



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Síntesis parcial, estudio computacional del mecanismo de formación, uso en la síntesis de polímeros y evaluación de la actividad vasorrelajante de carotenoides obtenidos a partir de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína”

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

M en C. Eloy Rodríguez de León

Dirigido por:

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Co-dirigido por:

Dr. José Oscar Carlos Jiménez Halla

Querétaro, Qro., a Noviembre de 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

“Síntesis parcial, estudio computacional del mecanismo de formación,
uso en la síntesis de polímeros y evaluación de la actividad
vasorrelajante de carotenoides obtenidos a partir de la
(3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Químico Biológicas

Presenta

M en C. Eloy Rodríguez de León

Dirigido por:

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Co-dirigido por:

Dr. José Oscar Carlos Jiménez Halla

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Presidente

Dr. José Oscar Carlos Jiménez Halla
Secretario

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Vocal

Dra. María Alejandra Rojas Molina
Suplente

Dr. Rubén Antonio Romo Mancillas
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre, 2019.
México

RESUMEN

Los carotenoides son una familia de compuestos naturales con un papel sumamente importante en la naturaleza, ya que forman parte de la maquinaria fotosintética de las plantas y de algunos microorganismos. Además, estos compuestos son esenciales para el humano, porque ayudan a mantener una buena salud y a prevenir distintas enfermedades. A la fecha, se han aislado y caracterizado más de 750 carotenoides. De éstos, el β -caroteno, la β -criptoxantina, la luteína y la zeaxantina son los más ubicuos. Los carotenoides han cobrado importancia debido a que se les han encontrado diversas aplicaciones, tales como colorantes naturales en la industria avícola, acuícola y cosmética, así como aditivos nutraceuticos en la industria alimentaria y como suplementos e ingredientes activos en la industria farmacéutica. Sin embargo, los métodos actuales para producir estos compuestos, ya sea mediante extracción a partir de sus fuentes naturales o mediante síntesis total, no logran cubrir las demandas de su consumo o hacen muy cara su adquisición. En esta investigación, se desarrollaron nuevas estrategias que permitieron obtener de una forma sencilla y eficiente la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína (**1**), la (3*R*,3'*S*)-zeaxantina (**2**) y la (3*R*,3'*S*)-astaxantina (**3**). La (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína se obtuvo mediante la hidrólisis básica de sus ésteres naturales extraídos a partir de una fuente renovable, la oleorresina de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.), mientras que la (3*R*,3'*S*)-zeaxantina se obtuvo mediante una reacción de isomerización catalizada por base, a partir de **1** y a partir de los ésteres de luteína con rendimientos del 92 y 95% respectivamente. El compuesto **2** fue posteriormente oxidado para producir la (3*R*,3'*S*)-astaxantina. Con este proceso, se logró un rendimiento global del 68% y de hasta un 76%, cuando se irradió con luz UV (365 nm) durante la reacción. También se estudiaron, desde el aspecto computacional mediante cálculos a nivel DFT (Density-Functional Theory), los mecanismos de reacción de la conversión de **1** a **2** y de **2** a **3**. Estos cálculos teóricos revelan que la reacción de isomerización catalizada por base involucra la desprotonación del C-6' en el compuesto **1**, seguida de una protonación en el C-4', para llegar a la formación de **2**; mientras que la oxidación de **2** a **3** ocurre a través de un mecanismo *vía* radicales libres. Además, los tres carotenoides obtenidos (**1**, **2** y **3**) se utilizaron por primera vez como extendedores de cadena en la síntesis de poliésteres uretanos (PEUs), para con ello crear nuevos materiales que posean las bondades químicas de los carotenoides, tales como su poderoso efecto antioxidante. Estos PEUs fueron caracterizados química y físicamente, observándose que presentan propiedades mecánicas con un comportamiento plástico. Sin embargo, faltan más estudios para explorar los usos potenciales de estos nuevos materiales, por ejemplo, como fotoprotectores y antioxidantes. Finalmente, se evaluó de forma preliminar el efecto vasorrelajante de los compuestos **1**, **2** y **3** en el modelo de aorta de rata, encontrándose que la (3*R*,3'*S*)-astaxantina es la más potente de los tres ($CE_{50} = 3.3 \pm 2.1 \mu\text{M}$) y hasta 11 veces más potente que la acetilcolina ($CE_{50} = 37.4 \pm 8.9 \mu\text{M}$), la cual fue usada como control positivo. El efecto vasodilatador de la (3*R*,3'*S*)-astaxantina resultó ser similar al del fármaco comercial "neбиволол".

Palabras clave: Carotenoides, (3*R*,3'*S*)-astaxantina, síntesis parcial.

SUMMARY

The family of carotenoids is a class of compounds that play a very important role in nature, because they are part of the photosynthetic machinery of plants and some microorganisms. In addition, these compounds are essential for humans, as they help in the maintenance of health and the prevention of different diseases. To date, more than 750 carotenoids have been identified in the nature, being the most abundant β -carotene, β -cryptoxanthin, lutein, and zeaxanthin. These compounds have also gained importance, since they possess diverse applications at the industrial level, where they are employed as natural colorants in aquaculture, poultry, and in the cosmetic industry. They are also used as nutraceutical additives in food, and as supplements and active ingredients in the pharmaceutical industry. However, the current methods to produce these compounds through extraction from their natural sources or by total synthesis, do not satisfy the world demand, and consequently make them very expensive. In this research, new strategies have been developed to easily obtain the carotenoids (3*R*,3'*R*,6'*R*)-lutein (**1**), (3*R*,3'*S*)-zeaxanthin (**2**), and (3*R*,3'*S*)-astaxanthin (**3**). Compound **1** was obtained by base hydrolysis of its esters from the marigold (*Tagetes erecta* L.) oleoresin, a renewable source, while (3*R*,3'*S*)-zeaxanthin was obtained both through a base-catalyzed isomerization reaction of **1**, and from lutein esters, with 92% and 95% yields, respectively. Compound **2** was further oxidized to produce the xanthophyll **3**. This reaction was obtained with a global yield of 68%. The same oxidation performed with UV irradiation (365 nm) for 5 min provided a better global yield (76%). The poorly understood formation mechanisms of these two compounds were also investigated using Density-Functional Theory (DFT) calculations. These theoretical studies revealed that isomerization involves a base-catalyzed deprotonation at C-6', followed by C-4' protonation, while oxidation occurs via free radical mechanisms. In addition, the three carotenoids (**1**, **2**, and **3**) were used for the first time as chain extenders in the synthesis of polyester-urethanes (PEUs). These PEUs are new smart polymers which could potentially possess a photo-protector effect derived from the intrinsic chemical properties of the carotenoids, such as their antioxidant effects. The PEUs were chemical and physically characterized. The mechanical properties of these PEUs showed evident plastic behavior. However, more research into these novel PEUs is necessary to fully explore their potential uses as photoprotectors and antioxidant materials given the intrinsic chemical properties of carotenoids. Finally, the vasorelaxing effects of the three carotenoids were evaluated preliminary in the rat aortic rings assay. (3*R*,3'*S*)-astaxanthin produced the most potent vasodilator effect ($EC_{50} = 3.3 \pm 2.1 \mu\text{M}$), which was up to 11-fold more potent than acetylcholine ($EC_{50} = 37.4 \pm 8.9 \mu\text{M}$), the positive control employed. The vasodilator effect of (3*R*,3'*S*)-astaxanthin turn out to be similar to that of the commercial drug "nebivolol".

Keywords: Carotenoids, (3*R*,3'*S*)-astaxanthin, partial synthesis.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a la memoria de mi amado hermano

Adrián Rodríguez de León.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado.

Al **Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría-UAQ** (FOPER-2016 y FOPER-2019-00967) por aportar la mayor parte del financiamiento para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Moustapha Bah** por su gran apoyo, esfuerzo, dedicación y contribución en la realización de este trabajo.

Al **Dr. J. Oscar C. Jiménez-Halla** por su gran contribución en la realización de este trabajo, reconozco que sin su apoyo gran parte de este trabajo y las excelentes colaboraciones hechas no hubieran sido posible sin él.

Al **Dr. José Eduardo Báez** por su excelente amistad, apoyo y la gran dirección en la parte de la síntesis de los polímeros. Aunque no aparece como parte del comité de este trabajo su contribución al mismo es cuantiosa y muy valiosa.

A mi esposa **Marcela Valle** y mis hijos **Leonardo** y **Alejandro** por hacer que mi vida sea muy feliz.

A mis padres **Mine** y **Chaco**, y a mis hermanos **Hugo**, **Adrián** y **Perla** por darme su apoyo y cariño siempre.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Importancia de los carotenoides	3
2.1.1 Generalidades sobre los carotenoides	3
2.1.2 Clasificación de los carotenoides.....	4
2.1.3 Biosíntesis de carotenoides.....	6
2.1.4 Importancia económica global de los carotenoides	8
2.2 Luteína	9
2.2.1 Importancia de la luteína	9
2.2.2 Métodos de obtención de luteína.....	12
2.2.3 La luteína como material de partida para la síntesis de otros carotenoides.....	14

2.2.4	Aplicaciones industriales de la (3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,6' <i>R</i>)- luteína	16
2.3	Zeaxantina.....	17
2.3.1	Importancia de la zeaxantina.....	17
2.3.2	Método de síntesis de zeaxantina	18
2.4	Astaxantina.....	19
2.4.1	Importancia de la astaxantina.....	19
2.4.2	Método de obtención de la astaxantina	22
2.4.3	Importancia económica global de la astaxantina	24
2.5	Efectos de los carotenoides en el sistema cardiovascular	25
2.6	Polímeros a base de carotenoides	26
2.7	Estudios computacionales sobre la química de los carotenoides.....	28
3	JUSTIFICACIÓN	31
4	HIPÓTESIS.....	33
5	OBJETIVOS	34
5.1	Objetivo general.....	34
5.2	Objetivos particulares	34
6.	METODOLOGÍA	35
6.1	Hidrólisis de los ésteres de luteína	45
6.2	Extracción de los carotenoides de la oleoresina de flor de cempasúchil	37
6.3	Hidrólisis de los ésteres de luteína	37
6.4	Análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAR) .	38
6.5	Transformación de luteína a zeaxantina.....	38
6.6	Transformación de zeaxantina a astaxantina	39
6.7	Cálculos computacionales	39

6.8	Síntesis de Macrodiolos.....	41
6.9	Síntesis de Poliésteres uretanos	42
6.10	Evaluación del efecto vasorrelajante	43
6.11	Análisis estadístico y construcción de las curvas concentración respuesta	43
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
7.1	Extracción de los carotenoides de la oleoresina de la flor de cempasúchil	44
7.2	Hidrólisis de los ésteres de luteína	45
7.3	Caracterización de la (3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,6' <i>R</i>)- luteína.....	47
7.4	Síntesis parcial de la (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-zeaxantina a partir de la luteína y los ésteres de la luteína	51
7.5	Caracterización de la (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-zeaxantina	54
7.6	Estudio computacional del p <i>K</i> _a del protón H-6' de la luteína y del mecanismo de reacción de luteína a zeaxantina	58
7.7	Síntesis parcial de astaxantina a partir de la zeaxantina	61
7.8	Caracterización de la (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-astaxantina	64
7.9	Estudio computacional del mecanismo de conversión de zeaxantina a astaxantina	69
7.10	Síntesis de poliésteres uretanos utilizando las xantófilas 1, 2 y 3	72
7.10.1	Síntesis de los macrodiolos precursores de los PEUs.....	72
7.10.2	Caracterización de los macrodiolos precursores de los PEUs	73
7.11	Síntesis de los PEUs utilizando las xantófila 1, 2 y 3 como extendedores de cadena	75
7.12	Caracterización de los PEUs mediante RMN e IR.....	78
7.13	Calorimetría de los PEUs	80

7.14	Propiedades mecánicas de los PEus	84
7.15	Evaluación farmacológica preliminar de los compuestos 1, 2 y 3	88
8.	CONCLUSIONES	90
9.	REFERENCIAS.....	92
10.	ANEXOS	102

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ejemplos de carotenoides presentes en diversos organismos	3
2	Clasificación de la familia de los carotenoides	5
3	Estructura base de un carotenoide	5
4	Estructuras anatómicas del ojo humano	9
5	Estructura de la proteína StARD3 acoplada con la luteína	10
6	Imagen de la flor <i>Tagetes erecta</i> L.	12
7	Interacción de los carotenoides con la membrana celular	20
8	Isómeros configuracionales de la astaxantina	21
9	Isómeros geométricos de la astaxantina	22
10	Polímero derivado de astaxantina y D,L-lactida	27
11	Mecanismos antioxidantes de los carotenoides	29
12	Algunas propiedades de los carotenoides estudiadas usando metodologías de la química teórica	30
13	Cromatograma de los ésteres de luteína extraídos a partir de oleorresina de flor de cempasúchil	44
14	Espectros UV-Vis de los 5 picos mayoritarios en la mezcla rica en ésteres de luteína	45
15	Cromatograma de la luteína libre	46
16	Espectro de RMN de ^1H de la (3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,6' <i>R</i>)-luteína	48
17	Espectro de RMN de ^{13}C de la (3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,6' <i>R</i>)-luteína	48
18	HSQC de la (3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,6' <i>R</i>)-luteína.	49
19	Cromatograma de la zeaxantina obtenida a partir de 1	53
20	Espectro de RMN de ^1H de (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-zeaxantina	55
21	Espectro de RMN de ^{13}C de la (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-zeaxantina	56

22	^1H - ^1H COSY de la (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-zeaxantina	57
23	Perfil de energía calculado para la conversión of 1 a 2	60
24	Cromatograma de la (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-astaxantina obtenida	63
25	Coelución de la luteína, zeaxantina y astaxantina obtenidas en este trabajo	64
26	Espectro de RMN de ^1H de la (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-astaxantina	65
27	Espectro de RMN de ^{13}C de la (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-astaxantina	66
28	HMBC de la (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-astaxantina	67
29	Espectro de RMN de ^1H del macrodiol con GP = 10	75
30	Fotografías de las películas de los PEUs	77
31	Espectro de RMN de ^{13}C del PEU derivado de 2	78
32	Espectros IR del PEU obtenido a partir del macrodiol 1 con DP= 5 y 1 , macrodiol con DP= 5 y el compuesto	80
33	Termogramas de los cuatro macrodioles	81
34	Termogramas de los PEUs sintetizados a partir del macrodiol con GP = 10	82
35	Termogramas de los PEUs derivados del macrodiol con DP= 20 y los diferentes extendedores de cadena (J-N).	83
36	Efecto del grado de polimerización de la PCL en la cristalinidad de los PEUs	84
37	Propiedades mecánicas del PEU derivado del 1,8-octanodiol y el macrodiol con GP = 5	85
38	Propiedades mecánicas del PEU derivado del compuesto 3 y el macrodiol con GP = 5	86
39	Curvas concentración–respuesta de los carotenoides y algunos fármacos antihipertensivos comerciales	88

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema		Página
1	Biosíntesis de carotenoides	7
2	Síntesis total de la (3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,6' <i>R</i>)-luteína	13
3	Síntesis parcial de carotenoides a partir de la (3 <i>R</i> ,3' <i>R</i> ,6' <i>R</i>)-luteína	15
4	Síntesis total de la (3 <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-zeaxantina	18
5	Rutas de síntesis (A-D) para la obtención de astaxantina	23
6	Producción industrial de astaxantina a partir del alga <i>H. pluvialis</i>	24
7	Hidrólisis de los ésteres de luteína	45
8	Síntesis de (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-zeaxantina	51
9	Síntesis de zeaxantina a partir de los ésteres de luteína	53
10	Síntesis de la (3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-astaxantina	61
11	Rutas posibles para la oxidación de zeaxantina a astaxantina	70
12	Mecanismo radicalario plausible para la oxidación de 2 a 3	71
13	Síntesis de macrodioles	72
14	Síntesis de PEUs utilizando las xantófilas 1, 2 y 3 como extendedores de cadena	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Aplicaciones de algunos carotenoides en las actividades humanas y sus fuentes principales de obtención	8
2	Proporción de ésteres de luteína presentes en la oleorresina	13
3	Fuentes naturales de astaxantina y relación de sus estereoisómeros	22
4	Estudios del efecto de la astaxantina sobre la presión sanguínea	25
5	Gradiente utilizado para el análisis de las reacciones	38
6	Condiciones de hidrólisis de los ésteres de luteína	46
7	Datos espectroscópicos de RMN para la luteína	50
8	Optimización de las condiciones de reacción para la obtención de 2	51
9	Condiciones de reacción para la obtención de 2 a partir de los ésteres de luteína “one-pot”	54
10	Datos espectroscópicos de RMN para la zeaxantina	58
11	Valores calculados de pKa del protón H-6' en la luteína	59
12	Reacción de oxidación de (3R,3'S)-zeaxantina a (3R,3'S)-astaxantina	61
13	Datos espectroscópicos de RMN para la (3R,3'S)-astaxantina	68
14	Síntesis de macrodioles derivados del 1,8-octanodiol y CL	73
15	Condiciones de reacción, propiedades térmicas y mecánicas de los PEUs	87

ABREVIATURAS Y SIGLAS

Ach: Acetil colina

BHT: Butil hidroxi tolueno

CDI: 1,1-Carbonil diimidazol

CDCl₃: Cloroformo deuterado

CIP(O)(Et)₂: 2-Cloro, 1,3-dimetilimidazolio dietilfosfito

CL: ε-caprolactona

DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DBN: 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno

DCE: 1,2-dicloro etano

DCM: Dicloro metano

DFT: Teoría de Funcionales de la Densidad

DIBAL-H: Hidruro de diisobutil aluminio

DIPEA: *N,N*-Diisopropil etil amina

DMF: *N,N*-Dimetil formamida

DMSO: Dimetil sulfóxido

HDI: 1,6-Diisocianato de hexametileno

IPP: Pirofosfato de Isopentenilo

LDA: Diisopropil amiduro de litio

MTBE: Metil terbutil éter

Oct: 1, 8-octanodiol

Sn(Oct)₂: Octanoato de estaño (II)

TEA: Trietil amina

TMS: Tetrametil silano

1. INTRODUCCIÓN

La necesidad de desarrollar estrategias que permitan obtener compuestos con efectos benéficos en la salud humana de una forma eficiente, es un tema de gran importancia, ya que a la fecha los procesos industriales para producir moléculas con fines nutricionales, cosméticos y/o farmacéuticos, conllevan distintos pasos de producción en los cuales se generan desechos contaminantes, bajos rendimientos o simplemente no son lo suficientemente eficientes. Por lo tanto, es importante desarrollar métodos que permitan obtener compuestos con aplicación para la actividad humana o con efectos biológicos positivos para la salud, al mismo tiempo es importante buscar estrategias que permitan optimizar, abaratar y hacer más eficiente la obtención de estas moléculas. Existen diversos métodos que pueden llevar a la obtención de compuestos con potenciales aplicaciones. Dos de los más comunes son la extracción a partir de productos naturales y la síntesis orgánica. El primero ayuda a conocer los metabolitos secundarios con actividad biológica presentes en un organismo. Este método ha servido de inspiración para el segundo. Por su parte, la síntesis se basa en una construcción planificada de moléculas mediante reacciones químicas. Asimismo, existe una estrategia en la que convergen los métodos mencionados. Esta estrategia consiste en utilizar moléculas obtenidas a partir de una fuente natural, y a partir de éstas, realizar modificaciones químicas para llegar a la construcción de otras moléculas con mayor valor agregado que los compuestos de partida. Este método, conocido como síntesis parcial o semi-síntesis, es una estrategia eficiente para la obtención de compuestos que difícilmente se pueden obtener a través de síntesis total.

Existe una gran diversidad de moléculas provenientes de fuentes naturales que ejercen efectos benéficos sobre la salud humana, entre las que se encuentran las de la familia de los carotenoides. Estos compuestos destacan por poseer una potente actividad antioxidante y también por estar involucrados en la maquinaria foto-sintética de las plantas y de algunos microorganismos. Actualmente, los carotenoides han cobrado importancia debido a que se les han encontrado diversas aplicaciones a nivel industrial, tales como colorantes naturales en la industria

avícola, acuícola y cosmética, como aditivos nutraceuticos en la industria alimentaria y como suplementos e ingredientes activos en la industria farmacéutica.

La flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) es una fuente significativa del carotenoide (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína, el cual puede ser utilizado como materia prima para síntesis parciales que conducen a la obtención de otros carotenoides que puedan tener importante actividad biológica o aplicación industrial. Entre los compuestos que se pueden obtener a partir de la luteína, tal vez el más importante es su isómero conocido como zeaxantina, el cual, al igual que la luteína, presenta efectos que contrarrestan la degeneración macular causada por la edad. También la zeaxantina es materia prima para la síntesis parcial de otro carotenoide, la astaxantina, la cual cuenta con amplia demanda a nivel global. Esta última se ha reportado como uno de los mejores antioxidantes hasta ahora conocidos.

Resulta importante por lo tanto la búsqueda de estrategias sintéticas eficientes que permitan obtener la (3*R*,3'*S*)-zeaxantina y la (3*R*,3'*S*)-astaxantina a partir de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína extraída de la flor de cempasúchil. Asimismo, estos compuestos pueden ser utilizados como extendedores de cadena en la síntesis de poliésteres uretanos (PEUs) con la intención de crear nuevos materiales que adquieran las propiedades químicas de los carotenoides, tales como su poderoso efecto antioxidante.

Finalmente, cabe mencionar que diversos estudios poblacionales han descrito que una dieta rica en carotenoides ayuda a prevenir las enfermedades cardiovasculares, entre otras. Por lo tanto, es importante conocer el efecto vasodilatador de estos compuestos con la intención de explorar su potencial como agentes antihipertensivos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia de los carotenoides

2.1.1. Generalidades sobre los carotenoides

Los carotenoides son un grupo de compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, muchos de los cuales son importantes para la nutrición y para la salud humana [1-2]. A la fecha, se han aislado y caracterizado más de 750 carotenoides presentes en diversos organismos naturales, incluyendo distintas especies de plantas, microorganismos como bacterias y algas, hongos, organismos acuáticos y en algunas aves [3-4]. En la **Figura 1**, se presentan las estructuras de algunos de los carotenoides más comunes.

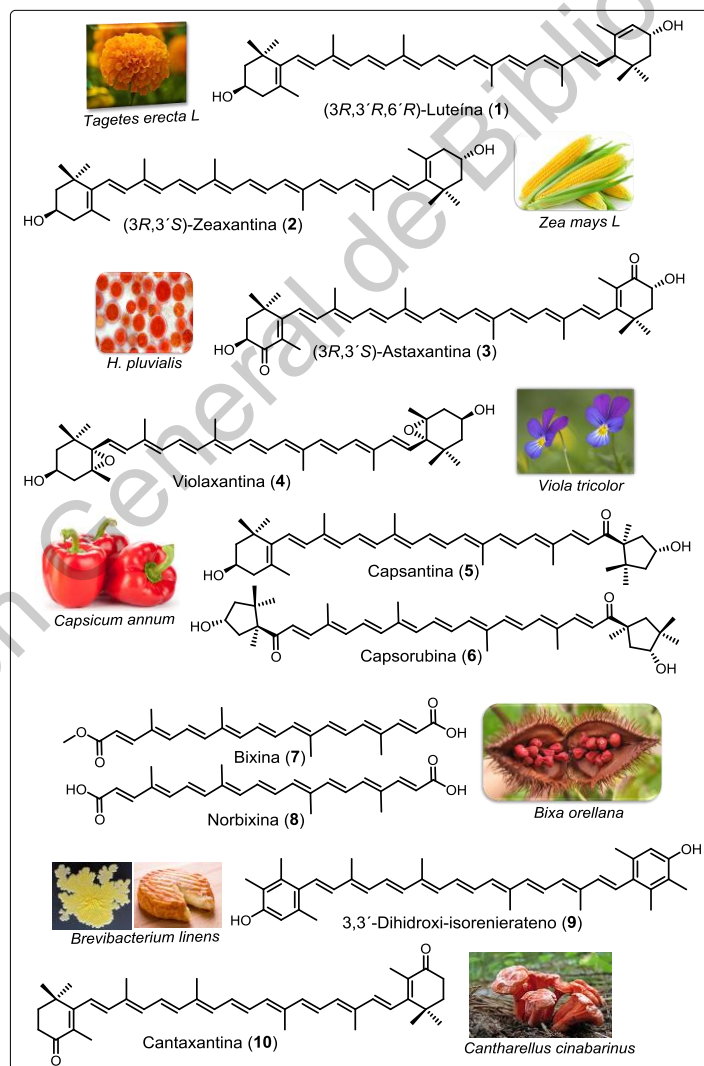


Figura 1. Ejemplos de carotenoides caracterizados en diversos organismos.

Por ejemplo, la luteína (1) se ha encontrado en cantidades significativas en los pétalos de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.) [5], la zeaxantina (2) en el maíz variedad amarilla (*Zea mays*), de donde deriva su nombre [6] y la astaxantina (3) en el exoesqueleto de la langosta marina (*Astacus gammarus* L.) [7]. Sin embargo, el alga de agua dulce conocida como *Haematococcus pluvialis* (*H.pluvialis*) contiene la mayor cantidad de astaxantina natural [8]. También el carotenoide conocido como violaxantina (4) está presente en los pétalos de las flores de *Viola tricolor* (planta conocida comúnmente como pensamiento) [9]. En el fruto de la planta *Capsicum annum*, “pimiento morrón”, se hallan la capsantina (5) y capsorrubina (6) [10]. En las semillas del fruto de la *Bixa Orellana*, conocida en nuestro país como “achiote”, se encuentran los norcarotenoides bixina (7) y norbixina (8) [11]. Por otra parte, en la bacteria *Brevibacterium linens* utilizada para la maduración de algunos quesos (Munster, Limburger, Wisconsin brick, entre otros) se ha caracterizado el 3,3'-dihidroxi-isorenierateno (9) [12]. En la especie del hongo *Cantharellus cinabarinus*, se ha descubierto la cantaxantina (10), razón por la cual recibe ese nombre [13]. Asimismo, de algunos vegetales, se han aislado en una alta concentración el β -caroteno (11) (Figura 2) presente en la zanahoria (*Daucus carota*) [14] y el licopeno (12) (Figura 2) del jitomate (*Solanum lycopersicum*) [15]. Dentro de la amplia variedad de carotenoides distribuidos en la naturaleza, el α -caroteno, el β -caroteno, la (3R)- β -criptoxantina (14) (Figura 2), (1) y (3R,3'R)-zeaxantina son los más abundantes [16].

Asimismo, los carotenoides han cobrado importancia debido a que son compuestos coloridos, por lo que son ampliamente utilizados como pigmentos en las industrias alimentaria, avícola, acuícola, cosmética y farmacéutica [17,18]. Pero también, hay otras razones por las que han llamado la atención, y éstas se deben a que presentan efectos benéficos para la salud.

2.1.2. Clasificación de los carotenoides

Los carotenoides son los principales responsables del color brillante presente en algunos organismos que van de la escala del amarillo al rojo [19]. Químicamente,

son polienos altamente conjugados. Éstos son una familia de compuestos constituida por dos grupos que pueden ser clasificados con base en su estructura química como: carotenos y xantófilas (**Figura 2**) [20]. Los carotenos son los compuestos que están constituidos únicamente por carbono e hidrógeno; entre éstos, se encuentran el β -caroteno (**11**), el licopeno (**12**) y el nonapreno (**13**), por mencionar algunos. Las xantófilas son los compuestos que están constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno; la β -criptoxantina (**14**), el 3,3'-dihidroxi-isorenierateno (**15**) y la fucoxantina (**16**) son ejemplos de este grupo [2].

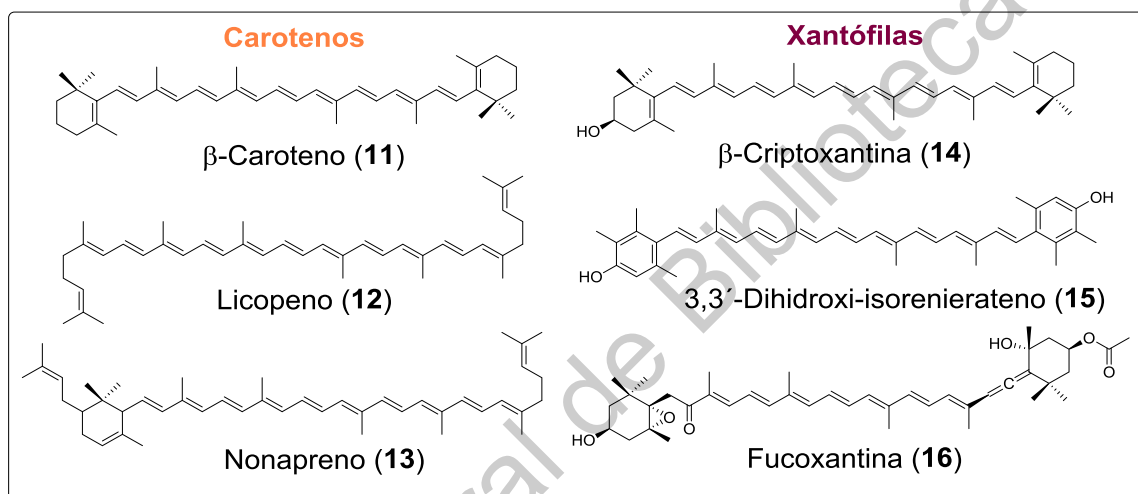


Figura 2. Clasificación de la familia de los carotenoides.

La mayoría de las estructuras de los carotenoides proviene del esqueleto base mostrado en la **Figura 3**. Dichas estructuras pueden ser lineales o contener ciclos en los extremos de la molécula [21].

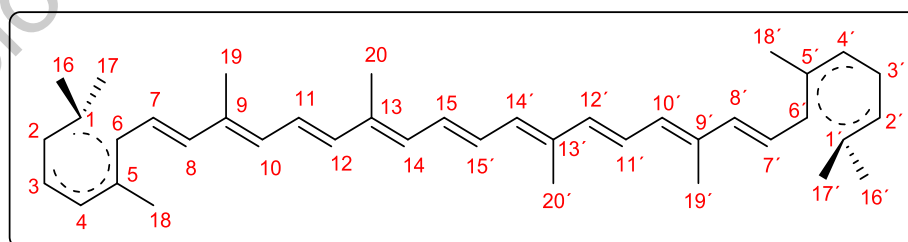


Figura 3. Estructura base de un carotenoide.

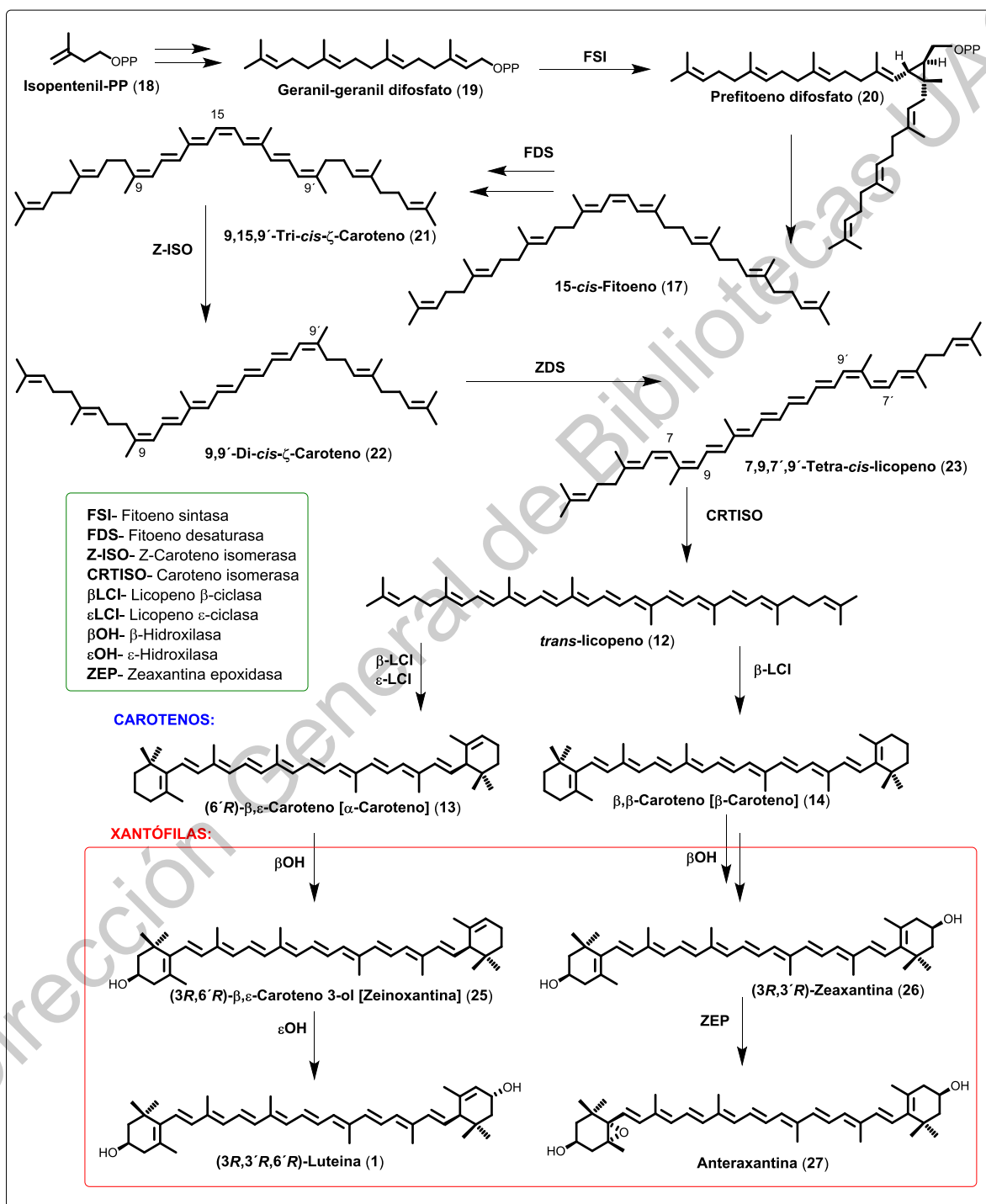
2.1.3. Biosíntesis de carotenoides

La gran mayoría de los más de 750 carotenoides hasta ahora conocidos en la naturaleza provienen del tetraterpeno fitoeno (**17**) [1] obtenido a partir de la ruta que utiliza como unidad biosintética inicial el difosfato de isopentenilo (o isopentenil pirofosfato: IPP) (**18**), proveniente de la ruta del ácido mevalónico y del 4-fosfato del 2-C-metileritritol (MEP) (de sus siglas en inglés: *MethylErythritol Phosphate*) que a su vez se origina de la vía del monofosfato de desoxi xilulosa. Por muchos años, se creyó que, en la mayoría de los organismos vivos, los terpenoides provenían exclusivamente de la ruta del ácido mevalónico, pero recientemente, se ha descubierto que se originan mayoritariamente de la vía del MEP (**Esquema 1**) [22].

La biosíntesis de carotenoides comienza cuando dos moléculas de geranilgeranil difosfato (**19**) llevan a cabo la dimerización “cola con cola”, de forma contraria a la unión común de las dos unidades biosintéticas fundamentales de esta ruta, el dimetil alil pirofosfato y el IPP, para formar la parte central del carotenoide (prefitoeno difosfato, **20**). La formación y apertura del anillo de ciclopropano tetrasustituido del compuesto **20** es asistida, en la biosíntesis de las plantas, por luz UV y la enzima fitoeno sintasa (**FSI**), la cual genera el 15-*cis*-fitoeno (**17**). Subsecuentemente, una serie de reacciones de des-hidrogenación catalizadas por la enzima fitoeno desaturasa (**FDS**) dan origen al compuesto 9,15,9'-tri-*cis*- ζ -caroteno (**21**), el cual se isomeriza al compuesto 9,9'-di-*cis*- ζ -caroteno (**22**) por la acción de la enzima ζ -caroteno isomerasa (**Z-ISO**) y luz. El isómero di-*cis* (**22**) es transformado en el compuesto 7,9,7',9'-tetra-*cis*-licopeno (**23**) por la enzima ζ -caroteno desaturasa (**ZDE**). La conversión final al licopeno *trans* (**12**) es llevada a cabo por la enzima caroteno isomerasa (**CRTISO**) [1].

El licopeno puede llevar a cabo una ciclación intramolecular para producir los diversos anillos terminales en los carotenoides por acción de las ciclasas (**LCIs**). La ϵ -licopeno ciclasa (ϵ -**LCI**) es una enzima concomitante que lleva a la formación del compuesto α -caroteno (**25**). La generación de las xantófilas es catalizada por las β -hidroxilasas y ϵ -hidroxilasas, para lograr la hidroxilación de los anillos correspondientes. La mono-epoxidación del anillo β de la (3*R*,3'*R*)-zeaxantina (**26**)

puede llevar a la formación de la anteraxantina (**27**) y asimismo la di-epoxidación del anillo β de la zeaxantina por la acción de la enzima zeaxantina epoxidasa (**ZEP**) genera el carotenoide violaxantina (**4**) (**Figura 1**).








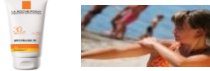
Esquema 1. Biosíntesis de carotenoides.

Finalmente, las modificaciones del polieno insaturado C₄₀ por oxidación (hidroxilasas y cetolasas), transposiciones y escisiones forman los diferentes esqueletos de la familia de los carotenoides [22–24].

2.1.4. Importancia económica global de los carotenoides

Los carotenoides son moléculas con una alta demanda a nivel global debido a que se les han encontrado diversas aplicaciones a nivel industrial (**Tabla 1**) [25]. Con propósitos comerciales, los carotenoides son obtenidos mediante síntesis química o, aunque menos frecuentemente, a partir de fuentes naturales. Cabe mencionar que algunas fuentes naturales proporcionan una menor cantidad de compuesto comparada con la obtenida a partir de síntesis [25].

Tabla 1. Aplicaciones de algunos carotenoides en las actividades humanas y sus fuentes principales de obtención.

Carotenoide	Fuente	Aplicación	
Astaxantina	Síntesis total y <i>H. pluvialis</i>	Pigmentación acuícola	
Luteína	<i>Tagetes erecta</i> L.	Pigmentación avícola	
β-caroteno	Síntesis total y <i>Daucus carota</i>	Precursor de vitamina A [26]	
Bixina y Norbixina	<i>Bixa orellana</i>	Colorante alimentario E160b	
Capsantina y capsorubina	<i>Capsicum annum</i>	Colorante y saborizante	
3,3'-dihidroxiisorenierateno	Síntesis total	Fotoprotector [27]	

Actualmente, el 85% la demanda mundial de los carotenoides, la cual se encuentra en aumento, es abastecida por dos empresas, la alemana BASF® y la suiza DSM® [28].

Un estudio publicado por la BCC Research revela que, en el año 2017, el mercado de los carotenoides a nivel global estaba valuado en \$1500 millones de dólares y se espera que para el año 2022, este mercado alcance un valor aproximado de \$2000 millones de dólares, siendo la astaxantina, uno de los de mayor demanda a nivel mundial [28].

2.2. Luteína

2.2.1. Importancia de la luteína

La luteína (1) es un derivado dihidroxilado del α -caroteno. Se ha comprobado que el consumo de luteína está directamente relacionado con la disminución de la degeneración macular causada por la edad, la cual es una de las principales causas de ceguera en el Occidente [29]. La luteína en el cuerpo humano se acumula selectivamente dentro de la retina humana, preferentemente en la zona conocida como la mácula lútea (**Figura 4**) [30], por lo que se han observado altas concentraciones de esta molécula en este órgano humano [30]. Asimismo, en diversos estudios, se ha observado y cuantificado la presencia de este carotenoide en el suero y leche de origen humano [31].

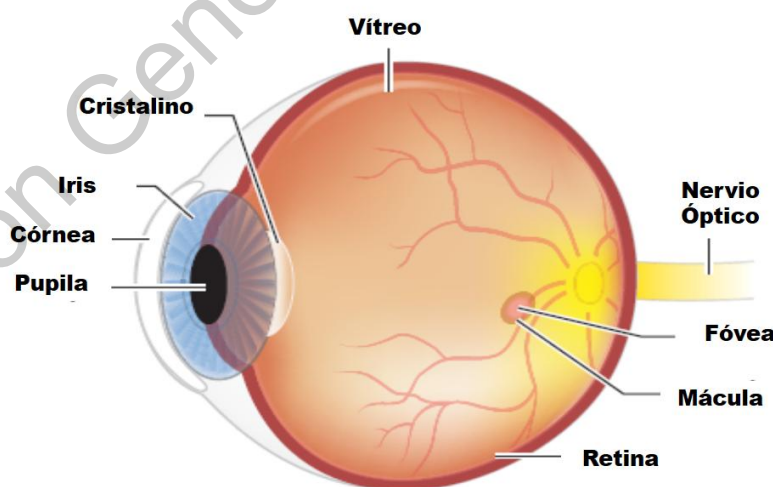


Figura 4. Estructuras anatómicas del ojo humano (adaptación a partir de [30]).

La presencia de la luteína en una zona específica del tejido ocular la hace única entre todos los carotenoides existentes en el cuerpo humano [31]. Actualmente, se piensa que, en los humanos, así como en las plantas, la luteína funciona mediante dos importantes mecanismos: el primero como un filtro de la luz azul de alta energía, y el segundo como un antioxidante que atrapa y neutraliza a las especies reactivas de oxígeno, cuya producción es catalizada por la luz [32].

La acumulación selectiva de la luteína en la mácula lútea, en el centro de la retina, ha sido atribuida a la existencia de proteínas específicas que se enlazan a este carotenoide y contribuyen a su alojamiento. Se ha identificado que el blanco de unión de la luteína en la mácula lútea es la proteína StARD3, y que ésta es la responsable de su distribución y estabilidad en el tejido ocular. La estructura cristalina del dominio de enlazamiento a la luteína en StARD3 ha sido determinada mediante difracción de rayos-X, con una resolución de 1.74 Å (**Figura 5**) [33]. Esta proteína presenta en su estructura una cavidad asimétrica que puede jugar un papel determinante en la selectividad hacia la luteína, debido a que ésta presenta dos anillos, α y β -iononas, a diferencia de los dos anillos de α -ionona que presentan otros carotenoides como la (3*R*,3'*R*)-zeaxantina (**26**) o la *meso*-zeaxantina, mismas que no son enlazadas por StARD3.

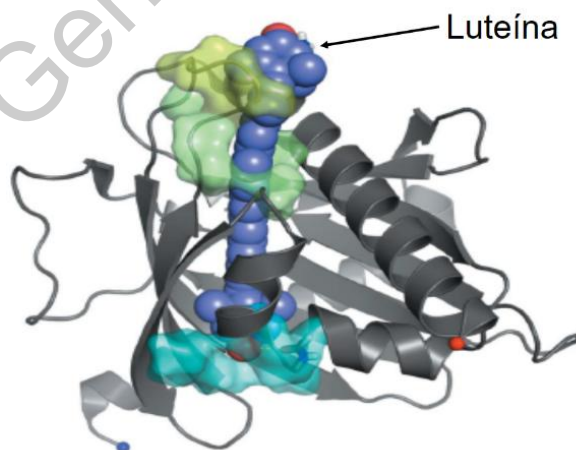


Figura 5. Estructura de la proteína StARD3 acoplada con la luteína (adaptada de [33]).

Otra proteína importante para la absorción de la luteína en el cuerpo humano es SR-B1, la cual ha sido recientemente identificada como un blanco de unión de ésta en la retina y este mismo receptor juega un papel importante en su absorción selectiva en el intestino [31].

Por otra parte, diversos estudios han mostrado que las xantófilas **1**, **2** y **26** encontradas en la retina, están positivamente correlacionadas con la velocidad de procesamiento visual. Asimismo, se ha reportado una relación significativa entre la densidad óptica de la pigmentación macular (DOPM) y un gran número de medidas visuales como la incapacidad de deslumbramiento, la recuperación del estrés y el contraste cromático [34]. La cantidad de luteína y zeaxantina presentes en la retina está fuertemente relacionada con la presencia de estos carotenoides en el tejido cerebral y en la DOPM, la cual ha sido también enlazada con las habilidades mediadas por el cerebro, tales como la cognición, el umbral auditivo, el balance de tiempo, el tiempo de reacción y la visión temporal [35].

En las últimas décadas, la investigación sobre los efectos biológicos de **1** en el cuerpo humano ha tenido un mayor enfoque en el área ocular y se ha encontrado que este carotenoide es un potencial agente para la prevención de la degeneración macular por edad (*Age-related Macular Degeneration*, AMD por sus siglas en inglés), la inflamación ocular, la catarata y la foto-fobia [32]. Algunos estudios han demostrado que la dieta suplementada con luteína es capaz de prevenir el desarrollo de catarata en ratas diabéticas, mientras que eliminarla de la dieta ha resultado en señales de degeneración temprana en la retina [36].

Aunque la luteína es conocida principalmente por su importancia en el ojo humano, este carotenoide ha demostrado ser un potencial agente terapéutico en una amplia variedad de desórdenes no oculares. Por ejemplo, estudios recientes sugieren que la luteína y la zeaxantina pueden ayudar a mantener una buena salud cardíaca por la disminución de los riesgos de la aterosclerosis [32].

Otro de los efectos terapéuticos que se le han evaluado a la luteína es su efecto foto-protector. Un estudio a nivel *in vitro* en cultivo de células epiteliales y del

cristalino del ojo humano muestra que la luteína puede inhibir la per-oxidación lipídica inducida por luz UV-B [32]. Por actuar como un filtro de la luz azul en los cristalinios y como parte de los pigmentos maculares, la luteína puede proteger a las estructuras retinales fundamentales, así como a los foto-receptores del daño provocado por la luz [37]. Además del efecto foto-protector en el ojo, la piel es otro sitio en donde la luteína juega un papel en la protección contra la luz solar y del posible daño provocado por la exposición a la radiación UV [31]. En otro estudio, se demostró que la administración de luteína en la piel de ratones desnudos inhibe la proliferación de las células epidérmicas y el eritema inducido por la luz UV-B hasta en un 50 % [31].

2.2.2. Métodos de obtención de luteína

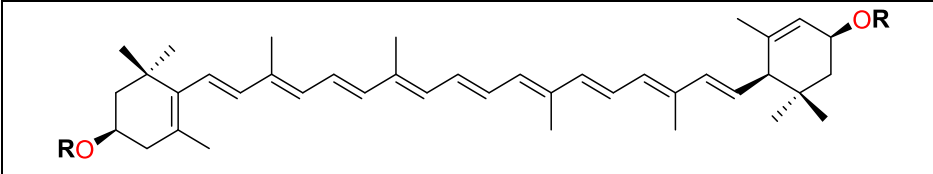
Actualmente, la principal fuente de luteína es la oleorresina de la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L., **Figura 6**). Esta última es obtenida a partir de los pétalos de ésta [38].



Figura 6. Imagen de la flor *Tagetes erecta* L.

La luteína proveniente de la flor de cempasúchil se encuentra en su forma di-esterificada con distintos ácidos grasos (**Tabla 2**), siendo el di-palmitato el principal [39]. Otros ésteres presentes en la flor son los derivados de los ácidos mirístico y esteárico, así como los di-ésteres mixtos derivados de estos ácidos.

Tabla 2. Proporción de ésteres de luteína presentes en la oleorresina.

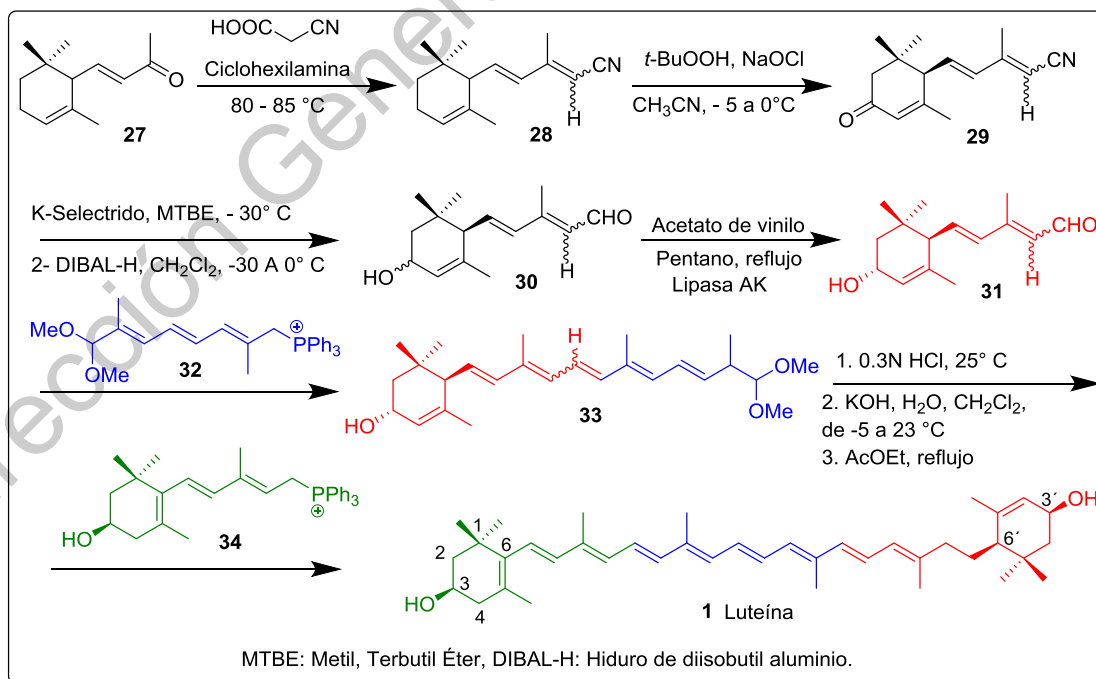


Tipo de éster (R)	Porcentaje (%)
Palmitato	35.5
Miristato	12.6
Miristato y palmitato	24.7
Palmitato y estearato	14.4
Estearato	2.4

La cantidad de los ésteres de luteína presentes en la flor de cempasúchil varía desde los 4 hasta los 800 mg/kg de flor seca [39].

Otro de los métodos que se han implementado para obtener luteína es a través de su síntesis total. El principal reto que presenta la síntesis de esta molécula es por la presencia de tres centros quirales en las posiciones C3, C3' y C6' de su estructura, lo que resulta en la generación de ocho posibles estereoisómeros [40].

La publicación más reciente y eficiente sobre la síntesis de la luteína ha sido utilizando la α -ionona (**27**) como material de partida (**Esquema 2**).



Esquema 2. Síntesis total de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína.

Esta síntesis comienza con la condensación de Knoevenagel con ácido ciano-acético en presencia de ciclohexilamina, lo cual genera el nitrilo **28** como una mezcla de isómeros. La oxidación alílica en la posición 3 del compuesto **28** fue llevada a cabo con *t*-BuOOH y NaOCl. El paso de la reducción de la cetona y el grupo nitrilo del compuesto **29** fue llevado a cabo con una mezcla de los reactivos K-Selectrido e hidruro de diisobutil aluminio (DIBAL-H), formándose una mezcla de diastereoisómeros del compuesto **30** [(3*R*,6*R*) y (3*S*,6*R*)], donde el (3*R*,6*R*) predomina. Los dos diastereoisómeros fueron separados utilizando una acilación enantio-específica con acetato de vinilo y la enzima lipasa AK obtenida de *Pseudomonas fluorescens*. Después de 48 horas, el isómero (3*R*,6*R*) (**31**) fue obtenido con un exceso enantiomérico del 94%. El compuesto **31** y el iluro de fósforo **32** permitieron el alargamiento de la cadena a través de una reacción de Wittig.

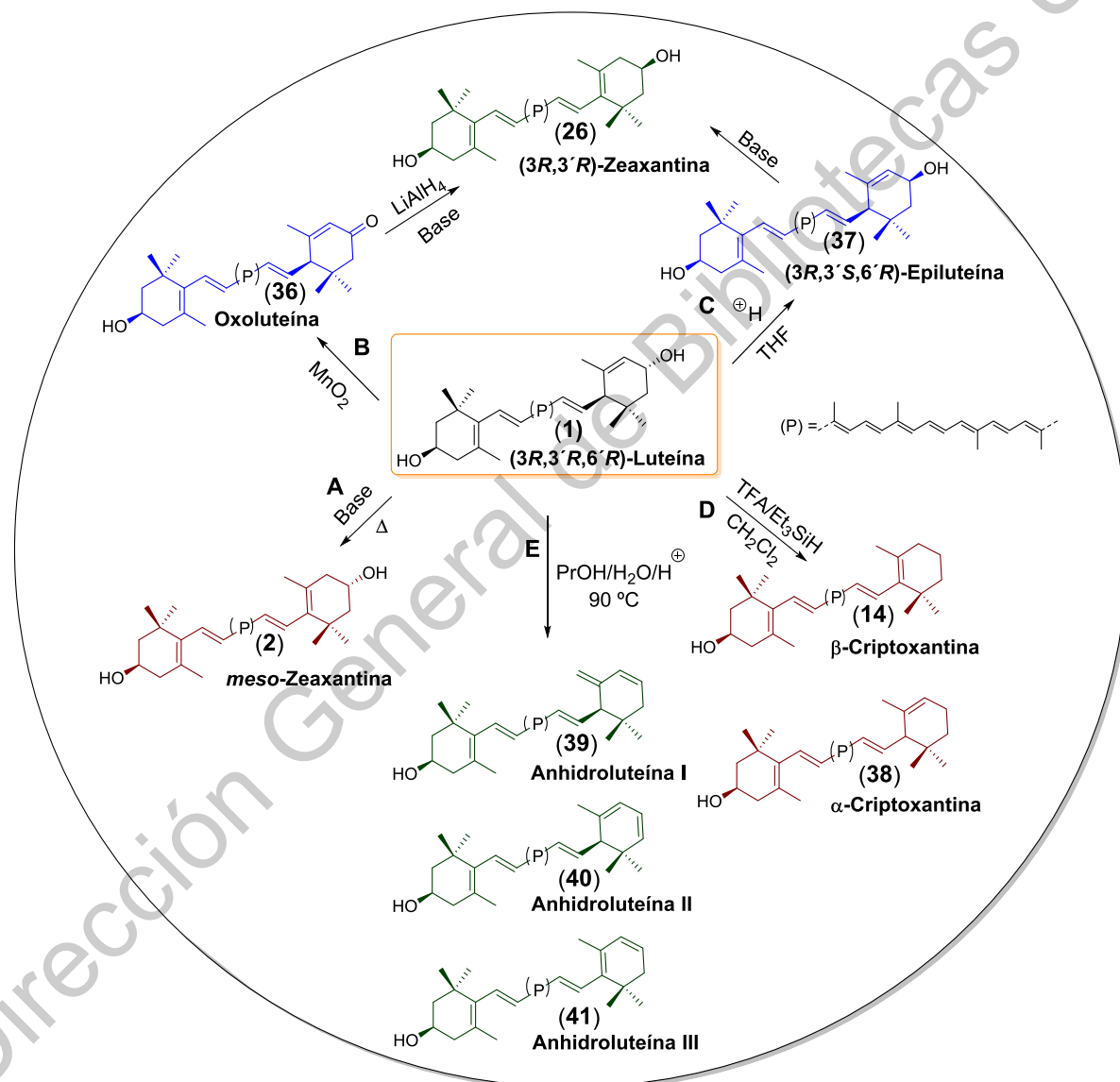
La hidrólisis del grupo acetal en **33** y la posterior isomerización por el tratamiento con acetato de paladio en acetato de etilo forman mayoritariamente el aldehído con una geometría *trans*, el cual es sometido a una segunda reacción de Wittig con la sal de fosfonio (**34**) para formar la mezcla de isómeros en una proporción 99:1, siendo el isómero *trans* el mayoritario [1]. El rendimiento global para la síntesis de **1**, obtenido a través de esta ruta, es de apenas el 5 % después de 7 pasos de reacción [40].

2.2.3. La luteína como material de partida para la síntesis de otros carotenoides

La (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína también ha servido como material de partida para obtener otros carotenoides, tales como las α y β -criptoxantinas, las anhidroluteínas y la (3*R*,3'*R*)-zeaxantina (**Esquema 3**) [41].

Así, en presencia de base y calor, la luteína es capaz de isomerizarse al carotenoide (3*R*,3'*S*)-zeaxantina, también conocido como *meso*-zeaxantina (**ruta A, Esquema 3**) [42,43], aunque el mecanismo de esta transformación no está del todo esclarecido. También, la oxidación del hidroxilo alílico en **1**, usando MnO₂, genera la oxoluteína (**36**) (**ruta B**) [44], la cual es después isomerizada y posteriormente reducida para generar una mezcla racémica de

(3*R*,3'*S*)-zeaxantina y (3*R*,3'*R*)-zeaxantina. Otra estrategia que se ha seguido para obtener un alto rendimiento de la (3*R*,3'*R*)-zeaxantina es mediante la epimerización de **1** en medio ácido a la 3'-epiluteína (**37**). En esa reacción, se lleva a cabo la inversión de la configuración del hidroxilo alílico unido al C-3', cuya posterior isomerización genera la (3*R*,3'*R*)-zeaxantina (**ruta C, Esquema 3**) [45,46]; se ha reportado que este proceso de epimerización de **1** ocurre en la cocción de vegetales verdes [47].



Esquema 3. Síntesis parcial de carotenoides a partir de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína.

Asimismo, Khachik y colaboradores han utilizado la luteína de origen natural como precursor para la síntesis parcial de los carotenoides α -criptoxantina (**38**) y β -criptoxantina (**14**) (**ruta D**). Ellos describen un proceso industrialmente viable para la transformación directa de **1** al compuesto ópticamente activo **14** con un alto rendimiento mediante la desoxigenación alílica con un ácido fuerte y una variedad de donadores de iones hidruro [48]. Finalmente, el tratamiento a alta temperatura y medio ácido cataliza la deshidratación de **1**, formando una mezcla de anhidroluteínas (**39-41**), con un rendimiento global del 86 % (**ruta E**) [49].

2.2.4. Aplicaciones industriales de la (3R,3'R,6'R)-luteína

La luteína ha encontrado su principal aplicación en la pigmentación de la piel de pollo y la yema de huevo. La demanda global de este producto es de cerca de 13.5 millones de toneladas anualmente [50]. La luteína es una molécula que ha recibido desde el año 2001 el reconocimiento como un aditivo alimenticio inocuo, o "GRAS (*generally recognized as safe*)" en los Estados Unidos, lo cual permite su uso como aditivo en ciertos alimentos y bebidas, tales como cereales, barras de cereal, jugos de fruta y bebidas [32]. A nivel industrial, el mercado para la luteína fue de 135 millones de dólares estadounidenses en el año 2015. Su fuerte aplicación en los suplementos y la creciente demanda de productos funcionales pueden favorecer un aumento en el consumo de este carotenoide [50].

Debido al papel de la luteína y la zeaxantina en la salud del ojo humano, incluyendo la prevención de la degeneración macular por edad, alrededor del mundo se consumen suplementos que contienen estas xantófilas [51]. Este consumo ha resultado en un negocio que representa millones de dólares en el mercado global. Asimismo, los estudios sobre este compuesto han obtenido suficiente evidencia científica sobre sus efectos benéficos en la salud. En ese mismo sentido, varios estudios observacionales han mostrado que se debe de consumir, al menos, 6 mg de luteína diariamente para lograr una protección de enfermedades maculares. En occidente, se ha reportado que sólo se consume diariamente entre 1 y 2 mg de **1**, lo que sugiere un déficit en el consumo [52]. Este hecho representa una oportunidad

de mercado para cubrir la falta de estas xantófilas en la dieta de la población occidental.

Finalmente, el mercado de la luteína en el área de la nutrición humana se espera que tenga expectativas de crecimiento del 5.3% para el año 2024. Esta expectativa de crecimiento es debido, al menos en parte, a los crecientes desórdenes oculares tales como el glaucoma, las cataratas, la degeneración macular por edad y la retinopatía diabética, lo cual puede influir en el crecimiento de esta industria [53].

2.3. Zeaxantina

2.3.1. Importancia de la zeaxantina

La zeaxantina es el carotenoide que se ha encontrado de forma más abundante en el maíz amarillo (*Zea mays L*) (**Figura 1**), del cual deriva su nombre. Algunas fuentes naturales de zeaxantina son: la yema de huevo, el maíz, las mandarinas, las naranjas y los vegetales verdes [54].

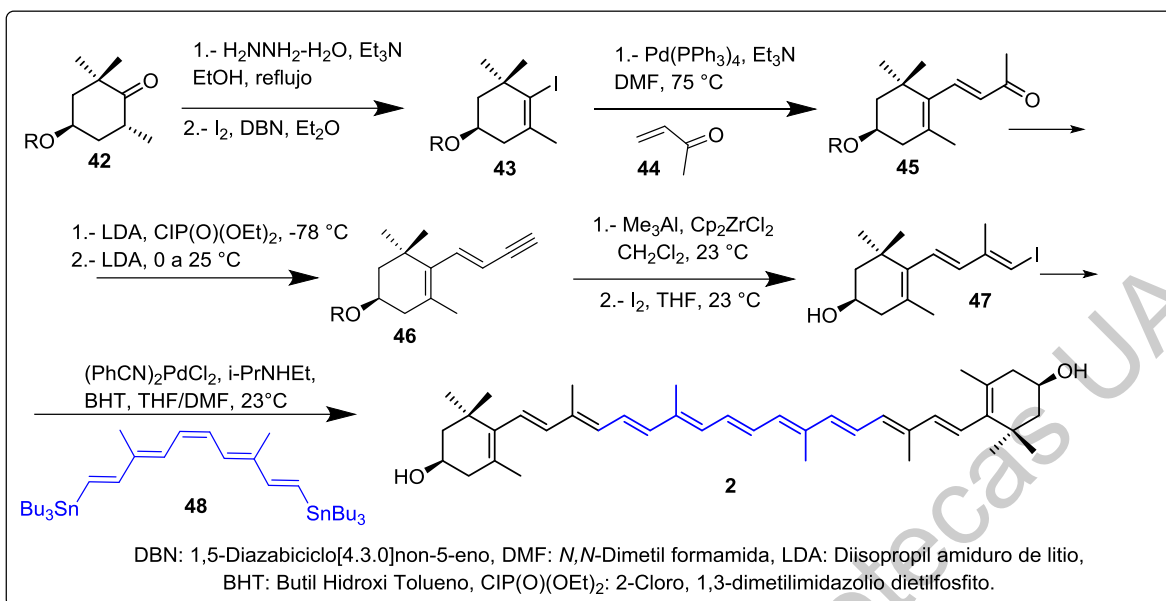
En el cuerpo humano, la zeaxantina está concentrada en la retina, en donde, en conjunto con la luteína, forman la pigmentación macular. La zeaxantina se ha encontrado presente en el ojo humano, principalmente como una mezcla en proporción 50:50 de sus estereoisómeros (**2**) y (**26**) [55]. Se piensa que la (3*R*,3'*S*)-zeaxantina debe formarse a partir del metabolismo de la luteína, debido a que no se reconoce como un producto de origen natural [56,57]. Sin embargo, esto indica que el consumo de luteína puede contribuir al incremento de la concentración de *meso*-zeaxantina en la mácula. La relación global de luteína y zeaxantina en la retina es de 2:1, pero esta misma relación en el centro de la mácula es inversa, es decir, de 1:2. Esta variación en la distribución de estos carotenoides en el ojo humano puede deberse a la expresión de proteínas específicas para estas moléculas en dichos sitios [58].

La zeaxantina ha mostrado una importante relación entre su consumo diario y la reducción del riesgo de degeneración macular por edad [1]. La degeneración

macular y la enfermedad en el ojo humano por cataratas son de las principales causas de ceguera a nivel mundial en personas mayores de 40 años. Se estima que para el año 2020, la degeneración macular por edad se incrementa en una tercera parte en el Reino Unido y hasta en un 50 % en los Estados Unidos. Por lo tanto, el consumo de estos carotenoides es importante para retardar estos padecimientos [29]. En un estudio reciente sobre la toxicidad de esta molécula en ratas, y en específico de la *meso*-zeaxantina, se concluyó que no existe evidencia de su toxicidad, mutagenicidad y/o efectos perjudiciales a nivel hematológico, así como tampoco efectos histopatológicos negativos. Estas observaciones indican que el uso de *meso*-zeaxantina es seguro a una dosis de 300 mg/kg al día en ratas después de administrar el compuesto de manera oral durante 13 semanas consecutivas. De este estudio, se concluye que no existe toxicidad alguna del compuesto por lo que puede ser apto para el consumo humano [59].

2.3.2. Método de síntesis de zeaxantina

La síntesis de zeaxantina más eficiente hasta ahora reportada fue realizada utilizando la reacción de acoplamiento cruzado de Stille y partiendo de la cetona (**42**) (**Esquema 4**) [60,61]. Esta síntesis continúa con la reacción de acoplamiento de Heck entre el yodato de ciclo-hexenilo (**43**) con la metil-vinil cetona (**44**) para elongar la cadena y formar el compuesto **45**. Posteriormente, se genera a partir de **45** el alquino terminal **46**, para formar a partir de éste el yoduro (**47**).



Esquema 4. Síntesis total de la (3*R*,3'*R*)-zeaxantina.

Por otra parte, el pentaenil-bis-estano (48) fue preparado por la condensación entre el 3-metil, 2,4-pentadienil, 5-tributilestaño, 2-sulfonil benzotiazol, y el 3-metil, 5-tributilestaño, 2,4-pentadienal, ambos preparados a partir del alcohol correspondiente [60]. El acoplamiento final mediante la reacción de acoplamiento cruzado de Stille permite formar la molécula de zeaxantina (2) con un rendimiento global del 70 % y después de 5 pasos de reacción [1].

2.4. Astaxantina

2.4.1. Importancia de la astaxantina

El nombre astaxantina incluye en realidad a tres isómeros configuracionales. La astaxantina es el principal carotenoide encontrado en animales acuáticos de origen marino tales como el salmón, la trucha, el camarón, la langosta y el krill [62]. Se ha reportado que este compuesto posee una elevada actividad antioxidante, aproximadamente 10 veces mayor que el β -caroteno y de hasta 100 veces mayor que el α -tocoferol [62]. El poderoso efecto antioxidante de esta molécula se ha demostrado a nivel *in vitro* e *in vivo*. En un estudio donde se evaluaron cinco distintos carotenoides (zeaxantina, luteína, β -caroteno, licopeno y astaxantina) en un modelo de peroxidación lipídica sobre membranas enriquecidas con ácidos

grasos poliinsaturados, se ha encontrado una correlación entre la estructura química de estos compuestos con la forma en la que se orientan en la membrana lipídica (**Figura 7**), lo cual pudo ser comprobado usando difracción de rayos X de ángulo pequeño [63].

Los carotenoides de baja polaridad, como el β -caroteno, desordenan la bicapa de la membrana, mientras que la astaxantina preserva la estructura al internarse en ella; de esta forma, esta xantófila suprime la penetración de especies reactivas de oxígeno al interior de la célula (**Figura 7**). Estos resultados sugieren que el potencial antioxidante de los carotenoides a nivel *in vivo* depende de sus distintas interacciones con la membrana celular [64].

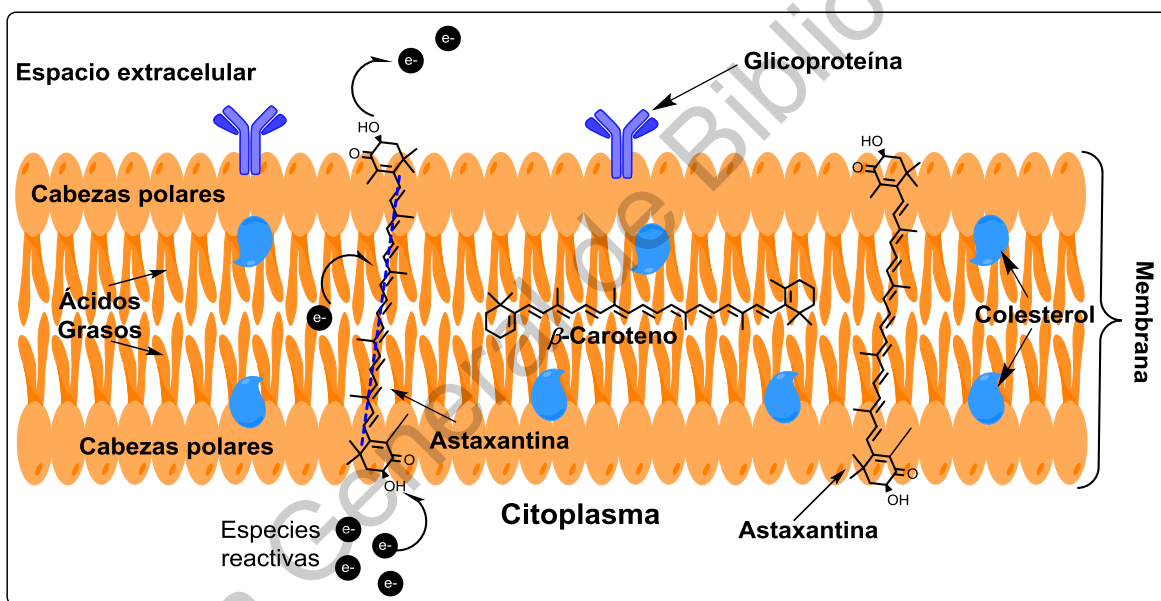


Figura 7. Interacción de los carotenoides con la membrana celular (Adaptación a partir de [65]).

El efecto biológico de la astaxantina se ha explorado principalmente en el sistema cardiovascular. Por ejemplo, su efecto sobre la presión sanguínea ha sido evaluado en ratas espontáneamente hipertensas (REH). En este estudio, hubo una reducción significativa en la presión sanguínea después de 14 días de administración por vía oral de este compuesto [65]. Esta molécula administrada por

vía oral también mejora la producción de óxido nítrico (NO), el cual está involucrado en la relajación vascular [66–69].

Para evaluar la biodisponibilidad de la astaxantina (**3**), se ha realizado un estudio aleatorizado de doble ciego en 28 voluntarios sanos. Los participantes consumieron 250 g de salmón (5 µg/g de **3**). Al medir los niveles de los tres estereoisómeros de la astaxantina (**Figura 8**) en el plasma de los participantes, el análisis muestra que el nivel del (3*S*,3'*S*) aparece más elevado, comparado con los de los dos estereoisómeros restantes. Esto sugiere que dichos estereoisómeros deben tener diferente biodisponibilidad [70].

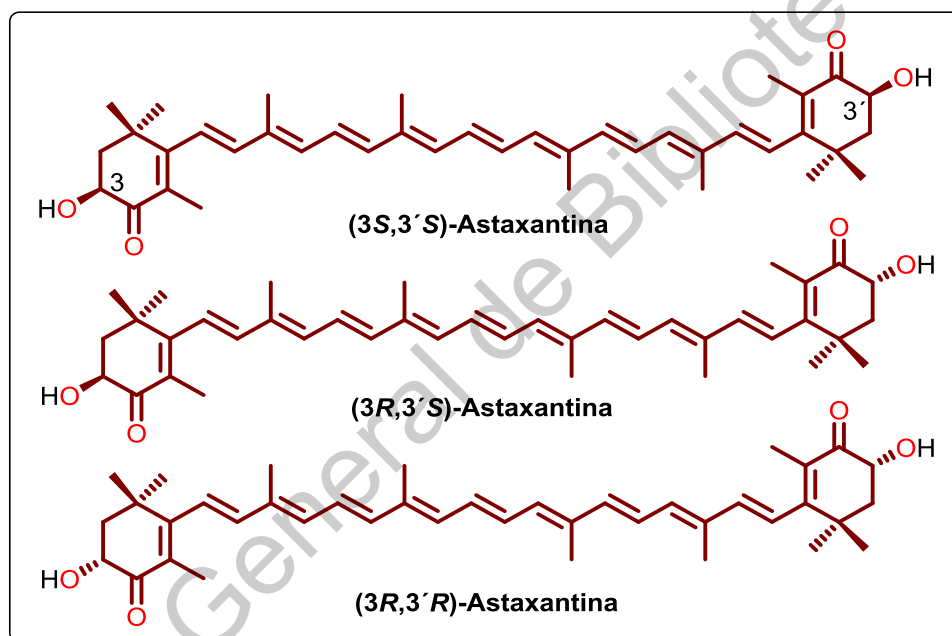


Figura 8. Isómeros configuracionales de la astaxantina.

