



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química.
Análisis y Gestión de Calidad Químicos.

Síntesis de derivados de fosfatidilcolina con uniones tipo éter

Autor:

Javier Cartón González

Tutor:

Alfonso Pérez Encabo

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	4
2. RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
3. INTRODUCCIÓN.....	7
4. PLAN DE TRABAJO.....	19
5. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	21
5.1 Síntesis de ácidos grasos monoinsaturados.....	21
5.1.1 Hidrogenación de alquinos.....	21
5.1.2 Reacción de Wittig.....	22
5.2 Síntesis de acilglicéridos.....	23
5.2.1 Síntesis de acilglicéridos asimétricos.....	23
5.2.2 Síntesis de acilglicéridos simétricos.....	24
5.3 Síntesis de fosfolípidos.....	26
5.3.1 (2R)-glicidol.....	27
5.3.2 D-Manitol.....	28
5.3.3 (2R)-Solketal.....	30
5.3.4 Organoestanno.....	30
5.4 Síntesis de fosfatidilcolina.....	31
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	33
6.1 Síntesis de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ol.....	33
6.2 Síntesis de diacilgliceroles.....	34
6.2.1 Síntesis del (Z)-1-bromo-7-hexadeceno.....	35
6.2.2 Síntesis de Williamson.....	38
6.2.3 Acoplamiento del ácido palmítico.....	39
6.3 Síntesis de la fosfatidilcolina.....	40
7. CONCLUSIONES.....	42
8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	43
8.1 Consideraciones principales.....	43
8.2 Caracterización de compuestos.....	43
8.2.1 Resonancia Magnética Nuclear.....	43
8.2.2 Infrarrojo.....	43
8.3 Síntesis de intermedios precursores del glicerol.....	44
8.3.1 Síntesis de (5-amino-2,2-dioxan-5-il) metanol (1).....	44

8.3.2	síntesis de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ona (2).....	46
8.3.3	Síntesis de 2,2-dimeti-1,3-dioxan-5-ol (3).....	48
8.4	Síntesis de los derivados del ácido (Z)-7-hexadecenoico.....	51
8.4.1	Síntesis del (Z)-7-hexdecenoato de etilo (6).....	51
8.4.2	Síntesis del (Z)-7-hexadecenol (7).....	53
8.4.3	Síntesis del bromuro de (Z)-7-hexadecenoilo (8).....	56
8.5	Incorporación de los ácidos grasos y bromuro de bencilo al derivado de glicerol.....	58
8.5.1	Síntesis de (Z)-5-(hex-3-en-1-iloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano (9).....	58
8.5.2	Síntesis de 5-(beciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano (10).....	61
8.5.3	Síntesis de (Z)-2-(hexadec-7-en-1-iloxi) propano-1,3-diol (11).....	64
8.5.4	Síntesis de 2-(benciloxi) propano-1,3-diol (12).....	66
8.5.5	Síntesis del palmitato de(Z)-2-(hexadec-3-en-1-iloxi)-3-hidroxipropilo.....	69
8.5.6	Síntesis del palmitato de 2-(benciloxi)-3-hidroxipropilo.....	72

1. ABREBIATURAS

- DMAP 4-Dimetilaminopiridina.
- DCC N, N'-diciclohexilcarboniimida.
- DCM Dicolorometano.
- THF Tetrahidrofurano.
- DMF Dimetilformamida.
- DBTO Óxido de dibutilestaño.
- TEA Trietilamina.
- RMN Resonancia Magnética Nuclear.
- Py Piridina.
- TLC Cromatografía en capa fina.
- PA Ácido fosfatídico
- PC Fosfatidilcolina

2. RESUMEN

En este trabajo se ha diseñado una ruta sintética para la obtención de fosfoglicéridos derivados de la fosfatidilcolina que se incorporarán posteriormente a células para poder hacer un estudio de su actividad biológica y, en concreto, sus propiedades antiinflamatorias.

Se ha incorporado de forma sucesiva el ácido palmítico, hexadecenoico, cloruro de bencilo y fosfato de colina. El ácido palmítico se introducirá todas las veces como acilo en uno de los carbonos terminales del glicerol (sn-1 o sn-3), mientras que el resto bencilo y hexadecenoico se introducirán como éteres en la posición sn-2 del glicerol. La sustitución del grupo éster, grupo funcional clásico de los triglicéridos, por un grupo éter permitirá conservar la regioquímica de la molécula evitando así posibles transesterificaciones intramoleculares con el grupo acilo. Gracias a esto se podrá estudiar la bioactividad de la molécula en el medio celular.

ABSTRACT

In this work, a synthetic route has been designed to obtain phosphoglycerides derived from phosphatylcholine has been designed. This will subsequently be incorporated into cells to be able to study their biological activity and, specifically, their anti-inflammatory properties.

The work plan that has been followed is about the successive incorporation of palmitic acid, hexadecenoic acid, benzyl chloride and choline phosphate. Palmitic acid will be introduced each time as acyl at one of the terminal carbons of glycerol (sn-1 or sn-3), while the benzyl and hexadecenoic moiety will be introduced as ethers at the sn-2 position of glycerol. The substitution of the ester group, the classic functional group of triglycerides, by an ether group will allow the regiochemistry of the molecule to be preserved, thus avoiding possible intramolecular transesterifications with the acyl group. Thanks to this, it will be possible to study the bioactivity of the molecule in the cellular medium.

3. INTRODUCCIÓN

Este estudio se enmarca en la síntesis fosfoglicéridos derivados de la fosfatidilcolina con actividad antiinflamatoria. Los fosfoglicéridos son una familia de productos naturales que han demostrado ser muy importantes en el ámbito farmacéutico debido a su gran biocompatibilidad y su gran rango de aplicaciones. De esta manera, se han estudiado y diseñado un gran abanico de fosfoglicéridos bioactivos muy interesantes y con funciones muy variadas¹. El grupo de investigación donde se ha desarrollado este TFM cuenta con una amplia experiencia en la síntesis de productos naturales, concretamente en lípidos.

Los lípidos son una de las macromoléculas más importantes que se encuentran en todos los organismos vivos debido a que desempeñan funciones tales como almacenamiento de energía, construcción de la membrana de las células y participación en procesos de señalización celular ^{2,3}. Existen ocho familias de lípidos dependiendo de la estructura básica de la que estén formados; ácidos grasos, glicerolípidos, fosfoglicerolípidos, fosfoesfingolípidos, sacarolípidos, lípidos policétidos, esterolípidos y prenolípidos ⁴.

¹ Jing Li, Xuling Wang, Ting Zhang, Chunling Wang, Zhenjun Huang, Xiang Luo, Yihui Deng, A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 10, Issue 2, **2015**, Pages 81-98, ISSN 1818-0876.

² M. Oresic, V.A. Hänninen, A. Vidal-Puig, Lipidomics: a new window to biomedical frontiers, *Trends Biotechnol* 26 (**2008**) 647–652.

³ A.D. Watson, Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems, *J Lipid Res* 47 (**2006**) 2101–2111.

⁴ Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (**2019**). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (7a. ed.). Barcelona: Omega.

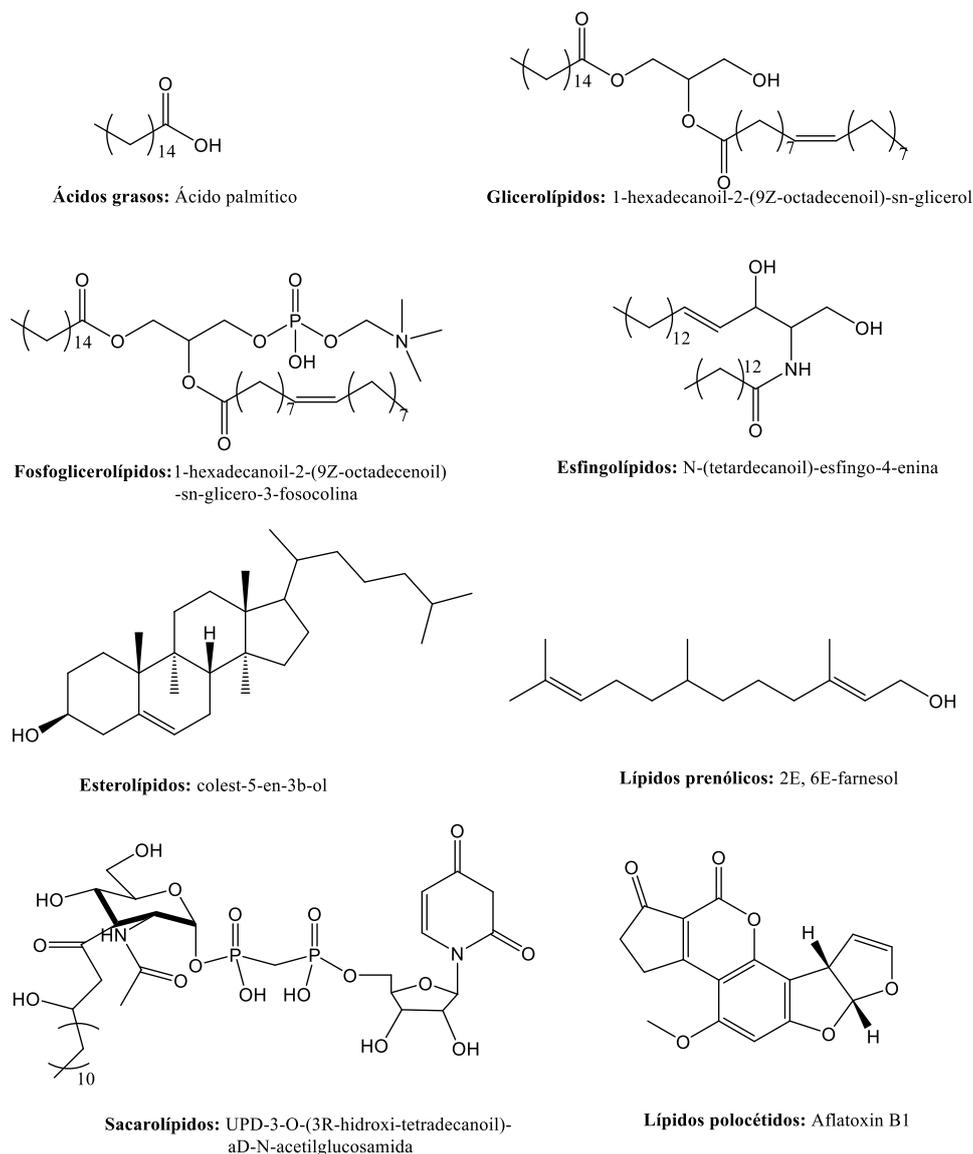


Figura 1: Diferentes familias de lípidos.

En este caso, y como se ha comentado anteriormente, este trabajo se centrará en las características, la biosíntesis y la síntesis en el laboratorio de fosfolípidos, y en concreto los fosfoglicéridos derivados de fosfatidilcolina.

La primera extracción de fosfolípidos se realizó por el químico francés Vauquelin en 1811. Dicha extracción se realizó tratando con metanol caliente tejido cerebral dando lugar a una sustancia que bautizó como acide cérébrique. Años más tarde, su compatriota Theodore Gobley realizó la extracción de la fosfatidilcolina de la yema de huevo y de tejido cerebral^{5,6}. En Alemania, John Ludwig Wilhelm Thudichum consiguió diferenciar muchos de los fosfolípidos que existen en el cerebro. Tras años de investigación, Thudichum concluyó que los fosfolípidos son el centro de la vida del bioplasma.

⁵ M. Gobley, J. Pharm. Chim. 20 (1874) 98.

⁶ M. Gobley, J. Pharm. Chim. 20 (1874) 161.

Los fosfolípidos están presentes en todo tipo de organismos y desempeñan funciones muy diversas dentro de ellos, entre ellas la más importante es la formación de la bicapa lipídica de los orgánulos y membrana celular. Existen dos familias principales de fosfolípidos, los fosfoesfingolípidos y los fosfoglicéridos. Por un lado, fosfoesfingolípidos están formados por una molécula de esfingosina a la que se le une un ácido graso de cadena larga en el grupo amino, dando lugar estructura base del esfingolípido (ceramida), y un grupo derivado del ortofosfato a la que se le une una molécula de colina ⁷ (Figura 2).

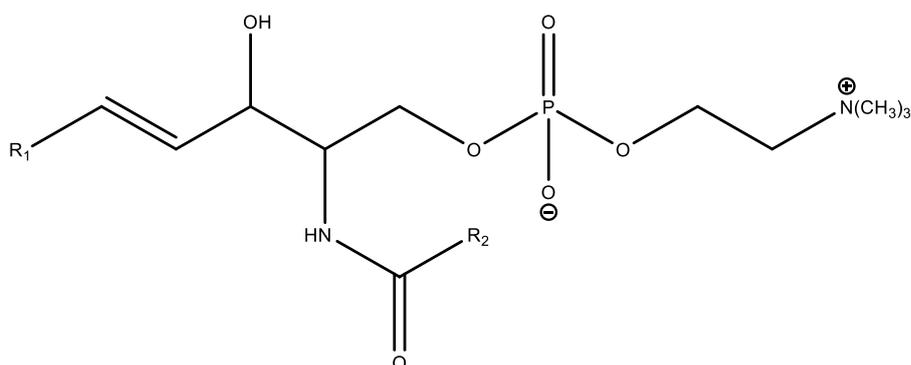


Figura 2: Estructura general de la esfingomielina (SPM).

En general los ácidos grasos que se unen a la esfingosina formando la ceramida son muy variados. Por lo general, el ácido graso que predomina en los mamíferos es el ácido palmítico (C16:0) pero existen más fosfoesfingolípidos con otros ácidos como el ácido nervónico (C24:1), el ácido lignocérico (24:0) o el ácido esteárico (C18:0) muy predominante en el sistema nervioso central ^{8,9}.

Por otro lado, los fosfoglicéridos están formados por una molécula de glicerol a la que se le unen un ácido graso saturado en el C₃, un ácido graso insaturado en el C₂ y una molécula de ortofosfato unida a diferentes biomoléculas. El fosfoglicérido más simple es el PA, el cual no tiene ninguna molécula unida al grupo ortofosfato. De este derivan los demás fosfoglicéridos los cuales tienen unidas al grupo ortofosfato moléculas como bases nitrogenadas como la serina dando lugar a fosfatidilserinas (PS), una molécula de inositol dando fosfatidilinositol (PI), etc. (Figura 3).

⁷ Barenholz, Y. and Gatt, S. *In Phospholipids*, pp.129-177 (Hawthorne, J. N. and Ansel G. D. eds) Elsevier Medical Press, New York, NY, **1982**.

⁸ Kim, M.-Y., Linardic, C., Obeid, L. and Hannun, Y. *J. Biol. Chem.* **266**, 484-489 (1991).

⁹ White, D. *In Form and Function of Phospholipids*, pp.441-481 (Ansell, G.D., Dawson, R. M. C. and Hawthorne, J. N., eds) Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, **1973**.

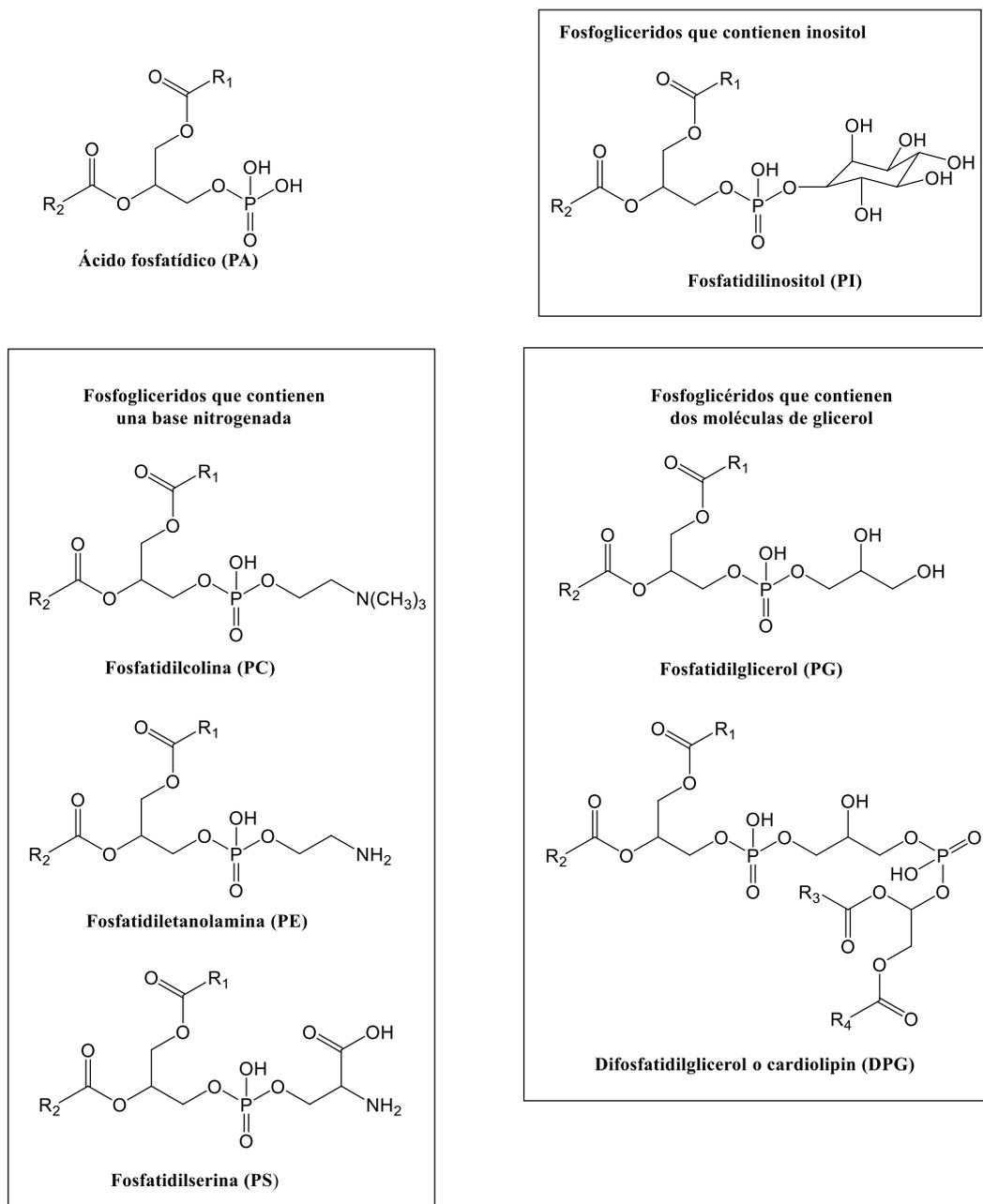


Figura 3: Tipos de fosfoglicéridos dependiendo del sustituyente en el grupo ortofosfato.

Por lo general, los fosfolípidos se sintetizan en el retículo endoplasmático de las células¹⁰, aunque alguna etapa de su biosíntesis ocurre en otros lugares como el núcleo. Existe una ruta sintética diferente para cada uno de los fosfolípidos anteriormente mencionados, aunque sus precursores, el diacilglicerol (DG) y el CDP-diacilglicerol (CDP-DG), se sintetizan siempre de la misma manera ¹¹. En la **figura 4** se observa que existen dos productos de partida que convergen para dar DG o CDP-DG. Por un lado, en la parte izquierda del esquema

¹⁰ Vance DE, Choy PC, Farren SB, Lim PH, Schneider WJ. Asymmetry of phospholipid biosynthesis. *Nature* **1977**;270:268-269.

¹¹ Siniosoglou S. Phospholipid metabolism and nuclear function: roles of the lipin family of phosphatidic acid phosphatases. *Biochim Biophys Acta* **2013**;1831:575-581.

se parte del glicerol-3 fosfato que se transforma en 1-acetilglicerol-3-fosfato a través del enzima glicerol-3-fosfatasa (GPAT). Por otro lado, en la parte derecha del esquema, partiendo de la dihidroxiacetona-fosfato se obtiene el 1-acil-dihidroxiacetona-fosfato por acción del enzima acetiltransferasa. Tras la reducción del grupo cetona, se llega a la molécula de 1-acetilglicerol-3-fosfato, misma molécula a la que se llegó por la otra ruta. A continuación, por acción del enzima liso-PA-acetiltransferasa se obtiene ácido fosfatídico. A partir de aquí, se obtienen los dos precursores mencionados anteriormente, el DG por acción del enzima ácido fosfatídico fosfatasa-1 (PAP-1) y el CDP-DG por acción de CDP-DG sintasa (CDP-DGS). La actividad de los enzimas GPAT, liso-PA-acetiltransferasa y CDP-DGS se lleva a cabo en el retículo endoplasmático de la célula mientras que la actividad del PAP-1 ocurre en el citosol cuando se une a las membranas del retículo endoplasmático^{12,13}.

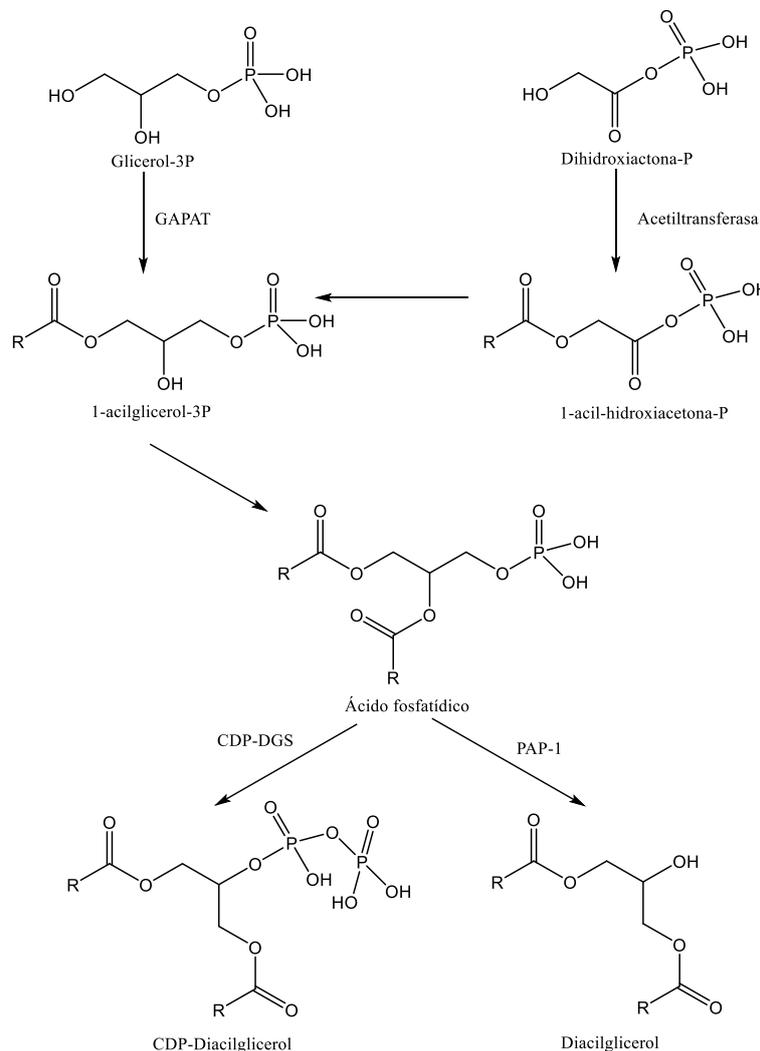


Figura 4: Ruta biosintética de los precursores de los fosfolípidos: CDP-Diacilglicerol y diacilglicerol.

¹² Pellon-Maison M, Montanaro MA, Coleman RA, Gonzalez-Baro MR. Mitochondrial glycerol-3-P acyltransferase 1 is most active in outer mitochondrial membrane but not in mitochondrial associated vesicles (MAV). *Biochim Biophys Acta* **2007**;1771:830–838.

¹³ Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **2009**;1791:501–506.

Desde este punto existen muchas rutas sintéticas que dan lugar a los diferentes fosfolípidos. Debido a que en este trabajo se van a estudiar los derivados de la fosfatidilcolina, a continuación, se procede a comentar la biosíntesis de esta. Por lo general la síntesis de PC ocurre a través de la ruta Kennedy ^{14,15}. Esta ruta parte de una molécula de colina extracelular la cual es importada al interior de la célula. Esta, a través del enzima colina-kinasa y una molécula de adenosintrifosfato (ATP) da lugar a la fosfocolina. Este proceso ocurre en el citosol. A continuación, esta reacciona con una molécula de citidintrifosfato (CTP) catalizado por el del enzima fosfocolina-citidiltransferasa dando lugar a CDP-colina¹⁶. Esta reacción tiene lugar en el núcleo de la célula cosa que no tiene una explicación biológica clara ya que el enzima que la cataliza se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula¹⁷. Además, el último paso de la síntesis de la PC está catalizada por el enzima CPD-colina:1,2-diacilglicerolcolinafosfotransferasa, una proteína integral de membrana la cual transfiere el precursor, DG, a la molécula de CDP-colina. Como se ha comentado anteriormente, la ruta Kennedy es la ruta más frecuente de la biosíntesis de la PC pero no la única (**Figura 5**). Una vía alternativa a esta es la ruta PEMT, la cual se basa en la transformación de la fosfatidiletanolamina (PE) en PC a través del enzima PE N-metiltransferasa (PEMT) localizada en la membrana del retículo endoplasmático de la célula¹⁸. Este enzima transforma el PE en PC catalizando tres reacciones de metilación de manera consecutiva ¹⁹. Por lo general, esta ruta no es la más común en la síntesis de PC para la mayoría de las células del organismo de los mamíferos salvo para los hepatocitos, las células del hígado.

¹⁴ Kennedy EP, Weiss SB. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. *J Biol Chem* **1956**;222:193–214.

¹⁵ Vance DE, Vance JE. Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. In: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Amsterdam: Elsevier; **2008**, pp. 213–244

¹⁶ Fagone P, Jackowski S. Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle. *Biochim Biophys Acta* **2013**;1831:523–532.

¹⁷ Cornell RB, Northwood IC. Regulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by amphitropism and relocalization. *Trends Biochem Sci* **2000**;25:441–447.

¹⁸ Vance DE. Physiological roles of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **2013**;1831:626–632.

¹⁹ Vance DE. Phospholipid methylation in mammals: from biochemistry to physiological function. *Biochim Biophys Acta* **2014**;1838:1477–1487.

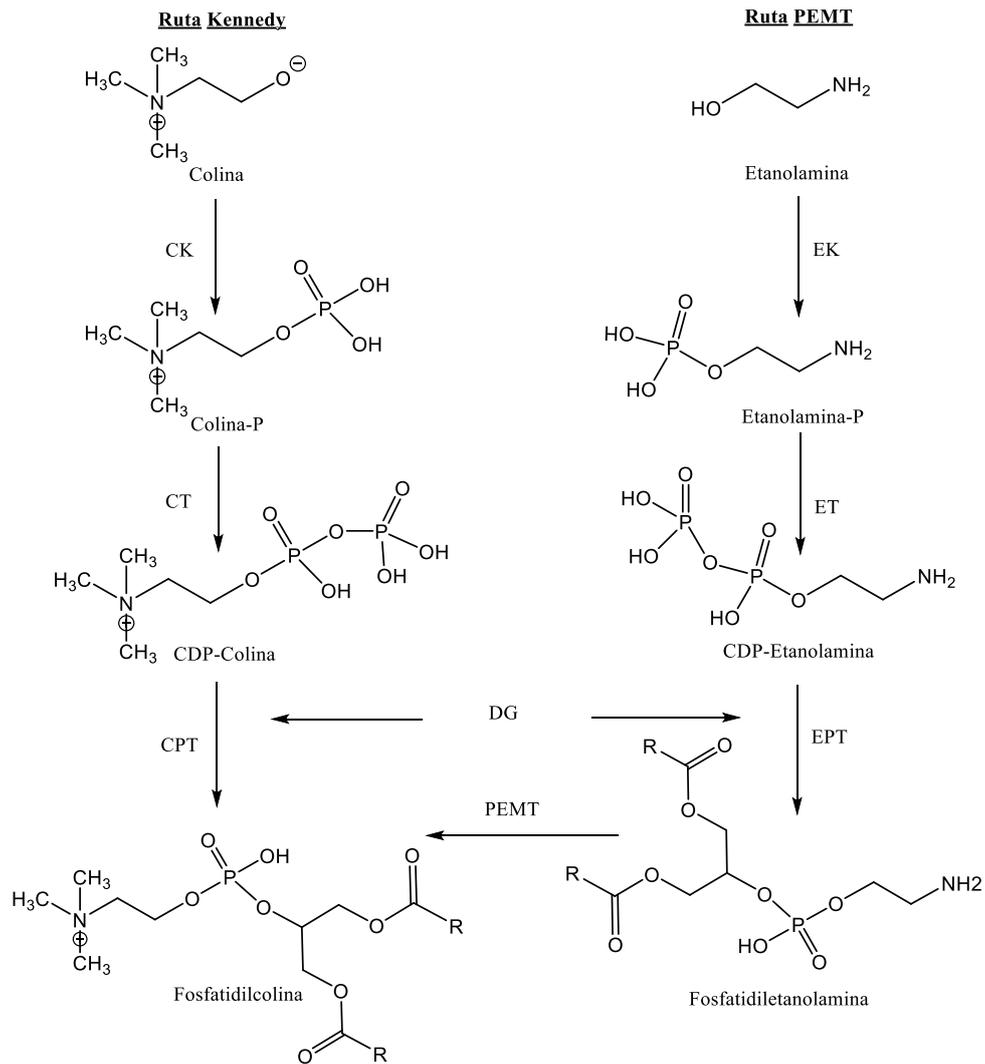


Figura 5: Esquema sintético de la ruta Kennedy y la ruta PEMT ²⁰.

La función típica de los fosfoglicéridos y las esfingomielinas es estructural, formar parte de la membrana celular, núcleo u otros orgánulos de las células debido a su naturaleza anfipática ^{21,22}. Gracias al carácter hidrofílico del grupo fosfato y al carácter hidrófobo de las largas cadenas hidrocarbonadas, estas moléculas se agregan formando una doble capa fosfolipídica donde las zonas hidrófilas se orientan hacia el interior y exterior de la célula. La formación de esta estructura celular dota a la célula de una barrera permeable pero

²⁰ Wang B, Tontonoz P. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease. Annual Review of Physiology. **2019** Feb;81:165-188. DOI: 10.1146/annurev-physiol-020518-114444. PMID: 30379616; PMCID: PMC7008953.

²¹ Castro-Gómez, P.; Garcia-Serrano, A.; Visioli, F.; Fontecha, J. Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids **2015**, 101, 41-51.

²² Contarini, G.; Povoletto, M. Phospholipids in milk fat: Composition, biological and technological significance, and analytical strategies. Int. J. Mol. Sci. **2013**, 14, 2808-2831.

selectiva, dejando una vía directa por la que la célula puede obtener nutrientes e iones ²³. Por otro lado, la bicapa celular va a funcionar como la matriz perfecta para estructuras proteicas se incrusten en ella desempeñando funciones como transporte de electrones en la respiración celular, biomarcadores, etc. Esto es muy importante desde el punto de vista de la medicina debido a que gracias a este tipo de estructuras que están incrustadas en la membrana celular es posible identificar enfermedades.

