

Síntesis y caracterización de α -amidofosfonatos: evaluación de su efecto tóxico sobre *Artemia Salina*

Eder Misael Saldaña-Corral¹, Aided Vázquez Vazquez¹, Oscar García-Barradas², Pilar Carranza-Rosales³, Susana López-Cortina¹, Blanca Muñoz-Flores¹, Víctor Jiménez-Pérez y Eugenio Hernández-Fernández^{1*}

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Ave. Universidad S/N Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza N.L., 66451 México.

²Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana, Av. Dr. Luis Castelazo Ayala S/N., 91190 Xalapa, Veracruz., México.

³Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social. Calle 2 de Abril y San Luis Potosí, Col. Independencia. Monterrey, N.L., C.P.64720.

*E-mail: eugenio.hernandezfr@uanl.edu.mx

Recibido 31 de Mayo de 2012, Aceptado 20 de Junio de 2012

Resumen

En este trabajo se describe la síntesis de nuevos α -amidofosfonatos, los cuales fueron preparados a partir de la (S)-fenilalanina, la 2-metil-5-nitroanilina y el 2-aminofenol. Las rutas sintéticas empleadas para la preparación de los compuestos presentan buenos rendimientos químicos. Las moléculas obtenidas fueron caracterizadas por RMN ¹H y EM, fueron utilizadas para sintetizar un complejo de Sn(IV) y evaluar su efecto tóxico sobre *Artemia Salina*. Aún cuando se puede sintetizar exitosamente el complejo de estaño, las pruebas biológicas y su posible aplicación terapéutica está limitada por la alta inestabilidad a temperatura ambiente. El ensayo en *A. salina* permitió realizar un tamizaje adecuado descartando diversos compuestos y focalizando la atención en los que tuvieron mejor capacidad tóxica. Los amidofosfonatos **12** y **13** 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.

Palabras clave: α -amidofosfonatos, *Artemia salina*, síntesis asimétrica.

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 ADN [4].



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 [5-9].

2. Parte experimental

2.1 Información general

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 (N_2) 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 ^{31}P y 50MHz para ^{13}C , Varian MERCURY 300 a 300MHz para 1H , 121MHz para ^{31}P y 75MHz para ^{13}C , Varian INOVA 400 a 400MHz para 1H y 100MHz para ^{13}C . 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 mm). Los análisis de masas de alta resolución (EMAR) se llevaron a cabo en un equipo JEOL MStation JMS-700.

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.

2.2 Síntesis del clorhidrato del (S)-2-amino-3-fenilpropanoato de metilo (2).

En un matraz redondo de 500mL provisto de un agitador magnético se agregaron 5.00 g (30.27 mmol) de (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 3.96 g (2.43 mL, 33.29 mmol) de cloruro de tionilo ($SOCl_2$) 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, obteniéndose con un 94% de rendimiento químico. P. f. = 140 °C.

2.3 Síntesis del (S)-2-(2-bromoacetamido)-3-fenilpropanoato de metilo (4).

En un matraz redondo de 500 mL provisto de un agitador magnético se agregaron 5.00 g (23.18 mmol) del clorhidrato de éster metílico **2** y se adicionaron 150 mL de una mezcla 4:1 de diclorometano:agua. A la solución resultante se le adicionaron 8.01 g (57.96 mmol) de carbonato de potasio y posteriormente se agregaron 5.15 g (2.22 mL, 25.50 mmol) de bromuro de bromoacetilo **3** 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, se evaporó hasta sequedad y se purificó por cromatografía en columna, obteniéndose un rendimiento químico del 89%. P. f. = 82 °C. RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$): δ 3.12 (dd, J = 13.9 Hz, 6.0 Hz,

1H, CH_2Ph), 3.18 ($J = 13.9$ Hz, 5.7 Hz, 1H, CH_2Ph), 3.74 (s, 3H, CH_3O), 3.82 y 3.86 (AB, $J = 13.6$ Hz, 2H, CH_2Br), 4.85 (dt, $J = 7.9$ Hz, 5.8 Hz, 1H, CHBn), 6.86 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, NH), 7.24-7.33 (m, 5H, H_{arom}).

