



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LIC. QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

TÍTULO:

OBTENCIÓN DEL NEOLIGNANO: LICARINA A

PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE:

Biotransformaciones. Desarrollo de métodos biocatalíticos de síntesis y
preparación de compuestos orgánicos biológicamente activos

Alumno (a): Lara Ruiz María Guadalupe

Matricula: 2172029384

Asesor interno:

Dra. Liliana Hernández Vázquez 27790

Asesor externo:

Dr. José de Jesús Lira Ricárdez 43461

Lugar de realización:

Laboratorio de Biocatálisis Aplicada (N-304), UAM-Xochimilco

Fecha de inicio: 15/08/2022

Fecha de término: 15/02/2023

ÍNDICE

Introducción	2
Lignanos y Neolignanos	3
Licarina A (DHDIE)	4
Neolignanos presentes en semillas de <i>Myristica fragrans</i> Houtt	5
Síntesis química de DHDIE	6
Síntesis biocatalítica	6
Peroxidasa de rábano picante (HRP) para la síntesis de DHDIE	7
Metodología y actividades realizadas	9
1. Síntesis de (\pm)-licarina A usando peroxidasa de rábano	9
2. Síntesis de (-)-licarina A usando agua de coco.	10
3. Obtención de (+)-licarina A a partir de Nuez moscada	11
Metas alcanzadas	12
Resultados y discusión de resultados	12
Obtención de (\pm)-licarina A con HRP	12
Obtención de (-)-licarina A con agua de coco	21
Obtención de (+)- licarina A mediante nuez moscada.	25
Conclusiones	30
Recomendaciones	30
Referencias	31
Anexo	34

Introducción

La medicina tradicional a menudo emplea el uso de plantas debido a que producen un gran número de compuestos bioactivos, los cuales pueden emplearse como una fuente alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades. Los fenilpropanoides son metabolitos secundarios de tipo aromático que contienen estructura general C_6C_3 , y su dimerización conduce a la formación de los lignanos y neolignanos. Estos compuestos vegetales tienen una múltiple diversidad de estructuras ramificadas y/o cíclicas y se encuentran en diversas especies medicinales y comestibles.¹ Tanto los lignanos, como neolignanos se han aislado de diversas fuentes naturales, y poseen propiedades antivirales, antitumorales y neuroprotectoras.²

La licarina A o dehidrodiisoeugenol (DHDIE) es el neolignano que más se ha estudiado hasta el momento, se ha aislado en diversas especies tales como: *Aristolochia taliscana* (Aristolochiaceae), *Machilus thunbergii* (Lauraceae) y *Myristica fragrans* (Myristicaceae).³ Este tipo de neolignano posee asimetría debido a la presencia de dos carbonos quirales, por ello, se han aislado en la naturaleza como formas enantioméricamente puras o mezcla racémica.¹ El creciente interés en el DHDIE se debe a sus actividades biológicas, como, citotoxicidad, antioxidante, antiinflamatoria, tripanocida, antibacteriana y neuroprotectora.⁴

Actualmente, la licarina A se aísla a partir de especies vegetales o mediante dimerización oxidativa de isoeugenol utilizando tanto metodologías biocatalíticas que involucran el uso de enzimas oxidorreductasas (peroxidasas), agua de coco (*Cocos nucifera* L.) y cultivos celulares, así como metodologías que involucran el uso de reactivos oxidantes como el óxido de plata y cloruro férrico.^{1,2,5}

El presente trabajo detalla los resultados sobre la síntesis de licarina A mediante el uso de peroxidasa de rábano picante (*Armoracia rusticana*, HRP) y agua de coco (*Cocos nucifera* L) como biocatalizadores, y la extracción de dehidroisoeugenol de semillas de nuez moscada.

Antecedentes

Lignan y Neolignan

Los lignanos y neolignanos se definen como metabolitos secundarios fenólicos de plantas⁶ formados principalmente por dímeros de unidades de fenilpropeno, y poseen una amplia diversidad de propiedades biológicas interesantes que los convierte en una fuente importante de candidatos a fármacos.⁷ Las unidades de fenilpropeno se biosintetizan a partir de la desaminación oxidativa de la fenilalanina a ácido *trans*-cinámico, su posterior hidroxilación a ácido *p*-cumárico y sus análogos polihidroxilados, como el ácido cafeico. Estos derivados del ácido *p*-cumárico y sus respectivos aldehídos y alcoholes actúan como monómeros de partida en la síntesis de lignanos y neolignanos.⁸ La dimerización de estos monómeros procede a través de mecanismos de radicales libres mediado por lacasas y peroxidasas. El acoplamiento de radicales mediado por estas enzimas, seguido de posteriores transformaciones a la dimerización tales como: metilaciones o hidroxilaciones, conduce a la formación de metabolitos secundarios fenólicos provenientes de subunidades fenilpropanoides.⁷ Los compuestos que tienen unidades de fenilpropanoides unidas por un enlace en los carbonos C-8 y C-8' se denominan lignanos (Figura 1), si dichas unidades se acoplan a través de otros átomos de carbono de la cadena C₃ o el anillo C₆, se denominan neolignanos.⁹

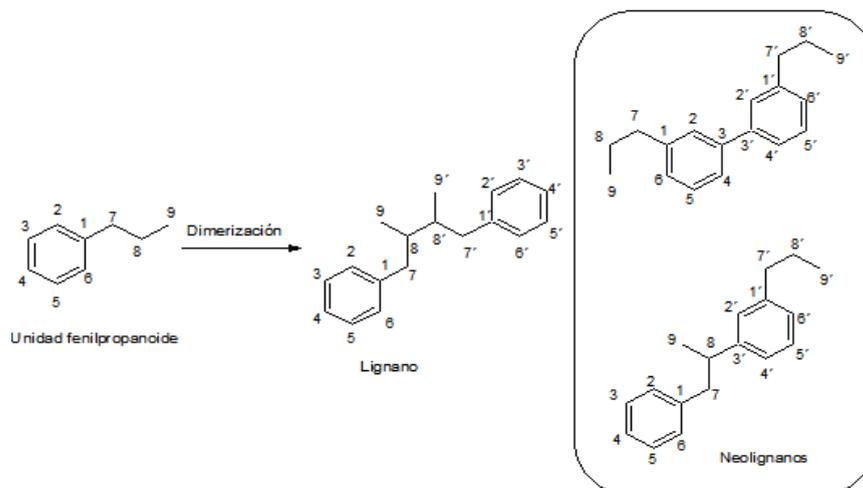


Figura 1. Esquema general de la formación de lignanos y neolignanos.

Los neolignanicos comprenden un gran grupo de compuestos que se encuentran en varias familias de plantas, como Myristicaceae y Piperaceae. Uno de estos neolignanicos es la licarina A (DHIDE). Este compuesto fue aislado en 1973 de la corteza de *Myristica fragrans*, y posteriormente se aisló de *Licaria aritus*. No obstante, DHIDE se ha sintetizado previamente mediante oxidación de isoeugenol, y su estructura se determinó antes de aislarlo de una fuente natural.⁸

Licarina A (DHDIE)

La licarina A es un dihidrobenzofurano natural, actualmente es el producto más sintetizado de esta clase de neolignanicos,² posee dos centros quirales en su estructura, los cuales implican diferencias en sus actividades biológicas dependiendo de la estereoespecificidad de esta propiedad biológica.⁴ Se ha aislado como; polvo blanco, soluble en disolventes orgánicos como acetato de etilo y diclorometano, y la mezcla racémica tiene un punto de fusión (pf) en un intervalo de 120-130°C, su enantiómero levorotatorio presenta una apariencia de sólido cristalino incoloro con un punto de fusión de 115-120°C y una rotación óptica negativa, $[\alpha]_D^{25^\circ}$ de -44°.¹⁰

El DHDIE se aisló principalmente de la raíz de *Krameria cystoides*¹¹, sin embargo, en los últimos años se han aislado licarinas de diversas especies de plantas tales como: *Aristolochia taliscana* (Aristolochiaceae), *Machilus thunbergii* (Lauraceae), semillas de nuez moscada (*Myristica fragrans* (Myristicaceae)), hojas de *Magnolia ovata* (Magnoliaceae), entre otras especies. El creciente interés en aislar este neolignano se relaciona con sus actividades biológicas enlistadas como agente antibacteriano, antiinflamatorio, tripanocida, citotóxico y neuroprotector.¹⁰ Sin embargo, dado que las licarinas se aíslan de fuentes naturales, por lo general se obtienen bajos rendimientos; por lo tanto, se han investigado rutas de síntesis a partir de isoeugenol (Figura 2), empleando metodologías químicas que incluyen el uso de reactivos oxidantes como óxido de plata, nitrato de cerio amoniacal y cloruro de hierro (III), así como, metodologías biocatalíticas en las cuales se utilizan peroxidasas, agua de coco y cultivos celulares.¹²

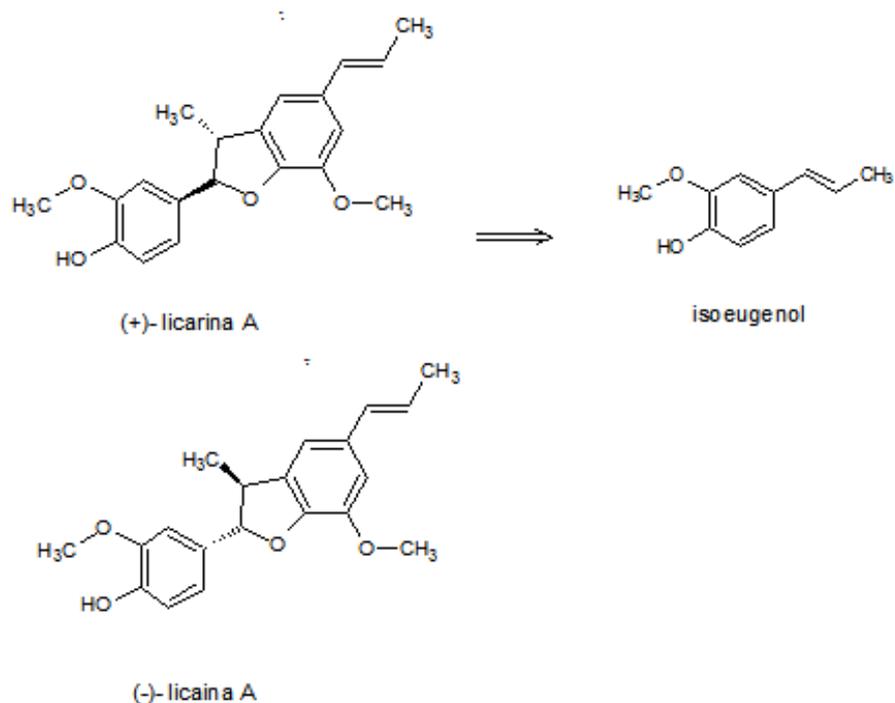


Figura 2. Retrosíntesis de Licarina A a partir de isoeugenol

Neolignan presentes en semillas de *Myristica fragrans* Houtt

Según el número de compuestos identificados, los lignanos y los neolignan constituyen la clase más abundante de metabolitos secundarios presentes en la semilla de *M. fragrans* Houtt. (Myristicaceae).¹³ Esta semilla se emplea en la medicina tradicional china para tratar la ansiedad y la depresión, además de utilizarla como analgésico, antibiótico, afrodisíaco, hipolipemiante y antidiarreico.¹⁴ Los metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos/ácidos grasos y proteínas) constituyen hasta el 80% del peso de la semilla seca de nuez moscada mientras que el peso restante lo componen metabolitos secundarios de diversa naturaleza química. Incluyen aceites esenciales (terpenos y fenilpropanoides) y compuestos fenólicos (ácidos cafeico, ferúlico y protocatéquico y lignanos/neolignan) como los componentes principales.¹² Entre los principales neolignan de tipo dihidrobenzofuranos presentes en nuez moscada se encuentran las licarinas A,B,C y E, estudios realizados por Leon Díaz y colaboradores demostraron la presencia de licarina A en nuez moscada y su moderada actividad antimicrobiana¹⁵ Por otro lado Min y colaboradores demostró los efectos inhibitorios de los neolignan presentes en la semilla de *M. fragrans*.¹⁶

Como se ha demostrado anteriormente, la nuez moscada contiene una mezcla compleja de metabolitos secundarios, por lo que existe la necesidad de tener acceso a estos compuestos en forma pura, y así poder obtener mayor información sobre sus diferentes actividades biológicas.¹²

Síntesis química de DHDIE

En la búsqueda de obtener mejores rendimientos en la síntesis de DHDIE a partir de isoeugenol (IE), se han utilizado diversas metodologías, una ellas es la descrita por Leopold, el cual sintetizó DHDIE a partir de IE, usando como catalizador cloruro férrico (FeCl_3) con una relación isoeugenol- FeCl_3 1.4:1 dando un rendimiento del 30%.⁵

