



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

“PREPARACIÓN DE FOSFOMIOINOSITOLES PORTADORES DEL ÁCIDO (Z)-7-HEXADECENOICO”

Autor: María Martín Calvo

Tutor/es: Purificación Cuadrado Curto

D^a Purificación Cuadrado Curto, profesora del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valladolid, en relación a la SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN DEL TRABAJO FIN DE GRADO, y como tutora del trabajo **“Preparación de Fosfomioinositoles Portadores del Ácido (Z)-7-hexadecenoico”** realizado por **D^a María Martín Calvo**, según el Reglamento sobre la Elaboración y Evaluación del Trabajo Fin de Grado aprobado por el Consejo de Gobierno de 18 de enero de 2012 (BOCyL 15 de febrero de 2012, modificado el 27 de marzo de 2013), informa que:

Dicho trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valladolid, por la alumna D^a María Martín Calvo de forma satisfactoria y con gran dedicación, demostrando poseer una gran capacidad de trabajo y análisis.

Por lo que concluyo que: Tanto el trabajo como los aspectos científicos desarrollados en el mismo reúnen las condiciones para ser defendidos ante el correspondiente tribunal. El trabajo se encuentra plenamente integrado dentro de los objetivos que se pretenden en el Trabajo Fin de Grado, para la obtención del Grado en Química.

Valladolid, 16 de Julio de 2018

Fdo. Purificación Cuadrado Curto

Índice

Abreviaturas	7
Resumen / Abstract	9
Introducción	11
Objetivos y plan de trabajo	15
Antecedentes bibliográficos	19
1. Síntesis del derivado de mioinositol:.....	19
2. Síntesis del ácido graso (Z)-7-hexadecenoico	20
Hidrogenación de alquinos	20
Reacción de Wittig	21
3. Síntesis de diacilgliceroles	22
(2R)-glicidol.....	22
(2R)-solketal	23
4. Síntesis de glicerofosfomioinositales	24
Resultados y discusión.....	25
1. Protección selectiva del mioinositol.....	25
2. Síntesis del ácido graso (Z)-7-hexadecenoico	29
3. Síntesis del diacilglicerol.....	30
4. Síntesis del glicerofosfomioinositol.....	33
Conclusiones.....	35
Materiales y métodos:.....	37
Anexo: ¹ H, ¹³ C, HSQC, COSY.....	49
Bibliografía.....	81

Abreviaturas

DAG	Diacilglicerol
DCC	N,N-diciclohexilcarbodiimida
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT-Cl	Cloruro de dimetoxitritilo
MOM-Cl	Cloruro de metilmetiléter
TBDPS-Cl	Cloruro de <i>terc</i> -butildifenilsilano
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TsOH	Ácido p-toluensulfónico

Resumen / Abstract

Este trabajo fin de grado está dedicado a la síntesis de glicerofosfomioinositales, concretamente aquellos que porten en la posición sn₂ el isómero n-9 del ácido hexadecenoico [(Z)-7-hexadecenoico], a fin de establecer su potencial actividad antiinflamatoria en macrófagos.

El trabajo se encuentra dividido en cuatro partes:

- Síntesis del derivado de mioinositol.
- Síntesis del ácido graso.
- Síntesis del fosfodiacylglicerol.
- Ensamblaje del fosfodiacylglicerol y el mioinositol de manera quimio-, regio- y estereoespecífica.

This final project is focused on the synthesis of glycerophosphomyoinositols, more specifically one which is capable of carrying in the position sn₂ acid hexadecenoic n-9 isomer [(Z)-7-hexadecenoic acid], to clarify its potential anti-inflammatory activity at macrophages.

The project is divided in 4 main parts:

- Synthesis of myoinositol derivative.
- Fatty acid synthesis.
- Phosphodyacylglycerol's synthesis.
- Phosphodiacylglycerol and myoinositol's linking in a regio- and stereospecific way.

Introducción

Este Trabajo Fin de Grado está enmarcado dentro de una investigación más amplia, la cual pretende estudiar el mecanismo de actuación de una familia de ácidos grasos (isómeros del ácido palmitoleico (16:1)). Cabe destacar por su actividad antiinflamatoria recientemente constatada el ácido graso **(Z)-7-hexadecenoico (16:1 n-9)** el cual se encuentra presente en los organismos como constituyente de diversos lípidos.

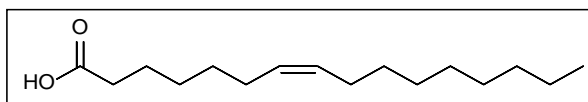


Figura 1: Ácido (Z)-7-hexadecenoico.

Se ha demostrado que los mediadores lipídicos producidos durante las respuestas inflamatorias lo hacen en dos fases temporalmente distintas, en un proceso donde la función de estos se invierte. Los primeros que se generan son proinflamatorios, y los segundos antiinflamatorios. Las células poseen de forma intrínseca mecanismos programados para reducir la inflamación y con ello evitar el daño excesivo e irreversible.

Trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación^[1,2], han permitido esclarecer que ciertos lípidos con potencial proinflamatorio (como el ácido araquínico) se liberan en los sitios donde se genera daño, y pueden actuar sobre las células del sistema inmune innato, monocitos y macrófagos, promoviendo la síntesis y acumulación de un ácido graso inusual: el ácido (Z)-7-hexadecenoico (16:1 n-9), identificado de modo inequívoco por espectrometría de masas y que se localiza de forma mayoritaria en los lípidos de estas células. El objetivo último de nuestro trabajo será establecer de modo concluyente el papel antiinflamatorio de este ácido.

El ácido araquínico, producto que secretan las células endoteliales en gran cantidad cuando están activadas por algún agente extraño, atrae los monocitos, los cuales atraviesan la membrana y ya en el interior se diferencian en macrófagos, donde se acumulan gran cantidad de lípidos neutros en forma de gotas lipídicas. Cuando hay grandes cantidades, se depositan en la pared. Esta es la etapa clave en la formación de placas ateroscleróticas.

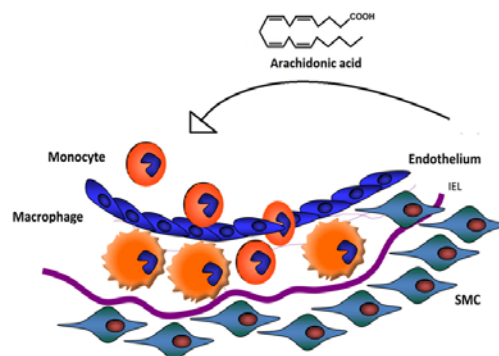


Imagen 1: Formación de placas ateroscleróticas.

Este proceso promoverá la síntesis de nuevos ácidos grasos para combatir el proceso inflamatorio, encontrándose aquí un aumento en la proporción del ácido (Z)-7-hexadecenoico (16:1 n-9).

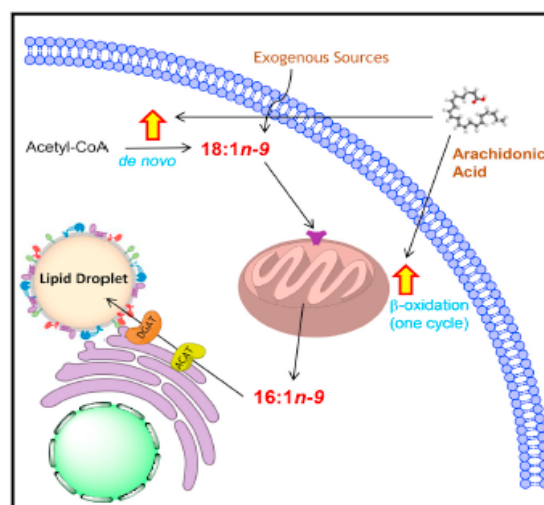


Imagen 2: Proceso de síntesis de ácidos grasos.

Debido a este hecho, y a la ausencia del isómero 16:1 n-9 durante otros procesos inflamatorios diferentes, se espera que este ácido graso pueda actuar como biomarcador de enfermedades ateroscleróticas.

Se ha observado que el ácido Z-7-hexadecenoico se incorpora en diferentes formas biológicas como monoacilgliceroles (MAG), diacilgliceroles (DAG), triacilgliceroles (TAG), fosfolípidos (PL) y ésteres de colesterol (CE). Preferentemente, como se observa en la imagen 3, la incorporación ocurre en glicerofosfolípidos.

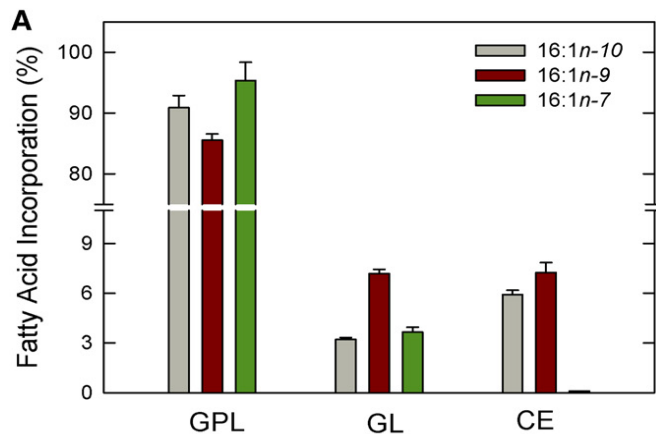


Imagen 3^[1]: Lípidos donde se incorpora el ácido (Z)-7-hexadecenoico (nmol/mg proteína)

Este trabajo se propone sintetizar diferentes lípidos, principalmente derivados de mioinositol y, más concretamente, glicerofosfomioinositoles, mediante los cuales sea posible introducir el ácido Z-7-hexadecenoico (16:1 n-9) adecuadamente marcado, para hacer su seguimiento in vivo.

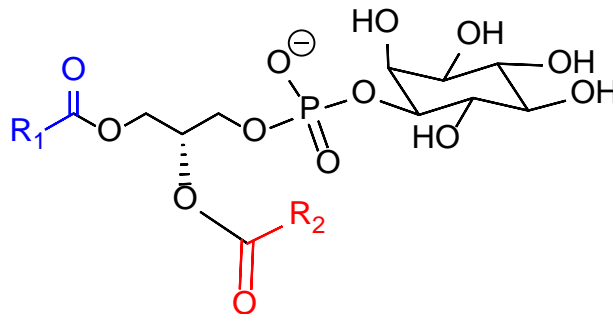


Figura 2: Estructura general de un glicerofosfomioinositol

Los fosfatos de mioinositol participan en el anclaje de proteínas en la membrana celular^[3], además de ser portadores de ácidos grasos. Esto le añade valor e interés al diseño de procedimientos y rutas para su preparación.

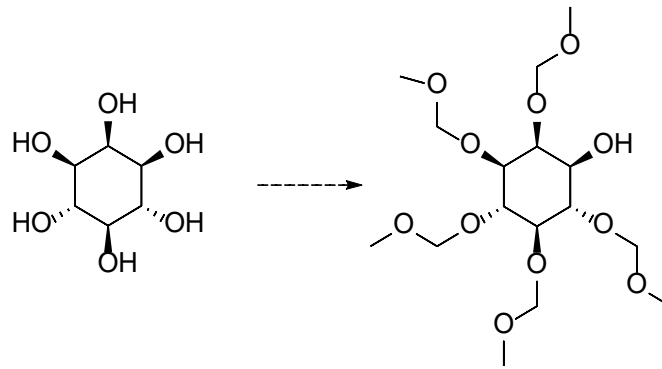
Objetivos y plan de trabajo

Los principales objetivos a llevar a cabo en este trabajo son los siguientes:

- Proteger selectivamente los grupos hidroxilo del mioinositol para la obtención del derivado deseado, aquel con el OH de C-1 libre.
- Sintetizar el ácido (Z)-7-hexadecenoico.
- Unir dicho ácido graso insaturado al derivado de glicerol de forma selectiva, dejando el grupo hidroxilo primario sn_3 libre para, posteriormente, formar el fosfato y unir el derivado de mioinositol.
- Formar un fosfolípido a partir del diacilglicerol y el derivado de mioinositol.

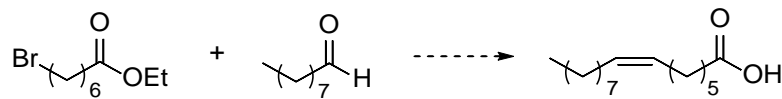
Para conseguir estos objetivos se ha diseñado el siguiente plan de trabajo:

- Protección selectiva de los grupos hidroxilo 2, 3, 4, 5 y 6 del mioinositol, quedando libre el situado en el C-1, donde se producirá la unión con el fosfoglicerol.



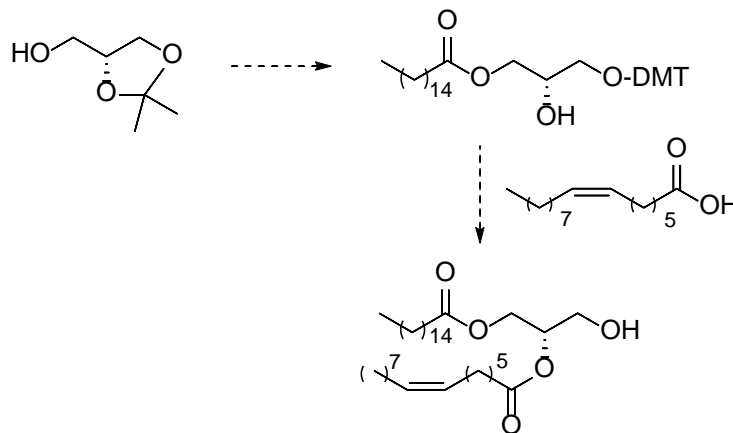
Esquema 1: Protección selectiva mioinositol.

- Obtención del ácido graso (Z)-7 hexadecenoico a partir del 7-bromoheptanoato de etilo y nonanal, por reacción del Wittig.



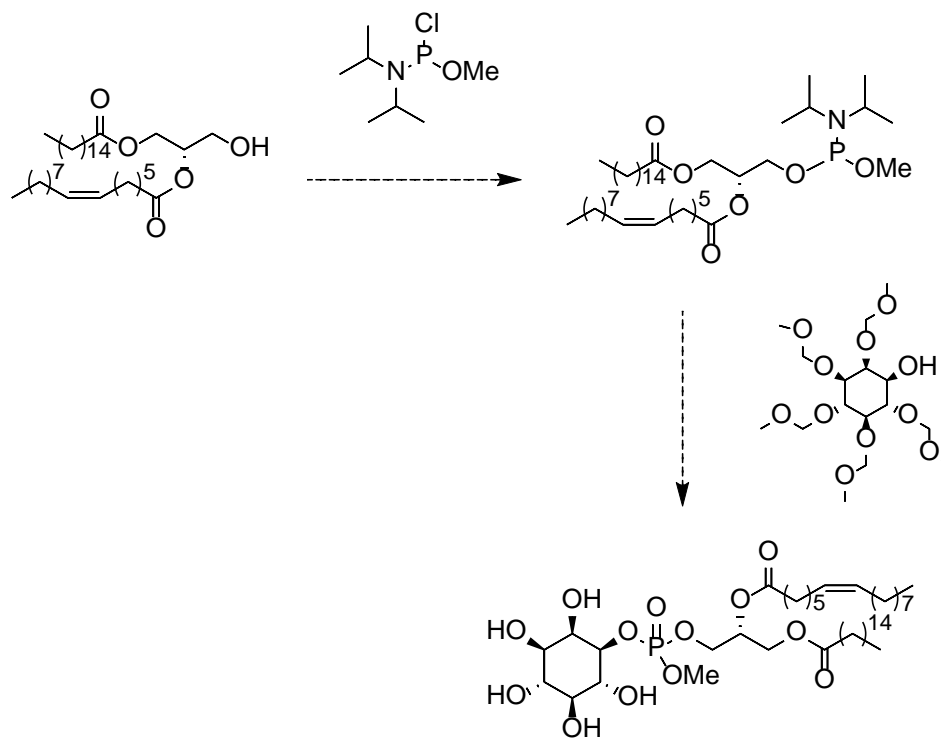
Esquema 2: Síntesis ácido (Z)-7-hexadecenoico.

- Síntesis del diacilglicerol a partir del ácido graso (Z)-7-hexadecenoico, un derivado de ácido palmítico sobre un derivado adecuado del propanotriol, el enantiómero biológicamente activo preparado a partir del (2R)-solketal.



Esquema 3: Síntesis diacilglicerol.

- Síntesis del glicerofosfolípido a partir del diacilglicerol previamente obtenido por reacción con el cloruro de fosfinoilo adecuado, y posterior esterificación del fosfito resultante con el mioinositol.
- Oxidación quimioselectiva del fosfito a fosfato.
- La eliminación final de los grupos protectores del mioinositol, proporcionará el glicerofosfomioinositol deseado.



Esquema 4: Síntesis de glicerofosfomioinositol

Antecedentes bibliográficos

1. Síntesis del derivado de mioinositol:

Desde hace tiempo se conoce que los fosfatos de mioinositol desencadenan procesos biológicos importantes como, por ejemplo, servir de anclaje de proteínas en la membrana celular.

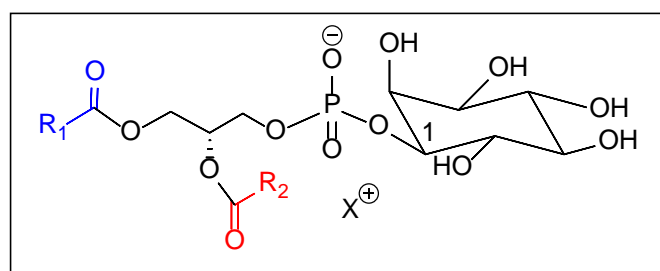


Figura 3: Glicerofosfomioinositol.

De los diferentes estereoisómeros de inositol, solo el mioinositol se encuentra formando glicerofosfatos de manera natural en los organismos vivos. Es por este hecho que nuestro trabajo se propone sintetizar diferentes fosfogliceroles en cuya estructura esté el mioinositol junto con el ácido (Z)-7-hexadecenoico (16:1 n-9), para estudiar su actividad antiinflamatoria. En el estudio bibliográfico llevado a cabo, se han recopilado datos acerca de diferentes aspectos relacionados con este objetivo concreto.

Uno de los aspectos más problemáticos de esta síntesis, está en la diferenciación de los seis grupos hidroxilo secundarios del mioinositol. Diferentes autores han desarrollado procesos que permiten su protección selectiva, en base a efectos estéricos que afectan o diferencian su reactividad ^[4]. Los sucesivos procesos de protección y desprotección selectiva conducentes al derivado con el grupo OH en C-1 libre tienen como consecuencia una disminución del rendimiento ^[5] global de la síntesis.

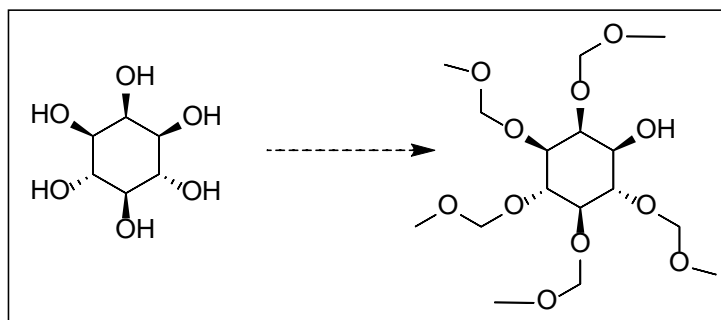
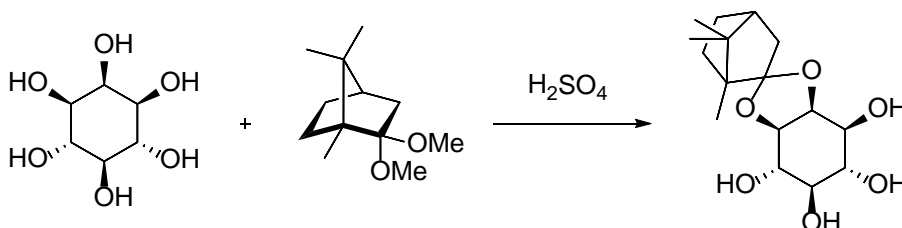


Figura 4: Protección selectiva del mioinositol.

Uno de los procedimientos estudiados para obtener derivados de mioinositol es partir del 2,3-O-(1',7',7'-trimetil[2'.2'.1']bicyclohept-2'-iliden)-mioinositol. Esta molécula se ha sintetizado por transcetalización del dimetilacetal del alcanfor, con mioinositol (*Esquema 5*). El proceso, según los autores, originó diferentes regio- y estereoisómeros ^[5,6], con predominio del derivado buscado como mezcla de dos diastereoisómeros, que se separaron por cristalización fraccionada.



Esquema 5

A partir de este acetal, se han descrito diferentes vías de protección secuencial ^[5] que sin embargo, proporcionan pobres rendimientos en el estereoisómero buscado.

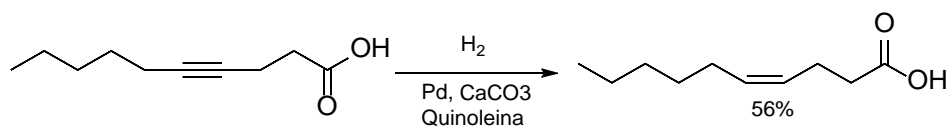
2. Síntesis del ácido graso (Z)-7-hexadecenoico

La síntesis de ácidos grasos de estereoquímica *cis* puede realizarse de distintas formas. A continuación, se recogen algunas de las más utilizadas.

Hidrogenación de alquinos

Este proceso consiste en la hidrogenación selectiva de alquinos para generar (Z)-alquenos. Se consigue la estereoselectividad utilizando el “catalizador de Lindlar”, que

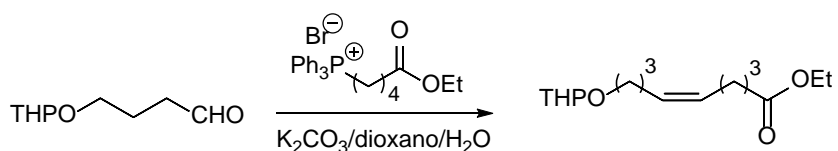
consiste en paladio (5%) sobre carbonato de calcio y quinoleína. Cuando se utiliza este catalizador, se obtienen buenos resultados, tal y como se observa en diversas investigaciones como por ejemplo en la síntesis del ácido (Z)-4-decenoico a partir del ácido 4-decinoico ^[7] (*Esquema 6*).



Esquema 6

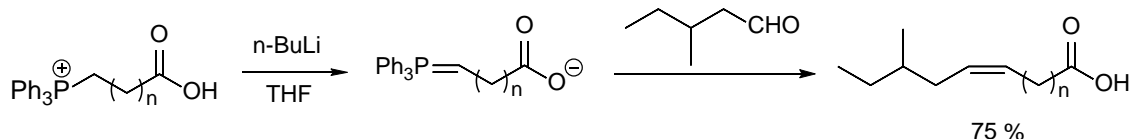
Reacción de Wittig

Esta reacción se produce entre una cetona o aldehído y un iluro de fósforo, dando lugar a un (Z)-alqueno ^[8]. Este hecho se ha comprobado de forma exitosa en la preparación del 9-(tetrahidropiran-2-iloxi)-(Z)-nonanoato de etilo, a partir de la sal de fosfonio procedente del 5-bromopentanoato de etilo y un aldehído ^[9] (*Esquema 7*).



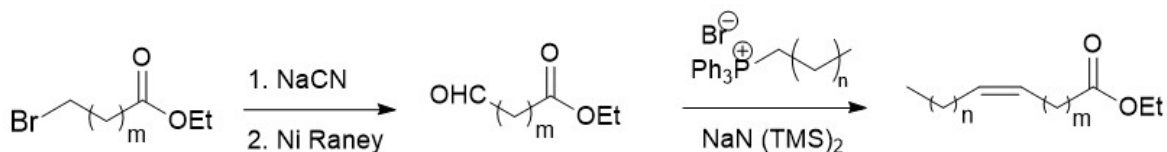
Esquema 7

La obtención de un (Z)-alqueno se ha realizado también partiendo de aldehídos ramificados ^[10]. Este es el caso de la síntesis tanto del ácido 14-metilhexadecenoico, como del ácido 12-metiltridecenoico. Los dos se prepararon a partir de un iluro de fósforo y 3-metilpentanal (*Esquema 8*).



Esquema 8

En el caso concreto de nuestro trabajo, el objetivo es el ácido graso (Z)-7-hexadecenoico (16:1 n-9), cuya síntesis se ha abordado de varias formas. En una de ellas se partió de 6-bromohexanoato de etilo, el cual se transformó en 7-oxoheptanoato de etilo, de cuya reacción posterior con el iluro de fósforo correspondiente, se obtuvo el ácido deseado ^[11] (*Esquema 9*).



Esquema 9

La *cis*-diastereoselectividad de la reacción de Wittig, es tanto mayor, cuanto mayor sea la longitud de los fragmentos alcanoicos a insertar ^[11].

3. Síntesis de diacilgliceroles

La síntesis de diacilgliceroles tiene como principal reto mantener la regio- y enantioselectividad entre los hidroxilos pertenecientes al glicerol. Por esto se han estudiado varias vías que parten de un derivado del *R*-glicerol, correctamente protegido para preservar la estereoquímica.

En la bibliografía se utilizan diversos métodos, entre los cuales los más ventajosos parten del (*2R*)-glicidol y del (*2R*)-solketal, respectivamente.

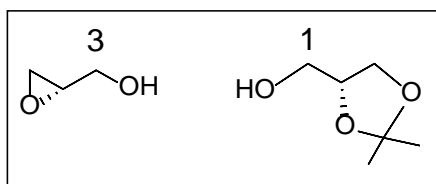
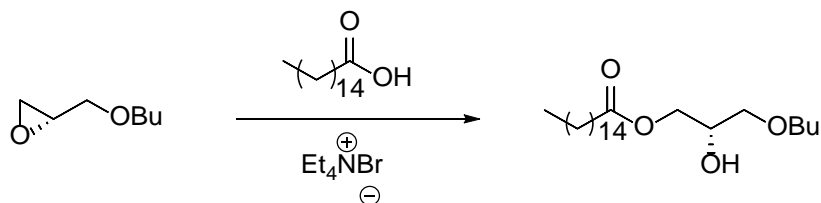


Figura 5: Estructuras de (*2R*)-glicidol (izquierda) y (*2R*)-solketal (derecha)

(*2R*)-glicidol

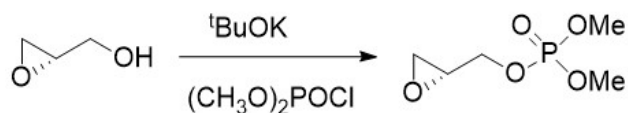
Si se parte de este derivado de oxirano, se puede llegar a distinguir los grupos hidroxilo de la posición 1, así como de la 2 ^[12,13]. La protección del OH primario se puede realizar de diferentes formas:

- Usando ácidos grasos y bromuro de tetraetilamonio como catalizador, se incorporará el grupo ácido en la posición 1 ^[12] (Esquema 10).



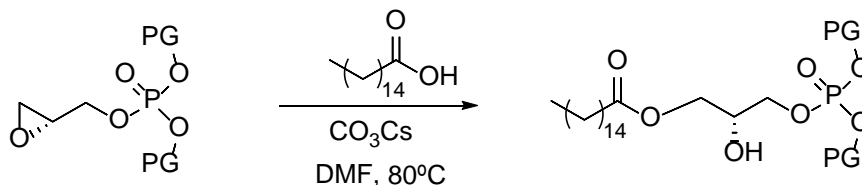
Esquema 10

- Haciendo reaccionar (*2R*)-glicidol con cloruro de dimetilfosfonio ^[13], en presencia de *tert*-butóxido potásico, para obtener el 3-fosfatidil derivado (Esquema 11).



Esquema 11

- En medio básico, se produce la apertura nucleófila del epóxido, de forma regioselectiva^[14] (Esquema 12).



Esquema 12

Esta metodología nos permite partir de un derivado donde el OH primario (C-3) se encuentra ya sustituido, para así incorporar los ácidos grasos deseados sucesivamente en C-1 y C-2.

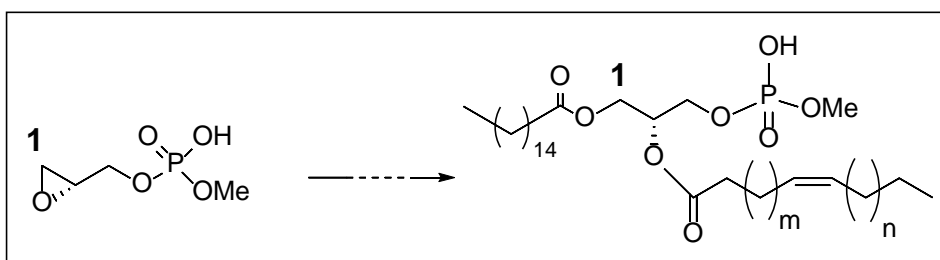


Figura 6: Síntesis de fosfodiacylglicerol a partir de (2R)-glicidol

(2R)-solketal

El uso del (2R)-solketal o 1,2-O-isopropiliden glicerol es una buena alternativa al (2R)-glicidol, ya que permite acceder al grupo hidroxilo en C-1. Posteriormente es posible liberar el 2,3-diol, proteger la posición 3 e introducir el ácido graso deseado en C-2. Esta metodología requiere proteger previamente el grupo hidroxilo libre para, más tarde, eliminar el grupo isopropilideno en condiciones ácidas.

Este método implica proporciona una buena regioselectividad entre el hidroxilo primario y secundario, facilitando el bloqueo del hidroxilo primario y la introducción del ácido graso en el secundario.

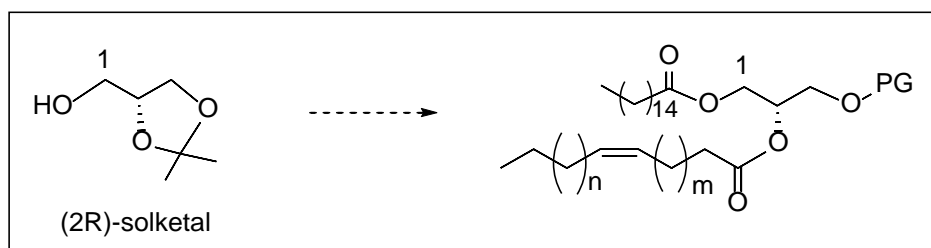
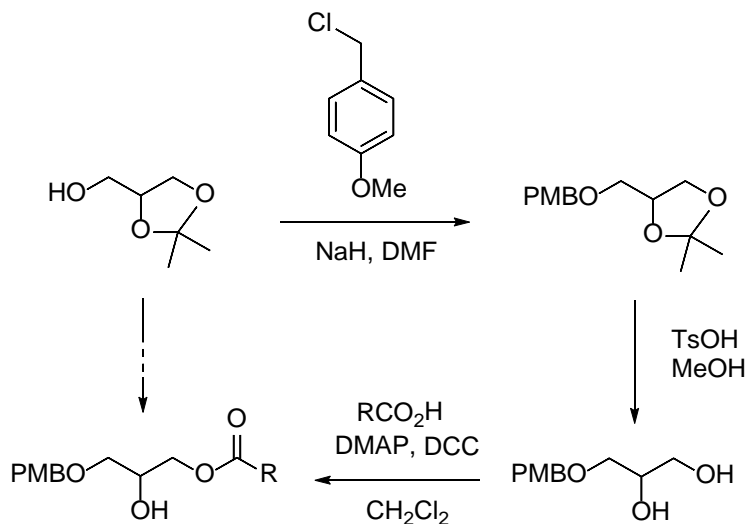


Figura 7: Síntesis de diacylglicerol a partir de (2R)-solketal

Otra posible vía para sintetizar el diacilglicerol es tratar (2*R*)-solketal con cloruro de 4-metoxibencilo en medio básico^[15], quedando así el grupo hidroxilo de C-1 protegido. Posteriormente, se deberá abrir el acetal con ácido *p*-toluensulfónico para, por último, incorporar un ácido graso en C-3 en presencia de DMAP y DCC. De esta forma se consigue liberar el OH secundario, lugar donde se unirá el ácido graso (*Esquema 13*).

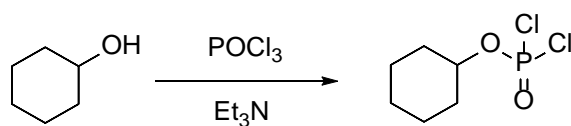


Esquema 13

4. Síntesis de glicerofosfomioinositales

La fosforilación del diacilglicerol, etapa previa a la introducción del mioinositol, se llevará a cabo por esterificación de un fosfito o un fosfato con el hidroxilo en C-3 del diacilglicerol.

En la literatura existente al respecto, se han descrito diferentes procedimientos. La preparación de monómeros de fosfodichlorohidratos de alquilo o arilo se puede realizar utilizando tanto fosfitos como fosfatos. Éstos últimos son los más versátiles, concretamente el oxiclورو de fósforo, el cual permite incorporar secuencialmente, hasta restos alcoxilo^[16] (*Esquema 14*).



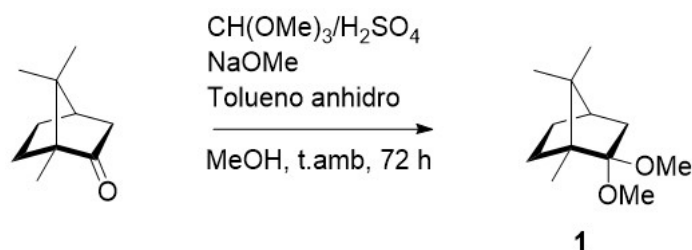
Esquema 14

Resultados y discusión

1. Protección selectiva del mioinositol

La preparación del derivado de mioinositol precisa un conjunto de etapas que implican protecciones y desprotecciones selectivas de los diferentes grupos hidroxilo.

Se comienza con la protección selectiva de los OH *cis* en C-2 y C-3, haciendo reaccionar el mioinositol con un dimetilacetal del *R*-alcanfor, el cual se prepara previamente obteniendo buenos rendimientos a partir del *R*-alcanfor^[6] (*Esquema 15*).



Esquema 15

Esta protección selectiva conlleva un proceso de transcetalización donde se obtiene una mezcla de 4 isómeros^[17], resultantes de la incorporación del alcanfor sobre los OH de C-1 y C-2 o C-2 y C-3 del mioinositol.

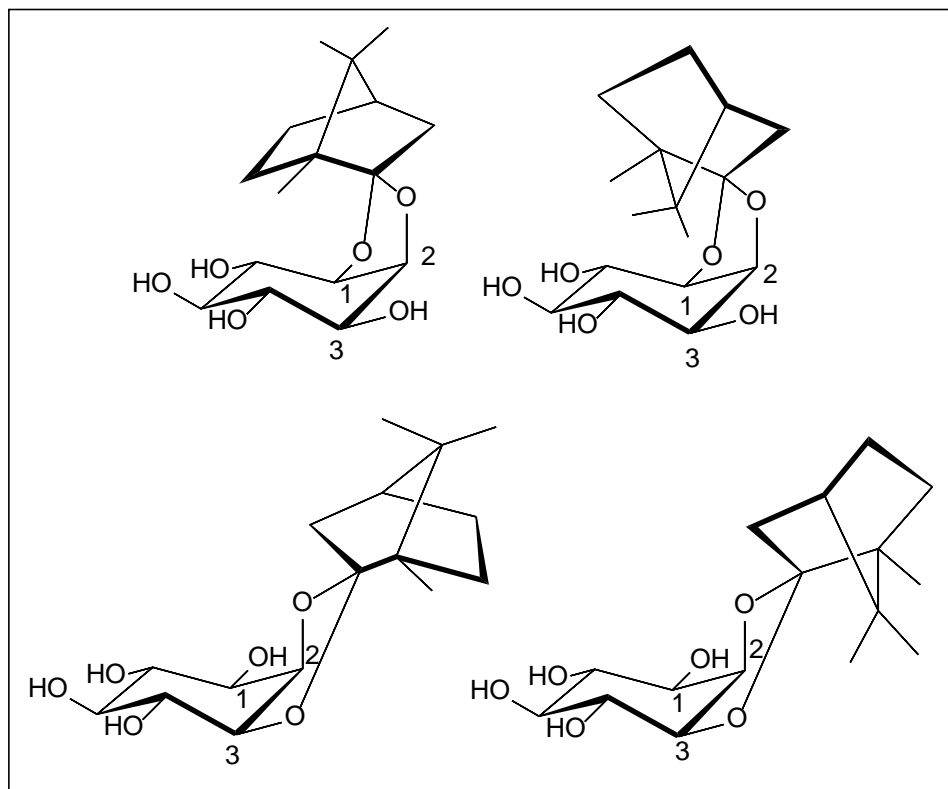


Figura 8: Isómeros de mioinositol tras la transcetalización.

El isómero de interés puede separarse mediante sucesivas recristalizaciones, ya que es el más insoluble de los cuatro ^[18,19]. Es por estas recristalizaciones, y por la existencia de diferentes isómeros que el rendimiento de esta etapa sea muy bajo, no superando el 35%. Esto condiciona las etapas siguientes, ya que se trata de la etapa limitante de la síntesis (*Esquema 16*).

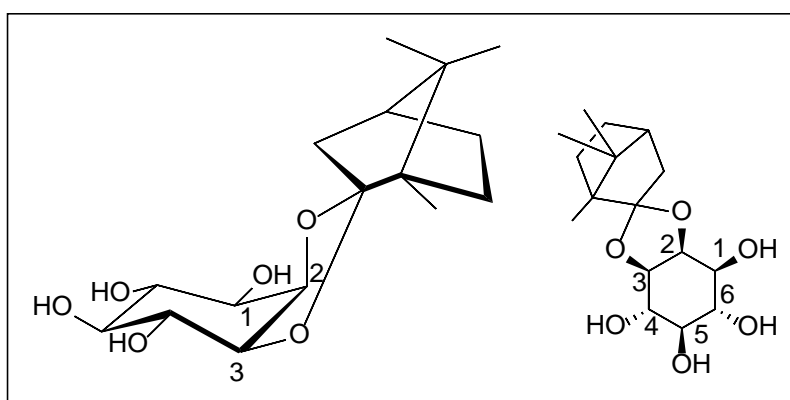
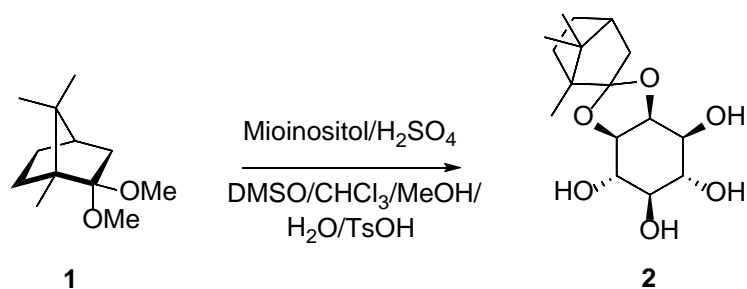


Figura 9: Isómero de mioinositol deseado.



