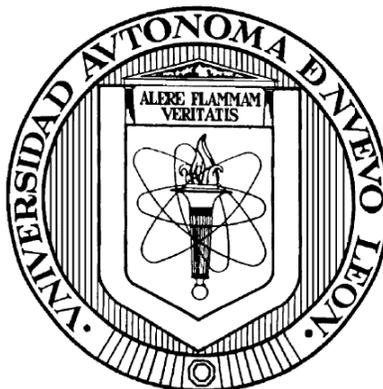


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS α -AMINOFOSFONATOS
(TIPO ÉSTER Y TIPO AMIDA) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA Y ANTIBACTERIANA *in vitro*.**

Por

M.C. ERIKA LILIÁN LOREDO CALDERÓN

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS con Orientación en Farmacia.**

SEPTIEMBRE 2021

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS α -AMINOFOSFONATOS
(TIPO ÉSTER Y TIPO AMIDA) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA Y ANTIBACTERIANA *in vitro*.**

Aprobación de la Tesis:

Dra. Susana Thelma López Cortina
Presidente

Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís
Secretario

Dra. Ma. Del Rayo Camacho Corona
1^{er} Vocal

Dra. Tannya Rocío Ibarra Rivera
2^{do} Vocal

Dr. Emanuel Hernández Núñez
3^{er} Vocal

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Subdirectora de Estudios de Posgrado

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS α -AMINOFOSFONATOS
(TIPO ÉSTER Y TIPO AMIDA) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA Y ANTIBACTERIANA *in vitro*.**

Asesores de Tesis:

Dra. Susana Thelma López Cortina
Directora

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Co-Directora

Dr. Carlos A. Velázquez Martínez
Director Externo

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS α -AMINOFOSFONATOS
(TIPO ÉSTER Y TIPO AMIDA) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIPROLIFERATIVA Y ANTIBACTERIANA *in vitro*.**

Revisión de la Tesis:

**Dra. Susana Thelma López Cortina
Asesor de Tesis.**

**Dra. María del Rayo Camacho Corona
Comité Tutorial.**

**Dr. Edgar Abraham García Zepeda.
Comité Tutorial.**

**Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís.
Comité Tutorial.**

**Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Subdirectora de Estudios de Posgrado.**

RESUMEN

Nombre: Erika Lilián Loredo Calderón.

Fecha de Graduación: septiembre, 2021

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Facultad de Ciencias Químicas.

Título del Estudio: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS α -AMINOFOSFONATOS (TIPO ÉSTER Y TIPO AMIDA) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y ANTIBACTERIANA *in vitro*.

Número de páginas: 324

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con orientación en Farmacia.

Área de Estudio: Síntesis de moléculas con actividad biológica.

Propósito y Método del Estudio: Los α -aminofosfonatos (α -AP) han presentado diversas actividades dentro de la química medicinal (inhibidores enzimáticos, antivirales, antioxidantes, antimicrobianos y anticancerígenos). El objetivo principal del proyecto fue realizar la síntesis de dos series de α -AP, evaluar su actividad antiproliferativa y antibacteriana *in vitro*. La síntesis se realizó por el método *one-pot* de Kabachnik-Fields empleando irradiación por microondas sin catalizadores y con etanol como disolvente. Los productos obtenidos fueron purificados y caracterizados (RMN ^1H , ^{13}C , ^{31}P y HRMS). La determinación de la CI_{50} se realizó por el método de evaluación de viabilidad celular MTT en las líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231, MCF-7 y en la línea celular no modificada MCF-10A. La evaluación de apoptosis se realizó por la detección de caspasa-3. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en placa utilizando las cepas *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*.

Contribuciones y Conclusiones: Dieciocho α -AP (nueve ésteres y nueve amidas) fueron sintetizados, purificados y caracterizados. El éster **5** y las amidas **15**, **18** y **22** presentaron actividad antiproliferativa en **MDA-MB-231**. Los ésteres **5**, **8** y las amidas **17** y **18** lograron inhibir la proliferación celular de **MCF-7**. El éster **5** y amidas **15**, **18** y **22** resultaron citotóxicos en la línea celular no tumoral **MCF-10A**, mientras que el éster **8** y la amida **17** no lo fueron. Lo anterior sugiere que los α -AP **8** y **17** son selectivos para la línea celular cancerígena. Se determinó que los α -AP activos producen muerte celular al desencadenar el proceso apoptótico. Las amidas **15-18** y **21** presentaron actividad antibacteriana con CMI menores en *S. aureus*.

FIRMA DEL ASESOR: _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por todas las bendiciones que me ha otorgado, por enviarme a tan buenas personas a cada lugar que he ido, por las maravillosas experiencias que me ha permitido vivir y por brindarme las herramientas para que de una u otra forma alcance mis objetivos.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Susana López Cortina por su asesoría durante la realización de este proyecto, por brindarme su apoyo, por sus consejos tanto académicos como de la vida cotidiana, por su amistad, por su cariño y por tantos momentos invaluable compartidos.

Al Dr. Carlos Velázquez Martínez por aceptarme en su grupo de investigación, por abrirme las puertas y recibirme en su laboratorio, por todo el apoyo que me otorgó para que pudiera desarrollar el proyecto y por todos sus consejos durante mi estancia en Edmonton.

A la Dra. Mónica Ramírez por ser mi co-asesora, por apoyarme en la parte biológica del proyecto y por ser un gran ejemplo de fortaleza.

A mi comité tutorial; la Dra. Rayito, el Dr. Abraham y el Dr. Francisco Ávalos por todas sus observaciones y aportaciones que sin duda enriquecieron esta investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Industrial: Sofy, Porras, Fer, Anthony, Juany, Mayra y José Luis, gracias por su amistad, por su apoyo, por sus consejos, por tantos momentos divertidos, pláticas, experiencias y retos en el laboratorio. Reitero mi agradecimiento a Fer por siempre tener una excelente actitud y por todo su apoyo durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros del INGEN: Zacatecas, Jesús, Eli y Jorge por todo el apoyo que me otorgaron durante mi estadía en su laboratorio.

A la Dra. Pilar Morales San Claudio por el apoyo brindado para la realización de la actividad antibacteriana.

Al Dr. Eder Arredondo Espinoza por los recursos para la determinación de apoptosis.

A mis compañeros de laboratorio 2-081 del edificio Katz de la Universidad de Alberta: David y Amir, gracias por todo su apoyo, sus consejos, reuniones de grupo y momentos divertidos durante mi estancia en Edmonton.

A Oileng, Eder y Liang por recibirme en su familia, por compartir conmigo su experiencia viviendo en Edmonton, por llevarme a conocer la ciudad y sus actividades, por los tips, las pláticas, por estar al pendiente de mí, pero sobre todo gracias por su valiosa amistad y cariño.

A mis padres Marisela Calderón Olmos y Miguel Ángel Loredó Gutiérrez por su amor incondicional, por su apoyo en todos los aspectos y por creer en mí en todo momento. A mis hermanos Miguel, Jaime y Samantha, por tantas experiencias divertidas y de aprendizaje que hemos vivido.

Finalmente quiero agradecer a la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y a CONACYT por la beca otorgada.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
TABLA DE CONTENIDO	VII
LISTA DE TABLAS	XVI
LISTA DE FIGURAS	XIX
LISTA DE ESQUEMAS	XXIX
NOMENCLATURA	XXX
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. CÁNCER.....	1
1.1.1. ESTADÍSTICA A NIVEL MUNDIAL	1
1.1.2. ESTADÍSTICA EN MÉXICO.....	2
1.1.3. FACTORES CAUSALES DEL CÁNCER.....	4
1.1.4. TRATAMIENTOS.....	5
1.2. ENFERMEDADES INFECCIOSAS.....	12
1.2.1. INFECCIONES BACTERIANAS	12
1.2.1.1. ETIOLOGÍA BACTERIANA	12
1.2.1.2. ESTADÍSTICA DE INFECCIONES BACTERIANAS	13
1.2.1.3. TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS.....	14
1.2.1.4. FARMACORRESISTENCIA.....	15
1.3. AMINOFOSFONATOS (α -AP).....	19
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	21
2.1 α -AMINOFOSFONATOS	21
2.1.1 SÍNTESIS ORGÁNICA.....	22
2.1.2 ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA	25
2.1.3 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	29

2.1.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	32
CAPÍTULO 3.	36
3.1. HIPÓTESIS.	36
3.2. OBJETIVO GENERAL.....	36
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3.4. APORTACIÓN CIENTÍFICA.	37
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	38
INFORMACIÓN GENERAL.	38
4.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.	39
4.2 SÍNTESIS DE LOS α -AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER	45
4.3 SÍNTESIS DE LOS α -AMINOFOSFONATOS TIPO AMIDA.....	47
4.4 PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS.....	50
4.5 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS PRODUCTOS SINTETIZADOS Y PURIFICADOS.....	52
4.6 ESTRATEGIA GENERAL DE LA EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS	55
4.7 SCREENING DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS (ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA EN LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS)	57
4.8 DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR <i>IN</i> <i>VITRO</i> DE LOS α -AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER Y TIPO AMIDA.	63
4.9 DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD <i>IN VITRO</i> , DE LOS α - AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER Y TIPO AMIDA.....	64
4.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE TODOS LOS COMPUESTOS.....	65
4.10.1. DETERMINACIÓN DE LA CMI	68
4.11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	71
4.12 REALIZACIÓN DE ENSAYOS QUE APORTEN INFORMACIÓN RESPECTO AL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS MÁS ACTIVOS. ...	74
4.12.1. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO	74

4.12.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA.....	75
4.13 FORMA DE MANEJO Y DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS.	79
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
A. SÍNTESIS ORGÁNICA.....	80
5.1. SERIE 1. α -AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER.....	80
5.1.1. α -AMINOFOSFONATO 4 (ÉSTER DE <i>p</i> -CLOROBENZALDEHÍDO)	80
5.1.1.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 4	80
5.1.1.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 4	81
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	82
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	86
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	87
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	88
5.1.2. α -AMINOFOSFONATO 5 (ÉSTER DE <i>p</i> -HIDROXIBENZALDEHÍDO).....	88
5.1.2.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 5	88
5.1.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 5	89
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	89
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	93
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	95
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	95
5.1.3. α -AMINOFOSFONATO 6 (ÉSTER DE <i>p</i> -METOXIBENZALDEHÍDO).....	95
5.1.3.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 6	95
5.1.3.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 6	96
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	96
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	100
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	102
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	102
5.1.4. α -AMINOFOSFONATO 7 (ÉSTER DE BENZALDEHÍDO)	103
5.1.4.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 7	103
5.1.4.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 7	103

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	103
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	107
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	109
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	109
5.1.5. α -AMINOFOSFONATO 8 (ÉSTER DE 4-(DIFENILAMINO) BENZALDEHÍDO)	109
5.1.5.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 8	110
5.1.5.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 8	110
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	110
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	114
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	116
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	116
5.1.6. α -AMINOFOSFONATO 9 (ÉSTER DE 4-(4-MORFOLINIL) BENZALDEHÍDO)	116
5.1.6.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 9	116
5.1.6.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 9	117
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	117
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	121
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	123
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	124
5.1.7. α -AMINOFOSFONATO 10 (ÉSTER DE 1-METIL-1-H-PIRAZOL-4-CARBOXALDEHÍDO)	124
5.1.7.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 10	124
5.1.7.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 10	125
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	125
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	129
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	131
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	131
5.1.8. α -AMINOFOSFONATO 11 (ÉSTER DE ISOBUTIRALDEHÍDO)	131

5.1.8.1.	SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 11	131
5.1.8.2.	CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 11	132
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	132
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	136
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	138
▪	ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	138
5.1.9.	α -AMINOFOSFONATO 12 (ÉSTER DE 2-ETIL-BUTILALDEHÍDO)	139
5.1.9.1.	SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 12	139
5.1.9.2.	CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 12	139
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	140
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	143
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	145
▪	ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	146
5.1.10.	COMPARACIÓN DE SÍNTESIS ORGÁNICA DE α -AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER	146
5.2.	SERIE 2. α -AMINOFOSFONATOS TIPO AMIDA.....	148
5.2.1.	AMIDA 14	149
5.2.1.1.	SÍNTESIS DE LA AMIDA 14	150
5.2.1.2.	CARACTERIZACIÓN DE LA AMIDA 14	153
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	153
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	157
▪	ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	158
5.2.2.	α -AMINOFOSFONATO 15 (AMIDA DE <i>p</i> -CLOROBENZALDEHÍDO).....	159
5.2.2.1.	SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 15	159
5.2.2.2.	CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 15	159
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	159
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	163
▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	165
▪	ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	166

5.2.3. α -AMINOFOSFONATO 16 (AMIDA DE <i>p</i> -HIDROXIBENZALDEHÍDO)	166
5.2.3.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 16	166
5.2.3.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 16	167
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	167
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	171
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	172
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	173
5.2.4. α -AMINOFOSFONATO 17 (AMIDA DE <i>p</i> -METOXIBENZALDEHÍDO)	173
5.2.4.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 17	173
5.2.4.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 17	174
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	174
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	178
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	180
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	181
5.2.5. α -AMINOFOSFONATO 18 (AMIDA DE BENZALDEHÍDO)	181
5.2.5.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 18	181
5.2.5.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 18	181
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	182
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	185
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	187
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	187
5.2.6. α -AMINOFOSFONATO 19 (AMIDA DE 4-(DIFENILAMINO) BENZALDEHÍDO).....	187
5.2.6.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 19	187
5.2.6.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 19	188
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	188
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	192
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	194
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	194

5.2.7. α -AMINOFOSFONATO 20 (AMIDA DE 4-(4-MORFOLINIL) BENZALDEHÍDO).....	194
5.2.7.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 20	195
5.2.7.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 20	195
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	195
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	199
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	201
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	202
5.2.8. α -AMINOFOSFONATO 21 (AMIDA DE 1-METIL-1- <i>H</i> -PIRAZOL-4-CARBOXALDEHÍDO)	202
5.2.8.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 21	202
5.2.8.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 21	203
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	203
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	207
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	209
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	209
5.2.9. α -AMINOFOSFONATO 22 (AMIDA DE ISOBUTIRALDEHÍDO).....	210
5.2.9.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 22	210
5.2.9.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 22	210
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	211
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	215
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P	217
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	217
5.2.10. α -AMINOFOSFONATO 23 (ÉSTER DE 2-ETIL-BUTILALDEHÍDO)	217
5.2.10.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 23	218
5.2.10.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 23	218
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H	218
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C	223

▪	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ³¹ P.....	225
▪	ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN	225
5.2.11.	COMPARACIÓN DE SÍNTESIS ORGÁNICA DE α -AMINOFOSFONATOS TIPO AMIDA.....	226
B.	PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	228
5.3.	LÍNEA CELULAR MDA-MB-231	228
5.3.1.	EVALUACIÓN PRELIMINAR (SCREENING) DE LOS α -AMINOFOSFONATOS	228
5.3.2.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LOS α -AMINOFOSFONATOS EN COMPARACIÓN CON FOTEMUSTINE.....	230
5.4.	LÍNEA CELULAR MCF-7	232
5.4.1.	EVALUACIÓN PRELIMINAR (SCREENING) α -AMINOFOSFONATOS	232
5.4.2.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LOS α -AMINOFOSFONATOS EN COMPARACIÓN CON FOTEMUSTINE.....	234
5.5.	DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS α -AMINOFOSFONATOS	236
5.6.	COMPARACIÓN ENTRE ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA EN LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS Y LA CITOTOXICIDAD DE LOS α -AMINOFOSFONATOS.....	238
5.7.	REALIZACIÓN DE ENSAYOS QUE APORTEN INFORMACIÓN RESPECTO AL MECANISMO DE ACCIÓN	243
5.7.1.	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO	243
5.7.2.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA.....	246
5.8.	EVALUACIÓN PRELIMINAR (SCREENING) DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS α -AMINOFOSFONATOS.....	248
5.8.1.	SCREENING DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN LA CEPA <i>Escherichia coli</i>	248
5.8.2.	SCREENING DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN LA CEPA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250

5.8.3.SCREENING DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN LA CEPA <i>Staphylococcus aureus</i>	252
5.8.4.RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL SCREENING Y ELECCIÓN DE COMPUESTOS PARA DETERMINACIÓN DE CMI	253
5.9. DETERMINACIÓN DE LA CMI.....	255
5.9.1.DETERMINACIÓN DE LA CMI EN LA CEPA <i>Escherichia coli</i>	255
5.9.2.DETERMINACIÓN DE LA CMI EN LA CEPA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	255
5.9.3.DETERMINACIÓN DE LA CMI EN LA CEPA <i>Staphylococcus aureus</i>	256
5.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	258
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	260
ANEXOS	263
7.1. ESTÁNDAR DE MCFARLAND 0.5 M.....	263
7.2. CONDICIONES DE REACCIÓN AMIDA 14	264
7.3. CARACTERIZACIÓN ÁCIDO 14B	266
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹ H.	266
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹³ C.	267
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN.....	267
7.4. COMPARACIÓN RMN ¹ H AMIDA 16 VS AMIDA 16 + D ₂ O	268
7.5. RESUMEN DE DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS α-AP	270
DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	281
REFERENCIAS.....	282

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Mortalidad atribuida al cáncer OMS 2020.....	2
Tabla 2. Mortalidad atribuida al cáncer, México. INEGI 2018.....	3
Tabla 3. Agentes externos causantes de cáncer.....	5
Tabla 4. Clasificación de agentes antibacterianos.....	15
Tabla 5. Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos, OMS.....	18
Tabla 6. Antecedentes de la síntesis de α -aminofosfonatos.	22
Tabla 7. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Mizraei y colaboradores	25
Tabla 8. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Klimczak y colaboradores	26
Tabla 9. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Anil Kumar y colaboradores	29
Tabla 10. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Sampath y colaboradores.	30
Tabla 11. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Gundluru y colaboradores.	32

Tabla 12. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Subba-Reddy y colaboradores.	33
Tabla 13. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Venkata y colaboradores.	35
Tabla 14. Radicales de los α -aminofosfonatos tipo éster, compuestos 4-12	47
Tabla 15. Radicales de los α -aminofosfonatos tipo éster, compuestos 15-23	49
Tabla 16. Condiciones de reacción y rendimientos obtenidos. Serie 1.....	147
Tabla 17. Condiciones de reacción probadas para la síntesis de los derivados de α -aminofosfonatos tipo amida.	150
Tabla 18. Condiciones de reacción y rendimientos obtenidos en la síntesis de la amida 14	151
Tabla 19. Condiciones de reacción optimizadas y rendimientos obtenidos en la síntesis de la amida 14	152
Tabla 20. Condiciones de reacción y rendimientos obtenidos. Serie 2.....	226
Tabla 21. Cl_{50} de los compuestos activos en línea celular MDA-MB-231.....	231
Tabla 22. Cl_{50} de los compuestos activos en línea celular MCF-7	235
Tabla 23. Cl_{50} de los compuestos activos en línea celular MCF-10A	238
Tabla 24. Comparación entre actividad antiproliferativa y citotoxicidad	239
Tabla 25. Resultados del screening en <i>Escherichia coli</i>	249
Tabla 26. Resultados del screening en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	251
Tabla 27. Resultados del screening en <i>Staphylococcus aureus</i>	252
Tabla 28. Resumen del screening en las tres cepas evaluadas	254

Tabla 29. Determinación de la CMI en <i>Escherichia coli</i>	255
Tabla 30. Determinación de la CMI en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	256
Tabla 31. Determinación de la CMI en <i>Staphylococcus aureus</i>	256

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estructura química de un α -aminofosfonato y un α -aminoácido	19
Figura 2. Estructura de los compuestos sintetizados por Fang y colaboradores.	26
Figura 3. Estructura de los compuestos sintetizados por Mizraei y colaboradores.	25
Figura 4. Estructura de los compuestos sintetizados por Klimczak y colaboradores.	26
Figura 5. Estructura de los compuestos sintetizados por Man-Yi Ye y colaboradores.	27
Figura 6. Estructura de los compuestos sintetizados por Yan Ping y colaboradores.	28
Figura 7. Estructura de los compuestos sintetizados por Anil Kumar y colaboradores. .	28
Figura 8. Estructura de los compuestos sintetizados por Sampath y colaboradores.	30
Figura 9. Estructura de los compuestos sintetizados por Maddina y colaboradores.	31
Figura 10. Estructura de los compuestos sintetizados por Abdel y colaboradores.	31
Figura 11. Estructura de los compuestos sintetizados por Gundluru y colaboradores.	32
Figura 12. Estructura de los compuestos sintetizados por Subba-Reddy y colaboradores.	33
Figura 13. Estructura de los compuestos sintetizados por Venkata y colaboradores.	34
Figura 14. Equipo de Microondas <i>Monowave 300, Anton-Paar</i>	46
Figura 15. Equipo de Microondas <i>MW Irradiator, Biotage</i>	48

Figura 16. Equipo de cromatografía flash <i>ISOLERA ONE, Biotage</i>	51
Figura 17. Equipo de cromatografía flash <i>CombiFlash Rf, Teledyne ISCO</i>	52
Figura 18. Equipo de RMN ^1H (60 MHz), <i>Anazasi</i>	53
Figura 19. Equipo de RMN ^1H (60 MHz), <i>nanalysis</i>	53
Figura 20. Equipo de RMN (600 MHz), <i>Bruker Ascend 600</i>	54
Figura 21. Equipo de Espectrometría de Masas, <i>Agilent technologies 1260 infinity</i>	55
Figura 22. Placa de 96 pozos, distribución establecida por el software Cheburator para determinación de la actividad antiproliferativa de los α -aminofosfonatos en el <i>screening</i> inicial	62
Figura 23. Placa de 96 pozos, distribución de compuestos elegidos para la determinación de la actividad antiproliferativa <i>in vitro</i>	64
Figura 24. Placa de 96 pozos, distribución de compuestos para la realización del <i>screening</i> bacteriano.	67
Figura 25. Placa de 96 pozos, distribución de compuestos elegidos para la determinación de la CMI.	70
Figura 26. Placa de 96 pozos, distribución de compuestos elegidos para la determinación de la actividad antioxidante.	73
Figura 27. Placa de 96 pozos, distribución de compuestos elegidos para la determinación del estrés oxidativo.	75
Figura 28. Placa de 6 pozos, distribución de compuestos elegidos para la determinación de la actividad apoptótica.	76
Figura 29. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 4	83

Figura 30. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 4	84
Figura 31. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 4	85
Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 4	86
Figura 33. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 4	88
Figura 34. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 5	90
Figura 35. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 5	91
Figura 36. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 5	93
Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 5	94
Figura 38. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 5	95
Figura 39. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 6	97
Figura 40. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 6	99
Figura 41. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 6	100
Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 6	101
Figura 43. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 6	102
Figura 44. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 7	104

Figura 45. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 7	106
Figura 46. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 7	107
Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 7	108
Figura 48. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 7	109
Figura 49. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 8	111
Figura 50. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 8	113
Figura 51. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 8	114
Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 8	115
Figura 53. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 8	116
Figura 54. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 9	118
Figura 55. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 9	120
Figura 56. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 9	121
Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3 , MeOD) del α -aminofosfonato 9	122
Figura 58. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 9	124
Figura 59. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 10	126

Figura 60. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 10 .	128
Figura 61. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 10 .	129
Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 10 .	130
Figura 63. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 10 .	131
Figura 64. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 11 .	133
Figura 65. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 11 .	135
Figura 66. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 11 .	136
Figura 67. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 11 .	137
Figura 68. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 11 .	138
Figura 69. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 12 .	140
Figura 70. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 12 .	142
Figura 71. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 12 .	143
Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 12 .	144
Figura 73. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 12 .	146
Figura 74. Ácido α -Aminofosfónico obtenido durante las condiciones iniciales de síntesis.	149

Figura 75. Productos obtenidos con la ruta de síntesis del Esquema 6: amida 14 y ácido 14b	151
Figura 76. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO d_6) de la amida 14	154
Figura 77. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO d_6) de la amida 14	156
Figura 78. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H la amida 14	157
Figura 79. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) de la amida 14	158
Figura 80. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 15	160
Figura 81. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 15	162
Figura 82. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 15	163
Figura 83. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 15	164
Figura 84. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 15	165
Figura 85. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 16	168
Figura 86. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 16	169
Figura 87. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 16	170
Figura 88. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 16	171
Figura 89. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 16	173
Figura 90. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 17	175

Figura 91. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 17 .	177
Figura 92. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 17 .	178
Figura 93. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 17 .	179
Figura 94. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 17 .	180
Figura 95. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 18 .	182
Figura 96. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 18 .	184
Figura 97. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 18 .	185
Figura 98. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 18 .	186
Figura 99. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 18 .	187
Figura 100. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 19 .	189
Figura 101. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 19 .	191
Figura 102. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 19 .	192
Figura 103. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 19 .	193
Figura 104. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 19 .	194
Figura 105. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 20 .	196

Figura 106. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 20 .	198
Figura 107. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 20 .	199
Figura 108. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 20 .	200
Figura 109. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 20 .	202
Figura 110. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 21 .	204
Figura 111. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 21 .	206
Figura 112. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 21 .	207
Figura 113. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 21 .	208
Figura 114. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 21 .	209
Figura 115. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 22 .	212
Figura 116. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 22 .	214
Figura 117. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 22 .	215
Figura 118. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 22 .	216
Figura 119. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 22 .	217
Figura 120. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 23 .	219

Figura 121. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 23 .	221
Figura 122. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato 23 .	223
Figura 123. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 23 .	224
Figura 124. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 23 .	225
Figura 125. Línea celular MDA-MB-231 a) 10X b) 20X.	228
Figura 126. Reporte del screening realizado en la línea celular MDA-MB-231.	229
Figura 127. Actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> de los compuestos activos en la línea celular MDA-MB-231.	231
Figura 128. Línea celular MCF-7, a) 10X b) 20X.	232
Figura 129. Reporte del screening realizado en la línea celular MCF-7.	233
Figura 130. Actividad antiproliferativa <i>in vitro</i> de los compuestos activos en la línea celular MCF-7.	235
Figura 131. Línea celular MCF-10A, a) 10X b) 20X.	236
Figura 132. Citotoxicidad de compuestos activos línea celular MCF-10A.	237
Figura 133. Evaluación de producción de ROS del α -AP 5 .	244
Figura 134. Evaluación de producción de ROS del α -AP 8 .	244
Figura 135. Evaluación de producción de ROS del α -AP 17 .	245
Figura 136. Evaluación de producción de ROS del α -AP 18 .	245
Figura 137. Determinación de capasa-3 en MCF-7.	247

Figura 138. Evaluación de la actividad antibacteriana, crecimiento bacteriano positivo.....	249
Figura 139. Evaluación de la actividad antioxidante a) α -aminofosfonatos, b) control (ácido ascórbico)	258
Figura 140. Estructura Química del ácido 14b	266
Figura 141. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) del ácido 14b	266
Figura 142. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) del ácido 14b	267
Figura 143. Espectros de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) amida 16 (superior), amida 16 + D $_2$ O (inferior).....	268
Figura 144. Ampliación de los espectros de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) amida 16 (superior), amida 16 + D $_2$ O (inferior)	269

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Página
Esquema 1. Esquema general de la reacción “one-pot” multicomponente Kabachnick-Fields.....	21
Esquema 2. Síntesis de los α -aminofosfonatos tipo éster.....	47
Esquema 3. Síntesis de (S)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletíl)benzamida	48
Esquema 4. Síntesis de los derivados de α -aminofosfonatos tipo amida.....	49
Esquema 5. Condiciones de reacción propuestas inicialmente para la síntesis de los derivados de α -aminofosfonatos tipo amida. (ver R, en Tabla 14).	148
Esquema 6. Síntesis de la amida 14 , materia prima para los derivados de α -aminofosfonatos tipo amida (15-23).....	150

NOMENCLATURA

α -AP	α -Aminofosfonato
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
5-FU	5-fluoracilo
A549	Línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549
CCF	Cromatografía en capa fina
CELAES	Centro de Laboratorios Especializados
CI_{50}	Concentración Inhibitoria media
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CNE	Línea celular de cáncer nasofaríngeo CNE
DCFDA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DEQ	Desarrollo de Especialidades Químicas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, <i>Buffer</i> Dulbeco salino de fosfatos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazina
DU145	Línea celular de cáncer de próstata DU145
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectrometría de Masas.
EMAR	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
Eq	Equivalentes

ESI	Electrospray Ionization, ionización con electrospray
EtOH	Etanol
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas
h	Horas
Hct-116	Línea celular de cáncer de colón Hct-116
HeLa	Línea celular de cáncer de cérvix HeLa
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanosulfónico
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical HUVEC
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INGGEN	Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica
KB	Línea celular de carcinoma epidérmico oral KB
KYSE	Línea celular de cáncer de esófago KYSE
MB-MDA-231	Línea celular de cáncer de mama MB-MDA-231, triple negativo
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama MCF-7, receptor de estrógenos positivo
MCF-10A	Línea celular de tejido mamario MCF-10A
MGC-803	Línea celular de cáncer gástrico MGC-803
mL	Mililitros
mmol	Milimoles
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MW	Microondas
NCI-H460	Línea celular de cáncer de pulmón NCI-H460
NCI-N87	Línea celular de cáncer de estómago NCI-N87
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate Buffered Saline, <i>Buffer</i> salino de fosfatos
PC-3	Cáncer de próstata PC-3
PF	Punto de fusión
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

R_f	Constante del factor de retención
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^{31}P	Resonancia Magnética Nuclear de Fósforo 31
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Reactive Oxygen Species, Especies Reactivas de oxígeno
s	Segundos
SFB	Suero Fetal Bovino
SSA	Secretaría de Salud
T	Temperatura
t	Tiempo
TA	Temperatura Ambiente
TMV	Virus del Mosaico de Tabaco
U2OS	Línea celular de osteosarcoma U2OS
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidades formadoras de colonias
VPH	Virus del Papiloma Humano
W	Watts
WST-1	2-(4-Yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN.

1.1. CÁNCER.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que el cáncer es el término genérico asignado a un amplio grupo de enfermedades con capacidad de afectar cualquier parte del organismo. El cáncer se caracteriza por desencadenar metástasis, proceso en el cual se presenta multiplicación rápida y descontrolada de células anormales capaces de invadir tejidos y diseminarse a varios órganos a través del torrente sanguíneo o del sistema linfático.^{1,2}

1.1.1. ESTADÍSTICA A NIVEL MUNDIAL.

Datos de la OMS posicionan al cáncer como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en el año 2020 se registraron casi 10 millones de defunciones. Se prevén 27.5 millones de nuevos casos para el año 2040.^{1,3}

Los datos epidemiológicos de la incidencia del cáncer y mortalidad causada por cáncer varían enormemente entre países y regiones alrededor del mundo,⁴ aproximadamente el 70% de la mortalidad debida al cáncer se presenta en países de ingresos medios y altos. Una problemática frecuente en este padecimiento es la falta de diagnóstico, la detección del cáncer en una fase avanzada y la falta de tratamiento; aunado al impacto económico, el cuál es substancial y va en aumento, estimaciones reportadas por la OMS establecen que el costo total en 2010 ascendió a US\$ 1,16 billones.²

Existen más de 100 tipos de cáncer, los tipos de cáncer reciben el nombre de los tejidos u órganos donde se forman, también suelen nombrarse según el tipo de células que los forma.⁵ Los cinco principales tipos de cáncer responsables de la mortalidad mundial son (tabla 1):

Tabla 1. Mortalidad atribuida al cáncer OMS 2020.¹

Tipo de cáncer	Número de Defunciones
Pulmonar	1 800 000
Colorrectal	935 000
Hepático	830 000
Gástrico	769 000
Mamario	685 000

1.1.2. ESTADÍSTICA EN MÉXICO.

La Secretaría de Salud (SSA) en 2017, posiciona al cáncer como la tercera causa de muerte en México, describe que 14 de 100 fallecimientos se deben a este padecimiento e indica que los tumores malignos más frecuentes son: el cáncer de mama (20 000 casos), próstata y cervicouterino (14 000 casos), colon y pulmón (8 000 casos).⁶

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) en su comunicado publicado en febrero de 2018, reporta los datos de mortalidad nacional distribuidos en grupos de diferentes edades en un periodo de 2011 a 2016 (Tabla 2)⁷:

Tabla 2. Mortalidad atribuida al cáncer, México. INEGI 2018.

Rango de edad (años)	Número de Defunciones	Tipo de cáncer
0 - 17	2 de cada 100 000	Tumor en órganos hematopoyéticos
18 - 29	3 de cada 100 000 hombres 2 de cada 100 000 mujeres	
30 - 59	3 de cada 10	Cáncer en órganos digestivos
60 y más	4 de cada 10 mujeres 3 de cada 10 hombres	

En 2016, se presentaron 16 defunciones por cada 100 000 mujeres de 20 años y más debido al cáncer de mama.

Para la población de 18 a 29 años, el cáncer de órganos hematopoyéticos es agente causal del mayor porcentaje de muertes (27.1 - 30.9%), en segundo lugar, se encuentra el cáncer de ovario y testículos y en tercer lugar se encuentran los tumores de órganos digestivos.

Los cinco principales tipos de cáncer como causa de mortalidad para el grupo de 30 a 59 años son: tumores malignos de los órganos digestivos, cáncer de órganos genitales femeninos (cáncer cérvico uterino y de ovario), tumor maligno de mama, cáncer de órganos hematopoyéticos y tumores malignos de los órganos respiratorios e intratorácicos (cáncer de pulmón).

El mayor porcentaje de muertes por cáncer en la población de 60 años y más se presenta en tumores malignos de órganos digestivos, posteriormente cáncer de órganos genitales masculinos, la tercera causa de muerte corresponde a los tumores malignos de los órganos respiratorios e intratorácicos y finalmente los tumores en órganos genitales femeninos.⁷

1.1.3. FACTORES CAUSALES DEL CÁNCER.

El cáncer se puede desarrollar cuando existe una transformación de células normales a células tumorales o cancerígenas. Dicho proceso se presenta cuando agentes externos causan daño a los proto-oncogenes (genes involucrados en el control de la proliferación celular); existen agentes que causan daño genético, pero que son capaces de potenciar selectivamente el crecimiento de células tumorales. El cáncer surge por la acumulación de varias mutaciones (generalmente por varios años), las cuales evaden el proceso de control de proliferación y muerte celular.⁸ La

interacción de los factores genéticos del paciente con algunos agentes externos (ejemplos de estos en la Tabla 3) puede dar lugar al desarrollo del cáncer.¹

Tabla 3. Agentes externos causantes de cáncer.

Tipo de agente carcinogénico	Ejemplo
Físico	Radiación ionizante y ultravioleta ⁹
Químico	Amianto, humo de tabaco, aflatoxinas, arsénico ¹
Biológico	Infecciones causadas por virus: Virus del Papiloma Humano (VPH) ^{10,11,12} bacterias: <i>Helicobacter pylori</i> ^{10,13,14} parásitos: <i>Schistosoma haematobium</i> ^{10,15}

Existen otros factores de riesgo (además de los mencionados en la Tabla 3), como son: inactividad física,¹ edad avanzada,¹⁶ factores hormonales, factores dietéticos e incluso consumo de alcohol;⁴ estos últimos han sido relacionados con el desarrollo de cáncer de pulmón en pacientes no fumadores.¹⁷

1.1.4. TRATAMIENTOS.

El correcto diagnóstico del cáncer es fundamental para la prescripción de un tratamiento eficaz y acorde al tipo de cáncer que padece el paciente; cada caso es diferente y requiere de un protocolo específico que puede abarcar una o varias alternativas.¹ A continuación se describen algunos de los tratamientos empleados en la actualidad para contrarrestar el cáncer:

a. Quimioterapia. Tratamiento basado en la administración de medicamentos, los cuales tienen como principal objetivo destruir las células de rápido crecimiento. Al ser una terapia sistémica, puede actuar en todo el cuerpo (a diferencia de la cirugía y la radioterapia); asimismo, tiene la capacidad de destruir células cancerosas que se han propagado a partes alejadas del tumor original e inclusive en metástasis.¹⁸ El mecanismo de acción consiste en provocar una alteración celular que desencadene la muerte celular,¹⁹ a continuación se mencionan los principales mecanismos de acción de algunos fármacos empleados en la quimioterapia:

- Agentes intercalantes del Ácido Desoxirribonucleico (ADN): promueven el arresto del ciclo celular mediante el daño inducido en el ADN; antraciclinas (doxorubicina), capecitabina y compuestos con platino.
- Agentes estabilizadores de microtúbulos: producen el arresto del ciclo celular al estabilizar los microtúbulos; taxanos y epotilonas.
- Inhibidores del factor de crecimiento epidérmico: Inhiben competitivamente la unión del factor de crecimiento y promueven la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; trastuzumab, cetuximab y pertuzumab.

- Inhibidores del receptor de tirosina quinasa: bloquean las vías oncogénicas mediante la inhibición de la fosforilación de las proteínas; lapatinib y sunitinib.
- Inhibidores de la angiogénesis: Reducen el crecimiento microvascular o bien bloquean las vías proangiogénicas; bevacizumab e ixabepilona.²⁰

b. Radioterapia. Este tratamiento emplea partículas u ondas de alta energía (rayos X, rayos gamma, rayos de electrones o de protones) para dañar o eliminar las células tumorales. Esta terapia es localizada, se somete al paciente a radiaciones con dichos rayos de alta energía y la radiación actúa a nivel celular dañando el ADN (inespecíficamente, es decir tanto en células normales como en células cancerosas)²¹ este daño frena el crecimiento y la división celular, y finalmente causa la muerte celular. La radioterapia puede administrarse de manera externa o interna; la *radiación externa* se efectúa con aparatos que envían la radiación a la zona del tumor y la *radioterapia interna* (también conocida como braquiterapia)²² emplea una fuente radioactiva o implante que debe ser colocada cerca o dentro del tumor del paciente. La radioterapia puede administrarse en combinación con otros tratamientos, como la cirugía o la quimioterapia.¹⁸

c. Cirugía. Es un procedimiento empleado para diagnosticar, determinar la etapa (estadificación) y tratar el cáncer. El método más utilizado para los tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz, es necesario extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar que todas las células cancerosas han sido extraídas.^{23,24} Además de la cirugía convencional, existen otro tipo de técnicas quirúrgicas: cirugía láser, criocirugía, electrocirugía, ablación por radiofrecuencia, cirugía de Mohs (controlada mediante microscopio), cirugía laparoscópica y toracoscópica.²⁵

d. Inmunoterapia. Este tratamiento se caracteriza por estimular o reponer el sistema inmunitario del paciente para que reconozca y elimine eficazmente las células cancerosas. Con la finalidad de mejorar, identificar o recuperar el funcionamiento adecuado del sistema inmunológico se utilizan agentes producidos por el cuerpo o fabricados en un laboratorio (anticuerpos). Los anticuerpos producidos en el laboratorio son llamados anticuerpos monoclonales y pueden ser diseñados para atacar un blanco específico.²⁶ Existen diversos anticuerpos que pueden ser administrados y que producen la activación del sistema inmune. También se emplea esta terapia para aplicar radiación directamente en las células cancerosas, este tratamiento es

llamado radioinmunoterapia. Algunos anticuerpos monoclonales son utilizados para transportar medicamentos potentes (usados en la quimioterapia) e ingresarlos directamente en las células cancerosas.¹⁸

e. Hormonoterapia. Es el tratamiento que disminuye o detiene el crecimiento de tumores que requieren de hormonas para crecer;²⁷ por lo anterior, esta terapia se emplea principalmente para combatir tumores como los de mama y de próstata. El tratamiento actúa al alterar la producción o impidiendo la acción de las hormonas sobre los órganos involucrados. Puede administrarse antes de otro tratamiento, en este caso la hormonoterapia actuaría como neoadyuvante, al ayudar en la eliminación de las células cancerosa y contribuyendo a la eficacia del tratamiento principal.¹⁸

f. Terapia Fotodinámica. Es un método terapéutico óptico, mínimamente invasivo. Involucra elementos que carecen de citotoxicidad por separado, pero que al combinarse producen efectos celulares tóxicos en un ambiente dependiente de oxígeno.²⁸ Consiste en la administración de un fármaco (llamado fármaco fotosensibilizador, FS) seguido por la irradiación con luz visible. Cuando el FS es expuesto a una longitud de onda en particular y en presencia de oxígeno, produce especies reactivas

de oxígeno que inducen muerte celular y destrucción del tejido canceroso.²⁹

Las terapias mencionadas anteriormente presentan efectos adversos y la mayoría de ellas no son selectivas hacia el tejido cancerígeno; es decir, que destruyen tanto a las células sanas como a las células cancerosas. Adicional a lo anterior, un factor que determina la efectividad en el tratamiento quirúrgico es la habilidad del cirujano para diferenciar el tejido tumoral del normal, basándose en un criterio subjetivo para la extracción total de las células neoplásicas.³⁰

Los efectos secundarios presentados frecuentemente una vez administradas las terapias anteriormente mencionadas, se enlistan a continuación:^{18,31}

- Náusea y vómito.
- Caída del cabello.
- Cansancio / Fatiga.
- Convulsiones.
- Debilidad.
- Dolor.
- Fiebre.
- Problemas de coagulación por la trombocitopenia.
- Anemia debido a la eritropenia.
- Inmunosupresión y por tanto infecciones.

- Problemas intestinales y estomacales.
- Disminución del apetito y del peso.
- Llagas en boca, encías y garganta.
- Problemas en nervios y músculos.
- Hepatotoxicidad y nefrotoxicidad.
- Problemas de fertilidad debido a los efectos en órganos reproductores.

Debido a los efectos adversos enlistados anteriormente, es necesario contar con alternativas que sean efectivas, selectivas hacia las células cancerígenas y además que presenten los menores efectos secundarios posibles.

Dado que la quimioterapia es uno de los principales tratamientos empleados y debido al surgimiento de la resistencia de algunos tipos de cáncer frente a los fármacos quimioterapéuticos de cabecera, es fundamental el trabajo en la investigación del tratamiento del cáncer, con la finalidad de proponer nuevas alternativas que contrarresten este padecimiento. La investigación basada en el diseño de nuevos fármacos contra el cáncer es crítica para el avance en este campo, tanto para el aporte de nuevos tratamientos eficaces y menos tóxicos, como para la mejora de las terapias actualmente utilizadas.³²

1.2. ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Los microorganismos patógenos como bacterias, virus, hongos o parásitos son los agentes causales de las enfermedades infecciosas; estas pueden transmitirse directa o indirectamente de una persona a otra.³³ La transmisión directa está sujeta al contacto con una persona que está enferma (mujeres embarazadas también pueden transmitir enfermedades infecciosas a sus bebés por esta vía); mientras que el contacto indirecto se refiere a la vía de contagio mediante la manipulación o el contacto de artículos que estuvieron en contacto con una persona enferma. Las enfermedades infecciosas también se pueden contraer por una infección causada a través de picaduras de insectos o animales, o bien mediante el consumo o contacto de agua, suelo o plantas contaminados.³⁴

1.2.1. INFECCIONES BACTERIANAS

Las bacterias son microorganismos procariotas, unicelulares, con un tamaño entre 0.3 a 6 μm de longitud.³⁵ Existen bacterias que son patógenas y son agentes causantes de infecciones en el ser humano; algunas de ellas tienen la capacidad de producir toxinas, las cuales pueden dañar los tejidos y causar enfermedades.³⁶

1.2.1.1. ETIOLOGÍA BACTERIANA

Se ha identificado una gran cantidad de bacterias que son capaces de generar infecciones. Las bacterias patógenas son

capaces de producir enfermedades variadas, con distintos signos y síntomas, por ejemplo:

- a) Meningitis meningocócica y septicemia causada por *Neisseria meningitidis*.³⁷
- b) Neumonía, septicemia y meningitis causada por *Streptococcus pneumoniae*.³⁸
- c) Tuberculosis, causada por *Mycobacterium tuberculosis*.³⁹
- d) Gastroenteritis bacteriana causada por *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*,⁴⁰ *Escherichia coli*,⁴¹ *Salmonella typhi*,⁴² *Shigella dysenteriae*,⁴³ y *Yersinia enterocolitica*.⁴⁴
- e) Enfermedades de transmisión sexual causadas por: *Neisseria gonorrhoeae*,⁴⁵ *Chlamydia trachomatis*,⁴⁶ y *Treponema pallidum*.⁴⁷
- f) Cólera, *Vibrio cholerae*.⁴⁸
- g) Infecciones cutáneas causadas por *Staphylococcus aureus*.⁴⁹

1.2.1.2. ESTADÍSTICA DE INFECCIONES BACTERIANAS

Anualmente, el tratamiento y la atención médica de cientos de millones de pacientes en todo el mundo, se complica por infecciones que se contraen durante la asistencia médica. Debido a lo anterior, se dan algunos casos en los que el paciente se enferma más gravemente que si no se hubiera infectado. Las infecciones nosocomiales, son las infecciones que están relacionadas con la

atención sanitaria, se producen por causas variadas y son un problema de salud importante.

Datos de la OMS, establecen que más de 1.4 millones de personas en todo el mundo contraen infecciones nosocomiales. En países en desarrollo, el riesgo de infección hospitalaria o nosocomial es de 2 a 20 veces mayor que en los países desarrollados. En los Estados Unidos de América (EUA), 1 de cada 136 pacientes se enferman gravemente a consecuencia de una infección nosocomial, lo que se traduce a 2 millones de casos y 80 000 casos de mortalidad anual. En México, se calcula que de 450 000 casos de infección nosocomial se presentan 32 muertes. Respecto a costos relacionados con dichas infecciones, se estima que la cifra en EUA es de 4 500 – 5 700 millones de US\$, mientras que en México el costo estimado anual es de 1 500 millones.⁵⁰

1.2.1.3. TRATAMIENTO DE INFECCIONES BACTERIANAS

Los antibióticos son medicamentos que combaten las infecciones bacterianas. Estos actúan de dos maneras, matando a las bacterias (bactericidas) o impidiendo su reproducción (bacteriostáticos). Los antibióticos se clasifican con base a su estructura química y mecanismo de acción como se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4. Clasificación de agentes antibacterianos.^{51,52}

Blanco terapéutico	Clase	Ejemplo
Pared celular	Penicilinas (β lactámicos)	Penicilina G, Ampicilina, Oxacilina, Piperacilina
	Inhibidores de β -lactamasas y combinaciones penicilínicas	Ácido clavulánico + Ticarcilina Sulbactam + Ampicilina Tazobactam + Piperacilina
	Cefalosporinas (β lactámicos)	Cefazolina (1ª generación) Cefoxitina (2ª generación) Ceftriaxona (3ª generación) Cefepime (4ª generación)
	Monobactámicos (β lactámicos)	Aztreonam
	Carbapenems (β lactámicos)	Imipenem
	Glucopéptidos	Vancomicina
Ácidos Nucleicos	Sulfonamidas, ^a (antifolatos)	Cotrimoxazol (Trimetoprima + Sulfametoxazol)
	Quinolonas ^{b,53} (inhiben las topoisomerasas)	Ácido nalidíxico (1ª generación) Ciprofloxacino (2ª generación) Levofloxacino (3ª generación)
Síntesis de proteínas	Aminoglucósidos (actúan a nivel de ribosomas en la subunidad 30S)	Estreptomicina (1ª generación) Gentamicina (2ª generación)
	Macrólidos ^a (actúan a nivel de ribosomas en la subunidad 50S)	Eritromicina Claritromicina
	Lincosamidas ^b (actúan a nivel de ribosomas en la subunidad 50S)	Clindamicina

^a fármacos bacteriostáticos, ^b bacteriostático a concentraciones menores, bactericidas a concentraciones elevadas

1.2.1.4. FARMACORRESISTENCIA

Las enfermedades infecciosas eran la principal causa de mortalidad del ser humano, antes del descubrimiento y uso de los

fármacos antibacterianos; en algunas partes del mundo lo sigue siendo, principalmente en países en desarrollo que no tienen acceso a medicamentos.

Una grave problemática relacionada con el uso de los antibióticos es el surgimiento de la resistencia bacteriana. Las infecciones nosocomiales causadas por microorganismos resistentes a los antimicrobianos son una importante causa de mortalidad a nivel mundial.⁵⁴

La resistencia a los antibióticos no es una enfermedad diferente, sino que surge después del descubrimiento y la propagación del uso de antibióticos como sulfonamidas y penicilina, en la “edad de oro” (mediados del siglo XX) de los descubrimientos de antimicrobianos; durante ese periodo, se dio el uso excesivo e indebido de los antibióticos, ocasionando que muchos microorganismos adquirieran resistencia a los antimicrobianos. Las bacterias farmacorresistentes pueden causar mayor morbilidad y mortalidad, especialmente a pacientes con otras enfermedades o inmunosuprimidos.

La resistencia bacteriana es propagada a través de la transmisión de los factores de resistencia de una bacteria a otra. Los factores que contribuyen al desarrollo de farmacorresistencia son:

uso inapropiado e incontrolado de antibióticos, administración de dosis subóptimas, poca duración del tratamiento y el diagnóstico erróneo.⁵⁵

La OMS, en febrero de 2017, publicó una lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, en donde se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud de la población. En dicha lista, se mencionan principalmente las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos las cuales tiene la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y transmitir el material genético que posee esa farmacorresistencia. En la Tabla 5 se muestran los patógenos prioritarios.⁵⁶

Tabla 5. Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos, OMS.

Prioridad	Patógeno	Resistencia
1. Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos
	Enterobacteriaceae, productoras de ESBL ^a	Carbapenémicos
2. Elevada	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina, sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina
	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Campylobacter</i> spp	Fluoroquinolonas
	<i>Salmonellae</i>	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas, fluoroquinolonas
3. Media	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolonas

^a ESBL, Betalactamasas de espectro extendido, por sus siglas en inglés *Extended spectrum beta lactamases*; principalmente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* sp

Debido a los datos mostrados anteriormente con respecto a la grave problemática de salud que implica el incremento de las bacterias farmacorresistentes, surge la necesidad de continuar con la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos; con la finalidad de proponer nuevas alternativas farmacéuticas que puedan aportar más opciones de tratamiento para la recuperación de la salud en la población.

1.3. AMINOFOSFONATOS (α -AP)

Los compuestos organofosforados son sustratos importantes en el estudio de procesos bioquímicos; especialmente los compuestos tetracoordinados de fósforo pentavalente son ampliamente utilizados como compuestos biológicamente activos.

Los α -aminofosfonatos son considerados análogos estructurales de los α -aminoácidos (Figura 1) y presentan propiedades similares, pueden ser reconocidos por receptores y actuar como inhibidores enzimáticos.

Se ha reportado que los α -aminofosfonatos y sus derivados, han mostrado actividad antiviral, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, han producido inhibición enzimática y también han presentado buena inhibición de la proliferación de células cancerígenas.^{57,58,59,60}

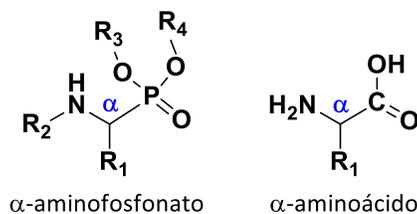


Figura 1. Estructura química de un α -aminofosfonato y un α -aminoácido

Debido a las diversas propiedades farmacológicas de los α -aminofosfonatos, se han desarrollado varios métodos para la síntesis de nuevos derivados bioactivos de este tipo de compuestos. Actualmente, la reacción de Kabachnik-

Fields mediante irradiación por microondas sin catalizadores, es uno de los métodos más efectivos para la síntesis de α -aminofosfonatos.⁶¹

Por otra parte, algunos compuestos heterocíclicos y compuestos relacionados como las amidas, han mostrado importantes propiedades antitumorales, neuroprotectoras, antibióticas y antifúngicas.^{62,63}

Debido a las propiedades biológicas que han mostrado los α -aminofosfonatos y algunos de sus derivados, se propone realizar la síntesis y caracterización de nuevos α -aminofosfonatos, así como de sus derivados tipo amida y realizar la evaluación de su actividad antiproliferativa y la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro*.

Llevar a cabo este proyecto, permitirá la generación de conocimiento científico relevante y original, así como brindar nuevas opciones de moléculas activas que puedan actuar como agentes anticancerígenos y/o antibacterianos.

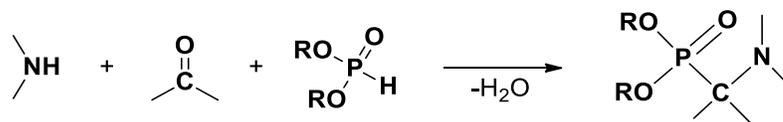
CAPÍTULO 2.

ANTECEDENTES.

2.1 α -AMINOFOSFONATOS

La síntesis orgánica de los α -aminofosfonatos, se ha logrado por metodologías variadas, las cuales incluyen: alquilación nucleofílica de bases de Schiff, adición nucleofílica de fosfitas a iminas,^{64,65} conversión de 1-hidroxifosfonatos a su correspondiente α -aminofosfonato^{65,66} y reacciones de acoplamiento de tres componentes empleando ultrasonido,⁶⁷ entre otras.

Además de las metodologías mencionados anteriormente, existe la reacción de Kabachnik-Fields, que involucra el acoplamiento de tres componentes en un solo paso “one pot”; en la cual reaccionan aldehídos (o cetonas), aminas y diaril o dialquil fosfitas para producir el α -aminofosfonato (Esquema 1). Esta metodología ha demostrado ser una excelente alternativa para la síntesis de compuestos con enlaces carbono-fósforo, es una ruta efectiva y prometedora, para la síntesis de compuestos con actividades biológicas importantes.^{68,69} A continuación se describen los antecedentes en los cuales se basó esta investigación.



Esquema 1. Esquema general de la reacción “one-pot” multicomponente Kabachnik-Fields.⁶⁹

2.1.1 SÍNTESIS ORGÁNICA

Tal como se mencionó, uno de los métodos más utilizados actualmente para la síntesis de α -aminofosfonatos, es el método de reacción “one pot” multicomponente Kabachnik-Fields. En la Tabla 6 se muestran algunos antecedentes de la síntesis de este tipo de compuestos, las condiciones de reacción empleadas y los rendimientos de reacción obtenidos.

Tabla 6. Antecedentes de la síntesis de α -aminofosfonatos.

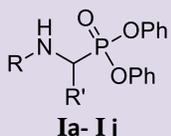
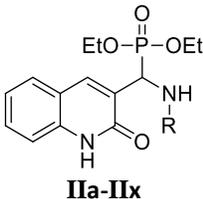
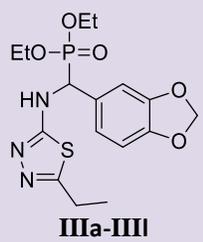
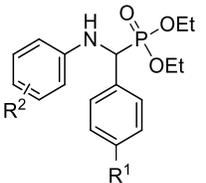
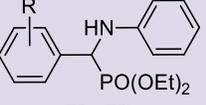
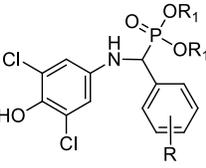
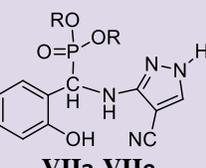
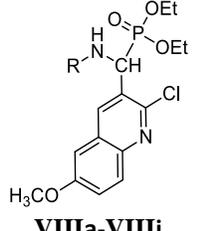
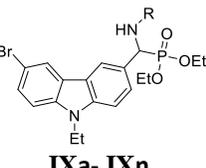
AÑO/ AUTOR	MÉTODO DE REACCIÓN	MW POTENCIA (Watts)	T (°C)	t (min)	R %	COMPUESTOS SINTETIZADOS
2016. Sampath ⁶⁸	Convencional “One pot” Polientilenglicol	N/A	80	120	79-92	 Ia- I j
2016. Fang ⁷⁰	Convencional “One pot” Tolueno a. RCHO+ArNH ₂ b. HPO(OEt) ₂	N/A	a. TA b. Reflujo	a. 15 b. 1-5 h	55- 91	 IIa-IIx
2016. Gundluru ⁷¹	Convencional “One pot” Sin disolvente Ácido fosfosulfónico*	N/A	60	2-5 h	81-94	 IIIa-IIIi
	MW “One pot” Sin disolvente Ácido fosfosulfónico*	400	-	5-9	95-97	

Tabla 6. Antecedentes de la síntesis de α -aminofosfonatos (continuación)

AÑO/ AUTOR	MÉTODO DE REACCIÓN	MW POTENCIA (Watts)	T (°C)	T (min)	R %	COMPUESTOS SINTETIZADOS
2015. Mirzaei ⁶⁵	Convencional "One pot" Sin disolvente	N/A	50-60	30-120	85-96	 IVa-IVp
2014. Kumari ⁷²	MW "One pot" Sin disolvente	100-140	100-120	15-30	85-97	 Va-Vi
2014. Subba- Redy ⁷³	MW "One pot" Sin disolvente Amberlyst-15*	490	-	4-6	83-92	 VIa-VIj
2013. Yan-Ping ⁷⁴	MW "One pot" Sin disolvente	200	110	20-30	79-87	 VIIa-VIIe
2012. Venkata- Ramana ⁶¹	Convencional Tolueno	N/A	Reflujo	4-6 h	68-74	 VIIIa-VIIIj
	MW "One pot" Tolueno	490	-	12-14	84-92	
2012. Anil-Kumar	Convencional "One pot" Polientilenglicol	N/A	100	6-7 h	75-92	 IXa- IXn

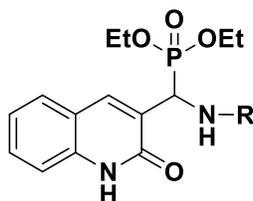
T: Temperatura, t: tiempo, R: rendimiento, N/A: No Aplica, TA: Temperatura Ambiente, *catalizador

Los antecedentes presentados anteriormente, muestran condiciones de reacción que han sido empleadas por diferentes grupos de investigación para la síntesis de α -aminofosfonatos. Los reportes citados establecen que los α -aminofosfonatos han sido sintetizados por el método de reacción de Kabachnik-Fields; ya sea por método convencional o empleando irradiación con MW. Como se observa en la Tabla 6 de antecedentes, los tiempos de reacción por el método convencional varían entre 0.5-7 h, mientras que, al emplear MW, los tiempos de reacción se acortan a 5-30 min. Las temperaturas de reacción varían entre 60-120°C y los rendimientos de reacción van de 55-96% por el método convencional y de 79-97% por MW; los datos anteriores establecen las ventajas de realizar síntesis vía MW, tiempos de reacción cortos y mayores rendimientos de reacción.

La mayoría de los antecedentes enlistados en la Tabla 6, carecen del uso de un catalizador; sin embargo, los α -aminofosfonatos han sido sintetizados empleando un sinfín de catalizadores: BiCl_3 , TaCl_5 , InCl_3 , SbCl_3 ,⁶⁸ ácido fosfosulfónico,⁷¹ Amberlist-15,⁷³ FeCl_3 , TiO_2 , TiCl_4 , VCl_3 , nitrato de etilamonio, entre otros. La mayoría de los catalizadores que han sido empleados en la síntesis de α -aminofosfonatos son costosos, tóxicos e involucran el uso de solventes contaminantes al ambiente.⁶⁵ Debido a lo anterior, surgió la necesidad de emplear metodología de síntesis orientada a la química verde, en donde no se emplearan solventes contaminantes ni catalizadores tóxicos.

2.1.2 ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA

Fang y colaboradores en 2016, sintetizaron α -aminofosfonatos (Figura 2) mediante las condiciones de reacción mencionadas en la Tabla 6 y evaluaron su actividad anticancerígena. Emplearon cuatro líneas celulares: A549 (adenocarcinoma de pulmón), HeLa (cáncer de cérvix), MCF-7 (cáncer de mama) y U2OS (osteosarcoma), determinaron la viabilidad celular por el método de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], utilizaron el 5-fluorouracilo (5-FU) como control. Reportaron que seis compuestos (**IIj**, **IIq**, **IIr**, **IIs**, **IIu** y **IIx**) presentaron mejor actividad que 5-FU ($Cl_{50}=34.3 \mu\text{M}$) con $Cl_{50}=16.6$ - $31.1 \mu\text{M}$ en células A549. En células HeLa, catorce compuestos (**IIb- II f**, **IIj**, **III**, **II n**, **II r-II v**, **II x**) presentaron actividad anticancerígena con $Cl_{50}= 2.5$ - $50 \mu\text{M}$, mientras que el Cl_{50} de 5-FU fue de $56.5 \mu\text{M}$. Diecinueve compuestos presentaron mejor actividad que 5-FU con $Cl_{50}=0.3$ - $79.0 \mu\text{M}$ en células MCF-7 (**II b**, **II d-II j**, **III**, **II n**, **II p-II x**). Finalmente, siete compuestos (**II n**, **II p**, **II t-II x**) presentaron $Cl_{50}= <50 \mu\text{M}$ en células U2OS. La determinación de apoptosis fue realizada en células HeLa, (expuestas al compuesto **IIu**) por los métodos de tinción de naranja de acridina/bromuro de etidio y Hoechst 33342, concluyeron que el compuesto **IIu** es capaz de producir apoptosis.⁷⁰



IIa-x

R:

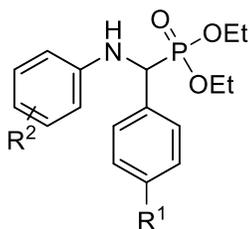
IIa	Ph	IIg	2-NO ₂ C ₆ H ₄	IIm	2-BrC ₆ H ₄	IIs	2,4-diNO ₂ C ₆ H ₃
IIb	2-CH ₃ C ₆ H ₄	IIh	4-NO ₂ C ₆ H ₄	IIn	3-BrC ₆ H ₄	IIt	2-Cl-4-NO ₂ C ₆ H ₃
IIc	3-CH ₃ C ₆ H ₄	IIi	4-OCH ₃ C ₆ H ₄	IIo	4-BrC ₆ H ₄	IIu	3-Cl-4-FC ₆ H ₃
IId	4-CH ₃ C ₆ H ₄	IIj	2-ClC ₆ H ₄	IIp	2,6-diCH ₃ C ₆ H ₃	IIv	2,3-diClC ₆ H ₃
IIe	3-CF ₃ C ₆ H ₄	IIk	3-ClC ₆ H ₄	IIq	3,4-diCH ₃ C ₆ H ₃	IIw	3,5-diClC ₆ H ₃
IIf	4-CF ₃ C ₆ H ₄	IIl	4-ClC ₆ H ₄	IIr	3,5-diCF ₃ C ₆ H ₃	IIx	1-Naftil

Figura 2. Estructura de los compuestos sintetizados por Fang y colaboradores.

Mizraei y colaboradores en 2015, sintetizaron α -aminofosfonatos (Figura 3, Tabla 7) y evaluaron su actividad anticancerígena en la línea celular DU145 (cáncer de próstata) por el método de detección de viabilidad celular MTT, reportaron dos compuestos (**IVb** y **IVd** Cl_{50} = 46, 45 μ M, respectivamente) con actividad similar al fármaco control docetaxel (Cl_{50} = 40 μ M) a las 48 h de exposición.⁶⁵

Tabla 7. Sustituyentes R¹ y R² de los α -aminofosfonatos sintetizados por Mizraei y colaboradores

COMPUESTO	ALDEHÍDO R ¹	AMINA R ²
IVa	4-N(Et) ₂	4-Cl
IVb	4-N(Et) ₂	4-Br
IVc	4-N(Et) ₂	3-Br
IVd	4-N(Et) ₂	4-Me
IVe	4-N(Et) ₂	3-Me
IVf	4-N(Et) ₂	H
IVg	4-N(Et) ₂	4-NO ₂
IVh	4-N(Et) ₂	O-CH ₃
IVi	4-N(Me) ₂	4-Cl
IVj	4-N(Me) ₂	4-Br
IVk	4-N(Me) ₂	3-Br
IVl	4-N(Me) ₂	4-Me
IVm	4-N(Me) ₂	3-Me
IVn	4-N(Me) ₂	H
IVo	4-N(Me) ₂	4-NO ₂
IVp	4-N(Me) ₂	O-CH ₃

**IVa-p****Figura 3.** Estructura de los compuestos sintetizados por Mizraei y colaboradores.

Klimczak y colaboradores en 2015, sintetizaron α -aminofosfonatos (Figura 4, Tabla 8) y evaluaron la actividad anticancerígena en tres líneas celulares de cáncer de esófago: KYSE 30, KYSE 150 y KYSE 270. Utilizaron el método de MTT y reportaron valores de Cl_{50} = 38, 51 y 77 μ M del compuesto más activo (**Xa**). Realizaron la determinación de apoptosis empleando un kit de bioluminiscencia y reportaron que el compuesto más activo induce un proceso apoptótico. No emplearon fármaco control.⁷⁵

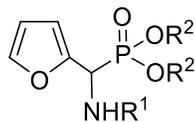
**Xa-d**

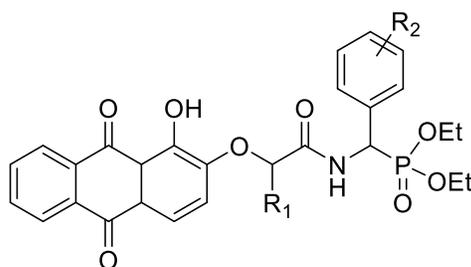
Figura 4. Estructura de los compuestos sintetizados por Klimczak y colaboradores.

Tabla 8. Sustituyentes R¹ y R² de los α -aminofosfonatos sintetizados por Klimczak y colaboradores

COMPUESTO	R ¹	R ²
Xa	2-MeO-C ₆ H ₄	Me
Xb	3-MeO-C ₆ H ₄	Me
Xc	3-MeO-C ₆ H ₄	Et
Xd	4-MeO-C ₆ H ₄	Et

Man Yi Ye y colaboradores en 2014, sintetizaron α -aminofosfonatos (**XIa-k** y **XIIa-q**, Figura 5) y evaluaron la actividad antitumoral por el método de MTT. Utilizaron las líneas celulares: NCI-H460 (cáncer de pulmón), KB (carcinoma epidérmico oral), MGC-803 (cáncer gástrico), HeLa (cáncer de cérvix), Hct-116 (cáncer de colon), CNE (cáncer nasofaríngeo), A549 (cáncer de pulmón) y HUVEC (células endoteliales de cordón umbilical), como fármaco control emplearon 5-FU. En la línea celular Hct-116, los compuestos **XIIb** y **XIIm** presentaron mayor actividad que el control, (Cl₅₀= 8-10 μ M), Cl₅₀ de 5-FU= 10 μ M. Para la línea celular MGC-803, la totalidad de compuestos (**XI** y **XII**) presentaron mejor actividad que 5-FU (Cl₅₀=47 μ M), con un rango de Cl₅₀= 3-39 μ M. Respecto a la evaluación en las células NCI-H460, casi la totalidad de los compuestos resultó ser más activa que el control (5-FU, Cl₅₀=45 μ M). Para la línea celular A549, alrededor de la mitad de los compuestos (**XIi**, **XIk**, **XIIa-XIIh**, **XIIj**, **XIII**, **XIIi-XIIp**) presentan una Cl₅₀ menor a la del control (5-FU, Cl₅₀=34 μ M). En la línea celular KB, alrededor de la mitad de los compuestos (**XIIa**, **XIIb**, **XIIh**, **XIIj**, **XIII-XIIo**, **XIIq**) presentan una Cl₅₀ menor a la del control (5-FU, 1.2 μ M). Los compuestos **XIa-XIk**, **XIII-XIIm**,

XIIp y XIIq, presentaron menor citotoxicidad ($Cl_{50} = >50 \mu M$) que el control 5-FU ($Cl_{50} = 24 \mu M$) en células HUVEC, (información disponible en el material adicional del artículo). Finalmente, evaluaron la inducción de apoptosis (en células NCI-H460, empleando los compuestos **XIIh**, **XIIj** y **XIIn**) por el método de tinción de Hoechst 33258, activación de caspasa por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) y ensayos de citometría de flujo; concluyeron que los α -aminofosfonatos son capaces de inducir apoptosis, activar las caspasas 3, 4 y 9 y detener el ciclo celular en la fase G1.⁷⁶



XI $R_1 = H$

XII $R_1 = CH_3$

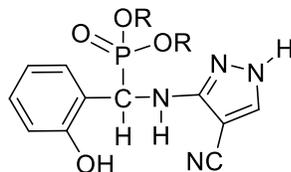
R:

XIa 4-Br	XIf 2-F	XIk 4-CH ₃	XIle 2-Cl	XIij 2-OCH ₃	XIio 2-Naftil
XIb 2-Br	XIg 4-F	XIIa 4-Br	XIIf 3-Cl	XIik 3-OCH ₃	XIip 3-CH ₃
XIc 2-OCH ₃	XIh 2-Cl	XIib 2-Br	XIlg 4-F	XIil 4-OCH ₃	XIiq 4-CH ₃
XId 4-OCH ₃	XIi Ph	XIic 3-Br	XIih 2-F	XIIm Ph	
XIe 3-OCH ₃	XIj 3-CH ₃	XIId 4-Cl	XIii 3-F	XIIn 1-Naftil	

Figura 5. Estructura de los compuestos sintetizados por Man-Yi Ye y colaboradores.

Yan Ping y colaboradores en 2013, sintetizaron los α -aminofosfonatos **VIIa-e** (Figura 6) y evaluaron la actividad antitumoral y antiviral. La determinación de la actividad anticancerígena fue evaluada en la línea celular PC-3 (cáncer de próstata) a 1 y 10 $\mu mol/L$ por 72 h de exposición. Emplearon el método de evaluación de viabilidad celular MTT. Concluyeron que el compuesto

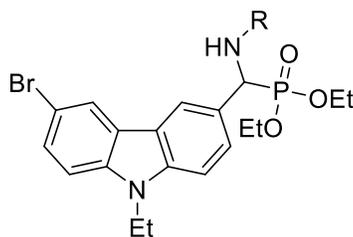
con di-*i*-pentilfosfita (**VIIe**) mostró una excelente actividad antitumoral con un 91% de inhibición celular a 10 $\mu\text{mol/L}$. No emplearon fármaco control.⁷⁴



VIIa-e: R=Et, n-Pr, n-Bu, *i*-Bu, *i*-amil

Figura 6. Estructura de los compuestos sintetizados por Yan Ping y colaboradores.

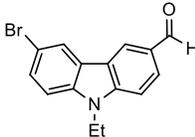
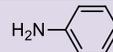
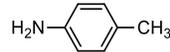
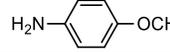
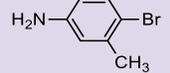
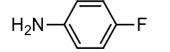
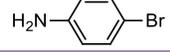
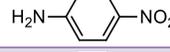
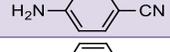
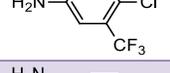
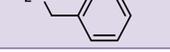
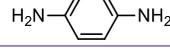
Anil Kumar y colaboradores en 2012, sintetizaron α -aminofosfonatos (Figura 7, Tabla 9) y determinaron la actividad anticancerígena empleando tres líneas celulares: A549, MCF-7 y NCI-N87 (cáncer de pulmón, mama y estómago, respectivamente). Utilizaron el método de evaluación de viabilidad celular de WST-1 [2-(4-Yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio], evaluaron concentraciones de 1-10 μM ; tres compuestos presentaron buena actividad anti proliferativa contra las tres líneas celulares (**IXc**, **IXe** y **IXm**). El compuesto **IXe** mostró un 58% de inhibición a 1 μM en la línea celular A549, no emplearon fármaco control.⁵⁸



IXa-n

Figura 7. Estructura de los compuestos sintetizados por Anil Kumar y colaboradores.

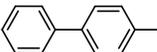
Tabla 9. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Anil Kumar y colaboradores

COMPUESTO	ALDEHÍDO	AMINA
IXa		
IXb		
IXc		
IXd		
IXe		
IXf		
IXg		
IXh		
IXi		
IXj		
IXk		
IXl		
IXm		
IXn		

2.1.3 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

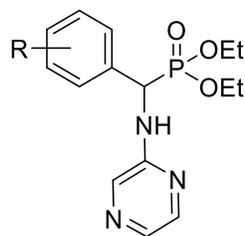
Sampath y colaboradores en 2016, sintetizaron α -aminofosfonatos (Figura 8, Tabla 10) y evaluaron la actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus bovis*. Utilizaron el método de difusión en disco evaluando concentraciones de 150, 250 y 350 $\mu\text{g/mL}$, emplearon estreptomina como control y reportaron que cinco compuestos (**Ia**, **Ic**, **Ie**, **If** y **Ii**) poseen potente actividad antibacteriana. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en un rango de 78-162 $\mu\text{g/mL}$ (datos obtenidos del material adicional del artículo).⁶⁸

Tabla 10. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Sampath y colaboradores.

COMPUESTO	R	R'
Ia		
Ib		
Ic		
Id		
Ie		
If		
Ig		
Ih		
Ii		
Ij		

**Ia-j****Figura 8.** Estructura de los compuestos sintetizados por Sampath y colaboradores.

Maddina y colaboradores en 2014, realizaron la síntesis de α -aminofosfonatos (Figura 9) y evaluaron la actividad antibacteriana y antifúngica. Utilizaron el método de difusión en disco (controles: DMSO y estreptomycin) evaluaron concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Los compuestos derivados de benzaldehído, *p*-clorobenzaldehído y *p*-metoxibenzaldehído (**XIIIa**, **XIIIc**, **XIIIi**) mostraron una potente actividad antibacteriana contra *B. subtilis* (16 mm de halo de inhibición a 25 $\mu\text{g/mL}$), *E. coli* (16 mm a 25 $\mu\text{g/mL}$) y *P. aeruginosa* (16 mm a 50 $\mu\text{g/mL}$).⁵⁹



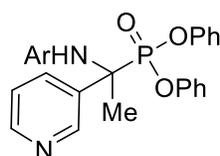
R:

XIIIa-l

XIIIa	C ₆ H ₅	XIIIe	2-OH-C ₆ H ₄	XIIIi	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄
XIIIb	4-OH-C ₆ H ₄	XIIIf	3-OH-C ₆ H ₄	XIIIj	3-CH ₃ -C ₆ H ₄
XIIIc	4-Cl-C ₆ H ₄	XIIIg	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	XIIIk	3,4,5-OCH ₃ -C ₆ H ₂
XIIId	4-F-C ₆ H ₄	XIIIh	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	XIIIl	2,4-Cl ₂ -C ₆ H ₃

Figura 9. Estructura de los compuestos sintetizados por Maddina y colaboradores.