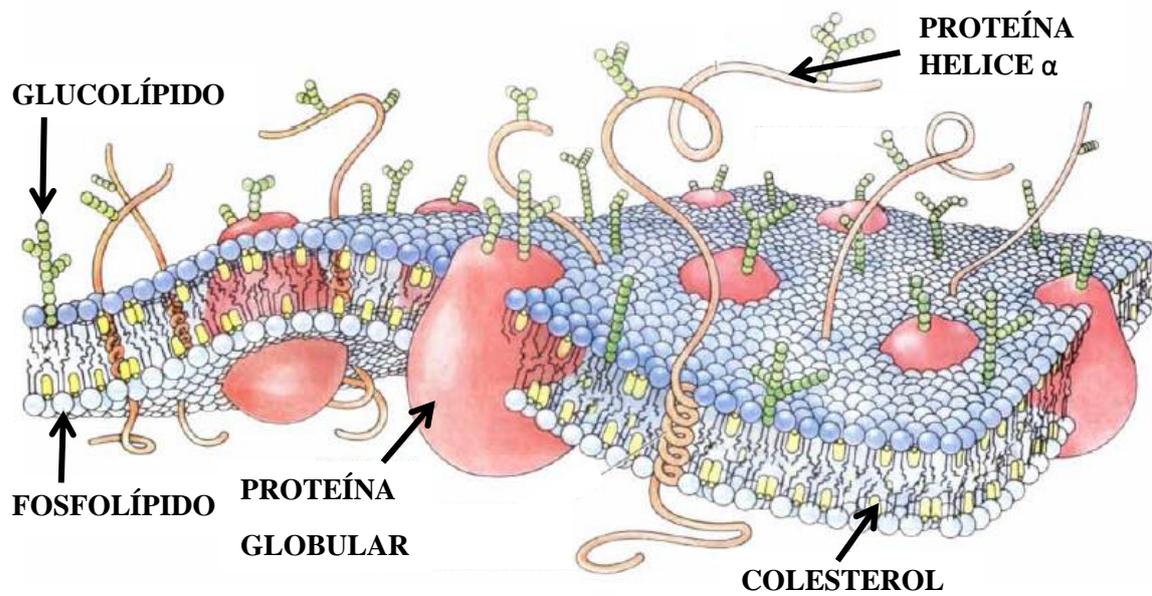


Figura 6: Membrana celular con todos sus componentes bioquímicos ²⁴

Es interesante conocer la composición membrana celular ya que es posible conocer mucha información de ella, por ejemplo, se puede saber cuándo se va a producir la muerte celular. La membrana celular se compone por una distribución asimétrica de los diferentes fosfolípidos. Por un lado, la zona externa de la membrana está constituida, en su mayoría, por las formas zwitterionicas de la fosfatidilcolina y la esfingomielina por lo que esta parte de la membrana será prácticamente neutra. Por otro lado, la zona interna está formada por PE (entre un 20% y un 40%) y por PS (entre un 2% y un 10%), por lo que, al contrario que en la capa externa, esta tendrá cierta carga. La pérdida de esta asimetría en la bicapa, es decir, la exposición de PE y PS al exterior de la célula va a ser un indicativo de que se va a producir un proceso de muerte celular ²⁵. El hecho de que la PS se exponga es una ventaja ya que

²³ Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I. Phospholipids of Animal and Marine Origin: Structure, Function, and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules*. 2017 Nov 14;22(11):1964. doi: 10.3390/molecules22111964. PMID: 29135918; PMCID: PMC6150200.

²⁴ Wang B, Tontonoz P. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease. *Annual Review of Physiology*. 2019 Feb;81:165-188. DOI: 10.1146/annurev-physiol-020518-114444. PMID: 30379616; PMCID: PMC7008953.

²⁵ Emoto, K., Toyama-Sorimachi, N., Karasuyama, H., Inoue, K., and Umeda, M. (1997) Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* 232, 430–434.

haciendo uso de proteínas capaces de anclarse a esta ²⁶ se podrá conocer el grado de muerte celular que está habiendo dentro de un ser vivo. Esto puede ser muy útil para saber si un tratamiento contra alguna enfermedad, como el cáncer, está haciendo efecto al paciente (**Figura 7**).

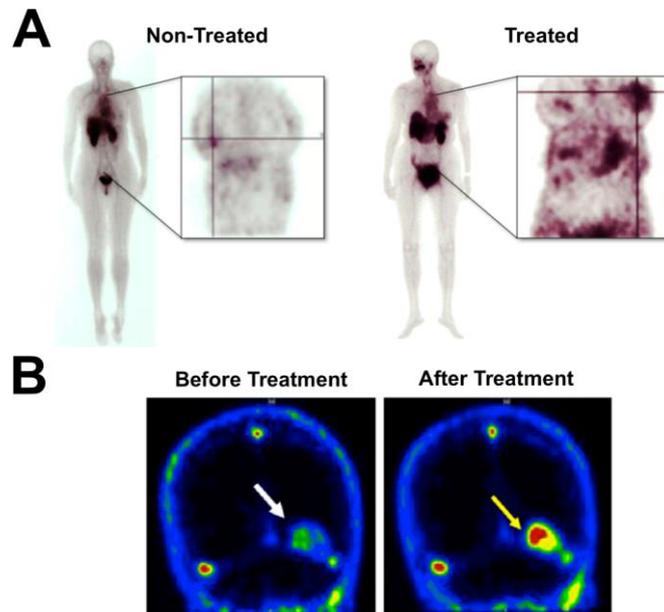


Figura 7: Imágenes de muerte celular marcadas con proteínas. (A) Imagen gammagráfica de una paciente con cáncer de mama, a la izquierda, no tratado y, a la derecha, tratado a la cual se le ha inyectado ^{99m}Tc-EC-Anexin V una proteína que se adhiere a las PS. Como se observa la acumulación de esta proteína es mayor cuando se trata la paciente que cuando no se la trata, por lo que en principio el tratamiento estaría dando resultado. (B) PET de un cerebro con metástasis al cual se le ha subministrado ¹⁸F-ML10. De la misma manera que en (A) se puede observar la diferencia entre la acumulación de la proteína cuando no es tratado a cuando es tratado ²⁷.

Los fosfolípidos, como se acaba de mostrar, pueden ser determinantes a la hora de funcionar como marcadores indirectos de membrana de las células, pero esta no la única función que son capaces de desempeñar en el medio fisiológico. Otra de las funciones más importantes que desempeñan este tipo de moléculas es servir como fuente de ácidos grasos insaturados. Dichos ácidos grasos sirven de mediadores lipídicos que regulan la inflamación ^{28,29} y la sensibilidad a la insulina ³⁰. Este proceso de reciclado está regulado por las fosfolipasas A₂

²⁶ Zhao, M. In vivo apoptosis imaging agents and strategies. *Anti-Cancer Agent. Med. Chem* (2009). 9, 1018–1023.

²⁷ Kurihara, H., Yang, D. J., Cristofanilli, M., Erwin, W. D., Yu, D. F., Kohanim, S., Mendez, R., and Kim, E. E. Imaging and dosimetry of ^{99m}Tc-EC-Annexin V: preliminary clinical study targeting apoptosis in breast tumors. *Appl. Radiat. Isot.* (2008) 66, 1175–1182.

²⁸ Winyard PG, Willoughby DA: *Inflammation Protocols*. Edited by Winyard PG, Willoughby DA. Totowa NJ, Humana, 2003

²⁹ Henson PM: Resolution of inflammation. *Chest* 1991, 99:2S–6S

³⁰ Todoric J, Löffler M, Huber J, Bilban M, Reimers M, Kadi A, Zeyda.1.

(PLA₂), un tipo de enzimas que se adhieren en la posición sn-2 del fosfoglicerolípido catalizando la salida del ácido graso de dicha posición ^{31,32,33}. Existen muchos tipos de PLA₂ con diferentes afinidades por los diferentes ácidos grasos que constituyen los fosfoglicéridos. Entre estos enzimas, los que están relacionados con la regulación de la cantidad de ácidos grasos libres hay en medio, estos son cPLA₂α y iPLA₂-VIA. El primero se encarga de la liberación de ácidos eicosanoides tras recibir algún estímulo celular. El segundo se encarga de la liberación de la mayoría de los ácidos grasos por lo que en la mayoría de las ocasiones los procesos celulares van a estar regulados por estos.

Es muy importante que exista equilibrio en la concentración de ácidos grasos que se encuentran en el organismo, ya que muchos de ellos, como los ácidos eicosanoides anteriormente mencionados los cuales generan activaciones celulares muy potentes en el organismo. Ahora bien, si existe un desequilibrio de este tipo de ácidos grasos se puede generar un estado de inflamación crónica en pacientes diabéticos ^{34, 35} provocando daños en el sistema cardiovascular, riñones, ojos y nervios ³⁶. El ácido araquidónico en concreto es el responsable de favorecer enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis. El ácido araquidónico es liberado por las células endoteliales favoreciendo la acumulación de gotas lipídicas en monocitos que circulan por el torrente sanguíneo transformándolos en monocitos espumosos capaces de adherirse en las paredes de las arterias provocando el desarrollo de la enfermedad ³⁷.

³¹ Mouchlis, V.D.; Dennis, E.A. Phospholipase A2 catalysis and lipid mediator lipidomics. *Biochim. Biophys. Acta* **2019**, 1864, 766–771.

³² Murakami, M.; Sato, H.; Taketomi, Y. Updating phospholipase A2 biology. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1457.

³³ Astudillo, A.M.; Balboa, M.A.; Balsinde, J. Selectivity of phospholipid hydrolysis by phospholipase A2 enzymes in activated cells leading to polyunsaturated fatty acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* **2019**, 1864, 772–783.

³⁴ D. T. Graves and R. A. Kayal, “Diabetic complications and dysregulated innate immunity,” *Frontiers in Bioscience*, **2008**. vol. 13, no. 4, pp. 1227–1239,

³⁵ J. I. Odegaard and A. Chawla, “Connecting type 1 and type 2 diabetes through innate immunity,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2012**. vol. 2, no. 3,

³⁶ International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*, International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, **2013** 6th edition, <http://www.idf.org/diabetesatlas>.

³⁷ Guijas, C., Meana, C., Astudillo, A. M., Balboa, M. A., & Balsinde, J. 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**). 23(6), 689-699. doi: 10.1016/j.chembiol.2016.04.012

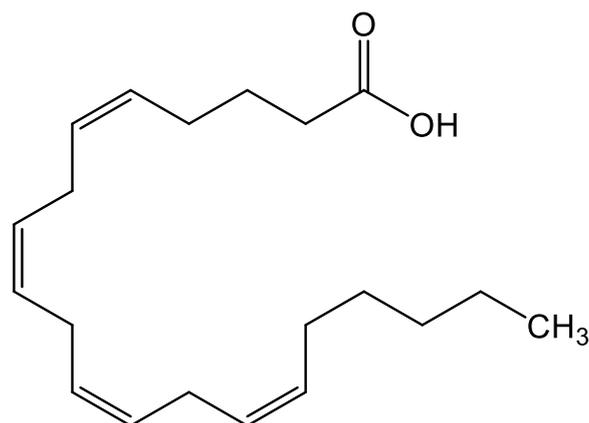


Figura 8: Ácido araquidónico.

El ácido palmítico (16:1-7) y sus isómeros tienen grandes propiedades antiinflamatorias, inhibición de la acumulación de grasa en el hígado y aumenta la sensibilidad a la insulina^{38,39}. Ensayos en células murinas, donde se encuentran ácidos grasos de este tipo en forma de fosfatidilcolina acompañados de ácido palmítico (**Figura 9**), se observó que esta especie disminuye en procesos de activación inflamatoria. En el caso de la aterosclerosis, cuando comienza la acumulación de los monocitos espumosos, se activa el enzima iPLA₂-VIA liberando los isómeros del ácido del ácido palmítico los cuales contribuyen a homeostasis.

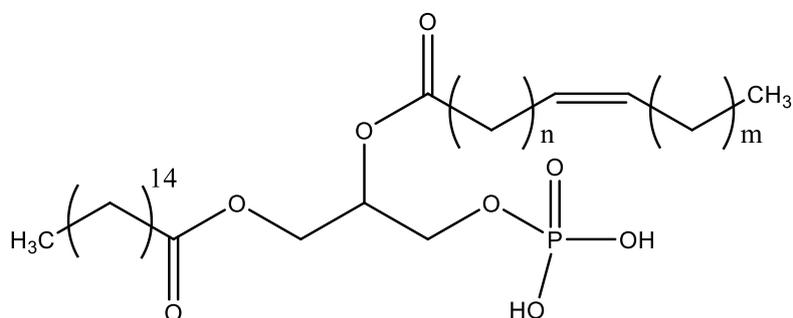


Figura 9: Estructura general de fosfolípido derivado del ácido palmítico acompañado de ácido palmítico.

La distribución de los ácidos grasos 16:1 anteriormente comentados dentro de las células de murina es muy variada, por lo que podemos encontrar estos ácidos grasos en la mayoría

³⁸ M.M. Yore, I. Syed, P.M. Moraes-Vieira, T. Zhang, M.A. Herman, E.A. Homan, R.T. Patel, J. Lee, S. Chen, O.D. Peroni, A.S. Dhaneshwar, A. Hammarstedt, U. Smith, T.E. McGraw, A. Saghatelian, B.B. Kahn, Discovery of a class of endogenous mammalian lipids with anti-diabetic and anti-inflammatory effects, *Cell* 159 (2014) 318–332.

³⁹ De Souza, C.O.; Vannice, G.K.; Rosa Neto, J.C.; Calder, P.C. Is palmitoleic acid a plausible nonpharmacological strategy to prevent or control chronic metabolic and inflammatory disorders? *Mol. Nutr. Food Res.* 2018, 62, 1700504.

de los fosfolípidos que se han visto a lo largo de este trabajo. En concreto, el ácido palmitoleico, y sus isómeros, se encuentran en su mayoría en fosfatidilcolinas ⁴⁰ (**Figura 10**)

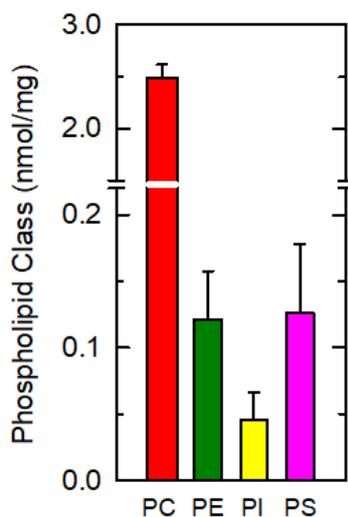


Figura 10: Distribución de ácidos grasos 16:1 en las células de murina.

Por último, cabe destacar la familia de los FAHFA's (Fatty Acids esters of Hydroxy Fatty Acids) la cual es relativamente nueva. Estos consisten en un ácido graso esterificado a un grupo hidroxilo de otro ácido graso (**Figura 11**). Se ha demostrado que esta familia de ácidos grasos se encuentra en macrófagos los cuales ante un estímulo son capaces de liberar ácidos grasos 16:1 que, como ya se ha visto, tienen propiedades antiinflamatorias ^{41,42}.

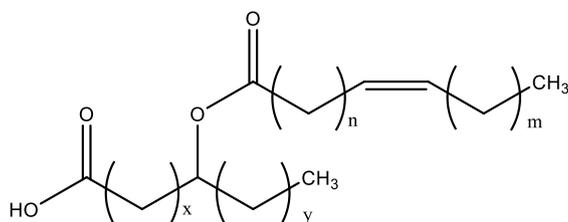


Figura 11: Estructura general de in FAHFA con propiedades antiinflamatorias.

⁴⁰ Astudillo, A. M., Meana, C., Bermúdez, M. A., Pérez-Encabo, A., Balboa, M. A., & Balsinde, J. Release of Anti-Inflammatory Palmitoleic Acid and Its Positional Isomers by Mouse Peritoneal Macrophages. *Biomedicines*, (2020). 8(11), 480. doi: 10.1016/j.bbailip.2018.07.002

⁴¹ Yore, M. M., Syed, I., Moraes-Vieira, P. M., Zhang, T., Herman, M. A., Homan, E. A., Patel, R. T., Lee, J., Chen, S., Peroni, O. D., Dhaneshwar, A. S., Hammarstedt, A., Smith, U., McGraw, T. E., Saghatelian, A., & Kahn, B. B.. Discovery of a Class of Endogenous Mammalian Lipids with Anti-Diabetic and Anti-inflammatory Effects. (2014) *Cell*, 159(2), 318-332. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.035

⁴² Bermúdez Arias, M. Á. Regulación de la respuesta inflamatoria de las células fagocíticas por lípidos: papel del ácido araquidónico y de los isómeros del ácido palmitoleico [Universidad de Valladolid]. (2021) doi: 10.35376/10324/47553

4. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Este trabajo se enmarca en la síntesis de fosfolípidos para su estudio en el medio fisiológico como agentes inflamatorios. El hecho de bloquear al ácido graso insaturado al derivado de fosfatidilcolina va a permitir conocer si su bioactividad se debe solamente al ácido graso o al conjunto del fosfolípido ya que se conoce que en el medio fisiológico existe la hidrólisis de los ácidos grasos de la estructura original.

Así pues, el objetivo de este trabajo es el diseño de una ruta sintética que permita la obtención de derivados de fosfatidilcolina, en concreto el derivado del ácido (Z)-7-hexadecenoico y derivado del ácido benzoico como éteres (**Figura 12**).

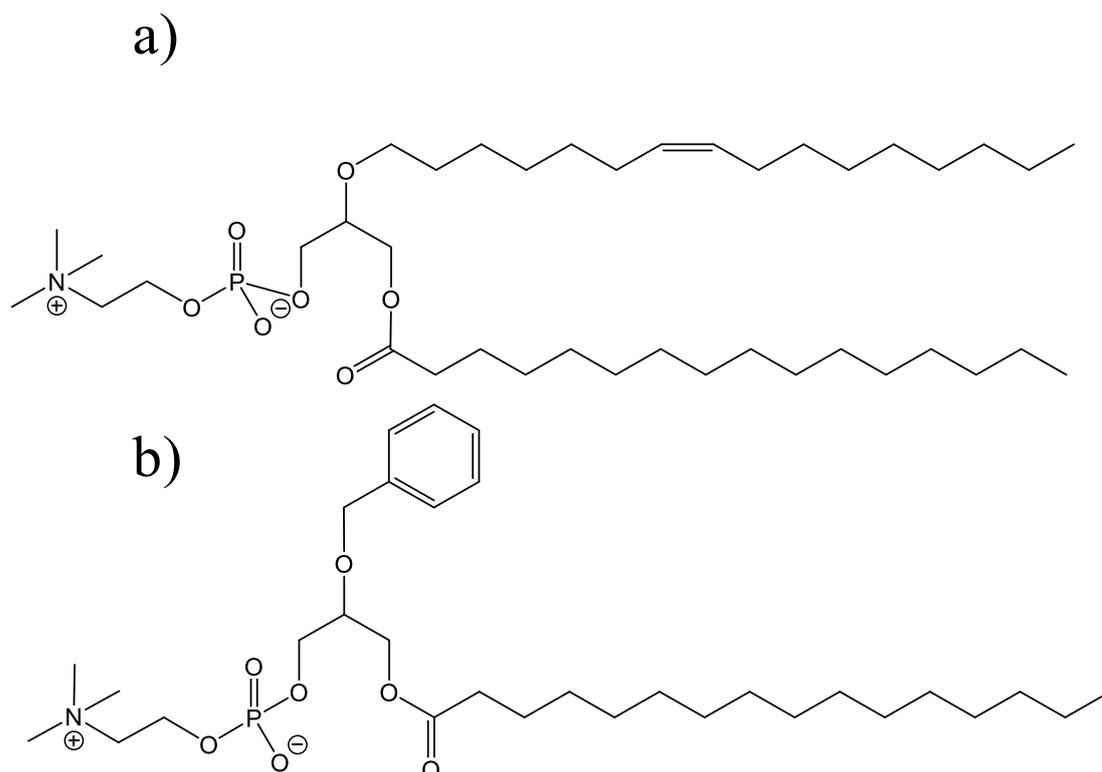


Figura 12: Fosfatidilcolina portadora del derivado del ácido (Z)-7-hexadecenoico **a)** y del ácido 2-fenilacético **b)**.

Para poder llevar a cabo este objetivo se han desarrollado las siguientes etapas:

- Diseño una ruta sintética para la obtención del éster derivado del ácido (Z)-7-hexadecenoico.
- Obtención del bromuro de (Z)-7-hexadecenoilo.
- Protección de los grupos hidroxilo primarios del glicerol para la posterior síntesis de Williamson con el correspondiente haluro.
- Incorporación del ácido palmítico y fosfatidilcolina de manera secuenciada sobre los éteres anterior obteniendo los fosfolípidos de interés.

Los objetivos propuestos se han abordado acorde con el siguiente plan de trabajo:

- Síntesis del éster derivado del ácido graso (Z)-7-hexadecenoico:

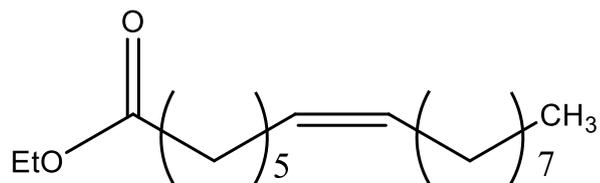


Figura 13: (Z)-7-hexadecenoato de etilo.

- Obtención del bromuro del éster anterior:

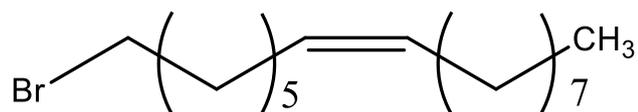


Figura 14: Bromuro de (Z)-7-hexadecenilo.

- Síntesis del 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ol derivado del glicerol protegido como acetal:

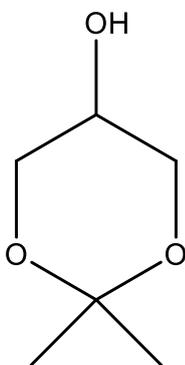


Figura 15: 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ol.

- Síntesis del fosfolípido correspondiente por incorporación secuenciada de ácido palmítico y fosfatidilcolina:

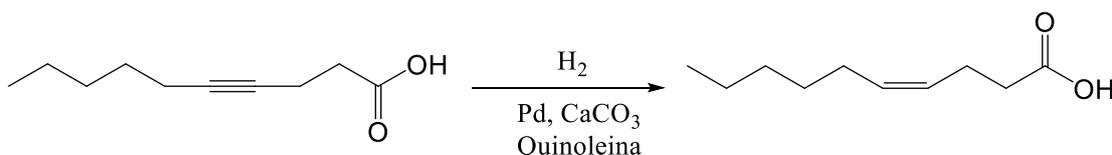
5. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

5.1 Síntesis de ácidos grasos monoinsaturados.

La síntesis de ácidos grasos monoinsaturados de estereoquímica cis puede realizarse de diferentes metodologías. A continuación, se recogen las más comunes.

5.1.1 Hidrogenación de alquinos

Este proceso se basa en la reducción de triples enlaces con el del catalizador de Lindlar, el cual genera dobles enlaces con estereoquímica cis. Además, este catalizador es selectivo de triples enlaces por lo que se puede utilizar en presencia de otros grupos funcionales como ácidos carboxílicos. El elemento activo del catalizador de Lindlar es el paladio, el cual se encuentra en una proporción del 5% sobre una matriz de carbonato de calcio y quinoleína. El empleo de este catalizador genera resultados generalmente buenos como se demuestra en numerosos estudios como por ejemplo en la síntesis del ácido (Z)-4-decenoico a partir del ácido 4-decinoico ⁴³ (**Esquema 1**).

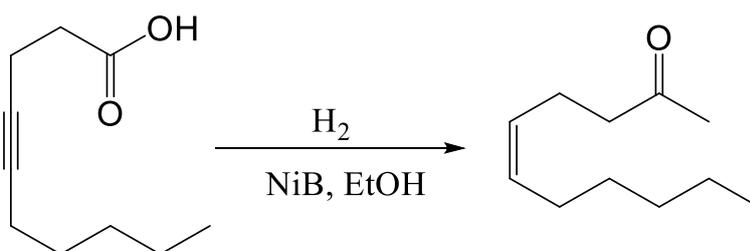


Esquema 1: Esquema sintético del ácido (Z)-4-decenoico.

Además del catalizador de Lindlar, se pueden utilizar otros metales de transición como catalizadores como el Ni. El Ni se utiliza como reductor de triples enlaces en la síntesis de algunos leucotrienos ⁴⁴ (**Esquema 2**).

⁴³ 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.*, (2012). 53, 5441–5444.

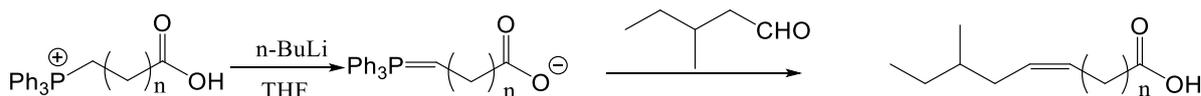
⁴⁴ Djuric, S. W., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Keith, R. H., Villani-Price, D., & Tsai, B.-S.. Enantioselective total synthesis and pharmacologic profile of 12-deoxy-12(S)-methyl leukotriene B₄. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, (1991) 1(3), 179-182. doi: 10.1016/S0960-894X(01)80795-2



Esquema 2: Esquema sintético de un leucotrieno.

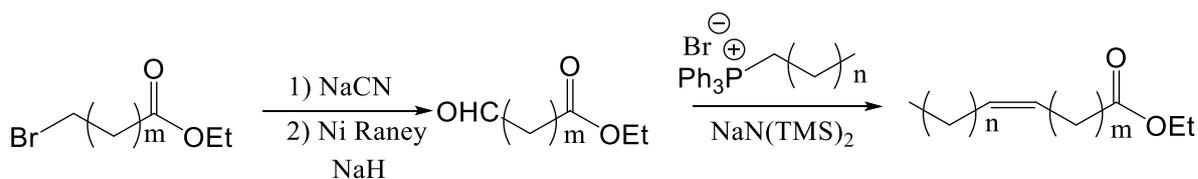
5.1.2 Reacción de Wittig

Esta reacción se basa en la obtención de un (Z)-alqueno haciendo reaccionar un yluro de fósforo⁴⁵ con un aldehído o una cetona en presencia de un ácido de Lewis. Esta reacción ha resultado especialmente útil en la obtención de (Z)-alquenos ramificados a partir de aldehídos ramificados⁴⁶ (**Esquema 3**)



Esquema 3: Esquema sintético de un (Z)-alqueno ramificado.

Además, la reacción de Wittig se ha aplicado de múltiples maneras en la síntesis de ácidos grasos. La diastereoselectividad es mayor cuanto más largos sean los restos que se inserten⁴⁷ (**Esquema 4**).



Esquema 4: Esquema sintético de un ácido graso monoinsaturado.

⁴⁵ R. Rabinowitz and R. Marcus, *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 1312 (1962).

⁴⁶ Thurnhofer, S. & Vetter, W. Synthesis of (S)-(+)-enantiomers of food-relevant (n-5)-monoenoic and saturated anteiso-fatty acids by a Wittig reaction. *Tetrahedron*, (2007) **63**, 1140–1145.

⁴⁷ Mostyn, S. N. et al.. Synthesis and Characterization of Novel Acyl-Glycine Inhibitors of GlyT2. *ACS Chemical Neuroscience*, (2017) **8**, 1949–1959.

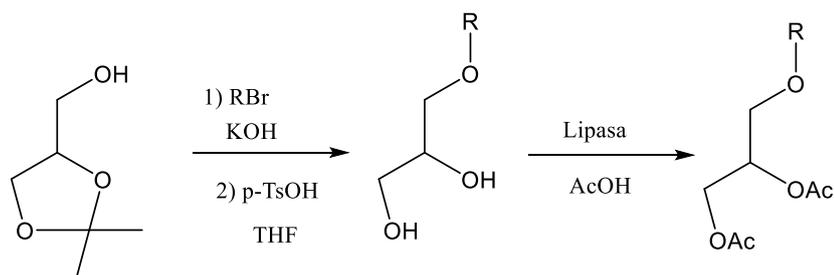
5.2 Síntesis de acilglicéridos

Es interesante conocer diferentes metodologías basadas en la incorporación de ácidos grasos en moléculas de glicerol o derivadas. La síntesis de diacilgliceroles se puede dividir en síntesis simétricas o en asimétricas.

5.2.1 Síntesis de acilglicéridos asimétricos

La obtención de este tipo de diacilgliceroles ha sido de interés a lo largo de los años ya que han tenido muchas aplicaciones terapéuticas como el aumento de la eliminación de metales pesados en el organismo, ayudan a paliar síntomas del asma, artritis, soriasis, etc ⁴⁸.

Debido a la importancia médica de este tipo de compuestos G. Haraldsson y colaboradores⁴⁹ desarrollaron un método quimioenzimático basado en dos etapas tal y como se muestra en el **esquema 5**. La síntesis comienza con el derivado de glicerol protegido en las posiciones sn-1 y sn-2 reaccionando con un bromuro de alquilo para formar el éter correspondiente. Posteriormente realiza la hidrólisis del grupo protector con un ácido orgánico en medio acuoso para dar lugar al -diol. A continuación, se realiza la esterificación de las posiciones protegidas, sn-1 y sn-2, la cual está catalizada por lipasas dando lugar a los correspondientes acetatos.



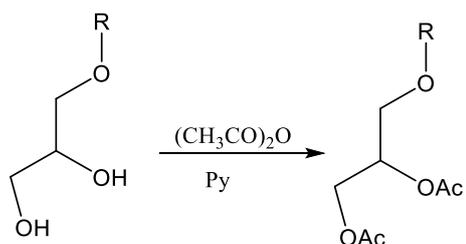
Esquema 5: Síntesis quimioenzimática de acilglicéridos asimétricos.

Adicionalmente, Fred Snyder y sus colaboradores llevaron a cabo la reacción de acetilación del 1-alkil-glicerol con anhídrido acético ⁵⁰ (**Esquema 6**).

⁴⁸ Pugliese, P. T.; Jordan, K.; Cederberg, H.; Brohult, J.J. *Alt. Compl. Med.* **1998**, 4, 87–99.

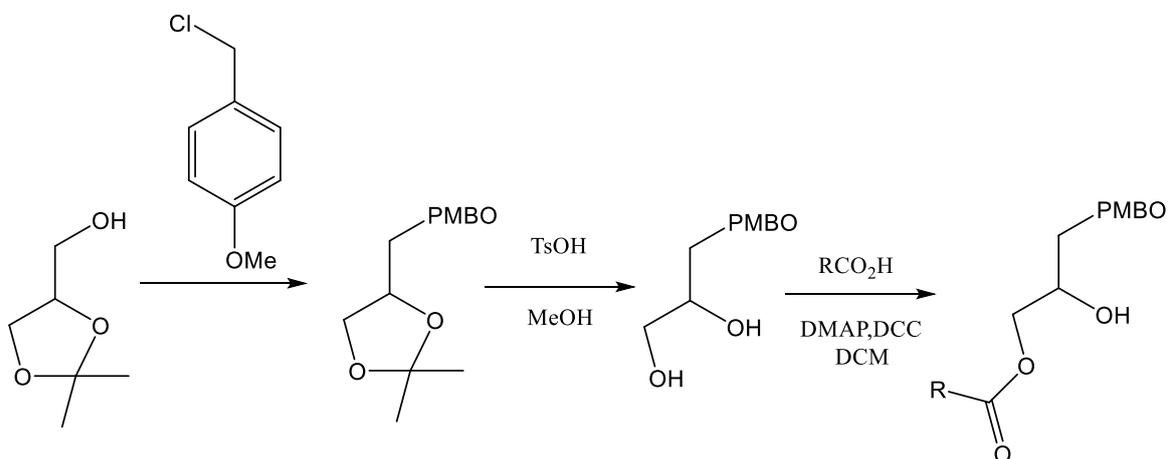
⁴⁹ A. Halldorsson, P. Thordarson, B. Kristinsson, C. D. Magnusson and, G. G. Haraldsson *Tetrahedron: Asymmetry*, 2 **2004**, 15, 2893–2899

⁵⁰ M. L. Blanr, Edgar A. Cress y Fred Snyder, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1984**, 118, No.1



Esquema 6: Síntesis química de acilglicéridos asimétricos.

