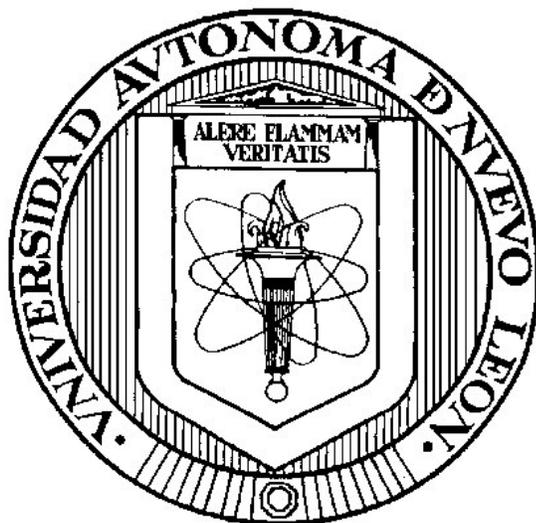


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE
NUEVOS α -AMINOFOSFONATOS Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA "IN VITRO".**

Por

Lic. JOSÉ LUIS GONZÁLEZ LLERENA

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

MONTERREY, N.L. JULIO 2020

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE NUEVOS
 α -AMINOFOSFONATOS Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA “*IN VITRO*”.**

Aprobación de la tesis:



Dra. Susana Thelma López Cortina

Directora de Tesis

Dra. Ma. Elena Cantú Cárdenas

Co-Directora de Tesis

Dra. Yolanda Araceli Gracia Vásquez

Comité tutorial

Dra. Élide Marcela Aguilar Bravo

Comité tutorial

Dr. Omar González Santiago

Comité tutorial

RESUMEN

Nombre: José Luis González Llerena

Fecha de Graduación: Julio 2020

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del proyecto: SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE NUEVOS α -AMINOFOSFONATOS Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “*IN VITRO*”.

Número de páginas: 140

Candidato para la obtención del grado de Maestro en Ciencias con orientación en Farmacia.

Área de estudio: Síntesis de moléculas con actividad biológica.

Propósito y método de estudio: El desarrollo de distintos mecanismos de resistencia por parte de las bacterias a los múltiples antimicrobianos, es un tema alarmante en la actualidad, y en mayor medida en el futuro. Un punto importante en la formación de bacterias resistentes son los hospitales, en los cuales existe una gran confluencia de distintos microorganismos, entre ellos las bacterias y numerosos antibióticos son utilizados para tratar las infecciones causadas por

éstas. A lo mencionado anteriormente, se suma el mal uso de los antibióticos por parte de la población en general, por tanto, la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos con nuevos mecanismos de acción se convierte en una necesidad primordial. Los α -aminofosfonatos son compuestos prometedores que han demostrado tener una amplia gama de actividades biológicas, de las cuales se han reportado: antibacteriana, antiviral y antineoplásica, entre otras. En el presente proyecto fueron sintetizados cinco nuevos α -aminofosfonatos unidos a grupos que se presentan frecuentemente en moléculas presentes en productos naturales, los cuales, de la misma manera que los α -aminofosfonatos, han demostrado tener distintas actividades biológicas, principalmente, antineoplásica y antibacteriana. Para llevar a cabo la síntesis, fue utilizada la reacción de Kabachnik-Fields, la cual consiste en la condensación de un aldehído, una amina y una fosfita, ésta fue catalizada utilizando agitación en vórtex. La purificación de los compuestos fue por medio de filtración al vacío y recristalización, siendo esto un método no convencional y ecológicamente amigable. Posterior a esto, fueron realizadas las pruebas antimicrobianas *in vitro* empleando la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de “Kirby-Bauer” con la que pudimos observar que ninguno de los compuestos sintetizados presentó actividad antibacteriana, posterior a esto fue llevado a cabo un análisis computacional de los compuestos, donde se obtuvieron las energías de afinidad de la unión de los ligandos con las proteínas diana y algunos aspectos de la posible farmacocinética y farmacodinamia. La caracterización de los nuevos compuestos sintetizados fue mediante Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{31}P , lo cual confirmó la correcta síntesis de los mismos.

Contribuciones y conclusiones: Se logró obtener cinco α -aminofosfonatos mediante un método de síntesis y purificación amigable con el medio ambiente, los cuales fueron caracterizados por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear. Fue probada la actividad antibacteriana de los compuestos “*in vitro*” mediante la técnica de “Kirby-Bauer”, resultando en una nula actividad en contra de las bacterias probadas, esto probablemente debido a la pobre difusión de los compuestos en el medio. También se realizó un análisis computacional de los compuestos, el cual consistió en pruebas de acoplamiento molecular sobre distintas dianas y la predicción de distintas características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los compuestos, debido a que el análisis de las dianas moleculares fueron proteínas que participan en el ciclo celular o tienen funciones específicas en la división de las células en humanos, estas últimas mostraron la posibilidad de evaluar los compuestos en líneas celulares cancerígenas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al Dios Trino, Padre, Hijo y Espíritu Santo, por su benevolencia para con los hombres, mayoritariamente aquella mostrada en Cristo Jesús y su muerte en la cruz por todo hombre, principalmente aquel que se arrepiente y pone su fe en su obra redentora, para librarle de la condenación eterna. Las misericordias de Dios son grandes e innumerables, su gracia infinita y sus carismas, excelentísimos. Por su gracia, el Señor dota de ciencia al hombre, como lo dice el Proverbio: “Porque el Señor da sabiduría, de su boca vienen el conocimiento y la inteligencia” y nos permite manipular y entender un poco de su creación a un nivel humano para gloria suya. Agradezco grandemente que, en su Providencia, me haya dado una familia que me apoya en toda manera y en todos mis proyectos y que pide a Dios por mí, algo elemental en la vida, mi padre José Luis González Morales, mi madre, Hortensia Llerena Elizondo y mi hermana, Rocío González Llerena. También agradezco que el Señor me haya permitido coincidir con un amigo y compañero de la maestría, el Químico Farmacéutico Biólogo, Bryan Alejandro Espinosa Rodríguez quien en todo momento estuvo ayudándome con las unidades de aprendizaje y el desarrollo de mi trabajo experimental y en la elaboración de la tesis que se presenta, sin duda, no hubiera sido posible sin su ayuda el llevar a cabo este proyecto. Agradezco a mi asesora de tesis, la Doctora Susana Thelma López Cortina por confiarme este proyecto y por su amplia disposición y ayuda en el trabajo realizado, a mis compañeros de laboratorio que siempre se mostraron abiertos y dispuestos a ayudar en todo lo que necesité. De la misma manera agradezco a la Dra. María Elena Cantú Cárdenas por permitirnos el uso del Laboratorio de Biotecnología y por sus asesorías brindadas durante el

desarrollo del proyecto; también al Dr. Julio Silva por su asesoramiento en las pruebas antibacterianas *in vitro*. Por último, agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas por la apertura de sus puertas y por la oportunidad de realizar el presente proyecto, sin olvidar el mucho aprendizaje que me llevo de sus maestros, muy queridos y respetados.

Tabla de contenido

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Estadísticas y problemática mundial de las infecciones bacterianas. 1	
1.2 Estadísticas y problemática en México	2
1.3 Problemática de las infecciones nosocomiales	3
1.4 Tratamiento.....	5
1.5 Mecanismos de resistencia bacteriana	7
1.6 Compuestos organofosforados: α -aminofosfonatos.....	9
1.7 Síntesis de los α -aminofosfonatos	10
CAPÍTULO II.....	11
ANTECEDENTES.....	11
2.1 Síntesis de los α -aminofosfonatos.....	11
2.2 Estudios clínicos y preclínicos de compuestos organofosforados.....	15
2.3 Otros compuestos con actividad antibacteriana.....	16
CAPÍTULO III	20
3.1 Justificación.....	20
3.2 Hipótesis.....	20
3.3 Objetivo general	21
3.4 Objetivos específicos	21
CAPÍTULO IV	22
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	22
4.1 Información general.....	22
4.2 Reactivos, material y equipo.....	23
4.3 Forma de manejo y disposición de los residuos generados.....	24

4.4 Síntesis de los α -aminofosfonatos.....	25
4.4.1 Síntesis a temperatura ambiente de los α -aminofosfonatos.....	25
4.4.2 Purificación de los α -aminofosfonatos.....	26
4.4.3 Caracterización de los α -aminofosfonatos.....	26
4.5 Pruebas biológicas.....	27
4.5.1 Método de difusión disco o prueba de Kirby-Bauer para susceptibilidad antibacteriana.....	27
4.6 Análisis computacional.....	29
4.6.1 Análisis del acoplamiento molecular.....	29
4.6.2 Modelado molecular de los α -aminofosfonatos.....	33
4.6.3 Análisis de las posibles dianas de los α -aminofosfonatos en humanos.....	36
4.6.4 Análisis de las propiedades farmacocinéticas en humanos.....	37
4.7 Análisis estadístico.....	40
CAPÍTULO V.....	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
5.1 Síntesis de los α -aminofosfonatos.....	40
5.1.1 Síntesis del compuesto A-001.....	42
5.1.2 Síntesis del compuesto A-003.....	43
5.1.3 Síntesis del compuesto A-004.....	43
5.1.4 Síntesis del compuesto A-005.....	44
5.2 Mecanismo de la reacción de Kabachnik-Fields.....	45
5.3 Síntesis no convencionales.....	46
5.4 Purificación de los α -aminofosfonatos.....	49
5.5 Elucidación estructural de los α -aminofosfonatos.....	50
5.5.1 Espectro de RMN- ¹ H del compuesto A002.....	51

5.5.2 Espectro RMN- ¹³ C del compuesto A002	53
5.5.3 Espectro RMN- ³¹ P del compuesto A-002	54
5.5.4 Espectro de RMN- ¹ H del compuesto A004	57
5.5.5 Espectro RMN- ¹³ C del compuesto A004	59
5.5.6 Espectro RMN- ³¹ P del compuesto A004.....	60
5.6 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana.....	64
5.7 Análisis computacional	71
5.7.1 Análisis del acoplamiento molecular	75
5.7.2 Modelado molecular de los α-aminofosfonatos.....	78
5.7.3 Análisis de las dianas de los compuestos en humanos.....	95
5.7.4 Análisis de las propiedades farmacocinéticas	96
CAPÍTULO VI.....	99
CONCLUSIONES.....	99
PERSPECTIVAS	100
ANEXOS	102
REFERENCIAS.....	135

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Incidencia bacteriana en ambientes hospitalarios de México en el año 2016.	4
2. Características farmacocinéticas y farmacodinámicas de distintos compuestos organofosforados	15
3. Residuos generados durante el proyecto.	25
4. Reactivos y cantidades usadas en la reacción de Kabachnik-Fields	40
5. Aldehídos utilizados, tiempos de reacción, rendimientos y cantidades obtenidas de los compuestos	42
6. Resumen de las señales de RMN de ^1H, ^{13}C, ^{31}P	60
7. Halos de inhibición de los compuestos	65
8. Energías de afinidad y constantes de disociación de los compuestos sobre las distintas dianas.	76
9. Dianas obtenidas en el software SwissTargetPrediction del SIB.	95
10. Análisis de las pruebas de Lipinski para los distintos compuestos	97

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura general del indol.	17
2. Estructura general de los indazoles.	18
3. Estructura del Cinamaldehído	19
4. Interfaz del programa Avogadro	31
5. Interfaz del programa Pymol	31
6. Interfaz del programa Autodocktools.	33
7. Interfaz del programa UCSF Chimera	35
8. Interfaz del programa LigPlot+,	36
9. Interfaz de la página web del SIB	37
10. Interfaz de la página web del SIB, en la pestaña SwissADME	38
11. Proceso de síntesis de los α -aminofosfonatos	41
12. Proceso de purificación de los α -aminofosfonatos.....	49
13. Espectro de RMN ^1H del compuesto A-002 (primera parte).	50
14. Espectro de RMN ^1H del compuesto A-002 (segunda parte).	51
15. Espectro RMN- ^{13}C del compuesto A-002.....	53
16. Espectro RMN- ^{31}P del compuesto A-002.....	54
17. Espectro de RMN- ^1H del compuesto A-004 (primera parte).....	57
18. Espectro de RMN- ^1H del compuesto A-004 (segunda parte).....	57
19. Espectro de RMN- ^1H del compuesto A-004 (tercera parte).	56
20. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto A-004.....	59
21. Espectro de RMN- ^{31}P del compuesto A-004.	60
22. Inhibición de algunos de los compuestos sobre las bacterias.	66
23. Inhibición (mm) sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	67
24. Inhibición (mm) sobre <i>Escherichia coli</i>	68

25. Inhibición (mm) sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
26. Inhibición (mm) sobre <i>Enterococcus faecalis</i>	70
27. Conformación más estable del compuesto A-001	71
28. Conformación más estable del compuesto A-002	72
29. Conformación más estable del compuesto A-003	72
30. Conformación más estable del compuesto A-004	73
31. Conformación más estable del compuesto A-005	73
32. Proteína Betalactamasa.....	74
33. Proteína Betalactamasa clase B VIM-2	76
34. Proteína alanina racemasa	75
35. Complejo A-003-Betalactamasa clase B VIM-2	77
36. Imagen de las interacciones entre el compuesto A-003 y la proteína Betalactamasa clase B VIM-2	79
37. Imagen de las interacciones entre el compuesto A-003 y la proteína Betalactamasa clase B VIM-2	80
38. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A- 001 y la proteína Alanina racemasa	81
39. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A- 001 y la proteína Betalactamasa clase B VIM 2	82
40. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A- 001 y la proteína Betalactamasa	83
41. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A- 002 y la proteína Alanina racemasa	84
42. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A- 002 y la proteína Betalactamasa clase B VIM-2	85
43. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A- 002 y la proteína Betalactamasa	86

44. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-003 y la proteína Alanina racemasa	87
45. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-003 y la proteína Betalactamasa	88
46. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-004 y la proteína Alanina racemasa	89
47. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-004 y la proteína Betalactamasa clase B VIM-2	90
48. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-004 y la proteína Betalactamasa	91
49. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-005 y la proteína Alanina racemasa	92
50. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-005 y la proteína Betalactamasa clase B VIM-2	93
51. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-005 y la proteína Betalactamasa	94
52. Diagrama de “huevo hervido”	98
53. Complejo A-001-Alanina racemasa	102
54. Complejo A-001-Betalactamasa clase B VIM-2	103
55. Complejo A-001-Betalactamasa	103
56. Complejo A-002-Alanina racemasa	104
57. Complejo A-002- Betalactamasa clase B VIM-2	104
58. Complejo A-002-Betalactamasa	105
59. Complejo A-003-Alanina racemasa	105
60. Complejo A-003-Betalactamasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del	106
61. Complejo A-004-Alanina racemasa	106
62. Complejo A-004-Betalactamasa clase B VIM-2	107

63. Complejo A-004-Betalactamasa	107
64. Complejo A-005-Alanina racemasa	108
65. Complejo A-005-Betalactamasa clase B VIM-2	108
66. Complejo A-005-Betalactamasa	109
67. Inhibición de los compuestos sobre las cepas bacterianas de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	110
68. Inhibición de los compuestos sobre las cepas bacterianas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. faecalis</i>	110
69. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-001 (primera parte).	111
70. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-001(segunda parte).....	112
71. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-001 (tercera parte).....	113
72. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto A-001	114
73. Espectro de RMN ³¹ P del compuesto A-001	115
74. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-002 (primera parte)	116
75. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-002 (segunda parte).....	117
76. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto A-002	118
77. Espectro de RMN ³¹ P del compuesto A-002	119
78. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-003 (primera parte).	120
79. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-003 (segunda parte).	121
80. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto A-003	122
81. Espectro de RMN ³¹ P del compuesto A-003.	123
82. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-004 (primera parte).	124

83. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-004 (segunda parte).	125
84. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-004 (tercera parte).....	126
85. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-004 (cuarta parte).	127
86. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto A-004.	128
87. Espectro de RMN ³¹ P del compuesto A-004.	129
88. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-005 (primera parte).	130
89. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-005 (segunda parte).	131
90. Espectro de RMN ¹ H del compuesto A-005 (tercera parte).....	132
91. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto A-005.	133
92. Espectro de RMN ³¹ P del compuesto A-005.	134

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Página
1. Reacción de la síntesis de los derivados de Abdel-Megeed.....	12
2. Reacción de síntesis realizada por Subba-Reddy y colaboradores.	12
3. Reacción realizada por Maddina y colaboradores.	13
4. Reacción de la síntesis realizada por Sampath y colaboradores.	14
5. Reacción realizada por Cordero y colaboradores.....	14
6. Reacción realizada por Salgado y colaboradores.....	15
7. Reacción de Kabachnik-Fields y los diferentes sustituyentes utilizados ...	26
8. Mecanismo de reacción de Kabachnik Fields.....	48

Nomenclatura

°C	Grados centígrados
Å	Angstrom
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ala	Alanina
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico Mensajero
Asp	Aspartato
ATP	Trifosfato de Adenosina
CELAES	Centro de Laboratorios Especializados
Chk	Serina/Treonina Cinasa Chk
EtOH	Etanol
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas
Gly	Glicina
His	Histidina
Hz	Hertz
kcal	Kilocaloría
IC50	Concentración Inhibitoria Media

Leu	Leucina
Log P	Coeficiente de Reparto Octanol-Agua
mg	Miligramos
mL	Mililitros
nM	Nanomolar
PGP	Glucoproteína P
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes Por Millón
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
Ser	Serina
SIB	Instituto Suizo de Bioinformática
CCF	Cromatografía en Capa Fina
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
μL	Microlitros
μM	Micromolar

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estadísticas y problemática mundial de las infecciones bacterianas.

Se puede definir como infección bacteriana a la invasión de un huésped por parte de una bacteria patógena, la cual, evadiendo al sistema inmunitario, entra y coloniza dentro del huésped, llegando a causar la muerte o daño del mismo, siendo este último, permanente o temporal. (1) Las defunciones en el mundo causadas por este tipo de infecciones, continúan estando entre las primeras causas de mortalidad, solo superadas por las enfermedades crónicas no transmisibles. De acuerdo con cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2016, las infecciones de las vías respiratorias inferiores aparecen como las más letales con una cifra anual de 3 millones de muertes, seguida de la diarrea infecciosa con 1.4 millones y la tuberculosis, con 1.3 millones. Éstas dos últimas han disminuido su incidencia en los últimos años, no obstante, aún se sitúan entre las primeras diez causas de muerte en todo el mundo. (2)

La OMS ha publicado una lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, clasificándolos con un grado de urgencia, que van desde la crítica hasta la media. El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre dichas bacterias actualmente se

incluyen: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacterias como *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia*, y *Proteus*, las cuales son bacterias que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como sepsis y neumonías. Estas bacterias han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (los mejores antibióticos disponibles para tratar las bacterias multifármacorresistentes). Los niveles segundo y tercero de la lista de “patógenos prioritarios”, categorías de prioridad alta y media, contienen otras bacterias que exhiben una farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias por salmonela. (3)

1.2 Estadísticas y problemática en México

En México, en el año 2014 se presentaron 17 mil muertes causadas por influenza y neumonía; y las principales causas de morbilidad fueron las infecciones respiratorias agudas con 27 millones de casos; las infecciones intestinales con 5 millones de casos; e infecciones en las vías urinarias con 4 millones de casos.

Dentro de las principales causas de muerte, desde el año 2007 hasta el 2017 aparecen las infecciones del tracto respiratorio ocupando el noveno lugar. (4) Otro problema presentado en México es el de las muertes por infecciones nosocomiales, un problema el cual abordaremos más adelante. Aunado a este problema encontramos la resistencia bacteriana mencionada anteriormente, sobre la que existen numerosos reportes de los hospitales mexicanos de un gran número de cepas resistentes, las cuales son una causa importante de muerte durante la estancia hospitalaria.

1.3 Problemática de las infecciones nosocomiales

Existe un grave problema entre las personas que anualmente son atendidas en los hospitales, las cuales sufren de complicaciones a causa de infecciones que contraen durante su estancia, agravando su situación, ocasionando el alargamiento de su permanencia hospitalaria, además de incapacidad para laborar por largos periodos de tiempo y un gran número de muertes. Toda esta problemática genera además de lo mencionado, altas cargas económicas para los sistemas de salud. Estas infecciones contraídas a nivel hospitalario se conocen como “infecciones hospitalarias o nosocomiales” y son una grave amenaza para la seguridad de las personas hospitalizadas. En el mundo, los países en desarrollo poseen un mayor riesgo de contraer infecciones nosocomiales comparados con los países desarrollados, y estos pueden superar hasta un 25% de pacientes afectados. Encontramos que, en México por cada 450,000 casos registrados con infección hospitalaria, se presentan 32 muertes. (5)

Para identificar los microorganismos causantes de estas infecciones, se realizó un estudio en México dirigido por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el objetivo de conocer la incidencia de distintas bacterias en relación con las infecciones hospitalarias. Los resultados del estudio (tabla 1) indicaron una mayor frecuencia para el caso de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus coagulasa-negativos*. (6)

Tabla 1. Incidencia bacteriana en ambientes hospitalarios de México en el año 2016.

Bacteria	Incidencia (%)	No. de casos
<i>Escherichia coli</i>	16.9	8192
<i>Staphylococcus coagulasa-negativos</i>	14.0	6771
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.9	5275
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.8	4725
<i>Klebsiella(pneumoniae/oxytoca)</i>	7.3	3493
<i>Enterobacter cloacae</i>	3.5	1696
<i>Acinetobacter spp</i>	3.0	1437

Otra variable para considerar en el caso de las infecciones bacterianas nosocomiales es la generación acelerada de múltiples mecanismos de resistencia hacia los antibióticos usados en la actualidad. Una de las principales razones de la aparición de estos mecanismos de resistencia es el uso indiscriminado de los antibióticos. (7) Esta resistencia bacteriana representa una de las más grandes amenazas de salud pública ya que, aunque este es un fenómeno natural, este problema avanza de manera creciente y veloz, ocasionando que infecciones como la neumonía, tuberculosis, salmonelosis o gonorrea se vuelvan enfermedades muy difíciles de tratar, provocando un aumento en el número de muertes.

Por otro lado, es alarmante que la investigación para el desarrollo de nuevas formas de contrarrestar esta situación está disminuyendo, debido a que las pruebas clínicas son muy estrictas y los protocolos demasiado largos para poder aprobar un antibiótico, teniendo como consecuencia que la industria farmacéutica brinde poco apoyo para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Todo esto ha ocasionado

que, con el paso de tiempo, se hayan aprobado una menor cantidad de antibióticos, mientras que las bacterias continúan generando mecanismos de resistencia para las terapias existentes. (8)

1.4 Tratamiento

El tratamiento para las infecciones bacterianas consiste en una gama de compuestos denominados antibióticos o antimicrobianos, de los cuales tristemente algunos de ellos, han perdido efectividad por la generación de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias (9), los cuales se mencionarán más adelante con mayor detalle. Estos agentes se pueden clasificar tal como se describe a continuación:

- a) **Inhibidores de la síntesis de la pared celular:** Estos agentes antimicrobianos han sido usados históricamente con un éxito muy grande, dentro de este grupo podemos encontrar a los β -lactámicos, glucopéptidos, cefalosporinas, penicilinas, entre otros. Algunos de los miembros de estos grupos ya han sido discontinuados debido a la resistencia bacteriana.

- b) **Despolarizantes de la membrana celular:** Estos agentes, como su nombre lo indica, tienen la capacidad de despolarizar la membrana celular bacteriana, lo cual ocasiona que algunos canales, especialmente iónicos, se abran, destruyendo la homeostasis de la célula bacteriana y destruyéndola al permitir la transferencia de iones, este es uno de los mecanismos más comunes por los cuales causan un efecto bactericida.

Algunos ejemplos de este tipo de fármacos son los lipopéptidos como las polimixinas. (9, 10)

- c) Inhibidores de la síntesis de proteínas:** La síntesis de proteínas es un proceso vital para cualquier tipo de célula, y de la misma manera que en las células eucariotas, en las bacterias, esta tarea es realizada por los ribosomas. El ribosoma bacteriano está constituido por ARN, que incluye el ARN 16S, 23S y 5S, los cuales son ácidos ribonucleicos con actividad catalítica (ribozimas), que facilitan el proceso de la formación del enlace peptídico para la formación de las proteínas en la bacteria, las unidades antes mencionadas, en conjunto con más de 50 factores proteicos que se ensamblan en 2 subunidades, la 30S y la 50S y uniéndose estas, conforman el ribosoma denominado 70S. La síntesis de proteínas se da un proceso conocido como traducción, el cual consiste en la lectura de los codones del ARN mensajero por el ribosoma, en este complejo proceso mecanicista, por medio de pasos regulados con especial afinidad, participan numerosas proteínas que se denominan factores de la traducción, los cuales dirigen al ribosoma en la síntesis proteica en algunos pasos esenciales que podemos nombrar como: iniciación, elongación, terminación y reciclaje de ribosomas. Los antibióticos que actúan a través de este mecanismo de acción, participan en alguno de estos procesos interfiriendo en cualquiera de los pasos mencionados, provocando la muerte de la célula bacteriana. (11)

- d) Antimetabolitos o interruptores del metabolismo:** En cuanto a los antibióticos que tienen este mecanismo de acción han tenido un desarrollo con precedente mucho tiempo atrás. Un ejemplo clásico de estos son los fármacos que inhiben la vía del folato, el cual es esencial para muchas reacciones de transferencia de carbono y es un elemento primordial en la síntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos. Existe una enzima llamada dihidrofolato reductasa la cual tiene un papel preponderante en la reserva de tetrahidrofolato en la célula, el cual es un precursor en la síntesis de glicina, metionina, timidina trifosfato y purinas. La inactivación de esta enzima priva a la célula de metabolitos esenciales para formar las macromoléculas principales como proteínas, ADN y ARN, conduciendo a la falta de replicación bacteriana. (12)

1.5 Mecanismos de resistencia bacteriana

Dentro de los mecanismos de resistencia generados por las bacterias podemos encontrar 4 principales:

- a) Limitar la absorción del fármaco.** La capa de lipopolisacáridos en las bacterias gram negativas le confiere protección a la bacteria sobre algunas moléculas, por lo tanto, estas bacterias tienen una resistencia innata ante un grupo de agentes antimicrobianos muy eficaces. Otro ejemplo similar puede ser observado en las micobacterias cuya membrana tiene un alto contenido de lípidos y ácidos micólicos los cuales hacen imposible la entrada de muchos agentes antimicrobianos; sin embargo, los agentes lipofílicos tienen un acceso facilitado, ejemplos de estos fármacos son la rifampicina y las

fluoroquinolonas, los cuales son ampliamente utilizados en el tratamiento de la tuberculosis, enfermedad causada por una micobacteria. Un ejemplo claro de cómo es que se genera resistencia de esta manera es el caso de *Staphylococcus aureus* el cual ha logrado desarrollar resistencia a la vancomicina por medio de mecanismos distintos, uno de ellos es el engrosamiento de su pared celular lo que hace difícil la entrada de los fármacos. Otra manifestación de este tipo de resistencia es la formación de biopelículas, esto es visto en la colonización bacteriana.

b) Modificación de la diana farmacológica. Dentro de la célula bacteriana existen distintas dianas sobre las cuales los fármacos pueden actuar. Un ejemplo de los mecanismos de resistencia de este tipo, es el dirigido hacia los fármacos betalactámicos que son utilizados casi de manera exclusiva por bacterias gram positivas y consiste en alterar la estructura y número de las proteínas de unión a penicilina, las cuales son transpeptidasas que participan en la construcción del peptidoglucano en la pared celular. Un aumento en la producción de proteínas de unión a penicilina con menor afinidad a los fármacos o un déficit de proteínas de unión a penicilina con una afinidad normal, afecta directamente la cantidad de fármaco que puede unirse a su objetivo, esto es posible a través de diversas mutaciones en genes específicos.

c) Inactivación del fármaco. Existen dos formas principales por medio de las cuales las bacterias logran inactivar fármacos, puede ser por la degradación

de los mismos o al transferirles un grupo funcional que los torna inactivos, un ejemplo de enzimas que hidrolizan fármacos son las β -lactamasas. En cuanto a la inactivación de fármacos por medio de la adición de grupos funcionales, la forma más común es la de añadir grupos acetilo, proceso conocido como acetilación, también se pueden añadir grupos fosforilo y adenilo.

d) Expulsión de fármacos: Las bacterias pueden lograr la expulsión de fármacos por bombas codificadas en sus genomas, algunas de estas tienen una expresión normal y otras son sobreexpresadas en determinadas situaciones. Estas bombas tienen la función de que las células bacterianas sean protegidas de una gran cantidad de sustancias tóxicas que llegan a ella, estas bombas son llamadas MDR (por las siglas en inglés Multi Drug Resistance).(9)

1.6 Compuestos organofosforados: α -aminofosfonatos

Una familia de moléculas de interés terapéutico por sus propiedades farmacológicas son los α -aminofosfonatos, que son compuestos organofosforados que tienen relación estructural con los α -aminoácidos, y los cuales poseen la capacidad de intervenir en procesos patológicos. Se ha demostrado que los α -aminofosfonatos poseen actividad antiviral, antifúngica y antibacteriana, lo que da un panorama prometedor para el desarrollo de nuevos antibióticos. Estos compuestos fueron estudiados por primera vez hace medio siglo y su actividad biológica se le adjudica principalmente a la base de los enlaces entre los átomos de nitrógeno, carbono y

fósforo. Este tipo de compuestos participan como péptido-miméticos y su principal mecanismo de acción es la inhibición enzimática.(13-15) Los mecanismos biológicos más importantes atribuidos a su actividad, incluyen la inhibición de una enzima implicada en la síntesis del peptidoglicano en las bacterias; inhibición de la ADN girasa, la enzima responsable de liberar la tensión torsional del ADN durante la replicación. Además, este tipo de compuestos son capaces de inhibir a las betalactamasas, enzimas responsables de la degradación del anillo beta-lactámico presente en muchos antibióticos, principalmente penicilinas. (16)

1.7 Síntesis de los α -aminofosfonatos

En cuanto a la síntesis de los α -aminofosfonatos, la ruta sintética más eficiente y estudiada para este fin por sus buenos rendimientos es aquella que involucra a la reacción de Kabachnik-Fields, la cual se fundamenta en la reacción entre un aldehído, una amina primaria y una fosfita para enlazar los átomos de nitrógeno, carbono y fósforo, formando el farmacóforo deseado. Sin embargo, a pesar de los buenos rendimientos que ésta genera, se ha buscado modificar las condiciones de reacción originales hacia reacciones asistidas por microondas, con el objetivo de diseñar una reacción acorde a los principios de la química verde, de acuerdo a los principios que procuran la sustentabilidad en los procesos químicos. Se han llegado a realizar síntesis de α -aminofosfonatos y algunos otros derivados relacionados vía microondas y por la reacción antes mencionada, sin la utilización de solventes como las reportadas por Keglevich y Bálint, ellos utilizaron la anilina o bencilamina como amina, formaldehído, benzaldehído, acetofenona o ciclohexona como oxocomponentes y dialquil fosfitas y óxido de difenilfosfina como reactivo, ellos

realizaron la síntesis y probaron distintas temperaturas, 80°C, 100°C y 120°C, obteniendo rendimientos desde un 80% hasta un 94%. Esta reacción ha sido objeto de múltiples estudios para generar mejores rendimientos y afectar menos al medio ambiente, los cuales, aún se siguen reportando. (17)

Por lo tanto, la síntesis de nuevos α -aminofosfonatos mediante síntesis sencillas y amigables con el medio ambiente, con la obtención de buenos rendimientos, plantea una innovadora y útil alternativa para el creciente problema de resistencia bacteriana y de las infecciones nosocomiales por medio del aporte de nuevas plataformas con nuevos mecanismos de acción.

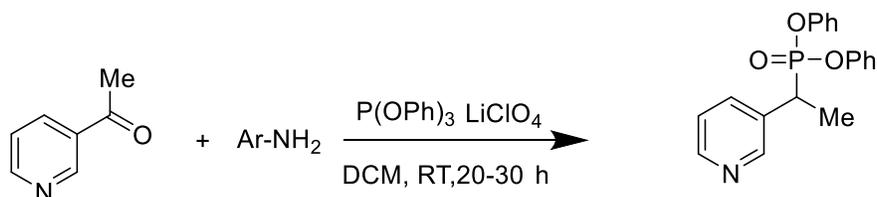
CAPÍTULO II

2. ANTECEDENTES

2.1 Síntesis de los α -aminofosfonatos

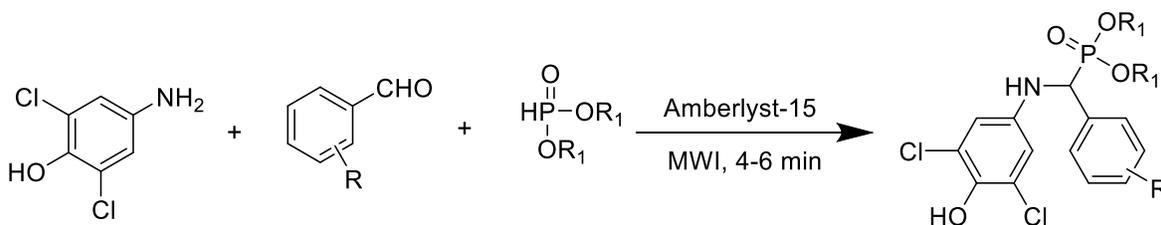
En 2012 Abdel-Megeed y colaboradores, llevaron a cabo la síntesis de α -aminofosfonatos, obteniendo buenos rendimientos (73 al 90%) para la mayoría de los compuestos sintetizados (esquema 1). Además, probaron su actividad antibacteriana sobre bacterias como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Durante el estudio utilizaron rangos de concentración de

10-1000 $\mu\text{g/mL}$ y reportaron alta actividad antibacteriana en rangos de concentraciones bajas, encontrando una concentración mínima inhibitoria de 10 $\mu\text{g/mL}$, utilizando ciprofloxacino como control positivo. (13)



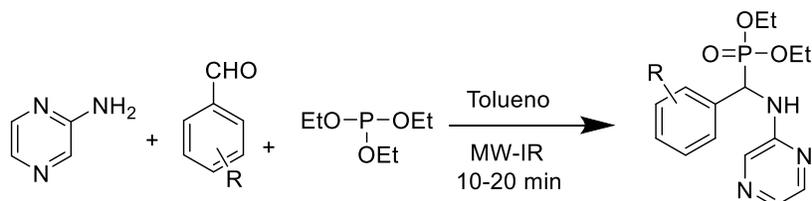
Esquema 1. Reacción de la síntesis de los derivados de Abdel-Megeed y colaboradores.

En 2014, Subba-Reddy y colaboradores, llevaron a cabo la síntesis de α -aminofosfonatos mediante la reacción de Kabachnik-Fields por irradiación de microondas en un solo paso y sin el uso de disolventes (esquema 2). La reacción fue llevada a cabo utilizando Amberlyst-IRC15, una resina de intercambio iónico como catalizador a 490 watts por un rango de tiempo de 4 a 6 minutos y obtuvieron rendimientos de reacción de 82-92%. (16)



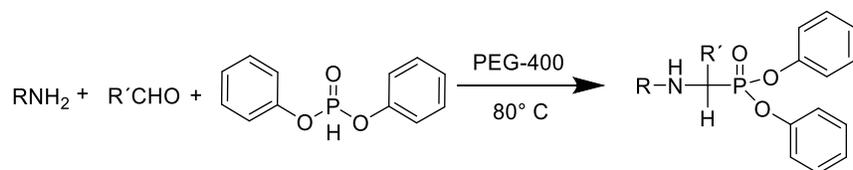
Esquema 2. Reacción de síntesis realizada por Subba-Reddy y colaboradores.

También en 2014, Maddina y colaboradores, llevaron a cabo una síntesis de α -aminofosfonatos y evaluaron su actividad antibacteriana y antifúngica obteniendo buenos resultados. La síntesis fue realizada por irradiación con microondas y se utilizó tolueno como disolvente (esquema 3). Ellos evaluaron concentraciones de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ y los compuestos derivados de benzaldehído; *p*-clorobenzaldehído y *p*-metoxibenzaldehído los cuales mostraron una potente actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* (16 mm de halo de inhibición a 25 $\mu\text{g/mL}$), *Escherichia coli* (16 mm a 25 $\mu\text{g/mL}$) y *Pseudomonas aeruginosa* (16 mm a 50 $\mu\text{g/mL}$) en comparación con el control Estreptomocina (13mm a 25 $\mu\text{g/mL}$).⁽¹⁵⁾



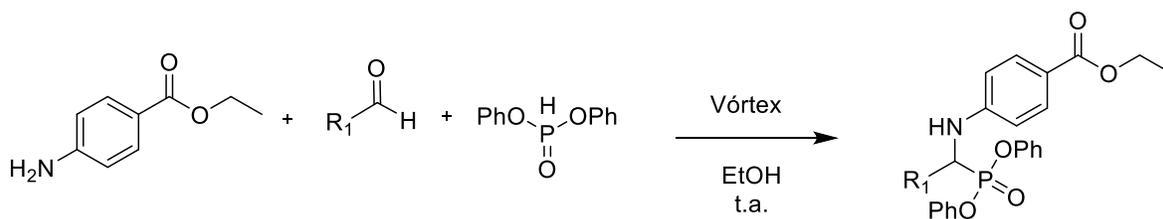
Esquema 3. Reacción realizada por Maddina y colaboradores.

En 2016, Sampath y colaboradores, llevaron a cabo la síntesis de una serie de distintos derivados de α -aminofosfonatos (esquema 4) a través de la reacción de Kabachnik-Fields utilizando polietilenglicol como solvente (amigable con el ambiente) y evaluaron su actividad antibacteriana y antioxidante. Para la prueba utilizaron las siguientes bacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus bovis*. Se utilizó el método de difusión en disco a concentraciones de 150, 250 y 350 $\mu\text{g/mL}$, se empleó estreptomocina como control y reportaron que cinco compuestos poseen una fuerte actividad, las concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos fueron desde 94 $\mu\text{g/mL}$ hasta 154 $\mu\text{g/mL}$, reportando el control 94 $\mu\text{g/mL}$.⁽¹⁸⁾



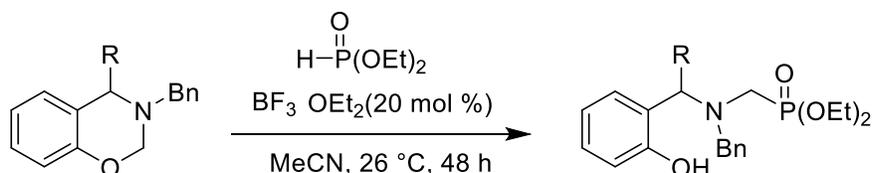
Esquema 4. Reacción de la síntesis realizada por Sampath y colaboradores.

En 2018, Cordero Díaz en su Tesis de Maestría dentro de nuestro grupo de investigación, reportó una metodología no convencional para la síntesis de α -aminofosfonatos con aplicación potencial como antifúngicos, la cual consiste en llevar a cabo la reacción de Kabachnik-Fields por agitación con vórtex y en presencia de etanol como solvente a temperatura ambiente. Este método se puede considerar como amigable con el medio ambiente. La obtención de los productos fue por cristalización y lavados por filtración a vacío, así como la purificación de las aguas madres por cromatografía en columna para la obtención una mayor cantidad de producto puro. Se reportaron rendimientos entre el 71% y el 95%.



Esquema 5. Reacción realizada por Cordero y colaboradores.

En 2019, Salgado y colaboradores realizaron la síntesis de α -aminofosfonatos, utilizando 1,3-benzoxazinas, dietil fosfita y eterato de trifluoruro de boro como catalizador en MeCN, a 26 °C durante 48 horas, obteniendo rendimientos que iban desde un 24 hasta un 96%. En el esquema 6 se muestra la reacción y sus condiciones. (19)



Esquema 6. Reacción realizada por Salgado y colaboradores.

