



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**SÍNTESIS DE POTENCIALES INHIBIDORES DE LA
BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA DE
*Pseudomonas aeruginosa***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:
MARIA DEL REFUGIO RAMÍREZ ZÁRATE

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. MARIA PATRICIA S. DEMARE NEGRETE

ASESOR DE TESIS: DRA. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES



ENERO, 2007



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.

CON CARINO Y RESPETO

A mis padres

A mi hermana y su esposo

A mis sobrinas

A mis abuelitos

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer en esta vida todo el amor, apoyo y comprensión que me han brindado, les dedico esta pequeña parte de mí.

María del Refugio Ramírez Zárate

AGRADECIMIENTOS

Con admiración y respeto a los profesores M. en C. M. Patricia S. Demare Negrete y al Dr. J. Ignacio Regla Contreras, por sus enseñanzas, apoyo, confianza, consejos y amistad brindada.

Al QFB Rodrigo González Olvera por el apoyo, comentarios y tiempo dedicado.

A los QFB Roberto C. Melgar Fernández y QFB José Luis Olivares por sus comentarios y ayuda en la realización de estudios espectroscópicos.

Al departamento de RMN del Instituto de Química UNAM.

A mis sinodales por sus consejos y observaciones.

A mis queridas amigas Claudia y Cecilia por su amistad y apoyo moral.

A mis compañeros Idalia, Yurytzi, Esteban, Ivon, Paloma, Eder y Jazael, gracias por su amistad.

A mis compañeros del laboratorio: Leticia, Rodrigo, Víctor, Thalía, Maricela, Nayeli, Manuel, Miguel, Araceli, Eric, Gabriel y Axel, gracias por su apoyo.

A mi maestra Paty

*Por la infinita paciencia, dedicación y apoyo incondicional que me brindó en todo momento, para alcanzar así una
de mis más grandes metas: mi carrera profesional*

Mi más sincero agradecimiento

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Síntesis de Fármacos L-329, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la M. en C. María Patricia S. Demare Negrete y la asesoría del Dr. José Ignacio Regla Contreras, contando con el apoyo económico de una beca otorgada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DEGAPA dentro del proyecto IN206505.

Este trabajo fue presentado en el congreso XLI
Congreso Mexicano de Química, del 24 al 28 de septiembre de 2006
Palacio de Minería, Centro Histórico, México, D. F.

**CONTENIDO**

Abreviaturas.....	<i>i</i>
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
3.2. GLICINA BETAÍNA.....	5
3.3. BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA.....	6
3.3.1. Mecanismo de la reacción catalizada por la BADH.....	7
3.4. FUNCIÓN Y REACTIVIDAD DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA CATALÍTICA.....	8
3.5. INHIBIDORES DE LAS ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS.....	12
3.5.1. Disulfiram.....	12
3.5.2. S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato-S-óxido (2).....	15
3.5.3. S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato-S-dióxido (4).....	16
3.5.4. Derivados del ácido bencensulfohidroxámico.....	16
3.6. SÍNTESIS QUÍMICA.....	18
3.6.1. Síntesis de S-alkil tiocarbamatos.....	18
3.6.2. Métodos generales de oxidación de sulfuros y sulfóxidos...	20
3.6.1.1. Peróxido de hidrógeno.....	21
3.6.1.2. Ácido perbenzoico y sus derivados.....	21
3.6.1.3. Metaperyodato de sodio.....	22
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
6. HIPÓTESIS.....	25



7.	PARTE EXPERIMENTAL.....	26
7.1.	MATERIALES.....	26
7.2.	TÉCNICAS EXPERIMENTALES.....	29
7.3.	PROCEDIMIENTOS.....	30
7.3.1.	S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato (1)	30
7.3.2.	S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato- <i>S</i> -óxido (2)	30
7.3.3.	S-metil- <i>O</i> -(<i>N,N</i> -dietilcarbamoil)sulfenato (3).....	31
7.3.4.	S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato- <i>S</i> -dióxido (4).....	32
7.3.5.	<i>O</i> -(dietilcarbamoil)- <i>N</i> -hidroxiftalamida (5).....	32
7.3.6.	Ácido <i>O</i> -(dietilcarbamoil)bencensulfohidroxámico (6).....	33
7.3.7.	<i>N</i> -(etoxicarbonil)bencensulfohidroxamato de <i>O</i> -(dietilcarbamoilo) (7).....	34
7.3.8.	2-(((dietilamino)carbonil)oxi)- <i>N,N</i> -dimetilpropilamina (8)...	35
7.3.9.	Cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)- <i>N,N,N</i> -trimetilpropilamonio (9)	35
7.3.10.	2-(((dietilamino)carbonil)oxi)- <i>N,N</i> -dimetiletilamina (10).....	36
7.3.11.	Cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)- <i>N,N,N</i> -trimetiletilamonio (11)	37
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
9.	CONCLUSIONES.....	53
10.	PERSPECTIVAS.....	54
11.	REFERENCIAS.....	55
	ANEXO I.....	60
Espectro 1.	RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS): S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato (1)...	61
Espectro 2.	RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃ , TMS): S-metil- <i>O</i> -(<i>N,N</i> -dietilcarbamoil)sulfenato (3).....	62
Espectro 3.	RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃ , TMS): S-metil- <i>O</i> -(<i>N,N</i> -dietilcarbamoil)sulfenato (3).....	63
Espectro 4.	Masas (I. Q.) S-metil- <i>O</i> -(<i>N,N</i> -dietilcarbamoil) sulfenato (3).....	64



Espectro 5.	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS): mezcla de compuestos 2 y 3	65
Espectro 6.	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS): S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato-S-dióxido (4).....	66
Espectro 7.	RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS): S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato-S-dióxido (4).....	67
Espectro 8.	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS): <i>N</i> (etoxicarbonil) bencensulfohidroxamato de <i>O</i> -(dietilcarbamoilo) (7).....	68
Espectro 9.	RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS): <i>N</i> (etoxicarbonil) bencensulfohidroxamato de <i>O</i> -(dietilcarbamoilo) (7).....	69
Espectro 10	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS): Cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)- <i>N,N,N</i> -trimetiletilamonio (9).....	70
Espectro 11	RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS): Cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)- <i>N,N,N</i> -trimetiletilamonio (9).....	71
Espectro 12	RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS): Cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)- <i>N,N,N</i> -trimetilpropilamonio (11).....	72
Espectro 13	RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS): Cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)- <i>N,N,N</i> -trimetilpropilamonio (11).....	73



1. RESUMEN

La patogenicidad de la *Pseudomonas aeruginosa* es un problema de salud vigente debido a la resistencia que presenta esta bacteria a los antibióticos convencionales. Ante esta situación se han realizado numerosas investigaciones en busca de diseñar nuevos agentes terapéuticos que actúen eficientemente en contra del patógeno. En estos estudios, se ha logrado detectar a la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) como una enzima fundamental para la supervivencia de la bacteria en sus sitios de infección, por lo que se ha propuesto que por medio de su inhibición por compuestos específicos, capaces de bloquear a la cisteína esencial altamente reactiva de esta enzima, se podría reducir la patogenicidad de la bacteria.

En este trabajo se reporta la síntesis de los compuestos S-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-óxido (**2**), S-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-dióxido (**4**), *N*-(etoxicarbonil)bencensulfhidroxamato de *O*-(dietilcarbamoilo) (**7**), cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropilamonio (**9**) y cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletilamonio (**11**) los cuales se han propuesto como inhibidores de la BADH de la *Pseudomonas aeruginosa*, puesto que han presentado esta actividad con otros tipos de aldehído deshidrogenasas.

La síntesis de los compuestos **4**, **7**, **9** y **11** fue realizada eficientemente con rendimientos de 76, 36, 42 y 40 %, respectivamente. En contraste, los experimentos realizados para obtener el compuesto **2** reproduciendo o modificando la metodología descrita, condujeron en todos los casos a una mezcla de **2** con el producto de transposición S-metil-*O*-(*N,N*-dietilcarbamoilo)sulfenato (**3**).



2. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista de muy alta resistencia a antibióticos que infecta las vías urinarias, el ojo, las heridas causadas por quemaduras y los pulmones de individuos con fibrosis quística, en los que es la principal causa de mortalidad.¹ Estudios previos han propuesto que la bacteria depende de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) para subsistir en los tejidos que infecta.^{2,3} La BADH, que pertenece a la familia de las aldehído deshidrogenasas (ALDH), tiene la característica de poseer una cisteína esencial de muy elevada reactividad, lo que puede aprovecharse para el diseño de inhibidores selectivos.²

Se ha estudiado la inhibición de la BADH de *P. aeruginosa* empleando disulfiram,^{4,5} el cual ha sido empleado desde hace más de 50 años para combatir problemas de alcoholismo. Este efecto farmacológico lo ejerce a través de la inhibición de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial hepática (ALDH2) produciendo un aumento considerable de los niveles de acetaldehído después de la ingesta de alguna cantidad de alcohol, provocando signos y síntomas incómodos tales como náuseas, vómito, aumento en el ritmo cardíaco y bajas en la presión sanguínea.⁶

Así mismo, otros estudios han descrito que el *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-óxido (**2**) y el *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-dióxido (**4**), metabolitos del disulfiram, poseen también actividad inhibitoria sobre la ALDH2 de hígado,^{7,8} con la ventaja sobre el disulfiram de que reaccionan muy pobremente, sobre todo el primero de ellos, con el glutatión, sustancia que actúa como reductor fisiológico.

Por otro lado, se ha encontrado que compuestos derivados del ácido bencensulfhidroxámico, como por ejemplo el *N*-(etoxicarbonil)bencensulfhidroxamato de *O*-(dietilcarbamoilo) (**7**), son inhibidores de la ALDH de levaduras ya que son agentes carbamoilantes/nitroxilantes.⁹ Debido a esto, se ha considerado que compuestos



que posean un grupo dietilcarbamoilo podrían poseer igualmente una actividad inhibitoria sobre la BADH de *Pseudomonas aeruginosa*.

En esta misma línea de los posibles agentes carbamoilantes de la BADH, se propuso estudiar la actividad de dos compuestos que combinan en su estructura la fracción dietilcarbamoilo y el grupo trimetilamonio, presente en la betaína aldehído. Con este fin se propusieron los compuestos cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropilamonio (**9**) y cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletilamonio (**11**), los cuales presentan una cadena de dos y tres átomos de carbono que separan al dietilcarbamoilo del grupo trimetilamonio.

Por lo anterior, se planteó la conveniencia de sintetizar y evaluar los compuestos *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-óxido (**2**), *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-dióxido (**4**), *N*-(etoxicarbonil)bencensulfhidroxamato de *O*-(dietilcarbamoilo) (**7**), cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropilamonio (**9**) y cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletilamonio (**11**), correspondiéndole al presente trabajo la preparación de los mismos mediante metodologías de síntesis eficientes.

Si alguno de estos compuestos mostrara la actividad prevista, podrían ser la base para el diseño de inhibidores específicos de la enzima y abriría la posibilidad de obtener un nuevo tipo de fármacos para la terapia humana en contra del patógeno.



3. MARCO TEÓRICO

3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Las *Pseudomonas* son bacilos rectos o curvados, Gram negativas, de 0.5-1.0 μm por 1.5-4.0 μm de tamaño, no formadoras de esporas. Presentan flagelos polares, normalmente aislados; su metabolismo es respiratorio no fermentativo, aunque pueden producir pequeñas cantidades de ácido a partir de glucosa en anaerobiosis. Tienen requerimientos nutritivos muy simples ya que emplean compuestos orgánicos de bajo peso molecular, pero no polímeros pues carecen de las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar los polímeros a sus monómeros; crecen a pH neutro, en un rango mesofílico de temperaturas. Una de las características que más llama la atención de *Pseudomonas* es el amplio abanico de sustratos orgánicos que pueden utilizar como fuentes de carbono y energía.¹

Ciertas especies de *Pseudomonas* son patógenas, como *Pseudomonas aeruginosa*, que se encuentra frecuentemente asociada a infecciones del aparato respiratorio y sistema urinario en humanos. Las infecciones por este patógeno son frecuentes en quemaduras u otros traumatismos severos que afecten amplias zonas de la piel, o bien en pacientes con fibrosis quística. Es un oportunista típico, iniciando una infección cuando el individuo se encuentra bajo en defensas.¹

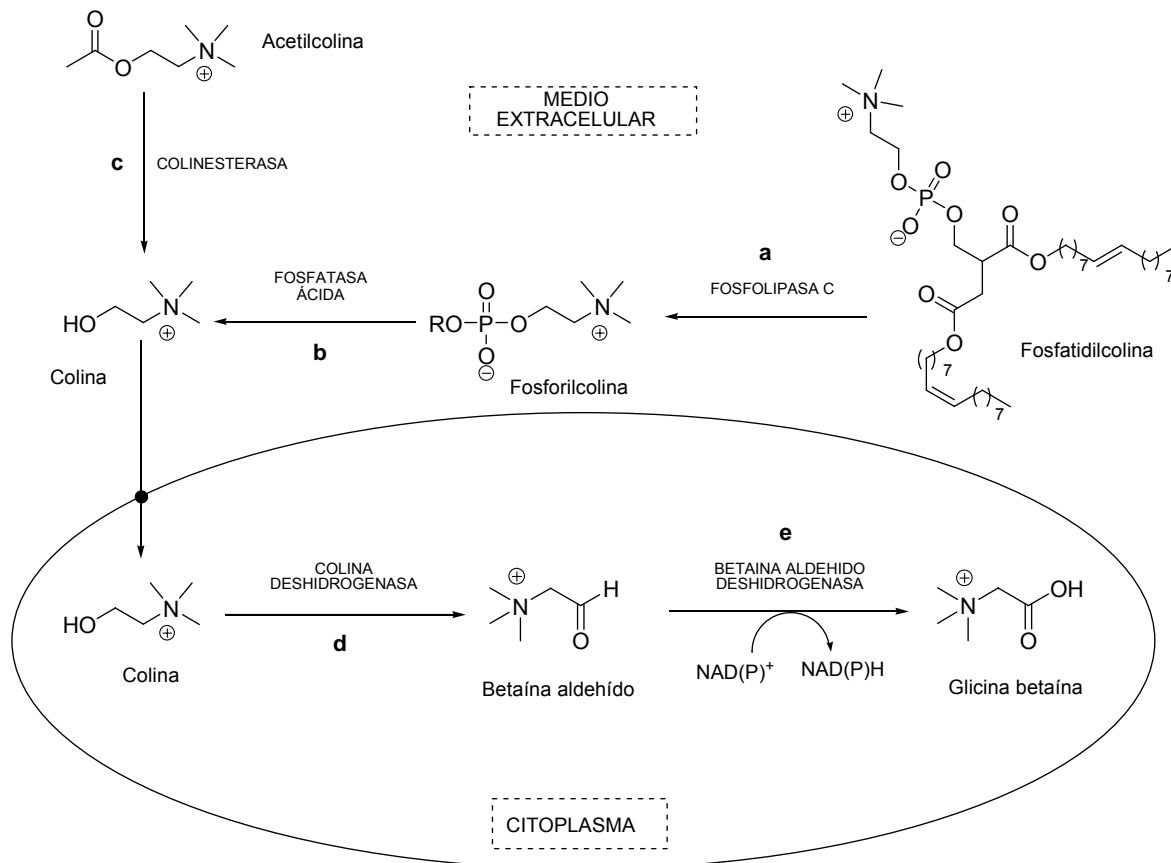
Este microorganismo es resistente a muchos de los antibióticos utilizados rutinariamente de modo que la quimioterapia es difícil. Esta resistencia se debe a la transferencia intercelular de plásmidos *R*, que confieren la resistencia llevando genes para la destoxicación por diversos antibióticos y otros inhibidores de crecimiento. La polimixina es un antibiótico frecuentemente empleado frente a *P. aeruginosa* aunque este fármaco debe utilizarse con precaución en la terapia humana debido a su toxicidad y a los severos efectos colaterales que causa.¹



3.2. GLICINA BETAÍNA

La glicina betaína (*N,N,N*-trimetilglicina) es un compuesto de amonio cuaternario, que actúa como soluto compatible u osmoprotector al ser sintetizado y acumulado en concentraciones importantes en el citoplasma de las células de diversos procariontas y eucariontas en respuesta a un estrés osmótico. Este compuesto, junto con otros osmolitos, protege a las células de la salinidad, el calor, la deshidratación y el congelamiento; es compatible con las funciones celulares y no interfiere con el metabolismo.¹⁰

La glicina betaína puede ser tomada directamente del medio ambiente o sintetizada. Una vía biosintética para glicina betaína es a partir de colina, utilizando la betaína aldehído como intermediario.¹¹⁻¹⁴ (Esquema 3.1)



