

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

# ESTUDIO PARA LA OBTENCIÓN DE LA OXILIPINA (3*S*)-16,17- DIDESHIDROFALCARINOL PRESENTE EN *Tridax procumbens* L.

Tesis que presenta HORACIO LARQUÉ GARCÍA

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Opción: Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2020

### CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C. POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Horacio Larqué García**, titulado "**Estudio para la obtención de la oxilipina (3S)-16,17dideshidrofalcarinol presente en** *Tridax procumbens* **L**." fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Biotecnología de Productos Naturales, bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

"un finti

Dra. Cecilia<sup>/</sup>Hernández Zepeda Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 21 de agosto de 2020.

### **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados. dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

M.C. Horacio Larqué García

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, y forma parte del proyecto titulado "Aislamiento y síntesis de metabolitos de plantas medicinales de la península de Yucatán y evaluación *in vitro* e *in vivo* de su actividad leishmanicida" (Conacyt #257920).

### AGRADECIMIENTOS

Al Conacyt, por la beca otorgada No. 296554.

Al CICY, por las instalaciones y por crear el espacio adecuado para la generación de conocimiento.

Al Laboratorio de Química de Productos Naturales, que jamás cerró sus puertas, siendo éste mi primera casa.

Al Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, a quién considero un amigo, un mentor, un excelente químico, pero, sobre todo, un mejor ser humano.

Al MC. Luis W. Torres Tapia, por su apoyo técnico en todas las determinaciónes analíticas, su paciencia y experiencia son y serán admirables.

A la Dra. Esther del Olmo Fernández, de la Universidad de Salamanca, España, por su cobijo al llegar a un mundo nuevo y por creer en mi siempre.

Al Dr. Ricardo Escárcena-Romero de la Universidad de Salamanca, España, a quien sin sus duras lecciones de química no hubiera sido posible el trabajo de síntesis orgánica.

Al Dr. Eugenio Sánchez-Arreola de la Universidad De Las Américas Puebla, por abrirme las puertas de la Universidad y facilitarme el acceso al extractor supercrítico.

Al MC. Mario U. Larqué-Saavedra, por los diseños estadísticos.

A mis sinodales de mi examen predoctoral, por puntualizar mis carencias, teniendo la voluntad de corregir, proponer y ayudar, aterrizar y reenfocar mis fortalezas.

A los sinodales de mi examen de grado, por su tiempo, dedicación y ánimo de siempre contribuir a mi formación académica.

A mis profesores, por ser el vértice y arista del camino a la verdad.

A mis compañeros del laboratorio tanto del CICY como de la USAL, quienes hicieron con su presencia este camino más llevadero y divertido.

Finalmente, a todos aquellos a quienes dejé en la mudez, pero que su presencia dio forma a lo que hoy soy. Añado a este agradecimiento a todos los millones de mexicanos a quienes gracias al pago de sus impuestos me fue posible sostenerme durante cuatro años. A ustedes, con México, estaré en deuda siempre.

### **PRODUCTOS GENERADOS DE ESTA TESIS**

### Artículos de investigación

1) Larqué-García, H., Torres-Tapia, L.W., Vera-Ku, M., Gamboa-León, R., Novelo-Castilla, S., Coral-Martínez, T.I., Peraza-Sánchez, S.R. Quantitative seasonal variation of the falcarinol-type polyacetylene (3*S*)-16,17-didehydrofalcarinol and its spatial tissue distribution in *Tridax procumbens*. *Phytochemical Analysis*. 2020; 31, 183-190.

2) Larqué-García, H., Torres-Tapia, L.W., Del Olmo-Fernández, E., Sánchez-Arreola, E., Peraza-Sánchez, S.R. Effect of supercritical CO<sub>2</sub> extraction variability on the yield of *Tridax procumbens* roots extract and (3*S*)-16,17-didehydrofalcarinol content. *Journal of Supercritical Fluids.* On line: 30/04/2020 https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104859

### Participación en congresos

1) Larqué-García, H., Torres-Tapia, L.W., Peraza-Sánchez, S.R., Escárcena-Romero, R., Del Olmo-Fernández, E. Synthesis of falcarinol-type compounds present in *Tridax procumbens* and *in vitro* leishmanicidal activity. Congreso de la Sociedad Española de Química Terapéutica. Salamanca, España (23-28 de enero, 2018). Presentación oral.

2) Larqué-García, H., Torres-Tapia, L.W., Vera-Ku, M., Gamboa-León, R., Coral-Martínez, T.I., Peraza-Sánchez, S.R. Variación estacional de la oxilipina (3*S*)-16,17dideshidrofalcarionI presente en *Tridax procumbens* y su localización anatómica. XV<sup>a</sup> Reunión de la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales. San Luis Potosí, México (22-25 de mayo de 2019). Póster.

3) Larqué-García, H., Escárcena-Romero, R., Peraza-Sánchez, S.R., Del Olmo-Fernández, E. Approach to the synthesis of (3*S*)-16,17-didehydrofalcarinol, a polyacetylene with leishmanicidal properties. 4<sup>th</sup> Iberoamerican Symposium on Organic Chemistry. Villa Clara, Cuba (4-8 de diciembre de 2019). Póster.

...a mi Mario U. Larqué-Saavedra, mi padre, por ser Motivo, Presencia y Fluidez.

# ÍNDICE

### **CAPÍTULO I**

### ANTECEDENTES DE Tridax procumbens L.

1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 ANTECEDENTES	2
1.2.1 Consideraciones de Tridax procumbens L	2
1.2.2 Descripción botánica y localización geográfica	3
1.2.3 Usos medicinales y actividad biológica	5
1.2.4 Fitoquímica de <i>Tridax procumbens</i> L	6
1.2.5 Distribución de acetilenos de tipo C-17	8
1.2.6 Metabolismo secundario	13
1.2.7 Poliacetilenos	14
1.2.8 Biosíntesis de ácidos grasos	16
1.2.9 Oxilipinas	17
1.2.10 Biosíntesis de (3 <i>S</i> )-16,17-dideshidrofalcarinol	18
1.2.11 (3 <i>S</i> )-16,17-dideshirofalcarinol	21
JUSTIFICACIÓN	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
	24

# **CAPÍTULO II**

OBTENCIÓN DE LA OXILIPINA (3*S*)-16,17-DIDESHIDROFALCARINOL MEDIANTE LA EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN, PARA LA CUANTIFICACIÓN ANATÓMICA EN *Tridax procumbens* L.

2.1 INTRODUCCIÓN	. 25
2.2 ANTECEDENTES	. 26
2.2.1 Extracción	. 26

2.2.2 Extracción por disolventes orgánicos: maceración
2.2.3 Cromatografía
2.2.4 Cromatografía de gases (CG) 29
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS
2.3.1 Material vegetal
2.3.2 Obtención de extractos metanólicos por maceración
2.3.3 Obtención de la fracción hexánica por partición
2.3.4 Análisis cualitativo de la oxilipina (3 <i>S</i> )-16,17-dideshidrofalcarinol 33
2.3.5 Análisis cuantitativo de la oxilipina (3 <i>S</i> )-16,17-dideshidrofalcarinol 34
2.3.6 Diseño experimental 34
2.3.7 Extracción por maceración a gran escala
2.3.8 Aislamiento y purificación de la fracción hexánica TPR-2a
2.3.9 Purificación de la subfracciónTPR-3a
2.3.10 Purificación de la subfración TPR-4b
2.3.11 Purificación de TPR-3b 38
2.3.12 Identificación y caracterización de los compuestos TPR-4b'1,
TPR-5c1 y TPR-4a''1 mediante métodos espectroscópicos
2.3.13 Validación del método analítico 39
2.3.13.1 Linealidad 40
2.3.13.2 Precisión
2.3.13.3 Límite de Detección (LD) 41
2.3.13.4 Límite de Cuantificación (LC) 41
2.3.13.4 Límite de Cuantificación (LC)412.3.13.5 Especificidad (Selectividad)41
<ul> <li>2.3.13.4 Límite de Cuantificación (LC)</li></ul>
2.3.13.4 Límite de Cuantificación (LC)412.3.13.5 Especificidad (Selectividad)412.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN422.4.1 Identificación de metabolitos aislados42
2.3.13.4 Límite de Cuantificación (LC)412.3.13.5 Especificidad (Selectividad)412.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN422.4.1 Identificación de metabolitos aislados422.4.2 Espectrofotometría de Infrarrojo (IR) de TPR-4"a142
2.3.13.4 Límite de Cuantificación (LC)412.3.13.5 Especificidad (Selectividad)412.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN422.4.1 Identificación de metabolitos aislados422.4.2 Espectrofotometría de Infrarrojo (IR) de TPR-4"a1422.4.3 Espectrometría de masas (EM) de TPR-4"a144
2.3.13.4 Límite de Cuantificación (LC)412.3.13.5 Especificidad (Selectividad)412.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN422.4.1 Identificación de metabolitos aislados422.4.2 Espectrofotometría de Infrarrojo (IR) de TPR-4"a1422.4.3 Espectrometría de masas (EM) de TPR-4"a1442.4.4 RMN-1H de TPR-4"a146

2.4.6 Localización anatómica de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarino	I
en <i>Tridax procumbens</i> L. a lo largo de un año	. 52

# **CAPÍTULO III**

# EXTRACCIÓN DE LA OXILIPINA (3S)-16,17-DIDESHIDROFALCARINOL POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

3.1 INTRODUCIÓN	6
3.2 ANTECEDENTES	;9
3.2.1 Extracción de moléculas de tipo falcarinol C-17	;9
3.2.2 SFE <i>vs</i> extracción convencional6	50
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS 6	52
3.3.1 Instrumentación 6	52
3.3.2 Extracción por Fluidos Súper Críticos (SFE- CO2)6	52
3.3.3 Análisis estadístico 6	53
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN6	<b>54</b>
3.4.1 Condiciones óptimas de la SFE-CO2 para la obtención del	
extracto de raíz6	<b>54</b>
3.4.2 Perfil fitoquímico del extracto de raíz obtenido por SFE-CO2 6	<b>57</b>
3.4.3 (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, aislamiento e identificación	'0
3.4.4 Condiciones supercríticas para la obtención de	
(3S)-16,17-dideshidrofalcarinol	'O

# **CAPÍTULO IV**

# APROXIMACIÓN A LA SÍNTESIS DE (3S)-16,17-DIDESHIDROFALCARINOL

4.1 INTRODUCCIÓN	73
4.2 ANTECEDENTES	75
4.2.1 Estrategias para la obtención de fármacos enantiomericamente	
puros	75

4.2.2 Resolución de mezclas	75
4.2.3 Síntesis estereoselectiva	76
4.2.4 Síntesis de poliacetilenos de tipo falcarinol C-17	77
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	82
4.3.1 Técnicas generales cromatográficas	82
4.3.2 Intrumentación	83
4.3.3 Análisis de retrosíntesis	83
4.3.4 Síntesis total	87
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
4.4.1 Síntesis lineal para la obtención de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol	98

# CAPÍTULO V

### **CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**

5.1 CONCLUSIONES GENERALES	111
5.2 PERSPECTIVAS	112
BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXOS	

### LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Actividad leishmanicida de extractos metanólicos de plantas
nativas de la península de Yucatán 2
Cuadro 1.2 Especies representativas del género Tridax en México
Cuadro 2.1 Asignación de desplazamientos químicos para <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C-RMN
del compuesto TPR-4a''1 a 600 MHz 49
Cuadro 2.2 Peso y rendimiento de las diferentes fracciones con respecto
al peso original del material vegetal
Cuadro 2.3 Contenido de la oxilipina (3 <i>S</i> )-16,17-dideshidrofalcarinol
en <i>Tridax procumbens</i> L 55
Cuadro 3.1 Rendimiento (mg/g) de los extractos de CO2 obtenidos de
las raíces de <i>T. procumbens</i> mediante SFE66
Cuadro 3.2 Composición química del extracto de raíz de <i>T. procumbens</i>
obtenido por SFE-CO <sub>2</sub> 69
Cuadro 3.3 Cantidad total (mg/g) de la oxilipina (3 <i>S</i> )-16,17-
dideshidrofalcarinol obtenida de raíces de <i>T. procumbens</i> por
SFE-CO <sub>2</sub> 72
Cuadro 4.1 Condiciones ensayadas para la hidrogenación selectiva
del alquino 6 93
Cuadro 4.2 Condiciones ideales para la hidrogenación selectiva del
alquino 6 103

### LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Ejemplar de la especie <i>Tridax procumbens</i> L
Figura 1.2 Mapa de distribución de <i>T. procumbens</i> en la región de la
península de Yucatán 5
Figura 1.3 Compuestos aislados en <i>T. procumbens</i> con actividad
farmacológica6
Figura 1.4 Compuestos aislados en <i>T. procumbens</i> 7
Figura 1.5 Distribución de compuestos tipo falcarinol C-17 en miembros
de las familias Asteraceae y Apiaceae 9-11
Figura 1.6 Moléculas de tipo falcarinol C-17 aisladas de <i>T. procumbens</i> 12
Figura 1.7 Probable biogénesis de (3 <i>S</i> )-16,17-dideshidrofalcarinol a
partir del ácido crepenínico 20
Figura 1.8 Estructura de la oxilipina (3 <i>S</i> )-16,17-dideshidrofalcarinol 21
Figura 2.1 Área protegida y destinada para las colectas de
T. procumbens31
Figura 2.2 Partes estudiadas de <i>T. procumbens</i> L. A) Fruto maduro,
B) Estructura radicular, C) Hoja joven con peciolo, D) Flor sésil
con receptáculo, E) Tallo con brotes y yemas axilares
Figura 2.3 Esquema general de purificación de la oxilipina
(3S)-16,17-dideshidrofalcarinol aislada en diferentes
fracciones
Figura 2.4 Placa resumen de las fracciones colectadas por CLV eluidas en
<i>n</i> -Hx/AcOEt (8:2) reveladas con ácido fosfomolíbdico36
Figura 2.5 A) Monitoreo por CCD de la fracción TPR-3a (2.82 g). B) Monitoreo
por CCD de la fracción TPR-3a (2.93 g) en un sistema <i>n</i> -Hx/AcOEt
(8:2) reveladas con ácido fosfomolíbdico
Figura 2.6 CCD de la fracción TPR-4b eluida en un sistema
<i>n</i> -Hx/AcOEt (8:2) revelada con ácido fosfomolíbdico
Figura 2.7 CCD de las fracciones TPR-3b, revelada con ácido

fosfomolíbdico 38
Figura 2.8 Cromatograma de gases TPR-4a''1 42
Figura 2.9 Espectro IR de TPR-4a''1. En la región de los grupos
funcionales se observa una señal ancha a 3385 cm <sup>-1</sup>
(no señalada) y una señal a 2253 cm <sup>-1</sup> no observada 43
Figura 2.10 Espectro de masas de baja resolución con
las señales más intensas y su abundancia relativa
Figura 2.11 Patrón de fragmentación por IE en modo positivo
propuesto para el compuesto TPR-4a''1.
Pico base <i>m/z</i> 91; [M] <sup>+</sup> , <i>m/z</i> 242
Figura 2.12 Espectro de RMN-¹H de TPR-4a''1 en CDCl₃ a
600 MHz y ampliación de la región de 6.0 a 4.9 ppm
Figura 2.13 Espectro de RMN-¹H de TPR-4a"1 en CDCl₃ a
600 MHz y ampliación de la región de 3.1 a 1.2 ppm47
Figura 2.14 Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de TPR-4a"1 en CDCl₃ a 600 MHz y
ampliación de las regiones de 82-62 y 30-26 ppm48
Figura 2.15 Compuestos poliacetilénicos con actividad leishmanicida50
Figura 2.16 Efecto de la PP (mm) frente a la concentración
de la oxilipina (3 <i>S</i> )-16,17-dideshidrofalcarinol
(mg⁺g <sup>−1</sup> en peso seco)54
Figura 3.1 Respuestas de las variables presión (bar), temperatura (ºC),
y tiempo de extracción (h) en el rendimiento total (mg/g) del
extracto de SFE-CO <sub>2</sub> en raíces de <i>T. procumbens</i> . Los valores
son la media (±) de la DE ( $P \le 0.05$ )
Figura 3.2 Comportamiento de las condiciones de extracción
óptimas de SFE-CO2 vs. extracto hexánico
de las raíces de <i>T. procumbens</i> 65
Figura 3.3 Cromatograma del extracto SFE-CO2 de raíz de <i>T. procumbens</i>
mostrando selectividad por moléculas de tipo falcarinol68

Figura 3.4	Respuesta entre las variables presión (bar), temperatura (ºC) y	
	tiempo de extracción (h) en la cantidad total de la oxilipina	
	(3 <i>S</i> )-16,17-dideshidrofalcarinol (mg/g) en el extracto de	
	raíces de <i>T. procumbens</i> obtenido por SFE-CO <sub>2</sub> . Los valores	
	son la media (±) de la SD ( <i>P</i> ≤ 0.05)71	1
Figura 4.1	Fármacos en los que uno de los enantiómeros	
	presenta efecto dual o tóxicos74	4
Figura 4.2	Bis-acetilenos C-17 obtenidos por síntesis asimétrica	7
Figura 4.3	X) No reportado, a) Oxidación de Swern. b) <i>n</i> -C₀H₀P⁺Ph₃Br⁻,	
	<i>n</i> -BuLi, THF, - 78 → 0 °C, 75% en dos pasos. c) 10% Pd/C,	
	95% EtOH, 72 h. 85%. d) <i>p</i> -TsCl, Pyr 96%. e) <i>p</i> -TsOH,	
	MeOH. f) K2CO3, MeOH, 90% en dos pasos. g) MOMCI,	
	i-Pr₂NEt, CH₂Cl₂, 0 ºC – rt, 82%. h) HCCLi∙NH₂(CH₂)₂NH₂,	
	THF-HMPA, - 20 ℃, 78%. i) MsCl, Et₃N, Pyr. j) MeOH, HCl.	
	k) K₂CO₃, MeOH, 77% en tres pasos. I) NBS, AgNO₃,	
	acetona, 82%	9
Figura 4.4	a) CuCl, NH2OH, HCl, EtNH2, MeOH, 0 ºC, 69%.	
	b) TBAF, THF, rt, 66%	9
Figura 4.5	a) MPMCI, NaH, THF-DMF. b) (i) (COCI)2, DMSO, Et3N,	
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , - 78 ºC, (ii) CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> PPh <sub>3</sub> +Br <sup>-</sup> , KO- <i>t</i> -Bu, THF,	
	- 78 ºC, 65%. c) DDQ, CH2Cl2 – H2O (20:1), 81%. d) PPh3,	
	CCl₄, reflujo, 91% e) LDA, THF, - 78 ℃, 64%. f) NBS, AgNO₃,	
	acetona, 79% 80	)
Figura 4.6	X) No reportado, a) CuCl, NH2OH HCl, Et3N, MeOH, 64%.	
	b) TBAF, THF, 84%81	I
Figura 4.7	a) (i) MeLi, THF, 0 ºC; (ii) Acroleína, - 78 ºC; (iii) NaOH,	
	THF, rt, 73%. b) (i) LiNH₂, NH₃, - 78 ºC; (ii) <i>n</i> -CァH₁₅Br,	
	70%; (iii) H <sub>2</sub> , Pd/CaCO <sub>3</sub> , quinolina, AcOEt, rt. 93%.	
	70%; (iii) H <sub>2</sub> , Pd/CaCO <sub>3</sub> , quinolina, AcOEt, rt. 93%. c) PPh <sub>3</sub> , CBr <sub>4</sub> , CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , rt. 99%; d) PPh <sub>3</sub> , CCl <sub>4</sub> , 80 ºC, 76%.	

Figura 4.8. Esquema general de retrosíntesis para la obtención de
(3 <i>S</i> )-16,17-dideshidrofalcarinol86
Figura 4.9 Mecanismo de reacción propuesto para la
protección de 1,6-hexanodiol (1)
Figura 4.10 Mecanismo de reacción para la oxidación de Swern
Figura 4.11 Mecanismo de reacción propuesto para la reacción de Wittig 100
Figura 4.12 Mecanismo de reacción propuesto para
la desproteccción de TBDMS100
Figura 4.13 Mecanismo de reacción propuesto para la
condensación de un aceileno terminal y un haluro
Figura 4.14 Productos formados de la hidrogenación de 6 y 11 102
Figura 4.15 Mecanismo de reacción propuesto para la
desprotección de un alcohol en forma de éter
Figura 4.16 Mecanismo de reacción propuesto por
la adición de un mesilato105
Figura 4.17 Mecanismo de reacción propuesto para la
formación del trialquino 13 105
Figura 4.18 Mecanismo de reacción propuesto para la
condensación de un <i>bis</i> -sililbutadiino con acroleína
Figura 4.19 Proceso de retrosíntesis para la obtención del Sintón A' 107
Figura 4.20 Proceso de retrosíntesis para la obtención del Sintón A" 109

#### RESUMEN

De *Tridax procumbens* L. se logró aislar la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol, bioactiva frente a la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) causada por el protozoo *Leishmania mexicana*, considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales desatendidas. Actualmente, el tratamiento se limita a fármacos a base de antimonio, que generalmente suelen ser agresivos al paciente al despertar reacciones secundarias que en ocasiones conllevan a la muerte. En México se reporta una media anual de 637 nuevos casos. Por lo anterior, nace la urgente necesidad de obtener nuevas moléculas que ayuden a combatir este padecimiento.

En el presente trabajo se estudian tres diferentes vías para la obtención de (3S)-16,17dideshidrofalcarinol; en la primera de ellas, se plantea un estudio en el cual se cuantifica a (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol en diferentes partes anatómicas de T. procumbens (hoja, flor, fruto, tallo y raíz) a lo largo de un año, añadiendo los factores de precipitación pluvial (PP), temperatura (°C) y fotoperiodo (min); los resultados indican que la parte de la planta en donde más se concentra la molécula es en la raíz en el mes de junio durante el periodo de lluvias (0.0358 mg/g), lo que coincide con los meses de mayor temperatura (30 °C) y mayor fotoperiodo (488 min); además, se logró aislar la molécula extraída de las raíces vía maceración obteniendo 0.0359 mg/g. La segunda propuesta fue el uso de "tecnologías verdes" con la extracción supercrítica, en la que se exhibe el uso de CO<sub>2</sub> como disolvente de extracción. Mediante la variación de la temperatura (°C), presión (bar) y tiempo de extracción (h) fue posible obtener el extracto de raíz y con ello cuantificar la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol. Los parámetros ideales que mejor se ajustaron para la máxima obtención de la molécula fueron: 150 bar, 45 °C, 1.5 h, con 0.0409 mg/g. Finalmente, en la tercera vía se propone la síntesis orgánica del compuesto. Para su preparación se plantea el análisis retrosintético en tres diferentes rutas, todas ellas lineales y con rendimientos aceptables ( $\geq$  75%); aun cuando han quedado inconclusas, se logró obtener la molécula novedosa heptadeca-1,16-dien-4,6,8-triin-3-ol, la cual será bioensayada en estudios in vitro de inhibición de crecimiento de promastigotes de *L. mexicana*.

Entre las dos técnicas de extracción utilizadas, no hubo diferencias significativas en cuanto a la cantidad de la oxilipina obtenida, sin embargo, destaca la SFE por el poco tiempo utilizado y ahorro en recursos.

#### ABSTRACT

From the species Tridax procumbens L. the oxylipin (3S)-16,17-didehydrofalcarinol was isolated, showing to be active against Leishmania mexicana, the protozoo causing localized cutaneous leishmaniasis, one of the neglected tropical diseases. Mexico is one of the countries where this ailment is present, with an annual mean of 637 new cases. Nowadays, there is no vaccine for the treatment of such condition, and due to this, the medication is limited to a few drugs based on antimony, which are in general toxic, causing secondary reactions and even death. Because of that, there is an urgent need to obtain new molecules which may help to fight this disease. In the present work, three different ways to obtain the oxylipin are proposed; the first one consisted of a study in which the target molecule is quantified in different anatomic parts of T. procumbens (leaves, flowers, fruits, stems, and roots) during an entire year, including the variables rainfall (PP), temperature (°C) and daylight (min); our results showed that the roots are where the molecule is found in the maximum amount (0.0358 mg/g) during the rainfall season in the month of June, matching with the months of high temperature (30 °C) and high daylight time (488 min); moreover, the oxylipin was isolated from maceration of roots with an amount of 0.0359 mg/g. In the second approach, supercritical extraction technology with CO<sub>2</sub> as solvent was used. By means of temperature (°C), pressure (bar), and extraction time (h) variations, the best yield of the root extract was obtained, and from which the oxylipin was quantified. The ideal parameters that gave the highest yield of the molecule were 150 bar, 45 °C, 1.5 h, with a total amount of 0.0409 mg/g. Finally, in the third approach, an organic synthesis for the oxylipin was carried out; for its preparation, a retrosynthetic analysis via three linear different routes with acceptable yields ( $\geq$  75%), was settled. After many and varied attempts, the molecule of interest was not obtained; however, the novel molecule heptadeca-1,16-dien-4,6,8-triyn-3ol was attained and further will be tasted against L. mexicana promastigotes. It is notable that there is no statistic significative difference in the amount of the oxylipin obtained between the two extraction techniques; however, in the SFE technique time and resources are saved.

# CAPÍTULO I ANTECEDENTES DE *Tridax procumbens* L.

### 1.1 INTRODUCCIÓN

La naturaleza representa un extraordinario reservorio de un gran número de moléculas, la mayoría de ellas aún desconocidas e inexploradas. Históricamente, los principios activos de los fármacos han sido obtenidos a partir de productos naturales y de compuestos derivados de los mismos. Sin embargo, durante las últimas décadas, la búsqueda de nuevas moléculas en nichos ecológicos ha ido en declive por múltiples razones, dentro de las que destacan principalmente: la evolución de la síntesis orgánica, la recombinación genética, el tiempo para la identificación y caracterización estructural de nuevos compuestos bioactivos, limitaciones climatológicas, variaciones en la composición de organismos vivos, e inclusive la pérdida de biodiversidad (se calcula que un total de 15,000 plantas medicinales están en peligro de extinción) (Shi-Lin *et al.*, 2016); aun cuando se asegure la disponibilidad del material vegetal, usualmente sólo se encontrarán pequeñas concentraciones del mismo y generalmente en mezclas complejas y difíciles de separar. Por lo anterior, existe un sentimiento desalentador y prevalente alrededor de la industria farmacéutica, relativo a la búsqueda de nuevas moléculas que, por lo general, tienen baja probabilidad de ser patentadas.

Aunque, aún hoy, muchos compuestos del carbono se aíslan mejor a partir de fuentes naturales, la mayoría de ellos se obtienen a partir de síntesis orgánica (Nicolaou, 2014; Morrison y Boyd, 1998), aun así, el reino vegetal sigue siendo por excelencia la mayor fuente de fármacos, su multiplicidad de estructuras químicas es enorme, por lo que es difícil citar una cifra con exactitud, pero se calcula más de 200,000 registrados (Kinghorn *et al.*, 2011), dentro de los que destacan los policétidos, siendo la mayoría de ellos de alto valor para la industria farmacéutica (Weissman y Leadlay, 2005); dada su complejidad estructural y numerosidad de centros quirales representan un gran problema para la discriminación de enantiómeros y por lo tanto para su manufactura (Butler, 2004). Por lo anterior, han surgido *de novo* técnicas que se aproximan a las características exigidas de cualquier proceso de extracción ideal, el cual debe ser rápido, simple, barato, no contaminante, selectivo, y conducir a la mayor cantidad de extracto final para su análisis.

### 1.2 ANTECEDENTES

### 1.2.1 Consideraciones de *Tridax procumbens* L.

Tomando en cuenta que una de las principales fuentes para encontrar nuevas moléculas con actividad terapéutica son los metabolitos secundarios aislados de especies vegetales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado prioritaria e indispensable la investigación de nuevas alternativas en diferentes nichos ecológicos para el tratamiento de enfermedades denominadas "desatendidas"; para ello, Peraza-Sánchez *et al.* (2007), en un estudio realizado con plantas nativas de la península de Yucatán, reportaron que los extractos metanólicos de muchas de estas plantas tienen una alta actividad leishmanicida, destacando el extracto metanólico de *Tridax procumbens* L. (Cuadro 1.1).

Especie botánica	Parte usada	Cl₅₀ (μg/mL)
Asclepias curassavica	Hojas	99
Byrsonima crassifolia	Corteza	14
Casimiroa tetrameria	Corteza	120
Clusia flava	Hojas	32
Croton chichenensis	Hojas	> 1000
Dorstenia contrajerva	Planta entera	23
Gliricidia sepium	Hojas	> 1000
Tridax procumbens	Planta entera	3

**Cuadro 1.1** Actividad leishmanicida de extractos metanólicos de plantas nativas de la península de Yucatán (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007).

Establecido por Linnaeus en 1753, *Tridax* es un género que se distribuye desde Sudamérica hasta Centroamérica, donde el mayor número de especies se ubica en México. En la península de Yucatán, destaca la especie *T. procumbens* L. (Cuadro 1.2), la cual ha sido ampliamente introducida alrededor del mundo, principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Se la encuentra con facilidad a orillas de caminos, prados soleados, terrenos baldíos y dunas. Su principal uso se centra en la etnomedicina (Ankita y Jain, 2012).

Especie	Distribución
T. balbisioides (Kunth) A. Gray	Chihuahua y Durango
<i>T. bicolor</i> A. Gray	Coahuila
<i>T. candidisima</i> A. Gray	San Luis Potosí
T. coronopifolia (Kunth) Hemsl	Nuevo León y Tamaulipas
<i>T. dubia</i> Rose	Jalisco y Colima
<i>T. erecta</i> A. Gray	Chihuahua
<i>T. mexicana</i> A.M. Powell	Michoacán y Guerrero
T. procumbens Linnaeus	Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y
	Yucatán
<i>T. purpusii</i> Brandegee	Veracruz y Guerrero
<i>T. trilobata</i> (Cav.) Hamsl	Guanajuato y Michoacán

**Cuadro 1.2** Especies representativas del género *Tridax* en México (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007).