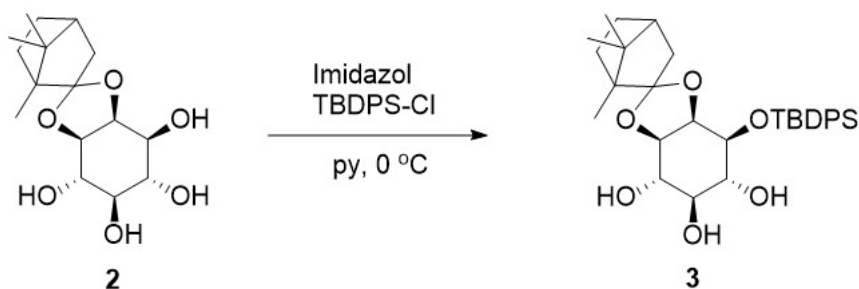
Esquema 16

Intentar mejorar el rendimiento de esta etapa es uno de los puntos donde más hincapié se ha hecho. De acuerdo con la bibliografía ^[6], los rendimientos de la protección selectiva fueron muy bajos. El procedimiento se optimizó incorporando los siguientes aspectos experimentales:

- 1) Las recristalizaciones se realizaron con metanol, evitando el uso de agua.
- 2) Se añadió el doble de ácido *p*-toluensulfónico (TsOH) de lo indicado en la biografía, tratando de facilitar la precipitación del isómero deseado. Se descubrió un apreciable incremento del rendimiento.

La baja solubilidad del compuesto **2**, aunque es útil para su separación, genera problemas a la hora de realizar la caracterización espectroscópica. De hecho, los espectros de RMN de este compuesto, fueron realizados en metanol deuterado.

Las características estéricas de la estructura del compuesto **2** favorecen la incorporación regioselectiva de un grupo protector voluminoso, como es el *tert*-butildifenilsililo (TBDPS), en el grupo hidroxilo de C-1, para obtener el compuesto **3** con excelentes rendimientos (93%) (Esquema 17).



Esquema 17

En este caso, es importante someter **2** a secados de unas 24 horas (a unos 65°C) para que esté completamente anhidro ya que la posible presencia de agua afectaría al rendimiento. Por otro lado, la regioselectividad aumenta de manera notable cuando se controla la temperatura de la reacción entre 0 y -2 °C.

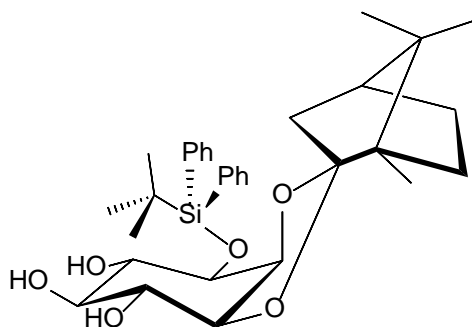
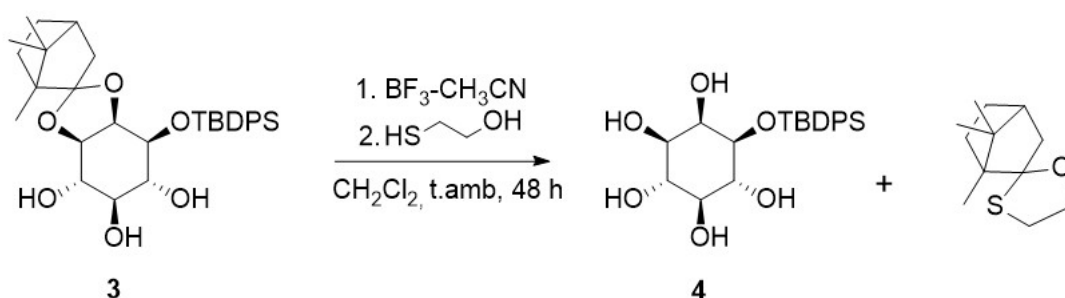


Figura 10: Estructura del compuesto **3**.

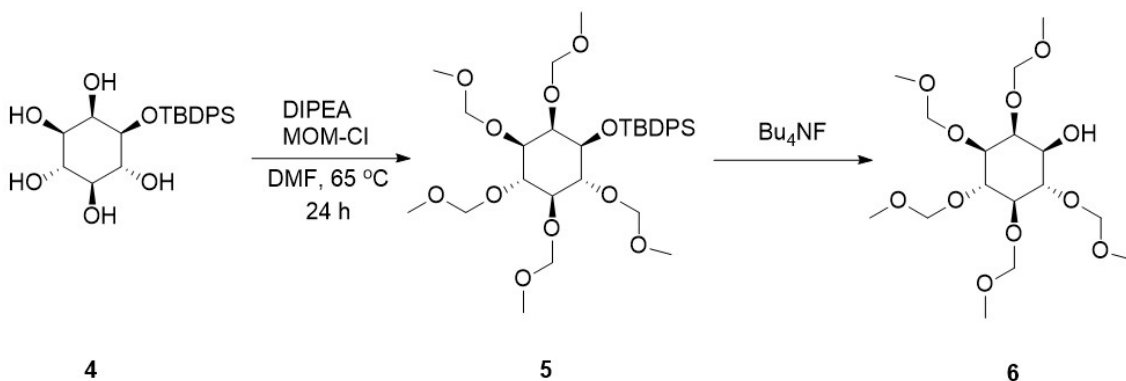
El paso siguiente consiste en la desprotección selectiva de los OH de C-2 y C-3 mediante transacetilación ácido-catalizada. Se realiza tratando el compuesto **3** con el complejo BF₃-acetonitrilo y 2-mercaptoetanol (*Esquema 18*).



Esquema 18

La reacción se realizó también con BF₃-Et₂O, pero mientras que el complejo con acetonitrilo proporciona un rendimiento medio del 55%, las reacciones con el complejo trifluoruro de boro/eterato se produjeron en muy escasa extensión. También es de mencionar que el monotioacetal del alcanfor se separa fácilmente del producto deseado por cromatografía en columna.

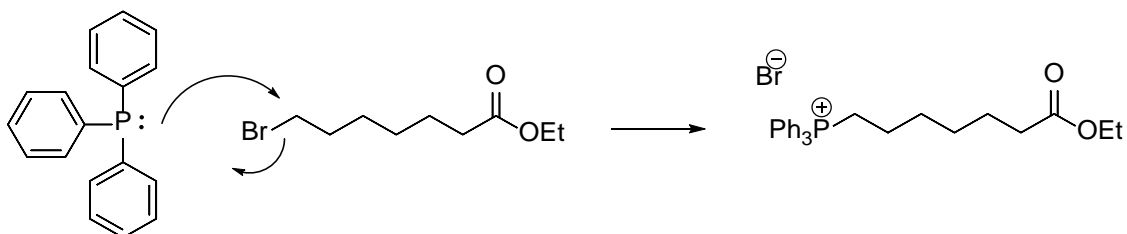
A continuación, se procede a la protección de los grupos hidroxilo con clorometilmetiléter (MOM-Cl) y finalmente, se lleva a cabo la eliminación del grupo protector TBDPS, dejando así libre el grupo OH del C-1 donde se unirá el diacilglicerol a través del éster fosfórico. Cabe destacar el alto rendimiento global obtenido (en torno al 90%) (*Esquema 19*).



Esquema 19

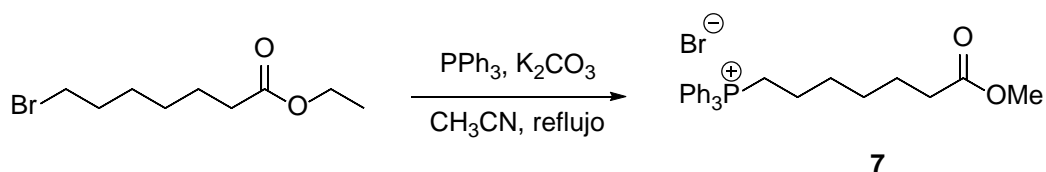
2. Síntesis del ácido graso (*Z*)-7-hexadecenoico

La ruta de síntesis utilizada para la preparación del ácido graso (*Z*)-7-hexadecenoico parte del 7-bromoheptanoato de etilo y trifenilfosfina, y transcurre por ataque nucleofílico del fósforo sobre el carbono unido al bromo. Para mejorar el rendimiento, la trifenilfosfina debe estar totalmente anhidra (*Esquema 20*).



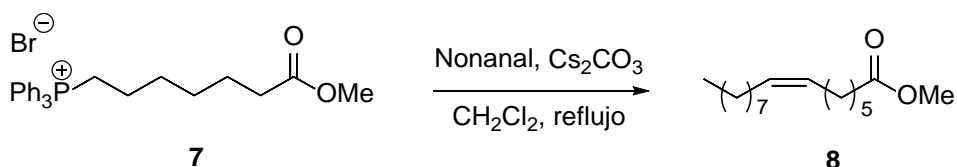
Esquema 20

Esta reacción no tiene mayores inconvenientes, aunque hay que mencionar que al realizar la purificación del compuesto mediante columna cromatográfica sobre gel de sílice como soporte, empleando cloruro de metileno/metanol (20:1) como eluyente, se produce la transesterificación del éster etílico en metílico. Como no se producen diferencias al continuar con la síntesis del ácido si se parte de éster etílico o metílico, se prosigue con el metílico en las etapas siguientes (*Esquema 21*). El rendimiento de esta reacción fue prácticamente cuantitativo ($\approx 99\%$).



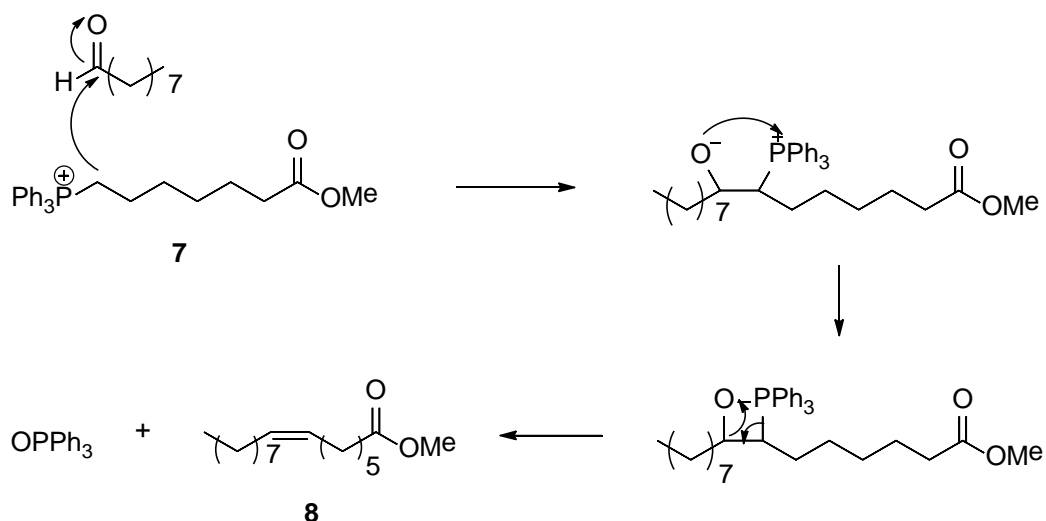
Esquema 21

El tratamiento de la sal de fosfonio previamente formada con nonanal y carbonato de cesio da como producto el (*Z*)-alqueno buscado con claro predominio sobre el estereoisómero (*E*) (*Esquema 22*).



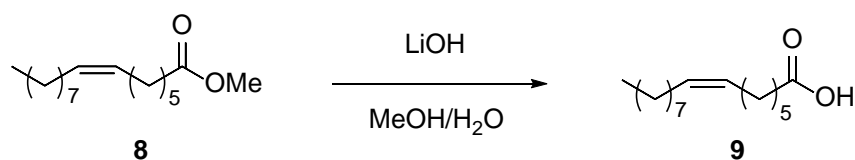
Esquema 22

La reacción de Wittig transcurre por ataque nucleofílico del iluro formado empleando carbonato de cesio como base, sobre el carbono carbonílico del aldehído. En este proceso se produce la formación de un intermedio donde el oxígeno ataca al fósforo, dando lugar a otro intermedio cíclico, derivado del oxafosfetano. El final de la reacción es una β -eliminación, donde se elimina el óxido de trifenilfosfina, formándose un doble enlace *cis* (*Esquema 23*). El éster **8** se obtiene con un 94% de rendimiento de producto puro.



Esquema 23

La saponificación del éster metílico con hidróxido de litio proporciona el ácido (*Z*)-7-hexadecenoico (Esquema 24) con un rendimiento del 85%.



Esquema 24

3. Síntesis del diacilglicerol

Como se ha explicado previamente en este trabajo, uno de los mayores retos en la síntesis de diacilgliceroles es la diferenciación de los grupos hidroxilos del glicerol. Además, se debe partir de derivados de glicerol enantioméricamente puros, en vista de la aplicación futura del trabajo (ensayos “*in vivo*”). La terminología utilizada para definir la estereoquímica absoluta denomina a cada carbono como *sn*₁, *sn*₂ y *sn*₃ (stereospecific nomenclature).

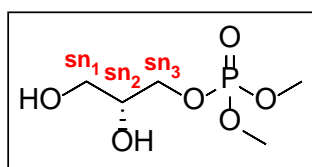
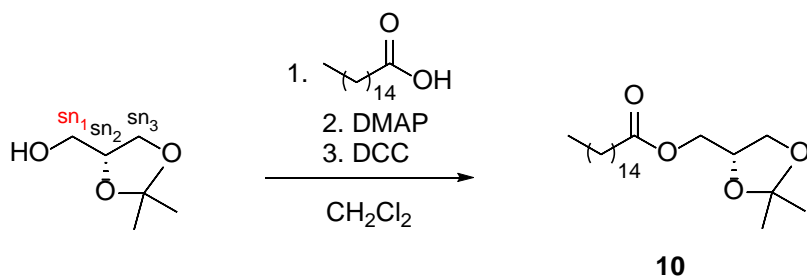


Figura 11: Posiciones *sn*₁, *sn*₂ y *sn*₃ en glicerina fosforilada

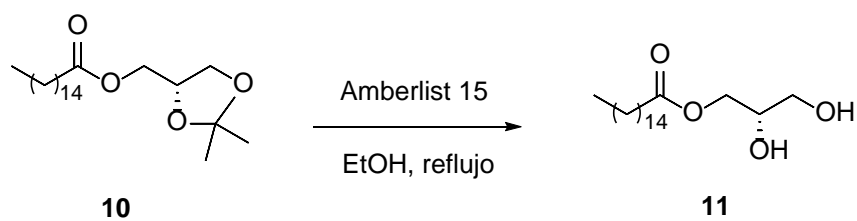
En este caso, se ha seguido la ruta que utiliza el (*2R*)-solketal^[20-24] como producto de partida.

Se hace reaccionar el (2*R*)-solketal con ácido palmítico, introduciéndose éste en el carbono unido al OH primario (sn₁) del solketal (*Esquema 25*). El uso de DMAP y DCC permite que la reacción se produzca sin afectar al grupo protector isopropilideno (rendimiento superior al 90%).



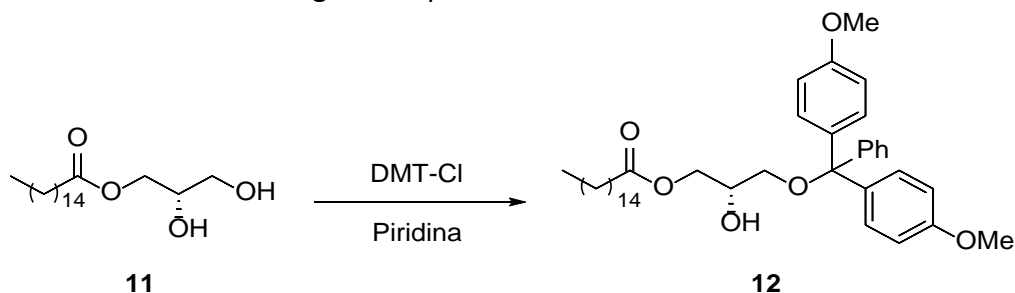
Esquema 25

El siguiente paso es la desprotección de los grupos hidroxilo. Para ello se utiliza la resina *Amberlist 15*, que sirve como intercambiadora de protones. Se ha incrementado el tiempo de reacción con respecto al descrito en la bibliografía ^[25], mejorándose el rendimiento (53%) (*Esquema 26*).



Esquema 26

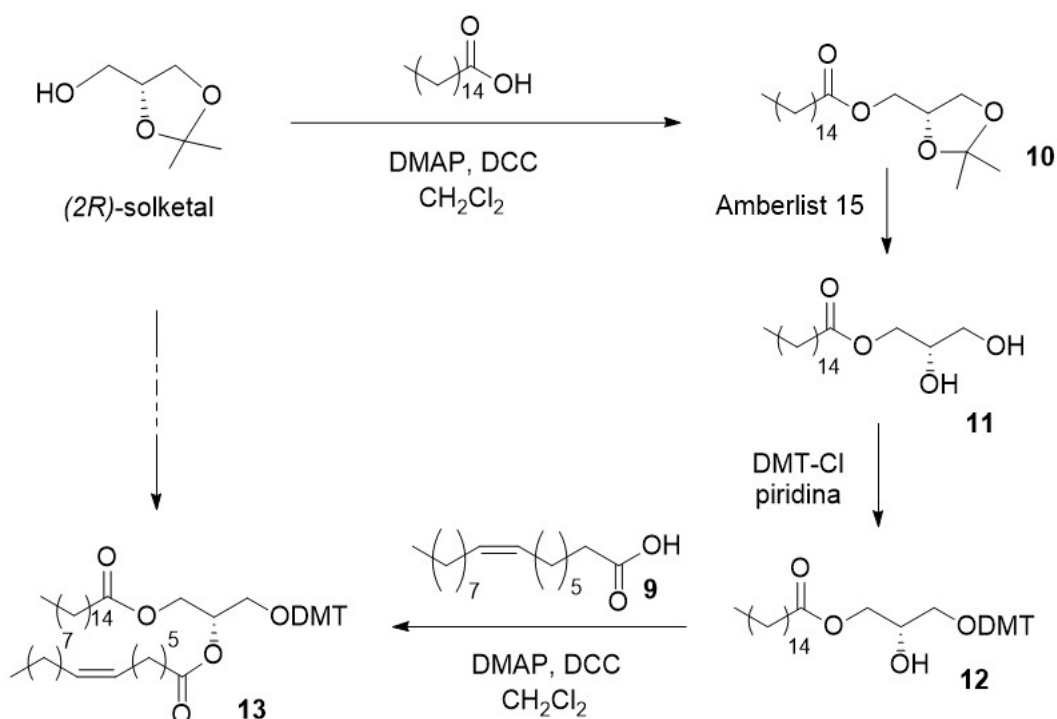
Para terminar, se protege el OH primario situado en sn₃ con cloruro de dimetoxitritilo (DMT-Cl), dejando libre el grupo hidroxilo de sn₂, que es donde se unirá el ácido graso (*Z*)-7-hexadecenoico (*Esquema 27*). Al ser un grupo protector muy voluminoso, se consigue gran selectividad en la reacción, que permite diferenciar el alcohol primario del secundario. Estas dos reacciones de protección y desprotección selectiva se producen con rendimientos globales próximos al 50%.



Esquema 27

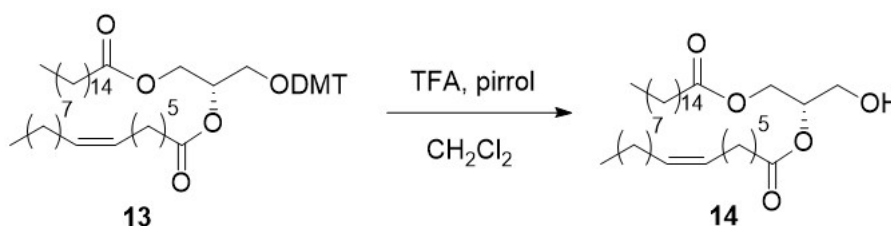
Como el objetivo es la puesta a punto de una metodología para la síntesis de un glicerofosfomioinositol, antes de la formación del diacilglicerol con el ácido graso (Z)-7-hexadecenoico y con objeto de estudiar las condiciones de reacción se utiliza el ácido oleico (16:1 n-9), producto comercial muy similar estructuralmente al (Z)-7-hexadecenoico (16:1 n-9), el cual se incorporará una vez optimizadas las condiciones de reacción (*Esquema 28*).

La introducción del ácido graso insaturado [procedimiento que será extrapolable a los diferentes isómeros posicionales del ácido (16:1)-hexadecenoico], sobre el hidroxilo secundario, se lleva a cabo por tratamiento con DCC y DMAP. Se probó a hacerlo a temperatura ambiente durante 24 horas, proporcionando así rendimientos muy bajos. Estos se mejoraron sustancialmente activando la reacción con ultrasonidos^[26], procedimiento éste que condujo a rendimientos superiores al 70%, en tiempos de tan solo 6 horas.



Esquema 28

A continuación, se debe eliminar el grupo protector dimetoxitritilo. Esto se realiza con ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de pirrol, obteniéndose rendimientos moderados (42%). (*Esquema 29*).

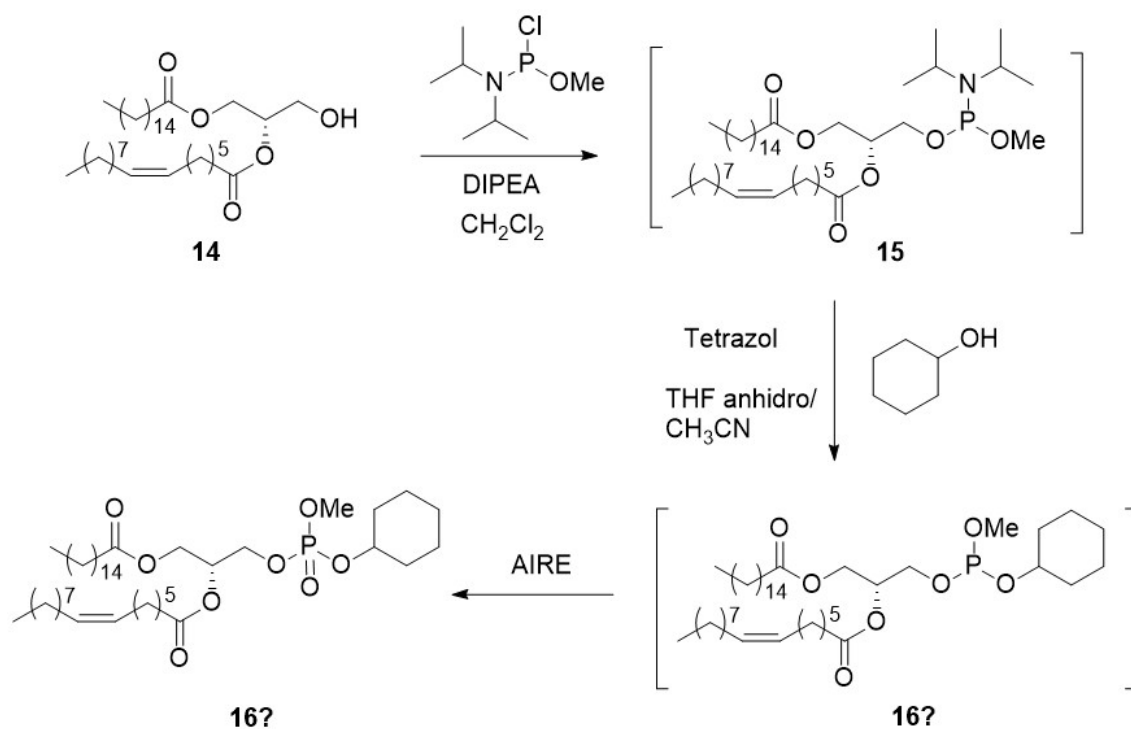


Esquema 29

4. Síntesis del glicerofosfomioinositol

La última etapa de este trabajo, tendría como objetivo la incorporación del mioinositol adecuadamente protegido al glicerofosfito, para proceder finalmente a la desprotección y con ello, al glicerofosfomioinositol deseado. Sin embargo, aunque se preparó el fosfito con buenos rendimientos, la esterificación final, no proporcionó resultados satisfactorios.

Inicialmente, desarrollamos la fosforilación del diacilglicérido, empleando el cloruro del ácido N, N-diisopropilmetilfosfinámico en DIPEA. El compuesto **15**, se caracterizó a través de una alícuota tomada de la masa de reacción, por ^1H -RMN y el ^{31}P -RMN. Confirmada la estructura, se empleó "in situ" para transformar la fosfamida **15** en el éster. A fin de ajustar las condiciones de reacción, evitando el uso del costoso derivado de mioinositol, se ajustaron las condiciones de esta etapa final empleando como sustituto el ciclohexanol (*Esquema 30*).



Esquema 30

En la caracterización de los compuestos **15** y **16**, los espectros de ^{31}P (*Espectros 58 y 60*) [registrados a 162 MHz], proporcionan señales situadas a 14,5 y 9,8 ppm, respectivamente. Los desplazamientos químicos son demasiado bajos (<15 ppm) para tratarse de un P^{III} ($\delta > 100\text{ppm}$) y por lo tanto, son más consistentes con el desplazamiento tabulado para un P^{V} ^[28,29] ($\delta > 90\text{ppm}$). Estos resultados sugieren que la oxidación ocurre "in situ", permitiendo así obviar la etapa de oxidación final, y con ello la posible epoxidación simultánea del doble enlace presente en el ácido graso.

Además, no ha sido posible comparar con datos bibliográficos concretos, debido a que los sustituyentes del fosfito/fosfato empleados son bastante peculiares. El análisis por infrarrojo también es consistente con la presencia de un fosfato, presentando para el compuesto **16** (*Espectro 61*) una banda de tensión intensa en torno a 1000 cm^{-1} , como corresponde al doble enlace $\text{P}=\text{O}$ [28,29].

La preparación del éster **16**, transcurrió con un rendimiento muy bajo. Permitió la caracterización del fosfato, pero la reacción no sirvió como método extrapolable a la incorporación del mioinositol.

Por todo ello, la última etapa de la síntesis, que constituirá la culminación del trabajo, no se pudo abordar, y queda pendiente para futuros trabajos.

Conclusiones

- *Se ha llevado a cabo la protección selectiva de 5 de los 6 grupos OH del mioinositol, obteniendo como producto el estereoisómero adecuado con el grupo hidroxilo de C-1 libre.*
- *El proceso sintético se ha optimizado, incrementando los rendimientos de las etapas limitantes.*
- *Se ha preparado el ácido graso (Z)-7-hexadecenoico (16:1 n-9) en tres etapas a partir de reactivos sencillos.*
- *La ruta de síntesis del diacilglicerol se ha llevado a cabo a partir de (2R)-solketal, añadiendo en la posición sn_1 el ácido palmítico, para proteger el grupo hidroxilo primario en sn_3 e incorporar por último el ácido graso insaturado en sn_2 .*
- *Se ha ensayado la esterificación del fosfato con el diacilglicerol anteriormente preparado, constando la oxidación simultánea del fosfito a fosfato.*
- *La reacción del diacilglicerofosfato con ciclohexanol, permitió preparar el ester fosfórico correspondiente, aunque en escasa extensión.*
- *El proceso podrá hacerse extensivo a cualquier pareja de ácidos grasos, y sus posiciones sobre el diacilglicerol son intercambiables, modificando la secuenciación de reacciones.*

Materiales y métodos:

El análisis por **cromatografía de placa fina (TLC)** se ha realizado con placas de sílica-gel. Se han revelado tanto con indicador fluorescente (294 nm) como con diversos reveladores (ácido fosfomolibdico, molibdato cérico de amonio...).

Los **reactivos** utilizados en las síntesis proceden de diversas casas comerciales (Aldrich, Acros Organics). Los **disolventes secos** fueron comerciales o bien secados mediante tamices moleculares en el laboratorio.

Los espectros de **¹H NMR** (400 MHz), **¹³C NMR** (101 MHz) y **³¹P NMR** (162 MHz) se obtuvieron en un equipo de Agilent Technologies. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm, utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. En ¹H los datos están escritos de la siguiente forma: desplazamiento químico (chemical shift), multiplicidad (s = singlete, d = doblete, dd = doble doblete, t = triplete, m = multiplete) e integración.

Del espectro bidimensional **HSQC** se obtiene información sobre el acoplamiento existente entre los átomos de hidrógeno y los de carbono presentes en la molécula.

El espectro bidimensional **COSY** aporta información sobre el acoplamiento entre los átomos de hidrógeno de una molécula.

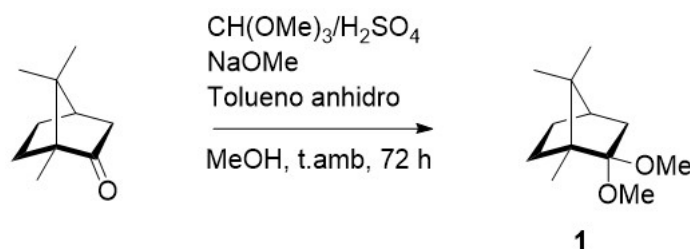
El espectro de infrarrojo nos aporta información sobre las bandas de vibración de los grupos funcionales más destacables presentes en cada compuesto.

Los espectros unidimensionales, así como los bidimensionales fueron obtenidos en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de Valladolid (LTI).

Los espectros de IR se registraron en un aparato Perkin-Elmer FT-IR System, Spectrum BX.

A continuación, se encuentran los procedimientos experimentales llevados a cabo en el laboratorio para la realización de este trabajo.

1. Síntesis de 2,2-dimetoxi-1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptano (**1**)^[6,27]:

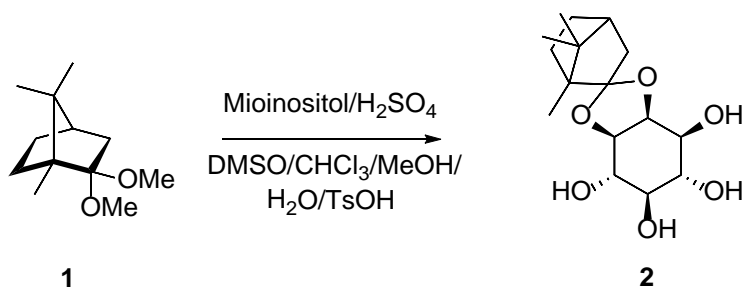


Se prepara una disolución de *D*-alcanfor (15,212 g, 0,100 mol) en MeOH (15,2 mL). Sobre ésta se añade ortoformiato de etilo (81,13 mL, 0,740 mol) y H₂SO₄ (0,46 mL) el cual actúa como catalizador. Se mantiene con agitación durante 2 días y después se adiciona una disolución de metóxido sódico en metanol (1,26 mL) para neutralizar. Se elimina el disolvente al rotavapor y el residuo se trata con tolueno anhidro (14,2 mL). Se filtra la disolución y se lleva de nuevo a concentrar, dando lugar a un líquido viscoso incoloro que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 1, 2, 3 y 4) como **1** (17,55 g, 0,089 mol, **89%**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 1: 3,19 (s, 3H), 3,12 (s, 3H), 2,16 (m, 1H), 1,70 (m, 2H), 1,62 (t, 1H), 1,31 (m, 1H), 1,20 (m, 1H), 1,11 (d, 1H), 0,93 (s, 3H), 0,88 (s, 3H), 0,79 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 2: 108.87, 77.21, 77.06, 76.61, 52.79, 50.11, 47.15, 44,14, 40.87, 29.26, 27.21, 20.50, 12.36.

2. Síntesis de 2,3-O-(1',7',7'-trimetil[2'.2'.1']bicyclohept-2'-iliden)-mioinositol (**2**)^[6]:

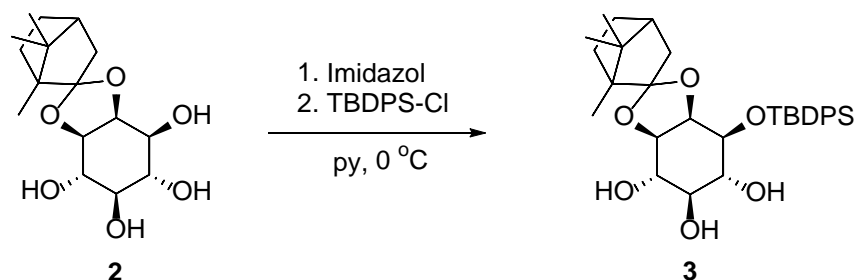


Se prepara una disolución del reactivo **1** (19,82 g, 0,100 mol) en DMSO anhidro (96,81 mL). Sobre esta se añade el mioinositol (6,84 g, 38,0 mmol) y H₂SO₄ (0,47 mL) y se deja a reflujo a 80°C durante 3 horas. Pasado este tiempo se le añade a la disolución, que tiene un tono rojo caramelo, Et₃N (3,08 mL) y se agita durante 5 minutos. El disolvente se elimina a vacío hasta tener una masa de reacción de 40,00 g. Después se añade CHCl₃ (137,4 mL), MeOH (8,62 mL), H₂O destilada (2,76 mL), TsOH (0,047 g) y se deja con agitación constante durante 12 horas a temperatura ambiente. Se observa la aparición de un precipitado. Se añade más Et₃N (1,03 mL) y seguidamente se filtra y se lava con CHCl₃. El sólido obtenido se recrystaliza en MeOH (0,1% Et₃N). El producto de la reacción es un sólido blanco, que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 5, 6, 7 y 8) como **2** (4,63 g, 0,015 mol, **15%**)

¹H NMR (400 MHz), δ (ppm), Espectro 5: 4,25 (t, 1H), 3,75 (t, 1H), 3,68, (dd, 1H), 3,54 – 3,39 (m, 2h), 3,29 (m, 6H), 3,10 (t, 1H), 2,11 – 1,97 (m, 2H), 1,69 (m, 2H), 1,37 (m, 1H), 1,02 (s, 3H), 0,85 (d, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 6: 117.47, 76.44, 76.25, 75.95, 73.73, 72.39, 70.42, 51.17, 45.18, 45.00, 29.12, 26.51, 19.72, 19.45, 8.95.

3. Síntesis de 1-O-(*tert*-butildifenilsilil)-2,3-O-(1',7',7'-trimetil[2.2.1]bicyclohept-2'-iliden)-mioinositol (**3**)^[6]:

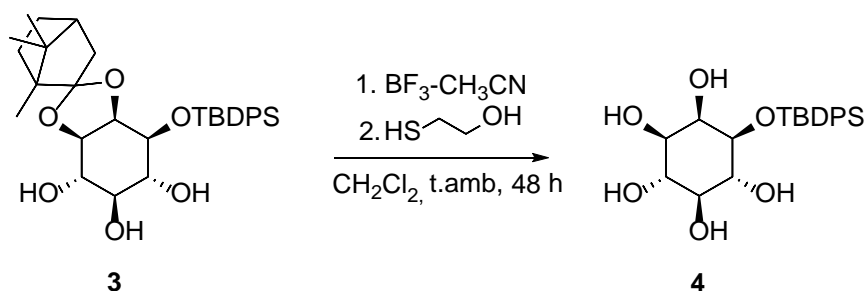


El compuesto **2** (31,639 g, 0,100 mol) se disuelve en piridina seca (319,7 mL) y se le añade imidazol (8,91 g, 0,131 mol) y cloruro de *tert*-butildifenilsililo (TBDPS-Cl) (24,05 mL, 0,092 mol). Se deja agitando durante 36 horas a 0°C. La reacción puede seguirse por TLC, utilizando como eluyente CHCl₃/MeOH (15:1), proporcionando una mancha con R_f = 0,42. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente y el precipitado obtenido se purifica mediante columna cromatográfica usando como eluyente CHCl₃/MeOH (30:1). El compuesto final es un sólido blanco con aspecto espumoso que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 9, 10, 11 y 12) como **3** (51,37 g, 0,093 mol, **93%**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 9: 7,73 (m, 4H), 7,37 (m, 6H), 3,87 (m, 1H), 3,76 (m, 2H), 3,56 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 3,11 (m, 2H), 1,92 (m, 1H), 1,67 (m, 3H), 1,28 (m, 3H), 1,07 (s, 9H), 0,83 (m, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 10: 135.99, 135.83, 133.39, 133.34, 127.81, 127.70, 118.09, 77.33, 76.99, 76.68, 76.32, 76.15, 75.76, 72.94, 72.64, 72.60, 51.55, 48.00, 45.15, 44.97, 29.54, 26.86, 20.52, 20.46, 19.33, 9.92.

4. Síntesis de 1-O-(*terc*-butildifenilsilil)-mioinositol (**4**)^[4]:

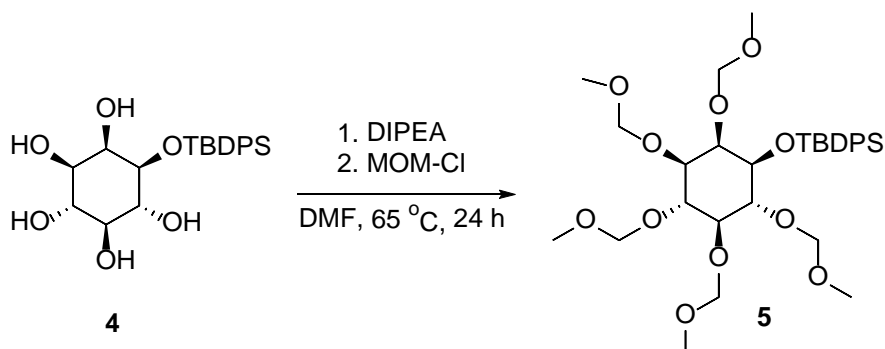


Se prepara una disolución del compuesto **3** (55,22 g, 0,100 mol) en CH_2Cl_2 (113,8 mL) y se le añade $\text{BF}_3 \cdot \text{CH}_3\text{CN}$ (16,17 mL, 0,126 mol). Se deja agitando durante 15 minutos. Después se le añade 2-mercaptoetanol (82,55 mL, 1,165 mol) y se agita a temperatura ambiente durante 72 horas. Se puede seguir la reacción por TLC usando como eluyente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (4:1) obteniendo una mancha con $R_f = 0,25$. Al terminar la reacción se elimina el disolvente y el compuesto obtenido se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (10:1). Finalmente se concentra, obteniéndose un sólido blanco de aspecto espumoso que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 13, 14, 15 y 16) como **4** (23,84 g, 0,057 mol, **57%**).