Alternativamente, se pueden obtener este tipo de compuestos a partir de la metodología indicada en el **esquema 7**. Dicha metodología comienza en la protección de las posiciones sn-1 y sn-2 en forma de acetal, como en los casos anteriores, y la posición sn-3 como éter con cloruro de 4-metoxibencilo. A continuación, se elimina el acetal para dejar libres las posiciones sn-1 y sn-2. Por lo general, existe una buena regioselectividad entre alcoholes primarios y secundarios por lo que se puede introducir cualquier ácido graso en la posición terminal no protegida del derivado del glicerol.

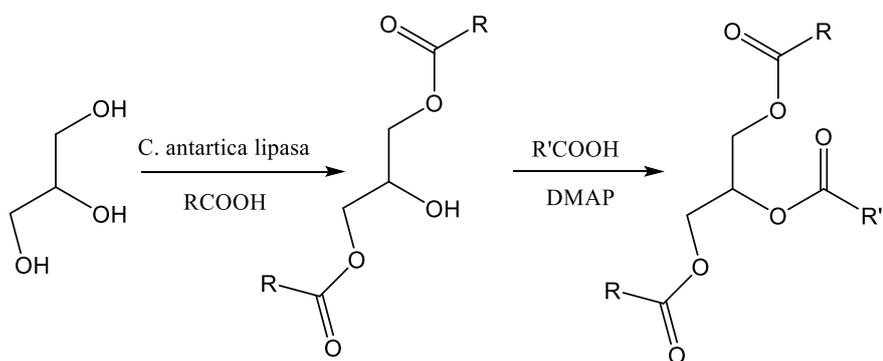


Esquema 7: Síntesis química de acilglicéridos asimétricos.

5.2.2 Síntesis de acilglicéridos simétricos

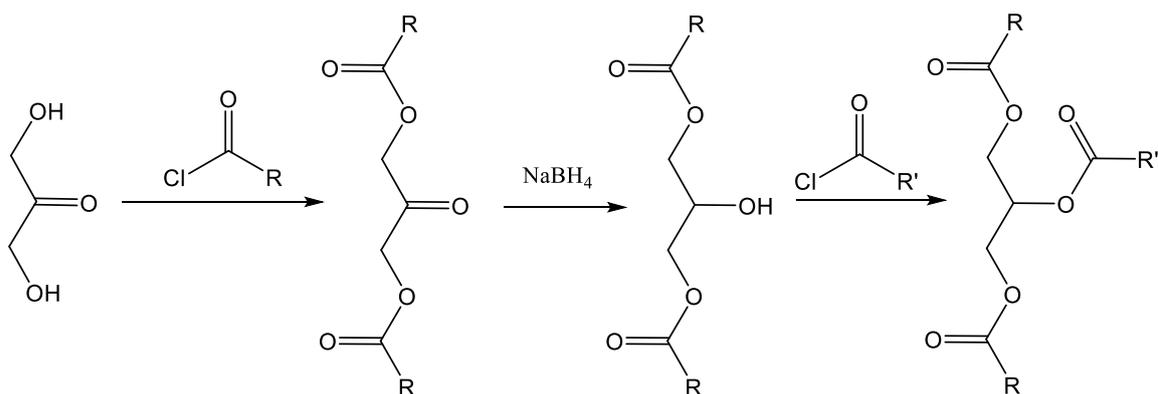
Al igual que en apartado anterior, existen vías quimioenzimáticas que permiten la formación de acilglicéridos. Un ejemplo es la desarrollada por el ya mencionado Haraldsson ⁵¹ la cual consta de dos pasos. En primer lugar, se hace reaccionar el ácido graso correspondiente con glicerol en presencia del enzima *Candida antarctica lipasa*, la cual es capaz de catalizar la reacción de esterificación solamente en las posiciones 1 y 3, dejando libre la posición central. En segundo lugar, se hace reaccionar el ácido graso deseado con el producto anterior en medio básico (**Esquema 8**).

⁵¹ C. D. Magnusson and G. G. Haraldsson *Tetrahedron*, **2010**, 66, 2728–2731



Esquema 8: Síntesis de acilglicéridos simétricos.

También se han descrito reacciones de acilglicéridos simétricos regioselectivas a partiendo de 1,3-dihidroxiopropanona⁵² (**Esquema 9**), desde la cual se puede llegar de manera sencilla un derivado de glicerol. Dichas reacciones comienzan con la reacción de un cloruro de ácido obteniéndose la correspondiente cetona simétrica correspondiente. Después, una reducción con borohidruro sódico va a generar el alcohol secundario. Por último, este alcohol se hace reaccionar con el cloruro de ácido deseado dando lugar al acilglicérido correspondiente.



Esquema 9: Síntesis de acilglicéridos simétricos.

Por otro lado, en lugar de realizar la alquilación directa en las posiciones 1 y 3, puede plantear la protección de estas posiciones como acetal. Dependiendo de donde se genere la protección, se van a obtener ciclos de cinco o de seis eslabones⁵³ (**Figura 16**).

⁵² M.S.Y. Khan and M. Akhter, *Eur. J. of Med. Chem.* **2005**, 40, 371-376

⁵³ Fischer, *Ber.*, **1897**, 27, 1536.

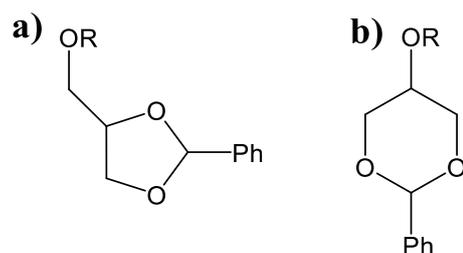
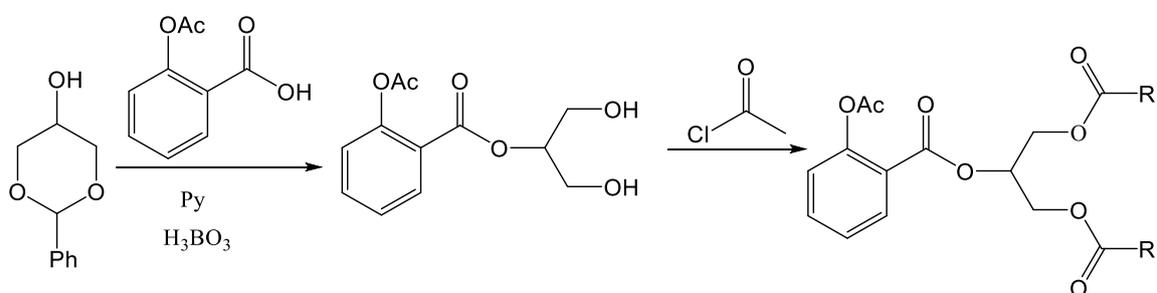


Figura 16: a) Acetal derivado del glicerol con las posiciones sn-2 y sn-3. b)) Acetal derivado del glicerol con las posiciones sn-1 y sn-3.

Un ejemplo de la aplicación esta metodología es en la síntesis de 1,3-bis(acanoil)-2-(O-acetilsalicilcicloil)-glicérido ⁵⁴ (**Esquema 10**). La síntesis con la reacción del acetal de seis eslabones derivado del benzaldehído y del glicerol con 2-acetoxibenzoil carboxilato en presencia de ácido bórico dando lugar la acetilación en la posición sn-2 y la desprotección. A continuación, se hace reaccionar el -diol con el cloruro de ácido deseado en presencia de piridina dando lugar al producto final.



Esquema 10: Síntesis de acilglicéridos simétricos protegidos en posiciones 1 y 3.

Existe un problema con este método ya que puede darse la trasposición del primer grupo éster por las diferentes posiciones del derivado de glicerol una vez es desprotegido.

5.3 Síntesis de fosfolípidos

La obtención de diacilgliceroles con ácidos grasos diferentes es interesante a la hora sintetizar fosfolípidos ya que esta estructura es la base de ellos. Por desgracia, la síntesis de este tipo de compuestos no es tan sencilla debido a que la regioselectividad y enantioselectividad debe ser estrictamente conservada, por lo que es necesario recurrir a rutas sintéticas donde la protección y desprotección de las posiciones sn-1 y sn-3 sean viables evitando así la migración de los grupos acilo. Además, al existir un centro quiral, se requiere de condiciones permitan trabajar sin perder la estereoquímica, por lo que se han estudiado numerosas condiciones en las que un derivado del R-glicerol es protegido de tal manera que sea posible realizar las reacciones deseadas conservando la estereoquímica.

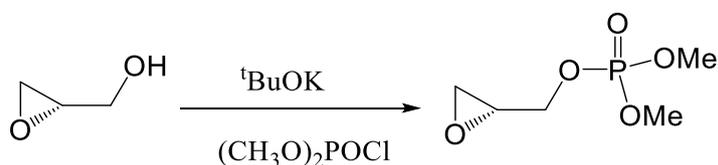
Hay numerosos métodos y rutas sintéticas que permiten la obtención de un derivado del R-glicerol, en concreto se van a tratar aquellas rutas que parten del (2R)-glicidol, D-manitol y el

⁵⁴ G. Y. Paris, D. L. Germaise y D. G. Cimon, J. of Med. Chem., **1979**, 22, No6, 683

(2R)-solketal. Adicionalmente, se va a hablar de un método que permite la protección de las posiciones sn-1 y sn-3 del R-glicerol a través de un derivado de estaño.

5.3.1 (2R)-glicidol

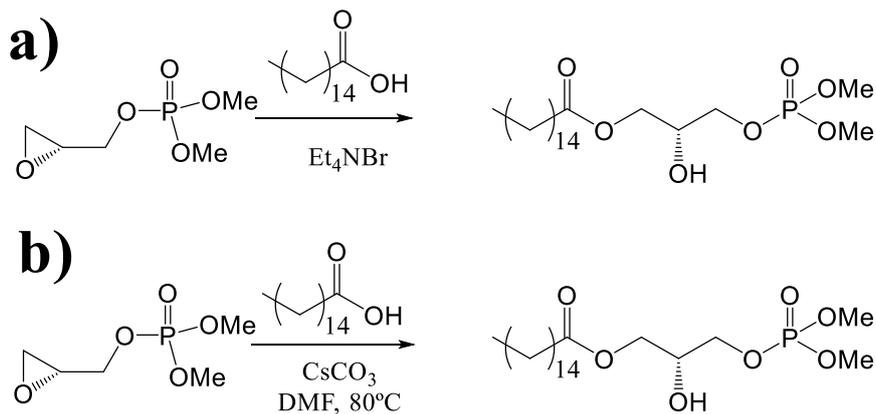
El (2R)-glicidol es un producto de partida interesante debido a que las posiciones sn-1 y sn-2 ya están protegidas con un grupo funcional que permite la posterior diferenciación de estas posiciones. Adicionalmente, es necesario proteger la posición sn-3 ya que esta podría interferir en la incorporación de los grupos acilo en las posiciones deseadas. Para ello, algunos autores optan por bloquearla con una molécula derivada del ácido ortofosfórico (**Esquema 11**) ya que así tendremos parte de la cabeza del fosfolípido que se persigue ⁵⁵.



Esquema 11: Esquema sintético de la posición sn-2 con cloruro de dimetilfosforilo y terbutóxido de potasio.

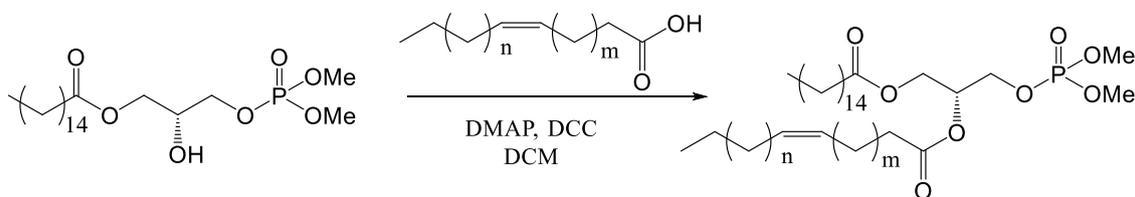
A continuación, se abre el epóxido para la incorporación del ácido graso deseado. Existen dos maneras de realizar este paso (**Esquema 12**):

⁵⁵ Xu, Y., Tanaka, M., Arai, H., Aoki, J., & Prestwich, G. D. (2004). Alkyl lysophosphatidic acid and fluoromethylene phosphonate analogs as metabolically-stabilized agonists for LPA receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(21), 5323-5328. doi: 10.1016/j.bmcl.2004.08.019



Esquema 12: a) Apertura del epóxido en presencia de bromuro de trietilamonio ⁵⁶ b) Apertura del epóxido en medio básico ⁵⁷.

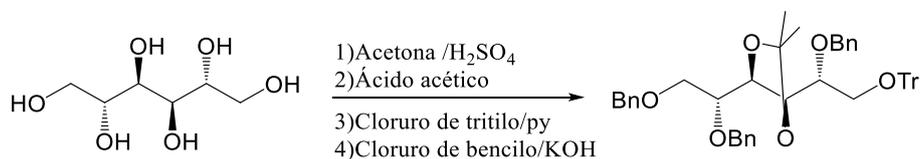
De esta manera se obtiene el monoacilglicerol susceptible de la incorporación del ácido graso insaturado correspondiente (**Esquema 13**).



Esquema 13: Esquema sintético del diacilglicerol.

5.3.2 D-manitol

El D-manitol es un compuesto polialcohólico el cual, con el tratamiento adecuado, puede escindirse en dos moléculas derivadas de glicerol, pero para poder incorporar en su estructura ácidos grasos hay que proteger los grupos hidroxilo convenientemente (**Esquema 14**).

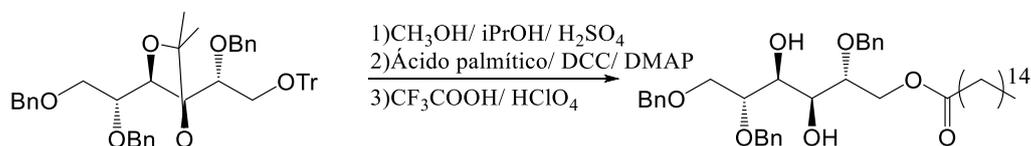


Esquema 14: Esquema sintético de la protección de los grupos hidroxilo ³⁷.

⁵⁶ Dyer, B. S., Jones, J. D., Ainge, G. D., Denis, M., Larsen, D. S., & Painter, G. F. (2007). Synthesis and Structure of Phosphatidylinositol Dimannoside. *The Journal of Organic Chemistry*, (2007). 72(9), 3282-3288. doi: 10.1021/jo0625599

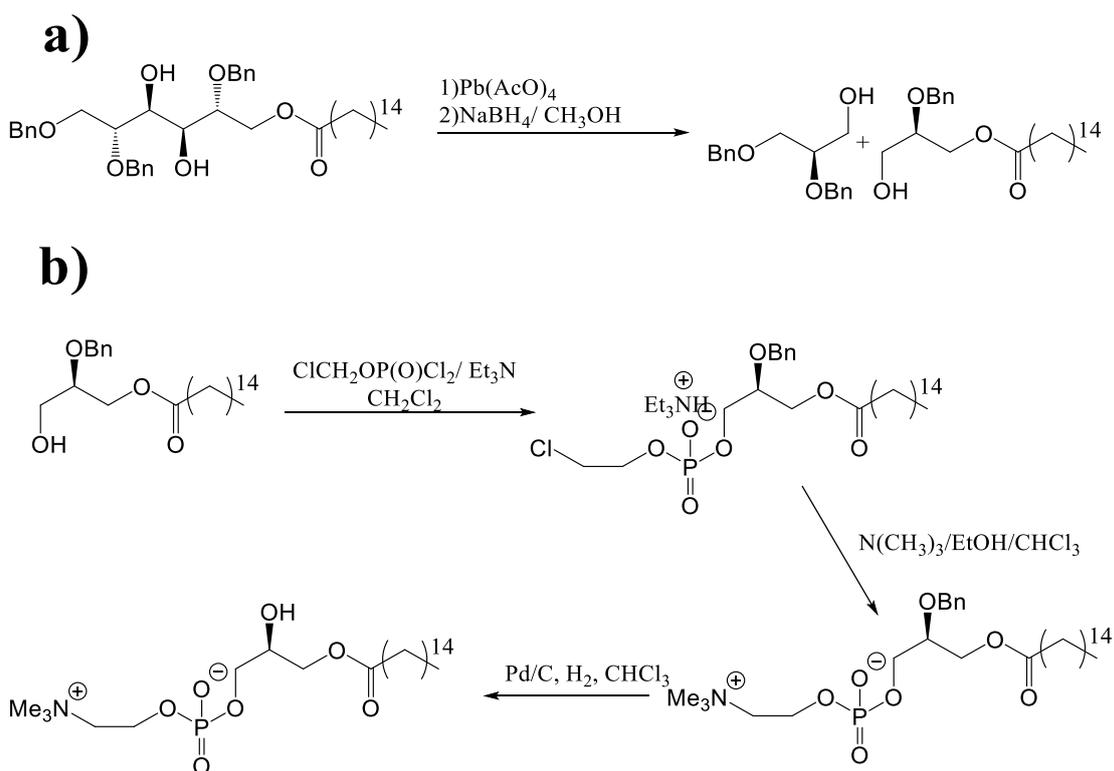
⁵⁷ D'Arrigo, P., & Servi, S. Synthesis of Lysophospholipids. *Molecules*, (2010). 15(3), 1354-1377. doi: 10.3390/molecules15031354

A continuación, se inserte el ácido palmítico en la posición del grupo tritilo selectivamente. Adicionalmente, el tratamiento con ácido trifluoroacético libera al acetal generándose el diol (Esquema 15).



Esquema 15 : Esquema sintético de la inserción de ácido palmítico y desprotección del diol.

A continuación, como se ha comentado anteriormente, se ha producir la rotura oxidativa de la molécula para generar el derivado de glicerol (reacción de Criegee⁵⁸. La posterior reacción con ácido cloroetilfosfórico y, después, trietilamina provoca la obtención de la sal de fosfonato de interés. Por último, por vía catalítica, se libera la posición sn-2 para la inserción del ácido graso insaturado que corresponda (Esquema 16).

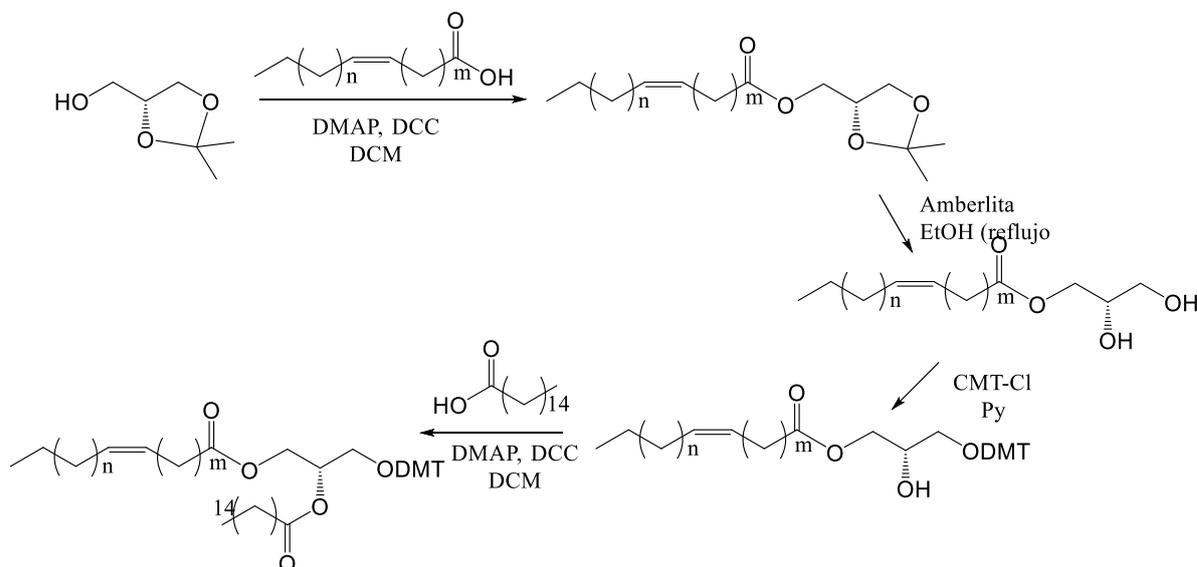


Esquema 16: a) Esquema de la rotura oxidativa (reacción de Criegee) **b)** Esquema sintético del derivado de fosfatidilcolina.

⁵⁸ Criegee Glycol Oxidation. En *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. John Wiley & Sons, Inc (2010). doi: 10.1002/9780470638859.conrr168

5.3.3 (2R)-solketal

El empleo del (2R)-solketal en la síntesis de diacilgliceridos debido a que se puede acceder de manera secuenciada a las diferentes posiciones del derivado de glicerol. Para ello, en primer lugar, se inserta el ácido graso monoinsaturado en la posición sn-1. A continuación, se elimina el acetal y se protege el hidroxilo de la posición sn-3. Por último, se inserta ácido palmítico en la posición sn-2 obteniéndose así el diacilglicerol (**Esquema 17**).



Esquema 17: Esquema sintético de acilgliceroles a partir de (2R)-solketal.

5.3.4 Organoestannano

Partiendo de la glicero-3-fosfatidilcolina (GCP) representada en la **figura 17**, la cual se puede obtener a través de la alcoholisis de lectinas naturales ⁵⁹, se pueden sintetizar diferentes tipos de fosfolípidos.

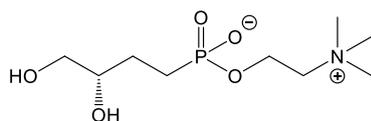


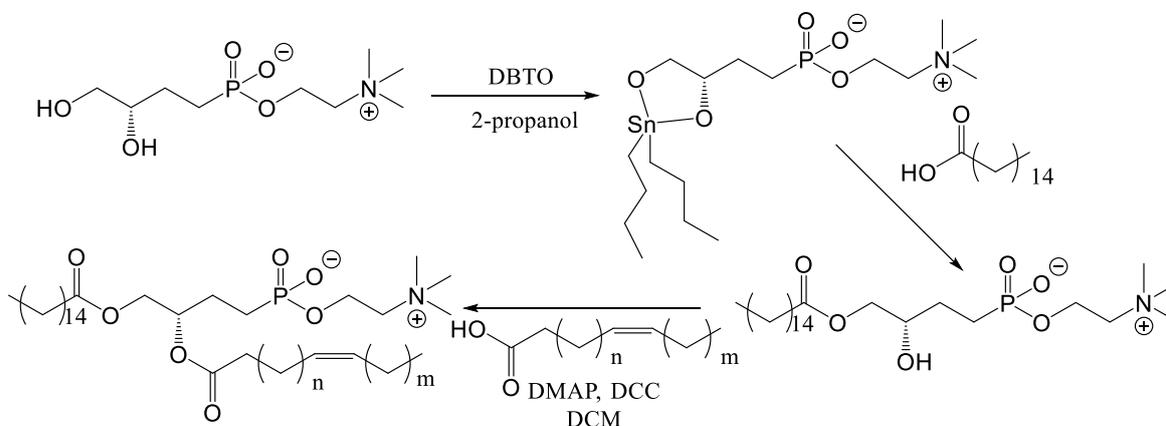
Figura 17: glicero-3-fisfatidilcolina (GCP).

A pesar de que es una buena opción como precursor de fosfolípidos, esta molécula solo es soluble en agua y disolventes alcohólicos de cadena corta por lo que por sí mismo su empleo en disolventes orgánicos es inviable. Debido a esto, la mayoría de los métodos que usan este producto de partida lo utilizan acompañado con cadmio ya que de esta manera es mucho más soluble en disolventes polares ⁶⁰. Desgraciadamente el cadmio es un metal pesado

⁵⁹ Baer, E; Kates, M.. L-alfa-Glycerolphosphorylcholine. J. Am. Chem. Soc., (1948) 70, 1394-1399.

⁶⁰ Chada, J. S. Preparation of crystalline L-alfa -glycerophosphorylcholine-cadmium chloride adduct from commercial egg lecithin. Chem. Phys. Lipids, (1970). 4, 104-108.

extremadamente tóxico ⁶¹ por lo que se han buscado otras alternativas. De esta manera, el empleo de óxidos de estaño ha permitido la monoacilación de la GCP a través de la formación in situ de un estanilen acetal ^{62,63,64} (**Esquema 18**).



Esquema 18: Esquema sintético de un fosfolípido a través de un estanilen acetal.

5.4 Síntesis de la fosfatidilcolina

Por lo general, los bromoésteres de ácidos fosfatídicos y sus análogos son intermedios en la síntesis de fosfolípidos. Los derivados de fosfatidilcolina se pueden obtener por aminación directa de los anteriores con aminas como amoníaco ⁶⁵, metilamina ⁶⁶, dimetilamina o trietilamina ⁶⁷. Durante el proceso de aminación se han registrado

⁶¹ Ichihara, K.; Iwasaki, H.; Ueda, K.; Takisawa, R.; Naito, H.; Tomosugi, M.). Synthesis of phosphatidylcholine: An improved method without using the cadmium chloride complex of sn-glycero-3-phosphocholine. *Chem. Phys. Lipids*, (2005) 137, 94-99.

⁶² Fasoli, E.; Arnone, A.; Caligiuri, A.; D'Arrigo, P.; de Ferra, L.; Servi, S. Tin-mediated synthesis of lysophospholipids. *Org. Biomol. Chem.* (2006), 4, 2974-2978.

⁶³ Gliszczynska, A., Niezgodna, N., Gładkowski, W., Czarnecka, M., Świtalska, M., & Wietrzyk, J.. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Phosphatidylcholine Analogues Containing Monoterpene Acids as Potent Antiproliferative Agents. *PLOS ONE*, (2016) 11(6), e0157278. doi: 10.1371/journal.pone.0157278

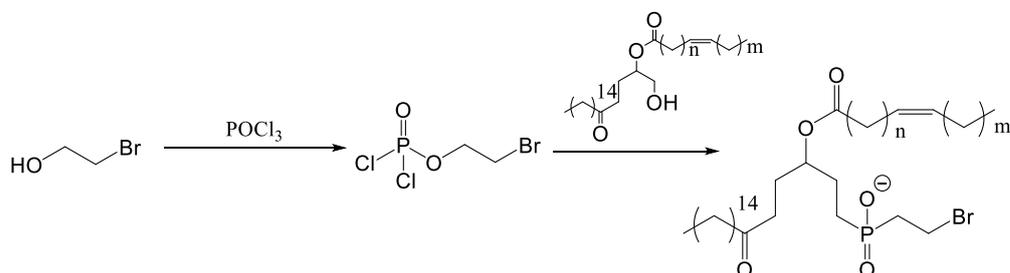
⁶⁴ D'Arrigo, P., Fasoli, E., Pedrocchi-Fantoni, G., Rossi, C., Saraceno, C., Tessaro, D., & Servi, S.. A practical selective synthesis of mixed short/long chains glycerophosphocholines. *Chemistry and Physics of Lipids*, (2007) 147(2), 113-118. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2007.03.008

⁶⁵ Shapiro, D., & Rabinsohn, Y. Synthesis of N-Monomethyl- and N,N-Dimethylcephalins. *Biochemistry*, 3(4), (1964). 603-605. doi: 10.1021/bi00892a023

⁶⁶ Pajouhesh, H., & Hancock, A. J. Synthesis of cyclopentano-N-methylphosphatidylethanolamines: aminolysis during the use of methylamine. *Journal of Lipid Research*, (1984). 25(3), 310-312. doi: 10.1016/S0022-2275(20)37828-7

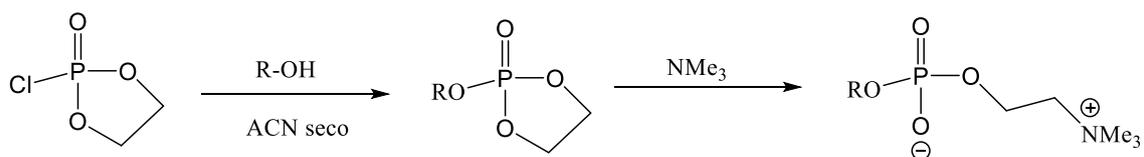
⁶⁷ Baer, E., & Pavanaram, S. K. N,N-Dimethylcephalins. *Journal of Biological Chemistry*, (1961). 236(9), 2410-2415. doi: 10.1016/S0021-9258(18)64012-8

migraciones de los grupos acilo obteniéndose una mezcla de isómeros, por lo que se ha buscado optimizar la reacción de aminación con isómeros análogos al 1,2-dihexadecilglicerol⁶⁸. Por lo general, para formar el bromoetilester de ácido fosfatídico se utiliza POCl₃ (**Esquema 19**).



Esquema 19: Esquema simplificado de la síntesis del intermedio de la síntesis de fosfolípidos.

Esta ruta es una vía válida que permite obtener fosfoglicéridos, pero el empleo de POCl₃ como fuente de ácido fosfatídico va generar una gran cantidad de subproductos por lo que el rendimiento se verá afectado ⁶⁹. Debido a esto, se han desarrollado otros métodos que utilizan compuestos diferentes como fuente de ácido fosfátidico. Un ejemplo es el 2-cloro-2-oxo1,3,2-dioxafosfano ⁷⁰ (**Esquema 20**).



Esquema 20: Esquema simplificado de la síntesis de fosfatidilcolina correspondiente.