Con base en estos resultados, se ha especulado acerca del efecto de los estereoisómeros de la astaxantina, proponiéndose un mayor efecto biológico por parte del isómero con configuración (3*S*,3'*S*). Sin embargo, en un estudio sobre la inhibición del crecimiento celular en líneas de cáncer de colon, los autores demostraron que las orientaciones espaciales de los grupos hidroxilos en los carbonos C-3 y C-3' no ejercen una diferencia significativa sobre la actividad anticancerígena de **3**, lo cual no está de acuerdo con las actividades previamente

propuestas para los estereoisómeros individuales [70]. En ese mismo sentido, se ha evaluado la actividad antioxidante de isómeros geométricos *E/Z* de esta xantófila (**Figura 9**), utilizando el radical DPPH. Después de la aplicación de una concentración de la mezcla que contenía isómeros geométricos de di-ésteres de este carotenoide [65], se encontró que los isómeros *cis*, en particular el 9-*cis*, presenta una actividad antioxidante cuatro veces mayor, comparada con la del isómero *trans*.

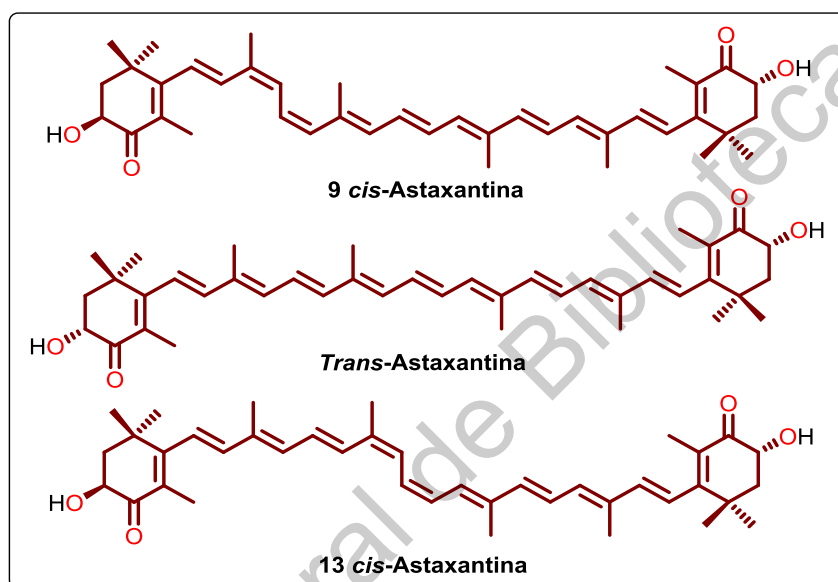


Figura 9. Isómeros geométricos de la astaxantina.

2.4.2. Métodos de obtención de la astaxantina

Se han encontrado diversas fuentes naturales de la astaxantina, en las cuales se reportan distintas proporciones de sus tres estereoisómeros (**Tabla 3**).

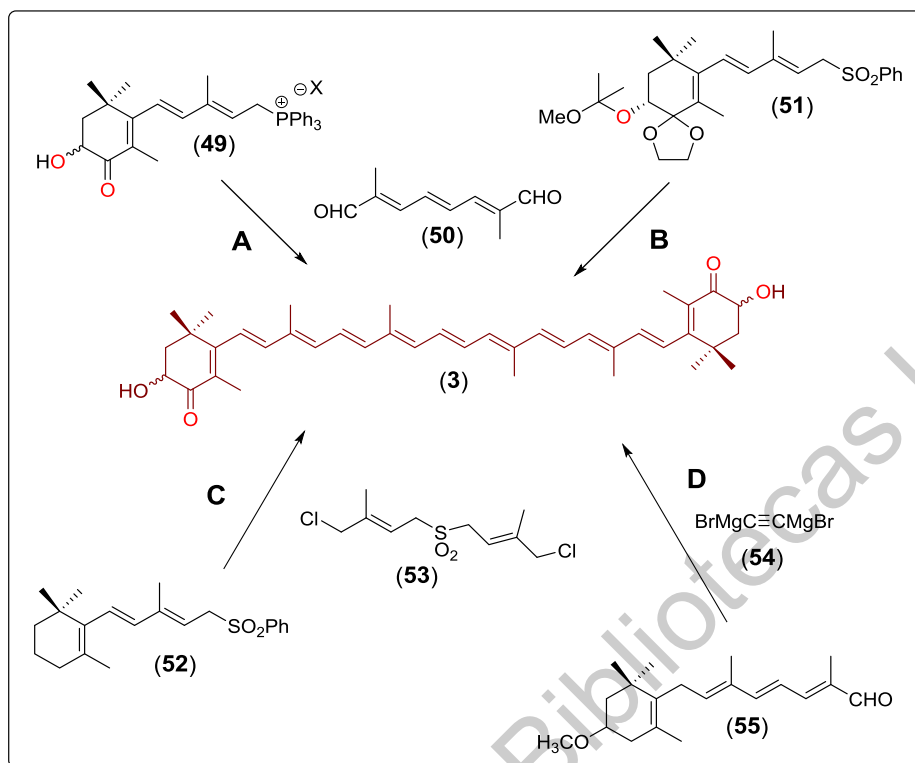
Tabla 3. Fuentes naturales de astaxantina y relación de sus estereoisómeros.

Fuente natural	Estereoisómeros en %			Referencia
	(3 <i>S</i> ,3' <i>S</i>)	(3 <i>R</i> ,3' <i>R</i>)	(3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)	
Salmón (<i>Salmo salar</i>)	78-85	12-17	2-6	[71]
Camarón (<i>Pandalus borealis</i>)	12-25	23-46	50-53	[72]

Alga <i>H.pluvialis</i>	100	-	-	[74]
<i>Adonis annua</i>	100	-	-	[74]
<i>Phaffia Rhodozyma</i>	2	98	-	[75]
Langosta <i>Hommarus gammarus</i>	50	30	20	[76,77]
Krill del ártico <i>Euphausia superba</i>	9	21	70	[75]
Camarón noruego <i>Acanthephyra purpurea</i>	20	40	15	[75]

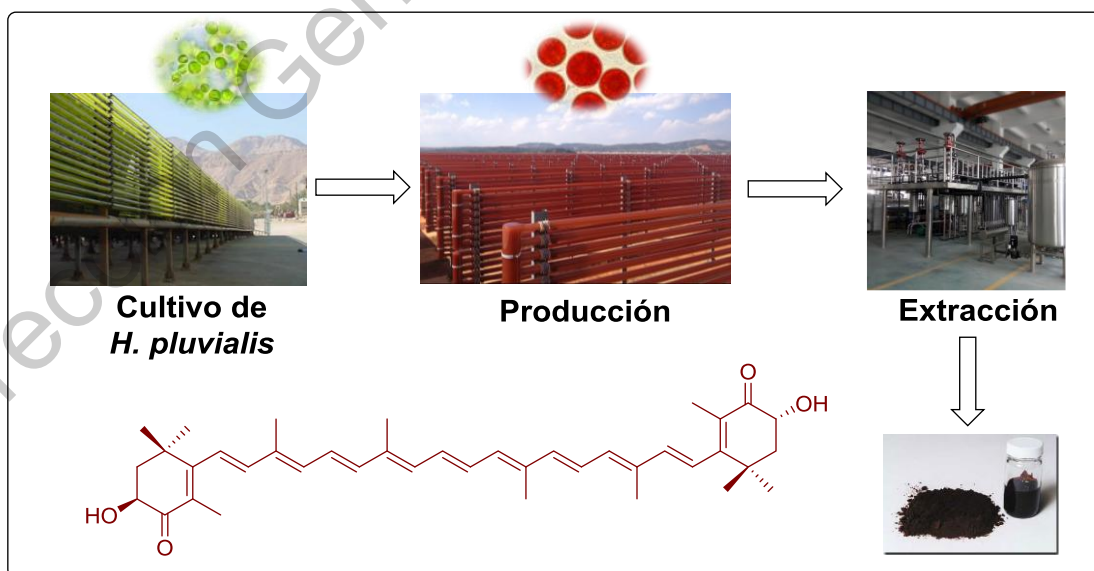
Hoy en día, la astaxantina comercial se obtiene a nivel industrial principalmente mediante síntesis total [73], la cual proporciona una mezcla de los tres estereoisómeros (3*S*,3'*S*), (3*R*,3'*S*) y (3*R*,3'*R*) en una proporción 1:2:1 respectivamente (**Figura 8**) [74].

La síntesis total indicada en la **ruta A (Esquema 6)** es la que proporcionó mayor rendimiento global (52%) después de 7 etapas de reacción a partir de dos equivalentes del iluro de fosforo (**49**) y el di-aldehído (**50**) [78]. En ese mismo año el mismo grupo de investigación propuso la **ruta B**, a partir de la cetona protegida (**51**) y el aldehído **50**. En esta ruta se obtuvo un rendimiento global del 47% [79]. La **ruta C** es una propuesta en la cual se pueden obtener fácilmente oxi-carotenoides como la cantaxantina, astaxantina y astaceno a través de la reacción de Ramberg-Bänklund y los reactivos **52** y **53** con un 46% de rendimiento [80]. Otra ruta (**ruta D**) y la primera descrita para la obtención de este compuesto, es donde se utiliza el reactivo de Grignard (**54**) y dos equivalentes del aldehído (**55**) aunque esta reacción procede con bajo rendimiento (15%) [81].



Esquema 5. Rutas de síntesis (A-D) para la obtención de astaxantina.

La segunda fuente de la astaxantina comercial a nivel industrial es a través del proceso de extracción supercrítica a partir del alga de agua dulce *Haematococcus pluvialis* (**Esquema 5**) [74,81].



Esquema 6. Producción industrial de astaxantina a partir del alga *H. pluvialis*.

2.4.3. Importancia económica global de la astaxantina

En 1987, la FDA aprobó la astaxantina como aditivo para su uso en la industria acuícola y en 1999 fue aprobado para su uso como suplemento nutracéutico [73].

En la acuicultura, **3** es un constituyente importante de los alimentos para peces. Debido a que el salmón y otros animales marinos no pueden sintetizar este compuesto, de *novo*, es necesario incluirlo en la dieta para obtener un color muscular rojizo, esencial en la aceptación del consumidor [82]. Los productores de salmón utilizan las xantófilas rojas **3** y **10** sintéticas como aditivos alimentarios, lo cual ocasiona que estos aditivos constituyan los componentes más costosos en la formulación del alimento, representando entre el 10 y el 15% del costo total. Los productos a base de **3** para la industria acuícola contienen entre el 1.5 y el 2% [82].

La astaxantina ha sido producida a una escala industrial principalmente mediante síntesis total. Desde 1990, la empresa Roche comenzó con la producción de esta molécula y prácticamente abasteció el mercado mundial. Tiempo después, varias compañías como Cyanotech, Algatex, Fuji, entre otras, se han fundado para competir por la venta de este compuesto. En el año 2000, **3** tenía un valor comercial de entre 2,500 y 3,500 dólares estadounidenses por kilogramo [83]. Para el año 2011, la astaxantina poseía un valor de mercado de 200 millones de dólares anuales.

Por otra parte, derivado de los estudios en el sistema cardiovascular de **3** también se han creado empresas dedicadas a la comercialización de este compuesto y sus derivados; por ejemplo, Cardax Pharmaceuticals® comercializó la sal di-sódica del di-éster succínico de la astaxantina (Cardax) como un agente capaz de tratar la osteoartritis, desórdenes metabólicos implicados en pacientes con diabetes y padecimientos cardiovasculares [84,85].

2.5. Efectos de los carotenoides en el sistema cardiovascular

En el sistema cardiovascular, la astaxantina es la que más ha destacado, comparada con otros carotenoides. Diversos estudios en ratas espontáneamente hipertensas (EHT) y normotensas han demostrado que la astaxantina es capaz de disminuir la presión arterial (**Tabla 4**) [86].

Tabla 4. Estudios del efecto de la astaxantina sobre la presión sanguínea.

Fuente (Proveedor)	Configuración	Modelo animal	Dosis y duración	Resultado (Concentración)	Referen.
Natural del <i>H. pluvialis</i> (Fuji chemical)	(3S,3'S)	Ratas Wistar kioto	50 mg/kg 2 semanas	Disminución de 18 mmHg	[62]
Sintética (BASF)	No especifica	Ratas EHT	75 y 200 mg/kg 8 semanas	Disminución de 24 mmHg (75 mg/Kg) Disminución de 28 mmHg (200 mg/Kg)	[87]
Sintética (Sigma Aldrich)	(3S,3'S), (3S,3'R), (3R,3'R)	Ratas EHT	300 y 600 mg/kg 3 semanas	Disminución de 25 mmHg (300 mg/Kg) Disminución de 27 mmHg (600 mg/Kg)	[74]

En el modelo de aorta aislada de rata, sólo el compuesto **3** entre las xantófilas obtenidas en este proyecto ha sido evaluado. Sin embargo, los estudios sobre el efecto de **3** en este modelo han evaluado el compuesto proveniente del alga *H. pluvialis*, que como se ha descrito anteriormente, es el isómero (3S,3'S), pero en sus formas libre, mono y di esterificadas. Esta mezcla indujo vasorrelajación mediante la vía del óxido nítrico (NO) a una concentración de entre 1 y 10 µM [82, 83,61]. También se ha reportado el efecto de la astaxantina sintética (comercializada por la empresa alemana BASF) en este mismo modelo y utilizando la aorta obtenida de ratas espontáneamente hipertensas. De este estudio, se determinó que el efecto vasodilatador de la astaxantina sintética no es dependiente del endotelio [87].

Finalmente, es importante mencionar que la astaxantina con configuración (3*R*,3'*S*) no ha sido evaluada en este modelo en su forma pura.

2.6. Polímeros a base de carotenoides

La necesidad de buscar y/o desarrollar nuevas estrategias para encontrar fármacos con un efecto biológico benéfico en la salud, o potenciar el efecto de fármacos ya existentes, es uno de los principales retos de la química medicinal. Actualmente, se ha planteado y estudiado como una alternativa el desarrollo de nuevos materiales que permitan la liberación de una o varias moléculas con actividad biológica en su sitio activo para de esa forma potenciar el efecto y lograr una mayor disponibilidad. El desarrollo de polímeros biodegradables como nuevos materiales amigables con el ambiente y la actual necesidad de incorporar moléculas bioactivas en sistemas poliméricos para sistemas de liberación *in vivo* es un área que ha cobrado interés en los últimos años [88,89]. Ejemplos de compuestos bioactivos en sistemas poliméricos son los polímeros biodegradables de la curcumina, los cuales mostraron buenos efectos citotóxicos hacia varias líneas celulares de cánceres humanos [90,91]. Sin embargo, moléculas con actividades biológicas importantes como los carotenoides pudieran ser usadas para crear nuevos polímeros “bioactivos”, nombrados recientemente como “poliactivos” [92].

Con respecto a los polímeros derivados de carotenoides publicados hasta la fecha, solamente existen dos reportes en los cuales la astaxantina ha sido utilizada. En ninguno de los dos artículos se indicó la estereoquímica del isómero de astaxantina utilizado para la obtención de los polímeros. En el primero, la astaxantina fue usada como un iniciador de la polimerización por apertura de anillo para obtener poli-lactidas (**Figura 10**) [93].

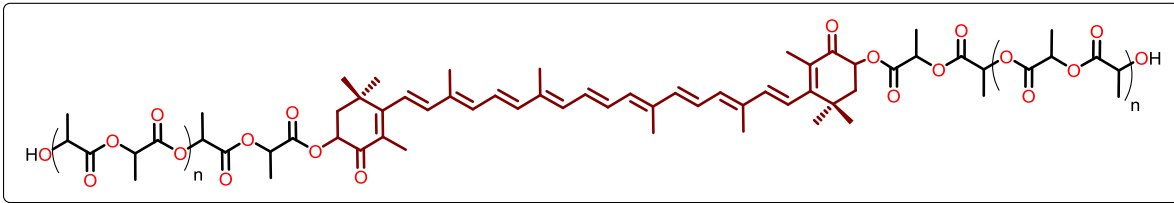
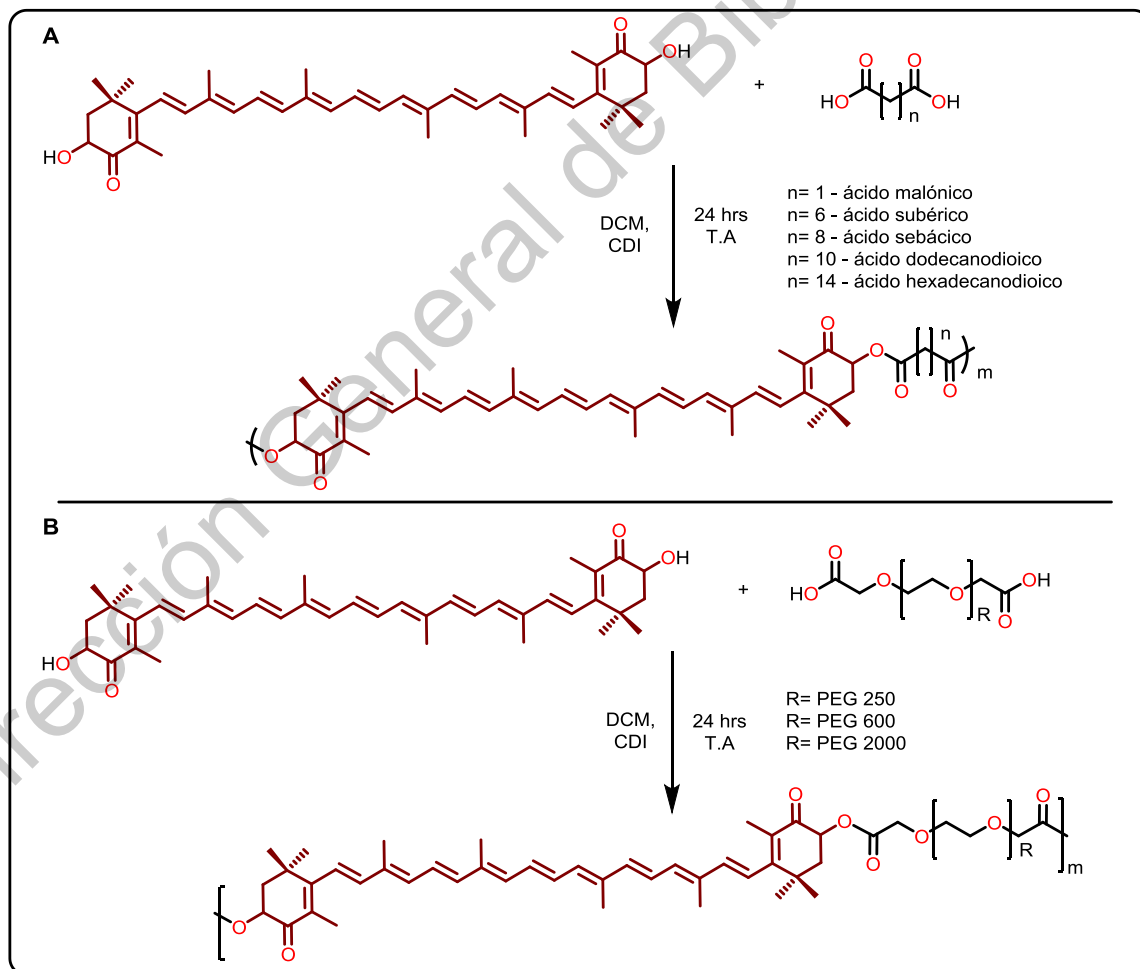


Figura 10. Polímero derivado de astaxantina y D,L-lactida.

En el segundo artículo, la astaxantina fue utilizada como un co-monomero para la síntesis de “poliactivos”. En este reporte, se usaron una serie de di-ácidos carboxílicos (**Esquema 6A**) y diferentes di-ácidos derivados del poli-etilenglicol (**Esquema 6B**). Estos compuestos están enfocados al desarrollo de nuevos materiales con propiedades anti-bacterianas para aplicaciones en sistemas tanto *in vitro* como *in vivo* [92].



Esquema 6. Síntesis de polímeros derivados de astaxantina.

Debido a que las xantófilas **1**, **2** y **3** son dioles (**Figura 1**), éstos han sido buenos iniciadores para producir poliésteres tales como poli lactidas. Sin embargo, estas xantófilas nunca antes han sido utilizadas como extendedores de cadena en la síntesis de poliésteres uretanos.

2.7. Estudios computacionales sobre la química de los carotenoides

Desde el punto de vista de la química teórica se han estudiado a los carotenoides desde varios aspectos tales como su calor de formación, sus estados electrónicos excitados y los mecanismos radicalarios que siguen para secuestrar a las especies reactivas de oxígeno (ERO) (**Figura 11**) [94].

Dirección General de Bibliotecas UAQ

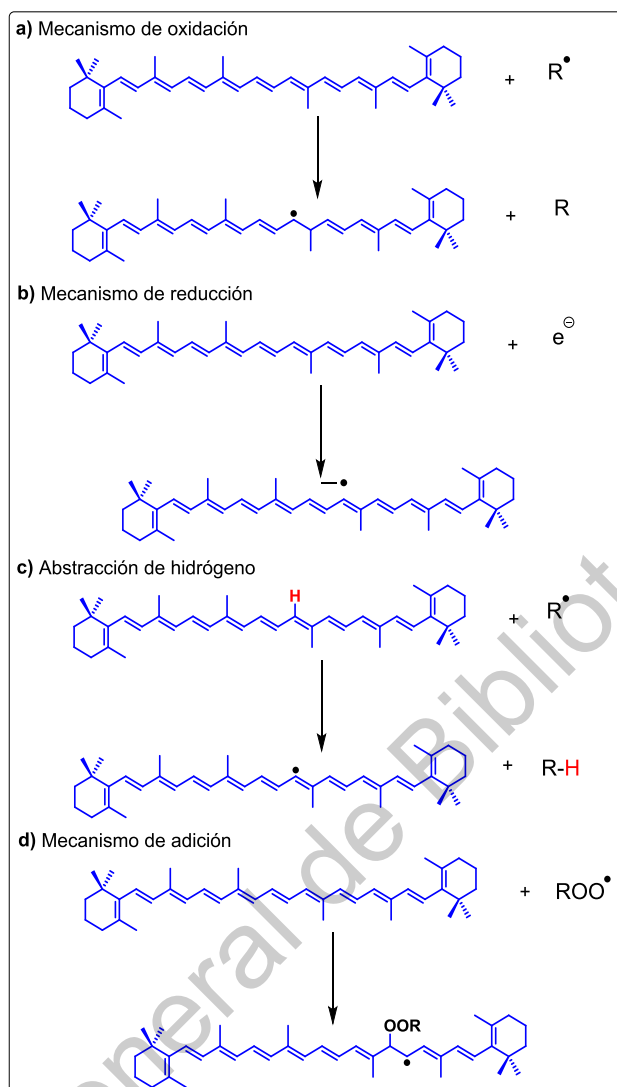


Figura 11. Mecanismos antioxidantes de los carotenoides.

De los cuatro mecanismos propuestos para estos compuestos (**Figura 11**), el más estudiado, experimental y teóricamente, es el de la abstracción de hidrógeno [95]. Derivado de estos estudios, se ha encontrado que el β -caroteno y la zeaxantina son más reactivos a las ERO que otros como la astaxantina y la cantaxantina [96].

Como mencionamos anteriormente, estas moléculas juegan un papel muy importante como captadores de la luz en los fotosistemas de las plantas y de algunos otros organismos. Dicho papel en la naturaleza se le ha atribuido físicamente a la flexibilidad de sus estados electrónicos. Por tal razón, diversos

estudios teóricos utilizando la metodología DFT se han realizado sobre los estados excitados de los carotenoides y con ello contribuir al entendimiento de la función de estos compuestos en los fotosistemas [97], su foto-protección en algunas especies de algas y cianobacterias, así como los cambios de coloración al interactuar con proteínas específicas en ciertas especies de crustáceos (**Figura 12**).

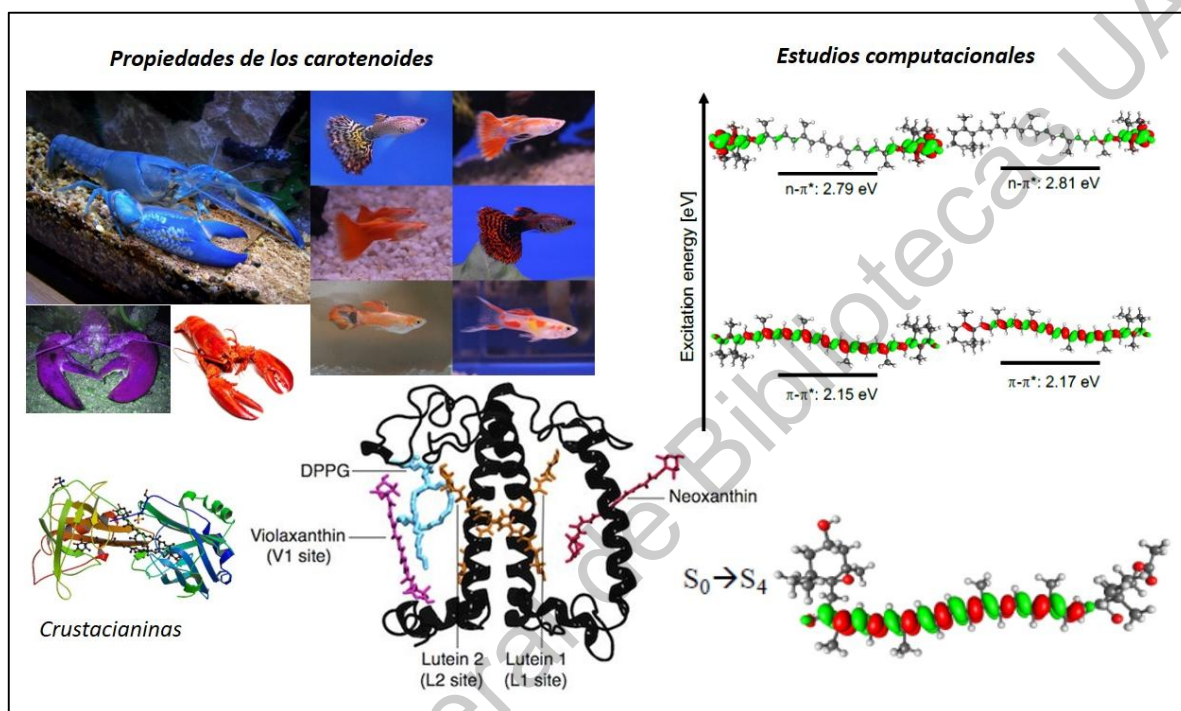


Figura 12. Algunas propiedades de los carotenoides estudiadas usando metodologías de la química teórica (Adaptación de [94-97]).

3. JUSTIFICACIÓN

Dentro de los productos naturales, los carotenoides han adquirido una importancia cada vez mayor, debido a que se les han encontrado diversas aplicaciones, en las cuales se emplean como colorantes naturales en las industrias avícola, la acuícola y la cosmética, así como aditivos nutraceuticos en la alimentaria y como suplementos e ingredientes activos en la farmacéutica. Algunos de ellos han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos como aditivos de alto valor nutraceutico y como colorantes. Estudios bien sustentados han demostrado que la dieta suplementada con luteína es capaz de prevenir el desarrollo de catarata en ratas diabéticas, mientras que su eliminación ha tenido como resultado, la degeneración temprana en la retina, donde actúan como filtros de la luz azul de alta energía. Con dicha actividad, se convierten también en protectores naturales de la piel humana, previniendo de esta forma el surgimiento y desarrollo de cáncer en ese nivel. A la fecha se han identificado más de 750 carotenoides naturales, entre los cuales, la luteína, la (3R,3'R)-zeaxantina, la (3R)- β -criptoxantina y el β -caroteno son de los más importantes. Se han encontrado en diferentes concentraciones en la leche materna, dependiendo de la dieta de la madre y también en diversos organismos, incluyendo distintas especies de plantas, microorganismos como bacterias y algas, hongos, organismos acuáticos y en algunas aves, donde imparten colores característicos a los mismos y juegan importantes funciones biológicas. Por ejemplo, algunos carotenoides son esenciales para el desarrollo del neonato. Otros poseen efectos vasodilatadores, lo cual los convierten en potenciales agentes antihipertensivos. Por ejemplo, la luteína y la zeaxantina pueden ayudar a mantener una buena salud cardiaca, ya que disminuyen los riesgos de aterosclerosis. Aunque se encuentran en diferentes organismos, la demanda mundial, que va en constante ascenso, está lejos de ser cubierta por las dos empresas europeas existentes dedicadas a la producción y venta de algunos carotenoides destinados sobre todo la industria acuícola y avícola. Como es de esperar, la adquisición de esos compuestos es muy costosa. Esta situación ha estimulado a los investigadores a buscar alternativas para su obtención:

extracción de fuentes naturales y síntesis orgánica. Esta última, que se efectúa en múltiples pasos utiliza reactivos no sólo tóxicos para los humanos, sino contaminantes del ambiente, y por si fuera poco, ha conducido hasta la fecha a rendimientos pobres. De los más comercializados, solo la astaxantina comercial proviene principalmente de síntesis en laboratorio, con el rendimiento máximo reportado de 52%. Dicho proceso proporciona una mezcla de los tres estereoisómeros (3S,3'S), (3R,3'S) y (3R,3'R). La segunda fuente a nivel industrial es a través del proceso de extracción supercrítica a partir del alga de agua dulce *Haematococcus pluvialis*. Sin embargo, dicha metodología es muy costosa, con la subsecuente repercusión para el consumidor final.

En la búsqueda continua de alternativas sintéticas para la obtención de tres de los carotenoides de mayor demanda, el presente proyecto se enfocó a la optimización de condiciones de extracción de luteína a partir de su mejor fuente, la flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.), utilizarla como materia prima para la síntesis parcial de la zeaxantina, la cual a su vez es convertida a astaxantina, procurando desarrollar métodos de síntesis fáciles, cortos, eficientes y con enfoque más ecológico, caracterizar las estructuras, determinar sus actividades vasorrelajantes *ex vivo* y utilizarlos en síntesis de polímeros “biodegradables” con posibles usos como liberadoras *in vivo* de una o varias moléculas con actividad biológica en su sitio de acción para de esa forma potenciar el efecto y lograr una mayor disponibilidad, o aún más, como nuevos polímeros “bioactivos”, nombrados recientemente como “poliactivos”.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos obtenidos mediante síntesis parcial a partir de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína se generan mediante isomerización y oxidación alílica, son buenos extendedores de cadena en la síntesis de poliésteres uretanos y presentan efecto vasorrelajante relevante a nivel *ex vivo*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Obtener los carotenoides (3*R*,3'*S*)-zeaxantina y (3*R*,3'*S*)-astaxantina mediante síntesis parcial a partir de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína, utilizarlos para generar nuevos materiales poliméricos, y evaluar su efecto vasorrelajante.

5.2. Objetivos particulares

- 1) Obtener ésteres de luteína a partir de la oleorresina de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta* L.).
- 2) Obtener la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína libre mediante la hidrólisis básica de sus ésteres.
- 3) Obtener, mediante síntesis parcial, la *meso*-zeaxantina a partir de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína utilizando distintas bases orgánicas e inorgánicas para la isomerización.
- 4) Obtener la (3*R*,3'*S*)-astaxantina a partir de *meso*-zeaxantina, mediante una reacción de oxidación alílica catalizada por yodo.
- 5) Elucidar computacionalmente los mecanismos de las reacciones de isomerización y oxidación, utilizando la metodología DFT.
- 6) Obtener nuevos poliésteres uretanos utilizando las xantófilas luteína, zeaxantina y astaxantina como extendedores de cadena.
- 7) Determinar el efecto vasorrelajante de los carotenoides en el modelo de aorta aislada de rata.

6. METODOLOGÍA

6.1. Materiales y equipos

Los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC) fueron adquiridos en un espectrómetro de la marca Brüker Avance III HD de 500 MHz del Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Físicoquímicas y Estructura Molecular (LACAPFEM) UG-UAA-CONACyT No. 123732 de la Universidad de Guanajuato. Se utilizó CDCl_3 como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

Los análisis mediante HPLC se realizaron en un equipo de la marca Waters (Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), integrado por una bomba cuaternaria modelo e2695 y un detector de arreglo de diodos (DAD) modelo 2998. Para los análisis cromatográficos, se utilizó como fase estacionaria una columna C_{30} (5 μm , 250 x 4.6 mm). El manejo del equipo, la adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos se realizó utilizando el software Empower3. Los análisis en cromatografía en capa fina se realizaron utilizando placas cubiertas de gel de sílice de 0.25 mm de espesor y con indicador de fluorescencia (PF 254) (Merck). Los compuestos se detectaron como manchas observables a simple vista.

Los espectros de FT-IR fueron adquiridos en un espectrofotómetro de la marca Perkin Elmer modelo Spectrum 100 provisto de un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR).

Las propiedades mecánicas para los poliésteres uretanos (PEUs) se midieron en un instrumento de la marca Zwick/Roell modelo Z005 equipado con una celda de carga de 5000 N. Para las mediciones, se cortaron probetas tipo 4, de acuerdo con la norma ISO-37, a partir de las películas. Las pruebas fueron realizadas a una velocidad de 200 mm/min. La tensión se midió a partir de la separación entre las mordazas y se refirió a una longitud inicial de 12 mm. Se midieron al menos 3 probetas por cada película de PEU sintetizado de acuerdo a la norma ISO 37.

Los termogramas mostrados en este trabajo fueron obtenidos, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés, “*Differential Scanning Calorimetry*”), utilizando un instrumento Q200. Las muestras fueron pesadas (aproximadamente entre 3 y 5 mg) y colocadas en crisoles de aluminio. Para los análisis, se utilizó el siguiente método de 5 etapas: 1) una rampa de calentamiento de 25 a 100 °C, 2) una isoterma a 100 °C con una duración de 1 minuto, 3) una rampa de enfriamiento de 100 °C hasta -40 °C, 4) una isoterma a -40 °C con una duración de 1 minuto y 5) un segundo calentamiento con una rampa de -40 °C hasta 100 °C. Todas las etapas de calentamiento y enfriamiento se realizaron a una velocidad de 10 °C/min.

La determinación de la polidispersidad de los macrodíoles sintetizados se realizó mediante cromatografía por permeación de gel (CPG) en un equipo de la marca “Agilent Technologies” utilizando como fase estacionaria una columna PLgel MIXED-D de 5 μm y como fase móvil se utilizó tetrahidrofurano (THF). El análisis se realizó a una temperatura constante de 37 °C. Para el cálculo del peso molecular numeral (M_n), se utilizaron estándares de poliestireno. La detección de las muestras y de los estándares se realizó utilizando un detector de índice de refracción.

Los hidróxidos de sodio y potasio, los carbonatos de sodio y de potasio, el bromato de sodio, el metabisulfito de sodio, así como el ácido cítrico y el yodo fueron adquiridos en la compañía REACTIVOS QUIMICA MEYER (Tlahuac, Ciudad de México, Mex.). La ϵ -caprolactona, el octanoato de estaño II, el hexametileno diisocianato, la trietil amina (TEA), diisopropil etileno diamina (DIPEA) y el diazabicyclo undeceno (DBU) fueron adquiridos de Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Los disolventes grado analítico y HPLC fueron adquiridos en Baker-Mallinckrodt (JT Baker, Mallinckrodt Baker Inc, Phillipsburg, NJ, USA). La oleorresina de la flor de cempasúchil fue comprada en “Oleo-especias” (Zapopan, Jalisco, México).

6.2. Extracción de los carotenoides de la oleorresina de flor de cempasúchil

A partir de la oleorresina de flor de cempasúchil, la cual es rica en ésteres de luteína, se extrajo la mayor cantidad posible de los mismos. Para su extracción, se realizó el siguiente procedimiento: en un matraz volumétrico de 500 mL, se colocaron 100 g de la oleorresina y se agregaron 200 mL de hexano. La mezcla se calentó a 40 °C y se agitó durante 45 minutos, manteniendo la temperatura constante. Este procedimiento se efectuó mediante una parrilla provista de un sistema de calentamiento, agitación y sensor de temperatura. La mezcla resultante se filtró y la porción líquida se descartó, mientras que la porción sólida se sometió a evaporación para eliminar el disolvente remanente con ayuda de un rota-evaporador.

La porción sólida nuevamente se colocó en un matraz volumétrico de 500 mL y se le adicionaron 200 mL de alcohol isopropílico. La mezcla se calentó a 40° C y se agitó durante 30 minutos, manteniendo la temperatura constante. Este proceso se repitió nuevamente para obtener una porción con alta concentración de ésteres de luteína. El residuo final fue secado a temperatura ambiente, este proceso nos permitió obtener 65 g un material rico en ésteres de luteína.

6.3. Hidrólisis de los ésteres de luteína

En un matraz volumétrico de 250 mL, se colocaron 100 g del extracto seco obtenido a partir de la oleorresina. Se adicionaron 120 mL de etanol y 11.2 g de hidróxido de potasio (KOH). La mezcla se agitó durante 15 minutos y se calentó a 60 °C durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se detuvo la agitación y se enfrió la mezcla a temperatura ambiente. Cuando la mezcla alcanzó la temperatura ambiente, se le agregó lentamente y con agitación 100 mL de una solución 0.3 M de ácido fosfórico (H₃PO₄). La mezcla se filtró con ayuda de vacío y el sólido restante se lavó con abundante agua. El compuesto obtenido fue purificado mediante precipitación por intercambio de disolvente de diclorometano a metanol frío. Este compuesto fue identificado como la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-Luteína (1).

6.4. Análisis mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAR)

La identificación y la cuantificación de los carotenoides obtenidos se realizaron con la ayuda de un cromatógrafo de líquidos descrito en el punto 6.1.

Para los análisis, se utilizó como fase móvil se utilizó un gradiente (**Tabla 5**) de metanol (MeOH), metil terbutil éter (MTBE) y agua a un flujo de 0.7 mL/min. La longitud de onda de detección fue a 474 nm, se utilizó un volumen de inyección de 10 μ L y un tiempo de análisis de 35 minutos.

Tabla 5. Gradiente utilizado para el análisis de las reacciones.

Tiempo (minutos)	MeOH (%)	MTBE (%)	H ₂ O (%)
0	81	15	4
15	66	30	4
23	16	80	4
27	16	80	4
27.1	81	15	4
35	81	15	4

6.5. Transformación de luteína a zeaxantina

En un matraz de dos bocas de 100 mL, se colocó 1 mmol (569 mg) de luteína y la muestra se disolvió en 10 mL de *n*-butanol. Posteriormente, se adicionaron 561 mg de KOH y la disolución se calentó durante 12 horas a 115 °C con agitación vigorosa. La reacción fue monitoreada por CLAR. Una vez alcanzado al menos un 90% de conversión, la reacción fue detenida a través de la adición de una disolución de H₃PO₄ 2N hasta alcanzar un pH neutro. Se le adicionó un exceso de agua, la mezcla de reacción se filtró y el disolvente se removió con ayuda de un rotaevaporador. El compuesto fue recristalizado usando metanol frío y se obtuvieron cristales color naranja e identificados como zeaxantina (**2**).

6.6. Transformación de zeaxantina a astaxantina

En un matraz de dos bocas de 50 mL, se colocaron 285 mg del compuesto **2** a los cuales se adicionaron 2.5 mg de yodo y la mezcla resultante se disolvió en 15 mL de cloruro de metileno. La mezcla se agitó durante 30 minutos y finalmente, se enfrió a una temperatura de 5 °C.

La solución oxidante fue independientemente preparada de acuerdo al siguiente procedimiento: en un matraz Erlenmeyer se colocaron 100 mg de NaBrO₃ y 50 mg de NaHCO₃ y se disolvieron en 5 mL de agua. Independientemente, en otro matraz Erlenmeyer se disolvieron 56 mg de Na₂S₂O₅ y se disolvieron en 2 mL de agua. Ambas disoluciones fueron enfriadas a 5 °C y mezcladas. La disolución resultante fue acidificada con ácido cítrico. Después de 30 segundos, la disolución adquirió un tono “amarillo-paja” y en ese momento, la misma fue adicionada lentamente a otra mezcla preparada previamente que contenía yodo y zeaxantina.

Una vez agregada la solución oxidante, se dio comienzo a la reacción de oxidación, la cual se mantuvo con agitación vigorosa y a una temperatura de 6 °C. La mezcla de reacción fue monitoreada por cromatografía en capa fina. Dicha mezcla se tornó progresivamente de color rojo-oscuro. La reacción fue detenida al llevarla a temperatura ambiente y neutralizada con una disolución acuosa que contenía 250 mg de NaHCO₃ y 80 mg de Na₂S₂O₅. La mezcla fue extraída con diclorometano (3 × 15 mL), la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y evaporada bajo presión reducida. El residuo fue purificado por cromatografía en capa fina preparativa, obteniéndose un compuesto que fue identificado como (3*R*,3'*S*)-astaxantina (**3**).

6.7. Cálculos computacionales

Para el estudio teórico de los mecanismos de reacción de la transformación de **1** a **2** y de **2** a **3**, se utilizó el programa Gaussian09 [98]. El estudio se realizó mediante el uso de la teoría de funcionales de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés: *Density Functional Theory*), que es un método alternativo de la mecánica cuántica, en el que el parámetro a optimizar es el funcional (función que recibe como

argumento otra función) que relaciona la distribución de la densidad electrónica con la energía del sistema. Las optimizaciones de la geometría fueron realizadas sin alguna restricción de la simetría. En el caso de la molécula de luteína, por simplicidad, se utilizó un sistema modelo (anillo de α -ionona) para la reacción de isomerización. Sin embargo, la molécula completa de la luteína también fue calculada (ver Figura A3 y A4). Se utilizó el funcional híbrido local M06–L con un conjunto de base doble ζ 6-31G(d) [99]. También, los cálculos de frecuencia harmónica fueron hechos al mismo nivel de teoría con la intención de cumplir dos objetivos: a) caracterizar la naturaleza de los puntos críticos encontrados en la superficie de energía potencial, es decir, el mínimo local que no contiene frecuencias negativas de los eigenvalores del Hessiano, mientras que un máximo (estado de transición) presenta uno y sólo un eigenvalor negativo, el cual corresponde a la coordenada de reacción deseada; b) obtener las correcciones térmicas y entrópicas, las cuales fueron obtenidas a 298K y 1 atm. Los cálculos “*Single-point*” fueron posteriormente realizados sobre las geometrías optimizadas, usando el modelo continuo polarizable (PCM por sus siglas en inglés: *Polarizable Continuum Mode*) [100-102] y definiendo al *n*-butanol como el disolvente de la reacción ($\epsilon=17.332$) para obtener la corrección de solvatación al mismo nivel de teoría que las geometrías optimizadas. Además, para mejorar los valores de energía final reportados en este trabajo, realizamos los cálculos de “*single-point*” con una calidad del conjunto base triple- ζ , 6-311+G(2d). Por lo tanto, el nivel de teoría fue definido como PCM:(*n*-butanol)M06–L/6-311+G(2d)//M06–L/6-31G(d). Para los mecanismos involucrados con la reacción de oxidación, se reportaron los cálculos al mismo nivel de teoría, pero solo en fase gaseosa.

Respecto a los cálculos de pK_a , se realizaron las optimizaciones de la geometría usando el modelo PCM de acuerdo a la ecuación 1, donde A–H pertenece al protón de la luteína. Por lo tanto, la energía libre de solvatación fue calculada como se muestra en la ecuación (2), donde $G_{solv}(H^+) = 264.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ es la energía libre de solvatación para el protón en *n*-butanol [103] y $RT\ln(24.46) = 1.89 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ el factor que toma en cuenta el cambio de fase gas a partir de 1 atm a 1 M. El término

$G_{gas}(H^+)$ es la energía libre absoluta para el protón en fase gaseosa y a presión y temperatura estándar. Esta energía fue fácilmente calculada usando la ecuación de Sackur–Tetrode y tuvo un valor de -6.28 kcal/mol. Esta ecuación facilita que se pueda calcular la acidez en fase gaseosa.



$$\Delta G_{solv} = G_{solv}(A-H) - G_{solv}(A^-) - G_{solv}(H^+) - G_{gas}(H^+) + RT \cdot \ln(24.46) \quad (2)$$

Así, el pK_a puede ser calculado mediante la siguiente ecuación (3):

$$pK_a = \frac{\Delta G_{solv}}{2.303 RT} \quad (3)$$

Finalmente, los cálculos de pK_a fueron hechos usando tres funcionales de la densidad: M06-L, cam-B3LYP y ω B97X-D, con los conjuntos base: 6-31+G(d), 6-311+G(2d) y def2-svp.

6.8. Síntesis de Macrodióles

Las reacciones de polimerización fueron realizadas utilizando distintas relaciones de la ϵ -caprolactona (CL) y del 1,8-octanodiol (Oct). Como ejemplo, se describe el proceso para la obtención del macrodiol con grado de polimerización (GP) = 10. En un matraz bola de 25 mL previamente seco y provisto de un agitador magnético, se adicionaron 5.707 g (50 mmol) de la CL, 3 mg del catalizador de heptamolibdato de amonio tetra hidratado $[(NH_4)_6 [Mo_7O_{24}] \cdot 4H_2O]$ y 590 mg del Oct (5 mmol). Se le colocó un refrigerante al matraz y la mezcla de reacción fue agitada y calentada a 150 °C durante 1 hora. Durante el calentamiento, se produce *in situ* el decamolibdato de amonio $(NH_4)_8[Mo_{10}O_{34}]$, a partir de la descomposición térmica del heptamolibdato de amonio, el cual funge como el auténtico catalizador de la reacción de polimerización por apertura de anillo [104-106].

Los macrodioles obtenidos fueron analizados y utilizados en la síntesis de los poliésteres uretanos sin una purificación previa. El peso molecular numeral y el grado de conversión fueron monitoreados a través de RMN de ^1H .

6.9. Síntesis de Poliésteres uretanos

La síntesis de los poliésteres uretanos (PEUs) fue llevada a cabo utilizando el método del prepolímero, el cual consiste en dos etapas [107]. Brevemente se describe un ejemplo de este proceso: 1) síntesis del prepolímero.- utilizando un sistema de reflujo con un matraz bola de 25 mL previamente secado y provisto de un agitador magnético. Se adicionaron 1 mmol del macrodiol (HOPCLOH), 1.55 mmoles del 1,6-diisocianato de hexametileno (HDI), 24 mg de etil hexanoato de estaño (II) como catalizador y 8 mL de 1,2-dicloroetano como disolvente. La mezcla de reacción fue agitada y calentada a 80 °C durante 1 hora. 2) Adición del extendedor de cadena. - transcurrido el tiempo de la obtención del prepolímero, se adicionaron a la mezcla de reacción del paso 1), 0.5 mmol de la xantófila correspondiente (**1**, **2** o **3**). Esta nueva mezcla fue agitada hasta que la disolución se tornara viscosa en aproximadamente 45 minutos. Una vez alcanza dicha consistencia, la mezcla fue colocada sobre un molde de vidrio con una superficie de teflón en el fondo dentro de la campana de extracción. De esa forma el disolvente fue lentamente evaporado y esto nos permitió obtener las películas de PEUs (**Figura 27**).

6.9. Síntesis de poliuretanos con carotenoides (segmento duro)

Las reacciones para la obtención de los segmentos duros fueron realizadas en un sistema de reflujo. A continuación, se describe un ejemplo de esta reacción: en un matraz balón de 25 mL previamente seco y provisto de un agitador se adicionaron 0.5 mmol de la xantófila correspondiente, 0.55 mmol de 1,6-diisocianato de hexametileno (HDI), 12 mg de 2-etil hexanoato de estaño (II) como catalizador y 4 mL de 1,2-dicloro etano (DCE) como disolvente. Esta mezcla fue agitada y calentada a 80 °C durante 2.5 horas. Transcurrido ese tiempo, la mezcla

fue llevada a temperatura ambiente y el disolvente fue evaporado lentamente en la campana de extracción.

6.10. Evaluación del efecto vasorrelajante

Los estudios de vasorrelajación se realizaron con apego a la norma NOM-062-ZOO-1999. Se utilizaron ratas Wistar macho de entre 250 a 300 g de peso. Los animales fueron sacrificados por decapitación (conforme al apartado 9.5.3.3 de la NOM-062-ZOO-1999) y se les extrajo la aorta torácica descendente, la cual se colocó en solución fisiológica de Krebs a un pH= 7.4 (126.8 mM de NaCl, 5.9 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM de MgCl₂, 30 mM de NaHCO₃, 1.2 mM de NaH₂PO₄, y 5 mM de D-glucosa). La aorta fue cortada en anillos de 4 a 5 mm de longitud. Dichos anillos fueron montados en una cámara de incubación y contraídos con fenilefrina (1 µM). Los cambios en el tono del músculo liso arterial se registraron por medio de un transductor de fuerza Grass modelo FT03 unido a un polígrafo Grass de 6 canales modelo 7-8P. La acetilcolina fue utilizada como control positivo [108].

Para la evaluación de las tres xantófilas (luteína, zeaxantina y astaxantina), éstas se disolvieron en la mínima cantidad de dimetil sulfoxido (0.02 % v/v en la cámara) y luego se diluyeron con agua destilada.

6.11. Análisis estadístico y construcción de las curvas concentración respuesta

Se realizaron tres evaluaciones de cada una de las concentraciones de 0.1, 0.316, 1, 3.16, 10, 31.6, 100, 316 y 1000 µM para cada uno de los compuestos. Los resultados se expresaron como el valor promedio ± el error estándar del promedio. Los datos experimentales obtenidos se graficaron mediante el programa PRISMA Graph Pad (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Todos los valores se ajustaron a una ecuación sigmoideal para la obtención de las curvas concentración respuesta. Para cada uno de los compuestos se determinó la concentración efectiva media (CE₅₀) y el efecto máximo (E_{max}). Los valores de CE₅₀ se tomaron como significativamente diferentes cuando sus intervalos de confianza de 95% no se traslapan entre ellos y el efecto máximo (E_{max}) con un error estándar.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Extracción de los carotenoides de la oleorresina de flor de cempasúchil

A partir de la oleorresina de flor de cempasúchil, la cual es rica en ésteres de luteína, se extrajo la mayor cantidad posible de éstos. Para confirmar la presencia de los ésteres de luteína en la oleorresina de la flor de cempasúchil, se realizó el análisis cromatográfico de fase reversa previamente descrito en el punto 6.4. Asimismo, todas las reacciones fueron monitoreadas utilizando este método cromatográfico. En la **Figura 13** se muestra el cromatograma obtenido.

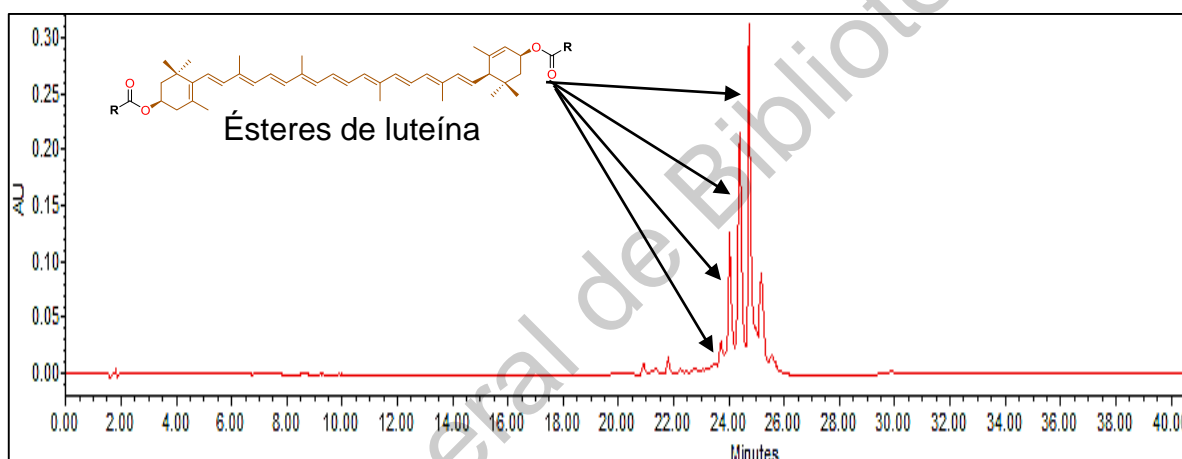


Figura 13. Cromatograma de los ésteres de luteína extraídos a partir de oleorresina de flor de cempasúchil.

En este cromatograma, se observa la presencia de 5 picos mayoritarios con los tiempos de retención de 23.7, 24.1, 24.4, 24.8 y 25.3 minutos, los cuales corresponden a los diésteres de luteína esterificados con ácido esteárico, palmítico y mirístico. Este análisis concuerda con lo previamente reportado por otros autores [39] (Ver **Tabla 2**).

Asimismo, la presencia de los diésteres derivados de la luteína de origen natural se pudo confirmar a través del análisis de los máximos de absorción de cada uno de los picos del cromatograma (**Figura 14**), los cuales indican que se trata del

mismo esqueleto base (luteína) con un máximo de absorción en 446 y otro en 474 nm.

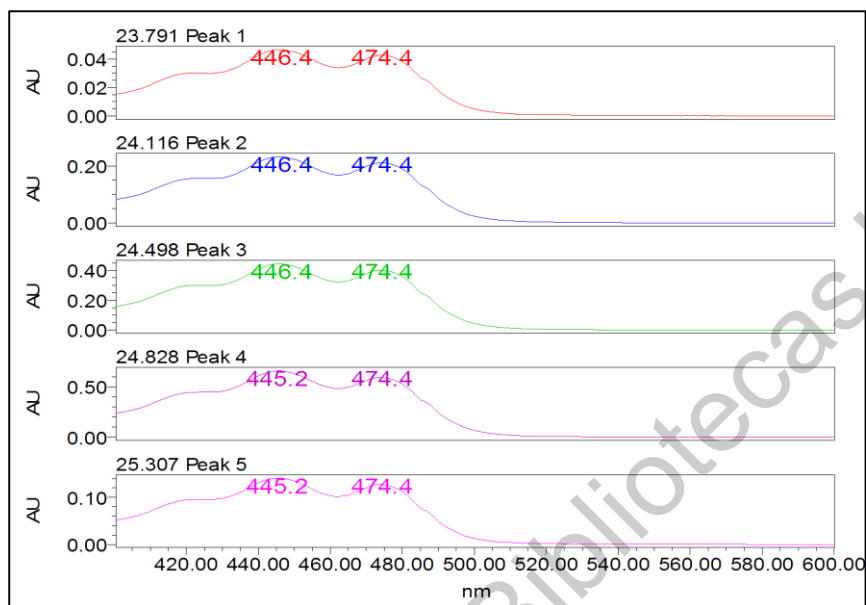
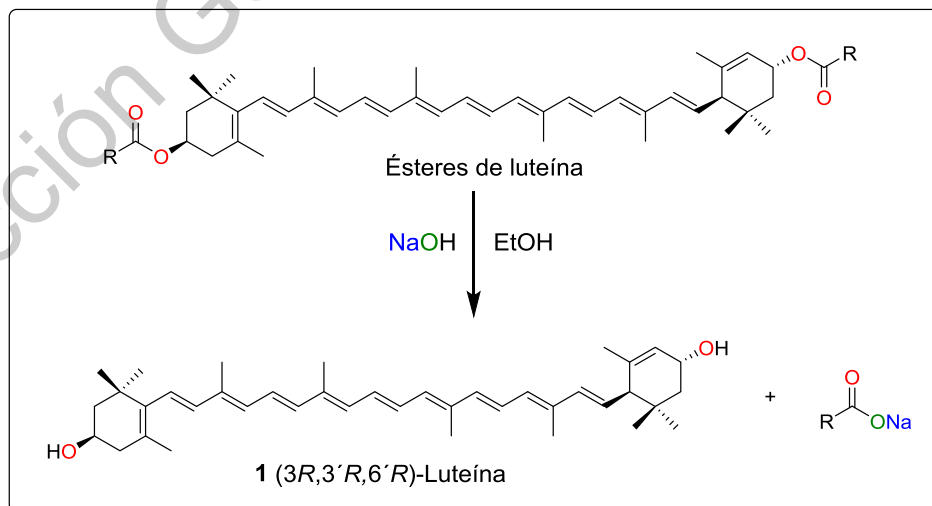


Figura 14. Espectros UV-Vis de los 5 picos mayoritarios en la mezcla rica en ésteres de luteína.

7.2. Hidrólisis de los ésteres de luteína

Los ésteres de luteína extraídos fueron hidrolizados utilizando hidróxido de sodio (NaOH) etanólico para obtener la luteína libre (**Esquema 7**).



Esquema 7. Hidrólisis de los ésteres de luteína.

Las mejores condiciones de hidrólisis se encontraron en un tiempo de 2.5 horas y a una temperatura de 65 °C (**Tabla 6**, Ensayo 5).

Tabla 6. Condiciones de hidrólisis de los ésteres de luteína.

Ensayo	Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	Rendimiento (%)
1	T.A	24	86
2	60	4	95
3	70	3	99
4	65	2	90
5	65	2.5	99

T.A: Temperatura ambiente.

La hidrólisis completa de los ésteres se pudo corroborar al comparar el cromatograma obtenido a partir de los ésteres de luteína mostrado en la **Figura 14** contra el cromatograma obtenido a partir de la hidrólisis básica de los mismos (**Figura 15**).

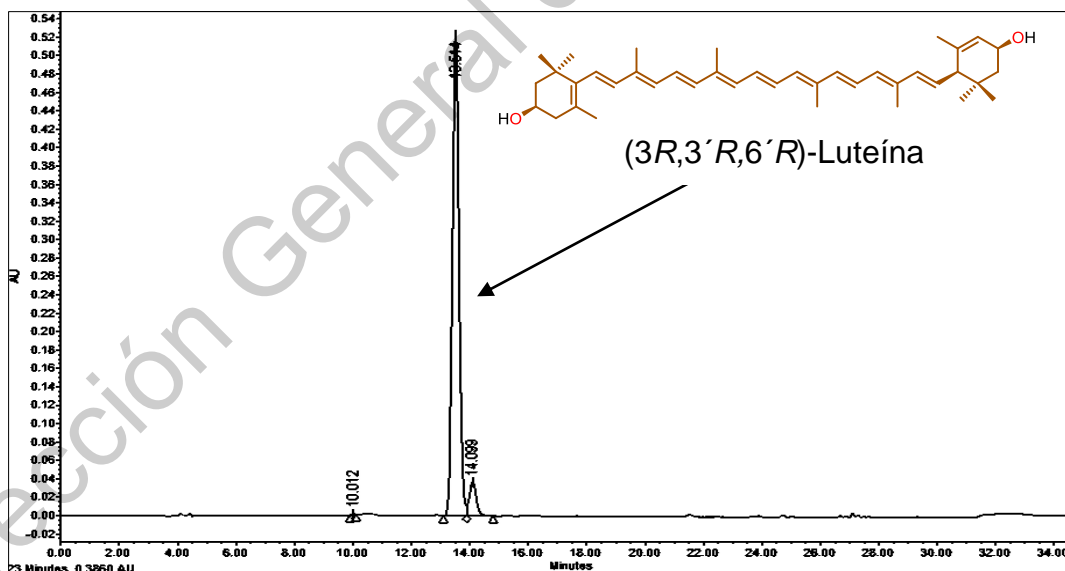


Figura 15. Cromatograma de la luteína libre.

El primer pico mostrado en la **Figura 15** corresponde a la luteína, la cual representa un 95%, mientras que el segundo pico corresponde a la

(3*R*,3'*R*)-zeaxantina de origen natural, también presente en la flor de cempasúchil. Lo anterior fue confirmado al adquirir los espectros UV de máxima absorción para cada pico, los cuales arrojan valores de 444 nm correspondiente a la luteína y de 451 nm correspondiente al máximo de la zeaxantina.

La mezcla luteína-zeaxantina, obtenida a partir de la hidrólisis básica de los ésteres, se sometió a cristalizaciones sucesivas en metanol frío para obtener el compuesto **1** con alta pureza.

7.3. Caracterización de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína

Para confirmar la naturaleza de la luteína, se obtuvieron sus espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C , así como los bidimensionales en modalidad COSY, HMBC y HSQC.

En la **Figura 16** se muestra el espectro de RMN de ^1H de la luteína, en el cual se observan, de campo bajo a campo alto, las señales características para los 15 protones de los metinos vinílicos, entre 6.67 y 5.44 ppm. También como era de esperar, se observan las señales correspondientes a los metinos base de oxígeno 3 y 3' aparecen a 4.00 y 4.25 ppm respectivamente. Mientras que el metino doblemente alílico 6' aparece en 2.41 ppm (d, $J = 8.1$ Hz). Respecto a los metilenos C-2, C-2' y C-4, aparecen en 1.48 y 1.78, 1.36 y 1.84 ppm y 2.05 y 2.39 ppm respectivamente. Finalmente, se observan las señales, todas singuletes, para los metilos entre 0.85 y 1.97 ppm.

Por su parte, en el espectro de ^{13}C (**Figura 17**) se observan las señales características para los 22 carbonos vinílicos entre 124.5 y 138.5 ppm. También se muestran las 10 señales de los metilos entre 12.8 y 30.3 ppm. Los metilenos de las posiciones 2, 2' y 4 aparecen en 44.7, 48.4 y 42.6 ppm respectivamente. Las señales correspondientes a los metinos 3, 3' y 6' se observan en 65.1, 65.9 y 55.9 ppm respectivamente, mientras que las señales de los carbonos cuaternarios 1 y 1' aparecen en 37.1 y 34.0 ppm respectivamente.

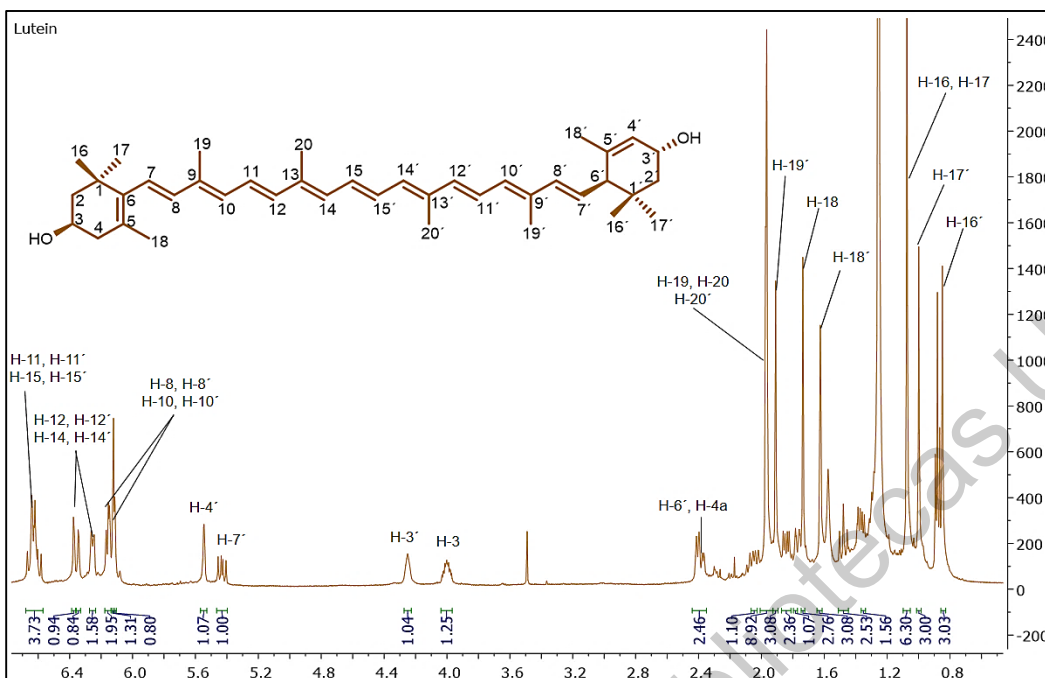


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína.

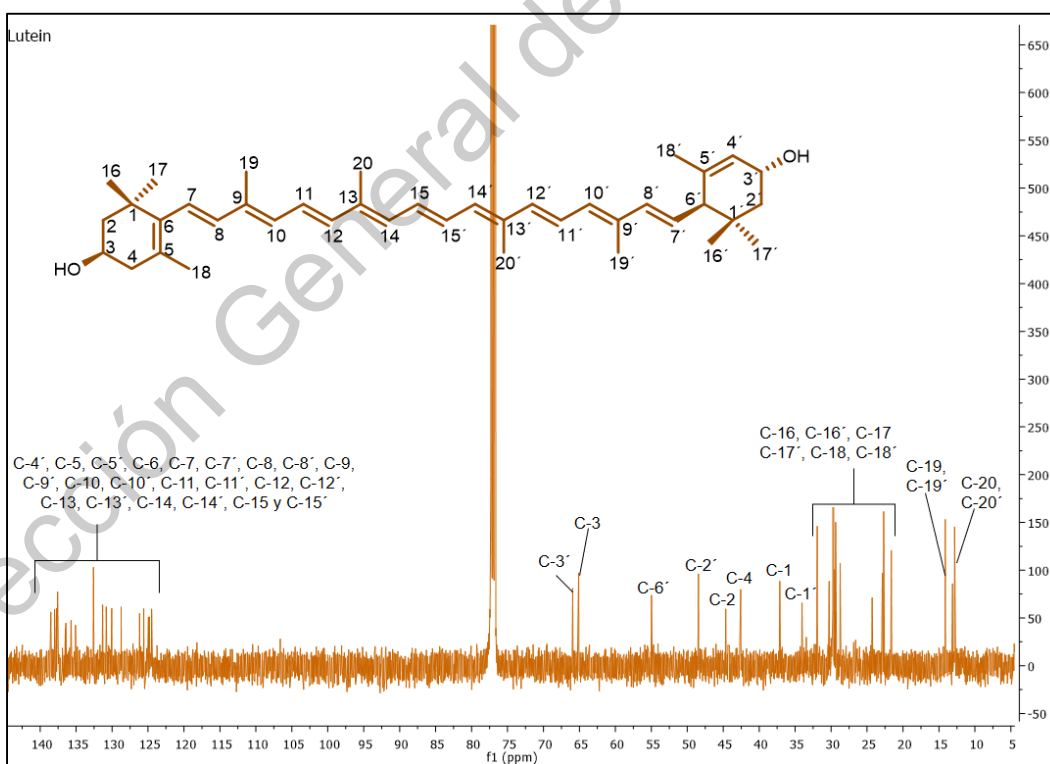


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína.

Es importante mencionar que las respectivas asignaciones de los protones y los carbonos fueron realizadas utilizando los espectros bidimensionales en modalidad COSY, HMBC y HSQC (**Figura 18**); así como por comparación con datos reportados en la literatura [109]. En la **Figura 18** se muestran los protones H-3 y H-3' interaccionando con sus respectivos carbonos, lo que muestra la asimetría de la luteína.

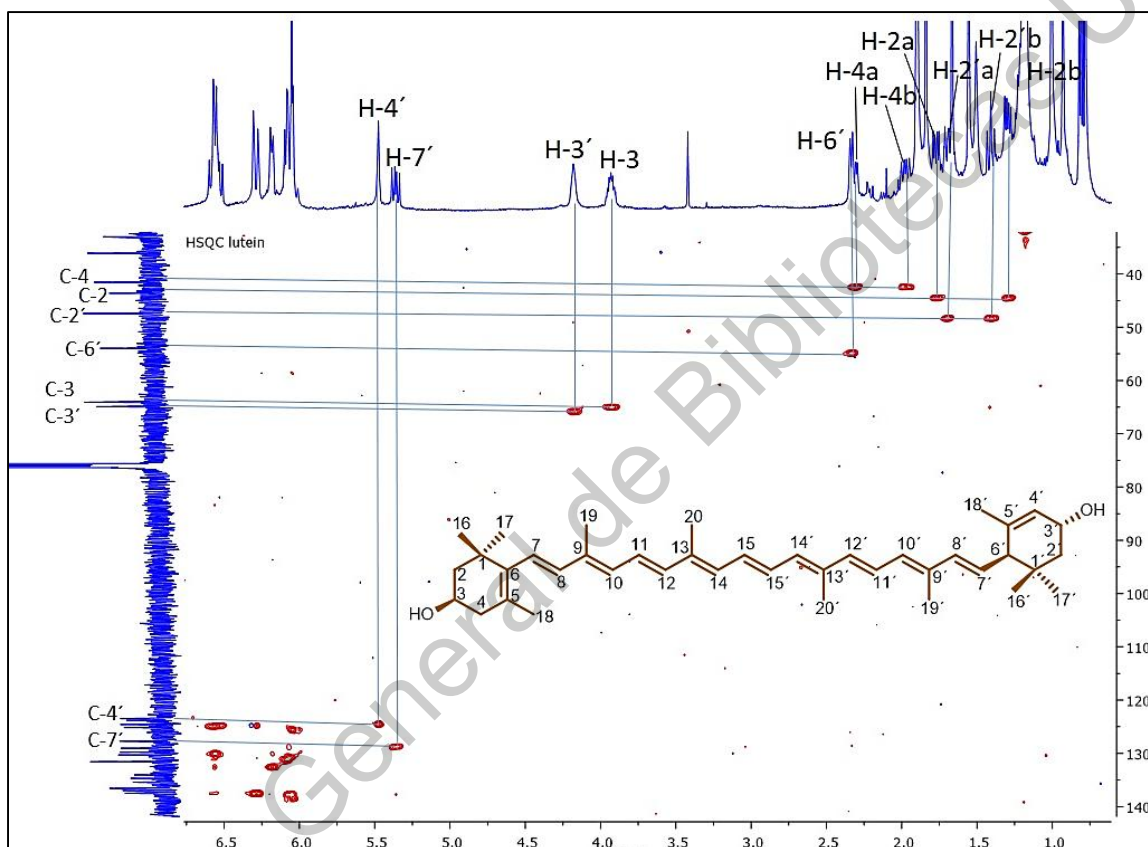


Figura 18. HSQC de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína.

Finalmente, en la **Tabla 7** se resume la asignación de señales correspondientes a cada uno de los 40 átomos de carbono de la luteína, así como los respectivos protones unidos a estos carbonos.

