

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS DE INHIBIDORES DE TRIPANOSOMAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

JESUS HERNANDEZ MORENO

MEXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: HELIO FLORES RAMIREZ
VOCAL: CARLOS RIUS ALONSO
SECRETARIO: JOSE MANUEL MENDEZ STIVALET
1^{ER} SUPLENTE: JOSE GUSTAVO AVILA ZARRAGA
1^{DO} SUPLENTE: BLAS FLORES PEREZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA, LABORATORIO 204,
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUIMICA,
UNAM.

Asesor:

Dr. Carlos Rius Alonso

Sustentante:

Jesús Hernández Moreno

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Antecedentes biológicos y farmacológicos	5
2.1.1 Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas) y Africana (Enfermedad del sueño)	5
2.1.2 Leishmaniasis	14
2.1.3 Quimioterapia para el tratamiento de Tripanosomiasis y Leishmaniasis	16
2.1.4 Resistencia a fármacos	19
2.1.5 Actividad antiprotozoaria en fosfolípidos análogos	22
2.1.6 Metabolismo de tripanosomas	25
2.2 Antecedentes químicos	30
2.2.1 Reacciones de ácidos polifosfóricos con compuestos hidroxilados	30
2.2.2 Propiedades físicas generales	32
2.2.3 Adición nucleofílica de alcoholes, formación de cetales	39
2.2.4 Aspectos termodinámicos	44
2.2.5 Especificaciones para el uso de resinas y fundamentos de intercambio iónico	46
3. PARTE EXPERIMENTAL	
3.1 Metodología de síntesis de 3-fosfo-propilamida	
3.1.1 Caracterización de 3-aminopropanol	49
3.1.2 Síntesis de ácido polifosfórico	49
3.1.3 Síntesis de 3-fosfopropilamina	50
3.1.4 Síntesis de 3-fosfopropilamida	51
3.2 Preparación de la columna de intercambio iónico y separación de compuestos después de la acetilación	52
3.3 Monitoreo y detección del compuesto organofosforado	53
3.4 Secuencia de síntesis de 3-fosfo-propilamida	55
3.5 Metodología de síntesis de 1,2-di-O-acetilglicerofosfato	
3.5.1 Purificación de fenol comercial	57
3.5.2 Síntesis de difenilclorofosfato	57
3.5.3 Síntesis del cetal de la ciclohexanona	58
3.5.4 Síntesis del difenilfosfato del cetal de la ciclohexanona	59
3.5.5 Síntesis del fosfato del cetal de la ciclohexanona	60
3.5.6 Síntesis de ácido glicerofosfórico	61
3.5.7 Síntesis de 1,2-di-O-acetilglicerofosfato	61
3.5.8 Separación del 1,2-di-O-acetilglicerofosfato de los subproductos de hidrólisis	62
3.6 Secuencia de síntesis de 1,2-di-O-acetilglicerofosfato	63

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1	Síntesis de 3-fosfopropilamida	
4.1.1	Materia prima 3-aminopropanol	65
4.1.2	Compuesto ácido polifosfórico	65
4.1.3	Compuesto 3-fosfopropilamina	66
4.1.4	Compuesto 3-fosfopropilamida	66
4.2	Síntesis de 1,2-di-O-acetilglicerofosfato	
4.2.1	Materia prima fenol	68
4.2.2	Compuesto difenilclorofosfato	68
4.2.3	Compuesto cetal de la ciclohexanona	68
4.2.4	Compuesto difenilfosfato del cetal de la ciclohexanona	69
4.2.5	Compuesto fosfato del cetal de la ciclohexanona	70
4.2.6	Compuesto ácido glicerofosfórico	70
4.2.7	Compuesto 1,2-di-O-acetilglicerofosfato	71
4.3	Separación de los compuestos acetilados de los subproductos de hidrólisis mediante columna empacada con resina de intercambio iónico	72
4.3.1	Preparación de la columna de intercambio iónico	73
5.	CONCLUSIONES	74
6.	BIBLIOGRAFÍA	75
7.	APÉNDICE	79

1. INTRODUCCIÓN

La salud de una vasta mayoría de la población mundial está en riesgo por infecciones producidas por protozoarios parásitos. Malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis son causa del sufrimiento de cientos de millones de personas y provocan la muerte a millones que habitan las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Las herramientas terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades son extremadamente limitadas. Muchos de los medicamentos disponibles han sido usados desde principios del siglo pasado y su administración no está libre de riesgos por lo que debe llevarse a cabo bajo estricta supervisión médica o bajo hospitalización.

Las infecciones por protozoarios en los animales tiene un triple interés, en producción animal, en salud animal y como un reservorio de la enfermedad para los humanos en infecciones zoonóticas. Desafortunadamente se ha encontrado la misma problemática de la enfermedad en los animales que en humanos: amplia resistencia, baja efectividad y alto costo en varios medicamentos. Bajo estas circunstancias, la disponibilidad de nuevos medicamentos de fácil administración y bajo costo se vuelve una imperiosa necesidad. Los costos y riesgos en el desarrollo de nuevos medicamentos para el Tercer Mundo por parte de la industria farmacéutica esta fuera de balance económico por las bajas ganancias y el largo período o nula recuperación de la inversión.

Enfermedad del sueño (tripanosomiasis humana africana)

Para mucha gente, la enfermedad del sueño (tripanosomiasis humana africana) es una oscura y exótica enfermedad que produce somnolencia. Los síntomas de hecho son mucho más severos y la enfermedad es mortal sin tratamiento. Sin embargo, mientras la enfermedad sólo afecta áreas aisladas del sub-Sahara Africano (donde los turistas rara vez se aventuran) también permanece ampliamente incomprendida. En 1999, 45,000 casos de la enfermedad fueron reportados a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la verdad es que muchos no se reportaron; se tiene un estimado de que entre 300,000 y 500,000 personas fueron infectadas por la enfermedad del sueño.

La enfermedad del sueño amenaza cerca de 60 millones de personas en 36 países del sub-Sahara Africano, incluyendo República Democrática del Congo, Angola, Camerún,

Uganda y el sur de Sudan. Menos de 4 millones tienen acceso a un diagnóstico y tratamiento. La enfermedad fue controlada adecuadamente en los años 60's pero ha regresado en las regiones apartadas y pantanosas del sub-Sahara Africano debido a años de conflictos, movimientos de población y por la carencia de recursos humanos y financieros.

La tripanosomiasis humana africana o enfermedad del sueño es una de las más importantes, pero también, de las más desatendidas de las infecciones tropicales. De acuerdo con la OMS cerca de 500,000 personas ya han adquirido los tripanosomas y si no son atendidos morirán. El resurgimiento de la enfermedad del sueño en los 70's representa uno de los mayores problemas de salud pública de proporciones epidémicas en muchas zonas rurales de África. El tratamiento requiere hospitalización y es muy costoso, potencialmente peligroso y limitado por la resistencia del parásito a los medicamentos. Se necesita urgentemente inversión en investigación patofisiológica y un verdadero compromiso internacional para pelear contra la tripanosomiasis en África ⁽¹⁾.

Enfermedad de Chagas

Es una enfermedad parasitaria ampliamente expandida, la tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas mata un aproximado de 50,000 personas por año en el Continente Americano. La enfermedad particularmente afecta a la gente más pobre. Un estimado de 18 millones de personas viven con el parásito en su sangre y cerca de 100 millones de personas están en riesgo de la enfermedad en 21 países de Centro y Sudamérica. Esto es cerca del 25% de la población de Latinoamérica. En Honduras, por ejemplo, 1.8 millones de personas viven en zona endémica, 300,000 de los cuales creen estar infectados por la enfermedad de Chagas.

Leishmaniasis

La leishmaniasis humana es causada por especies y subespecies de protozoarios del género *Leishmania* y la familia *Trypanosomastidae*. Son protozoarios parásitos que causan varias enfermedades en los humanos que incluyen lesiones cutáneas e infecciones viscerales que pueden ser fatales. Se ha estimado que alrededor de 2 millones de casos de leishmaniasis ocurren cada año en 88 países. La infección ocurre

en todos los continentes con excepción de Australia y probablemente afecta por lo menos a 100 millones de personas ⁽²⁾.

En 1991, como iniciativa europea fue creado "COST Action" en el campo de la medicina e investigación en salud concerniente al desarrollo de medicamentos derivados de la acridina para el tratamiento de la tripanosomiasis. "COST Action" comprendía en sus inicios a seis países europeos: Bélgica, Francia, Alemania, España, Suiza y Reino Unido. En 1995, quince laboratorios o institutos de once diferentes países, incluyendo a Kenya ya se encontraban participando, tiempo después el programa COST se amplió hacia la investigación de los parásitos que provocan la leishmaniasis y muchos más y diferentes clases de medicamentos con potencial antiparásito ⁽¹⁾.

Desarrollo de nuevos medicamentos contra la "Enfermedad del sueño".

En este proyecto se involucró la cooperación de varios laboratorios en Europa, Estados Unidos y México mediante la coordinación de la I.O.C.D. (International Organization for Chemical Sciences in Development) teniendo como finalidad el mejorar la situación actual en cuanto a los medicamentos usados en el tratamiento de las enfermedades causadas por Tripanosomas, tales como la Enfermedad del Sueño, Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis.

El metabolismo de la energía de los tripanosomas ha sido objeto de muchas revisiones durante la década pasada. En años recientes, por lo tanto, la nueva información nos lleva a tener más completa la película del metabolismo de los tripanosomas y a una revaloración del papel de algunos organelos característicos en la captación de energía de estos parásitos. Por años se pensó como un punto de ataque en el glicosoma por ser un organelo como el peroxisoma, que está involucrado para permitir que los parásitos lleven a cabo la glicólisis a gran velocidad con una cantidad relativamente pequeña de enzima. Sin embargo, los recientes resultados de estudios de la glicólisis de los tripanosomas y la detección de otras rutas y enzimas en el organelo requieren una modificación de esta visión.

Recientes investigaciones han provisto de mucha nueva información acerca de la energía y el metabolismo de carbohidratos de los parásitos tripanosomastidos. Las ideas han cambiado acerca del papel de los glicosomas en el metabolismo. Los cálculos han demostrado que, contrario a ideas previas, los glicosomas no sirven para incrementar el flujo glicolítico. Por otro lado, estudios computacionales revelan que la compartamentación de la glicólisis de tripanosoma brucei en el torrente sanguíneo previene la acumulación extrema de ciertos metabolitos en la célula.

Aún sería prematuro inferir de esos datos una función “real” del glicosoma, i.e. la razón del porque el ancestro común de Kinetoplastida, la glicólisis y otras enzimas del metabolismo de carbohidratos se hicieron compartamentalizadas dentro de los peróxisomas. En general, se pensó que los peróxisomas eran unos organelos bastante enigmáticos respecto a su origen, biogénesis y función. Hace una década eran descritos como organelos multipropósito en los cuales las reacciones metabólicas eran llevadas a cabo cuando pudiera ser ventajoso para la célula. Esta vaga definición aún se sostiene, pero para los glicosomas aún no está claro porque deben estar en ventaja cuando ya surgieron.

Otros cuestionamientos prominentes que permanecen acerca de la energía en el metabolismo de los carbohidratos en los tripanomastidaes es concerniente a los flujos a través de varias rutas internas y externas de los glicosomas, y el papel metabólico preciso del pirofosfato en estos parásitos ⁽³⁾.

2. ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES BIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS

2.1.1 Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas) y Africana (Enfermedad del sueño)

Los protozoarios pertenecientes a la familia de los Trypanosomiasis son los parásitos responsables de un gran número de enfermedades en los animales domésticos y en el hombre, una de éstas se conoce con el nombre de -Enfermedad del Sueño”, que es considerada por la Organización Mundial de la Salud ⁽⁴⁾, como una de las enfermedades de mayor incidencia provocada por parásitos. El causante es el tripanosoma brucei en su forma de protozoario que una vez ya en el torrente sanguíneo resulta ser casi siempre fatal si no se trata a tiempo.

Los pocos medicamentos disponibles en la actualidad tienen efectos colaterales muy serios, en particular el Melarsoprol y análogos, único tripanocida efectivo conocido, pero que en las últimas etapas de la enfermedad induce la muerte por encefalopatía en un 10% de los pacientes tratados. Así también otro compuesto recientemente usado para el tratamiento, Eflornitina (difluoro-metil-ornitina, DMFO) presenta serios inconvenientes, es prácticamente inactivo ante Trypanosoma Rhodesciense, una de las formas más virulentas de la -Enfermedad del Sueño”, el tratamiento requiere la administración de grandes cantidades, las recomendaciones de la FDA (Food and Drug Administration) es de 400 mg/kg peso del paciente diariamente por dos semanas bajo hospitalización ⁽⁵⁾.

Los hemoflagelos del humano incluyen a los géneros Trypanosoma y Leishmania, hay dos tipos de tripanosomas humanos; el Africano, que provoca la -Enfermedad del Sueño” y es transmitido por la mosca tsetse (Glossina): Trypanosoma Brucei Rhodesciense y Trypanosoma Brucei Gambiense y el Americano que provoca la Enfermedad de Chagas, es transmitida por insectos de nariz coniforme (Triatoma, etc.): Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.

El género *Leishmania* se divide habitualmente en tres especies que infectan al hombre, pero recientemente se dividieron en trece o en más especies, provocando Leishmaniasis cutánea (úlceras orientales), mucocutánea (espundia) y visceral (kala-azar). Todas las formas de estas infecciones son transmitidas por los jejenes (*Phlebotomus* en el viejo mundo ó *Lutzomyia* *Psychodopigus* en el nuevo mundo).

Los hemoflagelos del género *Trypanosoma* se encuentran en la sangre de los mamíferos en forma de tripomastigotos alargados maduros. En los tejidos de mamíferos ocurren otras etapas de ciclo de vida del tripanosoma, pero una etapa de epimastigoto en multiplicación procede a la formación de los tripomastigotos infecciosos (trypanosomas metacíclicos) en el huésped intermediario (insecto transmisor), en todas las especies de tripanosomas que afectan al hombre.

La tripanosomiasis se manifiesta en los seres humanos como "Enfermedad del Sueño Africana", "Enfermedad de Chagas" y "Tripanosomiasis asintomática", las formas infectantes del tripanosoma *brucei* Gambiense y *Rhodescense* se introducen por medio de la picadura de la mosca tsetse, se multiplican en el lugar de la inoculación y producen una induración variable (lesión primaria), la cual puede progresar hasta asumir la forma de chancro tripanosómico, diseminándose hasta los ganglios linfáticos, sangre y en etapas terminales, al sistema nervioso central, donde produce el típico síndrome de la "Enfermedad del sueño", debilidad, incapacidad para comer, emaciación tisular, inconciencia y muerte ⁽⁶⁾.

Enfermedad de Chagas

Esta enfermedad es provocada por *trypanosoma cruzi*, un protozoario parásito, que es transmitido a los humanos por insectos chupa sangre. Mientras el insecto pica este deposita sus heces en la piel las cuales pueden ser frotadas accidentalmente en la misma herida del piquete, en los ojos o en la boca. Estos insectos viven en las cuarteadoras de los muros y techos de viviendas elaborados de barro y paja, comúnmente localizadas en áreas pobres rurales y barrios urbanos de Latinoamérica. Esta enfermedad también puede ser transmitida vía transfusión sanguínea o de madre a hijo durante el embarazo.

En la fase aguda, los niños a menudo presentan fiebre, inflamación de glándulas linfáticas, agrandamiento del hígado y bazo e inflamación en el área del piquete del insecto. Dicha picadura rara vez es visible y aparentemente no presenta síntomas en la fase aguda. El parásito es capaz de incubarse en el organismo durante años, inclusive por décadas, sin que la víctima sea consciente de la infección. En aproximadamente una tercera parte de los casos agudos, las formas crónicas se desarrollan durante 10 a 20 años después de la infección. Cuando la fase crónica comienza es casi siempre muy tarde para el tratamiento, los síntomas son falla del corazón o una seria disfunción del esófago y el colon que pueden ser irreversibles. Los pacientes gradualmente enferman más y los síntomas cardiacos pueden llevar a la muerte súbita por falla del corazón. La expectativa de vida se reduce en un promedio de nueve años.

Nifurtimox y benzimidazol son los únicos medicamentos existentes en contra de la enfermedad de Chagas, aún así no son considerados como los ideales a causa de:

- a) Baja efectividad en la fase crónica de la enfermedad.
- b) Variaciones regionales significativas en la eficacia debido a la resistencia natural de tripanosoma cruzi.
- c) Alto grado de evasión de pacientes debido a los efectos colaterales del medicamento.
- d) Largos períodos de tratamiento (de 30 a 60 días).
- e) Necesidad de monitoreo bajo supervisión médica especializada.

En países pobres donde los programas de detección masiva no son factibles y el tratamiento médico muy caro, los niños menores de 12 años son usualmente los únicos que reciben el tratamiento. Los niños tienen una gran oportunidad de beneficiarse de los tratamientos aunque por otro lado desarrollarán lesiones crónicas.

Los programas de control de insectos vectores son caros y no es una adecuada respuesta para la crisis médica y socioeconómica que la enfermedad de Chagas

provoca en Latinoamérica. La prevención sola no es suficiente, tanto como que no tiene impacto en la gente que ya ha sido infectada por la enfermedad. La prevención ideal consistiría, de hecho, en mejorar las condiciones de vida de la población en riesgo. Por lo tanto la gente no puede sentarse a esperar un futuro libre de insectos mientras que la enfermedad discapacita y mata a adultos jóvenes en el pico de su vida útil trabajadora.

Enfermedad del sueño (tripanosomiasis humana africana)

Las formas crónica y aguda de la enfermedad son causadas por dos cercanos y relacionados protozoarios parásitos, *tripanosoma brucei* Gambiense y *Rhodescense*, respectivamente. Estos parásitos son transmitidos por la mosca tsetse, cuya especie vive en pantanos, a lo largo de ríos, riachuelos y arroyos, en bosques y en sabanas. Los habitantes de estos lugares están expuestos a estos insectos a diario cuando van al bosque o al río para acarrear agua, lavar su ropa, cazar o pescar. Cuando la mosca tsetse pica, se inyecta el *tripanosoma* (protozooario parásito) en el torrente sanguíneo de la persona, el parásito se reproduce primero en la sangre y en el sistema linfático y después en el sistema nervioso central.

Los primeros síntomas de la enfermedad del sueño no son específicos: fiebre, dolor de cabeza y dolor de articulaciones. En su primera fase la enfermedad es relativamente fácil de tratar pero a menudo permanece sin diagnosticar. En la segunda fase, cuando el parásito invade el sistema nervioso central, el estado mental del paciente y su comportamiento sufren cambios, desarrolla alteraciones durante el sueño (de aquí el nombre de la enfermedad) sufre dolor intenso, confusión mental y convulsiones. En esta fase, la enfermedad es caracterizada por síntomas neurológicos y, sin tratamiento, ocurre debilitamiento del cuerpo, somnolencia, coma y muerte. Desafortunadamente es hasta esta fase que la gente infectada busca tratamiento.

La enfermedad del sueño es notoriamente difícil de tratar. Isetionato de pentamidina, suramina, melarsoprol y eflornitina están registrados para el

tratamiento de la enfermedad, pero estos medicamentos son escasos, tóxicos y encuentran resistencia al parásito.

Pentamidina. Este caro medicamento es usado para el tratamiento de la infección por tripanosoma brucei Gambiense en sus etapas tempranas. Son raros los efectos colaterales y generalmente reversibles con la interrupción del tratamiento.

Suramina. Usada exclusivamente para el tratamiento en la fase inicial de la infección por tripanosoma brucei Rhodhescience, este medicamento tiene varios efectos colaterales, particularmente reacciones alérgicas y complicaciones renales.

Melarsoprol. Un derivado del arsénico sintetizado desde hace más de 50 años, se utiliza estrictamente en la segunda fase de la enfermedad (neurológica) para ambas infecciones, tripanosoma brucei Gambiense y Rhodhescience. Es un medicamento muy peligroso y de administración extremadamente dolorosa debido a su insolubilidad, por su toxicidad puede matar a uno de cada veinte pacientes tratados. Sin embargo, a pesar de los extremos efectos colaterales, el melarsoprol permanece como uno de los medicamentos más ampliamente usados para tratar las fases avanzadas de la enfermedad del sueño. Pese al hecho de que en algunas áreas de África este ha fallado para curar en 25 a 30% de los pacientes debido a la resistencia que ha desarrollado el parásito al medicamento.

Eflornitina. Este medicamento es más seguro, es la alternativa más efectiva al melarsoprol para el tratamiento de las etapas avanzadas de la infección por tripanosoma brucei Gambiense con menos efectos colaterales. Las propiedades tripanocidas de la eflornitina fueron descubiertas por la oportunidad y el espectacular suceso de ver empujadas a las personas fuera del coma, incluso se llegó a llamar el medicamento de la resurrección. Sin embargo, los fabricantes dejaron su producción en 1995 por razones de rentabilidad. La infección primero afectó a los pobres quienes no pudieron pagarlo.

ANTECEDENTES

En 2001, seguido de varios años de presión internacional pública encabezada por Medecins Sans Frontieres (Medicina sin Fronteras) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el productor original finalmente reanudó la producción de eflornitina para alcanzar el estimado de producción para cinco años y para contribuir financieramente con los programas de investigación en enfermedad del sueño de la OMS. Además, el productor también estuvo de acuerdo en transferir tecnología y proveer de asistencia técnica a los fabricantes del medicamento a largo plazo.

La enfermedad del sueño también se puede prevenir mediante un control efectivo de la mosca tsetse. La mosca tsetse femenina solo produce aproximadamente 10 larvas durante su corto periodo de vida, así que en teoría la prevención de la expansión de la enfermedad del sueño mediante este método podría ofrecer una alternativa efectiva. Los métodos tradicionales incluyen la eliminación de arbustos para la destrucción del hábitat de la mosca, fumigar con insecticida por aire o tierra.

Medicamentos usados en el tratamiento de la tripanosomiasis humana africana o enfermedad del sueño.

Fase / línea		Tripanosomiasis africana del oeste	Tripanosomiasis africana del este
Fase temprana o primaria	Primera línea	Pentamidina	Suramina
	Segunda línea	Eflornitina o melarsoprol	Melarsoprol
Fase tardía o secundaria	Primera línea	Melarsoprol	Melarsoprol
	Segunda línea	Eflornitina	Nifurtimox combinado con Melarsoprol

Algunas cuestiones fundamentales sin respuesta acerca de la tripanosomiasis humana africana.

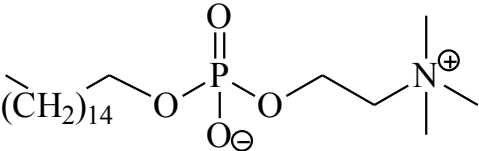
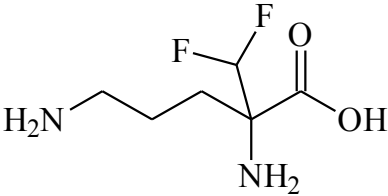
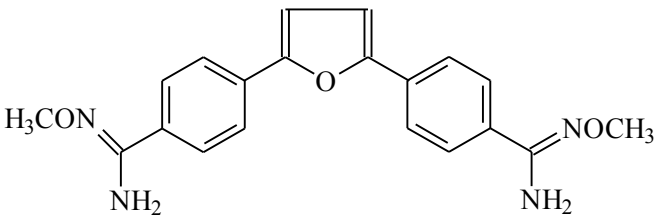
- 1) ¿Como es que los tripanosomas invaden el sistema nervioso?
- 2) ¿Como es que la infección mata?
- 3) ¿Cómo hacemos para que los mecanismos recién descubiertos de resistencia hacia los medicamentos que han sido identificados en modelos de laboratorio sean traducidos en herramientas útiles para el manejo de pacientes infectados?
- 4) ¿Como deberían ser seleccionadas las moléculas objetivo de los estudios bioquímicos para que sean diseñados nuevos medicamentos?
- 5) ¿Cómo pueden ser efectivamente combinados en los niveles local, nacional e internacional los esfuerzos en contra de la enfermedad en África? ⁽¹¹⁾

Avances sin precedentes se han dado en los últimos 21 años en la comprensión de la biología del tripanosoma Africano, avances que han sido acompañados de un lamentable progreso en la explotación de esta información y en el desarrollo de nuevos medicamentos. Sin duda, que el inhibidor de la ornitind Descarboxilasa, eflornitina, fue certificado para el tratamiento de fases avanzadas de tripanosomiasis gambiense en 1990 después de los primeros reportes del tratamiento en 1984. El bajo índice de severidad y de efectos adversos comparados con aquellos provocados por el melarsoprol lo llevó a ocupar el lugar de medicamento de primera línea en el tratamiento de la enfermedad en su fase avanzada. Sin embargo, las dificultades en su manufactura, las altas dosis requeridas y la necesidad de infusiones intravenosas prolongadas, hicieron de la eflornitina cara y difícil de distribuir y administrar en las zonas rurales de África. Su disponibilidad como tripanocida depende del compromiso hecho por Medecins Sans Frontieres y la Organización Mundial de la Salud con la compañía farmacéutica Sanofi-Aventis. Ningún otro medicamento ha sido certificado en los últimos 21 años. Durante este tiempo, no obstante, la incidencia de tripanosomiasis humana Africana se ha incrementado claramente, y aquellos

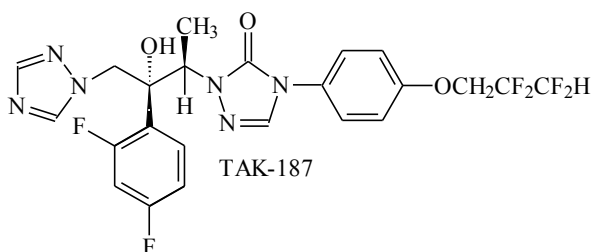
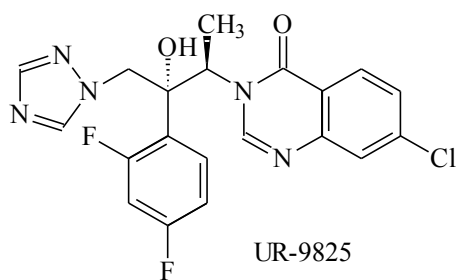
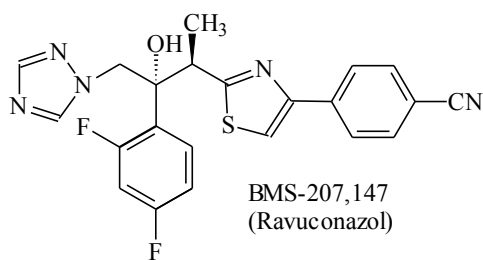
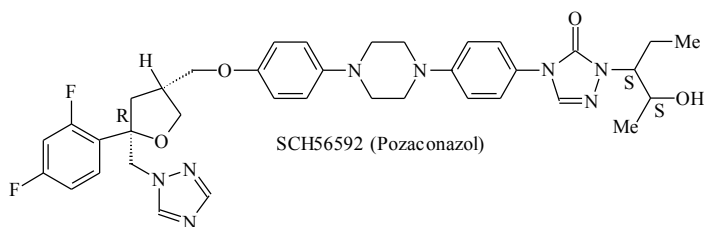
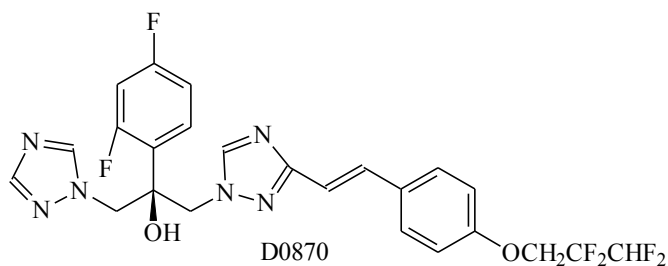
ocupados en el tratamiento de esta enfermedad tuvieron que intentar mejorar el uso de los medicamentos disponibles certificados.

Los estudios de farmacocinética del melarsoprol han llevado a pruebas exitosas de 10 días de tratamiento (comparados con los normales 21-35 días) mejora la docilidad del paciente y reduce los gastos de hospitalización. Combinaciones de pentamidina y eflornitina se encuentran bajo pruebas de laboratorio. Se incrementa la preocupación del creciente fracaso en el tratamiento con melarsoprol en algunos casos de HAT.