#### 1.2.2 Descripción botánica y localización geográfica

Reino: Plantae Subreino: Tracheobionta División: Magnoliophyta Clase: Magnoliopsida Subclase: Asteridae Orden: Asterales Familia: Asteraceae Subfamilia: Asteroidae Tribu: Millerieae Género: *Tridax* Especie: *Tridax procumbens* L.

Nombre común: Hierba del toro y en lengua maya como: "ta'ulum" y "bakenbox". Hierba heliófila, perenne, postrada, con la base leñosa, de 15 a 50 cm de largo; tallos muy ramificados, extendidos por el suelo, a veces enraizado en los nudos, hirsutos. Hojas opuestas, con pecíolos cortos, más anchas en el centro y hacia la base, de 2 a 12 cm de largo y de 1 a 6 cm de ancho, agudas en el ápice y en la base, generalmente divididas en 3 lóbulos, márgenes con dientes puntiagudos, cubiertas pilosas, ásperas

al tacto. Inflorescencia compuesta de cabezuelas solitarias sobre pedúnculos largos, de hasta 20 cm, cubiertos de pelos erectos o recostados apuntando hacia la base; cabezuela de 1 a 1.5 cm de ancho, aunque tiene el aspecto de una flor, en realidad está formada por numerosas flores sésiles dispuestas sobre un receptáculo plano involucro campanulado a hemisférico, de 6 a 8 mm de largo, las brácteas exteriores son ovadas a oblongas, con el ápice agudo, hirsuto; flores liguladas, 3 a 6 femeninas, en el borde de la cabezuela, y de 10 a 30 flores del disco hermafroditas, en la parte central; corola de las flores liguladas de forma oblonga a casi circular y uno de los lóbulos alargados en forma de cinta, con 2 o 3 pequeños lóbulos en el ápice, de color amarillo pálido o crema; flores del disco con corola tubular, que se ensancha hacia el ápice y se divide en 5 lóbulos iguales, amarillos; estambres alternos a los lóbulos de la corola. El fruto es un aquenio en forma de cono invertido negruzco cubierto de pelos; en el ápice del fruto se presenta una estructura llamada vilano con casi 20 cerdas parecidas a plumas; contiene una sola semilla. Florece y fructifica entre los meses de enero y octubre (Méndez-González *et al.*, 2012; Powell, 1965) (Figura 1.1).



Figura 1.1 Ejemplar de la especie Tridax procumbens L.

Es una especie de amplia distribución, tanto en el área de la península, como fuera de ella. Se encuentra en los trópicos de todo el mundo, principalmente en zonas sometidas a una fuerte perturbación (Figura 1.2).



**Figura 1.2** Mapa de distribución de *T. procumbens* en la región de la península de Yucatán. (Recuperado de: Méndez-González *et al.*, 2012.)

#### 1.2.3 Usos medicinales y actividad biológica

La parte aérea de la planta (hoja) es utilizada para tratar vómitos y espasmos menstruales en forma de infusión; las raíces en decocción o consumidas oralmente se emplean como agente diurético; además, se utiliza para tratar anemia, resfriados, inflamaciones (Martín-Quintal *et al.*, 2009); también muestra propiedades analgésicas, antidiabéticas, antiinflamatorias, antiparasitarias, entre otras (Bhagwat-Durgacharar *et al.*, 2012; Hitesh, 2006). Por otra parte, los policétidos de tipo falcarinol (17 carbonos) aislados de esta especie se han identificado como compuestos antifúngicos, al inhibir la esporulación, también se les ha adjudicado efectos neurotóxicos, causando envenenamiento, convulsiones violentas y la muerte, así mismo se han reportado como citotóxicos contra numerosas líneas celulares cancerígenas (Christensen y Brandt, 2006; Matsunaga *et al.*, 1990).

### 1.2.4 Fitoquímica de Tridax procumbens L.

De la especie *T. procumbens* L. se han aislado numerosos compuestos químicos con aplicaciones farmacológicas (Figura 1.3); de los primeros en haber sido reportados destacan la flavona puearina (1) (Cheng *et al.*, 2000), la cumarina esculetina (2) (Sharma *et al.*, 2008) y dos triterpenos: ácido oleanólico (3) (Wang *et al.*, 2009) y ácido betulínico (4) aislados de la planta entera (Dimitroula *et al.*, 2008). Así mismo, se han aislado y reportado tres nuevos flavonoides de la parte aérea de la planta, la 8,3'-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxi-6-*O*- $\beta$ -D- glucopiranosilflavona (5), 6,8,3'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (6) (Xu *et al.*, 2010) y un flavonol glicosilado, la quercetagetina o 3,6,4'-trimetoxi-7-*O*-neoesperidosidina (7); de igual forma se logró identificar por primera vez de la fracción no polar de un extracto etanólico los policétidos 1,2-dihidrodendroarboreol A (8) y B (9) (Wen-Hao *et al.*, 2008).



Figura 1.3 Compuestos aislados en *T. procumbens* con actividad farmacológica.

En las flores se encuentra una saponina esteroidea caracterizada como sitosterol 3-*O*- $\beta$ -D-xilopiranósido (**10**) (Saxena y Albert, 2005). De la fracción hexánica del extracto metanólico de las partes aéreas se aisló la oxilipina poliacetilénica (3*S*)-16,17dideshidrofalcarinol (**11**) (Martín-Quintal *et al.*, 2009). Del extracto hexánico de la planta entera se aisló el *bis*-bitiofeno tribisbitiofeno (**12**) (Ali y Jahangir, 2002). El extracto de éter de petróleo de la planta entera contiene ácidos grasos saturados e insaturados: araquidónico (**13**), mirístico (**14**), palmítico (**15**), láurico (**16**), palmitoleico (**17**) y linoleico (**18**) (Ashwini y Gabhe, 1988). Actualmente, han sido pocos los metabolitos secundarios aislados de *T. procumbens* que han sido evaluados contra alguna actividad antiprotozoaria, específicamente contra leishmaniasis, sin embargo, estudios realizados con **11** sugieren un posible tratamiento alternativo contra dicha enfermedad.



Figura 1.4 Compuestos aislados en T. procumbens.

#### 1.2.5 Distribución de acetilenos de tipo C-17

Dada su amplia distribución, las familias Apiaceae y Asteraceae son aquellas de las que más se han logrado aislar e identificar acetilenos de tipo C-17, sin embargo, no existen suficientes estudios que demuestren sus propiedades biológicas (Chen et al., 2015). De la raíz de Daucus carota se logró aislar falcarinol (19), falcarindiol (20) y falcarindiol-3acetato (22) (Hansen et al., 2003); también de la raíz de Petroselinum crispum se identificó falcarinol-8-metil-éter (23) (Wyrembek, 2012); en la especie Angelica japonica se ha reportado la presencia en raíz de falcarindiol-8-acetato (21) y (9Z)-heptadeca-1,9.dien-4,6-diino-3,8,9-triol (24) (Furumi et al., 1999); de las partes aéreas de Choisya ternata se identificó 10-cloreheptadeca-1-en-4,6-diino-2,8,9-triol (25) y panaxydol (26); en raíces de la especie Pastinaca sativa, falcarinona (27) y falcarinolona (28) (Roman et al., 2011); de Opopanax chironium se reporta falcarindiona (29), (2E,8E)-heptadeca-2,8-dien-4,6-diino-1,10-diol (42), (2E,9Z)-heptadeca-2,9-dien-4,6-diin-1-ol (43), acetato de (2E,8E,10E)-heptadeca-2,8,10-trien-4,6-diin-1-il (46), también en raíces; de Oenanthe fistulosa y O. crocata, oenantotoxin (30) y dihidrooenantotoxin (31); de las especies Azorella trifucata y Heracleum sphondylium se identificaron acetato de (2Z,9Z)-8-hidroxiheptadeca-2,9-dien-4,6-diin-1-il (32), (2Z,8S,9Z)-heptadeca-2,9-dien-4,6diino-1,8-diol (64) (Schulte, 1977) y (2Z,9Z)-heptadeca-2,9-dien-4,6-diin-8-ol (33) presentes en raíces; así como de Aegopodium podagraria se identificó (8Z)-heptadeca-1,8-dien-4,6-diino-3,10-diol (34), acetato de (9Z)-15-hidroxiheptadeca-9,16-diino-8-il (35), (2Z,9E)-heptadeca-2,9-dien-4,6-diin-1-ol (37) y (9Z)-3-hidroxiheptadeca-1,9-dien-4,6-diin-8-ol (38) (Schulte, 1977); por su parte, de Pituranthus tortuosum en raíz se identificó (9Z)-15-hidroxiheptadeca-9,16-dien-11,13-diin-8-ona (36), panaxydiol (39), (9*E*)-15-hidroxiheptadeca-9,16-dien,11,13-diin-8-il (**40**) acetato de V (9*E*)-15hidroxiheptadeca-9,16-dien-11,13-diin-8-ona (41) y (2Z,9Z)-heptadeca-2,9-dien-4,6diin-1-ol (65) (Schulte, 1977); en raíces de la especie Heracleum mantegazzianum, (2*E*,9*Z*)-heptadeca-2,9-dien-4,6-diin-8-ol (44), (9*Z*)-heptadeca-9-en-4,6-diin-8-ol (47); de la especie Cicuta virosa en raíz se reportó (8E)-heptadeca-8-en-4,6-dieno-1,10-diol (45), y de la planta entera, cicutoxina (50), isocicutotoxina (51), vitrol A (52) y C (53), cicutol (54), 2,3-dihidrooenanthetol (55), (8E,10E)-heptadeca-1,8,10-trien-4,6diin-3-ol (56), (8E,10E,12E)-heptadeca-1,8,10,12-tetraen-4,6-diino-3-ol (57),

(8Z,10E,12E)-heptadeca-1,8,10,12-tetraen-4,6-diino-3-ol (**58**) (Wittstock,1995), (5*E*,7*E*,9*E*,15*E*)-heptadeca-5,7,9,15-tetraen-11,13-diino-4-ona (**59**), (5*E*,7*E*,9*E*)-17-hidroxiheptadeca-5,7,9-trien-11,13-diin-4-ona (**60**), (7*E*,9*E*)-17-hidroxiheptadeca-7,9-dien-11,13-diin-4-ona (**61**) y (9*E*)-17-hidroxiheptadeca-9-en-11,13-diin-4-ona (**62**) (Govindan, 2007); en la raíz de *Notopterygium incisum* se aisló (10*E*)-heptadeca-1,10-dien-4,6-diino-3,8,9-triol (**48**); en las raíces de la especie *Ferulago campestris* se identificó 9-epoxyfalcarindiol (**49**); mientras que de la parte aérea de *Centella asiatica* se reportó cadiyenol (**63**); finalmente, de la planta entera de *Bupleurum longifolium* se aisló el acetato de (2*E*,4*E*,8*E*,10*E*)-heptadeca-2,4,8,10-tetraen-6-in-1-il (**66**), acetato de (2*E*,4*E*,9*Z*)-heptadeca-2,4,9-trien-6-in-1-il (**67**), acetato de (2*Z*,8*E*,10*E*,14*S*)-14-hidroxiheptadeca-2,8,10-trien-4,6-diin-1-il (**68**) y bupleurotoxina (**69**) (Huang *et al.*,2009) (Figura 1.5).







**Figura 1.5** Distribución de compuestos tipo falcarinol C-17 en miembros de las familias Asteraceae y Apiaceae.

Una característica notoria en muchas especies de la familia Asteraceae es la presencia de dobles y triples enlaces conjugados, los cuales producen un espectro típico en el UV. Las moléculas más estudiadas son: deshidrofalcarinol (**70**), deshidrofalcarindiol (**71**), centaur X4 (**72**), centaur X3 (**73**), gymnasterkoreaino B (**74**) y gymnasterkoreaino E (**75**) (Christensen, 1991) (Figura 1.6).



Figura 1.6 Moléculas de tipo falcarinol C-17 aisladas en T. procumbens.
### 1.2.6 Metabolismo secundario

El reino de las plantas es, por mucho, el mayor creador de productos naturales (Grant, 1972), produciendo un sin fin de compuestos orgánicos, donde la mayoría parece no ser indispensable para la vida al no participar directamente en procesos fundamentales como crecimiento, desarrollo o reproducción vegetal; los productos naturales son abundantes en individuos que carecen de un sistema inmunológico. Hasta hace un par de décadas se les consideraba como substancias de desecho o errores de las rutas metabólicas primarias (Hadacek, 2002); sin embargo, la biosíntesis de estos compuestos, llamados metabolitos secundarios, permite a las plantas adaptarse al medio ambiente y tener mayores posibilidades de existencia. Los metabolitos secundarios se caracterizan por su diversidad estructural y son biosintetizados a partir de un número limitado de precursores (Oksman-Caldentery e Inze, 2004). El entendimiento de su biogénesis resulta esencial para comprender la relación que existe entre el ambiente y la planta. Con el estudio y desarrollo de la fitoquímica, se volvió obvio que exclusivamente algunos de estos productos ocurren en la naturaleza como medida para preservar la vida. De este modo, algunas plantas inician la biogénesis de fitocomplejos bajo condiciones de estrés biótico y abiótico; varios de ellos presentan actividad selectiva (Jachak y Sakalani, 2007). Hoy en día constituyen una fuente valiosa de aleloquímicos en la que nuestro país ha incidido en pequeña escala.

El interés por el estudio del metabolismo secundario y sus productos tiene diferentes variantes, por un lado, la mayoría de los metabolitos secundarios poseen actividad terapéutica (anticancerígena, antimicrobiana, antifúngica, antiparasitaria, etc.) y, por el otro, la sobre producción para obtener un bien o servicio con fines industriales (Newman, y Cragg, 2016). El interés por los productos naturales no únicamente responde al llamado de la industria farmacéutica, si no que de ellos se deriva un amplio campo de aplicación, como tintas, polímeros, fibras, pegamentos, aceites, ceras, plaguicidas, agentes saborizantes y edulcorantes, perfumes, pero principalmente fármacos.

La multiplicidad de las estructuras químicas de los metabolitos secundarios es enorme, por lo que es difícil citar una cifra con exactitud, pero se calcula que a la fecha hay registradas más de 200,000 (Kinghorn *et al.*, 2011); así mismo, gracias a las nuevas técnicas analíticas el número de estructuras químicas que se descubre va en aumento rápidamente, pero también es cierto que la probabilidad de que un metabolito secundario se encuentre en diferentes grupos de organismos decrece a razón de la complejidad estructural de la molécula. Se sabe que algunos compuestos bioactivos se encuentran en diferentes órganos vegetales, aparentemente en el tallo, flores, frutos, hojas y raíz. No obstante, se considera al sistema radicular el depósito o reservorio preferido para la biosíntesis de compuestos bioactivos, esto probablemente se deba al papel que desempeñan como compuestos de defensa contra plagas, como insectos y otros predadores, y para prevenir enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus (Yaniv y Bachrach, 2013). Los policétidos son un ejemplo de metabolitos secundarios bioactivos, ampliamente estudiados y utilizados en beneficio de la salud del hombre.

#### **1.2.7 Poliacetilenos**

Los poliacetilenos o policétidos son un gran grupo de metabolitos secundarios derivados de los ácidos grasos que se forman por etapas y reacciones de condensación sucesivas con unidades de acetato; son compuestos en cuya estructura se pueden encontrar dos o más triples enlaces (Konovalov, 2014). Muchos de los aceites vegetales y grasas animales contienen una cadena larga de ácidos monocarboxílicos, conocidos como ácidos grasos. En el caso de que los grupos carbonilo no fueran removidos durante el proceso de biosíntesis, reacciones aldólicas se llevan a cabo, guiando a la deshidratación y enolización de compuestos aromáticos (Hertweck, 2009). El interés particular que se tiene con el estudio de los policétidos nace del conocimiento y amplia diversidad de sus estructuras, los cuales han probado tener un alto impacto en la salud humana; muchos de ellos son usados como agentes terapéuticos, poseedores de importantes actividades biológicas como antibióticos, anticancerígenos, antimicóticos, inmunosupresores, neurotóxicos, citotóxicos y antiparasitarios (Staunton y Weissman, 2001), siendo un gran nicho económico para la industria farmacéutica (se estima que las ventas rebasan los 10 billones de dólares anuales) (Firn, 2010). Se conocen poco más de 2,000 policétidos, la mayoría de ellos (1,100) aislados de plantas de la familia

Asteraceae, principalmente con cadenas que van de 10, 13, 14 y 17 átomos de carbono (Konovalov, 2014; Minto y Blacklock, 2008; Christensen, 1992). Incluso, antes de conocer su importancia en la medicina terapéutica, científicos se vieron interesados en descubrir cómo era que estas moléculas se estructuraban. Desde los primeros descubrimientos en el campo de los policétidos se ha tenido un gran avance, por ejemplo, se sabe que la formación de los policétidos está mediada por un complejo enzimático unido a una proteína portadora de grupos acilo (PPA) (Staunton y Weissman, 2001). Son altamente reactivos, guiando a su fácil oxidación y degradación, especialmente al ser expuestos a luz UV y a cierto pH, su alta reactividad conlleva al especial manejo para su extracción y aislamiento.

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo encontrados en plantas, hongos, líquenes, mohos, algas marinas, esponjas, insectos y anfibios, inclusive se han reportado en mamíferos como el humano (Konovalov, 2014). Su clasificación, se basa en la longitud del esqueleto de hidrocarbonos y en la presencia de algún heteroátomo en particular:

- 1) Acíclicos C14 C18
- 2) Acíclicos C8 C13
- 3) Compuestos con estructura de aleno
- 4) Compuestos aromáticos y heterocíclicos

Para entender la química de los policétidos, primero debemos comprender y estudiar a otra gran familia, en este caso del metabolismo primario, los ácidos grasos, que son los precursores de nuestro metabolito de estudio, la oxilipina aislada de *T. procumbens*.

#### 1.2.8 Biosíntesis de ácidos grasos

Los ácidos grasos pertenecen al metabolismo primario, son biosintetizados por una compleja y elegante maquinaria biosintética llamada ácido graso sintasa (AGS) y una PPA, la cual transporta los ácidos grasos al sitio catalítico (Beld *et al.*, 2014).

En las plantas se producen ácidos grasos con diversos fines, para la pared celular, membranas, almacén de energía como triglicéridos y forman parte de precursores del metabolismo secundario. Comúnmente, la biosíntesis de ácidos grasos inicia con una molécula de acetil-CoA, la cual al carboxilarse genera una molécula de malonil-CoA, que sirve como la estructura de anclaje principal para subsecuentes reacciones de condensación, reducción y deshidratación, hasta que la cadena de ácidos grasos madure y sea aprovechable para la célula (Thelen y Ohlrogge, 2001).

En 1950, Arthur Birch propuso que los polifenoles podrían ser producto de las policetonas, dichos postulados fueron determinantes por dos razones: la primera, en donde las policetonas podrían ser generadas a partir de unidades de acetato mediante repetidas reacciones de condensación, y, segundo, concluyó que marcando con isótopos radioactivos algunos átomos de moléculas en las que se veían involucradas unidades C-2 para su biosíntesis, tanto los ácidos grasos como el ácido esteárico incorporaban unidades de acetato y su unidad activa, hasta que fue identificada como acetil-CoA. Dichas observaciones revelaron que para su biosíntesis dependían del CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono), biotina e iones de magnesio; aun así, el CO<sub>2</sub> no era incorporado a la cadena final de los ácidos grasos (Hertweck, 2009). Los ácidos grasos comúnmente contienen en su estructura entre C-12 – C-20 con hasta más de cuatro dobles ligaduras. Los dobles enlaces comúnmente poseen una geometría *cis* y no son conjugados (Schetter y Mahrwald, 2006; Hamberg *et al.*, 2003).

# 1.2.9 Oxilipinas

El interés en el estudio de las oxilipinas y su relación con la respuesta de las plantas frente a diferentes situaciones de estrés, han provocado un importante avance en el conocimiento sobre su naturaleza, producción y función. Las oxilipinas constituyen una clase de metabolitos secundarios con estructuras y actividades diversas que se originan mediante la oxidación de los ácidos grasos insaturados (Mosblech et al., 2008). Los ácidos grasos constituyen la estructura principal de los lípidos y son comunes en todas las células, forman parte de membranas y lípidos de reserva y son una importante fuente de energía; además de estas funciones centrales, existe evidencia que conduce a pensar que las oxilipinas se biosintetizan como respuesta de la planta a la infección por insectos, o por heridas mecánicas, dando lugar a la acumulación de los compuestos correspondientes, además de cumplir un papel importante como señalizadores moleculares contribuyendo a la regulación de procesos relacionados con el desarrollo de la planta, así como adaptación en condiciones ambientales adversas, activación de la respuesta inmune como protección frente a patógenos (Steppuhn et al., 2010; Wu y Baldwin, 2010; Browse, 2009; Koo y Howe, 2009; Kishimoto et al., 2008; Vellosillo et al., 2010; Xue et al., 2007; Andersoon et al., 2006; Wang et al., 2006; Farmer et al., 2003; Feussner y Wasternack, 2002).

#### 1.2.10 Biosíntesis de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol

En la literatura no se encuentra propuesta alguna con respecto a la biosíntesis de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, sin embargo, dado que pertenece a los policétidos de tipo falcarinol (C-17), se cree que muy probablemente tienen un origen común, la descarboxilación de ácidos grasos. Dada la gran similitud con los ácidos grasos en cuanto a su estructura y las evidencias mostradas gracias al marcaje isotópico con <sup>14</sup>C e <sup>3</sup>H en precursores como el acetato y malonato, es aceptado que, en el caso de la familia de las asteráceas, los policétidos C-17 derivan de grasos insaturados C-18 (Chen *et al.*, 2015; Knispel *et al.*, 2013; Barley *et al.*, 1988; Bu'Lock y Smalley, 1967). Una muy probable ruta biogenética que guíe a la formación de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol es mediante la ruta del crepeninato (Figura 1.3), la cual comprende a lípidos derivados del acetato provenientes del metabolismo primario y diverge con la conversión de ácido linoleico a ácido crepenínico, teniendo como intermediario a un acetileno entre C-12 y C-13 (Minto y Blacklock, 2008), lo cual soporta la teoría que los policétidos C-17 se forman por modificaciones de los ácidos grasos (Haigh *et al.*, 1968).

Las moléculas derivadas de los productos naturales son biosintetizadas por catalizadores de origen proteico denominadas enzimas. En plantas superiores, la oxidación de ácidos grasos ocurre primordialmente bajo el control de lipooxigenasas (LOX's), que representan las principales enzimas involucradas en el proceso de formación de oxilipinas (Andreu et al., 2009). Una de las reacciones más comunes en el metabolismo de los lípidos insaturados es la oxidación (Feussner y Wasternack, 2002) y al metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) catalizados por LOX's se les conoce como biosíntesis de oxilipinas. El primer paso para su biosíntesis, es la formación de ácidos grasos hidroperoxidados, añadiendo dos moléculas de oxígeno de manera regio y estereoespecífica (Feussner y Wasternack, 2002; Brash, 1999), lo que puede lograrse mediante la oxidación química como consecuencia de su interacción con especies reactivas de oxígeno, tales como radicales hidroxilos, o por la acción de LOX's (Mosblech et al., 2008). Un segundo paso lo orquesta la enzima  $\alpha$ dioxigenasa ( $\alpha$ -DOX), que actúa sobre ácidos grasos de distintos tamaños y grados de saturación, generando un primer producto altamente reactivo, que contiene un grupo hidroperóxido en el C- $\alpha$  de la molécula (Hamberg *et al.*, 1999). Este producto primario se modifica de forma espontánea, dando lugar a tres tipos de derivados, un hidroxiácido con el mismo número de carbonos que el ácido graso utilizado como substrato, un aldehído y un ácido graso con un carbono menos que se pierde mediante una descarboxilación (Hamberg *et al.*, 2003). Las LOX's actúan exclusivamente sobre ácidos grasos poliinsaturados, que contengan dobles enlaces conjugados en su molécula, como es el caso de los ácidos linolénico y linoleico, que constituyen los principales substratos de este tipo de enzimas. La disponibilidad del substrato se debe principalmente a un estrés abiótico y biótico (Wasternack, 2007).

Dentro de las enzimas con actividad lipooxigenasa se distinguen tres: 9-LOX, 12-LOX y 14-LOX, dependiendo de la posición en que el oxígeno se incorpore (Browse, 2009; Nandakumar, 2007; Gardner, 1991); este tipo de enzimas parece tener un papel importante en la defensa contra patógenos (Fammartino et al., 2007; Matsui, 2006), además de fungir como señalizadores durante el proceso de patogénesis de las plantas (Andreu, 2009; Brash, 1999). Posteriormente, los productos de esta cascada de reacciones son liberadas en derivados de ácidos grasos por enzimas que aún no se han estudiado. La amplia actividad de estos metabolitos, en combinación al alto potencial para el beneficio de la salud humana, refleja la enorme importancia de esta familia de productos naturales, por lo que ha despertado un amplio interés en conocer su metabolismo como un prerreguisito para producirlos a gran escala (Knispel et al., 2013), ya sea por técnicas biotecnológicas (uso de organismos genéticamente modificados y cultivos celulares) o por síntesis química. El estudio del metabolismo secundario de las plantas guió al desarrollo de técnicas de separación, así como al acercamiento de nuevos métodos espectroscópicos para la elucidación de nuevas moléculas y metodologías para la síntesis química que, en conjunto, forman la base de la química orgánica contemporánea.





## 1.2.11 (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol

Es una oxilipina de la familia de los policétidos, aislada por primera vez por Bohlman *et al.* (1966) de la raíz de *Falcaria vulgaris* (Umbelliferae), y que también ha sido aislada de las raíces de *Artemisia capillaris* (Asteraceae) (Harada e Iwasaki, 1982), de *Calea integrifolia* (Compositae) (Bohlman y Zdero, 1976) y de la parte aérea de *Lidbeckia pectinata* (Asteraceae) (Bohlman *et al.*, 1972); Novelo-Castilla (2005) la aisló de la planta entera de *Tridax procumbens* (Asteraceae). Se describe como un aceite amarillo, muy lábil a temperatura ambiente y con tendencia a polimerizarse rápidamente formando hojuelas de color miel insolubles en cualquier tipo de disolvente orgánico y acuoso. De fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O, con una rotación óptica específica de [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>= +11.0 y una masa molecular de 242 g/mol (Figura 1.4).

OH

Figura 1.8 Estructura de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol.

# JUSTIFICACIÓN

Basado en los pocos, ineficaces e inciertos métodos para tratar enfermedades como la leishmaniasis, considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una "enfermedad desatendida" en las regiones más pobres y marginadas, junto con el alto valor comercial en el tratamiento, que en muchas ocasiones lo convierten en inalcanzable para el grueso de la población, el uso irrazonable de fármacos, generación de resistencia por parte del patógeno, la medicación con agentes a base de antimonio pentavalente, que por lo general arrastran graves efectos colaterales, se generó la necesidad de emprender nuevas iniciativas que reduzcan los casos de leishmaniasis, enfermedad parasitaria transmitida mediante la picadura de más de 20 especies de moscos dípteros, hematófagos hembra del género Phlebotomus en el Viejo Mundo y Lutzomyia en el Nuevo Mundo, también conocidos en algunas zonas del país como jején, papalotilla, palomilla o quemador (Urrutia, 2001), los cuales al picar inyectan un protozoario perteneciente al género Leishmania, de la familia Tryponosomatidae (Neto et al., 2004). Reportes recientes muestran que esta enfermedad afecta a más de 98 países en todo el mundo. Se estima que aproximadamente de 0.7 a 1.2 millones de nuevos casos de leishmaniasis cutánea se reportan anualmente a nivel mundial (WHO, 2016; Getti et al., 2009; Tempone et al., 2005; Urrutia, 2001), su prevalencia es de 12 millones de personas (Torres-Santos et al., 2004) y están en riesgo de contraerla 350 millones más (Croft y Coombs, 2003). En México, los últimos reportes datan del año 2015, registrándose un total de 447 nuevos casos en promedio en los últimos diez años (SSA, 2015), con una incidencia de 5/1,000 habitantes.

Así entonces, en el presente estudio se propone la búsqueda de diferentes y nuevos métodos que conduzcan a la obtención en términos de rendimientos de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol, misma que ha sido aislada y reportada de la planta entera *Tridax procumbens* L. la cual ha demostrado tener una alta actividad *in vitro* ( $CI_{50} = 0.132$  g/mL) contra promastigotes de la especie *Leishmania mexicana*, causante de la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) en México, en particular, en el Sureste mexicano.

# **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar y evaluar nuevos métodos que guíen a la obtención de un mayor rendimiento de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol.

# **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener el estándar de referencia (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol mediante la extracción por maceración, aislarlo y purificarlo aplicando diferentes técnicas cromatográficas de separación.
- 2. Confirmar, a través de técnicas espectroscópicas, la estructura molecular de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol.
- 3. Validar un método analítico para la cuantificación por cromatografía de gases de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol obtenida de la planta *Tridax procumbens* L.
- Cuantificar la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol obtenida de las fracciones hexánicas de *T. procumbens* L. en raíz, tallo, hoja, flor y fruto colectadas mensualmente a lo largo de un año.
- 5. Comparar los rendimientos de la oxilipina (3*S*)-16,17dideshidrofalcarinol a partir de dos métodos de obtención (extracción por maceración y extracción por fluidos supercríticos).
- 6. Realizar la síntesis total de la oxilipina (3*S*)-16-17dideshidrofalcarinol, así como de algunos subproductos.

# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para el cumplimiento de los objetivos planteados en este estudio, se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental:



# CAPÍTULO II

# OBTENCIÓN DE LA OXILIPINA (3S)-16,17-DIDESHIDROFALCARINOL MEDIANTE LA EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN Y SU CUANTIFICACIÓN ANATÓMICA EN *Tridax procumbens* L.