2.2 Estudios clínicos y preclínicos de compuestos organofosforados

Algunos compuestos organofosforados han llegado a fases clínicas, cuyas características de biodisponibilidad se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Características farmacocinéticas y farmacodinámicas de distintos compuestos organofosforados.(14)

Características farmacológicas	Tipo de compuesto organofosforado			
Actividad y selectividad	Moderada	Alta	Alta	Alta

Reversibilidad	Si	Si	No	Si
Estabilidad química y metabólica	Muy buena	Muy buena	Muy buena	Muy buena
Biodisponibilidad	Baja	Dependiente de la estructura	Buena	Muy baja
Excreción	Rápida	Dependiente de la estructura	Lenta	Muy rápida
Duración del efecto terapéutico	Corto	Corto	Largo	Largo
Efectos adversos	No	No	No	Sí

2.3 Otros compuestos con actividad antibacteriana

La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que mejoren la calidad de vida, ha sido motivo de diversos estudios en lo que respecta a las plantas, siendo los compuestos contenidos en estas, la base de múltiples fármacos actualmente utilizados en las terapias. Existe una gran cantidad de plantas que se les ha comprobado, entre otras actividades biológicas, que inhiben el crecimiento bacteriano, ya sea de bacterias gram positivas o gram negativas (18), lo cual sirve como una excelente guía en la búsqueda de nuevas formas de tratamiento. Algunas

de las estructuras químicas de compuestos encontrados en plantas y las diversas actividades biológicas que estos presentan, se describen a continuación.

Los indoles, (cuya estructura general se encuentra en la figura 1) y sus derivados, poseen actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral y antiparasitaria, son compuestos orgánicos con una estructura heterocíclica aromática cuya actividad biológica ha sido de mucha relevancia en la química medicinal. Estas moléculas han demostrado ser muy buenos candidatos para la lucha en contra de la resistencia bacteriana debido a su amplia gama de funciones biológicas. Se han considerado como posibles inhibidores de las bombas de expulsión NorA, las cuales son un mecanismo de resistencia bacteriana. (20). Por otra lado, en 2019, Yuan y colaboradores probaron compuestos que contenían como farmacóforo la estructura del indol, sobre distintas cepas bacterianas entre las cuales encontramos a *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*, todas estas cepas resistentes. Obtuvieron como resultado una fuerte inhibición antibacteriana por uno de los compuestos derivados con base indólica, específicamente sobre las bacterias antes mencionadas. (21)

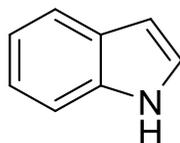


Figura 1. Estructura general del indol.

Los indazoles (cuya estructura general se encuentra en la figura 2), poseen una amplia gama de actividades biológicas, siendo utilizados contra bacterias y virus,

también como antidepresivos, antihiperglucemiantes y en el campo de la agricultura, como pesticidas. En el año 2010, Farooqui y colaboradores, llevaron a cabo la síntesis de diferentes derivados de indazoles obteniendo buenos resultados para varios de sus compuestos, las bacterias utilizadas para las pruebas biológicas fueron *Bacillus thurengensis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *E. coli*. (22) Por otro lado, en 2018, Malapati y colaboradores desarrollaron nuevos derivados que contenían como base la estructura del indazol, sus pruebas fueron sobre la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. Dentro de todos los derivados que fueron probados, ellos encontraron al menos dos, los cuales presentaban una potente inhibición tanto en bacterias en estado de replicación, como las que no se encontraban en este estado, fueron prometedores con posibles antibióticos antituberculosos. (23)

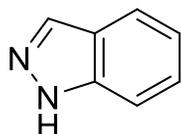


Figura 2. Estructura general de los indazoles.

El cinamaldehído (cuya estructura general se encuentra en la figura 3), es un componente de la canela que presenta actividad antibacteriana, entre otras. En 2006 Ooi y colaboradores, probaron el aceite esencial de canela y a través de técnicas como espectrometría de masas determinaron que el cinamaldehído constituye el 85% de la composición del extracto. Realizaron pruebas en bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, y bacterias Gram-negativas, *E.*

coli, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Salmonella typhimurium* y probaron que tuvieron buen efecto de inhibición de crecimiento. (24) Por otro lado, en el año 2019 fue publicado un reporte en donde se ha demostrado la actividad antibacteriana del cinamaldehído y sus derivados, sobre bacterias gram positivas y gram negativas, tales como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Salmonella spp.*, entre muchas otras. (25)

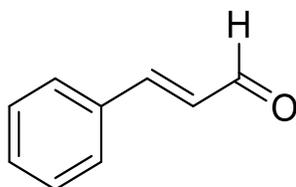


Figura 3. Estructura del Cinamaldehído

El planteamiento de las moléculas objetivo del presente proyecto se realizó con base en los reportes, por un lado, de la síntesis y actividad biológica evidente de los α -aminofosfonatos, y por otro a la evidencia de que compuestos tales como indoles, indazoles y cinamaldehído presentan actividad antimicrobiana.

Por otro lado, la realización de la síntesis se propuso con base en las tendencias de la síntesis orgánica enfocadas a utilizar condiciones de reacción amigables con el ambiente, tal es el caso de reacciones con limitado uso de disolventes y llevadas a cabo mediante agitación con vortex. Por lo tanto, este proyecto propuso primeramente la obtención de 5 nuevos derivados de α -aminofosfonatos a través de la reacción de Kabacnik-Fields en condiciones sustentables, además, la

determinación de su actividad antibacteriana potencial frente a 4 diferentes cepas y finalmente la realización de estudios de acoplamiento molecular (Docking).

CAPÍTULO III

3.1 Justificación.

Debido a que la terapia antimicrobiana actual se ha comprometido por la resistencia bacteriana y los índices de mortalidad de etiología infecciosa van en aumento, la búsqueda y diseño de nuevas estructuras que posean efectos antimicrobianos se ha convertido en una tarea de gran relevancia para combatir este problema de salud pública.

3.2 Hipótesis.

Al menos uno de los α -aminofosfonatos sintetizados presentará mayor actividad antibacteriana *in vitro* comparado con ciprofloxacino.

3.3 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar cinco nuevos α -aminofosfonatos, determinar su actividad antibacteriana *in vitro* y realizar análisis computacional de los compuestos.

3.4 Objetivos específicos

- 1.- Sintetizar y purificar 5 nuevos α -aminofosfonatos
- 2.- Caracterizar los nuevos compuestos mediante RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P .
- 3.- Determinar la actividad antibacteriana de los α -aminofosfonatos frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*.
- 4.- Realizar el análisis computacional de las moléculas (Acoplamiento molecular/Docking)

CAPÍTULO IV

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se muestra la metodología experimental seguida para lograr la síntesis de los compuestos, de la misma manera que la técnica de purificación utilizada, el proceso de caracterización de las moléculas y la metodología del cultivo celular que se utilizó en las pruebas biológicas para evaluar la actividad antibacteriana de los mismos, así como la metodología para la realización de las pruebas de análisis computacional con las diferentes dianas.

4.1 Información general

La síntesis orgánica de los compuestos se realizó en el Laboratorio de Química Industrial ubicado en el Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la FCQ de la UANL y en Laboratorio de Química Orgánica de la misma dependencia. En cuanto a las pruebas biológicas fueron realizadas en el Laboratorio de Biotecnología ubicado en el tercer piso del CELAES de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

4.2 Reactivos, material y equipo

Para la obtención de los α -aminofosfonatos fueron utilizados los siguientes reactivos y equipos:

- Sigma-Aldrich: Difenilfosfita 98%, 4-etilaminobenzoato 98%, 4 Clorobenzaldehído 97%, Indol 3-carboxaldehído 97%, 3,4,5 Trimetoxibenzaldehído 98%, Indazol 5-carboxaldehído 96%, Cinamalaldehído 99%
- Macherey-Nagel: Sílica 60, 0.040-0.063 mm.
- Desarrollo de Especialidades Químicas: acetato de etilo, hexano, metanol, diclorometano (grado industrial, destilados para su uso), isopropanol, etanol (grado industrial).
- Vórtex Genie 2

En cuanto a las pruebas biológicas que fueron realizadas en este proyecto, los equipos y reactivos fueron los siguientes:

- a) Pruebas antimicrobianas
 - Cajas Petri de plástico.
 - Agar bacteriológico Bioxon.
 - Caldo Mueller Hinton.
 - Papel filtro.
 - Micropipetas de 1000 μ L, 200 μ L y 20 μ L.
 - Etanol
 - Espectrofotómetro
 - Tubos HACK de 13 x 100 mm

- Varillas de vidrio
- Asa microbiológica
- Cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*) proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología del CELAES.

4.3 Forma de manejo y disposición de los residuos generados.

Para el manejo de los reactivos y en la realización de las reacciones y las purificaciones se utilizó el equipo de seguridad declarado en el reglamento del laboratorio de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ), como la bata, lentes de seguridad, mascarilla y guantes.

La disposición de los residuos generados se apejó al programa de disposición de residuos implementado por la FCQ de la UANL, utilizando los siguientes contenedores:

A (soluciones de sales inorgánicas, ácidos y bases neutralizados).

B (sólidos inorgánicos).

C (compuestos y disolventes orgánicos no halogenados).

D (compuestos y disolventes orgánicos halogenados).

E (muy tóxico, cancerígeno orgánico).

G (sólidos orgánicos).

Vidrio impregnado de sustancias químicas.

Residuos biológicos: el desecho de residuos mediante el estándar de clasificación de los Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI): Contenedor rojo: residuos punzocortantes biológico-infecciosos. Contenedor amarillo: residuos patológicos (órganos, tejidos, células biológico-infecciosas).

Tabla 3. Residuos generados durante el proyecto.

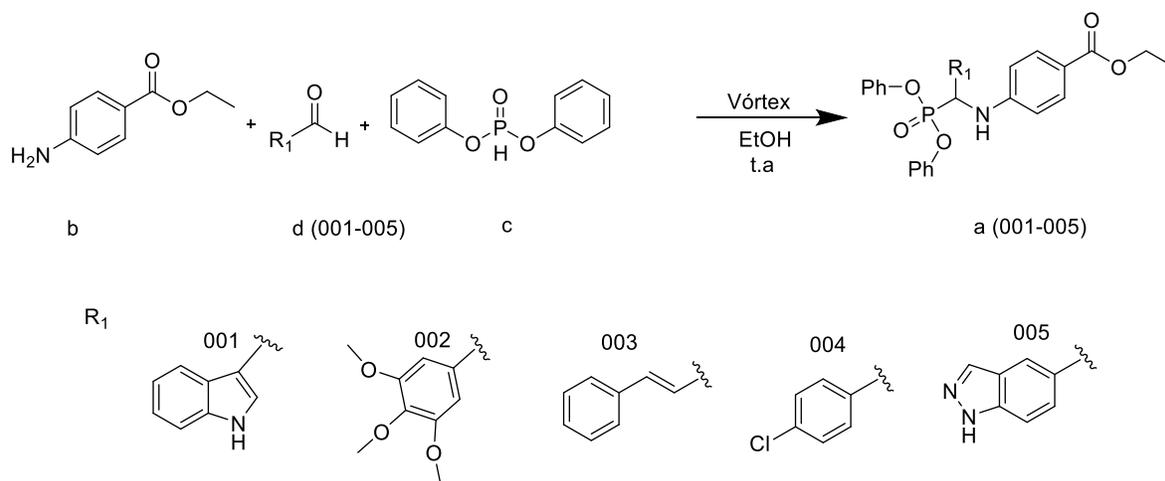
Residuo generado	Cantidad aproximada
Acetato de etilo	6 litros
Hexano	6 litros
Metanol	6 litros
Etanol	1 litro
Sílica gel	4 kg

4.4 Síntesis de los α -aminofosfonatos

4.4.1 Síntesis a temperatura ambiente de los α -aminofosfonatos.

La síntesis a temperatura ambiente de los α -aminofosfonatos se llevó a cabo siguiendo la siguiente metodología planteada: en un tubo de MW G10, se colocó 4-etilaminobenzoato (1 mmol), el aldehído correspondiente (1 mmol) y la difenilfosfita (1 mmol), usando como solvente etanol (Esquema 6). Se agitó en vórtex hasta que se observó un precipitado. El seguimiento de la reacción se realizó por

cromatografía en capa fina, las cuales fueron reveladas con una lámpara de luz UV de 366 nm.



Esquema 7. Reacción de Kabachnik-Fields y los diferentes sustituyentes utilizados en este proyecto.

4.4.2 Purificación de los α -aminofosfonatos

En cada una de las reacciones, la mayor cantidad del producto se obtuvo por cristalización en el crudo de reacción y la posterior filtración al vacío, en un embudo Buchner, un matraz Kitazato y papel filtro. Las aguas de filtrado se dejaron reposar durante toda la noche a una baja temperatura y al día siguiente se siguió la misma metodología obteniendo una cantidad mayor de producto. El seguimiento de las fracciones se llevó a cabo por cromatografía en capa fina.

4.4.3 Caracterización de los α -aminofosfonatos.

Para la caracterización de los compuestos sintetizados fue utilizada la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón, carbono 13 y fósforo 31 (^1H , ^{13}C

y ^{31}P), cuyos espectros resultantes brindaron información estructural suficiente para corroborar la obtención de los compuestos esperados.

4.5 Pruebas biológicas

Las bacterias utilizadas en esta prueba fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, las cepas proporcionadas fueron *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. Mediante el método de susceptibilidad antibacteriana más ampliamente utilizado, el método de Kirby-Bauer o de difusión en disco, todas estas cepas fueron evaluadas con los distintos compuestos sintetizados.

4.5.1 Método de difusión disco o prueba de Kirby-Bauer para susceptibilidad antibacteriana

a) Preparación de las diluciones de compuestos a evaluar.

Primeramente, se procedió a pesar 1 mg de cada uno de los 5 compuestos, los cuales fueron disueltos en 1 mL de DMSO, resultando en una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$, posteriormente una dilución fue realizada para obtener una concentración final de 500 $\mu\text{g/mL}$ y esta fue la concentración a la cual fueron probados los compuestos. En lo que respecta al ciprofloxacino fue disuelto en HCl al 0.1% por instrucciones de fabricante a una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$.

b) Preparación del medio Müller Hinton y adición a las cajas

El medio fue preparado mediante la adición de Agar bacteriológico y medio Müller Hinton con las siguientes cantidades: 15 g de Agar bacteriológico por cada litro de agua desionizada y 21 g de medio Müller Hinton, esta mezcla posteriormente fue puesta en calentamiento y agitación en una plancha de calentamiento a 130° C hasta que se llegó al punto de ebullición, enseguida fue retirada de la plancha y esterilizada en la autoclave a una temperatura de 120 °C y una presión de aproximadamente 30 libras durante 15 min. Se dejó enfriar hasta que alcanzó la temperatura adecuada y fue puesta una cantidad de 20 mL de medio en cada caja Petri.

c) Preparación y ajuste del inóculo

Los inóculos de las bacterias fueron preparados a partir de las cepas proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología, las cuales fueron tomadas y sembradas en un tubo HACH con medio Müller Hinton, las cuales se dejaron incubando a 37° C durante 24 horas, posteriormente a las bacterias sembradas en los tubos les fue añadida una cantidad de 3 mL de solución salina la cual fue preparada en una proporción de 8.5 g de NaCl por cada litro de agua y posteriormente fue tomado 1 mL de la mezcla de bacterias con solución salina y puesta en un tubo HACH con solución salina y ajustada a la escala 0.5 de McFarland.

d) Inoculación de las cajas, aplicación de los discos impregnados e incubación.

Para la inoculación de las cajas fueron tomados 200 µL de la última solución salina preparada y se añadieron a las cajas Petri con el medio Müller Hinton

anteriormente preparadas. La impregnación de los compuestos a las discos se realizó utilizando una micropipeta y se adicionaron 10 μ L de los compuestos ya disueltos, se colocaron 3 compuestos por caja, más el control de DMSO y el control positivo ciprofloxacino, posteriormente se dejaron incubar a 37° C durante 22 horas y se procedió a medir los mm de los halos de inhibición.

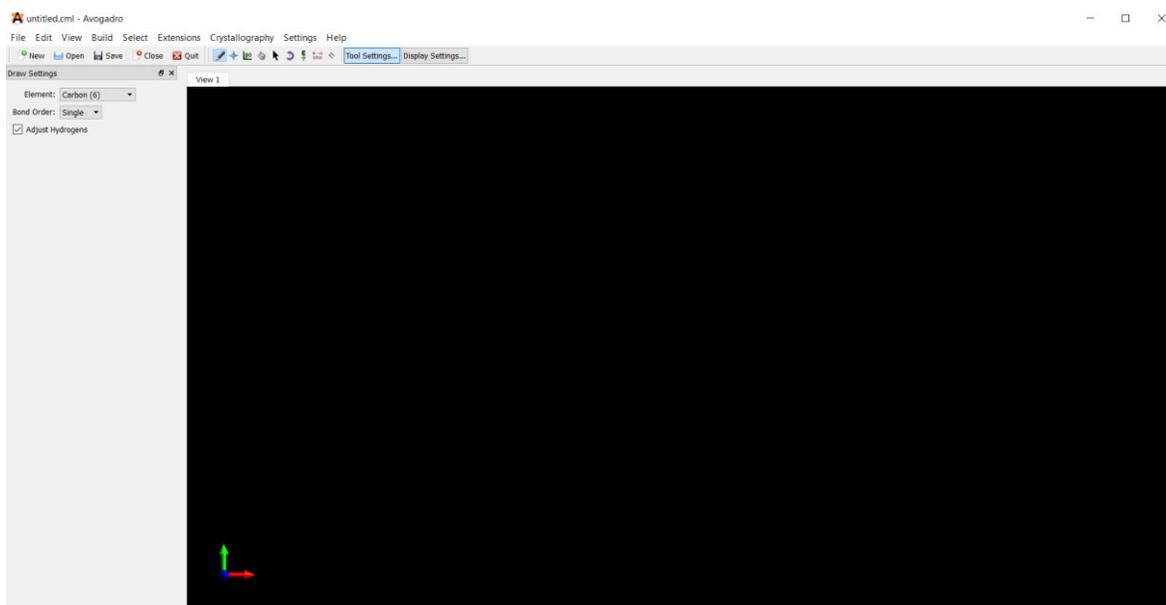
4.6 Análisis computacional

El análisis computacional consistió en la realización de un acoplamiento molecular entre los compuestos sintetizados y 3 proteínas dianas, para esto fue necesaria la utilización de distintos software, entre los cuales se encuentran AutoDock, PyMol, Phyton, Avogadro, Chimera y LigPlot+, posteriormente se realizaron análisis de farmacocinética y farmacodinámica con la ayuda de la base de datos del Instituto Suizo de Biotecnología, con las herramientas SwissTargetPrediction y SwissAdme.

4.6.1 Análisis del acoplamiento molecular

El análisis de acoplamiento molecular comenzó con la generación de las estructuras de los α -aminofosfonatos con una conformación espacial en 3D. Para llevar a cabo el cumplimiento de dicha tarea se utilizó el programa Avogadro, un software que es utilizado para realizar representaciones de moléculas y visualizar estructuras químicas en 3D y que, por medio de herramientas que el programa brinda relacionadas con dinámica molecular y minimización de energías es capaz de generar una estructura química en su conformación más estable o de más baja energía, que teóricamente sería la más cercana a la realidad, la interfaz del programa Avogadro se muestra en la figura 4. Las estructuras de los α -

aminofosfonatos fueron introducidas al software una a una y una vez cargadas dentro del programa se utilizaron las opciones con las herramientas de este para minimizar su energía y obtener su conformación más estable, y esta última fue guardada en formato .pdb para su posterior manejo en otros software. Seguido de esto, mediante el uso de Python, un software especializado en visualizar y editar estructuras de proteínas cristalizadas, fue realizada una limpieza de las proteínas (éstas fueron obtenidas de la fuente de datos del Protein Data Bank) que iban a ser utilizadas en el acoplamiento molecular. En esta limpieza, las moléculas de agua fueron eliminadas y de igual manera los ligandos que se cristalizaron con la proteína y los iones, en la figura 5 se muestra la interfaz del programa Pymol. (26) Luego de este tratamiento informático, los archivos se guardaron en formato .pdb para su posterior uso en los otros software. Las proteínas utilizadas fueron elegidas debido a que moléculas con similitud a las sintetizadas en este proyecto, fueron cristalizadas con las proteínas.



proceso al momento de introducirlos al programa y le añade una característica extra, el establecimiento de los enlaces rotacionales de la molécula y de la misma manera que con la proteína el programa da la opción de guardar el ligando en el formato .pdbqt. Dentro del programa AutoDocktools se procedió a seleccionar la herramienta GridBox, la cual es accesada mediante la opción del menú Grid con el objetivo de determinar la zona de la proteína en la cual se realizará el acoplamiento molecular con el ligando. La zona mencionada anteriormente (GridBox) se asigna en función de dos parámetros, uno de los cuales es el tamaño de la caja espacial en angstroms y el segundo son las coordenadas de dicha caja en los ejes X, Y y Z. Una vez introducidos dichos parámetros fueron guardados para proseguir con el proceso del acoplamiento. Después de esto nos dirigimos hacia la pestaña con el nombre Docking y se seleccionó de nuevo la proteína al elegir la opción Macromolecule y para la selección del ligando en la opción Ligand. Los parámetros de búsqueda fueron mantenidos en su forma ya predeterminada y como método de búsqueda se seleccionó el algoritmo genético lamarckiano para obtener los complejos proteína-ligando con la menor energía libre de Gibbs. Después de haber realizado estos pasos, nos dirigimos hacia la pestaña Run para seleccionar la opción Run AutoDock para que el proceso de acoplamiento fuera realizado, por último, para realizar el análisis nos dirigimos a la pestaña Analyze, seleccionando la opción Docking y posteriormente la opción Open. Este proceso se repitió para llevar a cabo el acoplamiento de cada complejo proteína-ligando y de cada uno, se generó un archivo con el formato .pdb con el acoplamiento que obtuvo una menor o más baja energía libre de Gibbs. (27) La interfaz del programa AutoDockTools se muestra en la figura 6.

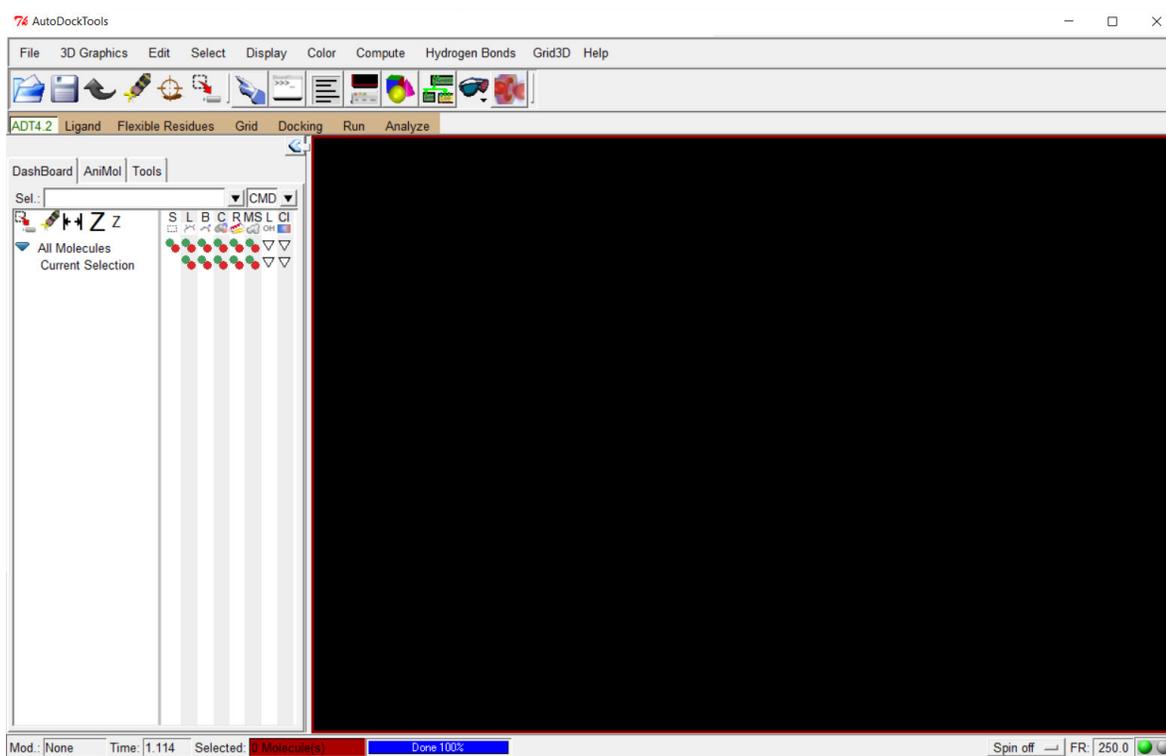


Figura 6. Interfaz del programa Autodocktools.

4.6.2 Modelado molecular de los α -aminofosfonatos

Los últimos archivos de formato .pdb de los complejos proteína-ligando con la menor energía libre de Gibbs generados en la parte previa fueron utilizados para llevar a cabo el modelado molecular utilizando los softwares UCSF Chimera y LigPlot+. En esta parte del análisis nos fue posible realizar un análisis más profundo de las interacciones resultantes entre los grupos funcionales de los ligandos, que en este caso fueron los α -aminofosfonatos y los residuos de aminoácidos de los péptidos.

Esta etapa se comenzó con la introducción de un archivo con el formato .pdb de los complejos proteína-ligando en el programa denominado UCSF Chimera. Posteriormente, el ligando fue seleccionado y nos dirigimos hacia la pestaña Select y se eligió la opción que nos permite hacer una selección por zona, para abarcar todos los átomos que se encuentren en una distancia establecida, que en este caso fue determinada en una distancia total de 5 Å, que según la literatura, es la máxima distancia en la que se pueden establecer interacciones no covalentes. Después de esto, una vez que la distancia de 5 Å fue seleccionada se dio clic en la pestaña Actions y se activó la opción "Show side chains only", esto para que nos fuera permitido visualizar todas las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que interactuaron con el ligando correspondiente. Para finalizar, nos dirigimos hacia la pestaña Tools y se dio clic en la opción FindHBond para poder visualizar los potenciales puentes de hidrógeno que se llegarían a establecer, tomando en cuenta a todos los átomos involucrados y los criterios geométricos. En la figura 7 se muestra la interfaz del programa Chimera.



Figura 7. Interfaz del programa UCSF Chimera

El modelado realizado fue simplificado utilizando el software LigPlot+, el cual nos permite analizar las interacciones proteína-ligando en un plano 2D partiendo del archivo en 3D generado previamente para cada complejo proteína-ligando. El hacer esto nos permitió obtener una imagen más sencilla de comprender con respecto a las interacciones y de que átomos participaban en estas. Para llevar a cabo dicha transformación primeramente nos dirigimos hacia la pestaña File y después a la opción PDB file. Posteriormente, después de haber seleccionado el archivo con formato .pdb correspondiente para cada complejo proteína-ligando, procedimos a dar clic en la pestaña Run que se encuentra en la ventana principal. Por último, los diagramas en 2D fueron archivados y enseguida analizados con los resultados del programa UCSF Chimera. En la figura 8 se puede apreciar la interfaz del programa LigPlot+ y una representación en 2D de uno de los complejos proteína-ligando.

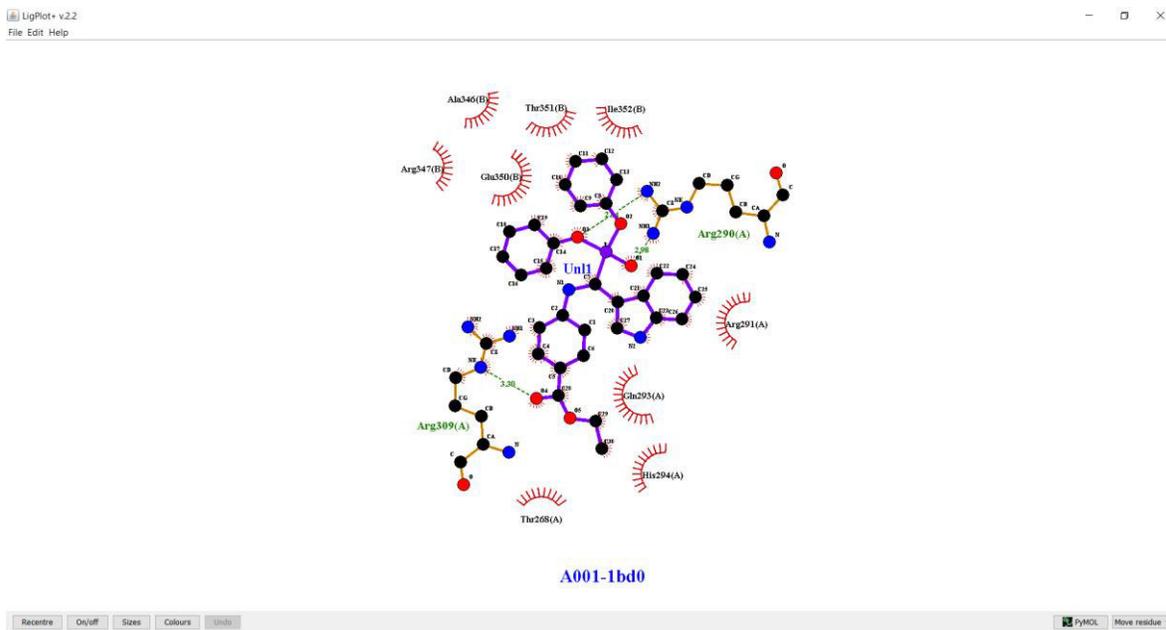


Figura 8. Interfaz del programa LigPlot+, mostrando las interacciones entre el compuesto A-001 y la proteína alanina racemasa con el código de identificación del Protein Data Bank (1bd0).

4.6.3 Análisis de las posibles dianas de los α -aminofosfonatos en humanos.

Para este análisis fue utilizada la herramienta SwissTargetPrediction de la base de datos del Instituto de Bioinformática Suizo. Una vez dentro de la interfaz del programa fueron introducidas las estructuras de los α -aminofosfonatos en el cuadro de dibujo que brinda el programa, posterior a esto el programa traduce la molécula a un código denominado SMILES, el cual es un tipo de nomenclatura para sustancias químicas aplicada en las ciencias bioinformáticas, conformada por una serie de datos alfanuméricos que ayudan para la representación de las moléculas. Una vez que la estructura fue introducida se procedió a realizar la búsqueda de las dianas, cuya especie seleccionada fue *Homo sapiens*. Una vez que el programa

arrojó los resultados, estos fueron archivados y analizados. En la figura 9 se muestra la interfaz del programa, el cual está disponible en el sitio web.

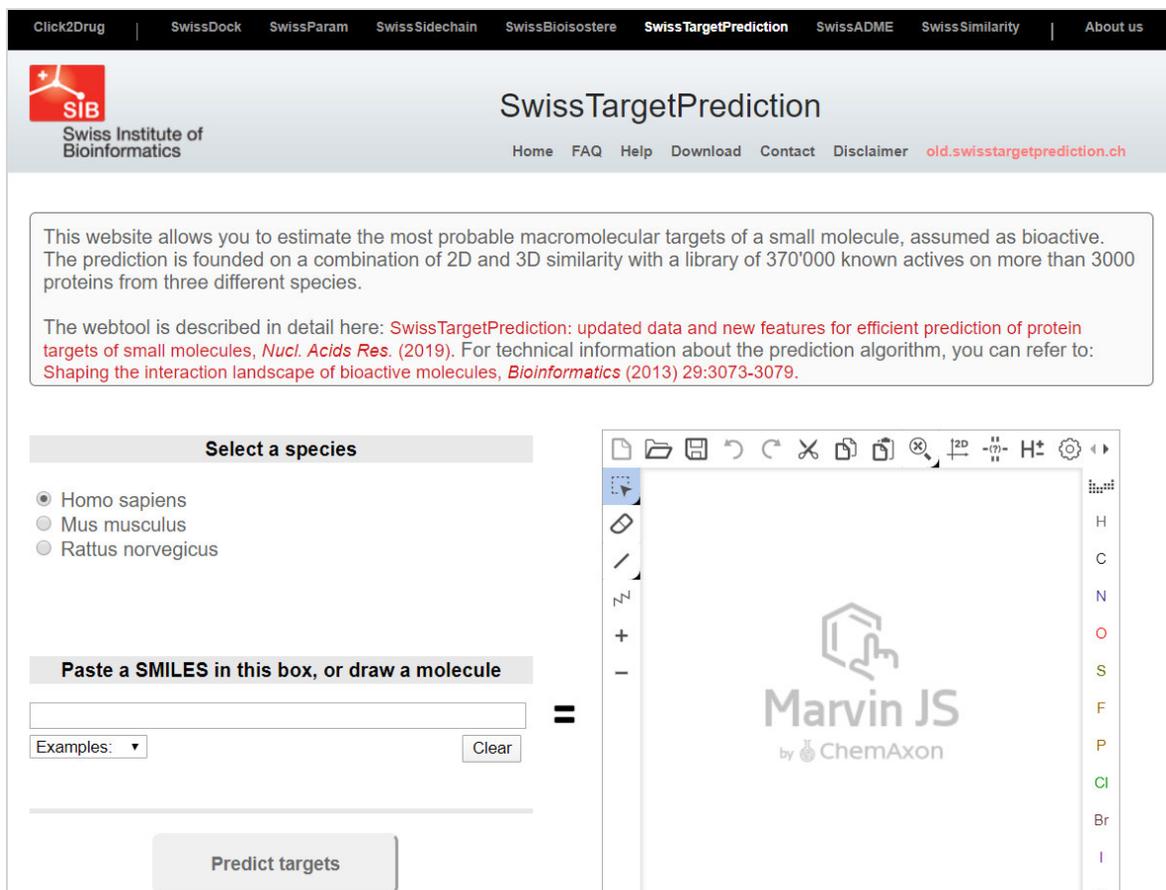


Figura 9. Interfaz de la página web del SIB, en la pantalla de la pestaña SwissTargetPrediction.

4.6.4 Análisis de las propiedades farmacocinéticas en humanos

Para finalizar el análisis computacional de los α -aminofosfonatos, se procedió a realizar el análisis de las propiedades farmacocinéticas. Para llevar a cabo dicho análisis se utilizó la base de datos SwissADME que también al Instituto Suizo de Bioinformática. El análisis comenzó introduciendo los códigos SMILES ya generados previamente en el análisis de las dianas y se corrió el proceso en el

software, los resultados fueron guardados y analizados, la información la encontramos en la sección de resultados. La figura 10 muestra la interfaz del programa la cual puede ser encontrada en el sitio web.

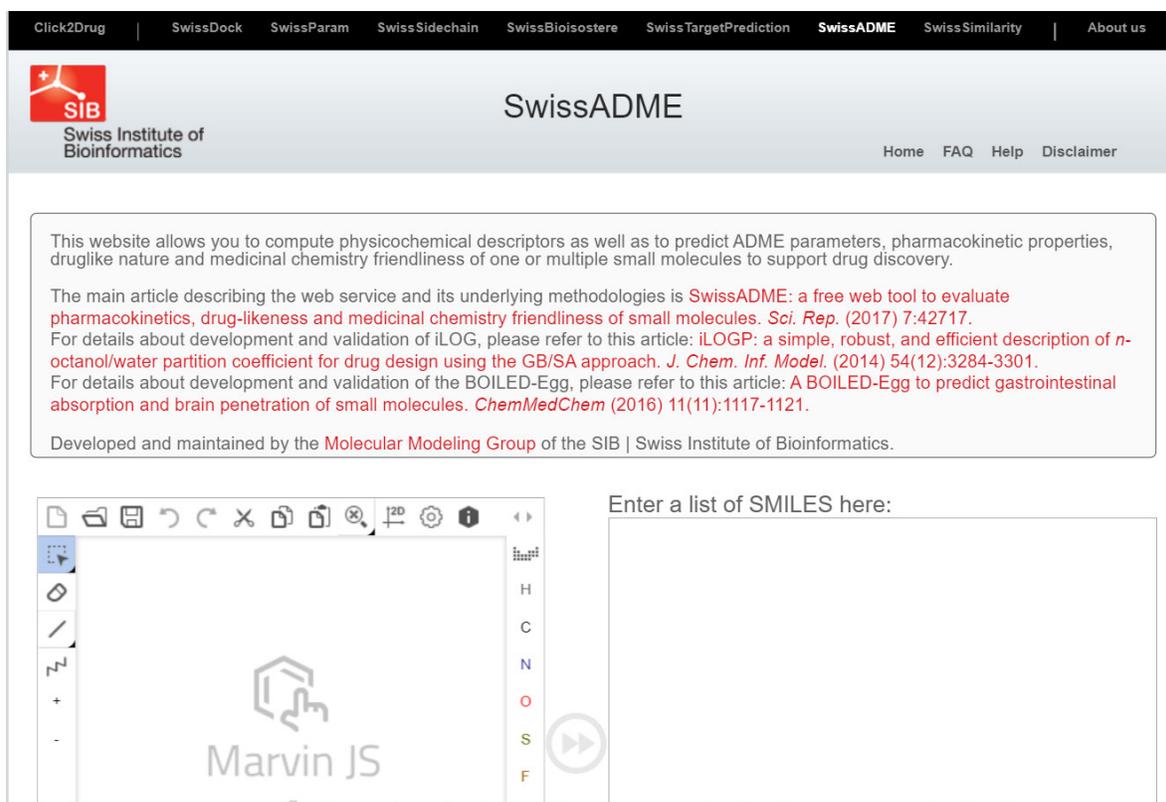


Figura 10. Interfaz de la página web del SIB, en la pestaña SwissADME para la predicción de perfiles farmacocinéticos

4.7 Análisis estadístico

La prueba estadística utilizada en el análisis de los resultados fue la prueba de Kruskal-Wallis. Esta fue elegida debido a que la distribución de los datos no era normal y por la naturaleza nominal y continua de las variables. Posteriormente de ser detectadas diferencias estadísticas con la prueba de Kruskal-Wallis, se realizó una comparación post-hoc con la prueba de Mann Whitney, con el objetivo de observar las diferencias por parejas entre los grupos analizados. El nivel de significancia fue determinada por los valores de p .

CAPÍTULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados y discusión de los mismos, en lo que respecta a la síntesis de los compuestos, su purificación y caracterización, así como los resultados de las pruebas biológicas frente a las diferentes cepas bacterianas y el análisis computacional (acoplamiento molecular).

5.1 Síntesis de los α -aminofosfonatos

La síntesis de los α -aminofosfonatos, se realizó de acuerdo con la metodología de la reacción “one-pot” de Kabachnik-Fields, añadiendo los aldehídos correspondientes, cuyos datos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Reactivos y cantidades usadas en la reacción de Kabachnik-Fields

Compuesto	Reactivo utilizado (Aldehído)	(mmol)	Cantidad
A-001	1-H-Indol-3-Carbaldehído	3.02	439.3 mg
A-002	3,4,5-Trimetoxibenzaldehído	3.02	593.85 mg
A-003	Cinamaldehído	3.02	380.97 μ l
A-004	4- Clorobenzaldehído	3.02	425.47 mg
A-005	1-H-Indazol-5-Carbaldehído	3.02	443 mg

Todas las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento de síntesis descrito en el apartado de la metodología en todas las reacciones se observó un precipitado de color blanco de grano fino. En la figura 11 se observa el proceso de síntesis en vórtex llevado a cabo, en donde se puede observar la formación del precipitado.



Figura 11. Proceso de síntesis de los α -aminofosfonatos mediante la reacción de Kabachnik-Fields y agitación en vórtex.

Como se puede observar en la figura 11 las materias primas utilizadas para la reacción fueron solubles en el solvente al comenzar la agitación en el vórtex, el precipitado fue apareciendo conforme avanzaba el tiempo. Todos los aldehídos utilizados presentan grupos aromáticos, y al momento de la agitación junto con las demás materias primas y el solvente, se mostraban solubilizados, después de cierto tiempo (mostrado en la tabla 5 para cada compuesto), se observó un precipitado blanco de grano fino que se sedimentaba, este se formó de manera espontánea debido a que la agitación genera energía cinética, la cual en un momento logra superar la energía de activación para que la reacción se lleve a cabo y esta termina ocurriendo. La presencia de dicho precipitado es evidencia de que se ha formado

un nuevo producto que en comparación con las materias primas, es parcialmente insoluble. Por otro lado, la cantidad de reactivos agregada es suficiente para formar una cantidad de producto que sature la solución.

