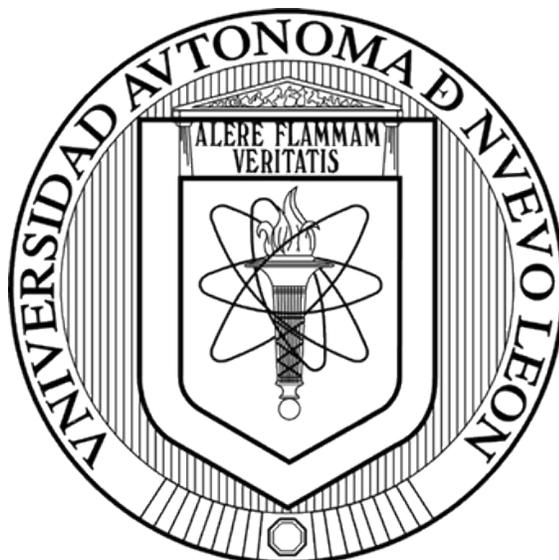


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SERIE DE α -
AMINOFOSFONATOS Y UNA SERIE DE ÁCIDOS α -AMINOFOSFÍNICOS Y
EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

POR

I.Q. ANTHONNY CORDERO DÍAZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

JULIO, 2018

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SERIE DE α -
AMINOFOSFONATOS Y UNA SERIE DE ÁCIDOS α -AMINOFOSFÍNICOS Y
EVALUACIÓN *IN VITRO* DE SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

Aprobación de tesis:

Dra. Susana Thelma López Cortina
Asesor de Tesis

Dra. Elizabeth Orozco Beltrán
Comité tutorial

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Comité tutorial

Dra. Ma. Del Rosario González González
Comité tutorial

RESUMEN

Nombre: Anthony Cordero Díaz

Fecha de Graduación: julio 2018

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Facultad de Ciencias Químicas.

Título del Estudio: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UNA SERIE DE α -AMINOFOSFONATOS Y UNA SERIE DE ÁCIDOS α -AMINOFOSFÍNICOS Y EVALUACION *IN VITRO* DE SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Número de páginas: 112

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en farmacia.

Área de estudio: Síntesis de moléculas con actividad biológica.

Propósito y método de estudio: La multiresistencia ante fármacos antifúngicos ya comercializados de *Lomentospora prolificans* (*L. Prolificans*) y algunas cepas de *Candida*, su carácter patogénico en los seres humanos y su capacidad invasiva en tejidos humanos que puede terminar en la muerte del hospedero hace necesaria la búsqueda de alternativas farmacológicas para el tratamiento de este tipo de enfermedades. Los ácidos α -aminofosfínicos y los α -aminofosfonatos representan un área de oportunidad importante para la obtención de compuestos con actividad antifúngica. Por lo que el objetivo del presente proyecto fue la síntesis de una nueva serie de α -aminofosfonatos y una nueva serie de ácidos α -aminofosfínicos y la evaluación *in vitro* de su actividad antifúngica. Para ello se llevó a cabo la reacción "one pot" de Kabanich-Fields en el que se hizo reaccionar: 4-etilaminobenzoato, difenilfosfita

y un aldehído. La obtención de los ácidos α -aminofosfínicos se hizo a través de la hidrólisis básica del fosfonoéster de los α -aminofosfonatos con carbonato de potasio. La purificación se realizó por filtración al vacío, recristalización y cromatografía en columna. Se caracterizaron por Resonancia Magnética de protón, carbono 13 y fósforo 31, Espectrometría de Masas y Alta resolución. Se evaluó su actividad antifúngica contra 8 cepas de *Candida* por la técnica de difusión en agar y contra 9 cepas de *L. prolificans* por el método de macrodilución del protocolo m38-a2 del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés), a una concentración de 256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 72 horas.

Contribuciones y Conclusiones: Se lograron sintetizar, purificar y caracterizar una serie de α -aminofosfonatos y una serie ácidos α -aminofosfínicos, Los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{31}P , permitieron corroborar la presencia del compuesto de interés gracias a las señales características de cada compuesto. Se realizó la evaluación antifúngica de los compuestos, resultando en dos compuestos (23h y 24h) con actividad contra *Lomentospora prolificans*.

AGRADECIMIENTOS

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo | página |
|--|--------|
| TABLA DE CONTENIDO | vi |
| LISTA DE TABLAS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE ESQUEMAS | xii |
| Nomenclatura | xiii |
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Problemática global de infecciones causadas por hongos y levaduras. | 1 |
| 1.1.1 Estadística a nivel mundial. | 2 |
| 1.1.2 Estadística en México. | 3 |
| 1.2 Género <i>Candida</i>. | 5 |
| a) Candidiasis. | 5 |
| Tipos de candidiasis. | 5 |
| i. Candidiasis profunda localizada. | 5 |
| ii. Candidiasis diseminada (CD). | 6 |
|) Epidemiología de <i>Candida</i>. | 6 |
| c) Tratamiento | 6 |
| 1.3 <i>Lomentospora prolificans</i>. | 8 |
| a) Scedosporiosis | 9 |
| i. Infección oportunista. | 9 |
| ii. Infección no oportunista. | 9 |
| d) Multirresistencia de <i>L. prolificans</i>. | 10 |
| 1.4 α-aminofosfonatos y ácidos α-aminofosfinícos. | 11 |
| 1.4.1 Síntesis de α-aminofosfonatos y ácidos α-aminofosfinícos. | 11 |
| CAPÍTULO 2 | 14 |
| ANTECEDENTES | 14 |
| 2.1 Síntesis y actividad biológica de α-aminofosfonatos | 14 |

| | |
|--|----|
| 2.2 Actividad antifúngica de los α -aminofosfonatos | 15 |
| 2.3 Síntesis de α -aminofosfonatos a temperatura ambiente. | 19 |
| 2.3 Síntesis mediante irradiación por microondas | 21 |
| 2.3. Síntesis de ácidos fosfínicos..... | 21 |
| 2.4. Análisis crítico de la literatura. | 23 |
| Capítulo 3..... | 25 |
| 3.1 Justificación | 25 |
| 3.2. Hipótesis | 25 |
| 3.3. Objetivo general..... | 25 |
| 3.4. Objetivos específicos..... | 25 |
| CAPÍTULO 4..... | 27 |
| METODOLOGÍA EXPERIMENTAL..... | 27 |
| Información general..... | 27 |
| Reactivos, material y equipo..... | 27 |
| Forma de manejo y disposición de los residuos generados. | 28 |
| 4.1 Síntesis de los α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos..... | 29 |
| 4.1.1. Síntesis a temperatura ambiente de la serie 1 de α -aminofosfonatos. | 30 |
| 4.1.2. Síntesis vía microondas de la serie 2 de ácidos α -aminofosfínicos. | 30 |
| 4.2. Purificación de los compuestos. | 31 |
| 4.2.1 Purificación de los α -aminofosfonatos, serie 1..... | 32 |
| 4.2.2 Purificación de los ácidos α -aminofosfínicos, serie 2..... | 32 |
| 4.3. Caracterización de los α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos. | 32 |
| 4.4. Pruebas biológicas en <i>Candida</i> y <i>Lomentospora prolificans</i> | 32 |
| 4.4.1 Método de difusión en placa por antibiograma..... | 34 |
| a) Preparación de las diluciones de compuestos a evaluar. | 34 |
| b) Ajuste del inóculo. | 34 |
| c) Inoculación de las placas, aplicación de los discos impregnados e incubación..... | 34 |
| 4.4.2 Método de difusión en agar. | 35 |
| a) Preparación de las diluciones de compuestos a evaluar. | 35 |
| b) Ajuste del inóculo. | 35 |

| | |
|--|-----------|
| c) Inoculación del medio de cultivo, depósito de compuestos en pocillos e incubación..... | 36 |
| 4.4.3 Método de macrodilución del protocolo m38-a2 (CLSI)..... | 37 |
| a) Preparación de las diluciones de compuestos a evaluar. | 37 |
| b) Ajuste del inóculo. | 37 |
| c) Inoculación del medio de cultivo, dosificación de los compuestos e incubación..... | 37 |
| CAPÍTULO 5..... | 39 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 39 |
| A. Síntesis Orgánica..... | 39 |
| 5.1. Síntesis de los α -aminofosfonatos de la serie 1. | 39 |
| 5.1.1 Mecanismo de la reacción de Kabachnik-Fields y su posible relación con los tiempos de reacción observados..... | 41 |
| 5.1.2. Tiempo de reacción del compuesto 23a. | 42 |
| 5.1.3 Tiempo de reacción del compuesto 23h..... | 44 |
| 5.2. Purificación de los α -aminofosfonatos de la serie 1. | 44 |
| 5.3. Elucidación estructural de los α -aminofosfonatos de la serie 1. | 48 |
| 5.4. Síntesis de los ácidos α -aminofosfínicos de la serie 2. | 54 |
| 5.5. Purificación de los ácidos α -aminofosfínicos de la serie 2..... | 55 |
| 5.6. Elucidación estructural de los ácidos α -aminofosfínicos de la serie 2. | 57 |
| B. Ensayos antifúngicos..... | 63 |
| 5.7 Método de difusión en placa..... | 63 |
| 5.9 Resultados del método de macrodilución del protocolo m38-a2 (CLSI). | 64 |
| CAPÍTULO 6..... | 71 |
| CONCLUSIONES | 71 |
| PRESPPECTIVAS | 73 |
| ANEXOS..... | 74 |
| Experimentos previos a la estandarización del proceso de síntesis de la serie de α -aminofosfonatos. | 74 |
| Experimentos para demostrar impedimento estérico | 75 |
| Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P | 78 |
| Bibliografía | 95 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Estadística de Micosis invasivas oportunistas a nivel mundial. ³ | 2 |
| Tabla 2. Rangos de fluconazol (MIC) contra aislados de especies de <i>Cándida</i> y porcentaje de aislados resistentes..... | 8 |
| Tabla 3. Rendimientos obtenidos con los diferentes sustituyentes de aldehídos por Subba-Reddy y colaboradores. | 15 |
| Tabla 4. Sustituyentes, tiempos de reacción y rendimiento de las reacciones llevadas a cabo por Aungo Ying y colaboradores..... | 20 |
| Tabla 5. Residuos generados durante el proyecto..... | 29 |
| Tabla 6. Cepas del género <i>Candida</i> usadas para evaluar actividad antifúngica de los compuestos sintetizados. | 33 |
| Tabla 7. <i>Cepas de Lomentospora prolificans</i> usadas en el proyecto..... | 33 |
| Tabla 8. Reactivos usados para la síntesis de la serie 1. | 39 |
| Tabla 9. Tiempos de reacción para la serie 1. | 41 |
| Tabla 10. Cantidades y rendimientos obtenidos en la síntesis de la serie 1..... | 47 |
| Tabla 11. Resumen de las señales de RMN de ¹ H, ¹³ C, ³¹ P observadas para los α-aminofosfonatos de la serie 1. | 52 |
| Tabla 12. Cantidad de reactivos usados para la síntesis de la serie 2. | 54 |
| Tabla 13. Cantidades y rendimientos obtenidos de la síntesis de la serie 2..... | 56 |
| Tabla 14. Señales de los compuestos de la serie 2..... | 61 |
| Tabla 15. Actividad de los compuestos 23h y 24a contra las diferentes cepas de <i>L. prolificans</i> | 70 |
| Tabla 16. Tiempos de agitación manual para la obtención de α-aminofosfonatos | 75 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Micosis invasivas oportunistas diagnosticadas durante el periodo 1993-2013. ¹⁰ | 4 |
| Figura 2. Especies del género Candida encontradas en el estudio, causantes de Candidosis. ¹⁰ | 4 |
| Figura 3. Ejemplos de estructuras de fármacos antifúngicos usados en tratamiento tópico: a) miconazol (imidazólico), b) fluconazol (triazólico). | 7 |
| Figura 4. Anfotericina b..... | 7 |
| Figura 5. Derivados de fosfonatos estudiados por Ouimette D.G. | 16 |
| <i>Figura 6. Molécula con mayor actividad antifúngica, sintetizada por Yang Song y colaboradores.</i> | 18 |
| Figura 7. Molécula con mayor actividad antifúngica contra Microsporium canis.19 | |
| Figura 8. Proceso general de síntesis de los compuestos de la serie 1. | 40 |
| Figura 9. Placa cromatográfica en la que se observan: α) compuesto 23a puro, l) Imina que muestra dos manchas parecidas a las materias primas, pero que por Resonancia Magnética Nuclear se confirma que es un solo compuesto, 4-CI) 4-clorobenzaldehído, 4-E) 4-etilaminobenzoato, F) difenilfosfita..... | 43 |
| Figura 10. Proceso de purificación de los compuestos de la serie 1. | 44 |
| Figura 11. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSOd) del compuesto 23a. | 48 |
| Figura 12. Espectro de RMN de ¹³ C (400 MHz, DMSOd) del compuesto 23a.. | 50 |
| Figura 13. Espectro de RMN ³¹ P acoplado (a) y desacoplado (b) (400 MHz, DMSOd) de 23a..... | 51 |
| Figura 14. Placa cromatográfica en sistema 7:3 Metanol/ Acetato de etilo, en el que se observa: A) ácido α-aminofosfínico puro, α) α-aminofosfonato R) crudo de reacción | 56 |
| Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz MeOD) del compuesto 24b..... | 57 |
| Figura 16. Espectro de RMN ¹³ C (400 MHz MeOD) del compuesto 24b. | 59 |
| Figura 17. Espectro de ³¹ P (400 MHz MeOD) desacoplado (a) y acoplado (b) con protón del compuesto 24b..... | 60 |
| Figura 18. Resultados obtenidos de la evaluación de la actividad de compuestos en difusión en disco por pocillo contra diferentes cepas de Cándida, al centro fluconazol, en la circunferencias los compuesto evaluados..... | 64 |
| Figura 19. Resultados de ensayos contra levaduras por macrodilución: a) y b) Control negativo con fluconazol, c) y d) control positivo con vehículo (DMSO al 10% y 30 μL de Tween 80), e) y f) control positivo con solución salina al 0.85% g) y h): compuesto evaluado..... | 66 |
| Figura 20. Efecto del compuesto 23h comprado al control positivo (solución salina) (SS). | 67 |
| Figura 21. Efecto del compuesto 23h comparado al control negativo Fluconazol (FLU), contra cepas 05-835, 05-2409 y 12-261. | 68 |

Figura 22. Efecto del compuesto 24a comparado al control negativo Fluconazol (FLU), contra la cepa 12-261. 68

Figura 23. Comparación de actividad entre: a) Fluconazol y b) compuesto 23h. 69

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|--|-----------|
| Esquema 1. Reacción reportada por K. Venkata Ramana y colaboradores | 13 |
| Esquema 2. Reacción reportada por Subba-Reddy y colaboradores. | 14 |
| Esquema 3. Reacción general con los diferentes sustituyentes, llevada por Yingshu Xu y Colaboradores. | 17 |
| Esquema 4. Reacción general con los diferentes sustituyentes, llevada por Yang Song y colaboradores..... | 18 |
| Esquema 5. Reacción general realizada por Zahra Rezaei y colaboradores. .. | 19 |
| Esquema 6. Reacción general realizada por Aungo Ying y colaboradores | 20 |
| Esquema 7. Reacción llevada a cabo por Mahdi Mirzaei con el uso de un solvente iónico. | 21 |
| Esquema 8. Reacción reportada por Kumari y colaboradores..... | 21 |
| <i>Esquema 9. Diferentes condiciones de reacción para obtención de ácidos fosfínicos.....</i> | <i>22</i> |
| Esquema 10. Reacción general para obtención de los α -aminofosfonatos de la serie 1. | 30 |
| Esquema 11. Reacción general para obtención de los ácidos α -aminofosfínicos de la serie 2. | 31 |
| Esquema 12. Mecanismo de reacción de Kabachnik-Fields..... | 42 |

Nomenclatura

| | |
|-----------------------|--|
| °C | Grados Celsius. |
| <i>C.</i> | <i>Candida.</i> |
| CCF | Cromatografía en capa fina. |
| CLSI | Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio. |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH | 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo. |
| <i>L. prolificans</i> | <i>Lomentospora prolificans.</i> |
| min | Minutos. |
| MIO | Micosis invasivas oportunistas. |
| mL | Mililitros. |
| mM | milimolar. |
| NBT | Nitroazul de tetrazolio. |
| nm | Nanómetros. |
| OMS | Organización Mundial de la Salud. |
| R.f. | Constante del factor de retención. |
| RMN ¹ H | Resonancia Magnética Nuclear de protón. |
| SFHEA | ácido sulfónico funcionalizado con hidroxietilamina. |
| SS | Solución salina. |
| TMSOK | Trimetilsilanoato de potasio |
| TMV | Virus del mosaico de Tabaco. |
| µg | Microgramos. |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática global de infecciones causadas por hongos y levaduras.

Las enfermedades infecciosas son actualmente una de las principales causas de muerte en todo el mundo¹, estas son causadas por microorganismos patógenos del ser humano como las bacterias, los virus, los parásitos y los hongos² (tanto levaduras como hongos filamentosos). De los agentes infecciosos que prevalecen hasta nuestros días, las infecciones causadas por hongos, mejor conocidas como micosis, toman especial importancia ya que se estima que son causantes de más de mil millones de enfermedades de manera anual, con efectos que van desde simples problemas cutáneos a infecciones de carácter invasivo en los que se la vida del hospedero se ve comprometida. A pesar de que las infecciones de piel y uñas superficiales se mantienen como las micosis más comunes, la relevancia de Micosis Invasivas Oportunistas (MIO), se ha incrementado de manera drástica las últimas décadas, esto se debe al incremento de casos clínicos causados por el crecimiento de la población susceptible a contraer infecciones, (principalmente los individuos inmunosuprimidos), y, todavía más importante, a las altas tasas de mortalidad asociadas a las MIO (Tabla 1).^{3,4,5}

La mayoría de los agentes etiológicos causantes de micosis pertenecen a pocas especies de hongos como los del género *Candida* y *Aspergillus*, desafortunadamente se han encontrado la presencia en nosocomios de otros hongos patógenos, como *Lomentospora prolificans* (*L.prolificans*). A pesar de la baja prevalencia de este último, es reconocido como un patógeno emergente que representa una preocupación importante para los médicos, debido a su tendencia de desarrollar infecciones invasivas en hospederos inmunocomprometidos y a su multiresistencia intrínseca a drogas antifúngicas.⁶

1.1.1 Estadística a nivel mundial.

Es de particular importancia la alta tasa de mortalidad asociada con las MIO, que muchas veces excede del 50% a pesar de la disponibilidad de diversos fármacos antifúngicos (Tabla 1).³

Como se puede apreciar en la tabla 1, son varias las especies que son responsables de estas infecciones invasivas, las cuales son responsables de más de 1.5 millones de muertes anualmente alrededor del mundo, y de echo las muertes debidas a las MIO superan a las reportadas por tuberculosis⁷ o malaria⁸.

Dentro de las MIO, las ocasionadas por el género *Candida* son de especial importancia ya que como se puede observar en la tabla 1, existen más de 400,000 mil casos de infecciones invasivas anualmente causadas por el género mencionado con una tasa mortalidad que va del 46%-75%.³

Tabla 1. Estadística de Micosis invasivas oportunistas a nivel mundial.³

| Enfermedad (Especie más común) | Población estimada con MIO al año | Tasa de mortalidad (% en Población infectada) |
|--|--|--|
| Aspergillosis (<i>Aspergillus fumigatus</i>) | >200,000 | 30-95 |
| Candidiasis (<i>Candida albicans</i>) | >400,000 | 46-75 |
| Cryptococcosis (<i>Cryptococcus neoformans</i>) | >1,000,000 | 20-70 |
| Mucormycosis (<i>Rhizopus oryzae</i>) | >10,000 | 30-90 |
| Pneumocystis (<i>Pneumocystis jirovecii</i>) | >400,000 | 20-80 |

Como se mencionó anteriormente *L. prolificans* se ha identificado recientemente como un hongo patógeno emergente, por lo que la población que sufre este tipo de MIO es relativamente pequeña, sin embargo la tasa de mortalidad es elevada como lo reportado por Rodríguez y colaboradores⁹ de la epidemiología y mortalidad de *L. prolificans* en 162 pacientes en este reporte se encontró que los factores de riesgo más importantes fueron tumores malignos (45.7%), fibrosis quística (11.72%) y trasplante de órganos (8.6%), los diagnósticos clínicos fueron infección diseminada (44.4%), micosis pulmonar (29%) e infecciones sobre huesos y articulaciones (10.4%). La mortalidad general fue de 46.9% pero la tasa de mortalidad para la enfermedad diseminada fue de 87.5% a pesar del tratamiento antifúngico que se le dio a los pacientes.

1.1.2 Estadística en México.

En el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI se realizó un estudio de la frecuencia de las principales micosis invasivas oportunistas (MIO) en un periodo que va entre enero de 1993 y diciembre de 2013.

Durante este periodo se diagnosticaron 472 MIO (figura 1), las más frecuentes fueron: candidosis, mucormicosis, criptococosis y aspergilosis.¹⁰

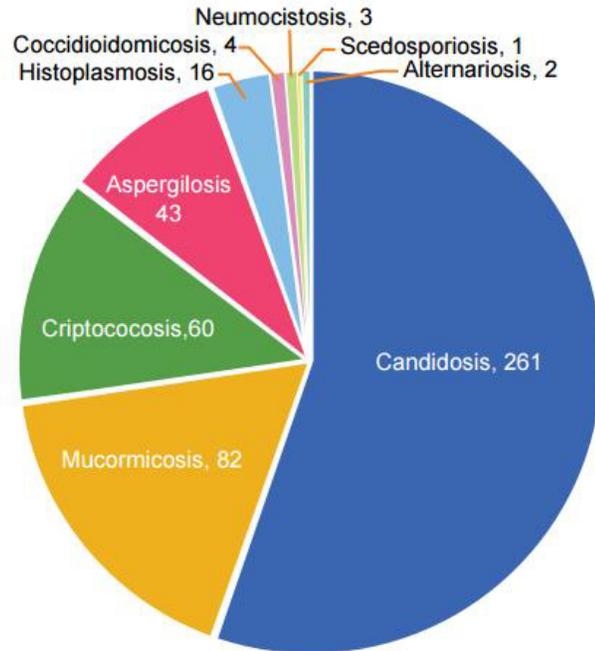


Figura 1. Micosis invasivas oportunistas diagnosticadas durante el periodo 1993-2013.¹⁰

Dentro de las MI causadas por el género *Candida* las especies que con mayor frecuencia se encontraron fueron: *Candida albicans* (*C. albicans*), *C. tropicalis* y *C. glabrata*. (Figura 2).

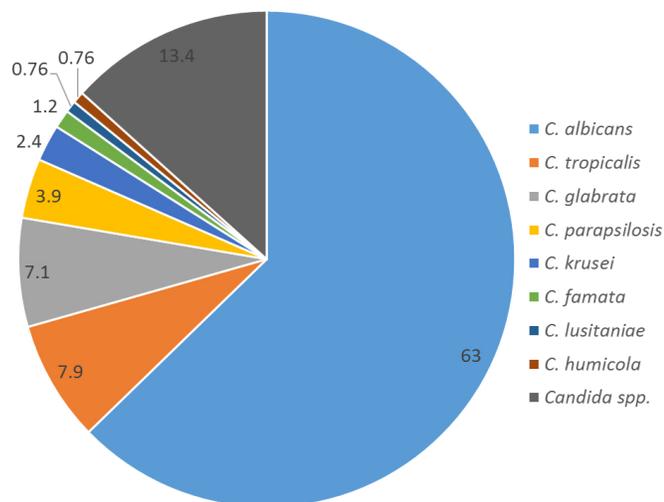


Figura 2. Especies del género *Candida* encontradas en el estudio, causantes de Candidosis.¹⁰

Son pocos los casos reportados en México sobre *L. prolificans*, sin embargo un reporte de Elizondo Zertuche y colaboradores¹¹ reportan que de 11 pacientes mexicanos solo uno sobrevivió por lo que la tasa de mortalidad fue de 91%.

Debido a la importancia mundial de las MIO causadas por el género *Candida* y a la importancia de *L. prolificans* como hongo patógeno emergente se considera importante tener información más detallada de ambos agentes patógenos: enfermedades que producen, epidemiología, tratamiento farmacológico y multiresistencia, temas que se abordaran en los apartados 1.2 (género *Candida*) y 1.3 (*L. prolificans*).

1.2 Género *Candida*.

Constituye un grupo de especies de levaduras que con frecuencia ocasionan micosis en el ser humano, siendo la especie *C. albicans* la de mayor importancia clínica, la enfermedad que causa es conocida como candidiasis.¹³

a) Candidiasis.

Es una infección primaria o secundaria, con manifestaciones clínicas extremadamente variables de evolución aguda, subaguda, crónica o episódica, en las cuales el hongo puede causar lesiones cutáneas, mucocutáneas e invasivas, siendo estas últimas las más peligrosas causando la muerte del hospedero.¹⁴

Tipos de candidiasis.

i. Candidiasis profunda localizada.

La infección invasora focal se produce en muchos casos por siembra hematológica. El compromiso visceral afecta a un único órgano citándose como los más frecuentes: pulmones, riñones, sistema nervioso, ojos, endocardio. En todos estos casos es necesario demostrar la presencia del hongo en los tejidos comprometidos, a través de estudios histopatológicos.¹⁵

ii. **Candidiasis diseminada (CD).**

Infección con múltiple localización visceral, demostrable por biopsia o autopsia o localización visceral de un único órgano asociado con Candidemia persistente. Está habitualmente acompañado por una respuesta inmunológica del huésped (si es inmunocompetente) y asociada a un factor predisponente.¹⁵

b) Epidemiología de *Candida*.

Es una infección cosmopolita. Se considera una de las infecciones oportunistas más frecuente en seres humanos. Su incidencia ha aumentado considerablemente en los últimos 20 años. Las levaduras son causantes del 7.45% de las micosis, el 25% de las micosis superficiales y entre 75% y 88% de las infecciones fúngicas nosocomiales. Afecta a individuos de cualquier edad, sexo o grupo étnico.¹⁶

Los hongos del género *Candida* son habitantes habituales en boca, sistema gastrointestinal, piel y vagina, por lo que se consideran agentes infecciosos endógenos específicos. Son poco virulentos, no son transmisibles y solo producen infección de la mucosa en presencia de una predisposición local o general manifiesta o ambas, de ahí que sean considerados hongos oportunistas.^{17,18}

c) Tratamiento

El tratamiento se hace con antifúngicos específicos de uso tópico y/o sistémico, dependiendo de la gravedad de la micosis ocasionada.

Cuando la infección se da de manera tópica se hace uso de los siguientes antimicóticos en su formulación tópica:¹⁶

- Derivados imidazólicos: miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol (figura 3).
- Derivados triazólicos: fluconazol, itraconazol (figura 3).

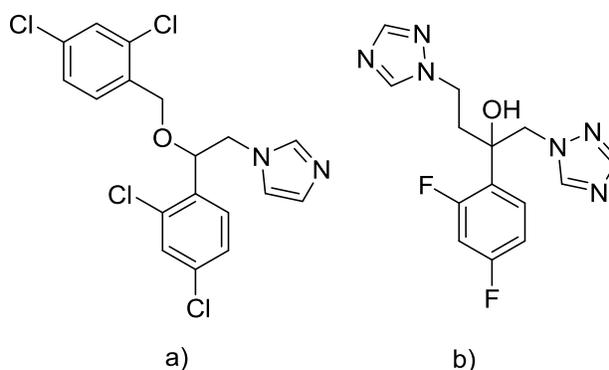


Figura 3. Ejemplos de estructuras de fármacos antifúngicos usados en tratamiento tópico: a) miconazol (imidazólico), b) fluconazol (triazólico).

Cuando la micosis se da de manera invasiva se hace uso de los antifúngicos antes mencionados en su versión oral y en casos extremos se hace uso de anfotericina b (figura 4).

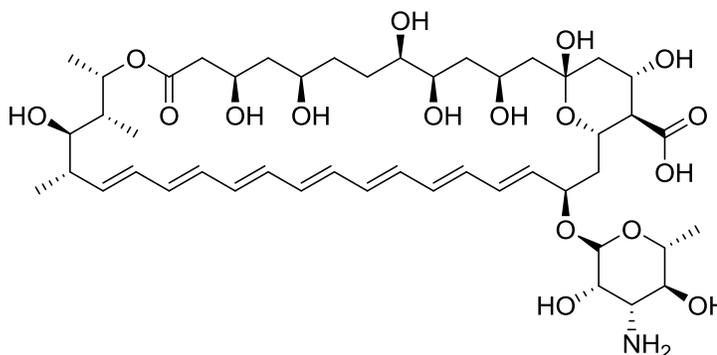


Figura 4. Anfotericina b

Es importante señalar, que los antimicóticos antes mencionados presentan efectos adversos colaterales que van desde dermatitis por contacto hasta náusea cefalea y vómito, siendo el efecto adverso más importante su hepatotoxicidad, para el caso de azoles e imidazoles además de la poca selectividad que presenta la anfotericina b.

d) Multiresistencia del género *Candida*.

Existe una gran variedad de compuestos que son usadas para el tratamiento de infecciones por *Candida*, los principales fueron mencionados en el apartado anterior, pero también existen otros fármacos antifúngicos como polienos, equinocandinas, análogos nucleósídicos, y alilaminas, con una variedad de

eficacia que depende del tipo y sitio de infección y la sensibilidad de las diferentes especies de *Candida*¹⁹, el fármaco más común para el tratamiento de las infecciones causadas por *C. albicans* es el fluconazol, sin embargo muchos estudios han documentado su habilidad para desarrollar una alta resistencia a azoles antifúngicos.²⁰, en la tabla 2 se muestra un recopilado de rangos de concentración mínima inhibitoria (CMI) de fluconazol contra diferentes especies de *Candida* y el porcentaje de aislados resistentes.

Tabla 2. Rangos de fluconazol (MIC) contra aislados de especies de *Candida* y porcentaje de aislados resistentes.

| Especies de <i>Candida</i> (# de aislados estudiados) | Rango de MIC (mg/L) | Porcentaje de aislados resistentes |
|--|----------------------------|---|
| <i>C. albicans</i> (5265) | 0.06 ≥ 128 | 3.5 |
| <i>C. glabrata</i> (7538) | 0.12 ≥ 128 | 7.8 |
| <i>C. krusei</i> (1075) | 0.06 ≥ 128 | 96.6 |
| <i>C. papapsilosis</i> (6023) | 0.06 ≥ 128 | 3.4 |
| <i>C. tropicalis</i> (3748) | 0.06 ≥ 128 | 2.3 |

1.3 *Lomentospora prolificans*.

Formalmente llamado *Scedosporium prolificans* (*S. prolificans*) es un hongo filamentoso oportunista que recientemente ha sido considerado como un patógeno emergente que afecta a está distribuido en todo el mundo y se encuentra presente frecuentemente en el suelo, aguas residuales y aguas contaminadas. Es responsable de serias infecciones debido a su alta virulencia, su natural tendencia a la invasión, diseminación y multiresistencia a los fármacos antifúngicos.²³

a) Scedosporiosis

Las enfermedades producidas por este hongo se llaman Scdosporiosis y van desde heridas cutáneas y subcutáneas a infecciones diseminadas en hospederos inmunocomprometidos.

i. Infección oportunista.

Pacientes con infección avanzada de VIH, inmunodeficiencias primarias (principalmente la enfermedad crónica granulomatosa (ECG) y el síndrome de Job), malignidad hematológica, pacientes con trasplante reciente, y aquellos con terapia antineoplásica o inmunosupresora, son especialmente susceptibles a infecciones por estos hongos filamentosos. En infecciones avanzadas de VIH, los pacientes desarrollan la infección durante la neutropenia, la mayoría de las infecciones en pacientes con ECG, han sido asociados exclusivamente a *S. apiosperum*, sin embargo en un estudio realizado por Bath y colaboradores en 2013 se encontró *L. prolificans* fue encontrado como agente etiológico de un absceso de cerebro en un paciente ECG. El sitio más común de infección son los pulmones y tejidos suaves, con ocasional extensión a los huesos.⁶

ii. Infección no oportunista.

Los pulmones y el tracto respiratorio superior son los sitios más comunes donde se puede encontrar este hongo filamentosos, después del micetoma. Estas condiciones caen en muchas categorías: colonización local transitoria, como saprobio broncopulmonar comprometido, formación de bolas fungosas (pseudallescherioma / escedosporioma), y pseudallescheriasis invasiva.⁶

b) Epidemiología

Las infecciones causadas por este organismo pueden estar localizadas en un órgano en específico, y se puede extender a los tejidos cercanos o se puede diseminar a órganos lejanos dependiendo de la vía de infección y el estado inmunológico del hospedero. Cuando *L. prolificans* infecta a individuos

inmunocompetentes este se manifiesta usualmente con una lesión con forma de heridas de punción o de cirugía y úlceras en la piel, esto genera infecciones localizadas que involucran la piel, huesos y articulaciones, en pacientes inmunocomprometidos con fibrosis quística, donde el factor más importante de riesgo para la adquisición de este patógeno es la inhalación, y especialmente aquellos pacientes que presentan malignidad hematológica, los que fueron trasplantados de algún órgano y recibieron un tratamiento inmunosupresor, las lesiones se propagan y resultan fatales en menos de un mes.¹¹

c) Tratamiento

Al igual que *Candida* el tratamiento de la micosis ocasionadas por *L. prolificans*, se hace con los antifúngicos disponibles en el mercado como lo derivados azólicos (fluconazol, voriconazol, posaconazol), polienos (anfotericina b), aliainas, sin embargo estas no resultan eficaces una vez que la infección se ha vuelto sistémica, debido a la multiresistencia intrínseca de *L. prolificans*.

d) Multiresistencia de *L. prolificans*.

Existen diversos estudios sobre la multiresistencia de *L. prolificans* a diversos fármacos Elizondo Zertuche y colaboradores evaluaron la susceptibilidad de 11 cepas de este hongo recolectados en un periodo de 10 años (2003-2013), contra anfotericina B (AmB), fluconazol (FLU), voriconazol (VRC), posaconazol (PSC), caspofungina, anidulafungina y micafungina. Resultando en que todas las cepas evaluadas presentaron resistencia a cada antifúngico evaluado con CMI para AmB (8->8 µg/ml), FLU (64->64 µg/ml), VRC (16->16 µg/ml), PSC (16->16 µg/ml) y las equinocandinas (caspofungina, anidulafungina y micafungina) tuvieron una CMI ≥ 8 µg/ml.

