



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Escalamiento del Proceso de Obtención de Labdanos de  
Interés Industrial”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

QUÍMICO FARMACOBIOLOGA EVA ESTHEFANY SOTO GUZMÁN

DIRECTORES

DOCTORA EN CIENCIAS ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES  
DOCTOR EN QUÍMICA MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO

Morelia, Michoacán.

Agosto, 2019.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y el D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado, con beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro becario 736502. Con apoyo económico a los Proyectos de la CIC-UMSNH.



## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Terpenos.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Técnicas de extracción.....	5
2.2 Extracción sólido-líquido.....	5
2.3 Tipos de disolventes.....	7
2.4 Constante dieléctrica.....	9
2.5 Extracción líquido-líquido.....	9
2.6 Extracción ácido-base.....	10
2.7 Reacciones ácido-base de Lewis.....	10
2.8 Separación y purificación.....	11
2.9 La industria de la perfumería.....	12
2.10 Perfumes.....	14
2.11 Ámbar gris.....	14
2.12 Métodos de síntesis de (-)-ambrox.....	16
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo general.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4. METODOLOGÍA GENERAL.....	26
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	27
6. CONCLUSIONES.....	46
7. PARTE EXPERIMENTAL.....	47
8. BIBLIOGRAFÍA.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Terpenos aislados del aceite esencial de <i>Ageratina jocotepecana</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Labdanos aislados de <i>Ageratina jocotepecana</i> .....	3
<b>Figura 3.</b> Estructura química del (-)-ambrox ( <b>10</b> ).....	4
<b>Figura 4.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz en $\text{CDCl}_3$ del extracto del disolvente No. 1 desengrasado de tallos y hojas.....	29
<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz del extracto del disolvente No. 4 de tallos a $-3\text{ }^\circ\text{C}$ .....	31
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz del (-)-13,14,15,16- <i>tetranor-8<math>\alpha</math></i> ,12-labdanodiol ( <b>9</b> ) impuro.....	33
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz del (-)-13,14,15,16- <i>tetranor-8<math>\alpha</math></i> ,12-labdanodiol ( <b>9</b> ).....	35
<b>Figura 8.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a 100 MHz del (-)-13,14,15,16- <i>tetranor-8<math>\alpha</math></i> ,12-labdanodiol ( <b>9</b> ).....	36
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a 400 MHz del (-)-ambrox ( <b>10</b> ).....	37
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a 100 MHz del (-)-ambrox ( <b>10</b> ).....	38
<b>Figura 11.</b> Trazo superior espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la bipartición del disolvente No. 1 obtenida de la reacción con la base II. Trazo inferior espectro de RMN de $^1\text{H}$ del extracto total del disolvente No. 4 de tallos.....	39
<b>Figura 12.</b> Trazo superior espectro de RMN de $^1\text{H}$ de la bipartición del disolvente No. 1 obtenida de la reacción con la base II. Trazo inferior espectro de RMN de $^1\text{H}$ del extracto total del disolvente No. 4 de hojas y flores.....	40
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del crudo de reacción del extracto del disolvente No. 4 de tallos con la base III.....	41
<b>Figura 14.</b> Trazo superior espectro de RMN de $^1\text{H}$ del crudo de reacción realizada con la base III. Trazo inferior espectro de RMN de $^1\text{H}$ del extracto total del disolvente No. 4 de tallos.....	42
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de muestra enriquecida de <b>9</b> libre de ácidos de labdano.....	43
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del crudo de reacción de ciclización obtenido de la fracción enriquecida de <b>9</b> libre de ácidos de labdano.....	44

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios.....	2
<b>Esquema 2.</b> Ejemplo de conversión de un ácido orgánico en su sal correspondiente.....	10
<b>Esquema 3.</b> Ejemplo de conversión de una sal inorgánica en su compuesto orgánico de partida.....	10
<b>Esquema 4.</b> Clases básicas de extracción de componentes aromáticos.....	12
<b>Esquema 5.</b> Principales precursores para la síntesis de (-)-ambrox ( <b>10</b> ), extraídos de especies vegetales.....	15
<b>Esquema 6.</b> Síntesis del (±)-ambrox a partir del monociclohomofarnesol ( <b>11</b> ).....	16
<b>Esquema 7.</b> Síntesis de (-)-ambrox ( <b>10</b> ) a partir de los ácidos <i>trans</i> - y <i>cis</i> -comúnicos ( <b>12a</b> <b>12b</b> ).....	17
<b>Esquema 8.</b> Obtención de (-)-ambrox ( <b>10</b> ) a partir del esclareol ( <b>17</b> ) y del <i>cis</i> -abienol ( <b>19</b> ).....	18
<b>Esquema 9.</b> Síntesis de (-)-ambrox ( <b>10</b> ) en un solo paso a partir del (-)-esclareol ( <b>17</b> ).....	18
<b>Esquema 10.</b> Síntesis de (-)-ambrox ( <b>10</b> ) empleando el hongo <i>Hyphozyma roseoniger</i> .....	19
<b>Esquema 11.</b> Síntesis de (-)-ambrox ( <b>10</b> ) a partir de la (+)-norambrenólida ( <b>18</b> ) obtenida del (-)-esclareol ( <b>17</b> ).....	20
<b>Esquema 12.</b> Síntesis del (-)-ambrox ( <b>10</b> ) a partir del ácido labdanólico ( <b>19</b> ).....	21
<b>Esquema 13.</b> Ciclización del (±)-13,14,15,16- <i>tetranor</i> -8 $\alpha$ ,12-labdanodiol ( <b>26</b> ) con <i>p</i> -TsCl y base.....	22
<b>Esquema 14.</b> Ciclización del (-)-13,14,15,16- <i>tetranor</i> -8 $\alpha$ ,12-labdanodiol ( <b>9</b> ) con calentamiento catalizada por ácidos en estado sólido.....	22
<b>Esquema 15.</b> Ciclización del (-)-13,14,15,16- <i>tetranor</i> -8 $\alpha$ ,12-labdanodiol ( <b>9</b> ) con partículas de Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> y HCl.....	23
<b>Esquema 16.</b> Obtención de (-)-ambrox ( <b>10</b> ) a partir de <i>Ageratina jocotepecana</i> .....	24
<b>Esquema 17.</b> Rendimientos de los extractos obtenidos por maceración de la colecta No. 2.....	30
<b>Esquema 18.</b> Rendimientos de los extractos obtenidos por maceración de la colecta No. 3.....	30
<b>Esquema 19.</b> Rutas de preparación desarrolladas para la obtención de (-)-ambrox ( <b>10</b> ).....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Colectas realizadas de <i>Ageratina jocosotepecana</i> .....	27
<b>Tabla 2.</b> Rendimientos de los extractos obtenidos a diferentes tiempos.....	28
<b>Tabla 3.</b> Rendimientos de los extractos obtenidos por reflujo.....	32
<b>Tabla 4.</b> Rendimientos de las biparticiones de los disolventes No. 1 y 2.....	32
<b>Tabla 5.</b> Rendimientos de los extractos de las colectas 4, 5, 6, 7 y 8.....	32

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Ganancias estimadas de la industria de los sabores y las fragancias en la última década.....	13
--	----

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
%	Por ciento
$\delta$	Desplazamiento químico en ppm
°C	Grados Celsius
a. C.	Antes de Cristo
c/u	Cada uno
D	Constante dieléctrica
$^{13}\text{C}$	Carbono 13
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
<i>epi</i>	Epímero
er	Permitividad relativa
g	Gramo
$^1\text{H}$	Hidrógeno 1
h	Horas
Hz	Hertz
kg	Kilogramos
l	Litros
m	Múltiple
mg	Miligramos



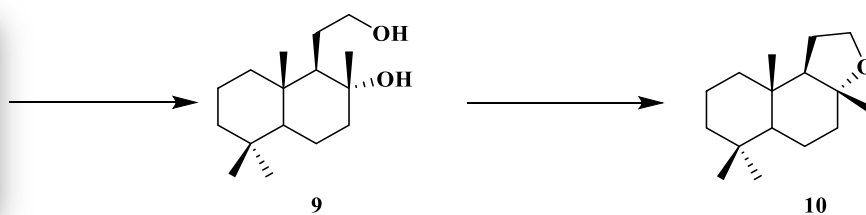
MHz	Megahertz
ml	Militro
No.	Número
<i>p</i>	<i>Para</i>
p. e.	Punto de ebullición
p. f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
T. A.	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano

## RESUMEN

En el presente trabajo se describe la optimización y escalamiento del proceso de obtención de (-)-ambrox (**10**) a partir del (-)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) obtenido de *Ageratina jocotepecana* a escalas superiores a las reportadas previamente, desarrollándose distintas rutas de preparación para el (-)-ambrox (**10**), las cuales son sencillas, prácticas y sustentables, y representan una alternativa novedosa para la producción de (-)-ambrox (**10**) a nivel industrial.



*Ageratina jocotepecana*



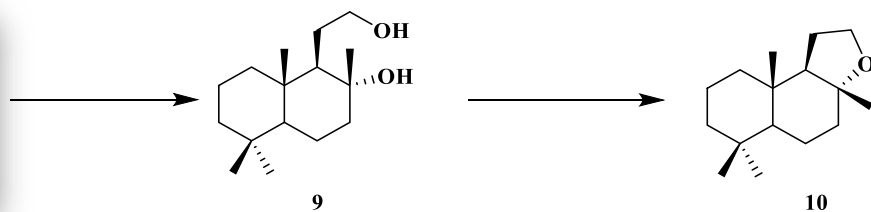
**Palabras clave:** *Ageratina jocotepecana*, labdanos, tetranorlabdanodiol, (-)-ambrox, asteraceae.

## ABSTRACT

In the present work the optimization and scaling of (–)-ambrox (**10**) is described via (–)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) from *Ageratina jocotepecana* at higher scales that previously reported, developing different (–)-ambrox (**10**) preparation routes, which are simple, practical and sustainable, and these procedures represent chemical alternatives for the (–) ambrox (**10**) industrial production.



*Ageratina jocotepecana*



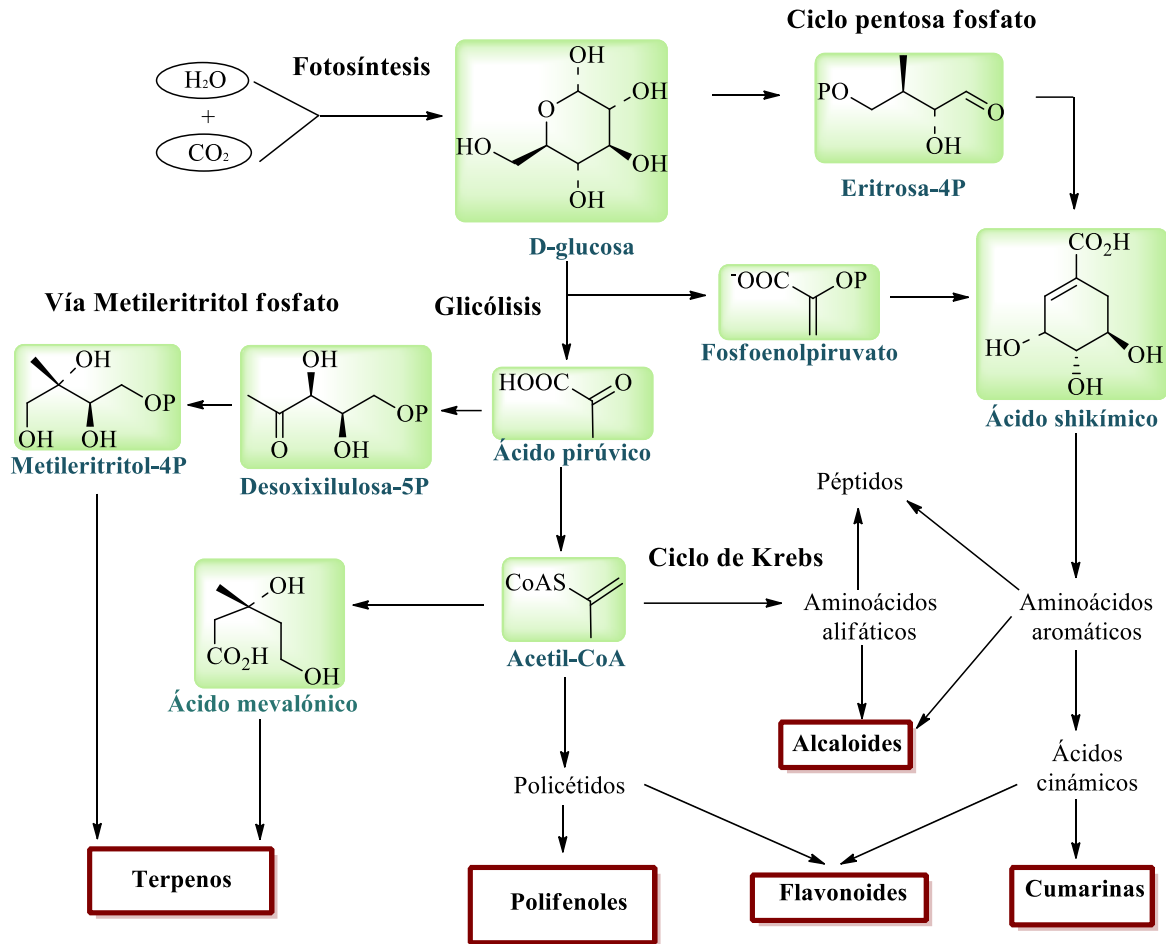
**Keywords:** *Ageratina jocotepecana*, labdanes, tetranorlabdanodiol, (–)-ambrox.

## 1. INTRODUCCIÓN

Un papel fundamental en la vida del hombre lo han desarrollado las plantas, que son fuente de una gran diversidad de productos metabólicos de importancia comercial, usados actualmente en las industrias farmacéutica, alimenticia y cosmética; ya que, a partir de moléculas de agua, dióxido de carbono y energía solar, elaboran carbohidratos, lípidos y proteínas, considerados como metabolitos primarios. También producen en menor proporción otros compuestos conocidos como metabolitos secundarios que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de metabolitos primarios; pero sí tienen funciones ecológicas específicas, como atrayentes o repelentes de animales. Algunos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción.

Los metabolitos secundarios presentan una distribución limitada en el reino vegetal, su producción generalmente está restringida a un determinado género de plantas, a una familia o incluso a algunas especies.

Los precursores de la biosíntesis de los metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario del carbono, como la glucólisis, el ciclo de Krebs, el ciclo de la pentosa fosfato y la vía del metileritritol fosfato (**esquema 1**). Estos se dividen en tres grandes grupos: compuestos nitrogenados, terpenoides y compuestos fenólicos (Sepúlveda-Jiménez et al., 2003; Shilpa et al., 2010).

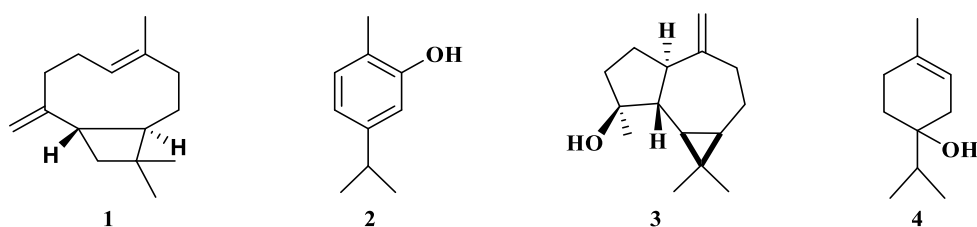


**Esquema 1.** Rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios (Modificado de Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

### 1.1 Terpenos

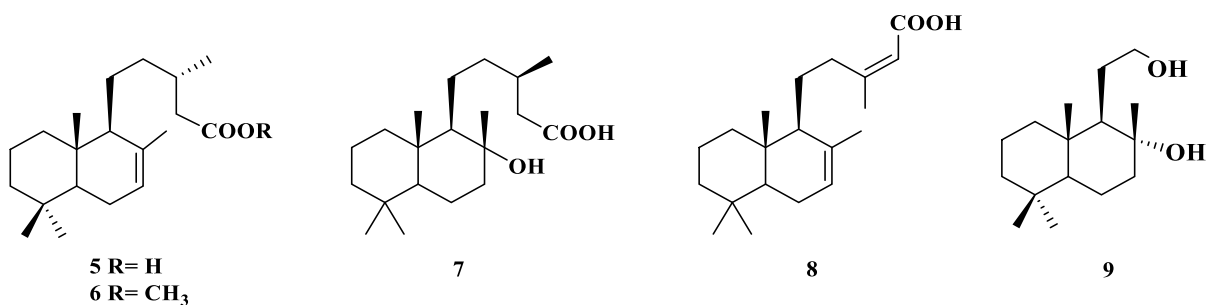
Los terpenoides constituyen el grupo de mayor número de productos naturales conocidos, siendo los componentes principales de los aceites esenciales naturales que son compuestos volátiles complejos que pueden ser sintetizados en todos los órganos de las plantas, es decir, flores, hojas, tallos, semillas, frutos, raíces o corteza; caracterizados por presentar aroma, lo cual los ha llevado a su inclusión en la perfumería.

Dentro de las plantas endémicas de México se encuentra la especie vegetal *Ageratina jocotepecana*, perteneciente a la familia Asteraceae, la cual es estudiada por nuestro grupo de trabajo. Esta especie es proveedora de importantes terpenos como  $\beta$ -cariofileno (1), carvacrol (2), espatulenol (3) y terpinen-4-ol (4), que se encuentran como componentes mayoritarios del aceite esencial de las partes aéreas (figura 1), y los cuales mostraron actividad repelente contra termitas (Ramírez-López et al., 2016).



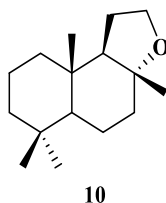
**Figura 1.** Terpenos aislados del aceite esencial de *Ageratina jocotepecana*.

También se han aislado de esta especie vegetal diversos diterpen labdanos: ácido catívico (5), éster metílico del ácido catívico (6), ácido 13-*epi*-labdanólico (7) y ácido labda-7,13-dien-15-oico (8) de los extractos hexánicos de sus partes aéreas (figura 2); mostrando el diterpeno 5 importante actividad antibacterial contra *Bacillus subtilis* (CMI 0.15 mg/ml) y *Staphylococcus aureus* (CMI 0.78 mg/ml), mientras que el diterpeno 7 mostró actividad moderada contra los mismos microorganismos (García-Sánchez et al., 2014). Cabe mencionar que los labdanos se han destacado como precursores químicos para la síntesis de fijadores de perfumes (Bolster et al., 2001).



