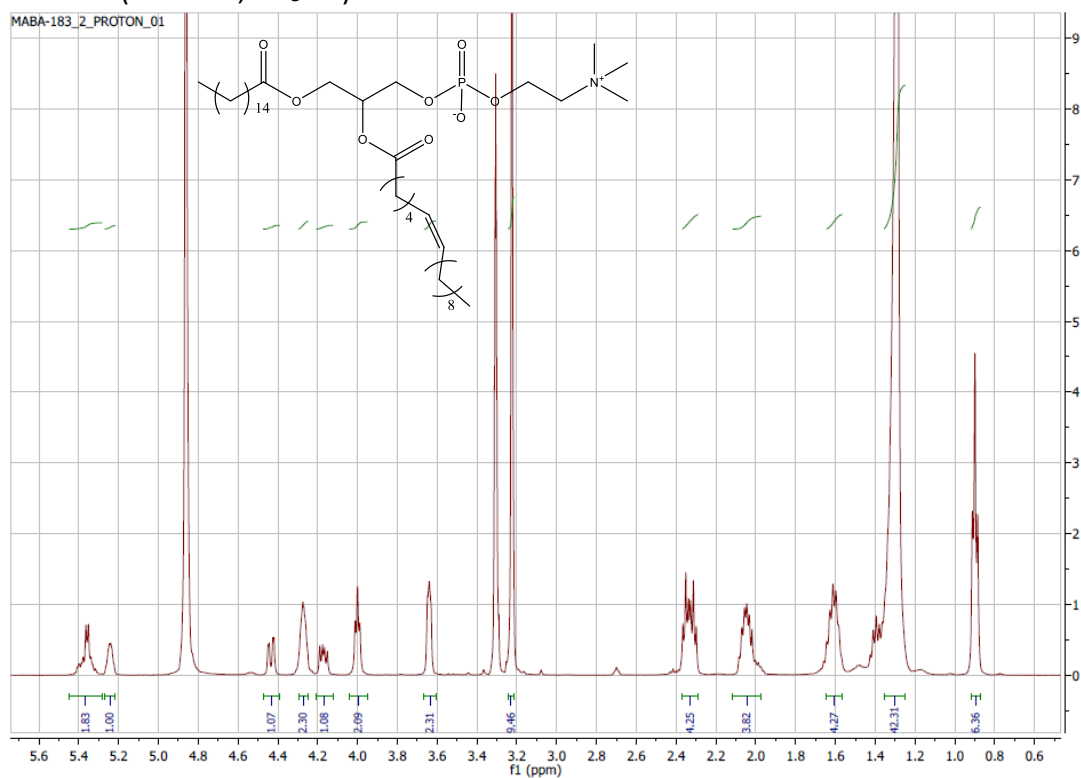
MS



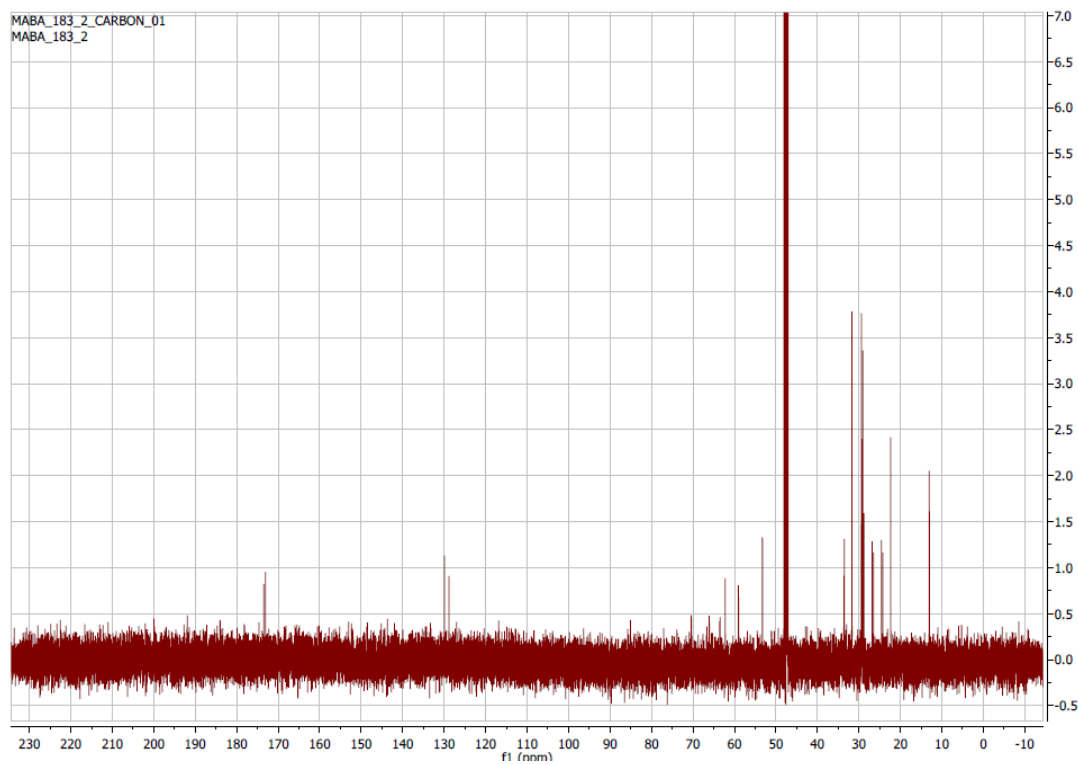
Meas. m/z	m/z	err [ppm]	mSigma	Ion Formula