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*), δ (ppm), Espectro 13: 7,72 (m, 4H), 7,35 (m, 6H), 4,47 (m, 5H), 3,61 (t, 1H), 3,47 (m, 1H), 3,34 (m, 4H), 2,77 (m, 2H), 2,47 (m, 1H), 0,98 (s, 9H).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm), Espectro 14: 136.26, 135.97, 134.91, 134.08, 129.83, 127.87, 127.81, 75.79, 74.78, 73.07, 72.85, 72.18, 39.94, 27.39, 19.63.

5. Síntesis de 2,3,4,5,6-pentakis(metoximetoxi)ciclohexiloxil(*terc*-butildifenilsililo) (**5**)^[3]:

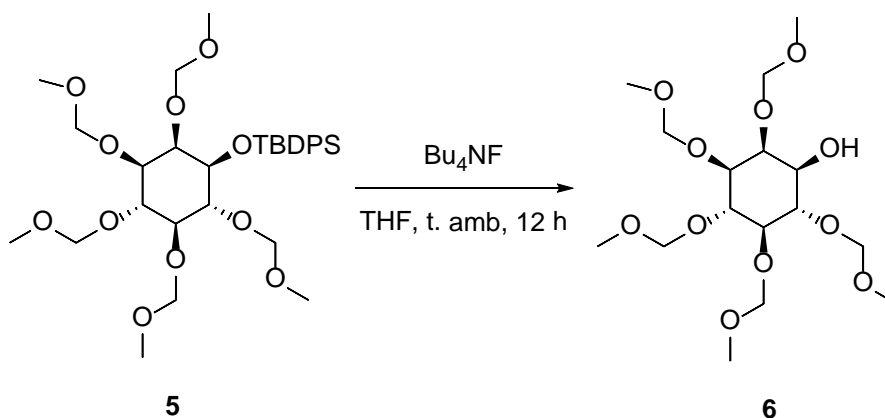


Se prepara una disolución del compuesto **4** (41,81 g, 0,100 mol) en DMF (181,78 mL), y sobre ella se añade DIPEA (139,43 mL, 843,16 mol) y cloruro de metilmetiléter (MOM-Cl) (48,73 mL, 0,638 mol). Se deja a 65°C durante 24 horas. La reacción puede seguirse mediante TLC utilizando como eluyente heptano /acetona (3:1), obteniéndose una mancha con $R_f = 0,12$. El compuesto obtenido se purifica mediante columna cromatográfica usando como eluyente heptano/acetona (8:1). Finalmente se concentra y se obtiene el producto final, un líquido viscoso incoloro que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 17, 18, 19 y 20) como **5** (54,26 g, 0,085 mol, **85%**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 17: 7,71 (m, 4H), 7,38 (m, 6H), 4,97 (dd, 2H), 4,85 (dd, 2H), 4,77 (dd, 2H), 4,50 (dd, 2H), 4,26 (dd, 2H), 3,99 (t, 1H), 3,78 (m, 2H), 3,48 (d, 5H), 3,38 (m, 4H), 3,23 (s, 2H), 3,18 (s, 1H), 3,11 (s, 3H), 1,08 (s, 9H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 18: 136.04, 135.83, 134.14, 132.85, 130.01, 129.80, 127.89, 127.68, 99.12, 98.75, 98.46, 97.22, 95.07, 79.32, 78.96, 77.71, 77.30, 76.99, 76.67, 75.56, 75.29, 74.18, 56.68, 56.60, 56.37, 55.51, 55.34, 27.28, 19.12.

6. Síntesis de 2,3,4,5,6-pentakis(metoximetoxi)ciclohexanol (6)^[3]:

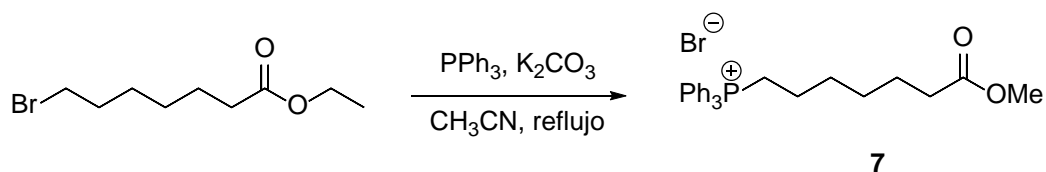


Se prepara una disolución del compuesto **5** (63,831 g, 0,100 mol) en THF (296,9 mL) y sobre esta se añade la disolución de Bu_4NF en THF 1M (100,2 mL, 0,339 mmol). Se deja con agitación durante 12 horas a temperatura ambiente y se sigue la reacción mediante TLC usando como eluyente heptano/acetona (3:1), observando una mancha con $R_f = 0,23$. El compuesto obtenido se purifica mediante columna cromatográfica usando como eluyente heptano/acetona (3:1). Para terminar, se concentra, obteniéndose un líquido amarillento de apariencia viscosa que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 21, 22, 23 y 24) como **6** (39,22 g, 0,098 mol, **98%**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 21: 4,85 – 4,70 (m, 10H), 4,06 (m, 1H), 3,96 (m, 1H), 3,91 (t, 1H), 3,76 (m, 1H), 3,65 (t, 1H), 3,52 – 3,37 (m, 17H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 22: 98.62, 98.40, 97.90, 96.13, 83.04, 79.56, 77.77, 77.30, 77.15, 76.98, 76.68, 76.36, 70.92, 56.30, 56.24, 56.03, 55.64, 55.61.

7. Síntesis de bromuro de (7-metoxi-7-oxoheptil)trifenilfosfonio (7):

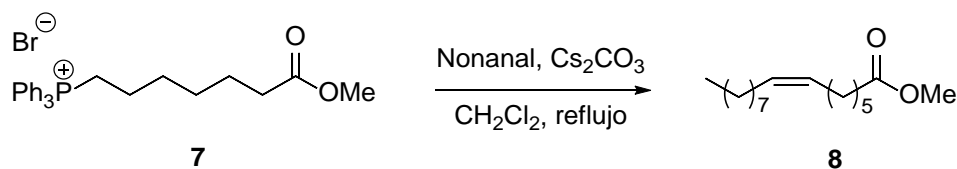


Se prepara una disolución de 7-bromoheptanoato de etilo (4,90 mL, 25,0 mmol) en CH₃CN anhidro (88,2 mL) sobre la que se añade PPh₃ (14,32 g, 54,4 mmol) y K₂CO₃ (2,025 g, 29,9 mmol). Se deja a reflujo a 95°C durante 24 horas. La reacción puede seguirse por TLC, utilizando como eluyente CH₂Cl₂/MeOH (20:1), proporcionando una mancha con R_f = 0,10. A continuación, se elimina el disolvente y el sólido resultante se lava con MeOH para eliminar la PPh₃ y se filtra. La disolución obtenida se concentra y se purifica el residuo mediante columna cromatográfica con eluyente CH₂Cl₂/MeOH (20:1). El producto de la reacción es una grasa marrón que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 25, 26, 27 y 28) como **7** (12,025 g, 24,8 mmol, **99%**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 25: 7,65 (m, 15 H), 3,62 (m, 2H), 3,50 (s, 3H), 2,45 (m, 1H), 2,18 (m, 2H), 1,52 (m, 4H), 1,45 (m, 2H), 1,22 (m, 2H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 26: 174.03, 134.94, 133.55, 133.45, 130.51, 130.39, 118.51, 111.65, 77.50, 77.21, 76.86, 51.31, 33.66, 29.89, 29.72, 28.35, 24.22, 22.79, 22.32, 22.28, 22.24.

8. Síntesis de (Z)-7-hexadecenoato de metilo (8):

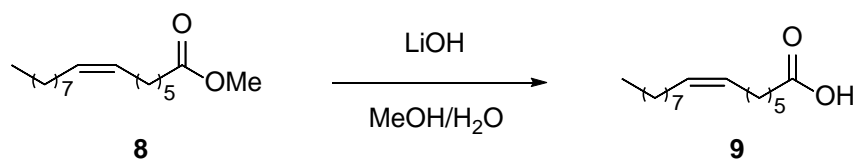


Se prepara una disolución de la sal de fosfonio (**7**) (12,103 g, 25,0 mmol) en CH₂Cl₂ (302,0 mL), sobre la cual se añade nonanal (4,17 mL, 28,8 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante unos minutos y a continuación se añade Cs₂CO₃ (31,47 g, 96,2 mmol). Se deja en agitación a 60°C durante 24 horas. La reacción puede seguirse mediante TLC, utilizando como eluyente heptano/acetato de etilo (10:1), generando una mancha con R_f = 0,25. Después se elimina el disolvente y el sólido se purifica por columna usando como eluyente heptano/CH₂Cl₂ (10:1). Para terminar, se concentra, obteniendo un líquido incoloro que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 29, 30, 31 y 32) como **8** (6,26 g, 23,4 mmol, **94%**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 29: 5,32 (m, 2H), 3,64 (s, 2H), 2,39 (m, 1H), 2,28 (m, 2H), 1,61 (m, 3H), 1,25 (m, 17H), 0,86 (t, 4H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 30: 174.20, 133.78, 133.58, 130.18, 129.40, 128.13, 77.25, 76.94, 76.64, 51.38, 43.89, 38.80, 34.03, 31.86, 31.73, 29,71, 29.48, 29.28, 29.12, 29.05, 28.76, 27.21, 26.95, 24.83, 22.63, 22.04, 20.00, 19.29, 14.06, 11.38.

9. Síntesis de ácido (Z)-7-hexadecenoico(9):

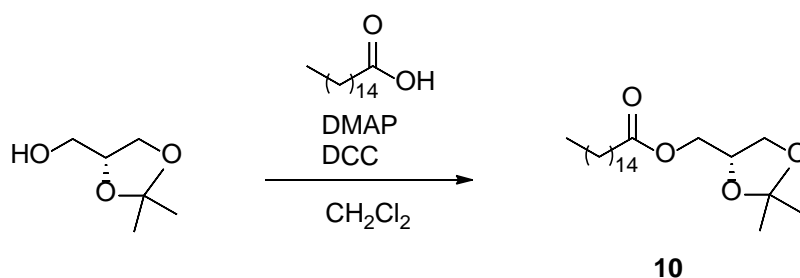


Se prepara una disolución del éster (**8**) (6,706 g, 25,0 mmol) en MeOH (217,6 mL) y sobre ella se añade una disolución de LiOH 4M (217,6 mL, 1,09 mol) y se agita durante 24 horas a 65°C. La reacción puede seguirse mediante TLC con eluyente heptano/acetato de etilo (5:1), obteniendo una mancha con $R_f = 0,20$. Al finalizar la reacción, se elimina el disolvente orgánico a rotavapor, y a la fase acuosa se le realiza una extracción líquido-líquido con éter. La fase acuosa resultante se acidifica con HCl hasta pH 1 y seguidamente se realiza otro lavado con éter. Para terminar se preseca con una disolución saturada de NaCl y se seca con $MgSO_4$ anhidro. Finalmente se concentra, obteniendo un líquido marrón viscoso que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 33, 34, 35 y 36) como **9** (5,396 g, 21,2 mmol, **85%**).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm), Espectro 33: 5,32 (m, 2H), 2,32 (t, 2H), 2,00 (m, 3H), 1,61 (m, 2H), 1,37-1,19 (m, 17H), 0,86 (t, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm), Espectro 34: 130.13, 129.41, 77.32, 76.98, 76.65, 34.03, 31.87, 29.72, 29.48, 29.28, 28,67, 27.17, 26.92, 24.52, 22.62, 14.01.

10. Síntesis de palmitato de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metilo (**10**)^[25]:

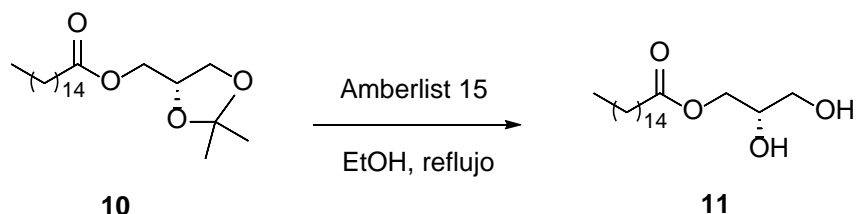


Se prepara una disolución con (2R) – solketal (6,22 mL, 50,0 mmol), ácido palmítico (12,81 g, 50,0 mmol) y DMAP (1,66 g, 13,6 mmol) en CH_2Cl_2 (109,9 mL) a 0°C. Por otra parte preparamos otra disolución de DCC (12,47 g, 60,3 mmol) en CH_2Cl_2 (22 mL), la cual se añade sobre la primera y se deja durante 24 horas con agitación a temperatura ambiente. La reacción puede seguirse mediante TLC, usando como eluyente heptano/acetato de etilo (3:1), proporcionando una mancha con $R_f = 0,5$. La disolución se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor. El compuesto obtenido se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente heptano/AcOEt (3:1). Para terminar, se concentra obteniéndose un precipitado blanco que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 37, 38, 39 y 40) como **10** (18,987 g, 46 mmol, **92%**)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 37: 4,30 (m, 1H), 4,15 (m, 1H), 4,07 (m, 2H), 3,72 (m, 1H), 2,32 (t, 2H), 1,61 (m, 2H), 1,38 (s, 6H), 1,23 (s, 21H), 0,86 (t, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 38: 173.65, 109.79, 77.28, 76.99, 76.59, 73.62, 66.29, 64.50, 34.10, 31.89, 29.67, 29.58, 29.45, 29.33, 29.24, 29.06, 26.68, 25.42, 24.85, 22.64, 14.06.

11. Síntesis de palmitato de 2,3-dihidroxi-propilo (**11**)^[25]:

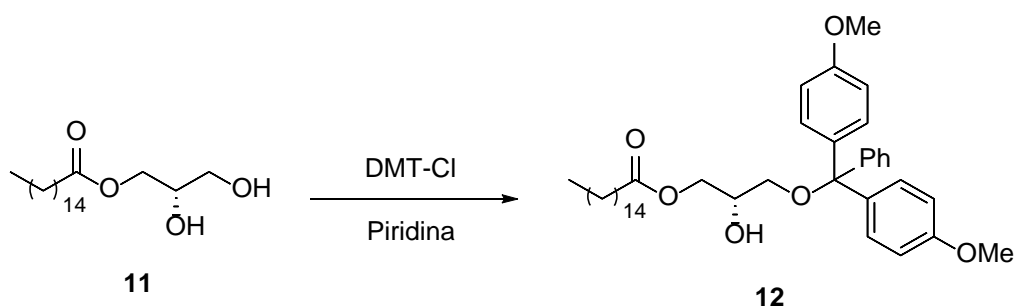


Se prepara una disolución de **10** (18,57 g, 50,0 mmol) en EtOH 95% (82,1 mL) y se añade Amberlist 15 (10% en masa, 1,857 g). Se deja a reflujo a 80°C durante 24 horas. Al finalizar la reacción se filtra con ayuda de celita y se concentra, apareciendo un sólido blanco que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 41, 42, 43 y 44) como **11** (8,792 g, 26,58 mmol, **53%**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 41: 4,16 (m, 2H), 3,92 (m, 1H), 3,64 (m, 2H), 2,34 (t, 2H), 1,61 (m, 2H), 1,24 (s, 21H), 0,86 (t, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 42: 77.25, 76.95, 76.65, 70.25, 65.18, 63.25, 34.05, 31.89, 29.64, 29.56, 29.40, 29.31, 29.22, 29.06, 24.87, 22.66, 14.09.

12. Síntesis de 3-dimetiltritol-2-hidroxi-propilpalmitato (**12**)^[25]:

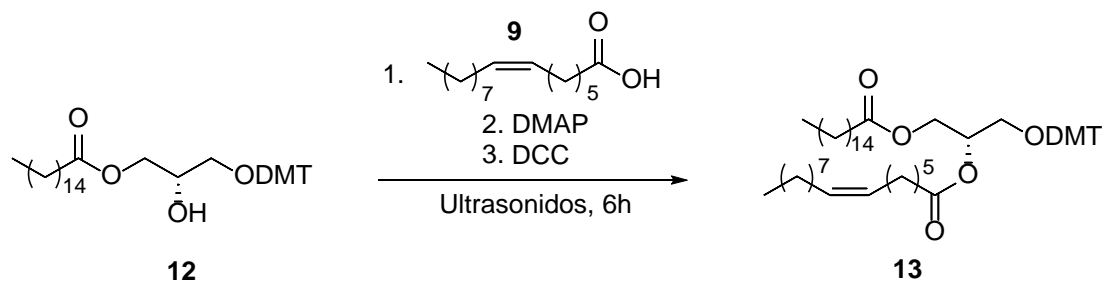


Se prepara una disolución del compuesto **11** (16,539 g, 50,0 mmol) y de cloruro de dimetoxitritilo (DMT-Cl) (20,064 g, 59,16 mmol) en piridina (363,3 mL) y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción puede seguirse por TLC usando como eluyente heptano/AcOEt (6:1), proporcionando una mancha con R_f = 0,10. Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente y se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente heptano/AcOEt (6:1). Se concentra y se obtiene un líquido muy viscoso con tonalidad amarillenta que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 45, 46, 47 y 48) como **12** (13,161 g, 20,7 mmol, **42%**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 45: 7,41(d, 2H), 7,23 (m, 8H), 6,78 (d, 4H), 4,16 (m, 2H), 3,98 (m, 1H), 3,77 (s, 6H), 3,20 (d, 2H), 2,30 (m, 2H), 1,57 (d, 2H), 1,25 (s, 20H), 0,85 (t, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 46: 174.00, 158.56, 144.52, 135.64, 129.97, 129.10, 128.07, 127.81, 126.82, 113.09, 86.26, 77.33, 77.01, 76.69, 69.32, 65.70, 63.96, 55.19, 34.12, 31.88, 29.64, 29.45, 29.37, 29.22, 29.14, 24.86, 22.66, 14.09.

13. Síntesis de (Z)-7-hexadecenoato de 1-dimetoxitritil-3-(palmitoiloxi)propan-2-ilo (**13**)^[25]:

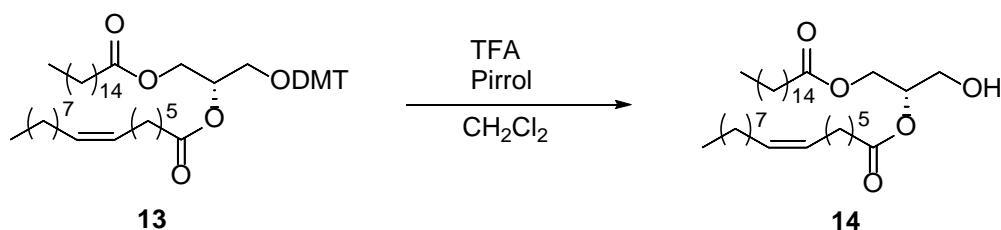


Se prepara una disolución de **12** (6,391 g, 10 mmol), ácido (Z)-7-hexadecenoico (25,68 g, 0,101 mol) y DMAP (0,358 g, 2,92 mmol) en CH₂Cl₂ (103,1 mL) a 0°C. Por otro lado, se prepara una disolución de DCC (2,49 g, 12,1 mmol) en CH₂Cl₂ la cual se añade sobre la primera y se deja a reflujo en ultrasonidos durante 6 horas. La reacción puede seguirse por placa usando como eluyente heptano/AcOEt (6:1), proporcionando una mancha con R_f = 0,42. Cuando la reacción termina, se elimina el disolvente y el residuo se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente heptano/AcOEt (15:1). Se concentra y se obtiene el producto final, un sólido de color blanco que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 49, 50, 51 y 52) como **13** (6,393 g, 7,1 mmol, **71%**)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 49: 7,41 – 7,12 (m, 9H), 6,80 (m, 4H), 5,32 (m, 2H), 5,24 (m, 1H). 4,36 – 4,17 (dd, 3H), 3,77 (s, 6H), 3,19 (m, 2H), 2,35 – 2,20 (m, 4H), 1,99 (m, 4H), 1,67 – 1,18 (m, 40H), 0,86 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 50: 129.93 (2C), 129.66, 129.07, 128.03, 127.79, 127.77, 127.71, 126.76, 113.13, 113.07, 86.03, 77.28, 76.96, 76.65, 70.46, 62.90, 62.00, 55.14, 34.37, 34.12, 31.90, 31.87, 29.76 – 29.01 (14C), 27.19, 27.15, 24.92, 24.83, 22.67, 14.07

14. Síntesis de (Z)-7-hexadecenoato de 1-hidroxi-3-(palmitoiloxi)propan-2-ilo (**14**)^[25]:

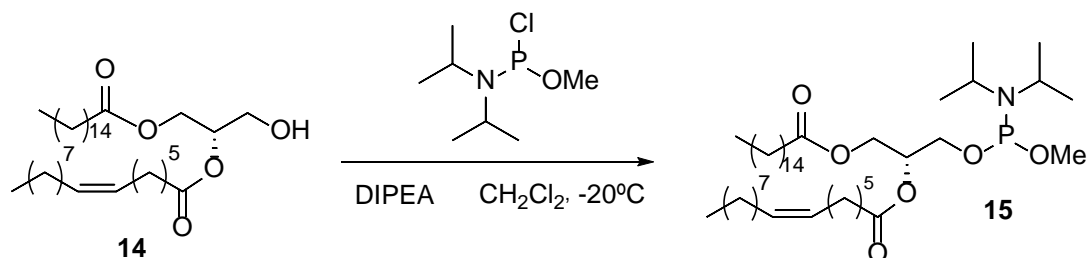


Se prepara una disolución de **13** (8,978 g, 10 mmol) en CH₂Cl₂ (91,5 mL), a la que se le añade ácido trifluoroacético (TFA) (89,78 μL, 1,17 mmol) y pirrol (1,22 mL, 17 mmol). Se mantiene con agitación a temperatura ambiente durante 6 horas. La reacción puede seguirse mediante TLC utilizando como eluyente heptano/dietiléter (3:1), proporcionando una mancha con R_f = 0,08. Se elimina el disolvente y el compuesto se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente heptano/dietiléter (6:1). Finalmente, se concentra, obteniéndose un sólido amarillento que se caracteriza espectroscópicamente (espectros 53, 54, 55 y 56) como **14** (2,51 g, 4,21 mmol, **42%**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 53: 5,32 (m, 2H), 5,06 (m, 1 H), 4,33 – 4,03 (m, 4H), 3,71 (t, 1H), 2,32 (m, 4H), 1,99 (m, 4H), 1,70 – 1,33 (m, 40H), 0,86 (m, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm), Espectro 54: 173.73, 173.35, 129.95, 129.59, 77.27, 76.96, 76.69, 72.10, 68.27, 64.28, 62.00, 61.42, 34.22, 34.07, 31.86, 29.74 – 28.98 (17C), 27.17, 27.11, 24.86, 22.63, 14.06.

15. Síntesis de (Z)-7-hexadecenoato de (2R)-1-[[diisopropilamino](metoxi)fosfaenil]-3-palmitoloxi}propan-2-ilo (**15**):

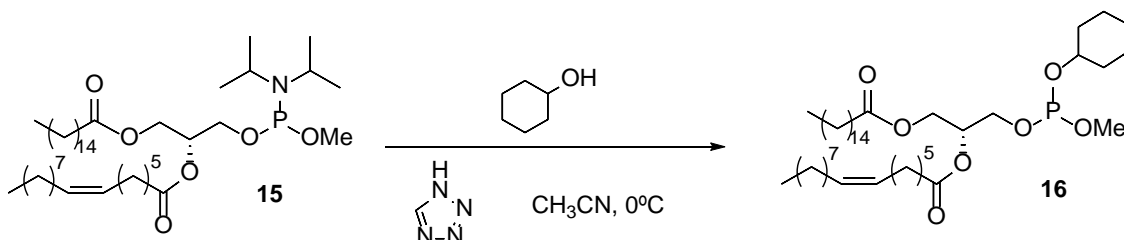


Se prepara una disolución del DAG (5,949 g, 10 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (1,07 L) y se enfría a -20°C. Por otro lado, se prepara una disolución en CH₂Cl₂ anhidro (237,8 mL) del fosfito (1,93 mL, 9,97 mmol) y DIPEA (2,27 mL, 13,6 mmol), la cual se añade sobre la primera cuando está fría. Al terminar la adición se quita el baño de acetona y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas. La reacción puede seguirse por TLC utilizando como eluyente heptano/acetato de etilo 2:1, observando la desaparición de la mancha del DAG en R_f = 0,67. Posteriormente se elimina el disolvente, obteniendo una grasa amarilla que se emplea directamente en la siguiente etapa. Se separa una alícuota, que se usa para la caracterización espectroscópica del compuesto **15** (espectros 57 y 58).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm), Espectro 57: 5,32 (m, 2H), 3,82 - 3,31 (m, 5H), 3,64 (d, 3H), 3,06 (q, 2H), 2,30 (m, 4H), 1,99 (m, 4H), 1,44 (d, 12H), 1,24 (m, 32H), 0,87 (t, 6H).

^{31}P NMR (12 MHz, CDCl_3), δ (ppm), Espectro 58: 14,5.

16. Síntesis de (Z)-7-hexadecenoato de (2R)-1-[[ciclohexiloxi](metoxi)fosfaenil]-3-palmitoloxi}propan-2-il (16):



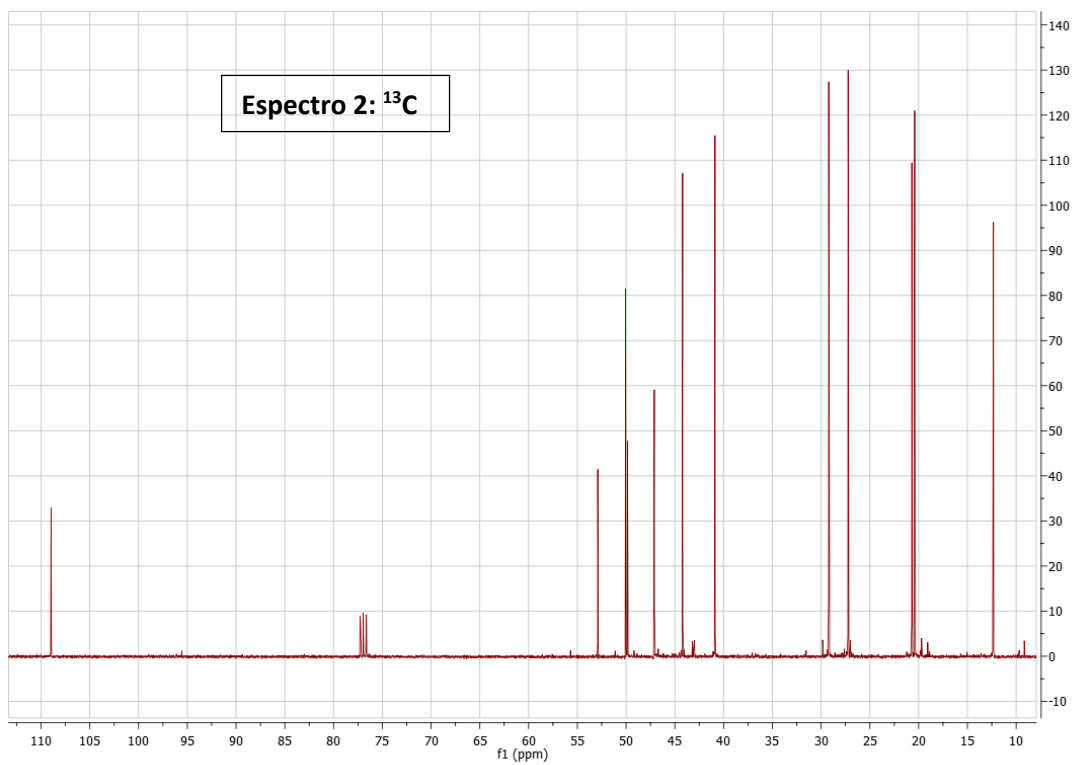
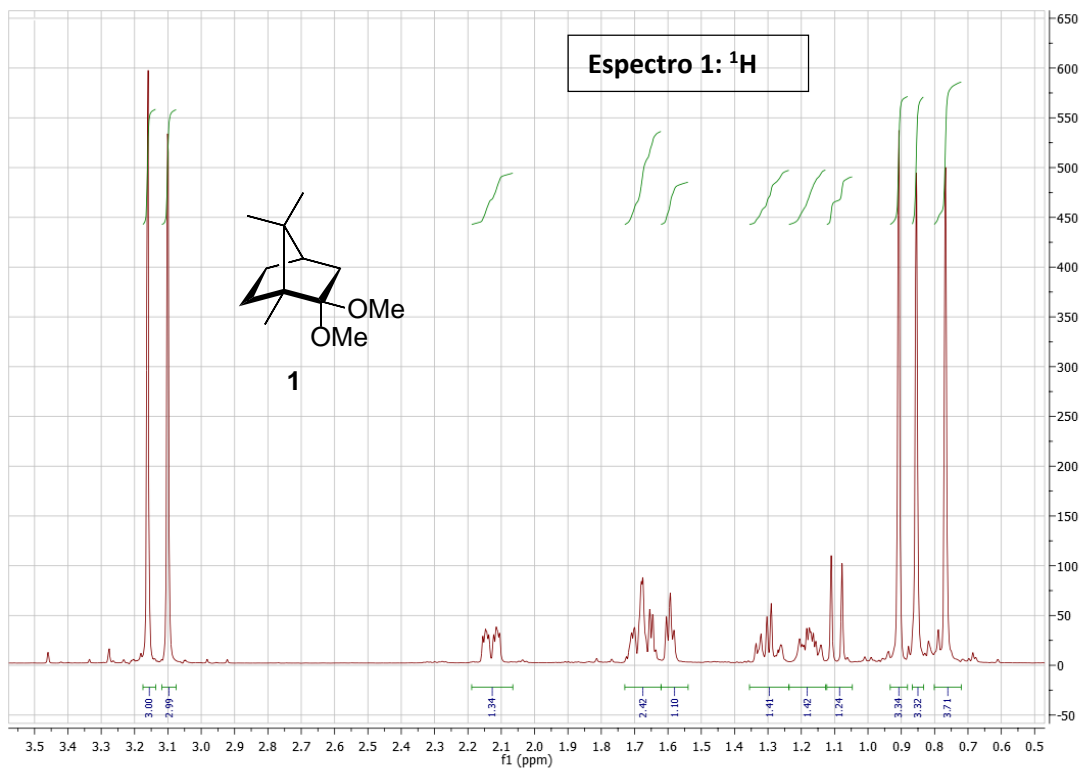
Se prepara una disolución del crudo de la reacción anterior (compuesto **15**) en CH_3CN (538 mL), se le añade tetrazol (2,60 mL, 29,7 mmol), y se pone a 0°C en baño de hielo. Una vez enfriada la mezcla, se añade una disolución previamente preparada de ciclohexanol (1,06 mL, 9,96 mmol) en THF anhidro (117 mL). Al terminar la adición se deja con agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. La reacción puede seguirse mediante TLC utilizando como eluyente heptano/acetato de etilo 2:1. Evoluciona lentamente, incluso añadiendo un exceso de ciclohexanol y llevando la mezcla a reflujo (+/- 80°C). Finalmente, el compuesto **16** se aísla mediante columna cromatográfica, utilizando como eluyente heptano/acetato de etilo 3:1. El rendimiento fue muy bajo, pudiendo caracterizarse el producto final por ^1H -RMN y ^{31}P -NMR (espectros 59 y 60).

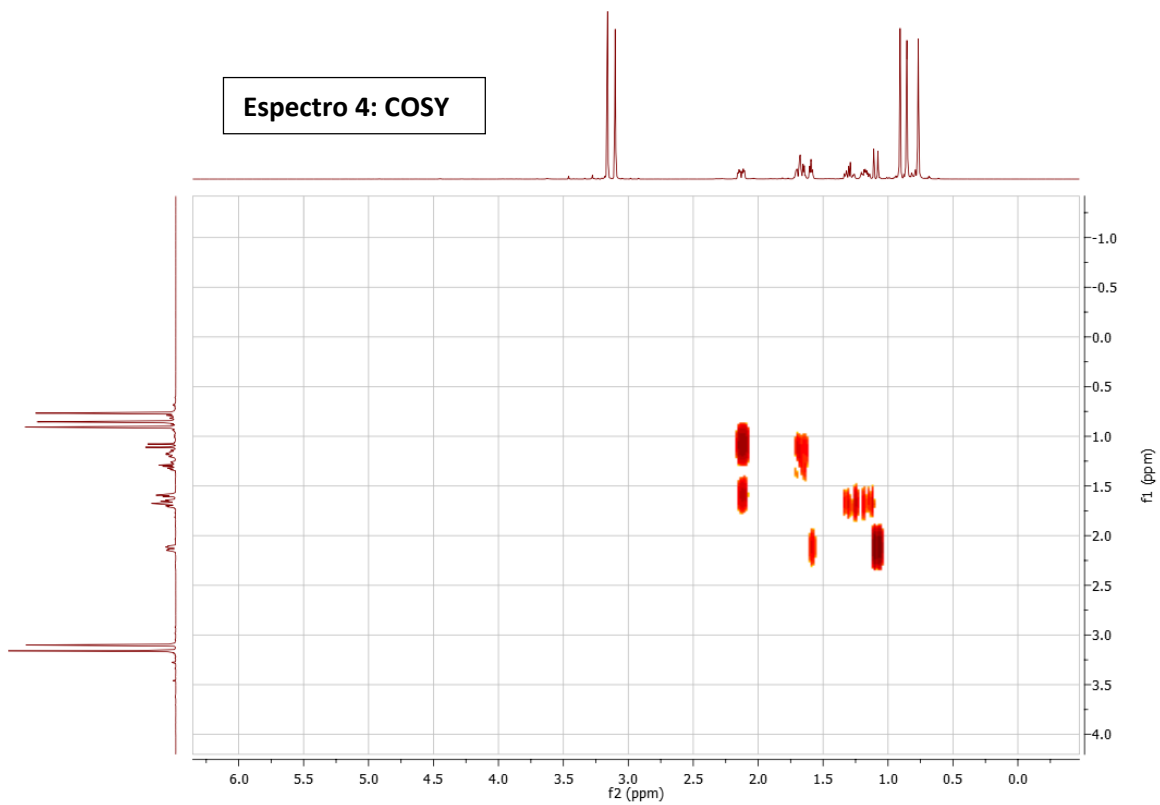
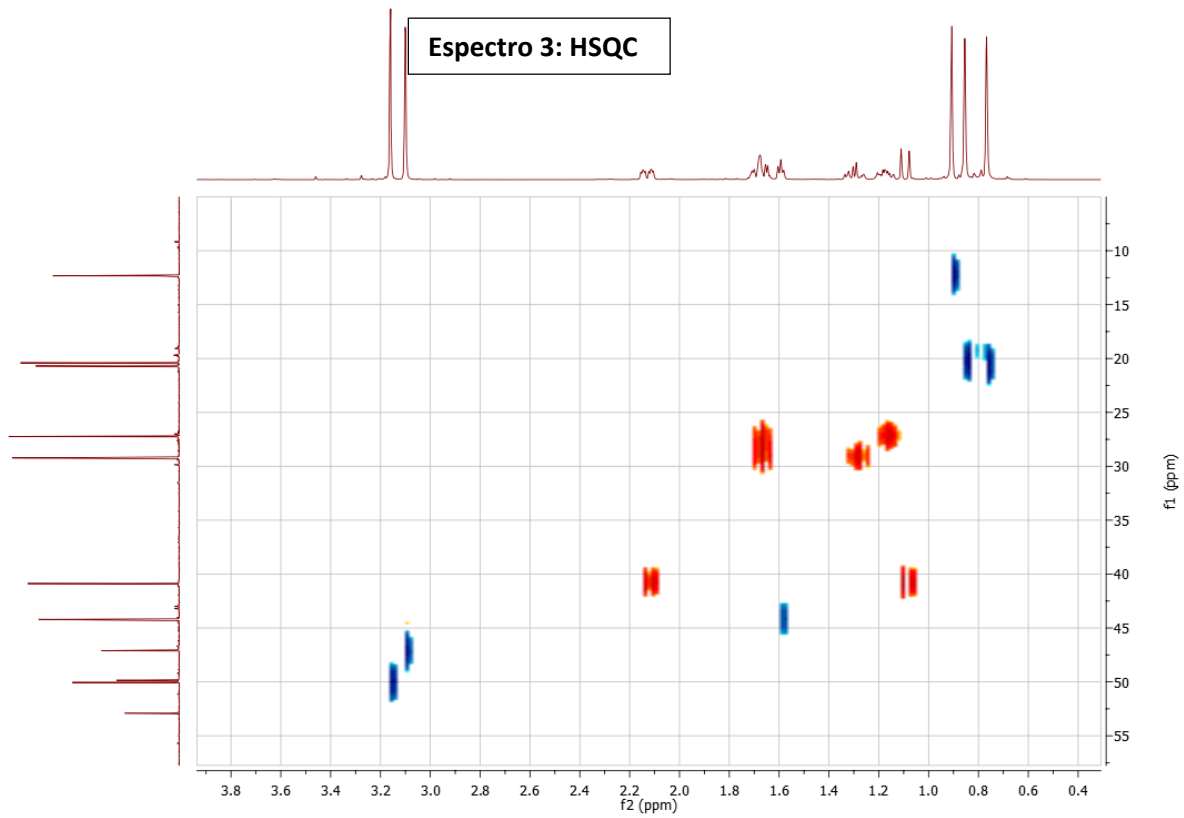
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm), Espectro 59: 5,32 (m, 2H), 5,28 (m, 1H), 4,36 - 4,02 (m, 4H), 3,77 (t, 1H), 2,33 (m, 4H), 1,99 (m, 4H), 1,65 - 1,19 (m, 50H), 0,86 (m, 6H).