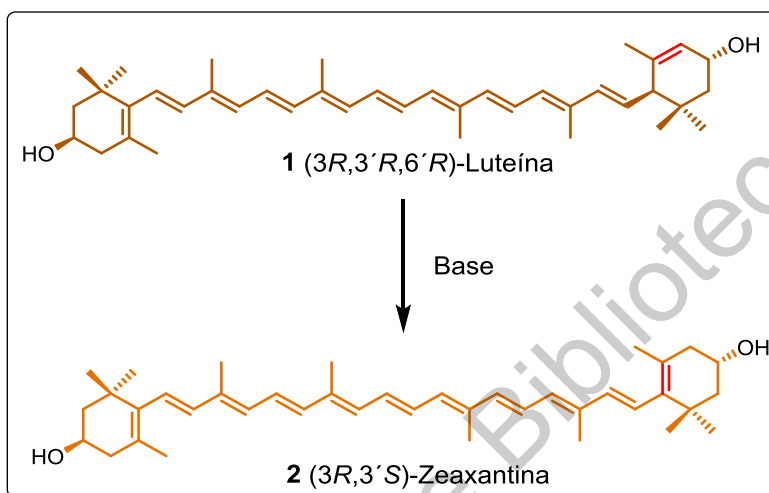
Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN (500 MHz, CDCl₃) para la luteína (1).

Luteína (1)		
Posición	δ _c , tipo	δ _H (J en Hz)
1	37.1, C	–
2	44.7, CH ₂	1.48 t, J = 12.0 Hz; 1.8 m
3	65.1, CH	4.00 m
4	42.6, CH ₂	2.05 dd, J = 16.5, 9.5 Hz; 2.39*
5	126.2, C	–
6	138.0, C	–
7	125.6, CH	6.12 m
8	138.5, CH	6.12 m
9	135.1, C	–
10	130.8, CH	6.15 m
11	124.9, CH	6.64*
12	137.6, CH	6.35 m
13	136.5, C	–
14 & 14'	132.6, CH	6.24 m, 6.26 m
15	130.0, CH	6.64 m
16	30.3, CH ₃	1.07* s
17	28.7, CH ₃	1.07* s
18	21.4, CH ₃	1.74 s
19	13.1, CH ₃	1.97* s
20	12.8, CH ₃	1.97* s
1'	34.0, C	–
2'	48.4, CH ₂	1.36 dd J = 13.1, 7.0 Hz, 1.84 dd, J = 13.1, 7.5 Hz
3'	65.9, CH	4.25 s
4'	124.5, CH	5.55 s
5'	137.8, C	–
6'	54.9, CH	2.41 d J = 8.1 Hz
7'	128.7, CH	5.44 dd J = 15.5, 10.0 Hz
8'	138.5, CH	6.11 m
9'	135.7, C	–
10'	131.3, CH	6.15*
11'	124.8, CH	6.64*
12'	137.7, CH	6.37 m
13'	136.4, C	–
15'	130.1, CH	6.64 m
16'	29.5, CH ₃	0.85 s
17'	24.3, CH ₃	1.00 s
18'	22.9, CH ₃	1.63 s
19'	13.1, CH ₃	1.91 s
20'	12.8, CH ₃	1.97*

* Señal sobrepuesta

7.4. Síntesis parcial de la (3*R*,3'*S*)-zeaxantina a partir de la luteína y de los ésteres de luteína

Para la conversión de **1** en **2** (**Esquema 8**), se evaluaron diferentes condiciones de reacción. Se probaron distintas bases orgánicas e inorgánicas (10 equivalentes en cada reacción) (**Tabla 8**).



Esquema 8. Síntesis de (3*R*,3'*S*)-zeaxantina.

Se encontró que, al utilizar bases voluminosas como trietil amina (TEA), 1,8-diaza biciclo[5.4.0]-7-undeceno (DBU) y N,N-diisopropil etil amina (DIPEA) no ocurre la reacción de isomerización del compuesto **1**. Mientras que al utilizar *tert*-butóxido de potasio (*t*-BuOK), otra base voluminosa, sólo productos de deshidratación, pero no de isomerización fueron observados (anhidroluteínas). Por otro lado, las bases pequeñas, como los hidróxidos de sodio y potasio, fueron efectivas para lograr la isomerización de **1**. También se estudió el efecto del disolvente en esta reacción. Los disolventes evaluados fueron metanol, etanol, agua, *n*-butanol y propilenglicol (PG). Los resultados obtenidos al variar el disolvente y utilizando KOH como base se muestran en la **Tabla 8**. Además, se encontró que al llevar a cabo la reacción en *n*-butanol, KOH y a una temperatura de 115 °C se obtuvo un rendimiento de 92%. Con respecto a los reportes previos de esta isomerización, en el año de 1994, en una patente afirmaron que la reacción de isomerización ocurre en etanol y la eficiencia de la reacción puede ser mejorada hasta en un 20% cuando

se aplica alta presión [42]. En otra patente utilizaron DMSO como disolvente, reportaron un rendimiento de entre 50 y 80% [43]. Nosotros encontramos que con estas condiciones, la reacción funciona bien ya que obtuvimos un 75% de rendimiento.

Tabla 8. Optimización de las condiciones de reacción para la obtención de **2**.

Ensayo	Base	Disolvente	Temperatura	Tiempo (Horas)	Rendimiento (%)
1	KOH	MeOH	Reflujo	12	65
2	KOH	EtOH	Reflujo	12	60
3	KOH	H ₂ O	Reflujo	16	sr
4	KOH	<i>n</i> -BuOH	115	12	92
5	KOH	PG	115	12	62
6	NaOH	<i>n</i> -BuOH	115	12	85
7	DBU	<i>n</i> -BuOH	100	20	sr
8	TEA	<i>n</i> -BuOH	100	24	sr
9	K ₂ CO ₃	<i>n</i> -BuOH	115	12	22
10	DIPEA	<i>n</i> -BuOH	115	24	sr
11	<i>t</i> -BuOK	<i>n</i> -BuOH	115	20	- ^a

sr= sin reacción, ^aproductos de deshidratación (anhidroluteínas).

Todas las reacciones fueron monitoreadas por HPLC utilizando condiciones previamente descritas (ver punto 6.4). En la **Figura 19** se muestra el cromatograma obtenido durante el monitoreo de la reacción de **1** a **2**.

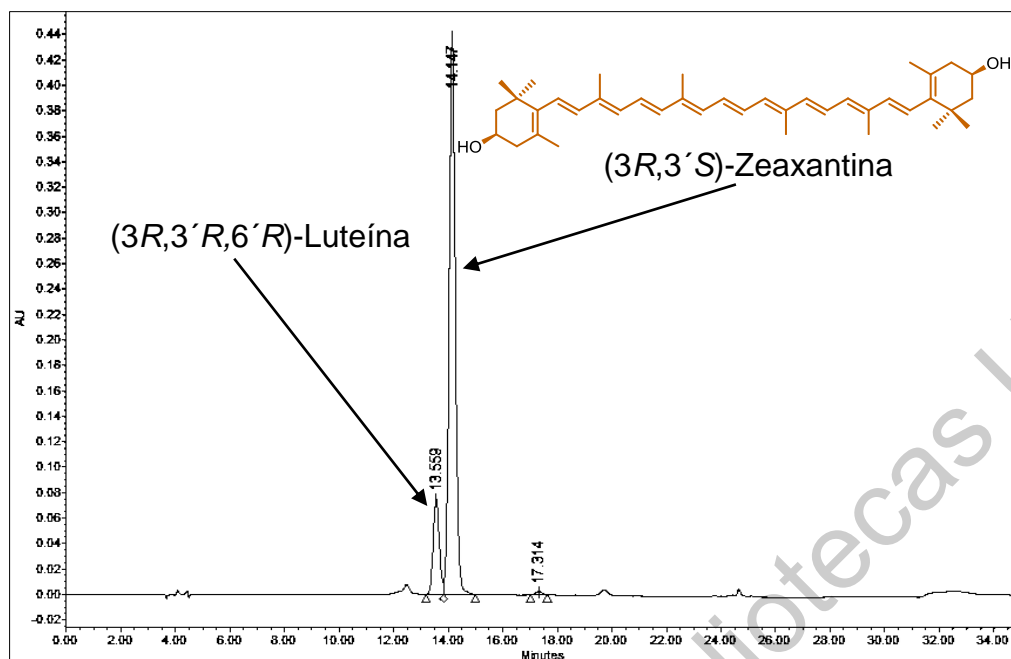
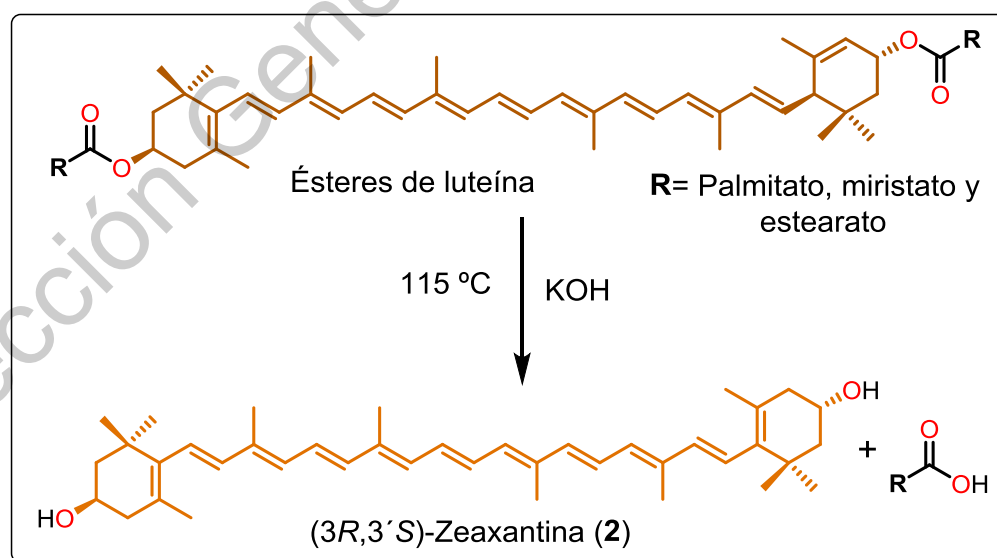


Figura 19. Cromatograma de la zeaxantina obtenida a partir de 1.

Basados en las mejores condiciones de la reacción encontradas para la formación del compuesto **2** (Tabla 8, Ensayo 4), se estudió la reacción de isomerización a partir de los ésteres de luteína, en una forma “one pot” (Esquema 9).



Esquema 9. Síntesis de zeaxantina a partir de los ésteres de luteína.

Para llevar a cabo estas pruebas se incrementó la concentración de KOH de 10 a 12 equivalentes.

La reacción en forma “one pot” fue ligeramente más lenta que cuando se parte de la luteína libre. Sin embargo, este proceso proporciona un rendimiento de hasta un 95% (**Tabla 9**, Ensayo 2), ligeramente superior al indicado en la **Tabla 8**.

Tabla 9. Condiciones de reacción para la obtención de **2** a partir de los ésteres de luteína (reacción “one-pot”).

Ensayo	Base	Disolvente	Tiempo (horas)	Rendimiento (%)
1	KOH	<i>n</i> -BuOH	12	86
2	KOH	<i>n</i> -BuOH	16	95
3	KOH	PG	16	72

7.5. Caracterización de la (3*R*,3'*S*)-zeaxantina

Para confirmar la naturaleza de la zeaxantina, se obtuvieron sus espectros de RMN de ¹H y de ¹³C, así como los espectros bidimensionales en modalidad COSY, HMBC y HSCQ para este compuesto. Es importante mencionar que debido a la simetría que posee esta molécula, todas las señales tanto en el espectro de protón como en el carbono, aparecen como señales dobles, es decir que cada señal en su respectivo espectro corresponde a dos posiciones equivalentes.

En la **Figura 20** se muestra el espectro de RMN de ¹H de la zeaxantina, en el cual se observan, de campo bajo a campo alto, las señales características para los metinos vinílicos, de 6.62 a 6.12 ppm, correspondientes a los protones unidos a los carbonos 7 y 7' (6.12, m), 8 y 8' (6.15 m), 10 y 10' (6.17 m), 11 y 11' (6.64 m), 12 y 12' (6.37 d, *J* = 14.7 Hz), 14 y 14' (6.26 m), y 15 y 15' (6.62 m).

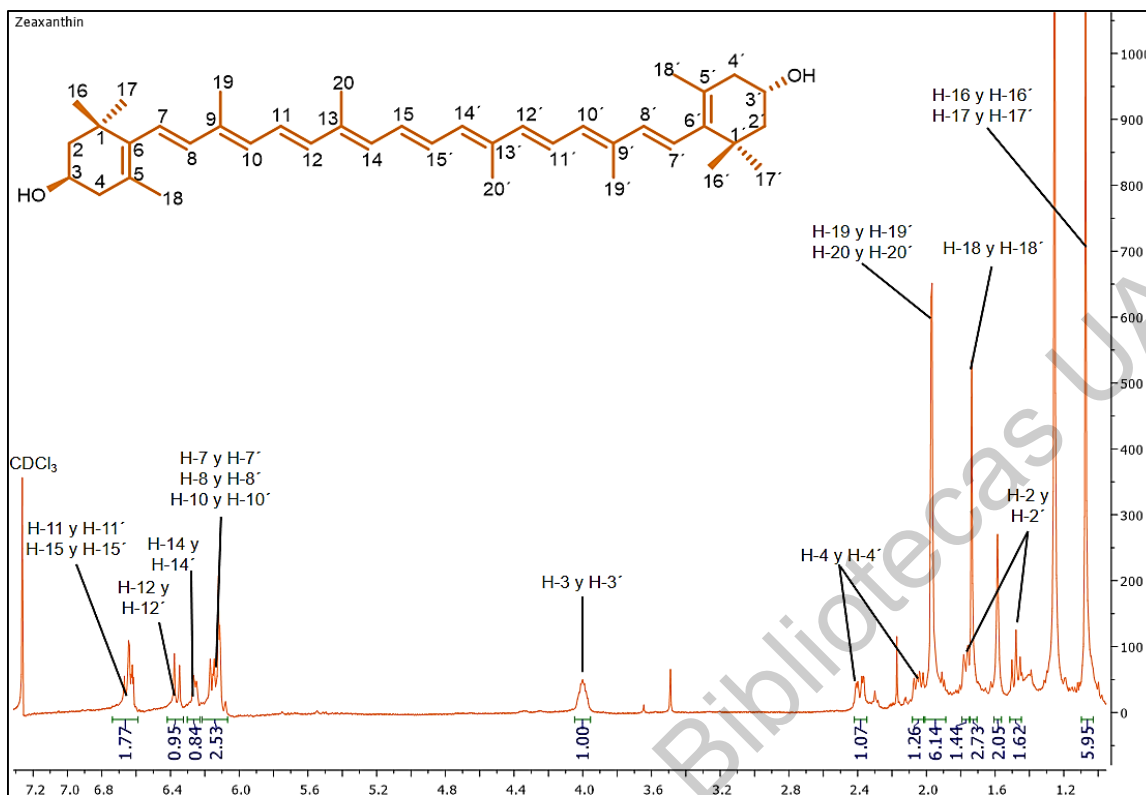


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de (3R,3'S)-zeaxantina.

Las señales correspondientes a los metinos base de oxígeno 3 y 3' aparecen ambos a 4.00 ppm. Los protones unidos a los carbonos en las posiciones 2 y 2' aparecen en 1.48 (t, $J = 12.0$ Hz) y 1.77 ppm (m) y los protones unidos a los C-4 y C-4' aparecen en 2.04 ppm (dd, $J = 16.5, 5$ Hz) y 2.39 ppm (dd, $J = 16.5, 5$ Hz). Las señales características para los metilos aparecen de 1.07 a 1.97 ppm, las cuales se observan todas como singuletes y corresponden a los protones unidos a los carbonos: 16 y 16' (1.07 s), 17 y 17' (1.07 s), 18 y 18' (1.74 s), 19 y 19' (1.97 s), y 20 y 20' (1.97 s).

En el espectro de ^{13}C (**Figura 21**) se observan las señales características para los carbonos vinílicos, de 125.6 a 138.6 ppm, correspondientes a los carbonos 5 y 5' (126.2), 6 y 6' (137.8), 7 y 7' (125.6), 8 y 8' (138.6), 9 y 9' (135.7), 10 y 10' (131.3), 11 y 11' (124.9), 12 y 12' (137.6), 13 y 13' (136.4), 14 y 14' (132.6), 15 y 15' (130.1).

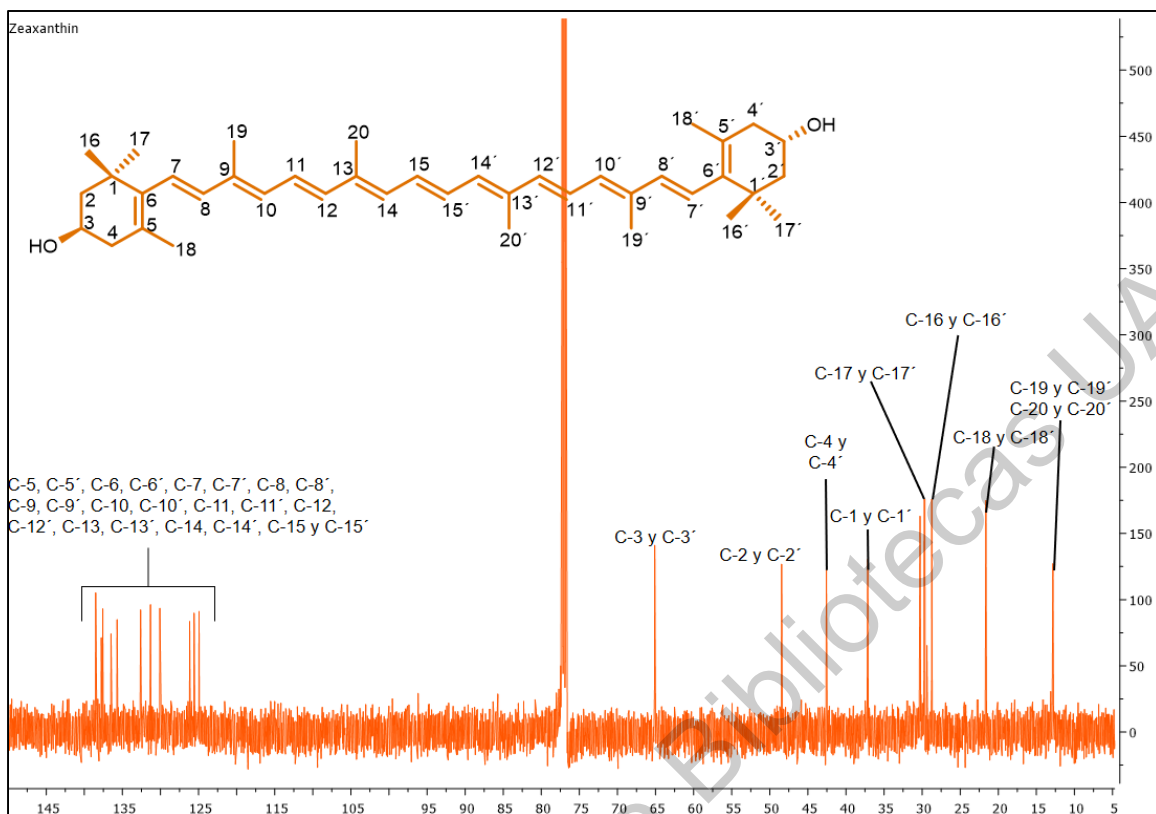


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de la (3*R*,3'*S*)-zeaxantina.

Las señales de los carbonos cuaternarios 1 y 1' aparecen ambos en 37.1 ppm. Las señales de los metilos se muestran entre 12.8 y 30.3 ppm correspondientes a las posiciones 16 y 16' (28.7), 17 y 17' (30.3), 18 y 18' (21.6), 19 y 19' (12.8), 20 y 20' (12.8). Por su parte, los metilenos de las posiciones 2, 2' y 4, 4' aparecen en 48.2 y 42.6 ppm, respectivamente. Las señales correspondientes a los metinos base de oxígeno 3 y 3' se observan en 65.1 ppm.

Al igual que con la luteína, las respectivas asignaciones de los protones y los carbonos fueron realizadas utilizando los espectros bidimensionales en modalidad COSY (**Figura 22**), HMBC y HSQC, y por comparación con datos reportados en la literatura [110]. En la **Figura 22** se muestra un espectro ^1H - ^1H COSY en el cual se observan las interacciones entre los protones no equivalentes de los metilenos en las posiciones 2, 2', 4 y 4' con el singulete del metino correspondiente a 3 y 3', lo

que demuestra la simetría en la molécula de zeaxantina comparada con su precursor la luteína.

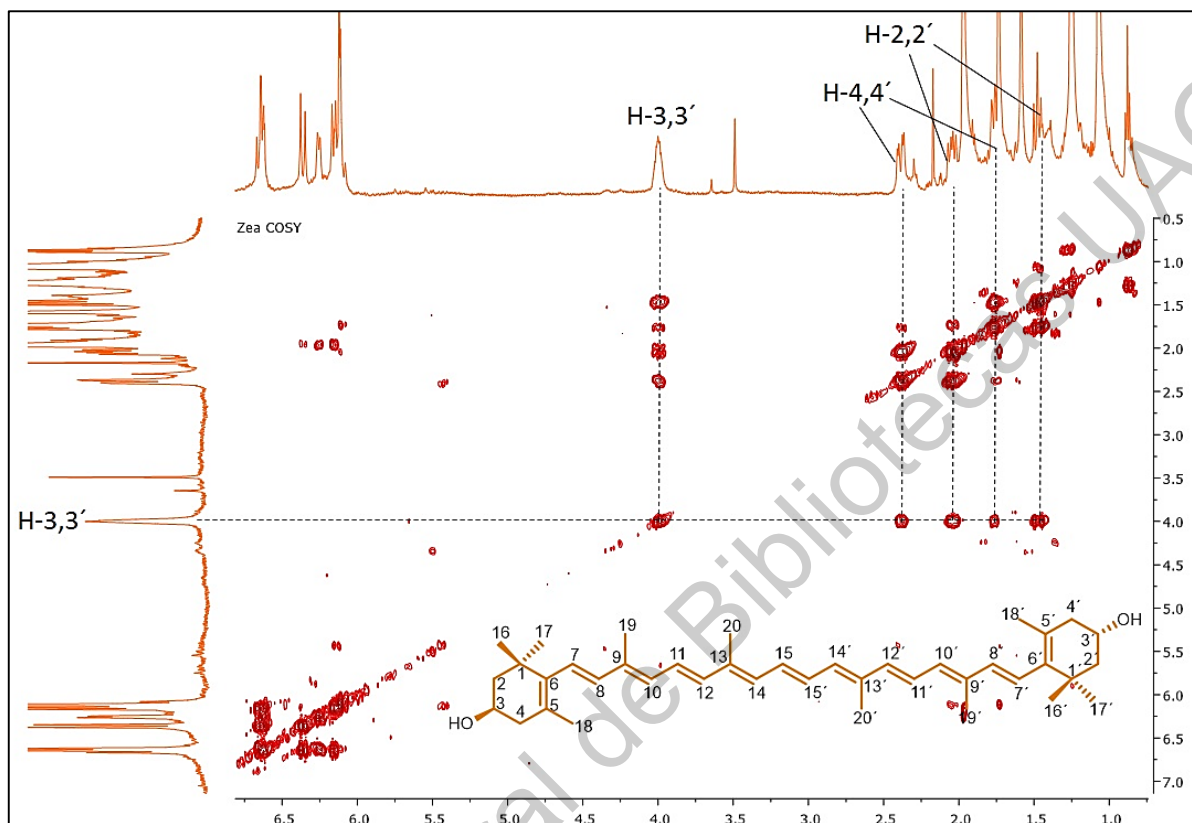


Figura 22. ^1H - ^1H COSY de la (3R,3'S)-zeaxantina (500 MHz, CDCl_3).

Finalmente, en la **Tabla 10** se resume la asignación de señales correspondientes a cada uno de los 40 átomos de carbono de la zeaxantina, así como los respectivos protones unidos a estos carbonos.

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN (500 MHz, CDCl₃) para la zeaxantina (2).

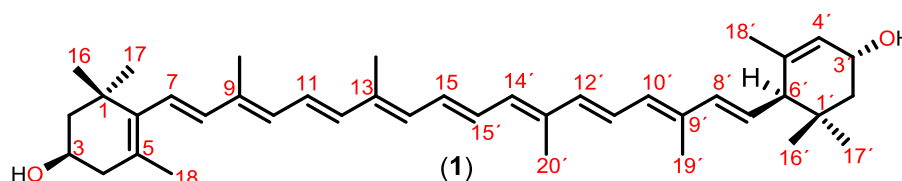
Zeaxantina (2)		
Posición	δ_c , tipo	δ_H (J en Hz)
1 & 1'	37.1, C	–
2 & 2'	48.4, CH ₂	1.77 m, 1.48 t, J = 12 Hz
3 & 3'	65.1, CH	4.00 m
4 & 4'	42.6, CH ₂	2.39 dd, J = 16.5, 5 Hz 2.04 dd, J = 16.5, 5 Hz
5 & 5'	126.2, C	–
6 & 6'	137.8, C	–
7 & 7'	125.6, CH	6.12*
8 & 8'	138.6, CH	6.15*
9 & 9'	135.7, C	–
10 & 10'	131.3, CH	6.17 m
11 & 11'	124.9, CH	6.64 m
12 & 12'	137.6, CH	6.37 d, J = 14.5 Hz
13 & 13'	136.4, C	–
14 & 14'	132.6, CH	6.26 m
15 & 15'	130.1, CH	6.62 m
16 & 16'	28.7, CH ₃	1.07 s
17 & 17'	30.3, CH ₃	1.07 s
18 & 18'	21.6, CH ₃	1.74 s
19 & 19'	12.8, CH ₃	1.97 s
20 & 20'	12.8, CH ₃	1.97 s

* Señal sobrepuesta

7.6.- Estudio computacional del pKa del protón H-6' en la luteína y del mecanismo de reacción de luteína a zeaxantina

Con el fin de entender el papel de la base en la reacción de isomerización, se calculó el valor de pKa del protón doblemente alílico en la posición 6' del anillo de α -ionona de la luteína. Para calibrar nuestra metodología computacional, se realizaron los cálculos utilizando diferentes funcionales (M06L, cam-B3LYP y ω B97XD) y distintos conjuntos base (6-31+G(d), 6-311+G(2d) y Def2-svp) (Tabla 11).

Tabla 11. Valores calculados de pKa del protón H-6' en la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína (**1**) con diferentes funcionales y conjuntos base.



	Método DFT	6-311+G(2d)	6-31+G(d)	Def2-svp
1	M06L	4.75	4.92	4.80
2	cam-b3lyp	4.87	4.90	4.90
3	ω B97XD	4.89	5.02	4.94

Los cálculos del pKa para el protón 6' permitieron establecer un valor para este protón de entre 4.75 y 5.03. Estos resultados sugieren que el proceso de isomerización no depende de la acidez del protón en la posición 6' para que éste ocurra, debido al hecho de que el uso de las bases como el *tert*-butóxido de potasio, el cual tiene un pKa similar al hidróxido de potasio, no lleva a la isomerización. Esto indica que la reacción es sólo posible con bases pequeñas y dicha reacción no ocurre con bases impedidas estéricamente, lo cual se confirmó experimentalmente (**Tabla 8**).

Con respecto al mecanismo involucrado en esta reacción de isomerización, se realizaron los cálculos DFT al nivel (PCM:*n*-butanol)M06-L/6-311+G(2d)//M06-L/6-31G(d) (**Figura 23**). Para este estudio se utilizó un sistema modelo, el cual consistió en el anillo de la α -ionona de la luteína. Asimismo, se realizaron los cálculos en el sistema completo, el cual involucra el sistema conjugado π en los dobles enlaces de la cadena del polieno. Los resultados obtenidos del sistema modelo son similares a los encontrados en el sistema completo. Sin embargo, se muestran en la **Figura 23** los cálculos del sistema modelo por simplicidad.

La reacción de isomerización comienza cuando la base (hidróxido de potasio) sustrae el protón en la posición 6' del sistema modelo de la luteína (**1_k**) (**Figura 23**). Este paso de reacción ocurre a través de un estado de transición **TS1_k** con una

barrera de energía de $17.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. La reacción continúa con la formación de un carbanión intermediario (**Int_k**), el cual posee una energía de $10.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ por encima de los reactivos. Posteriormente, este intermediario se reordena para formar un doble enlace en la posición 5' y 6' y con ello formar un polieno completamente conjugado y formar el carbanión en la posición 4'. En el segundo paso, la base conjugada transfiere el protón a la posición alílica (4') a través de un estado de transición **TS2_k**, con una barrera de energía de $7.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Esta protonación en la posición 4' lleva a la formación del sistema modelo de la zeaxantina (**2_k**), el cual es un paso exotérmico de $-18.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

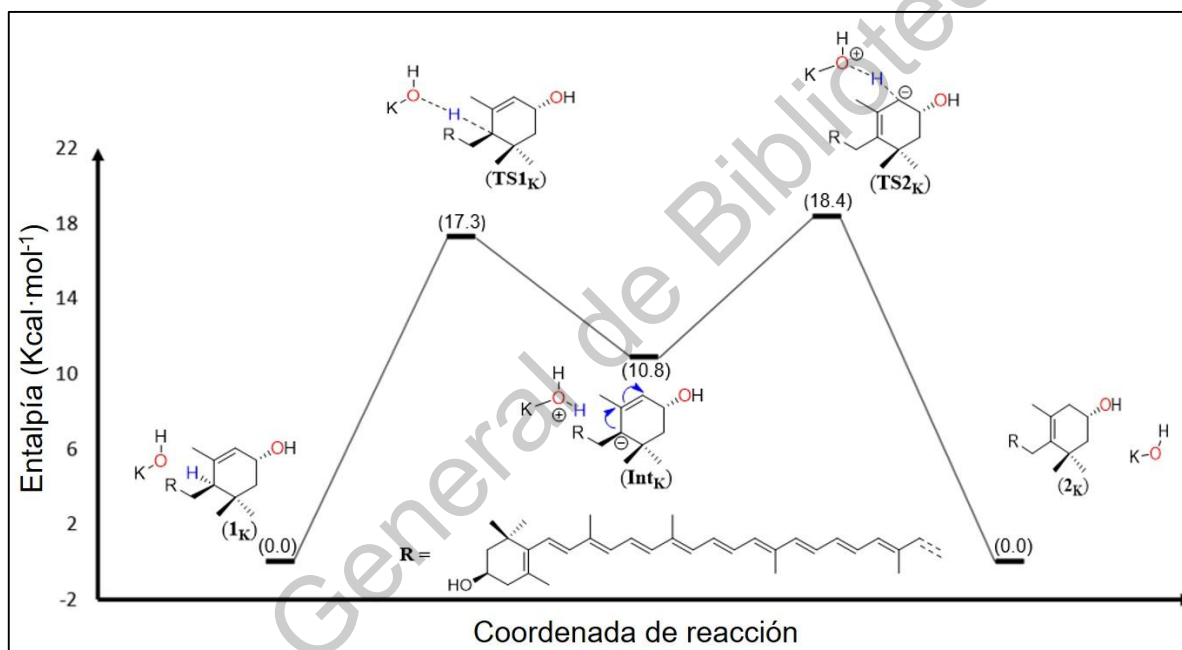


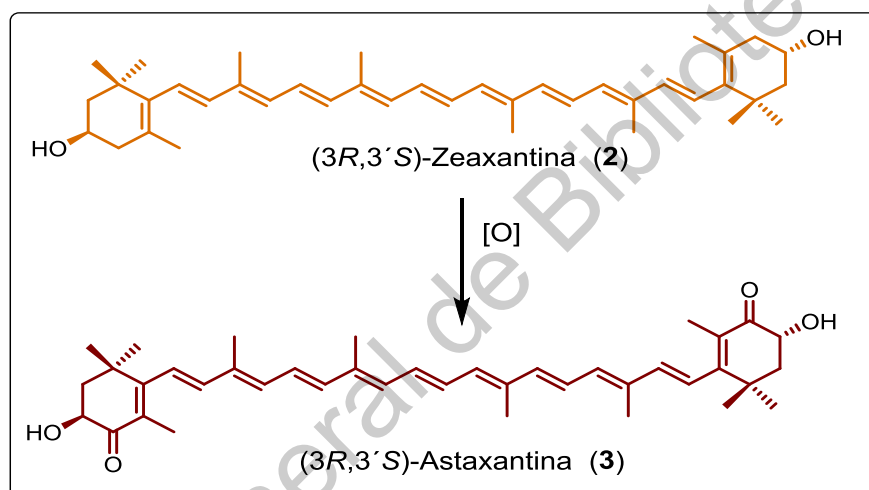
Figura 23. Perfil de energía calculado al nivel (PCM:*n*-butanol)M06-L/6-311+G(2d)//M06-L/6-31G(d) para la conversión of **1** a **2**.

También, se exploró computacionalmente el mecanismo de reacción con bases voluminosas como DBU y TEA. De esto último se concluye que se necesita de más energía para la conversión de **1** a **2** cuando se utilizan estas bases.

Los cálculos teóricos ayudaron a explicar por qué en los ensayos experimentales no ocurre la reacción de isomerización cuando se utilizan bases impedidas estéricamente.

7.7.- Síntesis de la (3*R*,3'*S*)-astaxantina a partir de la (3*R*,3'*S*)-zeaxantina

Para la síntesis de **3** (**Esquema 10**), se partió del compuesto **2** con una alta pureza y se emplearon concentraciones catalíticas de yodo y ácido hipobromoso como oxidantes (**Tabla 12**). Estas condiciones de reacción fueron similares a las propuestas por Schloemer y colaboradores [111]. Estos autores proponen que no es necesaria la protección de los grupos hidroxilos 3 y 3' presentes en la estructura de la zeaxantina por lo que utilizaron agentes halogenantes tales como *N*-bromo succinamida (NBS) para halogenar la posición alílica. Esta posición es posteriormente oxidada al grupo carbonilo con HBrO.



Esquema 10. Síntesis de la (3*R*,3'*S*)-astaxantina.

En esta parte del trabajo, nos enfocamos sólo al uso de sales y cantidades catalíticas de yodo con el fin de tener un proceso “amigable con el medio ambiente”. Es importante mencionar que estas sales son fácilmente removidas a partir del medio de reacción. Los reactivos utilizados en este proceso pueden formar radicales libres, y, por lo tanto, probablemente producir un radical alílico altamente estable derivado del compuesto **2**, el cual es posteriormente oxidado en los carbonos alílicos 4 y 4'. Esta hipótesis fue soportada por los cálculos teóricos que indicaron que la formación del radical alílico está favorecida con respecto al posible radical hidroxilo en la posición 3 y/o 3' (**Esquema 11**).

En las pruebas experimentales se utilizaron diferentes concentraciones de yodo y de sales para formar el agente oxidante (HBrO). Reportes previos indican que una disolución de yodo mezclada con algún carotenoide puede llevar a la formación de radicales derivados de carotenoides y esto ha sido confirmado por estudios de resonancia paramagnética electrónica [112-114].

Por lo tanto, utilizando diferentes proporciones de la mezcla oxidante, encontramos que, bajo condiciones de agitación vigorosa, en una solución acuosa con 2 equivalentes de bromato de sodio y 1 equivalente de metabisulfito de sodio mezclada con el compuesto **2**, se desencadena el proceso de oxidación con buenos rendimientos (72%). Asimismo, se encontró que utilizando diclorometano, pero no acetona o agua, la reacción procede (**Tabla 12**). El papel de la temperatura también fue investigado, encontrando que a temperatura ambiente o superior la reacción no se ve favorecida para la formación de **3**. Por el contrario, es necesaria una temperatura de 15 °C o inferior para que ocurra la formación del compuesto **3**. Sin embargo, cuando la reacción se lleva a cabo a una temperatura por debajo de 0 °C, se obtiene un bajo rendimiento.

Tabla 12. Reacción de oxidación de (3*R*,3'*S*)-zeaxantina a (3*R*,3'*S*)-astaxantina.

Ensayo	I ₂ % mol	Disolvente	Tiempo (Horas)	Rendimiento (%)
1	20	CH ₂ Cl ₂	4	46
2	10	CH ₂ Cl ₂	4	52
3	10	CH ₂ Cl ₂	2.5	72
4	5	CH ₂ Cl ₂	2.5	55
5	2	CH ₂ Cl ₂	2.5	60
6	10	CH ₂ Cl ₂	2.5	80 ^a
7	10	acetona	6	sr
8	10	agua	6	sr

^aReacción aplicando luz UV (365 nm); sr: sin reacción.

Todas estas pruebas permitieron establecer que la temperatura óptima para lograr la mejor conversión de **2** a **3** es de entre 0 y 10 °C. La relación óptima de yodo fue de 10% mol. Con una concentración de 20% mol o más, la reacción procede, pero el rendimiento disminuye a media que se aumenta la cantidad de yodo.

Por otra parte, al utilizar bajas concentraciones de yodo (entre 2 y 5% mol), la reacción procede, pero el rendimiento es más bajo que cuando se utiliza una concentración de 10% mol. En resumen, la mejor conversión fue lograda utilizando diclorometano como disolvente, a una temperatura de 10 °C, una concentración de yodo de 10% mol y un tiempo de reacción de 2.5 horas. También se encontró que la reacción puede proceder sin la aplicación de luz UV, aunque el rendimiento mejora en un 10 % cuando se aplica esta radiación a 365 nm durante 5 minutos. Asimismo, es importante mencionar que en disolución de diclorometano, la astaxantina tiende a isomerizarse geoméricamente para formar una mezcla de isómeros *cis-trans* (Ver **Figura 9**). De hecho, los productos comerciales de astaxantina, incluidos los productos obtenidos a partir del alga *H. pluvialis*, son una mezcla de los tres isómeros geométricos [115,116]. Nosotros observamos en el análisis mediante HPLC del producto final (**3**) (**Figura 24**) que se obtiene una mezcla de los tres isómeros geométricos.

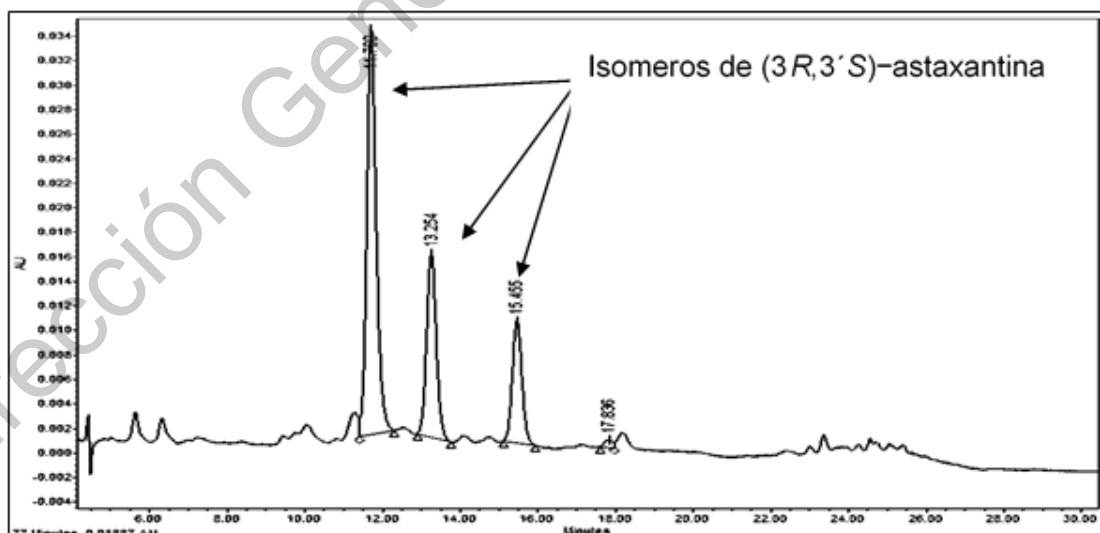


Figura 24. Cromatograma de la (3R,3'S)-astaxantina obtenida. Los tres picos observados son consecuencia de la isomerización *cis-trans*.

Para confirmar que efectivamente se trataban de isómeros geométricos de la astaxantina, se realizó la co-elución de la astaxantina obtenida con la luteína y la zeaxantina (**Figura 25**).

En la **Figura 25** se observan los picos pertenecientes a la luteína y zeaxantina, así como tres picos pertenecientes a los isómeros geométricos de la astaxantina.

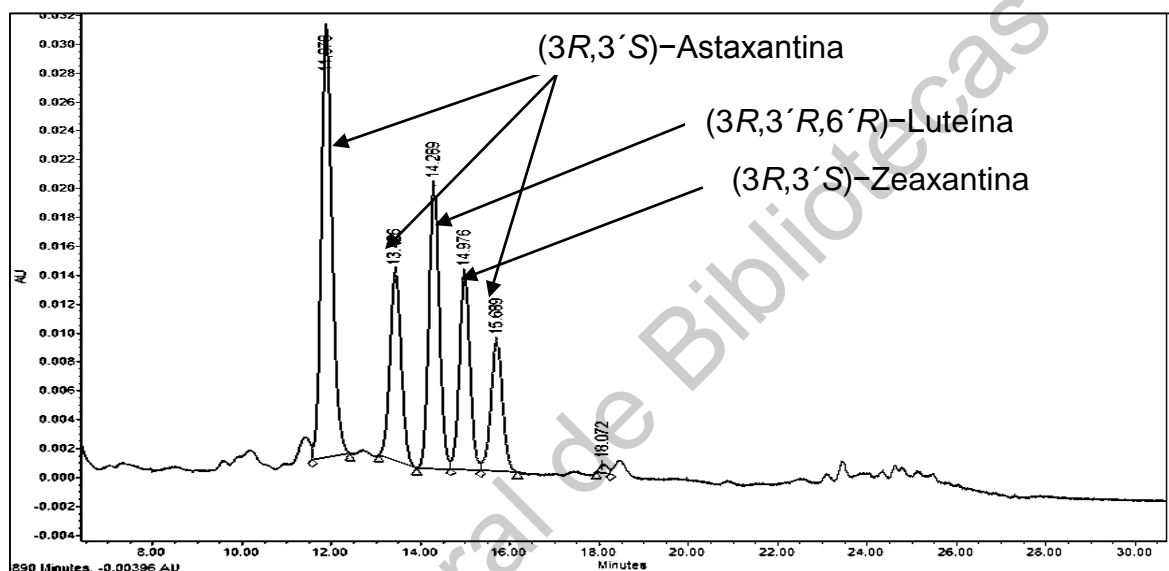


Figura 25. Coelución de la luteína, zeaxantina y astaxantina obtenidas en este trabajo.

Finalmente, se calculó el rendimiento global obtenido en la formación de **3** a partir de los ésteres de luteína, el cual fue del 68% y del 76% cuando se le aplica luz UV durante esta transformación.

7.8.- Caracterización de la (3R,3'S)-astaxantina

Al igual que con la luteína y la zeaxantina, para confirmar la naturaleza de la astaxantina obtenida después de la reacción de oxidación, se obtuvieron los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C , así como los espectros bidimensionales. También debido a la simetría que posee esta molécula, todas las señales, tanto en el espectro de protón, como en el de carbono, se muestran como señales dobles.

En la **Figura 26** se muestra el espectro de RMN de ^1H de la astaxantina, en el cual se observan, de campo bajo a campo alto, las señales características para los metinos vinílicos, de 6.68 a 6.20 ppm, correspondientes a los protones unidos a los carbonos 7 y 7' (6.20, m), 8 y 8' (6.43, traslapada), 10 y 10' (6.31, m), 11 y 11' (6.66, m), 12 y 12' (6.45 d, $J = 7.5$ Hz), 14 y 14' (6.29, m), y 15 y 15' (6.68, m).

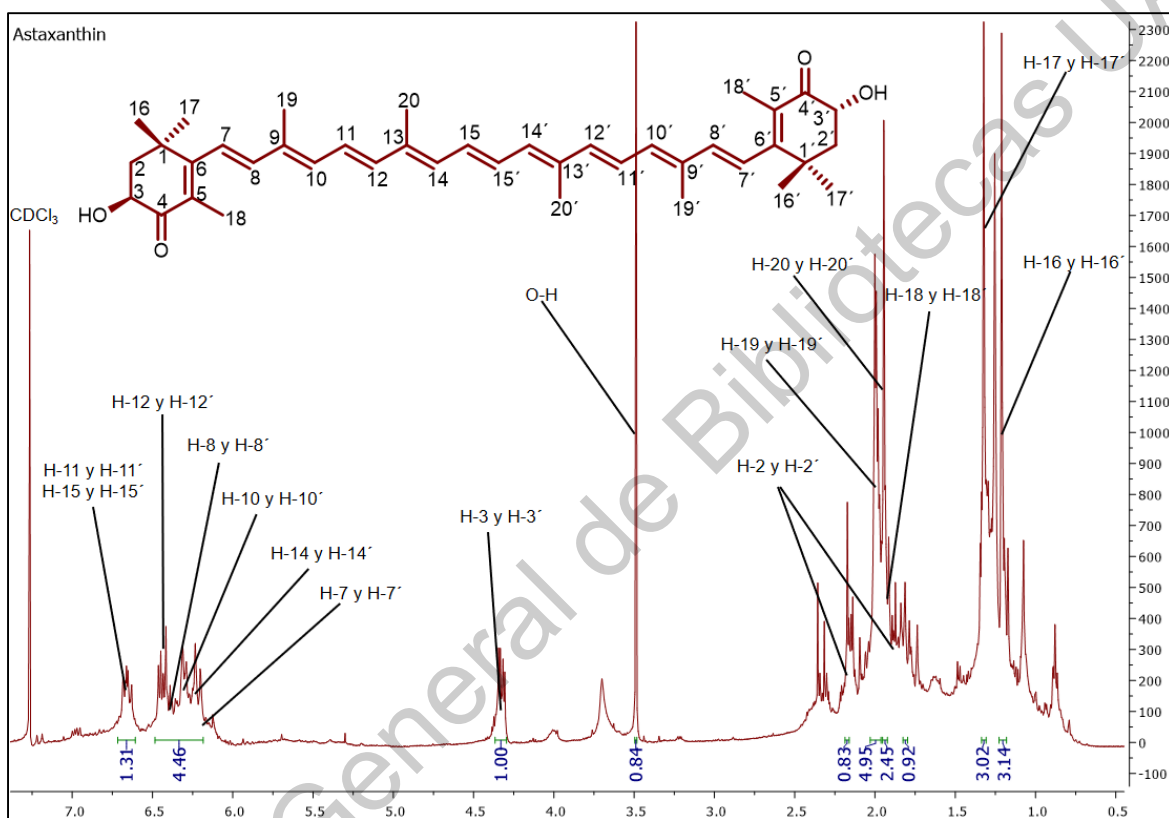


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de la (3R,3'S)-astaxantina.

Las señales correspondientes a los metinos base de oxígeno 3 y 3' aparecen ambos a 4.33 ppm como un doble de dobles. Los protones unidos a los carbonos en la posición 2 y 2' aparecen en 1.81 (m) y en 2.17 ppm traslapada con otra señal. Las señales características para los metilos aparecen de 1.07 a 1.97 ppm, las cuales se observan todas como singuletes y corresponden a los protones unidos a los carbonos: 16 y 16' (1.21 s), 17 y 17' (1.32 s), 18 y 18' (1.94 s), 19 y 19' (2.00 s), y 20 y 20' (1.99 s).

En el espectro de ^{13}C (**Figura 27**) se observan las señales características para los carbonos vinílicos, de 162.3 a 123.3 ppm, correspondientes a los carbonos 5 y 5' (126.8), 6 y 6' (162.3), 7 y 7' (123.3), 8 y 8' (142.4), 9 y 9' (134.8), 10 y 10' (135.2), 11 y 11' (124.6), 12 y 12' (139.7), 13 y 13' (136.7), 14 y 14' (133.8), 15 y 15' (130.7).

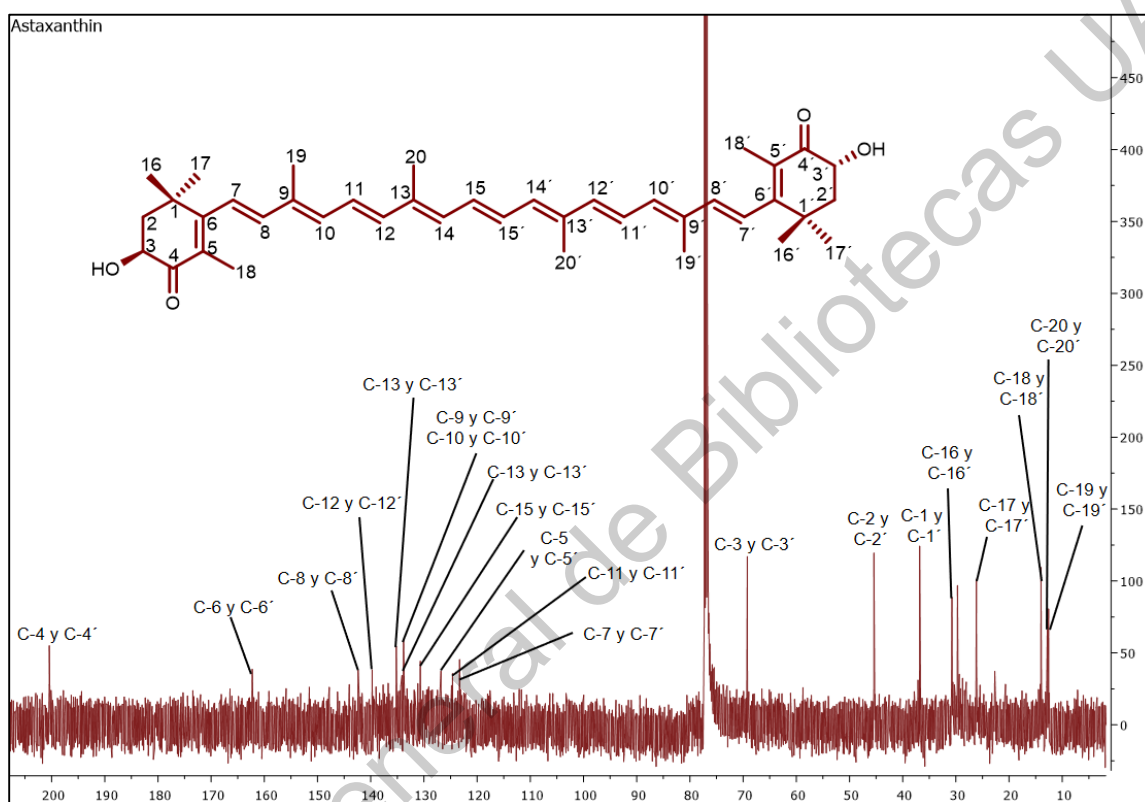


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de la (3*R*,3'*S*)-astaxantina.

Las señales de los carbonos cuaternarios 1 y 1' aparecen ambos en 36.8 ppm, mientras que la señal característica del grupo carbonilo de la astaxantina en la posición 4 y 4' aparece en 200.4 ppm. Las señales de los metilos se muestran entre 12.6 y 30.7 ppm correspondientes a las posiciones 16 y 16' (30.7), 17 y 17' (26.2), 18 y 18' (14.0), 19 y 19' (12.6), 20 y 20' (12.8). Por su parte, los metilenos de las posiciones 2 y 2' aparecen en 45.4 ppm, mientras que las señales correspondientes a los metinos base de oxígeno 3 y 3' se observan en 69.2 ppm.

También se obtuvieron los espectros bidimensionales para realizar la correcta asignación de este compuesto, así como su comparación con datos reportados en la literatura [117]. Como ejemplo, se muestra en la **Figura 28** el espectro en modalidad HMBC del compuesto **3**, en el cual se observa la interacción a tres enlaces del grupo carbonilo en 4-4' con los hidrógenos no equivalentes en 2-2'. Destaca, también, la interacción a tres enlaces entre el carbono vinílico y cuaternario en 6-6' con los metilos unidos a los carbonos C-16 y C-16', así como los C-17 y C-17'.

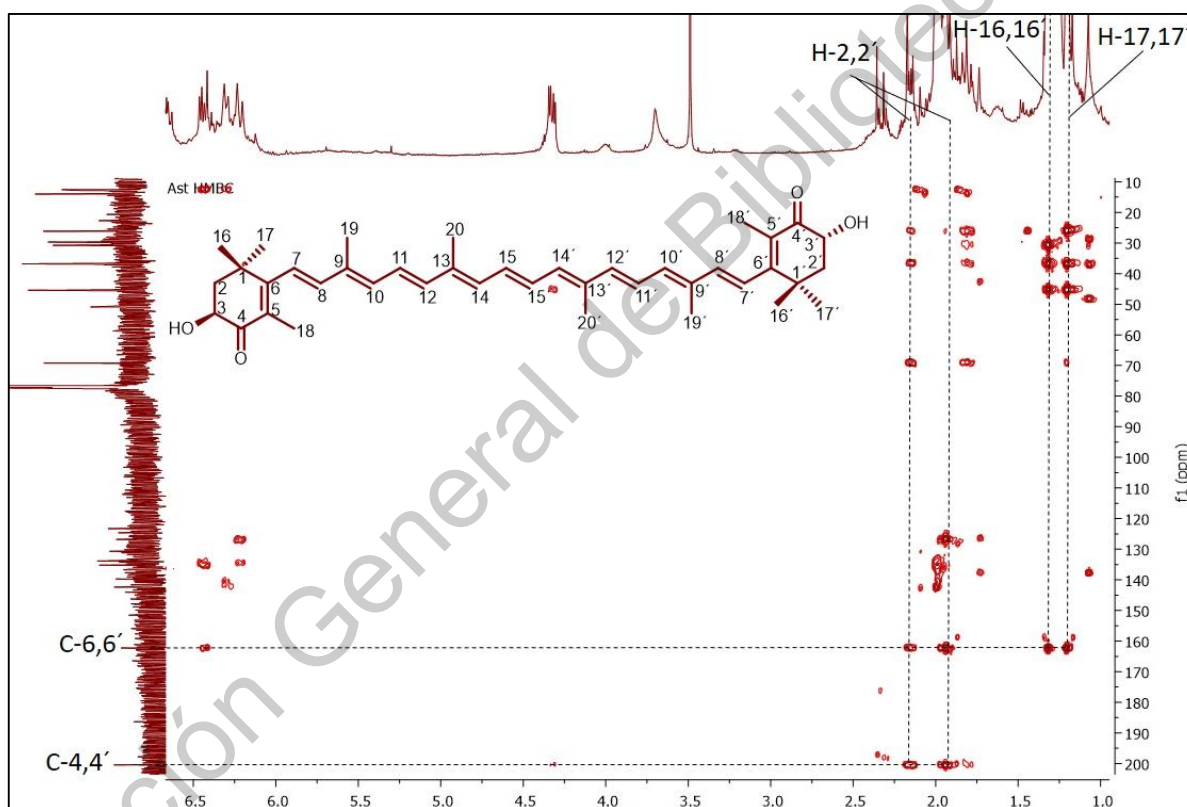


Figura 28. HMBC de la (3R,3'S)-astaxantina.

En la **Tabla 13** se resume la asignación de señales correspondientes a cada uno de los 40 átomos de carbono de la astaxantina, así como los respectivos protones unidos a estos carbonos.

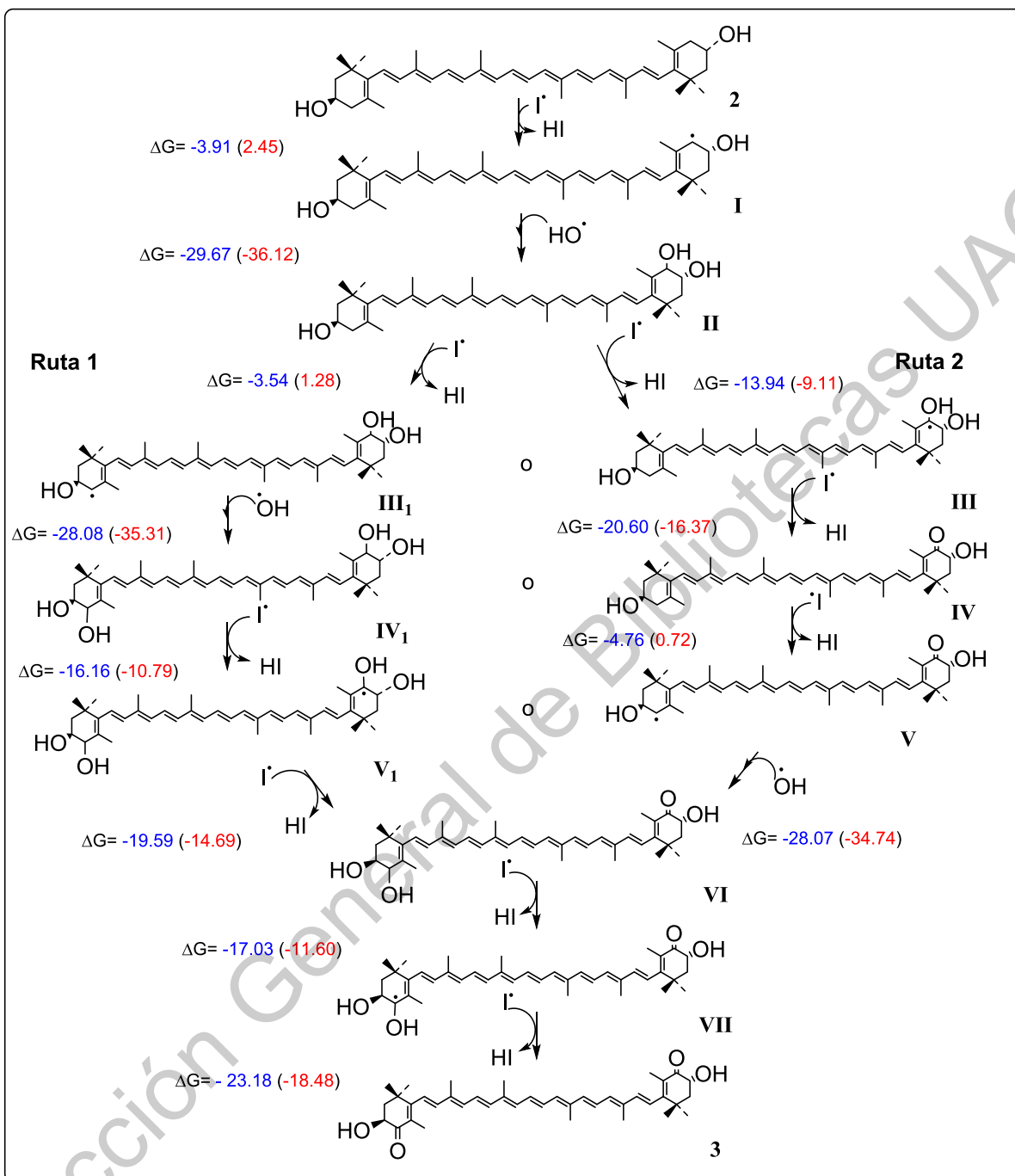
Tabla 13. Datos espectroscópicos de RMN (500MHz, CDCl₃) para la (3*R*,3'*S*)-astaxantina (**3**).

(3 <i>R</i> ,3' <i>S</i>)-astaxantina (3)		
Posición	δ _C , tipo	δ _H (<i>J</i> en Hz)
1 y 1'	36.8, C	–
2 y 2'	45.4, CH ₂	1.81 m, 2.17*
3 y 3'	69.2, CH	4.33 dd (<i>J</i> = 14.0, 5.5 Hz)
4 y 4'	200.4, C=O	–
5 y 5'	126.8, C	–
6 y 6'	162.3, C	–
7 y 7'	123.3, CH	6.20 m
8 y 8'	142.4, CH	6.43*
9 y 9'	134.8, C	–
10 y 10'	135.2, CH	6.31 m
11 y 11'	124.6, CH	6.66 m
12 y 12'	139.7, CH	6.45 d (<i>J</i> = 7.5 Hz)
13 y 13'	136.7, C	–
14 y 14'	133.8, CH	6.29 m
15 y 15'	130.7, CH	6.68 m
16 y 16'	30.7, CH ₃	1.21 s
17 y 17'	26.2, CH ₃	1.32 s
18 y 18'	14.0, CH ₃	1.94 s
19 y 19'	12.6, CH ₃	2.00*
20 y 20'	12.8, CH ₃	1.99*

* Señal sobrepuesta

7.9.- Estudio computacional del mecanismo de conversión de zeaxantina a astaxantina

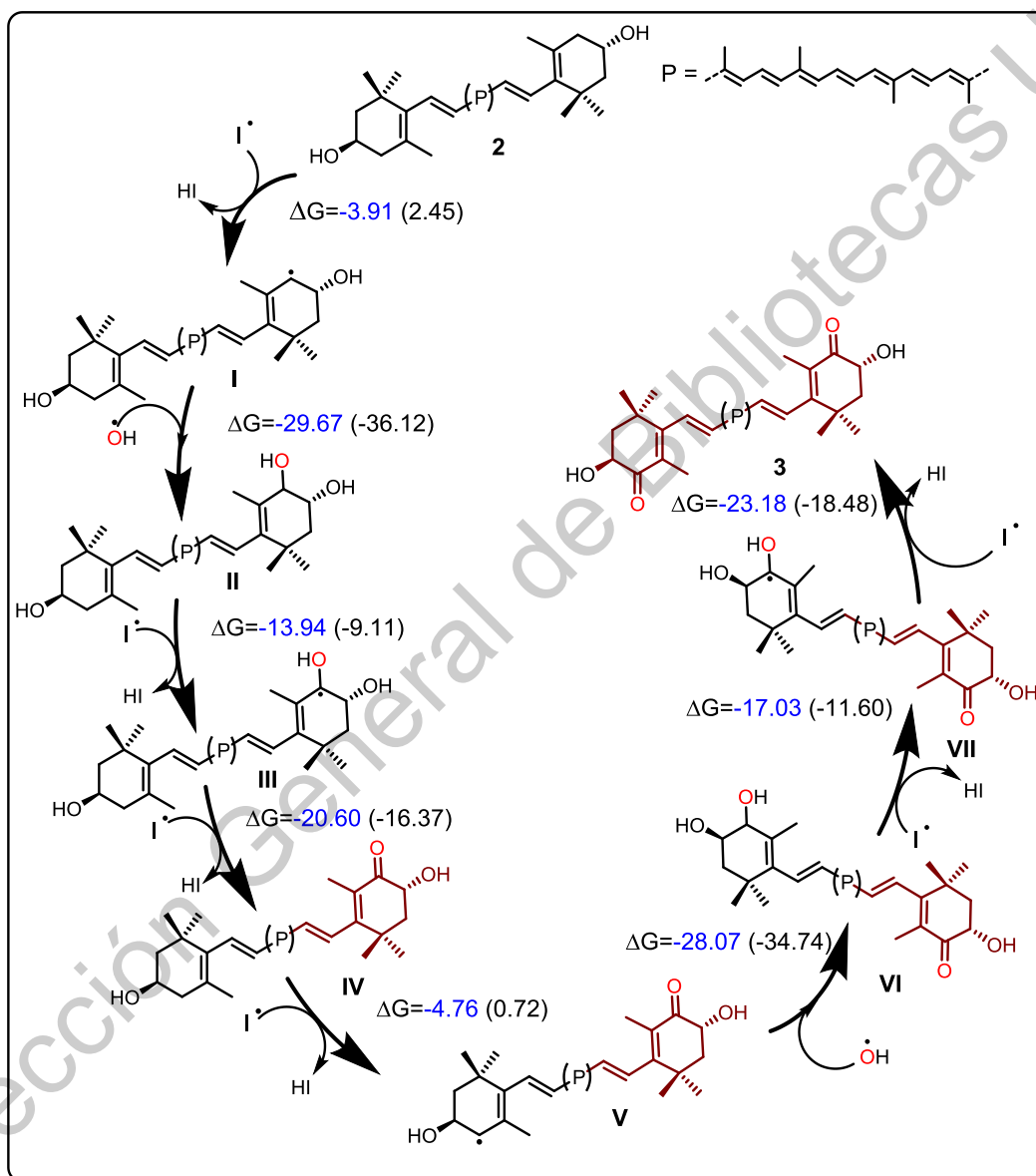
El estudio computacional del mecanismo de reacción involucrado en la reacción de oxidación fue realizado con el mismo nivel de teoría que el utilizado en la reacción de isomerización descrita anteriormente. Sin embargo, debido a que nuestra propuesta involucra pasos con radicales libres, el nivel de teoría utilizado no es lo suficientemente exacto para discutir la cinética de esta reacción. Por tal razón, no se proporcionan barreras energéticas (estados de transición e intermediarios), sino que solamente se proporcionan valores que indican si el paso de reacción está o no favorecido termodinámicamente [118]. A partir de los cálculos computacionales, se propone que la reacción inicia con la formación del radical alílico **I** en la posición 4' del compuesto **2** (**Esquema 11**). Posteriormente, la reacción con el radical hidroxilo forma el compuesto di-hidroxilado (**II**). A partir de aquí, existen dos posibles rutas; 1) la formación de un nuevo radical alílico en la posición C-4 (**Ruta 1**), o 2) la formación de radical hidroxi-alílico en la posición C-4' (**III**) (**Ruta 2**) (**Esquema 11**). Sin embargo, la formación de **III** ($\Delta G = -13.94$ kcal/mol) está más favorecida que la formación de **III₁** ($\Delta G = -3.54$ kcal/mol). Por esta razón, se asume el mecanismo de oxidación como se muestra en el **Esquema 12**.



Esquema 11. Rutas posibles para la oxidación de zeaxantina a astaxantina.

En el **Esquema 12**, la subsecuente reacción entre el radical yodo y el hidrógeno del grupo hidroxilo en la posición 4', seguido por la formación de un grupo carbonilo conjugado con el doble enlace de la posición 5(6) en **IV**, está favorecida. Después,

un nuevo radical alílico (**V**) es formado como resultado de la reacción entre **IV** y el yodo radical. En el siguiente paso, **V** reacciona con el radical hidroxilo para formar la α -hidroxi cetona **VI**. Finalmente, la reacción entre **VI** y el yodo radical genera el radical hidroxi alílico **VII**, el cual es deshidrogenado por la reacción con el radical yodo, llevando a la formación del compuesto final (**3**).



Esquema 12. Mecanismo radicalario plausible para la oxidación de **2** a **3**.

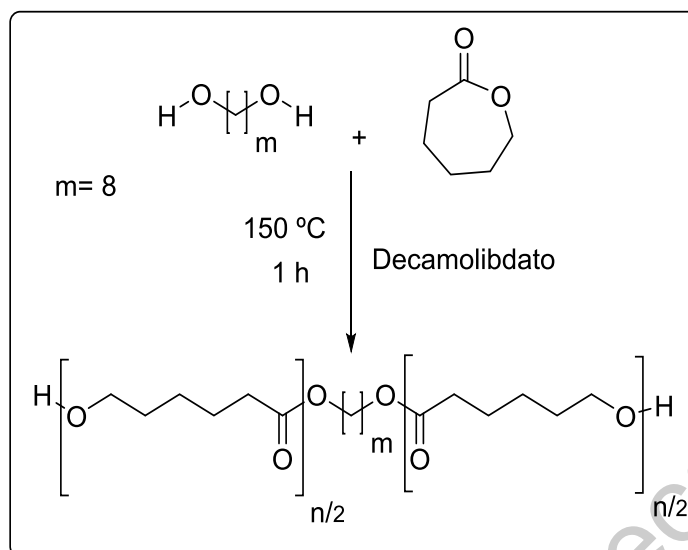
Es importante mencionar que este cálculo computacional aportó datos sobre el aumento en el rendimiento para la obtención de **3** cuando se aplica radiación UV, lo que soporta el plausible mecanismo radicalario para dicha transformación.

7.10.- Síntesis de poliésteres uretanos utilizando cuatro distintos macrodioles y las xantófilas 1, 2 y 3 como extendedores de cadena

7.10.1.- Síntesis de los macrodioles precursores de los PEUs

Una vez obtenidas la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína (**1**), la (3*R*,3'*S*)-zeaxantina (**2**) y la (3*R*,3'*S*)-astaxantina (**3**), siguiendo los procesos anteriormente descritos, se procedió a hacer uso de estos compuestos como extendedores de cadena en la síntesis de poliésteres uretanos con el fin de obtener un nuevo material (polímero) que potencialmente conserve las características químicas intrínsecas de los carotenoides, tales como su elevado efecto antioxidante. Sin embargo, es importante conocer, en primera instancia, la naturaleza química del nuevo material obtenido mediante su caracterización física y química para, a partir de ello, proyectar una posible aplicación.

Para la síntesis de los poliésteres uretanos (PEUs), se sintetizaron cuatro diferentes macrodioles derivados del 1,8-octanodiol (Oct) y la ϵ -caprolactona (CL), con grados de polimerización (GP) de 5, 10, 15 y 20. Los macrodioles (HOPCLOH) fueron obtenidos mediante polimerización por apertura de anillo utilizando decamolibdato de amonio $[(\text{NH}_4)_8[\text{Mo}_{10}\text{O}_{34}]]$ como catalizador (**Esquema 13**) [104-106].



Esquema 13. Síntesis de macrodioles.

Los macrodioles fueron obtenidos con una excelente conversión de entre 97 y 99% (**Tabla 14**). Los valores experimentales del peso molecular numeral (M_n) fueron obtenidos por cromatografía de permeación en gel (CPG) y se encontraron entre 1200 y 6600 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (**Tabla 14**).

Tabla 14. Síntesis de macrodioles derivados del 1,8-octanodiol y CL.

Ensayo	[CL]/[I] ^a	GP ^b	M_n^b	M_n^c	$M_w/M_n^{c,d}$	Conversión (%)
1	5	5.0	645	1239	1.36	99
2	10	9.9	1200	2227	1.36	99
3	15	15.0	1670	3679	1.35	99
4	20	19.4	2190	6612	1.35	97

^a [CL]/[iniciador]. ^b Determinado por RMN de ^1H en CDCl_3 . ^c Determinado por análisis de CPG. ^d M_w/M_n : polidispersidad.

7.10.2.- Caracterización de los macrodioles precursores de los PEUs

Para confirmar la naturaleza química de los macrodioles, se obtuvieron los respectivos espectros de RMN de ^1H para cada uno de los cuatro macrodioles sintetizados. A partir de dichos espectros, se calculó el correspondiente valor de GP a través de la relación que existe entre las integrales de las señales

correspondientes a los protones de los metilenos adyacentes al grupo éster (señal etiquetada como **a** en la **Figura 29**) con la integral de la señal correspondiente a los metilenos terminales (señal etiquetada como **e'**). Para establecer esa relación se utilizó la siguiente ecuación:

$$GP_{(RMN)} = \left(\frac{I_{pol}}{\#H_{pol}} \right) \left(\frac{I_{ter}}{\#H_{ter}} \right) \quad (2)$$

Donde I_{pol} es el valor de la integral de la señal etiquetada como “a” y observada como un triplete a 2.31 ppm en la **Figura 29**, $\#H_{pol}$ es el número de hidrógenos para los que integra dicha señal. I_{ter} es el valor de la integral de la señal etiquetada como “e” y observada como un triplete en 3.65 ppm, $\#H_{ter}$ es el número de hidrógenos para los que integra dicha señal. Finalmente, se multiplica por 2 debido a que el iniciador utilizado es bifuncional.

Por otra parte, los valores correspondientes al M_n mostrados en la **Tabla 14** se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$M_{n(RMN)} = (GP_{(RMN)})(M_{WCL}) + M_{Wdiol}$$

Donde M_{WCL} es el peso molecular del macrodiol y M_{Wdiol} es el peso molecular del diol.

También el grado de conversión para la obtención de estos macrodioles se obtuvo a través del análisis de los espectros de 1H , utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ Conversión} = \left(\frac{I_{pol}}{\#H_{pol}} \right) \left(\frac{ICL}{\#HCL} + \frac{I_{pol}}{\#H_{pol}} \right) \quad (100)$$

En donde ICL es el valor de la integral de la señal del monómero, $\#HCL$ es el número de hidrógenos para el cual integra la señal del monómero.