# 2.1 INTRODUCCIÓN

Tridax procumbens L. es una planta utilizada en la medicina tradicional a la que se le atribuyen propiedades analgésicas, antidiabéticas, antiinflamatorias y antiprotozoarias. De esta especie se ha aislado un gran número de metabolitos secundarios, destacando la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, policétido perteneciente a compuestos de tipo falcarinol C-17 y que gracias a su excelente actividad mostrada in vitro en diferentes cepas de L. mexicana despierta el interés de obtenerla en grandes cantidades (Martín-Quintal et al., 2009). La variabilidad en la concentración de este compuesto es debida a diferentes factores, tanto bióticos como abióticos, tales como su localización geográfica, factores genéticos y fisiológicos, época de cosecha, estrés hídrico y parte de la planta, los cuales contribuyen a la diferente acumulación de esta oxilipina. Un importante aspecto a tomar en cuenta es la alta inestabilidad de los policétidos de tipo falcarinol C-17, lo que trae como consecuencia que hasta ahora únicamente se haya logrado reportar la variabilidad en la concentración de este tipo de moléculas en especies de la familia Apiaceae con la ayuda de instrumentos analíticos como CG-FID, CG-EM o CG-EM/EM; para ello, la validación de un método analítico es necesaria para demostrar que los datos son confiables y aptos para el uso indicado.

Por lo que el propósito de este capítulo es determinar la época del año, así como la parte de la planta en la cual se concentra la mayor cantidad de la molécula (3*S*)-16,17dideshidrofalcarinol en condiciones silvestres, añadiendo como factores bióticos las variables precipitación pluvial, temperatura registrada y fotoperiodo.

# 2.2 ANTECEDENTES

### 2.2.1 Extracción

Como premisa, se sabe que el método de extracción tiene influencia directa en la cuantificación del analíto. Los procedimientos clásicos para obtener un compuesto puro de fuentes naturales son mediante la extracción con un amplio número de disolventes orgánicos. Tradicionalmente se han empleado métodos de extracción sólido-líquido, que incluyen la maceración, percolación, infusión, etc.; este tipo de técnicas conlleva largos periodos de tiempo, un alto volumen de disolvente y un bajo rendimiento. El modo de extracción depende de la naturaleza química de la molécula a ser aislada; en el caso de los policétidos, siendo derivados de los ácidos grasos y apolares, son relativamente fáciles de obtener y, por lo tanto, de plantear una estrategia para su extracción, purificación y aislamiento. Su solubilidad varía de acuerdo a sus sustituyentes y a la relación de grupos polares que haya en el esqueleto, siendo los menos oxigenados los más liposolubles; así entonces, se logran extraer con disolventes de mediana a baja polaridad.

Se sabe que los policétidos de tipo falcarinol C-17 son térmicamente inestables y rara vez se encuentran disponibles en forma pura. Por ello, el desarrollo de metodologías que guíen a la extracción, purificación, aislamiento y caracterización se vuelve esencial (Rawson, 2012).

El interés suscitado por la necesidad de obtener metabolitos secundarios de manera económica, rápida y eficiente, ha provocado la innovación de nuevas técnicas para la extracción.

#### 2.2.2 Extracción por disolventes orgánicos: maceración

Las propiedades fisicoquímicas del compuesto a ser extraído determinan la selección del disolvente, por lo que la selección de un disolvente apropiado es el primer paso para la extracción; disolventes de baja polaridad extraerán metabolitos apolares y viceversa, por lo que hacer coincidir la polaridad del compuesto de interés y el disolvente de extracción se vuelve crucial para una extracción óptima. Variables como toxicidad, solubilidad, selectividad y reactividad son factores importantes en los que se debe poner énfasis mientras se selecciona un disolvente. Cuando un compuesto es altamente soluble en un disolvente orgánico en particular, la extracción mediante disolventes se lleva a cabo. El efecto de la temperatura es muy importante en cuanto a la eficiencia, ya que puede llegar o no a afectar la solubilidad y difusión del disolvente sobre la matriz; a medida que la temperatura aumenta, la capacidad de disolución del analíto aumenta. La extracción se realiza por lo menos tres o cuatro veces para su extracción exhaustiva (Langa *et al.*, 2008).

### 2.2.3 Cromatografía

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos que facilitan la separación, identificación y cuantificación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas.

Deriva del vocablo griego *chromos* (color) y *graphos* (escritura), y fue utilizada para entender la teoría del color. El ruso botánico y bioquímico M.S. Tswett (1872-1919) acuñó este término a inicios del siglo XX para describir la separación de pigmentos en hojas. El proceso cromatográfico contempla la separación de componentes de una mezcla en dos fases inmiscibles entre sí, para ello, la muestra deberá estar disuelta en una fase móvil, la cual es impulsada a través de una matriz adsorbente o fase estacionaria, pudiendo ser sólida o líquida. Las fases son escogidas de tal forma que los componentes de la muestra presenten diferencias en cuanto al grado de distribución y a sus propiedades físicas (solubilidad, tamaño, fuerza iónica, polaridad, afinidad, etc.). Las interacciones químicas entre la fase estacionaria y la muestra, determinan el grado de migración y separación de los compuestos contenidos en una muestra, por lo tanto, una especie química que interactúe fuertemente con la fase

estacionaria se moverá con mayor lentitud en la columna, en cambio, aquellos unidos débilmente a la fase estacionaria, se moverán con rapidez. Como consecuencia de estas diferencias en la movilidad de los componentes, se separarán uno del otro. Lo anterior se expresa como una constante de distribución (*K*) que describe el reparto de los analítos en dos fases independientemente del mecanismo de separación. Otro parámetro a considerar es el factor de retención o factor de capacidad (*k*), que relaciona el tiempo en que un soluto pasa en la fase estacionaria y el tiempo en que pasa en la fase móvil; factor de separación (*α*) o coeficiente de selectividad, cuando dos analitos tienen el mismo tiempo de retención (*t*<sub>R</sub>) y no son separados, se le conoce como coelución. Una separación requiere diferentes valores de retención, entre mayor sean estas diferencias, mayor será la eficiencia de la separación o selectividad de la fase estacionaria (Engewald y Dettmer-Wilde, 2014; López-Hernández y Valadez-Villareal, 2008).

De acuerdo a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), la cromatografía se define como: "Método de separación, por el cual compuestos a ser separados son distribuidos en dos fases, una estacionaria y la otra móvil, avanzando en una dirección definida".

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar bajo diferentes criterios, *i.e.* según el estado de agregación de la fase móvil (CG, CL o FSC), según el mecanismo de separación: adsorción, solubilidad, intercambio iónico, exclusión, etc.

# 2.2.4 Cromatografía de Gases (CG)

Probablemente la cromatografía de gases (CG) sea una de las técnicas analíticas más acudidas para la separación, identificación y cuantificación de compuestos volátiles; sin embargo, este criterio no es exclusivo, ya que algunos compuestos con un punto de ebullición y masa molecular grande, como los hidrocarburos, pueden ser analizados debido a su estabilidad. La volatilidad depende del tamaño y polaridad de la molécula, a mayor peso y polaridad, menor volatilidad, por consecuencia se deben considerar ambos parámetros para la separación (Noa et al., 2005). Por lo tanto, la CG está limitada al análisis de compuestos gaseosos, líquidos o sólidos con menos de 60 átomos de carbono y una masa molecular y un punto de ebullición por debajo de 600 Da y 500 °C, respectivamente (Valcárcel, 2003). La operación inicia en el momento en el que la muestra se introduce en el puerto de inyección y de ser necesario se volatiliza, siendo transportada a la columna por un flujo constante de fase móvil, que por regla general debe ser un gas inerte; cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente, que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada substancia en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas.

La muestra es introducida por el puerto de inyección, donde pasa a una cámara y es calentada hasta volatilizarse, posteriormente es transportada a través de una columna por el flujo continuo de la fase móvil a alta presión. La fase estacionaria está formada por partículas de un pequeño diámetro, por lo tanto, habrá una mayor superficie de interacción en la columna. La velocidad a la que un analito se mueve en la columna con respecto a los demás compuestos está determinada por el tiempo en que permanece en la fase estacionaria (Harvey, 2004). Para la identificación de un compuesto se debe seleccionar un sistema de detección adecuado, este sistema detecta la presencia del soluto que es convertida en una señal eléctrica y procesada.

Se representa la señal obtenida frente al tiempo o al volumen de elución, y al gráfico obtenido se le conoce como *cromatograma*. Los solutos se representan gráficamente como una serie de picos o bandas, que pueden identificarse por su anchura, altura, área o tiempo de retención, mismos que están caracterizados por su posición. En el eje de las *x* se representa el tiempo y el eje *y* la intensidad de señal, por lo que picos

con un  $t_{\rm R}$  corto indican que los solutos son ligeramente retenidos por la fase estacionaria, mientras que aquellos con un  $t_{\rm R}$  largo, indican una mayor afinidad a la fase estacionaria. Cabe mencionar que la posición de los picos únicamente provee información de la identidad del compuesto, y que la abundancia puede representar una concentración, mientras que la forma del pico y su anchura indican un buen funcionamiento del sistema CG (Engewald y Dettmer-Wilde, 2014; López-Hernández y Valadez-Villareal, 2008). Dentro de los componentes básicos de un instrumento de CG se encuentran: gas acarreador, el cual provee un flujo continuo y transporta a los solutos de la fase móvil a la columna; generalmente se utiliza He,  $H_2$  y  $N_2$ ; inyector, dispositivo utilizado para introducir la muestra ya sea líquida o gaseosa a la cabeza de la columna; columna, se le considera como el corazón del sistema de CG, las hay empacadas y capilares, con fases estacionarias líquidas y sólidas; horno, sostiene a la columna, consiste en un termostato el cual provee una temperatura a la columna, generalmente se encuentra equipada de un ventilador que garantice la circulación de aire de manera continua; detector, es el dispositivo que registra la salida de los solutos conforme van abandonando la columna, generando una señal eléctrica, misma que se amplifica y se envía a un procesador; procesador de datos, registra, almacena y analiza los datos producidos por el detector (Skoog et al., 2001).

# 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

# 2.3.1 Material vegetal

La colecta del material vegetal es el primer paso en el procesamiento fitoquímico, por lo que el conocimiento preliminar de la planta en estudio es esencial. Las colectas de las muestras se realizaron bajo el protocolo de Buenas Prácticas de Colectas Agrícolas (GACP, 2003) en las mediaciones del Banco de Germoplasma del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), mismo que se encuentra en el Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, ubicado en la comunidad de Sierra Papacal, donde se asignaron áreas estratégicas y exclusivas para el crecimiento de Tridax procumbens L. (Figura 2.1) con coordenadas Lat.: 21º07'48.2" N, Long.: 89°46'46.6" W y Alt.: 9 msnm. Las colectas se hicieron de manera mensual durante un año, evitando el material enfermo y contaminado mediante lavados de agua corriente; se separó en estructura radicular, hoja, tallo, flor y fruto para su análisis (Figura 2.2). Las muestras se secaron a la sombra bajo condiciones controladas para evitar alteraciones químicas a temperatura ambiente y posteriormente en una estufa a 45 °C hasta su secado total. Debido a que el tamaño de partícula y la relación muestra/disolvente afecta la eficiencia de la extracción, se homogeneizó y se redujo el tamaño de partícula, aumentando el área de contacto con el disolvente (Luthuria et al., 2006). El material fue autentificado con el apoyo de un taxónomo experimentado, y una muestra representativa fue depositada con número de voucher 68952 en el herbario U Najil Tikin Xiw de la Unidad de Recursos Naturales del CICY.



Figura 2.1 Área protegida y destinada para las colectas de T. procumbens.



**Figura 2.2** Partes estudiadas de *Tridax procumbens* L. A) Fruto maduro, B) Estructura radicular, C) Hoja joven con peciolo, D) Flor sésil en receptáculo y E) Tallo con brotes y yemas axilares.

### 2.3.2 Obtención de extractos metanólicos por maceración

El primer paso para la extracción es la selección del disolvente apropiado. Cada una de las partes de la planta se colocó en maceración estática a temperatura ambiente durante un día con el volumen suficiente de MeOH hasta que cubriera en su totalidad al material vegetal; posteriormente, el disolvente se filtró primero con algodón y después con papel filtro Whatman®, la remoción del disolvente se llevó a cabo utilizando un evaporador rotatorio a presión reducida con un baño de agua a 40 °C marca Büchi®. El extracto crudo metanólico se recuperó y transfirió a un vial previamente pesado. Este procedimiento se repitió por triplicado para su extracción exhaustiva.

#### 2.3.3 Obtención de la fracción hexánica por partición

El extracto crudo metanólico se llevó a sequedad, para posteriormente disolverse en MeOH, en una relación 2:1 según el peso de la muestra, es decir, que por cada dos gramos de extracto se añadió 1 mL de disolvente. Una vez disuelto el extracto, se agregaron tres volúmenes de agua destilada y se extrajo por partición tres veces consecutivas con *n*-hexano en relacion 2:1, 1:1 y 1:1. Por último, las fracciones hexánicas colectadas se concentraron y llevaron a sequedad para posteriormente resguardarlas en atmósfera de N<sub>2</sub> con el fin de prevenir su oxidación.

#### 2.3.4 Análisis cualitativo de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol por CG

Las fracciones hexánicas, de cada mes y de cada tejido, se inyectaron a una concentración del 1% en un cromatógrafo de gases (CG) con un detector FID (Flame Ionization Detector) marca Agilent®, 7890A, bajo las siguientes condiciones de operación, rampas de temperatura: 180 °C por 3 min, 220 °C por 10 min y 300 °C por 20 min; modo de inyección: split, volumen de inyección: 1  $\mu$ L, flujo: 1 mL/min; en una columna J&W 19091J-413: 350 °C: 30 m × 320  $\mu$ m × 0.25  $\mu$ m, utilizando N<sub>2</sub> como gas acarreador.

# 2.3.5 Análisis cuantitativo de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol por CG

Para estudiar la posible variación de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol en *T. procumbens* L. a lo largo de un año en sus diferentes tejidos vegetales, se preparó una curva de calibración a partir de la oxilipina aislada. Muestras de las fracciones hexánicas de cada uno de los tejidos vegetales de cada mes se inyectaron por triplicado en el CG-FID, obteniendo una media del área bajo la curva; para la cuantificación de la oxilipina se utilizó la interpolación de la función de la línea recta obtenida a partir de la curva de calibración. Las condiciones cromatográficas utilizadas serán las mismas que las aplicadas al análisis cualitativo.

### 2.3.6 Diseño experimental

Se realizó un diseño de dos vías de clasificación: meses y tipo de tejido vegetal. Una vez realizado el análisis de varianza correspondiente, el cual contempla la interacción entre meses y tejidos, se procedió a la realización de comparaciones múltiples entre medias, utilizando para ello el método estadístico de Duncan. El tratamiento de los datos se realizó con el paquete estadístico SAS® 9.4.

# 2.3.7 Extracción por maceración a gran escala

Se realizó una colecta masiva de raíz de *T. procumbens* L. en la misma área experimental (1 Kg en peso seco). El tratamiento de la muestra se realizó tal cual se referencia en el apartado 2.3.2 y 2.3.3. A continuación, se sub-fraccionó hasta lograr el aislamiento e identificación del metabolito de interés. Para ello, se siguió la siguiente secuencia de purificación (Figura 2.3):



**Figura 2.3** Esquema general de purificación de la oxilipina (3*S*)-16,17dideshidrofalcarinol aislada en diferentes fracciones.

# 2.3.8 Aislamiento y purificación de la fracción hexánica (TPR-2a)

Con base en el peso obtenido de la partición hexánica (11.95 g), se montó una columna de cromatografía líquida al vacío (CLV) para la separación fraccionada por gradiente, utilizando ocho diferentes sistemas: Hx (100%), Hx/AcOEt (90:10), Hx/AcOEt (85:15), Hx/AcOEt (80:20), Hx/AcOEt (75:25), Hx/AcOEt (70:30), An (100%) y An/MeOH (70:30), colectando fracciones de 250 mL cada una. Aquellas con un patrón de separación similar entre ellas según lo indicó la cromatografía en capa delgada eluida en un sistema Hx/AcOEt (8:2) se reunieron; por lo que se agruparon en 5 fracciones (TPR-3a – TPR-3e). Para continuar con la purificación, las fracciones TPR-3a con TPR-3b se trataron como una sola y TPR-3c con TPR-3d como otra (Figura 2.4).





#### 2.3.9 Purificación de la subfraccion TPR-3a

Debido al peso de TPR-3a (5.76 g) se dividió y purificó en dos columnas diferentes. Para la primera (2.93 g), se montó una columna de cromatografía por gravedad (CG) con un sistema isocrático *n*-Hx/AcOEt (9:1), colectando 80 fracciones que según su similitud en el patrón de separación mostrado en CCD se reunieron en 5 subfracciones (TPR-4a – TPR-4e), de las cuales se utilizó la TPR-4b (18-35) para continuar con su purificación. Mientras que para la purificación de la otra fracción proveniente de TPR-3a (2.82 g) se eluyó en un sistema *n*-Hx/AcOEt (85:15); según su comportamiento mostrado en CCD, se reunieron en 3 fracciones (TPR-4a' – TPR-4c'), de las cuales en TPR-4b' (22-24) se observa un compuesto puro, al que se asignó el código TPR-4b'1 (0.83 g) (Figura 2.5).



**Figura 2.5** A) Monitoreo por CCD de la fraccion TPR-3a (2.82 g). B) Monitoreo por CCD de la fraccion TPR-3a (2.93 g) en un sistema n-Hx/AcOEt (8:2) reveladas con ácido fosfomolíbdico.

# 2.3.10 Purificación de la subfraccion TPR-4b

La CCD de TPR-4b (0.99 g) indica la presencia de otros compuestos en las subfracciones (18-35), por lo que se continuó con su purificación; para ello, se montó una columna empacada con Sephadex LH-20, eluida en un sistema DCM/MeOH (1:1), obteniendo 40 fracciones y agrupándose de TPR-5a – TPR-5d. En la fracción TPR-5c (7-9), se observó un componente mayoritario y puro que se asignó como TPR-5c1 (0.22 g) (Figura 2.6).



**Figura 2.6** CCD de la fracción TPR-4b, eluida en un sistema *n*-Hx/AcOEt (8:2) revelada con ácido fosfomolíbdico.

#### 2.3.11 Purificación de TPR-3b

Una vez concentrada y seca, la fracción TPR-3b (1.28 g) se montó en una columna de cromatografía por gravedad (CCG) con un sistema móvil isocrático de *n*-hexano 100%, colectándose 80 fracciones de 10 mL cada una; para conocer el grado de pureza, se constató mediante CCD, reuniéndose en 5 fracciones finales (TPR-4a" – TPR-4e"), de las cuales en TPR- 4a" (43-60) se observó la presencia de un compuesto puro, al que se le denominó TPR-4a"1, como se observa en la Figura 2.7.



Figura 2.7 CCD de las fracciones de TPR-3b revelada con ácido fosfomolíbdico.

# 2.3.12 Identificación y caracterización de los compuestos TPR-4b'1, TPR-5c1 y TPR-4a''1 mediante métodos espectroscópicos

La identificación de los compuestos se realizó por medio de técnicas espectroscópicas, las cuales fueron rápidas y sencillas, comparándolas frente a aquellas reportadas en la literatura: Espectroscopía de infrarrojo (IR), usando un equipo Nicolet 8700 Thermo Scientific®; cromatografía de gases 6890N acoplada a espectrometría de masas 5975B (CG-EM), marca Agilent Technologies®; así como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, en un equipo Varian® 600 Direct Drive.

# 2.3.13 Validación del método analítico

El proceso de validación se llevó a cabo en apego a la guía de validación de métodos químicos para suplementos botánicos, de la Asociación Oficial de Químicos Agrícolas (AOAC), misma que establece los parámetros analíticos que deben ser evaluados para la validación de un método no normalizado que se desea desarrollar.

### 2.3.13.1 Linealidad

Se conoce como la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analíto dentro de un intervalo dado.

No obstante, siempre existe el riesgo de que el modelo de regresión lineal sea una pobre estimación de la verdadera relación de los datos graficados en los ejes (*x*) y (*y*); para desestimar lo anterior, se preparó una disolución madre a una concentración de 10 mg/mL y a partir de ella se hicieron diluciones con concentraciones igualmente espaciadas en un intervalo de interés: 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3, 1.5, 1.7, 1.9, 2.1 y 2.3 mg/mL, agregándose 100  $\mu$ L de una disolución de vainillina de concentración 14.6 mg/mL a cada una de las diluciones. Cada nivel se inyectó por triplicado hasta obtener un coeficiente de determinación lo más cercano a 1, finalmente se determinó la curva de regresión de la respuesta analítica (*y*) *vs* nivel de concentración adicionado (*x*), por el método de Estándar Interno (E.I.), confirmando la linealidad.

Además, conjuntamente se determinó el *rango lineal*, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analíto para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar la interpolación en la curva.

#### 2.3.13.2 Precisión

Está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central, y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales. Se determina mediante: a) *Repetibilidad (r).* Proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mesurando bajo las mismas condiciones de medición. *b) Reproducibilidad (R).* Proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mesurando bajo diferentes condiciones de medición.

# 2.3.13.3 Límite de detección (LD)

Corresponde a la menor concentración de un analíto que puede ser detectada con certeza, pero no necesariamente cuantificado en condiciones establecidas. El LD se obtendrá a partir de la fórmula:

$$LD = \frac{3.3 \,\sigma}{S}$$

### 2.3.13.4 Límite de cuantificación (LC)

Corresponde a la menor concentración que un analito puede cuantificarse con precisión y exactitud bajo condiciones de trabajo establecidas. Se expresa:

$$LC = \frac{10\,\sigma}{S}$$

Dónde:

 $\sigma$  = desviación estándar de la respuesta.

S = pendiente de la curva de calibración.

# 2.3.13.5 Especificidad (Selectividad)

Para la evaluación de este parámetro, la molécula aislada se sometió a un medio ácido (HCl, 1 *M*) y medio básico (NaOH, 1 *M*) bajo agitación durante una hora, así mismo se tratará bajo condiciones aceleradas de temperatura (80 °C) durante una hora, bajo condiciones de luz ultravioleta  $\lambda = 254$  nm durante 1 día y bajo condiciones oxidantes con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en agitación durante una hora; posteriormente, se evaluó la media del área bajo la curva que arroje el cromatógrafo de gases de cinco réplicas. Todas las disoluciones a experimentar tendrán vainillina como estándar interno.

# 2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 2.4.1 Identificación de los metabolitos aislados

TPR-4a"1 se logró aislar a partir de 1 Kg de raíz en base seca colectada en el mes de diciembre de 2016. Se obtuvo como un aceite color amarillo pálido, muy lábil a temperatura ambiente y con tendencia a polimerizarse rápidamente, formando hojuelas de color miel insolubles en cualquier disolvente polar. Para evitar su polimerización, se mantuvo disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a bajas temperaturas.

Por cromatografía de gases se observó un pico mayoritario, con un  $t_{R}$  = 8.28 y una pureza del 96% (Figura 2.8), al realizar una CCD y revelarse con ácido fosfomolíbdico, mostró una sola mancha con un  $R_{f}$  = 0.36 en un sistema *n*-Hx/AcOEt (8:2).





#### 2.4.2 Espectrofotometría de Infrarrojo (IR) de TPR-4a"1.

En el espectro de IR de TPR-4a"1 (Figura 2.9) se observa en la región de los grupos funcionales una señal de estiramiento ancha a 3385 cm<sup>-1</sup>, perteneciente a los enlaces –OH o alcoholes secundarios poliméricos; su forma probablemente se deba a la presencia de humedad en el ambiente. Dos bandas comunes de estiramiento de los enlaces -C=C-H a 3075 y 3019 cm<sup>-1</sup>, un par de bandas típicas de estiramiento de

grupos -CH<sub>2</sub>- a 2925 y 2853 cm<sup>-1</sup>; a 2253 cm<sup>-1</sup>, una señal perteneciente a los triples enlaces centrales -C=C-, en ocasiones la banda llega a desaparecer si la simetría de la molécula es alta; finalmente, una señal a 1637 cm<sup>-1</sup> que indica la presencia de grupos vinílicos terminales -CH=CH<sub>2</sub>.



**Figura 2.9** Espectro IR de TPR-4a"1. En la región de los grupos funcionales se observa una señal ancha a 3385 cm<sup>-1</sup> (no señalada) y una señal a 2253 cm<sup>-1</sup> no observada.

### 2.4.3 Espectrometría de masas de TPR-4a"1

Mediante los datos obtenidos de la fragmentación por impacto de electrones (IE) en el espectrómetro de masas de alta resolución (Figura 2.10), en modo positivo, se propone un posible patrón de fragmentación para la caracterización del compuesto TPR- 4a''1.

Por lo general, los poliacetilenos resultan ser mucho más estables a la fragmentación en un modo positivo donde los iones [M]<sup>+</sup> suelen ser más abundantes que en modo negativo (Qiang et al., 2011; Soltoft et al., 2010; Schmiech et al., 2010), probablemente esta sea la razón por la cual la ionización de compuestos poliacetilénicos se realiza en modo positivo; inclusive, la ionización en modo negativo de poliacetilenos del tipo C-17 muestran una descomposición al perderse como ión principal una molécula de agua (Qiang et al., 2011; Pferschy-Wenzig et al., 2009). El espectro de masas de TPR- 4a"1 con IE en modo positivo muestra un ión molecular o ión padre a m/z [242]<sup>+</sup> y poca o nula presencia de  $[M+H]^+$ . Se observa también el fragmento m/z 241 con mayor intensidad, indicando que la molécula pronto pierde un protón, probablemente del grupo OH. El fragmento m/z 141 podría explicarse por la ruptura entre C10-C11, guiando a la formación de nuevos dobles y triples enlaces; los fragmentos m/z 129 y 128 se podrían generar mediante la incisión del C9-C10, mediante la pérdida del noctano; para m/z 128, habría una deslocalización de electrones al oxígeno; una posible ruta para la obtención de m/z 117 y 115, probablemente se deba a la pérdida del 1,4,6trien-3-octanol, generado de la ruptura entre el C8-C9, dando lugar a la formación de nuevos dobles y triples enlaces; el fragmento correspondiente a m/z 91 que representa el pico base, se logra mediante la ruptura en C2-C3 y C8-C9, deslocalizando la carga al oxígeno; para m/z 79 y 77, se sugiere una doble incisión entre C4-C5 y C11-12; la formación de los fragmentos m/z 67 y 55 se podría explicar por la ruptura entre C2-C3, C6-C7 y C5-C6, respectivamente (Figura 2.11).



**Figura 2.10** Espectro de masas de baja resolución con las señales más intensas y su abundancia relativa.



**Figura 2.11** Patrón de fragmentación por IE en modo positivo propuesto para el compuesto TPR- 4a"1. Pico base m/z 91; [M]<sup>+</sup>, m/z 242.

#### 2.4.4 RMN-<sup>1</sup>H de TPR-4a''1

De la interpretación de los datos obtenidos del espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figuras 2.12 y 2.13) de TPR-4a"1, se muestran catorce señales diferentes, ocho de ellas correspondientes a protones olefínicos a  $\delta$  5.93, 5.80, 5.50, 5.43, 5.37, 5.23, 4.99 y 4.93, una señal para un protón base de alcohol a  $\delta$  4.90 y una señal a 3.01 correspondiente a los protones vecinos del alquino (C-7) y alqueno (C-9) (Cuadro 2.1).



**Figura 2.12** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de TPR-4a"1 en CDCl<sub>3</sub> a 600 MHz y ampliación de la región de 6.0 a 4.9 ppm.


**Figura 2.13** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de TPR-4a''1 en CDCl<sub>3</sub> a 600 MHz y ampliación de la región de 3.1 a 1.2 ppm.

#### 2.4.5 RMN-<sup>13</sup>C de TPR-4a''1

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observan diecisiete señales diferentes (Figura 2.14); correspondientes al número de átomos de carbono contenidos en la molécula. Existen seis señales propuestas para carbonos con hibridación  $sp^2$  u olefínicos, comprendidas en la región de 150-100 ppm, cinco señales que representan a carbonos con hibridación sp o acetilenos y a átomos unidos a especies electronegativas (-C-O-) que va de la región 100-50 ppm, y, finalmente, seis señales de carbonos con hibridación  $sp^3$ , comprendidos en la región de 50-0 ppm (Cuadro 2.1).



**Figura 2.14** Espectro de RMN- $^{13}$ C de TPR-4a''1 en CDCl<sub>3</sub> a 600 MHz y ampliaciones de las regiones de 82-62 y 30-26 ppm.

C no.	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> Η	m	<i>J</i> (Hz)
1	117 1	5.23	dt	10.2, 0.8
I	117.1	5.45	dt	17.1, 0.7
2	136.3	5.93	ddd	16.8, 10, 5.2
3	63.6	4.90	ddd	16.8, 5.4, 1.3
4	74.4			
5	71.4			
6	64.2			
7	80.3			
8	17.8	3.01	d	6.8
9	122.1	5.37	dtt	17.2, 12, 6.9
10	133.1	5.50	dtt	9.9, 7.1, 1.3
11	27.3	2.03	m	
12	28.8	1.37	m	
13	28.9	1.30	m	
14	29.2	1.37	m	
15	33.8	2.03	m	
16	139.1	5.80	ddt	19.9, 13.2, 6.6
17	1111	4.93	dq	17.2, 0.9
17	114.4	4.99	dq	17.1, 1.3
3-OH		2.11	d	1.76

**Cuadro 2.1** Asignación de desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C-RMN del compuesto TPR-4a"1 a 600 MHz.