Tabla 5. Aldehídos utilizados, tiempos de reacción, rendimientos y cantidades obtenidas de los compuestos

5.1.1 Síntesis de los compuestos A-001 y A-002

Compuesto	Reactivo utilizado (Aldehído)	Cantidad obtenida (mg)	Rendimiento (%)	Tiempo de reacción (min)	Características de los compuestos
A-001	1-H-Indol-3-Carbaldehído	919.7	58	105	Polvo blanco fino
A-002	3,4,5-Trimetoxibenzaldehído	988.4	58	30	Polvo blanco fino
A-003	Cinamaldehído	610.0	49	30	Polvo blanco fino
A-004	4- Clorobenzaldehído	651.0	43	30	Polvo blanco fino
A-005	1-H-Indazol-5-Carbaldehído	144. 2	10	120	Polvo blanco fino

Cabe destacar que el compuesto A-001 junto con el A-002, obtuvieron los mejores rendimientos; sin embargo, la diferencia de tiempo de síntesis fue considerablemente más grande con el sustituyente del indol, probablemente debido al impedimento estérico presentado por el grupo indol, el cual consiste en 2 anillos aromáticos unidos, un anillo de 6 miembros y un anillo de 5 miembros, mientras que el compuesto A-002 solo consta de uno de seis miembros y, aunque contiene grupos metoxilo, estos tiene más libertad de movimiento debido a que están unidos por enlaces sencillos y no se encuentran formando ciclos.

5.1.2 Síntesis del compuesto A-003

Para este compuesto se realizó la reacción de la misma manera, en agitación por vórtex, a los 20 minutos aproximadamente se formó un precipitado blanco de apariencia pastosa y se continuó hasta los 30 minutos para posteriormente ser filtrada. Este compuesto junto con el compuesto A-004 fueron los más rápidos en formarse, probablemente debido a la distancia proporcionada por la cadena alifática que une al carbono del carbonilo del aldehído, con el anillo aromático; debido a que dicha distancia es más grande que en los demás sustituyentes, esta le confiere una libertad estérica que facilita el ataque por parte de la difenilfosfita al carbono de la imina ya formada, y cabe destacar que de esta distancia carecen los demás sustituyentes, el compuesto A-004 se discute a continuación.

5.1.3 Síntesis del compuesto A-004

El compuesto A-004 fue anteriormente sintetizado por el grupo de investigación, en un trabajo realizado por Cordero, Díaz en 2018, el tiempo de reacción de este

compuesto fue de 30 minutos. Sin embargo, en comparación con el trabajo de nuestro grupo de investigación encontramos de una misma manera que se forma la imina del 4-clorobenzaldehído en un tiempo menor al minuto de la reacción, esta aparece como un precipitado en forma de agujas. A este precipitado se le siguió agitando y a los 15 minutos la mezcla de reacción se torna transparente indicando que todos los compuestos están disueltos, esto da indicio a que el ataque nucleofílico de la fosfita está ocurriendo ya que una vez pasados otros 10 minutos se observa el precipitado blanquecino característico de las reacciones de los otros compuestos, este es diferente a la imina ya que presenta un aspecto granular y mediante la técnica de cromatografía en capa fina se observa la aparición de un compuesto con distinto R.F. al de la imina y al de las materias primas. Debido a que este grupo presenta un átomo electroattractor como lo es el cloro, este puede retirar densidad electrónica del anillo aromático lo que repercute directamente en la carga parcial del carbono del carbonilo del aldehído.

5.1.4 Síntesis del compuesto A-005

El compuesto A-005 fue el compuesto con menor porcentaje de rendimiento entre los compuestos sintetizados, el tiempo transcurrido en formarse el precipitado observado en las otras reacciones, fue mayor en este caso en comparación con todos los demás; se realizó la agitación por un tiempo total de 2 horas, hasta que fue observada la formación del precipitado, la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (CCF). El bajo rendimiento se pudo deber

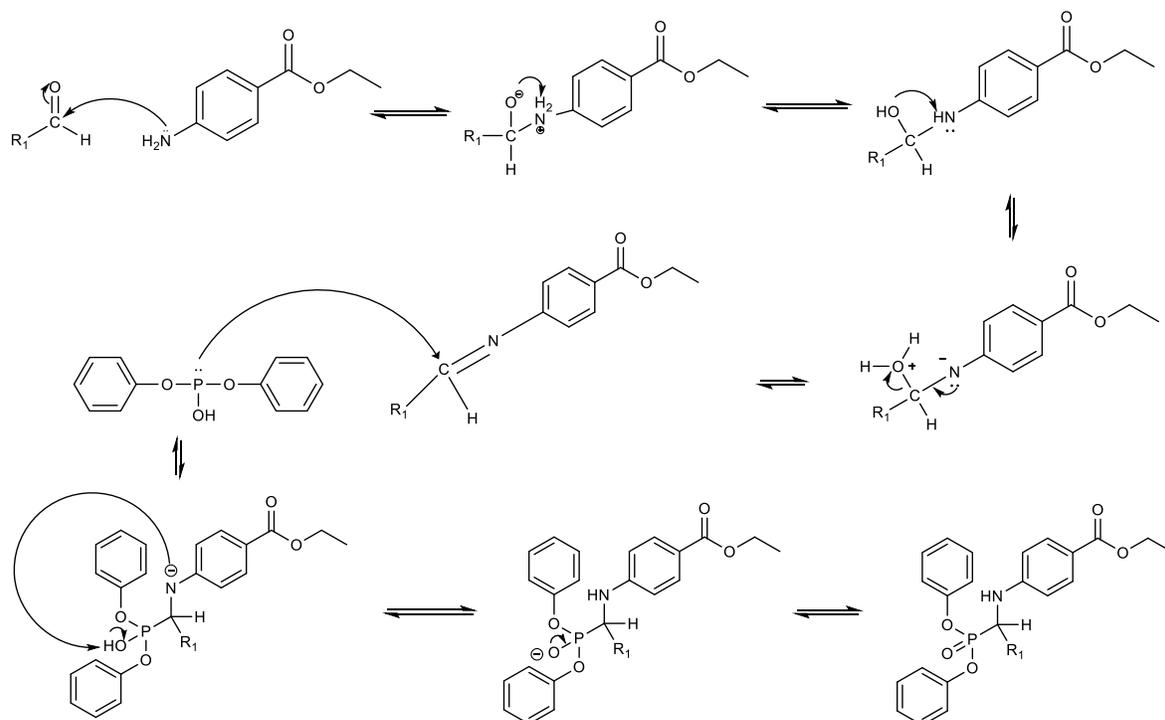
probablemente al acomodo espacial de la parte del anillo de pirazol contenido en el indazol, parte que contiene un par de electrones libres en uno de sus nitrógenos, y aunado el hecho que al contener dos anillos aromáticos de la misma manera que el compuesto A-001 presenta un mayor impedimento estérico, interfiriendo éstos en el ataque de la difenilfosfita tautomerizada al carbono de la imina ya formada, recordando también que la difenilfosfita es un farmacóforo voluminoso y con gran densidad electrónica conferida por los electrones no compartidos de los oxígenos.

5.2 Mecanismo de la reacción de Kabachnik-Fields

En el esquema 7 puede ser observado el mecanismo de la reacción de Kabachnik-Fields, que de acuerdo a lo reportado por Cherkasov y colaboradores (28) consiste básicamente en dos etapas principales, la primera consta de la formación de una imina, resultante de la reacción entre el aldehído y la amina primaria, en dónde el carbono del carbonilo del aldehído sufre un ataque nucleofílico por parte del par electrónico no compartido del nitrógeno del grupo amino de la amina primaria, a lo cual le continúa un ataque nucleofílico de la difenilfosfita en una forma tautomérica, al carbono de la imina formada anteriormente, obteniéndose el α -aminofosfonato como producto final.

Debido a que los aldehídos que se utilizaron en este proyecto presentaban grupos aromáticos, en comparación con aldehídos alifáticos que han sido sintetizados anteriormente en el grupo de investigación, mostraron un menor tiempo de reacción hasta la aparición del precipitado, de la misma manera reportada por Cordero en 2018 (29), esto debido al efecto de resonancia de los anillos aromáticos los cuales estabilizan la cargas de los grupos carbonilo de los aldehídos, mientras que en los

aldehídos alifáticos no ocurre este efecto. Por otro lado, es importante considerar el posible efecto de los grupos presentes en los aldehídos para la estabilidad de la imina intermediaria y su relación con los porcentajes de rendimiento observados, sin embargo, al no detectar una tendencia específica, se deben considerar también diferentes factores que pueden influir, tales como, pérdidas de producto en la purificación, posibles impurezas en los reactivos utilizados, entre otros.



Esquema 8. Mecanismo de reacción de Kabachnik-Fields

5.3 Síntesis no convencionales

Dentro de la literatura podemos encontrar una variedad de métodos de síntesis no convencionales para la obtención de α -aminofosfonatos, incluyendo la utilización de líquidos iónicos reportadas en múltiples ocasiones, sin embargo el uso de

determinados líquidos iónicos tiene ciertos inconvenientes como: bajos rendimientos, tiempos muy largos de reacción, altos costos, entre algunos otros (30); sin embargo, existen algunos otros reportes de síntesis de aminofosfonatos con líquidos iónicos como los reportados por Zahed Karimi y colaboradores en 2017, donde utilizaron sulfato de trietilamonio como catalizador obteniendo buenos rendimientos que iban del 80% al 96% (31). También encontramos otros métodos, como la síntesis mediada por microondas sin presencia de disolvente como lo reportado por Tajti y colaboradores en 2019, en cuyo trabajo ellos sintetizaron α -aminofosfonatos tras condensar N-metil etanolamina, paraformaldehído y dietilfosfita, probando diferentes temperaturas que variaron de 60 °C a 100 °C, obteniendo rendimientos de entre el 62% y 84% con purificación en columna cromatográfica (32), en comparación con la metodología seguida en el presente proyecto, si bien, la síntesis propuesta involucra la utilización de solventes, en este caso fue etanol, este es un solvente de baja toxicidad y que no causa daño ecológico, además de que se utilizó en cantidades mínimas. Adicionalmente, para la purificación de los compuestos no se utilizó columna cromatográfica, lo cual implica una ventaja, ya que este método de purificación involucra el uso de cantidades grandes de solventes. En la tesis de Cordero en 2018, se reportó la síntesis de α -aminofosfonatos y ácidos α -aminofosfónicos parcialmente hidrolizados obteniendo buenos rendimientos que iban del 71% al 95%, dejando evidencia de que el método de agitación por vórtex a temperatura ambiente y con limitado uso de solventes y sin purificación en columna es un método muy eficiente, de bajo costo y bajo impacto ambiental, y este método pudo ser corroborado en la obtención de los 5 nuevos α -aminofosfonatos que son las moléculas de estudio en

el presente proyecto de Tesis. De la misma manera, en el año 2018 Tiwari y colaboradores llevaron a cabo la síntesis de algunos nuevos fosfonatos mediante la reacción de Kabachnik-Fields utilizando un catalizador verde llamado nitrato de amonio cérico, con altos rendimientos que iban desde el 84 al 95%, en comparación con nuestro sistema en vórtex, éste representa un gasto extra por el costo del catalizador, problema que en nuestro caso no se presenta ya que no es necesario un catalizador. (33) En 2019, Bálint y colaboradores reportaron la síntesis de fosfonoilmetilaminas mediante la reacción de Kabachnik-Fields asistida por microondas y sin presencia de catalizadores, obteniendo rendimientos que iban desde el 92 hasta el 97%, si bien los compuestos sintetizados por este grupo de investigación varían un poco con respecto a los nuestros en cuanto a la estructura química, continúan siendo muy parecidos entre sí y sintetizados por la misma reacción, sin embargo la agitación en vórtex continúa siendo un método más sencillo y económico en comparación con la técnica de microondas. (34) En 2020 Ihammi y colaboradores sintetizaron por la misma reacción propuesta y realizada en el presente proyecto, nuevos α -aminofosfonatos, utilizando catalizadores como FeCl_3 , LaCl_3 , CeCl_3 , obteniendo rendimientos altos que iban desde el 78 al 95% y posteriormente a esto realizaron las pruebas biológicas y un docking molecular, en comparación con su método, la ventaja de utilizar el método de vórtex y sin catalizadores, representa una ventaja económica en comparación con el uso de catalizadores, que como se mencionó anteriormente, generalmente tienen un costo elevado. (35)

5.4 Purificación de los α -aminofosfonatos

El método principal para la purificación de los α -aminofosfonatos, fue mediante lavados con etanol, posteriormente al sobrenadante se le dejó en congelación para que el compuesto continuara precipitando, este proceso se repitió otra vez hasta el punto de no encontrar precipitado. El método aplicado para la obtención de la mayor parte de cada producto en las distintas reacciones el cual consistía en dejar en congelación durante un tiempo determinado, que iba de las 24 a las 72 horas, tiene como fundamento que, al disminuir la temperatura, las moléculas de producto presentan una menor solubilidad en el solvente, formando un precipitado, el cual posteriormente se filtró y se le realizaron lavados con el solvente frío. En la figura 12 se observa el procedimiento de filtrado y el precipitado de polvo blanco que se recolectó, el cual fue muy similar para cada compuesto.



Figura 12. Proceso de purificación de los α -aminofosfonatos, mediante filtración al vacío.

5.5 Elucidación estructural de los α -aminofosfonatos.

La identificación estructural de los α -aminofosfonatos se realizó por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{31}P (RMN ^1H , ^{13}C y ^{31}P). A continuación se muestran los espectros de RMN antes mencionados de los compuestos A-002 y A-004, las señales de los demás compuestos se pueden encontrar en la tabla 6 y en los anexos, para estos también se obtuvieron las señales esperadas para los compuestos sintetizados.

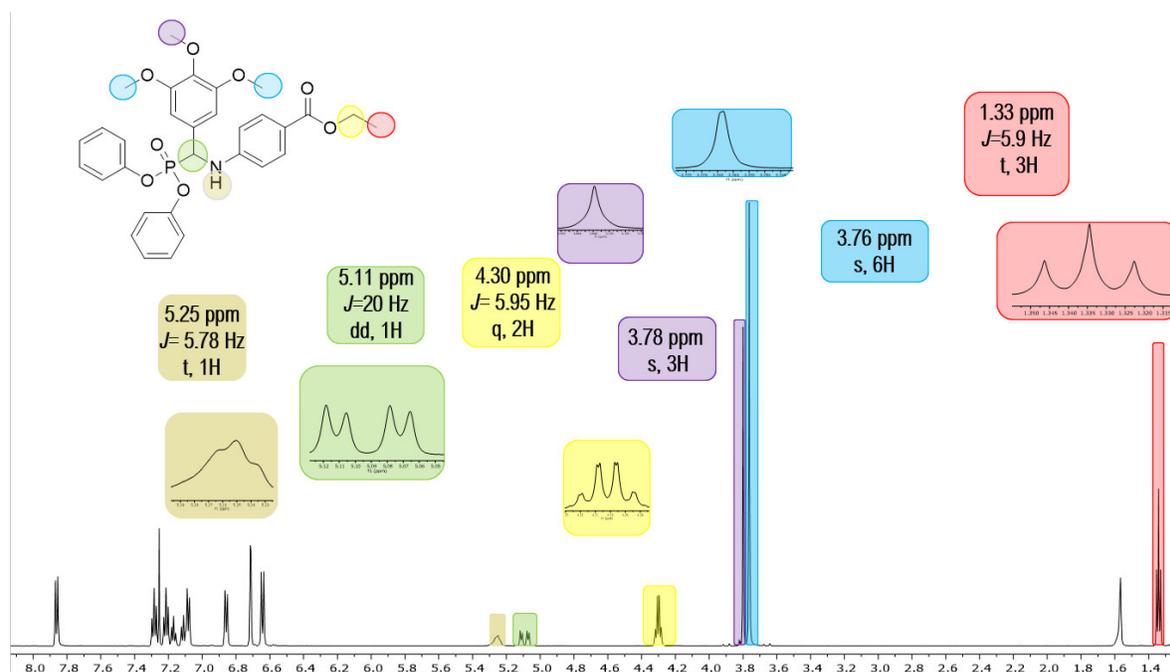


Figura 13. Espectro de RMN ^1H del compuesto A-002 (primera parte).

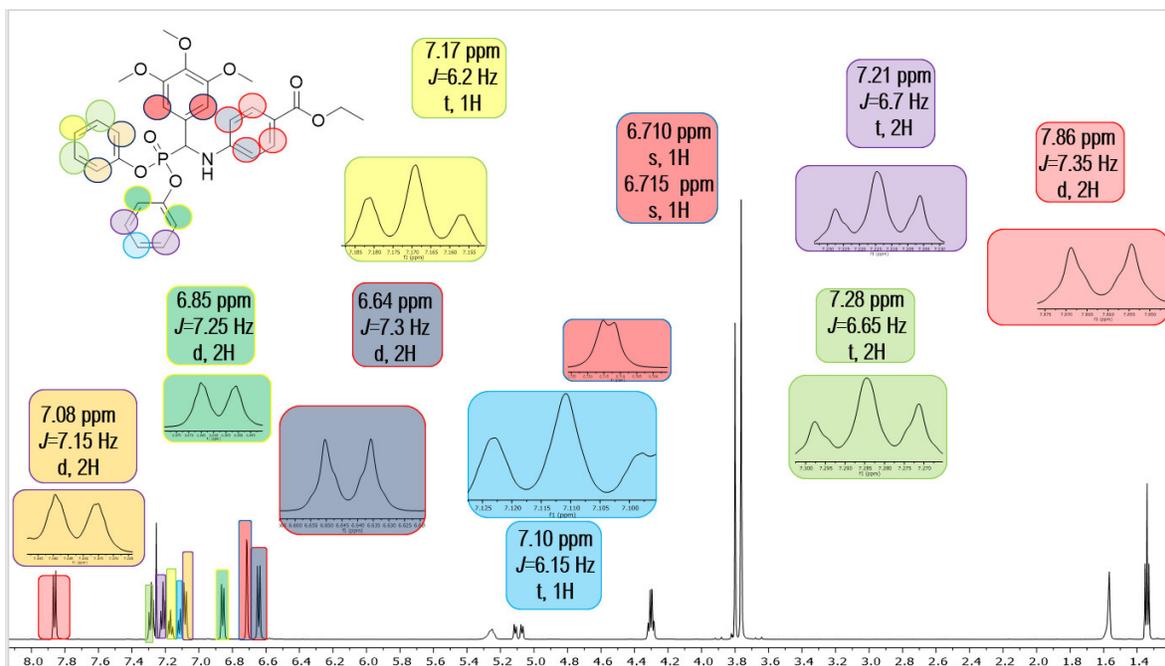


Figura 14. Espectro de RMN ^1H del compuesto A-002 (segunda parte).

5.5.1 Espectro de RMN- ^1H del compuesto A002

El espectro de RMN- ^1H del compuesto A-002 se muestra en las figuras 13 y 14, este fue disuelto en DMSO deuterado. Se pueden observar las siguientes señales: con un desplazamiento de (δ) 1.33 ppm se observa un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 5.9 Hz que integra para 3 protones correspondientes al grupo metilo de la parte de etoxilo de la molécula, en (δ) 3.76 ppm se puede observar un singulete que integra para 6 protones pertenecientes a los 2 grupos metilo de los metoxilos en *meta* al carbono quiral, en (δ) 3.78 ppm un singulete que integra para 3 protones correspondientes al grupo metilo del metoxilo en *para* al carbono quiral, en (δ) 4.30 ppm un cuarteto con una constante de acoplamiento (J) de 5.95 Hz que integra para 2 protones que corresponde al grupo metileno del etoxilo, en (δ) 5.11

ppm un doble de dobles con una constante de acoplamiento (J) de 20 Hz que integra para el protón del grupo metino, el cual es el carbono quiral de la molécula, el cual muestra un acoplamiento con el fósforo y con el protón del grupo amino, posteriormente en (δ) 5.25 ppm encontramos un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 5.78 Hz que integra para un protón correspondiente al grupo amino de la molécula, en (δ) 6.64 ppm un doble con una constante de acoplamiento (J) de 7.3 Hz que integra para dos protones correspondientes a los protones en *orto* al grupo amino, en (δ) 6.710 un singulete que integra para un protón correspondiente a uno de los protones en *orto* al carbono quiral en el anillo con el grupo trimetoxi, en (δ) 6.715 encontramos otro singulete que integra para el otro protón en *orto* al carbono quiral en el mismo anillo con el grupo trimetoxi, estas señales se observan muy cercanas pero se alcanza a distinguir la separación de los 2 singuletes lo cual es posiblemente debido al distinto ambiente químico en el que se encuentra cada protón, en (δ) 6.85 ppm un doble con una constante de acoplamiento (J) de 7.25 Hz que integra para dos protones correspondientes a los protones en *orto* al oxígeno del grupo fenoxi, posteriormente a campos más bajos en (δ) 7.08 ppm encontramos otro doble con una constante de acoplamiento (J) de 7.15 Hz que integra para dos protones correspondientes a los protones en *orto* al oxígeno del grupo fenoxi restante, en (δ) 7.10 ppm se observa un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 6.15 Hz que integra para un protón correspondiente al protón en *para* al oxígeno del grupo fenoxi, en (δ) 7.17 ppm se puede encontrar un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 6.2 Hz que integra para un protón correspondiente al protón en *para* al oxígeno en el grupo fenoxi restante, en (δ) 7.21 ppm encontramos un triplete con una constante de

acoplamiento (J) de 6.7 Hz que integra para dos protones correspondientes a los protones en *meta* al oxígeno del grupo fenoxi, en (δ) 7.28 ppm se observa un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 6.65 Hz que integra para dos protones que corresponden a los protones en *meta* al oxígeno en el grupo fenoxi restante, por último, en (δ) 7.86 ppm podemos observar un doble con una constante de acoplamiento (J) de 7.35 Hz que integra para dos protones correspondientes a los protones del anillo en *orto* al grupo éster de la molécula.

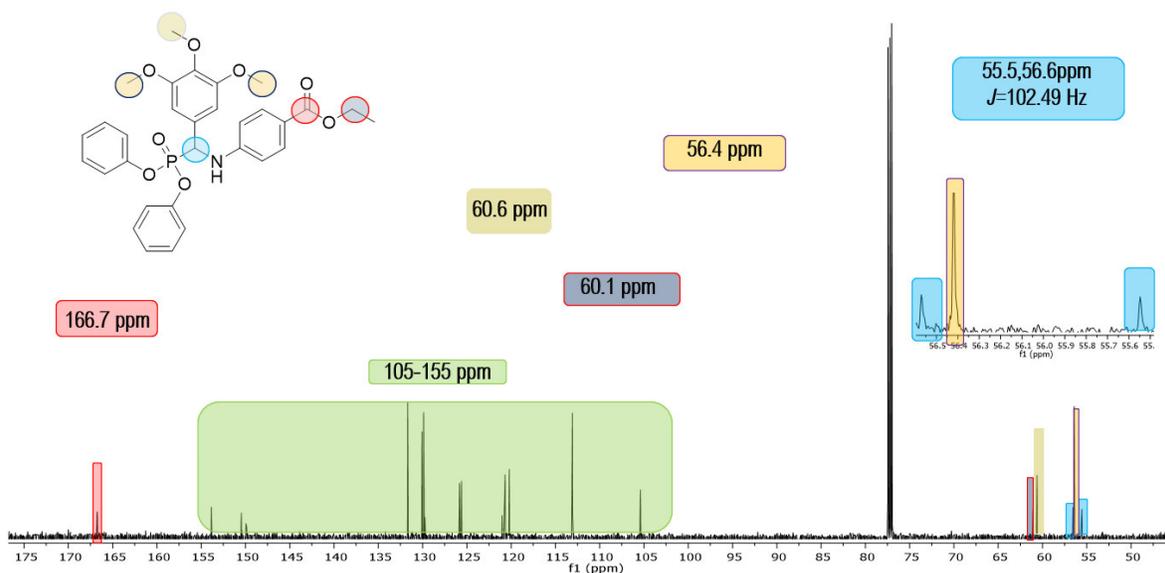


Figura 15. Espectro RMN-¹³C del compuesto A-002.

5.5.2 Espectro RMN-¹³C del compuesto A002

En la figura 15 se muestra el espectro de RMN-¹³C del compuesto A-002, en cual se pueden apreciar las siguientes señales: con un desplazamiento químico δ de 55.5 y 55.6 ppm un doblete con una constante de acoplamiento (J) de 102.49 Hz correspondiente a la señal del carbono quiral de la molécula, dicha señal doble es resultado del acoplamiento con el fósforo, en δ 56.4 ppm una señal que corresponde

a los carbonos de los grupos metoxilo en orientación *meta* con respecto al carbono quiral de la molécula, en δ 60.1 ppm encontramos la señal correspondiente al metileno del grupo etoxilo de la molécula, en δ 60.6 ppm encontramos la señal correspondiente al carbono del grupo metoxilo restante, que se encuentra en posición *para* al carbono quiral en δ 105-155 ppm encontramos las señales que corresponde a los carbonos aromáticos, en δ 166.7 ppm encontramos la señal correspondiente al carbono del carbonilo del éster.

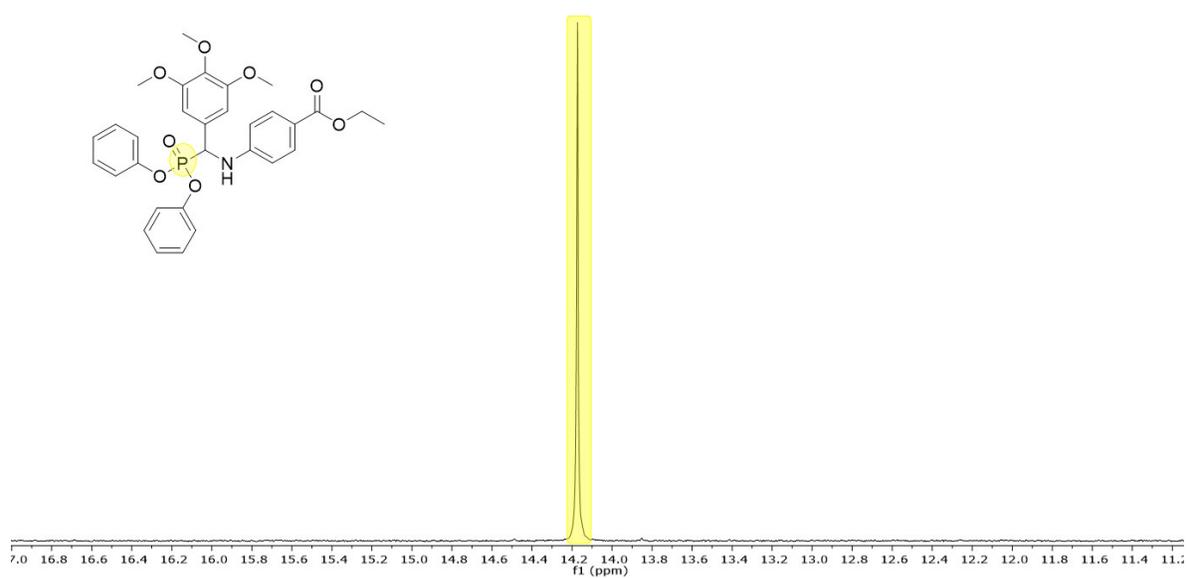


Figura 16. Espectro RMN- ^{31}P del compuesto A-002.

5.5.3 Espectro RMN- ^{31}P del compuesto A-002

En la figura 16 se muestra el espectro de RMN ^{31}P del compuesto A002 con el cual se confirma la presencia del fósforo, con la señal encontrada en un desplazamiento químico de δ 14.1 ppm

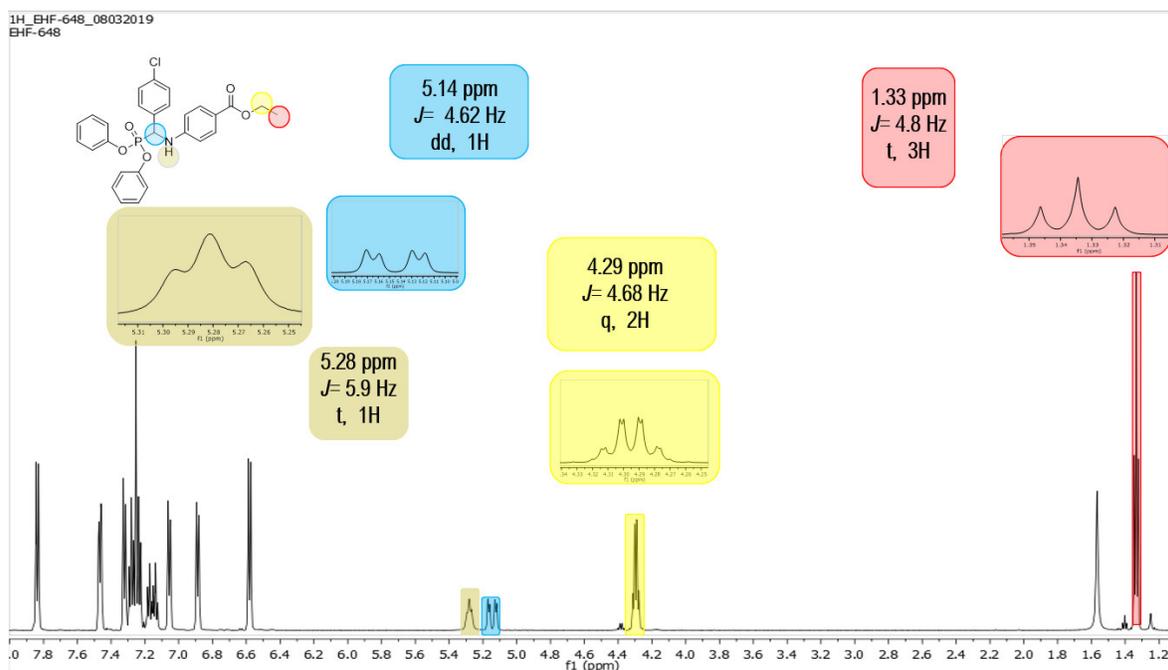


Figura 17. Espectro de RMN- ^1H del compuesto A-004 (primera parte).

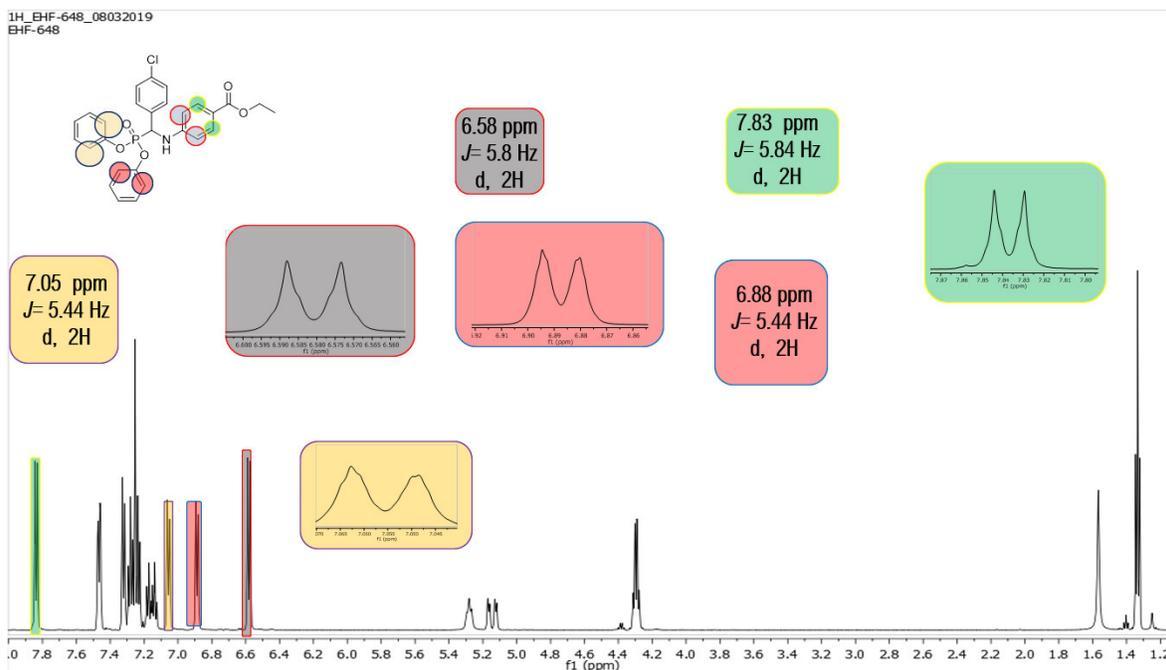


Figura 18. Espectro de RMN-¹H del compuesto A-004 (segunda parte).

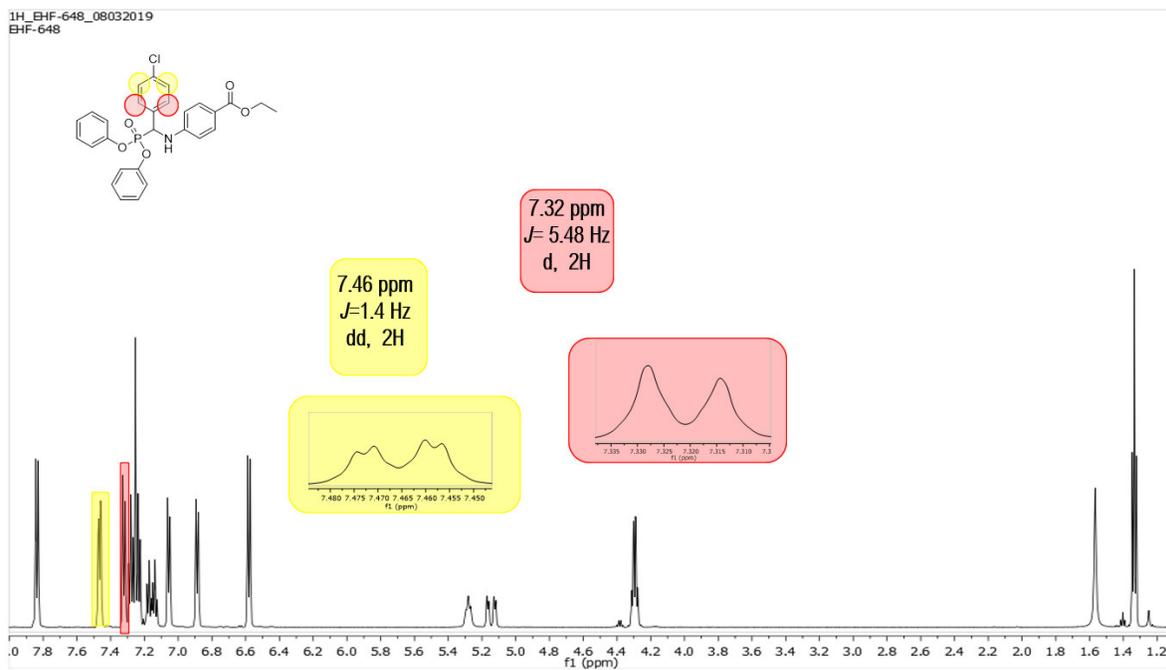


Figura 19. Espectro de RMN-¹H del compuesto A-004 (tercera parte).

5.5.4 Espectro de RMN-¹H del compuesto A004

En las figuras 17, 18 y 19 se muestra el espectro de RMN-¹H del compuesto A-004, el cual fue disuelto en DMSO deuterado y se pueden encontrar las siguientes señales: con un desplazamiento de (δ) 1.33 ppm un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 4.8 Hz que integra para tres protones correspondientes al grupo metilo de la parte de etoxilo de la molécula, en (δ) 4.29 ppm encontramos un cuarteto con una constante de acoplamiento (J) de 4.68 Hz que integra para dos protones correspondientes al grupo metileno de la parte de etoxilo de la molécula, en (δ) 5.14 ppm se observa un doble de dobles con una constante de acoplamiento (J) de 4.62 Hz que integra para 1 protón correspondiente al protón del grupo metino, el cual contiene al carbono quiral de la molécula, la señal de doble de dobles es debido al acoplamiento con el fósforo y el protón del grupo amino, en (δ) 5.28 ppm se puede observar un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 5.9 Hz que integra para un protón correspondiente al protón del grupo amino de la molécula, en (δ) 6.58 ppm encontramos un doble con una constante de acoplamiento (J) 5.8 Hz que integra para dos protones correspondientes a los protones en *orto* al grupo amino, en (δ) 6.88 ppm se observa un doble con una constante de acoplamiento (J) de 5.44 Hz que integra para dos protones correspondientes a los protones en *orto* al oxígeno del grupo fenoxi, en (δ) 7.05 ppm encontramos un doble con una constante de acoplamiento (J) de 5.44 Hz, que integra para 2 protones correspondientes a los protones en *orto* al oxígeno del otro grupo fenoxi, en (δ) 7.13 ppm se puede observar un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 4.96 Hz que integra para un protón correspondiente al protón en *para* al oxígeno del grupo fenoxi, en (δ) 7.17 otro triplete con una constante de acoplamiento (J) de 5

Hz, que integra para el protón en *para* al oxígeno del otro grupo fenoxi, en (δ) 7.23 ppm un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 5.6 Hz que integra para dos protones correspondientes a los protones en *meta* al oxígeno de uno de los grupos fenoxi, en (δ) 7.27 ppm encontramos un triplete con una constante de acoplamiento (J) de 5.18 Hz que integra para dos protones correspondientes a los protones en *meta* al oxígeno del otro grupo fenoxi, en (δ) 7.32 ppm encontramos un doble con una constante de acoplamiento (J) de 5.48 Hz que integra para dos protones que corresponde a los dos protones, que corresponde a los protones en *meta* al cloro, en (δ) 7.46 ppm un doble de dobles con una constante de acoplamiento (J) de 1.4 Hz que integra para dos protones correspondientes a los protones en *orto* al cloro, por último en (δ) 7.83 ppm se observa un doble con una constante de acoplamiento (J) de 5.84 Hz que integra para dos protones que corresponden a los protones en *orto* al grupo éster.

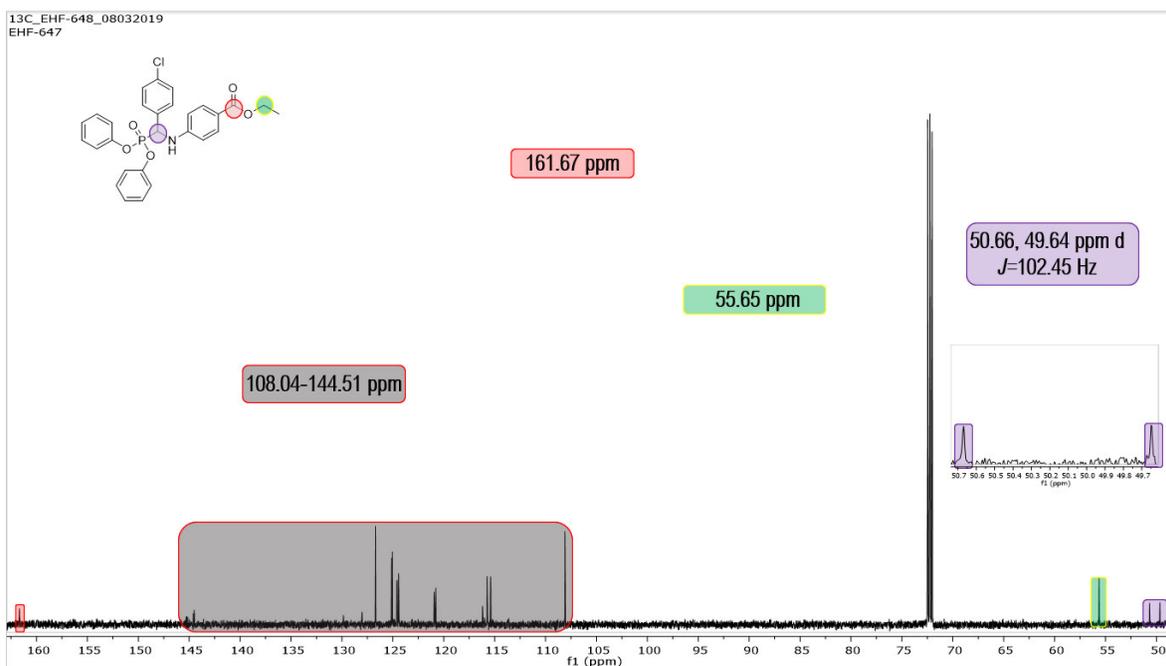


Figura 20. Espectro de RMN-¹³C del compuesto A-004.

