

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**NUEVAS SERIES DE  $\alpha$ -AMINOFOSFONATOS Y ÁCIDOS  $\alpha$ -AMINOFOSFÓNICOS MONOHIDROLIZADOS: SÍNTESIS, MODELADO MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FRENTE A HONGOS FILAMENTOSOS DEL GÉNERO *Scedosporium*.**

**Por:**

**M.C. Anthony Cordero Díaz**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS  
con orientación en Farmacia**

**Octubre, 2022**

**“NUEVAS SERIES DE  $\alpha$ -AMINOFOSFONATOS Y ÁCIDOS  $\alpha$ -AMINOFOSFÓNICOS MONOHIDROLIZADOS: SÍNTESIS, MODELADO MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FRENTE A HONGOS FILAMENTOSOS DEL GÉNERO *Scedosporium*.”**

Aprobación de la Tesis:

---

**Dra. Susana Thelma López Cortina**

---

**Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas**

---

**Dra. Patricia Cristina Esquivel Ferriño**

---

**Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís**

---

**Dra. María Elena Cantú Cárdenas**

**Sub-Director de estudios de posgrado**

## RESUMEN

**Nombre: Anthony Cordero Díaz      Fecha de graduación: octubre 2022**

**Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**Facultad de Ciencias Químicas.**

**Título del Estudio: NUEVAS SERIES DE  $\alpha$ -AMINOFOSFONATOS Y ÁCIDOS  $\alpha$ -AMINOFOSFÓNICOS MONOHIDROLIZADOS: SÌNTESES, MODELADO MOLECULAR Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FRENTE A HONGOS FILAMENTOSOS DEL GÉNERO *Scedosporium*.**

**Número de páginas: 113**

**Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con orientación en farmacia.**

**Área de estudio: Síntesis de moléculas con actividad biológica.**

**Propósito y método de estudio:** El género *Scedosporium* ha cobrado gran importancia médica en años recientes debido al aumento de casos reportados de enfermedades causadas por este hongo. Su carácter patogénico, la alta virulencia, su multirresistencia ante antifúngicos convencionales y su alta tasa de

mortalidad en pacientes inmunocomprometidos hace necesaria la búsqueda de nuevos antifúngicos para el tratamiento de las micosis causadas por los hongos que conforman a este género.

Una posible alternativa terapéutica para este problema son los  $\alpha$ -aminofosfonatos y los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados de los cuales se ha reportado una amplia actividad biológica incluyéndose como antifúngicos. Debido a esto el objetivo del presente proyecto fue la síntesis de nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos y ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos y su evaluación *in vitro* de su actividad antifúngica contra cepas del género *Scedosporium*. Para ello se realizó la síntesis de los  $\alpha$ -aminofosfonatos por medio de la reacción de Kabachnik-Fields en la que se hace reaccionar: 4-etilaminobenzoato, difenilfosfita y un aldehído. Posteriormente se realizó una hidrólisis básica de los  $\alpha$ -aminofosfonatos con carbonato de potasio para la obtención de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos. La purificación se llevó a cabo por filtración al vacío, recristalización y cromatografía en columna. Se evaluó su actividad antifúngica contra 23 cepas del género *Scedosporium* mediante el método de difusión en agar y por macrodilución siguiendo el protocolo M38-A2 avalado por el Instituto de Estandarización Clínica y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés).

**Contribuciones y Conclusiones:** Se sintetizaron y purificaron seis  $\alpha$ -aminofosfonatos y seis ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados, posteriormente fueron caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  y espectroscopia de masas de alta resolución corroborando la estructura de los compuestos

planteados en este proyecto. El compuesto **32f** presentó mejor actividad antifúngica que el voriconazol (VRC) por el método de difusión en agar, posteriormente se evaluó por el método de macrodilución, siguiendo el protocolo M38-A2, y su rango de actividad fue de 648.6-700  $\mu\text{g/mL}$ , la citotoxicidad de este compuesto fue menor a la del VRC contra células sanas COS-7, finalmente se realizó un estudio de este compuesto por modelado molecular que demostró que su posible mecanismo de acción es por inhibición alostérica de la Lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa, enzima importante en la síntesis de ergosterol, componente clave de la pared celular de los hongos, su deficiencia provoca poros en la pared celular ocasionando la muerte por presión osmótica.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a quienes han estado conmigo a lo largo de mi desarrollo no solo académico sino también personal y que han sentado las bases para seguir creciendo en los diversos aspectos de mi vida.

Agradezco a la Doctora Susana López Cortina por su apoyo y asesoría en el desarrollo de este proyecto y por haberme permitido formar parte del equipo de Síntesis Orgánica.

A la Doctora Mariana Elizondo Zertuche y al Doctor Efrén Robledo Leal por formar parte de este proyecto, por sus asesorías, y por su apoyo en las dudas que me surgían durante el proyecto, así como por permitirme trabajar en los laboratorios de la Facultad de Medicina y de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Al Doctor Emanuel Hernández Núñez y al Doctor Eugenio Hernández por su apoyo en el estudio de Modelado molecular y en la interpretación de espectros, respectivamente, apoyo sin el cual no hubiera sido posible la conclusión de este proyecto.

A mí comité tutorial; a la Doctora Lucía, a la Doctora Patricia, al Doctor Francisco, porque gracias a sus observaciones en las reuniones el proyecto se pudo enriquecer.

Al Doctor Michel Heya y al Doctor Raúl, no solo colegas sino también grandes amigos con los que compartí momentos de diversión y también pláticas de intercambio de conocimiento.

A mis padres; Antonia Díaz Torres y Rubén Cordero Muñoz por su apoyo en el desarrollo de mis proyectos y por estar en momentos claves de mi vida, a mis hermanos Claudia y Daniel por su apoyo en los momentos difíciles y por las risas y enojos que hemos vivido.

Finalmente agradecer a la Facultad de Ciencias Químicas, La Facultad de Medicina, La Facultad de Ciencias Biológicas y a CONACYT por la beca otorgada sin la cual no se hubiera podido desarrollar este proyecto.

## Tabla de contenido

NOMENCLATURA.....	xv
CAPÍTULO 1 .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Género <i>Scedosporium</i> .....	3
1.1.1 Infecciones causadas por el género <i>Scedosporium</i> .....	4
1.1.2 Prevalencia del género <i>Scedosporium</i> en México. ....	5
1.2 $\alpha$ -aminofosfonatos y ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.....	8
1.2.1 Estudios <i>in vitro</i> para la evaluación de $\alpha$ -aminofosfonatos y ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados .....	9
1.3 Estudios de modelado molecular.....	11
CAPÍTULO 2 .....	13
ANTECEDENTES.....	13
2.1 Síntesis de $\alpha$ -aminofosfonatos y actividad antifúngica .....	13
2.2 Síntesis y actividad biológica de ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados. ....	19
2.3 Antifúngicos comerciales .....	22
2.4 Estudios de susceptibilidad <i>in vitro</i> del género <i>Scedosporium</i> .....	23
2.5 Modelado molecular <i>in silico</i> de $\alpha$ -aminofosfonatos .....	24
2.7 Análisis crítico de la literatura.....	26



CAPÍTULO 3.....	28
APORTACIÓN CIENTÍFICA .....	28
3.1 Justificación.....	28
3.2 Hipótesis.....	28
3.3 Objetivo general.....	29
3.4 Objetivos específicos.....	29
Síntesis: .....	29
Actividad biológica: .....	29
CAPÍTULO 4.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
4.1. Materiales, Reactivos y Equipos. ....	31
4.2 Síntesis de $\alpha$ -aminofosfonatos.....	33
4.3 Síntesis de ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados. ....	34
4.4 Purificación de las series 1 y 2 .....	35
4.5 Caracterización de las dos series .....	35
4.6 Pruebas biológicas .....	35
4.6.1 Reactivación de aislamientos del género <i>Scedosporium</i> .....	36
4.6.2 Estudios de susceptibilidad <i>in vitro</i> .....	36
4.6.3 Pruebas de citotoxicidad.....	37
4.7 Estudio de Docking.....	39

4.8 Forma de manejo y disposición de los residuos generados. ....	40
4.9 Costo del proyecto .....	41
<b>CAPITULO 5</b> .....	<b>43</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>43</b>
5.1 Síntesis de $\alpha$ -aminofosfonatos.....	43
5.1.1 Purificación de los $\alpha$ -aminofosfonatos .....	49
5.1.2. Elucidación estructural de los $\alpha$ -aminofosfonatos .....	50
5.1.3. Espectrometría de Masas de alta resolución.....	55
5.2 Síntesis de ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados .....	55
5.2.1. Purificación de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.....	57
5.2.2. Elucidación estructural de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.....	58
5.2.3. Espectrometría de Masas de alta resolución.....	63
5.3 Resultados de las pruebas biológicas.....	64
5.3.2. Determinación de la CMI <sub>100</sub> contra 23 cepas por el protocolo M38-A2 .....	68
5.3.3 Determinación de citotoxicidad de los compuestos 32a y 32f .....	70
5.4 Modelado molecular (Docking).....	72
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>76</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>76</b>
Capítulo 7. ....	79
Anexos.....	79
Resumen de los Datos espectroscópicos de los compuestos sintetizados.....	79
Referencias.....	86

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Espectro clínico de la scedosporiosis <sup>15</sup> .....	5
<b>Tabla 2.</b> Sustituyentes, tiempo de reacción y rendimientos de la síntesis reportada por Almorou. <sup>28</sup> .....	17
<b>Tabla 3.</b> Costo de materiales y reactivos del proyecto. ....	41
<b>Tabla 4.</b> Tiempos de reacción y rendimientos de $\alpha$ -aminofosfonatos.....	46
<b>Tabla 5.</b> Valores de HRMS (ESI+) m/z, calculados y encontrados para la serie de $\alpha$ -aminofosfonatos. ....	55
<b>Tabla 6.</b> Rendimientos obtenidos de la serie de ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.....	58
<b>Tabla 7.</b> Valores de HRMS (ESI+) m/z, calculados y encontrados para la serie de ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados. ....	63
<b>Tabla 8.</b> Espectroscopia de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ , datos de acoplamiento CH-P, C-P y C-F en compuestos <b>31a-f</b> y <b>32a-f</b> . ....	64
<b>Tabla 9.</b> Susceptibilidad in vitro por el método de difusión en agar de 3 cepas del género <i>Scedosporium</i> contra el VRC y los compuestos <b>31a-f</b> y <b>32a-f</b> .....	67
<b>Tabla 10.</b> Susceptibilidad in vitro de las 23 cepas del género <i>Scedosporium</i> contra antifúngicos y el compuesto <b>32f</b> .....	70
<b>Tabla 11.</b> Citotoxicidad en células sanas COS-7 por el ensayo de MTT contra VRC y los compuestos <b>32a</b> y <b>32f</b> .....	72

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Distribución del género <i>Scedosporium</i> en áreas de actividad humana en México. <sup>16</sup> .....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura de Antifúngicos comerciales y familia a la que pertenecen según su estructura y mecanismo de acción. ....	23
<b>Figura 3.</b> Moléculas que presentaron mejor actividad protectora in vivo que el control ningnanmicina. <sup>33</sup> .....	25
<b>Figura 4.</b> Compuestos sintetizados con actividad contra <i>L. prolificans</i> . ....	26
<b>Figura 5.</b> Sustituyentes de los reactivos y del producto que pueden formar puentes de hidrógeno con el etanol (marcados en rojo). ....	48
<b>Figura 6.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO-d6) del compuesto <b>31a</b> . ....	50
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (400 MHz, DMSO-d6) del compuesto <b>31a</b> . ....	52
<b>Figura 8.</b> Espectro de RMN de <sup>31</sup> P (400 MHz, DMSO-d6) del compuesto <b>31a</b> . ....	54
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, MEOD) del compuesto <b>32e</b> . ....	59
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (400 MHz, MEOD) del compuesto <b>32e</b> ...	61
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN de <sup>31</sup> P (400 MHz, MEOD) del compuesto <b>32a</b> . ..	62
<b>Figura 12.</b> Halos de inhibición observados por el compuesto <b>32f</b> a las 48 horas. ....	66
<b>Figura 13.</b> Halos de inhibición observados por el compuesto <b>32f</b> a las 72 horas ....	66
<b>Figura 14.</b> Resultados de las pruebas en caldo de cultivo hasta 700 µg/mL ...	67

<b>Figura 15.</b> Punto de corte de inhibición del 100 % de crecimiento a 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sin inhibición a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del compuesto <b>32f</b> .....	68
<b>Figura 16.</b> Interacciones entre los compuestos <b>32a</b> y <b>32f</b> con la Lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa.....	74

## Lista de Esquemas

<b>Esquema 1.</b> Condiciones de reacción y compuestos más activos reportados por Muarak y colaboradores. <sup>25</sup> .....	14
<b>Esquema 2.</b> Obtención de $\alpha$ -aminofosfonatos por dos pasos reportada por Subramanyam y colaboradores. <sup>26</sup> .....	16
<b>Esquema 3.</b> Reacción reportada por Almurao y colaboradores .....	17
<b>Esquema 4.</b> Reacción modelo realizada por Munichandra y colaboradores, para la obtención de $\alpha$ -aminofosfonatos por tres metodologías diferentes. ....	19
<b>Esquema 5.</b> Pasos de reacción reportada por Fadel y Tesson en el que se obtiene un ácido $\alpha$ -aminofósfonico monohidrolizado en el segundo paso. ....	20
<b>Esquema 6.</b> Reacción reportada por Francesco y colaboradores en el que con el uso de NaOH se obtiene la hidrólisis parcial de un $\alpha$ -aminofosfonato. <sup>30</sup> ....	21
<b>Esquema 7.</b> Reacción reportada por Pyun y colaboradores en el que se obtiene un ácido $\alpha$ -aminofosfónico monohidrolizado en el segundo paso.....	21
<b>Esquema 8.</b> Reacción general para obtención de $\alpha$ -aminofosfonatos. ....	33
<b>Esquema 9.</b> Reacción general para la obtención de ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.....	34

## NOMENCLATURA

µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
°C	Grados Celsius
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMB	Anfotericina B
ANF	Anidulafungina
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	Colección de Tipos Cultivos Americanos
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo Deuterado
CELAES	Centro de Laboratorios Especializados
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COS-7	Células de Mono Verde Africano COS-7
CRCEI	Centro Regional de Enfermedades Infecciosas
CSP	Caspofungina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido Deuterado

DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ESI	Ionización de Electrospray
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana
Eq.	Equivalentes
EtOH	Etanol
FLC	Fluconazol
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas
g	gramos
GLASS	Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos
h	horas
HRMS	Espectroscopia de Masas de Alta Resolución
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de Potasio
LGA	Logaritmo Genérico de Lamarck
MCF	Micafungina
MEOD	Metanol Deuterado
mg	miligramos
mL	Mililitros
mmol	Milimoles
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio



MW	Microondas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDA	Agar Papa Dextrosa
PDB	Banco de Datos de Proteínas
PSC	Posaconazol
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>31</sup> P	Resonancia Magnética Nuclear de Fósforo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	Desviación Cuadrática Media
RPMI-1640	Instituto Parque Memorial Roswell
s	Segundos
S.S.	Solución Salina
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
T	Temperatura
t	Tiempo
t.a.	Temperatura ambiente
TMV	Virus del Mosaico del Tabaco
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VRC	Voriconazol



## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

Se estima que más de 1,700 millones de personas sufren de infecciones causadas por hongos en el mundo,<sup>1</sup> las infecciones que pueden causar van desde simples infecciones cutáneas hasta aquellas que pueden poner en riesgo la vida del hospedero,<sup>2</sup> estas últimas son conocidas como micosis invasivas las cuales se diseminan por el torrente sanguíneo y afectan órganos como pulmones, hígado, riñones y al sistema nervioso central,<sup>3</sup> lo que provoca un estimado de 1.7 millones de muertes alrededor del mundo cada año,<sup>4</sup> esta cifra es comparable a las muertes causadas por tuberculosis con 1.4 millones de decesos en 2019<sup>5</sup> y superior a las causadas por malaria con 405 mil muertes en 2018,<sup>6</sup> sin embargo, existe una baja preocupación por parte de las instituciones de salud para la prevención, diagnóstico y control de las enfermedades causadas por hongos patógenos del ser humano,<sup>7</sup> a excepción de los centros para el control y la prevención de enfermedades en Estados Unidos, la mayoría de las instituciones públicas de salud en el mundo carecen de programas para el control y tratamiento de infecciones micóticas.<sup>8</sup>

Por otra parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en agosto de 2019 publicó un protocolo de implementación temprana para la inclusión de *Candida* spp. en su “Sistema Mundial de Vigilancia a los Antimicrobianos” (en adelante GLASS por sus siglas en inglés “Global Antimicrobial Resistance Surveillance System”), en el que reconocen que, aunque los hongos están fuera del punto de vista de la salud pública, son una causa importante de enfermedades y muerte en los seres humanos, en este protocolo señalan que las limitantes para abordar la amenaza que suponen estas infecciones son la falta de datos a nivel mundial ya que pocos países cuentan con sistemas efectivos de vigilancia y en la mayoría de ellos el reporte de las infecciones no son de notificación obligatoria, por lo que las estadísticas sobre su incidencia, resistencia y la carga de la enfermedad son limitadas y por lo tanto su importancia médica puede estar subestimada.<sup>7</sup>

El protocolo se centra en las infecciones en torrente sanguíneo causadas por especies del género *Candida*, por ser el tipo de infección sistémica más común, sin embargo, el espectro de infecciones invasivas causadas por hongos farmacorresistentes a los antifúngicos es amplio,<sup>9</sup> por lo que la implementación de este sistema de control sigue siendo pobre ante los requerimientos reales para el control de enfermedades causadas por hongos patógenos del ser humano.

Al problema de un bajo control de las infecciones causadas por hongos por parte de las instituciones públicas de salud y la farmacorresistencia desarrollada por especies de importancia médica ya conocidas (*Candida* spp.; *Aspergillus* spp. y

*Criptococcus* spp),<sup>10</sup> se suma la aparición de patógenos emergentes con farmacorresistencia intrínseca a los antifúngicos disponibles en el mercado como es el caso de las especies de *Lomentospora* y *Scedosporium*.<sup>11</sup>

### **1.1 Género *Scedosporium***

El género *Scedosporium* ha sido catalogado recientemente como patógeno emergente de prevalencia mundial, de gran importancia médica debido, entre otros factores: a su patogenicidad, su multifarmacorresistencia, la seriedad de las infecciones que causan en el ser humano, sus altas tasa de mortalidad tanto en pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes,<sup>12</sup> su prevalencia a nivel mundial y el incremento de los casos registrados año con año.<sup>13</sup> Estos factores convierten al género *Scedosporium* en un ente patógeno que puede llegar a convertirse en el causante de graves problemas para el área de la salud en el futuro cercano.

Por ser un género de reciente descubrimiento, el número de especies que lo componen ha variado a través del tiempo. Hasta 2018 se consideró que el género estaba formado por más de 10 especies, algunas de las más importantes son *S. apiospermum*, *S. angustum*, *S. aurantiacum*, *S. boydii*, *S. degoohii*, *S. desertorum* entre otras, sin embargo, la conformación de las especies de este género tiende a cambiar a medida que se recaban más datos filogenéticos.<sup>12</sup>

### **1.1.1 Infecciones causadas por el género *Scedosporium***

Las infecciones causadas por este género comprenden un amplio espectro de manifestaciones clínicas que incluyen micetomas, colonización de vías respiratorias, infecciones sinopulmonares, infecciones extrapulmonares localizadas e infecciones diseminadas, las enfermedades causadas por éstos son generalmente llamadas “scedosporiosis”.<sup>14</sup>

Se adquieren por traumatismo, heridas profundas o quirúrgicas e inmersión accidental en aguas contaminadas y afecta principalmente a pacientes con neutropenia, inmunosupresión, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), pacientes que están bajo tratamiento con corticoides y a los que se les realiza trasplante de órganos. Las manifestaciones clínicas se pueden agrupar en tres síndromes: 1) enfermedad localizada 2) colonización asintomática o sintomática y 3) enfermedad sistémica invasiva. En la **Tabla 1** se muestra el espectro clínico de la scedosporiosis.<sup>15</sup>

**Tabla 1.** Espectro clínico de la scedosporiosis<sup>15</sup>

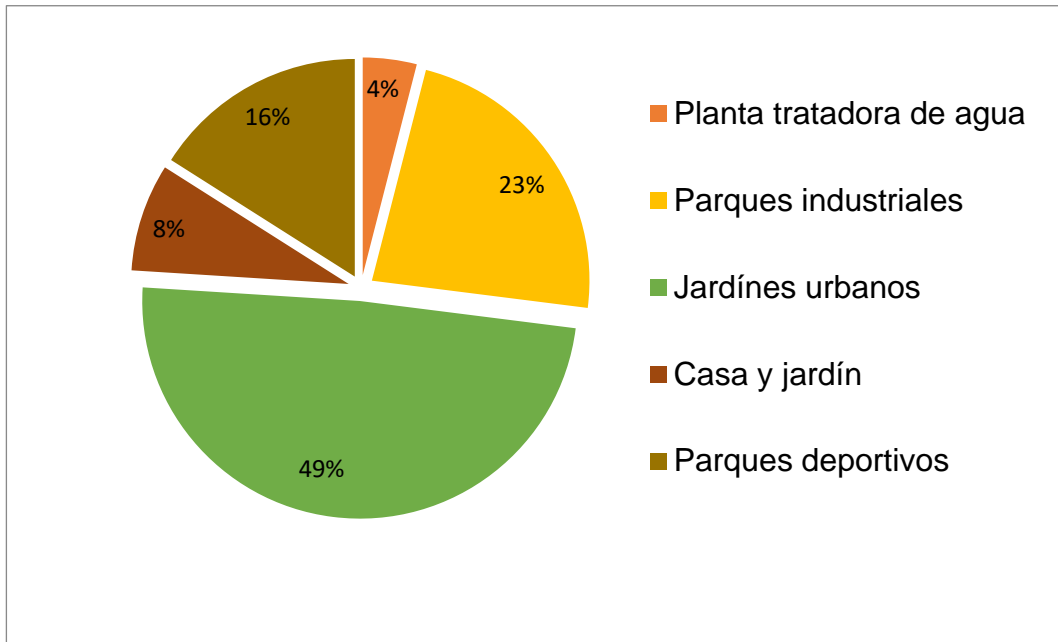
Cuadro clínico	Manifestaciones
<b>Localizado</b>	Micetoma
	Artritis
	Osteomielitis
	Infecciones oculares
	Onicomycosis
	Infecciones linfocutáneas
<b>Colonización</b>	Sinusitis
	Otitis
	Masa fúngica
	Alergia broncopulmonar
	Colonización pulmonar en fibrosis quística
<b>Sistémico</b>	Infección invasiva pulmonar
	Endocarditis
	Infección diseminada
	Infecciones en el sistema nervioso central

### 1.1.2 Prevalencia del género *Scedosporium* en México.

El género *Scedosporium* es cosmopolita, ya que se ha logrado aislar de varias regiones del mundo como en Europa, Asia, Oceanía, Sudamérica y Norteamérica,<sup>13</sup> es importante señalar que los aislamientos han sido de ambientes con gran impacto de actividad humana como son, aguas contaminadas, suelos agrícolas, jardines urbanos y estanques contaminados, cabe señalar que no se ha logrado aislar de medios naturales como bosques y selvas.<sup>13</sup>

En 2017, Elizondo Zertuche realizó un estudio de la prevalencia de este género en la República Mexicana, el cual consistió en el muestreo de 25 de los 32 estados, con un total de 97 muestras medio ambientales de las cuales se lograron aislar 100 cepas (69 cepas de *S. apiospermum*, 16 cepas de *S. boydii*, 7 cepas de *S. aurantiacum*, 5 cepas de *S. dehoogii* y 3 cepas de *S. angustum*). Se logró aislar las cepas del género en 22 de los 25 estados muestreados, estas fueron obtenidas de plantas tratadoras de agua, parques industriales, jardines urbanos, casas, jardines y parques deportivos,<sup>16</sup> en la **Figura 1** se observa el porcentaje de aislados por área y se puede observar que la mayor prevalencia del género se encuentra en casas y jardines, por lo que es un hecho que se encuentra presente en lugares donde los mexicanos realizan actividades cotidianas, por lo que existe un riesgo real de exposición a las esporas de este hongo y por lo tanto a desarrollar las enfermedades que causa este género.