2.4 Síntesis del (S)-2-(2-(dimetoxifosforil)acetamido)-2-fenilacetato de metilo (5).

En un matraz redondo de 50 mL provisto de un agitador magnético, con un condensador acoplado, se agregaron 2.50 g (8.33 mmol) de la bromoamida del éster metílico **4** y se le adicionaron 3.10 g (2.95 mL, 24.99 mmol) de trimetilfosfita 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 [(MeO)₃P y (MeO)₂P(O)Me]. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando un sistema de disolventes 5:4:1 (AcOEt:Hex:MeOH), obteniéndose un líquido viscoso (97%). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2.84 (dd, $J_{\text{HP}} = 19.9$ Hz, $J_{\text{gem}} = 15.12$ Hz, 1H, CH_2P), 2.90 (dd, $J_{\text{HP}} = 19.9$ Hz, $J_{\text{gem}} = 15.12$ Hz, 1H, CH_2P), 3.06 (dd, $J = 14.0$ Hz, 7.1 Hz, 1H, CH_2Ph), 3.18 (dd, $J = 14.0$ Hz, 5.5 Hz, 1H, CH_2Ph), 3.69 (d, $J = 11.2$ Hz, 3H, CH_3OP), 3.76 (d, $J = 11.2$ Hz, 3H, CH_3OP), 3.71 (s, 3H, CH_3O), 4.84 (dt, $J = 7.3$ Hz, 5.5 Hz, 1H, CHBn), 7.13 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 7.16-7.32 (m, 5H, H_{arom}).

2.5 Síntesis del (S)-2-(2-(dietoxifosforil)acetamido)-2-fenilacetato de metilo (6).

En un matraz redondo de 50 mL provisto de un agitador magnético, con un condensador acoplado, se agregaron 2.50 g (8.33 mmol) de la bromoamida del éster metílico **4** y se le adicionaron 4.15 g (4.28 mL, 24.99 mmol) de trietilfosfita 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 150 °C durante 5 horas para eliminar los compuestos volátiles [(EtO)₃P y (EtO)₂P(O)Et]. El residuo resultante fue utilizado sin purificación adicional, obteniéndose un líquido viscoso amarillo (95%).

2.6 Síntesis del (S)-2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil fosfonato de dimetilo (7) [10].

En un matraz redondo de 250 mL provisto de un agitador magnético, con un sistema de reflujo acoplado, se agregaron 4.00 g (12.15 mmol) de la fosfonoamida de éster metílico **6** con 1.84 g (48.59 mmol) de borohidruro de sodio (NaBH₄); 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 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, obteniéndose un líquido viscoso (90%). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2.88 (d, $J_{\text{HP}} = 19.9$ Hz, 2H, CH_2P), 2.89 (dd, $J = 7.4$ Hz, $J = 2.2$ Hz, 2H, CH_2Ph), 3.54 (dd, $J = 11.3$ Hz, 4.8 Hz, 2H, CH_2OH), 3.69 (d, $J = 11.2$ Hz, 3H, CH_3OP), 3.77 (d, $J = 11.2$ Hz, 3H, CH_3OP), 4.21 (m, 1H, CHBn), 7.1 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH), 7.18-7.30 (m, 5H, H_{arom}).

2.7 Síntesis del (S)-2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil fosfonato de dietilo (8).

En un matraz redondo de 250 mL provisto de un agitador magnético, con un sistema de reflujo acoplado, se agregaron 4.00 g (11.19 mmol) de la fosfonoamida de éster metílico **6** con 1.69 g (44.78 mmol) de borohidruro de sodio (NaBH₄); 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 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, obteniéndose un líquido viscoso (84%). **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 2.82 (d, $J = 21.0$ Hz, 2H, CH_2P), 3.50-3.69 (m, 2H, CH_2OH), 3.98-4.14 (m, 4H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 4.16-4.25 (m, 1H, CHBn), 6.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH), 7.16-7.31 (m, 5H, H_{arom}). **RMN** ³¹P (121 MHz, CDCl₃): δ 22.97.