La multiresistencia y patogenicidad de este hongo filamentoso y del género *Candida*, así como los efectos adversos provocados por los antifúngicos comerciales es una pauta importante que hace necesaria la búsqueda de alternativas para su tratamiento, a través de la síntesis de nuevas moléculas

con potencial actividad antifúngica,⁵ búsqueda en la que los α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos.

1.4 α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos.

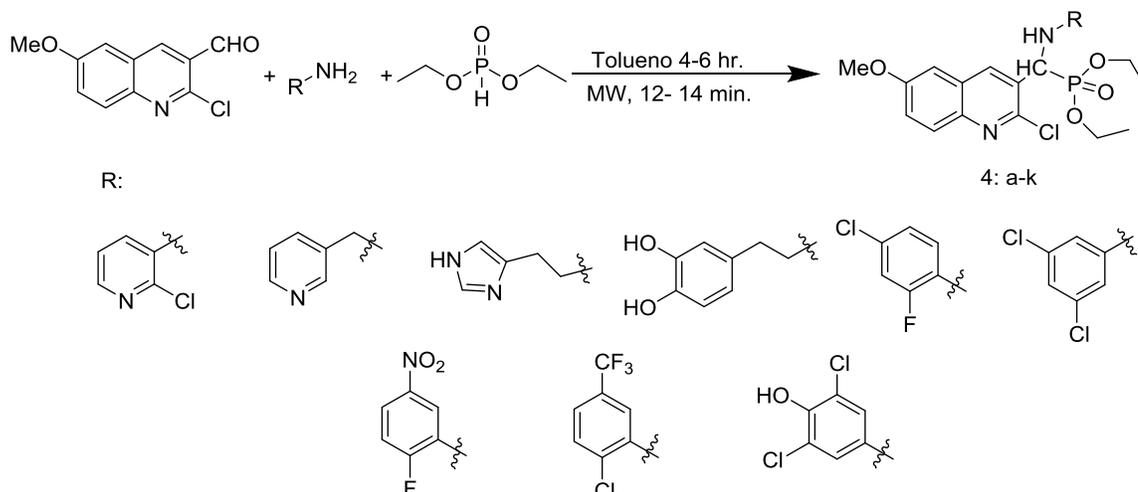
Los ácidos α -aminofosfónicos y sus derivados los ácidos α -aminofosfínicos y los α -aminofosfonatos son análogos estructurales de los α -aminoácidos, en los cuales la parte correspondiente al grupo funcional carboxilo que es plano, ha sido sustituido por un derivado fosfónico tetraédrico, esto les confiere a los derivados de ácidos α -aminofosfónicos amplia actividad biológica, ya que pueden mimetizar el estado de transición de los α -aminoácidos, lo cual puede interferir en diversos procesos enzimáticos.

Este tipo de compuestos y sus derivados es decir los ácidos α -aminofosfínicos y los α -aminofosfonatos presentan una baja toxicidad en células de mamífero y por ser análogos de los α -aminoácidos tienen un amplio rango de aplicación en áreas como la industria alimentaria, la agricultura y la química medicinal por su utilidad como intermediarios sintéticos.^{26,27,28,29} Además, constituyen una clase importante de compuestos con diversas actividades biológicas, tal es el caso de algunos α -aminofosfonatos sustituidos por grupos alquilo, los cuales presentan actividad antifúngica,^{30,31} actividad antibacterial,^{32,33} efectos antitumorales^{34,35} y actividad antiviral.³⁶

1.4.1 Síntesis de α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos.

Existen muchos reportes sobre la síntesis tanto de α -aminofosfonatos como de ácidos α -aminofosfínicos, se ha reportado la síntesis de los primeros mediante el uso de metodologías no convencionales como lo son microondas, ultrasonido, mecanosíntesis entre otros, mientras que para los ácidos α -aminofosfínicos, la síntesis aún se lleva a cabo de manera convencional empleando ácidos o bases fuertes para obtener el ácido correspondiente producto de la hidrólisis del fosfonoéster.

Un ejemplo de la síntesis y la actividad biológica que presentan estos compuestos es el estudio realizado en 2012 por K. Venkata Ramana y colaboradores,³⁷ quienes realizaron la síntesis de α -aminofosfonatos comparando dos métodos, método convencional e irradiación por microondas. Obtuvieron rendimientos entre 68-74% con el método convencional, mientras que, mediante irradiación con microondas fue de 84-92%. Concluyeron que por el método de irradiación por microondas, se obtuvieron rendimientos más altos y en menor tiempo de reacción (Esquema 1). Las pruebas biológicas a las cuales sometieron sus productos, fueron ensayos antivirales y evaluación de la actividad antioxidante. La actividad antioxidante se realizó con dos métodos: el método de DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo) con una solución 1 mM de DPPH 0.1 mL, 99% etanol 0.8 mL y 0.1 mL de cada uno de los compuestos, preparados mediante su disolución en metanol, se midió espectrofotométricamente, monitoreando la disminución de la absorbancia a 517 nm, usando Ascorbato de sodio como control. También realizaron el método de captación de radicales súper óxido con la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT), para las prueba antiviral se inocularon en hojas de tabaco 6×10^{-3} UFC de TMV (Unidades Formadoras de Colonias de Virus del mosaico de Tabaco), se lavaron con agua y se dejaron secar, los compuestos fueron esparcidos sobre la hoja y se dejaron a temperatura ambiente por 3 días, finalmente contaron las lesiones producidas en la hoja. Encontraron que los compuestos poseen una potente actividad antiviral contra TMV (6×10^{-3} mg/mL), y una potente actividad antioxidante.



Esquema 1. Reacción reportada por K. Venkata Ramana y colaboradores³⁶

La potencial actividad antifúngica de α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos aunado a la problemática nacional y mundial de enfermedades causadas por hongos, especialmente las levaduras del género *Candida* y el descubrimiento del género *Lomentospora prolificans* como un patógeno emergente y multiresistente a diversos fármacos antifúngicos, fue la base para el planteamiento del presente proyecto, en el cual se realizó la síntesis y caracterización de una serie de α -aminofosfonatos y una de ácidos α -aminofosfínicos, además se evaluó su actividad antifúngica contra los hongos patógenos mencionados. Los resultados obtenidos proporcionaron información valiosa sobre la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento de este tipo de enfermedades.

CAPÍTULO 2

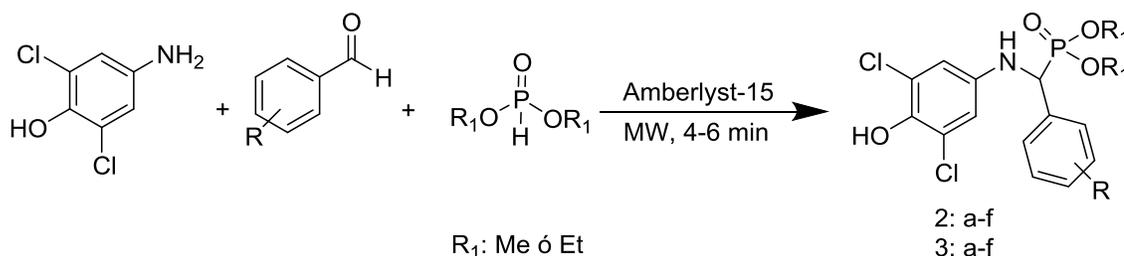
ANTECEDENTES

La síntesis de los derivados de ácidos α -aminofosfónicos (α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos) ha sido reportada desde hace algunas décadas, a continuación se mostrarán las metodologías empleadas para la obtención de estos productos y su evaluación biológica.

2.1 Síntesis y actividad biológica de α -aminofosfonatos

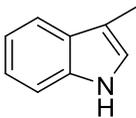
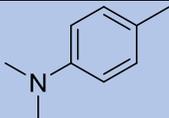
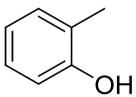
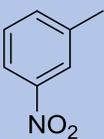
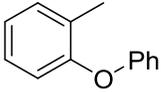
En 2014 Subba-Reddy y colaboradores,³⁸ realizaron la síntesis de α -aminofosfonatos mediante irradiación por microondas “one-pot” Kabachnik-Fields, sin el uso de disolventes. La reacción fue llevada a cabo mediante la mezcla de 3,5-dicloro-4-hidroxifenilamina (1 mmol), un aldehído aromático (1 mmol) y dietil o dimetil fosfita (1mmol), catalizado con Amberlyst-15 (Una resina de intercambio iónico) (100 mg) a 490 Watts por 4-6 min (Esquema 2), obtuvieron rendimientos de reacción del 83-92% (Tabla 3).

Realizaron la determinación de su actividad antioxidante mediante la siguiente metodología: se agregaron 85 Mm de DPPH a un medio que contenía los compuestos a evaluar el medio se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y se midió la observancia a 518 nm (usaron como control ácido ascórbico), concluyeron que todos los compuestos sintetizados mostraron buena actividad contra el agente oxidante 2,2-difenil-1-picrilhidrazina.



Esquema 2. Reacción reportada por Subba-Reddy y colaboradores.

Tabla 3. Rendimientos obtenidos con los diferentes sustituyentes de aldehídos por Subba-Reddy y colaboradores.

| Sustituyentes del aldehído (R) | Rendimientos obtenidos de acuerdo a los Sustituyentes en el aldehído y la fosfita. | |
|---|--|------------------------|
| | R ₂ : Metilo | R ₂ : Etilo |
|  | 84 | 89 |
|  | 86 | 89 |
|  | 89 | 90 |
|  | 92 | 83 |
|  | 83 | 89 |

2.2 Actividad antifúngica de los α -aminofosfonatos

Como referencia clásica de la actividad de derivados de fosfonatos con actividad antifúngica se tiene que en 1989 Ouimette D.G. y Coffey M.D.³⁹, evaluaron la actividad antifúngica de fosfonato de potasio, hipofosfonato de potasio y de tres fosfonatos con sustituyentes alquilo (metil, dimetil y dietil fosfonatos) (Figura 5), contra 9 especies aisladas de *Phytophthora in vitro*, encontraron que el fosfonato de potasio fue el que tuvo mayor capacidad de inhibición contra la mayoría de las cepas aisladas y el hipofosfonato de potasio presentó casi 100 veces menos actividad que este compuesto, entre los fosfonatos sustituidos el monoetil fosfonato presentó mayor actividad inhibitoria

contra la mayoría de las cepas estudiadas, posteriormente se realizó un estudio *in vivo* de estos compuestos encontrando que los cuatro compuestos derivados de fosfonatos presentan igual actividad inhibitoria, a excepción del hipofosfonato de potasio. La concentración media de máxima inhibición (IC50) para el monoetil fosfonato para las diversas especies estudiadas, fue de un rango de 0.06 a 3.9 µeq/mL. Ellos deducen que la igualdad de inhibición de los cuatro fosfonatos se debe a la rapidez con la que se hidrolizan estos compuestos en los tejidos vivos, este artículo es una referencia de la actividad de los derivados de fosfonatos tanto *in vitro* como *in vivo*.

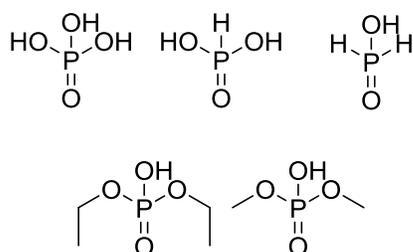
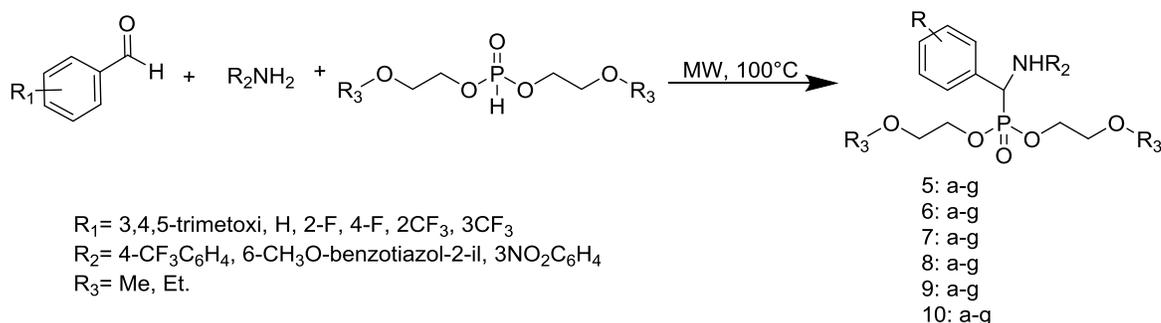


Figura 5. Derivados de fosfonatos estudiados por Ouimette D.G y Coffey M.D..

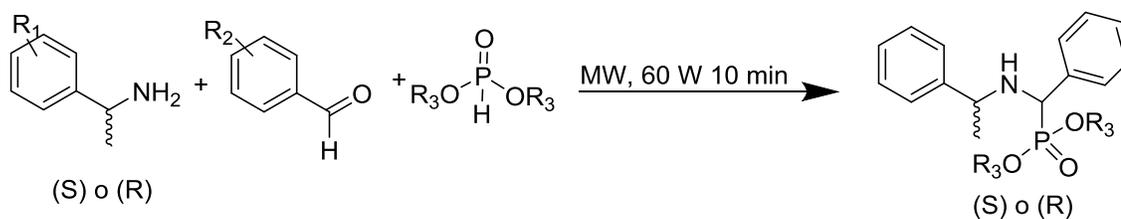
En 2006 Yingshu Xu⁴⁰ y colaboradores, desarrollaron un método eficiente para la síntesis de varios derivados de α -aminofosfonatos por el tratamiento de benzaldehídos sustituidos y anilinas con bis(2-metoxietil)- o bis(2-etoxietil) fosfita bajo irradiación de microondas libre de disolventes y catalizadores (Esquema 3), realizaron un ensayo biológico de las moléculas para evaluar su actividad antimicótica contra *Fusarium oxysporum*, *Valsamali* y *Gibberella zeae*, la técnica que usaron para evaluar la actividad fue la del “plato envenenado”, el medio de cultivo, 90 mL de agar papa dextrosa (PDA), fue mezclado con una solución de acetona (10 mL) que contenía los compuestos a evaluar, la concentración final de los compuesto en el medio de cultivo fue de 500 µg/mL (el control Hymexazol tuvo la misma concentración), se uso acetona y agua destilada como control, los hongos a evaluar previamente habían sido incubados en PDA a 25°C por 5 días, y de estos cultivos se corto un cuadro de agar/hongo de aproximadamente 0.45 cm por lado y se inoculo en el medio de cultivo con los α -aminofosfonatos a evaluar, se dejaron incubar por 5 días a

25°C, se midió el radio de crecimiento y se comparó con el control. Se encontró que los compuestos presentan un grado de inhibición menor que el Hymexazol.



Esquema 3. Reacción general con los diferentes sustituyentes, llevada por Yingshu Xu y Colaboradores.

En 2006 Yang Song y colaboradores,¹⁶ evaluaron la actividad antifúngica de una serie de α -aminofosfonatos quirales con sustituyentes de flúor, la síntesis se llevó a cabo bajo irradiación de microondas, obteniendo rendimientos moderados que van del 68% a 80.9% las condiciones de reacción se muestran en el esquema 4. Todos los compuestos fueron probados contra seis hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum*, *Gibberella zeae*, *Phytophthora infestans*, *Piricularia oryzae*, *Pellicularia sasakii*, *Rhizoctonia solani*, las cuales fueron aisladas e incubadas en agar de papa y dextrosa (PDA) a 25°C por cinco días, posteriormente se llevó a cabo el bioensayo con la técnica del “plato envenenado” que ya ha sido descrita en el estudio realizado por Yingshu Xu, midieron el radio de crecimiento de las colonias de hongos para evaluar el halo de inhibición de las moléculas, finalmente los rangos de inhibición a 50 $\mu\text{g/mL}$ van desde el 8.51% hasta 60.47%. La molécula con mejor actividad se muestra en la figura 6. Encontraron que las nuevas moléculas sintetizadas exhiben una actividad prometedora, ya que presentan un mejor porcentaje de inhibición que el Hymexazol a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$.



R₁: 4-F,H, R₂: 2-F, 2-CF₃, R₃: Et, n-Pr, i-Pr, n-Bu

11: a-d
12: a-d
13: a-d
14: a-d

Esquema 4. Reacción general con los diferentes sustituyentes, llevada por Yang Song y colaboradores.

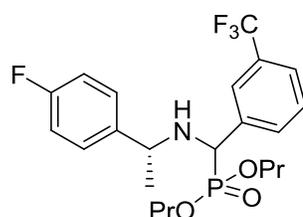
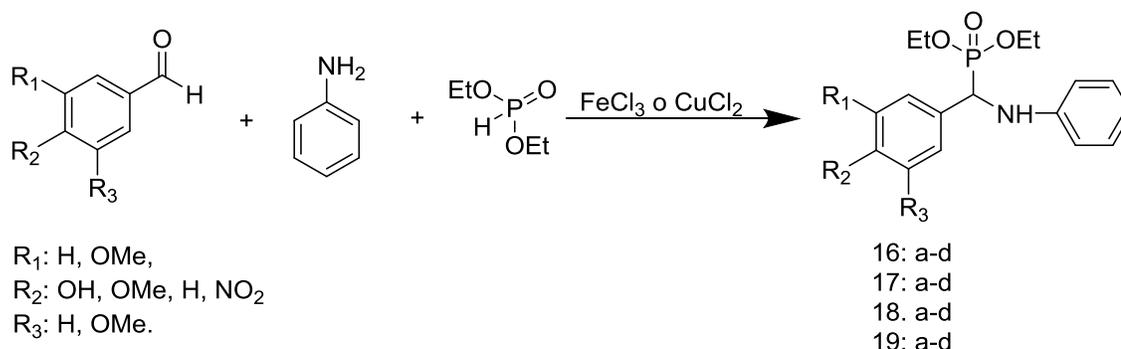


Figura 6. Molécula con mayor actividad antifúngica, sintetizada por Yang Song y colaboradores.

En 2011 Zahra Rezaei y colaboradores¹⁹ compararon el efecto de dos catalizadores, cloruro de cobre (II) contra cloruro de hierro (III), los resultados obtenidos muestran que las reacciones llevadas a cabo en presencia de cloruro de cobre (II) tienen menor rendimiento y un tiempo de reacción mayor que las llevadas a cabo con cloruro de hierro (III) (esquema 5), las estructuras de los compuestos químicos fueron confirmados por métodos analíticos espectroscópicos.

Estos compuestos fueron investigados para evaluar su actividad antifúngica mediante la técnica de “plato envenenado” y por la técnica de microdilución contra las cepas: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Aspergillus flavus*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Epidermophyton floccosum*, estos hongos fueron previamente cultivados antes de los ensayos, los compuestos a evaluar fueron diluidos en DMSO a una concentración de 200 mg/mL de cada molécula sintetizada, posteriormente se volvieron a diluir en los medios de cultivo solido (técnica del “plato envenenado”) y liquido (Técnica de microdilución) para tener un rango de concentración en los medios de cultivo de

0.0625 a 2048 µg/ml, como resultado obtuvieron el compuesto mostrado en la figura 7, como el más activo contra la cepa *Microsporium canis*, se encontró un CMI de 5 µg/mL, siendo mejor que el CMI de griseofulvina que fue de 6 µg/mL.



Esquema 5. Reacción general realizada por Zahra Rezaei y colaboradores.

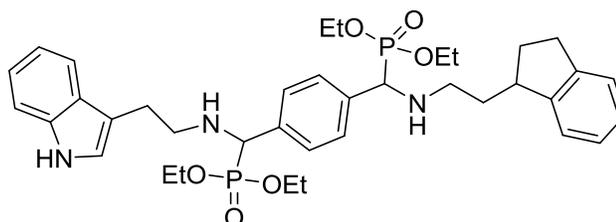
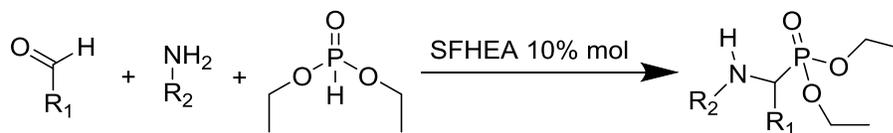


Figura 7. Molécula con mayor actividad antifúngica contra *Microsporium canis*.¹⁹

2.3 Síntesis de α -aminofosfonatos a temperatura ambiente.

En 2014 Aungo Ying y colaboradores⁴¹ desarrollaron un método simple y eficiente para la síntesis de alfa-aminofosfonatos formados a partir de aldehídos aromáticos, dietil fosfita y aminas aromáticas usando como catalizadores diversos líquidos iónicos tales como [SFHEA][NO₃], [SFHEA][CF₃COO], [SFHEA][CH₃SO₃], [SFHEA][HSO₄] [SFHEA: ácido sulfónico (SO₃H funcionalizado con hidroxietilamina)] (Esquema 6), los cuales pueden ser reutilizados, obtuvieron rendimientos que van del 81-93%, los diferentes sustituyentes y sus rendimientos se dan en la tabla 4. Los compuestos obtenidos fueron caracterizados por Espectroscopia de Correlación H-H (H-H COSY).



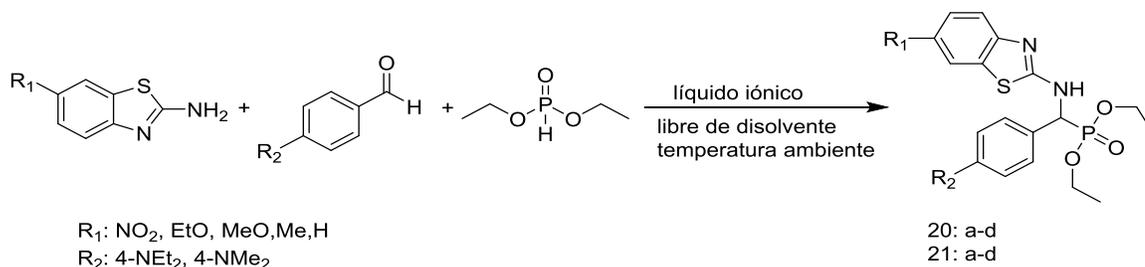
15: a-j

Esquema 6. Reacción general realizada por Aungo Ying y colaboradores

Tabla 4. Sustituyentes, tiempos de reacción y rendimiento de las reacciones llevadas a cabo por Aungo Ying y colaboradores.

| R ₁ | R ₂ | Tiempo (h) | Rendimiento (%) |
|--|-------------------------------|------------|-----------------|
| C ₆ H ₅ | C ₆ H ₅ | 1 | 91 |
| 2-OCH ₃ C ₆ H ₄ | C ₆ H ₅ | 2 | 81 |
| 3-OCH ₃ C ₆ H ₄ | C ₆ H ₅ | 1.5 | 85 |
| 4-OCH ₃ C ₆ H ₄ | C ₆ H ₅ | 1.5 | 87 |
| 4-OHC ₆ H ₄ | C ₆ H ₅ | 1.5 | 84 |
| 3,4-OCH ₃ C ₆ H ₄ | C ₆ H ₅ | 1.5 | 83 |
| 3-NO ₂ C ₆ H ₄ | C ₆ H ₅ | 1 | 92 |
| 4-NO ₂ C ₆ H ₄ | C ₆ H ₅ | 1 | 93 |
| 2-Tienil | C ₆ H ₅ | 2 | 86 |

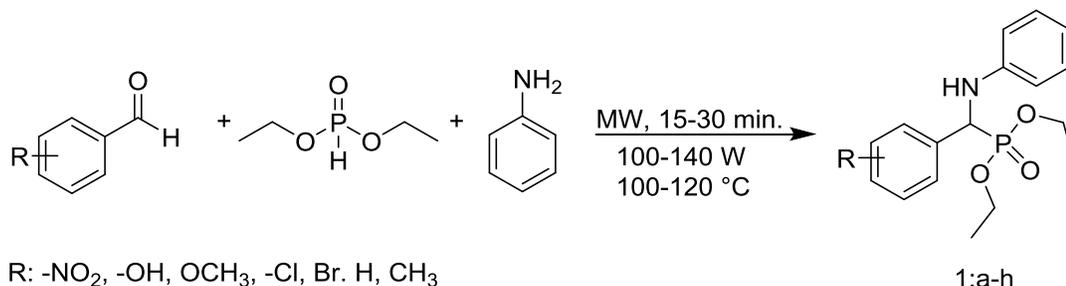
En 2016 Mahdi Mirzaei⁴² y colaboradores realizaron la síntesis de α -aminofosfonatos que contenían benzotriazol en su estructura a temperatura ambiente y libre de disolventes usando como catalizador reutilizable el compuesto [1-methylpyrrolidin-2-one-SO₃H]Cl (Esquema 7), el cual es un líquido iónico funcionalizado derivado de un ácido sulfónico, que tuvo la función de un ácido de Bronsted, obtuvieron excelentes rendimientos que van del 88% al 96%, en tiempos de reacción cortos (de 1 a 2.5 horas), por último realizaron el docking de los compuestos contra la quinasa 2 dependiente de ciclina, encontrando que el compuesto con sustituyentes en R₁: dimetilamino y R₂: nitro, fue el más selectivo contra esta proteína.



Esquema 7. Reacción llevada a cabo por Mahdi Mirzaei con el uso de un solvente iónico.

2.3 Síntesis mediante irradiación por microondas

En 2014 Kumari y colaboradores,⁴³ mediante irradiación con microondas y sin disolvente realizaron la síntesis de alfa-hidroxifosfonatos y alfa-aminofosfonatos (Esquema 8). La reacción se llevó a cabo por la mezcla de aldehído (1 mmol), dietil-fosfita (1 mmol), y anilina (1 mmol), bajo presión de 6-9 bar a una temperatura de 100-120°C con una potencia de 100- 130 Watt por 15-30 min. Obtuvieron rendimientos de reacción entre 85-97%.

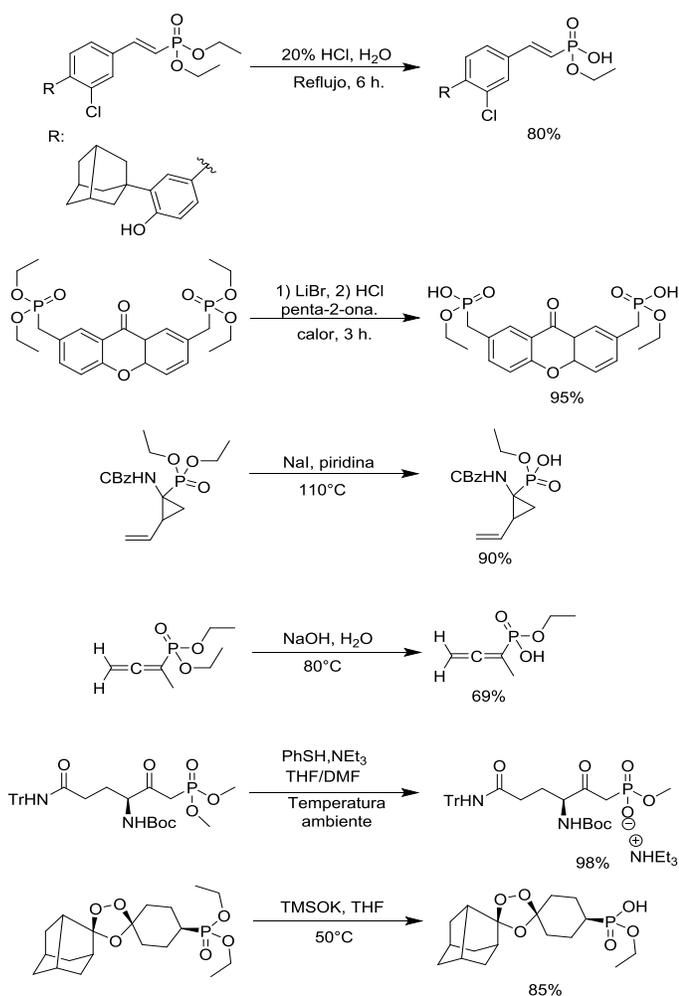


Esquema 8. Reacción reportada por Kumari y colaboradores.

2.3. Síntesis de ácidos fosfínicos.

Se han reportado varios métodos de síntesis para la desprotección selectiva de únicamente uno de los grupos de los esteres fosfínicos⁴⁴, lo cual es facilitado por agentes de reacción como ácido clorhídrico diluido, halogenuros alcalinos, PhSH/NEt₃ (tiofenol/trietilamina) y TMSOK (Trimetilsilanoato de potasio) todos ellos ácidos y bases fuertes, en el esquema 9 se pueden observar diferentes condiciones de reacción empleando los catalizadores ya mencionados, todos estos catalizadores permiten la formación de los ácidos fosfínicos con

rendimientos de moderados a altos (del 60-98%), además se puede observar que las metodologías de síntesis son de manera convencional, no hay reportes aún de la monodesprotección de uno solo de los grupos éster por técnicas no convencionales y su evaluación antifúngica, debido a que la síntesis que se reportan llevan a cabo la hidrólisis total de los grupos éster para la formación de ácidos fosfónicos y por lo tanto la evaluación biológica se ha hecho de estos compuestos y no de los ácidos fosfínicos.



Esquema 9. Diferentes condiciones de reacción para obtención de ácidos fosfónicos.

2.4. Análisis crítico de la literatura.

Como se puede observar en los antecedentes reportados, para la síntesis de α -aminofosfonatos se busca que las reacciones presenten el menor impacto medioambiental posible, por eso se hace el uso de diferentes técnicas de síntesis no convencional como:

- Irradiación de microondas, el cual disminuye los tiempos de reacción considerablemente de horas a cuestión de minutos.
- El uso de disolventes iónicos y de catalizadores que pueden ser reutilizados, pero presentan tiempos de reacción mayores que la irradiación de microondas además del costo agregado de los disolventes y/o catalizadores.

Por otro lado, las reacciones de monodesprotección de diaquilfosfitas para la obtención de ácidos α -aminofosfinícos requieren de condiciones de acidez o basicidad muy agresivas.

Por lo anterior, el presente proyecto tuvo como propósito la síntesis de dos series de compuestos, una de α -aminofosfonatos y otra de ácidos α -aminofosfinícos, una serie se llevó a cabo a temperatura ambiente sin catalizadores y utilizando etanol como disolvente, el cual es de uso común en los laboratorios de síntesis y se usó en cantidades mínimas, sin la necesidad de usar disolventes iónicos y/o catalizadores, dicha metodología presenta ventajas, en cuestión de costo, tiempo de reacción e impacto medioambiental. Por otro lado la utilización de irradiación por microondas para la síntesis de la segunda serie de ácidos α -aminofosfinícos también representó una ventaja en los tiempos de reacción e impacto medioambiental además de que el uso de carbonato de potasio representa una condición más suave de reacción, en comparación a lo reportado hasta hoy.

Los resultados mostrados en los antecedentes reportan que los α -aminofosfonatos presentan una amplia gama de actividad antifúngica, en función de la estructura y de los grupos funcionales presentes en cada

molécula, en el presente proyecto los compuestos sintetizados no presentaron actividad contra levaduras del genero *Candida* pero si presenta actividad contra *L. prolificans* por lo que la novedad en la estructura de los compuestos sintetizados y la amplia aplicación de los derivados de α -aminofosfonatos dan una pauta para realizar una aplicación importante en el ámbito medicinal, y la búsqueda de un sinergismo con otros fármacos o la modificación estructural de los compuestos activos para potenciar la actividad de los mismos.

Capítulo 3

En este capítulo se muestran los puntos principales con los que se estructuró la realización del proyecto.

3.1 Justificación

Debido al carácter invasivo y la alta tasa de mortalidad reportada para el género *Candida* y *Lomentospora prolificans* y la multiresistencia comprobada ante antifúngicos comerciales de este último, es necesaria la búsqueda de alternativas farmacológicas para el tratamiento de estas enfermedades, por lo que la síntesis de ácidos α -aminofosfínicos y α -aminofosfonatos, análogos estructurales de los α -aminoácidos, de los cuales hay estudios en los que se reportan una baja citotoxicidad en células de mamífero sanas permitirá ofrecer información relacionada con nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades producidas por hongos y levaduras.

3.2. Hipótesis.

Al menos uno de los compuestos sintetizados (α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos) presenta actividad antifúngica similar o mayor comparada con Fluconazol.

3.3. Objetivo general.

Sintetizar y caracterizar una serie de α -aminofosfonatos y una de ácidos α -aminofosfínicos y determinar su actividad antifúngica comparada con fluconazol.

3.4. Objetivos específicos.

3.4.1. Sintetizar a temperatura ambiente los α -aminofosfonatos (serie 1).

3.4.2. Sintetizar por vía microondas los ácidos α -aminofosfínicos (serie 2).

3.4.2. Purificar los productos obtenidos.

3.4.3. Caracterizar los productos mediante RMN ^1H , ^{13}C y ^{31}P .

3.4.4. Realizar el tamizaje de los compuestos sobre *Candida*, para identificar los que presentan actividad.

3.4.5. Realizar el tamizaje de los compuestos sobre *Lomentospora prolificans*, para identificar los que presentan actividad.

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se presenta la metodología experimental llevada a cabo para lograr la obtención de los compuestos sintetizados, la técnica de purificación empleada, el proceso de caracterización llevado a cabo y la metodología del cultivo celular utilizado en las pruebas biológicas para evaluar la actividad antifúngica de los mismos.

Información general

La parte de síntesis orgánica fue llevada a cabo en el Laboratorio de Química Industrial ubicado en el Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la FCQ de la UANL.

Reactivos, material y equipo

Para la síntesis de los α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos se utilizaron los siguientes reactivos y equipos:

- SIGMA-ALDRICH: 4-Clorobenzaldehído 97%, 4-Hidroxibenzaldehído 98%, Isobutiraldehído 98%, 2-etilbutiraldehído 92%, 4-(difenilamino) benzaldehído 97%, 4-(dietilamino) benzaldehído, difenilfosfita 98%, diterbutilfosfita 97%, 4-etilaminobenzoato 98%.
- Macherey-Nagel: Sílica 60, 0.040-0.063 mm.
- Desarrollo de Especialidades Químicas: acetato de etilo, hexano, metanol, diclorometano (grado industrial, destilados para su uso), isopropanol, etanol (grado industrial).
- Vortex MAXIMIX I, marca Thermo Scientific. El cual fue prestado por el laboratorio de micología y fitopatología del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas.
- Microondas para síntesis Monowave 300, marca Anton Paar. ubicado en el laboratorio de Química Orgánica 4, ubicado en el tercer piso del

edificio redondo de Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) perteneciente al Laboratorio de Química Industrial.