Abdel-Megeed y colaboradores en 2012, sintetizaron cinco α -aminofosfonatos, **XIVa-e** (Figura 10) y evaluaron la actividad antibacteriana contra *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus* en un rango de concentración de 10-1000 $\mu\text{g/mL}$. Reportaron que todos los compuestos presentaron alta actividad antibacteriana a concentraciones bajas (CMI promedio 10 $\mu\text{g/mL}$), utilizaron Ciprofloxacino (CMI= 5 $\mu\text{g/mL}$) como control.⁵⁷



XIVa-e

Ar = C₆H₅, 4-ClC₆H₄, 4-MeC₆H₄, 4-HOC₆H₄, NHC₆H₅

Figura 10. Estructura de los compuestos sintetizados por Abdel y colaboradores.

2.1.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Gundluru y colaboradores en 2016, sintetizaron α -aminofosfonatos (Figura 11) y evaluaron la actividad antioxidante por el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH). Una solución de 85 μ M de DPPH fue agregada a un medio con los diferentes α -aminofosfonatos, después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, se midió la disminución de la absorbancia (518 nm). Ácido ascórbico fue usado como control, reportaron que todos los compuestos muestran buena actividad antioxidante *in vitro*.⁷¹

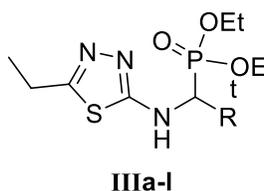


Figura 11. Estructura de los compuestos sintetizados por Gundluru y colaboradores.

Tabla 11. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Gundluru y colaboradores.

COMPUESTO	R	COMPUESTO	R	COMPUESTO	R
IIIa		IIIe		IIIi	
IIIb		IIIf		IIIj	
IIIc		IIIg		IIIk	
III d		IIIh		III l	

Sampath y colaboradores en 2016, sintetizaron α -aminofosfonatos (Figura 8, Tabla 9) y evaluaron la actividad antioxidante empleando el método de DPPH y ácido ascórbico como control, reportaron alta actividad antioxidante.⁶⁸

Subba-Reddy y colaboradores en 2014, sintetizaron α -AP (Figura 12, Tabla 12) y realizaron la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH, usaron ácido ascórbico como control. Concluyeron que todos los compuestos presentaron buena actividad antioxidante; sin embargo, el mejor fue el **VIh**.⁷³

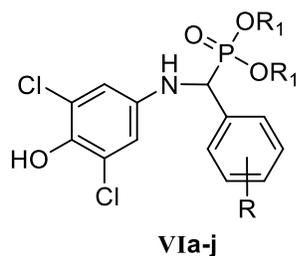
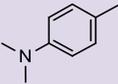
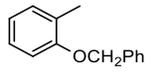


Figura 12. Estructura de los compuestos sintetizados por Subba-Reddy y colaboradores.

Tabla 12. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Subba-Reddy y colaboradores.

COMPUESTO	R	R ₁
VIa		Et
VIb		Et
VIc		Et
VI d		Et
VIe		Et
VI f		Me

Tabla 12. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Subba-Reddy y colaboradores (continuación).

COMPUESTO	R	R ₁
VIg		Me
VIh		Me
VIi		Me
VIj		Me

Venkata-Ramana y colaboradores en 2012, sintetizaron α -aminofosfonatos (Figura 13, Tabla 13) y evaluaron la actividad antiviral y antioxidante. La actividad antioxidante fue determinada por el método de DPPH (solución 1 mM), encontraron que los compuestos poseen una buena actividad antioxidante y una potente actividad antiviral contra Virus del Mosaico de Tabaco (TMV) (6×10^{-3} mg/mL).⁶¹

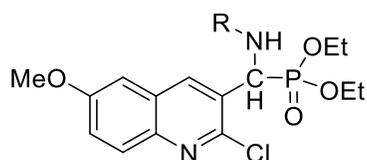
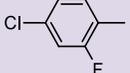
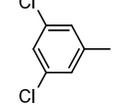
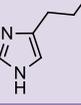
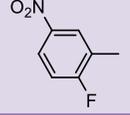
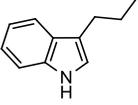
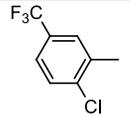
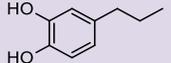
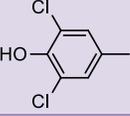
**VIIIa-j****Figura 13.** Estructura de los compuestos sintetizados por Venkata y colaboradores.

Tabla 13. Radicales de los α -aminofosfonatos sintetizados por Venkata y colaboradores.

COMPUESTO	R	COMPUESTO	R
VIIIa		VIIIf	
VIIIb		VIIIg	
VIIIc		VIIIh	
VIIId		VIIIi	
VIIIe		VIIIj	

El análisis crítico de la literatura presentado en esta sección pone de manifiesto la relevancia de la actividad farmacológica de los α -aminofosfonatos, en el presente proyecto, se planteó realizar una comparación entre dos series de estos compuestos, las cuales difieren en un grupo éster y un grupo amida. Se propuso que los derivados tipo amida incrementan la actividad presentada por los α -aminofosfonatos tipo éster. También se realizó una comparación de la actividad de los compuestos contra la actividad de los controles seleccionados en cada una de las pruebas.

CAPÍTULO 3.

En este capítulo se muestran los puntos principales en los cuales se fundamentó la realización del proyecto, se plantea la hipótesis, los objetivos y la aportación científica del mismo.

3.1. HIPÓTESIS.

Nuevos derivados tipo amida de α -aminofosfonatos, presentan mayor actividad antiproliferativa en células cancerígenas y antibacteriana *in vitro* en comparación con los α -aminofosfonatos precursores.

3.2. OBJETIVO GENERAL.

Sintetizar y caracterizar nuevos α -aminofosfonatos (tipo éster y tipo amida) y determinar su actividad antiproliferativa y antibacteriana *in vitro*.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 3.3.1. Sintetizar nueve α -aminofosfonatos tipo éster (Serie 1).
- 3.3.2. Sintetizar nueve α -aminofosfonatos tipo amida (Serie 2).
- 3.3.3. Purificar los dieciocho productos obtenidos.
- 3.3.4. Caracterizar los productos mediante RMN ^1H , ^{13}C y ^{31}P , espectrometría de masas de alta resolución.
- 3.3.5. Determinar la actividad antibacteriana de los α -aminofosfonatos precursores, y de sus derivados tipo amida.

- 3.3.6. Realizar el screening *in vitro* de todos los productos sintetizados (inhibición de la proliferación celular por el método de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)).
- 3.3.7. Determinar la actividad antiproliferativa *in vitro*, de los α -aminofosfonatos precursores y de los derivados tipo amida, por el método de viabilidad celular MTT.
- 3.3.8. Determinar la citotoxicidad, de los α -aminofosfonatos precursores y de los derivados tipo amida por el método de viabilidad celular MTT.
- 3.3.9. Realizar ensayos que aporten información con respecto al posible mecanismo de acción de los 2 compuestos con mayor actividad antiproliferativa (determinación de actividad apoptótica y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)).
- 3.3.10. Determinar la actividad antioxidante de los α -aminofosfonatos por el método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazina, DPPH.

3.4. APORTACIÓN CIENTÍFICA.

La síntesis de nuevos α -aminofosfonatos (tipo éster y tipo amida) y el estudio de su actividad antiproliferativa y antibacteriana *in vitro*, permitirá ofrecer información científicamente relevante relacionada con nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento del cáncer e infecciones bacterianas, así como información relacionada con la citotoxicidad de los compuestos evaluados.

CAPÍTULO 4.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se presenta la metodología experimental empleada para la síntesis orgánica de los α -aminofosfonatos (tanto para los derivados tipo éster, como para los derivados tipo amida); la técnica de purificación utilizada; el proceso de caracterización estructural; la metodología del cultivo celular desarrollada en las pruebas biológicas para la evaluación de la citotoxicidad, efecto antiproliferativo y determinación de apoptosis; la técnica seguida para la determinación de la actividad antimicrobiana, determinación de la concentración mínima inhibitoria y finalmente los protocolos seguidos durante la determinación de la actividad antioxidante y la determinación de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés, Reactive Oxygen Species).

INFORMACIÓN GENERAL.

La primera parte de la síntesis orgánica (correspondiente a la síntesis de los α -aminofosfonatos tipo éster) fue llevada a cabo en el Laboratorio de Química Industrial ubicado en el Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) y en el Laboratorio de Química Orgánica 4 ubicado en tercer piso del edificio redondo; ambos en la FCQ de la UANL.

La segunda parte relacionada con síntesis de los α -aminofosfonatos tipo amida fue realizada en el laboratorio 2-081, los ensayos correspondientes a la evaluación de la actividad antiproliferativa en células cancerígenas y citotoxicidad de todos los compuestos fueron llevados a cabo en el laboratorio de cultivo celular 2-054; ambos ubicados en el edificio Katz de la Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Alberta, Edmonton Alberta, Canadá.

Los ensayos correspondientes a la evaluación de la actividad antibacteriana y determinación de la CMI fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología 3, ubicado en el segundo piso del edificio redondo de la FCQ de la UANL.

La evaluación de la actividad antioxidante, determinación de estrés oxidativo y determinación de la producción de apoptosis, fueron realizados en el laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica (INGGEN) ubicado en la subdivisión de estudios de posgrado de la FCQ de la UANL.

4.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.

4.1.1. MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA SÍNTESIS DE LOS

α -AMINOFOSFONATOS:

- **SIGMA-ALDRICH:** 4-Clorobenzaldehído 97%, 4-Hidroxibenzaldehído 98%, 4-Metoxibenzaldehído 98%, Benzaldehído 99%, 4-(Difenilamino) benzaldehído 97%, 4-(4-Morfolinil) benzaldehído 97%, 1-Metil-1-*H*-pirazol-4-carboxaldehído 96%, Isobutiraldehído 98%, 2-etil-butiraldehído $\geq 92\%$, 4-Aminobenzoato de etilo 98%, Difenilfosfita 98%, (S)-(+)-2-Fenilglicinol 98%, Etanolamina $\geq 99\%$, Fosfato tribásico de potasio $\geq 98\%$. Solventes grado HPLC:

Hexano $\geq 95\%$, Acetato de etilo (AcOEt) 99.8%, Metanol (MeOH) $\geq 99.9\%$, Isopropanol (*i*PrOH) $\geq 99.7\%$, Dimetilsulfóxido (DMSO) $\geq 99.5\%$

- **Macherey-Nagel:** Sílica Gel 60, 0.040-0.063 mm
- **Biotage:** Cartuchos (columnas) para purificación, Biotage SNAP KP-Sil 10g, 25g y 50g.
- **Fisher Scientific, Teledyne ISCO Inc:** Columna RediSep Rf Gold, High Performance. HP Sílica 40g
- **Desarrollo de Especialidades Químicas (DEQ):** Carbonato de potasio, etanol 97%, isopropanol, ácido acético. Disolventes grado industrial, destilados previo a su uso: hexano, acetato de etilo, metanol.
- **Merck:** Placas para cromatografía en capa fina (por sus siglas en inglés TLC, Thin Layer Chromatography) TLC sílica gel 60 F₂₅₄ Analytical chromatography.

4.1.2. MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS PARA LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS

DE LOS α -AMINOFOSFONATOS:

a) Cultivo celular y determinación de la inhibición de proliferación celular y citotoxicidad de los α -aminofosfonatos:

- **GIBCO:** Medio de cultivo celular RPMI (con L-glutamina), medio de cultivo celular DMEM/F12 GIBCO Dulbecco's modified Eagle Medium Nutrient Mixture F12 Ham ([+]-L-Glutamina, [+]-15 mM HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il] etanosulfónico)). Mezcla de antibióticos PenStrep: 5000 unidades/mL de penicilina,

5000 µg/mL de estreptomina. Solución de Tripsina-EDTA (1X)
0.25% (ácido etilendiaminotetraacético, EDTA)

- **Kit Lonza:** Insulina (recombinante humana), hidrocortisona, extracto bovino de pituitaria, sulfato de gentamicina, anfotericina B, factor de crecimiento epidérmico (recombinante humano).
- **Líneas celulares:** MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™ (cáncer de mama, triple negativo), MCF-7 ATCC® HTB-22™ (cáncer de mama, receptor hormonal positivo), MCF-10A ATCC® CRL-10317™ (tejido mamario no tumoral), Vero (células epiteliales de riñón de mono).
- **SIGMA-ALDRICH:** Suero Fetal Bovino (SFB) F-1051. Buffer Salino de Fosfatos Dulbecco (DPBS por sus siglas en inglés, Dulbecco's Phosphate Buffered Salin) D8537, modificado sin cloruro de calcio ni cloruro de magnesio. MTT, Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Dimetilsulfóxido (DMSO) ≥99.5%
- **MCE MedChem Express:** Fotemustine 95.87%
- **Thermo Scientific:** Frascos de cultivo T75 cm² Biolite 130190. Placas de 96 pozos estériles, fondo plano con tapa. Puntas para micropipeta de 1-10 µL, 20-200 µL y 100-1000µL.
- **Corning:** Reservorios (poliestireno estéril) 50 mL, tubos cónicos 15 mL y 50 mL
- **VWR:** Hematocitómetro
- **Eppendorf:** microtubos 1.5 mL, 2 mL

- Micropipetas 1-10 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , pipeta multicanal 30-300 μL .

b) Evaluación de la actividad antioxidante, determinación de producción de especies reactivas de oxígeno y actividad apoptótica:

- **SIGMA-ALDRICH:** Dimetilsulfóxido (DMSO) $\geq 99.5\%$, Diacetato de 2',7'-Diclorofluoresceína (DCFDA) $\geq 97\%$, Xantina Oxidasa, Ácido cítrico $\geq 99.5\%$, 2,2-Difenil-1-picryl-hidrazina (DPPH).
- **Thermo Scientific:** Kit para determinación de actividad apoptótica, Molecular Probes, *EnzChek Caspase-3 Assay Kit #2*.
- **Desarrollo de Especialidades Químicas (DEQ):** Metanol grado ACS.
- Micropipetas y puntas 1-10 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , pipeta multicanal 30-300 μL .

c) Evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de CMI:

- **Cepas bacterianas:** *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología, ubicado en el segundo piso del edificio redondo de la FCQ, UANL.
- **SIGMA-ALDRICH:** Dimetilsulfóxido (DMSO) $\geq 99.5\%$,
- **PISA:** Solución salina 0.9%
- **Senosiain, Altia:** Ciprofloxacino 200mg/100mL.

- **Corning Costar:** Placas de 96 pozos fondo redondo, no tratadas, estériles.
- **Eppendorf:** Micropipetas y puntas 20-200 μL , 100-1000 μL
- **Otros:** mechero bunsen, asas bacterianas, tubos pyrex con rosca 13x100mm, estándar 0.5 McFarland (Cloruro de Bario, BaCl_2 ; Ácido Sulfúrico, H_2SO_4), caldo nutritivo.

4.1.3. EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA SÍNTESIS ORGÁNICA Y ELUCIDACIÓN

ESTRUCTURAL DE LOS α -AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER:

- Equipo de Microondas para síntesis *Monowave 300, Anton-Paar*; equipo de cromatografía flash *ISOLERA ONE, Biotage*; equipo de RMN ^1H (60 MHz), *Anazasi*; ubicados en el laboratorio de Química Orgánica 4 del edificio redondo de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.
- Equipo de RMN (400 MHz) ^1H , ^{13}C y ^{31}P , *Varian*; ubicado en el laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL.
- Espectrómetro de Masas de alta resolución, *Agilent technologies 1260 infinity*, ubicado en el laboratorio de Espectrometría de Masas en el departamento de Química y Bioquímica de la Universidad Brigham Young, Provo Utah.

4.1.4. EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA SÍNTESIS ORGÁNICA Y ELUCIDACIÓN

ESTRUCTURAL DE LOS α -AMINOFOSFONATOS TIPO AMIDA:

- Equipo de Microondas *MW Irradiator, Biotage*; equipo de cromatografía flash *CombiFlash Rf, Teledyne ISCO*; Equipo de RMN ^1H (60 MHz), *nanalysis* ubicados en el laboratorio 2-081 del edificio Katz, Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Alberta.
- Equipo de RMN (600 MHz) ^1H , ^{13}C y ^{31}P , *Bruker Ascend 600*; ubicado en el laboratorio 2-032 del edificio Katz, Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Alberta.
- Espectrómetro de Masas de alta resolución, *Agilent technologies 1260 infinity*, ubicado en el laboratorio de Espectrometría de Masas en el departamento de Química y Bioquímica de la Universidad Brigham Young, Provo Utah.

4.1.5. EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD

ANTIPROLIFERATIVA Y CITOTÓXICA DE LOS α -AMINOFOSFONATOS:

- Incubadora para cultivo celular VWR, *CO₂ Symphony 5.3 A*; Microscopio invertido OLYMPUS, *Culture Microscope CK40*; ubicados en el laboratorio 2-057 del edificio Katz, Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Alberta.
- Lector de microplacas Biotek, *synergy H1 Hybrid Multi Mode Reader*; ubicados en el laboratorio 2-043 del edificio Katz, Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Alberta.

4.1.6. EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD

ANTIBACTERIANA DE LOS α -AMINOFOSFONATOS:

- Incubadora para cultivo bacteriano, *General Purpose Incubator Sheldon Manufacturing, Inc.* Ubicada en el laboratorio de Microbiología, en el segundo piso del edificio redondo de la FCQ, UANL.

4.1.7. EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD

ANTIOXIDANTE, DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y ACTIVIDAD APOPTÓTICA DE LOS α -AMINOFOSFONATOS

La totalidad de los equipos enlistados a continuación se encuentran ubicados en el laboratorio de INGEN de la Subdivisión de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

- Incubadora para cultivo celular *Thermo Scientific MIDI 40 CO₂ Incubator*.
- Lector de microplacas *Biotek Instruments Elx800 UV Absorbance Microplate Reader*.
- Fluorómetro Thermo Scientific, *Fluoroskan Ascent*.

4.2 SÍNTESIS DE LOS α -AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER

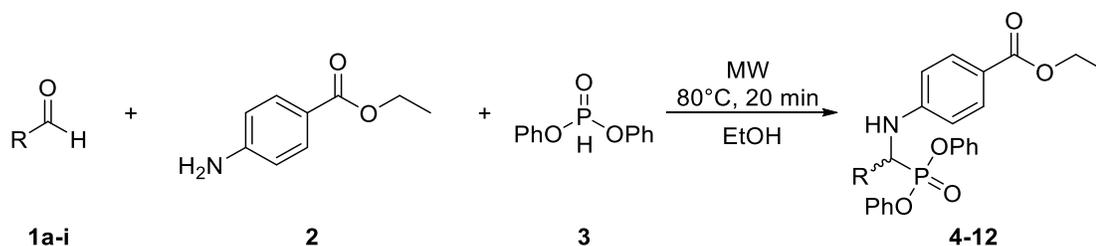
La síntesis orgánica de la serie de α -aminofosfonatos tipo éster, se llevó a cabo mediante la reacción *one-pot* de Kabachnik Fields, utilizando irradiación por microondas

como fuente de activación, empleando el equipo *Monowave 300, Anton-Paar* (Figura 14).



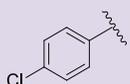
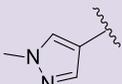
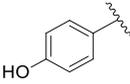
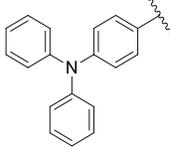
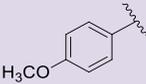
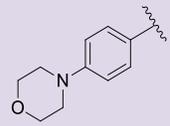
Figura 14. Equipo de Microondas *Monowave 300, Anton-Paar*.

En un tubo G10 con agitador magnético, se agregaron: 4-aminobenzoato de etilo, **2** (1.0 Eq), aldehído, **1a-j** (1.5 Eq) y difenilfosfita **3** (1.5 Eq), las condiciones de reacción fueron: temperatura de 80°C y tiempo de 20 min (Esquema 2, Tabla 14). Los parámetros del equipo de MW (temperatura y tiempo) se ajustaron en cada experimento para favorecer la reacción e incrementar el rendimiento de los productos deseados. Los aldehídos **1a-j** varían en el grupo R y corresponden al mismo orden descrito para los productos **4 – 12**.



Esquema 2. Síntesis de los α -aminofosfonatos tipo éster.

Tabla 14. Radicales de los α -aminofosfonatos tipo éster, compuestos **4-12**.

α -AP	R	α -AP	R	α -AP	R
4		7		10	
5		8		11	
6		9		12	

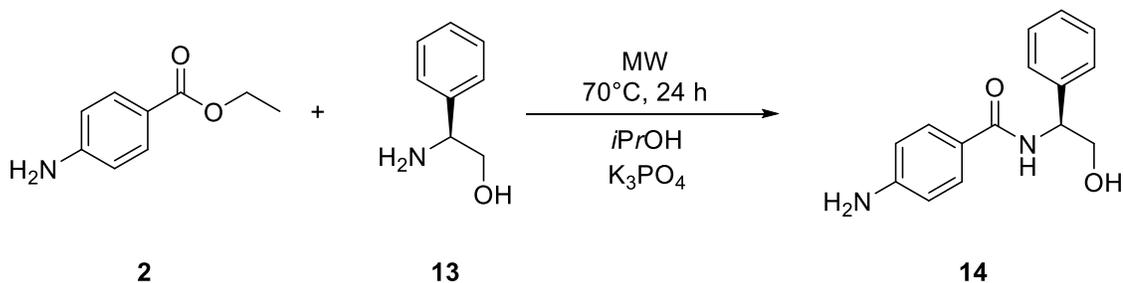
4.3 SÍNTESIS DE LOS α -AMINOFOSFONATOS TIPO AMIDA

La síntesis de los derivados tipo amida, se llevó a cabo por irradiación por microondas empleando el equipo de Microondas *MW Irradiator, Biotage* (Figura 15).



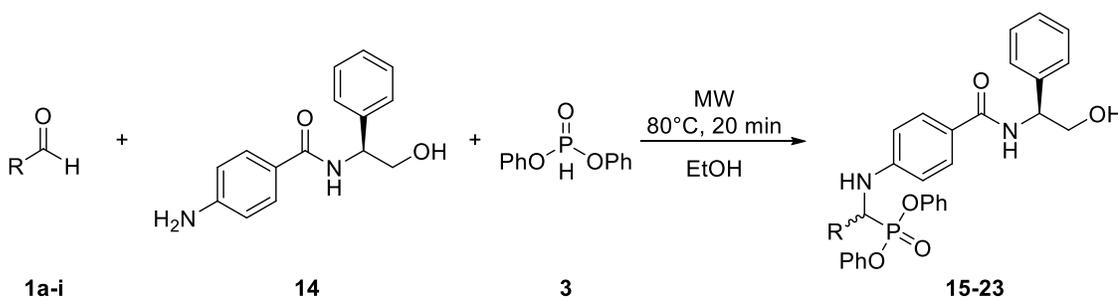
Figura 15. Equipo de Microondas MW Irradiator, Biotage.

Inicialmente se sintetizó la materia prima tipo amida **14** ((*S*)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletíl)benzamida), en un vial de reacción de 0.5-2 mL, con agitador magnético, se agregaron: 4-Aminobenzoato de etilo **2** (1 Eq), (*S*)-(+)-2-Fenilglicinol **13** (1 Eq) y K_3PO_4 (0.3 Eq) en isopropanol, a una temperatura de 70°C por 24h (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis de (*S*)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletíl)benzamida

Posteriormente, se realizó la síntesis de los derivados de α -aminofosfonatos tipo amida siguiendo el método de reacción de *one pot* de Kabachnik Fields. En un vial de reacción de 0.5-2 mL, con agitador magnético, se agregaron: la materia prima tipo amida **14** (*S*)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletíl)benzamidaa (1 Eq), aldehído **1a-i** (1 Eq) y difenilfosfita **3** (3 Eq) en etanol a 80°C por 20 min (Esquema 4). Los parámetros del equipo de MW (temperatura y tiempo) se ajustaron en cada experimento para favorecer la reacción e incrementar el rendimiento.



Esquema 4. Síntesis de los derivados de α -aminofosfonatos tipo amida.

Tabla 15. Radicales de los α -aminofosfonatos tipo éster, compuestos **15-23**.

α -AP	R	α -AP	R	α -AP	R
15		18		21	
16		19		22	
17		20		23	

4.4 PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS

Se evaluaron diferentes sistemas de disolventes mediante cromatografía en capa fina (TLC) y se eligió el que presentó una eficiente separación del producto de interés.

Inicialmente, los primeros α -aminofosfonatos tipo éster, se purificaron en columna cromatográfica con gel de sílice y el sistema de disolventes que presentó la mejor separación del compuesto de interés. Posteriormente, las purificaciones restantes, fueron realizadas utilizando el equipo de purificación de cromatografía flash *ISOLERA ONE, Biotage* (Figura 16). Las purificaciones de la amida **14** (empleada como materia prima) y algunas purificaciones de los α -aminofosfonatos tipo amida, fueron realizadas empleando el equipo de purificación de cromatografía flash *CombiFlash Rf, Teledyne ISCO* (Figura 17). Ambos equipos fueron programados partiendo del sistema de disolventes elegido para la TLC y extrapolándolo al gradiente en el software del equipo. En el equipo *CombiFlash Rf*, se corrieron dos sistemas para contar con dos valores de *Rf* y esa información se utilizó para que el equipo optimizara automáticamente el gradiente con la finalidad de obtener la mejor separación del compuesto de interés; algunas veces fue necesario editar el método cromatográfico mientras la purificación se encontraba en proceso.



Figura 16. Equipo de cromatografía flash *ISOLERA ONE*, *Biotage*.

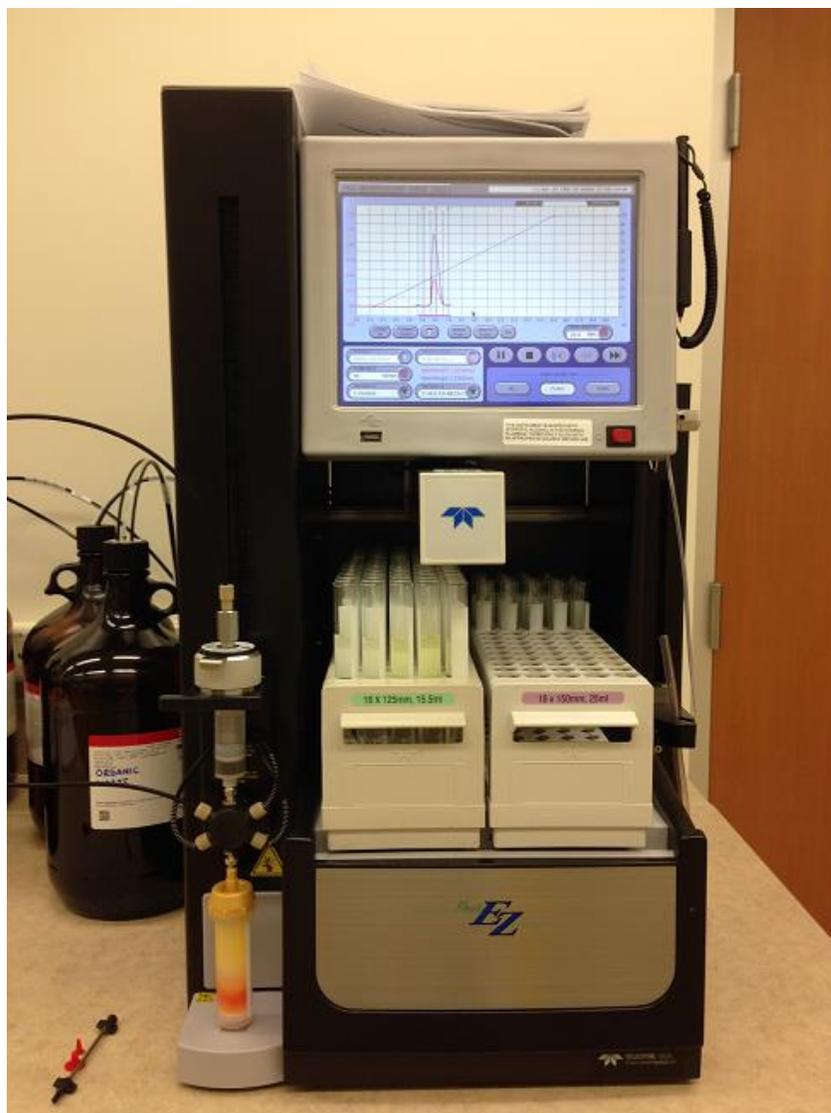


Figura 17. Equipo de cromatografía flash *CombiFlash Rf*, *Teledyne ISCO*.

4.5 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS PRODUCTOS SINTETIZADOS Y PURIFICADOS.

La caracterización inicial, se llevó a cabo mediante un análisis preliminar por Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ^1H) de 60 MHz, utilizando el equipo de RMN ^1H (60 MHz), *Anzasi* (Figura 18), para los α -aminofosfonatos tipo éster y el equipo

de RMN ^1H (60 MHz), *nanalysis* (Figura 19) para la amida empleada como materia prima y los α -aminofosfonatos tipo amida.



Figura 18. Equipo de RMN ^1H (60 MHz), *Anazasi*.



Figura 19. Equipo de RMN ^1H (60 MHz), *nanalysis*.

Posteriormente, los productos fueron caracterizados en un equipo de RMN de mayor frecuencia (400 MHz o 600 MHz) analizando ^1H , ^{13}C y ^{31}P (Figura 20).

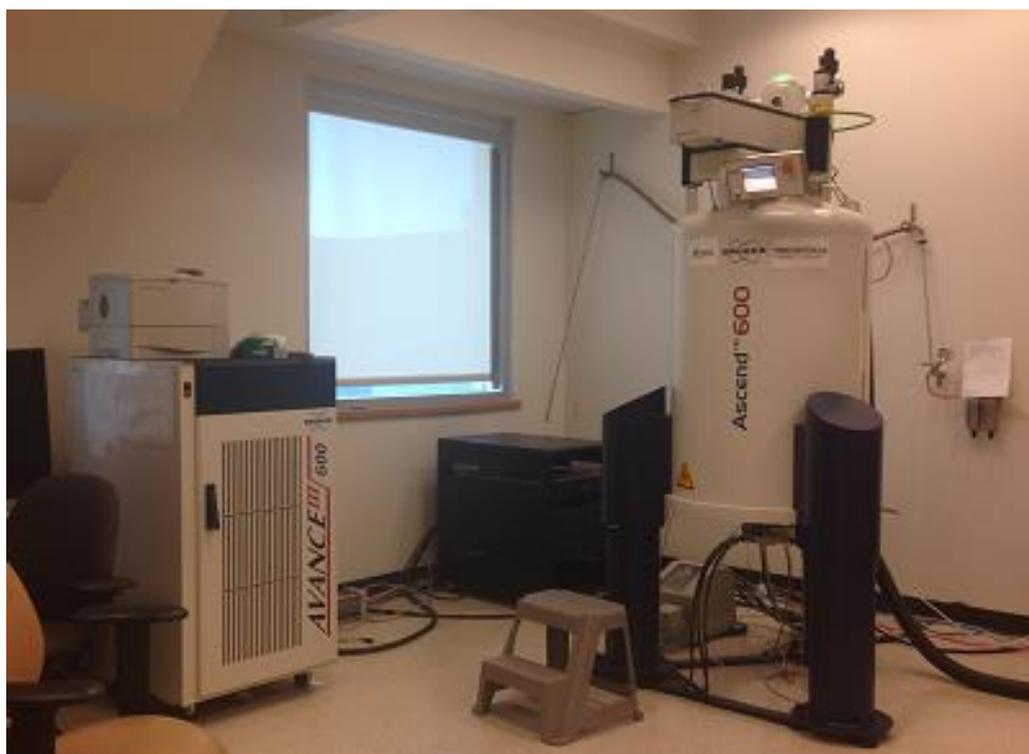


Figura 20. Equipo de RMN (600 MHz), *Bruker Ascend 600*

Asimismo, se realizó un análisis de Espectrometría de Masas de alta resolución (Figura 21), utilizando como método de ionización electro spray, ESI, por sus siglas en inglés *Electrospray Ionization*.



Figura 21. Equipo de Espectrometría de Masas, *Agilent technologies 1260 infinity*.

Finalmente, se realizó el cotejo de los resultados arrojados en todos los análisis anteriormente mencionados, buscando la relación de estos con los resultados esperados.

4.6 ESTRATEGIA GENERAL DE LA EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

Finalizada la parte de síntesis, purificación y caracterización, se propuso la siguiente estrategia para la evaluación biológica de los α -aminofosfonatos.

- a) Realización de la evaluación preliminar (*screening*) de las dos series de compuestos para determinar su actividad antiproliferativa, analizando

únicamente 4 concentraciones de estos en las dos líneas celulares cancerígenas.

- b) Selección de los 4 compuestos más activos, para la realización de la determinación de la actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerígenas y obtención de la CI_{50} , analizando 6 concentraciones de los α -aminofosfonatos que mostraron actividad antiproliferativa en el *screening*.
- c) Determinación de la citotoxicidad de los 4 compuestos más activos, empleando la línea celular no tumoral de tejido mamario.
- d) Selección de los 2 compuestos que presentaron una CI_{50} más baja, para la determinación de actividad apoptótica y determinación de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).
- e) Realización de la evaluación preliminar (*screening*) de las dos series de compuestos para determinar su actividad antibacteriana, analizando únicamente una concentración en las tres cepas bacterianas.
- f) Selección de los 4 compuestos más activos, para la determinación de la actividad antibacteriana y obtención de la CMI, empleando el método de microdilución en placa, analizando 6 concentraciones de los α -aminofosfonatos que mostraron actividad en el *screening*.
- g) Adicionalmente, determinación de la actividad antioxidante de la totalidad de los compuestos sintetizados.

Una vez planteada la estrategia general, se describe a continuación la metodología utilizada para la realización de los objetivos propuestos.

4.7 SCREENING DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS (ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA EN LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS)

Se llevó a cabo una evaluación preliminar (*screening*) de la actividad antiproliferativa de todos los compuestos sintetizados.

Se emplearon líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-231 (triple negativo) y MCF-7 (receptor hormonal positivo) para realizar la evaluación de la inhibición de proliferación celular. El screening se realizó por triplicado y en tres días diferentes. Todo el proceso relacionado con las pruebas biológicas se realizó en un ambiente de esterilidad y de acuerdo a la siguiente metodología:

a) Propagación celular.

El proceso de propagación celular inició con la tripsinización de un cultivo celular que alcanzó al menos un 80% de confluencia. La tripsinización consistió en la adición de 500 μ L de tripsina 0.25% a la caja de cultivo T75 con la línea celular confluyente, se incubó 5 min a 37°C (para despegar la monocapa celular), y posteriormente 2 mL de medio de cultivo fueron adicionados para inactivar la enzima. Una vez que las células se desprendieron de la caja de cultivo, se tomaron alícuotas de la suspensión para sembrar en más cajas de cultivo, a todos ellos se agregó medio de cultivo *cuanto baste para* (cbp) 4 mL. Se incubó a 37°C, 5% CO₂ y humedad. Las cajas de cultivo fueron revisadas continuamente para asegurar la viabilidad celular y el cambio de medio de cultivo fue llevado a cabo cada 2 días hasta la obtención de un cultivo confluyente.

b) Preparación de la placa de 96 pozos.

A un cultivo celular confluyente destinado para la evaluación de la actividad de los compuestos, se le adicionaron 500 μL de tripsina 0.25%, se incubó 5 min a 37°C; posteriormente, se inactivó la enzima con 2 mL de medio de cultivo, se tomó la suspensión celular y se colocó en un tubo cónico de 15 mL. El frasco de cultivo se lavó con 2 mL de PBS, se retiró y se adicionó al tubo cónico. Se llevó a centrifugación (1250 rpm, 5 min a 25°C), se retiró el sobrenadante y la pastilla celular fue resuspendida en medio de cultivo para continuar con el conteo celular en hematocitómetro o cámara de Neubauer. Se realizaron los cálculos para obtener la concentración celular/mL, y una vez conocida la cantidad celular disponible, se calculó la cantidad de células/pozo en 100 μL /pozo para cada línea celular (8 000 cel/pozo para MDA-MB-231 y 10 000 cel/pozo para MCF-7 y MCF-10A). Se depositó la suspensión con la concentración deseada en cada pozo de la placa y se incubó por 24 h a 37°C, 5% CO_2 y 95% de humedad.

c) Preparación de los compuestos a evaluar

Se preparó una solución stock de 10 mg/mL; para ello, se pesaron 5 mg de cada compuesto y se disolvieron en 500 μL de DMSO. Las concentraciones finales a evaluar fueron 0.1, 1.0, 10.0 y 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para que las concentraciones finales fueran las anteriormente mencionadas se concentraron las soluciones 1:6 debido a lo siguiente:

Solución 600 µg/mL

600 µg – 1000 µL (concentración)

x - 20 µL (volumen de la solución del compuesto a evaluar)

x = 12 µg/20 µL

Debido a que las células en cada pozo se encuentran en 100 µL de medio

de cultivo:

12 µg – 120 µL (volumen en el pozo*)

x - 1000 µL (para calcular la concentración/mL)

x = 100 µg/mL concentración final

**100 µL de la suspensión celular + 20 µL de la concentración a evaluar
en cada pozo*

Por lo anterior, para evaluar la concentración final de 0.1, 1.0, 10.0 y 100.0 µg/mL, se prepararon las soluciones: 0.6, 6.0, 60.0 y 600.0 µg/mL.

Para preparar las diferentes concentraciones de cada compuesto a evaluar, primero se prepararon los siguientes substocks (partiendo del stock de 10 mg/mL):

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Substock de 1000 µg/mL:

$$V_1 = \frac{(1000 \frac{\mu g}{mL})(1 mL)}{10000 \mu g/mL} = 0.1 mL$$

100 µL del stock 10 mg/mL + 900 µL de medio de cultivo

Substock de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$:

$$V_1 = \frac{(600 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})(1 \text{ mL})}{10000 \mu\text{g}/\text{mL}} = 0.06 \text{ mL}$$

60 μL del stock 10 mg/mL + 940 μL de medio de cultivo

Substock de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$:

$$V_1 = \frac{(60 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})(1 \text{ mL})}{600 \mu\text{g}/\text{mL}} = 0.1 \text{ mL}$$

100 μL del substock 600 mg/mL + 900 μL de medio de cultivo

Substock de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$:

$$V_1 = \frac{(6 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})(1 \text{ mL})}{60 \mu\text{g}/\text{mL}} = 0.1 \text{ mL}$$

100 μL del substock 60 mg/mL + 900 μL de medio de cultivo

Substock de 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$:

$$V_1 = \frac{(0.6 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})(1 \text{ mL})}{6 \mu\text{g}/\text{mL}} = 0.1 \text{ mL}$$

100 μL del substock 6 mg/mL + 900 μL de medio de cultivo

Nota importante: la concentración máxima de DMSO en contacto con las células fue del 1% debido a lo siguiente:

%DMSO:

Para la preparación del substock de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se tomaron 60 μL del stock de 10 mg/mL (100% DMSO) a los cuales se les adicionaron 940 μL de medio de cultivo, por lo que la concentración de DMSO en esa solución corresponde al 6%.

$$C_2 = \frac{(100\%)(60 \mu\text{L})}{1000 \mu\text{L}} = 6\%$$

De la solución anterior (600 µg/mL) se tomaron 20 µL y éstos se agregaron a la suspensión celular cuyo volumen fue de 100 µL/pozo; por lo tanto, el volumen final fue de 120 µL y la concentración final del DMSO corresponde a 1%. Dicho porcentaje no presenta citotoxicidad; sin embargo, el control de DMSO fue evaluado en todos los ensayos.

$$C_2 = \frac{(6\%)(20 \mu\text{L})}{120 \mu\text{L}} = 1\%$$

d) Exposición a los compuestos

En el inciso a), se describió la metodología para preparar la placa de 96 pozos con una cantidad determinada de células/pozo, al final de la preparación de la placa, se requiere incubación de la misma. Una vez transcurridas las 24 h de incubación, se observó la formación de monocapa y se continuó con la exposición a los compuestos. Se adicionaron 20 µL de cada concentración a evaluar (0.6, 6.0, 60.0 y 600 µg/mL) de los diferentes compuestos y el control (fotemustine), distribuidos en la placa de 96 pozos como se describe en la (Figura 22), posteriormente, se incubó por 24 h a 37°C, 5% CO₂ y ambiente de humedad.

	1 st triplicate; 2 nd triplicate; 3 rd triplicate; 4 th triplicate; highest dose									4 th triplicate; lowest dose			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Reference drug	A	100	100	100	10	10	10	1	1	1	0.1	0.1	0.1
Novel compound 1	B	10	10	10	1	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.01
Novel compound 2	C	10	10	10	1	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.01
Novel compound 3	D	10	10	10	1	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.01
Novel compound 4	E	10	10	10	1	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.01
	F			N O T U S E D									
	G			N O T U S E D									
Control row	H	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CM	CM	CM

CC – control of untreated cells, growing in the media

CM – control of the media, without addition of the cells

Figura 22. Placa de 96 pozos, distribución establecida por el software Cheburator⁷⁷ para determinación de la actividad antiproliferativa de los α -aminofosfonatos en el *screening* inicial

El software Cheburator fue utilizado para el análisis de los resultados obtenidos en el *screening*, una vez que se tuvieron los datos de lecturas de absorbancia del MTT, el cual se describe a continuación.

e) Evaluación de la actividad antiproliferativa y citotóxica por el método MTT

El método de evaluación de viabilidad celular de MTT, se fundamenta en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a sales de formazán por las deshidrogenasas mitocondriales; es decir, a mayor número de células viables, mayor actividad metabólica y mayor cantidad de MTT reducido, por lo tanto, mayor generación de color.⁷⁸

Una vez transcurrido el tiempo en que las células estuvieron en contacto con los compuestos y el control, se reemplazó el medio de cultivo por 120 μL de medio de cultivo nuevo, se agregaron 30 μL de una solución de MTT (3 mg/mL disuelto en PBS estéril) y se incubó 3 h a 37°C, 5% CO_2 y ambiente de humedad. Después de ese tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo de cada pozo con una pipeta Pasteur y empleando vacío, se dejó secar en la campana por 2 h y posteriormente se observaron los cristales morados de formazán que fueron disueltos en 100 μL de DMSO. Finalmente se midió la absorbancia a λ 570 nm utilizando el lector de microplacas y el software Gen5.

4.8 DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO* DE LOS α -AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER Y TIPO AMIDA.

Una vez que se obtuvieron los resultados del *screening*, se realizó una selección de los 4 compuestos más activos en cada línea celular y se siguió la misma metodología descrita para el *screening* (procedimiento establecido en el punto 4.7); sin embargo, en este ensayo se evaluaron 6 concentraciones, rango de concentración: 0.098, 0.391, 1.562, 6.250, 25.000, 100.000 $\mu\text{g/mL}$. Los compuestos seleccionados fueron adicionados de acuerdo a la distribución mostrada en la Figura 23. Para la determinación de la CI_{50} se utilizó el software PRISM.

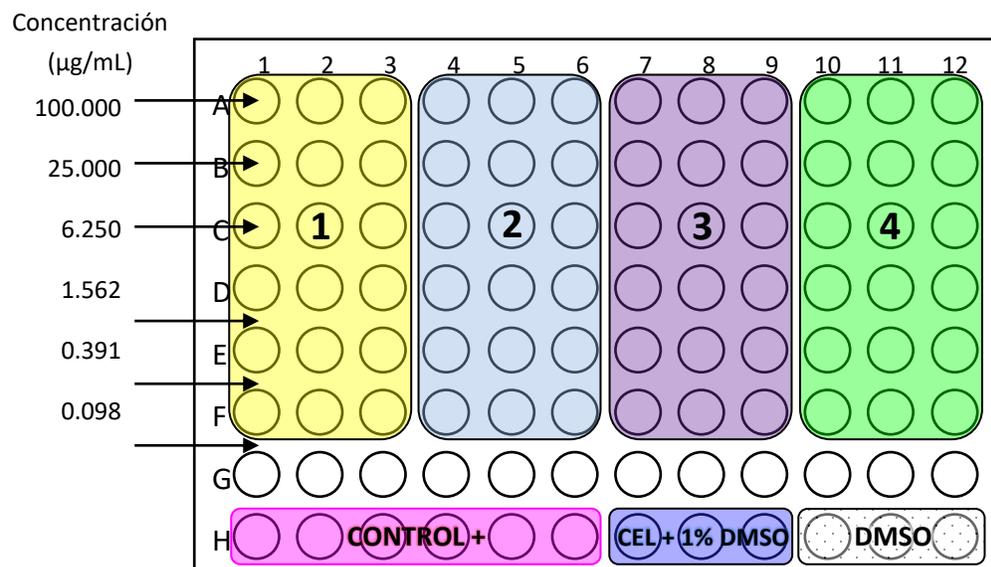


Figura 23. Placa de 96 pozos, distribución de compuestos elegidos para la determinación de la actividad antiproliferativa *in vitro*.

4.9 DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD *IN VITRO*, DE LOS α -AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER Y TIPO AMIDA.

Los α -aminofosfonatos que fueron más activos, fueron seleccionados para la evaluación de la citotoxicidad en células de tejido mamario no tumoral; sin embargo, también se incluyeron compuestos con una CI_{50} media, dado que se consideró que si éstos tenían una CI_{50} relativamente baja en células cancerígenas y baja o nula citotoxicidad, serían compuestos prometedores para ser considerados en futuras evaluaciones. La adición de los compuestos se realizó de acuerdo a la distribución mostrada en la Figura 23.

4.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE TODOS LOS COMPUESTOS

Para la evaluación de la actividad antibacteriana, se partió de cultivos puros proporcionados por el laboratorio de Microbiología de la FCQ de la UANL. El inóculo bacteriano empleado para la evaluación de la actividad de los α -aminofosfonatos fue preparado mediante la selección de colonias aisladas de un cultivo puro con 24 h de crecimiento. Todo el procedimiento descrito a continuación fue realizado en ambiente de esterilidad proporcionado por el uso de un mechero Bunsen.

a) Preparación de soluciones

Se preparó una solución stock de 2 mg/mL; para ello, se pesaron 2 mg de cada compuesto y se disolvieron en 1000 μ L de DMSO. La solución de trabajo empleada para la evaluación de la actividad bacteriana se preparó a una concentración de 200 μ g/mL para que la concentración final correspondiera a 100 μ g/mL. La solución de trabajo (200 μ g/mL) se preparó de acuerdo a lo siguiente:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Substock de 200 μ g/mL:

$$V_1 = \frac{(200 \frac{\mu g}{mL})(1 mL)}{2000 \mu g/mL} = 0.1 mL$$

100 μ L del stock 2 mg/mL + 900 μ L de caldo nutritivo

b) Preparación del inóculo bacteriano

Con el asa bacteriana se tomaron de 3 a 5 colonias aisladas y éstas fueron transferidas a un tubo con 10 mL de solución salina. Se comparó la turbidez del inóculo con el estándar 0.5 de McFarland (preparación del estándar de McFarland en ANEXOS 7.1) y se adicionaron más UFC, hasta alcanzar el mismo nivel de turbidez que el estándar de referencia (5×10^4 UFC/0.1 mL por pozo).

c) Preparación de la placa de 96 pozos

100 μ L del substock de 200 μ g/mL de cada compuesto a evaluar, fueron agregados a la placa de 96 pozos de fondo redondo, de acuerdo a lo descrito en la Figura 24. Posteriormente 100 μ L del inóculo bacteriano fueron agregados a cada pozo de la placa de 96 pozos. Se incubaron las placas a 37°C por 24 h, se revisó la turbidez del control positivo, en donde un botón >2mm presente indicó un adecuado crecimiento bacteriano. Se revisaron resultados del efecto de los compuestos adicionados en cada pozo. El screening fue realizado por triplicado en tres días diferentes. Se eligieron los α -aminofosfonatos más activos y se realizó la determinación de la CMI.

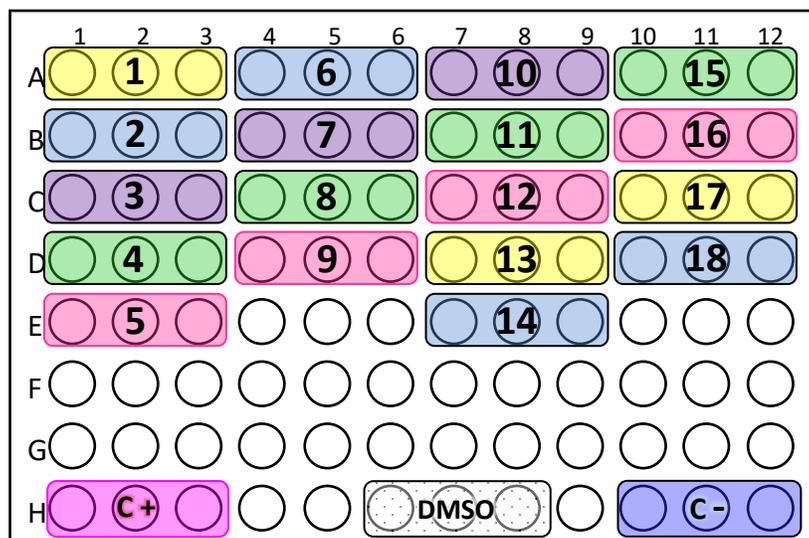


Figura 24. Placa de 96 pozos, distribución de compuestos para la realización del *screening* bacteriano.

NOTA IMPORTANTE: la concentración máxima de DMSO en contacto con las bacterias fue del 5% debido a lo siguiente:

%DMSO:

Para la preparación del substock de 200 µg/mL se tomaron 100 µL del stock de 2 mg/mL (100% DMSO) a los cuales se les adicionaron 900 µL de caldo de cultivo, por lo que la concentración de DMSO en esa solución corresponde al 10%

$$C_2 = \frac{(100\%)(100 \mu\text{L})}{1000 \mu\text{L}} = 10\%$$

De la solución anterior (200 µg/mL) se tomaron 100 µL y a éstos se les agregaron 100 µL del inóculo bacteriano; por lo tanto, el volumen final fue de 200 µL y la concentración final del DMSO corresponde al 5%. Dicho porcentaje

no presenta citotoxicidad; sin embargo, el control de DMSO fue evaluado en todos los ensayos.

$$C_2 = \frac{(10\%)(100 \mu\text{L})}{200 \mu\text{L}} = 5\%$$

4.10.1. DETERMINACIÓN DE LA CMI

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se empleó la metodología de microdilución en placa,⁷⁹ para ello se seleccionaron los 5 compuestos más activos y a diferencia del *screening*, en esta ocasión se realizaron diluciones seriadas, las concentraciones a evaluar fueron: 100.000, 50.000, 25.000, 12.500, 6.250, 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se emplearon las mismas cepas bacterianas utilizadas en el *screening*: *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

a) Preparación de soluciones

Para la determinación de la CMI, se partió del mismo stock mencionado en el punto **4.10 a)**, el cual tuvo una concentración de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; sin embargo, para la preparación de las soluciones seriadas, se preparó un substock de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Substock de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$:

$$V_1 = \frac{(400 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}})(2 \text{ mL})}{2000 \mu\text{g}/\text{mL}} = 0.4 \text{ mL}$$

400 μL del stock 2 mg/mL + 1600 μL de caldo nutritivo

b) Preparación del inóculo bacteriano

La preparación del inóculo bacteriano se realizó siguiendo la misma metodología de trabajo descrita en el punto **4.10 b)**.

c) Preparación de la placa de 96 pozos

La preparación de la placa de 96 pozos inició con la adición de 100 μL de caldo nutritivo a los pozos elegidos para la evaluación de los compuestos (A-1: F12), posteriormente en la primer fila de la placa, se adicionaron 100 μL del substock de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se mezclaron y se tomaron 100 μL de esa solución (cuya concentración corresponde a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se agregaron al pozo siguiente, se mezclaron y se tomaron 100 μL de esa solución (cuya concentración corresponde a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se agregaron al pozo siguiente y así sucesivamente hasta tener 6 concentraciones, lo cual corresponde al método de diluciones seriadas (Figura 25).

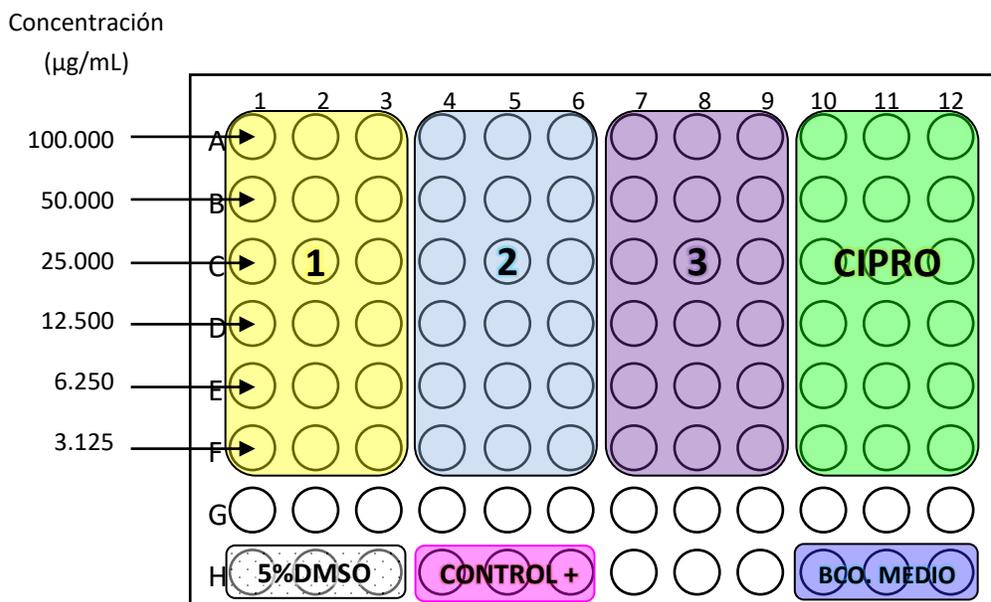


Figura 25. Placa de 96 pozos, distribución de compuestos elegidos para la determinación de la CMI.

Una vez concluido el paso anterior, se adicionaron 100 μL del inóculo bacteriano; de esta manera, los compuestos que se encontraban a las concentraciones 200.00, 100.00, 50.00, 25.00, 12.50 y 6.25 $\mu\text{g/mL}$ se diluyeron y las concentraciones finales a evaluar correspondieron a 100.000, 50.000, 25.000, 12.500, 6.250 y 3.125 $\mu\text{g/mL}$.

Se evaluaron los siguientes controles: a) 5% DMSO, correspondiente al control del porcentaje máximo de DMSO adicionado (5%), para descartar que la inhibición del crecimiento bacteriano se debiera al solvente y no a la actividad antibacteriana de los compuestos; b) CONTROL +, consistió en la adición del microorganismo y caldo

nutritivo, lo cual correspondió al 100% de crecimiento bacteriano; c) *BCO. MEDIO*, control correspondiente a los pozos adicionados únicamente con medio de cultivo (caldo nutritivo), para descartar una contaminación en la placa de 96 pozos, d) *Ciprofloxacino*, corresponde al fármaco control al cual también se le realizaron las diluciones seriadas para determinar la CMI.

Una vez que se llenaron las placas, se incubaron a 37°C por 24 h, se revisó la turbidez del control positivo en donde un botón >2mm presente indicó un adecuado crecimiento bacteriano. Se revisaron resultados del efecto de los compuestos adicionados en cada pozo. Los ensayos de determinación de la CMI fueron realizados por triplicado en tres días diferentes.

4.11 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de la actividad antioxidante se realizó empleando el método de DPPH,⁸⁰ en el cual se utilizó ácido ascórbico como control. Inicialmente, se preparó un stock de DPPH a 10 000 µg/mL y posteriormente substocks de 1000, 100 y 60 µg/mL. Para la preparación de las soluciones anteriormente mencionadas, se realizaron los siguientes cálculos:

Stock DPPH 10 000 µg/mL

Se pesaron 10 mg de DPPH y se disolvió en 1 mL de metanol

Substock 1000 µg/mL:

$$V_1 = \frac{(1000 \frac{\mu g}{mL})(5 mL)}{10000 \mu g/mL} = 0.5 mL$$

500 µL del stock 10 mg/mL + 4.5 mL de metanol

Substock 100 µg/mL:

$$V_1 = \frac{(100 \frac{\mu g}{mL})(11 mL)}{1000 \mu g/mL} = 1.1 mL$$

1.1 mL del substock 1000 µg/mL + 9.9 mL de metanol

Substock 60 µg/mL:

$$V_1 = \frac{(60 \frac{\mu g}{mL})(11 mL)}{1000 \mu g/mL} = 660 \mu L$$

660 µL del substock 1000 µg/mL + 10.34 mL de metanol

Se evaluaron todos los α -aminofosfonatos sintetizados, se prepararon diluciones seriadas, como se describe en el punto **4.10.1 c)**, pero empleando metanol como diluyente en lugar del caldo nutritivo. Las concentraciones finales evaluadas fueron: 100.000, 50.000, 25.000, 12.500 y 6.250 µg/mL. Posterior a la adición y dilución de los compuestos, se agregaron 100 µL de la solución de DPPH a evaluar (60 µg/mL). Como control, se utilizó ácido ascórbico en las siguientes concentraciones: 200, 100, 80, 60, 40, 20 y 10 µg/mL (en cada pozo 100 µL de la solución de ácido ascórbico + 100 µL de la

solución de DPPH). La distribución de los compuestos y controles en la placa de 96 se describe en la Figura 26.

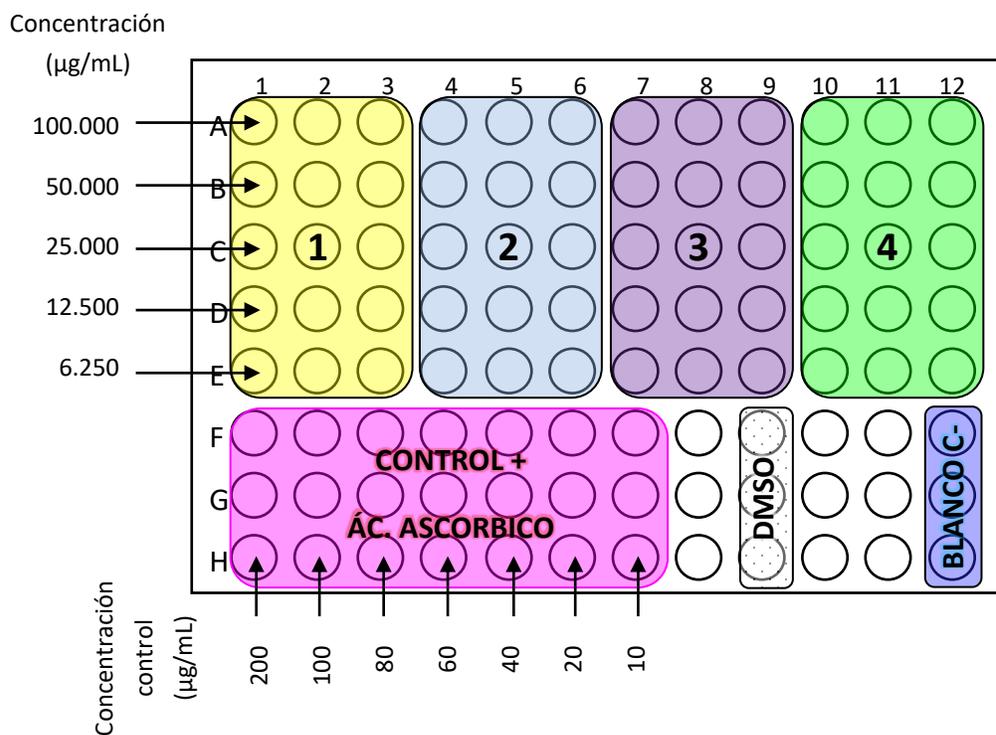


Figura 26. Placa de 96 pozos, distribución de compuestos elegidos para la determinación de la actividad antioxidante.

Posteriormente se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, finalmente, se realizó la lectura de absorbancia, empleando el lector de microplacas a una λ de 550 nm.

4.12 REALIZACIÓN DE ENSAYOS QUE APORTEN INFORMACIÓN RESPECTO AL POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS COMPUESTOS MÁS ACTIVOS.

4.12.1. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO

Se seleccionaron los compuestos que presentaron actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerígenas, para determinar si el mecanismo de acción por el cual provocaron muerte celular se debía a la producción de ROS; para ello, se siguió la metodología descrita a continuación, empleando el diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) para la detección de especies reactivas de oxígeno.⁸¹

Se empleó un cultivo confluyente de la línea celular MCF-7, (metodología de cultivo celular descrita en la sección **4.7 a) a d)**); se llevó a cabo la preparación de las placas de 96 pozos de la misma manera como se describió anteriormente; sin embargo, para esta determinación, las células fueron expuestas a las concentraciones: 100.000, 50.000, 25.000, 12.500, 6.250 y 3.125 µg/mL de cada compuesto activo. Como *control positivo (+)* se empleó una solución de Xantina Oxidasa (XO) (0.06 U/mL). La distribución de los compuestos en la placa de 96 pozos se realizó como se describe en la Figura 27.

Posteriormente 100 µL de la solución de DCFDA (50 µg/mL), fueron agregados a los todos pozos con compuestos o controles a evaluar, se incubó a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad; finalmente, se realizaron lecturas a 0.5, 1.0, 2.0,

3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 12.0 y 24.0 h empleando el fluorómetro a una λ de excitación de 585 nm y λ de emisión de 530 nm.

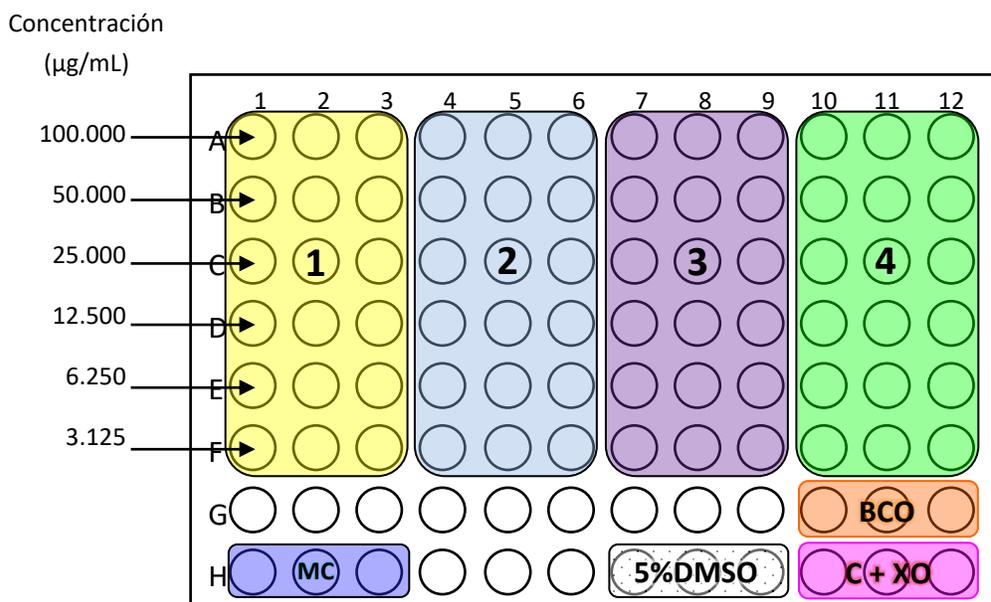


Figura 27. Placa de 96 pozos, distribución de compuestos elegidos para la determinación del estrés oxidativo.

4.12.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA

Para la determinación de la actividad apoptótica, se siguió el protocolo establecido en el inserto del kit *EnzChek® Caspase-3 Assay kit #2* de *Molecular Probes*.

La línea celular MCF-7 fue utilizada para la determinación de apoptosis, la propagación celular fue realizada de acuerdo al punto **4.7 a)**, una vez que se alcanzó el 80% de confluencia, las células fueron tripsinizadas empleando el método descrito para determinación de actividad antiproliferativa (**4.7 b)**).

Una placa de 6 pozos fue preparada sembrando 1 000 000 cel/pozo en 2 mL de medio de cultivo/pozo. La placa de 6 pozos fue incubada 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad; posteriormente, el CI₅₀ de cada compuesto y control positivo de apoptosis fue adicionado (36 µM) y la placa se volvió a incubar en las condiciones anteriores, distribución de compuestos en Figura 28.

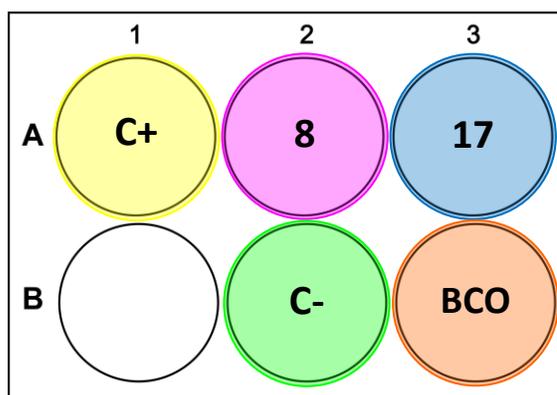


Figura 28. Placa de 6 pozos, distribución de compuestos elegidos para la determinación de la actividad apoptótica.

Podofilotoxina (36 µM) fue empleada como control positivo (inductor de apoptosis), como control negativo se emplearon células sin tratamiento y para el blanco se empleó medio de cultivo.

Después de 24 h de incubación con los compuestos a evaluar, las células fueron colectadas y lavadas con PBS; para ello, se retiró el medio de cultivo que contenían las cajas de cultivo celular, se tripsinizaron con 200 µL de tripsina y se incubaron por 5 min a 37°C, transcurrido el tiempo, se agregó 1 mL de medio de cultivo para inactivar la enzima, se tomó la suspensión celular y se colocó en un tubo cónico. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, se tomó la

pastilla celular, se lavó con 2 mL de PBS se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se retiró el sobrenadante y la pastilla celular obtenida fue empleada para seguir el protocolo establecido en el inserto el kit, el cual se describe a continuación.

Las soluciones fueron preparadas como se establece en el inserto del kit:

- a) *Solución stock 5 mM del sustrato Z-DEVD-R110*. Una vez que los viales del sustrato y de DMSO estuvieron a temperatura ambiente, el sustrato fue disuelto en 264 μL de DMSO.
- b) *Solución stock 1 M de Ditioneitol (DTT)*. 650 μL de H_2O desionizada y ultrapurificada fueron agregados al vial de DTT.
- c) *Buffer de lisis 1X*. 50 μL de *buffer* de lisis 20X fueron agregados a 950 μL de H_2O desionizada y ultrapurificada.

Una vez preparadas las soluciones de trabajo, se continuó con el protocolo de determinación de apoptosis. Cada pastilla celular colectada (obtenida de las células expuestas a: Control positivo, Control negativo, $\alpha\text{-AP}$ **8** y **17**) fue resuspendida en 50 μL del *buffer* de lisis 1X; posteriormente, se incubó en un baño de hielo por 30 min.

Mientras las células se encontraban en el proceso de lisis, se prepararon las siguientes soluciones:

- d) *Solución 2X de buffer de reacción.* Se mezclaron 400 μL de *buffer* de reacción 5X + 10 μL de DTT 1 M + 590 μL de H_2O desionizada y ultrapurificada.
- e) *Solución de trabajo 2x del sustrato.* Se mezclaron 10 μL de la solución 5 mM del sustrato (preparada en a)) con 990 μL del *buffer* de reacción 2X (preparado en d)).

Una vez concluidos los 30 min de incubación en hielo, el lisado celular fue centrifugado a 5000 rpm por 5 min; posteriormente, se tomaron 50 μL del sobrenadante de cada muestra, y se adicionaron a un microtubo para su posterior análisis.

Con la finalidad de homogenizar las muestras empleadas en la detección de caspasa-3, se realizó la determinación de proteínas en cada lisado celular siguiendo el método de Bradford^{82,83} y se realizó el ajuste de concentración para que en todas las muestras se tuvieran 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas totales en 50 μL de volumen total, se utilizó buffer de lisis 1X para realizar el ajuste de concentración.

Una vez que la cantidad de proteína fue estandarizada, 50 μL de cada muestra fueron agregados a una placa oscura de 96 pozos, como blanco se emplearon 50 μL de buffer de lisis 1X; posteriormente se agregaron 50 μL de solución de trabajo 2X de sustrato a cada muestra y controles, se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, se realizó la lectura de fluorescencia (excitación/emisión 496-520 nm).

4.13 FORMA DE MANEJO Y DISPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS GENERADOS.

Las reacciones que se llevaron a cabo no son consideradas de alto riesgo para la salud, por lo que para su realización se utilizó el equipo básico de protección personal de laboratorio (bata, lentes, guantes y mascarilla al manipular sílica gel).

Para descartar los residuos generados, se 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.
- Plástico impregnado con sustancias químicas.
- Basura industrial.
- Residuos biológicos: el desecho de estos residuos se llevó a cabo mediante el estándar de clasificación de los RPBI (Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos) empleando:
 - i. Contenedor rojo: Residuos punzocortantes biológico-infeccioso
 - ii. Contenedor amarillo: Residuos patológicos (órganos, tejidos, células biológico-infecciosas).

CAPÍTULO 5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se describen los resultados obtenidos tanto en el área de síntesis, purificación y caracterización de los α -aminofosfonatos, como también de las pruebas biológicas realizados a los mismos.

A. SÍNTESIS ORGÁNICA.

5.1. SERIE 1. α -AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER.

5.1.1. α -AMINOFOSFONATO 4 (ÉSTER DE *p*-CLOROBENZALDEHÍDO)

En la Figura 31 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato 4

5.1.1.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 4

4-(((4-clorofenil)(difenoxyfosforil)metil)amino) benzoato de etilo.

4-Clorobenzaldehído (0.50 g, 1 eq), 4-aminobenzoato de etilo (0.59 g, 1 eq) y difenilfosfita (1.25 g, 1.5 eq) fueron disueltos en etanol (3 mL). La mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 80°C por 20 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

El crudo de reacción fue adsorbido en sílica gel, el solvente fue evaporado y la purificación fue realizada por cromatografía en columna con sílica gel; el sistema de disolventes: hexano - acetato de etilo (7:3) presentó la mejor separación del compuesto de interés. Se identificó la mancha del producto, se juntaron las fracciones en las cuales se tuvo el compuesto puro con el mismo factor de retención (R_f), $R_f=0.49$ (7:3 hexano - acetato de etilo), se concentraron las fracciones al eliminar el solvente por rotaevaporación y se obtuvo un sólido de color blanco con un punto de fusión (PF) de 116-118°C.

El α -aminofosfonato **4** posee una masa molecular de 521.93 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 1524.60 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 82% de rendimiento químico.

5.1.1.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO **4**

A continuación, se muestran los valores de las señales observadas en los espectros de Resonancia Magnética Nuclear ^1H , ^{13}C , y ^{31}P .

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El análisis de ^1H RMN fue realizado y se obtuvo el espectro con varias señales a diferentes desplazamientos químicos (δ , ppm), una vez analizados todos los parámetros de utilidad, se llevó a cabo la asignación de las señales con los protones presentes en la molécula.

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 29.

A un desplazamiento químico de 1.26 ppm (*a*) se observa una señal triple (t, $J = 7.0$ Hz) que integra para 3 H y corresponde a los protones del metilo (CH_3) de la parte del éster.

En 4.21 ppm (*b*) se encuentra un cuarteto (c, $J = 7.0$ Hz) que integra para 2 H, los protones del metileno (CH_2) de la parte del éster.

Posteriormente, a 5.88 ppm (*c*) se puede observar un doble de doble (dd, $J = 25.4, 10.2$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón que está unido al Carbono α (enlazado al Nitrógeno y al Fósforo), el cual es una de las señales características que identifican a esta familia de α -aminofosfonatos.

En 6.95 ppm (*d*) se observa una señal doble (d, $J = 8.7$ Hz) que integra para 2 H, señal característica que corresponde a los protones *meta* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

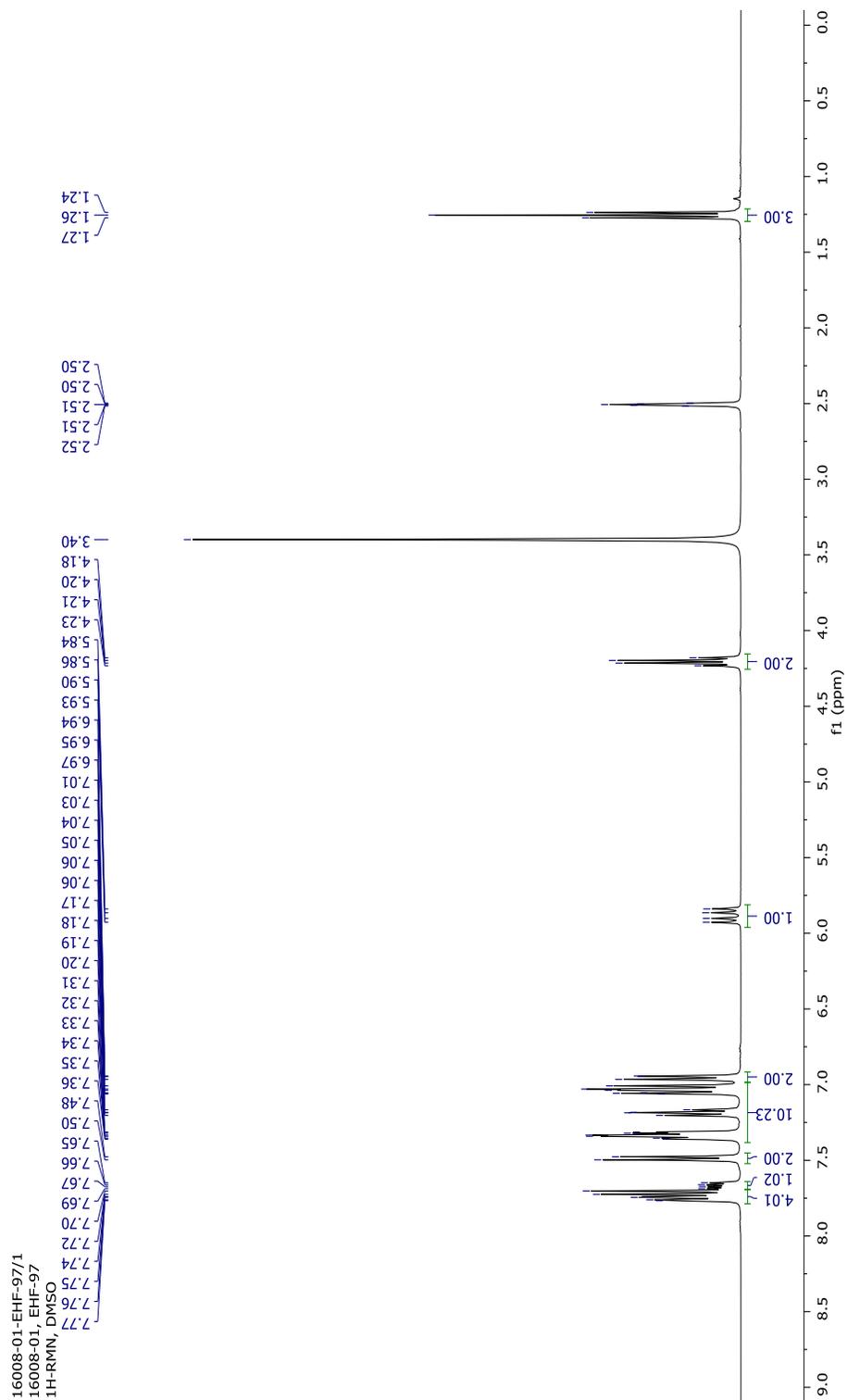


Figura 29. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) del α-aminofosfonato 4.