2.8 Síntesis del (2-((2-hidroxifenil)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo (12).

En un matraz redondo de 250 mL provisto de un agitador magnético y un tapón, se agregó 1.0g (9.16 mmol) de la anilina **10** con 1.96 g (10.08 mmol) del ácido dietilfosfoacético **9** y se pusieron bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente en otro matraz redondo de 250 mL se pesaron 1.89 g (9.16 mmol) de dicitclohexil carbodiimida (DCC) y 0.22 g (1.83 mmol) 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 (dicitclohexilurea, 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), obteniéndose el compuesto deseado como un aceite de color café claro (66%). **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3): δ 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 3.10 (d, $J = 21.0$ Hz, 2H, CH_2P), 4.18 (dc, $J = 14.2$ Hz, 7.1 Hz, 4H, CH_2OP), 6.8 (td, $J = 7.6$ Hz, 1.5 Hz, 1H, H_{arom}), 6.95 (dd, $J = 8.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H, H_{arom}), 7.04 (td, $J = 8.6$ Hz, 1.5 Hz, 1H, H_{arom}), 7.46 (dd, $J = 7.9$ Hz, 1.3 Hz, 1H, H_{arom}), 8.84 y 9.28 (2a, 2H, OH, NH). **RMN ^{31}P** (121 MHz, CDCl_3): δ 22.97.

2.9 Síntesis del (2-((2-metil-5-nitrofenil)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo (13).

En un matraz redondo de 250 mL provisto de un agitador magnético y un tapón, se agregó 1.0g (6.57 mmol) de **11** con 1.42 g (7.23 mmol) del ácido dietilfosfoacético **9** y se pusieron bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente en otro matraz redondo de 250 mL se pesaron 1.36 g (6.57 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y 0.16 g (1.31 mmol) 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 (dicitclohexilurea, 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), obteniéndose el compuesto deseado como un sólido amorfo de color amarillo (1.0608 g, 63%), p. f. = 95-97 °C. **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3): δ 1.38 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OP}$), 2.40 (s, 3H, CH_3Ph), 3.11 (d, $J = 20.4$ Hz, 2H, CH_2P), 4.20 (dc, $J = 14.2$ Hz, 7.1 Hz, 4H, CH_2OP), 7.27 (d, $J = 10$ Hz, 1.5 Hz, 1H, H_{arom}), 7.85 (dd, $J = 8.4$ Hz, 2.6 Hz, 1H, H_{arom}), 8.77 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H_{arom}), 9.23 (s, 1H, NH). **RMN ^{31}P** (121 MHz, CDCl_3): δ 23.91.

2.10 Síntesis del complejo de estaño (14).

Dentro de una caja seca en atmósfera de argón, se colocó 0.5 g (1.66 mmol) de **7** en un matraz de Schlenk provisto de un agitador magnético y se adicionó dicloro metano como disolvente. Posteriormente se adicionó 0.186 g (1.66 mmol) de tertbutóxido de potasio y se dejó en agitación de 2 a 4 horas. Transcurrido este tiempo se adicionó 0.252 g (0.083) de cloruro de dibutil estaño 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, obteniéndose un sólido blanco (25%) que se descompone a temperatura ambiente.