Posteriormente, Liu y colaboradores utilizaron una reacción de dimerización por radicales de IE, empleando como catalizador óxido de plata, en tolueno y acetona para producir un 40% de DHDIE.¹¹

Síntesis biocatalítica

El desarrollo de biocatalizadores para reacciones de oxidación es un área de investigación versátil y actualmente muy importante, en la que las enzimas y los cultivos celulares juegan un papel especialmente importante.⁷ Este enfoque constituye una alternativa limpia y ecológica a los métodos químicos tradicionales en los que se utilizan catalizadores como FeCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{Cu}(\text{OH})\text{Cl}$ para el acoplamiento oxidativo de compuestos fenólicos.¹⁹

En la síntesis biocatalítica de DHDIE a través de procesos oxidativos involucra el uso de catalizadores enzimáticos tales como: peroxidasas y lacasas. Las peroxidasas (POD) incluyen un grupo de enzimas pertenecientes al grupo de las oxidoreductasas, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza.¹⁹ La primera peroxidasa fue aislada de una planta de higo (*Ficus carica* L.) en 1936; y posteriormente se han aislado y purificado otras isoformas, de las cuales las más investigadas han sido la peroxidasa de rábano picante (*A Armoracia rusticana*) (HRP) y la peroxidasa de nabo (*Brassica rapa*) (SBP).²⁰ Estas enzimas fácilmente disponibles se caracterizan por su alta estabilidad, su actividad y baja especificidad de sustrato, por lo que no requieren cofactores adicionales, por esta

razón, se pueden usar aislados, principalmente de las raíces de la planta de rábano picante como principal fuente comercial.²¹

Peroxidasa de rábano picante (HRP) para la síntesis de DHDIE

La peroxidasa de rábano picante (HRP) se ha establecido como un biocatalizador eficaz para las reacciones de oxidación orgánicas e inorgánicas debido a su capacidad oxidante del peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones. Se ha informado sobre el uso de HRP para sintetizar el neolignano licarina A con un rendimiento excelente.¹⁸

Un método para la obtención de licarina A es mediante la dimerización oxidativa de isoeugenol por medio de biocatalizadores que incluyen la peroxidasa de rábano picante y H_2O_2 (Figura 3).²² El trabajo realizado por Nascimento y colaboradores involucra el uso de HPR y H_2O_2 para transformar IE en DHIE con un rendimiento del 99%. En dicho trabajo se obtuvieron ambos enantiómeros; posteriormente, se transformaron en los derivados de α -metoxi- α -trifluorometilfenilacetato, estos diasterómeros se separaron por HPLC, y se transformaron en (+)-licarina A y (-)-licarina A.²³

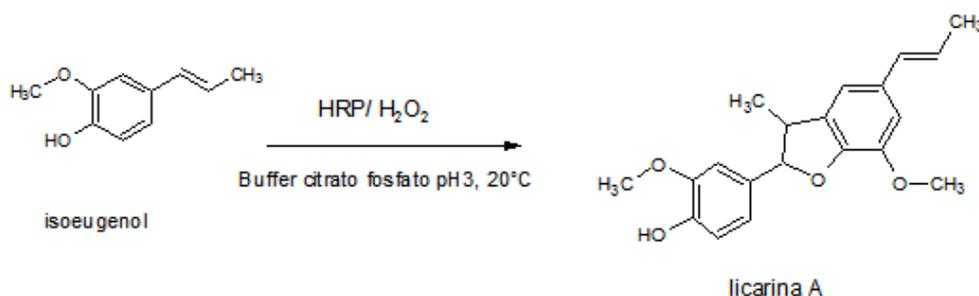


Figura 3. Síntesis licarina A y su obtención mediante dimerización oxidativa del isoeugenol usando peroxidasa de rábano.

Posteriormente, Pereira y colaboradores, obtuvo la mezcla racémica por acoplamiento oxidativo regio y diastereo-selectivo de isoeugenol con HPR- H_2O_2 con un rendimiento del 98%, posteriormente la resolución de los enantiómeros se realizó por HPLC quiral mediante una columna analítica ChiralPak con una fase móvil de hexano:2-PrOH 9:1 v/v.²⁴

Cocos nucifera L. para la síntesis de licarina A

El fruto del coco, *Cocos nucifera L.* contiene peroxidasa presentes en el endospermo líquido del coco (agua de coco) estas enzimas se usan como biocatalizadores en procesos de reducción y reacción hidrolítica. En las reacciones de acoplamiento oxidativo, por ejemplo, el proceso se produce entre dos unidades de *p*-hioxifenilpropanoides, en las que es necesaria la presencia de un grupo hidroxilo libre unido al anillo aromatico. La reacción es catalizada por las peroxidasa presentes en el agua de coco y la oxidación del sustrato se logra mediante la reducción del hierro porfirínico del sitio activo, así como la reactivación de la peroxidasa mediante la reoxidación del hierro y la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua.²⁵ El rendimiento reportado por Rodrigues y Barbosa-Filho (2017) utilizando este método fue del 55%, según estos autores, cuando se añade al agua de coco cantidades solución de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada al 3% en peso) y *p*-hidroxifenilpropanoide se produce la formación de unidades fenilpropanoides estereoespecificas (Figura 4). Lo cual da como resultado, (-)-licarina A.¹⁹

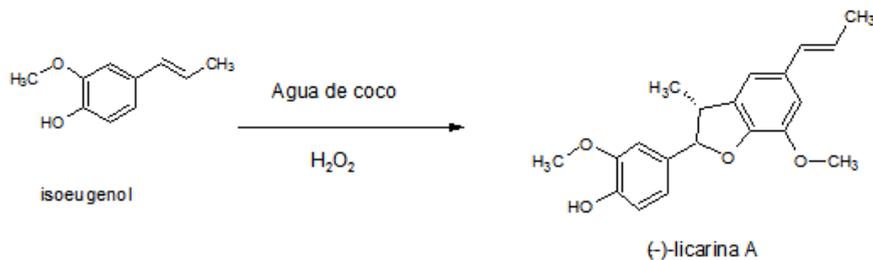


Figura 4. Síntesis de (-)- licarina A mediante catalizador de agua de coco

Objetivo General

Obtener licarina A (dehidrodiisoeugenol) como mezcla racémica y sus enantiómeros puros.

Objetivos específicos

- Sintetizar licarina A como mezcla racémica usando peroxidasa de rábano.
- Sintetizar el (-) licarina A usando agua de coco (*Cocos nucifera L.*).

- Extraer y purificar (+) licarina A a partir de nuez moscada (*Myristica fragrans*)

Metodología y actividades realizadas

1. Síntesis de (±)-licarina A usando peroxidasa de rábano

La mezcla racémica de licarina A se obtuvo por acoplamiento oxidativo de isoeugenol, peroxidasa de rábano picante y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), siguiendo la metodología descrita por Nascimento y colaboradores.

Se solubilizó isoeugenol (10 mmol) en MeOH (50 mL), tampón citrato-fosfato (450 mL, 20 mM, pH 3,) y peroxidasa de rábano picante (HRP, 12.4 mg, 2500 U, polvo liofilizado, -150 U/mg, Sigma-Aldrich®). La mezcla se agitó mientras se añadió gota a gota H₂O₂ al 30% (0,6 ml, 5 mmol) durante 10 min. Tras el proceso de agitación de la mezcla de reacción durante 3 horas, se filtro el líquido usando un embudo de vidrio. Se hizo la separación del residuo amarillo resultante con EtOAc 3 X 300mL. Los solubles orgánicos y el residuo se combinaron y lavaron con una solución saturada de NH₄Cl (300 mL) seguidamente se secó con Na₂SO₄. La mezcla obtenida se purificó en cromatografía en columna usando hexano:acetato de etilo como eluyentes en polaridades crecientes. El producto bruto obtenido tras la evaporación del disolvente dió como resultado un sólido blanco con un rendimiento de 25%.

Este procedimiento se repitió tres veces con diferente tipo de enzima y distinto tiempo de reacción. En la tabla 1 se muestran las características de cada reacción.

Tabla 1. Cantidades sometidas a reacción en la síntesis de (±)- licarina A con HRP.

Reacción	IE (mmol)	Enzima (mg)	Enzima HRP	H ₂ O ₂ 30% (mL)	Tiempo (h)
1	10	12.4	Liofilizada ~150 U/mg	0.6	3
2	10	12.4	Liofilizada ~150 U/mg	0.6	2
3	10	12.4	Tipo VI	0.5	1

Los tres productos se compararon por CCF, con hexano: AcOEt en una polaridad de 80:20 como eluyente. Las cromatoplasmas fueron reveladas con sulfato cérico. Posteriormente los compuestos se caracterizaron mediante punto de fusión (pf), rotación óptica y RMN ^1H y ^{13}C para su comparación con lo establecido en la literatura.

2. Síntesis de (-)-licarina A usando agua de coco.

Durante el procedimiento se modificaron diferentes variables como el tiempo de reacción, el tipo de enzima y el volumen de agua de coco, esto permitió determinar cuales son las mejores condiciones para la síntesis de licarina A que involucra mejores rendimientos.

La síntesis de (-)-licarina A se obtuvo mediante acoplamiento oxidativo de isoeugenol utilizando como peroxidasa agua de coco y peróxido de hidrógeno 3%, como se describe por Rodrigues y colaboradores(2017).

Se recolectó agua de cuatro cocos verdes (*Cocos nucifera L.*), para un volumen final de 0.6 L, que posteriormente fue filtrado en un embudo de vidrio con un tapón de algodón y el líquido se trasvasó a un matraz Erlenmeyer que contenía una barra magnética. Posteriormente, se colocó sobre una placa agitadora y con el medio de reacción agitado magnéticamente se añadió una solución de 0.37 g de isoeugenol en 4 mL de MeOH. Posteriormente se adicionó lentamente una solución acuosa de H_2O_2 al 3% (p/v) hasta llegar a un total de 5.18 mL, que se mantuvo en agitación magnética durante 1 h, luego se agregaron 0,19 L de CH_2Cl_2 a la solución, y se agitó magnéticamente durante 10 min más. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo con 300 mL (2x) de CH_2Cl_2 . Las fases de diclorometano se combinaron y se secaron con sulfato de magnesio anhidro y luego se filtraron. Se purificó el producto obtenido por cromatografía en columna de gel de sílice preparativa, utilizando como eluyente una mezcla de hexano:AcOEt en polaridades crecientes. Como se muestra en la tabla 2 se hicieron un total de seis repeticiones para obtener una cantidad considerable de producto.

Tabla 2. Características de repeticiones realizadas para la síntesis de (-)-licarina A.

Reacciones	IE (g)	Agua de coco (L)	H ₂ O ₂ al 3% (mL)	MeOH (mL)	Tiempo
1	0.37	0.6	5.2	3.75	1 h
2	0.4	0.6	5.5	4	1 h
3	1	1.6	13.8	10	1 h
4	0.75	1.2	10.8	7.5	1 h
5	0.82	1.3	12	8	1 h
6	1	1.5	13	10	1 h

Los productos obtenidos se compararon por CCF utilizando como eluyente hexano:acetato de etilo en proporción 80:20. El compuesto se identificó mediante pf, rotación óptica y RMN ¹H y ¹³C y fue comparado con lo descrito por Rodrigues y colaboradores (2017).

3. Obtención de (+)-licarina A a partir de Nuez moscada

La extracción de (+)-licarina A mediante su extracción de nuez moscada siguiendo la metodología de Kruekaew S. y colaboradores (2022).

Se recolectaron granos enteros de nuez moscada y posteriormente se redujeron a polvo fino con ayuda de una licuadora, se obtuvo un total de 1.39 kg los cuales se dividieron en tres matraz erlenmeyer para su extracción en MeOH (4L) a temperatura ambiente durante 7 días. El extracto metanólico se juntó y filtró seguidamente se evaporó el disolvente a presión reducida en un rotavapor para obtener un residuo de color rojizo. El residuo resultante se dividió en tres fracciones para su posterior purificación. El sobrante se extrajo nuevamente en MeOH a temperatura ambiente durante 14 días para poder extraer la mayor cantidad de producto posible.

Al momento de usar el rotavapor se cayó la segunda fracción al agua destilada por lo que se procedió a eliminar el exceso de agua en un secador al vacío. Los

residuos obtenidos una vez que se evaporó el disolvente y el agua de todas las fracciones.

Las tres fracciones se purificaron por separado mediante cromatografía en columna usando como eluyente hexano:acetato de etilo en polaridades crecientes. Se realizaron varias cromatoplasmas para poder identificar en qué fracción de la columna se encontraba el producto deseado.

La primera fracción se envió a RMN ^1H y ^{13}C para su identificación, la segunda y tercera fracción se dejaron para su posterior re-purificación. El producto obtenido se comparó por CCF con hexano:AcOEt en polaridad 80:20 como eluyente, en el siguiente orden: (\pm)-licarina A, (-)-licarina A y el producto.