(3*S*)-16,17-Dideshidrofalcarinol es una oxilipina que fue reportada por primera vez por Bolhmann *et al.* (1966) de la raíz de *Falcaria vulgaris* (Umbelliferae), y que también ha sido aislada de raíces de *Calea integrifolia* (Bolhmann y Zdero, 1976), de la parte aérea de *Lidbeckia pectinata* (Bolhmann y Zdero, 1972) y de la planta entera de *Tridax procumbens* L. (Novelo-Castillo, 2005), que son especies pertenecientes a la familia Asteraceae. El término oxilipina ha sido introducido como un vocablo colectivo para compuestos oxigenados biosintetizados a partir de ácidos grasos (Vivanco *et al.*, 2005), implicados en la respuesta al daño físico causado por animales o insectos, así como al estrés y al ataque de patógenos (How *et al.*, 2002).

La presencia de enlaces triples en su estructura permite que se les considere como lípidos acetilénicos o poliacetilenos (polienos) que, a menudo, contienen enlaces dobles o unidades de alenos. Hoy en día se conocen más de mil poliacetilenos aislados de plantas, que son formados a partir de los ácidos grasos insaturados, como el ácido oleico y el linoleico, por deshidrogenación adicional de sus enlaces *cis*-alqueno y acortamiento subsecuente de la cadena hidrocarbonada. Por otra parte, el poliacetileno más estudiado de la familia C-17 es el falcarinol, también conocido como panaxynol, y es considerado como una fitoalexina, las cuales son substancias que se biosintetizan en respuesta a daños externos como el ataque de algún patógeno o por heridas, y están ausentes en tejidos normales de las plantas (Vivanco *et al.*, 2005); es decir, que en algunas especies estos compuestos no se encuentran de manera constitutiva, sino que son inducidos tras haber sufrido una lesión, tal como sucede en especies de la familia Fabaceae y Solanaceae; así por ejemplo, en *Solanum lycopersicum* se observa producción de falcarinol y falcarindiol cuando son infectados por *Verticillum albo-atrum* (Elgersman *et al.*, 1984).

A excepción del (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol, no existe evidencia que pruebe la actividad leishmanicida de poliacetilenos C-17, sin embargo, se han reportado algunos otros compuestos poliacetilénicos que demuestran esta actividad, dentro de los que destacan el acetato de 8-hidroxiheptadeca-4,6-diin-3-il (**76**), el acetato de 8-hidroxiheptadeca-1-eno-4,6-diin-3-il (**77**) y el acetato de 16-acetoxy-11-hidroxioctadeca-17-eno-12,14-diinil (**78**), obtenidos de *Cussonia zimmermanni*, siendo **77** el compuesto más activo ( $CI_{50} = 0.04 \text{ y } 0.1 \mu \text{g/mL}$ ), debido probablemente a la presencia del doble enlace en la posición C-4 (Figura 2.15) (Senn *et al.*, 2007).



Figura 2.15 Compuestos poliacetilénicos con actividad leishmanicida.

Después de comparar los datos espectroscópicos de las fracciones TPR-4b'1 y TPR-5c1 con TPR-4a"1, se asume que se trata de la misma molécula, la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol.

Por otra parte, en el presente estudio se obtuvieron 1.18 g de la oxilipina (3*S*)-16,17dideshidrofalcarinol aislados de 1 Kg de raíz de *T. procumbens* (Cuadro 2.2), mientras que Martín-Quintal (2009), obtuvo 22 mg de la oxilipina a partir de 10 Kg en peso seco de material vegetal de las partes aéreas de la misma especie. Esta gran diferencia se podría explicar por diversos factores que afectan a la disponibilidad de la oxilipina, desde el lugar de colecta, época del año, parte de la planta y múltiples variables que a continuación se explican.

Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
TPR-1a	122.2103	12.221
TPR-2a	11.9513	9.7792
TPR-3a	5.7607	0.5760
TPR-3b	1.2843	0.1284
TPR-5c1	0.2290	0.0229
TPR-4b´1	0.8310	0.8310
TPR-4a´´1	0.1242	0.0124

**Cuadro 2.2** Peso y rendimiento de las diferentes fracciones con respecto al peso original del material vegetal.

# 2.4.6 Localización anatómica de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol en *Tridax procumbens* L. a lo largo de un año

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la oxilipina (3*S*)-16,17dideshidrofalcarinol no se distribuye de manera homogénea en las partes de la planta estudiada, ya que existen diferencias significativas en la interacción entre meses y partes de la planta (Figura 2.16 y Cuadro 2.3), mas sí se encuentra de manera constante, lo que se reafirma en lo propuesto por Olsson y Svensson (1996), sosteniendo que los poliacetilenos del tipo falcarinol C-17 tienden a estar presentes de manera constitutiva, indicando que actúan primeramente como compuestos preinfectivos en las especies que los producen, aunque se ha logrado observar un incremento en la respuesta a infecciones por patógenos.

Los resultados destacan el contenido de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol en la raíz de manera significativa durante todo el año, exceptuando los meses de menor precipitación pluvial (PP). Junio, cuyo valor de PP es el más elevado, representa el mes con mayor contenido de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol en todo el estudio con 0.0358 mg\*g<sup>-1</sup>, lo que contrasta con el mes marzo, siendo el de menor contenido de (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol en todo el estudio con 0.0088 mg\*g<sup>-1</sup>, lo que contrasta con el mes marzo, siendo el de menor contenido de (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol en todo el estudio con 0.0008 mg\*g<sup>-1</sup> en la misma parte de la planta, siendo el mes de menor PP. En un estudio similar, Kellenberg *et al.* (2015) reportan en falcarinol, falcarindiol y acetato de falcarinol 0.0890, 0.0467 y 0.0480 mg\*g<sup>-1</sup>, respectivamente, en la época de mayor PP con la especie *Daucus carota*; por su parte, Czepa *et al.* (2004) en las mismas tres moléculas del tipo falcarinol C-17 reportan haber encontrado concentraciones de 0.0330, 0.0250 y 0.0150 mg\*g<sup>-1</sup> en la misma especie, mientras que en este estudio se obtuvo un promedio para la raíz de 0.0122 mg\*g<sup>-1</sup>.

Del tallo, se puede decir que, después de la raíz, es la parte de la planta con mayor contenido de la oxilipina en promedio, destacando su contenido en el mes de junio con 0.0080 mg\*g<sup>-1</sup>, seguido del promedio de la hoja, donde sobresale el mes de enero con 0.0095 mg\*g<sup>-1</sup>, en la flor se acentúa el mes de octubre con 0.0065 mg\*g<sup>-1</sup> y, finalmente, el fruto, despuntando en febrero con 0.0057 mg\*g<sup>-1</sup>.

Con lo anterior, parece indicar que la biogénesis de los compuestos de tipo falcarinol C-17 se da en función de la disponibilidad de agua, principalmente, ya que, en promedio, los meses que denotan una menor PP son los que en sus diferentes partes anatómicas expresan una menor acumulación de la oxilipina.

Como se sabe, la producción y distribución de metabolitos secundarios se da en función de múltiples factores, destacando dentro de ellos la disponibilidad de agua y el fotoperiodo. Lo anterior, pone de manifiesto lo propuesto por Czepa *et al.* (2004), quienes propusieron la localización anatómica de poliacetilenos en *Daucus carota* L., demostrando que la mayor concentración de falcarindiol se hizo presente en el floema y en la parte superior de la raíz (0.0330 mg\*g<sup>-1</sup>) y una menor cantidad en el xilema (0.0200 mg\*g<sup>-1</sup>).

La distribución de falcarinol se definió de manera homogénea en toda la raíz, con un promedio de 0.0250 mg\*g<sup>-1</sup> en peso fresco. El acetato de 3-falcarindiol se localizó en la parte superior de la raíz con 0.0150 mg\*g<sup>-1</sup>, mientras que en la parte inferior de la misma con 0.0080 mg\*g<sup>-1</sup>. En un estudio similar, Baranska *et al.* (2005) estudiaron a detalle la localización anatómica de poliacetilenos, concluyendo que es en el parénquima donde existe una mayor concentración, esto se le atribuye a la presencia de nodos vasculares en floemas jóvenes y a los canales pericíclicos del periderma y, muy posiblemente, estos canales sean los responsables del transporte y acumulación de los poliacetilenos en las raíces (Rawson, 2012; Baranska *et al.*, 2005; Garrod *et al.*, 1979).

La deficiencia de agua usualmente inhibe el crecimiento, afectando primordialmente la fotosíntesis. La deficiencia puede inducir o detener la biosíntesis de metabolitos secundarios. Aunque la respuesta a la deficiencia de agua ha sido estudiada en una amplia diversidad de especies con metabolitos secundarios de interés industrial, hay muy poca referencia concerniente al déficit de agua en oxilipinas del tipo falcarinol C-17.



**Figura 2.16** Efecto de la PP (mm) frente a la concentración de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol (mg\*g<sup>-1</sup> en peso seco). El experimento se realizó bajo las normas de un diseño completamente aleatorizado. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de tres repeticiones de cada una de las partes de la planta a lo largo de un año (*p* < 0.05).

Contenido de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (mg/g en peso seco)												
Mag	Parte de la planta											
IVIES	Raíz	Tallo	Hoja	Flor	Fruto							
Septiembre 2016	$0.0053 \pm 0.000^{\text{J}}$	$0.0012 \pm 0.000^{E}$	$0.0008 \pm 0.000^{\text{E}}$	$0.0024 \pm 0.000^{\text{DE}}$	$0.0014 \pm 0.000^{D}$							
Octubre 2016	$0.0069 \pm 0.000^{1}$	$0.0026 \pm 0.000^{\text{CD}}$	$0.0015 \pm 0.000^{D}$	$0.0065 \pm 0.000^{\text{A}}$	$0.0010 \pm 0.000^{D}$							
Noviembre 2016	0.0077 ± 0.001 <sup>H</sup>	0.0033 ± 0.000 <sup>C</sup>	0.0036 ± 0.000 <sup>C</sup>	$0.0018 \pm 0.000^{E}$	$0.0022 \pm 0.000^{\circ}$							
Diciembre 2016	$0.0107 \pm 0.000^{G}$	0.0031 ± 0.000 <sup>C</sup>	$0.0060 \pm 0.000^{B}$	$0.0033 \pm 0.000^{\circ}$	0.0016 ± 0.000 <sup>CD</sup>							
Enero 2017	0.0169 ± 0.002 <sup>C</sup>	$0.0051 \pm 0.000^{B}$	$0.0095 \pm 0.000^{\text{A}}$	$0.0041 \pm 0.000^{B}$	0.0016 ± 0.000 <sup>CD</sup>							
Febrero 2017	$0.0015 \pm 0.000^{K}$	$0.0027 \pm 0.000^{\text{CD}}$	$0.0019 \pm 0.000^{D}$	$0.0029 \pm 0.000^{\text{CD}}$	$0.0057 \pm 0.000^{\text{A}}$							
Marzo 2017	$0.0008 \pm 0.000^{K}$	$0.0020 \pm 0.000^{\text{DE}}$	$0.0018 \pm 0.000^{D}$	$0.0025 \pm 0.000^{\text{CDE}}$	$0.0038 \pm 0.000^{B}$							
Abril 2017	0.0163 ± 0.001 <sup>D</sup>	$0.0020 \pm 0.000^{D}$	$0.0017 \pm 0.000^{D}$	$0.0024 \pm 0.000^{\text{DE}}$	$0.0015 \pm 0.000^{CD}$							
Mayo 2017	$0.0190 \pm 0.003^{B}$	$0.0051 \pm 0.000^{B}$	$0.0020 \pm 0.000^{D}$	$0.0026 \pm 0.000^{\text{CDE}}$	0.0016 ± 0.000 <sup>CD</sup>							
Junio 2017	0.0358 ± 0.001 <sup>A</sup>	$0.0080 \pm 0.000^{\text{A}}$	$0.0020 \pm 0.000^{D}$	$0.0027 \pm 0.000^{\text{CD}}$	0.0014 ± 0.000 <sup>CD</sup>							
Julio 2017	0.0142 ± 0.001 <sup>E</sup>	$0.0029 \pm 0.000^{\circ}$	$0.0015 \pm 0.000^{\text{DE}}$	$0.0023 \pm 0.000^{\text{DE}}$	$0.0014 \pm 0.000^{D}$							
Agosto 2017	0.0120 ± 0.000 <sup>F</sup>	$0.0021 \pm 0.000^{D}$	$0.0070 \pm 0.000^{D}$	0.0011 ± 0.000 <sup>F</sup>	0.0017 ± 0.000 <sup>CD</sup>							

**Cuadro 2.3** Contenido de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol en *T. procumbens*.

\* Los datos presentados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar (n = 3). Superíndices con la misma letra por columna indica diferencias significativas entre meses. ANOVA (p < 0.05). Método Tukey.

## CAPÍTULO III EXTRACCIÓN DE LA OXILIPINA (3*S*)-16,17-DIDESHIDROFALCARINOL POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Uno de los estímulos que despertó el interés de desarrollar tecnologías nuevas y limpias para la obtención de moléculas de origen natural fueron las rigurosas regulaciones de la industria farmacéutica, que exige la búsqueda de disolventes y técnicas "verdes" que substituyan a los compuestos orgánicos volátiles. En las últimas décadas una tecnología que ha logrado tomar fuerza debido a su gran poder de extracción y altos rendimientos es la extracción por fluidos supercríticos (SFE, por sus siglas en inglés) (Mohamed y Mansoori, 2002; Reventós *et al.*, 2002).

La extracción de compuestos provenientes de fuentes naturales ha sido ampliamente estudiada desde los años 70's. La SFE es, sin lugar a duda, una de las técnicas más eficientes para la obtención de compuestos poco polares y haciendo uso de codisolventes se puede obtener moléculas polares (Herrero et al., 2010; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007). Como se verá, un fluido supercrítico (SF) es aquel que, por encima de una temperatura crítica, ya no puede ser licuado independientemente del aumento de presión; a temperatura y presión por encima de la temperatura y presión crítica (punto crítico), una substancia se convierte en un SF. Un SF posee propiedades de disolvente que se parecen a las de un líquido, pero también exhibe propiedades de transporte y difusión parecidas a las de un gas (Meireles, 2008). De esta manera, no sólo puede disolver solutos, sino que también es miscible con los gases ordinarios y puede penetrar en los poros de los sólidos, otra ventaja es que poseen menor viscosidad y un coeficiente de difusión mayor que el de los líquidos; con ello, la densidad del fluido aumenta al aumentar la presión y, al aumentar la densidad, la solubilidad de un soluto en un SF aumenta (Temelli, 2009). El hecho de que las propiedades puedan ajustarse variando la presión y la temperatura tiene ventajas para la aplicación de estos fluidos como agentes de extracción.

En la práctica, más del 90% de las SFE se llevan a cabo con CO<sub>2</sub>, por muchas razones: es un disolvente no tóxico "verde", no inflamable, se le encuentra en altas purezas, es

de bajo costo, fácilmente removible del extracto, químicamente inerte e inflamable, reconocido por la Food and Drug Administration (FDA) como un gas seguro, y su habilidad de ser operado a bajas temperaturas sin hacer uso de agentes oxidantes externos facilita la extracción, además de tener una presión crítica baja (74 bar) a una temperatura de 32 °C. Dada la naturaleza química propia del CO<sub>2</sub>, la diferencia de electronegatividades en los enlaces C-O ( $\mu = 0$ ) y a su geometría molecular, el CO<sub>2</sub> está limitado a extraer compuestos lipofílicos o de baja polaridad sin hacer uso de un codisolvente (Reverchon y De Marco, 2006). En relación al análisis de productos naturales, el funcionamiento de una SFE comparado con otras técnicas de extracción, ya sea reciente o convencional, ha sido altamente evaluado. A la SFE se le ha comparado directamente con la extracción clásica por maceración con disolventes (Wang et al., 2008), soxhlet, hidrodestilación, sólido/líquido (Franco et al., 2007) y ultrasonido (Wang et al., 2008) y en todas ellas se ha demostrado un mayor rendimiento y menor tiempo, corroborando sus inminentes ventajas sobre técnicas tradicionales de extracción. Las condiciones de operación dependen específicamente de la familia o compuestos a ser extraídos; muchos son los factores y variables a considerar que se deben ajustar en la SFE para optimizar una extracción ideal, lo cual consume mucho tiempo; dichos parámetros pueden ser el peso molecular, polaridad, temperatura, etc. (Langa et al., 2009). Como regla general, para la extracción de compuestos termolábiles, la temperatura debe de estar entre 35-60 °C, ya que el incremento de la temperatura reduce la viscosidad del CO<sub>2</sub>, por lo que se reduce la eficiencia en la extracción, pero incrementa la presión de vapor del compuesto a ser extraído (Reverchon y De Marco, 2006); diferentes autores definen la presión como la variable más importante en el proceso de extracción, por lo que se dice que, a mayor presión, mayor será la eficiencia del disolvente y menor la selectividad; otro parámetro crucial es el flujo de CO<sub>2</sub>. Estas variables están conectadas a la termodinámica y cinética del proceso de extracción.

En relación al tamaño de partícula, éste deberá de ser entre 0.25 y 2 mm, ya que al disminuir el tamaño de partícula conlleva a un aumento en el área, provocando una extracción más eficiente; la forma y porosidad de la partícula también son importantes.

Otros parámetros son el tiempo de extracción, ya que es importante maximizar el tiempo de contacto del fluido con la muestra; la cantidad de agua que contenga la

muestra; el método de secado de la misma, en donde se reporta que el secado de la muestra por liofilización conduce a mejores rendimientos que el secado en estufa; por último, otro gran factor dependiente es el empaque de la celda de extracción, ésta deberá estar lo suficientemente compacta con el material, para que el fluido pueda difundirse a través de la muestra (Temelli, 2009; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007; Rao *et al.*, 2007; Reverchon y De Marco, 2006).

#### 3.2 ANTECEDENTES

#### 3.2.1 Extracción de moléculas de tipo falcarinol C-17

Pocos son los reportes que se encuentran en la literatura referentes a la extracción y aislamiento de moléculas de tipo falcarinol C-17, entre ellos está lo descrito por Wei-Huang *et al.* (2010), quienes después de trabajar en la extracción supercrítica de la especie *Oplopanax horridus* condujo al aislamiento de las dos nuevas moléculas **5** y **6**, junto con cuatro moléculas más previamente descritas: (3S,8S)-falcarinol, oplopandiol, 1-acetato de (11S,6S,9Z)-9,17-octadecadieno-12,14-diino-1,11,16-triol y acetato de oplopandiol. Por su parte, Li-Shao *et al.* (2014), después de variar la presión, temperatura de la celda y tiempo de extracción, proponen que bajo las condiciones de operación 360 bar, 40 °C y 3 h logran obtener la mayor cantidad de extracto de CO<sub>2</sub> de la misma especie, como resultado de ello, logran aislar tres metabolitos mayoritarios, entre ellos *S*-falcarinol (**7**).



La extracción con dióxido de carbono (SFE-CO<sub>2</sub>) ha recibido especial atención como una alternativa para la obtención de moléculas de carácter apolar, mejorando su solubilidad, en dependencia del largo de la cadena hidrocarbonada y de la presencia de grupos funcionales (Stahl *et al.*, 1988). El CO<sub>2</sub> es el disolvente más utilizado para este proceso, dado que no únicamente es barato y disponible en alta pureza, sino que es seguro de manejar y no es tóxico (Brunner, 2005). Las propiedades de este disolvente se pueden resumir en unas cuantas reglas: i) Disuelve compuestos apolares o poco polares, ii) El poder de extracción del CO<sub>2</sub> aumenta conforme la masa molecular disminuye y el poder de extracción disminuye a medida que la masa molecular aumenta, iii) el CO<sub>2</sub> tiene una alta afinidad a compuestos

orgánicos oxigenados de mediana masa molecular y iv) el CO<sub>2</sub> es capaz de separar compuestos que son menos volátiles, con mayor masa molecular y/o son menos polares al aumentar la presión.

García *et al.* (1996) establecieron que cada compuesto posee un índice de extracción bajo diferentes condiciones del SF, relacionado a factores tales como temperatura, presión y tiempo de extracción, al modificar estas variables nos permite que las moléculas apolares no disueltas en el SF puedan ser extraídas (Nielsen, 1998). Por lo tanto, al optimizar estas condiciones se pueden reducir los costos y tiempos.

#### 3.2.2 SFE vs extracción convencional

La SFE ha llamado altamente la atención dado que es una alternativa frente a la extracción convencional con disolventes. Esta tecnología utiliza SF's como disolventes, cada uno se caracteriza por tener un punto crítico, el cual está definido en términos de la temperatura crítica y presión crítica, esto es, que los fluidos no pueden ser licuados por encima de su temperatura crítica independientemente de la presión que sea aplicada, pero pueden alcanzar densidades cercanas a las de un líquido. Una substancia es considerada como un SF cuando está por encima de su temperatura crítica y presión critica. La alta densidad de los SF's contribuye al aumento de la solubilidad de los compuestos, mientras que la baja viscosidad permite la penetración en los sólidos con una menor fricción; así, manipulando la temperatura y la presión por encima del punto crítico se pueden afectar las propiedades del SF y aumentar la habilidad de los SF's para penetrar y extraer las moléculas deseadas (Dunford et al., 2003). Los métodos convencionales usualmente utilizan altas temperaturas, lo cual puede llegar a ser responsable de la degradación de los metabolitos; adicionalmente, el uso de disolventes orgánicos conlleva a la contaminación de la muestra; por su parte, las bajas temperaturas con las que la SFE trabaja permite que las moléculas termosensibles no se degraden (Cheung et al., 1998). El tamaño de partícula influye en la eficiencia de extracción debido al área superficial que entra en contacto con el SF (Eller y King, 1996), igual que la cantidad de humedad que contenga la muestra (Stahl et al., 1988).

Algunas de las ventajas en el uso de los fluidos en la SFE son:

1) Tienen una menor viscosidad y mayor difusividad, por lo tanto, pueden penetrar en los poros de los sólidos más eficientemente que los disolventes líquidos, lo que resulta de una mejor y más rápida transferencia de masa.

2) Los SF son forzados a atravesar las muestras durante el tiempo de extracción.

3) La eficiencia de solvatación puede incrementarse al aumentar la presión y/o temperatura, por lo tanto, los hace más selectivos, lo que es ideal para la extracción del material vegetal (Reverchon *et al.*, 2003).

4) Los solutos disueltos en SF's se pueden separar fácilmente por despresurización.

5) Dado que se lleva a cabo a bajas temperaturas se puede lograr extraer compuestos termolábiles (Dron *et al.*, 1997).

6) Comparado con los métodos de extracción convencionales, el material vegetal que se necesita para llevar a cabo una extracción con rendimientos satisfactorios es bajo (Henning *et al.*, 1994).

7) No utiliza disolventes orgánicos, mientras que las técnicas convencionales utilizan grandes volúmenes (Otterbach y Wenclawiak, 1999).

8) El CO<sub>2</sub> puede ser recirculado y reutilizado, con lo cual se minimiza la generación de desperdicios.

Aunque la técnica se sigue mejorando, el costo beneficio que trae consigo es de recalcarse; quizá una de las limitantes pueda ser el volumen de muestra, pero a medida que esto se vaya mejorando, los beneficios económicos a gran escala también mejorarán.

### 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención del extracto de CO<sub>2</sub> mediante la celda de SFE se realizó en el Laboratorio de Investigación Fitoquímica, en la Escuela de Ciencias en la Universidad De Las Américas Puebla (UDLAP), mientras que las determinaciones analíticas se realizaron en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

#### 3.3.1 Instrumentación

#### Extractor de fluidos supercríticos (SFE)

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un extractor Helix<sup>™</sup>, Applied Separations®, en una celda de 100 mL, de diámetro externo 5.72 cm, diámetro interno 3.17 cm, altura externa 24.30 cm y altura interna 12.62 cm.

#### Cromatógrafo de gases (CG)

Se trabajó con un cromatógrafo de gases (CG) Agilent® 7890A con detector FID (Flame lonization Detector) bajo las siguientes condiciones de operación: rampas de temperatura: 180 °C por 3 min, 220 °C por 10 min y 300 °C por 20 min; modo de inyección: split; volumen de inyección: 1  $\mu$ L; flujo: 1 mL/min; columna J&W 19091J-413 (máx. 350 °C) de 30 m × 320  $\mu$ m × 0.25  $\mu$ m, utilizando N<sub>2</sub> como gas acarreador.

#### Reactivos

Se utilizó dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a una pureza del 99.99% y aire comprimido de pureza grado industrial para la extracción supercrítica. Diferentes disolventes orgánicos (Conquimex®) fueron utilizados para las determinaciones analíticas.

#### 3.3.2 Extracción por fluidos supercríticos (SFE-CO<sub>2</sub>)

Para la obtención de los extractos, se pesó en cada tratamiento 5 g de raíz seca de *T. procumbens* y se colocaron dentro de la celda de extracción. En primera instancia y como fase fija, se dejó que el  $CO_2$  impregnara la muestra durante 15 min, posteriormente, en la fase dinámica, cada 30 min se liberó presión hasta completar el ciclo de extracción, la muestra se recuperó en un vial de 10 mL color ámbar con *septum* y se pesó.

#### 3.3.3 Análisis estadístico

Se realizó un diseño experimental bajo un arreglo factorial, donde se probaron tres diferentes presiones (P), tres diferentes temperaturas (T) y tres diferentes tiempos (t); teniendo el siguiente arreglo estadístico:

 $P^3 \times T^3 \times t^3 = 27$  tratamientos

Los datos obtenidos se trataron con la versión más actualizada de la paquetería estadística SAS.

#### 3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.4.1 Condiciones óptimas de la SFE-CO<sub>2</sub> para la obtención del extracto de raíz

De acuerdo a lo obtenido en nuestros resultados, la mayor cantidad del extracto de CO<sub>2</sub> se alcanzó a altas presiones (150 y 200 bar), altas temperaturas (40 y 45 °C) y en largos periodos de tiempo (3.0 y 4.5 h). Los mejores rendimientos se dieron al operar bajo las siguientes condiciones: 200 bar, 40 °C, 4.5 h; 200 bar, 45 °C, 4.5 h; 150 bar, 40 °C, 4.5 h; y 200 bar, 40 °C, 3.0 h. El análisis estadístico demostró no tener diferencia significativa entre ellas, con 0.2230, 0.2151, 0.2100 y 0.2008 mg/g, respectivamente, cuando la densidad del CO<sub>2</sub> es la más alta durante el periodo de extracción. Lo anterior corrobora lo propuesto por Wang *et al.* (2001), quienes reportan que a presiones por encima de 200 bar y 60 °C se mejora el rendimiento de extracción en raíces de *Panax ginseng* (0.1 g/g); por su parte, Leal *et al.* (2010) reportan un máximo rendimiento (0.18%) en *P. glomerata* a 200 bar y 30 °C.

Lo anterior puede ser explicado dado que la solubilidad de una substancia en un SF depende del valor de la densidad del disolvente, el cual aumenta a medida que aumenta la presión del sistema (Brunner, 1994; Souvova, 1994). Así mismo, nuestros resultados coinciden con lo sugerido por Tramontin et al. (2019), quienes confirman que a presiones por arriba de los 160 bar y a altas temperaturas, el rendimiento de extracción aumenta. Así mismo, se observó entre las variables de estudio y la cantidad total de extracto de CO<sub>2</sub> que la presión tiene un notable efecto en el rendimiento global (Figura 3.1); el entendido general es que la presión es el parámetro que más afecta al proceso, por encima de la temperatura y el tiempo de extracción; estas observaciones se asemejan a trabajos publicados anteriormente, en donde se estudia la interacción de los tres parámetros y se observa cómo la presión influye en el poder de solvatación del CO<sub>2</sub>, lo que se explica debido a que a altas presiones el poder de solvatación del disolvente aumenta (Davarnejad et al., 2008). Por otra parte, también se observa que a presión baja (100 bar), la cantidad recuperada de extracto es la menor dentro de todos los tratamientos, cuando el CO<sub>2</sub> tiene la menor densidad dentro de un rango de 0.0837 a 0.1773 mg/g; además de esto, todos los tratamientos mostraron un comportamiento similar en términos de la cantidad de extracto recuperado, comprendido entre 0.1278 y 0.1794 mg/g (Cuadro 3.1).



**Figura 3.1** Respuesta de las variables presión (bar), temperatura (°C) y tiempo de extracción (h) en el rendimiento total (mg/g) del extracto de SFE-CO<sub>2</sub> en raíces de *T*. *procumbens*. Los valores son la media (±) de la DE ( $P \le 0.05$ ).



**Figura 3.2** Comportamiento de las condiciones de extracción óptimas de SFE-CO<sub>2</sub> *vs.* extracto hexánico de las raíces de *T. procumbens*.

Presión	Temperatura	Densidad	Coeficiente de	Tiempo (h)							
(Bar)	(°C)	CO <sub>2</sub> (Kg/m <sup>3</sup> )	difusión (cm²/s)	1.5	3.0	4.5					
	35	700.1	0.0016	$0.1022 \pm (0.007)^{\text{DEFG}}$	$0.1538 \pm (0.027)^{\text{ABCDEFG}}$	$0.1733 \pm (0.016)^{\text{ABCDE}}$					
100	40	628.7	0.0016	$0.0852 \pm (0.004)^{\text{G}}$	$0.1103 \pm (0.001)^{\text{DEFG}}$	$0.1233\pm(0.005)^{\text{CDEFG}}$					
	45	506.5	0.0017	$0.0886 \pm (0.023)^{\text{GF}}$	$0.0837 \pm (0.006)^{\text{G}}$	$0.0986 \pm (0.003)^{\text{EFG}}$					
	35	813.6	0.0010	$0.1422 \pm (0.003)^{\text{ABCDEFG}}$	$0.1736 \pm (0.006)^{\text{ABCDE}}$	$0.1681 \pm (0.014)^{\text{ABCDEF}}$					
150	40	780.3	0.0011	$0.1409 \pm (0.004)^{\text{BCDEFG}}$	$0.1271 \pm (0.021)^{\text{CDEFG}}$	$0.2100 \pm (0.063)^{\text{AB}}$					
	45	740.0	0.0011	$0.1278\pm(0.006)^{\text{CDEFG}}$	$0.1409 \pm (0.004)^{\text{BCDEFG}}$	$0.1794 \pm (0.001)^{\text{ABCD}}$					
	35	865.2	0.0081	$0.1532 \pm (0.042)^{\text{ABCDEFG}}$	$0.1757 \pm (0.021)^{\text{ABCDE}}$	$0.1602 \pm (0.033)^{\text{ABCDEFG}}$					
200	40	839.9	0.0086	$0.1584 \pm (0.004)^{\text{ABCDEFG}}$	$0.2008 \pm (0.030)^{\text{ABC}}$	$0.2230 \pm (0.028)^{\text{A}}$					
	45	812.1	0.0085	$0.1752 \pm (0.005)^{\text{ABCDE}}$	$0.1714 \pm (0.014)^{\text{ABCDE}}$	$0.2151 \pm (0.050)^{\text{AB}}$					

Cuadro 3.1 Rendimiento (mg/g) de los extractos de CO2 obtenidos de las raíces de T. procumbens mediante SFE.