Esquema 3.1. Biosíntesis de glicina betaína en *P. aeruginosa*.^{11,14}



Esta vía es conservada en bacterias, plantas y animales aunque existen diferencias en las enzimas involucradas. Las plantas convierten la colina a betaína aldehído por la acción de la colina monooxigenasa, mientras que bacterias y animales catalizan la reacción utilizando colina deshidrogenasa o colina oxidasa.¹⁴

La colina y sus precursores —acetilcolina, fosfatidilcolina o fosforilcolina— son especialmente abundantes en los sitios que infecta *Pseudomonas aeruginosa*, lo que resulta favorable para el crecimiento de la bacteria, ya que los aprovecha como fuente de carbono, nitrógeno y energía.^{3,15}

Un paso obligatorio en el catabolismo de estos compuestos por *P. aeruginosa* es la oxidación irreversible de betaína aldehído a glicina betaína, ilustrada en el esquema anterior, la cual es catalizada por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa. Esta reacción es sumamente importante, pues de no llevarse a cabo la acumulación de betaína aldehído y el daño a la bacteria sería inevitable, ya que esta sustancia es sumamente tóxica para ella,¹⁶ de ahí que se puede especular en una estrategia terapéutica antimicrobiana que involucre la inhibición de la BADH.¹⁷⁻¹⁸

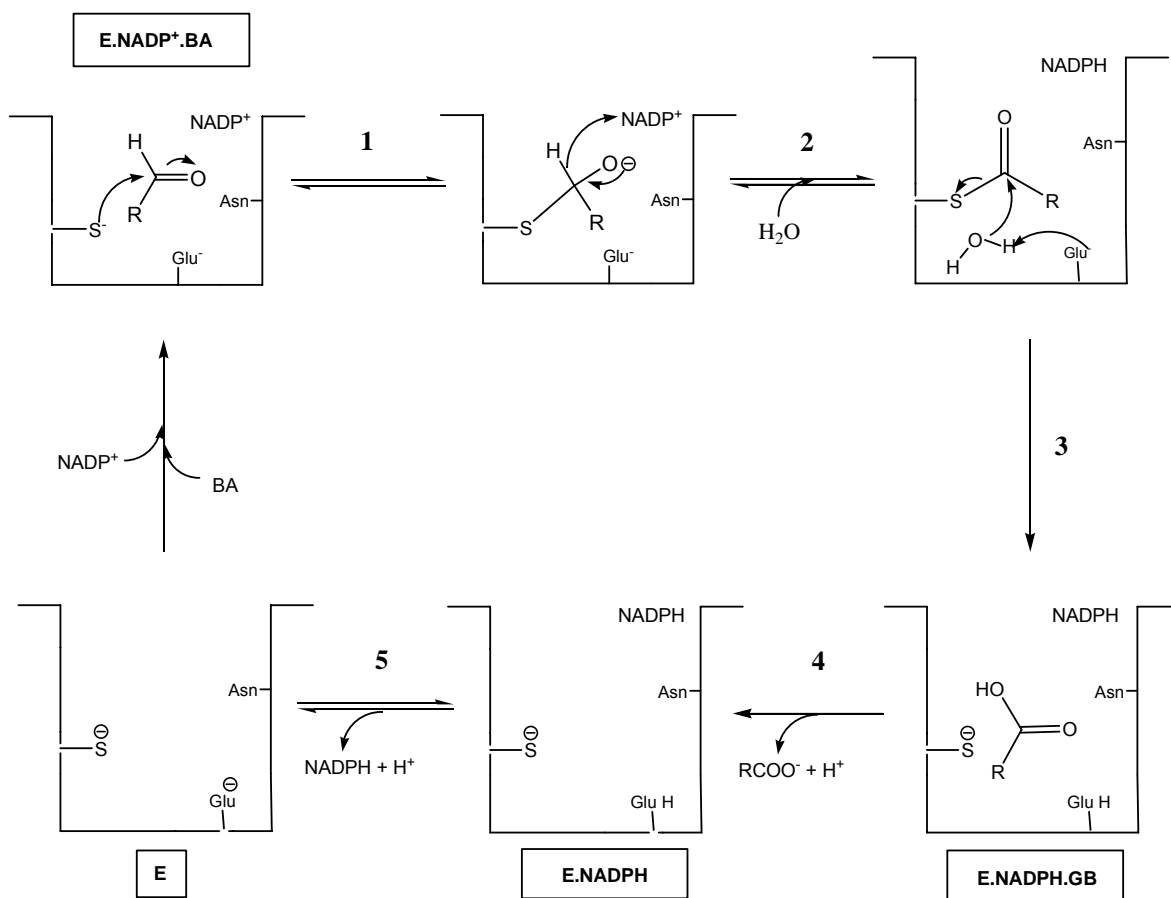
3.3. BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA: BADH

La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) pertenece a la familia de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs), enzimas que catalizan la oxidación irreversible de los aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, con la reducción del NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido) o NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato). En la mayor parte de los organismos, la reacción catalizada por la BADH es el paso final de la ruta biosintética de glicina betaína a partir de la colina o de sus precursores.¹⁴ (Esquema 3.1)



3.3.1. Mecanismo de la reacción catalizada por la BADH.

La reacción catalizada por la BADH, como la catalizada por el resto de las aldehído deshidrogenasas, es la oxidación de un aldehído por transferencia de un hidruro (H^-) al nucleótido NAD^+ o $NADP^+$, lo que implica sustraer un electrón a un átomo de carbono deficiente en electrones. Por ello, las enzimas siguen una estrategia que se muestra en el esquema 3.2.



Esquema 3.2. Mecanismo de la reacción catalizada por la BADH.¹⁴

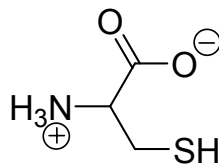
La estrategia de la enzima es convertir al carbono trigonal plano del aldehído en un carbono tetraédrico no deficiente en electrones, al que resulta posible



sustraerle un hidruro.¹⁴ La formación del carbono tetraédrico se logra mediante catálisis covalente, en la que intervienen tres residuos del sitio activo: una cisteína, un glutámico y una asparagina.^{14,19} Con la formación de este intermediario se forma un puente de hidrógeno con el grupo amida de la asparagina catalítica (paso 1, Esquema 3.2) y la estructura se estabiliza, permitiendo una eficiente transferencia del hidruro hacia la posición C4 de la coenzima, la cual queda reducida al mismo tiempo que el tiohemiacetal se oxida al correspondiente tioéster (paso 2). El glutámico catalítico desprotona a una molécula de agua, que ataca e hidroliza al tioéster, formando la glicina betaína (paso 3).²⁰ Con la liberación ordenada de los productos (pasos 4 y 5), se regenera la enzima libre.

3.4. Función y reactividad de los residuos de cisteína catalítica.

La cisteína es un aminoácido que posee un grupo tiol muy reactivo (Esquema 3.3). En las proteínas es el residuo menos abundante, con un porcentaje menor al 3 %. Sin embargo, a pesar de su abundancia relativamente baja, la capacidad del grupo tiol para donar electrones y para oscilar entre un estado reducido (-SH) y diversos estados de oxidación le permite a este residuo participar en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas, como son la estabilidad, el plegamiento, la unión de metales, la catálisis enzimática y la regulación de la actividad proteica.²¹



Esquema 3.3. Estructura de la cisteína.

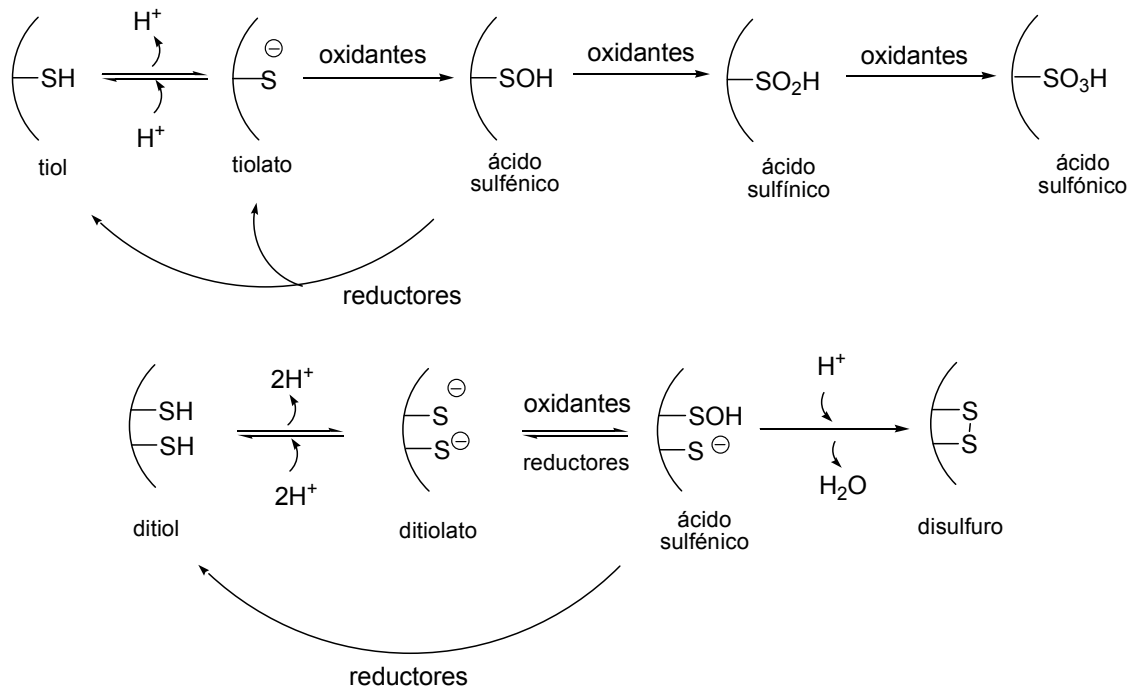
La cisteína no se ioniza a pH fisiológico y forma puentes de hidrógeno relativamente débiles, por lo que no contribuye significativamente a la estabilidad de las proteínas por medio de enlaces salinos o puentes de hidrógeno. No



obstante, si los grupos tiol de dos residuos de cisteína de la misma cadena o de cadenas polipeptídicas diferentes están próximos y en la orientación adecuada, pueden unirse por oxidación formando un puente disulfuro, que es un enlace covalente fuerte; estos enlaces estabilizan la estructura nativa de la proteína, haciéndola menos susceptible a la degradación por proteasas.

Los diferentes estados de oxidación del grupo tiol de los residuos de cisteína son el ácido sulfénico (-SOH), el ácido sulfinico (-SO₂H), el ácido sulfónico (-SO₃H) y el puente disulfuro (-S-S-). Tanto la oxidación a ácido sulfénico como la que conlleva a la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína son reversibles por agentes reductores, mientras que los otros dos estados de oxidación, ácidos sulfinico y sulfónico, no pueden ser reducidos a cisteína.²¹

(Esquema 3.4)



Esquema 3.4. Estados de oxidación del grupo tiol de la cisteína.²¹



Al ser oxidados los residuos de cisteína se pierde la función de las proteínas intracelulares involucradas en la catálisis, la expresión génica, la transducción de señales, etc. A este proceso de oxidación responde un mecanismo de regulación basado en modificaciones por óxido-reducción, reversibles y específicas, a residuos de cisteína de proteínas. Entre estos sistemas de modificación está la formación y ruptura de puentes disulfuro mixtos con otro tiol como el glutatión (GSH).

El GSH está distribuido universalmente en bacterias, plantas y animales y probablemente es el péptido simple más abundante en concentración de 1 a 10 mM. La forma oxidada (GSSG) consiste en dos moléculas de glutatión unidas por un puente disulfuro. La glutatión reductasa (GR) es la enzima que cataliza la reducción, dependiente de NADPH, de GSSG a GSH. Esta reacción es muy importante en los procesos metabólicos y normalmente produce una proporción de GSH:GSSG de más de 100:1, lo que permite al GSH funcionar como un agente reductor intracelular.²¹

En el sitio activo de algunas enzimas se encuentra un residuo de cisteína altamente reactivo, responsable de la catálisis nucleofílica en la que el sustrato es modificado por la formación de un enlace covalente con la enzima para dar un intermediario reactivo. Los grupos nucleofílicos de las enzimas que comúnmente funcionan en la catálisis covalente son el grupo imidazol de los residuos de histidina, el grupo hidroxilo de los residuos de serina y el grupo tiol de los residuos de cisteína, que es el nucleófilo más potente de los tres.

Existe una amplia gama de enzimas conocidas que usan el grupo tiol de un residuo de cisteína en catálisis nucleofílica (Tabla 3.1), entre ellas están las aldehído deshidrogenasas, que catalizan la oxidación irreversible de los aldehídos, dependiente de NAD(P)^+ .²¹



Tabla 3.1. Algunas enzimas que emplean al grupo tiol de un residuo de cisteína como nucleófilo.²¹

ENZIMA	INTERMEDIARIO
Aldehído deshidrogenasas	Tiohemiacetal
Tiol proteasas	Tioéster
Carbamoil fosfato sintetetasas	Tioéster
Peroxirredoxinas (1 Cys)	Ácido sulfénico
Peroxirredoxinas (2 Cys)	Ácido sulfénico y disulfuro
NADH peroxidadas	Ácido sulfénico y disulfuro mixto
Proteína tirosina fosfatasas	Tiol-fosfato

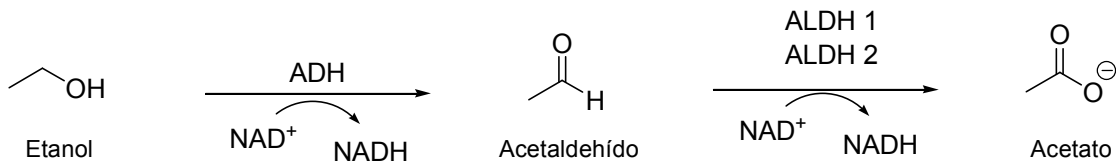
A pesar de que el grupo tiol de los residuos de cisteína es el nucleófilo más potente de los existentes en las proteínas, es el ión tiolato (S^-), no la forma tiol (-SH), la especie que es reactiva como nucleófilo, por lo que la reactividad del residuo de cisteína catalítico está determinada por la fracción del tiol que está presente en la forma de tiolato y por la reactividad intrínseca de este tiolato. A su vez, estos factores dependen de la basicidad del grupo tiol, es decir de su pKa, el cual es de 8.9 para el residuo de cisteína libre. De ser éste el valor para el residuo de cisteína catalítico, estas enzimas no serían activas a valores de pH fisiológicos. Se requiere por lo tanto que el grupo tiol del residuo de cisteína del sitio activo sufra una activación inicial para que esté presente en la forma del tiolato y que el sitio activo esté diseñado de tal manera que el tiol de la cisteína catalítica tenga un valor de *pKa* considerablemente disminuido, con lo que el residuo de cisteína catalítica estará, a los valores de pH del medio intracelular, mayoritariamente en su forma de tiolato muy reactivo.²¹



3.5. INHIBIDORES DE LAS ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS

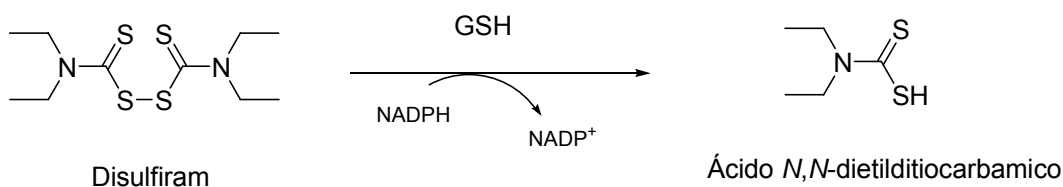
3.5.1. Disulfiram

A mediados del siglo pasado surgió una estrategia terapéutica en contra del alcoholismo basada en el uso de disulfiram (bis(dietilcarbamoil)disulfuro), una sustancia que al ser administrada previamente a una ingestión de alcohol, provoca una serie de malestares como son náuseas, vómito, taquicardia e hipotensión, debido a la acumulación de acetaldehído en el torrente sanguíneo.²² La acción farmacológica del disulfiram deriva de la inhibición de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial hepática (ALDH2), enzima que cataliza el último paso de la oxidación del etanol.²²⁻²³ (Esquema 3.5)