En la Figura 30 se presenta una ampliación del espectro, en la cual se muestran con mayor claridad las señales de los protones restantes.

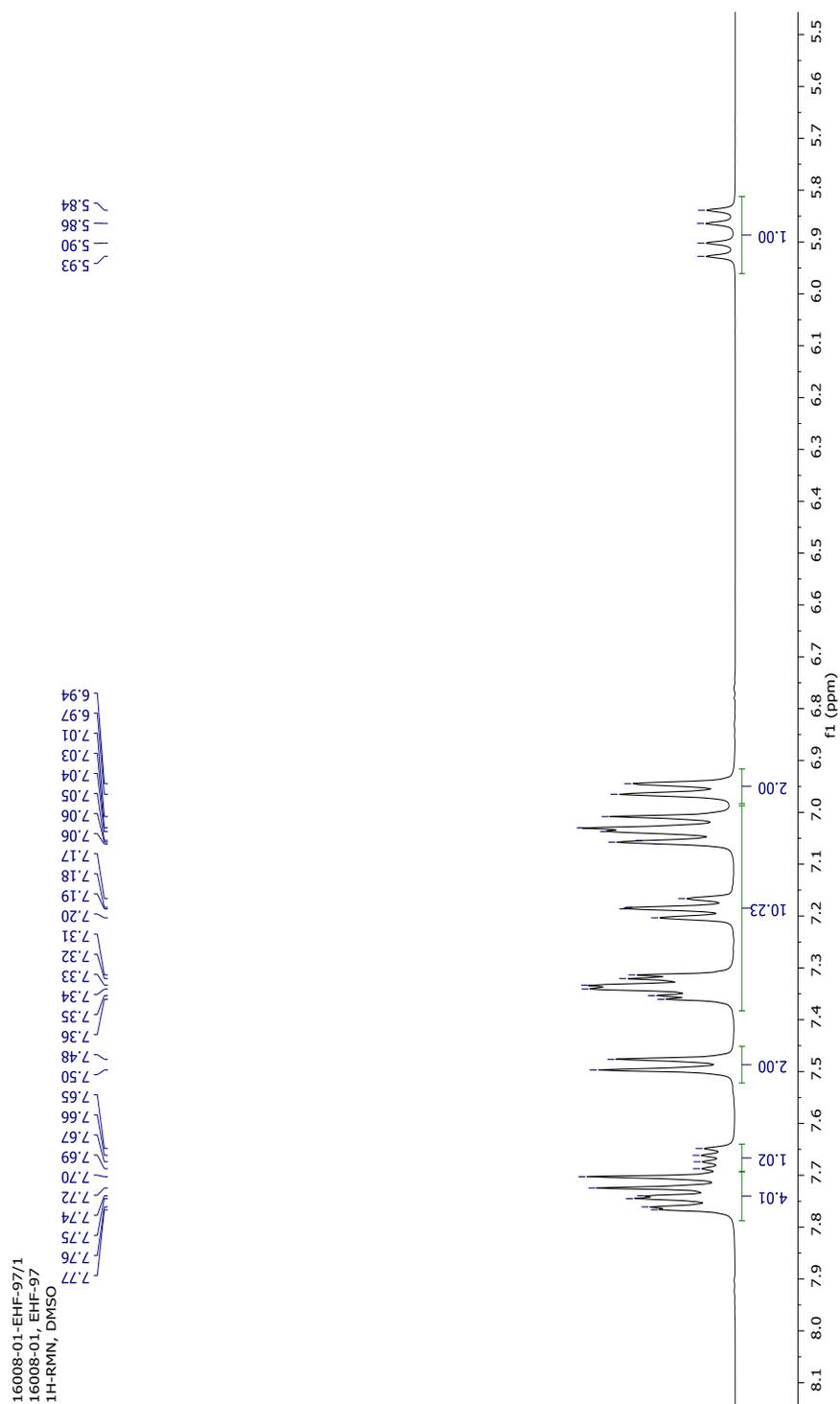


Figura 30. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **4**.

A un desplazamiento químico de 7.00 – 7.38 ppm (*e*) se encuentran las señales multiplete que integran para 10 H y corresponden a los protones de los dos fenilos de la difenilfosfita. En 7.49 ppm (*f*) se observa una señal doble (d, $J = 8.3$ Hz) que integra para 2 H, los protones *orto* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo, como se puede observar, se tiene los dos dobles característicos de un fenilo disustituido.

Posteriormente, en 7.67 ppm (*g*) se encuentra una señal doble de doble (dd, $J = 10.3, 5.3$ Hz) que integra para 1 H, el protón enlazado al N en el grupo amino. Finalmente, a 7.68-7.79 ppm (*h*) se observa un multiplete que integra para 4 H y corresponden a los protones del *p*-cloro fenilo.

En la Figura 31 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

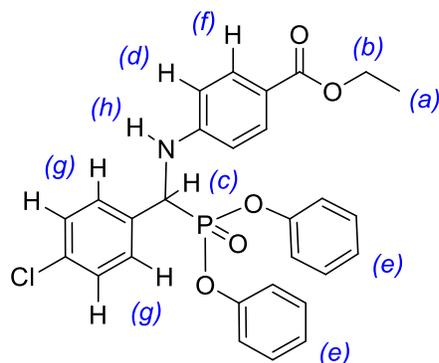


Figura 31. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **4**.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (101 MHz,

DMSO- d_6) se muestra en la Figura 32:

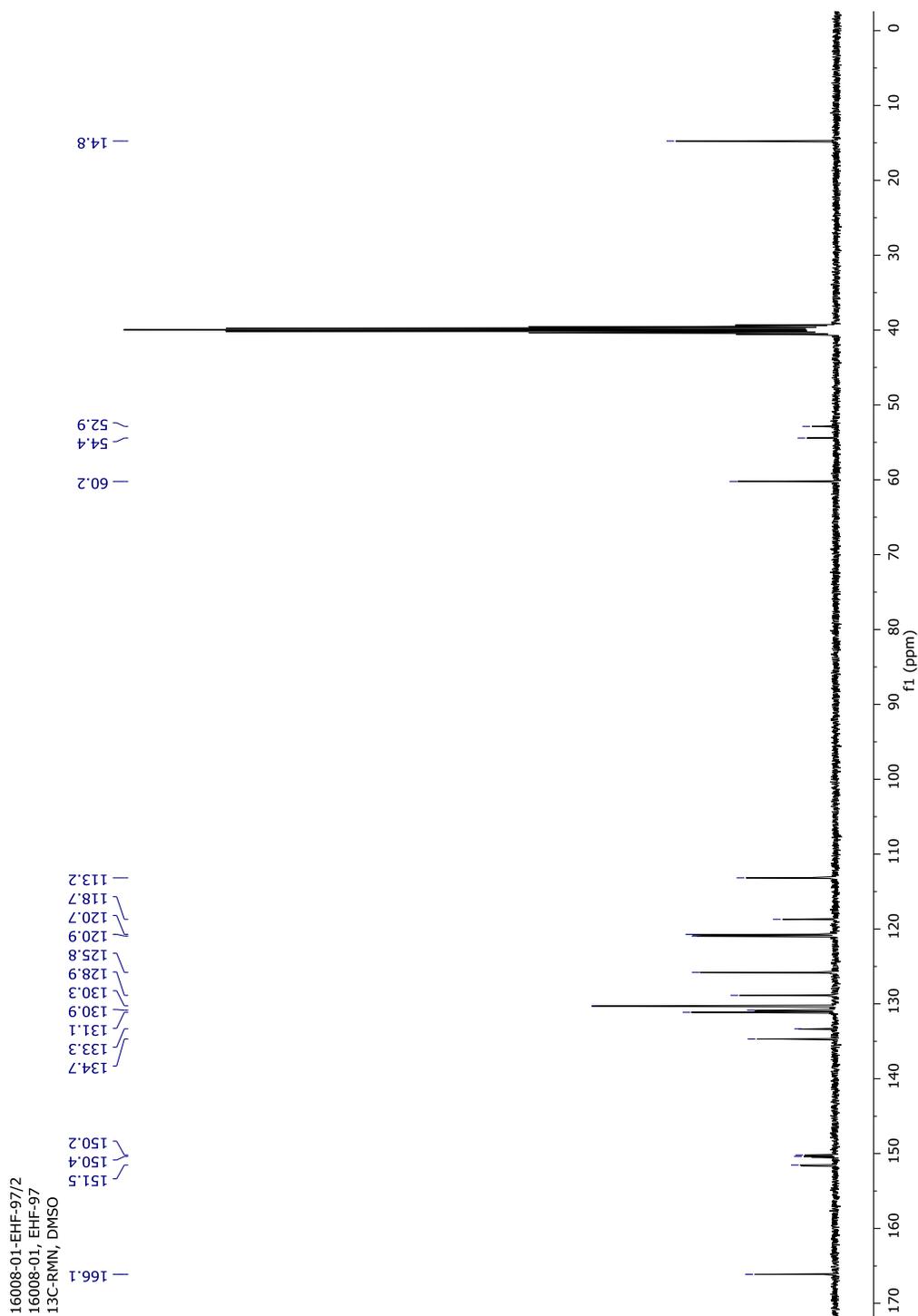


Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 4.

A un desplazamiento químico de 14.8 y 60.2 ppm, se observan las señales correspondientes a los C alifáticos del éster (CH₃ y CH₂ respectivamente). Entre estas dos señales, se encuentra una señal doble en 53.6 ppm con una constante de acoplamiento característica para este tipo de compuestos ($d, J = 156.3$ Hz), ésta indica la presencia del enlace C-P y es evidencia de que la reacción de acoplamiento se llevó a cabo.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 113.2, 118.7, 120.7, 120.9, 125.8, 128.9, 130.3, 130.9, 131.1, 133.3, 134.7, 150.2, 150.4 y 151.5 ppm.

Finalmente, en 166.1 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo del éster.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ³¹P.**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ³¹P (162 MHz, DMSO-*d*₆) se muestra en la Figura 33, en el cual se observa una señal doble (debido al acoplamiento del P con el H del C α) a un desplazamiento químico de 15.24 ppm ($d, J=25.1$ Hz).

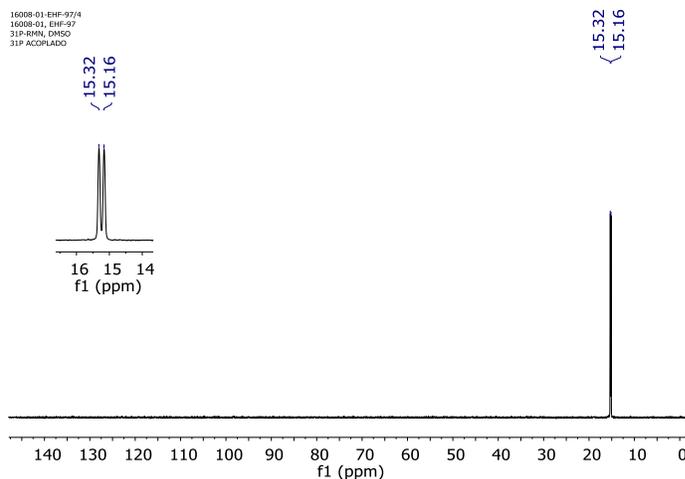


Figura 33. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del α -aminofosfonato **4**.

▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI^+) m/z , valor calculado para

$\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{ClNO}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 522.1159$, encontrado 522.1094.

5.1.2. α -AMINOFOSFONATO 5 (ÉSTER DE *p*-HIDROXIBENZALDEHÍDO)

En la Figura 36 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **5**

5.1.2.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 5

4-(((difenoxifosforil)(4-hidroxifenil)metil)amino)benzoato de etilo.

4-Hidroxibenzaldehído (0.50 g, 1 eq), 4-aminobenzoato de etilo

(0.68 g, 1 eq) y difenilfosfita (1.44 g, 1.5 eq) fueron disueltos en etanol (3 mL).

La mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 90°C por 30 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

El crudo de reacción fue adsorbido en sílica gel, el solvente fue evaporado y la purificación fue realizada por cromatografía en columna con sílica gel; el sistema de disolventes hexano: acetato de etilo (1:1) presentó la mejor separación del compuesto **5**. Se identificó la mancha del producto, se juntaron las fracciones en las cuales se tuvo el compuesto puro con el mismo $R_f = 0.52$ (1:1 hexano-acetato de etilo), se concentraron las fracciones al eliminar el solvente mediante la rotaevaporación y finalmente se obtuvo un sólido de color naranja con un PF de 154-156°C.

El α -aminofosfonato **5** posee una masa molecular de 503.48 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 1492.70 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 72% de rendimiento químico.

5.1.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO **5**

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 34.

A un desplazamiento químico de 1.26 ppm (*a*) aparece una señal triplete (t, $J = 7.1$ Hz) que integra para 3 H y corresponde a los protones del metilo del éster. En 4.21 ppm (*b*) se encuentra un cuarteto (c, $J = 7.0$ Hz), que integra para 2 H, los protones del metileno del éster.

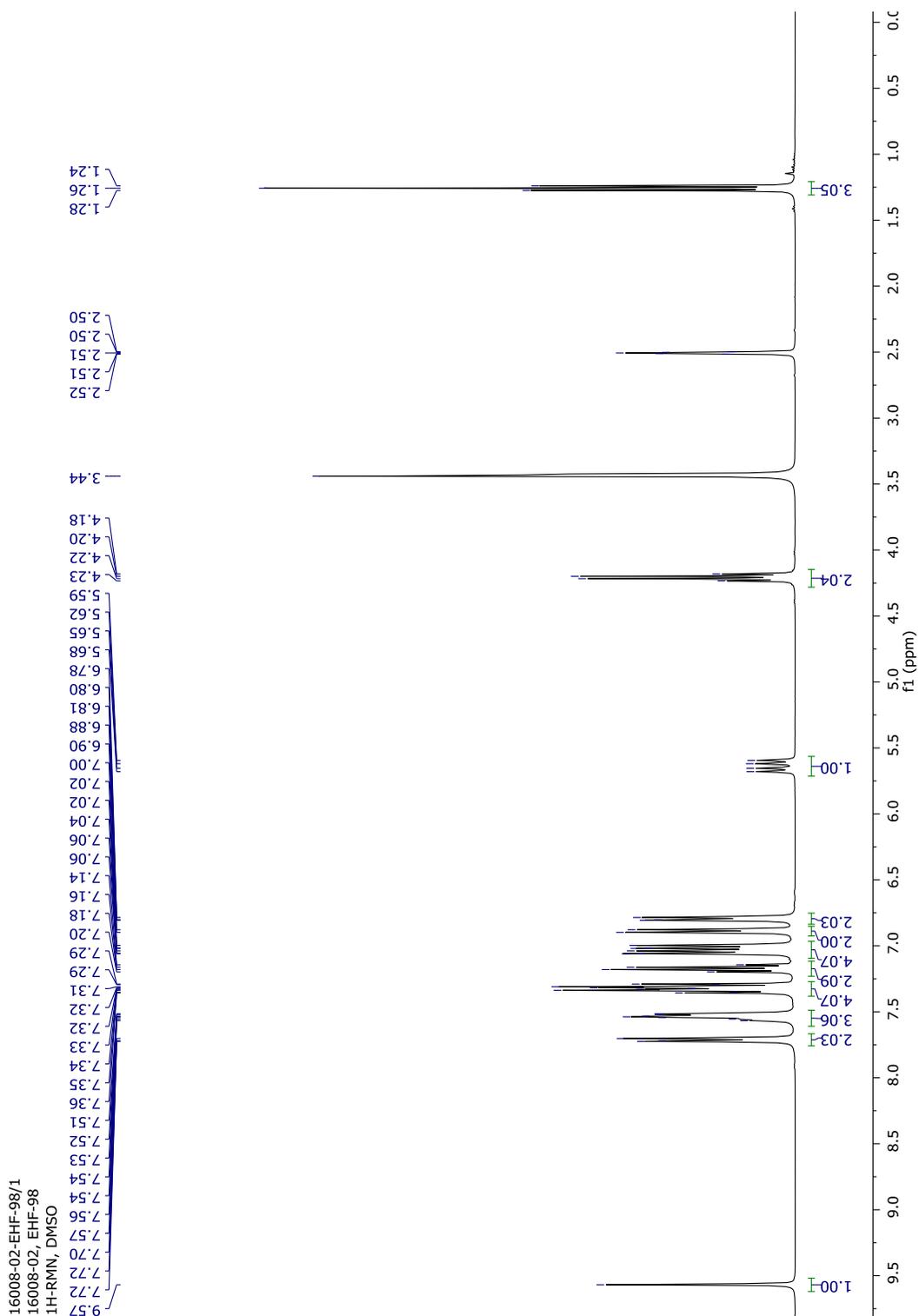


Figura 34. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) del α-aminofosfonato 5.

En la Figura 35 se presenta una ampliación del espectro, en la cual se muestran con mayor claridad las señales de los protones restantes.

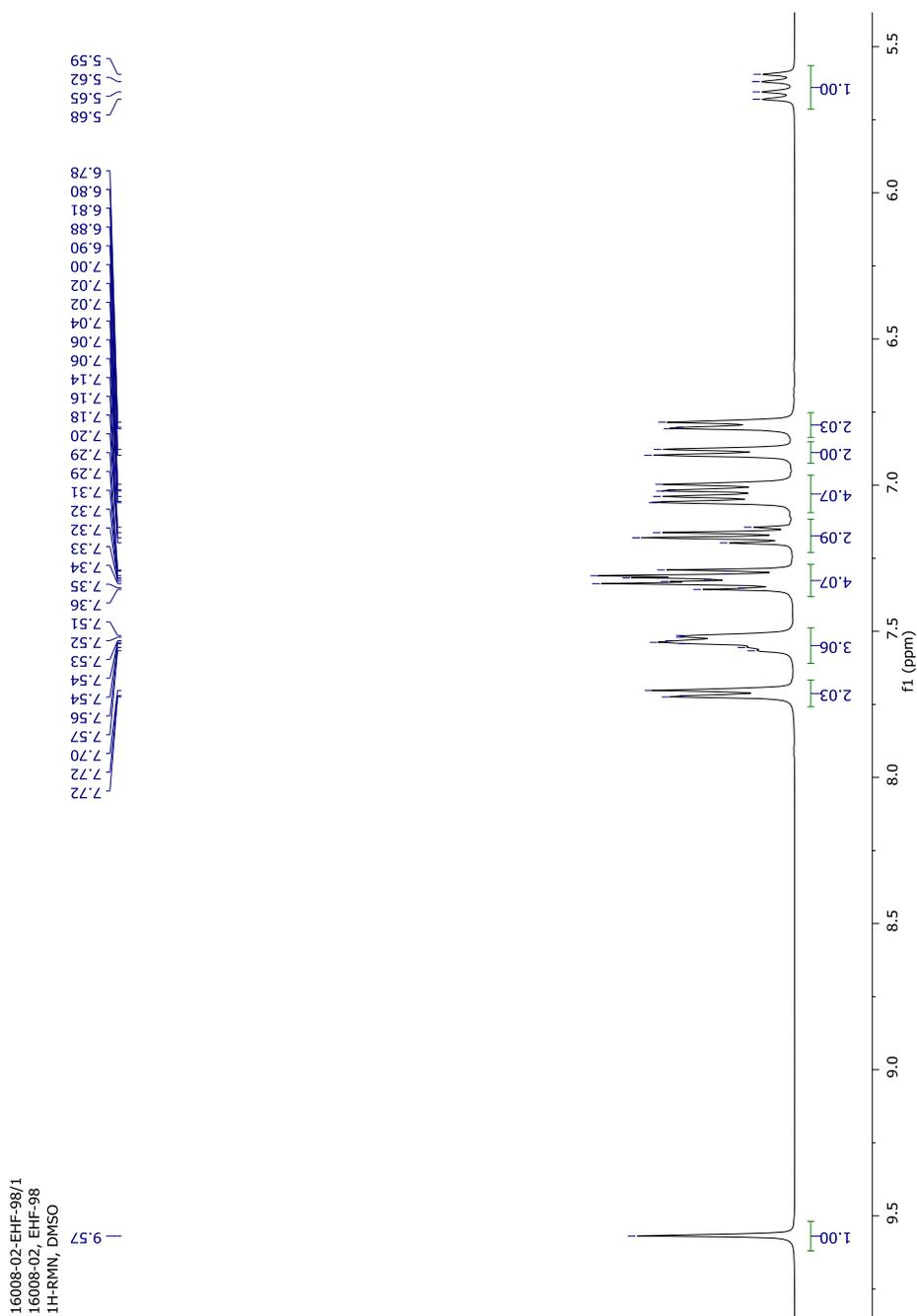


Figura 35. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del α -aminofosfonato **5**.

En 5.64 ppm (*c*) se observa una señal doble de doble (dd, $J = 24.1, 10.0$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al Carbono α . A un desplazamiento químico de 6.80 ppm (*d*) aparece una señal doble (d, $J = 8.8$ Hz), que integra para 2 H, señal característica que corresponde a los protones *meta* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

Posteriormente en 6.85 – 7.60 ppm (*e*) se observan las señales multiplete que integran para 14 H y corresponden a protones aromáticos de la difenilfosfita y del *p*-OH fenilo. En 7.56 ppm (*f*) se encuentra un doblete (d, $J = 4.6$ Hz) que integra para 1 H, el protón unido al Nitrógeno. En 7.71 ppm (*g*) aparece una señal doble (d, $J = 9.0$ Hz), que integra para 2 H, señal característica que corresponde a los protones *orto* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

Finalmente, en 9.57 ppm (*h*) se observa una señal singulete, que integra para 1 H, y corresponde al OH del *p*-OH fenilo. En la Figura 36 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

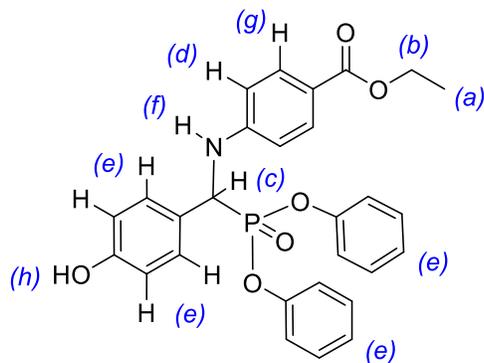


Figura 36. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **5**.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .**

El espectro obtenido después del análisis de ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 37.

A un desplazamiento químico de 14.8 y 60.2 ppm, se observan las señales correspondientes a los C alifáticos del éster (CH_3 y CH_2 respectivamente). Entre estas dos señales, se encuentra la señal que indica la presencia del enlace C-P, la cual corresponde al doblete ubicado en 53.8 ppm (d, $J = 157.6$ Hz) con una constante de acoplamiento característica que evidencia que la reacción de Kabachnik-Fields se llevó a cabo.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 113.1, 115.6, 118.3, 120.8, 121.0, 125.3, 125.6, 125.7, 130.2, 130.3, 130.4, 131.1, 150.4, 150.5, 151.8 y 157.8 ppm.

Finalmente, en 166.2 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo del éster.

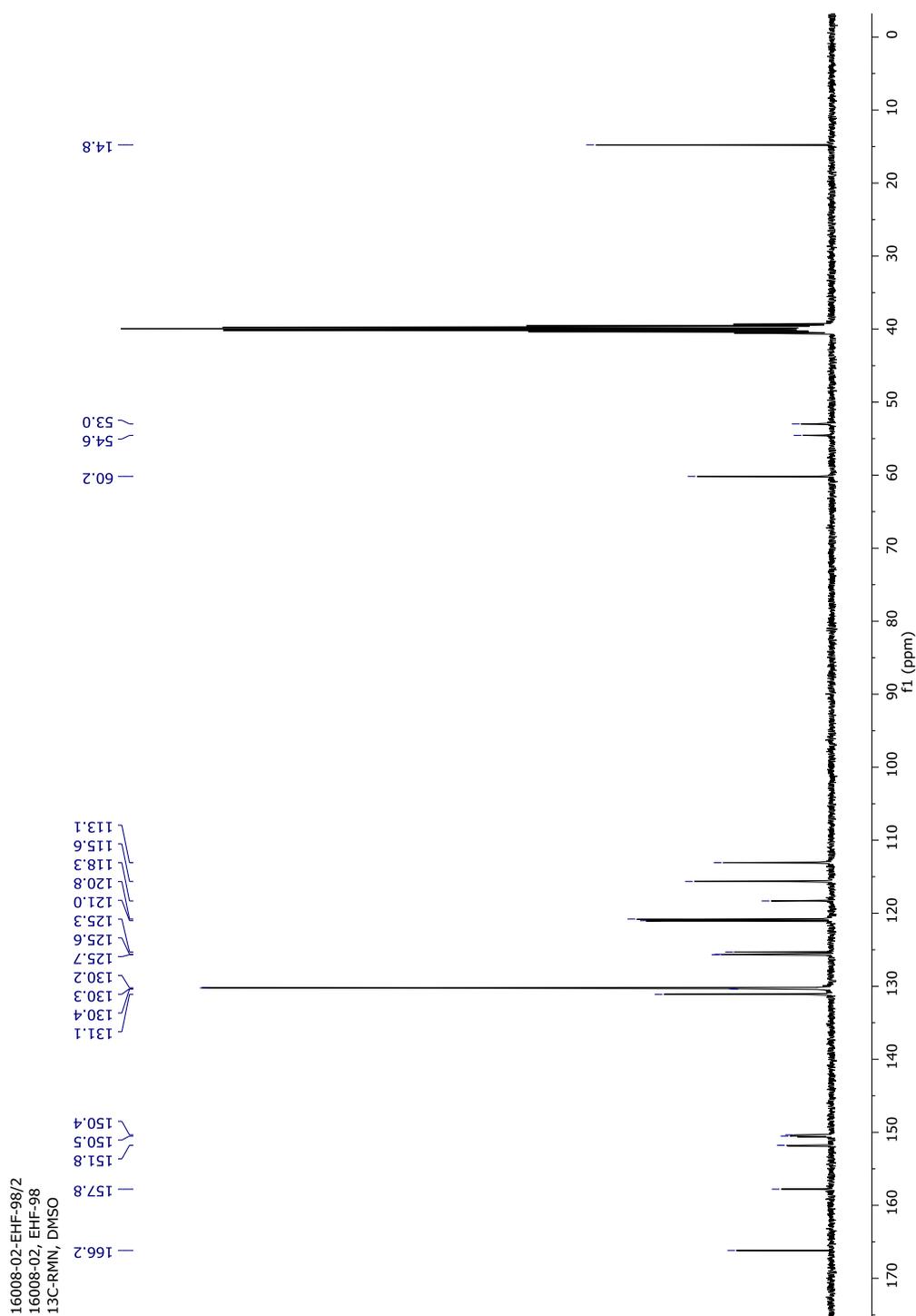


Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 5.

- **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 38, en el cual se observa una señal doble a 16.30 ppm (d, $J = 24.0$ Hz).

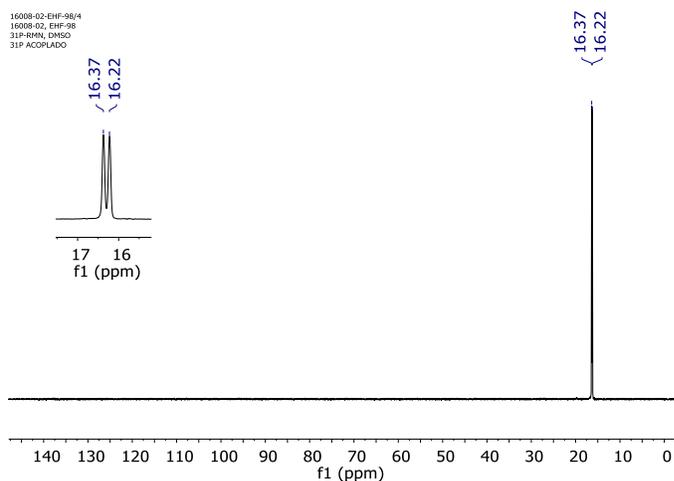


Figura 38. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **5**.

- **ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN**

En el análisis de HRMS (ESI⁺) m/z , valor calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_6\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 504.1498, encontrado 504.1485.

5.1.3. α -AMINOFOSFONATO **6** (ÉSTER DE *p*-METOXIBENZALDEHÍDO)

En la Figura 41 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **6**

5.1.3.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO **6**

4-(((difenoxifosforil)(4-metoxifenil)metil)amino) benzoato de etilo.

4-Metoxibenzaldehído (0.50 g, 1 eq), 4-aminobenzoato de etilo (0.61 g, 1 eq) y difenilfosfita (1.29 g, 1.5 eq) fueron disueltos en etanol (3 mL). La mezcla

de reacción se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 20 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

Para la purificación del compuesto **6**, el crudo de reacción fue filtrado y lavado con etanol. Se corrió una TLC comparando el sólido obtenido con las materias primas, obteniendo una mancha diferente a éstas últimas. El producto obtenido posee un $R_f=0.31$ (hexano: acetato de etilo 7:3), el sólido de color blanco posee un PF de 147-149°C.

El α -aminofosfonato **6** posee una masa molecular de 517.51 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 1658.40 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 87% de rendimiento químico.

5.1.3.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO **6**

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 39.

A un desplazamiento químico de 1.26 ppm (*a*) aparece una señal triplete (t, $J = 7.1$ Hz) que integra para 3 H y corresponde a los protones del metilo del éster. En 3.74 ppm (*b*) se encuentra una señal singulete que integra para 3 H, los protones del metoxilo del *p*-metoxi fenilo. En 4.21 ppm (*c*) se observa un cuarteto (c, $J = 7.0$ Hz), que integra para 2 H, los protones del metileno del éster.

En 5.72 ppm (*d*) se observa una señal doble de doble (dd, $J = 24.4, 10.1$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al Carbono α del α -aminofosfonato.

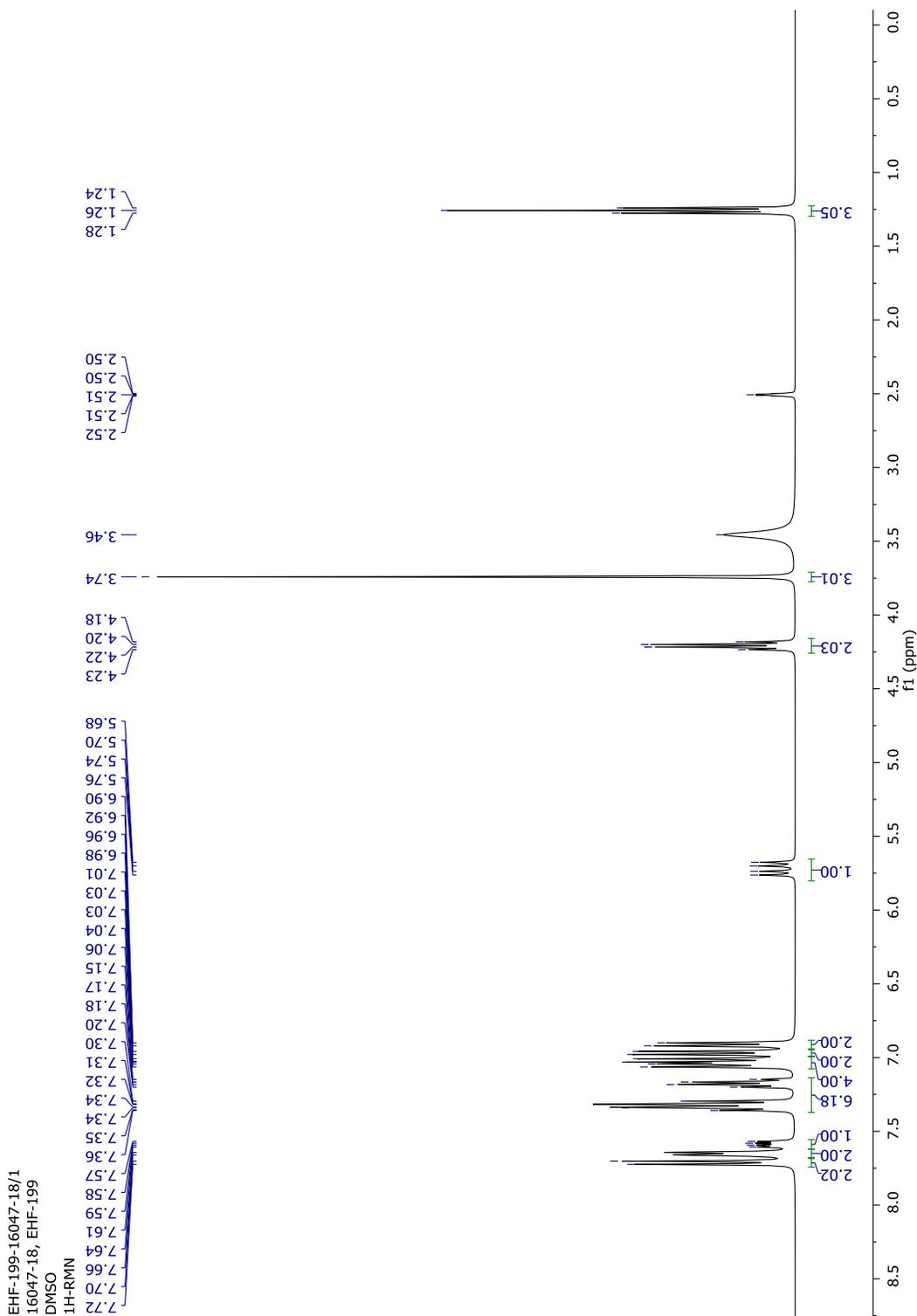


Figura 39. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **6**.

A un desplazamiento químico de 6.91 ppm (*e*) aparece una señal doble (d, $J = 8.1$ Hz), que integra para 2 H, señal característica que corresponde a los protones *meta* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo. En 6.97 ppm (*f*) aparece una señal doble (d, $J = 8.5$ Hz), que integra para 2 H y corresponde a los protones *orto* del *p*-metoxi fenilo.

Posteriormente en 6.99 – 7.39 ppm (*g*) se observan las señales multiplete que integran para 10 H y corresponden a protones aromáticos de la difenilfosfita.

A un desplazamiento químico de 7.59 ppm (*h*) aparece una señal doble de doble (dd, $J = 10.2, 4.9$ Hz) que integra para 1 H, el protón el amino. En 7.65 ppm (*i*) aparece una señal doble (d, $J = 8.6$ Hz), que integra para 2 H, los protones *meta* del *p*-metoxifenilo.

Finalmente, en 7.71 ppm (*j*) se observa una señal doble (d, $J = 8.6$ Hz), que integra para 2 H, señal característica que corresponde a los protones *orto* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

En la Figura 40 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

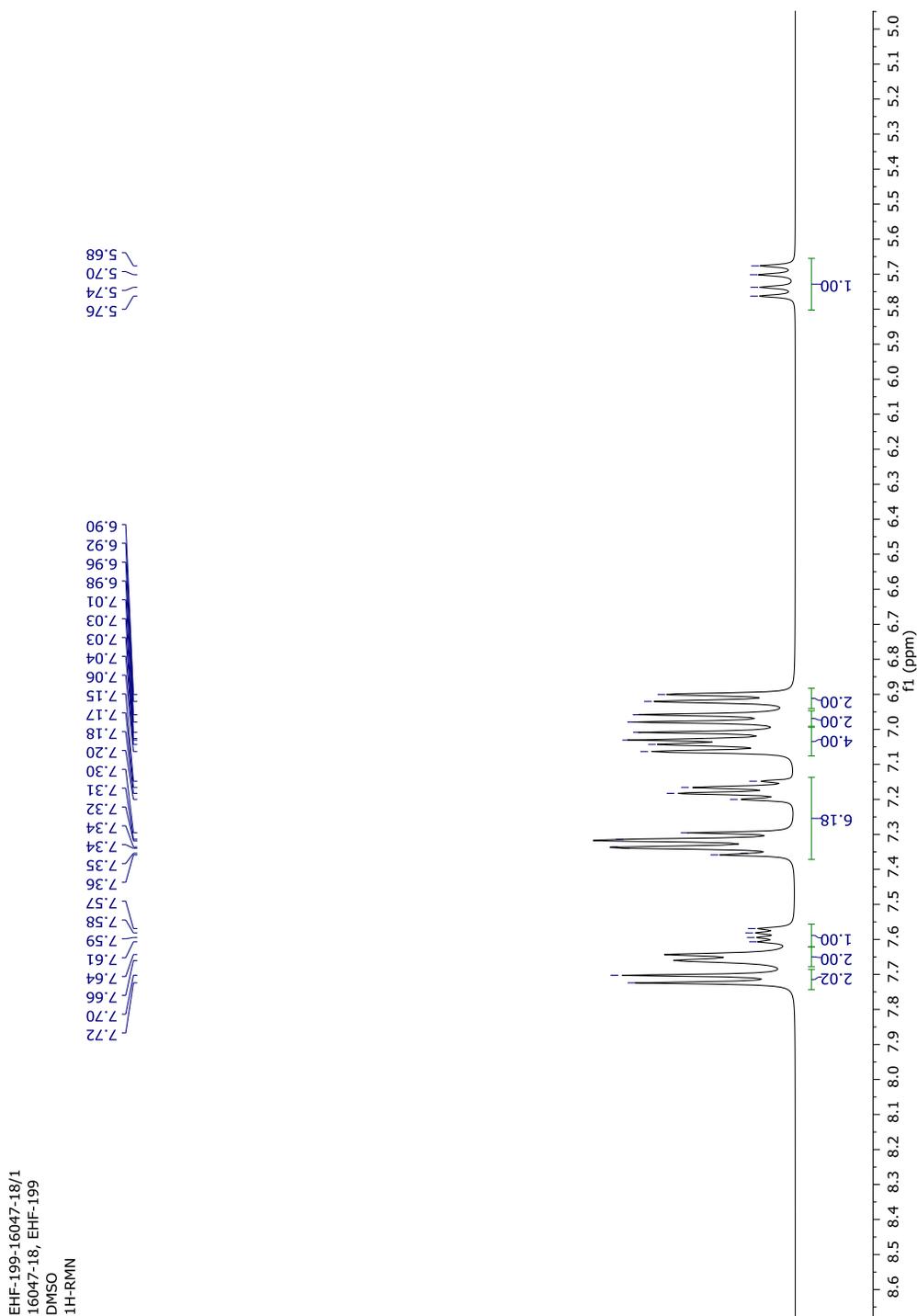


Figura 40. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **6**.

En la Figura 41 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

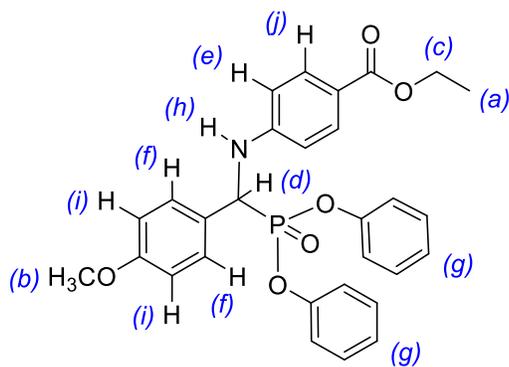


Figura 41. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **6**.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) se muestra en la Figura 42.

A un desplazamiento químico de 14.8 ppm, se observa la señal correspondiente al C alifático del metilo del éster. En 53.70 ppm, se encuentra un doblete (d, $J = 157.2$ Hz) que indica la presencia del enlace C-P, la constante de acoplamiento es característica y evidencia que la reacción de Kabachnik-Fields se llevó a cabo.

A 55.6 ppm, se observa la señal del C del metoxilo. En 60.2 ppm se encuentra la señal correspondiente al C del metileno del éster.

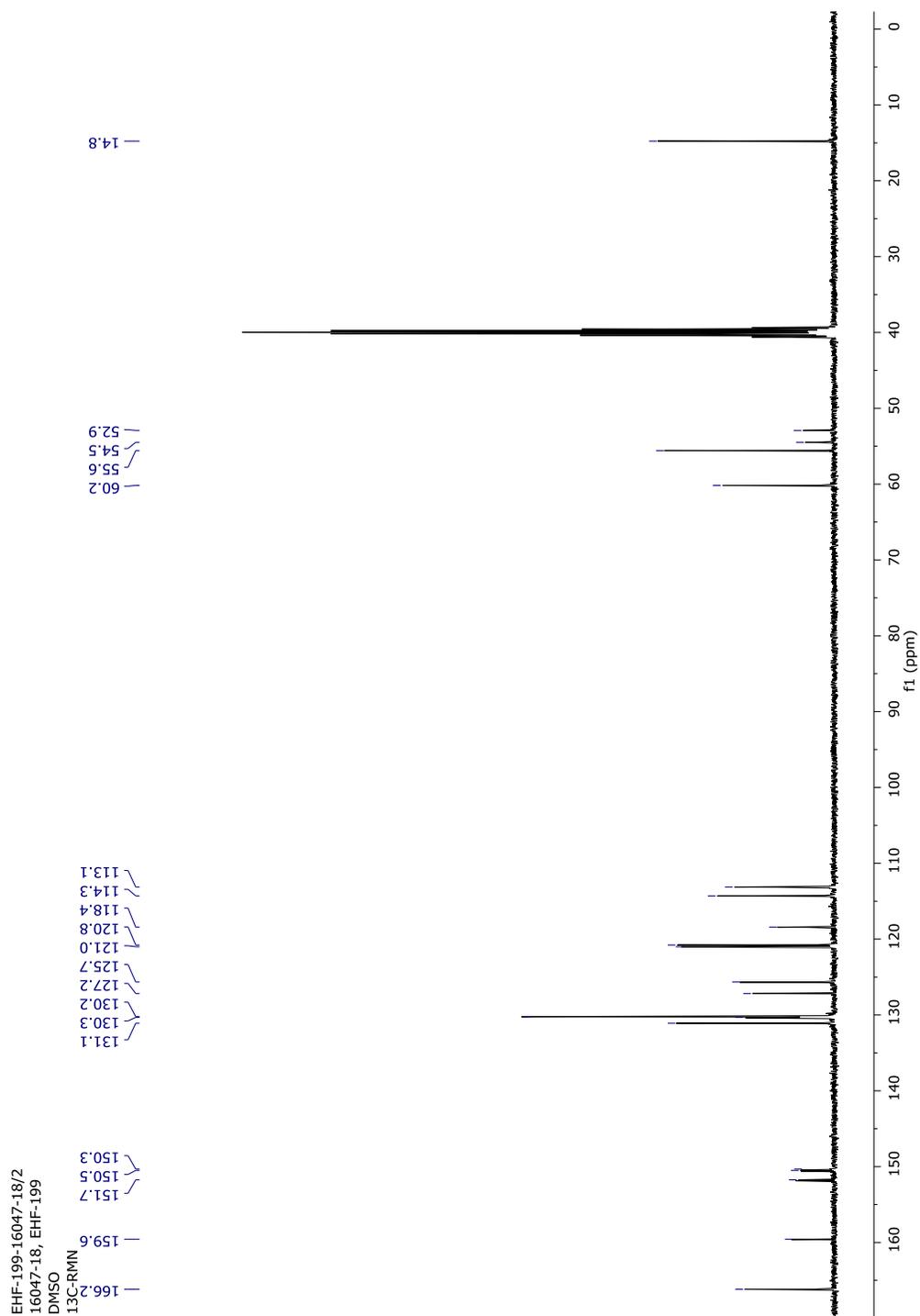


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 6.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 113.1, 114.3, 118.4, 120.8, 121.0, 125.7, 127.2, 130.2, 130.3, 131.1, 150.3, 150.5, 151.7 y 159.6 ppm. Finalmente, en 166.2 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo del éster.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 43, en el cual se observa una señal doble a 16.08 ppm (d, $J = 24.2$ Hz).

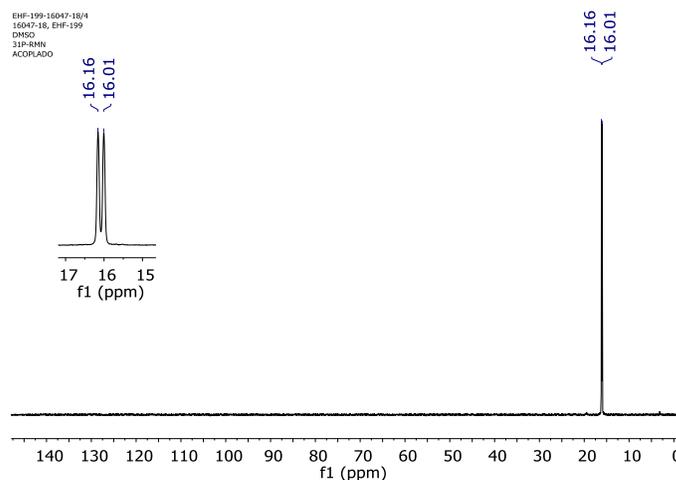


Figura 43. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **6**.

▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI $^+$) m/z , valor calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{NO}_6\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 518.1654, encontrado 518.1636.

5.1.4. α -AMINOFOSFONATO 7 (ÉSTER DE BENZALDEHÍDO)

En la Figura 46 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato 7

5.1.4.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 7

4-(((difenoxyfosforil)(fenil)metil)amino) benzoato de etilo. Benzaldehído (0.50 g, 1 eq), 4-aminobenzoato de etilo (0.78 g, 1 eq) y difenilfosfita (1.66 g, 1.5 eq) fueron disueltos en etanol (3 mL). La mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 80°C por 20 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

Para la purificación del compuesto 7, el crudo de reacción fue filtrado y lavado con etanol. Se corrió una TLC comparando el sólido obtenido con las materias primas, obteniendo una mancha diferente a éstas últimas. El producto obtenido posee un $R_f=0.42$ (hexano: acetato de etilo 7:3), el sólido de color blanco posee un PF de 142-143°C.

El α -aminofosfonato 7 posee una masa molecular de 395.39 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 1712.60 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 92% de rendimiento químico.

5.1.4.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 7

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 44.

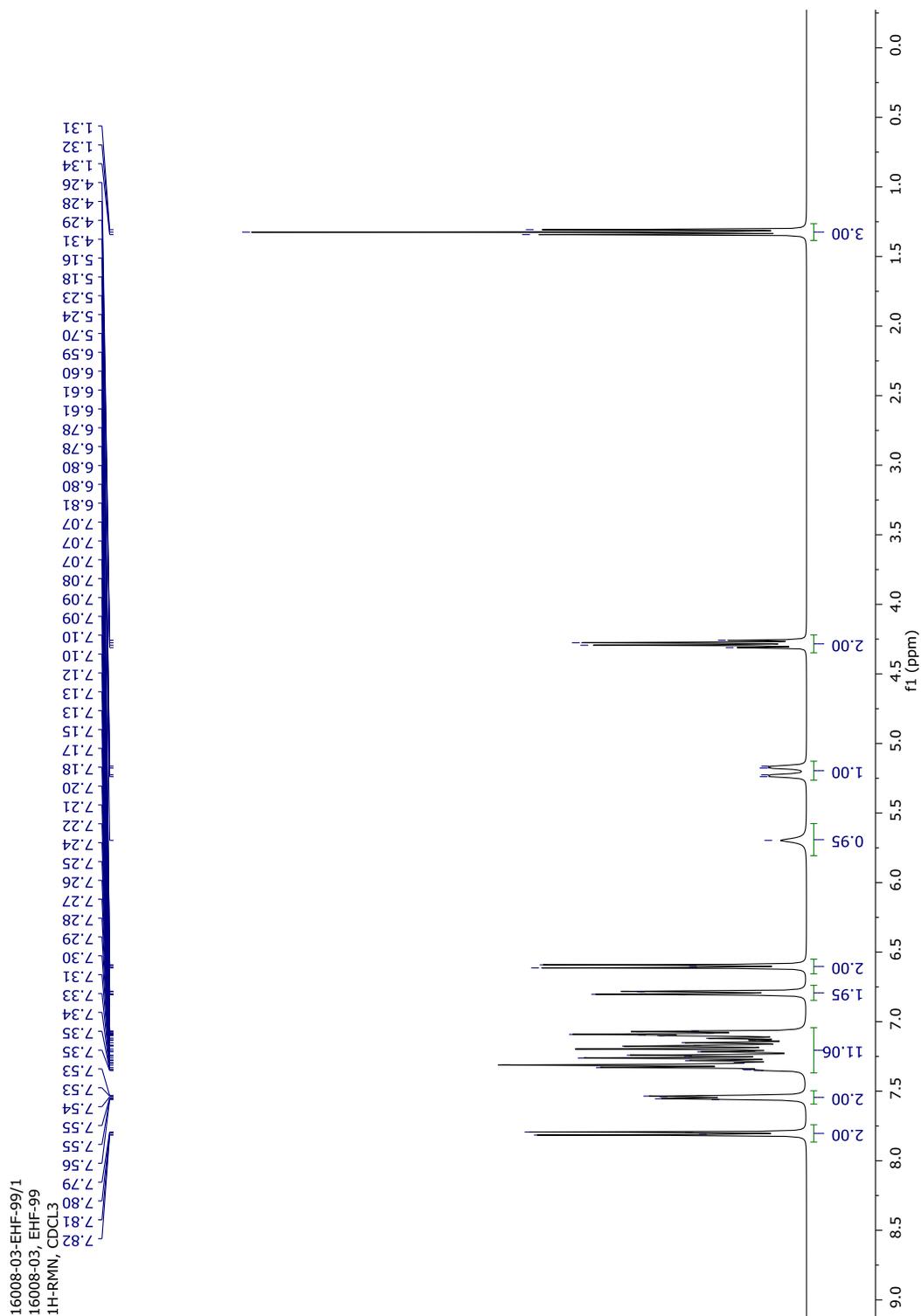


Figura 44. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 7.

A un desplazamiento químico de 1.32 ppm (*a*) aparece una señal triplete (t, $J = 7.1$ Hz) que integra para 3 H y corresponde a los protones del metilo del éster.

En 4.29 ppm (*b*) se observa un cuarteto (c, $J = 7.1$ Hz), que integra para 2 H, los protones del metileno del éster.

En 5.20 ppm (*c*) se observa una señal doble de doble (dd, $J = 24.7, 5.2$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al Carbono α del α -aminofosfonato.

A un desplazamiento químico de 5.70 ppm (*d*) aparece un singulete ancho, que integra para 1 H, el protón unido al N del amino.

En 6.60 ppm (*e*) se observa una señal doble (d, $J = 8.8$ Hz), que integra para 2 H, y corresponde a señal característica de los protones *meta* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

Posteriormente en 6.71 – 7.64 ppm (*f*) aparecen los multiplete que integran para 15 H y corresponde a los protones aromáticos del fenilo y de la difenilfosfita.

Finalmente, en 7.80 ppm (*g*) se observa una señal doble (d, $J = 8.7$ Hz), que integra para 2 H, señal característica que corresponde a los protones *orto* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

En la se Figura 45 presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

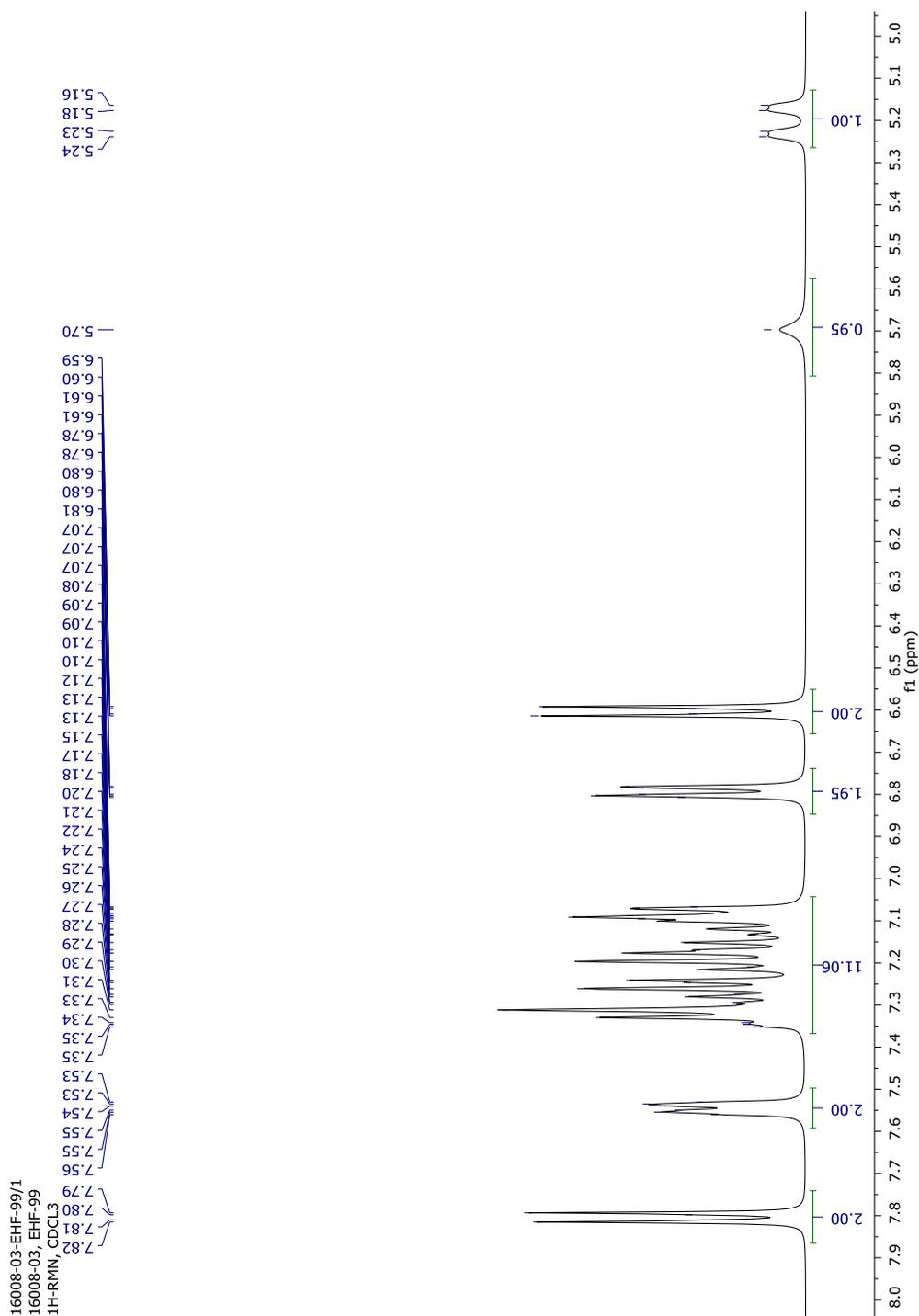


Figura 45. Ampliación del espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) del α-aminofosfonato 7.

En la Figura 46 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

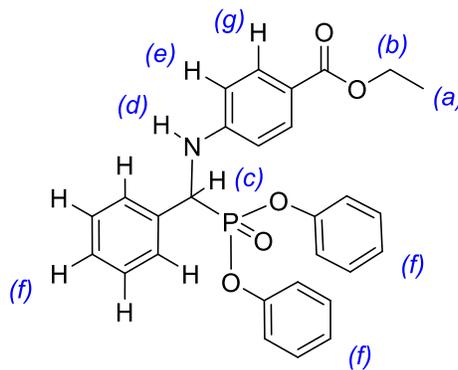
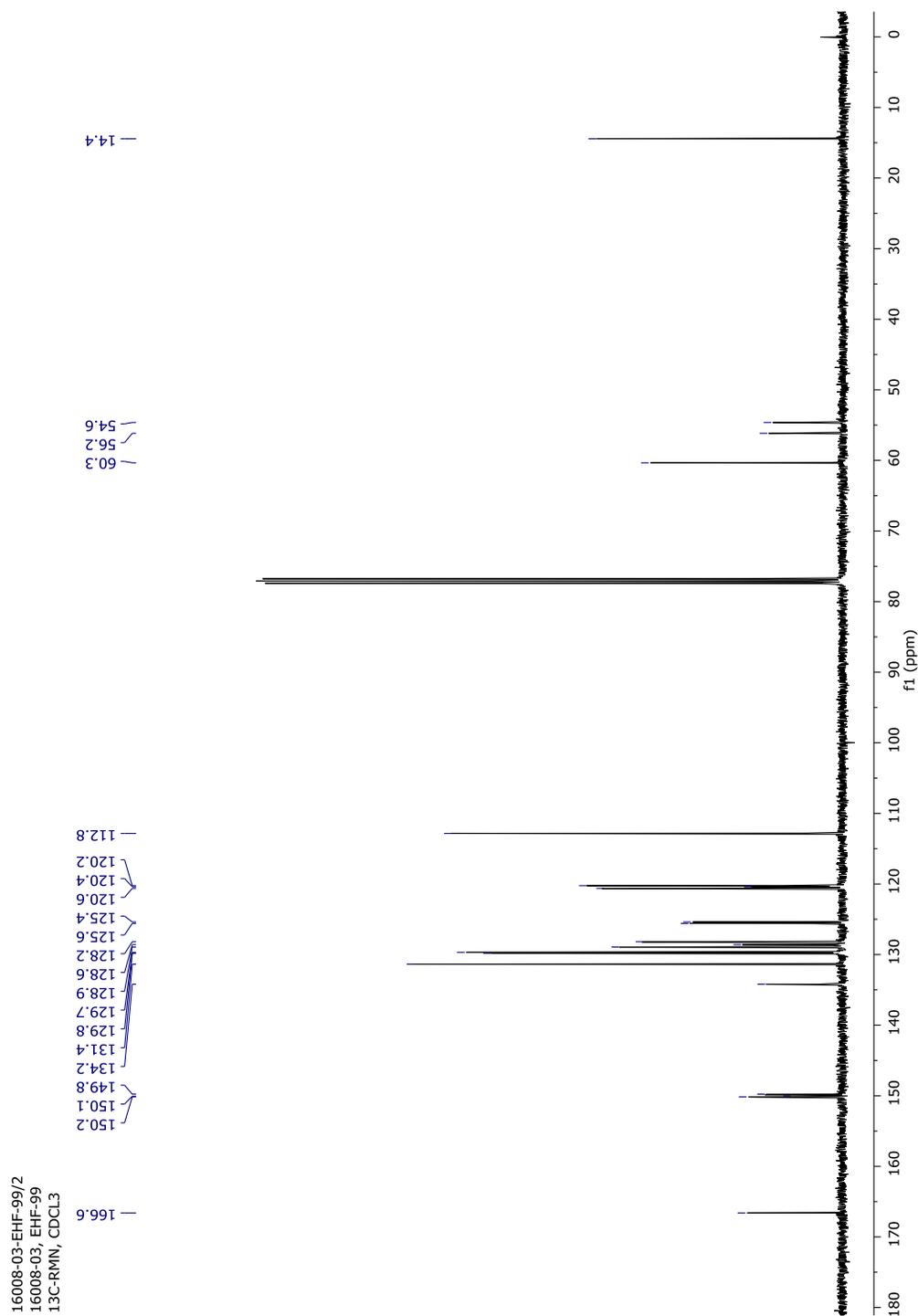


Figura 46. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **7**.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 47.

A un desplazamiento químico de 14.4 y 60.3 ppm, se observan las señales correspondientes a los C alifáticos del éster (CH_3 y CH_2 respectivamente). Entre estas dos señales, se encuentra la señal que indica la presencia del enlace C-P, la cual corresponde al doblete ubicado en 55.4 ppm (d, $J = 154.5$ Hz) con una constante de acoplamiento característica que evidencia que la reacción de Kabachnik-Fields se llevó a cabo.

**Figura 47.** Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 7.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 112.8, 120.2, 120.4, 120.6, 125.4, 125.6, 128.2, 128.6, 128.9, 129.7, 129.8, 131.4, 134.2, 149.8, 150.1 y 150.2 ppm. Finalmente, en 166.6 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo del éster.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 48, en el cual se observa una señal doble a 14.58 (d, $J = 24.3$ Hz).

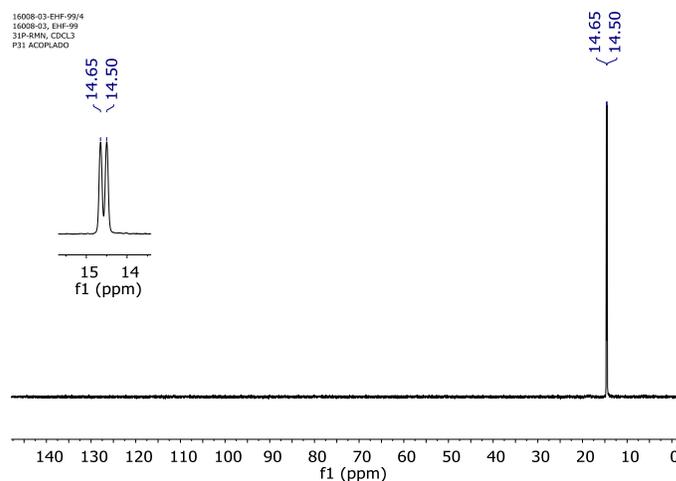


Figura 48. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato **7**.

▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI^+) m/z , valor calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 488.1549, encontrado 488.1553.

5.1.5. α -AMINOFOSFONATO **8** (ÉSTER DE 4-(DIFENILAMINO) BENZALDEHÍDO)

En la Figura 51 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **8**.

5.1.5.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO **8**

4-(((difenoxifosforil)(4-(difenilamino)fenil)metil)amino)benzoato de etilo. 4-(Difenil-amino)benzaldehído (0.50 g, 1 eq), 4-aminobenzoato de etilo (0.30 g, 1 eq) y difenilfosfita (0.64 g, 1.5 eq) fueron disueltos en etanol (3 mL). La mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 80°C por 20 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

El crudo de reacción fue adsorbido en sílica gel, el solvente fue evaporado y la purificación fue realizada por cromatografía en columna con sílica gel; el sistema de disolventes hexano: acetato de etilo (7:3) presentó la mejor separación del compuesto **8**. Se identificó la mancha del producto, se juntaron las fracciones en las cuales se tuvo el compuesto puro con el mismo $R_f = 0.50$ (7:3 hexano-acetato de etilo), se concentraron las fracciones al eliminar el solvente mediante la rotaevaporación y finalmente se obtuvo un sólido de color café con un PF de 144-146°C.

El α -aminofosfonato **8** posee una masa molecular de 654.69 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 699.70 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 58% de rendimiento químico.

5.1.5.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO **8**

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 49.

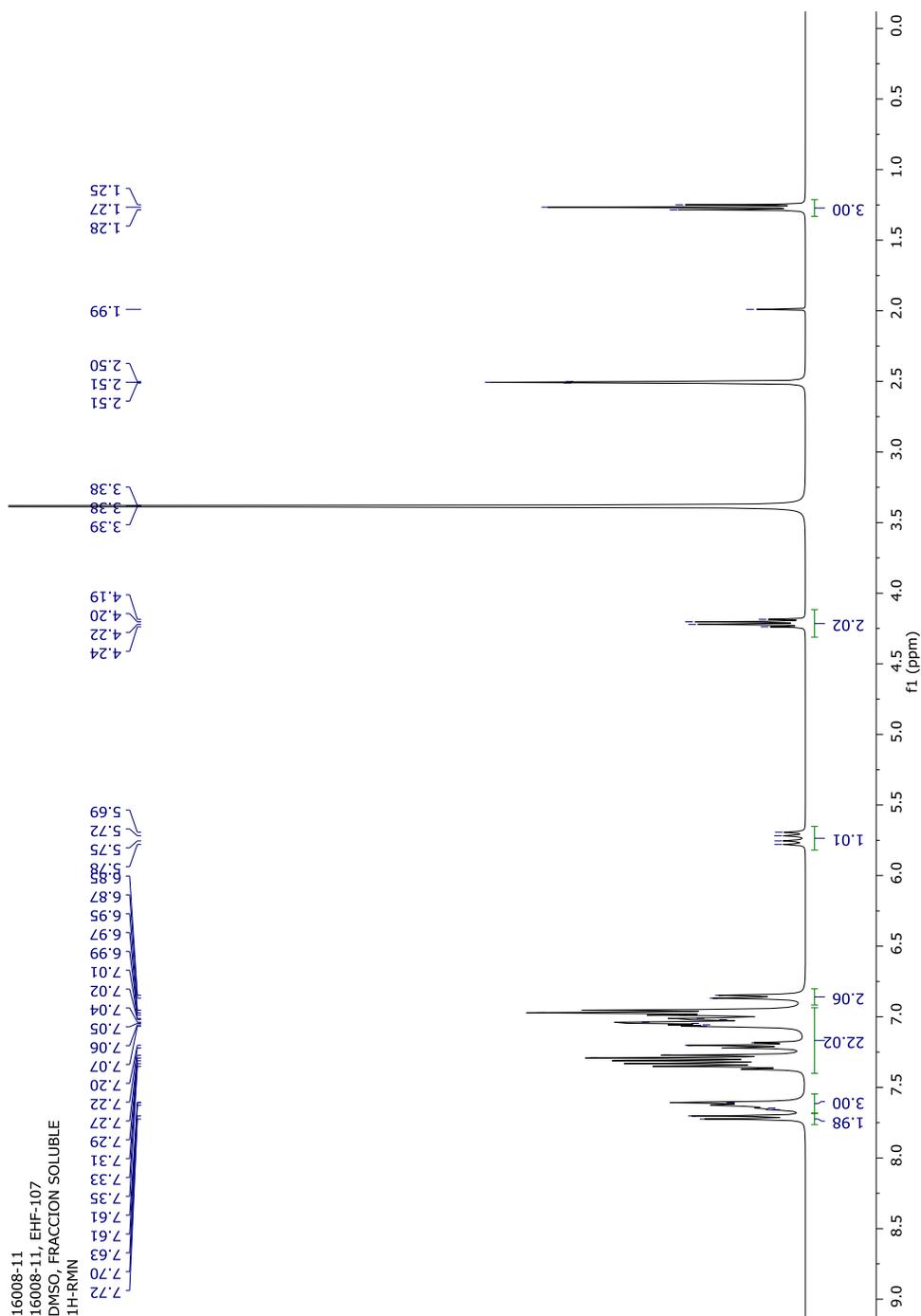


Figura 49. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **8**.

A un desplazamiento químico de 1.27 ppm (*a*) aparece una señal triplete (t, $J = 7.1$ Hz) que integra para 3 H y corresponde a los protones del metilo del éster. En 4.21 ppm (*b*) se observa un cuarteto

(c, $J = 7.1$ Hz), que integra para 2 H, los protones del metileno del éster.

En 5.74 ppm (c) se observa una señal doble de doble (dd, $J = 24.4, 10.1$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al Carbono α del α -aminofosfonato.

En 6.86 ppm (d) se observa una señal doble (d, $J = 8.2$ Hz), que integra para 2 H, y corresponde a señal característica de los protones *meta* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

Posteriormente en 6.92 – 7.65 ppm (e) aparecen los multipletes que integran para 24 H y corresponde a los protones aromáticos del trifenilamino y de la difenilfosfita. En la Figura 50 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

En 7.65 ppm (f) se encuentra una señal doble (d, $J = 4.6$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del amino. Finalmente, en 7.71 ppm (g) se observa una señal doble (d, $J = 8.8$ Hz), que integra para 2 H y corresponde a la señal característica de los protones *orto* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

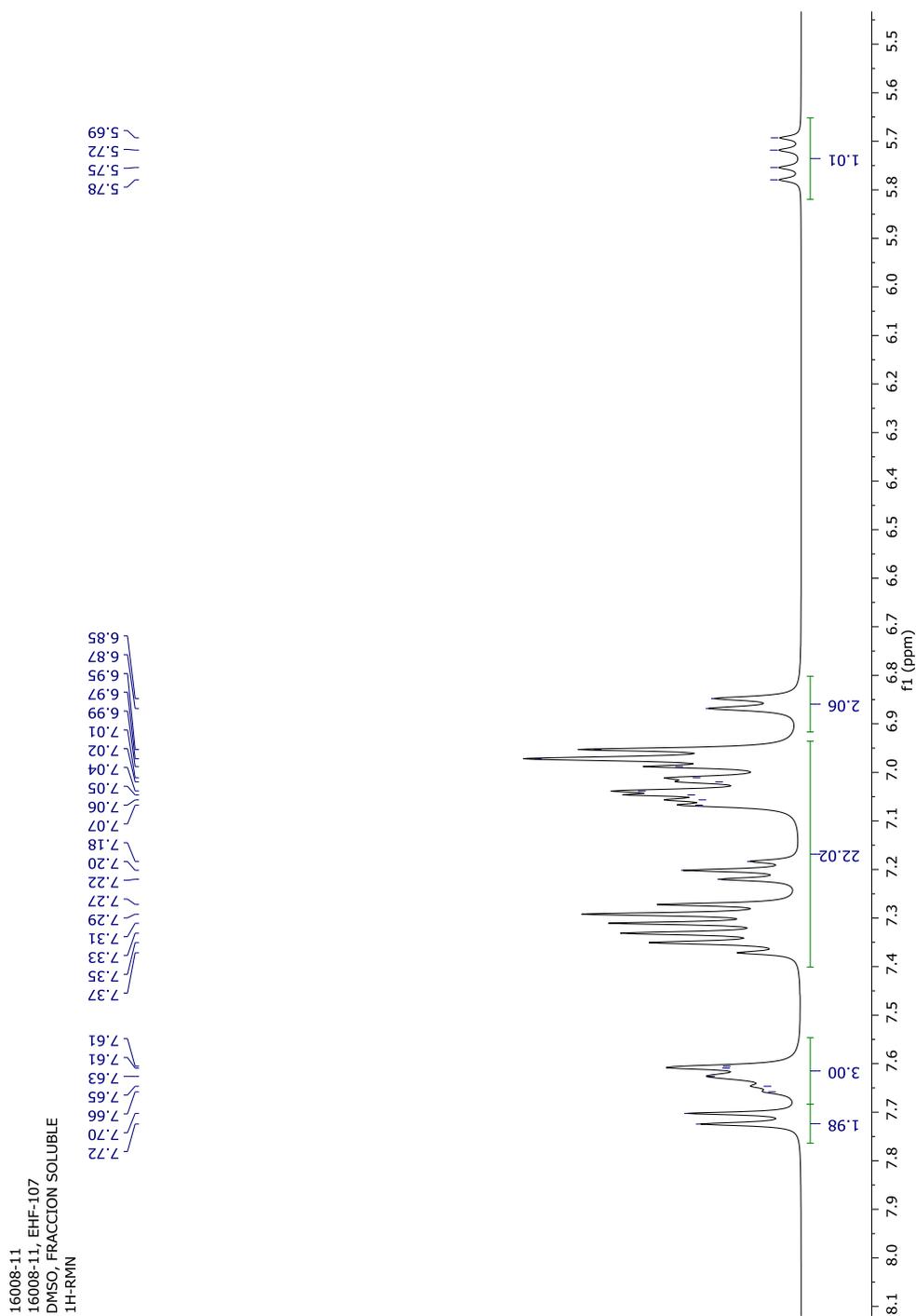


Figura 50. Ampliación del espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **8**.

En la Figura 51 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

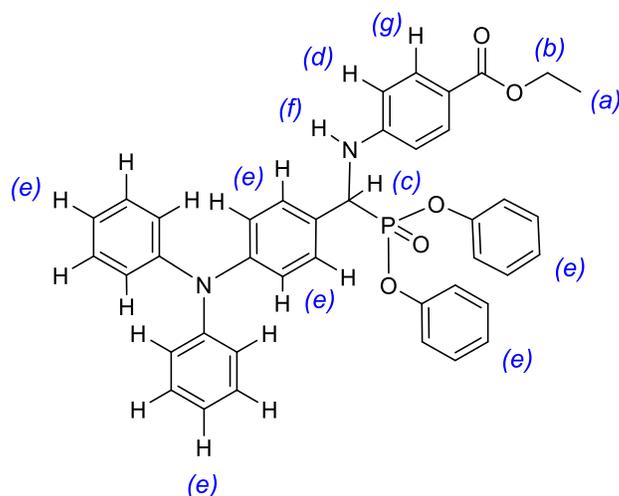


Figura 51. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **8**.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 52.

A un desplazamiento químico de 14.8 y 60.2 ppm, se observan las señales correspondientes a los C alifáticos del éster (CH_3 y CH_2 respectivamente). Entre estas dos señales, se encuentra la señal que indica la presencia del enlace C-P, la cual corresponde al doblete ubicado en 53.8 ppm (d, $J = 156.0$ Hz) con una constante de acoplamiento característica que evidencia que la reacción de Kabachnik-Fields se llevó a cabo.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 113.0, 118.4, 120.6, 121.0, 123.6, 124.4, 125.8, 129.2, 130.0, 130.2, 130.3, 131.2, 147.5, 147.7, 150.4, 150.5 y 151.7 ppm.