Las cromatoplasmas fueron reveladas con sulfato sérico.

Metas alcanzadas

Las metas alcanzadas en este trabajo fueron la síntesis tanto de: (\pm)-licarina A y (-)-licarina A ambos productos se obtuvieron puros, sin embargo aunque se logró obtener (+)-licarina A el compuesto resultante no obtuvo la pureza deseada.

Resultados y discusión de resultados

Obtención de (\pm)-licarina A con HRP

- Características de la peroxidasa HRP

Se usaron dos tipos de enzimas: peroxidasa HRP Liofilizada ~ 150 U/mg y peroxidasa HRP Tipo IV.

- Repeticiones

En esta síntesis se realizaron 3 repeticiones para poder identificar las condiciones ideales para la reacción de síntesis. En la primera y segunda repetición se utilizó peroxidasa de rábano picante liofilizada con un tiempo de reacción de 3h para la primera y 2 h para la segunda respectivamente. Ambas reacciones tuvieron un rendimiento del 25% (Tabla 3).

Tabla 3. Características de las repeticiones, punto de fusión y rendimiento de cada reacción.

	IE (mmol)	Enzima (mg)	Enzima HPR	H ₂ O ₂ 30%	Tiempo (h)	Rend. (%)	p.f (°C)	[α]
1	10	12.4	Liofilizada ~150 U/mg.	0.6mL	3	25	ND	ND
2	10	12.4	Liofilizada ~150 U/mg.	0.6mL	2	25	120-125	0°
3	10	12.4	Tipo IV	0.5mL	1	43	115-120	0°

Como se observa en la tercera repetición el tiempo de reacción fue menor y dio mejores rendimientos (43%), a pesar de que las tres reacciones se utilizó la misma cantidad de IE, esta última logró mejores resultados debidamente a que se utilizó una enzima más pura y esto contribuyó a que la reacción se diera más rápido.

Las cromatoplasmas tomadas en las 3 repeticiones fueron reveladas con sulfato cérico, como se observa en la figura 5, en los tres productos obtenidos se logró visualizar la (+/-)-licarina A, sin embargo, en la tercera repetición se visualizaron menos subproductos (manchas arriba y abajo) en comparación de los productos obtenidos en las primeras repeticiones, esto podría deberse a que al tratarse de una enzima más pura la reacción ocurre con más rapidez lo que ocasionó la formación de menos impurezas ya que al momento de realizar la reacción la mezcla tomó un color más amarillento por lo que se procedió a disminuir el tiempo de reacción (1h) que en comparación con las primeras repeticiones la reacción fue más rápido.

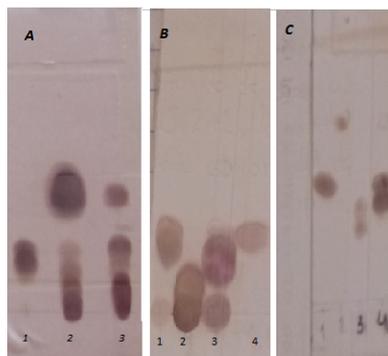
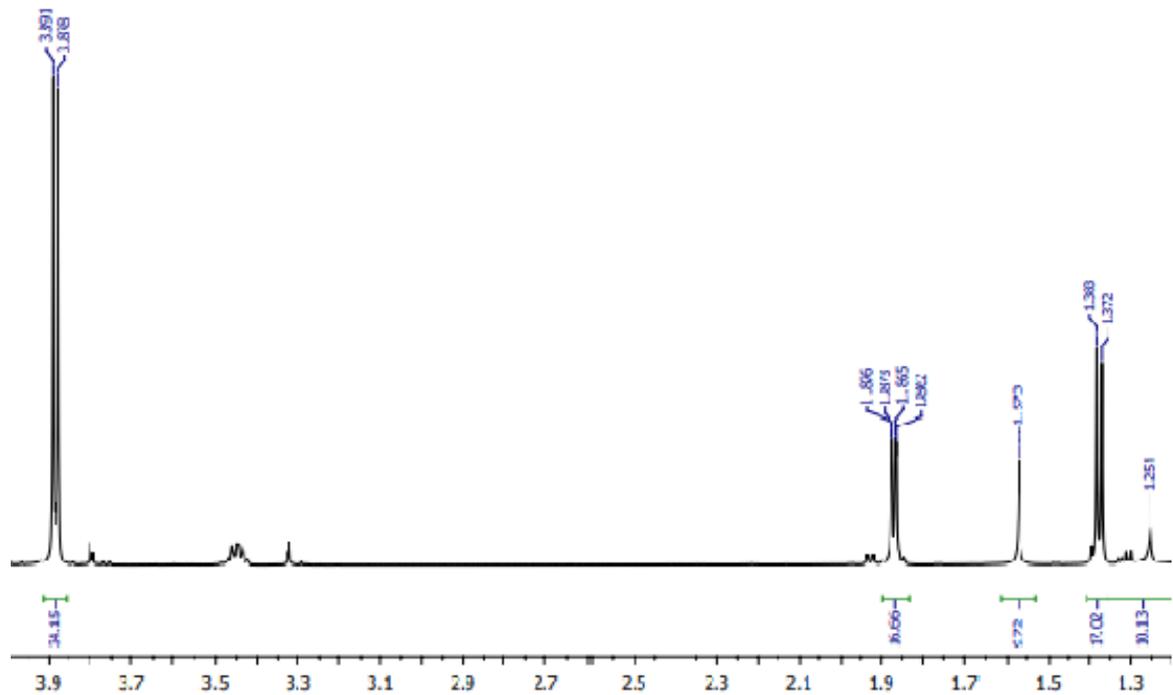
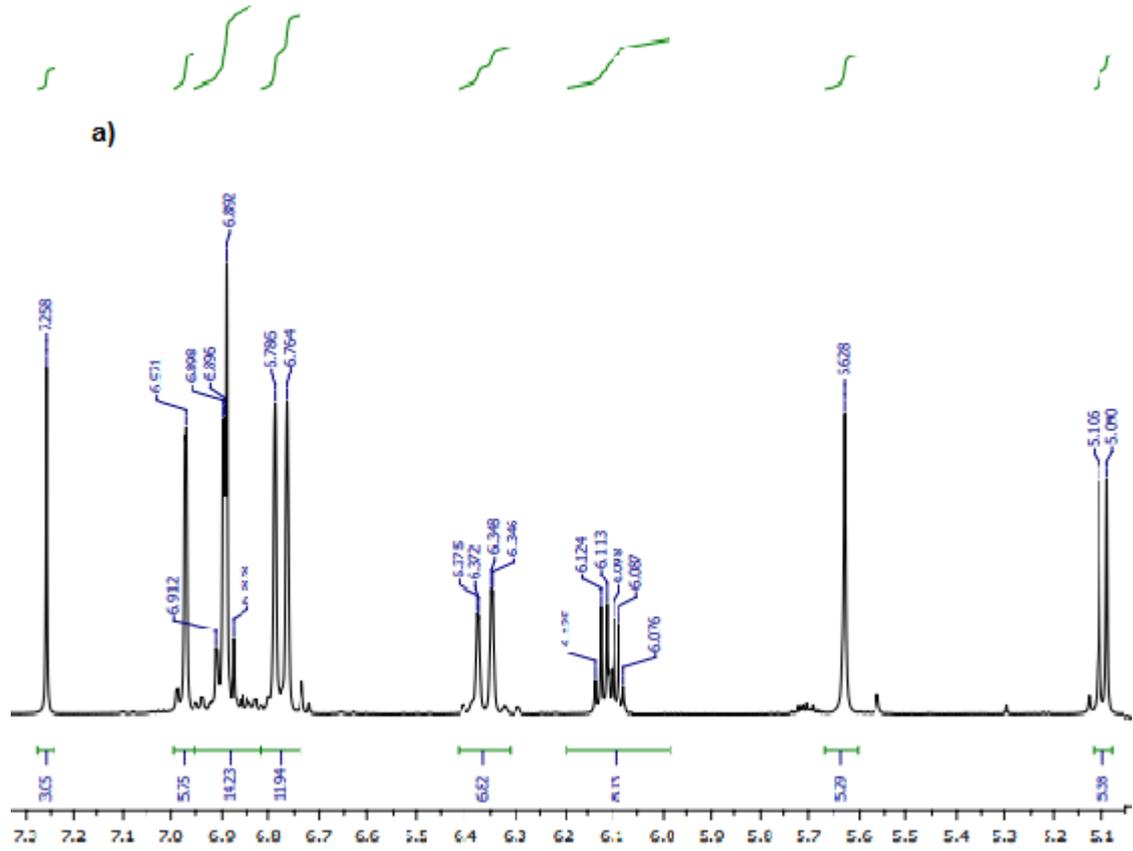
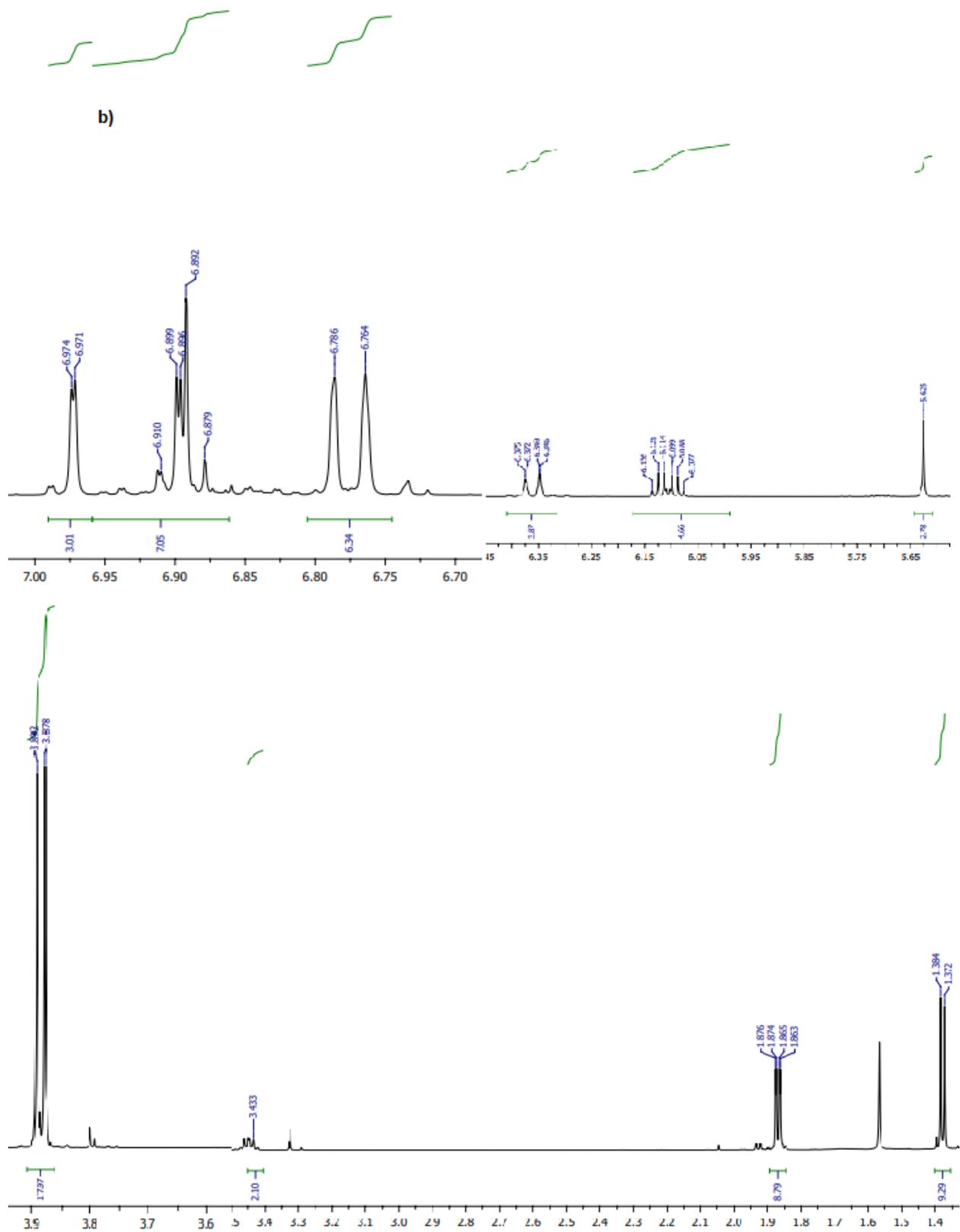


Figura 5. Cromatoplasmas de las 3 repeticiones. A) repetición 1 (1. producto, 2. Isougenol, 3. referencia), B) repetición 2 (1. producto puro, 2. manchas abajo, 3. producto con impurezas, 4. producto obtenido en la primera repetición) y C) repetición 3 (1. referencia, 2. isoeugenol, 3 y 4 producto con impurezas)

Posteriormente, los productos de la segunda y tercera repetición se caracterizaron mediante punto de fusión y rotación óptica como se muestra en la tabla 3, los resultados muestran una ligera discrepancia en el punto de fusión del segundo y el tercer producto, sin embargo, al ser comparados con la referencia se pudo establecer que aunque manejan diferencias se encuentran dentro del rango que maneja la literatura el cual reporta un punto de fusión que va desde 130-135°C y 112-120°C dependiendo la referencia solicitada.