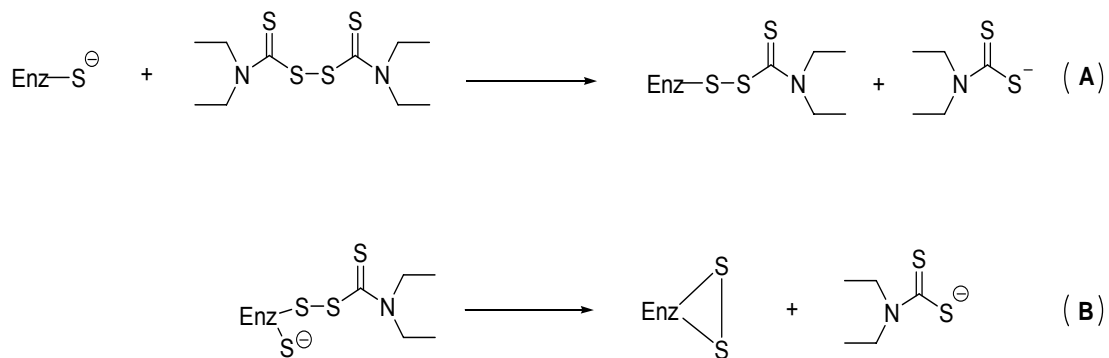
Esquema 3.5. Vía de oxidación del etanol en hígado. El etanol es oxidado al aldehído mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), posteriormente el aldehído es oxidado hasta el ácido carboxílico, mediado por la aldehído deshidrogenasa de clase 1 (citoplásmica) o clase 2 (mitocondrial).²⁴

Desde que el disulfiram empezó a ser empleado en la terapia humana, numerosas investigaciones surgieron en busca de establecer su mecanismo de inhibición. En 1977, Cobby y col.²⁵ demostraron que el disulfiram no es el principio activo que ejerce la influencia sobre el metabolismo de oxidación del etanol pues encontraron que, después de ser ingerido, es reducido rápidamente a dietilditiocarbamato (DDTC) por acción de la glutatión reductasa (Esquema 3.6). Con ésto, los autores justificaron la presencia predominante de esta sustancia en el torrente sanguíneo después de la administración del disulfiram, pues para entonces ya había otros investigadores que habían reportado la existencia de esta especie.²⁶



Esquema 3.6. Reducción del disulfiram en sangre por acción de la glutatión reductasa.^{25,26}

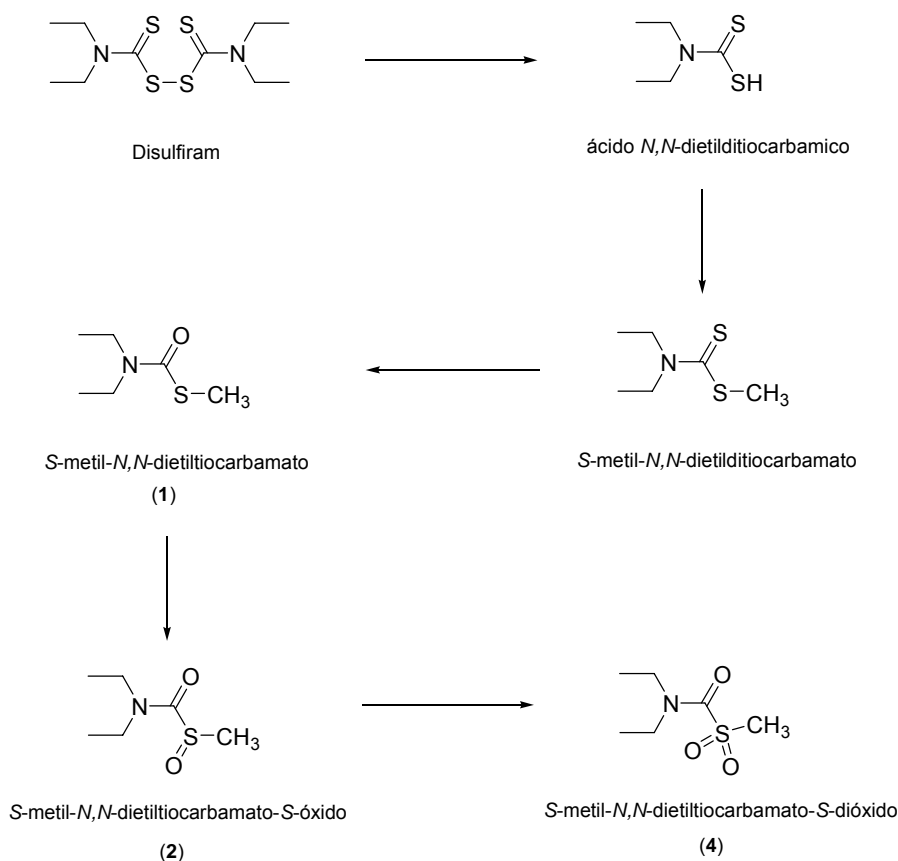
Otros estudios en torno al mecanismo de acción del disulfiram^{27,28} proponen que, después de ser ingerido, se combina con un tiolato de la enzima para formar un disulfuro mixto (Esquema 3.7, ruta A). Vallari y col.²⁹ describieron que, en estudios *in vitro*, el disulfiram inhibió directamente a la ALDH de mitocondria de hígado de rata (ALDH2). Ellos propusieron que la inhibición surge de la formación de un enlace disulfuro intramolecular entre dos de las tres cisteínas contiguas presentes en el sitio activo de la enzima. (Esquema 3.7, ruta B) Sin embargo, algunos autores opinan que estos mecanismos son poco factibles *in vivo*, dada la vida media corta del disulfiram en el torrente sanguíneo.²⁵



Esquema 3.7. Mecanismos de inactivación de la ALDH mitocondrial. A) Propuesta de Kitson, 1975;²⁷ B) propuesta de Vallari y col., 1982.²⁹



Hart y col.³⁰ propusieron la ruta metabólica de disulfiram mostrada en el Esquema 3.8. Este estudio estableció que el ácido *N,N*-dietilditiocarbámico sufre una reacción de metilación para formar el *S*-metil-*N,N*-dietilditiocarbamato, el cual es activado metabólicamente por desulfuración oxidativa y oxidación para formar el *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato (1) y el *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-óxido (2) respectivamente. Este último es el precursor de la sulfona *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-dióxido (4).³⁰ Otros trabajos apoyan esta hipótesis.^{8,31-33} Hart y col.³² estudiaron el potencial de inhibición *in vitro* e *in vivo* de los metabolitos del disulfiram sobre la ALDH de hígado de rata y establecieron el siguiente orden: *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-óxido (2) > *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato (1) > *S*-metil-*N,N*-dietilditiocarbamato > ácido *N,N*-dietilditiocarbámico.



Esquema 3.8. Vía metabólica propuesta por Hart y col. para la bioactivación del disulfiram.³²⁻³⁵

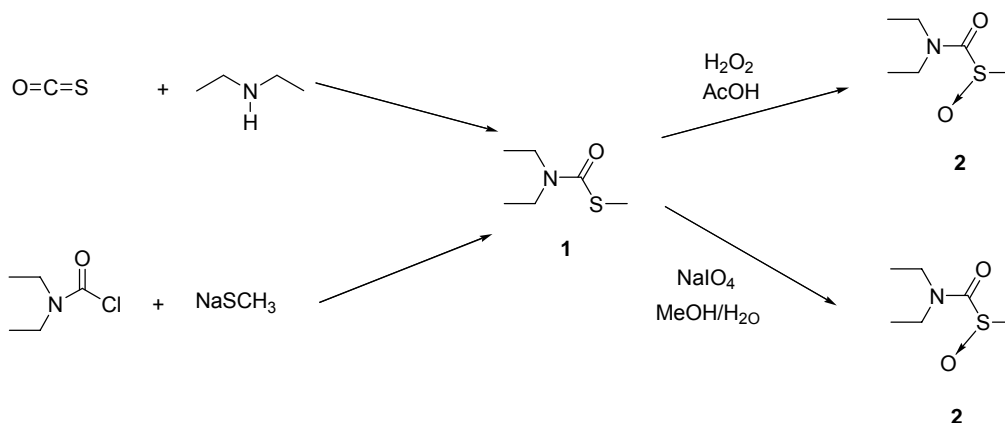


En relación con el efecto que tiene el disulfiram sobre las betaína aldehído deshidrogenasas, se ha encontrado en estudios preliminares *in vitro* que el disulfiram es un excelente inhibidor de la BADH de *P. aeruginosa*.^{3,4} El estudio en relación con el efecto inhibitorio de los metabolitos del disulfiram sobre la BADH de *P. aeruginosa* es un campo abierto a la investigación que podría dar lugar a interesantes aplicaciones.

3.5.2. S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-óxido (2)

A partir de 1992, con los estudios reportados por Hart y Faiman,⁸ ha sido por lo general aceptada la hipótesis de que el S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-óxido (2) es el principal responsable de la actividad inhibitoria sobre la ALDH.³⁷⁻⁴⁰ Estudiando la inhibición de la enzima con otros tiocarbamatos, estos autores sostienen su afirmación de que la inhibición se lleva a cabo previa formación del correspondiente sulfóxido, en lo que han coincidido otros estudios *in vitro* e *in vivo* realizados por otros investigadores.⁴¹

Se ha descrito la síntesis de 2 a partir de la oxidación del tiocarbamato 1 al sulfóxido 2 con sulfuro de carbonilo y dietilamina,^{8,42} y a partir de cloruro de dietilcarbamoilo y tiometóxido de sodio.⁴³ Hart y col.⁸ describen la oxidación de 1 con metaperyodato de sodio y Schloss⁴⁴ la reporta con peróxido de hidrógeno y ácido acético (Esquema 3.9).



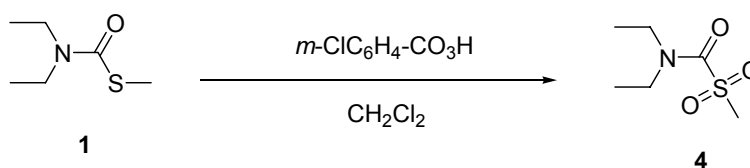
Esquema 3.9. Preparación del S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-óxido (2).^{8,42-44.}



3.5.3. S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (4)

El interés por esta especie química surgió al observar la formación de una pequeña cantidad de ésta durante la síntesis del S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-óxido (2) con metaperyodato de sodio; Nagendra y col.³⁸ evaluaron la actividad de este compuesto *in vitro* e *in vivo*, resultando un inhibidor de la ALDH mitocondrial de hígado de rata más potente que el propio sulfóxido.^{35,38} La presencia de este compuesto es el resultado de la oxidación *in vivo* del S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-óxido (2). Debido a su alta reactividad es difícil detectarlo en sangre excepto conjugado a proteínas. Por lo anterior se ha considerado a este compuesto demasiado tóxico para ser un potencial agente terapéutico.³⁴

La síntesis química de 4 a partir del compuesto 1 ha sido descrita con ácido *m*-cloroperoxibenzoico.^{38,44} (Esquema 3.10)



Esquema 3.10. Preparación del S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (4).

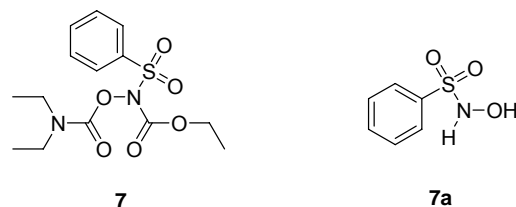
3.5.4. Derivados del ácido bencensulfhidroxámico

Existen reportes en la literatura de compuestos ajenos al metabolismo del disulfiram, también considerados profármacos, que originan o liberan agentes que actúan sobre la enzima ALDH, provocando su inhibición. Entre estos agentes se mencionan los generadores de nitroxilo, óxido nítrico, nitrosobenceno, carboxilo⁴⁵⁻⁴⁷ y de carbamoilo,⁹ entre otros.

Conway y col.,⁹ prepararon algunos derivados del ácido bencensulfhidroxámico (7a) (Esquema 3.11) sustituyendo el grupo hidroxilo por el grupo

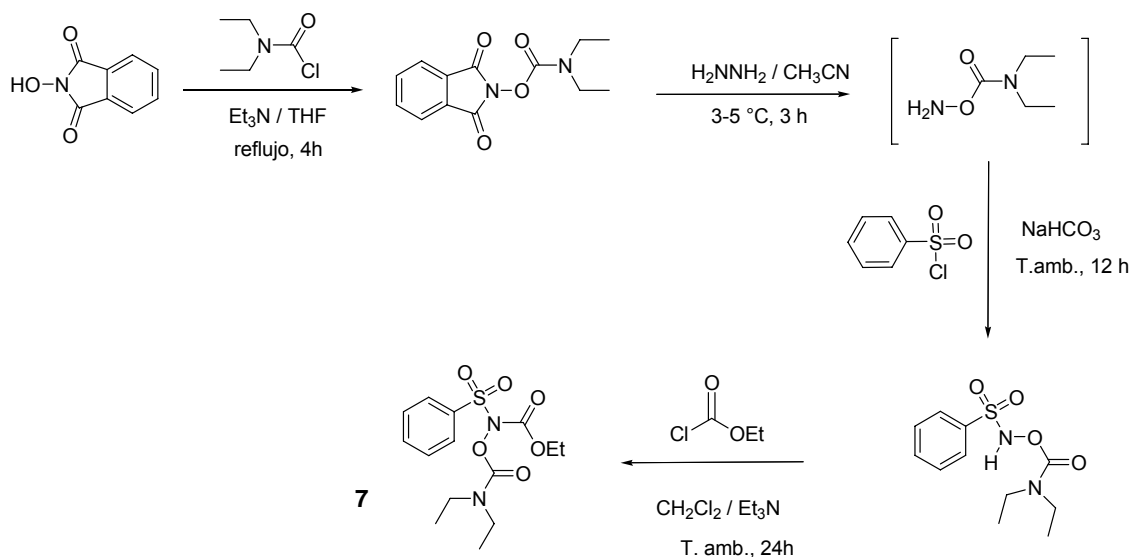


N,N-dietilcarbamoilo y el nitrógeno de la hidroxilamina por los grupos acetilo, terbutilcarbonilo, benzoilo y etoxicarbonilo, respectivamente. Estos compuestos fueron evaluados *in vitro* como inhibidores de la aldehído deshidrogenasa de levadura, presentando actividad sólo el sustituido con el etoxicarbonilo (compuesto **7**).⁹



Esquema 3.11. Estructura del *N*-(etoxicarbonil)benzensulfohidroxamato de *O*-(dietilcarbamoilo) (**7**) y del ácido benzensulfohidroxámico (**7a**).

Cuando Conway y col. administraron el compuesto **7** en ratas, se elevaron significativamente los niveles de acetaldehído en sangre después de suministrar etanol, resultado de la inhibición *in vivo* de la ALDH. Los autores lo atribuyen a una doble funcionalidad del compuesto, como agente nitroxilante y carbamoilante.⁹ La síntesis química de **7** a partir de *N*-hidroxifitalimida está descrita como se muestra en el Esquema 3.12.⁹



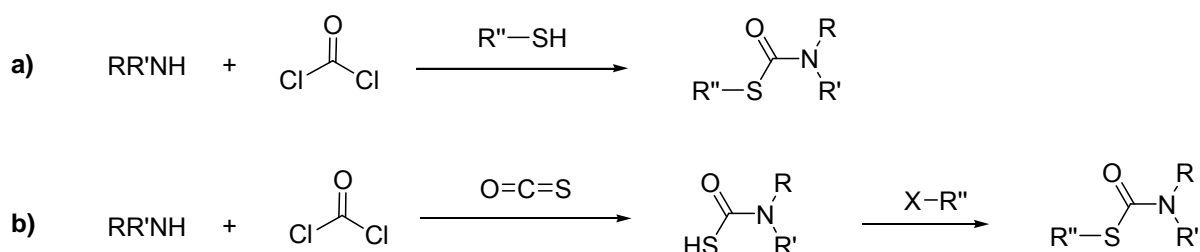
Esquema 3.12. Preparación del *N*-(etoxicarbonil)benzensulfohidroxamato de *O*-(dietilcarbamoilo) (**7**).