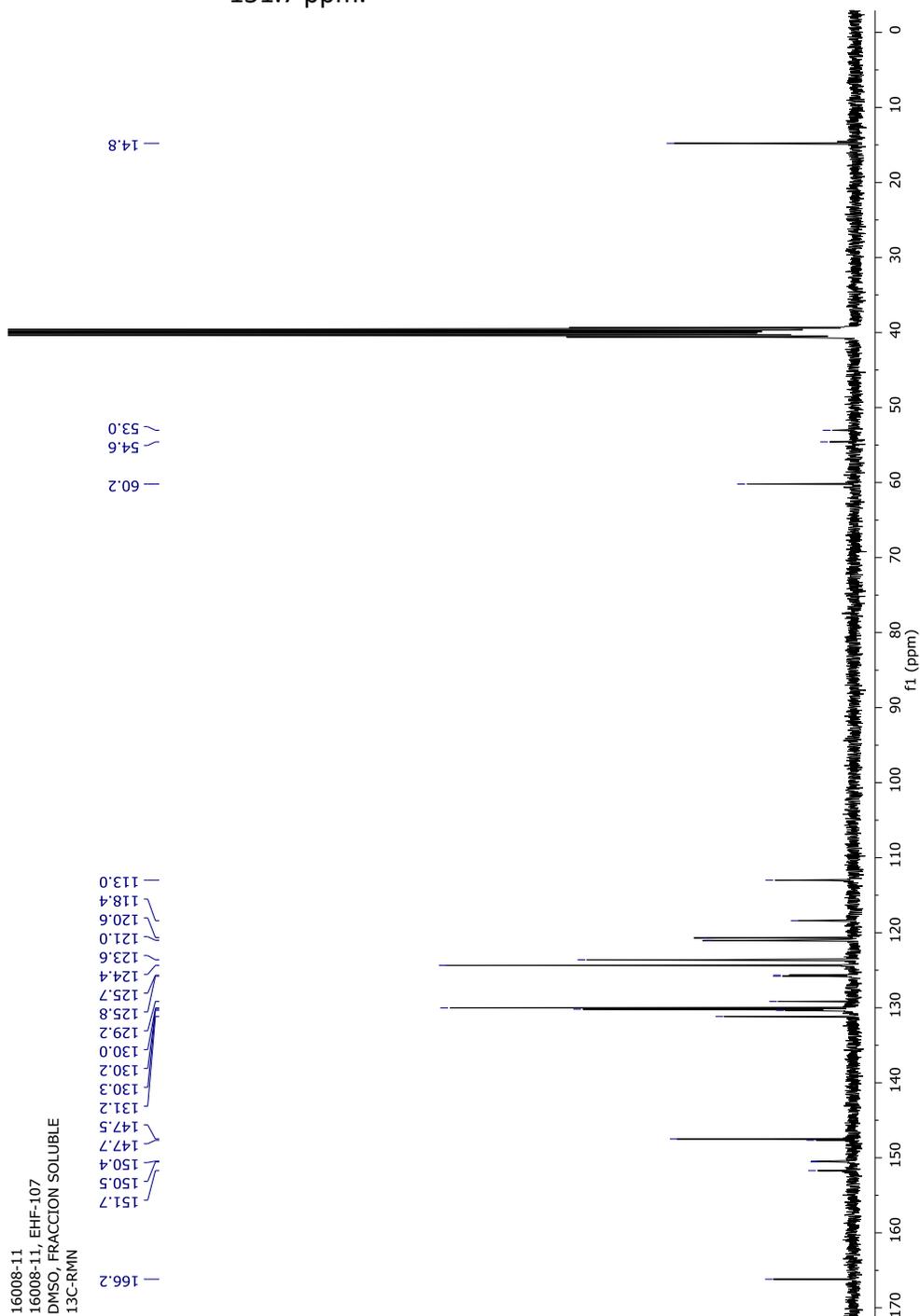


Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 8.

Finalmente, en 166.2 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo del éster.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 53, en el cual se observa una señal doble 15.92 (d, $J = 24.5$ Hz).

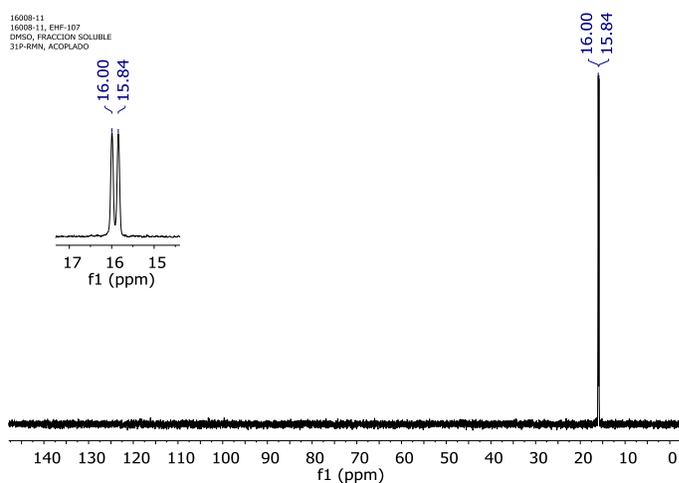


Figura 53. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **8**.

▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI $^+$) m/z , valor calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ $[\text{M} - \text{H}]^+$ 653.2205, encontrado 653.2128.

5.1.6. α -AMINOFOSFONATO **9** (ÉSTER DE 4-(4-MORFOLINIL) BENZALDEHÍDO)

En la Figura 56 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **9**.

5.1.6.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO **9**

4-(((difenoxifosforil)(4-morfolinofenil)metil)amino) benzoato de etilo.

4-(4-Morfolinil)benzaldehído (0.50 g, 1 eq), 4-aminobenzoato de etilo (0.43 g, 1 eq) y difenilfosfita (0.92, 1.5 eq) fueron disueltos en etanol (3 mL). La mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 30 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

El crudo de reacción fue adsorbido en sílica gel, el solvente fue evaporado y la purificación fue realizada por cromatografía en columna con sílica gel; el sistema de disolventes hexano: acetato de etilo (7:3) presentó la mejor separación del compuesto **9**. Se identificó la mancha del producto, se juntaron las fracciones en las cuales se tuvo el compuesto puro con el mismo $R_f = 0.59$ (hexano: acetato de etilo (4:6), se concentraron las fracciones al eliminar el solvente mediante la rotaevaporación y finalmente se obtuvo un sólido de color café oscuro con un PF de 98-100°C.

El α -aminofosfonato **9** posee una masa molecular de 572.59 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 885.7 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 59% de rendimiento químico.

5.1.6.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO **9**

- **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 54.

A un desplazamiento químico de 1.34 ppm (*a*) aparece una señal triplete (t, $J = 7.1$ Hz) que integra para 3 H y corresponde a los protones del metilo del éster.

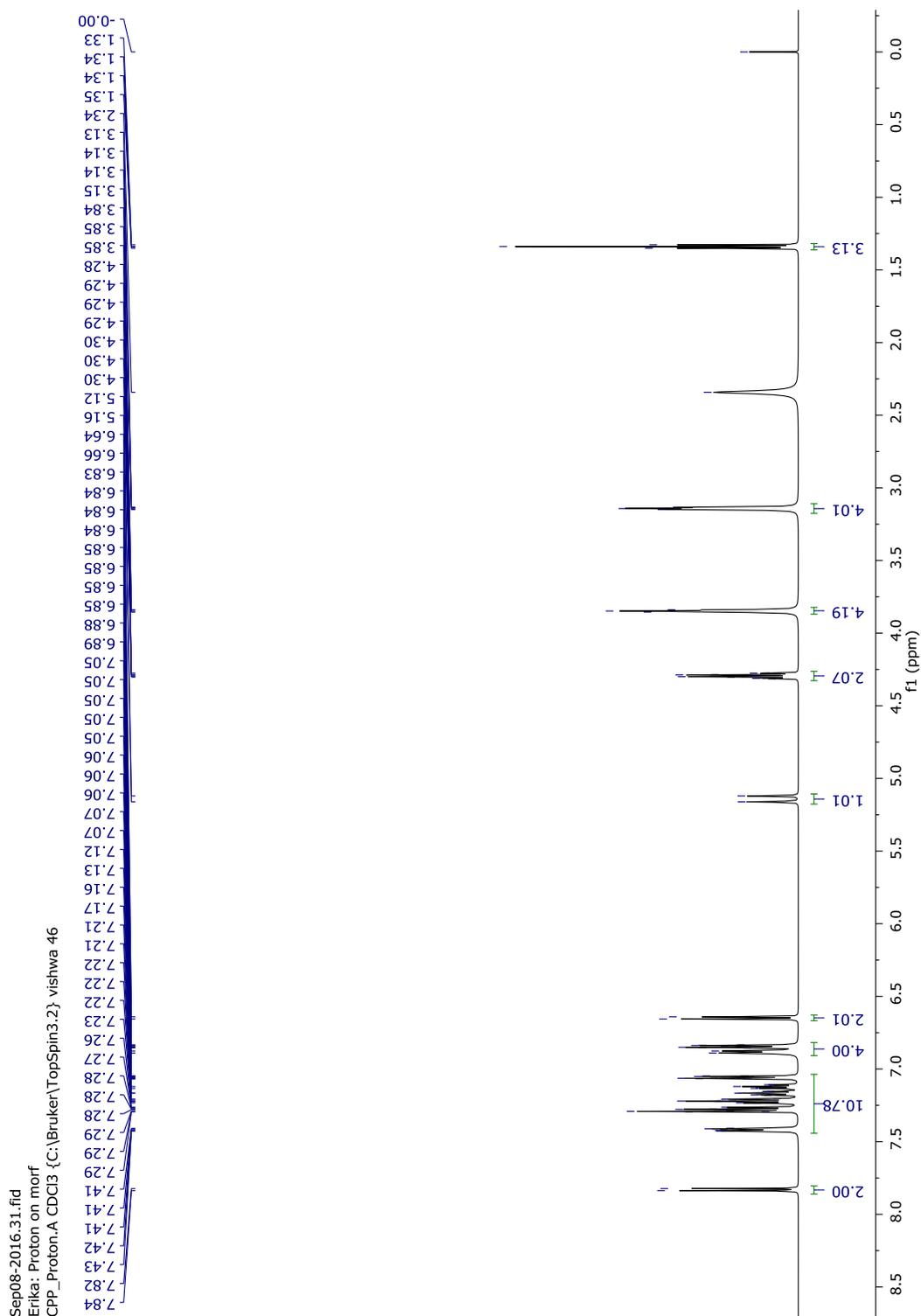


Figura 54. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 9.

En 3.14 ppm (*b*) se observa un doble de doble (dd, $J = 6.1, 3.1$ Hz), que integra para 4 H, los protones alifáticos de los dos metilenos enlazados al N del morfolinil. En 3.85 ppm (*c*) se observa una señal triplete (t, $J = 4.8$ Hz), que integra para 4 H, los protones alifáticos de los dos metilenos enlazados al O del morfolinil.

En 4.29 ppm (*d*) se observa un cuarteto (c, $J = 7.1$ Hz), que integra para 2 H, los protones del metileno del éster. En 5.14 ppm (*e*) se observa una señal doble (d, $J = 24.2$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al Carbono α del α -aminofosfonato.

A un desplazamiento químico de 6.65 ppm (*f*) aparece un doble (d, $J = 8.8$ Hz), que integra para 2 H, y corresponde a señal característica de los protones *meta* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

En 6.83 – 6.90 ppm (*g*) se observa una señal multiplete que integra para 4 H, y corresponde a señal de los protones aromáticos del fenilo enlazado con el morfolinil.

Posteriormente en 7.03 – 7.48 ppm (*f*) aparecen los multipletes que integran para 10 H y corresponde a los protones aromáticos de la difenilfosfita.

En la Figura 55 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

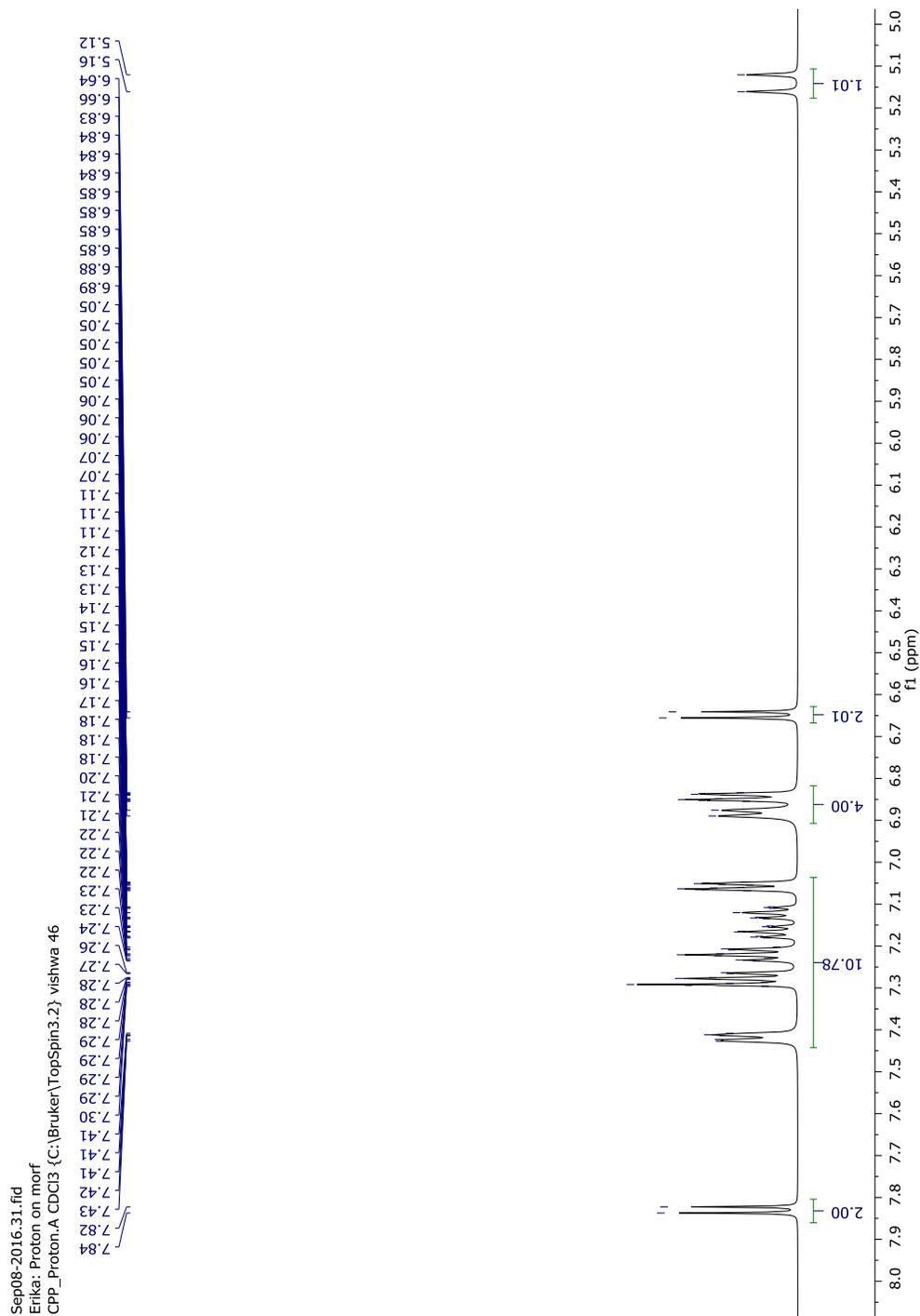


Figura 55. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato **9**.

Finalmente, en 7.83 ppm (*g*) se observa una señal doble (*d*, $J = 8.8$ Hz), que integra para 2 H, señal característica que corresponde a los protones *orto* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

En la Figura 56 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

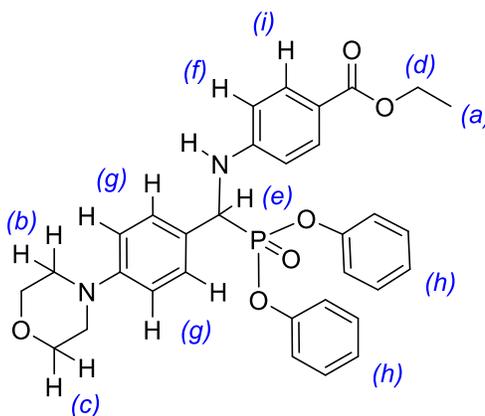


Figura 56. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **9**.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 57.

A un desplazamiento químico de 14.3 ppm, se observa la señal correspondiente al C del metilo del éster. En 47.2 y 49.0 ppm, se

observan las señal de los C alifáticos del morfolinil, que están enlazados al N.

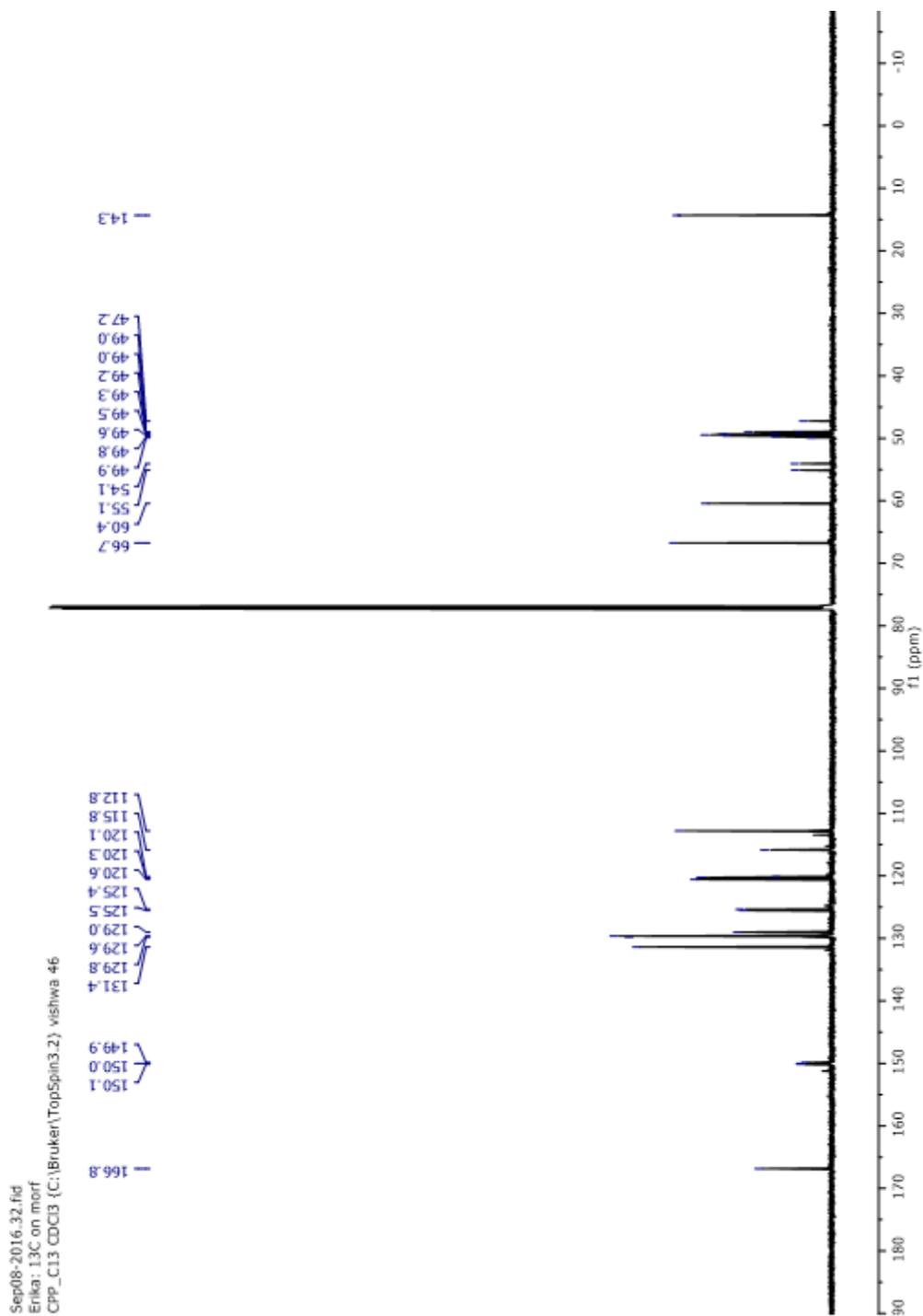


Figura 57. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3 , MeOD) del α -aminofosfonato 9.

En 54.6 ppm se encuentra la señal doblete (d, $J = 156.4$ Hz) que indica la presencia del enlace C-P, con una constante de acoplamiento característica que evidencia que la reacción de Kabachnik-Fields se llevó a cabo.

En 60.4 ppm, se observa la señal correspondiente al C del metileno del éster. En 66.7 ppm, se observa la señal de los C alifáticos del morfolinil, que están enlazados al O.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 112.8, 115.8, 120.1, 120.3, 120.6, 125.4, 125.5, 129.0, 129.6, 129.8, 131.4, 149.9, 150.0 y 150.1 ppm.

Finalmente, en 166.8 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo del éster.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 58, en el cual se observa una señal doble a 14.96 ppm (d, $J = 23.9$ Hz).

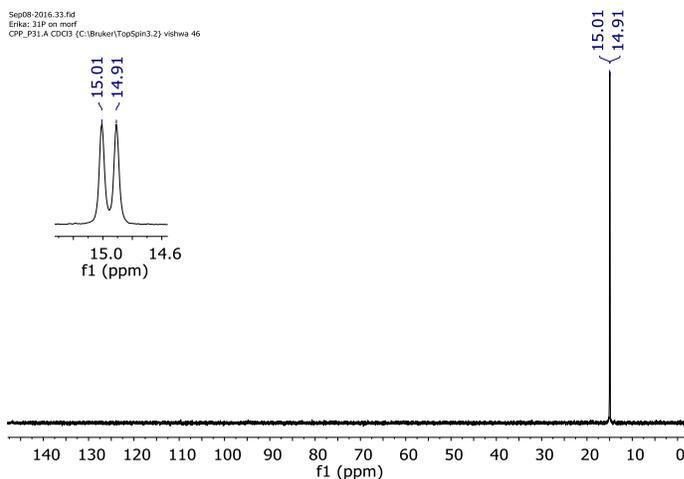


Figura 58. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato **9**.

▪ **ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN**

En el análisis de HRMS (ESI^+) m/z , valor calculado para

$\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 573.2076, encontrado 573.1992.

5.1.7. α -AMINOFOSFONATO 10 (ÉSTER DE 1-METIL-1-H-PIRAZOL-4-CARBOXALDEHÍDO)

En la Figura 61 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **10**.

5.1.7.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 10

4-(((difenoxifosforil)(1-metil-1H-pirazol-4-il)metil)amino)benzoato de etilo. 1-Metil-1H-pirazol-4-carboxaldehído (0.20 g, 1 eq), 4-aminobenzoato de etilo (0.30 g, 1 eq) y difenilfosfita (0.64 g, 1.5 eq) fueron disueltos en etanol (3 mL). La mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 30 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

El crudo de reacción fue adsorbido en sílica gel, el solvente fue evaporado y la purificación fue realizada por cromatografía en columna con sílica gel; se empleó un gradiente de hexano: acetato de etilo (1:1 a 1:9) ya que este presentó la mejor separación del compuesto **10**. Se identificó la mancha del producto, se juntaron las fracciones en las cuales se tuvo el compuesto puro con el mismo $R_f = 0.45$ (hexano: acetato de etilo 3:7), se concentraron las fracciones al eliminar el solvente mediante la rotaevaporación y finalmente se obtuvo un sólido de color amarillo pálido con un PF de 122-124°C.

El α -aminofosfonato **10** posee una masa molecular de 491.48 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 887.6 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 97% de rendimiento químico.

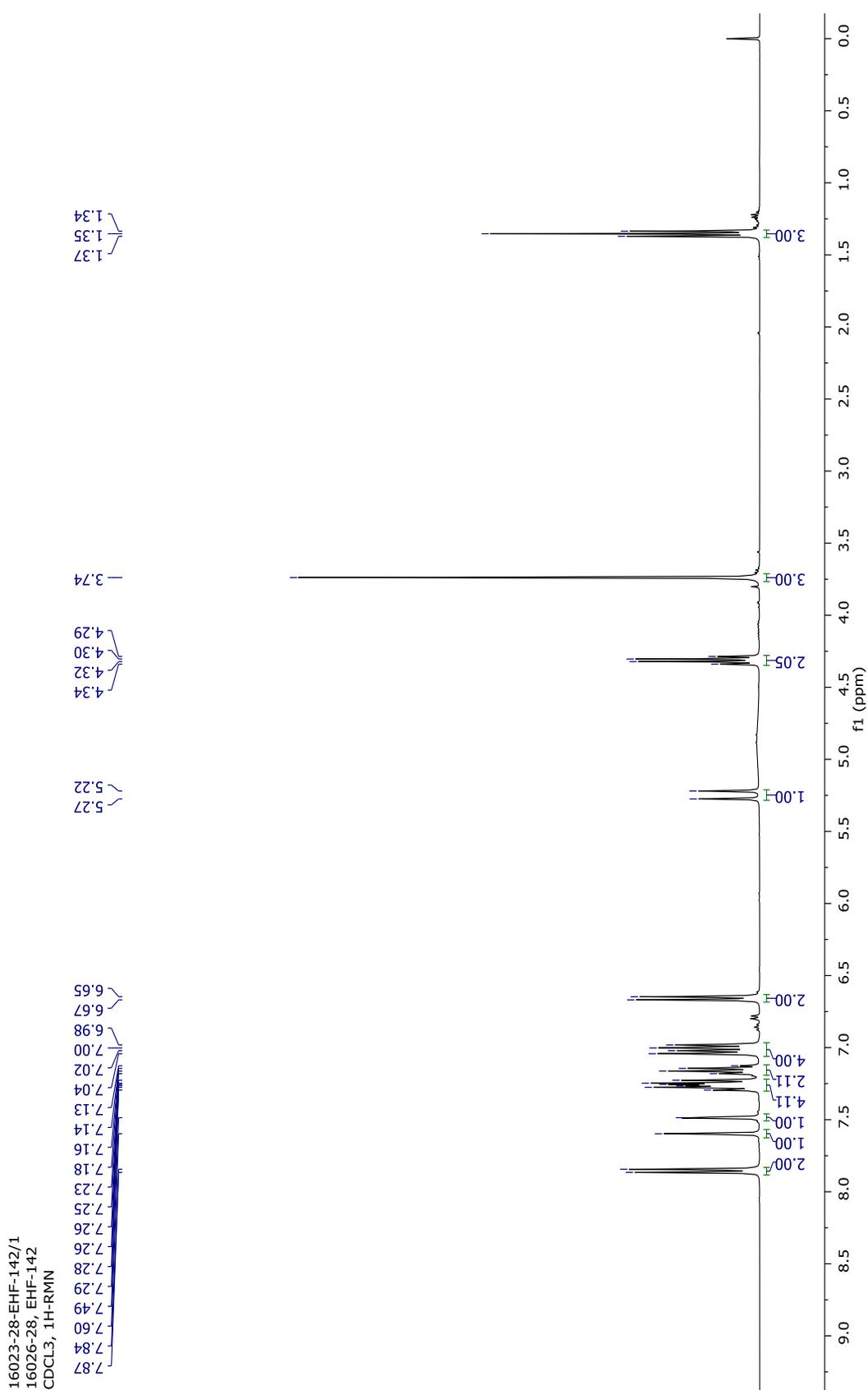
5.1.7.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO **10**

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 59.

A un desplazamiento químico de 1.35 ppm (*a*) aparece una señal triplete (t, $J = 7.1$ Hz) que integra para 3 H y corresponde a los protones del metilo del éster.

En 3.74 ppm (*b*) se observa una señal singulete que integra para 3 H y corresponde al metilo enlazado al N del pirazol.

Figura 59. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) del α-aminofosfonato 10.

A 4.31 ppm (*c*) se encuentra un cuarteto (c , $J = 7.1$ Hz), que integra para 2 H, los protones del metileno del éster. A un desplazamiento químico de 5.25 ppm (*d*) aparece una señal doble (d , $J = 22.1$ Hz), que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al Carbono α del α -aminofosfonato.

En 6.66 ppm (*e*) aparece un doble (d , $J = 8.8$ Hz), que integra para 2 H, y corresponde a señal característica de los protones *meta* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo. En 6.95 – 7.32 ppm (*f*) se observa una señal multiplete que integra para 10 H, y corresponde a señal de los protones aromáticos de la difenilfosfita.

Posteriormente en 7.49 ppm (*g*) aparecen una señal singulete que integran para 1 H y corresponde al protón aromático del pirazol enlazado al C contiguo al *N*-metilo. En 7.60 ppm (*h*) aparecen otra señal singulete que integran para 1 H y corresponde al protón aromático del pirazol enlazado al C que a su vez está enlazado por un doble enlace al N (C=N).

En la Figura 60 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

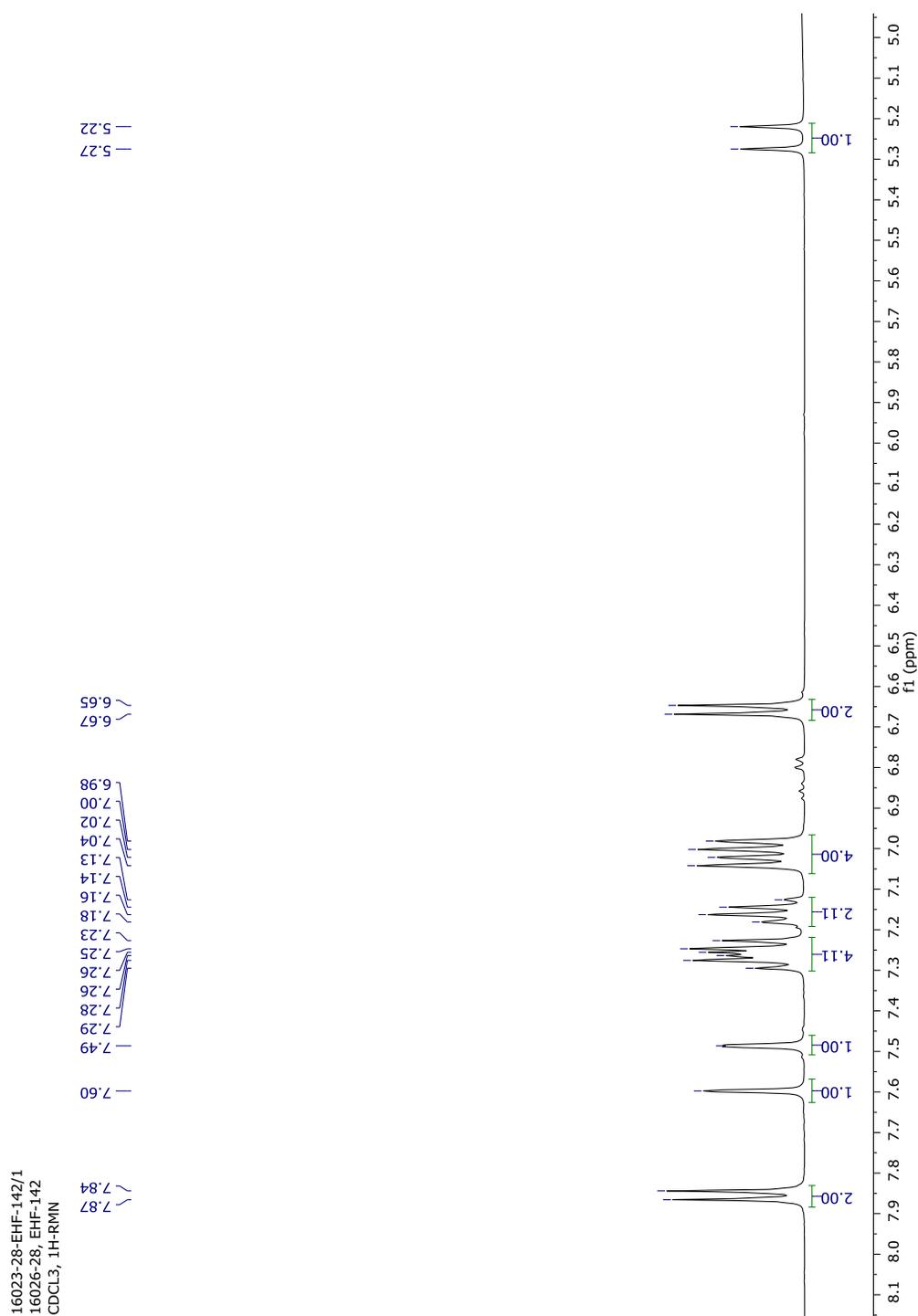


Figura 60. Ampliación del espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) del α-aminofosfonato **10**.

Finalmente, en 7.85 ppm (*i*) se observa una señal doble (d, $J = 8.7$ Hz), que integra para 2 H, señal característica que corresponde a los protones *orto* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

En la Figura 61 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

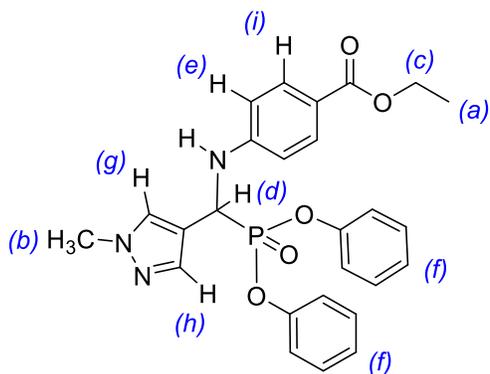


Figura 61. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **10**.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 62.

A un desplazamiento químico de 14.4 ppm, se observa la señal correspondiente al C del metilo del éster. En 39.1 ppm se observa la señal del C del *N*-metilo del pirazol. En 47.0 ppm se encuentra la señal doblete (d, $J = 163.0$ Hz) que indica la presencia del enlace C-P, con una constante de acoplamiento característica que evidencia que la reacción de Kabachnik-Fields se llevó a cabo. En 60.4 ppm, se observa la señal correspondiente al C del metileno del éster.

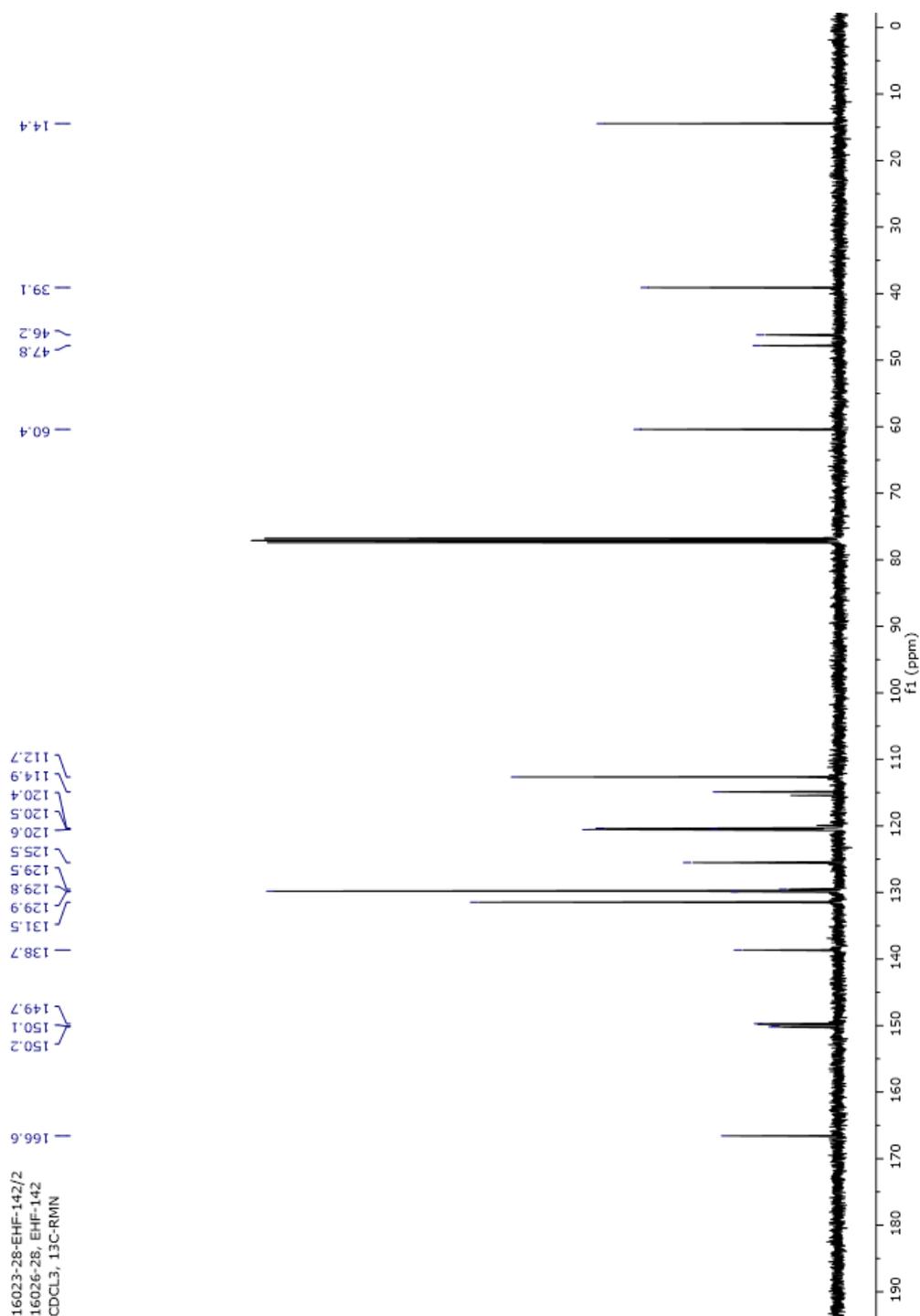


Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato 10.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 112.7, 114.9, 120.4, 120.5, 120.6, 125.5, 129.5, 129.8, 129.9, 131.5, 138.7, 149.7, 150.1 y 150.2 ppm.

Finalmente, en 166.6 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo del éster.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 63, en el cual se observa una señal doble a 14.46 ppm (d, $J = 21.9$ Hz).

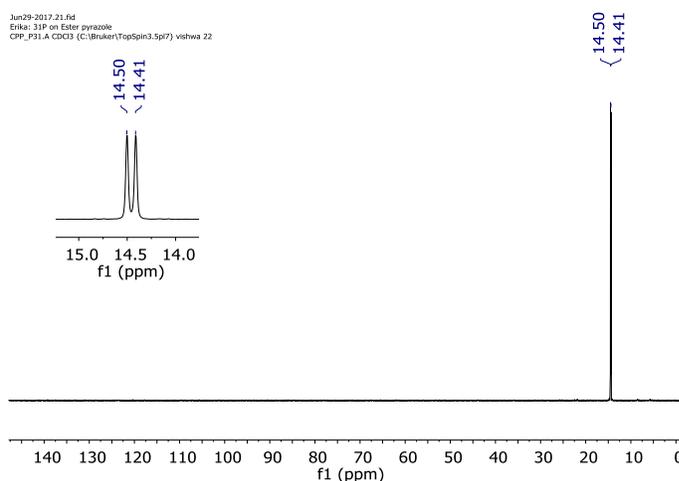


Figura 63. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato **10**.

▪ **ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN**

En el análisis de HRMS (ESI^+) m/z , valor calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 492.1610, encontrado 492.1612.

5.1.8. α -AMINOFOSFONATO **11** (ÉSTER DE ISOBUTIRALDEHÍDO)

En la Figura 66 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **11**.

5.1.8.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO **11**

4-((1-(difenoxfosforil)-2-metilpropil)amino)benzoato de etilo.

Isobutiraldehído (0.50 g, 1 eq), 4-aminobenzoato de etilo (1.14 g, 1 eq) y difenilfosfita (2.44, 1.5 eq) fueron disueltos en etanol (3 mL). La mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 40 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

El crudo de reacción fue adsorbido en sílica gel, el solvente fue evaporado y la purificación fue realizada por cromatografía en columna con sílica gel; el sistema hexano: acetato de etilo (7:3) presentó la mejor separación del compuesto **11**. Se identificó la mancha del producto, se juntaron las fracciones en las cuales se tuvo el compuesto puro con el mismo $R_f = 0.39$ (hexano: acetato de etilo (7:3), se concentraron las fracciones al eliminar el solvente mediante la rotaevaporación y finalmente se obtuvo un sólido de color blanco con un PF de 103-105°C.

El α -aminofosfonato **11** posee una masa molecular de 453.47 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 2319.50 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 74% de rendimiento químico.

5.1.8.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 11**▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 64.

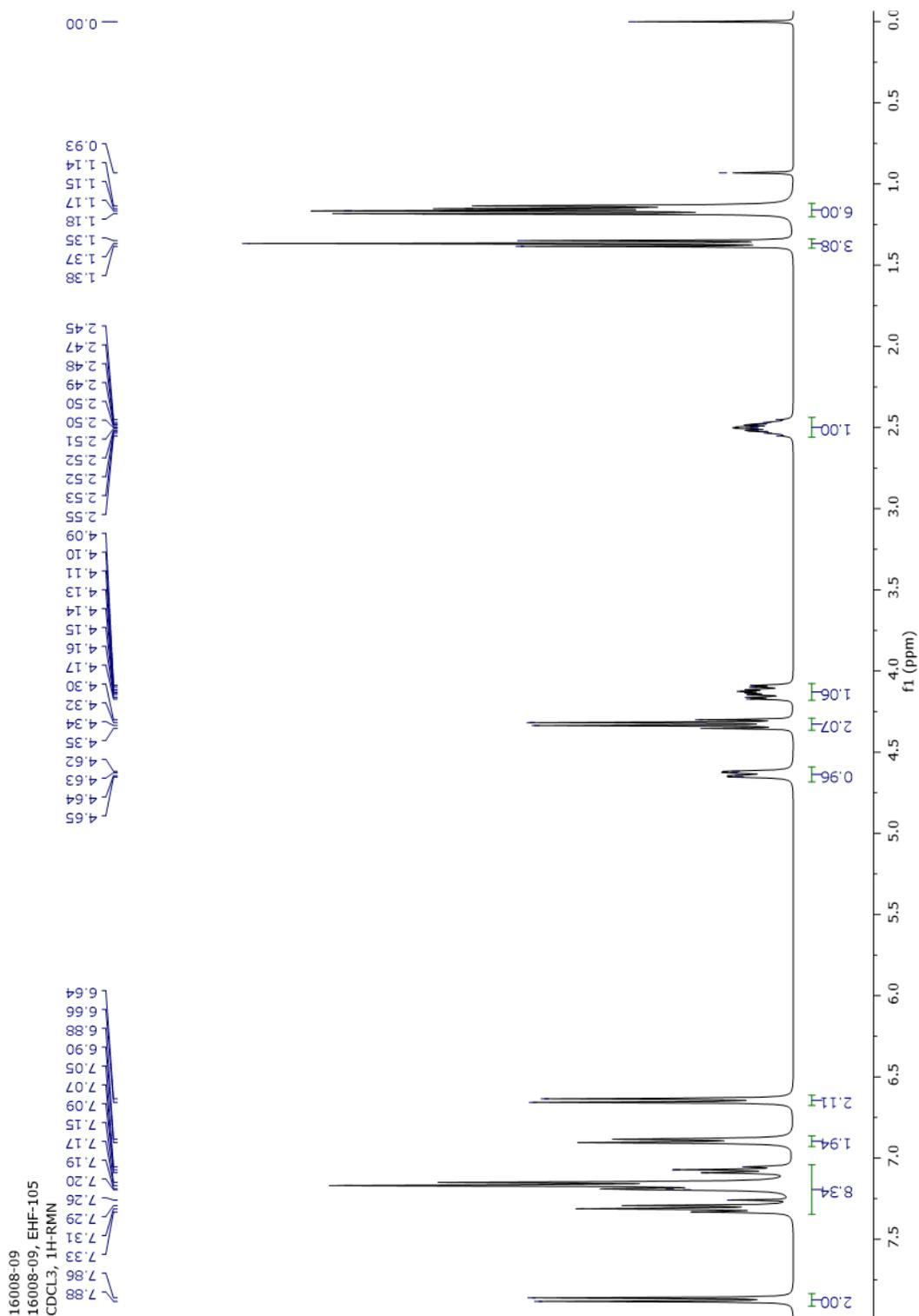


Figura 64. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) del α-aminofosfonato **11**.

A un desplazamiento químico de 1.16 ppm (*a*) aparece una señal doble de doble (dd, $J = 12.5, 6.8$ Hz) que integra para 6 H y

corresponde a los protones de los metilos del isopropilo. En 1.37 ppm (b) aparece una señal triplete (t, $J = 7.1$ Hz) que integra para 3 H y corresponde a los protones del metilo del éster.

En 2.44 - 2.56 ppm (c) se observa una señal multiplete que integra para 1 H y corresponde al CH del isopropilo contiguo al C α . En 4.13 ppm (d) se encuentra una señal doble de doble de doble (ddd, $J = 19.0, 10.7, 4.2$ Hz), que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al Carbono α del α -aminofosfonato.

En 4.33 ppm (e) aparece un cuarteto (c, $J = 7.1$ Hz), que integra para 2 H, los protones del metileno del éster. A un desplazamiento químico de 4.64 ppm (f) aparece una señal doble de doble (dd, $J = 3.5, 10.7$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al N. En 6.65 ppm (g) aparece un doble (d, $J = 8.7$ Hz), que integra para 2 H, y corresponde a señal característica de los protones *meta* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo. En 6.84 – 7.38 ppm (h) se observa una señal multiplete que integra para 10 H, y corresponde a señal de los protones aromáticos de la difenilfosfita.

Finalmente, en 7.87 ppm (i) se observa una señal doble (d, $J = 8.7$ Hz), que integra para 2 H, señal característica que corresponde a los protones *orto* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

En la Figura 65 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

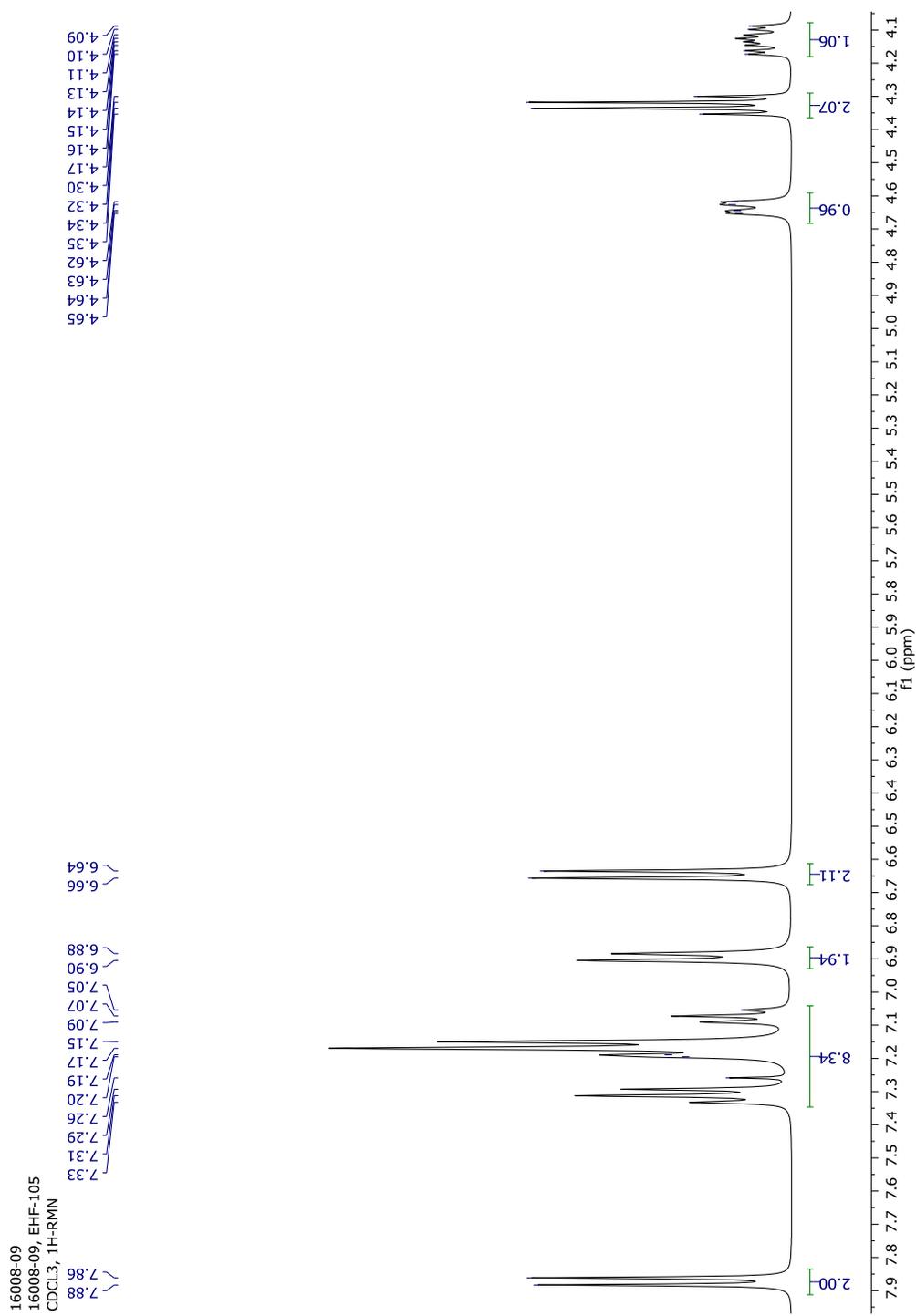


Figura 65. Ampliación del espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) del α-aminofosfonato **11**.

En la Figura 66 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

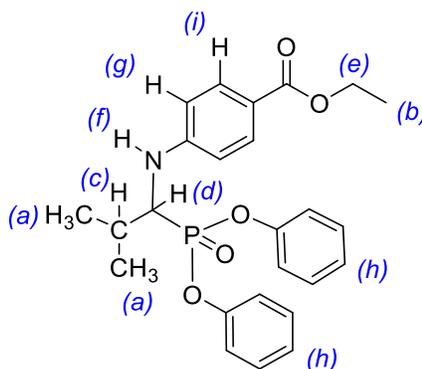


Figura 66. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **11**.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .

El espectro obtenido después del análisis de ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 67.

A un desplazamiento químico de 14.5 ppm, se observa la señal correspondiente al C del metilo del éster. En 17.9 y 20.7 ppm se observan las señales de los carbonos de los metilos del isopropilo. A 30.1 ppm aparece la señal del C del CH del isopropilo. En 55.6 ppm se encuentra la señal doblete (d, $J = 151.9$ Hz) que indica la presencia del enlace C-P, con una constante de acoplamiento característica que

evidencia que la reacción de Kabachnik-Fields se llevó a cabo. En 60.4 ppm, se observa la señal correspondiente al C del metileno del éster.

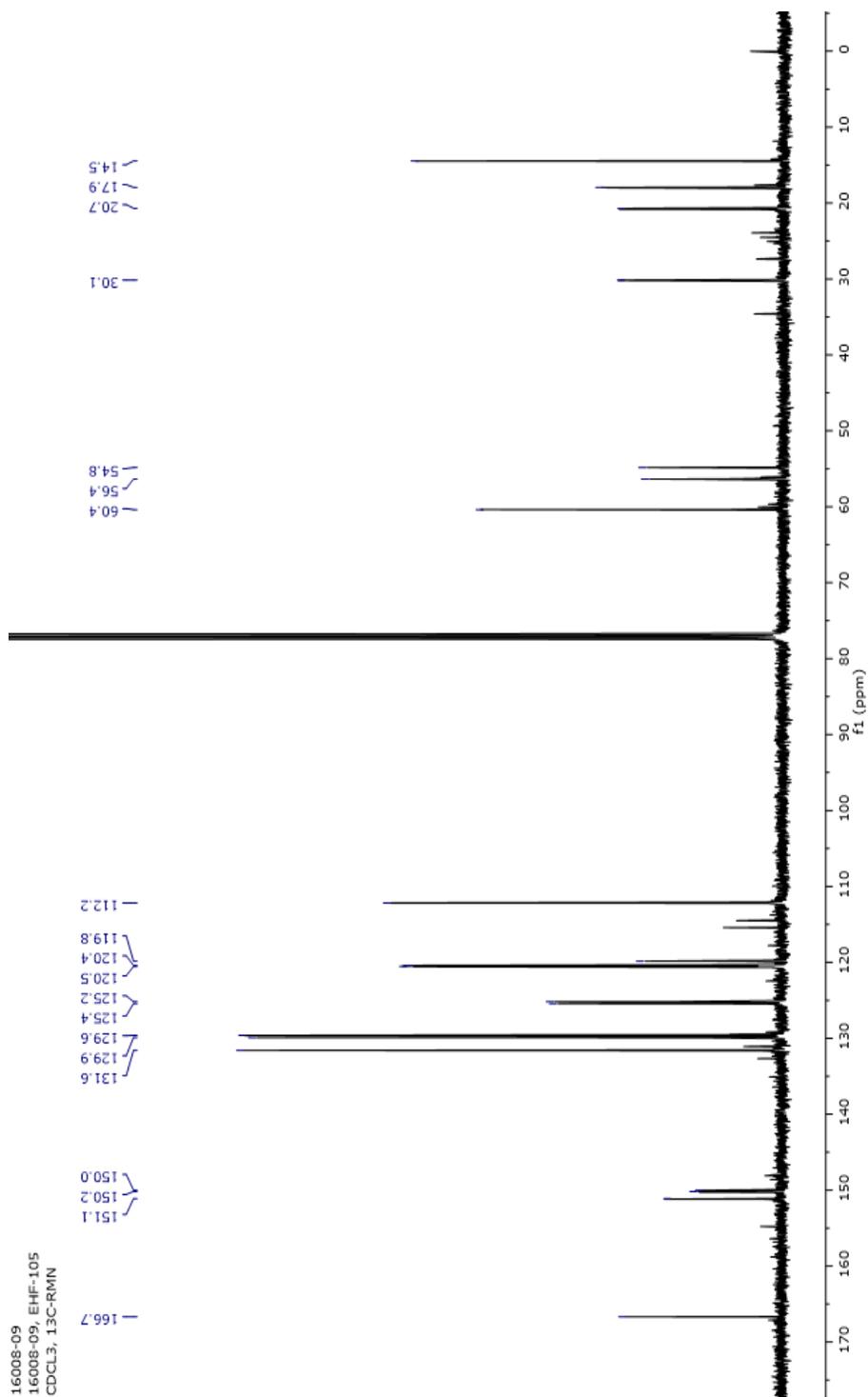


Figura 67. Espectro de RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) del α-aminofosfonato 11.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 112.2, 119.8, 120.4, 120.5, 125.2, 125.4, 129.6, 129.9, 131.6, 150.0, 150.2 y 151.1 ppm.

Finalmente, en 166.7 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo del éster.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 68, en el cual se observa una señal doble de doble a 17.54 ppm (dd, $J = 19.2, 8.3$ Hz).

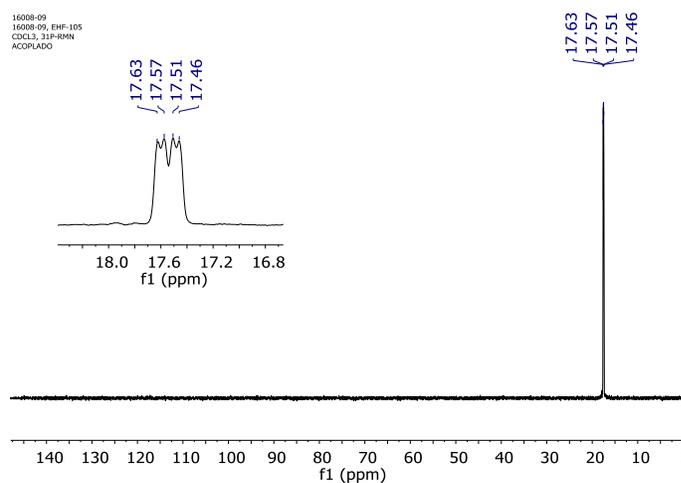


Figura 68. Espectro de RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato **11**.

▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI⁺) m/z , valor calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 454.1705, encontrado 454.1658.

5.1.9. α -AMINOFOSFONATO 12 (ÉSTER DE 2-ETIL-BUTILALDEHÍDO)

En la Figura 71 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **12**.

5.1.9.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 12

4-((1-(difenoxyfosforil)-2-etilbutil)amino)benzoato de etilo.

2-Etilbutiraldehído (0.50 g, 1 eq), 4-aminobenzoato de etilo (0.82 g, 1 eq) y difenilfosfita (1.75, 1.5 eq) fueron disueltos en etanol (3 mL). La mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 80°C por 30 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

El crudo de reacción fue adsorbido en sílica gel, el solvente fue evaporado y la purificación fue realizada por cromatografía en columna con sílica gel; el sistema de disolventes hexano: acetato de etilo (7:3) presentó la mejor separación del compuesto **12**. Se identificó la mancha del producto, se juntaron las fracciones en las cuales se tuvo el compuesto puro con el mismo $R_f = 0.48$ (hexano: acetato de etilo (7:3), se concentraron las fracciones al eliminar el solvente mediante la rotaevaporación y finalmente se obtuvo un sólido cristalino de color blanco con un PF de 121-123°C.

El α -aminofosfonato **12** posee una masa molecular de 453.47 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 2317.00 g de producto puro, lo cual corresponde a un 90% de rendimiento químico.

5.1.9.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 12

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 69.

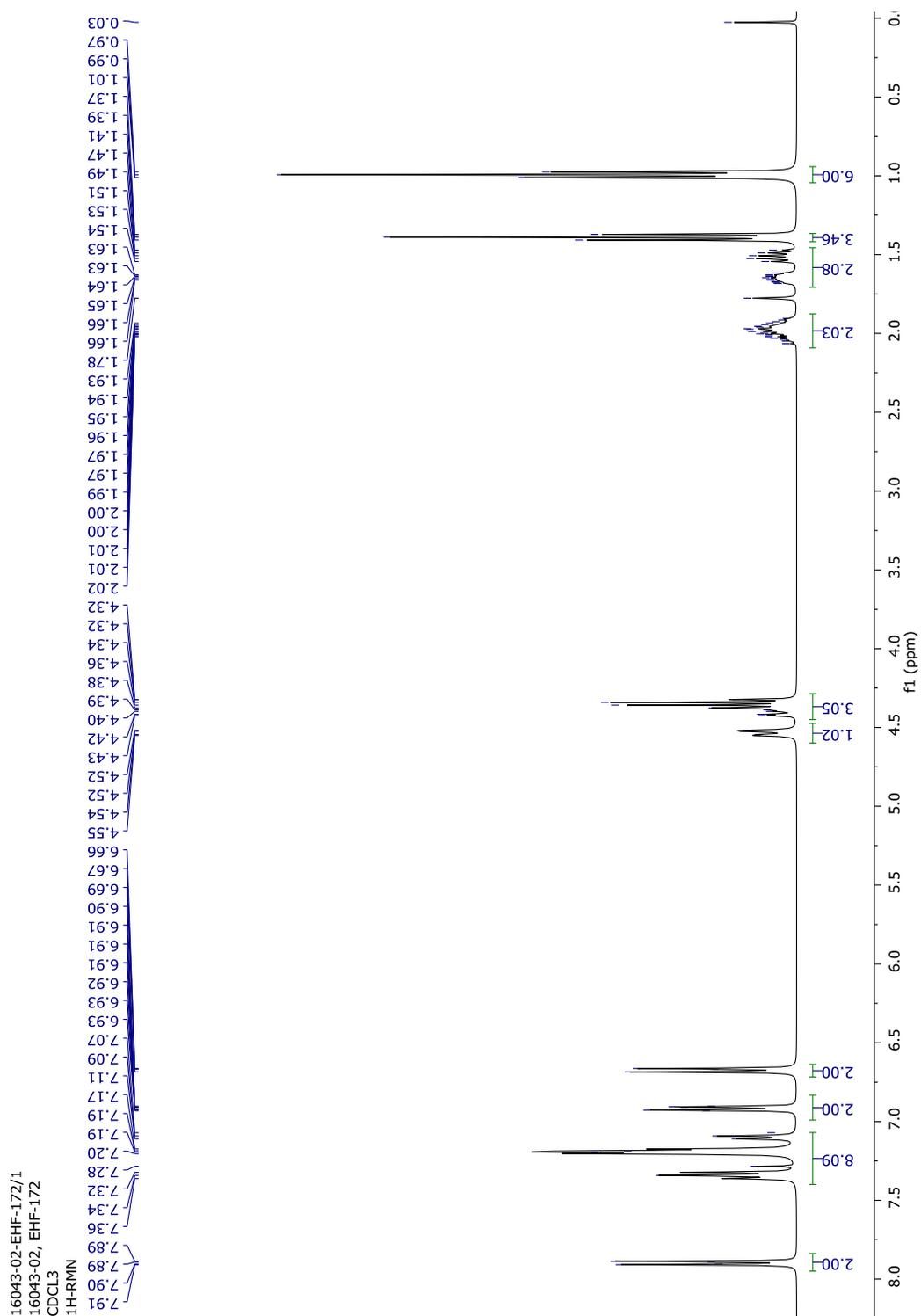


Figura 69. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) del α -aminofosfonato **12**.

A un desplazamiento químico de 0.99 ppm (*a*) aparece una señal triplete (t, $J = 7.3$ Hz) que integra para 6 H y corresponde a los protones de los metilos provenientes del 2-etilbutiraldehído. En 1.39 ppm (*b*) aparece una señal triplete (t, $J = 7.1$ Hz) que integra para 3 H y corresponde a los protones del metilo del éster.

En 1.45 – 1.74 ppm (*c*) y en 1.88 – 2.10 ppm (*d*) aparecen dos multipletes que integran para 2 H cada uno y corresponden a los protones de los metilenos provenientes del 2-etilbutiraldehído.

En 4.35 ppm (*e*) aparece un cuarteto (c, $J = 7.2$ Hz), que integra para 2 H, los protones del metileno del éster. Empalmado con la señal anterior, en 4.41 ppm (*f*) se encuentra una señal doble de doble (dd, $J = 10.9, 3.6$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al Carbono α del α -aminofosfonato.

A 4.51 – 4.57 ppm (*g*) se observa una señal multiplete que integra para 1 H y corresponde al CH contiguo al C α . En 6.67 ppm (*h*) aparece un doble (d, $J = 8.7$ Hz), que integra para 2 H, y corresponde a señal característica de los protones *meta* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

En la Figura 70 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

En 6.84 – 7.39 ppm (i) se observa una señal multiplete que integra para 10 H, y corresponde a señal de los protones aromáticos de la difenilfosfita.

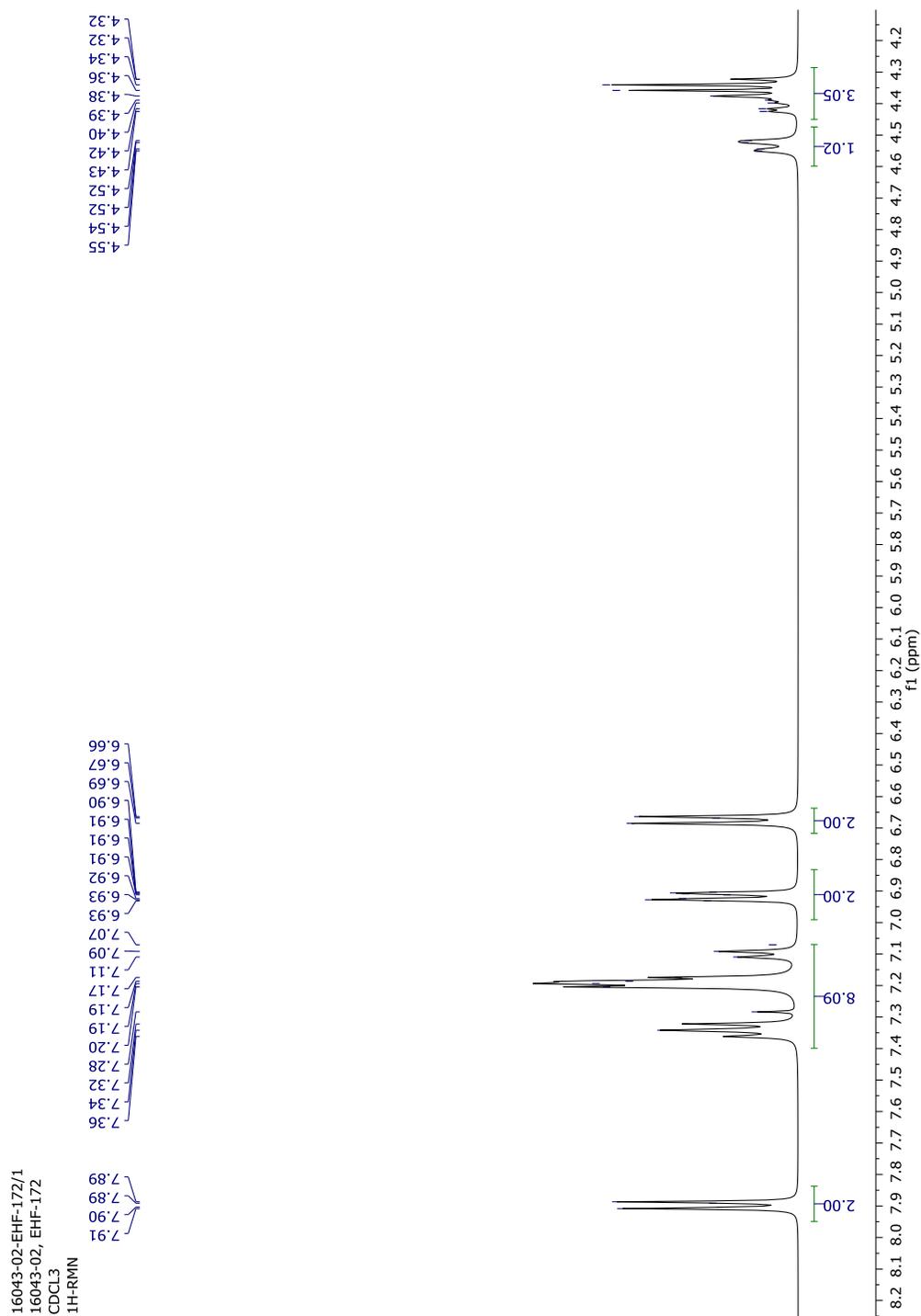


Figura 70. Ampliación del espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) del α-aminofosfonato 12.

Finalmente, en 7.90 ppm (*j*) se observa una señal doble (d, $J = 8.7$ Hz), que integra para 2 H, señal característica que corresponde a los protones *orto* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo.

En la Figura 71 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

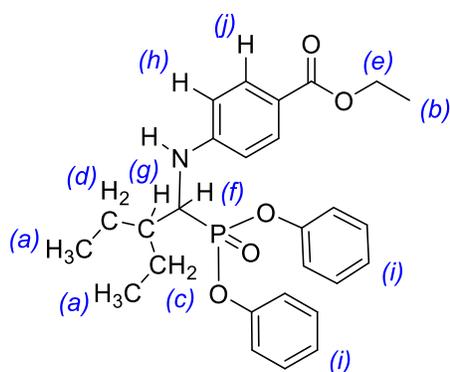


Figura 71. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **12**.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 72.

A un desplazamiento químico de 11.9 y 12.0 ppm, se observan las señales de los carbonos alifáticos correspondiente a los C de los metilos provenientes del 2-etilbutilaldehído. En 14.4 ppm, se observa la señal correspondiente al C del metilo del éster. En 22.3 y 22.8 ppm se observan las señales de los carbonos de los metilenos provenientes

del 2-etilbutilaldehído. En 43.3 ppm aparece la señal del C del CH proveniente del 2-etilbutilaldehído.

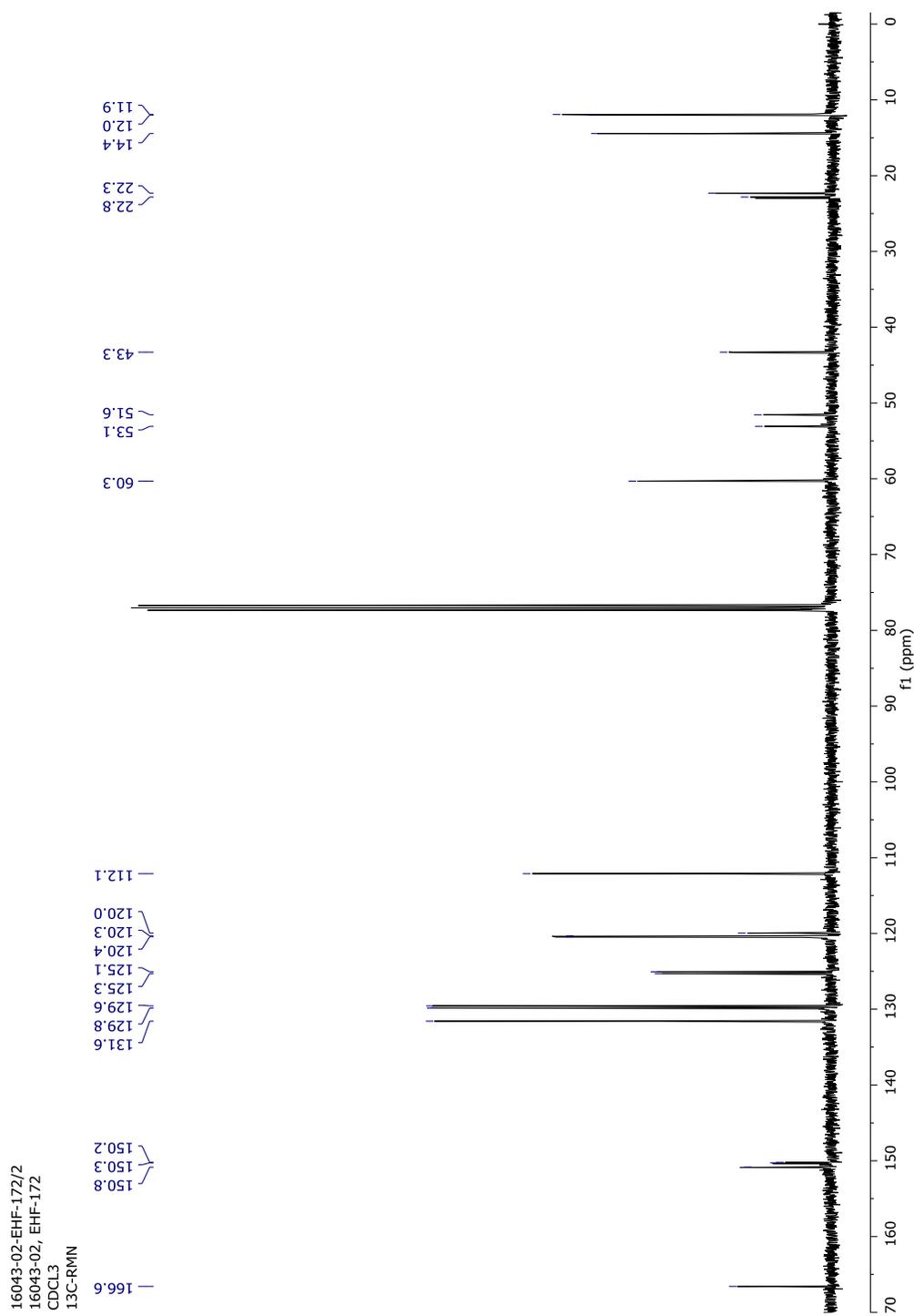


Figura 72. Espectro de RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) del α-aminofosfonato **12**.

En 52.3 ppm se encuentra la señal doblete (d, $J = 153.5$ Hz) que indica la presencia del enlace C-P, con una constante de acoplamiento característica que evidencia que la reacción de Kabachnik-Fields se llevó a cabo. En 60.3 ppm, se observa la señal correspondiente al C del metileno del éster.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 112.1, 120.0, 120.3, 120.4, 125.1, 125.3, 129.6, 129.8, 131.6, 150.2, 150.3 y 150.8 ppm.

Finalmente, en 166.6 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo del éster.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3) se muestra en la Figura 73, en el cual se observa una señal doble de doble a 18.22 ppm (dd, $J = 18.6, 10.7$ Hz).

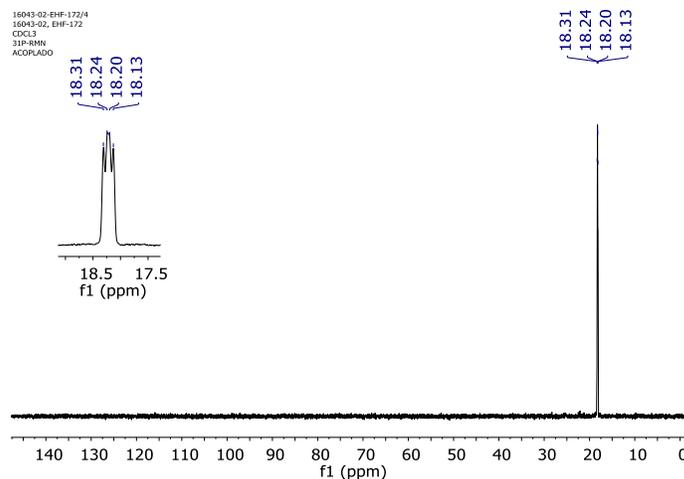


Figura 73. Espectro de RMN ³¹P (162 MHz, CDCl₃) del α-aminofosfonato **12**.

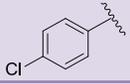
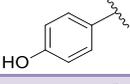
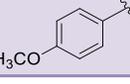
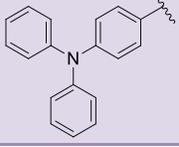
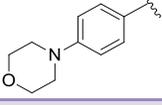
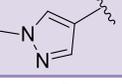
▪ **ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN**

En el análisis de HRMS (ESI⁺) *m/z*, valor calculado para C₂₇H₃₃NO₅P [M + H]⁺ 482.2018, encontrado 482.2020.