**Figura 2.** Labdanos aislados de *Ageratina jocotepecana*.

Adicionalmente, en un estudio posterior se estableció a la planta *A. jocotepecana* como una fuente potencial del (-)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) a baja escala (mg). Este es un precursor del valioso compuesto (-)-ambrox (**10**) usado como agente fijador de alta calidad, el cual está destinado a ofrecer efectos estables y de largo plazo a los perfumes, considerándose de gran importancia en la industria de la perfumería (Pérez-Gutiérrez, 2012).



**Figura 3.** Estructura química del (-)-ambrox (**10**).

Debido a esto, existen diversos procedimientos para la obtención de **10**; sin embargo, son complejos y costosos, e incluyen la generación de subproductos indeseados.

En el presente proyecto se llevó a cabo el escalamiento y optimización del proceso de obtención de (-)-ambrox (**10**) a partir de *Ageratina jocotepecana* a escalas superiores a las reportadas previamente, representando este nuevo proceso una alternativa para incursionar en la industria de la perfumería.

## 2. ANTECEDENTES

La historia de la extracción de productos naturales se remonta a Mesopotamia y Egipto, donde la producción de perfumes y aceites farmacológicamente activos era un negocio importante. Diversos textos confirman la sofisticada tecnología química que existía; uno de ellos es el Papiro de Ebers, que data de 1600 años a. C., en el cual se describe el uso de la cerveza y el vino como disolventes alcohólicos, que generaban una mayor solubilidad del soluto; también se han documentado recetas para obtener cremas y perfumes desde la época del rey asirio Tukulti-Ninurta I, 1120 a. C.; sin embargo, no hubo mucho desarrollo hasta la época medieval, cuando el etanol puro estuvo disponible como disolvente.

## 2.1 Técnicas de extracción

Actualmente la química de productos naturales se encuentra como un área activa de investigación, basándose en el estudio y la extracción de los constituyentes químicos del material vegetal que ha sido recolectado, secado y molido de acuerdo a los procedimientos establecidos. El estudio de tales compuestos comprende: sus estructuras químicas, metabolismo (anabolismo y catabolismo), distribución natural, función biológica, extracción y evaluación cuali-cuantitativa.

El procedimiento de extracción ideal debe ser exhaustivo (es decir, extraer tanto de los metabolitos deseados como sea posible), rápido, simple y reproducible. La selección de un método de extracción adecuado depende principalmente de la naturaleza y la cantidad de material para ser extraído, si se van a extraer grandes cantidades, la facilidad de transferencia desde la escala inicial hasta la escala masiva debe considerarse. Los métodos de extracción de productos naturales utilizan disolventes orgánicos o acuosos, estos tipos de extracciones pueden ser “sólido-líquido” o “líquido-líquido” (Bart & Pilz, 2011).

## 2.2 Extracción sólido-líquido

En la extracción sólido-líquido, el material vegetal se coloca en contacto con un disolvente; en primer lugar, el disolvente tiene que difundirse en las células, después solubilizar los metabolitos, y finalmente difundirse fuera de las células, para posterior evaporación o liofilización de las soluciones, obteniéndose extractos crudos secos.

En general, las extracciones pueden facilitarse por la molienda (ya que las células se destruyen en gran medida) y al aumentar la temperatura, debido a que favorecen la solubilización de los compuestos presentes. Existen diversas técnicas de extracción, entre las que se encuentran:

- Maceración

Este procedimiento consiste en colocar la planta en un disolvente adecuado en un contenedor cerrado a temperatura ambiente; después de la extracción, el material vegetal residual es separado del disolvente por filtración o decantación. Para una extracción



exhaustiva es recomendable dos o más maceraciones. Este método es preferible para la extracción de compuestos volátiles o termolábiles. Algunos inconvenientes es que puede llevar mucho tiempo y consumir grandes volúmenes de disolvente; sin embargo, la agitación ocasional o constante puede aumentar la velocidad de extracción.

- Percolación

En este proceso la muestra se impregna con un disolvente en un percolador (un contenedor cilíndrico o cónico con un grifo en la parte posterior). Se vierte disolvente adicional sobre la planta y se filtra lentamente (gota a gota) desde el fondo del percolador. La percolación es adecuada para extracción inicial y de gran escala; existen varios factores que influyen en los rendimientos de los extractos como la molienda de la muestra, ya que los polvos finos y materiales como resinas se hinchan excesivamente obstruyendo el percolador; además, si el material no se distribuye homogéneamente en el contenedor, es posible que el disolvente no llegue a todas las áreas y la extracción sea incompleta.

- Decocción

Es un método que consiste en hervir la planta en agua por espacio de 15 a 20 minutos (según sea la planta o el principio activo a extraer), se enfría y se filtra, obteniendo el extracto acuoso; este procedimiento es usado para compuestos que no sufran alteraciones con la temperatura (Nafiu, et al., 2017).

- Extracción Soxhlet

Este es un proceso continuo, en el cual la muestra se coloca dentro de un cartucho en forma de dedal de celulosa, en el sifón; posteriormente el disolvente contenido en el matraz alcanza su punto de ebullición por efecto del calor, sube en forma de vapor por el cuello de éste, recorre el sifón y llega al refrigerante. En éste, se condensa y regresa al sifón en forma líquida. El disolvente se acumula justo donde está el cartucho de celulosa, entrando en contacto con la muestra; el sifón acumula el disolvente con los compuestos extraídos hasta que alcanza el nivel suficiente para regresar al matraz. El disolvente se recircula por el equipo repetidamente, extrayendo en cada recorrido una fracción de

compuestos; por lo tanto, consume menos tiempo y menos cantidad de disolvente que la maceración y percolación.

- Reflujo

En la extracción bajo reflujo, la planta se coloca con un disolvente en un matraz de fondo redondo, que está conectado a un condensador. El disolvente es calentado hasta su punto de ebullición, a medida que el vapor se condensa, el disolvente se recicla al matraz, generándose un menor gasto de disolvente y mejores rendimientos.

- Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor se aplica a la extracción de aceites esenciales (volátiles), la cual consiste en colocar la planta en un matraz, a través del cual se pasa vapor de agua que arrastra los aceites esenciales hacia el condensador que enfría la mezcla, la cual es separada posteriormente para obtener el producto deseado.

La principal desventaja de los métodos que implican la aplicación de calor, es que los componentes termolábiles corren el riesgo de degradarse (Sarker, et al., 2006).

### 2.3 Tipos de disolventes

Todos los métodos de extracción mencionados implican el uso de algún disolvente. La elección de éste, comúnmente sigue la regla “lo similar disuelve lo similar”, esto quiere decir, que los solutos no polares o muy poco polares se disuelven con mayor facilidad en disolventes no polares; y que los solutos polares se disuelven mejor en disolventes polares, como el agua. Esta regla se aplica en los compuestos no polares o poco polares, pues las fuerzas de atracción que mantienen unidas a las moléculas del soluto o del disolvente son pequeñas y la energía para separarlas es mínima, lográndose con sustancias similares al crear interacciones no covalentes.

En el caso de los compuestos polares esta regla no se aplica completamente, pues sustancias "no polares" y los compuestos polares que contienen una elevada proporción de átomos de Oxígeno (O) y de Nitrógeno (N), pueden generar cierta polaridad a la molécula apolar, permitiendo la formación de puentes de hidrógeno, y así su disolución.

Los disolventes de acuerdo a las interacciones que pueden establecer con un soluto específico, se clasifican en tres tipos:

- Disolvente aprótico apolar: se caracteriza por una baja permitividad relativa, que también se denomina constante dieléctrica ( $\epsilon_r < 15$ ), un momento dipolar bajo y la incapacidad de actuar como donador de enlaces de hidrógeno.
- Disolvente aprótico dipolar: posee grandes permitividades relativas ( $\epsilon_r > 15$ ) y momentos dipolares importantes. Estos disolventes no actúan como donantes de enlaces de hidrógeno, ya que sus enlaces C-H no se encuentran suficientemente polarizados.
- Disolventes próticos: contienen átomos de hidrógeno unidos a elementos electronegativos (F-H, O-H, N-H), son donantes de enlaces de hidrógeno, tienen permitividades relativas mayores a 15 y son fuertemente polares. A esta clase de disolventes pertenecen: el agua, amoníaco, alcoholes, ácidos carboxílicos y amidas primarias.

Además de la solubilidad y polaridad, que son características claves en la obtención de un extracto crudo, existen criterios adicionales para la selección del disolvente:

- Selectividad: una alta selectividad permite utilizar menos etapas de extracción.
- La recuperabilidad del disolvente: la cual debe ser fácil. Si se utiliza la evaporación o destilación, el disolvente debe tener un bajo calor de evaporación, no debe formar azeótropos ni condensarse fácilmente con el agua de refrigeración.
- Viscosidad y punto de fusión: altas viscosidades reducen el efecto de transferencia de masa eficientemente y conducen a dificultades con el bombeo y la dispersión. El punto de fusión del disolvente debe ser preferiblemente más bajo que la temperatura ambiente para que sea de fácil manejo.
- Toxicidad e inflamabilidad: para el procesamiento de alimentos son tomados en consideración únicamente disolventes no tóxicos.
- Corrosividad: los disolventes corrosivos aumentan el costo del equipo.
- Estabilidad térmica y química: es importante que el disolvente sea térmica y químicamente estable a medida que se recicla.

- Disponibilidad y costos: el disolvente debe ser fácil de adquirir y de un costo accesible.

## 2.4 Constante dieléctrica (D)

Un indicador cuantitativo de la polaridad de un disolvente es su constante dieléctrica, la cual mide la capacidad relativa de una sustancia para interferir con la atracción entre cargas de signo opuesto, como las presentes en los iones positivos y negativos (Weininger & Stermitz, 1988).

La constante dieléctrica (D) del disolvente se altera fácilmente con la temperatura, lo que influye directamente en la solubilidad de los compuestos. En el caso de una extracción sólido-líquido la temperatura también afecta la solubilidad del soluto, ya que al aumentar la temperatura aumenta la energía cinética de las partículas, lo cual permite una mayor interacción entre el soluto y el disolvente, facilitando su disolución (Ikada, 1971; Reichardt, 2003).

## 2.5 Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es un método útil para separar componentes de una mezcla, basado en la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer en dos disolventes diferentes. Este método consiste en la transferencia de una sustancia dada desde una "fase líquida A" a otra "fase líquida B" entre sí. En la práctica este método es muy utilizado para separar compuestos orgánicos de las mezclas de reacción en disolución o suspensión acuosa.

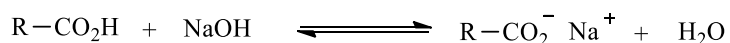
Para realizar este tipo de extracción el disolvente a utilizar debe presentar ciertas características:

- \*No ser miscible con el otro disolvente.
- \*El componente deseado debe ser más soluble en el disolvente de extracción que en el disolvente original.
- \*El resto de componentes no deben ser solubles en el disolvente de extracción.
- \*Volátil, de manera que se pueda eliminar fácilmente del producto extraído mediante destilación o evaporación; ya que la destilación constituye una de las principales técnicas para purificar líquidos volátiles a partir de una mezcla de varios componentes con diferente

volatilidad. Este método consiste en calentar un líquido hasta que sus componentes más volátiles pasen a fase vapor y, posteriormente, enfriar el vapor hasta recuperar estos componentes en forma líquida mediante un proceso de condensación (Angurell et al., 2018).

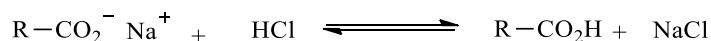
## 2.6 Extracciones ácido-base

La extracción líquido-líquido es muy útil para extraer compuestos orgánicos con carácter ácido o básico (Bronsted-Lowry) que están disueltos en un disolvente orgánico, ya que estos pueden llevarse a una fase acuosa aprovechando sus propiedades ácido/base. Las sales que se forman en estas extracciones son ahora solubles en agua (**esquema 2**). Los compuestos orgánicos neutros, no se verán afectados por estas reacciones y permanecerán inalterados en la disolución orgánica de partida. En todos los casos, es necesaria una extracción exhaustiva con objeto de garantizar la transformación de todo el compuesto orgánico ácido o básico en su sal.



**Esquema 2.** Ejemplo de conversión de un ácido orgánico en su sal correspondiente.

Una vez que el compuesto orgánico ácido o básico se encuentra disuelto en la fase acuosa en forma de su sal, puede recuperarse de nuevo mediante la reacción ácido-base inversa, que transforma la sal en el compuesto orgánico de partida, insoluble en agua. Si el producto es sólido, se filtra, y si es líquido, se extrae con un disolvente orgánico adecuado; en el caso de las sales sódicas de los ácidos carboxílicos y de los fenoles son fácilmente convertibles en los compuestos de partida por tratamiento de ácido sulfúrico, fosfórico o clorhídrico (**esquema 3**).

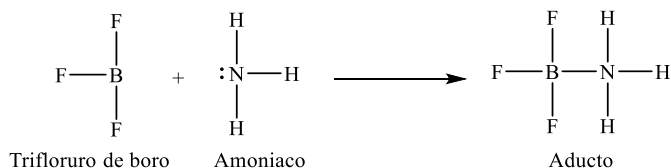


**Esquema 3.** Ejemplo de conversión de una sal inorgánica en su compuesto orgánico de partida.

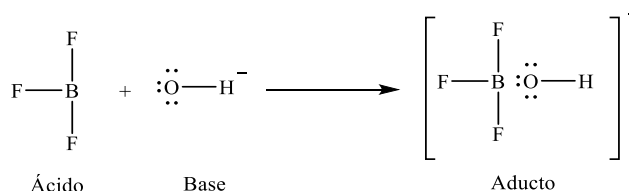
## 2.7 Reacciones ácido-base de Lewis

Las reacciones ácido-base no solo ocurren entre compuestos de Bronsted-Lowry, también se llevan a cabo entre bases y ácidos de Lewis; sin embargo, la reacción entre un

ácido de Lewis y una base resulta en un producto de adición: un aducto, es decir, un producto de dos especies reactivas unidas por un enlace covalente coordinado. Un ejemplo es la reacción entre el trifloruro de boro ( $\text{BF}_3$ ) y el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) generando un aducto:



El  $\text{BF}_3$  actúa como ácido aceptando un par de electrones del  $\text{NH}_3$ , el cual actúa como base donando el par de electrones. Similar es la reacción entre el  $\text{BF}_3$  y el ion hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), produciendo el aducto  $[\text{BF}_3(\text{OH})]^-$ :



Estos tipos de reacciones entre ácidos y bases, ya sean de Lewis o de Bronsted-Lowry, generan productos inmiscibles en disolventes orgánicos, lo que facilita su separación en una mezcla (Kornblum, 2010).

## 2.8 Separación y Purificación

Para la purificación de los extractos se utilizan métodos que se basan principalmente en técnicas cromatográficas, ya que son muy flexibles debido a sus principios de separación, cuyos mecanismos son:

- Cromatografía de adsorción.
- Cromatografía de bipartición.
- Cromatografía de intercambio iónico.
- Cromatografía por exclusión molecular.

Los diversos procesos de extracción y purificación de productos naturales han permitido la obtención de una importante gama de metabolitos secundarios de diversas fuentes naturales, como lo son los aceites esenciales y fijadores, que son ampliamente utilizados en la industria de la perfumería.

## 2.9 La industria de la perfumería

El uso de materiales perfumados para todo tipo de propósitos se remonta miles de años. La palabra "perfume" viene del latín “*per*”, por y “*fumare*”, producir humo, que se refería a una sustancia aromática que producía humo al quemarse, reflejando uno de los usos más antiguos de los materiales aromáticos, la quema de incienso y las hierbas como ofrenda religiosa.

Tradicionalmente, el descubrimiento y desarrollo de compuestos sintéticos aromáticos se basa en el análisis de fuentes naturales, como las plantas (como la lavanda y el jazmín), las frutas (por ejemplo, limón y naranja) y animales (incluido el almizcle del ciervo almizclero y el ámbar gris del cachalote). Los diferentes componentes de estas fuentes naturales se obtienen utilizando métodos antiguos y nuevos que caen en tres clases básicas: expresión, destilación y extracción con disolvente, como se muestra en el **esquema 4**:

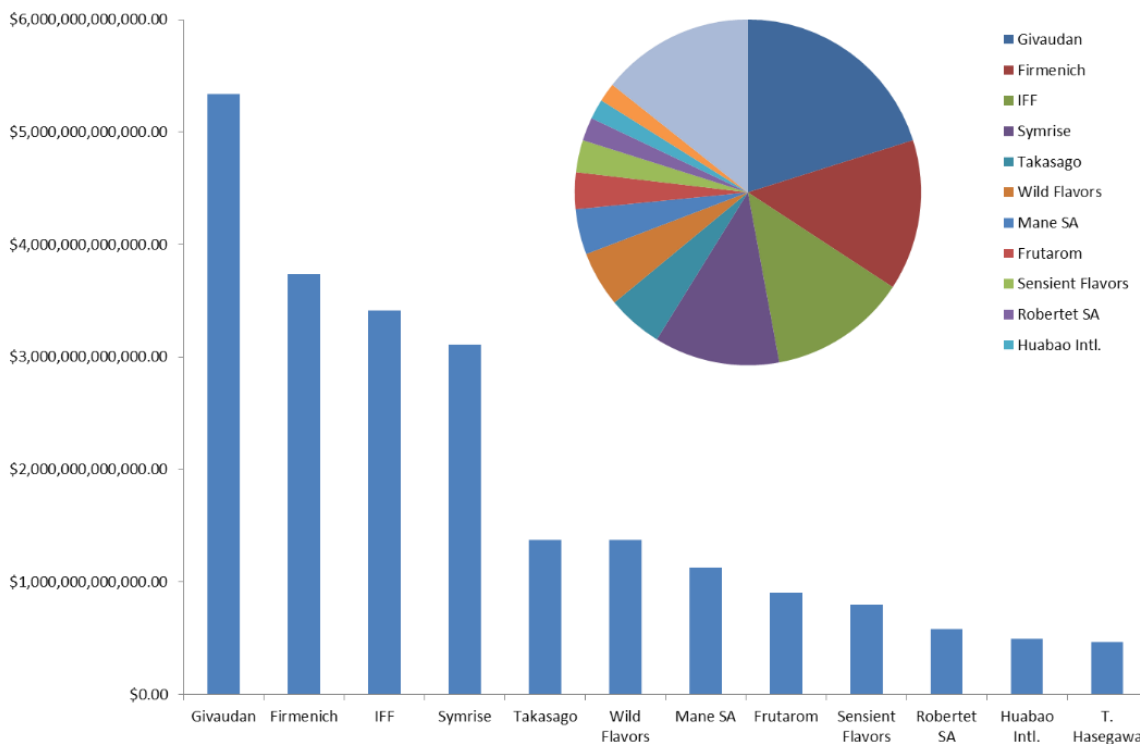


**Esquema 4.** Clases básicas de extracción de componentes aromáticos (Fortineau, 2004).

Actualmente las preparaciones de fragancias o perfumes se utilizan en una variedad de aplicaciones: productos de cuidado personal, limpieza; así como para modificar el aire en interiores (Klaschka & Kolossa-Gehring, 2007). Por ello, hoy en día, se estima que la industria de los sabores y fragancias genera alrededor de 27.5 billones de dólares al año de

ganancias, correspondiendo el 50% a cada una de ellas (13.75 billones para los sabores y 13.75 billones para las fragancias), generándose el incremento del 10% anual de la demanda de aceite esencial en el comercio internacional, aumentando de manera exponencial el requerimiento de plantas aromáticas (Bano et al., 2016).