**Figura 1.** Distribución del género *Scedosporium* en áreas de actividad humana en México.<sup>16</sup>

Actualmente las infecciones causadas por estos hongos han cobrado gran importancia debido a que existe un aumento en los casos clínicos reportados en los últimos años, a esto se suma su difícil diagnóstico, lo que les confiere propiedades debido a que en la fase de infección presenta una morfología y ramificación de hifas similar a la de *Aspergillus*,<sup>17</sup> y aunque se logre diagnosticar, los tratamientos antifúngicos muchas veces son poco efectivos debido a que el principal tratamiento ante una infección micótica invasiva causada por *Aspergillus* es el fármaco anfotericina b (AMB)<sup>15</sup> a la cual este hongo presenta resistencia intrínseca por lo que en la mayoría de los casos no se logra salvar la vida del paciente, además de que este fármaco presenta poca selectividad por lo que se usa solamente en casos donde la vida del paciente corre peligro, es por ello que

se hace necesario la búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones causadas por el género *Scedosporium*.

## **1.2 Los $\alpha$ -aminofosfonatos y ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados**

Los  $\alpha$ -aminofosfonatos y sus derivados (ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados), se presentan como una alternativa para el tratamiento de las enfermedades causadas por el género *Scedosporium*, debido a que, al ser análogos estructurales de los  $\alpha$ -aminoácidos, pueden mimetizar el estado de transición de estos lo que les confiere propiedades terapéuticas.<sup>18</sup> Existen numerosos reportes de la actividad biológica de  $\alpha$ -aminofosfonatos y sus derivados como antivirales,<sup>19</sup> anticancerígenos,<sup>20</sup> antibacterianos<sup>21</sup> y en lo que compete a este proyecto como antifúngicos.<sup>22</sup> Además, se reportan algunas ventajas con respecto a los antifúngicos comerciales como el hecho de que se ha demostrado que tienen una baja citotoxicidad en las células sanas de mamíferos.<sup>23</sup> Por otro lado, hay un gran cantidad de reportes de síntesis de los  $\alpha$ -aminofosfonatos por metodologías que involucran reacciones de multicomponentes, siendo la más conocida la reacción de Kabachnik-Fields en la que se hace reaccionar una amina, un aldehído y una fosfita, para la obtención del  $\alpha$ -aminofosfonato, y con esta reacción se han reportado varias metodologías de síntesis verde como son el uso de irradiación por microondas libre de disolvente, el uso tanto de líquidos iónicos como de sales inorgánicas en cantidades catalíticas.

Por otro lado, la obtención de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados a partir de los ésteres fosfónicos ha sido poco reportada, no solo con respecto a su síntesis sino también respecto a su actividad biológica, esto se debe principalmente a que la mayoría de los reportes están enfocados en la obtención de la hidrólisis total del grupo difosfonéster,<sup>24,25</sup> así que la hidrólisis parcial, como se propone en este proyecto, representa una área de oportunidad para el desarrollo de compuestos organofosforados con aplicaciones interesantes en el área de desarrollo de fármacos.

### **1.2.1 Estudios *in vitro* para la evaluación de $\alpha$ -aminofosfonatos y ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.**

Existen una gran variedad de métodos para la evaluación *in vitro* de compuestos con potencial actividad antifúngica de manera cualitativa y cuantitativa entre las que se encuentran: difusión en medios sólidos (papa agar dextrosa o Müller Hinton), difusión por disco impregnado, difusión por pocillo, E-test, entre otros, estos procedimientos se basan en la difusión de los compuestos a evaluar a través del medio y determinar si poseen actividad inhibitoria, la cual se observará mediante la formación de un halo de inhibición, con respecto al control (generalmente antifúngicos comerciales), para de esta manera determinar la actividad antifúngica de un compuesto.

Otro método cuantitativo para evaluar la actividad antifúngica de compuestos es mediante dilución en caldo, los compuestos a diferentes concentraciones son

agregados a tubos con medios de cultivo inoculados a concentraciones conocidas de esporas o levaduras, de igual manera se requieren controles de crecimiento negativos (fármaco comercial) y positivos (vehículo y medio de cultivo sin droga o compuesto), con la finalidad de determinar la concentración mínima que se expresa al 50, 90 y el 100 % ( $CMI_{50}$ ,  $CMI_{90}$ ,  $CMI_{100}$ ) de las unidades formadoras de colonias (UFC) de los compuestos evaluados.

Las metodologías mencionadas se usan como primeras pruebas en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos, cuyo objetivo principal es, evaluar si el compuesto presenta o no actividad biológica por lo que se aplican para la evaluación de nuevos compuestos como es el caso de los  $\alpha$ -aminofosfonatos y de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados planteados en el presente proyecto.

Los compuestos que superan este primer filtro pueden ser evaluados mediante protocolos estandarizados avalados internacionalmente, como los establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en Inglés) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST por sus siglas en inglés), en los cuales se establecen los lineamientos para llevar a cabo ensayos de susceptibilidad confiables y reproducibles, que sientan las bases para poder llevar a cabo pruebas en modelos *in vivo*.

### 1.3 Estudios de modelado molecular

El estudio por medio de modelados computacionales de nuevos compuestos con potencial farmacéutico se ha convertido desde los años 80 en una herramienta útil no solo para el diseño de nuevos fármacos sino también para proponer posibles mecanismos de acción de los compuestos que presentan actividad en modelos *in vitro*, ya que con los estudios *in silico* de los compuestos acoplados a proteínas, de las cuales se tienen cristales, se puede proponer un posible sitio diana de la molécula activa y por lo tanto saber a qué proteína tiene afinidad, para el caso del presente proyecto se eligió la proteína lanosterol 14 alfa-desmetilasa como sitio diana de las moléculas más activas, ya que esta proteína es el principal sitio blanco de los antifúngicos derivados de azoles, debido a que la inhibición de esta proteína causa la deficiencia de ergosterol, componente clave en la estructura de la pared celular de los hongos y su deficiencia provoca poros en ella, ocasionando la muerte del hongo por presión osmótica.

Con base a lo anterior, en el presente proyecto se propuso la síntesis de nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos y ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos, debido a su amplia actividad biológica y a su potencial actividad antifúngica como alternativa para el problema nacional y mundial que representan las enfermedades ocasionadas por las diferentes especies que conforman al género *Scedosporium*, cuya multirresistencia y factores de virulencia lo convierten en un patógeno de gran importancia médica. Los resultados que se obtuvieron en este proyecto proporcionan información relevante en la búsqueda de alternativas para el

diseño, síntesis y evaluación de estos compuestos promisorios para el tratamiento de micosis.

## CAPÍTULO 2

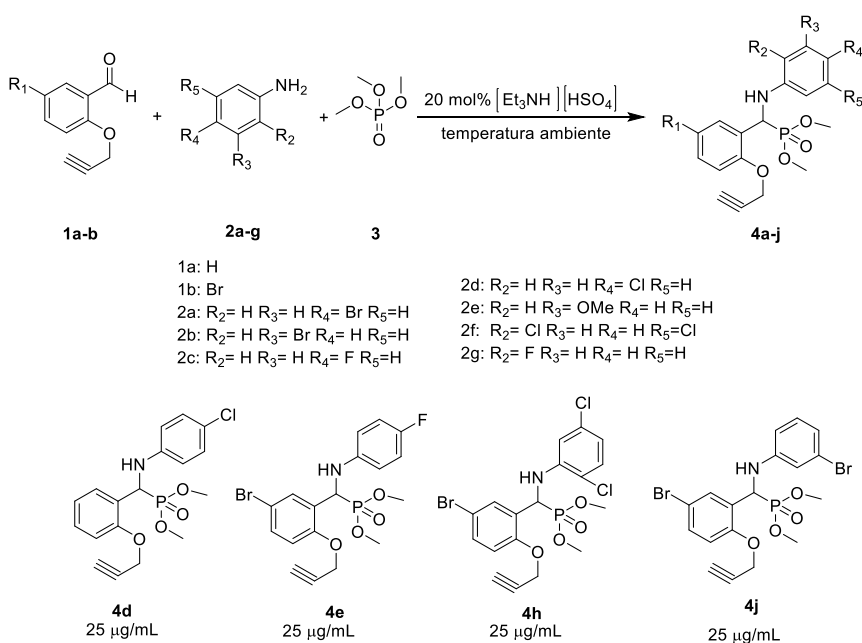
### ANTECEDENTES

#### 2.1 Síntesis de $\alpha$ -aminofosfonatos y actividad antifúngica

La síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos ha sido ampliamente reportada por diversas metodologías, que van desde métodos convencionales, hasta métodos no convencionales como el uso de microondas, ultrasonido, mecanosíntesis, entre otros, desde metodologías en las que se hace uso de catalizadores hasta sales inorgánicas y la implementación de líquidos iónicos que por sus características pueden ser reutilizables. En esta sección se incluyen algunas de las investigaciones recientes sobre la síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos y evaluación de su actividad antifúngica.

En 2016, MuBarak y colaboradores realizaron la síntesis de una serie de  $\alpha$ -aminofosfonatos mediante la reacción “one pot” de tres componentes los cuales son un aldehído, una amina y trimetilfosfita (**Esquema 1**), usaron un líquido iónico  $[\text{Et}_3\text{NH}][\text{HSO}_4]$ , un catalizador que lo describen como eficiente, reutilizable y amigable con el medio ambiente, en esta metodología omitieron el uso de disolventes y llevaron a cabo la síntesis a temperatura ambiente. Los rendimientos reportados fueron de buenos a excelentes (82 – 95 %), posteriormente evaluaron la actividad de los compuestos sintetizados contra cinco cepas de hongos (*Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus*

*flavus*, *Aspergillus niger* y *Criptococcus neoformans*). Para la evaluación biológica usaron el método estándar de difusión en agar, y encontraron que cuatro de los compuestos presentan una concentración mínima inhibitoria (CMI<sub>100</sub>) de 25 µg/mL similar al fármaco control Miconazol, los compuestos **4d** y **4j** mostraron actividad contra *Aspergillus niger* y los compuestos **4e** y **4h** contra *Candida albicans*.<sup>26</sup>

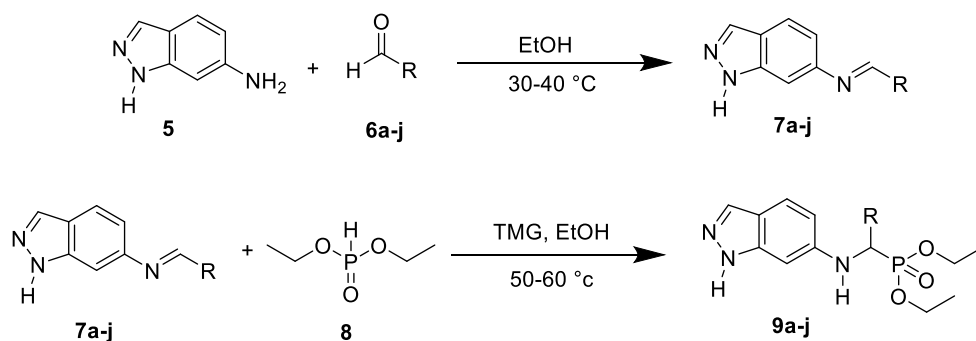


**Esquema 1.** Condiciones de reacción y compuestos más activos reportados por Muarak y colaboradores.<sup>26</sup>

En 2017, Subramanyam y colaboradores reportaron la síntesis de α-aminofosfonatos por dos pasos de reacción (reacción de Pudovik), el primer paso consistió en la formación de iminas de la reacción entre el 6-aminoindazol y una serie de aldehídos en etanol a 40 °C por una hora, en el segundo paso la imina



formada se hizo reaccionar con dietilfosfita en etanol en presencia de tetrametilguanidina (TMG) como un catalizador reutilizable por un tiempo de 3 a 5 horas hasta obtener el correspondiente  $\alpha$ -aminofosfonato (**Esquema 2**) con rendimientos de 85 – 96 %. Posteriormente evaluaron su actividad *in vitro* contra *Harpophora oryzae* y *Aspergillus niger* por el método de difusión en disco, los compuestos mostraron de moderada a buena actividad antifúngica, destacando los compuestos **9f** y **9j** que cuentan con grupos electroattractores (cloro y nitro) unidos al fenilo.<sup>27</sup>

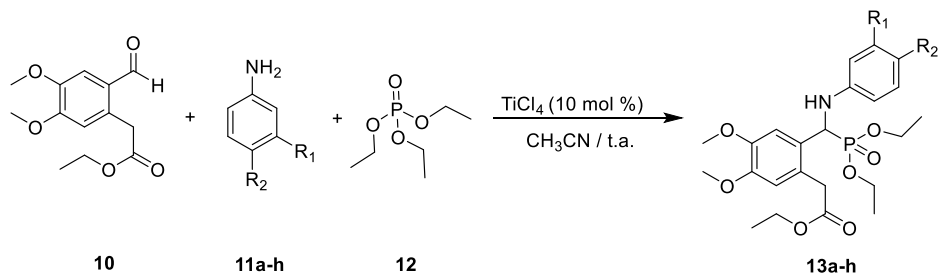


Compuesto	R	Compuesto	R	Compuesto	R
5a		5e		5h	
5b		5f		5i	
5c		5g		5j	
5d					

**Esquema 2.** Obtención de  $\alpha$ -aminofosfonatos por dos pasos reportada por Subramanyam y colaboradores.<sup>27</sup>

En 2016, Almurao y colaboradores reportaron la síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos por la reacción “one pot” de Kabachnik-Fields, empleando como catalizador tetracloruro de titanio ( $\text{TiCl}_4$ ) en acetonitrilo (**Esquema 3**), los sustituyentes, tiempos de reacción y rendimientos se muestran en la **Tabla 2**. Los compuestos fueron evaluados contra cepas de *A. niger* y *C. albicans* por el método de difusión en agar, se encontró que 4 compuestos (**13a**, **13c**, **13e** y **13g**) presentaron una buena actividad contra el hongo filamentoso a una concentración de 100 ppm (12.45,12.11,12.11,12.33 mm de halo de inhibición respectivamente), aunque

menor en comparación a la anfotericina b (15.34 mm), se vuelve a observar que al igual que los dos estudios anteriores, los compuestos que presentan sustituyentes electroattractores en el anillo aromático presentan buena actividad antifúngica.<sup>28</sup>

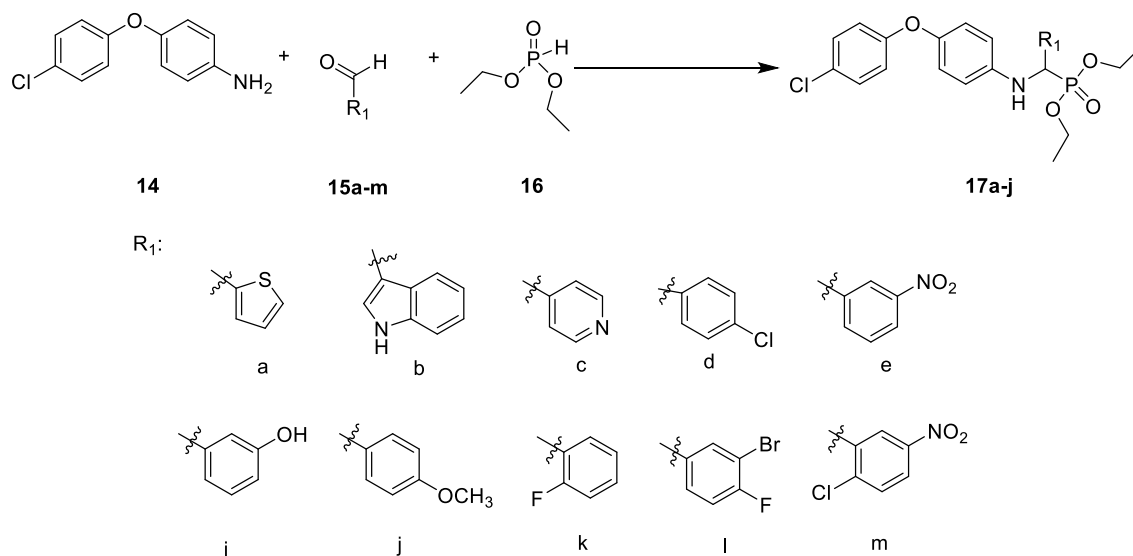


**Esquema 3.** Reacción reportada por Almuraou y colaboradores.<sup>28</sup>

**Tabla 2.** Sustituyentes, tiempo de reacción y rendimientos de la síntesis reportada por Almorou.<sup>28</sup>

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)
<b>a</b>	H	H	3	85
<b>b</b>	H	Cl	4	83
<b>c</b>	H	NO <sub>2</sub>	5	72
<b>d</b>	OCH <sub>3</sub>	H	6	82
<b>e</b>	H	F	3	77
<b>f</b>	Cl	F	7	75
<b>g</b>	H	Br	4	80
<b>h</b>	H	I	5	79

En el mismo año, Munichandra y colaboradores realizaron la síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos evaluando tres métodos de síntesis: tradicional, ultrasonido y por microondas, los resultados obtenidos muestran que se favorecen los tiempos de reacción por el método de irradiación con microondas (4 - 8 min), en segundo lugar con ultrasonido (32 - 52 min) y en tercer lugar el método tradicional (2.0 h y 3.5 h), en los tres métodos fue usado  $\text{SiO}_2\text{-ZnBr}_2$  como catalizador al cual le atribuyen los rendimientos obtenidos de buenos a excelentes (85 - 97 %). En el **Esquema 4** se muestra la reacción general, posteriormente los compuestos se evaluó su actividad antifúngica por el método de difusión en disco utilizando como fármaco control nistatina, las concentraciones de los compuestos evaluados fueron de 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , y también se obtuvo la concentración mínima inhibitoria de los compuestos ( $\text{CMI}_{100}$ ) empleando el método de microdilución en caldo .Los resultados mostraron que el compuesto **17b** presenta una buena actividad contra *C .albicans* y el compuesto identificado por **17g**, y es activo contra *A. fumigatus* .<sup>29</sup>

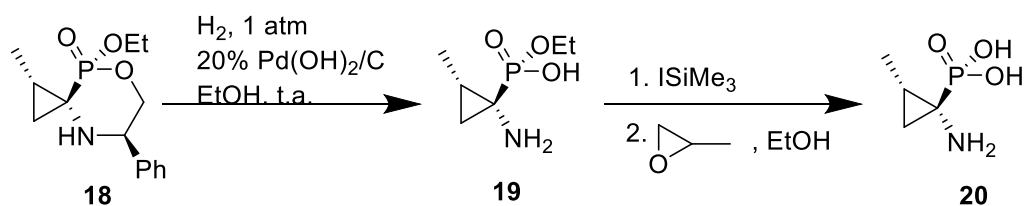


**Esquema 4.** Reacción modelo realizada por Munichandra y colaboradores, para la obtención de  $\alpha$ -aminofosfonatos por tres metodologías diferentes.<sup>29</sup>

## 2.2 Síntesis y actividad biológica de ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.

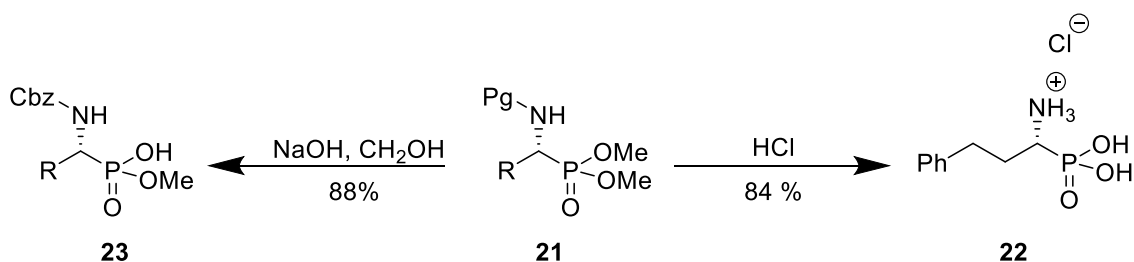
Como ya se mencionó en la introducción, son pocos los reportes de síntesis de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados y de su actividad biológica debido a que en estos estudios se lleva a cabo la hidrólisis total, siendo por lo tanto intermediarios de la reacción que no son recuperados, a continuación, se muestran algunas reacciones en la que se obtienen los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.