⁶⁸ Eibl, H., & Nicksch, A. The synthesis of phospholipids by direct amination. *Chemistry and Physics of Lipids*, (1978). 22(1), 1-8. doi: 10.1016/0009-3084(78)90002-6

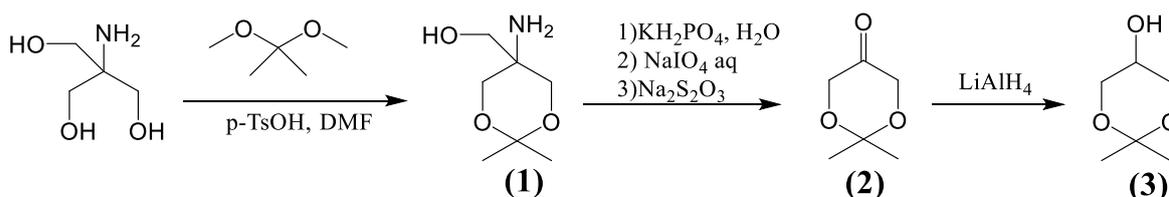
⁶⁹ Marx, M. H., Piantadosi, C., Nosedá, A., Daniel, L. W., & Modest, E. J. Synthesis and evaluation of neoplastic cell growth inhibition of 1-N-alkylamide analogs of glycerol-3-phosphocholine. *Journal of Medicinal Chemistry*, (1988). 31(4), 858-863. doi: 10.1021/jm00399a029

⁷⁰ Kim, U. T., & Hajdu, J. Synthesis of phospholipid headgroups via nucleophilic ring opening of 1,3,2-dioxaphospholanes. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (1993). 1, 70. doi: 10.1039/c39930000070

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Síntesis de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ol

Como se ha comentado en el cuarto apartado, se ha preparado un derivado del glicerol el cual tiene protegidas como acetal las posiciones sn-1 y sn-2 dejando libre la posición sn-3 permitiendo la incorporación de un sustituyente, en este caso el ácido (Z) 7-hexadecenoico y un grupo bencilo, a través de un enlace éter. La metodología empleada para la síntesis del derivado de glicerol (**3**) se basó, en primer lugar, en la reacción de transacetilación con 2,2-dimetoxipropano ⁷¹, proporcionando la protección de las posiciones sn-1 y sn-3 como dimetilacetal. En segundo lugar, se realiza la rotura oxidativa en presencia de peryodato de sodio ⁷¹ dando lugar a una imina cuya hidrólisis con agua genera la correspondiente cetona⁷². Por último, la obtención del derivado de glicerol (**3**) deseado se obtiene por reducción del grupo carbonilo con hidruro de aluminio y litio (**Esquema 21**). Cabe destacar que el compuesto (**3**) es moderadamente soluble en agua por lo que es importante que la cantidad de agua empleada en la hidrólisis del hidruro sea la mínima posible. Se asiló (**3**), tras la reducción de (**2**), como un aceite amarillento con un rendimiento del 73%.

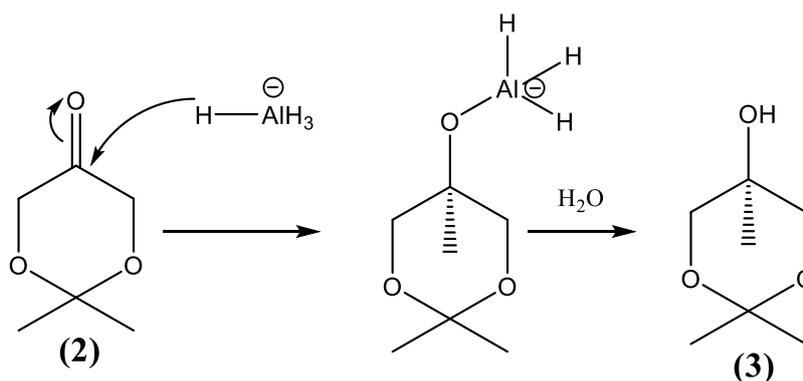


Esquema 21: Esquema de la síntesis del 3,3-dimetil-1,3-dioxan-5-ol.

El mecanismo de reducción de la cetona (**2**) con hidruro de aluminio y litio viene descrito por el **esquema 22**:

⁷¹ Forbes, D. C., Ene, D. G., & Doyle, M. P. Stereoselective Synthesis of Substituted 5-Hydroxy-1,3-dioxanes. *Synthesis*, **1998**(06), 879-882. doi: 10.1055/s-1998-2090

⁷² Pomplun, S., Shugrue, C. R., Schmitt, A. M., Schissel, C. K., Farquhar, C. E., & Pentelute, B. L. Secondary Amino Alcohols: Traceless Cleavable Linkers for Use in Affinity Capture and Release. *Angewandte Chemie International Edition*, **(2020)**, 59(28), 11566-11572. doi: 10.1002/anie.202003478



Esquema 22: Esquema del mecanismo de reducción de la cetona (2).

Cabe destacar que al tratarse de un alcohol este va a ser soluble en agua por lo que es muy importante utilizar la cantidad mínima de agua requerida ya que si no se podría perder rendimiento.

6.2 Síntesis de diacilgliceroles

Como se ha comentado anteriormente, la incorporación de dos ácidos grasos en la molécula de glicerol produce procesos de migración intramolecular. Para evitar estos procesos no deseados en este trabajo aborda la incorporación del ácido graso insaturado, ácido (Z)-7-hexadecenoico, en forma de éter. Para poder incorporar le ácido graso en forma de éter al derivado de glicerol es necesario realizar una síntesis de Williamson ⁷³ la cual consiste en hacer reaccionar un alcohol con un bromuro de alquilo o arilo. De esta manera se hará reaccionar le bromuro de (Z)-7-hexadecenoico y el bromuro de bencilo con el derivado de glicerol. El posterior tratamiento ácido liberará las posiciones protegidas para dar pie a la incorporación del ácido palmítico y la fosfatidilcolina. El bromuro de bencilo es comercial, en cambio el bromuro de (Z)-7-hexadecenoico no lo es por lo que habrá que prepararlo. La preparación de este compuesto consta de una reacción Wittig para obtener el ácido graso monosaturado, la reducción del grupo ácido y la halogenación del hidroxilo.

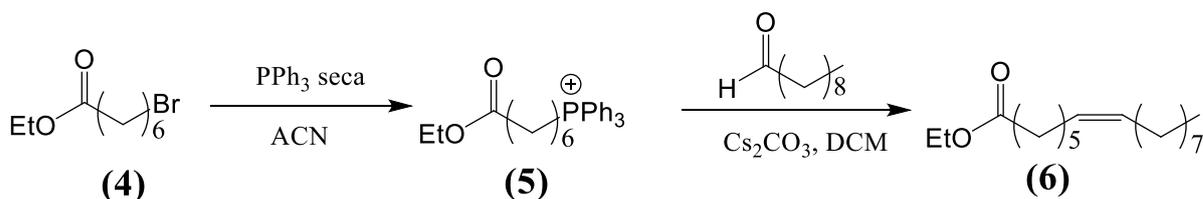
6.2.1 Síntesis del (Z)-1-bromo-7-hexadeceno.

El bromuro de bencilo es comercial, en cambio el bromuro de (Z)-7-hexadecenoico no lo es por lo que habrá que prepararlo. La preparación de este compuesto consta de una reacción Wittig para obtener éster derivado del ácido (Z)-7-hexadecenoico, la reducción del grupo ácido y la halogenación del hidroxilo.

En primer lugar, la metodología empleada para la síntesis del (Z)-7-hexadecenoato de etilo se basó en la reacción del iluro de fósforo derivado del 7-bromoheptanoato de etilo con nonanal en DCM en presencia de cloruro de cesio tal como representa el **esquema 23**. Para que la formación del iluro de fosforo ocurra de manera óptima la trifenilfosfina se secó a

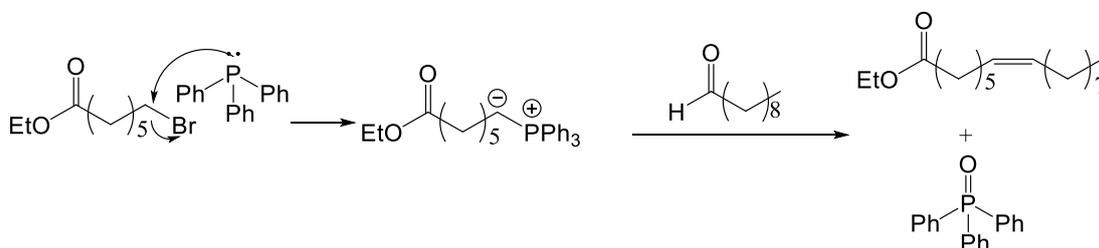
⁷³ «Theory of Aetherification». *Philosophical Magazine* **1850** 37: 350-356.

vacío, por lo que las condiciones de reacción de para la formación de este deben ser anhidras. Tras la purificación por columna, el producto se aísla como un aceite incoloro con un rendimiento del 85%.



Esquema 23 : Esquema sintético del iluro de fosforo y el (Z)-7-hexadecenoato de etilo.

El mecanismo de reacción por el que ocurre esta reacción viene representado por el **esquema 24**:



Esquema 24 : Formación del iluro de fósforo y posterior reacción con nonanal.

La geometría cis se puede explicar por la formación del intermedio representado en la **figura 18**, donde las interacciones estéricas son menores que en otras conformaciones.

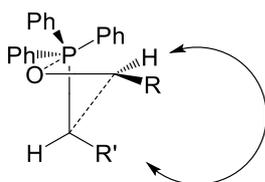
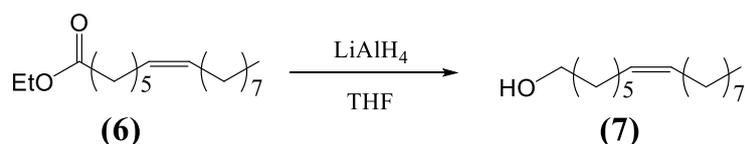


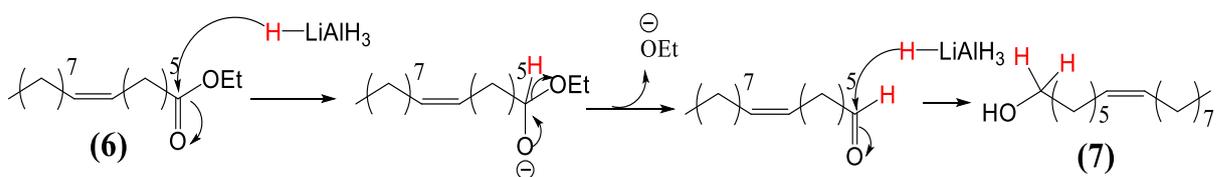
Figura 18: Estado de transición de la reacción de Wittig.

En segundo lugar, la metodología para la obtención del (Z)-7-hexadecenol se basó en la reducción del éster anterior con hidruro de aluminio y litio en THF (**Esquema 25**). Debido a que el hidruro de aluminio y litio es sensible al aire, las condiciones de reacción que se requieren son rigurosamente anhidras. Tras la purificación por columna, se aisló un aceite amarillento con un rendimiento del 81.6 %.



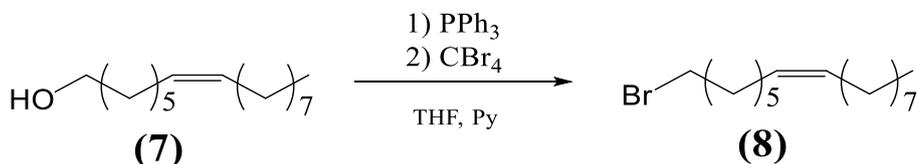
Esquema 25 : Esquema sintético de la reducción del grupo éster a alcohol.

Esta reacción se realizó con exceso de reductor (1:2) debido a que en las reducciones de grupos carboxílicos se consumen dos iones hidruro⁷⁴ tal y como se muestra en el **esquema 26**:



Esquema 26 : Reacción de reducción del grupo éster.

Por último, la metodología utilizada para la halogenación del alcohol anteriormente sintetizado consiste en la realización de una reacción de Appel⁷⁵ utilizando tetrabromuro de carbono en THF en presencia de piridina (**Esquema 27**). El producto se aisló como un aceite incoloro con rendimiento del 69 %.



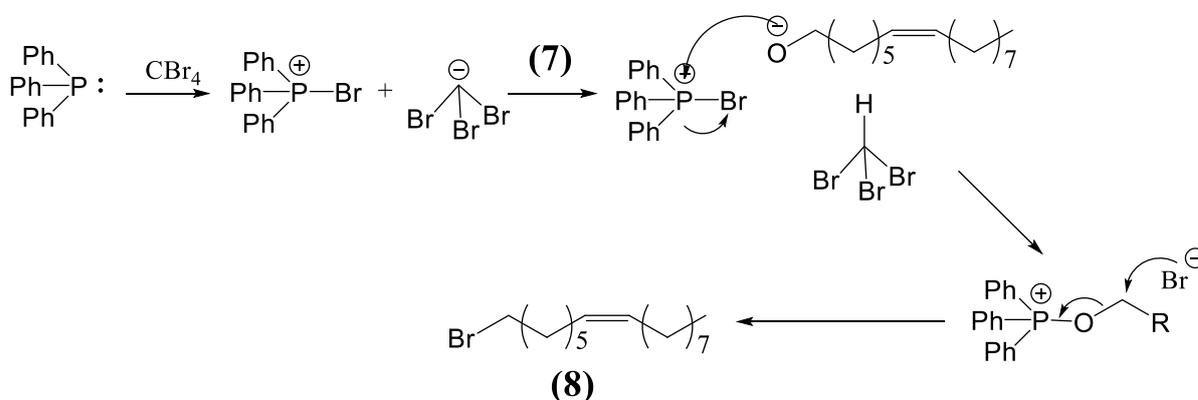
Esquema 27 : Reacción de Appel con CBr₄.

El mecanismo de la reacción comienza con la reacción del tetrabromuro de carbono con la trifenilfosfina generando un catión bromotrifenilfosfonio y un anión tribromuro de carbono el cual es capturado por el protón del alcohol generando bromoformo. A continuación, ocurre a la sustitución nucleófila del bromo por el alcóxido dando como producto el catión alcóxotrifenilfosfonio. Debido a que el sustituyente de fósforo es un buen grupo saliente

⁷⁴ Nystrom, R. F., & Brown, W. G. Reduction of Organic Compounds by Lithium Aluminum Hydride. I. Aldehydes, Ketones, Esters, Acid Chlorides and Acid Anhydrides. *Journal of the American Chemical Society*, (1947). 69(5), 1197-1199. doi: 10.1021/ja01197a060

⁷⁵ Rolf Appel «Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage». *Angewandte Chemie International Edition in English* (1975). 14 (12): 801-811. doi:10.1002/anie.197508011

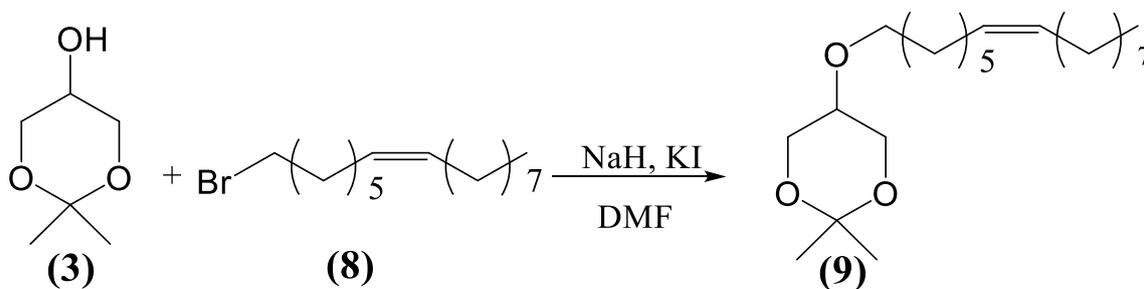
puede darse la sustitución nucleófila de este por un bromuro generándose el derivado halogenado deseado (**Esquema 28**).



Esquema 28 :Mecanismo de la reacción de Apple.

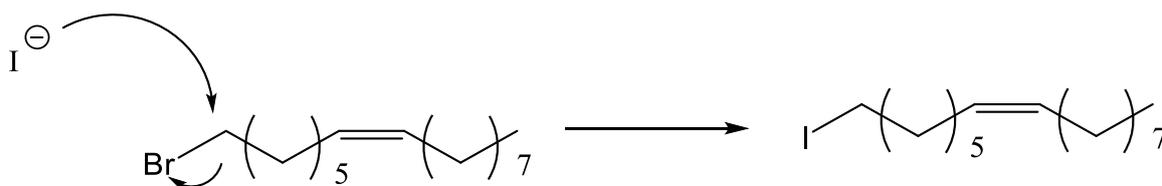
6.2.2 Síntesis de Williamson

La metodología empleada para la incorporación del ácido graso monoinsaturado al derivado de glicerol se basó en la formación in situ del alcóxido en presencia hidruro de sodio y posteriormente se le hizo reaccionar con el bromuro (3) con (8) en presencia de un KI como sal catalizadora tal y como se muestra en el **esquema 29**. El producto se aisló como un aceite de color amarillo con un rendimiento de 15% para (9) y del 42% para el (10).



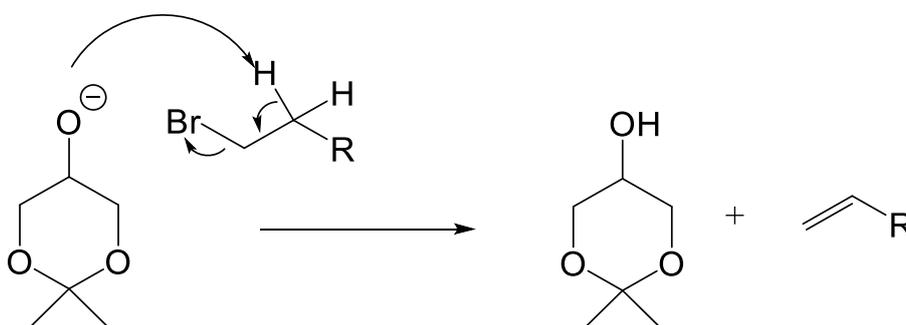
Esquema 29 : Reacción de Williamson para el bromuro de acilo.

La presencia de yoduro de potasio en la reacción es interesante debido a que el yodo desplaza al átomo de bromo formándose el yoduro, el cual es más reactivo frente a un nucleófilo como el alcóxido debido a que el yodo es mucho mejor grupo saliente que el bromo (**Esquema 30**).



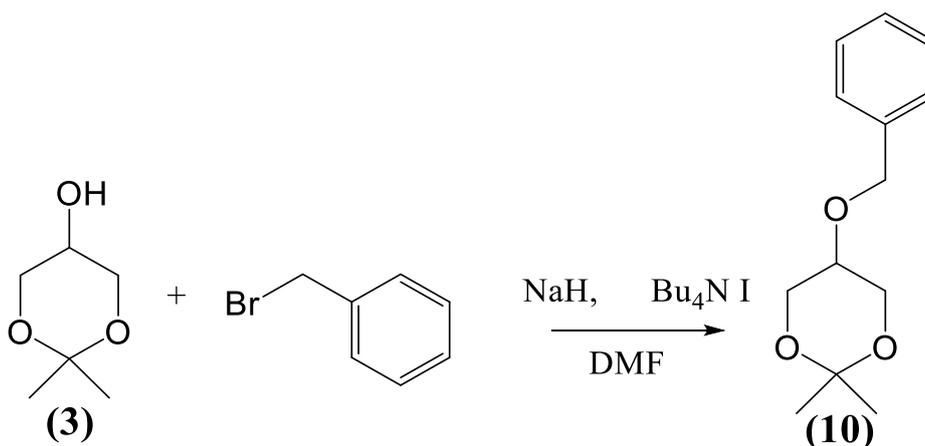
Esquema 30 : Sustitución nucleófila de un bromo por un yodo.

En este caso, debido a que el bromuro derivado del ácido graso adicionado es primario, la reacción de eliminación compite con el acoplamiento de este al derivado de glicerol por lo que el rendimiento de esta reacción es muy bajo tal y como se ha indicado previamente (**Esquema 31**).



Esquema 31: Eliminación del bromo por acción de una base.

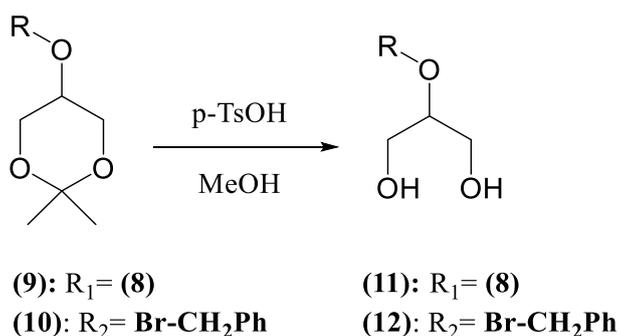
Esta reacción se repitió utilizando bromuro de bencilo comercial debido a que el producto (**8**) se acabó y no fue posible volver a sintetizarlo. La metodología empleada para la incorporación del bromuro de bencilo al derivado de glicerol es totalmente análoga a la que se utilizó para la incorporación del ácido graso salvo que se utilizó tetrabutilamonio como sal catalizadora (**Esquema 32**). El producto se aisló como un aceite de color amarillo con un rendimiento del 42% para el (**10**).



Esquema 32: Reacción de Williamson para el bromuro de bencilo.

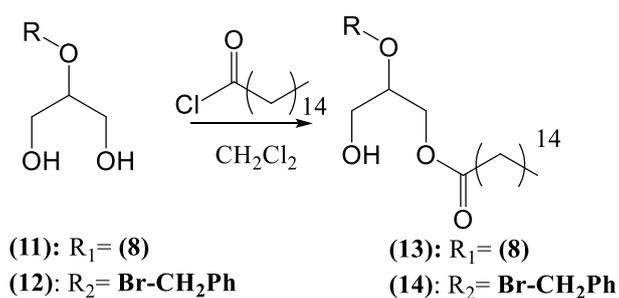
6.2.3 Acoplamiento del ácido palmítico

Para que el acoplamiento del ácido palmítico sea posible, en primer lugar, hay que realizar la desprotección de las posiciones sn-1 y sn-3 las cuales se encuentran como acetal. Para ello, la metodología empleada para realizar la desprotección se basó en tratamiento en condiciones suaves con ácido p-toluensulfónico en metanol (**Esquema 33**). Un aceite amarillento con un rendimiento del 54 % para (**11**) y del 61% para (**12**).



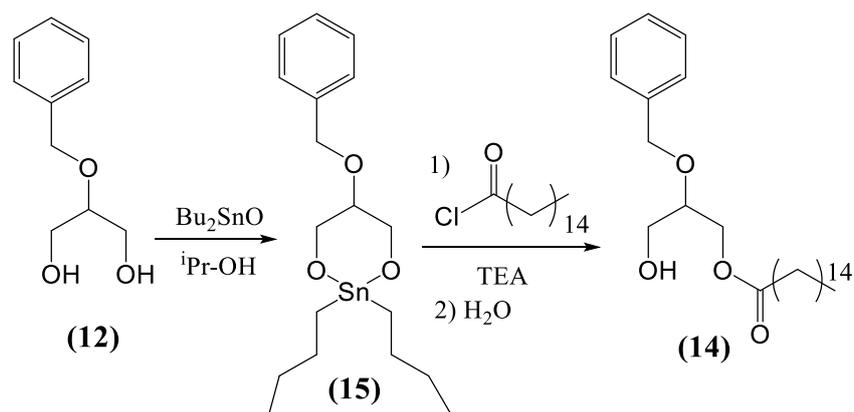
Esquema 33: Reacción de desprotección.

Debido a que los compuestos (**11**) y (**12**) tienen dos posibles hidroxilos a los que se puede incorporar ácido palmítico fue necesario controlar las condiciones de reacción para que no se diese la diacilación de manera mayoritaria. Para ello se hizo reacción cloruro de palmitoilo con el compuesto con cada uno de los compuestos (**11**) y (**12**) en proporción (1:2) en DCM en presencia de TEA (**Esquema 34**). El producto se aisló tras purificación por columna como un aceite marrón con un rendimiento del 10% para el producto (**14**) y en el caso de (**13**) no se pudo calcular el rendimiento.



Esquema 34: Reacción de incorporación del ácido palmítico.

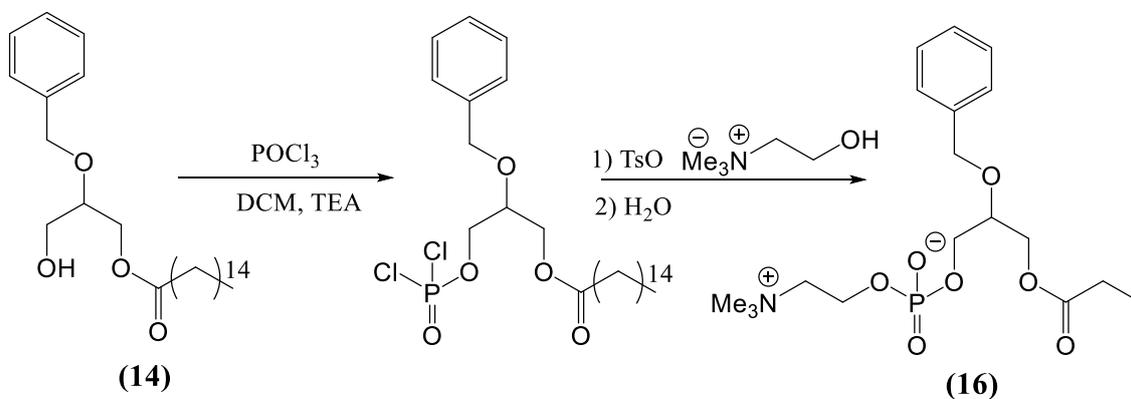
Adicionalmente se realizó una prueba con óxido de dibutil estaño para comprobar si la monoacilación con ácido palmítico ocurre de manera más favorable. La metodología empleada se basó en hacer reaccionar DBTO con el compuesto (**12**) y seguidamente la adición del cloruro de palmitoilo en presencia de TEA (**Esquema 35**). Por desgracia este método no resultó eficaz ya que no se consiguió hacer reaccionar el estanileno acetal con el cloruro de palmitoilo.



Esquema 35: Formación, con DBTO, del estanileno acetal y posterior reacción e hidrólisis para dar el producto final.

6.3 Síntesis de fosfatidilcolina

El acoplamiento final del fosfato y la colina solo se pudo probar con el compuesto **(14)** debido a limitación de tiempo y de producto **(13)**. La metodología empleada se basó en la preparación in situ del fosfato derivado del glicerol al cual, posteriormente, se hace reaccionar con tosilato de colina en presencia de TEA para dar el producto final (**Esquema 36**). Debido a que el agente fosforilante, oxiclorigerato de fósforo, es sensible al aire, se llevó a cabo la reacción en condiciones anhidras. El producto final no se pudo ni aislar ni identificar por RMN por lo que se desconoce si la reacción se produjo.



Esquema 36: Esquema sintético de la obtención de la fosfatidilcolina final **(16)**.

7. CONCLUSIONES

- Se ha conseguido poner a punto un método rápido y eficaz para la síntesis del ácido (Z)-7-hexadecenoilo.
- Se ha conseguido la inserción del ácido graso y de bromuro de bencilo en el intermedio 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ol pero con rendimientos bajos por lo que será necesario la optimización del método.
- Se ha conseguido la inserción cloruro de palmitoilo en los intermedios **(11)** y **(12)** con rendimientos bajos por lo que será necesario la optimización del método.
- La inserción de la fosfocolina no ha sido exitosa ya que no se ha dispuesto del suficiente tiempo para poner a punto la reacción.

8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

8.1 Consideraciones principales

Todas las reacciones se han realizado en matraces esféricos de una o dos bocas y, las reacciones que lo necesitaron, bajo atmósfera de argón.

Todos los reactivos, así como los disolventes empleados, han sido adquiridos en diferentes casas comerciales como Sigma Aldrich, Apollo Scientific, Carbosynth o Acros Organics. En el caso de necesitar disolventes secos, estos se prepararon en el laboratorio empelado tamices moleculares bajo atmósfera de argón o se adquirieron de manera comercial.

8.2 Caracterización de compuestos

8.2.1 Resonancia magnética nuclear

Los experimentos de RMN fueron realizados en los espectrómetros de 400 MHz de Agilent Technologies y Aligent DD2 500 MHz ubicados en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. Los disolventes deuterados que se emplearon para realizar dichos espectros fueron adquiridos de manera comercial. Alguno de ellos fue empleado seco, utilizando zeolitas, y almacenados en matraces Schlenk bajo nitrógeno. Los tubos de RMN que se emplearon fueron de vidrio y de 5 mm de sección, y cuando fue necesario se utilizaron tubos Young de vidrio de la misma sección que los anteriores

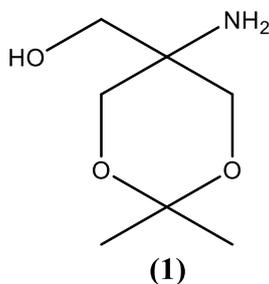
Los desplazamientos químicos (δ) de los núcleos se representan en partes por millón (ppm). La multiplicidad de las señales se representa de acuerdo con la abreviación estándar s=singlete, d=doblete, t=tripleto, dd=doblete de dobletes, dt=doblete de tripletes, m=multiplete, br=señal ancha. Las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz. Todos los espectros fueron analizados mediante el software MestreNova x64.

8.2.2 Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo fueron realizados por el epectrómetro ATR, Bruker Tensor-27 ubicado en el Aulario de Ciencias de la Universidad de Valladolid. Las muestras que se utilizaron estaban en estado líquido (aceites). Las frecuencias de vibración vienen representadas como numero de onda $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}).