5.5.5 Espectro RMN-¹³C del compuesto A004

En la figura 20 se muestra el espectro de RMN-¹³C del compuesto A-004, en cual se pueden apreciar las siguientes señales: con un desplazamiento químico δ de 49.64 ppm y 50.66 ppm se puede observar una señal doble correspondiente al carbono quiral de la molécula, esta señal doble es ocasionada por el acoplamiento del carbono mencionado anteriormente con el átomo de fósforo, en δ 55.65 ppm encontramos la señal correspondiente al carbono del metileno de la parte del grupo etoxilo de la molécula, entre δ 108 y 145 ppm encontramos las señales correspondientes a los carbonos aromáticos, en δ 161.67 ppm encontramos la señal que corresponde al carbono del carbonilo del éster.

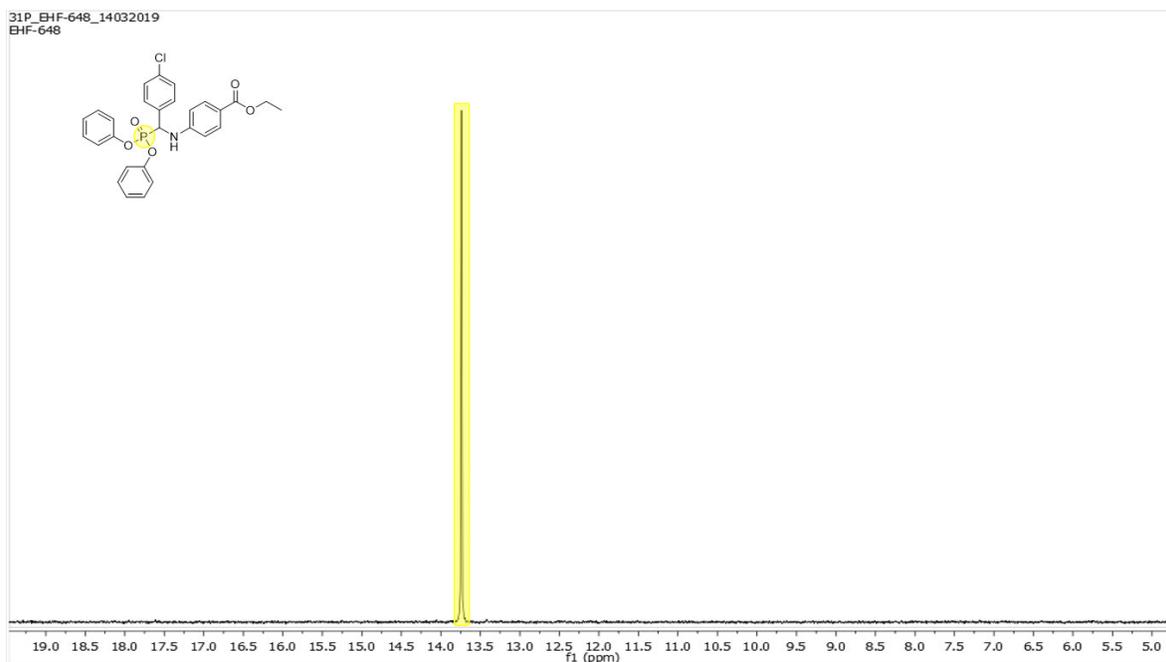
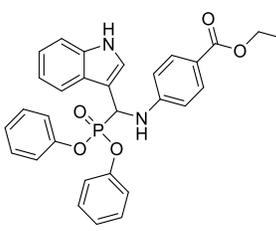


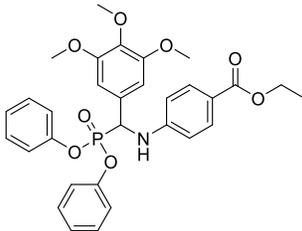
Figura 21. Espectro de RMN-³¹P del compuesto A-004.

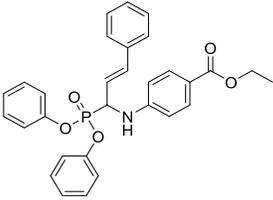
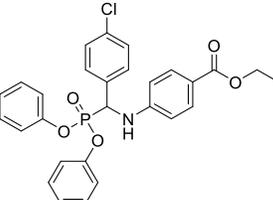
5.5.6 Espectro RMN-³¹P del compuesto A004

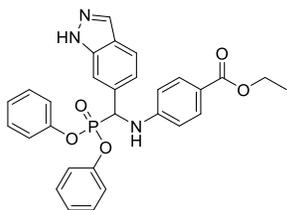
En la figura 21 se muestra el espectro de RMN ³¹-P del compuesto A-004 con el cual se confirma la presencia del fósforo, con la señal encontrada en un desplazamiento químico δ 13.7 ppm. A continuación se muestra en la Tabla 6 las señales a manera de resumen de los compuestos A-001 al A-005. La potencia del equipo de RMN-1H fue de 400 MHz. y para el RMN-13C de 100 MHz. Los compuestos fueron corridos en DMSO deuterado.

Tabla 6. Resumen de las señales de RMN de ¹H, ¹³C, ³¹P

Compuesto	Desplazamientos RMN ¹ H	Desplazamientos RMN ¹³ C	Desplazamientos RMN ³¹ P
A001 	¹ H NMR δ 8.34 (s, 1H, ArH), 7.95 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz, 2H, ArH), 7.70 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1H, ArH), 7.38 (s, 1H, ArH), 7.35 (d, <i>J</i> = 6.7 Hz, 1H, ArH), 7.02- 7.28 (m, 10H, ArH), 6.80 (d, <i>J</i> = 7 Hz, 2H, ArH), 6.70 (d, <i>J</i> = 4.5 Hz, 2H, ArH), 5.57 (dd, <i>J</i> = 17.6, 7 Hz, 1H, CH), 4.98	¹³ C NMR δ 161.88 (C=O), 104-146 (m, ArC), 55.60 (CH ₂), 42.83, 43.93 (d, <i>J</i> = 136.25 Hz, C-P), 9.67 (CH ₃)	³¹ P NMR δ 15.25

	(t, $J=5\text{Hz}$, 1H, NH), 4.30 (q, $J =5\text{Hz}$, 2H, CH ₂) 1.34 (t, J $=5\text{Hz}$, 3H, CH ₃)		
<p>A002</p> 	¹ H NMR δ 7.86 (d, $J = 7.35$ Hz, 2H, ArH), 7.28 (t, $J =6.65$ Hz, 2H, ArH), 7.21 (t, $J=6.7$ Hz, 2H, ArH), 7.17 (t, $J =6.2$ Hz, 1H, ArH), 7.10 (t, J $=6.15$ Hz, 1H, ArH), 7.08 (d, $J=7.15$ Hz, 2H, ArH), 6.85 (d, J $=7.25$ Hz, 2H, ArH), 6.715 (s, 1H, ArH), 6.710 (s, 1H, ArH), 6.64 (d, $J =7.3$ Hz, 2H, ArH), 5.25 (t, $J=5.78$ Hz, 1H, NH), 5.7, 5.11 (dd, $J = 20$ Hz, 1H, CH), 4.30 (q, $J =5.95$ Hz, 2H, CH ₂), 3.78 (s, 3H, MeO), 3.76 (s, 6H, MeO), 1.33 (t, J $=5.9$ Hz, 3H, CH ₃)	¹³ C NMR δ 166.7 (C=O), 105- 155 (m, ArC), 60.6 (OCH ₃), 60.1 (CH ₂), 56.4 (2OCH ₃), 55.5, 55.6 (d, $J= 102.49$ Hz, CH)	³¹ P NMR δ 14.1

A003	^1H NMR δ	^{13}C NMR δ	^{31}P NMR δ
	<p>7.89 (d, $J= 5.92$ Hz, 2H, ArH), 7.13-7.33 (m, 13H, ArH) 7.05 (d, $J= 5.44$ Hz, 2H, ArH), (t, $J= 4.74$ Hz, 1H, NH), 6.78 (dd, $J= 3.22$ Hz, 1H, CH), 6.69 (d, $J= 5.88$ Hz, 2H, ArH), 6.34 (ddd, $J= 10.56, 4.24, 3.79$ Hz, 1H, CH) 4.87 (m, 2H, C=C, N-H) 4.29 (q, $J= 4.73$ Hz, 2H, CH₂), 1.35 (t, $J= 4.74$ Hz, 3H, CH₃)</p>	<p>166.42 (C=O), 112.8-150.1 (m, ArC), 60.33 (CH₂), 53.87, 52.82 (d, $J= 104.62$ Hz, CH), 14.42 (CH₃)</p>	<p>14.08</p>
A004 	<p>7.83 (d, $J= 5.84$ Hz, 2H, ArH), 7.46 (dd, $J= 1.4$ Hz, 2H, ArH), 7.32 (d, $J= 5.48$ Hz, 2H, ArH), 7.27 (t, $J= 5.18$ Hz,</p>	<p>161.67 (C=O), 108-145 (m, ArC), 55.65 (CH₂), 50.66, 49.64 (d, $J= 102.45$ Hz, CH)</p>	<p>13.7</p>

	2H, ArH), 7.23 (t, $J= 5.6$ Hz, 2H, ArH), 7.17 (t, $J= 4.96$ Hz, 1H, ArH), 7.05 (d, $J= 5.44$ Hz, 2H, ArH), 6.88 (d, $J= 5.44$ Hz, 2H, ArH), 6.58 (d, $J= 5.8$ Hz, 2H, ArH), 5.28 (t, $J= 5.9$ Hz, 1H, NH), 5.14 (dd, $J= 4.62$ Hz, 1H, CH), 4.29 (q, $J= 4.68$ Hz, 2H, CH ₂), 1.33 (t, $J= 4.8$ Hz, 3H, CH ₃)		
A005 	¹ H NMR δ 11.22 (s, 1H, NH), 8.02 (s, 1H, ArH), 7.92 (s, 1H, ArH), 7.82 (d, $J=5.88$ Hz, 1H, ArH), 7.54 (d, $J=5.76$ Hz, 1H, ArH), 7.42 (d, $J=5.76$ Hz, 1H, ArH), 7.05-7.28 (m, 9H, ArH), 6.83 (d, $J=5.6$ Hz, 2H, ArH), 6.64 (d, $J=6.32$ Hz, 2H, ArH), 5.44 (dd, $J=5.4$ Hz, 1H, CH),	¹³ C NMR δ 166.4 (C=O), 110-150.2 (m, ArC), 60.3 (CH ₂), 55.92, 54.89 (d, $J=128.66$, CH), 14.3 (CH ₃)	³¹ P NMR δ 14.5

	5.25 (t, $J=6$ Hz, 1H, NH), 4.28 (q, $J=4.76$ Hz, 2H, CH ₂), 1.31 (t, $J=4.72$ Hz, 3H, CH ₃)		
--	--	--	--

5.6 Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana

A continuación, se muestran los resultados del ensayo realizado para verificar si el crecimiento de las bacterias era inhibido por los compuestos sintetizados, y como se puede observar en la tabla 7 ningún compuesto presentó actividad mayor que la del DMSO. En comparación con el control positivo ciprofloxacino, ninguno de los compuestos sintetizados logró superar la actividad antibacteriana, siendo la diferencia de actividad muy marcada. La inactividad de los compuestos sintetizados, se pudo deber al carácter no polar de las moléculas sintetizadas, ya que estas presentan un logP alto o, en otras palabras, presentan una naturaleza lipofílica, esto pudo dificultar la correcta distribución en un medio con un ambiente acuoso polar y su mejor interacción con las cepas bacterianas. Otro aspecto que también pudo haber afectado, es el tamaño de los compuestos, el cual es un tamaño grande y debido a que las bacterias contienen proteínas con naturaleza polar en sus membranas, éstas pudieron haber impedido la internalización debido a naturaleza no polar de los compuestos.

Tabla 7. Halos de inhibición de los compuestos

Compuesto	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	<i>Escherichia coli</i> (mm)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (mm)	<i>Enterococcus faecalis</i> (mm)
A-001	9.6	6.3	6.0	5.0
A-002	10.0	5.3	5.0	5.0
A-003	9.6	5.6	5.3	5.0
A-004	9.6	6.0	5.0	5.0
A-005	7.0	6.0	5.6	5.6
DMSO	10.3	7.6	16.6	9.3
Ciprofloxacino	25.6	40.0	36.0	40.6

Como se puede apreciar en la tabla 7 los halos de inhibición de los compuestos sintetizados iban desde los 5 mm que representa 0% de inhibición debido que ese es el tamaño de los discos, hasta los 40 mm en el caso del antibiótico ciprofloxacino en la mayoría de las cepas bacterianas, salvo en el caso de *Staphylococcus aureus*, en la cual el área de inhibición fue de 25.6 mm. (con base en el control positivo).

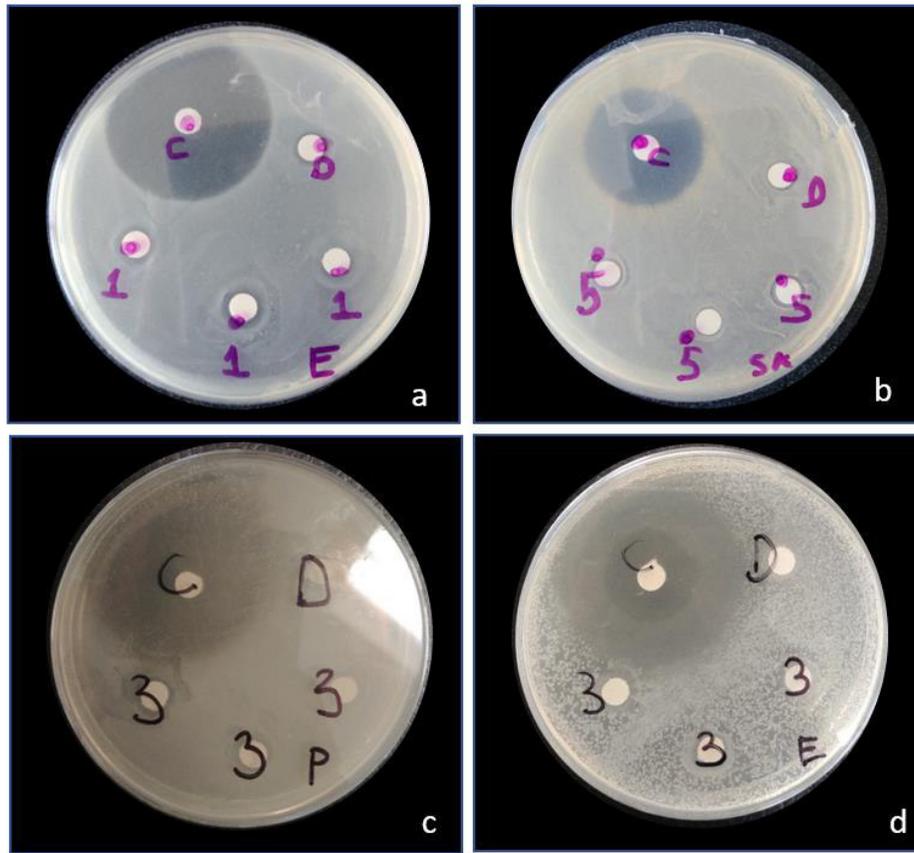


Figura 22. Inhibición de algunos de los compuestos sobre las bacterias.

En la figura 22 se muestran los halos de inhibición de algunos compuestos sobre las distintas bacterias, en el recuadro marcado con la letra a se muestra la acción del compuesto A-001 sobre la bacteria *Escherichia coli*, en el recuadro marcado con la letra b, se muestra la acción del compuesto A-005 sobre la bacteria *Staphylococcus aureus*, en el recuadro c se muestra la acción del compuesto A-003 sobre la bacteria bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, y por último, en el recuadro con la letra d se muestra la acción del compuesto A-003 sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.

A continuación se muestra la evaluación estadística y las gráficas de la actividad de los compuestos sobre las distintas cepas bacterianas:

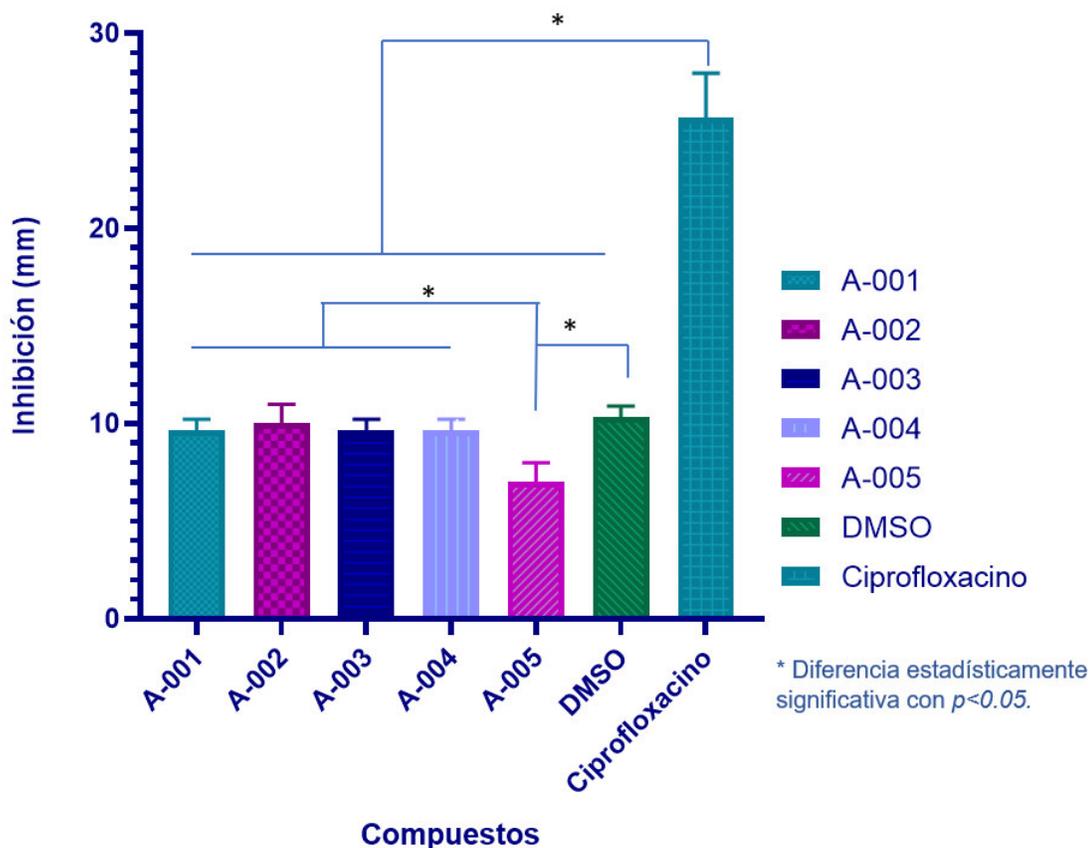


Figura 23. Inhibición (mm) de los compuestos sobre la bacteria *Staphylococcus aureus*.

Como se observa en la figura 23, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la actividad de los compuestos sintetizados con respecto al ciprofloxacino sobre la bacteria *Staphylococcus aureus*. La actividad inhibitoria de los compuestos, nunca rebasó la del control negativo y por ende no fue observada una diferencia entre los mismos. Por otro lado, no se observó diferencia estadísticamente significativa en la actividad entre los distintos compuestos a

excepción de los compuestos A-002 y A-005 en la cual si se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

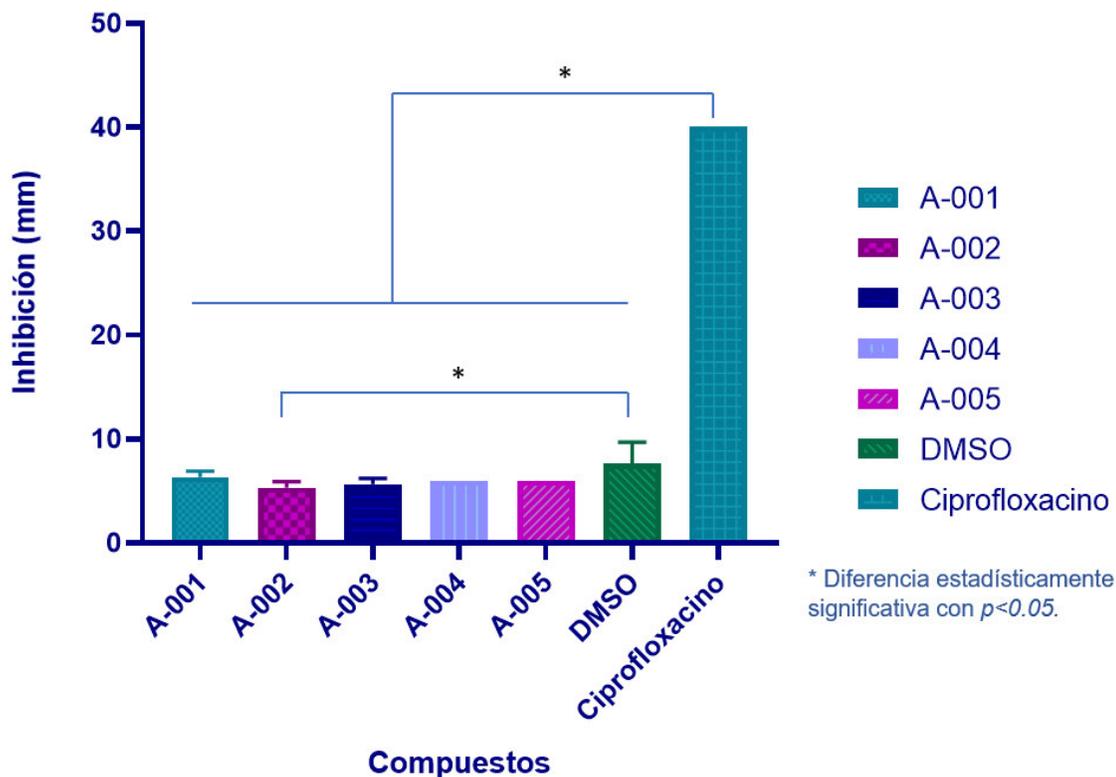


Figura 24. Inhibición (mm) de los compuestos sobre la bacteria *Escherichia coli*.

En la figura 24 se puede observar una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la actividad de los compuestos sintetizados en comparación con el ciprofloxacino sobre la bacteria *Escherichia coli*. Es posible notar que ningún compuesto logró rebasar la actividad del vehículo (DMSO), no fue observada una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) con excepción del compuesto A-002, siendo la actividad inhibitoria de éste, menor que la de los demás compuestos, mas no de significancia estadística.

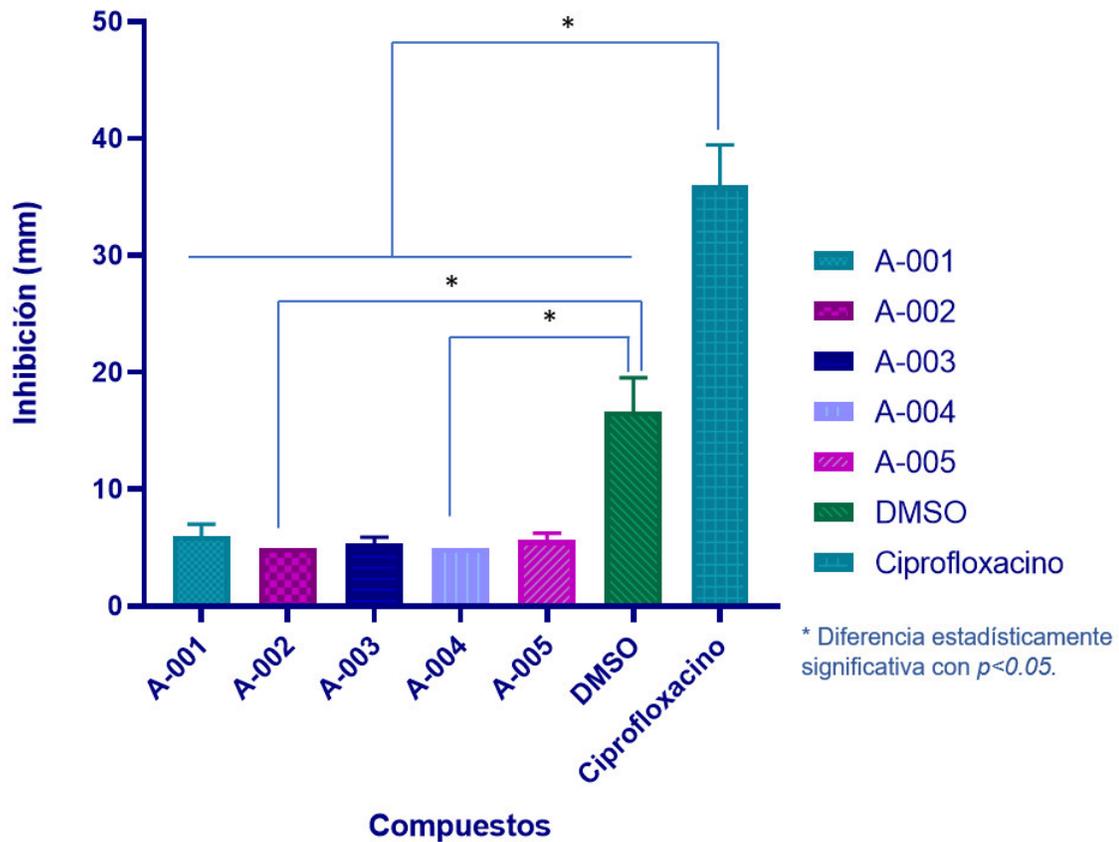


Figura 25. Inhibición (mm) de los compuestos sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

En la figura 25 se muestra la actividad de los compuestos sintetizados sobre la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, aquí puede ser observada una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las actividades de los compuestos en comparación con ciprofloxacino y en comparación con el control negativo (DMSO). Como se puede observar, los compuestos no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$).

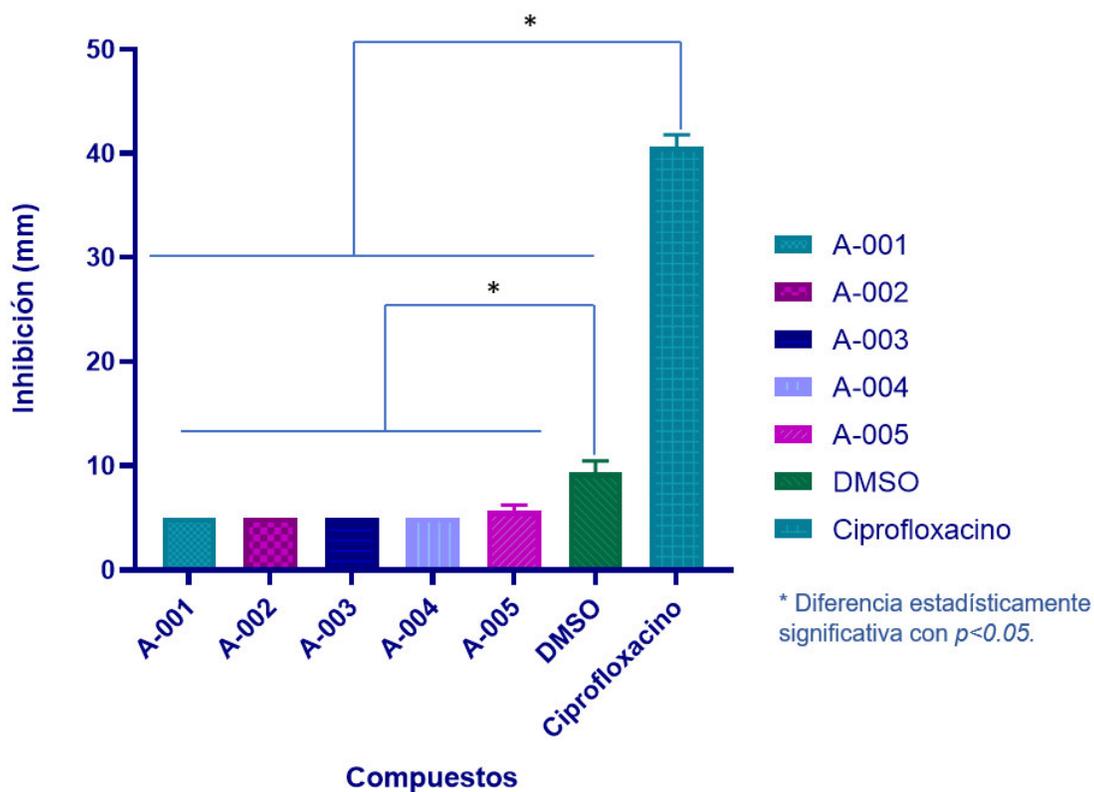


Figura 26. Inhibición (mm) de los compuestos sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*.

En la figura 26 se puede observar la actividad de los compuestos sobre la bacteria *Enterococcus faecalis*, es notable una diferencia estadísticamente significativa entre los compuestos y el ciprofloxacino ($p < 0.05$). La actividad fue disminuida en comparación con el control negativo (DMSO) con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Se observa que los compuestos no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre ellos en cuanto actividad ($p \leq 0.05$).

5.7 Análisis computacional

En las siguientes figuras (27-31) se muestra la conformación más estable de los compuestos A-001- A005.

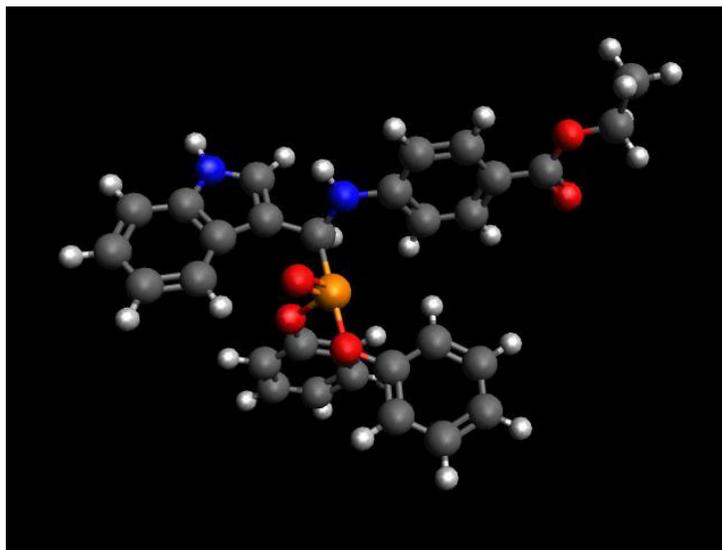


Figura 27. Conformación más estable del compuesto A-001 proporcionada por el software Avogadro.

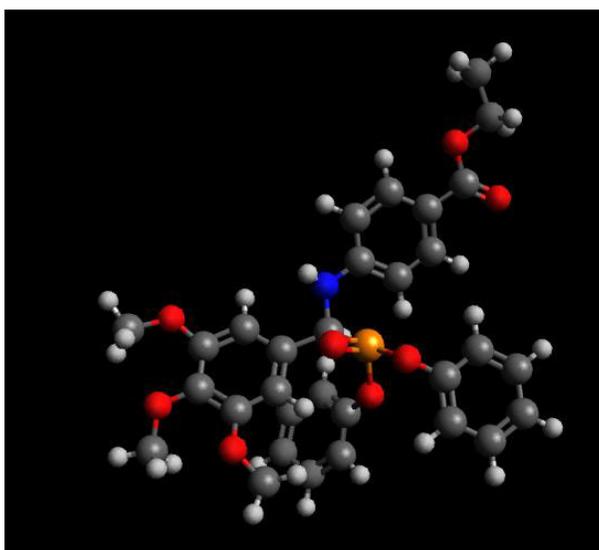


Figura 28. Conformación más estable del compuesto A-002 proporcionada por el software Avogadro.

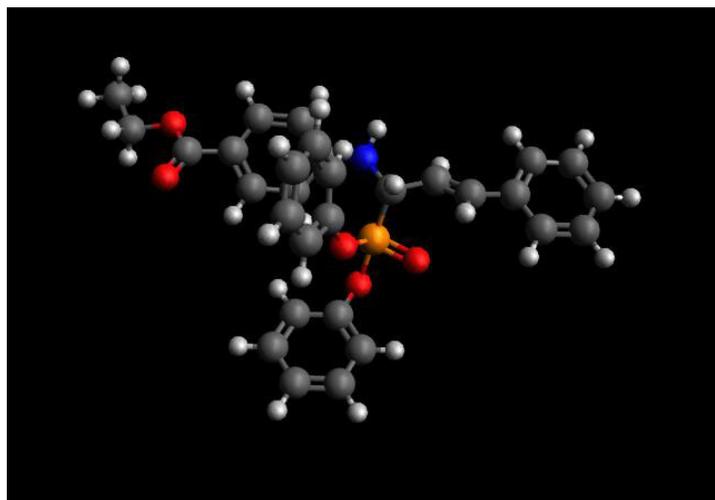


Figura 29. Conformación más estable del compuesto A-003 proporcionada por el software Avogadro.

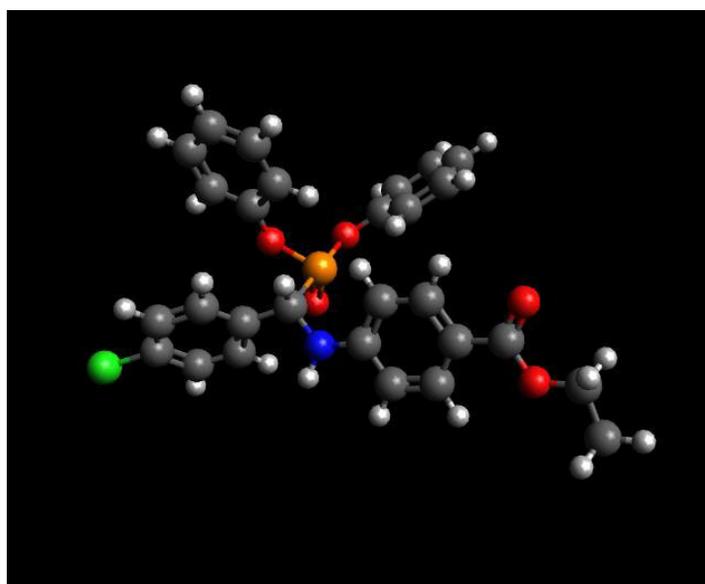


Figura 30. Conformación más estable del compuesto A-004 proporcionada por el software Avogadro.

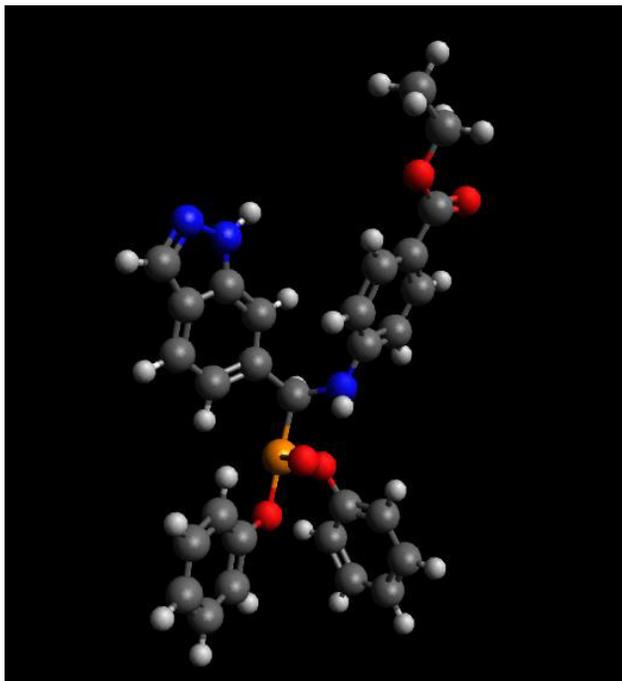


Figura 31. Conformación más estable del compuesto A-005 proporcionada por el software Avogadro.

En las siguientes figuras (32-34) se muestran las proteínas ya limpias, con las cuales se realizaron las pruebas de acoplamiento molecular para todos los compuestos.

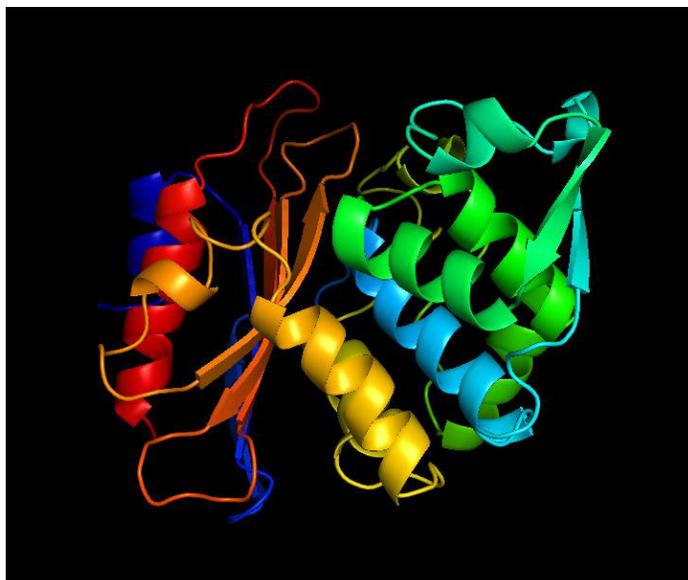


Figura 32. Proteína Betalactamasa procesada en el programa computacional Pymol.

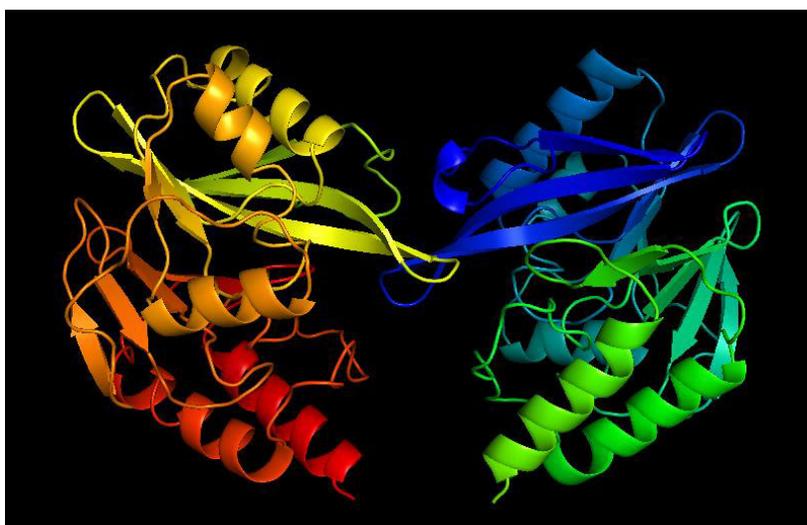


Figura 33. Proteína Betalactamasa clase B VIM-2 procesada en el programa computacional Pymol.

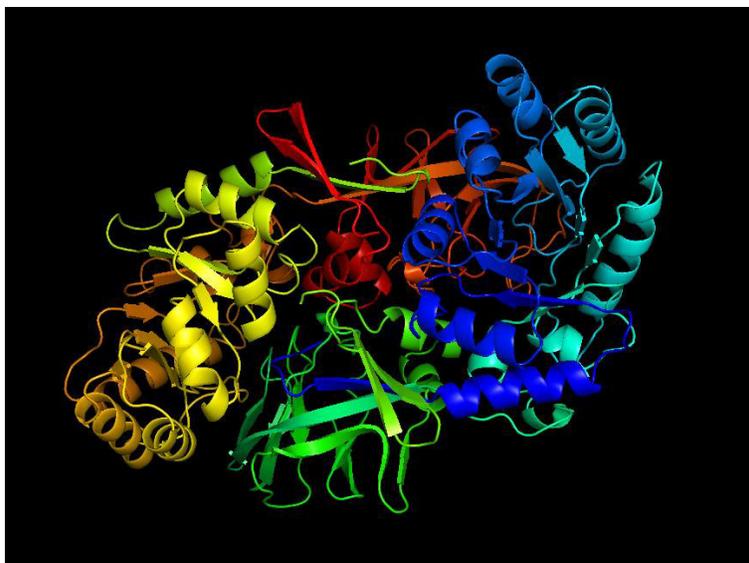


Figura 34. Proteína alanina racemasa procesada en el programa computacional Pymol.

