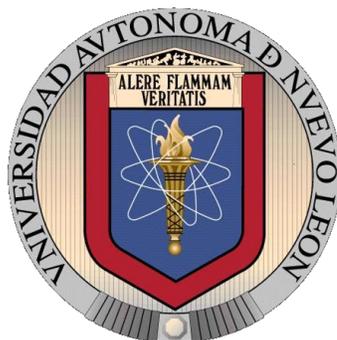


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE Sn (IV)
DERIVADOS DE α -AMIDOFOSFONATOS: EVALUACIÓN
DE SU EFECTO TÓXICO SOBRE *Artemia salina*

Por
EDER MISAEL SALDAÑA CORRAL

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

Julio, 2012

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE Sn (IV)
DERIVADOS DE α -AMIDOFOSFONATOS: EVALUACIÓN DE SU EFECTO
TÓXICO SOBRE *Artemia salina*.

Aprobación de la tesis:

Dr. Eugenio Hernández Fernández
Director de Tesis

Dra. Lucía Cantú Cárdenas
Comité Tutorial

Dra. Ivonne A. Camacho Mora
Comité Tutorial

M. C. Ma. del Rosario González González
Comité Tutorial

Dra. Ma. Teresa Garza González
Subdirectora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Eder Misael Saldaña Corral

Fecha de Graduación: Julio, 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE Sn (IV) DERIVADOS DE α -AMIDOFOSFONATOS: EVALUACIÓN DE SU EFECTO TÓXICO SOBRE *Artemia salina*.

Número de páginas: 95

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Farmacia

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: El presente trabajo de tesis se centró en el diseño y síntesis de nuevos compuestos (α -amidofosfonatos) y su reacción con cloruro de dibutil estaño para la formación de complejos de estaño, enfocado en la investigación de posibles agentes antineoplásicos para contribuir en la ya extensa lucha contra el cáncer. Para lograr lo anterior, se aplicaron métodos utilizados en síntesis de compuestos en el área de la química orgánica y posteriormente de métodos biológicos para estudiar el comportamiento de los compuestos obtenidos en organismos vivos (*Artemia Salina*).

Contribuciones y Conclusiones: Se obtuvieron exitosamente dos clorhidratos de éster metílico, dos bromoamidas de éster metílico, dos fosfonoamidas de éster metílico, tres fosfohidroxiamidas, un acetato de fosfohidroxiamida, dos fosfofenilamidas y un complejo de estaño derivado de una fosfohidroxiamida. Aun cuando se puede obtener exitosamente, el complejo de estaño obtenido no es apto para someterse a pruebas biológicas debido a su carácter lábil al ambiente. El ensayo en *A. salina* permitió realizar un tamizaje adecuado descartando diversos compuestos y focalizando la atención en los que mejor capacidad tóxica tuvieron (compuestos MO12 y MO13), por lo cual se proponen como candidatos a estudiar su actividad sobre cultivos de células de origen neoplásico y sobre células normales.

FIRMA DEL ASESOR: _____

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE Sn (IV)
DERIVADOS DE α -AMIDOFOSFONATOS: EVALUACIÓN DE SU EFECTO
TÓXICO SOBRE *Artemia salina*.

Presentado por:

L.Q.I. Eder Misael Saldaña Corral

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Síntesis Orgánica del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Eugenio Hernández Fernández, en el Laboratorio 8-B del Centro de Investigaciones Químicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Morelos bajo la dirección del Dr. Miguel Muñoz y en el Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, con la asesoría de la Dra. María del Pilar Carranza Rosales. El desarrollo de este trabajo fue posible gracias a la beca otorgada (237771) y recursos proporcionados por el proyecto CB-101898 otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	i
TABLA DE CONTENIDO.....	iii
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ESTRUCTURAS.....	ix
Materias Primas	ix
Productos.....	x
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2	6
2 ANTECEDENTES.....	6
CAPÍTULO 3	12
3.1 Hipótesis	12
3.2 Objetivo General.....	12
3.3 Objetivos Específicos.....	12
CAPÍTULO 4	13
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1 Información general	13
4.1.1 Métodos sintéticos.....	13
4.1.2 Métodos biológicos	14
4.2 Métodos sintéticos	15
4.2.1 Obtención de clorhidratos de ésteres metílicos.....	15
4.2.2 Obtención de bromoamidas de ésteres metílicos	16
4.2.3 Obtención de fosfonoamidas de ésteres metílicos	16
4.2.4 Obtención de fosfohidroxiamidas.....	17
4.2.5 Obtención del acetato de fosfohidroxiamida	18
4.2.6 Obtención de fosfofenilamidas.....	18

4.2.7	Obtención de complejos de estaño.....	19
4.3	Métodos biológicos.....	20
4.4	Seguridad en el laboratorio y disposición de residuos...	22
CAPÍTULO 5	23
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5.1	Parte sintética	23
5.1.1	Preparación del clorhidrato del (S)-2-amino-2-fenilacetato de metilo (MO1)	23
5.1.2	Preparación del clorhidrato del (S)-2-amino-3-fenilpropanoato de metilo (MO2)	24
5.1.3	Preparación de (S)-2-(2-bromoacetamido)-2-fenilacetato de metilo (MO3)	25
5.1.4	Preparación de (S)-2-(2-bromoacetamido)-3-fenilpropanoato de metilo (MO4)	31
5.1.5	Preparación de (S)-2-(2-(dimetoxifosforil)acetamido)-2-fenilacetato de metilo (MO5)	37
5.1.6	Preparación de (S)-2-(2-(dimetoxifosforil)acetamido)-2-fenilacetato de metilo (MO6)	42
5.1.7	Preparación de (S)-2-(2-(dietoxifosforil)acetamido)-2-fenilacetato de metilo (MO7)	48
5.1.8	Preparación de (S)-2-((2-hidroxi-1-feniletíl)amino)-2-oxoetil fosfonato de dimetilo (MO8)	49
5.1.9	Preparación de (S)-2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil fosfonato de dimetilo (MO9)	55
5.1.10	Preparación de (S)-2-((2-hidroxi-1-feniletíl)amino)-2-oxoetil fosfonato de dietilo (MO10).....	61
5.1.11	Preparación del acetato de (S)-2-(2-dimetoxifosforil)acetamido)-3-fenilpropilo (MO11)	65
5.1.12	Preparación de (2-((2-hidroxifenil)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dietilo (MO12)	69
5.1.13	Preparación de (2-((2-metil-5-nitrofenil)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dietilo (MO13).....	73

5.1.14 Preparación de la sal de potasio de (S)-(2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dimetilo (CX0)	75
5.1.15 Preparación de dibutilestaño-diilo de dimetil bis(((S)-4-benzil-4,5-dihidro oxazol-2-il)metil)fosfonito)	76
5.2 Parte biológica.....	87
CAPÍTULO 6	89
6 CONCLUSIONES	89
REFERENCIAS	91
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	94

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Actividad antitumoral de los complejos de Sn 1 y 2 (10^{-4} M) ...	6
2. Actividad antineoplásica de los compuestos 3, 4 y 5.	7
3. Actividad antitumoral de los compuestos 6 - 9.....	8
4. Actividad de los complejos contra líneas cancerígenas.	9
5. Comparación de comportamiento entre <i>A. Salina</i> y MCF-7.....	9
6. Resultados de dosis letal media de Altomare <i>et al.</i>	10
7. Toxicidad de ligantes sintéticos sobre <i>A. salina</i>	87

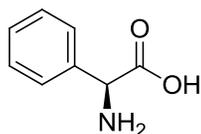
LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Sitios de acción de algunas terapias antineoplásicas.	3
2. Compuestos de estaño.	4
3. Análogos isostéricos de fósforo.	5
4. Complejos de estaño (IV) derivados de ácidos carboxílicos.	6
5. Complejos de Sn y su ligante de origen.	7
6. Complejos de estaño derivados del ciclopentadienil.	8
7. Complejos de estaño derivados de Cianoximas.	9
8. Espectro de NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MO3.	27
9. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO3.	28
10. Espectro de NMR de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MO3.	30
11. Espectro de NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MO4.	33
12. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO4.	34
13. Espectro de NMR ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MO4.	36
14. Espectro de NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MO5.	38
15. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO5.	39
16. Espectro de NMR ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MO5.	41
17. Espectro de NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MO6.	43
18. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO6.	44
19. Espectro de NMR ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MO6.	47
20. Espectro de NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MO8.	51
21. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO8.	52

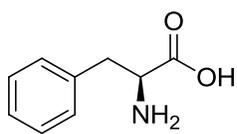
22. Espectro de NMR ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MO8.....	54
23. Espectro de NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MO9	57
24. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO9.....	58
25. Espectro de NMR ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MO9.....	60
26. Espectro de NMR ^1H (300 MHz, CDCl_3) de MO10	62
27. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO10.....	63
28. Espectro de NMR ^1H (300 MHz, CDCl_3) de MO11	67
29. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO11.....	68
30. Espectro de NMR ^1H (300 MHz, CDCl_3) de MO12	71
31. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO12.....	72
32. Complejos de estaño con una amida quiral.....	74
33. Complejos formados por Jiménez <i>et al.</i>	74
34. Espectro de NMR ^1H (200 MHz, CDCl_3) de CX1.....	78
35. Nueva estructura propuesta para CX1.....	79
36. Formación de oxazolinas mediante reactivos de estaño	80
37. Mecanismo propuesto para la generación de CX1	80
38. Fragmentación propuesta para CX1	81
39. Espectro de MS (CI^+) de CX1	82
40. Espectro de NMR ^{31}P (81 MHz, CDCl_3) de CX1.....	84
41. Espectro de NMR ^{119}Sn (74.56 MHz, CDCl_3) de CX1 [t = 0]....	85
42. Espectro de NMR ^{119}Sn (74.56 MHz, CDCl_3) de CX1 [t = 16h]	85
43. Espectro de NMR ^{119}Sn (74.56 MHz, CDCl_3) de $\text{nBu}_2\text{SnCl}_2$	85

LISTA DE ESTRUCTURAS

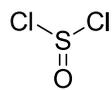
Materias Primas



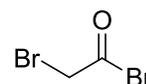
MP1



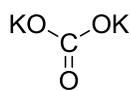
MP2



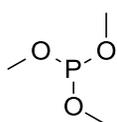
MP3



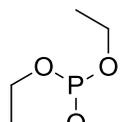
MP4



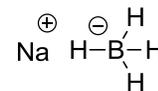
MP5



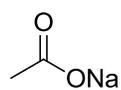
MP6



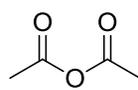
MP7



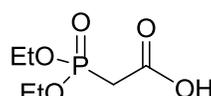
MP8



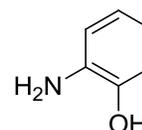
MP-9



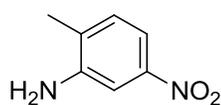
MP10



MP11



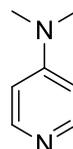
MP12



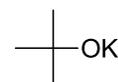
MP13



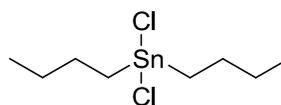
MP14



MP15

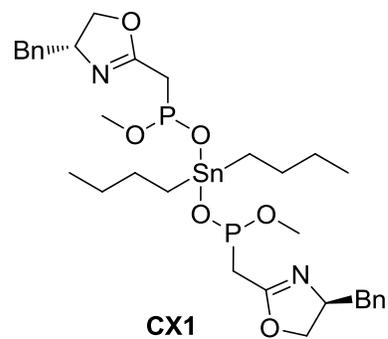
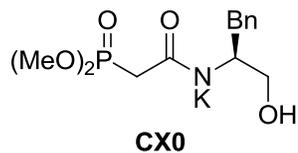
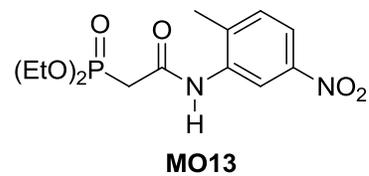
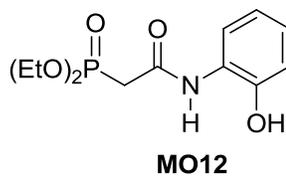
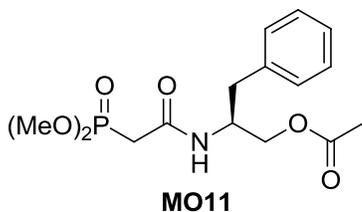
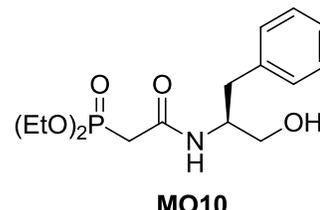
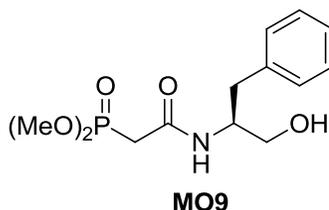
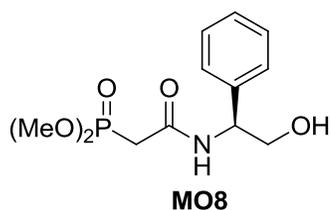
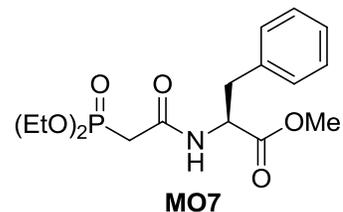
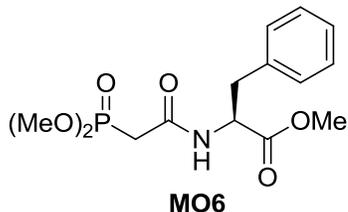
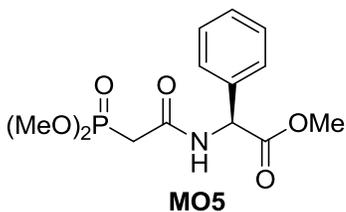
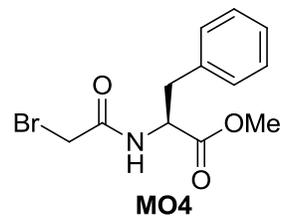
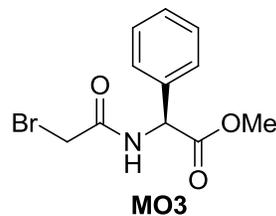
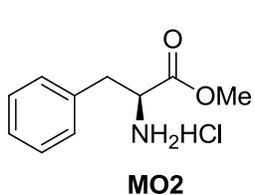
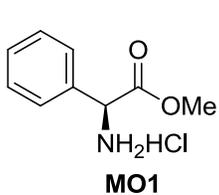


MP16



MP17

Productos



CAPÍTULO 1

1 INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas de salud a nivel mundial y causa de muerte prematura es el cáncer, problema actualmente en expansión. Se pronostica que el índice de mortalidad mundial debido al cáncer tenga un incremento del 45% entre 2007 y 2030, es decir, de 7.9 millones de defunciones pasará a 11.5 millones. De igual manera se espera que la incidencia de nuevos casos incremente de 11.3 millones en 2007 hasta 15.5 millones en 2030.¹

Para comprender la complejidad del problema es necesario entender qué es el cáncer. Éste es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células anormales. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. En muchos casos, el tumor suele invadir el tejido circundante y diseminarse vía sanguínea o linfática para provocar metástasis en puntos distantes del organismo.²

El cáncer comienza con la modificación de una célula normal a través de un proceso que abarca varias fases, desde la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Dichos cambios pueden ser ocasionados por la interacción entre los factores genéticos de una persona y por agentes externos tales como: carcinógenos físicos (por ejemplo: luz ultravioleta y radiaciones ionizantes), carcinógenos químicos (por ejemplo: asbesto y humo de tabaco) y carcinógenos biológicos (por ejemplo: infecciones causadas por ciertos virus,

bacterias o parásitos). El envejecimiento es otro factor fundamental en el desarrollo de cáncer. La incidencia de cáncer aumenta espectacularmente con la edad, muy probablemente porque con la edad aumenta la acumulación de factores de riesgo y mutaciones hacia distintos tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad. El consumo de tabaco, el consumo de alcohol, la ingesta insuficiente de frutas y hortalizas, las infecciones por virus de la hepatitis B, de la hepatitis C y por virus del papiloma humano (VPH) son los principales factores de riesgo de cáncer en los países de ingresos bajos y medianos. El cáncer cervicouterino causado por VPH es una de las principales causas de defunción por cáncer entre las mujeres en países de bajos ingresos. En los países de ingresos elevados, el consumo de tabaco y alcohol, el exceso de peso y la obesidad son causas muy importantes de cáncer.³

Existen procesos como la necrosis y apoptosis para combatir de manera natural a las células cancerosas en el organismo, pero el sistema inmunológico no siempre es capaz de ganar esta batalla y es cuando se debe recurrir al uso de estrategias como lo son cirugía, quimioterapia y radioterapia o combinaciones de ellas.

En este sentido, la quimioterapia y radioterapia pueden inducir daño irreparable al ADN, lo cual puede cesar la replicación de células tumorales y crear condiciones de apoptosis. La radiación ionizante causa daño indirecto en la cadena de ADN mediante las especies reactivas de oxígeno, mientras que la

quimioterapia utiliza sustancias químicas que interactúan directamente con el ADN⁴ (Figura 1).

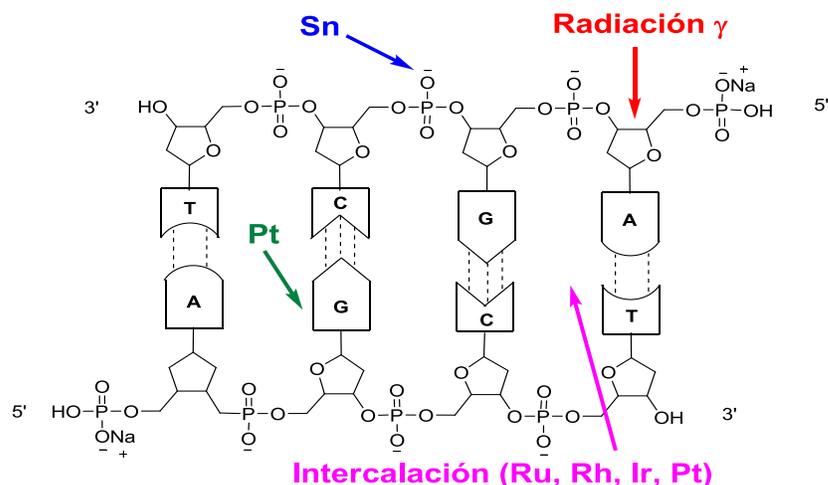


Figura 1. Sitios de acción de algunas terapias antineoplásicas

A pesar de la gran variedad de fármacos antineoplásicos existentes, la mayoría de ellos provocan efectos colaterales adversos que van desde la caída del cabello y episodios de diarrea, hasta debilitamiento general y hepatotoxicidad o nefrotoxicidad.

Debido a esto, la búsqueda de nuevos compuestos o moléculas, ya sean naturales o sintéticos, que puedan ser utilizados en el diseño de nuevas estrategias de tratamiento o prevención del cáncer es de vital importancia para encontrar nuevas alternativas que ofrezcan mejor relación costo-beneficio.

Con base en todo lo anterior y para satisfacer la creciente demanda de mejores alternativas contra el cáncer, diversos equipos de investigación se han dado a la tarea de diseñar y sintetizar nuevos compuestos que puedan ser utilizados como fármacos antineoplásicos.

Al respecto de esto último, la investigación en la síntesis y aplicación de fármacos conteniendo metales en su estructura es considerada actualmente una de las áreas con mayor expansión en química biomédica e inorgánica.⁴

Por ejemplo, durante las últimas décadas los complejos de estaño derivados de ácidos carboxílicos (Figura 2) han sido el objeto de estudios exhaustivos debido a su diversidad estructural; así como su significativa actividad biológica como pesticidas, bactericidas y agentes con actividad antitumoral contra algunas líneas cancerígenas humanas.^{5, 6}

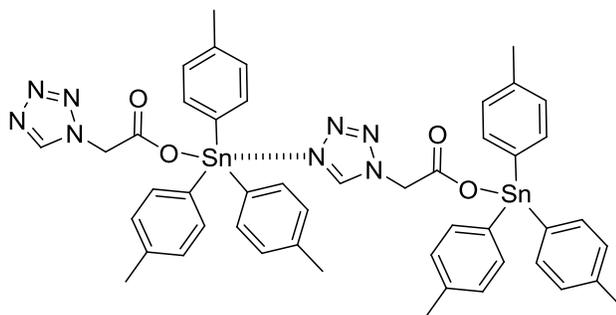


Figura 2. Compuestos de estaño.

La primera demostración de esto fue el retardo del crecimiento de tumores en ratones. Estudios posteriores han dado a conocer que el estaño no actúa directamente con las bases de nucleótidos, sino con los grupos fosfato periféricos de los residuos de fosforribosa.⁷

Un ejemplo adicional lo constituyen los compuestos organofosforados, los cuales son sustratos de gran importancia para el estudio de procesos bioquímicos, específicamente los compuestos que contienen en su estructura algún átomo de fósforo pentavalente tetra coordinado han sido utilizados

ampliamente como compuestos biológicamente activos. Durante mucho tiempo los compuestos fosforados análogos de ácidos carboxílicos, donde el grupo carboxilo ha sido remplazado por un grupo fosforilo, han llamado la atención para la preparación de análogos isostéricos de diversos productos naturales. Por ejemplo, los ácidos β -aminofosfónicos como isómeros de β -aminoácidos son muy importantes y poseen diversas e interesantes propiedades biológicas y bioquímicas al actuar como agentes antibacteriales, inhibidores enzimáticos, haptenos para anticuerpos catalíticos e incluso agentes contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)⁸ (Figura 3).

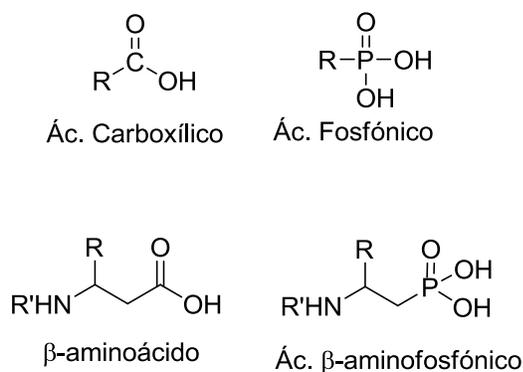
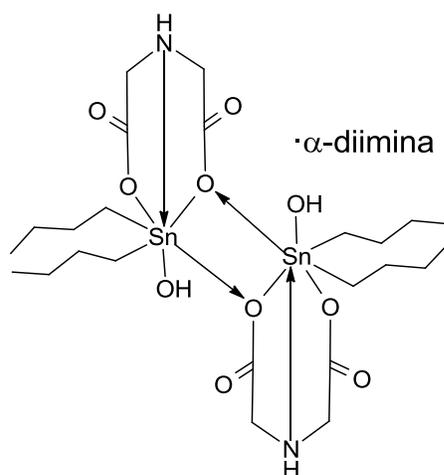


Figura 3. Análogos isostéricos de fósforo

CAPÍTULO 2

2 ANTECEDENTES

En 2009, Siddiqi y colaboradores⁹ sintetizaron dos complejos de estaño (Figura 4) y evaluaron su actividad antitumoral contra tres tipos celulares de cáncer [cáncer de pulmón (A-549), leucemia humana (HL-60) y leucemia de rata (P388)] encontrando en todos los casos que los complejos de estaño son igualmente o más activos que el cisplatino (Tabla 1).



α -diimina= 2,2'-bipiridina [1], 1,10-fenantrolina [2]

Figura 4. Complejos de estaño (IV) derivados de ácidos carboxílicos.

	% Inhibición		
	Leucemia de Rata	Leucemia Humana	Cáncer de Pulmón
1	100	100	100
2	100	100	100
Cisplatino	84	100	37

Tabla 1. Actividad antitumoral de los complejos de Sn **1** y **2** (10^{-4} M)

En 2009, Wiecek y colaboradores¹⁰ desarrollaron los complejos de estaño **3**, **4**, y **5** a partir de la tiosemicarbazona (Figura 5). Estos compuestos fueron

probados contra fibroblastos de ratón y cultivos celulares de carcinoma de pulmón (A-549), cáncer de vejiga (T-24) y cáncer de mama (MCF-7); encontrando que el compuesto **3** resultó ser el más activo en contra de los fibroblastos de ratón; sin embargo no presenta una actividad mayor que el cisplatino. Para el carcinoma de pulmón, el compuesto más activo resultó ser el **4**, mostrando una mayor actividad antineoplásica que el cisplatino. Para las líneas celulares de cáncer de vejiga y cáncer de mama, el compuesto que mostró actividad aún mejor que el cisplatino fue el **5**. Es importante destacar que los complejos de Sn resultan ser más activos que los ligantes libres (Tabla 2).

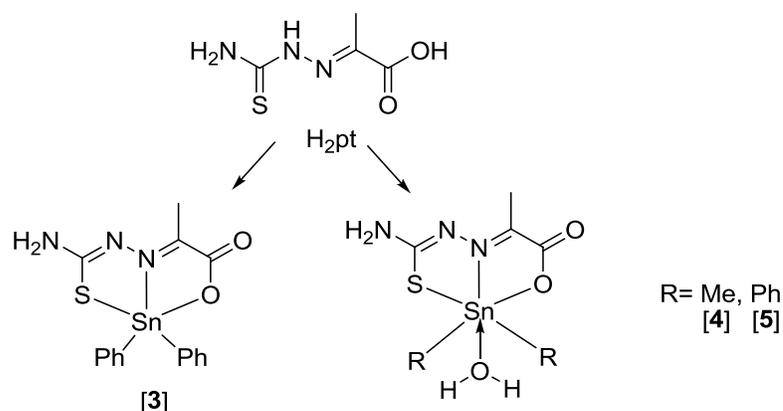


Figura 5. Complejos de Sn y su ligante de origen.

	IC ₅₀ (μM)			
	Fibroblasto de Ratón	Carcinoma de Pulmón	Cáncer de Vejiga	Cáncer de Mama
H₂pt	34.7	--	18.2	160.4
3	0.88	7.2	0.43x10 ⁻⁴	0.69
4	1.02	0.91	19.73	1.24
5	0.95	4.83	4.52	0.62
Cisplatino	0.69	1.53	41.66	7.99

Tabla 2. Actividad antineoplásica de los compuestos **3**, **4** y **5**.