En la **Figura 29** se muestra el espectro de RMN de 1H del macrodiol correspondiente al $GP = 10$. En dicho espectro se pueden apreciar las señales correspondientes al metileno terminal (**e'**) en 3.65 ppm y de los metilenos adyacentes al grupo carbonilo en 2.31 ppm (**a**). Los metilenos **b** y **d** aparecen

traslapados en 1.64 ppm, mientras que las señales correspondientes a los metilenos C y D aparecen traslapadas a aproximadamente 1.32 ppm.

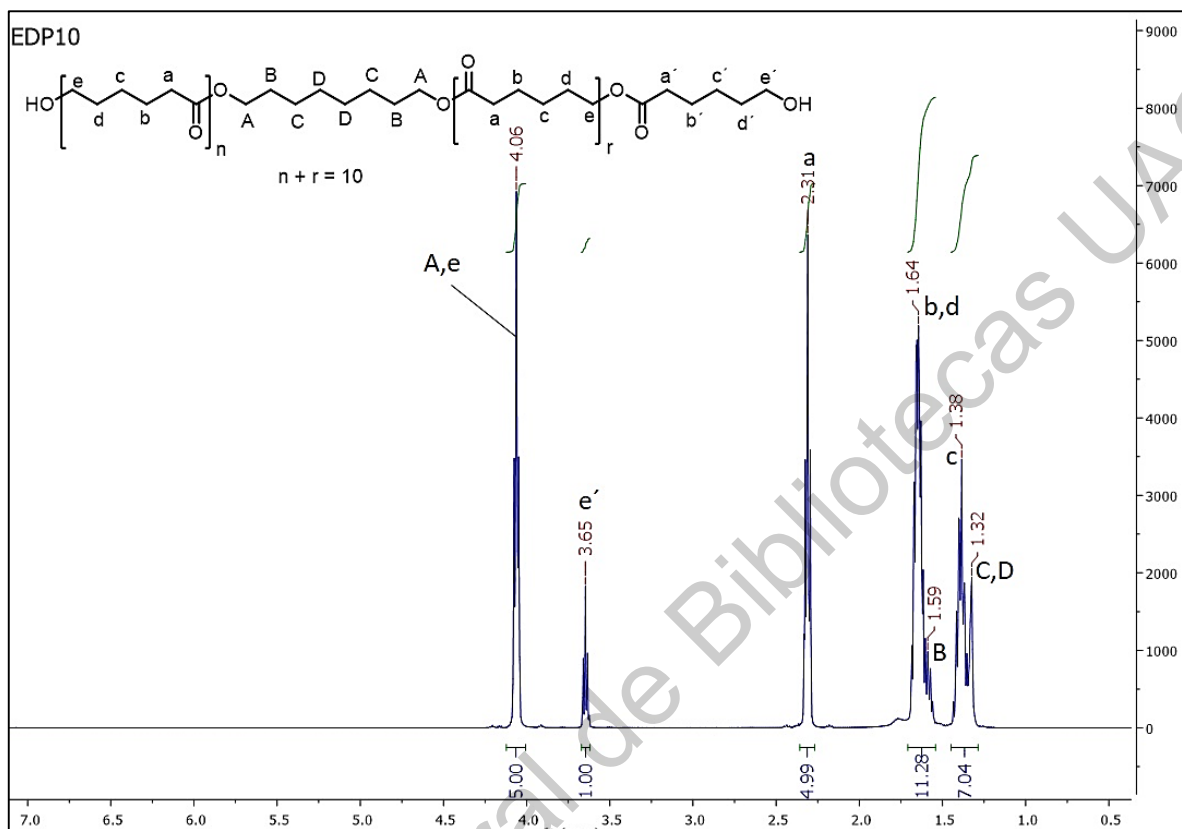
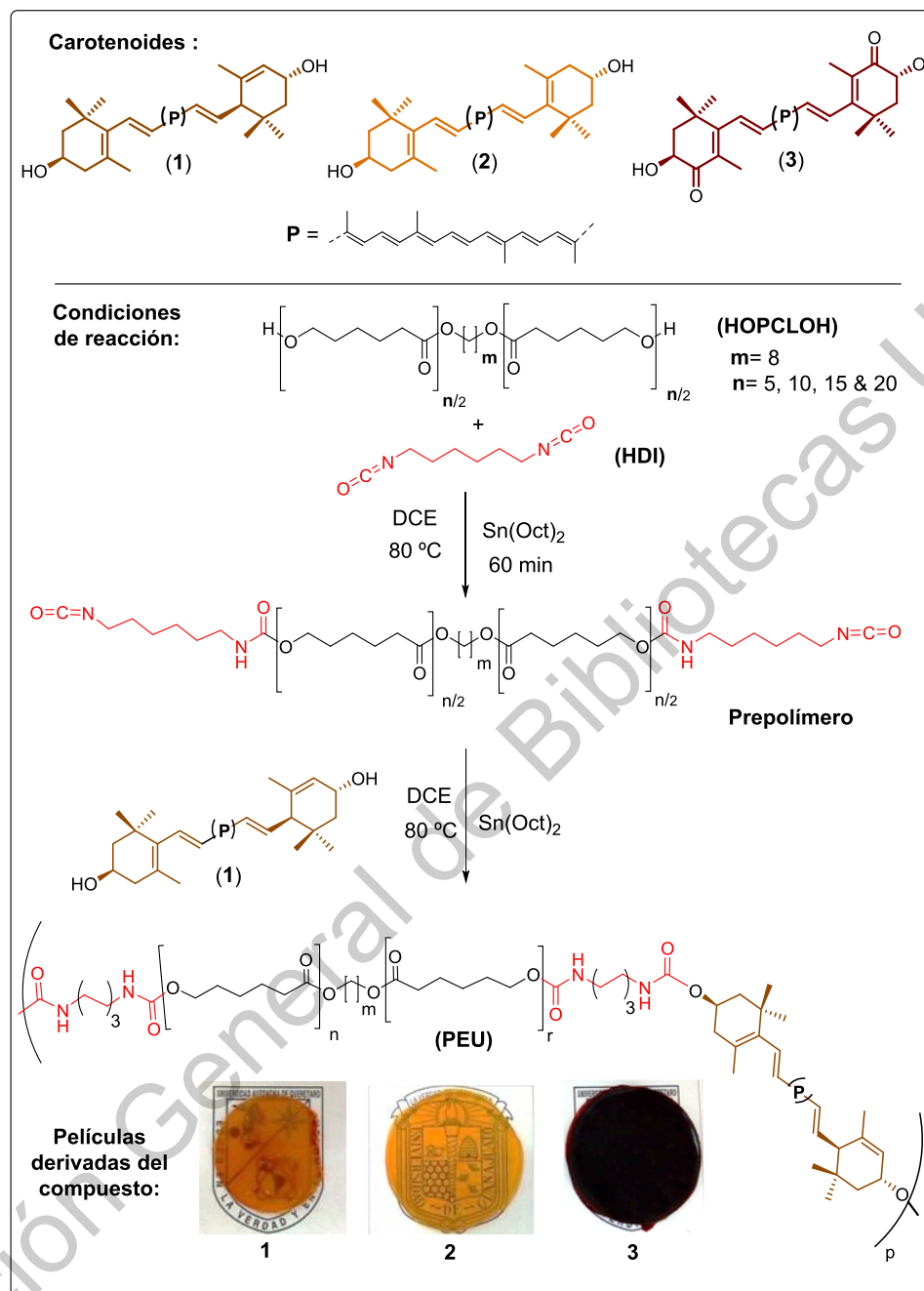


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) en CDCl_3 del macrodiol con GP = 10.

7.11.- Síntesis de los PEUs utilizando 1, 2 y 3 como extendedores de cadena

Los distintos macrodioles (GP = 5, 10, 15 o 20) se pusieron a reaccionar con el 1,6-hexametilen diisocianato (HDI), en presencia de octanoato de estaño (II) $[\text{Sn}(\text{Oct})_2]$ como catalizador y 1,2-dicloroetano (DCE) como disolvente, durante 1 hora a una temperatura de 80 °C para formar un prepolímero. Transcurrido ese tiempo, se adicionó el extendedor de cadena (xantófila 1, 2 o 3) (**Esquema 14**).



Esquema 14. Síntesis de PEUs utilizando las xantófilas 1, 2 y 3 como extendedores de cadena.

La mezcla de reacción fue agitada durante un periodo de tiempo de entre 1.3 y 5 horas. Ésta fue detenida cuando la disolución comenzó a tornarse viscosa. Una vez terminada la reacción, el disolvente fue evaporado lentamente mediante “*casting*” en un molde de vidrio provisto de una superficie de PTFE en el fondo

dentro de la campana de extracción para formar las respectivas películas (**Figura 30**). Por comparación, cuatro PEUs más fueron sintetizados utilizando 1,8-octanodiol como extendedor de cadena y el mismo prepolímero a partir de los macrodioles con GP = 5, 10, 15 o 20.

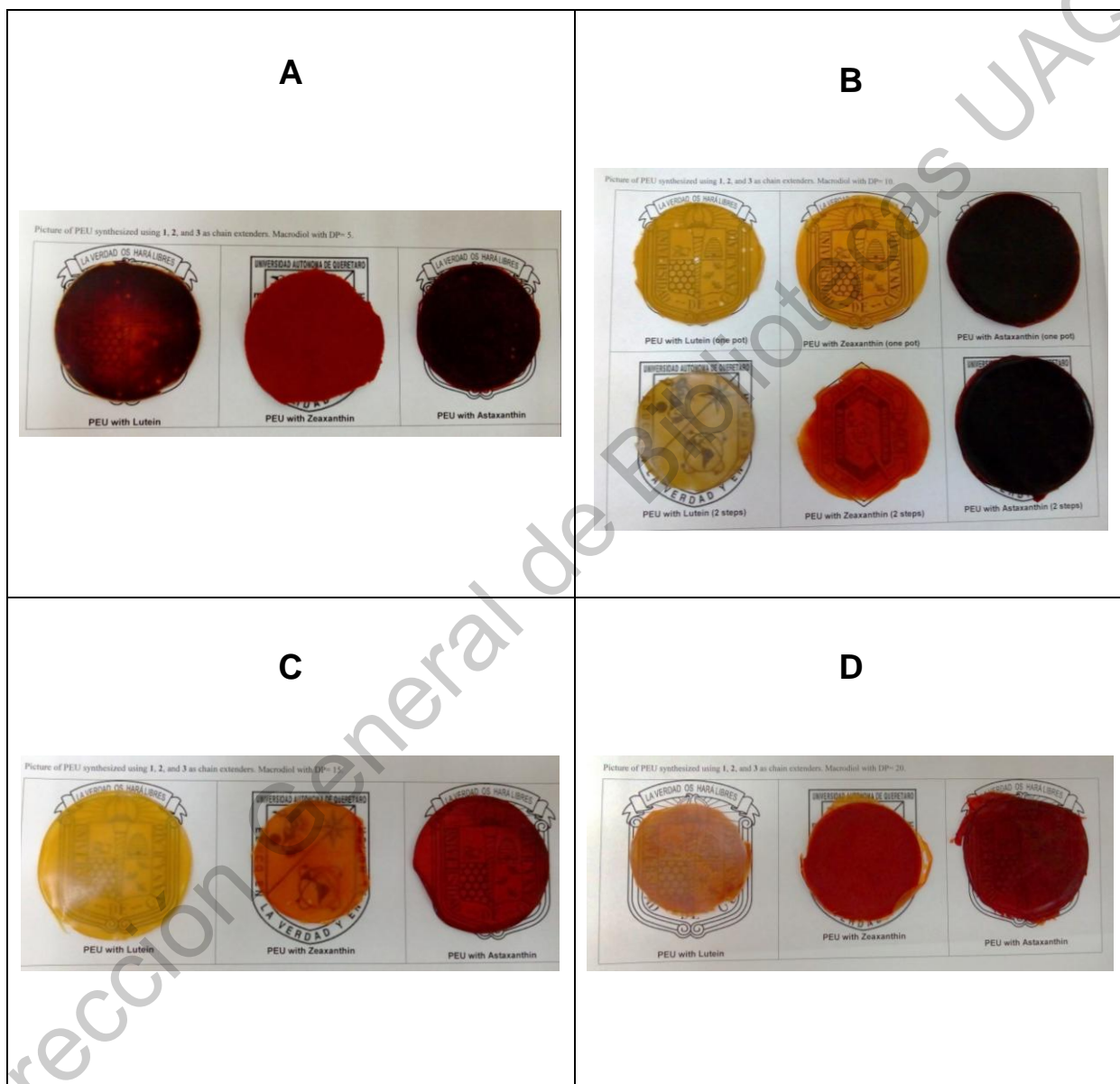


Figura 30. Fotografías de las películas de los PEUs sintetizados utilizando **1, 2 y 3** como extendedores de cadena y el macrodiol con GP = 5 (**A**), GP = 10 sintetizada en una ruta one pot (**B arriba**) y sintetizadas en dos pasos (**B abajo**) GP = 15 (**C**), y GP = 20 (**D**).

7.12.- Caracterización de los PEUs mediante resonancia magnética nuclear y espectroscopia de infrarrojo

Algunas películas de PEUs fueron caracterizadas utilizando RMN de ^1H y ^{13}C , aunque otras no pudieron ser caracterizadas por esta técnica, debido a la baja solubilidad, inclusive en DMSO a $100\text{ }^\circ\text{C}$. La **Figura 31** muestra el espectro de RMN de ^{13}C del PEU obtenido a partir del compuesto **2** y el macrodiol con GP = 20.

Las señales a un δ desde 124.9 hasta 138.5 en el espectro de la xantófila libre (**Figura 20**) y en el PEU fueron asignadas a los átomos de carbono 5 hasta 15 y de 5' hasta 15' (carbonos vinílicos) de la zeaxantina libre y el fragmento de la zeaxantina en el PEU (**Figura 31**). Las señales a 173.6 ppm y 156.7 ppm corresponden a los carbonilos del grupo éster y del grupo uretano, respectivamente.

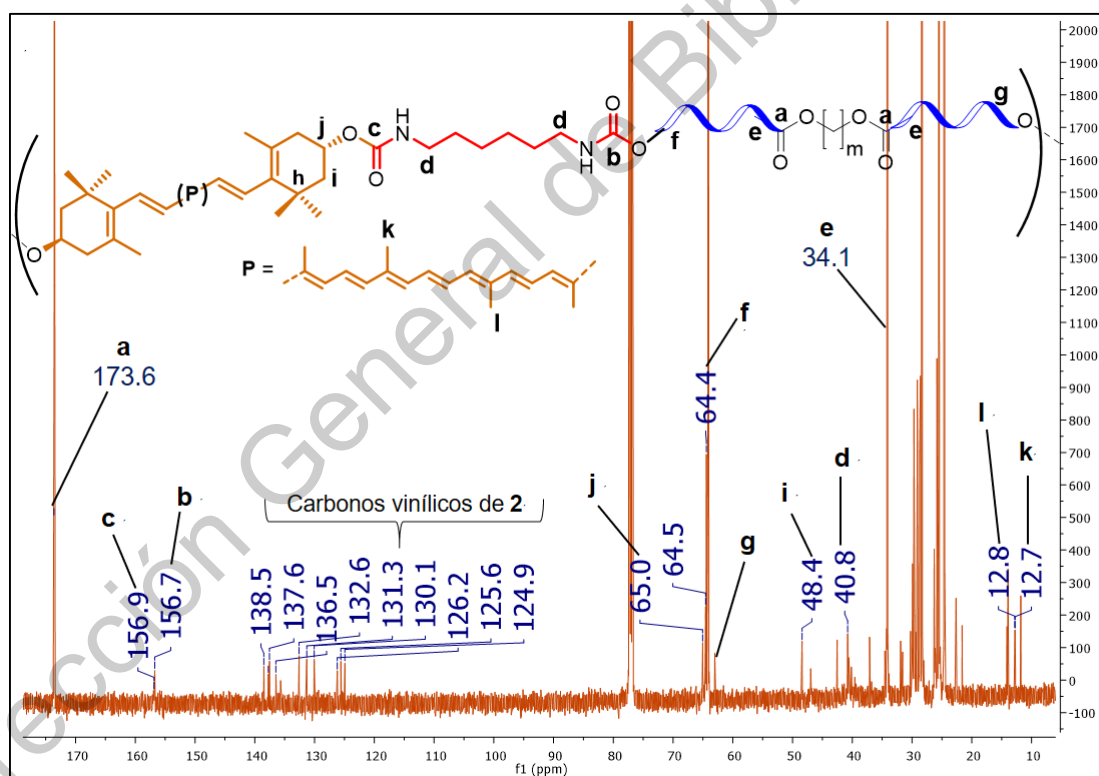


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) del PEU derivado de **2**.

La señal en $\delta = 64.1$ fue asignada a los carbonos de los metilenos unidos al oxígeno sp^3 del grupo éster ($-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$). Además, la señal a $\delta 40.8$ corresponde

al metileno unido al grupo uretano ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-NH-CO-O-}$) y la señal en 34.1 ppm corresponde al metileno unido al grupo carbonilo del éster ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CO-O-}$). Asimismo, el espectro de RMN de ^1H de este PEU (**Figura A9**) confirma la presencia de la xantófila en la estructura del PEU.

En ese mismo sentido, los análisis mediante espectroscopia IR por transformada de Fourier (FT-IR) resultaron muy útiles para la caracterización de los grupos carbonilos presentes en los macrodioles y los PEUs sintetizados. Las señales características de los carbonilos del éster y del uretano en la película del PEU obtenido a partir del compuesto **1** y del macrodiol con GP = 5 se observan a 1729 cm^{-1} y 1684 cm^{-1} , respectivamente (**Figura 29 A**). También las bandas en 3314 cm^{-1} y 1536 cm^{-1} corroboran el estiramiento (ν) N-H y el tijereteo (δ) del N-H del grupo uretano, respectivamente. En el espectro de la poli(ϵ -caprolactona) (HOPCLOH) (**Figura 29 B**), se observa una sola banda en la región de estiramiento del carbonilo a 1722 cm^{-1} , la cual corresponde al grupo éster $[-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-]$. Con respecto a la xantófila **1** utilizada como extendedora de la cadena (**Figura 29 C**), se observa una banda ancha correspondiente al grupo hidroxilo a 3387 cm^{-1} y una pequeña banda a 3012 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C-H del grupo vinílico.

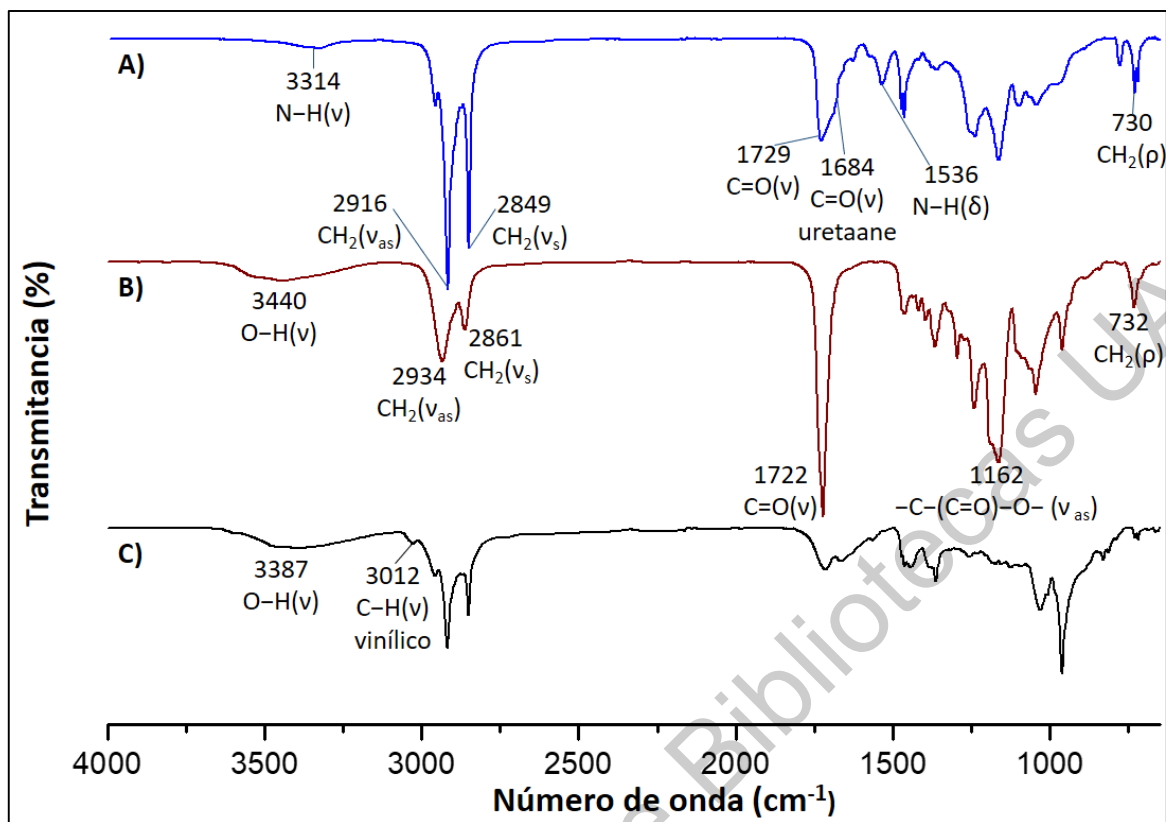


Figura 32. Espectros IR del PEU sintetizado a partir del macrodiol con GP = 5 y el compuesto **1** como extendedor de cadena (A), macrodiol con GP = 5 (B), y el compuesto **1** (C).

7.13.- Calorimetría de los PEUs

La calorimetría diferencial de barrido fue utilizada para conocer la temperatura de fusión de los diferentes segmentos en la estructura de todos los PEUs y sus respectivos macrodioles. En la **Figura 33** se muestran los termogramas de los cuatro diferentes macrodioles y una serie comparativa de PEU derivados de dos macrodioles (GP = 10 y 20) y los diferentes extendedores de cadena (**1**, **2**, **3** y Oct). Los puntos de fusión para los cuatro HOPCLOH fueron detectados entre 25.7 y 44.3 °C (**Figura 33**). Estos macrodioles muestran una tendencia a incrementar la temperatura de fusión (T_F) con respecto al incremento del GP.

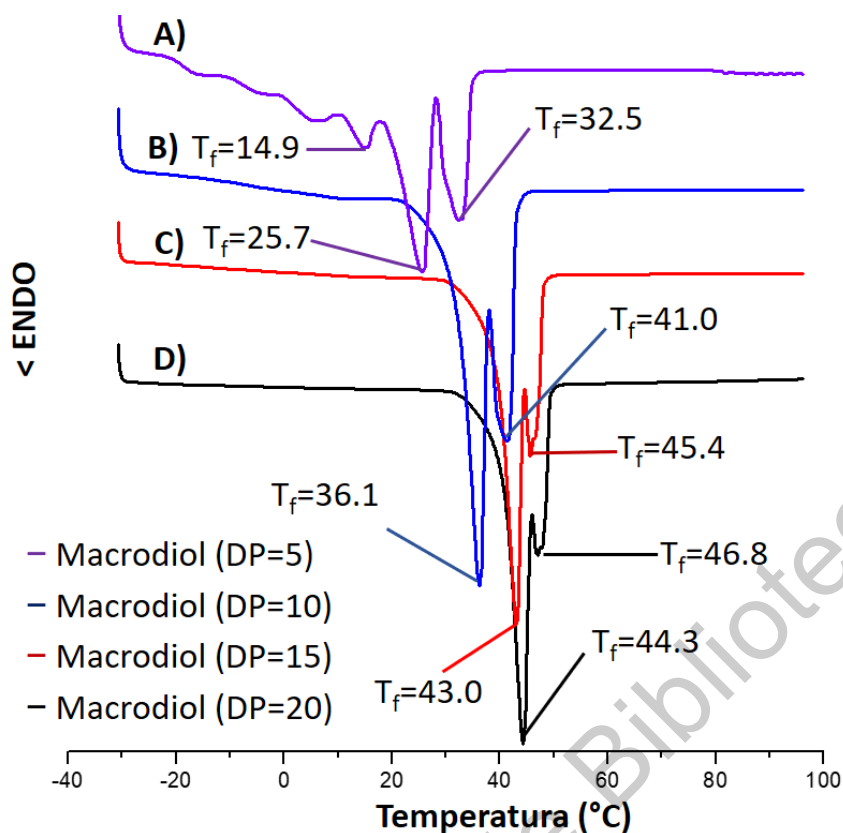


Figura 33. Termogramas de los cuatro macrodiolos. Condiciones: 10 °C/min (exo arriba), segundo ciclo de calentamiento. (Grado de polimerización GP = DP)

Los puntos de fusión para la serie de PEUs derivados del macrodiol con GP = 10, obtenido en dos pasos con los diferentes extendedores de cadena, se observan entre 28.7 y 34.4 °C (**Figura 34 E-I**). Estos resultados son muy similares a los encontrados para la serie de PEUs derivados del macrodiol con GP = 10 obtenidos mediante la forma *one-pot* (**Figura A12**). Por lo que no se observa una diferencia significativa entre los PEUs obtenidos en sólo paso comparado con los obtenidos en dos pasos.

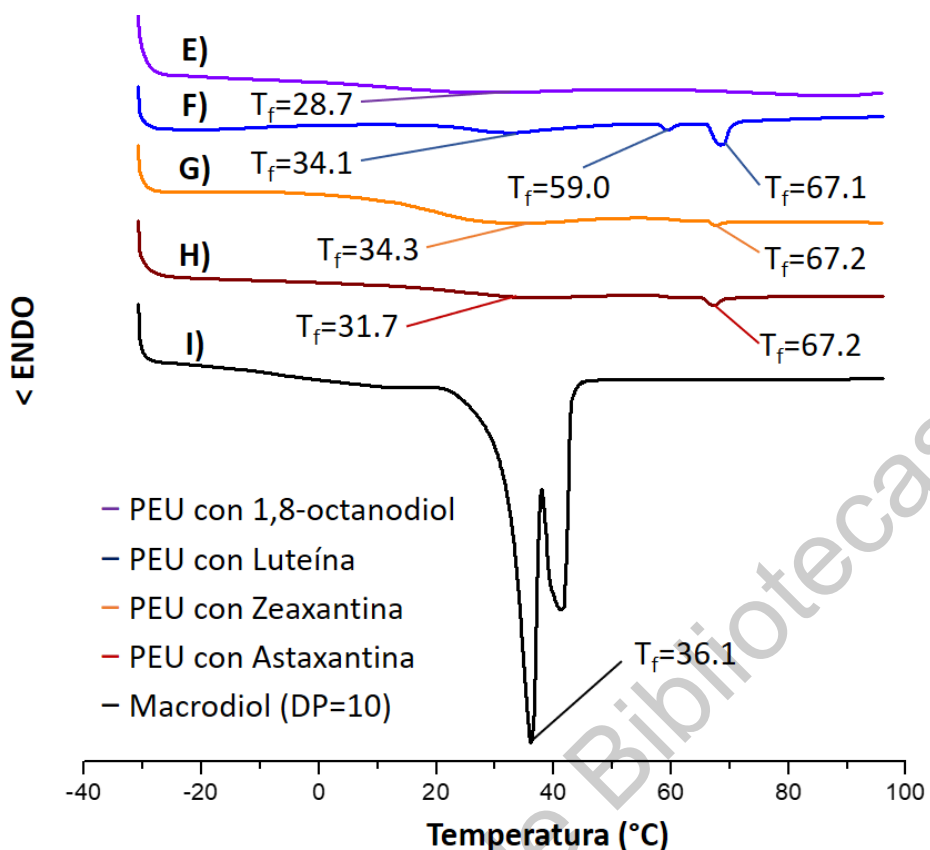


Figura 34. Termogramas de los PEUs sintetizados a partir del macrodiol con GP = 10. Condiciones: 10 °C/min (exo arriba), segundo ciclo de calentamiento.

Los PEUs obtenidos a partir del Oct muestran una baja temperatura de fusión. Esta serie de PEUs (GP = 10) presenta una segunda temperatura de fusión (T_{f2}) entre 67.1 y 67.2 °C, la cual puede ser atribuida a la fusión del segmento duro. Para confirmar dicha aseveración, el segmento duro fue sintetizado de forma independiente, utilizando HDI y cada una de las tres xantófilas. Como se esperaba, los resultados de los tres polímeros (poliuretano carotenoide) muestran una única temperatura de fusión en 67 °C (**Figura A17**).

Todos los PEUs muestran un comportamiento similar en su T_f entre cada serie, excepto la serie derivada del macrodiol con GP = 5, la cual no muestra cristalinidad en el segmento suave (**Figura A13**). Asimismo, los PEUs obtenidos cuando se utiliza el Oct como extendedor no muestran esa segunda temperatura de fusión, en contraste con los derivados de la luteína que muestran la T_{f2} cercana a

67 °C. Esta característica puede ser atribuida a una mayor asimetría en la molécula de luteína, la cual posee tres centros quirales ($3R,3'R,6'R$) comparado con la estructura *meso* de las xantófilas **2** y **3**.

Respecto a la serie de PEUs derivados del macrodiol con GP = 20 y los diferentes extendedores de cadena, los puntos de fusión se encontraron entre 39.3 y 44.4 °C. La temperatura de fusión para los PEU usando Oct fue de 44.4 °C, la cual es muy similar a la del macrodiol de partida (44.3 °C). El PEU usando **1** tiene un punto de fusión en 41.5 °C y se detectó adicionalmente una transición endotérmica a 67.4 °C, la cual fue asignada a la temperatura de fusión del segmento duro.

Por otra parte, los PEUs derivados de los macrodiolos con GP = 15 (**Figura A11**) muestran una T_f similar a la de los PEUs con GP = 20 (**Figura 35**).

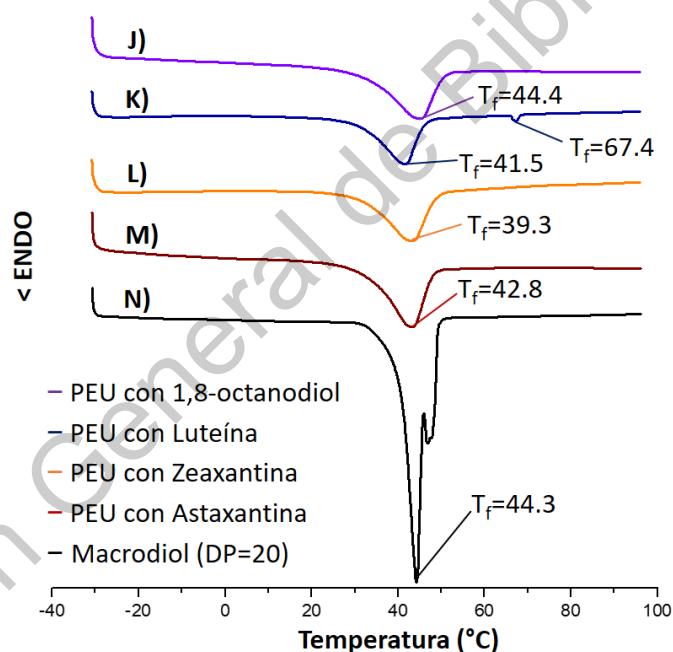


Figura 35. Termogramas de los PEUs derivados del macrodiol con GP= 20 y los diferentes extendedores de cadena (J-N). Condiciones: 10 °C/min (exo arriba), segundo ciclo de calentamiento. (DP = GP).

Los efectos de la HOPCLOH en la cristalinidad del segmento suave (PCL) de los PEUs fue estudiada. En la **Figura 36** se muestra el efecto del GP y los diferentes extendedores de cadena sobre la cristalinidad. Todos los PEUs muestran la tendencia de incrementar la cristalinidad con respecto al incremento del GP.

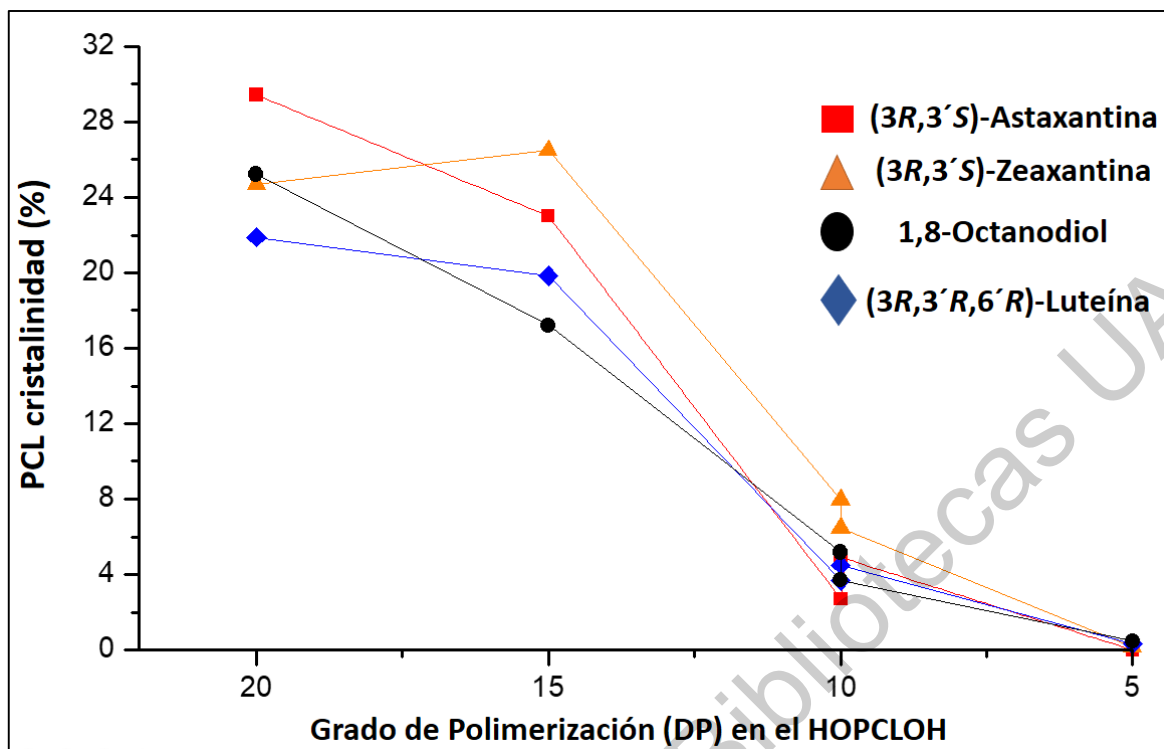


Figura 36. Efecto del grado de polimerización de la PCL en la cristalinidad de los PEUs.

7.14.- Propiedades mecánicas de los PEUs

También, se evaluaron las propiedades mecánicas de las películas de PEU. En la **Tabla 15** se observa que la mayoría de las películas presenta un bajo valor de estrés y de tensión a la ruptura y un valor de modulo relativamente elevado, lo que indica un comportamiento plástico de los PEUs. En las **Figuras 37 y 38** se muestran los gráficos de las pruebas mecánicas para los PEUs derivados del macrodiol con GP = 5 y Oct (**Figura 37**) y la derivada de **3** y el mismo macrodiol (**Figura 38**).

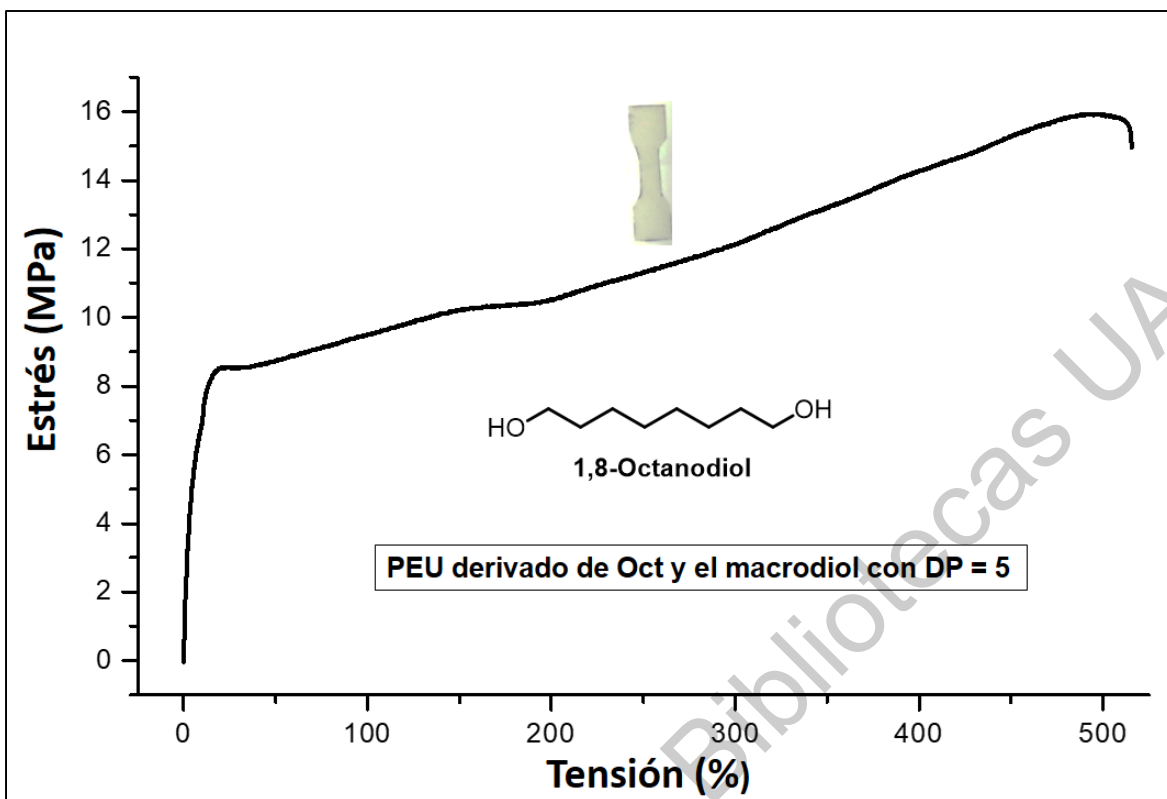


Figura 37. Propiedades mecánicas del PEU derivado del 1,8-octanodiol y el macrodiol con GP = 5.

Ambas muestras exhiben un comportamiento plástico, aunque se observa que la incorporación del compuesto **3** en la cadena principal del PEU induce un bajo valor de estrés y tensión a la ruptura con respecto a la muestra derivada de Oct. En ese sentido, en la mayoría de las muestras de PEU derivados del Oct el valor del módulo es más grande que en las películas derivadas de los carotenoides **1**, **2** y **3**.

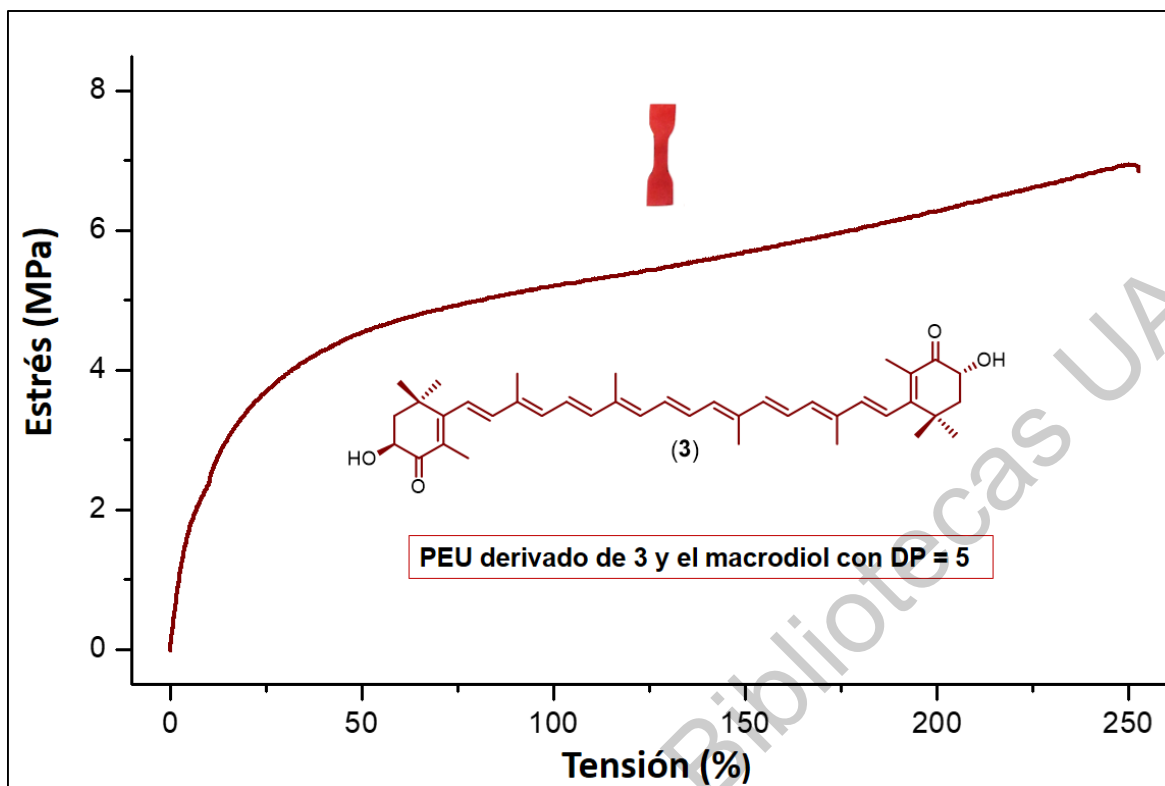


Figura 38. Propiedades mecánicas del PEU derivado del compuesto **3** y el macrodiol con GP = 5.

Estos resultados sugieren que la cadena olefinica de las xantófilas impide estéricamente las interacciones por puente de hidrógeno de los grupos uretano.

Finalmente, en la **Tabla 15** se listan los valores correspondientes de las propiedades térmicas y mecánicas para cada uno de los PEUs sintetizados. Estos materiales representan una nueva serie de “polímeros inteligentes” que pudieran ser utilizados como potenciales agentes foto-protectores o materiales con capacidad de prevenir la oxidación.

Tabla 15. Condiciones de reacción, propiedades térmicas y mecánicas de los PEUs.

PEU: Ext (GP)	M_n HOPCLOH	Ext. de cadena	HS (%)	Tiempo ^a (Horas)	Segmento suave		Segmento duro		Tensión a la ruptura (MPa)	Defor- mación. a la ruptura (%)	Módulo (MPa)
					T_f (°C)	ΔH_f (J/g)	T_f (°C)	ΔH_f (J/g)			
Oct(20)	2190	Oct	13.3	1.30	44.4	33.5	-	-	4.0 ± 0.9	2.9 ± 0.5	313.9 ± 23.8
1(20)	2190	1	20.4	2	41.5	29.2	67.4	0.5	3.6 ± 0.3	3.1 ± 0.4	284.5 ± 14.8
2(20)	2190	2	20.4	1.75	39.3	33.2	-	-	-	-	-
3(20)	2190	3	21.3	1.75	42.8	39.8	-	-	7.9 ± 0.2	22.8 ± 7.5	268.9 ± 7.9
Oct(15)	1670	Oct	16.7	1.25	43.4	22.7	-	-	3.4 ± 0.2	4.5 ± 1.1	180.6 ± 14.4
1(15)	1670	1	25.9	1.75	34.6	26.4	67.9	0.6	-	-	-
2(15)	1670	2	25.4	2	39.3	35.6	-	-	6.6 ± 0.2	16.9 ± 1.5	215.9 ± 7.2
3(15)	1670	3	25.8	2	36.8	31.1	-	-	6.1 ± 0.1	145.1 ± 56.6	133.0 ± 55.7
Oct(10)	1200	Oct	21.8	2	28.7	6.4	-	-	4.9 ± 0.4	59.8 ± 14.1	93.1 ± 6.5
1(10)	1200	1	31.6	5	34.1	4.6	67.1	4.4	4.9 ± 1.9	355.6 ± 155.8	37.2 ± 1.8
2(10)	1200	2	32.3	3.5	34.3	10.6	67.2	0.5	3.9 ± 0.4	355.1 ± 86.1	30.4 ± 3.4
3(10)	1200	3	34.3	1.50	31.7	3.7	67.2	1.0	2.2 ± 0.3	152.0 ± 14.2	6.1 ± 3.5
Oct(10) b	1200	Oct	22.9	1.75	23.9	4.4	-	-	-	-	-
1(10) ^b	1200	1	31.4	4	32.9	5.7	68.9	2.8	-	-	-
2(10) ^b	1200	2	31.8	3	26.8	8.5	67.5	0.2	-	-	-
3(10) ^b	1200	3	32.9	1.25	32.4	6.7	67.4	0.7	-	-	-
Oct(5)	645	Oct	34.9	1.25	-	-	-	-	12.7 ± 2.8	422.6 ± 106.7	199.4 ± 21.5
1(5)	645	1	46.1	1.75	-	-	67.0	5.5	4.6 ± 0.3	94.1 ± 11.5	93.6 ± 2.0
2(5)	645	2	46	2.50	-	-	66.8	2.8	3.0 ± 0.9	4.9 ± 1.2	155.6 ± 11.7
3(5)	645	3	46.5	1.50	-	-	-	-	6.9 ± 1.0	245.4 ± 71.6	51.7 ± 4.8

Oct = 1,8-octanodiol; 1, 2, y 3 = xantófilas; ^a Tiempo de reacción, ^b Sintetizada en una forma "one pot".

7.15.- Evaluación farmacológica preliminar de los compuestos 1, 2 y 3

Finalmente, se exploró de forma preliminar el efecto vasorrelajante de las xantófilas **1, 2 y 3** en su forma libre en el modelo de aorta aislada de rata.

Las tres xantófilas evaluadas relajaron la aorta de rata de una manera dependiente de la concentración (**Figura 39**).

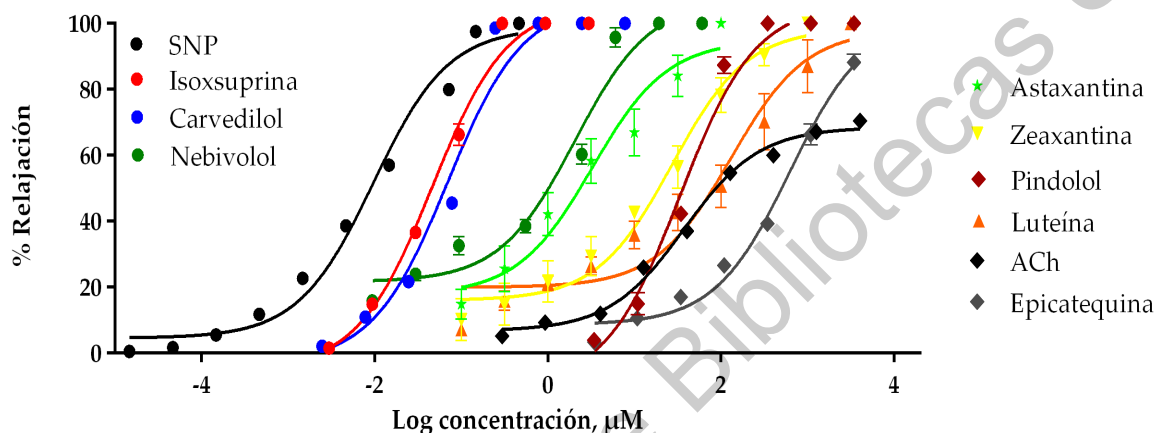


Figura 39 Curvas concentración–respuesta de los carotenoides y algunos fármacos antihipertensivos comerciales (Los datos de los fármacos comerciales fueron tomados con el permiso de la autora de la referencia [119]).

La astaxantina, con una concentración efectiva media (CE_{50}) de $3.3 \pm 2.1 \mu\text{M}$, y la zeaxantina con una CE_{50} de $27.3 \pm 3.8 \mu\text{M}$ resultaron ser más potentes que la acetilcolina (ACh) usada como control positivo cuya CE_{50} fue de $37.4 \pm 8.9 \mu\text{M}$. Las potencias de la astaxantina y de la zeaxantina fueron superiores a la de la ACh en una proporción de 11.3 y 1.4, respectivamente. Mientras que la luteína con una CE_{50} de 111.8 ± 19.2 resultó ser tres veces menos potente que la ACh. Asimismo, las tres xantófilas mostraron una eficacia mayor que la del control positivo, al mostrar un 100% de relajación. Es de notarse que la astaxantina posee un efecto similar al del fármaco comercial “nebivolol”, mientras que el efecto de la luteína y la zeaxantina resultó ser análogo al del “pindolol”.

Hasta la fecha, en el sistema cardiovascular, de los tres carotenoides obtenidos en este trabajo, solo la astaxantina había sido evaluada. Los estudios sobre el efecto vasodilatador de **3** en el modelo de aorta aislada de rata se han realizado utilizando el compuesto proveniente del alga *H. pluvialis*, que como se ha descrito anteriormente, es el isómero (3*S*,3'*S*), pero en sus formas libre, mono y diesterificadas. También se ha evaluado, en este mismo modelo, el efecto de la astaxantina sintética, la cual cabe recordar es una mezcla de los isómeros (3*S*,3'*S*), (3*R*,3'*S*), (3*R*,3'*R*) en una proporción 1:2:1 [82].

Sin embargo, en esta investigación se evaluó por primera vez, aunque de forma preliminar, el efecto vasorrelajante de las xantófilas luteína y zeaxantina, así como de la astaxantina enantioméricamente pura con configuración (3*R*,3'*S*). Aunque los resultados son bastantes prometedores, más estudios son necesarios para conocer el mecanismo por el cual actúan estos compuestos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

8.- CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un proceso sencillo y eficiente para obtener el carotenoide (3*R*,3'*S*)-astaxantina (**3**) a partir de la (3*R*,3'*R*,6'*R*)-luteína (**1**) y ésteres de luteína *via* la (3*R*,3'*S*)-zeaxantina (**2**). Los estudios experimentales y computacionales de la conversión de **1** en **2** indican que este proceso no está favorecido cuando se utilizan bases voluminosas. También, se demostró que es posible lograr la oxidación de **2** a **3** sin la necesidad de usar grupos protectores, peróxidos o metales de transición. El rendimiento global de la obtención del compuesto **3** fue del 73% a partir de **1** y del 76% a partir de los ésteres de luteína. Este rendimiento es sustancialmente más alto comparado con lo escasamente reportado a la fecha a través de síntesis parcial; también excede el rendimiento más alto reportado para la obtención de astaxantina a nivel industrial mediante síntesis total.

2. Los estudios biológicos del efecto de la astaxantina hasta ahora conocidos han utilizado principalmente a la astaxantina sintética (mezcla de enantiómeros (3*S*,3'*S*), (3*R*,3'*S*), (3*R*,3'*R*)) o la astaxantina proveniente del *H. pluvialis* con configuración (3*S*,3'*S*). Por lo que, el proceso desarrollado en el presente proyecto representa una alternativa para llevar a cabo estudios sobre la inocuidad para el consumo humano de la (3*R*,3'*S*)-astaxantina, ya que a la fecha, no se han investigado los efectos de esta molécula con esa configuración.

3. Los cálculos computacionales a nivel DFT aportaron datos sobre el aumento en el rendimiento para la obtención de **3** cuando se aplica radiación UV en la reacción de oxidación al soportar un plausible mecanismo radicalario para dicha transformación.

4. Los carotenoides **1**, **2** y **3** son buenos extendedores de cadena en la síntesis de poliésteres uretanos (PEUs). La caracterización mediante distintas técnicas como RMN, IR y DSC, confirma la inserción de los carotenoides en los PEUs.

5. Las propiedades mecánicas de estos PEUs mostraron un bajo valor de estrés y de tensión a la ruptura y un valor de modulo relativamente elevado, lo que indica que estos materiales poseen un comportamiento plástico.

6. En este estudio, se desarrolló un método novedoso de obtención de PEUs, en el que se disminuye el uso de materiales contaminantes derivados del petróleo a través de la sustitución por productos naturales más “amigables con el medio ambiente”, como los carotenoides utilizados como precursores para la síntesis de PEUs.

7. La evaluación farmacológica de las xantófilas **1**, **2** y **3** mostró un 100% de relajación de la aorta aislada de rata, mientras que las concentraciones efectivas medias del efecto vasodilatador resultaron ser de $111.8 \pm 1.4 \mu\text{M}$, $27.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$ y $3.3 \pm 2.1 \mu\text{M}$ respectivamente. La astaxantina fue la más potente de las tres y hasta 11.3 veces más potente que la acetilcolina ($\text{CE}_{50} = 37.4 \pm 8.9 \mu\text{M}$), la cual fue usada como control positivo. Es de notarse que la astaxantina posee un efecto similar al del fármaco comercial “nebivolol”. Aunque los resultados son bastantes prometedores, más estudios son necesarios para elucidar el mecanismo por el cual actúan estos compuestos.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

9. REFERENCIAS

- [1] Álvarez R, Vaz B, Gronemeyer H, de Lera ÁR. Functions, Therapeutic Application, and Synthesis of Retinoids and Carotenoids. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1–125.
- [2] Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H.E. 1995. Carotenoids: Isolation and Analysis. Basel, Birkhäuser Verlag. 1A: 17-42.
- [3] Rivera, S. M. Guide for Carotenoid Identification in Biological Samples. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1473–1484.
- [4] Bauerfeind, J.; Hintze, V.; Kschonsek, J.; Killenberg, M.; Böhm, V. Use of photochemiluminescence for the Determination of Antioxidant Activities of Carotenoids and Antioxidant Capacities of Selected Tomato Products. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 7452–7459.
- [5] Bernstein P. S., Li, B.; Vachali, P. P.; Gorusupudi, A.; Shyam, R.; Henriksen, B. S.; Nolan, J. M. Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Prog Retin Eye Res.* **2016**, *50*, 34–66.
- [6] Zhang, Y.; Liu, Z.; Sun, J.; Xue, C.; Mao, X. Biotechnological production of zeaxanthin by microorganisms. *Trends Food Sci Tech.* **2018**, *71*, 225–234.
- [7] Kuhn, R.; Soerensen, N.A. The coloring matters of the lobster (*Astacus gammarus* L.). *Z. Angew. Chem.* **1938**, *51*, 465–466.
- [8] Davinelli, S.; Nielsen, M. E.; Scapagnini, G. Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review. *Nutrients* **2018**, *10*, 522.
- [9] Molnar, P.; Szabolcs, J.; Radics, L. Naturally occurring di-*cis*-violaxanthins from *Viola tricolor*: isolation and identification by ¹H NMR spectroscopy of four di-*cis*-isomers. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 195–199.
- [10] Deli, J.; Molnár, P. Paprika carotenoids: analysis, isolation, structure elucidation. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 1197–1219.
- [11] Rivera-Madrid, R.; Aguilar-Espinosa, M.; Cárdenas-Conejo, Y.; Garza-Caligaris, L. E. Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1406.

- [12] Galauo, P.; Sutthiwong, N.; Leclercq-Perlat, M-N.; Valla, A.; Caro, Y.; Fouillaud, M.; Guérard, F.; Duffosé, L. First isolation of *Brevibacterium sp.* Pigments in the rind of an industrial red-smear-ripened soft cheese. *Int. J. Dairy Technol.* **2015**, *68*, 144–147.
- [13] Haxo, F. Carotenoids of the mushroom *Cantharellus cinnabarinus*. *Bot. Gaz.* **1950**, *112*, 228–232.
- [14] Karrer, P.; Helfenstein, A.; Wehrli, H.; Wettstein, A. Pflanzenfarbstoffe XXV. Über die Konstitution des Lycopins und Carotins. *Helv. Chim. Acta.* **1930**, *13* (5), 1084–1099.
- [15] Barber, NJ.; Barber, J. Lycopene and prostate cancer. *Prostate Cancer P. D.* **2002**, *5*, 6–12.
- [16] Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H.E. Carotenoids: Nutrition and Health. Basel, Birkhäuser Verlag. **2009**, *5*, pp. 45–57.
- [17] Cazzonelli, C. Carotenoids in Nature: insights from plants and beyond. *Funct. Plant Biol.* **2011**, *38*, 833–847.
- [18] Breithaupt, D.E. Modern application of xanthophylls in animal feeding a review. *Trends Food Sci Tech.* **2007**, *18*, 501–506.
- [19] Britton, G. Biosynthesis of carotenoids. **1976** In: Goodwin TW, Ed., Plant Pigments, Academic Press: London. pp. 133-182.
- [20] Yahia, E. Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry and human health. John Wiley and Sons Ltd. **2018**, *1*, pp. 15-18.
- [21] IUPAC-IUB. Nomenclature of carotenoids. 1974. *Pure. Appl. Chem.* *41*: 1-26.
- [22] Dewick, P. Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach. John Wiley and Sons. **2009**, 3 ed, pp.300-304.
- [23] Oldfield, E.; Lin, F-Y. Terpene biosynthesis: modularity rules. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 1124–1137.
- [24] Kim, Y.; DellaPena, D. Defining the primary route for lutein synthesis in plants: The role of Arabidopsis carotenoid β -ring hydroxylase CYP97A3. *PNAS.* **2006**, *103*, 3474–3479.
- [25] Rivera, S.M. Guide for carotenoid identification in biological samples. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1473–1484.

- [26] Grune, T.; Lietz, G.; Palou, A.; Ross, C.; Stahl, W.; Tang, G.; Thurnham, D.; Yin, S.; Biesalsk, H. K. β -Carotene Is an Important Vitamin A Source for Humans. *J Nutr.* **2010**, *140* (12), 2268–2285.
- [27] Martin, H-D.; Kock, S.; Scherrers, R.; Lutter, K.; Wagener, T.; Hundsdörfer, C.; Frixel, S.; Schaper, K.; Ernst, H.; Schrader, W.; Görner, H.; Stahl, W. 3,3'-dihydroxyisorenieratene, a Natural Carotenoid with Superior Antioxidant and Photoprotective Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 400–403.
- [28] McWilliams, A. Report Overview “The Global Market for Carotenoids”, *BCC Research Food and Beverage Report* **2018**, *1*, 1–26.
- [29] El-Sayed, M.A-A.; Humayoun, A.; Khalid, Z.; Rashida, A. Dietary Sources of Lutein and Zeaxanthin Carotenoids and their Role in Eye Health. *Nutrients* **2013**, *5*, 1169–1185.
- [30] Kijlstra, A.; Tian, Y.; Kelly, E.; Berendschot, T. *Prog Retin Eye Res.* **2012**, *31*, 303–315.
- [31] Khachik, F. Partial synthesis of serum carotenoids and their metabolites. *Acta Biochim Pol.* **2012**, *59*(1), 75–78.
- [32] Alves-Rodríguez, A.; Shao, A. The science behind lutein. *Toxicol Lett.* **2004**, *150*, 57–83.
- [33] Horvath, M. P.; George, E. W.; Tran, Q. T.; Baumgardner, K.; Zharov, G.; Lee, S.; Sharifzadeh, H.; Mattinson, T.; Li, B.; Bernstein, P. S. Structure of the lutein binding domain of human StARD3 at 1.74 Å resolution and model of complex with lutein. *Acta Crystallogr F.* **2016**, *72*, 609–618.
- [34] Bovier, E. R.; Hammond, B. R. A randomized placebo-controlled study on the effects of lutein and zeaxanthin on visual processing speed in young healthy subjects. *Arch Biochem Biophys.* **2015**, *572*, 54–57.
- [35] Vishwanathan, R.; Neuriger, M.; Snodderly, D. M.; Schalch, W.; Johnson, E. J. Macular lutein and zeaxanthin are related to brain lutein and zeaxanthin in primates. *Nutr Neurosci.* **2013**, *16*, 21–29.
- [36] Kalariya, N. M.; Ramana, K. V.; vanKuijk F. J. G. M. Focus on Molecules: Lutein. *Exp Eye Res.* **2012**, *102*, 107–108.

- [37] Chitchumroonchokchai, C.; Bomser, J. A.; Glamm, J. E.; Failla, M. L. Xanthophylls and α -Tocopherol Decrease UVB-Induced Lipid Peroxidation and Stress Signaling in Human Lens Epithelial Cells. *J Nutr.* **2004**, *134*, 3225–3232.
- [38] Lin, J-H.; Lee, D-J.; Chang, J-S. Lutein in specific marigold flowers and microalgae. *J Taiwan Inst Chem E.* **2015**, *49*, 90–94.
- [39] Pratheesh, V.B.; Benny, N.; Sujatha, C.H. Isolation, Stabilization and Characterization of Xanthophyll from Marigold Flower-*Tagetes erecta* L. *Mod App Sci.* **2009**, *3*, 19–28.
- [40] Khachik, F.; Chang, A-N. Total synthesis of (3*R*,3'*R*,6'*R*)-Lutein and its Stereoisomers. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3875–3885.
- [41] Rodríguez-deLeón, E.; Jiménez-Halla, J.O.C.; Báez, J.E.; Bah, M. A Simple and Efficient Method for the Partial Synthesis of Pure (3*R*,3'*S*)-Astaxanthin from (3*R*,3'*R*,6'*R*)-Lutein and Lutein Esters via (3*R*,3'*S*)-Zeaxanthin and Theoretical Study of Their Formation Mechanisms. *Molecules* **2019**, *24*(7), 1–13.
- [42] Torres-Cardona, M.D. Process for the isomerization of lutein. U.S. Patent 5,523,494, 4 June 1996.
- [43] Bernhard, K.U.S. Process for the manufacturing of zeaxanthin from lutein. U.S. Patent 5,780,693, 14 July 1998.
- [44] Buchecker, R.; Eugster, C.H.; Weber, A. Absolute Konfiguration von α -Doradexanthin und von Fritschellaxanthin, einem neuen Carotinoid aus *Fritschella tuberosa* IYENG. *Helv. Chim. Acta.* **1978**, *61*, 1962–1968.
- [45] Khachik, F. An efficient conversion of (3*R*,3'*R*,6'*R*)-lutein to (3*R*,3'*S*,6'*R*)-lutein (3'-epilutein) and (3*R*,3'*R*)-zeaxanthin. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 67–72.
- [46] Khachick, F. Process for making a (3*R*,3'*R*)-zeaxanthin precursor. U.S. Patent 6,818,798, 16 November 2004.
- [47] Deli, J.; Molnar, P.; Osz, E.; Tóth, G.; Zsila, F. Epimerisation of lutein to 3'-epilutein in processed foods. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 925–928.
- [48] Khachik, F.; Chang, A.-N.; Gana, A.; Mazzola, E. Partial synthesis of (3*R*,6'*R*)- α -cryptoxanthin from (3*R*,3'*R*,6'*R*)-lutein. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 220–226.

- [49] Khachik, F. Partial synthesis of serum carotenoids and their metabolites. *Acta Biochim. Polon.* **2012**, *59*, 75–78.
- [50] “Global Market Insights, Inc. Eye Health Ingredients Market worth over \$290 Million by 2024.” **2017** [consultado el 01 de Julio del 2019]. Disponible en: <https://globenewswire.com/newsrelease/2017/05/18/987651/0/en/>
- [51] Fernández-Sevilla, J. M.; Ación, F. G.; Molina-Grima, E. Biotechnological production of lutein and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2010**, *86*, 27–40.
- [52] Coleman, H.; Chew, E. Nutritional supplementation in age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol.* **2007**, *18*, 220–223.
- [53] “Global lutein market report” 2019 [consultado el 01 de Julio del 2019]. Disponible en: <https://www.energiasmarketresearch.com/global-lutein-market-report/#1490956978512-aa4994a2-860cfa3f-f4e9>
- [54] Sajilata, M. G.; Shingal, R. S.; Kamat, M. Y. The carotenoid pigment zeaxanthin—a review. *Compr rev food sci f.* **2008**, *7*, 29–49.
- [55] Manikandan, R.; Thiagarajan, R.; Goutham, G.; Arumugam, M.; Beulaja, M.; Rastrelli, L.; Skalicka-Woźniak, K.; Habtemariam, Orhan, S. E.; Nabavi, S. F.; Nabavi, S. M. Zeaxanthin and ocular health, from bench to bedside. *Fitoterapia* **2016**, *109*, 58–66.
- [56] Bone, R. A.; Landrum, J.T.; Hime, G. W.; Cains, A.; Zamor, J. Stereochemistry of the human macular carotenoids. *Invest Ophthal Vis Sci.* **1993**, *34*, 2033–2040.
- [57] Bone RA, Landrum JT, Friedes LM, Gomez CM, Kilburn MD, Menendez E, Vidal I, Wang W. Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Exp Eye Res.* **1997**, *64*, 211–218.
- [58] Sajilata, M.; Singhal, R.; Kamat, M. The carotenoid pigment zeaxanthin—a review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2008**, *7*, 29–49.
- [59] Xu, X.; Zhang, L.; Shao, B.; Sun, X.; Ho, C-T.; Li, S. Safety evaluation of meso-zeaxanthin. *Food Control* **2013**, *32*, 678–686.
- [60] Vaz, B.; Álvarez, R.; de Lera, A. R. Synthesis of Symmetrical Carotenoids by a Two-Fold Stille Reaction. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5040–5043.

- [61] Fontán, N.; Domínguez, M.; Álvarez, R.; de Lera, Á. R. Synthesis of C₄₀-Symmetrical Fully Conjugated Carotenoids by Olefin Metathesis. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 67, 5040–5043.
- [62] Hussein, G.; Sankawa, U.; Goto, H.; Matsumoto, K.; Watanabe, H. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 443–449.
- [63] McNulty, H.; Jacob, R. F.; Preston, R. Biologic Activity of Carotenoids Related to Distinct Membrane Physicochemical Interactions. *Am J Cardiol.* **2008**, 101, 20–29.
- [64] McNulty, H. P.; Byun, J.; Lockwood, S. F.; Jacob, R. F.; Mason, R. P. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochim Biophys Acta.* **2007**, 1768, 167–174.
- [65] Pashkow, F. J.; Watumull, D. G.; Campbell, C. L. Astaxanthin: A Novel Potential Treatment for Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Am J Cardiol.* **2008**, 101, 58–68.
- [66] Fassett, R. G.; Coombes, J. S. Astaxanthin: A potential Therapeutic Agent in Cardiovascular Disease. *Marine Drugs* **2011**, 9, 447–465.
- [67] Gross, G. J.; Hazen, S. L.; Lockwood, S. F. Seven-day oral supplementation with Cardax (Disodium disuccinate astaxanthin) provides significant cardioprotection and reduces oxidative stress in rats. *Mol. Cell. Biochem.* **2006**, 283, 23–30.
- [68] Gross, G. J.; Lockwood, S. F. Cardioprotection and myocardial salvage by a disodium disuccinate astaxanthin derivative (Cardax). *Life. Sci.* **2004**, 75, 215–224.
- [69] Hussein, G.; Nakamura, M.; Zhao, Q.; Iguchi, T.; Goto, H.; Sankawa, U.; Watanabe, H. Antihypertensive and Neuroprotective Effects of Astaxanthin in Experimental Animals. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, 28(1) 47–52.
- [70] Liu, X.; Song, M.; Zili, G.; Cai, X.; Dixon, W.; Chen, X.; Cao, Y.; Xiao, H. Stereoisomers of Astaxanthin Inhibit Human Colon Cancer Cell Growth by Inducing G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, 64, 7750–7759.
- [71] Yang, S.; Zhang, T.; Xu, J.; Li, X.; Zhou, Q.; Xue, C. Chiral separation and analysis of astaxanthin stereoisomers in biological organisms by high-performance liquid chromatography. *Chinese Food Sci.* **2015**, 36, 139–144.

- [72] Renstrom, B.; Borch, G.; Liaaen-Jensen, S. Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin 4. *Ex shrimps (Pandalus borealis)*. *Comp Biochem Physiol B*. **1981**, 69, 621-624.
- [73] Higuera-Ciaparra, I.; Félix-Valenzuela, L.; Goycoolea, F.M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, 46, 185-196.
- [74] Visioli, F.; Artaria, C. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: Mechanism of action, therapeutic merits, and knowledge gaps. *Food Funct.* **2017**, 8, 39-63.
- [75] Andrewes, A. G.; Starr, M. P. (3*R*,3'*R*)-astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Phytochemistry* **1976**, 15, 1009-1011.
- [76] Ronneberg, H.; Renstrom, B.; Aareskjold, K.; Liaaen-Jensen, S.; Vecchi, M.; Leuenberger, F. J.; Müller, R. K.; Mayer, H. Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin ex lobster eggs (*Homarus gammarus*). *Helv. Chim. Acta.* **1980**, 63, 711-715.
- [77] Foss, P.; Resntrom, B.; Liaaen-Jansen, S. Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin in crustaceans including zooplankton. *Comp. Biochem. Physiol.* **1987**, 86, 313-314.
- [78] Widmer, V.E.; Zell, R.; Albin, E.; Crameri, Y.; Wagner, H.P.; Dinkel, J.; Schlageter, M.; Lukat, T. Technische Verfahren zur Synthese von Carotinoiden und verwandten Verbindungen aus 6-Oxo-isophoron. II. Ein neues Konzept für die synthese von (3*RS*,3'*RS*)-Astaxanthin. *Helv. Chim. Acta.* **1981**, 64, 2436-2446.
- [79] Zell, R.; Widmer, E. Technische Verfahren zur Synthese von Carotinoiden und verwandten Verbindungen aus 6-Oxo-isophoron. IV. Neues Konzept für die Synthese von (3*RS*,3'*RS*)-, (3*S*,3'*S*)- und (3*R*,3'*R*)-9,9'-di-cis-7,8,7',8'-Tetradehydroastaxanthin. *Helv. Chim. Acta.* **1981**, 64, 2463-2468.
- [80] Choi, S.; Koo, S. Efficient Synthesis of the Keto-carotenoids Canthaxanthin, Astaxanthin, and Astacene. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 3328-3331.
- [81] Surmatis J.D., Thommen R. A Total Synthesis of Astaxanthin Dimethyl Ether. *J. Org. Chem.* **1966**, 32, 180-184.

- [82] Panis, G.; Rosales, J. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a technoeconomic assessment all through production line. *Algal Res.* **2016**, *18*, 175–190.
- [83] Olaizola, M. Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J Appl Phycol.* **2000**, *12*, 499–506.
- [84] Gross, G.; Lockwood, S. F. Cardioprotection and myocardial salvage by a disodium disuccinate astaxanthin derivative (Cardax™). *Life Sci.* **2004**, *75* 215–224.
- [85] Lauver, D. A.; Lockwood, S. F.; Lucchesi, B. R. Disodium Disuccinate Astaxanthin (Cardax) Attenuates Complement Activation and Reduces Myocardial Injury following Ischemia/Reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* **2005**, *314*, 686–692.
- [86] Yanai, H.; Ito, K.; Yoshida, H.; Tada, N. Antihypertensive effects of astaxanthin. *Integr Blood Press Control.* **2008**, *1*, 1-3.
- [87] Monroy-Ruiz, J.; Ángeles-Sevilla, M.; Carrón, R.; Montero, M-J. Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Res.* **2011**, *63*, 44–50.
- [88] Báez, J. E.; Marcos-Fernández, Á.; Martínez-Richa, A.; Galindo-Iranzo, P. Poly(ϵ -caprolactone) diols (HOPCLOH) and their poly(ester-urethane)s (PEU s): The effect of linear aliphatic diols [HO-(CH₂)_m-OH] as initiators. *Polym. Plast. Technol. Eng.* **2017**, *56*, 889–898.
- [89] Báez, J. E.; Ramirez, D.; Valentín, J. L.; Marcos-Fernández, A. Biodegradable Poly(ester-urethane-amide)s Based on Poly(ϵ -caprolactone) and Diamide-Diol Chain Extenders with Crystalline Hard Segments. Synthesis and Characterization. *Macromolecules* **2012**, *45*, 6966–6980.
- [90] Tang, H.; Murphy, C. J.; Zhang, B.; Zheng, Y.; Vankirk, E. A.; Radosz, M. Curcumin polymers as anticancer conjugates. *Biomaterials* **2010**, *31*, 7139–7149.
- [91] Shpaisman, N.; Sheihet, N.; Bushman, J.; Winters, J.; Khon, J. One-Step Synthesis of Biodegradable Curcumin-Derived Hydrogels as Potential Soft Tissue Fillers after Breast Cancer Surgery. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2279–2286.