En el 2000 Fadel y Tesson reportaron la preparación de ácidos aminociclopropanofosfónicos enantioméricamente puros, para ello primero obtuvieron espirofosfonatos para posteriormente llevar a cabo una hidrogenación de éstos para obtener el monoéster correspondiente, posteriormente es tratado con yoduro de tetrametil silano y con óxido de propileno en etanol para obtener el enantiómero puro (**Esquema 5**).<sup>30</sup>



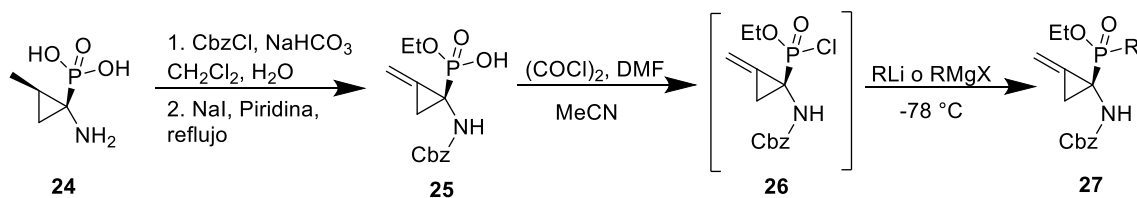
**Esquema 5.** Pasos de reacción reportada por Fadel y Tesson en el que se obtiene un ácido  $\alpha$ -aminofósónico monohidrolizado en el segundo paso.<sup>30</sup>

En 2008 Francesco y colaboradores reportaron las síntesis de ácidos  $\alpha$ -aminofósónicos monohidrolizados ópticamente activos haciendo uso de catalizadores de transferencia de fase, con este tipo de catalizador formaron derivados de  $\alpha$ -aminofosfonatos lo cuales posteriormente llevaron a la hidrólisis completa haciendo uso de ácido clorhídrico o a hidrólisis parcial usando NaOH en metanol (**Esquema 6**). El compuesto obtenido (**23**) es un intermediario en el ensamblaje de fosfono-péptidos inhibidores de enzimas proteasas.<sup>31</sup>



**Esquema 6.** Reacción reportada por Francesco y colaboradores en el que con el uso de NaOH se obtiene la hidrólisis parcial de un  $\alpha$ -aminofosfonato.<sup>31</sup>

En 2012, Pyun y colaboradores realizaron la síntesis de  $\alpha$ -amino-C-fosfinatos como producto final de tres pasos de reacción: como primer paso se obtiene como intermediario el ácido  $\alpha$ -aminofosfónico monohidrolizado donde se usó cloroformiato de bencilo y bicarbonato de sodio en diclorometano y agua, el segundo paso consistió en el tratamiento con yoduro de sodio en piridina a reflujo, bajo estas condiciones se obtuvo el monoéster del fosfonato con un rendimiento del 88%. El tercer paso consistió en el tratamiento del compuesto 26 con un reactivo de Grignard. La ruta completa con las condiciones de reacción para la obtención del  $\alpha$ -amino-C-fosfinato se muestra a continuación (**Esquema 7**).<sup>32</sup>

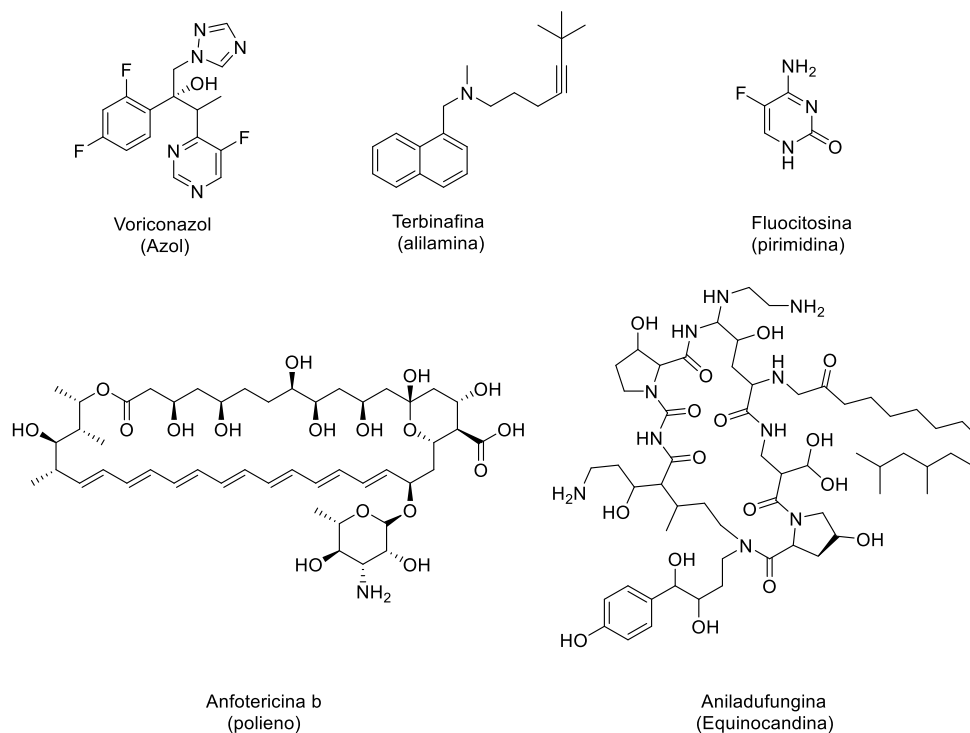


**Esquema 7.** Reacción reportada por Pyun y colaboradores en el que se obtiene un ácido  $\alpha$ -aminofosfónico monohidrolizado en el primer paso.<sup>32</sup>

### 2.3 Antifúngicos comerciales

Los antifúngicos disponibles en el mercado se clasifican en 5 tipos principales de familias de acuerdo con su estructura: azoles, polienos, alilaminas, equinocandinas y pirimidinas,<sup>4</sup> cada uno de ellos tiene un mecanismo de acción diferente, los azoles, inhiben la actividad de la enzima lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilasa disminuyendo la cantidad de ergosterol en el hongo; los polienos como la anfotericina b, se unen al ergosterol de la membrana celular del hongo alterando su permeabilidad; las alilaminas inhiben la enzima escualeno epoxidasa importante en la síntesis de ergosterol en el hongo; el sitio de unión de las equinocandinas es la 1,3- $\beta$ -glucano sintetasa alterando de esta manera la organización celular; y las pirimidinas interfieren en la síntesis de ADN y ARN. En la **Figura 2** se observan las estructuras de 5 antifúngicos pertenecientes cada familia. Con base a sus estructuras se puede observar que el VRC, que es el único fármaco que presenta actividad contra las cepas del género *Scedosporium*, posee en su estructura además de un anillo de 5 miembros propio de los azoles antifúngicos, tiene halógenos unidos a anillos aromáticos así como la presencia de grupos hidroxilo, por lo que las moléculas propuestas en este proyecto tienen como base la inclusión de estos grupos funcionales en su estructura.





**Figura 2.** Estructura de Antifúngicos comerciales y familia a la que pertenecen según su estructura y mecanismo de acción.

## 2.4 Estudios de susceptibilidad *in vitro* del género *Scedosporium*

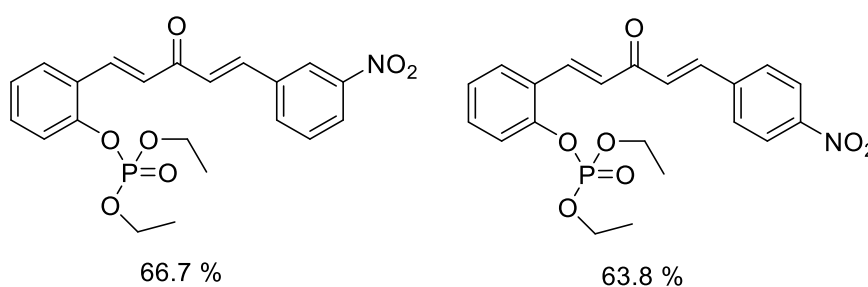
No existen en la literatura reportes de la actividad *in vitro* de derivados de  $\alpha$ -aminofosfonatos y de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados contra el género *Scedosporium*, sin embargo existen estudios de susceptibilidad del género contra diferentes fármacos comerciales, el más representativo para este proyecto es el realizado por Elizondo-Zertuche y colaboradores en 2017, en el que se reporta un estudio de susceptibilidad *in vitro* de 100 aislados ambientales de este género empleando el método de microdilución de acuerdo al protocolo

M38-A2 del CLSI. Los agentes antifúngicos empleados fueron anfotericina b (AMB), fluconazol (FLC), posaconazol (PSC), voriconazol (VRC), caspofungina (CSP), anidulafungina (ANF) y micafungina (MCF), las concentraciones probadas fueron de 0.125 a 64  $\mu\text{g/mL}$  para FLC, 0.03 a 16  $\mu\text{g/mL}$ , para VRC, PSC y AMB, de 0.015 a 8  $\mu\text{g/mL}$  para las equinocandinas, la concentración mínima inhibitoria ( $\text{CMI}_{100}$ ) se determinó de manera visual, es decir dónde no se observó crecimiento de filamentos se consideró una inhibición del 100 %, tal como lo marca el protocolo M38-A2. Los resultados indicaron que la menor  $\text{CMI}_{100}$  fue para el VRC y el CMI mayor para FLC, todas las cepas fueron resistentes a las equinocandinas y a AMB, por lo que se concluyó que este género muestra una amplia resistencia a diversos antimicóticos.<sup>16</sup>

## **2.5 Modelado molecular *in silico* de $\alpha$ -aminofosfonatos**

Como antecedente del estudio de modelado molecular para compuestos organofosforados que previamente mostraron actividad *in vitro*, con el fin de proponer posibles sitios de acción tenemos el estudio realizado en 2019 por Chen y colaboradores,<sup>33</sup> en el cual realizaron la síntesis y la evaluación de derivados fosforilados *in vitro* para determinar su actividad contra bacterias fitopatógenas (Xoo y Xac), además evaluaron su actividad protectora y curativa contra el virus del mosaico del tabaco, el cual fue un modelo *in vivo* usando hojas de la planta. Los compuestos mostrados en la **Figura 3** presentaron una actividad protectora de 66.7 y 63.8 % que resultó mejor que la actividad mostrada por el control

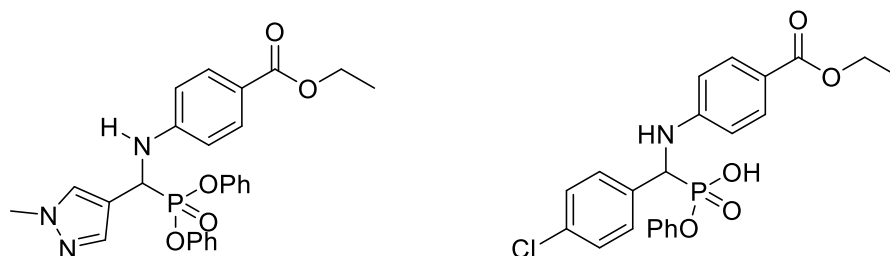
ningnanmicina del 56.1 %. Es por ello que hicieron estudios de docking para identificar los probables sitios de unión en la proteína de la capa (coat protein) del virus antes mencionado, de este estudio se obtuvo que efectivamente existe una afinidad de las moléculas de estudio por el sitio activo de la proteína,<sup>33</sup> este artículo es un ejemplo de que el mecanismo de acción de un compuesto puede ser propuesta por estudios computacionales, cuando este ya mostró actividad en modelos biológicos.



**Figura 3.** Moléculas que presentaron mejor actividad protectora *in vivo* que el control ningnanmicina.<sup>33</sup>

En el proyecto previo para obtener el grado de Maestría en Ciencias, se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de una serie  $\alpha$ -aminofosfonatos y una serie de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados, y se concluyó que dos moléculas (**Figura 4**) presentaron actividad contra *Lomentospora prolificans* (*L. prolificans*), el cual, hasta hace algunos años, pertenecía al género *Scedosporium*. Sin embargo, este hongo se presentaba como el más virulento de las especies que conformaban al género y con una resistencia intrínseca mayor frente a los

antifúngicos comerciales,<sup>34</sup> por lo que el hecho de que dos compuestos presentaran actividad contra este hongo da una base importante para hacer estudios de la actividad de estos compuestos y compuestos similares contra cepas del género *Scedosporium*.



**Figura 4.** Compuestos sintetizados con actividad contra *L. prolificans*.

## 2.7 Análisis crítico de la literatura

De acuerdo con lo reportado en la literatura se puede observar que son amplios los reportes de síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos, los cuales presentan metodologías que buscan llevar a cabo una síntesis amigable con el ambiente, pero que aún pueden ser mejoradas, además, los  $\alpha$ -aminofosfonatos con sustituyentes electroattractores en especial halógenos, presentan actividad antifúngica. Sin embargo, no hay reportes de la evaluación de su actividad antifúngica contra el género *Scedosporium*. Por el contrario, la síntesis de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados ha sido poco reportada por metodologías tradicionales o que involucran condiciones drásticas de reacción además de que no hay reportes de su actividad antifúngica en la literatura.

Por otro lado, existen antecedentes de la alta virulencia del género *Scedosporium* determinados por estudios *in vivo*, que funcionan como base para la realización de este proyecto y que corroboran el por qué este hongo se catalogó recientemente como patógeno de gran importancia médica, de igual forma se tienen antecedentes de los diferentes modelos *in vitro* para la evaluación de la actividad de  $\alpha$ -aminofosfonatos y ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados, así como de los modelos computacionales que son útiles para explicar y justificar la actividad observada al ser evaluadas por las diferentes metodologías de evaluación biológica.

Por lo anterior, en el presente proyecto se propone la síntesis de seis  $\alpha$ -aminofosfonatos y seis ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos por metodologías sencillas y amigables con el ambiente y la evaluación *in vitro* de su actividad antifúngica contra 23 cepas del género *Scedosporium*,

El criterio para el diseño de las moléculas propuestas en este proyecto, el empleo de estructuras de azoles comerciales, los compuestos que presentaron actividad antifúngica en el proyecto realizado durante la maestría, ya que como se muestra en esta sección los compuestos que presentan en sus estructuras halógenos unidos a anillos aromáticos, grupos hidroxilo y anillos de 5 miembros son los que presentan actividad promisoriosa contra diversos hongos. Por otro lado, para poder proponer un posible mecanismo de acción de las moléculas sintetizadas se empleará un tamizaje en silico por medio de un Docking,

## CAPÍTULO 3

### APORTACIÓN CIENTÍFICA

#### 3.1 Justificación

Debido a la prevalencia mundial, la presencia en ambientes de actividad humana, la alta virulencia y la multifarmacoresistencia presentada por el género *Scedosporium* se hace necesaria la búsqueda de alternativas para el tratamiento de las enfermedades causadas por estos hongos, por lo que la evaluación antifúngica *in vitro* de nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos y ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados, permitirá obtener información relevante de la potencial actividad de estos compuestos organofosforados contra el género *Scedosporium*.

#### 3.2 Hipótesis

Al menos uno de los compuestos sintetizados ( $\alpha$ -aminofosfonatos o ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados) presenta una mejor actividad antifúngica *in vitro* en comparación a Voriconazol.

### 3.3 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos y ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados y evaluar su actividad antifúngica *in vitro* frente a hongos filamentosos multifarmacoresistentes del género *Scedosporium*.

### 3.4 Objetivos específicos

#### Síntesis:

1. Sintetizar una serie de  $\alpha$ -aminofosfonatos, vía agitación en vórtex.
2. Sintetizar una serie de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos vía microondas.
3. Caracterizar las dos series por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón, carbono 13 y fósforo 31 y por espectrometría de masas de alta resolución.

#### Actividad biológica:

4. Determinar la susceptibilidad *in vitro* de las 2 series de compuestos:
  - a) Screening inicial de los compuestos por el método de difusión en agar.
  - b) Evaluación del compuesto más activo por el método de referencia M38- A2 del CLSI, frente a 23 aislamientos del género *Scedosporium*.
5. Determinar la citotoxicidad del compuesto más activo, por el método de viabilidad celular MTT.

6. Realizar estudios *in silico* del compuesto más activo mediante la construcción de modelos 3D.



## CAPÍTULO 4.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Materiales, Reactivos y Equipos.

Para la síntesis de los  $\alpha$ -aminofosfonatos, ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados y las pruebas de actividad antifúngica, se emplearon los siguientes reactivos:

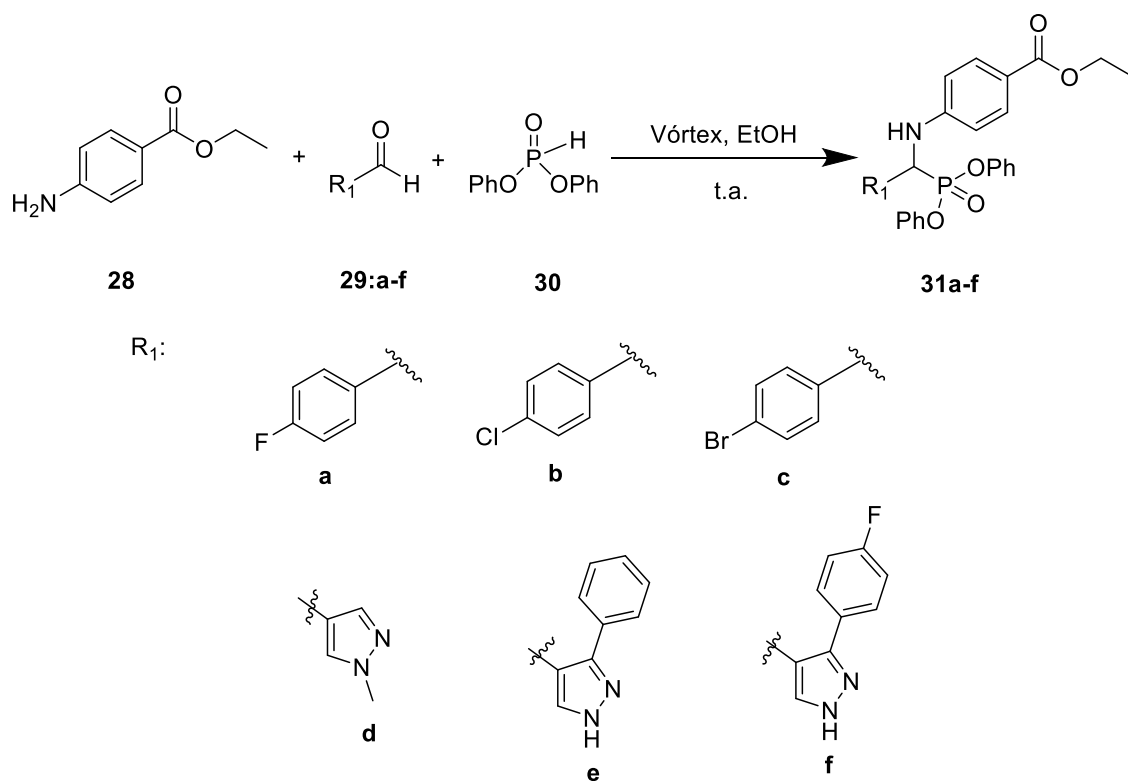
- SIGMA-ALDRICH: 4-Clorobenzaldehído 97 %, 4-Bromobenzaldehído 97 %, 4-Fluorobenzaldehído 97 %, difenilfosfita 98 %, 4-etilaminobenzoato 98 %, 1-metil-1H-pirazol-4-carbozaldehído 97 %, 3-fenil-1H-pirazol-4-carbozaldehído, 3-(4-fluorofenil)-1H-pirazol-4-carbozaldehído, Tween 80.
- Macherey-Nagel: Sílica 60, 0.040-0.063 mm.
- Desarrollo de Especialidades Químicas: acetato de etilo, hexano, metanol, diclorometano (grado industrial, destilados para su uso), isopropanol, etanol.
- Agua estéril.
- DMSO.
- Solución salina (S.S) estéril al 0.85%.

Localización de los equipos a utilizar en el presente proyecto

- Para la parte de síntesis de la serie de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados se usó el equipo de microondas para síntesis Monowave 300, marca Anton Paar localizado en el laboratorio de Química orgánica 4, situado en el tercer piso del edificio redondo de Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) perteneciente al laboratorio de Química Industrial.
- Para el análisis estructural de (RMN) de protón las muestras se analizaron en un equipo de RMN de 400 MHz ubicado en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Mérida.
- Para confirmar la estructura de los compuestos sintetizados se usó el espectrómetro de Masas de alta resolución, Agilent technologies 1260 infinity, ubicado en el laboratorio de Espectrometría de Masas en el departamento de Química y Bioquímica de la Universidad Brigham Young, Provo Utah.
- Para la evaluación de actividad biológica de los compuestos se usaron los equipos con los que cuenta el laboratorio de Fitopatología y Micología del departamento de microbiología e inmunología de la Facultad de Biología, de la UANL, los cuales son: 2 campanas de flujo laminar, 2 centrifugas, 2 agitadores tipo vórtex, 6 incubadoras.