En la figura 6 se pueden apreciar los 3 espectros de ^1H de RMN comparados entre sí, los 3 espectros coinciden visualmente en las señales para cada uno de los H, sin embargo, en las primeras 2 repeticiones (a y b), se observa a simple vista que los espectros muestran varias señales que demuestran impurezas en comparación con el tercero (c) en donde se observó un espectro más limpio, por lo que se compararon con lo reportado por Rodrigues y colaboradores (21).





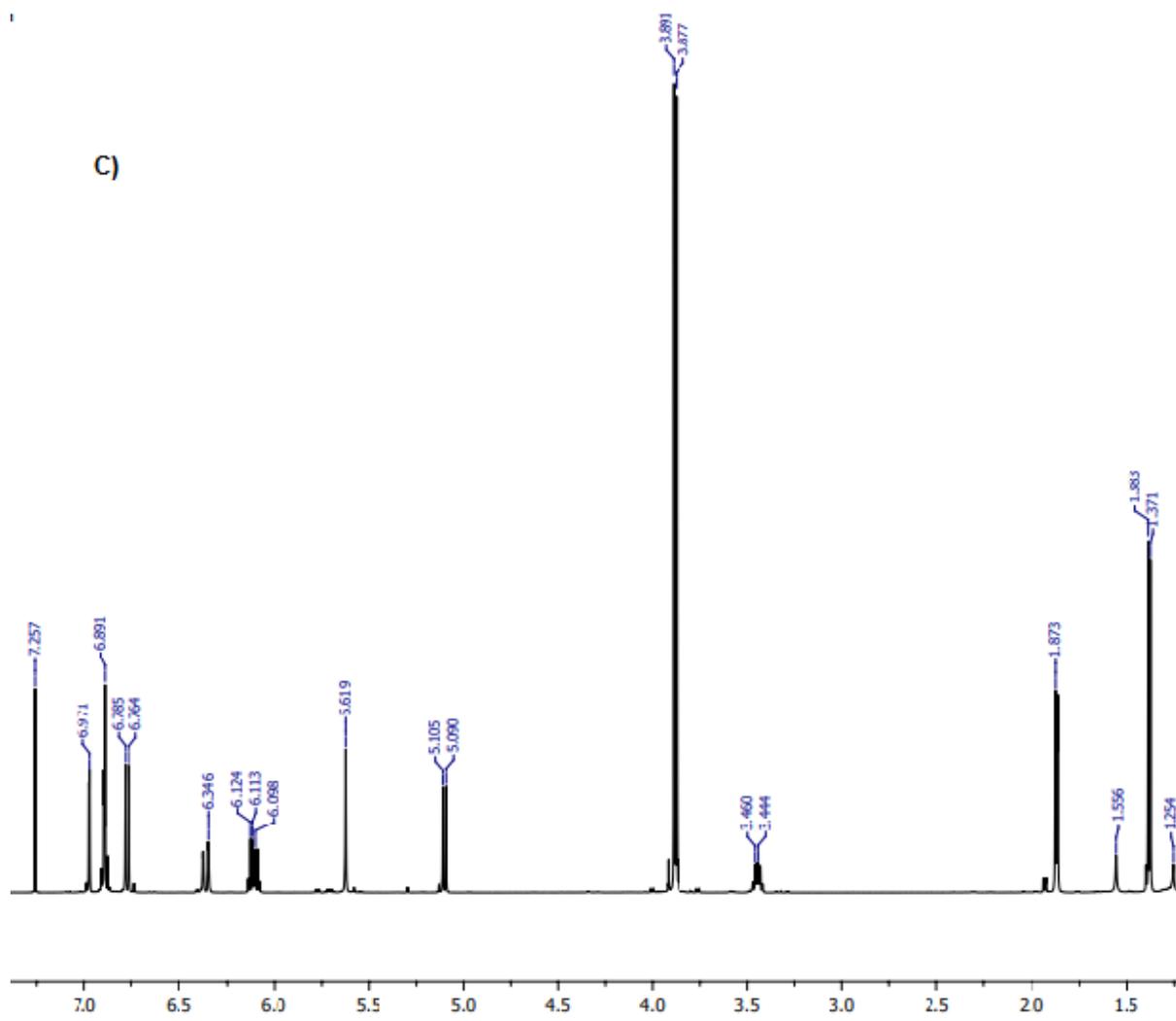


Figura 6. Aspectos de ^1H de RMN con CDCl_3 . A) 1° repetición, B) 2° repetición y C) 3° repetición.

En la tabla 4 se observa el tipo de hidrógeno asignado de acuerdo con la señal de desplazamiento de cada átomo de hidrógeno en los espectros, así mismo, se representan los desplazamientos documentados en la literatura para ello se tomó como referencia la estructura de licarina A reportada por Rodrigues y colaboradores (figura 7). Puede observarse que tanto en la ilustración como en los datos obtenidos en la tabla las señales en el espectro son muy cercanas a lo reportado en previas investigaciones en las cuales se sintetizó el mismo compuesto.

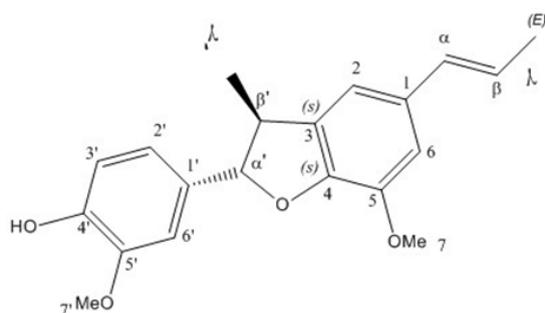
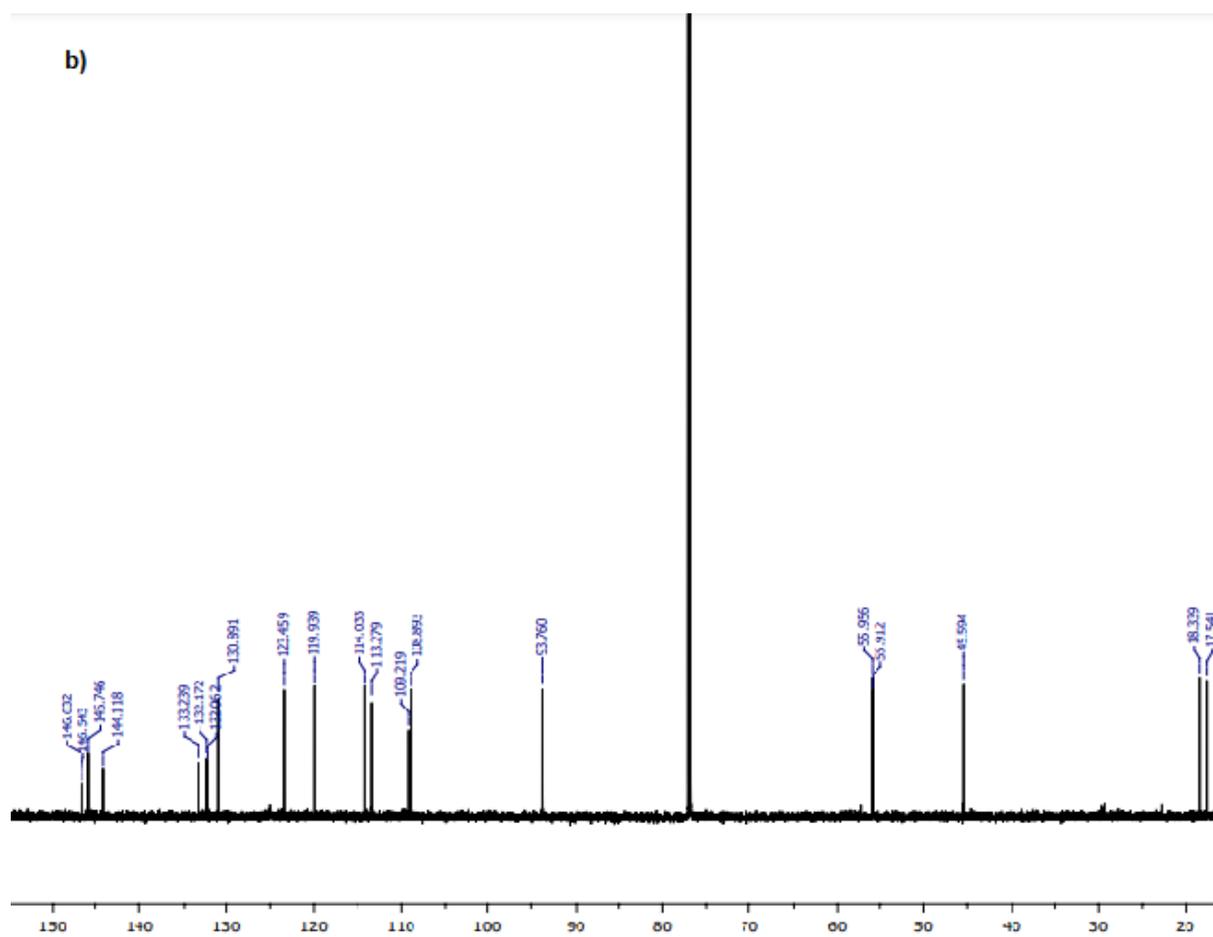
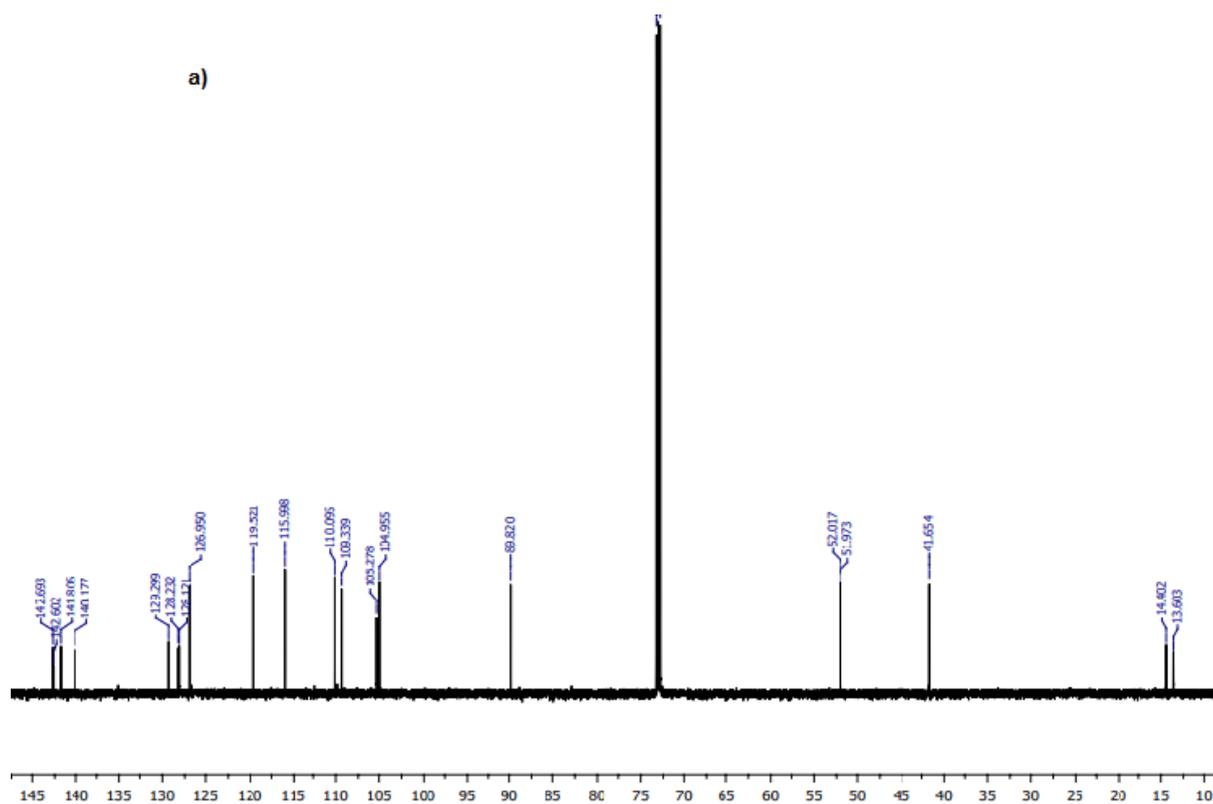


Figura 7. Estructura de licarina A

Hidrogenos	Reportado en la literatura	Multiplicidad obtenida	Desplazamiento obtenido (ppm)		
	Desplazamiento (ppm)		1° repetición	2° repetición	3° repetición
1H y H-6'	6.96	singulete	6.97	6.97	6.97
2H,H-2', H-5	6.88	singulete	6.88	6.89	6.89
1H,H-6	6.77	singulete	6.78	6.78	6.78
1H,H-2	6.75	singulete	6.76	6.76	6.76
1H,H- α	6.36	doblete	6.37	6.37	6.37
1H,H- β	6.09	doble cuatriplete	6.09	6.09	6.09
1H, OH	5.64	singulete	5.63	5.63	5.62
1H,H- α'	5.08	doblete	5.09	5.09	5.09
3H,OCH ₃	3.88	singulete	3.89	3.89	3.89
3H,OCH ₃	3.86	singulete	3.87	3.87	3.87
1H,H- β'	3.43	doble cuatriplete	3.44	3.44	3.43
3H,H α	1.86	doble doblete	1.86	1.86	1.86
3H,H α'	1.36	doblete	1.37	1.37	1.37

Tabla 4. Desplazamientos en espectro de ¹H RMN.