La parte correspondiente a las pruebas biológicas fue realizada en el laboratorio de micología y fitopatología del Departamento de Microbiología, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los compuestos fueron evaluados en ocho cepas diferentes del género *Candida* y en trece cepas diferentes de *Pseudallescheria boydii* utilizando los siguientes reactivos y equipos:

- MCD LAB: agar dextrosa y papa (PDA), medio para identificación, cultivo y recuento de levaduras de Hongos.
- Solución salina al 0.85%
- DIFCO™: dextrosa
- DIBICO: extracto de levadura
- MERCK-Schuchardt: Dimetilsulfóxido (DMSO)
- BD BIOXON: Agar Müller-Hinton, Peptona de caseína.
- BD FALCON™: Tubos snap
- Incubadora marca MARSÁ

Forma de manejo y disposición de los residuos generados.

a) Las reacciones que se llevarán a cabo no son consideradas de alto riesgo para la salud, por lo que para su realización, únicamente se requirió el equipo personal de seguridad en el laboratorio (bata, lentes y guantes).

b) La disposición de los residuos generados siguió el programa de disposición de residuos implementado por la FCQ de la UANL, utilizando los siguientes contenedores:

- A (soluciones de sales inorgánicas, ácidos y bases neutralizados).
- B (sólidos inorgánicos).
- C (compuestos y disolventes orgánicos no halogenados).

- D (compuestos y disolventes orgánicos halogenados).
- E (muy tóxico, cancerígeno orgánico).
- G (sólidos orgánicos).
- Vidrio impregnado de sustancias químicas.
- Residuos biológicos: el desecho de residuos mediante el estándar de clasificación de los RPBI (Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos):
 - i. Contenedor rojo: Residuos punzocortantes biológico-infeccioso.
 - ii. Contenedor amarillo: Residuos patológicos (órganos, tejidos, células biológico-infecciosas).

En la tabla 5 se muestran una aproximación de los principales residuos generados en el presente proyecto.

Tabla 5. Residuos generados durante el proyecto

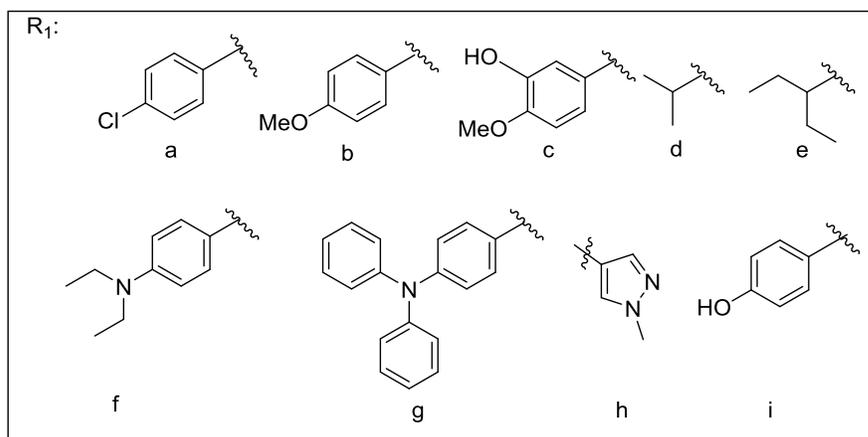
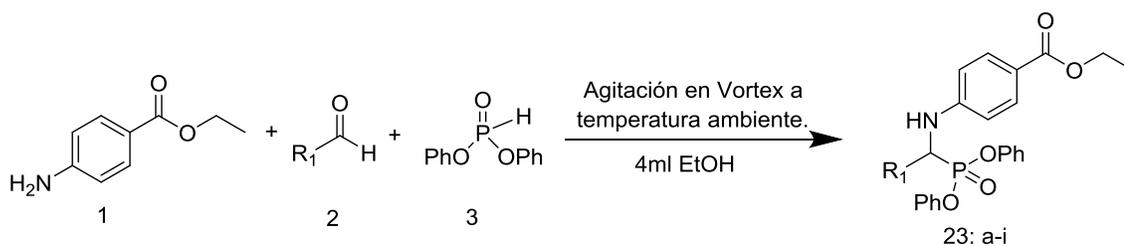
| Residuo generado | Cantidad aproximada |
|-------------------------|----------------------------|
| Acetato de etilo | 15 litros |
| Hexano | 15 litros |
| Metanol | 15 litros |
| Etanol | 1 litro |
| Sílica gel | 5 kilogramos |

4.1 Síntesis de los α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos.

Se realizó la síntesis de dos series de compuestos, la serie 1 (α -aminofosfonatos) se llevó a cabo por agitación en Vortex y a temperatura ambiente, la serie 2 (ácidos α -aminofosfínicos) se realizó por irradiación de microondas.

4.1.1. Síntesis a temperatura ambiente de la serie 1 de α -aminofosfonatos.

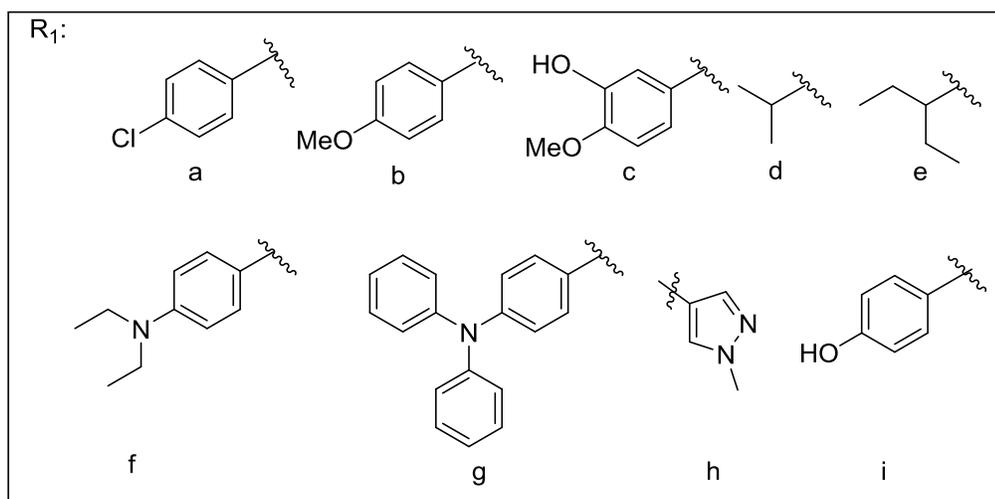
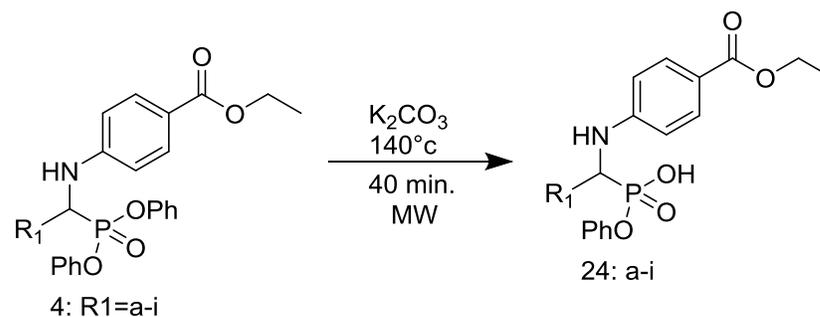
La síntesis a temperatura ambiente de los α -aminofosfonatos de la serie 1 se llevó a cabo de la siguiente forma: en un tubo de MW G10, se adicionó el reactivo 4-etilaminobenzoato (1 mmol), seguido del aldehído correspondiente (1 mmol) en presencia de difenilfosfita (1 mmol), usando como disolvente etanol (Esquema 10). Se agitó en vortex hasta que se observó un precipitado.



Esquema 10. Reacción general para obtención de los α -aminofosfonatos de la serie 1.

4.1.2. Síntesis vía microondas de la serie 2 de ácidos α -aminofosfínicos.

La síntesis vía microondas de los ácidos α -aminofosfínicos de la serie 2 se llevó a cabo de la siguiente forma: en un tubo de MW G10, se añadió para cada reacción el α -aminofosfonato (1 mmol) correspondiente de la serie 1 y carbonato de potasio (3 mmol), usando etanol como disolvente (esquema 11), se dejó bajo irradiación por microondas por un tiempo de 40 minutos.



Esquema 11. Reacción general para obtención de los ácidos α -aminofosfónicos de la serie 2.

4.2. Purificación de los compuestos.

La purificación de los compuestos se llevó a cabo por técnicas estándar usadas en los laboratorios de síntesis orgánica, es decir se emplearon las técnicas de filtración al vacío, recristalización y separación por columna cromatográfica con gel de sílice, de acuerdo a las características individuales de cada compuesto obtenido.

La presencia de cada producto obtenido se confirmó mediante cromatografía en capa fina, además de que se evaluaron diferentes sistemas de disolventes para alcanzar una separación eficiente de aquellos compuestos que serían separados por columna cromatográfica.

4.2.1 Purificación de los α -aminofosfonatos, serie 1.

La purificación de la serie 1 se llevó a cabo por filtración a vacío, posteriormente al sobrenadante se le dejó recristalizar en congelador, una vez recristalizado se volvió a filtrar al vacío, por último al sobrenadante que aún contenía el producto de interés (la presencia del producto final se verificó por cromatografía en capa fina), se le llevó a columna cromatográfica con gel de sílice y una combinación de disolventes, los cuales fueron elegidos de acuerdo al comportamiento del producto obtenido, en base a la mejor separación de los compuestos de interés.

4.2.2 Purificación de los ácidos α -aminofosfínicos, serie 2.

La purificación de la serie 2 de α -aminofosfonatos se llevó a cabo mediante columna cromatográfica, con una mezcla de disolventes, los cuales fueron elegidos de acuerdo a la polaridad de cada uno de los compuestos obtenidos, esto con el objetivo de obtener una buena separación.

4.3. Caracterización de los α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfínicos.

La caracterización de los compuestos sintetizados se llevó a cabo por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón, carbono 13 y fósforo 31 (^1H , ^{13}C y ^{31}P), los espectros obtenidos de estas técnicas nos ofrecieron información estructural relevante para asegurar que se habían obtenido los compuestos esperados.

4.4. Pruebas biológicas en *Candida* y *Lomentospora prolificans*.

Las levaduras del género *Candida* fueron obtenidos del cepario perteneciente al laboratorio de micología y fitopatología del Departamento de Microbiología, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de las cuales se escogieron 8 cepas para evaluar la actividad de los compuestos propuestos en el proyecto, a las diferentes cepas se les asignó una clave de identificación como se muestra en la tabla 6, las diferentes cepas de *Candida* fueron obtenidas de aislado del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Por otro lado

las cepas de *L. prolificans*, fueron obtenidas de la Facultad de Medicina, las cepas utilizadas para el presente proyecto se muestran en la tabla 7.

Tabla 6. Cepas del género *Candida* usadas para evaluar actividad antifúngica de los compuestos sintetizados.

| Clave | Cepa |
|-------|-------------------------------|
| C1 | <i>C. tropicalis</i> #41 |
| C2 | <i>C. glabrata</i> #410 |
| C3 | <i>C. albicans</i> #389 |
| C4 | <i>C. glabrata</i> #034 |
| C5 | <i>C. parapsilosis</i> #298 |
| C6 | <i>C. guilliermondii</i> #184 |
| C7 | <i>C. tropicalis</i> #93 |
| C8 | <i>C. albicans</i> #69 |

Tabla 7. Cepas de *L. prolificans* usadas en el proyecto.

| Cepa. | Sitios de aislamientos ²⁵ |
|--------------|--------------------------------------|
| L.P. 04-2673 | Seno maxilar |
| L.P. 05-2190 | Sangre, LCR |
| L.P. 06-1220 | Lavado broncoalveolar |
| L.P. 12-261 | Sangre |
| L.P. 05-835 | Lavado broncoalveolar |
| L.P. 06-2411 | Sangre |
| L.P. 05-2409 | Sangre |
| L.P. 13-196 | Biopsia de piel |
| L.P. 11-2242 | Sangre |

4.4.1 Método de difusión en placa por antibiograma.

Se hizo un primer tamizaje de los compuestos para evaluar su actividad de manera cualitativa, por el método de difusión en placa por antibiograma, únicamente se evaluaron las cepas de *Candida*.

a) Preparación de las diluciones de compuestos a evaluar.

Se realizó una solución trabajo en DMSO (Dimetilsulfóxido) a una concentración de 50 mg/mL, a partir de esta se tomaron 100 µL y se diluyeron en 900 µL de solución salina para obtener una concentración de 5 mg/mL, a partir de esta primera dilución se tomaron de nuevo 100 µL y se volvió a diluir en 900 µL de solución salina para una concentración final de 0.5 mg/mL de los compuestos y de fluconazol.

b) Ajuste del inóculo.

Las levaduras incubadas a 35°C por un tiempo de 48 horas, se inocularon en solución salina a 0.85%, y con ayuda de un espectrofotómetro se ajustó a una transmitancia de 85 ± 1 a 650 nm. Para asegurar una concentración de 10^6 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) de levaduras.

c) Inoculación de las placas, aplicación de los discos impregnados e incubación.

Una vez que se obtuvo la concentración deseada de levaduras y de compuestos a evaluar, se procedió al sembrado sobre cajas Petri de 20 ml con medio de cultivo agar Müller-Hinton, para ello se hizo un sembrado tipo césped con ayuda de hisopos estériles, los cuales se empaparon con el inóculo posteriormente se descargó sobre la superficie del medio de cultivo mediante un movimiento de zigzag que cubrió toda la caja Petri, esto se realizó cuatro veces moviendo la caja Petri en ángulos de 90°C, esto con el fin de que la caja quedara totalmente impregnada con la solución.

Posteriormente se impregnaron discos de papel filtro estéril con las diluciones en DMSO con la concentración final de los compuestos a evaluar, que se manejaron con pinzas metálicas esterilizadas mediante su flameo tras inmersión en alcohol. Los discos se depositaron en la superficie del medio inoculado, procurando dejar espacio suficiente entre los discos para evitar interferencias entre la actividad individual de los compuestos, realizando una ligera presión para que quedaran adheridos al medio, se usó como fármaco de referencia fluconazol, se usó como control negativo una caja Petri con el sembrado de levaduras sin compuesto ni fármaco (para asegurar que factores diferentes a los compuestos interfieran con el crecimiento de las levaduras) y como control positivo una caja Petri sin inóculo ni fármaco para asegurar la esterilidad del medio.

Finalmente se incubaron a 35°C por 48 horas.

4.4.2 Método de difusión en agar.

Se hizo un segundo tamizaje de los compuestos para evaluar la actividad de los compuestos por halo de inhibición, por el método de difusión en agar, únicamente se evaluaron las cepas de *Candida* por este método.

a) Preparación de las diluciones de compuestos a evaluar.

De una solución de trabajo para cada compuesto con concentración de 50 mg/mL en DMSO, se tomaron 5 µL de esta solución y se diluyeron en 995 µL de DMSO, para obtener una concentración final de 0.25 mg/mL de cada uno de los compuestos.

b) Ajuste del inóculo.

Las levaduras incubadas a 35°C por un tiempo de 48 horas, se les transvasó con ayuda de un asa bacteriológica a un mililitro de solución salina al 0.85%, a partir de esta solución madre se tomaron 100 µL y se adicionaron en 900 µL de solución salina, tomado la nueva solución se hizo la misma dilución y se

repitió el proceso cuatro veces esto para obtener concentraciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , con respecto a la solución madre, posteriormente a la penúltima dilución se le hizo el conteo con cámara de Neubauer para determinar la concentración de la última dilución siendo válida solo si el promedio del conteo está entre 30 y 300 levaduras, en caso de que fuera menor se procedía al conteo de la dilución con la concentración diez veces menor, en el caso de que fuera mayor se contaba la dilución con concentración diez veces menor y de esta manera podríamos saber las concentraciones de cada una de las diluciones, la concentración deseada para este ensayo fue de 10^8 UFC de levaduras, al estar en el rango de conteo en la cámara de Neubauer (30-300 levaduras), sabemos que la concentración de la dilución de la que obtuvimos la muestra es de una concentración de 10^5 UFC, por lo que a partir de esa dilución podemos determinar en que dilución se encuentra la deseada (10^8 UFC).

c) Inoculación del medio de cultivo, depósito de compuestos en pocillos e incubación.

Una vez se tuvo la concentración de levaduras a 10^8 UFC, se diluyó en 40 mL de agar Müeller-Hinton atemperado a 40 °C, para una concentración final de 10^6 UFC.

El medio de cultivo con el inóculo de levaduras se vació en cajas Petri de 20 ml y se dejaron a que solidificaran a temperatura ambiente.

Una vez solidificados se practicaron pocillos de 0.8 cm de diámetro por 0.5 cm de altura, los cuales se hicieron con ayuda de un sacacorchos esterilizado mediante su flameo tras inmersión en alcohol al 70%, los orificios se practicaron cerca de la circunferencia de la placa y dos al centro, de esta manera se pudieron evaluar 6 compuestos y como control fluconazol y DMSO.

Los pocillos se llenaron con 50 μ L de los compuestos en solución a evaluar, y la misma cantidad de fluconazol y DMSO.

Se dejaron incubar a 35 °C por 48 horas.

4.4.3 Método de macrodilución del protocolo m38-a2 (CLSI).

Las pruebas para hongos filamentosos del género *Lomentospora prolificans* se evaluaron por el método de macrodilución de acuerdo al protocolo m38-a2 emitido por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés).

a) Preparación de las diluciones de compuestos a evaluar.

Se disolvieron 25.6 mg de los compuesto a evaluar en 1 ml de DMSO al 100%, a partir de esta disolución se tomaron 100 μ L y se diluyeron en 900 μ L de solución salina, se agregaron de 1 a 3 gotas de Tween 80, para obtener una concentración de 2.56 mg/ml.

b) Ajuste del inóculo.

El ajuste del inóculo para las esporas se hizo por conteo en cámara de Neubauer, para obtener las esporas sin hifas que interfirieran en el conteo se adicionaron a la caja Petri 5 ml de solución salina se hizo un raspado de la superficie de la placa, posteriormente se extrajo la solución y se transvaso a un tubo falcón acondicionado con una gasa que sirvió de filtro para retener las hifas del hongo y pasaran solamente las esporas a partir de este filtrado se hicieron las diluciones como se vio en el apartado 4.4.3 a), y se hizo el cálculo para obtener una concentración de esporas de entre 0.4×10^4 y 4×10^4 en la solución final.

c) Inoculación del medio de cultivo, dosificación de los compuestos e incubación.

Una vez conociendo la concentración de esporas en las soluciones, se tomó aquella solución que diluyendo en caldo Mueller-Hinton alcanzara la concentración de esporas de entre 0.4×10^4 y 4×10^4 , una vez inoculado el medio de cultivo se depositaron 900 μ L del medio y se transvasaron a tubos snap, una vez llenados los tubos snap con el medio inoculado, se agregó 100 μ L (por

duplicado) de los compuestos a evaluar quedando con una concentración final de 256 $\mu\text{L}/\text{mL}$, se usó como controles positivos de crecimiento solución salina 100 μL y el vehículo (DMSO al 1%), y como control negativo de crecimiento 100 μL de fluconazol con la misma concentración de los compuestos.

Se les agitó con vortex por 10 segundos a cada tubo empleado y se incubaron a 35 °C por 72 horas.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos en la síntesis y purificación de las moléculas de este proyecto, así como los resultados de las pruebas biológicas.

A. Síntesis Orgánica

5.1. Síntesis de los α -aminofosfonatos de la serie 1.

La síntesis de los compuestos de la serie 1, se realizó de acuerdo a la reacción “one pot” de Kabachnik-Fields, variando los aldehídos tal como se muestra en la tabla 8 y utilizando como reactivos fijos 4-etilaminobenzoato (3.03 mmol, 500 mg) y difenilfosfita (3.03 mmol, 580 μ L).

Tabla 8. Reactivos usados para la síntesis de la serie 1.

| Aldehído | Reactivo | n (mmol) | Cantidad |
|----------|--|----------|-------------|
| 22a | 4-Clorobenzaldehído | 3.03 | 426 mg |
| 22b | 4-metoxibenzaldehído | 3.03 | 412.5 mg |
| 22c | 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído | 3.03 | 460.4 mg |
| 22d | Isobutiraldehído | 4.53 | 410 μ L |
| 22e | 2-Etilbutiraldehído | 4.53 | 557 μ L |
| 22f | 4-dietilaminobenzaldehído | 3.03 | 536 mg |
| 22g | 4-difenilaminobenzaldehído | 1.83 | 500 mg* |
| 22h | 1-metil-1H-pirazol-4-carbaldehído | 3.03 | 333.7 mg |
| 22i | 4-Hidroxibenzaldehído | 3.03 | 370 mg |

*En el caso del 4-dietilaminobenzaldehído, del cual no se contaba con cantidad suficiente, el cálculo se tuvo que ajustar a las siguientes cantidades de reactivos: 500 mg (1.83 mmol) de 4-difenilaminobenzaldehído, 302 mg (1.83 mmol) de 4-Etilaminobenzoato y 429 mg (1.83 mmol) de difenilfosfita.

Todas las reacciones se realizaron de acuerdo al procedimiento de síntesis descrito en el apartado 4.1.1., en todas las reacciones se observó un precipitado. En la figura 8 se observa el proceso de síntesis en vortex llevado a cabo.

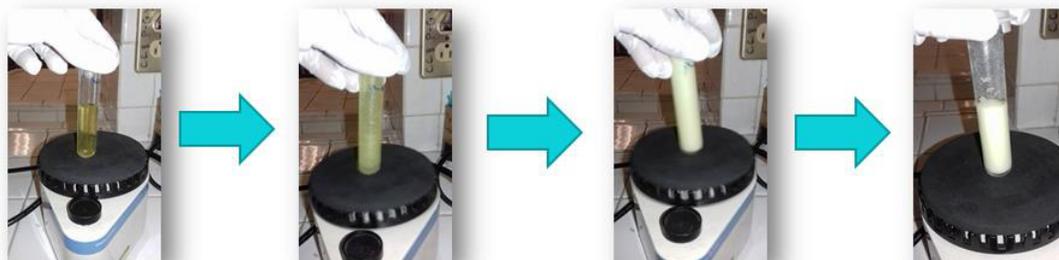


Figura 8. Proceso general de síntesis de los compuestos de la serie 1.

Como se observa en la figura 8, las materias primas empleadas en la reacción son solubles en etanol en el caso de los aldehídos alifáticos (22d y 22e) la solución se mantiene transparente, en los aldehídos con sustituyentes hidroxilo y metoxi (22b, 22c y 22i) adquiere una coloración amarillenta y los aldehídos con sustituyentes nitrogenados (22f y 22g) adquieren una coloración rojiza.

La solución mantiene ese color durante la mayor parte de la agitación, hasta que de manera espontánea, en el caso de los aldehídos aromáticos, adquiere un color blanquecino indicio claro de que la reacción se ha llevado a cabo, esto se debe a que durante la agitación aumenta la energía cinética de las moléculas, hasta un punto en el que esta energía cinética iguala la energía de activación necesaria para que se dé la reacción.

En el caso de los aldehídos alifáticos la aparición del precipitado no se da de manera espontánea, ya que en los primeros minutos se observa la formación de partículas suspendidas y se debe mantener en agitación por 15 a 20 minutos más para que se lleve a cabo la reacción por completo, ya que no es tan fácil el ataque nucleofílico como se discute en el apartado 5.1.1.

Al final se obtiene un precipitado tanto para los aldehídos alifáticos como para los aromáticos, asegurando de esta forma que se ha obtenido un producto

nuevo, ya que en comparación con las materias este se vuelve parcialmente insoluble en el disolvente. Además las cantidades agregadas de reactivos para la reacción producen la cantidad suficiente de producto para que se obtenga una solución saturada en el medio de reacción (etanol) y se produzca el precipitado.

En la tabla 9, se puede observar los diferentes tiempos para cada una de las reacciones llevadas a cabo.

Tabla 9. Tiempos de reacción para la serie 1.

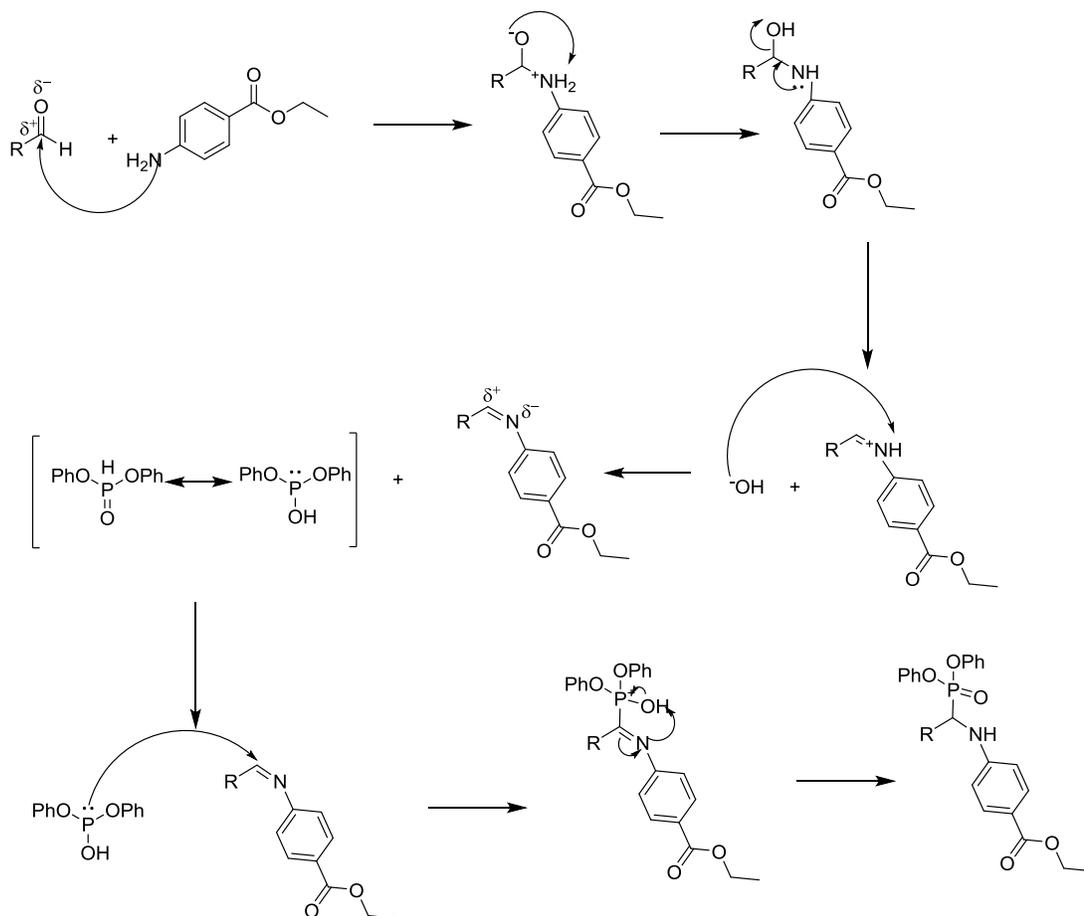
| Compuesto | Tiempo de reacción (min). |
|-----------|---------------------------|
| 23a | 25 min |
| 23b | 2 min 30 s. |
| 23c | 10 min. |
| 23d | 85 min |
| 23e | 55 min. |
| 23f | 8 min. |
| 23g | 10 min |
| 23h | 60 min en refrigeración |
| 23i | 20 min |

5.1.1 Mecanismo de la reacción de Kabachnik-Fields y su posible relación con los tiempos de reacción observados.

En el esquema 12 se puede apreciar el mecanismo de reacción de Kabachnik-Fields que de acuerdo a Cherkasov⁵⁵ y colaboradores consiste básicamente en dos etapas principales, la primera consiste en la formación de una imina, que resulta de la reacción entre el aldehído y la amina primaria, posteriormente la difenilfosfita se tautomeriza para volverse nucleofílico y de esta manera atacar al carbono de la imina formada previamente, formando el α -aminofosfonato como producto final.

Los resultados mostrados en la tabla 9, nos indican que al llevar a cabo una reacción entre un aldehído aromático y un aldehído alifático con una amina, los tiempos de reacción son más cortos para el caso de aldehídos aromáticos debido al efecto que causa la resonancia del anillo en comparación con las cargas parciales de los átomos del aldehído alifático.

Por tal motivo, los carbonos de los grupos carbonílicos de los aldehídos aromáticos tienen una densidad de carga menor (parcialmente positiva) en comparación con los carbonos de los aldehídos alifáticos y es más fácil de sustituir.



Esquema 12. Mecanismo de reacción de Kabachnik-Fields

5.1.2. Tiempo de reacción del compuesto 23a.

En el caso del compuesto 23a, el único aldehído aromático con un sustituyente electroatractor propuesto en el proyecto, durante la reacción se ve de manera inicial la formación de la imina en un tiempo menor al minuto, esto se comprobó de manera visual por la formación de un precipitado con forma de agujas características de la formación de imina del 4-clorobenzaldehído y en cromatografía de capa fina en el que pudiera parecer que no hay reacción ya

que al correr la placa en el sistema de disolventes 7:3 hexano/acetato de etilo, la imina se descompone en las materias primas, es decir se observan dos manchas con el mismo factor de retención que el 4-clorobenzaldehído y el 4-etilaminobenzoato para la imina [Figura 9 (I)], esto ocurre al parecer porque la acidez de la Sílica de la placa cromatográfica es suficiente para romper el doble enlace Carbono-Nitrógeno.

Por experiencia en el grupo de investigación se sabe que a pesar de que este fenómeno se dé en la placa cromatográfica, al momento de comprobar la estructura por RMN de ^1H Y ^{13}C , en los espectros se observan de manera clara las señales características de la imina.

Si al precipitado se le sigue agitando en vortex a los 15 minutos el medio de reacción se vuelve a ver de un color transparente, probable indicio de que el ataque nucleofílico de la fosfita se está dando, ya que al pasar diez minutos más de agitación se vuelve a ver un precipitado blanquecino, pero visualmente diferente a la imina, ya que adquiere un aspecto granuloso en lugar de forma de aguja tal como se mencionó anteriormente, además de que por cromatografía en placa fina se observa que se obtiene un compuesto con un R.f. diferente a las materias primas.

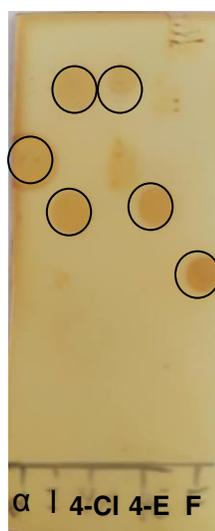


Figura 9. Placa cromatográfica en la que se observan: **α**) compuesto 23a puro, **I**) Imina que muestra dos manchas parecidas a las materias primas, pero que

por Resonancia Magnética Nuclear se confirma que es un solo compuesto, **4-CI**) 4-clorobenzaldehído, **4-E**) 4-etilaminobenzoato, **F**) difenilfosfita.

5.1.3 Tiempo de reacción del compuesto 23h.

Para el caso del compuesto 23h, el cual es derivado del 1-metil-1H-pirazol-4-carbaldehído, se agitó en vortex por un tiempo de hora y media, no se observó precipitado durante la agitación, así que se dejó en congelación por una hora, observándose el precipitado esperado, en este caso la agitación pudo haber dado pauta a que se alcanzara la energía de activación y al congelar se logró la saturación del compuesto en el etanol.

5.2. Purificación de los α -aminofosfonatos de la serie 1.

La purificación de los α -aminofosfonatos de la serie 1 (figura 10), se llevó a cabo haciendo lavados con etanol. Además, al sobrenadante se le dejó en congelación para que el compuesto formado se recrystalizará, cuando ya no había precipitado se procedió a hacer una cromatografía en capa fina para descartar la presencia del compuesto de interés en el sobrenadante, si se verificaba su presencia se procedía a una purificación por columna.

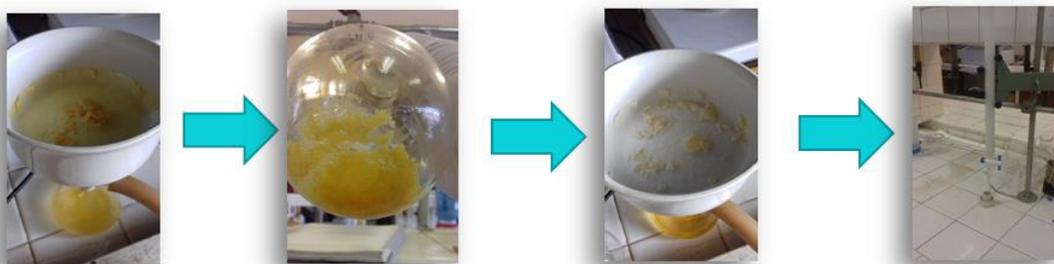


Figura 10. Proceso de purificación de los compuestos de la serie 1.

El proceso de recrystalización permite la formación de conglomerados granulosos que disminuyen la probabilidad de que el compuesto se disuelva en el disolvente y vuelva a quedar en el sobrenadante, para el caso del compuesto 23d y 23e, los derivados de aldehídos alifáticos la recrystalización se tornó difícil ya que al parecer su naturaleza alifática aumenta la solubilidad en etanol.

Para el compuesto 23e (derivado de etilbutiraldehído, 22e) se realizaron hasta 5 recristalizaciones, hasta que se dejó de ver el precipitado en cantidad suficiente como para volver a filtrar,

Para el compuesto 23d (derivado de isobutiraldehído, 22d), se hicieron intentos de recristalización, solo se logró de manera eficiente la primera vez ya que es muy soluble en etanol y la mayoría del compuesto se disolvió durante los lavados por lo que se tuvo que purificar en columna con un sistema 7:3 Hexano/acetato de etilo. Para el compuesto 23g el producto es completamente insoluble en etanol por lo que fue posible recuperar todo el producto por filtración al vacío la primera vez aunque no se obtuvo el producto puro por lo que fue necesaria la purificación del compuesto en columna usando un sistema 7:3 Hexano/acetato de etilo, para el compuesto 23b, 23c, 23f y 23h la mayor parte del producto se obtiene en la primera filtración, en el caso del compuesto 23a se obtuvo del filtrado una mezcla de la imina y del α -aminofosfonato que se pudo separar en columna con el sistema 3:2 acetato de etilo/ hexano.