5.7.1 Análisis del acoplamiento molecular

Se llevó a cabo el acoplamiento molecular entre las moléculas propuestas y la lista de posibles proteínas diana que arrojó el ensayo de predicción de dianas. Las energías de afinidad (kcal/mol) y las constantes de disociación (en μM o nM) calculadas para la interacción más estable de cada compuesto, se muestran en la tabla 8.

Posteriormente, fue llevado a cabo el acoplamiento molecular entre los compuestos sintetizados y las tres proteínas anteriormente mencionadas. El programa nos arrojó las energías de afinidad con las unidades de kcal/mol y las constantes de disociación con mayor estabilidad en unidades de μM o nM que fueron calculadas en la interacción, cuyos resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Energías de afinidad y constantes de disociación de los compuestos sobre las distintas dianas.

Compuesto	Alanina racemasa		Betalactamasa		Betalactamasa clase B VIM-2	
	Energías de afinidad (kcal/mol)	Constantes de disociación (μM)	Energías de afinidad (kcal/mol)	Constantes de disociación (μM)	Energías de afinidad (kcal/mol)	Constantes de disociación
A-001	-4.92	248.56	-4.82	293.24	-7.56	2.87 μM
A-002	-4.62	413.39	-4.26	747.76	-7.14	5.85 μM
A-003	-6.39	20.6	-5.95	43.76	-9.44	121.3 nM
A-004	-4.72	349.7	-6.88	9.05	-7.82	1.86 μM
A-005	-5.84	52.76	-6.22	27.7	-7.52	3.09 μM

Como se puede observar en la tabla 8 el complejo ligando-proteína que mostró una mayor energía de afinidad fue el compuesto A-003 con la proteína Betalactamasa clase B VIM-2, con una constante de disociación de 121.3 nM, cuyo complejo se muestra en la figura 35.

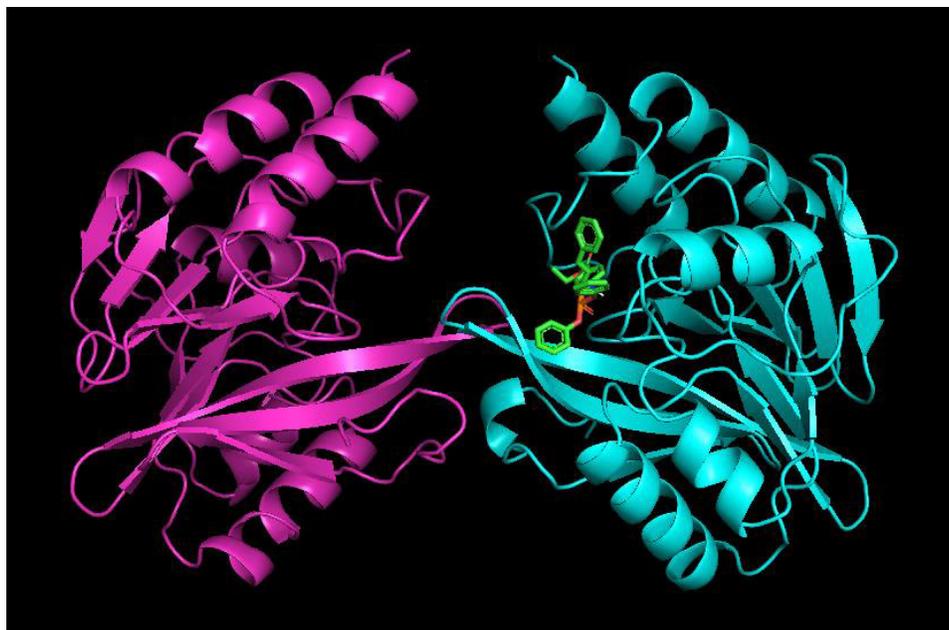
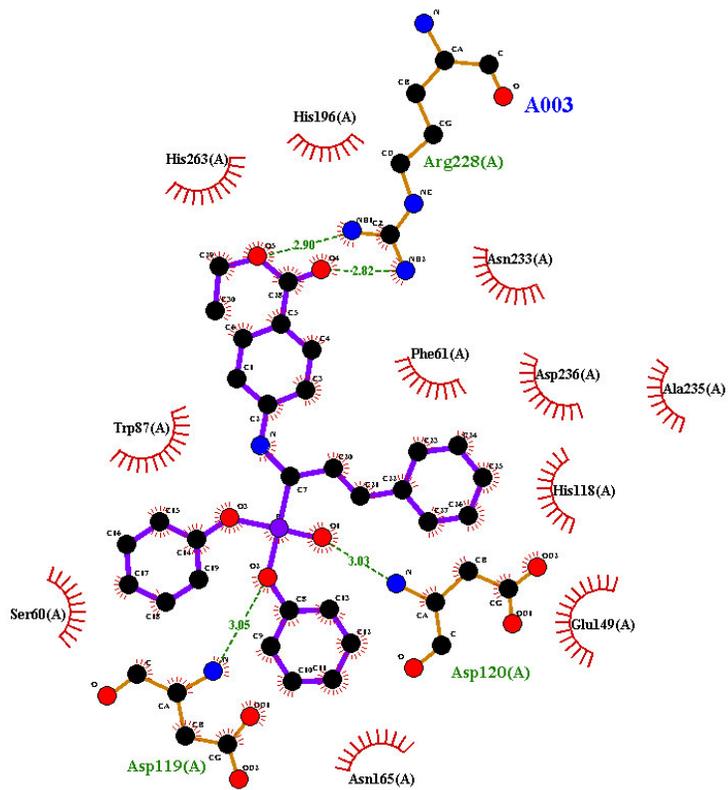


Figura 35. Complejo A-003-Betalactamasa clase B VIM-2

Se pueden observar también energías moderadas para los demás compuestos sobre ésta misma proteína, que iban desde 7.14 kcal/mol hasta 7.82 kcal/mol, esto sugiere que esa proteína tiene la capacidad de interactuar más fácilmente con compuestos como los sintetizados en este proyecto. En cuanto a las constantes de disociación, cabe mencionar que nuestros compuestos obtuvieron valores calculados que iban desde 121.3 nM hasta 5.85 μ M, esto coincide con los datos reportados en la literatura en el trabajo de Skagseth y colaboradores, en el cual fueron evaluados compuestos similares a los sintetizados en este proyecto, muestran IC50 que iban desde 0.38 μ M hasta 133 μ M (36).

5.7.2 Modelado molecular de los α -aminofosfonatos

A continuación se muestran los resultados del modelado molecular con los programas Ligplot+, Pymol y UCSF Chimera. En la figura 36 se muestran las interacciones del complejo A-003-Betalactamasa clase B VIM-2 en 2D, que fue el compuesto con mayor energía de afinidad. La energía de afinidad fue -9.44 kcal/mol y en la imagen se pueden observar tres enlaces o puentes de hidrógeno formados entre el aminoácido Arg228, específicamente de su grupo amino y el oxígeno del grupo éster de la molécula, otro puente de hidrógeno se encuentra entre el aminoácido Asp120 formado por su grupo amino, con el oxígeno unido con un doble enlace al fósforo, y por último otro más entre el grupo amino del aminoácido Asp119 y el oxígeno de uno de los grupos fenoxi del compuesto A-003. Otras interacciones observadas entre los distintos residuos de aminoácidos, específicamente Ser60, Trp87, Asn165, Glu149, His118, Ala235, Asp236, Phe61, Asn233, His263, His196, se encuentran formando interacciones de tipo de Van der Waals con las partes cíclicas de la molécula ligando. En la figura 37 se puede observar una representación en 3D del complejo proteína-ligando, haciendo notar los enlaces o puentes de hidrógeno en color celeste.



A003-Betalactamasa clase B VIM-2

Figura 36. Imagen de las interacciones entre el compuesto A-003 y la proteína Betalactamasa clase B VIM-2 proporcionada por el software LigPlot+.

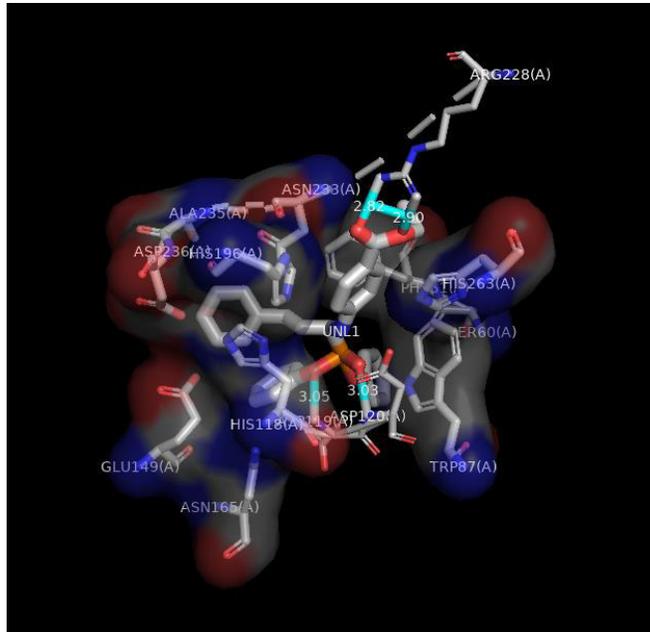
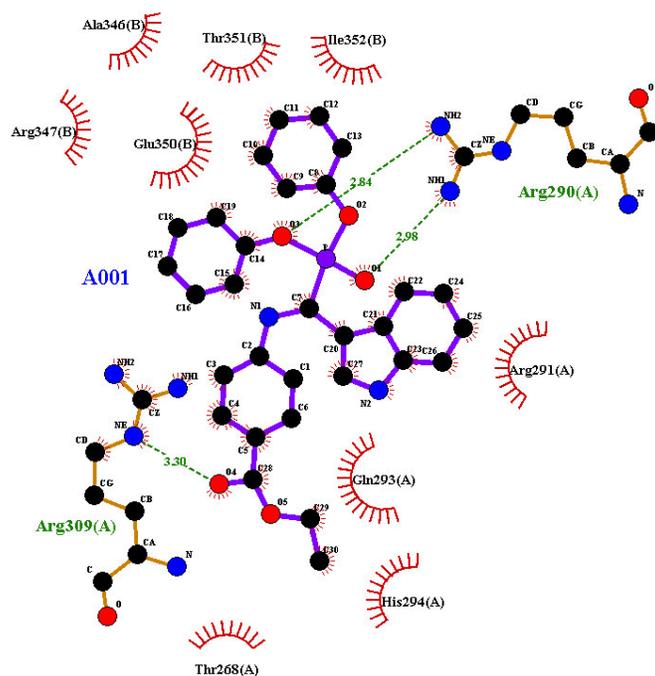


Figura 37. Imagen de las interacciones entre el compuesto A-003 y la proteína Betalactamasa clase B VIM-2 proporcionada por el programa Pymol.

A continuación se muestran los resultados del programa Ligplot+ de los complejos ligando-proteína en 2D restantes

En la figura 38 podemos observar las interacciones del complejo A-001-Alanina racemasa. Se puede observar la formación de tres puentes de hidrógeno, uno formado entre el uno de los grupos amino del aminoácido Arg290 y el oxígeno del uno de los grupos fenoxi de nuestro ligando, otro mas puede ser observado entre otro de los grupo amino, del aminoácido anteriormente mencionado y el oxígeno unido con un doble enlace al átomo de fósforo y el último de los tres, entre uno de los grupos amino del aminoácido Arg309 y el oxígeno del carbonilo del grupo éster de la molécula ligando. También se observan interacciones de tipo de Van der

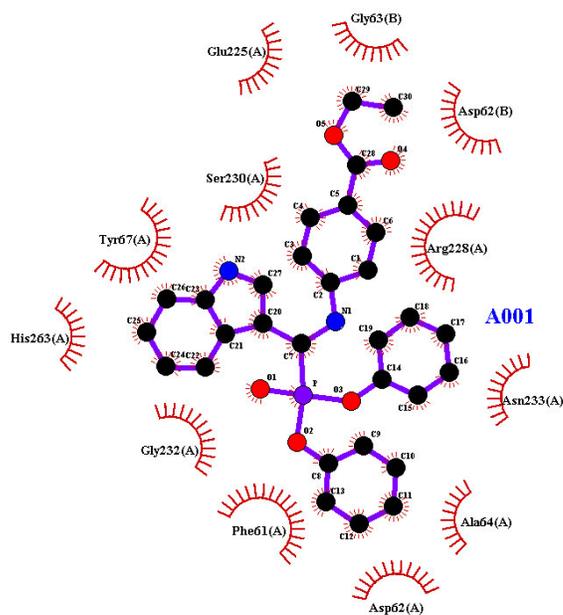
Waals entre los aminoácidos Arg347, Ala346, Thr351, Ile352, Glu350, Arg291, Gln293, His294, Thr268 y los grupos aromáticos y del ligando.



A001-Alanina racemasa

Figura 38. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-001 y la proteína Alanina racemasa, proporcionada por el software LigPlot+.

En la figura 39 se muestran las interacciones existentes entre el complejo A-001-Betalactamasa clase B VIM-2, a diferencia de las interacciones presentadas con la proteína Alanina racemasa, no fueron observadas interacciones por puentes de hidrógeno. Las interacciones presentadas en este complejo son solo de tipo de Van der Waals, y por mencionar algunas, entre los aminoácidos Asp62, Gly63, Glu225, Ser230, Phe61, Tyr 67, His263, entre otras con los anillos aromáticos de nuestro ligando.



A001-Betalactamasa clase B VIM-2

Figura 39. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-001 y la proteína Betalactamasa clase B VIM 2, proporcionada por el software LigPlot+.

Por último, en lo que respecta al compuesto A-001, como podemos observar en la figura 40, se muestran las interacciones del complejo A-001-Betalactamasa. Encontramos que se forman dos puentes de hidrógeno, el primero entre el grupo amino de la parte indólica de nuestra molécula, y el átomo de oxígeno del aminoácido Ser235 de la proteína, el otro lo podemos encontrar entre el grupo hidroxilo del aminoácido Ser70 y un oxígeno uno de los grupos fenoxi de nuestra molécula. El resto de las interacciones son de tipo Van der Waals, entre los aminoácidos Asp276, Ser216, Arg244, Gln237, Asn132, Asn170, Ile167, Tyr105 y los anillos aromáticos del ligando.

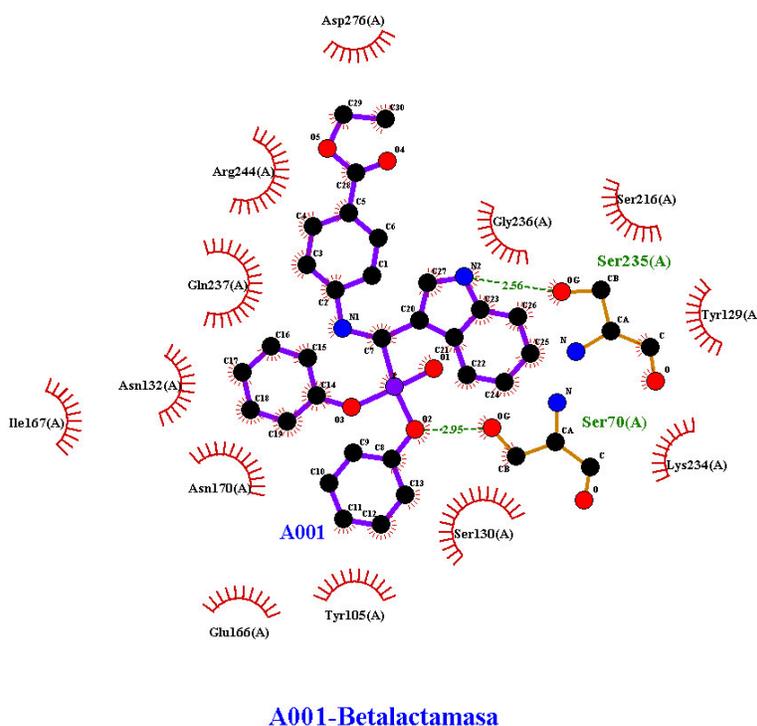


Figura 40. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-001 y la proteína Betalactamasa, proporcionada por el software LigPlot+.

En la figura 41 se muestran las interacciones del complejo A-002-Alanina racemasa. Cuatro puentes de hidrógeno son formados en el complejo. Los primeros dos puentes son formados por grupos amino de 2 aminoácidos histidina (His294 e His348) con el oxígeno del carbonilo del grupo éster de la molécula; otro de ellos es formado por un oxígeno del grupo trimetoxi, específicamente un grupo metoxi que se encuentra en posición *meta*, con un aminoácido Arg309, el resto de interacciones son el tipo de Van der Waals entre los aminoácidos Thr268, Ile352, Arg291, Gln293, Glu350 y los anillos aromáticos de la molécula.

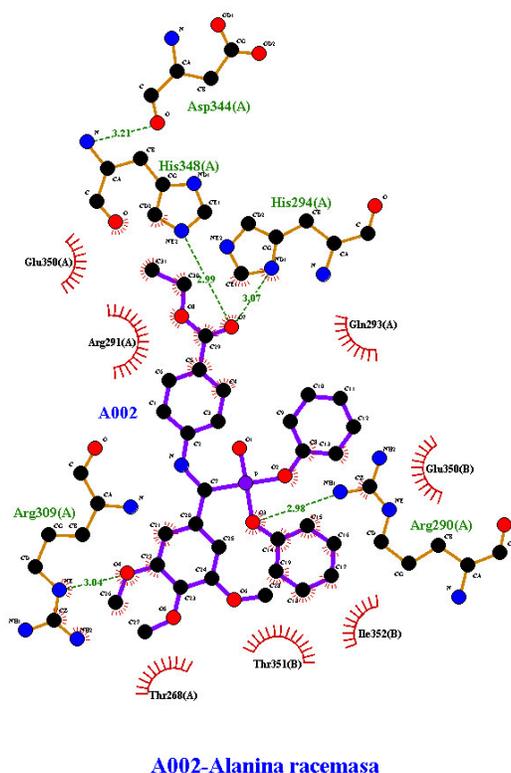
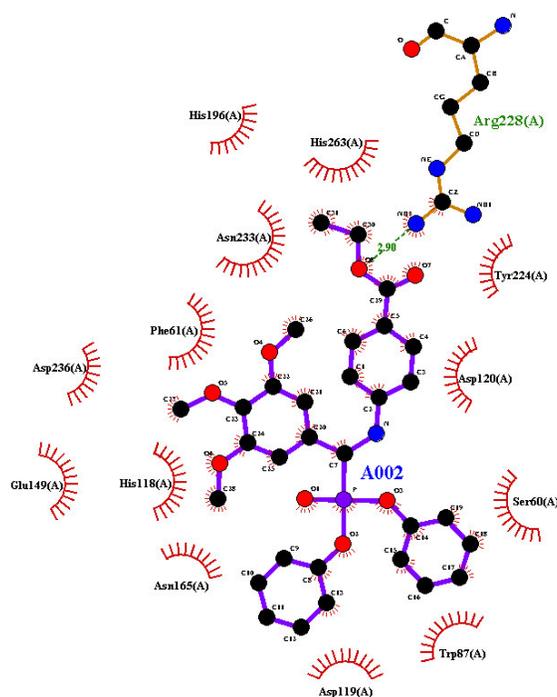


Figura 41. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-002 y la proteína Alanina racemasa, proporcionada por el software LigPlot+.

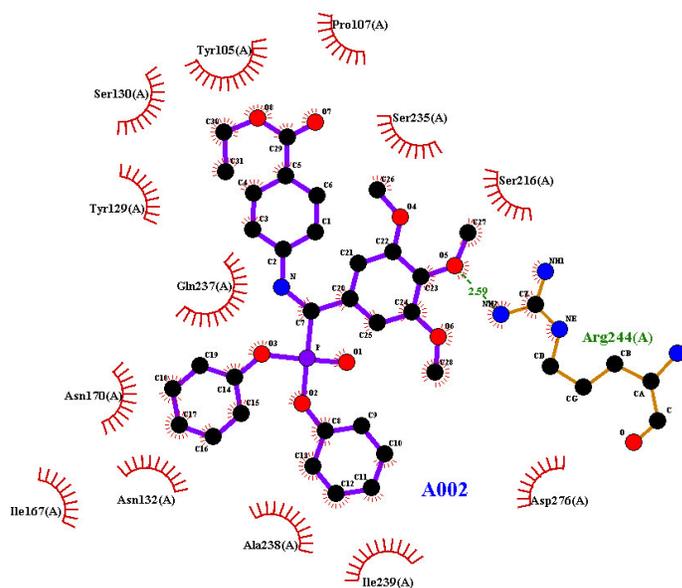
En la figura 42 se puede observar el complejo A-002-Betalactamasa clase B VIM-2 y de manera similar a los resultados del compuesto A-001, la interacción ligando-proteína fue menor, presentando solamente 1 puente de hidrógeno entre uno de los grupos amino del aminoácido Arg228 y el oxígeno del grupo éster de la molécula ligando. El resto de las interacciones fueron de tipo Van der Waals, entre los aminoácidos His296, His263, Asn233, Tyr224, Asp120, Ser60, Asp119, entre otros y los grupos aromáticos de la molécula.



A002-Betalactamasa clase B VIM-2

Figura 42. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-002 y la proteína Betalactamasa clase B VIM-2, proporcionada por el software LigPlot+.

En la figura 43 podemos observar las interacciones entre el complejo A-002-Betalactamasa. Solo se presenta la formación de un puente de hidrógeno entre uno de los grupos amino del aminoácido Arg244 y un oxígeno del grupo metoxi en posición *para* del grupo trimetoxi de la molécula. Las demás interacciones son de la misma manera que en el resto de los complejos, de tipo Van der Waals, por mencionar algunos aminoácidos que participan, encontramos a Pro107, Ser216, Ser235, Tyr105, Ser130, Glu237, Ala238, los cuales se encuentran interaccionando con los grupos aromáticos de la molécula ligando. De la misma manera no tuvo interacciones significativas al presentar solo un puente de hidrógeno.



A002-Betalactamasa

Figura 43. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-002 y la proteína Betalactamasa, proporcionada por el software LigPlot+.

En la figura 44 se muestran las interacciones del complejo A-003-Alanina racemasa, donde se puede observar la formación de solo dos puentes de hidrógeno, uno de ellos entre uno de los grupos amino del aminoácido Arg309 y oxígeno del carbonilo del grupo éster de la molécula, el puente de hidrógeno restante, se forma entre un átomo de oxígeno del aminoácido Glu350 y el grupo amino de nuestra molécula ligando; el resto de las interacciones son de tipo de Van der Waals, entre los aminoácidos Leu289, Arg290, Thr351, Glu355, Arg291, Glu350, His294, entre otros y los grupos aromáticos de nuestra molécula.

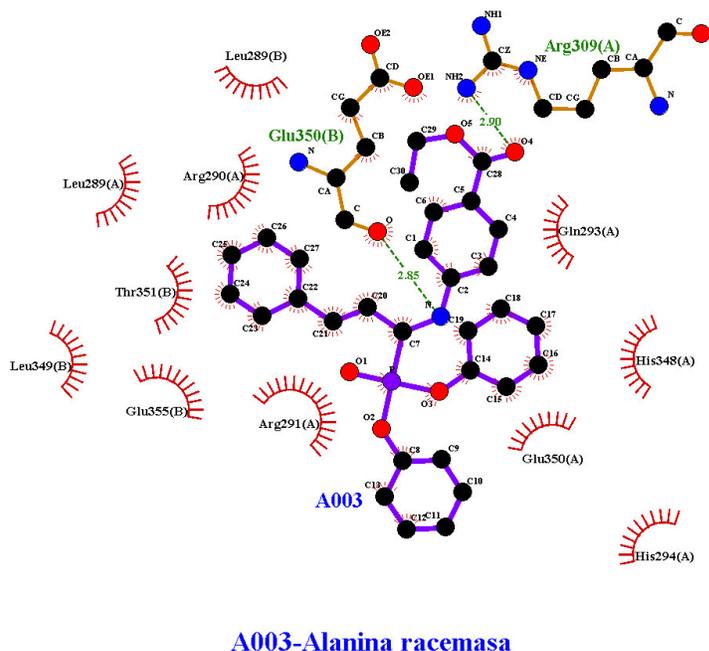
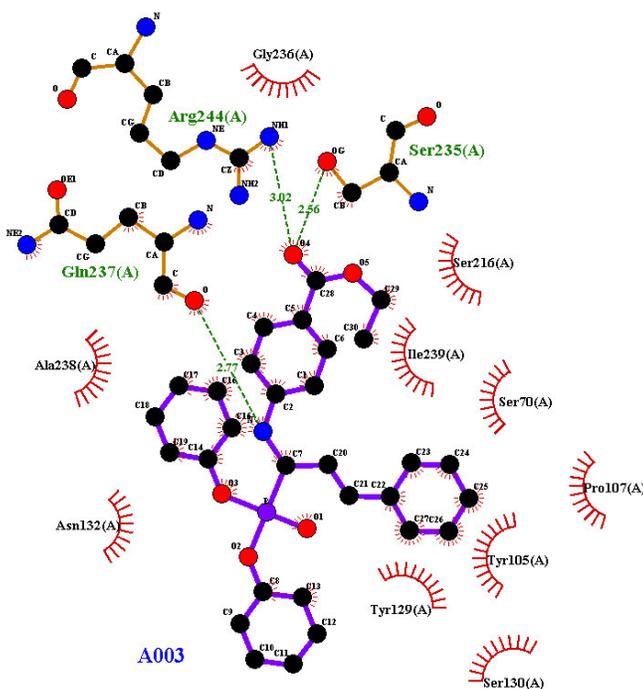


Figura 44. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-003 y la proteína Alanina racemasa, proporcionada por el software LigPlot+.

En la figura 45 podemos observar las interacciones del complejo A-003-Betalactamasa. Podemos observar la formación de tres puentes de hidrógeno, dos de ellos formados entre dos aminoácidos distintos (Ser235 y Arg244) uno entre uno de los grupos amino de Arg244 y el oxígeno del carbonilo del éster de molécula e interaccionando con este mismo, uno de los grupos hidroxilo de Ser235, el otro puente de hidrógeno se encuentra entre el aminoácido Gln237 y el grupo amino del ligando. El resto son interacciones de Van der Waals, entre los aminoácidos Pro107, Ser216, Gly236, Asn132, entre otros y los grupos aromáticos del compuesto A-003.



A003-Betalactamasa

Figura 45. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-003 y la proteína Betalactamasa, proporcionada por el software LigPlot+.

En la figura 46 podemos observar las interacciones del complejo A-004-Alanina racemasa, encontramos que se forman tres puentes de hidrógeno, dos de ellos son formados con el oxígeno unido con un doble enlace al átomo de fósforo, uno entre uno de los grupos amino del aminoácido Arg309 y otro con un grupo amino del aminoácido Gln293, el puente restante, se forma entre uno de los oxígenos de un grupo fenoxi y otro de los grupos amino del aminoácido Arg309. Las interacciones restantes que aparecen, son interacciones de Van der Waals, entre los aminoácidos Arg347, Ala346, Glu350, His294, entre otros y los anillos aromáticos de nuestra molécula ligando.

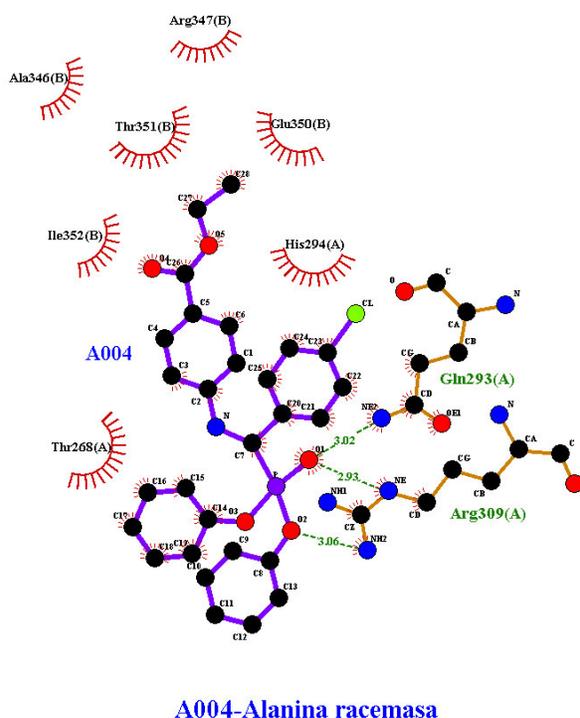
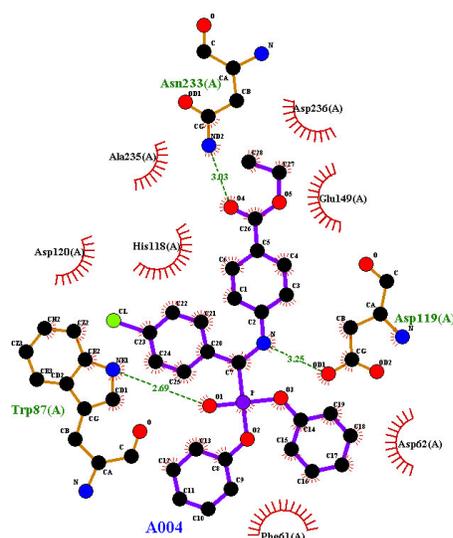


Figura 46. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-004 y la proteína Alanina racemasa, proporcionada por el software LigPlot+.

En la figura 47 se pueden observar las interacciones del complejo A-004-Betalactamasa clase B VIM-2. Se pueden observar tres puentes de hidrógeno, uno entre el grupo amino del aminoácido Asn233 y el oxígeno del carbonilo del éster de nuestra molécula, otro entre el grupo amino del anillo indólico del aminoácido Trp87 y el oxígeno unido con un doble enlace al átomo de fósforo y el último entre el grupo amino del ligando y un grupo hidroxilo del aminoácido Asp119, el resto de las interacciones son del tipo Van der Waals entre los aminoácidos Asp236, Gln149, Asp62, Phe61, His118, Asp120, entre otros con los anillos aromáticos del ligando.



A004-Betalactamasa clase B VIM-2

Figura 47. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-004 y la proteína Betalactamasa clase B VIM-2, proporcionada por el software LigPlot+.

En la figura 48 se observan las interacciones entre el complejo A-004-Betalactamasa, de la misma manera que con la proteína anterior, podemos observar tres puentes de hidrógeno, dos de los cuales, se observan siendo formados entre el oxígeno del carbonilo del éster de nuestra molécula y uno de los grupos amino del aminoácido Arg244 y un grupo hidroxilo del aminoácido Ser235, el puente restante los observamos entre el grupo amino de la molécula y el oxígeno de un grupo hidroxilo del aminoácido Gln237, el resto de las interacciones son de tipo Van der Waals entre los aminoácidos Ser216, Ser70, Ser130, Gly236, Tyr105, Asn132, Asn170, entre otros con los anillos aromáticos de la molécula ligando.

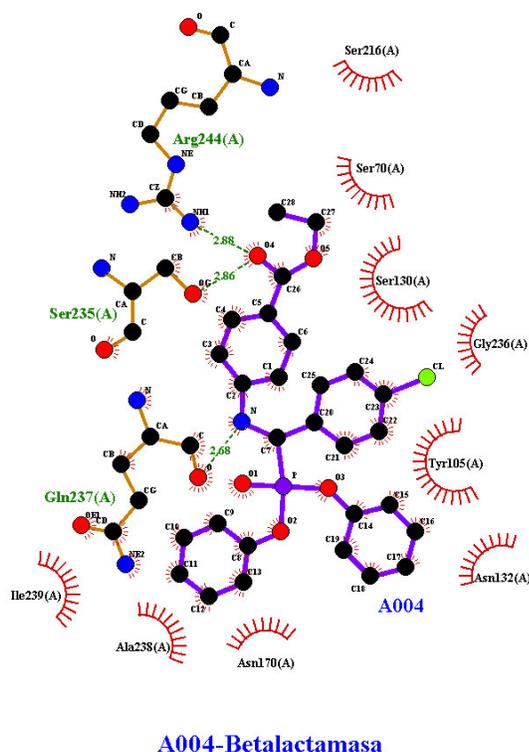
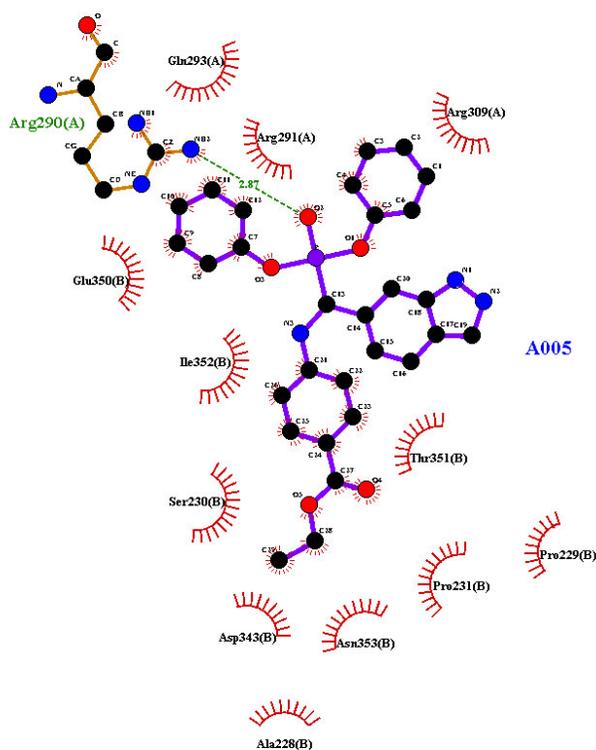


Figura 48. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-004 y la proteína Betalactamasa, proporcionada por el software LigPlot+.

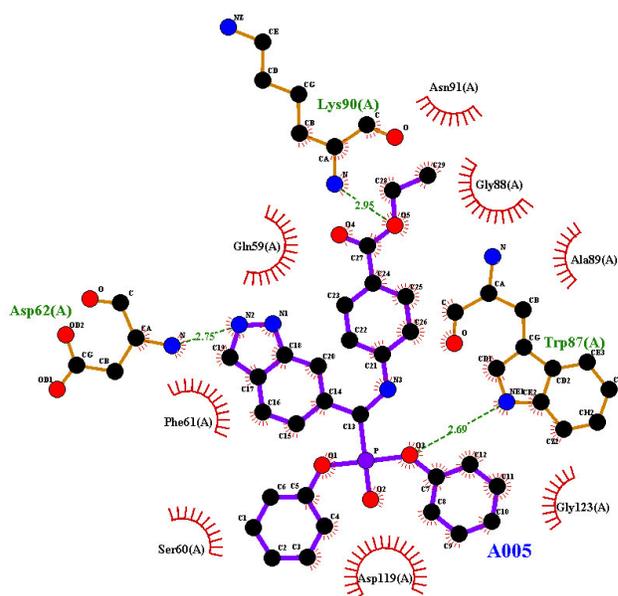
En la figura 49 se observan las interacciones del complejo A-005-Alanina racemasa, es notable la formación de solo un puente de hidrógeno entre el oxígeno unido con un doble enlace al fósforo y uno de los grupos amino del aminoácido Arg290, el resto de las interacciones son de tipo Van der Waals entre los aminoácidos Arg309, Glu350, Thr351, Pro231, Asp343, Ala228, entre otros, con los anillos aromáticos del compuesto.



A005-Alanina racemasa

Figura 49. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-005 y la proteína Alanina racemasa, proporcionada por el software LigPlot+.

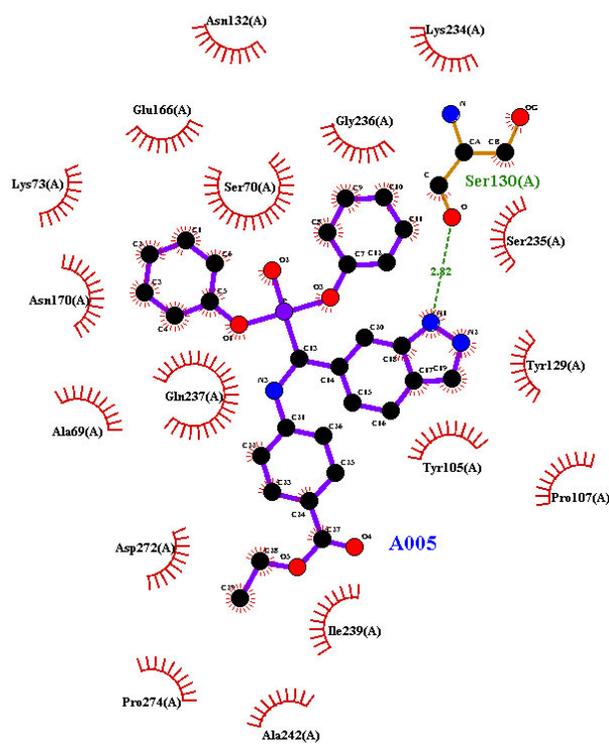
En la figura 50 podemos observar las interacciones presentadas en el complejo A-005-Betalactamasa clase B VIM-2, donde podemos notar la formación de tres puentes de hidrógeno, uno de ellos entre el grupo amino del aminoácido Lys90 y el oxígeno del grupo éster de nuestra molécula, otro entre el nitrógeno del grupo amino del aminoácido Asp62 y el grupo amino de la parte indazólica de nuestra molécula, el último entre el grupo amino de la parte indólica del aminoácido Trp87 y el oxígeno de uno de los grupos fenoxi de nuestra molécula, el resto, por mencionar algunos, son interacciones de tipo Van der Waals entre los aminoácidos Gly88, Asn91, Phe61, Ala89, Asp119, entre otros, con los anillos aromáticos de nuestra molécula.



A005-Betalactamasa clase B VIM-2

Figura 50. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-005 y la proteína Betalactamasa clase B VIM-2, proporcionada por el software LigPlot+.

En la figura 51 podemos observar las interacciones presentadas en el complejo A-005-Betalactamasa, es posible notar la formación de solo un puente de hidrógeno entre el oxígeno del grupo hidroxilo del aminoácido Ser130 y el grupo amino de la parte indazólica de nuestra molécula, el resto son solo interacciones de tipo Van der Waals, entre los aminoácidos Asn132, Gly326, Lys234, Tyr129, Pro107, Ser70, entre otros, con los anillos aromáticos de nuestra molécula.



A005-Betalactamasa

Figura 51. Imagen en 2D donde se muestran las interacciones entre el compuesto A-005 y la proteína Betalactamasa, proporcionada por el software LigPlot+.

5.7.3 Análisis de las dianas de los compuestos en humanos

Como también fue mencionado en el apartado de metodología, se realizó un análisis de las dianas posibles a las cuales nuestros compuestos se unirían teóricamente en humanos, utilizando las mismas herramientas que fueron empleadas para el análisis farmacocinético; la base de datos y los programas del Instituto Suizo de Biotecnología. Este análisis se realizó con el objetivo de encontrar alguna homología en proteínas humanas y bacterianas, como lo es el caso de los canales o bombas las cuales tienen una amplia similitud en bacterias y humanos. Otro objetivo fue comprobar si nuestros compuestos tienen alguna otra posible actividad, como por ejemplo en cáncer. Las distintas dianas que el programa arrojó, se encuentran en la tabla 9, la cual se muestra a continuación.

Tabla 9. Dianas obtenidas en el software SwissTargetPrediction del SIB.