- [92] Weintraub, S.; Shpigel, T.; Harris, L. G.; Shuster, R.; Lewis, E. C.; Lewitus, D. Y. Astaxanthin-based polymers as new antimicrobial compounds. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 4182–4189.
- [93] Middleton, H.; Tempelaar, S.; Haddleton, D. M.; Dove, A. Organocatalytic synthesis of astaxanthin-containing poly(lactide)s. *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 595–600.
- [94] Jomova, K.; Valko, M. Health protective effects of carotenoids and their interaction with other biological antioxidants. *Eur J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 102–110.
- [95] Galano, A.; Francisco-Marquez, M. Reactions of OOH Radical with β -Carotene, Lycopene, and Torulene: Hydrogen Atom Transfer and Adduct Formation Mechanisms. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 11338–11345.
- [96] Martínez, A.; Vargas, R.; Galano, A. Theoretical study on the chemical fate of adducts formed through free radical addition reactions to carotenoids. *Theor Chem Acc.* **2010**, *127*, 595–600.
- [97] Spezia, R.; Knecht, S.; Mennucci, B. Excited state characterization of carbonyl containing carotenoids: a comparison between single and multireference descriptions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 17156–17166.
- [98] Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. Gaussian09, Revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2010.
- [99] Zhao, Y.; Truhlar, D.G. A new local density functional for main-group thermochemistry, transition metal bonding, thermochemical kinetics, and non-covalent interactions. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 1–18.
- [100] Cossi, M.; Barone, V.; Cammi, R.; Tomasi, J. Ab initio study of solvated molecules: A new implementation of the polarizable continuum model. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *255*, 327–335.
- [101] Barone, V.; Cossi, M. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3210–3221.
- [102] Mennucci, B.; Tomasi, J. Continuum solvation models: A new approach to the problem of solute's charge distribution and cavity boundaries. *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 5151–5158.

- [103] Case, B.; Parson, R. The real energy free of solvation of ions in some non-aqueous and mixed solvents. *Trans. Faraday Soc.* **1967**, *63*, 1224–1239.
- [104] Báez, J. E.; Marcos-Fernández, A.; Martínez-Richa, A. One Step Route to α -Hydroxyl- ω -(carboxylic acid) Polylactones Using Catalysis by Decamolybdate Anion. *Macromolecules* **2005**, *38*, 1599–1608.
- [105] Báez, J. E.; Martínez-Rosales, M.; Martínez-Richa, A. Ring-opening polymerization of lactones catalyzed by decamolybdate anion. *Polymer* **2003**, *44*, 6767–6772.
- [106] Báez, J. E.; Marcos-Fernández, A.; Lebrón-Aguilar, R.; Martínez-Richa, A. A novel route to α,ω -telechelic poly(ϵ -caprolactone) diols, precursors of biodegradable polyurethanes, using catalysis by decamolybdate anion. *Polymer* **2006**, *47*, 8420–8429.
- [107] Báez, J. E.; Ramírez, D.; Valentín, J. L.; Marcos-Fernández, A. Biodegradable Poly(ester-urethane-amide)s Based on Poly(ϵ -caprolactone) and Diamine Diol Chain Extenders with Crystalline Hard Segments. Synthesis and Characterization. *Macromolecules* **2012**, *45*, 6966–6980.
- [108] Ibarra-Alvarado, C.; García, J. A.; Aguilar, M. B.; Rojas, A.; Falcón, A.; Heimer de la Cotera, E. P. Biochemical and pharmacological characterization of toxins obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146*, 511–518.
- [109] Otaka, J.; Seo, S.; Nishimura, M. Lutein, a natural carotenoid, induces α -1,3-glucan accumulation on the cell wall surface of fungal plant pathogens. *Molecules* **2016**, *21*, 980.
- [110] Englert, G.; Noack, K.; Broger, E.A.; Glinz, E.; Vecchi, M.; Zell, R. Synthesis, isolation, and full spectroscopic characterization of eleven Z-isomers of (3R,3'R)-zeaxanthin. *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 969–982.
- [111] Schloemer, G.C.; Davis, J.L. Preparación de astaxantina. Patente ES2 312 433, 22 January 2003.
- [112] Ding, R.; Grant, J.L.; Metzger, R.M.; Kispert, L.D. Carotenoid cation radicals produced by the interaction of carotenoids with iodine. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 4600–4606.

- [113] Lutnaes, B.F.; Krane, J.; Liaaen-Jensen, S. On the structure of carotenoid iodine complexes. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2821–2828.
- [114] Liaaen-Jensen, S. Studies on Allylic Oxidation of Compounds. *Acta Chem. Scand.* **1965**, *19*, 1166–1174.
- [115] Yuan, J.-P.; Chen, F. Isomerization of *trans*-astaxanthin to *cis*-astaxanthin in organic solvents. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3656–3660.
- [116] Holtin, K.; Kuehnle, M.; Rehbein, J.; Schuler, P.; Nicholson, G.; Albert, K. Determination of Astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1613–1622.
- [117] Englert, G.; Kienzle, F.; Noack, K. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, UV, und CD. Daten von synthetischem (3S,3'S)-astaxanthin, seinem 15-*cis*-isomeren un einegen analogen verbindungen. *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 1209–1219.
- [118] Izgorodina, E.I.; Brittain, D.R.B.; Hodgson, J.L.; Krenske, E.H.; Lin, C.Y.; Namazian, M.; Coote, M.L. Should Contemporary Density Functional Theory Methods Be Used to Study the Thermodynamics of Radical Reactions? *J. Phys. Chem. A.* **2007**, *111*, 10754–10768
- [119] Medina-Ruiz, D.; Erreguin-Luna, B.; Luna-Vázquez, F.; Romo-Mancillas, A.; Rojas-Molina, A.; Ibarra-Alvarado, C. Vasodilation Elicited by Isoxsuprine, identified by High-Throughput Virtual Screening of Compound Libraries, Involves Activation of the NO/cGMP and H₂S/KATP Pathways and Blockade of α_1 -adrenoceptors and Calcium Channels. *Molecules* **2019**, *24*(5), 1-21.

10. ANEXOS

En este apartado se anexan los espectros, tablas y figuras correspondientes a análisis complementarios que no se discuten en esta tesis, pero que contribuyen a soportar, al menos en parte, las conclusiones a las cuales se llegaron en esta investigación.

Finalmente, se adicionan los artículos de investigación derivados de este trabajo.

10.1 TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
10.1.1. Datos experimentales	103
Tabla A1. Datos experimentales de UV-Vis de los carotenoides.	107
Tabla A2. Implementación de las condiciones de reacción para la conversión de 1 a 2 .	107
Tabla A3. Implementación de las condiciones de reacción para la conversión de 2 a 3 .	108
10.1.2. Mecanismos de reacción calculados	109
Figura A1. Perfil de energía en entalpía para la conversión de luteína (1) a zeaxantina (2), usando hidróxido de sodio como base.	109
Figura A2. Perfil de energía en energía libre para la conversión de luteína (1) a zeaxantina (2), usando hidróxido de sodio como base.	109
Figura A3. Perfil de energía en energía libre para la conversión de (1) a (2) utilizando KOH como la base.	110
Figura A4. Perfil de energía en entalpía para la conversión de (1) a (2) utilizando KOH como base (sistema real).	110
Tabla A4. Coordenadas cartesianas de las estructuras optimizadas a nivel (PCM:1-butanol)M06-L/6-311+G(2d)//M06-L/6-31G(d).	111

Tabla A5. Coordenadas cartesianas de las estructuras optimizadas involucradas en el mecanismo de oxidación nivel M06-L/6-311+G(2d)//M06-L/6-31G(d).	125
10.1.3. Espectros de ¹H de RMN	142
Figura A5. Espectro de RMN de ¹ H del macrodiol con GP = 5 (500 MHz, CDCl ₃).	142
Figura A6. Espectro de RMN de ¹ H del macrodiol con GP = 10 (500 MHz, CDCl ₃).	142
Figura A7. Espectro de RMN de ¹ H del macrodiol con GP = 15 (500 MHz, CDCl ₃).	143
Figura A8. Espectro de RMN de ¹ H del macrodiol con GP = 15 (500 MHz, CDCl ₃).	143
Figura A9. Espectro de RMN de ¹ H del PEU obtenido a partir de 2 como extendedor de la cadena (500 MHz, CDCl ₃).	144
10.1.4. Propiedades térmicas obtenidas por DSC de los Macrodiolos y los poliésteres uretanos segmentados	145
Figura A10. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir del macrodiol con GP = 20 y los diferentes extendedores de cadena.	145
Figura A11. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir del macrodiol con GP = 15 y los diferentes extendedores de cadena.	145
Figura A12. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir de los macrodiolos con GP = 10 y los diferentes extendedores de cadena.	146
Figura A13. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir de los macrodiolos con GP = 5 y los diferentes extendedores de cadena.	146
Figura A14. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir de 1 y los diferentes macrodiolos.	147
Figura A15. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir de 2 y los diferentes macrodiolos.	147

Figura A16. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir de 3 y los diferentes macrodioles	148
Figura A17. Análisis de DSC de los tres diferentes segmentos duros	148
10.1.5. Espectros de infrarrojo	149
Figura A18. Espectros de FT-IR de las tres xantófilas	149
Figura A19. Espectro FTIR del macrodiol con GP = 5	149
Figura A20. Espectros FT-IR de los cuatro macrodioles	150
Figura A21. Espectro FTIR del PEU sintetizado a partir del macrodiol con DP = 5 y Oct como extendedor de cadena.	150
Figura A22. Espectros FT-IR de los PEUs sintetizados a partir de los diferentes macrodioles y Oct como extendedor de cadena.	151
Figura A23. Espectro FTIR del PEU sintetizado a partir del macrodiol con DP = 5 y 1 como extendedor de cadena.	151
Figura A24. Espectros FT-IR de los PEUs sintetizados a partir de los diferentes macrodioles y 1 como extendedor de cadena	152
Figura A25. Espectro FTIR del PEU sintetizado a partir del macrodiol con DP = 5 y 2 como extendedor de cadena.	152
Figura A26. Espectros FT-IR de los PEUs sintetizados a partir de los diferentes macrodioles y 2 como entendedor de cadena	153
Figura A27. Espectro FTIR del PEU sintetizado a partir del macrodiol con DP = 5 y 3 como extendedor de cadena.	153

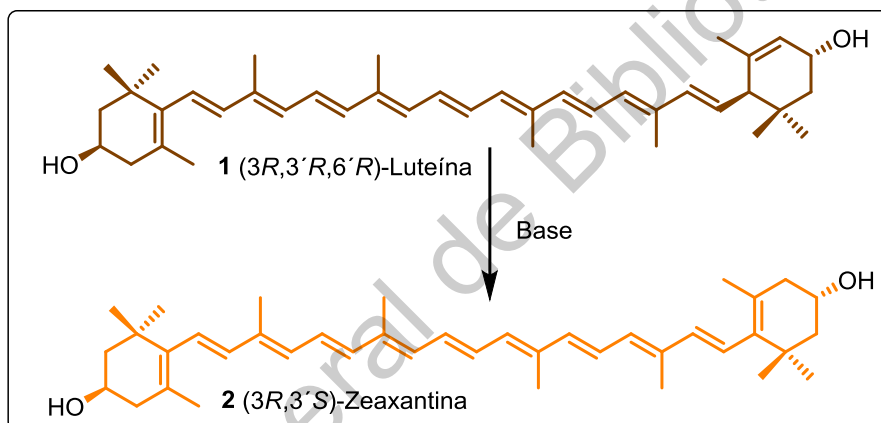
Figura A28. Espectros FTIR de los PEUs sintetizados a partir de los diferentes macrodioles y 3 como extendedor de cadena.	154
10.1.6. Propiedades mecánicas	155
Figura A29. Efecto del contenido del segmento duro en la tensión a la ruptura	155
Figura A30. Efecto del porcentaje del segmento duro en el módulo	155
Figura A31. Efecto del contenido del segmento duro en el estrés	156
Figura A32. Efecto del porcentaje de segmento duro en la cristalinidad de la PCL en los PEUs	156
Artículos de investigación	157

10.1.1. Datos experimentales

Tabla A1. Datos experimentales de UV-Vis de la λ_{\max} de los carotenoides.

Compuesto	λ_{\max} (nm)
Luteína	446 & 474
Ésteres de luteína	446 & 474
Zeaxantina	450 & 478
Astaxantina	474

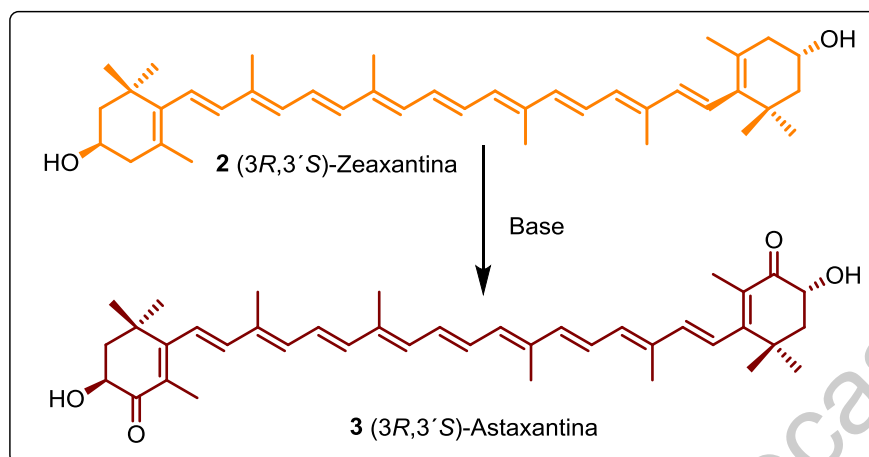
Tabla A2. Implementación de las condiciones de reacción para la conversión de **1** a **2**.



Ensayo	Tiempo reacción (Horas)	Disolvente	Temperatura (°C)	KOH (equivalentes)	Rendimiento (%)
1	8	Sin/disolvente	110	10	30
2	10	DMSO	110	10	75
3	12	Hexano	Reflujo	16	sr
4	14	Tolueno	Reflujo	12	sr
5	14	<i>n</i> -BuOH	115	10	92
6	16	<i>n</i> -BuOH	90	10	50
7	24	<i>n</i> -BuOH	rt	10	sr
8	12	<i>n</i> -BuOH	115	12	92

sr= sin reacción

Tabla A3. Implementación de las condiciones de reacción para la conversión de **2** a **3**.



Ensayo	% mol I ₂	Disolvente	Equivalentes en la mezcla oxidante*	Tiempo de reacción (Horas)	Rendimiento (%)
1	20	CH ₂ Cl ₂	2:1	4	20
2	10	CH ₂ Cl ₂	1.5:1	4	10
3	10	CH ₂ Cl ₂	2:1	2	64
4	5	CH ₂ Cl ₂	1:1	2.5	5
5	2	CH ₂ Cl ₂	4:1	2.5	10
6	10	CH ₂ Cl ₂	2:1	4	42
7	10	acetona	2:1	6	nr
8	10	Agua	2:1	6	nr

*Relación de NaBrO₃ y Na₂S₂O₅, todas las reacciones a 10 °C, sr= sin reacción.

10.1.2. Mecanismos de reacción calculados

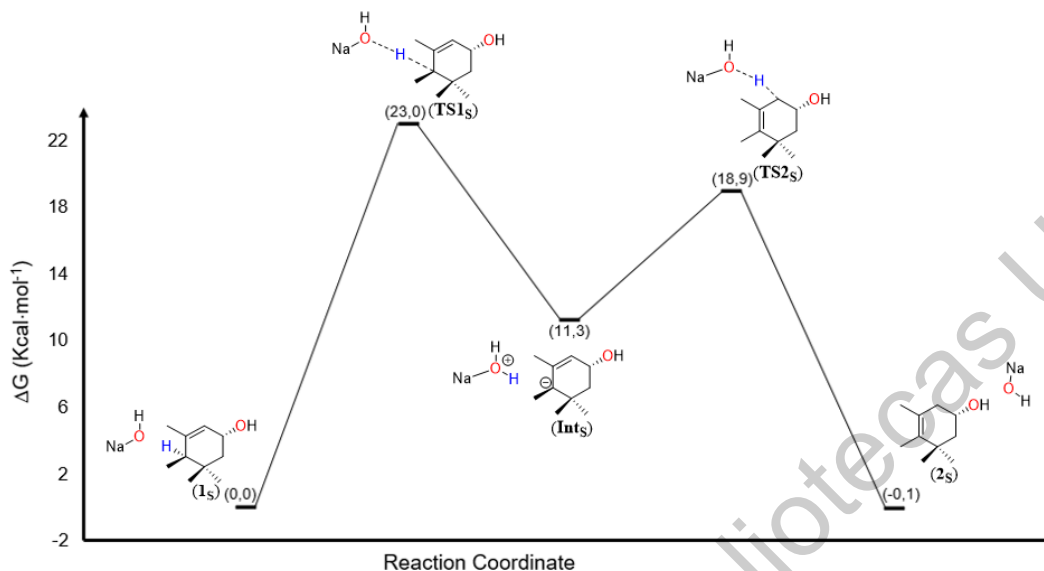


Figura A1. Perfil de energía para la conversión de la luteína (**1**) a zeaxantina (**2**) calculado al nivel (PCM:*n*-butanol) M06-L/6-311+G(2d)//M06-L/6-31G(d), utilizando hidróxido de sodio como base. Los valores de energía están expresado como energías libres en kcal·mol⁻¹.

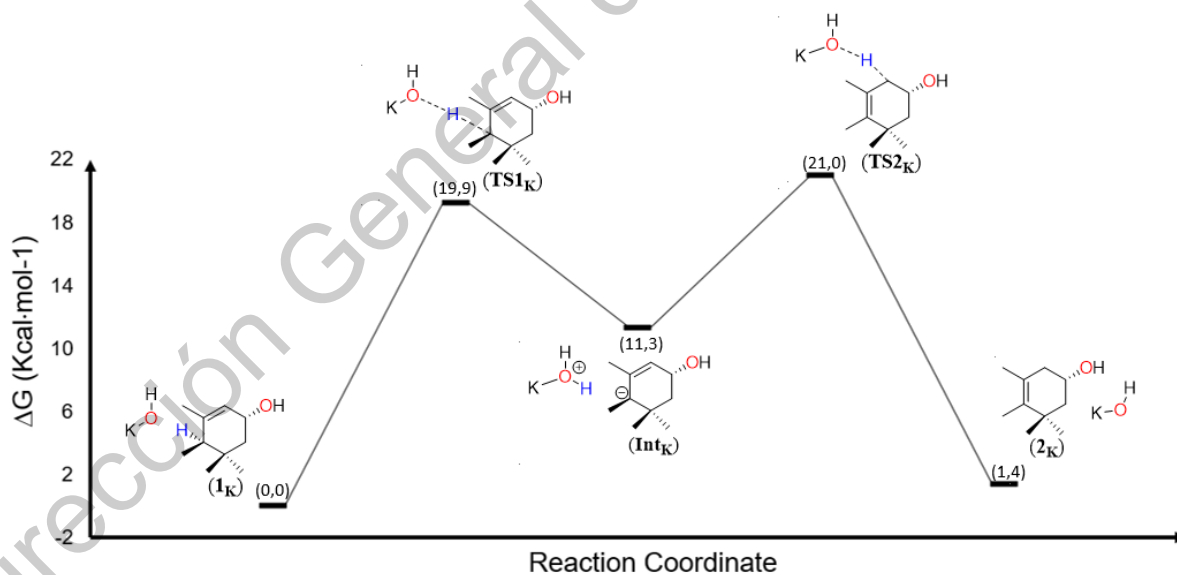


Figura A2. Perfil de energía para la conversión de (**1**) a (**2**) calculado al nivel (PCM:*n*-butanol) M06-L/6-311+G(2d)//M06-L/6-31G(d), utilizando KOH como la base. Los valores de energía están expresados como energía libre en kcal·mol⁻¹.

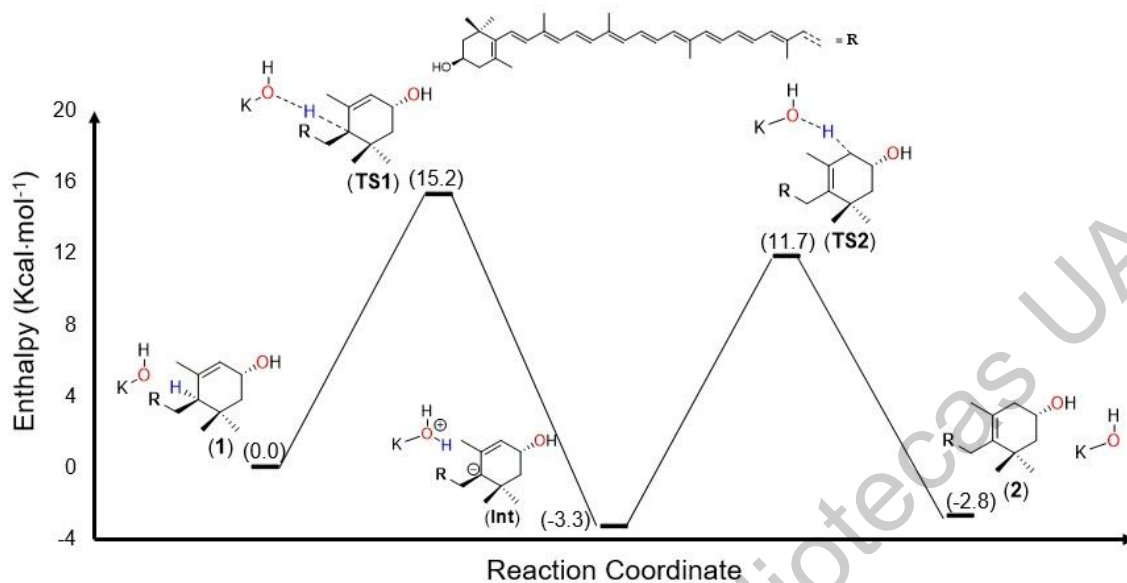


Figura A3. Perfil de energía para la conversión de (1) a (2) calculado al nivel (PCM:*n*-butanol) M06-L/6-311+G(2d)//M06-L/6-31G(d), utilizando KOH como base. Los valores de energía están expresados en entalpías en Kcal·mol⁻¹. **Nota:** Este perfil corresponde al sistema real.

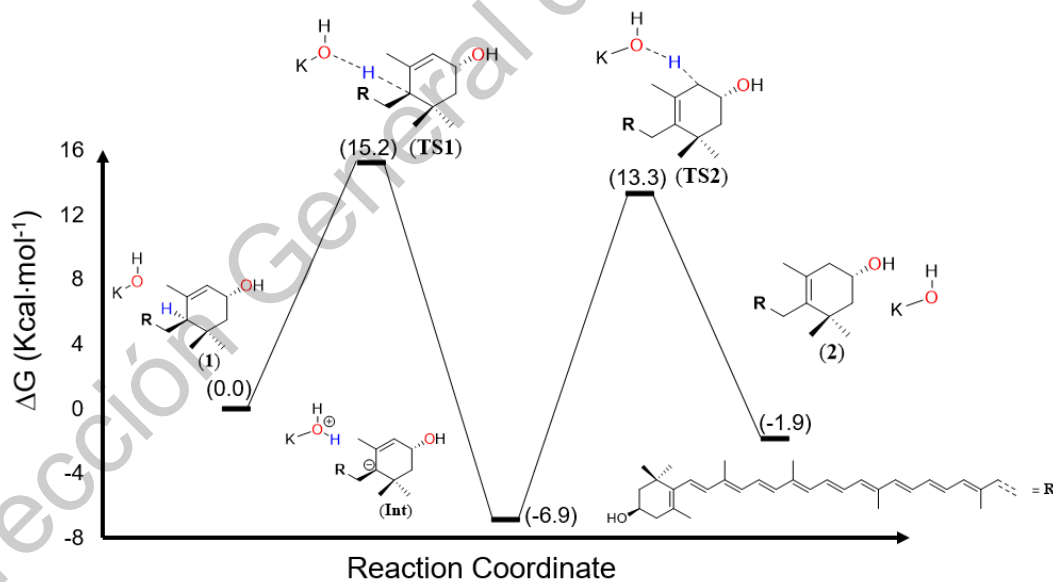


Figura A4. Perfil de energía para la conversión de (1) a (2) calculado al nivel (PCM:*n*-butanol) M06-L/6-311+G(2d)//M06-L/6-31G(d), utilizando KOH como base. Los valores de energía están expresados en energías libres en Kcal·mol⁻¹. **Nota:** Este perfil corresponde al sistema real.

Tabla A4. Coordenadas cartesianas de las estructuras optimizadas a nivel (PCM:1-butanol)M06-L/6-311+G(2d)//M06-L/6-31G(d).

- Mecanismo de hidróxido de sodio:

1s			TS1s				
E(scf) = -743.286248060 a.u.			E(scf) = -743.257407875a.u.				
			$\nu_{\min} = -1188.20 \text{ cm}^{-1}$				
C	-2.288121000	0.018338000	-0.4511860	C	-2.01612500	0.568590000	0.878233000
C	-0.9063280	0.301398000	-1.052594000	C	-0.85050500	1.134301000	0.046747000
C	0.015676000	0.861882000	0.060124000	C	0.348123000	0.162257000	0.171328000
C	-0.040749000	0.020098000	1.319115000	C	-0.05275300	-1.24722500	-0.086716000
C	-1.076681000	-0.787234000	1.59470400	C	-1.330865000	-1.673380000	-0.00260300
C	-2.28306900	-0.951620000	0.729551000	C	-2.470405000	-0.82780400	0.455634000
H	-2.72304400	0.975336000	-0.115291000	H	-1.68524300	0.527794000	1.931006000
H	-2.96796800	-0.366484000	-1.229960000	H	-2.88597300	1.249775000	0.851181000
H	-1.05667200	-1.391862000	2.508188000	H	-1.58405600	-2.695882000	-0.305312000
C	1.129218000	0.161997000	2.239446000	C	1.000768000	-2.189619000	-0.60559200
H	1.055356000	-0.49652600	3.113911000	H	0.626275000	-3.21767800	-0.697694000
H	2.064280000	-0.06100400	1.698676000	H	1.339926000	-1.861581000	-1.600994000
H	1.231568000	1.198690000	2.596167000	H	1.901034000	-2.21795800	0.025152000
C	-1.04618800	1.313497000	-2.187275000	C	-0.529727000	2.536334000	0.56024000
H	-1.544294000	2.233141000	-1.85402100	H	-0.36367300	2.555229000	1.645205000
H	-0.06228300	1.597084000	-2.58689200	H	0.368337000	2.946712000	0.075199000
H	-1.635465000	0.891232000	-3.01284000	H	-1.36274700	3.219619000	0.343302000
C	-0.28075800	-0.972317000	-1.625102000	C	-1.25351900	1.270084000	-1.427229000
H	-0.954426000	-1.44839800	-2.350678000	H	-2.172032000	1.864808000	-1.53535800
H	0.660486000	-0.73436600	-2.141432000	H	-0.45310900	1.766065000	-1.992360000
H	-0.065103000	-1.711053000	-0.84493700	H	-1.442398000	0.293243000	-1.88551800
C	-0.275326000	2.292762000	0.419892000	C	1.237611000	0.380187000	1.306875000
H	-1.30965200	2.517952000	0.713418000	H	1.498083000	1.433769000	1.479097000
C	0.634895000	3.267543000	0.446092000	C	1.874492000	-0.508526000	2.11206600
H	1.673493000	3.073612000	0.167423000	H	1.667736000	-1.578789000	2.08226400
H	0.388036000	4.287198000	0.740561000	H	2.579594000	-0.172581000	2.87199700
H	1.111036000	0.821773000	-0.32703200	H	1.257114000	0.504292000	-0.87036100
O	-2.32528300	-2.330999000	0.322629000	O	-3.443493000	-0.795606000	-0.60914200
H	-3.217072000	-0.73859500	1.367208000	H	-2.966180000	-1.331763000	1.36311500
H	-3.19893300	-2.455139000	-0.124273000	H	-4.232249000	-0.330005000	-0.23704600

O	3.526371000	0.017561000	-0.56629200	O	2.152121000	0.767931000	-1.682186000
H	3.438925000	0.462091000	0.296266000	H	1.899571000	0.238713000	-2.46057700
Na	3.273421000	-2.11865800	-0.51106800	Na	3.690764000	-0.054870000	-0.29141600

Ints				TS2s			
E(scf) = -743.274536505 a.u.				E(scf) = -743.257407875.u.			
C	-2.334410000	0.591868000	0.61191700	$v_{\min} = -1188.2010^{-1}$			
C	-1.025215000	1.146533000	0.018076000	C	-2.016125000	0.568590000	0.878233000
C	0.152322000	0.313854000	0.559538000	C	-0.850505000	1.134301000	0.046747000
C	-0.100039000	-1.106738000	0.65366900	C	0.348123000	0.162257000	0.171328000
C	-1.337100000	-1.669540000	0.46829200	C	-0.052753000	-1.247225000	-0.08671600
C	-2.589557000	-0.885537000	0.34140900	C	-1.330865000	-1.673380000	-0.00260300
H	-2.298526000	0.741518000	1.71434800	C	-2.470405000	-0.827804000	0.45563400
H	-3.196594000	1.188976000	0.23896700	H	-1.685243000	0.527794000	1.93100600
H	-1.428233000	-2.759651000	0.49403600	H	-2.885973000	1.249775000	0.851181000
C	1.039160000	-2.049185000	0.93892900	H	-1.584056000	-2.695882000	-0.30531200
H	0.737058000	-3.090856000	0.76601300	C	1.000768000	-2.189619000	-0.60559200
H	1.919065000	-1.836646000	0.31376000	H	0.626275000	-3.217678000	-0.69769400
H	1.385074000	-1.977383000	1.98047000	H	1.339926000	-1.861581000	-1.60099400
C	-0.962696000	2.628141000	0.39694200	H	1.901034000	-2.217958000	0.02515200
H	-0.853449000	2.767000000	1.48194700	C	-0.529727000	2.536334000	0.560240000
H	-0.132051000	3.154104000	-0.09308000	H	-0.363673000	2.555229000	1.64520500
H	-1.888245000	3.133002000	0.08354900	H	0.368337000	2.946712000	0.075199000
C	-1.076667000	1.067541000	-1.51736200	H	-1.362747000	3.219619000	0.34330200
H	-1.980516000	1.553632000	-1.91775200	C	-1.253519000	1.270084000	-1.42722900
H	-0.202141000	1.570272000	-1.95699300	H	-2.172032000	1.864808000	-1.53535800
H	-1.088340000	0.026574000	-1.86083300	H	-0.453109000	1.766065000	-1.99236000
C	1.355379000	0.954766000	0.927461000	H	-1.442398000	0.293243000	-1.88551800
H	1.332690000	2.031557000	0.720392000	C	1.237611000	0.380187000	1.306875000
C	2.585079000	0.562035000	1.455728000	H	1.498083000	1.433769000	1.479097000
H	2.769390000	-0.421998000	1.89167400	C	1.874492000	-0.508526000	2.112066000
H	3.273156000	1.351290000	1.775524000	H	1.667736000	-1.578789000	2.08226400
H	1.272971000	-0.123971000	-1.25159500	H	2.579594000	-0.172581000	2.87199700
O	-3.181065000	-1.120867000	-0.96386200	H	1.257114000	0.504292000	-0.87036100
H	-3.350313000	-1.255235000	1.11694900	O	-3.443493000	-0.795606000	-0.60914200
H	-4.046645000	-0.643948000	-0.95222200	H	-2.966180000	-1.331763000	1.36311500
O	1.905646000	-0.384785000	-1.95980900	H	-4.232249000	-0.330005000	-0.23704600

H	1.571812000	-1.261895000	-2.24324400	O	2.152121000	0.767931000	-1.68218600
Na	3.833604000	-0.129414000	-0.73092100	H	1.899571000	0.238713000	-2.46577000
				Na	3.690764000	-0.054870000	-0.29141600

2s

E(scf) = -743.295128858 a.u.

C	0.734695000	-1.815980000	-0.90817600
C	1.456339000	-0.914457000	0.10695100
C	1.007874000	0.547727000	-0.02294300
C	-0.086915000	0.917578000	-0.73548400
C	-0.934702000	-0.070475000	-1.49486900
C	-0.737615000	-1.519885000	-1.10555200
H	1.219627000	-1.693001000	-1.90352000
H	0.882471000	-2.880935000	-0.61957100
H	-0.732423000	0.044551000	-2.57852200
C	-0.592304000	2.324387000	-0.86020600
H	-1.687625000	2.323599000	-0.73466000
H	-0.155118000	3.010633000	-0.12851500
H	-0.390632000	2.737547000	-1.86124200
C	1.864410000	1.500237000	0.698736000
H	2.234990000	1.151916000	1.672879000
C	2.302831000	2.692011000	0.272149000
H	2.042354000	3.089705000	-0.70862500
H	2.958681000	3.306332000	0.887715000
C	2.960263000	-1.021911000	-0.18682300
H	3.201641000	-0.613405000	-1.17781000
H	3.563117000	-0.482401000	0.55565200
H	3.273124000	-2.075732000	-0.16972400
C	1.229443000	-1.411323000	1.54558200
H	1.535076000	-2.464093000	1.63387700
H	1.826988000	-0.838070000	2.26735400
H	0.176165000	-1.340431000	1.841893000
H	-2.000836000	0.199463000	-1.36527900
H	-1.138353000	-2.176459000	-1.91088600
O	-1.514850000	-1.745488000	0.08770800
O	-3.823656000	0.949499000	0.39436600
H	-3.899150000	0.274757000	-0.30575100
Na	-2.195236000	0.006892000	1.49723400

H -1.280351000 -2.649315000 0.42236700

- Mecanismo con hidróxido de potasio:

1_K			TS1_K		
E(scf) = -1180.88449886 a.u.			E(scf) = -1180.86344412 a.u.		
C	-2.439383000	-0.272665000	-0.19458000	$\nu_{\min} = -1333.3081 \text{ cm}^{-1}$	
C	-1.235113000	0.276655000	-0.97024600	C	2.295470000 -0.492942000 0.88491100
C	-0.264615000	0.957663000	0.031637000	C	1.126906000 -1.124172000 0.10882100
C	0.003088000	0.094973000	1.250576000	C	-0.090376000 -0.169986000 0.20681800
C	-0.809224000	-0.914736000	1.60345400	C	0.284774000 1.228784000 -0.14396400
C	-2.079436000	-1.273020000	0.90465900	C	1.556811000 1.679159000 -0.11791000
H	-2.974352000	0.575084000	0.26692800	C	2.719043000 0.882925000 0.371588000
H	-3.155120000	-0.741768000	-0.89071600	H	1.981571000 -0.393975000 1.93920200
H	-0.554654000	-1.523864000	2.47820800	H	3.176085000 -1.160794000 0.884629000
C	1.214403000	0.463850000	2.048801000	H	1.787671000 2.682785000 -0.49349100
H	1.424615000	-0.268560000	2.83929000	C	-0.801766000 2.120452000 -0.68275100
H	2.094249000	0.568329000	1.386407000	H	-0.423294000 3.113981000 -0.95757400
H	1.081131000	1.447150000	2.526080000	H	-1.25069100 1.661639000 -1.578245000
C	-1.712554000	1.286612000	-2.01148400	H	-1.624083000 2.268391000 0.03299100
H	-2.294030000	2.097955000	-1.55560800	C	0.837627000 -2.500229000 0.70142600
H	-0.862718000	1.745639000	-2.53631300	H	0.683268000 -2.461540000 1.787701000
H	-2.347700000	0.798203000	-2.76313400	H	-0.060990000 -2.946636000 0.25089600
C	-0.51386700	-0.856161000	-1.70402400	H	1.677968000 -3.182863000 0.511595000
H	-1.189787000	-1.345954000	-2.41798900	C	1.504559000 -1.331836000 -1.36349400
H	0.345091000	-0.466612000	-2.27108700	H	2.425662000 -1.925036000 -1.45708900
H	-0.171550000	-1.634783000	-1.01319200	H	0.695478000 -1.859995000 -1.88457800
C	-0.736797000	2.308620000	0.49302300	H	1.678561000 -0.378159000 -1.87400800
H	-1.740907000	2.339885000	0.93774500	C	-0.928762000 -0.314098000 1.39713300
C	-0.014268000	3.428076000	0.43975400	H	-1.269530000 -1.365497000 1.63205200
H	0.990855000	3.430252000	0.012288000	C	-1.456320000 0.646337000 2.19849000
H	-0.388617000	4.379351000	0.81658200	H	-1.186792000 1.699630000 2.10419900
H	0.762600000	1.113171000	-0.49608600	H	-2.147080000 0.395560000 3.00403500
O	-1.940519000	-2.620686000	0.41935000	H	-0.96083000 -0.601223000 -0.80894100
H	-2.926644000	-1.261931000	1.68548900	O	3.676469000 0.804187000 -0.70447100
H	-2.835299000	-2.884835000	0.08935600	H	3.218899000 1.447064000 1.239938000
O	3.329273000	0.859795000	-0.53232700	H	4.475347000 0.366083000 -0.32090800

H	3.032108000	1.698767000	-0.14208900	O	-1.786550000	-0.969014000	-1.68068200
K	2.743542000	-1.525134000	-0.49461900	H	-1.361686000	-0.654317000	-2.49793800
				K	-3.627510000	0.045640000	-0.19998100

Int_K

E(scf) = -1180.87785427 a.u.

C	2.696351000	0.610310000	-0.46638300
C	1.341857000	1.152243000	0.030559000
C	0.211585000	0.338164000	-0.62708800
C	0.471357000	-1.075842000	-0.74764300
C	1.689194000	-1.651095000	-0.47774700
C	2.927304000	-0.876429000	-0.22443100
H	2.755560000	0.797493000	-1.56216400
H	3.524138000	1.191772000	-0.00192500
H	1.781690000	-2.739542000	-0.54063800
C	-0.639332000	-2.004202000	-1.16370400
H	-0.340148000	-3.053206000	-1.03507000
H	-1.557922000	-1.834243000	-0.58319700
H	-0.917116000	-1.869321000	-2.21936900
C	1.313451000	2.643738000	-0.312298000
H	1.280258000	2.811427000	-1.39833700
H	0.453822000	3.162875000	0.133101000
H	2.217705000	3.134350000	0.077102000
C	1.264225000	1.033630000	1.562082000
H	2.123199000	1.520494000	2.051458000
H	0.347107000	1.512146000	1.936883000
H	1.260583000	-0.015408000	1.87954600
C	-0.966736000	0.995586000	-1.05800200
H	-0.953540000	2.066731000	-0.82331000
C	-2.150758000	0.628940000	-1.68411200
H	-2.347890000	-0.357487000	-2.10677200
H	-2.844209000	1.420857000	-1.98372300
H	-1.029886000	-0.232629000	1.05104400
O	3.416788000	-1.152858000	1.11675700
H	3.747338000	-1.222629000	-0.94766600
H	4.280245000	-0.677167000	1.18552500
O	-1.640850000	-0.560950000	1.74866900
H	-1.194688000	-1.373768000	2.06286000

TS2_K

E(scf) = -1180.86765647a.u.

$v_{\min} = -1513.1702^{-1}$	C	-1.229004000	-1.829910000	0.61925000
	C	-1.745727000	-0.551832000	-0.06255900
	C	-0.902912000	0.668861000	0.34718100
	C	0.186611000	0.518113000	1.185191000
	C	0.883849000	-0.742020000	1.38791900
	C	0.285216000	-1.939564000	0.69567700
	H	-1.600714000	-1.856483000	1.65764800
	H	-1.668834000	-2.708358000	0.11320100
	H	1.121754000	-0.933897000	2.455107000
	C	0.839098000	1.685072000	1.875566000
	H	1.253257000	1.355926000	2.839622000
	H	1.693159000	2.082937000	1.303249000
	H	0.150241000	2.520150000	2.050382000
	C	-1.355447000	1.938324000	-0.19194600
	H	-2.38256700	1.928387000	-0.57791100
	C	-0.699840000	3.109397000	-0.36929400
	H	0.337478000	3.271417000	-0.08031800
	H	-1.207171000	3.960695000	-0.82055900
	C	-3.199778000	-0.36228900	0.405383000
	H	-3.244619000	-0.160468000	1.48347200
	H	-3.705124000	0.461330000	-0.11415300
	H	-3.782674000	-1.272932000	0.20763800
	C	-1.785125000	-0.727820000	-1.58915800
	H	-2.435819000	-1.570358000	-1.86638000
	H	-2.183503000	0.170959000	-2.07954100
	H	-0.793534000	-0.935905000	-2.00583100
	H	2.139290000	-0.531376000	0.89724900
	H	0.550796000	-2.864086000	1.24445500
	O	0.865050000	-2.031724000	-0.63657900
	O	3.303380000	-0.282440000	0.37390200
	H	3.551838000	-1.18297500	0.097105000

K	-3.986565000	-0.068554000	0.57441300	H	0.377628000	-2.753572000	-1.10734000
				K	1.622107000	0.470206000	-1.54815500

2κ

E(scf) = -1180.89235949 a.u.

C	-1.251753000	-1.747781000	0.91526300
C	-1.795545000	-0.734692000	-0.10536500
C	-1.125070000	0.636972000	0.052926000
C	0.001380000	0.818022000	0.789135000
C	0.664130000	-0.299775000	1.552644000
C	0.246455000	-1.694568000	1.138235000
H	-1.730375000	-1.553638000	1.90211900
H	-1.565951000	-2.772042000	0.61245100
H	0.454267000	-0.165315000	2.63260300
C	0.743170000	2.115394000	0.91907500
H	1.825236000	1.916568000	0.81324500
H	0.435759000	2.864449000	0.18197900
H	0.599914000	2.562321000	1.91613600
C	-1.797003000	1.717977000	-0.68286100
H	-2.211592000	1.432962000	-1.65982000
C	-2.029175000	2.971572000	-0.27002900
H	-1.715197000	3.328688000	0.71068200
H	-2.563775000	3.683037000	-0.89853600
C	-3.305507000	-0.606928000	0.14370200
H	-3.510709000	-0.186414000	1.13795700
H	-3.789086000	0.039435000	-0.60095300
H	-3.783518000	-1.595781000	0.08975400
C	-1.602702000	-1.247628000	-1.54320000
H	-2.072672000	-2.235402000	-1.65874200
H	-2.072629000	-0.577420000	-2.27567900
H	-0.541738000	-1.346601000	-1.79715100
H	1.761326000	-0.194354000	1.44929900
H	0.522084000	-2.415541000	1.94188000
O	0.993884000	-2.022964000	-0.04713400
O	3.774373000	0.658529000	0.501475000
H	3.592124000	0.930174000	1.416309000
H	0.638211000	-2.883963000	-0.38399800
K	2.373262000	-0.078266000	-1.40112700

- Mecanismo de hidróxido de potasio (Sistema real):

1			TS1		
E(scf) = -2383.87582120 a.u.			E(scf) = -2383.85609406 a.u.		
C	-13.55839700	0.72053600	0.92315900	$\nu_{\min} = -1670.2610\text{cm}^{-1}$	
C	-14.62653200	-0.271854000	1.39764100	C	-13.78647100 0.80383700 0.68569400
C	-15.19212000	-1.10692300	0.26857500	C	-14.87162500 -0.12715100 1.2409470
C	-14.08312000	-1.93101500	-0.34890100	C	-15.33625500 -1.15250700 0.2287040
C	-12.80779500	-1.17116000	-0.59182300	C	-14.17052900 -2.03494300 -0.1592490
C	-12.54061400	0.02231000	0.00682700	C	-12.89842300 -1.2852610 -0.4478410
H	-14.18123000	-0.96383500	2.14885100	C	-12.69507500 -0.00145100 -0.0404110
H	-15.44026900	0.28710900	1.91257000	H	-14.47430600 -0.67339100 2.1269620
H	-13.87353000	-2.78702800	0.32778300	H	-15.73060700 0.48555900 1.59634200
H	-14.42732100	-2.38983400	-1.2940680	H	-13.99409100 -2.75497400 0.6683220
C	-12.86412500	1.28175300	2.17117900	H	-14.4382040 -2.65979400 -1.0312560
H	-12.15381200	2.08277100	1.92717200	C	-13.18921900 1.57427300 1.87042400
H	-13.61235000	1.69983200	2.85959800	H	-12.46643900 2.33618100 1.54923400
H	-12.31446900	0.49594100	2.70738100	H	-13.98780200 2.08644100 2.42603200
C	-14.21384900	1.88776500	0.16919600	H	-12.67552200 0.89661100 2.56621700
H	-14.91508200	2.42109000	0.82733500	C	-14.40651000 1.81849900 -0.2874540
H	-13.46539000	2.61638800	-0.17206200	H	-15.16106200 2.43036700 0.22790700
H	-14.76853500	1.54398800	-0.71301100	H	-13.64844300 2.50321200 -0.6922600
C	-11.88038900	-1.85206300	-1.55326800	H	-14.89310300 1.32202200 -1.1368930
H	-11.28975100	-2.64228800	-1.0625020	C	-11.89647300 -2.08327000 -1.2280540
H	-12.45464300	-2.35036400	-2.3474020	H	-11.28166800 -2.7261260 -0.5777020
H	-11.16716200	-1.16363900	-2.0201340	H	-12.4090360 -2.75800800 -1.9282260
C	-11.30594900	0.77110200	-0.1905480	H	-11.2030190 -1.453034000 -1.796793
H	-11.41884200	1.86104000	-0.18247000	C	-11.4705410 0.74754700 -0.2903270
C	-10.03925300	0.28378400	-0.27021300	H	-11.61103000 1.82381000 -0.4386620
H	-9.88220800	-0.79595400	-0.18936100	C	-10.18738200 0.29500700 -0.2650430
C	-8.84379400	1.07745800	-0.39352200	H	-10.00131100 -0.7574410 -0.0316310
C	-7.62900600	0.4346690	-0.39008400	C	-9.01113000 1.09882400 -0.46867700
H	-7.65439200	-0.65855200	-0.30826600	C	-7.77814800 0.4974650 -0.36472200
C	-6.33514900	1.01759700	-0.46525100	H	-7.77789900 -0.5754500 -0.1363150
H	-6.25977900	2.10575300	-0.54426700	C	-6.4981990 1.09466500 -0.51032900
C	-5.17748300	0.28463900	-0.43091300	H	-6.44747200 2.16293100 -0.7388930
H	-5.26547600	-0.80520200	-0.35057300	C	-5.32244700 0.39987900 -0.37184000
C	-8.97859500	2.56583900	-0.49799500	H	-5.38956300 -0.67050500 -0.1421110

H	-9.60698900	2.84739100	-1.35536400	C	-9.18159800	2.55693900	-0.77000800
H	-9.47277700	2.98182600	0.39316400	H	-9.78614100	2.70970400	-1.67615500
H	-8.01477000	3.07210000	-0.60977300	H	-9.71667700	3.06990600	0.04372700
C	-3.84997900	0.81060000	-0.47940100	H	-8.22733400	3.07305200	-0.91543000
C	-2.78855400	-0.06963900	-0.42031100	C	-4.00729700	0.93684600	-0.49063500
H	-3.04162600	-1.13393200	-0.34532200	C	-2.92589100	0.09382500	-0.31031800
C	-1.40704500	0.23616500	-0.43667500	H	-3.16131300	-0.95413500	-0.08745200
H	-1.09909300	1.28470800	-0.50749800	C	-1.55213400	0.41409400	-0.37113500
C	-0.41530700	-0.71273900	-0.35890100	H	-1.25952200	1.44692800	-0.58743800
H	-0.72189900	-1.76163100	-0.28631400	C	-0.54365100	-0.50465600	-0.16774300
C	-3.67007600	2.29532500	-0.58610900	H	-0.84307900	-1.53609500	0.04810500
H	-4.13249600	2.68443400	-1.50510100	C	-3.85221200	2.39609000	-0.80161100
H	-4.16197600	2.81458300	0.24914600	H	-4.31950800	2.65013300	-1.76468700
H	-2.61810400	2.59641600	-0.59071400	H	-4.35188800	3.01886800	-0.04490800
C	0.96573400	-0.40330100	-0.36128800	H	-2.80449800	2.70912900	-0.84934100
H	1.21603200	0.66149800	-0.43803400	C	0.83118000	-0.19389400	-0.21408000
C	2.02902900	-1.27761800	-0.26930300	H	1.07836600	0.85251200	-0.42960000
C	3.35499200	-0.74282200	-0.27603600	C	1.90461900	-1.04759400	-0.01358800
H	3.43795800	0.34623000	-0.37106400	C	3.22514100	-0.52552200	-0.08963300
C	4.51468600	-1.46214300	-0.16515500	H	3.31279300	0.54446300	-0.31252400
H	4.44756400	-2.54914600	-0.06176300	C	4.39017200	-1.23604000	0.09832300
C	1.85452500	-2.76205500	-0.15368900	H	4.30754100	-2.30349500	0.32453200
H	2.28706600	-3.13930000	0.78462300	C	1.72279500	-2.50661400	0.28808800
H	0.80470400	-3.06956300	-0.18274700	H	2.15263600	-2.76654700	1.26644900
H	2.37885200	-3.28587300	-0.96600100	H	0.67158000	-2.81030200	0.29701500
C	5.80548500	-0.86245700	-0.16881200	H	2.24329200	-3.13150000	-0.45201200
H	5.82392100	0.22787100	-0.28558200	C	5.68190500	-0.66989000	0.01970700
C	7.02128700	-1.48236600	-0.03133800	H	5.72149600	0.40162600	-0.21078900
C	8.21392300	-0.66772000	-0.05243600	C	6.90112400	-1.29991900	0.20430300
H	8.06941400	0.41132900	-0.20953900	C	8.10216000	-0.53272800	0.10689100
C	9.48234900	-1.10142000	0.11438600	H	7.96928800	0.52899800	-0.13356900
C	7.17545100	-2.96085800	0.14741200	C	9.37188200	-0.99955000	0.33609800
H	7.64717900	-3.19336400	1.11396900	C	7.00226700	-2.76276600	0.52394000
H	6.22307300	-3.49884500	0.10293700	H	7.51010300	-2.92245500	1.48674600
H	7.83822900	-3.38192800	-0.62317600	H	6.02678000	-3.25561100	0.57945000
O	-16.19478500	-2.01671300	0.71852400	H	7.60309300	-3.29316600	-0.22873200
H	-16.92356800	-1.46317500	1.09472600	O	-16.35781100	-2.00218400	0.74926000

H	-15.62065800	-0.43287900	-0.5129610	H	-17.12071800	-1.41374300	0.9737510
C	12.56753500	-1.78476200	-0.24930500	H	-15.71314700	-0.6300990	-0.6843490
C	11.79328300	-0.61345900	-0.86675000	C	11.26482800	0.7029900	2.36872600
C	10.671049000	-0.18668200	0.11541100	C	11.61753500	-0.4186700	1.37763400
C	11.18622700	-0.03197800	1.53384800	C	10.6332110	-0.29858400	0.17827000
C	12.32913400	-0.600499000	1.94781700	C	10.54968800	1.09738200	-0.35093300
C	13.19800400	-1.47840500	1.10822800	C	10.95702400	2.16762400	0.3605110
H	11.87241500	-2.63374500	-0.12884900	C	11.3794710	2.11334700	1.79035300
H	13.35224900	-2.12987800	-0.94380900	H	10.22390200	0.5424300	2.69934900
H	12.672366000	-0.42516000	2.97362400	H	11.89604300	0.6332270	3.27217700
C	10.32318900	0.78384200	2.44477500	H	10.97085500	3.15801400	-0.10882600
H	10.82958300	1.02758100	3.38732300	C	10.08832800	1.2652510	-1.7736800
H	10.00080800	1.70987100	1.94026200	H	10.28840900	2.27758400	-2.14950200
H	9.39291700	0.24728700	2.69107200	H	10.59464700	0.53397300	-2.42139600
C	11.19564500	-1.04821800	-2.20308700	H	9.0127400	1.0752220	-1.89403500
H	10.57060700	-1.94491600	-2.09959800	C	11.50254100	-1.76417300	2.0905200
H	10.56557500	-0.25531400	-2.63100200	H	10.53030500	-1.89262200	2.58342700
H	11.98974200	-1.27404200	-2.92831700	H	11.6381470	-2.60056100	1.38961400
C	12.71379500	0.58181300	-1.12193800	H	12.27887400	-1.8499190	2.86312300
H	13.57073100	0.29332000	-1.74594000	C	13.06861200	-0.27399500	0.90772900
H	12.16574800	1.37556600	-1.65014700	H	13.75556900	-0.25914700	1.76504900
H	13.11279500	0.99651900	-0.19001600	H	13.34689100	-1.11626000	0.26088800
O	14.48118800	-0.83711400	0.99857800	H	13.21996700	0.66836500	0.36926400
H	15.07928900	-1.49950600	0.57226200	O	12.715460	2.64787200	1.87354500
O	8.74160900	2.84339000	0.1337150	H	12.91445000	2.72854400	2.8389250
H	8.34562300	2.23977700	0.78383100	O	11.93187000	-1.51695700	-1.7967680
H	10.27337300	0.85381700	-0.20618400	H	11.19046700	-1.7112240	-2.39905200
K	10.61129300	4.30155300	-0.47890800	H	11.24636400	-0.96089300	-0.7942000
H	9.67803600	-2.16676300	0.29648600	K	13.63402600	0.30796200	-2.44309400
H	13.34454300	-2.47463500	1.66513200	H	9.4585900	-2.04759800	0.64383300
				H	10.6889280	2.80193400	2.40151200

Int

E(scf) = -2383.88980483 a.u.

C	13.75578300	0.10640400	-0.5825390
C	14.77327800	-1.02108700	-0.36522200
C	15.01547600	-1.31521000	1.09987000
C	13.72378900	-1.78340900	1.73094800

TS2

E(scf) = -2383.86656597.u.

$\nu_{\min} = -1681.6380 \text{ cm}^{-1}$

C	-13.27344500	-0.38955200	0.07664100
C	-11.98683300	-1.1786590	0.3788130
C	-10.77398000	-0.58230000	-0.3627420

C	12.53259700	-0.93074100	1.38260500	C	-10.94184100	0.52058000	-1.1947490
C	12.51749500	-0.08961600	0.30981100	C	-12.04713800	1.44698900	-1.0717410
H	14.40197100	-1.95480900	-0.8467800	C	-13.08020200	1.11375100	-0.0239840
H	15.72814800	-0.75331000	-0.87135100	H	-13.6853090	-0.72577700	-0.9009260
H	13.54449100	-2.83152300	1.40868100	H	-14.03976900	-0.64396300	0.8437500
H	13.8341600	-1.83504100	2.82979300	H	-12.48775400	1.72934400	-2.043750
C	13.36088700	0.09155600	-2.06472100	C	-9.93617200	0.91930300	-2.23676200
H	12.71212200	0.93653800	-2.33003200	H	-9.27347300	1.72041200	-1.86990500
H	14.2605800	0.15193200	-2.69416100	H	-9.30353500	0.0893120	-2.5702980
H	12.82881100	-0.83407800	-2.32464500	H	-10.45789100	1.34083400	-3.1087560
C	14.40237100	1.46554900	-0.27032000	C	-12.22563500	-2.61840500	-0.1091590
H	15.26278800	1.64084000	-0.93249800	H	-12.34763200	-2.6512060	-1.2003860
H	13.69476500	2.29206800	-0.42388700	H	-11.40373900	-3.29459700	0.1615950
H	14.75547400	1.51946600	0.76754600	H	-13.14188100	-3.02300800	0.3453070
C	11.38511800	-1.0903520	2.33557400	C	-11.7352200	-1.24735000	1.89350600
H	10.75481400	-1.9607410	2.0908200	H	-12.59004900	-1.71543700	2.4043830
H	11.75835300	-1.26246400	3.35565700	H	-10.84468700	-1.85155700	2.1181190
H	10.72367500	-0.21615300	2.34915500	H	-11.59348100	-0.25287200	2.3327100
C	11.3722800	0.73049000	-0.06599900	H	-11.45601800	2.59081900	-0.7619150
H	11.61991800	1.6999940	-0.5125300	H	-14.05064700	1.59290400	-0.2844930
C	10.05206100	0.3934950	-0.01515600	O	-12.62905200	1.66579800	1.24039400
H	9.78291100	-0.6075970	0.33610600	O	-10.76434000	3.68191800	-0.4128250
C	8.94782700	1.21548500	-0.42036600	H	-10.28909000	3.86073200	-1.2435680
C	7.67175000	0.69888600	-0.3311980	H	-13.24203500	1.31640500	1.93482200
H	7.59942600	-0.32814600	0.05010400	C	-9.53529700	-1.27528800	-0.1789580
C	6.43615900	1.30864300	-0.65524200	C	-8.24581600	-0.82470600	-0.3625360
H	6.43969700	2.33413600	-1.03632900	H	-8.07934300	0.20576900	-0.6880040
C	5.22295400	0.66686500	-0.50534000	C	-7.06149100	-1.58239200	-0.1245770
H	5.24996700	-0.36048400	-0.11963200	C	-5.83128600	-0.96794700	-0.2944360
C	9.23062200	2.59932300	-0.92228700	H	-5.85528900	0.08182000	-0.61155100
H	9.77246300	3.19561700	-0.17218500	C	-4.5462260	-1.52217400	-0.10641700
H	9.87646900	2.57837600	-1.81434800	H	-4.47309600	-2.57014900	0.19936100
H	8.31944300	3.14623300	-1.18709600	C	-3.37826000	-0.8134900	-0.28346600
C	3.93838600	1.18784500	-0.79313900	H	-3.46484200	0.23761300	-0.58354100
C	2.82080500	0.38788400	-0.56832400	C	-7.18592500	-3.01353600	0.30817800
H	3.03055000	-0.61584600	-0.17568600	H	-7.72870000	-3.09458700	1.26177100
C	1.46566400	0.68363100	-0.76973700	H	-7.76068900	-3.60143400	-0.4217000

H	1.18589100	1.66894400	-1.15823800	H	-6.21536400	-3.50177400	0.43917900
C	0.43900400	-0.21616900	-0.49362900	C	-2.05765300	-1.31025900	-0.10935800
H	0.74769200	-1.19318700	-0.10377600	C	-0.98910300	-0.45053700	-0.30828900
C	3.82746100	2.58637200	-1.32726500	H	-1.24221700	0.57790800	-0.59248800
H	4.25187600	3.32175500	-0.62653900	C	0.38714800	-0.73230500	-0.18300700
H	4.38828300	2.70443400	-2.26710900	H	0.69499600	-1.74661100	0.09367000
H	2.79047300	2.87939600	-1.52370900	C	1.38458300	0.19865200	-0.38439100
C	-0.92416500	0.03070200	-0.66654400	H	1.07959000	1.21473200	-0.65629900
H	-1.19271900	1.02092900	-1.05509400	C	-1.87157600	-2.74439500	0.29089100
C	-2.00034100	-0.82829700	-0.39157100	H	-2.32464000	-2.94483000	1.27296800
C	-3.31542900	-0.39111600	-0.60900400	H	-2.36660000	-3.42170000	-0.41977500
H	-3.43781000	0.62500000	-1.00309900	H	-0.81801400	-3.03501400	0.34759600
C	-4.48098500	-1.12279700	-0.35685800	C	2.76125500	-0.08757500	-0.25665200
H	-4.35703900	-2.13433000	0.04202500	H	3.01067600	-1.12125800	0.01224000
C	-1.77326600	-2.21452900	0.14744200	C	3.82974000	0.77353500	-0.42788600
H	-2.26910200	-2.97144300	-0.47662700	C	5.15102900	0.26832900	-0.25050500
H	-0.71308400	-2.47976700	0.20265700	H	5.23203600	-0.79370600	0.01088300
H	-2.19370500	-2.32662900	1.15774800	C	6.31669900	0.98164300	-0.37713400
C	-5.77282800	-0.65379900	-0.56319900	H	6.25380400	2.04266100	-0.63465200
H	-5.86268800	0.36725900	-0.95542300	C	3.65517200	2.21812600	-0.79132300
C	-6.99598500	-1.31913700	-0.31696900	H	2.60537300	2.49632100	-0.92772100
C	-8.19810200	-0.65087700	-0.55641200	H	4.07638700	2.87687700	-0.01734100
H	-8.09772800	0.35987800	-0.94757300	H	4.18797200	2.46078200	-1.72259100
C	-9.47827300	-1.21940300	-0.34610400	C	7.60268500	0.40818600	-0.19452500
C	-7.00730300	-2.72789600	0.21322900	H	7.61457500	-0.65976700	0.05526100
H	-7.60196500	-3.39268800	-0.42926400	C	8.82830000	1.02448500	-0.29790700
H	-6.00381500	-3.15817400	0.28621300	C	10.01239200	0.23685700	-0.07793300
H	-7.46151400	-2.7814800	1.21328400	H	9.83567000	-0.81308800	0.17317500
O	15.98518300	-2.34455100	1.29200300	C	11.29191100	0.6984010	-0.11740300
H	16.82420700	-2.01383400	0.88553300	H	11.42419100	1.77288400	-0.28353900
H	15.35141000	-0.38251400	1.61574100	C	8.98254200	2.47895400	-0.62346500
C	-13.14172200	-1.38007300	-1.03594500	H	8.02239700	2.98385900	-0.76937000
C	-11.92868300	-1.72756400	-0.15752000	H	9.51867800	3.00859000	0.17864000
C	-10.77733000	-0.75272200	-0.46473600	H	9.579339000	2.62322600	-1.5360830
C	-11.16757600	0.6232400	-0.7317930	C	12.52009000	-0.04342100	0.1390490
C	-12.47076300	0.99610800	-0.8787750	C	13.61293200	0.77718200	0.84333200
C	-13.62093700	0.05864400	-0.9337140	C	13.97208600	-2.09492800	0.08857200

H	-12.86544300	-1.5769980	-2.0963280	C	14.74416800	-0.11936800	1.37321300
H	-13.98109200	-2.0694270	-0.7953780	C	15.17387600	-1.23582200	0.44781900
H	-12.69773100	2.0601200	-1.0004450	H	15.61629700	0.51697700	1.6394000
C	-10.13531200	1.71478700	-0.8164410	H	14.40043600	-0.59971400	2.31608200
H	-10.62112200	2.70022900	-0.8374700	C	14.16077900	1.83816700	-0.12534100
H	-9.43731500	1.68708700	0.03154800	H	13.37628200	2.54453100	-0.43051400
H	-9.5217190	1.63524700	-1.7250320	H	14.95293600	2.42237400	0.36497800
C	-11.58186500	-3.19096200	-0.4519040	H	14.58442800	1.37811000	-1.02298400
H	-11.18825400	-3.3169940	-1.4701340	C	13.02110200	1.50908100	2.05734000
H	-10.84389800	-3.60438200	0.2480640	H	12.26527200	2.24958700	1.76305900
H	-12.48690300	-3.8078310	-0.3603950	H	12.54851600	0.80527800	2.75660700
C	-12.29625200	-1.62275900	1.3310080	H	13.81555200	2.04116700	2.60048600
H	-13.15743100	-2.26512400	1.5695080	C	12.71660300	-1.33527900	-0.2430990
H	-11.45029200	-1.94258700	1.9572530	H	13.75762800	-2.78784900	0.92906300
H	-12.56701600	-0.59819300	1.6081460	C	11.71881900	-2.14193500	-1.0199200
O	-14.45808400	0.30502400	0.2167030	H	11.10618800	-2.78555200	-0.3680340
H	-15.26393300	-0.25423200	0.0870400	H	11.02402500	-1.52000900	-1.5957940
O	-10.78810600	1.42585600	2.4364410	H	12.23777000	-2.81864300	-1.7140550
H	-11.55468600	1.36273100	1.8269210	H	14.23676700	-2.75619000	-0.7586140
K	-9.55809300	3.81027800	2.1981170	H	-9.62460400	-2.28288000	0.24083500
H	-9.42028200	-2.26170900	-0.0279230	K	-9.93609700	2.07637000	1.46336400
H	-10.25852800	0.63737700	2.1932120	O	15.77955700	-0.66390200	-0.7145440
H	-14.24011500	0.29584700	-1.8725130	H	16.03068300	-1.42176900	-1.2984500
				H	15.92356200	-1.87201900	0.97493500

2

E(scf) = -2383.88567346 a.u.

C	-13.29884700	-0.36503000	0.0722740
C	-12.01503000	-1.17088700	0.3426670
C	-10.80820700	-0.59958800	-0.4202900
C	-10.91086800	0.51565000	-1.1989300
C	-12.12136800	1.40552800	-1.1845070
C	-13.09466500	1.13058500	-0.0589810
H	-13.74979200	-0.7121390	-0.8848640
H	-14.04208300	-0.59304700	0.8684770
H	-12.64941900	1.34232400	-2.1561930
C	-9.85777400	1.03082700	-2.1271690
H	-9.38602700	1.92958600	-1.6805360

H	-9.08938700	0.29371600	-2.3812090
H	-10.33491000	1.37427300	-3.0590330
C	-12.29450100	-2.60882000	-0.1275890
H	-12.4150780	-2.65494300	-1.2186070
H	-11.50077900	-3.31081400	0.1594090
H	-13.22694500	-2.97064600	0.3289840
C	-11.71116900	-1.22598700	1.8480500
H	-12.55312800	-1.67713900	2.3930070
H	-10.81969300	-1.83752000	2.0475160
H	-11.5398040	-0.22632700	2.2655140
H	-11.75280400	2.45092800	-1.1142570
H	-14.06977900	1.62031600	-0.2830910
O	-12.54726800	1.71860000	1.1350190
O	-9.48402000	3.77416000	-0.4308020
H	-9.92706800	3.92154400	-1.2832340
H	-13.13804100	1.44798100	1.8831490
C	-9.57391600	-1.35659800	-0.2605660
C	-8.30029800	-0.87311900	-0.2524750
H	-8.13477700	0.20138900	-0.3828530
C	-7.10667600	-1.65573200	-0.0727100
C	-5.89275500	-1.00957800	-0.1073940
H	-5.92183100	0.07577800	-0.2630430
C	-4.59791400	-1.58005400	0.0117050
H	-4.51733800	-2.66041600	0.1625720
C	-3.44421000	-0.84337800	-0.0701050
H	-3.54015300	0.23777100	-0.2253070
C	-7.23747200	-3.13450400	0.1286680
H	-7.84943500	-3.36064900	1.0146770
H	-7.74693900	-3.60831300	-0.7232150
H	-6.27079700	-3.63126400	0.2573920
C	-2.11374100	-1.35376200	0.0167140
C	-1.05954800	-0.47020400	-0.1054120
H	-1.32191400	0.58309700	-0.2607500
C	0.32383000	-0.76073600	-0.0619360
H	0.64178400	-1.79737500	0.0920590
C	1.30634100	0.19118300	-0.2074600
H	0.98809100	1.22744900	-0.3632580

C	-1.92023200	-2.82541700	0.22891600
H	-2.37941900	-3.15337000	1.17291700
H	-2.40675100	-3.40617600	-0.5681370
H	-0.86531700	-3.11508900	0.25424200
C	2.68995200	-0.09939000	-0.16978500
H	2.95319700	-1.15166400	-0.00902600
C	3.74304100	0.78218800	-0.31210200
C	5.07463800	0.27139100	-0.24027100
H	5.17197800	-0.80718100	-0.06877000
C	6.22674400	1.00377500	-0.36365500
H	6.14418900	2.08062200	-0.53714100
C	3.54787000	2.25145500	-0.53826600
H	2.49303500	2.54220200	-0.55040000
H	4.04778600	2.84078200	0.24405600
H	3.99228200	2.56779600	-1.49325600
C	7.52426400	0.43294900	-0.27057800
H	7.55623300	-0.64804600	-0.08872000
C	8.73685400	1.07263300	-0.37486700
C	9.93662800	0.29109400	-0.22330900
H	9.78088500	-0.77255000	-0.02139500
C	11.20629300	0.77768900	-0.25813900
H	11.31699700	1.86137600	-0.37488300
C	8.86297300	2.54445200	-0.62376900
H	7.89341800	3.0403380	-0.73235400
H	9.40099600	3.03971100	0.1986490
H	9.44567000	2.74494800	-1.5346590
C	12.45232200	0.0520350	-0.0528630
C	13.53965000	0.86244300	0.6730000
C	13.97097100	-1.94089100	-0.2524490
C	14.64862100	-0.05749400	1.19967900
C	15.12992400	-1.05183200	0.16452200
H	15.49841000	0.56143500	1.56215800
H	14.26353400	-0.62794500	2.07773000
C	14.13051300	1.89960000	-0.29414300
H	13.35471100	2.57356300	-0.68323000
H	14.87864600	2.51972300	0.22048800
H	14.61734100	1.42235500	-1.15447200

C	12.94734000	1.60609900	1.87723800
H	12.21398600	2.36645300	1.57735500
H	12.44834300	0.91179400	2.5673790
H	13.74714200	2.11681800	2.43213100
C	12.67726800	-1.21379200	-0.5028080
H	13.80622500	-2.69573900	0.54780200
C	11.68331300	-2.01193100	-1.2930470
H	11.09363800	-2.68736800	-0.6526240
H	10.96715200	-1.38363100	-1.8352660
H	12.20219800	-2.65407900	-2.0185710
O	16.24231600	-1.81977600	0.62141000
H	15.51431700	-0.50991600	-0.7271350
H	15.93164700	-2.29504700	1.43347500
H	14.24540800	-2.53024900	-1.1468610
H	-9.69378500	-2.42336400	-0.0479190
K	-9.86606400	2.16552400	1.41741900

Tabla A5. Coordenadas cartesianas de las estructuras optimizadas involucradas en el mecanismo de oxidación nivel M06-L/6-311+G(2d)//M06-L/6-31G(d).