El mercado más grande de esta industria se encuentra en Europa, África y la región del Medio Oriente (36%), América del Norte (32%), seguida del Pacífico-Asia (26%) y Sudamérica (6%); existiendo ocho grandes empresas globales, destacando: Givaudan, Firmenich, International Flavors & Fragancias y Symrise, que generan alrededor del 60% de las ganancias en el mercado mundial (**gráfica 1**) (Guentert, 2007; Ochoa, 2017).



**Gráfica 1.** Ganancias estimadas de la industria de los sabores y las fragancias en la última década.

En México la industria de la perfumería mueve cada año alrededor de 21 mil 500 millones de pesos y se prevé que hacia 2021 llegue a 25 mil 300 millones de pesos.



## 2.10 Perfumes

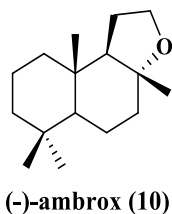
Los perfumes son mezclas de sustancias odoríficas que generalmente denominamos esencias, y se formulan con aceites esenciales, su base o disolvente casi siempre es el alcohol etílico y también contienen un fijador que en algunos casos, es utilizado en proporciones de nueve partes de fijador por una parte de esencia, convirtiéndolo en uno de los componentes principales de las fragancias (Saucedo et al., 2002).

Entre los componentes de los perfumes se encuentran diferentes estructuras terpenoides, tanto naturales como sintéticas, destacando los monoterpenos oxigenados que presentan olores más fuertes y son muy volátiles, en menor grado se tienen los sesquiterpenos y diterpenos que sirven como disolventes y fijadores de los componentes más volátiles, debido a que presentan mayor peso molecular, hidrofobicidad y baja volatilidad (Sell, 2006; Bakkali et al., 2008; Martínez-Guido, 2015).

## 2.11 Ámbar gris

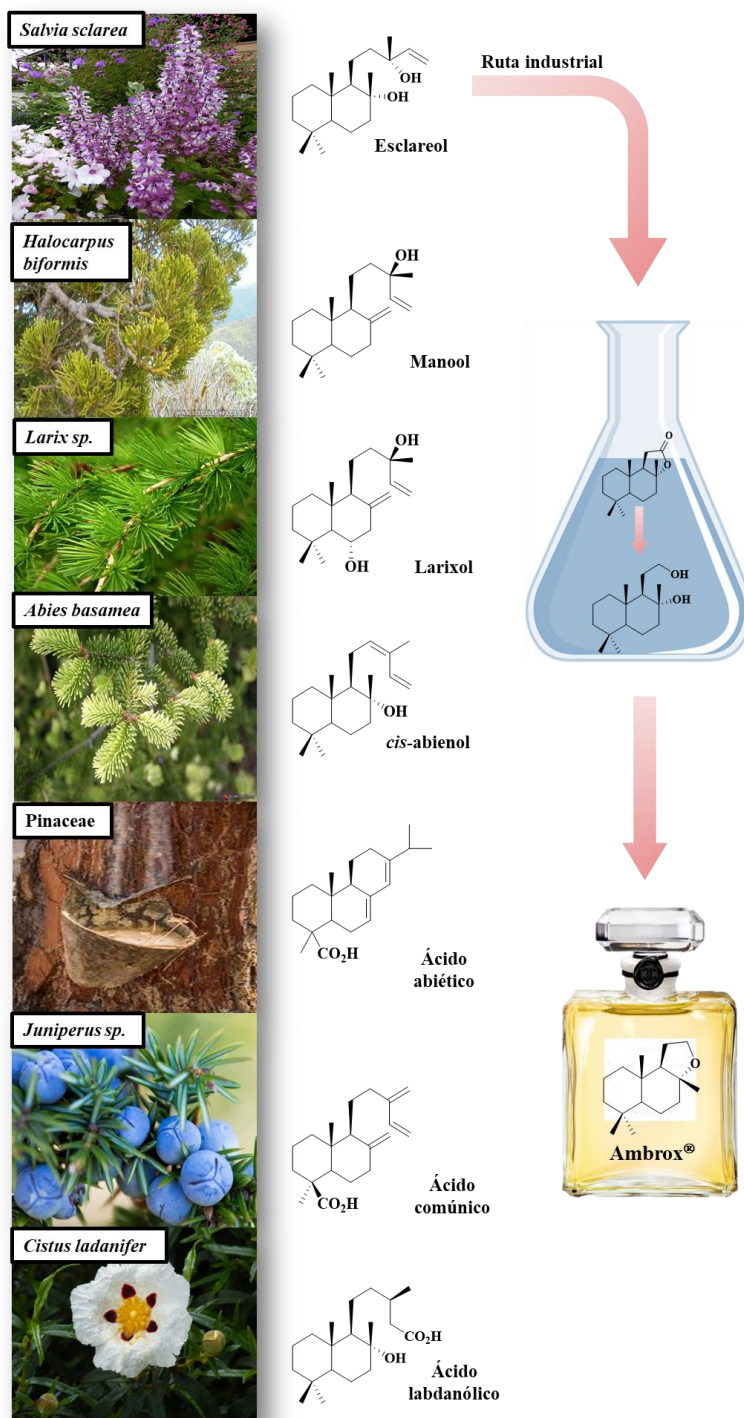
El ámbar gris es un producto metabólico de los cachalotes (*Physeter macrocephalus*) y es considerado uno de los más valiosos fijadores de perfumes animales; desafortunadamente, los intestinos del cachalote son la única fuente natural de esta sustancia, una especie en peligro de extinción. Actualmente, existen alternativas para la síntesis de sustancias que componen el ámbar gris, entre ellas destaca el perhidronaftofurano, también conocido como Ambrox/Ambroxan o (-)-ambrox.

El (-)-ambrox (**10**) corresponde al compuesto (-)-3,5,5,9a-tetrametildodecahidronafto-(2,1-b)furano, que presenta la siguiente estructura:



Múltiples procedimientos alternativos se han desarrollado para la síntesis y obtención de este compuesto y derivados de él, empleando otros productos naturales como material de partida, principalmente terpenos como: el *cis*-abienol, el ácido labdanólico y el

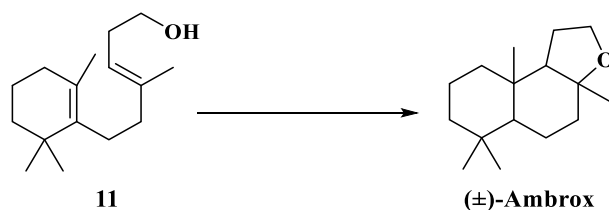
ácido comúnic, que pueden ser obtenidos a partir de extractos de especies vegetales (esquema 5).



**Esquema 5.** Principales precursores para la síntesis de (-)-ambrox (10), extraídos de especies vegetales (Zerbe & Bohlmann, 2015).

## 2.12 Métodos de síntesis de (-)-ambrox

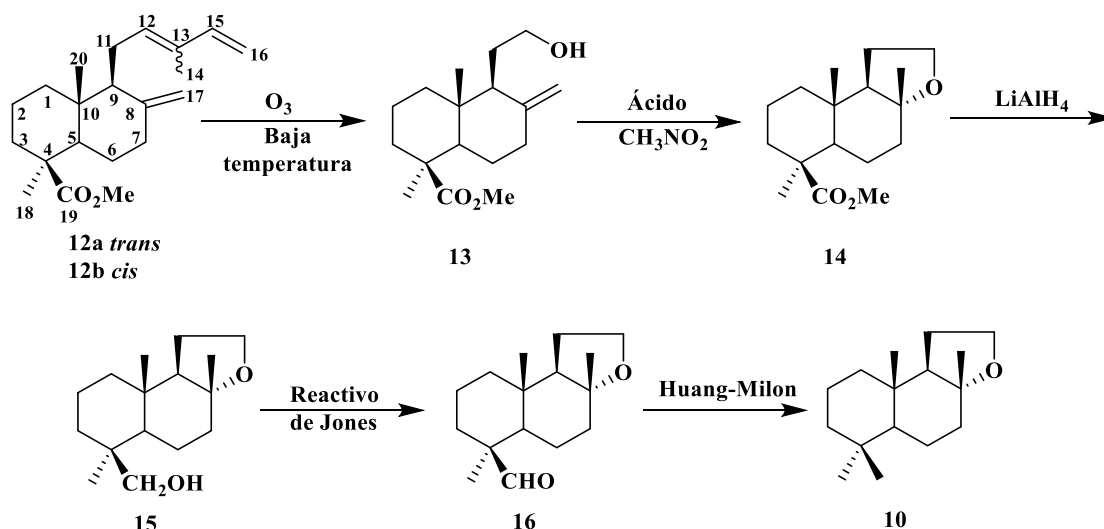
La obtención del (-)-ambrox (**10**) de forma totalmente sintética fue reportada a partir del ácido monociclohomofarnésico o derivados del mismo, como el monociclohomofarnesol (**11**) (**esquema 6**). De esta forma sintetizaron los productos Ambrox DL<sup>®</sup> de Firmenich (>50% (±)-ambrox y <50% diastereoisómeros) y Cetalo<sup>®</sup>; así como el producto comercial Cetalo<sup>®</sup> Laevo<sup>®</sup> (>99% (-)-ambrox) que fue producido presumiblemente vía resolución óptica del intermediario (±)-esclareólida. Estos procesos no permiten la obtención del (-)-ambrox (**10**) enantioméricamente puro, por lo que deben comercializarse en forma racémica o bien, aplicar métodos de resolución quiral costosos y complejos.



**Esquema 6.** Síntesis del (±)-ambrox a partir del monociclohomofarnesol (**11**).

Otro procedimiento para la síntesis de (-)-ambrox (**10**) fue descrito por Fernández-Barrero et al., en la patente Española ES2069469A1, el cual consiste en una semisíntesis de cinco etapas a partir de derivados de ácidos diterpénicos de origen natural *trans*- y *cis*-comúnicos (**12a** y **12b**), obtenidos de los extractos apolares de especies pertenecientes a la familia de las cupresáceas del género *Juniperus*. En la primer etapa se llevó a cabo la degradación del doble enlace C<sub>12</sub> de manera regioselectiva mediante ozonólisis reductora a baja temperatura hasta la conversión del 40% en el alcohol homosesquiterpénico 12-hidroxi-13,14,15,16-tetranorlabd-8(17)-en-19-oato de metilo (**13**), el cual fue tratado con ácido en presencia de nitrometano para llevar a cabo la ciclización de manera cuantitativa y estereoselectiva originando el epóxido 8 $\alpha$ ,12-epoxi-13,14,15,16-tetranorlabdan-19-oato de metilo (**14**), el cual fue reducido con hidruro de litio y aluminio produciendo 8 $\alpha$ ,12-epoxi-13,14,15,16-tetranorlabdan-19-ol (**15**), posteriormente fue oxidado con el reactivo de Jones generando el 8 $\alpha$ ,12-epoxi-13,14,15,16-tetranorlabdan-19-al (**16**), que es convertido por el

procedimiento Huang-Minlon en (-)-ambrox (**10**); dicho procedimiento resulta complejo, tardado y costoso, pues requiere numerosas etapas de reacción y reactivos (**esquema 7**).

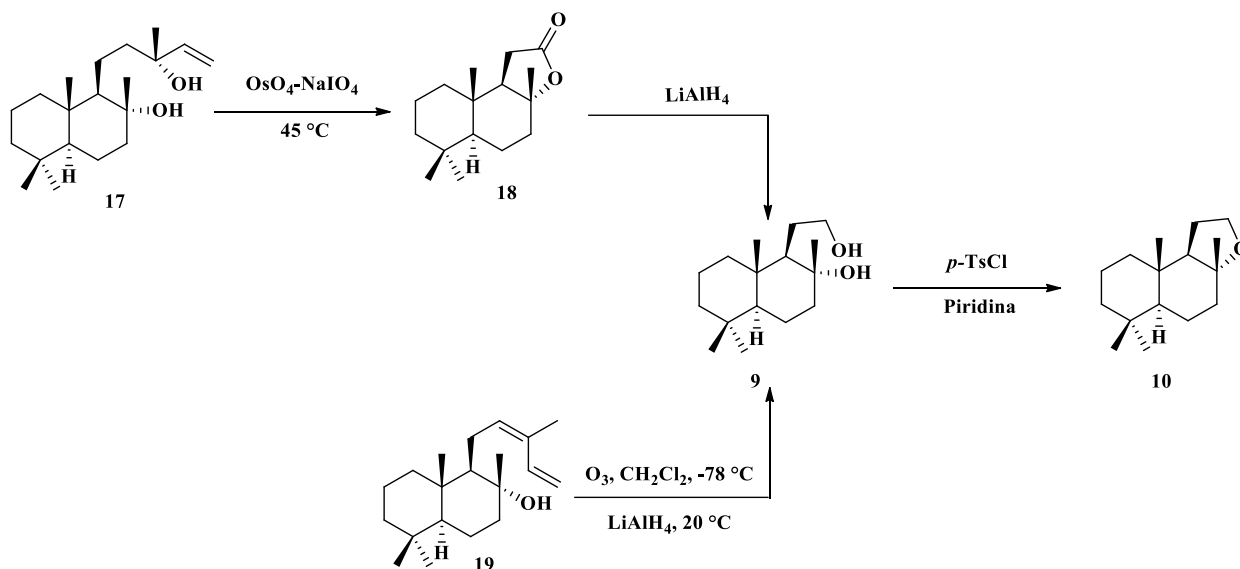


**Esquema 7.** Síntesis de (-)-ambrox (**10**) a partir de los ácidos *trans*- y *cis*-comúnicos (**12a** **12b**).

Asimismo, han sido desarrollados otros procedimientos, en los cuales se usó el (-)-esclareol (**17**), el cual es el principal recurso industrial para la producción de (-)-ambrox (**10**). Esta materia de partida tiene la desventaja de ser un material costoso, presente sólo en cantidades muy pequeñas en el aceite esencial de *Salvia sclarea*. Además, no puede convertirse en **10** por medio de una sola reacción química, involucra al menos tres pasos de reacción: una degradación oxidativa de la cadena lateral de **17**, una posterior reducción y una ciclodeshidratación, pasando por diversos intermediarios como son típicamente metilcetonas, (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) o norambrenólida (**18**) (Moulines et al., 2001).

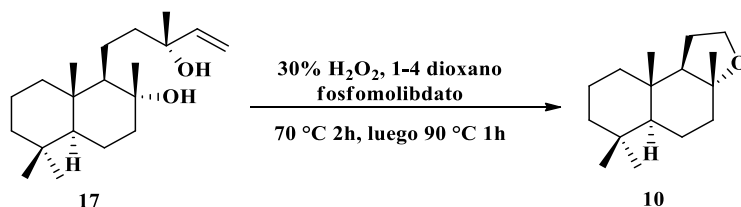
Por ejemplo, en la patente Española ES2044780A1 solicitada por Fernández-Barrero et al., el (-)-esclareol (**17**) fue sometido a un procedimiento de degradación del enlace  $C_{12}$ - $C_{13}$ , mediante tratamiento con tetróxido de osmio-peryodato sódico a 45 °C, y reducción con hidruro de aluminio y litio generándose el (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), el cual se ciclizó en presencia de cloruro de *p*-toluensulfonilo y piridina produciendo (-)-ambrox (**10**); en esta misma solicitud se describe otro procedimiento a partir del *cis*-abienol (**19**), el cual se sometió a la degradación de la cadena lateral, mediante

ozonólisis reductora a baja temperatura, para formar el compuesto **9**, que se transformó en **10** como se describió anteriormente. El uso del hidruro de litio y aluminio en estos procedimientos es peligroso debido a que es altamente inflamable y no adecuado para uso industrial (**esquema 8**).



**Esquema 8.** Obtención de (-)-ambrox (**10**) a partir del esclareol (**17**) y del *cis*-abienol (**19**).

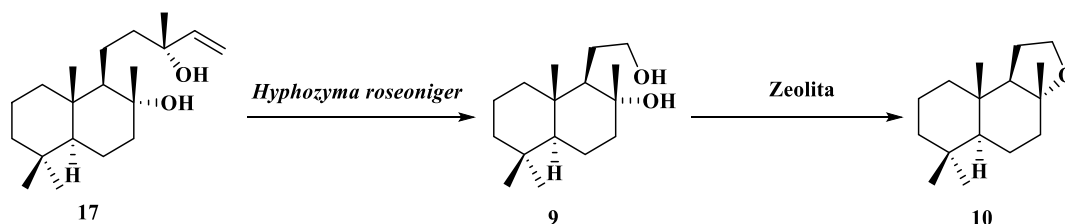
En el año 2016 Shaoxiang y colaboradores desarrollaron una síntesis en un solo paso a partir del (-)-esclareol (**17**) a través de una oxidación con peróxido de hidrógeno en presencia de un catalizador de fosfomolibdato de amonio cuaternario [ $\text{C}_5\text{H}_5\text{NC}_{16}\text{H}_{33}$ ] [ $\text{H}_2\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ]; sin embargo, este procedimiento da un rendimiento global bajo del 20% (**esquema 9**) (Shaoxiang et al., 2016).