Compuesto	Dianas moleculares
A-001	Fosfodiesterasa, receptor cannabinoide 2.
A-002	Caseína quinasa alfa y caseína quinasa alfa (prime), carnitina o-palmitoil transferasa (isoforma hepática), tirosina-proteína quinasa SYK, hexoquinasa tipo IV, receptor de adenosina A3, receptor de adenosina A2a, quinasa BRAF, CDK9, ciclina T1, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, tanquirasa 2.
A-003	Activador de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3)

A-004	MAP quinasa p38 alfa y beta, receptor del neuropéptido Y, calicreína 1,2,3,4, receptor cannabinoide 1 y 2.
A-005	De la familia A de los receptores acoplados a proteína G encontramos al receptor V2 de la vasopresina, receptor V1a de la vasopresina, receptor B de interleucina-8, receptor de ghrelina y a una quinasa, la serina/treonina quinasa Chk1.

Como se puede observar en la tabla, muchas de las enzimas son esenciales en procesos de división celular y mantenimiento de la integridad y estabilidad genómica, esto coincide con el trabajo de Loredo y colaboradores en 2019 (37), en el cual sintetizaron moléculas similares a las de este proyecto, siendo uno de sus compuestos activo sobre células cancerígenas específicamente sobre una línea de cáncer de mama MCF-7 con un IC50 de 36 μ M.

5.7.4 Análisis de las propiedades farmacocinéticas

Este análisis fue enfocado en verificar si los compuestos contaban con las propiedades necesarias para presentar una buena biodisponibilidad. El primer análisis que fue realizado por el programa, fue el de comprobar si los compuestos cumplían con las reglas de Lipinski, cuyos resultados se muestran en la tabla 10, según la literatura, estas reglas consisten en los siguientes puntos que se describen a continuación: a) la molécula o compuesto debe tener un peso molecular por debajo de los 500 Da, b) la molécula debe tener un número de donadores de puente de hidrógeno menor a cinco, c) debe tener un número de aceptores de puente de

hidrógeno mayor a 10 y d) tener un coeficiente de reparto octanol-agua (iLogP) menor que 5. Como se puede observar en la tabla 10 ninguno de los compuestos cumple con las reglas de Lipinski, específicamente, en lo que respecta al peso molecular, todos nuestros compuestos rebasan el peso de 500 Da, por lo tanto no cumplen esa regla, en cuanto al número de donadores de puente de hidrógeno se puede observar que todos cumplen la regla, todos poseen un número menor a cinco, en cuanto al número de aceptores, ninguno de los compuestos cumple con la regla, la cual establece que debe ser mayor a diez, en cuanto al iLog P todos los compuestos cumplen con la regla. Estos problemas presentados tanto en el peso como en el número de aceptores de puente de hidrogeno podrían ser fácilmente solucionados al quitar los grupos fenilo de las moléculas, en su parte fenoxi y si fuese necesario cambiarlos por algunos otros grupos que brinden un iLogP ideal para que se cumplan las demás reglas.

Tabla 10. Análisis de las pruebas de Lipinski para los distintos compuestos

Compuesto	Peso molecular (Da)	# de donadores de H	# de aceptores de H	iLog P	Accesibilidad sintética	Reglas de Lipinski
A-001	526.52	2	5	4.2	4.76	No
A-002	577.56	1	8	4.74	5.1	No
A-003	513.52	1	5	4.7	4.96	No
A-004	521.93	1	5	4.68	4.6	No
A-005	527.51	2	6	3.74	4.7	No

De la misma manera, estando dentro de la misma base de datos, se procedió a realizar un análisis para obtener el diagrama de huevo hervido, el cual nos brindó información acerca de perfiles de absorción intestinal, en caso que el fármaco se fuese a ingerir de manera oral, y muestra también la capacidad de las moléculas para atravesar la barrera hematoencefálica, ver figura 52.

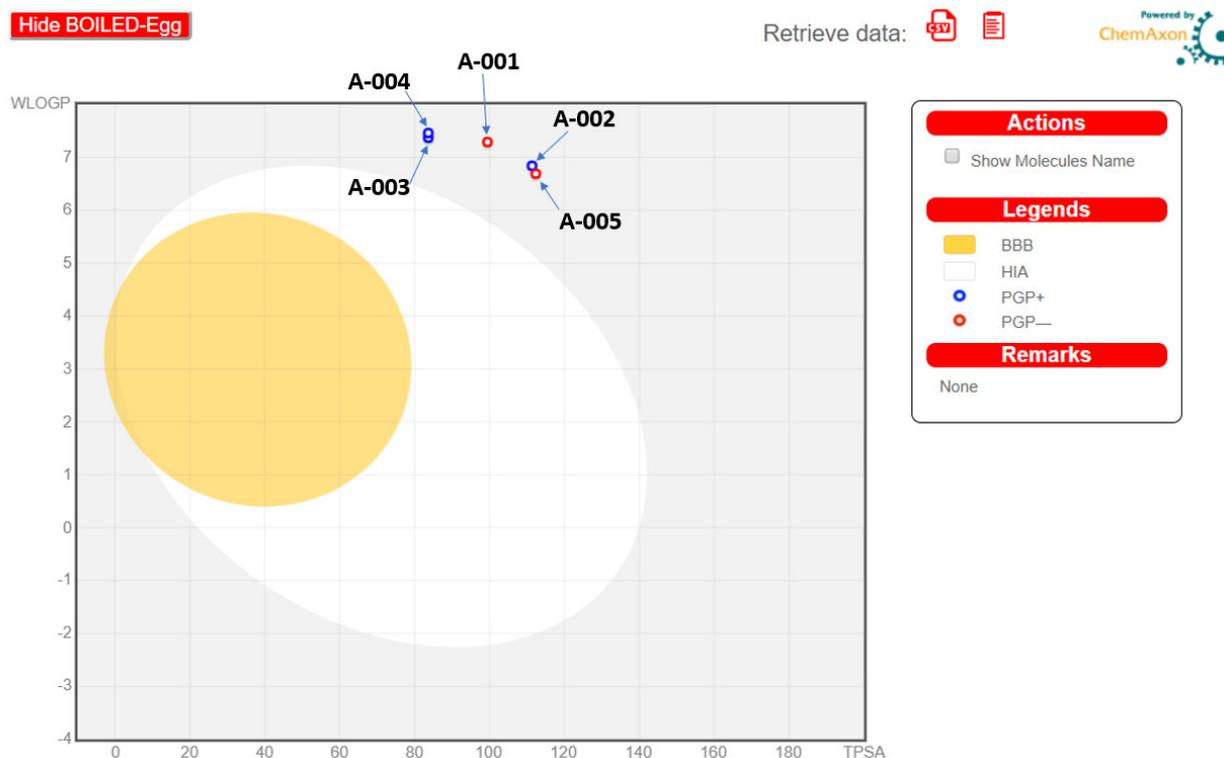


Figura 52. Diagrama de “huevo hervido” proporcionado por el análisis de la base de datos del SIB en el apartado de SwissADME.

Como se puede observar en el diagrama, los compuestos se encuentran en el área gris, esto significa que los compuestos son difícilmente absorbidos por vía oral, de manera específica, estos presentarán teóricamente, una pobre absorción a nivel intestinal. El diagrama muestra un área blanca (la cual simula la clara del huevo), si los compuestos aparecen dentro de ésta región, significa que serán fácilmente

absorbidos, lo cual no ocurrió con nuestros compuestos. Si se llegasen a encontrar compuestos en el área amarilla (lo cual simula la yema de huevo) significa que los compuestos podrían atravesar la barrera hematoencefálica, lo cual no es deseable en la química medicinal y tal como se puede observar ninguno de nuestros compuestos lograrían teóricamente atravesar dicha barrera. Un último punto a observar en el diagrama es que algunos compuestos se muestran como círculos azules (en el caso de los compuestos A-002, A-003, A-004) y como círculos rojos (en el caso de A-001 y A-005), en este caso los círculos rojos indican que éste compuesto no tiene afinidad hacia la glucoproteína P y los círculos azules indican que si se tiene dicha afinidad, éste análisis nos permite predecir ciertos mecanismos de resistencia por parte de células cancerígenas y esto se podría extrapolar por homología a bombas de expulsión bacteriana.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES

- La síntesis de los α -aminofosfonatos mediante la reacción de Kabachnik-Fields, llevada a cabo por medio de agitación en vórtex, a temperatura

ambiente y utilizando etanol como solvente, sumada a la sencilla y eficiente purificación de los compuestos por medio de filtración al vacío y recristalización, representa una síntesis amigable con el medio ambiente, de bajo costo, rápida y sencilla para la generación de éstos compuestos de interés farmacológico.

- La caracterización de los compuestos mediante Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C , ^{31}P , nos fue útil para comprobar que los compuestos eran los que se esperaban.
- Ninguno de los compuestos presentó actividad antibacteriana “*in vitro*” sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus Faecalis*.
- La hipótesis se rechaza ya que ninguno de los compuestos sintetizados logró superar la actividad antibacteriana del ciprofloxacino.
- Los programas computacionales y bases de datos nos brindaron un panorama teórico del por qué la mayoría de los compuestos no presentaron actividad y a su vez dieron indicios de las posibles aplicaciones en otros sistemas celulares, como por ejemplo, células eucariotas y específicamente en patologías como el cáncer.

PERSPECTIVAS

Según los resultados que fueron obtenidos en este proyecto, con relación a las perspectivas, cabe destacar lo siguiente:

En cuanto a la síntesis orgánica, el seguir investigando y probando métodos de síntesis innovadores y relevantes dentro de la química verde, como el realizado en este proyecto, así como de la búsqueda de nuevos métodos de purificación que también sean amigables con el medio ambiente y de bajo costo, esto permitirá la obtención de mayores rendimientos. En cuanto a la parte biológica se podrían realizar ciertas modificaciones estructurales en los compuestos para que las moléculas sean más afines a las proteínas bacterianas y tengan un mejor perfil farmacocinético, lo cual puede ser asistido y calculado probabilísticamente por los múltiples programas computacionales que actualmente existen. En lo que respecta a la difusión de los compuestos en el medio de cultivo, la cual fue muy baja en el presente proyecto, es posible realizar otras pruebas como la microdilución en placa e intentar disolver el compuesto con ayuda de algún detergente como el tween 80 para mejorar su solubilidad. Sin duda, su efecto anticancerígeno, antiviral, antifúngico, etc. deberán ser evaluados.

ANEXOS

En este apartado se encuentran los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{31}P , así como imágenes del análisis computacional realizado.

A continuación, se muestran los complejos proteína-ligando de todos los acoplamientos realizados (Figuras 53-66).



Figura 53. Complejo A-001-Alanina racemasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.

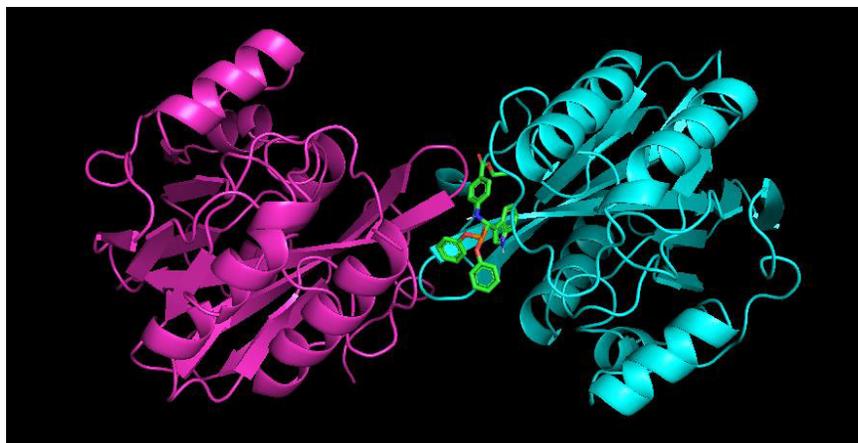


Figura 54. Complejo A-001-Betalactamasa clase B VIM-2. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.



Figura 55. Complejo A-001-Betalactamasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.



Figura 56. Complejo A-002-Alanina racemasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.

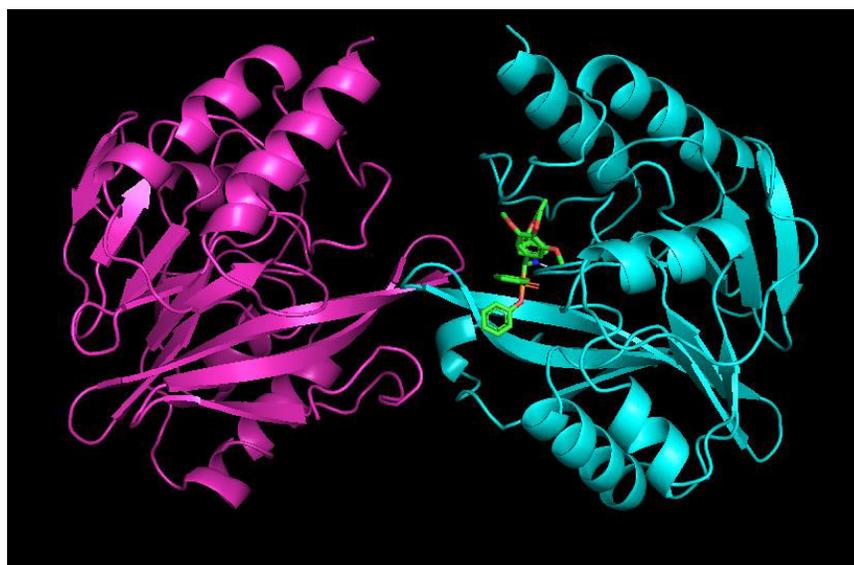


Figura 57. Complejo A-002- Betalactamasa clase B VIM-2. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.

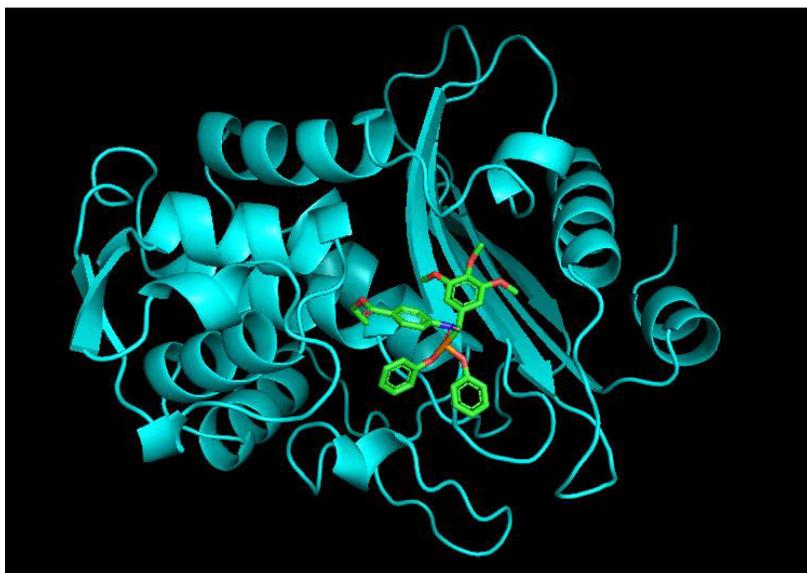


Figura 58. Complejo A-002-Betalactamasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.



Figura 59. Complejo A-003-Alanina racemasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.

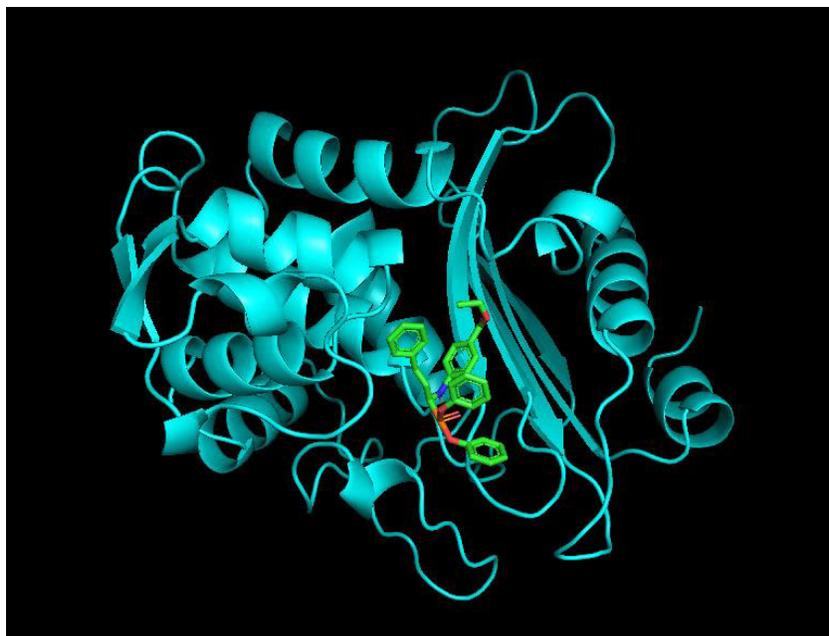


Figura 60. Complejo A-003-Betalactamasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.



Figura 61. Complejo A-004-Alanina racemasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.

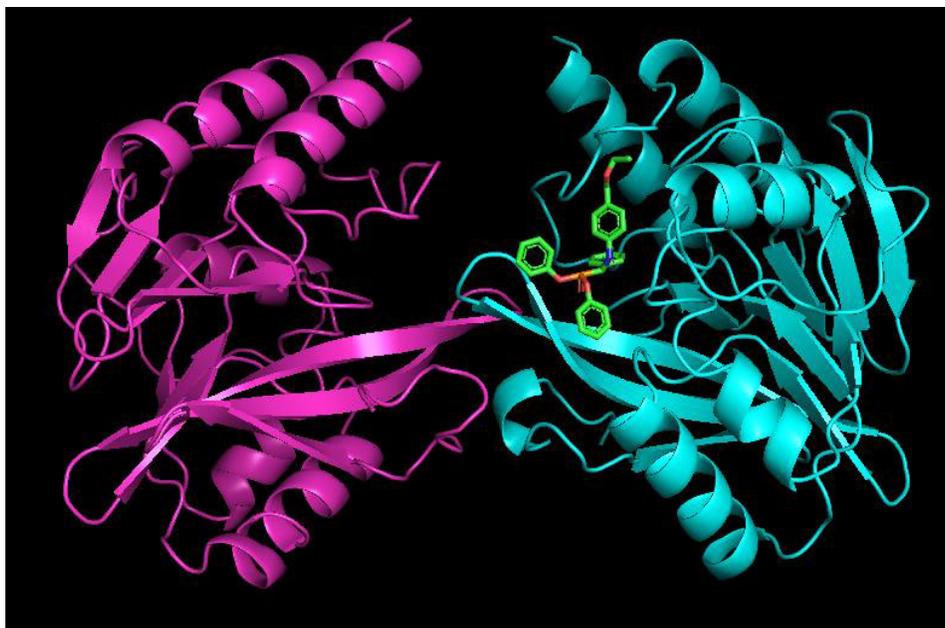


Figura 62. Complejo A-004-Betalactamasa clase B VIM-2. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.

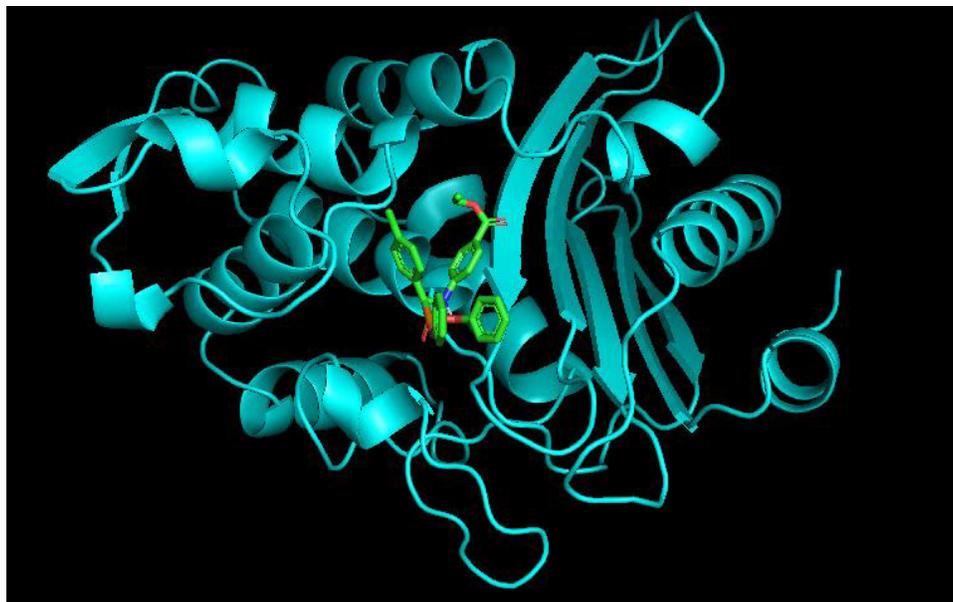


Figura 63. Complejo A-004-Betalactamasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.



Figura 64. Complejo A-005-Alanina racemasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.

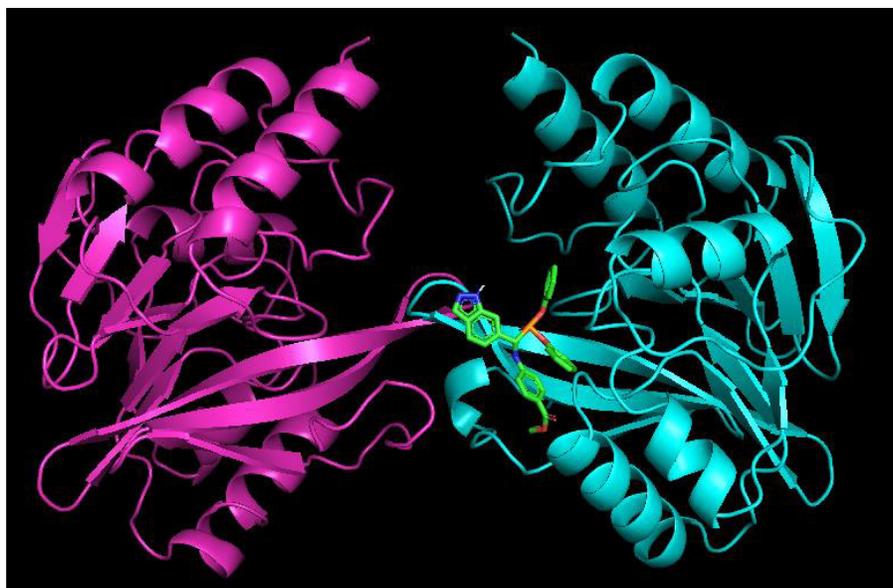


Figura 65. Complejo A-005-Betalactamasa clase B VIM-2. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.

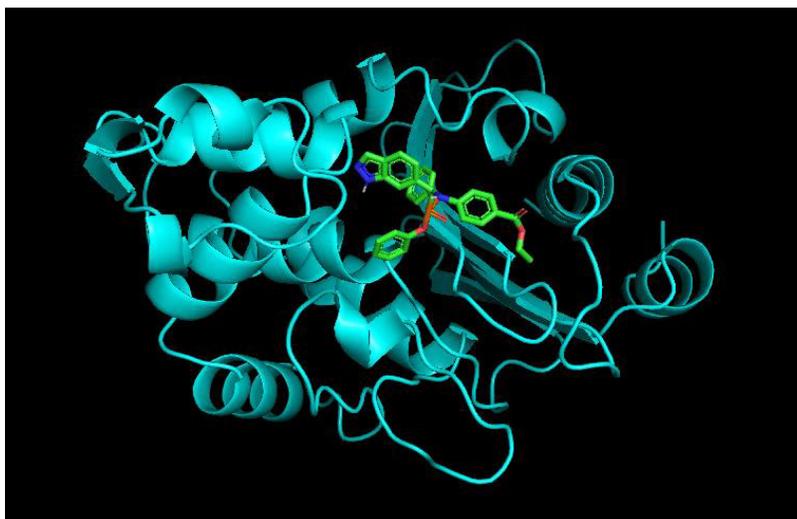


Figura 66. Complejo A-005-Betalactamasa. Imagen obtenida del programa Pymol después de introducir el archivo con el resultado del acoplamiento por Autodock4.

En las figuras 67 y 68 podemos observar los halos de inhibición del resto de los compuestos sobre las distintas cepas bacterianas, y posteriormente, de las figuras 69 a la 92 se muestran el resto de los espectros de RMN de todos los compuestos sintetizados, las cuales se muestran a continuación:

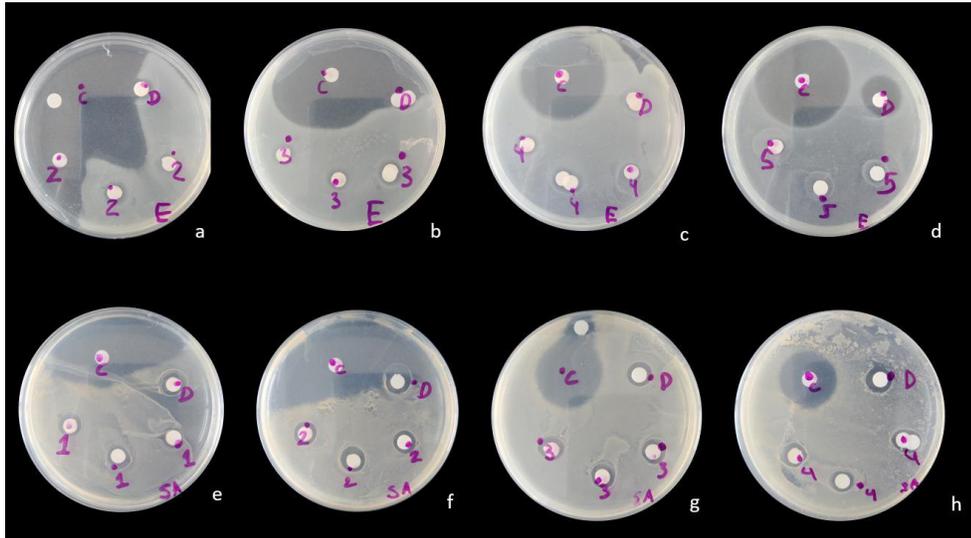


Figura 67. Inhibición de los compuestos sobre las cepas bacterianas de *E. coli* y *S. aureus*. Se muestran en la primera línea los compuestos A-002 y A-005 (a-d) sobre la bacteria *E. coli* y los compuestos A-001 y A-004 (e-h) sobre la bacteria *S. aureus*.

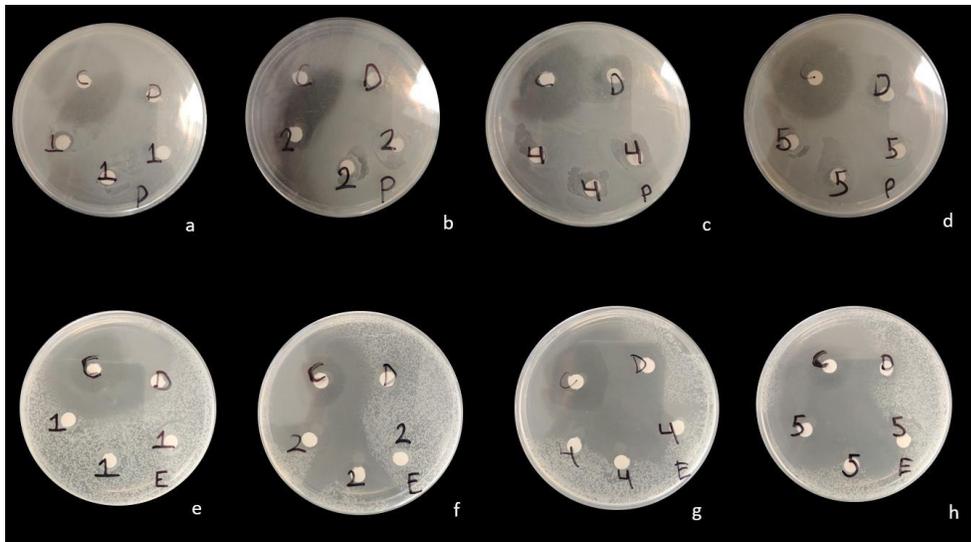


Figura 68. Inhibición de los compuestos sobre las cepas bacterianas de *P. aeruginosa* y *E. faecalis*. Se muestran en la primera línea, los compuestos A-001, A-002, A-004 y A-005 (a-d) sobre la bacteria *P. aeruginosa* y los mismos compuestos (e-h) sobre la bacteria *E. faecalis*.

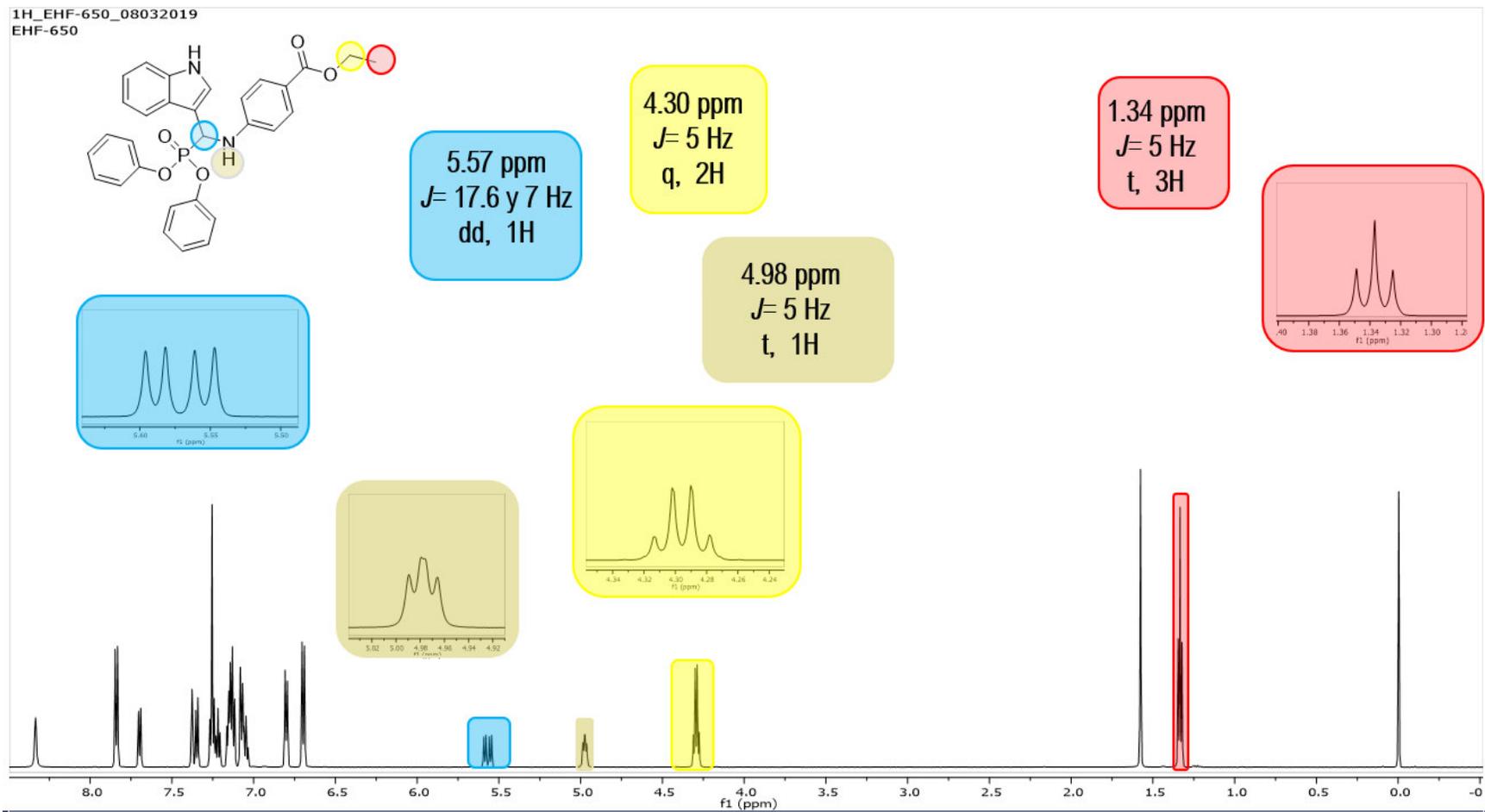


Figura 69. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-001 (primera parte).

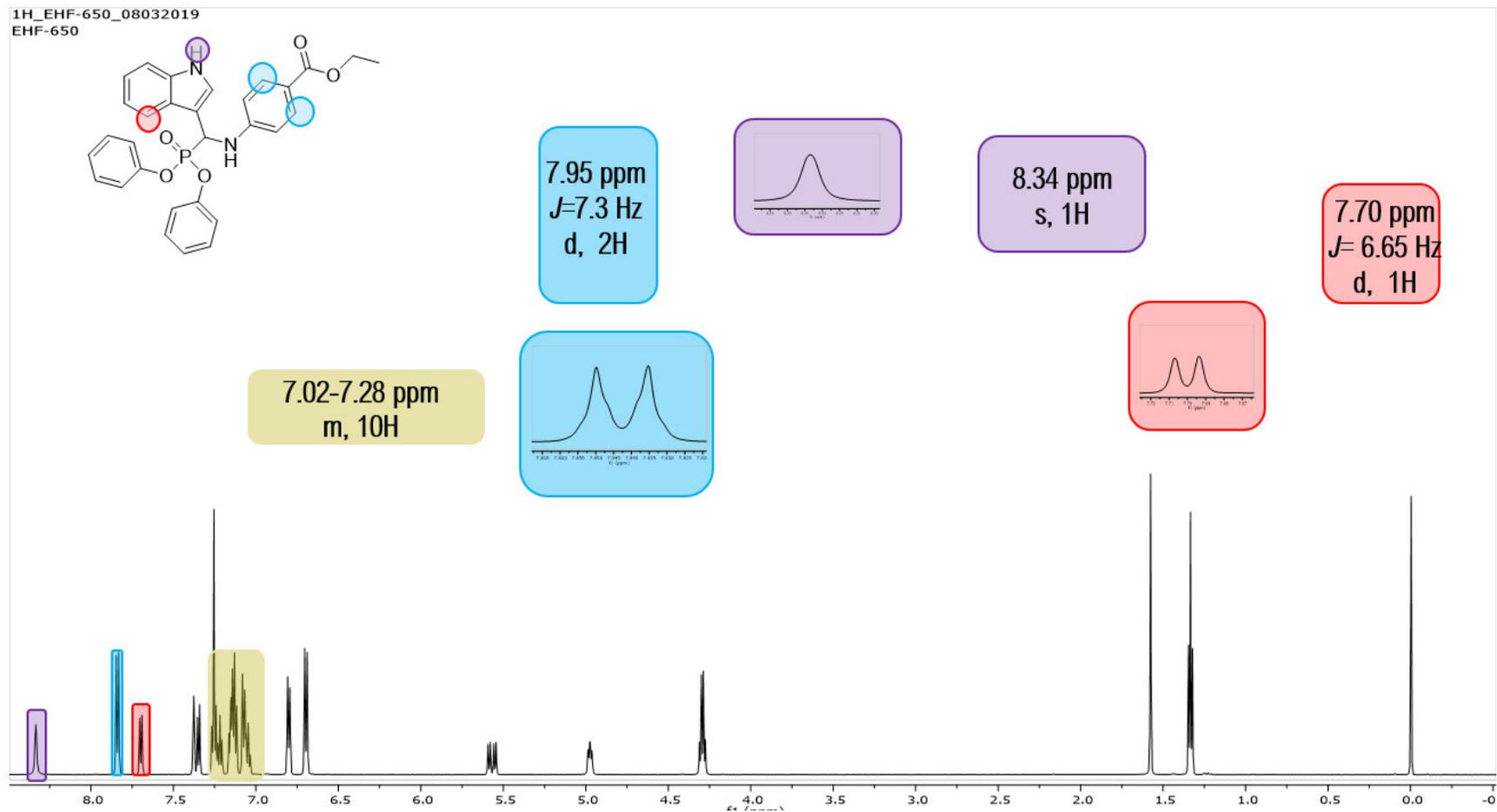


Figura 71. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-001 (tercera parte).