732,5545	732,5538	-0.9	72.8	C40H79NO8P
754,5379	754,5357	-2.9	29.8	C40H78NNaO8P

PC-n10

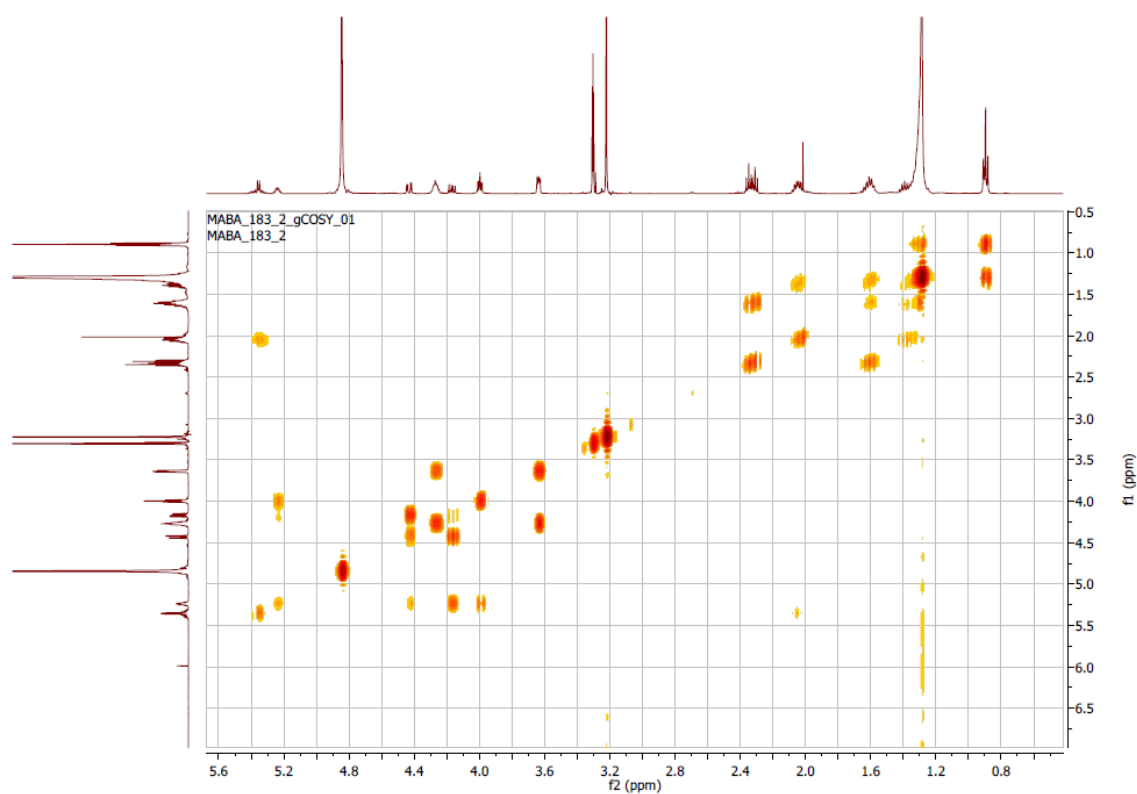
^1H RMN (400MHz, CD_3OD)