## 4.2 Síntesis de $\alpha$ -aminofosfonatos.

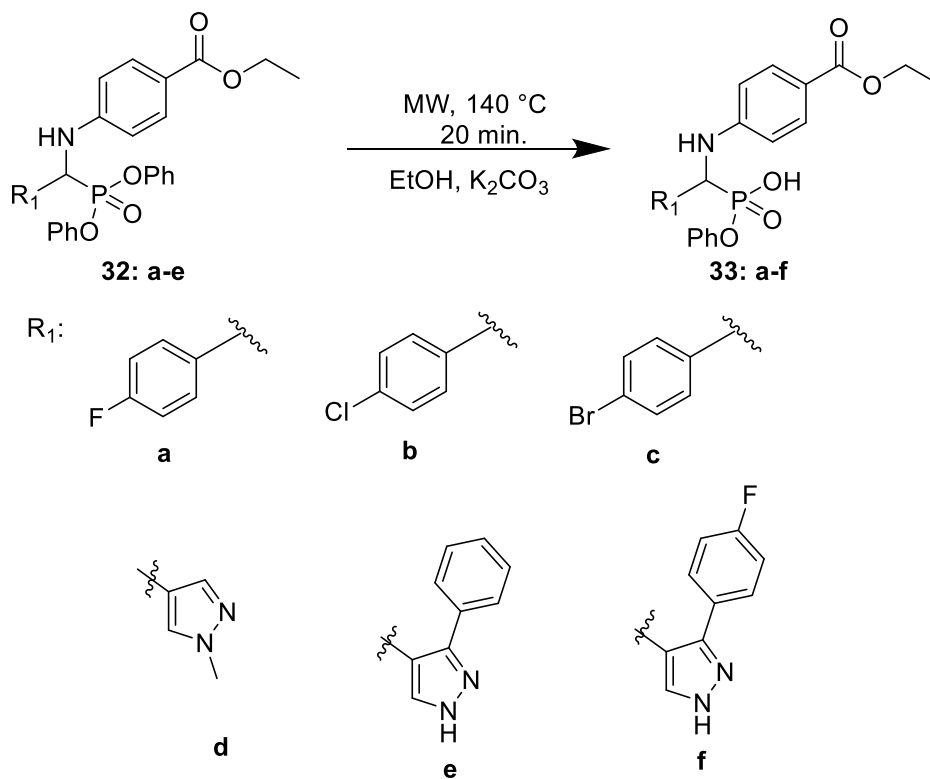
La síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos a temperatura ambiente se llevó a cabo mediante la siguiente metodología (**Esquema 8**): en un tubo de vidrio, se adicionó 4-etilaminobenzoato (1 Eq.), seguido del aldehído correspondiente (1 Eq.) en presencia de difenilfosfita (1 Eq.), se agitó en vórtex hasta que se observó la formación de un precipitado, el tiempo de reacción es dependiente de la precipitación del producto final.



**Esquema 8.** Reacción general para obtención de  $\alpha$ -aminofosfonatos.

### 4.3 Síntesis de ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.

La síntesis de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados se realizó mediante irradiación por microondas por la siguiente metodología (**Esquema 9**): en un tubo de microondas G10 con agitador magnético, se adicionó el  $\alpha$ -aminofosfonato correspondiente (1 Eq.) obtenido de la primera serie, se le agregó carbonato de potasio (1 Eq.), se hizo reaccionar por microondas a 140 °C por 20 minutos, el avance de reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina.



**Esquema 9.** Reacción general para la obtención de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.

#### **4.4 Purificación de las series 1 y 2**

La purificación de la serie de  $\alpha$ -aminofosfonatos se realizó por filtración al vacío con lavados de etanol frío y por recristalización, la serie de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados se purificó por columna cromatográfica usando el sistema de disolventes que presentó mejor separación de productos (7:3 acetato de etilo/metanol).

#### **4.5 Caracterización de las dos series**

La caracterización de las series 1 y 2 se llevó a cabo mediante Resonancia magnética nuclear de protón, carbono 13 y fósforo 31 (RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ), el equipo empleado fue de la marca Varian de 400 MHz, asimismo, se realizó un análisis de Espectrometría de Masas de alta resolución; utilizando como método de ionización electrospray, Finalmente se realizó la comparación de los resultados arrojados por los análisis anteriormente mencionados y los datos teóricos esperados para corroborar que se obtuvieron los compuestos planteados en este proyecto.

#### **4.6 Pruebas biológicas**

Las pruebas biológicas se realizaron en el Centro Regional de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UANL y en los laboratorios de Fitopatología y Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Biología de la UANL.

#### **4.6.1 Reactivación de aislamientos del género *Scedosporium***

Un total de 23 aislamientos ambientales del género *Scedosporium* en los que se incluyen cepas de *S. apiospermum* (5), *S. boydii* (5), *S. aurantiacum* (3), *S. dehoogii* (5), *S. angustum* (5) provenientes del laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina, UANL., se resembraron en agar papa dextrosa (PDA) para su reactivación metabólica, se incubaron a 35 °C por 72 horas y posteriormente se mantuvieron en refrigeración hasta su empleo.

#### **4.6.2 Estudios de susceptibilidad *in vitro***

Los estudios de susceptibilidad *in vitro* se dividen en dos partes, el primero consistió en un tamizaje de todos los compuestos sintetizados por el método de difusión en agar para encontrar el compuesto más activo por halo de inhibición contra tres cepas del género *Scedosporium* (ZS-025, 00-320, MC-070), se hizo un sembrado tipo césped sobre medio PDA a una concentración con rango de  $0.4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  conidios/mL de las cepas que tenían 7 días de crecimiento y se colocaron discos impregnados con los compuestos a evaluar a concentraciones de 1-10 mg/mL se incubaron por 72 horas a 35 °C, posteriormente se midió el halo de inhibición y se determinó el compuesto más activo como aquel en el que se presentó un mayor halo de inhibición a una menor concentración, tomando en cuenta el halo de inhibición del VRC como control. Una vez determinado el compuesto más activo por el método antes descrito se procedió a determinar la CMI<sub>100</sub> siguiendo el protocolo de referencia M38-A2 del CLSI, mediante el método de macrodilución para las 23 cepas del género

*Scedosporium*. El rango de concentración evaluado fue de 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 565  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , este rango fue encontrado a partir de pruebas previas por el método de susceptibilidad en medio líquido que se mencionará en el apartado de resultados y discusión.

En el primer método se usó como control Fluconazol (FLC), y en el segundo método Voriconazol (VRC), Fluconazol (FLC) y Anfotericina b (AMB) como controles negativos y medio de cultivo sin fármaco como control positivo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se anexaron dos cepas de referencia como control de calidad tal como lo marca el protocolo antes mencionado (*Candida parapsilosis* ATCC 22019) y *Paecilomyces variotii* MYA 3630 (obtenidos de ATTC). Se realizaron las lecturas de  $\text{CMI}_{100}$  de forma visual a las 48 y 72 h. También se realizó análisis estadísticos como: rango y media geométrica para determinar la  $\text{CMI}_{100}$  del compuesto activo.

#### **4.6.3 Pruebas de citotoxicidad**

La línea celular COS-7 que utilizó el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química, fue donada por el Centro Médico Siglo XXI. La línea celular fue cultivada en el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (10 %) y una mezcla de antibióticos-antimicótico (1 %). Los cultivos de células se mantuvieron en incubación a 37 °C con una atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$ . Las células se cosecharon con solución de tripsina-EDTA, ya desprendidas de la base del frasco de cultivo, se recolectaron y se diluyeron con medio suplementado para

inactivar la tripsina. Se tomó una alícuota de células para realizar la cuenta de viabilidad a través de la técnica de azul de tripano empleando un contador electrónico. Se ajustó la densidad del inóculo a  $10 \times 10^4$  cel/mL y se depositaron en un volumen de 100  $\mu$ L en placas de 96 pocillos. Se dejaron incubar por 24 h para facilitar su adherencia al sustrato del fondo del pozo. Pasado este periodo de tiempo se agregaron los compuestos en solución con medio suplementado, así como su correspondiente disolvente, en un volumen de 100  $\mu$ L. Los compuestos se prepararon a la concentración de 40 mM en DMSO y/o etanol, con la finalidad de probar la concentración de 1000  $\mu$ M y emplear la mínima cantidad de DMSO. El etopósido se preparó a 20 mM en DMSO. A las 24 h, al cultivo con tratamientos se le retiró el medio y se lavó con una solución de buffer de fosfato e inmediatamente se agregaron 100  $\mu$ L de una solución de MTT (Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) preparada a 5 mg/mL en buffer de fosfatos, se dejaron por 4 h en la incubadora. Terminado este periodo se les retiró la solución de MTT y se agregaron 100  $\mu$ L de DMSO para favorecer la solubilidad de formazán, el cual es producto de la reducción enzimática del MTT por células viables, a mayor producción de formazán mayor viabilidad celular, se agitó la placa cubierta de la exposición de la luz y se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas a una longitud de onda de 470 nm. La viabilidad celular se calculó de la siguiente expresión:

$$\% \text{Viabilidad} = (\text{DO tratamiento} / \text{DO vehículo}) * 100$$



Los datos se procesaron de manera individual o por experimento independiente obteniendo el promedio de estos, más error estándar de la media.

#### **4.7 Estudio de Docking**

Se realizaron estudios Docking de las moléculas que presentaron actividad en este proyecto, para ello se utilizó el programa Pymol 3.1 para la preparación del ligando (VRC) y la proteína (Lanosterol 14-alfadesmetilasa) y para la visualización de la estructura molecular. La estructura cristalina de la proteína se obtuvo del Protein Data Bank (PDB) con el código de acceso 5HS1. Las moléculas se optimizaron en el programa Avogrado para obtener la estructura con la conformación de menor energía, posteriormente se convirtió al formato pdbqt, con el fin de realizar los cálculos. Los cálculos se realizaron con Autodock Vina, realizando varias simulaciones en cada experimento. Cada una de estas simulaciones muestra de un modo predictivo la unión proteína-ligando. En este experimento, las moléculas de agua y el VRC (ligando cristalizado) se eliminaron del archivo de proteínas en formato pdbqt. Para la validación del protocolo de acoplamiento, se eliminaron las coordinaciones con el ligando. Se encontraron las coordenadas de las interacciones proteína-ligando polar, a partir de las cuales se ejecutaron varias simulaciones con diferentes tamaños de caja (10 a 60 Å), y con la ayuda del programa pymol se eligió la coordenada y el tamaño de caja más cercano a una desviación cuadrática media (RMSD por sus siglas en inglés) de 2.5. Todos los cálculos para el acoplamiento flexible de ligando fijado a proteínas se analizaron utilizando el método del algoritmo genérico de Lamarck

(LGA). El sitio de acoplamiento en 14  $\alpha$ -desmetilasa se definió mediante el establecimiento de una caja de cuadrícula utilizando Pymol 3.1. El tamaño del cuadro de la cuadrícula para las coordenadas x, y, z era 60 Å, con un espaciado de la cuadrícula de 0.375 Å, centrado en  $x = 106.102$ ,  $y = 11.437$  y  $z = 19.340$  Å. Se eligió la mejor conformación basándose en la energía de enlace más baja después de que se completó la búsqueda de acoplamiento. En los archivos de configuración de AutoDock Vina, los modos de número de parámetro se establecieron en 1000 modos y la exhaustividad en 1000.

Con esta información, los compuestos se ejecutaron en el programa Autodock Vina para evaluar las energías de interacción de los compuestos con la proteína. El número total de corridas fue 1000. Finalmente, las interacciones entre las moléculas y los residuos de aminoácidos de la proteína se observaron con el programa Discovery Studio Visualizer.

#### **4.8 Forma de manejo y disposición de los residuos generados.**

- a) Las reacciones que se llevaron a cabo no son consideradas de alto riesgo para la salud, por lo que, para su realización, únicamente se requiere el equipo personal de seguridad en el laboratorio (bata, lentes y guantes).
- b) Las pruebas biológicas se realizaron en el laboratorio de micología de la Facultad de Medicina de la UANL, certificado por SAGARPA en un dictamen aprobatorio (AUT-B-B-1216-029), que considera los lineamientos de las normas NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-ECOL-SSA 1-2002.
- c) La disposición de los residuos generados siguió el programa de disposición de residuos implementado por la FCQ de la UANL, utilizando los siguientes contenedores:
  - A (soluciones de sales inorgánicas, ácidos y bases neutralizados)

- B (sólidos inorgánicos)
- C (compuestos y disolventes orgánicos no halogenados)
- D (compuestos y disolventes orgánicos halogenados)
- E (muy tóxico, cancerígeno orgánico)
- G (sólidos orgánicos)
- Vidrio impregnado de sustancias químicas.
- Residuos biológicos: el desecho de residuos mediante el estándar de clasificación de los RPBI (Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos):
  - i. Contenedor rojo: Residuos punzocortantes biológico-infeccioso
  - ii. Contenedor amarillo: Residuos patológicos (órganos, tejidos, células biológico-infecciosas).

#### 4.9 Costo del proyecto

**Tabla 3.** Costo de materiales y reactivos del proyecto.

Material	Costo	Materiales	Costo
<b>4-Etilaminobenzoato</b>	\$ 766.00	Sílice gel	\$ 3,950.00
<b>Difenilfosfita</b>	\$ 672.00	Pinzas para refrigerante	\$ 150.00
<b>4-Clorobenzaldehído</b>	\$ 754.00	Micropipeta	\$ 3,750.00
<b>4-Bromobenzaldehído</b>	\$ 1,397.00	Puntas para pipeta	\$ 250.00
<b>4-Fluorobenzaldehído</b>	\$ 1,639.00	Viales	\$ 100.00
<b>1-metil-1H-pirazol-4-carboxaldehído</b>	\$ 2,068.00	Matraces	\$ 1,000.00
<b>3-fenil-1H-pirazol-4-carboxaldehído</b>	\$ 1,710.00	Cuba cromatográfica	\$ 380.00
<b>Carbonato de potasio</b>	\$ 1,259.00	Columnas	\$ 2,700.00
<b>Disolventes</b>	\$ 1,500.00	Tapas de viales de reacción	\$ 1,000.00
<b>medios de cultivos</b>	\$4,000.00	Barras agitación	\$ 65.00

<b>Líneas celulares</b>	\$6,000.00	Vial de reacción	\$ 500.00
<b>Suma</b>	\$11,765.00	<b>Suma</b>	\$ 13,845.00
<b>Costo aproximado del proyecto</b>			\$ 35,610.00

## CAPITULO 5

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos de la síntesis, la purificación y la elucidación estructural de los compuestos, así como los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* de su actividad antifúngica, su citotoxicidad y los estudios de modelado molecular de las moléculas que presentaron mayor actividad.

#### 5.1 Síntesis de $\alpha$ -aminofosfonatos

La síntesis de los  $\alpha$ -aminofosfonatos se realizó de acuerdo con la reacción “one pot” de Kabachnik-Fields, en la que se hace reaccionar el aldehído correspondiente, el 4-etilaminobenzoato y la difenilfosfita, en 4 mL de etanol y agitación en vórtex a temperatura ambiente, para cada uno de los compuestos se observó un precipitado color blanco, a continuación, se detallará lo observado para cada uno de los compuestos sintetizados.

**Compuesto 31a.** Es el compuesto derivado del 4-Fluorobenzaldehído, se agitó en vórtex a temperatura ambiente (21°C), durante la reacción no se observa cambio alguno hasta los 15 minutos se forma un precipitado de color blanco, el producto se verificó por cromatografía en capa fina (CCF).

**Compuesto 31b.** Es el compuesto derivado del 4-Clorobenzaldehído, se agitó en vórtex a temperatura ambiente (21°C), al minuto de la agitación se observa un precipitado en forma de cristales finos, sin embargo, en el análisis por cromatografía de capa fina (CCF) se observan las materias primas, esto es debido a la formación de la imina en la reacción la cual es insoluble en etanol, la presencia de las materias primas en la placa es debido a que la acidez de la placa de sílice es suficiente para romper el doble enlace de la imina, además se tienen antecedentes en el grupo de investigación en los que a pesar de que en la CCF se observan las materias primas en el espectro de RMN de protón y carbono se observan las señales que se esperarían de la imina, sin embargo, si a la reacción se deja agitar por más tiempo se puede observar a los 15 minutos de agitación que la imina se disuelve en el etanol y a los 25 minutos vuelve aparecer un precipitado diferente al observado inicialmente, ya que en vez de ser cristales finos se tiene un producto grumoso en el medio de reacción, al verificar en CCF se puede observar la formación de un nuevo producto que tiene un factor de retención (Rf) diferente al de las materias primas, es importante señalar que la temperatura y el tiempo es un factor determinante en la formación de este producto ya que a una temperatura mayor a los 21 °C, como por ejemplo a una temperatura de 25 °C no se observa la formación de precipitado sino hasta los 45 minutos de agitación.

**Compuesto 31c.** Es el compuesto derivado del 4-Bromobenzaldehído, para este compuesto se observa la formación del precipitado de manera inmediata al

agregar la difenilfosfita a la solución que previamente contenía la amina y el aldehído correspondiente, se verificó la formación del producto por CCF y se observó una mancha con Rf diferente a las materias primas, para asegurar que la reacción se lleve por completo se dejó agitar por 5 minutos en vórtex.

**Compuesto 31d.** Es el compuesto derivado del 1-H-pirazol-4-carboxaldehído, se agita en vórtex a temperatura ambiente (17 °C), no se observa cambio hasta la formación del precipitado a los 15 minutos, en este caso también es importante señalar que la temperatura es un factor en la formación del precipitado ya que, a una temperatura de 23 °C, no se observa la formación de precipitado aun cuando se deje agitar por más de 90 minutos, esto se debe probablemente a que se trata de una reacción exotérmica, la formación del producto se siguió por CCF.

**Compuesto 31e.** Es el compuesto derivado de 3-fenil-1H-pirazol-4-carboxaldehído, en este caso el aldehído es insoluble en etanol, sin embargo, al agregar el 4-etilaminobenzoato se vuelve soluble en el medio de reacción por la formación de la imina correspondiente, posteriormente al agregar la difenilfosfita se mantiene soluble en el medio de reacción hasta la formación de un precipitado a los 15 minutos.

**Compuesto 31f.** Es el compuesto derivado de 3-(4-fluorofenil)-1H-pirazol-4-carbozaldehído el aldehído es insoluble en etanol, al agregar el 4-etilaminobenzoato se mantiene insoluble en el medio de reacción, sin embargo, al agregar la difenilfosfita, la mezcla de reacción se solubiliza en el medio, al continuar la agitación por 5 minutos se observa la formación de un precipitado, el producto de reacción se verificó por CCF.

A continuación, se muestra en la **Tabla 4** el resumen de los tiempos de reacción de cada compuesto y los rendimientos correspondientes.

**Tabla 4.** Tiempos de reacción y rendimientos de  $\alpha$ -aminofosfonatos

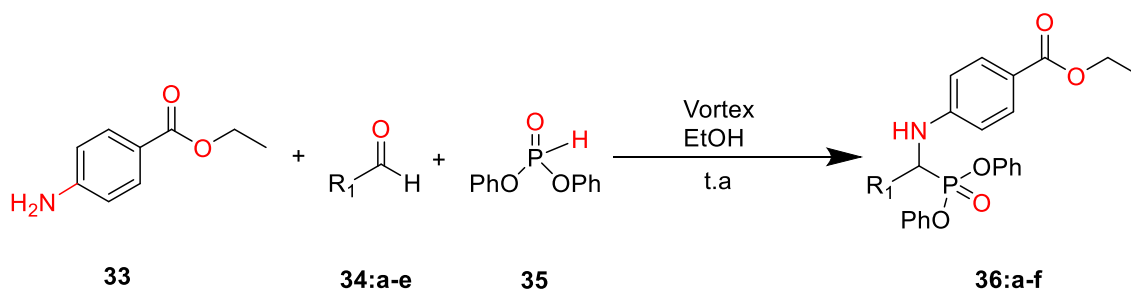
Compuesto	Tiempo reacción (min)	Rendimiento (%)
<b>31a</b>	15	77
<b>31b</b>	25	65
<b>31c</b>	5	50
<b>31d</b>	15	92
<b>31e</b>	15	98
<b>31f</b>	15	95

El comportamiento de los compuestos en la mezcla de reacción se puede explicar a partir de las características fisicoquímicas de los reactivos y de los productos con base en la polaridad de los solutos en un solvente polar como el etanol que tiene disponible grupos hidroxilo para la formación de puentes de hidrógeno y una parte alifática que puede tener interacciones de Van der Waals, el 4-etilaminobenzoato tiene una amina primaria con dos protones disponibles para la



formación de puentes de hidrógeno, de igual manera tiene un grupo éster con dos oxígenos que pueden formar puentes de hidrógeno con el disolvente, por otro lado la difenilfosfita es líquida lo que ayuda a disolverse en el medio además de que posee un oxígeno y un hidrógeno en su estructura que ayudan a la formación de puentes de hidrógeno, por otro lado, los aldehídos tienen en común la presencia del grupo carbonilo que ayuda en la solubilidad de este reactivo en un medio polar, sin embargo, esto solo aplica para los aldehídos halogenados derivados del benzaldehído (4-Fluorobenzaldehído, 4-Clorobenzaldehído y 4-Bromobenzaldehído) y para el 1-metil-1H-pirazol-4-carboxaldehído, en este último la presencia de los nitrógenos con pares de electrones facilita su solubilidad en medios polares, en el caso de los otros dos aldehídos derivados de pirazol (3-fenil-1H-pirazol-4-carboxaldehído y 3-(4-fluorofenil)-1H-pirazol-4-carboxaldehído), la presencia de los anillos aromáticos, el tamaño de la molécula y su carácter apolar los hace insolubles en etanol.

La formación de un precipitado en todas las reacciones se basa en el mismo principio de la solubilidad, en todas las reacciones con los diferentes sustituyentes de aldehídos de manera general se pierden las interacciones del tipo puente de hidrógeno de las materias primas con la formación del carbono quiral de la molécula, además de que la molécula final es más grande y con un número mayor de anillos aromáticos que dificultan su solubilidad en etanol **(Figura 5)**.



**Figura 5.** Sustituyentes de los reactivos y del producto que pueden formar puentes de hidrógeno con el etanol (marcados en rojo).