Es importante señalar, que para los compuestos de la serie 1, se logró que la purificación se realizara casi exclusivamente por recristalización, filtración al vacío y lavados con etanol y al final la recuperación del disolvente (etanol) al momento de la rotaevaporación, dicho disolvente puede ser reutilizado. Este procedimiento se puede considerar como un método de purificación amigable con el medio ambiente, en comparación con la purificación en columna cromatográfica (que se utilizó solo en pocos casos), ya que en esta última se requiere el uso de sílica gel (que debe ser desechada luego de varios usos) y mezcla de disolventes que no pueden ser reutilizados después de la rotaevaporación y por lo tanto son considerados como desechos directamente.

Las cantidades y rendimientos obtenidos de la serie 1 se muestran en la tabla 10, los rendimientos en general son de buenos a altos siendo el más bajo para el compuesto 23c (el derivado de 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído, 22c) con el 72% y el más alto para el compuesto 23d (el derivado de isobutiraldehído 22d) con el 94%.

Existen muchos reportes en la literatura en los que la síntesis de los α -aminofosfonatos se lleva a cabo por métodos no convencionales y por el uso de líquidos iónicos, como el reportado por Zahed Karimi⁵⁶ y colaboradores en el 2016, en el que llevaron a cabo la síntesis de α -aminofosfonatos mediante el uso de sulfato de trietilamonio como un catalizador eficiente para la síntesis de este tipo de compuestos el cual es un líquido iónico que es reutilizable y con el cual obtuvieron altos rendimientos (80%-96%), como este hay muchos reportes científicos en la que los líquidos iónicos reutilizables tienen un papel importante en la síntesis de α -aminofosfonatos, de igual forma se han reportado métodos no convencionales como el uso de irradiación por microondas, reportado por diversos investigadores como Koteswara Rao⁵⁷ y colaboradores, en el cual obtienen los productos correspondientes de la reacción de Kabachnik-Fields con ayuda de microondas. El presente proyecto muestra ventajas sobre lo reportando en la síntesis de los compuestos ya mencionados, ya que no fue necesario usar líquidos iónicos los cuales deben ser preparados ([SFHEA][NO₃], [SFHEA][CF₃COO], [SFHEA][CH₃SO₃], [SFHEA][HSO₄]) y a pesar de ser reutilizables tienen un límite de uso, el uso de líquidos iónicos se sustituyó en el presente proyecto por etanol por ser un disolvente común en los laboratorios de química orgánica y que se puede reutilizar de acuerdo a la metodología propuesta. Con respecto al microondas y a otras técnicas no convencionales (Ultrasonido, mecano-síntesis, entre otros), el uso de vortex en el presente proyecto para llevar a cabo la agitación, presenta ventajas tales como el uso de equipo de bajo costo, además de un consumo menor de energía eléctrica, lo cual contribuye a la reducción del costo del proyecto, aunado a los altos rendimientos observados (71%-95%).

Tabla 10. Cantidades y rendimientos obtenidos en la síntesis de la serie 1.

| Compuesto | Cantidad Obtenida | Rendimiento |
|-----------|-------------------|-------------|
| 23a | 1.25 g | 85% |
| 23b | 1.52 g | 95% |
| 23c | 117 g | 72% |
| 23d | 1.23 g | 94% |
| 23e | 0.96 g | 71% |
| 23f | 1.16 g | 75% |
| 23j | 1.14 g | 90% |
| 23h | 1.23 g | 86% |
| 23i | 1.13 g | 75% |

5.3. Elucidación estructural de los α -aminofosfonatos de la serie 1.

La identificación estructural de los α -aminofosfonatos de la serie 1 se realizó por la técnica de resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{31}P (RMN ^1H , ^{13}C y ^{31}P).

A continuación se muestran los espectros del compuesto 23a:

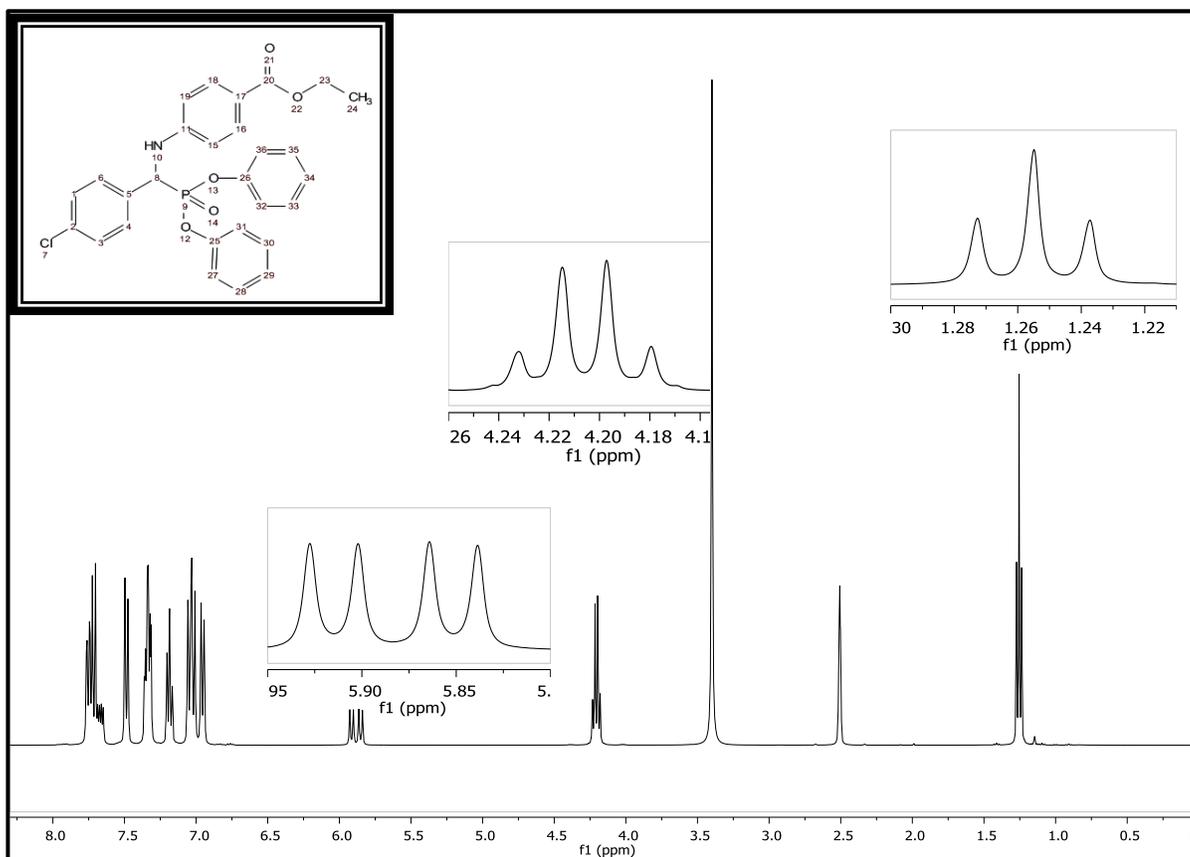


Figura 11. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) del compuesto 23a.

En el espectro de la figura 11 para el compuesto 23a, disuelto en DMSO-d_6 , se observan las siguientes señales: con un desplazamiento (δ) 1.25 ppm se observa un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 7.1 Hz, que integra para 3 protones y que corresponde a los protones del metilo de la parte etoxi de la molécula, en δ 4.20 se observa un cuarteto con $J = 7.1$ Hz que integra para 2 protones pertenecientes a los protones del metileno del etoxilo, en δ 5.90 se observa un doble de dobles con $J = 25.4$ y 10.4 Hz, que integra para un protón y que corresponde al protón del carbono quiral presente en la

molécula el cual se está acoplado con el fósforo y con el protón de la amina, en la región de protones aromáticos se observan las siguientes señales: en δ 6.95 se observa un doble con $J= 8.3$ Hz que integra para 2 protones y que corresponde a los protones en posición *meta* al carbonilo de la molécula, en δ 7.04 un doble de dobles con $J= 11.1$ y 8.7 Hz que integra para 4 protones que corresponden a los protones en posición *meta* a los oxígenos del fosfonoéster de la molécula, en δ 7.18 se observa un triplete con $J= 7.4$ Hz que integra para 2 protones que corresponde a los protones en posición *para* al fosfonoéster, en δ 7.34 un triple de dobles con $J= 8.0$ y 2.8 Hz que integra para 4 protones pertenecientes a los protones *orto* al oxígeno del fosfonoéster en δ 7.49 un doble con $J= 8.4$ Hz que integra para 2 protones y que corresponde a los protones *orto* al cloro, en δ 7.67 un multiplete que integra para 1 protón que pertenece al protón unido al nitrógeno, en δ 7.71 un doble con $J=8.8$ Hz que integra para 2 protones perteneciente a los protones en posición *orto* al carbonilo y en δ 7.75 un doble de dobles con $J= 8.5$ y 1.9 Hz que integra para 2 protones que corresponde a los protones *meta* al cloro.

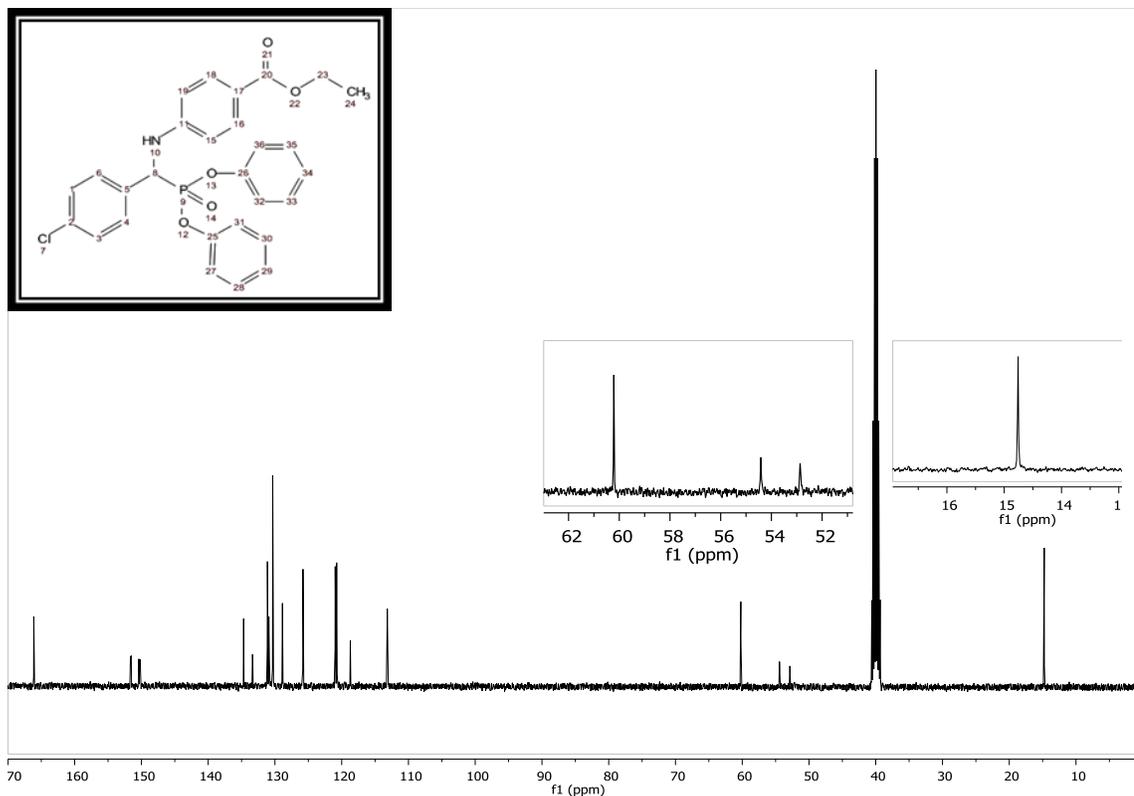


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, DMSO d_6) del compuesto 23a.

En la figura 12 se observa el espectro de carbono 13 del compuesto 23a, se pueden apreciar las siguientes señales: en δ 14.7 ppm se observa la señal del metilo de la parte etoxi de la molécula, en δ 54.3 y δ 52.4 ppm se observan dos señales con una $J = 159.4$ Hz, correspondientes al carbono quiral de la molécula, esta señal doble se debe al acoplamiento que se da entre el carbono mencionado y el fósforo, en δ 60.2 ppm se observa la señal del carbono metilénico del etoxilo del éster, en la región de los carbonos aromáticos se observan las siguientes señales: en δ 113.18 la señal del carbono en posición *orto* al nitrógeno, en δ 118.72 la señal del carbono en posición *orto* al cloro, en δ 120.74 la señal del carbono unido al carbono quiral de la molécula, en δ 120.97 la señal del carbono en posición *para* al oxígeno, en δ 125.81 la señal del carbono en posición *meta* al cloro, en δ 128.89 la señal del carbono en posición *meta* al nitrógeno, en δ 130.31 la señal del carbono en posición *orto* al oxígeno, en δ 131.14 la señal del carbono unido al cloro, en δ 133.36 la señal del carbono unido al nitrógeno, en δ 134.70 la señal del carbono unido al

carbono del carbonilo de la molécula, en 151.60 la señal de los carbonos unidos a los oxígenos del fosfonoéster de la molécula.

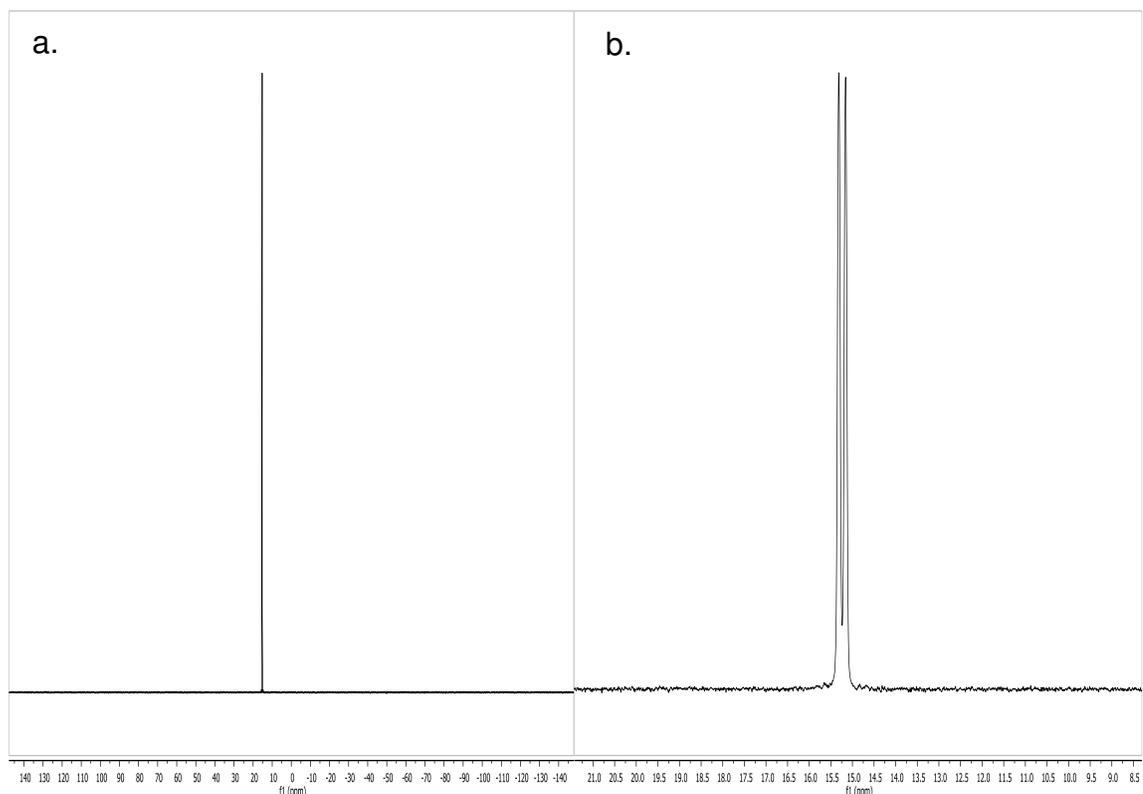
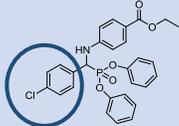
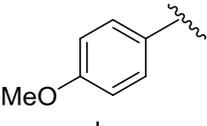
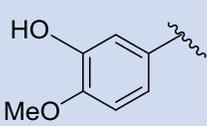
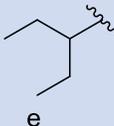


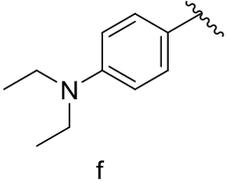
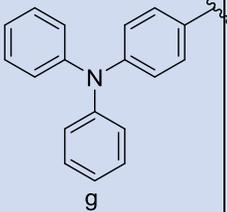
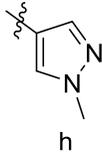
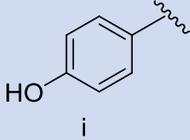
Figura 13. Espectro de RMN ^{31}P acoplado (a) y desacoplado (b) (400 MHz, DMSO d_6) de 23a.

En la figura 13 se muestran los espectros de fósforo acoplado y desacoplado con protón del compuesto 23a, el espectro de fósforo desacoplado nos muestra la presencia del fósforo en la molécula, mientras que el espectro de fósforo acoplado a protón nos indica que efectivamente existe un acoplamiento entre el fósforo y el protón del carbono quiral.

Es importante indicar que las señales de RMN del etoxilo del éster, del carbono quiral, de los anillos aromáticos y del fósforo mostradas para el compuesto 23a son señales comunes en general con las moléculas del resto de los α -aminofosfonatos de la serie 1; en la tabla 11 se muestra el resumen de las señales de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{31}P para cada compuesto y se presentan de manera particular las señales que no son comunes entre la serie de compuestos.

Tabla 11. Resumen de las señales de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{31}P observadas para los α -aminofosfonatos de la serie 1.

| Compuesto (23a-23i) | Datos de RMN de ^1H | Desplazamientos químicos de ^{13}C | ^{31}P acoplado y desacoplado con H |
|--|---|---|--|
|  <p>A</p> | δ (ppm): 1.25 (t, J=7.1Hz,3H), 4.20 (c, J=7.1Hz,2H), 4.20 (c, J=7.1Hz,2H), 5.64(dd, J=25.4Hz-10.2Hz,1H) 6.75-7.75 (m, 19H). | δ (ppm): 14.7, 54.4, 60.2, 110-150 (Ar-C), 166.1 (C=O). | δ (ppm): 15.24 |
|  <p>b</p> | δ (ppm): 1.25 (t, J=7.1Hz,3H), 3.45 (s,3H), 4.20 (c, J=7.1Hz,2H), 5.64 (dd, J=25.4Hz-10.2Hz,1H), 6.75-7.75(m,19H). | δ (ppm): 14.7, 54.4, 55.7, 60.2, 110-150(Ar-C), 166.1 (C=O). | δ (ppm): 14.42 |
|  <p>c</p> | δ (ppm): 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.32 (c, J = 7.1 Hz, 2H), 5.10 (dd, J = 24.1, 7.9 Hz, 1H), 5.66 (s, 1H), 7.95 – 6.56 (m, 18H). | δ (ppm): 14.41 , 54.93, , 55.98, 60.34, 110-150(Ar-C), 166.56 (C=O). | δ (ppm): 14.56 |
|  <p>d</p> | δ (ppm):1.04 y 1.12(d, J=6.9Hz,3H), 1.36 (t,J=7.1Hz,3H), 2.47 (m,1H), 3.75 (dd,19.9, 3.7Hz, 1H), 4.29 (c,7.1 Hz, 2H), 7.78-6.56 (m, 14H) | δ (ppm): 13.37, 20.51, 17.39, 30.15, 55.24, 59.90, 155-110(Ar-C), 167.5 (C=O). | δ (ppm): 14.42 |
|  <p>e</p> | δ (ppm): 0.96 (dt, J= 10.7, 7.4 Hz, 1H), 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.62 –1.40 (m, 2H), 2.06 –1.78 (m, 2H), 3.98 (dd, J = 19.8, 3.4 Hz, 1H),4.29 (c, J = 7.1 Hz, 2H), | δ (ppm): 11.22, 13.37, 22.23 , 22.84, 43.58, 51.71, 59.89, 155-110(Ar-C), 167.5 (C=O). | δ (ppm): 17.18 |

| | | | |
|--|---|---|-----------------------|
| | 7.81 – 6.51 (m, 14H). | | |
|  <p>f</p> | δ (ppm): 1.05 (t, J=6.9Hz,6H), 1.25 (t, J=7.1Hz,3H), 3.30 (c, J=6.9Hz,4H), 4.20 (c, J=7.1Hz,2H), 5.64 (dd, J=25.4Hz-10.2Hz,1H), 6.75-7.75 (m,19H). | δ (ppm): 12.8, 14.7, 44.0, 55.7, 60.2, 110-150(Ar-C), 166.1. (C=O) | δ (ppm): 14.42 |
|  <p>g</p> | δ (ppm): 1.25 (t, J=7.1Hz,3H), 4.20 (c, J=7.1Hz,2H), 5.64 (dd, J=25.4Hz-10.2Hz,1H) 6.75-7.75 (m, 29H). | δ (ppm): 14.7, 55.7, 60.2, 110-155 (Ar-C), 166.1 (C=O). | δ (ppm): 15.24 |
|  <p>h</p> | δ (ppm): 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 3.95 (s, 1H), 4.20 (c, J=7.1Hz,2H), 5.64 (dd, J=25.4Hz-10.2Hz,1H), 7.88 – 6.80 (m, 17H). | δ (ppm): 14.7, 38.89, 55.7, 60.2, 162.01 – 109.23 (Ar-C), 166.1 (C=O). | δ (ppm): 15.24 |
|  <p>i</p> | δ (ppm): 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 4.32 (c, J = 7.1 Hz, 2H), 5.10 (dd, J = 24.1, 7.9 Hz, 1H), 5.66 (s, 1H), 7.95 – 6.56 (m, 19H). | δ (ppm): 14.41, 54.93, 60.34, 110-150(Ar-C), 166.56 (C=O). | δ (ppm): 17.18 |

5.4. Síntesis de los ácidos α -aminofosfónicos de la serie 2.

La síntesis de la serie 2 se llevó a cabo por irradiación de microondas por 40 minutos 100 watts y a una temperatura de 140 °C, la reacción fue una hidrólisis básica de ésteres usando como base carbonato de potasio, ya que al ser de grado industrial el etanol usado para la reacción existe la posibilidad de que se encuentre agua en el medio de reacción, condición necesaria para la hidrólisis de ésteres, los α -aminofosfonatos obtenidos de la primera serie fueron usados para obtener la segunda serie, la cantidades usadas de reactivos se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Cantidad de reactivos usados para la síntesis de la serie 2.

| Compuesto final | cantidad de reactivos (mg) | mmol. |
|-----------------|---|-------|
| 24a | 4a: 500 K ₂ CO ₃ : 141.2 | 0.96 |
| 24b | 4b: 500 K ₂ CO ₃ : 135.6 | 0.97 |
| 24c | 4c: 500 K ₂ CO ₃ : 129.5 | 0.94 |
| 24d | 5d: 500 K ₂ CO ₃ : 152.4 | 1.10 |
| 24e | 5e: 500 K ₂ CO ₃ : 143.7 | 1.04 |
| 24f | 5f: 500 K ₂ CO ₃ : 123.7 | 0.90 |
| 24g | 5g: 300 K ₂ CO ₃ : 63.3 | 0.46 |
| 24h | 5h: 500 K ₂ CO ₃ : 140.6 | 1.02 |

Posterior a la reacción en microondas se observa de manera visual que efectivamente se llevó a cabo una transformación química del compuesto ya que los reactivos son en su mayoría parcialmente insolubles en etanol y en la mezcla obtenida después de la reacción se observa que el nuevo producto es soluble en etanol y solo se observa el precipitado del carbonato de potasio recuperado.

Los reportes respecto a la monodesprotección de ácidos fosfínicos incluyen condiciones de reacción drásticas como la reportada por Dawson⁵⁸ y colaboradores, en el que hacen uso de ácido clorhídrico a una concentración de 20% (volumen/volumen), en el presente proyecto se probaron condiciones de reacción más suaves que las reportadas por los investigadores, ya que el carbonato de potasio es una base catalogada como suave, además el uso de microondas le da a la síntesis propuesta un carácter amigable con el ambiente.

5.5. Purificación de los ácidos α -aminofosfínicos de la serie 2.

Los ácidos α -aminofosfínicos de la serie 2 presentan una mayor solubilidad en etanol, el cual se usó como disolvente en las reacciones, por lo que no se dio una precipitación del compuesto de interés, por lo tanto, la purificación se llevó a cabo por cromatografía en columna para obtener los productos deseados.

Para realizar la purificación primero se probaron sistemas de elución para poder separar eficientemente los componentes de cada mezcla de reacción, se encontró por cromatografía en capa fina que en el sistema 7:3 hexano/acetato de etilo en todas las mezclas de reacción se observan las manchas correspondientes a las materias primas iniciales de los precursores (23a-23i), es decir, 4-aminobenzoato, difenilfosfita y el aldehído correspondiente, sin embargo, también se observa un producto polar que se queda en el punto de aplicación, al probar un sistema 7:3 acetato de etilo/metanol, se observa que dicho producto asciende en la placa.

Todos los compuesto obtenidos de la serie 2 se purificaron utilizando gradientes de sistemas de disolventes, primero se usó un sistema 8:2 acetato de

etilo/hexano, para eliminar todos los compuestos no polares, posteriormente se eluyó la columna con acetato al 100% para empezar a separar los subproductos polares, posteriormente se cambió al sistema 7:3 acetato de etilo/metanol, para obtener el producto deseado En el momento en el que se observó el producto esperado (24a - 24h) por CCF (Cromatografía en capa fina) (figura 14), se termina de eluir la columna con metanol al 100%, en la tabla 13 se muestran los rendimiento obtenidos para cada compuesto.

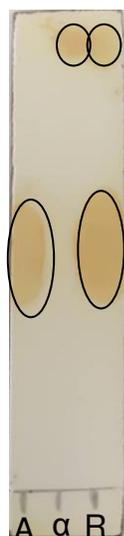


Figura 14. Placa cromatográfica en sistema 7:3 Metanol/ Acetato de etilo, en el que se observa: **A)** ácido α -aminofosfínico puro, **α)** α -aminofosfonato **R)** crudo de reacción

Tabla 13. Cantidades y rendimientos obtenidos de la síntesis de la serie 2.

| Compuesto | Cantidad obtenida (mg) | Rendimiento |
|-----------|------------------------|-------------|
| 24a | 268 | 63% |
| 24b | 174.7 | 42% |
| 24c | 234.1 | 55% |
| 24d | 257 | 63% |
| 24e | 238 | 57% |
| 24f | 239 | 55% |
| 24g | 194 | 73% |
| 24h | 225.4 | 53% |

Como se puede observar en la tabla 13 los rendimientos obtenidos son moderados (entre el 42% y 73%), esto se debe a la descomposición del α -aminofosfonato en las materias primas de partida, además de la formación de subproductos lo cual disminuye el rendimiento de los ácidos α -aminofosfónicos de la serie 2.

5.6. Elucidación estructural de los ácidos α -aminofosfónicos de la serie 2.

Se llevó a cabo la elucidación estructural para los ácidos α -aminofosfónicos de la serie 2, corroborando la obtención de los compuestos de interés por RMN de ^1H , ^{13}C , ^{31}P . A continuación se muestran los espectros de RMN del compuesto 24b.

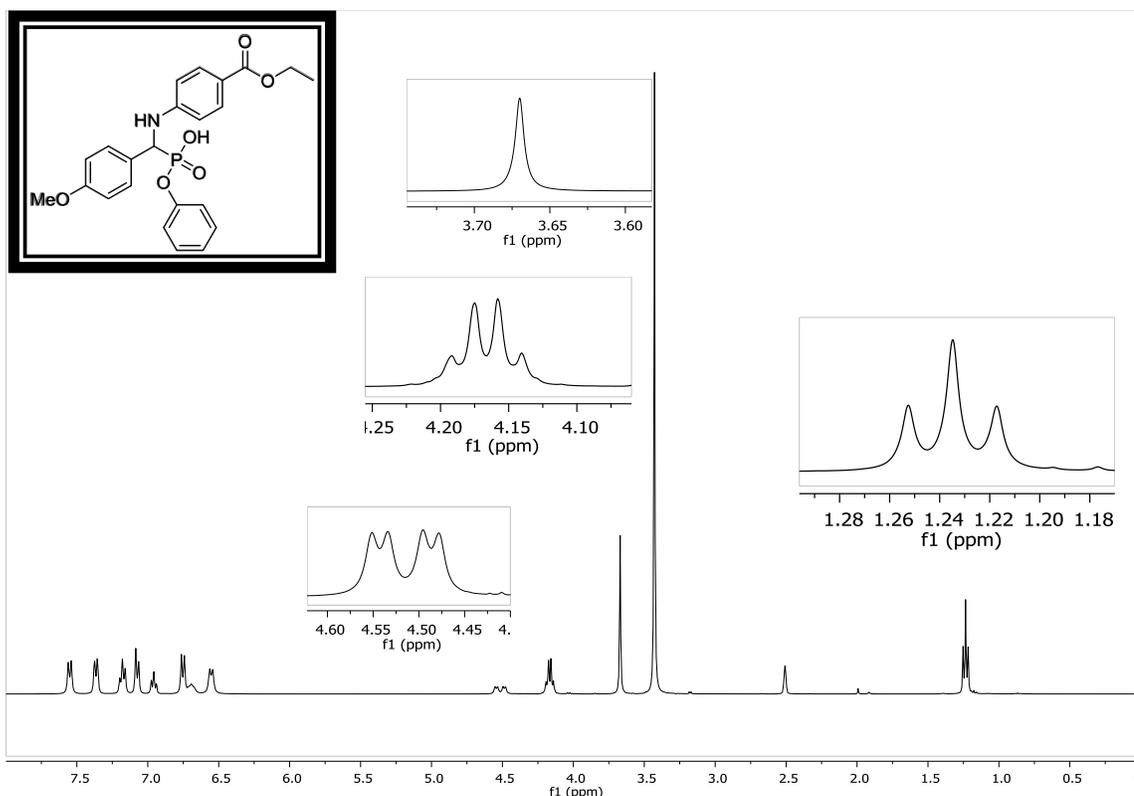


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz MeOD) del compuesto 24b.

En el espectro de la figura 15 para el compuesto 24b se observan las siguientes señales: con un desplazamiento (δ) 1.23 ppm se observa un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 7.1 Hz, que integra para tres protones y que corresponde a los protones del metilo del etoxilo del éster, en δ 3.67 ppm se

observa un singulete que integra para tres protones correspondientes a los protones del grupo etoxilo, en δ 4.17 ppm se observa un cuarteto con $J= 7.1$ Hz que integra para dos protones correspondientes al metileno del etoxilo del éster, en δ 4.51 ppm se observa un doble de dobles con $J's= 22.4$ y 7.2 Hz que integra para dos protones y que corresponde al protón del carbono quiral de la molécula, que se está acoplando con el fósforo y con el protón de la amina en la región de protones aromáticos se observan las siguientes señales: en δ 6.55 se observa un doble con $J= 8.1$ Hz que integra para 2 protones y que corresponde a los protones en posición *meta* al carbonilo de la molécula, en δ 6.74 un doble con $J= 8.9$ Hz que integra para 2 protones que corresponden a los protones en posición *meta* a los oxígenos del fosfonoéster de la molécula, en δ 6.96 se observa un triplete con $J= 7.2$ Hz que integra para 2 protones que corresponde a los protones en posición *para* al fosfonoéster, en δ 7.07 un doble con $J= 7.9$ y que integra para 2 protones pertenecientes a los protones *orto* al oxígeno del fosfonoéster, en δ 7.18 un triple con $J= 7.7$ Hz que integra para 2 protones y que corresponde a los protones *orto* al cloro, en δ 7.37 un doble con $J= 7.4$ Hz que integra para 2 protones perteneciente a los protones en posición *orto* al carbonilo y en δ 7.55 un doble con $J= 8.5$ Hz que integra para 2 protones que corresponde a los protones *meta* al cloro.

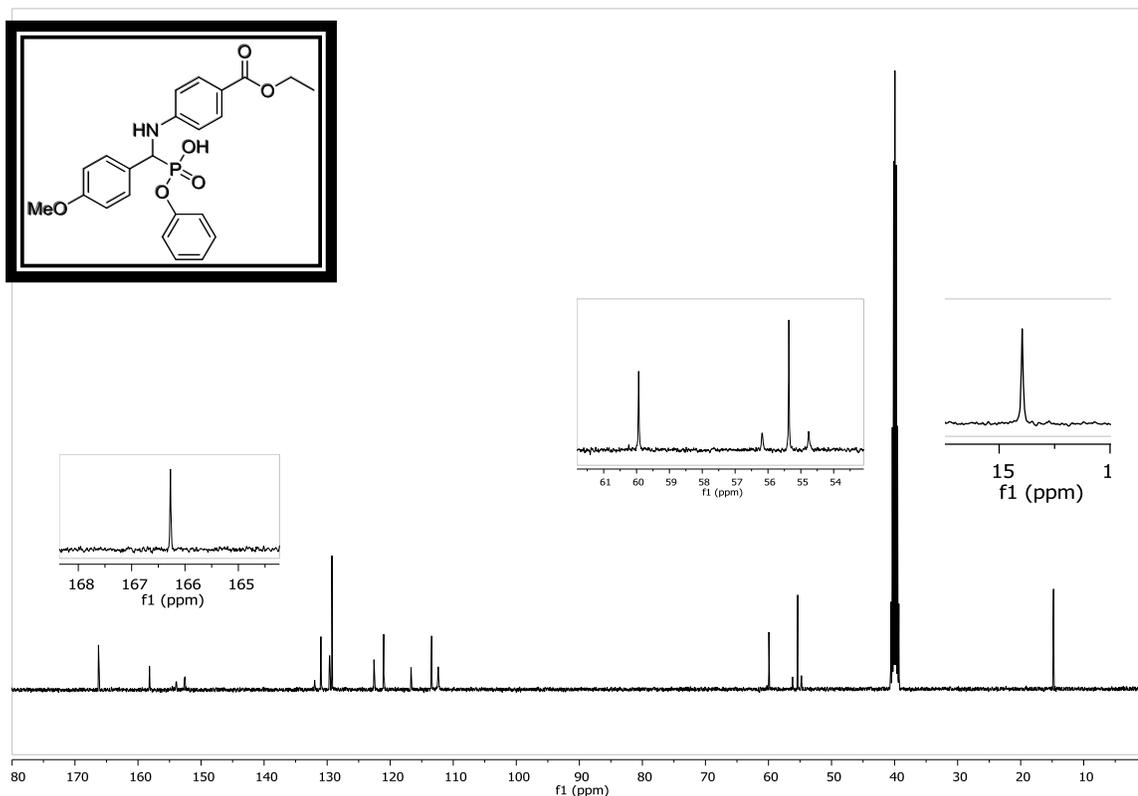


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz MeOD) del compuesto 24b.