^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3), δ (ppm), Espectro 60: 8,70.

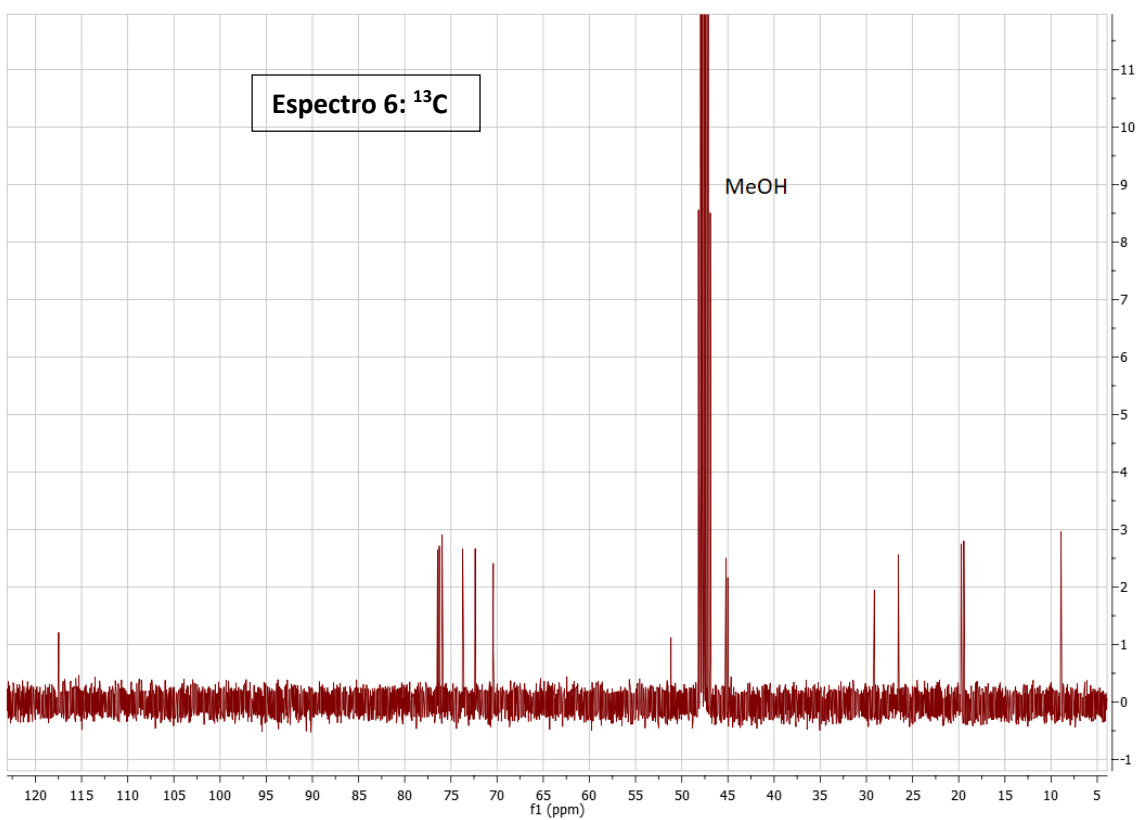
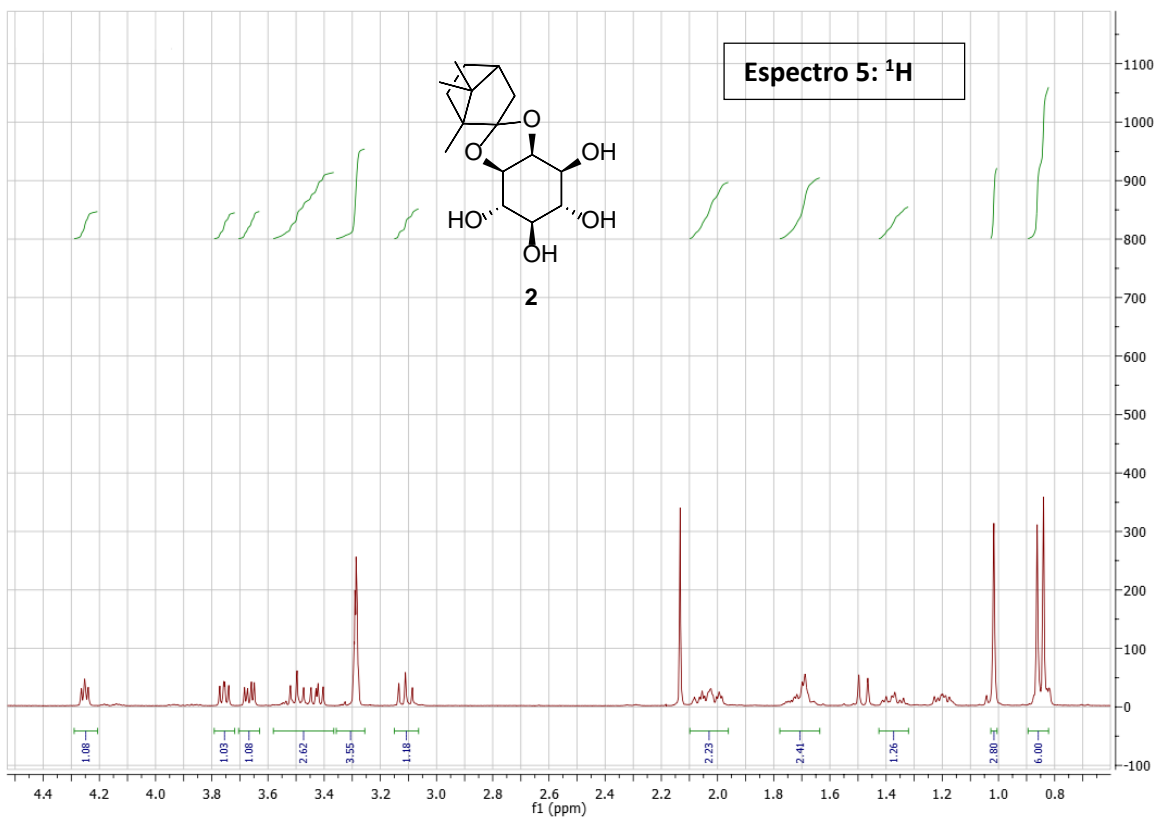
Anexo: ^1H , ^{13}C , HSQC, COSY

- **Compuesto 1:** 2,2-dimetoxi-1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]heptano

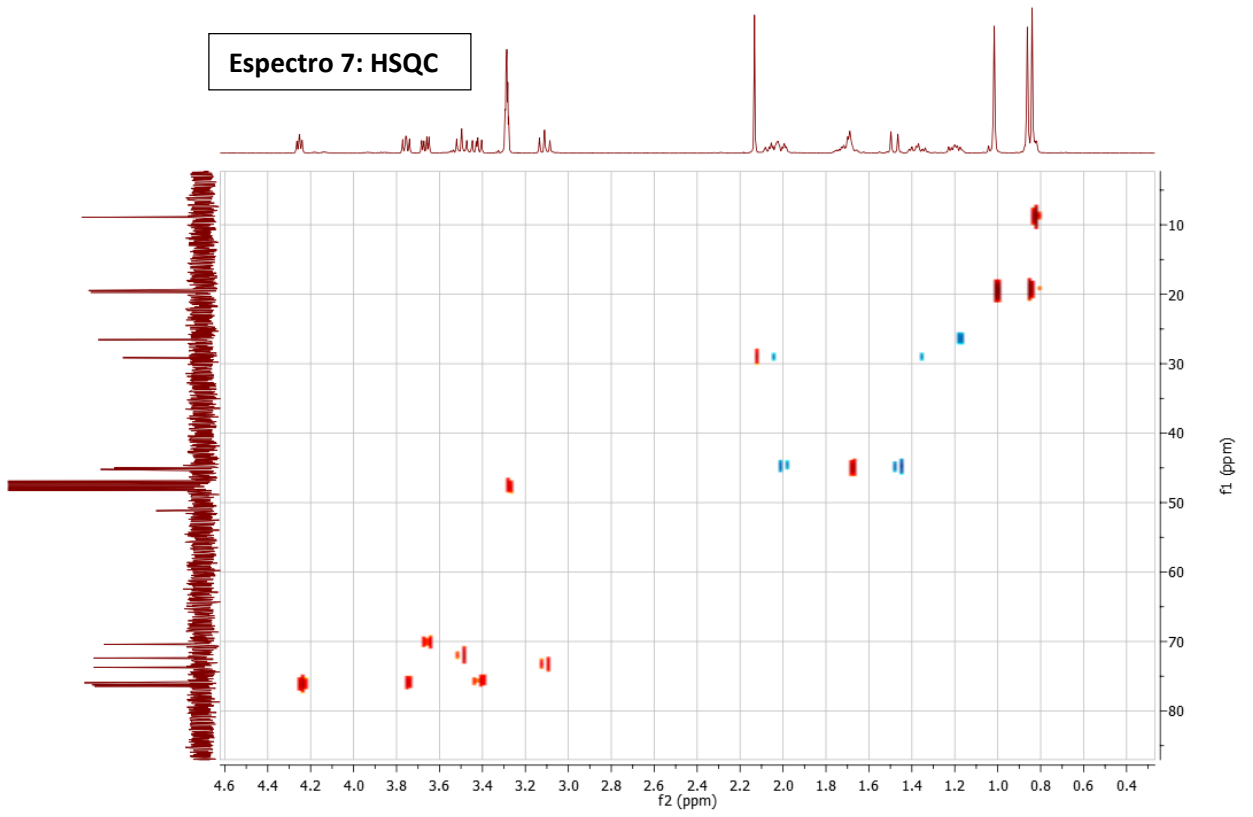




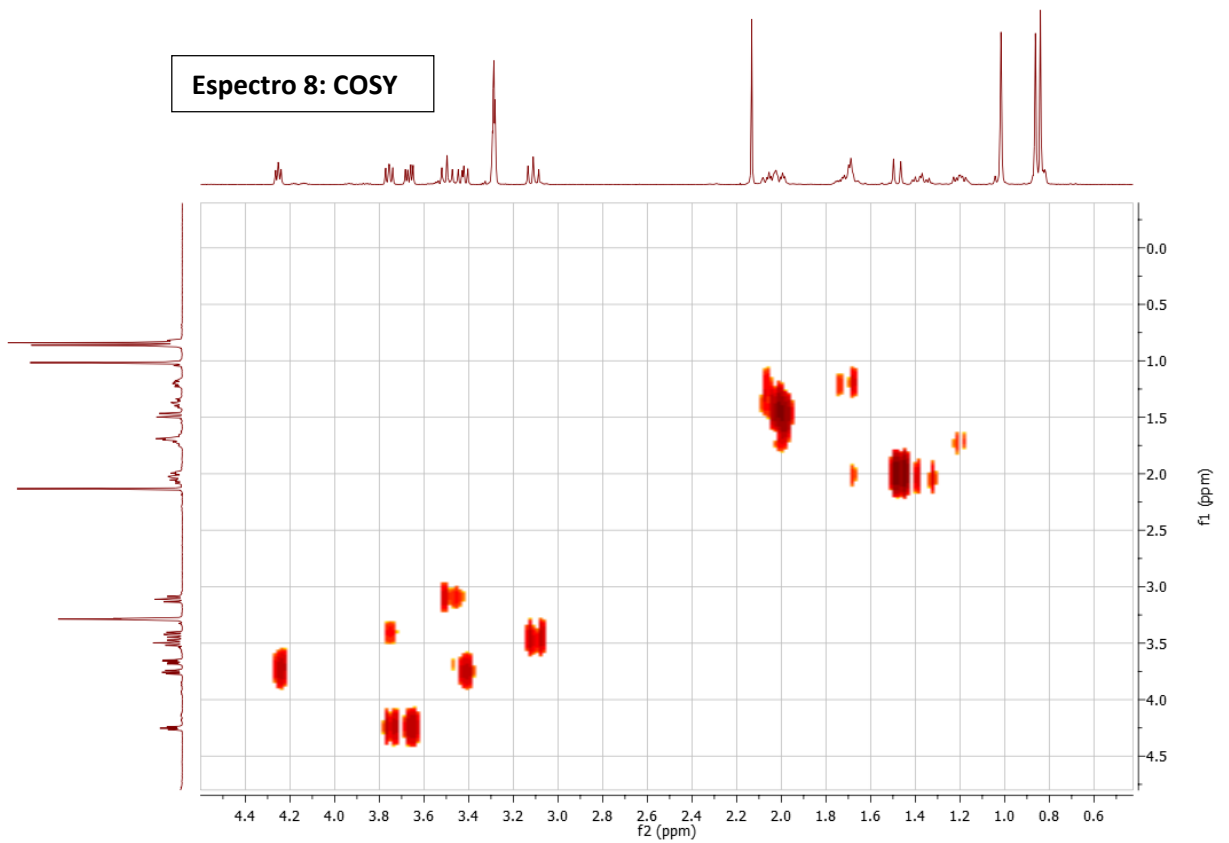
- **Compuesto 2:** 2,3-O-(1',7',7'-trimetil[2'.2'.1']bicyclohept-2'-iliden)-mioinositol.



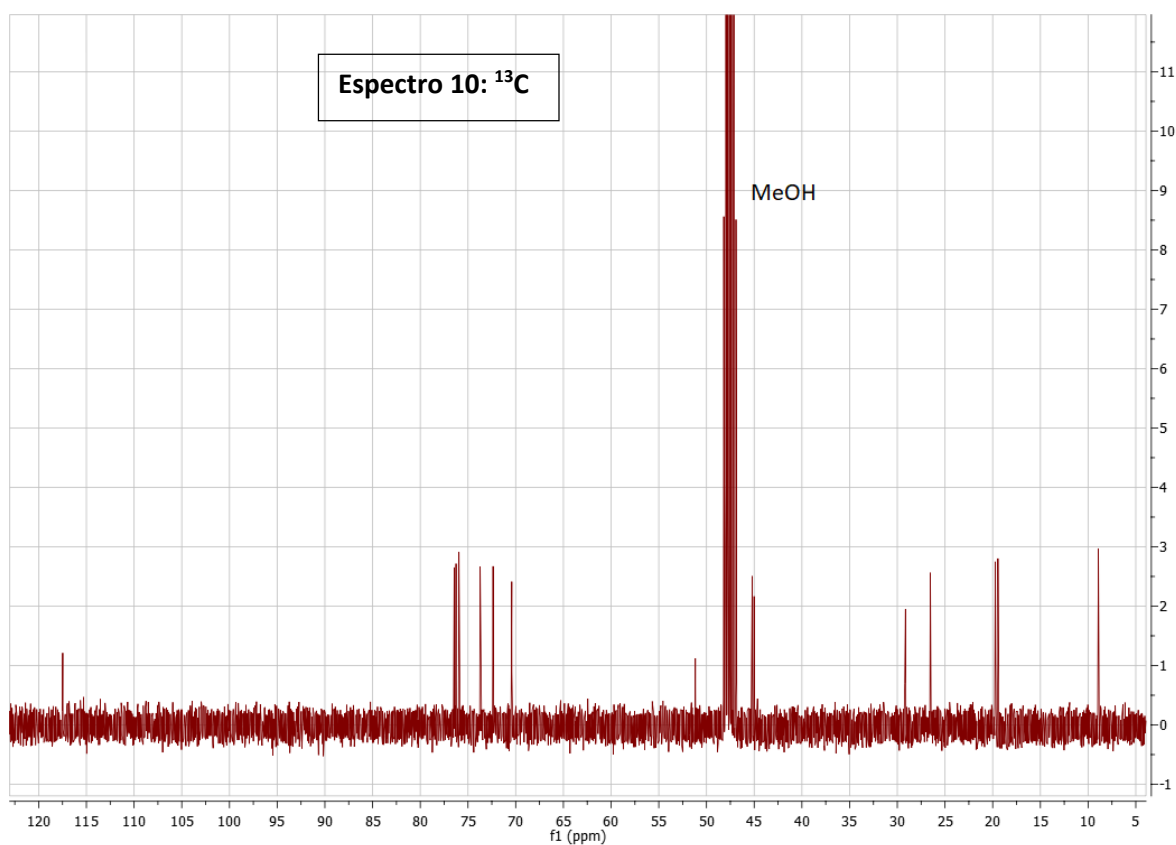
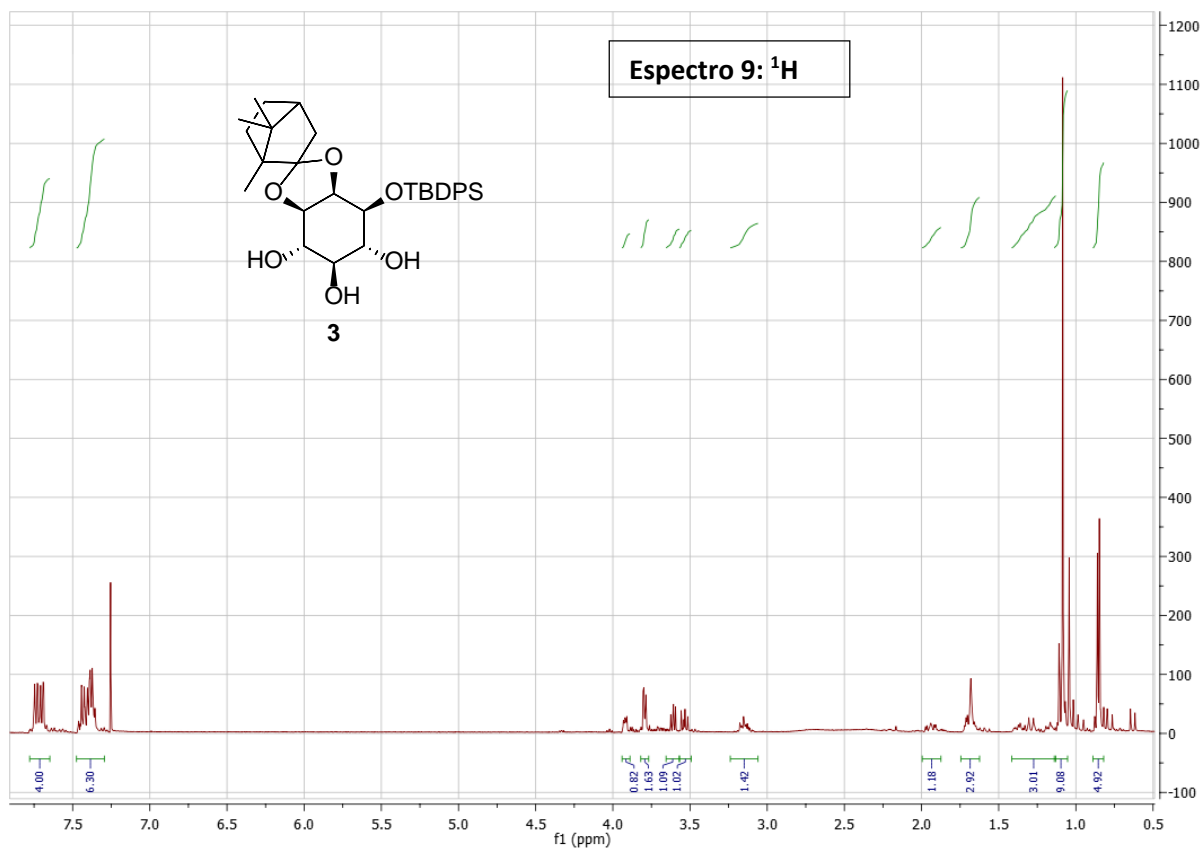
Espectro 7: HSQC



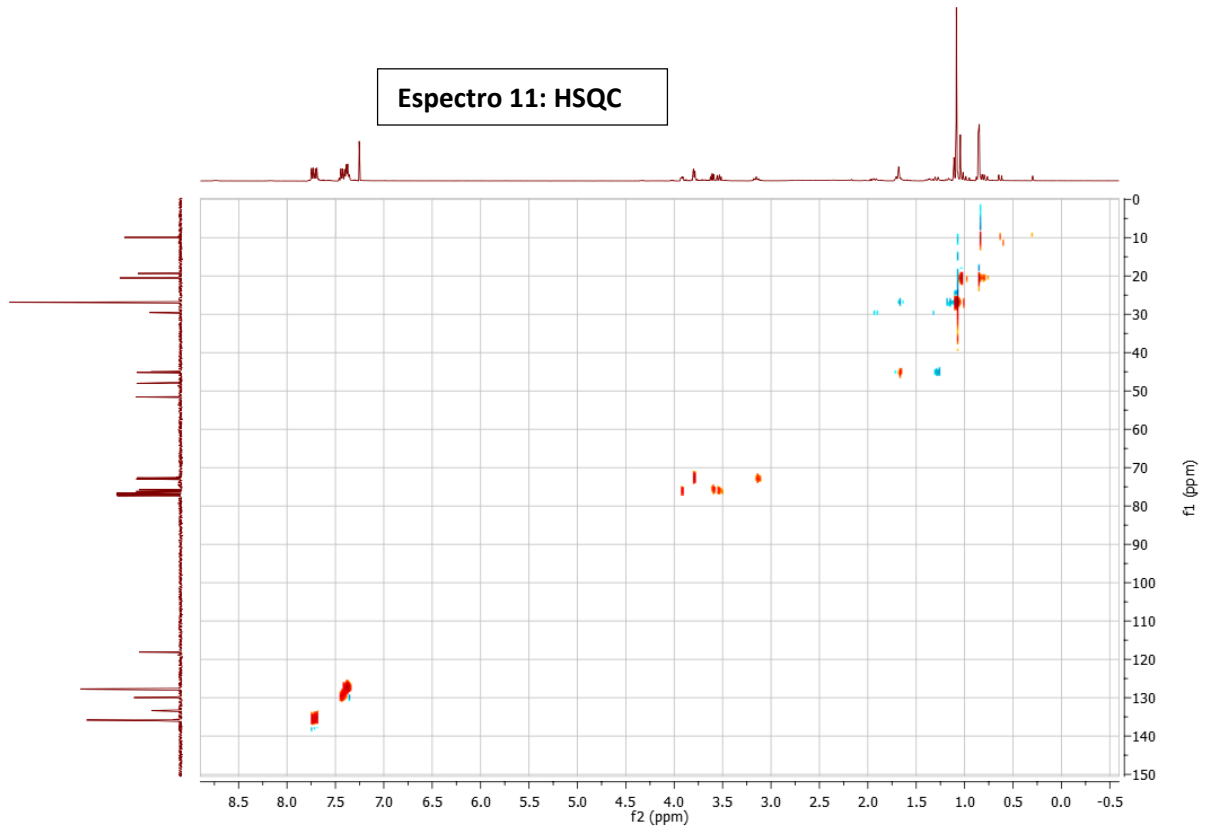
Espectro 8: COSY



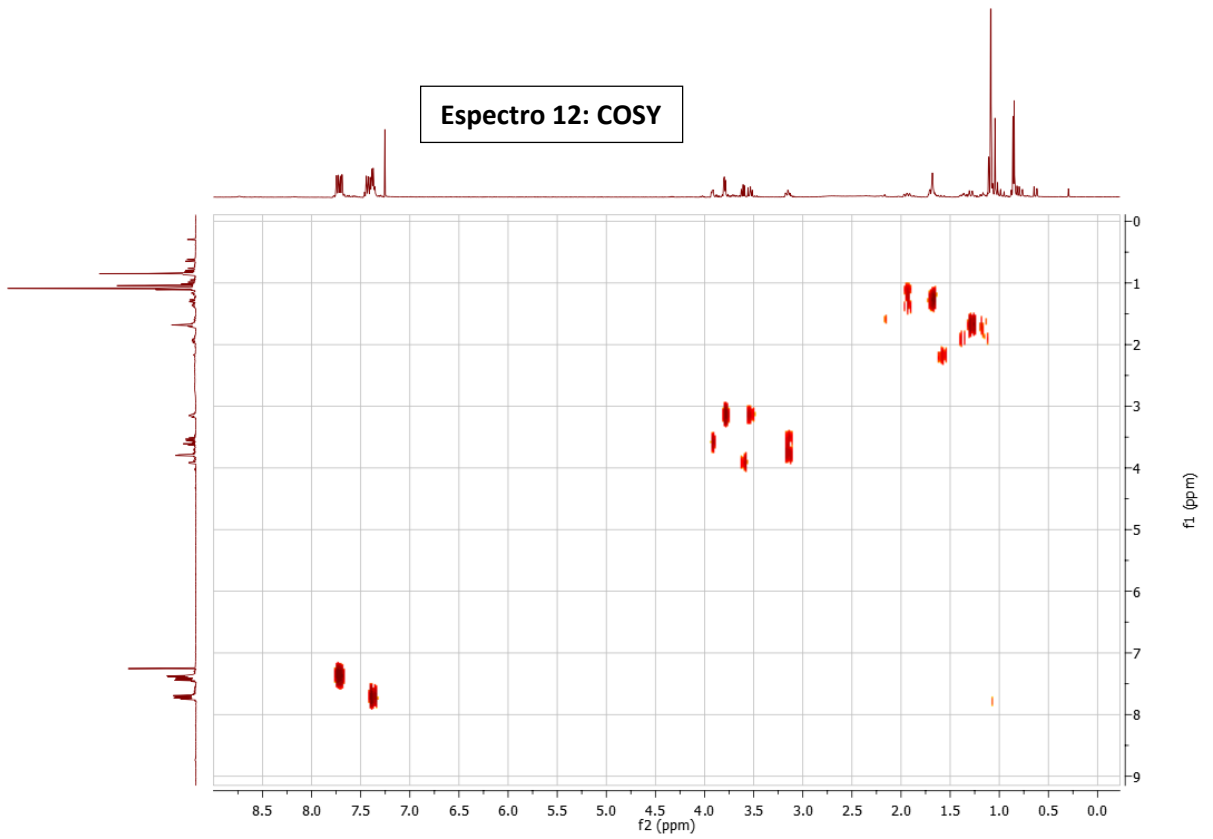
- **Compuesto 3:** 1-O-(*terc*-butildifenilsilil)-2,3-O-(1',7',7'-trimetil[2.2.1]bicyclohept-2'-iliden)-mioinositol



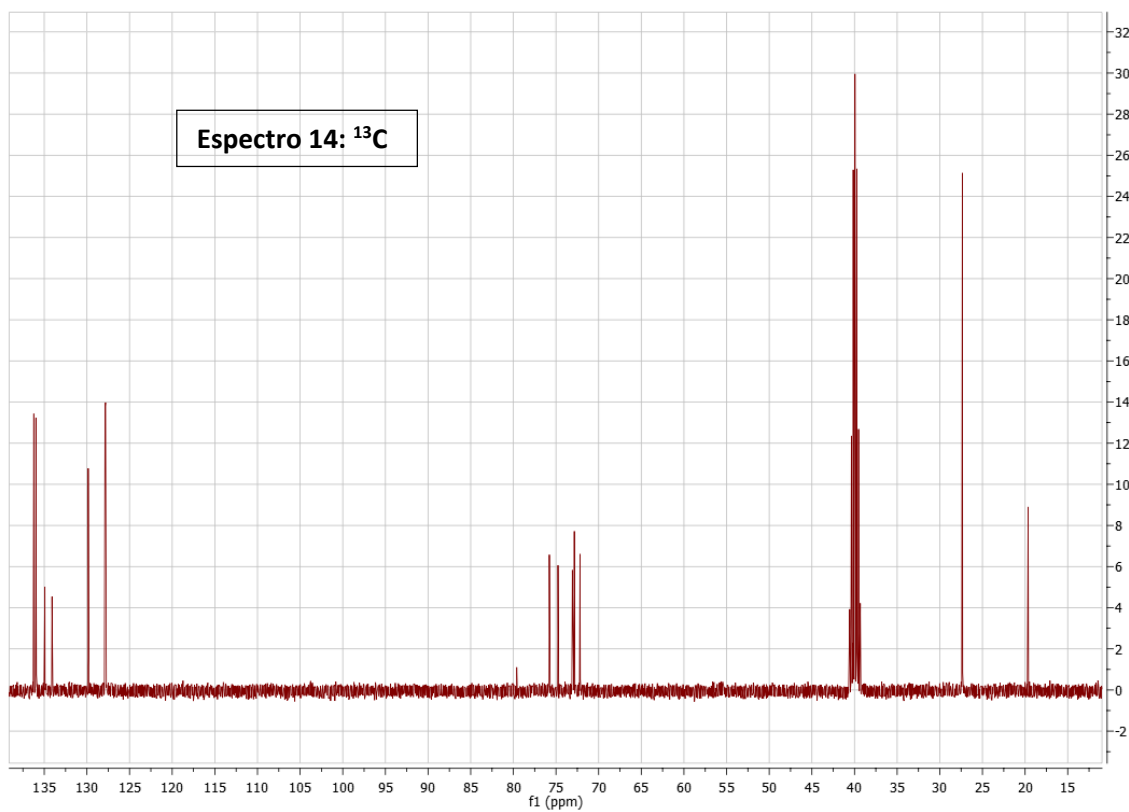
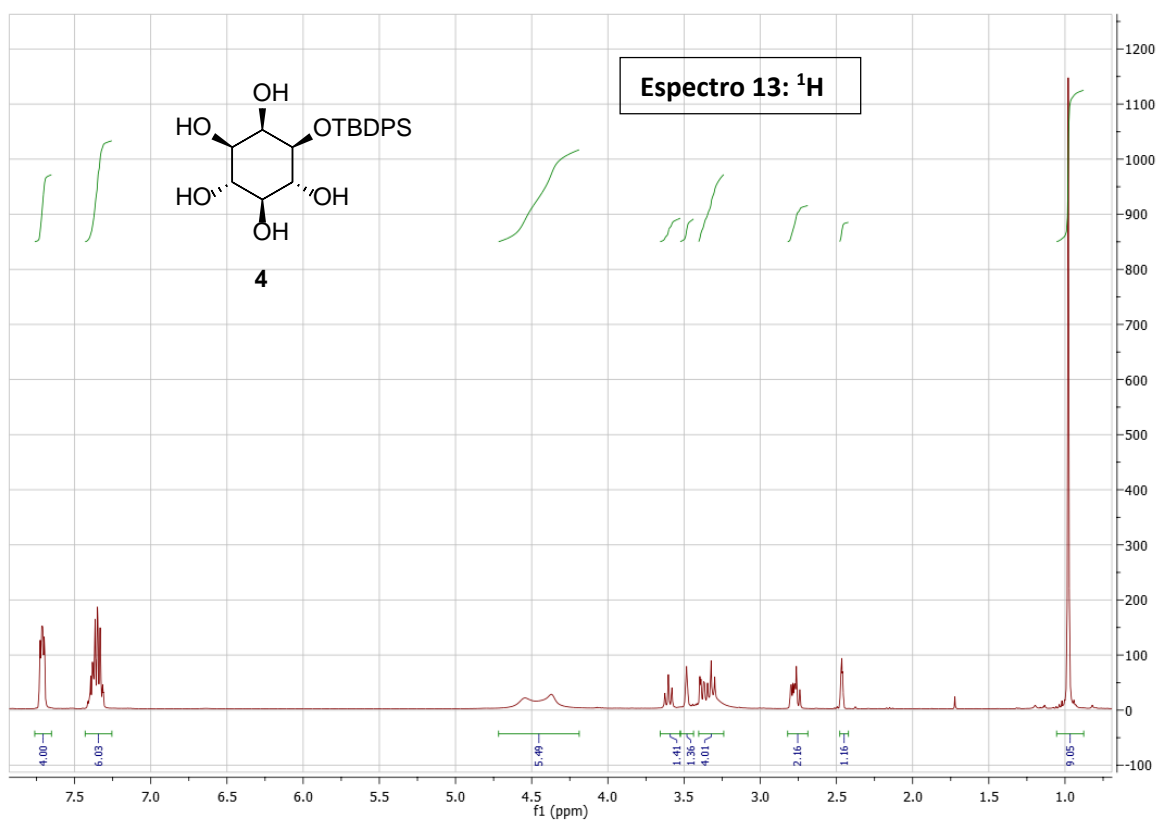
Espectro 11: HSQC

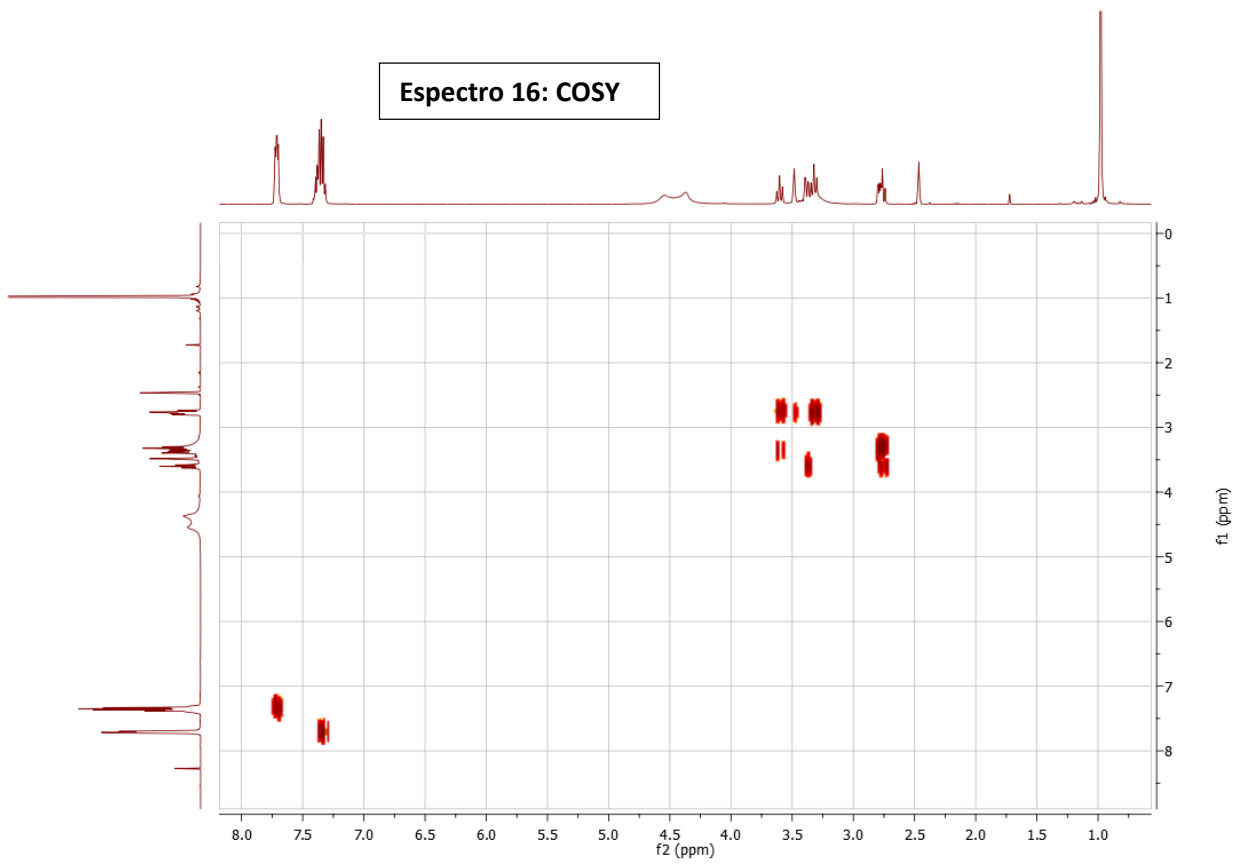
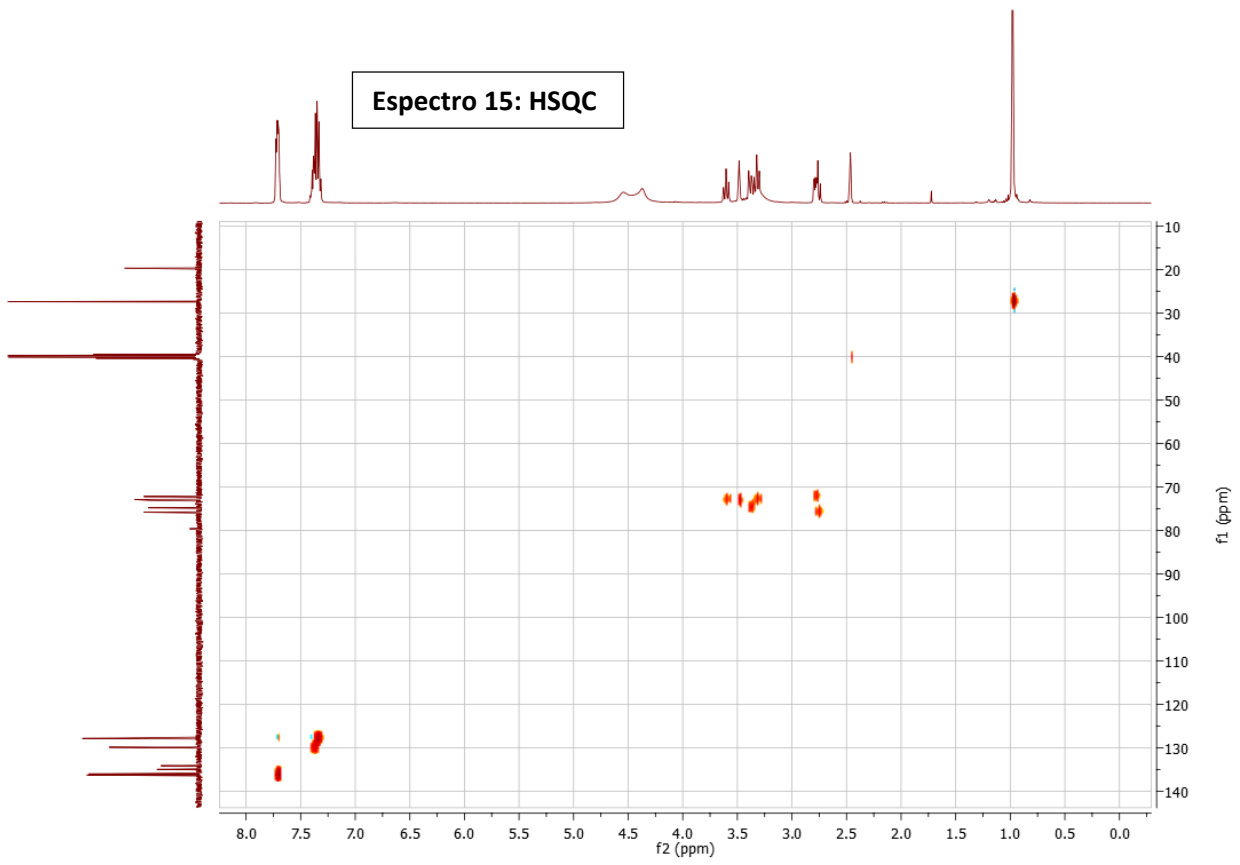