13C_EHF-650_08032019
EHF-650

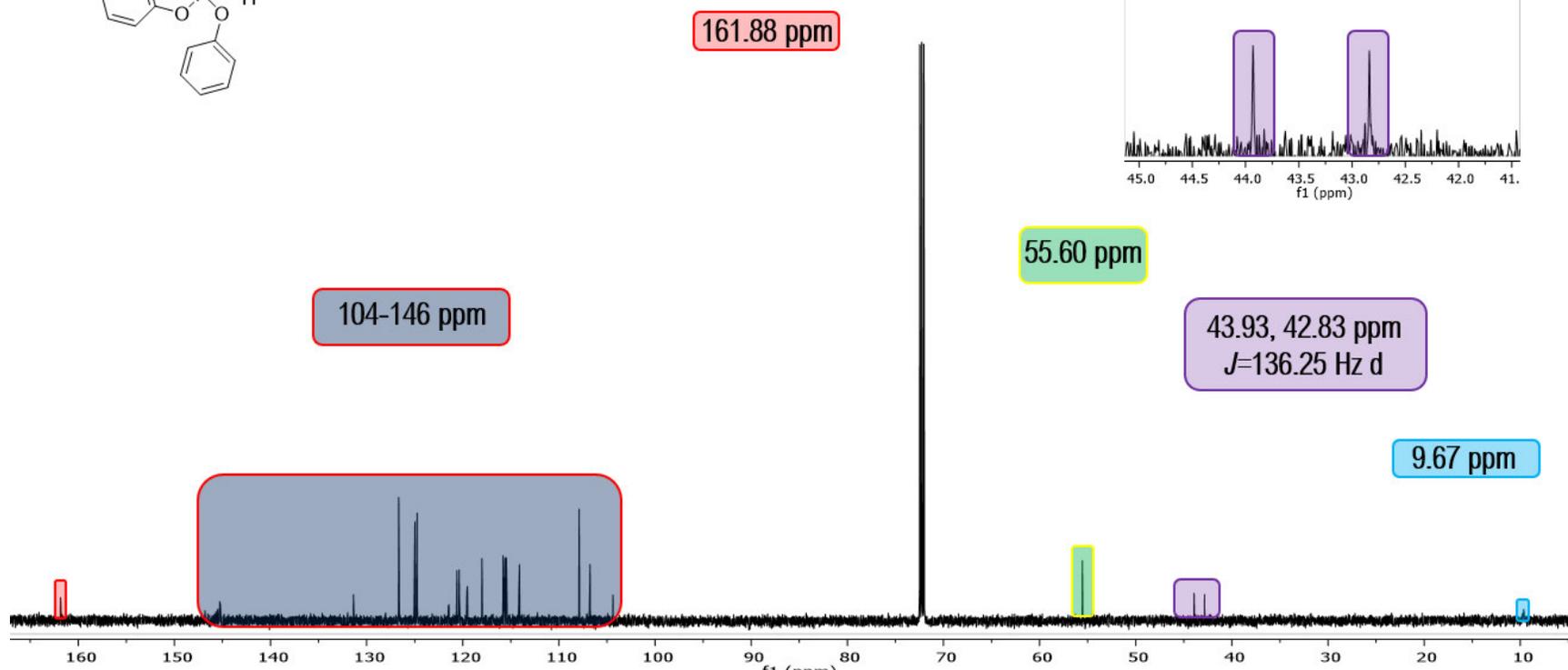
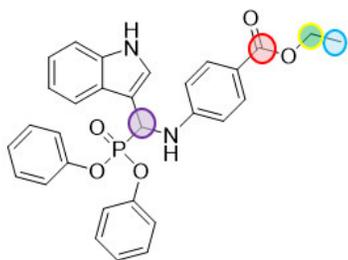


Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto A-001

31P_EHF-650_14032019
EHF-650

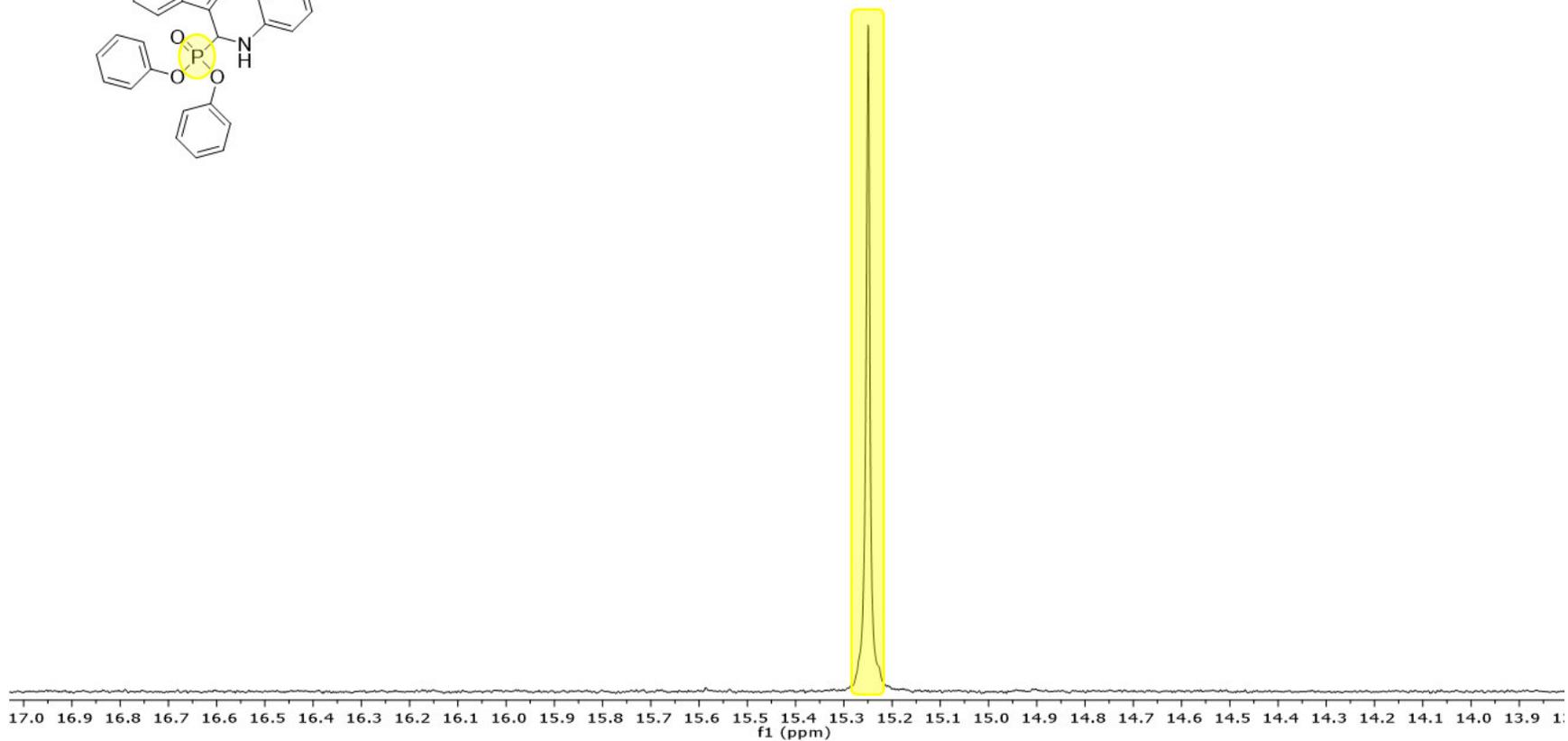
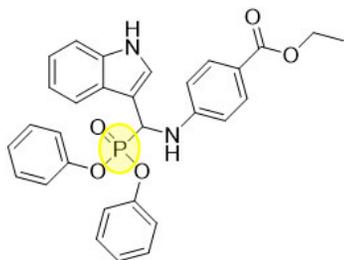


Figura 73. Espectro de RMN ³¹P del compuesto A-001

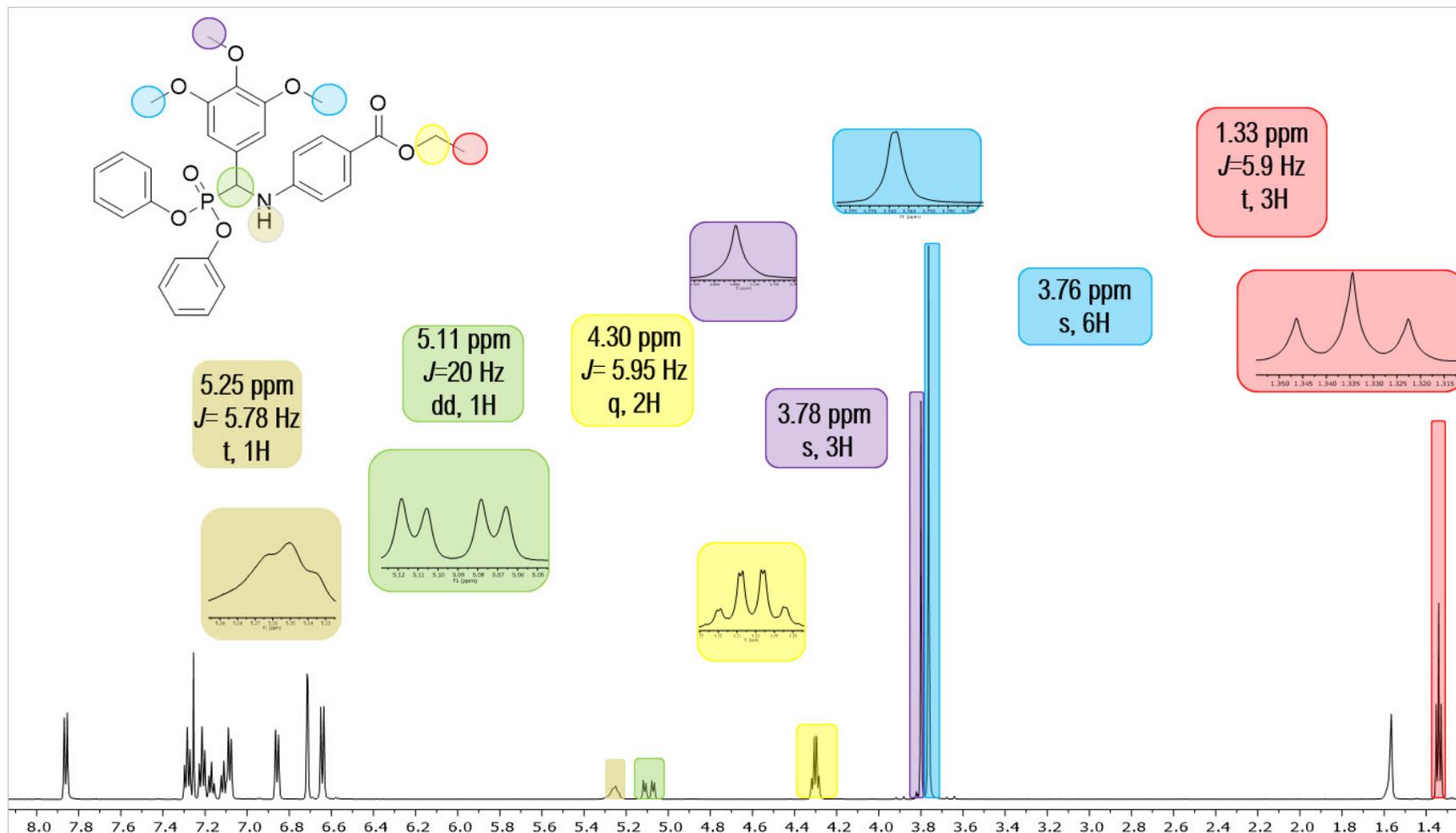


Figura 74. Espectro de RMN ^1H del compuesto A-002 (primera parte)

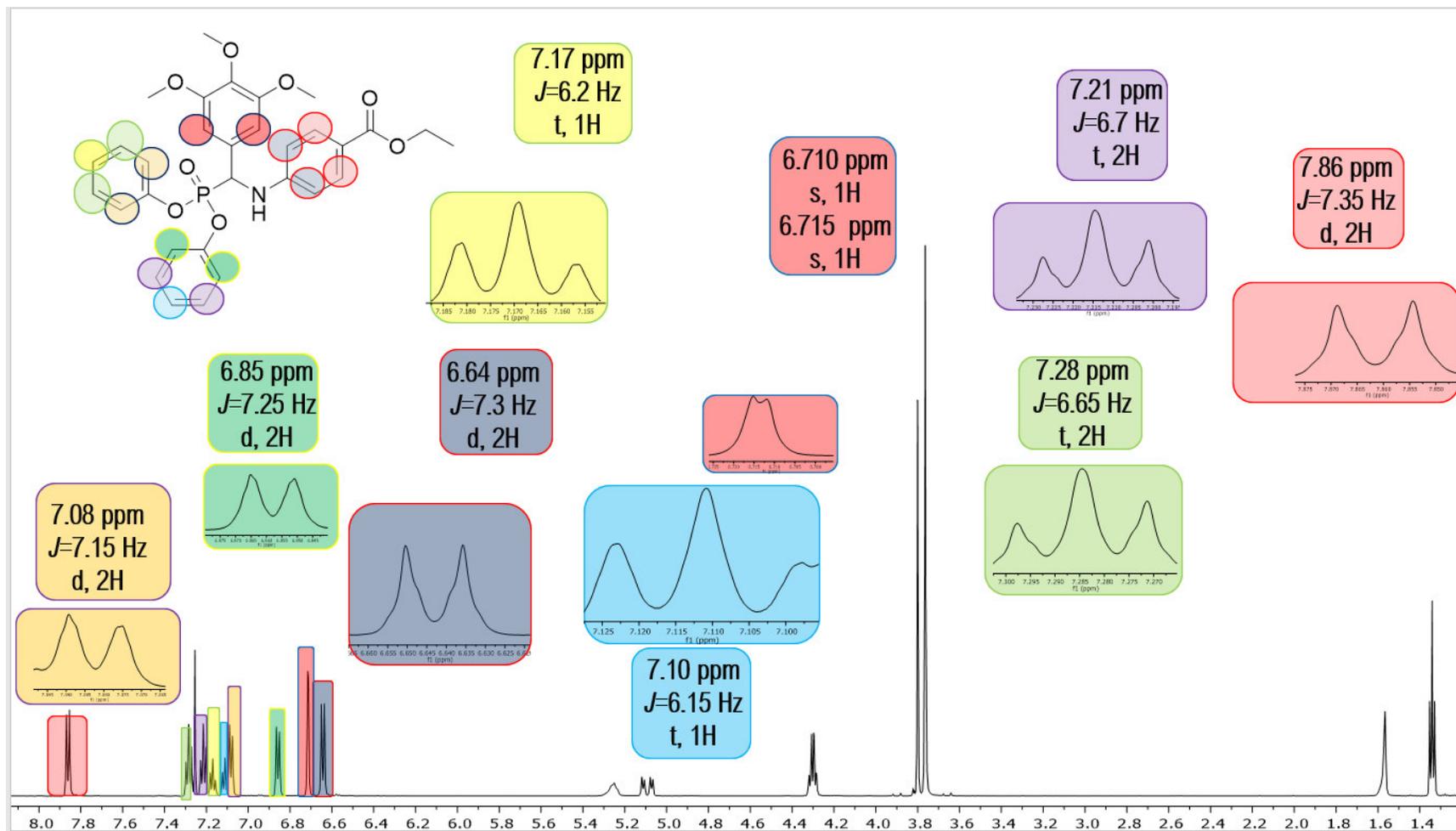


Figura 75. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-002 (segunda parte)

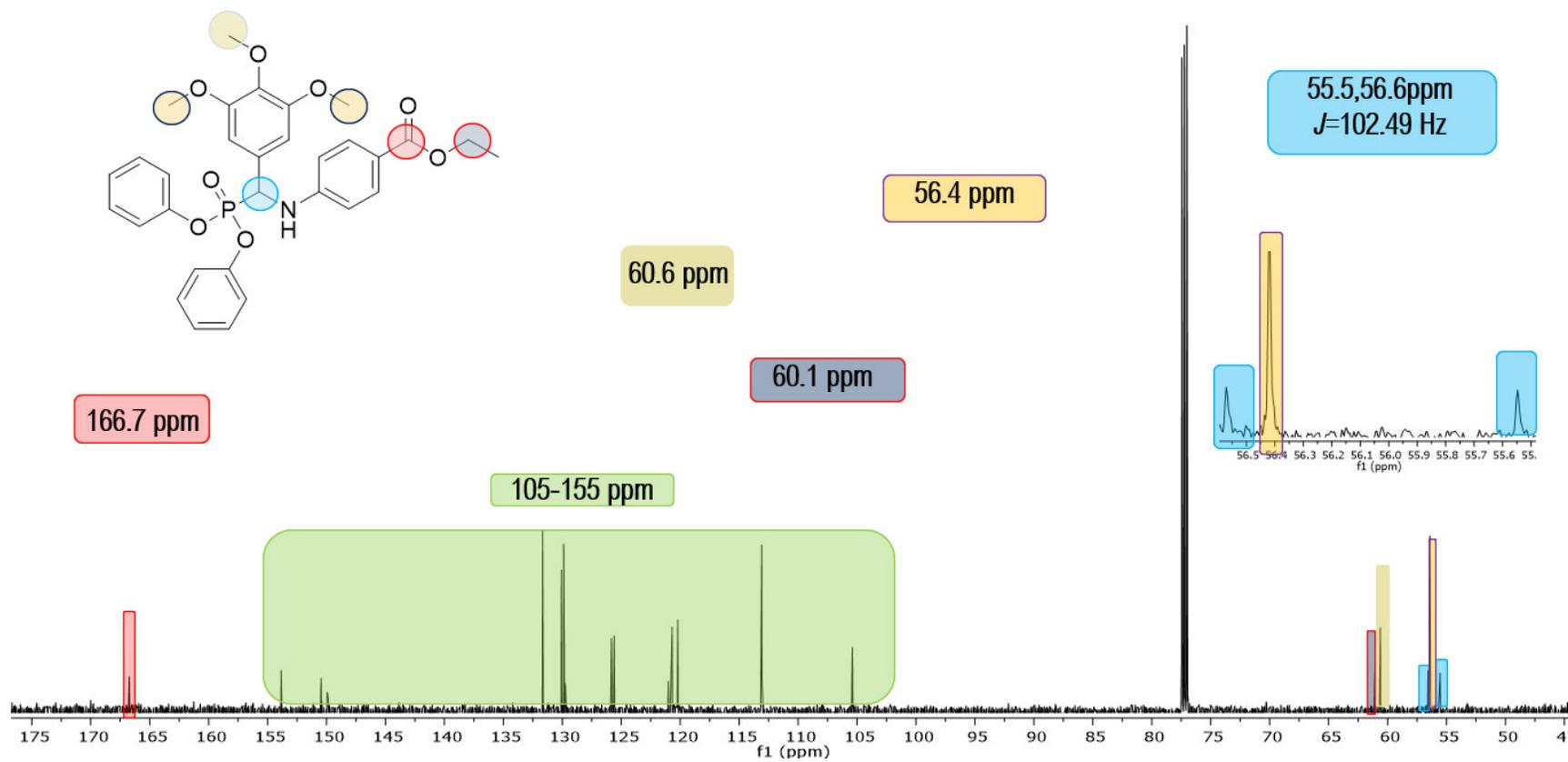


Figura 76. Espectro de RMN ¹³C del compuesto A-002

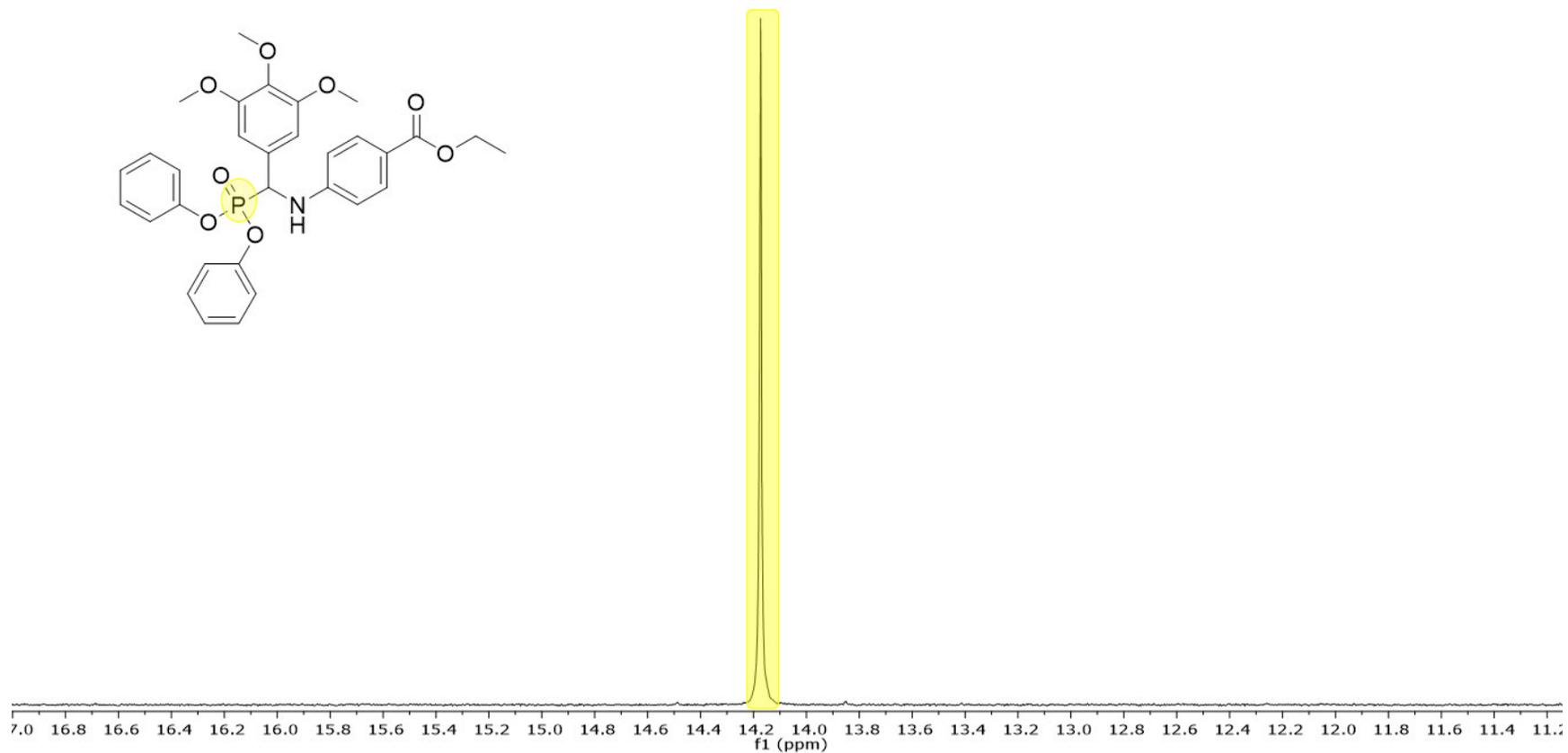


Figura 77. Espectro de RMN ^{31}P del compuesto A-002

1H_EHF-652_08032019
EHF-652

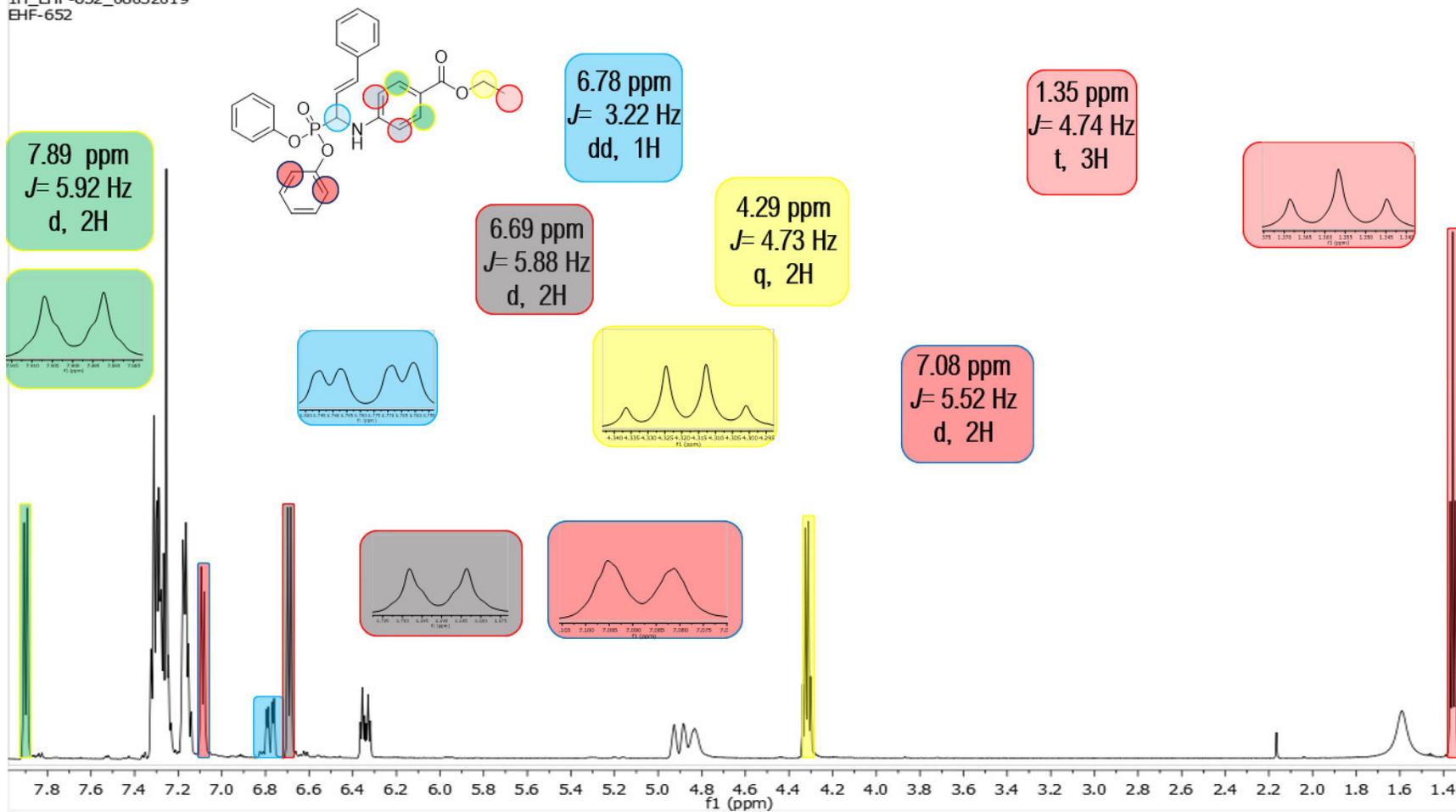


Figura 78. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-003 (primera parte).

1H_EHF-652_08032019
EHF-652

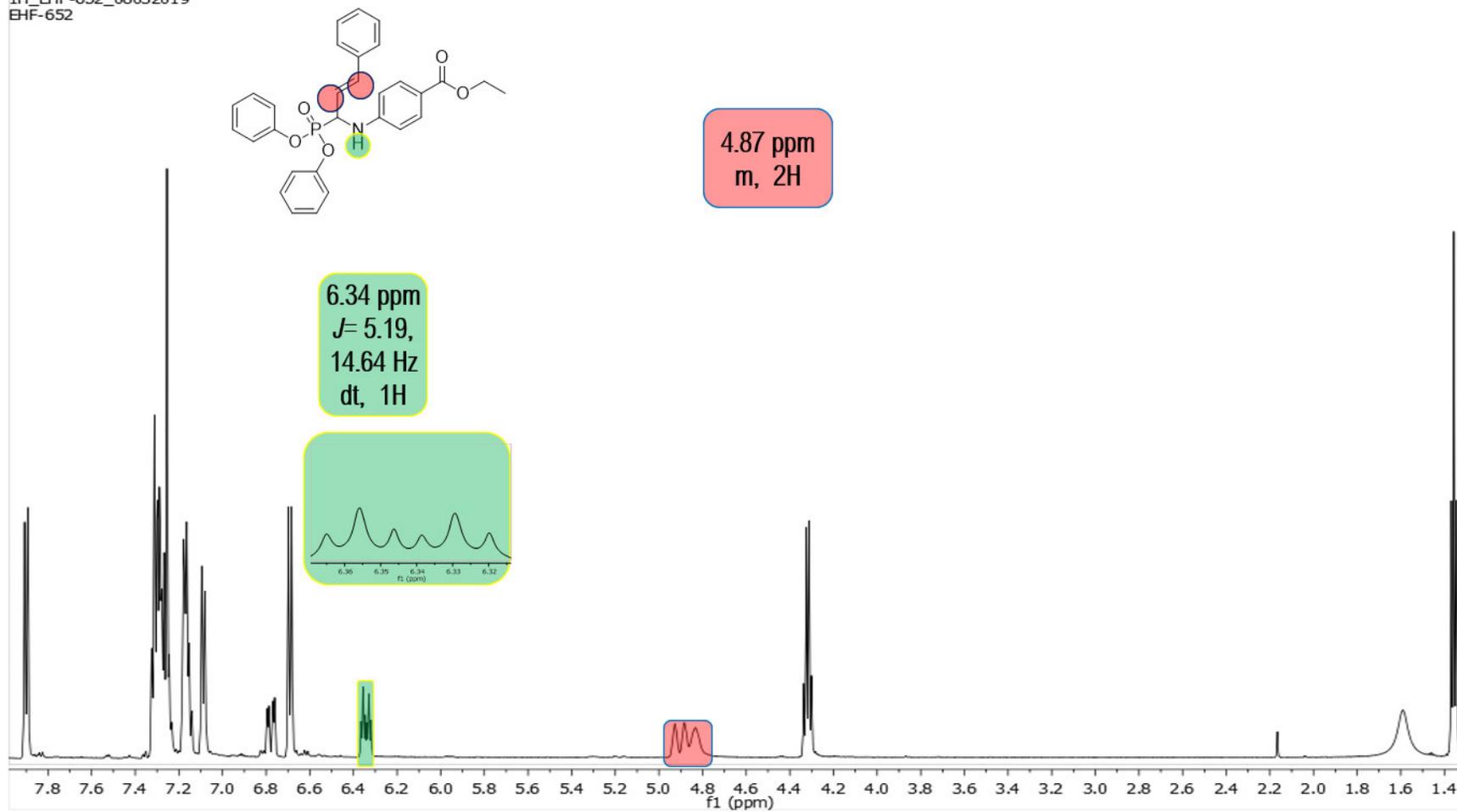


Figura 79. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-003 (segunda parte).

13C_EHF-652_08032019
EHF-652

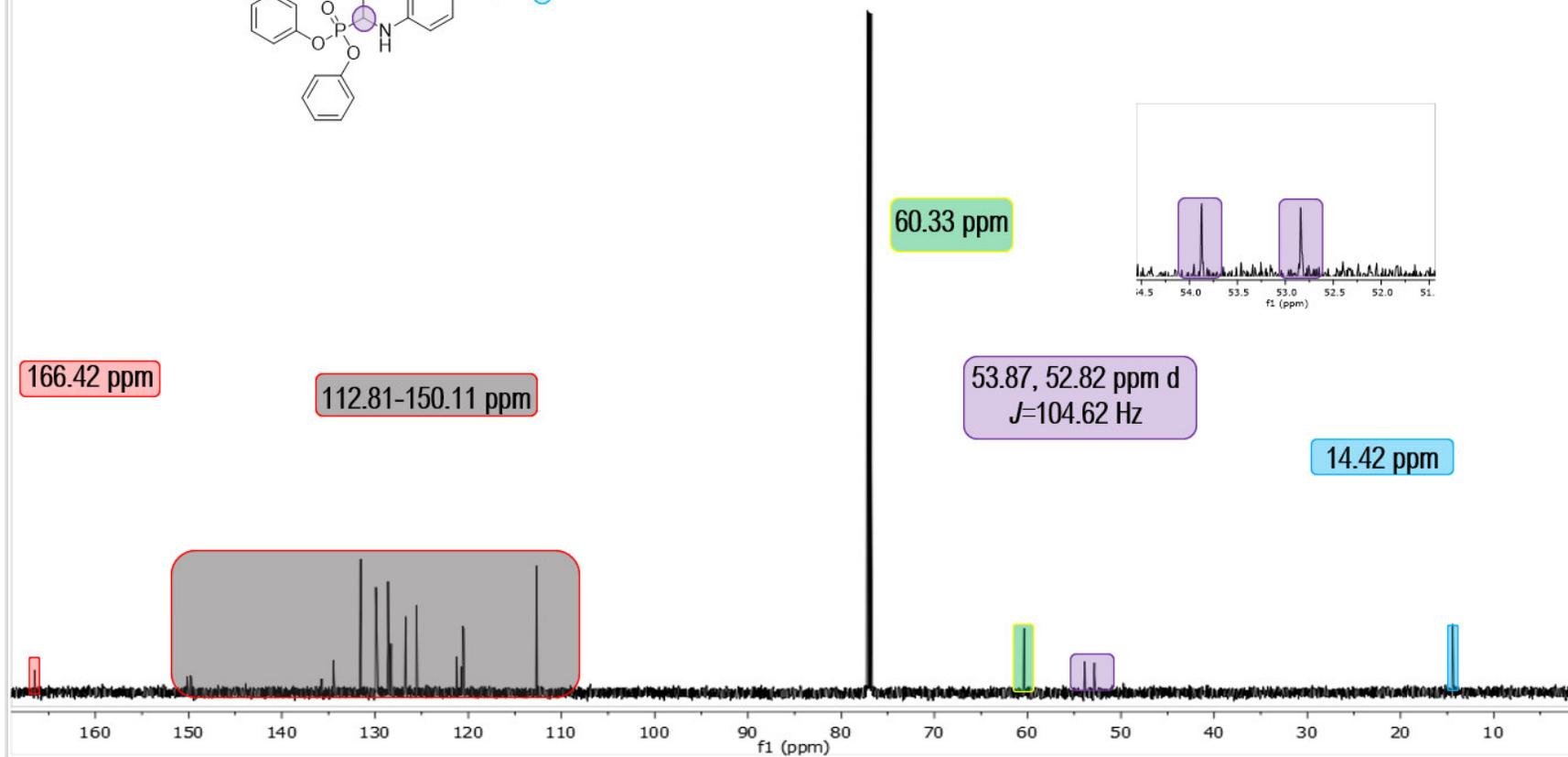
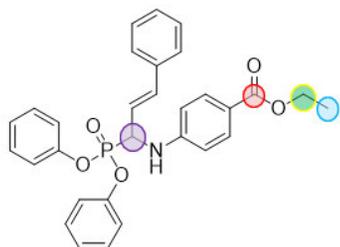


Figura 80. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto A-003

1H_EHF-648_08032019
EHF-648

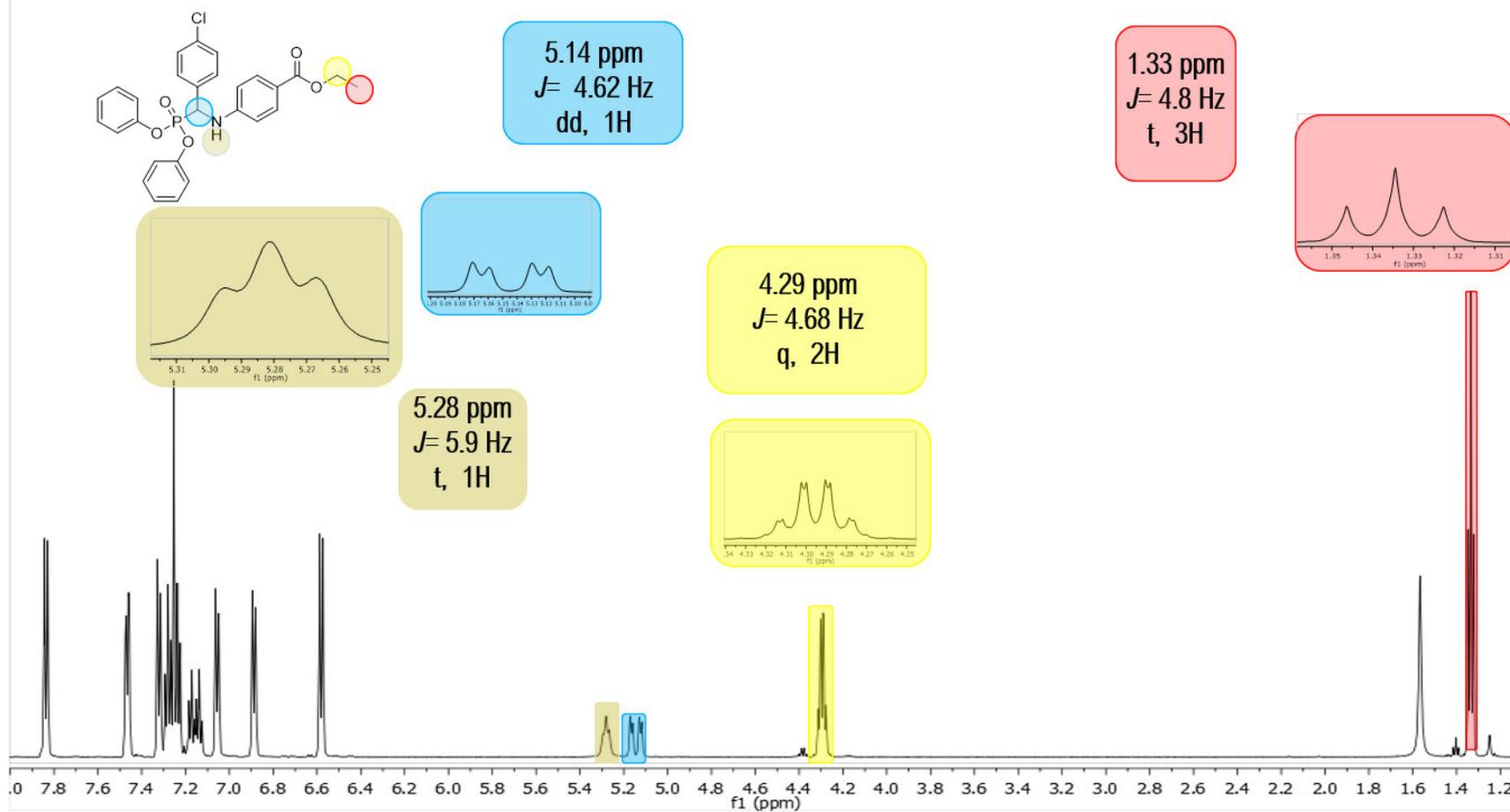


Figura 82. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-004 (primera parte).

1H_EHF-648_08032019
EHF-648

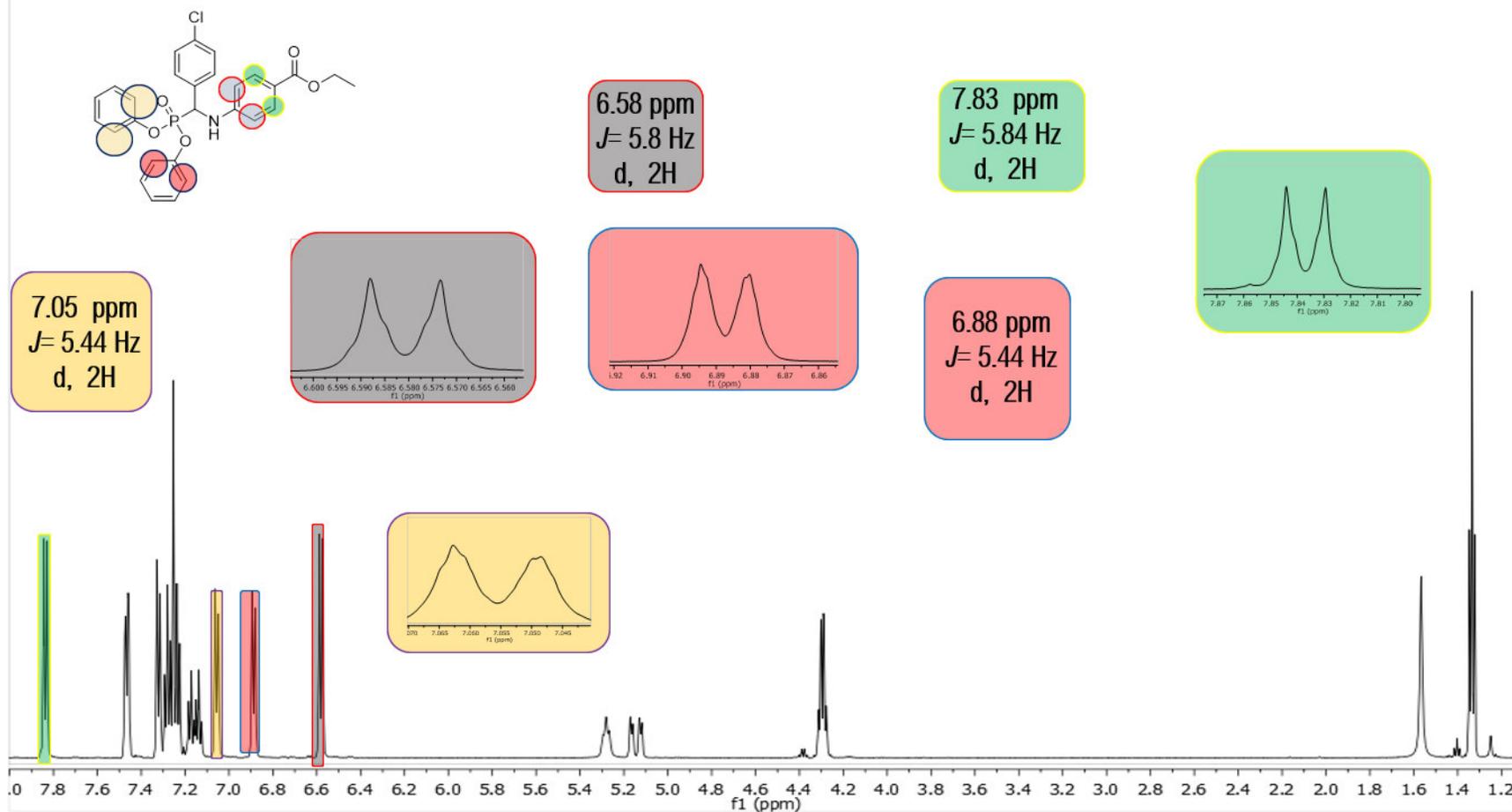


Figura 83. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-004 (segunda parte).