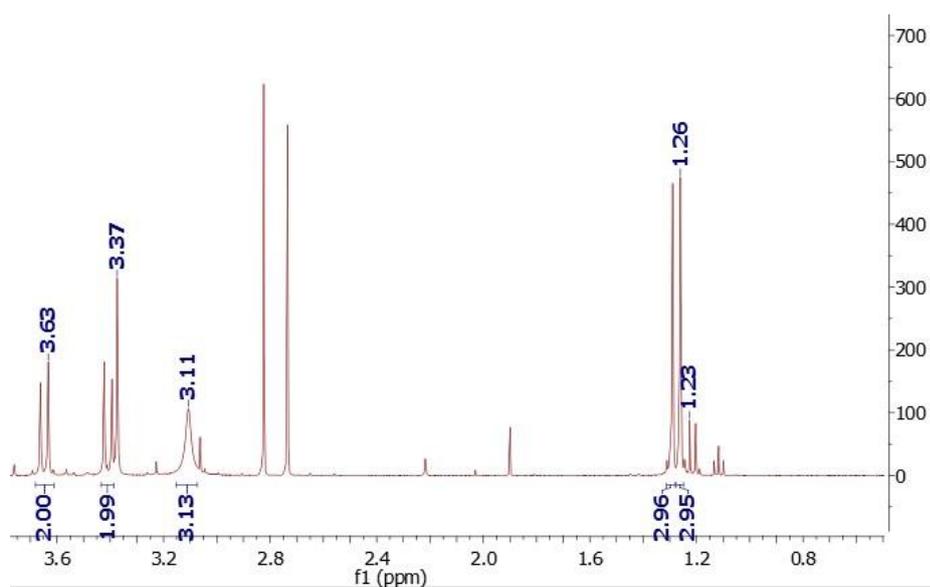
8.3 Síntesis de intermedios precursores de glicerol

8.3.1 Síntesis de (5-amino-2,2-dioxan-5-il) metanol (1)

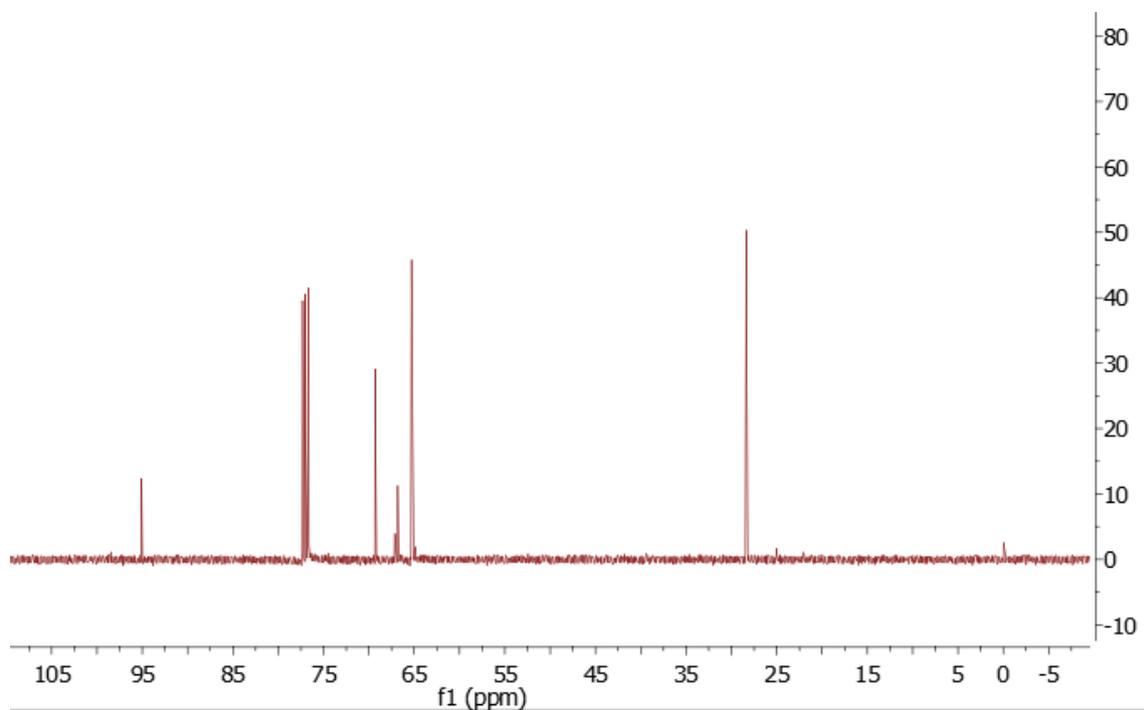


Se añadió, a una disolución de TRIS HCl Trizma (80 g, 0.51 mol, 1.0 eq.) en 160 mL DMF, ácido p-toluensulfónico (4.8 g, 25mmol) y 2,2-dimetoxipropano (82.5 g, 0.79 mol, 1.2 eq) y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 18h. Pasado dicho tiempo se añadió TEA (4mL) y se eliminó el disolvente dando lugar a un residuo de textura viscosa. El residuo de disolvió en una mezcla de TEA (60 mL) y acetato de etilo (1000 mL) y se dejó agitando durante 30 min dando lugar a un precipitado blanco el cual se filtró por gravedad. La reacción se puede seguir por TLC empleando como eluyente Heptano/AcOEt (2:1) con un $R_f = 0.3$. Por último, se elimina el disolvente y se seca a vacío dando lugar a un aceite incoloro (73.1 g 90.1 % de rendimiento).

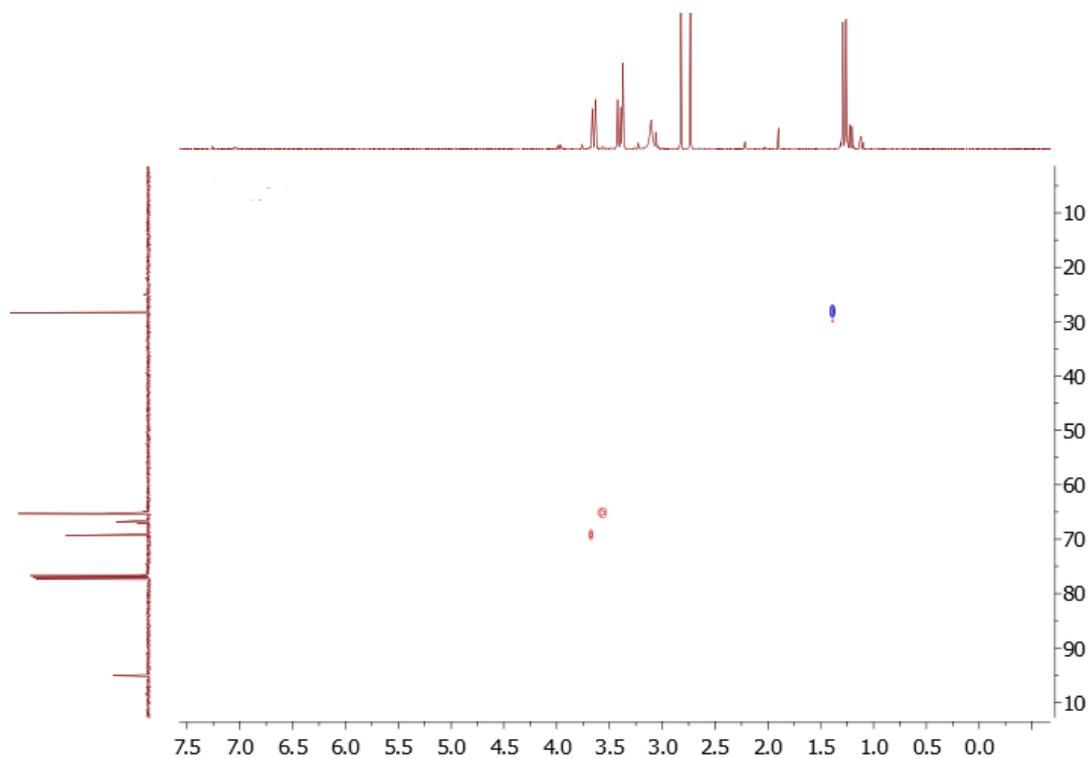
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.63 (d, $J=10.2$ Hz, $-\text{OCH}_2-$, 2H), 3.40 (d, $J=10.2$ Hz, $-\text{OCH}_2-$, 2H), 3.37 (s, $\text{HO}-\text{CH}_2$, 2H), 3.11 (s, $-\text{NH}_2$ y OH , 3H), 1.26 (s, CH_3 , 3H), 1.23 (s, $-\text{CH}_3$, 3H).



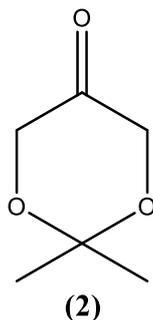
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 94 (O-C-O), 70.1 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 66.2 (C-NH $_2$), 65.2 (C-O-CH $_2$), 28.5 (-CH $_3$)



HSCQ (DCCl_3):

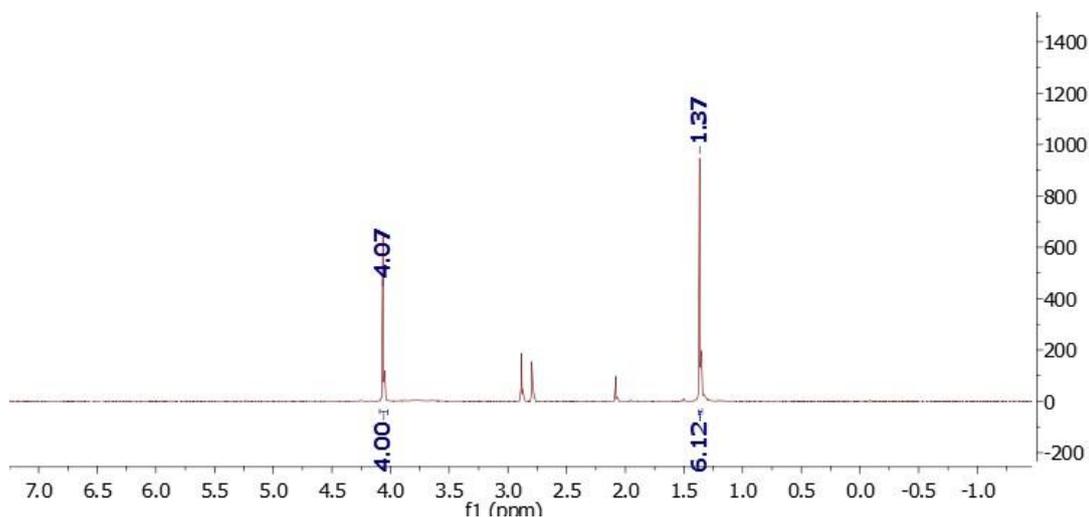


8.3.2 Síntesis de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ona (2)

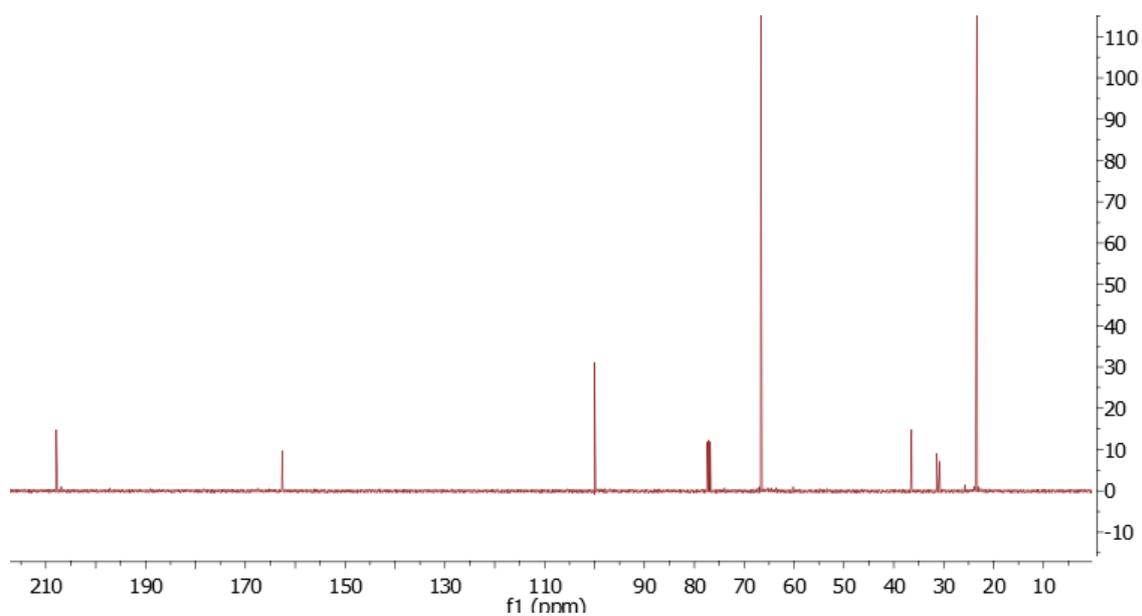


Se añadió 1500 mL de una disolución de NaIO_4 (109.2 g, 0,51 mol, 1 eq) sobre una disolución de KH_2PO_4 (70 g, 0.51 mol, 1 eq) y de (1) (81 g, 0.51 mol, 1 eq) en 1600 mL de agua a 0°C . La disolución se dejó agitando 3 horas a 0°C y el resto de día a temperatura ambiente. Tras dicho tiempo se añadió $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (127 g, 0.51 mol, 1 eq). La reacción se siguió por TLC con eluyente Heptano/ AcOEt (5:1) con un $R_f=0.6$. Cuando la reacción el producto se extrajo con DCM (3 x 500 mL), se combinaron las fases orgánicas y se lavaron con NaCl y se secaron con MgSO_4 . Se eliminó el disolvente y se obtuvo un aceite naranja oscuro (54.4 g, 82% de rendimiento)

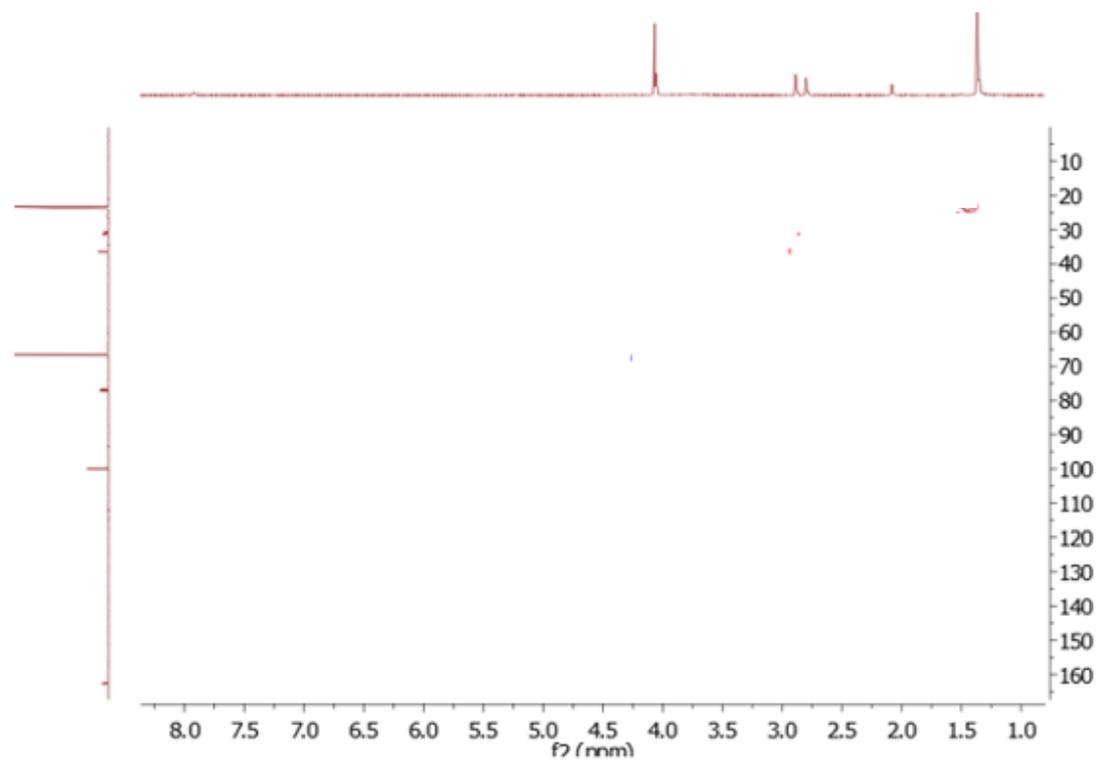
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4.07 (s, $-\text{CH}_2-$, 4H), 1.37 (s, CH_3 , 6H)



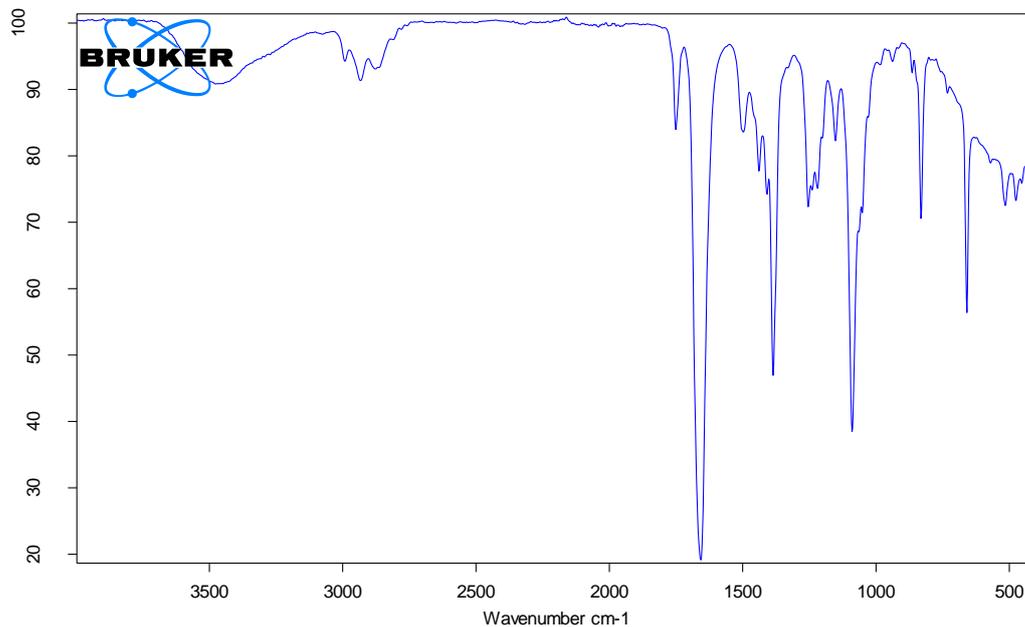
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 207.3 (C=O), 99.8 (C-O-C), 67.1 (O-CH₂), 23.7 (-CH₃)



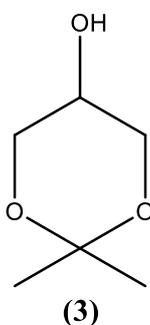
HSCQ (DCCl_3):



IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 1651 (C=O v)

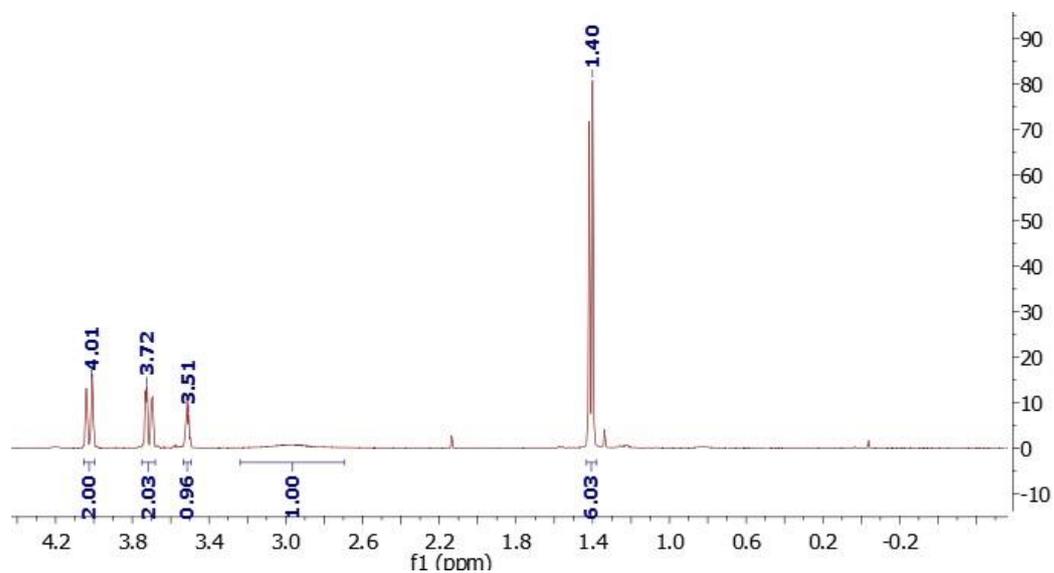


8.3.3 Síntesis de 2,2-dimetil-1,3-dioxan-5-ol (**3**)

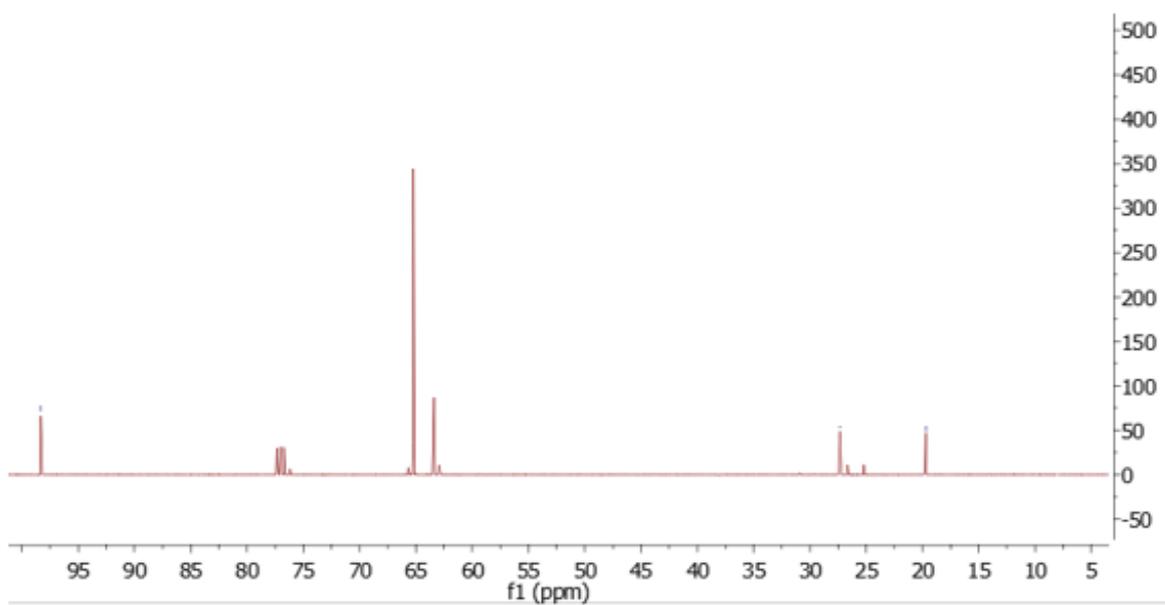


Se añadió gota a gota y a 0°C una disolución de **(2)** (12 g, 92 mmol, 1 eq) en 150 mL THF seco sobre una suspensión de LiAlH₄ (4.18 g, 0.11 mol, 1.2 eq) en 50 mL THF seco. La disolución se dejó agitando a temperatura ambiente. La reacción se siguió por TLC con eluyente Heptano/AcOEt (2:1) con un R_f=0.3. Una vez terminada la reacción se añadieron 300 mL de dietil éter, se realizó la hidrólisis X, X, 3X (4 mL de H₂O, 4 mL de NaOH al 20% y 12 mL de H₂O) a 0°C y la disolución se dejó agitando hasta la aparición de un sólido blanco (Al(OH)₃). A continuación, se filtró la disolución, se secó con MgSO₄ y se eliminó el disolvente dando lugar a un aceite amarillo (8.8 g, 73% de rendimiento).

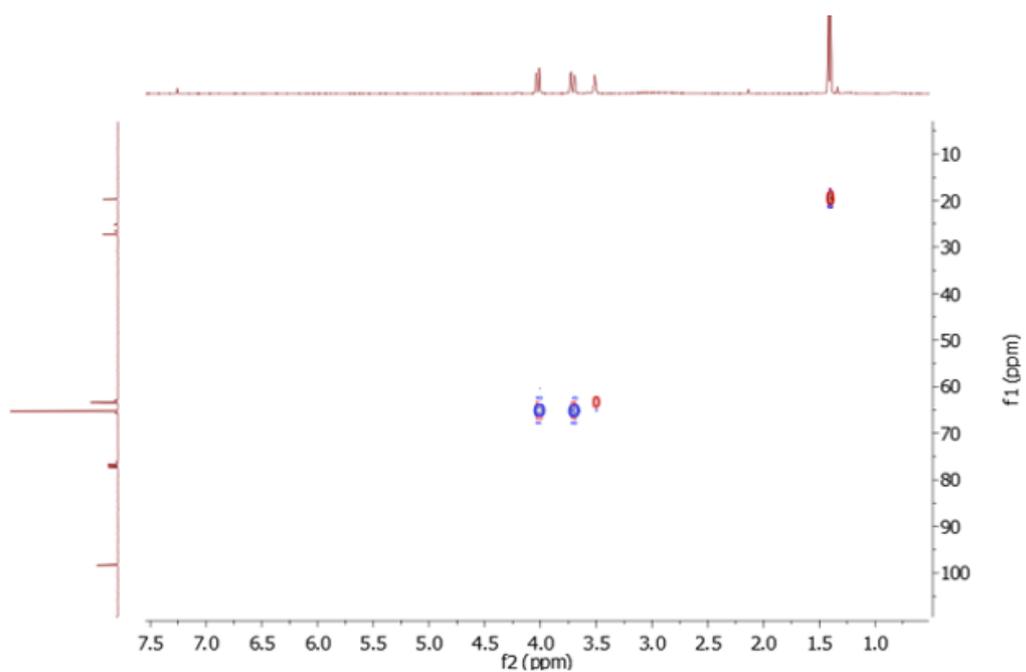
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4.01 (d, $J=10.2$ Hz, $-\text{CH}_2-$, 2H), 3.72 (d, $J=10.2$ Hz, $-\text{CH}_2-$, 2H), 3.51 (m, $-\text{CH}-$, 1H), 2.8 (s, $-\text{OH}$, 1H), 1.40 (s, $-\text{CH}_3$, 6H).



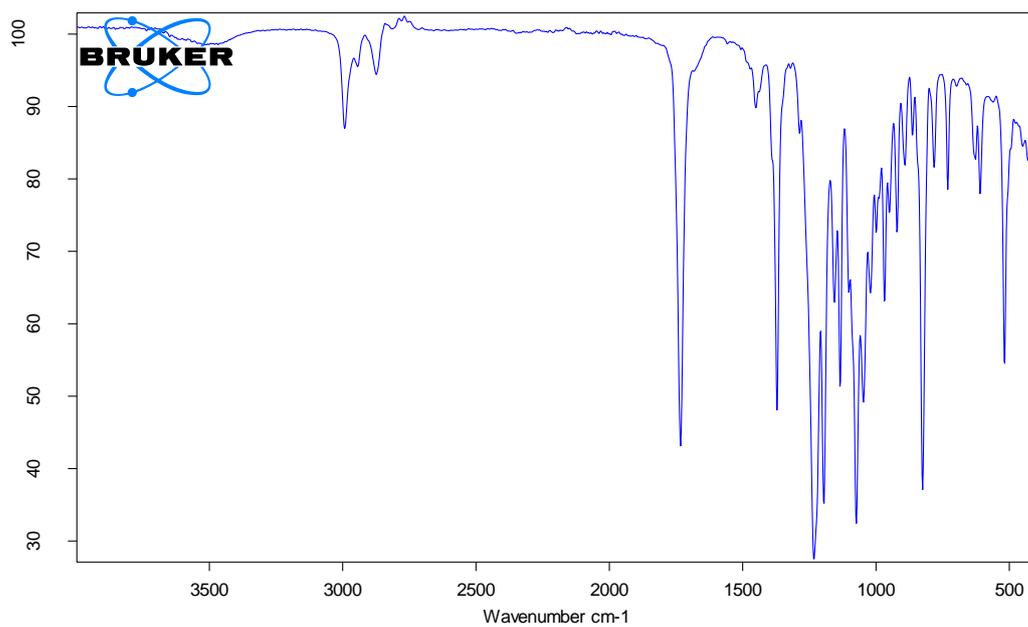
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 97.6 (C-O-C), 65.3 (O- CH_2-), 64.1 (CH-OH), 27.5 ($-\text{CH}_3$), 19.8 ($-\text{CH}_3$)



HSCQ (DCCl₃):

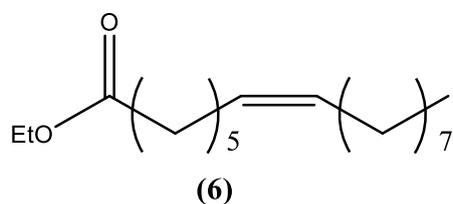


IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 3540 (-OH ν)



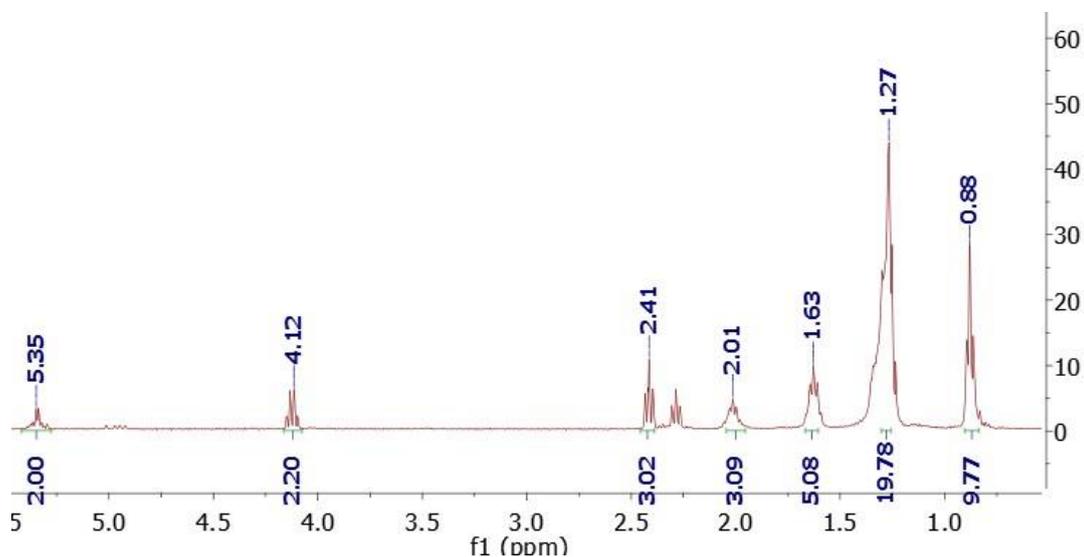
8.4 Síntesis de los derivados del ácido (Z)-7-hexadecenoico

8.4.1 Síntesis del (Z)-7-hexadecenoato de etilo (6)

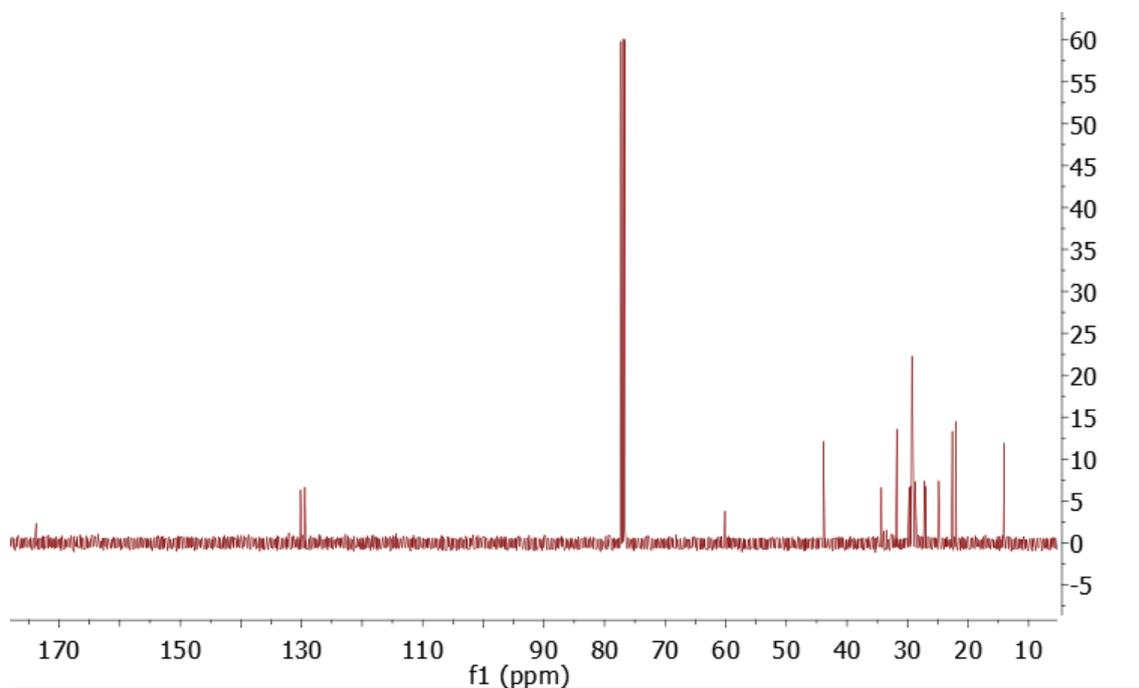


Se añadió gota a gota nonanal (5.8 mL, 30.8 mmol, 1eq) sobre una disolución del iluro de fosforo (5) (15.39 g, 30.8 mmol, 1 eq) en 400 mL de DCM. A continuación, se añadió Cs₂CO₃ (40 g, 0.12 mol, 4 eq) y la disolución se puso a reflujo durante dos días. Se pudo seguir la reacción por TLC con eluyente Heptano/AcOEt (30:1) con un R_f=0.4. Por último, se eliminó el disolvente y se purificó por columna con el eluyente anterior dando lugar a un aceite incoloro (7.46 g, 85 % de rendimiento).