*Nota.* Los datos se presentan como la media del error estandar (SE) n = 3. Superíndices con diferente letra indican diferencias significativas entre ellos. La comparación de medias se realizó con el método Duncan en el análisis de varianza (ANDEVA) ( $P \le 0.05$ ). Los coeficientes de difusión son calculados por la ecuación Hirschfelder, Bird and Spotz para gases no polares.

Se sabe que, por ejemplo, el tiempo también influencia al proceso de extracción. Bijttebier et al. (2014) describen una serie de valores que varían de entre 30 a 720 min, y asientan que a lapsos de tiempo largos se obtiene una mayor cantidad de extracto; nuestros resultados corroboran lo antes planteado, ya que a los primeros 30 min los mejores rendimientos son alcanzados bajo las condiciones: 200 bar, 40 °C, 4.5 h; 150 bar, 40 °C, 4.5 h, 200 bar, 40 °C, 3.0 h; y 200 bar, 45 °C, 4.5 h, recuperando un total de 0.0318, 0.0303, 0.0258 y 0.0235 mg/g, respectivamente (Figura 3.2). Una tendencia general es que largos periodos pueden guiar a un descenso en el rendimiento, posiblemente debido a reacciones de degradación, lo que no ocurre en periodos cortos, cuando el proceso es gobernado por un fenómeno de difusión por transferencia de masa, debido al hecho que a una menor residencia del disolvente se traduce en una menor transferencia de masa (De Andrade-Lima et al., 2019; Maixia et al., 2012). Realizando una comparación entre un proceso de extracción común como la maceración y la SFE, existe una diferencia notable en la cantidad del extracto obtenido, alcanzando en la maceración un punto máximo de extracto a las 1.5 h con 0.0248 mg/g, después de ese tiempo, la cinética de extracción empieza a descender; mientras que la SFE alcanza su máximo punto a las 0.5 h con 0.0318 mg/g, operando a condiciones de 200 bar y 40 °C.

#### 3.4.2 Perfil fitoquímico del extracto de raíz obtenido por SFE-CO2

La composición y perfiles fitoquímicos del extracto de SFE-CO<sub>2</sub> se obtuvieron mediante CG-EM, en donde un total de 21 compuestos fueron identificados junto con sus nombres, índice de retención de Kovats, masa exacta y abundancia relativa (Cuadro 3.2). La presencia o ausencia de compuestos varía, y los porcentajes de área relativos en el cromatograma se muestran en función de las variables utilizadas para cada tratamiento en específico. Los constituyentes principales de las raíces de *T. procumbens* son compuestos hidrofóbicos insaturados, principalmente ácido palmítico, falcarinol y (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol. El contenido de (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol fluctúa entre 0.94-0.11% del total del área integrada, en donde los mejores rendimientos fueron obtenidos trabajando con 200 bar, 40 °C, 4.5 h (Leal *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2001).

Uno de los compuestos presentes en las raíces de especies de la familia Asteraceae es el falcarinol. En el presente estudio, reportamos un rendimiento máximo de esta molécula con

9.79% a altas presiones y altas temperaturas (200 bar y 45 °C); en un contexto similar se encontra lo descrito por Maxia *et al.* (2012), quienes obtuvieron un 6.8% del estereoisómero *Z*-falcarinol a 100 bar y 40 °C del aceite esencial de *Apium nodiflorum*; por su parte, Kemzuraité *et al.* (2014) reportan el mayor rendimiento de *Z*-falcarinol y falcarinol con un 0.16% y 0.49%, respectivamente, en hojas de *Levisticum officinale* cuando utilizan temperaturas y presiones por encima de los 45 °C y 100 bar. El rendimiento global de la técnica depende del material vegetal y los compuestos presentes en él y la variación de las compuestos extraídos. También se demuestra que la concentración de algunos compuestos se incrementa con el aumento de la presión de extracción, mientras la concentración de otros disminuye (Al-Asheh *et al.*, 2012). Esto nos permite controlar la composición del extracto, resultando la SFE un procedimiento selectivo para la obtención de cierto tipo de moléculas (Figura 3.3). Hasta este punto, nadie anteriormente ha reportado el perfil fitoquímico de las raíces de *T. procumbens*.



**Figura 3.3** Cromatograma del extracto obtenido por SFE-CO<sub>2</sub> de raíz de *T. procumbens* mostrando selectividad por moléculas de tipo falcarinol.

Chamical compound	IK	Exact Mass	Treatment																										
Chemical compound	IK	Exact Wass	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Palmitic acid	1968	256.2402	0.87	7.39	10.50	22.34	10.62	18.81	19.03	16.28	10.83	43.52	50.11	45.86	22.44	32.69	38.78	30.59	5.34	39.46	23.11	21.07	18.58	25.22	32.41	5.10	15.72	1.06	15.16
Nonadecane	1910	268.3130	0.39	-	-	1.10	0.36	-	-	-	0.49	-	-	1.13	1.53	1.16	0.76	1.58	0.20	-	-	2.36	-	2.09	-	0.95	-	0.95	0.84
Stigmasterol	3138	412.3705	18.73	14.68	46.54	4.65	5.13	4.96	7.21	29.51	3.98	37.08	28.31	23.63	20.54	17.08	19.89	9.67	11.27	8.82	11.52	-	-	-	-	-	-	-	-
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)	2183	280.2402	-	1.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25.46	-	17.53	-	-	-	1.98
Falcarinol	2000	244.1827	0.33	3.96	1.87	2.28	8.25	9.91	5.87	7.37	9.79	3.19	2.68	2.45	1.24	0.67	1.26	0.89	5.69	7.99	8.95	2.19	6.71	1.76	5.65	1.25	1.9	0.96	2.57
(3S)-16,17-didehydrofalcarinol	1906	242.1128	0.03	0.11	0.14	0.19	0.73	0.47	1.2	0.94	0.49	0.92	0.26	0.21	0.50	0.11	0.16	0.22	0.18	0.84	0.73	0.15	0.45	0.76	0.22	0.22	0.43	0.30	0.46
Oleic acid	2163	252.2558	-	-	0.11	21.90	10.57	-	11.98	8.69	12.77	58.49	69.24	45.14	-	-	45.05	35.85	-	0.51	15.54	-	-	-	-	3.67	7.91	-	-
2-Methyl tetracosane	2442	352.4069	-	-	-	0.55	-	-	-	-	-	0.41	-	1.67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.79	0.26	-
cis Vaccenic acid	2113	282.2558	-	-	16.01	-	-	27.60	-	-	-	-	-	-	24.32	45.32	-	-	5.48	31.58	-	22.93	-	25.42	-	-	-	-	-
Heptacosane	2700	380.4382	-	0.30	-	1.15	1.86	0.39	-	-	2.10	0.70	0.77	1.58	3.53	1.96	0.85	1.66	-	1.15	-	5.81	0.54	7.78	-	-	0.72	-	-
7-Hexadecenal-(Z)	1798	238.2296	-	-	0.11	0.40	-	-	0.37	0.48	-	-	0.98	-	-	-	-	0.59	0.17	0.71	-	-	-	2.43	0.70	-	0.56	-	-
2-Hexadecanol	1794	242.2609	-	-	-	-	-	0.16	-	-	-	-	0.59	-	-	1.72	-	0.11	-	-	-	-	1.05	0.81	0.17	-	-	-	-
Ethanol, 2-(octadecyloxy)	2328	314.3184	-	-	-	-	-	0.43	-	-	-	-	0.82	-	-	-	-	-	-	-	-	2.79	-	0.33	-	-	-	-	-
Hexacosane	2606	366.4225	-	-	-	-	-	-	-	-	1.76	-	-	-	4.61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Hexyl-1-octanol	2069	214.2296	-	0.18	-	0.54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.57	-	1.02	0.15	-	-	-	-	-	-	-	0.68	-	-
1-Octanol-2-butyl	1393	186.1983	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.03	-	-	-	-	0.48	-	-	-	-	-	0.69	-	-
2-Methylhexacosane	2663	380.4382	-	-	-	-	-	-	0.34	-	-	-	-	-	-	3.31	1.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Decanol-2-hexyl	1790	242.2609	-	-	-	-	-	-	0.21	-	-	-	-	-	-	-	-	0.72	-	-	-	-	-	-	-	1.03	-	-	-
2-Methyltetracosane	2465	352.4069	-	0.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.85	-	-	0.97
Oxalic acid	2334	340.2613	-	0.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.55	1.60
Butyl-9-tetradecenoate	1986	282.2558	-	-	0.11	-	-	-	-	24.15	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-		-	-

#### Cuadro 3.2 Composición química del extracto de raíz de T. procumbens obtenido por SFE-CO2.

Nota. Los datos se muestran en porcentaje de área de cada compuesto del total del área integrada en el cromatograma de CG-EM. (-) Compuestos no identificados en la librería del NIST. Los compuestos se enlistan en orden del tiempo de elución en la columna.

#### 3.4.3 (3S)-16,17-Dideshidrofalcarinol, aislamiento e identificación

El rendimiento y cantidad del extracto no es la única característica en el proceso de extracción; otro valor de sumo interés es la cantidad total del compuesto, el cual puede ser extraído a partir de una cantidad de material vegetal. En un estudio previo, establecimos que la cantidad máxima de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol se encuentra en las raíces durante el periodo de lluvias, lo que comprende el período de mayo a julio (Larqué-García et al., 2020). Bajo ese entendido, se logró el aislamiento de (3S)-16,17dideshidrofalcarinol a partir de 28.6 g del extracto crudo de MeOH (TPR-1a), representando un 15.3% de rendimiento, mientras que de la fracción hexánica (TPR-2a) se obtuvo 2.7 g con un rendimiento de 9.44%; TPR-2a fue purificada mediante cromatografía flash para obtener el compuesto deseado con un total de 887.5 mg (0.41%); por otro lado, en una colecta efectuada en el mes de diciembre se obtuvo un rendimiento de 0.11% de la oxilipina; esta notable diferencia se puede explicar debido a que el tiempo de colecta fue diferente, aunado al hecho de que existe una variación genética natural en la concentración de poliacetilenos en individuos de la misma especie (Christensen y Kreutzmann, 2007; Rzedowski et al., 2004); además, el tipo de cromatografía utilizada en el presente estudio condujo a una mayor eficiencia en la separación, guiando a mayores rendimientos en menor tiempo y bajos costos.

Con base en los datos espectroscópicos obtenidos y en comparación con los previamente reportados en la literatura, se confirmó el aislamiento de la oxilipina (3*S*)-16,17dideshidrofalcarinol (Novelo-Castilla, 2005; Bohlmann y Zadero,1976).

#### 3.4.4 Condiciones supercríticas para la obtención de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol

Con base en los resultados (Cuadro 3.3) y evaluando las interacciones entre las tres variables (presión, temperatura y tiempo de extracción) incluidas en el modelo estadístico, se encontró que a altas temperaturas se logra obtener la mayor cantidad de la oxilipina (*3S*)-16,17-dideshidrofalcarinol utilizando una de las siguientes condiciones: 150 bar, 45 °C, 1.5 h; 150 bar, 45 °C, 4.5 h; 200 bar, 45 °C, 4.5 h; 200 bar, 40 °C, 4.5 h y 200 bar, 40 °C, 3.0 h, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas, con valores de rendimientos de 0.0409, 0.0397, 0.0371, 0.0367 y 0.0354 mg/g respectivamente. Por otro lado, al trabajar con tratamientos utilizando bajas presiones (100 bar) se obtuvo menores

cantidades de la oxilipina (Figura 3.4). En comparación con estudios previos, se ha reportado que la mayor cantidad de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol obtenida por maceración fue de 0.0359 mg/g (Larqué-García *et al.*, 2020); tomando esto en cuenta, no existe una diferencia notoria en cuanto al rendimiento obtenido por maceración y lo obtenido vía SFE. Las razones aún no son muy claras, pero se sabe que a presiones por encima de los 160 bar y altas temperaturas (por arriba de los 50 °C) conduce a la termodegradación e isomerización de moléculas de tipo falcarinol (Cadena-Carrera *et al.*, 2019; Mazzutti *et al.*, 2017; Prado *et al.*, 2014). Por otro lado, el contenido total de fibra (tipo y concentración), un componente crucial de la pared celular que le confiere rigidez, puede ser una barrera física para la difusión de CO<sub>2</sub> hacia la matriz, lo que puede disminuir el rendimiento (De Andrade-Lima *et al.*, 2019). Algunos de estos parámetros pueden explicarse porque en el presente estudio los rendimientos logrados de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol en *T. procumbens* fueron similares a cuando se extrajo por maceración o por SFE.



**Figura 3.4** Respuesta entre las variables presión (bar), temperatura (°C) y tiempo de extracción (h) en la cantidad total de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol (mg/g) presente en el extracto de raíces de *T. procumbens* obtenido por SFE-CO<sub>2</sub>. Los valores son la media (±) de la SD ( $P \le 0.05$ ).

Presión	Temperatura	Densidad	Coeficiente de	Tiempo (h)							
(Bar)	(°C)	CO <sub>2</sub> (Kg/m <sup>3</sup> )	difusión (cm²/s)	1.5	3.0	4.5					
	35	700.1	0.0016	$0.0163 \pm (0.001)^{\text{FGHIJ}}$	$0.0239 \pm (0.004)^{\text{DEFGHIJ}}$	$0.0307\pm(0.003)^{\text{ABCDE}}$					
100	40	628.7	0.0016	$0.0131 \pm (0.000)^{\text{IJ}}$	$0.0173 \pm (0.000)^{\text{FGHIJ}}$	$0.0192 \pm (0.000)^{\text{EFGHIJ}}$					
	45	506.5	0.0017	$0.0136 \pm (0.003)^{\text{HIJ}}$	$0.0130 \pm (0.000)^{\text{J}}$	$0.0156 \pm (0.000)^{\text{GHIJ}}$					
	35	813.6	0.0010	$0.0235\pm(0.001)^{\text{DEFGHIJ}}$	$0.0274 \pm (0.000)^{\text{BCDEFG}}$	$0.0265 \pm (0.002)^{\text{CDEFG}}$					
150	40	780.3	0.0011	$0.0244 \pm (0.000)^{\text{CDEFGHIJ}}$	$0.0238 \pm (0.001)^{\text{DEFGHIJ}}$	$0.0338 \pm (0.009)^{\text{ABCD}}$					
	45	740.0	0.0011	$0.0409 \pm (0.001)^{\text{A}}$	$0.0226 \pm (0.000)^{\text{DEFGHIJ}}$	$0.0397 \pm (0.001)^{\text{AB}}$					
	35	865.2	0.0081	$0.0257 \pm (0.006)^{\text{CDEFGHI}}$	$0.02847 \pm (0.003)^{\text{BCDEF}}$	$0.0263 \pm (0.005)^{\text{CDEFGH}}$					
200	40	839.9	0.0086	$0.0261 \pm (0.000)^{\text{CDEFGH}}$	$0.0354 \pm (0.006)^{\text{ABCD}}$	$0.0367 \pm (0.004)^{\text{ABC}}$					
	45	812.1	0.0085	$0.0287 \pm (0.000)^{\text{ABCDEF}}$	$0.0278 \pm (0.002)^{\text{BCDEFG}}$	$0.0371 \pm (0.008)^{\text{ABC}}$					

Cuadro 3.3 Cantidad total (mg/g) de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol obtenida de raíces de T. procumbens por SFE-CO<sub>2</sub>.

*Nota.* Los datos se presentan como la media del error estándar (SE) n = 3. Superíndices con diferente letra indican diferencias significativas entre ellos. La comparación de medias se realizó con el método Duncan en el análisis de varianza (ANDEVA) ( $P \le 0.05$ ). Los coeficientes de difusión son calculados por la ecuación Hirschfelder, Bird and Spotz para gases no polares.

## CAPÍTULO IV APROXIMACIÓN A LA SÍNTESIS DE (3*S*)-16,17-DIDESHIDROFALCARINOL

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

Los compuestos de tipo falcarinol C-17 se encuentran en continuo estudio debido al amplio número de actividades biológicas y beneficios que proporcionan a la salud humana, mostrando propiedades como reguladores de la respuesta inmune (Saikia et al., 2013), entre otras. Recientemente, se ha generado un nuevo interés al profundizar en el conocimiento de este tipo de moléculas, al demostrarse que el falcarinol podría ser responsable de la actividad frente a diferentes tipos de cáncer, en vez del β-caroteno como se pensaba en un principio. Posteriormente, varios estudios han indicado que algunos representantes de esta familia presentan actividades biológicas importantes, que los posiciona como excelentes agentes terapéuticos, de ahí, la necesidad de obtener moléculas con actividad terapéutica de manera rápida y eficiente, lo que implica la puesta a punto de nuevas rutas sintéticas, que logren adoptar las características exigidas por la industria farmacéutica. Muchos de estos compuestos presentan varios centros asimétricos. El cambio en la estereoquímica de sólo uno de ellos, en muchos casos, lleva a la pérdida de la actividad, de ahí la relevancia de obtener vía síntesis química exactamente la molécula. La actividad farmacológica de las moléculas se da en función del enantiómero, por lo que se ha creado la necesidad de administrar formas enantioméricamente puras y, por lo tanto, de obtenerlos como tal, ya que interactúan de manera diferente y, por lo mismo, conducen a un efecto diferente. La formación y existencia de los enantiómeros R y S marcan un elevado interés desde el punto de vista químico y farmacológico, ya que este hecho determina una posible respuesta diferente frente a una actividad farmacológica determinada, donde puede darse el caso de fármacos que presentan efectos distintos cuyas actividades presentan efecto dual, como es la indacrinona cuyo enantiómero (R) presenta actividad diurética, mientras que el (S) muestra actividad uricosúrica. Especial mención merece el caso de la talidomida, cuyo enantiómero (S) muestra acción teratogénica con múltiples afectados a nivel mundial que marcó un antes y un después en el estado de los enantiómeros y su ineficiencia en su actividad. Este efecto se complica con la presencia de más de un centro asimétrico, como puede ser el propoxifeno, donde el isómero (2S,3R) muestra acción analgésica y el (2R,3S), antitusiva (Figura 4.1).



Figura 4.1 Fármacos en los que uno de los enantiómeros presenta efecto dual o tóxicos.

Por lo acabado de exponer, se tendrá que decidir si el candidato a fármaco debe ser la mezcla racémica o uno de los enantiómeros, siempre y cuando su actividad esté justificada, ya que puede resultar ventajoso desde el punto de vista industrial obtener el racemato para posteriormente plantear una estrategia para su resolución.

Basado en la inestabilidad que presentan los compuestos de tipo falcarinol C-17, su dificultad en el aislamiento a partir de fuentes naturales y la obtención de cantidades necesarias para la realización de los diversos bioensayos, nace el interés en desarrollar un protocolo de síntesis, que permita obtener tanto la mezcla racémica  $(\pm)$  así como los enantiómeros (3R) y (3S) de la oxilipina 16,17-dideshidrofalcarinol, para así apoyar o dejar a un lado el aislamiento a partir de fuentes naturales, y dar paso a la síntesis química, la cual puede ayudar a clarificar su actividad en estudios *in vitro* e *in vivo* frente a una enfermedad tropical desatendida como es la leishmaniasis, en los cuales se requiere de grandes cantidades.

#### 4.2 ANTECEDENTES

#### 4.2.1 Estrategias para la obtención de fármacos enantioméricamente puros

Dado que la mayor parte de los fármacos que constituyen el arsenal terapéutico son de naturaleza orgánica, la metodología de síntesis orgánica se convierte en el proceso fundamental para su obtención. Los principios activos quirales que se extraen de fuentes naturales suelen contener una única forma enantiomérica, sin embargo, aquellos que proceden de un proceso sintético convencional suelen presentarse en forma de mezclas racémicas; en este caso, para poder obtener uno de los enantiómeros se suele utilizar dos estrategias fundamentalmente. En primer lugar, se puede llevar a cabo una resolución enantiomérica, nombre que reciben los procesos de separación de los enantiómeros de un racemato, ya sea por métodos físicos o químicos y, alternativamente, se puede abordar la síntesis selectiva del enantiómero deseado (Aitken, y Kilényi, 1992).

La separación de los enantiómeros de una mezcla racémica, cuando sólo se desea uno de ellos, representa una reducción muy importante en el rendimiento, lo que se convierte en una desventaja que al mismo tiempo puede ser una ventaja, ya que es la forma más rápida de disponer de ambos enantiómeros para ensayos individuales.

Por su parte, la síntesis selectiva del enantiómero deseado tiene como inconveniente principal el coste y tiempo que implica el desarrollo de una ruta sintética adecuada, además del exceso enantiomérico, considerado como una impureza desde el punto de vista terapéutico. Para llevar a cabo la síntesis selectiva de un enantiómero, se puede optar por utilizar un material de partida de origen natural que ya posea los centros estereogénicos con la configuración adecuada, o también se puede optar por llevar a cabo una síntesis asimétrica a partir de un auxiliar quiral, que será el responsable de la inducción asimétrica generada sobre el substrato (Delgado *et al.*, 2002).

#### 4.2.2 Resolución de mezclas

La separación cromatográfica preparativa sobre fases estacionarias quirales y los procesos de resolución por cinética enzimática son los más utilizados. Una característica obvia de los procesos de resolución es que el rendimiento no puede ser superior al 50%. La resolución cromatográfica en su forma preparativa puede realizarse directamente sobre los

enantiómeros o sobre derivados diastereoméricos obtenidos por un agente de derivatización quiral, generalmente dispuesto sobre la fase estacionaria.

Otro método es la resolución cinética (proceso químico), que se basa en la distinta velocidad con la que los dos enantiómeros de un racémico pueden reaccionar en presencia de un reactivo o catalizador quiral.

#### 4.2.3 Síntesis estereoselectiva

Alternativamente a la resolución de la mezcla se pueden conseguir compuestos enantioméricamente puros realizando la síntesis selectiva de éstos, también conocida como síntesis asimétrica, que tiene como finalidad la obtención selectiva de uno de los posibles isómeros de un determinado compuesto a partir de un substrato proquiral. Una síntesis asimétrica podría definirse como aquella síntesis en la cual un compuesto aquiral se une con moléculas o substratos para así convertirse en una molécula quiral, dando como resultado la formación de estereoisómeros en cantidades diferentes, con la finalidad de hallar el enantiómero más deseado y así maximizar la enantioselectividad. Se conocen dos vías de abordar la síntesis asimétrica, la inducción asimétrica y la reserva quiral.

#### Inducción asimétrica

Un substrato proquiral o grupo funcional es convertido en un producto enantioméricamente puro en una reacción mediada por un auxiliar quiral. Debido a que el auxiliar quiral no se incorpora al producto final, el éxito de la estereoselectividad está determinada mediante el exceso enantiomérico.

#### Reserva quiral

Este tipo de síntesis facilita en gran medida la obtención de la molécula diana, ya que se opta por utilizar un producto de partida de origen natural que posea centros estereogénicos con la configuración adecuada (reserva quiral). En este caso sólo habrá que desarrollar una síntesis convencional, prestando especial atención a aquellas etapas en las que la estereoquímica pueda verse afectada (Stephenson, 1996; Koskinen, 1993).

#### 4.2.4 Síntesis de poliacetilenos de tipo falcarinol C-17

Se denomina poliacetilenos a los compuestos naturales derivados de los ácidos grasos, cuyas estructuras contienen dos o más triples enlaces (Figura 4.2). Son compuestos que en general son biológicamente activos, y altamente reactivos a la oxidación, especialmente a la exposición de la luz UV, situación que los establece como compuestos altamente inestables, requiriendo condiciones especiales para su aislamiento y mantenimiento (Konovalov, 2014). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo un ejemplo el falcarinol, también llamado panaxynol y, anteriormente, carotatoxina, que fue descrito por primera vez en *Panax ginseng* por Takahashi (1964). El falcarinol ópticamente activo (3*R*) fue sintetizado por primera vez por Lu *et al.* (1998), utilizando las condiciones de reacción Cadiot-Chodkiewicz, que consisten en el acoplamiento sp-sp entre un alquino terminal y un haloalquino catalizado por una sal de cobre (Cul) y una amina como base, obteniendo un dialquino como producto.



Figura 4.2 Bis-acetilenos C-17 obtenidos por síntesis asimétrica.

Posteriormente, Mayer *et al.* (2002) describen un proceso semejante a partir de 1,4-dicloro-2-butino utilizando una resolución enzimática para tener acceso a los enantiómeros (3*S*) y (3*R*). Por otra parte, McLaughlin *et al.* (2010) lograron obtener el (+) y (–)-falcarinol mediante una estrategia de doble funcionalización de un butadiino, seguida de una resolución enzimática. Finalmente, Yan-Qing *et al.* (2015) reportan, hasta ahora, la única síntesis asimétrica para la obtención de ambos enantiómeros del falcarinol vía la alquinilación conjugada enantioselectiva de alquinos terminales a compuestos proquirales. Este procedimiento proporciona una forma sencilla de sintetizar compuestos con un centro proestereogénico a partir de compuestos carbonílicos como los aldehídos.

En relación al único centro estereogénico, es de resaltar que ambos enantiómeros se han logrado aislar e identificar (Larsen, 1966; Takahashi, 1964) de una serie de especies. Aún no se conoce con precisión el mecanismo de acción de los poliacetilenos tipo falcarinol, pero se les relaciona con propiedades alquilantes y, por ende, el grupo hidroxilo en el C-3 podría eliminarse, dando como resultado la formación de un carbocatión altamente reactivo, que podría estar estabilizado por resonancia (Christensen, 2009; Purup *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2006; Kobeak *et al.*, 2005).

Se han descrito varios procesos de síntesis para la obtención de derivados de falcarinol. Así, Zheng *et al.* (1999a) describen la primera síntesis para el panaxydol (I) (Figura 4.3), poliacetileno de la familia de los compuestos de tipo falcarinol C-17, aislado de *Panax ginseng.* De acuerdo con su propuesta, el tartrato de etilo **2** se transforma en el éter monobencílico **3**, seguido de oxidación de Swern, y tratamiento con un iluro de fósforo e hidrogenación catalítica para dar el alcohol **4**, que por tratamiento con cloruro de tosilo en piridina, metanol y un exceso de carbonato de potasio se obtiene el epóxido **5**. Posteriormente, el alcohol secundario se protege como metoximetil éter para obtener **6**, que se hace reaccionar con acetiluro de litio para dar el alquino **7**. Por tratamiento con cloruro de mesilo, ácido clorhídrico y carbonato de potasio, **7** se convierte en el epóxido **8**, que se hace reaccionar con *n*-bromo succinimida y nitrato de plata para dar el haloderivado **9**.


Figura 4.3 X) No reportado, a) Oxidación de Swern. b) *n*-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>P<sup>+</sup>Ph<sub>3</sub>Br, *n*-BuLi, THF, -78  $\rightarrow$  0 °C, 75% en dos pasos. c) 10% Pd/C, 95% EtOH, 72 h. 85%. d) *p*-TsCl, Pyr 96%. e) *p*-TsOH, MeOH. f) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 90% en dos pasos. g) MOMCl, i-Pr<sub>2</sub>NEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C – rt, 82%. h) HCCLi•NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, THF-HMPA, - 20 °C, 78%. i) MsCl, Et<sub>3</sub>N, Pyr. j) MeOH, HCl. k) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 77% en tres pasos. l) NBS, AgNO<sub>3</sub>, acetona, 82%.

Mediante la reacción Cadiot-Chodkiewicz (Figura 4.4), el fragmento **9** se acopla con el alquino **10**, obteniendo el compuesto **11**, que por desprotección del grupo *tert*-butil di fenil silano, lleva a la obtención de panaxydol (I), para ello se han llevado a cabo 14 pasos de reacción a partir del compuesto **3**, con un rendimiento global del 10%.



Panaxydol (I)

Figura 4.4 a) CuCl, NH<sub>2</sub>OH, HCl, EtNH<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C, 69%. b) TBAF, THF, rt, 66%.

Por su parte, Zheng *et al.* (1999b) desarrollaron una metodología para la obtención de falcarindiol (II), poliacetileno perteneciente al tipo falcarinol C-17, que ha sido aislado en un gran número de especies de la familia Araliaceae (Figura 4.5). Según indican, a partir de ácido *L*-tartárico se obtiene el diol **2**, que se transforma en el éter *p*-metoxibencílico **3**, seguido de una oxidación tipo Swern y reacción de Wittig con trifenil fosfina para dar el *Z*-alqueno **4** que se desprotege con dihidroxiquinoleína en dicloro metano y agua dando lugar al alcohol **5**, que a su vez se trata bajo condiciones suaves con trifenil fosfina y tetra cloruro de carbono para obtener **6**. Finalmente, el tratamiento del alqueno **6** con diisopropil amida de litio en tetrahidrofurano proporciona el alquino terminal **7**, que se trata con *n*-bromo succinimida y nitrato de plata para dar el compuesto **8**.