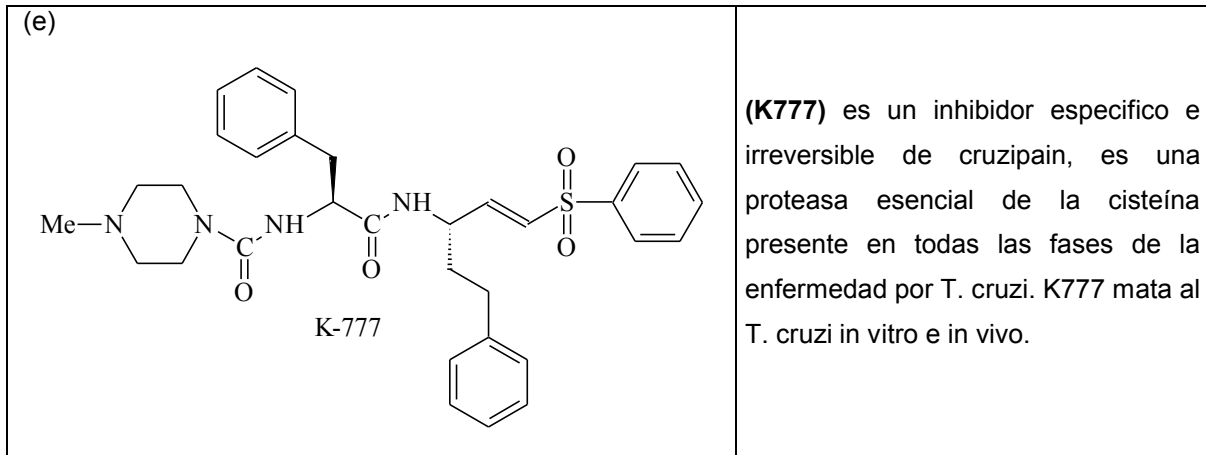
Nuevos medicamentos en desarrollo clínico o preclínico para Tripanosomiasis y Leishmaniasis

<p>(a)</p> 	<p>Miltefosina: es una alquilfosfocolina, originalmente desarrollada como agente anticancerígeno. Ha sido desarrollado por Zentaris, OMS y TDR para el tratamiento de LC y LV.</p>
<p>(b)</p> 	<p>Eflornitina: difluorometilornitina, es un inhibidor irreversible de la ornitina descarboxilasa y de la biosíntesis de poliamina, que fue desarrollada originalmente como agente anticancerígeno pero que ahora es usado en la fase 2 del tratamiento de la infección por tripanosoma brucei Gambiense.</p>
<p>(c)</p> 	<p>Diamidina: DB289 es un promedicamento de 2,5-bis(4-aminodifenil)furano (DB75 o furamidina) y está actualmente en la fase III de pruebas clínicas para el tratamiento de la fase I por infección de tripanosoma brucei Gambiense en África Central (en desarrollo con la Universidad del Norte de Carolina y el consorcio Gates)</p>

(d)



Nuevos derivados del triazol son inhibidores de tripanosoma cruzi esterol C14 α esterol dimetilasa que tienen una potente actividad selectiva y propiedades farmacocinéticas. Pueden erradicar el parásito en modelos animales de las fases crónica y aguda de la enfermedad de Chagas. Estos derivados se encuentran ahora en desarrollo como agentes sistemáticos antifungicidas ⁽⁶⁶⁾.



Solo un medicamento para el tratamiento de HAT se encuentra actualmente bajo pruebas clínicas. El promedicamento DB289, para uso oral, se transforma sistemáticamente en otra diamidina (DB75) que es activa contra la enfermedad en su fase temprana. La barrera de sangre del cerebro para pacientes en posteriores etapas de la enfermedad, sigue siendo un fuerte obstáculo para que los parásitos se alojen en el interior de él. El número de diamidinas que han surgido es extraordinario por el consorcio entre la Universidad del Sur de Carolina y el financiamiento de la Fundación Gates, también se espera que otros promedicamentos que muestran actividad en las últimas fases de la enfermedad pasen al desarrollo clínico.

Los tripanosomas son altamente sensibles a compuestos nitroheterocíclicos selectivos. Debido a que nitrofurano, nifurtimox y nitroimidazol y benzimidazol están certificados para usarse contra las infecciones de tripanosoma cruzi, se han hecho esfuerzos para extender su uso contra la Tripanosomiasis Africana.

2.1.2 Leishmaniasis

Los mamíferos no humanos son los reservorios de esta infección que se transmite al hombre principalmente por la picadura de las hembras del flebótomo infectadas. Los promastigotes libres, flagelados extracelulares, que viven en el tracto gastrointestinal del insecto vector son inoculados en el huésped, donde son fagocitados por los monocitos tisulares. En el interior de estas células se transforman en amastigotes redondeados que se localizan intracelularmente en

los fagolisosomas. El desarrollo de una enfermedad localizada o sistemática depende de la especie o subespecie del parásito infectante, la distribución de los macrófagos infectados y de la respuesta inmunológica del huésped. Según la extensión del compromiso sistemático y la gravedad clínica, la leishmaniasis humana puede ser clasificada en las formas cutánea, mucocutánea y visceral (kala azar) ⁽⁷⁾.

Medicamentos contra la Tripanosomiasis Americana (Enfermedad de Chagas) y Africana (Enfermedad del sueño)

No existe medicamento efectivo para la Tripanosomiasis Americana, aunque el Bayer 5205 (Nifurtimox) puede aliviar temporalmente a algunos pacientes con tripomastigotos en la sangre. La tripanosomiasis Africana se ha tratado principalmente con suramina sódica (Germanin) o isetionato de pentamidina (Lomidine), la primera preferentemente para la Gambiense y la segunda para la Rhodescience ⁽⁸⁾.

La enfermedad avanzada ya con afección del sistema nervioso central requiere melarsoprol (MelB), así como de suramina o triparsamida en presencia de parasitemia en infección activa de los ganglios linfáticos. Para cada una de estas enfermedades existe un número muy limitado de medicamentos; sin embargo, muchos de éstos tienen graves efectos colaterales, algunos son muy tóxicos, mientras que otros tienen una actividad muy incierta en cuanto a la eliminación total del parásito.

Es claro que se esperan medicamentos cada vez más efectivos contra la enfermedad y de efectos colaterales nulos o mínimos en el paciente.

2.1.3 Quimioterapia para el tratamiento de Tripanosomiasis y Leishmaniasis

Es más que decepcionante y para reflexionar que la quimioterapia para la tripanosomiasis humana Africana y la Enfermedad de Chagas es difícilmente diferente hoy a como lo fue hace 21 años. Los medicamentos usados para el tratamiento de ambas enfermedades, con todo y sus problemas de toxicidad asociados, efectividad variable, administración parenteral, y largos tratamientos, siguen siendo los mismos ahora que en ese entonces.

Medicamentos en uso y a prueba en 1985 y 2005

Leishmaniasis (tipo) Medicamentos Fase de prueba	1985	2005
Leishmaniasis visceral Medicamentos de primera línea Pruebas clínicas	Estibogluconato de sodio (Pentostam), antimonioato de meglumina (Glucantime); Anfhotericin B (Fungizone) Pentamidina Alopurinol (Fase II)	Estibogluconato de sodio (Pentostam, estibogluconato de sodio genérico), antimonioato de meglumina (Glucantime) Anfhotericin B (Fungizone) Liposomal amfotericin B (AmBisome) Pentamidina Miltefosina (oral, faseIV, registrado en India) Paromomycin (FaseIII) Sitamaquine (oral, fase III) Otras formulaciones de Amfotericin B
Leishmaniasis cutánea Medicamentos de primera línea Pruebas clínicas	Estibogluconato de sodio (Pentostam), antimonioato de meglumina (Glucantime); Anfhotericin B (Fungizone) Pentamidina Paromomycin (fórmula tópica, fase II) Alopurinol ribosido (Fase II)	Estibogluconato de sodio (Pentostam), antimonioato de meglumina (Glucantime) Anfhotericin B (Fungizone) Pentamidina Paromomycin (fórmula tópica) Miltefosina (oral, fase III) Paromomycin (otra fórmula tópica, fase II) Imiquimod (inmunomodulador tópico, fase II)

<p>Tripanosomiasis humana Africana</p> <p>Fase hemolinfática Medicamentos de primera línea</p> <p>Pruebas clínicas</p> <p>Fase del sistema nervioso central Medicamentos de primera línea</p> <p>Pruebas clínicas</p>	<p>Pentamidina Suramina</p> <p>Melarsoprol</p>	<p>Pentamidina Suramina</p> <p>DB 289 (Fase III)</p> <p>Melarsoprol Eflornitina</p> <p>Nifurtimox en combinación con eflornitina (Fase III)</p>
<p>Enfermedad de Chagas</p> <p>Fase aguda</p> <p>Pruebas clínicas</p> <p>Medicamentos en desarrollo preclínico</p>	<p>Benzimidazol; nifurtimox</p> <p>Alopurinol (fase aguda, fase II)</p>	<p>Benzimidazol; nifurtimox</p> <p>Benzimidazol (fase intermedia)</p> <p>Antifungal triazoles (posaconazol, ravuconazol, TAK-187) Inhibidor cruzipain (K777)</p>

Solamente en el tratamiento de la leishmaniasis es que se han logrado algunos claros avances, aunque muchos de estos han sido dolorosamente lentos y se han basado en estudios y pruebas de principios establecidos hace 21 años. Considerables avances en la validación y caracterización de los compuestos objetivo y en nueva química, están ahora haciendo la diferencia y ofrecen una nueva esperanza para los próximos años. Si este conocimiento hace buena pareja con el mejoramiento de los modelos de procesos de desarrollo de medicamentos, aunado a las oportunidades de financiamiento, es posible colocar los medicamentos a base de antimonio y arsénico en los estantes de un museo de una vez por todas.

Medicamentos para tratamiento de Leishmaniasis

De los estándares de medicamentos recomendados hace 20 años, los pentavalentes de antimonio son ahora casi obsoletos en la India debido a la resistencia que presentan los parásitos, pero siguen siendo útiles en el resto del mundo donde la introducción de marcas genéricas de medicamentos ha reducido

los costos. Amfotericin B, un medicamento de segunda línea en 1984, se ha movido a la vanguardia en la India. En 1979, grupos en Londres y Liverpool mostraron que la encapsulación de medicamentos a base de antimonio en los liposomas, incrementaba la eficacia antileishmania en modelos experimentales de leishmaniasis visceral (LV). Para 1985, había sido adoptada (aunque poco después abandonada) por Wellcome para el desarrollo de la formulación del liposoma estibogluconato de sodio, y quedó demostrado que los liposomas de Amfotericin B trabajaban en los modelos experimentales de LV y leishmaniasis cutánea (LC). Una variedad de formulaciones de lípidos de Amfotericin B, se desarrollaron de manera independiente durante los 80's para tratamiento de micosis sistémicas en pacientes inmunocomprometidos que también probaron ser efectivas en el tratamiento de la leishmaniasis. Una de estas (la preparación liposomal AmBisome, la cual se mostró primero para la cura de un caso de LV en 1991) es registrada para el tratamiento de LV, y una sola dosis de 5 mg/kg demostró una curación del 90% de pacientes. Los altos costos limitan el uso más amplio de AmBisome para los tratamientos. La paromomicina, originalmente un aminoglucósido de suministro oral para el tratamiento de infecciones intestinales, también demostró efectividad como tratamiento tópico para LC por 1985 y como un medicamento parenteral para LV en 1990. Sorprendentemente, este fue tomado hasta el 2005 para pruebas clínicas en fase III para paromomicina en contra de LV para ser completada en la India (una reflexión acerca de los limitados fondos disponibles). Para LC aún permanece la investigación más efectiva y formulaciones tópicas menos irritantes que aquellas originalmente desarrolladas, y algunas se encuentran experimentando bajo pruebas clínicas. Como con la paromomicina, la actividad antileishmaniasis de la miltefosina fue identificada en Wellcome y, de nuevo, su actividad fue probada por 1995. Este lisofosfolípido análogo, un sorprendente antiprotozorico fue descubierto más por casualidad que por diseño, es el primer tratamiento oral producido para LV, es efectivo contra LC y ha sido registrado para tratamiento de condiciones patológicas en India (en 2002) y Colombia (en 2005).

Una variedad de investigaciones nos lleva a los recientes reportes de nuevos compuestos con promisorio actividad in vivo:

- i) en rutas bioquímicas como la biosíntesis de isoprenoide, destaca la identificación de biofosfonatos anti leishmania
- ii) en la investigación de productos naturales destaca la identificación de maesabalidas
- iii) y en derivación química destaca la identificación de nuevas quinolinas.

2.1.4 Resistencia a fármacos

Leishmaniasis

El tratamiento elegido está basado en compuestos que contienen antimonio pentavalente, el cual probablemente actúa por inhibición de las rutas metabólicas. La quimioterapia antimonial ha sido usada contra la leishmaniasis por 50 años, pero la resistencia a estos se ha extendido en algunas regiones y ha alcanzado proporciones epidémicas en la India. Más alarmante resulta el repentino aumento de la co-infección HIV-leishmaniasis. Un número de medicamentos de segunda línea incluyen la pentamidina, aminosidina, paromomicina, amfotericin B, miltefosina, itraconazol y alopurinol. Algunos de estos son usados con antimonio, en pruebas clínicas únicamente en severa co-infección y con moderación dado su costo y toxicidad. Para estos medicamentos la resistencia in vitro ha sido demostrada, así como en un principio se espera que ocurra en la práctica⁽¹²⁾.

Tripanosomas

Estos tripanosomas son transmitidos a los humanos mediante el piquete de insectos chupadores de sangre, por la cual los parásitos invaden y proliferan en el sistema sanguíneo, eventualmente alcanzan el sistema nervioso central cruzando la barrera de sangre del cerebro con el fatal resultado en los casos de la enfermedad del sueño⁽¹²⁾.

Los programas de control para atacar a la mosca tsetsé y los tripanosomas, casi erradicaron el parásito del sub-Sahara Africano en los años 60's pero este ha resurgido en los 90's con aproximadamente 500,000 casos por año. Los

tripanosomas africanos son fácilmente cultivables, clonables y son favorablemente manejados genéticamente, así como los genes silenciados por el RNAi. El proyecto de secuenciación del genoma del tripanosoma brucei está bajo la conducción de TIGR y el Instituto Sanger. El primer tripanocida sintético, suramina, desarrollado del Tripan Red muerto, por Ehrlich (1907), se usa aún hoy en día con compuestos arseniosos y diamidinas (Williamson 1970) ⁽²⁾.

Tripanosomiasis Sudamericana (Enfermedad de Chagas)

En 1985, el fenómeno auto inmune es el factor primario en la patología asociada a la fase crónica de la Enfermedad de Chagas. Recientes investigaciones puntualizan la persistencia del parásito, asociado con una respuesta inmune desbalanceada que puede incluir reacciones autoinmunes generando continuas respuestas inflamatorias y tejidos infectados, que son las lesiones que caracterizan la fase crónica de la Enfermedad de Chagas. Estos descubrimientos indican que la eliminación del tripanosoma cruzi de pacientes infectados es un prerequisite para detener la evolución de la enfermedad y para prevenir las irreversibles consecuencias de larga duración. Desafortunadamente, a pesar de los impresionantes avances en el entendimiento de la biología del tripanosoma cruzi, los únicos medicamentos actuales disponibles en contra de estos organismos son aquellos que fueron certificados hace 21 años: nifurtimox y benzimidazol, que fueron desarrollados empíricamente en los 60's y 70's. Estos compuestos son activos en la fase aguda de la Enfermedad de Chagas (arriba del 89% de eficacia) y el benzimidazol, que también lo es para infecciones crónicas tempranas pero con limitada eficacia en contra de la enfermedad en la fase crónica declarada, sin embargo, los efectos colaterales de estos medicamentos, nifurtimox y benzimidazol, son muy severos.

Entre los agentes más avanzados en desarrollo están los nuevos derivados de triazol, que son inhibidores específicos de la biosíntesis de ergosterol cuya función es al nivel del C14 α de la esterol demetilasa. Inhibidores del cruzipain (una proteasa esencial específica para el parásito) y N-alquil-bisfosfonatos inhibidores de la farnesil-pirofosfato-sintasa que de manera selectiva se van acumulando en

los acidocalcisomas del parásito, son compuestos que rápidamente han avanzado al desarrollo preclínico.

Otros compuestos promisorios son los inhibidores del metabolismo y síntesis de tripanotion, inhibidores de la hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa y los nuevos inhibidores de la biosíntesis del ergosterol cuya función es a nivel de escualeno-sintetasa u oxidoescualeno-ciclasa, que también están en investigación experimental preclínica.

En los pasados 21 años se han visto considerables avances en el conocimiento de la bioquímica y biología celular de tres agentes patógenos que producen leishmaniasis y tripanosomiasis, estos avances están ejemplificados por la reciente publicación de la secuencia del genoma de estos organismos. Sin embargo, el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos también requiere la contribución de disciplinas como la química, farmacología, toxicología y farmacéutica para complementar estos avances en biología molecular, para posteriores desarrollos de adecuados modelos de las enfermedades y métodos para llevar los posibles medicamentos a estudios preclínicos, problema identificado también para otras enfermedades.

Un costo aproximado para el desarrollo de una nueva medicina para el mercado actualmente es de 800 millones de dólares, miles de compuestos son probados para tratamientos individuales, antes de que se obtenga un nuevo medicamento seguro, efectivo y se pueda comercializar.

El costo del desarrollo de medicamentos para enfermedades por infecciones tropicales debe ser significativamente bajo. El aumento en la concientización de esta situación nos debe llevar a la creación de asociaciones sin fines de lucro para el desarrollo de medicamentos, como lo es la iniciativa de Drugs for Neglected Diseases, Medicines for Malaria Venture o el Institute for One World Health que, junto con la OMS, Tropical Diseases Research Programme TDR, COST, Actia e IOCD, con el objetivo de direccionar este desbalance en el mundo de la

investigación biomédica y coordinar esfuerzos. El propósito es el proponer modelos alternativos de medicamentos, acogiendo la cooperación efectiva entre los sectores público y privado, incluyendo grupos de países endémicos en los cuales la investigación y servicios en salud están financiados y dirigidos por el sector público con un costo más bajo de producción y servicios.⁽²⁾

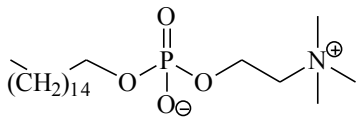
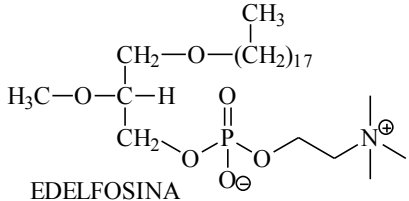
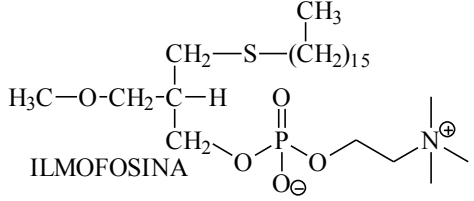
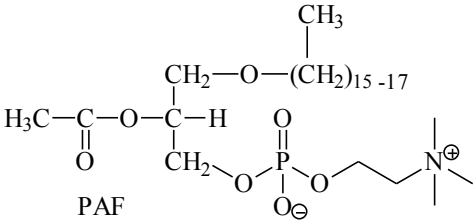
2.1.5 Actividad antiprotozoaria en fosfolípidos análogos

El interés en fosfolípidos análogos como agentes quimioterapéuticos resulta del trabajo de Munder y colaboradores seguida de su investigación en actividad inmunomoduladora de lisofosfatidilcolina (LPS). Debido a que esta tiene una corta vida en sistemas biológicos, por la escisión de fosfolípidos por acción de aciltransferasas, es que se han sintetizado más compuestos. Algunos de estos compuestos se establecieron para inhibir la proliferación de células tumorosas. Otros análogos de LPC fueron sintetizados por otros grupos de investigación como compuestos potencialmente antitumorales y diferentes metabolismos de lípidos y fosfolípidos así como su estructura y composición fueron explorados en células normales y neoplásicas. Estudios de requerimientos de estructuras mínimas de éter-fosfolípidos para actividad antineoplásica revela sitios de fragmentación o escisión esencial para fosfolipasa C y D, la eliminación del enlace del glicerol nos lleva a la síntesis y pruebas de alquilfosfocolinas contra células tumorosas. La formulación de hexadecilfosfocolina (HPC, miltefosina) fue aprobada en agosto de 1992 para el tratamiento tópico de metástasis en piel. El descubrimiento de estructuras de éter-lípidos del factor platelet-activating (PAF) también causó gran interés en la síntesis y actividad de fosfolípidos.

Los primeros reportes de actividad antiprotozoaria de los fosfolípidos análogos en los 80's contra *Tetrahymena pyriformis* y *Leishmania Donovanii* ocurrió al mismo tiempo que su desarrollo como medicamentos anticancerosos. Así se aprendió sobre la actividad antiprotozoaria de dos grupos de fosfolípidos análogos. En primera, alquilglicerofosfocolinas (AGPCs) que poseen un enlace glicerol sustituido en la posición sn2 es ejemplificado por rac-1-O-octadecil—2-O-metil-glicero-3-fosfocolina (ET-18-OCH₃, edelfosina), y en segunda, las

alquilfosfocolinas (APCs) en las cuales la fosfocolina es esterificada directamente con alcoholes de cadena larga sin glicerol, ejemplificado por hexadecil-fosfocolina (miltefosina).

Estructuras de fosfolípidos análogos

<p>a) Hexadecilfosfocolina es representativo de alquilfosfocolina.</p>	 <p>MILTEFOSINA</p>
<p>b) 1-O-octadecil—2-O-metil-glicero-3-fosfocolina (ET-18-OCH₃)</p>	 <p>EDELFOFINA</p>
<p>c) 1-hexadecil-mercapto-2-metoximetil-sn-glicero-3-fosfocolina (BM 41.440)</p>	 <p>ILMOFOFINA</p>
<p>d) 1-O-hexadecil/octadecil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina (PAF) b) c) y d) son representativos de alquilglicerofosfocolinas (AGPCs)</p>	 <p>PAF</p>

Estudios iniciales en Leishmaniasis por Achterben y Gercken mostraron que algunos AGPCs tuvieron actividad contra el promastigoto forma extracelular de *L. Donovanii* mientras que Croft et al. Mostraron que una serie de APCs , incluyendo hexadecilfosfocolina (miltefosina) tuvieron actividad en contra de la forma intracelular amastigoto de *L. Donovanii* tanto in vitro como in vivo. Estudios subsecuentes extendieron la información en la actividad antileishmaniasis de los fosfolípidos análogos incluyendo otros AGPC's edelfosina, ilmofosina y SRI-62,834 que alcanzó el nivel de experimentación bajo pruebas clínicas para el tratamiento de cáncer, contra *L. Donovanii* y contra otras especies de leishmaniasis.

Los fosfolípidos análogos, desarrollados como medicamentos, han obtenido recientemente el estatus de medicamentos antiprotozoarios promisorios, comentario editorial seguido de la publicación de resultados de las pruebas clínicas de la fase II de la aclamada miltefosina como el medicamento oral más esperado para el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Seguida de la exitosa fase III de pruebas, la miltefosina fue registrada en la India para el tratamiento de la leishmaniasis visceral el 15 de marzo de 2002. La actividad oral antileishmaniasis de este medicamento fosfolípido sirvió para poner atención en esta nueva clase de compuestos como antiprotozoarios. No hay evidencia de que este compuesto sea el óptimo contra leishmaniasis, hay pocos estudios para su mejor formulación y estudios no publicados acerca de la combinación de medicamentos. Toxicidad y teratogenicidad permanecen como problema (Sindermann 2002), la miltefosina no debería ser el fin de esta línea de investigación. En adición, aunque potenciales mecanismos de acción antitumoral de miltefosina y otros fosfolípidos análogos se han elaborado, en el presente no hay una indicación clara de cómo estos medicamentos ejercen su actividad antiprotozoaria. Las variaciones en la actividad antileishmania y antitripanosoma en la célula de éstos compuestos pueden proveer de herramientas para descubrir su mecanismo (o mecanismos) de acción antiprotozoaria.

Hace mucho que los compuestos análogos de fosfolípidos han demostrado claramente su toxicidad selectiva contra *Leishmania* y *tripanosoma cruzi*. Los estudios in vivo contra *tripanosoma cruzi* han sido limitados y merecen una atención más allá ⁽⁷⁾.

2.1.6 Metabolismo de tripanosomas

Los tripanosomas exhiben un mecanismo de supervivencia muy particular, la total dependencia del aprovechamiento de la energía liberada (ATP) adenosin trifosfato, en el proceso de la glucólisis en el punto en que se forma piruvato, por lo que esto se puede aprovechar para la búsqueda de nuevos fármacos, esto es, que las enzimas encargadas de capturar la energía sean inhibidas, dichos inhibidores deben exhibir una afinidad mínima para las enzimas equivalentes en el ser humano.

En *tripanosoma brucei*, las enzimas involucradas en el metabolismo de glucólisis y glicerol se encuentran en un organelo llamado glicosoma.

Las enzimas fueron purificadas y caracterizadas exhaustivamente, la estructura de dos de éstas enzimas han sido elucidadas por cristalografía de Rayos-X, glicosomal-triosafosfato-isomerasa y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa ⁽⁹⁾.

En este documento sólo se considera el diseño de inhibidores selectivos de la glicosomal-triosafosfato-isomerasa (g-TIM) del *Tripanosoma brucei*.

Para lograr un estudio con bases científicas y de resultados promisorios, se escogieron las enzimas del paso glicolítico de los tripanosomas, como posibles blancos para el diseño de nuevos y mejores medicamentos, basándose en un estudio racional sobre el conocimiento detallado de las diferencias entre las enzimas de los tripanosomas y su contraparte homólogas en el hombre.

Purificación de enzimas glicolíticas

Después de muchos esfuerzos se ha logrado desarrollar un sistema rutinario de purificación de nueve enzimas glicosomales y algunas isoenzimas citosólicas para

poder lograr estudios enzimológicos, producción de anticuerpos y experimentos para cristalización de proteínas. El grupo que más enzimas ha consumido es el del profesor W. Hol de la Universidad Estatal de Groninger, Holanda, (actualmente en la Universidad de Washington, U.S.A.)⁽⁵⁾ que mediante cristalización y subsecuente análisis de Rayos-X, elucidaron sus estructuras.

Los resultados experimentales enfatizan la importancia del sitio de unión del fosfato, con esto, como punto clave, varias moléculas se han modelado dirigidas al sitio activo de la g-TIM (glicosomal-triosafosfato-isomerasa) en la posición de los residuos de aminoácidos 400-402 donde hay una diferencia significativa en los residuos entre el tripanosoma y la enzima humana.

Esto los llevó a la elucidación de una molécula, que estructuralmente fue el modelo a seguir para la síntesis, iniciando con esta estructura, se han utilizado varias bases de datos de compuestos orgánicos para hallar posibles candidatos inhibidores. Una búsqueda en Chemical Abstract Search (CAS) de uno de los fragmentos de la molécula modelo, dio como resultado a seis posibles candidatos iniciales.

Triosafosfato-isomerasa

Del tripanosoma brucei, TIM fue la primer enzima del parásito cristalizada y resuelta su estructura tridimensional. Esta enzima cataliza la conversión reversible de triosa fosfatos, DHAP y GA3P. En su forma en el torrente sanguíneo, la enzima es localizada principalmente en el glicosoma y representa menos del 0.04% del total de la proteína del tripanosoma. En general, se han descrito pocos inhibidores de TIM. La enzima del tripanosoma es inhibida por sulfato, fosfato, arseniato y por 2-fosfoglicolato. También, parece que la suramina se liga a la TIM del tripanosoma brucei, y hay alguna evidencia de que la suramina puede intervenir en la formación de la forma activa homodimérica de la enzima. Aunque no existe argumento teórico para sugerir que la inhibición de la enzima pueda llevar a la muerte del parásito, los experimentos de Sandra Helfert, demuestran que la TIM es también una enzima vital y por lo tanto puede ser un buen objetivo para atacar con

medicamentos. TIM es la única enzima glicolítica encontrada en los glicosomas por lo que no se ha reportado más allá señal de importación de peróxisoma. Se ha estudiado esta importación de glicosoma y se ha mostrado que 21 péptidos internos de aminoácidos grandes tiene la habilidad de recorrer y reportar proteína a los glicosomas. El reemplazo de este péptido por la correspondiente TIM levadura detiene completamente la importación. Se propuso que este péptido expuesto a la superficie de la proteína nativa, es mediador de la interacción de la TIM con otra proteína que hace el transporte a PTS. La importación de la TIM dentro de los glicosomas debería entonces ser un proceso de retroalimentación.

Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa

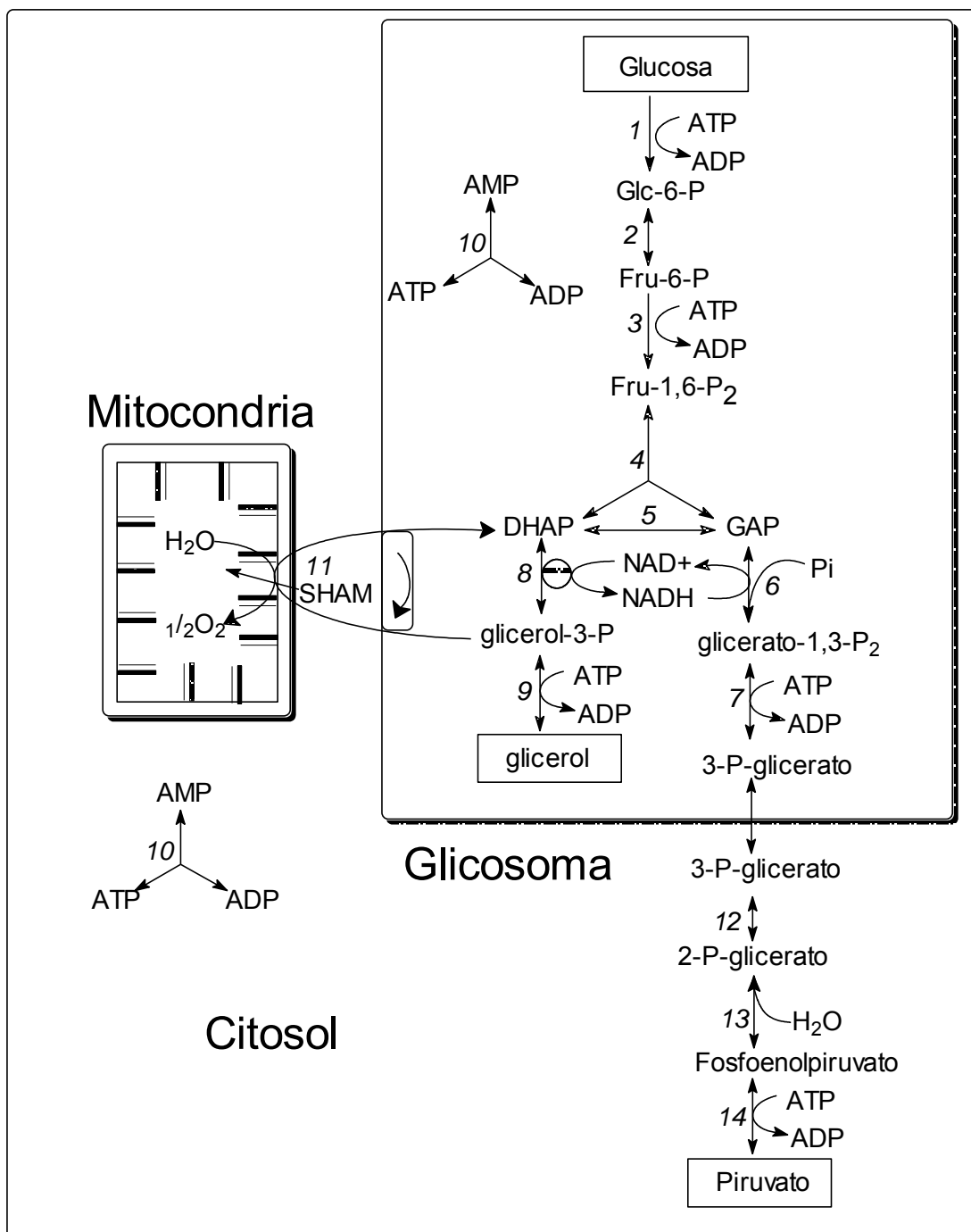
Todos los tripomastidae estudiados, incluyendo tripanosoma brucei, tienen 2 isoenzimas separadas, una en el citosol y otra en el glicosoma. Mientras que la enzima glicosomal es directamente involucrada en la glicólisis, la función de la isoenzima citosólica aún no es clara. La isoenzima glicosomal es inhibida por un inhibidor que contiene epóxido GAPDH, pentalenolactona, y por suramina, gossypol y ácido agarícico. Aunque el sitio sustrato-anclaje es bien conservado, ha sido posible para sintetizar epóxido o análogos que contienen alfa-enona que, selectiva e irreversiblemente, inhiben no solamente a la enzima, sino también el crecimiento del tripanosoma en un sistema de cultivo in vitro. Se han resuelto las estructuras tridimensionales para enzimas de tripanosoma brucei, cruzi y leishmania mexicana. Esto ha revelado un sitio de anclaje del cofactor del NAD el cual tiene unas diferencias interesantes responsables de una reducida afinidad por este cofactor. Se han sintetizado varios análogos de la adenosina altamente selectivos que quedan estrechamente colocados en el sitio de anclaje del NAD de la enzima del tripanosoma, pero que no se anclan al correspondiente sitio del homólogo mamífero. Algunos de estos compuestos tienen una gran selectividad para las enzimas glicosomales de los tres tripanomastidos e inhibe su actividad a concentraciones de micromolar a sub-micromolar. En tripanosoma brucei estos compuestos interfieren directamente con la glicólisis, se ha revelado, por la rápida inhibición de la producción de piruvato y su motilidad, que éstos también inhiben el crecimiento in vitro en bajo rango macromolar. Es interesante que estos

compuestos sean igualmente efectivos contra las formas sanguíneas del tripanosoma brucei, L. mexicana promastigotes y células como las amastigotes, y en amastigotes intracelulares de tripanosoma cruzi. No se ha demostrado toxicidad para las células huéspedes debajo de su solubilidad límite. Los resultados demuestran por primera vez que, a pesar del hecho que tripanosoma cruzi y L. mexicana se pueden pensar menos dependientes de la glicólisis que se debe a la presencia de mitocondrias activas y la inhibición de la glicólisis son de efectos letales para cada uno de estos parásitos ⁽¹⁰⁾.

Glicólisis de la forma del torrente sanguíneo del tripanosoma. Los metabolitos en cajas son nutrientes o productos finales del metabolismo.

Enzimas:

1	Hexoquinasa	8	Glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa
2	Fosfoglucoasa isomerasa	9	Glicerol quinasa
3	Fosfofructoquinasa	10	Adenilato quinasa
4	Aldolasa	11	Glicerol-3-fosfato-oxidasa
5	Triosafosfato isomerasa	12	Fosfoglicerato mutasa
6	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa	13	Enolasa
7	Fosfoglicerato quinasa	14	Piruvato quinasa

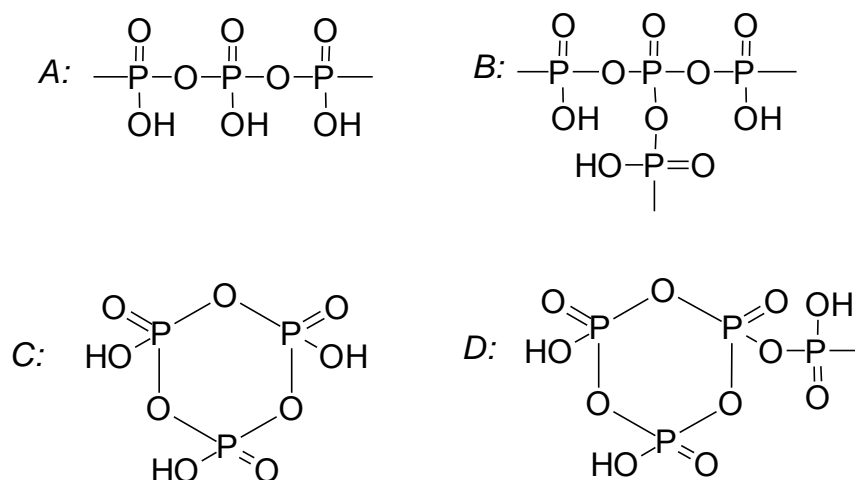


La parte que correspondió a la síntesis de algunos de éstos compuestos organofosforados es la que se llevó a cabo en el laboratorio 204 del Departamento de Química Orgánica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

2.2 ANTECEDENTES QUÍMICOS

2.2.1 Reacciones de ácidos polifosfóricos con compuestos hidroxilados.

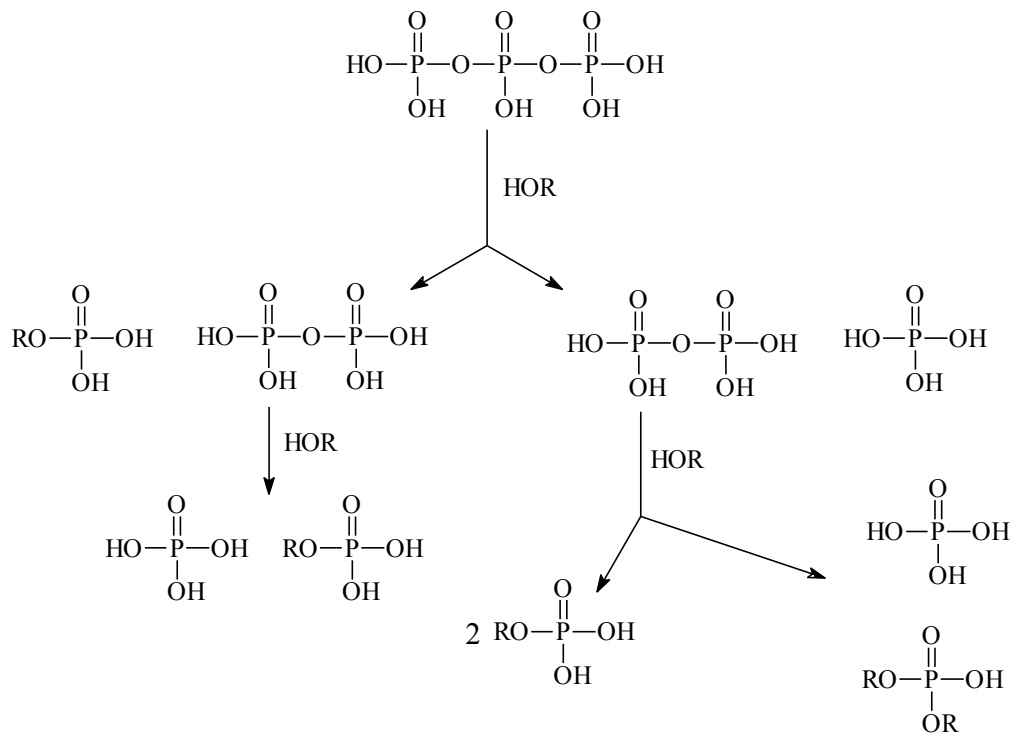
Los ácidos polifosfóricos son parcialmente anhídridos de ácido ortofosfórico, estos ácidos pueden formar una cadena no ramificada (tipo A) o ramificada (tipo B) ó pueden presentar una estructura cíclica que puede presentar derivaciones de cadenas lineales (C y D) en donde el tamaño del ciclo puede variar.



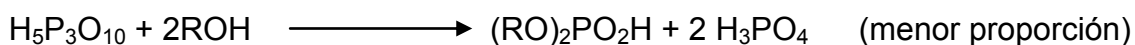
Este tipo de compuestos se pueden obtener, ya sea por condensación de ácido ortofosfórico mediante calentamiento (150° a 250°C ó incluso más altas), o por reacción de pentóxido de fósforo con ácido ortofosfórico ⁽¹³⁾.

Estos ácidos pueden reaccionar con alcoholes o fenoles, o ser preparados *in situ*, por ejemplo, calentando glicerol con ácido ortofosfórico a 150° - 200°C . Cuando son preparados por condensación térmica de H_3PO_4 a temperaturas relativamente bajas (150° - 200°C) los ácidos polifosfóricos producidos presentan esencialmente cadenas no ramificadas con bajo número de condensación (de 3 a 4) ⁽¹⁴⁾. La reacción, estadísticamente no es pura cuando se usa un ácido polifosfórico lineal no ramificado, el rompimiento de la cadena por un alcohol rinde preferencialmente ésteres primarios.

Reacción del ácido trifosfórico ($H_5P_3O_{10}$) con un alcohol.



Reacciones globales:



Las reacciones con ácido polifosfórico son generalmente realizadas por calentamiento de un alcohol puro en exceso o en solución etérea con el ácido en un baño de agua.

Después de completar la reacción, de algunas horas, la reacción es cesada con agua y el éter, si está presente, es separado por destilación, los ésteres fosfóricos son separados del ácido fosfórico por neutralización con $Ba(OH)_2$ o $Mg(OH)_2$, cristalizando en solución acuosa las sales respectivas de bario o magnesio.

La esterificación de alcoholes por ácido fosfórico "jaraboso" (deshidratado) es debida probablemente a la presencia del ácido polifosfórico en este producto generalmente preparado por concentración del ácido polifosfórico comercial a altas temperaturas y/o al vacío.

Calentando los compuestos hidroxilados con ácido fosfórico a temperaturas por encima de los 100°C bajo presión reducida se obtienen mezclas de ésteres similares a la mezcla de productos obtenida por reacción directa con ácido polifosfórico.

Los compuestos polihidroxilados dan resinas complejas, esta se puede reducir usando sales del ácido (fosfato mono ó disódico), puede resultar del hecho que bajo éstas condiciones la formación de polifosfatos más grandes es fuertemente reducida en tanto que se favorece más la formación, principalmente, de ésteres primarios, (con el ácido pirofosfórico se produce únicamente, ésteres primarios).

2.2.2 Propiedades físicas generales.

Acidez. Los ésteres de ácidos fosfóricos, anhidrofosfóricos o halofosfóricos que no contienen la función -OH en el átomo(s) de fósforo son neutros, con la excepción por supuesto, de derivados que presentan radicales orgánicos que contienen funciones libres ácidas o básicas. En el caso de los derivados anhidros o halofosfóricos, la solvólisis que generan las funciones -OH en el átomo de fósforo deben ser excluidas.

Los fosfoclorhidratos y bromhidratos bajo condiciones de hidrólisis o alcoholísis producen funciones ácidas. Derivados anhidro de ácidos fosforosos son generalmente estables en medio neutro y frecuentemente en medio alcalino pero son fácilmente descompuestos en medio ácido. Acil-fosfatos son hidrolizables a cualquier pH y presentan generalmente un máximo de estabilidad en pH 4-5.

Grupos fósforo-fluorhidrato son hidrolizables sólo suavemente. Esteres cíclicos con anillo de cinco miembros son rotos rápidamente, aquellos con grandes anillos son relativamente estables en medio neutro.

Los ésteres parciales de ácidos fosfóricos y polifosfóricos son fuertemente ácidos, dibásico y monobásico, respectivamente. En la serie de ésteres alifáticos la acidez es comparada con el ácido fosfórico, que aumenta con la alquilación, este aumento es inverso al tamaño del grupo alquilo, un éster dialquilado es más fuertemente ácido que el monoalquilado.

Esta conclusión con respecto a los derivados del ácido fosforoso es la relación genérica de ácidos fosfóricos orgánicos- ácidos fosforosos inorgánicos que es deducido por el remplazamiento de H por R antes de aquella de -OH por R.

El espectro de absorción de infra-rojo presenta un enlace de hidrógeno, líneas entre 1220 y 1280 cm^{-1} y la absorción de P-O-C es en la región de 980-1100 cm^{-1} .

Los derivados HO-P varían en su intensidad como el resultado del enlace de hidrógeno a cualquiera de los oxígenos del -OH (decremento de la acidez) o del grupo P=O (aumenta la acidez), pero factores estéricos intervienen de igual manera.

Espectro de absorción Ultra-violeta.

Los ésteres fosfóricos simples no tienen un espectro de absorción Ultra-violeta muy significativo, el trietilfosfato es casi transparente entre 1260 y 1100 cm^{-1} ⁽¹⁵⁾.

Infra-rojo y espectroscopía Raman.

Frecuencias de absorción de:

Grupo	En	Frecuencia
P-F	(RO) ₂ POF	905-875 cm ⁻¹
	plegado	500-300 cm ⁻¹ aprox.
P-Cl	(RO) ₂ POCl	590-480 cm ⁻¹
	(RO)PCl ₂	587 cm ⁻¹ fuerte
		544-420 cm ⁻¹ menos fuerte
P-Br		495-320 cm ⁻¹
P=O		1450-1980 cm ⁻¹ muy fuerte sobre todo el rango
		1320-1200 cm ⁻¹ en la mayor parte de los compuestos
		Los enlaces hidrógeno resultantes de la interacción con P-OH produce traslado de señal de 50-80 cm ⁻¹ .
P-OH	En ácidos organofosforados.	2700-2560 cm ⁻¹ absorción poco significativa, desaparece con la formación de sales, indicativo del enlace hidrógeno tan grande como aquella de los ácidos carboxílicos C(O)OH.

Empíricamente se relacionan seis regiones con el grupo P-OH.

	Frecuencia (cm ⁻¹)	Observación
I	3000-2525	(P)OH absorción
II	2400-2000	(P)OH absorción
III	1900-1600	P-OH combinación de bandas
IV	1400-1200	P-O-H deformación
V	1030-820	P-O-(H) absorción
VI	540-450	P-O-(H) deformación

Región de 1030	(P)OC
Absorción en 1242-1087	P-O-(C)
POCH ₃ 1200-1168	P-O-C alifático
1170-1105	P-O-CH ₂
1190-1087	P-O-CH
Aromático 1242-1110 (O-C) absorción	P-O-C
996-905 (P-O-(arilo))	

El ácido metafosfórico proporciona al menos un ácido trifosfórico cíclico, la tendencia para formar ésteres de ácidos fosfóricos condensados (y principalmente ácido pirofosfórico) es razonablemente alta; el uso de un exceso moderado de un compuesto hidroxilado ayuda a llevar la reacción hacia una mezcla de ésteres ortofosfóricos primarios y secundarios, dichas mezclas han sido usadas para la esterificación de hidroxiaminoácidos.

El mecanismo de ruptura del enlace del anhídrido está aún en discusión al parecer es probable que en un primer paso la alta polaridad del grupo fosforilo forme un aducto de enlace de hidrógeno con el compuesto hidroxilado, dicho aducto puede llevarse a un compuesto cuasifosfonio el cual después experimenta la ruptura observada.

Uso de haloderivados de fósforo pentavalente.

Bajo éstos conceptos se consideraron derivados con halógenos, ó con halógenos y funciones oxígenadas (O, OR).

En todos estos compuestos los halógenos reaccionan con los hidroxicompuestos rindiendo funciones (POR), así como los halogenuros de acilo. Con derivados de fósforo nos lleva a más que un átomo de halógeno, halogenuros de ésteres primarios o secundarios son producidos como intermediarios; algunas veces éstos pueden ser aislados y rendirán por hidrólisis de un ácido muy activo, funciones halogenuro de ácidos fosfóricos mono o diesterificados.

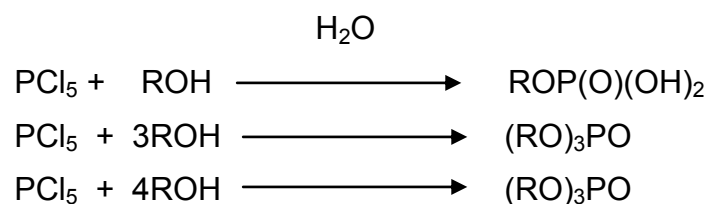
Pentahalogenuros de fósforo e hidroxicompuestos.

Esta posibilidad se lleva a cabo mucho más lento y en menor proporción, la reacción de pentahalogenuro de fósforo con alcoholes nos lleva preferencialmente a la formación de halogenuros de alquilo, el cual es seguido por la acción normal de el oxihalogenuro de fósforo resultante.

El efecto es más pronunciado en alcoholes secundarios y terciarios. La segunda reacción, como se espera, es facilitada por la presencia de piridina y resulta en la

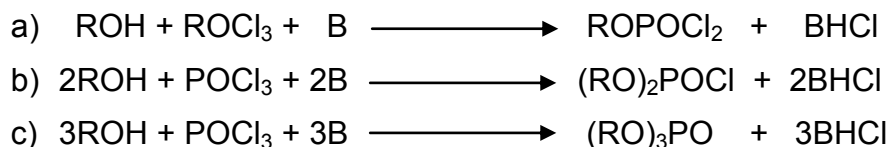
formación de una gama de ésteres. En algunos casos se forman monoalquildihalofosfatos (no aislados) con la formación de los correspondientes monoésteres por hidrólisis.

El fenol reacciona con la formación de halogenuros de cuasifosfonio, los cuales normalmente no se aíslan como los anteriores, pero las mezclas crudas son tratadas con agua o solución acuosa diluida de álcali para formar a los correspondientes ésteres.



Haluros de fosforilo y compuestos hidroxilados.

Esta reacción se lleva a cabo generalmente en presencia de una base orgánica terciaria (B)⁽¹⁶⁾. En principio las siguientes reacciones pueden tener lugar:



Los haluros obtenidos mediante las reacciones (a) y (b) dan por hidrólisis la función haluro del reactivo al correspondiente ácido mono o diesterificado, $(\text{OH})_2\text{P(O)RO}$ y $(\text{RO})_2\text{P(O)OH}$, respectivamente.

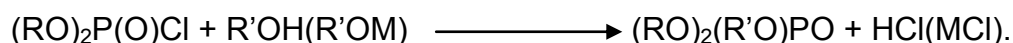
Las reacciones con el halogenuro de fosforilo se realizan generalmente en un solvente inerte a temperatura ambiente ó menor.

La hidrólisis de halogenuros de ésteres fosfóricos primarios o secundarios puede ser efectuada por agua a temperatura ambiente ó ligeramente por arriba de ésta; los ésteres secundarios requieren generalmente temperaturas más altas que

favorece parcialmente la hidrólisis de los grupos éster, especialmente en medios ácidos. Más aún, la hidrólisis de la función halogenuro es mejor efectuada por alcali diluído. Los halogenuros de ésteres cíclicos sufren apertura del anillo durante la hidrólisis ⁽¹⁷⁾. Este procedimiento general es el mejor proceso de laboratorio para la preparación de fosfatos terciarios homogéneos de todas las categorías.

Reacciones con hidroxi compuestos.

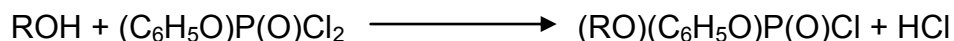
Los halofosfatos reaccionan como halogenuros de ácido con hidrocompuestos o sus derivados metalados. En esta forma $(RO)_2P(O)Cl$ con $R = C_2H_5$, $n-C_3H_7$, $iso-C_3H_7$, etc. han sido utilizados para la preparación de mezclas de ésteres fosfóricos terciarios $(RO)_2-(R'O)PO$ en una extensa variedad siguiendo la reacción general:



Mediante el uso del halofosfato con R fácilmente escindible, la mezcla de ésteres terciarios rendirá ácido fosfórico monoesterificado. Los agentes fosforilantes utilizados de esta clase con frecuencia son los derivados bencilo y fenilo.

Las funciones feniléster pueden ser escindidas mediante reflujo con $Ba(OH)_2$ (las funciones alquiléster de los ácidos fosfóricos generalmente no son afectadas bajo este tratamiento) o por hidrogenólisis catalítica; el grupo bencilo puede ser eliminado mediante el método antes mencionado.

A veces $(C_6H_5O)P(O)Cl_2$ es usado como agente fosforilante; bajo las condiciones apropiadas, la reacción siguiente es favorecida:



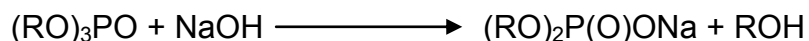
Este compuesto halofosfato puede ser usado después como agente fosforilante, o puede ser tratado en primera instancia con $Ba(OH)_2$ para la eliminación del cloruro de acilo y el feniléster dando el compuesto hidroxifosforilado $R-OPO_3H_2$.

Los halofosfatos del tipo $(RO)P(O)Cl_2$ pueden, por supuesto, ser usados para la síntesis de mezclas de ésteres terciarios $(RO)-(R'O)_2PO$ los cuales en su momento pueden disponerse para una escisión fácil de R que pueda proveer del fosfato secundario $(R'O)_2PO_2H$.

Remoción de grupos éster.

Rupturas parciales de ésteres fosfóricos secundarios o terciarios.

En general la estabilidad de los ésteres fosfóricos decrece de primario (1°) a terciario (3°). Los fosfatos terciarios pueden romperse rápido para dar ésteres secundarios. Especialmente en la serie de los alifáticos dichas reacciones pueden ser usadas para propósitos sintéticos cuando son utilizadas soluciones alcalinas. Los derivados alquilados son atacados incluso a temperatura ambiente, siempre que los radicales sean moderadamente largos; el aumento de tamaño en el radical rápidamente incrementa la resistencia a la hidrólisis.



Las rupturas ácidas son más difíciles de controlar, y generalmente da la degradación progresiva de los productos hasta la formación de ácido fosfórico.

Los fosfatos terciarios que contienen dos grupos fenilos o bencilos normalmente pueden ser hidrolizados bajo condiciones suaves con ácidos minerales diluidos a temperaturas moderadamente elevadas. La remoción selectiva de un grupo en estas condiciones se puede llevar a cabo, pero las condiciones generales pueden ser halladas experimentalmente para cada caso.

Normalmente los ésteres secundarios son estables a una escisión alcalina y un ataque solamente ocurre claramente bajo condiciones más drásticas. En ácidos la escisión ocurre rápidamente, pero generalmente a una velocidad menor a aquella mostrada en la degradación de ésteres terciarios ⁽¹⁸⁻²¹⁾.

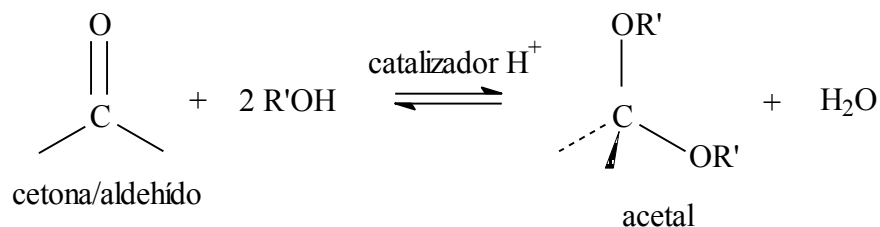
Los ésteres alifáticos primarios son estables a la hidrólisis alcalina, pero son atacados en medio ácido por calentamiento ⁽²²⁻²⁷⁾. La naturaleza de los sustituyentes es muy importante. Los grupos alquilo muestran, cuando se hidrolizan, una curva de doble inflexión, no presentándose la hidrólisis a pH= 8 y presenta un máximo a pH= 4-5 y un mínimo a pH= 1 con un rápido crecimiento en soluciones más ácidas ⁽²⁸⁾.

El monoglicolfosfato muestra un pico máximo a pH= 3-5 ⁽²⁹⁾, los derivados de glicerofosfato muestran un máximo a pH= 3 ⁽³⁰⁾, los fosfatos de carbohidratos simples como diosa-fosfato, glucosa 2-fosfato y fructofuranosa 6-fosfato muestran un mínimo a pH= 2-3, un máximo a pH= 7 y un incremento continuo de velocidad de hidrólisis ácidas más allá de pH= 1 ⁽³¹⁾.

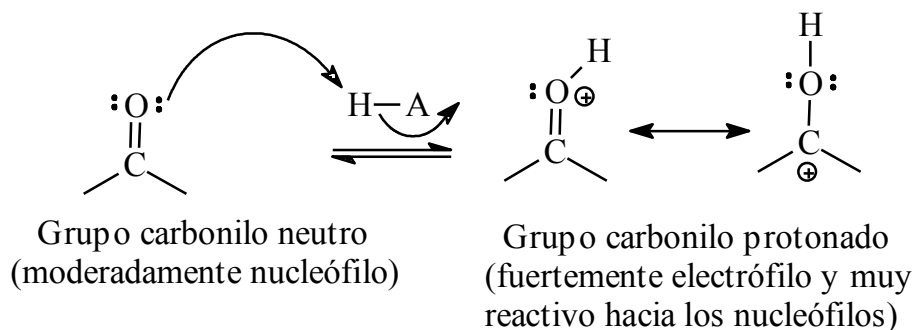
El tratamiento hidrolítico de glicerofosfatos, además de su rompimiento, involucra la transposición del grupo fosforilo. Esta es una reacción reversible estableciéndose un equilibrio de 87% de 1-fosfatos, que se obtiene fácilmente mediante el calentamiento del glicerofosfato crudo en ácidos minerales diluidos. Este fenómeno es de gran utilidad para el aislamiento del 1-isómero puro ^(22, 23, 27). Una transposición similar ocurre con xilosa.

2.2.3 Adición nucleofílica de alcoholes, formación de cetales.

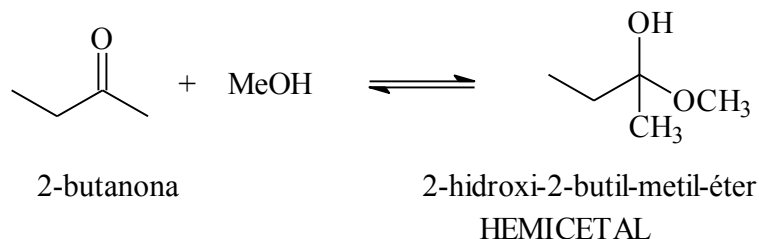
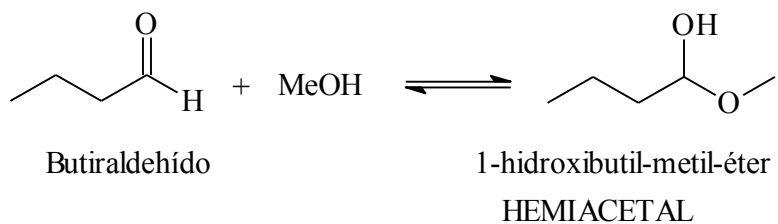
Cetonas y aldehídos reaccionan en forma reversible con alcoholes en presencia de un catalizador ácido para producir acetales, $(R_2C(OR')_2)$.



Como el agua, los alcoholes son nucleófilos relativamente débiles que se unen lentamente a cetonas y aldehídos en condiciones neutras, sin embargo, en condiciones ácidas el oxígeno del carbonilo (nucleófilo) se protona, y el compuesto protonado que resulta es mucho más reactivo que su antecesor neutro, de este modo, la adición del alcohol ocurre con rapidez.



La adición nucleofílica inicial del alcohol al grupo carbonilo produce un hidroxiéter llamado hemiacetal, análogo al gem-diol formado por agua. Los hemiacetales se forman de manera reversible, normalmente con el equilibrio en favor del compuesto carbonílico.



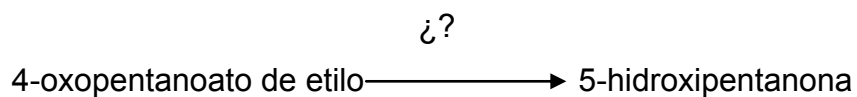
Sin embargo, con la presencia de ácido puede ocurrir una reacción posterior. La protonación del grupo hidroxilo, seguida por la pérdida de agua a través de un mecanismo tipo E1, forma un catión (un ion oxonio, R_3O^+) que una entonces un segundo equivalente del alcohol para producir el acetal.

Puesto que todos los pasos en la formación de un acetal son reversibles, la reacción puede ser desplazada hacia la derecha (del compuesto carbonílico al acetal) o hacia la izquierda (del acetal al compuesto carbonílico), dependiendo de las condiciones elegidas. La reacción hacia la derecha se favorece eligiendo condiciones que eliminen agua del medio y por tanto desplacen el equilibrio hacia la derecha. En la práctica, con frecuencia esto se hace eliminando el agua por destilación tan pronto como se forma.