En la figura 16 se muestra el espectro de RMN de carbono 13 para el compuesto 24b, en el cual se pueden observar las siguientes señales: en δ 14.8 ppm se observa la señal del carbono metílico del etoxilo del éster, en δ 55.3 ppm se observa el carbono metílico del grupo metoxilo, esta señal se encuentra entre dos señales que aparecen en δ 54.8 ppm y δ 56.2 ppm que tienen una $J = 135.6$ Hz las cuales se deben al acoplamiento entre el carbono quiral de la molécula y el fósforo, en δ 60 ppm se observa la señal del carbono metilénico del etoxilo del éster, en la región de los carbonos aromáticos se observan las siguientes señales: en δ 112.39 la señal del carbono en posición *orto* al nitrógeno, en δ 113.44 la señal del carbono en posición *orto* al cloro, en δ 116.70 la señal del carbono unido al carbono quiral de la molécula, en δ 121.06 la señal del carbono en posición *para* al oxígeno, en δ 122.59 la señal del carbono en posición *meta* al cloro, en δ 129.50 la señal del carbono en posición *meta* al nitrógeno, en δ 131.00 la señal del carbono en posición *orto* al oxígeno, en δ 131.99 la señal del carbono unido al cloro, en δ 152.60 la señal del

carbono unido al nitrógeno, en δ 158.19 la señal del carbono unido al carbono del carbonilo de la molécula, en 166.29 la señal de los carbonos unidos a los oxígenos del fosfonoéster de la molécula.

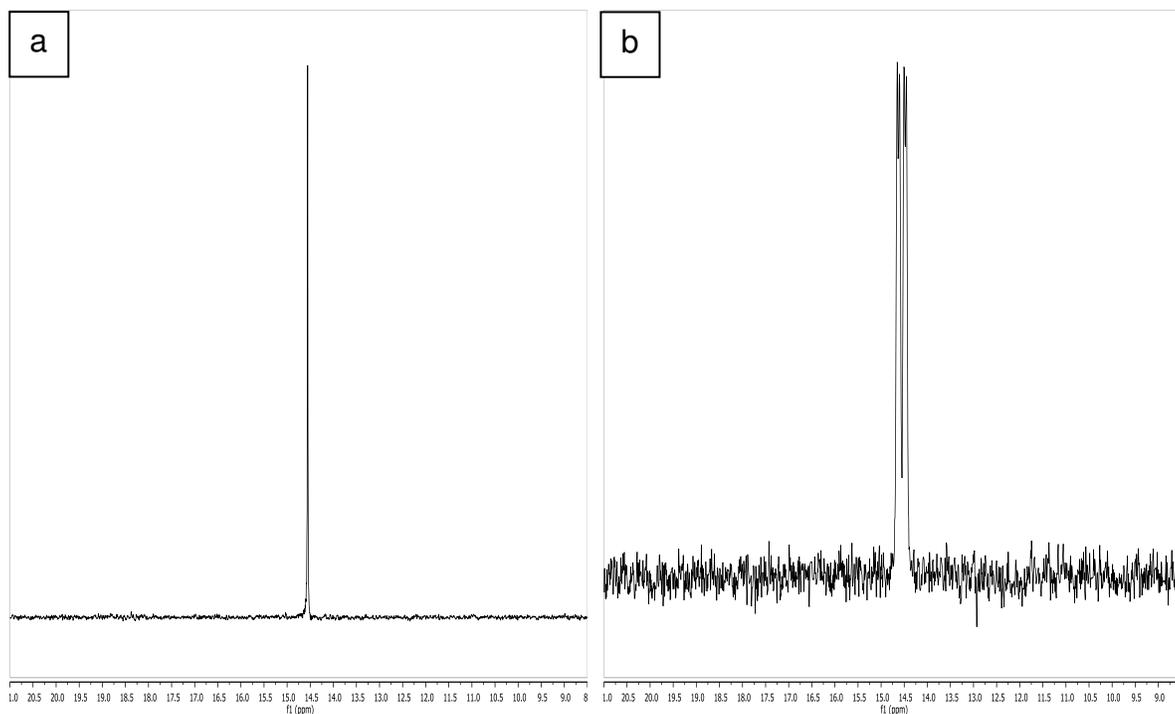
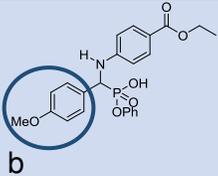
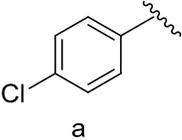
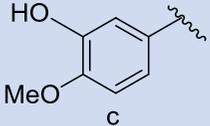
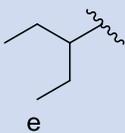


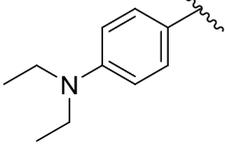
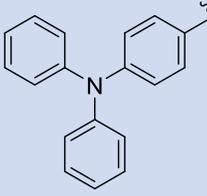
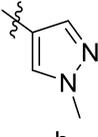
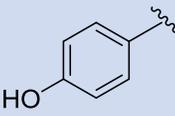
Figura 17. Espectro de ^{31}P (400 MHz MeOD) desacoplado (a) y acoplado (b) con protón del compuesto 24b.

En la figura 17 se observan los espectros de fósforo 31 acoplado y desacoplado con protón para el compuesto 24b, la señal de fósforo desacoplado corrobora la presencia del fósforo en la estructura de la molécula, en el espectro de fósforo 31 acoplado se observa el acoplamiento entre el fósforo y el protón del carbono quiral.

Los compuestos de la serie 2 de presentan señales comunes entre sí, en la tabla 14 se muestran las señales de cada uno de los compuestos, marcando de manera particular las señales que no son comunes entre la serie de compuestos.

Tabla 14. Señales de los compuestos de la serie 2.

| Compuesto (24a-24i) | Datos de RMN de ^1H | Desplazamientos químicos de ^{13}C | ^{31}P acoplado y desacoplado con H |
|---|---|--|--|
|  <p>b</p> | δ (ppm): 1.25 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 4.20 (c, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 4.20 (c, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 5.64(dd, $J=25.4\text{Hz}-10.2\text{Hz}$, 1H) 6.75-7.75 (m, 14H). | δ (ppm): 14.7, 54.4, 60.2, 110-150 (Ar-C), 166.1 (C=O). | δ (ppm): 14.56 |
|  <p>a</p> | δ (ppm): 1.25 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 3.45 (s, 3H), 4.20 (c, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 5.64 (dd, $J=25.4\text{Hz}-10.2\text{Hz}$, 1H), 6.75-7.75(m, 14H). | δ (ppm): 14.7, 54.4, 55.7, 60.2, 110-150(Ar-C), 166.1 (C=O). | δ (ppm): 14.42 |
|  <p>c</p> | δ (ppm): 1.36 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.32 (c, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H), 5.10 (dd, $J = 24.1, 7.9 \text{ Hz}$, 1H), 5.66 (s, 1H), 7.95 – 6.56 (m, 13H). | δ (ppm): 14.41, 54.93, 55.98, 60.34, 110-150(Ar-C), 166.56 (C=O). | δ (ppm): 14.56 |
|  <p>d</p> | δ (ppm): 1.04 y 1.12(d, $J=6.9\text{Hz}$, 3H), 1.36 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 2.47 (m, 1H), 3.75 (dd, 19.9, 3.7Hz, 1H), 4.29 (c, 7.1 Hz, 2H), 7.78-6.56 (m, 9H) | δ (ppm): 13.37, 20.51, 17.39, 30.15, 55.24, 59.90, 155-110(Ar-C), 167.5 (C=O). | δ (ppm): 14.42 |
|  <p>e</p> | δ (ppm): 0.96 (dt, $J= 10.7, 7.4 \text{ Hz}$, 1H), 1.36 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H), 1.62 –1.40 (m, 2H), 2.06 –1.78 (m, 2H), 3.98 (dd, $J = 19.8, 3.4 \text{ Hz}$, 1H), 4.29 (c, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H), 7.81 – 6.51 (m, 9H). | δ (ppm): 11.22, 13.37, 22.23, 22.84, 43.58, 51.71, 59.89, 155-110(Ar-C), 167.5 (C=O). | δ (ppm): 17.18 |

| | | | |
|--|---|---|-----------------------|
|  <p style="text-align: center;">f</p> | δ (ppm): 1.05 (t, J=6.9Hz,6H), 1.25 (t, J=7.1Hz,3H), 3.30 (c, J=6.9Hz,4H), 4.20 (c, J=7.1Hz,2H), 5.64 (dd, J=25.4Hz-10.2Hz,1H), 6.75-7.75 (m,14H). | δ (ppm): 12.8, 14.7, 44.0, 55.7, 60.2, 110-150(Ar-C), 166.1. (C=O) | δ (ppm): 14.42 |
|  <p style="text-align: center;">g</p> | J=25.4Hz-10.2Hz,1H) 6.75-7.75 (m, 29H). | δ (ppm): 14.7, 55.7, 60.2, 110-155 (Ar-C), 166.1 (C=O). | δ (ppm): 15.24 |
|  <p style="text-align: center;">h</p> | δ (ppm): 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 3.95 (s, 1H), 4.20 (c, J=7.1Hz,2H), 5.64 (dd, J=25.4Hz-10.2Hz,1H, 7.88 – 6.80 (m, 17H). | δ (ppm): 14.7, 38.89, 55.7, 60.2, 162.01 – 109.23 (Ar-C), 166.1 (C=O). | δ (ppm): 15.24 |
|  <p style="text-align: center;">i</p> | δ (ppm): 1.36 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 4.32 (c, J = 7.1 Hz, 2H), 5.10 (dd, J = 24.1, 7.9 Hz, 1H), 5.66 (s, 1H), 7.95 – 6.56 (m, 19H). | δ (ppm): 14.41 , 54.93, 60.34, 110-150(Ar-C), 166.56 (C=O). | δ (ppm): 17.18 |

B. Ensayos antifúngicos.

Una vez terminada la etapa de síntesis y caracterización de las dos series propuestas para el proyecto se procedió a evaluar su actividad biológica contra levaduras del género *Candida* y *Lomentospora prolificans*, en este apartado se describen los resultados obtenidos de los diferentes ensayos que se realizaron con este propósito.

5.7 Método de difusión en placa.

El primer ensayo para la evaluación antifúngica de los compuestos contra las diferentes cepas de *Candida* se realizó por el método de difusión en placa por disco impregnado o antibiograma, esperando observar un halo de inhibición por parte de los compuesto a evaluar, sin embargo esto no fue posible ya que al revisar las placas a las 48 horas se encontraron contaminadas, esto se debió a que durante el sembrado en césped con el uso de hisopos las placas quedaron expuestas a corrientes de aire a pesar de estar en un área estéril de mecheros, además hubo problemas en la aplicación de los discos por cuestiones de falta de experiencia en el manejo del disco impregnado, por lo que se tomó la decisión de la evaluación de los compuestos por el uso de difusión en placa por pocillos.

La técnica que sirvió para dar un mejor panorama de la actividad de los compuestos fue la de difusión en pocillo, como se puede observar en la figura 18, en la cual se muestra el ensayo realizado en el cual los compuestos se adicionaron en la circunferencia de la placa y en el centro se agregaron los controles los cuales fueron el fluconazol y el vehículo (DMSO), se puede observar que el fluconazol tiene un halo de inhibición notorio, mientras que los compuestos y el vehículo no presentan ningún halo de inhibición, el hecho de que el vehículo no presente actividad nos indica que éste es inocuo ante las levaduras, y que los compuestos no tienen actividad alguna contra las diferentes cepas de *Candida* evaluadas en el proyecto, esto se puede deber a

varios factores, como puede ser que no existan receptores que reconozcan los compuestos como potencial sustrato para el desarrollo de la levadura, por otro lado el tamaño de las moléculas sintetizadas en el presente proyecto les imposibilita que puedan atravesar la pared y la membrana por difusión facilitada, esta última formada en su mayor parte por polisacáridos como Manán, Glucán y Quitina, que al ser de carácter polar impiden que las moléculas presentadas en este proyecto con carácter apolar, las puedan atravesar.

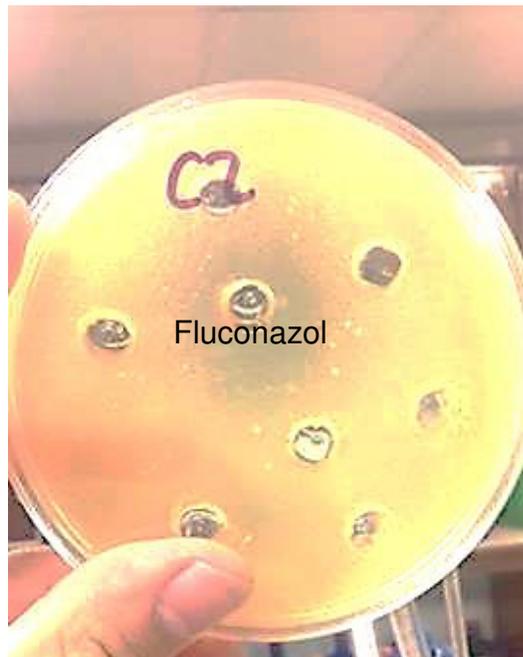


Figura 18. Resultados obtenidos de la evaluación de la actividad de compuestos en difusión en disco por pocillo contra diferentes cepas de *Candida*, al centro fluconazol, en la circunferencias los compuesto evaluados.

5.9 Resultados del método de macrodilución del protocolo m38-a2 (CLSI).

Este método se utilizó para evaluar de manera cualitativa la actividad de los compuestos sintetizados sobre las levaduras y hongos filamentosos de este proyecto, se realizó este ensayo sobre las diferentes cepas de *Candida* y se logró corroborar que efectivamente los compuestos no tienen actividad contra estas levaduras y que no se debió a un problema de difusión del vehículo utilizado, como se puede observar en la figura 19, en el caso del control

negativo fluconazol se observa que no hay crecimiento de levadura de manera visual se ve que el medio de cultivo no presenta la formación de sedimentos de biomasa y que al agitar el tubo no se enturbia el caldo de cultivo lo que da una pauta para asegurar que la levadura no presenta resistencia a este antimicótico ya que no hay crecimiento de levaduras, se usaron dos controles positivos de crecimiento en este ensayo uno de ellos fue el vehículo el cual fue DMSO al 1% con 30 μ L de Tween 80 y el otro fue solución salina al 0.85%, el primero tuvo el objeto de asegurarnos que el vehículo por sí solo no era capaz de inhibir el crecimiento de la levadura lo cual se corrobora en los resultados de ensayo ya que en este caso se observa la formación de un sedimento de biomasa que al agitarse enturbia el caldo de, el segundo control de igual manera sirvió para asegurar que factores externos como temperatura, presión osmótica o los mismos constituyentes del caldo de cultivo no son capaces de inhibir el crecimiento de la cepa ya que de igual forma que el control anterior hay formación de biomasa que se observa de manera visual, el ensayo muestra que dichos factores no tuvieron impacto en el desarrollo del hongo, por último se observa que los compuestos sintetizados no presentan actividad contra las diferentes cepas probadas de *Candida*, ya que al igual que en los controles positivos de crecimiento se forma un precipitado o sedimento de biomasa que al agitarlo vuelve turbio al caldo de cultivo.

De acuerdo al artículo de revisión escrito por Castrillón Rivera⁵⁹ y colaboradores, las levaduras incluyendo a *Candida* son capaces de formar biopelículas que les confiere resistencia a los antifúngicos azólicos como fluconazol, itraconazol y ketoconazol, en este proyecto no se observa resistencia contra fluconazol pero no se puede descartar que la posible formación de biopelículas les pudo haber conferido resistencia a los compuestos evaluados.

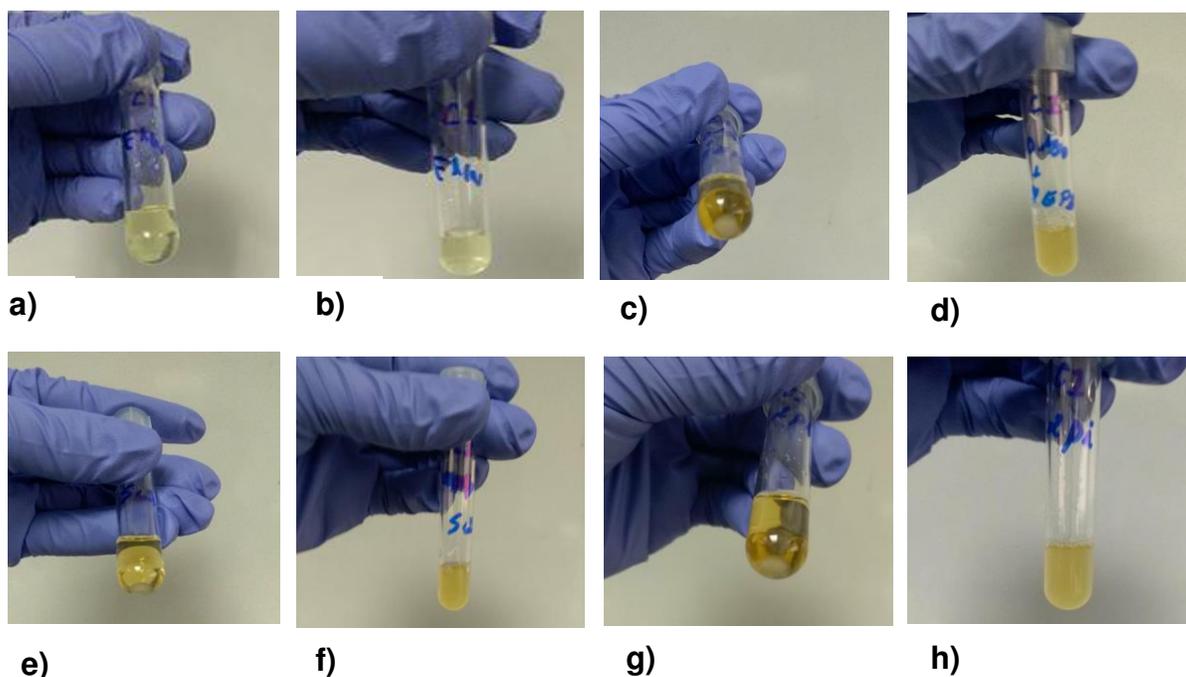


Figura 19. Resultados de ensayos contra levaduras por macrodilución: a) y b) Control negativo con fluconazol, c) y d) control positivo con vehículo (DMSO al 10% y 30 μ L de Tween 80), e) y f) control positivo con solución salina al 0.85% g) y h): compuesto evaluado.

Con un método similar fueron evaluadas las diferentes cepas de *Lomentospora prolificans*, en estos ensayos se encontró que dos de los compuestos sintetizados presentan una mejor actividad que el fluconazol, dichos compuestos son el 23h y 24a, siendo el compuesto 23h el que presenta una mejor actividad antifúngica comparada con fluconazol.

Como se puede observar en la figura 20 en la cual se aprecia el efecto del compuesto 23h con el control de positivo (solución salina), existe un crecimiento notorio a las 72 horas de incubación del control, mientras que para el cultivo con el compuesto que tuvo el mejor efecto se observa que el crecimiento es menor, se realizó para cada compuesto un duplicado.

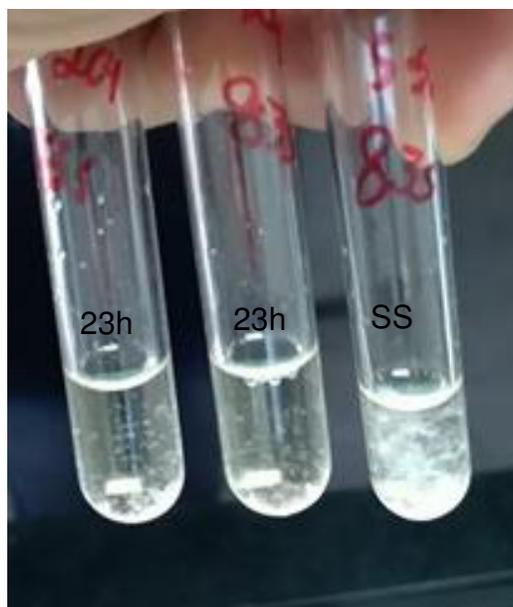


Figura 20. Efecto del compuesto 23h comprado al control positivo (solución salina) (SS).

En la figura 26 se observa que la actividad inhibitoria del fluconazol (usado como control negativo) es muy baja comparada con el compuesto 23h, de acuerdo a lo reportado por Elizondo Zertuche⁵, *Lomentospora prolificans* presenta resistencia a diversos antifúngicos de uso común en el tratamiento de infección por hongos patógenos del ser humano como: anfotericina B, voriconazol, posaconazol, caspofungina, micafungina y fluconazol, esto concuerda con lo que fue posible ver en los resultados obtenidos en los que existe crecimiento del hongo aún cuando para estos ensayos se usó una dosis superclínica de fluconazol (264 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cuando la dosis máxima es de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) esto da una pauta importante para afirmar que se ha obtenido un resultado prometedor con los dos compuestos mencionados (23h y 24a), ya que si bien no inhiben por completo el crecimiento de *Lomentospora prolificans* si tienen cierto efecto sobre el crecimiento normal de dicho hongo por lo que se pueden llegar a potenciar ya sea haciendo modificaciones estructurales a la molécula de partida o buscando el sinergismo con algún antimicótico.

En la figura 21 también se muestra la comparación de actividad entre fluconazol y el compuesto 23h (el compuesto que presenta la mejor actividad de

los mencionados anteriormente) contra las cepas 05-835, 05-2409 y 12-261, se puede observar como el compuesto presenta una mejor actividad inhibitoria contra estas cepas.

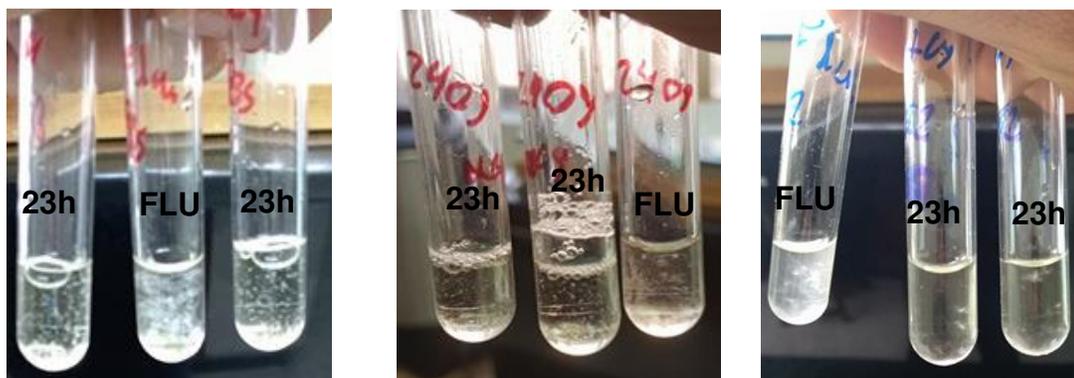


Figura 21. Efecto del compuesto 23h comparado al control negativo Fluconazol (FLU), contra cepas 05-835, 05-2409 y 12-261.

En la figura 22 se muestra la actividad del compuesto 24a contra la cepa 12-261, se puede observar que tiene un cierto efecto inhibitorio en el desarrollo de *Lomentospora prolificans*, no tan evidente como el compuesto 23h pero que también da una pauta para buscar modificaciones estructurales a su estructura o la búsqueda de sinergismo con otras moléculas para potenciar su actividad.

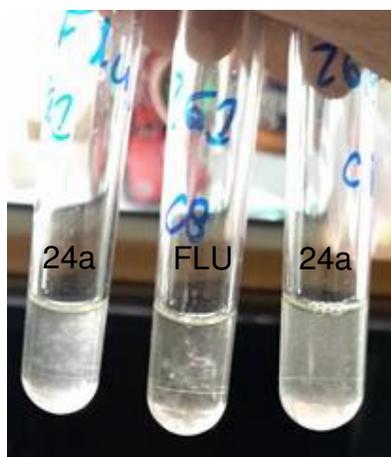


Figura 22. Efecto del compuesto 24a comparado al control negativo Fluconazol (FLU), contra la cepa 12-261.

En la figura 23 se muestra la comparativa de los efectos que tienen a nivel microscópico el fluconazol y el compuesto 23h, se puede observar que para el caso del tratamiento con fluconazol no se ve un efecto importante en las hifas de *Lomentospora prolificans* ya que se observa que son alargadas y rectas, mientras que con el tratamiento con el compuesto 23h las hifas se observan más cortas y deformadas y sin conidias, lo que sugiere que el compuesto está alterando membrana o pared celular por lo que no le permite desarrollarse normalmente y esta condición de estrés se debe a la presencia del compuesto 23h.

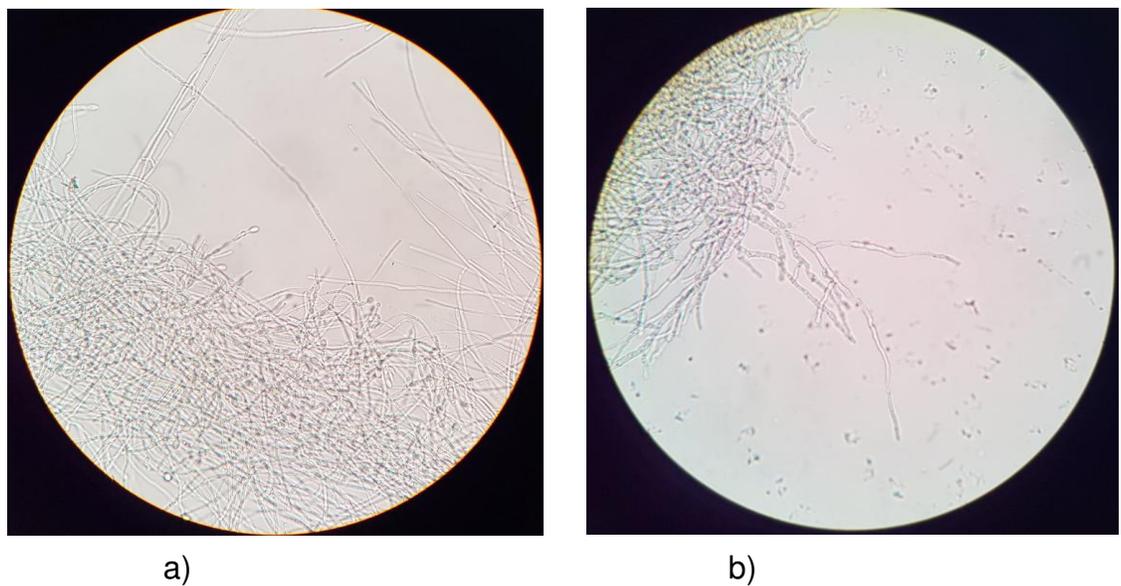


Figura 23. Comparación de actividad entre: a) Fluconazol y b) compuesto 23h.

En la tabla 15 se muestra la actividad de los compuestos 23h y 24a contra las diferentes cepas de *L. prolificans*, en la mayoría de los casos el compuesto 23h presenta una mejor actividad que el compuesto 24a, la actividad fue evaluada de manera visual, tal como establece el protocolo, aunque en todos los casos hubo crecimiento de *L. prolificans* en el medio de cultivo existieron casos en el que la inhibición de crecimiento fue notorio, considerando esto como actividad inhibitoria buena, en otros casos dicha actividad inhibitoria no era tan notoria pero el crecimiento era menor al control negativo (fluconazol), por lo que se

considera que una modificación estructural o sinergismo puede potenciar su actividad.

Tabla 15. Actividad de los compuestos 23h y 24a contra las diferentes cepas de *L. prolificans*.

| Cepa | Actividad inhibitoria del Compuesto 23h | Actividad inhibitoria del Compuesto 23a |
|--------------|--|--|
| L.P. 04-2673 | ++ | + |
| L.P. 05-2190 | ++ | + |
| L.P. 06-1220 | + | + |
| L.P. 12-261 | ++ | ++ |
| L.P. 05-835 | + | + |
| L.P. 06-2411 | ++ | ++ |
| L.P. 05-2409 | ++ | + |
| L.P. 13-196 | ++ | ++ |
| L.P. 11-2242 | ++ | + |

++: Actividad inhibitoria buena +: Actividad inhibitoria mejor que la de Fluconazol.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

6.1 La síntesis planteada para los α -aminofosfonatos de la serie 1, la cual se lleva a cabo a temperatura ambiente, con agitación por vortex y cuya purificación se realizó por filtración al vacío y recristalización, representa una propuesta de metodología experimental que involucra un proceso sencillo y amigable con el medio ambiente.

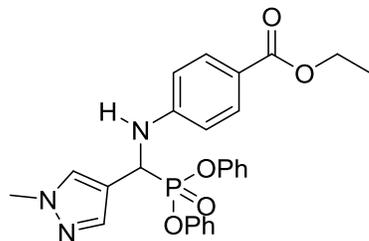
6.2 La síntesis vía microondas y en presencia de K_2CO_3 como base para la obtención de los ácidos α -aminofosfinícos de la serie 2, representan condiciones de reacción más suaves que las reportadas por otros investigadores y por lo tanto una síntesis más sencilla y amigable con el medio ambiente.

6.3. La caracterización de los compuestos de las dos series por RMN de 1H , ^{13}C , ^{31}P , nos permitió corroborar que obtuvimos los compuestos planteados.

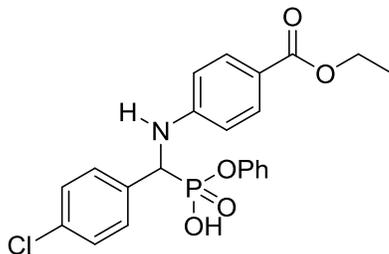
6.4 Se evaluó la actividad inhibitoria de las dos series propuestas en el proyecto (α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfónicos) contra ocho cepas diferentes de *Candida*, ninguno de los compuestos mostró actividad.

6.5 Los compuestos 23h y 24a muestran actividad inhibitoria, esto se puede deber a, en el caso del compuesto 23h, la presencia de un anillo derivado del pirazol, y en el caso del compuesto 24a, su carácter ácido y la presencia del Cloro.

6.6 La hipótesis se valida ya que dos compuestos (Etil-4-(((difenoxyfosforil)(1-metil-1H-pirazol-4-il)metil)amino)benzoato y Etil-4-(((4-clorofenil)(hidroxi(fenoxy)fosforil)metil)amino)benzoato), presentan una mejor actividad que fluconazol.



Etil-4-(((difenoxifosforil)(1-metil-1H-pirazol-4-il)metil)amino)benzoato



Etil-4-(((4-clorofenil)(hidroxi(fenoxi)fosforil)metil)amino)benzoato).

PRESPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente proyecto dan la pauta para continuar investigando los temas tratados, tanto en la parte de síntesis como la parte biológica, en la primera etapa se pueden seguir desarrollando procesos de síntesis que busquen el menor impacto ambiental posible y que se mejoren los rendimientos obtenidos tanto para la síntesis de α -aminofosfonatos como de ácidos α -aminofosfínicos. En la parte biológica queda un camino amplio de investigación, se debe realizar una técnica cuantitativa para determinar la concentración mínima inhibitoria, evaluar la citotoxicidad de los compuesto con células sanas del ser humano y a partir de estos estudios se pueden hacer modificaciones estructurales a los 2 compuestos que presentaron actividad contra *L. proliferans* para potenciar su actividad, evaluar su sinergismo con fármacos comerciales e incluso con extractos producto del efecto antagónico entre levaduras y hongos filamentosos (levaduras Killer). Se puede estudiar el mecanismo de acción de los compuestos, que de manera microscópica parecen tener efecto sobre la pared del hongo filamentosos, pero es necesario realizar pruebas adicionales a fin de elucidar el mecanismo de acción y corroborar la observación microscópica.

ANEXOS

En este apartado se incluyen los experimentos previos a la estandarización de la metodología de obtención de la serie de α -aminofosfonatos, así como los experimentos que se realizaron para demostrar el impedimento estérico en la obtención de la segunda serie de α -aminofosfonatos derivados de diterbutil fosfita propuesta al principio de este proyecto, así como los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{31}P , masas y de baja resolución de los compuestos que no se incluyen en el apartado de resultados y discusión.

Experimentos previos a la estandarización del proceso de síntesis de la serie de α -aminofosfonatos.

Antes de que se estandarizará el proceso de síntesis de la primera serie de α -aminofosfonatos se realizaron pruebas por agitación manual y por congelación, ya que durante las pruebas de síntesis asistidas por microondas se observó que el α -aminofosfonato derivado del Isobutiraldehído presentaba un mejor rendimiento si este se mantenía en congelación por varios días, por lo que se hizo el experimento de agitar manualmente el medio de reacción (los reactivos: 4-etilaminobenzoato, difenilfosfita e Isobutiraldehído, en 4 mL de etanol), omitiendo la irradiación por microondas, se dejó por 8 horas en congelación y se observó la formación de pequeños cristales en la superficie interior del tubo de microondas al agitar esa mezcla de reacción se observó un precipitado más notorio, el mismo procedimiento se realizó al α -aminofosfonato derivado del 2-etilbutiraldehído, obteniéndose un resultado similar al observado con el derivado de Isobutiraldehído, con el compuesto derivado del Dietilaminobenzaldehído no fue necesario que la mezcla se metiera a congelar ya que esta reaccionó con solo agitar, es por ello que se decidió hacer el mismo experimento con los demás aldehídos de la serie de α -aminofosfonatos, obteniéndose resultados similares, en la tabla 16.