2			I				
E(scf) = -1708.05727324 a.u.			E(scf) = -1707.43842737a.u.				
C	14.065214000	-0.457466000	0.520507000	C	13.876730000	0.098320000	-1.02193900
C	12.78997600	0.354519000	0.796002000	C	12.954400000	0.800519000	-0.01266300
C	11.67304100	0.004001000	-0.195403000	C	11.652642000	-0.004086000	0.06951600
C	11.78000400	-1.032307000	-1.068227000	C	11.826628000	-1.447943000	0.20246000
C	12.95014600	-1.973330000	-1.081155000	C	13.014566000	-2.036528000	-0.08166800
C	13.83242200	-1.909352000	0.146241000	C	14.192274000	-1.350388000	-0.67622400
H	14.61454900	0.008322000	-0.312911000	H	13.393952000	0.131202000	-2.01084600
H	14.73196600	-0.382906000	1.395057000	H	14.816713000	0.663985000	-1.11743200
H	13.56073900	-1.784514000	-1.980270000	C	10.727278000	-2.324502000	0.73534200
C	10.78866500	-1.334764000	-2.149322000	H	10.168532000	-1.838533000	1.54332000
H	10.12728200	-2.171486000	-1.879010000	H	9.998707000	-2.596855000	-0.03943200
H	10.15230300	-0.480955000	-2.399883000	H	11.142972000	-3.262119000	1.12022000
H	11.31514600	-1.653158000	-3.060989000	C	12.761357000	2.236998000	-0.49946500
C	13.18545000	1.835104000	0.679111000	H	12.212921000	2.280003000	-1.44931800

H	13.42021600	2.109364000	-0.357352000	H	12.227943000	2.858930000	0.22974400
H	12.40349400	2.511417000	1.042889000	H	13.741629000	2.704884000	-0.65609100
H	14.07941900	2.028373000	1.287001000	C	13.608116000	0.852763000	1.37788600
C	12.28158200	0.109827000	2.224908000	H	14.578205000	1.365929000	1.32669500
H	13.06378300	0.344762000	2.961344000	H	12.968223000	1.408792000	2.07537900
H	11.41780400	0.750911000	2.442719000	H	13.785876000	-0.145255000	1.78743700
H	11.97040200	-0.929969000	2.361738000	H	13.143072000	-3.099595000	0.12708900
H	12.58297800	-3.004618000	-1.195753000	H	14.468487000	-1.882031000	-1.60780100
H	14.80516100	-2.38129800	-0.085371000	O	15.270736000	-1.486388000	0.25615800
O	13.17744400	-2.65648600	1.167228000	H	16.064607000	-1.148976000	-0.18280900
H	13.68368200	-2.53208300	1.982581000	C	10.446942000	0.663403000	0.09673100
C	10.48956600	0.84953900	-0.107928000	C	9.112682000	0.190038000	0.06330300
C	9.19572100	0.44880900	-0.215161000	H	8.919754000	-0.871825000	-0.06823000
H	8.99059200	-0.61187900	-0.375668000	C	7.989114000	1.006013000	0.13637600
C	8.03944900	1.29490100	-0.097344000	C	6.714306000	0.403680000	0.03554700
C	6.79523200	0.72104500	-0.189438000	H	6.715687000	-0.681567000	-0.10634800
H	6.77054100	-0.36123400	-0.349412000	C	5.470798000	1.012654000	0.09568700
C	5.52796300	1.35372500	-0.102582000	H	5.418857000	2.092163000	0.24681900
H	5.49628300	2.43376300	0.050656000	C	4.263349000	0.318931000	-0.02640100
C	4.34241500	0.67542600	-0.200411000	H	4.324414000	-0.761325000	-0.18689600
H	4.39161300	-0.40732100	-0.349248000	C	8.137341000	2.490167000	0.31740500
C	8.24643200	2.76060100	0.127775000	H	8.713201000	2.729203000	1.22002600
H	8.78849700	2.94339400	1.066166000	H	8.673187000	2.944031000	-0.52663300
H	8.85597700	3.20235200	-0.671751000	H	7.175972000	3.002768000	0.40078300
H	7.30867300	3.31981700	0.176678000	C	2.980938000	0.877331000	0.04027300
C	3.03498100	1.24066800	-0.123723000	C	1.870370000	0.035422000	-0.11016600
C	1.94571100	0.40210500	-0.231914000	H	2.093734000	-1.021055000	-0.28765000
H	2.16588000	-0.66033000	-0.374217000	C	0.519794000	0.377945000	-0.06133200
C	0.57442100	0.73861000	-0.179964000	H	0.241548000	1.417544000	0.12722600
H	0.29186400	1.78473000	-0.040020000	C	-0.519172000	-0.528739000	-0.23697800
C	-0.43819000	-0.18284000	-0.292095000	H	-0.245469000	-1.567932000	-0.43366700
H	-0.14829000	-1.22716600	-0.429693000	C	2.831306000	2.353349000	0.27001900
C	2.90344900	2.72012400	0.074262000	H	3.273017000	2.655252000	1.22853500
H	3.36934700	3.03715900	1.016942000	H	3.345974000	2.929945000	-0.50935500
H	3.41280700	3.27249700	-0.726467000	H	1.787794000	2.677009000	0.27545700
H	1.86341200	3.05482300	0.093130000	C	-1.872891000	-0.180228000	-0.17681600
C	-1.81311100	0.13762500	-0.237813000	H	-2.086785000	0.872149000	0.03397900

H	-2.05020100	1.19724600	-0.102352000	C	-2.980871000	-1.003631000	-0.35084800
C	-2.88655700	-0.72331400	-0.330381000	C	-4.273757000	-0.436719000	-0.23491900
C	-4.20757800	-0.19052700	-0.246175000	H	-4.316738000	0.630997000	-0.00010700
H	-4.286796000	0.89265200	-0.11521500	C	-5.471300000	-1.099691000	-0.38513400
C	-5.36994400	-0.91159000	-0.30912400	H	-5.445163000	-2.163579000	-0.62613300
H	-5.29698000	-1.99266200	-0.43701600	C	-2.853960000	-2.465610000	-0.65623300
C	-2.72487900	-2.20219000	-0.51306600	H	-1.814919000	-2.801319000	-0.69788800
H	-1.67885900	-2.51559500	-0.54456000	H	-3.366583000	-3.074477000	0.10018200
H	-3.20915400	-2.75589700	0.30216500	H	-3.316761000	-2.711244000	-1.62147100
H	-3.19882000	-2.54042900	-1.444201000	C	-6.729755000	-0.473585000	-0.23953100
C	-6.66319100	-0.33579200	-0.209908000	H	-6.702303000	0.591257000	0.01158700
H	-6.69049000	0.75103100	-0.085244000	C	-7.980904000	-1.037106000	-0.36874800
C	-7.87615600	-0.97846100	-0.244818000	C	-9.132041000	-0.207473000	-0.15369600
C	-9.07714000	-0.19782200	-0.109040000	H	-8.921333000	0.829320000	0.11622300
H	-8.9321000	0.87786100	0.011484000	C	-10.428051000	-0.619258000	-0.20684800
C	-10.34024800	-0.696248000	-0.07250600	H	-10.599897000	-1.682980000	-0.39122300
H	-10.44189300	-1.784088000	-0.10186800	C	-8.189437000	-2.480128000	-0.70960000
C	-8.00691400	-2.461618000	-0.40630500	H	-7.251665000	-3.019289000	-0.86557500
H	-7.04381900	-2.963194000	-0.527637000	H	-8.739360000	-2.999105000	0.08787400
H	-8.5049700	-2.912312000	0.463660000	H	-8.790239000	-2.590633000	-1.62204900
H	-8.62367900	-2.712610000	-1.279352000	C	-11.625121000	0.162259000	0.06512500
C	-11.5876200	0.032806000	0.112352000	C	-12.733829000	-0.622567000	0.78175300
C	-12.6148410	-0.702735000	0.984399000	C	-13.000479000	2.261041000	0.04006500
C	-13.1267240	1.984890000	-0.218261000	C	-13.823891000	0.311917000	1.32908300
C	-13.78157500	0.214878000	1.382770000	C	-14.226563000	1.438600000	0.40480800
C	-14.27885200	1.130907000	0.287701000	H	-14.707490000	-0.282854000	1.59993700
H	-14.61100800	-0.398914000	1.761002000	H	-13.460420000	0.773798000	2.25962600
H	-13.46241100	0.857018000	2.217991000	C	-13.339828000	-1.656138000	-0.18096000
C	-13.13816800	-1.942342000	0.240747000	H	-12.589157000	-2.388204000	-0.50517100
H	-12.33370500	-2.661553000	0.040726000	H	-14.138850000	-2.216076000	0.32339500
H	-13.88571300	-2.460595000	0.856470000	H	-13.768840000	-1.177583000	-1.06414200
H	-13.61065600	-1.670377000	-0.705803000	C	-12.149703000	-1.374024000	1.98665400
C	-11.95213700	-1.169959000	2.288181000	H	-11.424248000	-2.138041000	1.68218100
H	-11.16582100	-1.912553000	2.106819000	H	-11.640182000	-0.689931000	2.67735100
H	-11.49669600	-0.330604000	2.829229000	H	-12.950832000	-1.880515000	2.54170100
H	-12.69890800	-1.632262000	2.947868000	C	-11.776886000	1.460419000	-0.31065200
C	-11.84474600	1.237297000	-0.462586000	H	-12.761322000	2.940041000	0.87792700

H	-12.94316500	2.801361000	0.502658000	C	-10.762490000	2.229717000	-1.10078200
C	-10.90276300	1.944542000	-1.388167000	H	-10.135792000	2.871821000	-0.46269400
H	-10.33498800	2.737362000	-0.877076000	H	-10.086764000	1.581189000	-1.66676800
H	-10.17259100	1.271211000	-1.847371000	H	-11.263106000	2.905698000	-1.80776600
H	-11.46093900	2.445596000	-2.191394000	H	-13.247664000	2.937830000	-0.79496300
H	-13.43093200	2.503072000	-1.143403000	H	10.523023000	1.749667000	0.10670400
H	10.66437900	1.898799000	0.140190000	O	-14.848825000	0.869512000	-0.74115800
O	-14.84083000	0.325565000	-0.741496000	H	-15.051575000	1.594373000	-1.34805600
H	-15.08150600	0.914644000	-1.469368000	H	-14.949863000	2.089287000	0.93054700
H	-15.05964000	1.794638000	0.704035000				

II

E(scf) = -1783.25802236 a.u.

C	13.751843000	-0.253161000	0.47745200
C	12.489284000	0.579604000	0.74091600
C	11.326391000	0.130101000	-0.15073600
C	11.400531000	-0.965515000	-0.95117900
C	12.575921000	-1.901413000	-0.93766600
C	13.495253000	-1.728422000	0.26198600
H	14.239559000	0.109940000	-0.43920300
H	14.471358000	-0.090580000	1.29595900
C	10.373704000	-1.356264000	-1.96853000
H	9.713917000	-2.159580000	-1.60694800
H	9.735564000	-0.520060000	-2.26849000
H	10.881789000	-1.744491000	-2.86021500
C	12.864806000	2.040207000	0.44431300
H	13.054851000	2.195922000	-0.62502100
H	12.091308000	2.748975000	0.76176300
H	13.780884000	2.303824000	0.98954100
C	12.057765000	0.485245000	2.21217500
H	12.880972000	0.781919000	2.87800200
H	11.212064000	1.155554000	2.41212600
H	11.744173000	-0.530998000	2.46935400
H	14.453560000	-2.231397000	0.02541400
O	12.868052000	-2.380133000	1.35775100
H	13.374710000	-2.159123000	2.15146400
C	10.135441000	0.965724000	-0.06972300
C	8.846264000	0.537859000	-0.09703500

III₁

E(scf) = -1782.64060457a.u.

C	13.776713000	-0.159677000	0.3163750
C	12.511186000	0.673853000	0.5649990
C	11.312609000	0.119289000	-0.2141070
C	11.370478000	-1.048251000	-0.9089170
C	12.568576000	-1.955302000	-0.8707620
C	13.542090000	-1.652853000	0.2582680
H	14.207843000	0.119640000	-0.6562430
H	14.533195000	0.094936000	1.0757220
C	10.303624000	-1.556905000	-1.8281370
H	9.680092000	-2.329450000	-1.3530420
H	9.633217000	-0.766950000	-2.1790290
H	10.775637000	-2.026416000	-2.7003250
C	12.840560000	2.104232000	0.1081230
H	12.967879000	2.158594000	-0.9802290
H	12.072722000	2.829742000	0.4004600
H	13.780028000	2.432118000	0.5726440
C	12.160587000	0.718614000	2.0596010
H	13.008291000	1.102317000	2.6452250
H	11.306968000	1.385213000	2.2374900
H	11.892437000	-0.273480000	2.4351200
H	14.498147000	-2.160176000	0.0219210
O	12.983616000	-2.206196000	1.4417700
H	13.53358700	-1.915036000	2.18230900
C	10.113015000	0.940592000	-0.1499340
C	8.824316000	0.503482000	-0.1069310

H	8.655473000	-0.534501000	-0.17542500	H	8.637727000	-0.572102000	-0.1014600
C	7.679357000	1.371737000	-0.00225500	C	7.660110000	1.337711000	-0.0407530
C	6.444580000	0.771275000	-0.01344400	C	6.421845000	0.734901000	0.0199420
H	6.436672000	-0.320675000	-0.08365100	H	6.416714000	-0.359397000	0.0282740
C	5.167784000	1.387714000	0.04602300	C	5.151781000	1.352315000	0.0595920
H	5.118098000	2.476491000	0.10103800	H	5.100934000	2.442208000	0.0361500
C	3.993397000	0.683567000	0.03079400	C	3.969335000	0.648060000	0.1148490
H	4.059313000	-0.407261000	-0.01892700	H	4.035353000	-0.443558000	0.1428400
C	7.866302000	2.853683000	0.09806700	C	7.841586000	2.823782000	-0.0486110
H	8.450330000	3.118548000	0.9903800	H	8.437450000	3.152141000	0.8143130
H	8.426052000	3.241329000	-0.76356900	H	8.386949000	3.151912000	-0.9434180
H	6.920612000	3.398946000	0.15195400	H	6.894629000	3.368521000	-0.0187150
C	2.677903000	1.233904000	0.07007600	C	2.665896000	1.201879000	0.1304830
C	1.600778000	0.372993000	0.05506700	C	1.574509000	0.340037000	0.1841050
H	1.836205000	-0.695001000	0.02031300	H	1.809805000	-0.727942000	0.2244360
C	0.225327000	0.694649000	0.07672300	C	0.214666000	0.667514000	0.1859300
H	-0.070404000	1.746000000	0.10171200	H	-0.079866000	1.718358000	0.1357210
C	-0.777030000	-0.244338000	0.06416300	C	-0.807469000	-0.273288000	0.2436210
H	-0.477398000	-1.294619000	0.04222800	H	-0.510466000	-1.323182000	0.3004950
C	2.526180000	2.723519000	0.12557900	C	2.510981000	2.691906000	0.0786340
H	2.998249000	3.135705000	1.02760700	H	3.03103600	3.174506000	0.9166090
H	3.018059000	3.204016000	-0.73055700	H	2.949395000	3.104371000	-0.8399460
H	1.481734000	3.044477000	0.12669500	H	1.466828000	3.011671000	0.1155620
C	-2.154410000	0.069238000	0.07411000	C	-2.163397000	0.049030000	0.2256320
H	-2.398859000	1.135607000	0.08855800	H	-2.404452000	1.114166000	0.1556340
C	-3.223100000	-0.802290000	0.06224900	C	-3.260607000	-0.821780000	0.2799640
C	-4.546024000	-0.267737000	0.06015900	C	-4.550987000	-0.281637000	0.2236520
H	-4.627998000	0.823121000	0.06928300	H	-4.628251000	0.805502000	0.1321640
C	-5.707964000	-0.992066000	0.04189000	C	-5.748609000	-1.001724000	0.2670060
H	-5.636165000	-2.080934000	0.03323800	H	-5.682243000	-2.086234000	0.3686870
C	-3.055342000	-2.291303000	0.04579000	C	-3.088825000	-2.308584000	0.3957770
H	-2.008157000	-2.602315000	0.05977300	H	-2.040429000	-2.615954000	0.3862480
H	-3.547333000	-2.754169000	0.91160300	H	-3.531009000	-2.688130000	1.3262680
H	-3.518196000	-2.731783000	-0.84748900	H	-3.590119000	-2.833106000	-0.4275670
C	-6.999302000	-0.403531000	0.02647600	C	-6.998788000	-0.410371000	0.1793390
H	-7.020126000	0.690583000	0.02978900	H	-7.011384000	0.678019000	0.0646780
C	-8.216866000	-1.037556000	0.00031200	C	-8.267662000	-1.033385000	0.2077190

C	-9.411066000	-0.235931000	-0.02397400	C	-9.395823000	-0.233977000	0.0625020
H	-9.255090000	0.844573000	-0.00355800	H	-9.207575000	0.830316000	-0.0541290
C	-10.682870000	-0.713679000	-0.03074200	C	-10.728406000	-0.711262000	0.1012570
H	-10.804102000	-1.797594000	0.03995600	H	-10.804848000	-1.771226000	0.3402110
C	-8.360472000	-2.527748000	-0.00223500	C	-8.401875000	-2.519438000	0.3820160
H	-7.399964000	-3.048864000	0.00630800	H	-7.436312000	-3.018625000	0.4938930
H	-8.928996000	-2.869220000	0.87404700	H	-8.996273000	-2.764812000	1.2716480
H	-8.917671000	-2.870834000	-0.88408400	H	-8.911373000	-2.981114000	-0.4730920
C	-11.926582000	0.043880000	-0.02091400	C	-11.934163000	-0.063722000	-0.0634920
C	-13.041211000	-0.601885000	0.81442800	C	-13.240881000	-0.833939000	0.1562400
C	-13.393892000	1.978205000	-0.65302700	C	-13.295031000	1.944527000	-0.4021450
C	-14.213236000	0.367659000	1.04032000	C	-14.200963000	0.067358000	0.9510110
C	-14.601344000	1.192930000	-0.16548000	C	-14.495015000	1.400529000	0.2938820
H	-15.083905000	-0.195924000	1.40339000	H	-15.153246000	-0.454709000	1.1148200
H	-13.941702000	1.073723000	1.83971900	H	-13.761594000	0.251395000	1.9421980
C	-13.529280000	-1.886215000	0.12457300	C	-13.841270000	-1.203597000	-1.2099510
H	-12.726336000	-2.630920000	0.05089900	H	-13.179889000	-1.904541000	-1.7359430
H	-14.338481000	-2.342575000	0.71043900	H	-14.820083000	-1.683561000	-1.0825240
H	-13.912666000	-1.681304000	-0.87748600	H	-13.990669000	-0.324404000	-1.8421270
C	-12.502448000	-0.978683000	2.20199300	C	-13.068919000	-2.121914000	0.9611490
H	-11.720922000	-1.746133000	2.14375200	H	-12.513102000	-2.890466000	0.4103310
H	-12.074671000	-0.108443000	2.71636600	H	-12.553486000	-1.945658000	1.9140590
H	-13.312183000	-1.377579000	2.82797700	H	-14.055531000	-2.546271000	1.1859410
C	-12.111353000	1.195410000	-0.71884300	C	-12.101039000	1.312157000	-0.5257970
H	-13.250971000	2.857450000	-0.00003800	C	-10.989738000	2.051914000	-1.2182620
C	-11.081581000	1.807296000	-1.61918400	H	-10.273336000	2.487836000	-0.5101590
H	-10.531759000	2.624920000	-1.12805800	H	-10.419637000	1.402941000	-1.8930330
H	-10.337712000	1.083926000	-1.96691600	H	-11.395694000	2.883530000	-1.8052070
H	-11.562737000	2.255678000	-2.99607000	H	-13.393468000	2.948938000	-0.8247750
H	-13.611334000	2.409052000	-1.64492100	H	10.273259000	2.016992000	-0.0626170
H	10.303891000	2.031719000	0.09679900	O	-15.595039000	1.208825000	-0.6093130
O	-15.104230000	0.310384000	-1.16141800	H	-15.654826000	2.001678000	-1.1606460
H	-15.295878000	0.841317000	-1.94634300	H	-14.810944000	2.120452000	1.0732090
H	-15.394682000	1.904542000	0.12956900	O	13.227114000	-1.845263000	-2.1356530
O	13.301511000	-1.693902000	-2.15286800	H	13.823288000	-2.603776000	-2.2122180
H	13.882446000	-2.459020000	-2.27049300	H	12.201170000	-2.989141000	-0.7264710
H	12.181255000	-2.934724000	-0.90775400				

IV ₁			V ₁				
E(scf) = -1858.45883268 a.u.			E(scf) = -1857.86172744 a.u.				
C	13.981261000	-0.096850000	1.00384000	C	13.997507000	0.008034000	0.84497000
C	12.706879000	0.758837000	0.94772300	C	12.712027000	0.848248000	0.81169200
C	11.650215000	0.132602000	0.03000600	C	11.630506000	0.188692000	-0.05251600
C	11.816280000	-1.084226000	-0.55142100	C	11.792068000	-1.040183000	-0.61149500
C	12.975427000	-1.983915000	-0.22841000	C	12.976295000	-1.915273000	-0.31321800
C	13.731021000	-1.588263000	1.03100300	C	13.765882000	-1.484927000	0.91321300
H	14.587184000	0.095440000	0.10624800	H	14.571898000	0.185794000	-0.07609200
H	14.592739000	0.219639000	1.86392100	H	14.632659000	0.350611000	1.67747300
C	10.913969000	-1.664485000	-1.59557800	C	10.862150000	-1.657423000	-1.60922600
H	10.216595000	-2.406770000	-1.17822900	H	10.189715000	-2.397955000	-1.14996800
H	10.315642000	-0.904532000	-2.10702500	H	10.236375000	-0.918829000	-2.11905600
H	11.521704000	-2.190097000	-2.34295400	H	11.451436000	-2.193985000	-2.36366700
C	13.133257000	2.136900000	0.41720900	C	13.103622000	2.218005000	0.23504500
H	13.454586000	2.081264000	-0.63015300	H	13.389283000	2.141118000	-0.82127700
H	12.335586000	2.884852000	0.49147900	H	12.299901000	2.958319000	0.31971000
H	13.978674000	2.513679000	1.00820100	H	13.964203000	2.618516000	0.78747000
C	12.106102000	0.949178000	2.34856200	C	12.158341000	1.065337000	2.22813500
H	12.850543000	1.375193000	3.03621500	H	12.921866000	1.514044000	2.87954800
H	11.253222000	1.639223000	2.31505000	H	11.297572000	1.745975000	2.20889200
H	11.747517000	0.000243000	2.75856600	H	11.824168000	0.122679000	2.67209300
H	14.703291000	-2.119106000	1.02104200	H	14.743747000	-2.005095000	0.88476700
O	12.950543000	-2.031190000	2.13240900	O	13.024625000	-1.911934000	2.04727400
H	13.355022000	-1.673430000	2.93499700	H	13.445780000	-1.527183000	2.82845400
C	10.454412000	0.944351000	-0.15172400	C	10.419324000	0.980074000	-0.21025000
C	9.174800000	0.497786000	-0.25089100	C	9.141284000	0.513145000	-0.26052400
H	8.991173000	-0.577704000	-0.21077800	H	8.976031000	-0.563665000	-0.18890200
C	8.002893000	1.324276000	-0.34862300	C	7.958452000	1.318598000	-0.34630100
C	6.773260000	0.713998000	-0.38944800	C	6.731930000	0.689154000	-0.33299700
H	6.772791000	-0.379921000	-0.36306400	H	6.750337000	-0.403273000	-0.27073700
C	5.493546000	1.324138000	-0.44866500	C	5.448491000	1.277073000	-0.38087400
H	5.437812000	2.413978000	-0.45791000	H	5.375156000	2.364654000	-0.43460700
C	4.322435000	0.614999000	-0.48155200	C	4.279525000	0.548236000	-0.35460900
H	4.391707000	-0.476762000	-0.47586000	H	4.367344000	-0.541070000	-0.30402200
C	8.176831000	2.810881000	-0.38398400	C	8.106779000	2.806219000	-0.43087400
H	8.676889000	3.172725000	0.52525300	H	8.615057000	3.204991000	0.45830000

H	8.810834000	3.114880000	-1.22746900	H	8.721455000	3.094721000	-1.29382200
H	7.228956000	3.347438000	-0.47388900	H	7.148457000	3.323922000	-0.52082900
C	3.005893000	1.163441000	-0.51132700	C	2.965465000	1.074738000	-0.38044400
C	1.930002000	0.301210000	-0.53875800	C	1.889510000	0.192010000	-0.34736800
H	2.166613000	-0.767006000	-0.55040500	H	2.144587000	-0.871594000	-0.31085000
C	0.554422000	0.622776000	-0.54441500	C	0.524314000	0.494239000	-0.35187000
H	0.258627000	1.674027000	-0.51651200	H	0.211431000	1.540596000	-0.38062000
C	-0.448750000	-0.314987000	-0.57509500	C	-0.482550000	-0.464839000	-0.31671700
H	-0.150708000	-1.365432000	-0.60889000	H	-0.168422000	-1.511027000	-0.29107900
C	2.851610000	2.653842000	-0.50200900	C	2.782760000	2.561389000	-0.44105500
H	3.307503000	3.093358000	0.39532200	H	3.275857000	3.057165000	0.40555000
H	3.358059000	3.109456000	-1.36339300	H	3.232187000	2.979072000	-1.35204200
H	1.807123000	2.973335000	-0.53024700	H	1.732177000	2.861336000	-0.42855300
C	-1.825535000	0.000783000	-0.55548400	C	-1.842848000	-0.163535000	-0.30931400
H	-2.067546000	1.066480000	-0.50140200	H	-2.100290000	0.899852000	-0.32935700
C	-2.896289000	-0.867763000	-0.58732500	C	-2.927760000	-1.051432000	-0.27391900
C	-4.217373000	-0.332280000	-0.52770500	C	-4.225129000	-0.527594000	-0.25581200
H	-4.295872000	0.755957000	-0.44907900	H	-4.318091000	0.562193000	-0.27059000
C	-5.381471000	-1.053176000	-0.54685700	C	-5.413373000	-1.264389000	-0.21419400
H	-5.313564000	-2.139088000	-0.62993300	H	-5.333162000	-2.352924000	-0.19966800
C	-2.731845000	-2.354639000	-0.67638400	C	-2.734590000	-2.539850000	-0.24735500
H	-1.685068000	-2.667213000	-0.68874800	H	-1.682903000	-2.832093000	-0.29782800
H	-3.216749000	-2.858438000	0.17018600	H	-3.152053000	-2.978699000	0.66842800
H	-3.203582000	-2.750073000	-1.58602400	H	-3.247451000	-3.022975000	-1.08899600
C	-6.669380000	-0.465660000	-0.44798500	C	-6.670171000	-0.682877000	-0.18298300
H	-6.685107000	0.623710000	-0.34600700	H	-6.696800000	0.411304000	-0.18959400
C	-7.888918000	-1.096510000	-0.44807800	C	-7.931471000	-1.320130000	-0.13568600
C	-9.075711000	-0.299768000	-0.28754100	C	-9.069981000	-0.526259000	-0.08596500
H	-8.911850000	0.773070000	-0.16672400	H	-8.904293000	0.549867000	-0.08409500
C	-10.345343000	-0.776801000	-0.21447100	C	-10.395757000	-1.008010000	0.03345500
H	-10.469331000	-1.862430000	-0.24809300	H	-10.481668000	-2.086595000	0.15964300
C	-8.038776000	-2.580022000	-0.58581200	C	-8.048894000	-2.817587000	-0.12842900
H	-7.083217000	-3.092732000	-0.72105000	H	-7.087278000	-3.315109000	-0.27792600
H	-8.523820000	-3.012852000	0.30037800	H	-8.459926000	-3.183478000	0.82212300
H	-8.675709000	-2.836038000	-1.44283800	H	-8.722884000	-3.170042000	-0.91892300
C	-11.564504000	-0.017788000	0.02743700	C	-11.573207000	-0.292882000	0.08020900
C	-12.579777000	-0.740699000	0.92281000	C	-12.890344000	-0.997581000	0.42411500

C	-13.041069000	1.992234000	-0.17963100	C	-12.786275000	1.809554000	0.18644300
C	-13.682138000	0.207517000	1.42612200	C	-13.585289000	-0.163572000	1.51348500
C	-14.198665000	1.177136000	0.37086700	C	-13.819261000	1.288807000	1.13319700
H	-14.521780000	-0.417597000	1.78341400	H	-14.550608000	-0.612687000	1.78681900
C	-13.218727000	-1.898303000	0.13779900	C	-13.777505000	-1.087721000	-0.82917600
H	-12.457025000	-2.630421000	-0.15754200	H	-13.335293000	-1.764672000	-1.57012200
H	-13.946590000	-2.428249000	0.76698100	H	-14.774179000	-1.477560000	-0.57701400
H	-13.733984000	-1.547707000	-0.75839700	H	-13.892295000	-0.114402000	-1.32322500
C	-11.882298000	-1.338634000	2.15492100	C	-12.714276000	-2.410445000	0.97390300
H	-11.207994000	-2.152641000	1.86359000	H	-12.313838000	-3.100709000	0.22196400
H	-11.303404000	-0.588798000	2.70030800	H	-12.044712000	-2.429654000	1.84244900
H	-12.627751000	-1.755394000	2.84471500	H	-13.686608000	-2.809052000	1.29054700
C	-11.812150000	1.199105000	-0.52258100	C	-11.694936000	1.120240000	-0.24447500
H	-12.771550000	2.760566000	0.56353000	C	-10.731020000	1.827815000	-1.15439100
C	-10.899034000	1.890545000	-1.48740700	H	-9.939723000	2.358165000	-0.60734300
H	-10.291096000	2.667494000	-0.99871200	H	-10.241772000	1.128764000	-1.84028900
H	-10.206902000	1.204002000	-1.98408200	H	-11.260384000	2.585925000	-1.74108800
H	-11.483033000	2.408922000	-2.26104400	H	10.549134000	2.064161000	-0.19543400
H	-13.380783000	2.558357000	-1.06305200	O	-15.127221000	1.569350000	0.59784700
H	10.599155000	2.025882000	-0.11214500	H	-15.232981000	1.017803000	-0.19330400
O	-14.880530000	0.434710000	-0.62519900	H	-13.806253000	1.910791000	2.04066100
H	-15.092202000	1.043744000	-1.34544100	O	13.815135000	-1.914198000	-1.47187500
H	-14.912002000	1.866107000	0.86923600	H	14.416416000	-2.667997000	-1.38812800
O	13.852696000	-1.980172000	-1.35798000	H	12.597308000	-2.937757000	-0.12518000
H	14.434118000	-2.748714000	-1.26880500	H	-12.958904000	-0.195635000	2.41632900
H	12.572714000	-3.002310000	-0.06935700	O	-13.005045000	3.091781000	-0.21162800
O	-13.145399000	0.976857000	2.49732800	H	-13.938290000	3.274806000	0.00511100
H	-13.867200000	1.516198000	2.84933200				

VI

E(scf) = -1857.27296088a.u.

C	14.173573000	-0.039620000	0.55000200
C	12.892842000	0.807157000	0.59799100
C	11.724443000	0.113583000	-0.11453800
C	11.830013000	-1.156325000	-0.63533900
C	12.980186000	-2.015705000	-0.32920100
C	13.949243000	-1.524029000	0.73526700
H	14.660651000	0.097717000	-0.42865600

VII

E(scf) = -1856.67665269 a.u.

C	14.170726000	0.078747000	0.48800700
C	12.877594000	0.907082000	0.52890500
C	11.710438000	0.174818000	-0.14733800
C	11.832414000	-1.108948000	-0.63423100
C	12.997437000	-1.941036000	-0.31604400
C	13.971668000	-1.402808000	0.72093800
H	14.642505000	0.193750000	-0.50092000

H	14.887388000	0.347334000	1.295017000	H	14.888358000	0.498962000	1.211177000
C	10.824273000	-1.789585000	-1.544726000	C	10.829674000	-1.781458000	-1.518397000
H	10.105742000	-2.418163000	-0.999881000	H	10.126849000	-2.408956000	-0.952225000
H	10.252924000	-1.048546000	-2.112943000	H	10.240759000	-1.064403000	-2.099210000
H	11.345830000	-2.462936000	-2.232221000	H	11.357174000	-2.462348000	-2.193938000
C	13.226772000	2.137978000	-0.096473000	C	13.180417000	2.222023000	-0.208094000
H	13.388377000	2.000420000	-1.172943000	H	13.331937000	2.055443000	-1.281913000
H	12.449260000	2.898297000	0.037635000	H	12.391438000	2.972662000	-0.086979000
H	14.151386000	2.548686000	0.330460000	H	14.102627000	2.660504000	0.195740000
C	12.492853000	1.106236000	2.051242000	C	12.493392000	1.241159000	1.978734000
H	13.317174000	1.606266000	2.578490000	H	13.315662000	1.771711000	2.478760000
H	11.622588000	1.773860000	2.088496000	H	11.611088000	1.892940000	2.009846000
H	12.240703000	0.186934000	2.587026000	H	12.266844000	0.333011000	2.544330000
H	14.890296000	-2.079241000	0.593078000	H	14.919786000	-1.947448000	0.583980000
O	13.361624000	-1.857599000	1.990643000	O	13.405383000	-1.706756000	1.993649000
H	14.000187000	-1.609309000	2.674703000	H	14.042847000	-1.415066000	2.661350000
C	10.524488000	0.915214000	-0.196999000	C	10.497771000	0.951359000	-0.238868000
C	9.232239000	0.481099000	-0.262173000	C	9.209938000	0.491058000	-0.284359000
H	9.032916000	-0.590283000	-0.276489000	H	9.032451000	-0.584059000	-0.264105000
C	8.074733000	1.324799000	-0.250719000	C	8.040632000	1.309926000	-0.294375000
C	6.835793000	0.726420000	-0.276988000	C	6.807097000	0.685966000	-0.284487000
H	6.826058000	-0.367040000	-0.313260000	H	6.820621000	-0.408144000	-0.275057000
C	5.563015000	1.347862000	-0.261589000	C	5.529936000	1.281169000	-0.282958000
H	5.514251000	2.436773000	-0.214329000	H	5.459541000	2.370131000	-0.288371000
C	4.387125000	0.643996000	-0.301051000	C	4.357797000	0.552769000	-0.272267000
H	4.453463000	-0.446659000	-0.351552000	H	4.444739000	-0.537661000	-0.267934000
C	8.262450000	2.809575000	-0.204358000	C	8.196334000	2.799271000	-0.307338000
H	8.810526000	3.110869000	0.699101000	H	8.731601000	3.148992000	0.586375000
H	8.856006000	3.160687000	-1.058807000	H	8.787593000	3.128750000	-1.171828000
H	7.317055000	3.357607000	-0.212671000	H	7.239276000	3.325718000	-0.342810000
C	3.073664000	1.195767000	-0.280918000	C	3.047188000	1.081832000	-0.264299000
C	1.997227000	0.333851000	-0.333040000	C	1.970266000	0.197167000	-0.254052000
H	2.234337000	-0.732592000	-0.392768000	H	2.225739000	-0.866800000	-0.255761000
C	0.622317000	0.653797000	-0.316793000	C	0.606821000	0.499658000	-0.240806000
H	0.323746000	1.702352000	-0.249307000	H	0.293317000	1.546076000	-0.235737000
C	-0.376307000	-0.288131000	-0.379961000	C	-0.399593000	-0.461976000	-0.232379000
H	-0.071241000	-1.334667000	-0.451021000	H	-0.084404000	-1.507973000	-0.240102000

C	2.920372000	2.684016000	-0.20015900	C	2.864650000	2.569680000	-0.26622400
H	3.376308000	3.079602000	0.71729300	H	3.341519000	3.029315000	0.60964400
H	3.425641000	3.180499000	-1.03908200	H	3.330038000	3.025223000	-1.15038200
H	1.875876000	3.004372000	-0.21214100	H	1.813916000	2.868994000	-0.26033400
C	-1.754602000	0.016963000	-0.35247400	C	-1.758843000	-0.161775000	-0.21360500
H	-2.006278000	1.078169000	-0.26690400	H	-2.017544000	0.901341000	-0.20331500
C	-2.816481000	-0.861640000	-0.41495000	C	-2.843053000	-1.052436000	-0.20493700
C	-4.142939000	-0.340595000	-0.35027800	C	-4.139791000	-0.529272000	-0.17988000
H	-4.233868000	0.744484000	-0.24768600	H	-4.233196000	0.560422000	-0.16618300
C	-5.297989000	-1.074910000	-0.39479400	C	-5.328287000	-1.267440000	-0.16821100
H	-5.216094000	-2.157873000	-0.49946100	H	-5.248447000	-2.355888000	-0.18185400
C	-2.636158000	-2.343581000	-0.54487100	C	-2.648465000	-2.540585000	-0.22426000
H	-1.586661000	-2.646219000	-0.55684900	H	-1.595352000	-2.831332000	-0.21422400
H	-3.122690000	-2.875258000	0.28325100	H	-3.125964000	-3.016044000	0.64211100
H	-3.096513000	-2.717205000	-1.46919100	H	-3.101556000	-2.988726000	-1.11823600
C	-6.594450000	-0.506540000	-0.29947400	C	-6.584333000	-0.685576000	-0.13627700
H	-6.628447000	0.580897000	-0.18447600	H	-6.610223000	0.408467000	-0.12024900
C	-7.803124000	-1.157878000	-0.32157700	C	-7.846502000	-1.322905000	-0.11673200
C	-9.005255000	-0.380700000	-0.17541600	C	-8.983986000	-0.527723000	-0.07092300
H	-8.862104000	0.694461000	-0.05294600	H	-8.817313000	0.548151000	-0.05128900
C	-10.265414000	-0.883578000	-0.12175800	C	-10.311938000	-1.008696000	0.02303300
H	-10.367256000	-1.971235000	-0.15377900	H	-10.402374000	-2.087960000	0.13925600
C	-7.927074000	-2.641911000	-0.47642600	C	-7.966600000	-2.819845000	-0.13655600
H	-6.962476000	-3.138626000	-0.60534800	H	-7.002453000	-3.317525000	-0.26760100
H	-8.415319000	-3.092212000	0.39912900	H	-8.403546000	-3.199352000	0.79684700
H	-8.549744000	-2.898375000	-1.34355400	H	-8.619973000	-3.157909000	-0.95026700
C	-11.508042000	-0.153620000	0.09457800	C	-11.487190000	-0.289145000	0.05708000
C	-12.509206000	-0.888258000	0.99465900	C	-12.811389000	-0.990062000	0.38089900
C	-13.043714000	1.804516000	-0.19449200	C	-12.693158000	1.816921000	0.15149600
C	-13.652605000	0.037934000	1.43171000	C	-13.516796000	-0.156374000	1.46371700
C	-14.180184000	0.940389000	0.34474000	C	-13.739488000	1.298360000	1.08521600
C	-13.058346000	-2.127154000	0.26922800	C	-13.682250000	-1.072372000	-0.88419100
H	-12.263258000	-2.851697000	0.05130200	H	-13.232023000	-1.746361000	-1.62297900
H	-13.791333000	-2.638503000	0.90742800	H	-14.682244000	-1.462183000	-0.64606700
H	-13.554515000	-1.857239000	-0.66555200	H	-13.789927000	-0.096558000	-1.37489000
C	-11.803016000	-1.355361000	2.27599400	C	-12.647453000	-2.405317000	0.92828200
H	-11.024224000	-2.099125000	2.06847300	H	-12.240732000	-3.094804000	0.17903200

H	-11.330588000	-0.515577000	2.80079500	H	-11.988980000	-2.430155000	1.80509500
H	-12.528664000	-1.816987000	2.95890700	H	-13.625061000	-2.801152000	1.23157800
C	-11.769513000	1.054374000	-0.46875200	C	-11.598059000	1.124638000	-0.26606400
C	-10.838205000	1.788027000	-1.38313100	C	-10.619876000	1.829728000	-1.16271500
H	-10.252006000	2.544452000	-0.84218500	H	-9.839260000	2.364664000	-0.60493900
H	-10.132036000	1.124940000	-1.89267200	H	-10.117987000	1.128220000	-1.83680300
H	-11.406434000	2.337228000	-2.14655200	H	-11.140147000	2.583792000	-1.76258100
H	-13.384570000	2.256282000	-1.15122400	H	10.621380000	2.032373000	-0.16221700
H	10.668303000	1.991368000	-0.09371700	O	-15.039102000	1.588135000	0.53660200
O	-14.761878000	0.147471000	-0.67763300	H	-15.142178000	1.037148000	-0.25531100
H	-15.005048000	0.739260000	-1.40360200	H	-13.732076000	1.917537000	1.99458800
H	-14.943526000	1.618341000	0.77920900	O	13.176771000	-3.046744000	-0.81831600
O	13.148233000	-3.107946000	-0.86251900	H	-12.902873000	-0.194221000	2.37477700
H	-13.289391000	0.701028000	2.23002100	H	-14.487482000	-0.602152000	1.72274000
H	-14.468214000	-0.562930000	1.85703400	O	-12.901983000	3.098743000	-0.24871700
O	-12.708430000	2.847021000	0.72336700	H	-13.835681000	3.288358000	-0.03897700
H	-13.480870000	3.427150000	0.79409400				

3

E(scf) = -1856.09491320 a.u.

C	14.123510000	-0.154434000	0.42213700
C	12.854326000	0.665913000	0.69462300
C	11.672710000	0.179670000	-0.15212700
C	11.742616000	-0.942142000	-0.94483900
C	12.884337000	-1.863374000	-0.86854000
C	13.888000000	-1.639808000	0.25301100
H	14.593679000	0.210184000	-0.5048880
H	14.855110000	0.038595000	1.22333400
C	10.715295000	-1.337316000	-1.95924200
H	10.014556000	-2.089334000	-1.57058900
H	10.126603000	-0.484067000	-2.3093100
H	11.220430000	-1.813776000	-2.80546400
C	13.198264000	2.124710000	0.35053300
H	13.341790000	2.262591000	-0.72851100
H	12.435190000	2.834897000	0.68840100
H	14.135230000	2.403141000	0.85037500
C	12.465042000	0.599873000	2.17979900
H	13.294855000	0.953857000	2.80708300

III

E(scf) = -1782.65811824 a.u.

C	13.482304000	0.279479000	-1.01878800
C	12.658004000	0.890954000	0.12464000
C	11.304790000	0.170566000	0.14521500
C	11.376745000	-1.281159000	0.17511500
C	12.515801000	-1.899770000	-0.23721600
C	13.655988000	-1.227927000	-0.92508400
H	12.983438000	0.517010000	-1.96992600
H	14.474832000	0.753474000	-1.06124200
C	10.296122000	-2.134068000	0.77569400
H	9.732752000	-1.586123000	1.53779800
H	9.574282000	-2.494114000	0.02985300
H	10.736368000	-3.025071000	1.23497700
C	12.554407000	2.391071000	-0.13970800
H	11.988281000	2.610161000	-1.05377200
H	12.076787000	2.924423000	0.69077500
H	13.559754000	2.815846000	-0.25592200
C	13.381574000	0.690063000	1.46553800
H	14.367534000	1.174042000	1.44474900

H	11.598045000	1.240953000	2.38410500	H	12.803385000	1.136979000	2.28378700
H	12.213193000	-0.422000000	2.47656700	H	13.537356000	-0.368623000	1.69383100
H	14.819262000	-2.148437000	-0.04343000	H	13.728137000	-1.648380000	-1.94654700
O	13.329844000	-2.263136000	1.40728500	O	14.825493000	-1.649949000	-0.19773200
H	13.980856000	-2.174340000	2.11818700	H	15.598068000	-1.420096000	-0.73247200
C	10.486353000	1.004896000	-0.06275500	C	10.137009000	0.900792000	0.21302100
C	9.193334000	0.583451000	-0.15295200	C	8.795987000	0.464337000	0.09669000
H	8.998305000	-0.479323000	-0.30100100	H	8.600773000	-0.582547000	-0.12942300
C	8.031905000	1.413586000	-0.02430500	C	7.679811000	1.286290000	0.19793600
C	6.797480000	0.810152000	-0.08779700	C	6.401106000	0.707934000	0.03222900
H	6.795055000	-0.275983000	-0.21865700	H	6.394314000	-0.366677000	-0.17579400
C	5.519919000	1.418040000	-0.01257200	C	5.162043000	1.323726000	0.11105700
H	5.462273000	2.502170000	0.09663800	H	5.116732000	2.394045000	0.31987400
C	4.351468000	0.704451000	-0.07641300	C	3.951871000	0.643117000	-0.05385700
H	4.429110000	-0.381829000	-0.17679600	H	4.011172000	-0.430792000	-0.25378400
C	8.213021000	2.887234000	0.16655000	C	7.841237000	2.751275000	0.48911300
H	8.775805000	3.100639000	1.08572300	H	8.296199000	2.918199000	1.47408700
H	8.788157000	3.326915000	-0.65882500	H	8.498247000	3.234202000	-0.24574100
H	7.264429000	3.425934000	0.23256700	H	6.891057000	3.291174000	0.47446700
C	3.031863000	1.240134000	-0.02569100	C	2.669890000	1.200306000	0.02032300
C	1.966368000	0.365089000	-0.08452500	C	1.560642000	0.360468000	-0.15142800
H	2.216161000	-0.697285000	-0.15990100	H	1.787765000	-0.693675000	-0.33841500
C	0.588121000	0.668472000	-0.05804300	C	0.208257000	0.695621000	-0.10719700
H	0.277376000	1.713831000	0.00359000	H	-0.078340000	1.734273000	0.07468300
C	-0.399214000	-0.286421000	-0.10676500	C	-0.820276000	-0.225118000	-0.27386700
H	-0.082868000	-1.330249000	-0.16354100	H	-0.529262000	-1.263354000	-0.44995100
C	2.861477000	2.723851000	0.09094400	C	2.517540000	2.669503000	0.28803500
H	3.309622000	3.101219000	1.01974800	H	2.940454000	2.943245000	1.26359600
H	3.364646000	3.245511000	-0.73350600	H	3.048284000	3.267684000	-0.46385200
H	1.813754000	3.033378000	0.08391500	H	1.473914000	2.993540000	0.28337900
C	-1.779868000	0.005576000	-0.08573500	C	-2.180239000	0.098849000	-0.22400500
H	-2.042202000	1.066407000	-0.03667800	H	-2.417014000	1.153432000	-0.05176300
C	-2.833338000	-0.885565000	-0.11997900	C	-3.269128000	-0.757351100	-0.35879200
C	-4.162318000	-0.371530000	-0.09349400	C	-4.577503000	-0.221531000	-0.27058400
H	-4.261928000	0.716837000	-0.05132400	H	-4.65345700	0.857936000	-0.10907100
C	-5.313638000	-1.115446000	-0.11417400	C	-5.751630000	-0.935419000	-0.36257700
H	-5.226485000	-2.202145000	-0.15365500	H	-5.683403000	-2.013441000	-0.51717400

C	-2.640741000	-2.370059000	-0.18418300	C	-3.106162000	-2.230124000	-0.58802000
H	-1.588982000	-2.664677000	-0.17682300	H	-2.059421000	-2.541375000	-0.62100200
H	-3.126565000	-2.868640000	0.66476800	H	-3.595365000	-2.810651000	0.20542100
H	-3.093363000	-2.788163000	-1.09307000	H	-3.571460000	-2.539517000	-1.53341800
C	-6.6099070000	-0.545273000	-0.08379500	C	-7.035569000	-0.354215000	-0.25922000
H	-6.647325000	0.547639000	-0.05209600	H	-7.056908000	0.730271000	-0.11296100
C	-7.820206000	-1.199765000	-0.08780500	C	-8.258429000	-0.987512000	-0.31286800
C	-9.017214000	-0.412505000	-0.05266500	C	-9.450956000	-0.201357000	-0.17018500
H	-8.872879000	0.668244000	-0.02724300	H	-9.299208000	0.871974000	-0.03656400
C	-10.285011000	-0.912138000	0.01580100	C	-10.720081000	-0.691283000	-0.13961600
H	-10.383826000	-1.996295000	0.08549300	H	-10.828952000	-1.778194000	-0.17742000
C	-7.9416440000	-2.691694000	-0.12266800	C	-8.397175000	-2.467169000	-0.49916300
H	-6.9743540000	-3.195814000	-0.18554500	H	-7.436330000	-2.971341000	-0.62797100
H	-8.451004000	-3.068004000	0.77520500	H	-8.897378000	-2.930150000	0.36324100
H	-8.542110000	-3.019633000	-0.98112800	H	-9.014737000	-2.701362000	-1.37634300
C	-11.523398000	-0.177136000	0.09191300	C	-11.960955000	0.045180000	0.05229900
C	-12.698584000	-0.890599000	0.77954500	C	-12.995608000	-0.691931000	0.91433500
C	-13.070587000	1.616281000	-0.51416700	C	-13.483774000	2.014842000	-0.25484800
C	-13.550855000	0.155706000	1.50643600	C	-14.153803000	0.231193000	1.32472600
C	-14.023232000	1.293679000	0.62771000	C	-14.643437000	1.165411000	0.24164400
C	-13.529481000	-1.621492000	-0.28394500	H	-14.988610000	-0.379657000	1.69588900
H	-12.914794000	-2.346050000	-0.83485700	H	-13.828347000	0.860013000	2.16765700
H	-14.355353000	-2.168896000	0.18880100	C	-13.529999000	1.916386000	0.15412200
H	-13.968278000	-0.924853000	-1.00612800	H	-12.731114000	-2.638369000	-0.05794500
C	-12.237674000	-1.905196000	1.83082000	H	-14.280582000	-2.437906000	0.76343100
H	-11.782007000	-2.799599000	1.38994100	H	-14.001776000	-1.626160000	-0.78731500
H	-11.514941000	-1.468580000	2.53163700	C	-12.338455000	-1.182018000	2.21263200
H	-13.103344000	-2.245902000	2.41262700	H	-11.559748000	-1.930302000	2.02257500
C	-11.728412000	1.033459000	-0.53250600	H	-11.874654000	-0.353966000	2.76390500
C	-10.748363000	1.718025000	-1.43139600	H	-13.090565000	-1.644427000	2.86624100
H	-10.097464000	2.415572000	-0.88597500	C	-12.208360000	1.259164000	-0.50820700
H	-10.094425000	1.007048000	-1.94926800	H	-13.293466000	2.821597000	0.47532200
H	-11.299323000	2.307311000	-2.17096600	C	-11.260616000	1.968735000	-1.42605000
H	10.647301000	2.054917000	0.18672900	H	-10.686841000	2.752275000	-0.90728200
O	-15.301866000	1.009662000	0.09346400	H	-10.535566000	1.294490000	-1.89194400
H	-15.383636000	1.615923000	-0.66504700	H	-11.814731000	2.481949000	-2.22452200
H	-14.0718300	2.220253000	1.23442300	H	-13.783752000	2.546270000	-1.17397300

O	13.018693000	-2.806585000	-1.64076900	H	10.255096000	1.976844000	0.33105400
H	-12.954819000	0.565135000	2.33422200	O	-15.214440000	0.378122000	-0.79678300
H	-14.429081000	-0.324487000	1.95841100	H	-15.447317000	0.978152000	-1.51822600
O	-13.488916000	2.367204000	-1.39857200	H	-15.417649000	1.831260000	0.66688600
				O	12.675460000	-3.242690000	-0.09161700
				H	13.635041000	-3.399591000	-0.15519900

IV

E(scf) = -1782.07233750 a.u.

C	-13.867200000	0.016382000	0.52087300
C	-12.581750000	-0.823850000	0.56031900
C	-11.413644000	-0.111077000	-0.13396400
C	-11.525748000	1.165540000	-0.63682700
C	-12.682482000	2.012622000	-0.32253700
C	-13.651145000	1.498718000	0.73182900
H	-14.349605000	-0.107228000	-0.4618740
H	-14.581837000	-0.386933000	1.25639600
C	-10.520500000	1.818727000	-1.53240500
H	-9.808645000	2.444174000	-0.97531700
H	-9.941729000	1.089806000	-2.10871600
H	-11.043887000	2.498355000	-2.21231700
C	-12.903494000	-2.143619000	-0.16029800
H	-13.061807000	-1.986838000	-1.23461900
H	-12.121173000	-2.900901000	-0.03740600
H	-13.826889000	-2.568534000	0.25515600
C	-12.188465000	-1.146540000	2.01032300
H	-13.011975000	-1.662892000	2.52287600
H	-11.313020000	-1.807607000	2.04118600
H	-11.947329000	-0.235038000	2.56426200
H	-14.594805000	2.051440000	0.59754600
O	-13.067290000	1.813698000	1.99377500
H	-13.703802000	1.546337000	2.67253800
C	-10.207666000	-0.902820000	-0.22121900
C	-8.917943000	-0.459325000	-0.27671300
H	-8.725550000	0.613383000	-0.27957400
C	-7.755237000	-1.295614000	-0.26688000
C	-6.519602000	-0.689690000	-0.28124200
H	-6.515886000	0.403974000	-0.31209800

V

E(scf) = -1781.45521977 a.u.

C	-13.867603000	0.013867000	0.46475400
C	-12.585190000	-0.831427000	0.49388300
C	-11.408891000	-0.104801000	-0.17243000
C	-11.513368000	1.186496000	-0.64150900
C	-12.669867000	2.028384000	-0.31414100
C	-13.648970000	1.489452000	0.71776200
H	-14.340923000	-0.081665000	-0.52544900
H	-14.590511000	-0.406757000	1.18229300
C	-10.500750000	1.859119000	-1.51400300
H	-9.792073000	2.469943000	-0.93702200
H	-9.919059000	1.143396000	-2.10356700
H	-11.018336000	2.555757000	-2.18104000
C	-12.904674000	-2.132265000	-0.26090100
H	-13.054781000	-1.949323000	-1.33226000
H	-12.125054000	-2.894224000	-0.15047900
H	-13.832005000	-2.564623000	0.13760700
C	-12.204941000	-1.189750000	1.93901000
H	-13.033313000	-1.717490000	2.43177300
H	-11.330414000	-1.852320000	1.96119600
H	-11.968093000	-0.291986000	2.51680000
H	-14.589991000	2.048369000	0.59087100
O	-13.074481000	1.768760000	1.99237100
H	-13.713472000	1.477379000	2.65876900
C	-10.206014000	-0.896111000	-0.27496000
C	-8.912248000	-0.453362000	-0.31089300
H	-8.718364000	0.618444000	-0.27388500
C	-7.755234000	-1.290544000	-0.32988400
C	-6.512395000	-0.686800000	-0.30383800
H	-6.507342000	0.407024000	-0.27704600

C	-5.244150000	-1.304893000	-0.25671400	C	-5.245335000	-1.304471000	-0.30348200
H	-5.191704000	-2.393502000	-0.20722000	H	-5.194476000	-2.394163000	-0.32605600
C	-4.069791000	-0.597686000	-0.28719100	C	-4.060871000	-0.598182000	-0.27194900
H	-4.137750000	0.492631000	-0.34241200	H	-4.127352000	0.493418000	-0.25089200
C	-7.934182000	-2.781885000	-0.23376100	C	-7.934684000	-2.776800000	-0.36692900
H	-8.482435000	-3.094589000	0.66570300	H	-8.480509000	-3.131151000	0.51846400
H	-8.523914000	-3.128582000	-1.09264500	H	-8.526260000	-3.083279000	-1.23953300
H	-6.985644000	-3.324390000	-0.24559600	H	-6.986219000	-3.318167000	-0.40530500
C	-2.756145000	-1.147709000	-0.24945800	C	-2.759915000	-1.152492000	-0.26129100
C	-1.678409000	-0.286786000	-0.29774400	C	-1.667489000	-0.288502000	-0.22912200
H	-1.913126000	0.779062000	-0.37514200	H	-1.902565000	0.780079000	-0.21835300
C	-0.304993000	-0.610142000	-0.25665500	C	-0.309698000	-0.617707000	-0.20810700
H	-0.012348000	-1.658150000	-0.15999900	H	-0.016548000	-1.669925000	-0.21288000
C	0.701538000	0.322936000	-0.32964600	C	0.714371000	0.323674000	-0.18017500
H	0.408100000	1.370035000	-0.43494800	H	0.420054000	1.375651000	-0.17951000
C	-2.603780000	-2.635456000	-0.15531100	C	-2.604838000	-2.643202000	-0.28619600
H	-3.066968000	-3.024209000	0.76141000	H	-3.107066000	-3.109559000	0.57156500
H	-3.102614000	-3.137961000	-0.99451500	H	-3.060843000	-3.073751000	-1.18760500
H	-1.559494000	-2.956494000	-0.15770600	H	-1.559999000	-2.961767000	-0.26554000
C	2.075554000	0.003355000	-0.27339500	C	2.067771000	-0.004165000	-0.15376000
H	2.311563000	-1.057281000	-0.14531300	H	2.304953000	-1.072325000	-0.15067000
C	3.151262000	0.863375000	-0.35757500	C	3.168606000	0.864566000	-0.13105200
C	4.467435000	0.323702000	-0.25783300	C	4.454867000	0.314355000	-0.10116800
H	4.536759000	-0.756354000	-0.09893000	H	4.526057000	-0.776995000	-0.09167900
C	5.638785000	1.029054000	-0.33794700	C	5.656920000	1.028839000	-0.08297200
H	5.583383000	2.105781000	-0.50689500	H	5.597803000	2.118346000	-0.09794300
C	2.995107000	2.341172000	-0.54961200	C	3.003804000	2.356318000	-0.14032300
H	1.950164000	2.658786000	-0.57674600	H	1.956524000	2.667314000	-0.14354700
H	3.488808000	2.898539000	0.25707100	H	3.477307000	2.814441000	0.73747400
H	3.462685000	2.669232000	-1.48753400	H	3.478944000	2.803248000	-1.02325400
C	6.918957000	0.432970000	-0.20522500	C	6.901887000	0.422693000	-0.04778400
H	6.919882000	-0.643959000	-0.01137300	H	6.906192000	-0.671602000	-0.03035000
C	8.148648000	1.040197000	-0.28323000	C	8.175646000	1.036535000	-0.03219400
C	9.323504000	0.235278000	-0.08352600	C	9.298013000	0.216932000	0.00678900
H	9.138359000	-0.815185000	0.14876600	H	9.100934000	-0.851344000	0.03402000
C	10.605688000	0.684769000	-0.10750900	C	10.631096000	0.692159000	0.05466000
H	10.749799000	1.757606000	-0.25994100	H	10.701542000	1.777342000	0.10378800

C	8.319025000	2.502551000	-0.55498500	C	8.321993000	2.530993000	-0.05950000
H	7.367717000	3.022811000	-0.69119800	H	7.360057000	3.048254000	-0.09348600
H	8.851989000	2.998189000	0.26817400	H	8.856262000	2.896150000	0.82705800
H	8.919864000	2.671011000	-1.45846200	H	8.899769000	2.860192000	-0.93217700
C	11.821907000	-0.071156000	0.15431800	C	11.840433000	0.031525000	0.09467200
C	12.907142000	0.726833000	0.89152600	C	13.133662000	0.842006000	0.23344800
C	13.249987000	-2.133259000	0.09386700	C	13.210208000	-1.991401000	0.25739700
C	14.014159000	-0.192122000	1.43138800	C	14.046440000	0.129626000	1.24592300
C	14.452609000	-1.290721000	0.48990000	C	14.371986000	-1.307008000	0.89249300
C	13.493372000	1.788365000	-0.05272200	C	13.812016000	0.935909000	-1.14343400
H	12.728227000	2.511391000	-0.36348000	H	13.182083000	1.508403000	-1.83677100
H	14.282234000	2.354667000	0.46027700	H	14.781014000	1.444816000	-1.05965500
H	13.929811000	1.333516000	-0.94465000	H	13.999274000	-0.050635000	-1.57599300
C	12.299852000	1.446234000	2.10459400	C	12.918993000	2.264622000	0.75130300
H	11.561241000	2.200831000	1.80809900	H	12.396685000	2.901284000	0.02677200
H	11.800566000	0.740873000	2.78124000	H	12.351250000	2.280003000	1.69067800
H	13.087006000	1.960065000	2.67255200	H	13.892452000	2.733952000	0.94040200
C	12.009267000	-1.355947000	-0.24933100	C	12.028994000	-1.408011000	-0.06573200
C	11.020566000	-2.134716000	-1.06239800	C	10.955443000	-2.286206000	-0.64565400
H	10.40018900	-2.798491000	-0.44061900	H	10.191304000	-2.553016000	0.09575200
H	10.337864000	-1.492729000	-1.62743600	H	10.436820000	-1.806919000	-1.48391000
H	11.543380000	-2.790052000	-1.77247300	H	11.386965000	-3.227164000	-1.00464400
H	13.520924000	-2.784327000	-0.75396600	H	-10.344266000	-1.976434000	-0.21617200
H	-10.344198000	-1.981015000	-0.1303200	O	15.519179000	-1.296233000	0.02955100
O	15.074889000	-0.684703000	-0.63670200	H	15.620034000	-2.190433000	-0.32615200
H	15.314555000	-1.393384000	-1.24929200	H	14.640999000	-1.850296000	1.81856400
H	15.184150000	-1.935345000	1.01141600	O	-12.836657000	3.140725000	-0.80502900
O	-12.856508000	3.111239000	-0.84070000	H	13.552619000	0.148041000	2.22844300
H	13.652609000	-0.680002000	2.34925300	H	14.989496000	0.682499000	1.35124200
H	14.880684000	0.418037000	1.72210100	H	13.327081000	-3.061615000	0.06188000
H	13.018661000	-2.837029000	0.91321500				

10.1.3. Espectros de RMN de ^1H

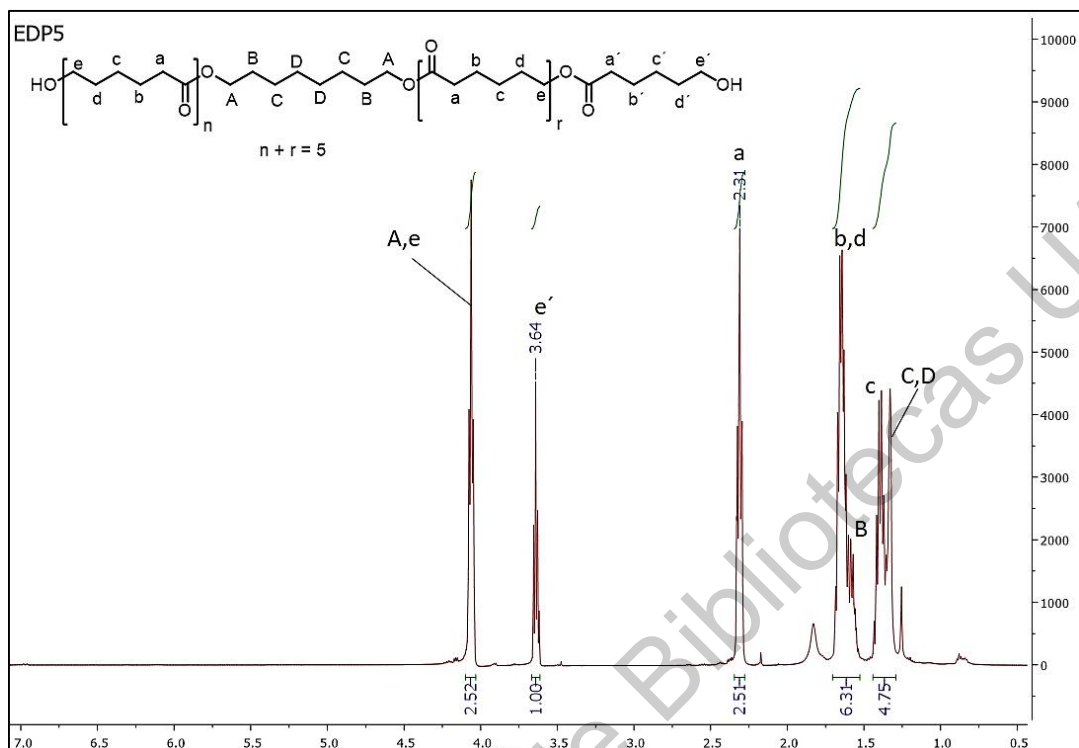


Figura A5. Espectro de RMN de ^1H del macrodiol con GP =5 (500 MHz, CDCl_3).

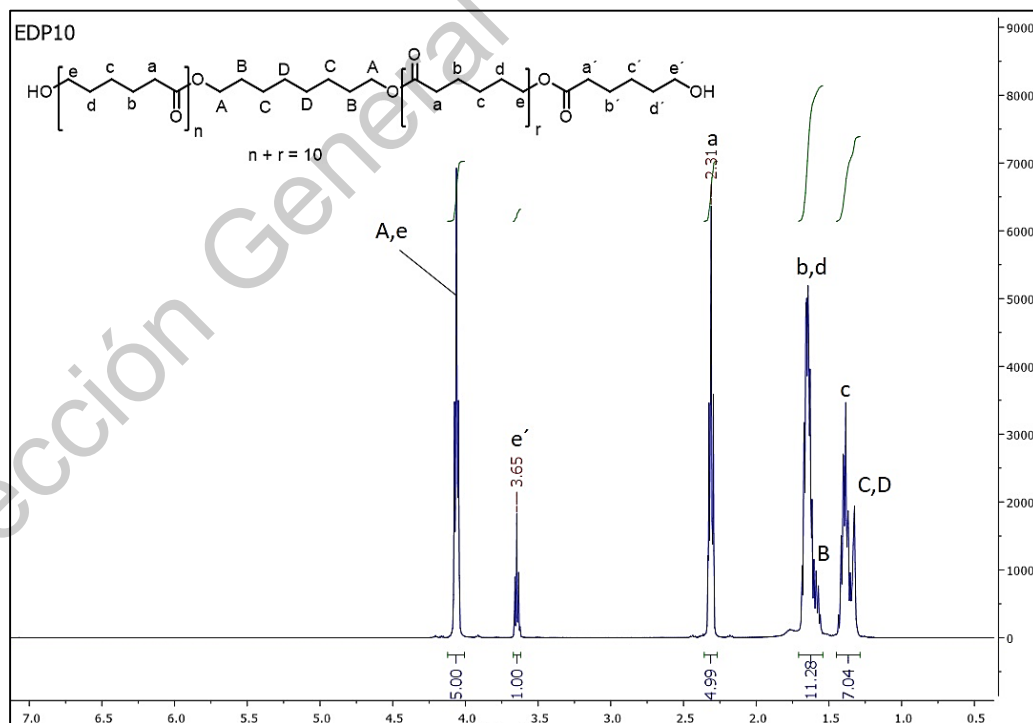


Figura A6. Espectro de RMN de ^1H del macrodiol con GP =10 (500 MHz, CDCl_3).

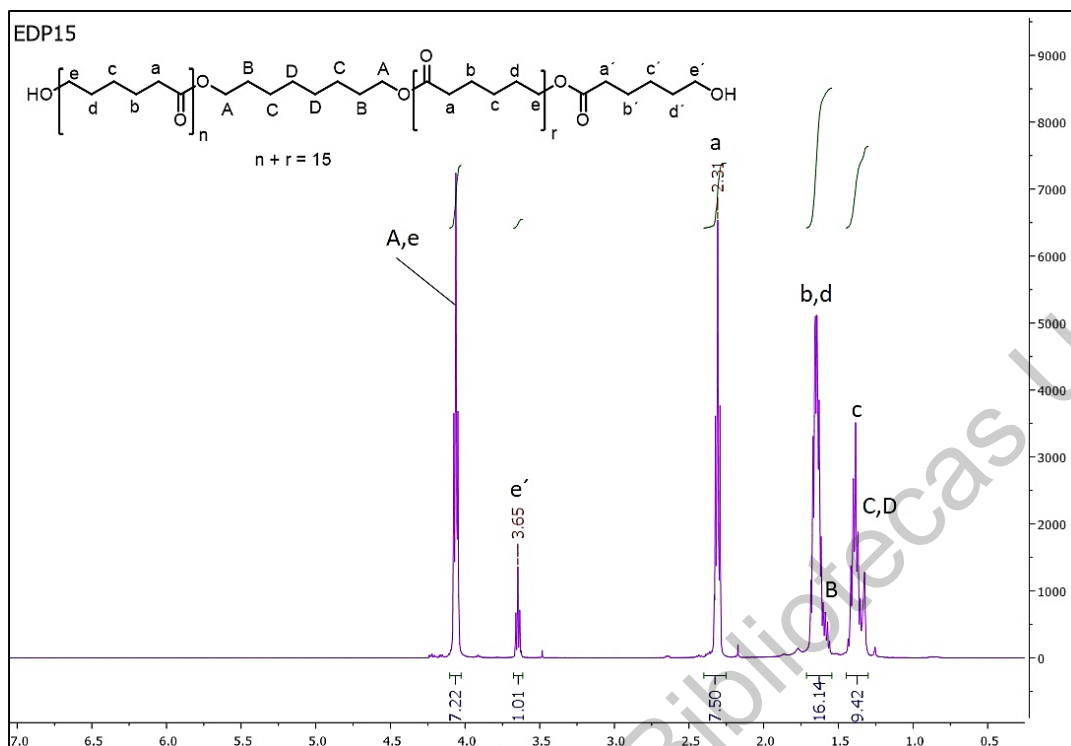


Figura A7. Espectro de RMN de ^1H del macrodiol con GP =15 (500 MHz, CDCl_3).

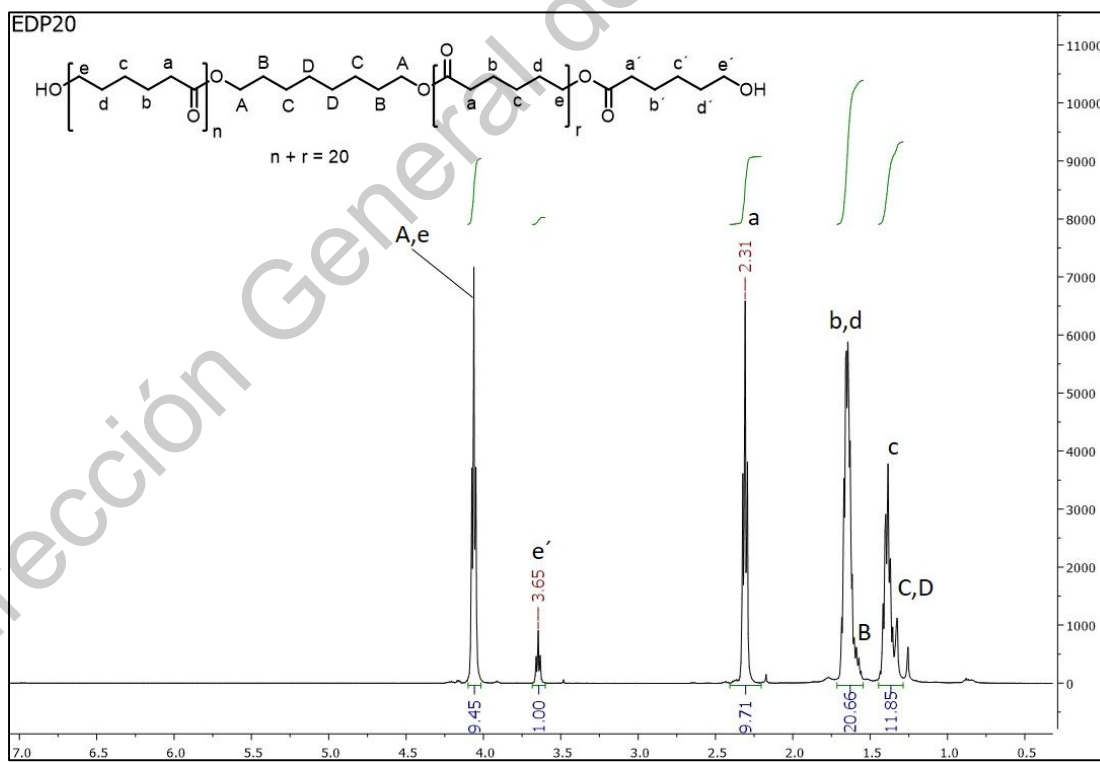


Figura A8. Espectro de RMN de ^1H del macrodiol con GP =20 (500 MHz, CDCl_3).