Otro de los factores importantes en la formación del precipitado es la temperatura, ya que en el caso de los compuesto **31b** y **31d**, solo se observa cuando la temperatura es igual o menor a los 21°C, esto también se debe a las características fisicoquímicas de las moléculas en solución ya que a menor temperatura menor solubilidad del soluto en el disolvente, esto ha sido reportado por Gaoquan y colaboradores<sup>35</sup> en un estudio donde se evalúa la relación de la temperatura y la solubilidad de compuestos orgánicos en diferentes solventes, en dicho trabajo se observa que a menor temperatura menor solubilidad del compuesto en el medio. Se puede observar en la **Tabla 4** el tiempo en el que se genera el precipitado no indica que la reacción se lleve por completo o sea más favorecida, como es el caso de los aldehídos halogenados, en específico el compuesto **31c** que precipita en el momento en el que se agrega la difenilfosfita pero el rendimiento es menor comparado a los otros dos compuestos (**31a** y **31b**),

por lo que el precipitado se debe más a una cuestión de solubilidad en el medio del producto final que a un favorecimiento de la reacción por el sustituyente.

La metodología utilizada para la síntesis de los  $\alpha$ -aminofosfonatos presenta ventajas con respecto a otras metodologías de síntesis no convencional, como es: el vórtex que es un equipo más barato en comparación con microondas y ultrasonido; que usa cantidades mínimas de etanol un solvente común en los laboratorios de química orgánica de bajo costo que puede ser fácilmente recuperado y se omite el uso de catalizadores en la reacción.

#### **5.1.1 Purificación de los $\alpha$ -aminofosfonatos**

Como se mencionó en el apartado anterior los productos son insolubles en etanol debido a que son compuestos con pocos sustituyentes polares, por lo que la purificación de los compuestos se realizó por filtración al vacío y lavados con etanol frío. Al realizar la filtración parte del producto se filtra en las aguas madres, sin embargo, este puede llevarse a recristalización, para posteriormente volver a filtrar, este proceso se puede realizar tantas veces como se observe el precipitado, y presenta ventajas frente a la purificación en columna, como lo son: la omisión del uso de la sílice la cual es costosa y contaminante a la hora de su disposición; no se usa un sistema de disolventes para la purificación, el etanol se puede recuperar por destilación en rotavapor y ser usado para otras reacciones o lavados; el proceso de filtración es más rápido y eficiente que la columna, ya que en esta última se puede dar el caso de que el producto salga con impurezas

(materia prima o subproductos) por la mala elección del sistema de solventes, por lo que el costo-beneficio favorece la purificación por filtración y recristalización.

### 5.1.2. Elucidación estructural de los $\alpha$ -aminofosfonatos

La identificación estructural de los  $\alpha$ -aminofosfonatos se realizó por Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  (RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) y por Espectrometría de Masas de alta resolución.

#### Elucidación estructural del compuesto 31a

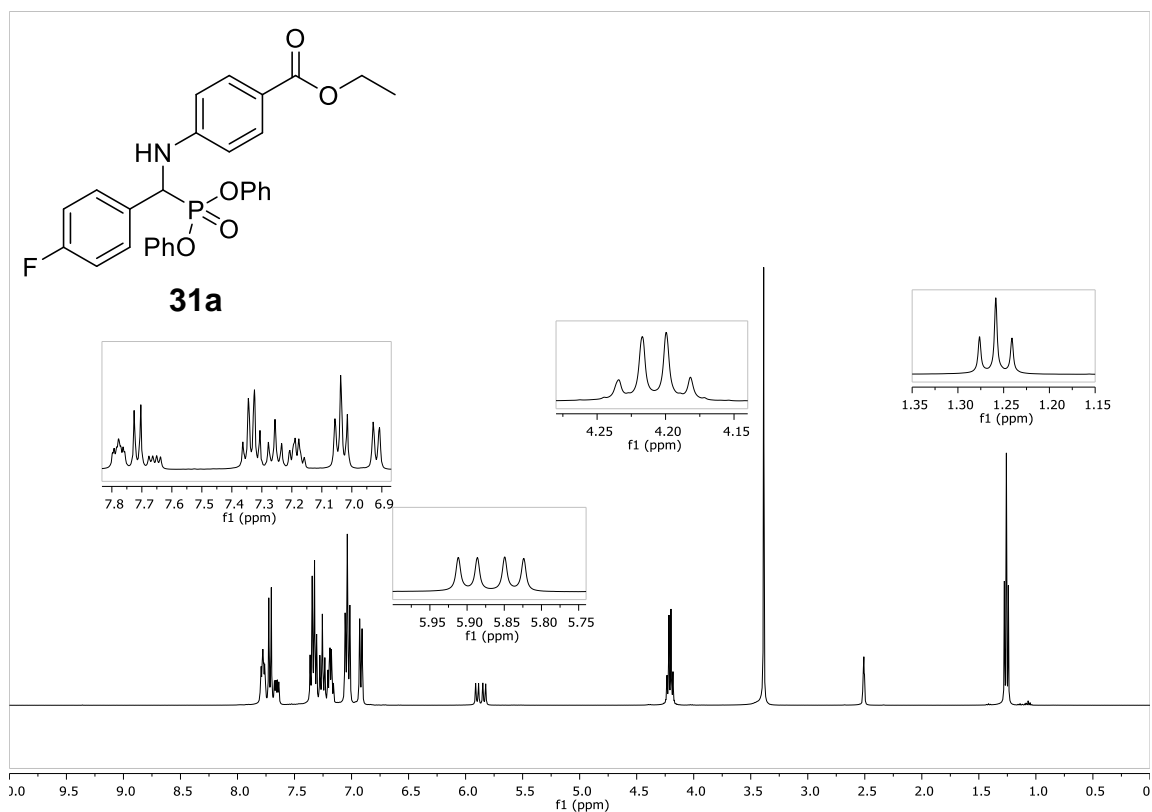
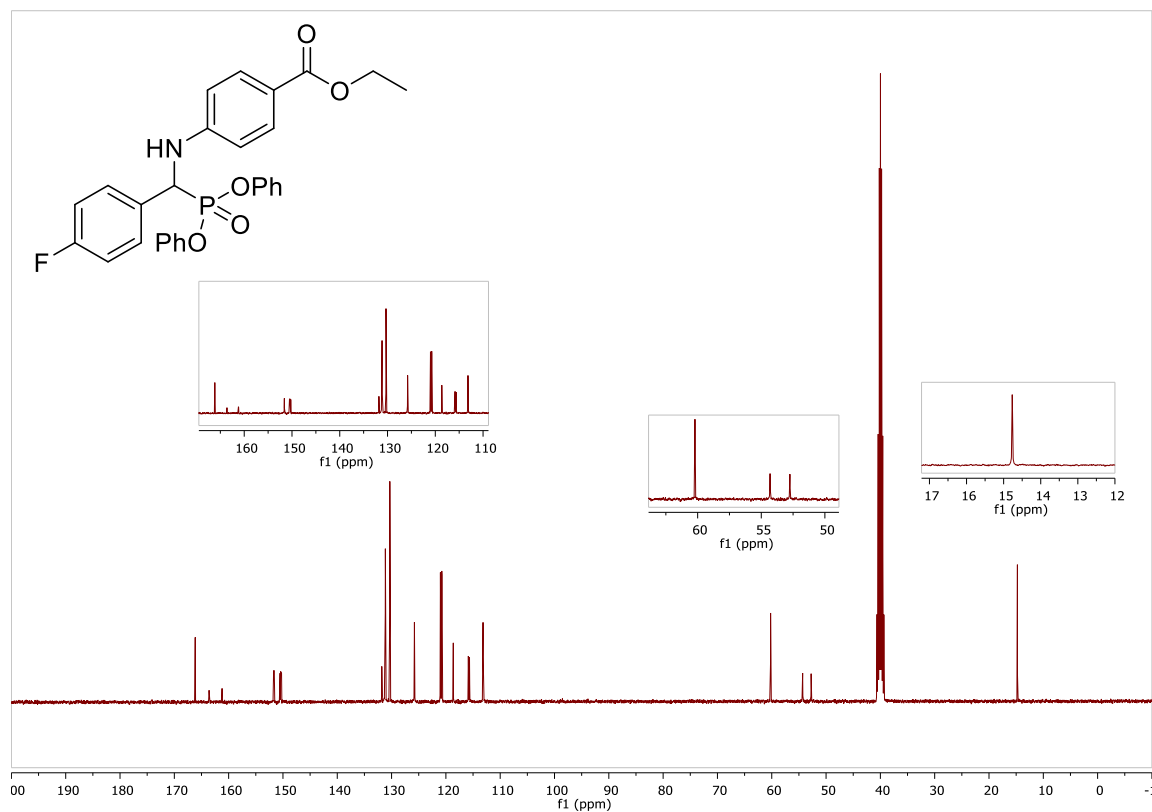


Figura 6. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) del compuesto 31a.

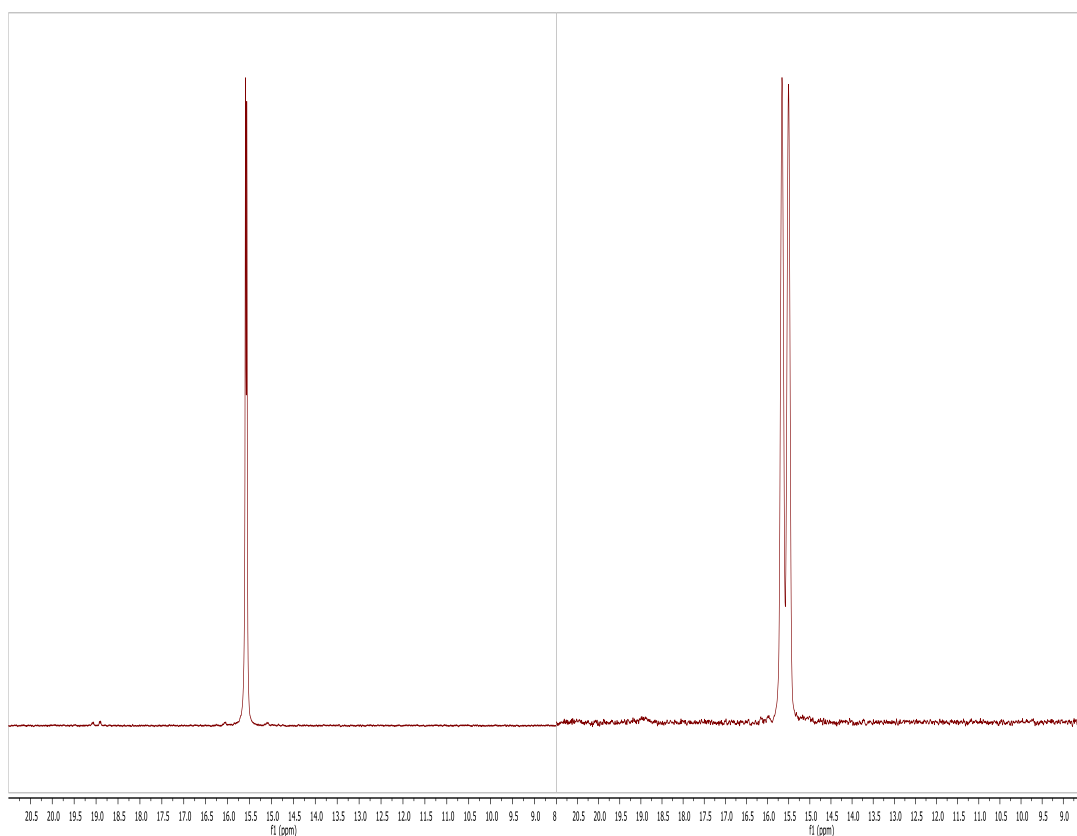
En el espectro de la **Figura 6** se muestran las señales que nos ayudan a corroborar que se obtuvo el compuesto propuesto. A continuación se detallan las señales observadas de la molécula **31a**: con un desplazamiento ( $\delta$ ) de 1.25 ppm se observa un triplete con una constante de acoplamiento ( $J$ ) de 7.1 Hz, que integra para 3 protones y que corresponde a los protones del metilo del grupo etoxilo, en un  $\delta$  de 4.20 ppm se observa un cuarteto con  $J = 7.1$  Hz, que integra para 2 protones y que corresponde a los protones del metileno del mismo grupo etoxilo; en  $\delta$  5.86 ppm se observa un doble de dobles con  $J$ 's = 24.9 y 10.2 Hz, que integra para 1 protón y corresponde al protón en el carbono quiral de la molécula, en este caso se da un doble de dobles debido a que el protón se está acoplando tanto al fósforo como al protón de la amina. En la región de los protones aromáticos se observan las siguientes señales: en  $\delta$  6.98 - 7.07 ppm un multiplete que integra para 4 protones, en  $\delta$  7.14 - 7.21 ppm un multiplete que integra para dos protones, en  $\delta$  7.23 - 7.27 un multiplete que integra para 2 protones, en  $\delta$  7.30 - 7.36 ppm un multiplete que integra para cuatro protones, en  $\delta$  7.65 ppm un doble de dobles con  $J$ 's = 10.2 y 5.1 Hz que integra para un protón y que pertenece al protón de la amina que se acopla al protón del carbono quiral y al fósforo que se encuentra a tres enlaces, en  $\delta$  7.71 ppm se observa una señal doble con  $J = 8.9$  Hz que integra para dos protones y en  $\delta$  7.75 - 7.79 ppm se observa un multiplete que integra para dos protones. Es importante señalar que las señales más importantes son las señales de acoplamiento del protón quiral

con el fósforo y con el protón de la amina, así como la señal de acoplamiento del protón de la amina con el protón de la parte quiral de la molécula y el fósforo, este último a tres enlaces de distancia, ya que estas señales son las que sirven de base para aseverar que se obtuvo el compuesto luego de la unión de los 3 reactivos de la síntesis llevada a cabo. Por otro lado, también existe el acoplamiento del Flúor con los protones aromáticos, sin embargo, debido a la complejidad de las señales en esta región dificulta encontrar dichos acoplamientos.



**Figura 7.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) del compuesto **31a**.

En la **Figura 7** se muestra el espectro de carbono 13 del compuesto **31a**, se pueden apreciar las señales de la región de alifáticos en los siguientes desplazamientos: en  $\delta$  14.3 ppm se observa la señal del metilo del grupo etoxilo del éster, en  $\delta$  53.1 ppm con  $J = 156.7$  Hz se observa un doble que corresponde al acoplamiento del fósforo con el carbono quiral del compuesto, en  $\delta$  59.7 ppm se observa la señal del carbono del metileno del grupo etoxilo del éster; en la región de los carbonos aromáticos se observan las siguientes señales: en  $\delta$  112.7 ppm una señal simple, en  $\delta$  115.3 ppm un doble con  $J = 21.6$  Hz, en  $\delta$  118.2 ppm una señal simple, en  $\delta$  120.3 ppm un doble con  $J = 4.0$  Hz, en  $\delta$  120.5 ppm un doble con  $J = 4.0$  Hz, en  $\delta$  125.3 ppm un doble con  $J = 2.9$  Hz, en  $\delta$  129.8 ppm un doble con  $J = 4.4$  Hz, en  $\delta$  130.7 ppm una señal doble con  $J = 14.6$  Hz, en  $\delta$  131.3 ppm un doble con  $J = 2.9$  Hz, en  $\delta$  149.9 ppm un doble con  $J = 10.0$  Hz, en  $\delta$  150.0 ppm un doble con  $J = 10.0$  Hz, en  $\delta$  151.2 ppm un doble con  $J = 12.4$  Hz, en  $\delta$  161.9 ppm un doble con  $J_{CF} = 244.3$  Hz que corresponde al acoplamiento entre el Flúor y el Carbono a un enlace de distancia, en  $\delta$  165.7 ppm se observa la señal característica del carbono del carbonilo. Es importante puntualizar que las señales dobles que se observan en la región de los aromáticos se deben al acoplamiento entre los carbonos y los átomos de Flúor y Fósforo que debido a la complejidad de los espectros no fue posible asignar.



**Figura 8.** Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) del compuesto **31a**.

En la **Figura 8** se muestra los espectros del fósforo desacoplado y acoplado a protón del compuesto **31a**, el espectro de fósforo desacoplado nos muestra la presencia del fósforo en la molécula, por otro lado, el espectro de fósforo acoplado a protón nos indica que existe un acoplamiento entre el fósforo y el protón del carbono quiral con una  $J = 25.4$  Hz.



### 5.1.3. Espectrometría de Masas de alta resolución

En el análisis de HRMS (ESI+) m/z, el valor calculado para el compuesto **31a** es de 506.1533 y el peso del pico del ion molecular encontrado fue de 506.1464, una diferencia aceptable y que nos ayuda a corroborar que el compuesto propuesto fue obtenido por el método de síntesis establecido. En la **Tabla 5** se muestran los valores calculados y encontrados por este método para cada compuesto sintetizado de la serie de  $\alpha$ -aminofosfonatos.

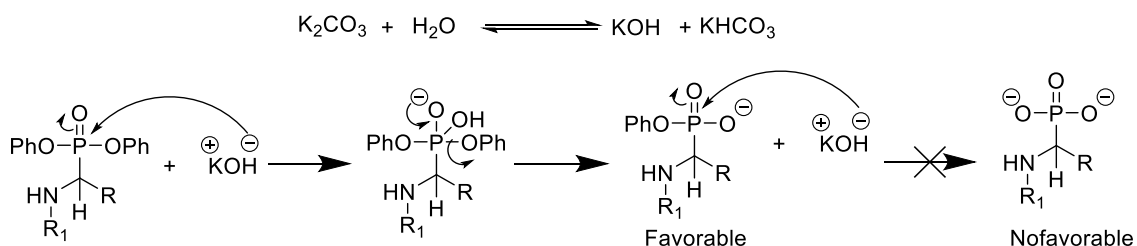
**Tabla 5.** Valores de HRMS (ESI+) m/z, calculados y encontrados para la serie de  $\alpha$ -aminofosfonatos.

Compuesto	Valor calculado	Valor encontrado
<b>31a</b>	506.1533	506.1464.
<b>31b</b>	522.1159	522.1128.
<b>31c</b>	566.0732	566.0699
<b>31d</b>	492.1610	492.1612
<b>31e</b>	554.1845	554.1801
<b>31f</b>	572.1751	572.1630

### 5.2 Síntesis de ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados

La síntesis de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados se llevó a cabo por una hidrólisis básica entre los  $\alpha$ -aminofosfonatos de la Serie 1 y el carbonato de potasio (1 Eq.), se llevó a irradiación de microondas a una temperatura de 140 °C por 20 minutos, el disolvente que se usó fue etanol y agua (3:1), la presencia de agua en el disolvente ayuda a que el carbonato de potasio se convierta en hidróxido de potasio una base más fuerte que puede atacar al fósforo y llevar a

cabo la hidrólisis parcial, es importante mencionar que no se lleva a cabo la hidrólisis total debido a que la reacción ocurre en un medio básico, al no haber disponibilidad de hidrógenos en el medio de reacción la hidrólisis total generaría que ambos oxígenos adquirieran carga negativa lo cual resulta en una condición no favorable en la estabilidad de la molécula.



**Esquema 10.** Posible mecanismo de reacción de la obtención de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados

Una vez que se lleva a cabo la reacción por microondas se puede observar que existe la formación de un compuesto con características fisicoquímicas diferentes ya que de manera visual el nuevo compuesto es soluble en el medio de reacción, como ya se mencionó anteriormente los  $\alpha$ -aminofosfonatos son insolubles en etanol, por lo que la solubilidad es un indicativo de que existe la formación de un nuevo producto ya que el producto es un ácido por lo que es de esperarse que presente mayor solubilidad en el etanol que el  $\alpha$ -aminofosfonato correspondiente. Al llevar a cabo el seguimiento de la reacción por CCF, se puede observar en un sistema con fase móvil 7:3 Hexano/acetato de etilo una retrosíntesis del  $\alpha$ -aminofosfonato ya que se observan manchas que presentan RZALDEHÍf iguales

a la amina, a la fosfita y al aldehído correspondiente al materia prima del  $\alpha$ -aminofosfonato, sin embargo, también se observa una mancha que queda en el punto de aplicación y que solo es posible hacer ascender por la placa de CCF con un sistema 7:3 Acetato de etilo/metanol, es decir el nuevo compuesto es más polar que la materia prima (el  $\alpha$ -aminofosfonato correspondiente), lo que dio un primer indicio de la formación del ácido esperado.

Como se mencionó en la introducción son pocos los reportes que se tienen de la hidrólisis parcial de  $\alpha$ -aminofosfonatos, las condiciones que son reportadas por investigadores como por ejemplo Dawson en las que se hace uso de ácido clorhídrico al 20% (v/v).<sup>31</sup> Son en general condiciones de reacción fuertes ya que usan bases y ácidos fuertes además de catalizadores y son metodologías tradicionales con largo tiempo de duración,<sup>24,25</sup> por lo que el presente trabajo presenta ventajas en la síntesis como son: el uso de microondas como método no convencional que disminuye los tiempos de reacción y que representa una metodología verde debido al uso de disolventes en cantidades mínimas, se hace uso de una base débil (carbonato de potasio) por lo que se está llevando a cabo una reacción en condiciones suaves.

### **5.2.1. Purificación de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados**

Como se mencionó en el apartado anterior los ácidos son más solubles en etanol que los  $\alpha$ -aminofosfonatos correspondientes, por lo tanto, no es posible llevar a

cabo una purificación por filtración y es necesario el uso de la columna cromatográfica con gel de sílice para la obtención de los productos puros.

Tal como se mencionó anteriormente, el nuevo producto es más polar que su precursor, por lo que se usó una fase móvil 7:3 acetato de etilo/metanol para llevar a cabo la purificación. A continuación, se muestran los rendimientos obtenidos para cada compuesto (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Rendimientos obtenidos de la serie de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.