Espectro 12: COSY

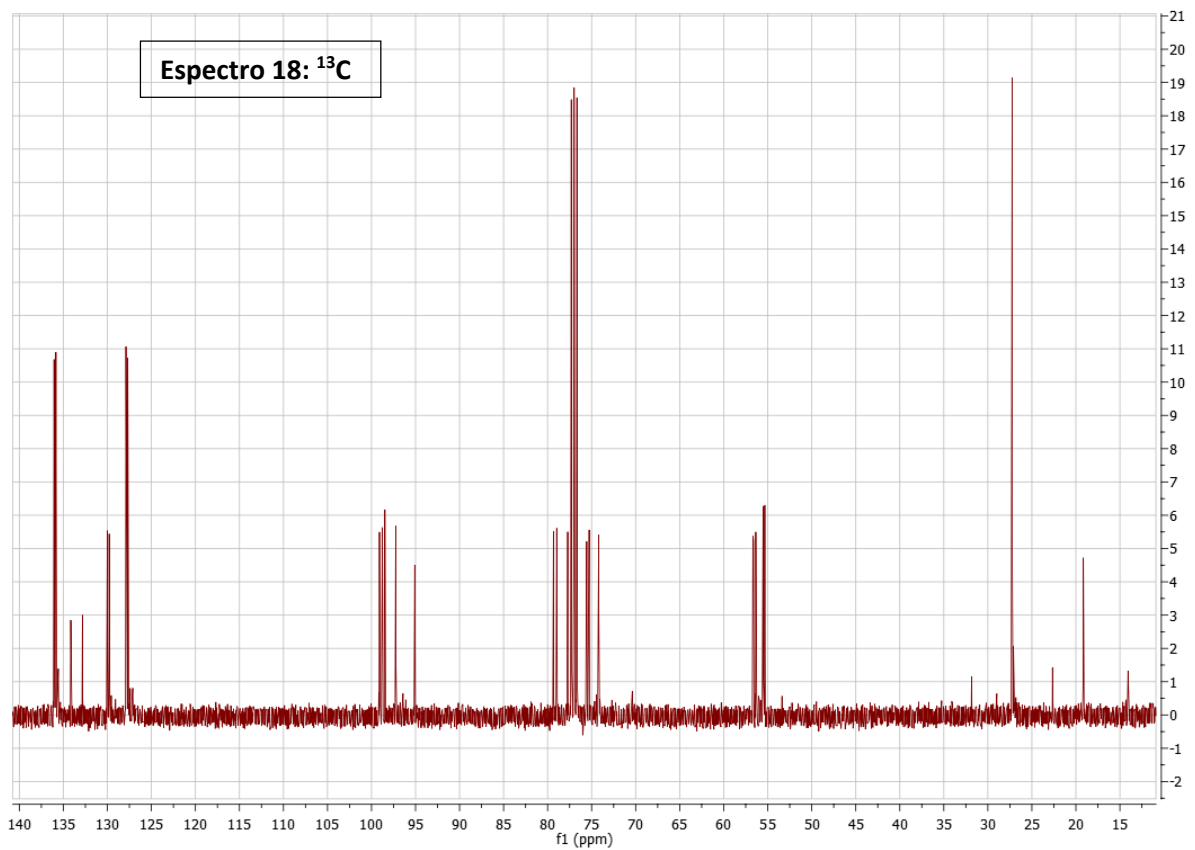
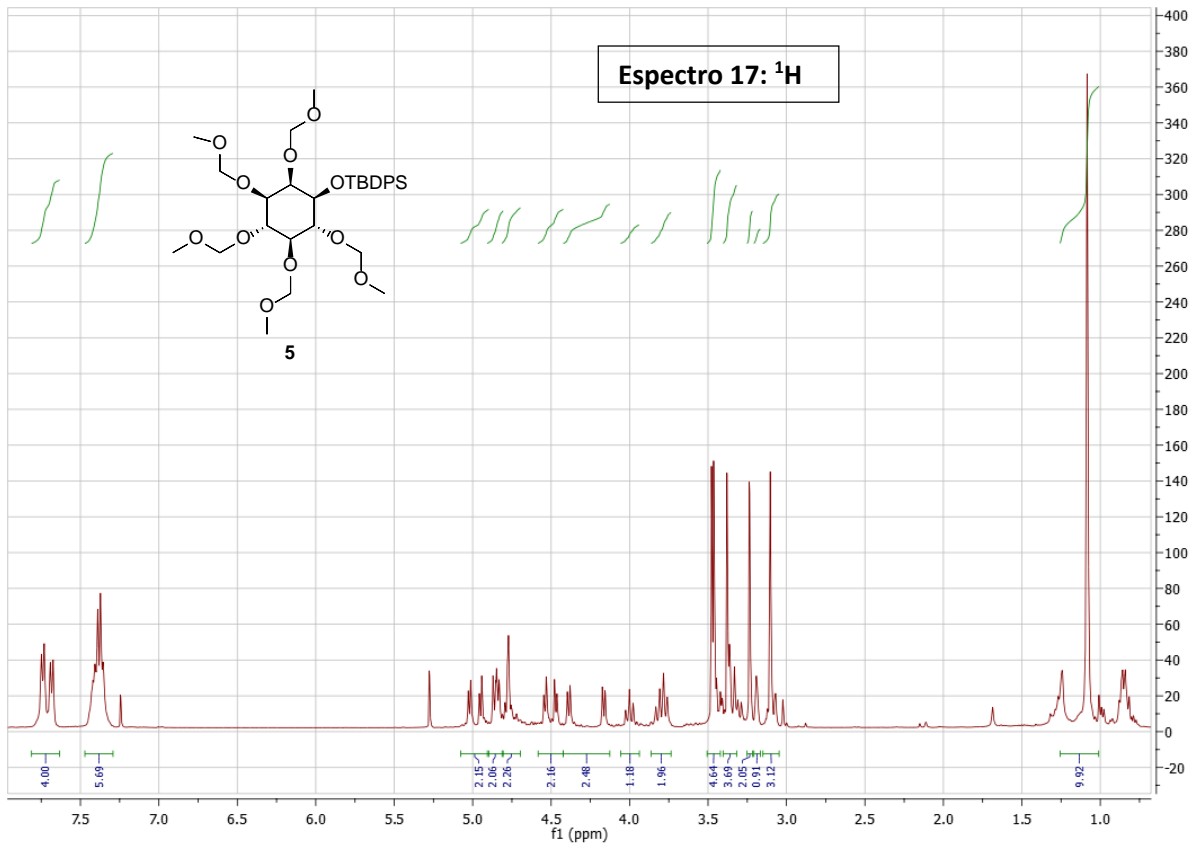


- **Compuesto 4:** 1-O-(*tert*-butildifenilsilil)-mioinositol

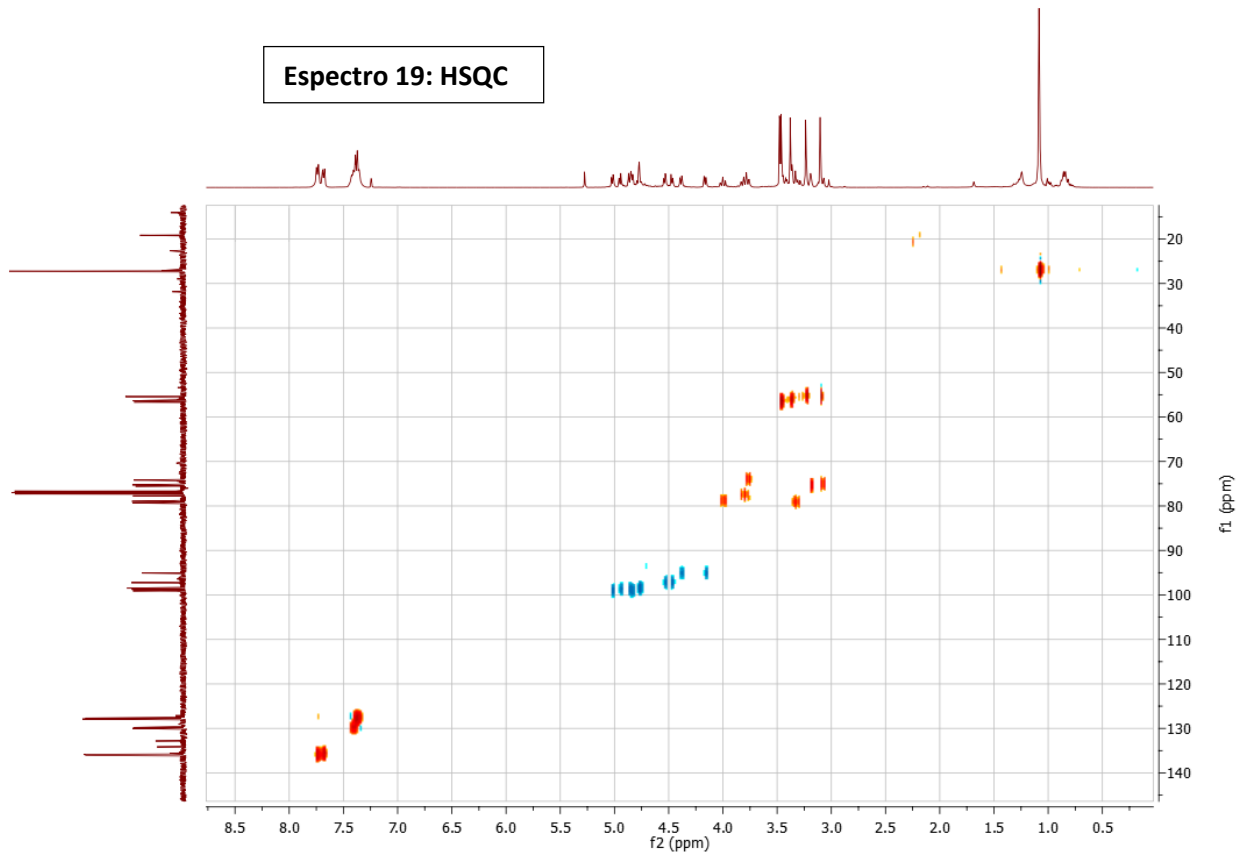




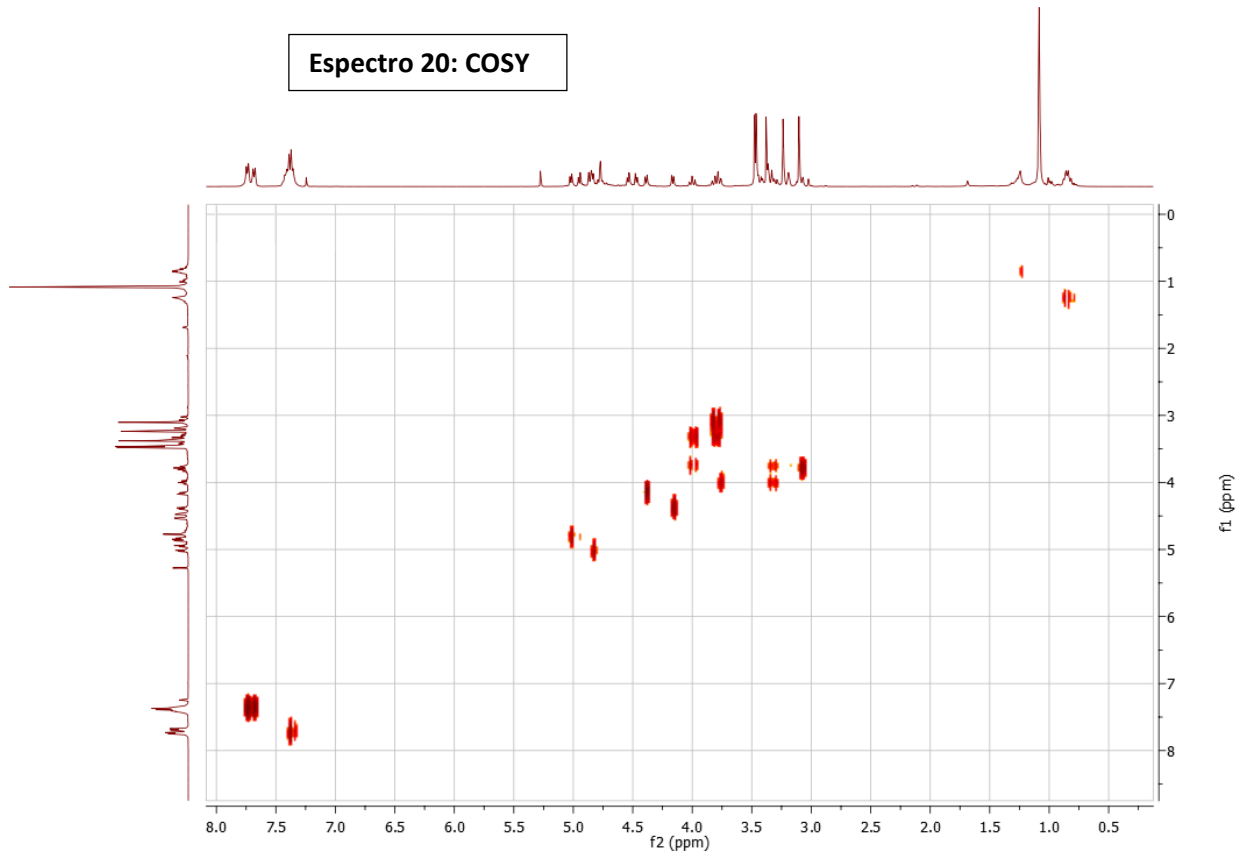
- **Compuesto 5:** 2,3,4,5,6-pentakis(metoximetoxi)ciclohexiloxil(*tert*-butildifenilsililo)



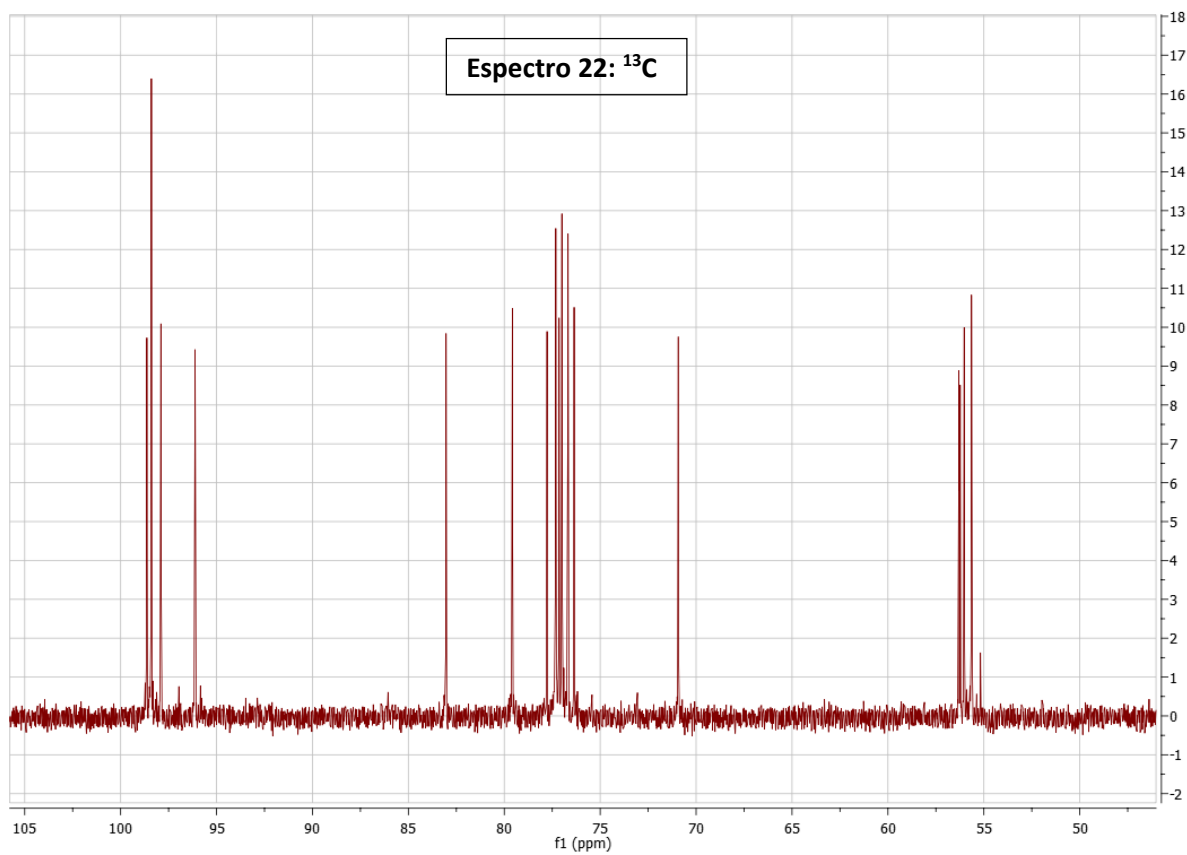
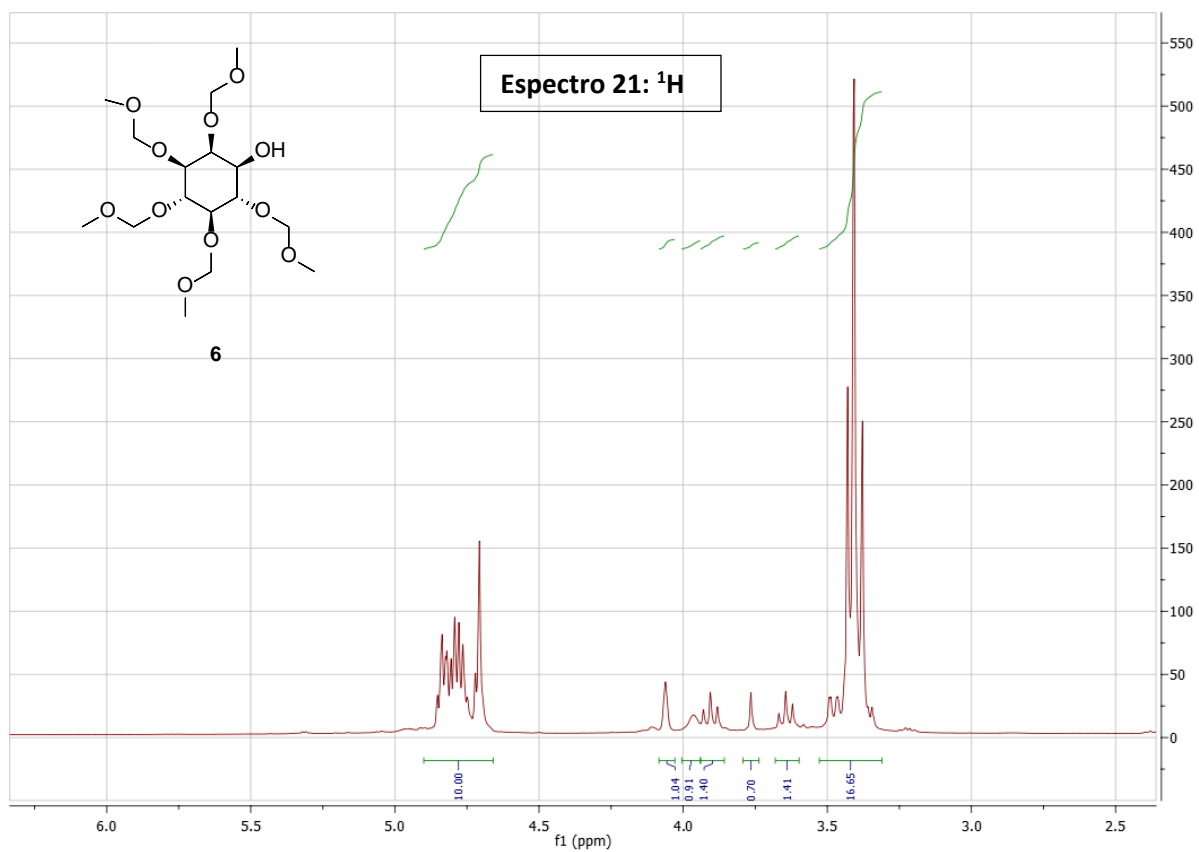
Espectro 19: HSQC



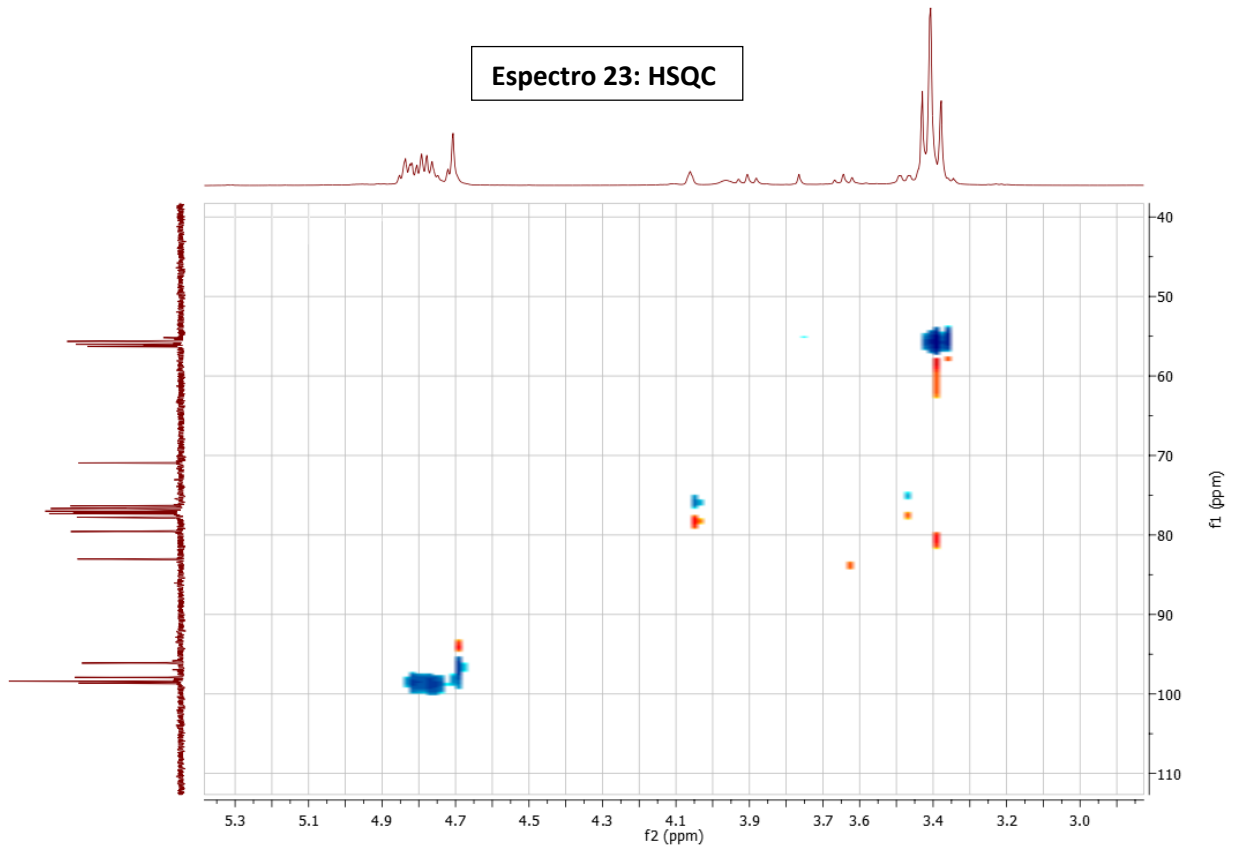
Espectro 20: COSY



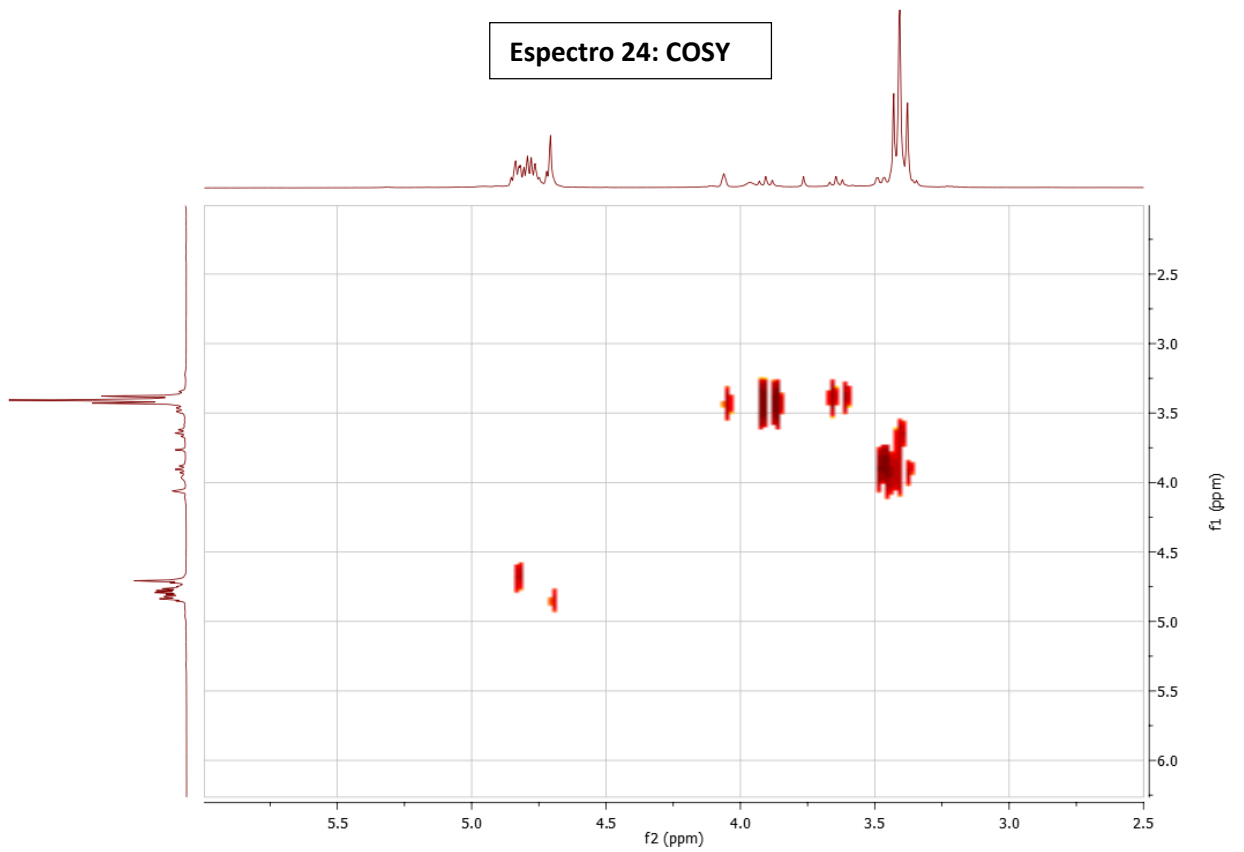
- **Compuesto 6:** 2,3,4,5,6-pentakis(metoximetoxi)ciclohexanol



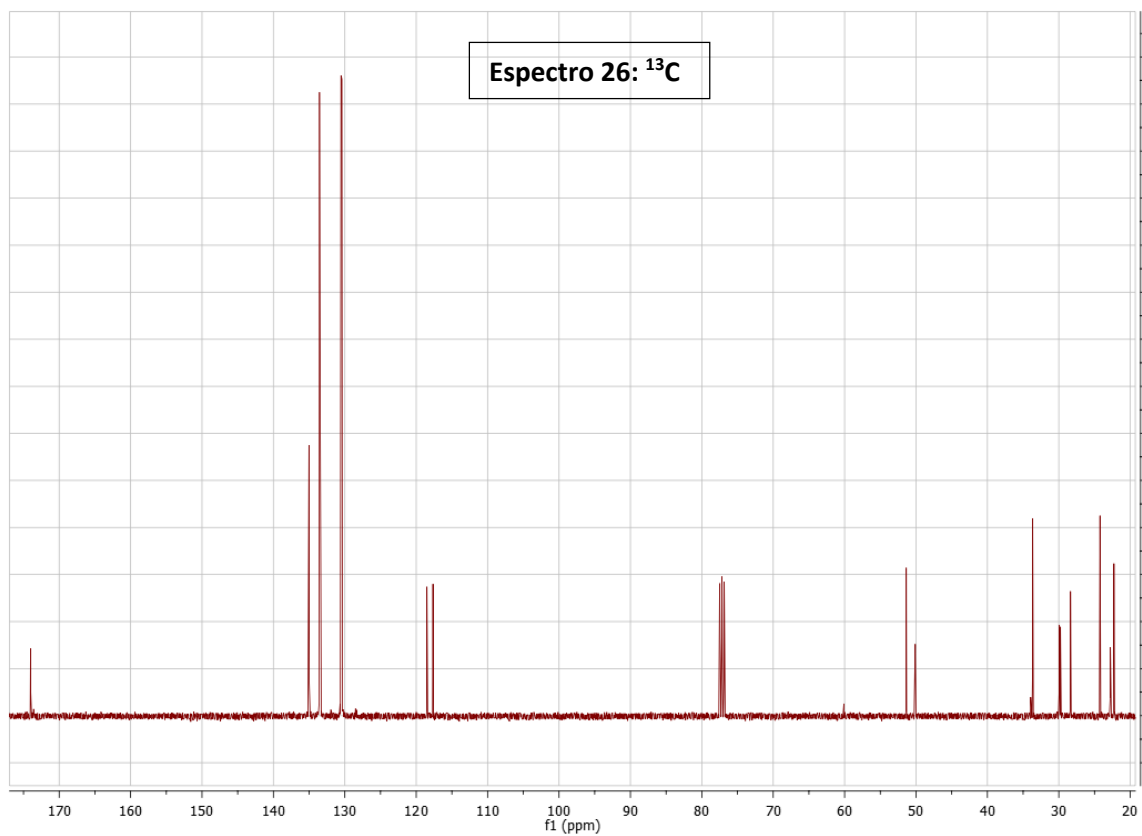
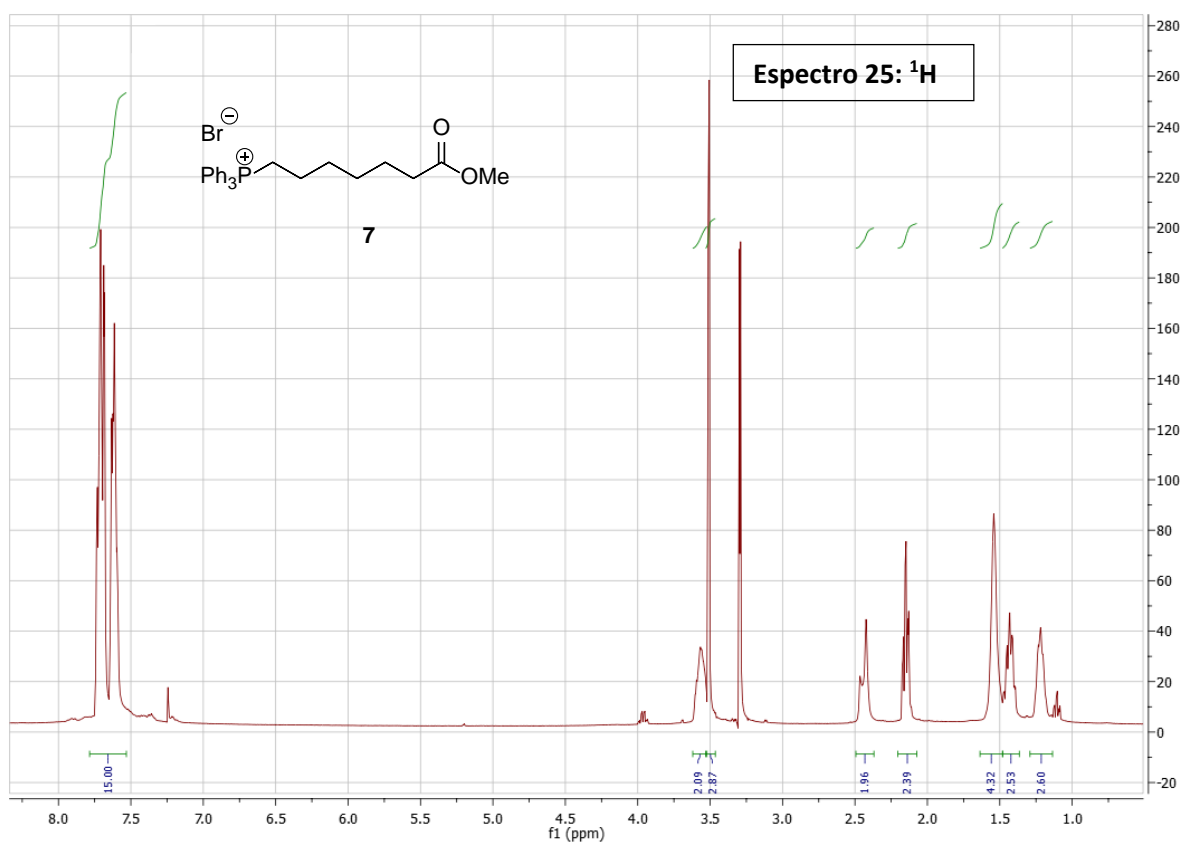
Espectro 23: HSQC

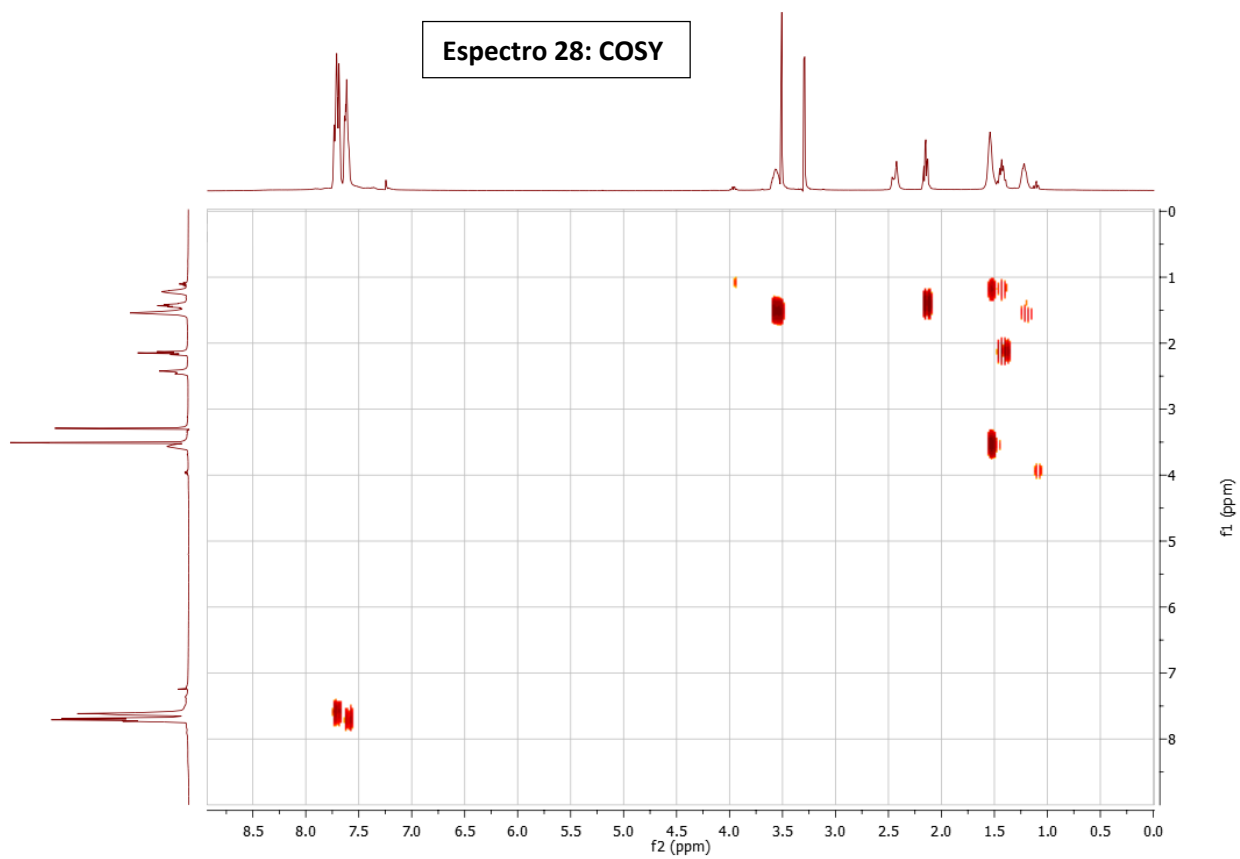
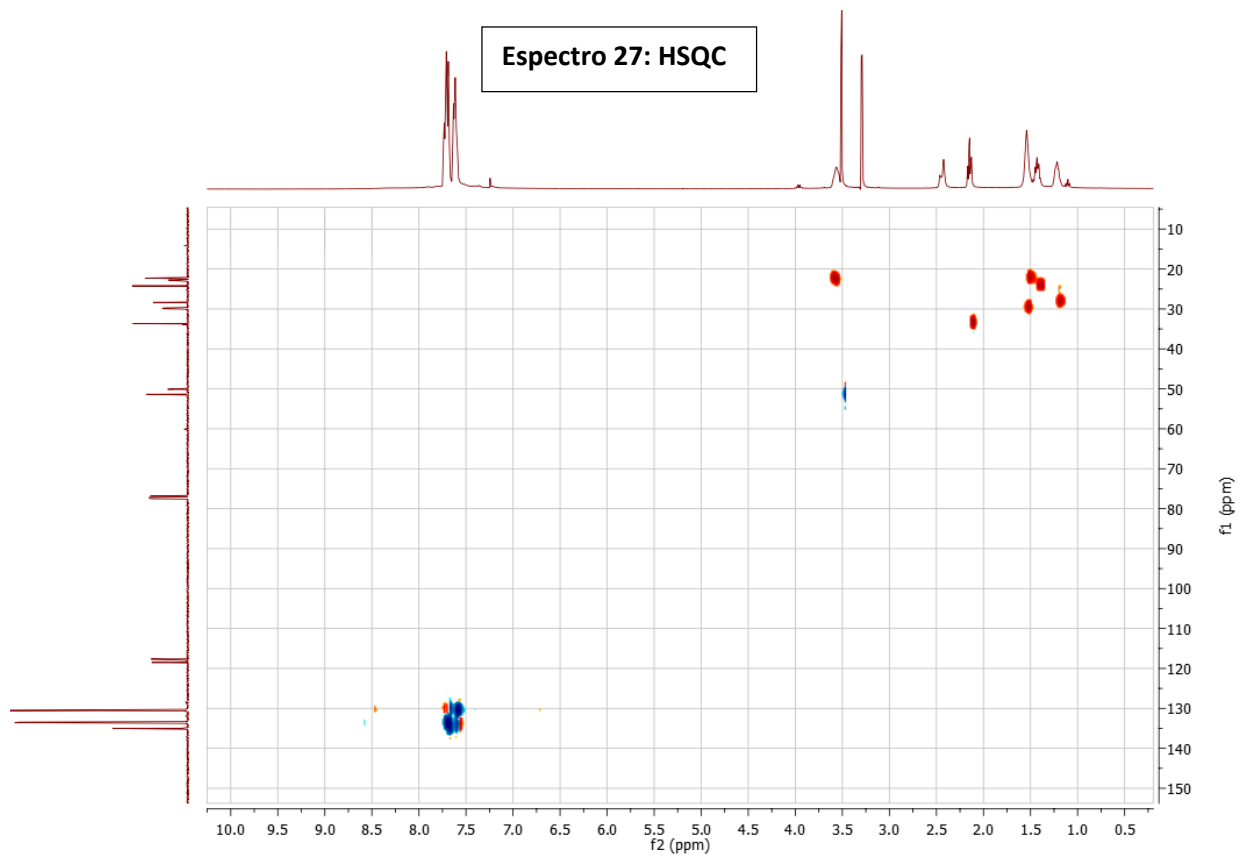