Tabla 16. Tiempos de agitación manual para la obtención de α -aminofosfonatos

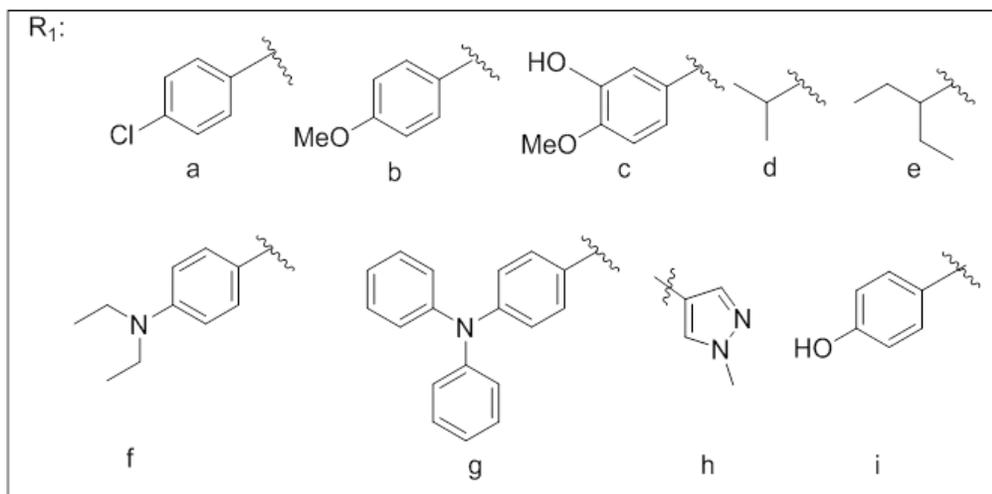
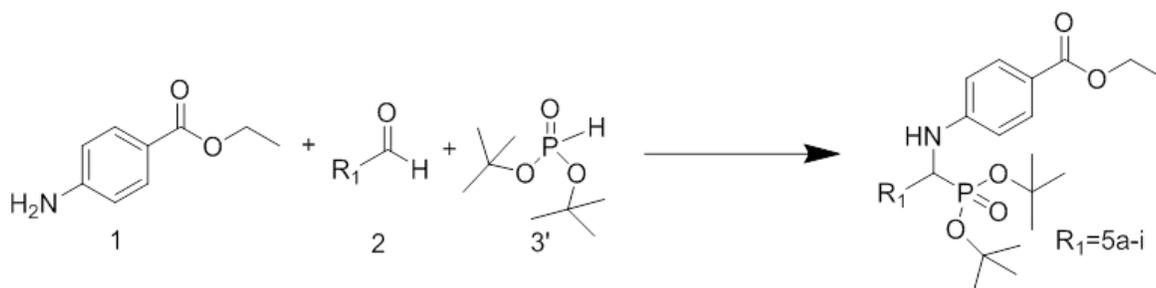
| Compuesto | Tiempo de agitación (min). |
|-----------|--|
| 22a | 3 min* |
| 22b | 5 min. |
| 22c | 10 min. |
| 22d | 300 min de agitación (previa agitación por 10 min) |
| 22e | 300 min. de congelación (previa agitación por 10 min). |
| 22f | 5 min. |
| 22g | 10 min |
| 22h | 1 hora de refrigeración (previa agitación por 10 min). |
| 22i | 20 min |

*Solo se obtiene la imina.

Dado que una agitación manual no es un método que se pueda estandarizar, se decidió hacer pruebas con vortex, cuyos resultados son expuestos en la sección de resultados y discusión.

Experimentos para demostrar impedimento estérico

La propuesta original de síntesis del presente proyecto tenía contemplada la síntesis de una segunda serie de α -aminofosfonatos sustituyendo la difenilfosfita por diterbutilfosfita (esquema 12), pero esta segunda serie no fue posible obtenerla ni por reacciones a temperatura ambiente ni vía microondas, esto se debió probablemente a cierto impedimento estérico ocasionado por la presencia de diterbutil en la fosfita un sustituyente voluminoso que, a diferencia del fenilo en el caso de la difenilfosfita, no entra en resonancia con el fósforo y lo hace más nucleofílico, por lo que se observó que solo se obtenía la imina en las reacciones.



Esto fue comprobado por un antecedente y una serie de experimentos:

Antecedente: Se tiene información en el grupo de investigación que la formación de la imina producto de la reacción entre el 4-clorobenzaldehído y el 4-etilaminobenzoato, cuando se quiere monitorear por CCF el avance de reacción, parece que no hay reacción ya que en la placa solo se observan las materias primas, aparentemente no hay formación de un producto nuevo, sin embargo si existe la formación de un precipitado, el cual puede ser filtrado al vacío con metanol y al ser enviado a RMN de ^1H y ^{13}C los espectros muestran las señales características de la imina esperada de esa reacción, esto se debe probablemente a que la Sílica contenida en la placa resulta lo suficientemente ácida como para romper el enlace de la imina.

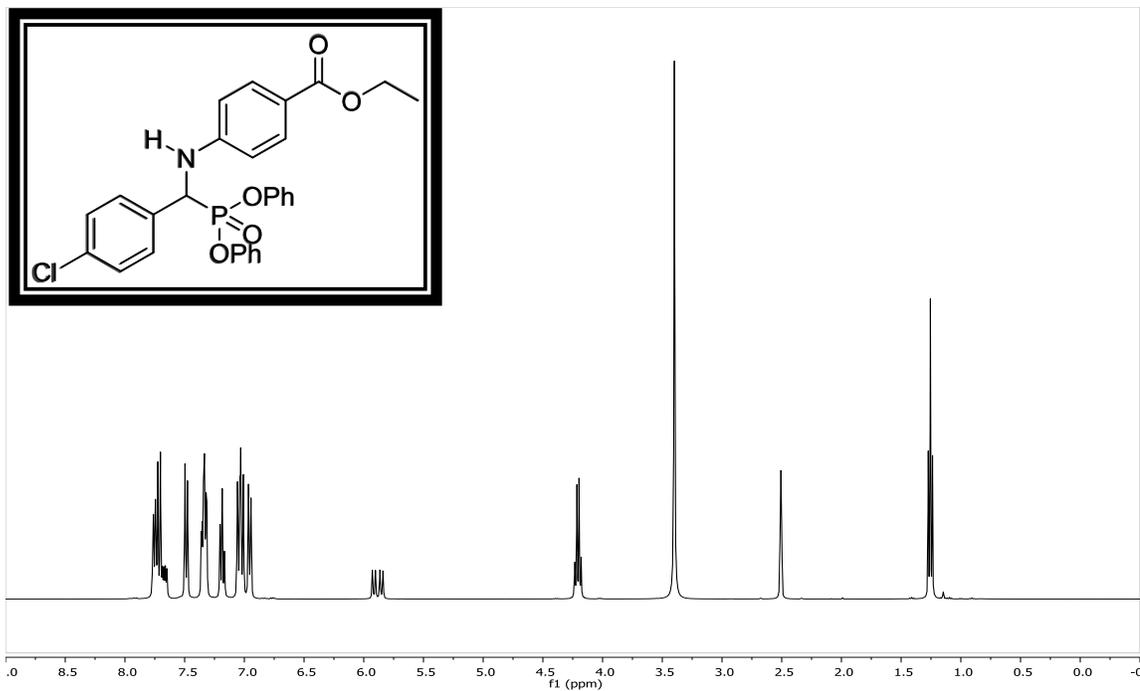
Los experimentos se describen a continuación:

- 1) Se prepararon cuatro medios de reacción en los que se hicieron reaccionar el 4-dietilaminobenzaldehído y el 4-etilaminobenzoato en 4ml de etanol para obtener la imina correspondiente, dos medios de reacción se hicieron reaccionar asistidos por microondas y los otros dos por vortex, esto con el fin de ver si había la formación de un nuevo producto que este caso sería la imina, sin embargo por CCF no fue posible determinar la formación del producto esperado ya que solo se observaba las materias primas tal como sucede en el antecedente de la imina del 4-clorobenzaldehído, solo que en este caso no se obtiene un precipitado, por lo que resulta difícil una purificación por columna
- 2) Dos de las reacciones (una vía microondas y la otra por vortex) anteriores se dejaron en recristalización para ver si se obtenían cristales que con lavados de acetato de etilo o metanol se pudieran obtener puros y mandar a RMN de ^1H y ^{13}C y confirmar la formación de la imina, las otras dos reacciones (una vía microondas y la otra por vortex) se hicieron reaccionar con la diterbutil fosfita de nuevo por microondas y por vortex, esperando observar una mancha con r.f. diferente a las materias primas, sin embargo esto no sucedió ya que se veían solo las materias primas para ambos casos (vortex y microondas).
- 3) El experimento se hizo de forma parecida para la obtención del compuesto 4f, en el que se obtuvo primero la formación de la imina tanto por vortex como por microondas, se observó el avance de reacción por CCF y se observaban las materias primas, sin embargo al agregar la difenilfosfita se daba un precipitado notorio y la formación como ya se tenía corroborado del α -aminofosfonato.

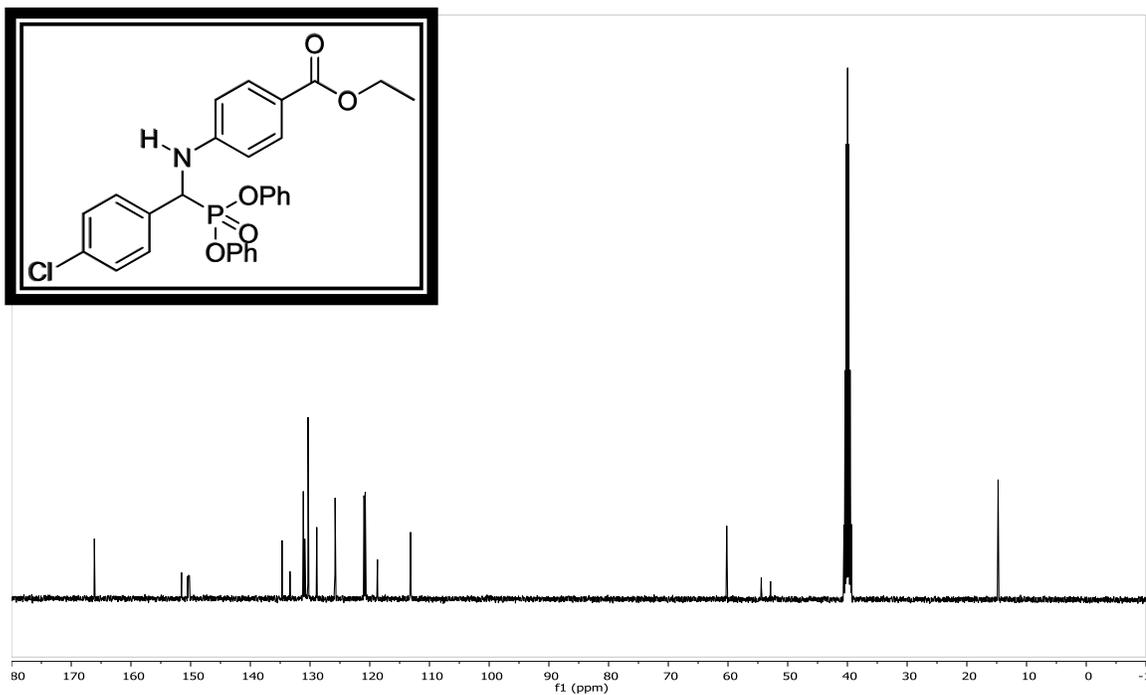
Por lo anterior se puede concluir que existe impedimento estérico por parte de la diterbutil fosfita para la obtención de α -aminofosfonatos derivados de esta segunda serie propuesta inicialmente en el proyecto, se pudo haber incluido algún catalizador que hiciera más nucleofílico al fósforo pero uno de los objetivos más importantes del presente proyecto fue la obtención de compuestos con actividad biológica por medio de la química verde.

Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P

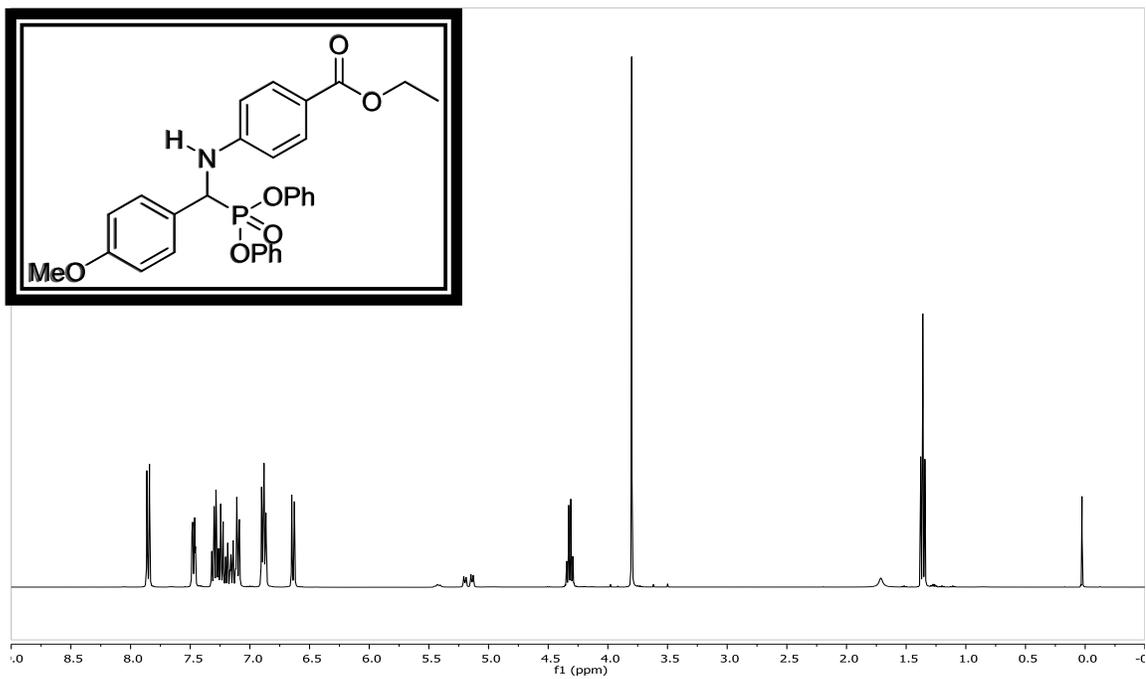
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 23a.



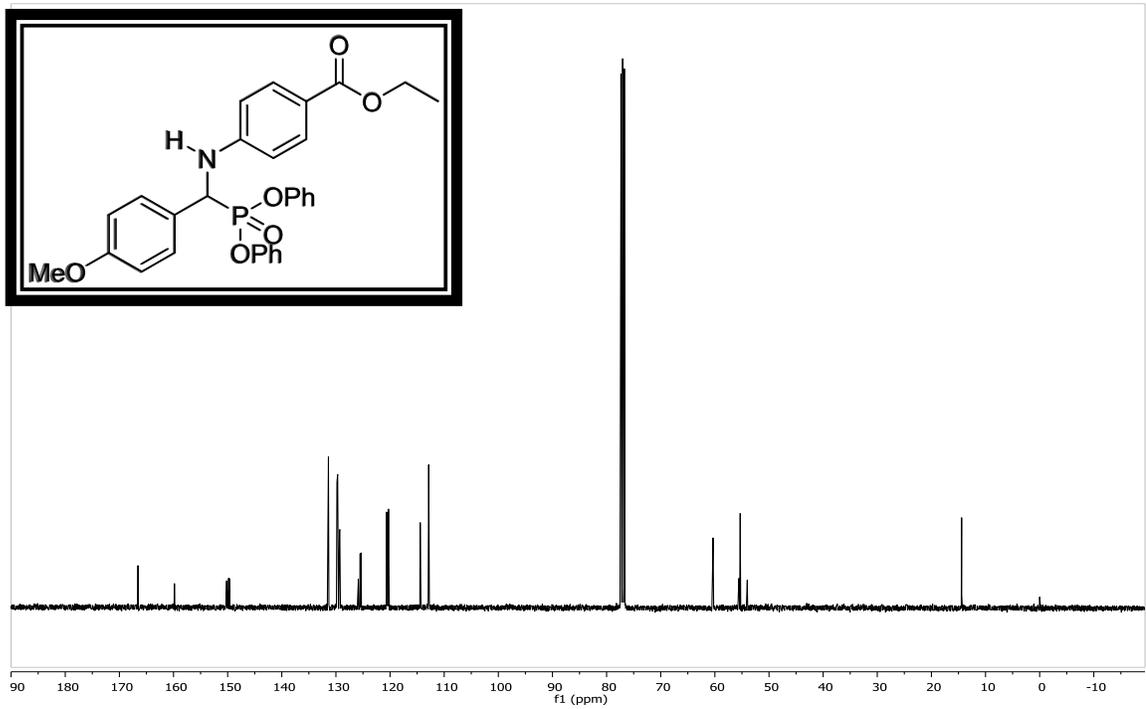
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 23a.



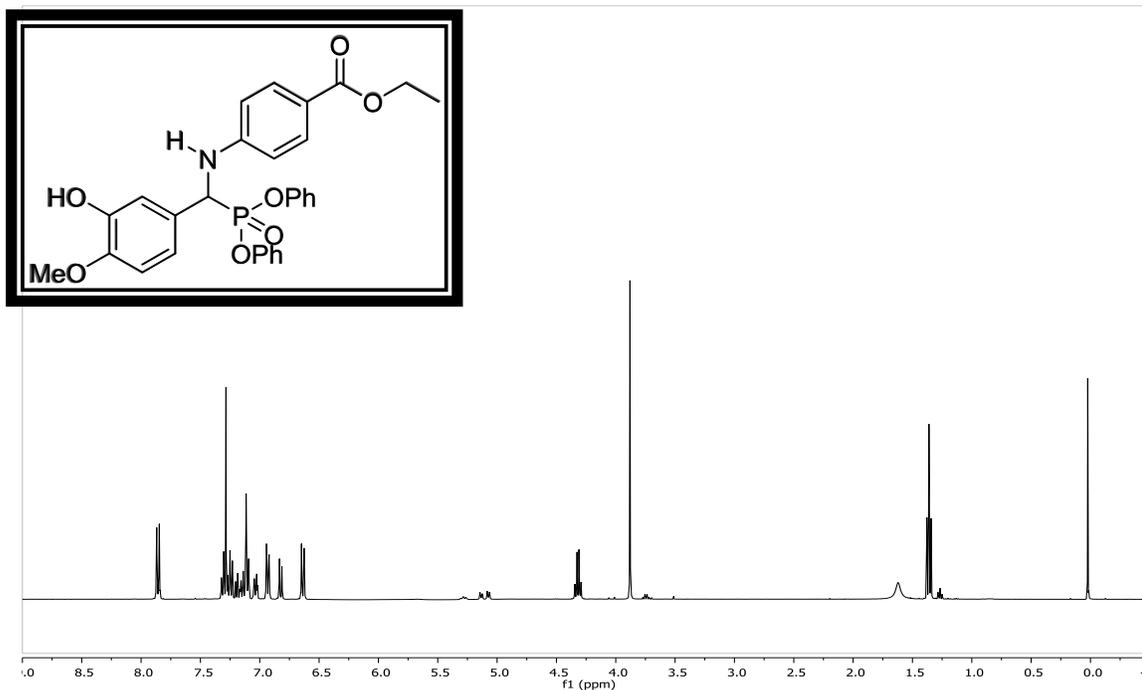
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 23b.



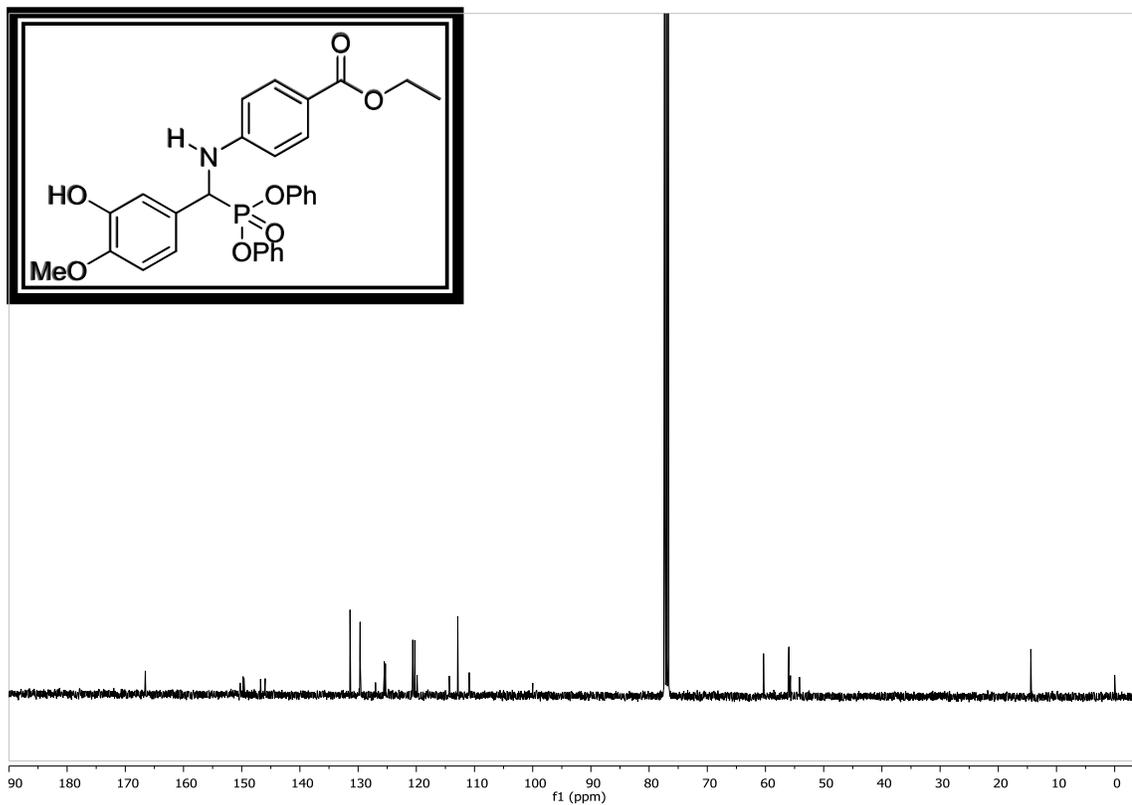
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 23b.



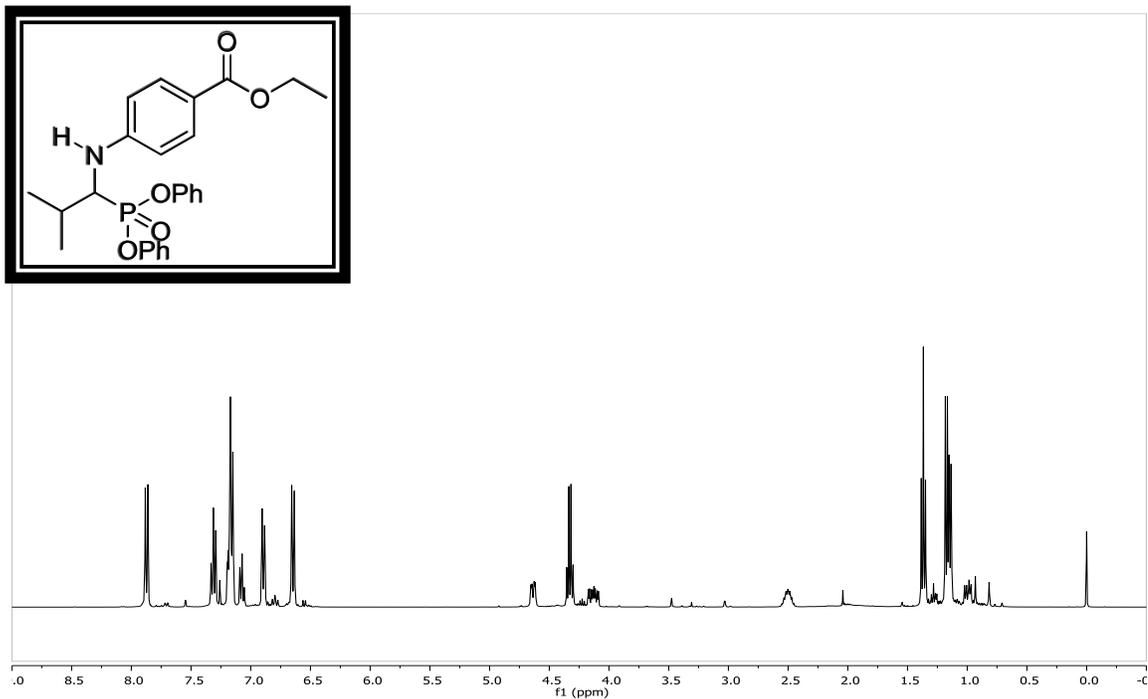
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 23c.



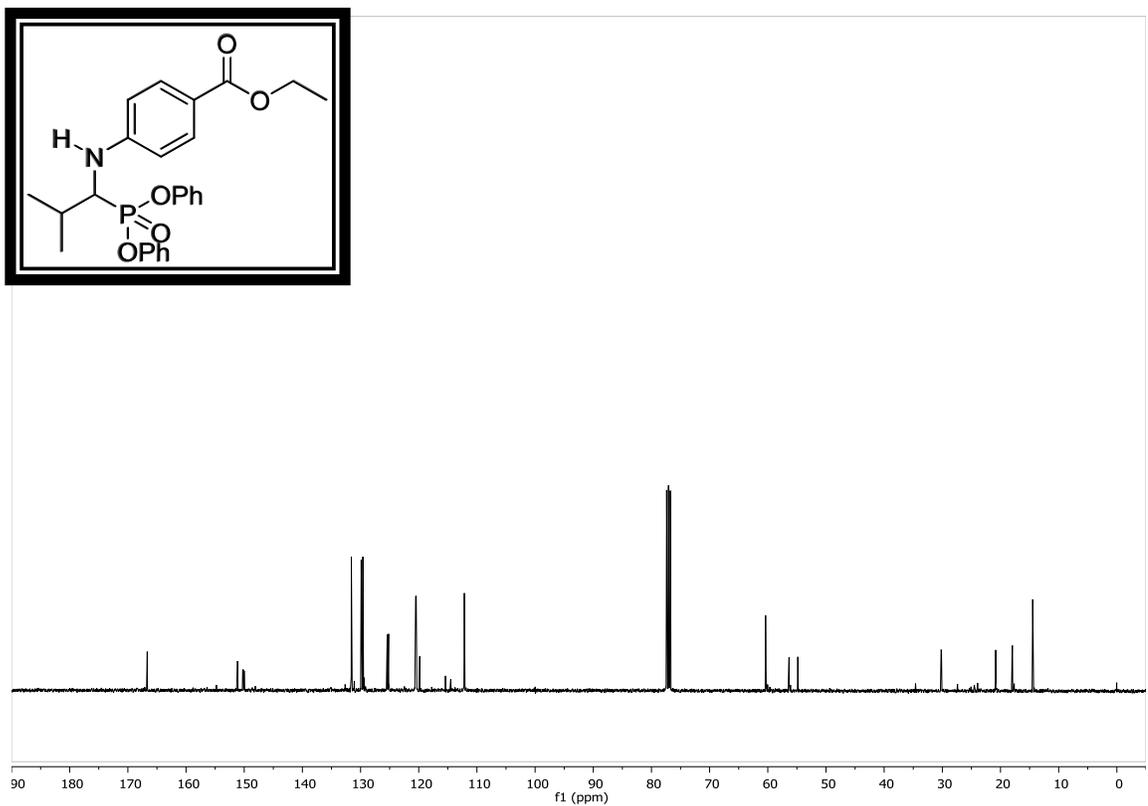
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 23c.



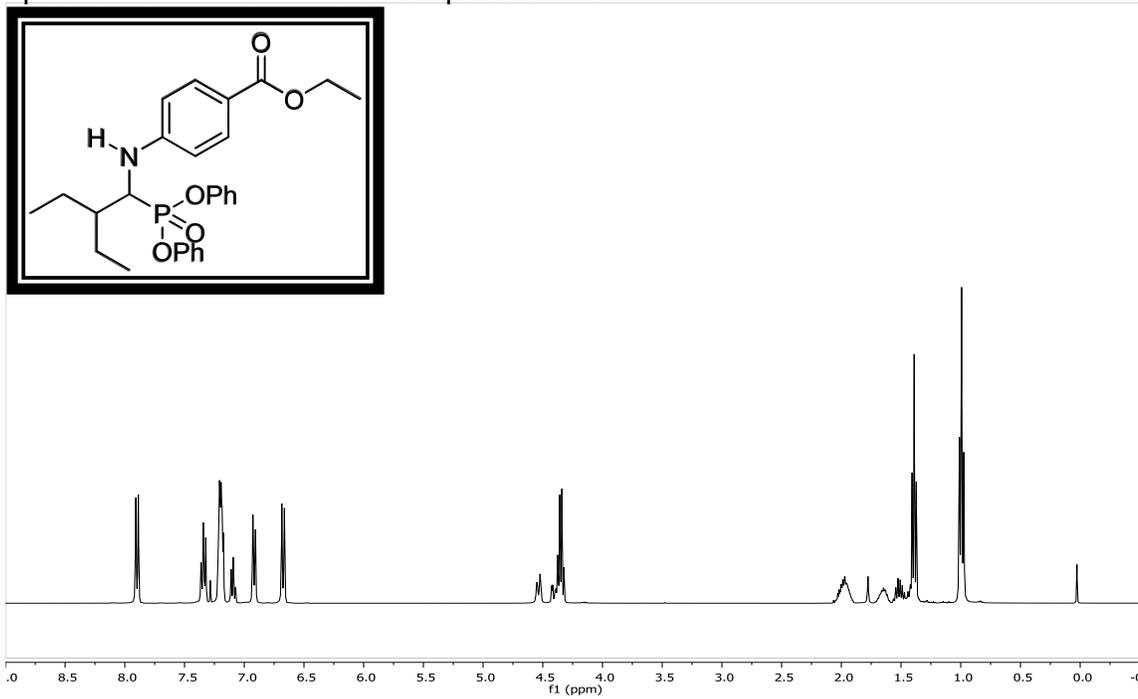
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 23d.



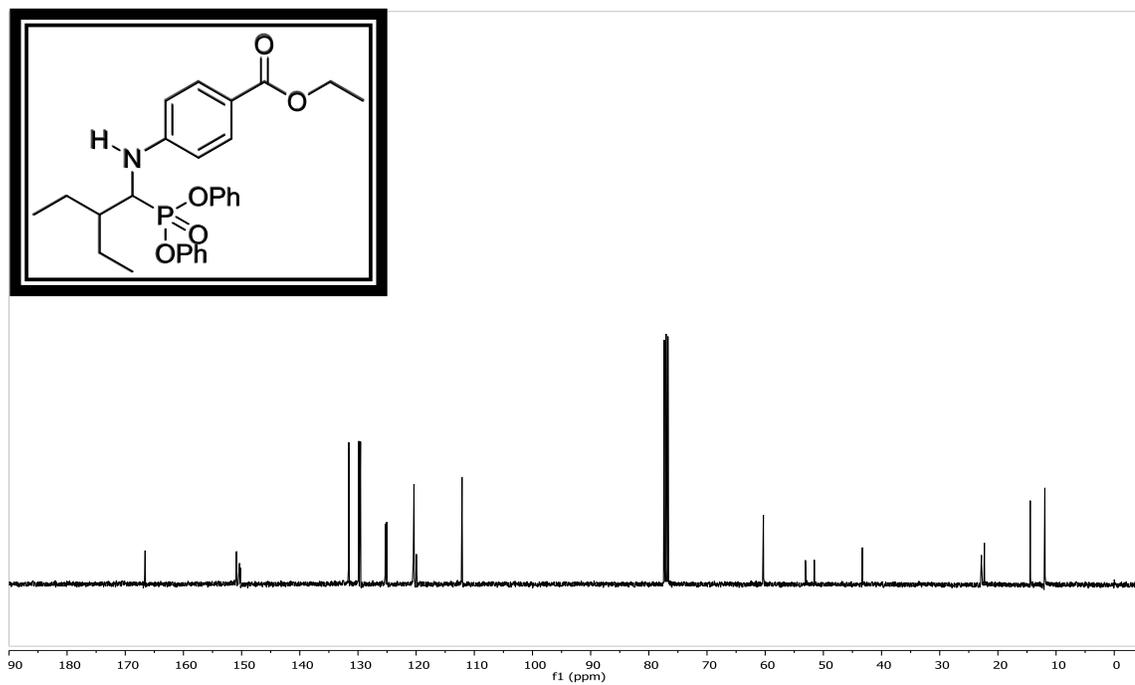
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 23d.



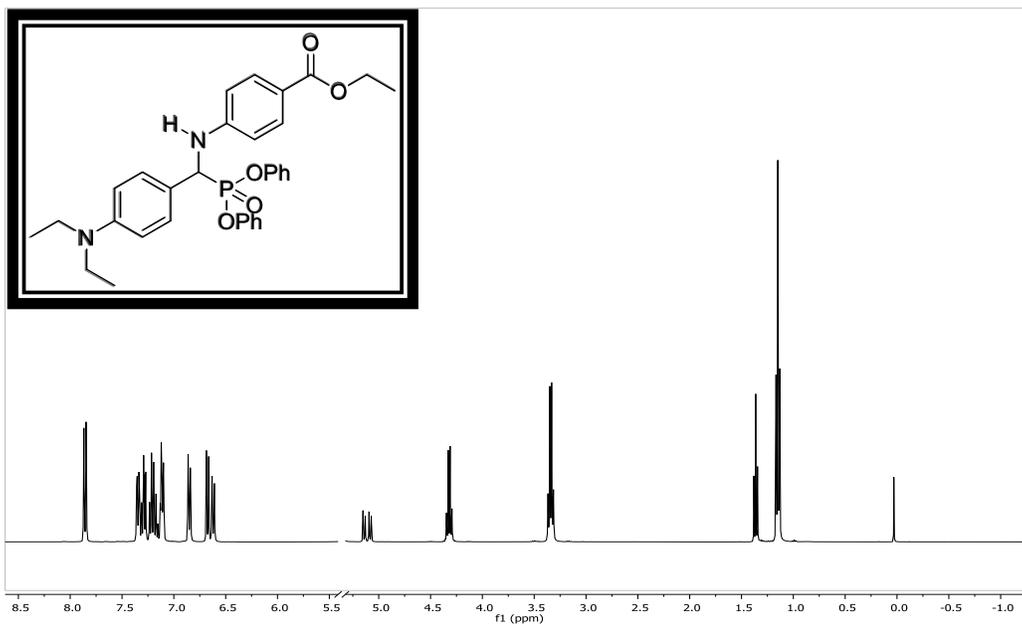
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 23e.