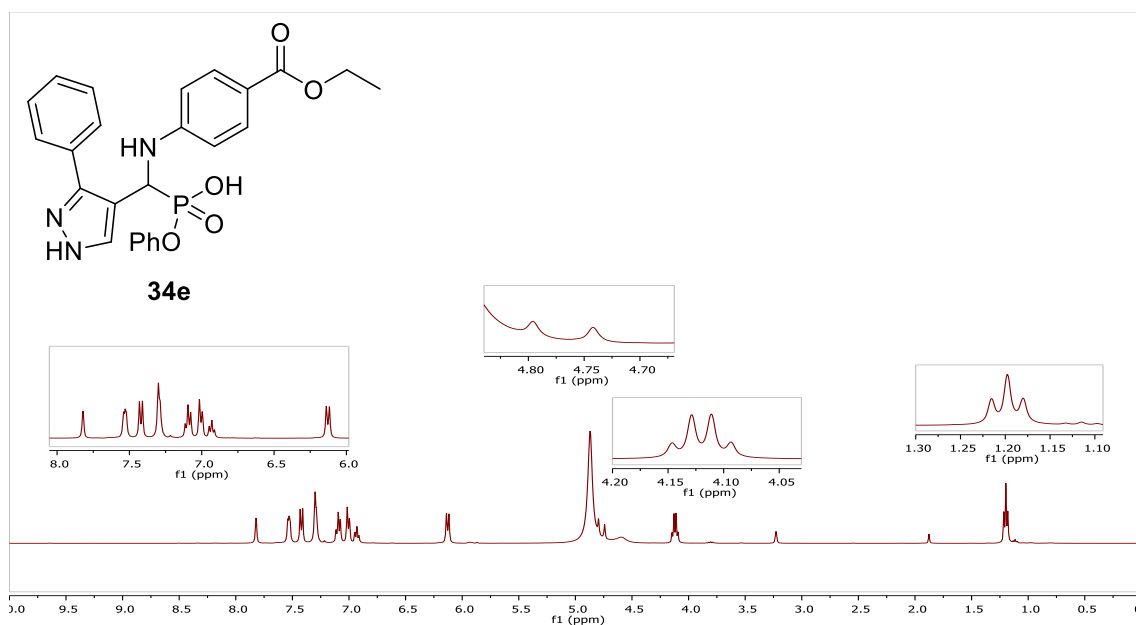
Compuesto	Rendimiento (%)
<b>32<sup>a</sup></b>	63
<b>32<sup>b</sup></b>	65
<b>32<sup>c</sup></b>	71
<b>32<sup>d</sup></b>	54
<b>32<sup>e</sup></b>	49
<b>32<sup>f</sup></b>	61

Se puede ver que los rendimientos son de moderados a buenos (49 – 71 %), esto se atribuye a la descomposición del  $\alpha$ -aminofosfonato a sus materias primas, además de que se observan otros subproductos de la reacción, que no fueron identificados, que disminuyen el rendimiento final.

### **5.2.2. Elucidación estructural de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados**

La elucidación estructural de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados se llevó a cabo por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ .

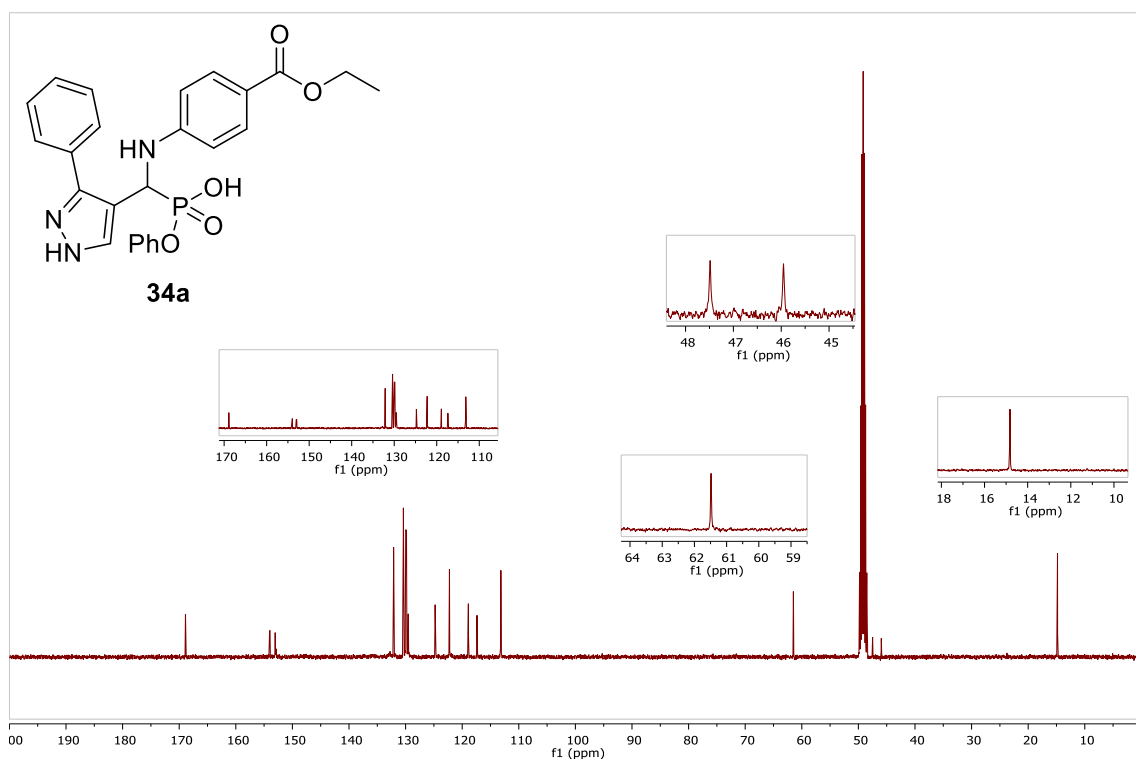
## Elucidación estructural del compuesto **32e** por RMN



**Figura 9.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz, MEOD) del compuesto **32e**.

En el espectro de RMN de protón de la **Figura 9** se observan las señales para el compuesto **32e**, las señales son las siguientes: con un desplazamiento de  $\delta$  1.20 ppm se observa un triplete con  $J = 7.1$  Hz que integra para 3 protones y que corresponde al metilo de la parte etoxilo, en  $\delta$  4.12 ppm se observa un cuarteto con  $J = 7.1$  Hz que integra para 2 protones y que corresponde al metileno del grupo etoxilo del éster; en  $\delta$  4.77 ppm un doble con  $J = 21.7$  Hz que integra para un protón y corresponde al protón en el carbono quiral del compuesto que se acopla al fósforo. Es importante mencionar, que solo se observa una constante de acoplamiento debido a que la muestra se corrió en MeOD como solvente por lo que existe un intercambio entre el protón de la amina y el Deuterio del solvente.

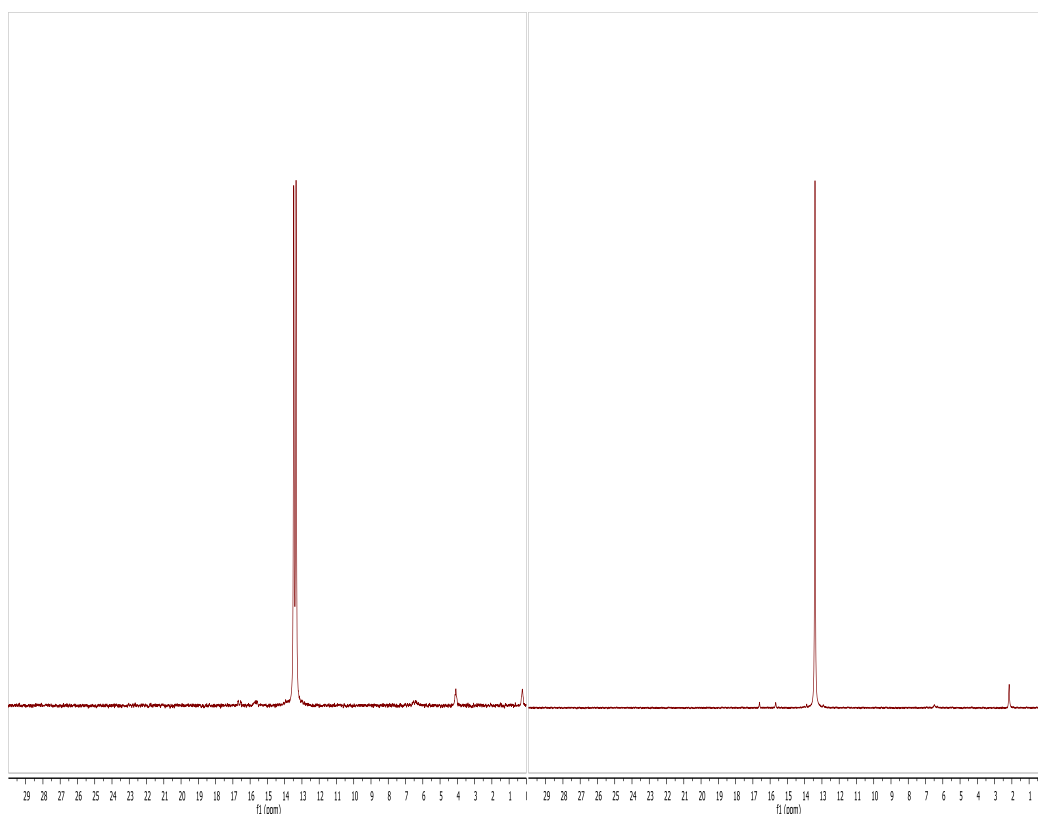
En la región de los aromáticos se observan las siguientes señales: en  $\delta$  6.13 ppm se observa un doble con  $J = 8.4$  Hz que integra para dos protones, en  $\delta$  6.91 - 6.95 ppm un multiplete que integra para un protón, en  $\delta$  6.99 - 7.01 ppm un multiplete que integra para dos protones, en  $\delta$  7.08 - 7.11 ppm un multiplete que integra para dos protones, en  $\delta$  7.29 - 7.30 un multiplete que integra para tres protones, en  $\delta$  7.42 ppm un doble con  $J = 8.5$  Hz que integra para dos protones, en  $\delta$  7.52 - 7.54 ppm un multiplete que integra para dos protones, en  $\delta$  7.82 una señal ancha que integra para un protón que corresponde al protón del anillo de pirazol, cabe señalar que, como la muestra se corrió en MeOD como solvente, las señales de los protones pertenecientes a los nitrógenos no se observan por el intercambio con el Deuterio del solvente. A partir de la integración de los protones en la región de los aromáticos se puede aseverar que se llevó a cabo la hidrólisis parcial de los  $\alpha$ -aminofosfonatos ya que el conteo de catorce protones corresponde a la pérdida de un anillo aromático (tomando también en cuenta el intercambio que existe con el Deuterio del solvente).



**Figura 10,** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (400 MHz, MEOD) del compuesto **32e**

En el espectro de carbono 13 que se muestra en la **Figura 10** se observan las siguientes señales: en  $\delta$  14.7 ppm la señal del carbono del metilo del grupo etoxilo del éster; en  $\delta$  46.6 ppm un doble con  $J = 154.3$  Hz que corresponde al acoplamiento del carbono quiral de la molécula con el fósforo, en  $\delta$  61.3 ppm se observa la señal del carbono del metileno del grupo etoxilo. En la región de los aromáticos se observan las siguientes señales: en  $\delta$  113.0 ppm una señal simple, en  $\delta$  117.2 ppm una señal simple, en  $\delta$  118.8 ppm una señal simple, en  $\delta$  122.1 ppm un doble con  $J = 4.0$  Hz que corresponde a un acoplamiento Carbono-Fósforo a tres enlaces, en  $\delta$  124.6 ppm una señal simple, en  $\delta$  129.4 ppm una

señal simple, en  $\delta$  129.8 ppm un doble con  $J = 14.0$  Hz que corresponde al acoplamiento Carbono Flúor a dos enlaces, en  $\delta$  130.2 ppm una señal simple, en  $\delta$  132.0 ppm una señal simple, en  $\delta$  152.8 ppm un doble con  $J = 11.6$  Hz que corresponde al acoplamiento Carbono-Fósforo a dos enlaces de distancia, en  $\delta$  153.8 ppm un doble con  $J = 7.8$  Hz que corresponde al acoplamiento Carbono-Flúor a tres enlaces y en  $\delta$  168.7 ppm la señal característica de un carbonilo.



**Figura 11.** Espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  (400 MHz, MEOD) del compuesto **32a**.

En la **Figura 11**, se muestran los espectros de RMN de fósforo 31 acoplado y desacoplado a protón, que dan indicios de que el compuesto contiene fósforo y



este se está acoplado al carbono quiral, en fósforo acoplado a protón se observa en  $\delta$  13.41 ppm se observa un doble con  $J = 21.4$  Hz, debido al acoplamiento fósforo-protón.

### 5.2.3. Espectrometría de Masas de alta resolución

En el análisis de HRMS (ESI+)  $m/z$ , el valor calculado para el compuesto **32e** es de 478.1532 y el peso del pico del ion molecular encontrado fue de 478.1513, una diferencia aceptable y que nos ayuda a corroborar que el compuesto propuesto fue obtenido por el método de síntesis utilizado. En la **Tabla 7** se muestran los valores calculados y encontrados por este método para cada compuesto sintetizado de la segunda serie.

**Tabla 7.** Valores de HRMS (ESI+)  $m/z$ , calculados y encontrados para la serie de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados.

Compuesto	Valor calculado	Valor encontrado
<b>32a</b>	430.1220	430.1134
<b>32b</b>	446.0924	446.0846
<b>32c</b>	490.0419	490.0316
<b>32d</b>	416.1375	416.1337
<b>32e</b>	478.1532	478.1513
<b>32f</b>	496.1438	496.1340

De manera general para ambas series de compuestos se puede observar en el espectro de protón, todos los compuestos (**31a-f** y **32a-f**) muestran las señales características de los protones alifáticos correspondientes al grupo etoxi (tripleto y cuarteto). Adicionalmente, entre  $\delta$  4.50 y 5.88 ppm, es posible observar el doble correspondiente a la  $J$  de acoplamiento del  $CH-P$  mostrando valores de 19.9 a

25.4 Hz. En el espectro de Carbono 13, las  $J$ 's de acoplamiento de C-P se observan para cada compuesto con valores entre 139.2 y 165.1 Hz a desplazamientos químicos con un rango de 45.5-56.9 ppm. Es importante mencionar que para los compuestos **31a**, **31f**, **32a** y **32f** es posible observar el acoplamiento amplio C-F con valores de 244.3 y 248.1 Hz para **32a** y **32f** y de 240.3 y 246.5 Hz para **31a** y **31f** respectivamente (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , datos de acoplamiento  $\text{CH-P}$ ,  $\text{C-P}$  y  $\text{C-F}$  en compuestos **31a-f** y **32a-f**.

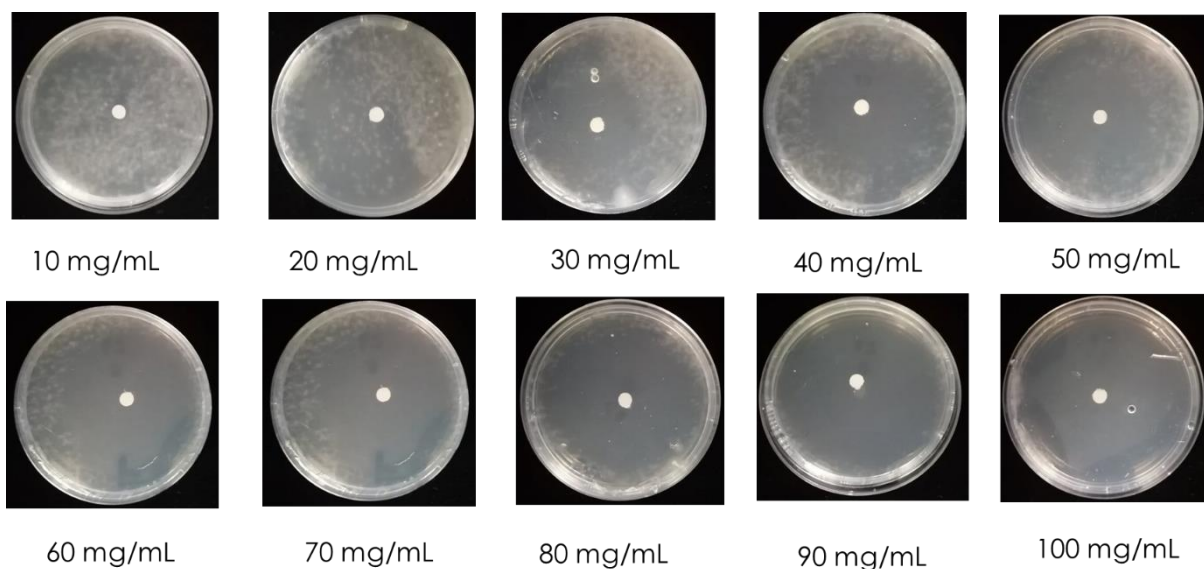
Compuesto	RMN de $^1\text{H}$ acoplamiento ( $J$ ) CH-P (Hz)	RMN de $^{13}\text{C}$ acoplamiento ( $J$ ) C- P (Hz)	RMN de $^{13}\text{C}$ Acoplamiento ( $J$ ) C-F (Hz)
<b>31a</b>	24.9	156.2	244.3
<b>31b</b>	25.1	156.2	-
<b>31c</b>	25.4	156.4	-
<b>31d</b>	22.1	163.0	-
<b>31e</b>	18.8	165.1	-
<b>31f</b>	19.9	164.7	248.1
<b>32a</b>	23.4	145.1	240.3
<b>32b</b>	23.6	143.3	-
<b>32c</b>	23.6	139.2	-
<b>32d</b>	22.4	149.2	-
<b>32e</b>	21.7	154.3	-
<b>32f</b>	21.5	153.4	246.5

### 5.3 Resultados de las pruebas biológicas

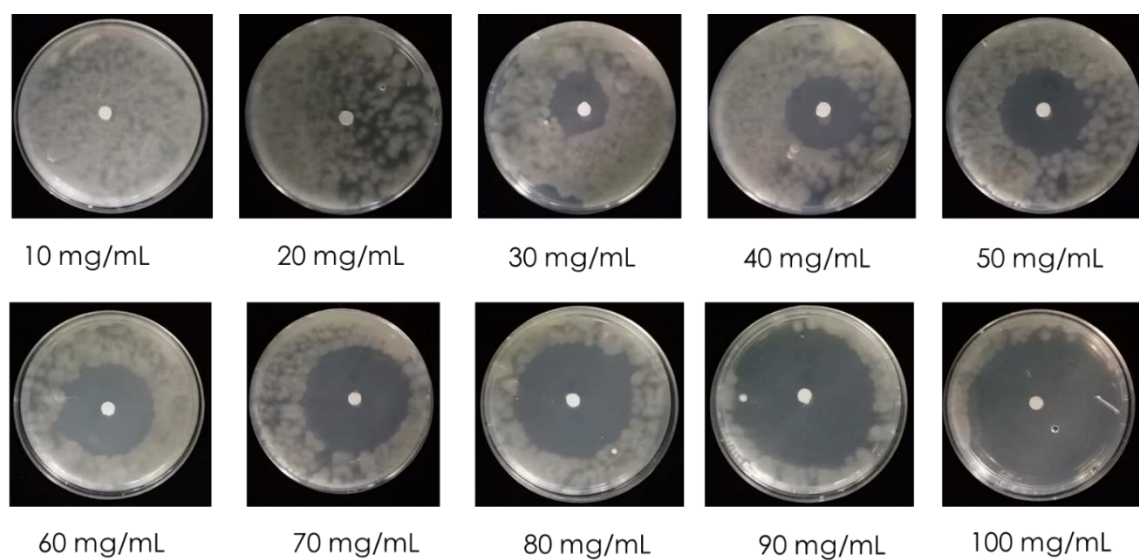
#### 5.3.1 Resultados de pruebas de difusión en agar

Los 12 compuestos sintetizados fueron evaluados por el método de difusión en agar contra las cepas de *S. boydii* (ZS-025), *S. apiospermum* (003-20) y *S. aurantiacum* (MC-070), el VRC fue usado como control positivo para la

comparación de los halos de inhibición de los compuestos, estos fueron medidos a las 72 horas, los resultados mostraron que las series de  $\alpha$ -aminofosfonatos (**31a-f**) no presentaron halos de inhibición medibles ( $\geq 1$  mm) a las diferentes concentraciones evaluadas, por otro lado, la serie de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados (**32a-f**) mostraron halos de inhibición medibles. Esto pudo deberse a la presencia del grupo hidroxilo que les da un carácter polar a las moléculas lo que facilita su difusión por el medio, en contraste con los difosfonoésteres de las series de los  $\alpha$ -aminofosfonatos donde las interacciones por enlaces de hidrógeno son menos significantes, impidiendo la correcta difusión<sup>36</sup>. De las series de ácidos, los compuestos **32a** y **32f** mostraron halos de inhibición comparables al VRC, el compuesto **32a** presentó halos de inhibición parecidos al VRC ( $10 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$ ) a una concentración de 5 mg/mL. Por otro lado, el compuesto **32f** mostró halos de inhibición mayores al VRC incluso a la menor concentración evaluada (1 mg/mL), (**Tabla 9** y **Figuras 12** y **13**). Con base en estos resultados, un segundo ensayo preliminar fue llevado a cabo con el compuesto **32f** por el método de difusión en caldo, con el propósito de optimizar la evaluación de la susceptibilidad de las 23 cepas del género *Scedosporium* mediante el protocolo M38-A2 del CLSI contra este compuesto, los resultados mostraron el 100% de inhibición de crecimiento de las tres cepas evaluadas en el rango 400 - 700  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 14** y **Figura 15**).



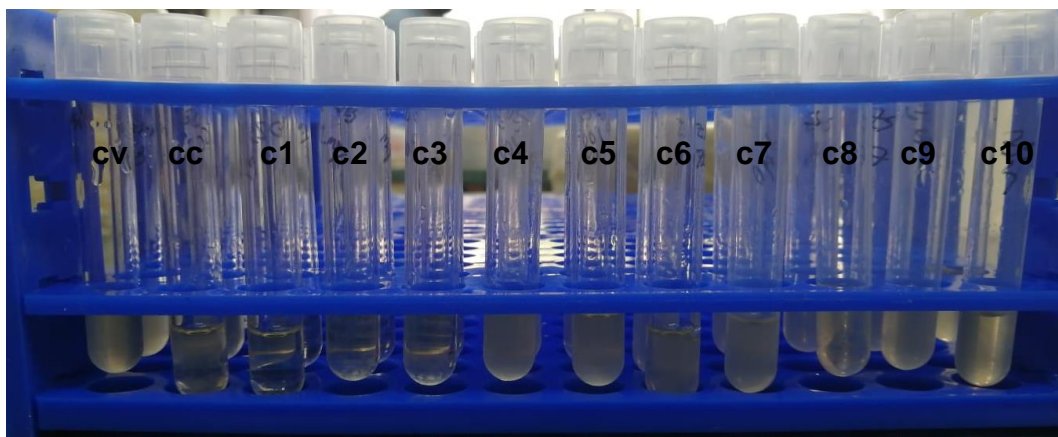
**Figura 12.** Halos de inhibición observados por el compuesto **32f** a las 48 horas.