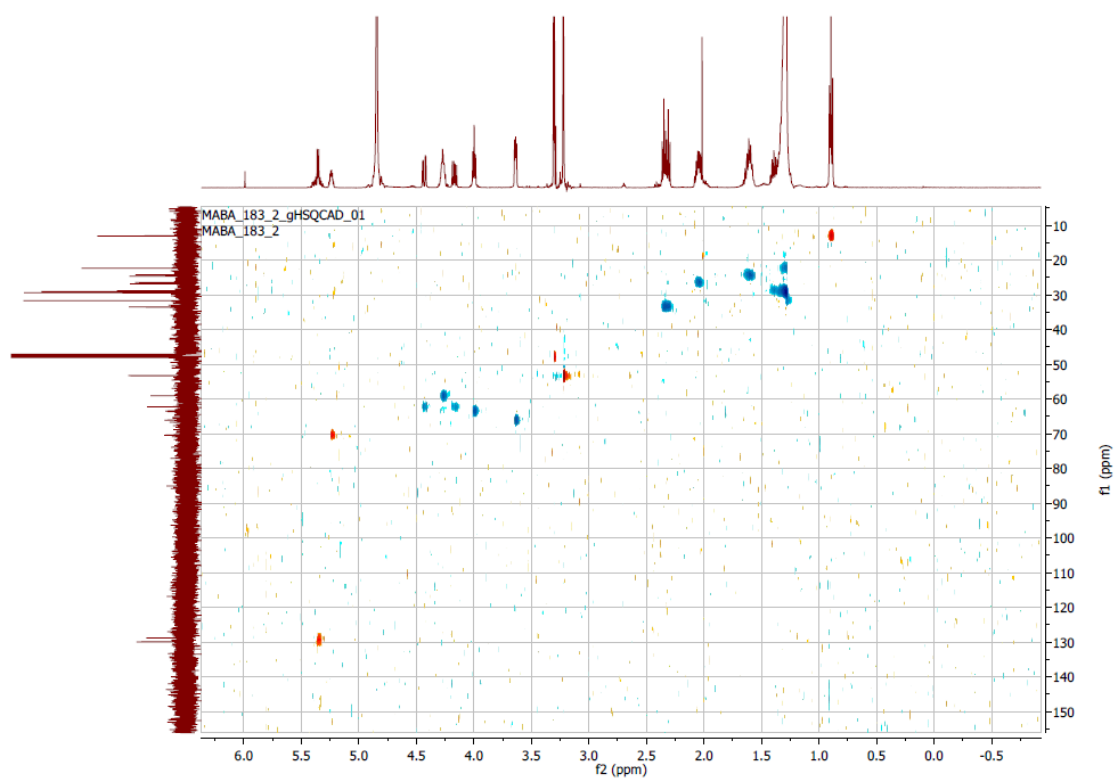
^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD)