3.6. SÍNTESIS QUÍMICA

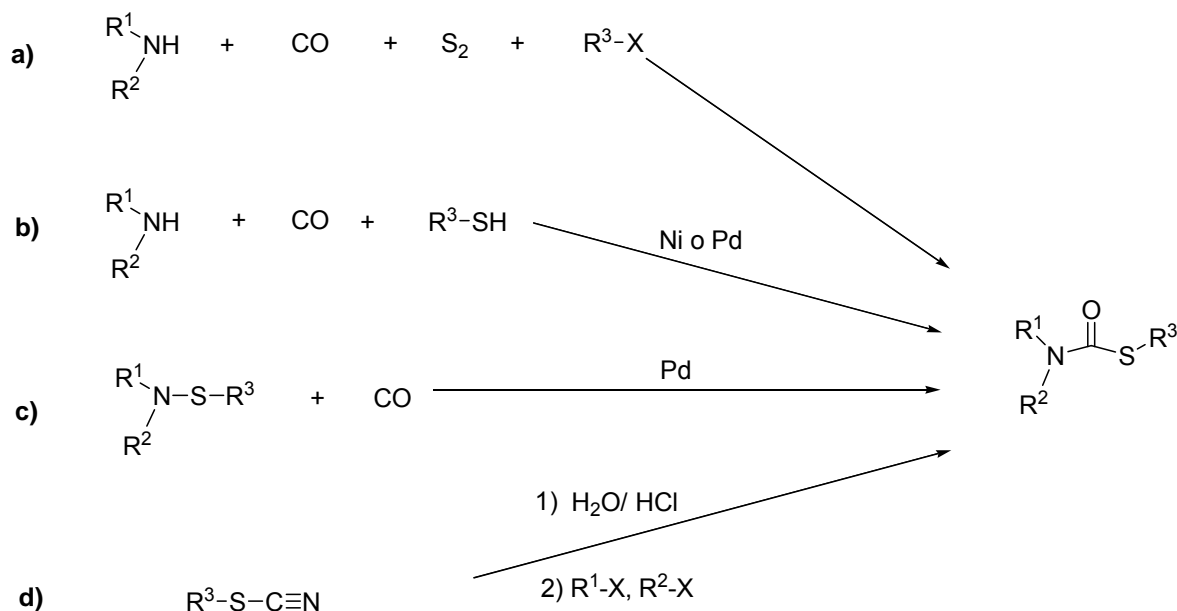
3.6.1. Síntesis de S-alquiltiocarbamatos

Los S-alquiltiocarbamatos (S-alquiltiouretanos) son un importante grupo de compuestos que, debido a su gran variedad de aplicaciones, han alcanzado un gran interés en diferentes campos de investigación. Dentro de sus actividades biológicas, destacando: anestésicos, fungicidas, bactericidas, pesticidas, antivirales y particularmente como herbicidas.⁴⁸ Entre los métodos generales de síntesis descritos para estos compuestos, está la reacción entre una amina y fosgeno, ya sea con un tiol o con sulfuro de carbonilo seguido de alquilación.⁴⁹ (Esquema 3.13)

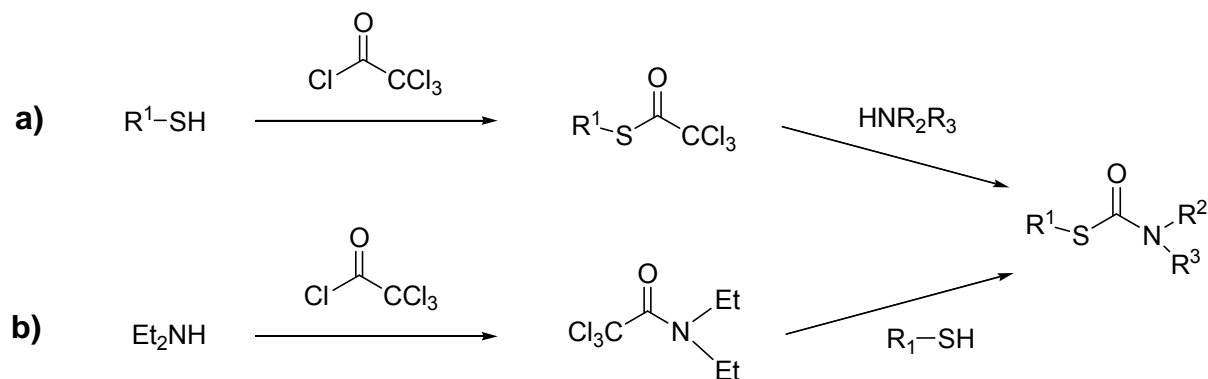


Esquema 3.13. Preparación de tiocarbamatos.⁴⁹

Otras estrategias descritas para la síntesis de tiocarbamatos son: a) la reacción entre una amina secundaria, monóxido de carbono, azufre y un haluro de alquilo;⁵⁰⁻⁵² b) a partir de una amina, un tiol y monóxido de carbono, con níquel o paladio como catalizadores;⁵³ c) a partir de sulfenamidas y monóxido de carbono con catálisis de paladio;⁵⁴ d) la hidratación de tiocianatos orgánicos en presencia de cloruro de hidrógeno produce tiocarbamatos *N,N*-disustituídos.^{48,55} (Esquema 3.14)

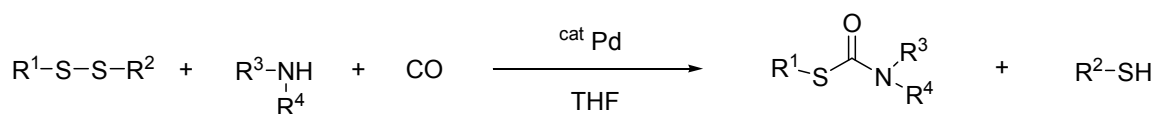
**Esquema 3.14.** Preparación de tiocarbamatos.

Wynne y col.⁴⁸ reportaron la obtención de alquiltiocarbamatos *N,N*-disustituídos a partir de tioles y aminas secundarias en una secuencia de dos pasos que involucra la reacción con cloruro de tricloroacetilo, para lo que evaluaron dos estrategias: a) la reacción inicial del grupo tiol con cloruro de tricloroacetilo para formar un tioéster y el posterior desplazamiento del triclorometilo con la amina para formar el tiocarbamato; b) la reacción inicial del grupo amino con cloruro de tricloroacetilo y después la sustitución con el tiol. (Esquema 3.15)

**Esquema 3.15.** Síntesis de tiocarbamatos.⁴⁸



Nishiyama y col.⁴⁹ describieron recientemente un nuevo método para la síntesis de tiocarbamatos, el cual consiste en hacer reaccionar dialquil o diaril disulfuros con aminas secundarias y monóxido de carbono en presencia de una cantidad catalítica de un complejo de paladio, como se ilustra en el Esquema 3.16.

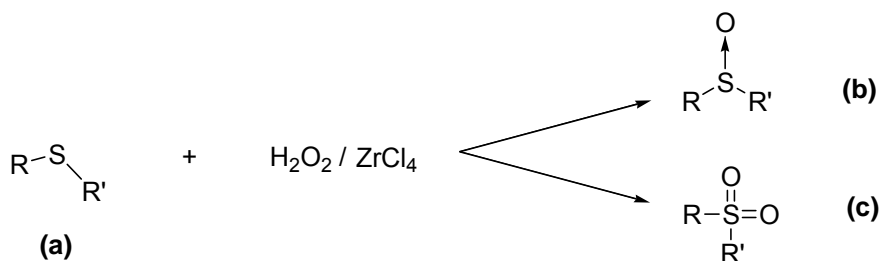


Esquema 3.16. Síntesis propuesta por Nishiyama y col. para tiocarbamatos.

3.6.2. Métodos generales de oxidación de sulfuros y sulfóxidos

La oxidación de sulfuros es la alternativa más sencilla para la síntesis de sulfóxidos y sulfonas. Para estas reacciones se han reportado una gran variedad de oxidantes; usualmente, dependiendo de las condiciones de reacción y de la proporción del oxidante es posible obtener el sulfóxido o la sulfona. Algunos de los oxidantes comúnmente empleados son peróxido de hidrógeno, oxígeno y ozono,⁵⁶ *N*-bromosuccinimida, compuestos halogenados como peryodato, hipoclorito, etc., perácidos y peróxidos, entre otros agentes oxidantes.⁵⁷

Recientemente, Bahrami⁵⁸ describe un sistema oxidante que involucra el uso de peróxido de hidrógeno catalizando con tetracloruro de zirconio para la oxidación selectiva de sulfuros a sulfóxidos o a sulfonas en presencia de otros grupos fácilmente oxidables. (Esquema 3.17)



Esquema 3.17. Oxidación de sulfuros con catálisis de ZrCl_4 .



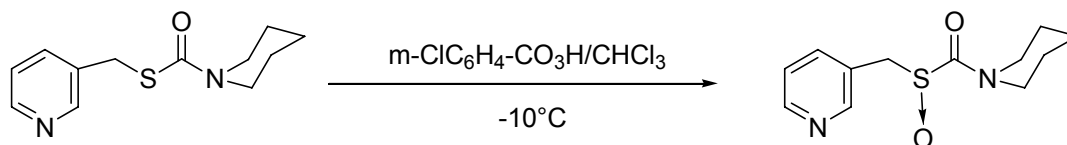
3.6.2.1. Peróxido de hidrógeno.

Este oxidante puede ser usado solo o en presencia de un catalizador, empleando como disolvente ácido acético. Es usado para oxidar sulfuros a sulfóxidos.⁵⁶ En años recientes, muchos procesos industriales han optado por el uso de peróxido de hidrógeno acuoso como oxidante, por su efectivo contenido de oxígeno, bajo costo, seguridad de almacenamiento y operación y por ser un reactivo ambientalmente amigable.⁵⁹

El ácido acético funciona también como activador esencial para que la reacción se lleve a cabo, pues el peróxido de hidrógeno oxida a los sulfuros lentamente. La oxidación puede ser llevada directamente hasta la sulfona. Generalmente las reacciones se llevan a cabo usando un exceso de peróxido de hidrógeno al 30 % en agua a temperatura ambiente y con un cosolvente como alcohol o acetona.⁵⁶

3.6.2.2. Ácido perbenzoico y sus derivados.

El ácido *m*-cloroperbenzoico es uno de los mejores agentes oxidantes selectivos para transformar sulfuros a sulfóxidos y para obtener sulfona libre de sulfóxido. Ha sido usado en una gran variedad de sustratos, como son tioéteres, tioésteres, heterociclos multifuncionales (Esquema 3.18), tioacetales, disulfuros y penicilinas, por mencionar algunos.⁵⁶

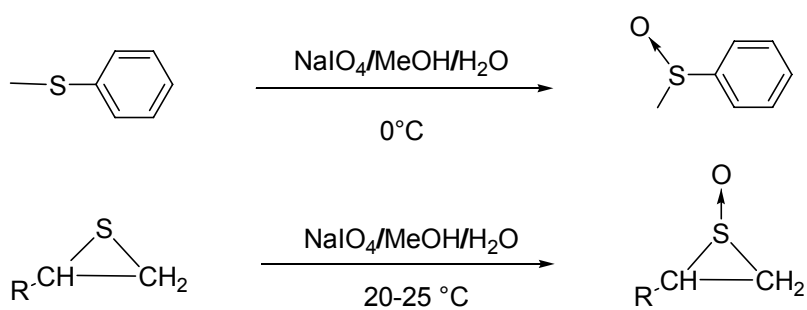


Esquema 3.18. Oxidación de tioésteres heterocíclicos con ácido *m*-cloroperbenzoico.⁵⁶



3.6.2.3. Metaperyodato de Sodio.

En 1961, Leonard y Jonson prepararon selectivamente sulfóxidos por oxidación de tioéteres usando metaperyodato de sodio, en frío. Esta reacción ha sido una de las más ampliamente usadas y uno de los mejores métodos para esta conversión.⁵⁶ (Esquema 3.19)



Esquema 3.19. Oxidación de algunos sulfuros con peryodato de sodio.⁵⁶

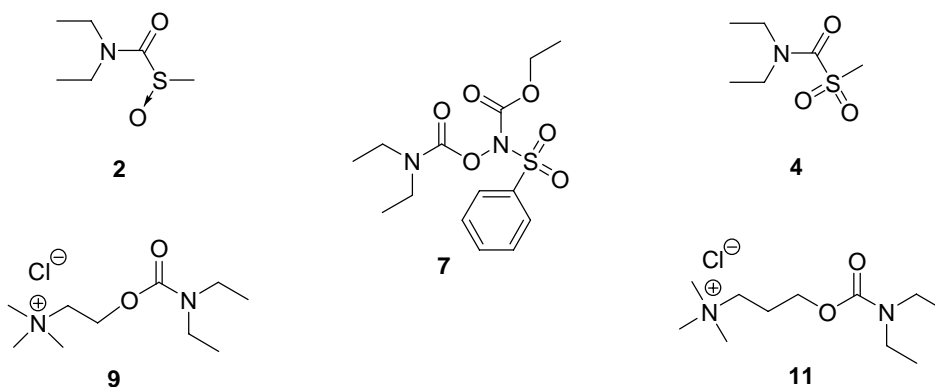


4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La quimioterapia para combatir infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* es difícil debido a que el microorganismo es naturalmente resistente a muchos de los antibióticos utilizados en la práctica médica. La polimixina es uno de los pocos antibióticos que logra combatir al patógeno, aunque su toxicidad y los severos efectos colaterales que causa obligan a usarlo con precaución en la terapia humana.¹ De aquí que surja la necesidad de nuevos fármacos capaces de superar la resistencia de la bacteria.

Existen estudios que sugieren que la *P. aeruginosa* es dependiente de la actividad de la enzima BADH para subsistir bajo las condiciones existentes en los sitios de infección,²⁻⁴ por lo que resulta conveniente aprovechar este blanco potencial para atacar a la bacteria iniciando una búsqueda de inhibidores específicos de la BADH de *P. aeruginosa* y con ello el posible desarrollo de nuevos fármacos eficaces contra el patógeno.

Por lo anterior, se planteó la conveniencia de llevar a cabo la síntesis de los compuestos mostrados en esquema 4.1, pues se les ha previsto como potenciales inhibidores de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa*.



Esquema 4.1. Compuestos propuestos como potenciales inhibidores de la BADH: S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-óxido (2), S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (4), N-(etoxicarbonil)benzensulfhidroxamato de O-(dietilcarbamoilo) (7), cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-N,N,N-trimetiletilamonio (9) y cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-N,N,N-trimetilpropilamonio (11).



5. OBJETIVO

Preparar los compuestos propuestos como inhibidores de la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) de *Pseudomonas aeruginosa*: S-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-óxido (**2**), S-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-dióxido (**4**), *N*-(etoxicarbonil)bencensulfhidroxamato de *O*-(dietilcarbamoilo) (**7**), cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropilamonio (**9**) y cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletilamonio (**11**).

5.1. Objetivos particulares

1. Establecer metodologías adecuadas de síntesis para preparar cada uno de los compuestos propuestos.
2. Realizar la identificación física y la caracterización espectroscópica de los productos obtenidos y de los intermediarios.
3. Optimizar las metodologías desarrolladas y escalar de 1 a 5 g cada uno de los productos finales **2**, **4**, **7**, **9** y **11**.



6. HIPÓTESIS

Mediante metodologías de síntesis eficientes, es posible llevar acabo la preparación de los compuestos *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-óxido (**2**), *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-dióxido (**4**), *N*-(etoxicarbonil)bencensulfhidroxamato de *O*-(dietilcarbamoilo) (**7**), cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropilamonio (**9**) y cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletilamonio (**11**), los cuales se han propuesto como posibles inhibidores de la betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*, dada la reactividad electrofílica demostrada para este tipo de compuestos sobre la cisteína catalítica de otras aldehído deshidrogenasas.



7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 MATERIALES

7.1.1. Reactivos

- Ácido acético (Baker)
- Ácido peracético 44.6 %
- Bicarbonato de sodio
- Cloroformiato de etilo
- Clorometano
- Cloruro de bencensulfonilo
- Cloruro de dietilcarbamoilo (Aldrich)
- Cloruro de sodio
- Celita
- Dimetilaminopropanol
- Dimetilaminoetanol
- Dióxido de carbono
- Florisil
- Hidróxido de sodio
- Hidróxido de potasio
- Hidracina anhidra[†]
- N-hidroxiftalimida (Fluka)
- Nitrógeno_(g)
- Peróxido de hidrógeno 30 % v/v
- Sulfato de sodio anhidro
- Sílica gel para columna (70-230 mesh)
- Sílica gel flash (200-400 mesh)
- Trietilamina
- Tiometóxido de sodio (Aldrich)
- Yodo

[†] La hidracina anhidra se obtuvo secando el compuesto monohidratado con un equivalente en peso de hidróxido de sodio en lentejas durante 24 horas y posterior destilación a presión reducida bajo atmósfera de nitrógeno.⁶⁰



7.1.2. Disolventes

- Acetonitrilo (Baker)
- Acetato de etilo*
- Agua destilada
- Acetona*
- Cloroformo*
- Cloruro de metileno*
- Etanol*
- Éter etílico*
- Hexano*
- Isopropanol*
- Metanol*
- Metil terbutil eter (MTB)*
- THF anhidro (Aldrich)
- Tolueno*

* Grado técnico, purificados por destilación fraccionada.