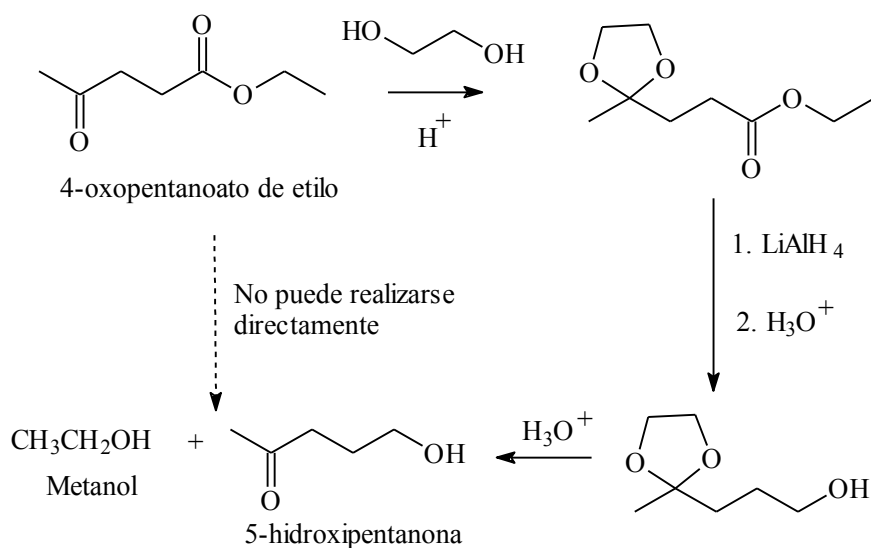
La reacción inversa se logra tratando el acetal con un ácido inorgánico en presencia de un gran exceso de agua para llevar el equilibrio hacia la izquierda. Los acetales son compuestos extremadamente útiles, debido a que pueden actuar como grupos protectores de cetonas y aldehídos, de la misma forma en que los éteres trimetilsilílicos actúan como grupos protectores de alcoholes.

Algunas veces sucede que un grupo funcional interfiere en las reacciones químicas que se intentan en otro lugar de una molécula compleja. Por ejemplo, el tratamiento del cetoéster inicial con $LiAlH_4$ reduciría tanto el grupo ceto como el grupo éster, para formar un diol como producto.

No obstante, el problema puede evitarse protegiendo el grupo ceto como un acetal. Al igual que otros éteres, los acetales son inertes frente a bases, agentes reductores hidruro, reactivos de Grignard, y condiciones catalíticas de reducción, pero son sensibles a los ácidos minerales. Por lo tanto, es posible inducir la reducción selectiva del grupo éster convirtiendo primero el grupo ceto en un acetal, después reduciendo el éster con $LiAlH_4$, y finalmente eliminando el cetal por tratamiento de ácido acuoso.

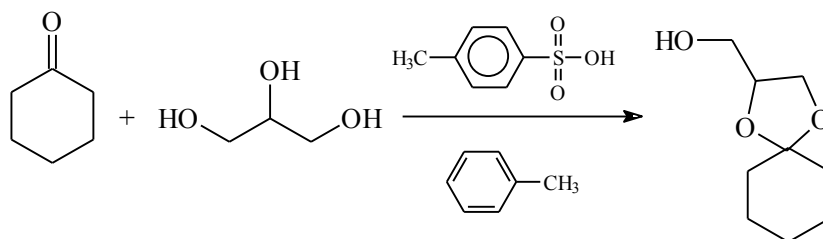


Tratamiento del 4-Oxopentanoato de etilo

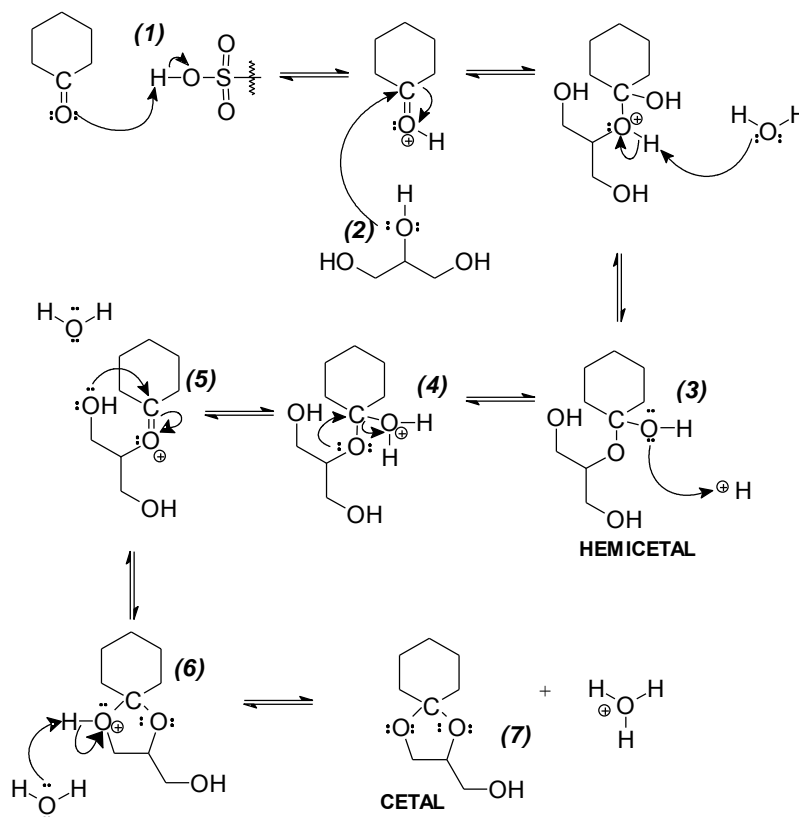


En la práctica, es conveniente utilizar etilenglicol como alcohol y así formar un cetal cíclico. El mecanismo de formación de un cetal cíclico usando un equivalente de etilenglicol es exactamente lo mismo que cuando se usan dos equivalentes de un monoalcohol. La única diferencia es que ahora los dos grupos alcohol están en la misma molécula y no en diferentes.

Mecanismo de formación de un cetal catalizada por ácido mediante la reacción de una cetona o un aldehído con un alcohol.



Mecanismo:



Descripción del mecanismo de formación del cetal.

- 1) La protonación del oxígeno carbonílico polariza fuertemente el grupo carbonilo, y...
- 2) ...activa a este grupo para el ataque nucleofílico por el par no compartido del oxígeno del alcohol.
- 3) La pérdida de un protón produce un hemicetal neutro como intermediario tetraédrico.
- 4) La protonación del hidroxilo del hemicetal lo convierte en un buen grupo saliente.
- 5) La deshidratación produce un ion oxonio como intermediario.
- 6) La adición de un segundo equivalente de alcohol origina un cetal protonado.
- 7) La pérdida de un protón forma un cetal neutro como producto.

2.2.4 Aspectos termodinámicos

La formación de hemiacetales y hemiacetales no es por lo general un proceso energéticamente favorable, es decir las constantes de equilibrio son menores a uno. Sin embargo, los hemiacetales y hemiacetales cíclicos juegan un papel de suma importancia en las propiedades de muchos productos naturales. Los carbohidratos existen principalmente bajo la forma cíclica hemiacetalica o hemiacetalica.

La formación de hemiacetales y hemiacetales cíclicos de cinco o seis miembros es consecuencia de una contribución de la entropía más favorable para el cambio de la energía libre de la reacción. Cuando una reacción química alcanza el equilibrio, la posición del mismo refleja las energías relativas de reactivos y productos.

La constante de equilibrio K se relaciona con la diferencia de energía libre estándar ΔG° entre los productos y los reactivos a través de la ecuación:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

En donde $R = 1.99 \times 10^{-3} \text{ kcal/mol-K} (8.31 \times 10^{-3} \text{ kJ/mol-K})$

T = temperatura en grados Kelvin.

K = (productos)/(reactivos)

Cuando los reactivos son de menor energía que los productos ($\Delta G^\circ > 0$; $K < 1$), entonces se dice que la reacción es endergónica, En una reacción exergónica, los productos son de menor energía que los reactivos ($\Delta G^\circ < 0$; $K > 1$). Dos importantes parámetros termodinámicos contribuyen a la diferencia de energía libre y por tanto a la posición de equilibrio. La entalpia, ΔH° , o calor de reacción, que está relacionado con las diferencias en las energías de enlace entre los productos y los reactivos. La entropía, ΔS° , es una medida de las diferencias de libertad de movimiento entre las moléculas de los productos y los reactivos. Un valor más positivo de la entropía indica un aumento en el grado de libertad al

transformarse los reactivos en productos. La expresión que relaciona entre sí dichos parámetros es:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$$

El valor de la entalpia, en la mayoría de las reacciones orgánicas, es en general mucho mayor que el del término $T \Delta S^\circ$ y, por tanto, su contribución a la diferencia de energía libre es más importante.

En consecuencia es frecuente hablar de reacciones refiriéndonos a ΔH° , es decir como exotérmicas ($\Delta H^\circ < 0$) ó endotérmicas ($\Delta H^\circ > 0$).

Cuando $\Delta H^\circ = T \Delta S^\circ$, situación que ocurre con frecuencia en sistemas biológicos, casi siempre se utilizan los términos exergónico y endergónico. Aunque para la mayoría de los ácidos carboxílicos la posición del equilibrio favorece a los reactivos, la transferencia de protón es muy rápida. La diferencia de energía libre gobierna la posición de equilibrio, pero no la velocidad a la que el equilibrio es establecido.

La formación del hemicetal o hemiacetal acíclico requiere que dos moléculas, el alcohol y el compuesto carbonílico, se pongan en contacto. Buena parte de la libertad de movimiento que cada molécula individual poseía antes de la reacción se pierde. En cambio, cuando una molécula única se cicla formando un anillo de cinco o seis miembros, relativamente libre de tensión, la pérdida de entropía es relativamente menor. El cambio en el término $T \Delta S^\circ$ es menor, lo mismo que el efecto sobre la energía libre y sobre la posición de equilibrio ⁽³²⁾.

2.2.5 Especificaciones para el uso de resinas de intercambio iónico

Reglas para el uso de resinas de intercambio iónico:

- Las resinas de intercambio iónico deben ser consideradas como insolubles.
- Las resinas cationiicas en forma de hidrógeno o del ácido libre debe ser neutralizada por álcali (NaOH), y la forma de sal o de sodio de la resina puede ser convertida de nuevo a la forma ácida por el tratamiento de una solución ácida como HCl.
- Cualquier forma de sal, así como la del ácido libre de las resinas catiónicas puede ser usada para el intercambio de cationes.
- Las formas de base libre o de $-OH$ en las resinas aniónicas pueden ser neutralizadas con ácidos y convertidas de nuevo a la base libre con álcali.
- Cualquier forma de sal, así como la de la base libre, de resinas aniónicas pueden ser usadas para el intercambio de aniones.

Fundamentos de intercambio iónico

- ✓ Las reacciones de intercambio iónico son estequiométricas: por cada gramo de equivalente del ión intercambiado tomado de la resina, un gramo equivalente del ión es desprendido de la resina de la solución.
- ✓ Las reacciones de intercambio iónico son, en general, reversibles.
- ✓ Todos los grupos de iones activos en una resina intercambiadora de iones son accesibles de cambiar su sitio por iones más pequeños.

- ✓ En general, cualquier compuesto que sea ionizable y soluble es capaz de reaccionar por intercambio iónico ⁽³³⁾.

Datos de la etiqueta del frasco que contiene la resina de intercambio iónico:

1 x 200 SIGMA DOWEX 1 Forma iónica: Cloruro

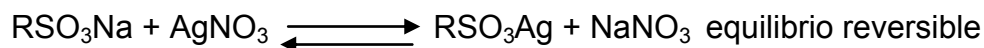
Intercambiador iónico fuertemente básico

Cross linkage (tamaño de malla o de red) = 8%

Dry mesh (malla de red seca) = 100-200

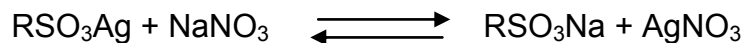
Contenido de humedad: 37%

Este envase contiene resina intercambiadora de iones la cual no ha sido específicamente procesada o limpiada. Sugerimos como tratamiento previo un lavado con una solución adecuada y lavar hasta neutralizar con agua desionizada:



R es la proporción orgánica de la resina y SO₃⁻ es la proporción móvil del grupo del ión activo.

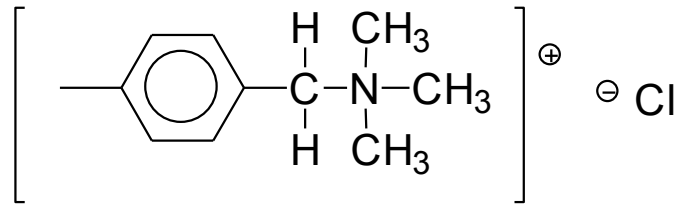
Las reacciones de intercambio iónico son reversibles, con la resina en forma de Ag⁺ en contacto con NaNO₃ la reacción procede así:



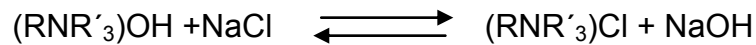
Esta reacción es conocida en su proceso inverso como la regeneración.

Tipos de resinas: DOWEX 1, 2, 11, 21K son resinas de intercambio iónico base fuerte, todas incorporan una función de amonio cuaternaria.

Resina DOWEX 1, TIPO I, básica fuerte.



Estas resinas, altamente ionizadas, pueden ser usadas sobre todo el rango de pH, por lo que también son capaces de formar sales neutras con la correspondiente base:



Las resinas DOWEX son las resinas intercambiadoras de iones más ampliamente utilizadas ⁽³⁴⁾.

Se usó el método de operación en columna considerado como una gran cantidad de operaciones de baches en serie.

100 g de resina 1.2 meq/g = 120 meq

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Metodología de síntesis de 3-fosfopropilamida

3.1.1 Caracterización de 3-aminopropanol. Esta ruta de síntesis utilizó como materia prima el 3-amino-propanol, debido a su disponibilidad comercial y costo accesible. Antes de proceder a la síntesis se caracterizó esta materia prima por IR y RMN ¹H. Espectros **IR1, RMN1**.

Propiedad	Valor
Formula molecular	C ₃ H ₉ NO
Punto de ebullición °C	187-188
Peso molecular (g/mol)	75.11
Densidad (g/ml)	0.982
Valor espectroscópico	
IR (cm⁻¹)	Asignación
3356	-OH
2940 y 2878	-CH ₂ -
1651	-NH ₂
1070	-OH primario
RMN ¹H (ppm)	
2.9	Triplete de los H's del C3
1.7	Quintuplete de los H's de C2
2.6	H's de NH ₂ -
3.6	Triplete de H's de C1

3.1.2 Síntesis de ácido polifosfórico n=2-2.7, donde “n” es el grado de condensación que corresponde a un exceso del 75% de las funciones P-O-P disponibles para la fosforilación. Se colocaron 100 ml de ácido ortofosfórico en un matríz bola de 250 ml provisto de agitación magnética y se pusieron a calentar en

un baño de aceite mineral a una temperatura de 240 °C durante 6 horas para obtener un ácido poli fosfórico de grado de condensación n=2 a 2.7⁽³⁵⁾. Se obtuvo un líquido incoloro de aspecto aceitoso.

Propiedad	Valor
Formula molecular	H ₂ O ₇ P ₃
Punto de ebullición °C	300
Peso molecular (g/mol)	206.93
Densidad (g/ml) _{25 °C}	2.06

3.1.3 Obtención de 3-fosfopropilamina (IR2, RMN2)

Fosforilación

En un matríz bola de 250 ml y provisto de agitación magnética, se colocaron 10 g (0.1333 mol) de 3-aminopropanol y se le agregaron 40 g (0.1999 mol) de ácido polifosfórico de grado de condensación n=2-2.7 obtenido anteriormente, se calentaron a 110 °C mediante baño de aceite durante 3 horas, al enfriarse la mezcla de reacción se obtiene un producto ligeramente amarillo muy viscoso.

Observando el espectro de RMN ¹H (**RMN2**) del producto anterior, tenemos un exceso de aminoalcohol con desplazamiento de 4.7 ppm, para eliminarlo se dejó calentando en baño maría y conectado directamente a la bomba de vacío. Nuevamente, observando el espectro de RMN ¹H (**RMN3**) tenemos que sigue apareciendo la señal del aminoalcohol (4.7 ppm) o al parecer de su sal con el mismo desplazamiento, fosfato de aminoalcohol, para desplazar el equilibrio y observar las bandas del producto se trataron 5 g de éste con 10 ml cada vez de NH₄OH al 10% disolviéndolo y concentrándolo 3 veces, una cada vez, calentando y evaporando con bomba de vacío.

El compuesto se disolvió en una solución diluida de NH₄OH (33 ml del concentrado llevado a 100 ml con H₂O destilada) se calentó en baño de agua

conectado al rotavapor y a la bomba de vacío y al final de cada operación se disolvió con H₂O destilada y se concentró de la misma forma. Queda un producto muy viscoso y soluble en agua (**RMN 3**).

Valor espectroscópico	Asignación
IR (cm⁻¹)	
2956	-OH
2940 y 2878	-CH ₂ -
1634	-NH ₂
RMN ¹H (ppm)	
2.0	Quintuplete de los H's de C2
3.1	Triplete de H's de C3
3.7	Triplete de los H's de C1
3.9	Cuadruplete de los H's del C1 por P
4.9	H's de -OH del fosfato

3.1.4 Síntesis de 3-fosfopropilamida

En un matrás bola de 100 ml se colocaron 1.0227 g del compuesto obtenido de la reacción anterior provisto de un refrigerante a reflujo con agitación magnética y canastilla de calentamiento se le agregaron 3.5 ml de anhídrido acético y 4.2 ml de piridina, se calentó lo suficiente como para dar el reflujo y se dejó así por 3 horas, se suspendió el calentamiento, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se vertió sobre 10 g de hielo picado para la hidrólisis total del anhídrido acético, no se formó ningún precipitado, se concentró al vacío y se obtuvieron 1.3 g de un líquido viscoso color ámbar, se le agregaron 3 volúmenes de H₂O destilada de 30 ml cada uno evaporándolos cada vez.

Analizando el espectro de RMN ¹H respectivo, se observó que se tiene piridina y acetato en exceso, que pudieran estar como tales o como acetato de piridinio. Para desplazar el equilibrio se disolvió NH₄OH al 30% diluido concentrados en rota vapor y después en baño maría directo y conectado a la bomba de vacío,

quedando un líquido viscoso de color café claro con un precipitado blanco, ambos muy solubles en agua. La RMN ^1H muestra dos bandas correspondientes al metilo del acetilo, debiendo ser sólo una, (era posible que la molécula estuviese plegada), también se tiene piridina. Dichas bandas que se ven en la resonancia se deben a la presencia del compuesto acetilado y la otra al acetato hidrolizado o al acetato de piridinio.

3.2 Preparación de la columna de intercambio iónico y separación de los compuestos después de la acetilación.

La resina de intercambio iónico, que se encuentra en forma de cloruros, es activada a forma de -OH haciendo pasar una solución de sosa al 5% (aprox. 500 ml), la resina es de un color crema claro y al hacer pasar la solución de sosa toma una coloración café oscuro y se calienta ⁽³³⁾. Al compuesto sin acetilar se le hizo un tratamiento previo básico con NH_4OH (descrito anteriormente). La resina se lavó con agua desionizada hasta pH neutro.

Se disolvieron 1.3063 g de la mezcla de reacción que contiene el compuesto acetilado, en la menor cantidad de agua desionizada y se integró a la resina. Se eluyó el compuesto con agua desionizada y se colectaron 10 fracciones de 100 ml cada una. Se concentró la primer muestra de 100 ml inmediatos a la aplicación de la muestra acetilada obteniendo 359.5 mg de un compuesto semisólido con olor a piridina. Se eluyó la columna con HCl al 5% colectándose 10 fracciones de 100 ml cada una. Se concentraron las fracciones ácidas quedando un residuo amarillo viscoso en las fracciones 1 y 2 que en total fueron 765.8 mg, que por RMN H^1 se observó que se separó tanto del acetato como de la piridina (**RMN4, IR3**).

Valor espectroscópico	Asignación
IR (cm^{-1})	
3356	-OH
2940 y 2878	-CH ₂ -
1651	-N-C=O de amida primaria

RMN ¹ H (ppm)	
1.85	Quintuplete de los H's de C2
2.0	Singulete de H's de C del metilo del acetilo
3.25	Triplete de los H's de C3
4.0	Triplete de los H's del C1 por P
4.8	H's de -OH del fosfato

3.3 Monitoreo y detección del compuesto organofosforado

Para visualizar lo que se tiene en las fracciones ácidas, se disolvió el concentrado de las fracciones evaporadas en la menor cantidad de agua desionizada y se aplicó en placas de papel filtro Whatman y se eluyeron con una mezcla de disolventes ^(36, 37) que modificamos después de varias pruebas variando la polaridad de la mezcla quedando las proporciones de la siguiente manera:

Compuesto	Cantidad
isopropanol	0.5 ml
THF	6 ml
H ₂ O	0.5 ml
acetona	1.0 ml
ac. p-toluen-sulfónico	0.1 g

Para el revelado de las placas se utilizó la solución de molibdato de amonio que se preparó de la siguiente manera:

Se disolvió 1 g de heptamolibdato de amonio en 8 ml de agua destilada y 3ml de HClO₄ al 70% y se llevó a un volumen de 100 ml con acetona. Se secó la placa, primero con calor (1 min.) y luego expuesta a la lampara de U.V. por 5 minutos.

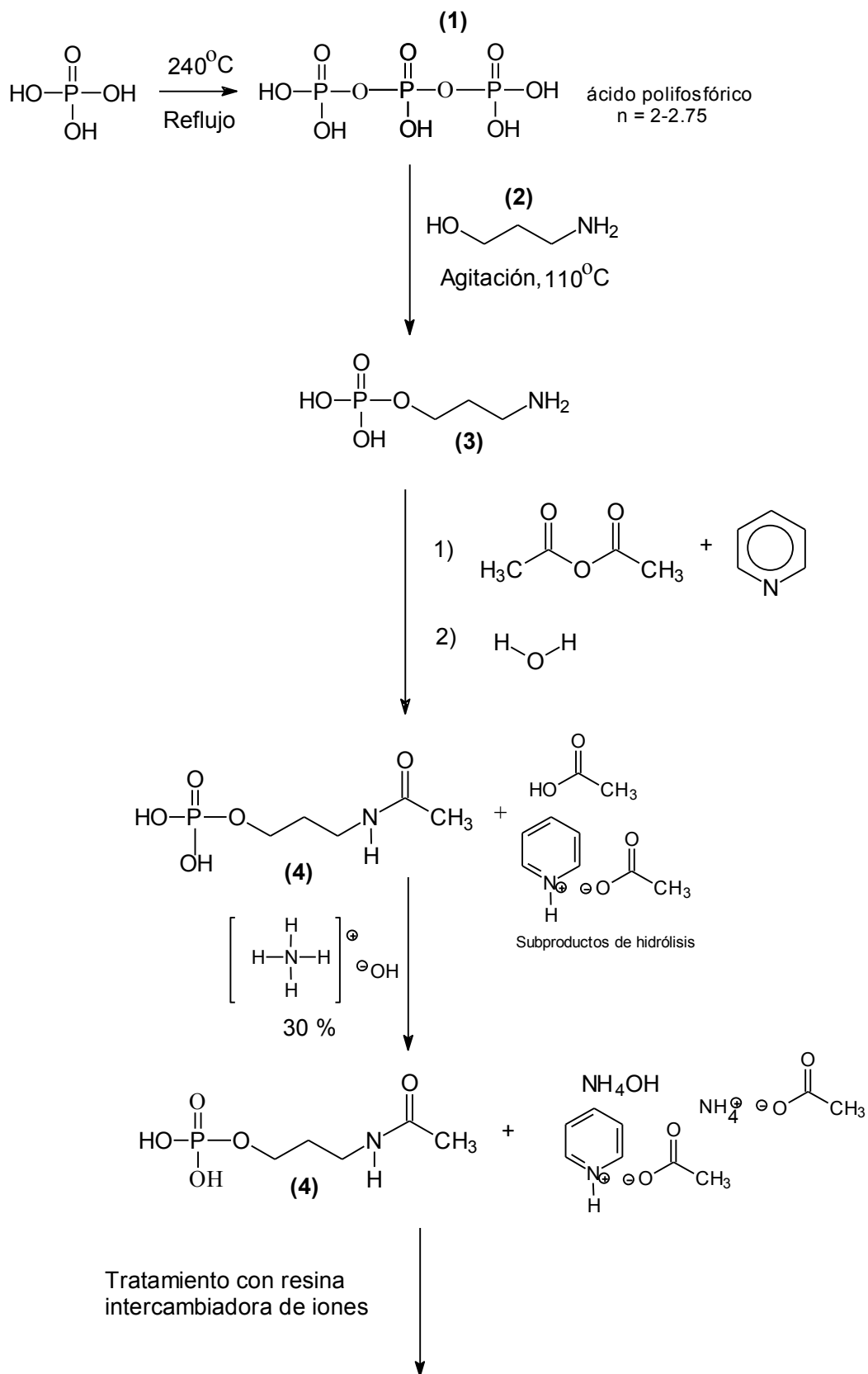
Se reveló una sola mancha verde amarilla con un R_f= 0.60.

PARTE EXPERIMENTAL

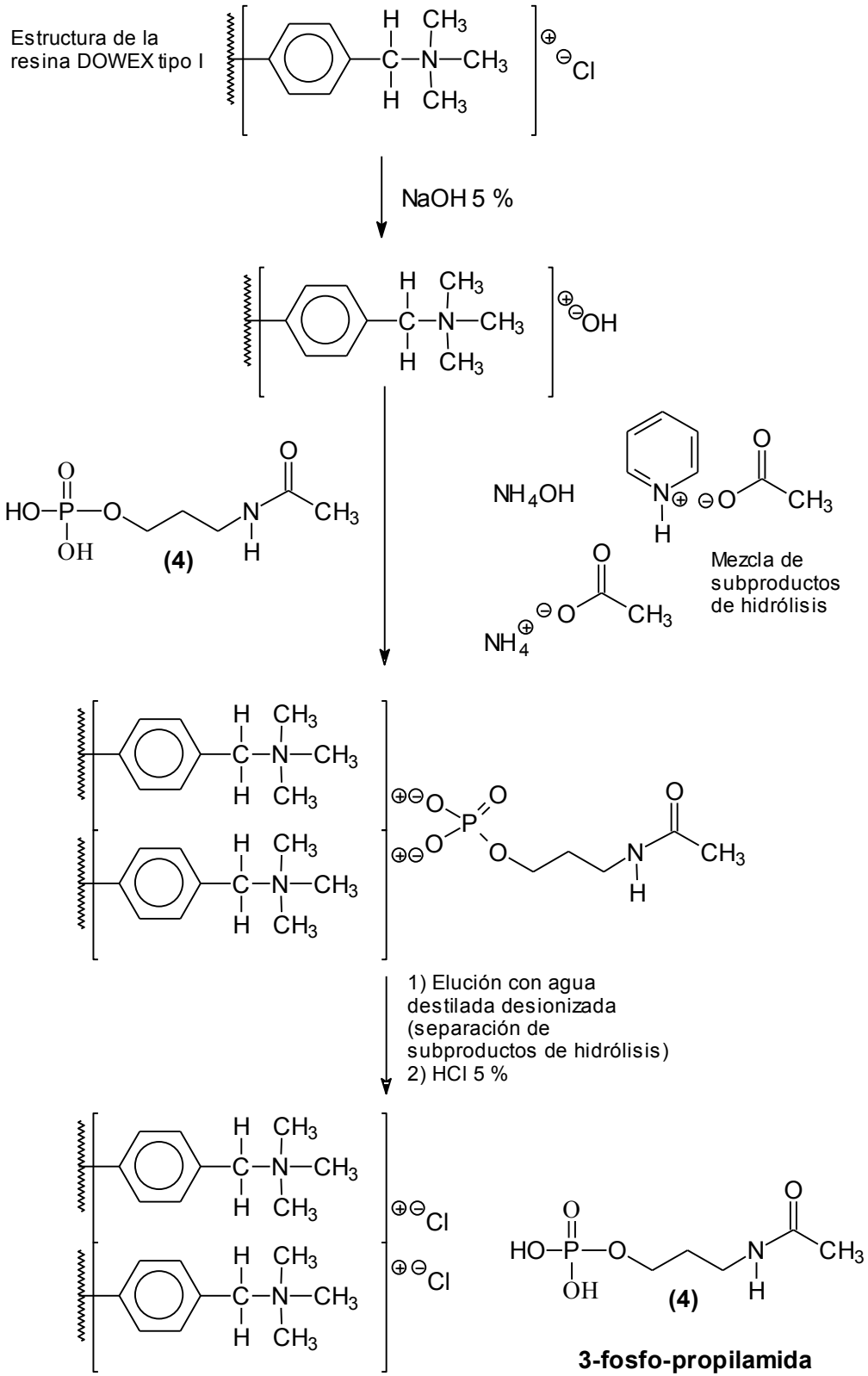
Se juntaron las fracciones correspondientes y se caracterizaron por RMN H¹ y por IR resultando ser la fosfoamida, como se muestra en la tabla de valores correspondiente.

Se realizaron dos reacciones de acetilación y su purificación de acuerdo a lo explicado anteriormente, obteniendo un rendimiento de 54.033% para 1 g. de aminofosfato y 55.8536% para 7.3391g.de aminofosfato.

3.4 Secuencia de síntesis de 3-fosfo-propilamida



PARTE EXPERIMENTAL



3.5 Metodología de síntesis de 1,2-di-O-acetilglicerofosfato

3.5.1 Purificación de fenol comercial

El fenol es higroscópico por lo que a la larga tiende a volverse un líquido semiviscoso y toma una coloración amarilla debido a impurezas de tipo orgánico, inorgánico y por presencia de algunos metales. La purificación del fenol comercial se llevó a cabo colocando 300g de éste en un matríz bola de 500 ml adaptado a un sistema de destilación quickfit conectado al vacío, destilándose un líquido incoloro que al enfriarse forma cristales blancos, destilandose aproximadamente 270 gr de éste. Para evitar que el fenol solidifique en el refrigerante a este se le hizo pasar una corriente de agua tibia.