Recientemente, en 2010, Gómez Ruiz y colaboradores⁵ sintetizaron complejos de estaño **6** - **9** (Figura 6), derivados de ciclopentadienil, y evaluaron

su actividad citotóxica contra células de carcinoma de pulmón (A-549) y de tiroides (8505C). En la Tabla 3 se puede observar que todos los complejos resultaron ser más activos en comparación con el cisplatino, siendo más efectivo el compuesto **8** para ambas líneas celulares.

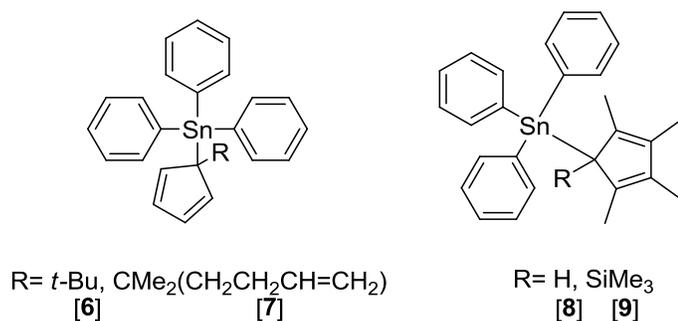


Figura 6. Complejos de estaño derivados del ciclopentadienil.

	IC ₅₀ (μM)	
	Cáncer de Tiroides	Carcinoma de Pulmón
6	0.103	0.079
7	0.110	0.108
8	0.085	0.038
9	0.343	0.384
Cisplatino	5	1.5

Tabla 3. Actividad antitumoral de los compuestos **6 - 9**

Por otra parte en 2007, Geramsichuk y colaboradores⁴ desarrollaron diversos complejos de estaño (Figura 7) y probaron su actividad contra células de cáncer de cérvix (HeLa) y colon (WiDr) encontrando que el compuesto **10** superó al cisplatino para cáncer de cérvix e igualó su actividad para el cáncer de colon, siendo los dos restantes menos efectivos que el cisplatino (Tabla 4).

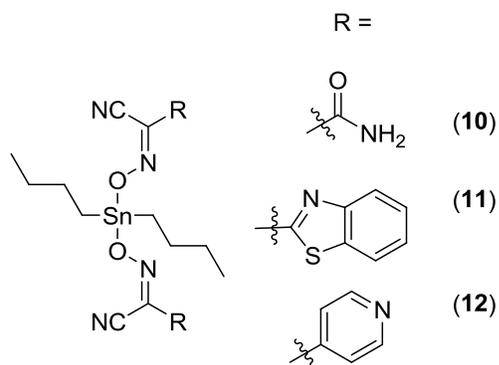


Figura 7. Complejos de estaño derivados de Cianoximas.

	% Actividad	
	Cáncer de Cérvix	Cáncer de Colon
Cisplatino	75-90	>90
10	>90	>90
11	25-50	50-75
12	25-50	75-90

Tabla 4. Actividad de los complejos contra líneas cancerígenas.

En lo que respecta a los ensayos biológicos realizados y siendo el objetivo principal de este trabajo desarrollar fármacos antineoplásicos, se decidió utilizar el ensayo de toxicidad contra *Artemia salina*. Su utilización se fundamenta debido a la correlación entre *A. salina* y la línea cancerígena MCF-7 (Cáncer de mama) encontrada por Badisa y colaboradores¹¹ (Tabla 5).

	Dosis Letal Media		
	Piperidinil-DES	Pirrolidinil-DES	4-Hidroxi Tamoxifen
<i>A. salina</i>	3.2 µg/mL	6.3 µg/mL	3.5 µg/mL
MCF-7	8.2 µg/mL	7.1 µg/mL	6.0 µg/mL

Tabla 5. Comparación de comportamiento entre *A. Salina* y MCF-7

El grupo de Badisa encontró una relación en los resultados de sus estudios realizados con *A. salina* y con MCF-7 al exponerlos a sus dos novedosos compuestos y a un antineoplásico comercial utilizado como referencia. Ellos

reportan un diferencial de dos veces la toxicidad para el piperidinil, pero que este fenómeno no se presenta para el pirrolidinil.

Este comportamiento fue consistente con otros reportes que ellos mismos habían consultado.^{12, 13}

Altomare y colaboradores¹⁴ describen que el ensayo con *A. salina* ha sido reportado por Logrieco¹⁵ y McLaughlin¹⁶ como un ensayo preliminar adecuado para la identificación de sustancias citotóxicas.

El grupo de Altomare prueba derivados de la Fusopirona (un metabolito antifúngico de *Fusarium semitectum*) en ensayos con *A. salina* y encuentran los siguientes resultados (Tabla 6).

DL ₅₀ (µg/mL)	
Derivado 1	21.9
Derivado 2	69.8
Derivado 3	30.1
Derivado 4	38.3
Derivado 5	43.1

Tabla 6. Resultados de dosis letal media de Altomare *et al.*

Estos datos muestran las bajas magnitudes de concentración que son necesarias en la determinación de la dosis letal media utilizando ensayos con *A. salina* dando una ventaja más al ser necesaria muy poca cantidad del compuesto a probar.

Además de adecuado, el ensayo con *A. salina* es considerado rápido, sencillo y económico. Es una de las alternativas para sustituir el uso de animales en

estudios toxicológicos dadas las ventajas económicas (ahorro en costos que implica el manejo de mamíferos) y bioéticas que involucran este tipo de ensayos. La capacidad de mantener a estos invertebrados vivos en cualquier época del año y en condiciones de laboratorio es otra de las ventajas que ofrece este tipo de ensayo. El “camáron de salmuera” (brine shrimp, *A. salina*) es un organismo marino simple, fácil de reproducir y eclosionar en condiciones normales de un laboratorio. Tiene un rango completo y efectivo para probar la toxicidad de diversos compuestos. Así que a través de la revisión de la literatura, se puede sugerir como uno de los mejores y rápidos ensayos biológicos y toxicológicos para todos los laboratorios, especialmente aquellos que requieran del tamizaje de fármacos, diversos compuestos o extractos naturales.¹⁷

CAPÍTULO 3

3.1 Hipótesis

Los nuevos complejos de estaño IV derivados de α -amidofosfonatos presentan actividad tóxica contra *A. Salina*.

3.2 Objetivo General

Sintetizar nuevos α -amidofosfonatos con sus respectivos complejos de estaño y evaluar su actividad biológica contra *A. salina*.

3.3 Objetivos Específicos

- Sintetizar nuevos complejos orgánicos de estaño.
- Caracterizar los productos obtenidos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{119}Sn) y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (EMAR).
- Evaluar el efecto tóxico *in vivo* de los α -amidofosfonatos y sus complejos de estaño (IV) sobre *Artemia salina*.

CAPÍTULO 4

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Información general

4.1.1 Métodos sintéticos

El material de vidrio, agitadores magnéticos, jeringas, cánulas y agujas que se utilizaron para reacciones en condiciones anhidras se secaron en una estufa a una temperatura de 120°C. Todas las materias primas y reactivos empleados se adquirieron en Aldrich, Fluka y otros distribuidores de reactivos y equipos para laboratorio.

Todos los experimentos que requirieron condiciones anhidras fueron llevados a cabo en atmósfera inerte de nitrógeno (N₂) usando técnicas de Schlenk en una línea dual de nitrógeno/vacío junto con una caja de guantes de atmósfera de argón (Ar). Los disolventes utilizados para estos experimentos (tetrahidrofurano, hexano, diclorometano) se obtuvieron de una caja de disolventes MBRAUN MB-SPS.

Los puntos de fusión se determinaron en equipos Mel-Temp.

Los espectros de RMN se obtuvieron con un espectrómetro Varian MERCURY 200 a 200MHz para ¹H, 81MHz para ³¹P y 50MHz para ¹³C, Varian MERCURY 300 a 300MHz para ¹H, 121MHz para ³¹P y 75MHz para ¹³C, Varian INOVA 400 a 400MHz para ¹H y 100MHz para ¹³C. Los desplazamientos

químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) respecto a la referencia interna de tetrametilsilano (TMS) para ^1H ; las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se denotaron con las siguientes abreviaturas: s para indicar una señal simple, d para indicar una señal doble, dd para indicar una señal doble de dobles, t para indicar una señal triple, dt para indicar un doble de triples, c para indicar una señal cuádruple, m para indicar una señal múltiple, a para indicar una señal ancha, Sistema AB; empleando en ocasiones combinaciones de ellas. El disolvente deuterado empleado en las determinaciones fue CDCl_3 .

El curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina, empleando como fase estacionaria gel de sílice y como revelador se utilizó luz ultravioleta y vapores de yodo. La purificación de los productos obtenidos de las reacciones realizadas se llevó a cabo por cromatografía en columna utilizando sílica gel Merck 60 (230-400 μm). Los análisis de masas de alta resolución (EMAR) se llevaron a cabo en un equipo JEOL MStation JMS-700.

4.1.2 Métodos biológicos

Para las pruebas *in vivo* utilizando *Artemia salina* se utilizaron una incubadora casera de doble cámara (una de ellas oscura), una lámpara convencional con una bombilla incandescente de 40 W y una bomba aireadora para pecera.

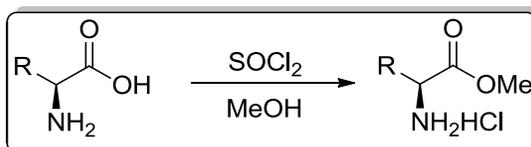
El agua utilizada para preparar el medio salino fue obtenida de un equipo Milli-Q y se utilizaron sal de mar y levadura comerciales.

Las pruebas se realizaron en placas de 6 pozos para ensayos celulares. El conteo de nauplios y las mediciones de los volúmenes a utilizar se realizaron con micropipetas de 200 μL , 200-1000 μL y 500-2500 μL a simple vista.

4.2 Métodos sintéticos

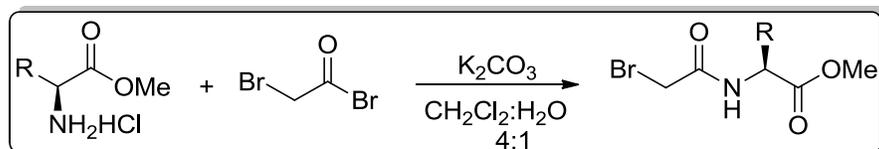
A continuación se presentan todos los procedimientos generales que se siguieron para llegar a las diversas moléculas objetivo que fueron sintetizadas en este estudio.

4.2.1 Obtención de clorhidratos de ésteres metílicos



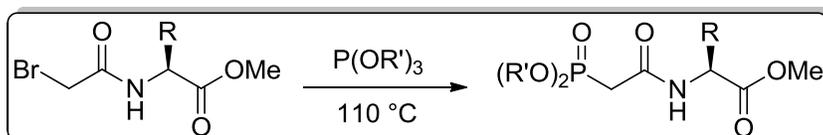
En un matraz redondo de 500mL provisto de un agitador magnético se agregó 1.0 Eq de (S)-fenilglicina o (S)-fenilalanina y se adicionaron 150 mL de metanol. El matraz se enfrió en un baño de hielo a 0°C y se adicionó lentamente 1.1 Eq de cloruro de tionilo (SOCl₂) evitando contacto con partes metálicas. La mezcla se dejó reaccionar por 20 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente hasta sequedad y al sólido resultante se le añadieron 20 mL de éter etílico, se dejó en agitación por 10 - 15 minutos y finalmente se filtró a vacío y se secó.

4.2.2 Obtención de bromoamidas de ésteres metílicos



En un matraz redondo de 500 mL provisto de un agitador magnético se agregó 1.0 Eq de clorhidrato de éster metílico y se adicionaron 150 mL de una mezcla 4:1 de diclorometano:agua. A la solución resultante se le adicionaron 2.5 Eq de carbonato de potasio y posteriormente se agregó 1.1 Eq de bromuro de bromoacetilo gota a gota. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 20 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se llevó a cabo la separación de la fase orgánica, lavándose tres veces la fase acuosa con acetato de etilo (30 mL cada vez). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, y se evaporó hasta sequedad.

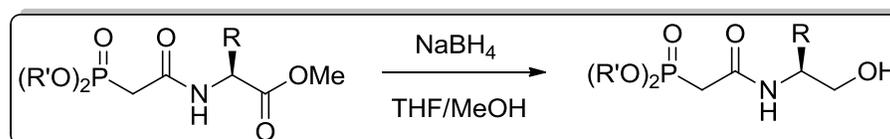
4.2.3 Obtención de fosfonoamidas de ésteres metílicos



En un matraz redondo de 50 mL provisto de un agitador magnético, con un condensador acoplado, se agregó 1.0 Eq de bromoamida de éster metílico y se le adicionaron 3.0 Eq de trialquilfosfita en ausencia de disolvente. El matraz se sumergió en un baño de aceite mineral a una temperatura de 110 ± 5 °C y la mezcla de reacción se dejó en agitación por 5 horas. Transcurrido este tiempo, el matraz se montó en un sistema de destilación a presión reducida a una

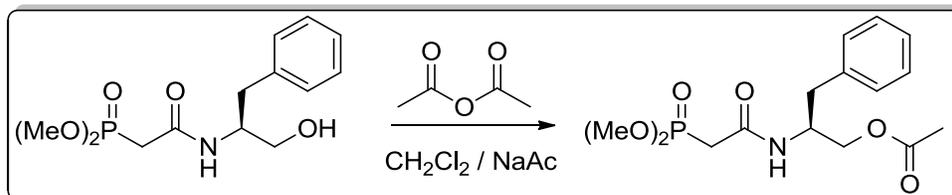
temperatura de 130 °C durante 5 horas para eliminar los compuestos volátiles [(R'O)₃P y (R'O)₂P(O)Me].

4.2.4 Obtención de fosfohidroxiamidas



En un matraz redondo de 250 mL provisto de un agitador magnético, con un sistema de reflujo acoplado, se agregó 1.0 Eq de fosfonamida de éster metílico con 4.0 Eq de borohidruro de sodio; se adicionaron 30 mL de tetrahidrofurano (THF) y se calentó a 65°C por 15 minutos. Posteriormente, se adicionaron 15 mL de metanol grado reactivo gota a gota y se dejó reaccionar en agitación y reflujo por 4 horas. Una vez consumada la reacción, se acidificó con HCl/MeOH al 20% hasta ya no observar precipitación. La mezcla de reacción se filtró a vacío y luego se agregaron 10 mL de agua destilada. Se evaporaron los componentes volátiles de la solución y se realizaron extracciones con acetato de etilo (3x30 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta sequedad. Finalmente, se purificó por columna cromatográfica utilizando un sistema de elución Acetato de etilo:Hexano:Metanol (5:4:1).

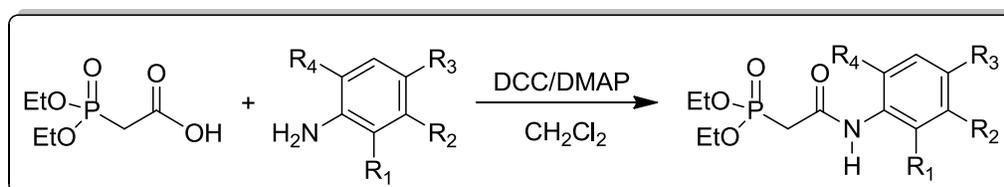
4.2.5 Obtención del acetato de fosfohidroxiamida



En un matraz redondo de 250 mL provisto de un agitador magnético, con un sistema de reflujo acoplado, se agregó 1.0 Eq de fosfohidroxiamida con 1.0 Eq de acetato de sodio; se adicionaron 40 mL de CH_2Cl_2 y se calentó a reflujo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se le agregaron 2.0 Eq de anhídrido acético y se dejó en agitación y calentamiento durante 4 horas.

Al finalizar el tiempo de reacción, se agregaron 10 mL de agua destilada y se realizaron extracciones con CH_2Cl_2 (3x30 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó hasta sequedad. Finalmente, se purificó por columna cromatográfica utilizando un sistema de elución Acetato de etilo:Hexano:Metanol (5:4:1).

4.2.6 Obtención de fosfofenilamidas



En un matraz redondo de 250 mL provisto de un agitador magnético y un tapón, se agregó 1.0 Eq de la anilina correspondiente con 1.1 Eq de ácido dietilfosfoacético y se pusieron bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente en

otro matraz redondo de 250 mL se pesaron 1.0 Eq de dicitohexil carbodiimida (DCC) y 0.2 Eq de 4-dimetilaminopiridina (DMAP), se colocaron bajo atmósfera de nitrógeno, se disolvieron completamente en aproximadamente 30 mL de CH_2Cl_2 seco y se transfirieron vía cánula al primer matraz. La mezcla de reacción se puso en agitación constante por 20 horas a temperatura ambiente, manteniendo la atmósfera inerte. Pasado este tiempo la reacción fue monitoreada mediante cromatografía en capa fina con una fase móvil de acetato de etilo:hexano (7:3). Finalizada la reacción se procedió a eliminar el sólido blanco formado (dicitohexilurea, DCU) mediante precipitación en frío y filtración a vacío lavando con AcOEt. Finalmente la solución se llevó a sequedad y se purificó por columna cromatográfica utilizando un sistema de elución acetato de etilo:hexano (7:3)

4.2.7 Obtención de complejos de estaño

Dentro de una caja seca en atmósfera de argón, se colocó 1.0 Eq de ligante en un matraz de Schlenk provisto de un agitador magnético y se adicionó dicloro metano como disolvente. Posteriormente se adicionó tertbutóxido de potasio y se dejó en agitación de 2 a 4 horas.

Transcurrido este tiempo se adicionó el reactivo organometálico en cuestión y se dejó nuevamente en agitación de 4 a 6 horas.

Luego de este tiempo se extrajo el matraz de la caja seca y se colocó en una línea de nitrógeno/vacío para su manipulación: adición de disolvente, evaporación parcial o total y filtración vía cánula.

4.3 Métodos biológicos

Inicialmente se llevó a cabo la incubación y eclosión de los huevecillos de *Artemia salina*.

Para esto se preparó un medio adecuado para su crecimiento como se describe a continuación.

Para un litro de medio se pesaron 40 gramos de sal marina en grano y 0.006 gramos de levadura comercial. Se agregaron de 950 a 990 mL de agua para disolver la sal y suspender la levadura homogéneamente y se llevó esta mezcla a un pH de 7.8 ajustando con HCl 1N y NaOH 1N. Posteriormente se afora a un litro.

Se colocó medio suficiente en la incubadora (400 a 600 mL) hasta rebasar el nivel de la ventanilla que comunica la cámara oscura con la expuesta a la luz.

Se agregaron 0.5 gramos de huevecillos de *A. salina* en la cámara oscura y burbujeeó aire suavemente para evitar la migración de los huevecillos fuera de la cámara oscura. Se colocó la lámpara a 30 cm de distancia por encima de la incubadora y se mantuvo a 29-32 °C.

Después de 24 horas se recolectaron los nauplios que migraron hacia la cámara expuesta a la luz y se colocaron en un recipiente traslúcido con 350-400 mL de medio salino.

Luego de 24 horas más, es decir, transcurridas 48 horas desde que se pusieron en eclosión, se colocaron de 9 a 11 nauplios en cada pocillo de una

microplaca de 6 pozos, en un volumen conocido de medio, menor o igual a 4 mL, pues el volumen final fue de 5 mL.

Se prepararon 3 pozos para cada concentración a probar, en este caso, para los compuestos sintetizados se probaron 100, 50 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El control de viabilidad fue medio de cultivo. Como control positivo de muerte se utilizó dicromato de potasio a concentraciones de 50, 25, 10 y 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Según los cálculos de concentración realizados, se agregó a cada pozo la cantidad de medio total necesario para que al adicionar el volumen de la dilución de cada compuesto sumara 5000 μL .

Se dejaron las placas con *A. salina* bajo la lámpara por 24 horas y finalmente se contó el número de organismos vivos y muertos.

4.4 Seguridad en el laboratorio y disposición de residuos

Para gestionar la disposición de los residuos generados a lo largo del trabajo de laboratorio, se siguió el Reglamento Interno de Seguridad e Higiene de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL, como se describe a continuación:

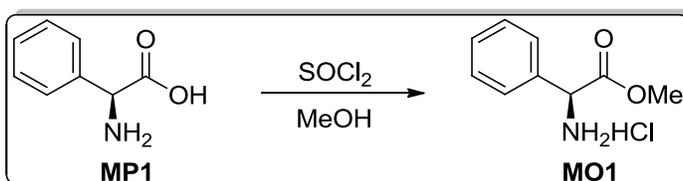
- ❖ **Colector A:** Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas.
- ❖ **Colector B:** sólidos inorgánicos, sales inorgánicas.
- ❖ **Colector C:** Tóxicos e inflamables, aminas, disolventes orgánicos halogenados.
- ❖ **Colector D:** Tóxicos e inflamables, aminas, disolventes orgánicos no halogenados.
- ❖ **Colector E orgánico:** Muy tóxico, cancerígeno, orgánico.
- ❖ **Colector E inorgánico:** Muy tóxico, cancerígeno, inorgánico.
- ❖ **Colector F:** Sales de metales preciosos.
- ❖ **Colector G:** Combinaciones orgánicas sólidas.
- ❖ **Colector H:** Oxidantes.
- ❖ **Colector de residuos de cianuro.**

CAPÍTULO 5

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Parte sintética

5.1.1 Preparación del clorhidrato del (*S*)-2-amino-2-fenilacetato de metilo (M01)



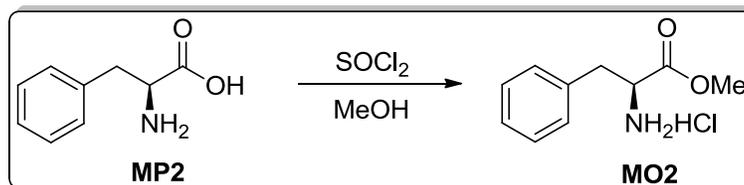
Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 5.00 g (33.08 mmol) de (*S*)-fenilglicina [MP1] con 4.33 g (2.65 mL, 36.39 mmol) de cloruro de tionilo en 150 mL de metanol.

Al agregar el cloruro de tionilo se escuchó fuertemente cada gota y hubo desprendimiento de gases (HCl_{gas}). Conforme se agregaba más cloruro de tionilo, la suspensión del aminoácido se tornó en una solución. No se observaron cambios de coloración.

El producto final se obtuvo como un sólido blanco amorfo con un 99% de rendimiento químico, presentando un punto de fusión de 215 °C.

Este producto fue utilizado sin purificación adicional.

5.1.2 Preparación del clorhidrato del (*S*)-2-amino-3-fenilpropanoato de metilo (MO2)

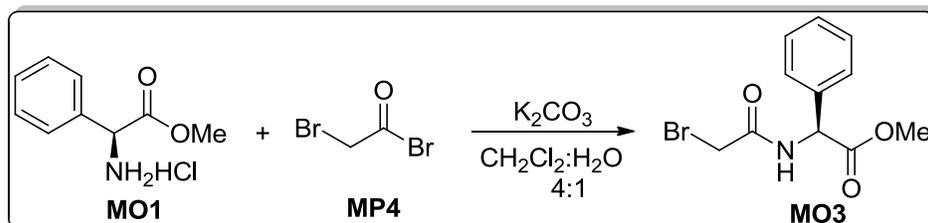


Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 5.00 g (30.27 mmol) de (*S*)-fenilalanina [**MP-2**] con 3.96 g (2.43 mL, 33.29 mmol) de cloruro de tionilo en 150 mL de metanol.

Para la síntesis de este producto se observó el mismo comportamiento general que para **MO1**, obteniendo el producto final como un sólido blanco amorfo con un 94% de rendimiento y presentando un punto de fusión de 140 °C.

Este producto fue utilizado sin purificación adicional.

5.1.3 Preparación de (S)-2-(2-bromoacetamido)-2-fenilacetato de metilo (M03)



Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 5.00 g (24.80 mmol) de **MO1** con 8.57 g (61.99 mmol) de carbonato de potasio y 5.51 g (2.38 mL, 27.27 mmol) de bromuro de bromoacetilo [**MP4**] en 150 mL de diclorometano:agua 4:1.

El carbonato de potasio fue utilizado para liberar el clorhidrato y es por esto que se observó un poco de efervescencia al principio de la reacción. El carbonato también se usó para capturar el ácido bromhídrico producido en la reacción. Al agregar el bromuro de bromoacetilo se observó un ligero desprendimiento de gases (HBr_{gas}) y no se observaron cambios de coloración.

Finalmente se obtuvo el producto como un sólido blanco amorfo con un rendimiento químico del 91% y un punto de fusión de 68 °C.

Para la caracterización de este producto se llevó a cabo el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y se obtuvo un espectro (Figura 8) con varias señales a diferentes desplazamientos químicos (δ , ppm).

La primera señal de interés es un singulete en 3.75 ppm que integra para los tres protones del metoxilo. A 3.89 ppm se observa un par de sistemas AB ($J = 13.7$ Hz) que pertenecen a los dos protones del metileno adyacente al átomo de bromo. Posteriormente se encuentra una señal doble a 5.54 ppm ($J = 7.1$ Hz) que integra para el protón del metino adyacente al grupo fenilo. En la zona de 7.34 a 7.39 ppm está la señal múltiple perteneciente a los cinco protones aromáticos y finalmente en 7.48 ppm se observa un doblete ($J = 5.6$ Hz) del protón unido al nitrógeno.