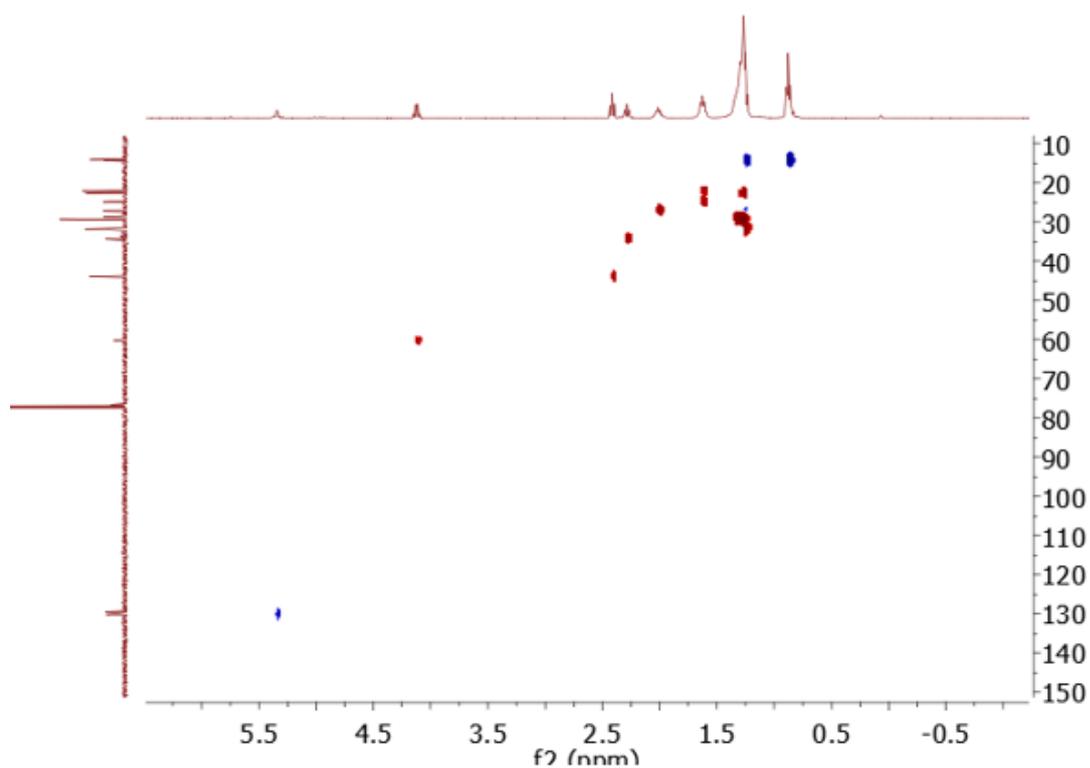
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.35 (m, CH=CH, 2H), 4.12 (m, CH₂, 2H), 2.41 (t, J=8.1, O=CH₂, 2H), 2.01 (m, CH₂-CH=CH-CH₂, 4H), 1.63 (m, O=CH₂-CH₂-, 2H), 1.27 (m, (-CH₂)₁₀, 20H), 0.87 (t, CH₃, 3H).



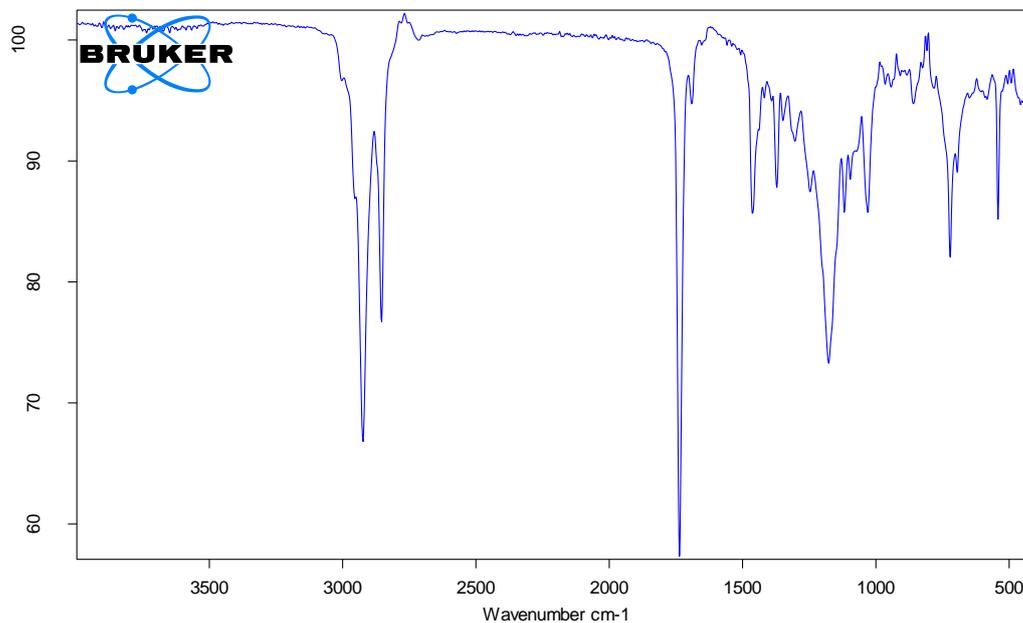
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 173.4 (O-C=O), 131.4 (-CH=), 129.8 (-CH=), 59.7 (-OCH₃), 44.7 (-OCH₃), 34.5 (O=C-CH₂-), 32.5, 30.3, 30.1, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.1, 27.7, 27.5, 14.4



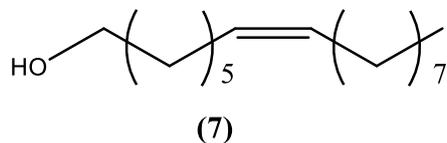
HSCQ (DCCl_3):



IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 2950 (CH=CH v), 1725 (C=O v)

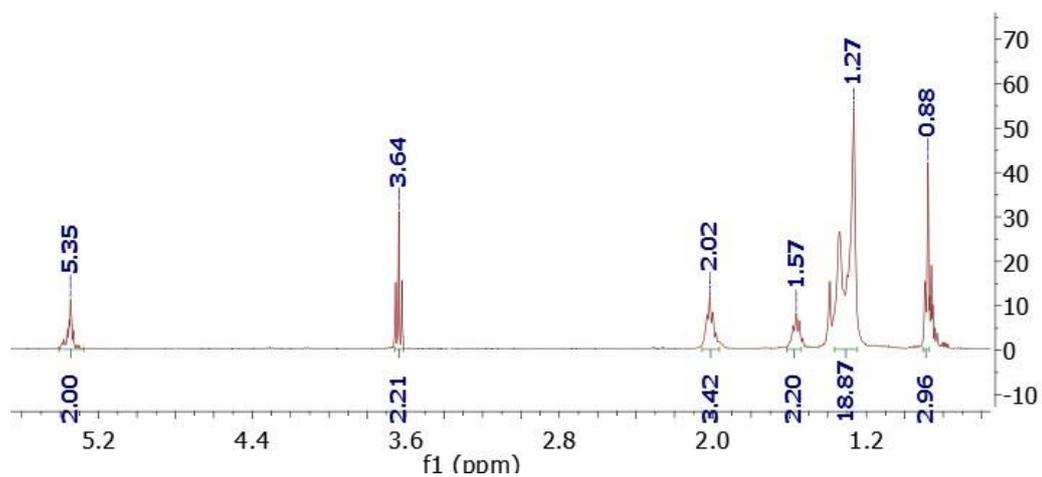


8.4.2 Síntesis del (Z)-7-hexadecenol (7)

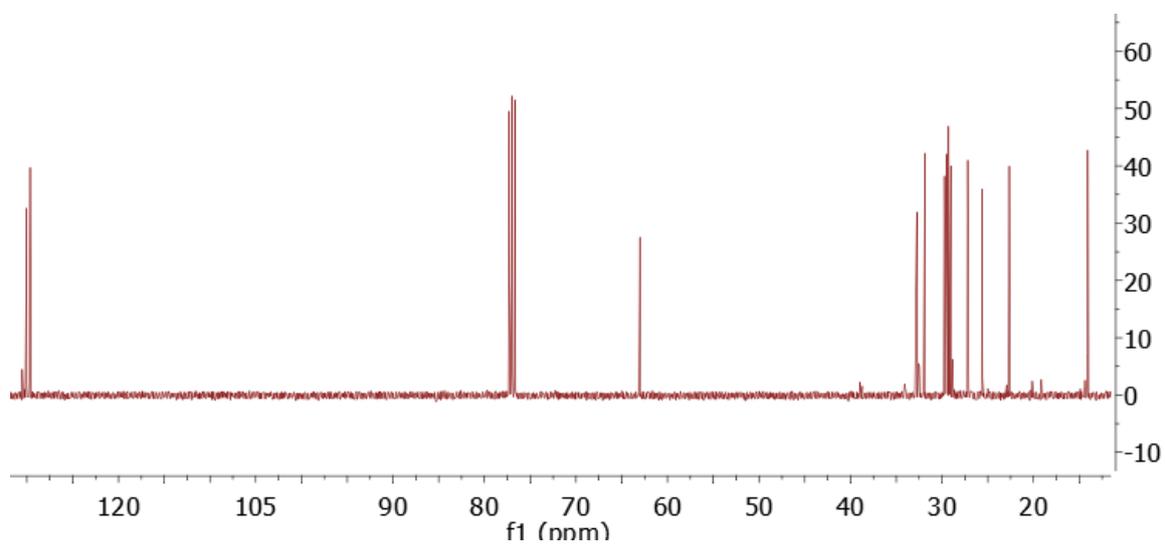


Se añadió gota a gota una disolución de (6) (4.88 g, 17 mmol, 1 eq) en 30 mL de THF seco sobre una suspensión de hidruro de aluminio y litio (1.31 g, 34 mmol, 2 eq) en 100 mL de THF seco y a 0°C. La reacción se siguió por TLC con eluyente Heptano/AcOEt (5:1) con un R_f=0.3. A continuación, se hizo la hidrólisis X, X, 3X (1.5 mL de H₂O, 1.5 mL de NaOH al 20% y 3 mL de H₂O) a 0°C y la disolución se dejó agitando hasta la aparición de un sólido blanco (Al(OH)₃). Por último, se filtró la disolución, se secó con MgSO₄, se eliminó el disolvente y se purificó por columna con el eluyente anterior dando lugar a un aceite amarillento (3.37 g, 81.6 % de rendimiento).

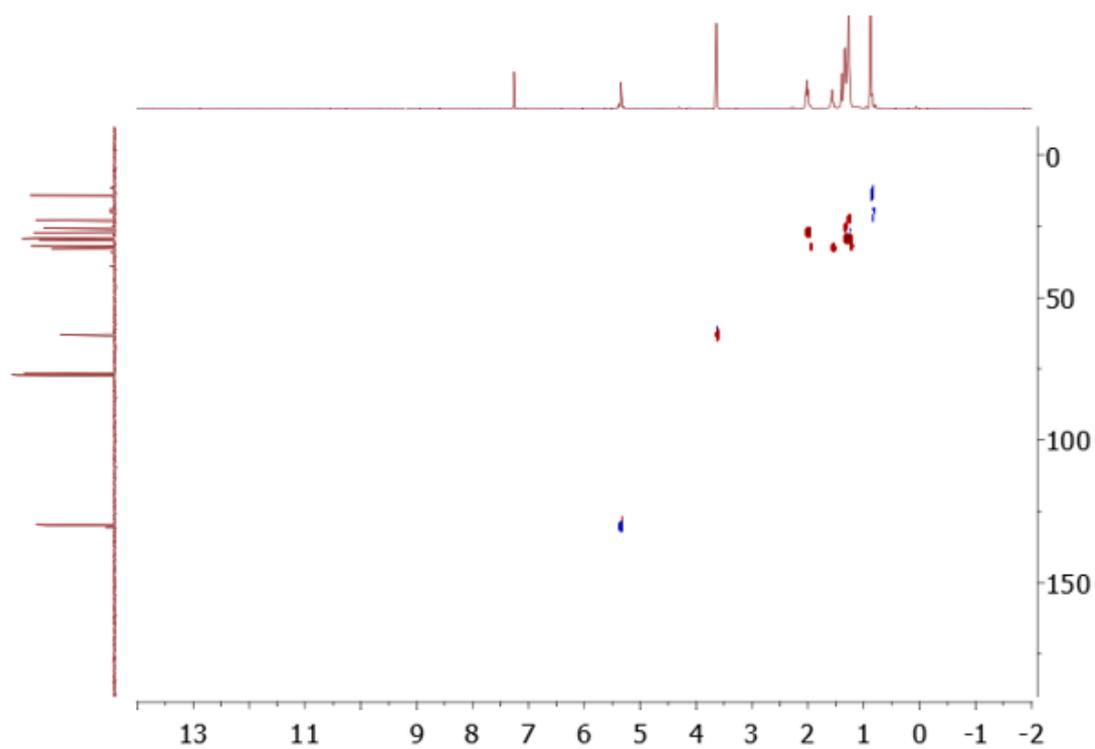
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.35 (m, CH=CH, 2H), 3.64 (t, J=6.4 Hz, -CH₂-OH, 2H), 2.02 (m, -CH₂-CH=CH-CH₂, 4H), 1.57 (m, OH-CH₂-CH₂, 2H), 1.27 (m, (-CH₂)₁₁, 22H), 0.88 (m, CH₃, 3H)



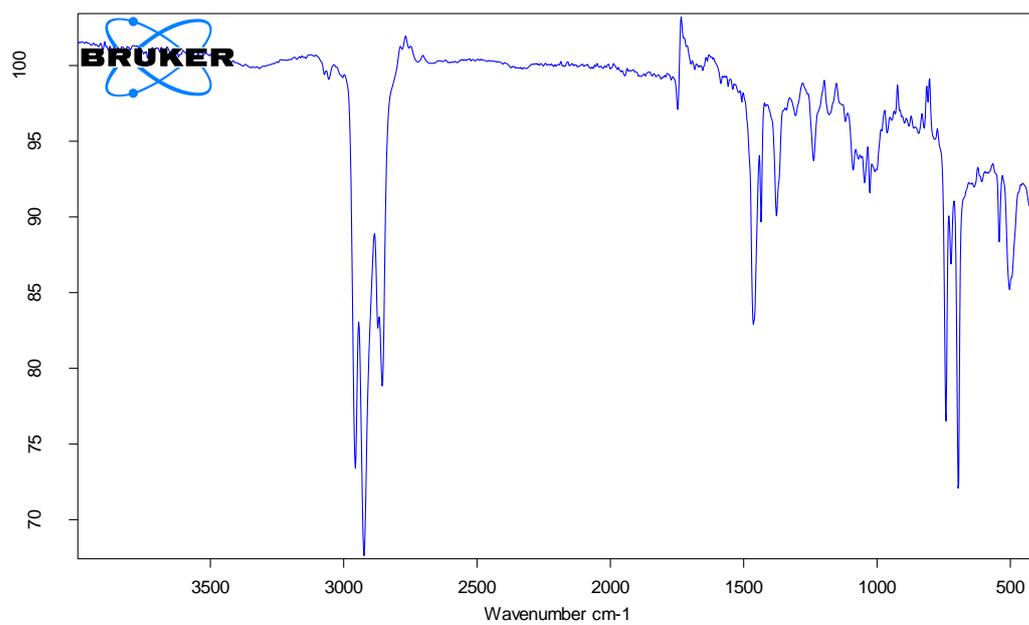
¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 129.6 (-CH=), 129.4 (-CH=), 63.2 (-CH₂-OH), 32.4, 31.7, 29.5, 29.1, 29.0, 26.8, 25.5, 22.3, 13.8



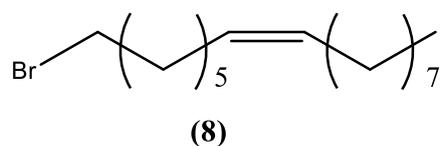
HSCQ (DCCl₃):



IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 3510 (-OH ν), 2950, 2900, 2760 (C=C-H ν)

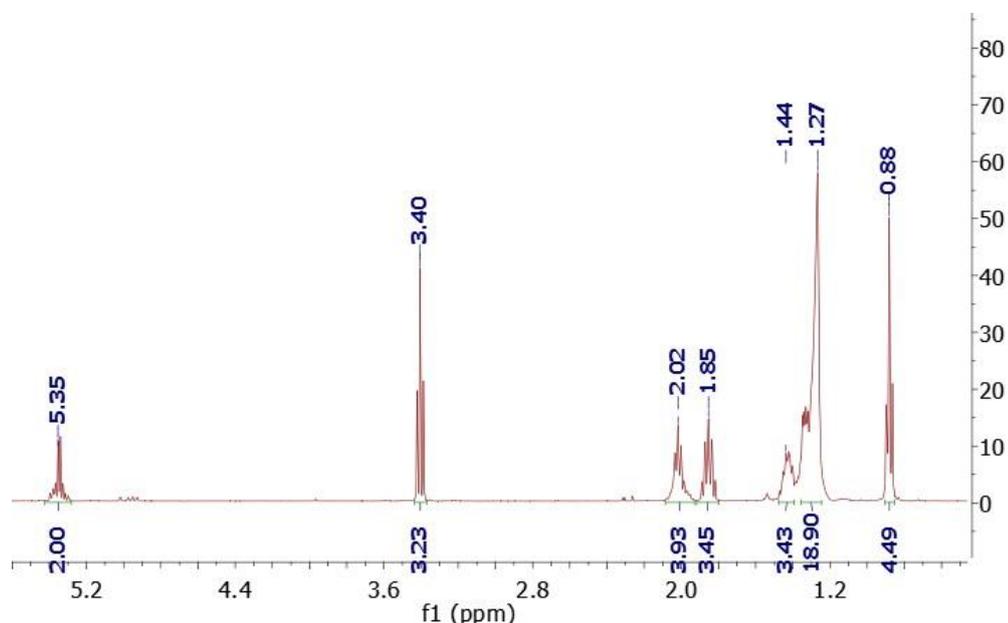


8.4.3 Síntesis del bromuro de (Z)-7-hexadecenoilo (**8**)

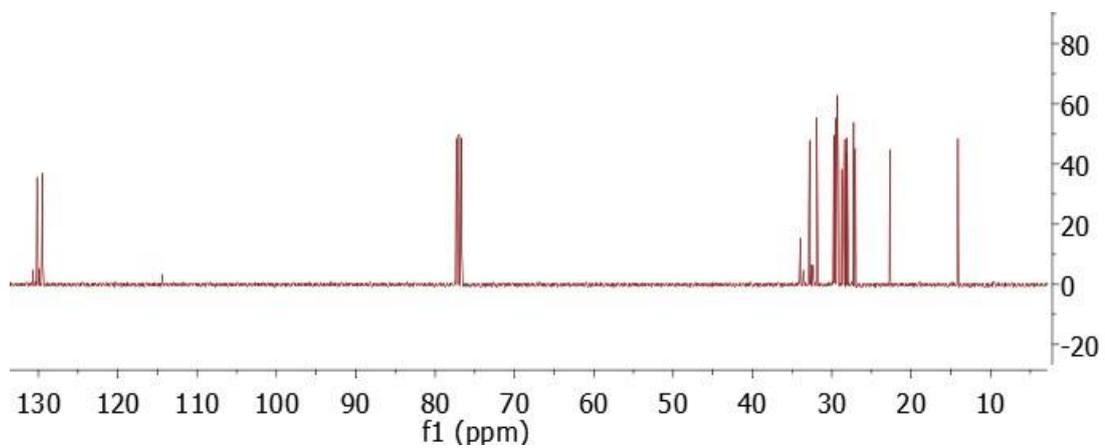


Se disolvió (**7**) (1.95g, 8.1 mmol, 1 eq) en 50 mL de THF seco y se añadió PPh₃ (3.2 g, 12 mmol, 1.5 eq), piridina (0.6 mL, 8.1 mmol, 1 eq) y CBr₄ (2.7 g, 8.1 mmol, 1 eq). La disolución se dejó agitando durante 4 horas a temperatura ambiente y se siguió la reacción por TLC utilizando heptano como eluyente con un R_f=0.6. A continuación, se extrajo el bromuro con terbutil-metil eter (3 x 20 mL) y se lava la disolución con HCl 1M (20 ml) y con una disolución saturada de NaCl (2 x 20 mL). Después, se eliminó el disolvente dando lugar a un sólido rojizo el cual se trituroó ciclohexano (3 x 20 mL). La disolución se filtró por gravedad, se concentró y se purificó por columna usando como eluyente heptano dando lugar a un aceite incoloro (1.70 g, 69.1% de rendimiento).

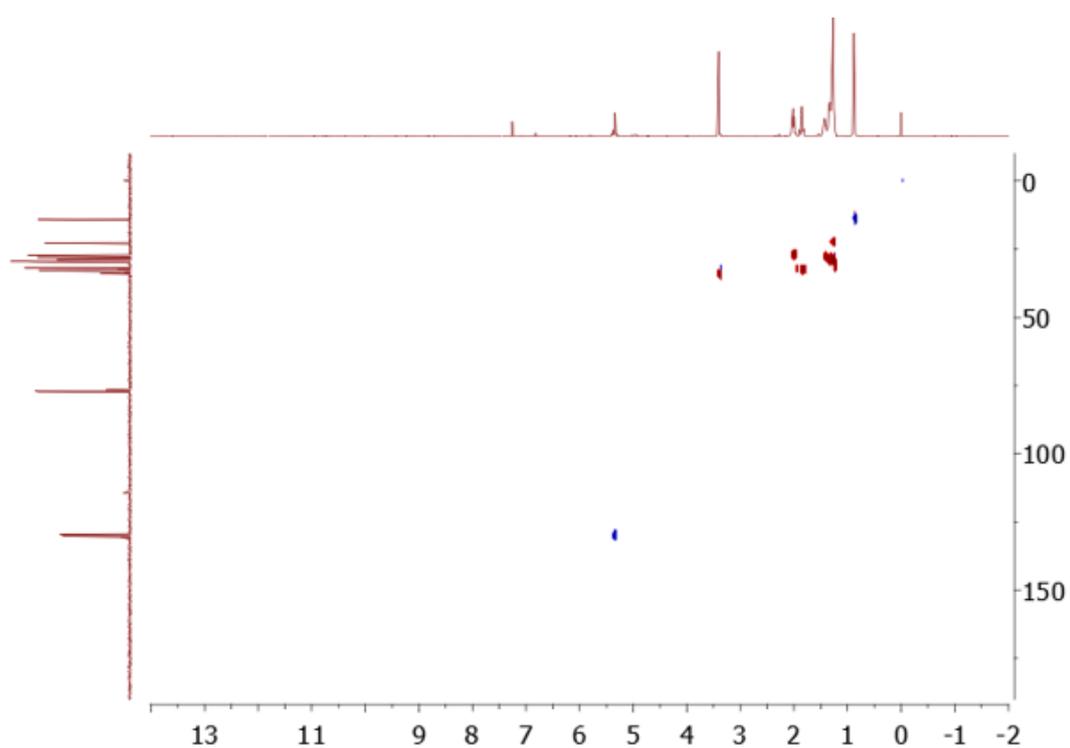
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.35 (m, CH=CH, 2H), 3.40 (t, J=6.8 Hz, -CH₂Br, 2H), 2.02 (m, CH₂-CH=CH-CH₂, 4H), 1.85 (m, Br-CH₂-CH₂, 2H), 1.44 (m, Br-CH₂-CH₂-CH₂, 2H), 1.27 (m, (-CH₂)₁₁, 20 H), 0.88 (t, J=7.1, -CH₃, 3H)



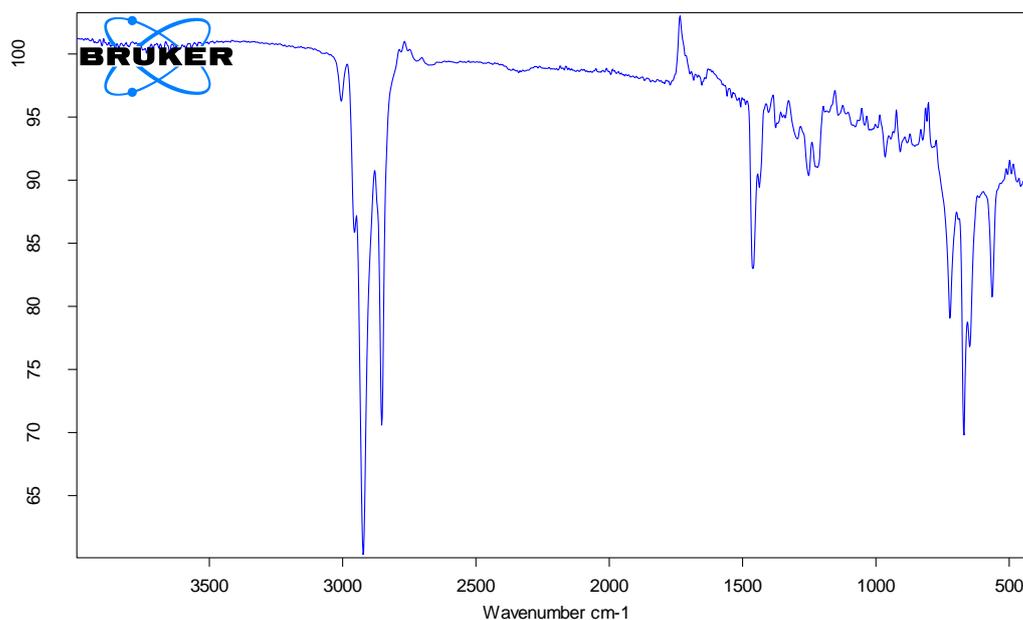
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 131.1 (-CH=), 129.8 (-CH=), 34.5 (-CH₂-Br), 32.8, 31.9, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 29.2, 28.9, 28.1, 27.3, 22.8, 13.8



HSCQ (DCCl_3):

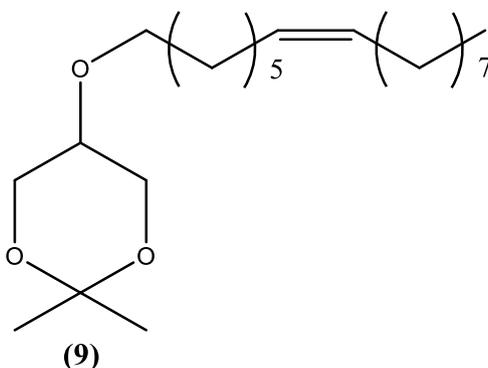


IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 2950, 2900, 2760 (C=C-H v)



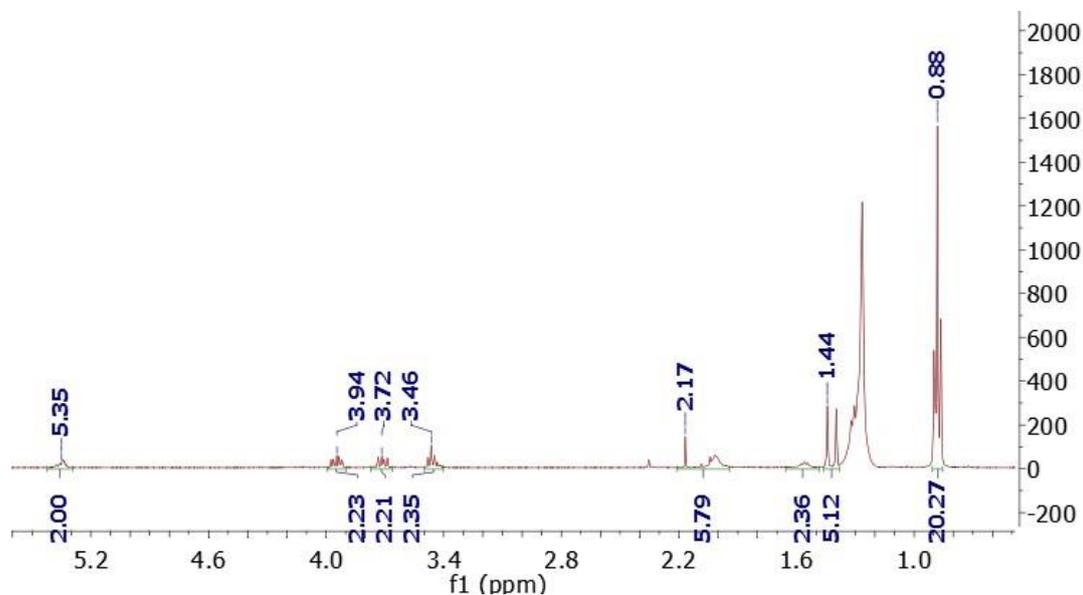
8.5 Incorporación de los ácidos grasos y bromuro de bencilo al derivado de glicerol.

8.5.1 Síntesis de (Z)-5-(hex-3-en-1-iloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano (9)

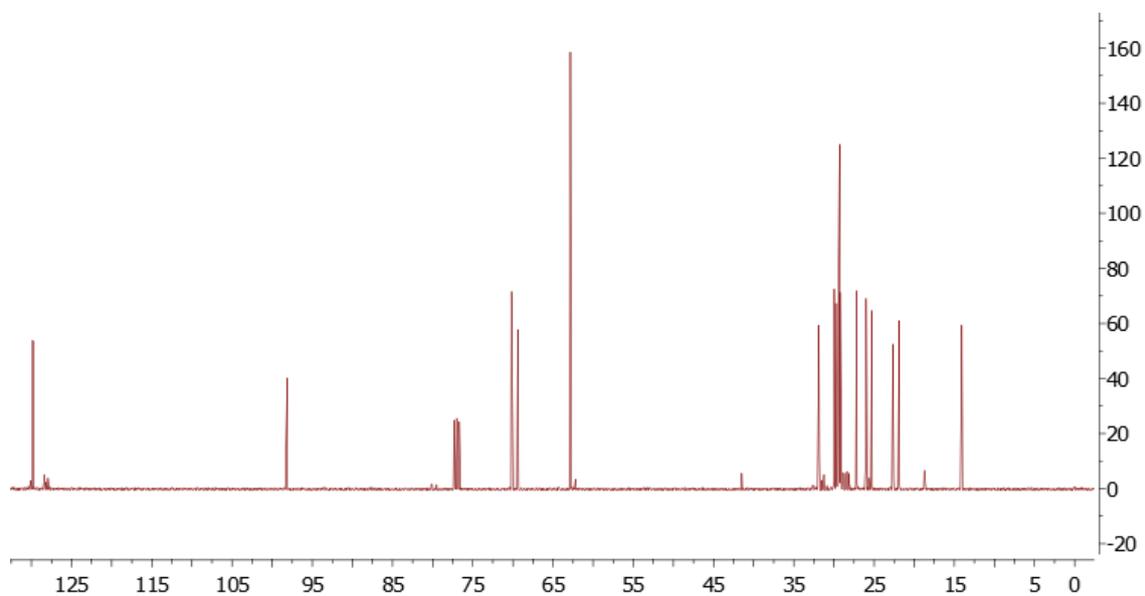


Se añadió 5 ml gota a gota una disolución de **(3)** (0.74 g, 5.6 mmol, 1 eq) en 15 mL DMF seca sobre una suspensión de hidruro de sodio (0.2 g, 8.4 mmol, 1.5 eq) y yoduro de potasio (1.11 g, 6.7 mmol, 1.2 eq) en el mismo disolvente y se calentó durante 20 minutos. Tras el tiempo indicado, la disolución se enfrió y se la añadió gota a gota y a 0°C una disolución de **(8)** (1.70 g, 6.6 mmol, 1 eq). La disolución se pone a refluxo durante 30 minutos. Se puede seguir la reacción por TLC con eluyente Heptano/AcOEt (20:1). Cuando la reacción terminó, se quitó la mayor parte de disolvente, se añadió AcOEt y se lavó con una disolución saturada de NaCl (2 x 10 mL), una disolución saturada de NaCO₃ (3 x 10 mL) y se secó con MgSO₄. Por último, se concentró y el producto se purificó mediante columna utilizando el anterior eluyente como fase móvil asilando un aceite amarillento (0.3g, 15% de rendimiento).