2.11 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 burbujó 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

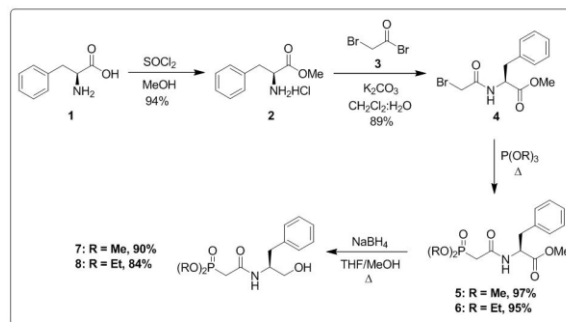
de medio salino. Luego de 24 horas más, es decir, transcurridas 48 horas desde que se pusieron en eclosión, se colocaron de 9 a 11 nauplios en cada pocillo de una microplaca de 6 pozos, en un volumen conocido de medio, menor o igual a 4 mL, pues el volumen final fue de 5 mL. Se prepararon 3 pozos para cada concentración a probar, en este caso, para los compuestos sintetizados se probaron 100, 50 y 25 $\mu\text{g/mL}$. 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 $\mu\text{g/mL}$. 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 [11-17].

3. Resultados y discussion

3.1 Síntesis del (S)-2-((1-hidroxi-3-fenilpropan-2-il)amino)-2-oxoetil fosfonato de dimetilo (7) y del (2-((2-hidroxi-fenil)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo (8).

La síntesis de **7** y **8** se llevó a cabo a partir de la (S)-fenilalanina, la cual se hace reaccionar con cloruro de tionilo (SOCl_2) en metanol, generándose el clorhidrato del éster metílico como un sólido blanco con un rendimiento químico del 94% y con un punto de fusión del 140 $^\circ\text{C}$, el cual al hacerse reaccionar con el bromuro de bromoacetilo **3** utilizando carbonato de potasio (K_2CO_3) en una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ a temperatura ambiente proporcionó la bromoamida **4** como un sólido blanco, con un rendimiento químico de 89% y con un punto de fusión del 82 $^\circ\text{C}$. Posteriormente la reacción de **4** con trialquilfosfita, primero con trimetilfosfita [(MeO) $_3$ P] mediante una reacción de Michaelis-Arbuzov a 110 $^\circ\text{C}$ sin disolvente, condujo al éster metílico de la fosfonoamida **5** como un líquido viscoso con un rendimiento químico de 97%; mientras que la reacción de **4** con trietilfosfita [(EtO) $_3$ P] proporcionó **6** como un líquido viscoso con un rendimiento químico del 95%. Finalmente, la reducción del éster metílico de **5** y **6** con borohidruro de sodio (NaBH_4) en una mezcla de THF/MeOH a reflujo condujo a los hidroxiderivados correspondientes **7** y **8** como líquidos viscosos y con rendimientos químicos del 90 y 84%, respectivamente (Esquema 1).

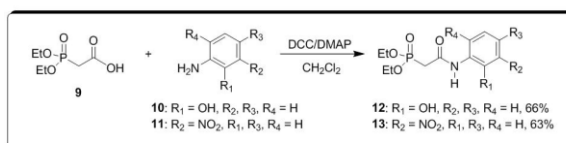
Los hidroxiderivados **7** y **8** fueron caracterizados por RMN de ^1H y se observó que la principal diferencia de **8** vs **7** es la presencia de un par de señales triples ($J = 7.1$ Hz) en 1.28 y 1.31 ppm que pertenecen a los metilos de los grupos etoxi.



Esquema 1.

3.2 Síntesis del (2-((2-hidroxi-fenil)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo (12) y del (2-((2-metil-5-nitrofenil)amino)-2-oxoetil) fosfonato de dietilo (13).

Para cumplir con este objetivo, inicialmente se llevó a cabo la preparación del ácido dietilfosfonoacético **9** al hacer reaccionar el dietilfosfonoacetato de etilo con hidróxido de potasio (KOH) en una mezcla de MeOH/ H_2O , obteniéndose el ácido carboxílico como un líquido, el cual sin purificación adicional se hizo reaccionar, primero, con el 2-aminofenol **10** en presencia de dicitlohexilcarbodiimina (DCC) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) utilizando cloruro de metileno seco, generándose el compuesto **12** como un aceite con un rendimiento químico del 66%, mientras que la reacción **9** con el 2-metil-5-nitroanilina **11** bajo las mismas condiciones proporcionó la amida **13** como un sólido amarillo con un rendimiento químico del 63% (Esquema 2).