**Figura 4.5** a) MPMCI, NaH, THF-DMF. b) (i) (COCI)<sub>2</sub>, DMSO, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C, (ii) CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>PPh<sub>3</sub>+Br<sup>-</sup>, KO-*t*-Bu, THF, -78 °C, 65%. c) DDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (20:1), 81%. d) PPh<sub>3</sub>, CCl<sub>4</sub>, reflujo, 91% e) LDA, THF, -78 °C, 64%. f) NBS, AgNO<sub>3</sub>, acetona, 79%.

Del mismo modo que en la Figura 4.4, aplicando la reacción Cadiot-Chodkiewicz sobre el fragmento **8** se puede unir al **11** que es adecuadamente obtenido a partir de D-xilosa (Figura 4.6) para dar el dialquino **12**, que por tratamiento con fluoruro de *tert*-butil amonio proporciona el falcarindiol (II). En total se han aplicado nueve pasos de reacción para la obtención de II con un rendimiento global de 11% a partir de **2**.



Figura 4.6 X) No reportado, a) CuCl, NH<sub>2</sub>OH HCl, Et<sub>3</sub>N, MeOH, 64%. b) TBAF, THF, 84%.

Recientemente, McLaughlin *et al.* (2010) describen una metodología más corta para la obtención de (±)-falcarinol (III) (Figura 4.7), a partir de la condensación de un *bis*-sililacetileno, con acroleína para la obtención del hidroxialquino **2.** Por otra parte, mediante una reacción de adición se logra unir el alcohol propargílico con un bromo alcano, que por hidrogenación selectiva del triple enlace en condiciones de Lindlar proporciona el doble enlace *cis*, compuesto **3**. La substitución del grupo hidroxilo por bromo o cloro con trifenilfosfina en presencia de tetra bromuro de carbono o tetra cloruro de carbono, respectivamente, proporciona los derivados halogenados **4** y **5**.

La unión del hidroxialquino  $2 \operatorname{con} 4$  o 5 proporciona el (*R*,*S*)-falcarinol (III). En total se aplicaron cuatro pasos de reacción, con un rendimiento global del 19% cuando se utiliza el bromoderivado 4 y del 25% cuando se utiliza el cloroderivado 5. Claramente este último proceso proporciona mejor rendimiento que los dos anteriores que reportan 10 y 11%, respectivamente.



**Figura 4.7** a) (i) MeLi, THF, 0 °C; (ii) acroleína, -78 °C; (iii) NaOH, THF, rt, 73%. b) (i) LiNH<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, -78 °C; (ii) *n*-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>Br, 70%; (iii) H<sub>2</sub>, Pd/CaCO<sub>3</sub>, quinolina, AcOEt, rt. 93%. c) PPh<sub>3</sub>, CBr<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt. 99%; d) PPh<sub>3</sub>, CCl<sub>4</sub>, 80 °C, 76%. e) Cul, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Et<sub>4</sub>NCl, DMF, rt, **4**, 19%, **5**, 25%.

### 4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

La síntesis de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol se realizó en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas: Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Salamanca, España, bajo el asesoramiento de la Dra. Esther del Olmo Fernández.

### 4.3.1 Técnicas generales cromatográficas

### Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizó placas de cromatografía de gel de sílice sobre aluminio Merck® 60 F<sub>254</sub>. Para su revelado se utilizó una disolución de ácido fosfomolíbdico en EtOH al 10%, seguido de calentamiento.

## Cromatografía en columna (CC)

Se realizó sobre gel de sílice Scharlab® 60 (230-400 mesh) en relación 20 g de gel de sílice por gramo de substancia a cromatografiar. Para la cabeza, se utilizó gel de sílice Merck® 60 (70-230 mesh). Las cromatografías se efectuaron en columnas de vidrio y con fase móvil por gradiente.

## 4.3.2 Instrumentación

## Espectroscopía infrarroja (IR-FT)

Se llevó a cabo en un espectrofotómetro Perkin Elmer® FT-IR System BX en película capilar sobre cristales de NaCI. La frecuencia de absorción ( $v_{máx}$ ) medida se expresa en cm<sup>-1</sup>.

## Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C).

Los espectros se obtuvieron en los espectrofotómetros Bruker Avance (400 MHz para <sup>1</sup>H y 100 MHz para <sup>13</sup>C), y en un Varian® (200 MHz para <sup>1</sup>H y 50 MHz para <sup>13</sup>C) en CDCl<sub>3</sub>. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz.

### Espectroscopía de masas

Los espectros se obtuvieron en un equipo Shimadzu QP5000<sup>®</sup> de triple cuadrupolo. La ionización se realizó con diferentes técnicas tales como Electro Spray Ionization (ESI), Tiempo de Vuelo (TOF) e Impacto Electrónico (IE) en modo positivo, aportando con ello los diferentes fragmentos ionizados en la molécula.

### 4.3.3 Análisis de retrosíntesis

Como anteriormente se ha mencionado, hasta ahora no existe ninguna estrategia de síntesis publicada que indique la obtención de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol, sin embargo, debido a la similitud estructural con el falcarinol, se plantean estrategias de síntesis que mejor se aproximen a la oxilipina, en búsqueda de los mejores rendimientos y en el menor número de etapas posibles a partir de reactivos de fácil obtención.

En la propuesta de síntesis para la obtención de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (Figura 4.8), se planteó la construcción de dos fragmentos o sintones, el primero de ellos, SINTÓN A, compuesto 9, se obtuvo mediante la formación de un grupo como el metansulfonato (OMs), ya que tiene todas las ventajas de un buen grupo saliente, sin verse afectado por algún protón ácido que reaccione con un nucleófilo, que a su vez proviene de la reacción entre el cloruro de mesilo (MsCl) y el alcohol 8, lo que permitió la substitución en el azufre, formando el enlace O-S y ruptura del enlace S-Cl; la adición de una base ayudó a la captación del protón ácido, y con ello, los mesilatos ayudan en reacciones de substitución y eliminación, así mismo el compuesto 8 se logró gracias a la desprotección en forma del tetrahidropiranil éter (THP-O), que se dió con la adición de catalizadores que actúen como ácidos de Lewis suaves vía hidrólisis ácida, obteniendo así 7 que se obtuvo con una reacción de hidrogenación con el reactivo de Lindlar, que actuó de manera selectiva sobre el acetileno 6, reduciendo el triple enlace a un doble enlace en posición *cis* (Zhang *et al.*, 2013; Yao-Ting et al., 2005; Marvell y Li, 1973). Sucesivamente, 6 provino de una reacción de condensación entre el reactivo alcohol propargílico protegido en forma de acetal (ii) con 7-bromohept-1-eno (5) por una reacción de adición utilizando MeLi como base (Chong y Wong, 1986) y hexametilfosforamida (HMPA) que ayudó a la formación de un complejo de litio, facilitando con ello el ataque del carbanión del propargilo al carbocatión primario de 5 (Stefani et al., 2013; Horner y Newcomb, 2012; Harcken y Brückner, 2001; Jeffery, 1989; Cossy y Pete, 1986). A su vez, por una reacción típica de substitución del alcohol 4 catalizada por trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) como base y tetrabromuro de carbono (CBr<sub>4</sub>) como donador de electrones, se obtiene el bromo alqueno 5 (Yan-Qing et al., 2015; Watanabe et al., 2013; Schelper y Meijere, 2005; Ashton et al., 1996), que se logró de 4 derivó de la desprotección de 3 en forma de tert-butildimetilsilil éter (TBDMS-OR), lo que se consiguió de manera sencilla, gracias a la adición de un intermediario pentacoordinado como el fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) que promueve la formación de un enlace Si-F, el cual es mejor grupo saliente que el Si-O (Díez-Martín et al., 2001; Hutchinson y Money, 1985). Las condiciones de la reacción Wittig permiten la preparación de alguenos a partir de aldehídos o cetonas, generando el ion iluro a partir de la sal de fosfonio; la geometría de la molécula depende de la estabilidad del grupo iluro, guiando a la obtención del alqueno (E) 3 que se pudo obtener gracias a 2, que procedió de la oxidación (Swern) del alcohol 1 con dimetilsulfóxido (DMSO) y cloruro de oxalilo (COCI)<sub>2</sub> a baja temperatura y una amina terciaria como trietil amina (Et<sub>3</sub>N) para dar lugar a la obtención de **2**. Finalmente, con la protección de un alcohol en la forma *tert*-butildimetilsilil éter (TBDMS-OR) de un diol (*i*) se obtuvo **1**, esto se logró sencillamente ya que los grupos sililo son fácilmente introducidos con una gran variedad de reactivos, tienen la virtud de ser altamente estables en presencia de bases y son fácilmente retirados. La facilidad de introducción y remoción de TBDMS se ve influenciado por factores estéricos (Kumar y Das, 2013; Saikia *et al.*, 2013; Burke *et al.*, 2000; Green y Wuts, 1999; McDougal *et al.*, 1986).

El **SINTÓN B**, compuesto **10**, se obtuvo mediante una reacción de condensación de los reactivos *bis*-sililbutadiino (*iii*) con acrilaldehído (*iv*) (McLaughlin *et al.*, 2010).



dideshidrofalcarinol.

#### 4.3.4 Síntesis total

**Reacción 1.** Protección de 1,6-hexanodiol en forma de sililéter para la obtención de 6-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-hexan-1-ol (**1**)



Modificación del método de McDougal *et al.* (1986). En un matraz de dos bocas se disolvieron 2 g de *i* (16.92 mmol) en 50 mL de DCM (seco) en atmósfera de N<sub>2</sub>. A continuación, se añadió imidazol (1.15 g, 16.92 mmol) seguido de cloruro de *tert*-butildimetilsililo (2.55 g, 16.92 mmol) en agitación constante durante 12 h, y a temperatura ambiente. Posteriormente, se extrajo con AcOEt ( $3 \times 30$  mL) y se lavo con agua hasta pH neutro. Las fases orgánicas se colectaron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro), y concentran a vacío. El crudo de reacción se purificó por CC sobre gel de sílice, eluyendo con Hex/AcOEt (8:2), obteniendo 2.87 g (12.37 mmol, 90% de rendimiento) de un aceite incoloro con un R<sub>f</sub> = 0.31 (*n*-Hex/AcOEt, 8:2), correspondiente a (*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-hexan-1-ol (**1**), segun lo indican sus propiedades espectroscópicas.

IR v<sub>máx</sub> (film) 3351 (br), 2931, 2858, 1472, 1388 cm<sup>-1</sup>.

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, 3.55 (4H, t, *J* = 6.6 Hz), 2.20 (1H, br, s, OH), 1.49 (4H, tt, *J* = 7.1, 6.8 Hz), 1.32-1.28 (4H, tt, *J* = 7.0, 6.4 Hz), 0.84 (9H, s), 0.00 (6H, s).
- <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, 63.1 (C-6), 62.5 (C-1), 32.7 (C-5), 32.4 (C-2), 25.8 (C-4), 25.4 (C-3), 18.2 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si], -6.5 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si].
- EM (TOF, ion positivo), calculada para  $C_{12}H_{28}O_2NaSi: m/z 255.1750$ ; encontrada: m/z 255.1765.

## **Reacción 2.** Oxidación de Swern para la obtención de 6-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)hexanal (2)



El método descrito por Burke *et al.* (2004) indica la preparación de aldehídos a partir de la oxidación de alcoholes en presencia de un grupo protector como TBDMS-OR, para ello, en un matraz de dos bocas bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, se añadieron DMSO (3 mL, 42.58 mmol), cloruro de oxalilo (10.63 mL, 21.27 mmol) y 60 mL de DCM (seco), manteniendo la reacción a –78 °C durante 30 min, posteriormente, se agregó gota a gota una disolución del alcohol 1 (2.87 g, 12.37 mmol) en 7 mL de DCM (seco) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y mediante cánula, dejando evolucionar la reacción durante 2 h. Finalmente, se añadió Et<sub>3</sub>N (9.88 mL, 70.90 mmol) manteniéndose en agitación por 30 min, a continuación, se dejo evolucionar a temperatura ambiente y se añadieron 10 mL de agua. La reacción se extrajo con AcOEt (3 × 30 mL), las fases orgánicas se lavaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro), y evaporaron al vacío. El crudo de reacción se purificó por CC sobre gel de sílice con un sistema de eluyentes Hex/AcOEt (8:2), obteniendo 1.33 g (5.85 mmol, 83% de rendimiento) de un aceite amarillo pálido con un R<sub>f</sub> = 0.62 (*n*-Hex/AcOEt, 8:2), correspondiente a 6-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-hexanal (**2**) según lo indican los datos espectroscópicos.

IR v<sub>max</sub> (film) 2930, 2858, 2711, 1731, 1472 cm<sup>-1</sup>.

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, 9.73 (1H, t, *J* = 3.5 Hz, 1C<u>H</u>O), 3.57 (2H, t, *J* = 6.3 Hz, 6CH<sub>2</sub>), 2.43-2.38 (2H, dt, *J* = 7.4, 6.4 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 1.62 (2H, quint, *J* = 7.4 Hz, 5CH<sub>2</sub>), 1.50 (2H, quint, *J* = 7.2 Hz, 3CH<sub>2</sub>), 1.36 (2H, quint, *J* = 7.2 Hz, 4CH<sub>2</sub>), 0.86 (9H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.01 (6H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).
- <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  202.6 (C-1), 62.7 (C-6), 43.8 (C-2), 32.4 (C-5), 25.8 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si], 25.5 (C-4), 21.8 (C-3), 18.2 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si], -2.3 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si].
- EM (TOF, ion positivo), calculada para  $C_{12}H_{26}O_2NaSi: m/z 253.1594$ ; encontrada: m/z 253.1601.

# **Reacción 3.** Preparación de alqueno (Wittig) para la obtención de *tert*-butil-dimetil-silanoxi hepta-6-eno (**3**)



Aplicando el procedimiento descrito por Díez-Martín *et al.* (2001), con ligeras variaciones. En un matraz de dos bocas en atmósfera de N<sub>2</sub> y a –78 °C se añadió la sal de Wittig (2.07 g, 8.71 mmol) en 20 mL de THF hasta su total disolución, posteriormente se agregó *n*-BuLi (4.35 mL, 6.97 mmol) dejando reaccionar la mezcla durante 1 h. A continuación, se agregó gota a gota el aldehído **2** (1.33 g, 5.81 mmol) previamente disuelto en 10 mL de THF, mediante una cánula y en atmósfera inerte, dejando evolucionar la reacción durante 2 h. La reacción se paró con una disolución saturada de NaCl y se extrajo con AcOEt (3 × 30 mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y se evaporó a vacío. La purificación del crudo de reacción se realizó mediante CC sobre gel de sílice con una fase móvil Hex/AcOEt (9:1), obteniendo 980 mg (4.50 mmol, 80% de rendimiento) de un aceite color amarillo pálido con un R<sub>f</sub> = 0.85 (*n*-Hex/AcOEt, 9:1), que presenta las siguientes propiedades espectroscópicas.

IR v<sub>max</sub> (film) 2929, 2857, 1471, 1255 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, ppm 5.83-5.75 (1H, ddt, J = 17.1, 10.2, 6.7 Hz, 6CH), 4.97 (1H<sub>trans</sub>, dd, J = 17.1, 2.0 Hz, 7CH); 4.93 (1H<sub>cis</sub>, dd, J = 10.2, 2.0 Hz, 7CH), 3.59 (2H, t, J = 6.6 Hz, 1CH<sub>2</sub>), 2.08-2.02 (2H, q, J = 7.5 Hz, 5CH<sub>2</sub>), 1.39-1.32 (6H, m, 2CH<sub>2</sub>, 3CH<sub>2</sub>, 4CH<sub>2</sub>), 0.89 (9H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si), 0.00 (6H, s, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).
<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, ppm 138.9 (C-6), 114.1 (C-7), 63.1 (C-4), 33.7 (C-5), 32.6 (C-3), 28.6 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si], 25.9 (C-2), 25.2 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si], 18.3 (C-1), -5.3 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Si].



Reacción 4. Desprotección del sililéter para obtener el hept-6-en-1-ol (4).

Bajo la metodología propuesta por Hutchinson y Money (1985) y con ligeras modificaciones. En un matraz de dos bocas en atmósfera de N<sub>2</sub> se disolvió el alqueno **3** (980 mg, 4.50 mmol) en 10 mL de THF manteniendo la mezcla a 0 °C; por otra parte, se disolvió TBAF (7.04 g, 4.28 mmol) en 13 mL de THF y la disolución se transfirió mediante una cánula al matraz de reacción bajo atmósfera inerte. Transcurridos 5 min, se retiro el baño de hielo, dejando evolucionar la reacción a temperatura ambiente durante 3 h. La reacción se paró con una mezcla de éter dietílico y agua (1:1). La fase acuosa se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3 × 30 mL) y se lavó con una disolución de NaCl saturada para finalmente secarse sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y evaporarse a vacío. La purificación del crudo de reacción se realizó mediante CC sobre gel de sílice con fase móvil Hex/AcOEt (8:2), obteniendo 410 mg (3.59 mmol, 92% de rendimiento) de un aceite incoloro con un R<sub>f</sub>= 0.22 (*n*-Hex/AcOEt, 8:2), que correspondían a los datos espectroscópicos de hept-6-en-1-ol (**4**).

IR v<sub>max</sub> (film) 3337 (br), 3077, 2931, 1641 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, ppm 5.75 (1H, ddt, *J* = 17.0, 10.2, 6.6 Hz, 6CH), 4.98 (1H<sub>trans</sub>, dd, *J* = 17.0, 2.1 Hz, 7CH<sub>2</sub>), 4.90 (1H<sub>cis</sub>, dd, *J* = 10.2, 2.1 Hz, 7CH<sub>2</sub>), 3.58 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, 1CH<sub>2</sub>), 2.03-2.00 (2H, q, *J* = 7.43 Hz, 5CH<sub>2</sub>), 1.53 (2H, tt, *J* = 7.2, 6.0 Hz, 2CH<sub>2</sub>), 1.36 (4H, m, 3CH<sub>2</sub>, 4CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, ppm 138.8 (C-6), 114.2 (C-7), 62.6 (C-1), 33.6 (C-5), 32.4 (C-2), 28.6 (C-4), 25.1 (C-3).

Reacción 5. Substitución del alcohol 4 para obtener el 7-bromohept-1-eno (5)



Siguiendo la metodología descrita por Watanabe *et al.* (2013) para la substitución de alcoholes primarios por bromo. En un matraz de reacción se añadió CBr<sub>4</sub> (1.74 g, 5.26 mmol) y PPh<sub>3</sub> (1.37 g, 5.26 mmol) a una disolución del alcohol **4** (200 mg, 1.75 mmol) y Et<sub>3</sub>N (1.06 g, 10.52 mmol) en 15 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a –30 °C, dejando evolucionar la mezcla durante 3 h. Posteriormente, la reacción se paró con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5%) y se extrae con hexano ( $3 \times 15$  mL). Las fases orgánicas se reunieron y lavaron con una disolución de NaCl saturada, para finalmente secarse sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y evaporarse a vacío, obteniendo 257 mg (1.45 mmol, 83%) de un aceite incoloro con un R<sub>f</sub> = 0.35 (*n*-Hex/AcOEt, 8:2), el cual se utilizó para las reacciones subsecuentes sin purificación. Los datos espectroscópicos coinciden con los asignados para el 7-bromohept-1-eno (**5**).

IR v<sub>máx</sub> (film) 2998, 2961, 2932, 1826, 730 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 5.83-5.74 (1H, ddt, J = 17.1, 10.2, 6.7 Hz, 2CH), 5.03-4.97 (1H<sub>trans</sub>, dd, J = 17.1, 2.0 Hz, 1CH<sub>2</sub>), 4.94 (1H<sub>cis</sub>, dd, J = 10.2, 2.0 Hz, 1CH<sub>2</sub>), 3.40 (2H, t, J = 6.8 Hz, 7CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ, 138.5 (C-2), 114.5 (C-1), 33.8 (C-3), 33.4 (C-7), 32.6 (C-6), 27.9 (C-4), 27.5 (C-5).





De acuerdo a la metodología descrita por Chong y Wong (1986). Sobre una disolución de 2-(prop-2-in-1-iloxi)-tetrahidro-2*H*-pirano (*ii*) (234 mg, 1.66 mmol) a 0 °C en THF (5 mL), se agrego MeLi (1.6 M, 900  $\mu$ L) y se dejó en agitación durante 15 min. Posteriormente, se adicionó el bromohepteno **5** (257 mg, 1.45 mmol) a la mezcla, seguido de HMPA (1.45 mmol y 259 mg). La reacción se llevó a temperatura ambiente con agitación durante 3 h, posteriormente se enfrió a 0 °C para añadir agua. La mezcla se extrae con AcOEt (3 × 20 mL), y finalmente se lavó con una disolución de NaCl (sat.). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y se evaporó a vacío. La purificación del crudo de reacción se realizó mediante CC sobre gel de sílice con fase móvil Hex/AcOEt (8:2), obteniendo 216 mg (1.22 mmol, 85% de rendimiento) de un aceite incoloro con un R<sub>f</sub> = 0.63 (*n*-Hex/AcOEt, 8:2), que de acuerdo a los datos espectroscópicos corresponde al 2-(deca-9-en-2-in-1-iloxi) tetrahidro-2*H*-pirano (**6**).

IR v<sub>máx</sub> (film) 3301, 2941, 2856, 1641, 1121, 1030 cm<sup>-1</sup>.

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 5.90-5.70 (1H, ddt, *J* = 17.0, 13.4, 7.2 Hz), 5.04 (1H<sub>trans</sub>, dd, *J* = 17.0, 2.1 Hz), 4.94 (1H, dd, *J* = 9.4, 3.2 Hz), 4.80 (1H<sub>cis</sub>, dd, *J* = 10.0, 2.1 Hz), 4.24 (2H, dt, *J* = 14.8, 2.4), 3.84 (1H<sub>axial</sub>, ddd, *J* = 10.8, 8.2, 3.4 Hz), 3.53 (1H<sub>ecuatorial</sub>, ddd, *J* = 8.6, 4.4, 4.2 Hz), 2.21 (2H, t, *J* = 7.2, 2.2 Hz), 2.04 (2H, t, *J* = 2.5 Hz), 1.85-1.36 (12H, m).
- <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ, 138.5 (C-9), 114.5 (C-10), 109.5 (C-2'), 79.7 (C-3), 73.9 (C-2), 61.9 (C-6'), 53.9 (C-1), 33.7 (C-8), 33.4 (C-3'), 32.6 (C-5), 30.1 (C-7), 27.9 (C-6) , 27.5 (C-5'), 25.2 (C-4'), 18.9 (C-4).
- EM (TOF, ion positivo), calculada para  $C_{15}H_{24}O_2Na$ : m/z 259.1668; encontrada: m/z 259.1664.

# **Reacción 7.** Hidrogenación selectiva de **6** para la obtención de 2-(deca-2,9-dien-1-iloxi) tetrahidro-2*H*-pirano (**7**)



Adaptando la metodología propuesta por Sousa y Taylor (1993) para la reducción de triples enlaces a dobles enlaces en posición *cis*. En un matraz de dos bocas y en atmósfera de H<sub>2</sub> se disolvió el alquino 2-(prop-2-in-1-iloxi) tetrahidro-2*H*-pirano (**7**) (100 mg, 0.45 mmol), quinoleína (220  $\mu$ L, 3.73 mmol) y una cantidad catalítica del reactivo de Lindlar en 5 mL de THF. La reacción se realizó a –20 °C durante 30 min y se dejó evolucionar a temperatura ambiente durante una noche. Finalmente, se hizo pasar la mezcla de reacción sobre una cama de celita. El filtrado se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y se evaporó al vacío.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del crudo de reacción, no se observaron señales correspondientes a dobles enlaces, por lo que se produjo la hidrogenación total de la molécula. Así mismo, se probaron diferentes condiciones de reacción (Cuadro 4.1) para lograr la hidrogenación selectiva del triple enlace a doble enlace en posición *cis*.

Entrada	<b>6</b> (mmol)	Lindlar / Quinoleína (mg) / (mmol)	Disolvente (mL)	Tiempo (h)	Producto
1	1	5 / 6.81	THF; 5	9	6
2	1	5 / -	THF; 6.2	9	6a
3	1	5 / -	THF; 10	9	6b
4	1	5 / 1.86	Hx / THF (10:1); 11	3	7
5	1	5 / 15.7	Hx / THF (10:1); 11	9	<b>6, 7</b> (2:1)

Cuadro 4.1 Condiciones ensayadas para la hidrogenación selectiva del alquino 6.

6a = (S)-2-(deciloxi)-tetrahidro-2H-pirano

**6b** = (*S*, *Z*)-2-(dec-2-en-1-iloxi)-tetrahidro-2*H*-pirano

## **Reacción 8.** Desprotección de alcohol en forma de acetal para la obtención de deca-9-en-2-in-1-ol (**11**)



Adecuando la propuesta de Yan *et al.* (2014) donde se plantea un método para la desprotección de un alcohol en forma de THP-OR. Sobre una disolución del alquino **6** (216 mg, 1.22 mmol) en 20 mL de MeOH seco, se añadió una cantidad catalítica de TsOH, manteniendo la mezcla en agitación durante 3 h. La reacción se extrajo con AcOEt ( $3 \times 15$  mL). El conjunto de fases orgánicas se lavó con una disolución de NaHCO<sub>3</sub> saturada y H<sub>2</sub>O destilada hasta pH neutro. Finalmente, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro), se filtró y evaporó a vacío. La purificación del crudo de reacción se realizó mediante CC sobre gel de sílice con fase móvil Hex/AcOEt (85:15), obteniendo 180 mg (1.18 mmol, 97% de rendimiento) como un aceite incoloro con un R<sub>f</sub> = 0.32 (*n*-Hex/AcOEt, 8:2), que, de acuerdo a los datos espectroscópicos, corresponde al deca-9-en-2-in-1-ol (**11**).

IR v<sub>máx</sub> (film) 3337 (br), 2932, 2226, 1640 cm<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 5.90-5.70 (1H, ddt, J = 17.2, 10.2, 6.8 Hz), 5.03 (1H<sub>trans</sub>, dd, J = 17.2, 2.1 Hz), 4.94 (1H<sub>cis</sub>, dd, J = 10.2, 2.1 Hz), 4.24 (2H, t, J = 2.2 Hz) 2.20 (2H, tt, J = 7.4, 2.0 Hz), 2.04 (2H, q, J = 5.4 Hz), 1.55-1.35 (6H, m).

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ, 138.8 (C-9), 114.3 (C-10), 86.2 (C-3), 78.4 (C-2), 51.1 (C-1), 33.6 (C-8), 28.4 (C-5), 28.3 (C-7), 28.3 (C-6), 18.6 (C-4).

## **Reacción 9.** Mesilación del alcohol para la obtención de deca-9-en-2-in-1-il-sulfonato de metilo (**12**).



Koch y Biggers (1994) establecieron un método para la formación de un buen grupo saliente como el MsO. Adaptando su propuesta, sobre una disolución del alcohol **11** (162 mg, 1.10 mmol) en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a –78 °C, se añadió Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L, 1.20 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP. Una vez disuelto en su totalidad se adicionó MsCl (55  $\mu$ L, 1.18 mmol), dejando en agitación durante 30 min, para posteriormente llevar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se para con una disolución de NH<sub>4</sub>Cl y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 20 mL), finalmente se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y se evaporó a vacío. La purificación del crudo de reacción se realizó mediante CC sobre gel de sílice con fase móvil Hex/AcOEt (90:10), obteniendo 135 mg (0.60 mmol, 50% de rendimiento) de un aceite incoloro con un R<sub>f</sub> = 0.51(*n*-Hex/AcOEt, 8:2) que, de acuerdo a los datos espectroscópicos, corresponde al deca-9-en-2-in-1-il-metansulfonato (**12**).

IR v<sub>máx</sub> (film) 3076, 2935, 2859, 2235, 1640, 1365 cm<sup>-1</sup>.

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ , 5.89-5.69 (1H, ddt, J = 16.8, 10.2, 6.6 Hz) 5.04 (1H<sub>trans</sub>, dd, J = 16.8, 2.1 Hz), 4.93 (1H<sub>cis</sub>, dd, J = 10.2, 2.1 Hz), 3.10 (3H, s), 2.22 (2H, tt, J = 6.9, 2.1 Hz), 2.05 (2H, t, J = 5.0 Hz), 1.58-1.38 (8H, m).
- <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ, 138.7 (C-9), 114.5 (C-10), 90.9 (C-3), 72.2 (C-2), 58.5 (C-1), 38.9 (C-1'), 33.5 (C-8), 28.4 (C-5) 28.2 (C-7), 28.0 (C-6), 18.6 (C-4).
- EM (TOF, ion positivo), calculada para  $C_{11}H_{18}O_3NaS$ : *m/z* 253.0868; encontrada: *m/z* 253.0868.

## Reacción 10. Condensación de acroleína con *bis*-sililacetileno (*iii*) para obtener el hepta-1-en-4,6-diin-3-ol (10)



Siguiendo las condiciones de reacción expuestas por McLaughlin et al. (2010) sobre una disolución de 1,4-bis(trimetilsilil)butadiino (iii) (1 g, 5.14 mmol) en 20 mL de THF seco, bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y a 0  $^{\circ}$ C, se añadió gota a gota una disolución de MeLi 1.6 M (5.14 mmol, 1.42 mL), manteniendo la mezcla de reacción durante 3 h, después se llevó a -78 °C, para añadir lentamente el 2-propenal (iv) (288 mg, 5.14 mmol), dejando evolucionar la mezcla durante 3 h a temperatura ambiente. La reacción se paró con una disolución de HCI 1 N hasta ajustar el pH 3, posteriormente se extrajo con AcOEt (2 × 15 mL). Las fases orgánicas se reunieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y evaporaron a vacío. Al crudo de reacción obtenido se agregaron 10 mL de THF seco y 10 mL de una disolución de NaOH 1 M, dejando en agitación vigorosa durante 10 min para después añadir una disolución de HCI 2 N (10 mL). La reacción se extrajo con AcOEt ( $2 \times 15$  mL) y se lavó con una disolución de NaCl saturada. Finalmente, las fases orgánicas se reunieron, secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y evaporaron a vacío. La purificación del crudo de reacción se realizó mediante CC sobre gel de sílice con fase móvil Hex/AcOEt (90:10), obteniendo 513 mg (4.84 mmol, 94% de rendimiento) de un aceite de color amarillo pálido con un  $R_f = 0.38$  (*n*-Hex/AcOEt, 9:1) que, según los datos espectroscópicos, corresponde a la molécula hepta-1-en-4,6-diin-3-ol (10).