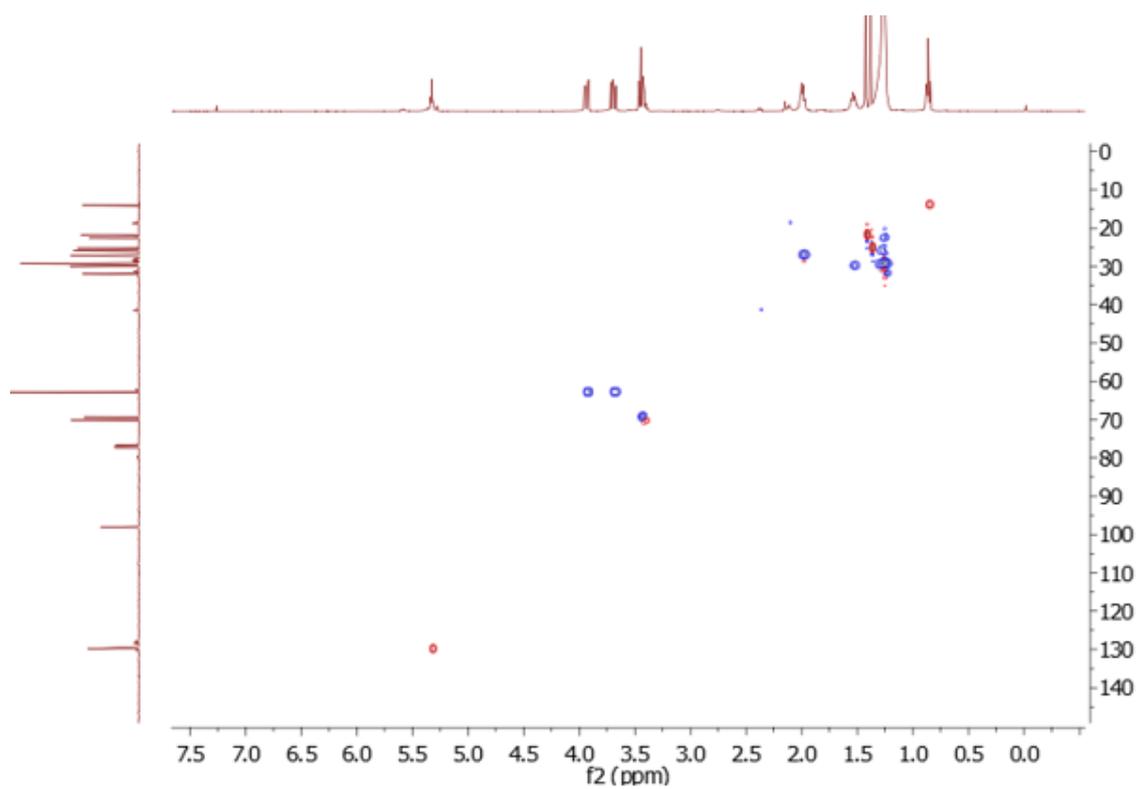
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.35 (m, $\text{CH}=\text{CH}$, 2H), 3.94 (m, $\text{O}-\text{CH}_2$, 2H), 3.72 (m, $\text{O}-\text{CH}_2$, 2H), 3.46 (m, $-\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_2$, 3H), 2.17 (m, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2$, 4H), 1.44 (s, CH_3 , 3H), 1.27 (m, $(-\text{CH}_2-)_{10}$, 20H), 0.88 (t, CH_2-CH_3 , 3H)



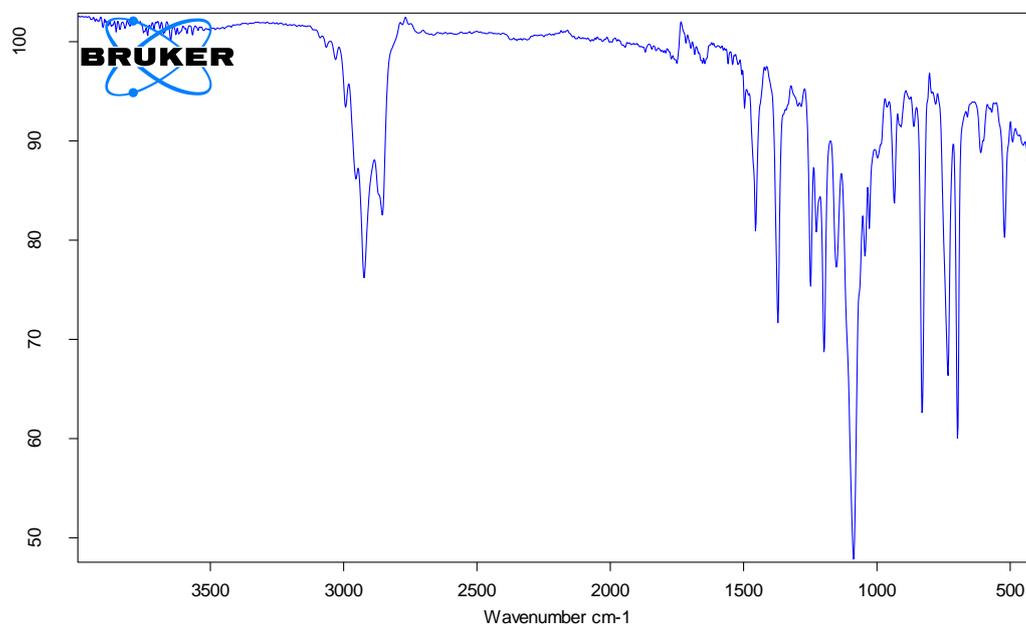
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 129.2 ($-\text{CH}=\text{}$), 128.7 ($-\text{CH}=\text{}$), 97.5 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 72.1 ($\text{CH}-\text{O}$), 69.8 ($\text{O}-\text{CH}_2$), 63.4 ($\text{CH}_2-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2$), 32.0, 30.0, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 27.0, 26.1, 22.0, 14.2



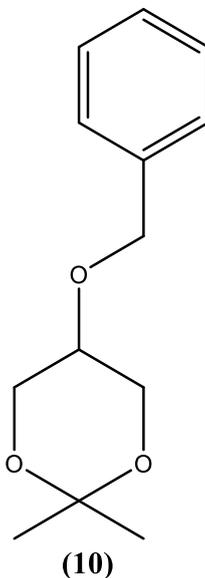
HSCQ (DCCl₃):



IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 2950, 2900, 2760 (C=C-H v)

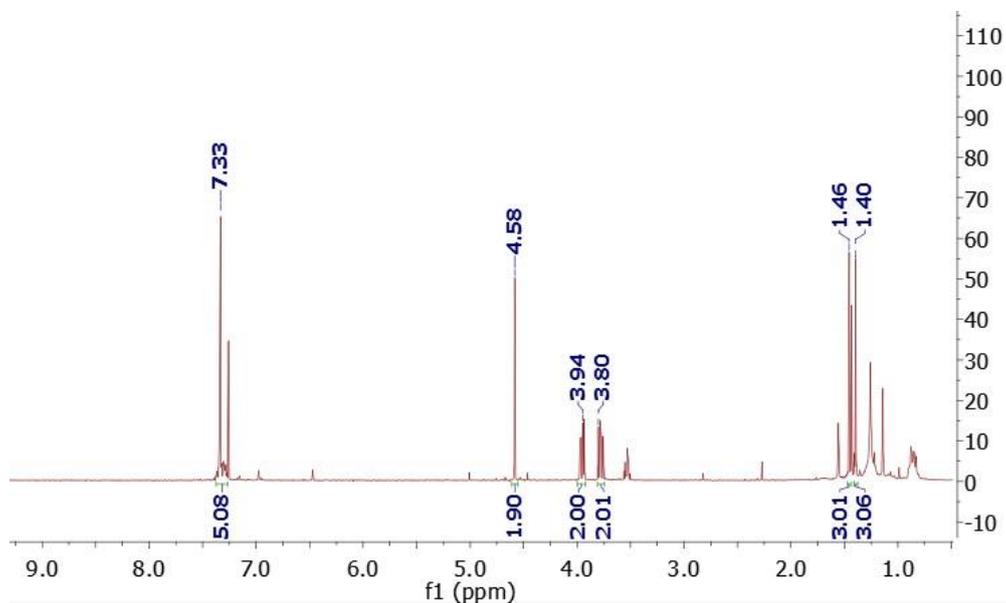


8.5.2 Síntesis de 5-(benciloxi)-2,2-dimetil-1,3-dioxano (**10**)

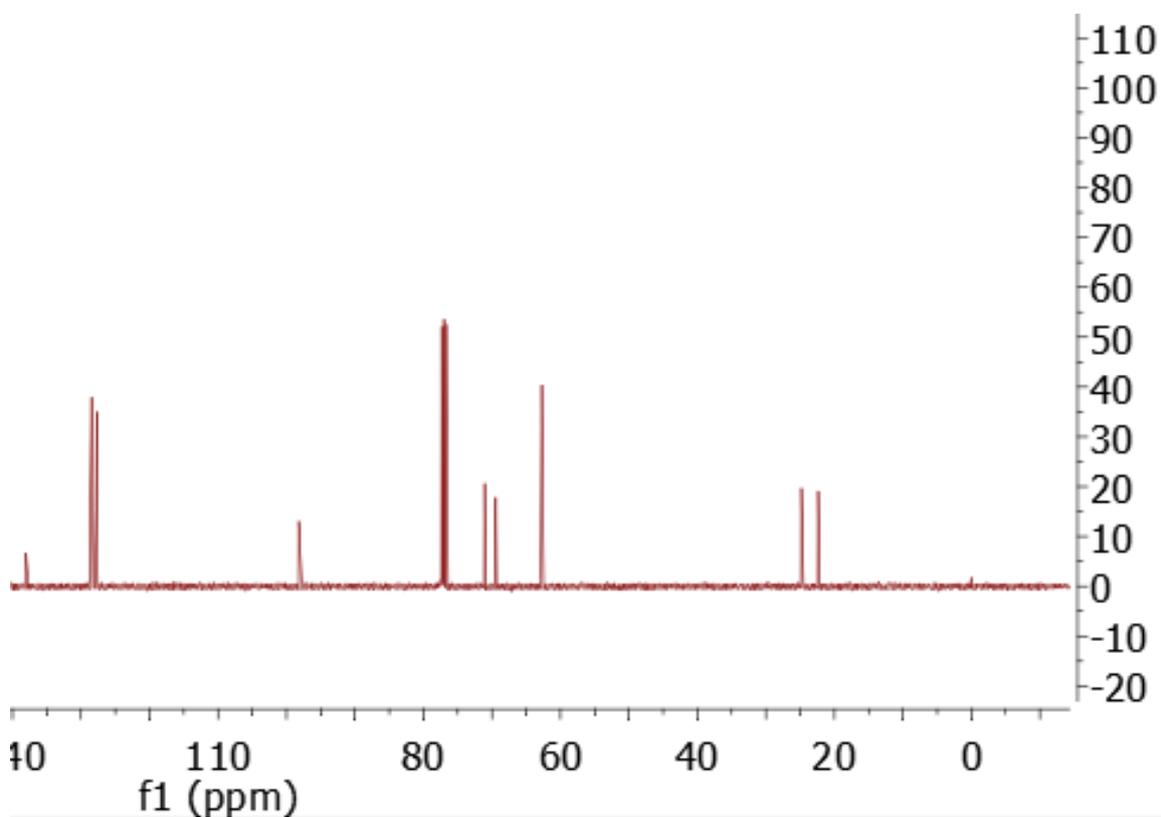


Se añadió gota a gota una disolución de **(3)** (3 g, 22.5 mmol, 1 eq) en 30 mL DMF seca sobre una suspensión de hidruro de sodio (0.7g, 27 mmol, 1.5 eq) y tetrabutilamonio (9 g, 0.0225 mol, 1 eq) en el mismo disolvente y se calentó durante 20 minutos. Tras el tiempo indicado, la disolución se enfrió y se la añadió gota a gota y a 0°C una disolución de bromuro de bencilo (3.8 g, 22.5 mmol, 1 eq). La disolución se pone a reflujo durante 30 minutos. Se puede seguir la reacción por TLC con eluyente Heptano/AcOEt (10:1). Cuando la reacción terminó, se quitó la mayor parte de disolvente, se añadió AcOEt y se lavó con una disolución saturada de NaCl (2 x 10 mL), una disolución saturada de NaCO₃ (3 x 10 mL) y se secó con MgSO₄. Por último, se concentró y el producto se purificó mediante columna utilizando el anterior eluyente como fase móvil asilando un aceite amarillento (2.1g, 42% de rendimiento).

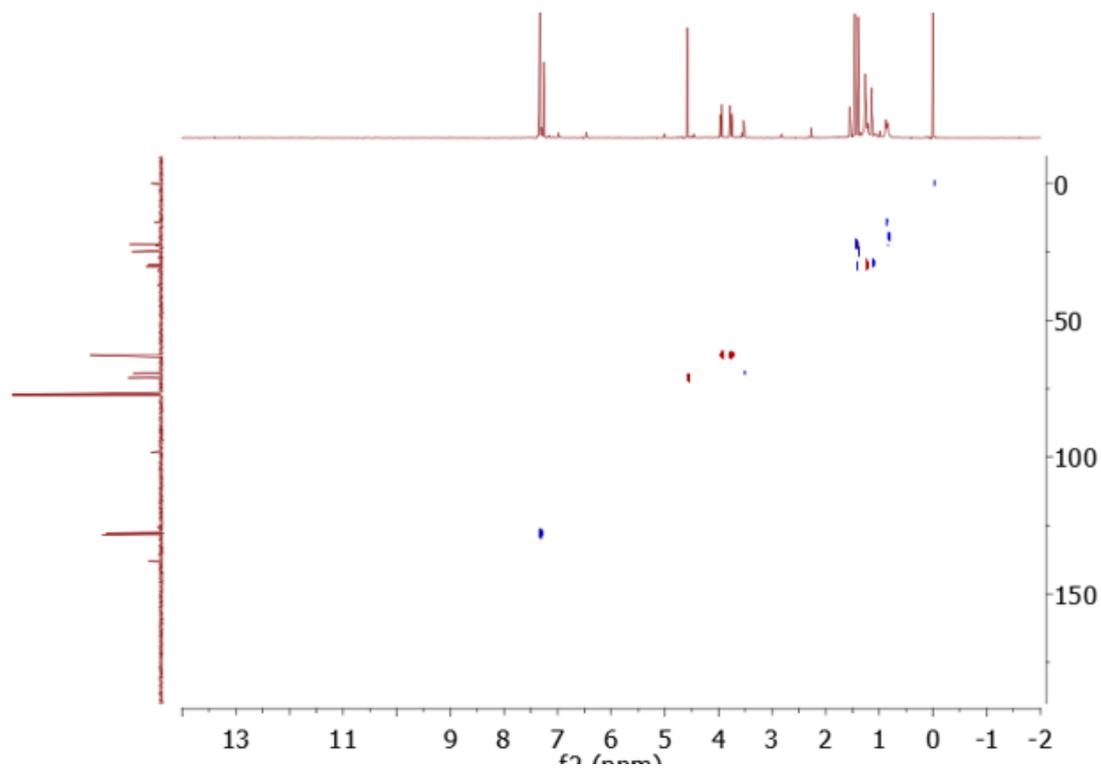
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.33 (m, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}$, 5H), 4.58 (s, $-\text{CH}_2-$, 2H), 3.94 (d, $J=10.2$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2$, 2H), 3.80 (d, $J=10.2$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2$, 2H), 1.46 (s, $-\text{CH}_3$, 3H), 1.40 (s, $-\text{CH}_3$, 3H).



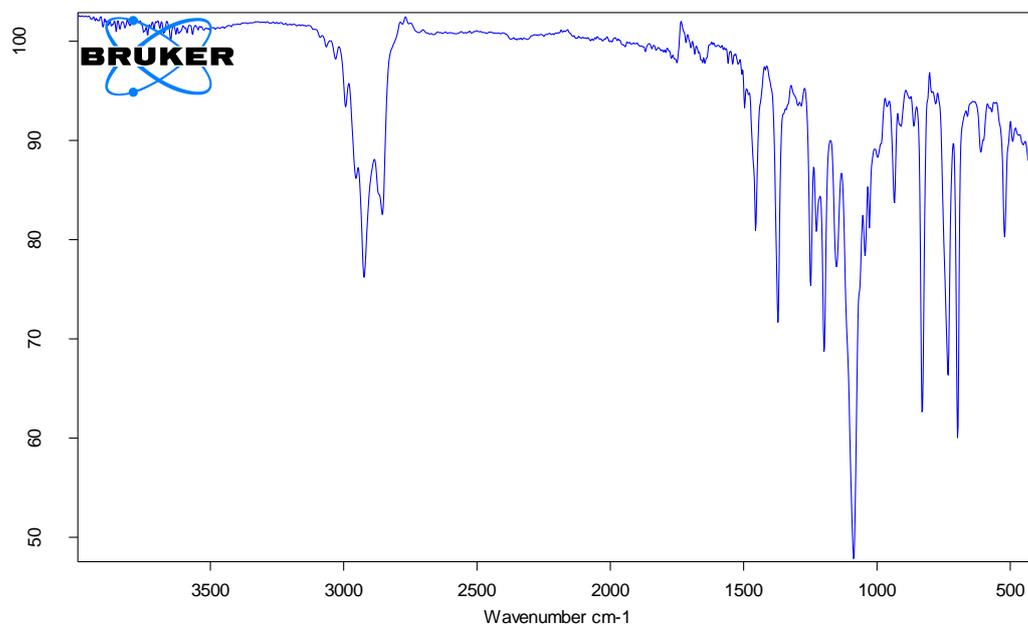
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 139.7 ($-\text{C}=\text{CH}-$), 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 128.8 ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}$), 98.3 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 71.1 ($\text{CH}-\text{O}$), 68.2 ($\text{O}-\text{CH}_2$), 62.5 ($\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2$), 25.3 ($-\text{CH}_3$), 23.6 ($-\text{CH}_3$)



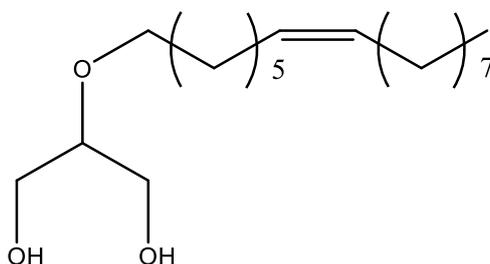
HSCQ (DCCl₃):



IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 2980 (CH=C-H v)



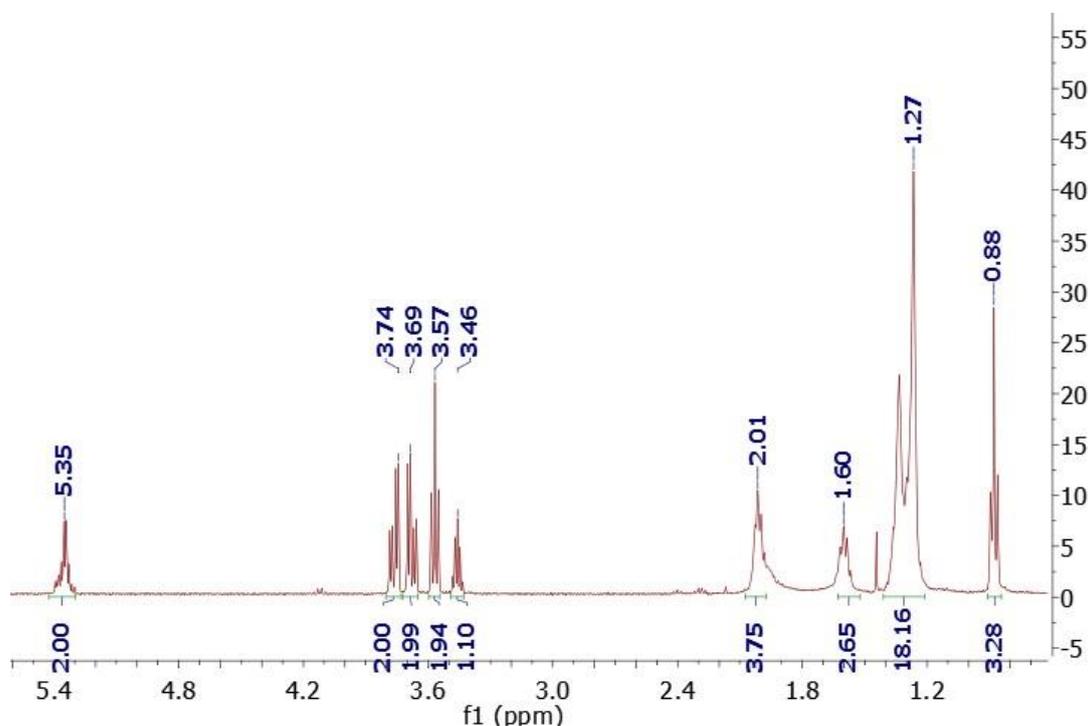
8.5.3 Síntesis de (Z)-2-(hexadec-7-en-1-iloxi) propano-1,3-diol (11)



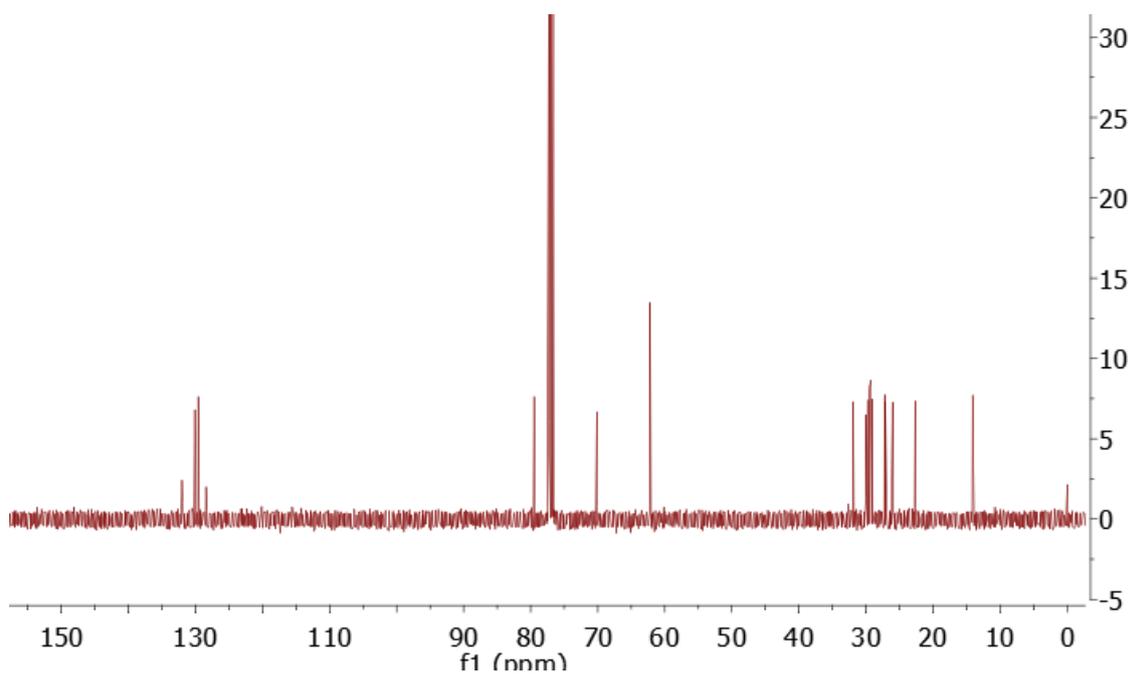
(11)

Se añadió ácido p-toluensulfónico (0.40 g, 2.25 mmol, 2 eq) sobre una disolución de (9) (0.40 g, 1.13 mmol, 1 eq) en 5 mL de MeOH. La disolución se puso a reflujo y se siguió la reacción por TLC con eluyente Heptano/AcOEt (3:2). Una vez terminada la reacción, la disolución se llevó a sequedad, se disolvió en AcOEt, se lavó con NaCO_3 y la fase orgánica se secó con MgSO_4 . La disolución resultante se llevó a sequedad dando lugar a un aceite de color amarillento (0.18 g, 54.3 % de rendimiento).

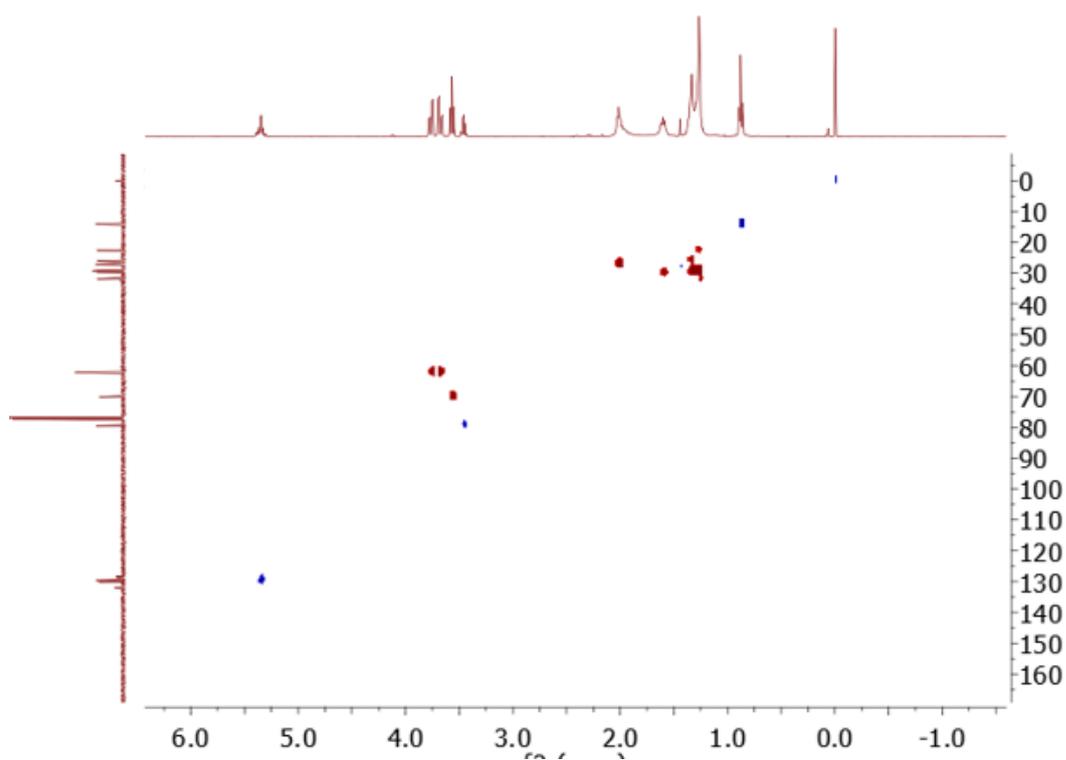
$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5.35 (m, $-\text{CH}=\text{CH}-$, 2H), 3.74 (d, $J=11.8$ Hz, $-\text{CH}_2-$, 2H), 3.69 (d, $J=11.8$ Hz, $-\text{CH}_2-$, 2H), 3.57 (t, $J=7.1$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2-$, 2H), 3.46 (m, $-\text{CH}-\text{O}-$, 1H), 2.01 (m, $\text{CH}_2.\text{CH}=\text{CH}=\text{CH}_2$, 4H), 1.60 (m, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, 2H), 1.27 (m, $(-\text{CH}_2)_{10}$, 20H), 0.88 (t, $J=6.7$, $-\text{CH}_3$, 3H)



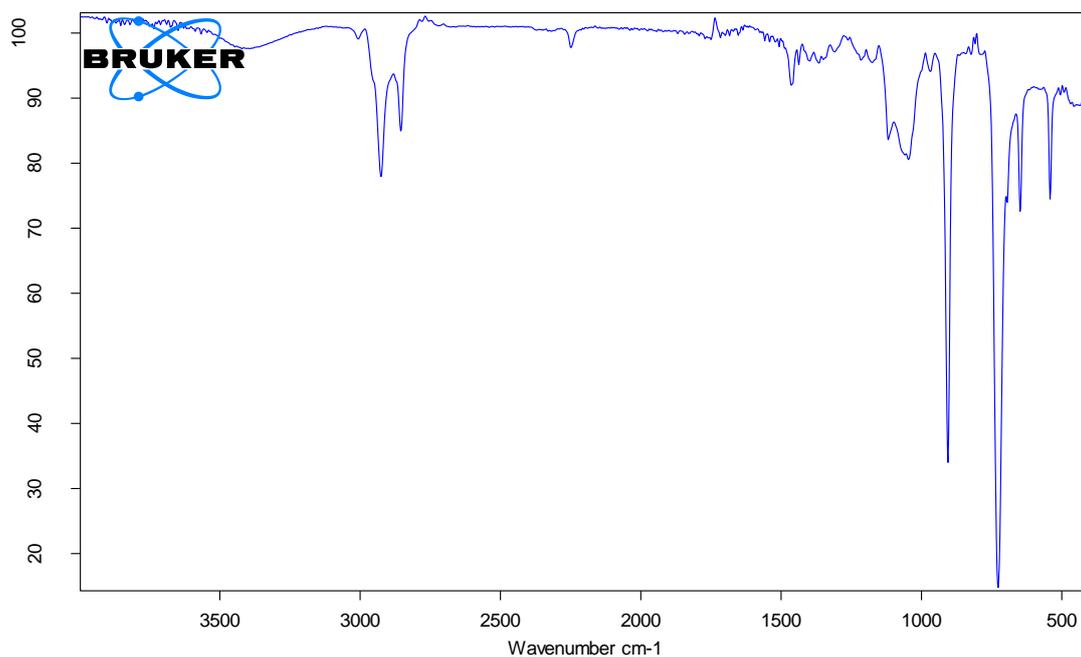
¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 133.2 (-CH=), 129.9 (-CH=), 80.0 (-O-CH-), 72.1 (-O-CH₂), 62.9 (-CH₂-O-), 32.2, 30.4, 30.2, 30.1, 29.9, 29.8, 29.7, 27.6, 26.5, 23.1, 13.5