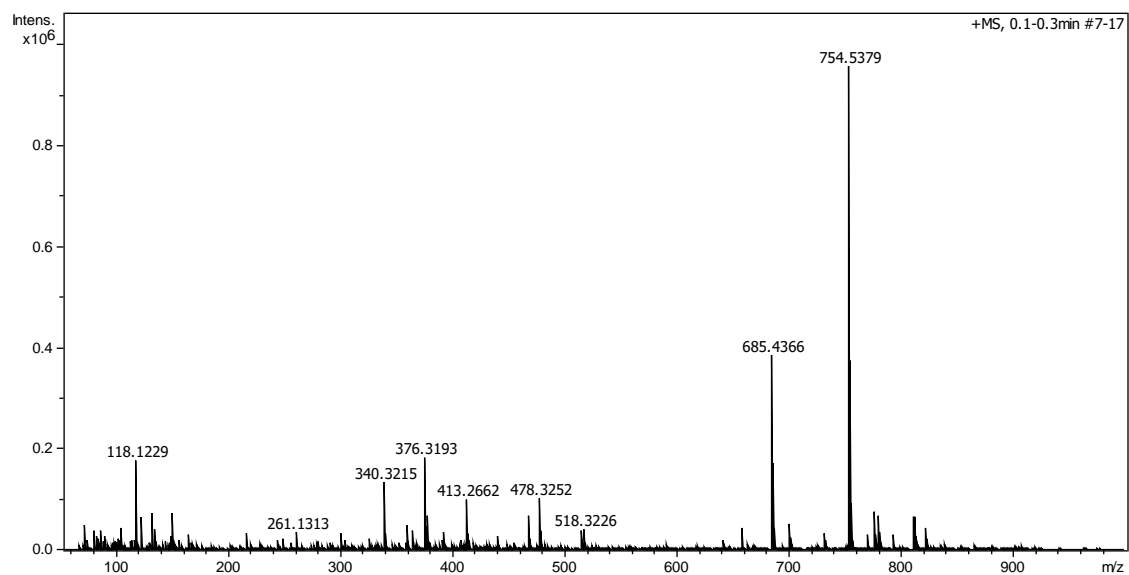
COSY



HSQCAD



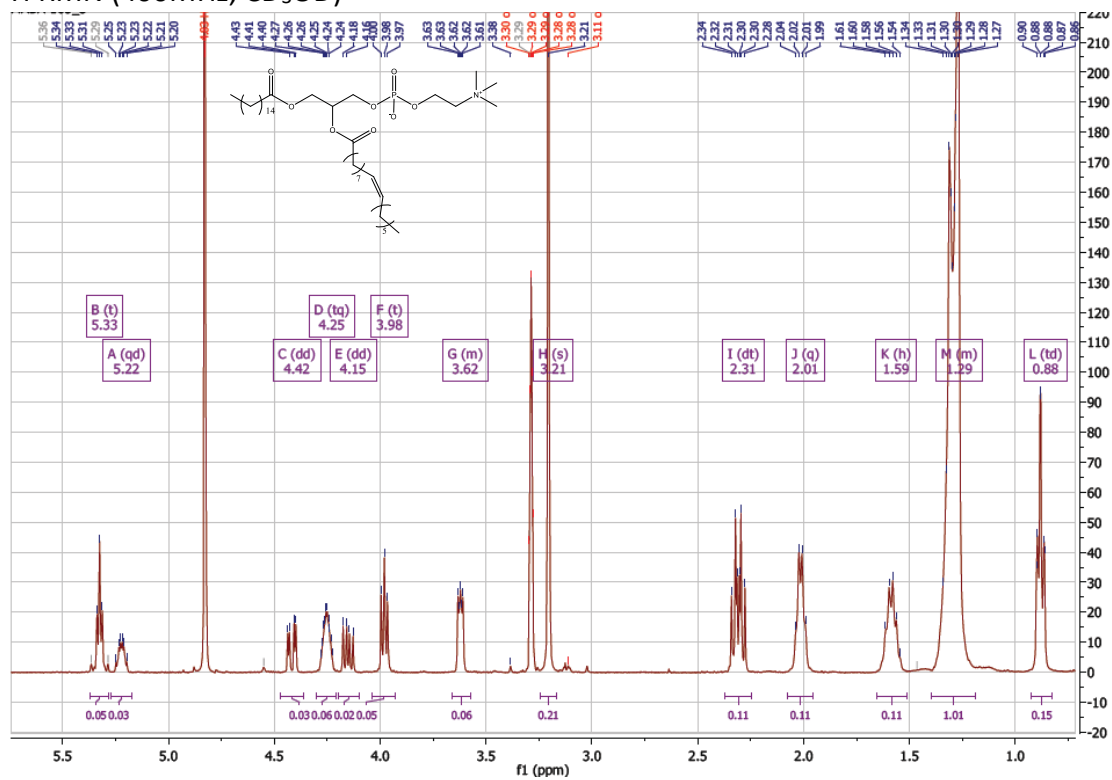
MS