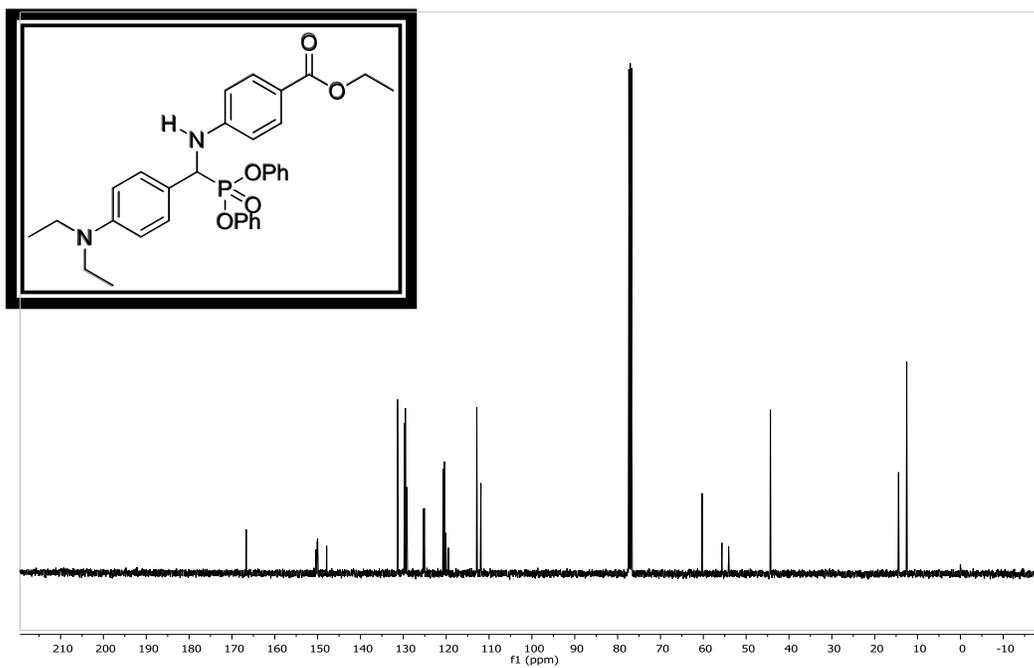
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 23e.



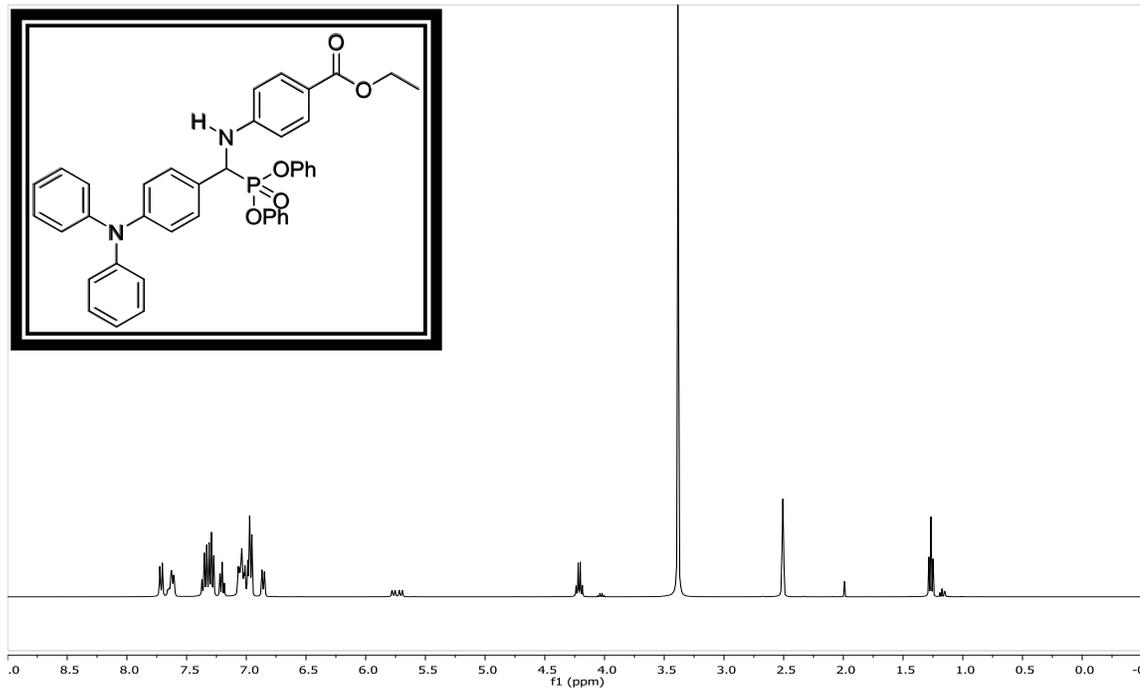
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 23f.



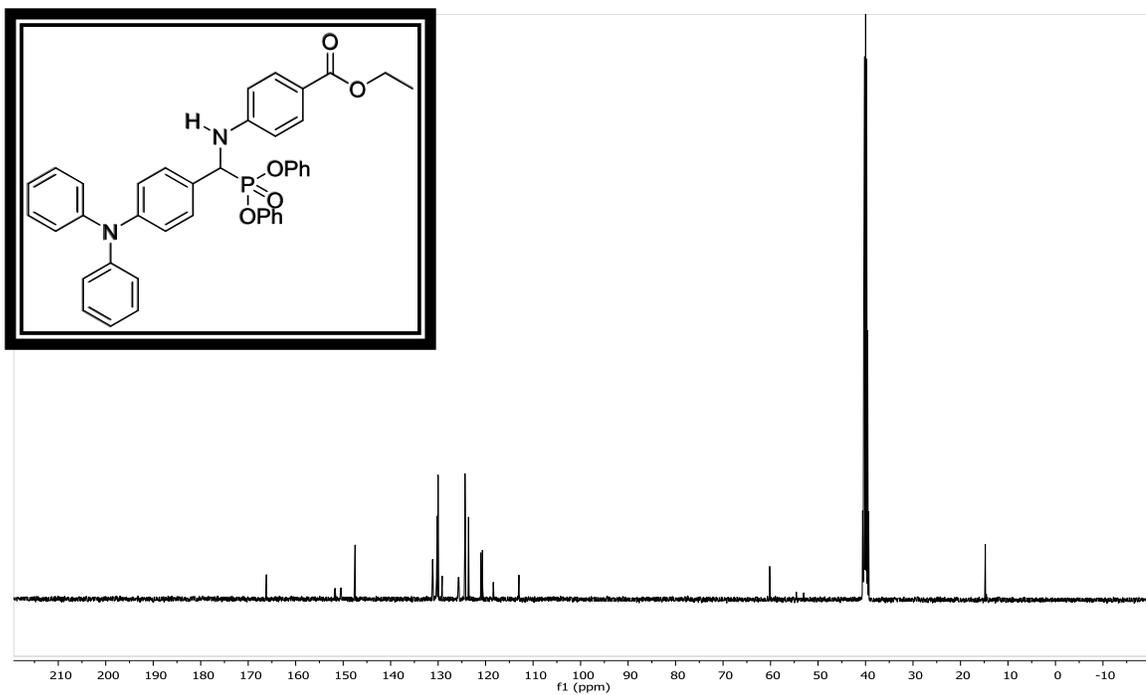
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 23f.



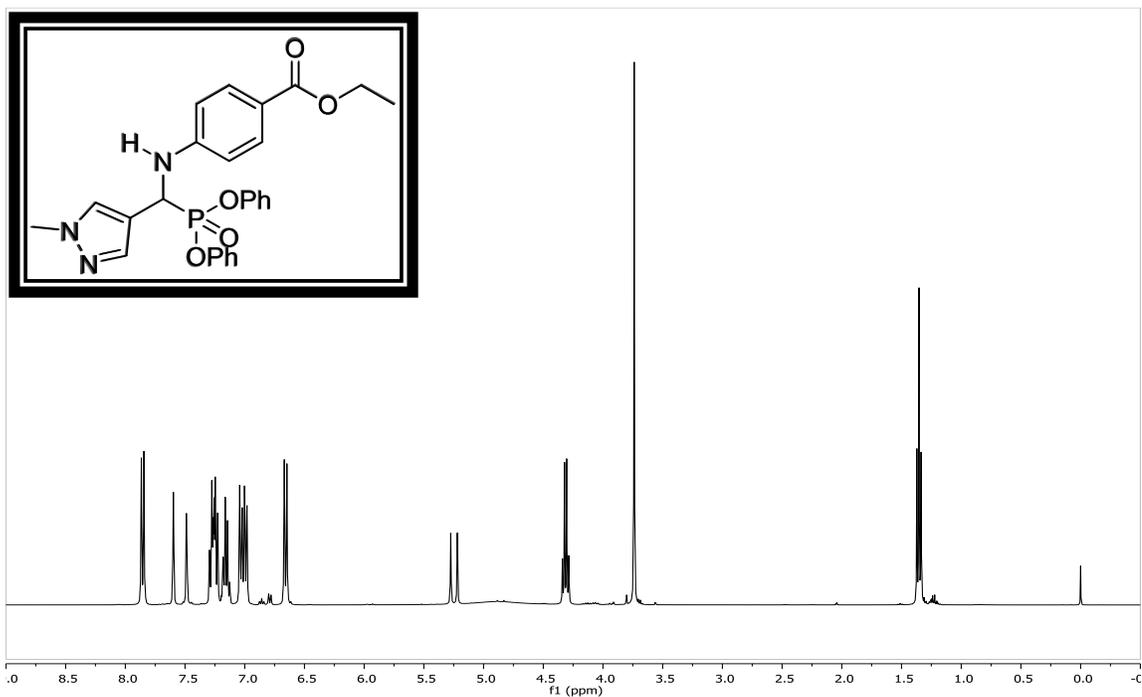
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 23g.



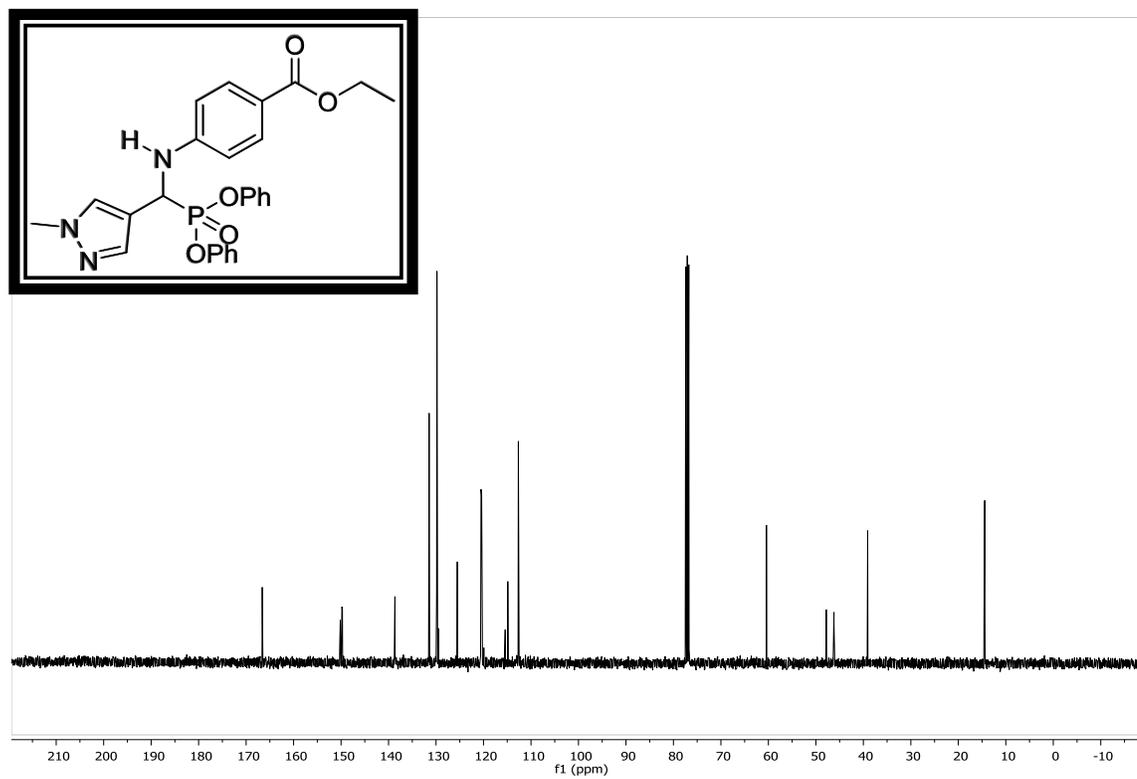
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 23g.



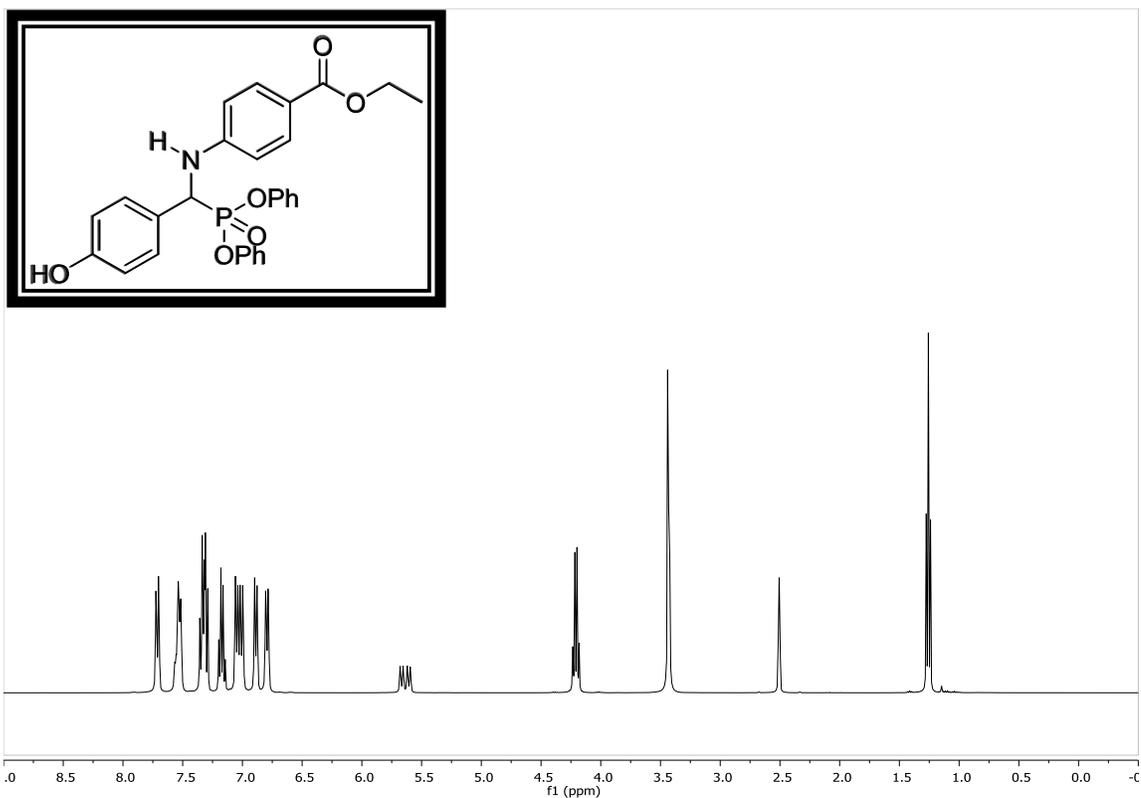
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 23h.



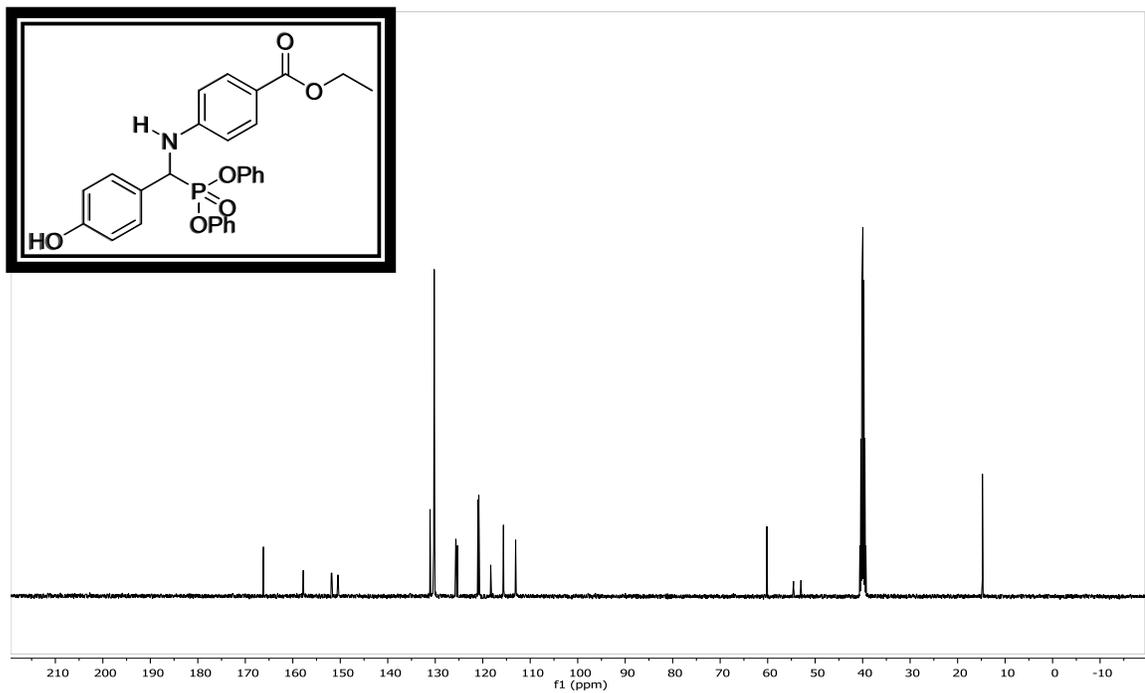
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 23h.



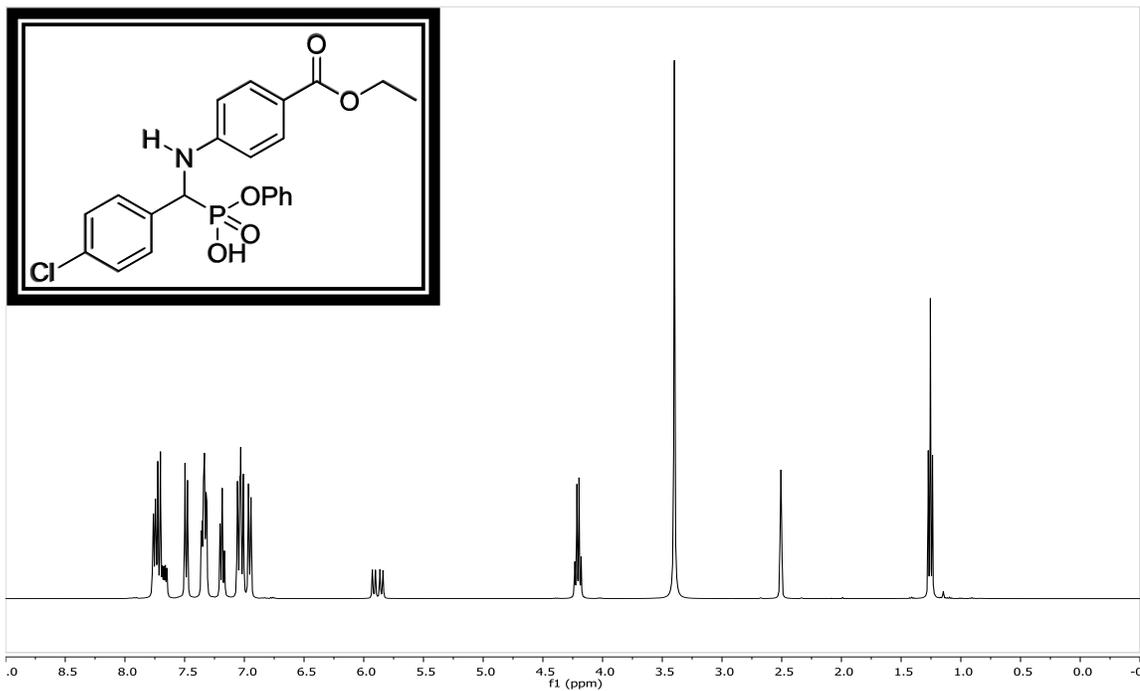
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 23i.



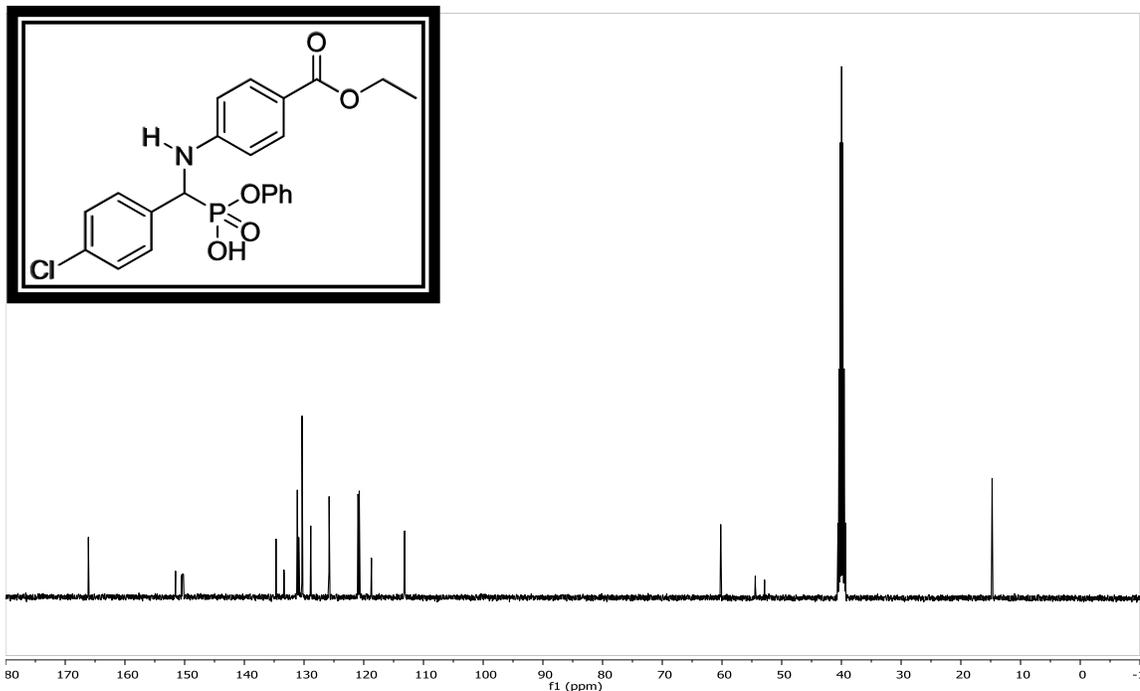
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 23i.



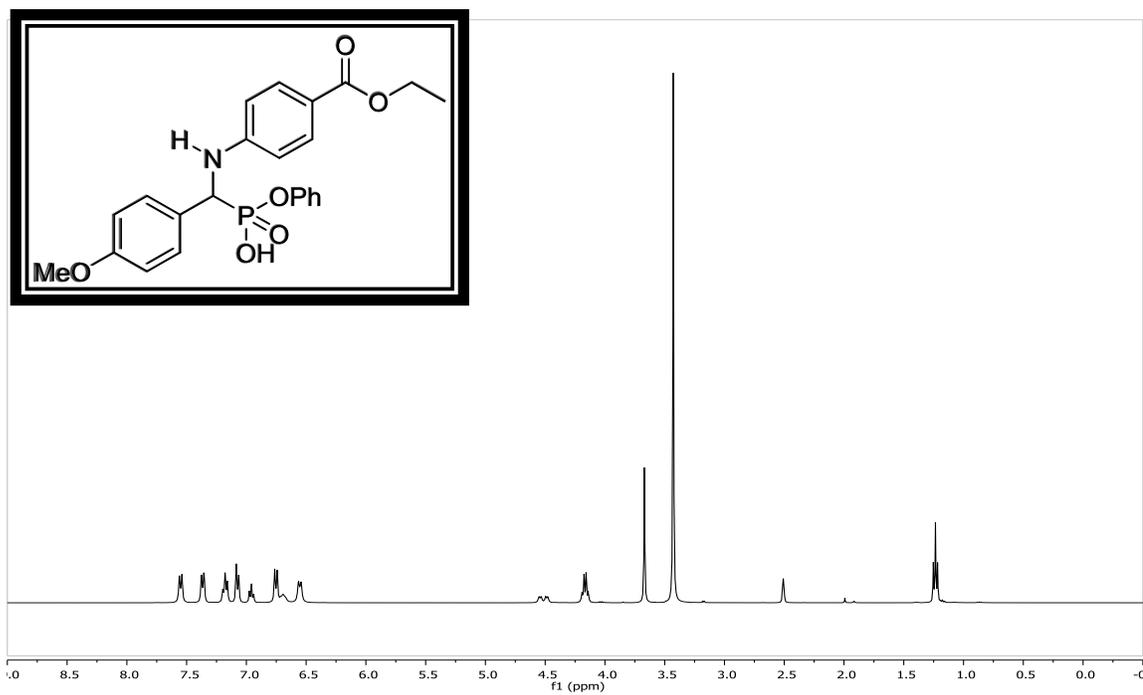
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 24a.



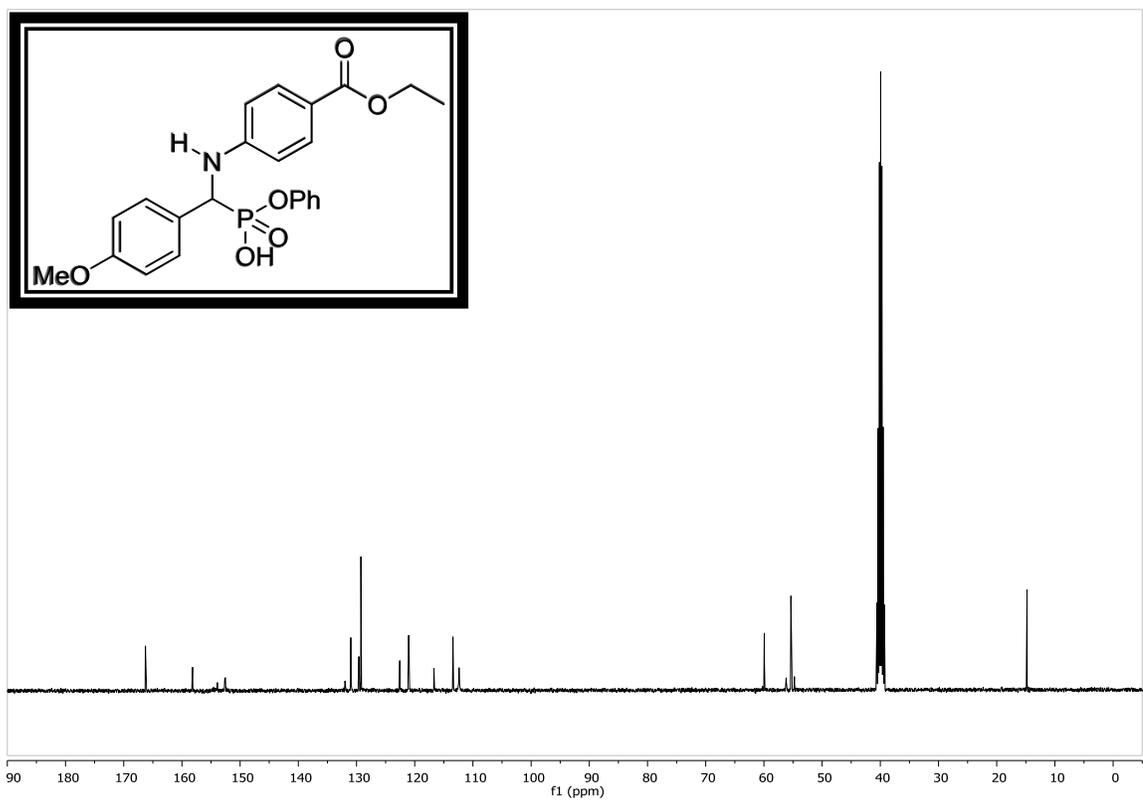
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 24a.



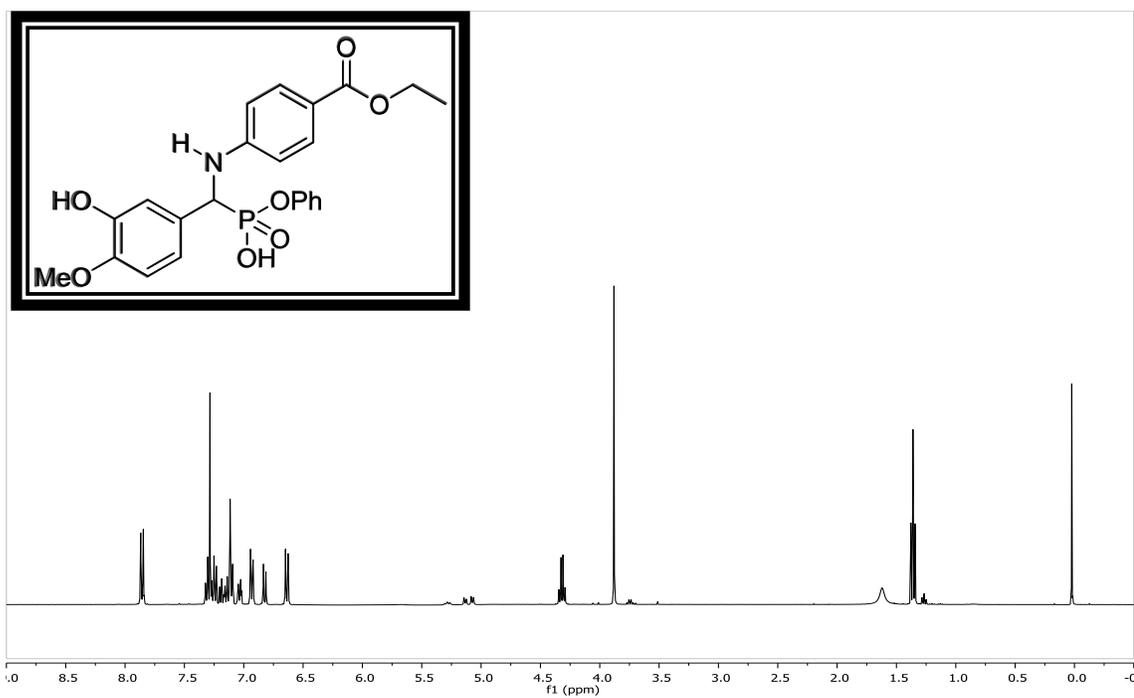
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 24b.



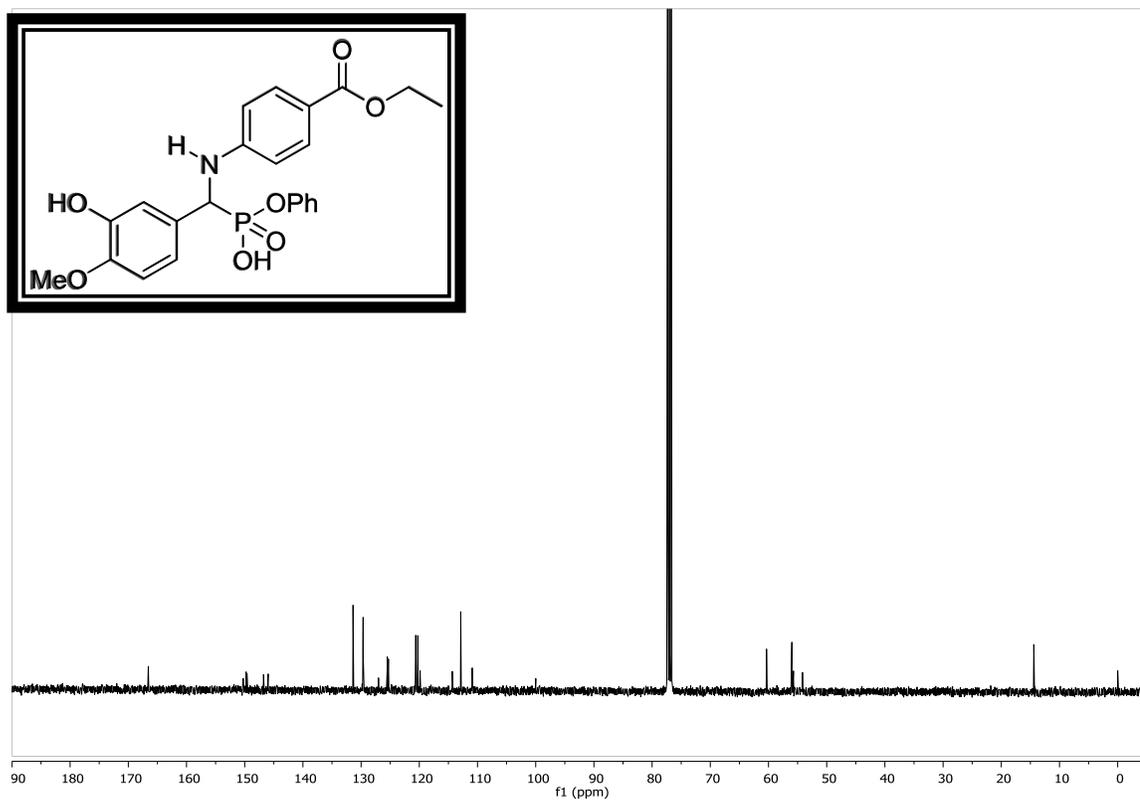
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 24b.