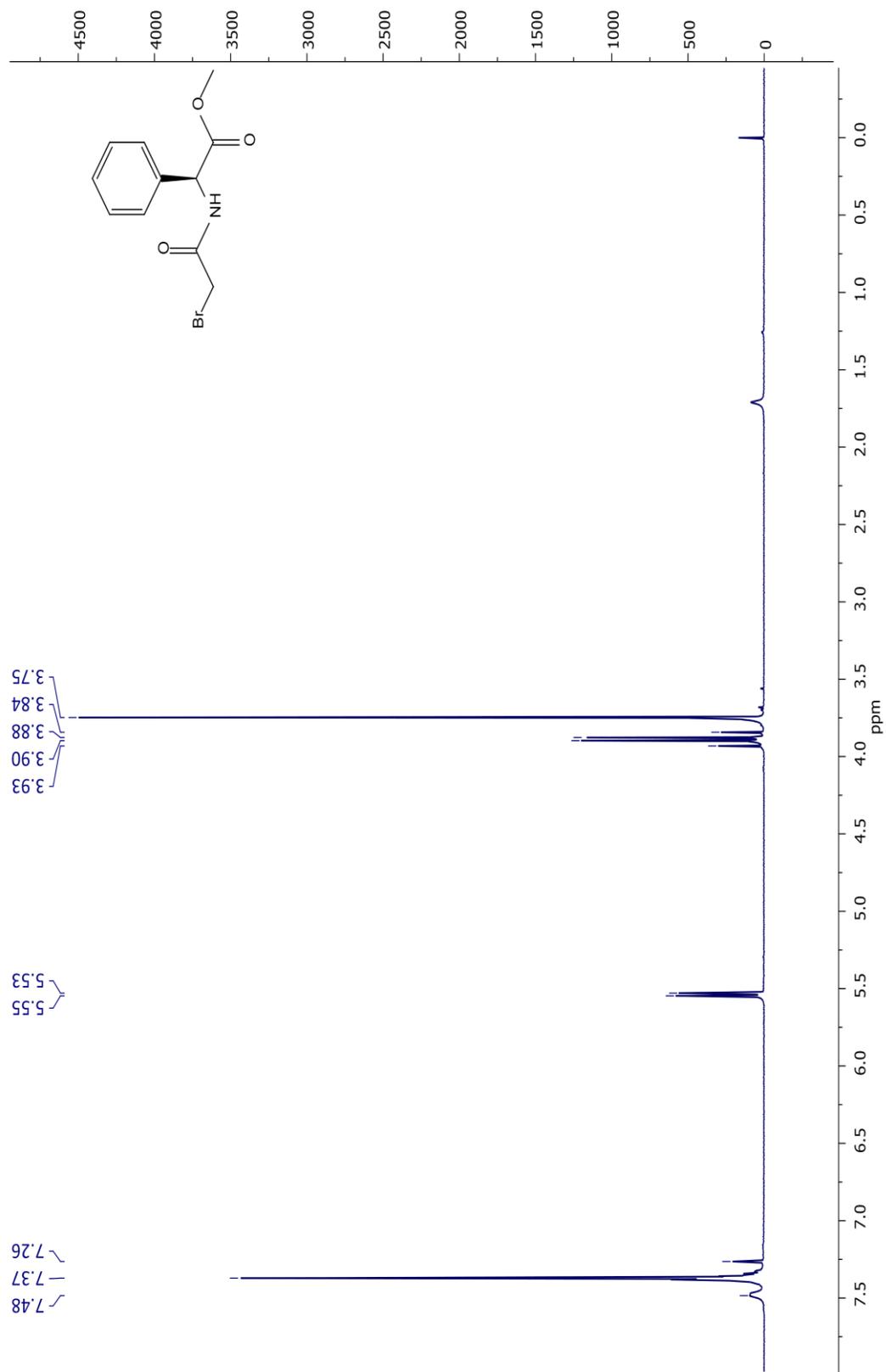


Figura 8. Espectro de NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃) de MO3

En la siguiente ampliación del espectro (Figura 9) se pueden apreciar de mejor manera las señales anteriormente mencionadas.

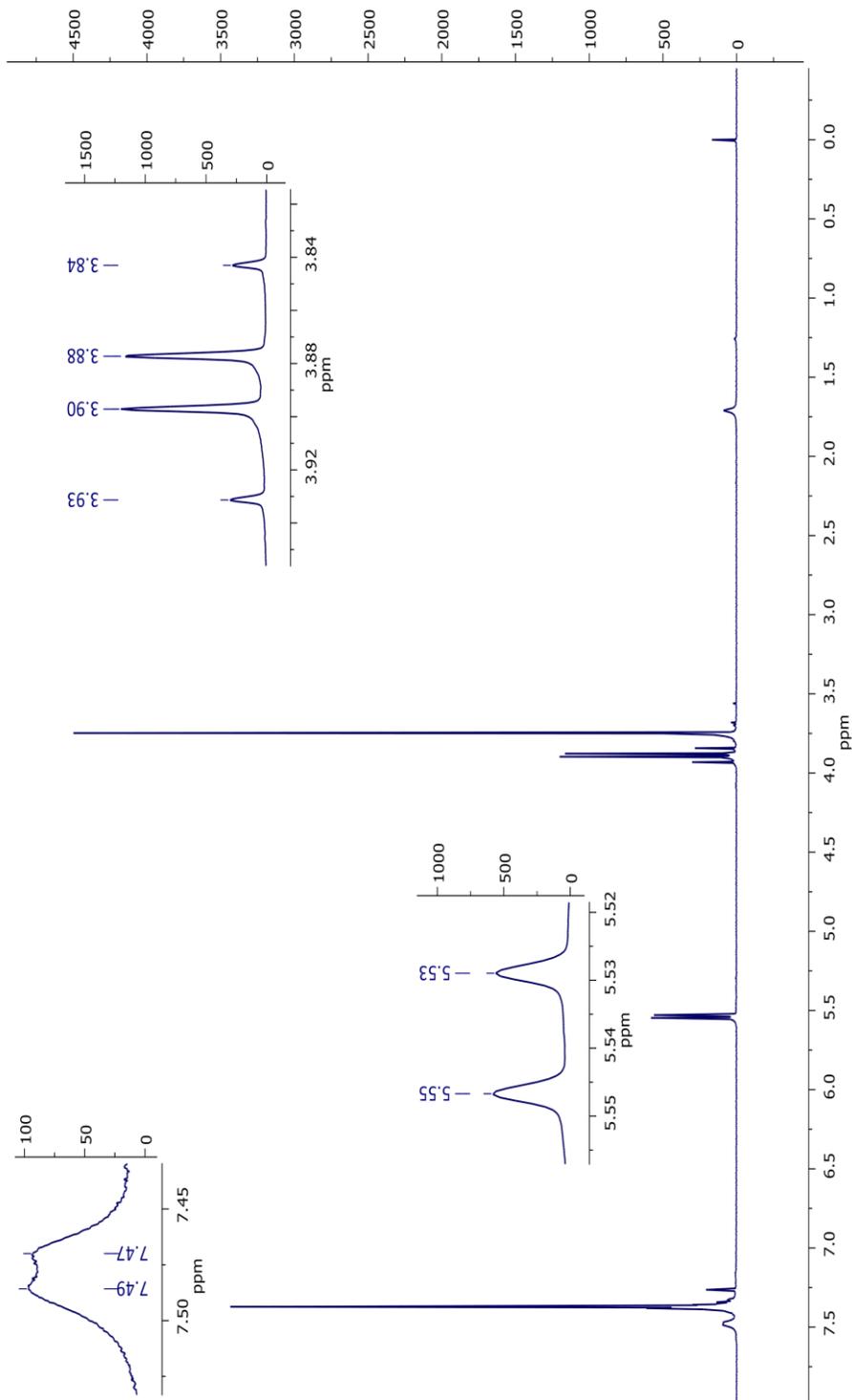


Figura 9. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO₃

En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (Figura 10) se aprecia inicialmente en 28.77 ppm la señal correspondiente al metileno unido al átomo de bromo, en 53.19 ppm se observa el metilo del éster y para el metino se aprecia una señal en 57.14 ppm.

Para los carbonos del anillo aromático, se observa una señal en 127.40 ppm para los *meta*, 129.00 ppm en la posición *para*, 129.28 ppm los carbonos *orto* y el ipso en 135.96 ppm.

Finalmente los carbonilos, en 165.15 ppm el de la amida y en 170.93 ppm el del éster.

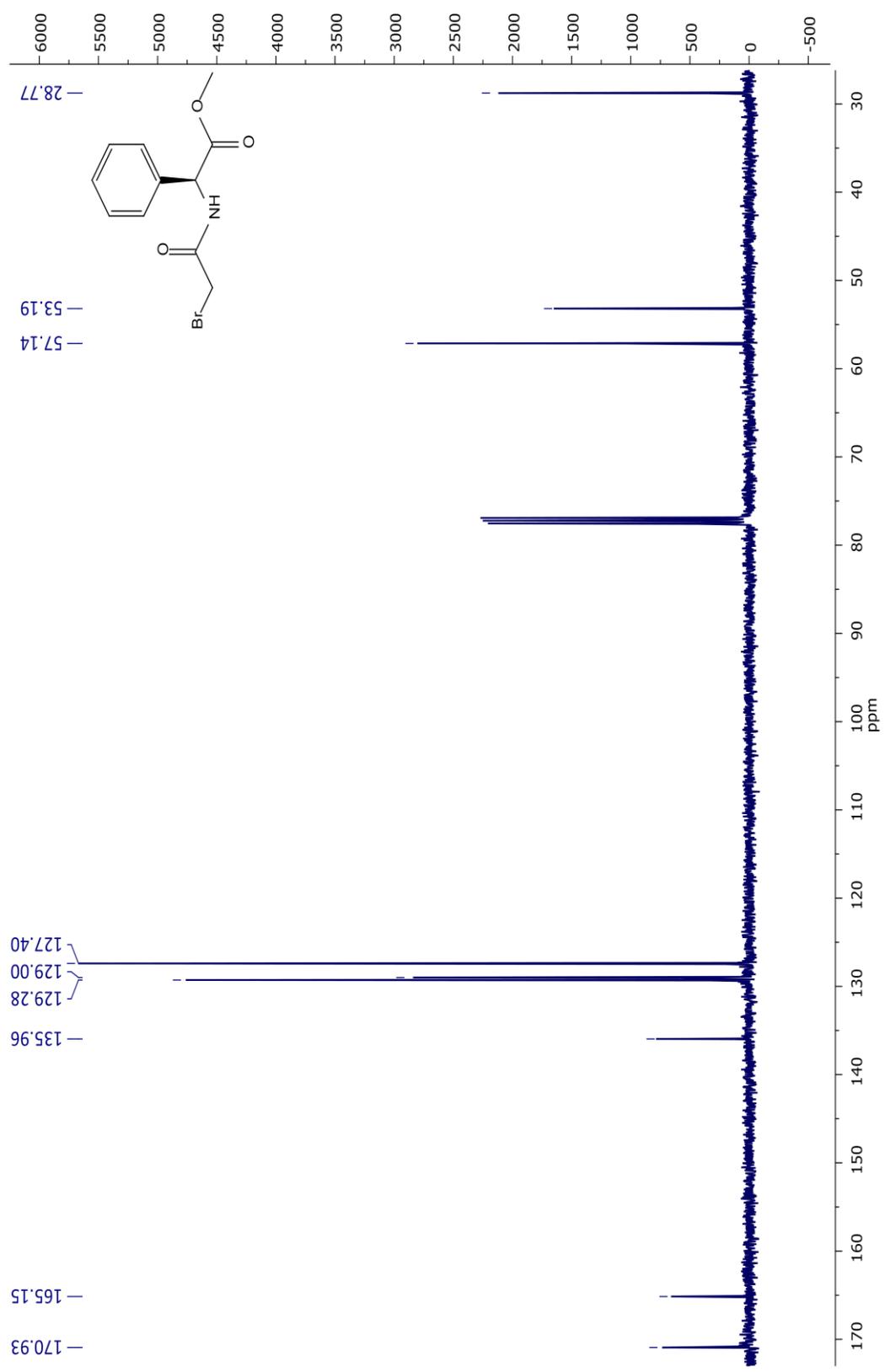
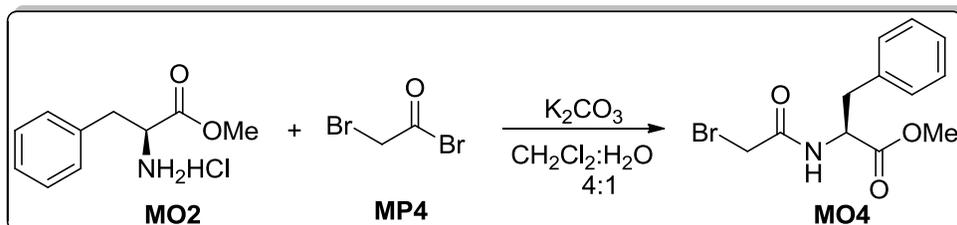


Figura 10. Espectro de NMR de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MO3

5.1.4 Preparación de (S)-2-(2-bromoacetamido)-3-fenilpropanoato de metilo (MO4)



Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 5.00 g (23.18 mmol) de **MO2** con 8.01 g (57.96 mmol) de carbonato de potasio y 5.15 g (2.22 mL, 25.50 mmol) de bromuro de bromoacetilo [**MP4**] en 150 mL de diclorometano:agua 4:1.

De igual manera que para el producto **MO3**, el carbonato de potasio se agregó con la finalidad de liberar el clorhidrato y capturar las moléculas de HBr formadas a lo largo de la reacción.

Este producto generó un rendimiento químico del 89% y un punto de fusión de 82 °C.

Para la caracterización de este producto se llevó a cabo el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H. En el espectro (Figura 11) se pueden destacar diversas señales.

Inicialmente se encuentran dos dobles de dobles a un desplazamiento de 3.12 y 3.18 ppm respectivamente ($J = 13.9$ Hz, 6.0 Hz y 13.9 Hz, 5.7 Hz) representando cada uno a un protón del metileno del bencilo. Una señal simple en 3.74 ppm para los tres protones del grupo metoxi. Se pueden observar, como en el compuesto **MO3**, los sistemas AB en 3.82 y 3.86 ppm ($J = 13.6$ Hz y 13.7 Hz) que integran cada uno para un protón del metileno adyacente al átomo de bromo.

Para el protón del metino que soporta el grupo bencilo se puede observar un doble de triples en 4.85 ppm ($J = 7.9$ Hz, 5.8 Hz). Posteriormente figura una señal doble en 6.86 ppm ($J = 5.4$ Hz) que integra para un protón, el perteneciente al nitrógeno. Finalmente está la señal múltiple que integra para los cinco protones aromáticos en la zona de 7.24 a 7.33 ppm.

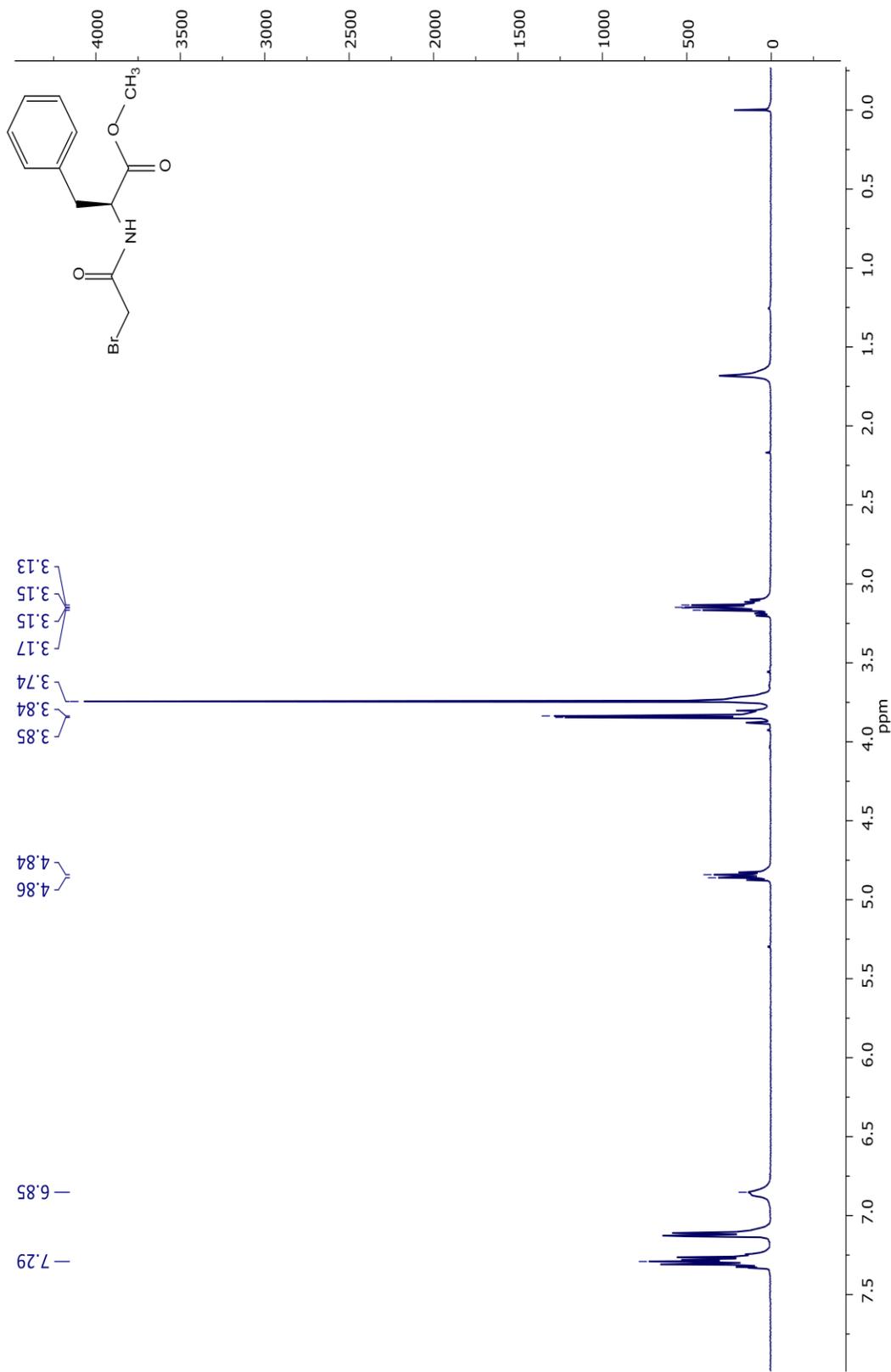


Figura 11. Espectro de NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MO4

En la siguiente ampliación del anterior espectro (Figura 12) se pueden observar las señales con mayor detalle.

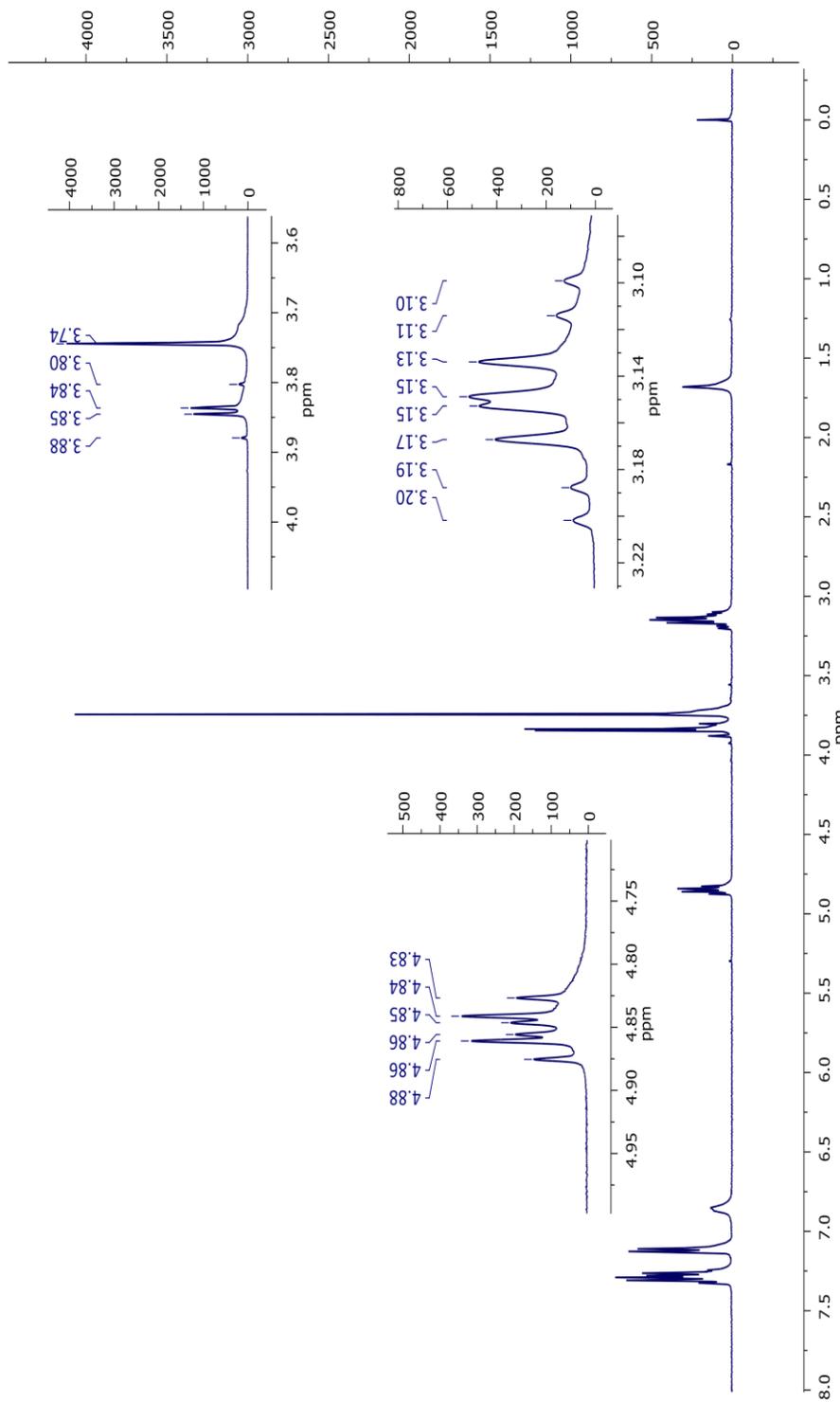


Figura 12. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO4

En el siguiente espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (Figura 13) es posible apreciar la primera señal correspondiente al metileno del bromo en 28.82 ppm, seguido del metileno del bencilo en 37.93 ppm, posteriormente, en 52.69 ppm, se encuentra el metilo del éster y a continuación el metino en 53.92 ppm.

Para las señales del anillo aromático la posición *meta* corresponde a la señal en 127.55 ppm, *para* en 128.89 ppm, *orto* en 129.47 ppm y el carbón *ipso* en 135.53 ppm.

Finalmente se encuentran el carbonilo de amida en 165.34 ppm y el de éster en 171.49.

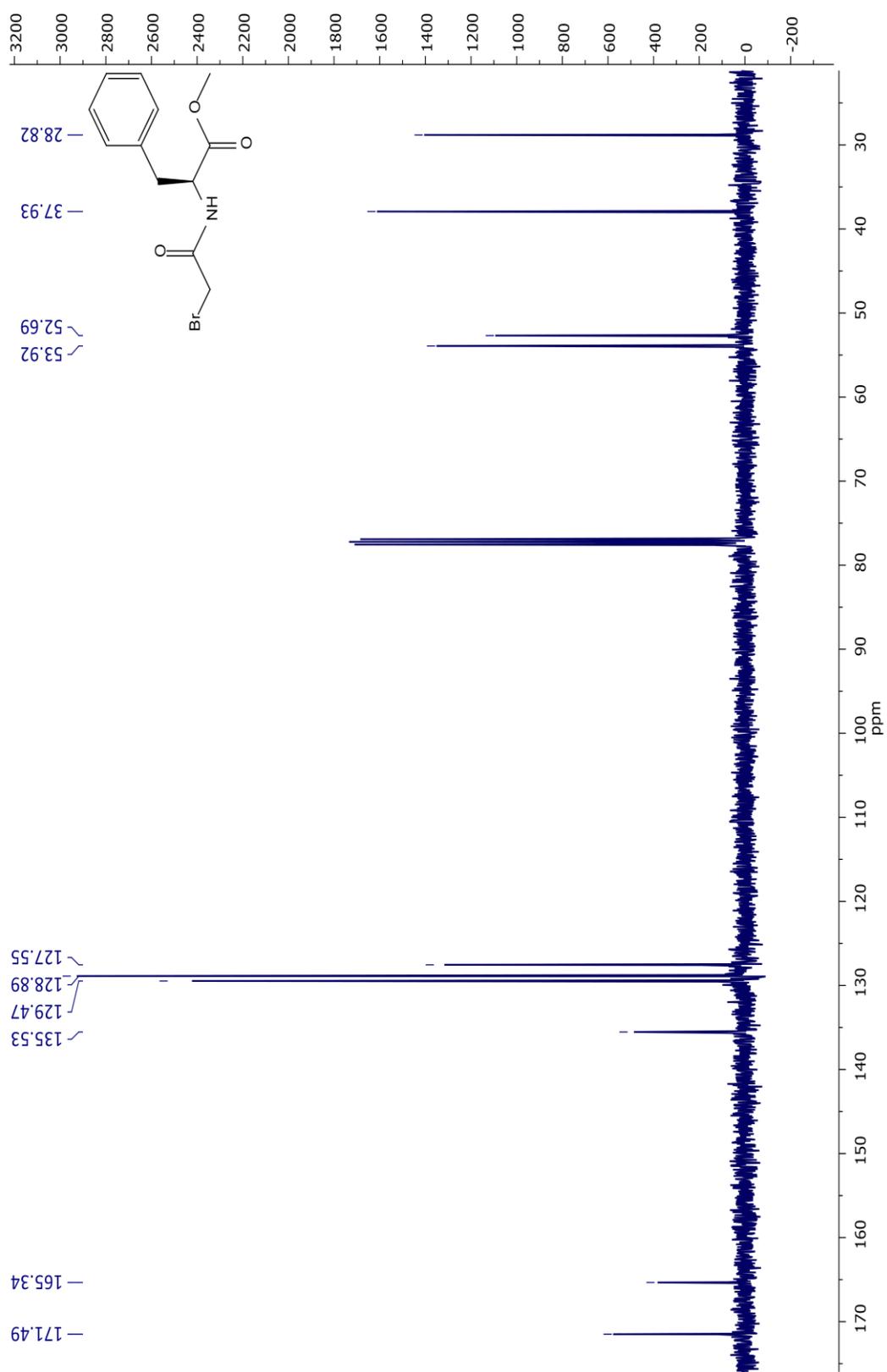
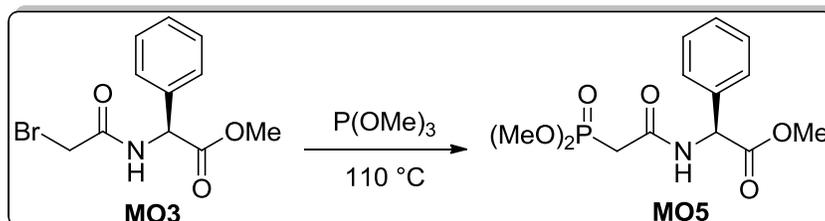


Figura 13. Espectro de NMR ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MO4

5.1.5 Preparación de (S)-2-(2-(dimetoxifosforil)acetamido)-2-fenilacetato de metilo (MO5)



Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 2.50 g (8.74 mmol) de **MO3** con 3.25 g (3.09 mL, 26.21 mmol) de trimetilfosfita.