5.1.10. COMPARACIÓN DE SÍNTESIS ORGÁNICA DE α-AMINOFOSFONATOS TIPO ÉSTER

Nueve α-aminofosfonatos tipo éster fueron sintetizados por el método de reacción “one pot” Kabachnik-Fields con irradiación por microondas. Se evaluaron diferentes condiciones de tiempo y temperatura, en la Tabla 16, se resumen las condiciones que produjeron los mejores rendimientos de reacción:

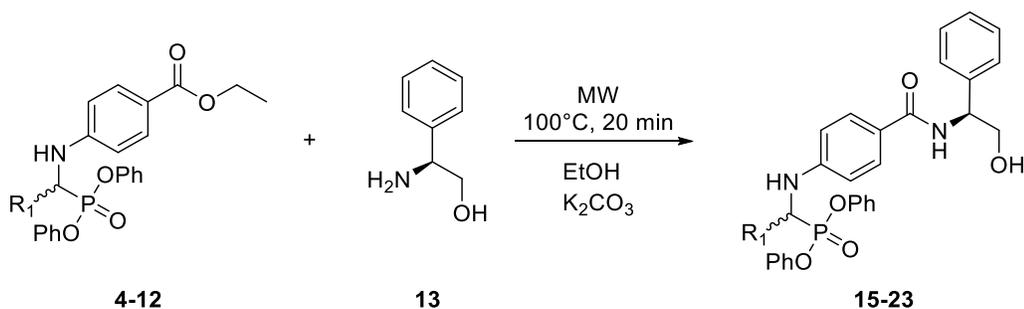
Tabla 16. Condiciones de reacción y rendimientos obtenidos. Serie 1

α -AP	R	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MIN)	RENDIMIENTO (%)
4		80	20	82
5		90	30	72
6		60	20	87
7		80	20	92
8		80	20	58
9		60	30	59
10		60	30	97
11		60	40	74
12		80	30	90

Los rendimientos obtenidos fueron de moderados a altos (58-97%). La metodología descrita, se propuso debido al interés de realizar protocolos dentro de la química verde, por lo cual no se hizo uso de ningún catalizador y se empleó etanol como disolvente. Las condiciones de reacción propuestas en este proyecto de investigación, mostraron rendimientos altos en la mayoría de los compuestos y coinciden con lo reportado por otros investigadores e incluso con algunos que emplearon catalizadores.^{59,61,72,73}

5.2. SERIE 2. α -AMINOFOSFONATOS TIPO AMIDA

La propuesta inicial del proyecto planteaba la síntesis de los derivados tipo amida a partir de los α -aminofosfonatos precursores (ésteres), bajo las condiciones de reacción que se describen en el Esquema 5.



Esquema 5. Condiciones de reacción propuestas inicialmente para la síntesis de los derivados de α -aminofosfonatos tipo amida. (ver R, en Tabla 14).

Se realizaron las reacciones de síntesis partiendo de las condiciones mencionadas anteriormente; empleando como materia prima el α -aminofosfonato tipo éster, el (*S*)-(+)-2-Fenilglicinol (**13**) y K_2CO_3 , utilizando etanol como disolvente a una temperatura de 100°C por 20 minutos. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados deseados, las materias primas reaccionaban, pero varios subproductos fueron obtenidos; entre ellos, se logró identificar el ácido α -aminofosfónico, como producto de la hidrólisis del grupo fosfonato (Figura 74).

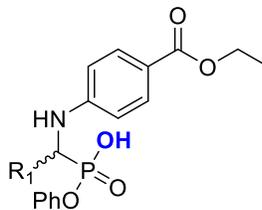


Figura 74. Ácido α -Aminofosfónico obtenido durante las condiciones iniciales de síntesis.

También se detectó que los demás subproductos encontrados correspondían a la ruptura de los enlaces con el carbono α al fósforo, dando como resultado la descomposición del α -aminofosfonato precursor tipo éster en las materias primas empleadas en cada caso (aldehído, 4-aminobenzoato de etilo y difenilfosfita).

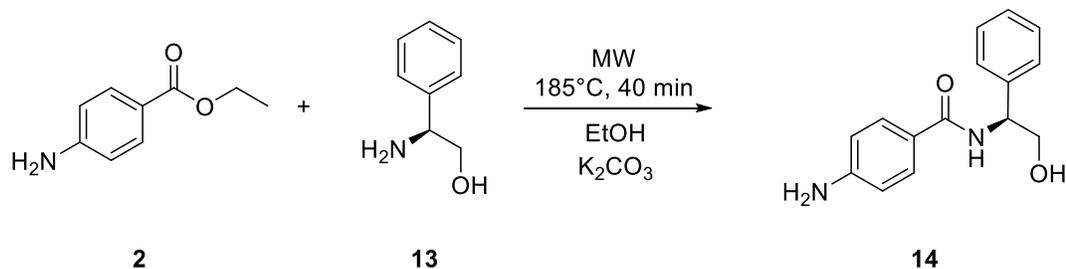
Se realizaron varias pruebas partiendo de las condiciones de reacción inicialmente propuestas para el proyecto (descritas en el Esquema 5), cambiando de materias primas, disolventes, equivalentes de base, etc, y no se obtuvieron los resultados que se esperaban (condiciones probadas en ANEXOS 7.2); debido a la situación anteriormente descrita, se decidió cambiar la ruta de síntesis para la obtención del producto de interés.

La nueva propuesta consistió en la modificación inicial del grupo éster del 4-aminobenzoato de etilo (**2**) para la obtención de la amida (**14**), la cual se llevó a cabo mediante la ruta de síntesis mostrada en el

Esquema 6 y las condiciones de reacción probadas se describen en la Tabla 17.

5.2.1. AMIDA 14.

5.2.1.1. SÍNTESIS DE LA AMIDA 14

(S)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletíl)benzamida.

Esquema 6. Síntesis de la amida **14**, materia prima para los derivados de α -aminofosfonatos tipo amida (**15-23**).

Tabla 17. Condiciones de reacción probadas para la síntesis de los derivados de α -aminofosfonatos tipo amida.

RXN	MATERIAS PRIMAS (EQUIVALENTES)			TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MIN)	PRODUCTO
	4-AMINO BENZOATO DE ETILO (2)	(S)-(+)-2-FENIL-GLICINOL (13)	K ₂ CO ₃			
30a	1	1	-	80	20	N.R
30b	1	1	-	100	20	N.R
30c	1	1	1	80	20	N.R
30d	1	1	1	100	20	N.R
30e	1	1	1	120	20	N.R
30f	1	1	1	140	20	N.R
30g	1	1	1	160	20	N.R
30h	1	1	1	180	20	N.R
30i	1	1	1	180	40	Dos productos observados en TLC
30j	1	1	1	190	20	Dos productos observados en TLC
30k	1	1	1	200	20	Dos productos observados en TLC

*En la totalidad de los experimentos se empleó etanol como disolvente. N.R: No Reacción

Los dos productos obtenidos en las 3 últimas reacciones de la Tabla 17 corresponden a los compuestos mostrados en la Figura 75 (amida **14** y al ácido **14b**).

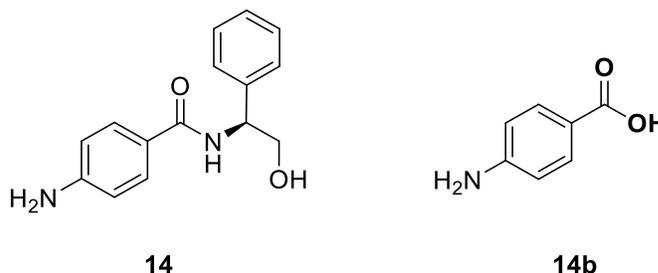


Figura 75. Productos obtenidos con la ruta de síntesis del

Esquema 6: amida **14** y ácido **14b**.

Una vez que los productos **14** y **14b** fueron identificados (caracterización de **14b** en ANEXOS 7.3), se buscaron nuevas condiciones de reacción con la finalidad de aumentar el rendimiento de la amida **14** y disminuir o eliminar la hidrólisis del éster para la obtención del ácido **14b**, para ello se llevaron a cabo las reacciones mostradas en la Tabla 18.

Tabla 18. Condiciones de reacción y rendimientos obtenidos en la síntesis de la amida **14**

RXN	MATERIAS PRIMAS (EQUIVALENTES)			TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MIN)	RENDIMIENTO (%) AMIDA (14)
	4-AMINO BENZOATO DE ETILO (2)	(S)-(+)-2-FENIL-GLICINOL (13)	K ₂ CO ₃			
31	1	1	1	185	40	12.7 mg (6.8%)
32	1	1	2	185	40	53.6 mg (9.5%)
35	1	1	3	185	40	291.8 mg (31.2%)

Las condiciones de reacción anteriores elevaban la presión del equipo de MW (la presión oscilaba entre los 20 y 25 bar; sin embargo, en una ocasión se elevó hasta 28.5 bar y el máximo permitido por el equipo es 30 bar) y dada la obtención de rendimientos bajos, se decidió cambiar la metodología para la síntesis de la amida **14**.

Partiendo de la ruta de síntesis descrita en el Esquema 3, se probaron diferentes condiciones de reacción; en las cuales se plantearon modificaciones y finalmente, como se observa en la Tabla 19, las mejores condiciones de reacción arrojaron un 75% de rendimiento (reacción 86), el cual fue obtenido cuando las materias primas: **2** (1 eq, 722.5 mg), **13** (1 eq, 600.0 mg) y K_3PO_4 (0.3 eq, 278.5 mg) se hicieron reaccionar por 24 h a 70 °C, empleando *i*PrOH como disolvente (2mL).

Tabla 19. Condiciones de reacción optimizadas y rendimientos obtenidos en la síntesis de la amida **14**

RXN	MATERIAS PRIMAS (EQUIVALENTES)			TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MIN)	RENDIMIENTO (%) AMIDA (14)
	4-AMINO BENZOATO DE ETILO (2)	(S)-(+)-2-FENIL-GLICINOL (13)	K_3PO_4			
75	1	1	0.3	60	22 h	62
74	1	1	0.3	120	25 min	37
76	1	1	0.3	120	40 min	54
78	1	1	0.3	60	24 h	70
86	1	1	0.3	70	24 h	75
98	1	1	0.3	60*	48 h	30

*método convencional

La amida **14**, fue purificada mediante recristalización con *i*PrOH, una vez que se realizó la filtración a vacío, se observó que el licor tenía un poco de producto, el cual fue purificado empleando el equipo de cromatografía flash *Combiflash*, el sistema de disolventes hexano: acetato de etilo: metanol (5:4:1) presentó la mejor separación del compuesto de interés. Se obtuvo un sólido blanco cristalino con un R_f de 0.36 (hexano: acetato de etilo: metanol 5:4:1) y un PF de 174-176°C.

La amida **14** posee una masa molecular de 256.30 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 840.80 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 75% de rendimiento químico.

Una vez que se contó con la amida **14** pura, ésta se caracterizó y se empleó como materia prima para la síntesis de la segunda serie de α -aminofosfonatos (tipo amida).

5.2.1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA AMIDA 14

- **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 76.

A un desplazamiento químico de 3.61 – 3.73 ppm (*a*) aparece una señal multiplete que integra para 2 H y corresponde a los protones del metileno provenientes del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

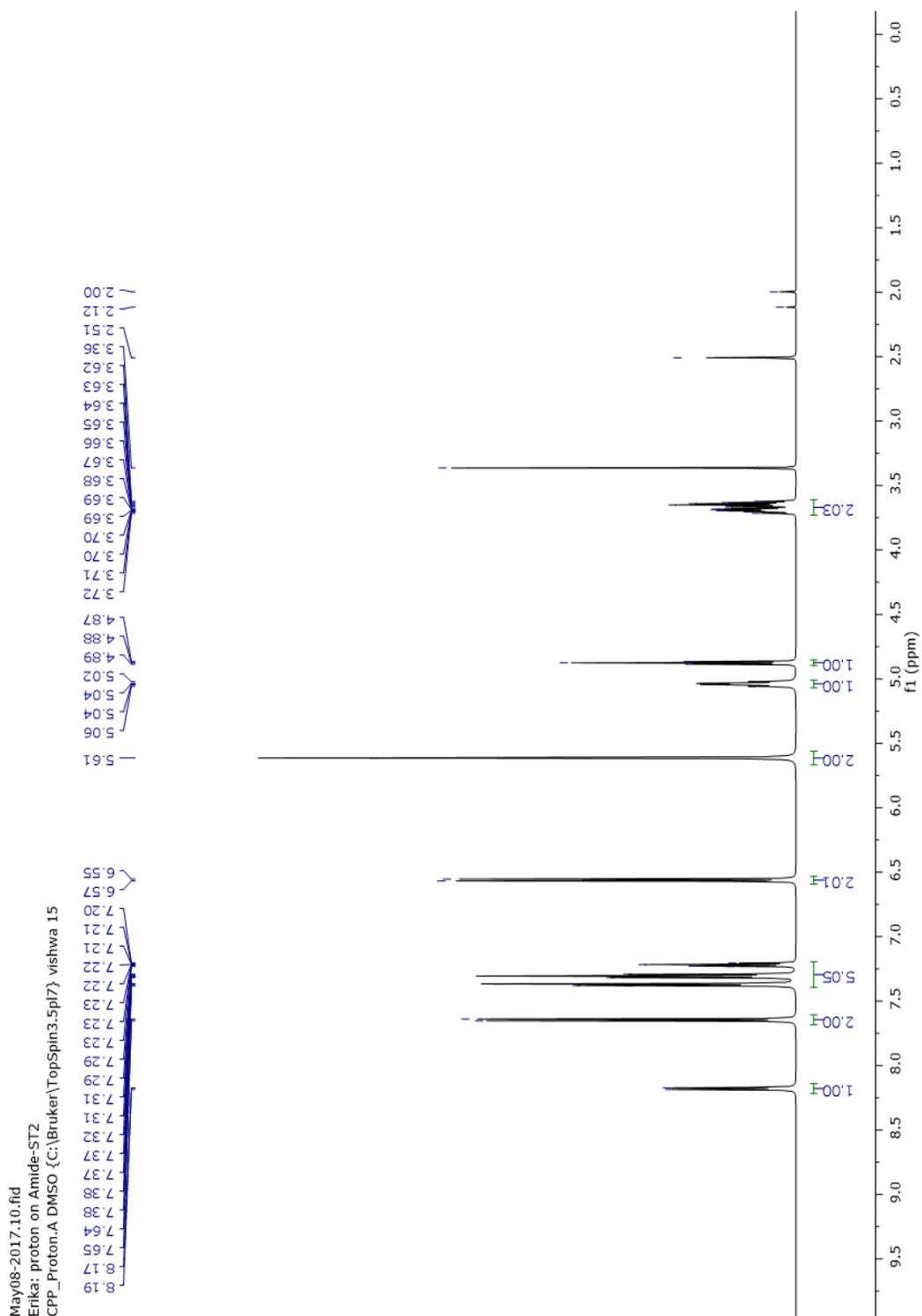


Figura 76. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO d_6) de la amida 14.

En 4.88 ppm (*b*) aparece una señal triplete (t, $J = 5.9$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del hidroxilo. Fue posible observar el protón del hidroxilo se acopla con otros protones (en este

caso con los protones del metileno) tanto en la amida **14** como en todos los α -aminofosfonatos tipo amida y esto debido a que es común observar acoplamiento del OH si la muestra es pura, si se analizó a baja temperatura o si fue disuelta en un solvente altamente polar como el dimetilsulfóxido⁸⁴ (todos los α -aminofosfonatos tipo amida y la amida **14** fueron disueltos en DMSO- d_6 para la obtención de los espectros de RMN).

En 5.04 ppm (*c*) aparece un cuarteto (*c*, $J = 7.8$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol. En 5.61 ppm (*d*) aparece una señal singulete que integra para 2 H y corresponde a los protones del grupo amino proveniente del 4-aminobenzoato de etilo.

A un desplazamiento químico de 6.56 ppm (*e*) se observa una señal doble (*d*, $J = 8.6$ Hz) que integra para 2 H, y corresponde a señal característica de los protones *meta* del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo. En 7.20 – 7.39 ppm (*f*) aparece una señal multiplete que integra para 5 H, los protones del fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, en 7.65 ppm (*g*) se observa una señal doble (*d*, $J = 8.6$ Hz), que integra para 2 H y corresponde a la señal característica de los protones orto del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo. Finalmente, en 8.18 ppm (*h*) se observa una señal doble (*d*, $J = 8.1$ Hz), que integra para 1 H, el protón del amino de la amida.

En la Figura 77 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

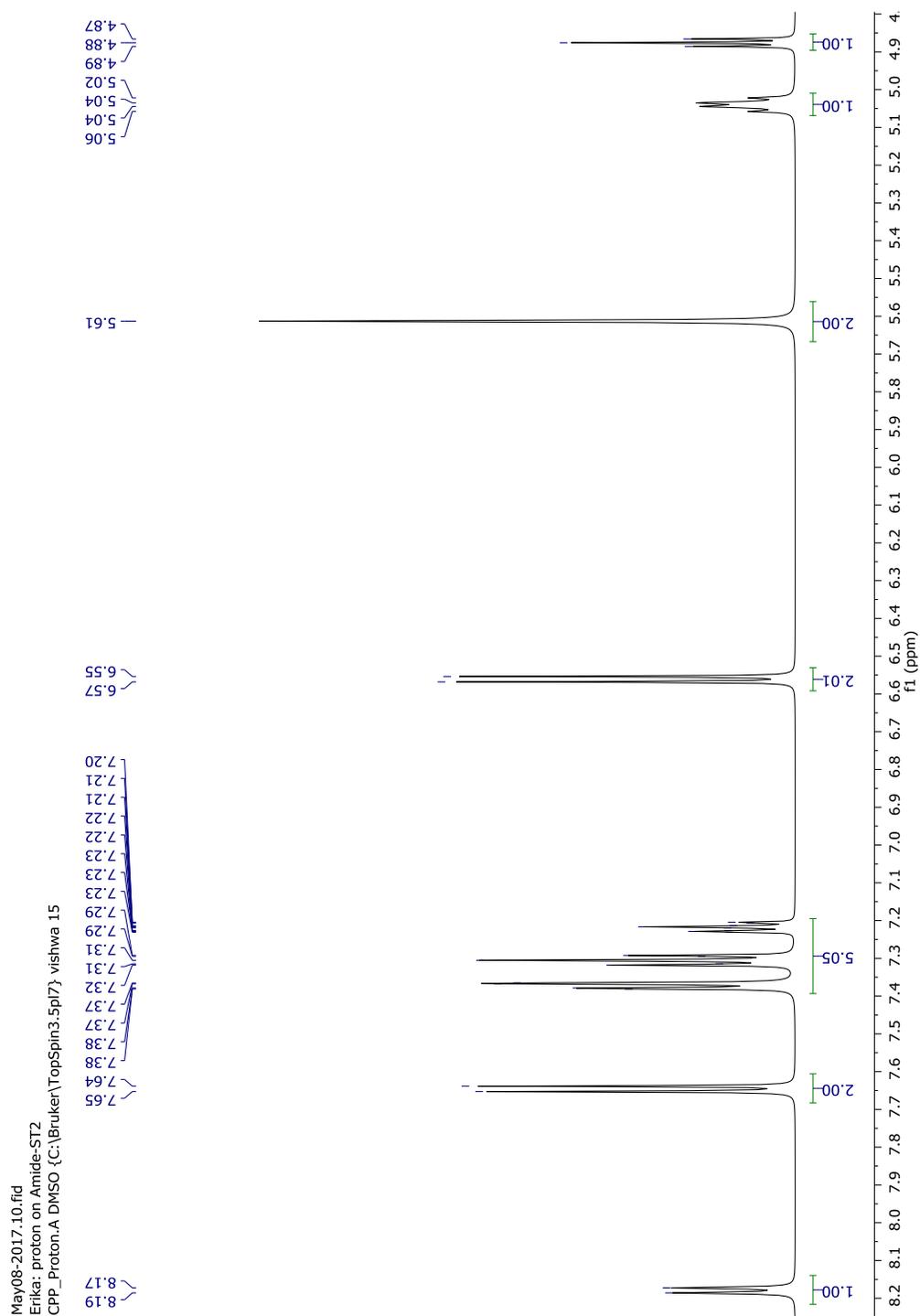


Figura 77. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO d_6) de la amida 14.

En la Figura 78 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

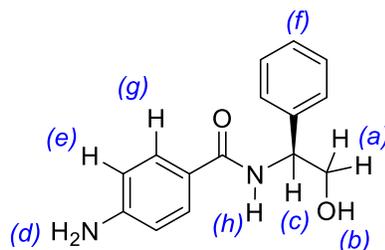


Figura 78. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H la amida **14**.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO d_6) se muestra en la Figura 79.

A un desplazamiento químico de 56.0 ppm se encuentra la señal correspondiente al C del CH unido al fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

En 65.1 ppm se observa la señal correspondiente al C del metileno del (S)-(+)-2-fenilglicinol. Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 112.9, 121.8, 127.1, 127.5, 128.4, 129.4, 142.4 y 152.1 ppm.

Finalmente, en 166.5 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo de la amida, lo que confirma que reacción entre el éster y el aminoalcohol se llevó a cabo.

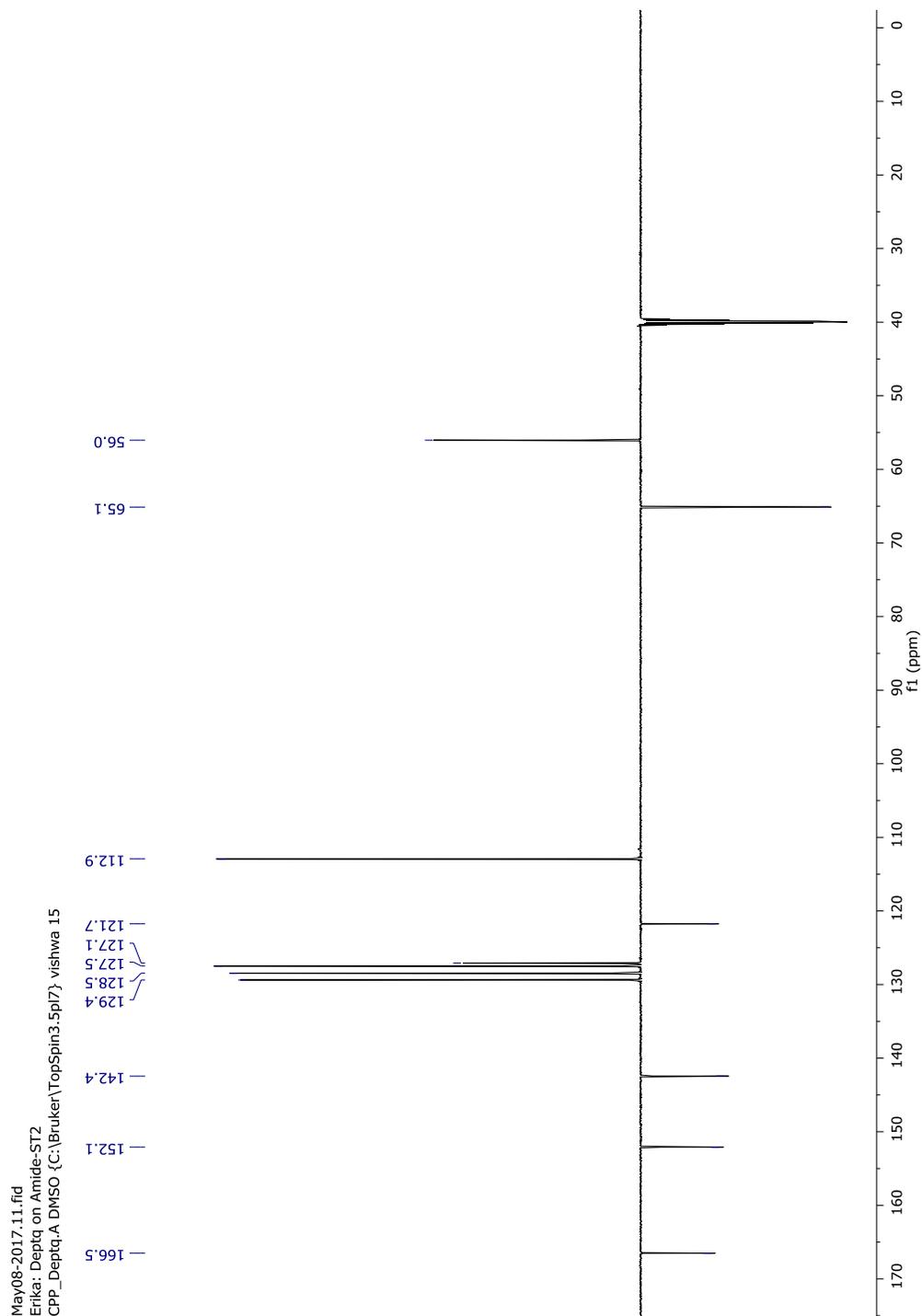


Figura 79. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de la amida **14**.

■ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI^+) m/z , valor calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 257.1285, encontrado 257.1288.

5.2.2. α -AMINOFOSFONATO 15 (AMIDA DE *p*-CLOROBENZALDEHÍDO)

En la Figura 82 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **15**.

5.2.2.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 15

Difenil ((4-clorofenil)((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)metil)fosfonato. 4-Clorobenzaldehído (63 mg, 1.5 eq), (S)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletil)benzamida (70.0 mg, 1 eq) y difenilfosfita (191.9 mg, 3 eq) fueron disueltos en etanol (0.5 mL), la mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 20 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

Para la purificación del compuesto **15**, el crudo de reacción fue filtrado y lavado con etanol frío. Se corrió una TLC comparando el sólido obtenido con las materias primas, obteniendo una mancha diferente a éstas últimas. El producto obtenido posee un $R_f=0.48$ (hexano: acetato de etilo: metanol 5:4:1), el sólido de color blanco (ligeramente aperlado) posee un PF de 148-150°C.

El α -aminofosfonato **15** posee una masa molecular de 613.0 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 133.8 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 80% de rendimiento químico.

5.2.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 15

- RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 80.

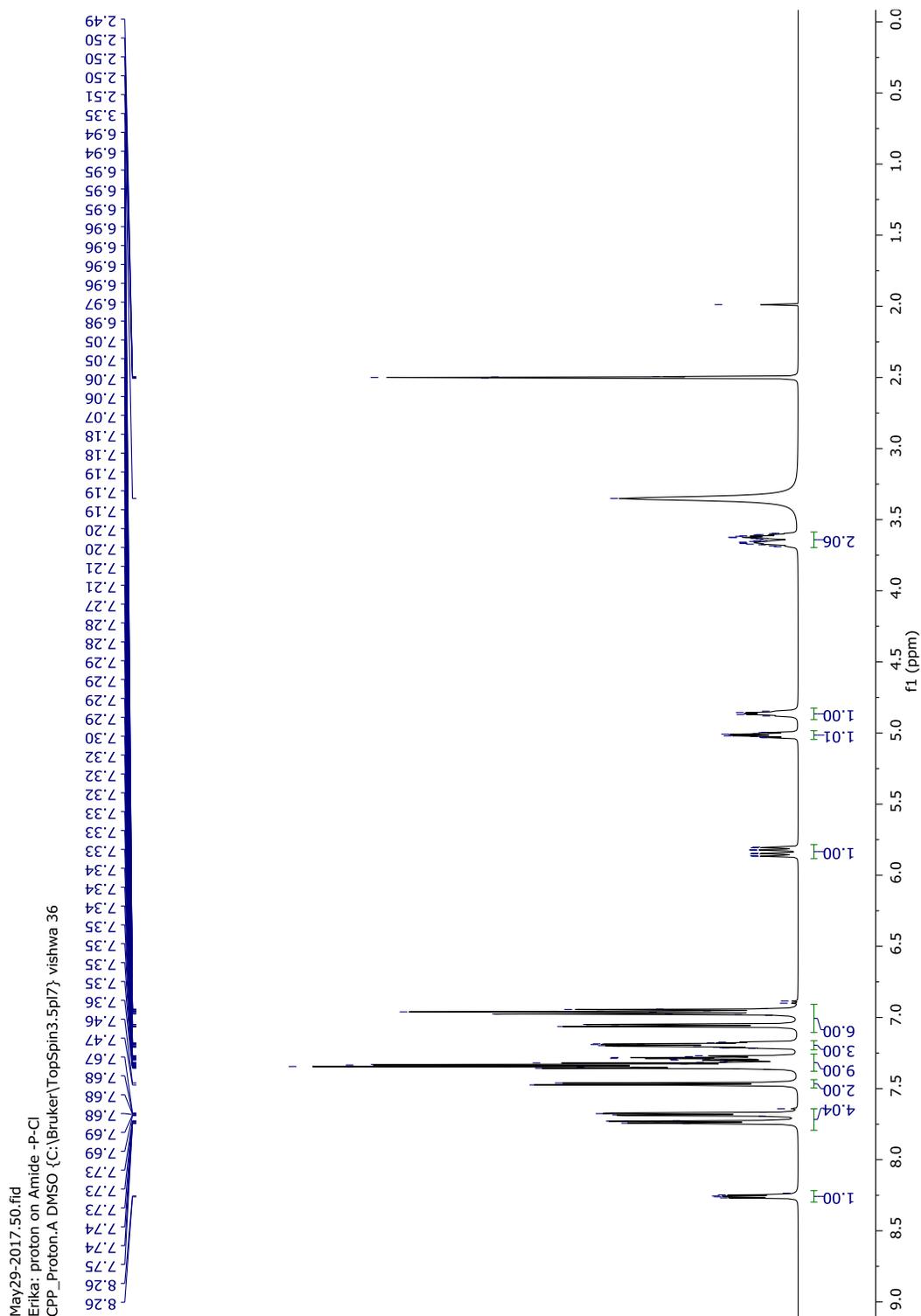


Figura 80. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 15.

Las señales observadas en el espectro de RMN ^1H son similares a las señales del correspondiente derivado tipo éster, por lo que se mostraran a detalle únicamente las diferencias observadas para el derivado tipo amida.

A un desplazamiento químico de 3.55 – 3.76 ppm (*a*) aparece una señal multiplete que integra para 2 H y corresponde a los protones del metileno provenientes del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

En 4.86 ppm (*b*) aparece una señal doble de triple (dt, $J = 8.8, 5.9$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del hidroxilo.

En 5.01 ppm (*c*) aparece un cuarteto (c, $J = 7.0$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del CH unido al fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, a 5.84 ppm (*d*) se puede observar un doble de doble de doble (ddd, $J = 25.6, 10.4, 2.4$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón que está unido al Carbono α (enlazado al Nitrógeno y al Fósforo), el cual es una de las señales características que identifican a los α -aminofosfonatos.

En la Figura 81 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

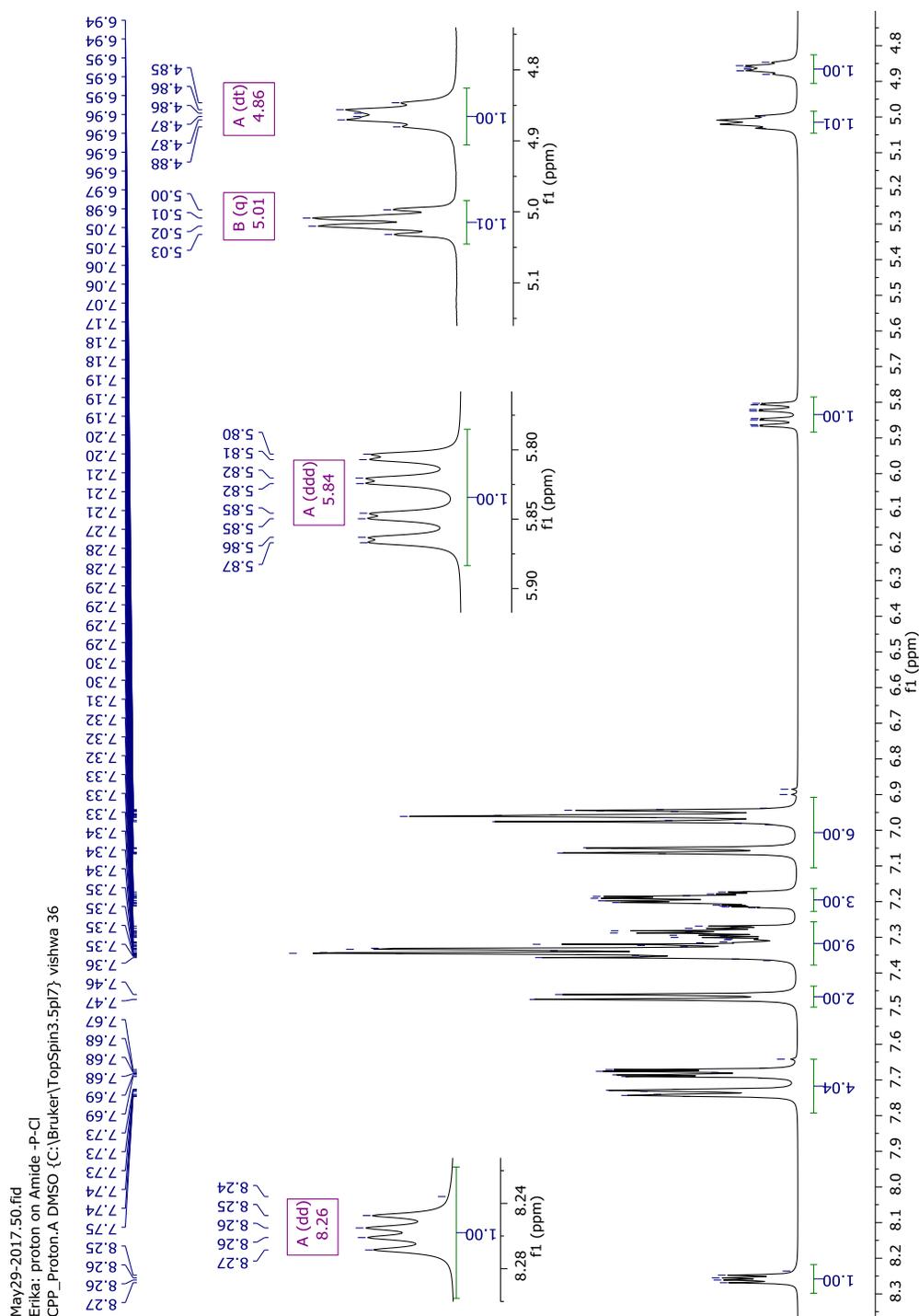


Figura 81. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 15.

En la región de los protones aromáticos, de 6.88 – 7.81 ppm (e) se encuentran las señales multiplete que integran para 24 H y

corresponden a los protones de los dos fenilos de la difenilfosfita (10 H), los protones del fenilo del del (S)-(+)-2-fenilglicinol (5 H), los protones del amino y del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo (5 H) y los protones del 4-clorofenilo (4 H).

Finalmente, en 8.26 ppm (*f*) se observa una señal doble de doble (dd, $J = 8.1, 4.5$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al N de la amida.

En la Figura 82 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

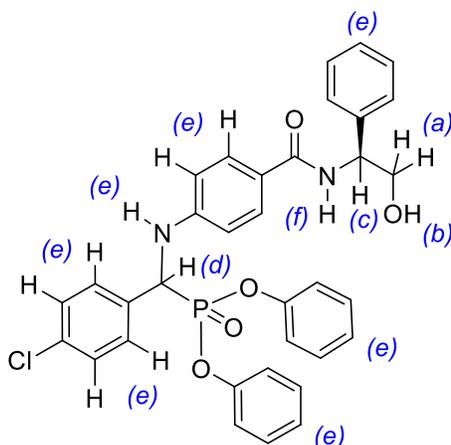


Figura 82. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **15**.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 83:

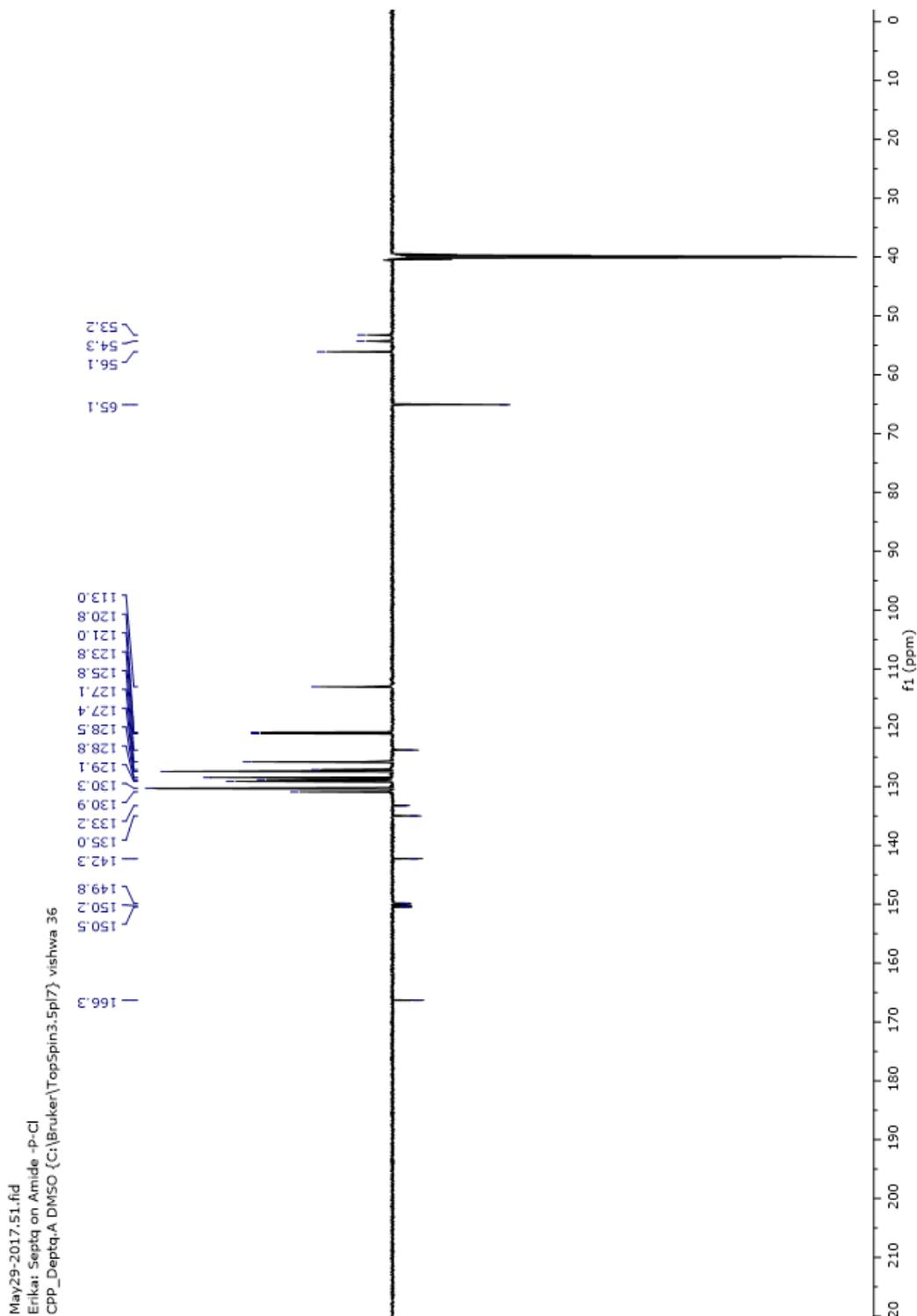


Figura 83. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 15.

A un desplazamiento químico de 53.8 ppm se encuentra un doblete (d, $J = 156.3$ Hz) con una constante de acoplamiento característica que indica la presencia del enlace C-P de los α -

aminofosfonatos. En 56.1 ppm se encuentra la señal correspondiente al C del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol. En 65.1 ppm se observa la señal correspondiente al C del metileno del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 113.0, 120.8, 121.0, 123.8, 125.8, 127.1, 127.4, 128.5, 128.8, 129.1, 130.3, 130.9, 133.2, 135.0, 142.3, 149.8, 150.2 y 150.5 ppm.

Finalmente, en 166.3 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo de la amida.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 84, en el cual se observa una señal doble a 15.59 ppm (d, $J = 26.4$ Hz).

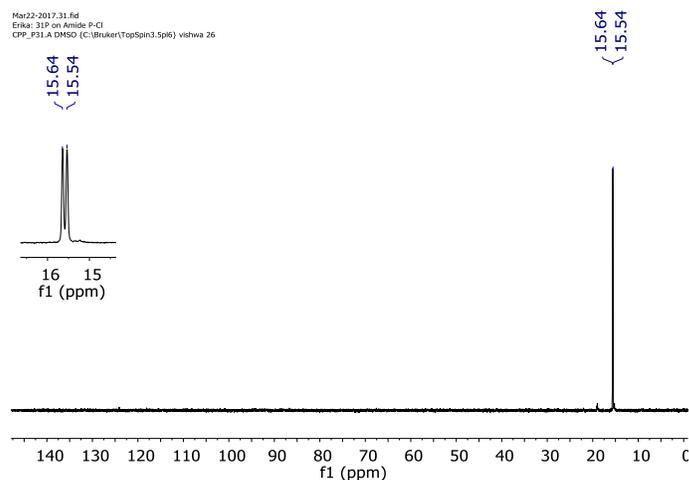


Figura 84. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **15**.

- **ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN**

En el análisis de HRMS (ESI⁺) m/z , valor calculado para

$C_{34}H_{31}ClN_2O_5P$ $[M + H]^+ = 613.1654$, encontrado 613.1720.

5.2.3. α -AMINOFOSFONATO 16 (AMIDA DE *p*-HIDROXIBENZALDEHÍDO)

En la Figura 87 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **16**.

5.2.3.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 16

Difenil (((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil) amino)(4-hidroxifenil)metil)fosfonato. 4-Hidroxibenzaldehído (50 mg, 1.5 eq), (S)-4-amino-*N*-(2-hidroxi-1-feniletil)benzamida (70.0 mg, 1 eq) y difenilfosfita (191.9 mg, 3 eq) fueron disueltos en etanol (0.5 mL), la mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 20 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

Para la purificación del compuesto **16**, el crudo de reacción fue filtrado y lavado con etanol frío. Se corrió una TLC comparando el sólido obtenido con las materias primas, se obtuvo una mancha diferente a éstas últimas. El producto obtenido posee un $R_f = 0.42$ (hexano: acetato de etilo: metanol 5:4:1), el sólido de color blanco posee un PF de 139-141°C.

El α -aminofosfonato **16** posee una masa molecular de 594.6 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 35.3 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 22% de rendimiento químico.

5.2.3.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 16

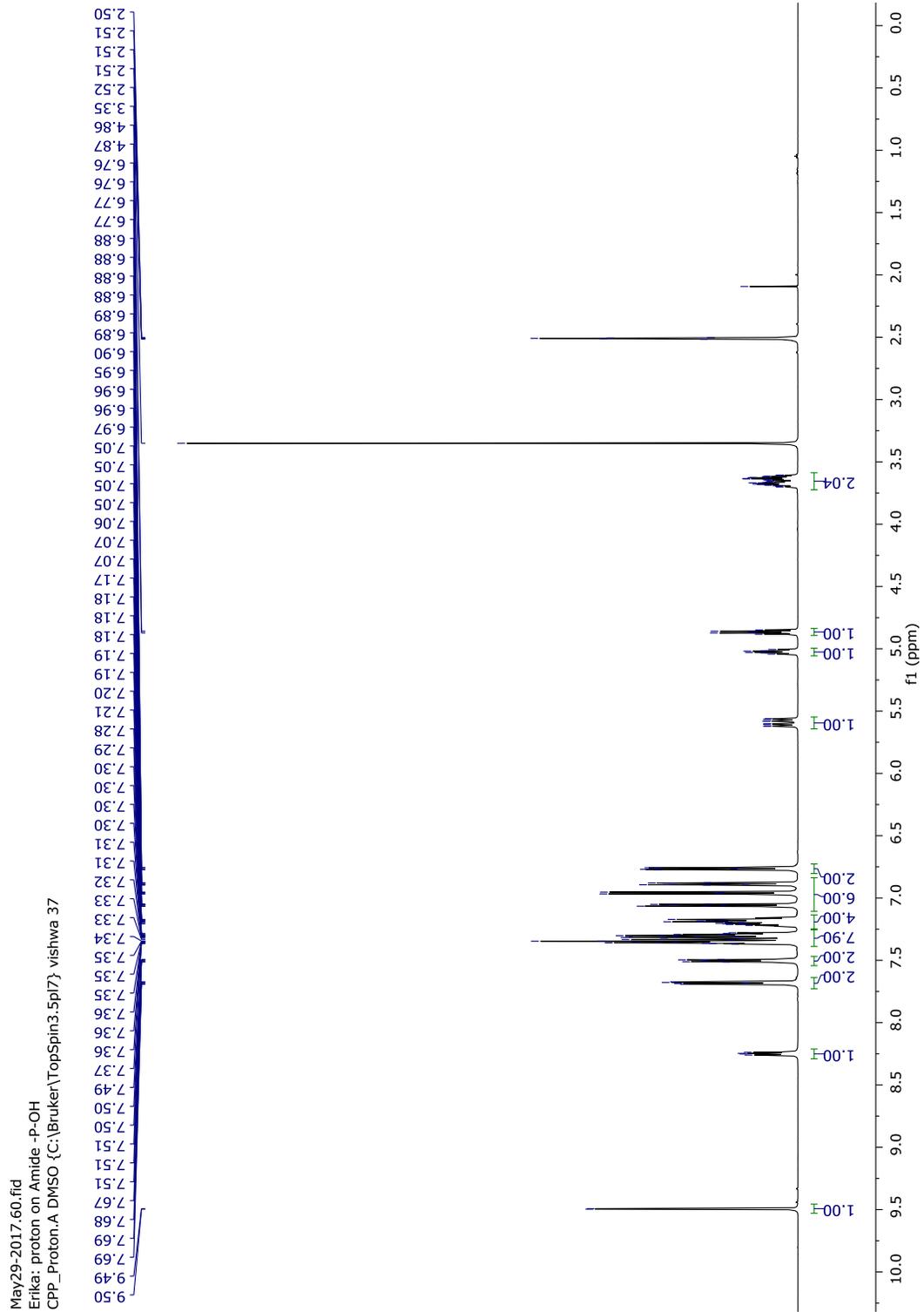
▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 85.

A un desplazamiento químico de 3.55 – 3.75 ppm (*a*) aparece una señal multiplete que integra para 2 H y corresponde a los protones del metileno provenientes del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

En 4.87 ppm (*b*) aparece una señal doble de triple (dt, $J = 8.5, 5.9$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del hidroxilo. En 5.02 ppm (*c*) aparece una señal triple de doble (td, $J = 7.8, 5.5$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del CH unido al fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol. **Nota:** Se realizó una prueba agregando D_2O a la muestra de la amida **16**, para corroborar la correcta asignación de los protones (*b*) y (*c*), espectros en ANEXOS 7.4

Posteriormente, a 5.59 ppm (*d*) se puede observar un doble de doble de doble (ddd, $J = 24.4, 10.3, 2.0$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón que está unido al Carbono α (enlazado al Nitrógeno y al Fósforo), el cual es una de las señales características que identifican a los α -aminofosfonatos.



En la Figura 86 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

corresponden a los protones de los dos fenilos de la difenilfosfita (10 H), los protones del fenilo del del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol (5 H), los protones del amino y del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo (5 H) y los protones del 4-hidroxifenilo (4 H).

Posteriormente, en 8.25 ppm (*f*) se observa una señal doble de doble (dd, $J = 8.1, 5.2$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al N de la amida.

Finalmente, en 9.49 ppm (*h*) se observa una señal doble (d, $J = 2.3$ Hz), que integra para 1 H, y corresponde al OH del *p*-hidroxifenilo.

En la Figura 87 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

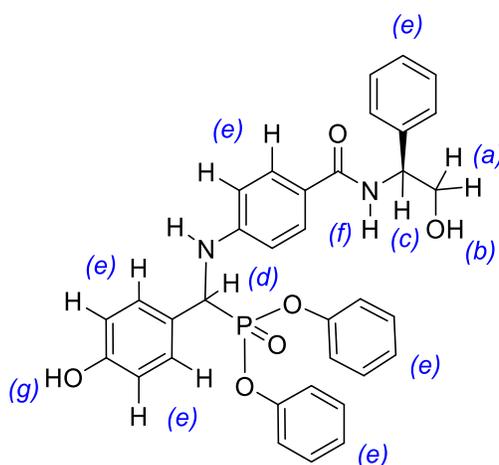


Figura 87. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **16**.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz,

$\text{DMSO-}d_6$) se muestra en la Figura 88.

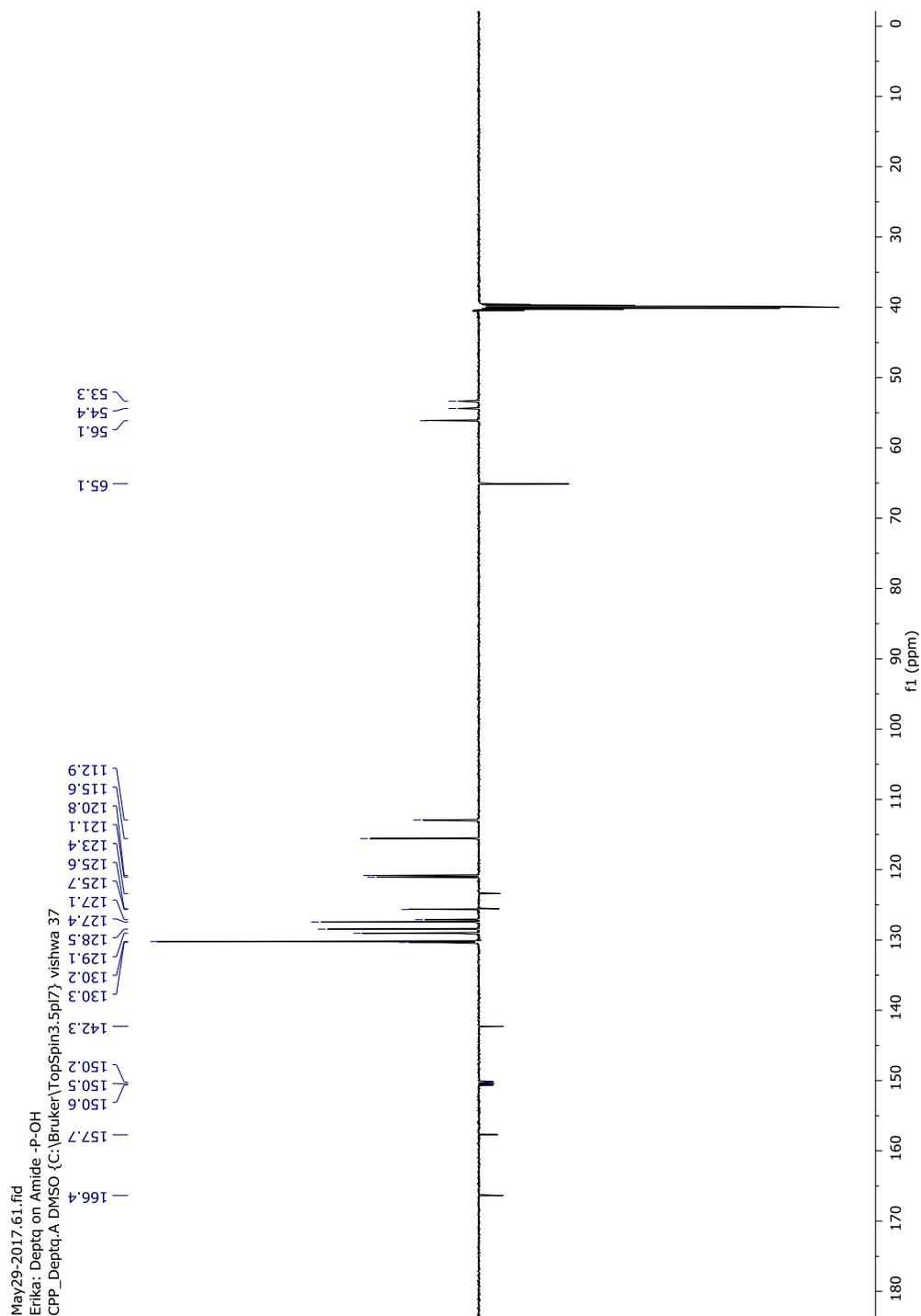


Figura 88. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **16**.

A un desplazamiento químico de 53.9 ppm se encuentra un doblete (d, $J = 157.6$ Hz) con una constante de acoplamiento característica que indica la presencia del enlace C-P de los α -aminofosfonatos.

En 56.1 ppm se encuentra la señal correspondiente al C del CH unido al fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol. En 65.1 ppm se observa la señal correspondiente al C del metileno del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 112.9, 115.6, 120.8, 121.1, 123.4, 125.6, 125.7, 127.1, 127.4, 128.5, 129.1, 130.2, 130.3, 142.3, 150.2, 150.5, 150.6 y 157.7 ppm.

Finalmente, en 166.4 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo de la amida.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 89 en el cual se observa una señal doble a 16.66 ppm (d, $J = 24.4$ Hz).

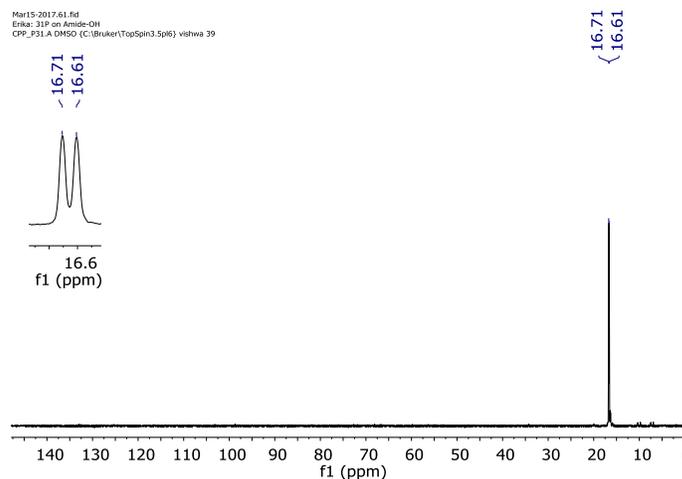


Figura 89. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **16**.

▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI^+) m/z , valor calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6\text{P} [\text{M} + \text{H}]^+$ 595.1992, encontrado 595.2016.

5.2.4. α -AMINOFOSFONATO **17** (AMIDA DE *p*-METOXIBENZALDEHÍDO)

En la Figura 92 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **17**.

5.2.4.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO **17**

Difenil (((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)(4-metoxifenil)metil)fosfonato. 4-Metoxibenzaldehído (55.8 mg, 1.5 eq) y (S)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletil)benzamida (70 mg, 1 eq) fueron disueltos en etanol (0.5 mL), se agregó la difenilfosfita (191.8 mg, 3 eq) y se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 20 min, el progreso de la reacción se monitoreó por TLC.

Para la purificación del compuesto **17**, el crudo de reacción fue filtrado y lavado con etanol frío. Se corrió una TLC comparando el sólido obtenido con las materias primas, se obtuvo una mancha diferente a éstas últimas. El producto obtenido posee un $R_f=0.42$ (hexano: acetato de etilo: metanol 5:4:1), el sólido de color blanco posee un PF de 140-143°C.

El α -aminofosfonato **17** posee una masa molecular de 608.6 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 133.7 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 80% de rendimiento químico.

5.2.4.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO **17**

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 90.

A un desplazamiento químico de 3.61 – 3.71 ppm (α) aparece una señal multiplete que integra para 2 H y corresponde a los protones del metileno provenientes del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

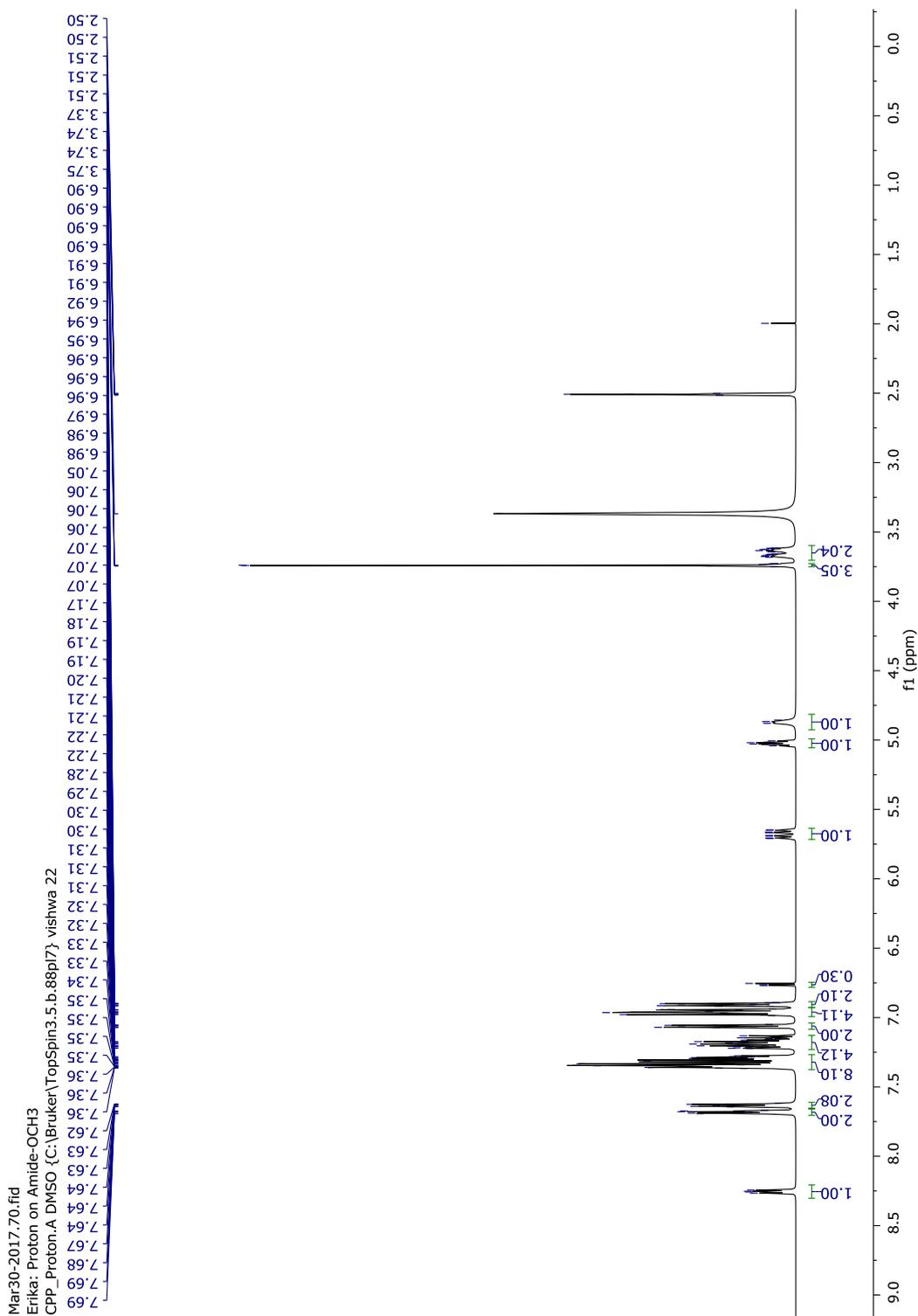


Figura 90. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del α -aminofosfonato 17.

En 3.74 ppm (*b*) se encuentra una señal doble (d, $J=1.2$ Hz) que integra para 3 H, los protones del metoxilo del *p*-metoxifenilo.

En 4.87 ppm (*c*) aparece un cuarteto ($c, J = 7.1$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del hidroxilo.

En 5.02 ppm (*d*) aparece una señal triple de doble ($td, J = 7.9, 5.4$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, a 5.68 ppm (*e*) se puede observar un doble de doble de doble ($ddd, J = 24.7, 10.3, 2.3$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón que está unido al Carbono α (enlazado al Nitrógeno y al Fósforo), el cual es una de las señales características que identifican a los α -aminofosfonatos.

En la región de los protones aromáticos, de 6.88 – 7.71 ppm (*f*) se encuentran las señales multiplete que integran para 24 H y corresponden a los protones de los dos fenilos de la difenilfosfita (10 H), los protones del fenilo del del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol (5 H), los protones del amino y del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo (5 H) y los protones del 4-metoxifenilo (4 H).

En la Figura 91 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

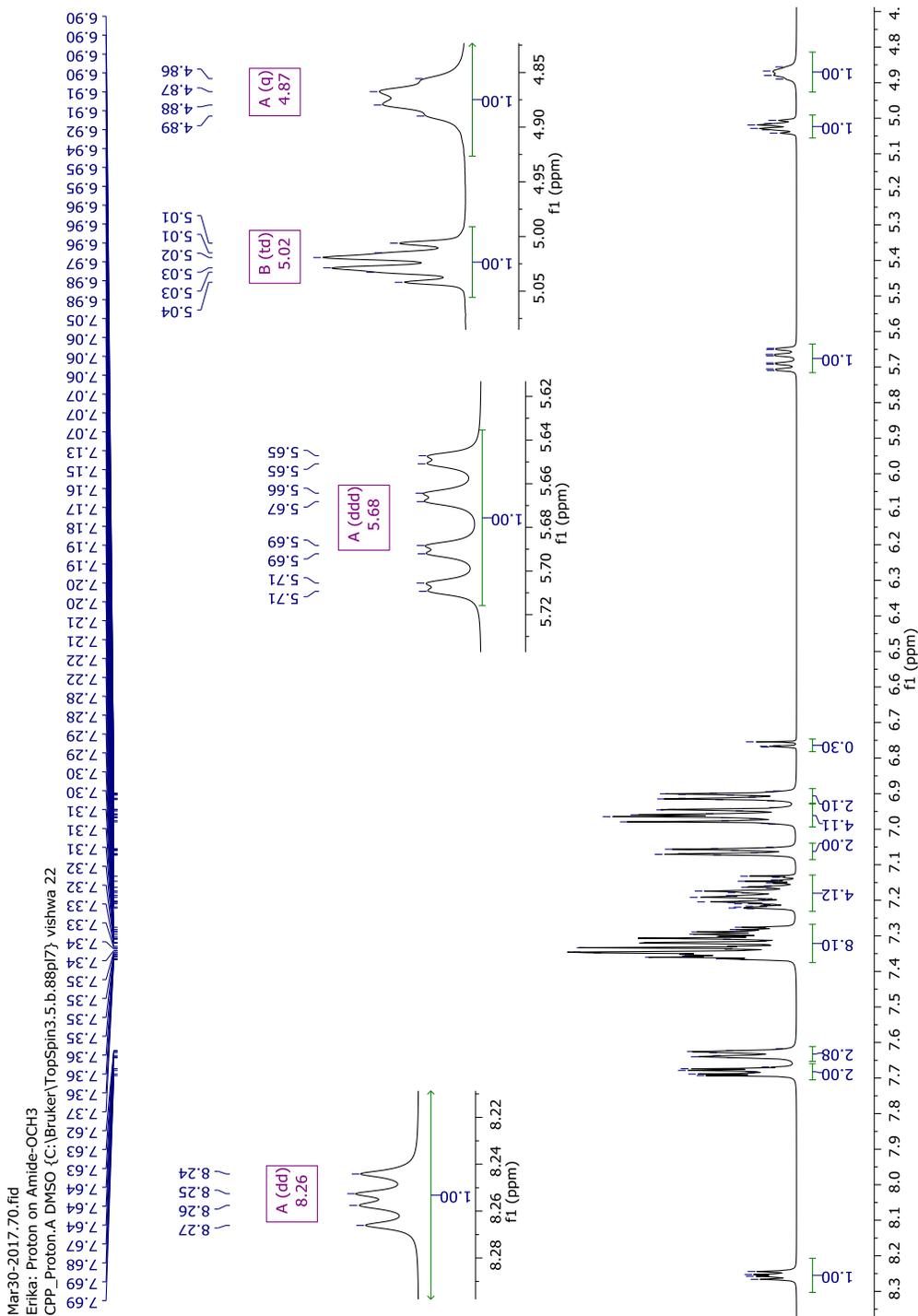


Figura 91. Ampliación del espectro de RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) del α-aminofosfonato 17.

Finalmente, en 8.26 ppm (*g*) se observa una señal doble de doble (*dd*, $J = 8.1, 5.1$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al N de la amida.

En la Figura 92 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

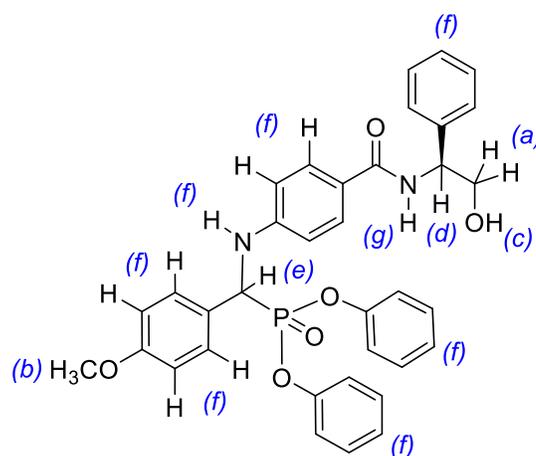


Figura 92. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **17**.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) se muestra en la Figura 93.

A un desplazamiento químico de 53.8 ppm se encuentra un doblete (*d*, $J = 157.5$ Hz) con una constante de acoplamiento característica que indica la presencia del enlace C-P de los α -aminofosfonatos.

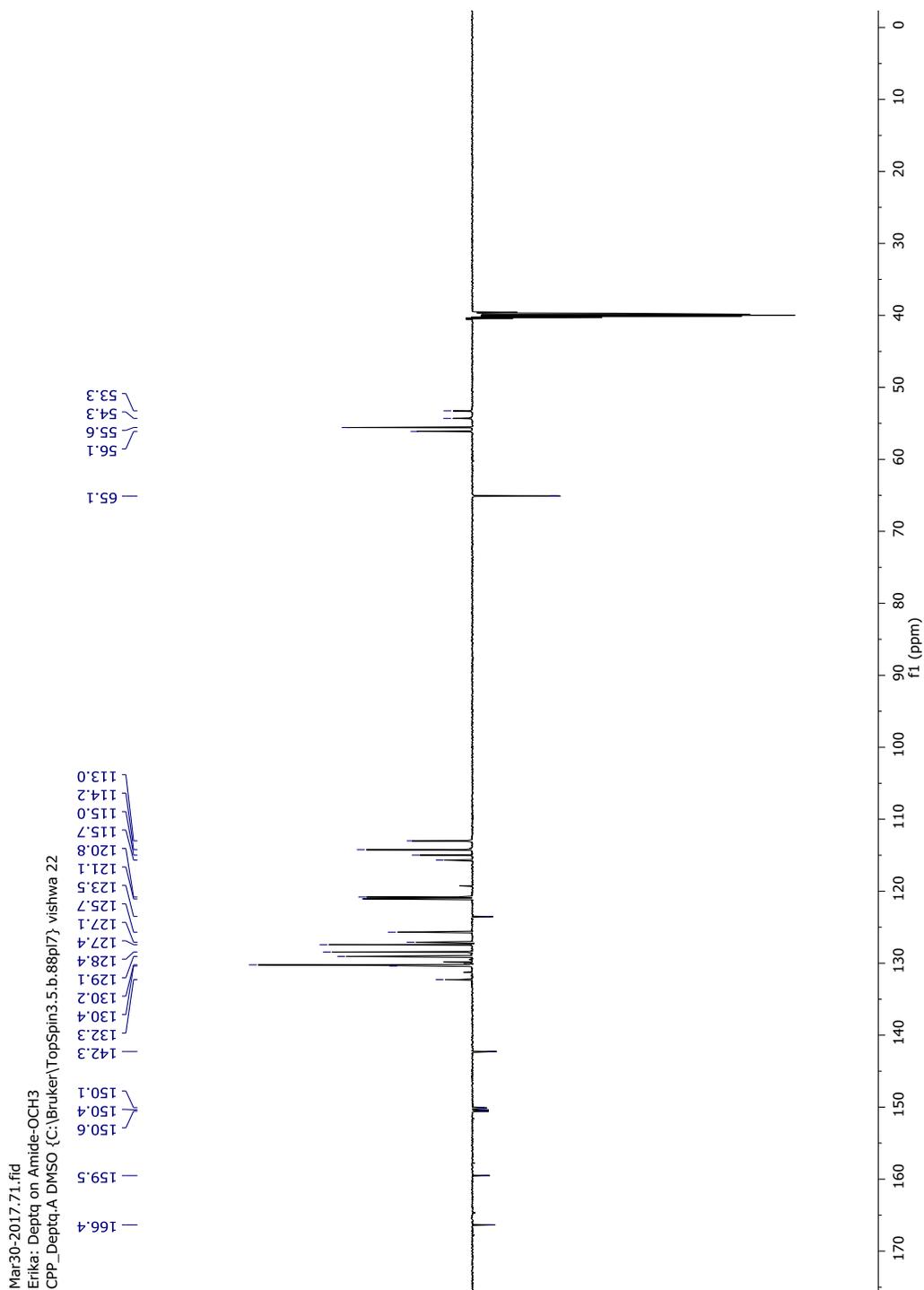


Figura 93. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 17.

En 55.6 ppm, se observan la señal del C del metoxilo. A 56.1 ppm aparece la señal correspondiente al C del CH unido al fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

En 65.1 ppm se observa la señal correspondiente al C del metileno del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 113.0, 114.2, 115.0, 115.7, 120.8, 121.1, 123.5, 125.7, 127.1, 127.4, 128.4, 129.1, 130.2, 130.4, 132.3, 142.3, 150.1, 150.4, 150.6 y 159.5 ppm.

Finalmente, en 166.4 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo de la amida.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 94, en el cual se observa una señal doble a 16.45 (d, $J = 24.8$ Hz).

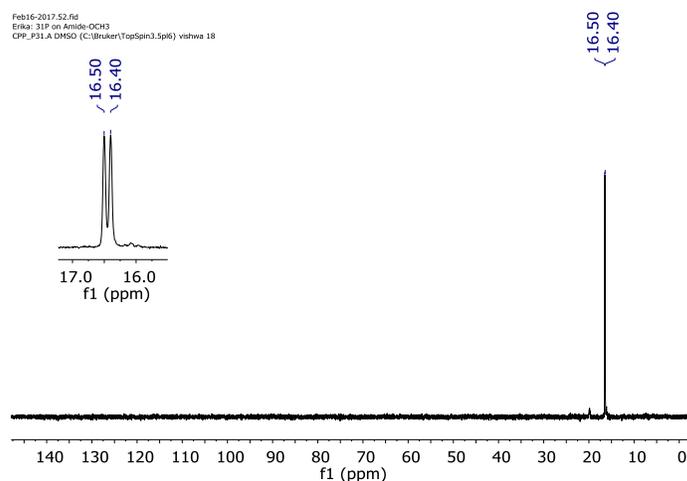


Figura 94. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **17**.

- **ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN**

En el análisis de HRMS (ESI⁺) m/z , valor calculado para

$C_{35}H_{34}N_2O_6P$ $[M + H]^+$ 609.2149, encontrado 609.2077.

5.2.5. α -AMINOFOSFONATO 18 (AMIDA DE BENZALDEHÍDO)

En la Figura 97 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **18**

5.2.5.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 18

Difenil (((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletíl)carbamoil)fenil)amino)(fenil)metil)fosfonato. Benzaldehído (82.8 mg, 1 eq), (S)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletíl)benzamida (200.0 mg, 1 eq) y difenilfosfita (548.2 mg, 3 eq) fueron disueltos en etanol (1.5 mL), la mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 70°C por 30 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

Para la purificación del compuesto **18**, el crudo de reacción fue filtrado y lavado con etanol frío. Se corrió una TLC comparando el sólido obtenido con las materias primas, se obtuvo una mancha diferente a éstas últimas. El producto obtenido posee un $R_f=0.42$ (hexano: acetato de etilo: metanol 5:4:1), el sólido de color blanco posee un PF de 170-172°C.

El α -aminofosfonato **18** posee una masa molecular de 578.6 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 154.6 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 34% de rendimiento químico.

5.2.5.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 18

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz,

DMSO- d_6) se muestra en la Figura 95.

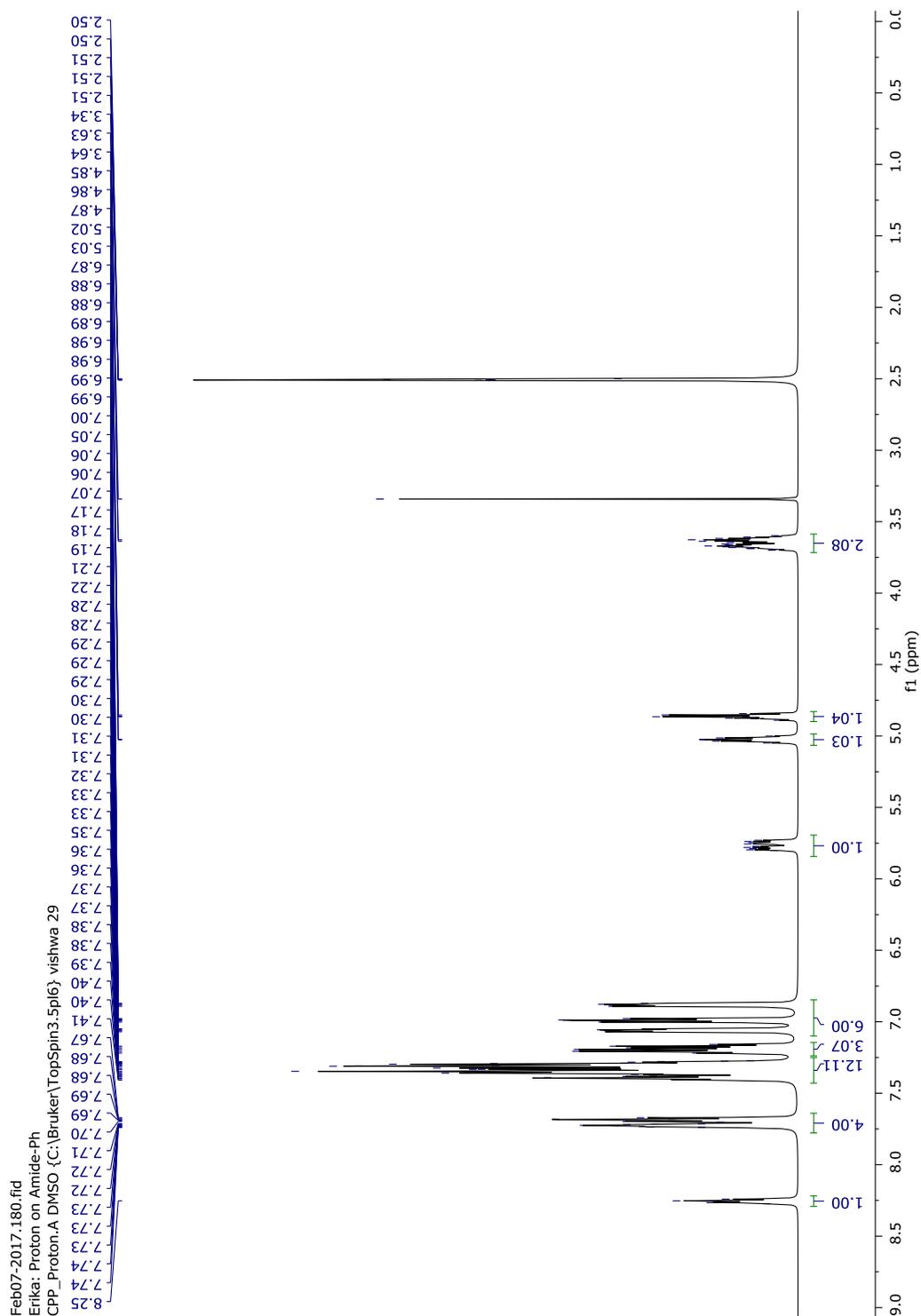


Figura 95. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **18**.