En la figura 8 se pueden observar los 4 espectros de ¹³C de RMN comparados entre sí; los espectros A) calculado mediante el programa ChemDraw, B) el obtenido en la primera repetición, C) segunda repetición y D) tercera repetición, coinciden visualmente.



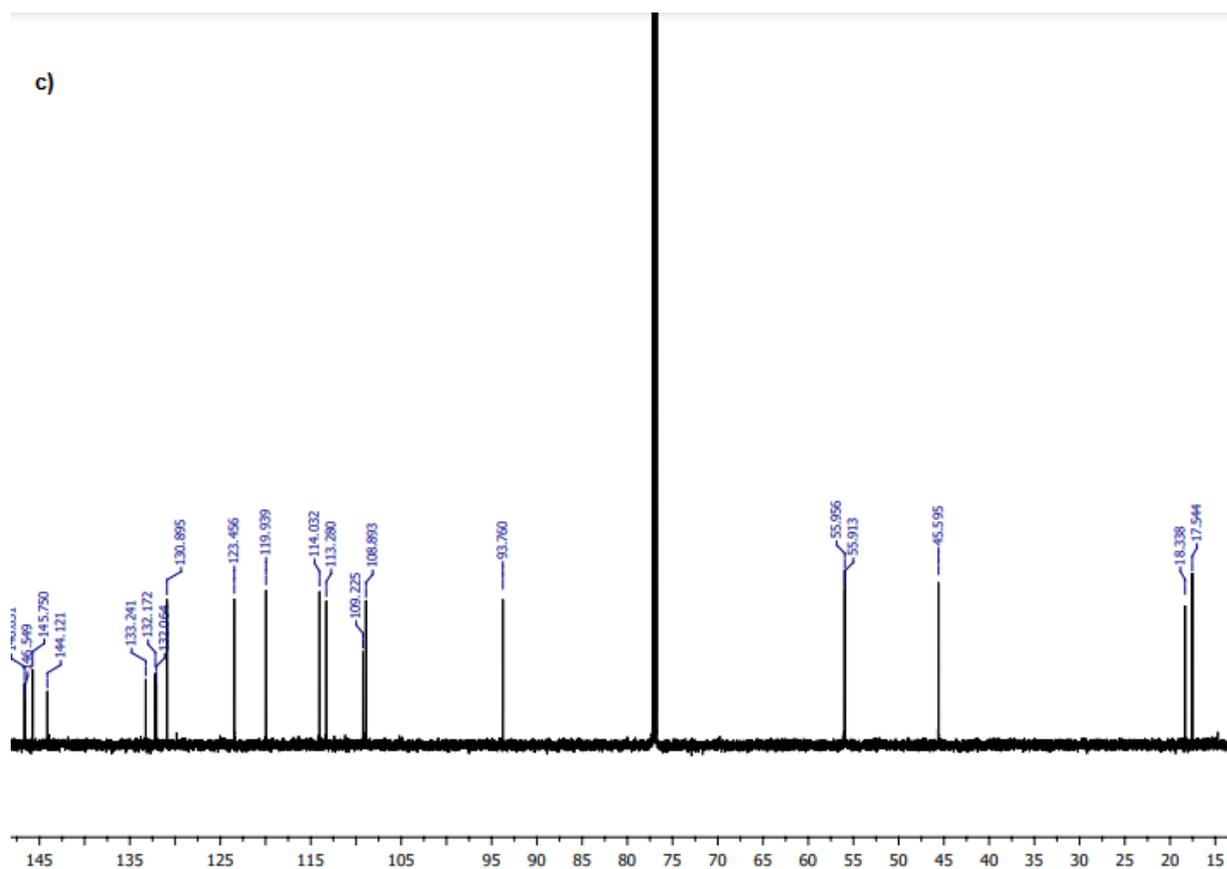


Figura 8. Espectros de ^{13}C RMN con CDCl_3 .

En la tabla 5 se muestran los carbonos asignados de acuerdo con cada desplazamiento en los 4 espectros, así mismo se presentan los desplazamientos reportados en la literatura de los diferentes carbonos que contiene la estructura de licarina A.

Se puede observar que los desplazamientos obtenidos en la tercera repetición se encuentran cercanos a los desplazamientos del espectro calculado y el reportado por la literatura.

Tabla 5. Desplazamientos obtenidos en espectros de ^{13}C RMN con CDCl_3 .

Tipo de Carbono	Desplazamiento (ppm)				
	Reportado en la literatura	Calculado	Obtenido 1° repetición	Obtenido 2° repetición	Obtenido 3° repetición
C4	146.60	147.95	146.67	142.69	146.54
C5'	146.48	146.63	142.61	142.60	145.74
C5	145.70	144.67	141.80	141.80	144.11
C4'	144.08	135.63	140.18	140.17	144.09
C3	133.20	133.81	129.28	129.29	133.23
C1'	132.13	132.48	128.12	128.23	132.17
C1	132.00	127.42	126.92	128.12	132.06
C α	130.87	126.54	119.52	126.95	130.89
C β	123.44	120.72	115.98	119.52	123.45
C2'	119.93	116.14	110.07	115.99	119.93
C3'	114.00	116.07	109.35	110.09	114.03
C2	113.23	111.70	105.30	109.33	113.27
C6	109.10	110.85	104.98	105.27	109.21
C6'	108.83	92.57	89.85	104.98	108.89
C α '	93.72	56.78	53.97	89.82	93.76
OMe	55.89	56.77	52.45	52.01	55.91
C β '	45.60	41.76	45.65	41.65	45.59
C λ	18.39	17.19	14.45	14.4	18.33
C λ '	17.50	16.06	13.65	13.6	17.51

Los productos obtenidos en la síntesis de licarina A mediante peroxidasa de rábano picante para obtener las condiciones idóneas de reacción, fueron un compuesto sólido de color blanquesino y olor característico. Sin embargo, se pudo observar que tanto los productos de la primera y segunda reacción al exponerlos en condiciones de temperatura ambiente se tornó el sólido a un color amarillento, por lo que se procedió a refrigerarlo para poder conservarlo.

Obtención de (-)-licarina A con agua de coco

- Características del agua de coco

Se utilizó agua de coco verde (*Cocos nucifera L*) previamente filtrado en algodón con ayuda de un embudo de vidrio.

- Repeticiones

Se realizaron 3 repeticiones de la metodología en cada repetición se hicieron dos reacciones con cantidades distintas de agua de coco, isoeugenol y H_2O_2 al 3% ver tabla 6

Tabla 6. Características físicas, punto de fusión, rotación óptica y rendimiento de cada reacción.

CLAVE	ISOEUGENOL (g)	Agua de coco (L)	H ₂ O ₂ al 3% (mL)	MeOH (mL)	Tiempo	Rend. (%)	p.f (°C)	[α]
Reacción 1	0.37	0.6	5.2	3.75	1h	36%	120-125	Negativa
	0.4	0.6	5.5	4	1h			
Reacción 2	1	1.6	13.8	10	1h			
	0.75	1.2	10.8	7.5	1h			
Reacción 3	0.82	1.3	12	8	1h			
	1	1.3	13	10	1h			

Las diferencias de las características físicas de las diferentes reacciones fueron visualmente notables, en la figura 9 podemos observar estas, en las primeras reacciones (1° y 2° repetición) el producto de reacción se torno un tono amarillento lechoso y al momento de hacer la separación de las fases se visualizaron muchas emulsiones en comparación con las ultimas dos reacciones (3° repetición) en donde la coloración de la reacción tomo un tono más amarillento y la formación de emulsiones fue menor. Esto podría deberse a la madurez de los cocos, debido a que en esta última repetición se pudieron abrir con más facilidad y desprendían un olor característico del agua de coco al momento de rasgar en la cáscara.

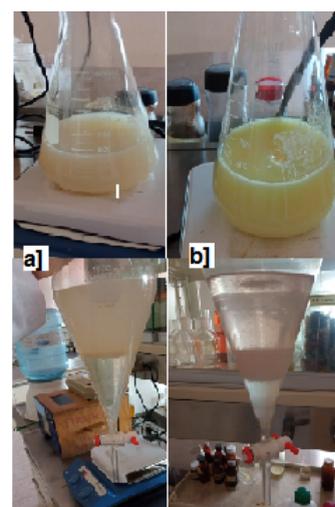


Figura 9. Repeticiones 1 y 2 (a), 3° repetición (b).

Las cromatoplasmas de las reacciones se revelaron con sulfato sérico, en la figura 10 se muestra que las últimas reacciones (5 y 6) se encuentran más puras que las reacciones anteriores (1,2,3,4) ya que hubo menos visualización de subproductos.

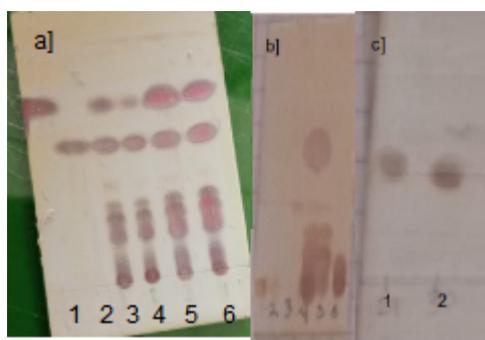


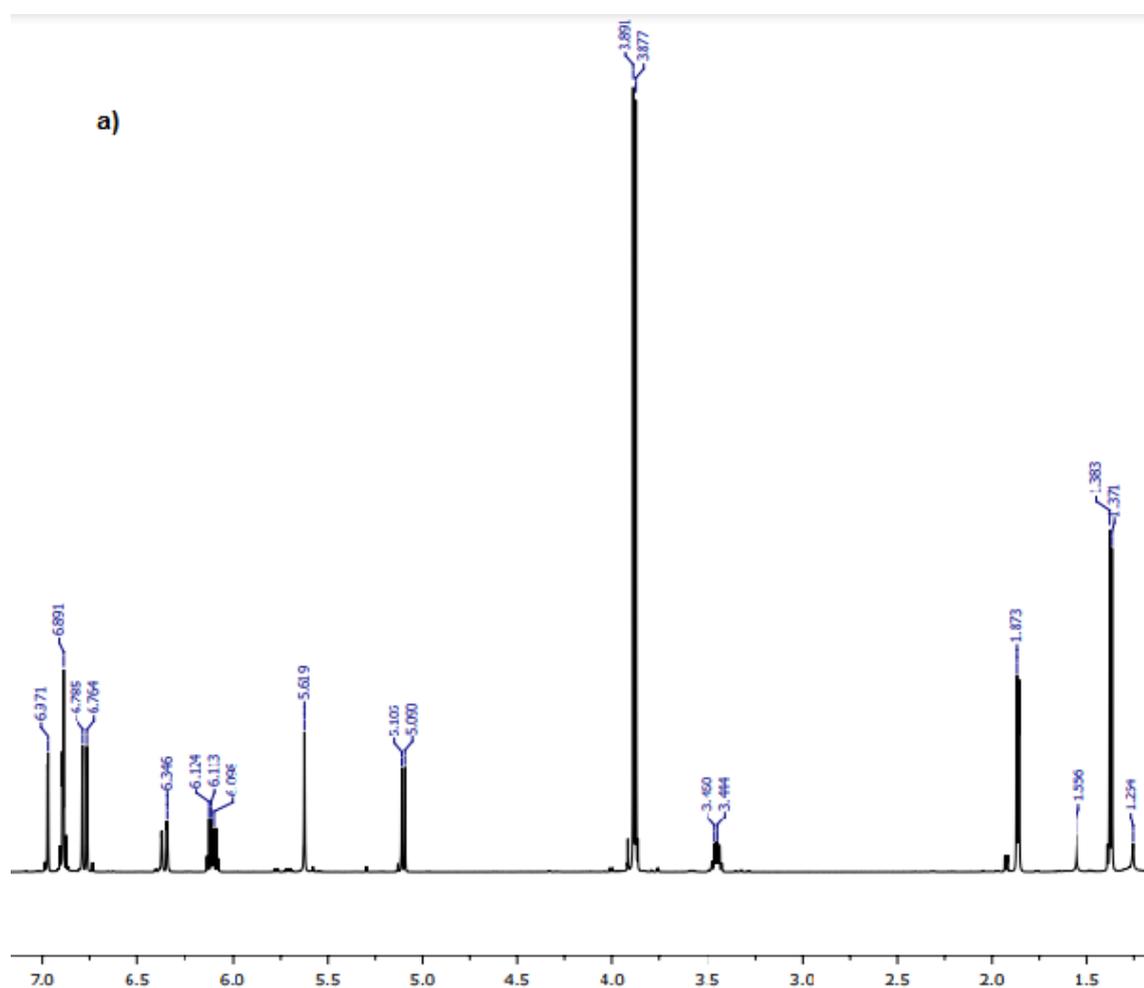
Figura 10. Cromatoplasmas de las reacciones a) primeras 4 reacciones, b) 5° reacción y c) 6° reacción

Los puntos 3,4, 5 y 6 de a) corresponden a las primeras 4 reacciones se pueden observar muchas impurezas (manchas abajo y arriba) en todos los productos obtenidos, en b) y c) los puntos 3 y 2 que corresponde al producto se visualiza puro

por lo que se demuestra que la tercera repetición que corresponden a las reacciones 5 y 6 obtuvo mejores resultados en cuanto a pureza del producto.