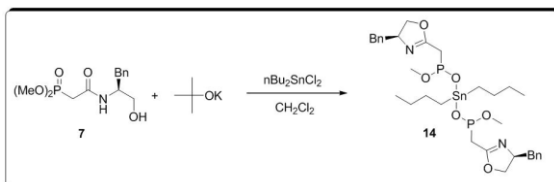
Esquema 2.

Una vez que se logró la obtención de los ligandos, el siguiente paso consistió en llevar a cabo la formación de complejos. Analizando la literatura se encontraron diversos reportes donde describe la preparación de complejos utilizando amidas quirales y reactivos organometálicos de estaño donde se confirma la formación de complejos de Sn(IV) [18-20].

3.3 Síntesis del dibutilestanoediilo de dimetil bis ((S)-4-benzil-4,5-dihidro-oxazol-2-il)-metilfosfonito (14).

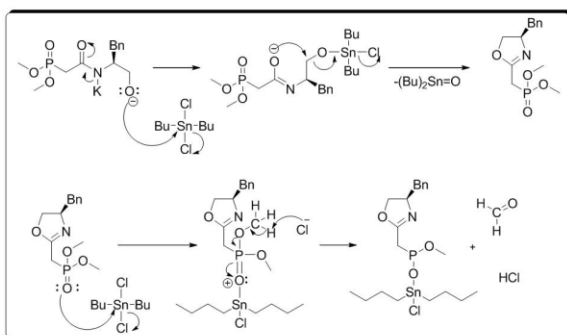
Para lograr este propósito, se hizo reaccionar la fosfohidroxiamida **7** con tertbutóxido de potasio en cloruro de metileno seco, generándose una suspensión lechosa. Posteriormente, se adicionó el cloruro de dibutil estaño ($\text{nBu}_2\text{SnCl}_2$) e inmediatamente la suspensión se tornó a una solución 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 producto obtenido fue analizado por RMN ^1H y Espectrometría de Masas con lo cual se propone que el estaño se encuentra coordinado a dos átomos de oxígeno provenientes de la fosfohidroxiamida **7**, observándose la formación de un anillo de oxazolina, además de que el átomo de fósforo sufrió un rearrreglo al pasar de fosforo pentavalente a trivalente (Esquema 3).



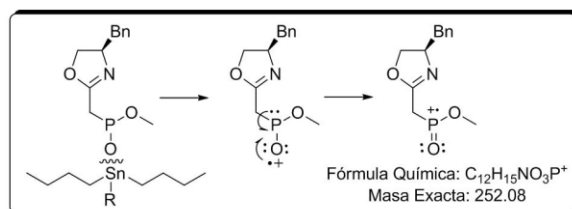
Esquema 3.

Para considerar la posible reorganización de la molécula como se describe se tienen como base antecedentes [19] 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. De la misma manera, por parte del cambio de fósforo pentavalente a uno trivalente se propone que siga un mecanismo como el que se muestra a continuación (Esquema 4):



Esquema 4.

Un apoyo más para reforzar la estructura propuesta es la evidencia que mostró la Espectrometría de Masas, donde se encuentra un pico para el fragmento propuesto (Esquema 5) que corresponde a una relación masa/carga (M/Z) de 252 (Figura 1):



Esquema 5.

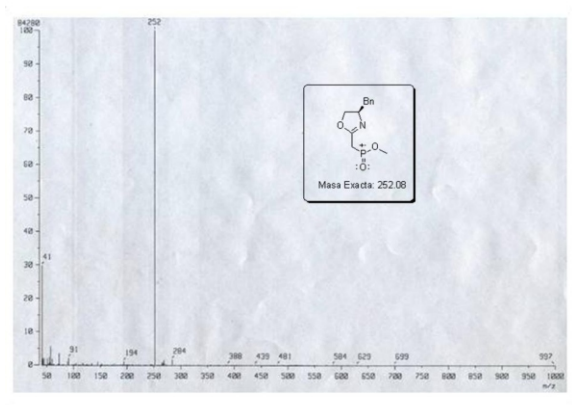


Figura 1. Espectro de MS (CI^-) de **14**.