Propiedad	Valor
Formula molecular	C ₆ H ₆ O
Punto de fusión °C	43
Punto de ebullición °C	182
Peso molecular (g/mol)	94.11
Densidad (g/ml)	1.07

3.5.2 Síntesis de difenilclorofosfato

Se colocaron 18.8221 g (mol = 0.2002) de fenol y 13 ml, 16.8 g (mol= 0.1098) de POCl₃, proporción 2:1 por la estequiometría, en un matríz bola de 100 ml con canastilla de calentamiento y agitación magnética y el condensador dispuesto a reflujo con un termómetro y una trampa de NaOH en lentejas para la absorción de HCl (g). La mezcla se dejó a reflujo a una temperatura de 106⁰C hasta que el fenol comenzó a condensarse en la columna, se quitó el reflujo y se colocó el sistema de destilación al vacío, se destiló primero el fenol que estaba en exceso entre 63-64⁰C, colectándose el cuerpo a 140-155⁰C/1.3 mmHg obteniéndose un rendimiento del 74-79 % (20 - 21.2 g) ⁽³⁸⁻⁴⁸⁾ (RMN5 e IR4).

Valor espectroscópico	Asignación
IR cm⁻¹	
3066	Anillo aromático
766 y 688	Monosustitución de anillo aromático
948	Vibraciones del grupo fosfato
RMN¹H ppm	
7.3	H's de los anillos aromáticos

3.5.3 Síntesis del cetal de la ciclohexanona

En un matr az bola de 500 ml provisto de agitación magnética y conectado a una columna empacada de fraccionamiento a reflujo con derivación para colector de humedad provisto de una trampa de CaCl₂ se colocaron (16 ml. 20 g, 0.2040 mol) de ciclohexanona y (80.164 g 85 ml, 0.8695 mol) de glicerina en 60 ml de benceno purificado y 1 g de ácido p-toluensulfónico monohidratado recristalizado.

La reacción se pone a reflujo con calentamiento moderado y agitación durante 48 horas que es el tiempo en que se homogeniza la mezcla de reacción al final de las cuales se han colectado 9 ml. de agua. Una vez ocurrido esto, se coloca la mezcla de reacción en un embudo de separación de 250 ml. al que se le agregan 20 ml. de una solución de NaOH al 10% se formó una emulsión lechosa que tarde en romperse (la agitación fué fuerte) se separó la fase orgánica la cual se lavó con porciones de agua destilada, 2 de 10 ml. cada una, una de 15 ml y una de 20 ml., una vez separada la fase orgánica a esta se le agregaron 5 gr de Na₂SO₄ anhidro para eliminar la humedad, se separó la fase orgánica y se destiló el exceso de benceno el cual destiló a 67 C ⁽⁴⁸⁻⁵³⁾.

Una vez hecho esto se colocó el sistema de destilación presión reducida destilando la cabeza a 50 C (benceno) y el cuerpo a 96 C colectándose para esta fracción 40 ml (40g., 0.2325 mol). Descendiendo después la temperatura a 64 C, se apaga el calentamiento. Señales de **RMN6 e IR5**.

Valor espectroscópico	Asignación
IR cm⁻¹	
3382	-OH
2938 y 2865	-CH ₂ -
1046	-OH primario
1002	C-O del cetal
RMN ppm	
4.0	Quintuplete de H's de C2
4.2	Señales de H's de C1
3.5	Triplete de H's de C3
2.25	H's de C5
1.7	Triplete de triplete de H's de C7
1.5	Señales de H's de C6

3.5.4 Síntesis del difenilfosfato del cetal de la ciclohexanona

En un matr az bola de 200 ml. se agregan 10 g del cetal (0.0581 mol) de la ciclohexanona, 22.395 g de difenil clorofosfato (0.0834 mol) con 5 ml. (0.0664 mol) de piridina y 100 ml de tolueno y se dejaron con agitación magnética durante 8 horas con el refrigerante a reflujo, al término del cual se separan la piridina y el tolueno por destilación a presión reducida. **RMN7 e IR6.**

Valor espectroscópico	Asignación
IR cm⁻¹	
3044	Anillo aromático
2934 y 2860	-CH ₂ -
756 y 692	Sobretonos del anillo aromático monosustituido
958 y 1024	P-O

RMN ppm	
4.2	Triplete de H's de C1
3.8	Multiplete de H's de C2
3.6	Triplete de H's de C3
2.25	H's de C5
1.7	Triplete de triplete de H's de C7
1.4	Señales de los H's de C6
7.3	H's de los anillos aromáticos

3.5.5 Síntesis del fosfato del cetal de la ciclohexanona

En un matr az bola de 300 ml. se colocaron 35.3474g del difenilfosfato del cetal de la ciclohexanona al cual se agregaron 200 ml. de una solución de Ba(OH)₂ saturada se colocó el refrigerante y se calentó hasta el reflujo durante 3 horas al término de las cuales se suspendió el calentamiento se dejó enfriar a temperatura ambiente y se neutralizó con CO₂ (hielo seco) hasta pH=6. La mezcla es filtrada mediante un embudo Buchner para retener el BaCO₃ que es un precipitado muy fino e insoluble en agua. El exceso de agua es evaporado en el rotavapor entonces la fase acuosa es extraída con éter para eliminar el fenol, se siguió evaporado la fase acuosa y al final de la evaporación queda un precipitado blanco, 9.7318g fosfato del cetal de la ciclohexanona ⁽⁵⁴⁻⁵⁹⁾, (RMN7a , IR6a).

Valor espectroscópico	Asignación
IR cm ⁻¹	
3430	-OH
2942 y 2896	-CH ₂ -
1098	-OH primario
920 y 1054	P-O

RMN1H ppm	
4.1	Triplete de H's de C1
3.9	Multiplete de H's de C2
3.6	Triplete de H's de C3
2.3	H's de C5
1.7	Triplete de triplete de H's de C7
1.5	Triplete de triplete de H's de C6
5.4	H's de los -OH

3.5.6 Síntesis de ácido glicerofosfórico

A los 9. 7318g fosfato del cetal de la ciclohexanona se le agrega una solución al 10 % de HCl (1 N) que se dejó 6 horas con agitación a temperatura ambiente y se neutralizó con NaOH al 10 % (1N) se concentró en rotavapor quedando un precipitado blanco con un peso de 3.3484 g. **RMN8, IR7.**

Valor espectroscópico	Asignación
IR cm⁻¹	
3386	-OH
2926	-CH ₂ -
1056	-OH primario
991 y 1100	P-O
RMN ppm	
3.9	Triplete de H's de C1
3.7	Multiplete de H's de C2
3.6	Triplete de H's de C3
4.8	H's de los -O-H

3.5.7 Síntesis de 1,2-di-O-acetilglicerofosfato

En un matríz redondo de 50 ml se colocaron 2.3g (0.0133mol) del ácido glicerofosfórico con 3 ml (mol = 0.032) de anhídrido acético y 8.3 ml (mol = 0.11) de piridina y se calentaron hasta el reflujo que duró 3 horas, cesa el calentamiento y se deja con agitación a temperatura ambiente durante 12 horas, terminado este período se vertió sobre 20g de hielo picado para hidrolizar por completo, se

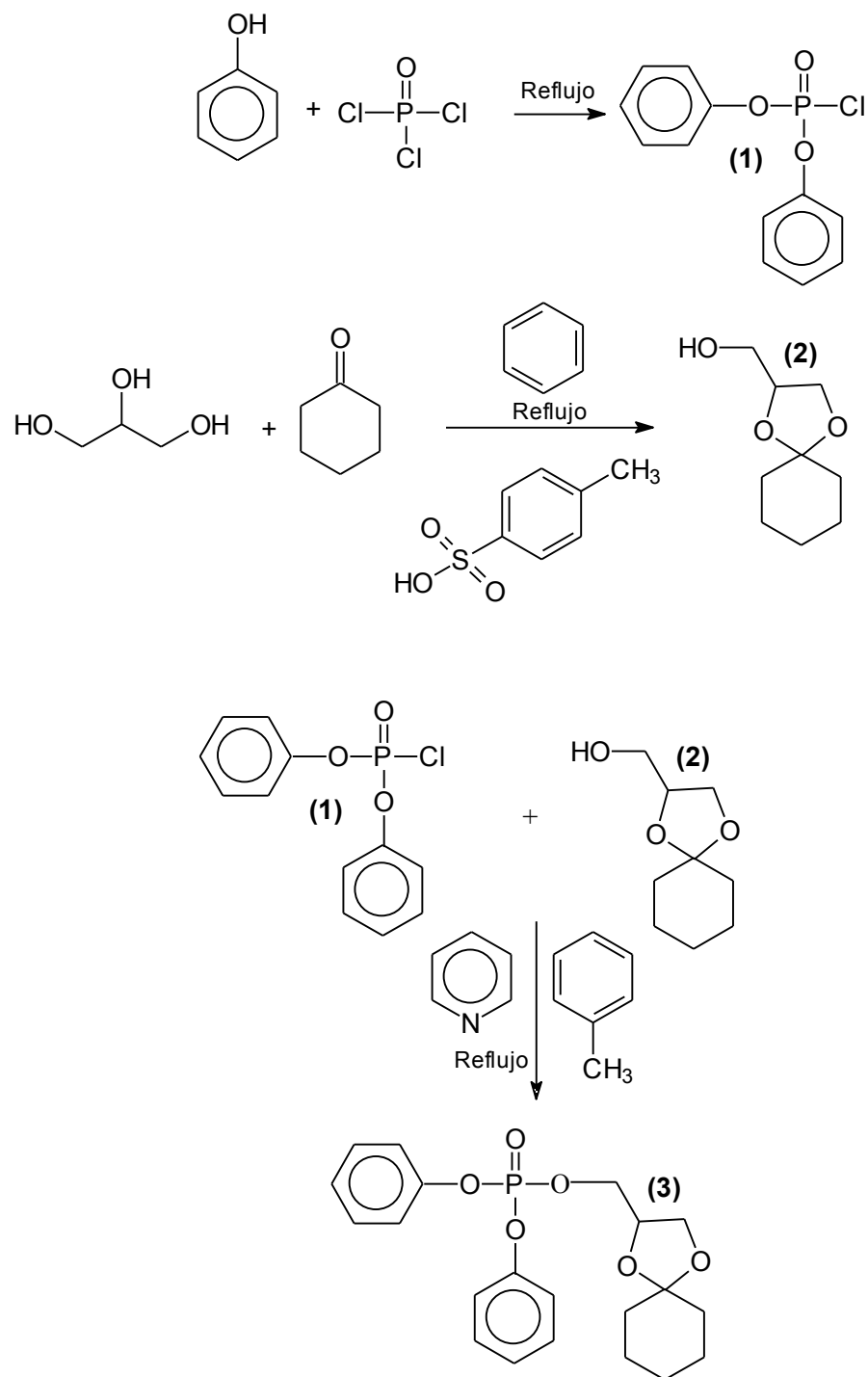
concentra en rotavapor quedando un precipitado de color blanco y con un peso de 1.9221g el rendimiento se da después del tratamiento con la resina de intercambio iónico.

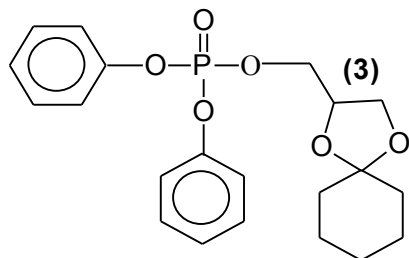
3.5.8 Separación del 1,2-di-O-acetilglicerofosfato de los subproductos de hidrólisis

Se preparó la muestra para el tratamiento mediante la columna empacada de resina de intercambio iónico como se describió para separar la fosfopropilamida, así como también el monitoreo y detección del compuesto organofosforado, es decir, con la misma mezcla de compuestos para el eluyente y como solución reveladora heptamolibdato de amonio, revelándose una sola mancha verde amarilla sobre un fondo azul intenso con un $R_f = 0.67$. Para 1 gramo de mezcla de acetilación pasada por la columna empacada de resina de intercambio iónico, se juntaron las fracciones (3 y 4) correspondientes dando un peso total 123.4 mg, de un compuesto líquido muy viscoso, se caracterizaron por RMN¹H y por IR (RMN10, IR8), se observó que se separó tanto el acetato como la piridina del 1,2-di-O-acetilglicerofosfato, para esta reacción se tiene un rendimiento del 12%.

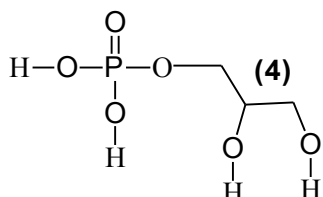
Valor espectroscópico	Asignación
IR cm⁻¹	
2896 y 2958	Carbonos alifáticos
1736	Acetilo
1006	Grupo fosfato
RMN ppm	
2.4	Triplete de H's de C1
4.2	Multiplete de H's de C2
4.0	Triplete de H's de C3
2.1	H's de metilos del acetilo

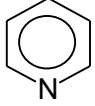
3.6 Secuencia de síntesis de 1,2-di-O-acetilglicerofosfato

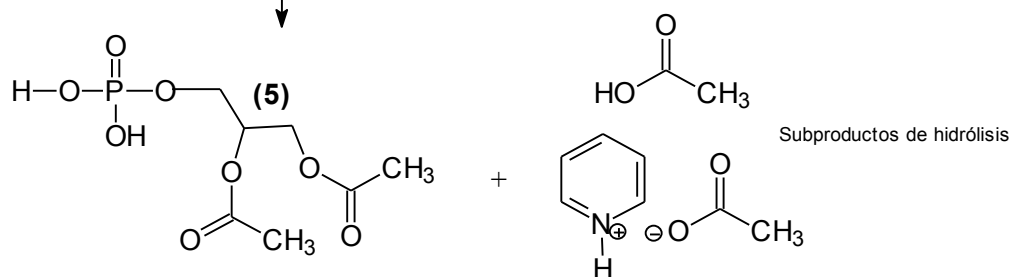




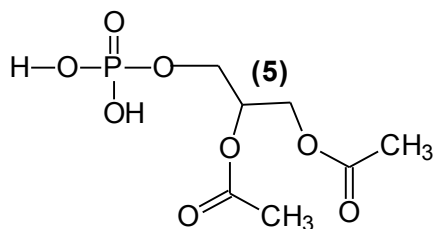
- I) Soln. Ba(OH)₂ saturada reflujo
- II) Neutralización con CO₂ (hielo seco)
- III) HCl al 3% agitación a temp. ambiente
- IV) Filtración embudo Buchner
- V) Extracción con éter
- VI) Fase acuosa con HCl 10%, reflujo



- VII) CC(=O)OC(=O)C  Reflujo
- VIII) H₂O



Tratamiento con resina de intercambio iónico



1,2-di-O-acetilglicerofosfato

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis de 3-fosfopropilamida

4.1.1 Materia prima 3-aminopropanol

Se dispuso de este reactivo de los disponibles en el laboratorio y se procedió a caracterizarlo por RMN ^1H y por IR (**RMN1**, **IR1**) Tabla 1 página 49.

En la espectroscopia de infrarrojo (Apéndice **IR1**), se observan los diferentes grupos funcionales presentes en la molécula. Se presentaron las bandas de alargamiento C-H de metilenos en 2940 cm^{-1} , que se comprueban con las bandas de 1434 cm^{-1} . La banda de 3356 cm^{-1} indica la presencia de $-\text{OH}$ de alcohol primario que se verifica con la banda en 1070 cm^{-1} . Otra banda a 1651 cm^{-1} nos señala que tenemos una amina $-\text{NH}_2$ primaria.

De acuerdo con el espectro **RMN1** se tienen áreas relativas de proporción 1:3:1. Tenemos un triplete a 3.6 ppm por el acoplamiento de los H's de C1 con los H's de C2 que integran para 1 protón. De tablas verificamos que los H's de C's unidos a átomos de elementos electronegativos como halógenos y O tienen un desplazamiento químico entre 3 y 4 ppm. Tenemos un quintuplete a 1.7 ppm por el acoplamiento de los H's de C2 con los H's de C1 y C3; integra para un protón. Se tiene un desdoblamiento de los protones de C2 por los protones de C1 y C3. Los protones de metilenos ($-\text{CH}_2-$) tienen un desplazamiento químico en 1.3 ppm, pero puede estar desplazado a campo bajo por el desapantallamiento de los C's unidos al oxígeno. Tenemos un triplete a 2.9 ppm por el acoplamiento de los H's de C3 con los H's de C2; integra para 3 protones. Tenemos un singulete ancho a 2.6 ppm de los H's de $-\text{NH}_2$, que se puede verificar con la adición de agua deuterada, si desaparece o disminuye de intensidad.

4.1.2 Compuesto ácido polifosfórico

Se utilizó ácido fosfórico disponible en el laboratorio que por calentamiento a reflujo y alta temperatura sufre deshidratación formando ácido polifosfórico de grado de condensación que corresponde a un exceso del 75% de las funciones

P-O-P disponibles para la fosforilación, sus propiedades físicas se describen en la tabla 1, página 50.

4.1.3 Compuesto 3-fosfopropilamina

Después de efectuar la reacción entre el 3-amino-propanol y el ácido polifosfórico, de acuerdo a lo descrito en la parte experimental, y al observar el espectro de RMN ^1H (Apéndice **RMN2**), se tiene un exceso del aminoalcohol por la señal en 4.9 ppm, después de realizar el tratamiento para desplazar el equilibrio hacia la formación de la fosfopropilamina mediante el uso de hidróxido de amonio diluido, tenemos las siguientes observaciones de la espectroscopia (**IR2** y **RMN2**).

De la espectroscopia de IR, **IR2**, observamos las principales bandas debidas a las siguientes grupos orgánicos característicos; las bandas de $-\text{CH}_2-$ metilenos en 2940 cm^{-1} y 2878 cm^{-1} , del $-\text{OH}$ del fosfato a 3356 cm^{-1} , y otra a 1651 cm^{-1} del $-\text{NH}_2$, amina primaria.

De **RMN2**, tenemos un triplete a 3.7 ppm por el acoplamiento de los H's de C2 con los H's de C1 que integran para 2 protones. De tablas verificamos que los H's de C's unidos a átomos de elementos electronegativos como halógenos y O tienen un desplazamiento químico entre 3 y 4 ppm. Tenemos un cuadruplete a 3.9 ppm por el acoplamiento a larga distancia de los H's de C1 con los H's de $-\text{OH}$ del fosfato. Tenemos un quintuplete a 2.0 ppm por el acoplamiento de los H's de C2 con los H's de C1 y C3; integra para 2 protones. Se tiene un desdoblamiento de los protones de C2 por los protones de C1 y C3. Los protones de metilenos ($-\text{CH}_2-$) tienen un desplazamiento químico en 1.3 ppm, pero puede estar desplazado a campo bajo por el desapantallamiento de los C's unidos al oxígeno. Tenemos un triplete a 3.1 ppm por el acoplamiento de los H's de C3 con los H's de C2; integra para 2 protones. En 4.9 ppm tenemos la acumulación de señales de H's de $-\text{OH}$ del fosfato.

4.1.4 Compuesto 3-fosfopropilamida

Después de llevar acabo la acetilación de la 3-fosfopropil-amida, nos encontramos con la problemática de separar los compuestos obtenidos, esto

debido a la gran solubilidad que presentaron en agua y casi nula ante los solventes orgánicos típicos. El espectro de RMN ^1H nos muestra la presencia de piridina y de subproductos de hidrólisis; para lograr esta separación, y después de estudiar la purificación de productos muy polares y el comportamiento del producto en solución, se hizo el tratamiento de este en una columna empacada con resina de intercambio iónico. Después del tratamiento de la mezcla, según describe la parte experimental, y de coleccionar y concentrar las fracciones correspondientes, se tienen las siguientes observaciones de los espectros de IR y RMN ^1H (**IR3** y **RMN4**).

Del espectro de infrarrojo correspondiente, (**IR3**), tenemos una banda de desplazamiento en 3356 cm^{-1} correspondientes al grupo fosfato, las correspondientes a los metilenos a 2940 cm^{-1} y 2878 cm^{-1} , otra en 1651 cm^{-1} correspondiente a la amida $-\text{N}-\text{C}=\text{O}$.

De **RMN4** tenemos un quintuplete a 1.85 ppm por el acoplamiento de los H's de C2 con los H's de C1 y C3 que integra para 5 protones. Tenemos un singulete a 2.0 ppm por los H's del metilo en el grupo acetilo que integra o tiene un área relativa de 3 (3H's). De tablas verificamos que estos protones del metilo en acetilo desplazan entre 2.1 y 2.6 ppm, se tendrán variaciones de acuerdo a la concentración de la muestra. Tenemos un triplete a 3.25 ppm por el acoplamiento de los H's de C3 con los H's de C2; integra para 2 protones. Tenemos un cuadruplete a 4.0 ppm por el acoplamiento a larga distancia de los H's de C1 con los H's de los HO- del fosfato y por acoplamiento con los H's de C2. En 4.8 ppm tenemos la acumulación de señales de H's de $-\text{OH}$ del fosfato.

4.2 Obtención de 1,2-di-O-acetilglicerofosfato

4.2.1 Materia prima fenol

Se realizó la purificación del fenol comercial, como se describe en la parte experimental, y cuyas propiedades físicas se muestran (Tabla1 pág. 57)

4.2.2 Compuesto difenilclorofosfato

En la espectroscopia de IR (**IR4**) se observan las bandas correspondientes a los diferentes grupos funcionales presentes en la molécula. El grupo de bandas de alargamiento a 3066 cm^{-1} correspondientes a la presencia de anillos aromáticos, en 766 cm^{-1} y 688 cm^{-1} indicadores de la monosustitución del anillo aromático y en 948 cm^{-1} las vibraciones del grupo fosfato.

De **RMN5**, para este compuesto sólo se esperan H's de un solo tipo, este tipo de protones se acoplan unos a otros de una manera compleja en 7.3 ppm. El área relativa integra para 10 protones.

4.2.3 Compuesto cetal de la ciclohexanona

De los espectros de Infrarrojo y RMN ^1H , **IR5** y **RMN6** del apéndice, tenemos que, en el caso de la espectroscopia de infrarrojo, observamos bandas a 3382 cm^{-1} del grupo $-\text{OH}$ del cual verificamos es de un alcohol primario debido a la banda en 1046 cm^{-1} , los desplazamientos de los metilenos $-\text{CH}_2-$ a 2938 cm^{-1} y 2865 cm^{-1} ; C-O del cetal a 1002 cm^{-1} .

De **RMN6** tenemos que los protones de C2 tienen acoplamiento con el protón metino C2 y los protones de C2 por lo que se observa un multiplete (quintuplete) en 4 ppm, de tablas de Wade se tiene un desplazamiento químico para los H's de metino (H-C-O saturado) de entre 3 y 4 ppm para H's enlazados a carbonos unidos a O u halógenos. Los protones de C6 tienen acoplamiento con cuatro protones de dos carbonos adyacentes C5 y C7, que integra para 1 H en 1.5 ppm. Los protones de C3 tienen acoplamiento con el protón metino C2 por lo que se observa un triplete en 3.5 ppm que integra para

3 H's, de tablas se tiene un desplazamiento químico para los H's de metino (H-C-O saturado) de entre 3 y 4 ppm para H's enlazados a carbonos unidos a O u halógenos. Los protones de C5 tienen acoplamiento con los protones metilenos de C6 con una señal de cuadruplete a 2.25 ppm. Los protones de C7 son equivalentes por su entorno tienen acoplamiento con los protones metilenos de C6 con una señal de triplete de triplete a 1.7 ppm que integra para 6 protones. El H del -OH se presenta como un pico ancho en 5.4 ppm que disminuye de intensidad al hacer el experimento con agua deuterada.

4.2.4 Compuesto difenilfosfato del cetal de la ciclohexanona

Los grupos funcionales que revela la espectroscopia de infrarrojo (Apéndice IR6) son las bandas en 3044 cm^{-1} correspondientes al anillo aromático, en 2934 cm^{-1} y 2860 cm^{-1} las bandas de los metilenos -CH₂-, los sobretonos del anillo aromático monosustituido en las bandas de 756 cm^{-1} y 692 cm^{-1} , las bandas de P-O se observan en 958 cm^{-1} y 1024 cm^{-1} .

La RMN ¹H, **RMN7**, muestra en 7.3 ppm tenemos las señales complejas de los acoplamientos de los H's de los anillos aromáticos del fosfato que integra para 10 protones. Los H's del C1 se acoplan al protón del metino de C2, en forma de triplete a 4.2 ppm, el desplazamiento de H's unidos a carbonos enlazados a elementos electronegativos como halógenos u oxígeno se observa entre 3 y 4 ppm, es posible que se encuentren desplazados un poco más a campo bajo por la interacción de los oxígenos del fosfato. El protón metino del C2 esta acoplado a los 2 H's de C1 y a 2 H's de C3, esta observando 4 H's de dos carbonos adyacentes en forma de multiplete (quintuplete) que integra para un protón en 3.8 ppm. Los protones del metileno de C3 se acoplan con el protón metino de C2 a 3.6 ppm en forma de triplete. Los protones de los metilenos de C5 se acoplan con los protones de C6 en un cuadruplete a 2.25 ppm. Los protones de los metilenos de C6 y se acoplan con los protones de C5 y C7 en triplete de triplete, o de manera compleja, a 1.4 ppm. Los H's de C7 tienen acoplamiento con los H's de C6 con una señal de triplete de triplete a 1.7 ppm.

4.2.5 Compuesto fosfato del cetal de la ciclohexanona (IR6a, RMN7a)

Los grupos funcionales que revela la espectroscopia de infrarrojo, **IR6a**, son las bandas en 3430 cm^{-1} correspondientes al $-\text{OH}$, en 2942 cm^{-1} y 2896 cm^{-1} las bandas de los metilenos $-\text{CH}_2-$, en 1098 cm^{-1} de $-\text{OH}$ primario, las bandas de P-O se observan en 920 cm^{-1} y 1054 cm^{-1} .

De **RMN7a**, los H's del C1 se acoplan al protón del metino, C2, en forma de triplete a 4.1 ppm, el desplazamiento de H's unidos a carbonos enlazados a elementos electronegativos como halógenos u oxígeno se observa entre 3 y 4 ppm, es posible que se encuentren desplazados un poco más a campo bajo por la interacción de los oxígenos del fosfato. El protón metino del C2 esta acoplado a los 2 H's de C1 y a 2H's de C3, esta observando 4 H's de dos carbonos adyacentes en forma de quintuplete que integra para un protón en 3.9 ppm, para H's metino este desplazamiento (de tablas) se observa entre 1.4 y 1.6 ppm. Los protones del metileno de C3 se acoplan con el protón metino de C2 a 3.6 ppm en forma de triplete. Los protones de los metilenos de C5 se acoplan con los protones de C6 en un cuadruplete a 2.3 ppm. Los protones de los metilenos de C6 son equivalentes entre ellos y se acoplan en triplete de triplete, o de manera compleja, a 1.5 ppm. Los protones de los metilenos de C7 se acoplan en triplete de triplete o de manera compleja a dos metilenos adyacentes de C6 a 1.7 ppm. En 5.4 ppm tenemos u pico ancho de $-\text{OH}$ que se verifica al correr el espectro en agua deuterada.

4.2.6 Compuesto ácido glicerofosfórico

Del espectro de infrarrojo, **IR7**, observamos bandas a 3386 cm^{-1} del grupo $-\text{OH}$ del cual verificamos es de un alcohol primario debido a la banda en 1056 cm^{-1} , los desplazamientos de los metilenos $-\text{CH}_2-$ alrededor de 2926 cm^{-1} , las bandas de P-O se observan en 991 cm^{-1} y 1100 cm^{-1} .

De **RMN8** tenemos que en 4.8 ppm tenemos una señal ancha de los acoplamientos de los H's de los $-\text{OH}$ que disminuye al repetirse el experimento con la muestra disuelta en agua deuterada. Los H's del C1 se acoplan al protón del metino, C2, en forma de triplete a 3.9 ppm, el desplazamiento de H's

unidos a carbonos enlazados a elementos electronegativos como halógenos u oxígeno se observa entre 3 y 4 ppm, es posible que se encuentren desplazados un poco más a campo bajo por la interacción de los oxígenos del fosfato. El protón metino del C2 esta acoplado a los 2 H's de C1 y a 2H's de C3, esta observando 4 H's de dos carbonos adyacentes en forma de multiplete a 3.7 ppm, (para H's metino este desplazamiento (de tablas) se observa entre 1.4 y 1.6 ppm). Los protones del metileno de C3 se acoplan con el protón metino de C2 a 3.6 ppm en forma de triplete, de tablas (H-C-O) saturado el desplazamiento químico de este protón está entre 3 y 4ppm.

4.2.7 Compuesto 1,2-di-O-acetilglicerofosfato

Para purificar este producto y separarlo de los subproductos de hidrólisis después de la acetilación, se hizo el tratamiento mediante resina de intercambio iónico, descrito en la parte experimental, como se hizo con la fosfopropilamida, debido a que presentó las mismas complicaciones y características de solubilidad.

Después del tratamiento con resina de intercambio iónico, los grupos funcionales que revela la espectroscopia de infrarrojo, **IR8**, son las bandas en 2896 cm^{-1} y 2958 cm^{-1} las bandas de los metilenos $-\text{CH}_2-$, las bandas de P-O del fosfato se observan en 1006 cm^{-1} y en 1736 cm^{-1} los del grupo acetilo.

De **RMN10**, los H's de C1 se acoplan al protón del metino, C2, en forma de triplete a 2.4 ppm, el desplazamiento de H's unidos a carbonos enlazados a elementos electronegativos como halógenos u oxígeno se observa entre 3 y 4 ppm, es posible que se encuentren desplazados un poco más a campo alto por la interacción de los oxígenos del fosfato. El protón metino del C2 esta acoplado a los 2 H's de C1 y a 2 H's de C3, esta observando 4 H's de dos carbonos adyacentes en forma de multiplete en 4.2 ppm, para H's metino este desplazamiento (de tablas) se observa entre 1.4 y 1.6 ppm el que esté desplazado a campo más bajo se puede deber a los oxigenos que tienden a desapantallar a ese protón. Los protones del metileno de C3 se acoplan con el protón metino de C2 a 4.0 ppm en forma de triplete, de tablas (H-C-O) saturado

el desplazamiento químico de este protón está entre 3 y 4 ppm. Se observa que los protones de los metilos del grupo carbonilo desplazan a 2.1 ppm como singulete que integra para 6 H's, este es el desplazamiento que describe la literatura de los metilos unidos a grupo carbonilo.