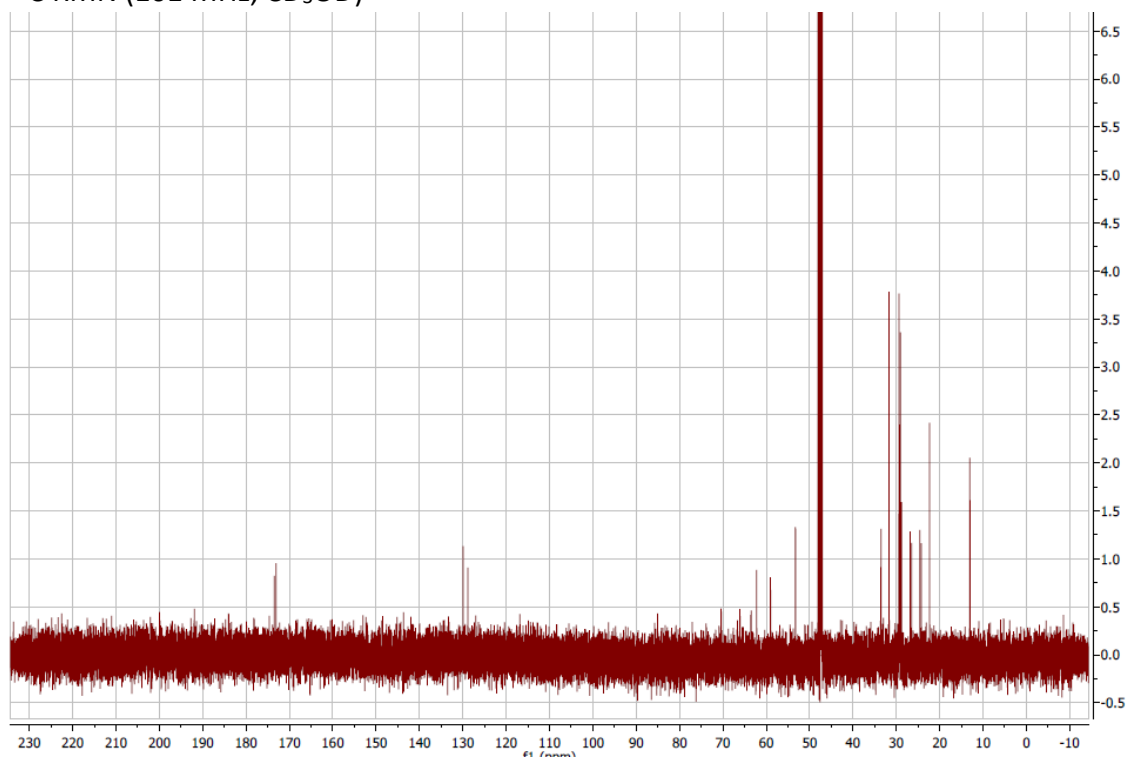
Meas. m/z	m/z	err [ppm]	mSigma	Ion Formula
754,5362	754,5357	-0.6	35.5	C40H78NNaO8P