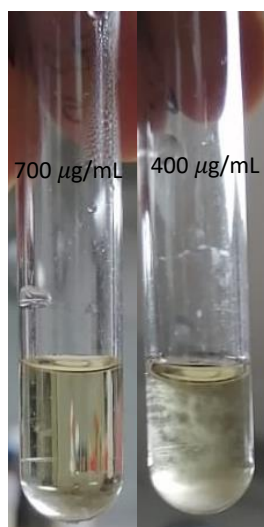
**Figura 13.** Halos de inhibición observados por el compuesto **32f** a las 72 horas

**Tabla 9.** Susceptibilidad *in vitro* por el método de difusión en agar de 3 cepas del género *Scedosporium* contra el VRC y los compuestos **31a-f** y **32a-f**.

Cepa / Antifúngico	Rango (mg/mL)	Rango de halo de inhibición (mm/72 h)
<b><i>S. apiospermum</i> (00-320)</b>		
VRC	0.016	≥ 10 mm
31a-f	1-10	1 ≥ 1mm
32a-f	1-10	2 ≥ 10mm
32f	0.1-1	7 ≥ 10mm
<b><i>S. boydii</i> (ZS-025)</b>		
VRC	0.016	≥ 10 mm
31a-f	1-10	1 ≥ 1mm
32a-f	1-10	1 ≥ 9mm
32f	0.1-1	5 ≥ 10mm
<b><i>S. aurantiacum</i> (MC-070)</b>		
VRC	0.016	≥ 10 mm
31a-f	1-10	1- ≥ 1mm
32a-f	1-10	2- ≥ 9mm
32f	0.1-1	3- ≥ 10mm



**Figura 14.** Resultados de las pruebas en caldo de cultivo hasta 700  $\mu\text{g/mL}$



**Figura 15.** Punto de corte de inhibición del 100 % de crecimiento a 700  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y sin inhibición a 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del compuesto **32f**.

### 5.3.2. Determinación de la $\text{CMI}_{100}$ contra 23 cepas por el protocolo M38-A2

El compuesto más activo (**32f**) fue evaluado contra 23 cepas del género *Scedosporium* (5 cepas de *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii* respectivamente y 3 cepas de *S. angustum*). El rango de las concentraciones evaluados para el experimento fue de 500-700  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la  $\text{CMI}_{100}$  fue determinada por media geométrica para el compuesto **32f** y los antifúngicos AMB, VRC y FLC, estos valores se muestran en la **Tabla 10**. Los resultados mostraron concordancia con los reportados previamente por Elizondo-Zertuche,<sup>16</sup> donde las cepas exhiben resistencia ante AMB con un rango en la media geométrica de 6.96 - 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , el FLC 36.75 - 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el VRC de 0.44 – 2.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (**Tabla 10**). Con respecto al compuesto **32f**, el presente proyecto

representa el primer estudio de una serie de  $\alpha$ -aminofosfonatos y una serie de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados contra diferentes especies del género *Scedosporium*, por lo que no existen reportes con los cuales comparar los resultados obtenidos, sin embargo, se pueden comparar de manera indirecta con trabajos como el de Mubarak<sup>26</sup> donde reporta la síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos y su actividad antifúngica contra cepas de *C. albicans*, *F. oxysporum*, *A. flavus*, *A. niger* y *C. neoformans*, en este trabajo reportan compuestos que presentan CMI<sub>100</sub> de 25  $\mu\text{g/mL}$ , con respecto al FLC usado como control que presenta una CMI<sub>100</sub> de 6.25  $\mu\text{g/mL}$ , por otra parte, a pesar de que el compuesto **32f** presenta un rango de actividad alto ( 648.76 - 700  $\mu\text{g/mL}$ ), es importante considerar que las especies del género *Scedosporium* exhiben una mayor resistencia al FLC que muchos otros hongos de importancia médica, con valores en algunas ocasiones superiores a los 64  $\mu\text{g/mL}$  para algunas especies (*S. aurantiacum* y *S. dehoogii*). Además, el compuesto **32f** presenta una menor citotoxicidad que este antifúngico en células sanas a 1000 $\mu\text{M}$ , convirtiéndolo en una opción promisorio para el tratamiento de infecciones causadas por hongos filamentosos que muestren resistencia ante los antifúngicos.

**Tabla 10.** Susceptibilidad *in vitro* de las 23 cepas del género *Scedosporium* contra antifúngicos y el compuesto **32f**

Cepas (n) / Antifúngico	Rango de CMI <sub>100</sub> (µg/mL)	Media geométrica de CMI <sub>100</sub> (µg/mL)
<b><i>S. apiospermum</i> (5)</b>		
AMB	2 – 16	6.96
VRC	1 – 4	2.64
FLC	64 ->64	64
<b>32f</b>	640 – 685	648.76
<b><i>S. aurantiacum</i> (5)</b>		
AMB	16 - >16	16
VRC	0.5 – 1	0.76
FLC	32 – 64	55.71
<b>32f</b>	700 >700	700
<b><i>S. dehoogii</i> (5)</b>		
AMB	16 - >16	16
VRC	0.5 – 1	0.87
FLC	32 – 64	36.75
<b>32f</b>	700 - >700	700
<b><i>S. boydii</i> (5)</b>		
AMB	8 - >16	8
VRC	0.25 – 1	0.44
FLC	32 – >64	45.25
<b>32f</b>	610 - >700	672.20
<b><i>S. angustum</i> (3)</b>		
AMB	8 - >16	8
VRC	0.5 – 1	0.63
FLC	32 – 64	50.80
<b>32f</b>	700	700

### 5.3.3 Determinación de citotoxicidad de los compuestos **32a** y **32f**

Para comparar la citotoxicidad en células sanas entre los dos compuestos que mostraron más actividad antifúngica (**32a** y **32f**) y el VRC, se realizó la prueba de MTT en células sanas de hígado de mono COS-7 a una concentración de



1000  $\mu\text{M}$  este valor es cercano a los 700  $\mu\text{g}$  para los compuestos, es decir, se evaluó la concentración más alta probada por el protocolo M38-A2, la razón de esto fue para poder comparar la toxicidad de los compuestos con el VRC a altas concentraciones, y de esta forma poder determinar si aún a pesar de la alta concentración de inhibición mostrada por el compuesto **32f** contra las cepas de *Scedosporium* este resulta ser menos tóxico que el VRC y de esta manera justificar su posible potencial como fármaco, también se realizó esta prueba con el compuesto **32a**. Los resultados obtenidos para la viabilidad celular fueron los que se muestran en la **Tabla 11**. De acuerdo con estos resultados, se puede observar que a pesar de la alta  $\text{CMI}_{100}$  del compuesto **32f** comparado al VRC, esta molécula (**32f**) presenta una menor toxicidad que el VRC a la misma concentración, es importante mencionar que uno de los principales efectos adversos del VRC es su hepatotoxicidad, lo que refuerza el hecho de que el compuesto **32f** al tener una menor toxicidad en células sanas, destaca la importancia de seguir estudiando este compuesto por métodos robustos para verificar su eficacia terapéutica en modelos *in vivo* como antifúngico.

**Tabla 11.** Citotoxicidad en células sanas COS-7 por el ensayo de MTT contra VRC y los compuestos **32a** y **32f**

Antifúngico/compuestos (1000 $\mu\text{M}$ )	Viabilidad (%)
VRC	65.80 $\pm$ 1.79
<b>32a</b>	55.20 $\pm$ 1.79
<b>32f</b>	73.51 $\pm$ 4.88
Etopósido (control 25 $\mu\text{M}$ )	84.0 $\pm$ 2.0

#### 5.4 Modelado molecular (Docking)

La lanosterol-14 $\alpha$ -desmetilasa es una proteína clave para la biosíntesis de ergosterol que, a su vez, es un componente importante de la membrana celular fúngica ya que es responsable de su integridad y función. Su insuficiencia provoca poros en la membrana, lo que ocasiona la muerte del hongo por ósmosis, por lo que la inhibición de esta proteína (Lanosterol-14 $\alpha$ -desmetilasa) resulta ser una de las principales dianas en el desarrollo de nuevos antifúngicos.<sup>37</sup>

De acuerdo con los resultados obtenidos por las pruebas *in vitro* para los compuestos **32a** y **32f**, se propuso que su posible mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de ergosterol por inhibición de la Lanosterol-14 $\alpha$ -desmetilasa, ya que a nivel microscópico se analizaron las hifas de las especies que fueron tratadas con los compuestos que presentaron actividad, se observó que la pared celular mostraba deformaciones, por lo que esto da una idea del

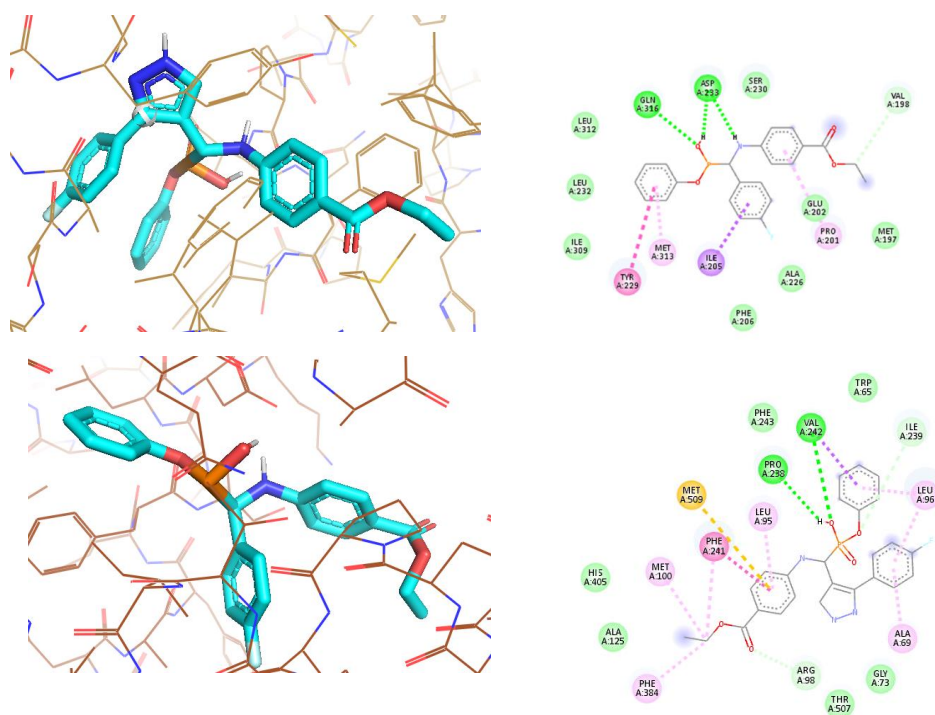
posible mecanismo de acción de los compuestos activos, para corroborar esta hipótesis se realizó un estudio de Docking molecular.

El sitio activo de Lanosterol-14 $\alpha$ -desmetilasa (PDB ID: 5HS1) se validó con el ligando cocrystalizado VRC. La diferencia espacial entre el ligando calculado y el original fue considerada con base a la desviación cuadrática media (RMSD por sus siglas en inglés), la cual fue de 2.5 Å, lo que indica una optimización adecuada para los valores de acoplamiento obtenidos. La validación se realizó con 1000 poses diferentes del ligando, diez repeticiones para cada uno, seleccionando el valor de energía más bajo. La visualización y superposición de proteínas se llevó a cabo utilizando Pymol 3.1 (Schrödinger, San Diego; <http://www.pymol.org/>).

Con el objetivo de obtener información sobre los probables sitios teóricos de unión de las moléculas **32a** y **32f** con la proteína 14- $\alpha$ -desmetilasa (entrada PDB 5HS1), diana principal de los azoles antifúngicos, estos compuestos se estudiaron mediante acoplamiento, lo cual se llevó a cabo con el programa Autodock Vina, utilizando un protocolo automatizado que, como se mencionó anteriormente, fue previamente validado con la predicción de unión entre la proteína y la estructura cristalina de VRC. El programa Autodock predijo con éxito el modo de unión del ligando cristalizado con una RMSD de 2.5 Å.

Según el programa Discovery Studio Visualizer, las interacciones observadas entre el compuesto **32a** con la proteína, en su pose más favorecida, son con el

bolsillo hidrofóbico formado por Leu312, Ser230, Met197, Glu202, Ala226, Phe206, Ile309 y Leu232, además de presentar interacciones del enlace de hidrógeno con los residuos Gln316 y Asp233, los anillos aromáticos presentan interacción del tipo  $\pi$  con Ile229 y Tyr229 (**Figura 16**). El compuesto **32f** se ubica en el bolsillo hidrofóbico formado por Ala125, His405, Phe243, Trp65, Ile239, Leu96, Gly73 y Thr507, también presenta interacciones tipo puente de hidrógeno con los residuos Pro238, Val242 e interacciones tipo  $\pi$  entre anillos aromáticos y residuos Phe241, Met509, Leu95, Val242, Leu96 y Ala69 (**Figura 16**).



**Figura 16.** Interacciones entre los compuestos **32a** y **32f** con la Lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa.

Los resultados obtenidos por acoplamiento molecular muestran la importancia de los sustituyentes mencionados en la sección de resultados *in vitro*, y también sugieren que el mecanismo de acción de los compuestos es por inhibición alostérica, ya que no hay interacción de las moléculas con el sitio activo de la proteína, la interacción de los azoles antifúngicos con el grupo hemo presente en el sitio activo de la Lanosterol-14 $\alpha$ -desmetilasa está relacionada con la toxicidad de esta familia de antifúngicos,<sup>38</sup> por lo que el hecho de que no exista interacción de las moléculas **32a** y **32f** con el sitio activo reduce su toxicidad, lo cual es corroborado por la pruebas citotóxicas cuyos resultados se presentaron en el apartado anterior.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES

6.1 La síntesis de seis nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos (**31a-f**) vía agitación en vórtex usando únicamente etanol como solvente y sin el uso de catalizador resultó en una metodología innovadora que involucra en sus pasos un enfoque de Química verde, obteniéndose rendimientos de moderados a altos (50 - 95 %) y en tiempos cortos de reacción (5 - 25 minutos)

6.2 La síntesis de seis nuevos ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados vía irradiación en microondas y con carbonato de potasio, una base débil, representan condiciones de reacción suaves y amigables con el medio ambiente, por lo que esta metodología también cumple con los postulados de Química verde, con rendimientos moderados (49 - 65 %) y en un tiempo corto de reacción (20 minutos).

6.3 La estructura de los  $\alpha$ -aminofosfonatos y de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos monohidrolizados fue corroborada con los resultados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  y HRMS, al comprobar que las señales corresponden a las esperadas de manera teórica.

6.4 El compuesto **32f** presentó mayor actividad inhibitoria contra las cepas ZS-025, 00-320 y MC-070 por halo de inhibición, al usar estas cepas resistentes del género *Scedosporium* se logró optimizar el costo y el proceso del proyecto ya que se evaluó la actividad de los 12 compuestos por una metodología sencilla y se eligió el compuesto más activo para la posterior determinación del CMI<sub>100</sub> por el protocolo M38-A2 del CLSI.

6.5 Se realizó el estudio de susceptibilidad *in vitro* del compuesto **32f** contra 23 cepas del género *Scedosporium* por el método de macrodilución tomando como base los lineamientos del protocolo M38-A2, se encontró que este compuesto presenta una CMI<sub>100</sub> en un rango de 648.76 - 700 µg/mL.

6.6 Se realizaron estudios de citotoxicidad en células sanas COS-7 de los compuestos **32a** y **32f** y el VRC a una concentración de 1000 µM, se encontró que el compuesto **32f** resultó con una menor citotoxicidad que el VRC (73.51 ± 4.88% (**32f**) y 65.80 ± 1.79% (VRC) de viabilidad.

6.7 Se realizaron estudios de acoplamiento molecular de los compuestos **32a** y **32f** con la Lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa, se encontró que estos compuestos pueden tener su mecanismo de acción por inhibición alostérica de la proteína, por lo que esto podría darnos una pauta del porqué presenta una menor toxicidad en comparación al VRC.

6.8. El compuesto **32f** se presenta como un compuesto interesante para seguir investigando su potencial uso como antifúngico con modelos más robustos.

6.9. La Hipótesis se valida de manera parcial, ya que el compuesto **32f** presenta una actividad antifúngica a una concentración de 648.56 -700 µg/mL, una concentración mayor a la de CMI<sub>100</sub> del VRC (0.44 -2.64 µg/mL), sin embargo, en los resultados obtenidos de citotoxicidad la molécula **32f** mostró una menor toxicidad que el VRC.



## Capítulo 7.

### Anexos

#### Resumen de los Datos espectroscópicos de los compuestos sintetizados

4-(((difenoxifosforil)(4-fluorofenil)metil)amino)benzoato de etilo, **31a**.

Polvo blanco (1.03 g, 77%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.20 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.86 (dd,  $J = 24.9$ , 10.2 Hz, 1H, P-**CH**-NH), 6.91 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.98-7.07 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.14-7.21 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.23-7.27 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.30-7.36 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.65 (dd,  $J = 10.2$ , 5.1 Hz, 1H, CH-**NH**-P), 7.71 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.75-7.79 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 14.3, 53.1 (d,  $J_{\text{CP}} = 156.2$  Hz), 59.7, 112.7, 115.3 (d,  $J = 21.6$  Hz), 118.2, 120.3 (d,  $J = 4.0$  Hz), 120.5 (d,  $J = 4.0$  Hz), 125.3 (d,  $J = 2.9$  Hz), 129.8 (d,  $J = 4.4$  Hz), 130.7 (d,  $J = 14.6$  Hz), 131.3 (d,  $J = 2.9$  Hz), 149.9 (d,  $J = 10.0$  Hz), 150.0 (d,  $J = 10.0$  Hz), 151.2 (d,  $J = 12.4$  Hz), 161.9 (d,  $J_{\text{CF}} = 244.3$  Hz), 163.1, 165.7 (C=O). RMN  $^{31}\text{P}$  (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ (ppm): 15.58. HRMS (ESI $^+$ )  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{FNO}_5\text{P}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  506.1533; encontrado 506.1464.

4-(((4-clorofenil)(difenoxifosforil)metil)amino)benzoato de etilo, **31b**.

Polvo blanco (1.55 g, 65%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.20 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.88 (dd,  $J = 25.1$ ,

10.3 Hz, 1H, P-**CH-NH**), 6.96 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 6.99-7.07 (m, 4H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.14-7.20 (m, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.29-7.37 (m, 4H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.48 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.67 (dd,  $J = 10.3, 5.4$  Hz, 1H, CH-**NH-P**), 7.69-7.78 (m, 4H,  $H_{\text{arom}}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 14.3, 53.2 (d,  $J_{\text{CP}} = 156.2$  Hz), 59.7, 112.7, 118.3, 120.3 (d,  $J = 4.0$  Hz), 120.5 (d,  $J = 3.9$  Hz), 125.3, 128.4 (d,  $J = 2.2$  Hz), 129.8 (d,  $J = 6.7$  Hz), 130.4 (d,  $J = 5.9$  Hz), 130.7, 132.9 (d,  $J = 3.8$  Hz), 134.3, 149.8 (d,  $J = 10.0$  Hz), 150.0 (d,  $J = 10.0$  Hz), 151.1 (d,  $J = 12.5$  Hz), 165.7 (C=O). RMN  $^{31}\text{P}$  (162 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$ (ppm): 15.24. HRMS (ESI $^+$ )  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{ClNO}_5\text{P}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  522.1159; encontrado 522.1128.

4-(((4bromofenil)(difenoxifosforil)metil)amino)benzoato de etilo, **31c**.

Polvo blanco (1.17 g, 50%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O**), 4.20 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, CH<sub>3</sub>**CH<sub>2</sub>O**), 5.86 (dd,  $J = 25.4, 10.2$  Hz, 1H, P-**CH-NH**), 6.95 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 6.99-7.04 (m, 4H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.16-7.20 (m, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.31-7.36 (m, 4H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.58-7.71 (m, 7H,  $H_{\text{arom}}$  and **NH**). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 14.3, 53.2 (d,  $J_{\text{CP}} = 156.4$  Hz), 59.8, 112.7, 118.2, 120.3 (d,  $J = 4.0$  Hz), 120.5 (d,  $J = 4.0$  Hz), 121.5 (d,  $J = 4.0$  Hz), 125.4, 129.9 (d,  $J = 7.3$  Hz), 130.7, 130.8 (d,  $J = 6.0$  Hz), 131.6 (d,  $J = 2.4$  Hz), 134.7, 149.8 (d,  $J = 10.0$  Hz), 150.0 (d,  $J = 10.0$  Hz), 151.2 (d,  $J = 12.6$  Hz), 165.7 (C=O). RMN  $^{31}\text{P}$  (162 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 15.07. HRMS (ESI $^+$ )  $m/z$  calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{BrNO}_5\text{P}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  566.0732; encontrado 566.0699.

4-(((difenoxifosforil)(1-metil-1H-pirazol-4-il)metil)amino)benzoato de etilo, **31d**.

Polvo blanco (0.84 g, 92%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ (ppm): 1.35 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.74 (s, 3H, N- $\text{CH}_3$ ), 4.31 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.25 (d,  $J = 22.1$  Hz, 1H,  $\text{CH-P}$ ), 6.66 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.95-7.32 (m, 10H,  $\text{H}_{\text{arom}}$  and  $\text{NH}$ ), 7.46-7.51 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.60 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.85 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ). Esto datos son acordes a lo reportado en la literatura.<sup>39</sup>

4-(((difenoxifosforil)(3-fenil-1H-pirazol-4-il)metil)amino)benzoato de etilo, **31e**.