7.1.3. Material

- Barras magnéticas de diferentes tamaños
- Capilares
- Cámaras de elución
- Columna cromatográfica
- Cromatofolios de sílica gel Alugram® SIL G/UV₂₅₄
- Embudos de vidrio de diferentes diámetros
- Embudos Buchner de porcelana
- Embudos Hirsch de porcelana
- Embudos de adición de diferentes capacidades
- Embudos de separación de diferentes capacidades
- Equipo de destilación simple, fraccionada y presión reducida.
- Matraz bola de tres bocas diferentes capacidades
- Matraz bola de diferentes capacidades
- Matraz Erlenmeyer de diferentes capacidades
- Mangueras para vacío
- Papel indicador de pH
- Papel indicador de óxido-reducción
- Parrilla de agitación y calentamiento



- Pipetas Pasteur
- Pipetas graduadas de diferentes capacidades
- Probetas graduadas de diferentes capacidades
- Pinzas de tres dedos
- Refrigerantes
- Soporte universal
- Trampas de humedad
- Vasos de precipitado de diferentes capacidades

7.1.4. Equipo e instrumentos

- Agitador mecánico Cole-Palmer Modelo Stir-Pak 4454-10
- Aparato Fisher Johns IL 684
- Balanza analítica Ohaus
- Balanza granataria OHAUSE 700-800
- Balanza semianalítica Mettler PB300
- Bomba de alto vacío
- Canastillas de calentamiento
- Equipo de RMN 300 MHz Eclipse Jeol
- Espectrómetro de masas Hewlett Packard modelo 5989-AMS-ENGINE acoplado a GC 5890 serie II
- Estufa EELISA
- Lámpara UV 254/366 nm Mineraligh
- Manómetro para alto vacío LABCONCO
- Recirculador de agua Lauda K2RD
- Reóstato Staco Energy
- Rotavapor Buchi R-124
- Potenciómetro Metrohm pH Meter 691
- Termómetro -10 a 250 °C
- Termómetro de alcohol de -10 a 50 °C



7.2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES

7.2.1. Puntos de fusión. Éstos fueron determinados en un aparato Fisher Johns IL 684.

7.2.2. Cromatografía en capa fina. Con esta técnica fue posible llevar a cabo el monitoreo de las reacciones, empleando cromatofolios de sílica gel Alugram® SIL G/UV₂₅₄ como fase estacionaria y como reveladores radiación ultravioleta y vapores de yodo.

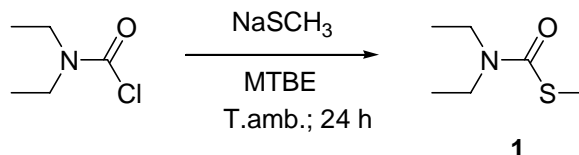
7.2.3. Caracterización espectroscópica. La caracterización se realizó por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ¹H) y de carbono 13 (RMN ¹³C), para lo cual contó con el apoyo del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Química, UNAM. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se obtuvieron en espectrofotómetros RMN Eclipse Jeol de 300 MHz. Se utilizaron como disolventes CDCl₃ y D₂O; TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm a partir del TMS y la constante de acoplamiento (J) en Hertz.

Los espectros de masas se obtuvieron en un Espectrómetro de masas Hewlett Packard modelo 5989-AMS-ENGINE acoplado a GC 5890 serie II, por Impacto Electrónico (I. E.).



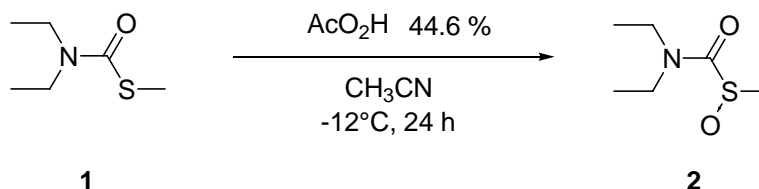
7.3. PROCEDIMIENTOS DE SÍNTESIS

7.3.1. S-metil-N,N-dietiltiocarbamato (1)



A una suspensión de 3.4 g (41.53 mmoles) de tiometóxido de sodio en 10 mL de metil terbutil éter a 5 °C se adicionaron lentamente 5.7 g (45.68 mmoles) de cloruro de dietilcarbamoilo. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación por 24 horas. El curso de la reacción fue seguido por cromatografía de capa fina en sílica gel usando un sistema de elución *n*-hexano-AcOEt (95:5, *R_f* 0.39). Terminada la reacción se filtró el cloruro de sodio producido en la reacción sobre celita, se lavó con MTBE y el filtrado se evaporó en el rotavapor hasta peso constante, obteniendo 5.3 g (86 %) de producto crudo como un líquido amarillo que no requirió purificación. (Anexo 1, espectro 1)

7.3.2. S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-óxido (2).

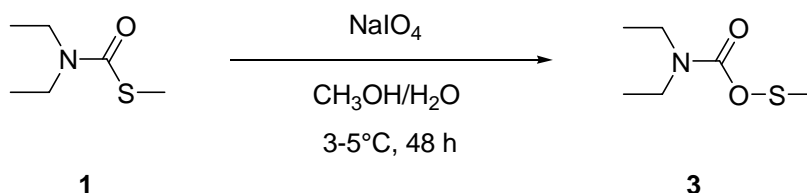


En un matraz bola de 25 mL se pesaron 0.23 g (1.36 mmoles) de **1**, se disolvió en 2.5 mL de acetonitrilo y se colocó en un baño de hielo-sal-acetona, (-12 °C.). Posteriormente se adicionaron lentamente y con agitación 0.2 mL



(1.22 mmoles) de ácido peracético 44.6 % disueltos en 1 mL de acetonitrilo, dejando reaccionar durante 24 horas. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante cromatografía de capa fina (*n*-hexano-acetona 1:1, R_f 0.26). Terminada la reacción se retiró el exceso de ácido acético y acetonitrilo mediante una destilación a presión reducida 25 mmHg/20-25 °C); se adicionaron 9 mL de isopropanol en tres tiempos para arrastrar los compuestos volátiles y se evaporó bajo las mismas condiciones de presión y temperatura hasta alcanzar peso constante, obteniendo 0.113 g (45.2 %) de un líquido incoloro. (Anexo 1, espectro 5)

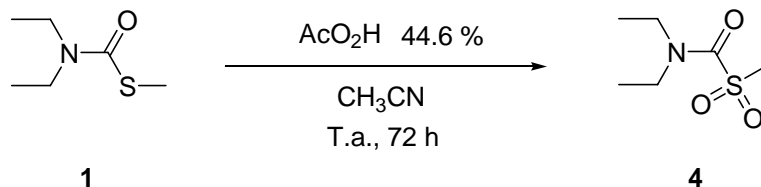
7.3.3. *S*-metil-*O*-(*N,N*-dietilcarbamoil)sulfenato (**3**).



Una solución de 1 g (6.80 mmoles) de *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato (**1**) en 10 mL de una mezcla agua-metanol 1:1 se enfrió a 0 °C y se adicionaron 0.8 g (3.39 mmoles) de peryodato de sodio en dos porciones, una al inicio y otra a las 24 horas de reacción, manteniendo agitación y temperatura de 3 a 5 °C, por un tiempo total de 48 horas (CCF en sílica gel; *n*-hexano-acetona 7:3 R_f 0.22). El sólido formado fue eliminado por filtración sobre celita y lavado con metanol; el filtrado se concentró en rotavapor, se disolvió en CH_2Cl_2 , se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó hasta sequedad en rotavapor. El producto se obtuvo como un líquido de color amarillo (0.57 g, 51.4%) cuyas propiedades espectroscópicas coinciden con las reportadas por Schloss para **3**. (Anexo 1, espectros 2 y 3)

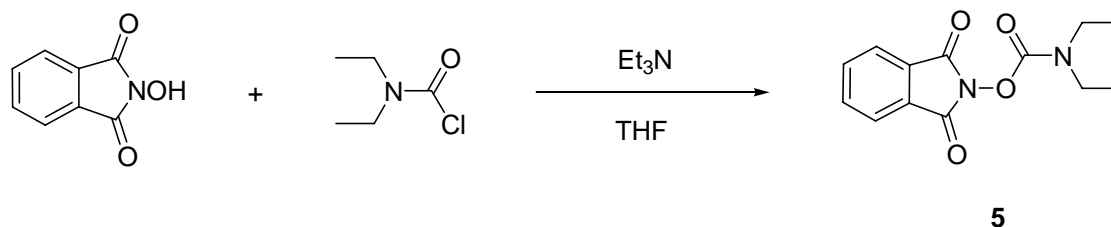


7.3.4. S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (4).



Se preparó una solución de **1** (1 g, 6.8 mmoles), en 2 mL de acetonitrilo sobre un baño de hielo. Se adicionaron lentamente 3.6 mL (4 g, 17 mmoles) de ácido peracético al 32 %. La mezcla reaccionó durante 72 horas, a temperatura ambiente con agitación, siguiendo el curso de la misma por cromatografía de capa fina en sílica gel (*n*-hexano–acetona 2:1, R_f 0.25). Se adicionaron 15 mL de isopropanol y se evaporó en rotavapor para eliminar ácido acético y peracético, se repitió la operación dos veces más y el residuo se disolvió en 15 mL de CH_2Cl_2 , se lavó con agua, se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó hasta peso constante, obteniendo 0.91 g (75 %) de un líquido incoloro. (Anexo 1, espectros 6 y 7)

7.3.5. O-(dietilcarbamoil)-N-hidroxiftalamida (5).

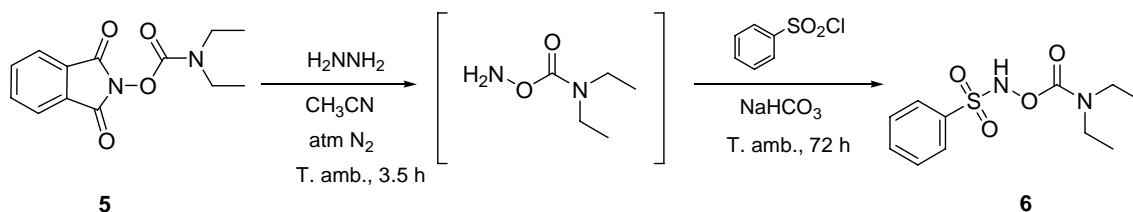


Se disolvieron 5 g de *N*-hidroxiftalamida (30.65 mmoles) en 90 mL de THF seco y se colocó en un baño de hielo bajo atmósfera de N_2 . Se adicionó lentamente trietilamina (4.7 mL, 33.71 mmoles) durante 10 minutos, con lo que la mezcla se coloreó roja. Posteriormente se adicionaron 8 mL de cloruro de dietilcarbamoilo (61.3 mmoles) durante 20 minutos, se dejó que la mezcla alcanzara la



temperatura ambiente y luego se colocó a reflujo durante 4 horas, con lo que adquirió un color amarillo. El seguimiento de reacción se llevó a cabo mediante cromatografía de capa fina (sílica gel, *n*-hexano– AcOEt 7:3, R_f 0.4). Se filtraron las sales ($\text{Et}_3\text{N}\cdot\text{HCl}$) al vacío sobre celita, se lavó con THF y el filtrado se evaporó hasta sequedad. Se adicionaron 20 mL de hexano, se refrigeró por 2 horas y se obtuvieron 7.9 g de cristales blancos pardos, los cuales se filtraron, se lavaron con *n*-hexano para finalmente recristalizar de AcOEt, obteniendo 5.9 g (73 %) de cristales blancos con un punto de fusión de 124 – 125 °C.

7.3.6. Ácido *O*-(dietilcarbamoil)bencensulfhidroxámico (6).

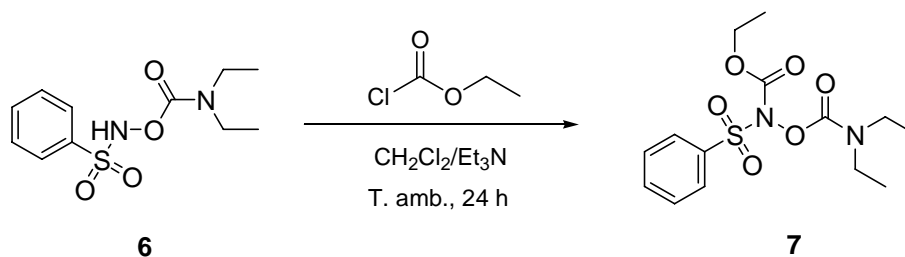


En un matraz bola de tres bocas con capacidad de 250 mL se colocaron 5.58 g (21.27 mmoles) de **5**, se disolvieron en 100 mL de acetonitrilo y la solución se colocó bajo una atmósfera de N_2 ; posteriormente se adicionaron lentamente 2.24 g (70.19 mmoles) de hidracina anhidra. La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos y en baño de hielo y agitación durante 3.5 horas; se monitoreó mediante cromatografía de capa fina (sílica gel, tolueno-AcOEt 5:1, R_f 0.25). Los sólidos formados fueron filtrados sobre celita y se lavaron con acetonitrilo frío. Al filtrado se le adicionaron lentamente 2.5 g (22 mmoles) de peróxido de hidrógeno al 30 % p/p, dejando agitar en baño de hielo por 1 hora y después a temperatura ambiente durante 3 horas. Se agregaron 1.8 g (21.27 mmoles) de bicarbonato de sodio y posteriormente se adicionaron lentamente, con agitación, 3.75 g (21.27 mmoles) de cloruro de bencensulfonilo, llevándose a cabo la reacción con agitación y a temperatura ambiente durante 72 horas. El avance de la reacción

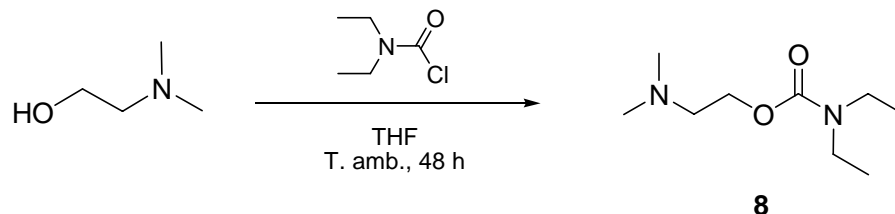


se verificó mediante cromatografía de capa fina, (*n*-hexano-AcOEt 2:1, R_f 0.4). Las sales de NaCl formadas fueron filtradas sobre celita, se lavaron con acetonitrilo y el filtrado se evaporó hasta sequedad, obteniendo un residuo líquido de consistencia viscosa de color amarillo mezclada con sólidos, por lo que se redisolvió en acetato de etilo, los insolubles se filtraron sobre celita, se lavaron con el mismo disolvente y el filtrado se evaporó hasta sequedad, obteniendo 6.63 g (97.4 %) de un líquido viscoso amarillo.

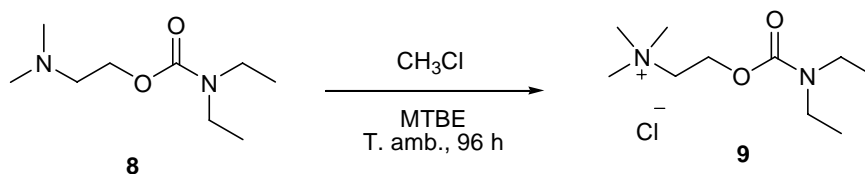
7.3.7. *N*-(etoxicarbonil)bencensulfohidroxamato de *O*-(dietilcarbamoilo) (7).



A 6.6 g (24.26 mmoles) del compuesto **6** disueltos en 200 mL de CH_2Cl_2 se adicionaron lentamente y con agitación 2.5 mL (26.7 mmoles) de cloroformiato de etilo a temperatura ambiente. Posteriormente, enfriando a 5-10 °C, se adicionaron lentamente 3.7 mL (26.7 mmoles) de trietilamina y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación durante 24 horas, siguiendo el curso de la reacción mediante cromatografía en capa fina, sistema *n*-hexano–AcOEt 1:1, (R_f 0.54). Al término, la mezcla fue evaporada hasta sequedad; el residuo se suspendió en AcOEt, se filtró sobre celita y el filtrado fue evaporado nuevamente hasta sequedad, obteniendo un residuo aceitoso de color amarillo, el cual después de 72 horas a -20 °C cristalizó. Se adicionó éter anhidro y se filtró obteniendo 4.3 g (51.5 %, rendimiento global 36 %) cristales blancos con un punto de fusión de 54 - 55 °C. (Anexo 1, espectros 8 y 9)

**7.3.8. 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N*-dimetiletilamina (8).**

En un matraz balón de 25 mL se colocaron 0.5 g (5.6 mmoles) de dimetilaminoetanol y se disolvieron en 10 mL de THF; se situó sobre un baño de agua a 10–15 °C para llevar a cabo la adición lenta del cloruro de dietilcarbamoilo (1.15 g, 8.4 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, siguiendo el curso de la misma por cromatografía de capa fina, sistema CHCl₃-MeOH (9:1, *R_f* 0.4) hasta completa desaparición del alcohol. La mezcla se evaporó hasta sequedad con lo que se obtuvo un residuo aceitoso al que se le adicionó 1 mL de agua destilada y bicarbonato de sodio sólido hasta saturar, y se dejó con agitación durante 2 horas. Se extrajo con acetato de etilo, se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó hasta sequedad, obteniendo 0.56 g (59.6 %) de producto.