IR v<sub>máx</sub> (film) 3284, 2857, 2208, 1660 cm<sup>-1</sup>.

- <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ, 6.03-5.87 (1H<sub>cis</sub>, ddd, J = 17.2, 10.2, 5.6 Hz, 2CH), 5.48 (1H<sub>trans</sub>, dd, J = 17.2, 1.2 Hz, 1CH<sub>2</sub>), 5.28 (1H, dd, J = 10.2, 1.2 Hz, 1CH<sub>2</sub>), 4.92 (1H, dd, J = 2.4, 1.4 Hz, 3CH), 2.04 (1H, s, 7CH), 1.96 (1H, s (br), O-H).
- <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ, 135.5 (C-2), 117.5 (C-1), 74.6 (C-4), 70.4 (C-5), 69.0 (C-6), 67.2 (C-7), 63.3 (C-3).
- EM (TOF, ion positivo), calculada para C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>O: m/z 107.0491; encontrada: m/z 107.0496.





En una adaptación a la metodología descrita por Koch y Biggers (1993), a una disolución de **12** (50 mg, 0.22 mmol) en 5 mL de DMF, se añadieron 3 mL de Et<sub>3</sub>N, una cantidad catalítica de cloruro de *bis*-trifenilfosfinapaladio (4.6 mg) y **10** (34.5 mg, 0.33 mmol), la disolución se agitó bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a 70 °C durante 1 h, y posteriormente se enfrió a temperatura ambiente. La reacción se paró con una disolución de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL) y se extrajo con AcOEt ( $2 \times 15$  mL), las fases orgánicas se lavaron con una disolución saturada de NaCl (saturada) y se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y se evaporaron al vacío. La purificación del crudo de reacción se realizó por CC sobre gel de sílice con fase móvil Hex/AcOEt (90:10).

Analizando el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del crudo de reacción, se detectan las señales correspondientes al compuesto **13**, en mezcla con una pequeña cantidad del compuesto **12**.

## 4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.4.1 Síntesis lineal para la obtención de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol

Como se ha indicado anteriormente para la obtención de la oxilipina (3*S*)-16,17dideshidrofalcarinol, se ha aplicado el proceso indicado en la Figura 4.8, que implica la obtención de los **SINTONES A** y **B**, deca-9-en-2-in-1-il-sulfonato de metilo (**12**) y hepta-1-en-4,6-diin-3-ol (**10**), respectivamente.

En un principio se decidió obtener el 7-bromohept-1-eno (**5**), aunque después se utilizó el compuesto comercial. El proceso parte del hexadecan-1,6-diol (*i*) comercial, que se monoprotege selectivamente en forma de *tert*-butildimetilsilil éter (TBDMS-OR), con cloruro de *tert*-butildimetilsililo, utilizando imidazol como base. Los silil derivados tienen la propiedad de ser altamente estables en presencia de bases, y ser fácilmente retirados. La facilidad de introducción y remoción de TBDMS es influenciada por factores estéricos (Kumar y Das, 2013; Saikia *et al.*, 2013; Burke *et al.*, 2000; Green y Wuts, 1999; McDougal *et al.*, 1986). En la Figura 4.9 se indica el proceso de formación del compuesto **1**, que se obtiene como un aceite incoloro con un 90% de rendimiento; en su espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observan dos señales que resuenan como singuletes a 0.84 y 0.00 ppm, que integran para nueve protones la primera y para seis la segunda, y corresponde al grupo *tert*-butildimetil. Estas señales aparecen en RMN-<sup>13</sup>C a 18.2 y –6.5 ppm, respectivamente.

Mecanismo de reacción



**Figura 4.9** Mecanismo de reacción propuesto para la protección de 1,6-hexanodiol (1). A continuación, el alcohol primario del compuesto **1** se oxida a aldehído aplicando la oxidación de Swern, con dimetilsulfóxido (DMSO) y cloruro de oxalilo (COCI)<sub>2</sub> a baja temperatura y una amina terciaria como trietilamina (Et<sub>3</sub>N) para dar lugar al aldehído **2** con un rendimiento del 83%. En la Figura 4.10 se indica el proceso de formación del compuesto **2**, que no muestra absorciones en IR por encima de 3000 cm<sup>-1</sup>, y en su espectro de RMN- <sup>1</sup>H se aprecia una señal a 9.73 ppm que resuenan como triplete, y en RMN-<sup>13</sup>C aparece a 202.6 ppm.





Figura 4.10 Mecanismo de reacción propuesto para la oxidación de Swern.

Posteriormente, aplicando condiciones de reacción de Wittig sobre el aldehído **2**, y tratando con bromuro de metiltrifenilfosfonio (Ph<sub>3</sub>P<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>Br<sup>-</sup>), en presencia *n*-butillitio se obtiene el alqueno terminal **3** en disposición *E*, con un rendimiento del 80% (Figura 4.11). El compuesto **3** muestra en su espectro de RMN-<sup>1</sup>H tres señales correspondientes con la presencia de un vinilo terminal a 5.83-5.75 (1H, ddt, *J* = 17.1, 10.2, 6.7 Hz, 6CH), 4.97 (1H<sub>trans</sub>, dd, *J* = 17.1, 2.0 Hz, 7CH) y 4.93 (1H<sub>cis</sub>, dd, *J* = 10.2, 2.0 Hz, 7CH) ppm, que resuenan en RMN-<sup>13</sup>C a 138.9 y 114.1 ppm, respectivamente.

#### Mecanismo de reacción



Figura 4.11 Mecanismo de reacción propuesto para la reacción de Wittig.

El grupo protector *tert*-butildimetilsilil éter (TBDMS-OR) se retira con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) (Díez-Martín *et al.*, 2001; Hutchinson y Money, 1985), obteniéndose el hidroxilalqueno 4 con un rendimiento del 92% (Figura 4.12). El espectro de IR del compuesto 4 muestra una banda de absorción a 3337 cm<sup>-1</sup>, correspondiente al grupo hidroxilo.



Figura 4.12 Mecanismo de reacción propuesto para la desprotección de TBDMS.

En el siguiente paso se realiza la substitución del hidroxilo **4** por un átomo de bromo, con trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) y tetrabromuro de carbono (CBr<sub>4</sub>) (Yan-Qing *et al.*, 2015; Watanabe *et al.*, 2013; Schelper y Meijere, 2005; Ashton *et al.*, 1996), obteniendo el bromo alqueno **5** con un rendimiento del 83%. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto **5** se observa un ligero apantallamiento de la señal correspondiente al metileno unido al átomo de bromo a 3.40 ppm, con respecto al valor encontrado para el compuesto **4** a 3.56 ppm, como era de esperar; al igual que en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C: de 33.4 ppm en haloalqueno **5**, frente a 62.6 ppm en el hidroxilalqueno **4**.

De esta manera se ha obtenido el 7-bromohepteno (5) en un proceso de cinco pasos a partir del hexadecan-1,6-diol (i) con un rendimiento global del 46%.

El 7-bromohepteno (**5**) se hace reaccionar con la sal de litio del derivado propargílico (*ii*) (Stefani *et al.*, 2013; Horner y Newcomb, 2012; Harcken y Brückner, 2001; Jeffery, 1989; Cossy y Pete, 1986) obtenida por tratamiento del 2-(prop-2-in-1-iloxi) tetrahidro-2*H*-pirano con metil litio y en presencia de HMPA (Chong y Wong, 1986), generando el alquino **6** con un rendimiento del 85% y según el mecanismo propuesto en la Figura 4.13; el compuesto **6** muestra en RMN-<sup>1</sup>H una señal a 5.90-5.70 ppm de dos protones que resuenan como ddt (J = 17.2, 13.4, 7.2 Hz) y corresponde al H-10 (a 109.5 ppm en RMN-<sup>13</sup>C); la señal correspondiente al metileno 1 aparece a 5.70 ppm como un triple con J = 1.2 Hz debido al acoplamiento con los protones en *cis, trans* y metileno en H-9.



Mecanismo de reacción

**Figura 4.13** Mecanismo de reacción propuesto para la condensación de un acetileno terminal y un haluro.

Posteriormente, se trata el alquino **6** con atmosfera  $H_2$  en presencia del catalizador de Lindlar (Pd-CaCO<sub>3</sub>) y quinoleína, durante 1 h, con el fin de obtener el alqueno en configuracion *cis* (Zhang *et al.*, 2013; Yao-Ting *et al.*, 2005; Marvell y Li, 1973). La reacción se controla por CCF, no observándose variación en el R<sub>f</sub> del material de partida después de una hora de reacción, por lo que se mantiene una hora más en las mismas condiciones y, posteriormente, otra hora más. Trabajada la reacción, se hace el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del crudo de reacción, observándose la desaparición de las señales correspondientes al vinilo terminal, por lo que se ha producido la hidrogenación completa de la molécula.

La hidrogenación en condiciones Lindlar, añadiendo 6.81 mmoles de quinoleína y 5 mL de THF durante 9 h, dio lugar al material de partida sin evolucionar (Cuadro 4.2, entrada 1). Se repitió la reacción en las mismas condiciones retirando la quinoleína, obteniéndose el compuesto totalmente hidrogenado (entrada 2). Un tercer intento (entrada 3), añadiendo el doble de volumen de THF, llevó a la obtención del compuesto **6b**, que muestra el doble enlace *cis* en las posiciones 2 y 3 y el vinilo terminal hidrogenado (Figura 4.14). Se cambió la polaridad del disolvente añadiendo hexano en proporción (10:1), una pequeña cantidad de quinoleína y se acortó el tiempo de reacción de 9 a 3 h (entrada 4) y de esta manera se obtiene el compuesto deseado **7**, mezclado con varias impurezas; lamentablemente, en el proceso de purificación se pierde el compuesto. En el último intento (entrada 5) se aumenta la proporción de quinoleína y el tiempo de reacción, obteniéndose una mezcla de material de partida y producto deseado en relación 2:1. De todo ello se deduce que las condiciones óptimas de hidrogenación son las descritas en la entrada 4, que se repetirán en un futuro para optimizar el proceso de purificación, o se utilizará el producto impuro para continuar con el proceso de síntesis.



Figura 4.14 Productos formados de la hidrogenación de 6 y 11.

Se decidió retirar el grupo THP protector del compuesto **6** y realizar la hidrogenación de la molécula hidroxialquino **11** en las condiciones indicadas en el Cuadro 4.2. La hidrólisis del THP se realiza con ácidos de Lewis suaves para dar el hidroxialquino **11**, con un rendimiento del 97%, según el mecanismo indicado en la Figura 4.15. El IR del compuesto **11** muestra una banda de absorción a 3337 cm<sup>-1</sup> correspondiente al enlace O-H. En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observa la desaparición de las señales correspondientes al fragmento de THP.

Entrada	11 (mmol)	Lindlar (mg)	Disolvente (mL)	Tiempo (h)	Producto
1	0.33	74	Hx / THF (10:1); 5	3	11a
2	0.33	5	MeOH; 8	0.33	11b

11a = Decan-1-ol

**11b** = (*Z*)-deca-2-en-1-ol

Mecanismo de reacción



**Figura 4.15** Mecanismo de reacción propuesto para la desprotección de un alcohol en forma de éter.

Se realiza la hidrogenación del hidroxialquino **11** con atmosfera  $H_2$  en presencia del catalizador de Lindlar (Pd-CaCO<sub>3</sub>) y quinoleína, durante 1 h, con el fin de obtener el alqueno en configuración *cis*. La reacción se controla por CCF, no observándose variación en el  $R_f$  del material de partida después de una hora de reacción, por lo que se mantiene una hora más en las mismas condiciones, y posteriormente otra hora más. Trabajada la reacción, se hace el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del crudo de reacción, observándose la desaparición de las señales correspondientes al vinilo terminal, por lo que se ha producido la hidrogenación completa de la molécula (Figura 4.14).

Ante la dificultad de realizar la hidrogenación selectiva del hidroxialquino **11** y obtener la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol, se decidió obtener un análogo que presente un triple enlace en lugar del doble enlace *cis* en las posiciones 2 y 3 (compuesto **13**). La realización de ensayos *in vitro* sobre *Leishmania* con el compuesto **13**, y su comparación con los valores encontrados para el compuesto natural (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol, permitirá establecer relaciones entre la estructura y la actividad y deducir la relevancia de la presencia de uno y otro tipo de insaturación.

Para realizar la síntesis del compuesto **13**, se transforma el hidroxilo de la posición 1 del hidroxialquino **11** en un buen grupo saliente, en forma de metilsilil éter, que posteriormente se hará reaccionar con el **SINTÓN B**. El tratamiento del hidroxialquino **11** con cloruro de metansulfonilo en presencia de trietilamina y cantidades catalíticas de DAMP proporciona el metil sulfonil derivado **12** con un rendimiento del 50%. El compuesto **12** no muestra en IR una banda de absorción por encima de 3000 cm<sup>-1</sup> y en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H muestra la aparición de una señal singulete correspondiente a tres protones a 3.10 ppm del metilo sobre azufre. En la Figura 4.16 se muestra el mecanismo de transformación del alcohol **11** en el mesilo **12**.

Mecanismo de reacción



Figura 4.16 Mecanismo de reacción propuesto para la adición de un mesilato.

Finalmente, el compuesto **12** se hace reaccionar con el hidroxidialquino **10**, en presencia de trietilamina y cloruro de bis-trifenilfosfinpaladio como catalizador, manteniendo la mezcla a 70 °C durante una hora (Figura 4.17). Realizado el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del crudo de reacción se aprecian las señales correspondientes a los dos grupos vinilo de 5.28 a 6.04 ppm, junto a una señal a 6.76 ppm que aparece como un multiplete y corresponde al protón geminal del grupo hidroxilo en posición 3. Además, se observa a 2.09 una señal multiplete que correspondería al metileno 10; lo anterior indica que se ha obtenido el compuesto **13** mezclado con el compuesto **12**. Una vez purificado el crudo de reacción, sólo se obtiene el compuesto **12**.



Figura 4.17 Mecanismo de reacción propuesto para la formación del trialquino 13.

La obtención del **SINTÓN B**, compuesto **10**, se realiza en un único paso por condensación de *bis*-sililbutadiino (*iii*) con acroleína (*iv*) en presencia de la base metil litio (McLaughlin *et al.*, 2010) (Figura 4.18). La base ataca al trimetil sililo formando la sal de alquenil litio y tetrametilsilano; el anión ataca al carbonilo de la acroleína formando el alcoxi aducto correspondiente, que en medio ácido evoluciona al alcohol secundario, y la acción del hidróxido sódico sobre el otro grupo trimetil sililo genera finalmente el compuesto **10** con un rendimiento del 94%.

Mecanismo de reacción



Figura 4.18 Mecanismo de reacción propuesto para la condensación de un *bis*-sililbutadiino con acroleína.

El compuesto **10** muestra en IR una banda de absorción por encima de 3282 cm<sup>-1</sup> del enlace O-H, y su espectro de RMN-<sup>1</sup>H muestra la aparición de una señal singulete a 4.92 ppm, que aparece como un doblete de dobletes (J = 2.4, 1.4 Hz) del protón base al hidroxilo, cuyo carbono en RMN-<sup>13</sup>C se observa a 63.3 ppm.

Debido a las dificultades encontradas en la hidrogenación selectiva del triple enlace, se plantean en perspectiva dos rutas de síntesis alternas para obtener el **SINTÓN A'** y **SINTÓN A**". En la primera se indica la obtención del trifluorometan sulfonilo 19, buen grupo saliente que se haría reaccionar con el **SINTÓN B**, para así obtener el (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol. El compuesto 19 se obtendría por tratamiento del hidroxialqueno 8 con cloruro de trifluorometan sulfonilo (OTf) en presencia de bases, 8 procedería de la hidrólisis del acetal 7 por tratamiento con ácidos de Lewis. El alqueno 7 se obtendría por deshidratación del hidroxilo primario del compuesto **18**, el cual se obtendría por eliminación del grupo protector difenil-*tert*-butilsilano en el compuesto **17**. El alqueno **17** procedería de la condensación entre los aldehídos **15** y **16** (**SINTÓN C**) en condiciones de McMurray. El aldehído **15** se obtiene por oxidación de Swern a partir del alcohol **14**, el cual se obtiene por protección selectiva del 1,8-octanodiol (v) con forma difenil-*tert*-butilsililo. Por otro lado, el **SINTÓN C** (compuesto **16**) se obtendría por oxidación en condiciones suaves a partir del reactivo (vi) (Figura 4.19).



En la segunda ruta, indicada en la Figura 4.20, se plantea la obtención del tosil derivado **25** como buen grupo saliente, que se haría reaccionar con el **SINTÓN B** para obtener el (3*S*)-16,17-dideshidrfalcarinol. El compuesto **25** se obtendría por tratamiento del hidroxialqueno

**8** con cloruro de tosilo (TsCl) en presencia de piridina como base, **8** procedería de la hidrólisis del acetal **7**. El alqueno **7** se obtendría, en este caso, por condensación entre los aldehídos **24** y **16** (**SINTÓN C**) en condiciones de McMurray. El aldehído **24** se obtendría por desprotección del acetal **23** en medio ácido. El alqueno **23** procedería de la condensación del tosilo **22** con el bromuro del alilmagnesio (*viii*). El dioxolano **22** se obtendría de la protección del aldehído **21** con etilenglicol, y éste de la oxidación en condiciones Swern del alcohol **20**, el cual se obtendría de la monoprotección del 1,5-pentanodiol (*vii*) con cloruro de tosilo.



Figura 4.20 Proceso de retrosíntesis para la obtención del SINTÓN A".

## CAPÍTULO V CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

### 5.1 CONCLUSIONES GENERALES

El estudio de dos diferentes vías (cromatografía convencional y SFE-CO<sub>2</sub>) para la obtención de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol permitió establecer una forma rápida, efectiva y barata de extracción, precisar la parte de la planta en la que abunda la oxilipina (raíz), así como la época del año en la que más se produce (mes de junio); con ello se puede establecer que la variación de moléculas de tipo falcarinol está fuertemente influenciada por factores externos, como la época de colecta, almacenamiento y localización geográfica; adicionalmente, existe un factor genético involucrado en el metabolismo de este tipo de moléculas. Durante este estudio se utilizó la tecnología SFE-CO<sub>2</sub>, del cual se concluye que el parámeto más influyente en la extracción es la presión, lo que propicia que la densidad del CO<sub>2</sub> aumente y con ello su difusión dentro de la matriz sea mayor, resultando un proceso sumamente eficiente, ayudando en el ahorro de consumo de recursos.

Por otra parte, se propuso una síntesis orgánica que ayudará a la obtención de la molécula en grandes cantidades, necesarias para establecer estudios *in vivo*, así como generar derivados para proponer estudios de relación estructura-actividad. Sin embargo, la inestabilidad de las moléculas de tipo falcarinol hizo que nos enfrentemos a un reto mayor; aunque las síntesis quedan inconclusas, se consiguió una nueva molécula de tipo falcarinol (trialquino **13**) nunca antes reportada, la cual será sometida a bioensayos *in vitro* frente a promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*, parásito causante de la leishmaniasis cutánea localizada (LCL).

## 5.2 PERSPECTIVAS

Se pretende ampliar el conocimiento en relación a la productividad de la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol y/o compuestos de la familia de tipo falcarinol C-17. Una de las propuestas es el cultivo *in vitro* y la propagación de la raíz, mediante el uso de técnicas que favorezcan su crecimiento, como puede ser el sistema de inmersión temporal automatizado.

Escalar la extracción supercrítica a un nivel piloto es así mismo una materia en la cual se debería invertir tiempo y recursos, ya que, como se demuestra en este estudio, es una excelente técnica para la extraccion selectiva de compuestos de naturaleza apolar.

Un trabajo pendiente es la preparación de numerosos derivados semi-sintéticos de la oxilipina, lo cual permitirá aumentar su estabilidad y acrecentar su solubilidad mediante la formación de sales, y podrán incluirse en estudios de relación estructura-actividad en bioensayos de actividad antiprotozoaria.

Por otra parte, hace falta explorar y ampliar el estudio de este tipo de moléculas en diferentes especies de la misma familia y de otras, y una vez obtenida la serie de compuestos, ampliar el conocimiento al retarlos frente al grupo de enfermedades parasitarias comprendidas como desatendidas.

Por último, es importante señalar la excelente bioactividad que la molécula (3*S*)-16,17dideshidrofalcarinol ha demostrado frente a la leishmaniasis, por lo que pareciera ser prometedora la continuidad y ampliación en el estudio de especies de esta misma familia en las que se reporten moléculas de tipo falcarinol.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, R.A. and Kilényi, S.N. (1992). Asymmetric Synthesis. Edit. Chapman and Hall. 1<sup>st</sup>. ed. Cambridge, Great Britain.
- Al-Asheh, S., Allawzi, M., Al-Otoom, A., Allaboun, H., Al-Zoubi, A. (2012). Supercritical fluid extraction of useful compounds from sage. *Journal of Natural Sciences*, 4, 544-551.
- Ali, S, Jahangir, M. (2002). A *bis*-biothiophene from *Tridax procumbens* L. (*Asteraceae*). *Natural Products Letters*, 16, 217-221.
- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnstrom, A., McPhail, K.L, Gerwick, W.H., Gobel, C., Feussner, I., Ellerstrom, M. (2006). Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*. Formation of a novel oxophytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 31528-31537.
- Andreu, A., Brodhun, F., Feussner, I. (2009). Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Progress in Lipid Research*, 48, 148-170.
- Ankita, J., Jain, A. (2012). *Tridax procumbens* L. A weed with immense medicinal importance: a review. *International Journal of Pharma and BioSciences*, 3, 545-552.
- Ashton, P.R., Königer, R. and Stoddart, J.F. (1996). Amino acid derivatives of β- cyclodextrin. Journal of Organic Chemistry, 61, 903-908.
- Ashwini, P., Gabhe, S. (1988). Saturated and unsaturated fatty-acids from *Tridax* procumbens. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 50, 163-168.
- Baranska, M., Schultz, H., Baranski, R., Nothnagel, T., Christensen, L.P. (2005). *In situ* simultaneous analysis of polyacetylenes, carotenoids and polysaccharides in carrots roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6565-6571.
- Barley, G. C., Jones, E. H. R., Thaller, V. (1988). Crepenynate as a precursor of falcarinol in carrot tissue culture. In: Chemistry and Biology of Naturally-Occurring Acetylenes and Related Compounds. (ed). Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 85-91.
- Beld, J.D, Lee, J., Burkart, M.D. (2014). Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. *Molecular BioSystems*, 11, 38-59.
- Bhagwat-Durgacharar, A., Killedar-Surech, G., Adnaik, R. S. (2012). Anti-diabetic activity of leaf extracts of *Tridax procumbens*. *International Journal of Green Pharmacy*, 2, 126-128.

Bijttebier, S., D'Hondt, E., Noten, B., Hermans, N., Apers, S., Exarchou, V., Voorpoels, S.

(2014). Automated analytical standard production with supercritical fluid chromatography for the quantification of bioactive C17-polyacetylenes: a case study on food processing waste. *Food Chemistry*, 15, 1-8.

- Bohlman, F., Niedballa, U. y Rode, K.M. (1966) Polyacetylene compounds. New polyenes with a C17-chain. *Chemische Berichte*, 99, 3552-3558.
- Bohlmann, F., Zadero, C. (1976). Polyacetylene compounds C-17. Acetylene compounds from *Calea integrifolia*. *Phytochemistry*, 15, 1177-1183.
- Bohlman, F., Zdero, C. (1972). Terpenes from higher plants. Two new sesquiterpene lactones from *Lidbeckia pectinata* and *Pentzia elegans*. *Tetrahedron*, 7, 621-624.
- Brash, A.R. (1999). Lipooxygenases: occurence, functions, catalysis and acquisition of substrate. *Journal of Biology Chemistry*, 274, 23679-23682.
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review Plant Biology*, 60, 183-205.
- Brunner, G. (1994). Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Process, second ed., Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Brunner, G., (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67, 21-33.
- Bu'Lock, J.D., Smith, G.N. (1967). The origin of naturally-occurring acetylenes. *Journal of the Chemical Society*, 332-336.
- Burke, L.T., Dixon, D.J., Ley, S.V. and Rodríguez, F. (2004). A short stereoselective total synthesis of the fusarium toxin equisetin. *Organic Letters*, 23, 3611-3613.
- Butler, M. S. (2004). The role of natural products in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141-2153.
- Cadena-Carrera, S., Tramontin, D.P., Bella-Cruz, A., Bella-Cruz, R.C., Müller, J.M., Hense,
  H. (2019). Biological activity of extracts from guayusa leaves (*llex guayusa* Loes.) obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and ethanol as cosolvent. *Journal of Supercritical Fluids*, 152.
- Chen, Y., Peng, S., Luo, Q., Zhang, J., Guo, Q., Zhang, Y., Chai, X. (2015). Chemical and pharmacological progress on polyacetylenes isolated from the family *Apiaceae*. *Chemistry and Biodiversity*, 12, 474-502.
- Cheng, G., Bai, Y., Zhaon, Y., Tao, J., Liu, Y., Tu, G., Ma, L., Liao, N., Xu, X. (2000). Flavonoids from *Ziziphus jujuba Mill* var. Spinosa. *Tetrahedron*, 56, 8915-8920.
- Cheung, P.C.K., Leung, A.Y.H., Ang, P.O. (1988). Comparison of supercritical carbon dioxide and Soxhlet extraction of lipids from a Brown seaweed, *Sargassum hemiphyllum* (Turn.) C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4228-4232.
- Chi-Shing, C., Tse, A. and Chan, K.S. (1994). Highly versatile methods for the synthesis of quinonylporphyrins via benzannulation of Fischer carbene complexes and palladium-catalyzed cross-coupling reactions. *Journal of Organic Chemistry*, 59, 6084-6089.
- Chong, J.M. and Wong, S. (1986). Alkylation of stabilized acetylides in DMSO. Preparation of  $\alpha$ , $\beta$ -acetylenic alcohol and acetals. *Tetrahedron Letters*, 45, 5445-5448.
- Christensen, L.P. (1991). Acetylenes and related compounds in *Asteraceae*. *Phytochemistry*, 30, 2453-2476.
- Christensen, L.P. (2009). Bioactivity of polyacetylenes in food plants. En: Watson R.R., Preeddy V.R., Eds. Bioactive Foods in Promoting Health. Oxford: Academic Press, 285-306.
- Christensen, L.P., Brandt, K. (2006). Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: occurrence, bioactivity and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 683-693.
- Christensen, L.P., Kreutzmann, S. (2007). Determination of polyacetylenes in carrot roots (*Daucus carota* L) by high performance liquid chromatography coupled with diode array detection. *Journal of Separation Science*, 30, 483-490.
- Cossy, J. and Pete, J.P. (1986). A one step synthesis of ω-hydroxyacetylenic carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*, 5, 573-574.
- Croft, S., Coombs, G. (2003). Leishmaniasis: current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, 19, 502-508.
- Czepa, A., Hofmann, T. (2004). Quantitative studies and sensory analysis on the influence of cultivar, spatial tissue distribution and industrial processing on the bitter off-taste of carrots (*Daucus carota* L.) and carrot products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4508-4514.
- Davarnejad, R., Kassim, K.M., Zainal, A., Sata, S.A. (2008). Supercritical fluid extraction of β-carotene from crude palm oil using CO<sub>2</sub>. *Journal of Food Engineering*, 89, 472-478.
- De Andrade Lima, M., Kestekoglou, I., Charalampopoulos, D., Chatzifragkou, A. (2019). Supercritical fluid extraction of carotenoids from vegetable waste matrices. *Molecules*, 24, 466.

- Delgado, A. Minguillón, C. and Joglar, J. (2002). Introducción a la síntesis de fármacos. Edit. Síntesis. 1er. ed. Madrid, España.
- Díez-Martín, D., Marcos, I.S., Besabe, P., Escarsega, R., Moro, R.F., Lumeras, W., Rodríguez, L. and Urones, J.G. (2001). Stereoselective synthesis of 2,2,6,6tetrasubstituted tetrahydropyrans. *Synthesis*, **7**, 1013-1022.
- Dimitroula, T., Nektarios, A., Konstantia, G., Caroline, S., Ioanna, C. (2008). Triterpenoids from *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. Tissue Cultures. *Helvetica Chimica Acta*, 91, 2110-2114.
- Dron, A., Guyer, D.E., Gage, D.A., Lira, C.T., (1997). Yield and quality of onion flavor oil obtained by supercritical fluid extraction and other methods. *Journal of Food Process Engineering*, 20, 107-123.
- Dunford, N.T. Teel, J.A., King, J.W., (2003). A continuous counter current supercritical fluid deacidification process for phytosterol ester fortification in rice bran oil. *Food Research International*, 36, 175-1811.
- Elgersma, D.M., Weijman, A.C.M., Roeymans, H.J., Van Eijk, G.W. (1984). Occurrence of falcarinol and falcarindiol in tomato plants after infection with *Verticillum albo-atrum* and characterization of four phytoalexins by capillary gas chromatography- mass spectrometry. *Phytopathologische Zeitschrift*, 109, 237-240.
- Eller, F.J., King, J.W., (1996). Supercritical fluid extraction: a film demonstration. Ver Bunsenges. *Physical Chemistry*, 88, 882-887.
- Engewald, W., Dettmer-Wilde, K. (2014). Theory of Gas Chromatography. en: Practical Gas Chromatography, a Comprehensive Reference. (ed.) Werner Engewald. Germany. pp. 21-57.
- Fammartino, A., Cardinale, F., Gobel, C., Mene-Saffrane, L., Fournier, J., Feussner, M., Esquerre-Tugaye. (2007). Characterization of a divinyl ether biosynthetic pathway specifically associated with pathogenesis in tobacco. *Plant Physiology*, 143, 378-388.
- Farmer, E.E., Almeras, E., Krishnamurthy, V. (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 372-378.
- Feussner, I., Wasternak, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annual Review Plant Biology*, 53, 275-297.
- Firn, R. (2010). Nature's Chemicals. In: The Natural Products that Shaped Our World. (ed).