**Esquema 9.** Síntesis de (-)-ambrox (**10**) en un solo paso a partir del (-)-esclareol (**17**).

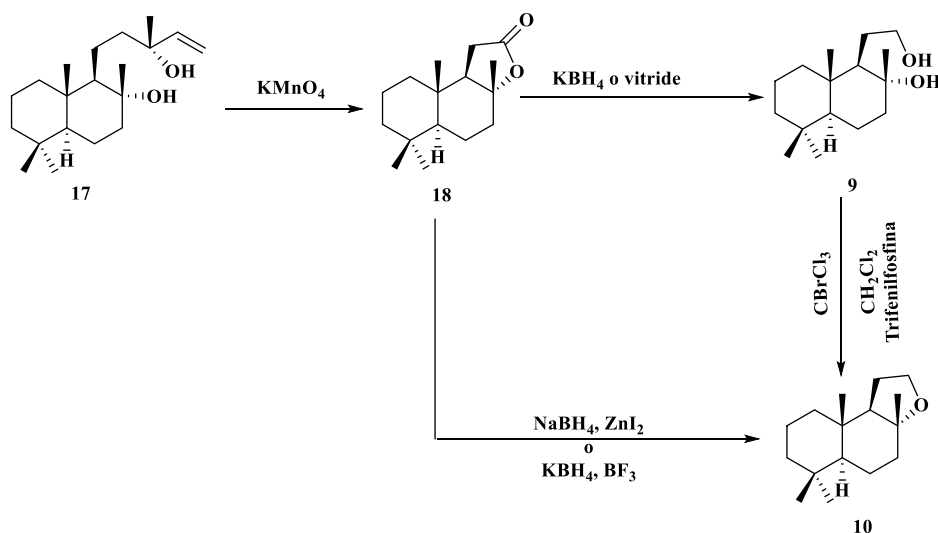
En el año 2010 Steenkamp y Taka, describieron en la patente US20100248316A1, que el (-)-esclareol (**17**) al ser tratado con el hongo *Hypozyma roseoniger* generó el (-)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), el cual posteriormente fue ciclizado en

presencia de una zeolita para producir **10** (**esquema 10**). Este procedimiento requiere de tiempos de reacción muy largos que van de 1 a 24 h y de temperaturas entre 0 a 110 °C, y la activación de la zeolita incrementa el costo de síntesis.



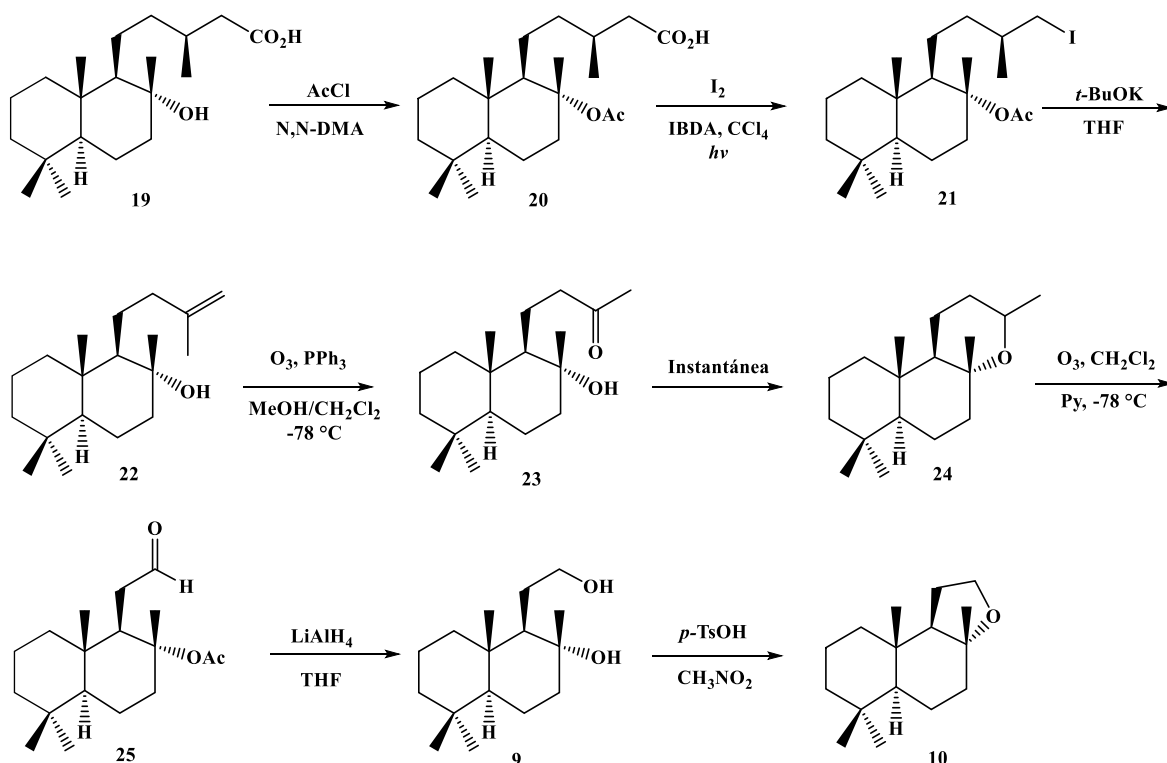
**Esquema 10.** Síntesis de (-)-ambrox (**10**) empleando el hongo *Hypozyma roseoniger*.

También sintetizaron a **10** a partir de la (+)-norambrenólida también llamada (+)-esclareolida (**18**) que puede ser obtenida de **17** mediante su oxidación con permanganato de potasio a temperatura ambiente; el procedimiento fue descrito por Fernández-Barrero et al., en la patente española ES2195777A1, en el cual **18** fue tratado con borohidruro de sodio en presencia de yoduro de zinc o con borohidruro de potasio en presencia de trifluoruro de boro para obtener (-)-ambrox (**10**). De igual manera se puede llegar a **10** a partir del tratamiento de **18** con vitride o borohidruro de potasio para obtener el (-)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), y la posterior ciclización con bromotriclorometano y trifenilfosfina en cloruro de metileno a reflujo (**esquema 11**). El inconveniente en estos métodos es el empleo de demasiados reactivos en cada una de las etapas de reacción, así como algunos reactivos tóxicos como la trifenilfosfina.



**Esquema 11.** Síntesis de (-)-ambrox (**10**) a partir de la (+)-norambrenólida (**18**) obtenida del (-)-esclareol (**17**).

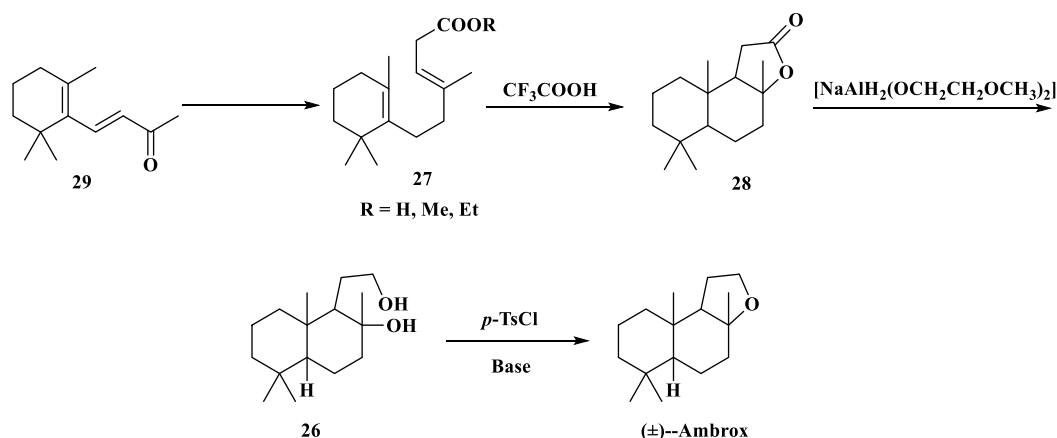
Por otro lado, se conocen procesos que no están basados en (-)-esclareol (**17**), aunque comprenden procedimientos costosos y tardados, o que pueden generar una considerable cantidad de contaminantes y/o subproductos no deseados, como lo muestra su obtención a partir del ácido labdanólico (**19**) que fue aislado de *Cistus ladaniferus L.*, el cual consiste en la acetilación del hidroxilo terciario con cloruro de ácido en *N,N*-dimetilnilina dando **20**, seguido de la descarboxilación del acetato con diacetato de yodobenceno y yodo, generando el yoduro **21**, el cual inmediatamente fue tratado con terbutóxido de potasio en THF, llevándose a cabo la deshidroyodación e hidrólisis del grupo acetato produciéndose el alqueno **22**, el cual tras ozonólisis dio la metilcetona **23**, que instantáneamente se ciclizó generándose el óxido de esclareol **24**, que fue tratado con ozono en diclorometano produciendo el aldehído **25**, el cual se redujo con hidruro de litio y aluminio generando el (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), que finalmente fue ciclizado en presencia del ácido *p*-toluensulfónico en nitrometano produciendo (-)-ambrox (**10**) (esquema 12) (Bolster et al., 2001).



**Esquema 12.** Síntesis del (-)-ambrox (**10**) a partir del ácido labdanólico (**19**).

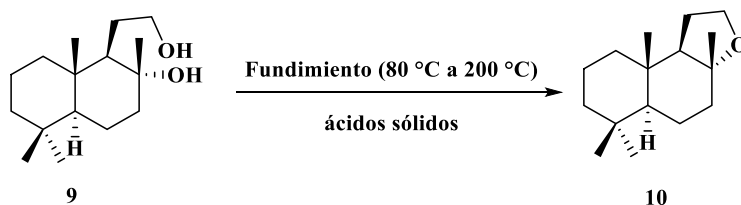
También existen diversos procedimientos para llevar a cabo la ciclización del (-)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) para obtener el (-)-ambrox (**10**), algunos ya se mencionaron anteriormente y otros se describen en diferentes patentes de invención. Por ejemplo, en la solicitud de la patente EP0165458A2 descrita por Kawanobe y Kogami, sugiere la ciclización de **9** llevada a cabo en presencia de una base y cloruro de *p*-toluensulfonilo, en donde el racemato de ( $\pm$ )-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**26**) puede ser sintetizado a partir de compuestos conocidos como ácido *trans*- $\beta$ -monociclohomofarnesílico o sus ésteres (**27**) a través de su tratamiento con ácido trifluoroacético dando ( $\pm$ )-norambrenólida (**28**); a su vez **27**, puede ser sintetizado a partir de dihidro- $\beta$ -ionona (**29**), que es barata y fácil de sintetizar u obtener (**esquema 13**); sin embargo, el proceso requiere de muchas etapas y reactivos, los cuales incrementan el costo del proceso. Adicionalmente, en una etapa del proceso se utiliza piridina como base, la cual tiene un olor desagradable, por lo que se debe ajustar la calidad de la esencia resultante. El reciclado de piridina es muy difícil debido a su solubilidad en agua, lo que conduce a un incremento en los costos.





**Esquema 13.** Ciclización del ( $\pm$ )-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**26**) con *p*-TsCl y base.

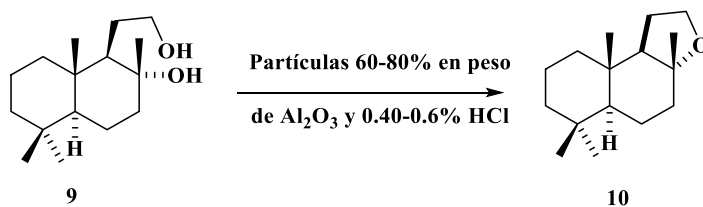
En otro procedimiento de síntesis de **10** descrito por Grimmer y Martin en la patente de Estados Unidos US5616737, se llevó a cabo la ciclización del ( $-$ )-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) mediante su calentamiento al estado fundido (80 °C a 200 °C) con ácidos en estado sólido, en presencia de 10 a 100% en peso, basado en el diol (**esquema 14**). Este proceso presenta como desventaja el elevado costo de los reactivos y del equipo necesario; así como el uso de un catalizador de alúmina muy específico pretratado con ácido clorhídrico.



**Esquema 14.** Ciclización del ( $-$ )-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) con calentamiento catalizada por ácidos en estado sólido.

Otro ejemplo de procedimiento para la ciclización del ( $-$ )-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) se encuentra en la patente alemana DE3912318A1 (Bruns, 1990), la cual se lleva a cabo con partículas con 60-80% en peso de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y 0.40 a 0.6% en peso de HCl (**esquema 15**); presenta como desventaja que no es suficientemente selectivo para los

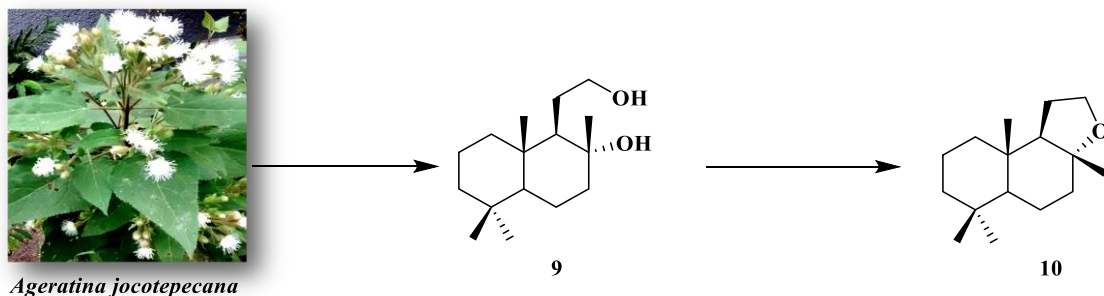
requerimientos olfatorios, y se debe utilizar un catalizador de alúmina muy específico, lo cual eleva su costo.



**Esquema 15.** Ciclización del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) con partículas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y HCl.

A pesar de las diversas síntesis reportadas para la obtención de (-)-ambrox (**10**), el compuesto más ampliamente usado como material de partida continúa siendo el (-)-esclareol (**17**). Sin embargo, los métodos de síntesis que han sido reportados a partir de este compuesto presentan como principal desventaja un alto consumo de reactivos, lo que se traduce en un alto costo, además del riesgo de toxicidad para quien realice el procedimiento, y añadiendo a esto, el tiempo invertido para la obtención del producto, ya que estas síntesis regularmente involucran una amplia serie de reacciones en su desarrollo (Fernández-Barrero et al., 2004).

Nuestro grupo de trabajo desarrolló un proceso de síntesis del (-)-ambrox (**10**) a partir de la planta *Ageratina jocotepecana*, descrito en las solicitudes de patente MX/a/2015/014945 (PCT/IB2015/058939) y MX/a/2015/014942 (PCT/IB2015/058938). Este proceso involucró el aislamiento del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) a partir del extracto hexánico de las partes aéreas de *Ageratina jocotepecana*, y la obtención de **10** en solo una etapa de reacción (**esquema 16**), haciéndolo un método simple, económico y sin que se ponga en riesgo al Cachalote para su obtención.



**Esquema 16.** Obtención de (-)-ambrox (**10**) a partir de *Ageratina jocotepecana*.

Este proceso, aunque a la fecha permite obtener (-)-ambrox (**10**) a escala de laboratorio, representa una alternativa atractiva y sustentable para su obtención a nivel industrial con valor agregado por su origen natural. Adicionalmente, se sabe que *A. jocotepecana* contiene terpenos que provienen de la biosíntesis del pirofosfato de labdanilo que pueden ser de utilidad en distintas ramas de la industria (García-Pacheco, 2015; Servín-García, 2017).

Con base en lo anterior, se pretende optimizar el proceso de obtención del precursor tetranorlabdanodiol (**9**) de *Ageratina jocotepecana*, probando diversas técnicas, posteriormente generar **10** mediante la ciclización en un solo paso; y así desarrollar y estandarizar un proceso sencillo, práctico, rentable y sustentable de síntesis de (-)-ambrox (**10**) a escalas superiores a las descritas hasta el momento.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Optimizar el proceso de síntesis de (-)-ambrox (**10**) a partir del (-)-13,14,15,16-*tetranor-8 $\alpha$ ,12*-labdanodiol (**9**) obtenido de la especie vegetal *Ageratina jocotepecana* a una escala superior a la establecida en estudios anteriores.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Optimizar el proceso para la obtención del extracto de *Ageratina jocotepecana*, el cual contiene el compuesto (-)-13,14,15,16-*tetranor-8 $\alpha$ ,12*-labdanodiol (**9**).
- Escalar y estandarizar las condiciones de ciclización del (-)-13,14,15,16-*tetranor-8 $\alpha$ ,12*-labdanodiol (**9**) procedente de *Ageratina jocotepecana* para la obtención de (-)-ambrox (**10**).
- Evaluar el proceso en términos de reproducibilidad

#### 4. METODOLOGÍA GENERAL



## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados generales de esta investigación se presentan de acuerdo a la conveniencia de la UMSNH para fines de protección intelectual.

La especie vegetal *Ageratina jocotepecana* fue colectada en diferentes épocas del año y lugares (**tabla 1**), debido a que la presencia del compuesto (-)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) varía dependiendo de estas dos variantes (Servín-García, 2017).