PC-n7

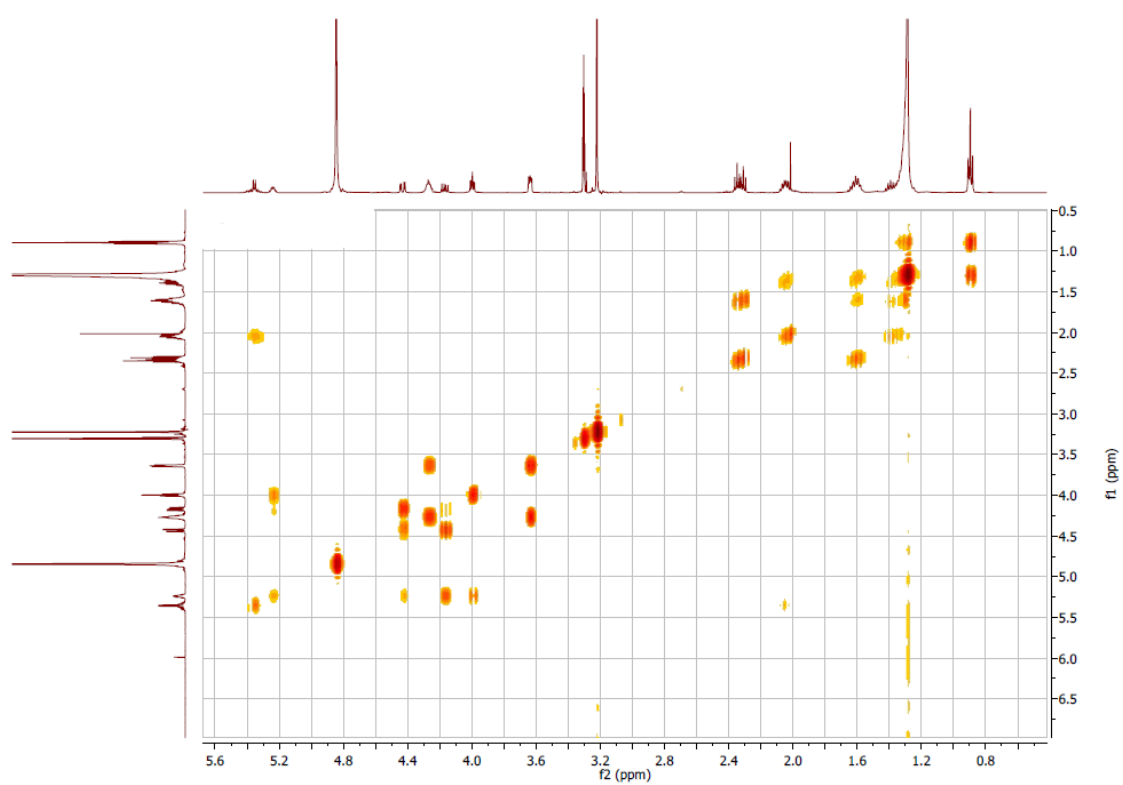
^1H RMN (400MHz, CD_3OD)