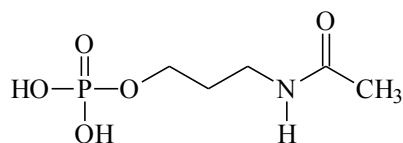
4.3 Separación de los compuestos acetilados de los subproductos de hidrólisis mediante columna empacada con resina de intercambio iónico

Debido a que los compuestos y subproductos de hidrólisis de la acetilación muestran gran solubilidad en agua y no en otros disolventes de tipo orgánico como acetato de etilo, cloroformo, hexano, tolueno, etc., así como en mezclas de éstos, se hicieron aplicaciones para su cromatografía en placas de papel filtro que se eluyeron con una mezcla de etanol-agua (1:1) y se revelaron con yodo, mostrando sólo dos manchas.

Entre las pruebas que se hicieron para tratar de separarlos tenemos una cromatografía en silica gel flash que no resultó viable por ser ésta soluble en agua y por no retener los compuestos, se probó una columna empaquetada con carbón activado que resultó no ser efectiva por la extrema lentitud del flujo, también se probó con una columna empaquetada con papel filtro molido que tampoco mostró ninguna retención. En todos los casos la elusión se hizo con agua destilada.

Después de toda esta problemática y de estudiar la purificación de productos muy polares y las propiedades del producto en solución, se contempló la posibilidad de usar una resina intercambiadora de iones ^(13, 60-66). Considerando los pKa's del compuesto organofosforado ⁽⁶⁷⁾ se puede trabajar el compuesto en un rango grande de pH ⁽⁶⁸⁻⁷¹⁾.

La resina que se usó fue la DOWEX 1 intercambiadora de aniones básica fuerte con una capacidad de intercambio de 1.2 meq/g, se usaron los 100 g de resina (120 meq), de acuerdo con esto se podían usar hasta 11.8272 g de mezcla para separar los compuestos.



$C_5H_{12}NO_5P$ 197.12 g/mol tiene 2 equivalentes por el nitrógeno.

Peso equivalente = peso molecular / no. de equivalentes

Peso equivalente = (197.12 g/mol) / 2

Peso equivalente = 98.56 g / mol

Peso mequivalente = 98.56 mg / mmol

(98.56 mg / mmol x 120 meq) x (1000mg / 1g) = 11.8272 g

4.3.1 Preparación de la columna de intercambio iónico

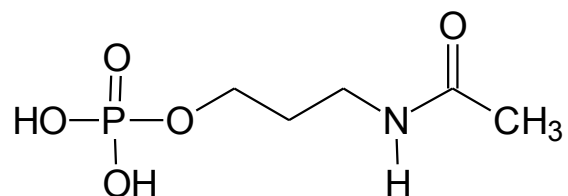
La resina que se usó fue la DOWEX 1 intercambiadora de aniones básica fuerte con una capacidad de intercambio de 1.2 meq/g, se usaron los 100 g de resina (120 meq), de acuerdo con esto se podían colocar hasta 10.26 g de mezcla para separar el producto de los subproductos de hidrólisis, ácido acético y acetato de piridinio.

La resina que se encuentra en forma de cloruros $-Cl$, es activada a forma de $-OH$ haciendo pasar una solución de sosa al 5% (aprox. 500 ml), la resina es de un color crema claro y al hacer pasar la solución de sosa toma una coloración café oscuro y se calienta. La reacción de intercambio iónico de $-OH$ por $-Cl$ es exotérmica. La resina se lavó con agua destilada y desionizada hasta pH neutro.

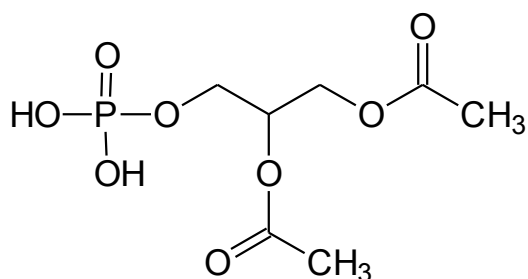
El monitoreo y detección de los compuestos organofosforados se llevó a cabo con la mezcla de eluyentes descrita en la parte experimental y las placas de elusión fueron reveladas con heptamolibdato de amonio, página 53.

5. CONCLUSIONES

Se lograron sintetizar, purificar y caracterizar por espectroscopia de infra rojo (IR) y resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H) los siguientes compuestos organofosforados:



3-fosfopropilamida



1,2-di-O-acetilglicerofosfato

Se están haciendo estudios de actividad inhibidora de los mismos, cuyos resultados serán reportados posteriormente.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) European Commission, European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research. COST B9 Action on Chemotherapy of Protozoal Infections 1997-2002. Final report.
- (2) Croft, S., Barret. M. and Urbina, J., Trends in Parasitology, Vol. 21, No. 11, November 2005, 508-512.
- (3) Michels, P. A. M., Hannaert, V. and Bringaud, F., Parasitology Today, 16 (2000), 482-489.
- (4) Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica, 8ª edición, Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V. 1991, México D.F., p.p. 980-90
- (5) Dr. W. Hol Comunicación personal (Washington University) 1992.
- (6) Jawetz, Ernst., Melnick, Joseph., y Adelberg, Edward., Microbiología Médica, 15a edición, Ed. Manual Moderno, México, 1983.
- (7) Croft, S., Seifert, K. and Duchene, M., Molecular & Biochemical Parasitology, 126 (2003), 165-172.
- (8) Euler (von), H., and A. Bernton,. Ver., 60, 1720 (1927).
- (9) F. M. D. Vellieux, (personal communication) R. J. Real, (personal communication) 1991.
- (10) Opperdoes, F. R. and Michaels, P. A. M., International Journal of Parasitology, 31 (2001), 482-490.
- (11) Stich, A., Abel, P. and Krishna, S., British Medical Journal, (2002), Volume 325, 203-206.
- (12) Jones, P. M. and George, A. M., International Journal of Parasitology, 35 (2005), 555-566.
- (13) M. H. Hack and F. M. Helmy, J. Chromatog., 1976,120,502.
- (14) G. M. Kosolapoff., L. Maier, Organic Phosphorous Compounds, Wiley Interscience, 1973, Printed in U.S.A., Cap. 15: Organic Derivatives of Phosphoric Acid.
- (15) Halman, M., J. Chem. Soc., 1954, 2158.
- (16) Reich, W. S., Nature, 157, 133 (1946).

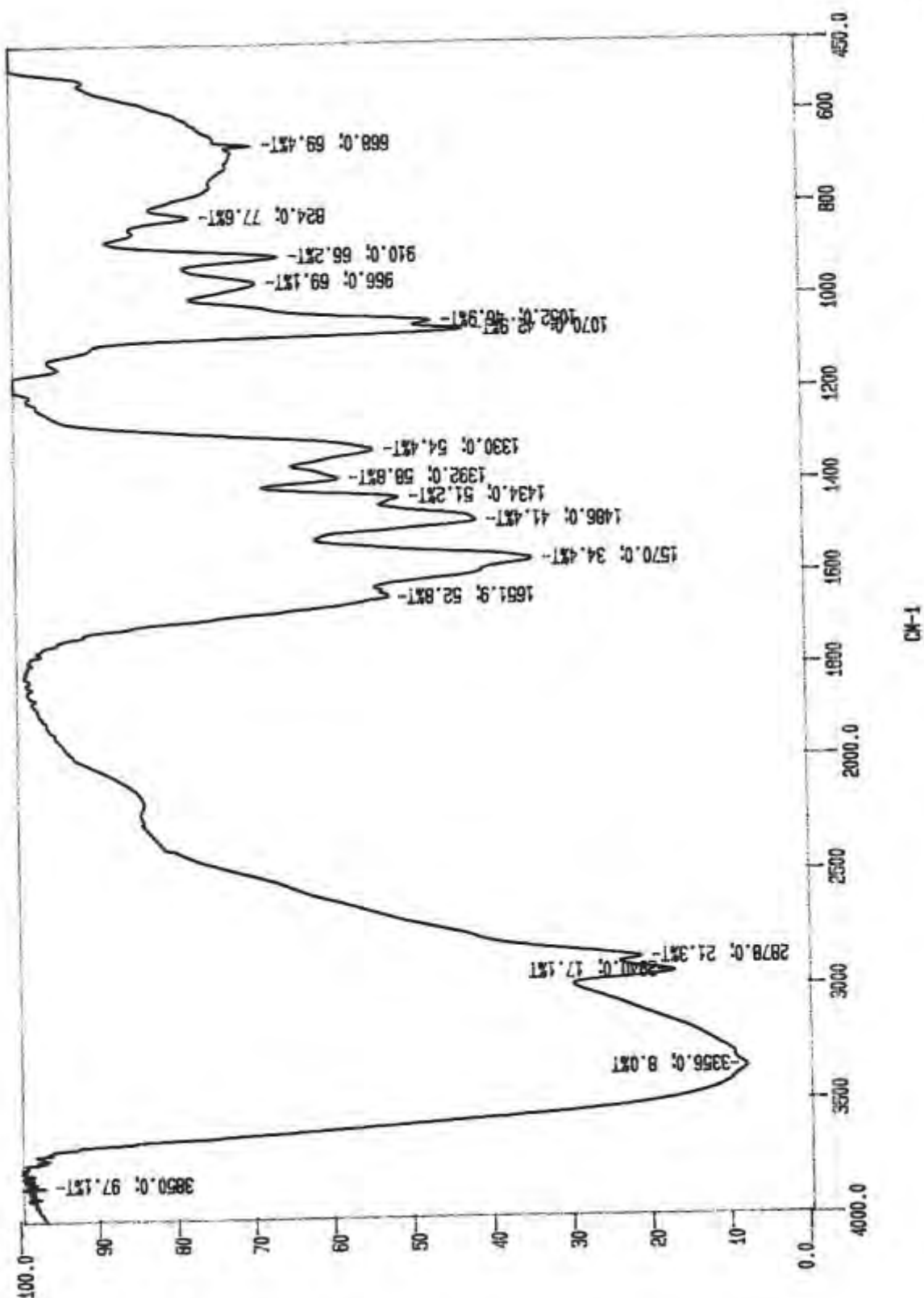
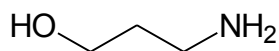
- (17) Fischer, E., Ber., 47, 3193 (1914).
- (18) Bailly, O., and J. Gaumé, Bull. Soc. Chim. (5), 3, 1396 (1936).
- (19) Cavalier, J., Compt. Rend., 127, 114, (1898).
- (20) Plimmer, R. H. A. and W. J. N. Burch, J. Chem. Soc., 1929, 279, 292.
- (21) Bailly, O., Compt. Rend., 206, 1902 (1938).
- (22) Bailly, O., Compt. Rend., 208, 443 (1939).
- (23) Bailly, O., and J. Gaumé., Compt. Rend., 199, 793, (1934); 198, 2258, (1934).
- (24) Darmon, M., Bull. Soc. Chim. France, 1942, 262.
- (25) Plimmer, R. H. A., Biochem. J., 35, 461, (1941).
- (26) Verckade, P. E., J. C. Stoppelenburgh and W. Cohen, Rec. Trav. Chim., 59, 886, (1940).
- (27) Desjobert, A., Compt. Rend. 224, 575 (1947), Bull. Soc. Chim, 1947, 809.
- (28) Claus, A. and O. Zimmermann, Ber., 14, 1482, (1881).
- (29) Bailly, O. Bull. Soc. Chim, 9, 314, 340, 405, 421, (1942).
- (30) Fleury, P., and J. Courtois, Bull. Soc. Chim., France, 8 397 (1941).
- (31) E. Cherbuliez, J. Rabinowitz., Helvetica Chimica Acta, 174, 29 (1956).
- (32) H. Hart., D. J. Hart., L. E. Craine., Química Orgánica, Ed. McGraw-Hill, 9a. Ed., 1995. Cap. 9: Aldehídos y cetonas.
- (33) Wilson y Wilson`s., Comprehensive Analytical Chemistry. II^B. Ion Exchangers., Elsevier Science Publishers Co. Inc. New York, N.Y. 1991
- (34) Kunin Robert., Ion Exchange Resins, Ed. J. Wiley New York, Reprinted 2nd ed., 1990, 512 p.
- (35) Cherbuliez Emile et J. Rabinowitz., Helvetica Chimica Acta, Vol. XXXIX, Fasciculus V (1956), no. 174.
- (36) Macherey-Nagel Düren., T.L.C. Thin Layer Chromatography. MN, Application 84, Separation of Phosphoric acid derivatives., pp. 84 y 99,1994.
- (37) R. G. Maile et al., J. Chromatogr., 132, (1977) 366.
- (38) Walsh, E. N., J. Am.Chem.Soc., 1959, 81,3023.
- (39) Rapp, M. Justus Liebigs, Ann. Chem., 1884, 224, 156.

- (40) Atherton., J. Chem. Soc., 1106 (1948).
- (41) Atherton et al., U.S. pat. 2490573 (1949 to Hoffman-La Roche).
- (42) Sir Derek Barton and W. David Ollis, Comprehensive Organic Chemistry, Diphenyl phosphochlorhydrate, 2,1218, 1267; 5, 127, 348, Ed. Oxford Pergamon, 1979.
- (43) F. Cramer, in "Newer Methods of Preparative Organic Chemistry", Ed. W. Forest Academic, New York, 1964, Vol. 3, pp. 319.
- (44) D. M. Brown., Adv. Org. Chem., 1963, 3, 75.
- (45) E. Baer., Biochem. Preps., 1, 50, (1951).
- (46) C. E. Ballov., Biochem. Preps., 7, 45, (1960).
- (47) P. Brigl and Müller., Ber., 72, 2121, (1939)
- (48) Newman, M. S., Org. Synth. Vol. III, pag. 502, 1955.
- (49) Lipshutz, Bruce H., Moretti, Robert and (in part) Crow, Robert., Tetrahedron Letters., vol. 30, no. 1, pp. 15-18, 1989.
- (50) M. M. Maglio, C. A. Burger., J. Am. Chem. Soc., 68, 529, (1945).
- (51) Pérez Jimeno Francisco., CAS. 97: 55794v. (Calipe S. A.) Span. ES 499129 (Cl. C072D317), 01 Jan. 1982.
- (52) Mikschik Edgar inventor; Austrian Pat. 180926 (1955 to Chemomedia Chemikalien) C.A. 49, 15951, 1955.
- (53) Brown and Macbride., Chem. and Ind., 1963, 103.
- (54) A. J. Showler and P. A. Darley., Chem. Rev., 1967, 67, 42.
- (55) C. Piantadosi et al., J. Org. Chem., 1963, 28, 2425.
- (56) M. L. Wolfrom, A. B. Diwatkar, J. Gelas and D. Horton., Carbohydr. Research., 1974, 35, 87.
- (57) E. J. Corey, S. Kim, S. Yoo, J. Am. Chem. Soc., 1978, 100, 4620.
- (58) C. Piantadosi, C. E. Anderson, E. A. Bretch and C. L. Yarbrow., J. Am. Chem. Soc., 80, 6613, (1958).
- (59) B. R. Brown and H. A. H. MacBride, J. Chem. Soc., 3822 (1964).
- (60) G. Volckaert, W. Min. Joy and W. Fiers., Analyt. Biochem., 1976, 72, 433.
- (61) N. Salen, jun, L. G. Aboud and W.H.Hoss., Analyt. Biochem., 1976, 76, 407.

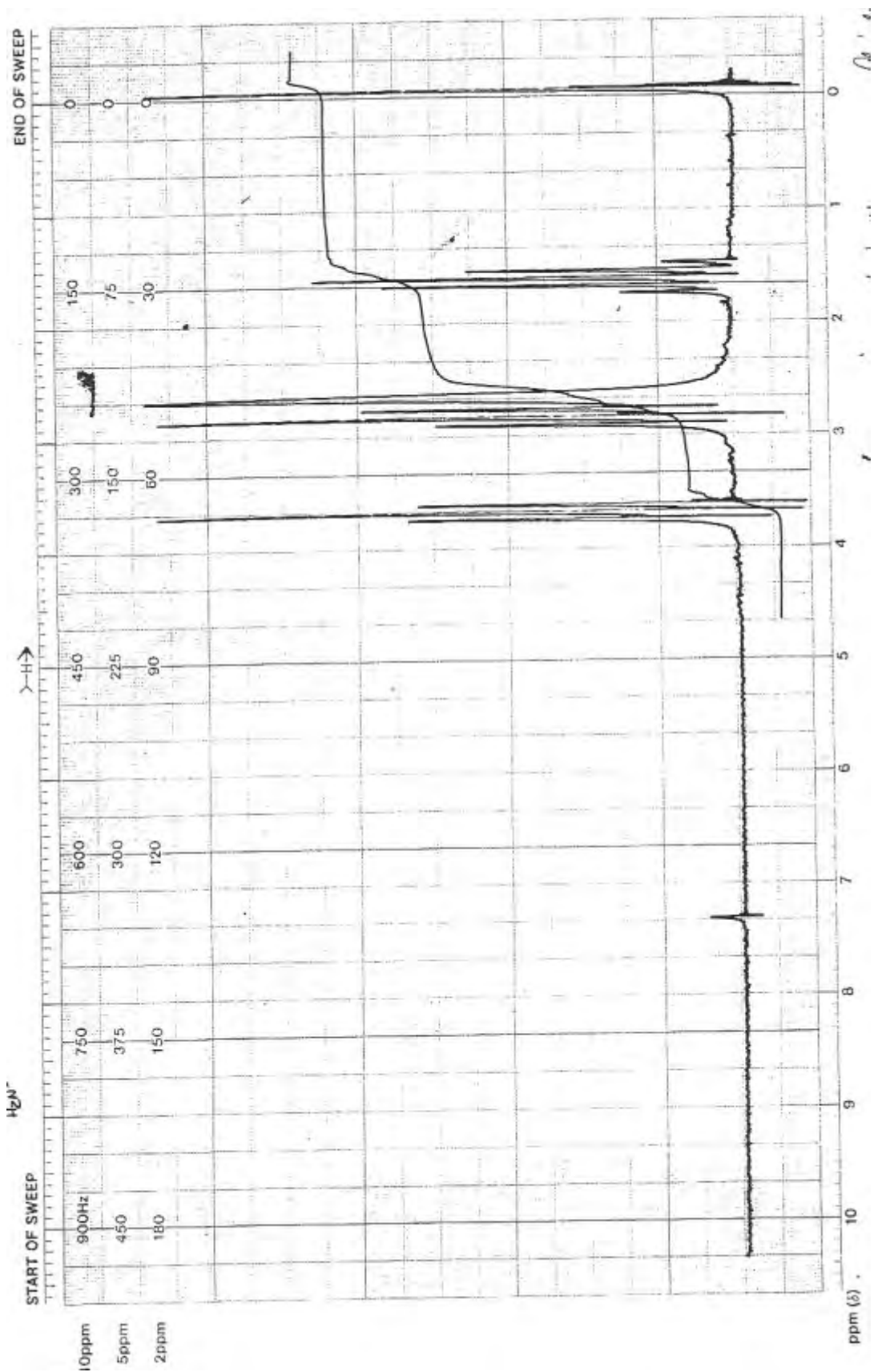
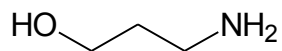
- (62) R. J. Maile, jun. and G. J. Fischesser., *J. Chromatog.*, 1977,132, 366.
- (63) W. Kreis, A. Greenspan, T. Woodcock and C. Gordon., *J. Chromatog. Sci.*, 1976,14, 331.
- (64) E. R. Sargent and P. F. Agris., *J. Chromatog.* 1976,123,490.
- (65) Fieser and Fieser; *Reagents for Organic Synthesis.*, Vol. 2, p. 227, Ion Exchangers resins.
- (66) Hidehiko Yamada, Toshihiko Tsuda, Taiji Watanabe, Masayuki Ohashi, Kimihiro Murakami and Hidenori Mochizuki, *Am. Soc. for Microbiology*, Vol. 37, No. 11, p. 2412-2417, Nov. 1993
- (67) Schulz, Pablo C. and Melong Alberto I., *Rev. Latinoamer. Quim.* 1976, 7, 9-16.
- (68) E. I. Matrosov, E. N. Tsevetkov, Z. N. Mironov, R. A. Malevannaya and M. C. Kabachik., *Bull. Acad. Sci., USSR.*, 1975, 24, 1231.
- (69) A. Piekos-Maron and T. A. Modro., *Phosphorous*, 1976, 6, 129.
- (70) D. Lucansky., *Chem. Prumysi.*, 1976, 26, 514.
- (71) Kabachik, M. I., CAS 77844, "Uniqueness of δ -P correlation systems in the chemistry of organophosphorous compounds", (*Inst. Element. Org. Soedin.*, Moscow, USSR). *Khim. Primen. Phosphoorg. Soedin.*, Tr, Konf., 5th, 1972 (pub. 1974), 257-269 (Russ). Edited by Kabachik, M. I., Nifantiev, E. E. "Nauka"; Moscow, USSR.

7. APÉNDICE

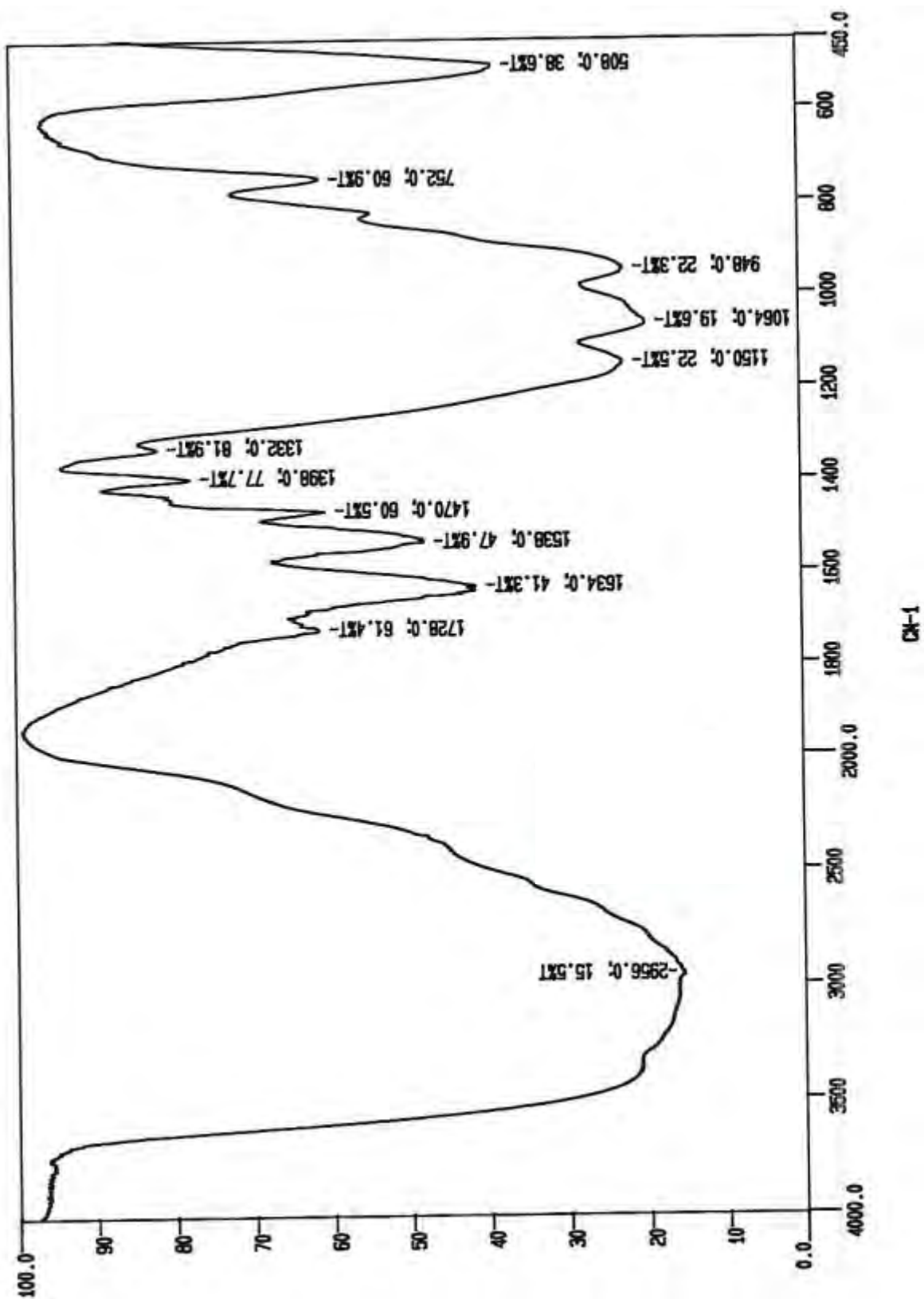
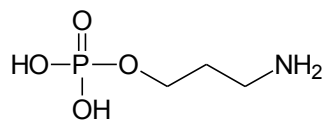
IR1 Materia prima 3-aminopropanol

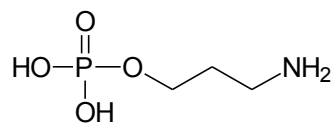


RMN1 Materia prima 3-aminopropanol

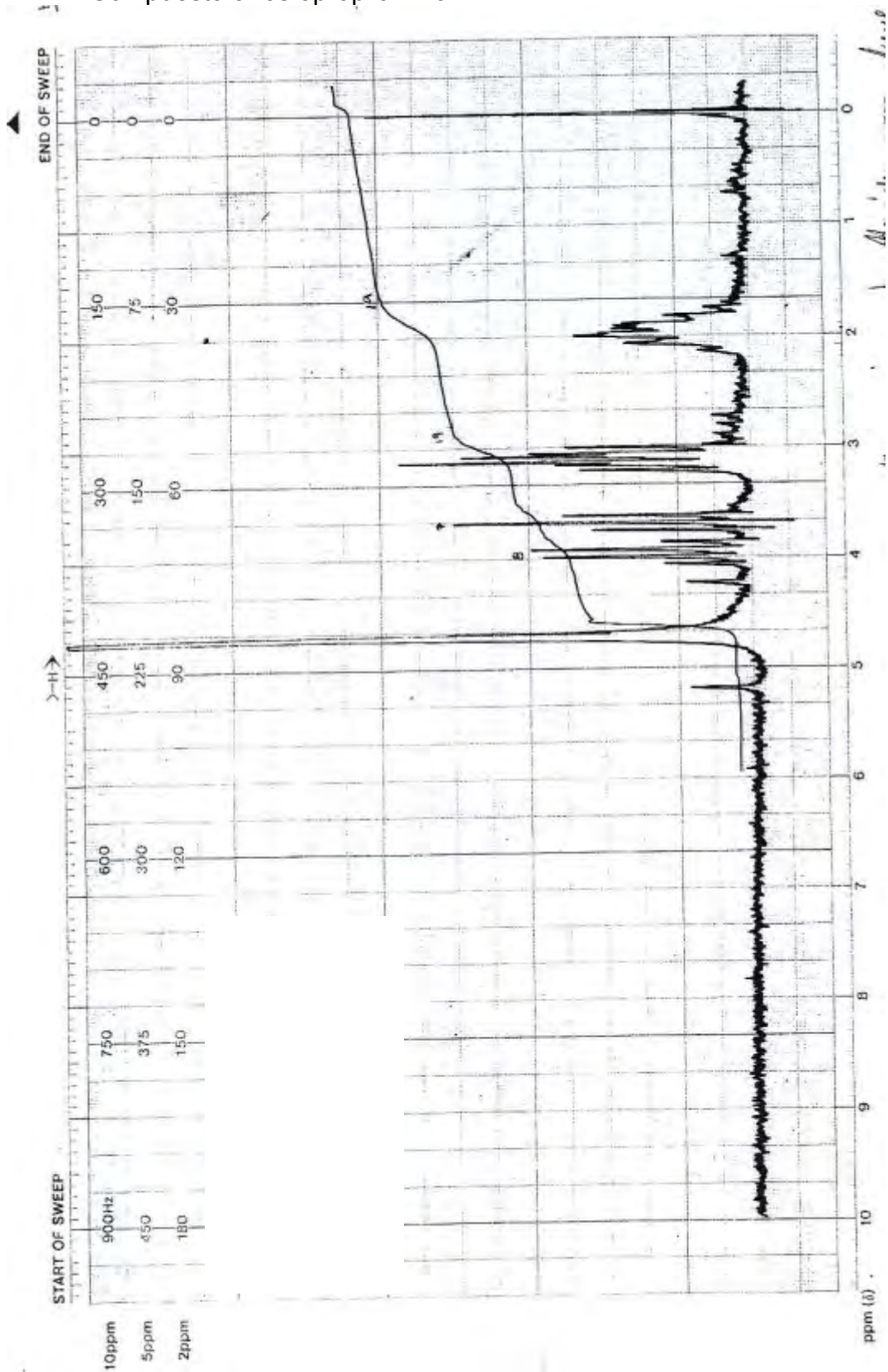


IR2 Compuesto 3-fosfopropilamina

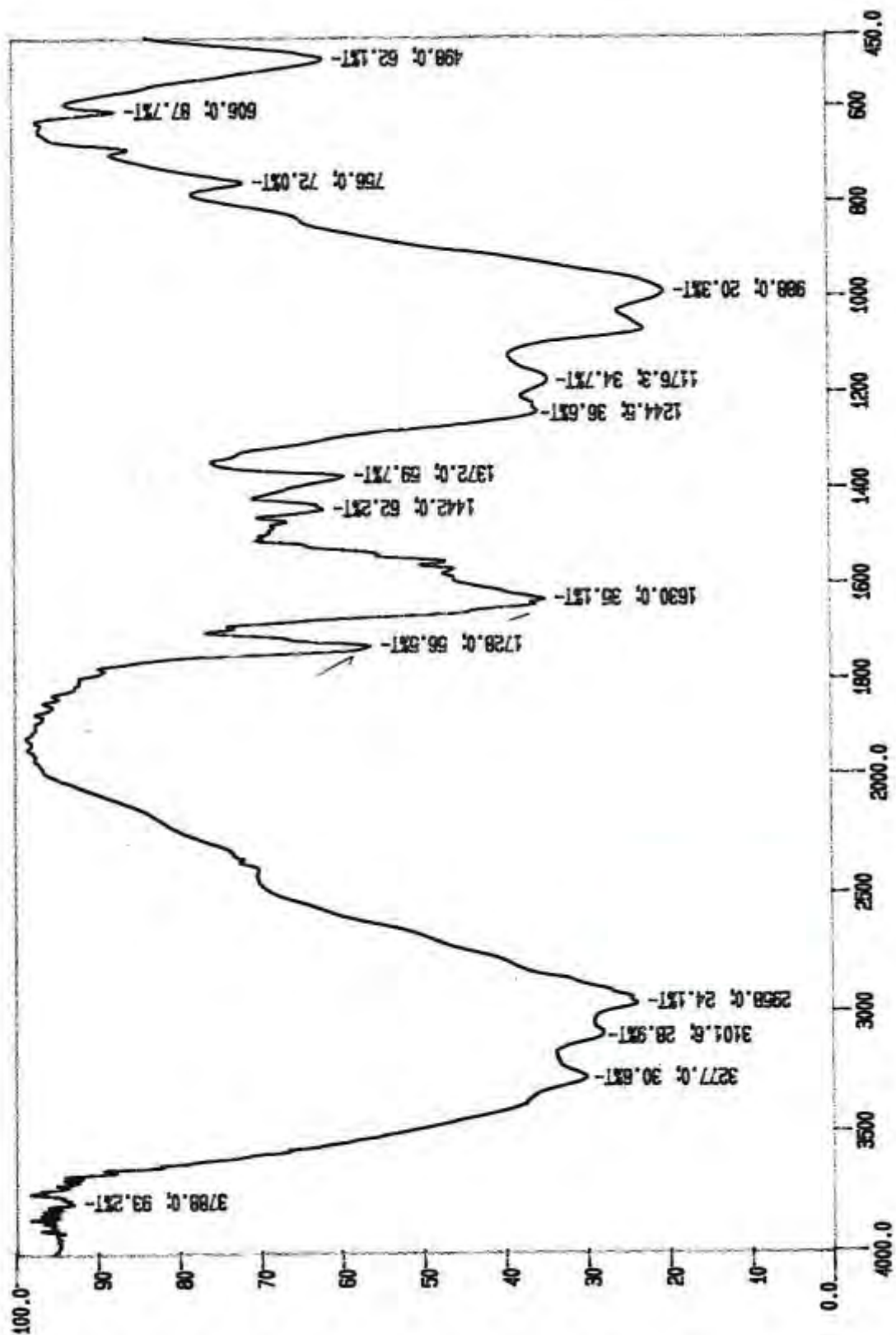
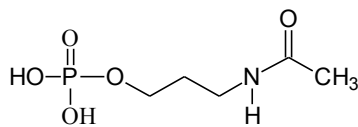