Una vez agregados ambos componentes en el matraz se sometieron a calentamiento y poco a poco se tornó todo en una solución viscosa y amarillenta. Transcurrido el tiempo de reacción se procedió a acoplar el matraz a un sistema de destilación a presión reducida para eliminar los subproductos volátiles $[\text{P}(\text{OMe})_3, \text{CH}_3\text{P}(\text{O})(\text{OMe})_2]$. Cuando la destilación terminó, se obtuvo un líquido viscoso, translúcido y amarillento. El rendimiento químico para este producto fue de 92%.

En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Figura 14) obtenido de este producto cabe destacar las siguientes señales principales:

En un desplazamiento químico de 3.71 ppm se observa una señal simple que integra para tres protones y pertenece al grupo metoxilo del éster. Sobre la misma zona, en 3.71 y 3.81 ppm se observan dos dobles ($J = 11.2\text{ Hz}$) que integran cada uno a tres protones y corresponden a ambos metoxilos unidos al átomo de fósforo. Estas señales dobles se deben al acoplamiento de los grupos metilo con el átomo de fósforo.

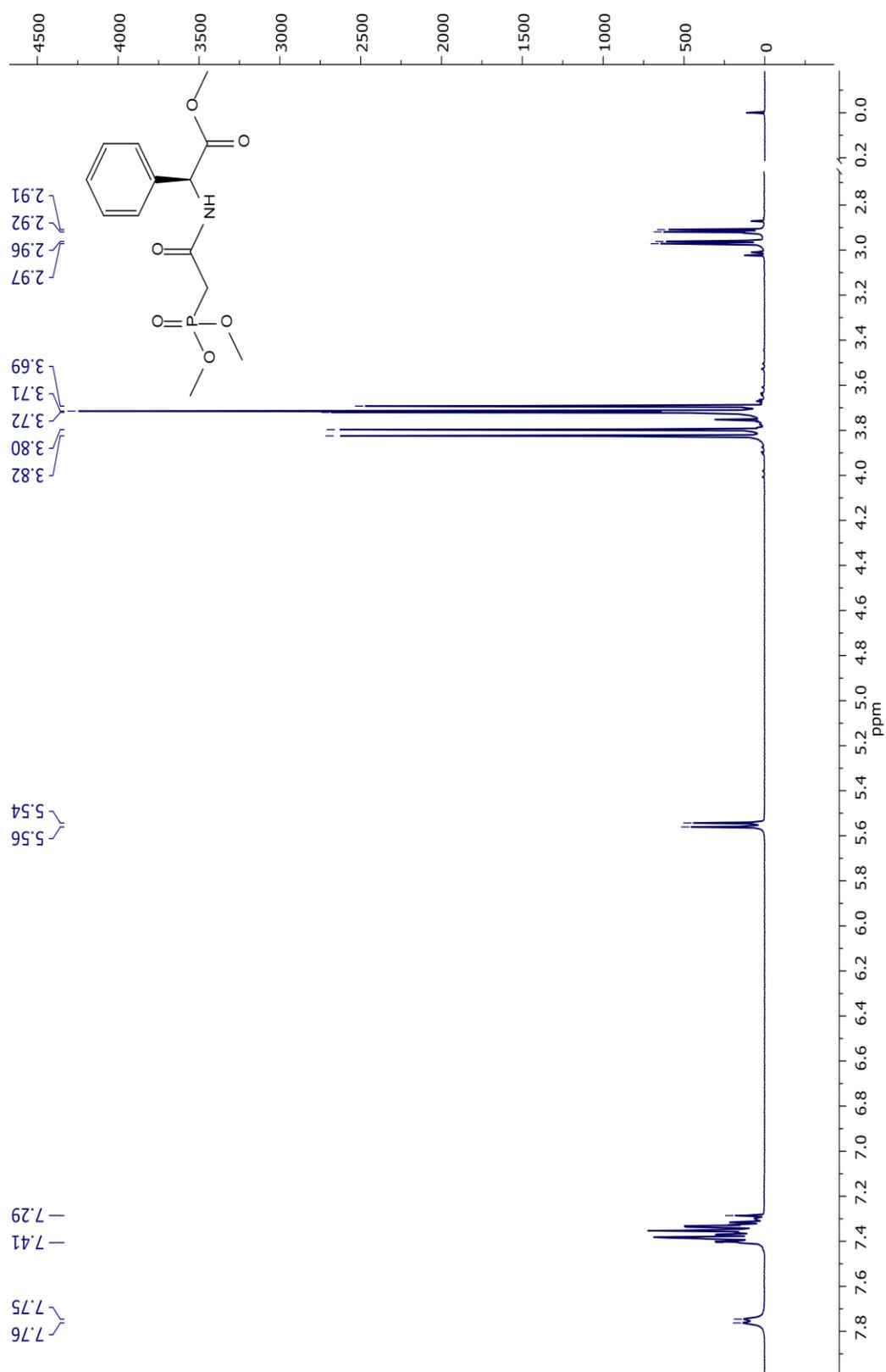


Figura 14. Espectro de NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MO5

En la ampliación del espectro (Figura 15) se observan con mayor claridad las señales restantes.

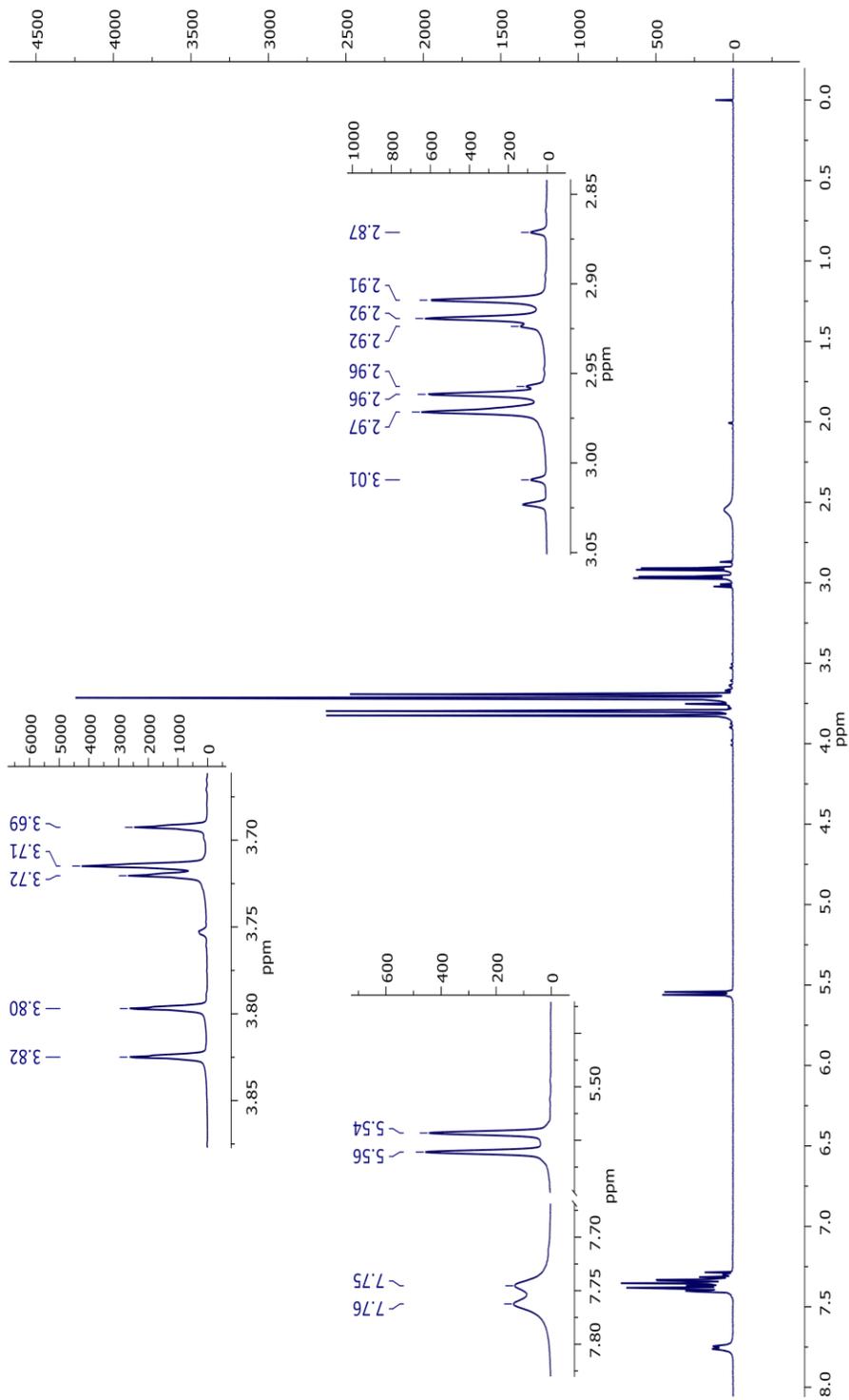


Figura 15. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO5

En 2.92 y 2.97 ppm se encuentran dos dobles de dobles ($J_{H/P} = 19.1$ Hz, $J_{gem} = 15.15$ Hz) que presentan los protones geminales del metileno unido al átomo de fósforo. Esos dos acoplamientos se deben a que los protones del metileno son diastereotópicos y por ende se acoplan uno con el otro; además de su acoplamiento con el átomo de fósforo, siendo la constante de acoplamiento para este último el valor más grande. Se encuentra una señal doble en 5.55 ppm ($J = 7.1$ Hz) que integra para el protón del metino quiral, en la zona de 7.29 a 7.41 ppm se observa una señal múltiple que corresponde a los cinco protones aromáticos y finalmente en un desplazamiento de 7.75 ppm está una señal doble ($J = 6.8$ Hz), la cual pertenece al protón del nitrógeno.

También figura el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (Figura 16) donde se observa a 34.35 ppm una señal doble ($J = 131.9$ Hz) para el metileno adyacente al fósforo (acoplamiento característico del ^{13}C con P), en 52.91 ppm la señal del metilo del grupo éster, dos señales dobles en 53.27 y 53.47 ppm ($J = 6.5$ y 6.3 Hz) para los carbonos de los metoxilos del fósforo, nuevamente por acoplamiento con P, y la señal para el metino se observa a 57.07 ppm.

Las señales de los carbonos del anillo aromático comienzan con una señal para la posición *meta* en 127.44 ppm, *para* en 128.75 ppm, *orto* en 129.11 e *ipso* en 136.16. Finalmente, otra señal doble en 163.55 ppm ($J = 4.1$ Hz) para el carbonilo de la amida y el del éster en 171.02 ppm.

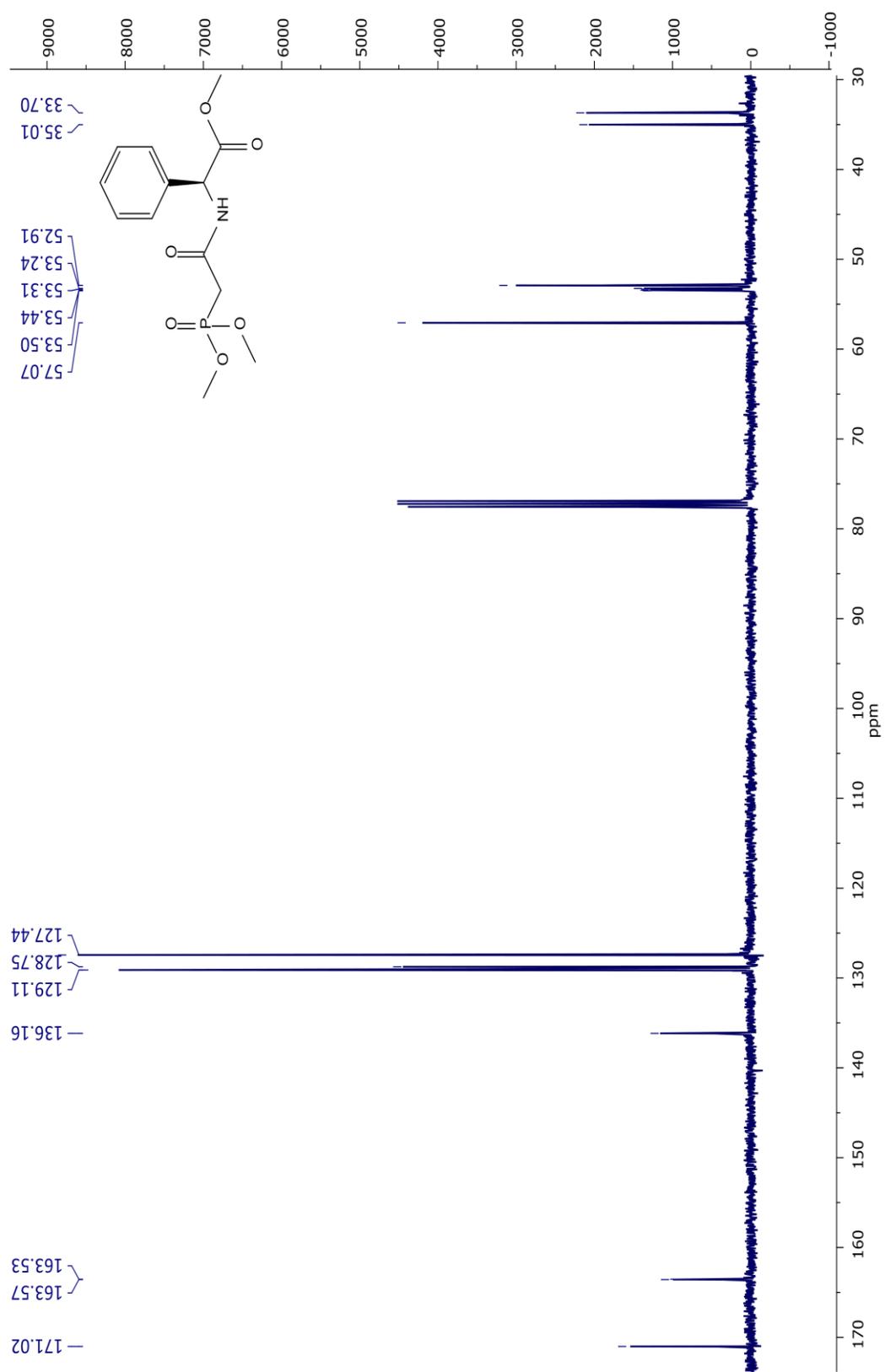
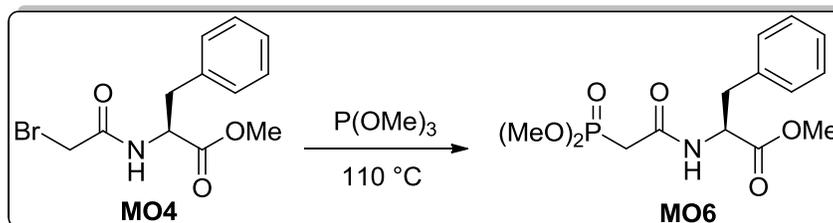


Figura 16. Espectro de NMR ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MO5

5.1.6 Preparación de (S)-2-(2-(dimetoxifosforil)acetamido)-2-fenilacetato de metilo (MO6)



Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 2.50 g (8.33 mmol) de **MO4** con 3.10 g (2.95 mL, 24.99 mmol) de trimetilfosfita.

Este producto se obtuvo con una coloración un poco más clara que el producto **MO5**, con un rendimiento químico del 97%.

Dentro de la caracterización para este producto figura el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , en cuyo espectro (Figura 17) es posible ubicar varias señales que también aparecen para el producto **MO5**.

La principal diferencia radica en la señal del metileno del bencilo, la cual se observa como un par de dobles de dobles. Uno que se encuentra a un desplazamiento de 3.06 ppm ($J = 14.0\text{ Hz}, 7.1\text{ Hz}$) y otro más en 3.18 ($J = 14.0\text{ Hz}, 5.5\text{ Hz}$), integrando cada uno para un protón.

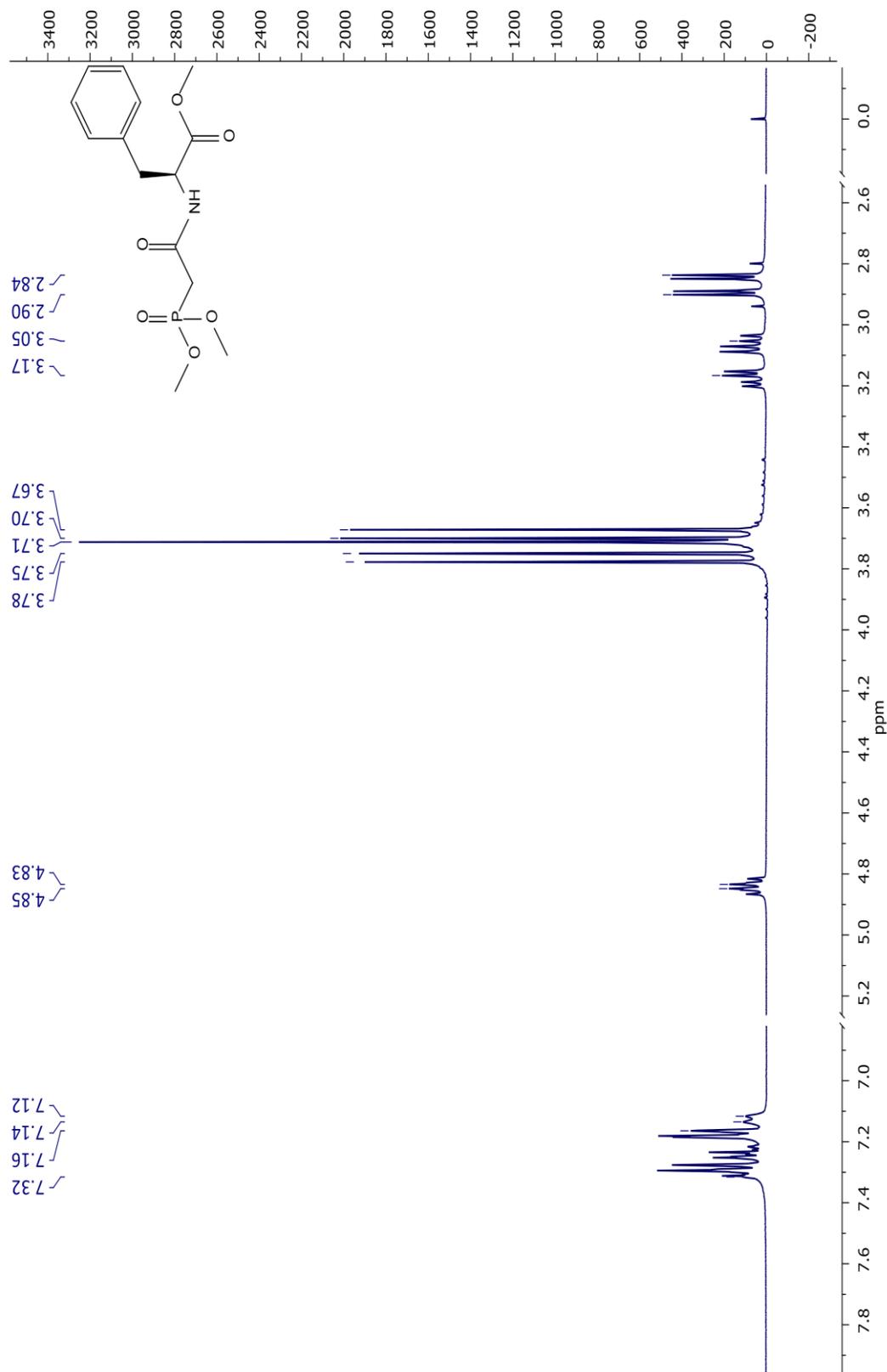


Figura 17. Espectro de NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MO6

En la siguiente ampliación del espectro (Figura 18) se pueden apreciar con más facilidad el resto de las señales.

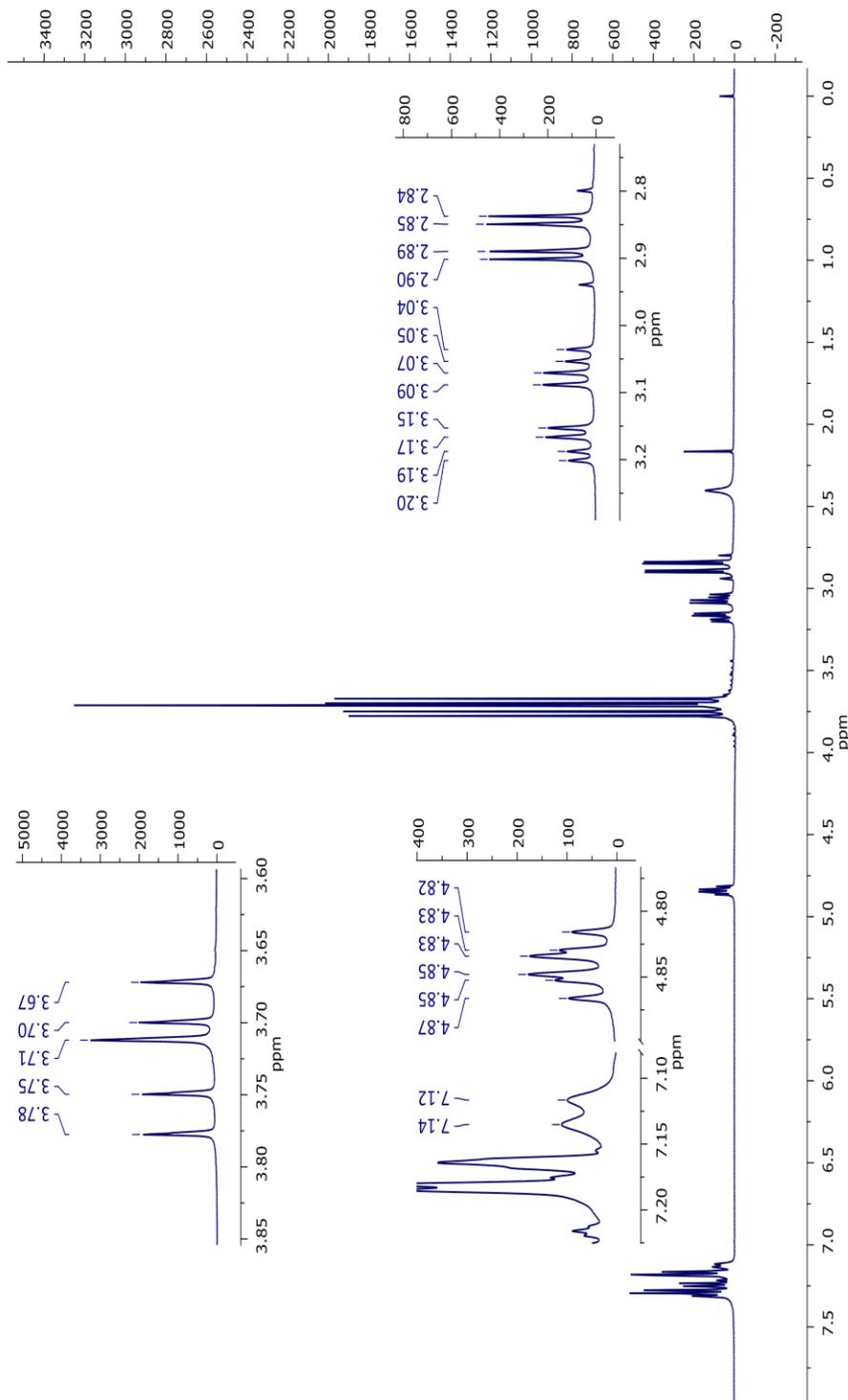


Figura 18. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO6

Se observan dos dobles de dobles a 2.84 ppm y 2.90 ppm ($J_{H/P} = 19.9$ Hz, $J_{gem} = 15.12$ Hz) que representan a cada uno de los protones geminales del metileno adyacente al átomo de fósforo (acoplamiento C-P).

A continuación se encuentran dos dobletes, uno en 3.69 ppm ($J = 11.2$ Hz) y el otro en 3.76 ppm ($J = 11.2$ Hz) integrando cada uno para los tres protones de cada grupo metoxi unido al átomo de fósforo. Entre estas dos señales se observa una simple en 3.71 ppm representando los tres protones del grupo metoxi del éster.

En un desplazamiento de 4.84 ppm se encuentra un doble de triples ($J = 7.3$ Hz, 5.5 Hz) que corresponde al protón del metino adyacente al bencilo. Después hay un doblete en 7.13 ppm ($J = 7.5$ Hz) para el protón del átomo de nitrógeno. Finalmente están los protones aromáticos contenidos en una señal múltiple en la zona de 7.16 a 7.32 ppm.

En el análisis de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C se obtuvo un espectro (Figura 19) donde a 34.26 ppm se observa una señal doble ($J = 132.2$ Hz) para el metileno adyacente al átomo de fósforo, en 37.82 ppm se encuentra la señal del metileno del bencilo, el metoxilo del grupo éster se visualiza en 52.43, dos señales dobles ($J = 6.4$ y 6.6 Hz) en 53.17 y 53.35 ppm para los metoxilos del fósforo y la señal del metino en 53.93 ppm.

Los carbonos de posición *meta* en el anillo aromático figuran en 127.19 ppm, 128.67 ppm para los de posición *para*, 129.36 ppm para los ubicados en *orto* y finalmente el *ipso* en 136.00 ppm.

Los carbonilos aparecen en 163.80 ppm como un doble para la amida ($J = 3.9$ Hz) y 171.73 ppm para el éster metílico.