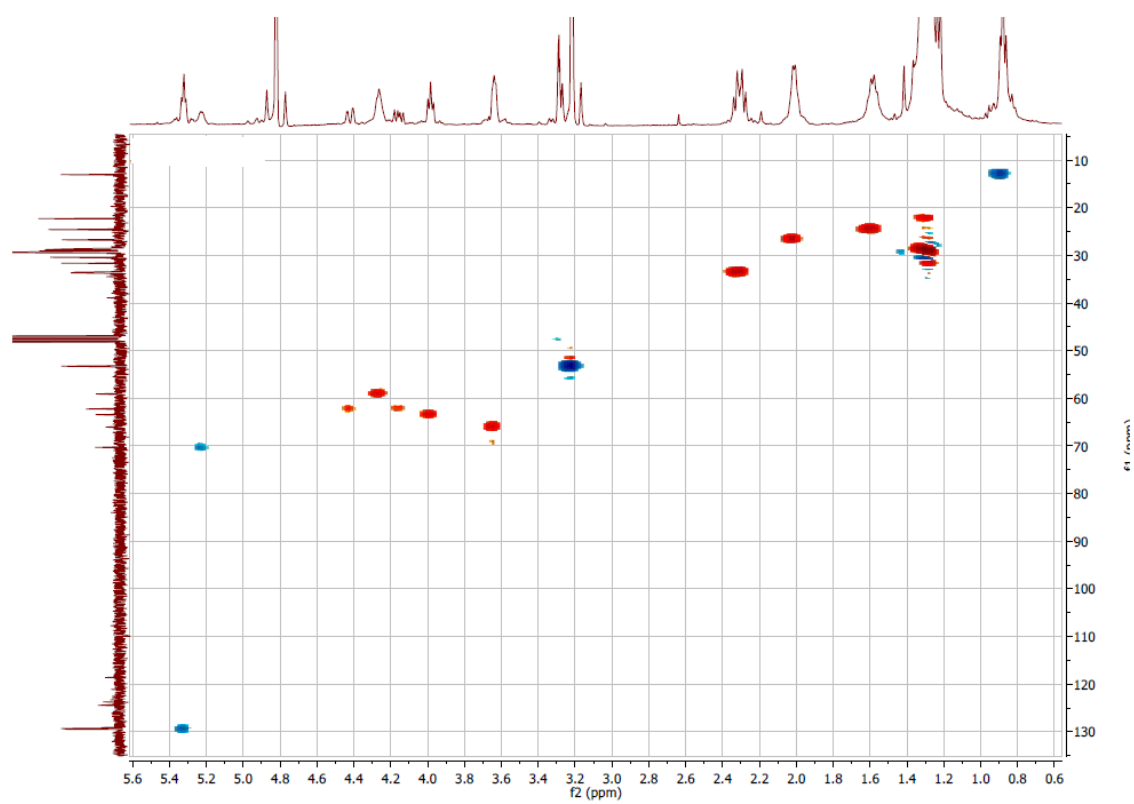
^{13}C RMN (101 MHz, CD_3OD)



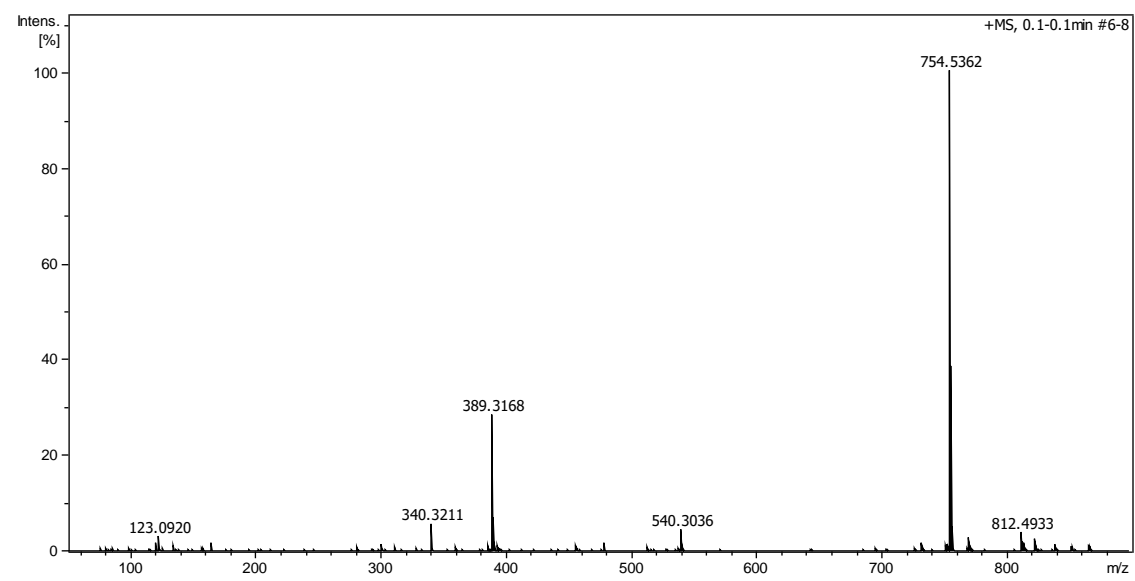
COSY



HSQCAD



MS



Meas. m/z	m/z	err [ppm]	mSigma	Ion Formula
754,5362	754,5357	-0.6	35.5	C40H78NNaO8P