Espectro 24: COSY

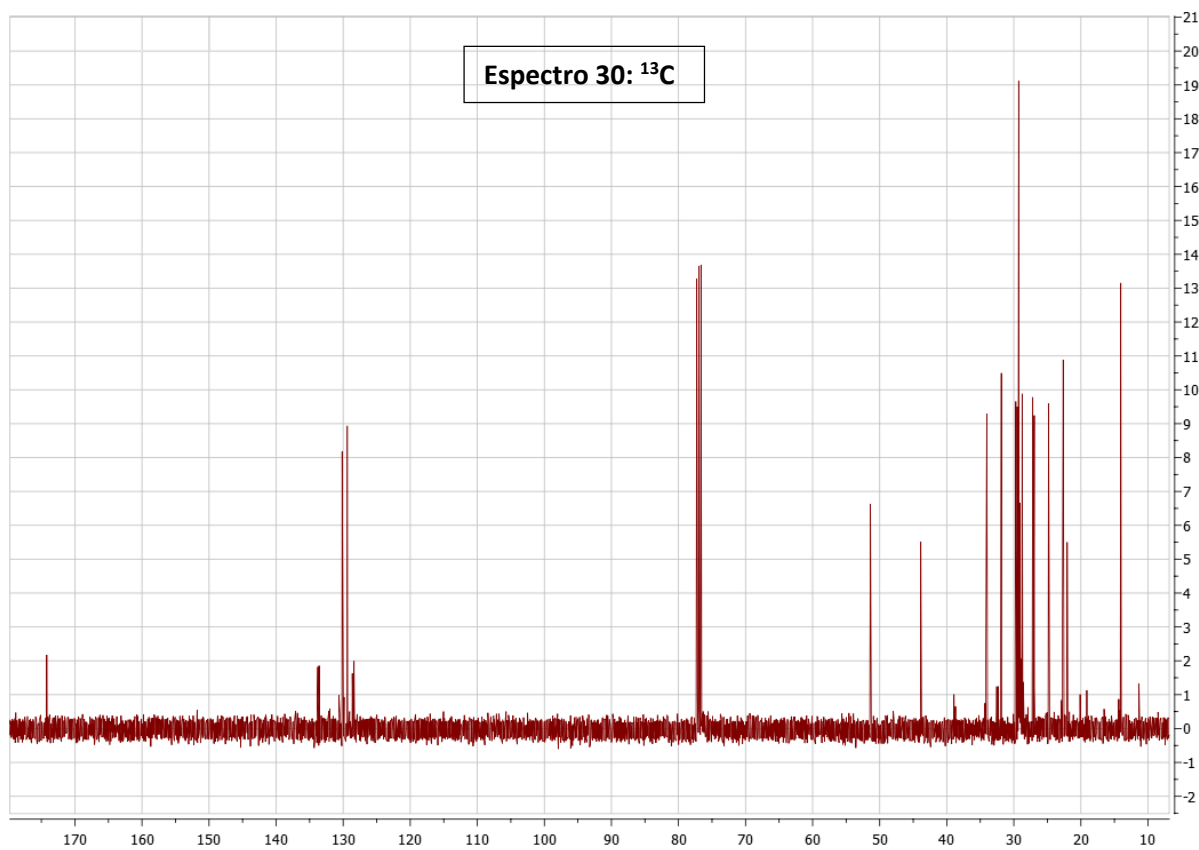
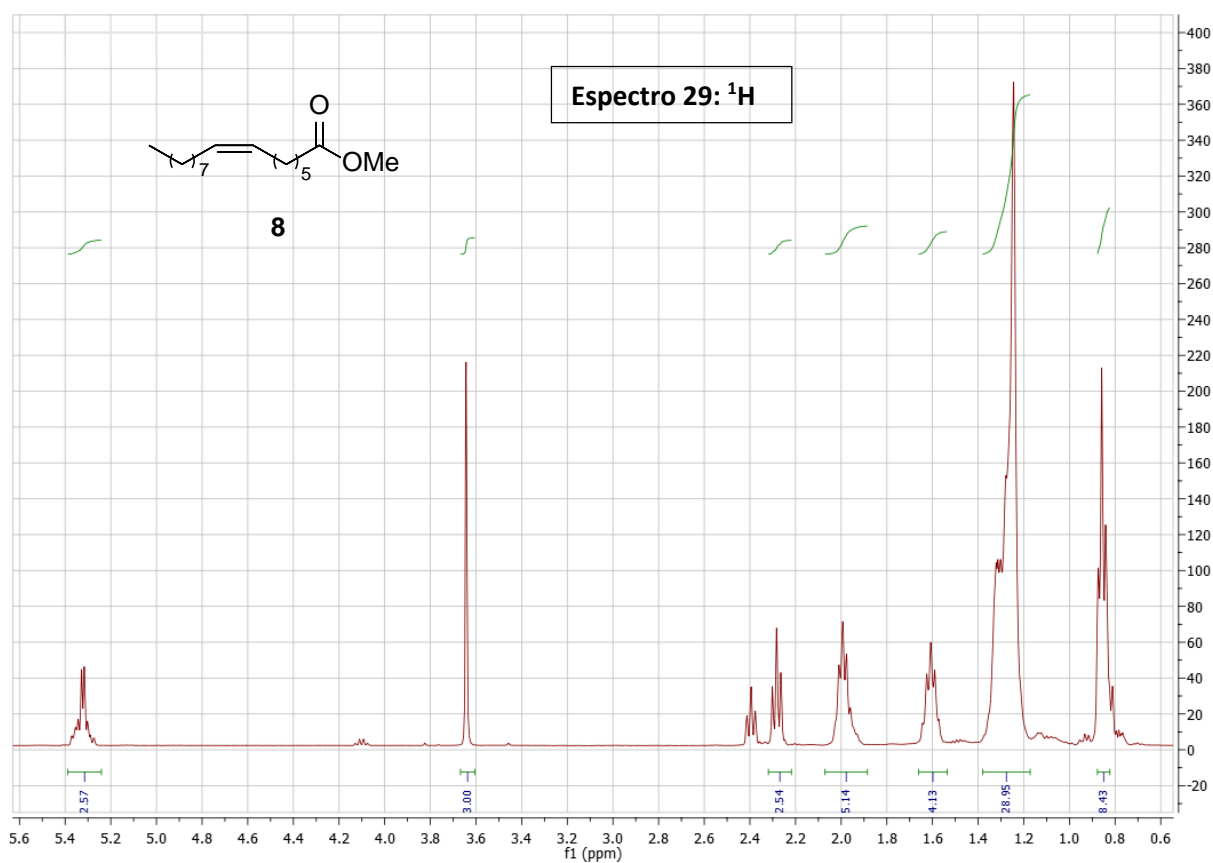


- **Compuesto 7:** bromuro de (7-metoxi-7-oxoheptil) trifenilfosfonio

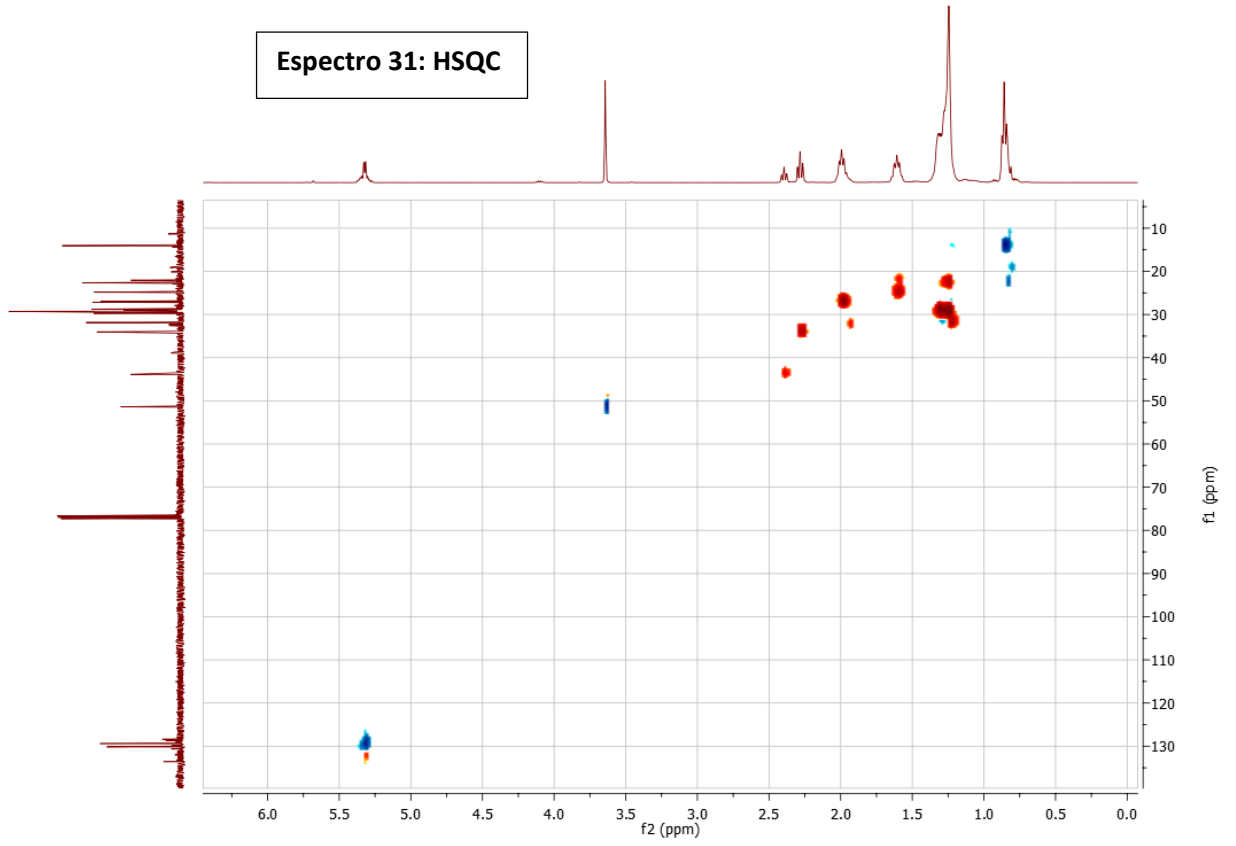




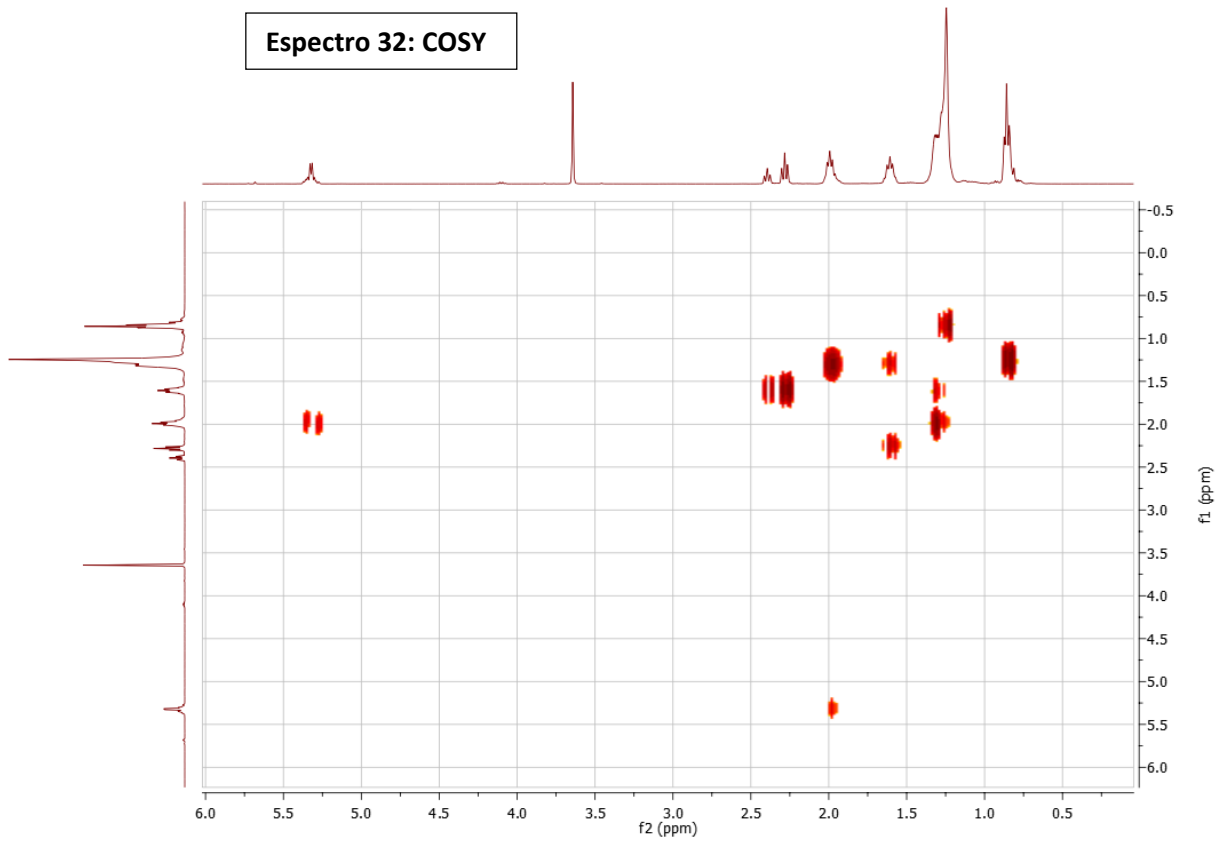
- **Compuesto 8:** (Z)-7-hexadecenoato de metilo



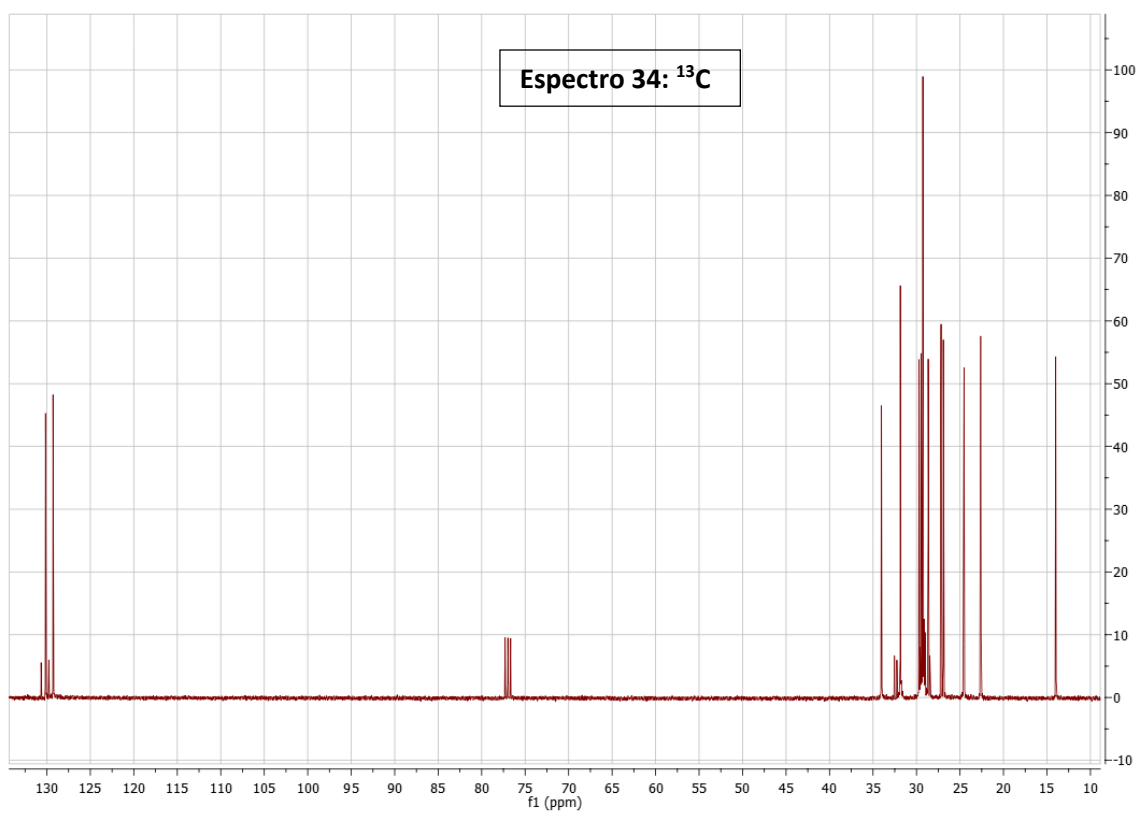
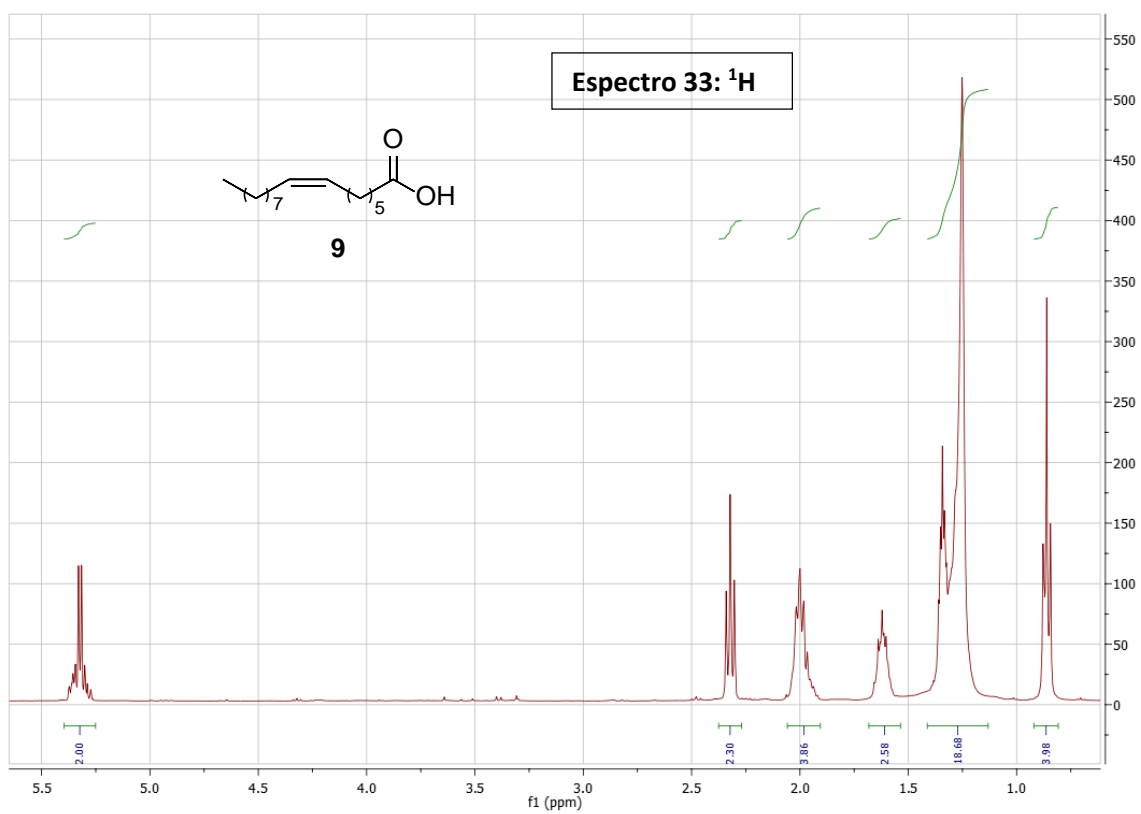
Espectro 31: HSQC



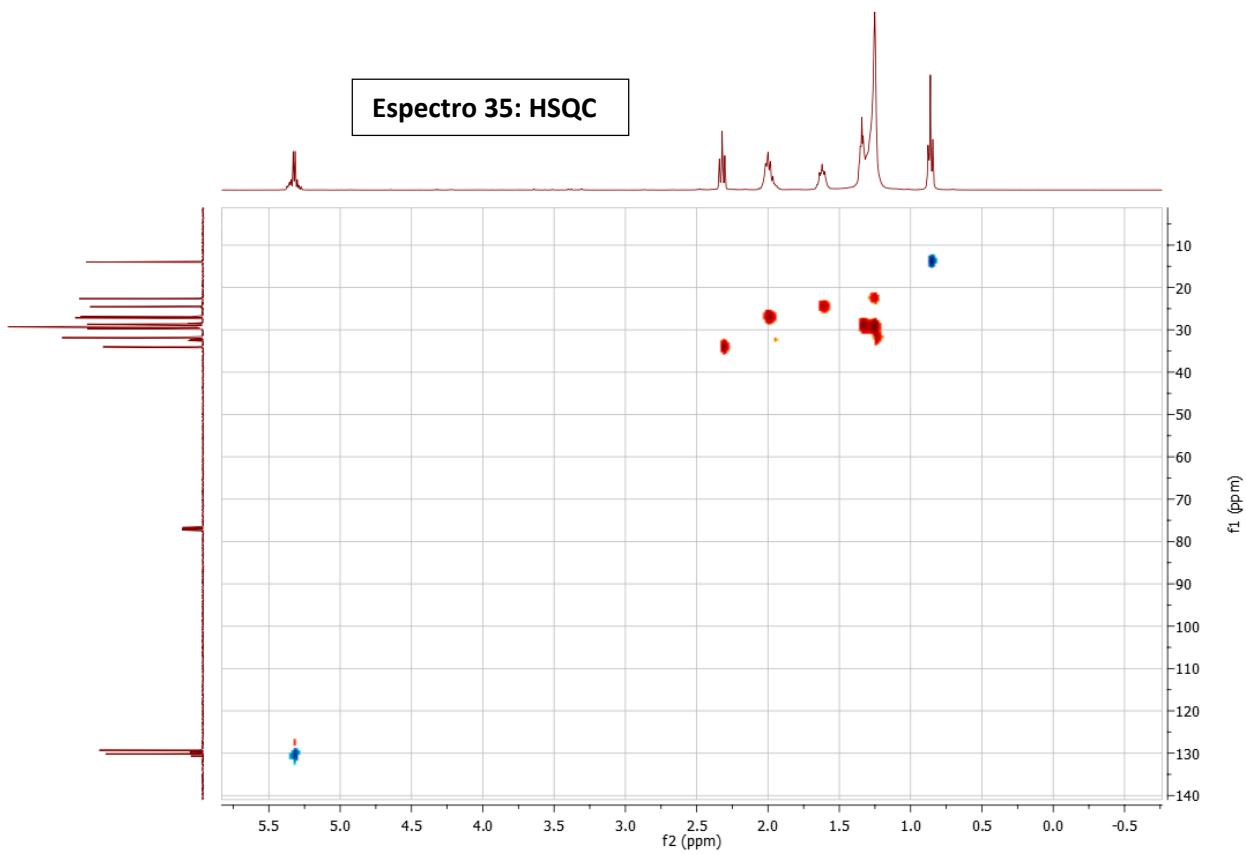
Espectro 32: COSY



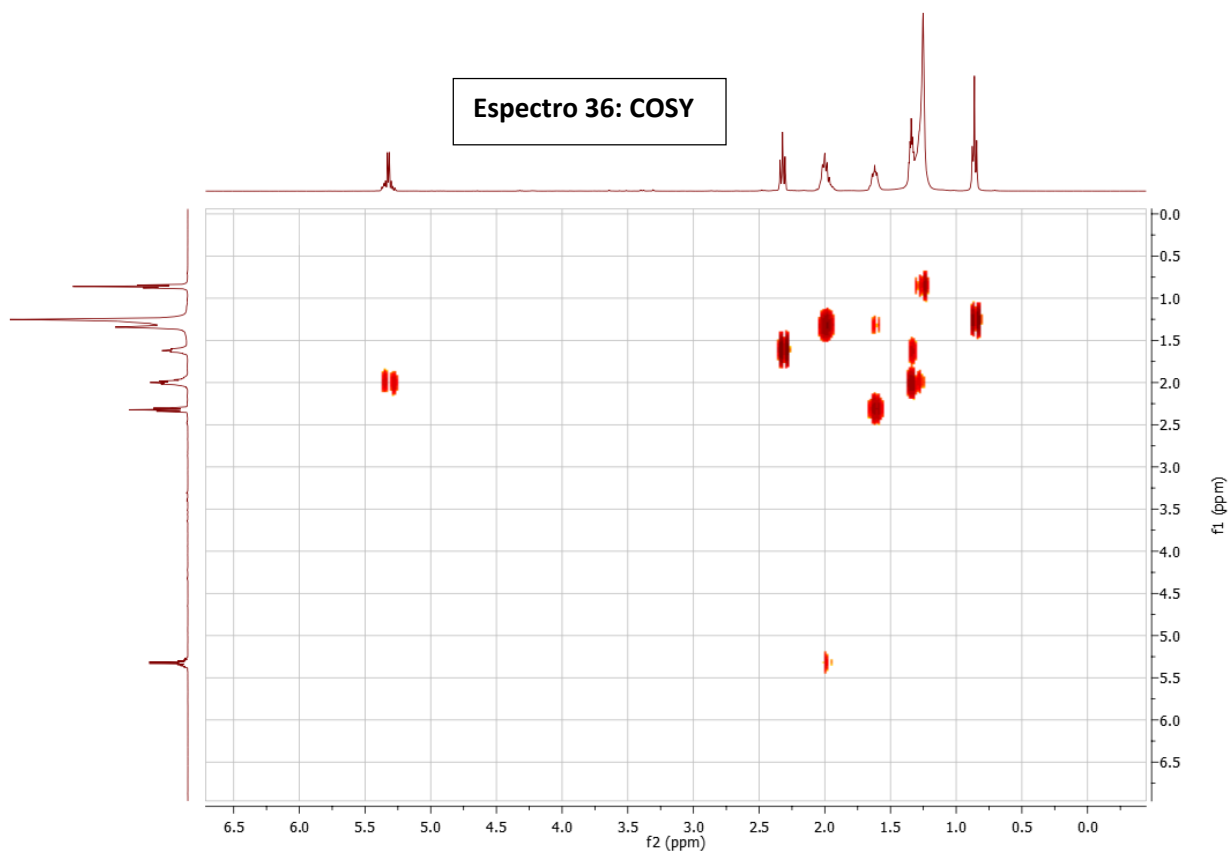
- **Compuesto 9:** ácido (Z)-7-hexadecenoico



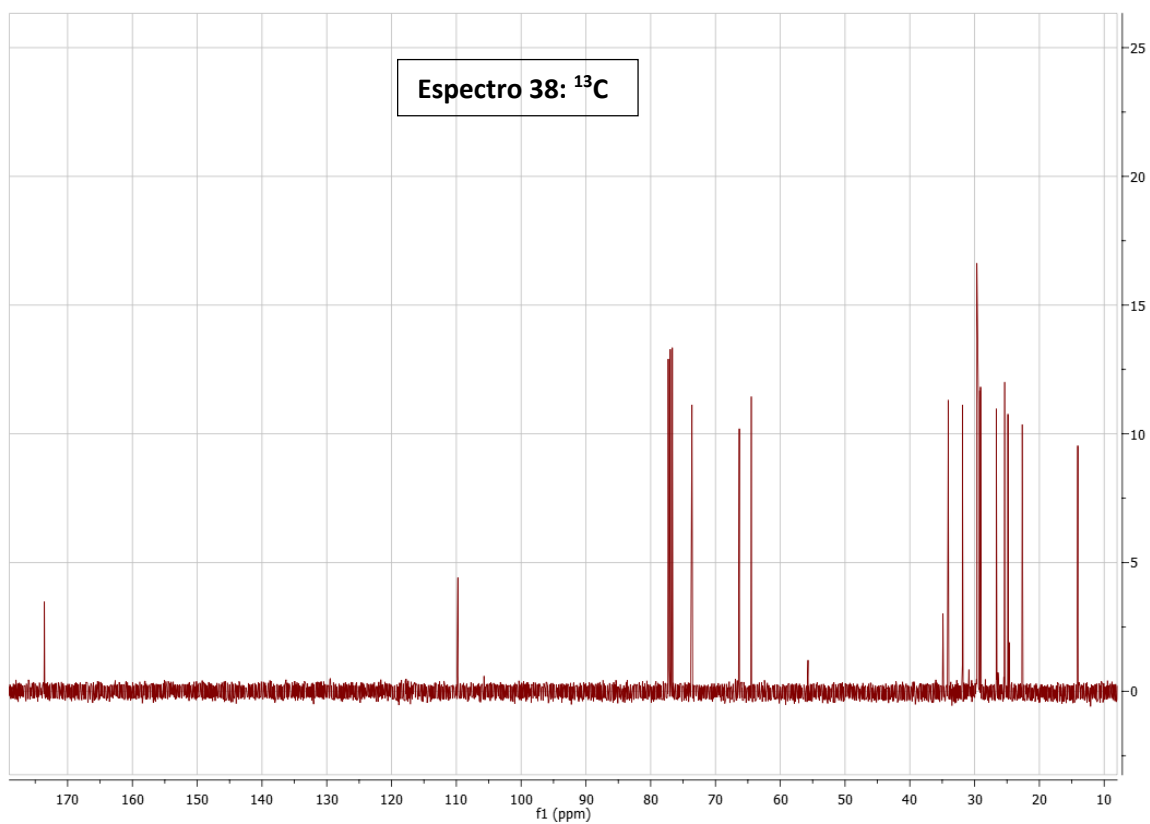
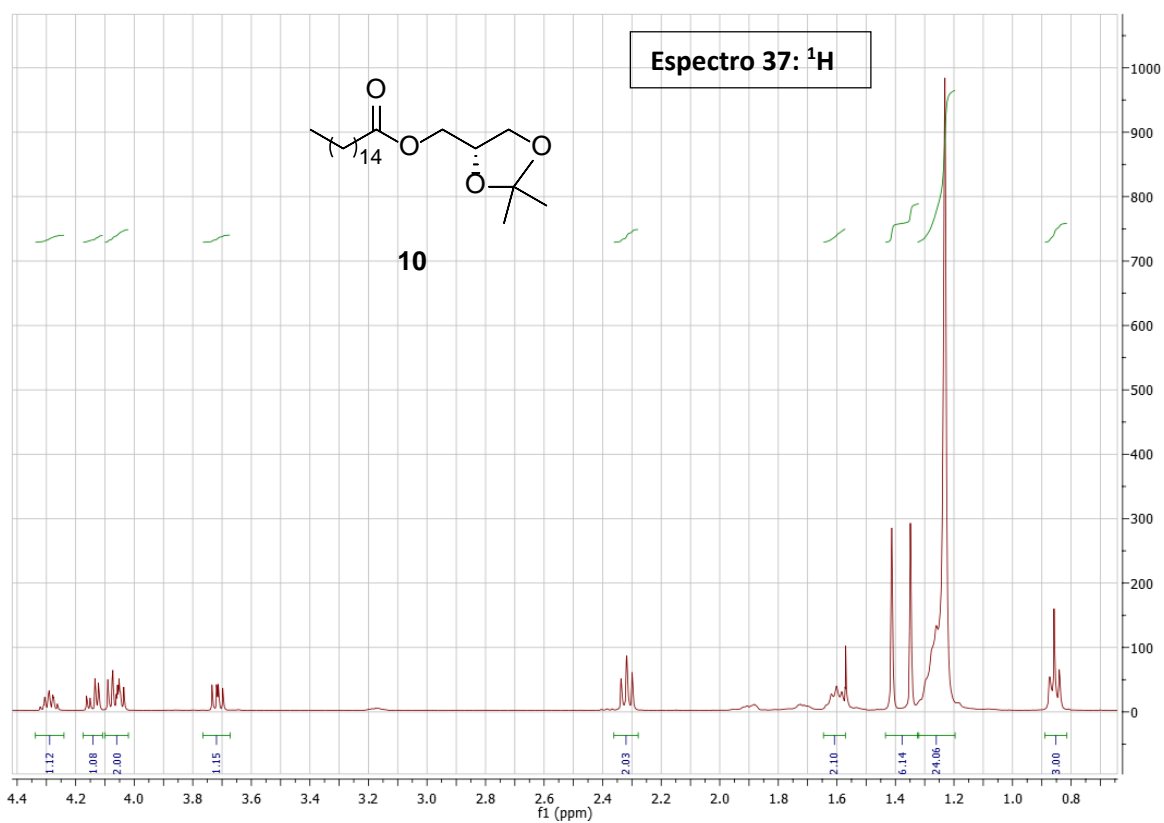
Espectro 35: HSQC



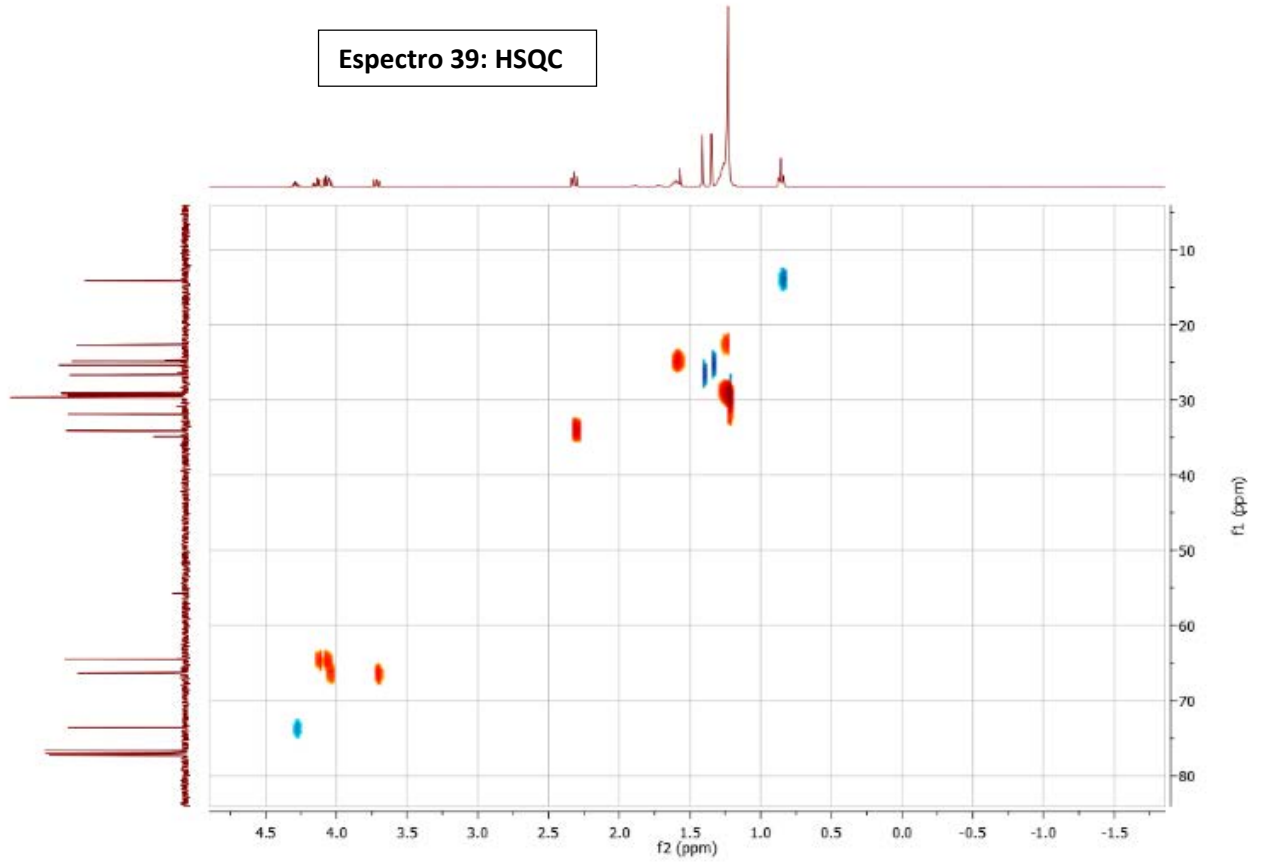
Espectro 36: COSY



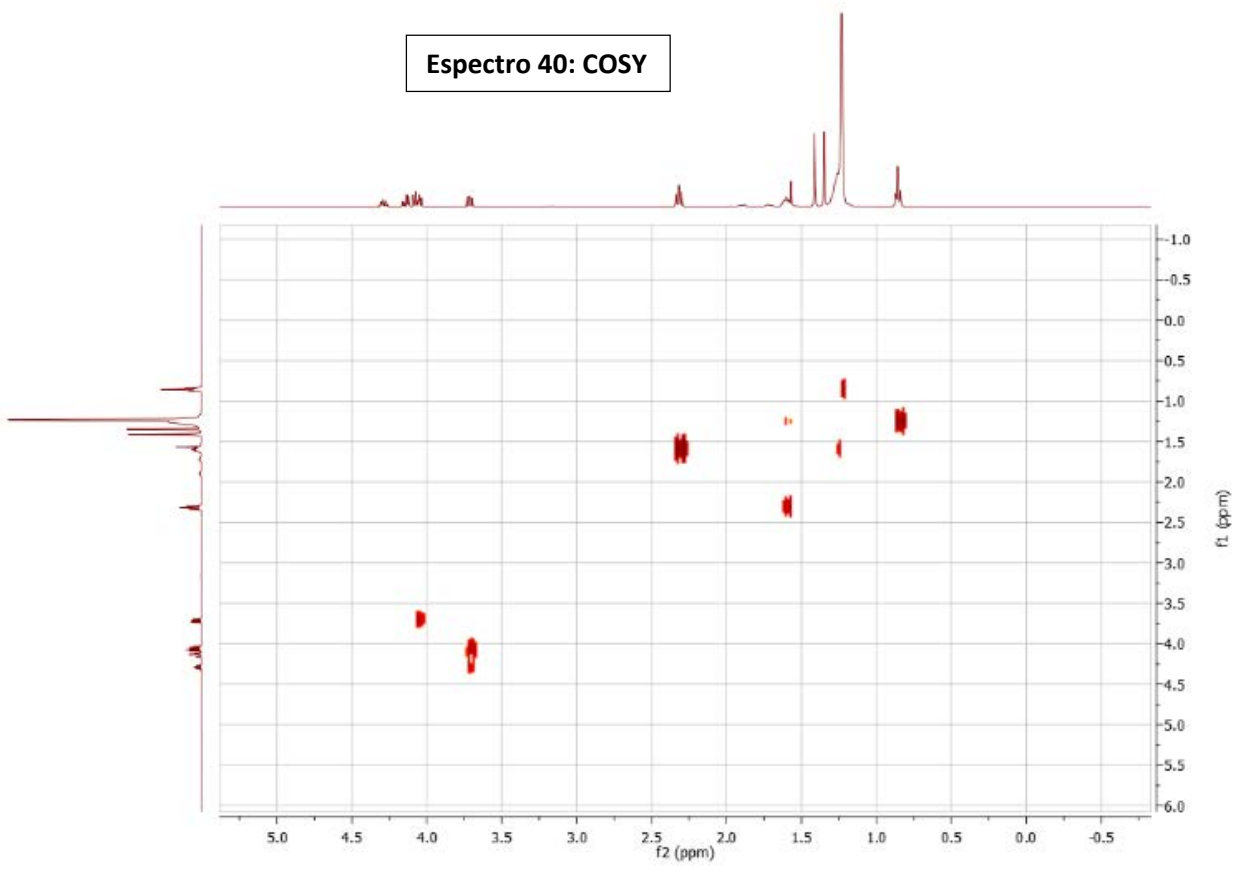
- **Compuesto 10:** palmitato de (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il) metilo