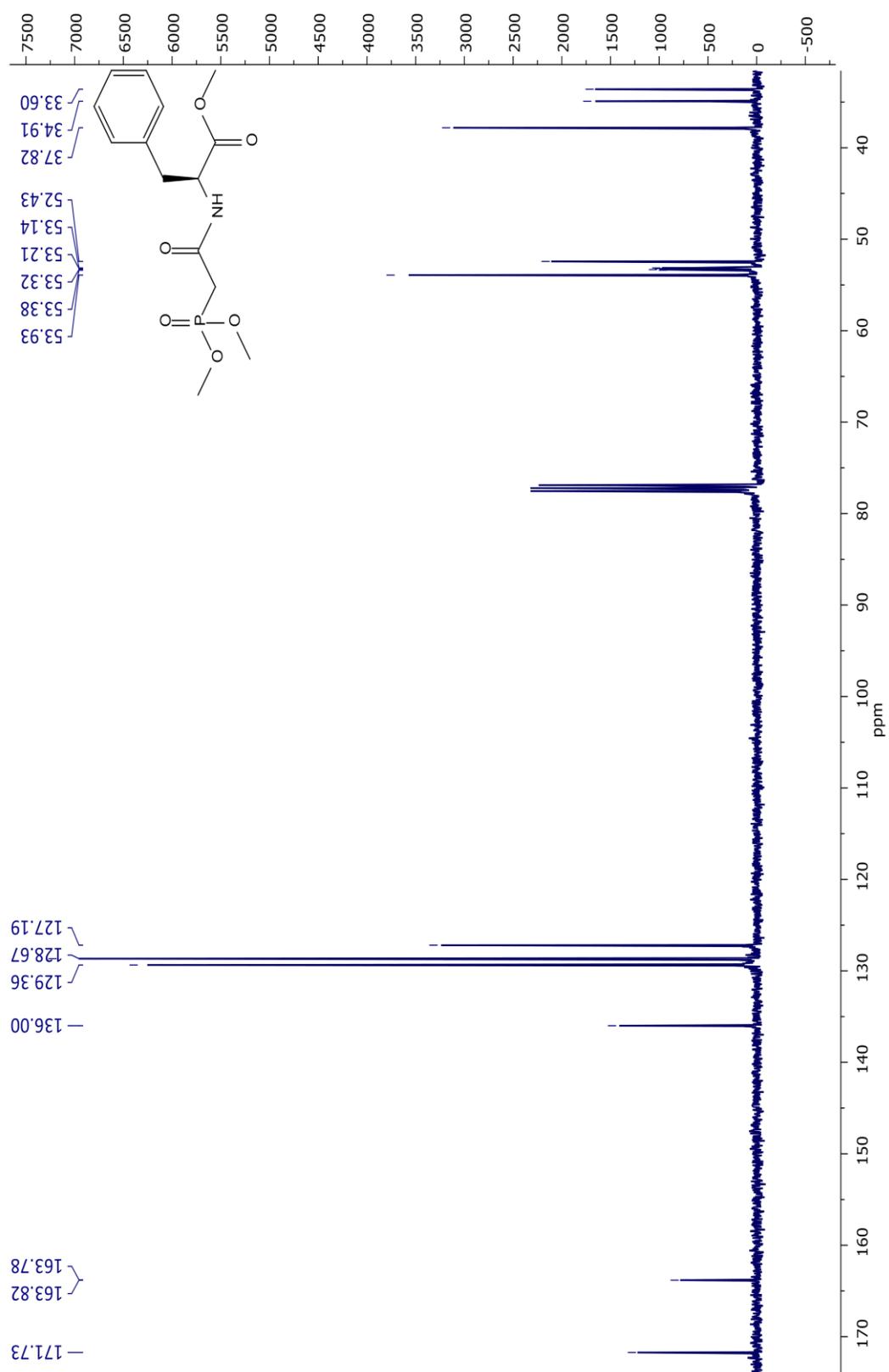
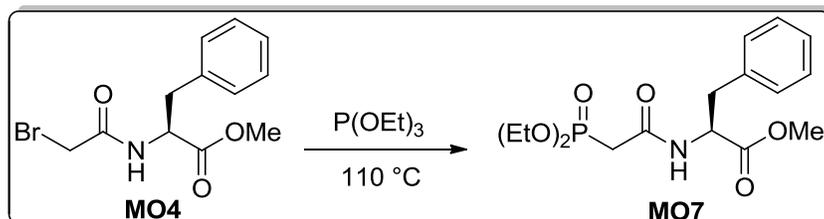


Figura 19. Espectro de NMR ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de MO6

5.1.7 Preparación de (*S*)-2-(2-(di-etoxifosforil)acetamido)-2-fenilacetato de metilo (M07)

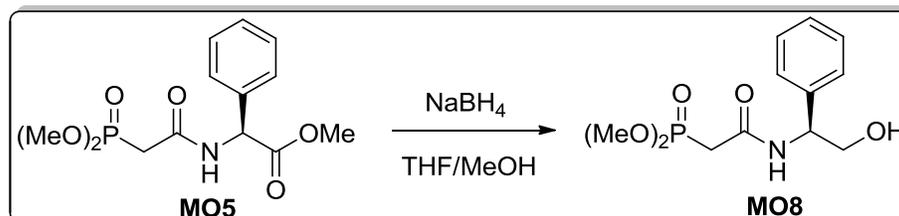


Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 2.50 g (8.33 mmol) de **MO4** con 4.15 g (4.28 mL, 24.99 mmol) de trietilfosfita.

Durante la segunda etapa del procedimiento, la destilación a presión reducida, se necesitó el incremento de la temperatura en $20\text{ }^\circ\text{C}$ en comparación con las reacciones en donde se utilizó trimetilfosfita. En este caso el subproducto formado resultó ser el etil dietil fosfonato junto con los residuos de la trietilfosfita, con puntos de ebullición de 194 y $156\text{ }^\circ\text{C}$, mayores en comparación con el metil dimetil fosfonato y la trimetilfosfita (181 y $111\text{ }^\circ\text{C}$).

Este producto se obtuvo como un líquido viscoso, amarillo, translúcido y con un rendimiento químico del 95%, el cual fue utilizado sin purificación adicional.

5.1.8 Preparación de (S)-2-((2-hidroxi-1-feniletil)amino)-2-oxoetil fosfonato de dimetilo (M08)



Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 4.00 g (12.69 mmol) de **M05** con 1.92 g (50.75 mmol) de borohidruro de sodio.

La mezcla de reacción se apreciaba incolora al inicio, pero adquirió un ligero color violeta al final. En la adición del metanol se observó una gran efervescencia, por lo que se tuvo que adicionar lentamente.

Luego de realizar las extracciones de la fase acuosa, se juntaron las fases orgánicas, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron los disolventes a presión reducida obteniendo un líquido viscoso amarillento.

La purificación de este producto se llevó a cabo por columna cromatográfica utilizando como fase móvil una mezcla de disolventes: acetato de etilo, hexano y metanol en una proporción 5:4:1; sobre una fase estacionaria de sílica gel obteniendo finalmente un líquido aceitoso ligeramente rosado con un rendimiento químico del 84%.

Para la caracterización de este producto se tiene inicialmente el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Figura 20) donde se puede observar la presencia de una señal doble en 2.96 ppm correspondiente al metileno unido al átomo de fósforo (acoplamiento H-P), seguido de dos señales dobles (acoplamiento H-P) en 3.69 y 3.78 ppm ($J = 11.2$) que corresponden cada una a un grupo metoxi unido al fósforo. Posteriormente se encuentra en 3.84 ppm un doble de dobles ($J = 11.7 \text{ Hz}, 4.1 \text{ Hz}$) que pertenece al metileno adyacente al hidroxilo, este conjunto de señales y la desaparición simple del éster metílico permiten confirmar que la reacción de reducción es satisfactoria.

En 5.08 ppm se aprecia un doble de triples ($J = 7.4 \text{ Hz}, 4.1 \text{ Hz}$) que representan el metino quiral. Una señal múltiple de 7.22 a 7.35 proveniente de los cinco protones aromáticos y finalmente para el protón del nitrógeno, a 7.77 ppm, una señal doble ($J = 7.8 \text{ Hz}$).

Las señales que se observan en el espectro de RMN a 1.25, 2.03, 2.16 y 4.11 ppm corresponden a los disolventes acetona y acetato de etilo utilizados en el proceso de purificación del compuesto.

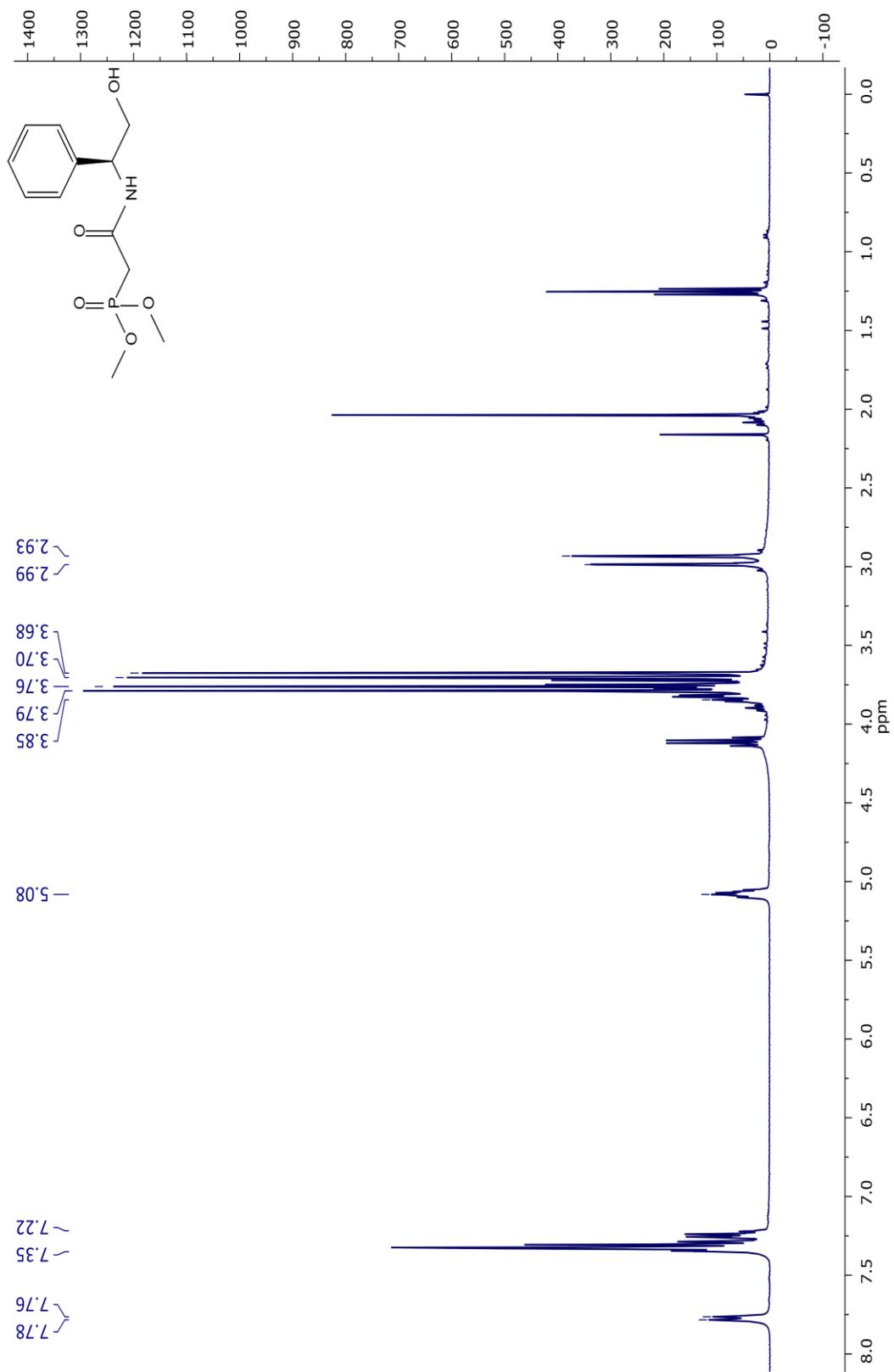


Figura 20. Espectro de NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3) de MO8

En la siguiente ampliación (Figura 21) se aprecian más claramente las señales antes descritas.

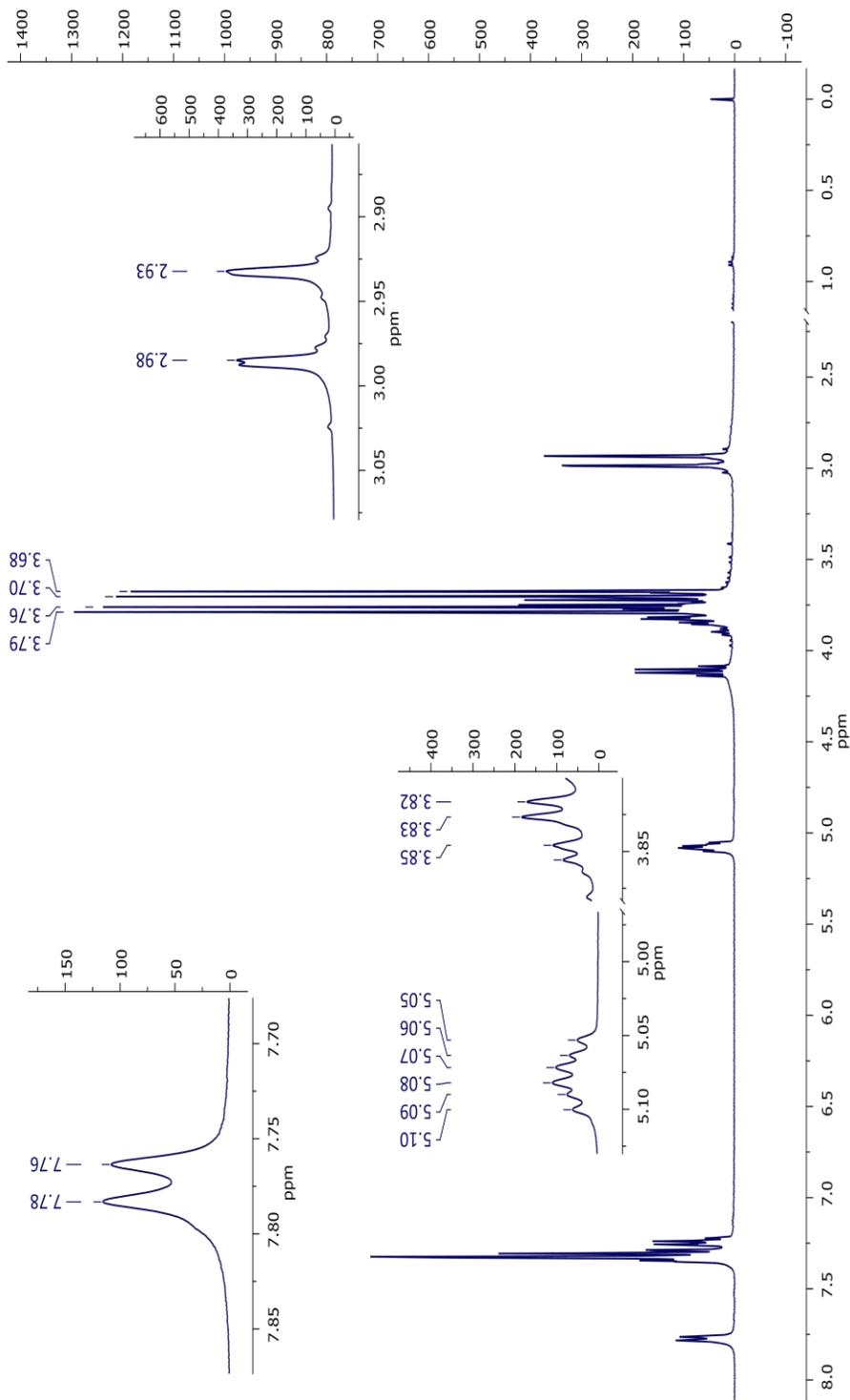


Figura 21. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO8

Para el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (Figura 22) se observa una señal doble a 34.66 ppm ($J = 131.4$) para el metileno unido al fósforo, un par de señales dobles ($J = 6.6$ Hz) en 53.22 y 53.66 ppm para los metoxilos del fósforo, el metino en 56.23 ppm y la señal del metileno del hidroxilo en 65.80 ppm.

Los carbonos *meta* del anillo aromático se encuentran a 126.89 ppm, el *para* en 127.63 ppm, los *orto* en 128.66 ppm y el *ipso* en 139.25 ppm. Finalmente el doblete para el carbonilo en 164.29 ppm ($J = 4.8$ Hz).

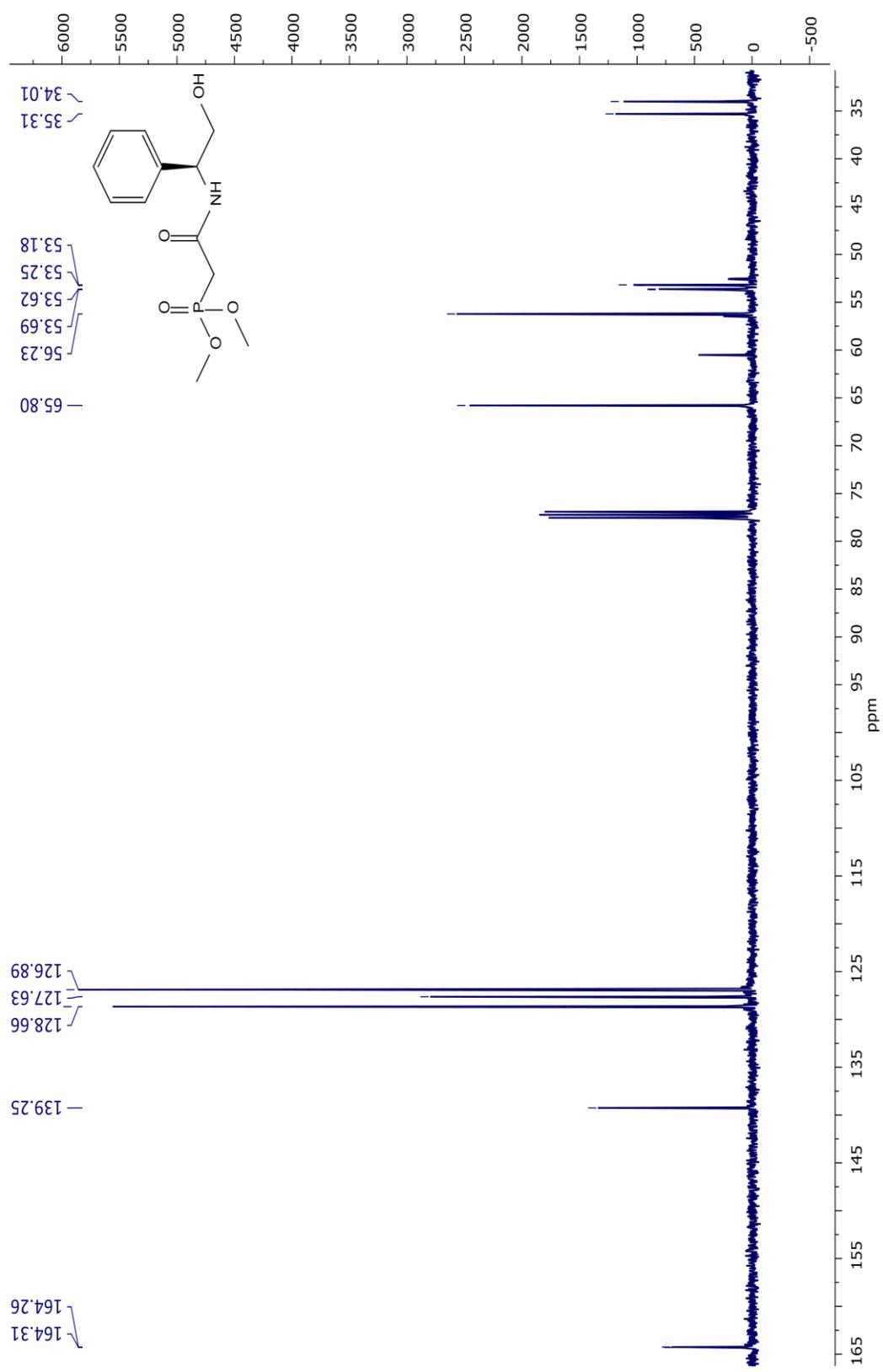
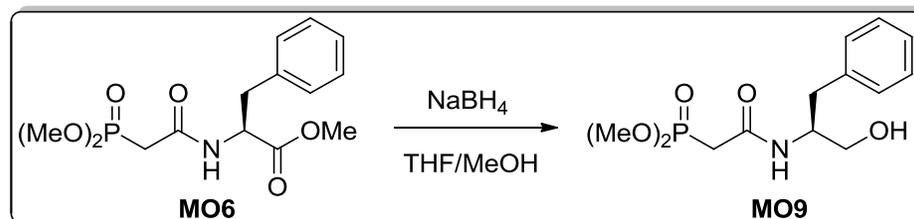


Figura 22. Espectro de NMR ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de MO8

5.1.9 Preparación de (*S*)-(2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dimetilo (M09)



Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 4.00 g (12.15 mmol) de **MO6** con 1.84 g (48.59 mmol) de borohidruro de sodio.

No se observaron cambios de coloración para este experimento.

El crudo de reacción se obtuvo como un líquido viscoso ligeramente amarillo y luego de su purificación por columna cromatográfica utilizando como fase móvil una mezcla de disolventes: acetato de etilo, hexano y metanol en una proporción 5:4:1, sobre una fase estacionaria de sílica gel, se obtuvo un líquido de aspecto físico muy similar al crudo con un rendimiento químico del 90%.

Para la caracterización de este producto se cuenta con el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Figura 23) en donde se puede apreciar a un desplazamiento químico de 2.88 ppm una señal doble correspondiente al metileno adyacente al fósforo; dentro de esta señal doble, también en 2.88 ppm, se encuentra un doble de dobles ($J = 7.4 \text{ Hz}, 2.2 \text{ Hz}$) que representa los dos protones del metileno del bencilo, posteriormente se encuentra a 3.54 ppm un

doble de dobles más ($J = 11.3 \text{ Hz}, 4.8 \text{ Hz}$), esta vez para el metileno que soporta el grupo hidroxilo.

En 3.69 y 3.77 se encuentran las señales que integran para los seis protones de los dos grupos metoxi unidos al átomo de fósforo, observándose como un par de dobletes ($J = 11.2 \text{ Hz}$). Se aprecia para el metino una señal múltiple en 4.21 ppm y un doble ($J = 7.9 \text{ Hz}$) para el protón del nitrógeno en 7.1 ppm.

Finalmente, de 7.18 a 7.30 ppm se encuentra la señal múltiple para los protones aromáticos.

Las señales en 1.2, 2.1 y 4.2 (triplete, singulete y cuarteto) corresponden al disolvente acetato de etilo, lo que indica que el compuesto retiene a dicho disolvente a pesar de que fue secado con una bomba de vacío durante un par de horas.

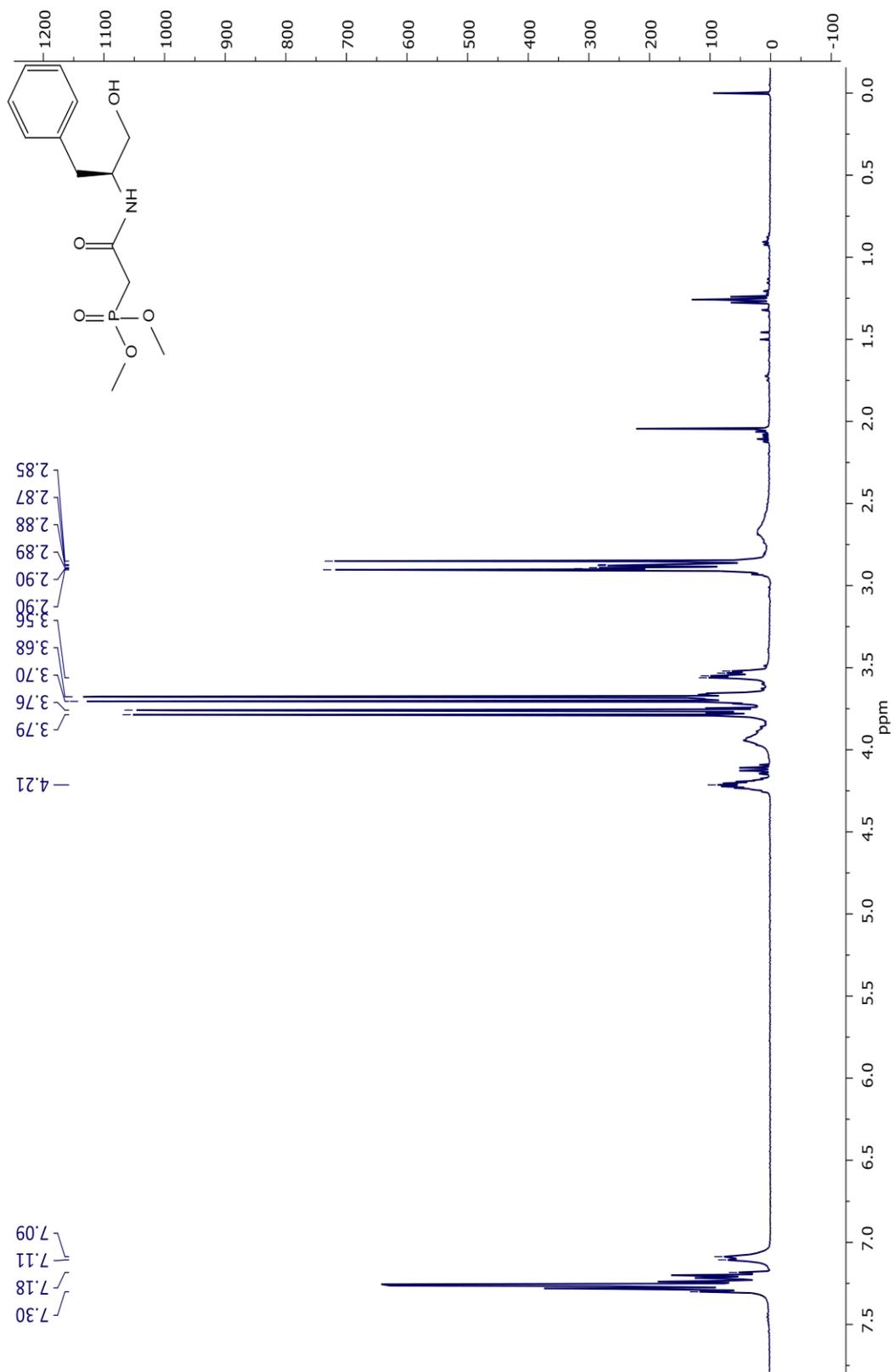


Figura 23. Espectro de NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃) de MO9

Para una mejor apreciación de las señales anteriormente descritas, se presenta la ampliación del espectro (Figura 24).