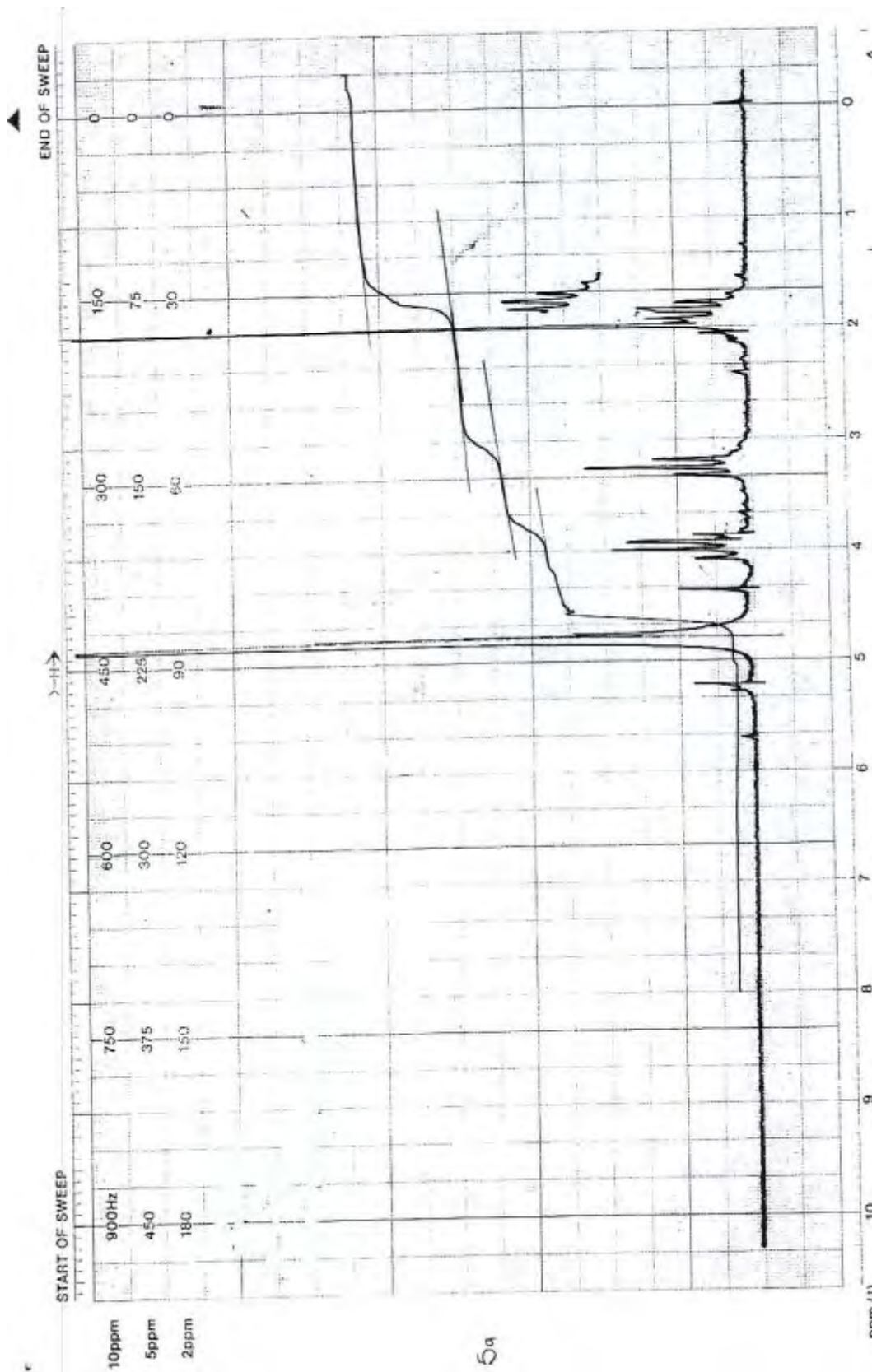
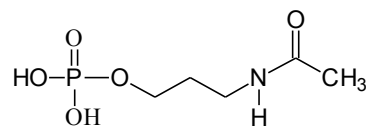
RMN2 Compuesto 3-fosfopropilamina

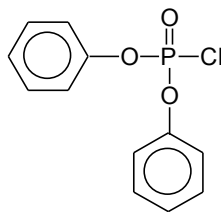


IR3 Compuesto 3-fosfopropilamida

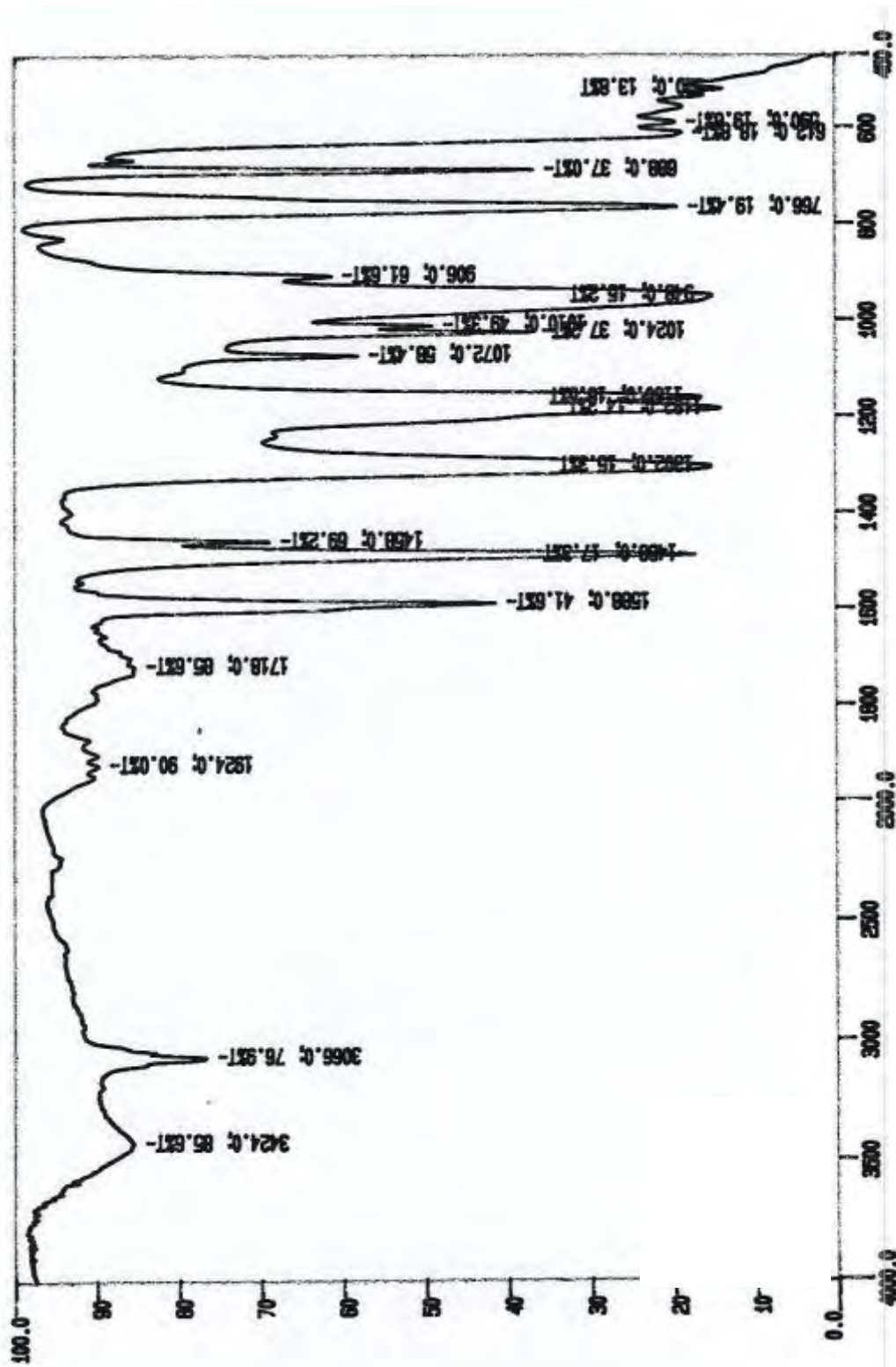


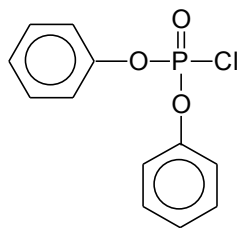
RMN4 Compuesto 3-fosfopropilamida



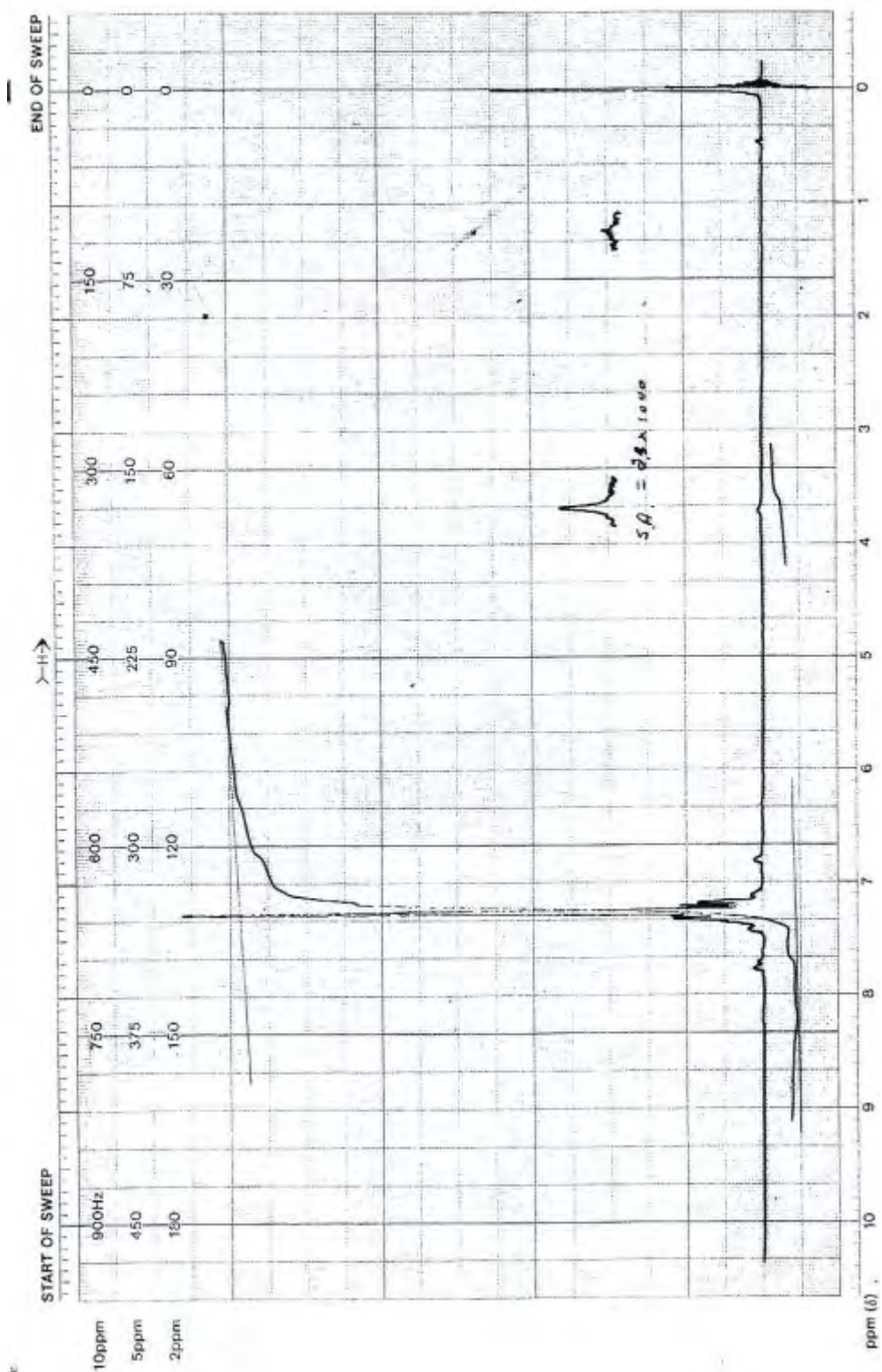


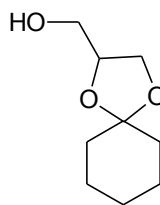
IR4 Compuesto difenilclorofosfato



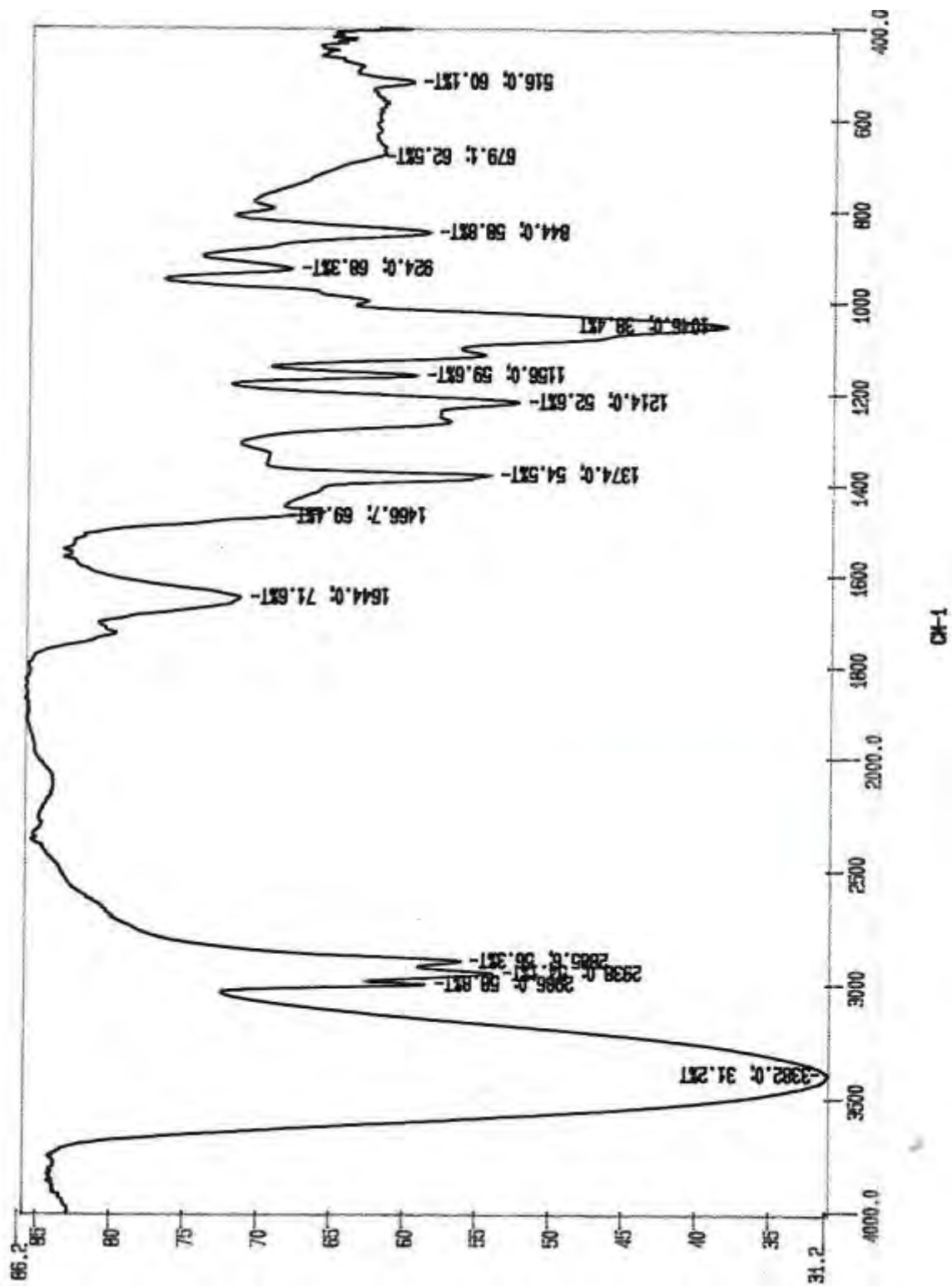


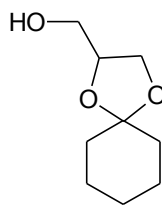
RMN5 Compuesto difenilclorofosfato



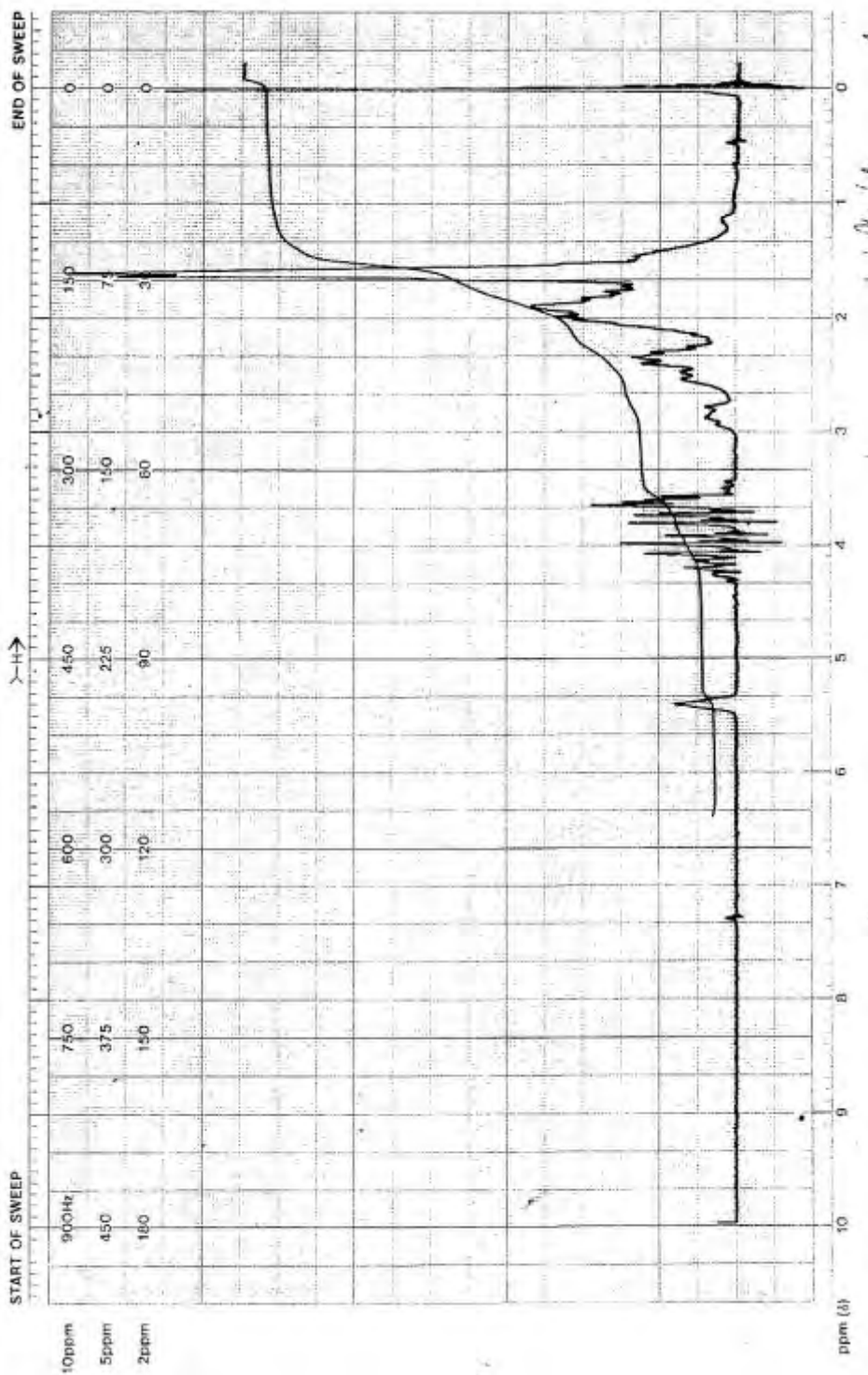


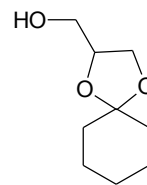
IR5 Compuesto cetal de la ciclohexanona



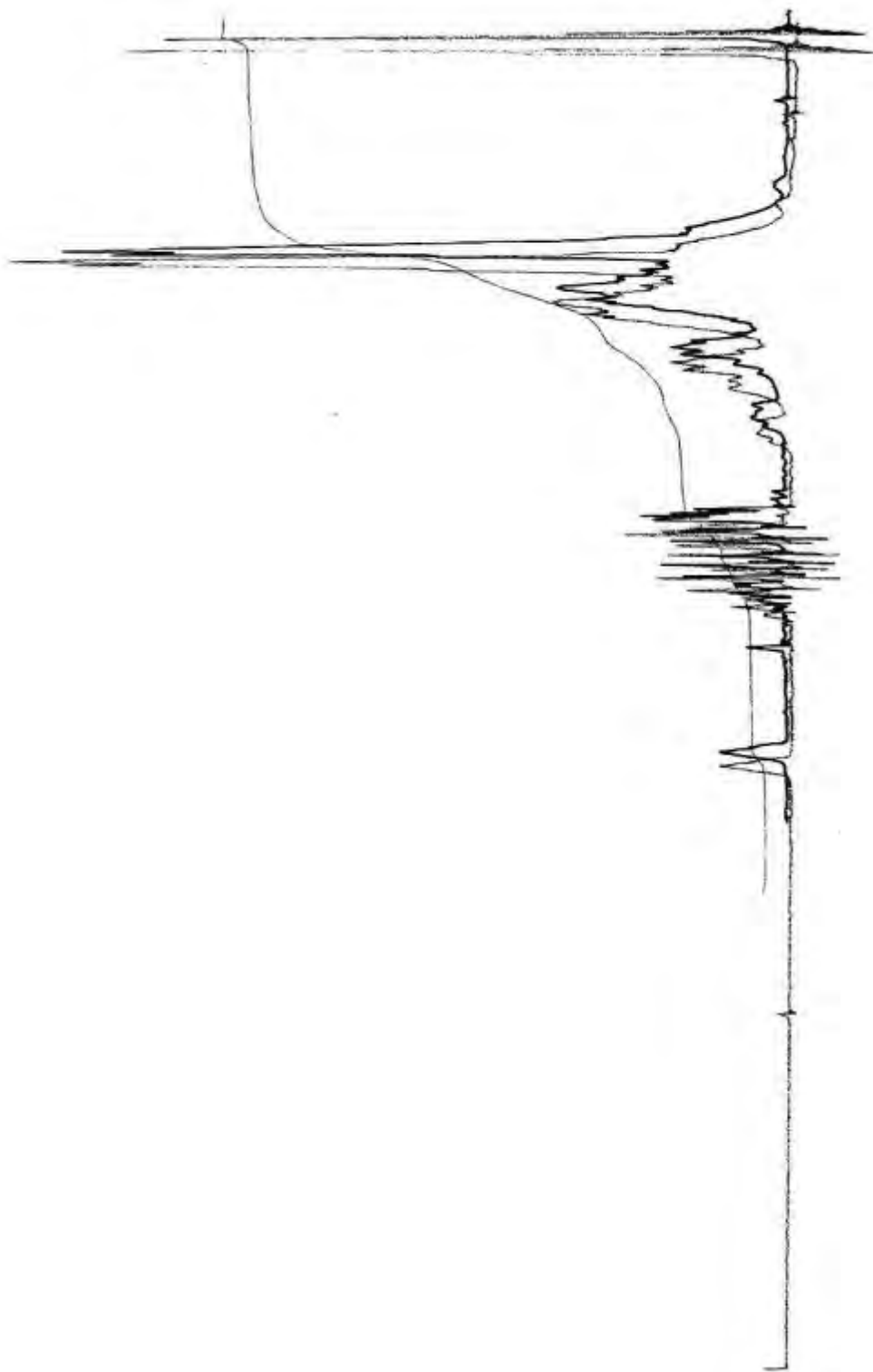


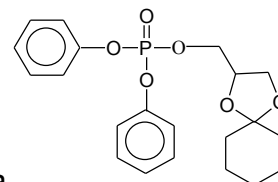
RMN6 Compuesto cetal de la ciclohexanona



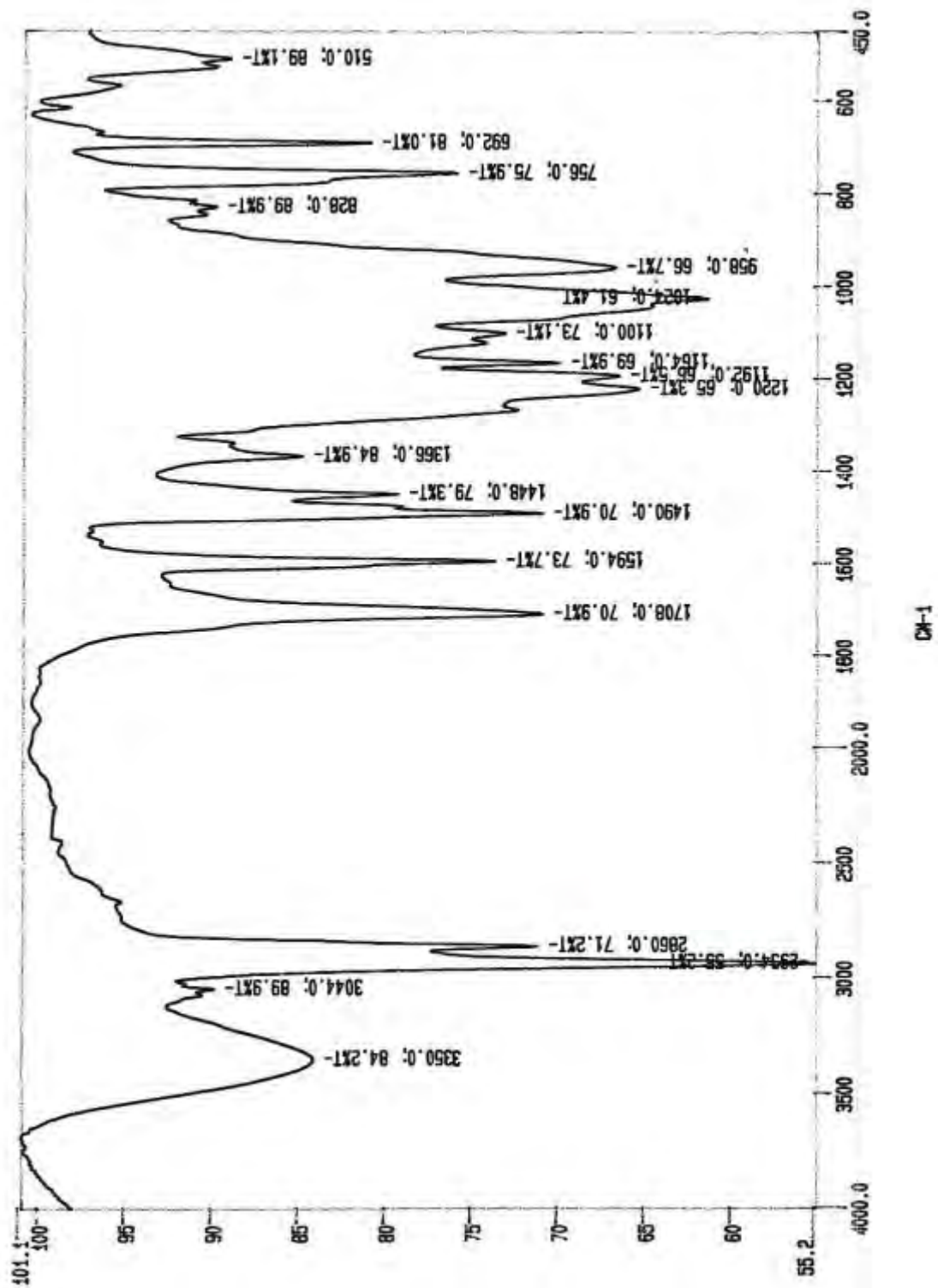


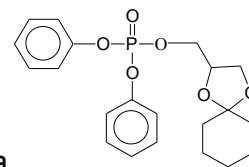
RMN6 Compuesto cetal de la ciclohexanona (+D₂O)