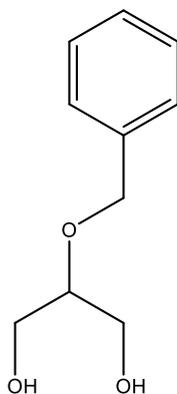
HSCQ (DCCl₃):



IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 3550 (-OH ν), 2950 (CH=C-H ν)



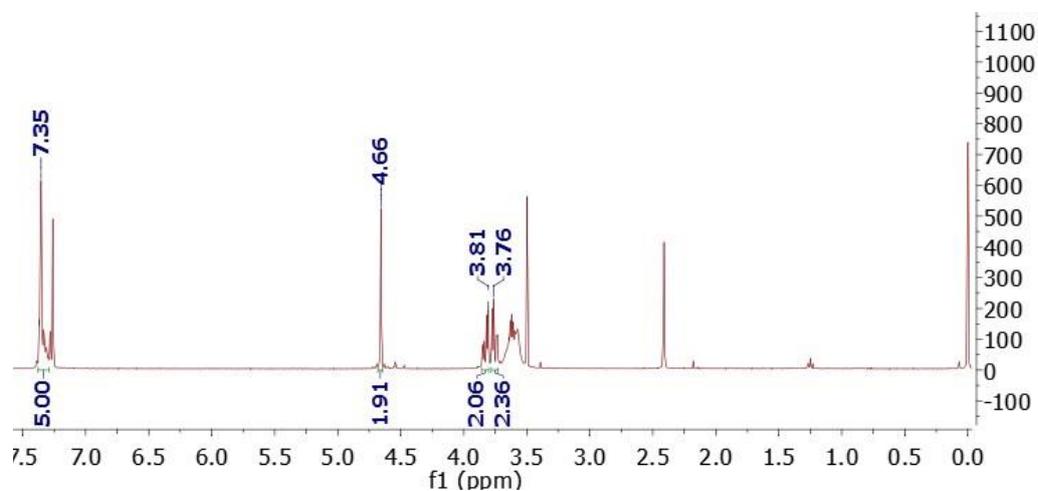
8.5.4 Síntesis de 2-(benciloxi) propano-1,3-diol (**12**)



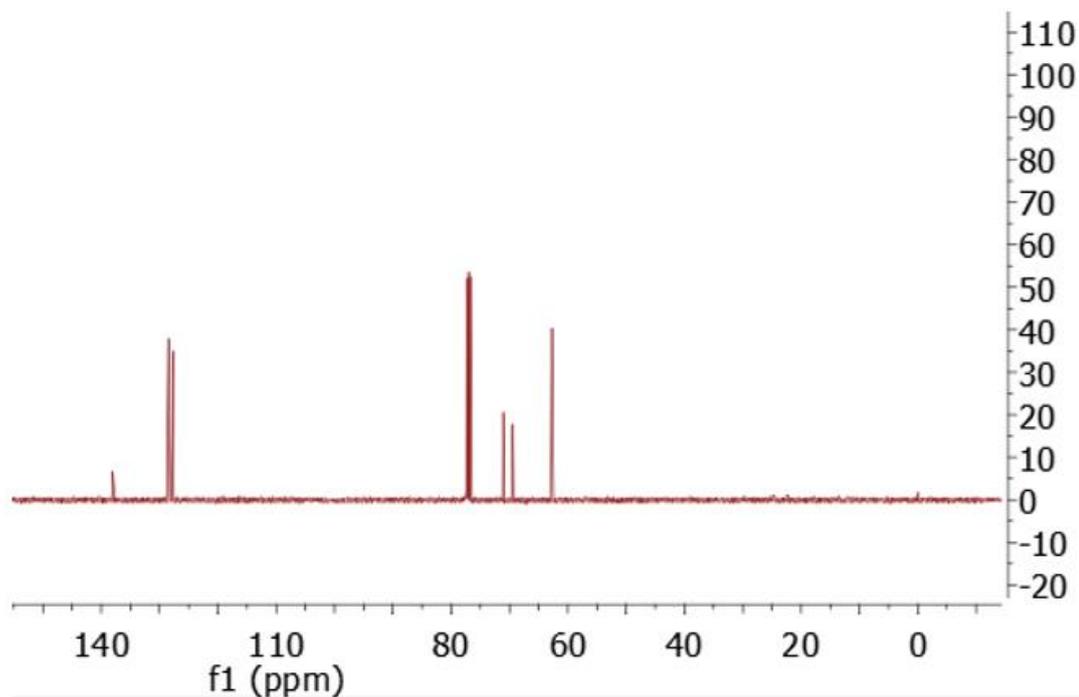
(**12**)

Se añadió ácido p-toluensulfónico (2.44 g, 14 mmol, 1.5 eq) sobre una disolución de (**10**) (2.1 g, 1.13 mmol, 1 eq) en 5 mL de MeOH. La disolución se puso a reflujo y se siguió la reacción por TLC con eluyente Heptano/AcOEt (10:1). Una vez terminada la reacción, la disolución se llevó a sequedad, se disolvió en AcOEt, se lavó con NaCO₃ y la fase orgánica se secó con MgSO₄. La disolución resultante se llevó a sequedad dando lugar a un aceite de color marrón (1.05 g, 61 % de rendimiento).

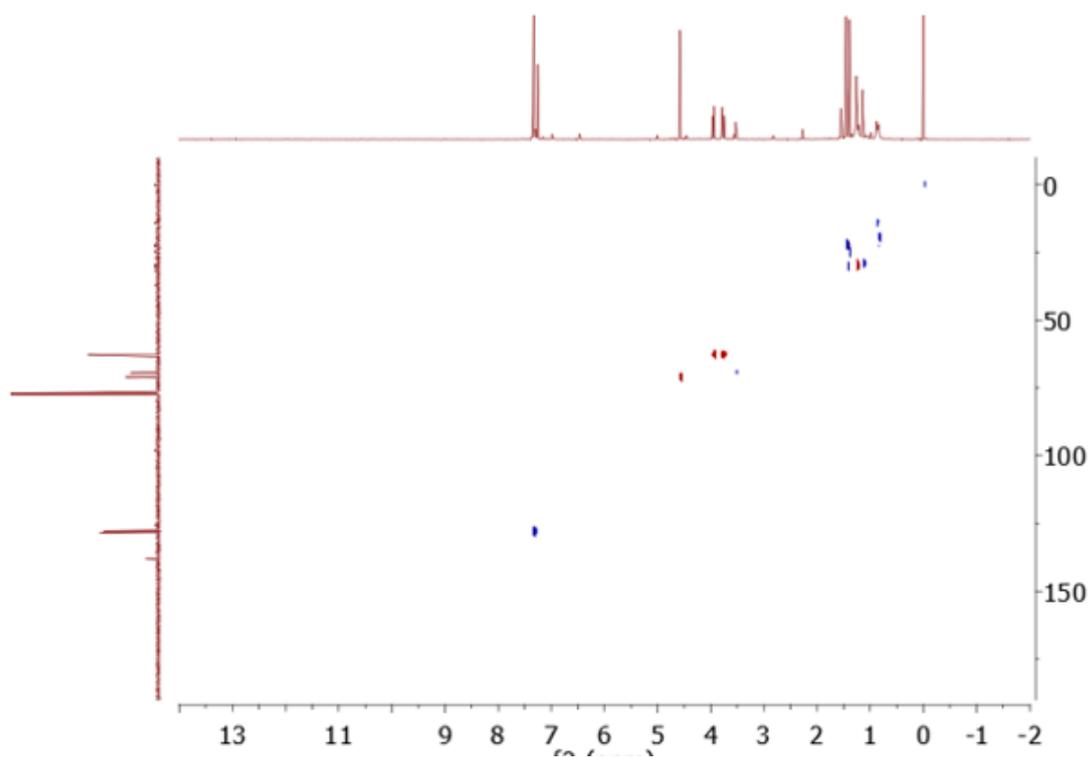
^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.35 (m, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}$, 5H), 4.66 (s, $-\text{CH}_2-$, 2H), 3.81 (d, $J=10.2$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2$, 2H), 3.76 (d, $J=10.2$ Hz, $\text{O}-\text{CH}_2$, 2H),



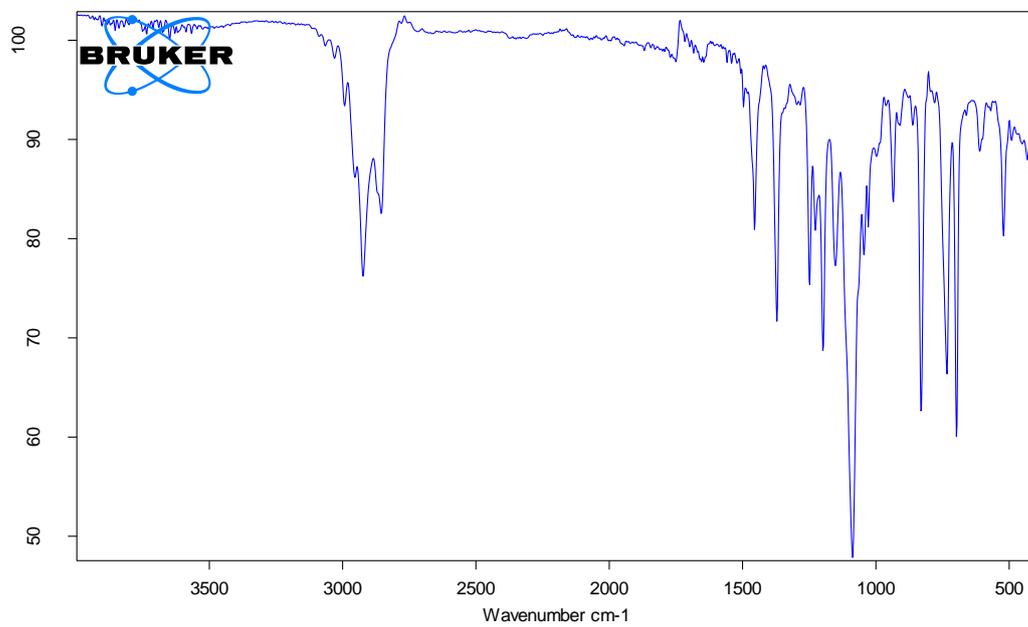
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 139.7 ($-\text{C}=\text{CH}-$), 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 128.8 ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{C}$), 71.1 ($\text{CH}-\text{O}$), 68.2 ($\text{O}-\text{CH}_2$), 62.5 ($\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2$)



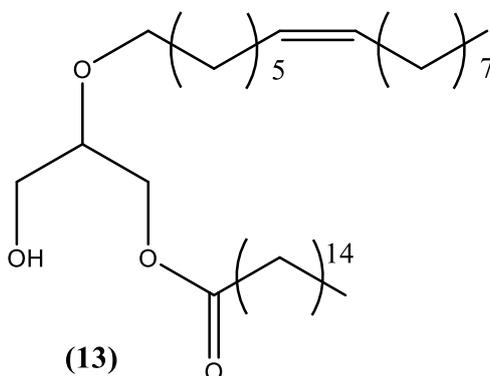
HSCQ (DCCl₃):



IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 3500 (-OH ν), 2950 (CH=C-H ν)

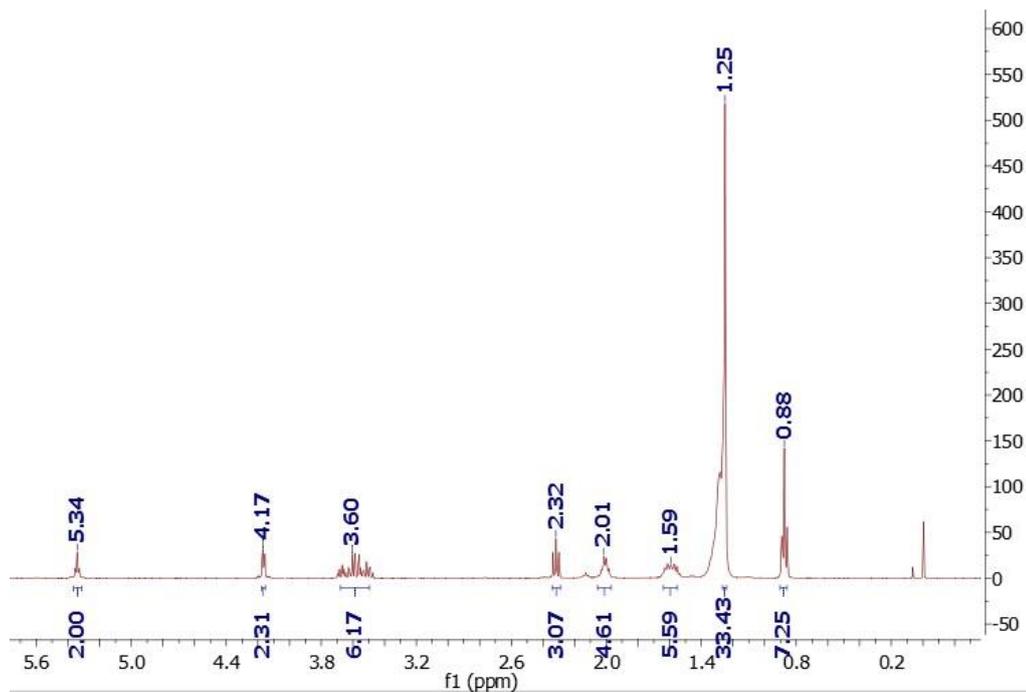


8.5.5 Síntesis del palmitato de(Z)-2-(hexadec-3-en-1-iloxi)-3-hidroxipropilo

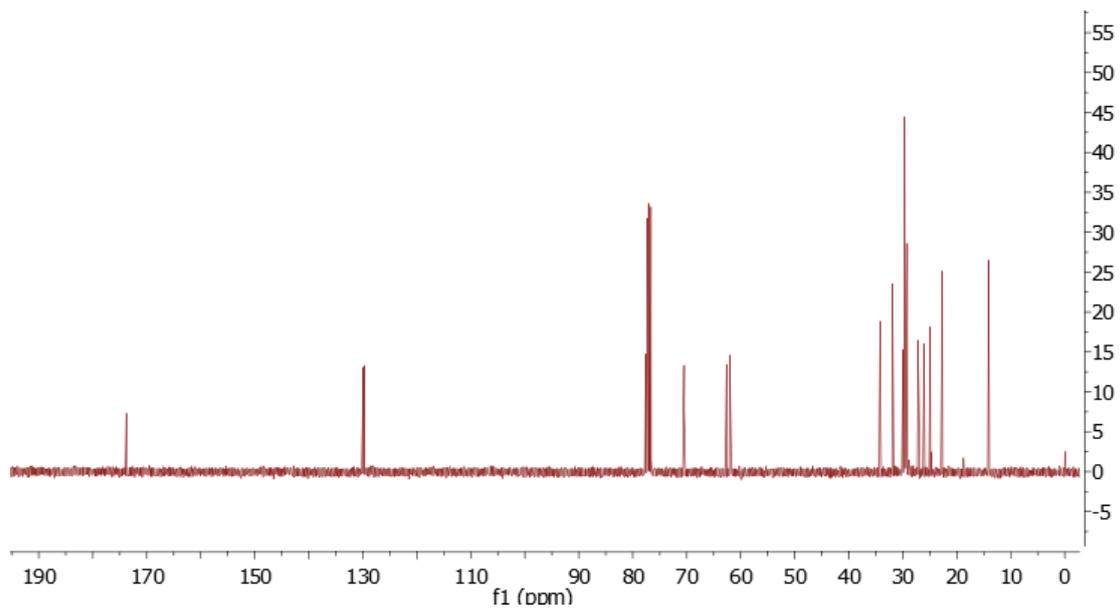


Se añadió gota a gota cloruro de palmitoilo (0.08 mL, 0.29 mmol, 0.7 eq) sobre una disolución de **(11)** (0.13 g, 0.41 mmol, 1 eq) y TEA (0.1 mL, 0.62 mmol, 1.5 eq) en 13 mL de DCM a 0°C. Se siguió la reacción por TLC con eluyente Heptano/AcOEt (20:1). Cuando la reacción se dio por terminada, la fase orgánica se lavó con NaCO₃, se secó con MgSO₄, se llevó a sequedad y se purificó por columna.

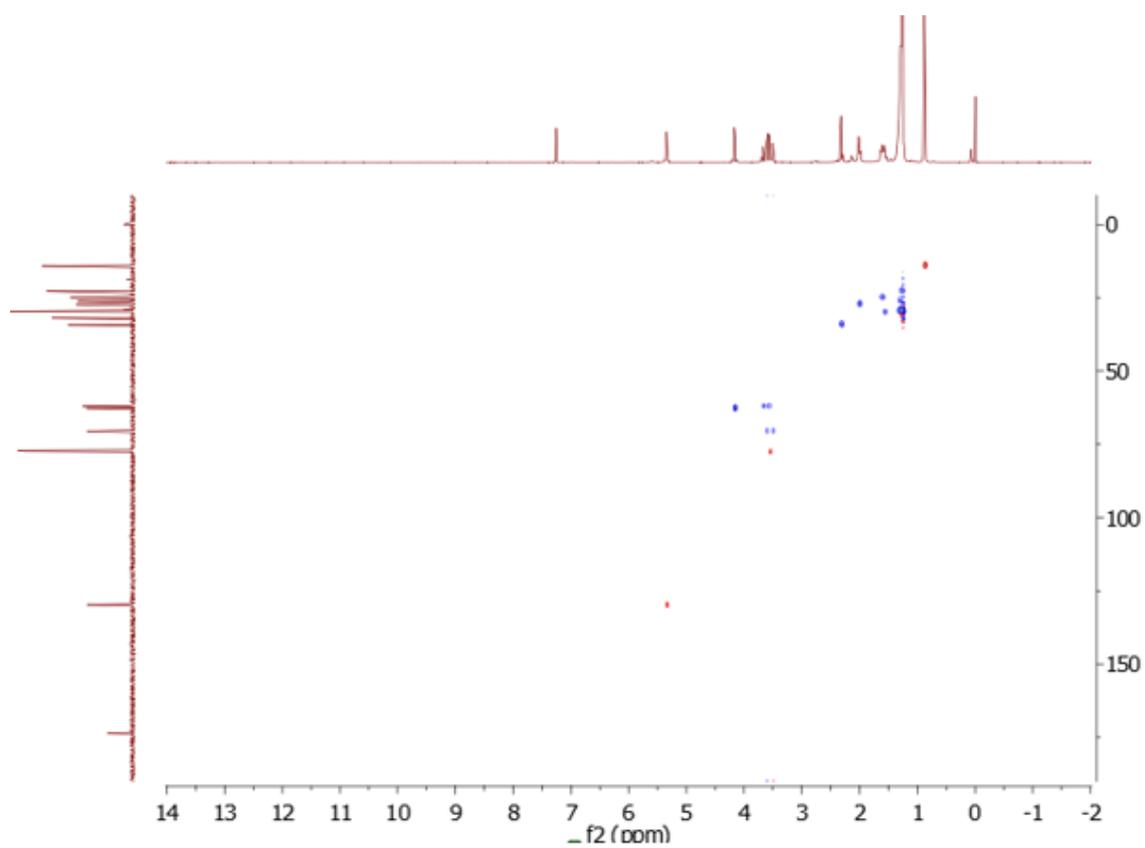
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.34 (m, -CH=CH-, 2H), 4.17 (t, -O-CH₂-, 2H), 3.60 (m, -O-CH-O-CH₂-, 5H), 2.32 (t, J=7.1 Hz, O=C-CH₂-, 2H), 2.01 (m, -CH₂-CH=CH-CH₂-, 4H), 1.59 (m, O-CH₂-CH₂, 2H), 1.25 (m, (-CH₂)₁₀, 20H), 0.88 (t, J=6.9, -CH₃, 3H)



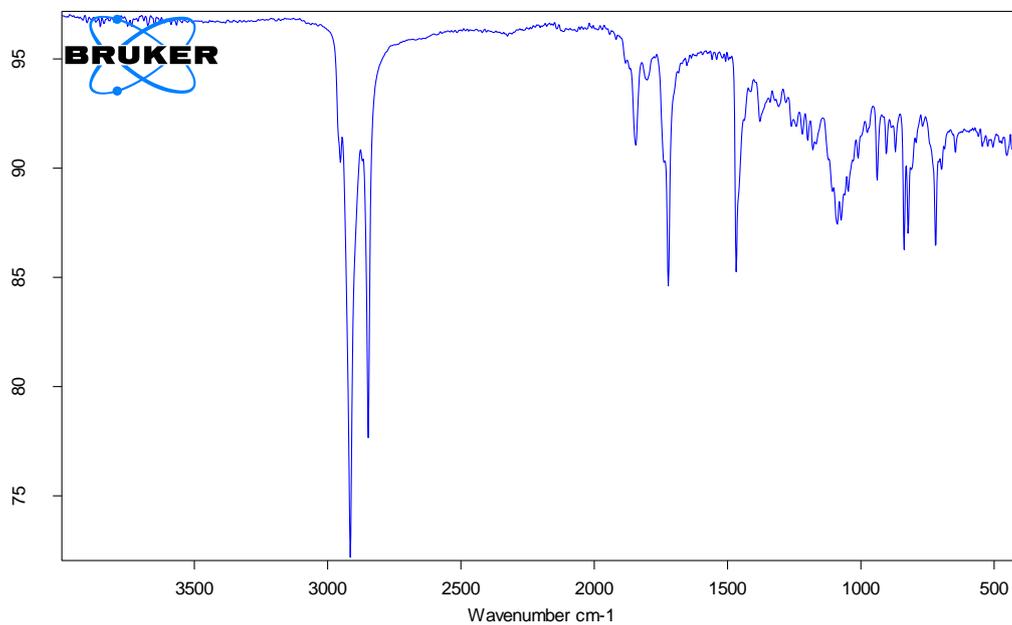
^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 174.5 (O-C=O), 130.9 (-CH=CH-), 77.8 (-O-CH-), 62.8 (-CH₂-O-C=O), 62.2 (-CH₂-OH), 34.3, 32.0, 30.1, 29.8, 27.4, 26.2, 25.1, 22.8, 14.3.



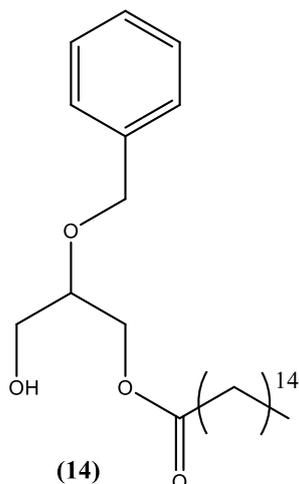
HSCQ (DCCl_3):



IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 2990 (CH=C-H ν), 1850 (C=O ν)

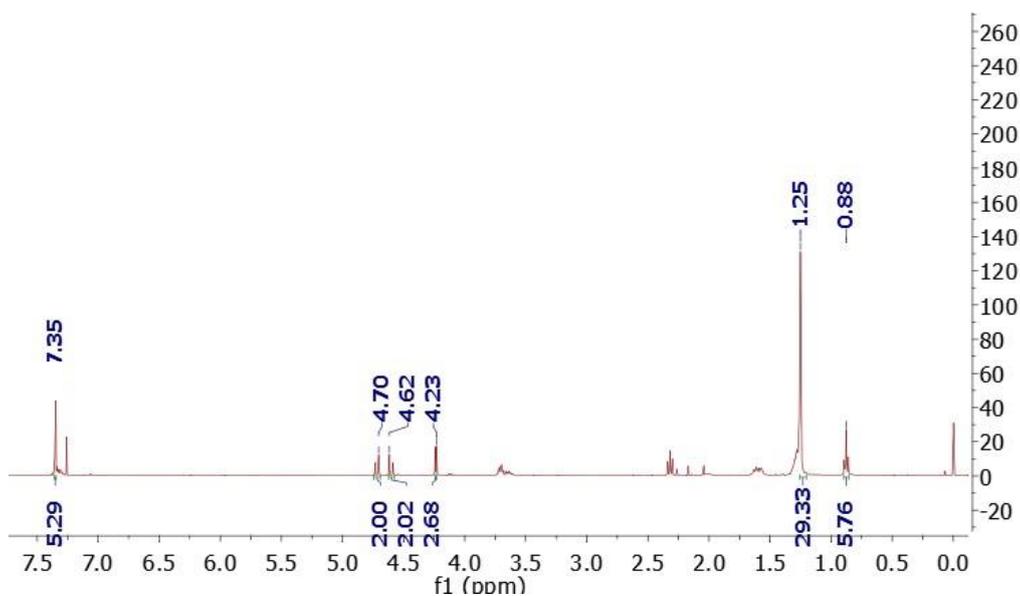


8.5.6 Síntesis del palmitato de 2-(benciloxi)-3-hidroxipropilo

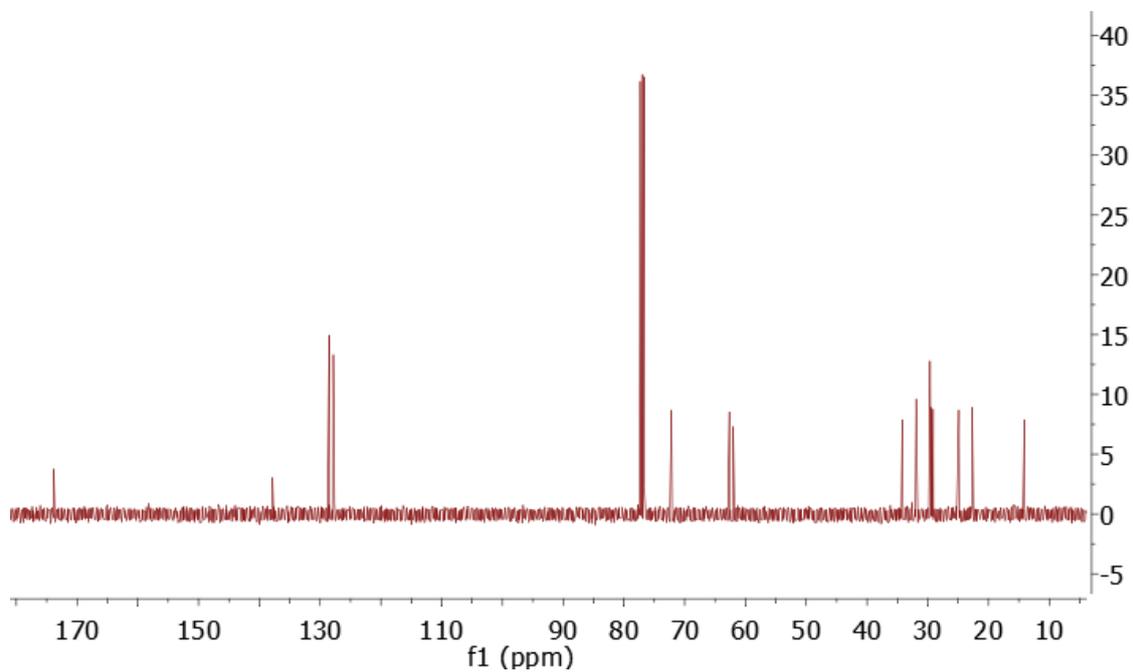


Se añadió gota a gota cloruro de palmitoilo (0.8 mL, 2.7 mmol, 0.5 eq) sobre una disolución de **(12)** (1 g, 5.5 mmol, 1 eq) y TEA (0.8 mL, 5.5 mmol, 1 eq) en 13 mL de DCM a 0°C. Se siguió la reacción por TLC con eluyente Heptano/AcOEt (4:1). Cuando la reacción se dio por terminada, la fase orgánica se lavó con NaCO₃, se secó con MgSO₄, se llevó a sequedad y se purificó por columna dando lugar a un aceite marrón (0.12g, 10% de rendimiento).

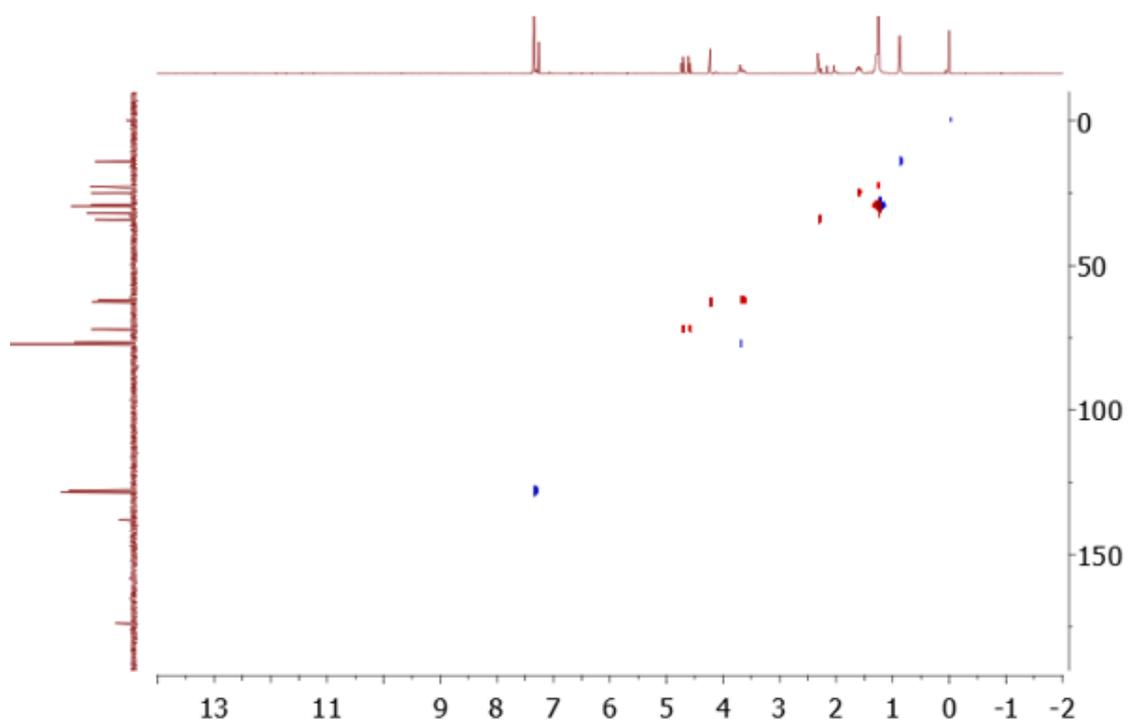
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.35 (m, CH=CH-CH=CH-CH=C, 5H), 4.70 (d, J=10.2 Hz, O-CH₂, 2H), 4.62 (d, J=10.2 Hz, O-CH₂, 2H), 4.23 (s, -CH₂-, 2H), 1.25 (m, (-CH₂)₁₀, 20H), 0.88 (t, J=7.1, -CH₃, 3H)



^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 174.2 (O-C=O), 137.8 (C=CH), 129.8, 129.7, 129.6, 129.5, 128.8 (-CH=CH-CH=CH-CH=), 74.1 (CH-O), 64.2 (O-CH₂), 62.5 (CH₂-O-C-O-CH₂), 34.9, 33.7, 29.9, 29.7, 29.4, 29.3, 24.9, 22.4, 14.2



HSCQ (DCCl_3):



IR $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 3450 (-OH ν), 2950 (CH=C-H ν), 1750 (C=O ν)