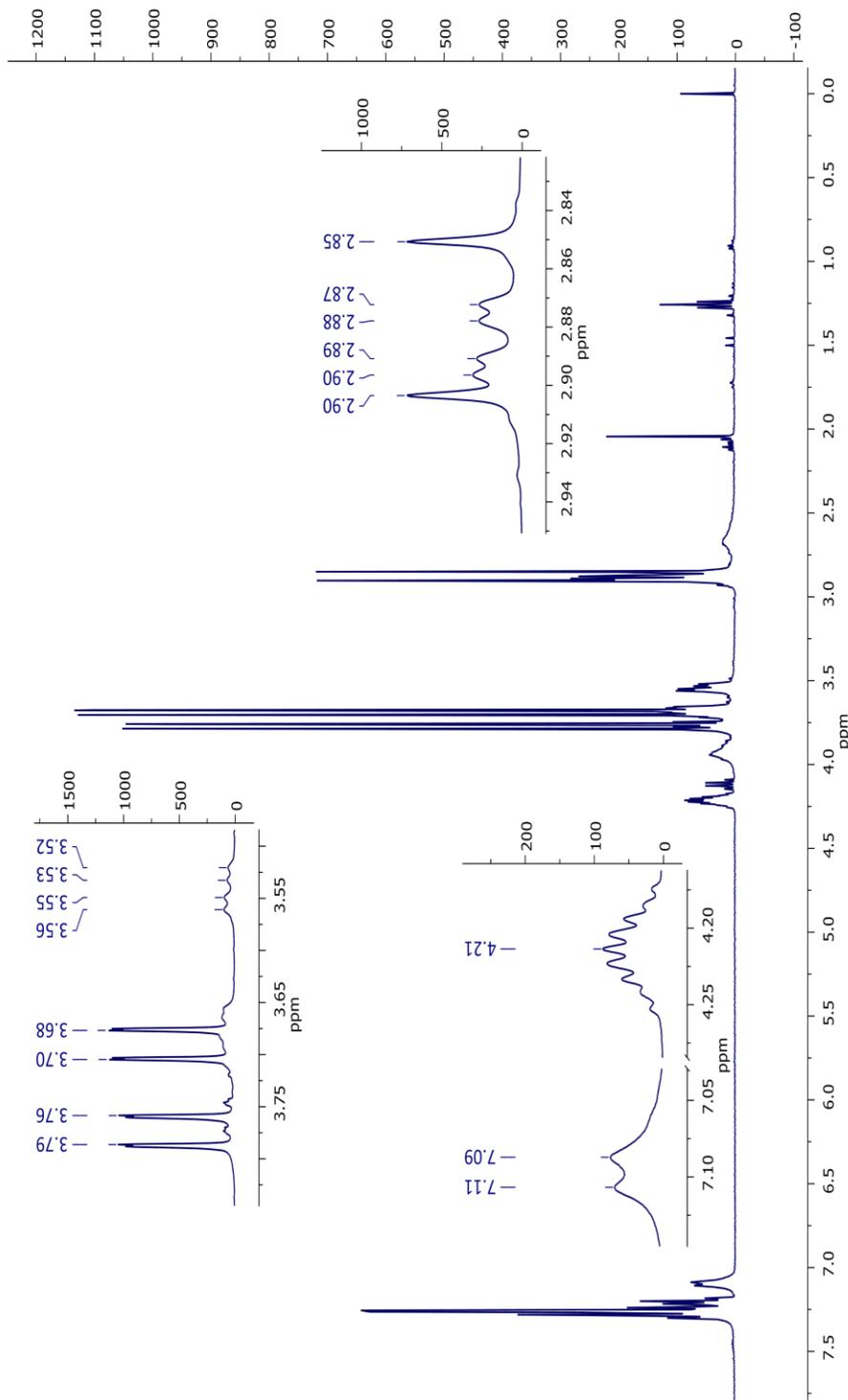


Figura 24. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO9

En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C (Figura 25) se puede observar una señal doble a 34.75 ppm ($J = 131.3$) para el metileno del fósforo, dos señales dobles ($J = 6.5$ y 6.6 Hz) en 53.19 y 53.72 ppm que corresponden a los metoxilos del fósforo, la señal del metino se encuentra entre las dos señales anteriores en 53.52 ppm y la señal del metileno del hidroxilo en 63.40 ppm.

Para el anillo aromático están las señales de la posición *meta* en 126.63 ppm, la *para* en 128.63 ppm, los *orto* en 129.43 ppm y el *ipso* en 138.06 ppm. Por último, un doblete para el carbonilo en 164.26 ppm ($J = 4.8$ Hz).

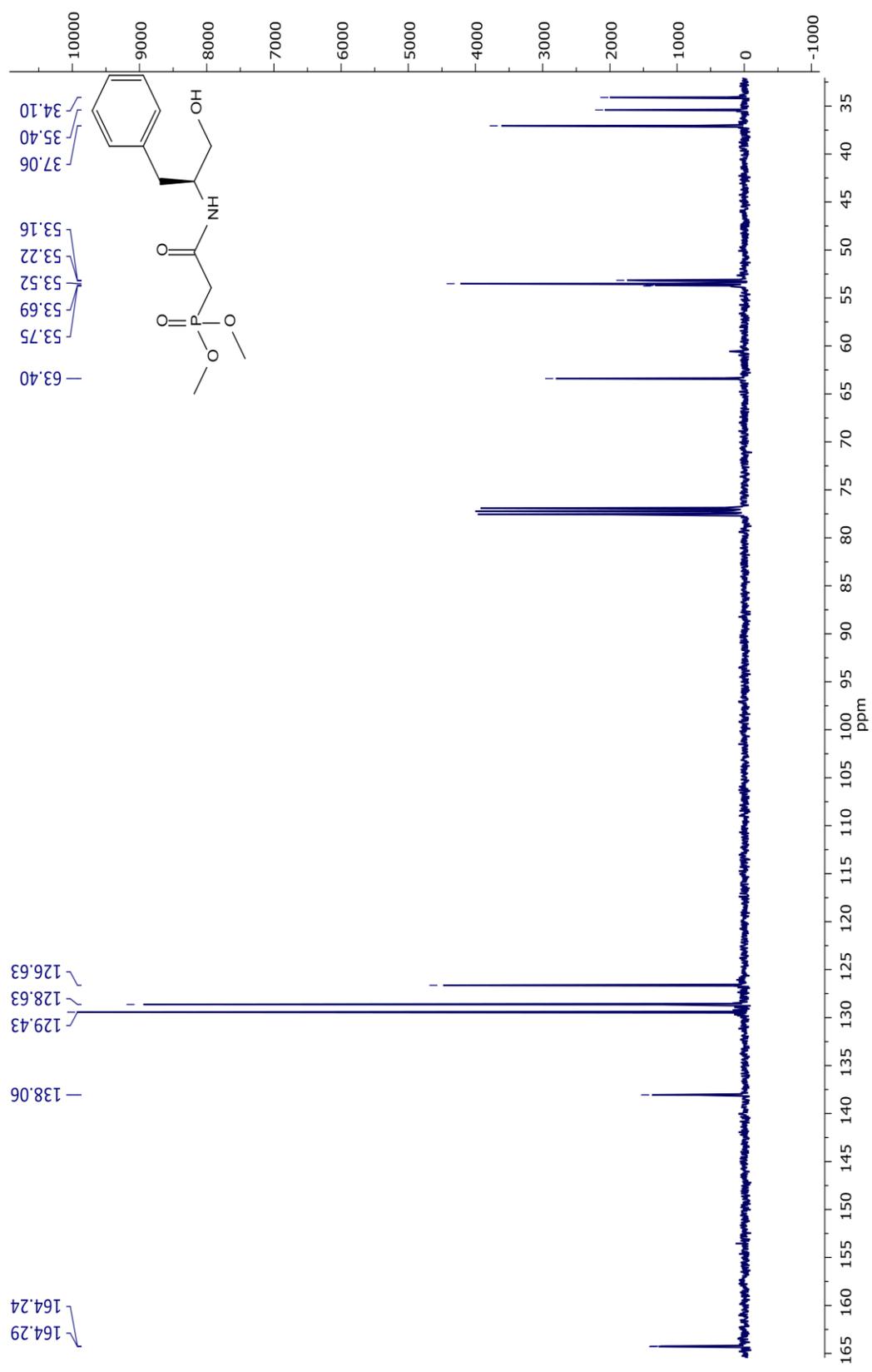
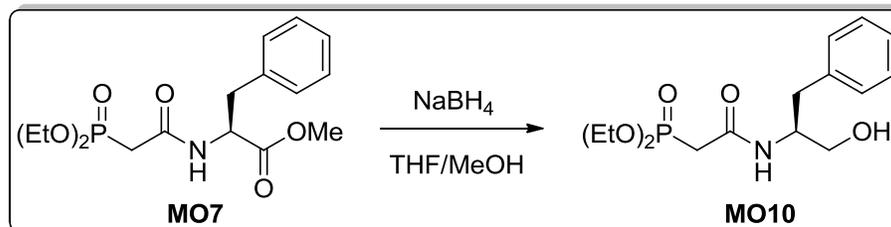


Figura 25. Espectro de NMR ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de MO9

5.1.10 Preparación de (S)-(2-((2-hidroxi-1-feniletíl)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dietilo (MO10)



Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 4.00 g (11.19 mmol) de MO7 con 1.69 g (44.78 mmol) de borohidruro de sodio.

El producto se obtuvo como un líquido viscoso amarillento que fue purificado por cromatografía en columna utilizando una mezcla de disolventes: acetato de etilo, hexano y metanol en una proporción 5:4:1, sobre una fase estacionaria de sílica gel; obteniendo finalmente un líquido viscoso ligeramente ámbar con un rendimiento químico del 84%.

Para el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H (Figura 26) de este producto tenemos como diferencia radical la presencia de un par de señales triples ($J = 7.1$ Hz) en 1.28 y 1.31 ppm que pertenecen a los metilos de los grupos etoxi.

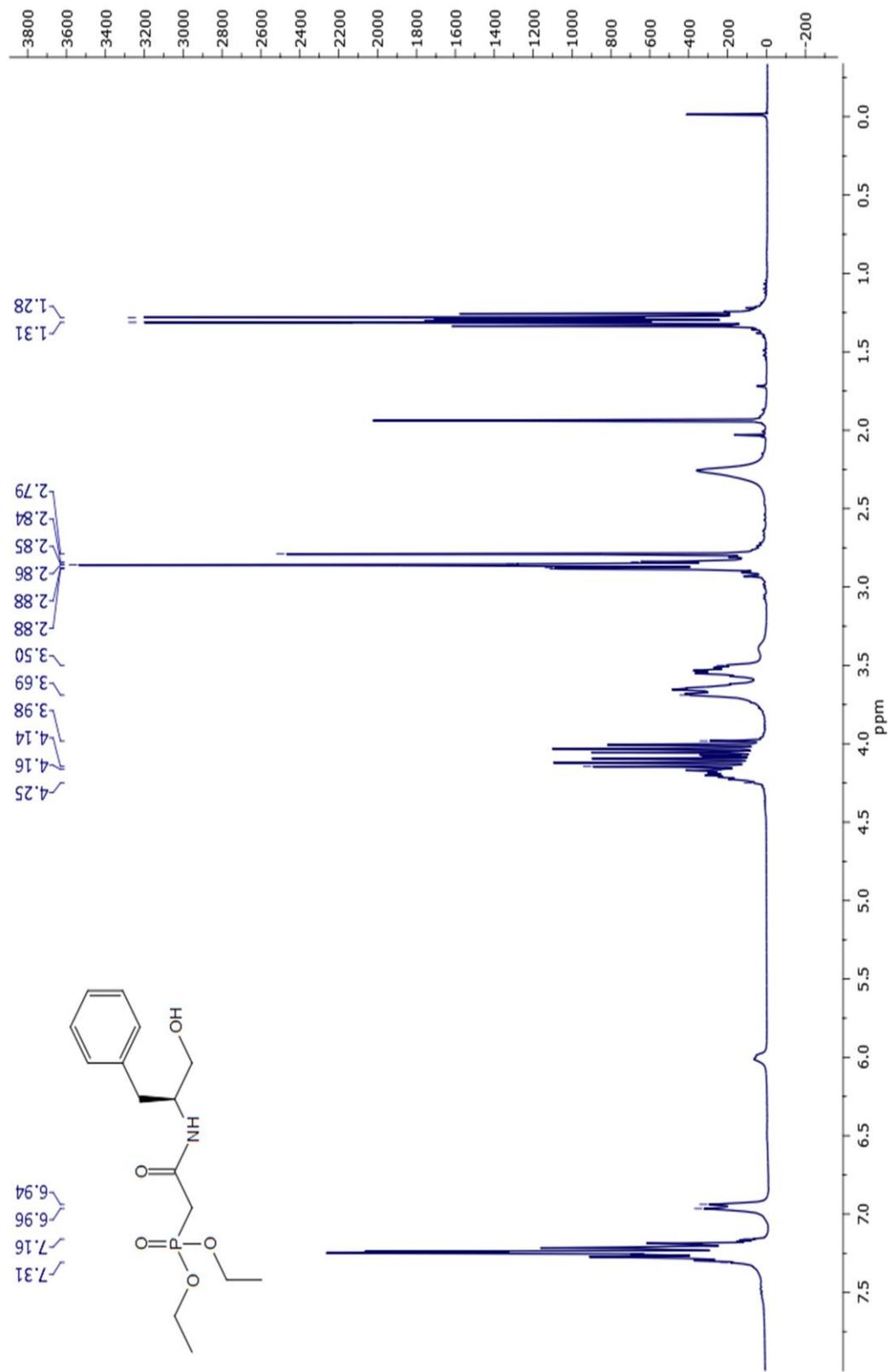


Figura 26. Espectro de NMR ^1H (300 MHz, CDCl_3) de MO10

En la siguiente ampliación del espectro (Figura 27) se puede observar con más claridad el resto de las señales que se describen posteriormente.

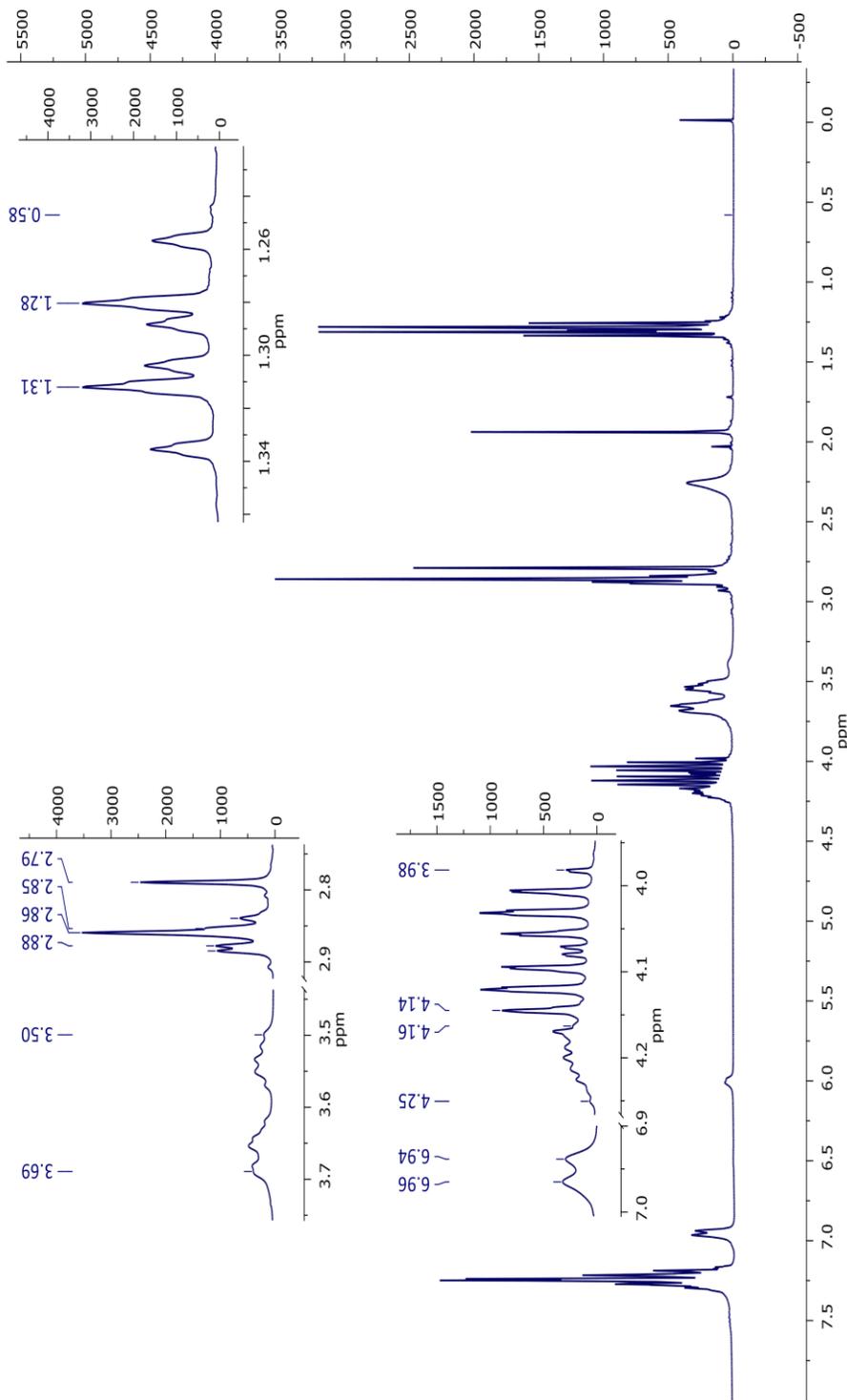
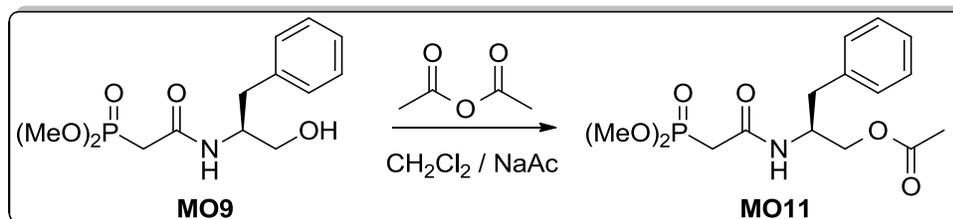


Figura 27. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO10

Se encuentra también una señal doble ($J = 21.0$ Hz) en 2.82 ppm que corresponde al metileno adyacente al fósforo y para el que está unido al grupo hidroxilo se encuentra una señal múltiple de 3.50 a 3.69 ppm.

Una señal múltiple de 3.98 a 4.14 ppm que representa los dos metilenos de los grupos etoxi, otra señal múltiple para el metileno que soporta el bencilo de 4.16 a 4.25 ppm y finalmente un doblete ($J = 8.0$ Hz) para el protón del nitrógeno en 6.95 ppm y los protones aromáticos de 7.16 a 7.31 ppm.

5.1.11 Preparación del acetato de (*S*)-2-(2-dimetoxifosforil)acetamido)-3-fenilpropilo (MO11)



Siguiendo el procedimiento general se hicieron reaccionar 0.50 g (1.66 mmol) de **MO9** con 0.14 g (1.66 mmol) de acetato de sodio y 0.34 g (0.31 mL, 3.32 mmol) de anhídrido acético.

El producto de esta reacción se obtuvo como un líquido aceitoso que fue purificado por cromatografía en columna utilizando una mezcla de disolventes: acetato de etilo, hexano y metanol en una proporción 5:4:1, sobre una fase estacionaria de sílica gel; obteniendo finalmente un sólido amorfo incoloro con un rendimiento químico del 88%.

Para la caracterización de este producto se realizó un análisis de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y en el espectro obtenido (Figura 28) se puede apreciar inicialmente a 2.04 ppm un singulete que representa el metilo del grupo acetilo, esta señal es característica de la protección del grupo hidroxilo, lo que hace que el compuesto derivado sea mucho menos polar que el hidroxiderivado. Para el metileno adyacente al fósforo se tiene una señal doble ($J = 21.7$ Hz) en 2.80 ppm, a continuación otra señal doble ($J = 6.52$ Hz) para el metileno del bencilo en 2.82 ppm, en 3.63 y 3.71 ppm un par de señales dobles (J

= 11.2 y 11.1 Hz) correspondientes a los metoxilos, en 3.97 y 4.07 ppm se encuentran dos dobles de dobles ($J = 11.3, 5.4$ Hz y $11.3, 4.3$ Hz) que corresponden uno a cada uno de los protones en el metileno adyacente al grupo acetilo.

Posteriormente una señal múltiple de 4.34 a 4.45 ppm que pertenece al metino, un doblete ($J = 8.3$ Hz) para el protón del nitrógeno y finalmente las señales del anillo aromático como una señal múltiple de 7.13 a 7.27 ppm.

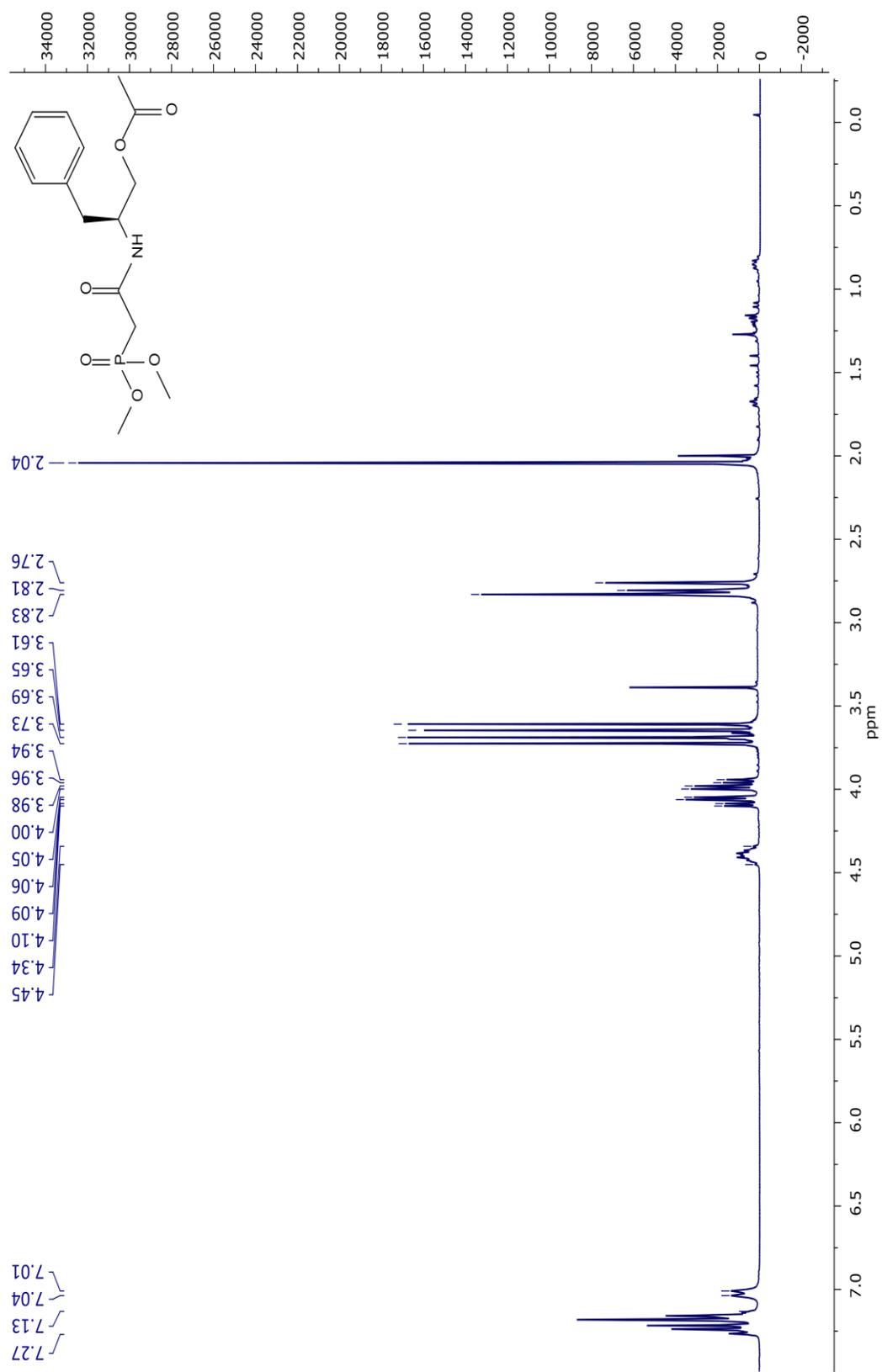


Figura 28. Espectro de NMR ^1H (300 MHz, CDCl_3) de MO11

A continuación se presenta la ampliación del espectro anterior para tener una mejor apreciación de las señales previamente descritas (Figura 29)

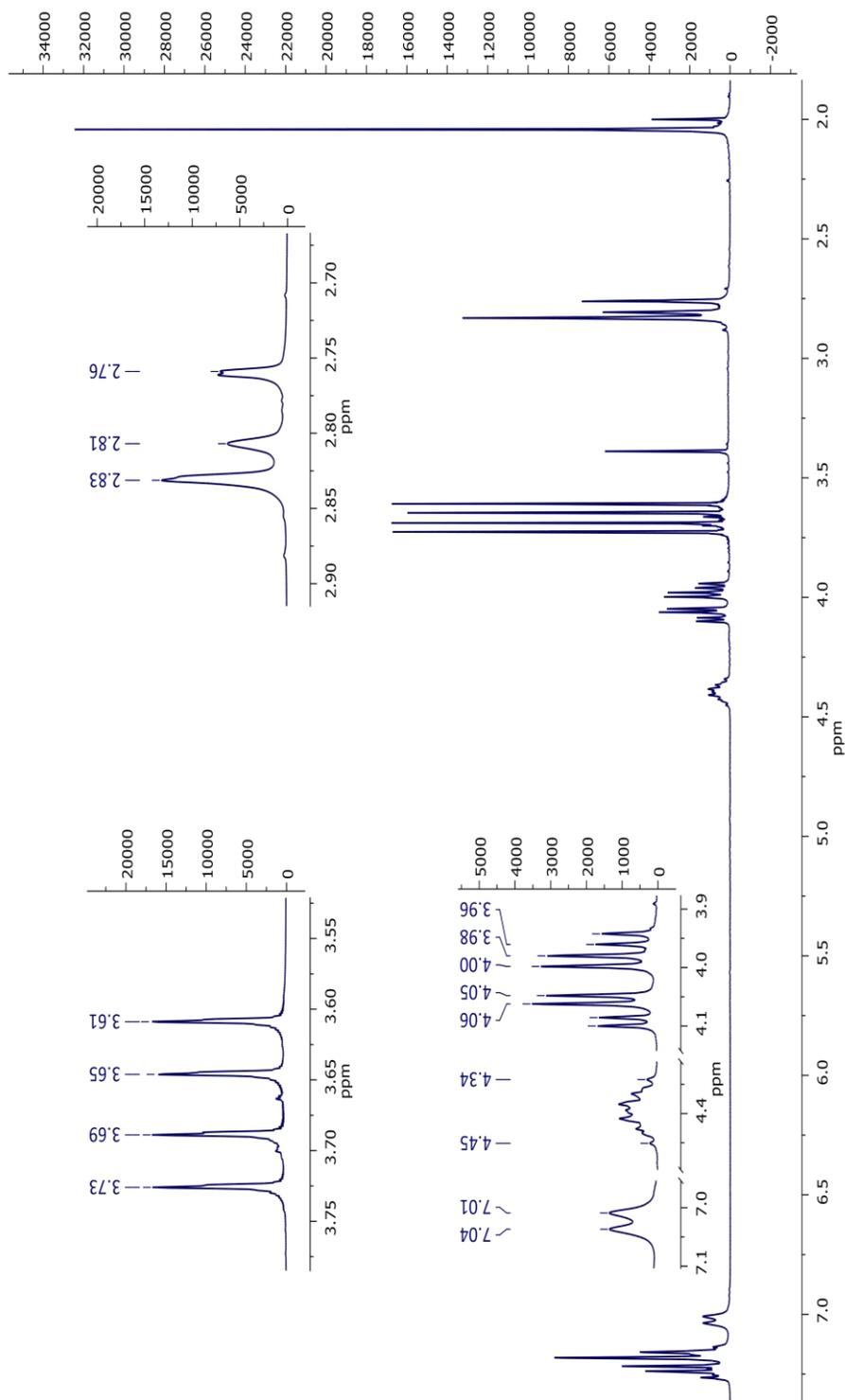
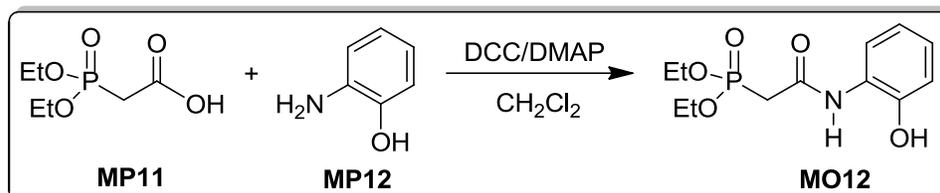


Figura 29. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO11

5.1.12 Preparación de (2-((2-hidroxifenil)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo (MO12)



Siguiendo el procedimiento general para la obtención de fosfofenilamidas se hicieron reaccionar 1.0g (9.16 mmol) de [MP12] con 1.96 g (10.08 mmol) de [MP11] en presencia de 1.89 g (9.16 mmol) de DCC y 0.22 g (1.83 mmol) de DMAP disueltos en 50 mL de CH₂Cl₂.