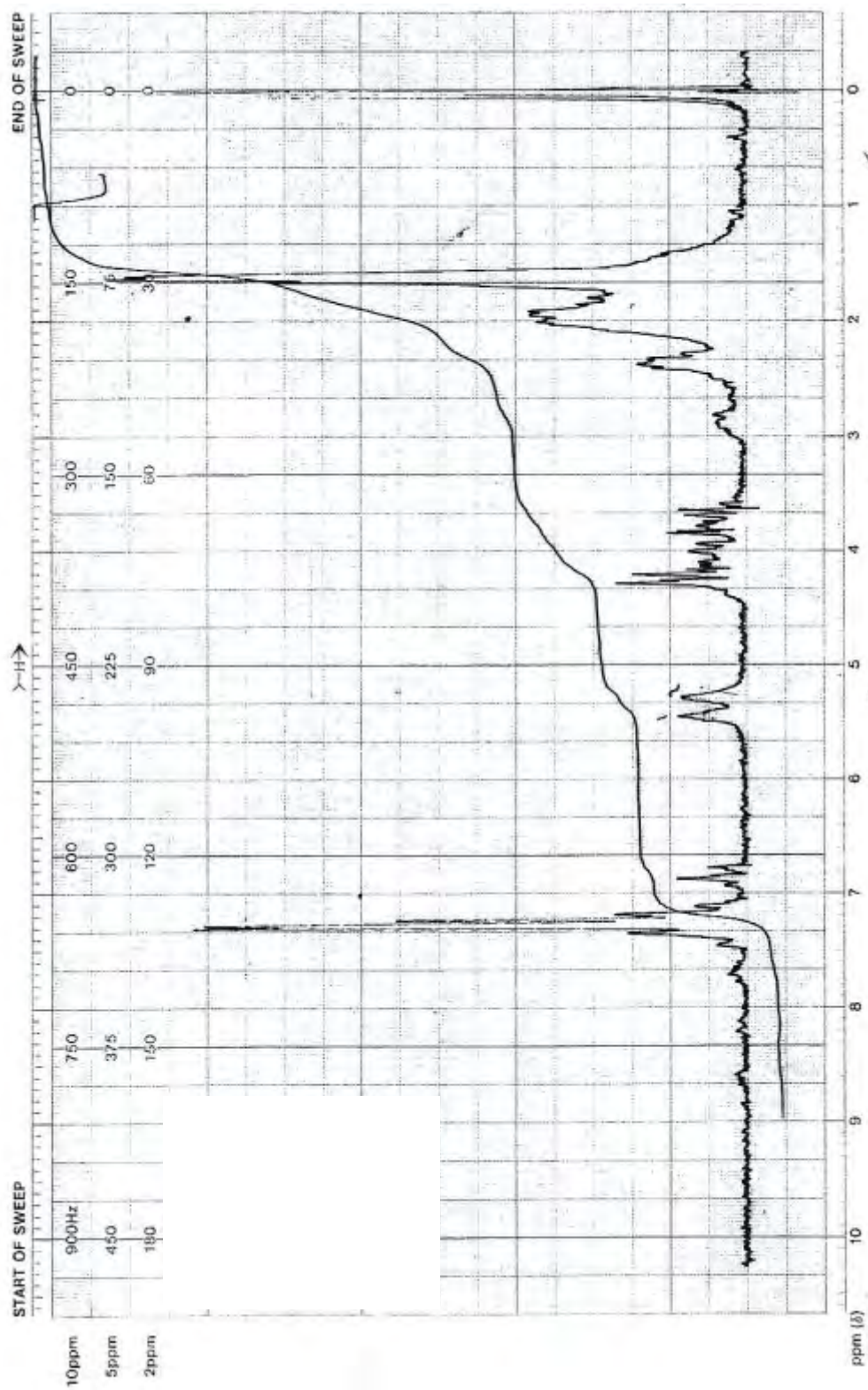


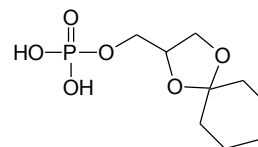
IR6 Compuesto difenilfosfato del cetal de la ciclohexanona



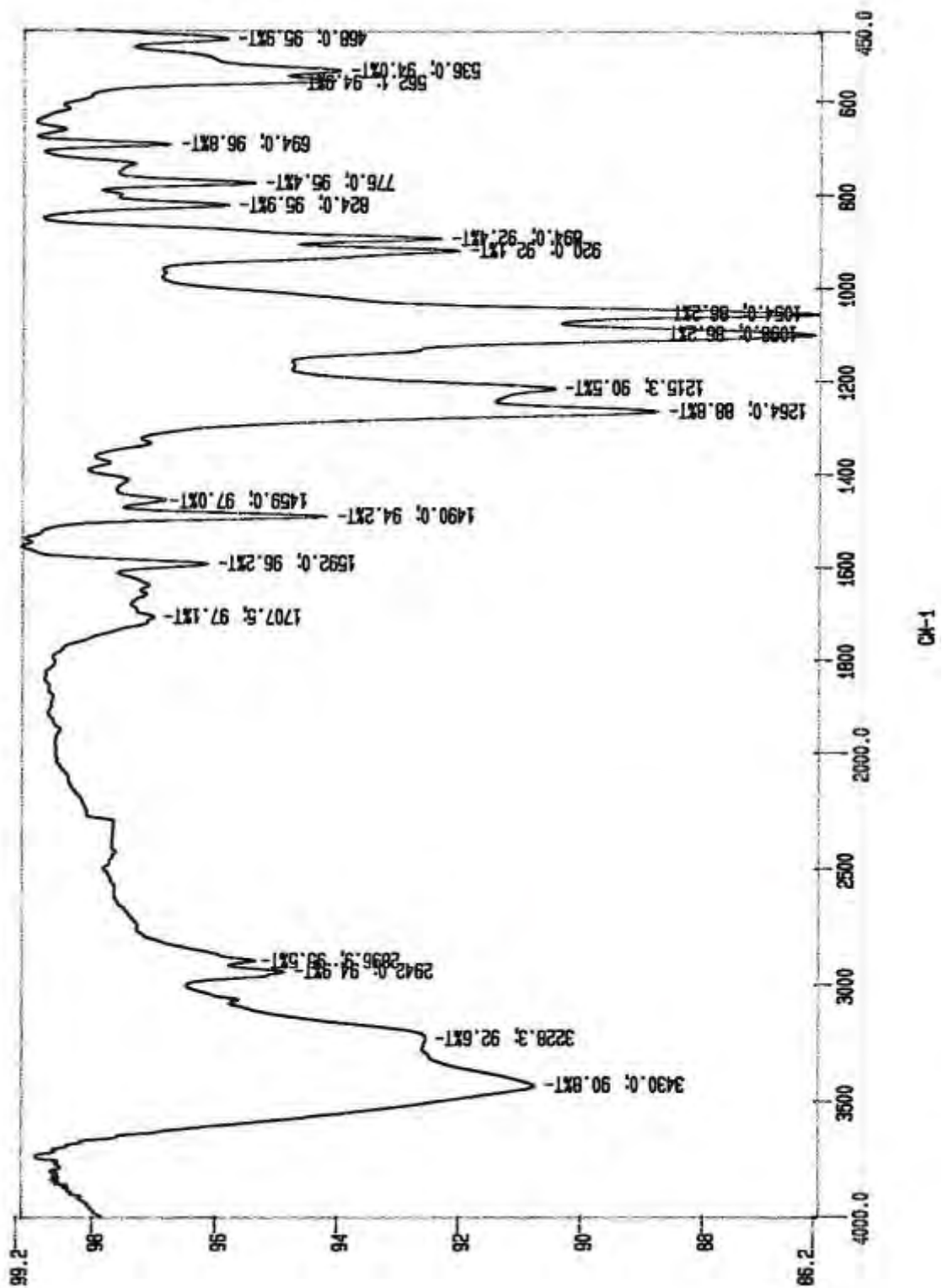


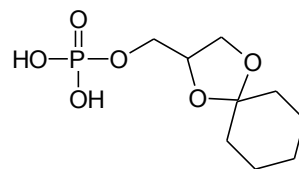
RMN7 Compuesto difenilfosfato del cetal de la ciclohexanona



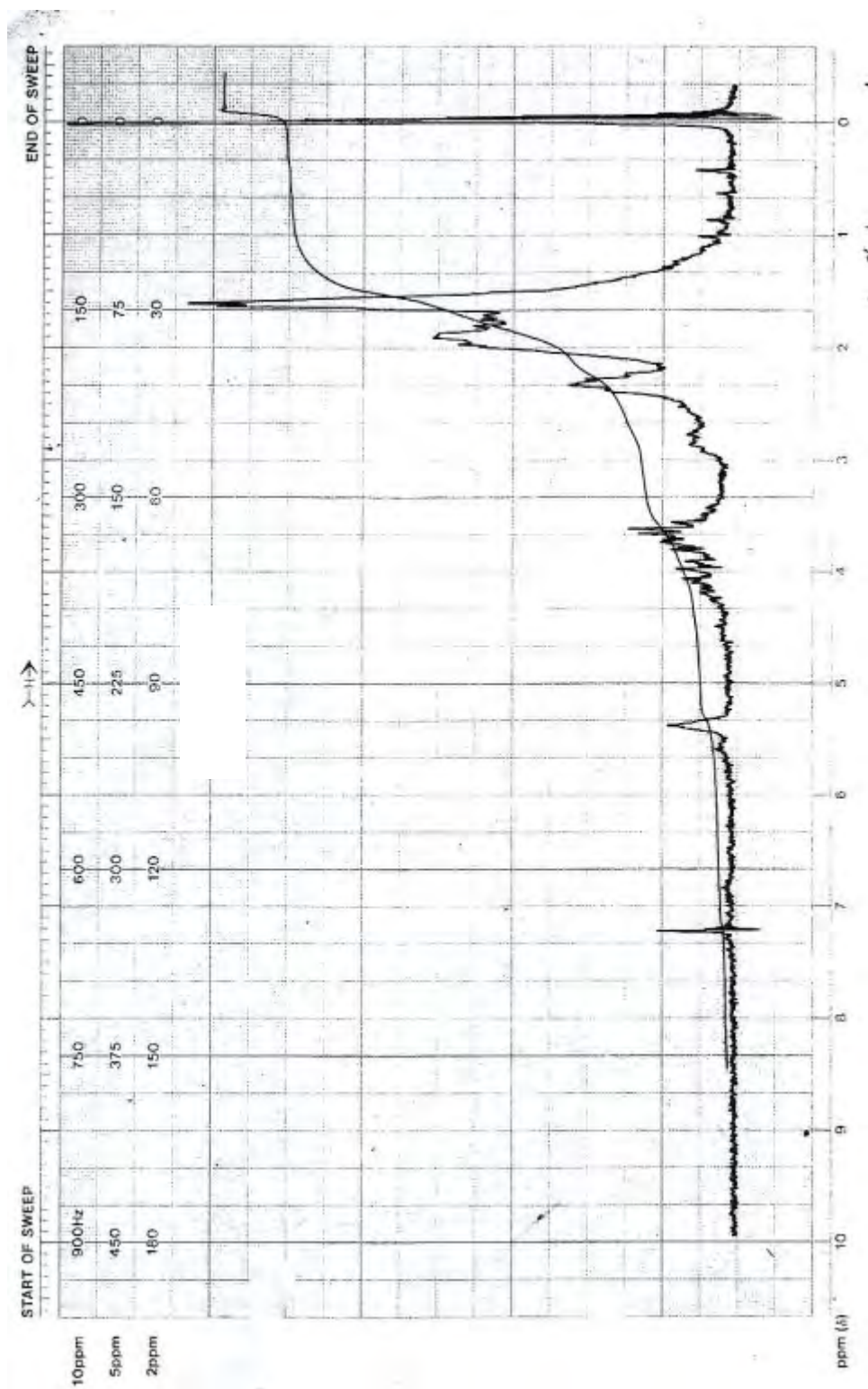


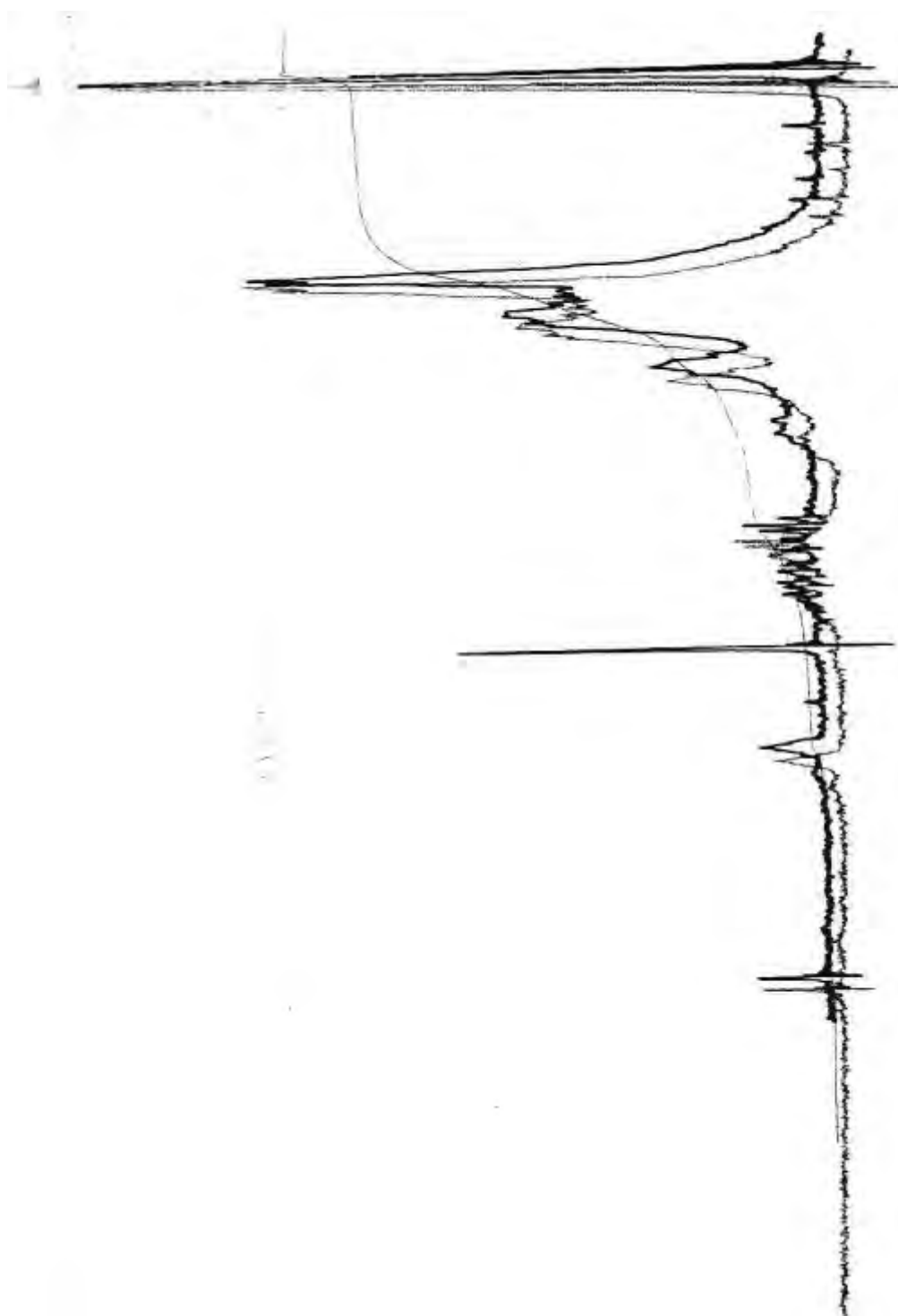
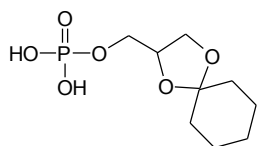
IR6a Compuesto fosfato del cetal de la ciclohexanona

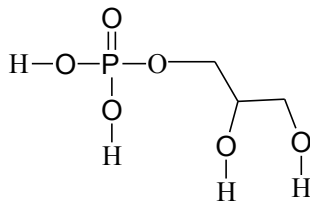




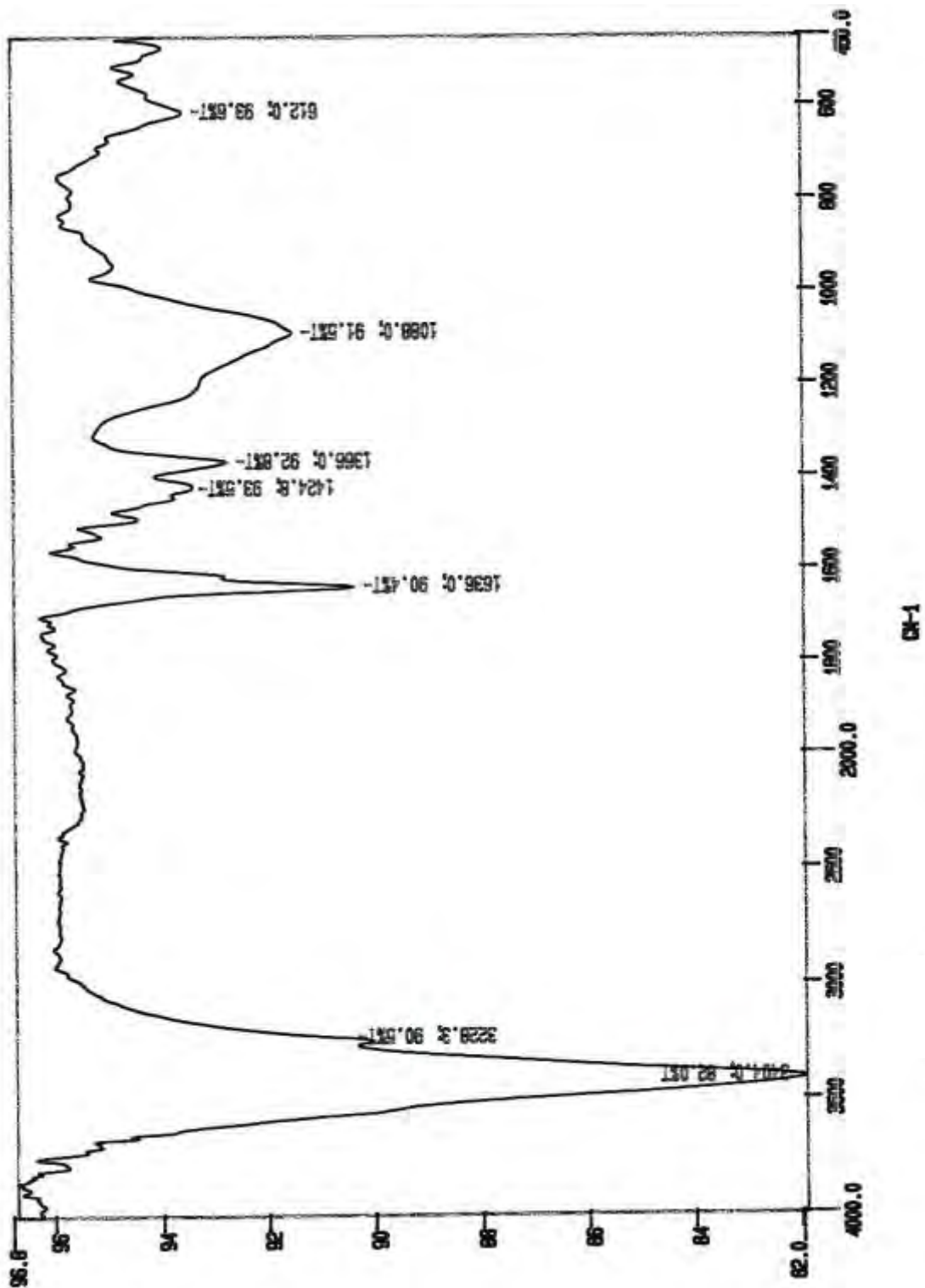
RMN7a Compuesto fosfato del cetal de la ciclohexanona

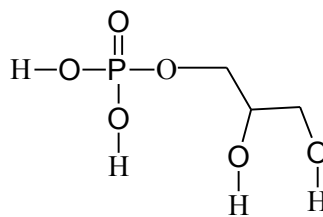


RMN7a Compuesto fosfato del cetal de la ciclohexanona (+D₂O)

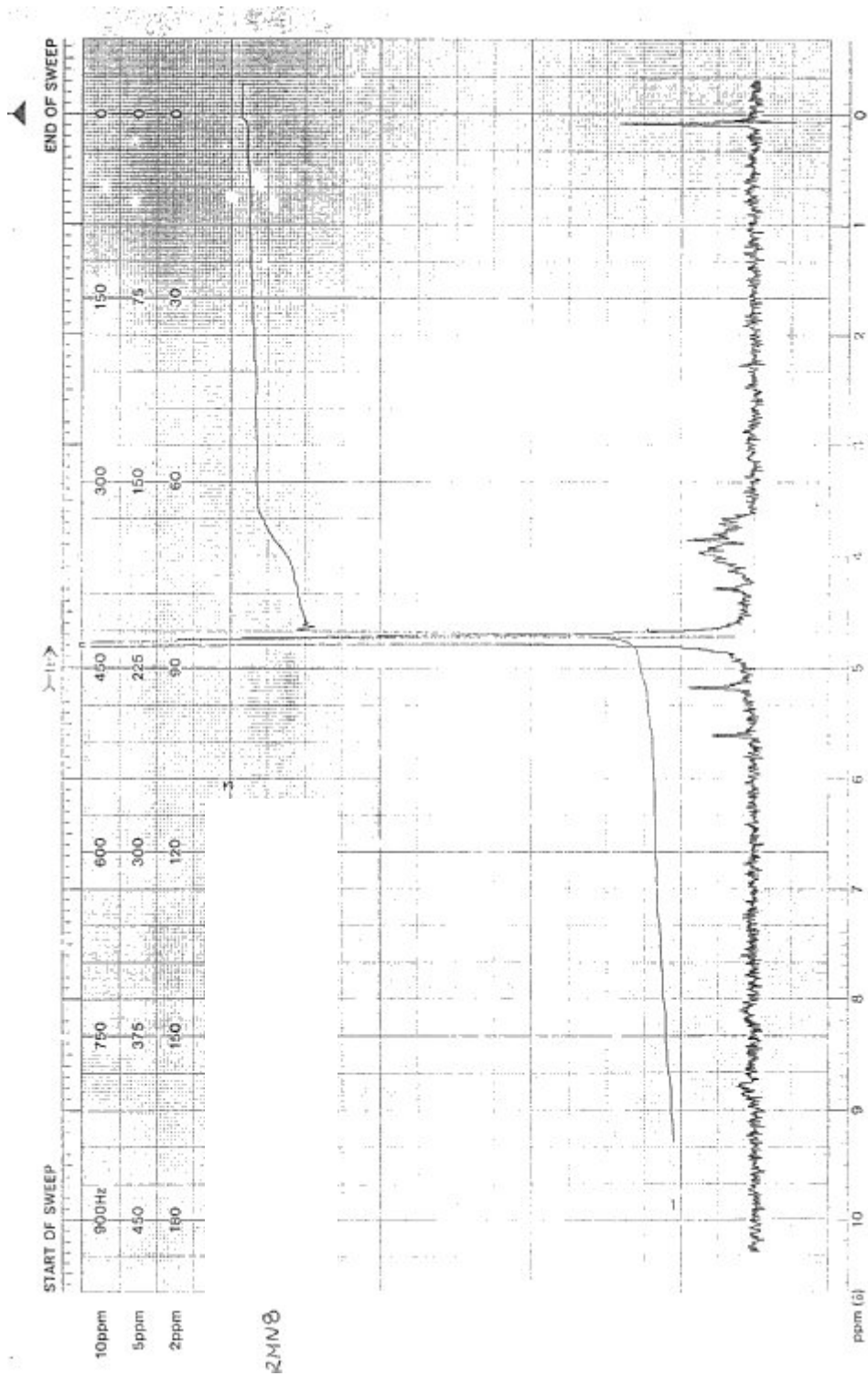


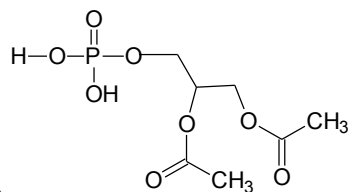
IR7 Compuesto ácido glicerofosfórico



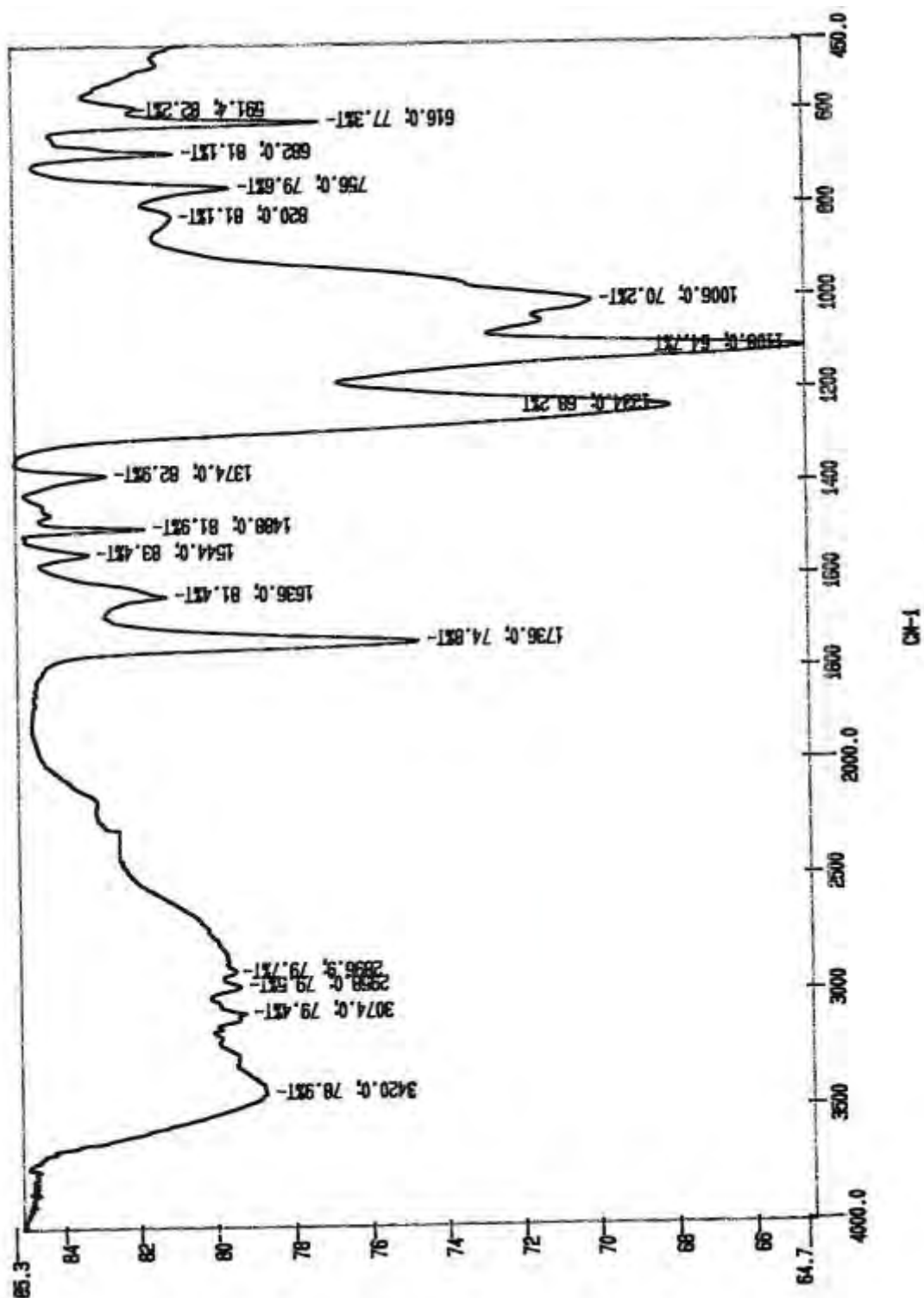


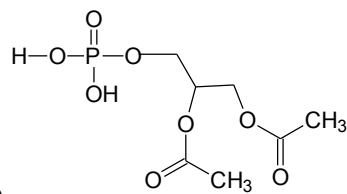
RMN8 Compuesto ácido glicerofosfórico





IR8 Compuesto 1,2-di-O-acetilglicerofosfato





RMN10 Compuesto 1,2-di-O-acetilglicerofosfato