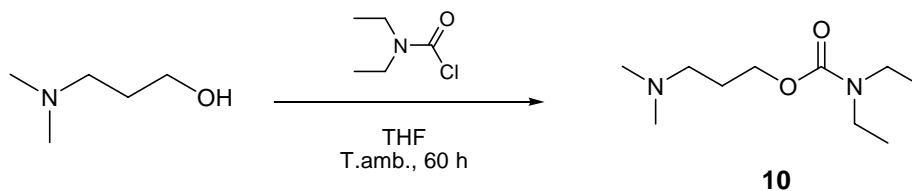
7.3.9. Cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletilamonio (9).

En 15 mL de MTBE fueron disueltos 0.56 g de **8**, posteriormente la solución fue transferida a un frasco para hidrogenación a presión. El frasco se colocó en el equipo Parr y se introdujo clorometano al sistema hasta lograr una presión de 60 lbs/pulg²; se agitó mecánicamente durante 4 días. La mezcla de reacción se transfirió a un matraz balón, enjuagando con isopropanol y se evaporó hasta



sequedad. El residuo se suspendió en acetato de etilo, se extrajo con agua destilada (5 por 5 mL) y se evaporó hasta sequedad la fase acuosa. Se purificó por cromatografía de columna, empleando sílica gel flash (230-400 mesh) y con un sistema de cloroformo-metanol (75:25, R_f 0.36), obteniendo 0.6 g (49.83 %) de producto líquido transparente. (Anexo 10 y 11)

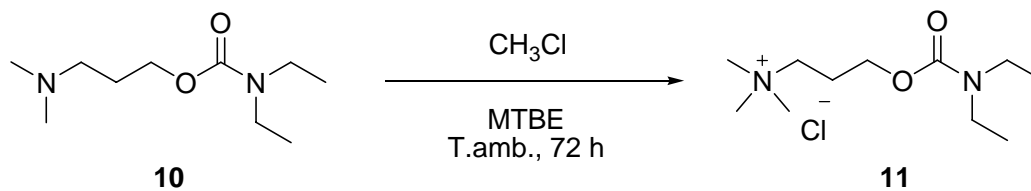
7.3.10. 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N*-dimetilpropilamina (10).



Se preparó una solución de 3-dimetilamino-1-propanol (0.53 g, 4.6 mmoles) en 10 mL de THF y se colocó la mezcla sobre un baño de hielo con agitación. Se adicionaron lentamente 0.63 g (4.6 mmoles) de cloruro de dietilcarbamoilo, dejando reaccionar en el baño de hielo por 30 minutos y a temperatura ambiente por 60 horas. Se observó el avance de la reacción por cromatografía de capa fina (CHCl_3 -MeOH 9:1, R_f 0.42). La mezcla se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en 1 mL de agua, se agregó bicarbonato de sodio hasta saturar, dejando reaccionar durante 2 horas. Se extrajo con AcOEt (5 x 5 mL), se secó con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía de columna, empleando sílica gel flash (230-400 mesh) con una fase móvil de CHCl_3 -MeOH (95:5). Se obtuvieron 0.24 g (20.9 %) de un líquido amarillo.



7.3.11. Cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropilamonio (11).

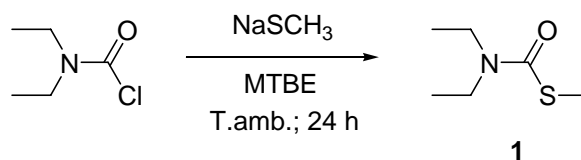


En un frasco para hidrogenación chico se colocó el producto obtenido **10** y se disolvió en 10 mL de MTBE. Se colocó en el equipo de hidrogenación Parr y se hizo pasar el clorometano gas hasta presión de 60 lbs/pulg². Se dejó con agitación constante a temperatura ambiente durante 72 horas. Se formó un precipitado blanco, el cual fue filtrado al vacío y lavado con MTBE (0.038 g, 42.9 %). Cromatografía en capa fina en CHCl₃-MeOH 8:2 (*R_f* 0.3). El producto, altamente higroscópico, fue caracterizado sin mayor purificación. (Anexo 1, espectros 12 y 13)



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

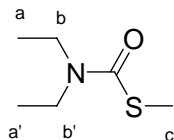
El compuesto **1** (S-metil-N,N-dietiltiocarbamato) fue preparado mediante una modificación del método descrito por Gray y col.,⁴³ quienes reportaron la síntesis de **1** a partir de cloruro de dietilcarbamoilo y tiometóxido de sodio en tolueno a reflujo. La modificación del disolvente y la temperatura de reacción (metilterbutil éter a temperatura ambiente) permitió simplificar el aislamiento del producto e incrementar su rendimiento (Esquema 8.1 y Tabla 8.1). La otra alternativa reportada en la literatura, en la que se parte de sulfuro de carbonilo y dietilamina⁸ fue descartada por razones de seguridad.



Esquema 8.1. Preparación del compuesto **1**.

El compuesto **1**, purificado por destilación a 170–180 °C/585 mmHg, se obtuvo con un 86 % de rendimiento. Se caracterizó por espectroscopia de RMN ¹H y ¹³C. (Tabla 8.1. Anexo 1, espectro 1)

Tabla 8.1. Resultados para el compuesto **1**.

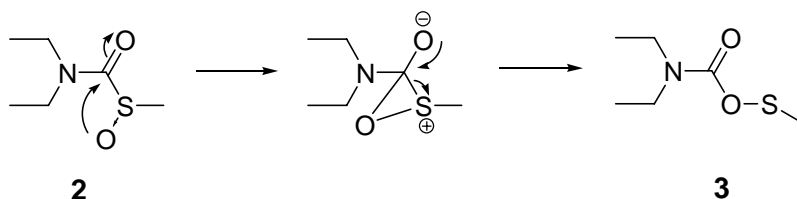


S-metil-N,N-dietiltiocarbamato (**1**): Líquido amarillo, fluido de olor característico, p. eb. 170-180 °C/585 mmHg, *R_f* 0.39 (*n*-hexano-AcOEt 95:5). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS)(Espectro 1): δ 1.17 (t, *J*=7.2 Hz, 6H, H-a,a'), 2.32 (s, 3H, H-c), 3.39 (c, *J*=6.8 Hz, 4H, H-b,b'). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS): δ 12.70 (-CH₃, C-a,a'), 13.34(-S-CH₃), 41.94 (-CH₂, C-b,b'), 167.57 (C=O).



Con relación a la preparación del S-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-S-óxido (**2**) se encontró el reporte de dos patentes en las que se describen metodologías diferentes para la oxidación del tiocarbamato **1**. La patente de Hart y col.,⁸ registrada en 1992, describe la síntesis de **2** empleando metaperyodato de sodio como oxidante de **1**. En 2003, otra metodología, descrita por Schloss en una solicitud de patente,⁴⁴ cuestiona la identidad del compuesto descrito por Hart y col., y asevera que se trata en realidad del producto de la transposición de **2**, el S-metil-*O*-(*N,N*-dietilcarbamoil)sulfenato (**3**).

En el Esquema 8.2 proponemos un mecanismo por el cual podría llevarse a cabo esta transposición, la cual Schloss afirma es promovida por sílice.



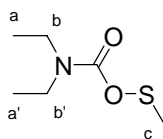
Esquema 8.2. Mecanismo propuesto para la transposición del compuesto **2** a **3**.

Schloss también reporta la oxidación de **1** con peróxido de hidrógeno en ácido acético y asegura que por este método obtuvo el compuesto deseado, el S-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-S-óxido (**2**) libre del compuesto de transposición **3**. De igual forma, describe la obtención del compuesto **3**, propiciando la transposición de **2** por contacto con gel de sílice.⁴⁴

Schloss estudió espectroscópicamente y por espectrometría de masas los compuestos **2** y **3**, y al confrontarlos con los reportados por Hart en 1992, encontró coincidencias entre el producto que él caracteriza como S-metil-*O*-(*N,N*-dietilcarbamoil)sulfenato (**3**) y el anteriormente reportado por Hart como el sulfóxido **2**, el cual, por cierto, fue el compuesto estudiado como inhibidor de aldehído deshidrogenadas durante varios años.



En este contexto, procedimos a experimentar ambas metodologías y a analizar por RMN ^1H los productos obtenidos en cada una de ellas. De estas pruebas, se observaron dos situaciones interesantes: mediante el método reportado por Hart y col., consistente en la oxidación de **1** con metaperyodato de sodio en metanol-agua, se obtuvo un producto espectroscópicamente idéntico al reportado por Schloss como el producto **3** (producto de transposición de **2**), cuyos resultados se muestran a continuación:



S-metil-O-(*N,N*-dietilcarbamoil)sulfenato (**3**): Líquido amarillo, fluído, R_f 0.22 (*n*-hexano-acetona 7:3). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS)(Espectro 2): δ 1.23 (t, $J=7.1$ Hz, 3H, H-a), 1.28 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, H-a'), 2.77 (s, 3H, H-c), 3.47 (c dobleteado, $J=7.1$ Hz, 2H, H-b), 3.58 (dd, $J=3.6$ Hz, 2H, H-b'). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS)(Espectro 3): δ 12.54 (CH_3 , C-a), 14.52 (CH_3 , C-a'), 37.38 (S- CH_3), 41.08 (CH_2 , C-b), 42.89 (CH_2 , C-b'), 167.95 (C=O). EM (I.E.) m/z (abundancia)(Espectro 4): 44(82) [$^+\text{CO}_2$], 47 (3) [$^+\text{SCH}_3$], 64 (11) [$^+\text{OSCH}_3$], 72 (96) [$(\text{CH}_2)_2\text{N}^+$], 100(100) [$(\text{CH}_2)_2\text{NCO}^+$], 116(1) [$(\text{CH}_2)_2\text{NCO}_2^+$].

Por otro lado, con el método de Schloss (H_2O_2 -ácido acético a 4°C) y en múltiples ensayos realizados en nuestro laboratorio, que incluyeron la modificación de la temperatura de reacción y aislamiento, únicamente se obtuvieron mezclas de los compuestos **2** y **3** (cromatográficamente indistinguibles) con **3** en mayor proporción. La modificación de la temperatura fue realizadas por cuestiones de estabilidad, pues se observó que al emplear temperaturas de reflujo e incluso la ambiental la muestra sufre descomposición, detectada mediante CCF, apariencia, olor y consistencia.

En los espectros de hidrógeno de estas mezclas se pudo identificar la presencia de **2** a partir de las señales correspondientes al grupo etilo, las cuales son una



señal triple en δ 1.4 ppm ($J= 7.2$) y otra cuádruple en δ 3.04 ppm ($J= 6.4$), señales correspondientes al metilo y metileno del grupo dietilamino y que coinciden con los desplazamientos reportados previamente. Los singuletes correspondientes al S-metilo de los compuestos **2** y **3** se ubican muy próximos en δ 2.79 y 2.77 ppm, lo cual no permitió su asignación inequívoca ni su integración. (Tabla 8.2 y Anexo 1, espectro 5)

Tabla 8.2. Comparación de señales espectroscópicas de los compuestos preparados por Schloss y Hart con los experimentales.

Hart y col. ^{7, 30}	Schloss ⁴⁴		Experimentales	
	Compuesto 2	Compuesto 3	Metodología de Hart	Metodología de Schloss
1.17 (t, 3H)	1.25 (t, 3H)	1.23 (t, 3H)	1.23 (t, $J= 7.1$ Hz, 3H)	
1.23 (t, 3H)	1.36 (t, 3H)	1.29 (t, 3H)	1.28 (t, $J= 7.2$ Hz, 3H)	1.4 (t, $J= 7.2$ Hz, 3H)
2.71 (s, 3H)	2.73 (s, 3H)	2.78 (s, 3H)	2.77 (s, 3H)	2.79 (s, 9H)
3.38 – 3.44 (m, 2H)	3.01 (c, 2H)	3.47 (c, 2H)	3.47 (c dobleteado, 2H)	3.04 (c, $J= 6.4$ Hz, 2H)
3.47 – 3.57 (m, 2H)	3.42 (c, 2H)	3.61 (c, 2H)	3.58 (dd, 2H)	

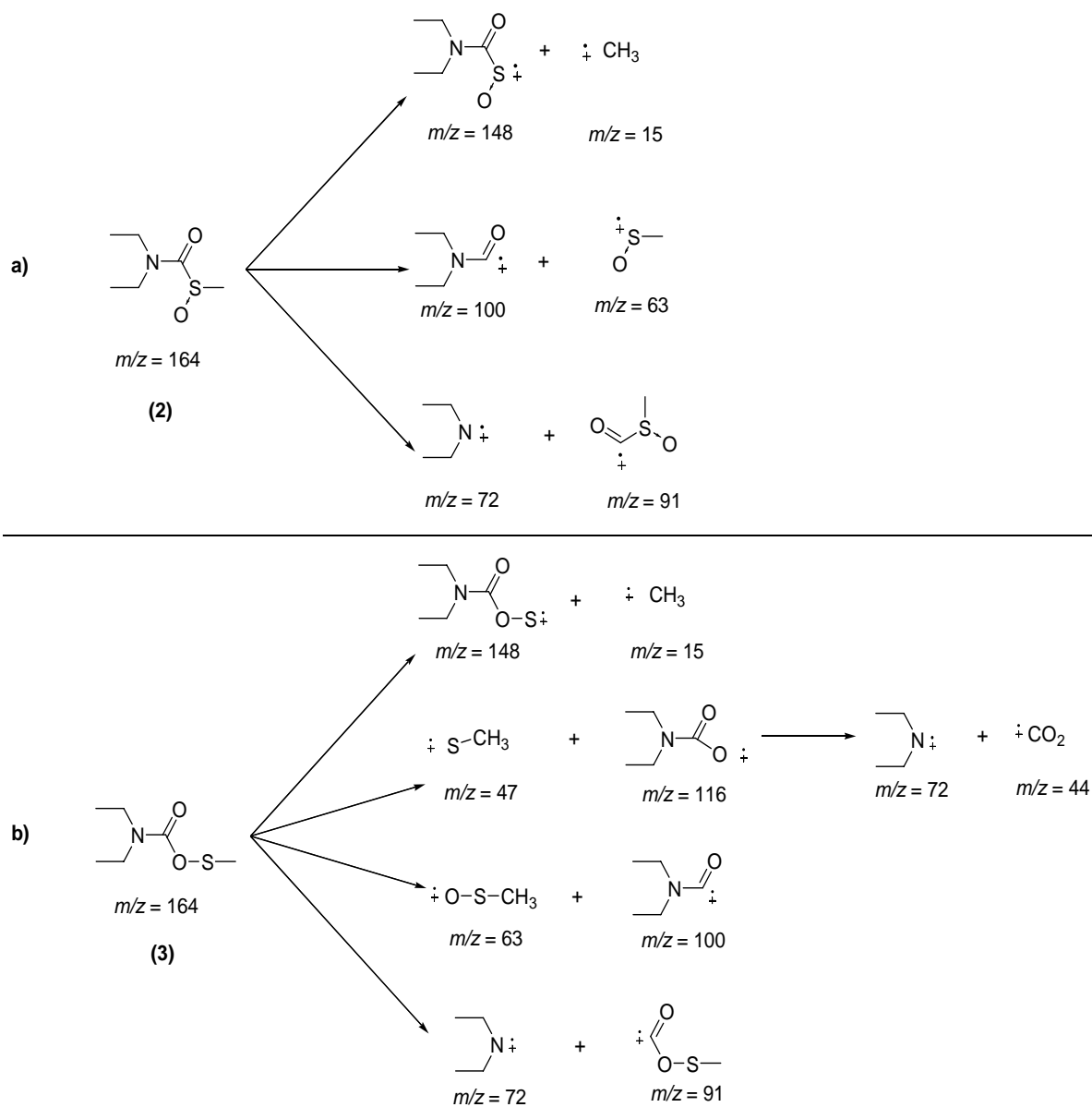
*Indistinguibles por su traslape con otras señales de la muestra.

Otro análisis descrito en ambas patentes es la espectrometría de masas. Hart reporta los siguientes fragmentos: m/z (abundancia) 164 (13), 148 (3), 100 (100), 72 (86) y 44 (82). Por su parte, Schloss cuestiona que el registro de estas señales permita la identificación inequívoca de **2**, puesto que la mayor parte de los iones pueden ser originados por ambos compuestos y hay dos que solamente el compuesto **3** podría formar.