El producto de esta reacción se obtuvo como un líquido que fue purificado por cromatografía en columna utilizando una mezcla de disolventes: acetato de etilo, hexano y metanol en una proporción 5:4:1, sobre una fase estacionaria de gel de sílice; obteniéndose el compuesto deseado como un aceite de color café claro con un rendimiento químico del 66%

Para la Resonancia Magnética Nuclear de ¹H, se tiene inicialmente en el espectro (Figura 30) a 1.35 ppm una señal triple ($J = 7.1$ Hz) para los metilos de los grupos etoxi, en 3.10 ppm una señal doble ($J = 21.0$ Hz) perteneciente al metileno unido al fósforo (acoplamiento H-P). En 4.18 se encuentra un doble de cuartetos que están encimados ($J = 14.2$ Hz, 7.1 Hz) (acoplamiento -CH₂O-P).

A continuación se encuentran los protones aromáticos, teniendo un triple de dobles ($J = 7.6$ Hz, 1.5 Hz) para el protón *para* al OH, un doble de dobles ($J =$

8.1 Hz, 1.5 Hz) en 6.95 ppm para el protón *orto* al OH, nuevamente un triple de dobles ($J = 8.6$ Hz, 1.5 Hz) en 7.04 ppm para el protón *para* respecto al NH y para aquel *orto* al NH otro doble de dobles ($J = 7.9$ Hz, 1.3 Hz) en 7.46 ppm.

Finalmente se observa en 8.84 y 9.28 ppm un par de señales simples y anchas para el OH y el NH respectivamente.

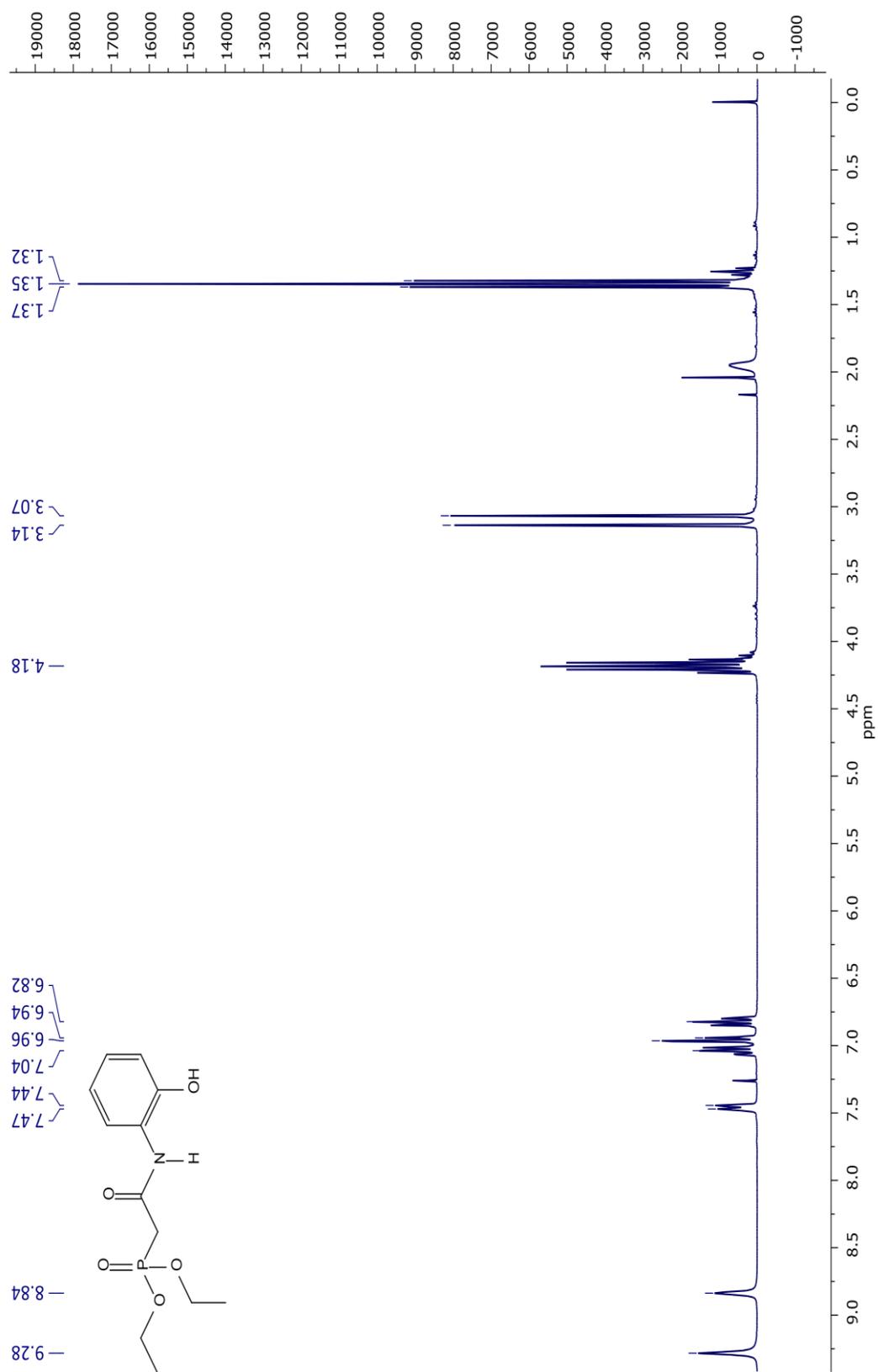


Figura 30. Espectro de NMR ^1H (300 MHz, CDCl_3) de MO12

Para una mejor apreciación de las señales anteriormente descritas, se muestra a continuación la ampliación del espectro (Figura 31).

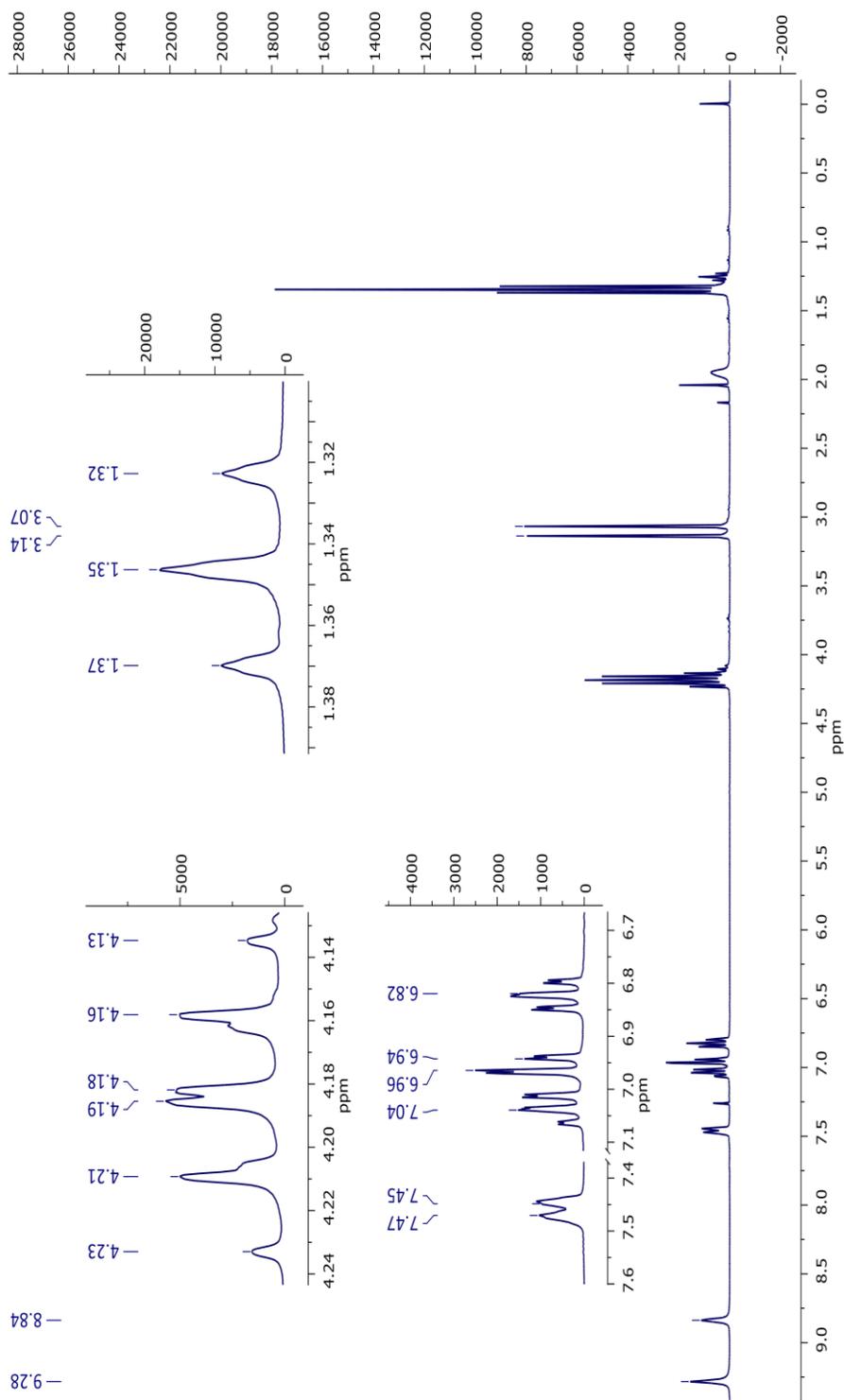
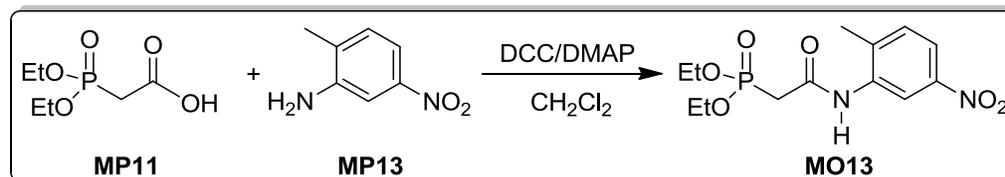


Figura 31. Ampliación del espectro de NMR ^1H de MO12

5.1.13 Preparación de (2-((2-metil-5-nitrofenil)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dietilo (M013)



Siguiendo el procedimiento general para la obtención de fosfofenilamidas se hicieron reaccionar 1.0g (6.57 mmol) de [MP13] con 1.42 g (7.23 mmol) de [MP11] en presencia de 1.36 g (6.57 mmol) de DCC y 0.16 g (1.31 mmol) de DMAP disueltos en 50 mL de CH₂Cl₂.

El producto de esta reacción se obtuvo como un sólido de color café que fue purificado por cromatografía en columna utilizando una mezcla de disolventes: acetato de etilo y hexano en una proporción 7:3, sobre una fase estacionaria de sílica gel; obteniendo finalmente un sólido amorfo de color amarillo con un rendimiento químico del 63%, el cual presenta un punto de fusión de 95-97 °C.

Una vez que se logró la obtención de los ligantes, el siguiente paso consistió en llevar a cabo la formación de complejos. Realizando búsquedas en literatura se encontró una publicación de Arjmand y colaboradores¹⁸ quienes prepararon un complejo utilizando una amida quirral y un par de reactivos organometálicos de estaño (Figura 32).

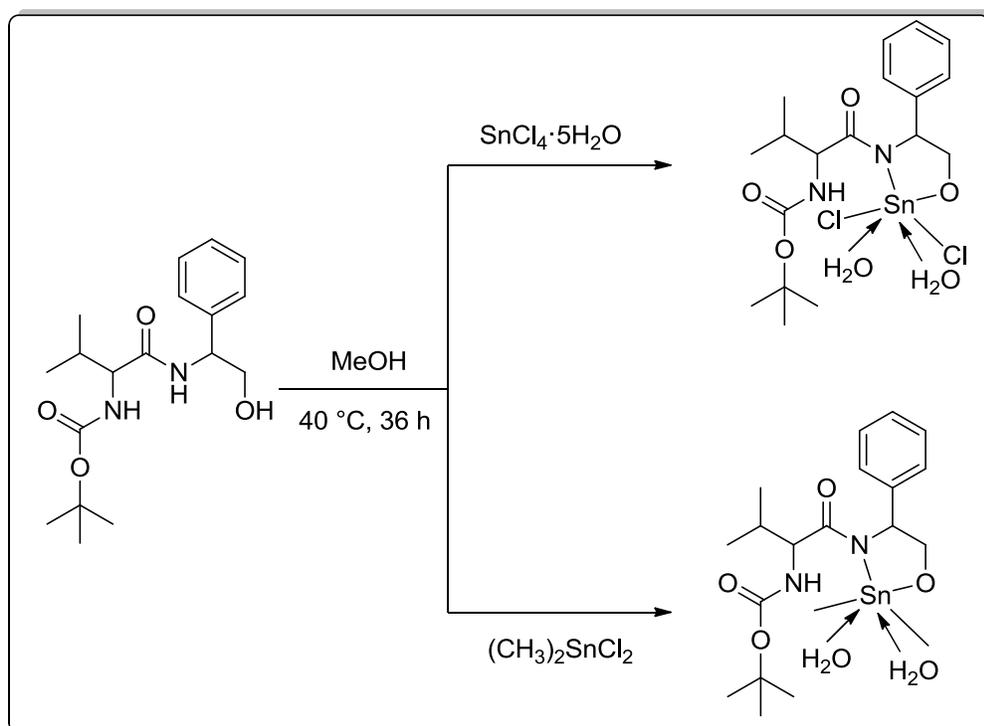


Figura 32. Complejos de estaño con una amida quiral

En un artículo adicional del 2006, Jiménez y colaboradores llevaron a cabo la preparación de complejos utilizando oxamidas como ligantes y reactivos de estaño donde se confirma la formación de complejos de Sn (IV).

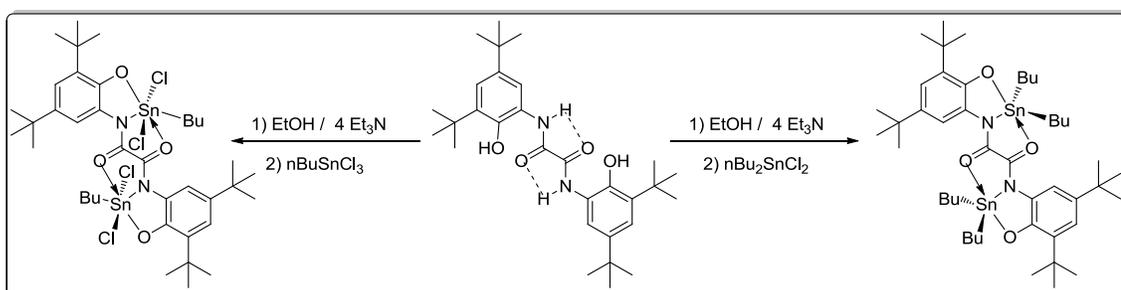
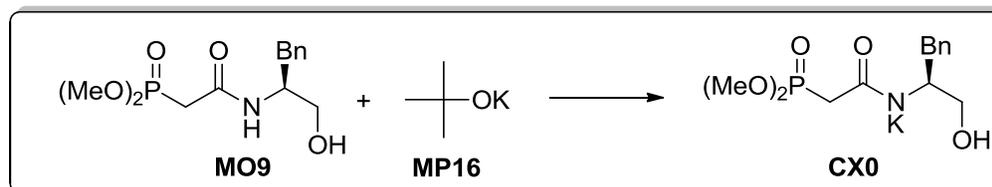


Figura 33. Complejos formados por Jiménez *et al*

En ese sentido se decidió inicialmente formar las sales de potasio utilizando tertbutóxido de potasio en dicloro metano.

5.1.14 Preparación de la sal de potasio de (S)-2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dimetilo (CX0)



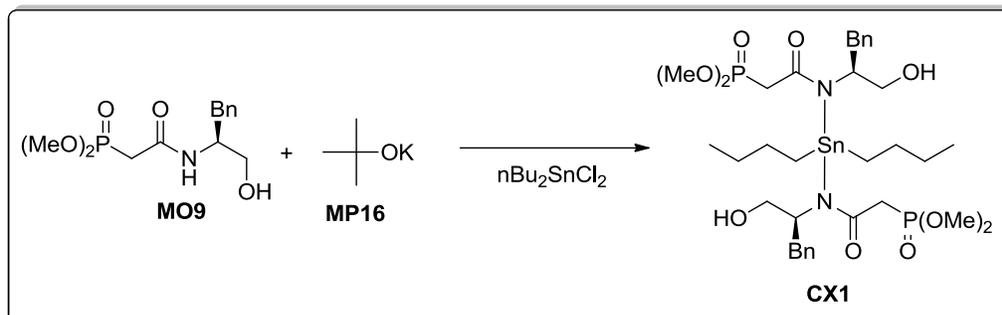
Siguiendo la primera parte del procedimiento general para los complejos de estaño, se hicieron reaccionar 0.50 g (1.66 mmol) de **MO9** con 0.186 g (1.66 mmol) de tertbutóxido de potasio [**MP16**].

La solución comenzó a tornarse en una suspensión lechosa gradualmente a partir de los 40 minutos de reacción. Finalizadas las 4 horas de reacción se colocó el matrás en la línea de vacío/nitrógeno y se dejó en reposo para que el sólido sedimentara. Luego de una hora de reposo se filtró la solución utilizando una cánula seca a la cual se le había acondicionado un tapón de papel filtro en uno de los extremos. El licor madre fue colocado en el congelador y el sólido se llevó a sequedad.

Transcurridos un par de días, el sólido se apreciaba como un líquido ligeramente viscoso. Se consideró una posible descomposición y se repitió el experimento.

Luego de realizar el segundo experimento los análisis de Espectroscopia Infrarroja y Resonancia Magnética Nuclear mostraron resultados incongruentes con lo esperado por lo que se decidió intentar la formación del complejo de manera *in situ*.

5.1.15 Preparación de dibutilestañodiilo de dimetil bis(((S)-4-benzil-4,5-dihidro oxazol-2-il)metil)fosfonito)



Siguiendo el procedimiento general para los complejos de estaño, se hicieron reaccionar 0.5 g (1.66 mmol) de **MO9** con 0.186 g (1.66 mmol) de tertbutóxido de potasio [**MP16**] y finalmente 0.252 g (0.083 mmol) de cloruro de dibutil estaño.

Una vez obtenida la suspensión lechosa a partir del tertbutóxido de potasio se agregó el organometálico e inmediatamente la suspensión se tornó a una solución cristalina ligeramente amarilla.

Luego de finalizado el tiempo de reacción y dejado en reposo el matraz, se observó la presencia de una pequeña cantidad de un precipitado salino finamente particulado. La solución fue filtrada vía cánula, el sólido fue identificado como un cloruro mediante nitrato de plata y a la solución se le redujo el volumen y se dejó en refrigeración durante 24 horas.

No se observó precipitación ni cristalización, por lo que el licor se llevó a sequedad. El sólido obtenido fue lavado redisolviendo en THF y precipitando con hexano en tres repeticiones.

Para los análisis de Resonancia Magnética Nuclear, en el ensayo para ^1H , se encontraron señales pertenecientes a los butilos unidos al átomo de estaño, pero las señales restantes eran incongruentes con lo esperado. En ^{31}P se encontraron diversas señales y entre ellas una correspondiente al ligante **MO9** libre. Finalmente se obtuvieron análisis de Espectrometría de Masas de Alta Resolución, pero no mostraron la distribución isotópica del estaño.

Con base en lo anterior, se decidió repetir el experimento, obteniendo resultados similares en todos los análisis y se decidió realizar uno extra: Resonancia Magnética Nuclear de ^{119}Sn , pero el ensayo originó resultados nulos.

Se optó entonces por analizar el licor resultante de los lavados del sólido, obteniendo el siguiente espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (Figura 34)

Como se puede apreciar, el espectro posee algunas características sustanciales distintas de las que se encuentran en el espectro de **MO9**.

Habiendo analizado las posibilidades y observado con detenimiento el espectro se consideró que el ligante **MO9** haya sufrido un cambio durante la reacción y se propuso que la estructura del complejo **CX1** sea la siguiente (Figura 35):

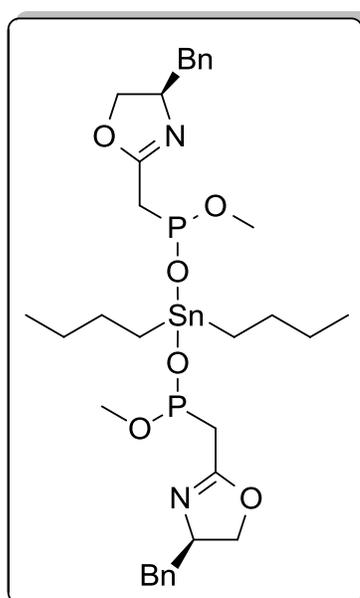


Figura 35. Nueva estructura propuesta para CX1

Para considerar la posible reorganización de la molécula como se describe se tienen como base antecedentes¹⁹ en los que reactivos de Sn (IV), entre ellos $n\text{Bu}_2\text{SnCl}_2$, son utilizados para realizar ciclaciones para la formación de oxazolinas como la que se propone.

Por ejemplo, Desimoni y colaboradores²⁰ llevaron a cabo la ciclación de dimetilmalonil bisdiamidas utilizando cloruro de dibutil estaño en xileno a temperatura de reflujo tal como se muestra en el siguiente esquema (Figura 36).