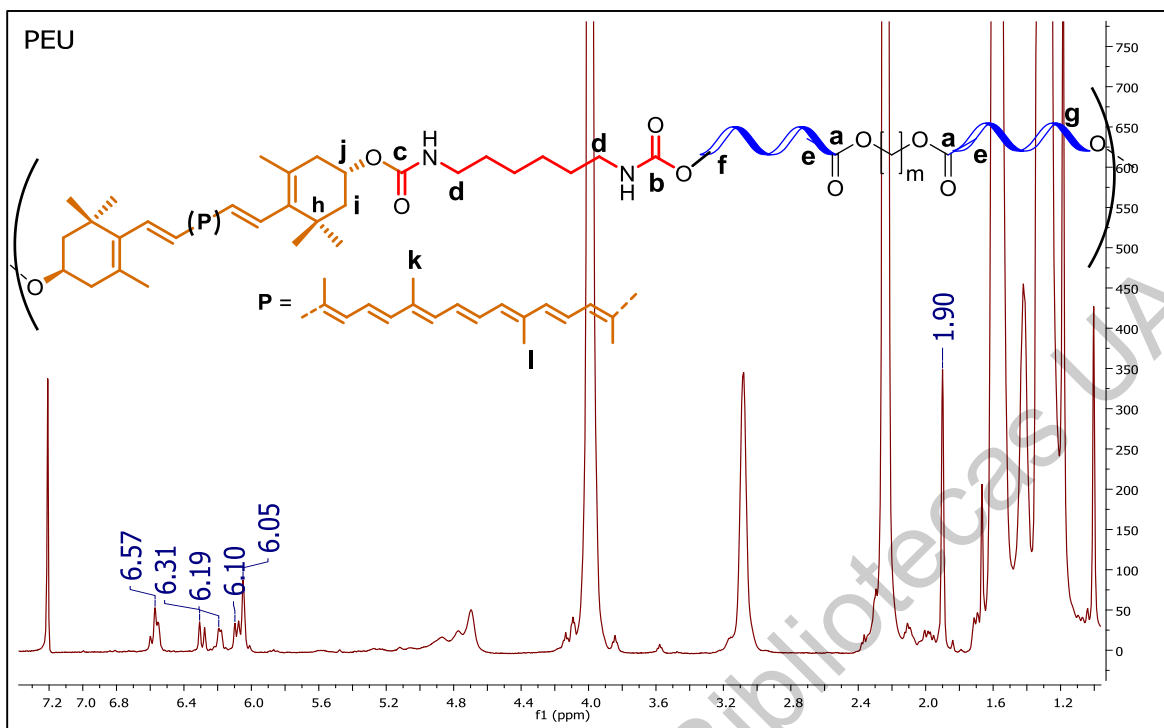


Figura A9. Espectro de RMN de ^1H del PEU obtenido a partir de **2** como extendedor de la cadena (500 MHz, CDCl_3).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

10.1.4. Propiedades térmicas obtenidas por DSC de los Macrodiolos y los poliésteres uretanos segmentados

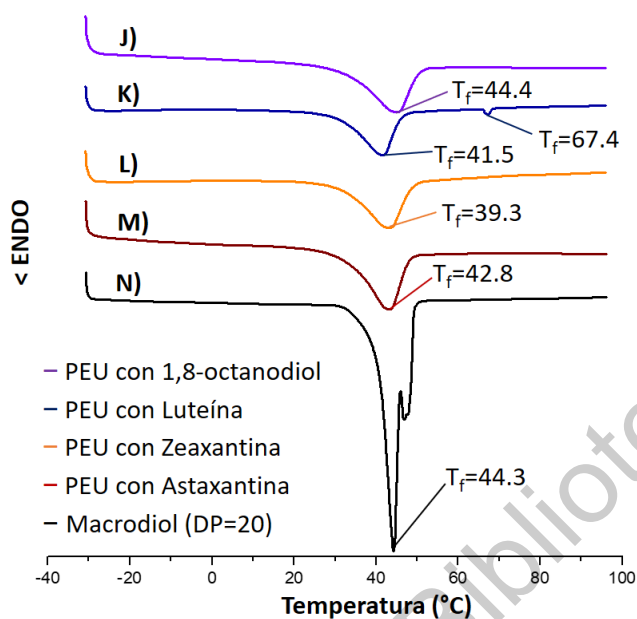


Figura A10. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir del macrodiol con GP = 20 y los diferentes extendedores de cadena (DP = GP).

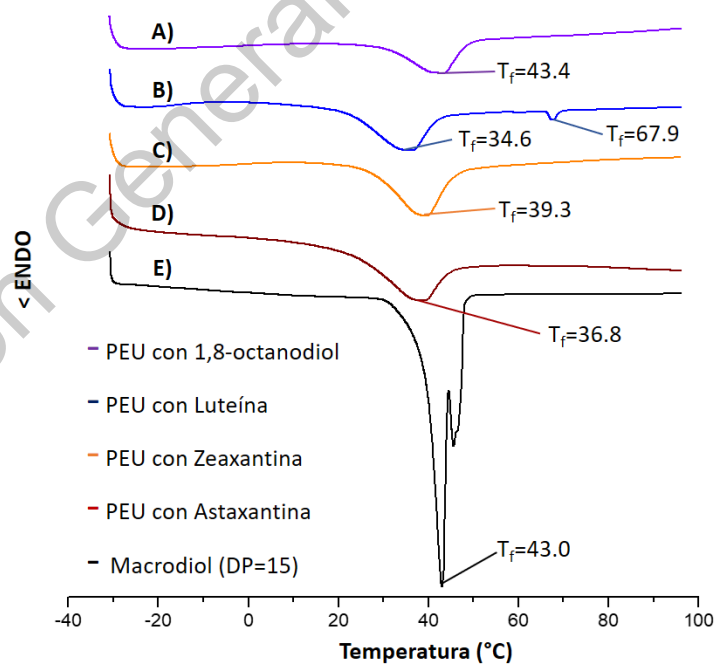


Figura A11. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir del macrodiol con GP = 15 y los diferentes extendedores de cadena.

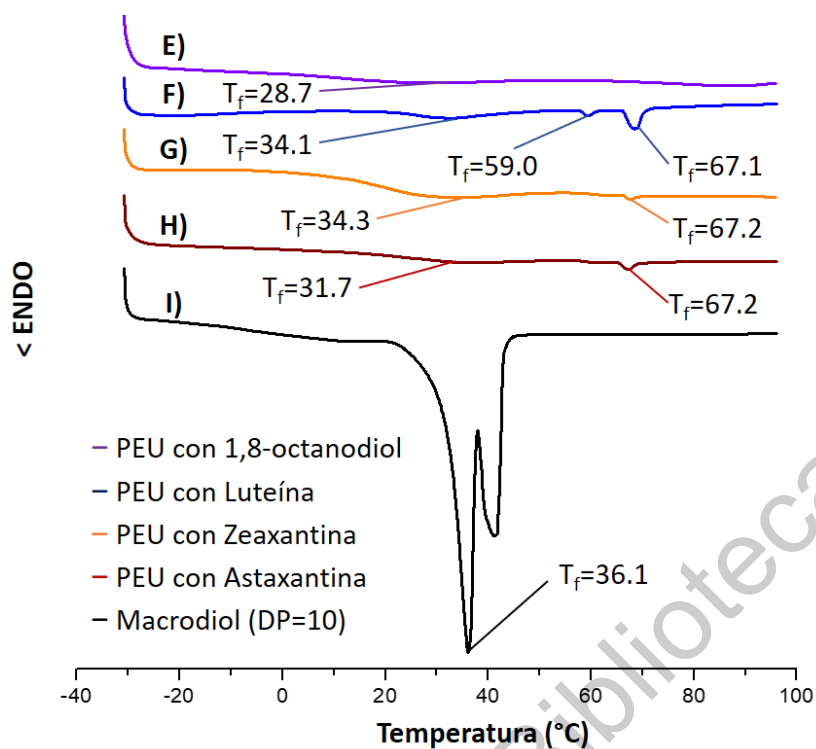


Figura A12. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir de los macrodiolos con GP = 10 y los diferentes extendedores de cadena.

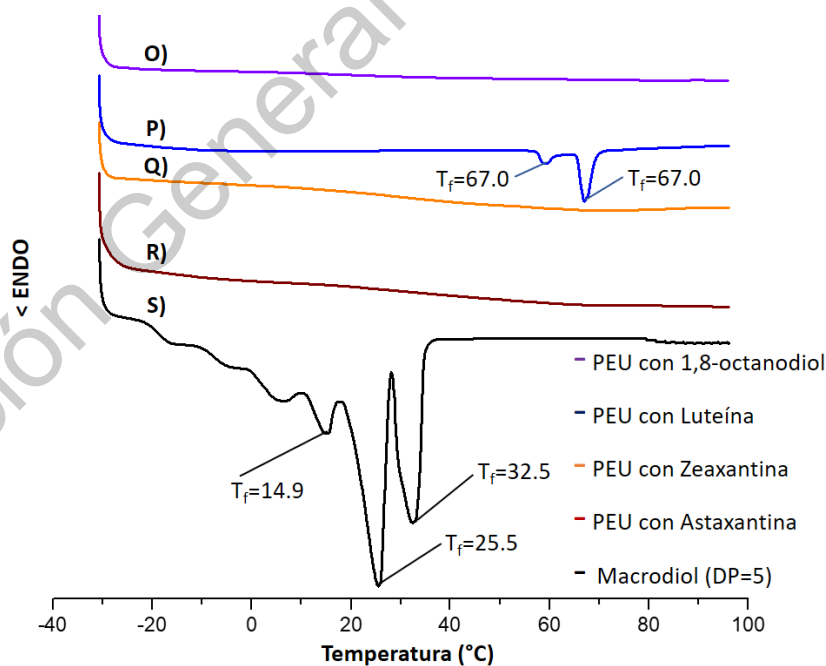


Figura A13. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir de los macrodiolos con GP = 5 y los diferentes extendedores de cadena.

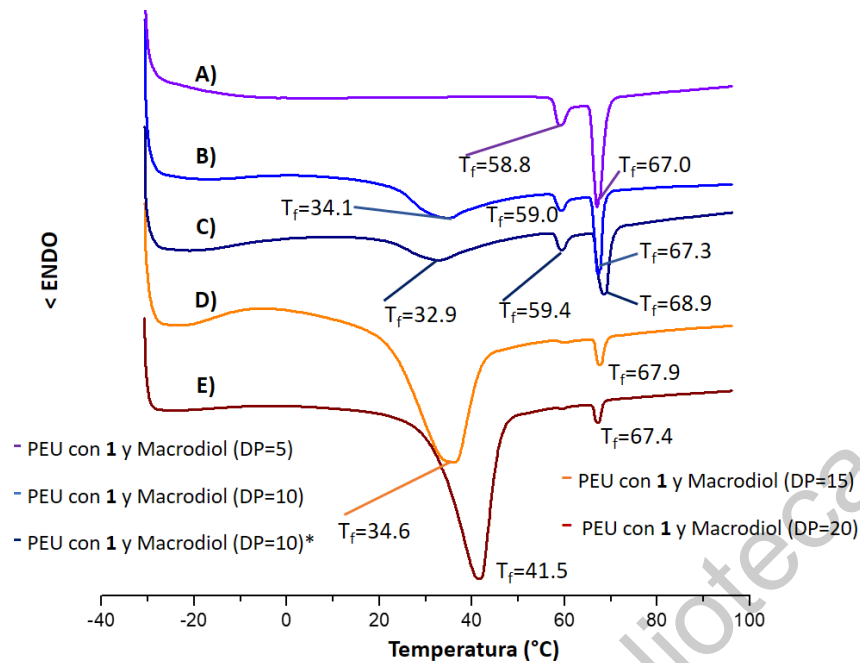


Figura A14. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir de 1 y los diferentes macrodiolos.

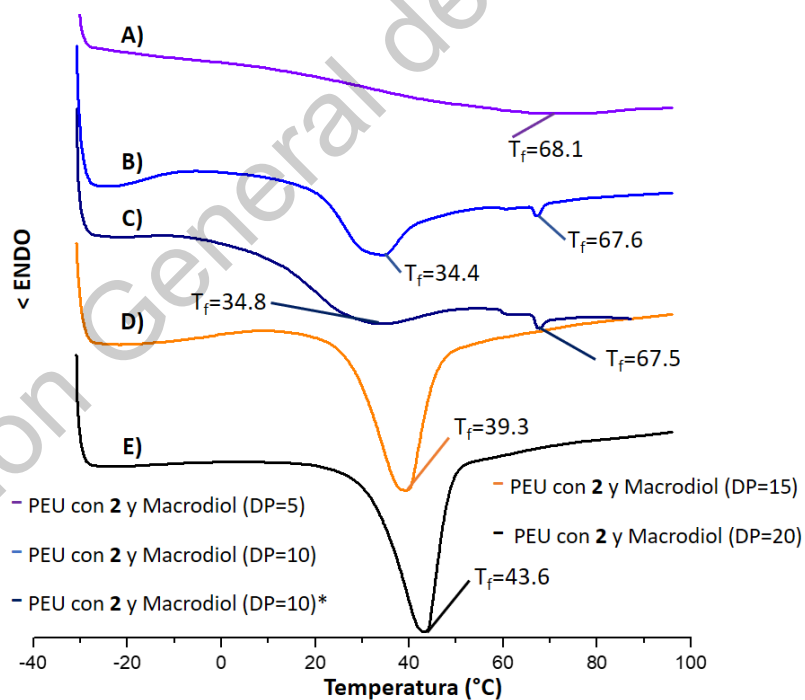


Figura A15. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir de 2 y los diferentes macrodiolos.

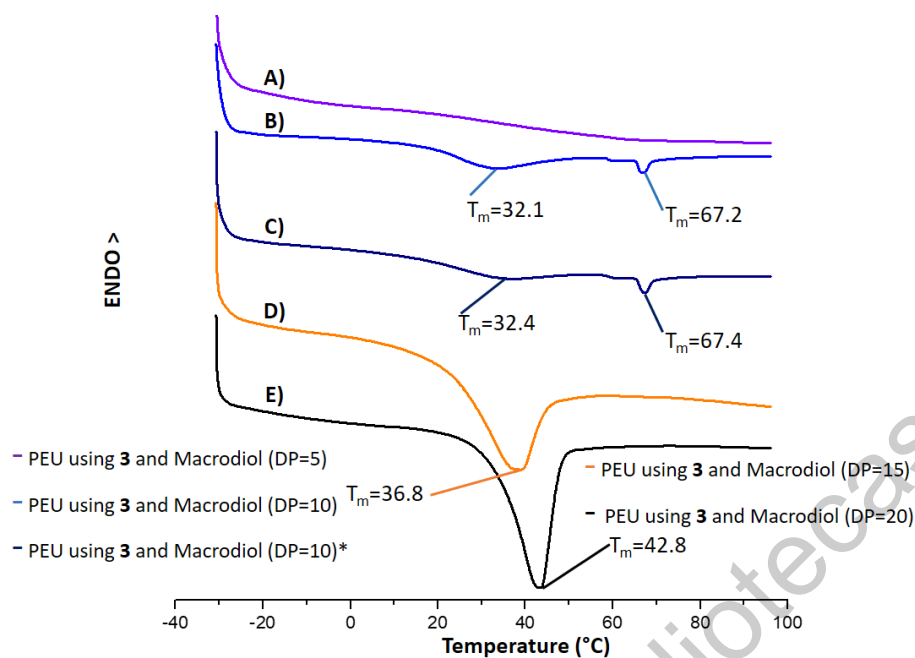


Figura A16. Análisis de DSC de los PEUs derivados a partir de **3** y los diferentes macrodiolos.

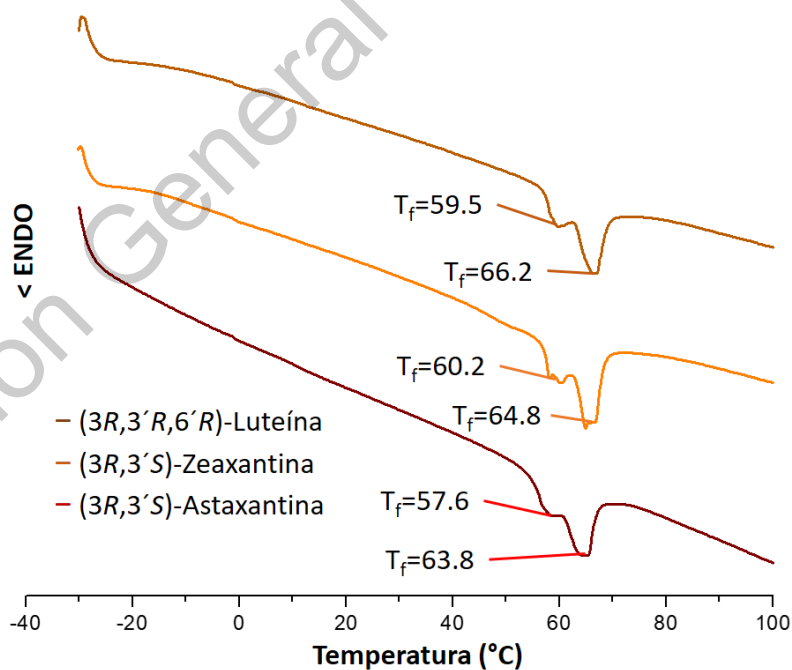


Figura A17. Análisis de DSC de los tres diferentes segmentos duros.

10.1.5. Espectros de infrarrojo

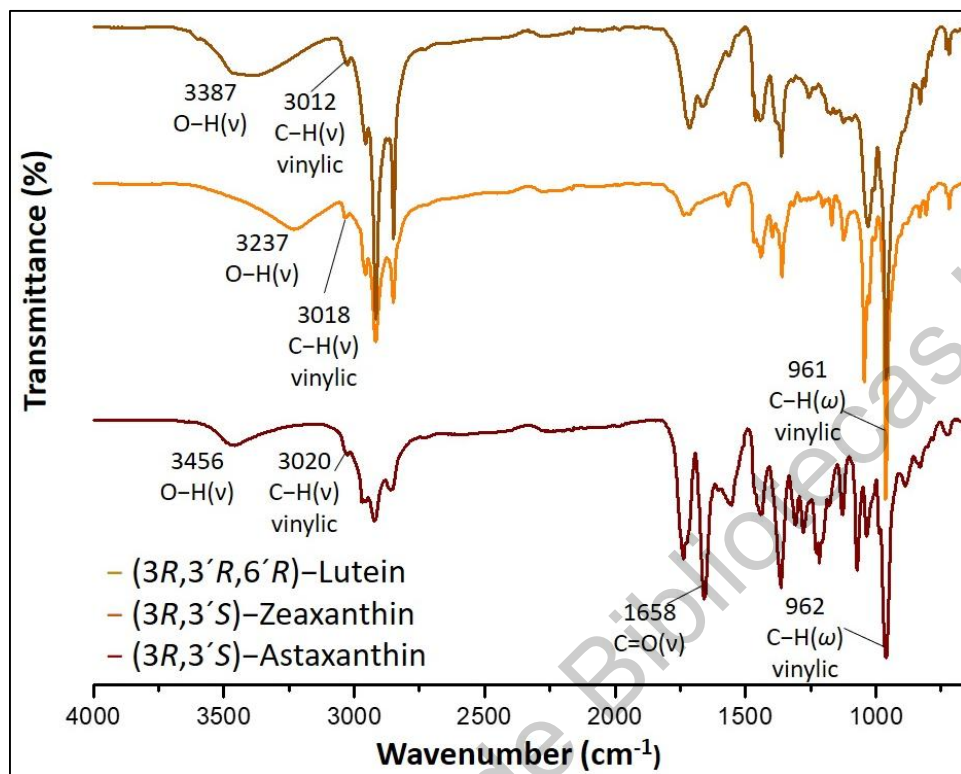


Figura A18. Espectros de FTIR de las tres xantófilas.

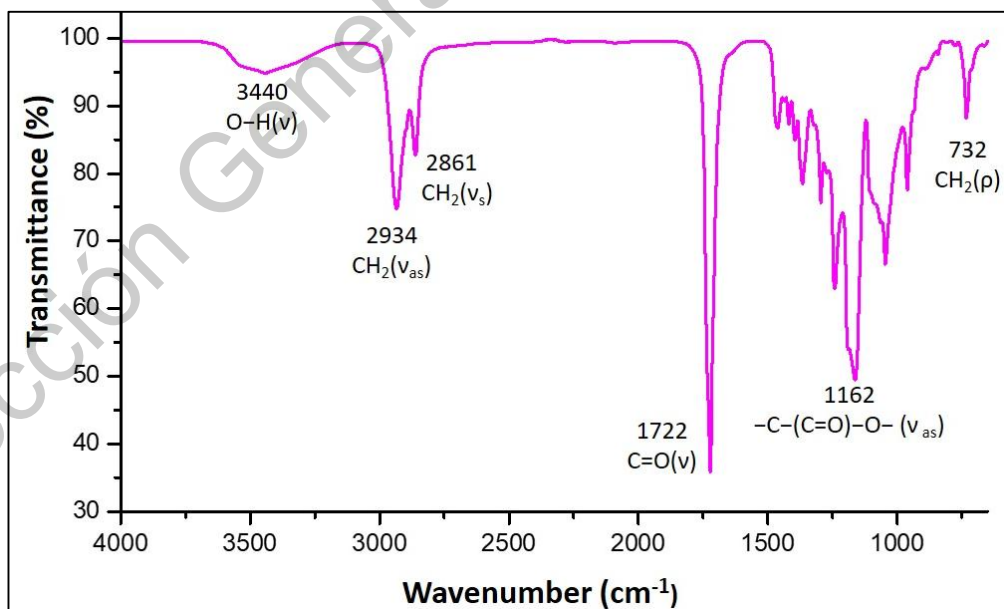


Figura A19. Espectro FTIR del macrodiol con GP = 5.

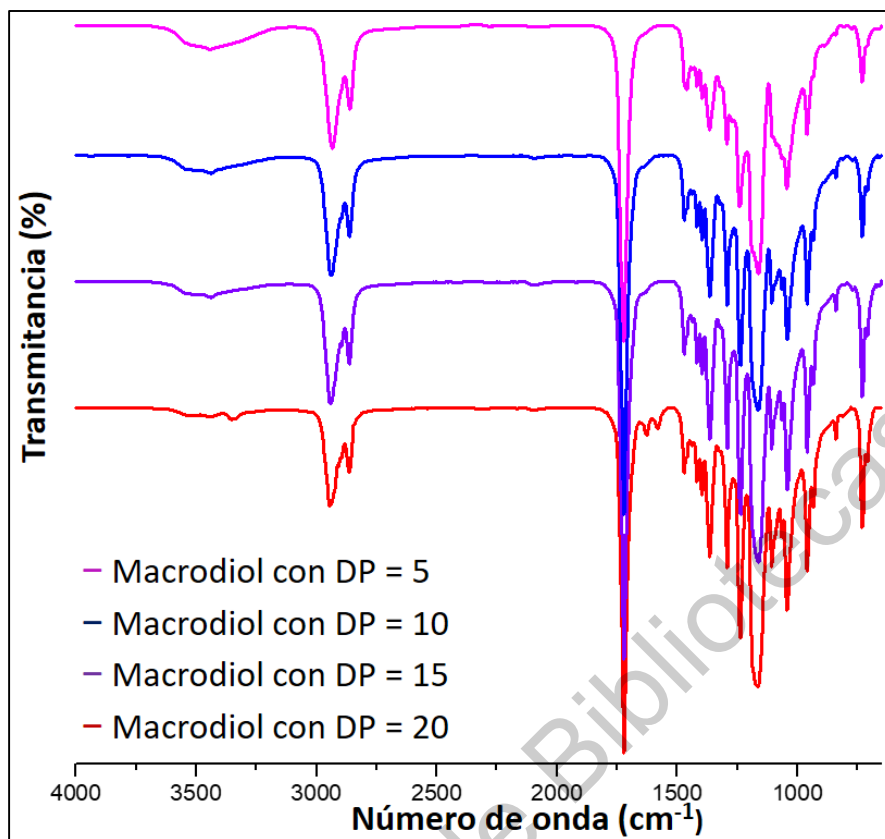


Figura A20. Espectros FTIR de los cuatro macrodiolos.

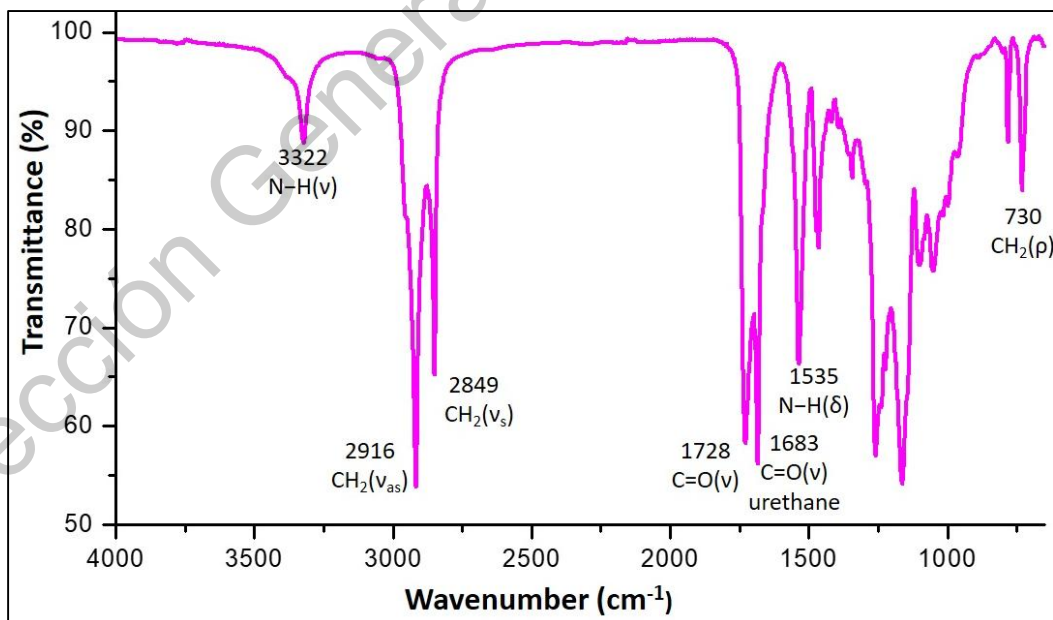


Figura A21. Espectro FTIR del PEU sintetizado a partir del macrodiol con DP = 5 y Oct como extendedor de cadena.

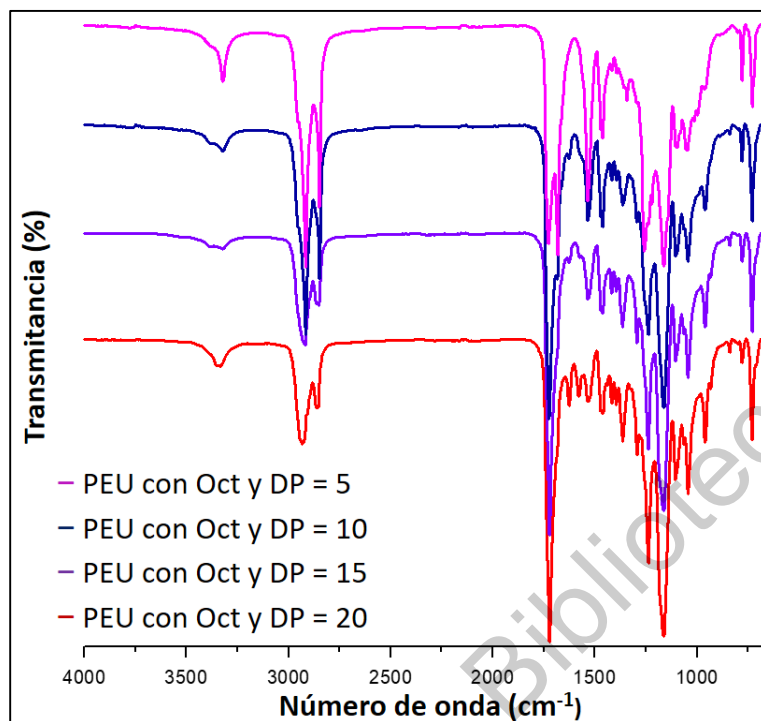


Figura A22. Espectros FTIR de los PEUs sintetizados a partir de los diferentes macrodiolos y **Oct** como extendedor de cadena.

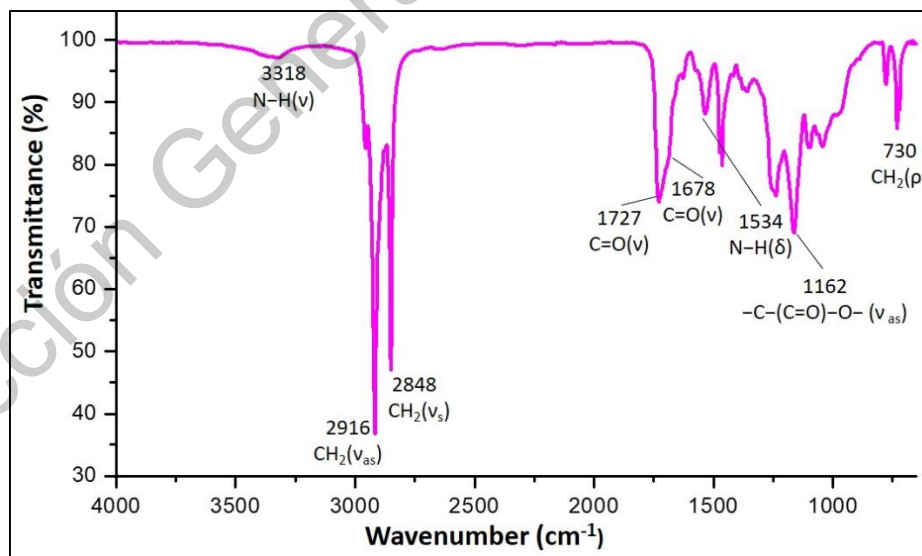


Figura A23. Espectro FTIR del PEU sintetizado a partir del macrodiol con DP = 5 y **1** como extendedor de cadena.

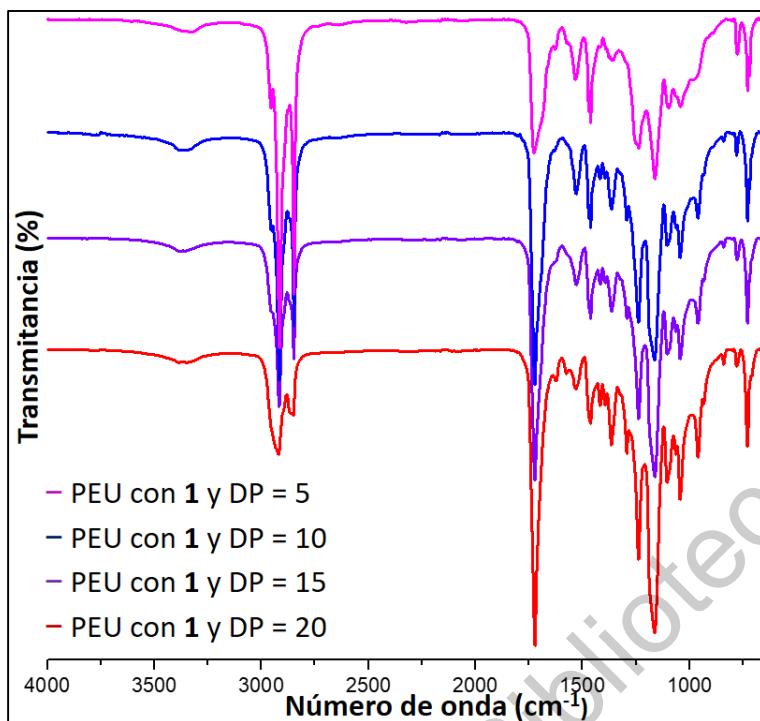


Figura A24. Espectros FTIR de los PEUs sintetizados a partir de los diferentes macrodioles y **1** como extendedor de cadena.

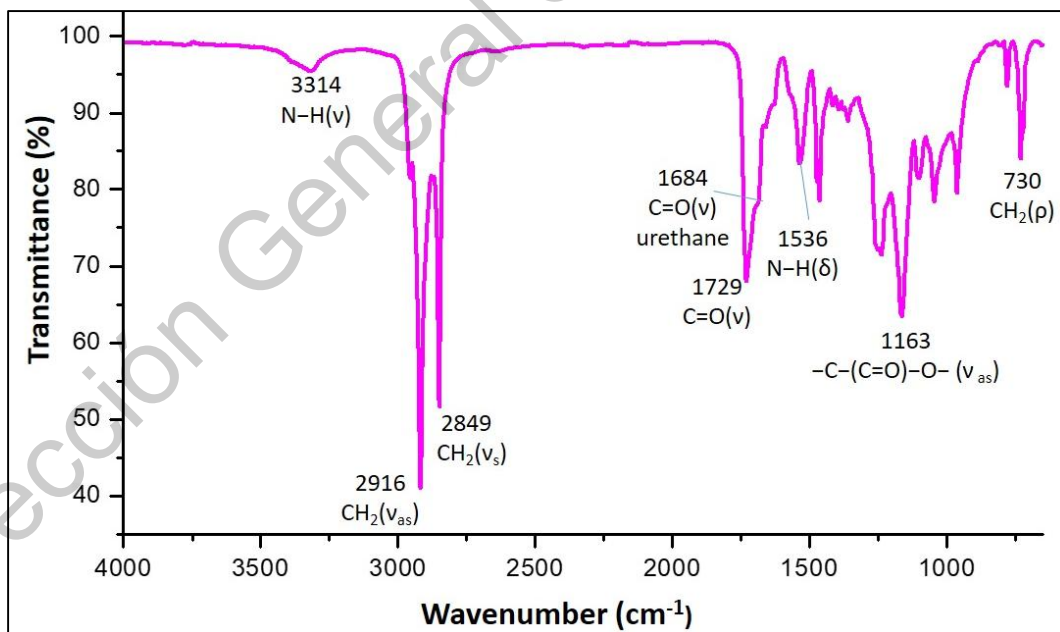


Figura A25. Espectro FTIR del PEU sintetizado a partir del macrodiol con DP = 5 y **2** como extendedor de cadena.

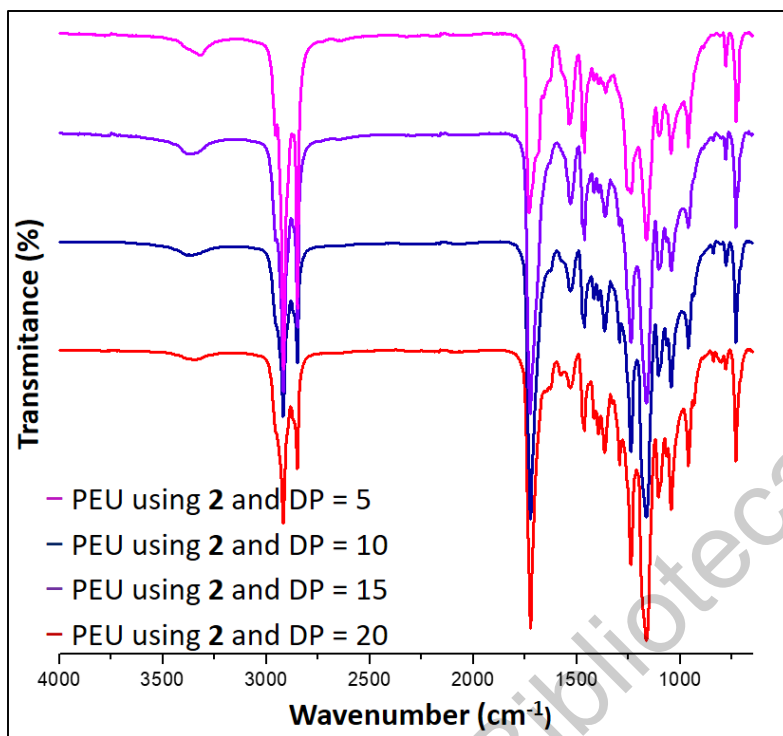


Figura A26. Espectros FTIR de los PEUs sintetizados a partir de los diferentes macrodiolos y **2** como entendedor de cadena.

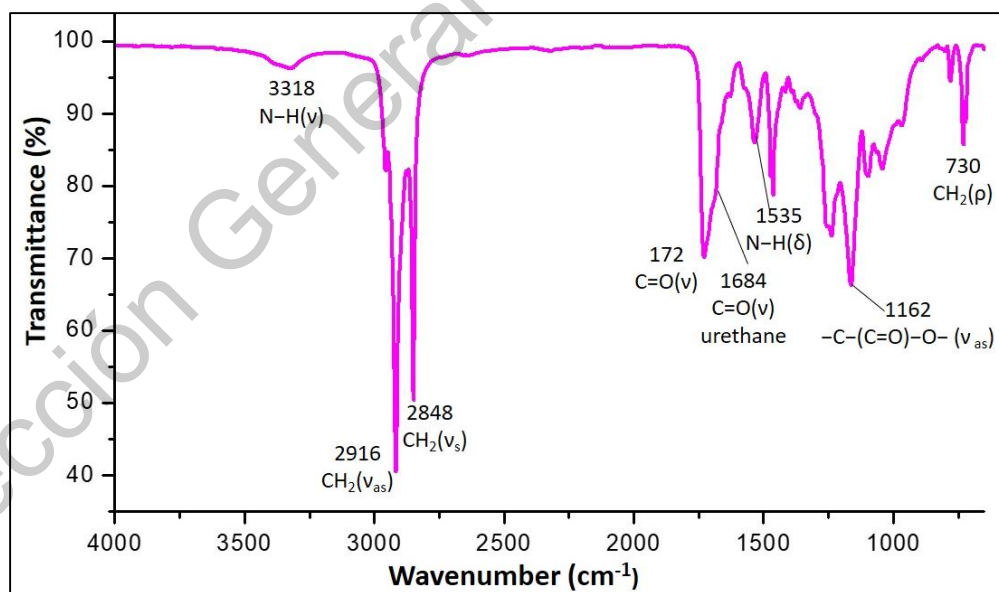


Figura A27. Espectro FTIR del PEU sintetizado a partir del macrodiol con DP = 5 y **3** como extendedor de cadena.

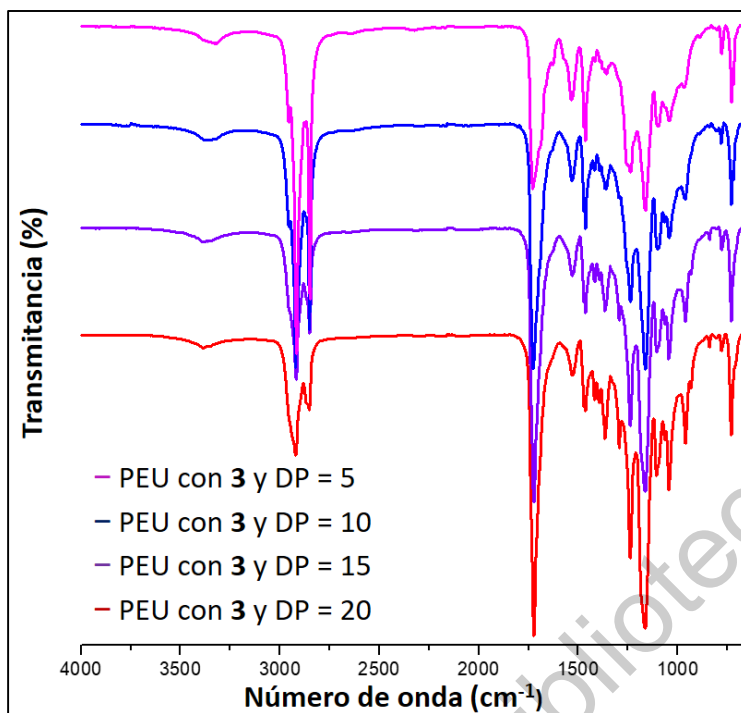


Figura A28. Espectros FTIR de los PEUs sintetizados a partir de los diferentes macrodiolos y **3** como extendedor de cadena.

10.1.6. Propiedades mecánicas

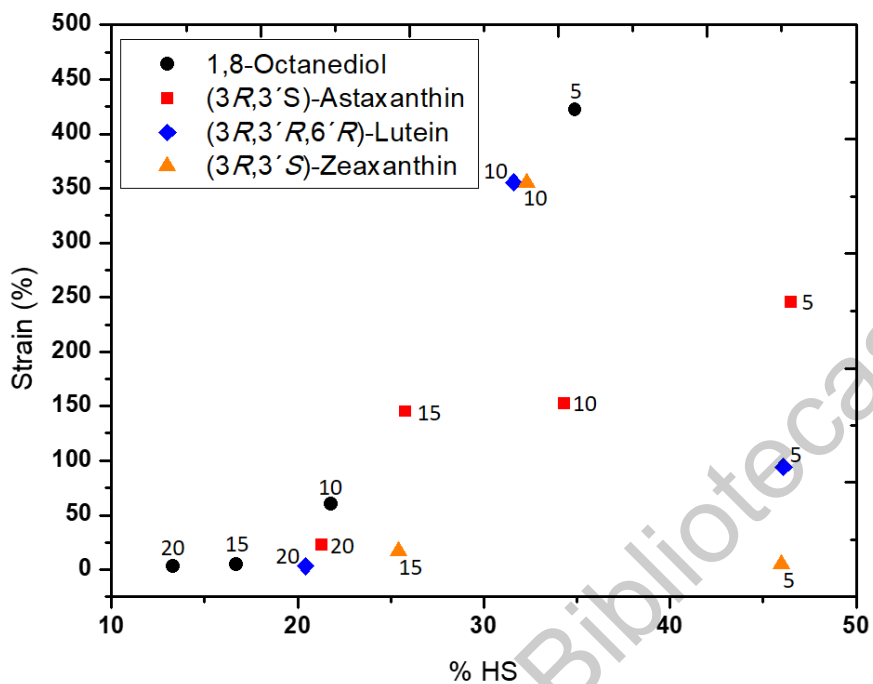


Figura A29. Efecto del contenido del segmento duro en la tensión a la ruptura.

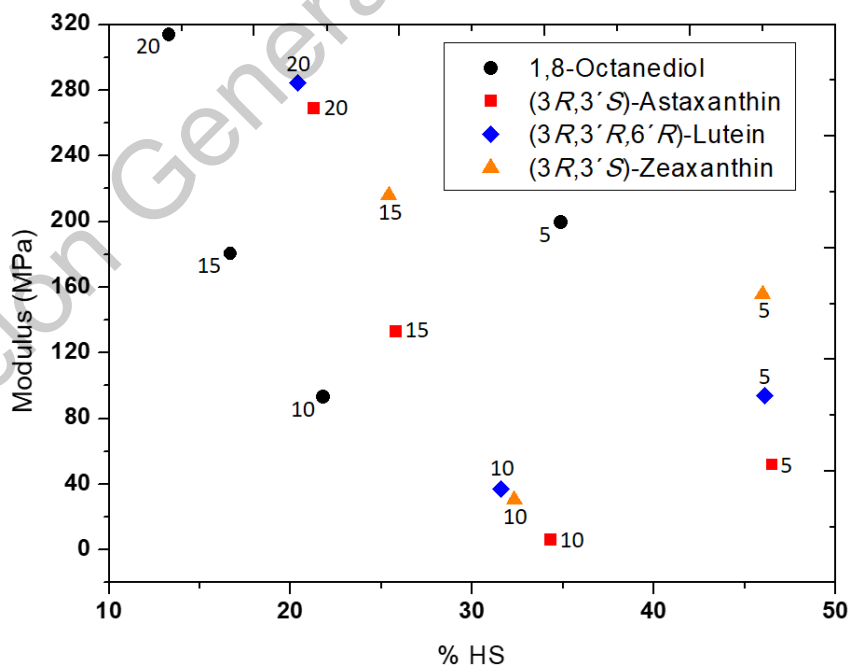


Figura A30. Efecto del porcentaje del segmento duro en el módulo.

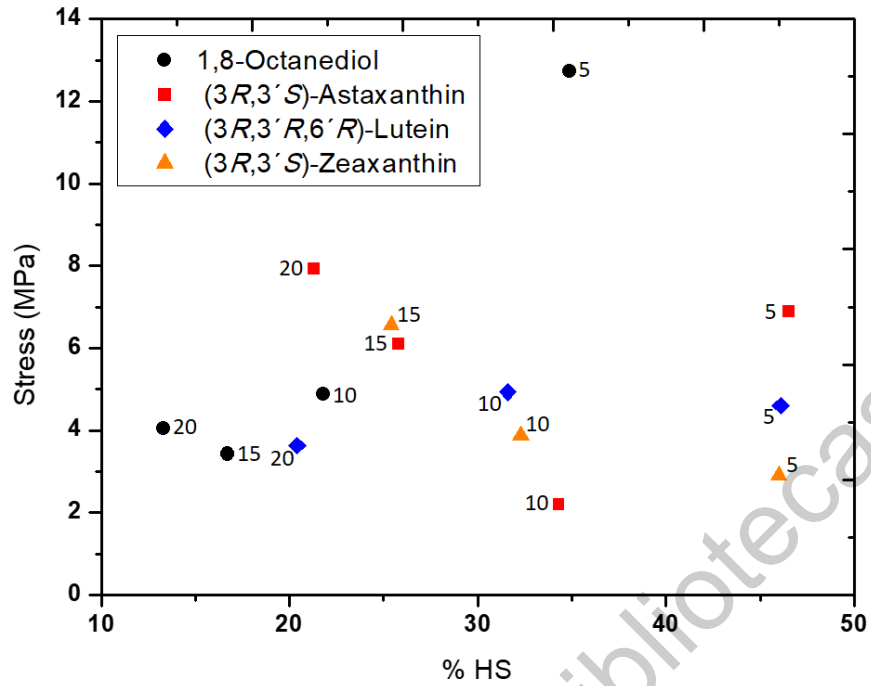


Figura A31. Efecto del contenido del segmento duro en el estrés.

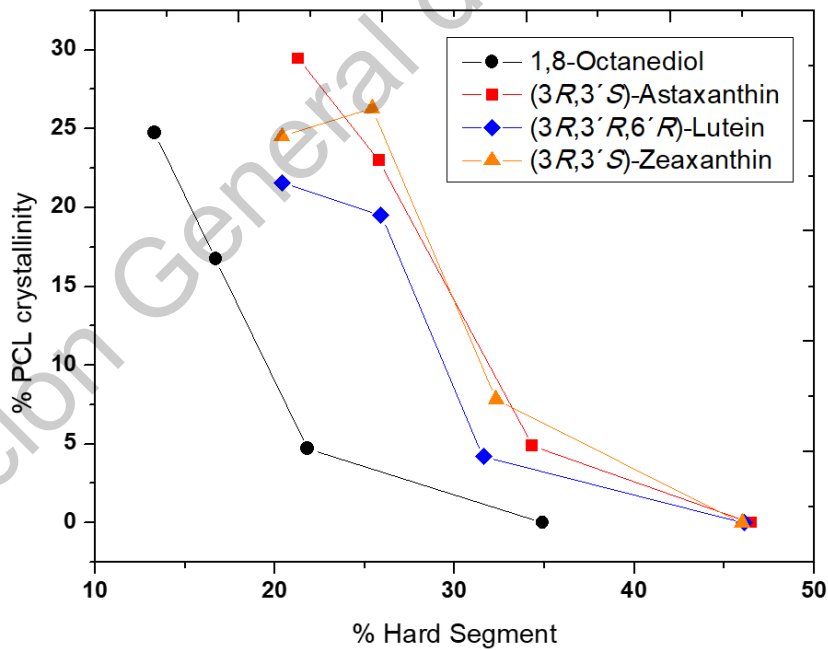



Figura A32. Efecto del porcentaje de segmento duro en la cristalinidad de la PCL en los PEUs.

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN DERIVADOS DE ESTE TRABAJO

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Article

A Simple and Efficient Method for the Partial Synthesis of Pure (3*R*,3'*S*)-Astaxanthin from (3*R*,3'*R*,6'*R*)-Lutein and Lutein Esters via (3*R*,3'*S*)-Zeaxanthin and Theoretical Study of Their Formation Mechanisms

Eloy Rodríguez-deLeón ¹, J. Oscar. C. Jiménez-Halla ^{2,*} , José E. Báez ² and M. Moustapha Bah ^{1,*}

¹ Posgrado en Ciencias Químico Biológicas, Faculty of Chemistry, Autonomous University of Querétaro, Querétaro 76010, Mexico; eloy.q22@gmail.com

² Department of Chemistry, Division of Natural and Exact Sciences, University of Guanajuato, Guanajuato 36050, Mexico; jebaez14@yahoo.com.mx

* Correspondence: jjimenez@ugto.mx (J.O.C.J.-H.); moubah@uaq.mx (M.M.B.); Tel.: +52-473-732-0006 (ext. 1433) (J.O.C.J.-H.); +52-442-192-1200 (ext. 5536) (M.M.B.)

Academic Editor: Vincenzo Piccialli

Received: 26 March 2019; Accepted: 7 April 2019; Published: 9 April 2019



Abstract: Carotenoids are natural compounds that have important roles in promoting and maintaining human health. Synthetic astaxanthin is a highly requested product by the aquaculture industry, but natural astaxanthin is not. Various strategies have been developed to synthesize this carotenoid. Nonetheless, these approaches have not only provided limited global yields, but its main commercial source also carries several health risks for humans. In this contribution, the one-pot base-catalyzed reaction of (3*R*,3'*R*,6'*R*)-lutein (**1**) esters has resulted in a successful isomerization process to easily obtain up to 95% meso-zeaxanthin (**2**), which in turn is oxidized to (3*R*,3'*S*)-astaxanthin (**3**) with a global yield of 68%. The same oxidation performed with UV irradiation (365 nm) for 5 min provided the highest global yield (76%). These chemical transformations have also been achieved with a significant reduction of the health risks associated with its potential human consumption. Furthermore, this is the first time only one of the configurational isomers has been obtained semisynthetically. The poorly understood formation mechanisms of these two compounds were also investigated using Density-Functional Theory (DFT) calculations. These theoretical studies revealed that the isomerization involves a base-catalyzed deprotonation at C-6', followed by C-4' protonation, while the oxidation occurs via free radical mechanisms.

Keywords: carotenoids; meso-zeaxanthin; (3*R*,3'*S*)-astaxanthin; partial synthesis; DFT calculation; reaction mechanism

1. Introduction

Carotenoids are natural compounds synthesized by plants and some other photosynthetic organisms such as algae, some types of bacteria, and a small number of aquatic organisms, whereby they have diverse and crucial functions [1]. More than 750 natural carotenoids have been identified in nature [2]. Lutein (**1**), (3*R*,3'*R*)-zeaxanthin, (3*R*)- β -cryptoxanthin (**4**), and β -carotene (**5**) (Figure 1) are among the most abundant [3].

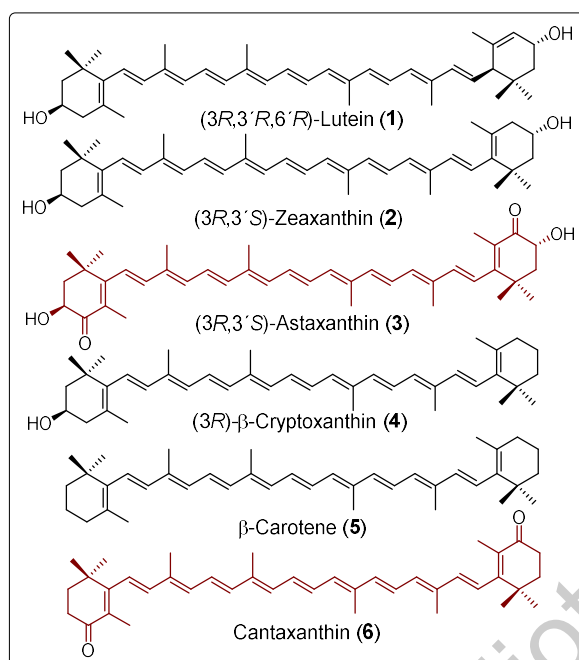
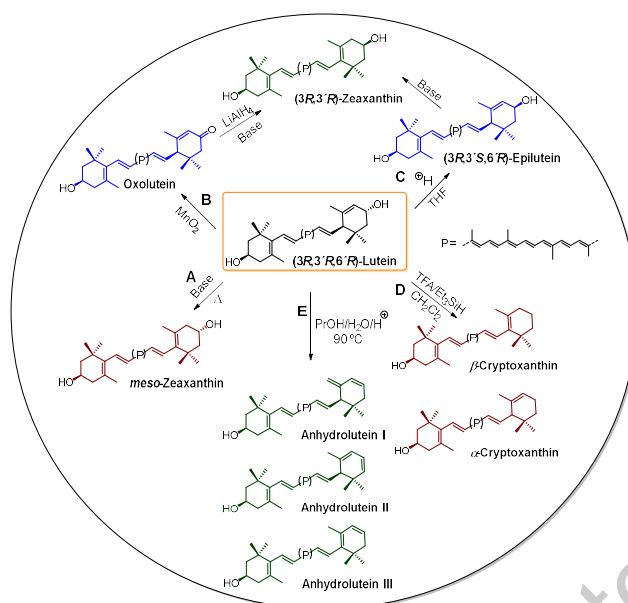


Figure 1. Structures of some common carotenoids.

These tetraterpenes first gained notability due to their colors. Currently, carotenoids and some apocarotenoids, which are sub-products resulting from the oxidative cleavage of a natural carotenoid, have important commercial applications in industry as nutraceutical additives, vitamin supplements, and cosmetic ingredients, and some have applications in the pharmaceutical industry [4]. For commercial purposes, carotenoids are mainly produced by chemical synthesis or less often by extraction from their natural sources [5,6], as is the case for astaxanthin (3), which is extracted from the microalga *Haematococcus pluvialis*. Commercial synthetic astaxanthin is actually a mixture of the two enantiomers (3R,3'R and 3S,3'S) and the meso compound (3R,3'S) in the ratio of 1:1:2, respectively [7,8]. However, astaxanthin obtained from *H. pluvialis* is mainly obtained in its mono and diesterified forms, and has been reported to account for up to 100% of (3S,3'S) [8]. Various strategies starting from natural carotenoids have been developed for obtaining other carotenoids or their derivatives, as illustrated in Scheme 1 for the partial synthesis of α -cryptoxanthins and β -cryptoxanthins, anhydroluteins, and zeaxanthins, using compound 1 as the starting material. For example, in the presence of a base and under heating, compound 1 can isomerize to meso-zeaxanthin (Scheme 1, route A) [9,10]. The mechanism by which this chemical transformation occurs has not yet been unambiguously elucidated, since there is only one proposal, which was not sufficiently supported [11]. On the other hand, the oxidation of the allylic hydroxyl group in 1 using MnO_2 has led to oxolutein (route B) [12], which is further reduced and then isomerized to the diastereoisomeric mixture composed of 2 and (3R,3'R)-zeaxanthin. Another strategy for obtaining (3R,3'R)-zeaxanthin has been the epimerization of 1 to 3'-epilutein in acid media [13]. This epimer in turn undergoes isomerization to (3R,3'R)-zeaxanthin (route C) [14]. This epimerization process has been reported to experimentally occur in green vegetables when processing in an acid medium [15]. Also, Khachik et al. have used 1 as the starting material for the partial synthesis of α -cryptoxanthins and β -cryptoxanthins. They described an industrially viable process to transform 1 into the optically active compound 4 (Figure 1) with a high yield via allylic deoxygenation in which a strong acid (Trifluoroacetic acid: TFA) and different hydride ion donors are employed (route D) [16]. Finally, the high-temperature and acid-catalyzed dehydration of 1 provided a mixture of anhydroluteins (route E) with an overall yield of 86% [17].



Scheme 1. Lutein as the starting material for the partial synthesis of other carotenoids.

Also, carotenoids have gained attention for their beneficial effects on human health [18–20]. For example, (3S,3'S)-astaxanthin is considered one of the most powerful antioxidants in nature [21], and has been reported to possess potential protective attributes against carcinogenesis [22,23], as well as have anti-inflammatory [24], antidiabetic [25,26], and antihypertensive effects [27]. Synthetic astaxanthin and some derivatives with the same skeleton as the central nucleus have been shown to contribute important benefits to the cardiovascular system [28]. An example of this was Cardax, which is the formerly commercialized disodium disuccinate salt of synthetic astaxanthin, and had a positive effect on high blood pressure and a cardioprotective effect [28–30]. There are several synthetic as well as extraction methods for obtaining astaxanthin; however, the extraction makes use of the highly expensive supercritical fluid extraction and provides less than 1% [21] of the increasing global demand. In addition to this, its total synthesis has always been achieved after long processes [7], even at the industrial level [1], whereby 52% of the mixture of the three configurational isomers has been reported as the overall better yield after seven synthetic steps [31]. Additionally, only natural astaxanthin is approved for medicinal purposes, owing to safety concerns associated with the potential toxicity of residual reagents, restricting the use of the synthetic compound in aquaculture, where it is employed to provide the pink-red tone to many edible organisms such as salmon, trout, and shrimp [21]. Until now, only one study concerning the allylic oxidation as a strategy for the partial synthesis of astaxanthin has been reported, where zeaxanthin and halogenated reagents were used as starting materials to subsequently oxidize the halogenated derivative [32], although the associated reaction mechanisms and the stereochemistry of the product were not determined. Another proposal is the one-step formation of astaxanthin from cantaxanthin (6) [33]. The allylic oxidation process usually involves the use of transition metals, which are not only environmentally unfriendly processes [34], but also carry important risks for human health when consumed [21]. In contrast to the limitations of these methodologies, our contribution has achieved a substantially simple, and more efficient, partial synthesis of zeaxanthin with good yields, employing the less toxic *n*-butanol, whilst avoiding the use of high-pressure and transition metals for obtaining (3R,3'S)-astaxanthin (3) through a radical process. Although the partial synthesis of zeaxanthin and astaxanthin have been described in different patents, to date there has not been any report on the overall yield of this compound starting from lutein or lutein esters. This opens an alternative way of obtaining this highly demanded product and the possibility of investigating its pharmacological benefits as an independent isomer, in contrast to any forms of the commercial astaxanthin products. Furthermore, the mechanisms involved in the

isomerization of **1** into **2**, and the oxidation of **2** to **3** were computationally explored in this contribution via DFT calculations.

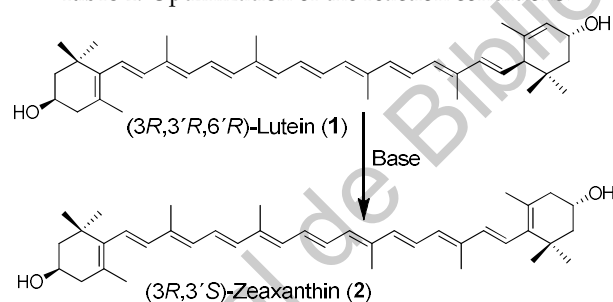
2. Results and Discussion

2.1. Synthesis and Formation Mechanism of Meso-zeaxanthin

2.1.1. High Yield Preparation of Meso-zeaxanthin

For the partial synthesis of **2**, the natural lutein esters were first extracted from the oleoresin of marigold (*Tagetes erecta* L.) and then hydrolyzed using an ethanolic KOH solution to provide compound **1**. For the conversion of **1** into **2**, different reaction conditions employing different bases (10 equivalents in each reaction) were tested (Table 1). It was found that the reaction of **1** does not occur at all with bulky bases such as TEA (triethylamine), DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene), and DIPEA (*N,N*-diisopropylethylamine). Meanwhile, when potassium *tert*-butoxide (*t*-BuOK), another bulky reactant, was added, only dehydration was detected, but isomerization products were not. By contrast, small bases such as potassium and sodium hydroxides (KOH and NaOH) were found to be effective in achieving the isomerization.

Table 1. Optimization of the reaction conditions.



Entry	Base	Solvent	Temperature	Time (Hours)	Yield (%)
1	KOH	MeOH	Reflux	12	65
2	KOH	EtOH	Reflux	12	60
3	KOH	Water	Reflux	16	nr
4	KOH	<i>n</i> -BuOH	115	12	92
5	KOH	PG	115	12	62
6	NaOH	<i>n</i> -BuOH	115	12	85
7	DBU	<i>n</i> -BuOH	100	20	nr
8	TEA	<i>n</i> -BuOH	100	24	nr
9	^a K ₂ CO ₃	<i>n</i> -BuOH	115	12	22
10	DIPEA	<i>n</i> -BuOH	115	24	nr
11	<i>t</i> -BuOK	<i>n</i> -BuOH	115	20	- ^b

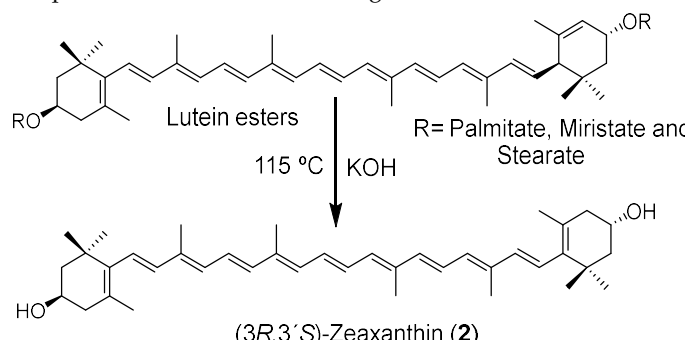
nr = no reaction, ^a K₂CO₃: potassium carbonate, ^b dehydration products (anhydroluteins).

When testing solvents such as methanol, ethanol, or propylene glycol (PG) and KOH, a moderate yield (60–65%) was obtained. Additionally, the reaction performance was found to be improved when *n*-butanol, KOH, and a high temperature (115 °C) were used (Table S3), whereby 92% yield was achieved. Torres-Cardona et al. asserted in a patent that the conversion reaction occurs in ethanol and that the efficiency of the reaction can be improved up to 20% conversion when applying pressure [9]. In another patent, Bernhard et al. used dimethyl sulfoxide (DMSO) as the solvent and reported a yield between 50–80% [10]. This reaction was found to work well, resulting in 75% yield (Table S3, Entry 2).

All the reactions were monitored using HPLC reverse-phase conditions (Figures S1–S3), which consisted of a C₃₀ column and gradients of methanol, methyl *tert*-butyl ether (MTBE), and water (Table S1). Based on the best reaction conditions found (Table 1, Entry 4), the isomerization reaction from lutein esters in a one-pot approach was explored (Table 2), and the KOH concentration was

increased from 10 to 12 equivalents. Although this process was revealed to be somewhat slower when compared with that starting from **1**, it provided a more satisfactory yield of 95% (Table 2, Entry 2).

Table 2. One-pot reaction conditions starting from lutein esters to meso-zeaxanthin.



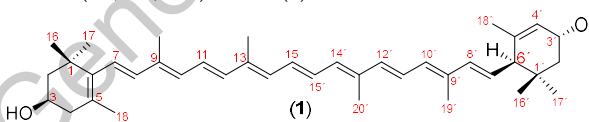
Lutein esters
115 °C KOH
R= Palmitate, Miristate and Stearate
(3R,3'S)-Zeaxanthin (**2**)

Entry	Base	Solvent	Time(Hours)	Yield (%)
1	KOH	<i>n</i> -BuOH	12	86
2	KOH	<i>n</i> -BuOH	16	95
3	KOH	PG	16	72

2.1.2. Theoretical Mechanism of the Conversion of (3R,3'R,6'R)-Lutein to Meso-zeaxanthin

To get some insight into the role of the base, the pKa value of the doubly allylic proton in the 6'-position of the α -ionone ring of lutein was calculated. Different calculations using three different functionals allowed the determination of a pKa value for this proton between 4.75–5.02 (Table 3). These results demonstrated that the isomerization process does not depend on the pKa of the proton in the 6'-position for the isomerization to occur, because the use of a base such as potassium *tert*-butoxide with a pKa similar to potassium hydroxide does not promote the isomerization. Thus, it can be argued that the reaction is only possible with small bases due to steric hindrance.

Table 3. pKa values of H-6' in (3R,3'R,6'R)-lutein (**1**) calculated with different functionals and basis sets.



DFT Method	6-311 + G(2d)	6-31 + G(d)	Def2-svp
1	M06L	4.75	4.92
2	cam-b3lyp	4.87	4.90
3	ω B97XD	4.89	5.02

With regard to the mechanism involved in this isomerization, DFT calculations at the (PCM:*n*-butanol)M06-L/6-311 + G(2d)/M06-L/6-31G(d) level were performed (Figure 2). A model system was considered to conduct the computations, which generated the results reported herein. That is, only one α -ionone ring of **1** was set up. Calculations with the full system (involving the delocalized π system in the chain of double bonds) can be found in the Supporting Information (Figure S15). Since the results using the model system are almost identical to those involving the complete lutein and zeaxanthin molecules, the smaller molecule was investigated for simplicity. The reaction starts as the base (potassium hydroxide) and deprotonates at the 6'-position of the lutein model system (**1_k**) (Figure 2). This reaction step occurs through the transition state **TS1_k** with an energy barrier of 17.3 kcal·mol⁻¹. The reaction occurs with the formation of a carbanion intermediate (**Int_k**), which is 10.8 kcal·mol⁻¹ above the energy of the reactants. Then, the intermediate rearranges itself to form a completely conjugated polyene. In the second step, the conjugated base transfers the proton to the allylic carbon through the transition state **TS2_k**, with an energy barrier of 7.6 kcal·mol⁻¹. This

protonation in the 4'-position leads to the model system of zeaxanthin (2_K), which is an exothermic step ($-18.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). The reaction mechanism using bulkier bases such as DBU and TEA was also computationally explored, from which it could be concluded that more energy is needed for the conversion of **1** into **2**. These theoretical calculations can explain, at least in part, why the experimental assays did not provide any yields, and most probably that the steric hindrance could have prevented the reactions from occurring.

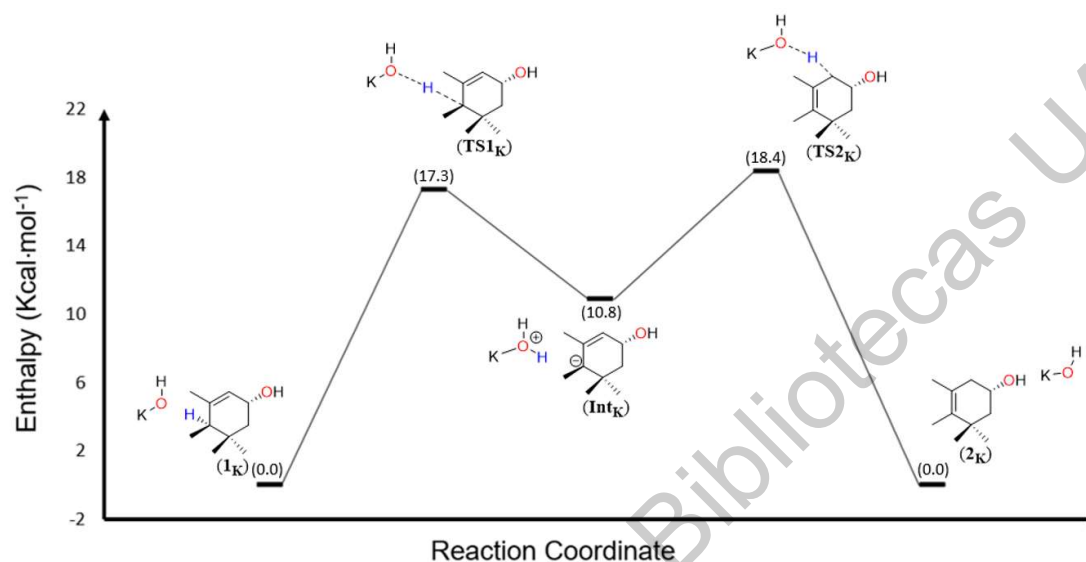


Figure 2. Energy profile calculated at the (PCM:*n*-butanol)M06-L/6-311 + G(2d) // M06-L/6-31G(d) level for the conversion of **1** into **2**.

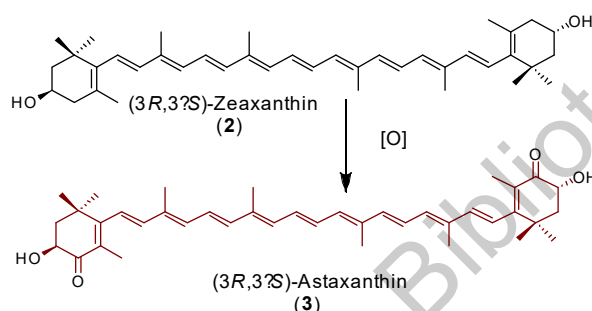
2.2. Synthesis and Formation Mechanism of Astaxanthin from Zeaxanthin

2.2.1. Synthesis of (3*R*,3'*S*)-Astaxanthin

For the partial synthesis of **3**, highly purified **2** was used as the starting material, and the allylic oxidation assays were performed employing a catalytic concentration of iodine and hypobromous acid as oxidants (Table 4), in the same way as the reaction conditions proposed by Schloemer et al. [32]. As was observed by these authors, the 3-hydroxyl and 3'-hydroxyl groups' protection of **2** was not necessary. They used halogenating agents such as *N*-bromo succinamide (NBS) to halogenate the allylic position, which then was oxidized to the carbonyl group by HBrO. In this contribution, we focused only on the use of salts and catalytic quantities of iodine in order to conduct at least a mild eco-friendly process. It is worth mentioning that these salts are easily removed from the reaction medium. These reagents can form free radicals, and therefore probably produce a highly stable allylic radical of compound **2**, which in turn is oxidized in the 4 and 4' allylic positions. This hypothesis is supported by the theoretical calculations, which indicate that the formation of an allylic radical is preferred over that of a hydroxyl radical at position 3. In these experimental assays, concentrations of iodine as well as the quantities of oxidant salts were varied. Previous investigations indicate that an iodine solution mixed with carotenoids can form radicals, and this has been confirmed by Electron Paramagnetic Resonance (EPR) studies [35–37]. Therefore, using different proportions of the oxidant mixture (Table S4), we found that under vigorous stirring in an aqueous solution with two equivalents of sodium bromate and one equivalent of sodium metabisulfite mixed with **2**, the oxidation process occurs with good yields (72%). Likewise, we found that the reaction proceeds in methylene chloride, but not in acetone or water (Table 4). The role of the temperature was also investigated. Room or higher temperatures do not favor the formation of **3**. In contrast, 15 °C or lower temperatures are required for the conversion to occur. However, a very low yield is obtained below 0 °C. These experiments allow an optimal temperature between 0–10 °C for the conversion of **2** to **3** to be determined. The optimal ratio

of iodine, which is the second oxidant agent used in the process, was 10% mol. At a major concentration of iodine (20% or more), the reaction still works, but the yield starts to decay. On the other hand, the reaction proceeds at a low concentration of iodine (2 or 5% mol), but the yield is lower than that obtained with 10% mol. In summary, the best conversion was achieved with CH₂Cl₂ as the solvent, an optimal temperature of 10 °C, 10% mol of iodine, and 2.5 h of reaction. It is well-known that UV light promotes radical formation. Interestingly, it was found that the reaction occurs without UV light, although the yield was improved by 8% when this radiation (365 nm, common commercial laboratory lamp for 5 min) was applied. It is worth mentioning that in CH₂Cl₂ solution, all *trans*-astaxanthin undergoes reversible isomerization to 9-*cis*- and 13-*cis* astaxanthins, so that the commercial product, including that from *H. pluvialis*, is a mixture of three geometric isomers [38,39]. This phenomenon was observed during the HPLC analysis of the final product (3) (Figure S4), which was obtained with a global yield of 76% from lutein esters.

Table 4. Oxidation reaction of (3*R*,3'*S*)-zeaxanthin to (3*R*,3'*S*)-astaxanthin.