Polvo blanco (1.47 g, 98%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ (ppm): 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.19 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.39 (dd,  $J = 18.8, 9.4$  Hz, 1H, P- $\text{CH-NH}$ ), 6.73 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.89 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.02 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.15-7.18 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.28-7.34 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.39-7.46 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$  and  $\text{NH}$ ), 7.53-7.55 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.66 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 8.03 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 13.23 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ (ppm): 14.3, 45.5 (d,  $J_{\text{CP}} = 165.1$  Hz), 59.8, 111.1 (d,  $J = 2.3$  Hz), 112.1, 118.0, 120.2 (d,  $J = 3.9$  Hz), 120.4 (d,  $J = 3.9$  Hz), 125.4, 127.9, 128.9, 129.9 (d,  $J = 4.3$  Hz), 130.8, 149.9 (d  $J = 10.3$  Hz), 150.0 (d  $J = 10.3$  Hz), 150.7 (d,  $J = 7.0$  Hz), 165.7 (C=O). RMN  $^{31}\text{P}$  (162 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ (ppm): 16.00. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ , calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5\text{P}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  554.1845; encontrado 554.1801.

4-(((difenoxifosforil)(3-(4-fluorofenil)-1H-pirazol-4-il)metil)amino)benzoato de etilo, **31f**.

Polvo blanco (1.36 g, 95%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$ (ppm): 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.20 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 5.39 (dd,  $J = 19.9, 9.9$

Hz, 1H, P-**CH**-NH), 6.75 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 6.91 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.02 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.15-7.19 (m, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.28-7.37 (m, 7H,  $H_{\text{arom}}$  and **NH**), 7.57-7.60 (m, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.67 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 8.08 (bs, 1H,  $H_{\text{arom}}$ ), 13.18 (bs, 1H, **NH**). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 14.3, 45.5 (d,  $J_{\text{CP}} = 164.7$  Hz), 59.8, 111.1 (d,  $J = 2.3$  Hz), 112.1, 115.8, 118.0, 120.2 (d,  $J = 3.9$  Hz), 120.4 (d,  $J = 3.9$  Hz), 125.4 (d,  $J = 3.7$  Hz), 129.9 (d,  $J = 6.3$  Hz), 130.0, 130.8, 149.9 (d,  $J = 10.3$  Hz), 150.0 (d,  $J = 10.7$  Hz), 150.7 (d,  $J = 7.1$  Hz), 163.2 (d,  $J_{\text{CF}} = 248.1$  Hz), 165.7 (C=O). RMN  $^{31}\text{P}$  (162 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ (ppm): 15.97. HRMS (ESI $^+$ )  $m/z$ , calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{28}\text{FN}_3\text{O}_5\text{P}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  572.1751; encontrado 572.1630.

4-(((4-fluorofenil)(hidroxi(fenoxi)fosforil)metil)amino)benzoato de etilo, **32a**.

Polvo blanco (111.5 mg, 63%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 1.28 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, **CH**<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.21 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, CH<sub>3</sub>**CH**<sub>2</sub>O), 4.70 (d,  $J = 23.4$  Hz, 1H, **CH**-P), 6.50 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 6.91-7.04 (m, 5H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.14-7.18 (m, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.42-7.46 (m, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), 7.65 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $H_{\text{arom}}$ ), RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 14.7, 56.6 (d,  $J_{\text{CP}} = 145.1$  Hz), 61.4, 113.2, 115.6 (d,  $J = 2.6$  Hz), 115.8 (d,  $J = 2.2$  Hz), 119.2, 122.0 (d,  $J = 4.0$  Hz), 124.5, 130.2, 130.8 (d,  $J = 4.8$  Hz), 130.9 (d,  $J = 5.0$  Hz), 132.2, 135.7 (d,  $J = 2.9$  Hz), 153.2 (d,  $J = 12.8$  Hz), 154.0 (d,  $J = 7.8$  Hz), 163.4 (d,  $J_{\text{CF}} = 240.3$  Hz), 168.8 (C=O). RMN  $^{31}\text{P}$  (162 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 12.33. HRMS (ESI $^+$ )  $m/z$ , calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{FNO}_5\text{P}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  430.1220; encontrado 430.1134.

4-(((4-clorofenil)(hidroxi(fenoxi)fosforil)metil)amino)benzoato de etilo, **32b**.

Polvo blanco (112.5 mg, 65%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 1.28 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.20 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.70 (d,  $J = 23.6$  Hz, 1H,  $\text{CH-P}$ ), 6.50 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 6.94-7.07 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.12-7.24 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.46 (dd,  $J = 8.5, 2.3$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.70 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 14.7, 56.9 (d,  $J_{\text{CP}} = 143.3$  Hz), 61.4, 113.2, 119.2, 122.0 (d,  $J = 4.0$  Hz), 124.5, 129.1 (d,  $J = 2.6$  Hz), 130.2, 130.7 (d,  $J = 4.8$  Hz), 132.2, 133.6 (d,  $J = 3.6$  Hz), 138.7 (d,  $J = 3.0$  Hz), 153.1 (d,  $J = 12.6$  Hz), 154.0 (d,  $J = 8.1$  Hz), 168.8 (C=O). RMN  $^{31}\text{P}$  (162 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 12.16. HRMS (ESI $^+$ )  $m/z$ , calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{ClNO}_5\text{P}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  446.0924; encontrado 446.0846.

4-(((4-bromofenil)(hidroxi(fenoxi)fosforil) metil)amino)benzoato de etilo, **32c**.

Polvo blanco (112.5 mg, 50%). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 1.29 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.22 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.68 (d,  $J = 23.6$  Hz, 1H,  $\text{CH-P}$ ), 6.50-6.55 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.01-7.05 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.16-7.20 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.35-7.40 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ), 7.66-7.68 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{arom}}$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 14.7, 56.9 (d,  $J_{\text{CP}} = 139.2$  Hz), 61.4, 113.3, 119.2, 122.0 (d,  $J = 4.0$  Hz), 124.5, 130.2, 130.9 (d,  $J = 4.4$  Hz), 131.1 (d,  $J = 5.2$  Hz), 132.0 (d,  $J = 6.5$  Hz), 132.1 (d,  $J = 13.4$  Hz), 140.1 (d,  $J = 3.0$  Hz), 153.7 (d,  $J = 12.6$  Hz), 154.8 (d,  $J = 8.1$  Hz), 168.8 (C=O). RMN  $^{31}\text{P}$  (162 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 14.51. HRMS

(ESI<sup>+</sup>) *m/z*, calculado para C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>BrNO<sub>5</sub>P [M + H]<sup>+</sup> 490.0419; encontrado 490.0316.

4-(((hidroxi(fenoxi)fosforil)(1-metil-1H-pirazol-4-il)metil)amino)benzoato de etilo,  
**32d.**

Polvo blanco (225.4 mg, 54%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ(ppm): 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O**), 3.66 (s, 3H, **CH<sub>3</sub>-N**), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>**CH<sub>2</sub>O**), 4.50 (dd, *J* = 22.4, 9.3 Hz 1H, P-**CH-NH**), 6.49 (bs, 1H, H<sub>arom</sub>), 6.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H<sub>arom</sub>), 6.92-6.96 (m, 1H, H<sub>arom</sub>), 7.05-7.07 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.14-7.18 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.35-7.41 (m, 1H, CH-**NH-P**), 7.59-7.61 (m, 3H, H<sub>arom</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ(ppm): 14.5, 38.3, 46.8 (d, *J*<sub>CP</sub> = 149.2 Hz) 59.6, 111.7, 116.1, 119.4, 120.8 (d, *J* = 3.9 Hz), 122.2, 128.9, 129.8, 130.7, 138.4 (d, *J* = 4.8 Hz), 152.4 (d, *J* = 11.6 Hz), 153.6, 166.0 (C=O). RMN <sup>31</sup>P (162 MHz, MeOD) δ(ppm): 10.13. HRMS (ESI<sup>+</sup>) *m/z*, calculado para C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P [M + H]<sup>+</sup> 416.1375; encontrado 416.1337.

4-(((hidroxi(fenoxi)fosforil)(3-fenil-1H-pirazol-4-il)metil)amino)benzoato de etilo,  
**32e.**

Polvo blanco (282.2 mg, 49%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD) δ(ppm): 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, **CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O**), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>3</sub>**CH<sub>2</sub>O**), 4.77 (d, *J* = 21.7 Hz, 1H, **CH-P**), 6.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H<sub>arom</sub>), 6.91-6.95 (m, 1H, H<sub>arom</sub>), 6.99-7.01 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.08-7.11 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.29-7.30 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 7.42 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.52-7.54 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.82 (s, 1H, H<sub>arom</sub>). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz,

MeOD)  $\delta$ (ppm): 14.7, 46.6 (d,  $J_{CP} = 154.3$  Hz), 61.3, 113.0, 117.2, 118.8, 122.1 (d,  $J = 4.0$  Hz), 124.6, 129.4, 129.8 (d,  $J = 14.0$  Hz), 130.2, 132.0, 152.8 (d,  $J = 11.6$  Hz), 153.8 (d,  $J = 7.8$  Hz), 168.7 (C=O). RMN  $^{31}P$  (162 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 13.40. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$ , calculado para C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P [M + H]<sup>+</sup> 478.1532; encontrado 478.1513.

4-(((3-(4-fluorofenil)-1H-pirazol-4-il)(hidroxi(fenoxi)fosforil)metil)amino)benzoato de etilo, **32f**.

Polvo blanco (354 mg, 61%). RMN  $^1H$  (400 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 1.21 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.13 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 4.68 (d,  $J = 21.5$  Hz, 1H, CH-P), 6.14 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H<sub>arom</sub>), 6.89-7.05 (m, 5H, H<sub>arom</sub>), 7.09-7.13 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.46 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.52-7.64 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.87 (s, 1H, H<sub>arom</sub>). RMN  $^{13}C$  (100 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm): 14.7, 46.7 (d,  $J_{CP} = 153.4$  Hz), 61.3, 113.0, 116.4 (d,  $J = 21.7.0$  Hz), 117.4, 118.8, 122.2 (d,  $J = 3.9$  Hz), 124.6, 130.2, 131.9 (d,  $J = 8.3$  Hz), 132.0, 152.9 (d,  $J = 11.5$  Hz), 153.9 (d,  $J = 7.8$  Hz), 164.2 (d,  $J_{CF} = 246.5$  Hz), 168.7 (C=O). RMN  $^{31}P$  (162 MHz, MeOD)  $\delta$ (ppm): 13.42. HRMS (ESI<sup>+</sup>)  $m/z$  Calculado para C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>P [M + H]<sup>+</sup> 496.1438; encontrado 496.1340.

## Referencias

- (1) Rauseo, A. M.; Coler-Reilly, A.; Larson, L.; Spec, A. Hope on the Horizon: Novel Fungal Treatments in Development. *Open Forum Infect. Dis.* **2020**, *7* (2), 1–19. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa016>.
- (2) Roemer, T.; Krysan, D. J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4* (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019703>.
- (3) Fernández de Ullivarri, M.; Arbulu, S.; Garcia-Gutierrez, E.; Cotter, P. D. Antifungal Peptides as Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10* (March). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00105>.
- (4) Houšť, J.; Spížek, J.; Havlíček, V. Antifungal Drugs. *Metabolites* **2020**, *10* (3). <https://doi.org/10.3390/metabo10030106>.
- (5) *Tuberculosis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (accessed 2021-03-22).
- (6) OMS | El Informe Mundial Sobre El Paludismo 2019 de Un Vistazo. *WHO* **2019**.
- (7) Rizo Amezquita, J. N.; Lozano Noriega, A. R. Vigilancia de La Resistencia a Los Antimicrobianos. *Evol Med Salud Pública* **2018**, *4* (1), 21–32.
- (8) Brown, G. D.; Denning, D. W.; Gow, N. A. R.; Levitz, S. M.; Netea, M. G.; White, T. C. Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4* (165). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>.



- (9) Perfect, J. R. The Antifungal Pipeline: A Reality Check. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (9), 603–616. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.46>.
- (10) Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R. O.; Denning, D. W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *J. Fungi* **2017**, *3* (4), 57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>.
- (11) Mello, T.; Bittencourt, V.; Liporagi-Lopes, L.; Aor, A.; Branquinha, M.; Santos, A. Insights into the Social Life and Obscure Side of *Scedosporium/Lomentospora* Species: Ubiquitous, Emerging and Multidrug-Resistant Opportunistic Pathogens. *Fungal Biol. Rev.* **2018**, *33*. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.07.002>.
- (12) Luplertlop, N. *Pseudallescheria/Scedosporium* Complex Species: From Saprobic to Pathogenic Fungus. *J. Mycol. Medicale* **2018**, *28* (2), 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.02.015>.
- (13) Kaltseis, J.; Rainer, J.; De Hoog, G. S. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* Species in Human-Dominated and Natural Environments and Their Distribution in Clinical Samples. *Med. Mycol.* **2009**, *47* (4), 398–405. <https://doi.org/10.1080/13693780802585317>.
- (14) Cortez, K. J.; Roilides, E.; Quiroz-Telles, F.; Meletiadis, J.; Antachopoulos, C.; Knudsen, T.; Buchanan, W.; Milanovich, J.; Sutton, D. A.; Fothergill, A.; Rinaldi, M. G.; Shea, Y. R.; Zaoutis, T.; Kottitil, S.; Walsh, T. J. Infections Caused by *Scedosporium* Spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21* (1), 157–197. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-07>.

- (15) Gilgado, F.; Cano, J.; Géne, J.; Serena, C.; Guarro, J. Different Virulence of the Species of the *Pseudallescheria Boydii* Complex. *Med. Mycol.* **2009**, *47* (4), 371–374. <https://doi.org/10.1080/13693780802256539>.
- (16) Elizondo-Zertuche, M.; Treviño-Rangel, R. de J.; Robledo-Leal, E.; Luna-Rodríguez, C. E.; Martínez-Fierro, M. L.; Rodríguez-Sánchez, I. P.; González, G. M. Molecular Identification and in Vitro Antifungal Susceptibility of *Scedosporium* Complex Isolates from High-Human-Activity Sites in Mexico. *Mycologia* **2017**, *109* (6), 874–881. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1416260>.
- (17) Al Refa, M.; Duhamel, C.; Le Rochais, J. P.; Icard, P. Lung *Scedosporiosis*: A Differential Diagnosis of *Aspergillosis*. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **2002**, *21* (5), 938–939. [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(02\)00068-4](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(02)00068-4).
- (18) Salgado-Escobar, O.; Hernández-Guadarrama, A.; Romero-Estudillo, I.; Linzaga-Elizalde, I. Molecules Direct Synthesis of Phosphonates and  $\alpha$ -Amino-Phosphonates from 1,3-Benzoxazines. <https://doi.org/10.3390/molecules24020294>.
- (19) Bhattacharya, A. K.; Rana, K. C.; Pannecouque, C.; DeClercq, E. An Efficient Synthesis of a Hydroxyethylamine (HEA) Isostere and Its  $\alpha$ -Aminophosphonate and Phosphoramidate Derivatives as Potential Anti-HIV Agents. *ChemMedChem* **2012**, *7* (9), 1601–1611. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200271>.

- (20) Prasad. Synthesis of Biologically Active  $\alpha$ -Aminophosphonates. *J. Mod. Med. Chem.* **2013**, 49–60. <https://doi.org/10.12970/2308-8044.2013.01.01.5>.
- (21) Eshtiaghi, N. Synthesis and Antibacterial Activity of  $\alpha$ -Aminophosphonates Bearing Neocryptolepine Moiety. *Int. J. Chem.* **2013**, 11–18.
- (22) Kenawy, E. R. S.; Azaam, M. M.; Saad-Allah, K. M. Synthesis and Antimicrobial Activity of  $\alpha$ -Aminophosphonates Containing Chitosan Moiety. *Arab. J. Chem.* **2015**, 8 (3), 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.12.029>.
- (23) Keglevich, G.; Bálint, E. The Kabachnik–Fields Reaction: Mechanism and Synthetic Use. *Molecules* **2012**, 17 (11), 12821–12835. <https://doi.org/10.3390/molecules171112821>.
- (24) Ordóñez, M.; Rojas-Cabrera, H.; Cativiela, C. An Overview of Stereoselective Synthesis of  $\alpha$ -Aminophosphonic Acids and Derivatives. *Tetrahedron* **2009**, 65 (1), 17–49. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.09.083>.
- (25) Ordóñez, M.; Viveros-Ceballos, J. L.; Cativiela, C.; Sayago, F. J. An Update on the Stereoselective Synthesis of  $\alpha$ -Aminophosphonic Acids and Derivatives. **2015**. <https://doi.org/10.13039/501100010067>.
- (26) Shaikh, M. H.; Subhedar, D. D.; Kalam Khan, F. A.; Sangshetti, J. N.; Shingate, B. B. [Et<sub>3</sub>NH][HSO<sub>4</sub>]-Catalyzed One-Pot, Solvent-Free Synthesis and Biological Evaluation of  $\alpha$ -Amino Phosphonates. *Res. Chem. Intermed.* **2016**, 42 (5), 5115–5131. <https://doi.org/10.1007/s11164-015-2348-z>.

- (27) Subramanyam, C.; Thaslim Basha, S.; Madhava, G.; Nayab Rasool, S.; Adam, S.; Durga Srinivasa Murthy, S.; Naga Raju, C. Synthesis, Spectral Characterization and Bioactivity Evaluation of Novel  $\alpha$ -Aminophosphonates. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2017**, *192* (3), 267–270. <https://doi.org/10.1080/10426507.2016.1225056>.
- (28) Amulrao U. Borsea; Nilesh L. Patila; Mahesh N. Patila; Raghav S. Malib. Efficient One Pot, Three-Component Synthesis of New  $\alpha$ -Aminophosphonates and Investigation of Their Antimicrobial Activity. *Pharma Chem.* **2016**, *8* (5), 256–261.
- (29) Sivala, M. R.; Devineni, S. R.; Golla, M.; Medarametla, V.; Pothuru, G. K.; Chamarthi, N. R. A Heterogeneous Catalyst, SiO<sub>2</sub>-ZnBr<sub>2</sub>: An Efficient Neat Access for  $\alpha$ -Aminophosphonates and Antimicrobial Activity Evaluation. *J. Chem. Sci.* **2016**, *128* (8), 1303–1313. <https://doi.org/10.1007/s12039-016-1113-1>.
- (30) Fadel, A.; Tesson, N. Preparation of Enantiomerically Pure (1S,2S)-1-Aminocyclopropanephosphonic Acid from Methylcyclopropanone Acetal via Spirophosphonate Intermediates. *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11* (9), 2023–2031. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)00134-8](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)00134-8).
- (31) Fini, F.; Micheletti, G.; Bernardi, L.; Pettersen, D.; Fochi, M.; Ricci, A. An Easy Entry to Optically Active  $\alpha$ -Amino Phosphonic Acid Derivatives Using Phase-Transfer Catalysis (PTC). *Chem. Commun.* **2008**, No. 36, 4345–4347. <https://doi.org/10.1039/B807027J>.

- (32) Pyun, H. J.; Clarke, M. O.; Cho, A.; Casarez, A.; Ji, M.; Fardis, M.; Pastor, R.; Sheng, X. C.; Kim, C. U. Synthesis of 1-Amino-2-Vinylcyclopropane-1-Phosphinates. Conversion of a Phosphonate to Phosphinates. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (18), 2360–2363. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.02.111>.
- (33) Chen, L.; Guo, T.; Xia, R.; Tang, X.; Chen, Y.; Zhang, C.; Xue, W. Novel Phosphorylated Penta-1,4-Dien-3-One Derivatives: Design, Synthesis, and Biological Activity. *Molecules* **2019**, *24* (5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules24050925>.
- (34) Wu, Y.; Grossman, N.; Totten, M.; Memon, W.; Fitzgerald, A.; Ying, C.; Zhang, S. X. Antifungal Susceptibility Profiles and Drug Resistance Mechanisms of Clinical *Lomentospora Prolificans* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64* (11). <https://doi.org/10.1128/AAC.00318-20>.
- (35) Chen, G.; Liang, J.; Han, J.; Zhao, H. Solubility Modeling, Solute–Solvent Interactions, and Thermodynamic Dissolution Properties of p-Nitrophenylacetonitrile in Sixteen Monosolvents at Temperatures Ranging from 278.15 to 333.15 K. *J. Chem. Eng. Data* **2019**, *64* (1), 315–323. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b00811>.
- (36) Eloff, J. N. Avoiding Pitfalls in Determining Antimicrobial Activity of Plant Extracts and Publishing the Results. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19* (1), 106. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2519-3>.

- (37) Sant, D. G.; Tupe, S. G.; Ramana, C. V.; Deshpande, M. V. Fungal Cell Membrane-Promising Drug Target for Antifungal Therapy. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121* (6), 1498–1510. <https://doi.org/10.1111/jam.13301>.
- (38) Pricopie, A.-I.; Focșan, M.; Ionuț, I.; Marc, G.; Vlase, L.; Găină, L.-I.; Vodnar, D. C.; Simon, E.; Barta, G.; Pîrnău, A.; Oniga, O. Novel 2,4-Disubstituted-1,3-Thiazole Derivatives: Synthesis, Anti-Candida Activity Evaluation and Interaction with Bovine Serum Albumine. *Molecules* **2020**, *25* (5), 1079. <https://doi.org/10.3390/molecules25051079>.
- (39) Loredó-Calderón, E. L.; Velázquez-Martínez, C. A.; Ramírez-Cabrera, M. A.; Hernández-Fernández, E.; Rivas-Galindo, V. M.; Arredondo Espinoza, E.; López-Cortina, S. T. Synthesis of Novel  $\alpha$ -Aminophosphonates under Microwave Irradiation, Biological Evaluation as Antiproliferative Agents and Apoptosis Inducers. *Med. Chem. Res.* **2019**, *28* (11), 2067–2078. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02436-z>.