En el Esquema 8.3 proponemos los patrones de fragmentación del análisis de espectrometría de masas por ionización química de los compuestos **2** y **3**, en el cual se puede apreciar que el ión con una masa molecular $m/z = 164$ podría ser atribuido al ión molecular (M^+) del compuesto **2** o del **3**. De igual forma, el ión con $m/z = 148$ puede corresponder a $[(C_2H_5)_2NC(O)S^+O]$ o a $[(C_2H_5)_2NC(O)OS^+]$;



mientras que los iones de $m/z = 100$ y $m/z = 72$ probablemente corresponden a los iones de *N,N*-dietilsocianato $[(C_2H_5)_2N^+CO]$ y dietilamina $[(C_2H_5)_2N^+]$, los cuales pueden originarse desde ambos compuestos.



Esquema 8.3. Patrón de fragmentación propiciado por espectrometría de masas:
a) compuesto 2, b) compuesto 3.



En la patente de Hart y col.⁸ se reporta un fragmento de $m/z = 44$ que debe pertenecer al catión radical de dióxido de carbono $[\text{OCO}^+]$. Esto parecería confirmar la presencia del compuesto de transposición en la muestra analizada. Por su parte Schloss señala que en el espectro de masas de su sulfóxido no había un pico detectable con masa de 44. Sin embargo, está descrito que cuando se somete un sulfóxido a espectrometría de masas, se origina inevitablemente una transposición como la descrita en este caso, causada por la energía que incide sobre la muestra.⁶³

Así, en una de las mezclas de **2** y **3**, obtenida por la metodología descrita por Hart y col., sometida a un análisis de espectrometría de masas por ionización química, se obtuvo el patrón de fragmentación esperado, pues se encontraron iones en común para ambos compuestos, pero también fue posible detectar los fragmentos con masa de 44 (82), 47 (3) y 116 (1), los cuales corresponden a los iones $[\text{OCO}^+]$, $[\text{CH}_3\text{S}^+]$ y $[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NCOO}^+]$ respectivamente, generados exclusivamente desde el compuesto **3**. (Anexo 1, espectro 4)

A partir de lo anterior, asumimos que las técnicas de análisis empleadas por ambos investigadores no ofrecen pruebas concluyentes sobre la identidad de los compuestos **2** y **3**. La gran similitud observada en el patrón espectroscópico de ambos compuestos en RMN ^1H (no se reporta ^{13}C) y el hecho de que puedan originar los mismos iones en espectrometría de masas, además de que ambos productos son indistinguibles por cromatografía en capa fina o en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), según lo reporta el propio Schloss,⁴⁴ fueron factores que se conjugaron para dar lugar a la confusión y controversia antes expuesta.

En nuestro estudio se concluyó que, en efecto, se trata de dos compuestos diferentes, al detectarse la presencia de ambos en los espectros de RMN, así como la transformación gradual del compuesto **2** en **3** en muestras almacenadas, aun a temperaturas de alrededor de $-20\text{ }^\circ\text{C}$.



Por otro lado, hay que destacar que, desde 1990, Faiman y otros investigadores realizaron estudios bioquímicos en relación con la inhibición de aldehído deshidrogenasas empleando el compuesto **3**, y que repetidamente reportaron actividad de este compuesto.^{7,8,30,32,37,42}

En vista de nuestro interés por obtener una muestra pura y estable del sulfóxido **2**, se buscó desarrollar condiciones de reacción y aislamiento lo más suaves y prudentes posibles, pues se presume que el sulfóxido **2** sufre la transposición descrita en esta etapa del proceso, principalmente cuando se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice o cuando se calienta.

Se probaron otros métodos de oxidación que incluyeron oxidantes como percarbonato de sodio, peróxido de hidrógeno, cloro, ácido *m*-cloroperbenzoico, con temperaturas desde 25 °C hasta -12 °C, con disolventes de bajo punto de ebullición para ser retirados únicamente por evaporación con vacío. Aún así la producción del compuesto de transposición **3** era inevitable en la mayoría de los ensayos, pero además era acompañada por la descomposición paulatina de la mezcla de reacción durante el aislamiento del producto.

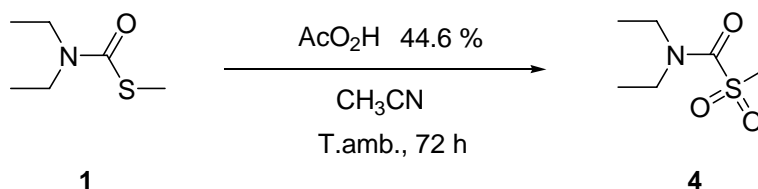
En los experimentos de oxidación que se realizaron con ácido peracético como oxidante en proporciones subestequiométricas, empleando acetonitrilo como disolvente, se observaron los mejores resultados en cuanto a proporción del sulfóxido **2** con respecto al transpuesto **3**; sin embargo no fue posible obtener una muestra pura del compuesto **2**.

En numerosos experimentos y variando las condiciones de reacción, se obtuvo en todos los casos una mezcla de **2** y **3** en proporciones variables (28-50% de **2** y 50-72% de **3**), además de contaminación con trazas de la materia prima (**1**) y del producto de sobreoxidación (la sulfona **4**).



Para la preparación del S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (**4**) se encontraron reportes que involucran el uso de ácido *m*-cloroperbenzoico como agente oxidante de **1**.^{30,44} Esta reacción presentó el inconveniente de producir ácido *m*-clorobenzoico como subproducto, el cual resultó difícil eliminar sin deteriorar el producto.

En busca de establecer un método de síntesis eficiente, fueron evaluados diferentes métodos generales de oxidación de sulfuros que incluyeron otros agentes oxidantes como metaperyodato de sodio, percarbonato de sodio, cloro, peróxido de hidrógeno en ácido acético y ácido peracético.^{55-56,64} La oxidación exhaustiva con este último oxidante resultó el método más conveniente. (Esquema 8.4)

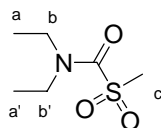


Esquema 8.4. Preparación del compuesto **4**.⁶⁴

En el espectro de RMN ¹H de **4** se observaron señales definidas para cada uno de los hidrógenos en la molécula, las cuales coinciden con las descritas en la literatura: dos señales triples (δ 1.23 y 1.30) y dos cuádruples (δ 3.42 y 3.75) para los hidrógenos de cada uno de los metilos y metilenos del -N(CH₂-CH₃)₂ y una señal simple (δ 3.13) que integra para los hidrógenos del metilo del -SO₂CH₃.

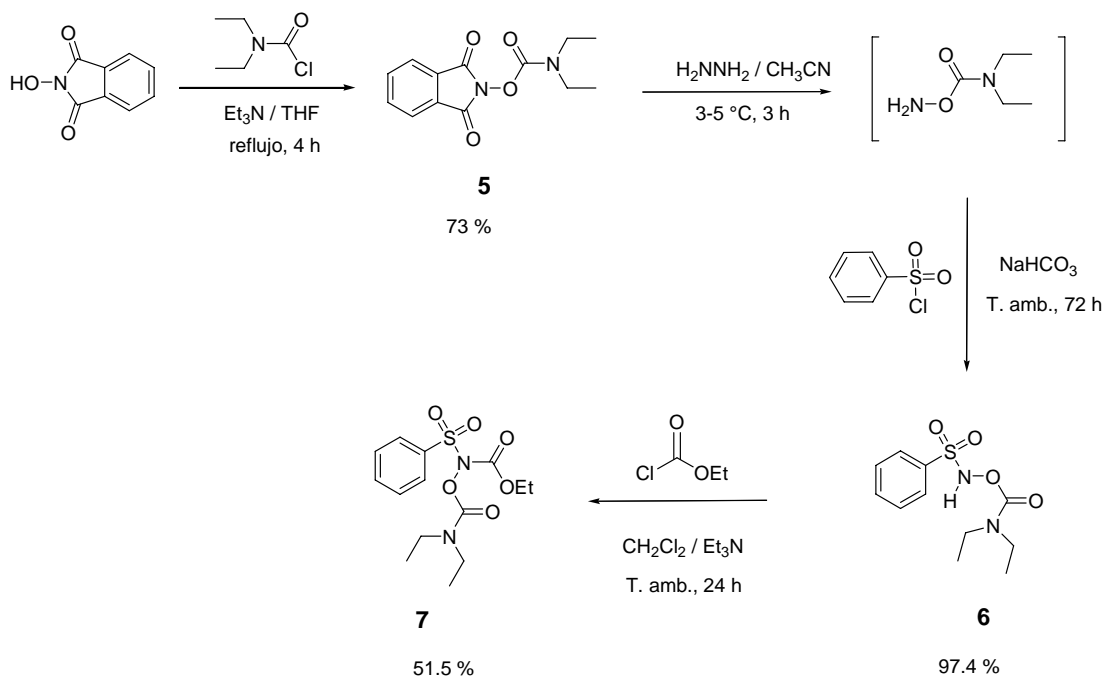
En contraste con lo observado para el compuesto **2**, la sulfona **4** parece ser estable, al no haberse observado evidencia alguna de productos de transposición o de degradación. Esta estabilidad puede ser producto del estado de oxidación del azufre. (Anexo 1, espectros 6 y 7)

Los resultados para la sulfona **4** se muestran a continuación:



S-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-S-dióxido (**4**): líquido incoloro, fluido, R_f 0.25 (hexano-acetona 2:1), 75 % de rendimiento (reportado 86 %). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS)(Espectro 6): δ 1.23 (t, $J=7$ Hz, 3H, H-a), 1.30 (t, $J=7.2$ Hz, 3H, H-a'), 3.13 (s, 3H, H-c), 3.42 (c, $J=7.1$ Hz, 2H, H-b), 3.75 (c, $J=7.1$ Hz, 2H, H-b'). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS)(Espectro 7): δ 12.12 (CH_3 , C-a), 13.72 (CH_3 , C-a'), 39.53 (S- CH_3), 41.47 ($-\text{CH}_2$, C-b), 42.61 (CH_2 , C-b'), 160.61 (C=O).

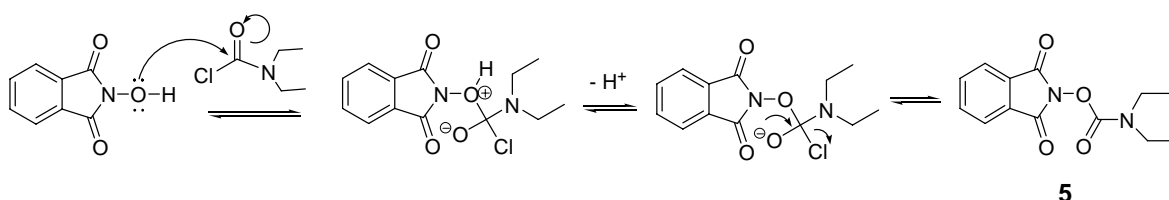
Para la preparación del compuesto *N*-(etoxicarbonil)bencensulfhidroxamato de *O*-(dietilcarbamilo) (**7**), se siguió la secuencia de reacciones descrita por Conway y col.⁹, a partir de *N*-hidroxiftalimida. (Esquema 8.5)



Esquema 8.5. Síntesis del compuesto **7**.

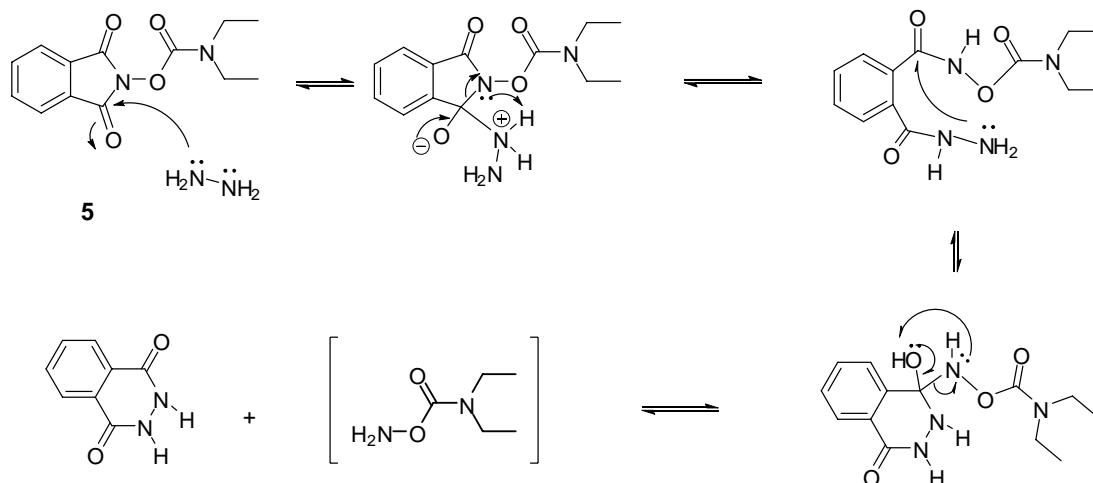


En el primer paso se hizo reaccionar el cloruro de dietilcarbamoilo y la *N*-hidroxiftalimida en presencia de trietilamina para producir el compuesto **5**. En el esquema 8.6 se propone el mecanismo de esta reacción.



Esquema 8.6. Mecanismo de reacción para el compuesto **5**.

Posteriormente la reacción de este compuesto **5** con hidrazina (hidrazinólisis), un nucleófilo de nitrógeno particularmente bueno a causa de la repulsión entre los dos pares de electrones libres de ambos átomos de nitrógeno adyacentes,⁶¹ libera la carbamoiloxima correspondiente, particularmente inestable (Esquema 8.7).

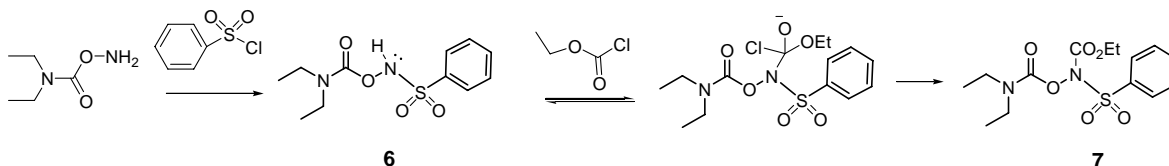


Esquema 8.7. Mecanismo de reacción para la hidrazinólisis de **5**.

Este intermediario, sin ser aislado, se hizo reaccionar con cloruro de bencensulfonilo (Esquema 8.8) para producir el ácido

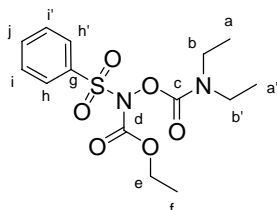


O-(dietilcarbamoil)bencensulfhidroxámico (**6**). Finalmente, una acilación con cloroformiato de etilo permitió obtener el derivado **7** como cristales blancos con p.f. 54-55 °C.



Esquema 8.8. Mecanismo de reacción para la formación del compuesto **7**.

Conway y col. describen al compuesto **7** como un aceite incoloro, aunque en nuestro caso cristalizó al conservarlo durante tres días a -20 °C en éter anhidro. El rendimiento global de la síntesis fue de 36%. A continuación se describen las constantes físicas y espectroscópicas determinadas:



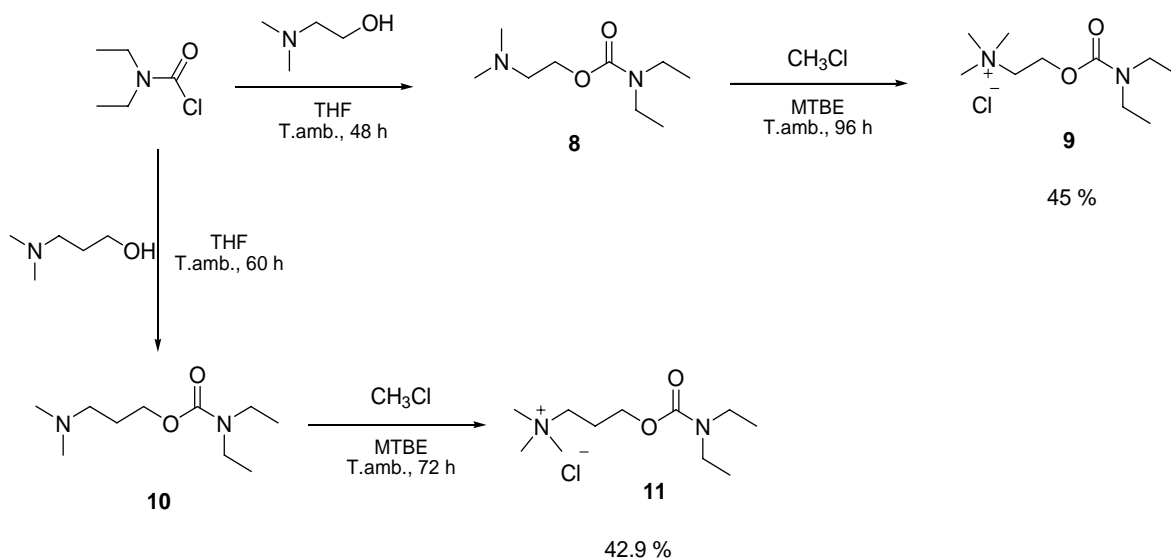
N-(etoxicarbonil)-bencensulfhidroxamato de *O*-(dietilcarbamoilo) (**7**): Cristales blancos, con p.f. 54 - 55 °C; R_f 0.54 (*n*-hexano-AcOEt 1:1). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS)(Espectro 8): δ 1.20 (t, $J=6.9$ Hz, 6H, H-a,a'), 1.23 (t, $J=7.2$, 3H, H-f), 3.38 (c, $J=6.9$ Hz, 4H, H-b,b'), 4.19 (c, $J=7.2$ Hz, 2H, H-e), 7.5-8.2 (m, 5H-Ar). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS)(Espectro 9): δ 13.17 (CH₃, C-f), 13.92 (CH₃, C-a,a'), 42.05 (CH₂, C-b), 43.69 (CH₂, C-b'), 64.174 (CH₂, C-e), 128.655 (CH, C-i,i'), 129.49 (CH, C-h,h'), 134.29 (CH, C-j), 137.65 (CH, C-g), 150.53 (C=O, C-d), 152.75 (C=O, C-c).