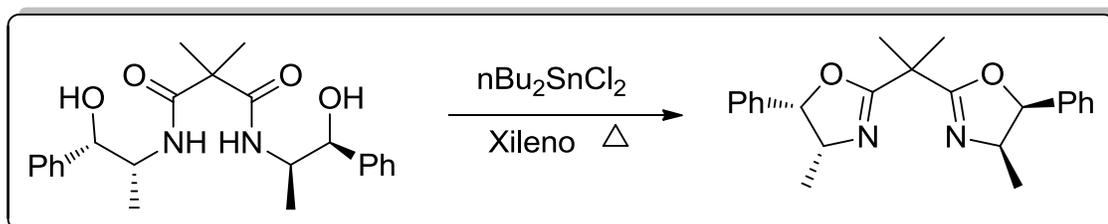


Figura 36. Formación de oxazolinas mediante reactivos de estaño

De la misma manera, por parte del cambio de fósforo pentavalente a uno trivalente se propone que siga un mecanismo como el que se propone a continuación (Figura 37):

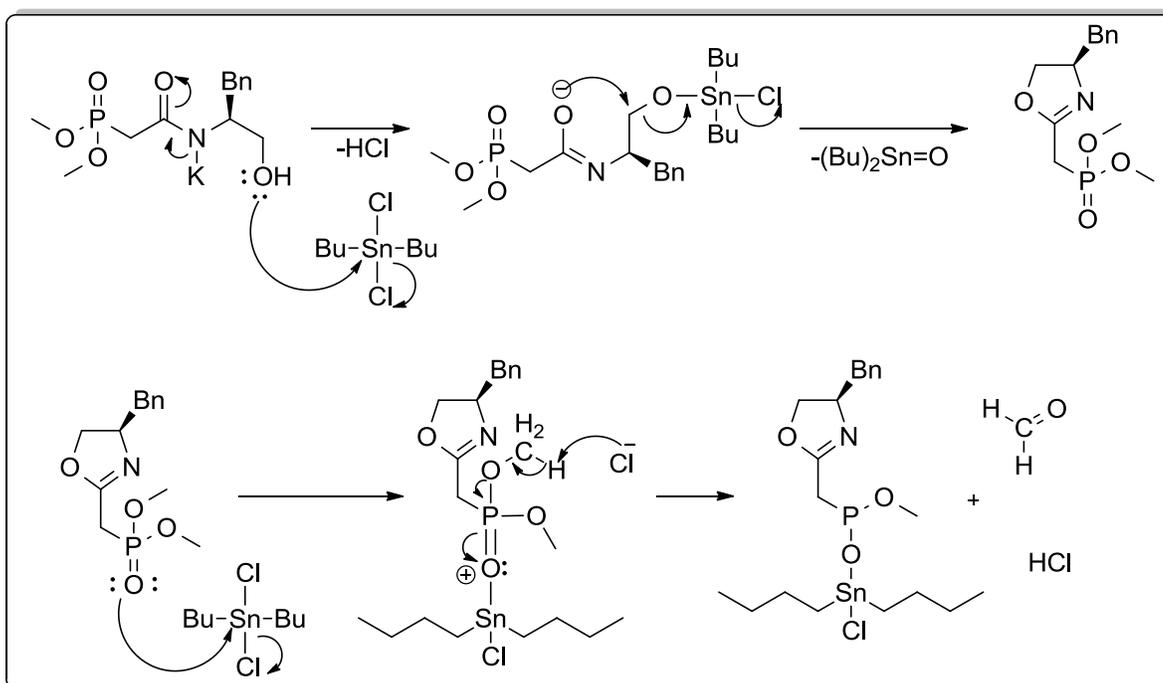


Figura 37. Mecanismo propuesto para la generación de CX1

Un apoyo más para reforzar la estructura propuesta es la evidencia que lanzó un ensayo de Espectrometría de Masas, donde se encuentra un pico para el fragmento propuesto (Figura 38) que corresponde a una relación masa/carga (M/Z) de 252 (Figura 39):

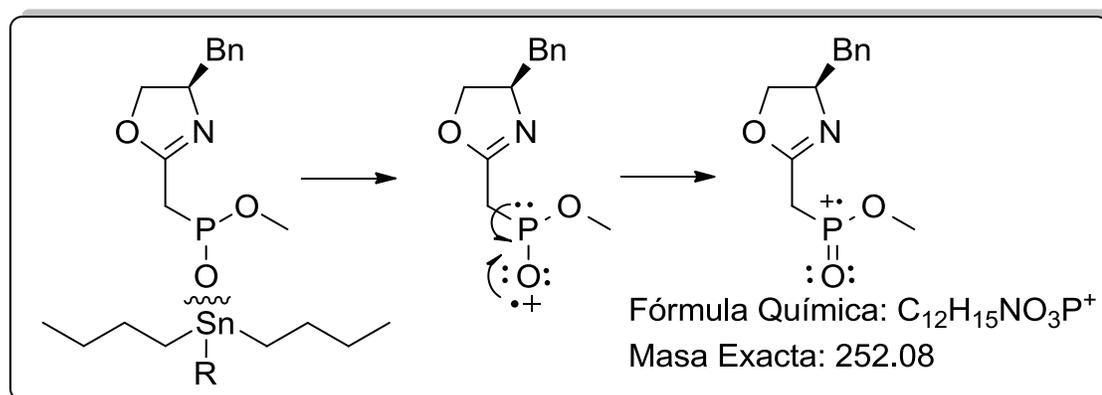


Figura 38. Fragmentación propuesta para CX1

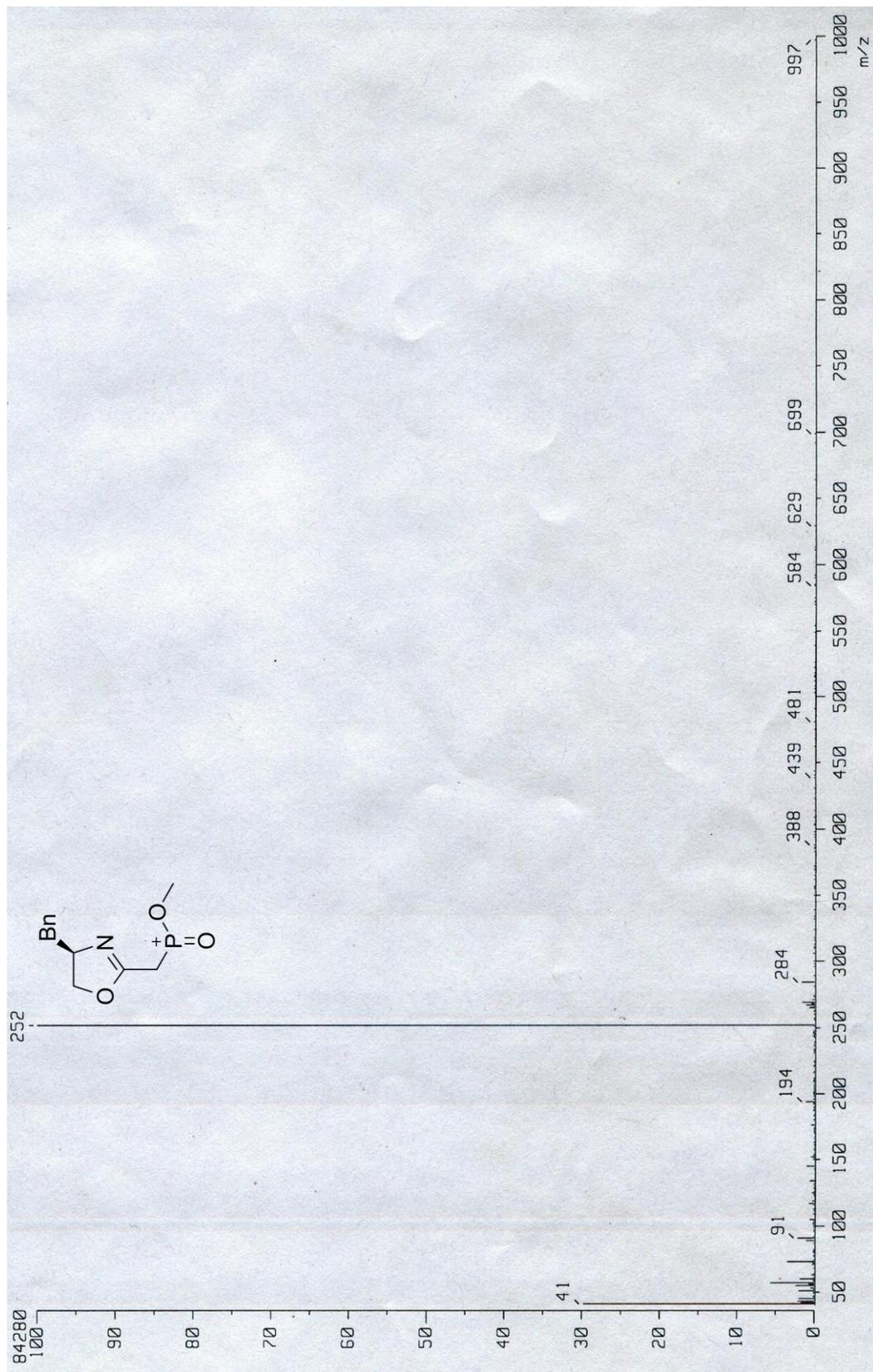


Figura 39. Espectro de MS (Cl⁺) de CX1

Por último, considerando la nueva estructura propuesta, se puede describir el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H para **CX1** como sigue:

Inicialmente se encuentran tres señales anchas en 0.94, 1.40 y 1.68 ppm que corresponden a los protones de los butilos unidos al centro metálico. Posteriormente se observan las señales del ligante y destaca inicialmente en 2.65 ppm un doble de dobles ($J = 13.7, 5.3$ Hz) para uno de los protones del metileno del bencilo, en 2.92 ppm un doble ($J = 21.6$ Hz) que representa al metileno adyacente al fósforo (acoplamiento característico $\text{CH}_2\text{-P}$), en 3.08 ppm otro doble de dobles ($J = 14.0, 8.4$ Hz) para el protón restante del metileno del bencilo, en 3.79 ppm un doble ($J = 11.0$ Hz) para los protones del metoxilo (acoplamiento característico $\text{CH}_3\text{O-P}$, acoplamiento más pequeño vs. $\text{CH}_2\text{-P}$).

Dos señales múltiples en 3.99 y 4.22 ppm que representan a cada uno de los protones del metileno del anillo, en 4.38 ppm una señal múltiple perteneciente al metino y finalmente de 7.16 a 7.27 ppm las señales de protones aromáticos.

En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{31}P (Figura 40) se encuentra la presencia de diversas señales minoritarias, no obstante se observa una señal abundante en 24.85 ppm, la cual es diferente a la de la materia prima que tiene un valor de 26.59 ppm

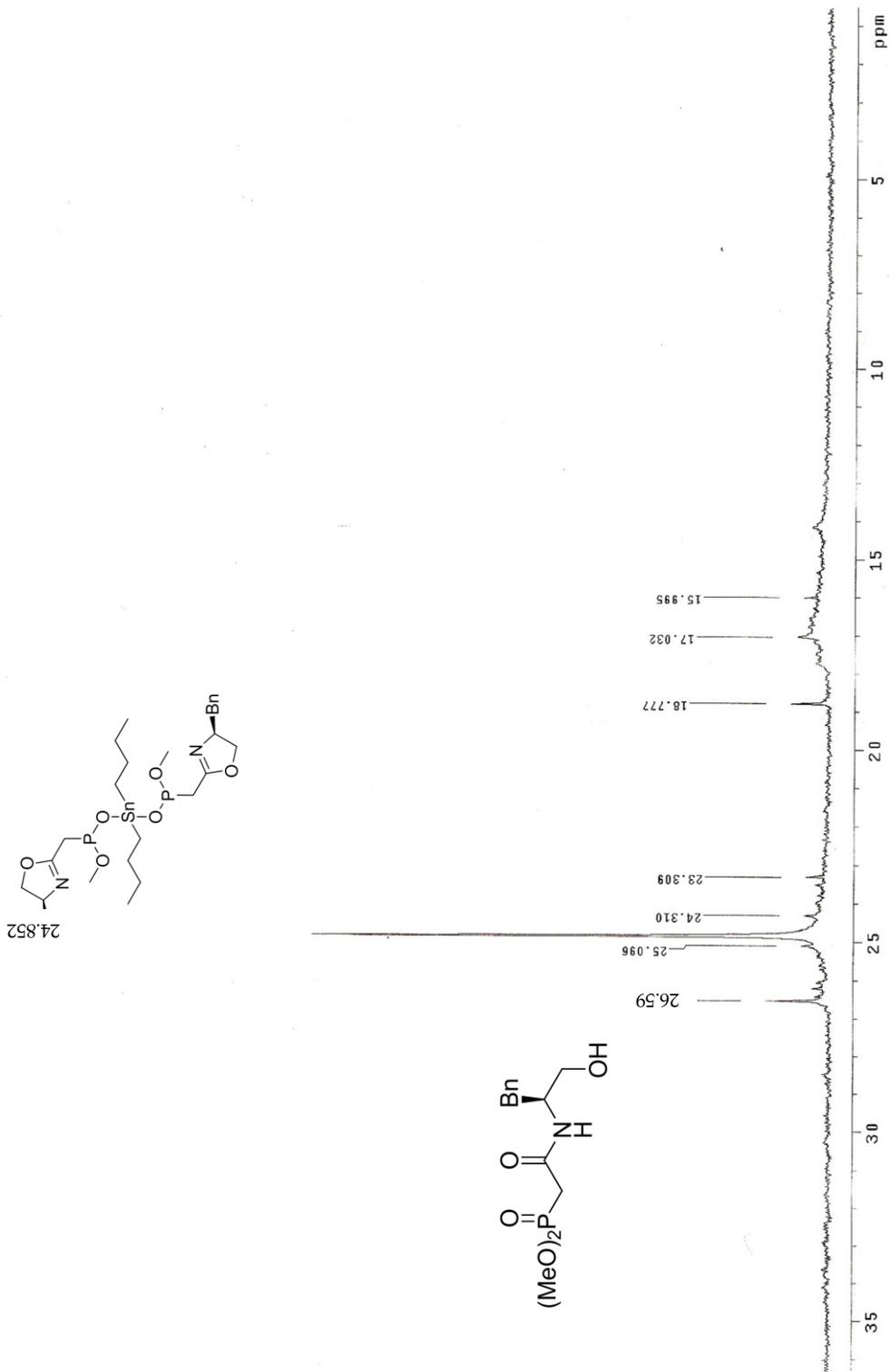


Figura 40. Espectro de NMR ^{31}P (81 MHz, CDCl_3) de CX1

Por último, para el ensayo de Resonancia Magnética Nuclear de ^{119}Sn , se tiene el espectro a tiempo cero de la reacción (Figura 41), y el obtenido al finalizar el tratamiento de la reacción (Figura 42), los cuales se compararon con el espectro resultante del cloruro de dibutil estaño (IV) (Figura 43).

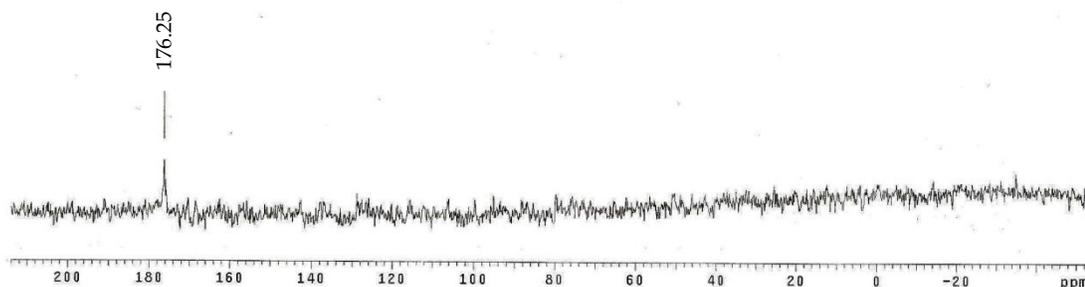


Figura 41. Espectro de NMR ^{119}Sn (74.56 MHz, CDCl_3) de CX1 [t = 0]

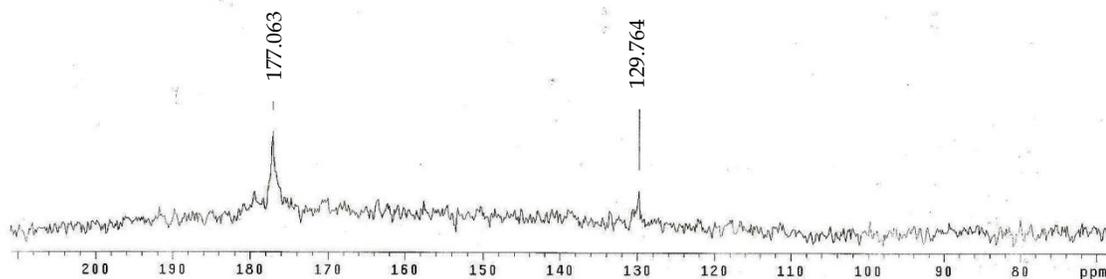


Figura 42. Espectro de NMR ^{119}Sn (74.56 MHz, CDCl_3) de CX1 [t = 16h]

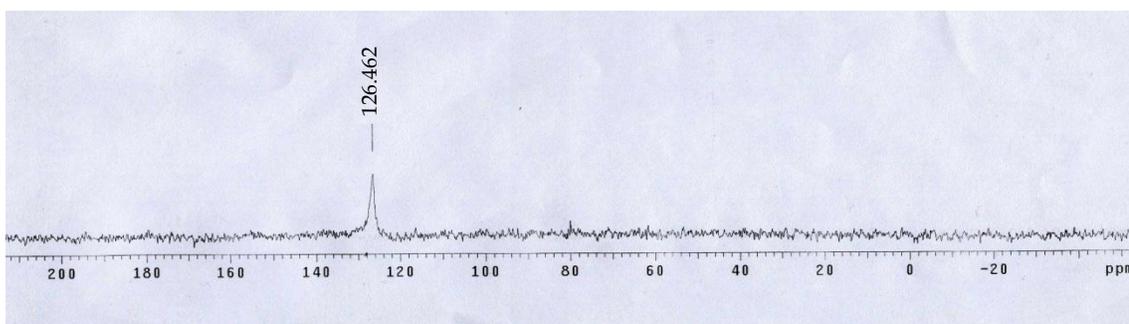


Figura 43. Espectro de NMR ^{119}Sn (74.56 MHz, CDCl_3) de $\text{nBu}_2\text{SnCl}_2$

Se puede apreciar en el espectro de t = 0 una única señal a 176.25 ppm, para el espectro de t = 16 h se tienen dos picos, uno a 177.063 ppm y otro a

129.764 ppm, finalmente en el espectro para el organometálico puro se tiene un solo pico a 126.462 ppm.

Esto permite notar la rápida conversión de la materia prima organometálica en alguna otra especie de estaño de forma prácticamente total, no obstante la manipulación del producto y el paso del tiempo, aún en atmósfera inerte, ocurre la descomposición de la especie originalmente formada.

Con base en todo lo anteriormente descrito, y aun habiendo obtenido exitosamente el complejo de estaño, se descarta la capacidad de estos complejos para ser utilizados en pruebas biológicas debido a su carácter lábil en el ambiente.

5.2 Parte biológica

Debido a la naturaleza inestable de los complejos de estaño en condiciones aeróbicas y a la necesidad de realizar el bioensayo de letalidad bajo esta condición, se decidió probar únicamente los ligantes libres que se sintetizaron para el complejamiento con estaño.

A continuación se presenta el resumen de los datos obtenidos (Tabla 7) luego de realizar los ensayos de toxicidad con *A. salina*.

	DL₅₀ (µg/mL)
Dicromato	20 ± 3
MO9	>300
MO10	>300
MO11	>300
MO12	>100 <300
MO13	>100 <300

Tabla 7. Toxicidad de ligantes sintéticos sobre *A. salina*

El ensayo se realizó por duplicado con tres repeticiones internas para cada concentración utilizada.

Podemos observar claramente la división de dos grupos entre los compuestos, siendo **MO9**, **MO10** y **MO11** los compuestos de baja actividad tóxica y **MO12** y **MO13** aquellos de una mayor actividad.

Aun cuando la DL₅₀ de **MO12** y **MO13** está entre 100 y 300 µg/mL, se concluye que son los mejores y candidatos de entre el grupo probado para realizar futuros estudios.

La conclusión anterior se fundamenta en que Nieva Moreno²¹ determinó valores de DL_{50} cercanos a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mediante el ensayo de toxicidad sobre *A. salina* los efectos tóxicos, tumorales, antitumorales y genotóxicos de extractos de propóleo.

En adición, existen publicaciones como la de Gray y colaboradores²² donde realizaron ensayos de cromonas sobre *A. salina* y se reportaron valores de DL_{50} superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, llegando a alcanzar hasta 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Con base en lo anterior, una perspectiva para un próximo trabajo es determinar la DL_{50} de los compuestos ensayados utilizando rangos de concentración más estrechos y posteriormente probarlos en ensayos con cultivos de líneas celulares de origen tumoral y normal para determinar su selectividad.

Considerando el papel que juega la estructura de los compuestos en su actividad, se puede resaltar que aunque en todos los compuestos probados existe un anillo aromático de seis carbonos, en los dos compuestos más activos (**MO12** y **MO13**) este anillo está incorporado en la estructura principal de la molécula y no como un radical adyacente, caso de **MO9**, **MO10** y **MO11**.

Es por esto que otra perspectiva sería llevar a cabo modificaciones estructurales de los compuestos tales como la incorporación de grupos sobre el anillo aromático para aumentar o disminuir la polaridad y también modificar su hidrofiliidad. Determinar su actividad biológica para determinar el impacto de dichas modificaciones y de esta manera realizar un análisis profundo de su relación estructura actividad.

CAPÍTULO 6

6 CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron exitosamente dos clorhidratos de éster metílico, dos bromoamidas de éster metílico, tres fosfonoamidas de éster metílico, tres fosfohidroxiamidas, un acetato de fosfohidroxiamida, dos fosfofenilamidas, una sal de potasio de fosfohidroxiamida y un complejo de estaño derivado de una fosfohidroxiamida.
2. Las rutas sintéticas empleadas para la preparación de los ligantes presentan buenos rendimientos químicos.
3. Aun cuando se pueden sintetizar exitosamente los complejos de estaño, las pruebas biológicas y su posible aplicación terapéutica está limitada por la alta inestabilidad de los compuestos.
4. El ensayo en *A. salina* permitió realizar un tamizaje adecuado descartando diversos compuestos y focalizando la atención en los que tuvieron mejor capacidad tóxica.

5. **MO12** y **MO13** muestran datos prometedores, por lo cual se proponen como candidatos para estudiar su actividad sobre cultivos de células de origen neoplásico y sobre células normales.

REFERENCIAS

- (1) Organización Mundial de la Salud (OMS) Centro De Prensa: Cáncer.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
Accesado: 02/VIII/12 1400.
- (2) Organización Mundial de la Salud (OMS) Temas De Salud: Cáncer.
<http://www.who.int/topics/cancer/es/> Accesado: 02/VIII/12 1400.
- (3) Organización Mundial de la Salud (OMS) ¿Aumenta O Disminuye El Número De Casos De Cáncer En El Mundo?
<http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html> Accesado: 02/VIII/12 1400.
- (4) Gerasimchuk, N.; Maher, T.; Durham, P.; Domasevitch, K. V.; Wilking, J., *et al.* Tin(IV) Cyanoximates: Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7268-7284.
- (5) Gómez-Ruiz, S.; Prashar, S.; Walther, T.; Fajardo, M.; Steinborn, D., *et al.* Cyclopentadienyltin (IV) Derivatives: Synthesis, Characterization and Study of Their Cytotoxic Activities. *Polyhedron* **2010**, *29*, 16-23.
- (6) Xie, Y.-f.; Yu, Y.; Fan, Z.-j.; Ma, L.; Mi, N., *et al.* Synthesis, Structure and Biological Activity of Triorganotin 1h-Tetrazolyl-1-Acetates : Cyclic Hexamer and Linkage Coordination Polymers. *Appl. Organometal. Chem.* **2010**, *24*, 1-7.
- (7) Gerasimchuk, N.; Maher, T.; Durham, P.; Domasevitch, K. V.; Wilking, J., *et al.* Tin(IV) Cyanoximates: Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity. Supporting Information. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7268-7284.
- (8) Palacios, F.; Alonso, C.; Santos, J. M. d. l. Synthesis of -Aminophosphonates and -Phosphinates. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 899-931.
- (9) Siddiqi, Z. a.; Shahid, M.; Kumar, S.; Khalid, M.; Noor, S. Synthesis, Crystal Structure and in Vitro Antitumor Activity of Carboxylate Bridged Dinuclear Organotin (IV) Complexes. *J. Organomet. Chem.* **2009**, *694*, 3768-3774.

- (10) Wiecek, J.; Dokorou, V.; Ciunik, Z.; Kovala-Demertzi, D. Organotin Complexes of Pyruvic Acid Thiosemicarbazone: Synthesis, Crystal Structures and Antiproliferative Activity of Neutral and Cationic Diorganotin Complexes. *Polyhedron* **2009**, *28*, 3298-3304.
- (11) Badisa, R. B.; Darling-reed, S. F.; Joseph, P.; John, S.; Latinwo, L. M., *et al.* Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma Mcf-7 Cells. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 2993-2996.
- (12) Badisa, R. B.; Badisa, V. L. D.; Walker, E. H.; Latinwo, L. M. Potent Cytotoxic Activity of *Saururus Cernuus* Extract on Human Colon and Breast Carcinoma Cultures under Normoxic Conditions. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 189-193.
- (13) Anderson, J. E.; Goetz, C. M.; McLaughlin, J. L.; Suffness, M. A Blind Comparison of Simple Bench-Top Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. *Phytochemical Analysis* **1991**, *2*, 107-111.
- (14) Altomare, C.; Pengue, R.; Favilla, M.; Evidente, A.; Visconti, A. Structure – Activity Relationships of Derivatives of Fusapyrone , an Antifungal Metabolite of *Fusarium Semitectum*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2997-3001.
- (15) Logrieco, A.; Moretti, A.; Fornelli, F.; Fogliano, V.; Ritieni, A., *et al.* Fusaproliferin Production by *Fusarium Subglutinans* and Its Toxicity to *Artemia Salina*, Sf-9 Insect Cells, and Iarc/Lcl 171 Human B Lymphocytes. *App. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3378-3384.
- (16) McLaughlin, J. L. Crown Gall Tumours on Potato Discs and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation. En *Methods in Plant Biochemistry*; Hostettmann, K., Ed.; Academic Press: New York, 1991; Vol. 6, 1, p 1-32.
- (17) Singh, K. Brine Shrimp (*Artemia Salina*). A Marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays. *J. Chinese Clinical Med.* **2007**, *2*, 236-240.

- (18) Arjmand, F.; Jamsheera, A. Synthesis, Characterization and in Vitro DNA Binding Studies of Tin (IV) Complexes of Tert-Butyl 1-(2-Hydroxy-1-Phenylethylamino)-3-Methyl-1-Oxobutan-2-yl Carbamate. *J. Organomet. Chem.* **2011**, *696*, 3572-3579.
- (19) Wuts, P. G. M.; Northuis, J. M.; Kwan, T. A.; Dead, P. The Synthesis of Oxazolines Using the Vilsmeier Reagent. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 9223-9225.
- (20) Desimoni, G.; Faita, G.; Mella, M. A Stereodivergent Synthesis of Chiral 4,5-Disubstituted Bis(Oxazolines). *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13649-13654.
- (21) Nieva Moreno, M. I.; Zampini, I. C.; Ordóñez, R. M.; Jaime, G. S.; Vattuone, M. a., *et al.* Evaluation of the Cytotoxicity, Genotoxicity, Mutagenicity, and Antimutagenicity of Propolis from Tucuman, Argentina. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8957-8962.
- (22) Gray, C. A.; Kaye, P. T.; Nchinda, A. T. Chromone Studies . Part 13. Synthesis and Electron-Impact Mass Spectrometric Studies of 5-Hydroxy-2-Isopropyl-7-Methoxychromone, a Constituent of the Medicinal Plant *Baekea Frutescens*, and Side-Chain Analogues. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1144-1146.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Eder Misael Saldaña Corral

Candidato para el grado de
Maestro en Ciencias con orientación en Farmacia

Tesis: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE Sn (IV)
DERIVADOS DE α -AMIDOFOSFONATOS: EVALUACIÓN DE SU EFECTO
TÓXICO SOBRE *Artemia salina*.

Campo de estudio: Área de la Salud

Biografía

Datos personales: Nacido en Durango, Durango, México el 13 de
noviembre de 1987, hijo de Plinio Saldaña Campos y María Corral Corral.

Educación

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León de la Licenciatura
en Química Industrial de la Facultad de Ciencias Químicas en el año 2009.