Oxford University Press. United Kingdom. pp. 67-70.

- Franco, D., Pinelo, M., Sineiro, J., Núñez, M.J. (2007). Processing of Rosa rubiginosa: Extraction of oil and antioxidant substances. *Bioresource Technology*, 98, 3506- 3512.
- Furumi, K., Fujioka, T., Fujii, H., Okabe, H., Nakano, Y., Matsunaga, H., Katano, M., Mori,
   M., Mihashi, K. (1999). Novel antiproliferative falcarindiol furanocoumarin ethers from
   the root of *Angelica japonica*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 8, 93-96.
- García, A., Lucas, A.D., Rincon, J., Álvarez, A., Gracia, I., García, M.A, (1996). Supercritical carbon dioxide extraction of fatty and waxy material from rice bran. *Journal of American Oil Chemist Society*, 73, 1127-1131.
- Gardner, H. (1991). Recent advances into the lipoxygenase's pathway of plants. *Biochemistry and Biophysics Acta*, 1084, 221-139.
- Garrod, B., Lewis, B.G., Coxon, D.T. (1978). *Cis*-heptadeca-1,9-diene-4,6-diyne-3,8diol, an antifungal polyacetylene from carrot root tissue. *Physiological Plant Pathology*, 13, 241-246.
- Getti, G., Durgadoss, P., Domínguez-Carmona, D., Martín-Quintal, Z., Peraza-Sánchez, S., Peña-Rodríguez, L. M., Humber, D. (2009). Leishmanicidal activity of yucatecan medicinal plants on leishmania species responsible for cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Parasitology*, 95, 456-460.
- Grant, N., Naves, R., (1972). Perfumes and the art of perfumery. *Journal of Chemical Education*, 49, 526-533.
- Green, T.W. and Wuts, P.G. (1999). Protective Groups in Organic Synthesis. Edit. John Wiley & Sons. 3<sup>th</sup> ed. United States of America.
- Govindan, G., Sambandan, T., Govindan, M., Sinskey, A., Vanessendelft, J., Adenan, I., Rha, C. (2007). A bioactive polyacetylene compound isolated from *Centella asiatica*. *Planta Medica*, 73, 597-599.
- Hadacek, F., (2002). Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Review in Plant Science*, 21, 273-322.
- Haigh, W.G., Morris, L.J., James, A.T. (1968). Acetylenic acid biosynthesis in *Crepis rubra*. *Lipids*, 3, 307-312.
- Hamberg, M., Sanz, A., Castresana, C. (1999). Alpha-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an alphadioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *Journal of Biology and*

Chemistry, 274, 24503-24513.

- Hamberg, M., Sanz, A., Rodríguez, M.J., Calvo, A.P., Castresana, C. (2003). Activation of the fatty acid α-dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves.
   Formation of oxylipins protecting against cell death. *Journal of Biology and Chemistry*, 278, 51796-51805.
- Harvey, D. (2004). Química Analítica Moderna. (ed.) McGraw Hill-Interamericana. Madrid, España. pág. 571.
- Hansen, S., Purp, S., Christensen, L. (2003). Bioactivity of falcarinol and the influence of processing and storage on its content in carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83, 1010-1017.
- Harada, R., Iwasaki, M. (1982). Volatile components of *Artemisia capillaris*. *Phytochemistry*, 21, 2009-2012.
- Harding, V.K., Heale, J.B. (1981). The accumulation of inhibitory compounds in the induced resistance response of carrot root slices to *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology*, 18, 7-15.
- Harcken, C. and Brückner R. (2001). Elucidation of the stereostructure of the annonaceous acetogenin (+)-montecristin through total synthesis. *New Journal of Chemistry*, 25, 40-54.
- Henning, J.A., Core, R.J., Gardea-Torresdey, J.L. (1994). Extracting volatile compounds from single plants using supercritical fluid extraction. *Crop Science*, 34, 1120-1122.
- Herrero, M., Mendiola, J.A., Ciefuentes, A., Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*. 1217, 2495-2511.
- Hertweck, C. (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie*. 48, 4688-4716.
- Hitesh, J. (2006). Indian Journal of Natural Products. 1, 31-33.
- Horner, J.H. and Newcomb M. (2012). (ω-2, ω-2, ω-3, ω-3)-Tetradeuterio-fatty acids for mechanistic studies of enzyme-catalyzed hydroxylation reactions. *Journal of Lebelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 55, 406-410.
- Howe, G.A., Schilmiller, A.L. (2002). Oxylipin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 230-236.
- Huang, H., Zhang, X., Shen, Y., Su, J., Liu, X., Tian, J., Lin, S., Shan, L., Zhang, W., Zhang, W. (2009). Polyacetylenes from *Bupleurum longiradiatum*. *Journal of Natural*

*Products*, 72, 2153-2157.

- Hutchinson, J.H. and Money, T. (1985). A formal enantiospecific synthesis of California red scale pheromone. *Canadian Journal of Chemistry*, 63, 3182-3185.
- Jachak, S., Sakalani, A. (2007). Challenges and opportunities in drug discovery from plants. *Current Science*, 92, 1251-1257.
- Jeffery, T. (1989). Copper (I) and phase transfer catalyzed allylic substitution by terminal alkynes. *Tetrahedron Letters*, 17, 2225-2228.
- Kinghorn, D., Pan, L., Fletcher, J., Chai, H. (2011). The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *Journal of Natural Products*, 74, 1539-1555.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., Takabayashi, J. (2008). Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in Arabidopsis against *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 69, 2127-2132.
- Kemzuarité, A., Venskutonis, P.R., Baranauskiené, R., Navikiené, D. (2014). Optimization of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of different anatomical parts of lovage (*Levisticum* officinale Koch.) using response surface methodology and evaluation of extracts composition. *Journal of Supercritical Fluids*, 87, 93-103.
- Knispel, N., Ostrozhenkova, E., Schramek, N., Huber, C., Peña-Rodríguez, L. M., Bonfill, M., Palazón, J., Wischmann, G., Cusidó, R.M., Eisenreich, W. (2013). Biosynthesis of panaxynol and panoxydol in *Panax ginseng. Molecules*, 18, 7686-7698.
- Knuthsen, P. (2010). Comparison of polyacetylene content in organically and conventionally grow carrots using a fast ultrasound liquid extraction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 7673-7679.
- Kobaek-Larsen, M., Christiansen, L.P., Vach, W., Ritskes-Hoitinga, J. And Brandt, K. (2005). Inhibitory effects of feeding with carrots or (-) Falcarinol on development of azoxymethane induced preneoplastic lesions in the rat colon. *Journal of Agricultural* and Food Chemistry, 53, 1823-1827.
- Koch, K. and Biggers, M. (1994). General preparation of 7-substituted 4-chromanones: synthesis of a potent aldose reductase inhibitor. *Journal of Organic Chemistry*, 59, 1216-1218.
- Konovalov, D.A. Polyacetylene compounds of plants of the *Asteraceae* family (2014) *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 48, 613-631.
- Koo, A.J., Howe, G.A. (2009). The wound hormone jasmonate. *Phytochemistry*, 70, 1571-1580.

- Koskinen, A. (1993). Asymmetric Synthesis of Natural Products. Edit. John Wiley & Sons. 1<sup>st</sup> ed. Sussex, Great Britain.
- Kumar, J.N. and Das, B. (2013). Stereoselective total synthesis of crucigasterins A, B and D through a common intermediate. *Tetrahedron Letters*, 54, 3865-3867.
- Langa, E., Della-Porta, G., Palavra, A.M.F., Urieta, J.S. y Mainar, A.M. (2009). Supercritical fluid extraction of Spanish sage essential oil: Optimization of the process parameters and modelling. *The Journal of the Supercritical Fluids*, 49, 174-181.
- Larqué-García, H., Torres-Tapia, L.W., Vera-Ku, M., Gamboa-León, R., Novelo-Castilla, S., Coral-Martínez, T.I., Peraza-Sánchez, S.R. (2020). Quantitative seasonal variation of the falcarinol-type polyacetylene (3*S*)-16,17-didehydrofalcarinol and its spatial tissue distribution in *Tridax procumbens, Phytochemical Analysis*, 31, 183-190.
- Larsen, P., Eichstedt, B. and Lemmich, J. (1969). (-)-1 is 3*R* from *Umbelliferous* (*Apiaceae*) plants. *Journal Acta Chemica Scandinavica*, 23, 2552-2554.
- Leal, P.F., Kfouri, M.B, Alexandre, F.C., Agundes, F.H.R.F., Prado, J.M., Toyama, M.H., Meireles, M.A.A. (2010). Brazilian ginseng extraction via LPSE and SFE: global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. *Journal of Supercritical Fluids*, 54, 38-45.
- López-Hernandez, E., Valadez-Villareal, A. (2008). Generalidades del proceso cromatográfico. en: Análisis Cromatográfico en las Ciencias Agropecuarias. (ed.) Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México, pp. 25-41.
- Lu, W., Zheng, G., Aisa, H.A. and Cai, J. (1998). First Total Synthesis of Optically Active Panaxydol, a Potential Antitumor Agent Isolated from *Panax Ginseng. Tetrahedron Letters*, 39, 9521-9522.
- Martín-Quintal Z., Moo-Puc, R., González-Salazar, F., Chan-Bacab, M., Torres-Tapia, L., Peraza-Sánchez, S.R. (2009). *In vitro* activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Journal of Ethnoparmacology*, 122, 463-467.
- Martín-Quintal, Z. (2009). Estudio de *Tridax procumbens* L. para la obtención de metabolitos con actividad antiprotozoaria. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. pp. 95.
- Marvell, E.N. and Li, T. (1973). Catalytic semihydrogenation of triple bond. *Synthesis*, 8, 457-468.
- Matsui, J. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 274-280.

- Matsunaga, H., Katano, M., Yamamoto, H., Fujito, H., Mori, M., Takata, K. (1990). Cytotoxic activity of polyacetylene compounds in *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 12, 3480-3482.
- Mayer, S.F., Steinreiber, A., Orru, R.V.A. and Faber, K. (2002). Chemoenzymatic asymmetric total syntheses of antitumor agents (3*R*,9*R*,10*R*) and (3*S*,9*R*,10*R*) Panaxytriol and (*R*) and (*S*) falcarinol from *Panax ginseng* using an enantioconvergent enzyme triggered cascade reaction. *Journal of Organic Chemistry*, 67, 9115-9121.
- Maxia, A., Falconieri, D., Piras, A., Porcedda, S., Marongiu, B., Frau, M.A., Goncalves, M.J., Cabral, C., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. (2012). Chemical composition and antifungal activity of essential oils and supercritical CO<sub>2</sub> extracts of *Apium nodiflorum* (L.) Lag., *Mycopathologia*, 174, 61-67.
- Mazzutti, S., Riehl, C.A.S., Ibañez, E., Ferreira, S.R.S. (2017). Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*. *Journal of Supercritical Fluids*, 119, 211-220.
- McDougal, P.G., Rico, J.G., Oh, Y. and Condon, B.D. (1986). A convenient procedure for the monosilylation of symmetric 1, *n*-Diols. *Journal of Organic Chemistry*, 51, 3388 3390.
- McLaughlin, N.P., Butler, E., Evans, P., Brunton, N.P., Koidis, A. and Rai, D.K. (2010). A short synthesis of (+) and (-)- falcarinol. *Tetrahedron*, 66, 9681-9687.
- Meireles, M.A. (2008). Extracting bioacive compounds for food products. Theory and applications. In: Contemporary Food Engineering Series. United States. pp. 272-288.
- Méndez-González, M., Durán-García, R., Borges-Argáez, R., Peraza-Sánchez, S., Dorantes-Euan, A., Tapia-Muñoz, J., Torres-Avilés, W. y Ferrer-Cervantes, M. (2012). Flora medicinal de los mayas peninsulares. CICY, CONACYT, FOMIX y PRONATURA. pp. 221-222.
- Minto, R.E., Backblock, B.J. (2008). Biosynthesis and functional of polyacetylenes and allied natural products. *Lipid Research*, 47, 233-306.
- Mohamed, R.S., Mansoori, G.A. (2002). Tue use of supercritical fluid extraction technology in food processing. Featured article – food technology magazine, June. *The World Markets Research* Centre, London, UK.
- Morrison, R., Boyd, R. (1998). Química Orgánica. (ed). Pearson-Addison Wesley. Estados Unidos de Norte América. pp. 1-3.
- Mosblech, I., Feussner, I., Heilmann, I. (2008). Oxylipins: Structurally diverse metabolites

from fatty acid oxidation. Plant Physiology and Biochemistry, 47, 511-517.

- Nandakumar, M. V., Tschop, A., Krautscheid, H., Schneider, C. (2007). Indium bipyridine catalysed, enantioselective thiolytic of *meso* epoxides. *Chemical Communications*, 2007, 2756-2758.
- Neto, A.G., Da Silva-Filho, A.A., Costa, J.M.L.C., Vinholis, A.H.C., Souza, G.H.B., Cunha, W.R., Silva, M.L.A.E. (2004). *Phytomedicine*, 11, 662-665.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2016). Natural Products as Source of New Drugs from 1981-2014. *Journal of Natural Products*. 79, 629-661.
- Nicolaou, K. (2014). Organic synthesis: the art and science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. *Proceedings of the Royal Society Academy*, 470, 1-17.
- Nielsen, S.S. (1998). Food analysis second edition: crude fat analysis. Purdue University, West Lafayette, Indiana, pp. 203-214 (Chapter 13).
- Noa, M.P., Pérez, F.N.A., Díaz, G.G., Vega y León, S. (2005). Cromatografía de gases y de líquidos de alta resolución. Aplicaciónes en el análisis de alimentos. (ed.) Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Xochimilco. México. pág. 326.
- Novelo-Castilla, J.Z. (2005). Oxilipina con actividad leishmanicida aislada de *Tridax procumbens* L. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. pp. 30.
- Novelo-Castilla, Z. (2005). Oxilipina con actividad leishmanicida aislada de *Tridax procumbens* L., Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Oksman-Caldentey, K. M., Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*, 9, 1360-1385.
- Olsson, K., Svensson, R. (1996). The influence of polyacetylenes on the susceptibility of carrots to storage diseases. *Journal of Phytopathology*, 144, 441-447.
- Otterbach, A., Wenclawiak, B.W. (1999). Supercritical fluid extraction kinetics of pyrethrins from flowers and allethrin from paper strips. *Journal of Analytical Chemistry*, 8, 472-474.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M., Mut-Martín, M. (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatán peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Pferschy-Wenzig, E., Getzinger, V., Kunert, O., Woelkart, K., Zahrl, J., Bauer, R. (2009). Determination of falcarinol in carrot (*Daucus carota* L.) genotypes using liquid

chromatography/mass spectrometry. Food Chemistry, 114, 1083-1090.

- Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S. (2007). Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A*, 1163, 2-24.
- Powell, A. M. (1965). Taxonomy of Tridax (Compositae). Brittonia, 17, 47-96.
- Prado, J.M., Veggi P.C., Meireles, M.A.A. (2014). Extraction methods for obtaining carotenoids from vegetables. Review. *Current Analytical Chemistry*, 10, 29-66.
- Purup, S., Larsen, E. And Christensen, L.P. (2009). Differential effects of falcarinol and related aliphatic C<sub>17</sub>-polyacetylenes on intestinal cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8290-8296.
- Qiang, H., Su., J., Zhang, X., Shan, L., Zhang, W. (2011). Qualitative and quantitative determination of polyacetylenes in different Bupleurum species by high performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 1131-1138.
- Rao, M. V., Al-Marzouqi, A, H., Kaneez, F. S., Salaman-Ashraf, S., Adem, A. (2007). Comparative evaluation of SFE and solvent extraction methods on the yield and composition of black seed (*Nigella sativa*). *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 30, 2545-2555.
- Rawson, A. (2012). An investigation of the effects of thermal and nonthermal processing methods on polyacetylenes from Apiaceae. PhD thesis. School of Natural Sciences. National University of Ireland, Galway.
- Reventós, M., Duarte, S., Alarcón, R. (2002). Application and possibilities of supercritical CO2 extraction in food processing industry: an overview. *Food Science Technology International*, 5, 269-284.
- Reverchon, E., De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 146-166.
- Reverchon, E., Volpe, M.C., Caputo, G. (2003). Supercritical fluid processing of polymers: composite particles and porous materials elaboration. *Current Opinion in Solid State and Material Science*, 7, 391-397.
- Roman, M., Baranski, R., Baranska, M. (2011). Non-destructive Raman analysis of polyacetylenes in *Apiaceae* vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 7647-7653.
- Rzedowski, J., Lemus, R.M., Rzedowski, G.C. (2004). Las especies de Bursera (Burceraceae) en la cuenca superior del río Papaloapan, México. Acta Botanica

Mexicana, 66,23-151.

- Schelper, M. and Meijere, A. (2005). Facile construction of spirocyclopropanated Bi-, Tri- and Tetracyclic skeletons by novel cascades involving intra- and intermolecular heck reaction of 2-bromo-1,6-enynes and bicyclopropylidene. *European Journal of Organic Chemistry*, 3, 582-592.
- Schmiech, L., Alaryac, C., Witulski, B., Hoffman, A. (2010). Structure determination of bisacetylenic oxylipins in carrots (*Daucus carota* L.) and enantioselective synthesis of falcarindiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11030-11040.
- Shi-Lin, C., Hua, Y., Hong-Mei, L., Qiong, W., Chun-Fang, L., Steinmetz, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress and prospects. *Chinese Medicine*, 1, 11-37.
- Saikia, B., Devi, T.J., and Barua, N.C. (2013). Stereoselective total synthesis of both (6R, 9*R*,10*S*,7*E*)-and (6*S*,9*R*,10*S*,7*E*)-epimers of oxylipin (9*R*,10*S*,7*E*)-6,9,10-trihydroxyoctadec-7-enoic acid. *Tetrahedron*, 69, 2157-2166.
- Saxena, V., Albert, S. (2005). β-Sitosterol-3-O- β-D-xylopiranoside from flowers of *Tridax procumbens* L. *Journal of Chemical Sciences*, 117, 263-266.
- Schetter, B., Mahrwald, R. (2006). Modern aldol methods for the total synthesis of polyketides. *Angewandte Chemie*, 45, 7506-7525.
- Schulte, K., Wulfhorst, G. (1977). Polyacetylenes of *Pituranthus tortuous* (Desf.) *Arch. Pharma*. pp. 285-310. Germany.
- Secretaría de Salud (2016). Dirección General de Epidemiología. Anuario de morbilidad 1984- 2015. [On line]. Disponible en: (http://www.epidemiologia.salud.gob.mx) [Acceso el 26 de agosto de 2016].
- Senn, M., Gunzenhauser, S., Brun, R., Séquin, U. (2007). Antiprotozoal polyacetylenes from Tanzanian medicinal plant *Cussonia zimmermanni*. *Journal of Natural Products*, 70, 1565-1569.
- Sharma, R., Negi, D., Gibbons, S., Otsuka. (2008). Chemical and antibacterial constituents of *Skimmia anquetelia*. *Planta Medica*, 74, 175-177.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2001). Métodos de separación. en: Química Analítica. (ed.) MacGraw-Hill. México, pág. 657.
- Stahal, E., Quirin, K.W., Gerard, D. (1988). Dense Gases for Extraction and Refining. Springer-Verlag, New York. p. 176.

- Stefani, H.A., Cardoso, L.D., Valduga, C.J. and Zeni, G. (2001). Study of the regioselectivity in the hydrotelluration of hydroxy alkynes. *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 172, 167-172.
- Stephenson, G.R. (1996). Advanced Asymetric Synthesis. Edit. Chapman and Hall. 1<sup>st</sup>. ed. Norwich, Great Britain.
- Steppuhu, A., Gaquerel, E., Baldwin, I.T. (2010). The two alpha-dox genes of *Nicotiana attenuata*: overlapping but distinct functions in development and stress responses. *Plant Biology*, 10, 171.
- Sousa, P.T. and Taylor, R. (1993). An easy route to 2-(*Z*-alkenyl)-Thiophenes via Sonogashira coupling followed by stereoselective alkyne reduction. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 4, 64-68.
- Sovova, H. (1994). Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>. Modelling of extraction curves. *Chemical Engineering Science*, 49, 409-414.
- Staunton, J., Weissman, Kira. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Products Report*, 18, 380-416.
- Takahashi, M., Isoi, K., Kimura, Y. and Yoshikura, M. (1964). Studies on the components of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 84, 757-759.
- Temelli, F. (2009). Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *Journal of Supercritical Fluids,* 47, 583-590.
- Tempone, A.G., Treiger-Borborema, S.E., De Andrade Jr. H.F., De Amorim-Gualda, N.C.,
  Yogi, A., Salerno-Carvalho, C., Bachiega, D., Lupo, F.N., Bonotto, S.V., Fischer,
  D.C.H. (2005). Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*, 12, 82-390.
- Thelen, J.J., Ohlrogge, J.B. (2001). Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis in Plants. *Metabolic Engineering*, 4, 12-21.
- Torres-Santos, E. C., Lopes, D., Rodrigues-Oliveira, R., Carauta, J. P., Bandeira-Falcao, C.A., Kaplan, M. A., Rossi-Bergmann, B. (2004). Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, 11, 114-120.
- Tramontin, D.P, Cadena-Carrera, S.E., Bella-Cruz, A., Bella-Cruz, C.C., Bolzan, A., Bastos-Quadri, M. (2019). Biological activity and chemical profile of Brazilian jackfruit seed extracts obtained by supercritical CO<sub>2</sub> and low-pressure techniques. *Journal of*

Supercritical Fluids, 152.

Urrutia, S. (2001). Leishmaniasis cutánea. Piel, 16, 253-257.

- Valcárcel, C.M., Gómez, H.A. (2003). Técnicas analíticas de separación. (ed.) Reverte S.A. Barcelona, España. pág. 778.
- Vellosillo, T., Vicente, J., Kulasekaran, S., Hamberg, M., Castresana, C. (2010). Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiology*, 154, 444-448.
- Vivanco, J.M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V.M., Flores, E.H. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*, 2, 68-75.
- Wang, H.C., Chen, C.R., Chang, C.J. (2001). Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides. *Food Chemistry*, 72, 505-509.
- Wang, L., Chen, Y., Song, Y., Liu, X. (2008). GC-MS of volatile components of Schisandra chinensis obtained by supercritical fluid and conventional extraction. Journal of Separation Science, 31, 3238-3245.
- Wang, X., Devaiah, S., Zhang, W., Welti, R. (2006). Signalling function of phosphatidic acid. *Progress of Lipid Research*, 45, 250-278.
- Wang, Y., Song, D, Li, Z., Yuan, T., Zhang, H., Pei, Y. Jing, Y., Hua, H. (2009). Triterpenoids isolated from the aerial parts of *Salvia chinensis*, *Phytochemistry Letters*, 2, 81-84.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annual Botany*, 100, 681-697.
- Watanabe, T., Umezawa, N., Kato, N. and Higuchi, T. (2013). Synthesis of the carbon framework of scholarisine A by intramolecular oxidative coupling. *Chemistry European Journal*, 19, 4255-4261.
- Wen-Hao, C., Xing-Ming, M., Yan-Ping, S. (2008). Chemical-constituent diversity of *Tridax procumbens. Canadian Journal of Chemistry*, 86, 892-898.
- Weissman, K. J., Leadlay, P. F. (2005). Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 925-936.
- Wittstock, U., Hadacek, F., Wurz, G., Teuscher, E., Greger, H. (1995). Polyacetylenes from water hemlock, *Cicuta virosa*. *Planta Medica*, 61, 439-445.
- World Health Organization (2016). Global Plan to Combat Neglected Tropical Diseases 2008-2015. [On line] Disponible en: (http://www.who.int/neglected\_diseases/about/en/) [Acceso el 22 de agosto del 2010].

- World Health Organization. (2003). Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. pp. 1-80.
- Wu, J., Baldwin, I.T. (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annual Review of Genetics*, 44, 1-24.
- Wyrembek, P., Negri, R, Appendino, G., Mozrzymas, J. (2012). Inhibitory effects of oenanthotoxin analogues on GABAergic currents in cultured rat hippocampal neurons depend on the polyacetylenes polarity. *European Journal of Pharmacology*, 683, 35-42.
- Xu, R., Zhang, J., Yuan, K. (2010). Two new flavones from *Tridax procumbens L. Molecules*, 15, 6357-6364.
- Xue, H., Chen, X., Li, G. (2007). Involvement of phospholipid signalling in plant growth and hormone effects. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 483-489.
- Yamada, K., Onaka, H., Tanaka, M., Inagaki, M. and Higuchi, R. (2005). Constituents of Holothuroidea, 16. Determination of absolute configuration of the branched methyl group in *ante*-iso type side chain moiety on long chain base of glucocerebroside from the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53, 1333-1334.
- Yaniv, Z., Bachrach, U. (2013). Roots as a Source of Metabolites with Medicinal Activity.In: Roots, the Hidden Half. (ed). Amram Eshel and Tom Beekman. Israel, pp. 1071-1084.
- Yan-Qing, Y., Shuo-Ning, L., Jiang-hun, Z., Yun, Z., Hao-Zhe, Z., Hong-Jie, D., Qing-Hua, B. and Wang, M. (2015). Total synthesis of each enantiomer of falcarinol and panaxjapyne A via asymmetric catalytic alkynylation of an aldehyde. *Tetrahedron: Asymmetry*, 26, 361-366.
- Yao-Ting, W., Noltemeyer, M. and de Meijere, A. (2005). Cascade reactions of α,βunsaturated Fischer carbene complexes with 1,5-dien-3-ynes as a convenient acces to ring-annelated benzene derivatives. *European Journal of Organic Chemistry*, 13, 2802-2810.
- Zhang, X., Liu, J., Sun, X. and Du, Y. (2013). An efficient *cis*-reduction of alkyne to alkene in the presence of a vinyl iodide: stereoselective synthesis of the C22-C31 fragment of leiodolide A. *Tetrahedron*, 69, 1553-1558.
- Zheng, G., Lu, W, Aisa, H.A. and Cai, J. (1999a). Absolute configuration of falcarinol, a potent antitumor agent commonly occurring in plants. *Tetrahedron Letters*, 40, 2181-2182.

Zheng, G., Lu, W. and Cai, J. (1999b). Stereoselective total synthesis of (3*R*,8*S*)-falcarindiol, a common polyacetilenic compound from *Umbellifers*. *Journal of Natural Products*, 62, 626-628.

## ANEXOS. Espectros



RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 6-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi-hexan-1-ol (1)



IR-FT del compuesto 6-(tert-butil-dimetil-silaniloxi-hexan-1-ol (1)



EM del compuesto 6-(tert-butil-dimetil-silaniloxi-hexan-1-ol (1)



RMN-1H del compuesto 6-(tert-butil-dimetil-silaniloxi)-hexana-1-al (2)



RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 6-(*tert*-butil-dimetil-silaniloxi)-hexan-1-al (2)



IR-FT del compuesto 6-(tert-butil-dimetil-silaniloxi)-hexan-1-al (2)



EM del compuesto 6-(tert-butil-dimetil-silaniloxi)-hexan-1-al (2)



RMN-1H del compuesto 6-(*tert*-butil-dimetil-silanoxi)-hepta-1-eno (3)



RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 6-(*tert*-butil-dimetil-silanoxi)-hepta-1-eno (3)



IR-FT del compuesto 6-(tert-butil-dimetil-silanoxi)-hepta-1-eno (3)



RMN-1H del compuesto hept-6-en-1-ol (4)



RMN-<sup>13</sup>C del compuesto hept-6-en-1-ol (4)



IR-FIT del compuesto hept-6-en-1-ol (4)



RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 7-bromohept-eno (5)



RMN-<sup>13</sup>C del compuesto 7-bromohept-eno (5)



IR-FIT del compuesto 7-bromohept-eno (5)



RMN-1H del compuesto 2-(dec-9-en-2-in-1-iloxi)-tetrahidro-2H-pirano (6)



RMN-13C del compuesto 2-(dec-9-en-2-in-1-iloxi)-tetrahidro-2H-pirano (6)



IR-FT del compuesto 2-(dec-9-en-2-in-1-iloxi)-tetrahidro-2H-pirano (6)



EM del compuesto 2-(dec-9-en-2-in-1-iloxi)-tetrahidro-2H-pirano (6)



RMN-<sup>1</sup>H del compuesto hepta-1-en-4,6-diin-3-ol (10)



141



IR-FT del compuesto hepta-1-en-4,6-diin-3-ol (10)



EM del compuesto hepta-1-en-4,6-diin-3-ol (10)



RMN-<sup>1</sup>H del compuesto deca-9-en-2-in-1-ol (11)





IR-FIT del compuesto deca-9-en-2-in-1-ol (11)



RMN-<sup>1</sup>H del compuesto deca-9-en-2-in-1-il-metansulfonato (**12**)





IR-FIT del compuesto deca-9-en-2-in-1-il-metansulfonato (12)



EM del compuesto deca-9-en-2-in-1-il-metansulfonato (12)