En esta síntesis se reunieron todos los productos y se repurificó como resultado obtuvimos un rendimiento del 36% el cual considerando la literatura no es un valor bajo.

En los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto obtenido se muestran en la figura 11, en donde puede observarse que el compuesto no presenta tantas impurezas puesto que las señales en el espectro son visualmente cercanas a las reportadas por Rodríguez y colaboradores las cuales se describen en la tabla 7, ^1H RMN (7a) y ^{13}C RMN (7b), así como, en los espectros de síntesis de (+/-)-licarina A con HPR.



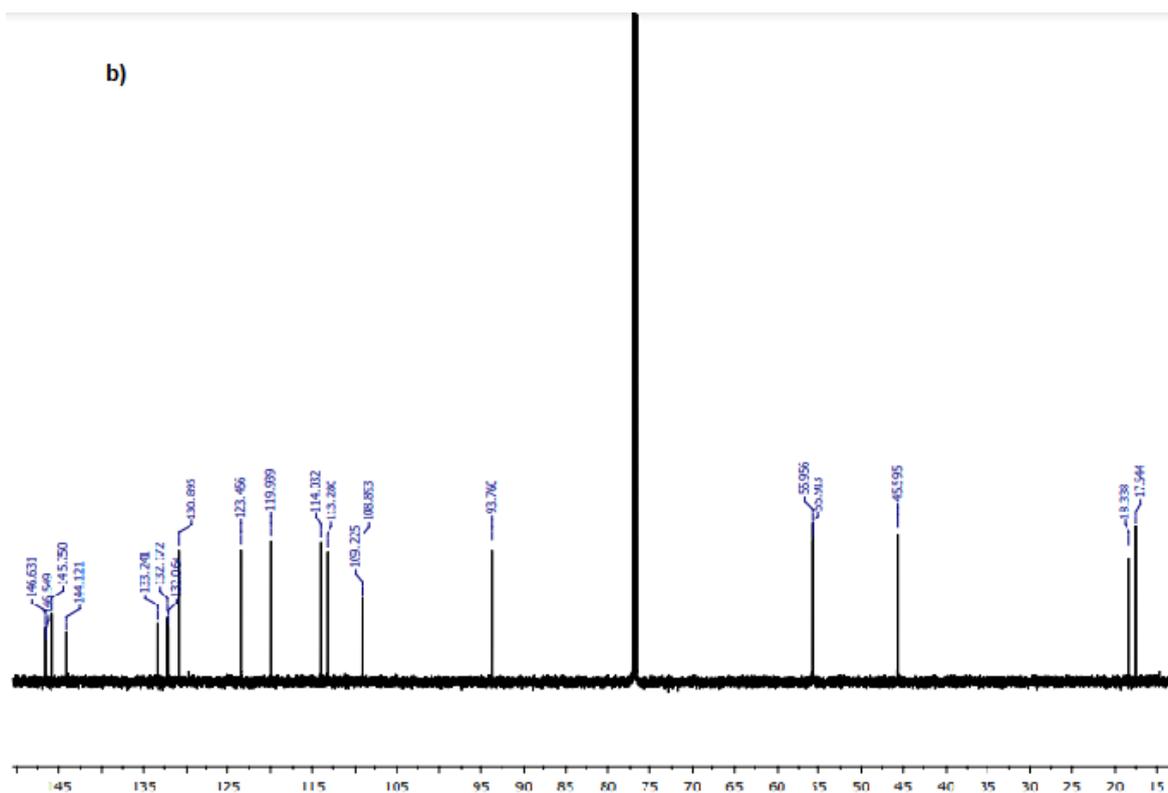


Figura 11. Espectros de RMN a) ^1H y b) ^{13}C

Tabla 7. Desplazamientos obtenidos en espectros de ^1H (a) ^{13}C (b) de RMN con CDCl_3

a) Hidrogenos	Reportado en la literatura		Multiplicidad obtenida	Desplazamiento obtenido (ppm)
	Multiplicidad	Desplazamiento (ppm)		
1H y H-6'	singulete	6.96	singulete	6.97
2H, H-2', H-5	singulete	6.88	singulete	6.89
1H, H-6	singulete	6.77	singulete	6.78
1H, H-2	singulete	6.75	singulete	6.76
1H, H- α	doblete	6.36	doblete	6.34
1H, H- β	doble cuatriplete	6.09	doble cuatriplete	6.09
1H, OH	singulete	5.64	singulete	5.61
1H, H- α'	doblete	5.08	doblete	5.09
3H, OCH_3	singulete	3.88	singulete	3.89
3H, OCH_3	singulete	3.86	singulete	3.87
1H, H- β'	doble cuatriplete	3.43	doble cuatriplete	3.44
3H, $\text{H}\lambda$	doble doblete	1.86	doble doblete	1.87
3H, $\text{H}\lambda'$	doblete	1.36	doblete	1.37

b)

Tipo de Cabono	Reportado en la literatura	Desplazamiento obtenido (ppm)
C4	146.60	146.63
C5'	146.48	146.54
C5	145.70	145.75
C4'	144.08	144.12
C3	133.20	133.24
C1'	132.13	132.17
C1	132.00	132.06
C α	130.87	130.89
C β	123.44	123.45
C2'	119.93	119.93
C3'	114.00	114.03
C2	113.23	113.28
C6	109.10	109.20
C6'	108.83	108.89
C α '	93.72	93.76
OMe	55.89	55.91
C β '	45.60	45.60
C λ	18.39	18.33
C λ '	17.50	17.54

Obtención de (+)- licarina A mediante nuez moscada.

- Características de la nuez moscada

Se recolectaron granos de nuez moscada, se trituraron y se dejó en MeOH por 7 días, posteriormente se filtró y evaporó.

Al finalizar la evaporación de los disolventes se realizó una CCF comparado los productos anteriormente obtenidos de (\pm)-licarina A y (-)-licarina A con los dos compuestos resultantes de la evaporación, como se aprecia en la figura 12, la CCF indicó que a diferencia de las impurezas observadas los 4 productos son los mismos.



Figura 12. CCF de los diferentes compuestos. 1- (\pm)-licarina A, 2-(-)-licarina A, 3 y 4 productos obtenidos.

Los compuestos obtenidos en la extracción se dividieron en 3 columnas para su purificación. La primera columna se realizó con una muestra del producto no contaminado, la polaridad en la que se alcanzó a visualizar el compuesto esperado fue en 80:20 hexano-AcOEt, la cual está registrada en la literatura y fue la misma que se obtuvo en las síntesis anteriores, sin embargo el producto obtenido tomó una consistencia oleosa lo cual es un indicador de impurezas presentes. Asimismo, la columna mostró unas manchas en un tono muy oscuro como se muestra en la figura 13b las cuales fueron difíciles de quitar. La segunda columna se realizó con la muestra a la cual le cayó agua, el producto obtenido fue más puro de consistencia menos oleosa y ligeramente amarillo. La columna se tornó un color más claro al obtenido en la anterior ver figura 13a, en esta fue más fácil obtener el compuesto aunque la polaridad a la que se observó fue de 70:30 hexano-AcOEt,.

Para la tercera columna se tomó el producto sobrante sin contaminar, la columna al igual que en la primera tomó un color oscuro, sin embargo en comparación con la primer y segunda fue más complicado purificar el compuesto ya que, aunque se empezó a visualizar el compuesto en polaridad 70:30 hexano-AcOEt, al igual que la segunda, está presentó más impurezas que en las anteriores figura 13-2c, en cuanto apariencia presento una textura oleosa color amarillo.

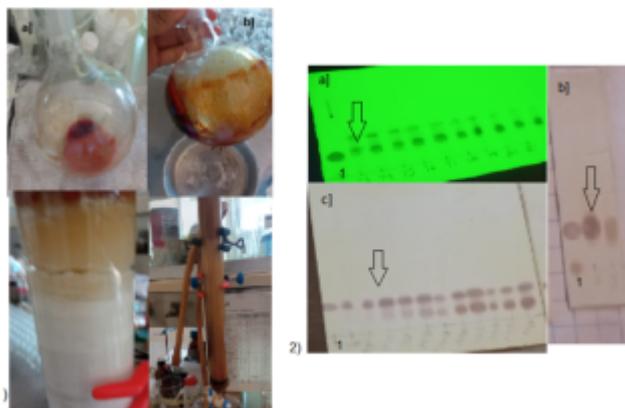
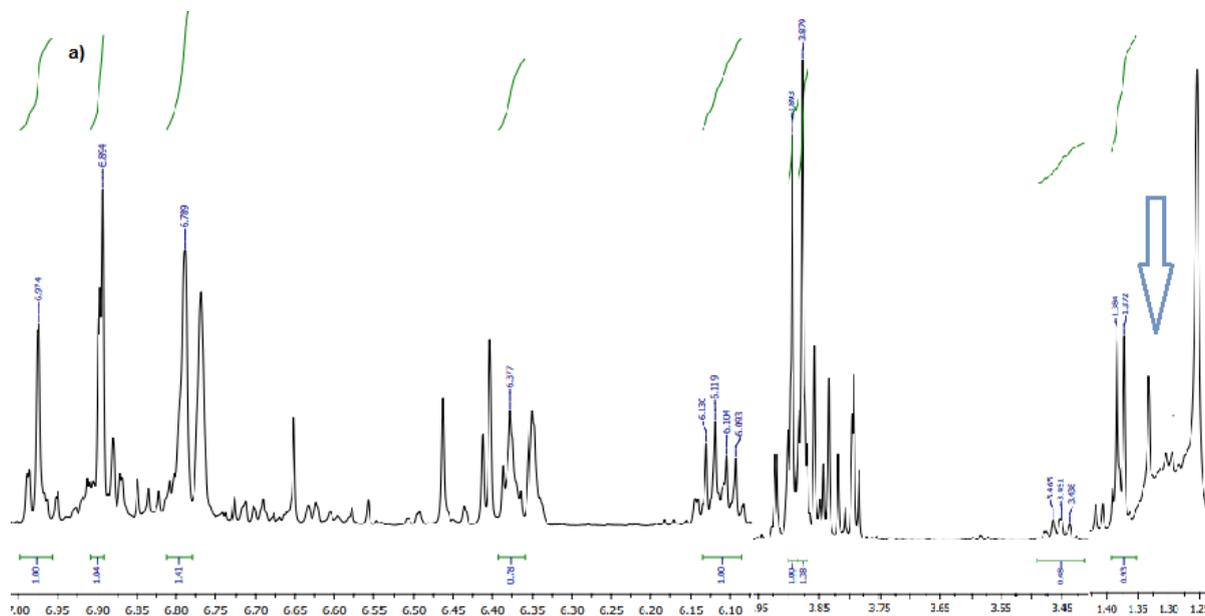


Figura 13.Producto obtenido. 1) comparación física de los productos después de la evaporación de disolventes, 2) cromatoplas de los productos: a) productos de la primera columna, b) productos de la segunda columna y c) producto de la tercera columna. Las flechas indican el producto obtenido y el 1 indica el producto de referencia.

Los productos obtenidos se recolectaron y juntos dieron un rendimiento del 30%, que pese a que no es un valor muy alto este es aceptable ya que en la literatura se reportan rendimientos cercanos al obtenido.