No. de colecta	Fecha y lugar de colecta
1	Diciembre 2017, Lugar 1
2	Febrero 2018, Lugar 2
3	Marzo 2018, Lugar 1
4	Junio 2018, Lugar 1
5	Julio 2018, Lugar 3
6	Julio 2018, Lugar 4
7	Septiembre 2018, Lugar 1
8	Marzo 2019, Lugar 5

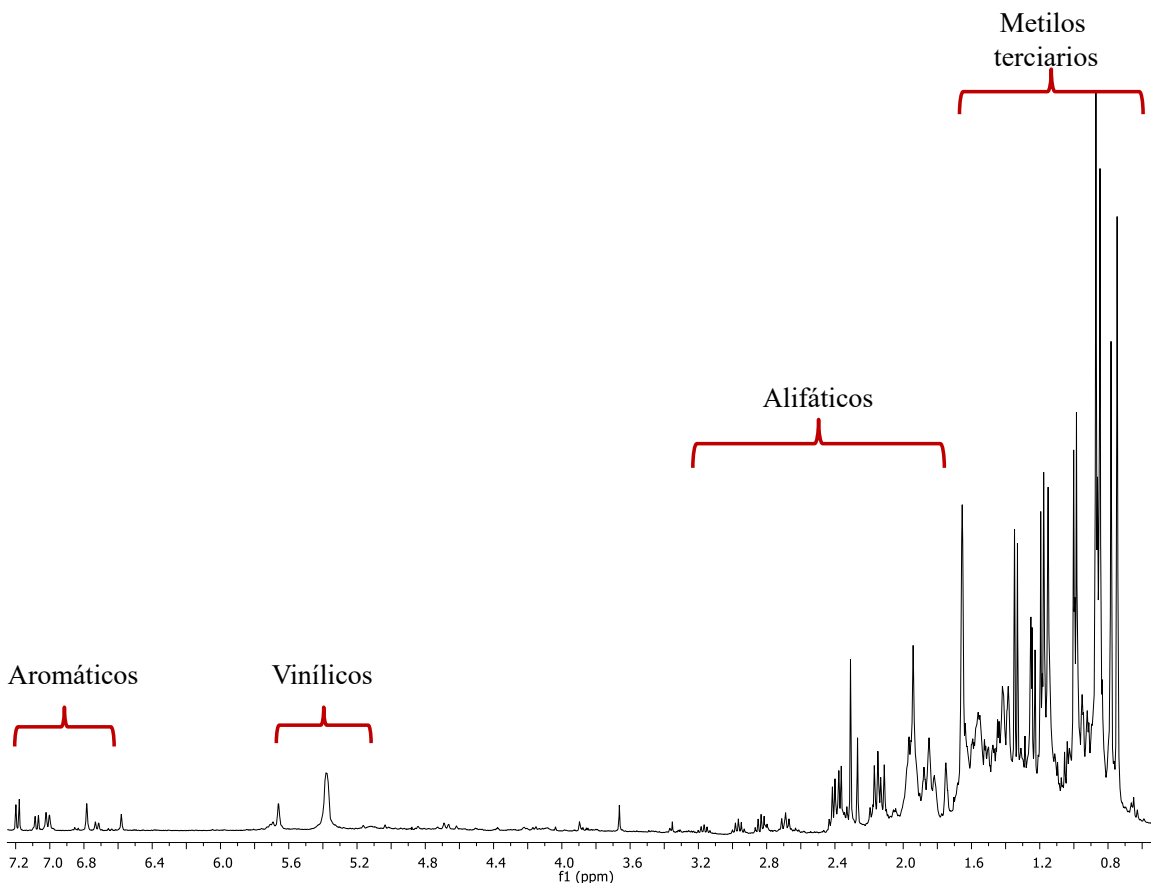
**Tabla 1.** Colectas realizadas de *Ageratina jocotepecana*.

Con el antecedente de que el (-)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) se encuentra en el extracto de tallos y hojas se probaron diferentes tiempos de maceración para optimizar la obtención, por ello cuatro lotes de 100 g (60 g de tallos y 40 g de hojas) de la colecta No. 2 fueron colocados en maceración en el disolvente No. 1, durante 4, 8, 24 y 72 h, obteniéndose los extractos correspondientes, los cuales posteriormente fueron desengrasados. Después, se obtuvo el extracto del disolvente No. 2 de cada lote bajo las mismas condiciones. Los rendimientos de los extractos obtenidos fueron muy similares, como se muestra en la **tabla 2**.

Peso de tallos-hojas (60:40)	Tiempo de maceración (h)	Extracto del disolvente No. 1 total (g)	Extracto del disolvente No. 1 desengrasado (g)	Extracto del disolvente No. 2 (g)
100 g	4	5.5	4.0	2.3
	8	5.8	4.3	2.5
	24	5.8	4.6	2.6
	72	6.1	4.8	2.8

**Tabla 2.** Rendimientos de los extractos obtenidos a diferentes tiempos.

Los extractos obtenidos con el disolvente No. 1 fueron analizados por RMN de  $^1\text{H}$  (**figura 4**), presentando la misma composición química. Su espectro mostró entre 7.3 y 5.3 ppm un conjunto de señales correspondientes a hidrógenos aromáticos y vinílicos, entre 3.2 y 1.8 ppm se observaron señales de protones alifáticos y en campos altos se ubicaron varias señales simples características de metilos terciarios, lo que indicó la presencia de terpenos como componentes mayoritarios; sin embargo, no se observaron las señales características del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), debido a que su abundancia en la planta va del 1 al 15.6%, dependiendo la época de año y el lugar de colecta; por lo cual esto no es un indicativo de la ausencia del compuesto (Servín-García, 2017).

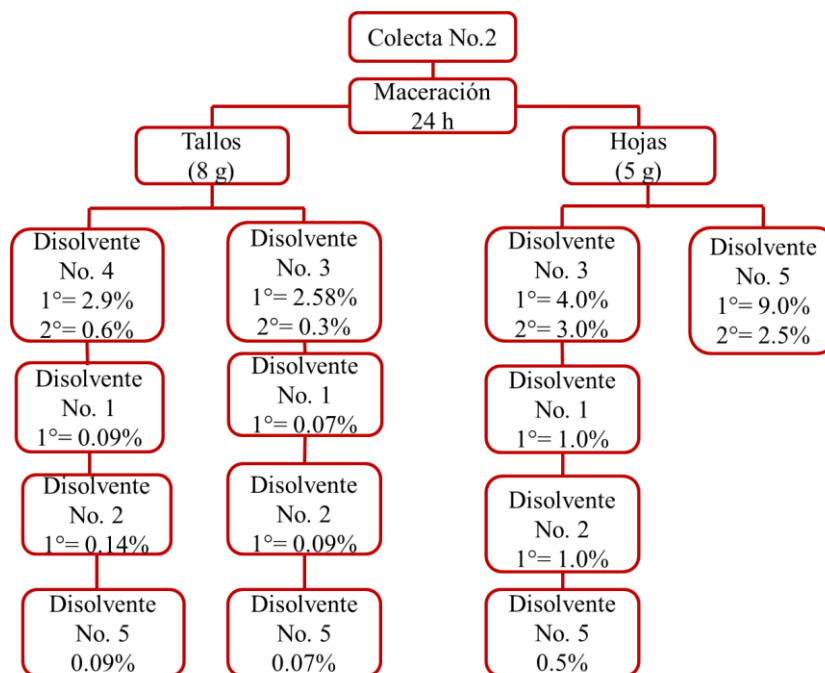


**Figura 4.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del extracto del disolvente No. 1 desengrasado de tallos y hojas.

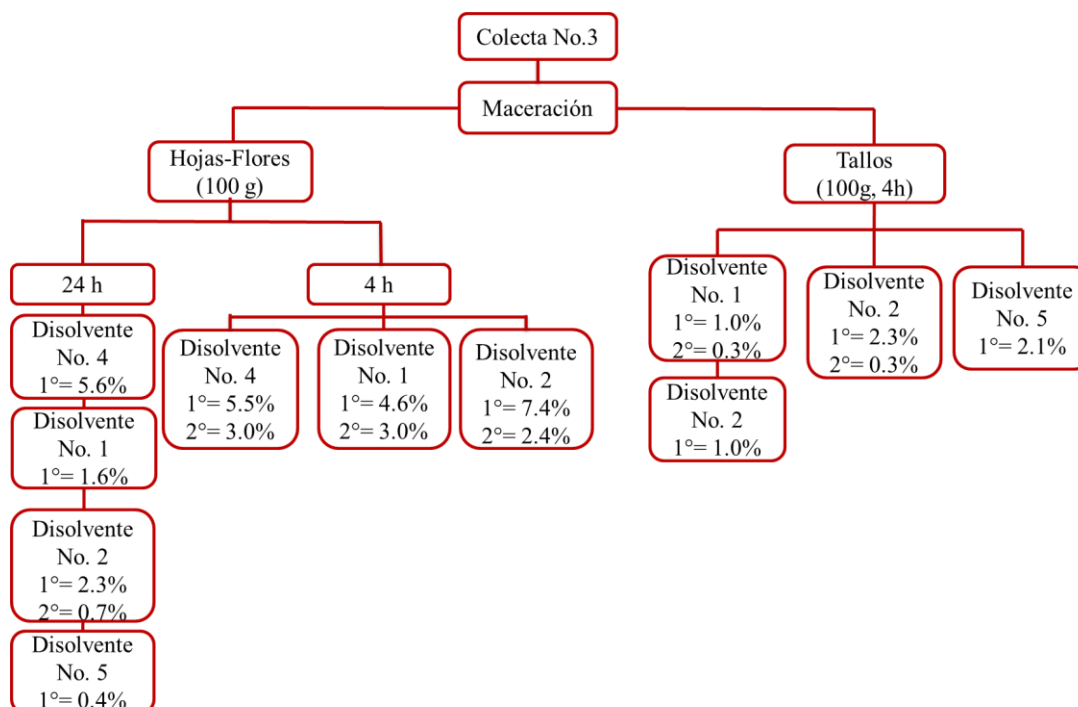
Con el propósito de extraer selectivamente los labdanos de la planta se realizaron maceraciones de tallos y hojas con diferentes disolventes. La selección de estos disolventes se basó en diferentes propiedades fisicoquímicas, como la constante dieléctrica ( $D$ ) del disolvente y la polaridad de las moléculas del compuesto; ya que estas definen las interacciones que se generaran entre ellos facilitando su extracción. Tomando en cuenta que el compuesto de interés es un diol, es decir, un compuesto polar y con referencia al artículo de Ikada, donde se reportan las propiedades dieléctricas de algunos dioles y la influencia de la temperatura en ellas, se decidió usar disolventes de polaridad media y alta con valores de constantes dieléctricas ( $D$ ) altos, a temperatura ambiente y a  $-3\text{ }^\circ\text{C}$ . Otra propiedad que se tomó en cuenta fue el punto de ebullición (p. e.) del disolvente, para que su recuperación y reutilización sean fácil; también se consideraron propiedades como la corrosión y la estabilidad química y térmica.



A continuación, se muestran en los esquemas 17 y 18 los rendimientos obtenidos de la colecta No. 2 y No. 3 de tallos y hojas con diferentes disolventes.

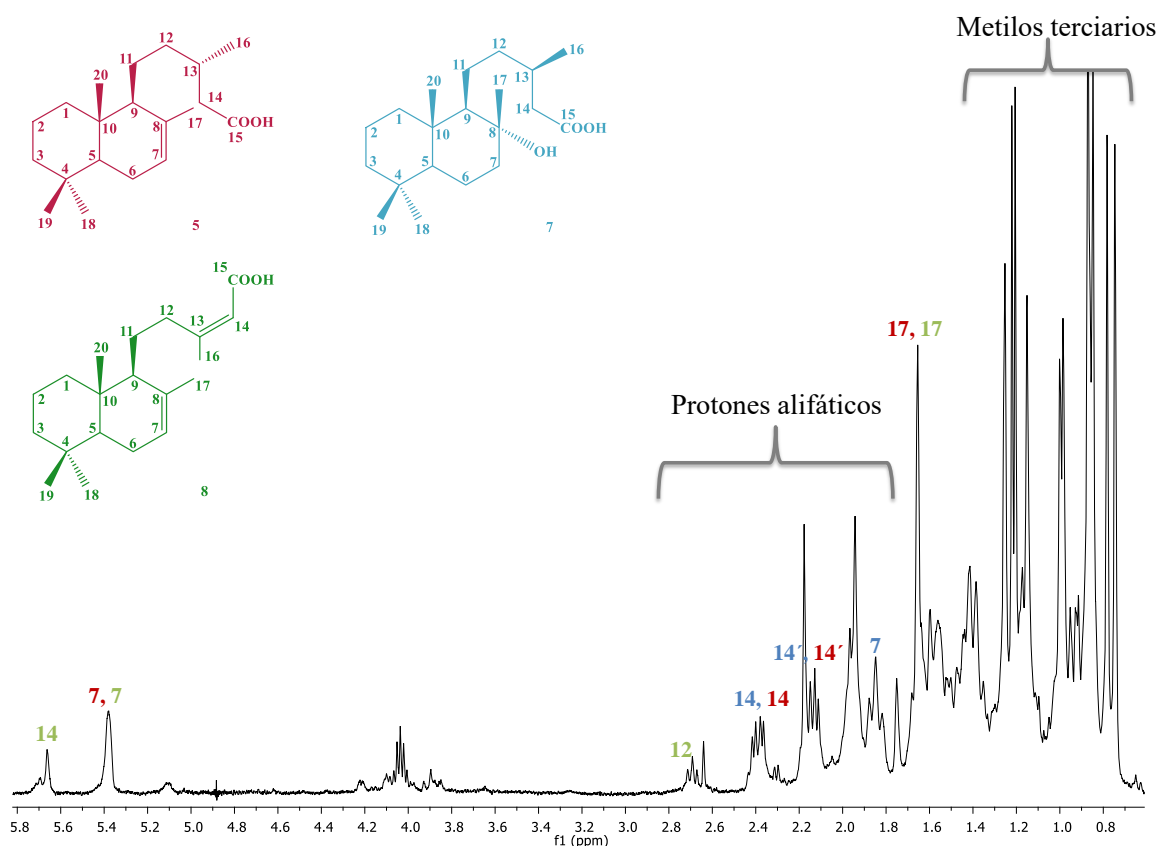


**Esquema 17.** Rendimientos de extractos obtenidos por maceración de la colecta No. 2.



**Esquema 18.** Rendimientos de los extractos obtenidos por maceración de la colecta No. 3.

Los extractos de disolvente No. 2 y del disolvente No. 5 obtenidos mostraron en su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  una composición química similar al extracto del disolvente No. 1, aunque presentaron señales atribuidas a compuestos más polares y las señales características de la clorofila, resultando no ser selectivos en su extracción; mientras que los disolventes No. 3 y 4 extrajeron de manera selectiva los ácidos de labdano, tanto a temperatura ambiente (T. A.) como a  $-3\text{ }^\circ\text{C}$ , como se muestra en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del extracto del disolvente No. 4 de tallos (**figura 5**), donde se observó en 5.66 y 5.38 ppm dos señales simples anchas características de protones vinílicos, entre 2.78 y 1.80 ppm se ubicaron conjuntos de señales características de protones alifáticos y en campo alto se observaron varias señales simples de metilos terciarios, estos patrones de señales fueron comparados con los reportados, indicando la presencia del ácido labd-7-en-15-oico (**5**), el ácido 13-*epi*-labdanólico (**7**) y el ácido labdan-7,13-dienoico (**8**) (Ramírez-López et al., 2016). Después, se hicieron maceraciones consecutivas con los disolventes No. 1, 2 y 5 de estos lotes, dando bajos rendimientos.



**Figura 5.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del extracto del disolvente No. 4 de tallos a  $-3\text{ }^\circ\text{C}$ .

Tras este análisis se llevaron a cabo reflujos de hojas, tallos y flores juntos empleando los disolventes No. 1 y 4, de manera separada, con el propósito de elevar el rendimiento del extracto; obteniéndose aproximadamente del 1-2% más de extracto mediante reflujo que por maceración y presentando mayor cantidad de grasa el extracto obtenido (**tabla 3**).

Peso de tallos, hojas-flores (1:1)	Reflujo	
	Disolvente No. 1	Disolvente No. 4
20 g	4.9%	5.4%
	0.9%	2.2%
	0.4%	0.6%

**Tabla 3.** Rendimientos de los extractos obtenidos por reflujo.

También se realizaron biparticiones con los disolvente No. 1 y 2 a partir del extracto acuoso de hojas y tallos obtenido por decocción, así como del extracto metanólico; sin embargo, estas no fueron selectivas (**tabla 4**).

Bipartición	Extracto acuoso	Extracto metanólico
Disolvente No. 1	0.1%	14.0%
Disolvente No. 2	0.2%	8.5%

**Tabla 4.** Rendimientos de las biparticiones de los disolventes No. 1 y 2.

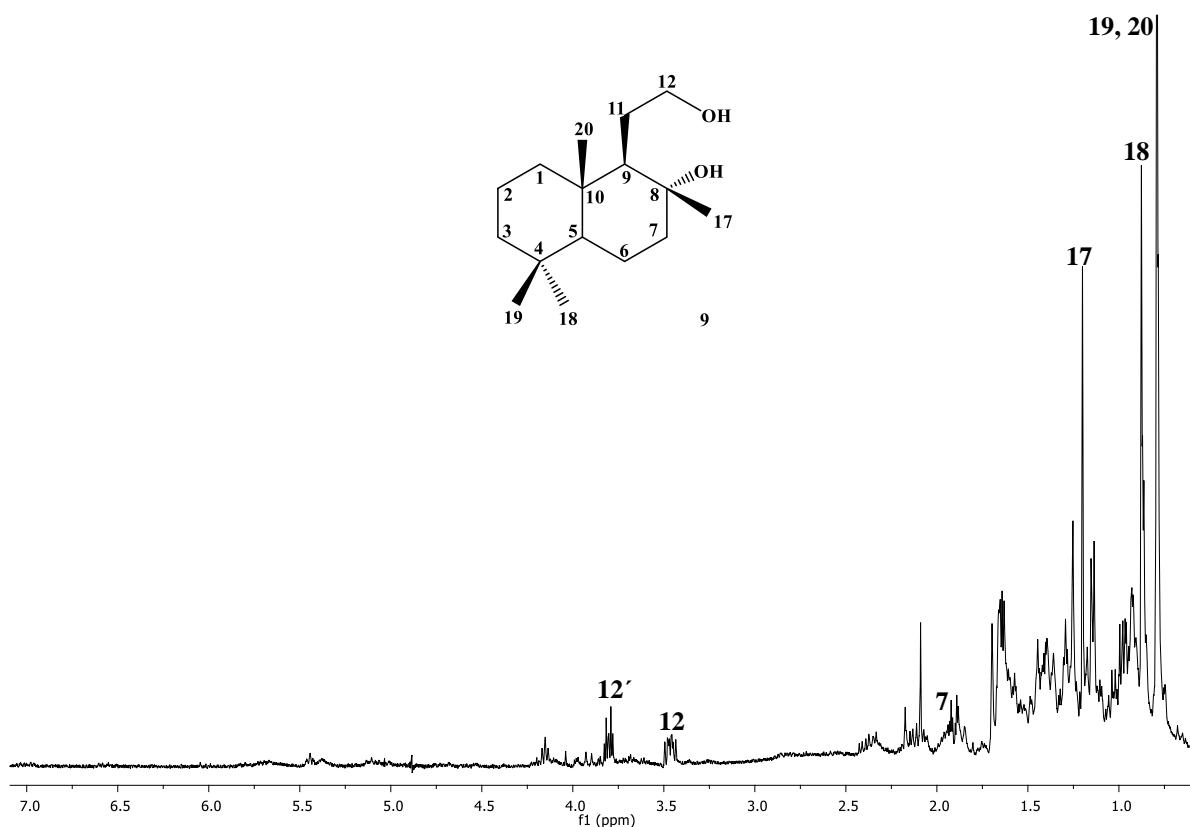
De acuerdo a los resultados obtenidos se realizó la obtención de extractos de las colectas No. 4, 5, 6 y 7, a temperatura ambiente, obteniéndose mayor rendimiento de extracto en la colecta No. 6, seguida de la No. 7 y la No. 8 (**tabla 5**).