A un desplazamiento químico de 3.54 – 3.76 ppm (*a*) aparece una señal multiplete que integra para 2 H y corresponde a los protones del metileno provenientes del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

En 4.87 ppm (*b*) aparece una señal triple de triple (tt, $J = 7.6, 5.9$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del hidroxilo. En 5.02 ppm (*c*) aparece una señal cuarteto de dobles (cd, $J = 7.8, 5.2$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, a 5.76 ppm (*d*) se puede observar un doble de doble de doble (ddd, $J = 25.2, 10.3, 4.7$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón que está unido al Carbono α (enlazado al Nitrógeno y al Fósforo), el cual es una de las señales características que identifican a los α -aminofosfonatos.

En la región de los protones aromáticos, de 6.85 – 7.85 ppm (*e*) se encuentran las señales multiplete que integran para 25 H y corresponden a los protones de los dos fenilos de la difenilfosfita (10 H), los protones del fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol (5 H), los protones del amino y del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo (5 H) y los protones del fenilo del benzaldehído (5 H).

En la Figura 96 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

En la Figura 97 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

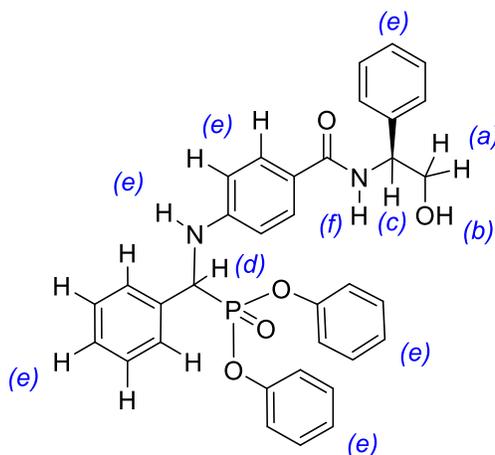


Figura 97. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **18**.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 98.

A un desplazamiento químico de 54.4 ppm se encuentra un doblete (d, $J = 156.0$ Hz) con una constante de acoplamiento característica que indica la presencia del enlace C-P de los α -aminofosfonatos.

En 56.1 ppm se encuentra la señal correspondiente al C del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol. En 65.1 ppm se observa la señal correspondiente al C del metileno del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 113.0, 120.8, 121.1, 123.6, 125.7, 127.1, 127.4, 128.4, 128.8, 129.1, 129.2, 130.3, 135.8, 142.3, 150.0, 150.3 y 150.5 ppm.

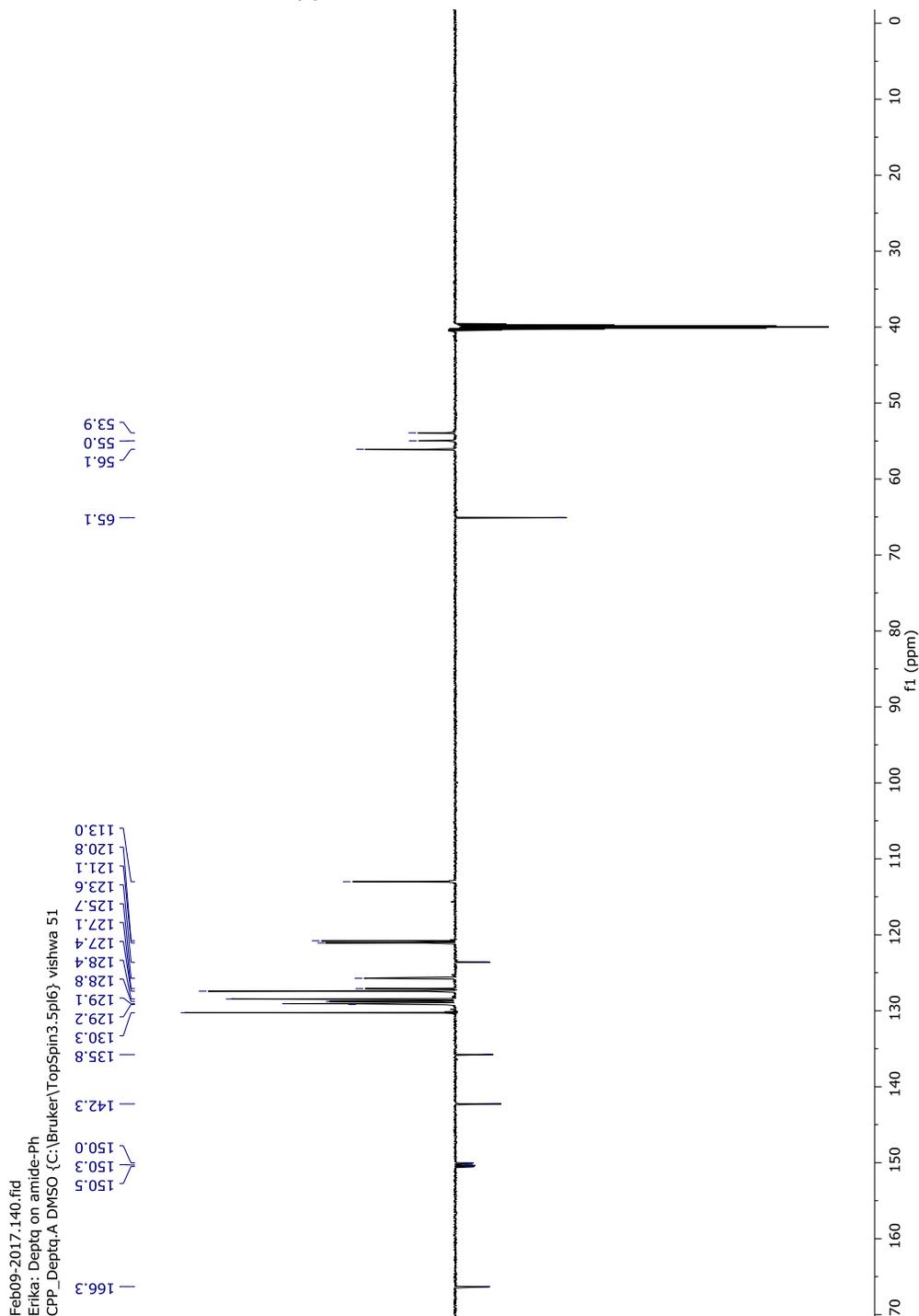


Figura 98. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 18.

Finalmente, en 166.3 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo de la amida.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 99 en el cual se observa una señal doble a 16.21 ppm (d, $J = 24.8$ Hz).

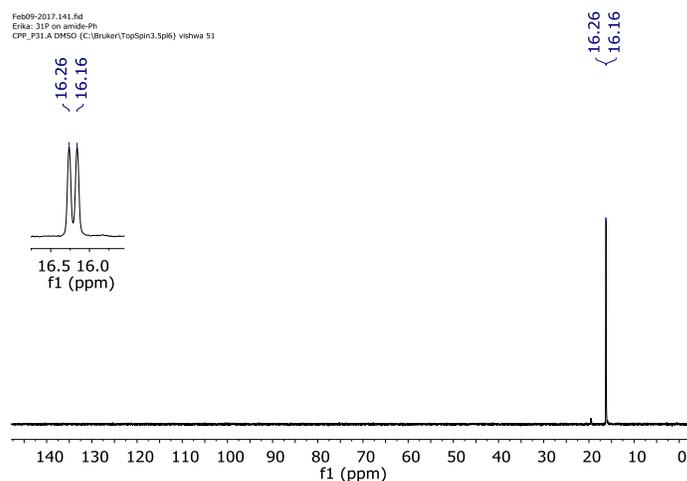


Figura 99. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **18**.

▪ **ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN**

En el análisis de HRMS (ESI⁺) m/z , valor calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 579.2043, encontrado 579.1975.

5.2.6. α -AMINOFOSFONATO 19 (AMIDA DE 4-(DIFENILAMINO) BENZALDEHÍDO)

En la Figura 102 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **19**

5.2.6.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 19

Difenil ((4-(difenilamino)fenil)(4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)metil)fosfonato. 4-(difenilamino)benzaldehído (213.3 mg, 1 eq), (S)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletil)benzamida (200.0 mg, 1 eq) y difenilfosfita (548.2 mg, 3 eq) fueron disueltos en etanol (1.5 mL), la mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 70°C por 30min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

Para la purificación del compuesto **19**, el crudo de reacción fue filtrado y lavado con etanol frío. Se corrió una TLC comparando el sólido obtenido con las materias primas, se obtuvo una mancha diferente a éstas últimas. El producto obtenido posee un $R_f=0.52$ (hexano: acetato de etilo: metanol 5:4:1), el sólido de color blanco posee un PF de 158-159°C.

El α -aminofosfonato **19** posee una masa molecular de 745.8 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 282.5 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 49% de rendimiento químico.

5.2.6.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO **19**

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 100.

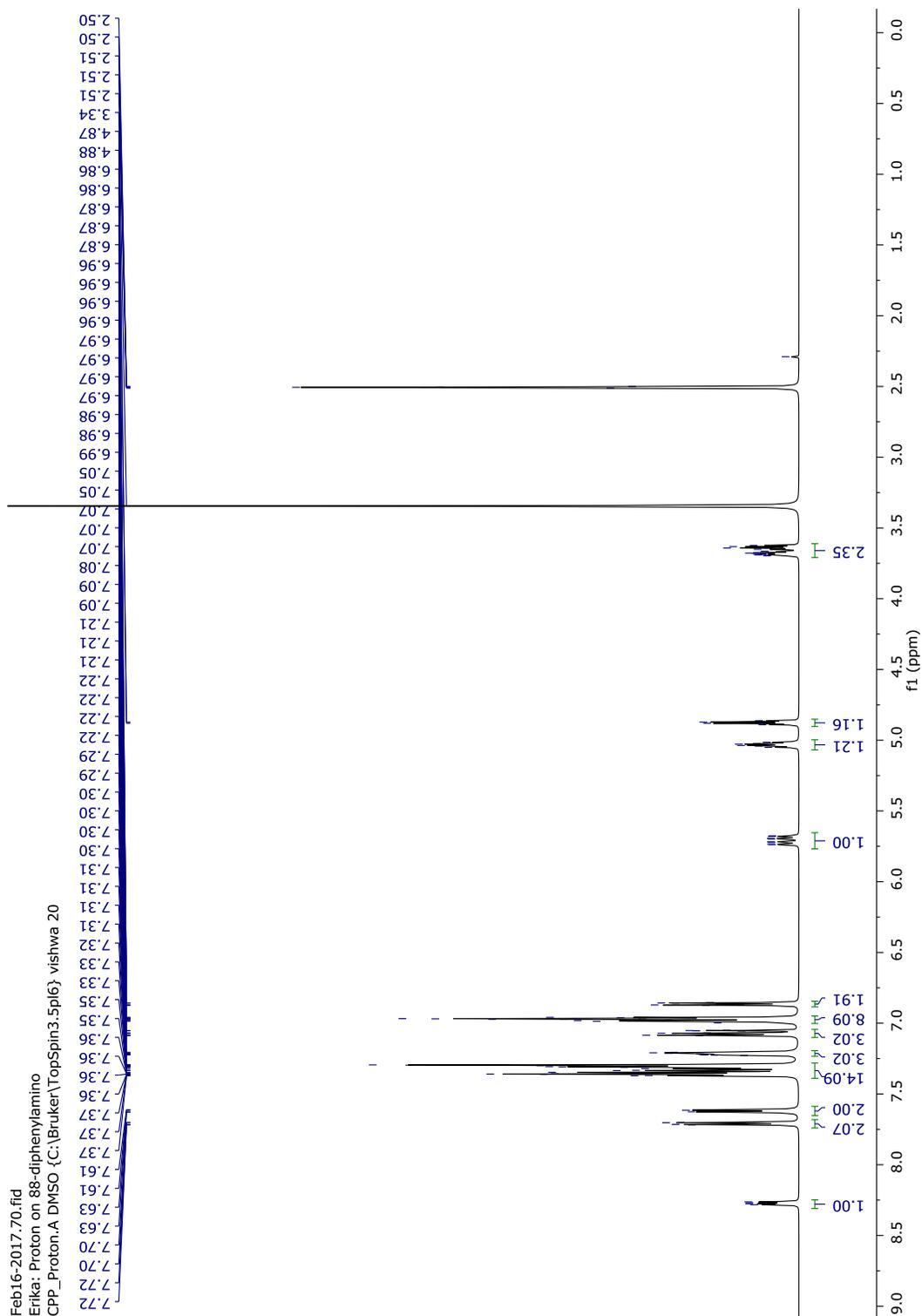


Figura 100. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del α -aminofosfonato **19**.

A un desplazamiento químico de 3.59 – 3.75 ppm (*a*) aparece una señal multiplete que integra para 2 H y corresponde a los protones del metileno provenientes del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

En 4.88 ppm (*b*) aparece un cuarteto (*c*, $J = 5.8$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del hidroxilo. En 5.03 ppm (*c*) aparece una señal triple de dobles (*td*, $J = 8.0, 5.4$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, a 5.71 ppm (*d*) se puede observar un doble de doble de doble (*ddd*, $J = 24.7, 10.3, 2.6$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón que está unido al Carbono α (enlazado al Nitrógeno y al Fósforo), el cual es una de las señales características que identifican a los α -aminofosfonatos.

En la región de los protones aromáticos, de 6.81 – 7.77 ppm (*e*) se encuentran las señales multiplete que integran para 34 H y corresponden a los protones de los dos fenilos de la difenilfosfita (10 H), los protones del fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol (5 H), los protones del amino y del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo (5 H) y los protones del trifenil amino (14 H).

Finalmente, en 8.27 ppm (*f*) se observa una señal doble de doble (*dd*, $J = 8.1, 4.0$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al N de la amida.

En la Figura 101 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

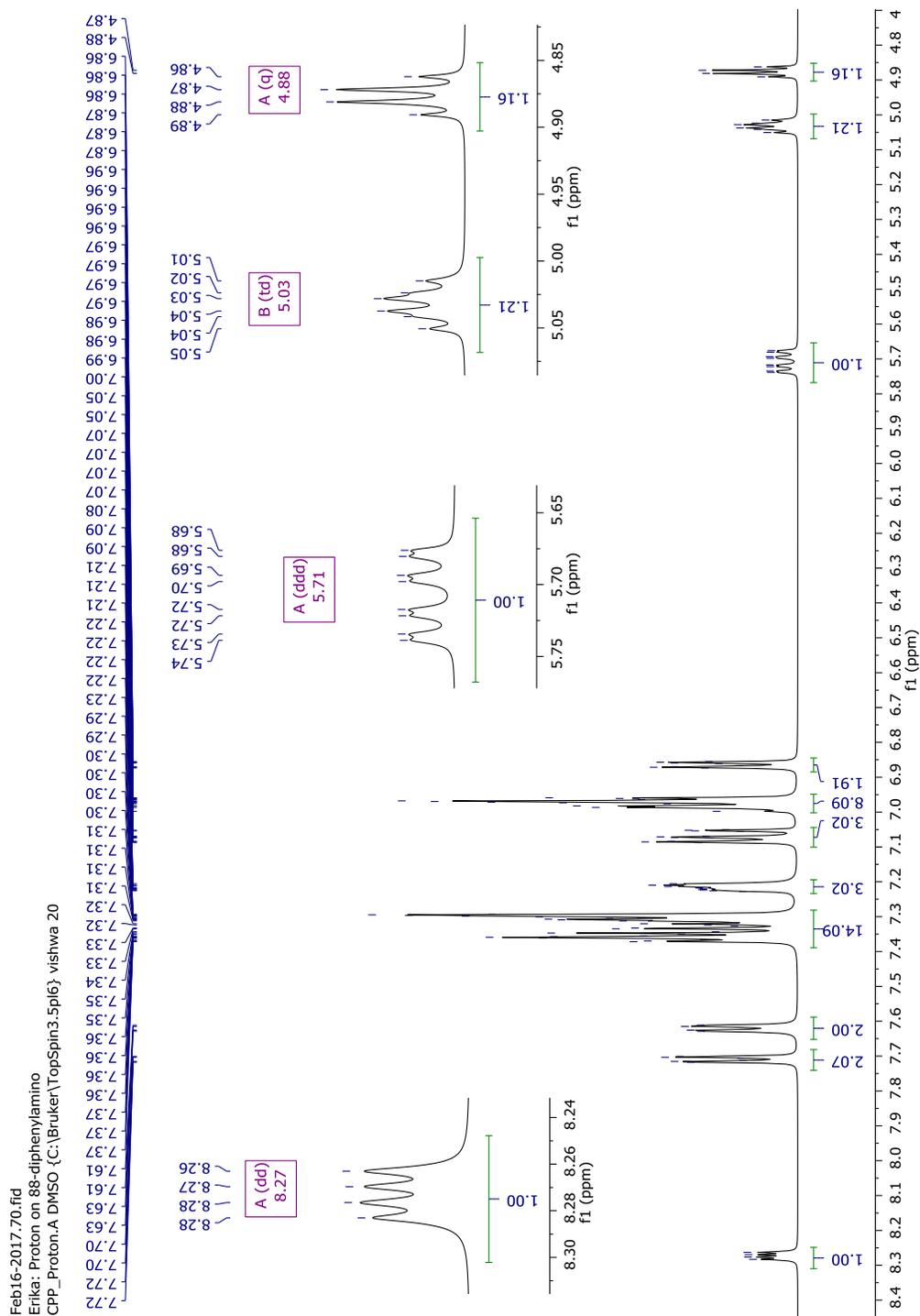


Figura 101. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **19**.

En la Figura 102 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

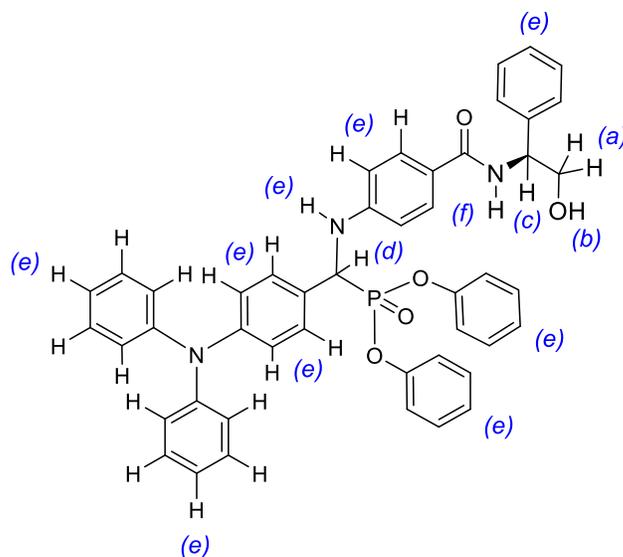


Figura 102. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **19**.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 103.

A un desplazamiento químico de 53.9 ppm se encuentra un doblete (d, $J = 156.2$ Hz) con una constante de acoplamiento característica que indica la presencia del enlace C-P de los α -aminofosfonatos. En 56.1 ppm se encuentra la señal correspondiente al C del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

En 65.1 ppm se observa la señal correspondiente al C del metileno del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

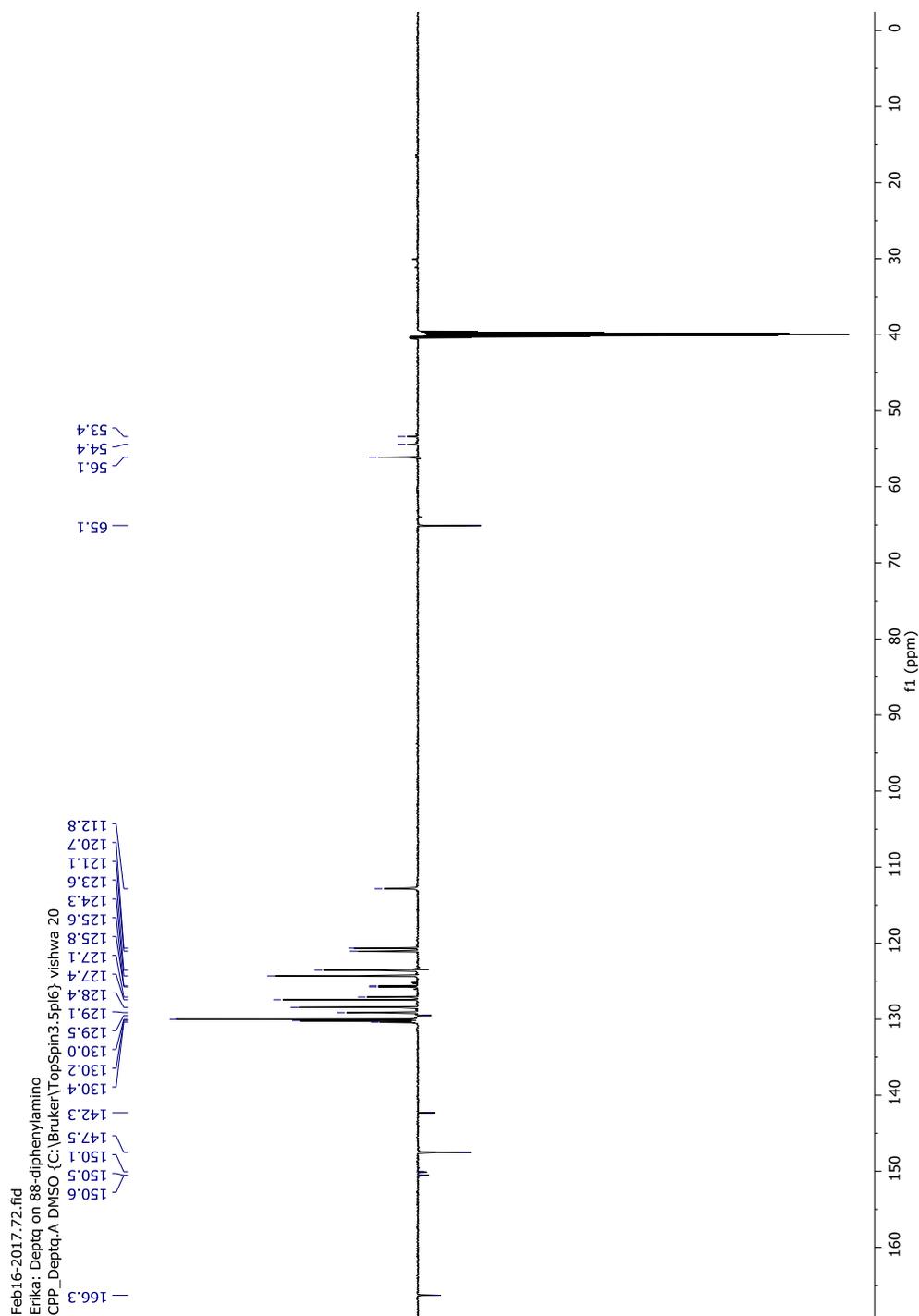


Figura 103. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **19**.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 112.8, 120.7, 121.1, 123.4, 123.6, 124.3, 125.6, 125.8, 127.1, 127.4, 128.4, 129.1, 129.5, 130.0, 130.2, 130.4, 142.3, 147.5, 147.6, 150.1, 150.5 y 150.6 ppm.

Finalmente, en 166.3 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo de la amida.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 104 en el cual se observa una señal doble a 16.28 ppm (d, $J = 24.5$ Hz).

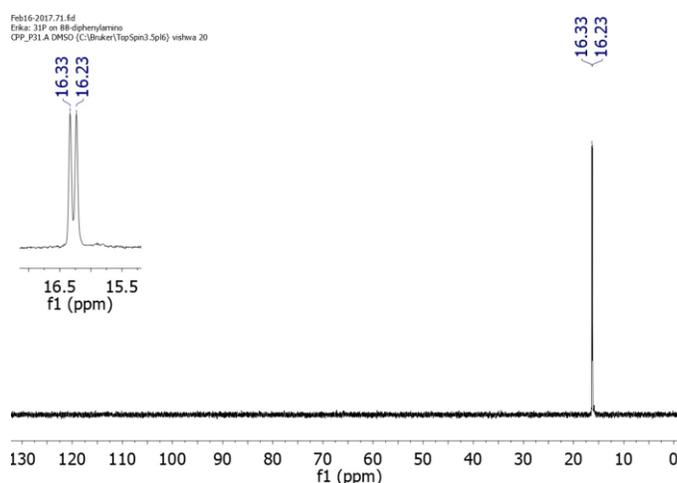


Figura 104. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **19**.

▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI $^+$) m/z , valor calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 746.2778, encontrado 746.2686.

5.2.7. α -AMINOFOSFONATO **20** (AMIDA DE 4-(4-MORFOLINIL) BENZALDEHÍDO)

En la Figura 107 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **20**.

5.2.7.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 20

Difenil (((4-(((*S*)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)(4-morfolinofenil)metil)fosfonato. 4-(4-Morfolinil)benzaldehído (78.3 mg, 1.5 eq), (*S*)-4-amino-*N*-(2-hidroxi-1-feniletil)benzamida (70 mg, 1 eq) y difenilfosfita (191.8 mg, 3 eq) fueron disueltos en etanol (0.5 mL), la mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 20 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

Para la purificación del compuesto **20**, el crudo de reacción fue filtrado y lavado con etanol frío. Se corrió una TLC comparando el sólido obtenido con las materias primas, se obtuvo una mancha diferente a éstas últimas. El producto obtenido posee un $R_f=0.32$ (hexano: acetato de etilo: metanol 5:4:1), el sólido de color amarillo paja posee un PF de 127-129°C.

El α -aminofosfonato **20** posee una masa molecular de 663.7 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 102.8 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 57% de rendimiento químico.

5.2.7.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 20

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 105.

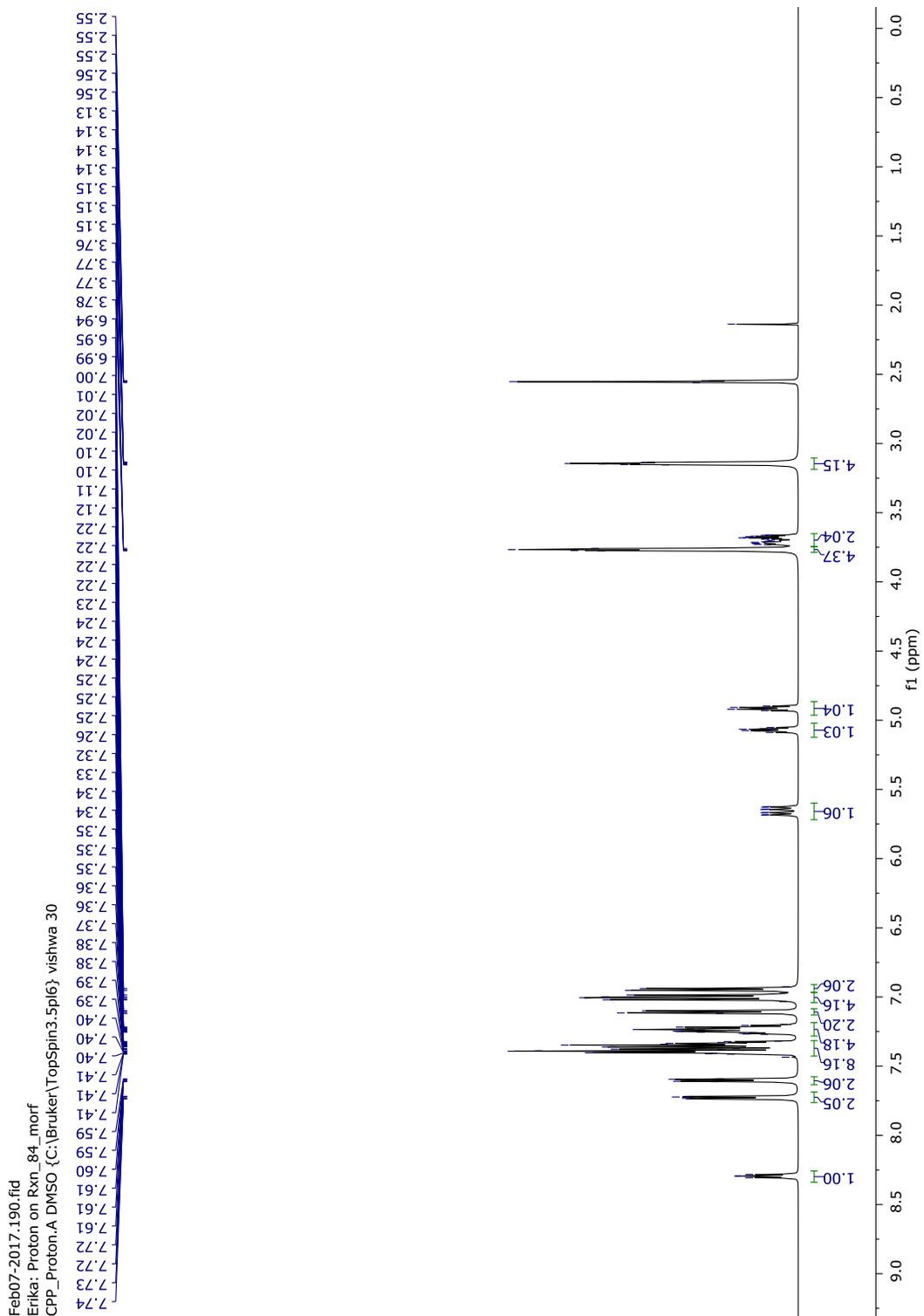


Figura 105. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 20.

A un desplazamiento químico de 3.09 – 3.21 ppm (α) aparece una señal multiplete que integra para 4 H y corresponde a los

protones alifáticos de los dos metilenos enlazados al N del morfolinil. En 3.64 – 3.75 ppm (*b*) aparece una señal multiplete que integra para 2 H y corresponde a los protones del metileno provenientes del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol. En 3.77 ppm (*c*) se observa una señal triplete (t, $J = 4.5$ Hz), que integra para 4 H, los protones alifáticos de los dos metilenos enlazados al O del morfolinil.

En 4.91 ppm (*d*) aparece un doble de triple (dt, $J = 8.0, 5.9$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del hidroxilo.

En 5.07 ppm (*e*) aparece una señal triple de doble (td, $J = 7.8, 5.5$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, a 5.66 ppm (*f*) se puede observar un doble de doble de doble (ddd, $J = 24.4, 10.3, 2.0$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón que está unido al Carbono α (enlazado al Nitrógeno y al Fósforo), el cual es una de las señales características que identifican a los α -aminofosfonatos.

En la región de los protones aromáticos, de 6.89 – 7.77 ppm (*g*) se encuentran las señales multiplete que integran para 24 H y corresponden a los protones de los dos fenilos de la difenilfosfita (10 H), los protones del fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol (5 H), los protones

del amino y del fenilo del 4-aminobenzoato de etilo (5 H) y los protones del fenilo enlazado al morfolinil (5 H).

En la Figura 106 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

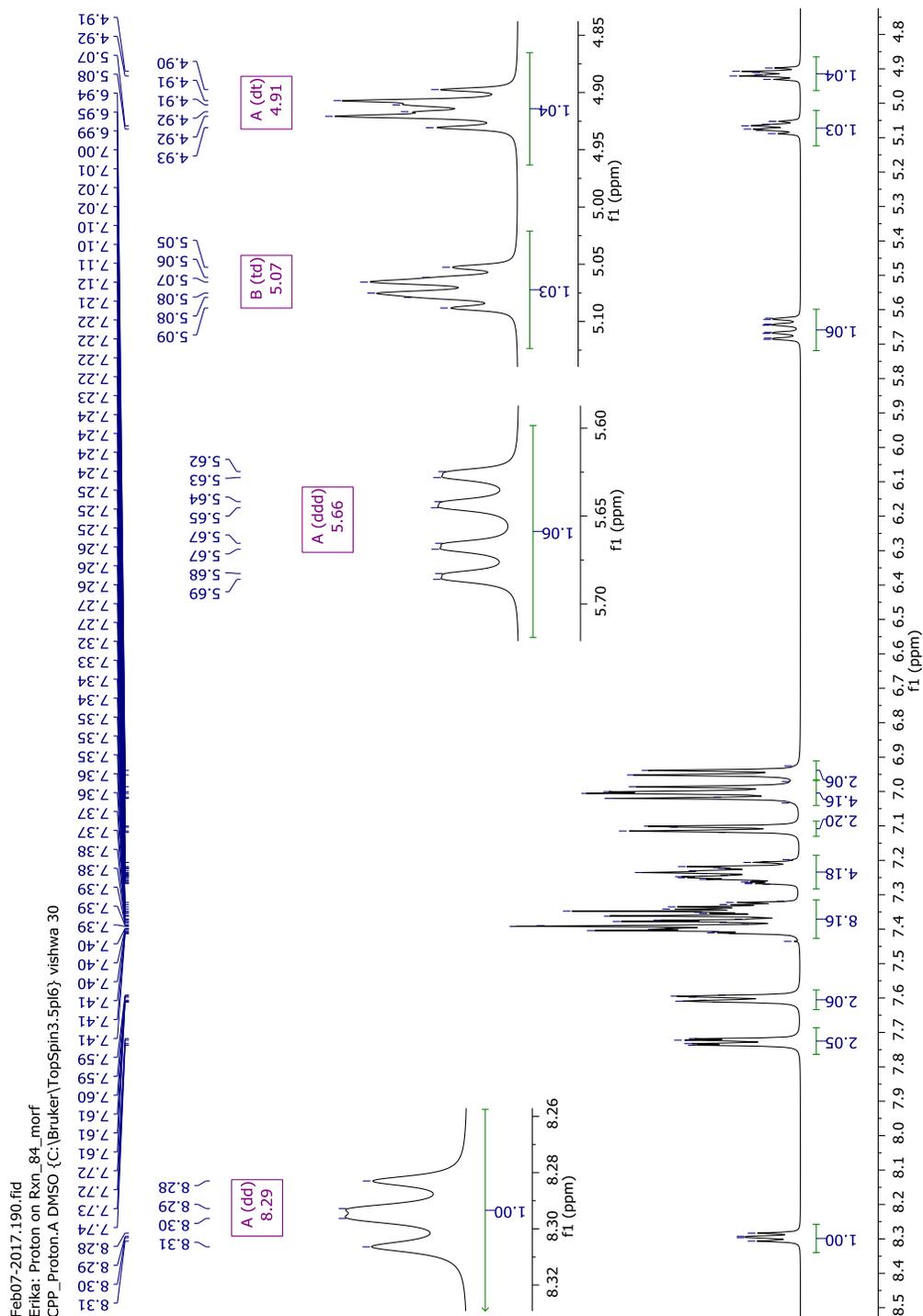


Figura 106. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato 20.

Finalmente, en 8.29 ppm (*h*) se observa una señal doble de doble (*dd*, $J = 8.1, 6.0$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al N de la amida.

En la Figura 107 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

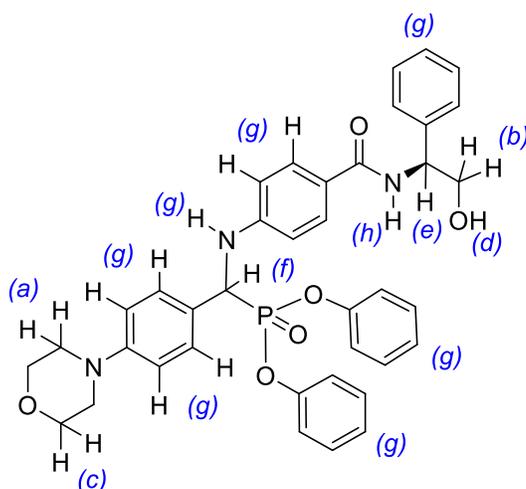


Figura 107. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **20**.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 108.

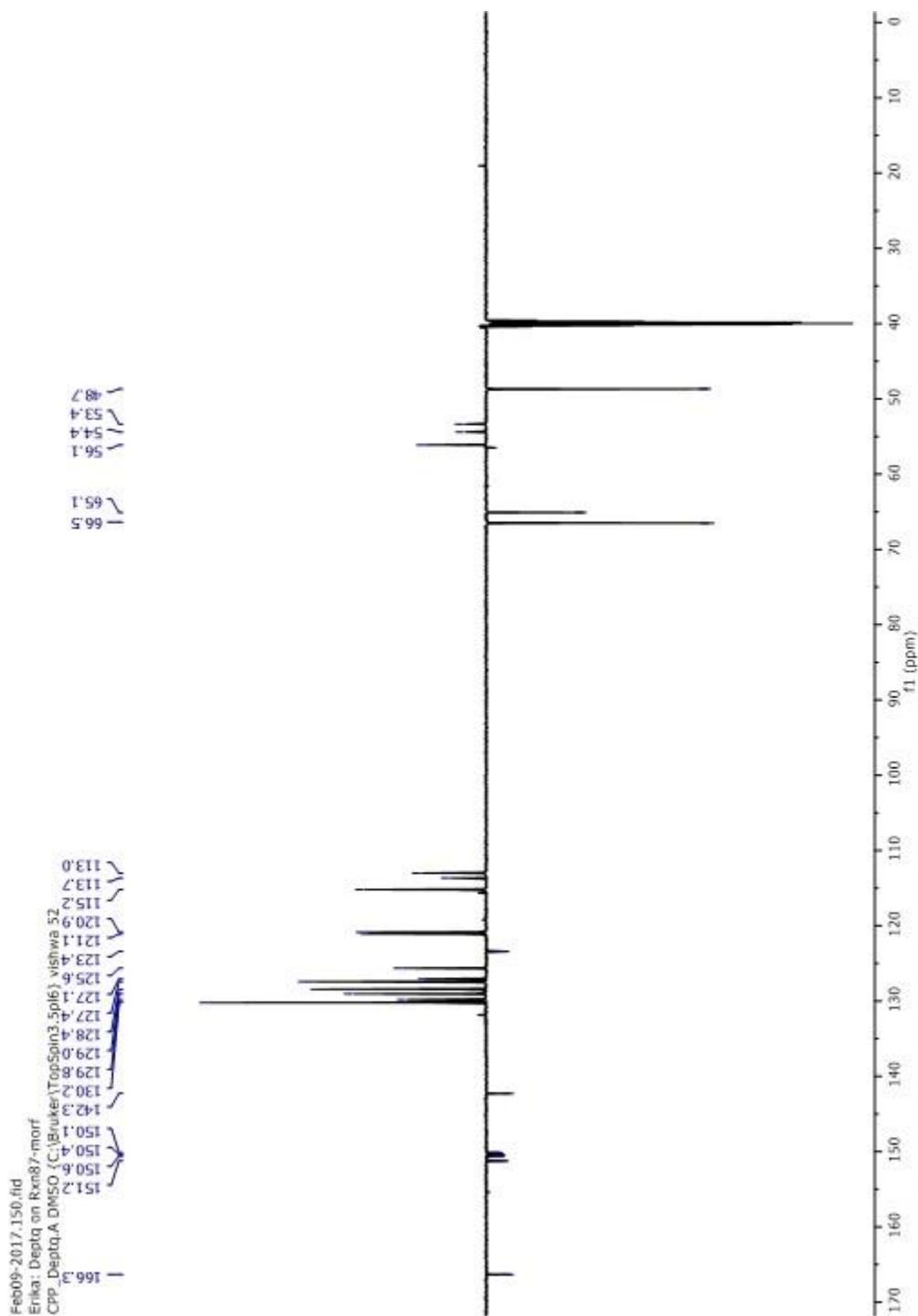


Figura 108. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **20**.

A un desplazamiento químico de 48.7 ppm, se observan las señales de los C alifáticos del morfolinil, que están enlazados al N. En 53.9 ppm se encuentra un doblete (d, $J = 157.7$ Hz) con una constante

de acoplamiento característica que indica la presencia del enlace C-P de los α -aminofosfonatos.

En 56.1 ppm se encuentra la señal correspondiente al C del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol. En 65.1 ppm se observa la señal correspondiente al C del metileno del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol. En 66.5 ppm, se observan las señales de los C alifáticos del morfolinil, que están enlazados al O.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 113.0, 113.7, 115.2, 120.9, 121.1, 123.4, 125.6, 127.1, 127.4, 128.4, 129.0, 129.8, 130.2, 142.3, 150.1, 150.4, 150.6 y 151.2 ppm.

Finalmente, en 166.3 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo de la amida.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 109, en el cual se observa una señal doble a 16.59 ppm (d, $J = 24.4$ Hz).

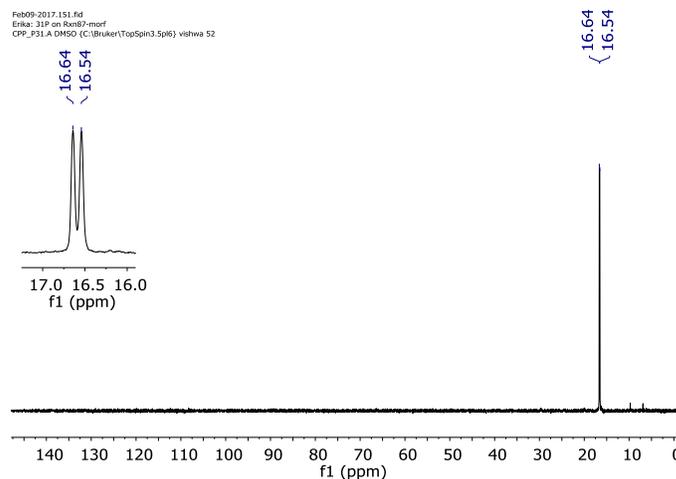


Figura 109. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **20**.

▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI^+) m/z , valor calculado para

$\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 664.2571 encontrado 664.2498.

5.2.8. α -AMINOFOSFONATO **21** (AMIDA DE 1-METIL-1-*H*-PIRAZOL-4-CARBOXALDEHÍDO)

En la Figura 112 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **21**

5.2.8.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO **21**

Difenil (((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)(1-metil-1H-pirazol-4-il)metil)fosfonato. 4-(dietilamino)benzaldehído (32.2 mg, 1.5 eq), (S)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletil)benzamida (50 mg, 1 eq) y difenilfosfita (137 mg, 3 eq) fueron disueltos en etanol (3 mL), la mezcla de reacción se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 30 min, el progreso de la reacción fue monitoreado por TLC.

Para la purificación del compuesto **21**, el crudo de reacción fue filtrado y lavado con etanol frío. Se corrió una TLC comparando el sólido obtenido con las materias primas, se obtuvo una mancha diferente a éstas últimas. El producto obtenido posee un R_f de 0.18 (hexano: acetato de etilo: metanol 6:3:1), el sólido de color blanco tornazol posee un PF de 126-128°C.

El α -aminofosfonato **21** posee una masa molecular de 582.6 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 75.2 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 66% de rendimiento químico.

5.2.8.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO **21**

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 110.

A un desplazamiento químico de 3.58 – 3.74 ppm (*a*) aparece una señal multiplete que integra para 2 H y corresponde a los protones del metileno provenientes del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol. En 3.81 ppm (*b*) se observa una señal singulete que integra para 3 H, los protones del *N*-metilo del pirazol.

En 4.88 ppm (*c*) aparece un singulete que integra para 1 H y corresponde al protón del hidroxilo.

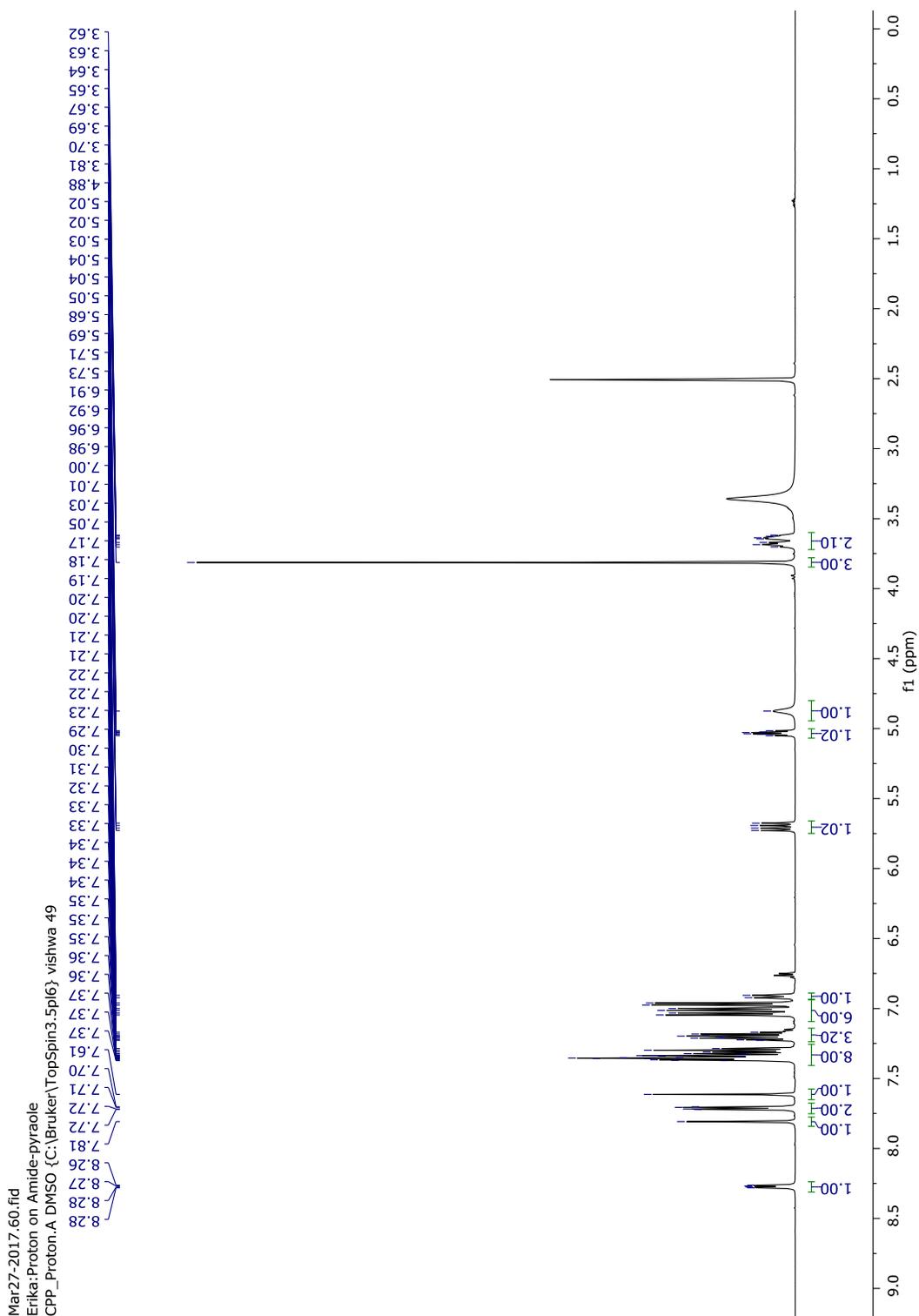


Figura 110. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **21**.

En 5.03 ppm (*d*) aparece una señal triple de doble (td, $J = 7.9$, 5.5 Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del CH unido al

fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol. Posteriormente, a 5.70 ppm (*e*) se puede observar un doble de doble (dd, $J = 21.2, 10.2$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón que está unido al Carbono α (enlazado al Nitrógeno y al Fósforo), el cual es una de las señales características que identifican a los α -aminofosfonatos.

En 6.91 ppm (*f*) se observa una señal doble (d, $J = 10.3$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del amino de la 4-amino benzamida. En 6.97 ppm (*g*) se encuentra una señal doble (d, $J = 8.7$ Hz) que integra para 2 H, los protones *meta* de la 4-aminobenzamida.

A un desplazamiento químico de 6.99 – 7.44 ppm (*h*) se encuentran las señales multiplete que integran para 15 H y corresponden a los protones de los dos fenilos de la difenilfosfita (10 H) y a los protones del fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol (5 H).

Posteriormente en 7.61 ppm (*i*) aparecen una señal singulete que integran para 1 H y corresponde al protón enlazado al C contiguo al *N*-metilo del pirazol. En 7.71 ppm (*j*) se encuentra una señal doble de doble (d, $J = 8.8, 2.0$ Hz) que integra para 2 H, los protones *orto* de la 4-aminobenzamida.

En la Figura 111 se presenta una ampliación del espectro, en la cual las señales se muestran con mayor claridad.

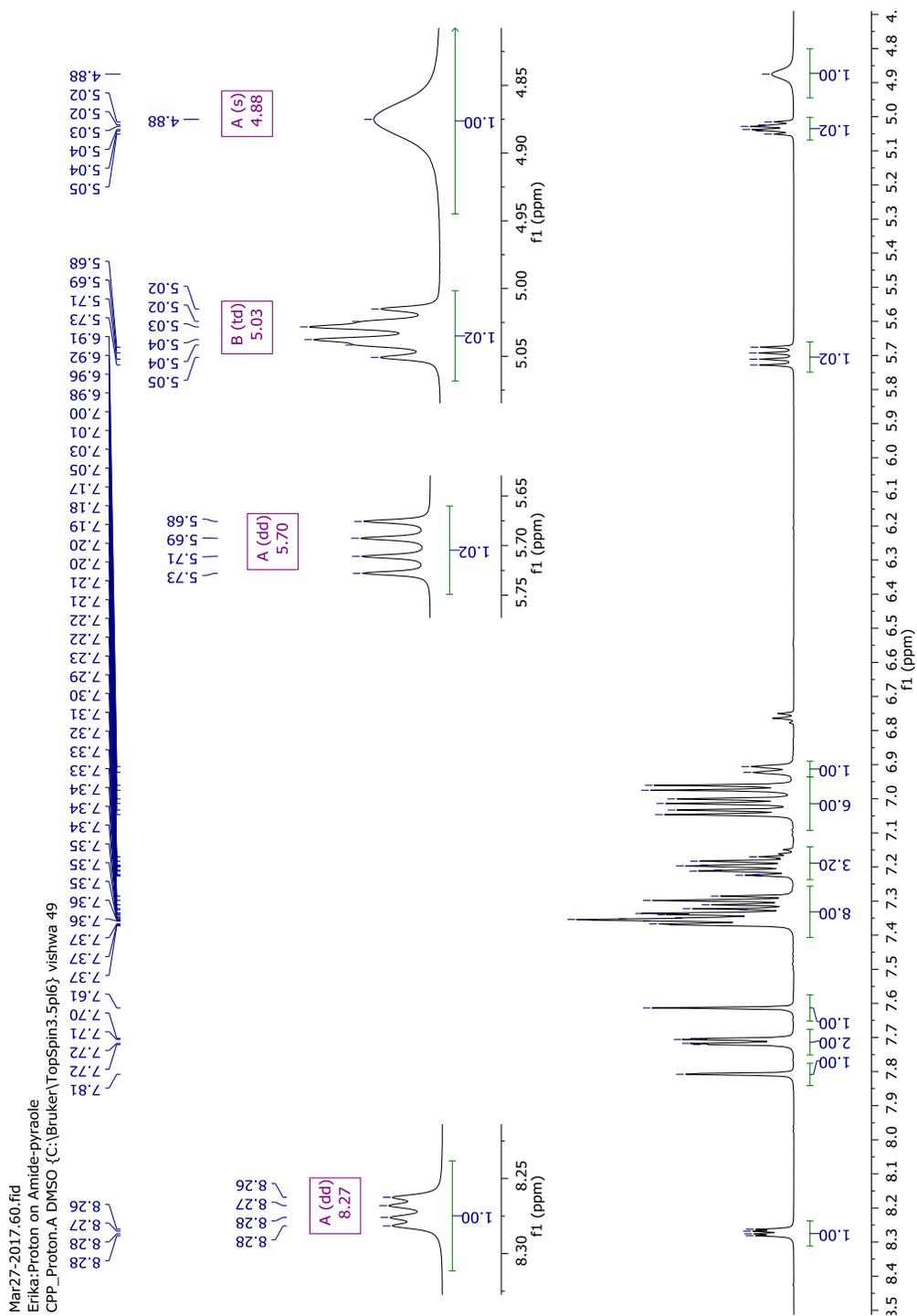


Figura 111. Ampliación del espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **21**.

En 7.81 ppm (*k*) aparece otra señal singlete que integran para 1 H y corresponde al protón enlazado al C que a su vez está enlazado por un doble enlace al N ($\text{C}=\text{N}$) del pirazol.

Finalmente, en 8.27 ppm (*l*) se observa una señal doble de doble (dd, $J = 8.1, 3.4$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al N de la amida.

En la Figura 112 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

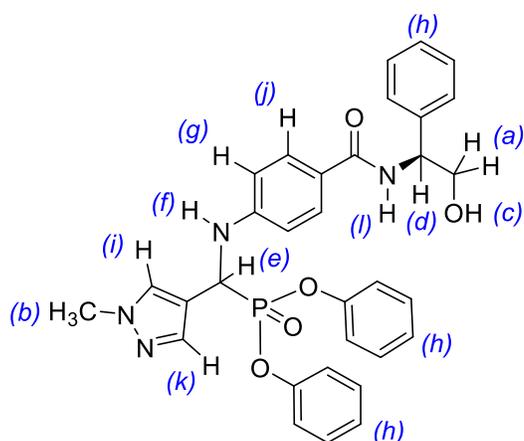


Figura 112. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **21**.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 113.

A un desplazamiento químico de 39.1 ppm, se observa la señal del C del *N*-metilo del pirazol. En 46.6 ppm se encuentra un doblete (d, $J = 163.2$ Hz) con una constante de acoplamiento característica que indica la presencia del enlace C-P de los α -aminofosfonatos.

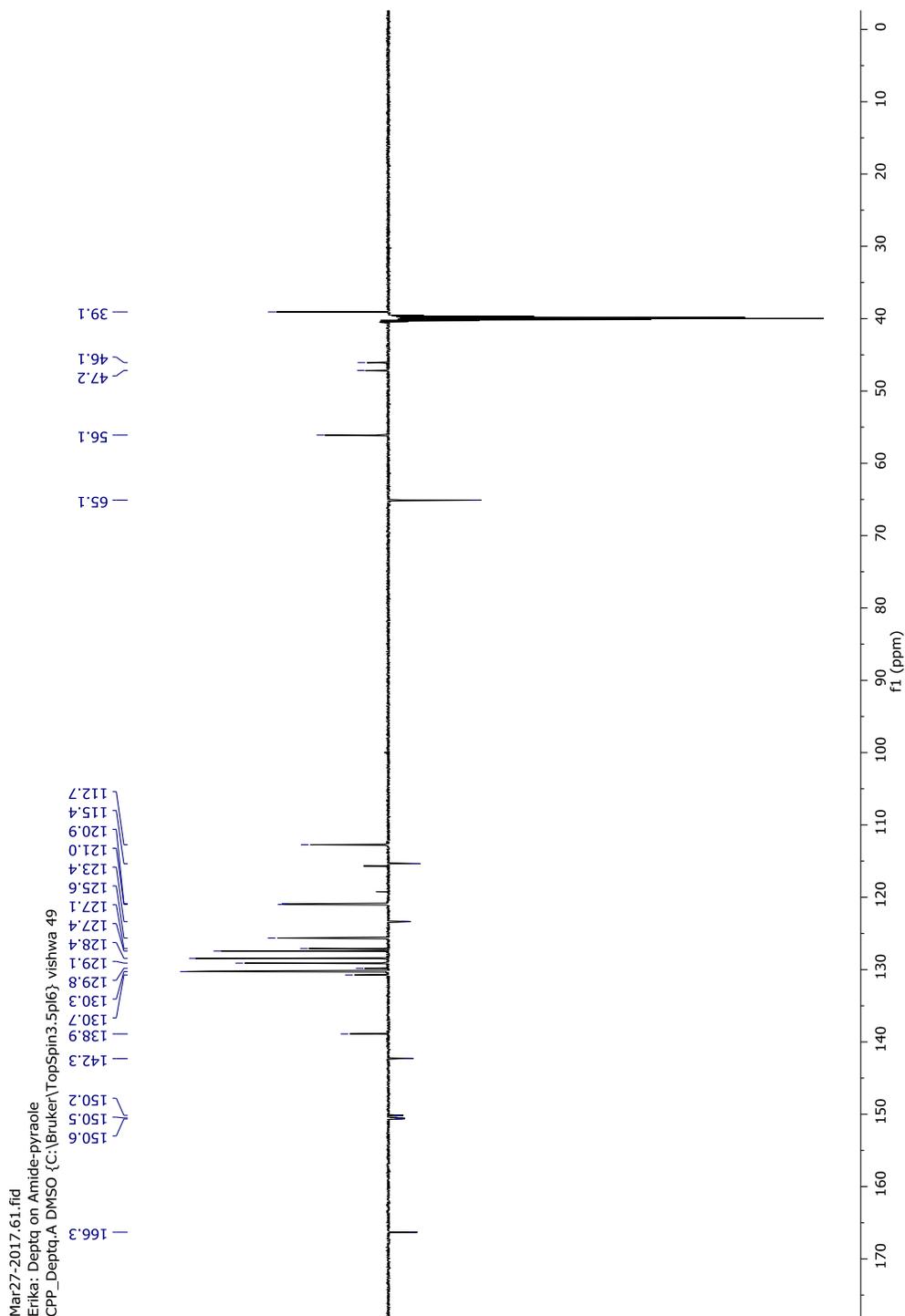


Figura 113. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **21**.

En 56.1 ppm se encuentra la señal correspondiente al C del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol. En 65.1 ppm se observa la señal correspondiente al C del metileno del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 112.7, 115.4, 120.9, 121.0, 123.4, 125.6, 127.1, 127.4, 128.4, 129.1, 129.8, 130.3, 130.7, 138.9, 142.3, 150.2, 150.5 y 150.6 ppm.

Finalmente, en 166.3 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo de la amida.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 114 en el cual se observa una señal doble a 16.40 ppm (d, $J = 20.9$ Hz).

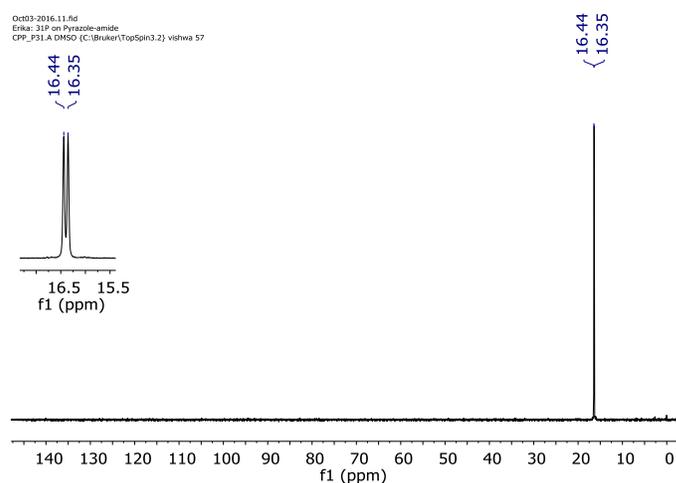


Figura 114. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **21**.

▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI $^+$) m/z , valor calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 583.2105, encontrado 583.2056.

5.2.9. α -AMINOFOSFONATO 22 (AMIDA DE ISOBUTIRALDEHÍDO)

En la Figura 117 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **22**

5.2.9.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 22

Difenil (1-((4-((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)-2-metilpropil)fosfonato. Isobutiraldehído (29.5 mg, 1.5 eq) y (S)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletil)benzamida (70.0 mg, 1 eq) fueron disueltos en etanol (0.5 mL), se agregó la difenilfosfita (191.9 mg, 3 eq) y se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 40 min, el progreso de la reacción continuó monitoreándose por TLC.

Para la purificación del compuesto **22**, el crudo de reacción fue adsorbido en sílica gel y se purificó en el equipo de cromatografía flash *Combiflash* empleando el sistema hexano: acetato de etilo: metanol (5:4:1). Se utilizó una columna de Silica 4g, con un flujo de 18 mL/min. Se corrió una TLC y se observaron dos manchas diferentes a las materias primas. Se realizó una recristalización con etanol y se obtuvo un producto puro de sólido color blanco con un $R_f=0.54$ (hexano: acetato de etilo: metanol 5:4:1) y un PF de 124-125°C.

El α -aminofosfonato **22** posee una masa molecular de 544.6 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 30.5 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 21% de rendimiento químico.

5.2.9.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 22

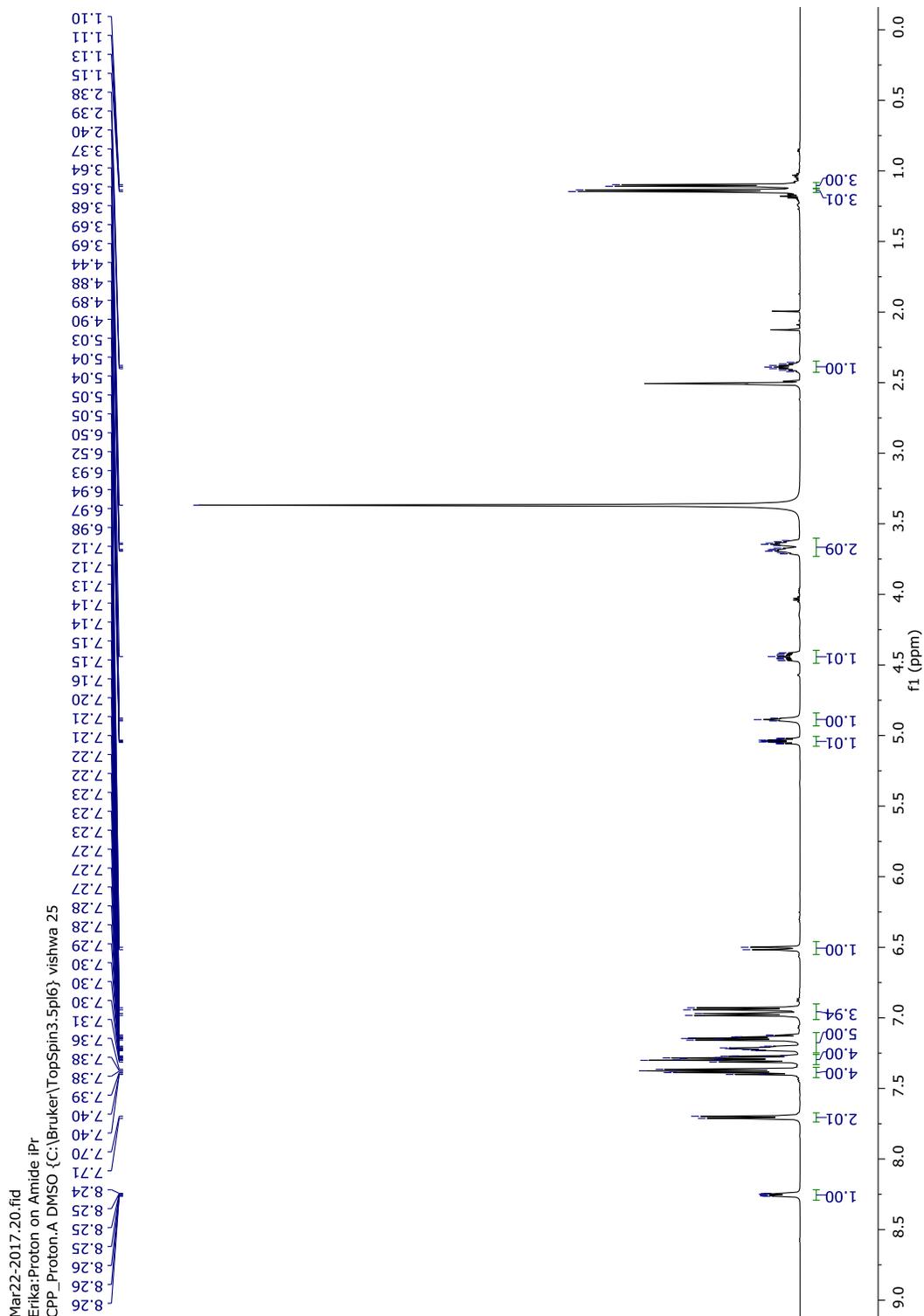
▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 115.

A un desplazamiento químico de 1.10 ppm (*a*) aparece una señal doble (d, $J = 6.7$ Hz) que integra para 3 H, a continuación, en 1.14 ppm (*b*) aparece otra señal doble (d, $J = 6.8$ Hz) que integra para 3 H; estas señales dobles corresponden a los protones de los metilos del isopropilo.

En 2.39 ppm (*c*) se observa un hepteto (hept, $J = 6.7$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al CH del isopropilo contiguo al C α . En 3.60 – 3.74 ppm (*d*) aparece una señal multiplete que integra para 2 H y corresponde a los protones del metileno provenientes del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, en 4.44 ppm (*e*) se puede observar un doble de doble de doble de doble (dddd, $J = 22.3, 16.6, 10.6, 5.3$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón que está unido al Carbono α (enlazado al Nitrógeno y al Fósforo), el cual es una de las señales características que identifican a los α -aminofosfonatos.



En 4.89 ppm (f) aparece un triplete (t, $J = 5.8$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del hidroxilo. En 4.99 – 5.08 ppm (g)

aparece una señal multiplete que integra para 1 H y corresponde al protón del CH unido al fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

En 6.51 ppm (*h*) se observa una señal doble (d, $J = 10.5$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del amino de la 4-amino benzamida.

En 6.94 ppm (*i*) se encuentra una señal doble (d, $J = 8.5$ Hz) que integra para 2 H, los protones *meta* de la 4-aminobenzamida.

A un desplazamiento químico de 6.96 – 7.43 ppm (*j*) se encuentran las señales multiplete que integran para 15 H y corresponden a los protones de los dos fenilos de la difenilfosfita (10 H) y a los protones del fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol (5 H).

En 7.70 ppm (*k*) se encuentra una señal doble (d, $J = 8.8$ Hz) que integra para 2 H, los protones *orto* de la 4-aminobenzamida. Finalmente, en 8.23 – 8.28 ppm (*l*) se observa una señal multiplete que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al N de la amida.

En la Figura 116 se presenta una ampliación del espectro, en la cual se muestran con mayor claridad las señales descritas.

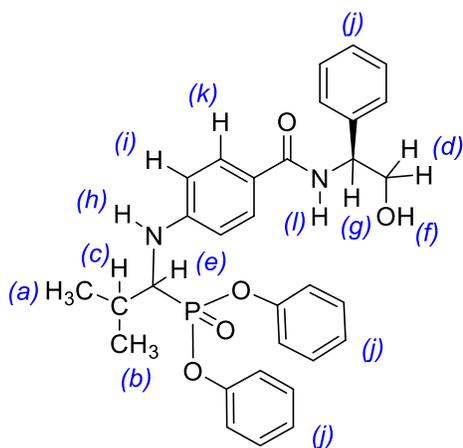


Figura 117. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **22**.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO - d_6) se muestra en la Figura 118.

A un desplazamiento químico de 18.9 y 20.6 ppm se observan las señales de los carbonos de los metilos del isopropilo. A 30.3 ppm aparece la señal del C del CH del isopropilo.

En 55.5 ppm se encuentra un doblete (d, $J = 152.4$ Hz) con una constante de acoplamiento característica que indica la presencia del enlace C-P de los α -aminofosfonatos. En 56.1 ppm se encuentra la señal correspondiente al C del CH unido al fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol. En 65.1 ppm se observa la señal correspondiente al C del metileno del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

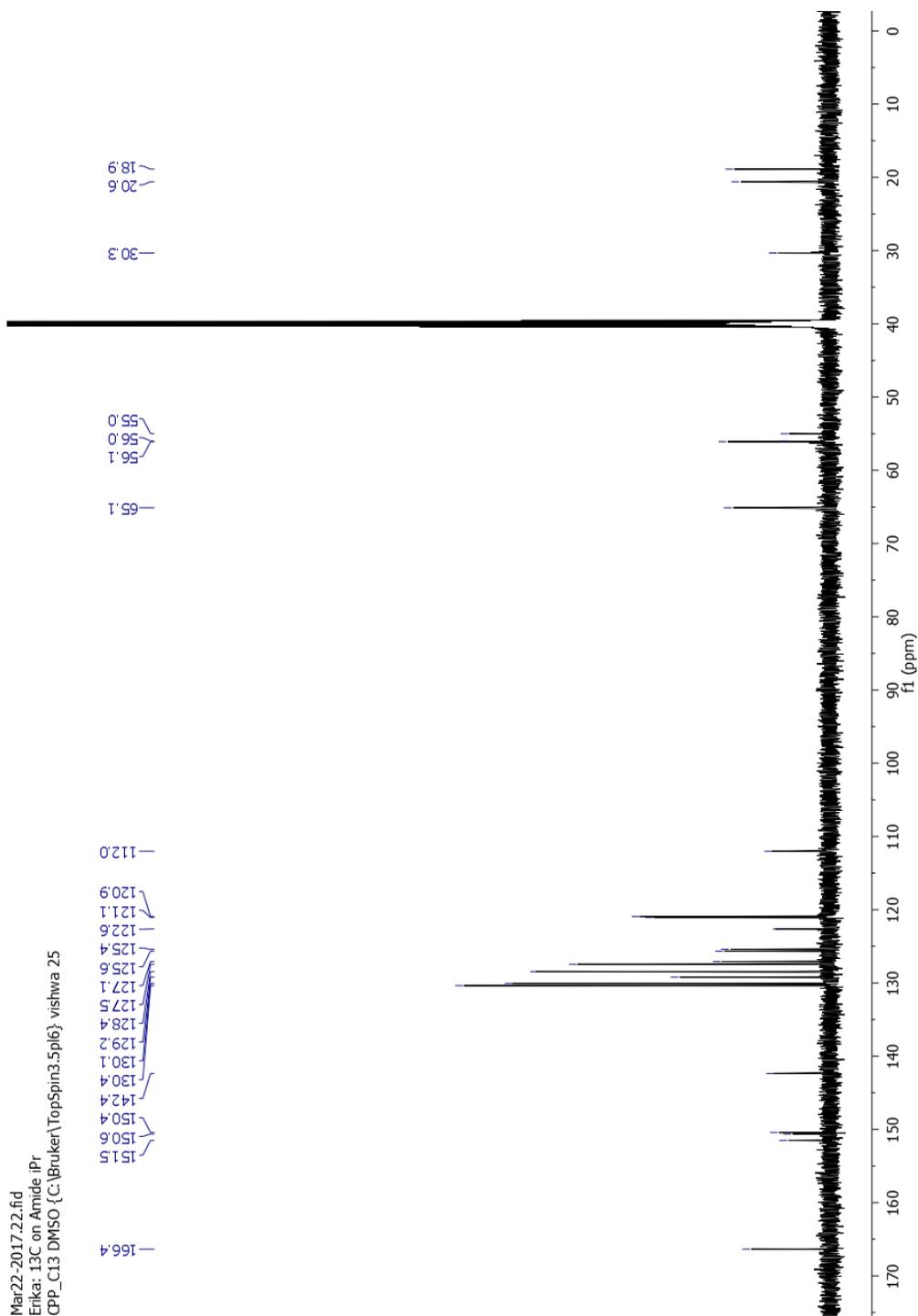


Figura 118. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato 22.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 112.0, 120.9, 121.1, 125.4, 125.7, 127.1, 127.5, 128.4, 129.2, 130.1, 130.4, 142.4, 150.4, 150.6 y 151.5 ppm.

Finalmente, en 166.4 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo de la amida.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 119 en el cual se observa una señal doble de doble a 19.31 ppm (dd, $J = 17.5, 7.1$ Hz).

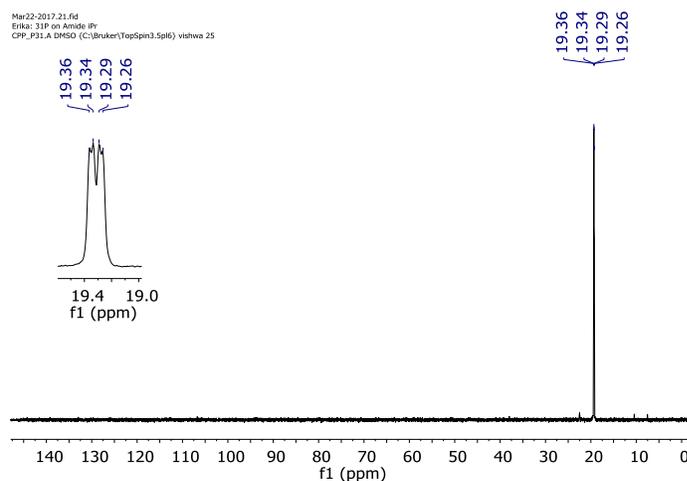


Figura 119. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **22**.

▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI $^+$) m/z , valor calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 545.2200, encontrado 545.2088.

5.2.10. α -AMINOFOSFONATO **23** (ÉSTER DE 2-ETIL-BUTILALDEHÍDO)

En la Figura 122 se encuentra la estructura química del α -aminofosfonato **23**.

5.2.10.1. SÍNTESIS DEL α -AMINOFOSFONATO 23

Difenil (2-etil-1-((4-((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)butil)fosfonato. 2-Etil-butiraldehído (41mg, 1.5 eq) y (S)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletil)benzamida (70.0 mg, 1 eq) fueron disueltos en etanol (0.5 mL), se agregó la difenilfosfita (191.9 mg, 3 eq) y se expuso a irradiación por microondas a 60°C por 40 min, el progreso de la reacción continuó monitoreándose por TLC.

Para la purificación del compuesto **23**, el crudo de reacción fue adsorbido en sílica gel y se purificó en el equipo de cromatografía flash *Combiflash* empleando el sistema hexano: acetato de etilo: metanol (5:4:1). Se utilizó una columna de Silica 12g Gold, con un flujo de 30 mL/min. Se concentraron las fracciones que contenían el producto mayoritario, el cual corresponde a un sólido color blanco con un $R_f=0.56$ (hexano: acetato de etilo: metanol 5:4:1).

El α -aminofosfonato **23** posee una masa molecular de 572.6 g/mol y después de realizar su purificación, se obtuvieron 49.2 mg de producto puro, lo cual corresponde a un 31% de rendimiento químico.