Una vez obtenidos los compuestos de interés, el siguiente paso consistió el llevar a cabo los ensayos de toxicidad de los compuestos **7**, **8**, **12** y **13** con *A. salina*, los resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Toxicidad de ligantes sintéticos sobre *A. Salina*.

	DL ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Dicromato	20 \pm 3
7	>300
8	>300
12	>100 <300
13	>100 <300

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 **7** y **8** los compuestos de baja actividad tóxica y **12** y **13** aquellos de una mayor actividad. Aún cuando la DL₅₀ de **12** y **13** está entre 100 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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 Moreno [21] determinó valores de DL₅₀ 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 colaboradores [22] donde realizaron ensayos de cromonas sobre *A. Salina* y se reportaron valores de DL₅₀ 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 (**12** y **13**) este anillo está incorporado en la estructura principal de la molécula y no como un radical adyacente, caso de **7** y **8**. 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.

4. Conclusiones

En este trabajo se sintetizaron y caracterizaron dos fosfohidroxiamidas (**7**, **8**) y dos fosfofenilamidas (**12**, **13**) y un complejo de estaño (**14**) derivado de una fosfohidroxiamida. Aun cuando se puede obtener exitosamente, el complejo de estaño **14** 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 dos compuestos y focalizando la atención en los que mejor capacidad tóxica tuvieron (compuestos **12** y **13**), por lo cual se proponen como candidatos a estudiar su actividad sobre cultivos de células de origen neoplásico y sobre células normales.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a CONACYT (CB-2008-101898) y a PAICYT (CE411-10) por el apoyo financiero otorgado para la realización de este trabajo. Misael Saldaña Corral y Aided Vázquez Vázquez agradecen al CONACYT por la beca otorgada (237771 y 15831), también agradecemos al Dr. Ezequiel Viveros Ontiveros de la FCB-UANL por el apoyo para la realización de las pruebas de toxicidad.

6. Referencias

- Organización Mundial de la Salud (OMS) Centro De Prensa: Cáncer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.htm> 1 (Accesado: 02/08/2012).
- Organización Mundial de la Salud (OMS) Temas De Salud: Cáncer. <http://www.who.int/topics/cancer/es/> (Accesado: 02/08/2012).
- 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: 02/08/2012).

- 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.
- 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.
- 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.
- Palacios, F.; Alonso, C.; Santos, J. M. Synthesis of -Aminophosphonates and -Phosphinates. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 899-931.
- 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.
- 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.
- (a) Ordóñez, M.; Hernández-Fernández, E.; Montiel-Pérez, M.; Bautista, R.; Bustos, P.; Rojas-Cabrera, H.; Fernández-Zertuche, M.; García-Barradas, O. A convenient method for the preparation of chiral phosphonoacetamides and their Horner-Wadsworth-Emmons reaction. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2007**, *18*, 2427-2436. (b) Hernández-Fernández, E.; Fernández-Zertuche, m.; García-Barradas, O.; Muñoz-Muñoz, O.; Ordóñez, M. *Synlett*. **2006**, 440-444. Practical and Efficient Synthesis of (*E*)- α,β -Unsaturated Amides Bearing (*S*)- α -Methylbenzylamine from 2-Phosphonamides via Horner-Wadsworth-Emmons Reaction.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Logrieco, A.; Moretti, A.; Fornelli, F.; Fogliano, V.; Ritiene, 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.
- 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.
- Singh, K. Brine Shrimp (*Artemia Salina*). A Marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays. *J. Chinese Clinical Med.* **2007**, *2*, 236-240.
- 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.