No. De colecta	Lugar y mes de colecta	Peso (kg)		Extracto total (g)	
		Tallos	Hojas	Tallos	Hojas
4	Lugar 1, Junio	0.91*	0.44*	80.00 (5.9%)	
5	Lugar 3, Julio	1.75*	0.89*	125.00 (4.8%)	
6	Lugar 4, Julio	0.83	1.08	35.00 (4.2%)	115.00 (10.7%)
7	Lugar 1, Septiembre	3.17	2.07	20.00 (<1%)	178.00 (8.9%)
8	Lugar 5, Marzo	3.71	2.86	95.00 (2.56%)	150.00 (5.24%)

\*Lotes de tallos y hojas colocados juntos en maceración.

**Tabla 5.** Rendimientos de los extractos de las colectas 4, 5, 6, 7 y 8.

Posteriormente, considerando el comportamiento del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) en purificaciones anteriores, se establecieron nuevas condiciones cromatográficas, llevándose a cabo la purificación del compuesto a una escala 10 veces mayor a la estandarizada, mediante el fraccionamiento por cromatografía en columna (García-Pacheco, 2015). De este proceso se obtuvo una miel amarilla, la cual fue analizada por RMN de  $^1\text{H}$  (**figura 6**), en cuyo espectro se observó la presencia de un compuesto mayoritario, destacando en 3.79 y 3.45 ppm una señal doble de triples y una múltiple de los protones H-12' y H-12 del metileno base de alcohol, en 1.90 ppm se observó la señal múltiple, correspondiente a uno de los protones del metileno CH<sub>2</sub>-7; en campos altos resaltaron tres señales simples en 1.19, 0.88 y 0.79 ppm características de los metilos terciarios 17, 18 y 19, 20; respectivamente. Estos datos fueron comparados con los reportados previamente en nuestro grupo de trabajo (Pérez-Gutiérrez, 2012), lo que indicó que se trataba del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**).



**Figura 6.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) impuro.

Las dos fracciones se unieron, obteniéndose aproximadamente 600 mg de (–)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) impuro; lo que coincide con lo reportado en un estudio estacional de *Ageratina jocotepecana* previamente realizado (Servín-García, 2017).

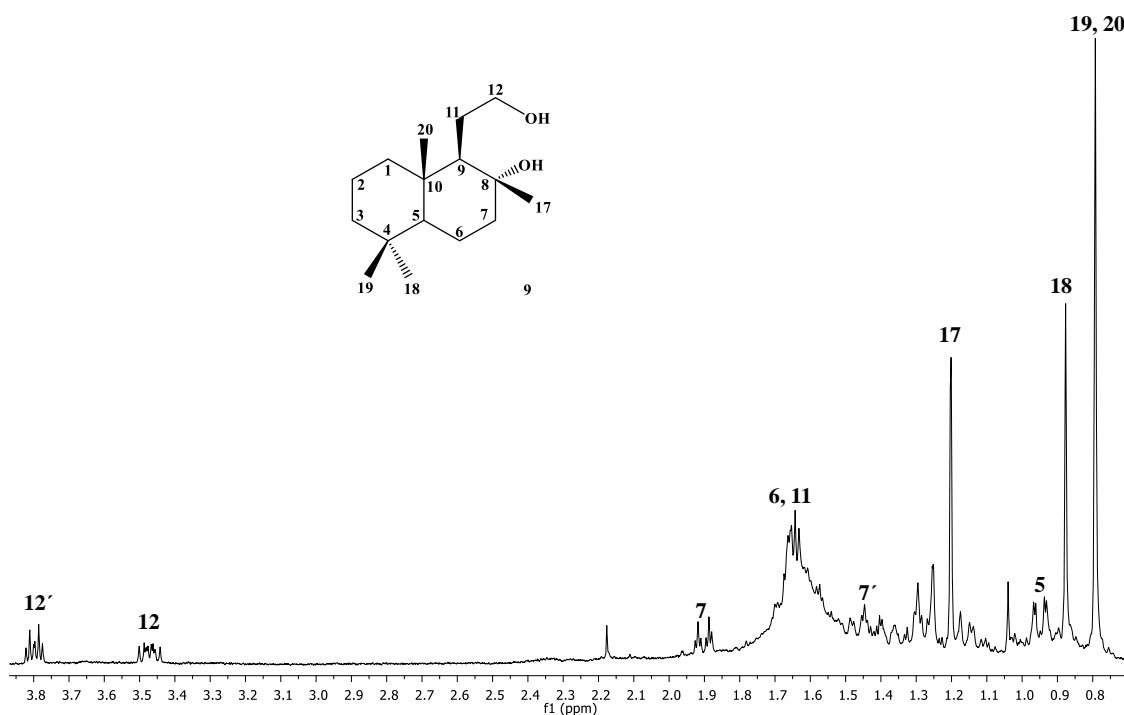
Estas nuevas condiciones cromatográficas permitieron la obtención de **9** a mayor escala en un tiempo de elución menor y con un 50% menos del disolvente utilizado anteriormente, representando así una técnica más eficiente. Estas mismas condiciones cromatográficas fueron aplicadas a 20, 40, 60 y 80 g de extracto del disolvente No. 4 de tallos y hojas, obteniéndose los mismos resultados.

En los extractos del disolvente No. 1 de la colecta No. 2 no se detectó el compuesto (–)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) lo que no coincide con el estudio estacional previamente reportado (Servín-García, 2017).

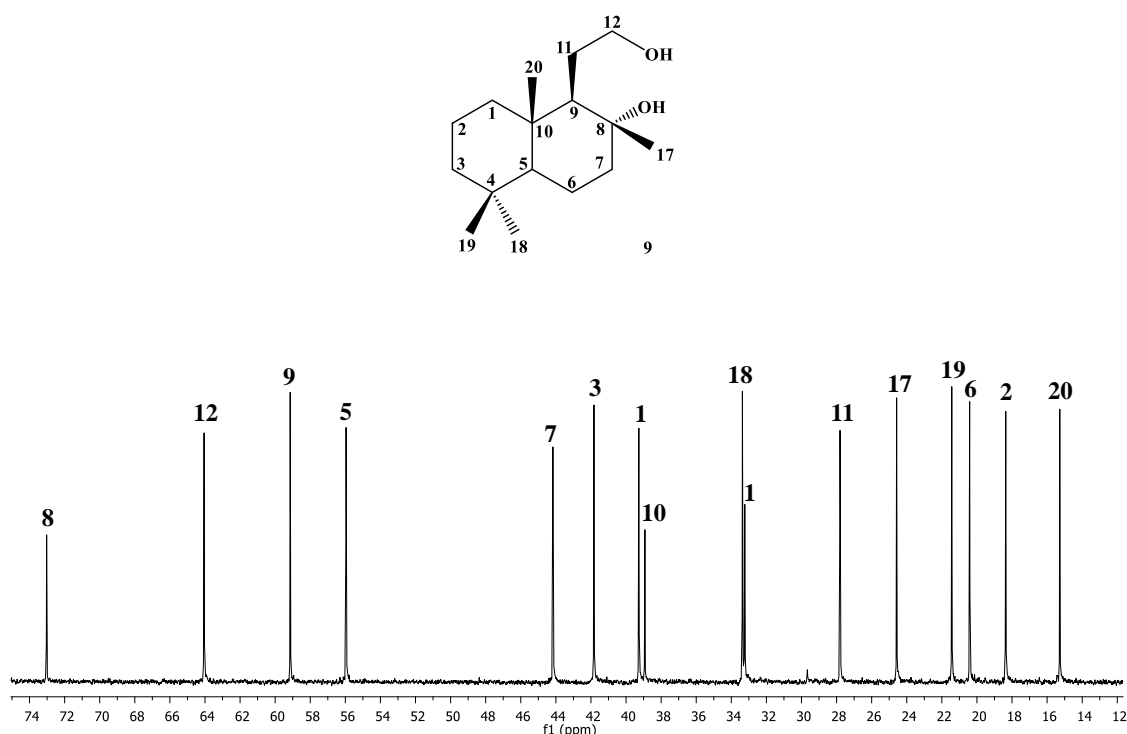
Posteriormente 40 g de extracto del disolvente No. 4 de flores y hojas de la colecta No. 3 fueron fraccionados bajo las condiciones establecidas; sin embargo, se obtuvo **9** en baja proporción mezclado con compuestos aromáticos. La obtención de menor cantidad de **9** en este extracto con respecto al extracto del disolvente No. 1 de tallos y hojas, y en mezcla, se debe a que el disolvente No. 4 extrae mayor cantidad de compuestos polares, y a la menor proporción de **9** que poseen las hojas y flores con respecto a los tallos.

Continuando con la purificación del (–)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), las fracciones enriquecidas de **9** fueron llevadas a cromatografías sucesivas con nuevas condiciones establecidas, lográndose aislar el (–)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) puro, en un rendimiento menor al 7%, obteniéndose cristales en forma de gránulos y agujas con un punto de fusión de 127-130 °C; los cuales fueron analizados por RMN de <sup>1</sup>H. En su espectro (**figura 7**) destacaron en 3.79 y 3.45 ppm una señal doble de triples y una múltiple de los protones H-12' y H-12 del metileno base de alcohol, en 1.90 ppm se observó la señal doble de triples con una  $J = 12.3, 3.1$  Hz, correspondiente a uno de los protones del metileno CH<sub>2</sub>-7; en campos altos se ubicaron tres señales simples en 1.19, 0.88 y 0.79 ppm características de los metilos terciarios CH<sub>3</sub>-17, CH<sub>3</sub>-18 y CH<sub>3</sub>-19, CH<sub>3</sub>-20; respectivamente. El espectro de RMN de <sup>13</sup>C (**figura 8**), mostró 16 señales, lo que nos indicó que se trataba de un derivado tetranorlabdano. En 73.0 y 64.1 ppm se observaron las señales correspondientes a los carbonos base de oxígeno en las posiciones C-8 y C-12,

respectivamente; en 59.1 y 55.9 ppm se ubicaron las señales de los carbonos de los metinos 9 y 5. En 44.2, 41.8, 39.3, 20.4 y 18.3 ppm se observaron las señales correspondientes a los metilenos C-7, C-3, C-1, C-6 y C-2 de la decalina; en 38.9 y 33.2 ppm se localizaron las señales de los carbonos cuaternarios C-10 y C-4, en 33.3, 24.6, 21.4 y 15.2 ppm se apreciaron las señales de los metilos 18, 17, 19 y 20, respectivamente; finalmente, en 27.8 ppm se observó la señal del metileno 11. Estos datos fueron iguales a los previamente reportados (García-Pacheco, 2015) para el (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), estas nuevas condiciones de recromatografía permitieron la purificación de **9** utilizando aproximadamente el 50% del disolvente que anteriormente se utilizaba, representando así una técnica más eficiente y económica.



**Figura 7.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**).



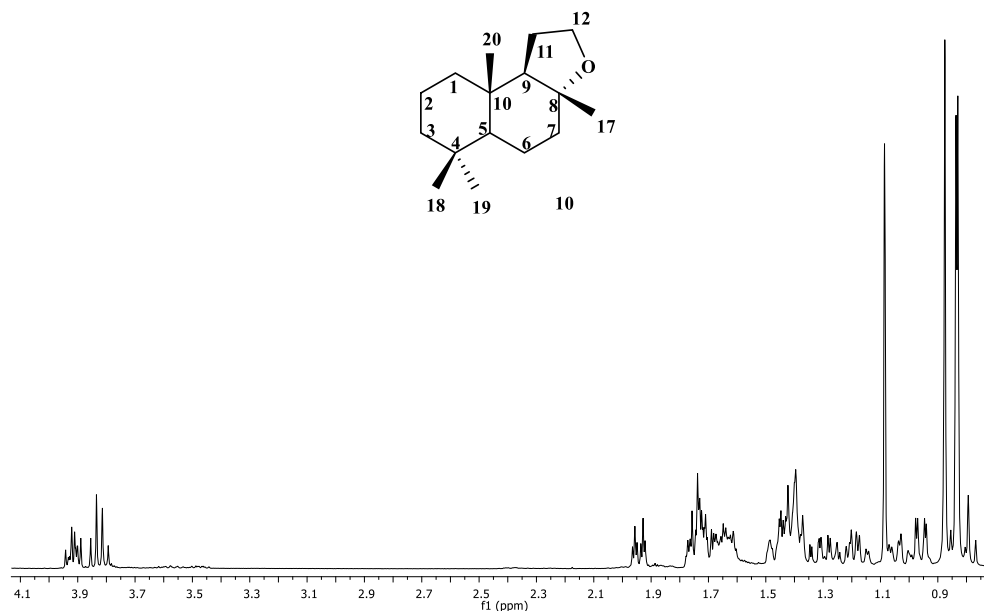
**Figura 8.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C a 100 MHz en CDCl<sub>3</sub> del (-)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**).

El bajo rendimiento de obtención de tetranorlabdanodiol (**9**) se atribuye a su poca abundancia en las plantas colectadas en ciertas épocas del año, así como también a que la alta pureza de **9** lo vuelve altamente insoluble, generándose su retención en la fase estacionaria, es decir en la sílice gel, representando esto un problema para la obtención de **9** en grandes cantidades, por lo que se utilizó como fase estacionaria alúmina generándose menos retención de **9**.

Posteriormente, considerando las condiciones de la reacción de ciclodeshidratación para 50 mg de 13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), establecidas anteriormente por nuestro grupo de trabajo (García-Pacheco, 2015), se realizó la reacción a mayor escala modificando el método de extracción y purificación del producto.

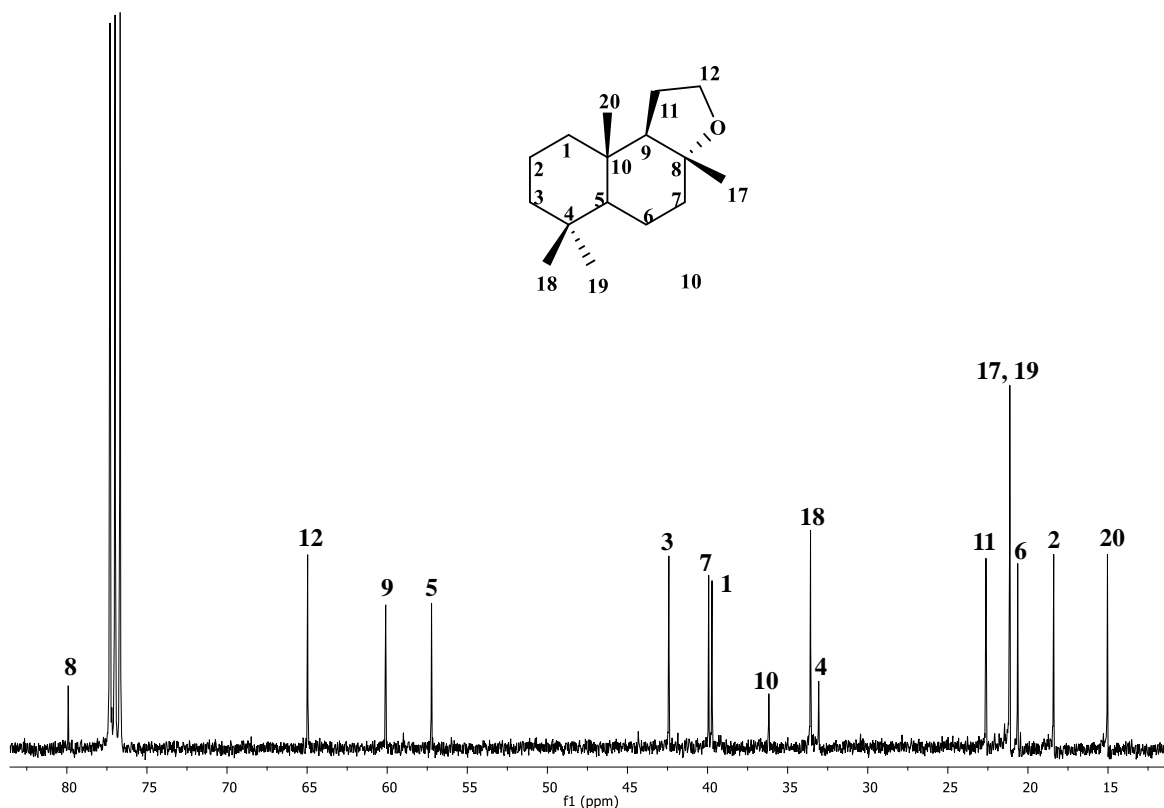
Se llevó a cabo la reacción con 60 mg, 100 mg y 200 mg de **9** en medio ácido, neutralizándose con una base posteriormente. Después se llevó a cabo la extracción de la reacción con varios disolventes, obteniéndose en el sobrenadante cristales en forma de agujas con un punto de fusión de 53-55 °C (cristales obtenidos de la fracción de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);

los cuales fueron analizados por RMN de  $^1\text{H}$ ; observándose en su espectro (**figura 9**) una señal múltiple en 3.92 ppm y una señal cuádruple en 3.81 ppm con  $J = 8.2$  Hz correspondientes a los H-12 y H-12' del metileno del anillo del tetrahidrofurano. En 1.94 ppm se localizó la señal de uno de los H-7 y en campos altos se ubicaron cuatro señales simples en 1.09, 0.87, 0.84 y 0.83 ppm correspondientes a los metilos terciarios CH<sub>3</sub>-17, CH<sub>3</sub>-18, CH<sub>3</sub>-19 y CH<sub>3</sub>-20, respectivamente. Su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**figura 10**) mostró en 79.9 ppm una señal para el carbono cuaternario base de oxígeno C-8, en 65.0 y 22.6 ppm se observaron las señales de los metilenos del tetrahidrofurano C-12 y C-11. En 60.1 y 57.2 ppm se ubicaron las señales de los carbonos metínicos 9 y 5, respectivamente; en 42.4, 39.9, 39.7, 20.6 y 18.4 ppm se observaron las señales de los metilenos C-3, C-7, C-1, C-6 y C-2 de la decalina respectivamente, en 36.2 y 33.1 ppm se apreciaron las señales de los carbonos cuaternarios C-10 y C-4, en 33.6 ppm se encontró la señal del metilo 18, en 21.1 ppm se observaron traslapadas las señales de los metilos 17 y 19, en 15.0 ppm se observó la señal del metilo 20. Estos datos fueron comparados con los reportados previamente en nuestro grupo de trabajo (García-Pacheco, 2015), lo que nos indicó que se trataba del (-)-ambrox (**10**). Estas condiciones de reacción de ciclodeshidratación permitieron la obtención de **10** de manera cuantitativa, resultando un método práctico, sencillo y eficaz.