5.2.10.2. CARACTERIZACIÓN DEL α -AMINOFOSFONATO 23

- RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 120.

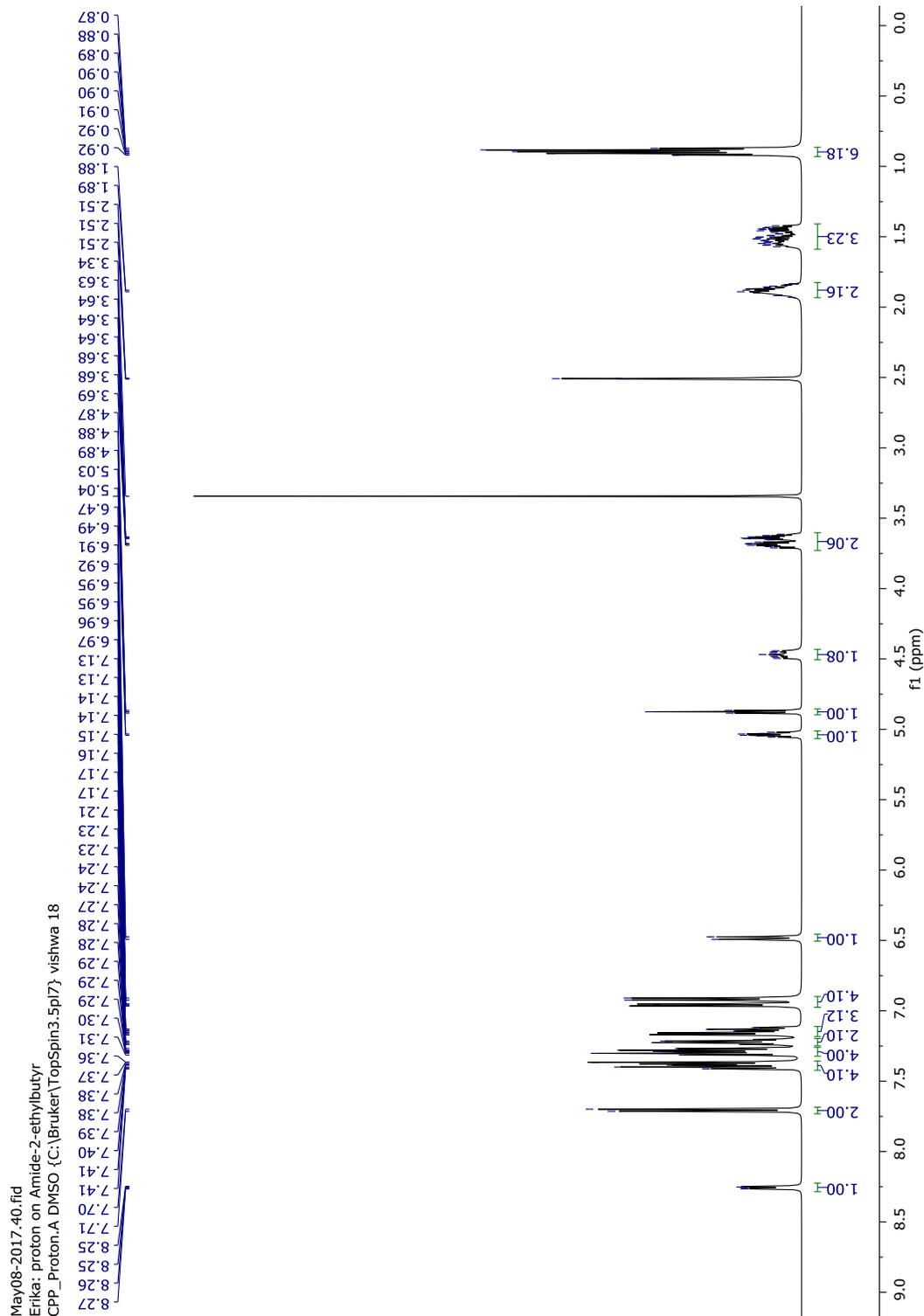


Figura 120. Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **23**.

A un desplazamiento químico de 0.81 – 0.99 ppm (*a*) aparece una señal multiplete que integra para 6 H y corresponde a los protones de los metilos provenientes del 2-etilbutiraldehído.

En 1.34 – 1.63 ppm (*b*) y en 1.79 – 1.95 ppm (*c*) aparecen dos multipletes que integran para 5 H y corresponden a los protones de los metilenos provenientes del 2-etilbutiraldehído y al protón del CH contiguo al C α .

En 3.59 – 3.74 ppm (*d*) aparece una señal multiplete que integra para 2 H y corresponde a los protones del metileno provenientes del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, en 4.47 ppm (*e*) se puede observar un doble de doble de doble (dddd, $J = 21.8, 16.4, 10.5, 5.1$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón que está unido al Carbono α (enlazado al Nitrógeno y al Fósforo), el cual es una de las señales características que identifican a los α -aminofosfonatos.

En 4.88 ppm (*f*) aparece un triplete (t, $J = 5.9$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del hidroxilo. En 5.04 ppm (*g*) aparece una señal triple de doble (td, $J = 7.9, 5.5$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del CH unido al fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol.

En 6.48 ppm (*h*) se observa una señal doble (d, $J = 10.5$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón del amino de la 4-amino benzamida.

En 6.92 ppm (*i*) se encuentra una señal doble (d, $J = 8.6$ Hz) que integra para 2 H, los protones *meta* de la 4-aminobenzamida.

A un desplazamiento químico de 6.93 – 7.45 ppm (*j*) se encuentran las señales multiplete que integran para 15 H y corresponden a los protones de los dos fenilos de la difenilfosfita (10 H) y a los protones del fenilo del (*S*)-(+)-2-fenilglicinol (5 H).

En 7.71 ppm (*k*) se encuentra una señal doble (d, $J = 8.8$ Hz) que integra para 2 H, los protones *orto* de la 4-aminobenzamida. Finalmente, en 8.26 ppm (*l*) se observa una señal doble de doble (dd, $J = 8.1, 3.2$ Hz) que integra para 1 H y corresponde al protón enlazado al N de la amida.

En la Figura 122 se indican en letras minúsculas y entre paréntesis los protones descritos anteriormente, para aclarar la asignación otorgada a cada señal.

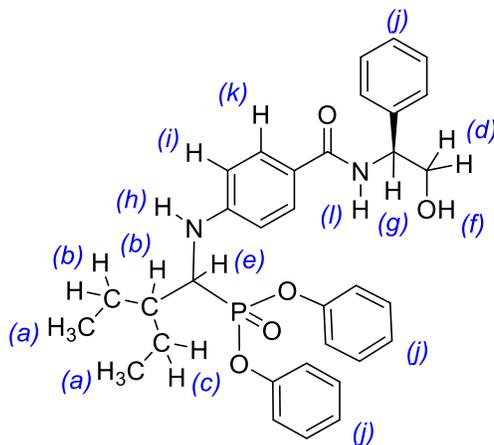


Figura 122. Asignación a las señales del espectro de RMN ^1H para el α -aminofosfonato **23**.

▪ **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 123.

A un desplazamiento químico de 11.7 y 12.0 ppm, se observan las señales de los carbonos alifáticos correspondiente a los C de los metilos provenientes del 2-etilbutilaldehído. En 22.0 y 22.4 ppm se observan las señales de los carbonos de los metilenos provenientes del 2-etilbutilaldehído. En 42.9 ppm aparece la señal del C del CH proveniente del 2-etilbutilaldehído. En 52.4 ppm se encuentra la señal doblete (d, $J = 154.2$ Hz) que indica la presencia del enlace C-P, con una constante de acoplamiento característica que evidencia que la reacción de Kabachnik-Fields se llevó a cabo.

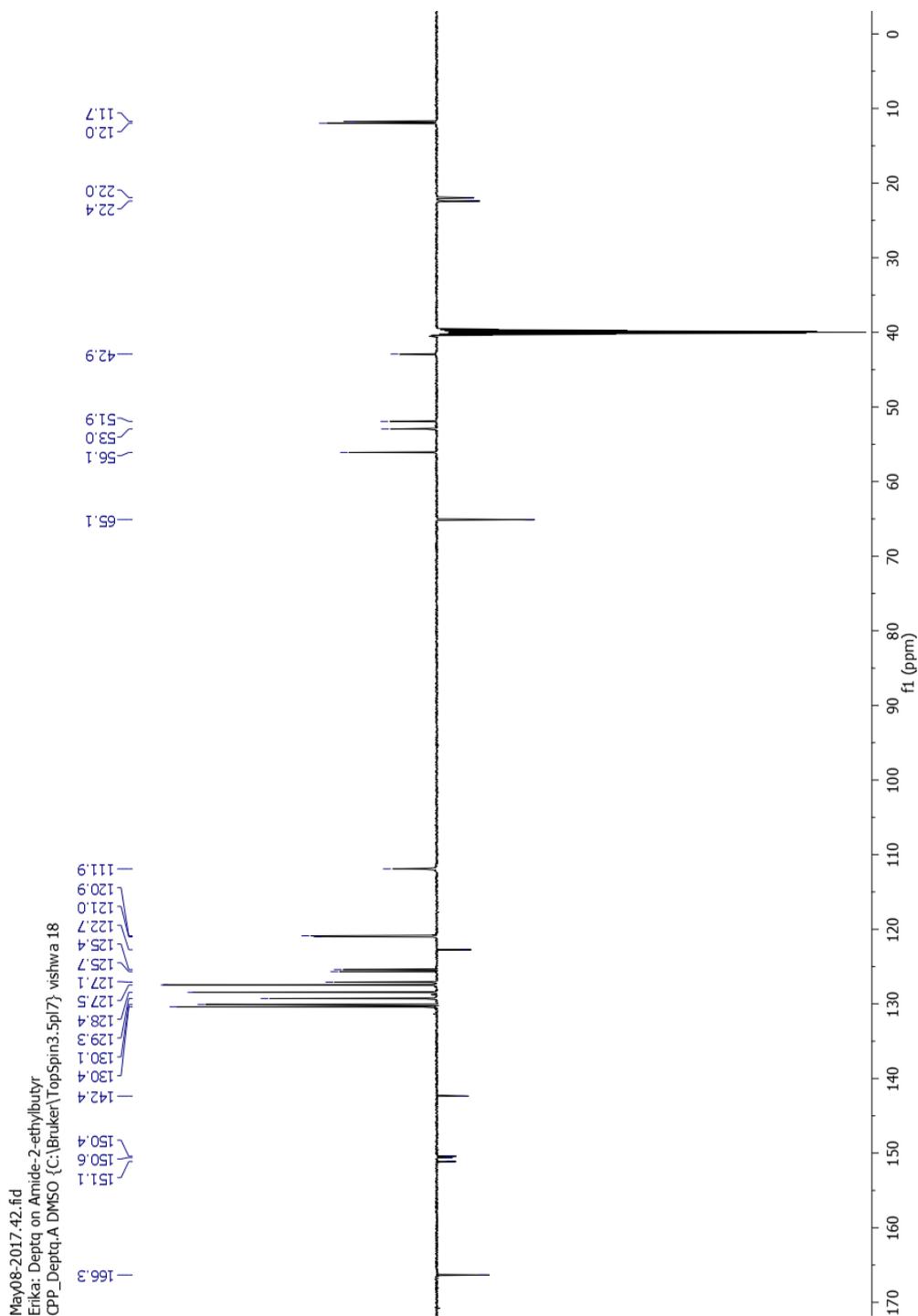


Figura 123. Espectro de RMN ^{13}C (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del α -aminofosfonato **23**.

En 56.1 ppm se encuentra la señal correspondiente al C del CH unido al fenilo del (S)-(+)-2-fenilglicinol. En 65.1 ppm se observa la señal correspondiente al C del metileno del (S)-(+)-2-fenilglicinol.

Posteriormente, las señales correspondientes a los Carbonos aromáticos se encuentran en 111.9, 120.9, 121.0, 122.7, 125.4, 125.7, 127.1, 127.5, 128.4, 129.3, 130.1, 130.4, 142.4, 150.4, 150.6 y 151.1 ppm.

Finalmente, en 166.3 ppm se observa la señal característica para el C del carbonilo del éster.

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{31}P .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) se muestra en la Figura 124 en el cual se observa una señal doble de doble a 19.81 ppm (dd, $J = 17.6, 8.3$ Hz).

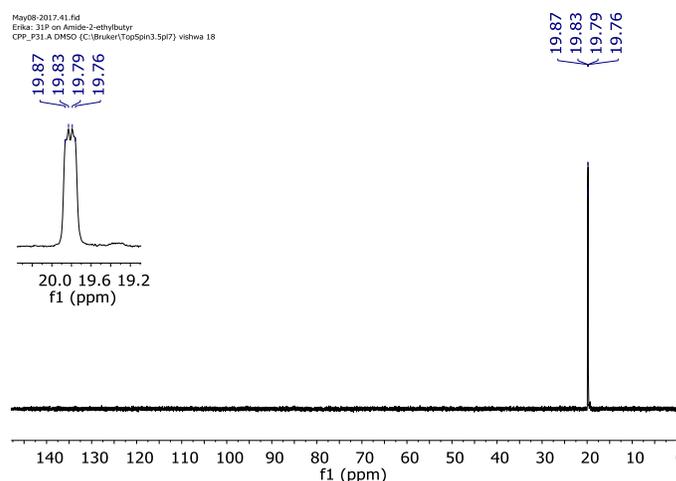


Figura 124. Espectro de RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) del α -aminofosfonato **23**.

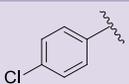
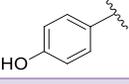
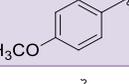
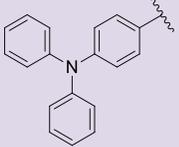
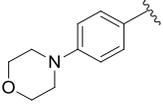
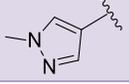
▪ ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN

En el análisis de HRMS (ESI $^+$) m/z , valor calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 573.2513 encontrado 573.2477.

5.2.11. COMPARACIÓN DE SÍNTESIS ORGÁNICA DE α -AMINOFOSFONATOS TIPO AMIDA

La síntesis de nueve α -aminofosfonatos tipo amida se llevó a cabo por el método de reacción “one pot” Kabachnik-Fields con irradiación por microondas. Se evaluaron diferentes condiciones de tiempo y temperatura. En la Tabla 20, se resumen las condiciones de reacción que produjeron los mejores rendimientos de reacción:

Tabla 20. Condiciones de reacción y rendimientos obtenidos. Serie 2

α -AP	R	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MIN)	RENDIMIENTO (%)
15		60	20	80
16		60	20	22
17		60	20	80
18		70	30	34
19		70	30	49
20		60	20	57
21		60	30	66
22		60	40	21
23		60	40	31

Los rendimientos de reacción obtenidos oscilaron entre 21 y 80%. Como se puede observar en las estructuras químicas de la serie 2 (Esquema 4), en cada una de las reacciones llevadas a cabo para la obtención de los α -aminofosfonatos tipo amida de la Serie 2, había la posibilidad de que el producto fuera la mezcla de dos diastereoisómeros (el *S,S* y el *S,R*). Lo anterior es una de las posibles causas de rendimientos bajos en algunos casos; es decir, lo que se realizó en cada experimento fue la síntesis de la mezcla diastereoisomérica; sin embargo, al parecer se favoreció la síntesis de alguno de los dos estereoisómeros y con ese fue con el que se trabajó en las pruebas biológicas en cada caso, a diferencia de los α -AP de la serie 1 (derivados tipo éster) donde se obtuvo una mezcla racémica y con esa se trabajó en las pruebas biológicas.

B. PRUEBAS BIOLÓGICAS**5.3. LÍNEA CELULAR MDA-MB-231****5.3.1. EVALUACIÓN PRELIMINAR (SCREENING) DE LOS α -AMINOFOSFONATOS**

En la Figura 125 se presenta la línea celular empleada para la evaluación de la actividad antiproliferativa de los α -aminofosfonatos.

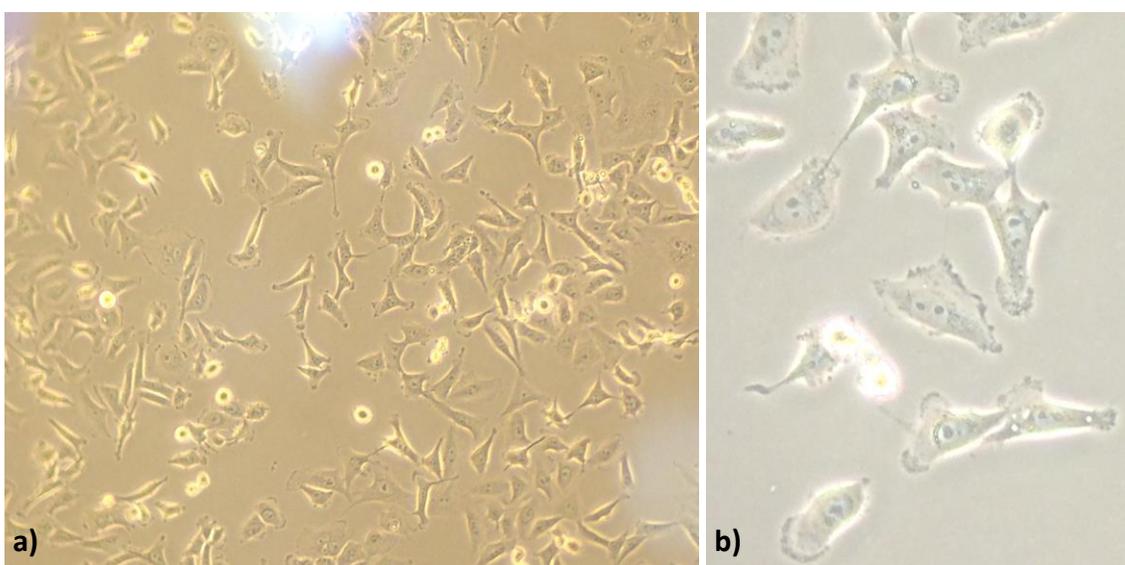
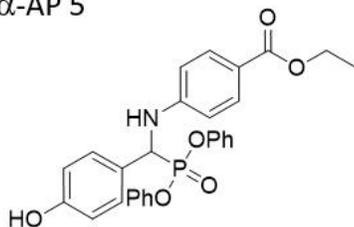


Figura 125. Línea celular MDA-MB-231 a) 10X b) 20X

Una vez realizado el proceso de exposición de las líneas celulares a la totalidad de los compuestos sintetizados (resumen de datos espectroscópicos en ANEXOS 7.5), se llevó a cabo la determinación de la viabilidad celular por el método de MTT; concluida la evaluación y con los valores de absorbancia obtenidos en las tres repeticiones (realizadas por triplicado), dichos datos se vaciaron al software Cheburator obteniendo los siguientes reportes (únicamente se muestran los resultados de los compuestos que presentaron

inhibición de la proliferación celular a una concentración menor a 100 µg/mL y el resultado de una sola repetición):

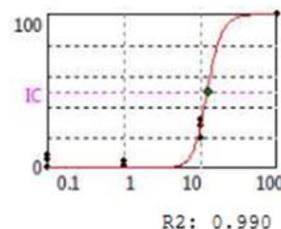
α -AP 5



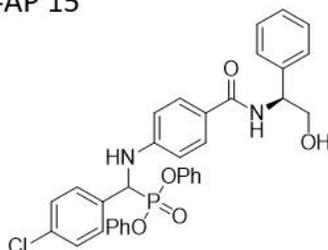
IC₅₀ (Abs.): 12.51 µg/ml;

ug/ml	Avg ± SD	% inh
100	0.052 ± 0.001	100.00
10	0.573 ± 0.041	25.65
1	0.731 ± 0.011	3.07
0.1	0.732 ± 0.043	2.93

Method: nonlinear regression



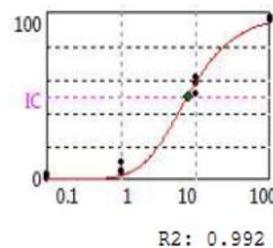
α -AP 15



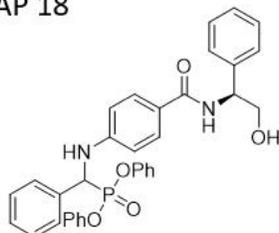
IC₅₀ (Abs.): 7.97 µg/ml

ug/ml	Avg ± SD	% inh
100	0.061 ± 0.006	96.23
10	0.253 ± 0.025	56.58
1	0.499 ± 0.015	6.04
0.1	0.522 ± 0.009	1.37

Method: nonlinear regression



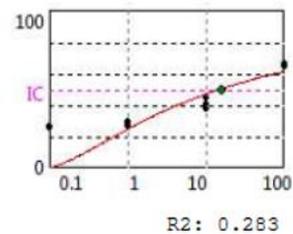
α -AP 18



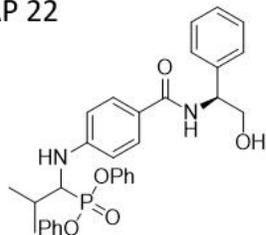
IC₅₀ (Abs.): 15.78 µg/ml

ug/ml	Avg ± SD	% inh
100	0.301 ± 0.007	65.01
10	0.456 ± 0.022	40.54
1	0.539 ± 0.011	27.38
0.1	0.551 ± 0.002	25.48

Method: nonlinear regression



α -AP 22



IC₅₀ (Abs.): 25.82 µg/ml

ug/ml	Avg ± SD	% inh
100	0.122 ± 0.015	83.45
10	0.418 ± 0.013	19.95
1	0.506 ± 0.003	1.26
0.1	0.524 ± 0.028	0.00

Method: nonlinear regression

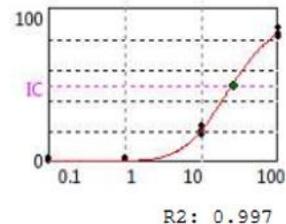


Figura 126. Reporte del screening realizado en la línea celular MDA-MB-231

Como se muestra en la Figura 126 en la serie 1 solamente el α -aminofosfonato **5**, (correspondiente al éster sintetizado a partir del *p*-hidroxibenzaldehído), presentó actividad antiproliferativa con un 100% de inhibición celular a 100 $\mu\text{g/mL}$. De la serie 2, los α -aminofosfonatos **15**, **18** y **22**, presentaron inhibición de la proliferación celular; la amida **15** a 10 $\mu\text{g/mL}$ presentó un 56% de inhibición, la amida **18** a 100 $\mu\text{g/mL}$ presentó un 65% de inhibición, la amida **22** a 100 $\mu\text{g/mL}$ presentó un 83% de inhibición, estos cuatro compuestos fueron seleccionados para la determinación de la CI_{50} .

5.3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LOS α -AMINOFOSFONATOS EN COMPARACIÓN CON FOTEMUSTINE

Una vez seleccionados los compuestos que en el screening presentaron inhibición de la proliferación celular en MDA-MB-231, se continuó con la determinación de la actividad antiproliferativa *in vitro* con un mayor número de puntos en la curva de concentración, se obtuvieron los gráficos de porcentaje de viabilidad vs concentración (Figura 127), se determinó la CI_{50} (se empleó el software PRISM) y se realizó la comparación de los resultados con el control Fotemustine (Tabla 21).

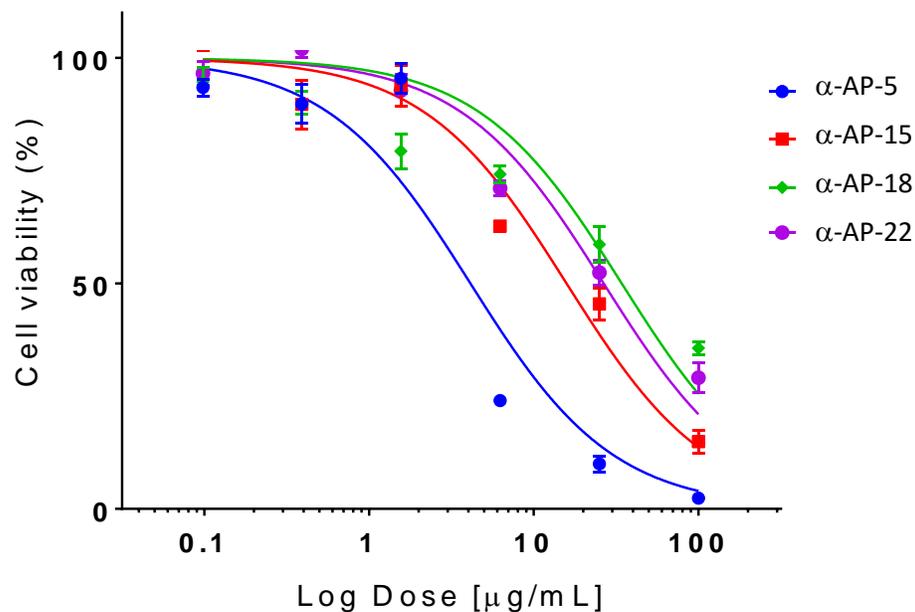
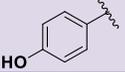
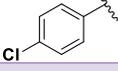
α - AP activos. MDA_MB231

Figura 127. Actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos activos en la línea celular MDA-MB-231

Tabla 21. CI_{50} de los compuestos activos en línea celular MDA-MB-231

SERIE	α -AP	CI_{50} (μ M)
1	5 	8.15 ± 0.36
	15 	26.61 ± 5.08
2	18 	61.58 ± 14.93
	22 	49.10 ± 3.94
	Fotemustine	851.00 ± 75.86

5.4. LÍNEA CELULAR MCF-7

5.4.1. EVALUACIÓN PRELIMINAR (SCREENING) α -AMINOFOSFONATOS

En la Figura 128 se presenta la línea celular empleada para la evaluación de la actividad antiproliferativa *in vitro* de los α -aminofosfonatos en las células MCF-7.

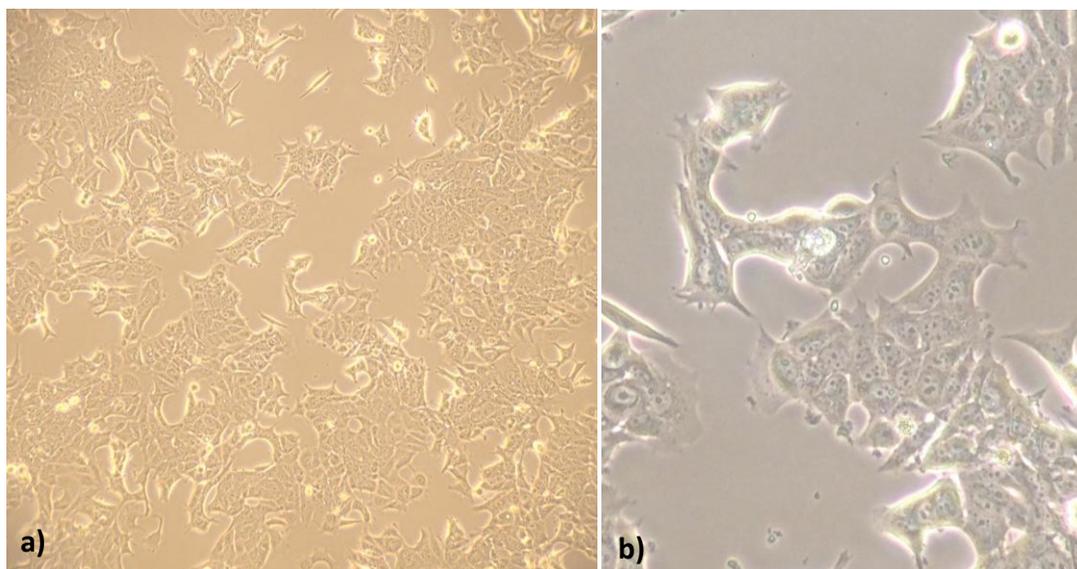


Figura 128. Línea celular MCF-7, a) 10X b) 20X

Una vez concluido el proceso de exposición a los compuestos, se realizó la determinación de la viabilidad celular por el método de MTT, se obtuvieron los valores de absorbancia y dichos datos se vaciaron al software Cheburator obteniendo los siguientes reportes (únicamente se muestran los resultados de los compuestos que presentaron actividad a una concentración menor de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el resultado de una sola repetición):

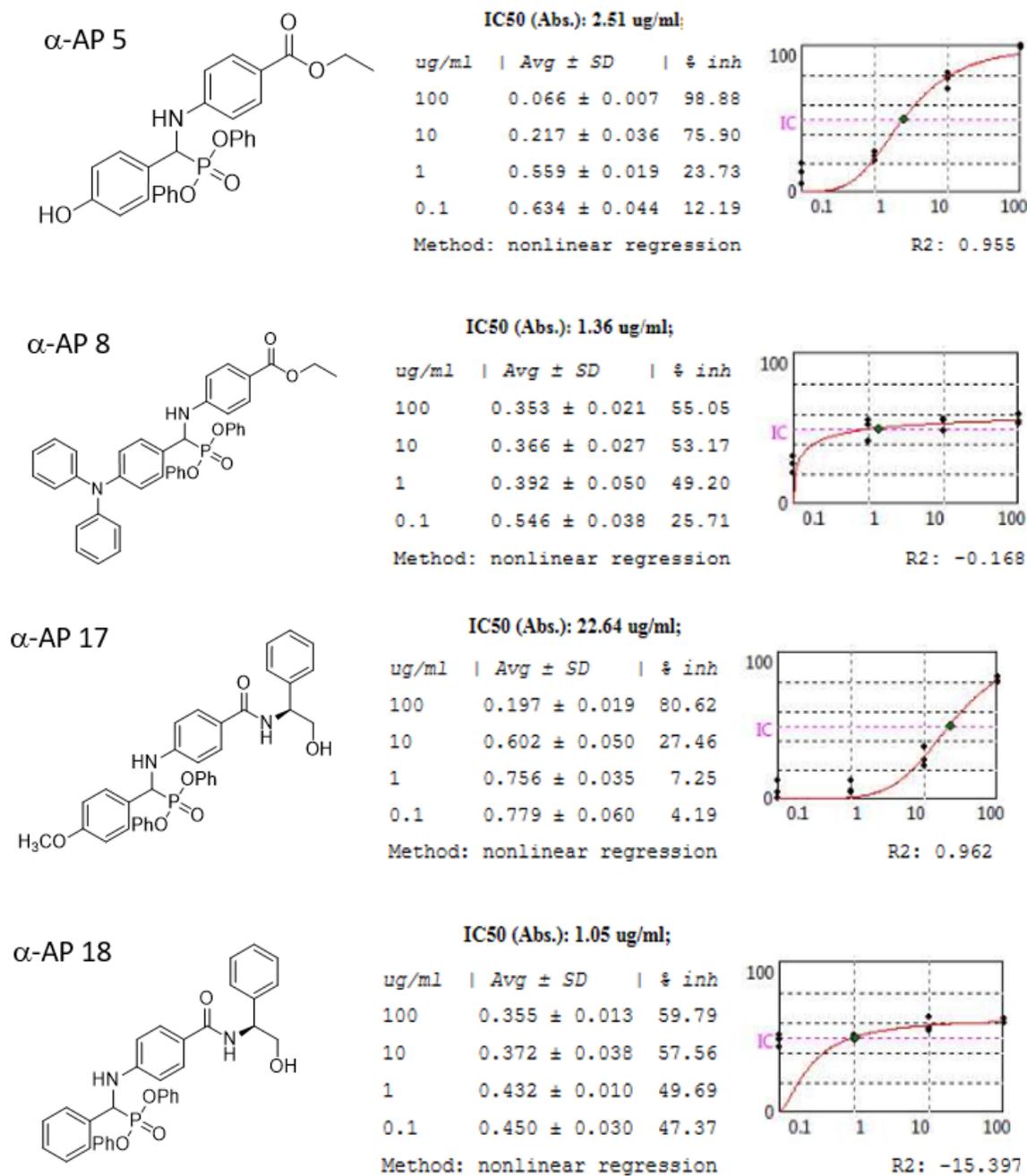


Figura 129. Reporte del screening realizado en la línea celular MCF-7

Como se muestra en la Figura 129, los compuestos que resultaron activos de la serie 1 fueron α -aminofosfonatos **5** (a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó un 76% de inhibición) y **8** (a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó un 53% de inhibición). De la serie 2, los α -aminofosfonatos **17** (a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó un 80% de inhibición) y **18** (a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ presentó un 57% de inhibición) presentaron actividad antiproliferativa a una concentración menor a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; estos cuatro compuestos fueron seleccionados para la determinación de la CI_{50} .

5.4.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LOS α -AMINOFOSFONATOS EN COMPARACIÓN CON FOTEMUSTINE

Una vez obtenidos los gráficos de porcentaje de viabilidad vs concentración (figura 130) se determinó la CI_{50} de cada compuesto activo y estos resultados se compararon con el control Fotemustine (tabla 22).

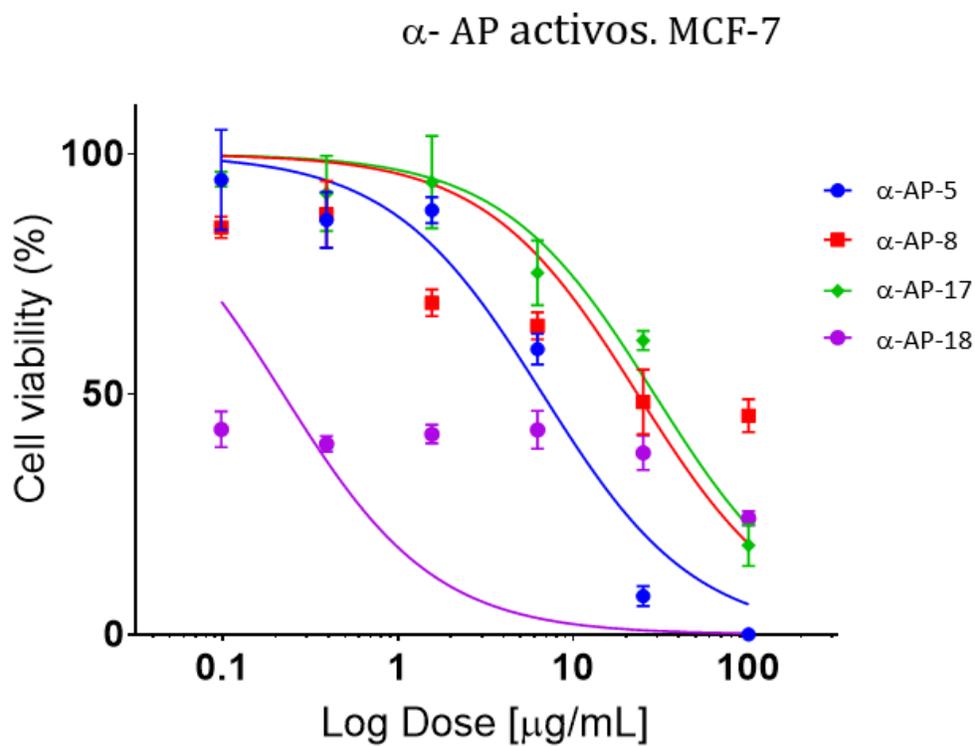
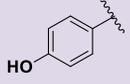
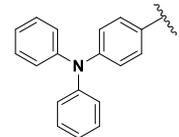
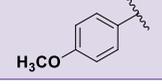
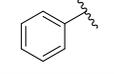


Figura 130. Actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos activos en la línea celular MCF-7

Tabla 22. CI_{50} de los compuestos activos en línea celular MCF-7

SERIE	α -AP	CI_{50} (μM)
1	5 	13.16 ± 0.53
2	8 	35.72 ± 16.65
	17 	36.68 ± 12.31
	18 	0.50 ± 0.22
	Fotemustine	812.61 ± 64.93

5.5. DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS α -AMINOFOSFONATOS

Una vez concluida la determinación de la actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerígenas, se llevó a cabo la determinación de la citotoxicidad de los compuestos moderadamente activos y los compuestos más activos.

La citotoxicidad se evaluó en la línea celular no modificada MCF-10A, línea celular de tejido mamario no tumoral, la morfología de esta línea celular se puede observar en la Figura 131.

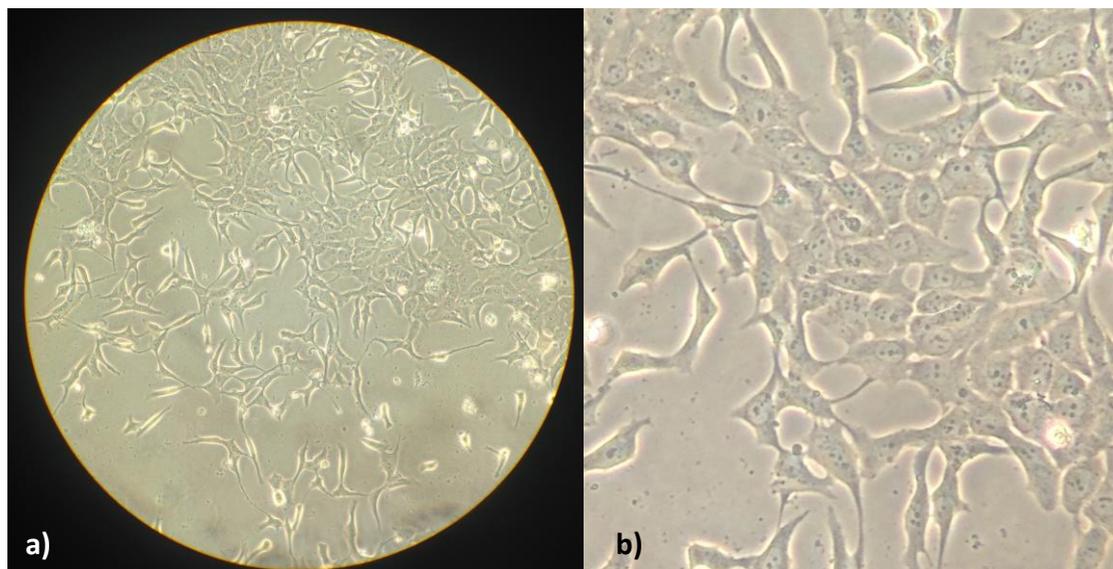


Figura 131. Línea celular MCF-10A, a)10X b) 20X

Una vez obtenidos los gráficos de porcentaje de viabilidad vs concentración (Figura 132), se determinó la CI_{50} de cada compuesto evaluado y estos resultados se compararon con el control Fotemustine (Tabla 24).

Citotoxicidad. MCF-10A

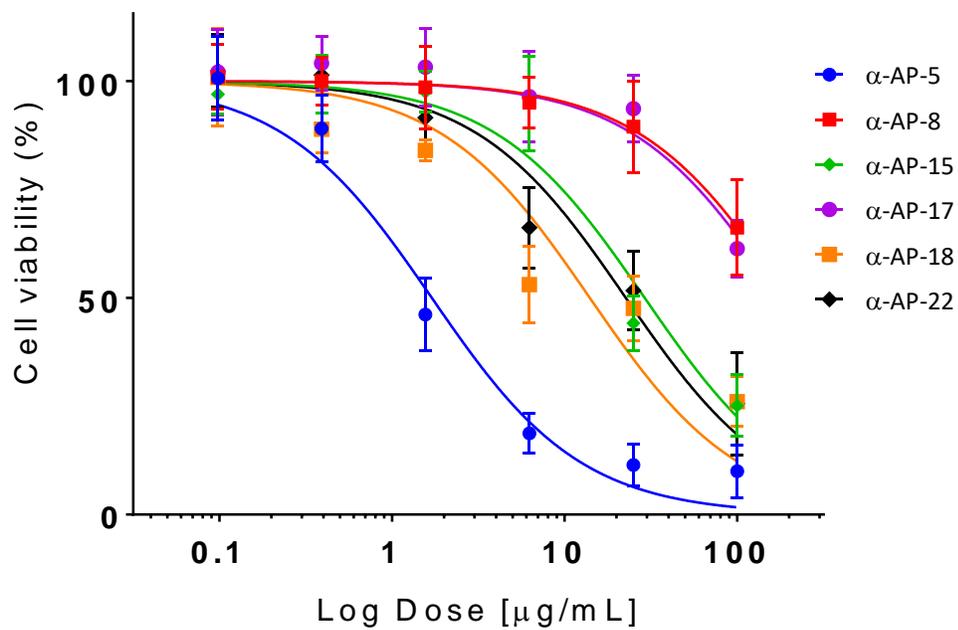
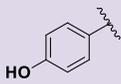
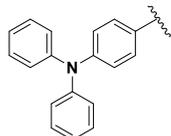
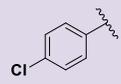
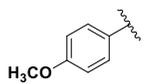


Figura 132. Citotoxicidad de compuestos activos línea celular MCF-10A

Tabla 23. Cl_{50} de los compuestos activos en línea celular MCF-10A

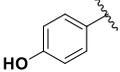
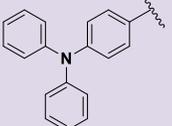
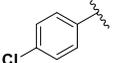
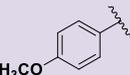
SERIE	α -AP	Cl_{50} (μ M)
1	5 	3.48 ± 0.62
	8 	≥ 100.00 $364.75 \pm 88.40^*$
2	15 	49.56 ± 10.41
	17 	≥ 100.00 $308.40 \pm 57.28^*$
	18 	27.08 ± 8.31
	22 	42.29 ± 9.95
	Fotemustine	1367.96 ± 86.32

**cifra extrapolada por el software*

5.6. COMPARACIÓN ENTRE ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA EN LÍNEAS CELULARES CANCERÍGENAS Y LA CITOTOXICIDAD DE LOS α -AMINOFOSFONATOS.

En la tabla 24 se pueden observar los resultados de la actividad antiproliferativa en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 y del efecto citotóxico en la línea celular MCF-10.

Tabla 24. Comparación entre actividad antiproliferativa y citotoxicidad

SERIE	α -AP	IC 50 (μ M)		
		MDA-MB-231	MCF-7	MCF-10A
1	5 	8.15 \pm 0.36	13.16 \pm 0.53	3.48 \pm 0.62
	8 	-	35.72 \pm 16.65	> 100.00 364.75 \pm 88.40*
2	15 	26.61 \pm 5.08	-	49.56 \pm 10.41
	17 	-	36.68 \pm 12.31	> 100.00 308.40 \pm 57.28*
	18 	61.58 \pm 14.93	0.50 \pm 0.22	27.08 \pm 8.31
	22 	49.10 \pm 3.94	-	42.29 \pm 9.95
	Fotemustine	851.00 \pm 75.86	812.61 \pm 64.93	1367.96 \pm 86.32

**cifra extrapolada por el software*

Respecto a la línea celular cancerígena MDA-MB-231, el éster de *p*-OH (**5**), las amidas de *p*-Cl (**15**), de fenilo (**18**) y de isopropil (**22**) presentaron inhibición de la proliferación celular; de estos cuatro compuestos, el éster **5** fue el más activo, con una Cl_{50} de 8.15 μ M. Los valores de Cl_{50} de los compuestos **15**, **22** y **18** fueron 26.61, 49.10 y 61.58 μ M respectivamente. Aunque el compuesto **5** fue el más activo, Cl_{50} = 3.48 μ M, este no ha sido considerado como un compuesto líder, debió a su elevada citotoxicidad. Se observó una situación similar con los compuestos **18** y **22**, los cuales presentaron actividad antiproliferativa; sin embargo, presentaron citotoxicidad en la

línea celular normal MCF-10A (27.08 y 42.29 μM respectivamente) con valores de Cl_{50} menores que en la línea celular MDA-MB-231. El α -aminofosfonato **15** (amida de *p*-Cl) posee un Cl_{50} = 26.61 μM para la línea celular MDA-MB-231, mientras que el valor de Cl_{50} para la línea celular no tumoral es de 49.56 μM ; lo anterior sugiere que es necesario aproximadamente el doble de la dosis para producir un efecto citotóxico en la línea celular MCF-10A. Finalmente, se establece que los compuestos **5**, **18** y **22** no fueron considerados como buenos candidatos, debido a la cercanía entre la concentración que produce una actividad antiproliferativa en células cancerígenas y la concentración a la que produce un efecto tóxico, es decir poseen una estrecha ventana terapéutica.

Para la línea celular MCF-7, los compuestos que presentaron inhibición de la proliferación celular fueron los α -AP **5**, **8**, **17**, **18**. El compuesto **5** (R= *p*-OH), presentó efecto anticancerígeno a una Cl_{50} = 13.16 μM , mientras que, para la línea celular no tumoral el Cl_{50} fue mucho menor, 3.48 μM ; es decir, que este compuesto presentó una elevada toxicidad en el tejido normal y por lo tanto no puede ser considerado como un compuesto líder.

Hallazgos importantes fueron observados respecto a la actividad antiproliferativa de los compuestos **8** y **17** (éster de difenilo y amida de *p*-OCH₃, respectivamente), los cuales poseen efecto anticancerígeno en la línea celular MCF-7 (Cl_{50} = 35.72 y 36.68 μM , respectivamente) y no poseen citotoxicidad en la línea celular normal MCF-10A, ya que los valores de Cl_{50} son mayores a 100 μM (el software arrojó un valor extrapolado de Cl_{50} > 300 μM).

Otro resultado interesante fue encontrado respecto al efecto anticancerígeno del derivado tipo amida **18** (R= fenilo), el cual fue el compuesto más activo con una CI_{50} = 0.50 μ M en MCF-7 y con CI_{50} = 27.08 μ M en MCF-10A; es importante observar que es necesaria más de 50 veces la CI_{50} en MCF-7, para que presente efecto tóxico en la línea celular no tumoral. Debido a lo anterior, el compuesto **18** puede ser considerado como un compuesto líder.

Una vez realizado el análisis de los resultados, no se puede establecer una relación estructura química-actividad biológica directamente; sin embargo, en general los derivados tipo amida son más activos que los derivados tipo éster, ya que solo 2 α -AP tipo éster (**5** y **8**) fueron activos, mientras que cuatro amidas (**15**, **17**, **18** y **22**) presentaron inhibición de la proliferación celular. Tampoco se observó una diferencia en la actividad al comparar los derivados éster y amida, con el mismo grupo R; por ejemplo, el éster **5** (R= *p*-OH) fue el compuesto más activo en la tres líneas celulares evaluadas; mientras que la amida **16** (mismo R), no presentó efecto citotóxico alguno.

Se observó que al parecer existe un efecto sinérgico en algunos derivados (por ejemplo, el éster **8**, R= trifenilamino) causado por la presencia del α -aminofosfonato, el grupo éster y el radical, mientras que dicho efecto no es observado en el correspondiente derivado tipo amida.

Para las amidas **17** y **18**, se identificó una situación similar; se observa un probable efecto sinérgico ocasionado por la presencia del α -aminofosfonato, el grupo

amida y el radical (*p*-OCH₃ y fenilo, respectivamente) que no es observado con los correspondientes derivados tipo éster.

Todos los compuestos activos presentaron valores de CI₅₀ menores al control Fotemustine; el cual fue elegido fármaco control debido a su semejanza estructural con los α -aminofosfonatos sintetizados, ambos pertenecen a la misma familia de compuestos. Además, Fotemustine es un fármaco efectivo que ha sido empleado principalmente en protocolos de tratamiento de melanoma maligno diseminado (fase I, II y III) con buena tasa de respuesta y supervivencia.^{84,86,87} Fotemustine, también ha presentados notables resultados en el tratamiento de linfoma del sistema nervioso central y glioblastoma multiforme.^{88,89} Finalmente, Fotemustine no había sido evaluado anteriormente en las líneas celulares MDA-MB-231, MFC-7 y MCF-10A y es de importancia científica el extender la investigación de posibles fármacos que puedan ser empleados como alternativas en el tratamiento del cáncer, cáncer de mama en este caso.

5.7. REALIZACIÓN DE ENSAYOS QUE APORTEN INFORMACIÓN RESPECTO AL MECANISMO DE ACCIÓN

5.7.1. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO

Como se describió en la sección de metodología (1.4.12.1) se seleccionaron los α -AP con actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerígenas (éster de *p*-OH (**5**), éster de difenilo (**8**); amida de *p*-OCH₃ (**17**) y amida de fenilo (**18**)) y se determinó si éstos provocaron muerte celular debido a la producción de ROS, siguiendo el método de DCFDA.

Para la determinación de la producción de ROS, se realizaron lecturas a 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 12.0 y 24.0 h empleando el fluorómetro a una λ de excitación de 585 nm y λ de emisión de 530 nm, se colectaron los datos de fluorescencia, se restó el valor del blanco a todas las lecturas y se realizaron los gráficos correspondientes, a continuación, se muestran los resultados obtenidos (Figura 133-Figura 136):

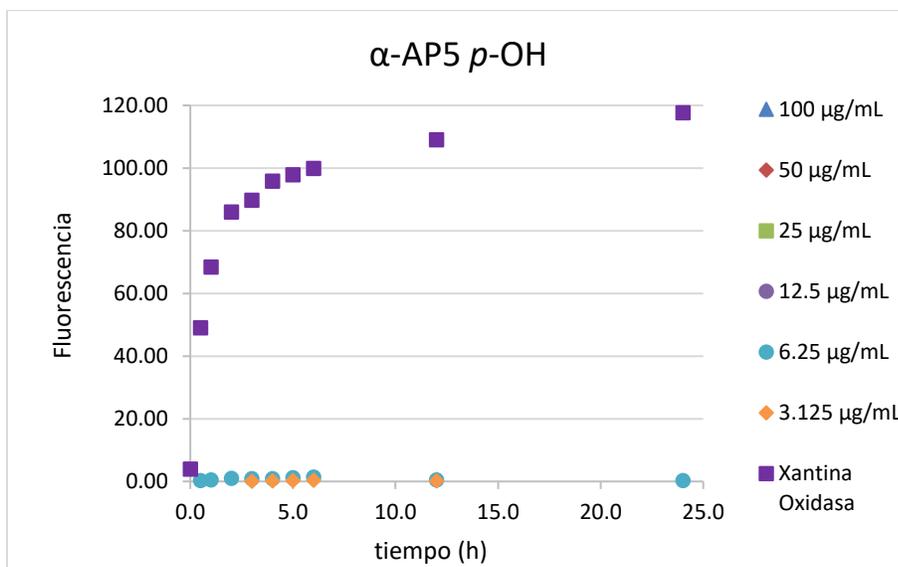


Figura 133. Evaluación de producción de ROS del α -AP 5

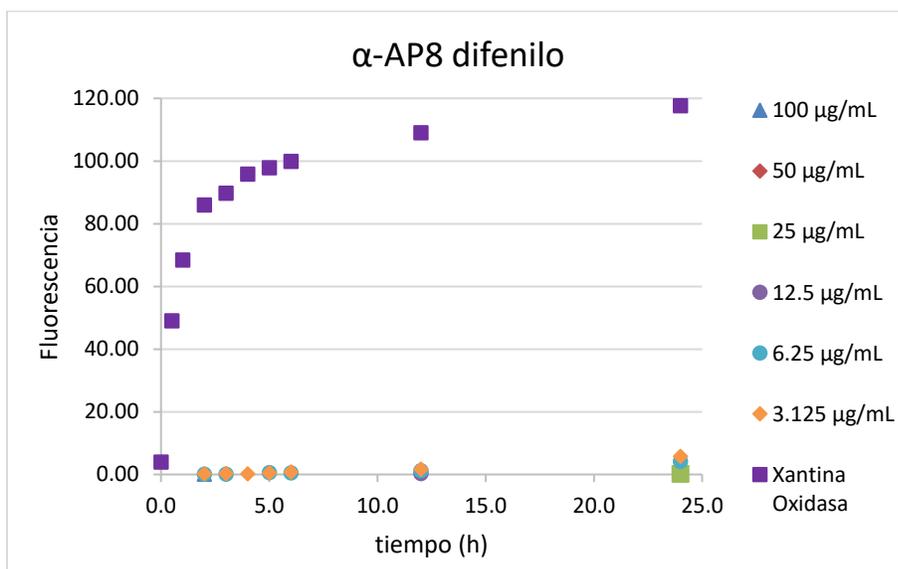


Figura 134. Evaluación de producción de ROS del α -AP 8

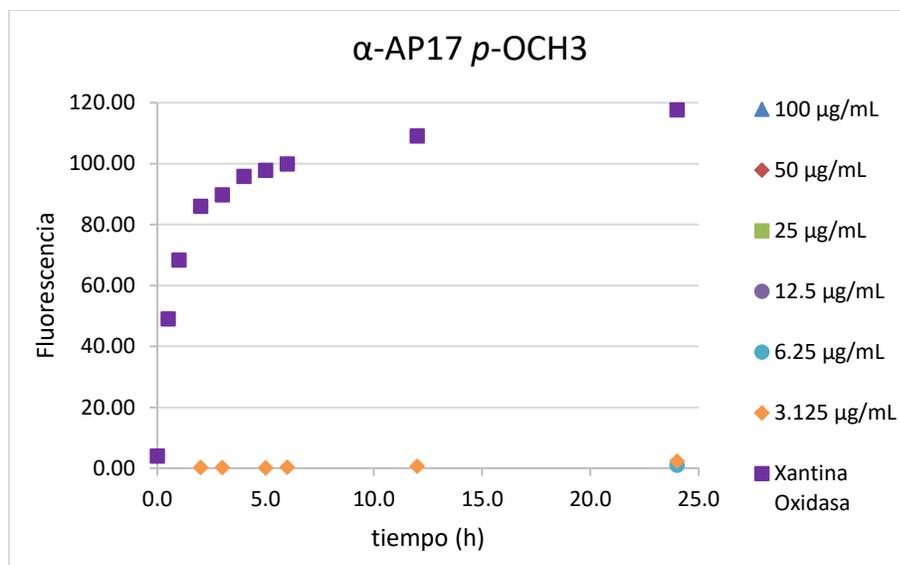


Figura 135. Evaluación de producción de ROS del α -AP 17

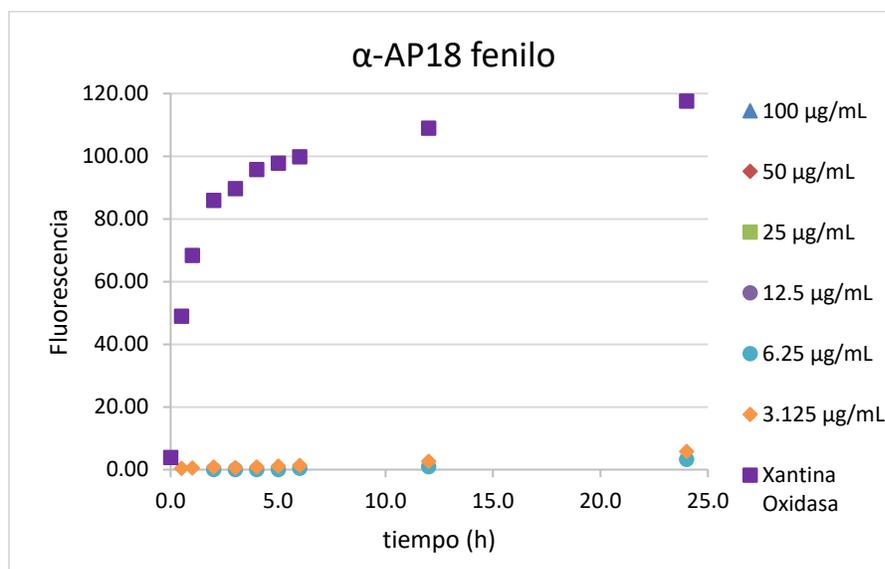


Figura 136. Evaluación de producción de ROS del α -AP 18

DCFDA es un precursor no fluorescente de la diclorofluoresceína (DCF), el DCFDA captado por las células, es metabolizado por esterasas intracelulares a H₂DCF, el cual se acumula dentro de la célula y posteriormente es oxidado por

ROS para producir DCF, el cual es un producto altamente fluorescente. La medición de DCF es una prueba de la presencia de estrés oxidativo.⁹⁰

Como se puede observar en los resultados mostrados anteriormente, los α -aminofosfonatos evaluados, no presentan producción de ROS, debido a que, no existe un aumento en el valor de fluorescencia, ni al incrementar la concentración de los compuestos evaluados, ni al transcurrir el tiempo; a diferencia del control Xantina Oxidasa, donde se observa un aumento en el valor de fluorescencia durante todo el ensayo.

5.7.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA

Las caspasas son una familia de cisteín proteasas que pueden actuar como mediadores de muerte celular⁹¹ y su activación durante el proceso apoptótico resulta en la desencadenación irreversible del proceso de muerte celular,⁹² por lo cual la activación de las caspasas juega un papel crucial en los eventos biológicos asociados con apoptosis.

Para establecer si la inhibición de la proliferación celular de los α -AP se debe a la activación del proceso apoptótico, se llevó a cabo la determinación de la actividad de la caspasa-3 de acuerdo a las especificaciones del inserto del kit *EnzChek® Caspase-3 assay kit #2* (descrito en la parte de metodología).

La actividad de la caspasa-3 fue evaluada en la línea celular MCF-7 después de ser expuesta a la Cl_{50} de los compuestos **8** y **17** (se seleccionó un derivado tipo éster y un derivado tipo amida), se empleó el sustrato específico

Z-DEVD-R110, el cual al ser hidrolizado produce el compuesto fluorescente rodamina 110 (R110), dicha fluorescencia fue medida empleando el fluorómetro a una λ de excitación de 496 nm y una λ de emisión de 520 nm. La apoptosis intrínseca, observada en el control negativo (células sin exposición a compuestos) fue empleada como blanco y fue restado de todas las lecturas obtenidas.

Como se observa en la Figura 137 los valores de fluorescencia de las células expuestas a los compuestos **8** y **17** indican actividad de la caspasa-3, debido a que la fluorescencia es directamente proporcional a la expresión de la caspasa-3. Por lo anterior se puede establecer que la muerte celular producida tanto por el control (podofilotoxina) como por los compuestos **8** y **17**, se debe a la inducción de apoptosis mediada por la activación de la caspasa-3.

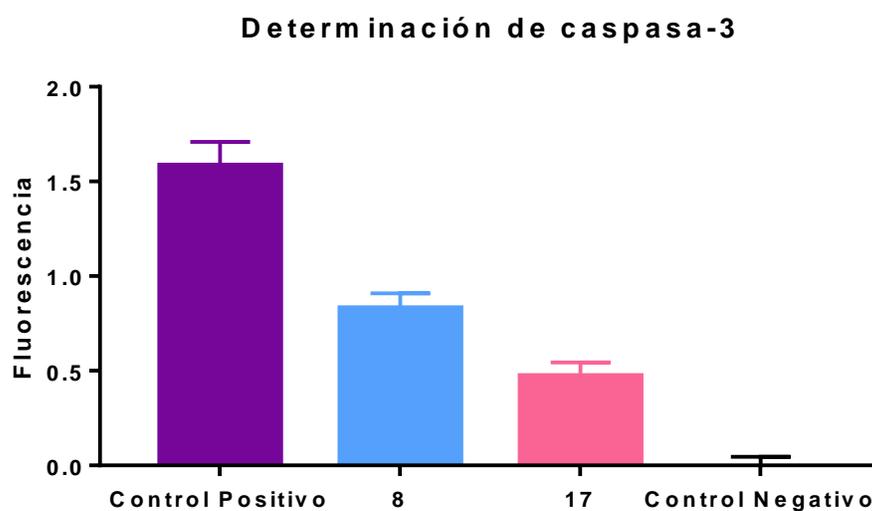


Figura 137. Determinación de caspasa-3 en MCF-7.

Los resultados anteriores, coinciden con lo encontrado en bibliografía, donde se establece que los α -AP son capaces de inducir apoptosis; Huang *et al.*, reportaron que los α -AP producen apoptosis y la evaluación del ciclo celular indicó que un compuesto puede secuestrar el ciclo en el estado G1.⁹³ Fang *et al.*, investigaron la inducción de apoptosis de los α -AP, por el método de tinción de naranja de acridina/bromuro de etidio e indicaron que estos compuestos son capaces de producir muerte celular mediante el proceso de apoptosis.⁷⁰

5.8. EVALUACIÓN PRELIMINAR (SCREENING) DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS α -AMINOFOSFONATOS

5.8.1. SCREENING DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN LA CEPA *Escherichia coli*

Como se describió en la parte de metodología (1.4.10) el inóculo bacteriano fue preparado y depositado en la placa de 96 pozos que contenía el compuesto a evaluar a una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente fue incubado por 24 h y se revisó la turbidez en cada pozo, donde un botón $>2\text{mm}$ indicaba un crecimiento bacteriano positivo, en la Figura 138 se muestra un ejemplo de crecimiento bacteriano positivo.

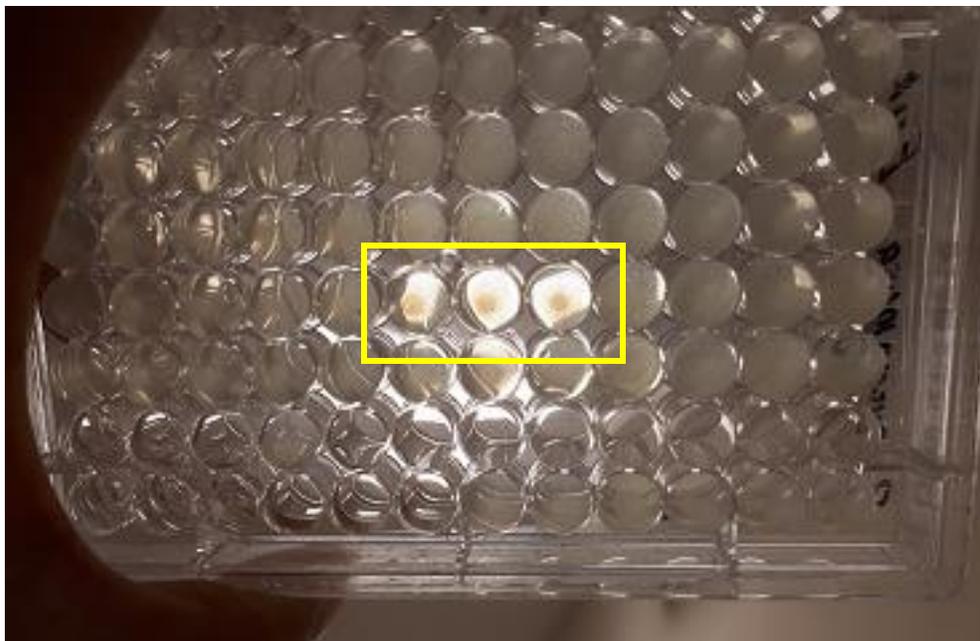


Figura 138. Evaluación de la actividad antibacteriana, crecimiento bacteriano positivo

Una vez colectados todos los resultados (la evaluación fue realizada por triplicado en tres días diferentes), se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 25. Resultados del screening en *Escherichia coli*

SERIE	α -AP	<i>Escherichia coli</i>	SERIE	α -AP	<i>Escherichia coli</i>
1	4	+	2	15	CP
	5	+		16	PP
	6	+		17	T
	7	+		18	CP
	8	T		19	CP
	9	+		20	CP
	10	+		21	PP
	11	+		22	+
	12	+		23	+

+ crecimiento bacteriano, **PP** Poco precipitado (correspondiente al crecimiento bacteriano), **CP** Compuesto Precipitado, **T** Turbio

Como se puede observar en la Tabla 25, casi la totalidad de los derivados tipo éster, a excepción del compuesto **8**, tienen el resultado de crecimiento bacteriano positivo (+) es decir que no provocaron muerte bacteriana y por lo tanto no poseen actividad antibacteriana a una concentración de 100 µg/mL.

Respecto a los derivados tipo amida, para los compuestos **15**, **18**, **19** y **20** el resultado fue *CP*, esto indica que no se observaba botón bacteriano, correspondiente a un resultado +, sino que se observaron unos pequeños cristales propios del compuesto; cabe señalar que estos α -AP poseen una baja solubilidad, incluso en DMSO y por ello se optó por considerar 100 µg/mL como la concentración máxima a evaluar.

Los compuestos **16** y **21** presentaron resultados *PP*, es decir, que se observó poco precipitado, no estaba presente el botón bacteriano característico del crecimiento positivo.

Para el compuesto **8** y **17** el resultado fue *T*, es decir, que había ausencia del botón característico de crecimiento bacteriano, pero el pozo no estaba totalmente transparente como en un resultado de inhibición del crecimiento bacteriano.

5.8.2. SCREENING DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN LA CEPA

Pseudomonas aeruginosa

Una vez colectados todos los resultados (la evaluación fue realizada por triplicado en tres días diferentes), se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 26. Resultados del screening en *Pseudomonas aeruginosa*

SERIE	α -AP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SERIE	α -AP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1	4	+	2	15	CP
	5	PP		16	SM
	6	+		17	SM
	7	+		18	CP
	8	T		19	T
	9	T		20	T
	10	T		21	PP
	11	PP		22	T
12	PP	23	T		

+ crecimiento bacteriano, PP Poco precipitado (correspondiente al crecimiento bacteriano), CP Compuesto Precipitado, T Turbio, SM Sin Microorganismo

Como se observa en la Tabla 26, los ésteres 4, 6 y 7 presentaron resultado +, es decir que no inhibieron el crecimiento bacteriano.

Para los compuestos 5, 11, 12 y 21 el resultado fue PP, es decir que se observó poco precipitado correspondiente al crecimiento bacteriano.

El resultado de los compuestos 8, 9, 10, 19, 20, 22 y 23 fue T turbio, ausencia del botón característico de crecimiento bacteriano, pero el pozo no estaba totalmente transparente como en un resultado de inhibición del crecimiento bacteriano.

Respecto a los compuestos **15** y **18**, el resultado fue *CP*, compuesto precipitado, es decir que no se observó un botón bacteriano, correspondiente a un resultado de crecimiento positivo, sino unos pequeños cristales propios del compuesto debido a su baja solubilidad.

Finalmente, para los α -AP **16** y **17**, se obtuvo *SM* debido a que se observaron los pozos totalmente transparentes, es decir, que estas amidas inhibieron el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa*.

5.8.3. SCREENING DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN LA CEPA *Staphylococcus aureus*

Una vez colectados todos los resultados (la evaluación fue realizada por triplicado en tres días diferentes), se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 27. Resultados del screening en *Staphylococcus aureus*

SERIE	α -AP	<i>Staphylococcus aureus</i>	SERIE	α -AP	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	4	T	2	15	CP
	5	T		16	SM
	6	T		17	CP
	7	T		18	CP
	8	T		19	T
	9	T		20	T
	10	T		21	SM
	11	T		22	T
	12	PP		23	T

+ crecimiento bacteriano, **PP** Poco precipitado (correspondiente al crecimiento bacteriano), **CP** Compuesto Precipitado, **T** Turbio, **SM** Sin Microorganismo

Como se observa en la Tabla 27, casi la totalidad de los ésteres (**4-11**), las amidas **19, 20, 22** y **23**, presentaron resultado **T**, turbio; ausencia del botón característico de crecimiento bacteriano, aunque el pozo no se observaba totalmente transparente como en un resultado de inhibición del crecimiento bacteriano.

Para el compuestos **12** el resultado fue **PP**, es decir que se observó poco precipitado correspondiente al crecimiento bacteriano.

Respecto a los compuestos **15, 17** y **18**, el resultado fue **CP**, compuesto precipitado, es decir que no se observó un botón bacteriano, correspondiente a un resultado de crecimiento positivo, sino unos pequeños cristales propios del compuesto debido a su baja solubilidad.

Finalmente, para los α -AP **16** y **21**, se obtuvo **SM** debido a que se observaron los pozos totalmente transparentes, es decir, que estas amidas inhibieron el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*.

5.8.4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL SCREENING Y ELECCIÓN DE COMPUESTOS PARA DETERMINACIÓN DE CMI

Una vez concluido el screening, se llevó a cabo la selección de los α -AP activos a los cuales se les determinó la CMI, en la Tabla 18, se muestra un resumen de todos los compuestos evaluados:

Tabla 28. Resumen del screening en las tres cepas evaluadas

SERIE	α -AP	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	4	+	+	T
	5	+	PP	T
	6	+	+	T
	7	+	+	T
	8	T	T	T
	9	+	T	T
	10	+	T	T
	11	+	PP	T
	12	+	PP	PP
2	15	CP	CP	CP
	16	PP	SM	SM
	17	T	SM	CP
	18	CP	CP	CP
	19	CP	T	T
	20	CP	T	T
	21	PP	PP	SM
	22	+	T	T
23	+	T	T	

+ crecimiento bacteriano, PP Poco precipitado (correspondiente al crecimiento bacteriano), CP Compuesto Precipitado, T Turbio, SM Sin Microorganismo

Los α -AP seleccionados, fueron aquellos que arrojaron en el screening el resultado de SM, el cual indicó ausencia del crecimiento bacteriano, tal es el caso de las amidas **16**, **17** y **21**.

Las amidas **15** y **18** también fueron seleccionadas, para evaluar si la inhibición del crecimiento bacteriano fue dada por la actividad antibacteriana del compuesto o si se debió a la precipitación de este.

5.9. DETERMINACIÓN DE LA CMI

Una vez concluida la metodología experimental para determinación de la concentración mínima inhibitoria, se llevó a cabo el análisis de los resultados observados en cada pozo de las diluciones seriadas y como se establece en el método, se definió el valor de la CMI como la concentración a la cual se observó ausencia del crecimiento bacteriano a las 24 h de incubación.

5.9.1. DETERMINACIÓN DE LA CMI EN LA CEPA *Escherichia coli*

Los resultados de la determinación de la CMI para la cepa de *Escherichia coli* se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Determinación de la CMI en *Escherichia coli*

α -AP	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
15	>100
16	>100
17	100
18	>100
21	>100
Ciprofloxacino	3.125

5.9.2. DETERMINACIÓN DE LA CMI EN LA CEPA *Pseudomonas aeruginosa*

Los resultados de la determinación de la CMI para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* se muestran a en Tabla 30.

Tabla 30. Determinación de la CMI en *Pseudomonas aeruginosa*

α -AP	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
15	100
16	100
17	100
18	100
21	100
Ciprofloxacino	6.25

5.9.3. DETERMINACIÓN DE LA CMI EN LA CEPA *Staphylococcus aureus*

Los resultados de la determinación de la CMI para la cepa de *Staphylococcus aureus* se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31. Determinación de la CMI en *Staphylococcus aureus*

α -AP	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
15	3.125
16	12.500
17	12.500
18	12.500
21	6.250
Ciprofloxacino	6.250

Una vez definido el valor de la CMI, se puede establecer que para la cepa *Escherichia coli*, los compuestos **15**, **16**, **18** y **21** no fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano a 100 $\mu\text{g/mL}$, lo anterior se determinó al observar los pozos de menor concentración, en los cuales se observó el botón característico de crecimiento bacteriano positivo; por lo que se puede establecer que la clasificación

del CP del screening se debe a que los compuestos iniciaban la inhibición del crecimiento bacteriano; sin embargo, no era la concentración adecuada para detener el crecimiento, es probable que una concentración mayor si mostrara ausencia del crecimiento bacteriano. Para el compuesto **17**, la CMI fue de 100 µg/mL, el valor fue definido debido a que desde la concentración anterior (50 µg/mL) se observaba un poco de precipitado y ausencia del botón bacteriano.

En la determinación de la CMI de los α -aminofosfonatos evaluados en *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvo que todos los compuestos (**15**, **16**, **17**, **18** y **21**) poseen una CMI de 100 µg/mL. Para los compuestos **16** y **17**, se corroboraron los resultados obtenidos en el screening, es decir, que a 100 µg/mL no había crecimiento bacteriano mientras que a la concentración anterior (50 µg/mL) se observó muy poco precipitado, se optó por establecer 100 µg/mL como la CMI. Para los compuestos **15**, **18** y **21** la CMI fue de 100 µg/mL, este valor fue establecido debido a que desde la concentración anterior (50 µg/mL) se observaba muy poco precipitado y ausencia del botón bacteriano.

Para la cepa de *Staphylococcus aureus* el compuesto más activo fue el **15** (amida de *p*-Cl) con un valor de CMI de 3.125 µg/mL, posteriormente el compuesto **21** (amida de pirazol) con una CMI de 6.250 µg/mL y finalmente, las amidas **16** (*p*-OH), **17** (*p*-OCH₃) y **18** (fenilo) con un valor de CMI de 12.500 µg/mL.

Con los resultados obtenidos, se puede establecer que las amidas activas (**15**, **16**, **17**, **18** y **21**), en general presentaron mayor efecto en las bacterias gram

positivas; debido a que en las otras dos cepas gram negativas los valores de CMI fueron más altos; sin embargo, para poder afirmar dicha selectividad hacia este tipo de bacterias es necesario evaluar más cepas.

5.10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Como se describió en la parte de metodología (4.11), la determinación de la actividad antioxidante de todos los α -aminofosfonatos se llevó a cabo por el método de DPPH, donde una presente actividad antioxidante disminuirá el valor de absorbancia debido a que el DPPH es un radical libre estable con una coloración morado oscuro que al reaccionar con un compuesto antioxidante, se reduce a DPPH-H y como consecuencia cambia de coloración, a un color amarillo y por lo tanto el valor de absorbancia disminuye.⁹⁴

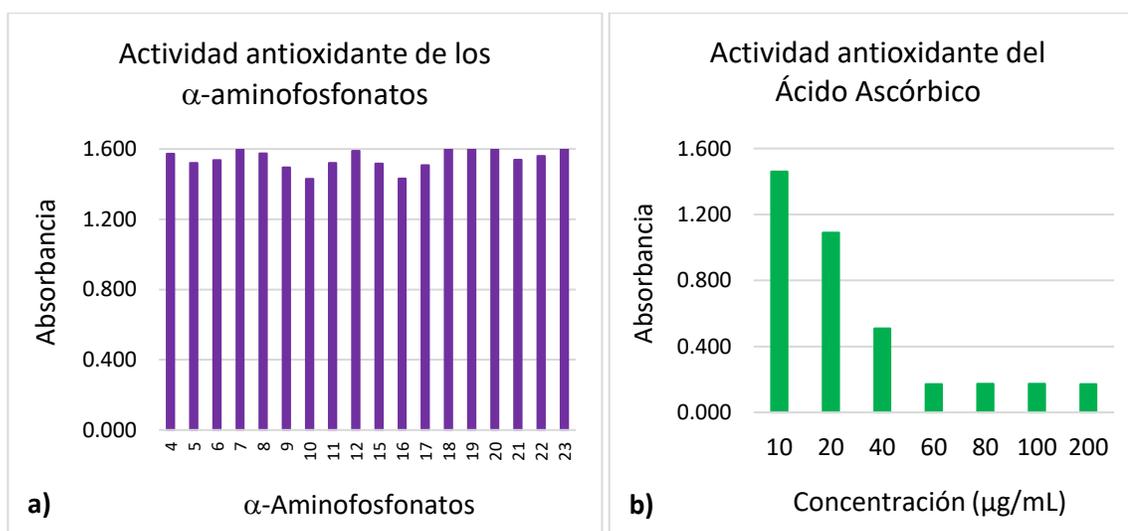


Figura 139. Evaluación de la actividad antioxidante **a)** α -aminofosfonatos, **b)** control (ácido ascórbico)

Como se observa en la Figura 139, los valores de absorbancia de los compuestos evaluados no disminuyeron como en el caso del control ácido ascórbico, cuyo valor de absorbancia disminuyó al incrementar la concentración del ácido ascórbico; lo anterior indica que los compuestos evaluados no presentan actividad antioxidante.