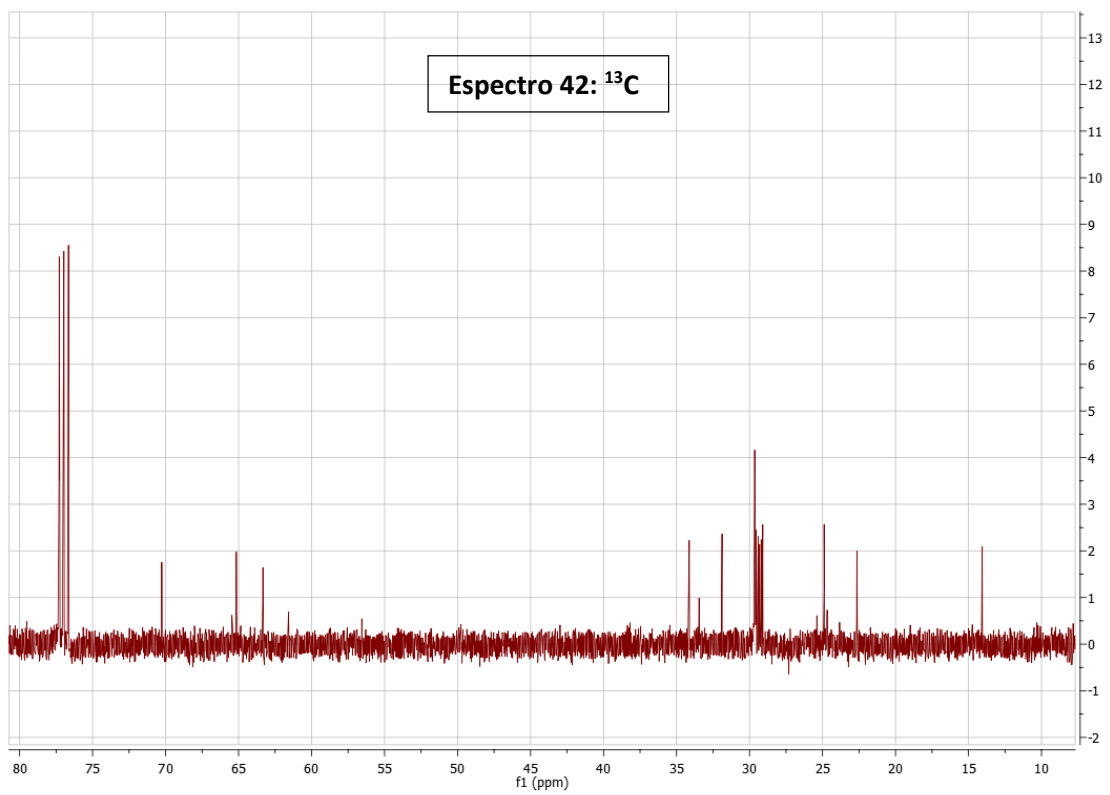
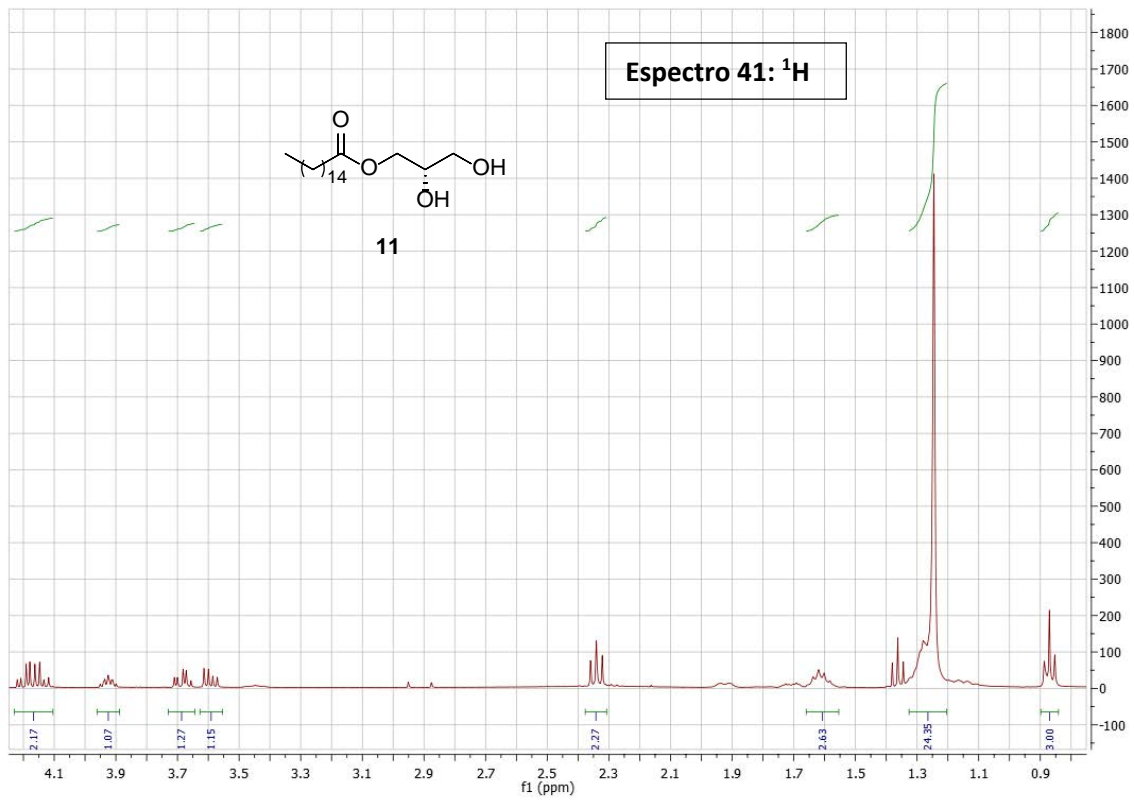
Espectro 39: HSQC



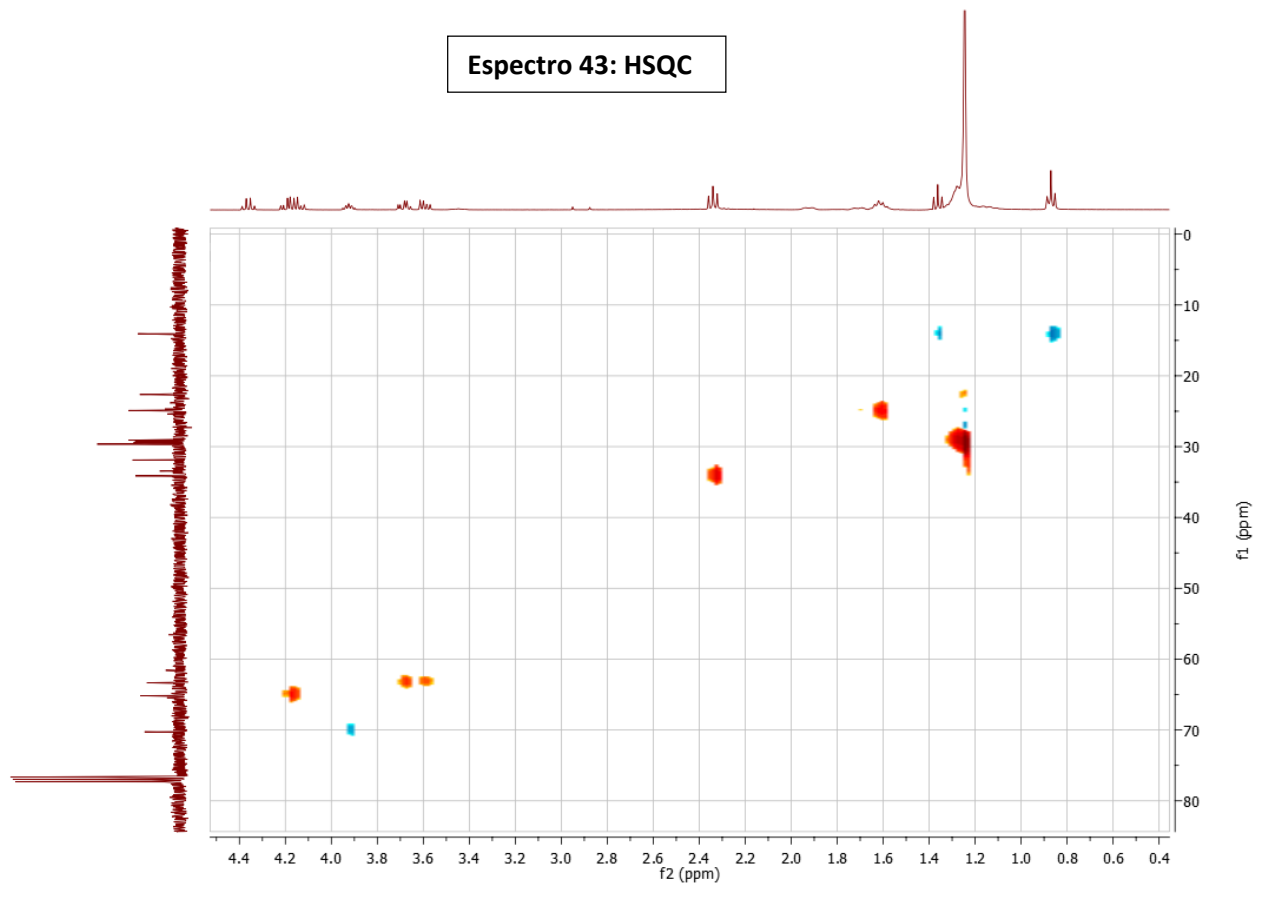
Espectro 40: COSY



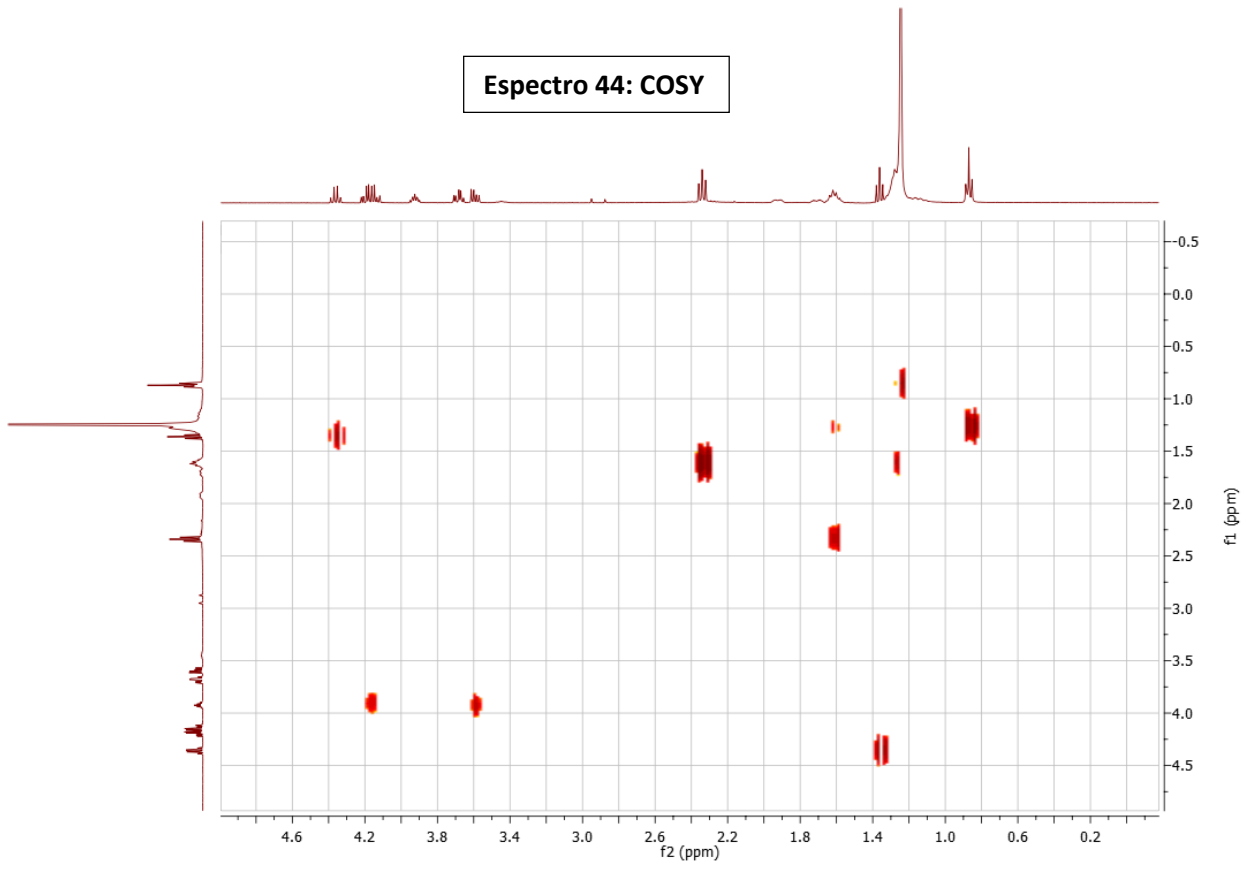
- **Compuesto 11:** palmitato de 2,3-dihidroxi-propilo



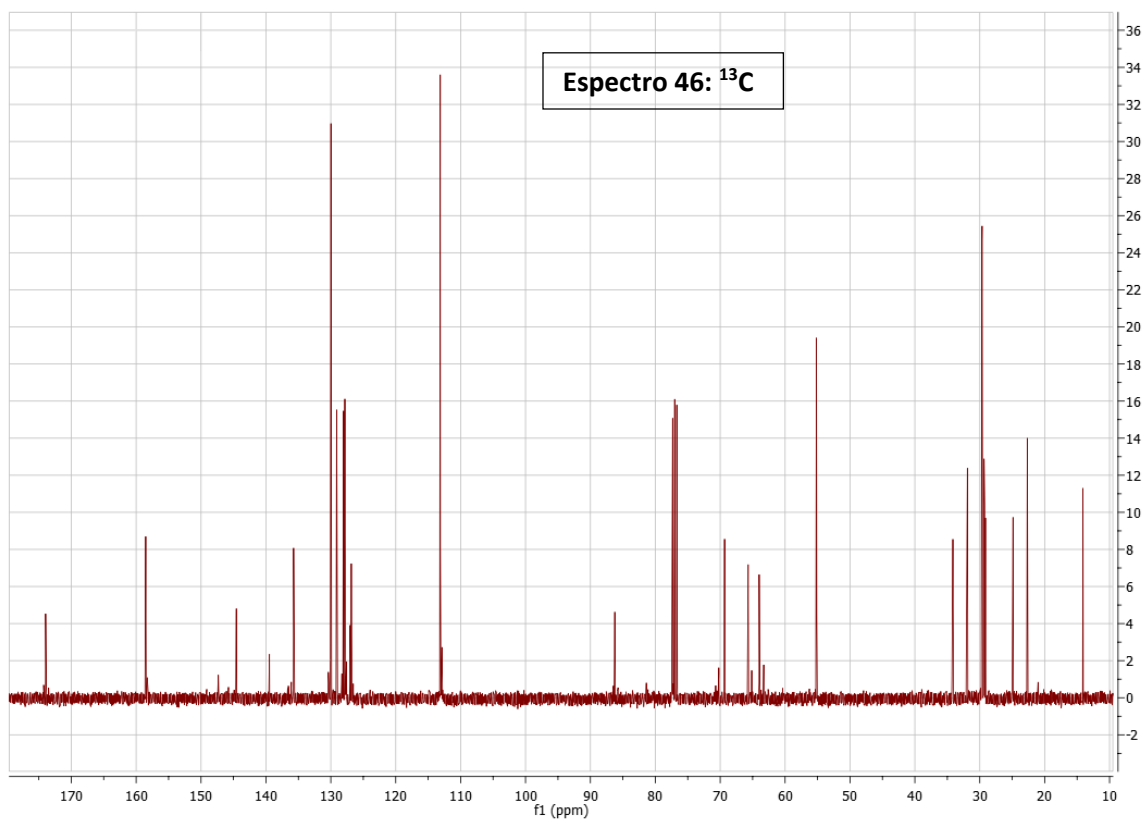
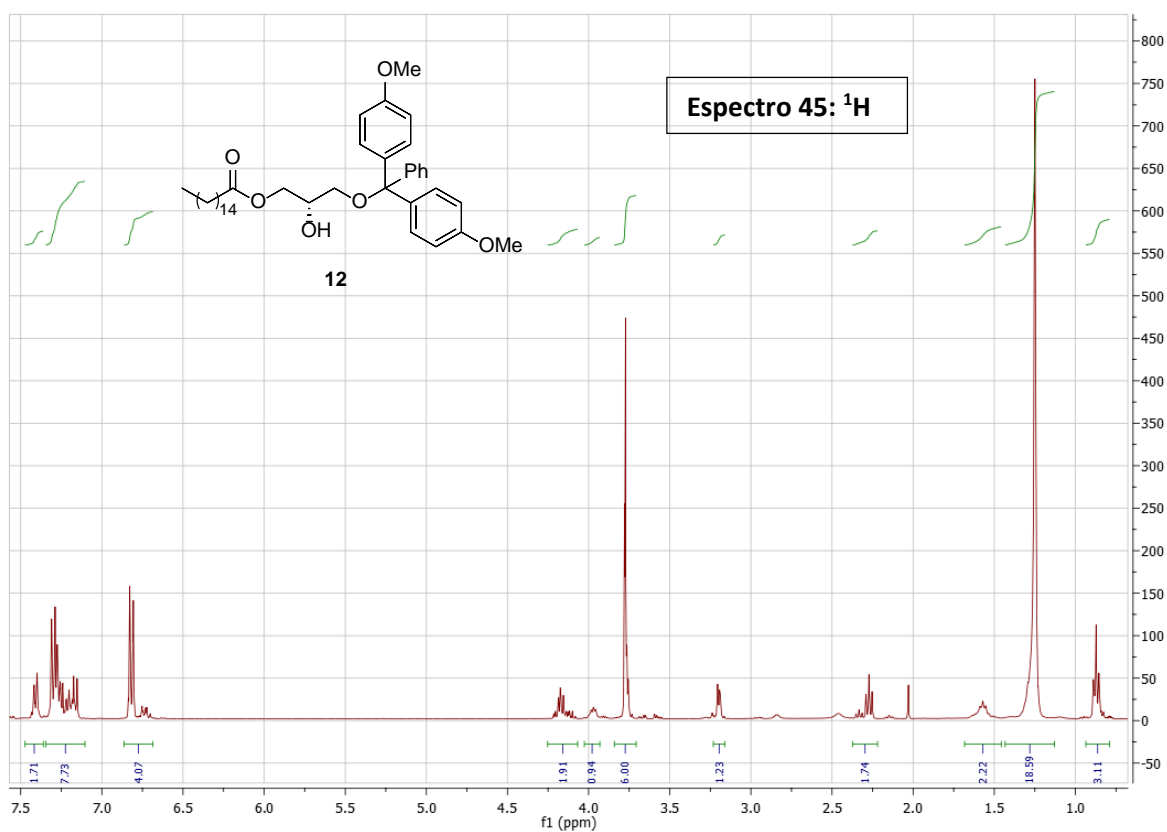
Espectro 43: HSQC



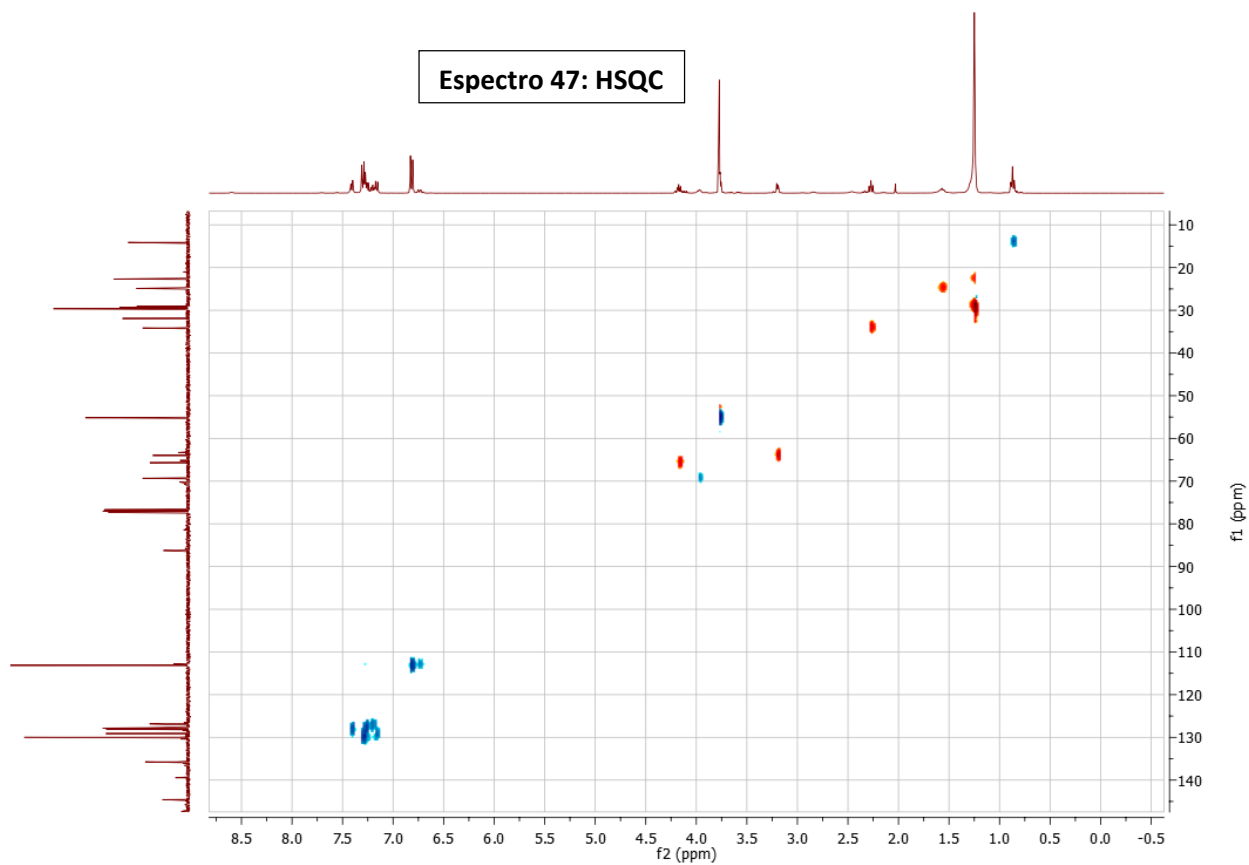
Espectro 44: COSY



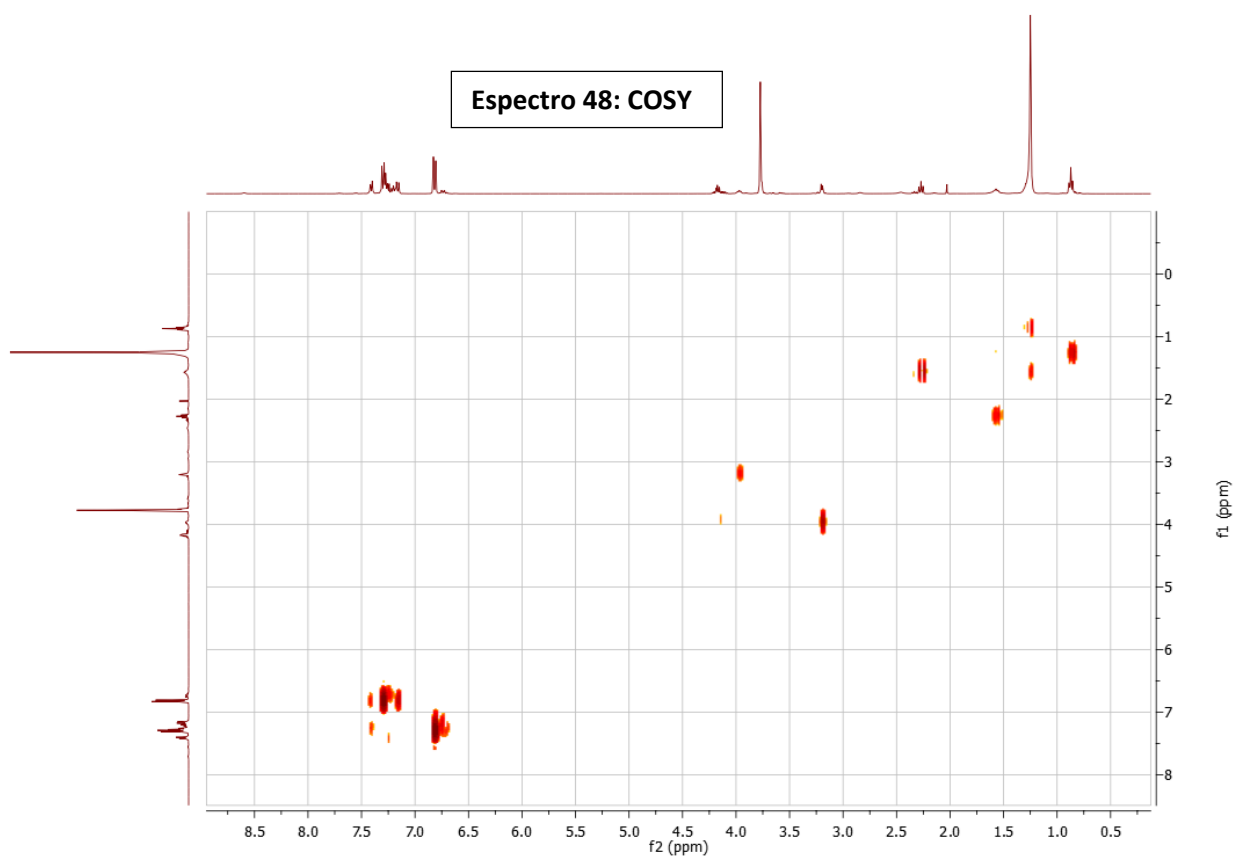
- **Compuesto 12: 3-dimetiltritol-2-hidroxi-propilpalmitato**



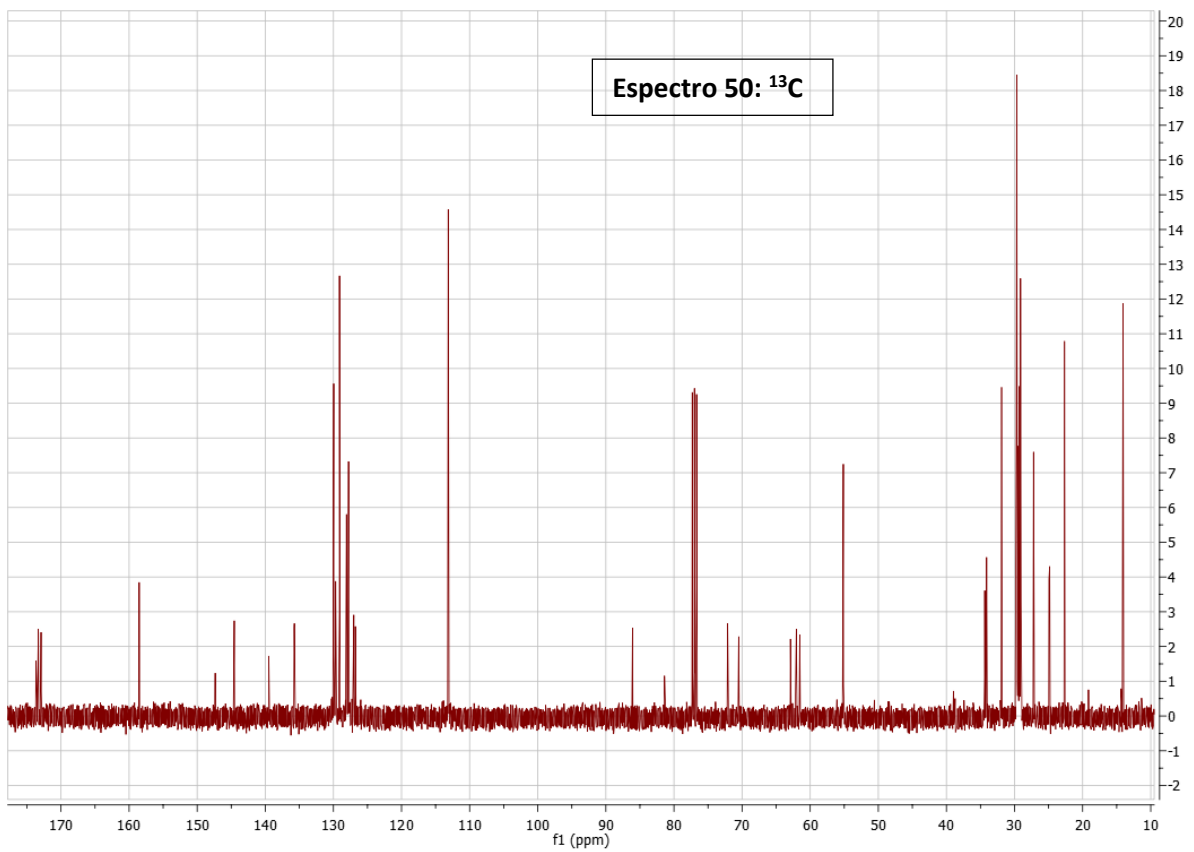
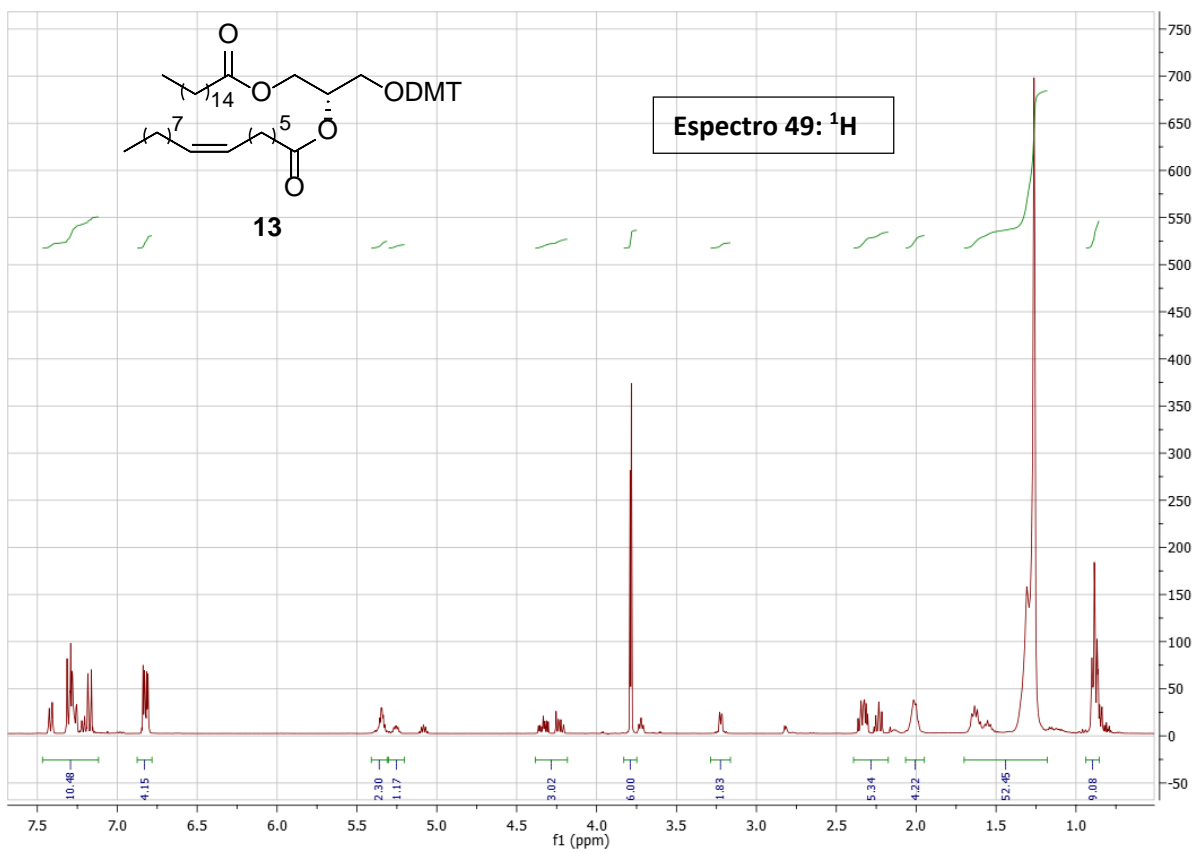
Espectro 47: HSQC