**Figura 9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del (-)-ambrox (**10**).





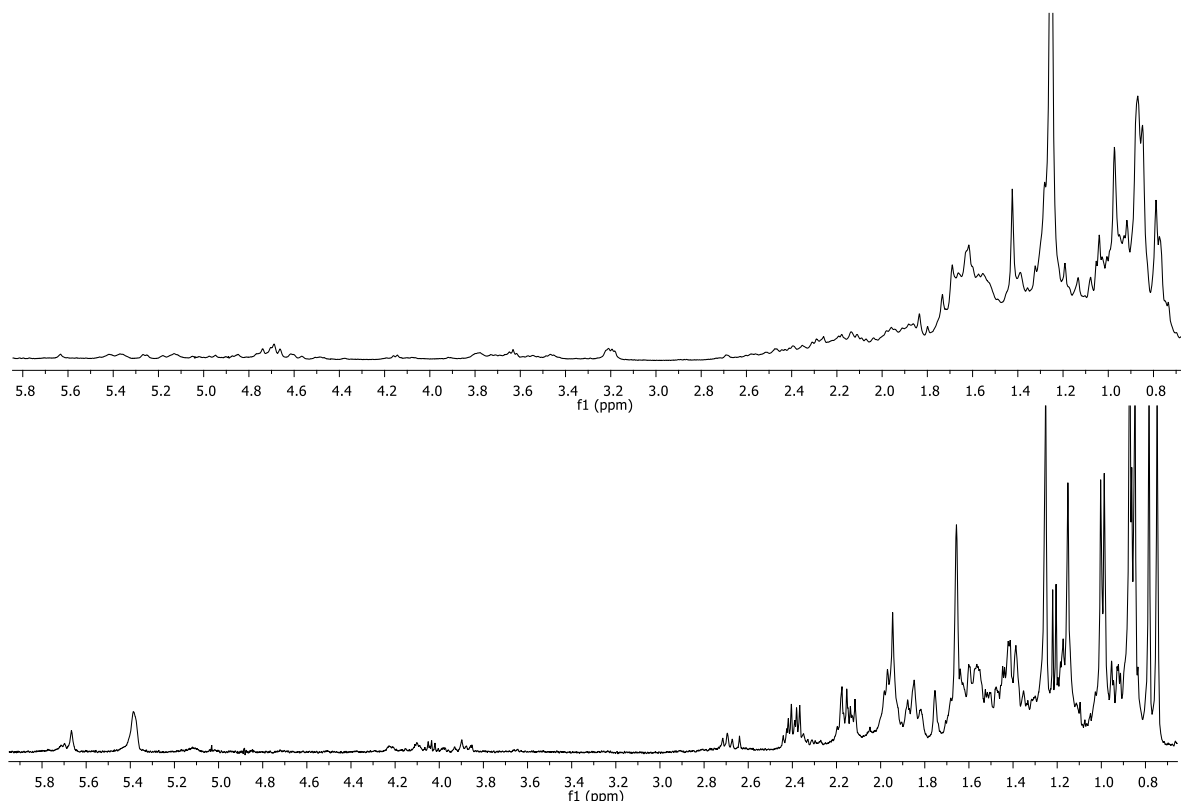
**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del (-)-ambrox (**10**).

Por otro lado, tomando en cuenta la abundancia de ácidos de labdanos en los extractos del disolvente No. 1 y 4 de tallos y hojas de *A. jocosotepecana* y tratando de evitar en la mayor medida posible los procesos cromatográficos para la obtención del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), se decidió llevar a cabo extracciones ácido-base. Se realizaron pruebas con tres bases diferentes: base I, base II y base III, con el fin de formar la sal correspondiente de los ácidos; y así obtener un extracto menos complejo, donde sea más fácil la purificación del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**).

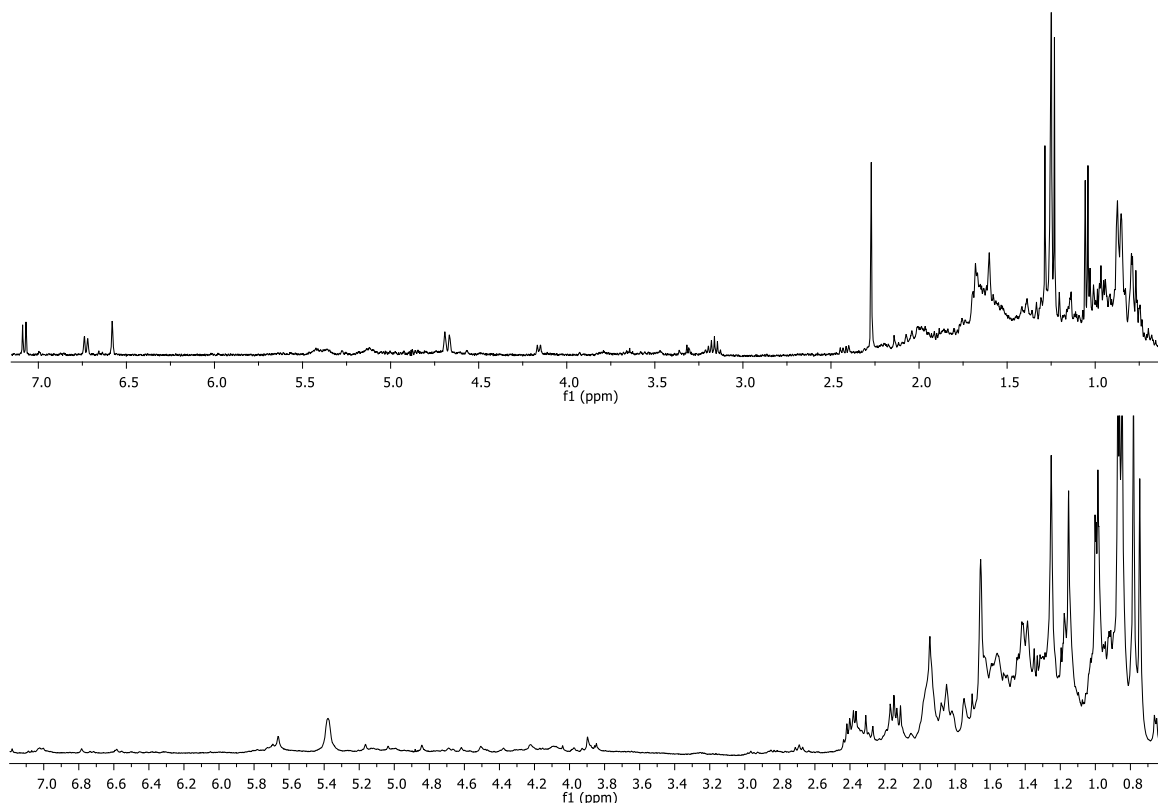
Primero se decidió realizar dos pruebas con la base I, que es menos fuerte con respecto a las otras dos bases, sin obtener resultados exitosos, por lo que se procedió a utilizar la base II.

Se realizaron reacciones con extracto del disolvente No. 4 de hojas y flores y con extracto del disolvente No. 1 por corto tiempo sin lograr retirar los ácidos. Debido a esto, se llevaron a cabo reacciones con extracto del disolvente No. 4 de tallos durante mayor tiempo

y extracciones con diversos disolventes. Las biparticiones obtenidas con el disolvente No. 1 obtenidas mostraron en su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**figuras 11 y 12**) una disminución considerable de los ácidos de labdano y en algunos casos se observaron las señales características del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdandiol (**9**), mientras que las biparticiones obtenidas con los disolventes No. 2 y 5 presentaron mayor cantidad de ácidos.

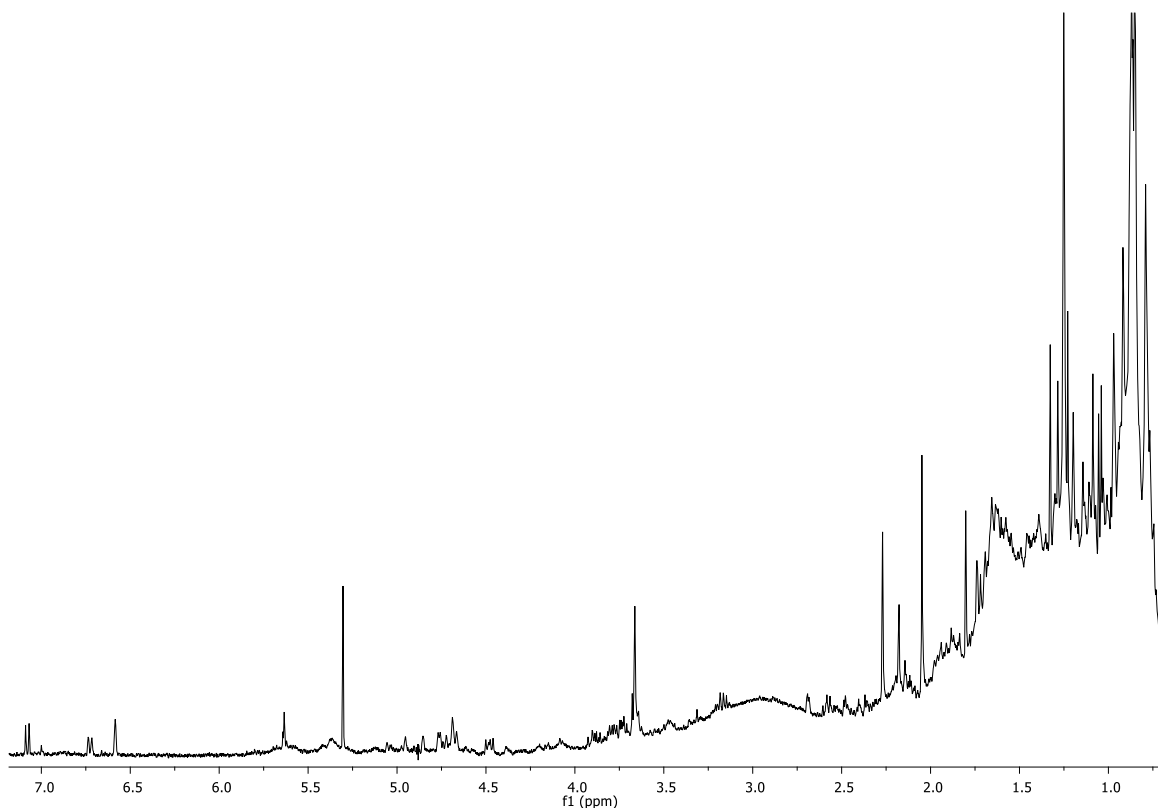


**Figura 11.** Trazo superior espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la bipartición del disolvente No. 1 obtenida de la reacción con la base II. Trazo inferior espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del extracto total del disolvente No. 4 de tallos .



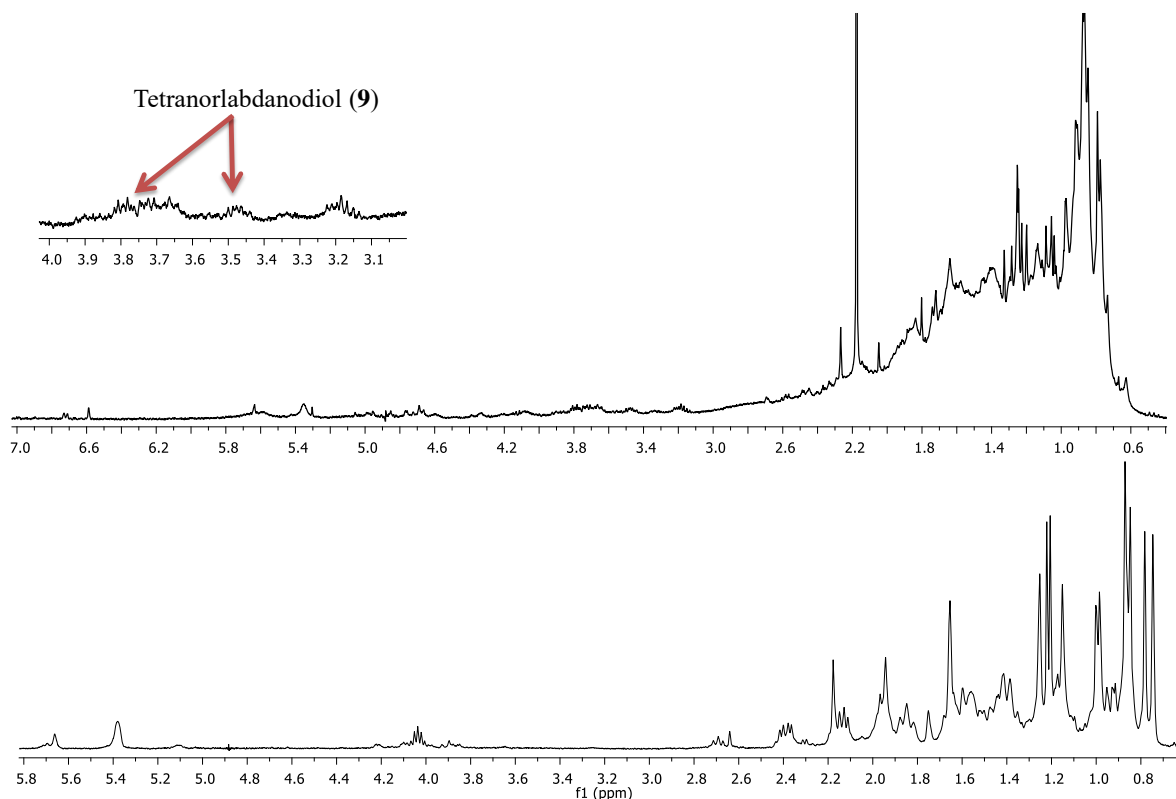
**Figura 12.** Trazo superior espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la bipartición del disolvente No. 1 obtenida de la reacción con la base II. Trazo inferior espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del extracto total del disolvente No. 4 de hojas y flores.

Al no obtener los resultados esperados se decidió probar la base III con el extracto del disolvente No. 4, generándose un precipitado color amarillo que fue separado por filtración, la fase orgánica recuperada fue enviada a RMN de  $^1\text{H}$  (**figura 13**). Su espectro mostró nula presencia de los ácidos de labdano, y se observaron las señales características del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdaniol (**9**). De acuerdo a los resultados se decidió realizar esta reacción a mayor escala, obteniéndose una clara disminución de los ácidos de labdano en el espectro, pero no su eliminación completa, aun así, esta reacción representa un método eficaz para retirar la mayoría de los ácidos de labdano, y así lograr la purificación del compuesto **9** de manera más sencilla.



**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del crudo de reacción del extracto del disolvente No. 4 de tallos con la base III.

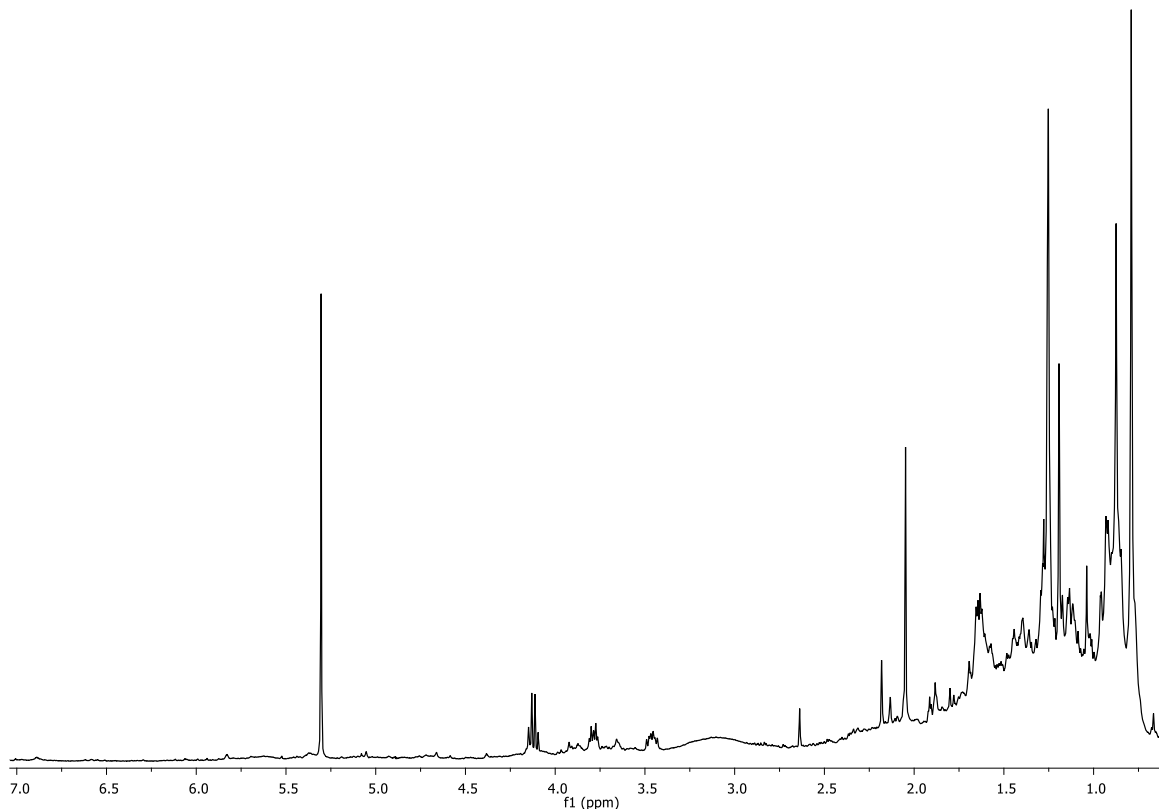
Se decidió optimizar las extracciones ácido-base previamente realizadas, llevándose a cabo dos pruebas más, una con solución saturada de la base II y la base III, lográndose retirar por completo los ácidos de labdano en ambos casos, obteniéndose mayor rendimiento con la base III. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**figura 14**) se observó claramente la ausencia de ácidos de labdano y la presencia de las señales características del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdandiol (**9**).