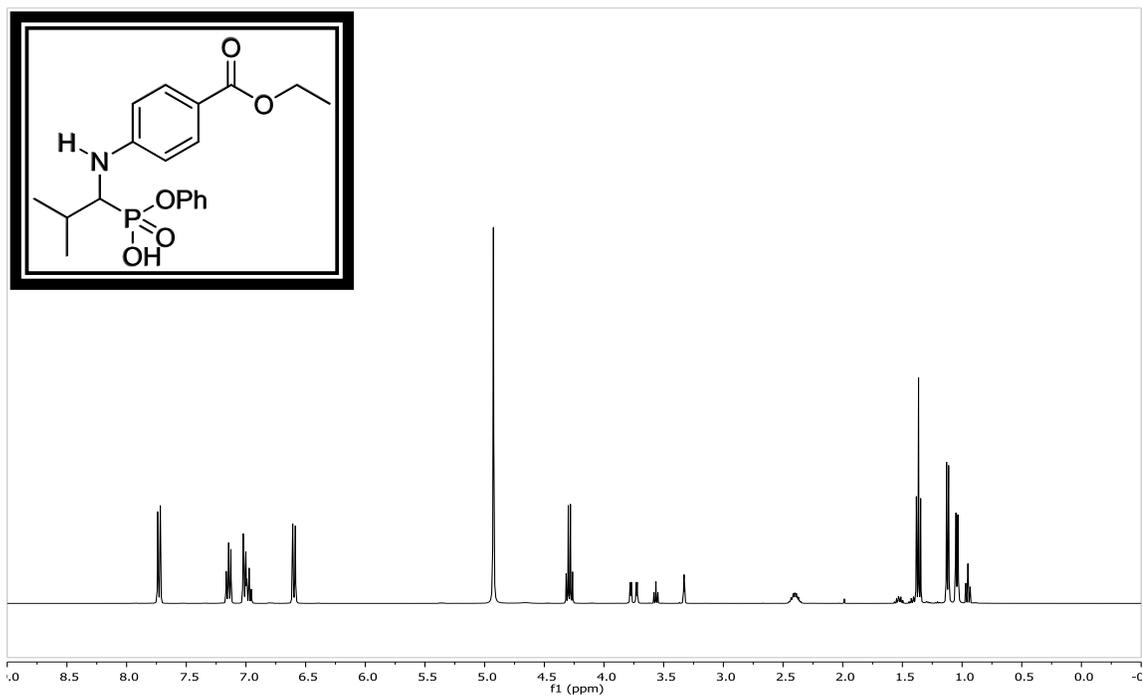
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 24c.



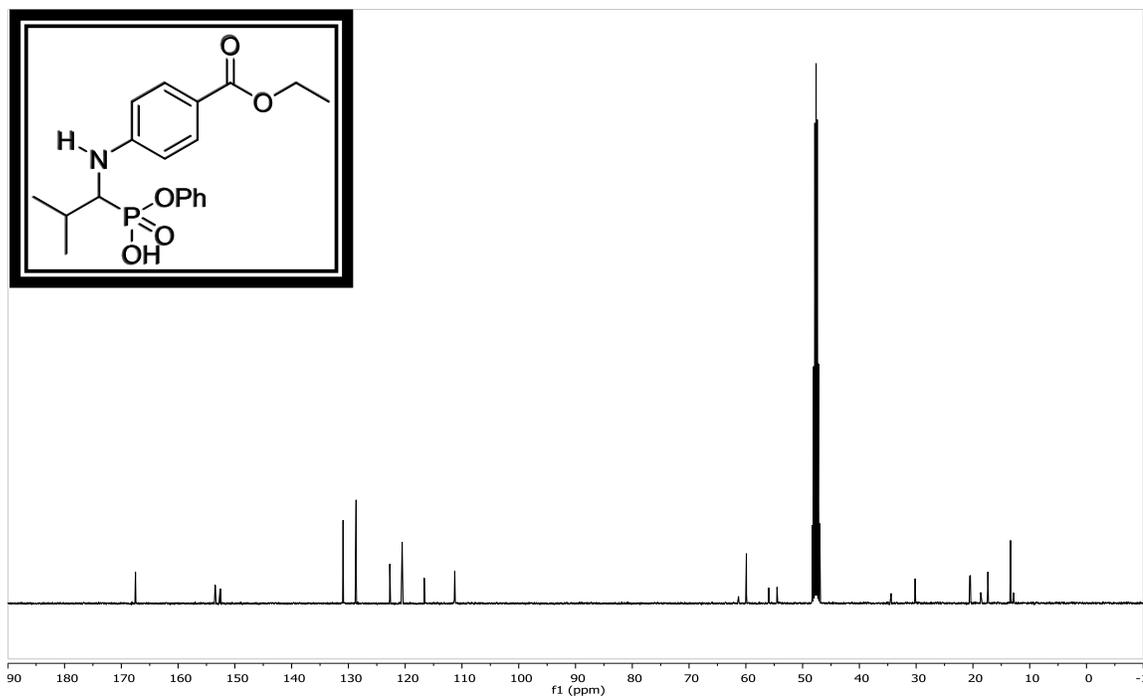
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 24c.



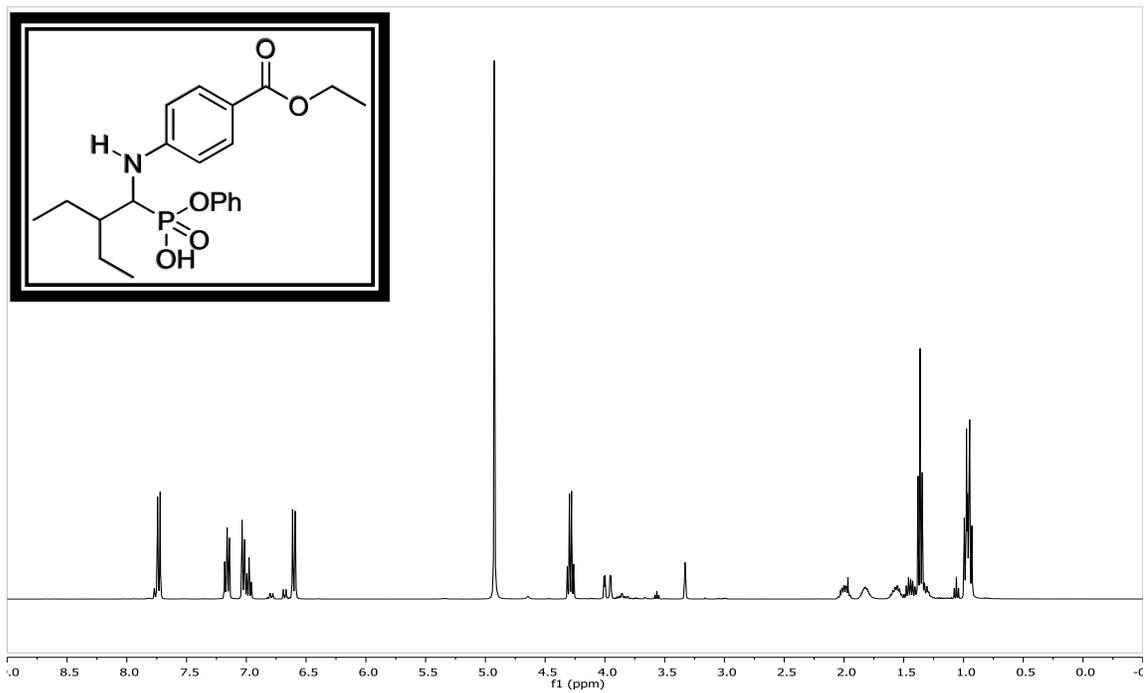
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 24d.



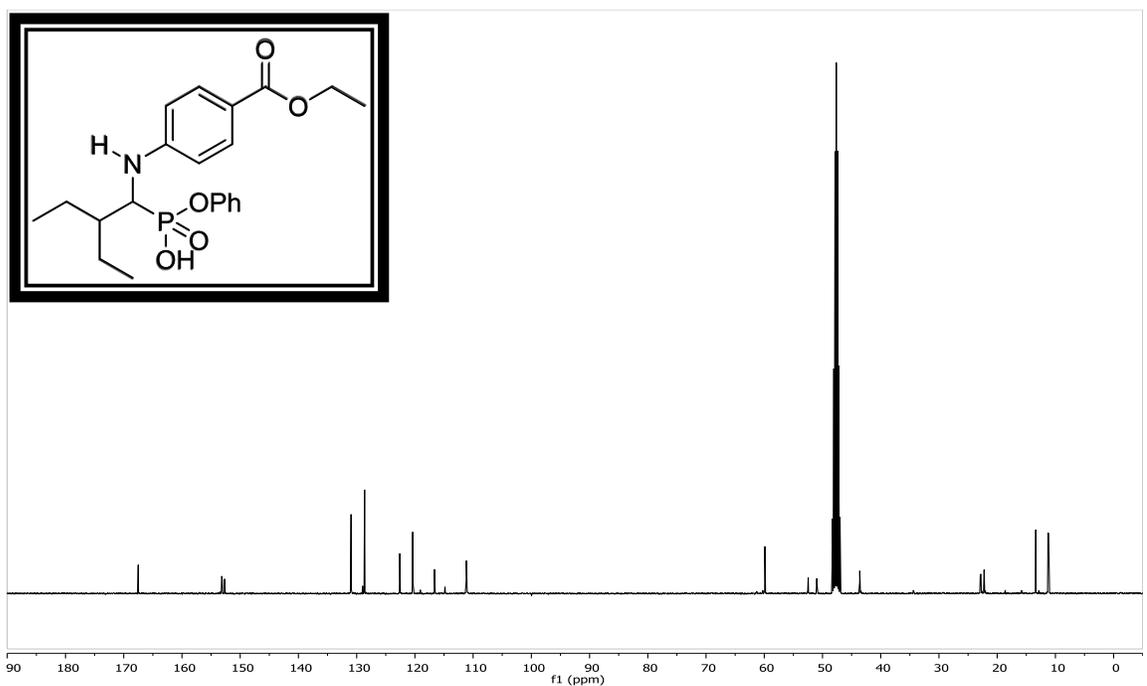
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 24d.



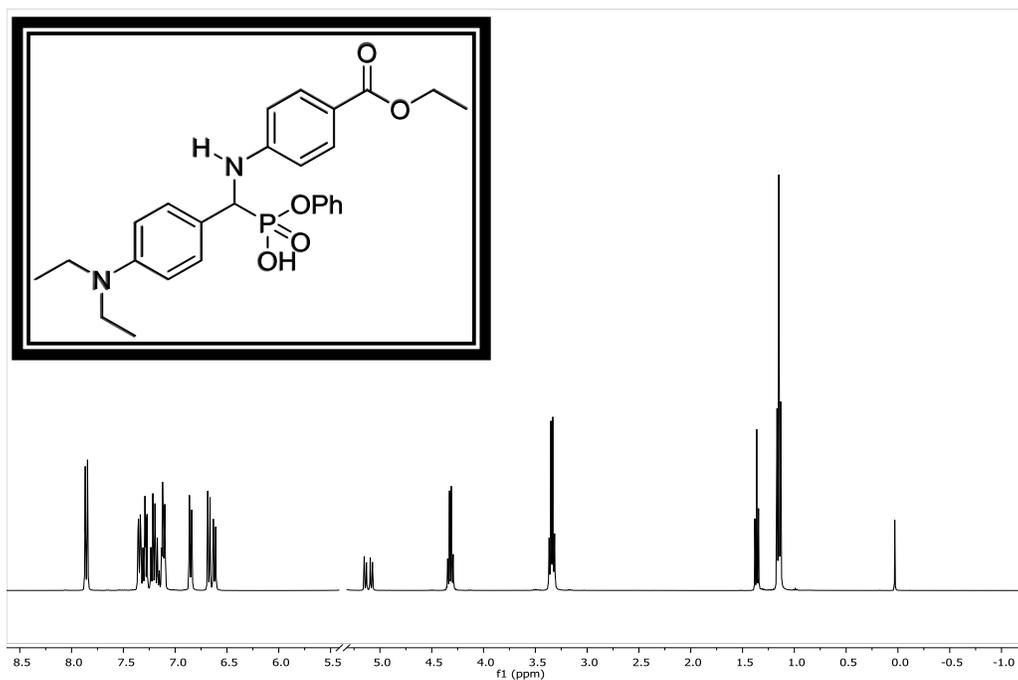
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 24e.



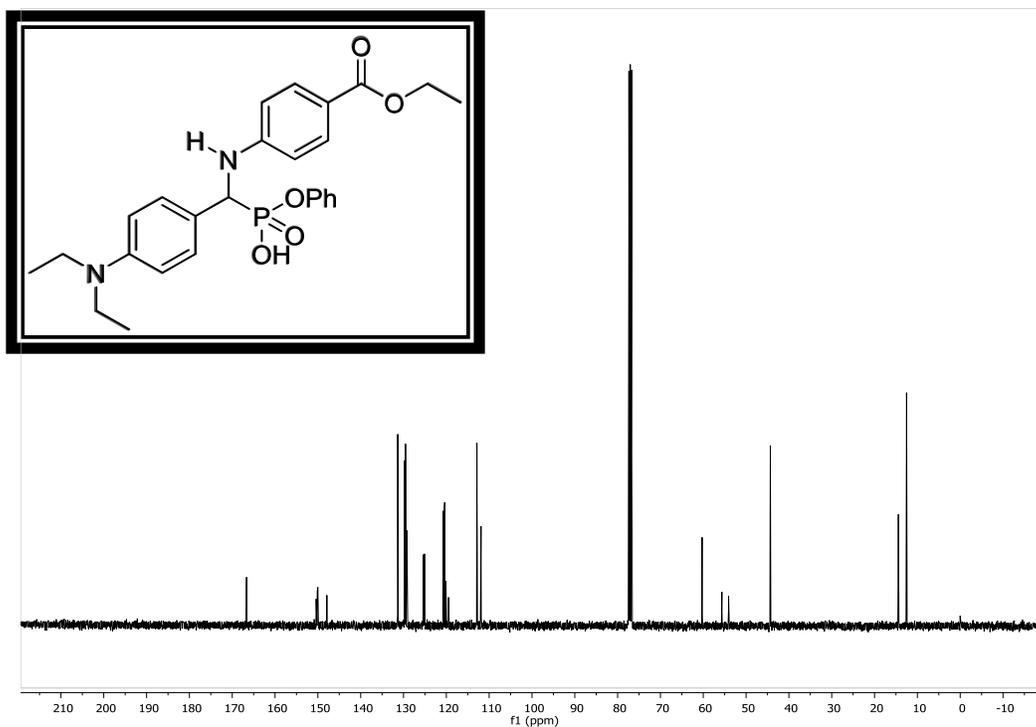
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 24e.



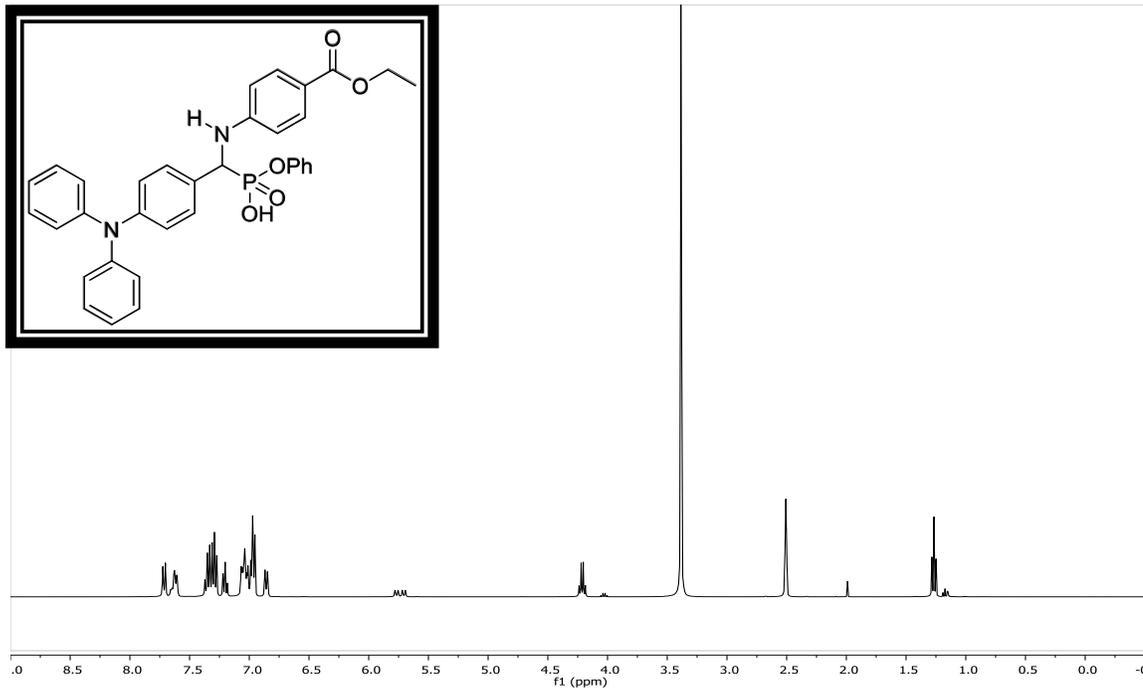
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 24f.



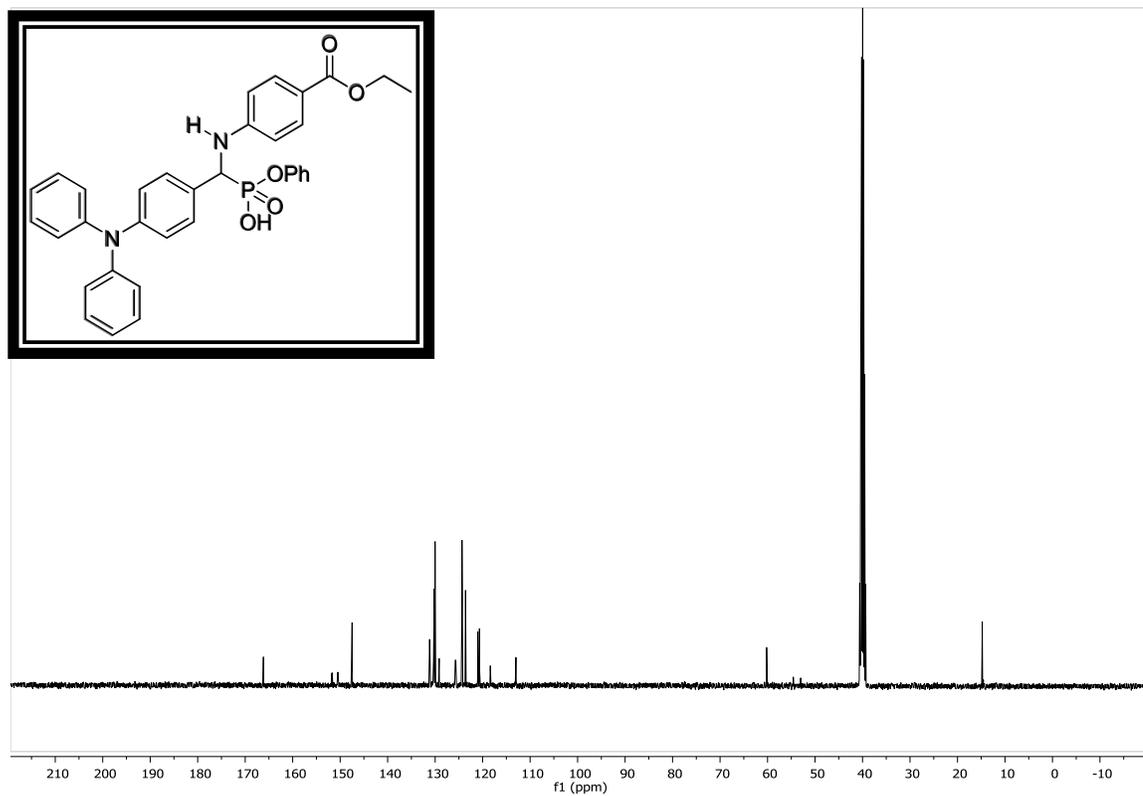
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 24f.



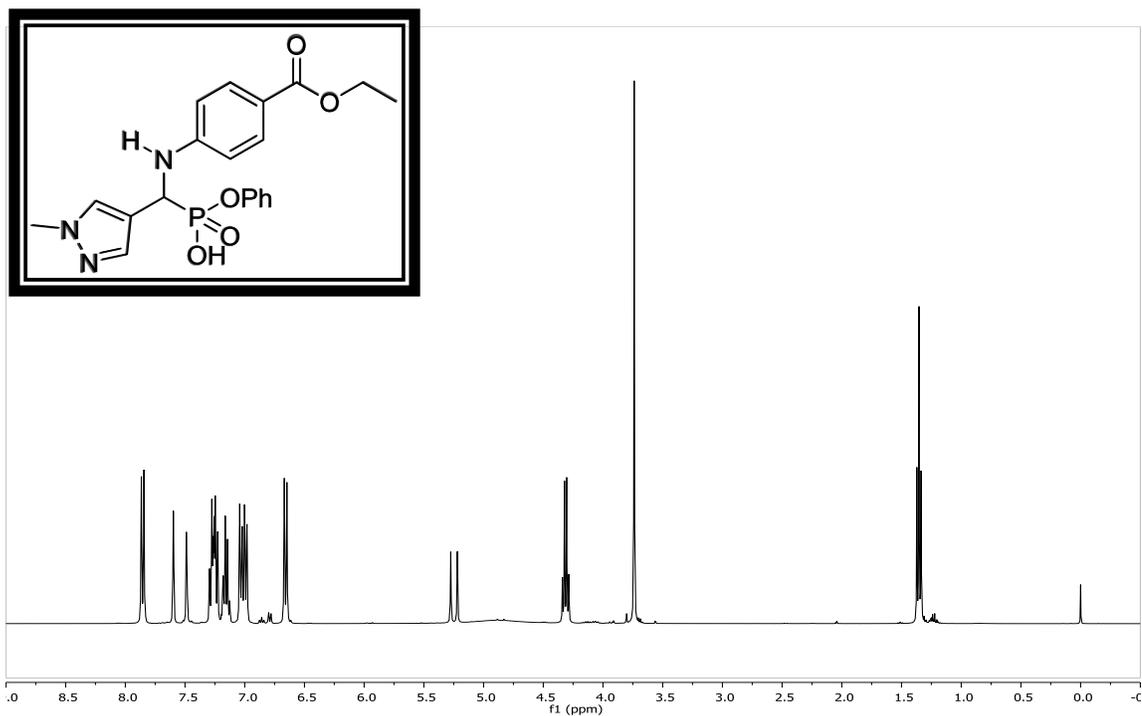
Espectro de RMN de ^1H del compuesto 24g.



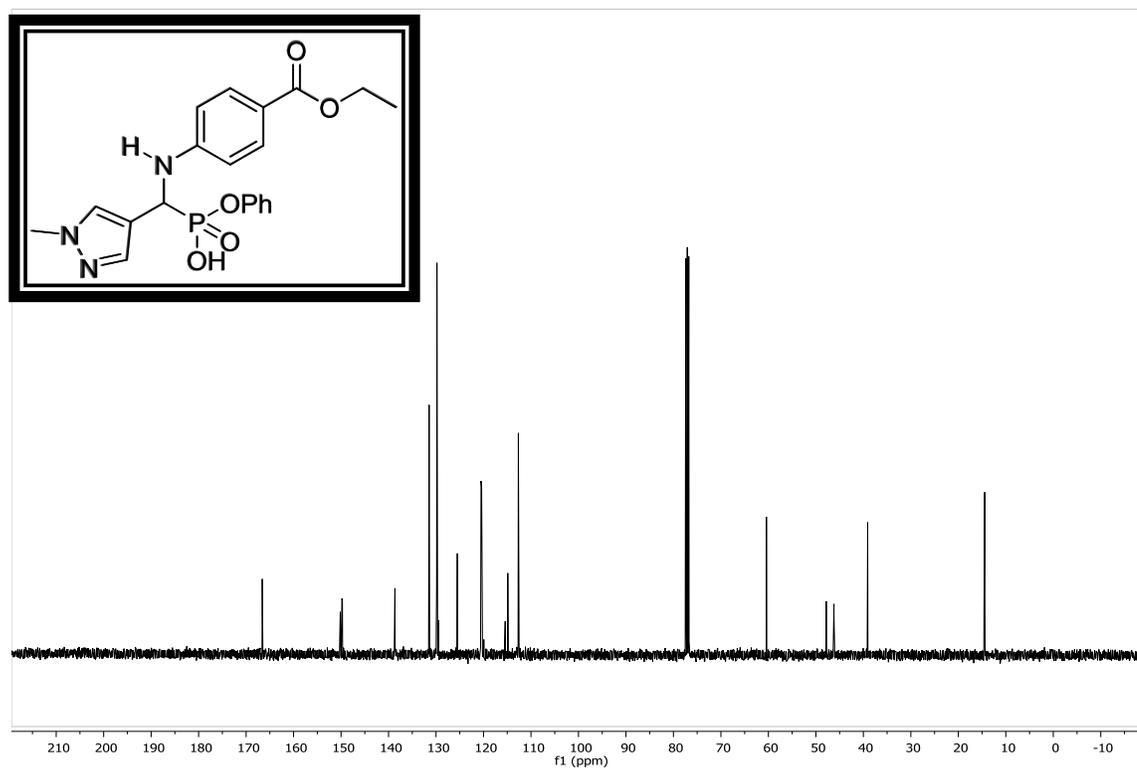
Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 24g.



Espectro de RMN de ^1H del compuesto 24h.



Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 24h.



Bibliografía

- 1.- Pellon Aize, Ramirez-Garcia Andoni, Buldain Idoia, Antoran Aitziber, Martin–Souto Leire, Rementeria Aitor, L. Hernando Fernando, Pathobiology of *Lomentospora prolificans*: could this species serve as a model of primary antifungal resistance?, *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2018**, (51): 10–15.
- 2.- Organización mundial de la salud. consultado el 10/07/2018 http://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/
- 3.- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* **2012**;(4):165rv13.
- 4.- Denning DW, Bromley MJ. Infectious disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science* **2015**, (347):1414–16.
- 5.- The Fungal Infection Trust. How common are fungal diseases? Fungal Res Trust 20th Anniv Meet **2016**.
- 6.- Sanglard D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front Med* **2016**;3-11.
- 7.- Organización Mundial de la salud. Consultado el 10/07/2018, Tuberculosis; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.
- 8.- Organización Mundial de la salud. Consultado el 10/07/2018, Malaria; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>
- 9.- Rodríguez Tudela Juan Luis, Berenguer Juan, Guarro Josep, Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases, *Medical mycology*, **2009**, (47): 359-370.
- 10.- Méndez-Tovar, Luis Javier et al.. Frecuencia de micosis invasivas en un hospital mexicano de alta especialidad. Experiencia de 21 años. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, **2016**, 54 (5): 581-587.
- 11.- Elizondo Zertuche Mariana, Alexandra M. Montoya, Efrén Robledo Leal, Comparative Pathogenicity of *Lomentospora prolificans* (*Scedosporium prolificans*) Isolates from Mexican Patients, *Springer, Mycopathologia*, **2017**, 182: 681-689.

-
- 13.- K Torres, A Soto, D Sandrea, M Villalobos, Candidiasis vaginal en primigestas, *Revista de Obstetricia*, **2005**, 65 (2): 55-58.
- 14.- Departamento de Microbiología y Parasitología- Recursos en micología, UNAM, consultado 11/07/2018:., <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
- 15.- Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* **2014** 31(1):42-8.
- 16.- Biasoli M., (2013), Candidiasis, pp. 1-31 Consultado el 04 de febrero de 2018: [en línea] Centro de Referencia Micológica (COREMIC), disponible en: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICO_S_2013/CANDIDIASIS_2013-1.pdf.
- 17.- Ceccotti E. Micosis bucales. En: Ceccotti E. Clínica estomatológica SIDA, cáncer y otras afecciones. Buenos Aires: Panamericana; **1993**,162-4.
- 18.- Jawest E. Micología médica. En: Jawest E, Melnick JL, Adelberg EA. Microbiología médica: 12. ed. México, D.F.: El Manual Moderno; **1988**, 326-41.
- 19.- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Ellis, D., Tullio, V. Results from the artemis disk global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, (48): 1366–1377.
- 20.- Oxman, D. A., Chow, J. K., Frenzl, G., Hadley, S., Hershkovitz, S., Ireland, P., Candidaemia associated with decreased *in vitro* fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern? *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, (65):1460–1465.
- 23.- De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ, Hyphomycetes. Genus: *Scedosporium*. Atlas of clinical fungi, 2ND ed. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures, **2000**: 899-901.

-
- 26.- Hiratake A.; Oda J. Aminophosphonic and aminoboronic acids as key elements of a transition state analogue inhibitor of enzymes, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **1997**,(6): 211–218.
- 27.- Moonen K.; Laureyn I.;Stevens C. V. Synthetic methods for azaheterocyclic phosphonates and their biological activity, *Chemical Reviews*, **2004**,104(12): 6177–6215.
- 28.- Palacios F.; Alonso C.; de los Santos J. M. β -phosphono and phosphinopeptides derived from β -amino-phosphonic and phosphinic acids, *Current Organic Chemistry*, **2004**, 8(15):1481–1496.
- 29.- Schug K. A.; Lindner W. Noncovalent binding between guanidinium and anionic groups: focus on biological and synthetic-based arginine/guanidinium interactions with phosph[on]ate and sulf[on]ate residues, *Chemical Reviews*, **2005**, 105 (1), 67–113.
- 30.- Ouimette D.; Coffey M. Comparative antifungal activity of four phosphonate compounds against isolates of nine *Phytophthora* species, *Phytopathology*, **1989**, 79(7):61–767.
- 31.- Yang S.; Gao X.W.; Diao C. L.; et al. Synthesis and antifungal activity of novel chiral α -aminophosphonates containing fluorine moiety, *Chinese Journal of Chemistry*, **2006**, 24(11):1581–1588.
- 32.- Kumari B. S.; Sankar A. U. R.; Suresh Reddy C.; Nayak S. K.; Naga Raju C. Synthesis, and antimicrobial activity of 2,10-dichloro-6- substituted aminobenzyl-12H-dibenzo [d,g][1,3,2]dioxaphosphocin- 6-oxides, *Arkivoc*, **2007**, 5 (13): 155–166.
- 33.- Sonar S. S.; Sadaphal S. A.; Labade V. B.; Shingate B. B.; Shingare M.S. An efficient synthesis and antibacterial screening of novel oxazepine α -aminophosphonates by ultrasound approach, *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, **2010**, 185(1): 65–73.
- 34.- Bloemink M. J.; Diederren J. J. H.; Dorenbos J. P.; Heetebrij R. J.; Keppler B. K.; Reedijk J. Calcium ions do accelerate the DNA binding of new antitumor-

active platinumaminophosphonate complexes, *European Journal of Inorganic Chemistry*, **1999**,10(5): 1655–1657.

35.- Yang Song B.; Zhang G.; et al. Synthesis, X-ray crystallographic analysis, and antitumor activity of N-(benzothiazole-2-yl)-1-(fluorophenyl)-O,O-dialkyl- α -aminophosphonates, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2006**, 16(6):1537–1543.

36.- Rao X.; Song Z.; He L. Synthesis and antitumor activity of novel α -aminophosphonates from diterpenic dehydroabietylamine, *Heteroatom Chemistry*, **2008**, 19 (5): 512–516.

37.- Venkata Ramana, S.; Rasheed, K.; Chandra Sekhar S. One-pot and catalyst-free synthesis of novel α -aminophosphonates under microwave irradiation and their biological activity, *Der Pharm Lett*, **2012**, 4(2): 456-463.

38.- Subba Reddy G.; Uma Maheswara Rao K.; Syama Sundar C.; Snathi Sudha S.; Haritha B.; Swapna S.; Suresh Reddy C. Neat synthesis and antioxidant activity of α -aminophosphonates. *Arab J Chem*, **2014**,7(5):833-838.

39.- Ouimette D.; Coffey M. Comparative antifungal activity of four phosphonate compounds against isolates of nine *Phytophthora* species, *Phytopathology*, **1989**, 79 (7): 761–767.

40.- Yingshu X.; Kai Y.; Baoan S.; Gangfang X.; Song Y.; Wei X.; Deyu H.; Ping L.; Guiping A. Synthesis and Antiviral Bioactivities of α -Aminophosphonates Containing Alkoxyethyl Moieties, *Chinese Journal of Chemistry* , **2006**, 103 (4): 2939-2953.

41.- Anguo Ying, Shuo Liu, Jianguo Yang, and Huanan Hu Synthesis of α -amino phosphonates under a neat condition catalyzed by multiple-acidic ionic liquids. *Industrial & Engineering Chemistry Research*,**2014**, 182 (5): 1452-1468.

42.- Mahdi Mirzaei, Hossein Eshghi, Maede Hasanpour, and Reihaneh Sabbaghzadeh, Synthesis, characterization, and application of [1-methylpyrrolidin-2-one-SO₃H]Cl as an efficient catalyst for the preparation of α -

-
- aminophosphonate and docking simulation of ligand bond complexes of cyclin-dependent kinase 2, phosphorus, sulfur, and silicon, **2016**, 191 (10): 1351-1357.
- 43.- Kumari S.; Shekhar A.; Pathak D. A New Catalyst and Solvent-free Green Synthesis of α -Hydroxy Phosphonates and α -Aminophosphonates. *Chemical Science Transactions*, **2014**, 3 (1): 45-54.
- 44.- Charles S. Demmer, Niels Krogsgaard-Larsen, and Lennart Bunch. Review on Modern Advances of Chemical Methods for the Introduction of a Phosphonic Acid Group. American Chemical Society. Chem. Rev. **2011**, 111:7981–8006
- 55.- Cherkasov, R.A.; Galkin, V.I. The Kabachnik–Fields reaction: synthetic potential and the problem of the mechanism. Russ. Chem. Rev. **1998**, 67, 857–882.
- 56.- Zahed Karimi-Jaberi, Ladan Bazyar and Mohammad Amiri, Synthesis of α -aminophosphonates in the presence of triethylammonium hydrogen sulfate [Et₃NH][HSO₄] as a highly efficient ionic liquid catalyst, *Rev. Roum. Chim.*, **2017**, 62(1): 23-26.
- 57.- Koteswara Rao Valasani, Chandra Sekhar Kuruva, Veerendra Koppolu, Jhansi Rani Vangavaragu and Victor W Day, Synthetic and Biological Applications of Benzothiazole Phosphonates, ResearchGate, **2017**, 115:10378-10406.
- 58.- Dawson, M. I.; Xia, Z.; Liu, G.; Fontana, J. A.; Farhana, L.; Patel, B. B.; The Peptidomimetic, 1-Adamantyl-Substituted, and Flex-Het Classes of Retinoid-Derived Molecules: Their Structure-Activity Relationships and Retinoid Receptor-Independent Anticancer Activities
Med. Chem. **2007**, 50:2622.
- 59.- Castrillón Rivera Laura Estela, Palma Ramos Alejandro, Padilla Desgarenes María del Carmen, Biopelículas fúngicas, artículo de revisión, *Dermatol Rev Mex.*, **2013**;57:350-361