Los espectros de ^1H de RMN se pueden observar en la figura 14, el espectro 14b es el resultado de la re purificación del compuesto obtenido, ambos espectros muestran similitud, sin embargo se pueden apreciar muchas impurezas observando esto y ante la posibilidad de que el producto no fuera el deseado, se compararon ambos espectros con los obtenidos anteriormente. Al hacer la comparación se visualizó en los dos espectros obtenidos (14a y 14b) una señal con desplazamiento que va desde 1.25-1.36 ppm (14c) la cual no se visualiza en los espectros de licarina racémica y negativa. Esto podría indicar la presencia de algún aceite presente en el compuesto ya que como marca la literatura la nuez moscada presenta gran cantidad de aceites y terpenos por lo que es muy probable que alguno de estos aceites se haya unido al compuesto deseado.

Al visualizar la señal, se compararon los desplazamientos obtenidos en la extracción con los reportados en la literatura, como se observa en la tabla 8, tanto los desplazamientos de ^1H (8a) como los de ^{13}C (8b) se asemejan a los reportados por Rodrigues y colaboradores por lo que se asume, que aunque se sugiere una posterior repurificación del compuesto este presenta todas las características para corroborar que es el producto deseado.



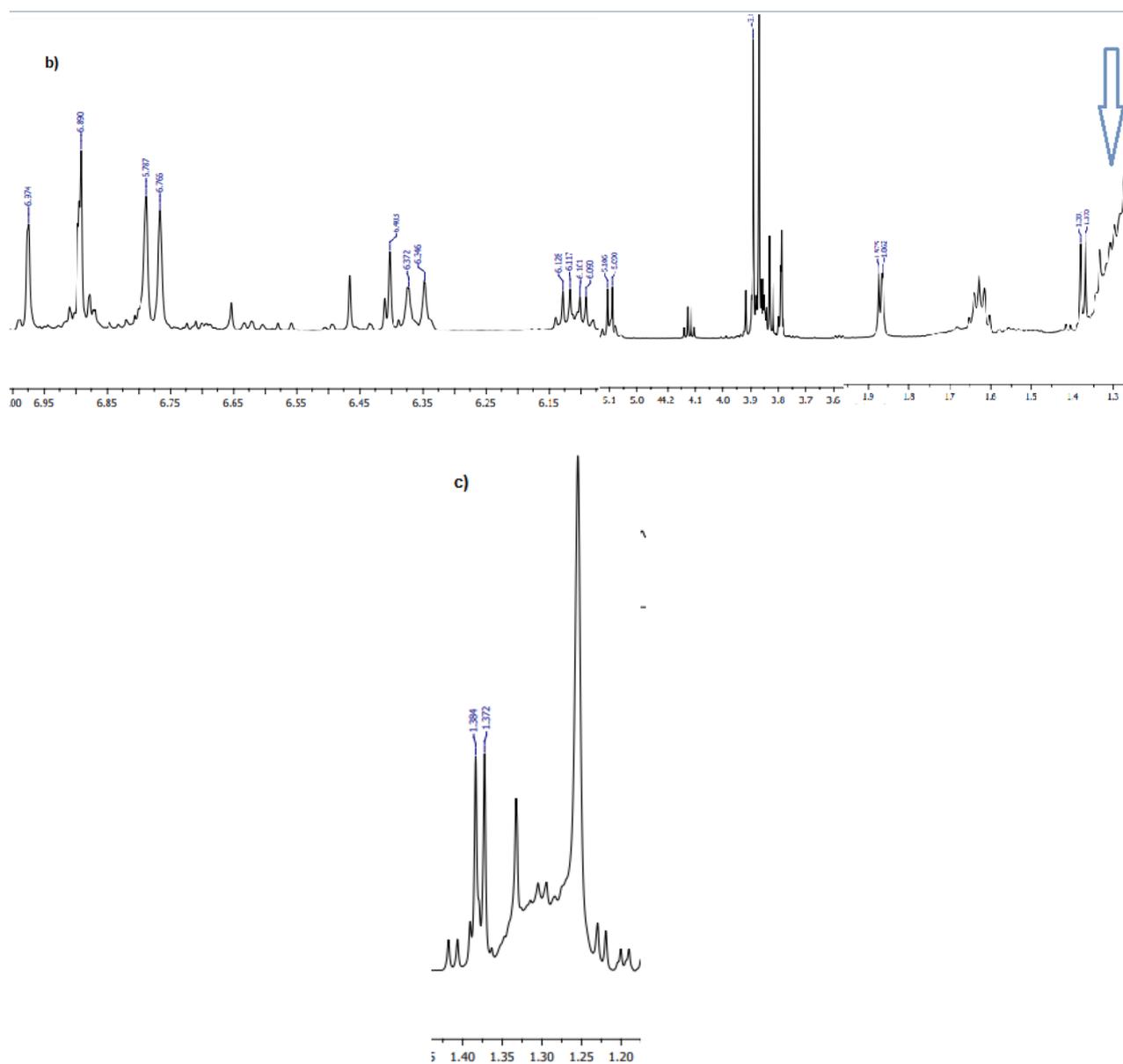


Figura 14. Espectros de ^1H de RMN. a) compuesto obtenido, b) resultado de la re purificación y c) vista amplificada de la señal de impureza. Las flechas indican la posición de la impureza en el espectro.

Tabla 8. desplazamientos (ppm) de los espectros de RMN ^1H (a) y ^{13}C (b).

a)

Hidrogenos	Reportado en la literatura		Desplazamiento obtenido (ppm)
	Multiplicidad	Desplazamiento (ppm)	
1H y H-6'	singulete	6.96	6.97
2H,H-2', H-5	singulete	6.88	6.89
1H,H-6	singulete	6.77	6.78
1H,H-2	singulete	6.75	6.76
1H,H- α	doblete	6.36	6.37
1H,H- β	doble cuatriplete	6.09	6.09
1H, OH	singulete	5.64	5.62
1H,H- α'	doblete	5.08	5.09
3H,OCH ₃	singulete	3.88	3.89
3H,OCH ₃	singulete	3.86	3.87
1H,H- β'	doble cuatriplete	3.43	3.43
3H,H λ	doble doblete	1.86	1.86
3H,H λ'	doblete	1.36	1.37

b)

Tipo de Cabono	Reportado en la literatura	Desplazamiento obtenido (ppm)
C4	146.60	146.53
C5'	146.48	146.54
C5	145.70	145.75
C4'	144.08	144.12
C3	133.20	133.24
C1'	132.13	132.17
C1	132.00	132.06
C α	130.87	130.89
C β	123.44	123.45
C2'	119.93	119.93
C3'	114.00	114.03
C2	113.23	113.28
C6	109.10	109.22
C6'	108.83	108.89
C α'	93.72	93.76
OMe	55.89	55.91
C β'	45.60	45.59
C λ	18.39	18.33
C λ'	17.50	17.54

Conclusiones

Se realizó la síntesis y caracterización por pf, rotación ópticas y RMN de ^1H y ^{13}C , de la mezcla racémica y las dos formas enantioméricas de licarina A.

En la síntesis de la mezcla racémica de licarina A, el mejor rendimiento que se obtuvo fue el de 43% en el cual se utilizó peroxidasa HRP tipo IV como biocatalizador, sin embargo, aunque se ocupó la peroxidasa y el tiempo de reacción indicados en la metodología, no se obtuvo un buen rendimiento del compuesto, por lo que se sugiere en próximas investigaciones se utilice más peroxidasa y el tiempo de reacciones sea mayor, así como utilizar reactivos más puros para que los productos contengan mayor pureza.

Se observó que para la síntesis del enantiómero negativo con agua de coco, estos deben ser maduros ya que al momento de hacer la separación de las fases se forman menos emulsiones lo que favorece la separación y con ello rendimiento de la reacción además de que el producto contiene menos impurezas.

En la extracción del enantiómero positivo, se obtuvieron muchas dificultades al momento de extraer el compuesto deseado, sin embargo, se observó que se tienen mejores resultados y la separación de los componentes es mejor si al producto resultante de la evaporación de los disolventes se le agrega agua, en este caso se hizo una investigación bibliográfica y se obtuvo que en algunas metodologías se agrega agua al 15% al compuesto antes de su purificación.

Dicho lo anterior, aunque en el caso del enantiómero positivo se requiere una posterior repurificación, se lograron cumplir los objetivos deseados en este trabajo.

Recomendaciones

Para la síntesis de la mezcla racémica de licarina A con HRP, se recomienda utilizar la enzima de HRP Tipo IV ya que con esta se obtuvieron mejores resultados y el tiempo de reacción fue menor, asimismo, se recomienda utilizar reactivos puros. En cuanto a la obtención de (-)-licarina A se sugiere utilizar cocos verdes maduros para evitar la formación de emulsiones y así facilitar el proceso de separación de las fases, de igual manera, para la obtención de (+)-licarina A se aconseja agregar agua al extracto de nuez moscada obtenido para poder retirar ceras o aceites que pudiera tener el compuesto y así obtener un producto más puro.

Referencias

1. Alvarenga DJ, de Figueiredo Peloso E, Marques MJ, de Souza TB, Hawkes JA, Carvalho DT. Natural and Semi-synthetic Licarins: Neolignans with Multi-functional Biological Properties. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2021 31:3. 2021;31(3):257-271. doi:10.1007/S43450-021-00144-7
2. Neuhaus WC, Jemison AL, Kozlowski MC. Oxidative dehydrogenative couplings of alkenyl phenols. *Org Biomol Chem*. 2021;19(38):8205-8226. doi:10.1039/D1OB01040A
3. Matsui T, Ito C, Masubuchi S, Itoigawa M. Licarin A is a candidate compound for the treatment of immediate hypersensitivity via inhibition of rat mast cell line RBL-2H3 cells. Published online 2015. doi:10.1111/jphp.12475
4. Paiva MRB De, Vasconcelos-Santos DV De, Coelho MM, et al. Licarin A as a Novel Drug for Inflammatory Eye Diseases. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2021;37(5):290-300. doi:10.1089/jop.2020.0129
5. Mardhatillah A, Mutakin M, Levita J. FeCl₃-catalyzed Synthesis of Dehydrodiisoeugenol. *Int J Chem*. 2015;8(1):1. doi:10.5539/ijc.v8n1p1
6. Consonni R, Ottolina G. NMR Characterization of Lignans. *Molecules*. 2022;27(7). doi:10.3390/molecules27072340
7. Zálešák F, Bon DJYD, Pospíšil J. Lignans and Neolignans: Plant secondary metabolites as a reservoir of biologically active substances. *Pharmacol Res*. 2019;146. doi:10.1016/j.phrs.2019.104284
8. Godínez-Chaparro B, Pérez-Gutiérrez S, Pérez-Ramos J, Heyerdahl-Viau I, Hernández-Vázquez L. Synthesis and Biological Activities of Dehydrodiisoeugenol: A Review. *Pharmaceuticals*. 2022;15(11):1351. doi:10.3390/ph15111351
9. Dong K, Zhao CY, Wang XJ, Wu LZ, Liu Q. Bioinspired Selective Synthesis of Heterodimer 8–5' or 8–O–4' Neolignan Analogs. Published online 2021. doi:10.1021/acs.orglett.1c00762
10. Kruakaew S, Singha S, Sangvichien E, Yahuafai J, Sutthivaiyakit S. Neolignans from *Myristica fragrans* seeds, revision of their absolute configurations, reduction products and biological activities. *Phytochemistry*. 2022;199:113174. doi:10.1016/j.phytochem.2022.113174

11. Liu SY, Wang GQ, Liang ZY, Wang QA. Synthesis of Dihydrobenzofuran Neoligans Licarin A and Dihydrocarinatin as Well as Related Triazolylglycosides. *Chem Res Chin Univ.* 2013;29(6):1119-1124. doi:10.1007/s40242-013-3131-6
12. Abourashed EA, El-Alfy AT. Chemical diversity and pharmacological significance of the secondary metabolites of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.). *Phytochemistry Reviews.* 2016;15(6):1035-1056. doi:10.1007/s11101-016-9469-x
13. Chiu S, Wang T, Belski M, Abourashed EA. HPLC-Guided Isolation, Purification and Characterization of Phenylpropanoid and Phenolic Constituents of Nutmeg Kernel (*Myristica fragrans*). *Nat Prod Commun.* 2016;11(4):483. doi:10.1177/1934578x1601100416
14. El-Alfy AT, Abourashed EA, Patel C, Mazhari N, An HR, Jeon A. Phenolic compounds from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) inhibit the endocannabinoid-modulating enzyme fatty acid amide hydrolase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2019;71(12):1879-1889. doi:10.1111/jphp.13174
15. León-Díaz R, Meckes-Fischer M, Valdovinos-Martínez L, Campos MG, Hernández-Pando R, Jiménez-Arellanes MA. Antitubercular activity and the subacute toxicity of (-)-licarin a in balb/c mice: A neolignan isolated from *aristolochia taliscana*. *Arch Med Res.* 2013;44(2):99-104. doi:10.1016/j.arcmed.2012.12.006
16. Min BS, Cuong TD, Hung TM, Min BK, Shin BS, Woo MH. Inhibitory effect of lignans from *myristica fragrans* on LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. *Bull Korean Chem Soc.* 2011;32(11):4059-4062. doi:10.5012/bkcs.2011.32.11.4059
17. Şişecioğlu M, Gülçin İ, Çankaya M, et al. Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research.* 2010;4(12):1187-1196. doi:10.5897/JMPR10.071
18. Hernández-Vázquez L, Olivera-Flores MTDJ, Ruíz-Terán F, Ayala I, Navarro-Ocaña A. Screening of plant cell cultures for their capacity to dimerize eugenol and isoeugenol: Preparation of dehydrodieugenol. *J Mol Catal B Enzym.* 2011;72(3-4):102-106. doi:10.1016/j.molcatb.2011.05.005