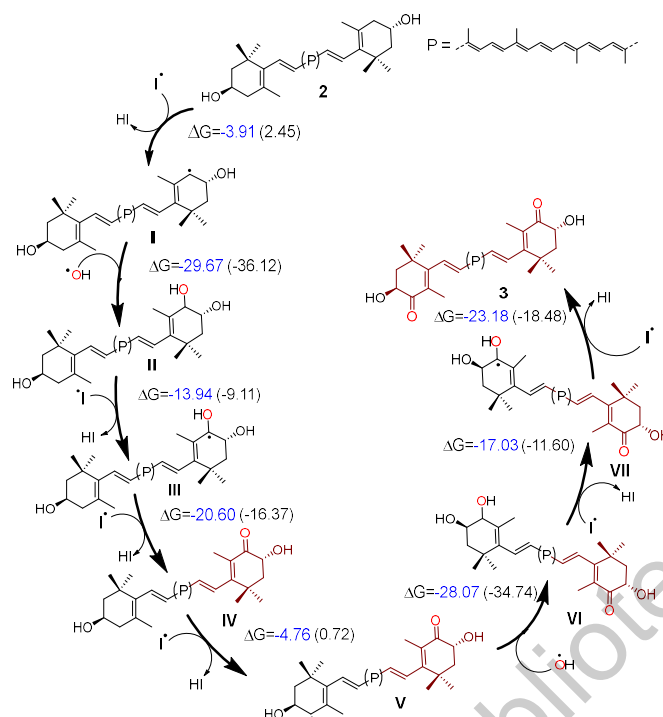
Entry	I ₂ % mol	Solvent	Time Hours	Yield (%)
1	20	CH ₂ Cl ₂	4	46
2	10	CH ₂ Cl ₂	4	52
3	10	CH ₂ Cl ₂	2.5	72
4	5	CH ₂ Cl ₂	2.5	55
5	2	CH ₂ Cl ₂	2.5	60
6	10	CH ₂ Cl ₂	2.5	80 ^a
7	10	acetone	6	nr ^b
8	10	water	6	nr ^b

^a Reaction applying UV light irradiation; ^b nr: no reaction.

2.2.2. Theoretical Mechanism for the Conversion of (3*R*,3'*S*)-Zeaxanthin to (3*R*,3'*S*)-Astaxanthin

With regard to the mechanism involved in this oxidation, we performed theoretical calculations at the same theoretical level as was used and described above. However, because our proposal involves radical reaction steps as described by Coote et al. [40], we do not provide energy barriers for these transformations, since our level of theory is not accurate enough to discuss their kinetics. Moreover, the radical species indicated here are neutral doublets for which open-shell calculations were performed, whereas the non-radical compounds are neutral singlets for which restricted open-shell calculations were applied for consistency.

We suggest that the reaction is initiated by the formation of the allylic radical I at the 4'-position of 2 (Scheme 2), and subsequently that the reaction with the hydroxyl radical to form the di-hydroxylated compound II is achieved.



Scheme 2. Plausible radical mechanism for the allylic oxidation of 2 to 3.

From here, there are two possible routes to follow: 1) the formation of a new allylic radical at C-4, or 2) the formation of a hydroxyl allylic radical at C-4' (**III**) (Scheme 2). The formation of **III** ($\Delta G = -13.94$ kcal/mol) is more favored than the other (**III₁** in pathway 1, Scheme S; ($\Delta G = -3.54$ kcal/mol). The subsequent reaction between the iodine radical and the hydrogen of the hydroxyl group at 4'-position, followed by the formation of a carbonyl group conjugated with the double bond in the positions 5(6) in **IV**, is favored. Later, a new allylic radical (**V**) is formed as a result of the reaction between **IV** and the iodine radical. In the next step, **V** reacts with the hydroxyl radical to form the hydroxyl-ketone **VI**. Finally, the reaction between **VI** and a radical iodine gives rise to the hydroxyl allylic radical **VII** formation, which undergoes the deprotonation promoted by iodine radicals, leading to the final compound **3**.

3. Materials and Methods

3.1. General Experimental Procedures

^1H , ^{13}C , and two-dimensional NMR spectra were acquired on a Bruker Avance III HD 500-MHz instrument, using CDCl_3 as solvent and tetramethylsilane (TMS) as internal standard. HPLC analyses were carried out on a Waters apparatus (Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) composed of a 2695e multi-solvent delivery system and a 2998 Photodiode Array (PDA) detector, using a C_{30} column ($5\ \mu\text{m}$, $250 \times 4.5\ \text{mm}$) at a flow rate of $0.7\ \text{mL}/\text{min}$. Control of this equipment, data acquisition, processing, and the management of chromatographic information were performed by the Empower software (Waters) (Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA). Thin Layer Chromatography (TLC) analyses were performed on 0.25-mm silica gel PF 254 (Merck) (Merck, Kenilworth, NJ, USA) plates, and spots were visually defined. All the salts, such as potassium hydroxide, sodium hydroxide, potassium *tert*-butoxide, sodium carbonate, potassium carbonate, sodium bromate, sodium metabisulfite, as well as citric acid and iodine, were purchased from REACTIVOS QUIMICA MEYER (Tlahuac, Ciudad de México, Mexico). The organic bases such as TEA, DIPEA, and DBU were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). HPLC and analytical solvents were acquired from Baker-Mallinckrodt (JT Baker, Mallinckrodt Baker Inc,

Phillipsburg, NJ, USA). The marigold oleoresin was purchased from Oleo-especies (Zapopan, Jalisco, Mexico). For the extraction of lutein esters, the marigold oleoresin (100 g) was washed successively with 50 mL of isopropyl alcohol and 50 mL of hexane. Each washing process was repeated three times. Then, the final residue was dried at room temperature, giving 65 g of dry starting material enriched in lutein esters.

3.2. Free (3R,3'R,6'R)-Lutein (1) from Oleoresin

The marigold oleoresin (100 g) was hydrolyzed with KOH (11.2 g) in ethanol (EtOH) (125 mL) under reflux for 3 hours. Upon completion of the reaction, the mixture was neutralized with 10.7% aqueous H₃PO₄ (*v/v*) and washed with 100 mL of hexane. About 12.5 g of a dry orange-red solid was recovered and purified by precipitation by solvent exchange from dichloromethane to cold methanol. The compound obtained was identified as (3R,3'R,6'R)-lutein (1): ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Figure S6): 0.85 (3H, s, H-16'), 1.00 (3H, s, H-17'), 1.07 (6H, s, H-16 and H-17), 1.36 (1H, dd, *J* = 13.1, 7.0 Hz, H-2'_A), 1.48 (1H, t, *J* = 12.0 Hz, H-2_A), 1.63 (3H, s, H-18'), 1.74 (3H, s, H-18), 1.78 (1H, m, H-2), 1.84 (1H, dd, *J* = 13.1, 7.0 Hz, H-2'_B), 1.91 (3H, s, H-19'), 1.97 (9H, s, H-19, H-20, and H-20'), 2.05 (1H, dd, *J* = 16.5, 9.5 Hz, H-4_A), 2.39 (1H, m, H-4_B), 2.41 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-6'), 4.01 (1H, m, H-3), 4.25 (1H, s, H-3'), 5.44 (1H, dd, *J* = 15.5, 10.0 Hz, H-7'), 5.55 (1H, s, H-4'), 6.12 (3H, m, H-7, H-8, and H-8'), 6.15 (2H, m, H-10 and H-10'), 6.24 (1H, m, H-14), 6.26 (1H, m, H-14'), 6.35 (1H, m, H-12), 6.37 (1H, m, H-12'), 6.64 (4H, m, H-11, H-11', H-15, and H-15'). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Figure S7): 12.8 (C-20 and C-20'), 13.1 (C-19 and C-19'), 21.4 (C-18), 22.9 (C-18'), 24.3 (C-17'), 28.7 (C-17), 29.5 (C-16'), 30.3 (C-16), 34.0 (C-1'), 37.1 (C-1), 42.6 (C-4), 44.7 (C-2), 48.4 (C-2'), 54.9 (C-6'), 65.1 (C-3), 65.9 (C-3'), 124.5 (C-4'), 124.8 (C-11'), 124.9 (C-11), 125.6 (C-7), 126.2 (C-5), 128.7 (C-7'), 130.0 (C-15), 130.1 (C-15'), 130.8 (C-10), 131.3 (C-10'), 132.6 (C-14 and C-14'), 135.1 (C-9), 135.7 (C-9'), 136.4 (C-13'), 136.5 (C-13), 137.6 (C-12), 137.7 (C-12'), 137.8 (C-5'), 138.0 (C-6), 138.5 (C-8 and C-8'). These data match those published by Otaka et al. [41].

3.3. Synthesis of (3R,3'S)-Zeaxanthin (2)

To 1 mmol (569 mg) of 1 in 10 mL of *n*-butanol, 561 mg of KOH was added, and the solution was heated for 12 h at 115 °C with vigorous stirring. The reaction was monitored by HPLC. Once 90% of the conversion was reached, the reaction was stopped by adding 2N of H₃PO₄ until it resulted in a neutral pH. A slight excess of water was added; then, the reaction mixture was filtered, and solvent was removed by rotary evaporation until dry to give a crude residue (540 mg). The compound was recrystallized using methanol, affording orange crystals (yield 92%). This compound was identified as (3R,3'S)-zeaxanthin (2): ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Figure S8): 1.07 (12H, s, H-16, H-16', H-17, and H-17'), 1.48 (2H, t, *J* = 12.0 Hz, H-2_A), 1.74 (6H, s, H-18 and H-18'), 1.77 (2H, m, H-2_B), 1.97 (12H, s, H-19, H-19', H-20, and H-20'), 2.04 (2H, dd, *J* = 16.5, 5.0 Hz, H-4_A), 2.39 (2H, dd, *J* = 16.5, 5.0 Hz, H-4_B), 4.00 (2H, m, H-3 and H-3'), 6.12 (2H, m, H-7 and H-7'), 6.15 (2H, m, H-8 and H-8'), 6.17 (2H, m, H-10 and H-10'), 6.26 (2H, m, H-14 and H-14'), 6.37 (2H, d, *J* = 14.5 Hz, H-12 and H-12'), 6.62 (2H, m, H-15 and H-15'), 6.64 (2H, m, H-11 and H-11'). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Figure S9): 12.8 (C-20 and C-20'), (C-19 and C-19'), 21.6 (C-18 and C-18'), 28.7 (C-16 and C-16'), 30.3 (C-17 and C-17'), 37.1 (C-1 and C-1'), 42.6 (C-4 and C-4'), 48.4 (C-2 and C-2'), 65.1 (C-3 and C-3'), 124.9 (C-11 and C-11'), 125.6 (C-7 and C-7'), 126.2 (C-5 and C-5'), 130.1 (C-15 and C-15'), 131.3 (C-10 and C-10'), 132.6 (C-14 and C-14'), 135.7 (C-9 and C-9'), 136.4 (C-13 and C-13'), 137.6 (C-12 and C-12'), 137.8 (C-6 and C-6'), 138.6 (C-8 and C-8') [42].

3.4. Synthesis of (3R,3'S)-astaxanthin (3)

Compound 2 (285 mg) was dissolved in methylene chloride (15 mL) and 2.5 mg of iodine was added. The mixture was stirred for 30 min. The oxidant solution was independently prepared according to the following procedure: 100 mg of NaBrO₃ were dissolved in 5 mL of water and 50 mg of NaHCO₃ was added; independently, 56 mg of Na₂S₂O₅ was dissolved in 2 mL of water. Both

solutions were cooled to 5 °C and mixed. The solution was acidified with citric acid. After 30 s, the solution turned pale yellow, and at this point, it was added to the zeaxanthin-iodine solution. The reaction mixture, which was vigorously stirred and monitored by TLC, over time turned dark red. Once no change in this color was observed, the reaction was stopped, left to reach room temperature, and then neutralized with a 25-mL aqueous solution containing 250 mg of NaHCO₃ and 80 mg of Na₂S₂O₅. The mixture was extracted with dichloromethane (3 × 15 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by preparative thin-layer chromatography on silica gel plates eluted with hexane-acetone (8:2), to afford a 72% yield of a dark red powder. This compound was identified as (3*R*,3'*S*)-astaxanthin (**3**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Figure S10): 1.21 (6H, s, H-16 and H-16'), 1.32 (6H, s, H-17 and H-17'), 1.81 (2H, m, H-2_A and H-2'_A), 1.94 (6H, s, H-18 and H-18'), 1.99 (6H, m, H-20 and H-20'), 2.00 (6H, m, H-19 and H-19'), 2.17 (2H, m, H-2_B and H-2'_B), 4.33 (2H, dd, *J* = 14.0, 5.5 Hz, H-3 and H-3'), 6.20 (2H, m, H-7 and H-7'), 6.29 (2H, m, H-14 and H-14'), 6.31 (2H, m, H-10 and H-10'), 6.43 (2H, m, H-8 and H-8'), 6.45 (2H, d, *J* = 7.5 Hz, H-12 and H-12'), 6.66 (2H, m, H11 and H-11'), 6.68 (2H, m, H-15 and H-15'). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (Figure S11): 12.6 (C-19 and C-19'), 12.8 (C-20 and C-20'), 14.0 (C-18 and C-18'), 26.2 (C-17 and C-17'), 30.7 (C-16 and C-16'), 36.8 (C-1 and C-1'), 45.4 (C-2 and C-2'), 69.2 (C-3 and C-3'), 123.3 (C-7 and C-7'), 124.6 (C-11 and C-11'), 126.8 (C-5 and C-5'), 130.7 (C-15 and C-15'), 133.8 (C-14 and C-14'), 134.8 (C-9 and C-9'), 135.2 (C-10 and C-10'), 136.7 (C-13 and C-13'), 139.7 (C-12 and C-12'), 142.4 (C-8 and C-8'), 162.3 (C-6 and C-6'), 200.4 (C-4 and C-4') [43].

3.5. Computational Calculations

Gas-phase DFT calculations using the Gaussian09 series (Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA) programs were performed [44]. Geometry optimizations were conducted without symmetry restrictions, but using a model system. That is, instead of the full lutein molecule, only one terminal ring was considered in the case of the isomerization reaction. However, the energy of the entire lutein molecule was also calculated for comparison with our model system (Figures S15 and S16). For numerical precision, the local hybrid density-functional M06–L [45] was set up along with a double-ζ quality basis set, 6-31G(d). Also, harmonic frequency calculations were performed at the same level of theory in order to fulfill two objectives. (i) The first was to characterize the nature of the critical points found on the potential energy surface—that is, local minima that contain zero negative (imaginary) Hessian eigenvalues, whereas maxima (transition states) present one and only one negative eigenvalue, which corresponds to the desired reaction coordinate. (ii) The second objective was to obtain the thermal and entropic corrections, which were set up to 298 K and 1 atm. Single-point calculations were later performed over the optimized geometries using the polarizable continuum model (PCM), [46–48] defining *n*-butanol as the reaction solvent ($\epsilon = 17.332$) to obtain the solvation correction at the same level of theory as for the geometric optimizations. In addition, to improve the final energy values reported in this work, we carried out single-point calculations with a triple-ζ quality basis set, 6-311 + G(2d), over each optimized geometry. Thus, the selected level of theory is defined as PCM:*n*-butanol)M06–L/6-311 + G(2d)/M06–L/6-31G(d). For the mechanism involved in the oxidation reaction, we reported our calculations at the same level of theory, but only in the gas phase.

Regarding the pKa calculations, we performed geometry optimizations using the PCM model according to Equation (1), where A–H stands for lutein. Thus, the solvated free energy could be calculated as shown in Equation (2), where $G_{solv}(H^+) = 264.5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ is the solvation free energy of a proton in *n*-butanol [49] and $RT\ln(24.46) = 1.89 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, which is the factor that accounts for the change in the gas-phase reference state from 1 atm to 1 M. The term $G_{gas}(H^+)$ is the absolute free energy of the gas-phase proton at standard temperature and pressure. This energy was easily calculated using the Sackur–Tetrode equation, and has a value of -6.28 kcal/mol , rendering it straightforward to calculate gas-phase acidities.



$$\Delta G_{solv} = G_{solv}(A - H) - G_{solv}(A^-) - G_{solv}(H^+) - G_{gas}(H^+) + RT \cdot \ln(24.46) \quad (2)$$

So, the pKa can then be calculated following Equation (3):

$$pKa = \frac{\Delta G_{solv}}{2.303 RT} \quad (3)$$

Finally, these pKa calculations were performed using three density functionals: M06-L [45], cam-B3LYP [50,51], and ω B97X-D [52], in conjunction with the basis sets, i.e. 6-31 + G(d), 6-311 + G(2d), and def2-svp.

4. Conclusions

A facile, efficient, and mild eco-friendly process to obtain (3R,3'S)-astaxanthin (**3**) from (3R,3'R,6'R)-lutein (**1**) and lutein esters via (3R,3'S)-zeaxanthin (**2**) has been developed. The experimental and computational studies of the conversion of **1** into **2** indicated that this process is not favored when using bulky bases. Also, it has been proven that the oxidation of **2** to **3** proceeds without the need for protecting groups, peroxides, or metals. The global yield of **3** was 73% from **1** and 76% from lutein esters, which was substantially higher than those reported in a handful of articles on their partial synthesis, and exceeding the highest yield reported on an industrial scale performed by total synthesis. The suitability of astaxanthin obtained via this process for potential human consumption may now be investigated. Finally, DFT calculations, in addition to leading to an improvement of the yield as a result of UV irradiation, support a plausible radical free mechanism for this conversion.

Supplementary Materials: Supplementary materials are available online at <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/7/1386/s1>.

Author Contributions: E.R-d. participated in the conception of the project, performed the experiments and calculations, and wrote the first version of the manuscript; J.E.B. acquired and analyzed part of the NMR spectra; J.O.C.-H. designed and directed the DFT calculations; M.M.B. participated in the conception of the project, acquired the funding, supervised the execution of the whole project, and drafted and edited the final manuscript.

Funding: This research received its main financial support from Fondo Para el Fortalecimiento de la Investigación (FOFIUAQ) (Grant Number: FCQ201818).

Acknowledgments: Eloy Rodríguez-deLeón thanks CONACyT for a doctoral fellowship. J.O.C. Jiménez-Halla acknowledges National Laboratory UG-AAA-CONACyT (123732) for supercomputing resources.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Álvarez, R.; Vaz, B.; Gronemeyer, H.; de Lera, A.R. Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1–125. [CrossRef] [PubMed]
2. Bauerfeind, J.; Hintze, V.; Kschonsek, J.; Killenberg, M.; Böhm, V. Use of photochemiluminescence for the determination of antioxidant capacities of selected tomato products. *J. Agric. Food. Chem.* **2014**, *62*, 7452–7459. [CrossRef]
3. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. *Carotenoids: Nutrition and Health*; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 2009; pp. 45–57.
4. Cazzonelli, C.I. Carotenoids in nature: Insights from plants and beyond. *Funct. Plant Biol.* **2011**, *38*, 833–847. [CrossRef]
5. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. *Carotenoids: Synthesis*; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 2009; pp. 1–6.
6. Rivera, S.M. Guide for carotenoid identification in biological samples. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1473–1484. [CrossRef] [PubMed]
7. Higuera-Ciaparra, I.; Félix-Valenzuela, L.; Goycoolea, F.M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, *46*, 185–196. [CrossRef]
8. Visioli, F.; Artaria, C. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: Mechanism of action, therapeutic merits, and knowledge gaps. *Food Funct.* **2017**, *8*, 39–63. [CrossRef]

9. Torres-Cardona, M.D. Process for the isomerization of lutein. U.S. Patent 5,523,494, 4 June 1996.
10. Bernhard, K.U.S. Process for the manufacturing of zeaxanthin from lutein. U.S. Patent 5,780,693, 14 July 1998.
11. Andrews, A.G. Isomerization of ϵ -Carotene to β -Carotene and Lutein to Zeaxanthin. *Acta Chem. Scand.* **1974**, *28*, 137–138. [[CrossRef](#)]
12. Buchecker, R.; Eugster, C.H.; Weber, A. Absolute Konfiguration von α -Doradexanthin und von Fritschellaxanthin, einem neuen Carotinoid aus *Fritschella tuberosa* IYENG. *Helv. Chim. Acta* **1978**, *61*, 1962–1968.
13. Khachick, F. Process for making a (3R,3'R)-zeaxanthin precursor. U.S. Patent 6,818,798, 16 November 2004.
14. Khachik, F. An efficient conversion of (3R,3'R,6'R)-lutein to (3R,3'S,6'R)-lutein (3'-epilutein) and (3R,3'R)-zeaxanthin. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 67–72. [[CrossRef](#)]
15. Deli, J.; Molnar, P.; Osz, E.; Tóth, G.; Zsila, F. Epimerisation of lutein to 3'-epilutein in processed foods. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 925–928. [[CrossRef](#)]
16. Khachik, F.; Chang, A.-N.; Gana, A.; Mazzola, E. Partial synthesis of (3R,6'R)- α -cryptoxanthin from (3R,3'R,6'R)-lutein. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 220–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Khachik, F. Partial synthesis of serum carotenoids and their metabolites. *Acta Biochim. Polon.* **2012**, *59*, 75–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Jomova, K.; Valko, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 102–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Rao, A.V.; Rao, L.G. Carotenoids and Human Health. *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 207–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Pan, M.-H.; Ho, C.-T. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2558–2574. [[CrossRef](#)]
21. Panis, G.; Rosales, J. Commercial Astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a technoeconomic assessment all through production line. *Algal Res.* **2016**, *18*, 175–190. [[CrossRef](#)]
22. Liu, X.; Song, M.; Gao, Z.; Cai, X.; Dixon, W.; Chen, X.; Cao, Y.; Xiao, H. Stereoisomers of Astaxanthin inhibit Human colon cancer cell growth by inducing G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 7750–7759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nagendrapabhu, P.; Sudhandiran, G. Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expression of ERK-2, NFkB and COX-2. *Investig. New Drugs* **2011**, *29*, 207–224. [[CrossRef](#)]
24. Fasset, R.G.; Coombes, J.S. Astaxanthin: A potential Therapeutic Agent in Cardiovascular Disease. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 447–465. [[CrossRef](#)]
25. Wang, J.-J.; Chen, Z.-Q.; Lu, W.-Q. Hypoglycemic effect of astaxanthin from shrimp waste in alloxan-induced diabetic mice. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 2363–2367. [[CrossRef](#)]
26. Hussein, G.; Sankawa, U.; Goto, H.; Matsumoto, K.; Watanabe, H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 443–449. [[CrossRef](#)]
27. Preuss, H.G.; Echard, B.; Yamashita, E.; Perricone, N.V. High dose Astaxanthin lowers blood pressure and increases insulin sensitivity in rats: Are these effects interdependent? *Int. J. Med. Sci.* **2011**, *8*, 126–138. [[CrossRef](#)]
28. Gross, G.J.; Lockwood, S.F. Cardioprotection and myocardial salvage by a disodium disuccinate Astaxanthin derivate (Cardax). *Life Sci.* **2004**, *75*, 215–224. [[CrossRef](#)]
29. Gross, G.J.; Lockwood, S.F. Acute and chronic administration of disodium disuccinate astaxanthin (Cardax) produces marked cardioprotection in dog hearts. *Mol. Cell. Biochem.* **2005**, *272*, 221–227. [[CrossRef](#)]
30. Lauver, D.A.; Lockwood, S.F.; Lucchesi, B.R. Disodium disuccinate Astaxanthin (Cardax) attenuates complement activation and reduces myocardial injury following ischemia/reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314*, 686–692. [[CrossRef](#)]
31. Widmer, V.E.; Zell, R.; Albin, E.; Cramer, Y.; Wagner, H.P.; Dinkel, J.; Schlageter, M.; Lukat, T. Technische Verfahren zur Synthese von Carotinoiden und verwandten Verbindungen aus 6-Oxo-isophoron. II. Ein neues Konzept für die Synthese von (3RS,3'RS)-Astaxanthin. *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2436–2446. [[CrossRef](#)]
32. Schloemer, G.C.; Davis, J.L. Preparación de astaxantina. Patente ES2 312 433, 22 January 2003.
33. Bernhard, K.; Miller, R.K.; Spruijtenburg, R. Cyclohexenone derivatives and process for making same. U.S. Patent 4,585,885, 29 April 1986.

34. Chen, K.; Zhang, P.; Wang, Y.; Li, H. Metal free allylic/benzylic oxidation strategies with molecular oxygen: Recent advances and future prospects. *Green Chem.* **2014**, *16*, 2344–2374. [CrossRef]
35. Ding, R.; Grant, J.L.; Metzger, R.M.; Kispert, L.D. Carotenoid cation radicals produced by the interaction of carotenoids with iodine. *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 4600–4606. [CrossRef]
36. Lutnaes, B.F.; Krane, J.; Liaaen-Jensen, S. On the structure of carotenoid iodine complexes. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2821–2828. [CrossRef]
37. Liaaen-Jensen, S. Studies on Allylic Oxidation of Compounds. *Acta Chem. Scand.* **1965**, *19*, 1166–1174. [CrossRef]
38. Yuan, J.-P.; Chen, F. Isomerization of *trans*-astaxanthin to *cis*-astaxanthin in organic solvents. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3656–3660. [CrossRef]
39. Holtin, K.; Kuehnle, M.; Rehbein, J.; Schuler, P.; Nicholson, G.; Albert, K. Determination of Astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 1613–1622. [CrossRef]
40. Izgorodina, E.I.; Brittain, D.R.B.; Hodgson, J.L.; Krenske, E.H.; Lin, C.Y.; Namazian, M.; Coote, M.L. Should Contemporary Density Functional Theory Methods Be Used to Study the Thermodynamics of Radical Reactions? *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 10754–10768. [CrossRef]
41. Otaka, J.; Seo, S.; Nishimura, M. Lutein, a natural carotenoid, induces α -1,3-glucan accumulation on the cell wall surface of fungal plant pathogens. *Molecules* **2016**, *21*, 980. [CrossRef]
42. Englert, G.; Noack, K.; Broger, E.A.; Glinz, E.; Vecchi, M.; Zell, R. Synthesis, isolation, and full spectroscopic characterization of eleven *Z*-isomers of (3*R*,3'*R*)-zeaxanthin. *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 969–982. [CrossRef]
43. Englert, G.; Kienzle, F.; Noack, K. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, UV, und CD. Daten von synthetischem (3*S*,3'*S*)-astaxanthin, seinem 15-*cis*-isomeren und einigen analogen verbindungen. *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 1209–1219.
44. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian09, Revision C.01*; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2010.
45. Zhao, Y.; Truhlar, D.G. A new local density functional for main-group thermochemistry, transition metal bonding, thermochemical kinetics, and non-covalent interactions. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 1–18. [CrossRef]
46. Cossi, M.; Barone, V.; Cammi, R.; Tomasi, J. Ab initio study of solvated molecules: A new implementation of the polarizable continuum model. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *255*, 327–335. [CrossRef]
47. Barone, V.; Cossi, M. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3210–3221. [CrossRef]
48. Mennucci, B.; Tomasi, J. Continuum solvation models: A new approach to the problem of solute's charge distribution and cavity boundaries. *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 5151–5158. [CrossRef]
49. Case, B.; Parson, R. The real energy free of solvation of ions in some non-aqueous and mixed solvents. *Trans. Faraday Soc.* **1967**, *63*, 1224–1239. [CrossRef]
50. Becke, A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100. [CrossRef]
51. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789. [CrossRef]
52. Chai, J.-D.; Head-Gordon, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6615–6620. [CrossRef]

Sample Availability: All compounds are available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Cite this: DOI: 10.1039/c9py01487j

Synthesis and characterization of segmented poly(ester-urethane)s (PEUs) containing carotenoids†

Eloy Rodríguez-deLeón,^a Moustapha Bah,^a J. Oscar C. Jiménez-Halla,^b José Bonilla-Cruz,^c Miriam Estévez^d and José E. Báez^{a,b}

A series of twenty segmented poly(ester-urethane)s (PEUs) were synthesized, by the reaction of four different macrodiols derived from ϵ -caprolactone (CL) and 1,8-octanediol (Oct), 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI), and three different carotenoids, (3*R*,3'*R*,6'*R*)-lutein (**1**) obtained from a renewable source such as marigold (*Tagetes erecta* L.), (3*R*,3'*S*)-zeaxanthin (**2**) and (3*R*,3'*S*)-astaxanthin (**3**) obtained by partial synthesis from **1**, as chain-extender agents. The mechanical properties of the PEUs showed evident plastic behavior. Some PEUs samples exhibited double segregation phases attributed to PCL (soft segment) and **1**, **2**, and **3**/HDI (hard segment) detected by DSC. This work represents the first report of the use of carotenoids as chain extenders in the synthesis of PEUs.

Received 3rd October 2019,
Accepted 22nd November 2019

DOI: 10.1039/c9py01487j

rsc.li/polymers

Introduction

Carotenoids are a group of compounds that play key roles in nature, especially in plants and some microorganisms, because these molecules are part of the photosynthetic machinery regulating the flow of energy and protecting the photosynthetic system against possible damage induced by light.^{1,2} Currently, there are more than 750 known carotenoids distributed throughout nature.^{3,4} The family of carotenoids is divided into two classes: carotenes (tetraterpenes comprising only carbon and hydrogen) and xanthophylls (oxygen-containing carotenes).^{5,6} Lutein (**1**) and zeaxanthin (**2**) (Fig. 1) are yellow-colored xanthophylls that are selectively accumulated in the human retina, specifically in the zone known as macula lutea.⁷ Compounds **1** and **2** are key factors protecting against the visual loss associated with the age-related macular degeneration (AMD).^{8,9} Due to the low hydrophilicity of xanthophylls, a number of different publications have reported

the synthesis of lutein-derived compounds that represent water soluble (or at least water-dispersible) xanthophylls, providing increased bioavailability. In addition, a number of hydrophilic molecules derived from the red xanthophyll astaxanthin (**3**) have been synthesized. Maybe the most famous of these derivatives is the formerly available drug Cardax, a disuccinic sodium salt of **3** aimed to attenuate myocardial damage.^{10–12} From another perspective, the development of biodegradable polymers as new ecofriendly materials,^{13,14} and the current need to incorporate bioactive molecules into polymeric systems for *in vivo* delivery applications, has been an area of high interest in recent years.¹⁵ Examples of bioactive compounds in polymeric systems are the curcumin biodegradable polymers, which show good cytotoxic effects towards a range of cancer cell lines.^{16,17} However, molecules with important biological activities such as carotenoids could be useful to create the new example of so-called “polyactives”.¹⁸ Of the carotenoid-derived polymers published to date, there are only two papers in which astaxanthin was used, although the stereochemistry of the isomer employed in

^aPosgrado en Ciencias Químico Biológicas, Faculty of Chemistry, Autonomous University of Querétaro (UAQ), Cerro de Las Campanas, Querétaro, Qro. 76010 Mexico. E-mail: moubah@uaq.mx

^bDepartment of Chemistry, Division of Natural and Exact Sciences (DCNE), University of Guanajuato (UG), Campus Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto. 36050 Mexico. E-mail: jebaez@ugto.mx

^cCentro de Investigación en Materiales Avanzados S.C. (CIMAV-Unidad Monterrey), Av. Alianza Norte 202, PIIT, Autopista Monterrey-Aeropuerto Km 10, Apodaca, N.L., 66628 Mexico

^dCentro Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, Qro. 76230 Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9py01487j

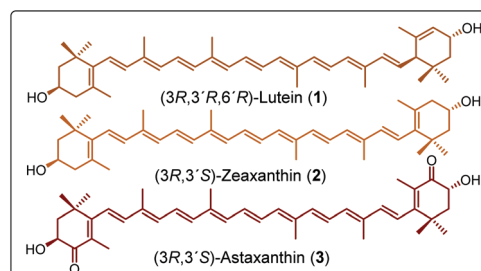


Fig. 1 Structure of carotenoids used in this work.



these reports is unknown. In the first report, astaxanthin was used as a bifunctional initiator in the ring-opening polymerization (ROP) synthesis of polylactides.¹⁵ In the second contribution, it was used as co-monomer to prepare bioactive polymers using different dicarboxylic acids; these compounds were targeted in order to develop new materials with antimicrobial properties for *in vivo* applications.¹⁸ Since xanthophylls such as **1**, **2**, and **3** are diols (Fig. 1), they can be good initiators for the production of polyesters such as poly(ϵ -caprolactone)s.¹⁹

In addition, carotenoids have never been used as chain extender agents in the synthesis of poly(ester-urethane)s (PEUs). In this work, we have used three natural xanthophylls, compounds **1**, **2**, and **3**, making the first successful use of xanthophylls as chain-extender agents to prepare segmented polyurethane films. The next two points justify this work: (a) the monomers (carotenoids) are from renewable resources and used in the preparation of a new family of segmented PEUs and (b) the comparison of PEUs derived from carotenoids with respect to PEUs derived from a conventional aliphatic diol. Additionally, the use of natural-based products (such as carotenoids) as building blocks as alternatives to petroleum-based resources is one important step towards more sustainable materials. These PEUs are new smart polymers, which could potentially possess antioxidants and photo-protector abilities.

Experimental section

Materials

All reagents, ϵ -caprolactone (CL), 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI), 1,8-octanediol (Oct), tin(II) 2-ethylhexanoate [Sn(Oct)₂], and the solvents 1,2-dichloroethane (DCE) and deuterated chloroform (CDCl₃) were purchased from Sigma Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) and used as received. Size-exclusion chromatography (SEC) solvents were purchased from Baker-Mallinckrodt (JT Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ, USA). (3*R*,3'*R*,6'*R*)-Lutein (**1**) was extracted from a Mexican marigold oleoresin (*Tagetes erecta* L.), while (3*R*,3'*S*)-zeaxanthin (**2**) was obtained through a base-catalyzed isomerization reaction of **1**. Compound **2** was further oxidized to produce (3*R*,3'*S*)-astaxanthin (**3**) (as we have described previously²⁰). Usually, xanthophylls are very expensive chemical compounds,²¹ and this is the reason for only a couple of reports in polymer chemistry that has been previously published.^{15,18}

Instruments

FT-IR spectra of the all xanthophylls, macrodiols, and PEUs films were recorded on a PerkinElmer Spectrum 100 FT-IR spectrophotometer with attenuated total reflectance spectroscopy (ATR) accessory. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded at room temperature on a 500 MHz Bruker Avance III HD instrument, using CDCl₃ as solvent. Chemical Shifts are reported as δ in parts per million (ppm) and referenced to the chemical shift of the residual solvent (¹³C at δ 77.16, and ¹H at δ 7.26, for CDCl₃). SEC was used to determine the number-

average molecular weight (M_n) and dispersity (D_M) of the synthesized macrodiols with a SEC 1260 Infinity Agilent Technologies. THF was the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹ at 37 °C using a column PLgel 5 μ m MIXED-D and coupled to a refractive index detector 1260 RID. The results are reported relative to polystyrene standards. The measurements of the matrix-assisted laser desorption and ionization of time of flight (MALDI-TOF) were recorded in the reflectron mode by using an AB SCIEX TOF/TOF 5800 SYSTEM equipped with a nitrogen laser emitting at 349 nm, an input bandwidth = 1000 MHz with a 3 ns pulse width, and working in positive mode. 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) was used as matrix in a concentration of 10 mg mL⁻¹ in THF as a solvent. Polymer samples (3 mg mL⁻¹) were dissolved in THF at room temperature, and then 10 μ L of sample solution was mixed with 10 μ L of matrix solution (50/50, vol/vol) and mixed in vortex. Different aliquots were placed on a stainless-steel plate, and the solvent was evaporated to make the film before start the acquisition. Thermograms were performed in a Differential Scanning Calorimetry (DSC) Q200 instrument. Three scans were obtained with two heating (0–100 °C, 100 to –30 °C, and –30 to 100 °C). The rate of heating/cooling was 10 °C min⁻¹ under a nitrogen purge. The melting points (T_m) are given as the minimum of the endothermic transition, and the data presented are taken from the second heating scan. Tensile measurements were performed with a Zwick/Roell model Z005 equipped with a 500 N load cell. The tensile test was performed at a test speed of 200 mm min⁻¹.

Synthesis of poly(ϵ -caprolactone) macrodiols (HOPCLOH)

Polymerization was performed in a previously dried 25 ml round-bottom flask. ϵ -Caprolactone (CL) (50 mmol, 5.707 g), ammonium heptamolybdate tetrahydrate (NH₄)₆[Mo₇O₂₄] \cdot 4H₂O (Hep, 2.42 \times 10⁻³ mmol, 3 mg), and 1,8-octanediol (Oct) (5 mmol, 590 mg) (CL/Oct = 10) were charged and heated to reflux by stirring them in an oil bath at 150 °C for 1 hour. Ammonium decamolybdate (NH₄)₈[Mo₁₀O₃₄] was obtained *in situ* in solid state by thermal decomposition of ammonium heptamolybdate.^{22–24} The macrodiols obtained and analysed were used without purification. Number-average molecular weight (M_n) and conversion were monitored by ¹H NMR (Fig. S1–S4†). M_n (theo) = 1280, M_n (NMR) = 1200, M_n (SEC) = 2220, D_M = 1.36 (Conv. = 99%). IR (cm⁻¹) 3440 (ν , OH), 2934 (ν_{as} , CH₂), 2861 (ν_s , CH₂), 1722 (ν , C=O), 1162 (ν , C–(C=O)–O), 732 (ρ , CH₂). NMR data for HOPCLOH. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, ppm): δ 4.06 (t, 2H, [CH₂O], PCL and Oct), 3.65 (t, 4H, [(CH₂OH)₂], PCL and Oct), 2.31 (t, 2H, (CH₂–CO–O), CL), 1.64 (m, 4H, [(CH₂)₂], PCL), 1.59 (q, 4H, [(CH₂)₂], Oct), 1.40 (q, 2H, [CH₂], CL), 1.33 (8H, [(CH₂)₄], Oct).

Synthesis of poly(ester-urethane)s (PEUs) derived from poly(ϵ -caprolactone) diol (HOPCLOH), 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI), and carotenoids **1**, **2**, and **3** as chain extenders

Synthesis of sixteen PEUs were carried out in a 25 mL round-bottom flask previously dried by using the prepolymer method (2 steps) [PEU: Oct(20), 1(20), 2(20), 3(20), Oct(15), 1(15), 2(15),



3(15), Oct(10), 1(10), 2(10), 3(10), Oct(5), 1(5), 2(5), and 3(5)]. An example of this process is briefly described here: first step (prepolymer)- α,ω -telechelic poly(ϵ -caprolactone) diol (HOPCLOH, $M_n(\text{NMR}) = 1200$) (1.058 g, 0.882 mmol), 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI) (232 mg, 1.368 mmol), tin(II) 2-ethylhexanoate (24 mg, two drops) as catalyst, and 8 mL of 1,2-dichloroethane (DCE) as solvent. The reaction mixture was heated in a reflux system with stirring at 80 °C for 1 hour. The second step (addition of chain extender) after prepolymerization, compound 3 (256 mg, 0.441 mmol) was added, and the mixture was stirred for a further 30 minutes at 80 °C. In addition, four PEUs: Oct(10)^b, 1(10)^b, 2(10)^b, and 3(10)^b (Table 2) were synthesized in a one-pot route.

Synthesis of poly(urethane-carotenoid) (hard segment)

These reactions were carried out in a 25 mL round-bottom flask previously dried. In a reaction example, xanthophyll 1 (0.5 mmol), 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI) (0.55 mmol), tin(II) 2-ethylhexanoate (12 mg, one drop) as catalyst, and 4 mL of 1,2-dichloroethane (DCE) as solvent were loaded and heated in a reflux system with stirring at 80 °C. The time of reaction was 3 hours and then the solvent was slowly evaporated in the fume hood. The material obtained was analyzed without purification.

Results and discussion

For the synthesis of the PEUs, four different macrodiols (HOPCLOH) derived from 1,8-octanediol (Oct) and CL, with degrees of polymerization (DP) equal to 5, 10, 15, and 20, were obtained by ROP using decamolybdate $[(\text{NH}_4)_8\text{Mo}_{10}\text{O}_{34}]$ as catalyst.^{22–24} The macrodiols were successfully obtained with excellent conversions (from 97 to 99%). The experimental

number-average molecular weight (M_n) values for these macrodiols (obtained by SEC) were between 1200 and 6600 g mol^{-1} (Table 1). NMR spectra of the macrodiols corroborated the terminal groups (Fig. S1–S4†).

Experimental values of M_n calculated from SEC are higher than M_n derived from NMR end-group analysis. Overestimation of M_n obtained by SEC for PCL is a common feature. The $M_n(\text{NMR})/M_n(\text{SEC})$ ratio exhibited values between 0.33 and 0.54 (Table 1, penultimate column). In previous contributions these values are similar.^{22–24} This effect is attributed to the differences in the hydrodynamic radius between polystyrene standards and the PCL samples.

The MALDI-TOF mass spectrum for α,ω -telechelic poly(ϵ -caprolactone) diol (HOPCLOH) [$M_n(\text{NMR}) = 645$] is shown in

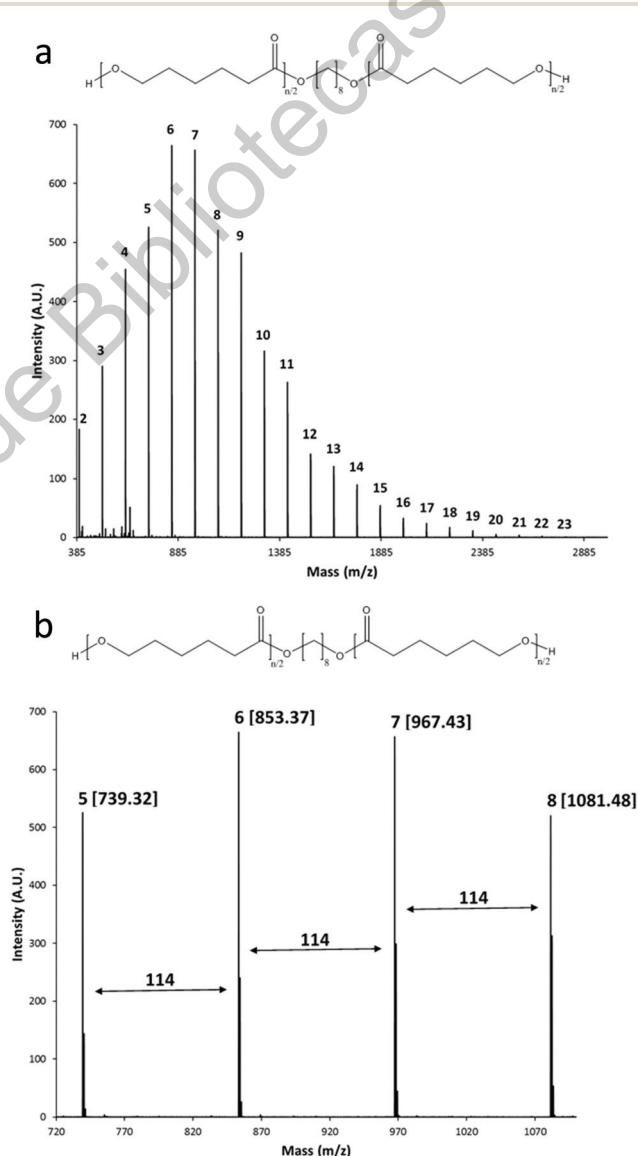


Fig. 2 (a) MALDI TOF mass spectrum of the HOPCLOH ($M_n(\text{NMR}) = 645$, Table 1, first line), the number indicates the degree of polymerization (DP) of each peak, and (b) expanded view for the 5–8 CL repeating units, in brackets the mass with sodium doped, 114 is the molecular weight of the CL monomer.

Table 1 Macrodiols (HOPCLOH) synthesis from 1,8-octanediol (Oct) and CL

$[\text{CL}]/[\text{I}]^a$	DP^b	M_n^b	M_n^c	M_n^d	$D_M^{d,e}$	Ratio^f	Conversion (%)
5	5.0	645	716	1240	1.36	0.52	99
10	9.9	1200	1280	2220	1.36	0.54	99
15	15.0	1670	1850	3680	1.35	0.45	99
20	19.4	2190	2420	6610	1.35	0.33	97

^a $[\text{CL}]/[\text{initiator}]$. ^b Determined by ^1H NMR in CDCl_3 . ^c Theoretical value. ^d Determined by size-exclusion chromatography (SEC) analysis. ^e D_M : dispersity. ^f $M_n(\text{NMR})/M_n(\text{SEC})$ ratio.



Fig. 2. The curve profile indicates a unimodal distribution (Fig. 2a), similar to that observed in the SEC chromatogram. In Fig. 2b, an expansion view illustrates the oligomers with 5–8 CL repeating units. All peaks are doped with sodium, and the mass is according to the chemical structure of the PCL macrodiol (HOPCLOH). Additionally, incorporation of the hydroxyl terminal groups was detected by NMR spectrum. Signals for macrocyclic species (CL)_n are not observed, which indicates that intramolecular transesterification reactions do not occur under these conditions. In Fig. 3, for the peak with DP = 5, a comparison between the experimental and simulated spectrum is illustrated, where both spectra showed a good agreement.

Later, the macrodiols (HOPCLOH) (with DP = 5, 10, 15 or 20) were reacted with HDI with a molar ratio 1 : 1.55 in the presence of tin(II) octoate [Sn(Oct)₂] as catalyst and 1,2-dichloroethane (DCE) as a solvent, for 1 hour at 80 °C to obtain a prepolymer. After this time, the chain extender (0.5 mmol of carotenoid 1, 2 or 3) was added (Scheme 1). The reaction was stirred for a period of time between 1.3 and 5 hours, and the reaction was stopped when the solution became viscous. Once

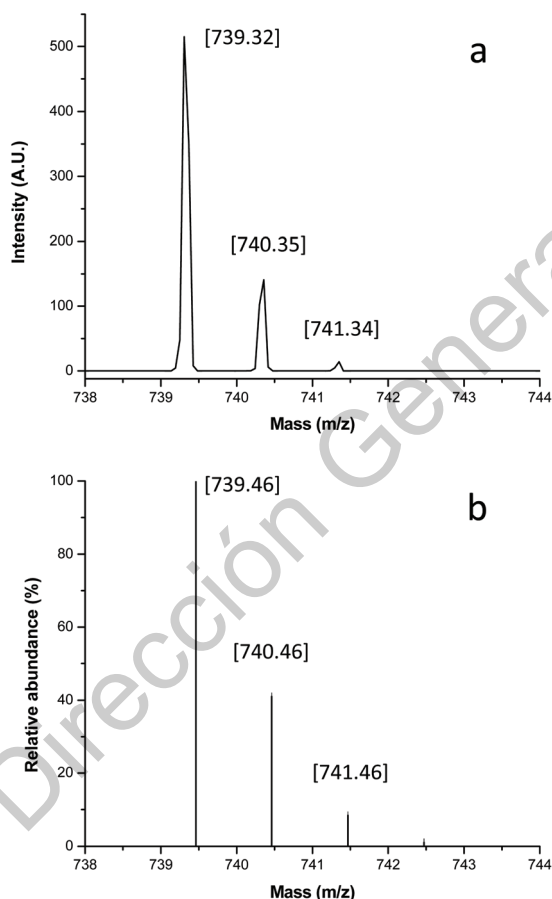
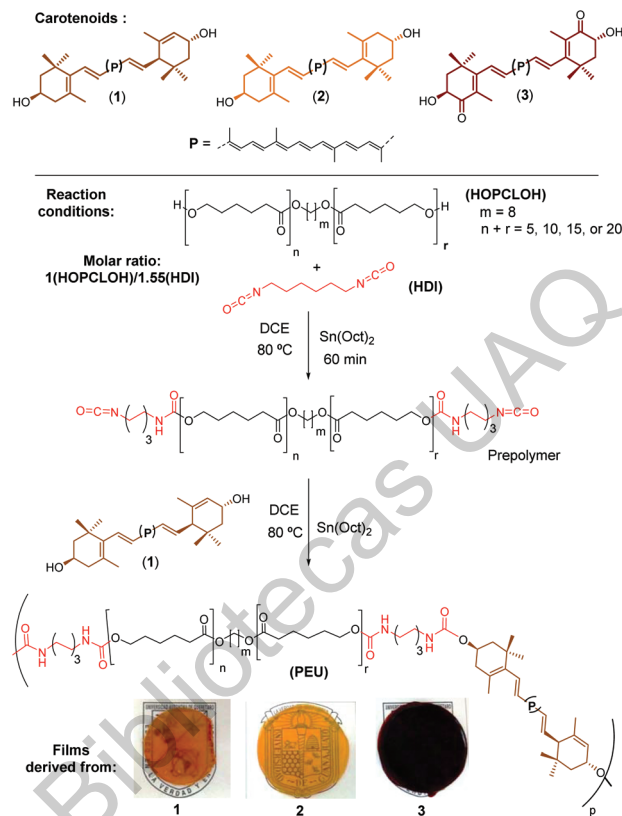


Fig. 3 MALDI-TOF mass spectrum view for the 738–744 *m/z* fragments of the HOPCLOH (Fig. 2b), degree of polymerization (DP) = 5 [OctPCL₅, HO(CH₂)₈O[CO(CH₂)₅O]₅H Na⁺], (a) experimental spectrum, and (b) isotopic distribution calculated for DP = 5 [C₃₈O₁₂H₆₈Na⁺, in <http://www.chemcalc.org>].²⁵ The mass with doped sodium is given in brackets.



Scheme 1 Synthesis of PEUs using 1, 2, and 3 as chain extenders (Table 2).

the reaction was finished, the solvent was slowly evaporated by casting into a glass mold with a PTFE surface at the bottom of the fume hood to form the respective films (Scheme 1).

For comparison, five PEUs were synthesized using Oct as chain extender and the same prepolymer derived from macrodiols with DPs of 5, 10, 15 or 20. Some PEU films were characterized using ¹H and ¹³C NMR spectra, while others could not be characterized, due to their very low solubility, even in hot DMSO.

Fig. 4 shows the ¹³C NMR spectra of compound 2 (Fig. 4a) and the PEU obtained from 2 and a macrodiol with DP = 20 (Fig. 4b). The assignment of different signals of the NMR spectrum was using 2D NMR spectra (ESI[†]). Signals at δ 124.9 to 138.5 in both spectra were assigned to vinylic carbon nuclei of the free zeaxanthin and the zeaxanthin moiety in the PEU. In the spectrum of PEU (Fig. 4b), the signals at 173.6 ppm, and 156.9 and 156.7 ppm correspond to ester and urethane carbonyl groups, respectively. The signal at δ 64.4 was assigned to the methylene bound to the sp³ oxygen of the ester group (–CO–O–CH₂–). Further, the signal at δ 40.8 corresponds to the methylene bound to the urethane group (–CH₂–NH–CO–O–), and the signal at δ 34.1 is ascribed to the methylene directly attached to the ester carbonyl group (–CH₂–CO–O–). In addition, some signals corresponding to the carotenoid moiety, such as those of the methyl groups at δ 12.8 and 12.7, and that of the oxygenated methine at δ 65.0 (C-j) were identified. In the same manner, the ¹H NMR spectrum confirmed the presence of the xanthophyll in the structure of the PEU (Fig. S13[†]).



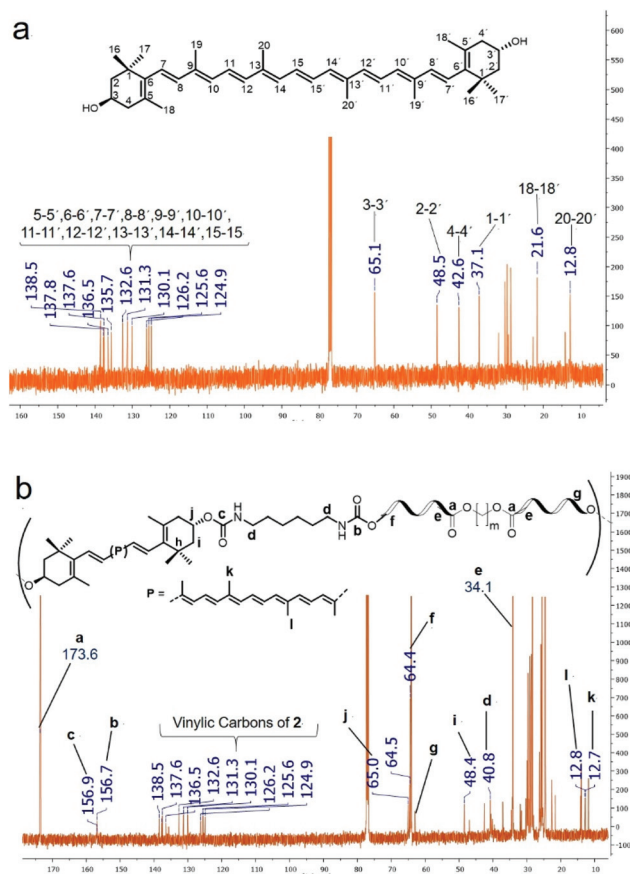


Fig. 4 (a) ^{13}C NMR spectrum of **2** in CDCl_3 and (b) ^{13}C NMR spectrum in CDCl_3 of PEU derived from **2**.

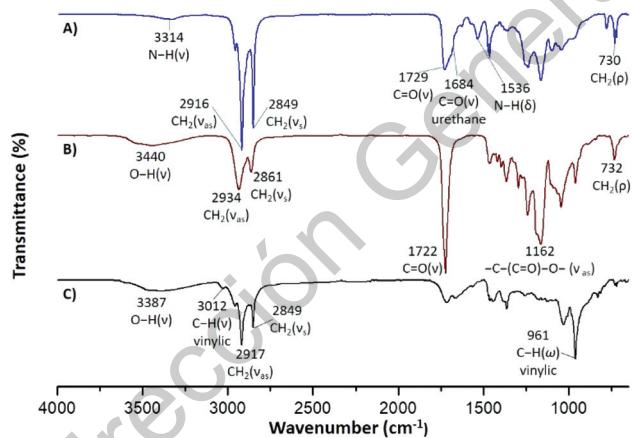


Fig. 5 FTIR spectra of (A) PEUs synthesized from a macrodiol with DP = 5 and **1** as chain extender, (B) macrodiol with DP = 5, and (C) compound **1**.

Likewise, FT-IR analysis provided useful information for the characterization of the carbonyl groups present in the synthesized macrodiols and PEUs. The ester carbonyl at 1729 cm^{-1} and the urethane carbonyl at 1684 cm^{-1} were observed in the PEU film derived from **1** and the macrodiol with DP = 5 [Fig. 5A]. Also, the bands at 3314 cm^{-1} and

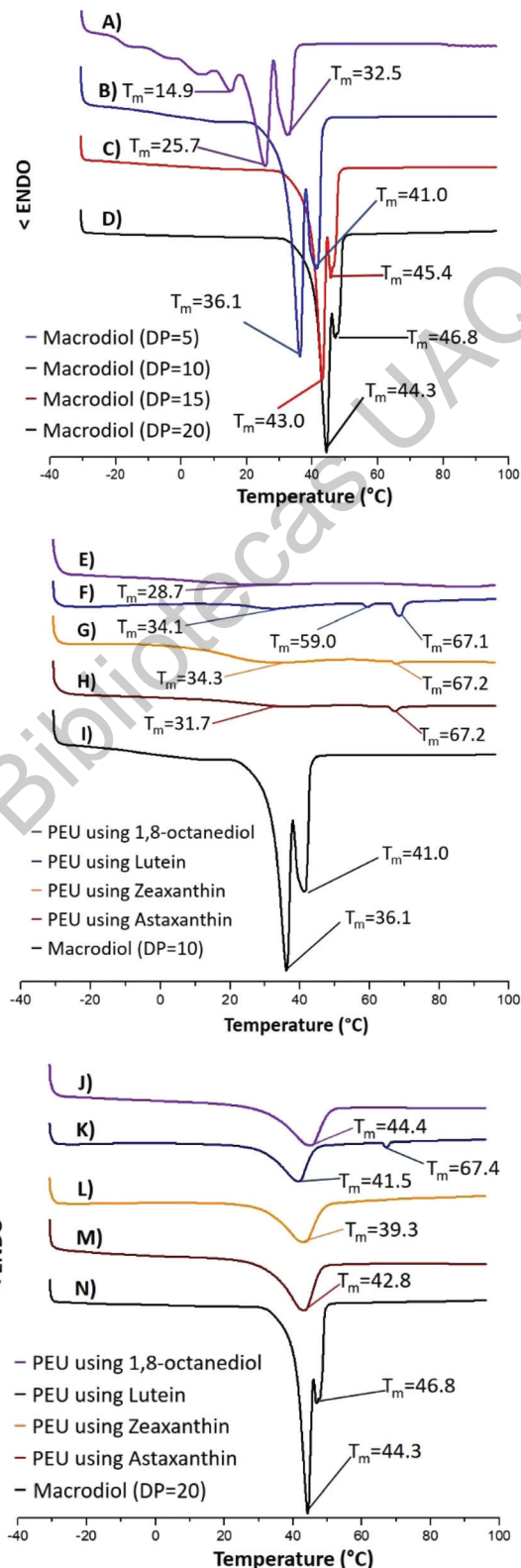


Fig. 6 DSC thermograms of the four different macrodiols (A–D), the PEUs derived from the macrodiol (DP = 10) with the different chain extenders (E–I), and the PEUs derived from the macrodiol (DP = 20) with the different chain extenders (J–N). Conditions: 10 °C min^{-1} (endo down); second heating cycle.



1536 cm^{-1} corroborated the N–H stretching and N–H scissoring modes of the urethane group, respectively. In the case of the poly(ϵ -caprolactone) diol (HOPCLOH) [Fig. 5B], a single band in the carbonyl stretching vibration region at 1722 cm^{-1} accounted for the ester group [–(C=O)–O–]. Regarding the xanthophyll **1** used as chain extender [Fig. 5C], a broad band at 3387 cm^{-1} was attributed to the hydroxyl groups and another thin band at 3012 cm^{-1} to the C–H stretching of the vinylic group.

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to analyze this series of PEUs and their respective macrodiols. Fig. 6 shows the DSC thermograms of the four different macrodiols and those of a comparative series of PEUs derived from two macrodiols (DP = 10 & 20) and the different chain extenders (**1**, **2**, **3**, and Oct). The melting temperatures (T_m) of the four HOPCLOHs were between 25.7 and 44.3 °C [Fig. 6A–D]. As can be seen, there is a clear increase in T_m as DP increases.

The melting points for the series of PEUs derived from the macrodiol with DP = 10, obtained in two steps with the different chain extenders, were observed between 28.7 and 34.3 °C (Fig. 5E–I) (Table 2). These results are very similar to those found for the series of PEUs derived from the macrodiol with DP = 10, which were obtained in a one-pot route (Fig. S18†). We did not observe a significant difference between the PEUs synthesized in two steps and those prepared *via* the one-pot route. The melting temperatures for the PEUs obtained using the three carotenoids as chain extenders were very similar (Fig. 5E–I).

The PEUs derived from Oct showed a lower T_m [Fig. 6E]. This series of PEUs (DP = 10) gave a similar second melting temperature (T_{m2}) between 67.1 and 67.2 °C, which is attributed to the hard segment (HS) (Fig. 6F–H). To confirm this

assumption, the so-called hard segments were independently synthesized using HDI and one of the three xanthophylls. As expected, the resulting three polymers showed a unique T_m at 65 °C (Fig. S23†).

All PEUs showed similar behavior in their T_m values within each series, except those derived from the macrodiol with DP = 5, which had no crystallinity in its soft segment (Table 2) (Fig. S19†). No T_{m2} was observed in any of the PEUs derived from Oct, in contrast to those from lutein with a T_{m2} near to 67 °C. This characteristic could be attributed to the major asymmetry in **1**, which has three stereocenters (3*R*,3'*R*,6'*R*) compared with the meso-structures found in xanthophylls **2** and **3**.

The melting points of the series of PEUs derived from the macrodiol with DP = 20 and the different chain-extendents were found between 39.3 and 44.4 °C (Fig. 6J–N). The T_m for the PEU prepared using Oct (Fig. 6J) was 44.4 °C, which is very similar to that of the macrodiol (44.3 °C) (Fig. 6N). The PEU prepared using **1** (Fig. 6K) had a melting point at 41.5 °C, and additional endothermic transitions were detected for this PEU at 67.4 °C, which were assigned to the hard segment melting temperature. On the other hand, the PEUs derived from the macrodiol with DP = 15 (Fig. S16†) showed similar T_m values to those of the PEU with DP = 20.

The effect of HOPCLOH on the crystallinity of the soft segment (SS) attributed to the PCL inside the PEUs was also studied. Fig. S24† shows the effects of the DP and the different chain extenders. All the PEUs showed a tendency towards increased crystallinity with increasing DP. Accordingly, the weight percent of the hard segment (wt% HS) had an important effect on the crystallinity of the PCL (Fig. S25†), thus,

Table 2 Reaction conditions, thermal properties, and mechanical properties of the synthesized poly(ester-urethane)s (PEUs)

PEU: obtained with (DP)	M_n HOPCLOH	Chain extender	HS (%)	Time ^a (Hours)	Soft segment		Hard segment		Stress at break (MPa)	Strain at break (%)	Modulus (MPa)
					T_m (°C)	ΔH_m (J g ⁻¹)	T_m (°C)	ΔH_m (J g ⁻¹)			
Oct(20)	2190	Oct	13.3	1.30	44.4	33.5	—	—	4.0 ± 0.9	2.9 ± 0.5	313.9 ± 23.8
1(20)	2190	1	20.4	2	41.5	29.2	67.4	0.5	3.6 ± 0.3	3.1 ± 0.4	284.5 ± 14.8
2(20)	2190	2	20.4	1.75	39.3	33.2	—	—	—	—	—
3(20)	2190	3	21.3	1.75	42.8	39.8	—	—	7.9 ± 0.2	22.8 ± 7.5	268.9 ± 7.9
Oct(15)	1670	Oct	16.7	1.25	43.4	22.7	—	—	3.4 ± 0.2	4.5 ± 1.1	180.6 ± 14.4
1(15)	1670	1	25.9	1.75	34.6	26.4	67.9	0.6	—	—	—
2(15)	1670	2	25.4	2	39.3	35.6	—	—	6.6 ± 0.2	16.9 ± 1.5	215.9 ± 7.2
3(15)	1670	3	25.8	2	36.8	31.1	—	—	6.1 ± 0.1	145.1 ± 56.6	133.0 ± 55.7
Oct(10)	1200	Oct	21.8	2	28.7	6.4	—	—	4.9 ± 0.4	59.8 ± 14.1	93.1 ± 6.5
1(10)	1200	1	31.6	5	34.1	4.6	67.1	4.4	4.9 ± 1.9	355.6 ± 155.8	37.2 ± 1.8
2(10)	1200	2	32.3	3.5	34.3	10.6	67.2	0.5	3.9 ± 0.4	355.1 ± 86.1	30.4 ± 3.4
3(10)	1200	3	34.3	1.50	31.7	3.7	67.2	1.0	2.2 ± 0.3	152.0 ± 14.2	6.1 ± 3.5
Oct(10) ^b	1200	Oct	22.9	1.75	23.9	4.4	—	—	—	—	—
1(10) ^b	1200	1	31.4	4	32.9	5.7	68.9	2.8	—	—	—
2(10) ^b	1200	2	31.8	3	26.8	8.5	67.5	0.2	—	—	—
3(10) ^b	1200	3	32.9	1.25	32.4	6.7	67.4	0.7	—	—	—
Oct(5)	645	Oct	34.9	1.25	—	—	—	—	12.7 ± 2.8	422.6 ± 106.7	199.4 ± 21.5
1(5)	645	1	46.1	1.75	—	—	67.0	5.5	4.6 ± 0.3	94.1 ± 11.5	93.6 ± 2.0
2(5)	645	2	46	2.50	—	—	66.8	2.8	3.0 ± 0.9	4.9 ± 1.2	155.6 ± 11.7
3(5)	645	3	46.5	1.50	—	—	—	—	6.9 ± 1.0	245.4 ± 71.6	51.7 ± 4.8

Oct = 1,8-octanediol; **1**, **2**, and **3** = xanthophylls. ^a Time of reaction. ^b Synthesized *via* a one-pot method.



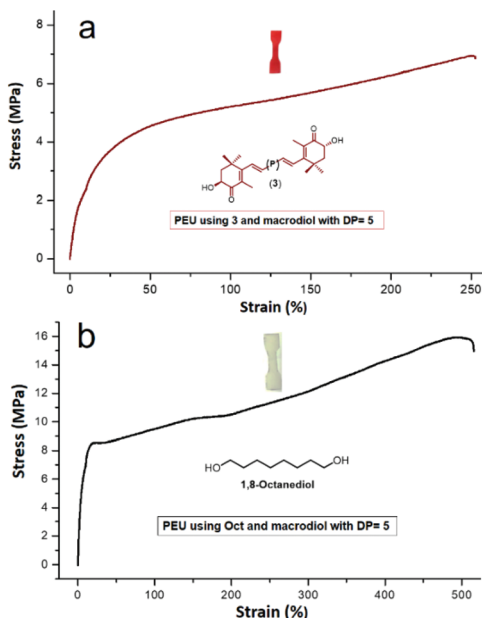


Fig. 7 Representative tensile data for PEUs derived from compound 3 (a) and those derived from 1,8-octanediol (Oct) (b).

when the HS was as high as 35% (\geq) the SS did not show a melting transition and entered into an amorphous domain.

The mechanical properties of the PEU films were also tested. In Table 2, the low values of stress and strain at break and relatively high modulus values indicate plastic behavior of the PEUs. Comparing two different PEU samples derived from 3 and Oct (Fig. 7), both samples exhibited a plastic profile, where the incorporation of 3 in the main chain of the PEU induces low stress and strain at break and modulus with respect to the Oct sample. In this sense, in the majority of the PEU samples the values of modulus for species derived from Oct are higher than those of carotenoids (1, 2, and 3) (Table 2, Fig. S38†). This result suggests that the olefinic chain of carotenoids sterically hinders the intermolecular hydrogen bonding of the urethane groups. Additionally, the dependency of the crystallinity (ΔH_m) of the soft segment (PCL) on the modulus of the PEUs had a negligible effect (Fig. S40†).

Experiments to determine other properties and potential applications of the PEUs formed in this work are underway in our laboratory and eventually will be published in a future contribution.

Conclusions

In summary, a new family of PEUs derived from carotenoids 1, 2, and 3 was successfully synthesized and characterized. The xanthophylls 1, 2, and 3 were found to be good chain-extender agents in the PEU synthesis and impart plastic behavior to their mechanical properties. It was shown that the carotenoids (1, 2, and 3) and hexamethylene diisocyanate (HDI) could generate their own microcrystalline domains, and some of the

PEUs exhibited double segregation of phases between the soft (PCL) and hard segments (1, 2, and 3/HDI), as detected by DSC. The xanthophylls 1, 2, and 3 represent an alternative use of natural products as precursors for PEUs with interesting structures and properties. More research into these novel PEUs is necessary to fully explore their potential uses as photoprotectors, and antioxidant materials that the intrinsic chemical properties of carotenoids may have given.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

E. R.-deL. thanks CONACYT for the doctoral fellowship and Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría-UAQ under Grant number FOPER-2019-00967, for the financial support. E. R.-deL. and J. E. B. are highly thankful to Gerardo Fonseca-Hernandez, CFATA-UNAM for his technical support in evaluating mechanical properties, to Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Fisicoquímicas y Estructura Molecular, the University of Guanajuato for the NMR spectra recording, and Patricia Cerda Hurtado (CIMAV-Unidad Monterrey) for the acquisition of the SEC chromatograms. J. E. B. thanks CONACYT Ciencia Básica for the grant "Proyecto SEP/284893" and DAIP CIIC 2019 (UG) "Proyecto 030/2019". J. E. B. thanks Kenneth J. Shea (University of California, Irvine) for his support in the acquisition of MALDI-TOF spectra.

Notes and references

- 1 T. J. Lamdrum, *Carotenoids Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties*, Taylor & Francis Group, Florida, 1st edn, 2001, pp. 3–4.
- 2 K. Jomova and M. Valko, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **70**, 102–110.
- 3 R. Álvarez, B. Vaz, H. Gronemeyer and A. R. de Lera, *Chem. Rev.*, 2014, **114**, 1–125.
- 4 S. M. Rivera, *J. Nat. Prod.*, 2016, **79**, 1473–1484.
- 5 M. H. Walter and D. Strack, *Nat. Prod. Rep.*, 2011, **28**, 663–692.
- 6 G. Britton, S. Liaaen-Jensen and H. Pfander, *Carotenoids volume 5: Nutrition and Health*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1st edn, 2009, pp. 7–8.
- 7 M. P. Horvath, E. George, Q. T. Tran, K. Baumgardner, G. Zharov, S. Lee, H. Sharifzadeh, T. Mattinson, B. Li and P. S. Bernstein, *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun.*, 2016, **72**, 609–618.
- 8 A. Kijlstra, Y. Tian, E. R. Kelly and T. T. J. M. Berendschot, *Prog. Retinal Eye Res.*, 2012, **31**, 303–315.
- 9 A. Alves-Rodrigues and A. Shao, *Toxicol. Lett.*, 2004, **150**, 57–83.



- 10 D. A. Frey, E. W. Kataisto, J. L. Ekmanis, S. O'Malley and S. F. Lockwood, *Org. Process Res. Dev.*, 2004, **8**, 796–801.
- 11 R. Fassett and J. S. Coombes, *Molecules*, 2012, **17**, 2030–2048.
- 12 F. Visioli and C. Artaria, *Food Funct.*, 2017, **8**, 39–63.
- 13 J. E. Báez, A. Marcos-Fernández, A. Martínez-Richa and P. Galindo-Iranzo, *Polym.-Plast. Technol. Eng.*, 2017, **56**, 889–898.
- 14 J. E. Báez, D. Ramirez, J. L. Valentín and A. Marcos-Fernández, *Macromolecules*, 2012, **45**, 6966–6980.
- 15 H. Middleton, S. Tempelaar, D. M. Haddleton and A. Dove, *Polym. Chem.*, 2011, **2**, 595–600.
- 16 H. Tang, C. J. Murphy, B. Zhang, Y. Zheng, E. A. Vankirk and M. Radosz, *Biomaterials*, 2010, **31**, 7139–7149.
- 17 N. Shpaisman, N. Sheihet, J. Bushman, J. Winters and J. Khon, *Biomacromolecules*, 2012, **13**, 2279–2286.
- 18 S. Weintraub, T. Shpigel, L. G. Harris, R. Shuster, E. C. Lewis and D. Y. Lewitus, *Polym. Chem.*, 2017, **8**, 4182–4189.
- 19 This work is currently in progress and shows that the ROP of lactide using xanthophylls as initiators provides, through a similar process as the one described by Middleton and coworkers,¹⁵ astaxanthin-containing poly(lactide)s.
- 20 E. Rodríguez-deLeón, J. E. Báez, J. O. C. Jiménez-Halla and M. M. Bah, *Molecules*, 2019, **24**(7), 1–13.
- 21 Sigma-Aldrich is now Merck, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/phr1699?lang=en®ion=GB>, (accessed November 2019).
- 22 J. E. Báez, A. Marcos-Fernández and A. Martínez-Richa, *Macromolecules*, 2005, **38**, 1599–1608.
- 23 J. E. Báez, M. Martínez-Rosales and A. Martínez-Richa, *Polymer*, 2003, **44**, 6767–6772.
- 24 J. E. Báez, A. Marcos-Fernández, R. Lebrón-Aguilar and A. Martínez-Richa, *Polymer*, 2006, **47**, 8420–8429.
- 25 L. Patiny and A. Borel, *J. Chem. Inf. Model.*, 2013, **53**, 1223–1228.