1H_EHF-648_08032019
EHF-648

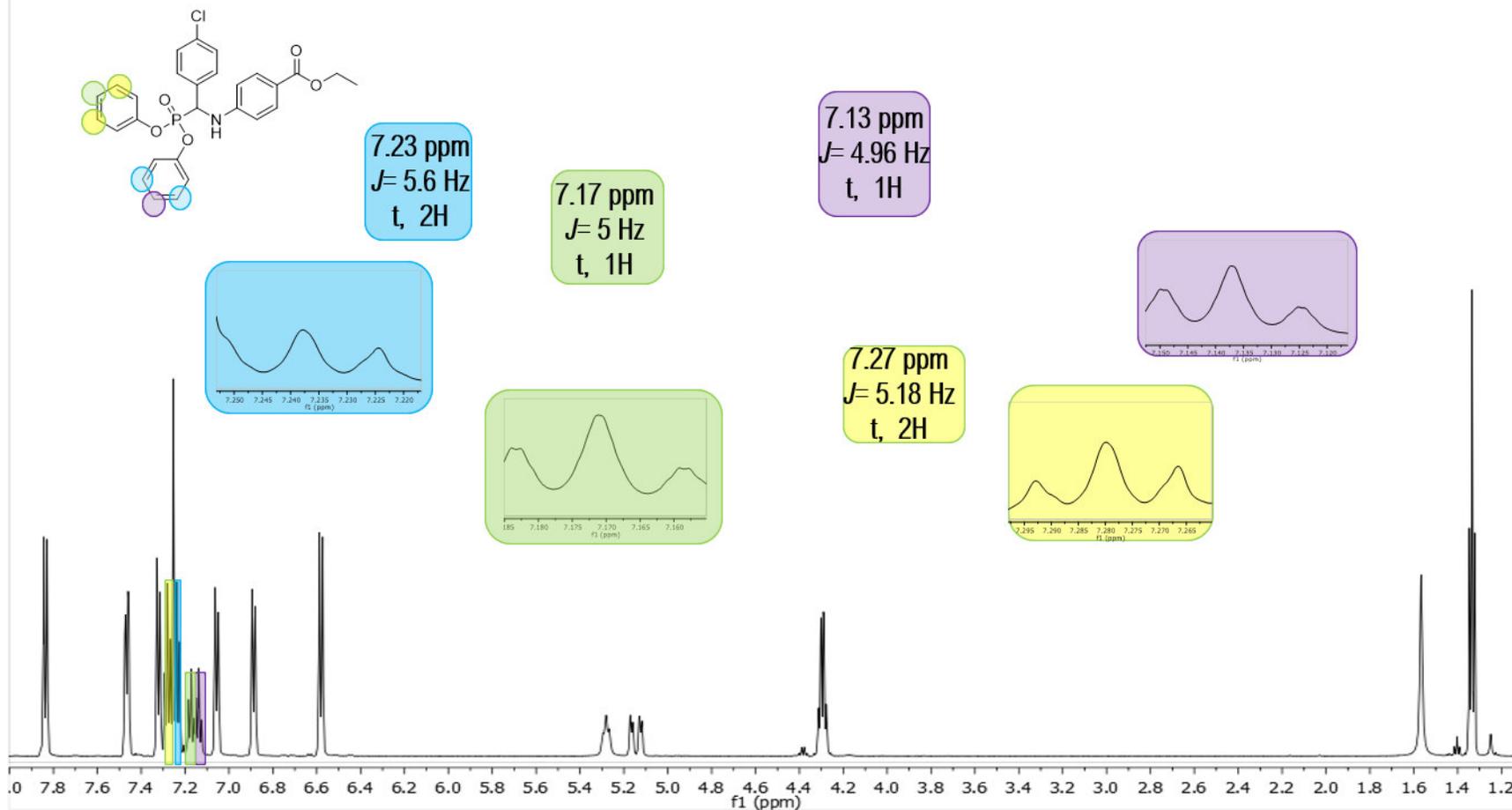


Figura 84. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-004 (tercera parte).

1H_EHF-648_08032019
EHF-648

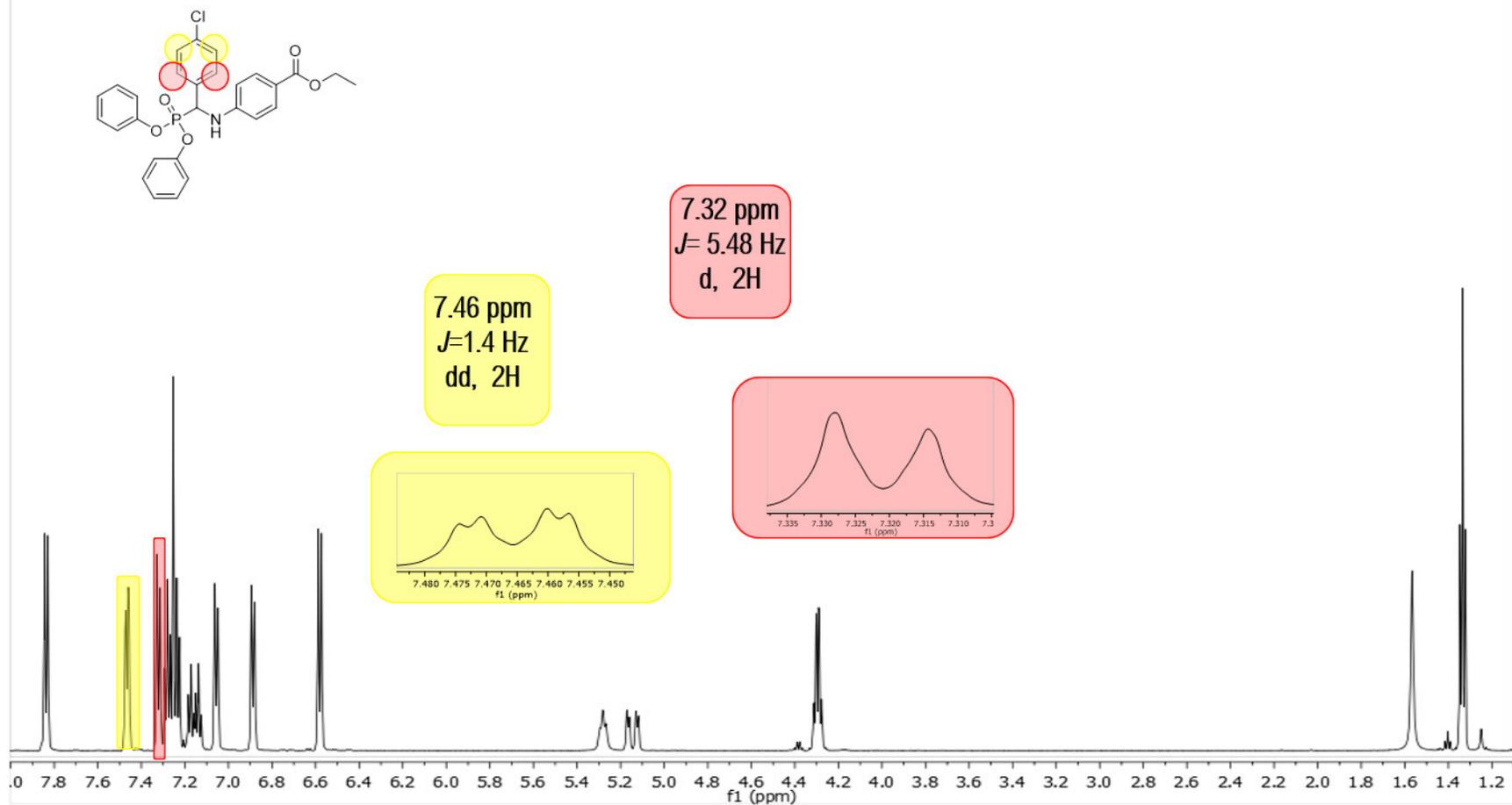


Figura 85. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-004 (cuarta parte).

13C_EHF-648_08032019
EHF-647

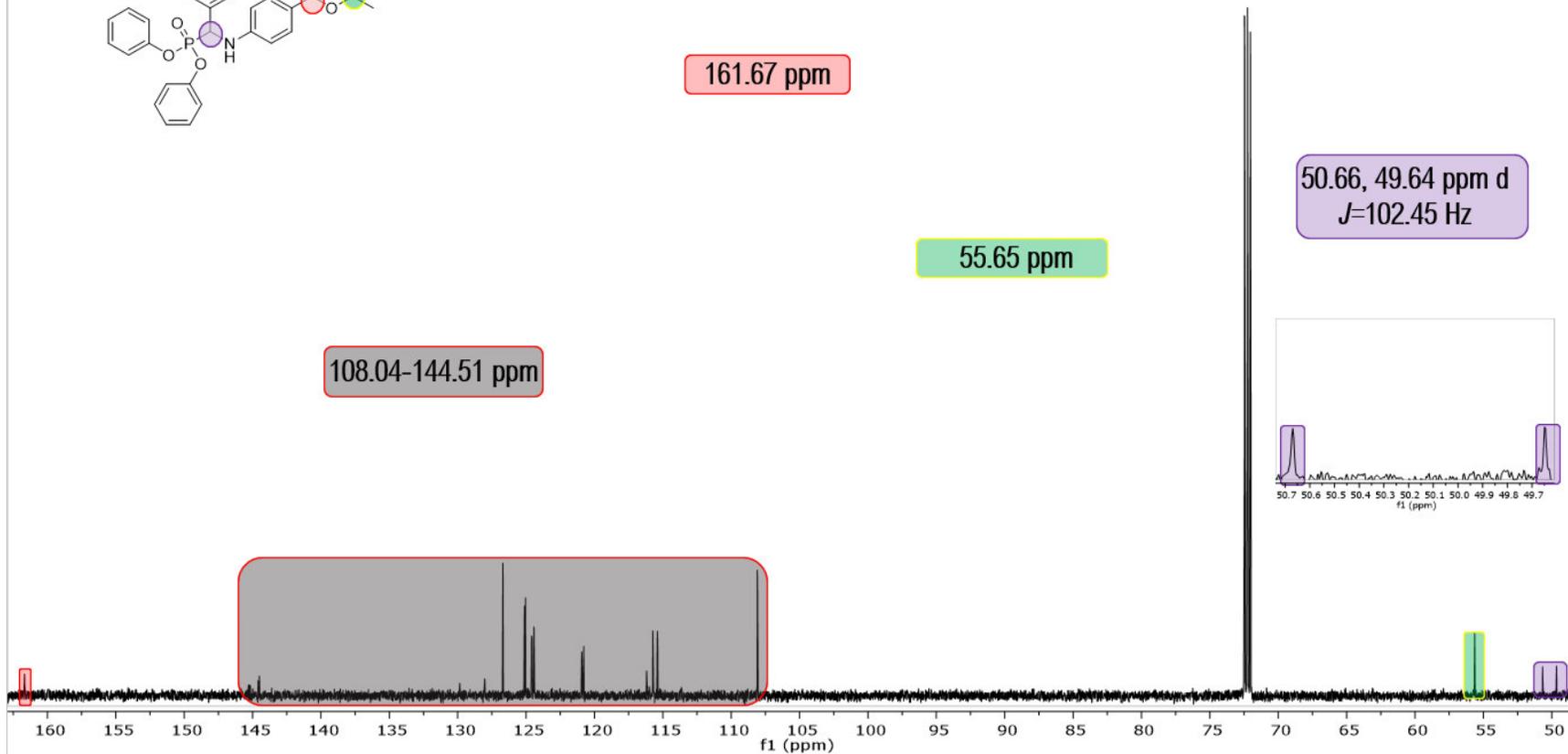
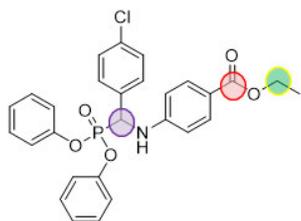


Figura 86. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto A-004.

31P_EHF-648_14032019
EHF-648

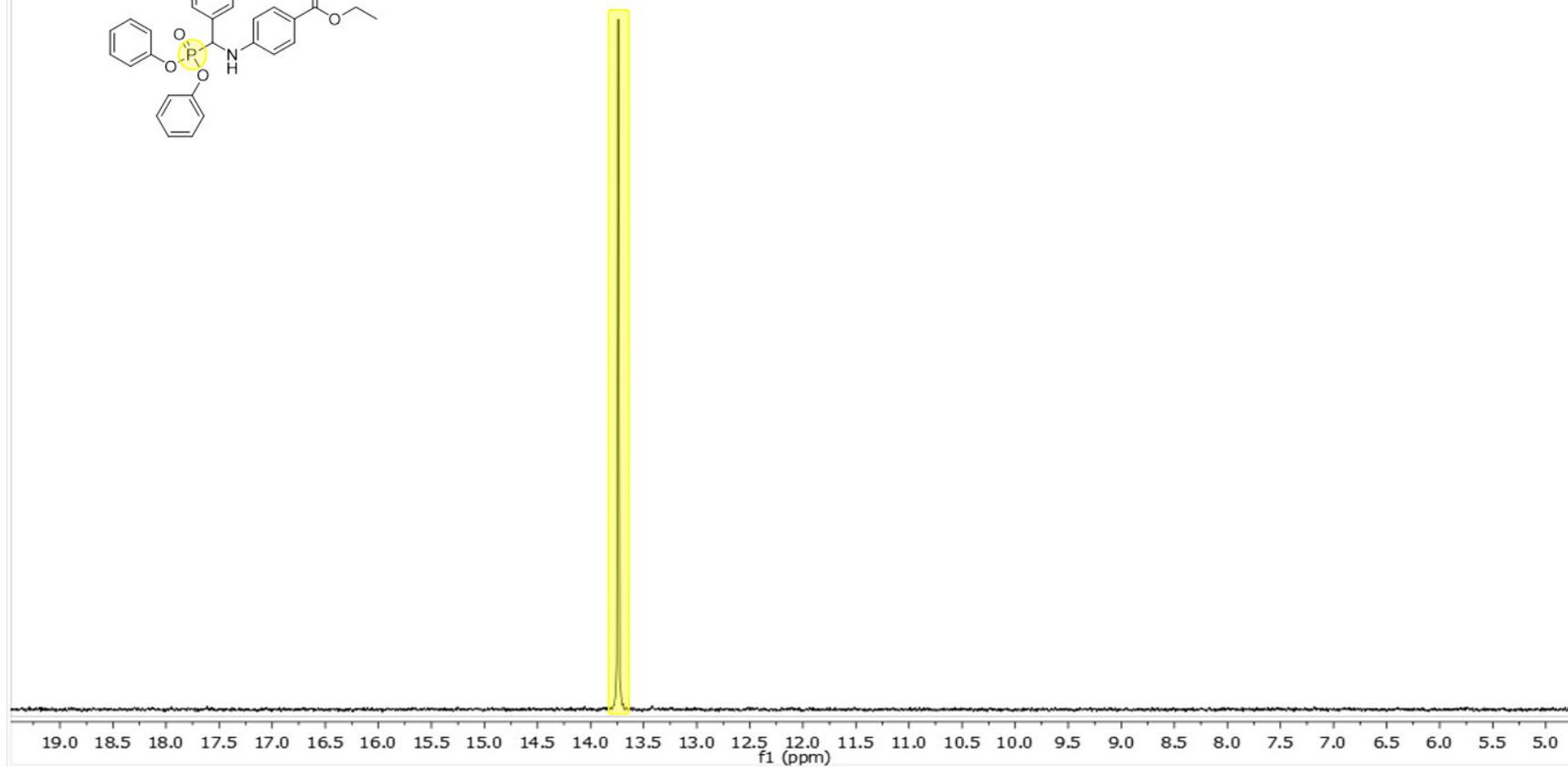
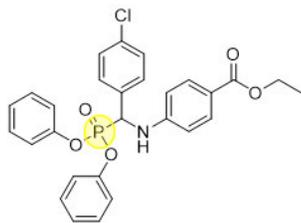


Figura 87. Espectro de RMN ³¹P del compuesto A-004.

Espectro protón
EHF-651

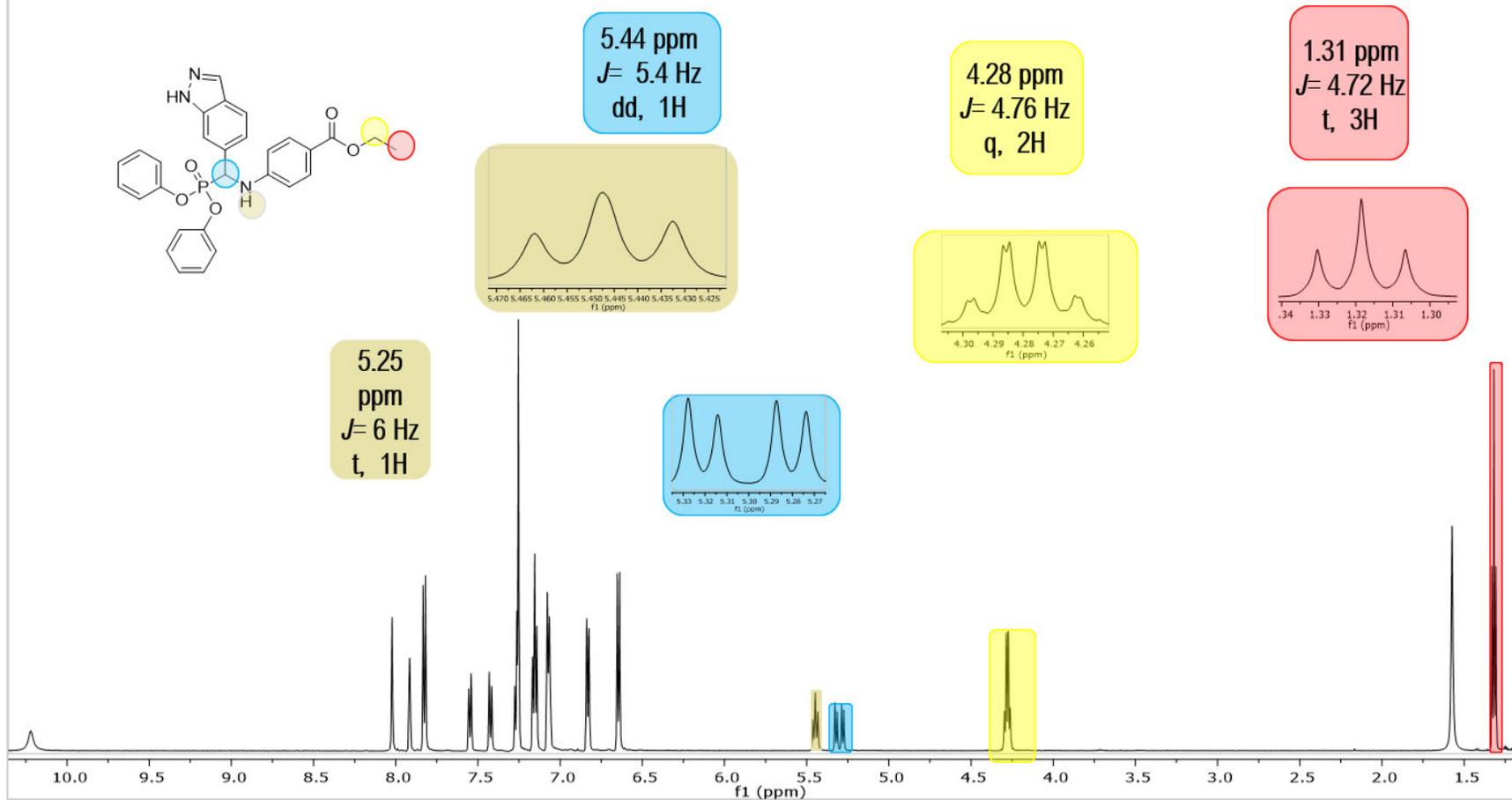


Figura 88. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-005 (primera parte).

Espectro protón
EHF-651

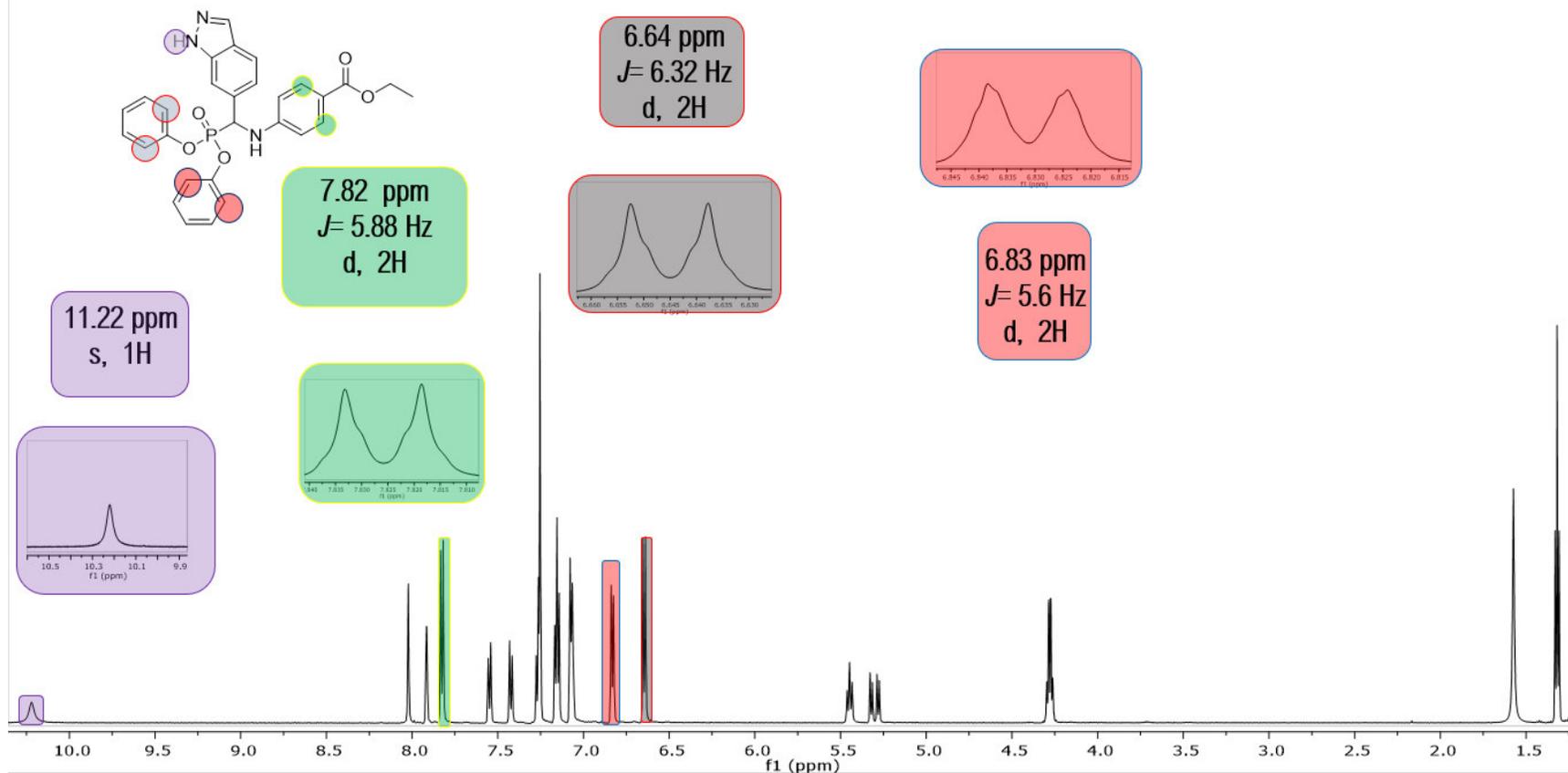


Figura 89. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-005 (segunda parte).

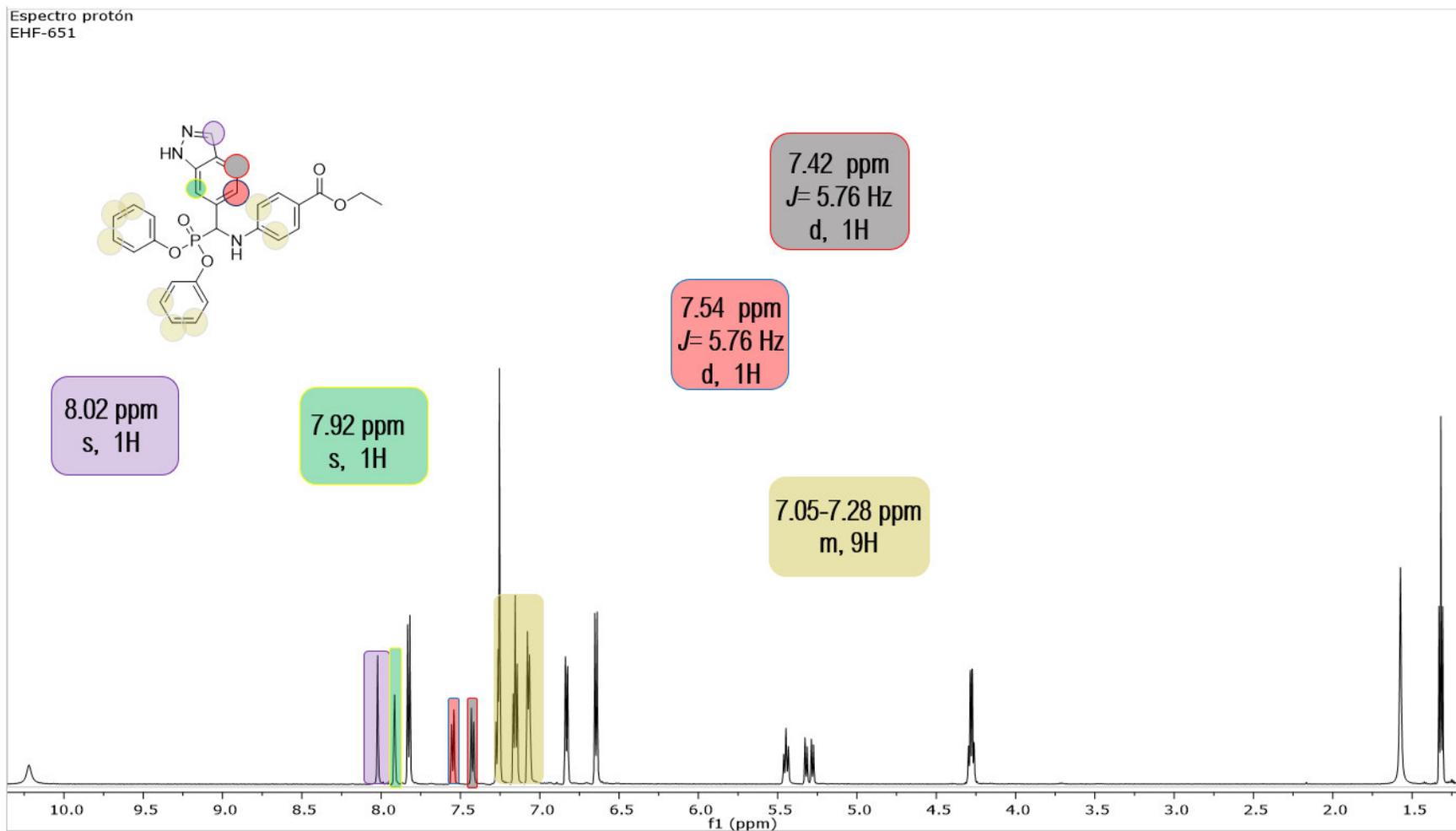


Figura 90. Espectro de RMN ¹H del compuesto A-005 (tercera parte).

13C_EHF-651_08032019
EHF-651

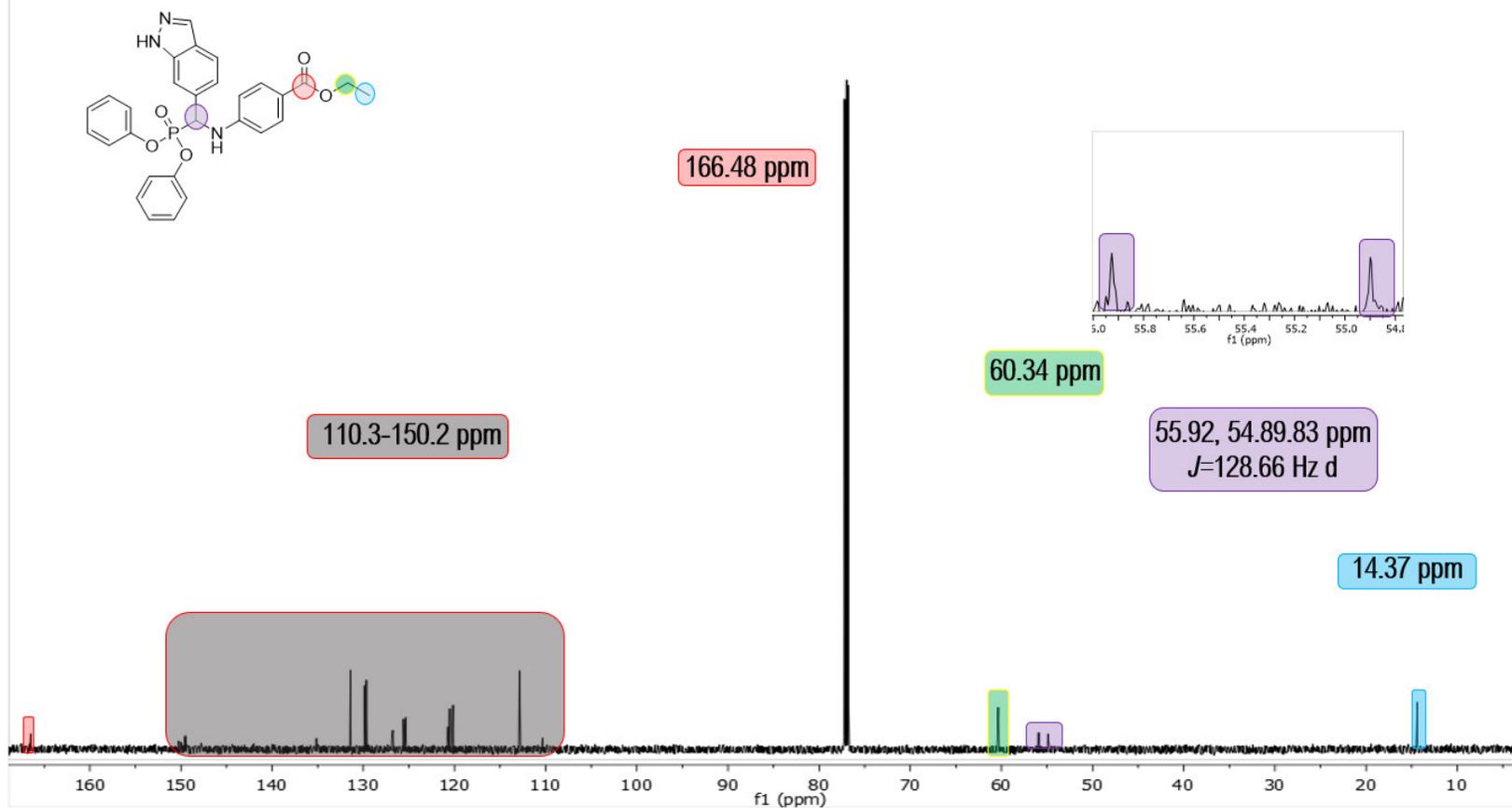


Figura 91. Espectro de RMN ¹³C del compuesto A-005.

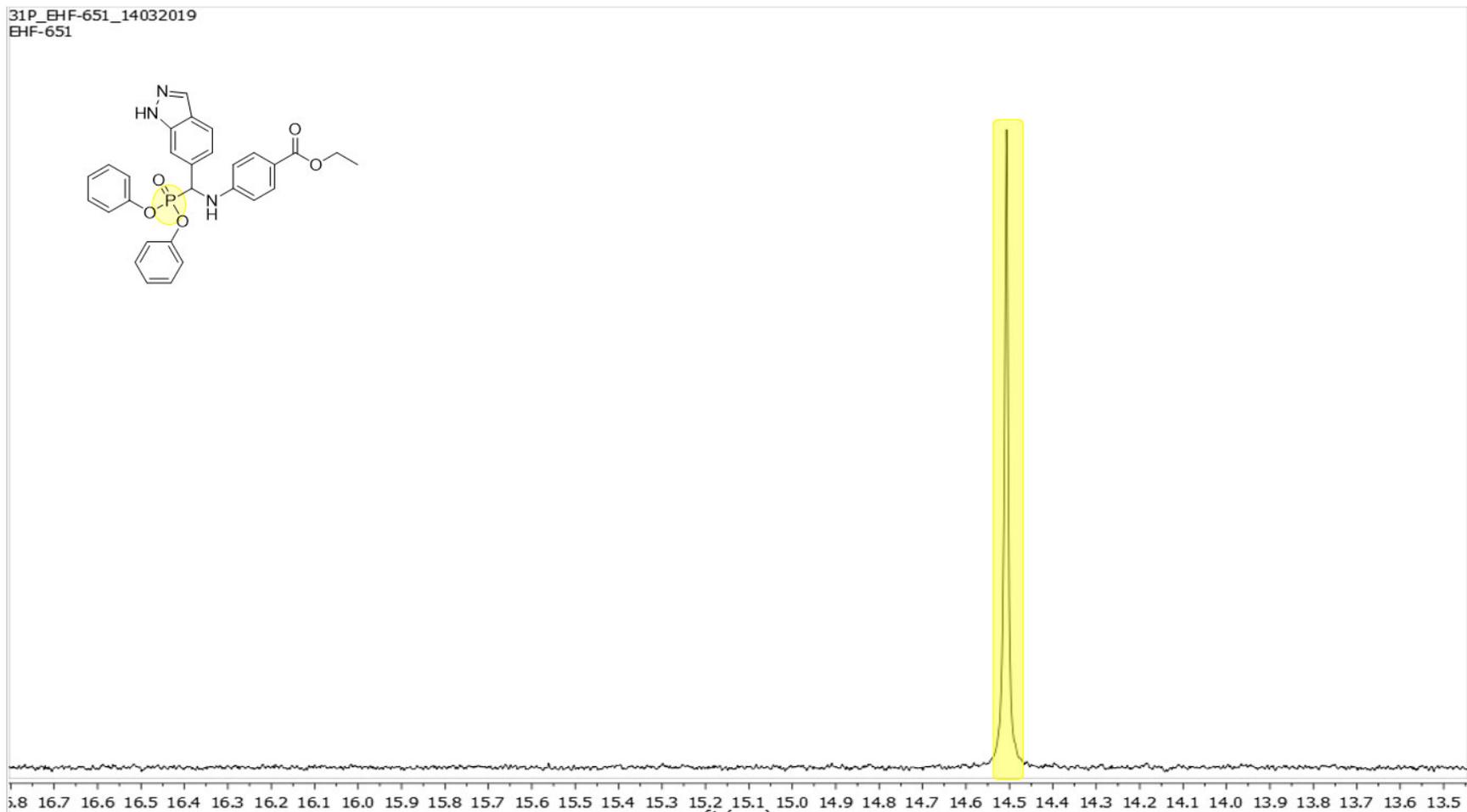


Figura 92. Espectro de RMN ^{31}P del compuesto A-005.

REFERENCIAS

1. Grant SS, Hung DT. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013;4(4):273-83.
2. OMS. Las diez principales causas de muerte 2018 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>].
3. OMS. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos 2017 [Available from: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>].
4. IHME. What causes the most deaths? 2017 [Available from: <http://www.healthdata.org/mexico>].
5. Arias-Flores R, Rosado-Quiab U, Vargas-Valerio A, Grajales-Muñiz C. Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2016;54(1):20-4.
6. Alós J-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2015;33(10):692-9.
7. OMS. Resistencia a los antibióticos 2018 [Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>].
8. Cole ST. Who will develop new antibacterial agents? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2014;369(1645):20130430.
9. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS microbiology*. 2018;4(3):482.
10. te Winkel JD, Gray DA, Seistrup KH, Hamoen LW, Strahl H. Analysis of antimicrobial-triggered membrane depolarization using voltage sensitive dyes. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2016;4:29.
11. Lin J, Zhou D, Steitz TA, Polikanov YS, Gagnon MG. Ribosome-targeting antibiotics: modes of action, mechanisms of resistance, and implications for drug design. *Annual review of biochemistry*. 2018;87:451-78.
12. Murima P, McKinney JD, Pethe K. Targeting bacterial central metabolism for drug development. *Chemistry & biology*. 2014;21(11):1423-32.

13. Abdel-Megeed MF, Badr BE, Azaam MM, El-Hiti GA. Synthesis, antimicrobial and anticancer activities of a novel series of diphenyl 1-(pyridin-3-yl) ethylphosphonates. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2012;20(7):2252-8.
14. Mucha A, Kafarski P, Berlicki Ł. Remarkable potential of the α -aminophosphonate/phosphinate structural motif in medicinal chemistry. *Journal of medicinal chemistry*. 2011;54(17):5955-80.
15. Maddina VA, Kalyankar MB, Kulkarni P. One-pot and catalyst-free synthesis of novel α -aminophosphonates under microwave irradiation and their Bio-activity. *IOSR J Pharm Biol Sci*. 2014;9:16-9.
16. Reddy GS, Rao KUM, Sundar CS, Sudha SS, Haritha B, Swapna S, et al. Neat synthesis and antioxidant activity of α -aminophosphonates. *Arabian Journal of Chemistry*. 2014;7(5):833-8.
17. Keglevich G, Bálint E. The Kabachnik–Fields reaction: Mechanism and synthetic use. *Molecules*. 2012;17(11):12821-35.
18. 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 and the Related Elements*. 2016;191(8):1081-5.
19. Salgado-Escobar O, Hernández-Guadarrama A, Romero-Estudillo I, Linzaga-Elizalde I. Direct Synthesis of Phosphonates and α -Amino-phosphonates from 1, 3-Benzoxazines. *Molecules*. 2019;24(2):294.
20. Buonerba F, Lepri S, Goracci L, Schindler BD, Seo SM, Kaatz GW, et al. Improved potency of indole-based NorA efflux pump inhibitors: from serendipity toward rational design and development. *Journal of medicinal chemistry*. 2017;60(1):517-23.
21. Yuan W, Yu Z, Song W, Li Y, Fang Z, Zhu B, et al. Indole-core-based novel antibacterial agent targeting FtsZ. *Infection and drug resistance*. 2019;12:2283.
22. Farooqui M, Ali NAS, Zaheer Z, Rahman ZU, Khan A. Synthesis, Anti-bacterial, Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Some New Biologically Important Indazole Derivatives.
23. Malapati P, Krishna VS, Dharmarajan S. Identification and development of novel indazole derivatives as potent bacterial peptidoglycan synthesis inhibitors. *International journal of mycobacteriology*. 2018;7(1):76.
24. Ooi LS, Li Y, Kam S-L, Wang H, Wong EY, Ooi VE. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *The American journal of Chinese medicine*. 2006;34(03):511-22.

25. Doyle AA, Stephens JC. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*. 2019;139:104405.
26. Rigsby RE, Parker AB. Using the P y MOL application to reinforce visual understanding of protein structure. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2016;44(5):433-7.
27. Ravi L, Krishnan K. A handbook on protein-ligand docking tool: Autodock4. *Innov J Med Sci*. 2016;4:1-6.
28. Rafael'A C, Galkin VI. The Kabachnik–Fields reaction: synthetic potential and the problem of the mechanism. *Russian Chemical Reviews*. 1998;67(10):857-82.
29. Cordero DA. Síntesis y caracterización de una serie de α -aminofosfonatos y una serie de ácidos α aminofosfínicos y evaluación. *in vitro* de su actividad antifúngica Universidad Autónoma de Nuevo León; 2018.
30. Ying A, Liu S, Yang J, Hu H. Synthesis of α -Amino Phosphonates under a Neat Condition Catalyzed by Multiple-Acidic Ionic Liquids. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2014;53(42):16143-7.
31. Karimi-Jaberi Z, Bazayar L, Amiri M. SYNTHESIS OF alpha-AMINOPHOSPHONATES IN THE PRESENCE OF TRIETHYLAMMONIUM HYDROGEN SULFATE [Et₃NE][HSO₄] AS A HIGHLY EFFICIENT IONIC LIQUID CATALYST. *REVUE ROUMAINE DE CHIMIE*. 2017;62(1):23-6.
32. Tajti Á, Szatmári E, Perdih F, Keglevich G, Bálint E. Microwave-Assisted Kabachnik–Fields Reaction with Amino Alcohols as the Amine Component. *Molecules*. 2019;24(8):1640.
33. Tiwari SV, Sharif NS, Gajare RI, Vazquez JAS, Sangshetti JN, Damale MD, et al. New 2-oxoindolin phosphonates as novel agents to treat cancer: a green synthesis and molecular modeling. *Molecules*. 2018;23(8):1981.
34. Bálint E, Tripolszky A, Hegedűs L, Keglevich G. Microwave-assisted synthesis of N, N-bis (phosphinoylmethyl) amines and N, N, N-tris (phosphinoylmethyl) amines bearing different substituents on the phosphorus atoms. *Beilstein journal of organic chemistry*. 2019;15(1):469-73.
35. Ihammi A, Chigr M, Ketatni EM, Saadi M, El Ammari L, Rakib EM. Synthesis of new α -amino-1H indazolyl-phosphonate derivatives: Crystal structure, Hirshfeld surface analysis and DFT studies. *Journal of Molecular Structure*. 2020:128702.
36. Skagseth S, Akhter S, Paulsen MH, Muhammad Z, Lauksund S, Samuelsen , et al. Metallo- β -lactamase inhibitors by bioisosteric replacement: Preparation, activity and binding. *European journal of medicinal chemistry*. 2017;135:159-73.
37. Loredó-Calderón EL, Velázquez-Martínez CA, Ramírez-Cabrera MA, Hernández-Fernández E, Rivas-Galindo VM, Espinoza EA, et al. Synthesis of novel

α -aminophosphonates under microwave irradiation, biological evaluation as antiproliferative agents and apoptosis inducers. *Medicinal Chemistry Research*. 2019;28(11):2067-78.