**Figura 14.** Trazo superior espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del crudo de reacción realizada con la base III. Trazo inferior espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del extracto total del disolvente No. 4 de tallos.

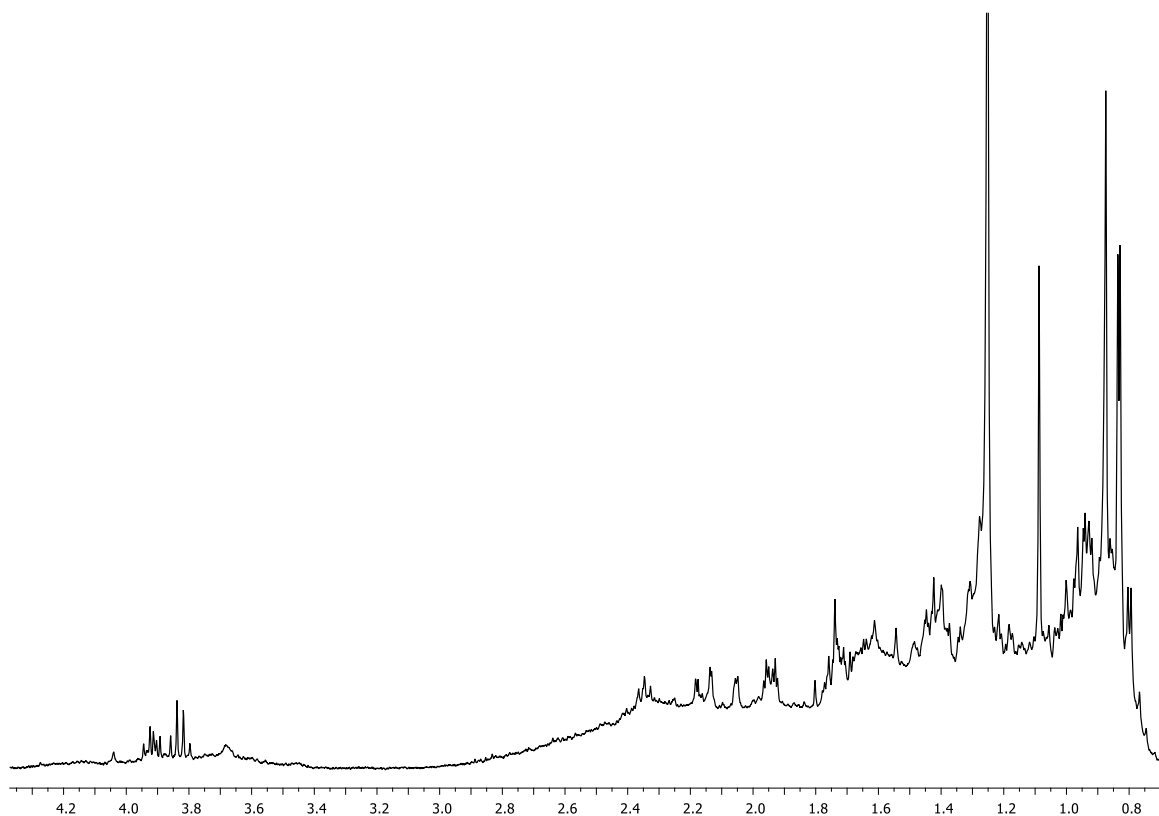
Con el propósito de determinar la cantidad suficiente de la base III para retirar los ácidos, se decidió realizar la reacción con diferentes concentraciones de la solución de base III, lográndose retirar los ácidos en todos los casos, también se escaló la cantidad de extracto, obteniéndose el mismo resultado satisfactorio. Los crudos de reacción obtenidos se fraccionaron por cromatografía lográndose obtener **9** puro.

Tratando de evitar el uso de la cromatografía para la purificación de **9** y obtener el (-)-ambrox (**10**) como producto mayoritario en la reacción de ciclodeshidratación, y lograr así su fácil cristalización y purificación se decidió llevar a cabo la reacción ácido/base con fracciones enriquecidas de (-)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) con la base III, lográndose retirar los ácidos presentes y otros contaminantes, observándose en su espectro de  $^1\text{H}$  (**figura 15**) el (-)-13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) como compuesto mayoritario.



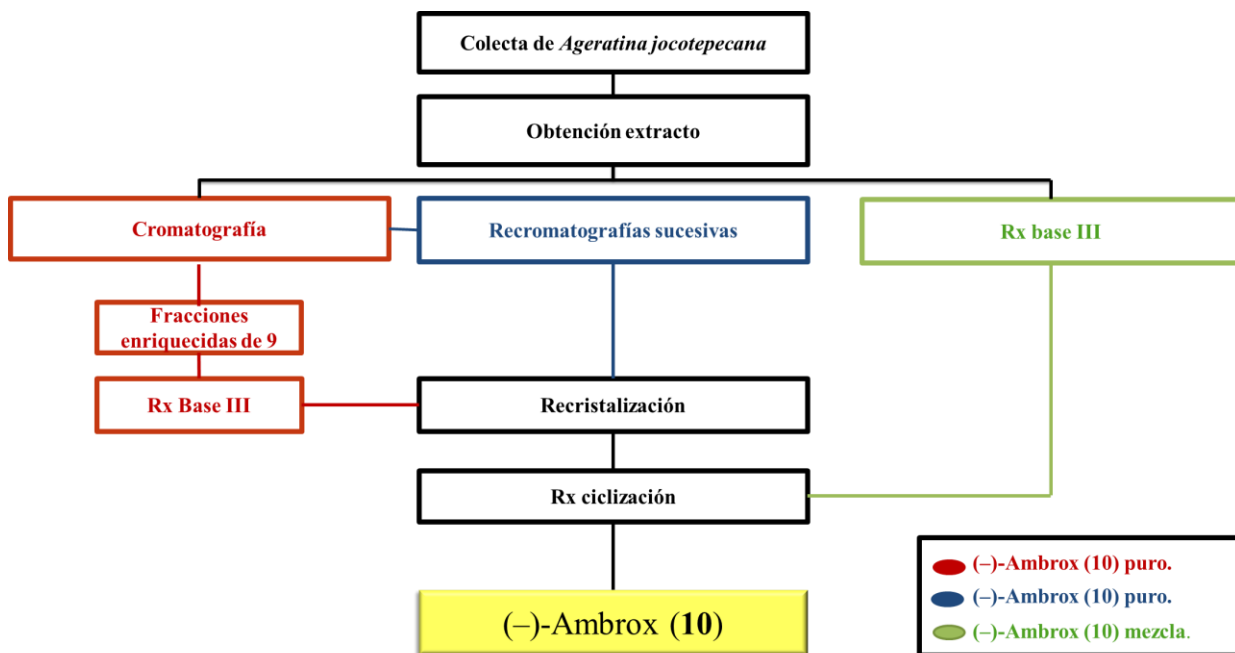
**Figura 15.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de muestra enriquecida de **9** libre de ácidos de labdano.

Posteriormente, el crudo de reacción se llevó a un proceso de ciclización modificándose las condiciones previamente establecidas, debido a que la materia prima **9** no se encontraba completamente pura generándose productos de descomposición. Con estas nuevas condiciones se obtuvo una fase orgánica color amarilla con un aroma característico de (-)-ambrox (**10**). Su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**figura 16**) mostró claramente las señales características de **10**.



**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del crudo de reacción de ciclización obtenido de la fracción enriquecida de **9** libre de ácidos de labdano.

Después de las diversas pruebas realizadas para la determinación del lugar y fecha más propicia para la colecta de la planta, el mejor método de extracción de **9** y la optimización de la reacción de ciclodeshidratación, se desarrollaron diversas rutas para la producción de (-)-ambrox (**10**), las cuales se muestran en el **esquema 19**:



**Esquema 19.** Rutas de preparación desarrolladas para la obtención de (-)-ambrox (10).

Las rutas identificadas con los colores rojo y azul nos llevan a la obtención de **10** en forma cristalina, es decir un producto puro de primera calidad, mientras que la ruta verde nos lleva a la obtención de un producto en mezcla, no menos importante esta ruta; ya que en ella se eliminan los procesos cromatográficos, los cuales implican elevados costos y mayor complejidad a nivel industrial; sin embargo, aún falta la optimización de esta ruta.



## 6. CONCLUSIONES

Se determinaron las mejores condiciones para la obtención de extracto.

De las diferentes bases y métodos para extraer los ácidos de labdano de los extractos, los lavados con solución de la base III resultó ser el método eficaz y sencillo para la obtención de un extracto menos complejo que permita de manera sencilla la purificación del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), o en otra instancia ser directamente la materia prima para realizar la reacción de ciclodeshidratación para la obtención de (-)-ambrox (**10**).

Se establecieron y estandarizaron nuevas condiciones de purificación del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**), las cuales permitieron su obtención en una escala 40 veces mayor, resultando una técnica práctica, selectiva y menos costosa que la anteriormente reportada.

Para la reacción de ciclodeshidratación del (-)-13,14,15,16-*tetranor*-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol (**9**) para la obtención de (-)-ambrox (**10**) se establecieron y estandarizaron nuevas condiciones, las cuales permitieron su realización en una escala 4 veces mayor a la anteriormente establecida, con un rendimiento cuantitativo y obtención del compuesto **10** en forma cristalina, sin necesidad de llevar a cabo la extracción ni la purificación del compuesto a partir del crudo de reacción.

Se logró desarrollar y optimizar tres rutas de preparación distintas para la obtención de (-)-ambrox (**10**), las cuales son más sencillas, prácticas y económicas a las previamente desarrolladas en nuestro grupo de trabajo, representando estos procesos una alternativa novedosa para la producción de (-)-ambrox (**10**) a nivel industrial, las cuales proporcionaron las bases para el desarrollo de una planta piloto en un futuro.

## **7. PARTE EXPERIMENTAL**

La parte experimental se reserva para fines de propiedad intelectual.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Angurell I., Casamitjana N., Caubet A., Dinarés I., Llor N., Muñoz-Torrero D., Nicolás E. Pérez-García M. L., Pujol M. D., Rosell G., Seco M., Velasco D. (2018). Extracción líquido-líquido. Universidad de Barcelona. Recuperado de [http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio\\_tip.html#10](http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/extraccio_tip.html#10). Consultado el 07/2019.
- Ávalos A., Pérez-Urria E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología), Serie Fisiología Vegetal*. 2:119-145.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46:446–475.
- Bano U., Ahamad Faiz Khan A. F., Mujeeb F., Maurya N., Tabassum H., Siddiqui M. H., Haneef M., Osama K. Farooqui A. (2016). Effect of plant growth regulators on essential oil yield in aromatic plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 8:733-739.
- Bart H.-J. & Pilz S. (2011). Industrial Scale Natural Products Extraction. Weinheim, Germany: *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*. 1-14.
- Bolster M., Jansen B., De Groot A. (2001). The synthesis of (–)-ambrox starting from labdanolic acid. *Tetrahedron*. 57:5657-5662.
- Bruns K. (1990). A process for the stereoselective preparation of 8 (alpha), 12-oxido-13,14,15,16-tetranorlabdane. *DE3912318A1*. Alemania.
- Carey F. A. & Sundberg R. J. (2000). Advance Organic Chemistry. Charlottesville, Virginia: *Kluwer Academic/Plenum Publishers*. 237-242.
- Del Río R. E., Gómez-Hurtado M. A., Martínez-Pacheco M. M., García-Pacheco I. (2017). Proceso de síntesis de ambrox a partir de 13,14,15,16-tetranor-8 $\alpha$ ,12-labdanodiol. *WO2017/068400A1*. Michoacán, México: Organización Mundial de la Propiedad Intelectual.
- Del Río R. E., Gómez-Hurtado M. A., Pérez-Gutiérrez A. I., González-Campos J. B. (2017). Proceso de síntesis de ambrox a partir de *Ageratina jocotepecana*. *WO2017/068401A1*. Michoacán, México: Organización Mundial de la Propiedad Intelectual.

- Fernández-Barrero A., Altarejos J., Salido-Ruiz S. (1995). Procedimiento para la preparación de productos olorosos tipo ambar gris a partir de ácidos comúnicos. *ES2069469A1*. España: Oficina española de Patentes y marcas.
- Fernández-Barrero A., Álvarez-Manzaneda E., Chahboun R. (2003). Procedimiento para la obtención de productos olorosos tipo ambar gris a partir de esclareol. *ES2195777A1*. España: Oficina española de Patentes y marcas.
- Fernández-Barrero A., Alvarez-Manzaneda E., Chahboun R., Arteaga A. (2004). Degradation of the Side Chain of (–)-Sclareol: A Very Short Synthesis of *nor*-Ambreinolide and Ambrox. *Synthetic Communications*. 34:3631-3643.
- Fernández-Barrero A., Álvarez-Manzanera E., Ramos J., Altarejos J. (1994). Procedures for obtaining ambrox from natural labdane diterpenes. *ES2044780A1*. España: Oficina española de Patentes y marcas.
- Fortineau A. (2004). Chemistry Perfumes Your Daily Life. *Journal of Chemical Education*. 45-46.
- García-Pacheco I. (2015). Optimización del aislamiento y ciclodeshidratación del tetranorlabdanodiol. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- García-Sánchez C. A., Sánchez-González A., Villaseñor J. L. (2014). La familia Asteraceae en el parque nacional de los Mármoles, Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana*. 106:97-116.
- García-Sánchez E., Ramírez-López C. B., Talavera-Alemán A., León-Hernández A., Martínez-Muñoz R. E., Martínez-Pacheco M. M., Gómez-Hurtado M. A., Cerda-García-Rojas C. M., Joseph-Nathan P., del Río R. E. (2014). Absolute Configuration of (13*R*)- and (13*S*)-Labdane Diterpenes Coexisting in *Ageratina jocotepecana*. *Journal of Natural Products*. 77:1005-1012.
- Grimmer J. & Martin C. (1997). Stereoselective preparation of (–)3a,6,6,9a-tetramethylperhydronaphtho[2,1-b]furan. *US5616737*. United States: google patents.
- Guentert M. (2007). The Flavour and Fragrance Industry—Past, Present, and Future. In: *Berger R.G. (eds) Flavours and Fragrances*. 1-2.
- Ikada E. (1971). Dielectric Properties of Some Diols. *The Journal of Physical Chemistry*. 75:1240-1245.

- Kawanobe T. & Kogami K. (1985). (±)-Ambrox, process for production thereof and use. EP0165458A2. Alemania: google patents.
- Klaschka U. & Kolossa-Gehring M. (2007): Fragrances in the Environment: Pleasant Odours for Nature?. *Env Sci Pollut Res.* 14:44–52.
- Kornblum Z. C. (2010). Acids and Bases. *Encyclopedia Americana*. Retrieved July 24, 2010, de Grolier Online <http://ea.grolier.com/article?id=0002600-00>.
- Laboratorio de Química Orgánica. (2018). Extracción ácido-base. Recuperado de [https://rodas5.us.es/file/23a16560-123f-bec5-ec5b-44a3042a281d/2/laboratotio\\_quimica\\_organtica\\_SCORM.zip/pagina\\_18.htm](https://rodas5.us.es/file/23a16560-123f-bec5-ec5b-44a3042a281d/2/laboratotio_quimica_organtica_SCORM.zip/pagina_18.htm). Consultado el 07/2019.
- Martínez-Guido S. I., Sengupta D., Nápoles-Rivera F., González-Campos J. B., Del Río R. E., Ponce-Ortega J. M., El-Halwagi M. M. (2015). Life cycle assessment for Ambrox® production from different chemical routes. *Journal of Cleaner Production.* 1-5.
- Moulines J., Lamidey A. M., Desvergnés-Breuil V. (2001). A practical synthesis of ambrox® from sclareol using no metallic oxidant. *Synthetic Communications.* 31:749–758.
- Naufiu M. O., Hamid A. A., Muritala H. F., Adeyemi S. B. (2017). Medicinal Spices and Vegetables from Africa: therapeutic potential against metabolic, inflammatory, infectious and systemic diseases. Chapter 7 Preparation, Standardization, and Quality Control of Medicinal Plants in Africa. *Academic Press.* Págs. 171-204. doi:10.1016/B978-0-12-809286-6.00007-8.
- Ochoa C. (2017). Perfumería, negocio con enorme esencia. Obtenido de <https://www.milenio.com/negocios/perfumeria-negocio-con-enorme-esencia>. Consultado el 07/2019.
- Pérez-Gutiérrez A. I. (2012). *Ageratina jocotepecana* fuente de tetranorlabdanodiol. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Ramírez-López C. B., García-Sánchez E., Martínez-Muñoz R.E., del Río R. E., Martínez-Pacheco M. M. (2016). Chemical composition of the essential oil from *Ageratina jocotepecana* and its repellent effect on Drywood termite *Incisitermes*

- marginipennis*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 15:53-60.
- Reichardt C. (2003). *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry* Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 82.
- Sarker S., Gray A., Latif Z. (2006). *Natural Products Isolation*. Totowa, New Jersey: Humana Press. 30-37.
- Saucedo A., Gómez M. A., Rolo R. (2002). *Esencias y fragancias*. Obtenido de <http://www.parqueciencias.com/export/sites/default/comun/galerias/galeriaDescargas/educacion-formacion/CienciaAula/esenciasFragancias.pdf>. Consultado el 01/2018.
- Sell C. (2006). *The Chemistry of Fragrances: From Perfumer to Consumer*. RSC Publishing. 2:54-56.
- Sepúlveda-Jiménez G., Porta-Ducoing H., Rocha-Sosa M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21:355-383.
- Servín-García G. (2017). *Análisis Estacional de Ageratina jocotepecana*. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Shaoxiang Y., Hongyu T., Baoguo S., Yongguo L., Yanfeng H., Yanyu L. (2016). One-pot synthesis of (-)-Ambrox. *Scientific Reports*. 6:1-4.
- Shilpa K., Varun K., Lakshmi BS. (2010). An alternate method of natural drug production: elucidating secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*. 5:222-247.
- Steenkamp L. & Taka M. (2010). *Process for the Production of Ambrafuran*. US20100248316A1. Chicago, United States: google patents.
- Weininger S. & Stermitz F. (1988). *Química orgánica*. Reverte. Págs. 1210.
- Zerbe P. & Bohlmann J. (2015). Enzymes for Synthetic Biology of Ambroxide-Related Diterpenoid Fragrance Compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. Doi 10.1007/10\_2015\_308.