19. Rodrigues LC, Barbosa-Filho JM, Marques SDG, et al. Formation of bioactive benzofuran via oxidative coupling, using coconut water (*Cocos nucifera* L.) as biocatalyst. *Organic Communications*. 2017;10(2):72-78. doi:10.25135/acg.oc.10.16.11.449
20. PURIFICATION AND SOME PARTIAL CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE ISOENZYME FROM BRASSICA OLERACEA CAPITATA L. | Semantic Scholar. Accessed May 10, 2022. <https://www.semanticscholar.org/paper/PURIFICATION-AND-SOME-PARTIAL-CHARACTERIZATION-OF-Yazdi-Khaleghparast/07bf3ff1c2d4e47d8af16c6dd072d6335022f5c8>
21. Laura Sánchez-Carvajal A, Alatorre-Santamaría S, Valerio-Alfaro G, Hernández-Vázquez L, Navarro-Ocaña A. Waste residues from *Opuntia ficus indica* for peroxidase-mediated preparation of phenolic dimeric compounds. doi:10.1016/j.btre.2018.e00291
22. Chen PY, Wu YH, Hsu MH, Wang TP, Wang EC. Cerium ammonium nitrate-mediated the oxidative dimerization of p-alkenylphenols: A new synthesis of substituted (\pm)-trans- dihydrobenzofurans. *Tetrahedron*. 2013;69(2):653-657. doi:10.1016/j.tet.2012.11.006
23. Nascimento IR, Lopes LMX, Davin LB, Lewis NG. *Stereoselective Synthesis of 8,9-Licarinediols*.
24. Pereira AC, Magalhães LG, Gonçalves UO, et al. Schistosomicidal and trypanocidal structure–activity relationships for (\pm)-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. *Phytochemistry*. 2011;72(11-12):1424-1430. doi:10.1016/j.phytochem.2011.04.007
25. Cezar Rodrigues L, Maria Barbosa-Filho J, Delany Gomes Marques S, et al. Formation of bioactive benzofuran via oxidative coupling, using coconut water (*Cocos nucifera* L.) as biocatalyst. *Org Commun*. 2017;10(2):72-78. doi:10.25135/acg.oc.10.16.11.449

Anexo

Metodología

- Obtención de (±)-licarina A con HRP

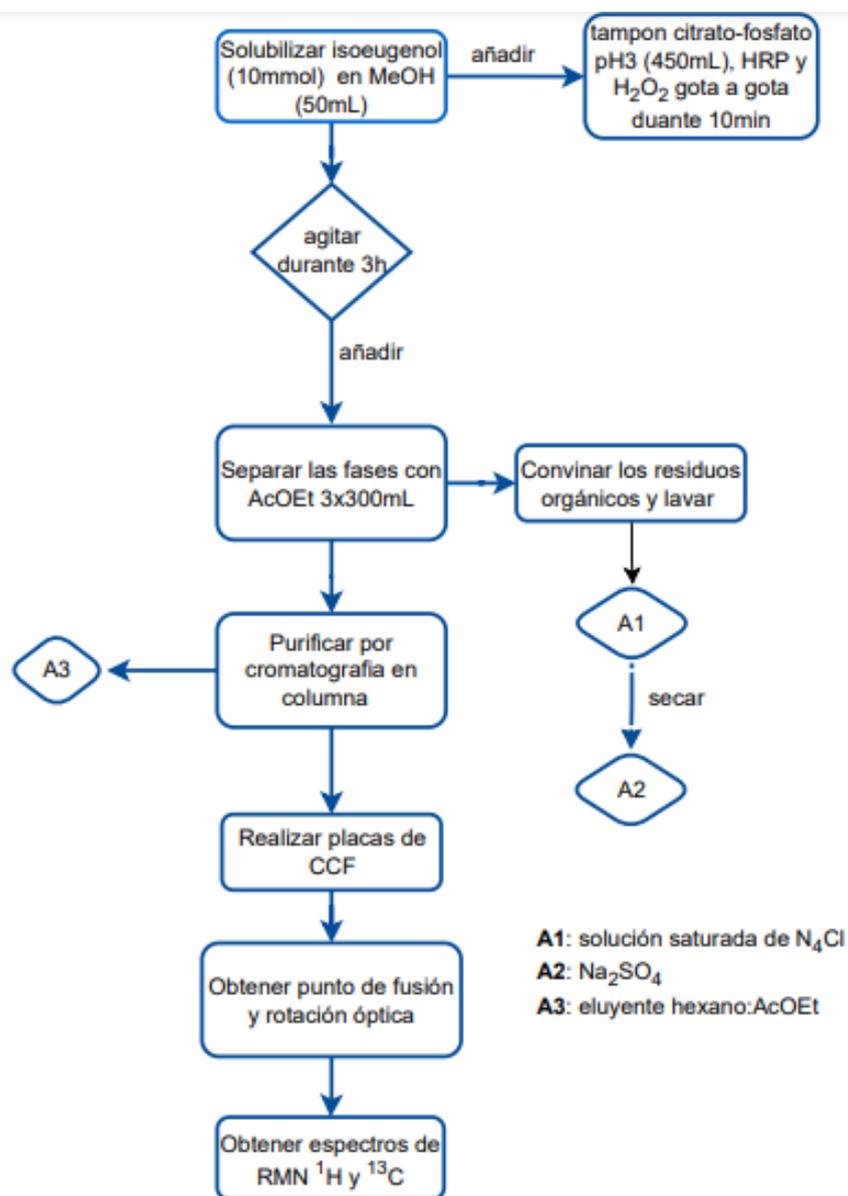


Figura 15. Diagrama de flujo de obtención de (±)-licarina A con HRP

□ Obtención de (-)-licarina A con agua de coco

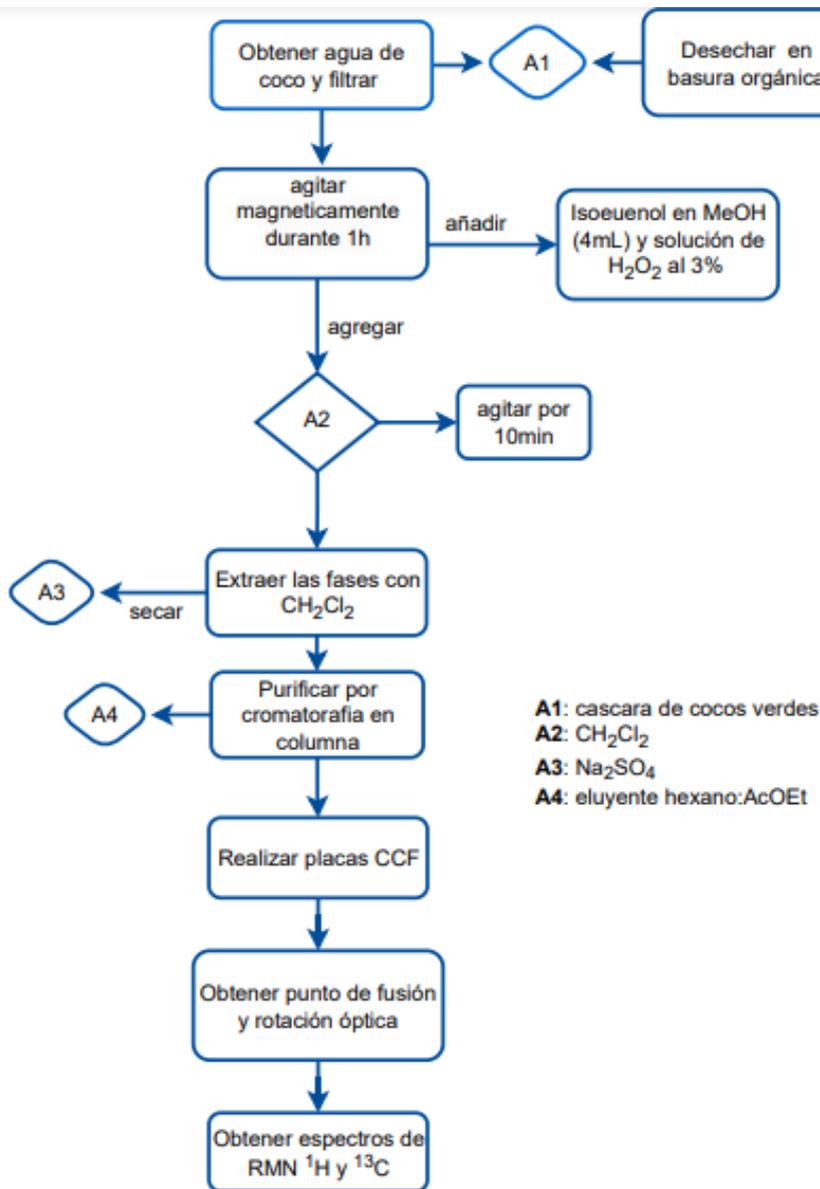


Figura 16. Diagrama de flujo de obtención de (-)-licarina A con agua de coco

□ Obtención de (+)-licarina A mediante nuez moscada

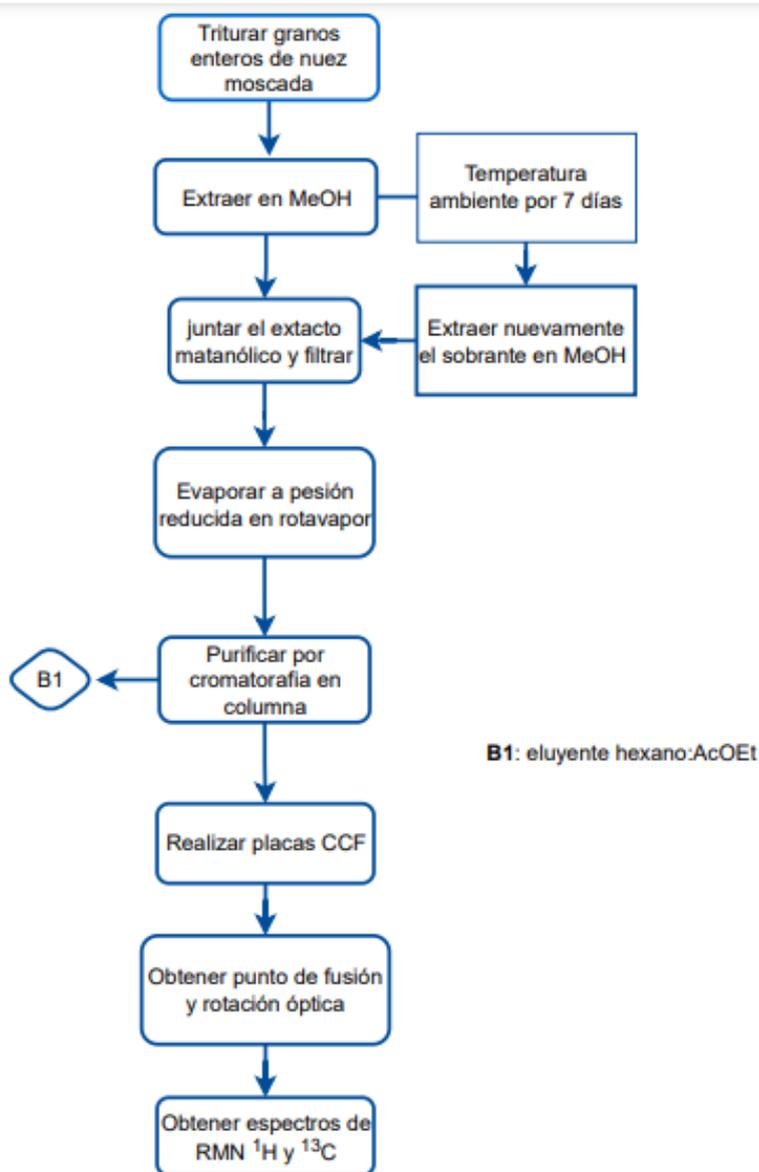


Figura 17. Diagrama de flujo de obtención de (+)-licarina A

Vo.Bo. del (la) o los asesores respecto al contenido académico.

Dra. Liliana Hernández Vázquez 27790

Asesor interno

Nombre, firma y No. económico

Dr. José de Jesús Lira Ricárdez 43461

Asesor externo

Nombre, firma y No. económico