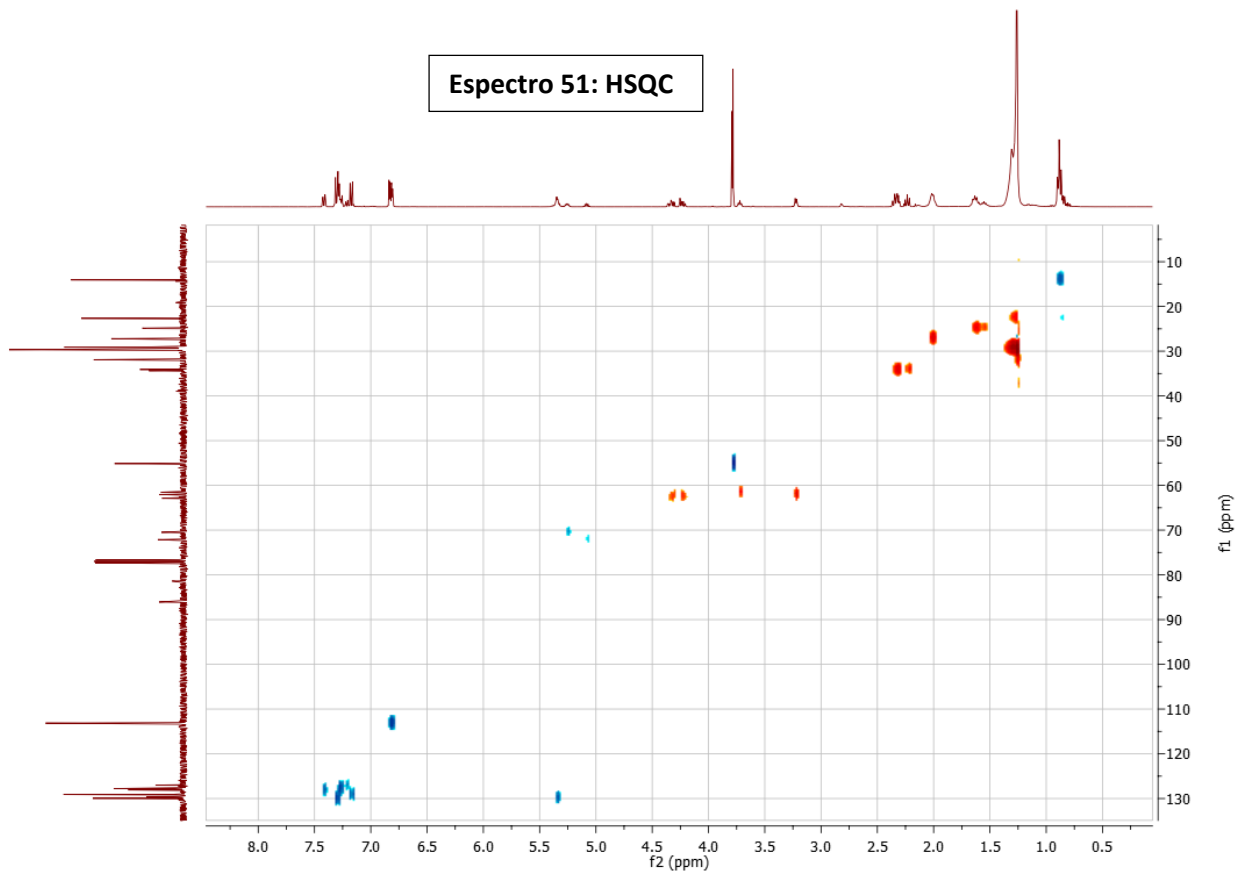
Espectro 48: COSY



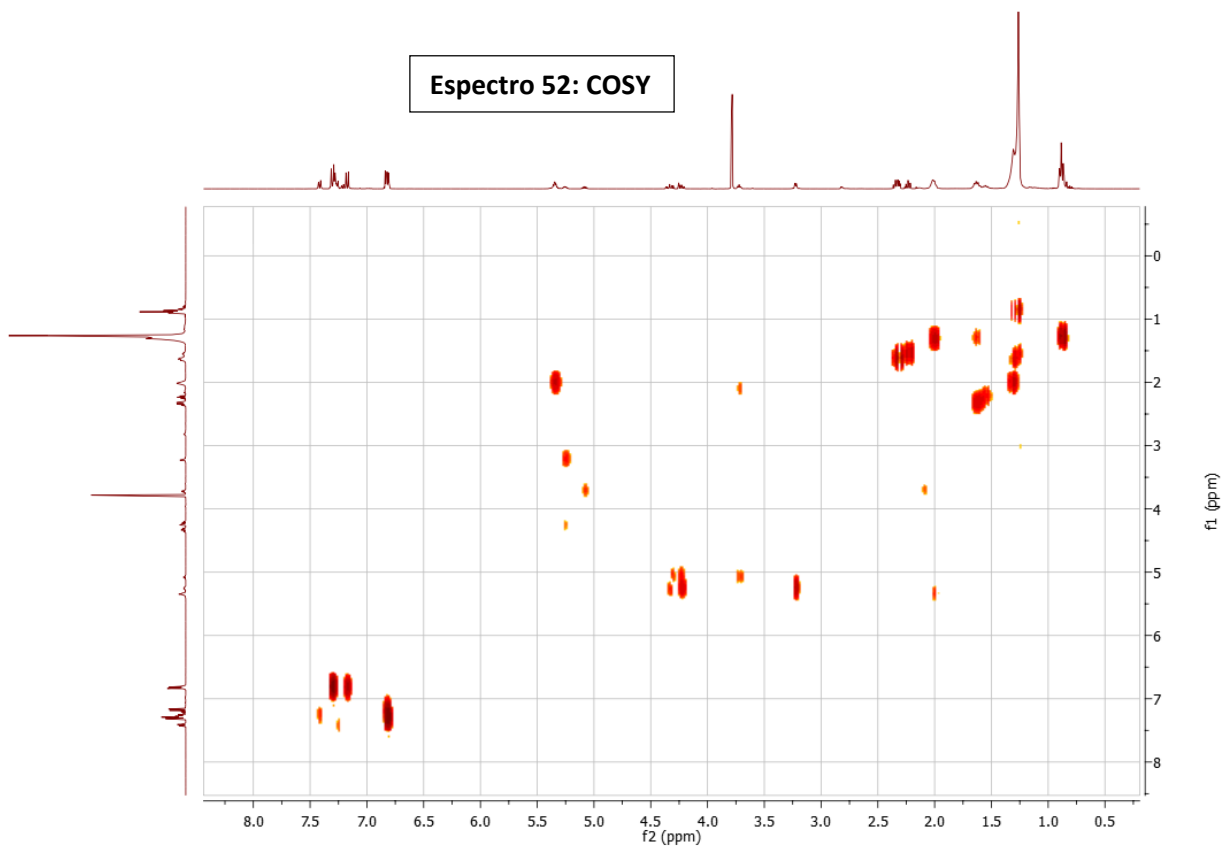
- **Compuesto 13:** (Z)-7-hexadecenoato de 1-dimetoxitritil-3-(palmitoiloxi)propan-2-ilo



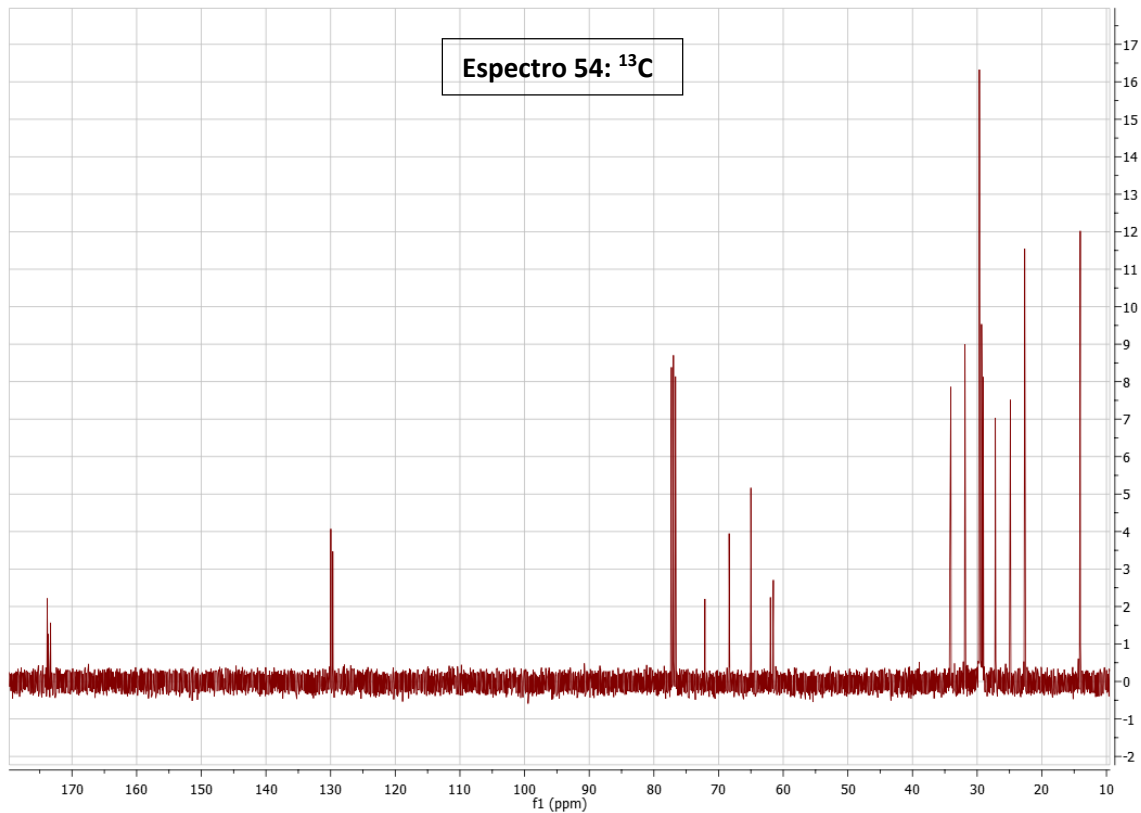
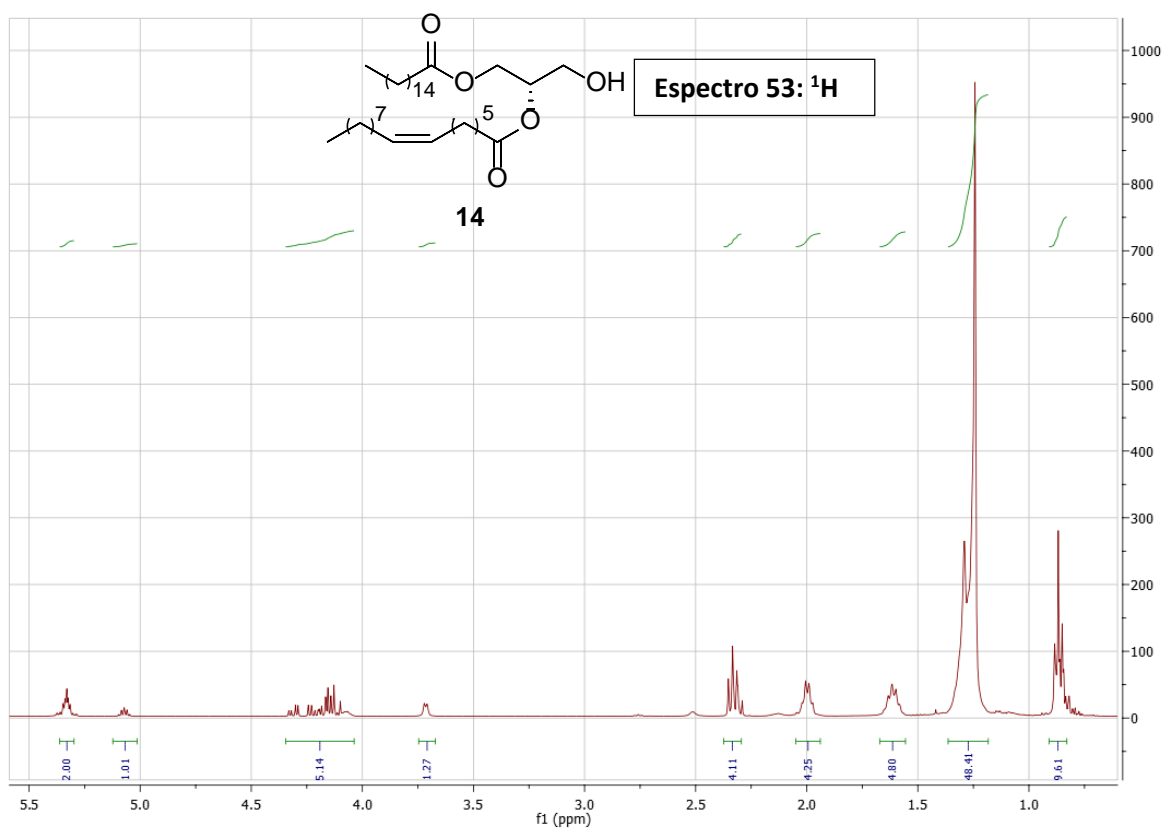
Espectro 51: HSQC



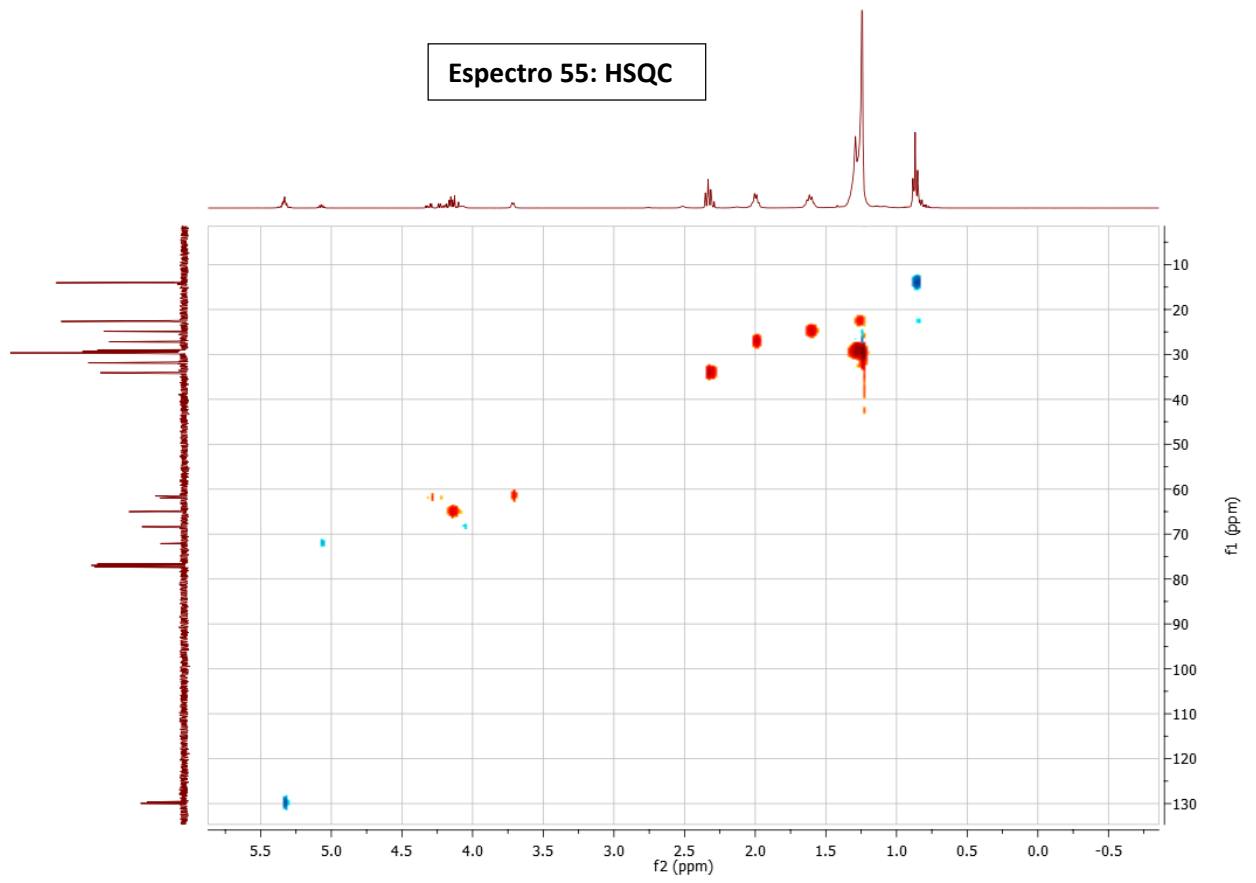
Espectro 52: COSY



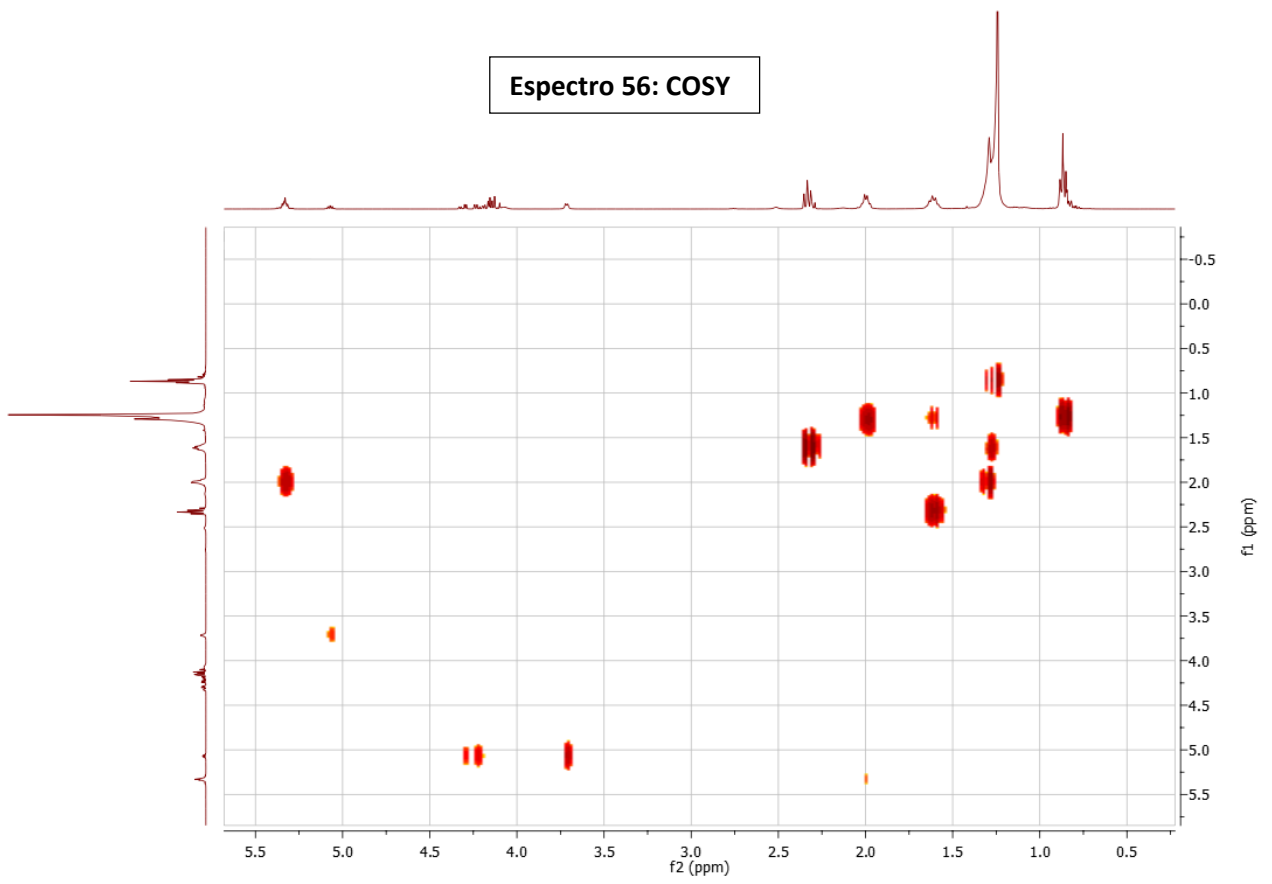
- **Compuesto 14:** (Z)-7-hexadecenoato de 1-hidroxi-3(palmitoiloxi) propan-2-ilo



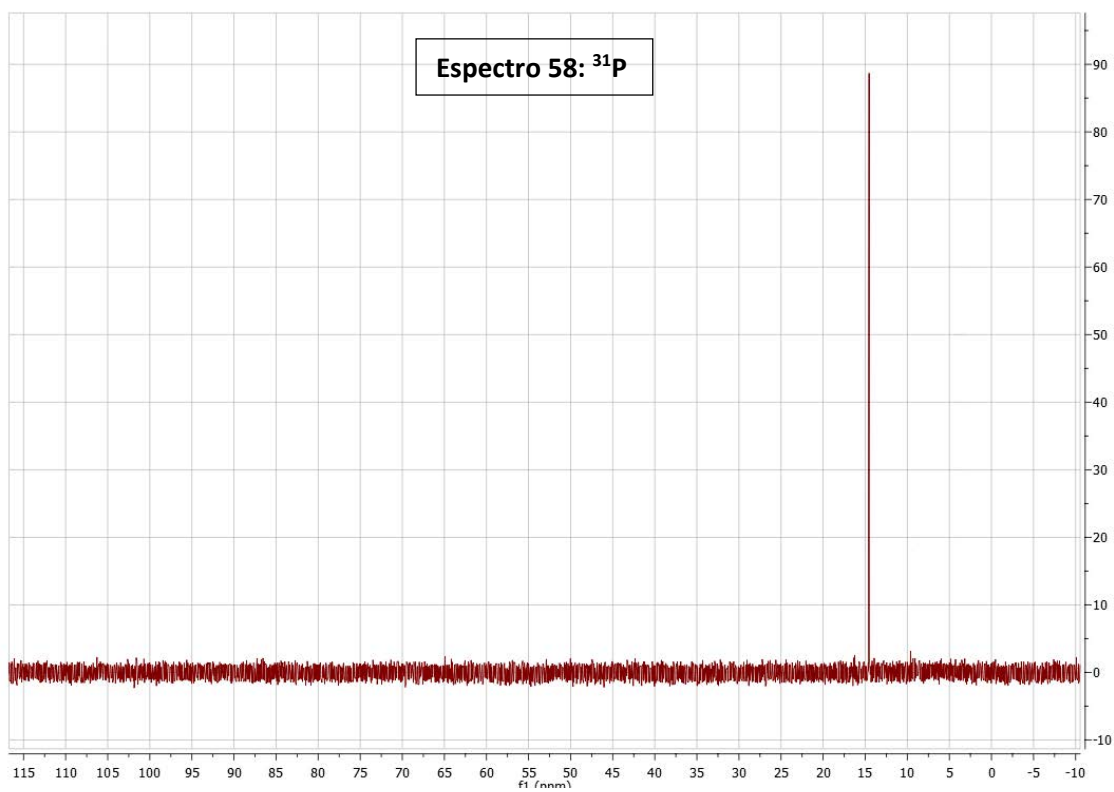
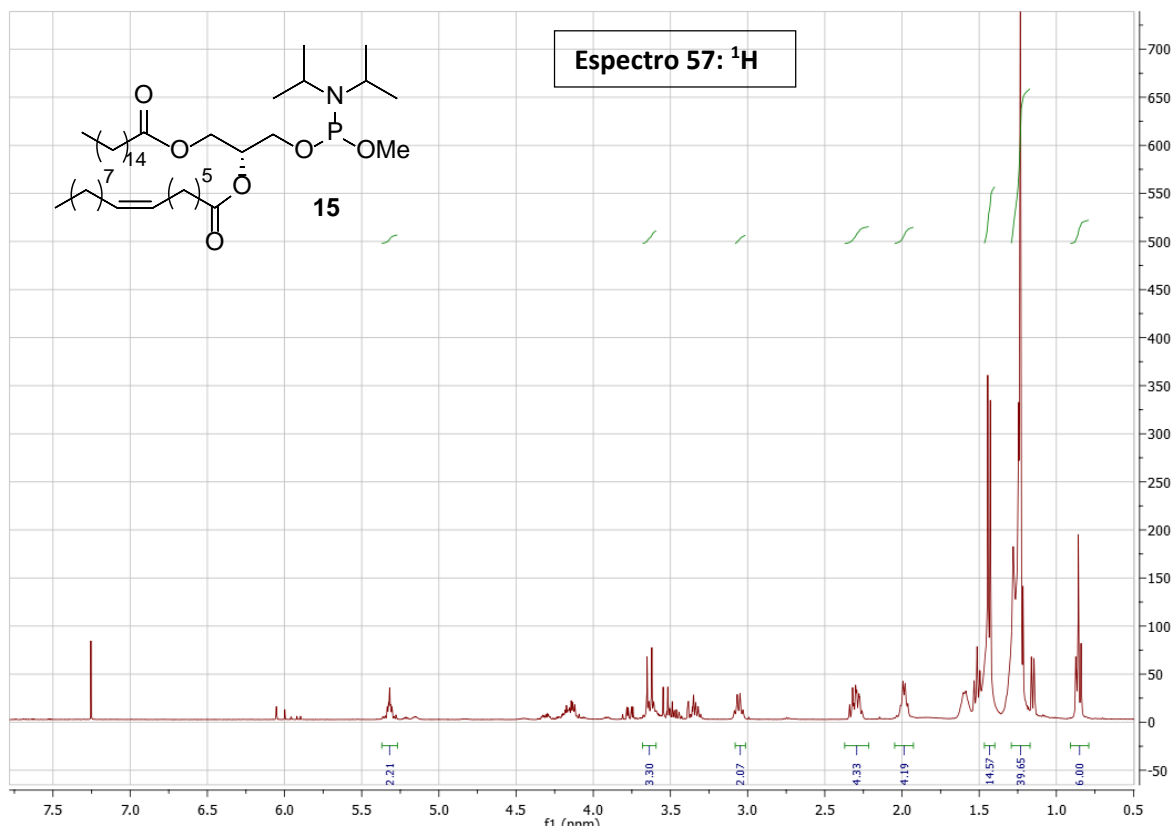
Espectro 55: HSQC



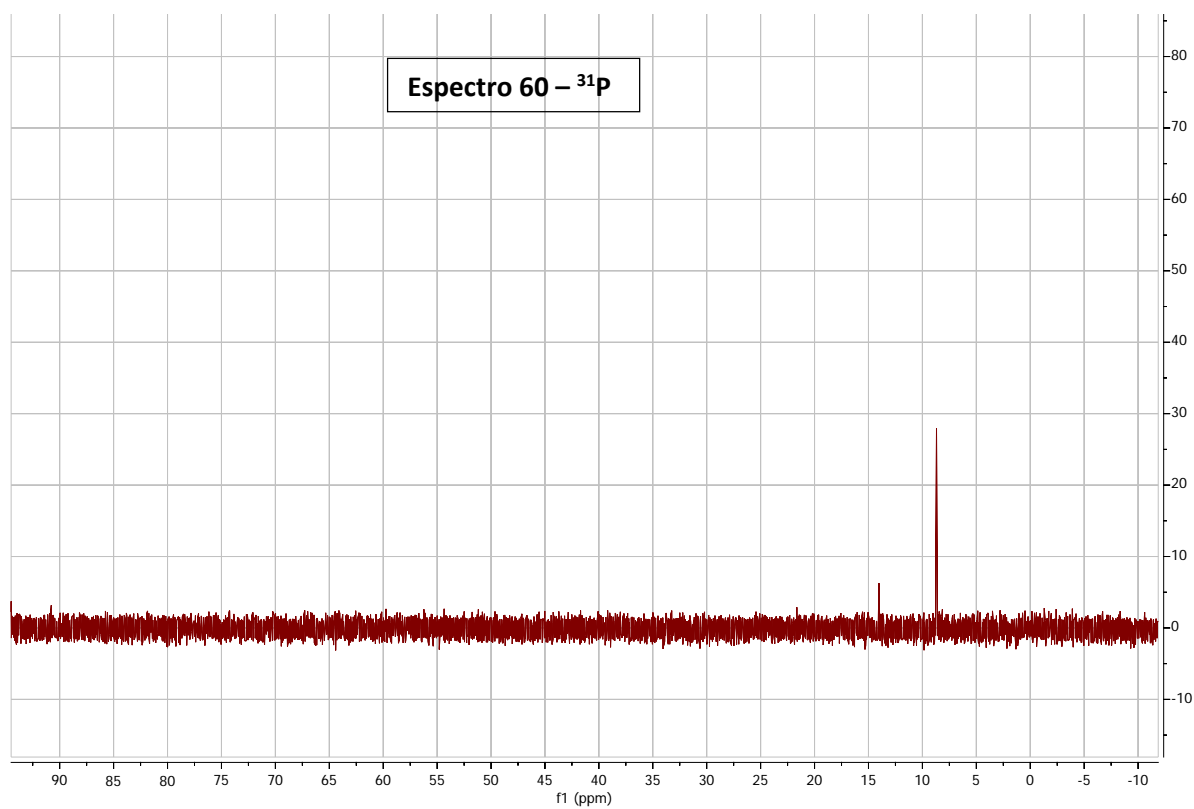
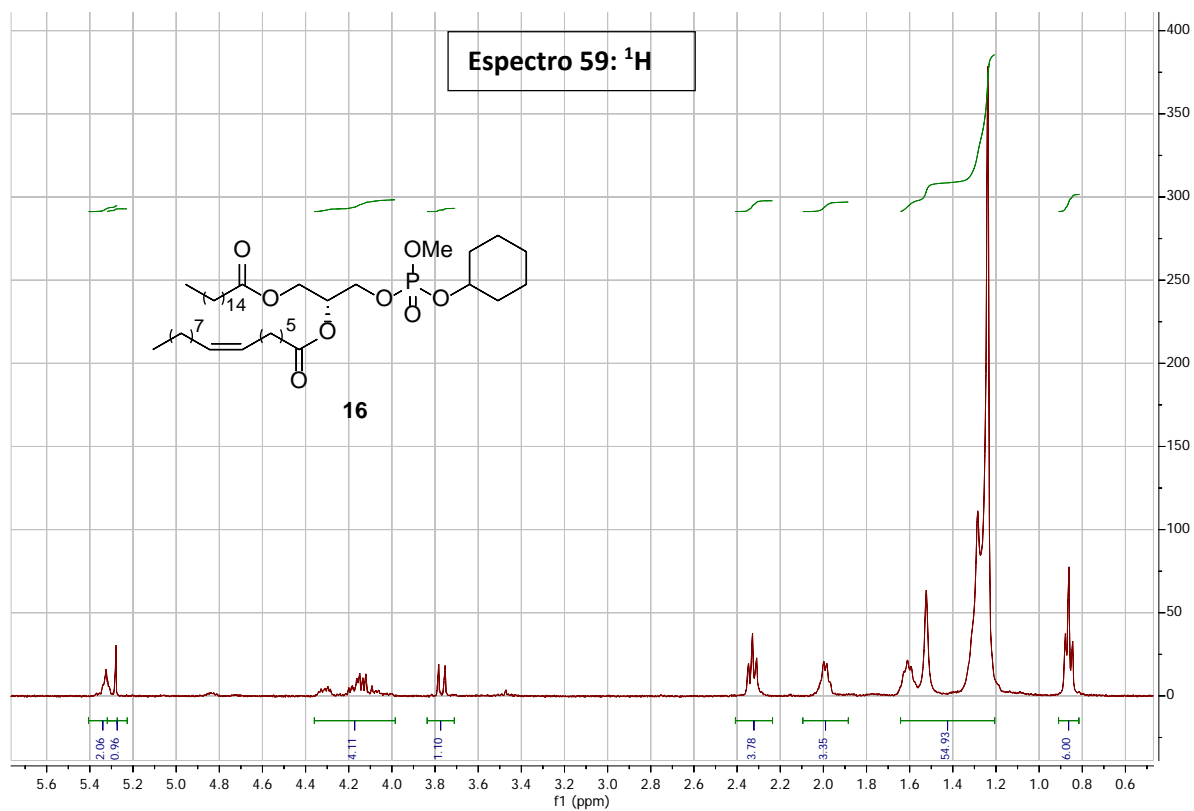
Espectro 56: COSY

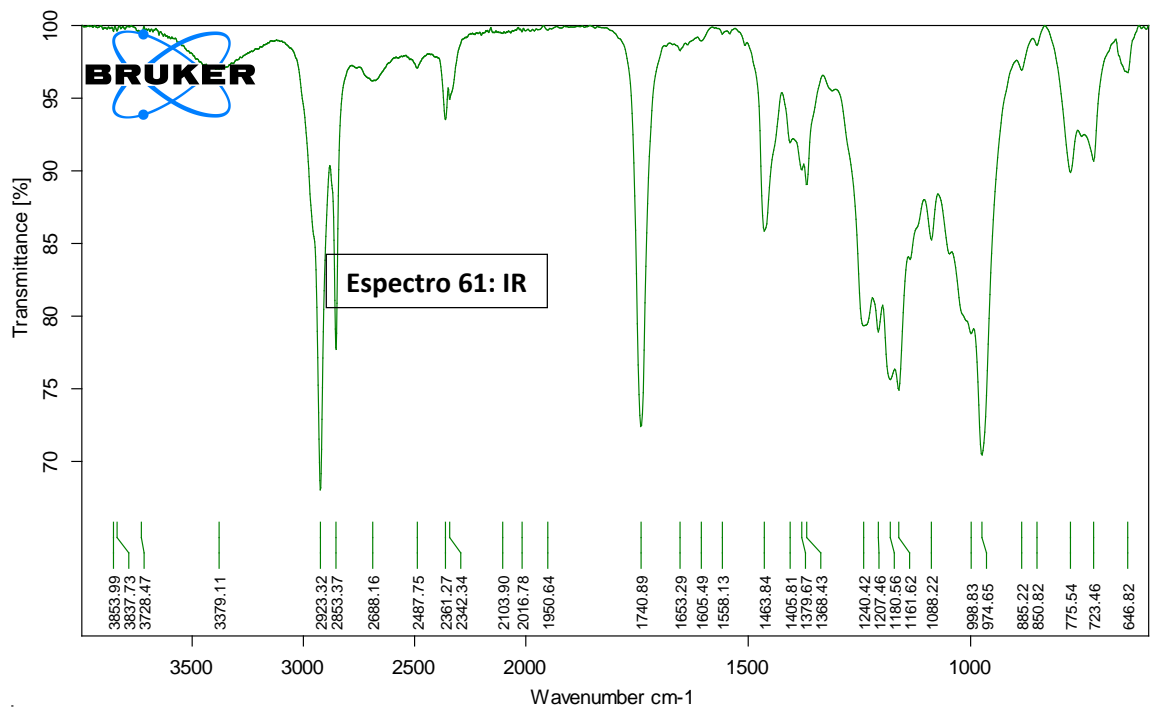


- **Compuesto 15:** (Z)-7-hexadecenoato de (2R)-1-
 {[diisopropilamino](metoxi)fosfaenil]-3-palmitoloxi}propan-2-il:



Compuesto 16: (Z)-7-hexadecenoato de (2R)-1-[[[(ciclohexiloxi)(metoxi)fosfaenil]-3-palmitoloxi]propan-2-il





Bibliografía

1. Astudillo, A. M. *et al.* Occurrence and Biological Activity of Palmitoleic Acid Isomers in Phagocytic Cells. **59**, 237–249 (2017).
2. Guijas, C., Meana, C. & Astudillo, A. M. Foamy Monocytes Are Enriched in cis -7-Hexadecenoic Fatty Acid (16 : 1n-9), a Possible Biomarker for Early Detection of Cardiovascular Article Foamy Monocytes Are Enriched in cis -7-Hexadecenoic Fatty Acid (16 : 1n-9), a Possible Biomarker for Early . 689–699 (2016).
3. Ferguson, M. A. J. & Williams, A. F. Cell-Surface Anchoring of Proteins via Glycosyl-Phosphatidylinositol Structures. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 285–320 (1988).
4. Majerus, P., Connolly, T. & Bansal, V. Inositol phosphates: synthesis and degradation. *J. Biol. Chem.* **263**, 3051–3054 (1988).
5. Bruzik, K. S. & Tsai, M. D. Efficient and systematic syntheses of enantiomerically pure and regiospecifically protected myo-inositols. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 6361–6374 (1992).
6. Lindberg, J., Öhberg, L., Garegg, P. J. & Konradsson, P. Efficient routes to glucosamine-myo-inositol derivatives, key building blocks in the synthesis of glycosylphosphatidylinositol anchor substances. *Tetrahedron* **58**, 1387–1398 (2002).
7. Kai, K., Kasamatsu, K. & Hayashi, H. (Z)-N-(4-Decenoyl)homoserine lactone, a new quorum-sensing molecule, produced by endobacteria associated with *Mortierella alpina* A-178. *Tetrahedron Lett.* **53**, 5441–5444 (2012).
8. Maryanoff, B. E. & Reitz, A. B. The Wittig olefination reaction and modifications involving phosphoryl-stabilized carbanions. Stereochemistry, mechanism, and selected synthetic aspects. *Chem. Rev.* **89**, 863–927 (1989).

9. Kaltia, J, Matikainen, J, Ala-Peijari, M, Hase, T, Kaltia, S. Synthesis of ethyl 5Z, 9Z,12Z-octadecatrienoate (ethyl pinolenate) and methyl 12Z,15Z-octadecadienoate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **85**, 561–565 (2008).
10. Thurnhofer, S. & Vetter, W. Synthesis of (S)-(+)-enantiomers of food-relevant (n-5)-monoenoic and saturated anteiso-fatty acids by a Wittig reaction. *Tetrahedron* **63**, 1140–1145 (2007).
11. Mostyn, S. N. *et al.* Synthesis and Characterization of Novel Acyl-Glycine Inhibitors of GlyT2. *ACS Chem. Neurosci.* **8**, 1949–1959 (2017).
12. Xu, Y., Tanaka, M., Arai, H., Aoki, J. & Prestwich, G. D. Alkyl lysophosphatidic acid and fluoromethylene phosphonate analogs as metabolically-stabilized agonists for LPA receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 5323–5328 (2004).
13. Dyer, B. S. *et al.* Synthesis and Structure of Phosphatidylinositol Dimannoside. *J. Org. Chem.* **72**, 3282–3288 (2007).
14. D'Arrigo, P. & Servi, S. Synthesis of lysophospholipids. *Molecules* **15**, 1354–1377 (2010).
15. Lim, Z.-Y., Thuring, J. W., Holmes, A. B., Manifava, M. & Ktistakis, N. T. Synthesis and biological evaluation of a PtdIns(4,5)P2 and a phosphatidic acid affinity matrix. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1067–1075 (2002). doi:10.1039/B200585A
16. Derouet, D; Piatti, T; Brosse, J. C. Synthèse de polyesters phosphoriques supports de molécules actives. *Eur. Polym. J.* **22**, 963–971 (1986).
17. Wewers, W., Gillandt, H. & Schmidt Traub, H. Advances in analysis and synthesis of myo-inositol-derivatives through resolution by crystallisation. *Tetrahedron: Asymmetry* **16**, 1723–1728 (2005).
18. Bruzik, K. S. & Salamończyk, G. M. Synthesis of the enantiomeric 1,4,5,6-tetra-O-benzyl-myo inositols. *Carbohydr. Res.* **195**, 67–73 (1989).
19. Pietrusiewicz, K. M., Salamończyk, G. M., Bruzik, K. S. & Wieczorek, W. The synthesis of homochiral inositol phosphates from myo-inositol. *Tetrahedron* **48**, 5523–5542 (1992).
20. Pecnik, S. & Knez, Z. Enzymatic fatty ester synthesis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 261–265 (1992).
21. Wang, Y. F., Lalonde, J. J., Momongan, M., Bergbreiter, D. E. & Wong, C. H. Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohols, glycerol derivatives, sugars and organometallics. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7200–7205 (1988).
22. Akoh, C. C. Lipase-catalyzed synthesis of partial glyceride. *Biotechnol. Lett.* **15**, 949–954 (1993).
23. Shi, Z.; Xu, J.; Hong, C.; Liu, D.; Shi, M. *Chem. React. Eng. Technol.* **40**, 1665 (1994).
24. Hess, R.; Borscheuer, U.; Capewell, A.; Scheper, T. *Enzyme Microb. Technol.* **17**,

- 725 (1995).
25. Yu, C. C., Lee, Y. S., Cheon, B. S. & Lee, S. H. Synthesis of Glycerol Monostearate with High Purity. *Bull. Korean Chem. Soc.* **24**, 1229–1231 (2003).
 26. Singh, A. An efficient synthesis of phosphatidylcholines. *J. Lipid Res.* **31**, 1522–1525 (1990).
 27. Traylor, T. G. & Perrin, C. L. The Rates of Methoxyl Exchange of Camphor and Norcamphor Dimethyl Ketals in Methanol-d₄. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4934–4942 (1966).
 28. Reich, H. J. Phosphorus Shifts Overview. *Chem 605 - Structure Determination Using Spectroscopic Methods* Available at: <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/11-p-data.htm>.
 29. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C.; Herrera, A.; Martínez, R. *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. (Springer-Verlag Ibérica, 2001).