CAPÍTULO 6.

CONCLUSIONES

6.1. La reacción multicomponente “one pot” Kabachnik-Fields, empleando irradiación con Microondas, es una excelente alternativa al método de síntesis de α -aminofosfonatos convencional, ya que mejora los tiempos y los rendimientos de reacción.

Se logró la síntesis de 9 nuevos α -aminofosfonatos tipo éster (4 – 12) con rendimientos de moderados a altos (58 – 97 %) y con tiempo de reacción cortos (20, 30 o 40 minutos).

6.2. Las condiciones de reacción fueron propuestas con un enfoque del uso de química verde, dichas condiciones ofrecen rendimientos de reacción comparables con la literatura, sin el uso de catalizadores y empleando etanol como único disolvente.

6.3. Se logró la síntesis de 9 α -aminofosfonatos tipo amida, con rendimientos que van desde 21 – 80% con tiempos de reacción de 20 a 40 min.

6.4. Las estructuras de todos los α -aminofosfonatos fueron confirmadas con los resultados de RMN ^1H , ^{13}C y ^{31}P y HRMS

6.5. Respecto a la citotoxicidad evaluada en células MCF-10A, el éster de *p*-OH (**5**), las amidas de *p*-Cl (**15**) y de isopropil (**22**), mostraron Cl_{50} bajos

(<50 μM) y muy similares al CI_{50} de la línea celular cancerígena lo cual indica una estrecha ventana terapéutica que se traduce en un riesgo de toxicidad en tejido normal.

- 6.6. Se encontró un resultado importante con el éster **8** (R= difenilamino) y la amida **17** (R= *p*-OCH₃), los cuales presentaron baja citotoxicidad en la línea celular no tumoral MCF-10A (CI_{50} >100 μM ~300 μM) y buena actividad antiproliferativa en la línea celular MCF-7 (CI_{50} 35.72 y 36.68 μM), por lo cual se proponen como buenos candidatos y posibles moléculas líder.
- 6.7. La amida **18** (R= fenilo) presentó excelente actividad antiproliferativa en MCF-7 (CI_{50} = 0.50 μM) y baja citotoxicidad en el tejido no tumoral, ya que se requieren casi 50 veces la CI_{50} de MCF-7 para causar la muerte celular en el tejido normal.
- 6.8. Respecto a los ensayos realizados para obtener información del posible mecanismo de acción, se concluye que los α -aminofosfonatos evaluados no provocan muerte celular por producción de especies reactivas de oxígeno.
- 6.9. Mediante la evaluación de la actividad de caspasa-3, se comprobó que los compuestos activos causan muerte celular mediante apoptosis.
- 6.10. Los ensayos de evaluación de actividad antiproliferativa mostraron que en general los derivados tipo amida son más activos que los derivados tipo éster; sin embargo, no se encontró relación directa entre un éster y una amida con el mismo grupo R.

- 6.11. No fue posible establecer una directa relación estructura química-actividad biológica; sin embargo, se encontró que al parecer existe un efecto sinérgico dado por la presencia de los tres componentes, el α -AP, el éster o amida y el grupo R.
- 6.12. La Hipótesis ha sido validada de manera parcial, ya que la actividad antiproliferativa en general es mayor para los derivados tipo amida; sin embargo, este comportamiento no es posible atribuirlo únicamente al cambio de grupo éster a grupo amida.
- 6.13. En el caso de la evaluación de la actividad antibacteriana, las amidas resultaron ser más activas que los ésteres, ya que desde el screening estos últimos fueron descartados al no presentar inhibición del crecimiento bacteriano.
- 6.14. Los α -aminofosfonatos resultaron más activos para la cepa gram positiva *Staphylococcus aureus* con CMI de 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (α -AP **15**) y 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (α -AP **16**, **17** y **18**). Interesantemente, el compuesto **21** presentó la misma CMI que el control ciprofloxacino (6.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

ANEXOS

7.1. ESTÁNDAR DE MCFARLAND 0.5 M

Protocolo para la preparación del estándar de McFarland empleado en la determinación de la actividad antibacteriana (metodología descrita en 4.10.b):

- 1% (peso/volumen) BaCl_2 anhidro
- 1% (volumen/volumen) H_2SO_4

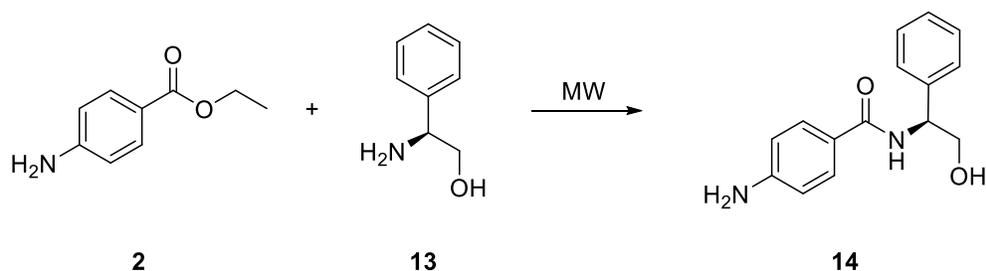
Agregar 0.5 mL de la solución de BaCl_2 1% a 99.5 mL de la solución de H_2SO_4 1%, agitar para mantener la suspensión.

Agregar 5 mL de la suspensión anterior a un tubo de rosca. El diámetro de estos tubos debe ser el mismo que los que se emplearán para ajustar la densidad de la suspensión del cultivo bacteriano previo a la inoculación. Cuando los estándares de 0.5 M son vigorosamente agitados, la turbidez mostrada equivale a la turbidez propia de un cultivo con aproximadamente 1.5×10^8 células.

Almacenar los tubos con la solución estándar de McFarland 0.5 M en la oscuridad a temperatura ambiente.

7.2. CONDICIONES DE REACCIÓN AMIDA 14

Condiciones probadas en la síntesis de la amida **14** (*S*)-4-amino-*N*-(2-hidroxi-1-feniletil)benzamida.



2 (eq)	13 (eq)	Base (eq)	solvente	Temperatura °C	tiempo (min)	Producto (% rendimiento)
1	1	-	EtOH	80	20	-
1	1	-	EtOH	100	20	-
1	1	K ₂ CO ₃ (1)	EtOH	80	20	-
1	1	K ₂ CO ₃ (1)	EtOH	100	20	-
1	1	K ₂ CO ₃ (1)	EtOH	120	20	-
1	1	K ₂ CO ₃ (1)	EtOH	140	20	-
1	1	K ₂ CO ₃ (1)	EtOH	160	20	-
1	1	K ₂ CO ₃ (1)	EtOH	180	20	-
1	1	K ₂ CO ₃ (1)	EtOH	180 <i>18.9 bar</i>	40	2 manchas en TLC Ácido + Amida
1	1	K ₂ CO ₃ (1)	EtOH	190 <i>23 bar</i>	20	2 manchas en TLC Ácido + Amida
1	1	K ₂ CO ₃ (1)	EtOH	200 <i>28.5 bar</i> No <i>recomendable</i>	20	2 manchas en TLC Ácido + Amida
1	1	K ₂ CO ₃ (1)	EtOH	185 <i>20 bar</i>	40	Ácido (49 mg) 32% + Amida (13 mg) 6.8%
1	1	K ₂ CO ₃ (2)	EtOH	180 <i>18.9 bar</i>	40	Ácido (383.5 mg) 85.1% + Amida (53.6 mg) 9.5%
2	1	K ₂ CO ₃ (2)	EtOH	185	40	Ácido (761.6 mg) 63.5% + Amida (117.6 mg) 10.5%
1	1	K ₂ CO ₃ (3)	EtOH	180 <i>18.9 bar</i>	40	Ácido (453.8 mg) 60.4% + Amida (291.8 mg) 31.2%
1	1	N(CH ₂ CH ₃) ₃ (3)	EtOH	185	4 h	Ácido (113 mg) 18.8% + Amida (31.8 mg) 4.2%
1.1	1	-	Tolueno	200	40	-

1.1	1	$N(CH_2CH_3)_3$ (2)	Tolueno	200	60	-
1.1	1	$N(CH_2CH_3)_3$ (2)	Tolueno	240	40	-
1.1	1	K_2CO_3 (3)	DMF	200	20	Ácido + Amida <i>evaporación de DMF en línea de vacío Schlenk no exitosa</i>
1.1	1	K_2CO_3 (3)	AcOEt	200	20	Ácido (no cuantificado) + Amida (11 mg) 7%
1	1	DMAP 0.1%	EtOH	80	7 h	-
1	1	DMAP 0.1%	EtOH	150	1 h	-
1	1	DMAP 0.1%	EtOH	170	2.5 h	-
1	1	DMAP 0.1%	EtOH	175	5.5 h	-

7.3. CARACTERIZACIÓN ÁCIDO 14B

La estructura química del ácido **14b** es mostrada en la Figura 140

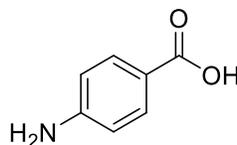


Figura 140. Estructura Química del ácido 14 b

▪ RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H .

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) se muestra en la Figura 141.

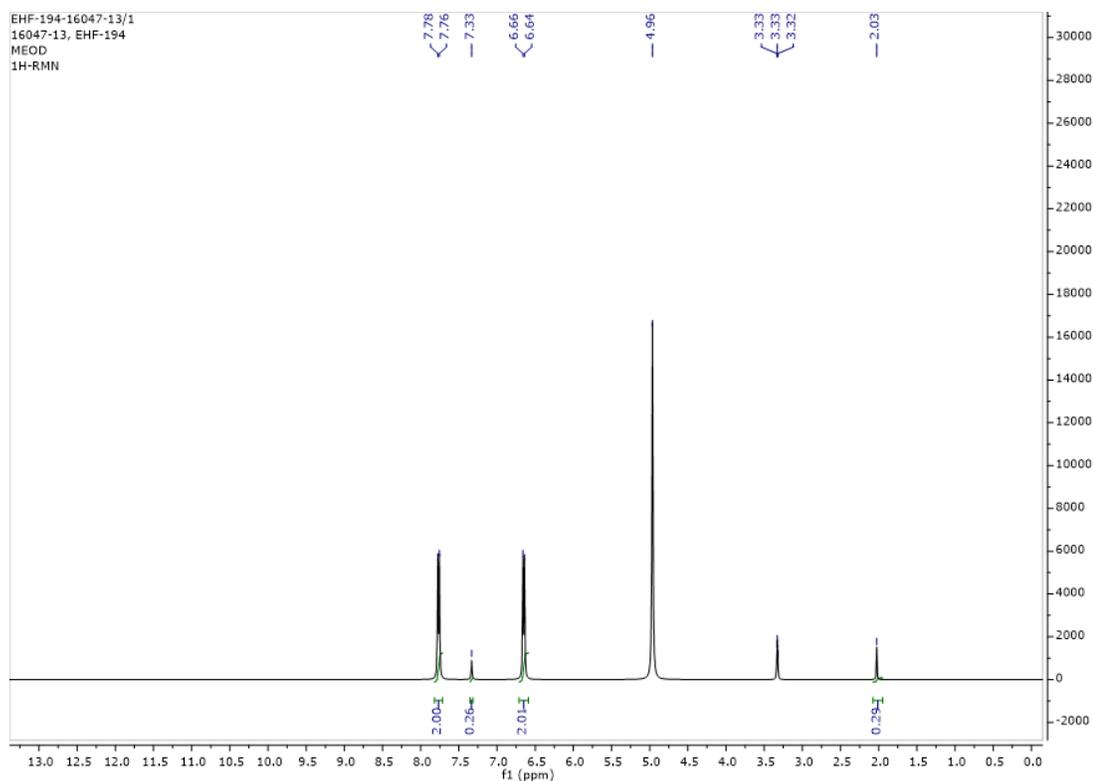


Figura 141. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, MeOD) del ácido **14b**.

- **RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C .**

El espectro obtenido después del análisis de RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) se muestra en la Figura 142.

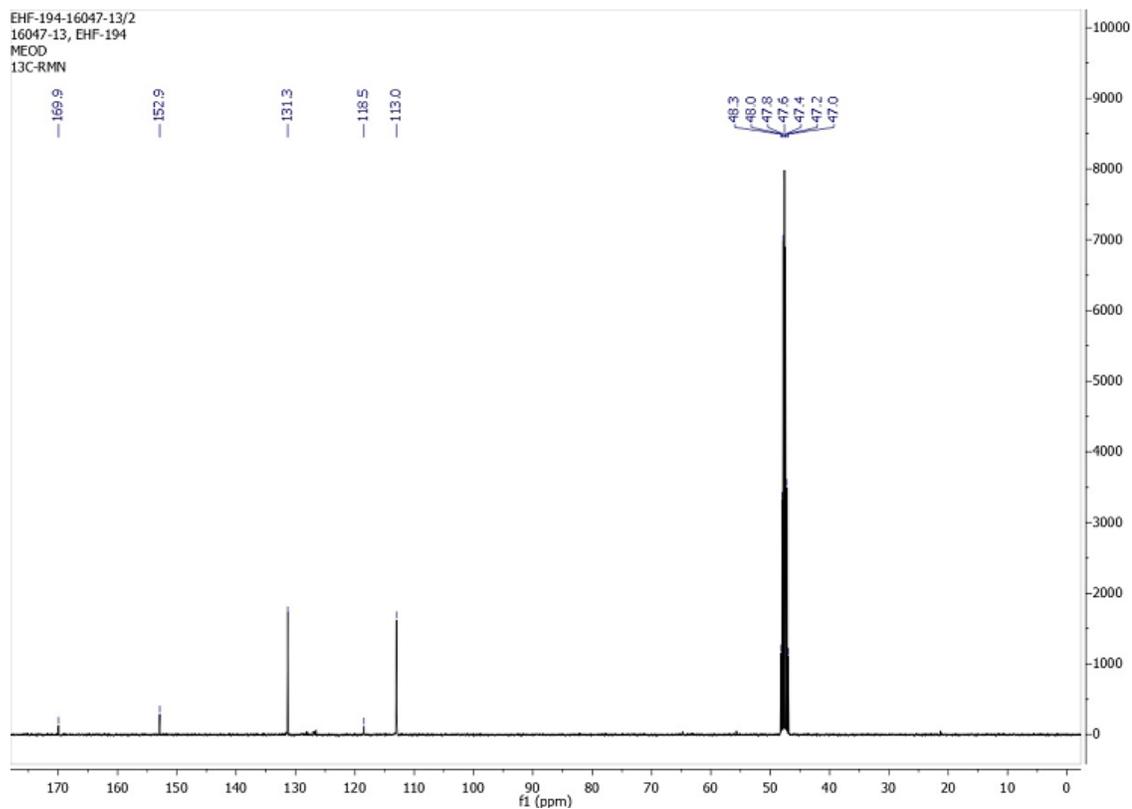


Figura 142. Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, MeOD) del ácido **14b**.

- **ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN**

En el análisis de HRMS (ESI⁺) m/z , valor calculado para $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺ 138.0550, encontrado 138.0540.

7.4. COMPARACIÓN RMN ^1H AMIDA 16 VS AMIDA 16 + D_2O

La Figura 143 muestra la comparación del espectro de $^1\text{RMN H}$ de la amida **16** (parte superior) respecto a la muestra de la amida **16** a la cual se le agregó D_2O (parte inferior).

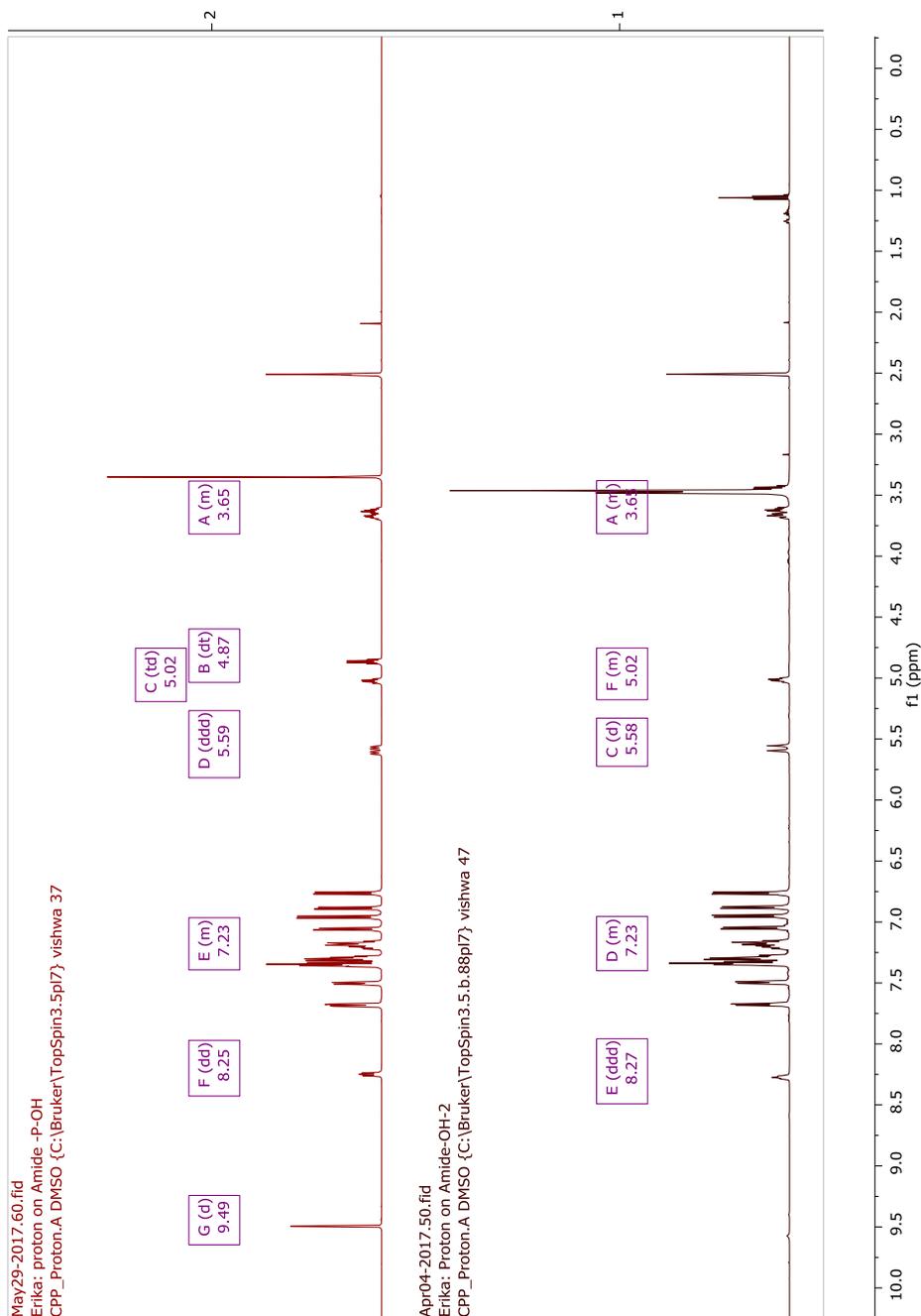


Figura 143. Espectros de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) amida **16** (superior), amida **16** + D_2O (inferior)

En la ampliación del espectro (Figura 144) se observa la desaparición de las señales que previamente aparecían en 4.87 y 9.49 ppm (correspondientes al OH de la amida **14** y al OH proveniente del *p*-hidroxibenzaldehído, respectivamente), lo anterior debido al intercambio ocurrido entre los hidroxilos de la muestra con el D₂O que se agregó en la prueba.

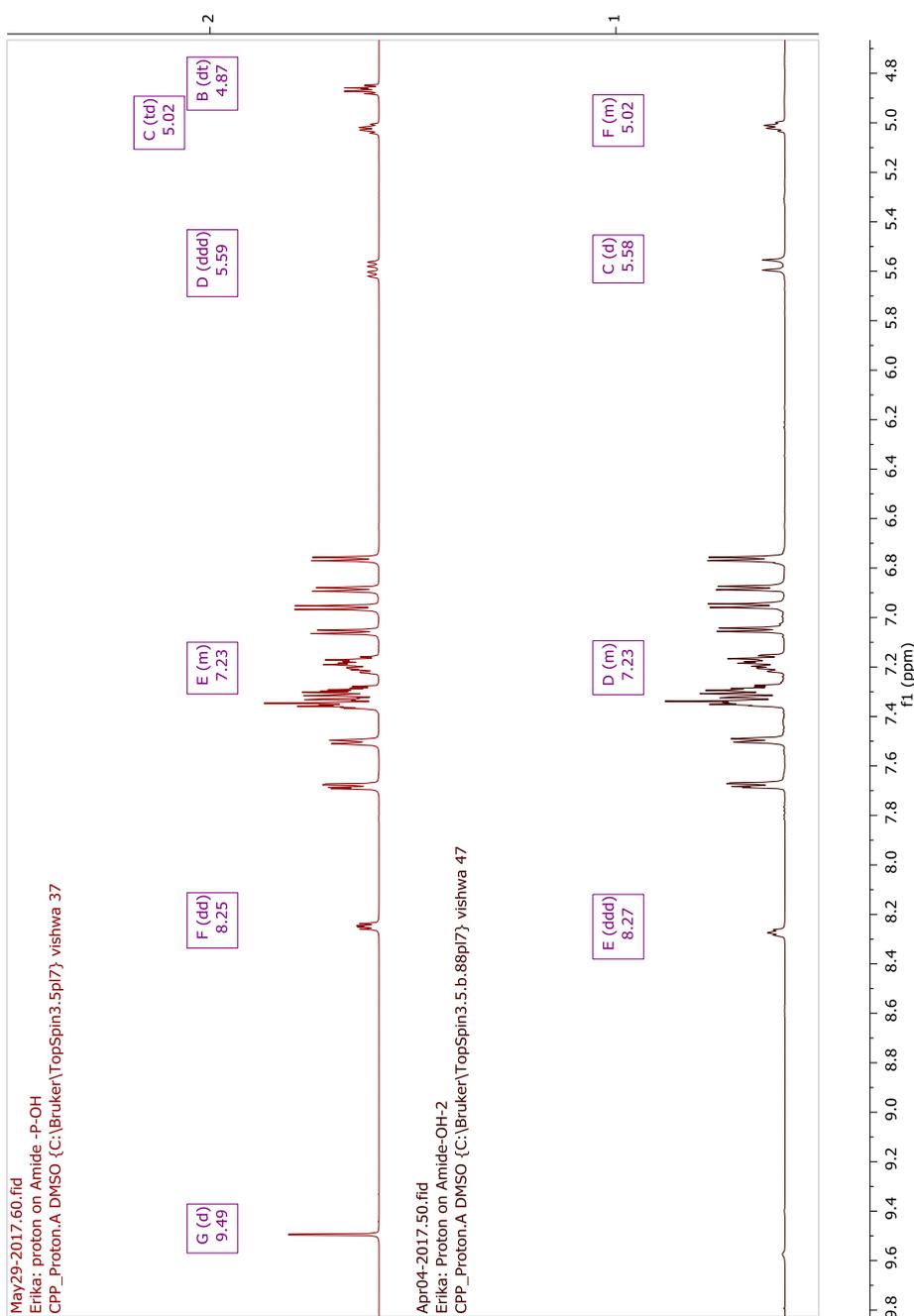


Figura 144. Ampliación de los espectros de RMN ¹H (600 MHz, DMSO-d₆) amida **16** (superior), amida **16** + D₂O (inferior)

7.5. RESUMEN DE DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE LOS α -AP

4-(((4-clorofenil)(difenoxifosforil)metil)amino) benzoato de etilo, 4 (1.52 g, 82%); sólido blanco; PF 116-118 °C; R_f = 0.49 (7:3 hexano – acetato de etilo). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.68 – 7.79 (m, 4H, ArH, H-8), 7.67 (dd, J = 10.3, 5.3 Hz, 1H, NH), 7.49 (d, J = 8.3, 2H, ArH, H-6), 7.00 – 7.38 (m, 10 H, ArH, H-5), 6.95 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH, H-4), 5.88 (dd, J = 25.4, 10.2 Hz, 1H, CH-P), 4.21 (c, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 1.26 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6): δ 166.1 (C=O), 151.5 (C-2), 150.4 (C-25), 150.2 (C-31), 134.7 (C-13), 133.3 (C-20), 131.1 (C-4, C-6), 130.9 (C-19, C-21), 130.3 (C-27, C-29, C-33, C35), 128.9 (C-18, C-22), 125.8 (C-28, C-34), 120.9 (C-26, C-30), 120.7 (C-32, C-36), 118.7 (C-5), 113.2 (C-1, C-3), 60.2 (C-10), 53.6 (d, J = 156.3 Hz, C-P), 14.8 (C-11). RMN ^{31}P (162 MHz, DMSO- d_6): δ 15.24 (d, J = 25.1 Hz). HRMS (ESI⁺) m/z calculado para C₂₈H₂₆ClNO₅P [M + H]⁺ 522.1159; encontrado 522.1094.

4-(((difenoxifosforil)(4-hidroxifenil)metil)amino)benzoato de etilo, 5 (1.50 g, 72%); sólido naranja; PF 154-156 °C; R_f = 0.52 (1:1 hexano – acetato de etilo). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.57 (s, 1H, OH), 7.71 (d, J = 9.0 Hz, 2H, ArH, H-7), 7.56 (d, J = 4.6 Hz, 1H, NH), 6.85 – 7.60 (m, 14H, ArH, H-5), 6.80 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ArH, H-4), 5.64 (dd, J = 24.1, 10.0 Hz, 1H, CH-P), 4.21 (c, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO- d_6): δ 166.2 (C=O), 157.8 (C-20), 151.8 (C-2), 150.5 (C-26), 150.4 (C-32), 131.1 (C-4, C-6), 130.4 (C-13), 130.3 (C-28, C-30) 130.2(C-34, C-36), 125.7 (C18) 125.6 (C-22), 125.3 (C-29, C-35), 121.0 (C-27, C-31), 120.8 (C-33, C-37), 118.3 (C-5), 115.6 (C-19, C-21), 113.1 (C-1, C-3), 60.2 (C-10), 53.8 (d, J = 157.6 Hz, C-P), 14.8 (C-11). RMN ^{31}P (162

MHz, DMSO- d_6): δ 16.30 (d, $J = 24.0$ Hz). HRMS (ESI⁺) m/z , calculado para C₂₈H₂₇NO₆P [M + H]⁺ 504.1498; encontrado 504.1485.

4-(((difenoxifosforil)(4-metoxifenil)metil)amino) benzoato de etilo, 6 (1.66 g, 87%); sólido blanco; PF 147-149 °C; $R_f = 0.31$ (7:3 hexano – acetato de etilo). RMN ¹H (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.71 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH, H-9), 7.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH, H-8), 7.59 (dd, $J = 10.2, 4.9$ Hz, 1H, NH), 6.99 – 7.39 (m, 10H, ArH, H-7), 6.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ArH, H-6), 6.91 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, ArH, H-5), 5.72 (dd, $J = 24.4, 10.1$ Hz, 1H, CH-P), 4.21 (c, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃). RMN ¹³C (101 MHz, DMSO- d_6): δ 166.2 (C=O), 159.6 (C-20), 151.7 (C-2), 150.5 (C-24), 150.3 (C-30), 131.1 (C-13), 130.3 (C-4, C-6), 130.2 (C-26, C-28, C-32 C-34), 127.2 (C-18, C-22), 125.7 (C-27, C-33), 121.0 (C-25, C-29), 120.8 (C-31, C-35), 118.4 (C-5), 114.3 (C-19, C-21), 113.1 (C-1, C-3), 60.2 (C-10), 55.6 (C-37), 53.7 (d, $J = 157.2$ Hz, C-P), 14.8 (C-11). RMN ³¹P (162 MHz, DMSO- d_6): δ 16.08 (d, $J = 24.2$ Hz). HRMS (ESI⁺) m/z , calculado para C₂₉H₂₉NO₆P [M + H]⁺ 518.1654; encontrado 518.1636.

4-(((difenoxifosforil)(fenil)metil)amino) benzoato de etilo, 7 (1.71 g, 92%); sólido blanco; PF 142-143 °C; $R_f = 0.42$ (7:3 hexano - acetato de etilo). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.80 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH, H-6), 6.71 – 7.64 (m, 15H, ArH, H-5), 6.60 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH, H-4), 5.70 (s, 1H, NH), 5.20 (dd, $J = 24.7, 5.2$ Hz, 1H, CH-P), 4.29 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 166.6 (C=O), 150.2 (C-2), 150.1 (C-24), 149.8 (C-30), 134.2 (C-13), 131.4 (C-4, C,6), 129.8 (C-26, C-28), 129.7 (C-32, C-34), 128.9 (C-19, C-21), 128.6 (C-20), 128.2 (C-18, C-22), 125.6 (C-27), 125.4 (C-33), 120.6 (C-25, C-29), 120.4 (C-5), 120.2 (C-31, C-35), 112.8 (C-1, C-3), 60.3 (C-10), 55.4 (d, J

= 154.5 Hz, C-P), 14.4 (C-11). RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3): δ 14.58 (d, $J = 24.3$ Hz). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{27}\text{NO}_5\text{P}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 488.1549; encontrado 488.1553.

4-(((difenoxifosforil)(4-(difenilamino)fenil)metil)amino)benzoato de etilo, 8 (0.70 g, 58%); sólido café; PF 144-146 °C; $R_f = 0.50$ (7:3 hexano - acetato de etilo). RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH, H-7), 7.65 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, NH), 7.65 – 6.92 (m, 24H, ArH, H-5), 6.86 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, ArH, H-4), 5.74 (dd, $J = 24.4, 10.1$ Hz, 1H, CH-P), 4.21 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3). RMN ^{13}C (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 166.2 (C=O), 151.7 (C-2), 150.5 (C-20), 150.4 (C-25), 147.7 (C-31), 147.5 (C-37, C-38), 131.2 (C-4, C-6), 130.3 (C-13), 130.2 (C-27, C-29, C-33, C-35), 130.0 (C-40, C-42, C-45, C-47), 129.2 (C-39, C-43, C-44, C-48), 125.8 (C-18, C-22, C-41, C-46), 124.4 (C-28, C-34), 123.6 (C-26, C-30), 121.0 (C-32, C-36), 120.6 (C-5), 118.4 (C-1, C-3), 113.0 (C-19, C-21), 60.2 (C-10), 53.8 (d, $J = 156.0$ Hz, C-P), 14.8 (C-11). RMN ^{31}P (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 15.92 (d, $J = 24.5$ Hz). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{40}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ [$\text{M} - \text{H}$] $^+$ 653.2205; encontrado 653.2128

4-(((difenoxifosforil)(4-morfolinofenil)metil)amino) benzoato de etilo, 9 (0.89 g, 59%); sólido café oscuro; PF 98-100 °C; $R_f = 0.59$ (4:6 hexano - acetato de etilo). RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ 7.83 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH, H-9), 7.03 – 7.48 (m, 10H, ArH, H-8), 6.90 – 6.83 (m, 4H, ArH, H-7), 6.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH, H-6), 5.14 (d, $J = 24.2$ Hz, 1H, CH-P), 4.29 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.85 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 3.14 (dd, $J = 6.1, 3.1$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3). RMN ^{13}C (151 MHz, CDCl_3 , MeOD): δ 166.8 (C=O), 150.1 (C-2), 150.0 (C-25, C-31), 149.9 (C-20), 131.4 (C-4, C-6), 129.8 (C-27, C-29), 129.6 (C-33, C-35), 129.0 (C-13), 125.5 (C-18, C-22), 125.4 (C-28, C-34), 120.6 (C-26, C-

30), 120.3 (C-32, C-36), 120.1 (C-5), 115.8 (C-1, C-3), 112.8 (C-19, C-21), 66.7 (C-39, C-40), 60.4 (C-10), 54.6 (d, $J = 156.4$ Hz, C-P), 49.0 (C-37), 47.2 (C-38), 14.3 (C-11). RMN ^{31}P (243 MHz, CDCl_3): δ 14.96 (d, $J = 23.9$ Hz). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 573.2076; encontrado 573.1992.

4-(((difenoxifosforil)(1-metil-1H-pirazol-4-il)metil)amino)benzoato de etilo, 10 (0.89 g, 97%); sólido amarillo pálido; PF 122-124°C; $R_f = 0.45$ (3:7 hexano - acetato de etilo). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH, H-9), 7.60 (s, 1H, ArH, H-8), 7.49 (s, 1H, Ar-H, H-7), 7.32 – 6.95 (m, 10H, ArH, H-6), 6.66 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH, H-5), 5.25 (d, $J = 22.1$ Hz, 1H, CH-P), 4.31 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 3.74 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-N}$), 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ 166.6 (C=O), 150.2 (C-2), 150.1 (C-19), 149.7 (C-25), 138.7 (C-34), 131.5 (C-4, C-6), 129.9 (C-21, C-23), 129.8 (C-27, C-29), 129.5 (C-31), 125.5 (C-22, C-28), 120.6 (C-20, C-24), 120.5 (C-13), 120.4 (C-26, C30), 114.9 (C-5), 112.7 (C-1, C-3), 60.4 (C-10), 47.0 (d, $J = 163.0$ Hz, C-P), 39.1 (C-35), 14.4 (C-11). RMN ^{31}P (243 MHz, CDCl_3): δ 14.46 (d, $J = 21.9$ Hz). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 492.1610; encontrado 492.1612.

4-((1-(difenoxifosforil)-2-metilpropil)amino)benzoato de etilo, 11 (2.32 g, 74%); sólido blanco; PF 103-105 °C; $R_f = 0.39$ (7:3 hexano - acetato de etilo). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH, H-9), 7.38 – 6.84(m, 10H, ArH, H-8), 6.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH, H-7), 4.64 (dd, $J = 10.7, 3.5$ Hz, 1H, NH), 4.33 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2), 4.13 (ddd, $J = 19.0, 10.7, 4.2$ Hz, 1H, CH-P), 2.56 - 2.44 (m, 1H, CH-CH-P), 1.37 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 1.16 (dd, $J = 12.5, 6.8$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{-CH}$). RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3): δ 166.7 (C=O), 151.1 (C-2), 150.2 (C-19), 150.0 (C-25), 131.6 (C-4, C-6), 129.9 (C-21, C-23), 129.6 (C-27,

C-29), 125.4 (C-22), 125.2 (C-28), 120.5 (C-20, C-24), 120.4 (C-26, C-30), 119.8 (C-5), 112.2 (C-1, C-3), 60.4 (C-10), 55.6 (d, $J = 151.9$ Hz, C-P), 30.1 (C-13), 20.7 (C-31), 17.9 (C-32), 14.5 (C-11). RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3): δ 17.54 (dd, $J = 19.2, 8.3$ Hz). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 454.1705; encontrado 454.1658.

4-((1-(difenoxyfosforil)-2-etilbutil)amino)benzoato de etilo, 12 (2.17 g, 90%); sólido cristalino color blanco; PF 121-123 °C; $R_f = 0.48$ (7:3 hexano - acetato de etilo). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH, H-10), 7.38 – 6.84 (m, 10H, H-9), 6.67 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH, H-8), 4.51 – 4.57 (m, 1H, $\text{CH}-\text{CH}_2$), 4.41 (dd, $J = 10.9, 3.6$ Hz, 1H, CH-P), 4.35 (c, $J = 7.2$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}$), 2.10 – 1.88 (m, 2H, CH_2-CH), 1.74 - 1.45 (m, 2H, CH_2-CH), 1.39 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}$), 0.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 6H, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}$). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 166.6 (C=O), 150.8 (C-2), 150.3 (C-19), 150.2 (C-25), 131.6 (C-4, C-6), 129.8 (C-21, C-23), 129.6 (C-27, C-29), 125.3 (C-22), 125.1 (C-28), 120.4 (C-20, C-24), 120.3 (C-26, C-30), 120.0 (C-5), 112.1 (C-1, C-3), 60.3 (C-10), 52.3 (d, $J = 153.5$ Hz, C-P), 43.3 (C-13), 22.8 (C-34), 22.3 (C-31), 14.4 (C-11), 12.0 (C-33), 11.9 (C-32). ^{31}P RMN (162 MHz, CDCl_3): δ 18.22 (dd, $J = 18.6, 10.7$ Hz). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NO}_5\text{P}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 482.2018; encontrado 482.2020.

(S)-4-amino-N-(2-hidroxi-1-feniletíl)benzamida, 14 (840.80 mg, 75%); sólido blanco; PF 174-176 °C; $R_f = 0.36$ (5:4:1 hexano - acetato de etilo - metanol). RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.18 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, NH), 7.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH, H-8), 7.39 – 7.20 (m, 5H, ArH, H-7), 6.56 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-6), 5.61 (s, 2H, NH_2), 5.04 (c, $J = 7.8$ Hz, 1H, CH-Ar), 4.88 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, OH), 3.73 – 3.61 (m, 2H, CH_2). RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO): δ 166.5 (C=O), 152.1 (C-2), 142.4 (C-14), 129.4 (C-4, C-6), 128.4 (C-6, C-18), 127.5 (C-15, C-

19), 127.1 (C-17), 121.8 (C-5), 112.9 (C-1, C-3), 65.1 (C-12), 56.0 (C-11). HRMS (ESI⁺) m/z , calculado para C₁₅H₁₆N₂O₂ [M + H]⁺ 257.1285; encontrado 257.1288.

Difenil ((4-clorofenil)((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletíl)carbamoil)fenil)amino)metil)fosfonato, 15 (133.8 mg, 80%); sólido color blanco ligeramente aperlado; purificado por recristalización en etanol; PF 148-150 °C; $R_f=0.48$ (hexano - acetato de etilo - metanol, 5:4:1) RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.26 (dd, $J = 8.1, 4.5$ Hz, 1H, NH-C=O), 7.81 – 6.88 (m, 24H, ArH), 5.84 (ddd, $J = 25.6, 10.4, 2.4$ Hz, 1H, CH-P), 5.01 (c, $J = 7.0$ Hz, 1H, CH-Ar), 4.86 (dt, $J = 8.8, 5.9$ Hz, 1H, OH), 3.76 – 3.55 (m, 2H, CH₂). RMN ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 166.3 (C=O), 150.5 (C-2), 150.2 (C-22), 149.8 (C-28), 142.3 (C-38), 135.0 (C-10), 133.2 (C-17), 130.9 (C-4, C-6), 130.3 (C-24, C-26, C-30, C-32), 129.1 (C-16, C-18), 128.8 (C-41), 128.5 (C-40, C-42), 127.4 (C-15, C-19), 127.1 (C-39, C-43), 125.8 (C-25, C31), 123.8 (C-5), 121.0 (C-23, C-27), 120.8 (C-29, C-33), 113.0 (C-1, C-3), 65.1 (C-36), 56.1 (C-35), 53.8 (d, $J = 156.3$ Hz, C-P). RMN ³¹P (243 MHz, DMSO-*d*₆): δ 15.59 (d, $J = 26.4$ Hz, P-H). HRMS (ESI⁺) m/z , calculado para C₃₄H₃₀ClN₂O₅P [M + H]⁺ 613.1654; encontrado 613.1720.

Difenil (((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletíl)carbamoil)fenil) amino)(4-hidroxifenil)metil) fosfonato, 16 (35.3 mg, 22%); sólido blanco purificado por recristalización en etanol; PF 139-141 °C; $R_f=0.42$ (hexano - acetato de etilo - metanol, 5:4:1) RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.49 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, Ar-OH), 8.25 (dd, $J = 8.1, 5.2$ Hz, 1H, NH-C=O), 7.77 – 6.60 (m, 24H, ArH, NH), 5.59 (ddd, $J = 24.4, 10.3, 2.0$ Hz, 1H, CH-P), 5.02 (td, $J = 7.8, 5.5$ Hz, 1H, CH-Ar), 4.87 (dt, $J = 8.5, 5.9$ Hz, 1H, OH), 3.75 – 3.55 (m, 2H, CH₂). RMN ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 166.4 (C=O), 157.7 (C-27), 150.6 (C-32), 150.5 (C-38), 150.2(C-12), 142.3 (C-5), 130.3 (C-14, C-16), 130.2 (C-34, C-36, C-40, C42), 129.1 (C-7, C-9), 128.5 (C-

6, C-10), 127.4 (C-25, C-29), 127.1 (C-8), 125.7 (C-35, C-41), 125.6 (C-20), 123.4 (C-15), 121.1 (C-33, C-37) 120.8 (C-39, C-43), 115.6 (C-11, C-13), 112.9 (C-26, C-28), 65.1 (C-3), 56.1 (C-2), 53.9 (d, $J = 157.6$ Hz, C-P). RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) δ 16.66 (d, $J = 24.4$ Hz, P-H). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_6\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 595.1992; encontrado 595.2016.

Difenil (((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletíl)carbamoil)fenil)amino)(4-metoxifenil)metil)fosfonato, 17 (133.7 mg 80%); sólido blanco purificado por recristalización en etanol; PF 140-143 °C; $R_f=0.42$ (hexano - acetato de etilo - metanol, 5:4:1). RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): δ 8.26 (dd, $J = 8.1, 5.1$ Hz, 1H, NH-C=O), 7.71 – 6.88 (m, 24H, ArH, NH), 5.68 (ddd, $J = 24.7, 10.3, 2.3$ Hz, 1H, CH-P), 5.02 (td, $J = 7.9, 5.4$ Hz, 1H, CH-Ar), 4.87 (c, $J = 7.1$ Hz, 1H, OH), 3.74 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H, OCH $_3$), 3.61 – 3.71 (m, 2H, CH $_2$). RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6): δ 166.4 (C=O), 159.5 (C-27), 150.6 (C-31), 150.4 (C-37), 150.1 (C-12), 142.3 (C-5), 132.3 (C-14, C-16), 130.4 (C-33, C-35), 130.2 (C-39, C-41), 129.1 (C-7, C9), 128.4 (C-25, C-29), 127.4 (C-6, C-10), 127.1 (C-8), 125.7 (C-34, C-40), 123.5 (C-20, C-15), 121.1 (C.32, C-36), 120.8 (C-38, C-42), 115.7 (C-11), 115.0 (C-13), 114.2 (C-26), 113.0 (C-28), 65.1 (C-3), 56.1 (C-2), 55.6 (C-44), 53.8 (d, $J = 157.5$ Hz, C-P). RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) δ 16.45 (d, $J = 24.8$ Hz, P-H). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 609.2149; encontrado 609.2077.

Difenil (((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletíl)carbamoil)fenil)amino)(fenil) metil)fosfonato, 18 (154.6 mg, 34%); sólido blanco purificado por recristalización en etanol; PF 170-172 °C; $R_f=0.42$ (hexano - acetato de etilo - metanol, 5:4:1). RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.30 – 8.22 (m, 1H, NH-C=O), 7.85 – 6.85 (m, 25H, ArH, NH), 5.76 (ddd, $J = 25.2, 10.3, 4.7$ Hz,

1H, CH-P), 5.02 (cd, $J = 7.8, 5.2$ Hz, 1H, CH-Ar), 4.87 (tt, $J = 7.6, 5.9$ Hz, 1H, OH), 3.76 – 3.54 (m, 2H, CH₂). RMN ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆): δ 166.3 (C=O), 150.5 (C-31), 150.3 (C-37), 150.0 (C-12), 142.3 (C-5), 135.8 (C-20), 130.3 (C-33, C-35, C-39, C-41), 129.2 (C-14, C-16), 129.1 (C-7, C-9), 128.8 (C-26, C-28), 128.4 (C-25, C-27, C-29), 127.4 (C-6, C-10), 127.1 (C-8), 125.7 (C-34, C-40), 123.6 (C-15), 121.1 (C-32, C-36), 120.8 (C-38, C-42), 113.0 (C-11, C-13), 65.1 (C-3), 56.1 (C-2), 54.4 (d, $J = 156.0$ Hz, C-P). RMN ³¹P (243 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16.21 (d, $J = 24.8$ Hz, P-H). HRMS (ESI⁺) m/z , calculado para C₃₄H₃₁N₂O₅P [M+H]⁺ 579.2043; encontrado 579.1975.

Difenil ((4-(difenilamino)fenil)(4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)metil)fosfonato, 19 (282.5 mg, 49%); sólido ligeramente amarillo purificado por recristalización en etanol; PF 158-159 °C; $R_f=0.52$ (hexano - acetato de etilo - metanol, 5:4:1). RMN ¹H (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.27 (dd, $J = 8.1, 4.0$ Hz, 1H, NH-C=O), 7.77 – 6.81 (m, 34H, ArH, NH), 5.71 (ddd, $J = 24.7, 10.3, 2.6$ Hz, 1H, CH-P), 5.03 (td, $J = 8.0, 5.4$ Hz, 1H, CH-Ar), 4.88 (c, $J = 5.8$ Hz, 1H, OH), 3.75 – 3.59 (m, 2H, CH₂). RMN ¹³C (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.3 (C=O), 150.6 (C-32), 150.5 (C-38), 150.1 (C-12), 147.6 (C-27), 147.5 (C-44, C-45), 142.3 (C-5), 130.4 (C-14, C16), 130.2 (C-34, C-36, C-40, C-42), 130.0 (C-47, C-49, C-52, C-54), 129.5 (C-20), 129.1 (C-7, C-9), 128.4 (C-6, C-10), 127.4 (C-46, C-50, C-51, C-55), 127.1 (C-25, C-29), 125.8 (C-48), 125.6 (C-53), 124.3 (C-35, C-41), 123.6 (C-26, C-28), 123.4 (C-15), 121.1(C-33, C-37), 120.7 (C-39, C-43), 112.8 (C-11, C-13), 65.1 (C-3), 56.1 (C-2), 53.90 (d, $J = 156.2$ Hz, C-P). RMN ³¹P (243 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16.28 (d, $J = 24.5$ Hz, P-H). HRMS (ESI⁺) m/z , calculado para C₄₆H₄₀N₃O₅P [M+H]⁺ 746.2778; encontrado 746.2686.

Difenil (((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)(4-morfolinofenil)metil)fosfonato, 20 (102.8 mg, 57%); sólido amarillo paja purificado por recristalización en etanol; PF 127-129 °C; $R_f=0.32$ (hexano - acetato de etilo - metanol, 5:4:1) RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): δ 8.29 (dd, $J = 8.1, 6.0$ Hz, 1H, NH-C=O), 7.77 – 6.89 (m, 24H, ArH, NH), 5.66 (ddd, $J = 24.4, 10.3, 2.0$ Hz, 1H, CH-P), 5.07 (td, $J = 7.8, 5.5$ Hz, 1H, CH-Ar), 4.91 (dt, $J = 8.0, 5.9$ Hz, 1H, OH), 3.77 (t, $J = 4.5$ Hz, 4H, CH₂-O(morph)), 3.75 - 3.64 (m, 2H, CH₂), 3.21 – 3.09 (m, 4H, CH₂-N(morph)). RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ 166.3 (C=O), 151.2 (C-27), 150.6 (C-32), 150.4 (C-38), 150.1 (C-12), 142.3 (C-5), 130.2 (C-34, C-36, C-40, C-42), 129.8 (C-14, C-16), 129.0 (C-7, C-9), 128.4 (C-6, C-10), 127.4 (C-25, C-29), 127.1 (C-8), 125.6 (C-35, C-41), 123.4 (C-20, C-15), 121.1 (C-33, C-37), 120.9 (C-39, C-43), 115.2 (C-11, C-13), 113.7 (C-28), 113.0 (C-6), 66.5 (C-46, C-47) 65.1 (C-3), 56.1 (C-2), 53.9 (d, $J = 157.7$ Hz, C-P), 48.7 (C-44, C-45). RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) δ 16.59 (d, $J = 24.4$ Hz, P-H). HRMS (ESI⁺) m/z , calculado para C₃₈H₃₈N₃O₆P [M+H]⁺ 664.2571; encontrado 664.2498.

Difenil (((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)(1-metil-1H-pirazol-4-il)metil)fosfonato, 21 (75.2 mg, 66%); sólido blanco purificado por recristalización en etanol; PF 126-128 °C; $R_f=0.18$ (hexano - acetato de etilo - metanol, 6:3:1). RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6): δ 8.27 (dd, $J = 8.1, 3.4$ Hz, 1H, NH-C=O), 7.81 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, CH-pirazol), 7.71 (dd, $J = 8.8, 2.0$ Hz, 2H, ArH, H-10), 7.61 (s, 1H, CH-pirazol), 7.44 – 6.99 (m, 15H, ArH, H-8), 6.97 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, ArH, H-7), 6.91 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, NH), 5.70 (dd, $J = 21.2, 10.2$ Hz, 1H, CH-P), 5.03 (td, $J = 7.9, 5.5$ Hz, 1H, CH-Ar), 4.88 (s, 1H, OH), 3.81 (s, 1H, CH₃), 3.74 – 3.58 (m, 2H, CH₂-OH). RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ 166.3 (C=O), 150.6

(C-26), 150.5 (C-32), 150.2 (C-12), 142.3 (C-5), 138.9 (C-41), 130.7 (C-14, C-16), 130.3 (C-28, C-30), 129.8 (C-34, C-36), 129.1 (C-7, C-9), 128.4 (C-6, C-10), 127.4 (C-38), 127.1 (C-8), 125.6 (C-29, C-35), 123.4 (C-15), 121.0 (C-27, C-31), 120.9 (C-33, C-37), 115.4 (C-20), 112.7 (C-11, C-13), 65.1 (C-3), 56.1 (C-2), 46.6 (d, $J = 163.2$ Hz, C-P), 39.1 (C-42). RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) δ 16.40 (d, $J = 20.9$ Hz, P-H). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$ [M+H] $^+$ 583.2105; encontrado 583.2056.

Difenil (1-((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletil)carbamoil)fenil)amino)-2-metil propil fosfonato, 22 (30.5 mg, 21%); sólido blanco purificado por cromatografía *flash*; sistema hexano - acetato de etilo - metanol (5:4:1), columna Silica 4g, flujo de 18 mL/min; PF 124-125 °C; $R_f = 0.54$ (hexano - acetato de etilo - metanol, 5:4:1). RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.28 – 8.23 (m, 1H, NH-C=O), 7.70 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, ArH, H-11), 7.43 – 6.96 (m, 15H, ArH, H-10), 6.94 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, ArH, H-9), 6.51 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, NH), 5.08 – 4.99 (m, 1H, CH-Ar), 4.89 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, OH), 4.44 (dddd, $J = 22.3, 16.6, 10.6, 5.3$ Hz, 1H, CH-P), 3.74 – 3.60 (m, 2H, CH $_2$), 2.39 (hept, $J = 6.7$ Hz, 1H, CH-(CH $_3$) $_2$), 1.14 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH $_3$), 1.10 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH $_3$). RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ 166.4 (C=O), 151.5 (C-12), 150.6 (C-26), 150.4 (C-32), 142.4 (C-5), 130.4 (C-14, C-16), 130.1 (C-28, C-30, C-34, C-36), 129.2 (C-15), 128.4 (C-7, C-9), 127.5 (C-6, C-10), 127.1 (C-8), 125.7 (C-29), 125.4 (C-35), 121.1 (C-27, C-31), 120.9 (C-33, C-37), 112.0 (C-11, C-13), 65.1 (C-3), 56.1 (C-2), 55.5 (d, $J = 152.4$ Hz, C-P), 30.3 (C-20), 20.6 (C-38), 18.9 (C-39). RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) δ 19.31 (dd, $J = 17.5, 7.1$ Hz). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ [M+H] $^+$ 545.2200; encontrado 545.2088

Difenil (2-etil-1-((4-(((S)-2-hidroxi-1-feniletíl)carbamoil)fenil)amino) butil)fosfonato, 23

(49.2 mg, 31%); sólido color blanco ligeramente amarillo purificado por cromatografía flash, sistema hexano - acetato de etilo - metanol (5:4:1); columna Silica 12g Gold, flujo de 30 mL/min; PF 88-90 °C; $R_f = 0.56$ (hexano - acetato de etilo - metanol, 5:4:1). RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.26 (dd, $J = 8.1, 3.2$ Hz, 1H, NH-C=O), 7.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, ArH, H-11), 7.45 – 6.93 (m, 15H, ArH, H-10), 6.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, ArH, H-9), 6.48 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, NH), 5.04 (td, $J = 7.9, 5.5$ Hz, 1H, CH-Ar), 4.88 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, OH), 4.47 (dddd, $J = 21.8, 16.4, 10.5, 5.1$ Hz, 1H, CH-P), 3.74 -3.59 (m, 2H, CH_2 -OH), 1.95 – 1.79 (m, 2H, CH_2), 1.63 – 1.34 (m, 3H, CH_2 y CH), 0.99 – 0.81 (m, 6H, CH_3). RMN ^{13}C (151 MHz, DMSO- d_6) δ 166.3 (C=O), 151.1 (C-11), 150.6 (C-25), 150.4 (C-31), 142.4 (C-4), 130.4 (C-27, C-29), 130.1 (C-33, C-35), 129.3 (C-13, C-15), 128.4 (C-6, C-8), 127.5 (C-5, C-9), 127.1 (C-7), 125.7 (C-28), 125.4 (C-31), 122.7 (C-14), 121.0 (C-26, C-30), 120.9 (C-32, C-36), 111.9 (C-10, C-12), 65.1 (C-3), 56.1 (C-2), 52.4 (d, $J = 154.2$ Hz, C-P), 42.9 (C-19), 22.4 (C-37), 22.0 (C-40), 12.0 (C-38), 11.7 (C-39). RMN ^{31}P (243 MHz, DMSO- d_6) δ 19.81 (dd, $J = 17.6, 8.3$ Hz). HRMS (ESI $^+$) m/z , calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 573.2513; encontrado 573.2477.

DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Artículo: Synthesis of novel α -aminophosphonates under microwave irradiation, biological evaluation as antiproliferative agents and apoptosis inducers. *Med Chem Res* **28**, 2067–2078 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02436-z>

Póster: Síntesis y Caracterización de Nuevos α -Aminofosfonatos y sus Derivados tipo Amida y Evaluación de su Actividad Anticancerígena *in vitro*. XV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Cuernavaca, Morelos. Abril 2019.

Póster: One-pot synthesis of novel α -aminophosphonates under microwave irradiation and their cytotoxic activity. 101st Canadian Chemistry Conference and Exhibition (CSC2018). Edmonton, Alberta, Canadá. Mayo 2018.

Póster: One-pot synthesis of novel α -aminophosphonates under microwave irradiation. Tercer Simposio Iberoamericano de Química Orgánica (SIBEAQO-III). Universidad de Porto, Porto, Portugal. Septiembre 2016.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Consultado el 15/07/2021
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. American Cancer Society. Consultado el 15/07/2021
<https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/cancer-avanzado/que-es.html>
3. Cancer Research UK. Consultado el 15/07/2021
<https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer/incidence#heading-One>
4. Stewart, B. W., Wild, C. P. World Cancer Report 2014. *International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. 2014.*
5. Instituto Nacional del Cáncer. Consultado el 18/02/2018
<https://www.cancer.gov/espanol/tipos>
6. Secretaria de Salud. Consultado el 18/02/2018
<https://www.gob.mx/salud/prensa/318-cancer-tercera-causa-de-muerte-en-mexico>
7. INEGI. Consultado el 18/02/2018
http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf
8. Brandan M. E., Villaseñor Y., Detección del cáncer de mama: Estado de la mamografía en México. *Cancerología. 1: 147-162. 2006.*
9. American Cancer Society. Consultado el 22/02/2018
<https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/radiation-exposure/uv-radiation/uv-radiation-does-uv-cause-cancer.html>
10. Plummer M., de-Martel C., Vignat J., Ferlay J., Bray F., Franceschi S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health. 4: e609-16. 2016.*
11. Lizcano M., Carrillo A., Contreras A., Infección por virus del Papiloma Humano: epidemiología, historia natural y carcinogénesis. *Cancerología. 4: 205-216. 2009.*
12. Chaturvedi A. K., Engels E. A., Anderson W. F., Gillison M. L., Incidence trends for *Human papillomavirus*- related and- unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *Journal of Clinical Oncology. 28(4): 612-619. 2008.*
13. Serrano A., Hernández M. C., De la Garza J., Herrera L. A., *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *Cancerología. 4: 193-204. 2009.*
14. Wroblewski L. E., Peek R. M., Wilson K. T. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors that Modulate Disease Risk. *Clinical Microbiology Reviews. 23 (4): 713-739. 2010.*
15. Palanca B., Zaragoza Q., Meseguer B., Pérez C., Trullenque E., Sempere P., Infección vesical por esquistosoma: una causa inhabitual de hematuria. *Actas Urológicas Españolas. 32(2): 253-255. 2008.*
16. Tomasetti C., Li L., Vogelstein B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science. 355, 1330-1334. 2017.*

17. Clément C., Wakelee H., Lung cancer incidence in never smokers. *European Journal of Clinical & Medical Oncology*. 2(2): 49-57. **2010**.
18. Instituto Nacional de Cancerología. INFOCÁNCER México. Consultado el 23/02/2018.
<http://www.infocancer.org.mx/tratamientos-con454i0.html>
19. Petrelli N., Winer E., Brahmer J., Dubey S., Smith S., *et. al.*, Clinical cancer advances 2009: Major research advances in cancer treatment, prevention, and screening-A report from the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 27(35): 6052-6069. **2009**.
20. RakT kaczuk K. H. Review of the Contemporary Cytotoxic and Biologic Combinations Available for the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Clinical Therapeutics*. 2273-2289, **2009**.
21. Cancer Research UK. Consultado el 24/07/2018
<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/radiotherapy/about>
22. American Cancer Society. Consultado el 24/02/2018
<https://www.cancer.org/content/cancer/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/radioterapia/conceptos-basicos.html>
23. INFOCANCER México. Consultado el 24/02/2018
<http://www.infocancer.org.mx/la-ciruga-como-tratamiento-contra-el-cncer-con906i0.html>
24. American Cancer Society. Consultado el 24/02/2018
<https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/cirugia/como-se-usa-la-cirugia-contra-el-cancer.html>
25. American Cancer Society. Consultado el 24/02/2018
<https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/cirugia/tecnicas-quirurgicas-especiales.html>
26. American Cancer Society. Consultado el 24/02/2018
<https://www.cancer.org/es/cancer/linfoma-hodgkin/tratamiento/anticuerpos-monoclonales.html>
27. National Cancer Institute. Hormone therapy to treat Cancer. Consultado el 24/02/2018
<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/hormone-therapy>
28. Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 3(5): 380-387. **2003**.
29. National Cancer Institute. Photodynamic Therapy for Cancer. Consultado el 24/02/2018
<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery/photodynamic-fact-sheet>
30. Nguyen Q., Olson E., Aguilera T., Jiang T., Scadeng M., *et. al.*, Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(9): 4317-4322. **2010**.

31. American Cancer Society. Control de efectos secundarios relacionados con el cáncer. Consultado el 24/02/2018.
<https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/efectos-secundarios-fisicos.html>
32. Instituto Nacional del Cáncer. Consultado el 24/02/2018
<https://www.cancer.gov/espanol/investigacion/areas/tratamiento>
33. Organización Mundial de la Salud. Consultado el 01/03/2018.
http://www.who.int/topics/infectious_diseases/es/
34. National Institutes of Health (NIH). US National Library of Medicine. MedlinePlus. Consultado el 01/03/2018.
<https://medlineplus.gov/spanish/infectiousdiseases.html>
35. Prescott L. M., Herley J. P., Klein D.A. Microbiología. Mc Graw Hill Interamericana. Quinta Edición. **2004**. 43-50 pp. ISBN: 84-486-0525.
36. NIH. Biblioteca Nacional de Medicina de los E.U.A. MedlinePlus. Infecciones bacterianas Consultado el 01/03/2018.
<https://medlineplus.gov/spanish/bacterialinfections.html>
37. Del Tordello E., Vacca I., Ram S., Rappuoli R., Serruto D. *Neisseria meningitidis* NaIP cleaves human complement C3, facilitating degradation of C3b and survival in human serum. *PNAS*. *11*(1): 427-432. **2014**.
38. Zdrzejewski M. J., Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiology and molecular biology reviews*. *65*(2): 187-207. **2001**.
39. Prescott L. M., Herley J. P., Klein D.A. Microbiología. Mc Graw Hill Interamericana. Quinta Edición. **2004**. 981-983 pp. ISBN: 84-486-0525.
40. Parkhill J., Wren B. W., Mungall K., Ketley J. M., Churcher C., Basham D., Chillingworth T., Davies R. M., Feltwell T., Holroyd S., Quail M. A., Rajandream M-A., Rutherford K. M., Van Vliet A. H. M., Whitehead S., Barrell B. G. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Letters to nature*. *403*, 665-668. **2000**.
41. Johnson J. R., Stell A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *The Journal of Infectious Diseases*. *181*(1): 261-272. **2000**.
42. Karkey A., Thwaites G. E., Baker S. The evolution of antimicrobial resistance in *Salmonella typhi*. *Current Opinion in Gastroenterology*. *34*(1): 25-30. **2018**.
43. Weis A. M., Gilpin B., Huang B. C., Kong N., Chen P., Weimer, B. C. *Shigella* draft genome sequences: resources for food safety and public health. *Genome Announcements*. *5* (16): e00176-17. **2017**.
44. Simner P. J., Oethinger M., Stellrecht K. A., Pillai D. R., Yogev R., Leblond H., Mortensen, J. Multisite evaluation of the BD Max extended enteric bacterial panel for detection of *Yersinia enterocolitica*, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Vibrio*, and *Plesiomonas shigelloides* from stool specimens. *Journal of clinical microbiology*, *55*(11): 3258-3266. **2017**.
45. Wi T., Lahra M. M., Ndowa F., Bala M., Dillon J. A. R., Ramon-Pardo P., Eremin S. E., Bolan G., Unemo, M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global

- surveillance and a call for international collaborative action. *PLoS medicine*, 14(7): e1002344. **2017**.
46. Hocking J.S., Huston W., Chen M. *Chlamydia trachomatis* Infection. *Sexually Transmitted Infections in HIV-Infected Adults and Special Populations*. 51-67. **2017**. Online ISBN 978-3-319-56692-4
47. Smolak A., Rowley J., Nagelkerke N., Kassebaum N. J., Chico R. M., Korenromp E. L., Abu-Raddad, L. J. Trends and predictors of syphilis prevalence in the general population: Global pooled analyses of 1103 prevalence measures including 136 million syphilis tests. *Clinical infectious diseases*. **2017**. <https://doi.org/10.1093/cid/cix975>.
48. Fu Y., Ho B. T., Mekalanos J. J. Tracking *Vibrio cholerae* cell-cell interactions during infection reveals bacterial population dynamics within intestinal microenvironments. *Cell host & microbe*. 23, 1-8. **2018**.
49. Nakagawa S., Matsumoto M., Katayama Y., Oguma R., Wakabayashi S., Nygaard, T., Saijo S., Inohara N., Otto M., Matsue H., Núñez, G., Nakamura Y. *Staphylococcus aureus* virulent PSM α peptides induce keratinocyte alarmin release to orchestrate IL-17-dependent skin inflammation. *Cell host & microbe*, 22(5): 667-677. **2017**.
50. Organización Mundial de la Salud. Consultado el 03/03/2018. <http://www.who.int/gpsc/background/es/>
51. Brunton L. L., Lazo J. S. Parker K. L. Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Undécima edición. Mc Graw Hill. **2007**. 1095-1098 pp. ISBN 970-10-5739-2.
52. Cuddy P. G. Antibiotic classification: Implications for drug selection. *Critical Care Nursing Quarterly*. 20(3): 89-102. **1997**.
53. Alós J. I. Quinolonas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 27(5): 290-297. **2009**.
54. Organización Mundial de la Salud. Farmacorresistencia. Consultado el 03/03/2018. http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/es/
55. Organización Mundial de la Salud. Prevención de las infecciones nosocomiales. Consultado el 03/03/2018. http://www.who.int/csr/resources/publications/ES_WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12.pdf
56. Organización Mundial de la Salud. Centro de prensa. Consultado el 04/03/2018. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
57. Abdel-Megeed M. F., Badr B.E., Azaam M.M., El Hiti G.A. Synthesis, antimicrobial and anticancer activities of a novel series of diphenyl 1-(pyridin-3-yl)ethylphosphonates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 20(7): 2252-2258, **2012**.
58. Anil Kumar M., Park Y. K., Duk Lee K. Synthesis and Antiproliferative Activity of Novel α -Aminophosphonates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 60(12): 1531-1537, **2012**.

59. Maddina V.A., Kalyankar M.B., Kulkarni P.A. One-pot and catalyst-free synthesis of novel α -aminophosphonates under microwave irradiation and their Bio-activity. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 9(5): 2319-7676, **2014**.
60. Gandavaram S. P., Gollapalli N. R. Synthesis of Biologically Active alpha-Aminophosphonates. *Journal of Modern Medicinal Chemistry*. 1, 49-60, **2013**.
61. Venkata-Ramana K., Rasheed S., Chandra Sekhar K., Adam S. One-pot and catalyst-free synthesis of novel α -aminophosphonates under microwave irradiation and their biological activity. *Der Pharmacia Lettre*. 4(2): 456-463, **2012**.
62. Fan L., Lobkovsky E., Ganem B. Bioactive 2-Oxazolines: A New Approach via One-Pot, Four-Component Reaction. *Organic letters*. 9(10): 2015-2017, **2007**.
63. Djurendić E., Vujašković D., Sakač M., Ajduković J. Synthesis and biological evaluation of some new 2-oxazoline and salicylic acid derivatives. *ARKIVOC*. (ii): 83-102, **2011**.
64. Boduszek B., Olszewski T. K., Goldman W., Grzegolec K., Blazejewska P. Preparation of new imidazole-2-yl-(amino)methylphosphonates, phosphinates and phosphine oxides and their unexpected cleavage under acidic conditions. *Tetrahedron*. 68, 1223-1229. **2012**.
65. Mirzaei M., Eshghi H., Rahimizadeh M., Bakavoli M., Matin M. M., Hosseinymehr M., Rudbar, H. A., Bruno G. An Eco-friendly three component manifold for the synthesis of α -Aminophosphonates under catalyst and solvent-free conditions, X-ray characterization and their evaluation as anticancer agents. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 62, 1087-1096, **2015**.
66. Rádai Z., Kiss N. Z., Mucsi Z., Keglevich G. Synthesis of α -hydroxyphosphonates and α -aminophosphonates. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*. 191 (11-12): 1564-1565, **2016**.
67. Xia M., Lu Y.-d. Ultrasound-assisted one-pot approach to α -aminophosphonates under solvent-free and catalyst-free conditions. *Ultrasonics Sonochemistry*. 14, 235-240, **2007**.
68. Sampath C., Harika P., Revaprasadu N. Design, green synthesis, anti-microbial, and anti-oxidant activities of novel α -aminophosphonates via Kabachnik-Fields reaction. *Phosphorus, Sulfur and Silicon Related Elements*. 191(8): 1081-1085. **2016**.
69. Keglevich G., Bálint, E. The Kabachnik-Fields reaction: mechanism and synthetic use. *Molecules*. 17, 12821-12835, **2012**.
70. Fang Y.L., Wu Z.L., Xiao M.W., Tang Y.T., Li K.M., Ye J., Xiang J.N., Hu AX. One-Pot Three-Component Synthesis of Novel Diethyl((2-oxo-1,2-dihydroquinolin-3-yl)(arylamino) methyl)phosphonate as Potential Anticancer Agents. *International Journal of Molecular Science*. 17(5): 653-668, **2016**.
71. Gundluru M., Sarva S., Reddy Kandula M. K., Reddy Netala V., Tartte V., Reddy Cirandur S. Phosphosulfonic acid- catalyzed green synthesis and bioassay of α -aryl- α' -1,3,4-thiadiazolyl aminophosphonates. *Heteroatom Chemistry*. 27, 269–278, **2016**.

72. Kumari S., Shekhar A., Pathak D. A New Catalyst and Solvent-free Green Synthesis of α -Hydroxyphosphonates and α -Aminophosphonates. *Chemical Science Transactions*. 3(1): 45-54, **2014**.
73. Subba Reddy G., Uma Maheswara R. K., SyamaSundar C., SnathiSudha S., Haritha B., Swapna S., Suresh Reddy C. Neat synthesis and antioxidant activity of α -aminophosphonates. *Arabian Journal of Chemistry*. 7(5): 833-838, **2014**.
74. Yan Ping H., Xin Chen S., Dong Ming L. Microwave-assisted syntheses, structures and bioactivities of α -amino phosphonates containing pyrazole and 2-hydroxybenzyl units. *Chinese Journal of Structural Chemistry*. 32(11): 1639-1646, **2013**.
75. Klimczak A.A., Matusiak A., Lewkowski J., Bitner J., Szmraj J., Kontek R. Dimethyl (2-furyl)-n-(2-methoxyphenyl) aminomethylphosphonate induces apoptosis in esophageal squamous cancer cells. Structure versus activity of its selected analogs. *Phosphorus, Sulfur and Silicon Related Elements*. 190, 1088–1099, **2015**.
76. Ye M.Y., Yao G.Y., Pan Y.M., Liao Z.X., Zhang Ye., Wang S. Synthesis and antitumor activities of novel α -aminophosphonate derivatives containing an alizarin moiety. *European journal of medicinal chemistry*. 83, 116-128, **2014**.
77. Nevozhay D. Cheburator software for automatically calculating drug inhibitory concentrations from *in vitro* screening assays. *Plos One*. 9(9); e106186, **2014**.
78. ATCC Protocol, MTT cell proliferation assay. Consultado el 29/03/2018 <https://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>
79. Coyle M. B. Manual of antimicrobial susceptibility testing. *American Society for Microbiology*. BCIT Imaging Services. ISBN 1-55581-349-6
80. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2): 211-219, **2004**.
81. Eruslanov E., & Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In *Advanced protocols in oxidative stress II* (pp. 57-72). Humana Press, Totowa, NJ. **2010**.
82. Hammond J. B. W., Kruger N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: Walker J.M. (eds) *New Protein Techniques. Methods in Molecular Biology™*, vol 3. Humana Press. **1988**.
83. Kruger N. J. The Bradford Method For Protein Quantitation. In: Walker J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ, **2009**.
84. Kemp, W. *Organic spectroscopy*. Macmillan International Higher Education. 150-152 pp- **1991**. ISBN 978-1-4039-0684-7
85. Fischel J. L., Barbé V., Berlion M., et al. Tamoxifen enhances the cytotoxic effects of the nitrosourea fotemustine. Results on human melanoma cell lines. *Eur J Cancer* 29:2269–2273, **1993**.
86. Avril M. F., Aamdal S., Grob J. J., et al. Fotemustine Compared With Dacarbazine in Patients With Disseminated Malignant Melanoma: A Phase III Study. *J Clin Oncol* 22:1118–1125, **2004**.

87. Guida M., Tommasi S., Strippoli S., et al. The search for a melanoma-tailored chemotherapy in the new era of personalized therapy: a phase II study of chemomodulating temozolomide followed by fotemustine and a cooperative study of GOIM (Gruppo Oncologico Italia Meridionale). *BMC Cancer* 18:552, **2018**.
88. Marinelli A., Lamberti G., Cerbone L. High-dose fotemustine in temozolomide-pretreated glioblastoma multiforme patients. *Medicine (Baltimore)* 97:e11254. **2018**.
89. Wu J., Duan L., Zhang L. Fotemustine, teniposide and dexamethasone versus high-dose methotrexate plus cytarabine in newly diagnosed primary CNS lymphoma: a randomised phase 2 trial. *J Neurooncol* 140:427–434, **2018**.
90. Eruslanov E., Kusmartsev. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. Chapter 4. D. Armstrong (ed.). *Advanced Protocols in Oxidative Stress II, Methods in Molecular Biology*, vol. 594. DOI 10.1007/978-1-60761-411-1_4, **2009**.
91. Fulda S., Debatin K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25:4798–4811, **2006**.
92. Magedov I V., Manpadi M., Van slambrouck S. Discovery and Investigation of Antiproliferative and Apoptosis-Inducing Properties of New Heterocyclic Podophyllotoxin Analogues Accessible by a One-Step Multicomponent *Synthesis*. *J Med Chem* 50:5183–5192, **2007**.
93. Huang X-C., Wang M., Pan Y-M. Synthesis and antitumor activities of novel α -aminophosphonates dehydroabiatic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 23:5283–5289, **2013**.
94. Nimse S. B., Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv*, 5, 28986-28006, **2015**.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Erika Lilián Loredo Calderón.

Candidata para el Grado de

Doctora en Ciencias con Orientación en Farmacia.

Tesis: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS α -AMINOFOSFONATOS (TIPO ÉSTER Y TIPO AMIDA) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y ANTIBACTERIANA *in vitro*.

Campo de Estudio: Síntesis de moléculas con actividad biológica.

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Cárdenas, San Luis Potosí el 28 de noviembre de 1985, hija de Marisela Calderón Olmos y Miguel Ángel Loredo Gutiérrez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia en 2012 con el nombramiento de “Desempeño sobresaliente”, FCQ UANL.

Egresada de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, grado obtenido Química Farmacobióloga en 2007 con el título “Desempeño Sobresaliente” en el Examen General de Egreso de la Licenciatura (EGEL) QFB, CENEVAL.

Experiencia Profesional: Profesor de asignatura en la FCQ, UANL (octubre 2017 – diciembre 2018). Visitante académico en la Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Alberta, Edmonton Alberta, Canadá (agosto 2016 – julio 2017). Jefe de Laboratorio en Dixpertia Investigación Biofarmacéutica y Farmacológica S.C. (febrero 2013 – marzo 2014). Investigador Químico en Dixpertia Investigación Biofarmacéutica y Farmacológica S.C. (marzo 2012 – enero 2013).