Las señales obtenidas en RMN ¹H y ¹³C para el compuesto **7** coinciden con las esperadas y con las descritas en la literatura. En ¹H se obtuvo la señal para los



metilos del etoxilo y del $-N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ como una triplete traslapado en 1.20 y 1.23 ppm; por el contrario, en ^{13}C es posible diferenciar estas señales a 13.17 y 13.92 ppm. En δ 3.38 ppm una señal cuádruple en el espectro de ^1H corresponde a los metilenos de $-N(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, mientras que ^{13}C se obtiene una señal para cada uno en 42.05 y 43.69 ppm. En ^1H , otra señal cuádruple, en 4.19 ppm, fue asignada al metileno del etoxilo. Las señales obtenidas en 7.54, 7.66 y 8.1 ppm corresponden a los hidrógenos aromáticos. Por su parte, las señales en ^{13}C para los dos carbonilos presentes en la molécula, se observaron en la zona característica para éste grupo funcional, con una diferencia aproximada de 2 ppm. Los espectros se muestran en el anexo 1, espectros 8 y 9.

El cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropilamonio (**9**) y cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletilamonio (**11**) se prepararon con una estrategia de dos pasos consistente en la síntesis de los dietilcarbamatos **8** y **10** por reacción del cloruro de dietilcarbamoilo con el aminoalcohol correspondiente y posteriormente la metilación de cada uno de estos compuestos intermedios. (Esquema 8.9)



Esquema 8.9. Preparación de los compuestos **9** y **11**.



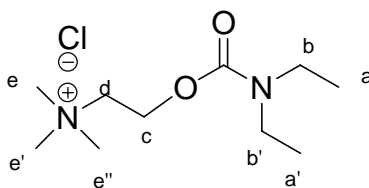
En la primera etapa de ambas síntesis, el alcohol reaccionó como nucleófilo sobre el cloruro de dietilcarbamoilo, ocasionando la sustitución consiguiente con la liberación de $\text{HCl}_{(g)}$. No fue necesario adicionar una base para neutralizar el ácido, dado que el propio aminoalcohol es una base. La adición de bicarbonato para terminar la reacción permitió liberar la amina.

La metilación de los dietilcarbamatos **8** y **10** debió realizarse con clorometano (gas) debido a que se deseaba obtener una sal de cloruro. Esto implicó diseñar un sistema que nos permitiera realizar una reacción, particularmente lenta, entre un líquido y un gas; esto es, un sistema hermético y presurizado con eficiente agitación. Estas condiciones fueron logradas con la adaptación de un equipo Parr para hidrogenación, con el que se alcanzaron estas condiciones a una presión de 60 lb/pulg^2 , lo cual no pudo haber sido realizado en equipos convencionales.

Los productos finales cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropilamonio (**9**) y cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletilamonio (**11**) fueron caracterizados por RMN ^1H y ^{13}C . En los espectros de ^1H para ambos compuestos se observó una señal triple para los metilos del $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$ y una señal simple para los tres metilos enlazados al nitrógeno. Para el compuesto **9** se observaron tres señales amplias para los metilenos de la molécula, traslapándose en 3.27 ppm los hidrógenos de los metilenos del $-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$, las otras dos señales se observaron en δ 4.05 y 4.58 ppm para los metilenos **c** y **d**, de acuerdo a la asignación ilustrada en la Tabla 8.3. Por su parte, el número de señales obtenidas por RMN ^{13}C coincide con el número de carbonos presentes en la molécula, ratificando así la identidad del compuesto **9**.



Tabla 8.3. Resultados para los compuestos 9.



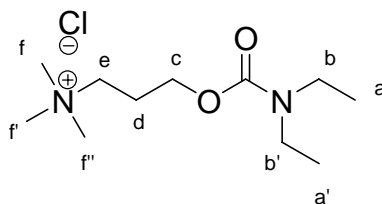
Cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-*N,N,N*-trimetiletilamonio (**9**): líquido transparente, 49.83 % de rendimiento, R_f 0.36 (cloroformo-metanol 75:25). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS)(Espectro 10): δ 1.12 (t, $J=7.1$ Hz, 6H, a,a'), 3.27 (brd, 4H, H-b,b'), 3.51 (s, 9H, H-e,e',e''), 4.04 (brd, 5H, H-d), 4.58 (brd, 2H, H-c). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS)(Espectro 11): δ 13.25 (CH_3 , C-a), 14.11 (CH_3 , C-a'), 41.30 (CH_2 , C-b), 41.99 (CH_2 , C-b'), 54.09 ($(\text{CH}_3)_3\text{-N}$), 58.78 (CH_2 , C-c), 65.35 (CH_2 , C-d), 154.56 (C=O).

En la RMN ^1H realizada para el compuesto **11**, se obtuvo una señal cuadruple en 3.19 ppm para los metilenos del $-\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$ y una triple en 4.08 ppm para el metileno **c**, según la asignación señalada en la tabla 8.4; sin embargo se observaron señales poco definidas para los metilenos **d** y **e** en 2.10 y 3.35 ppm, respectivamente. Se asume que estas señales corresponden a estos átomos por el desplazamiento que presentan de acuerdo al carácter electronegativo que los rodea y por la relación existente entre los valores de las constantes de acoplamiento de cada señal.

En ^{13}C se obtiene una sola señal para los dos metilos y metilenos de $-\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$, el resto de las señales fueron asignadas tomando en cuenta los mismos criterios de electronegatividad para cada átomo de carbono, señales que a su vez coincidieron con el número de carbonos presentes en la molécula. (Ver Tabla 8.4, Anexo 1, espectros 12-13)



Tabla 8.4. Resultados para el compuesto 11.



Cloruro de 2-(((diethylamino)carbonyloxi)-*N,N,N*-trimetilpropilamonio (**11**): líquido transparente, 42.9 % de rendimiento, *Rf* 0.3 (cloroformo-metanol 8:2). RMN ^1H (300 MHz, D_2O , TMS)(Espectro 12): δ 1.01 (t, $J=7.2$ Hz, 6H, H-a,a'), 2.10 (sextuple, $J=5.8$ Hz, 2H, H-d), 3.05 (s, 9H, H-f,f',f''), 3.19 (c, $J=7$ Hz, 6H, H-b,b'), 3.35 (t, $J=8.3$ Hz, 2H, H-e), 4.08 (t, $J=5.8$ Hz, 2H, H-c). RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O , TMS)(Espectro 13): δ 13.67 (CH_3 , C-a,a'), 23.44 (CH_2 , C-d), 42.66 (CH_2 , C-b,b'), 53.78 ($(\text{CH}_3)_3\text{-N}$), 63.04(CH_2 , C-e), 64.83(CH_2 , C-c), 157.99 (C=O).



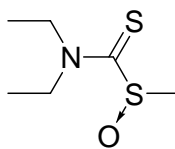
9. CONCLUSIONES

- Se realizó la síntesis de los siguientes compuestos, propuestos como posibles inhibidores de la BADH de *P. aeruginosa*: S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (**4**), N-(etoxicarbonil)bencensulfohidroxamato de O-(dietilcarbamoilo) (**7**), cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-N,N,N-trimetiletilamonio (**9**) y cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-N,N,N-trimetilpropilamonio (**11**).
- El N-(etoxicarbonil)bencensulfohidroxamato de O-(dietilcarbamoilo) (**7**), a partir de la metodología descrita por Conway y col.⁸, se logró obtener como un compuesto puro, estable y cristalino con p. f. de 54 - 55 °C.
- El compuesto **2**, S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-óxido fue obtenido en todos los casos como una mezcla con su producto de transposición, el S-metil-O-(N,N-dietilcarbamoil)sulfenato (**3**). Esto pudo ser determinado por RMN ¹H de las mezclas de reacción.
- Con el empleo de ácido peracético como agente oxidante de **1**, fue posible observar mejores resultados en cuanto a la apariencia física del compuesto y proporción del sulfóxido **2** con respecto al producto transpuesto **3**.
- La poca estabilidad del compuesto **2**, que obliga al reacomodo de la molécula, indica que el compuesto **3** es el isómero más estable. Se pudo aislar en forma pura e identificar mediante RMN ¹H, cuando se realizó la oxidación con metaperyodato de sodio, cuando se calentó durante el aislamiento y también al intentar purificar con gel de sílice.

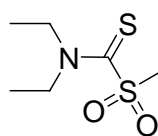


10. PERSPECTIVAS

- El trabajo se puede ampliar con la síntesis de la serie homóloga de ditiocarbamatos: S-metil-*N,N*-dietilditiocarbamato-S-óxido (**12**) y S-metil-*N,N*-dietilditiocarbamato-S-dióxido (**13**) los cuales han sido descritos también como inhibidores de aldehído deshidrogenasas,⁴⁰⁻⁴¹ para su evaluación como posibles inhibidores de la BADH.



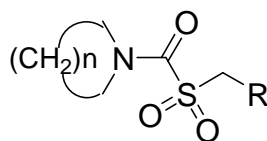
12



13

Esquema 11.1 Compuestos homólogos de dietilcarbamatos.

- Se plantea la pertinencia de preparar compuestos análogos, por modificación de los sustituyentes sobre el nitrógeno o sobre el azufre, buscando incrementar la estabilidad y la selectividad de estos compuestos hacia la cisteína catalítica de la enzima.



Esquema 11.2 Modificación del compuesto **4**.



11. REFERENCIAS

1. Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. Brock. *Biología de los microorganismos*. 10a. ed. Pearson Prentice Hall. España, **2004**. pp. 368-371.
2. González-Segura, L.; Velasco-García, R.; Muñoz-Clares, R. Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **2002** 361:577-585.
3. Velasco-García, R.; Zaldivar-Machorro, V. J.; Mujica-Jiménez, C.; González-Segura, L.; Muñoz-Clares, R. A. Disulfiram irreversible aggregates betaine aldehyde dehydrogenase – Apotential target for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Research Communications.* **2006** 241:408-415.
4. Velasco-García, R.; Chacón-Aguilar, V. M.; Hervert-Hernández, D.; Muñoz-Clares, R. A. Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves by disulfiram. *Chem. Biol. Interact.* **2003** 143-144:149-158.
5. Velasco-García, R.; Villalobos, M. A.; Ramírez-Romero, M. A.; Mujica-Jiménez, C.; Iturriaga, G.; Muñoz-Clares, R. A. Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Arch. Microbiol.* **2006** 185: 14-22.
6. Kitson, T.M. The disulfiram-ethanol reaction. *J. Stud. Alc.* **1977** 38:96-113.
7. Yourick, J. J.; Faiman, M. D. Comparative aspects of disulfiram and its metabolites in the disulfiram-ethanol reaction in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **1989** 38:413-421.
8. a) Hart, B. W.; Faiman, M. D. *In vitro* and *in vivo* inhibition of rat liver aldehyde dehydrogenase by S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate sulfoxide, a new metabolite of disulfiram. *Biochem. Pharmacol.* **1992** 43:403-406.
b) Hart, B. N.; Faiman, M. D. Thiocarbamate sulfoxide composition for deterring ethanol ingestion. US Pat. 5,153,219. **1992** October 6.
9. Conway, T. T.; DeMaster, E. G.; Goon, D. J.; Shirota, F. N.; Nagasawa, H. T. Diethylcarbamoyleating/nitroxylating agents as dual action inhibitors of aldehyde dehydrogenase: a disulfiram-cyanamide merger. *J. Med. Chem.* **1999** 42:4016-4020.



10. a) Pollard, A.; Wyn, J. Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. *Planta* **1979** 144:291-298. b) Lippert, K.; Galinski, E. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992** 37:61-65.
11. Hanson, A. D.; Rhodes, D. ¹⁴C tracer evidence for síntesis of choline and betaine via phosphoryl base intermediates in salinized sugarbeet leaves. *Plant. Physiol.* **1983** 71:692-700.
12. D'Souza-Ault, M. R.; Smith, L. T.; Smith, G. M. Roles of *N*-acetylglutaminyl-glutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993** 59:473-478.
13. Lisa, T. A.; Casale, C. H.; Doménech, C. E. Cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic conditions in a high-phosphate medium. *Curr. Microbiol.* **1994** 25:71-76.
14. Muñoz-Clares, R. A.; Velasco-García, Roberto. Genio y figura de la betaína aldehído deshidrogenasa. *Mensaje bioquímico*, **2004** 28, 203-222.
15. Nagasawa, T. Y.; Kagabata, Y.; Ogata, K. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agric. Biol. Chem.* **1976** 40:1743-1749.
16. Sage, A. E.; Vasil, A. I.; Vasil, M. L. Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **1997** 23:43-56.
17. Velasco-García, R.; González-Segura, L.; Muñoz-Clares, R. A. Steady-state kinetic mechanism of NADP⁺ and NAD⁺ dependent reactions catalyzed by betayne aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **1999** 352:675-683.
18. Velasco-García, R.; Mujica-Jiménez, C.; Mendoza-Hernández, G.; Muñoz-Clares, R. A. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1999** 181:1292-1300.
19. Farrés, J.; Wang, T.; Cunningham, J.; Weiner, H. Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **1995** 34:2592-2598.
20. Marchal, S.; Cobessi, D.; Rahuel, C. S.; Teté, F. F.; Aubry, A.; Branant, G. Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP⁺-dependent



aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Biol. Interact.* **2001** 130-132:15-28.

21. González-Segura, L.; Muñoz-Clares R. A. El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas. *Rev. Educ. Bioq.* **2003** 22-1:2-10.

22. Hald, J.; Jacobsen, E.; Larsen V. The sensitizing effect of tetraethylthiuramdisulphide (Antabuse) to ethylalcohol. *Acta Pharmacol.* **1948** 4:285-296.

23. Lundwall, L.; Bakeland, F. Disulfiram treatment of alcoholism. *J. Nerv. Ment. Dis.* **1971** 153:381-394.

24. Kwo, P.Y.; Crabb, D. W. Ethanol and the liver. Mechanism and management. Taylor & Francis. U. S. A., **2002**. pp. 98-100.

25. Cobby, J.; Mayersohn, M.; Selliah, S. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1977** 202:724-731.

26. Wells, J.; Koves, E. Detection of carbon disulfide (a disulfiram metabolite) in expired air by gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1974** 92:442-444.

27. Kitson, T. M. The effect of disulfiram on the aldehyde dehydrogenase of sheep liver. *Biochem. J.* **1975** 151:407-412.

28. Kitson, T. M. Mechanism of inactivation of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Biochem. J.* **1983** 213:551-554.

29. Vallari, R. C.; Pietruszko, R. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition by disulfiram. *Science* **1982** 216:637-639.

30. Hart, B. W.; Yourick, J. J.; Faiman, M. D. S-methyl-N,N-diethylthiolcarbamate: a disulfiram metabolite and potent rat liver mitochondrial low K_m aldehyde dehydrogenase inhibitor. *Alcohol* **1990** 7:165-9.

31. Johansson, B.; Petersen, E. N.; Arnold, E. Diethylthiocarbamic acid methyl ester: a potent inhibitor of aldehyde dehydrogenase found in rats treated with disulfiram or diethyldithiocarbamic acid methyl ester. *Biochem. Pharmacol.* **1989** 38:1053-1059.

32. Hart, B. W.; Faiman, M. D. Bioactivation of S-methyl-N,N-diethylthiolcarbamate to S-methyl-N,N-diethylthiolcarbamate sulfoxide. Implications for the role of cytochrome p450. *Biochem. Pharmacol.* **1993** 43:2285-2290.



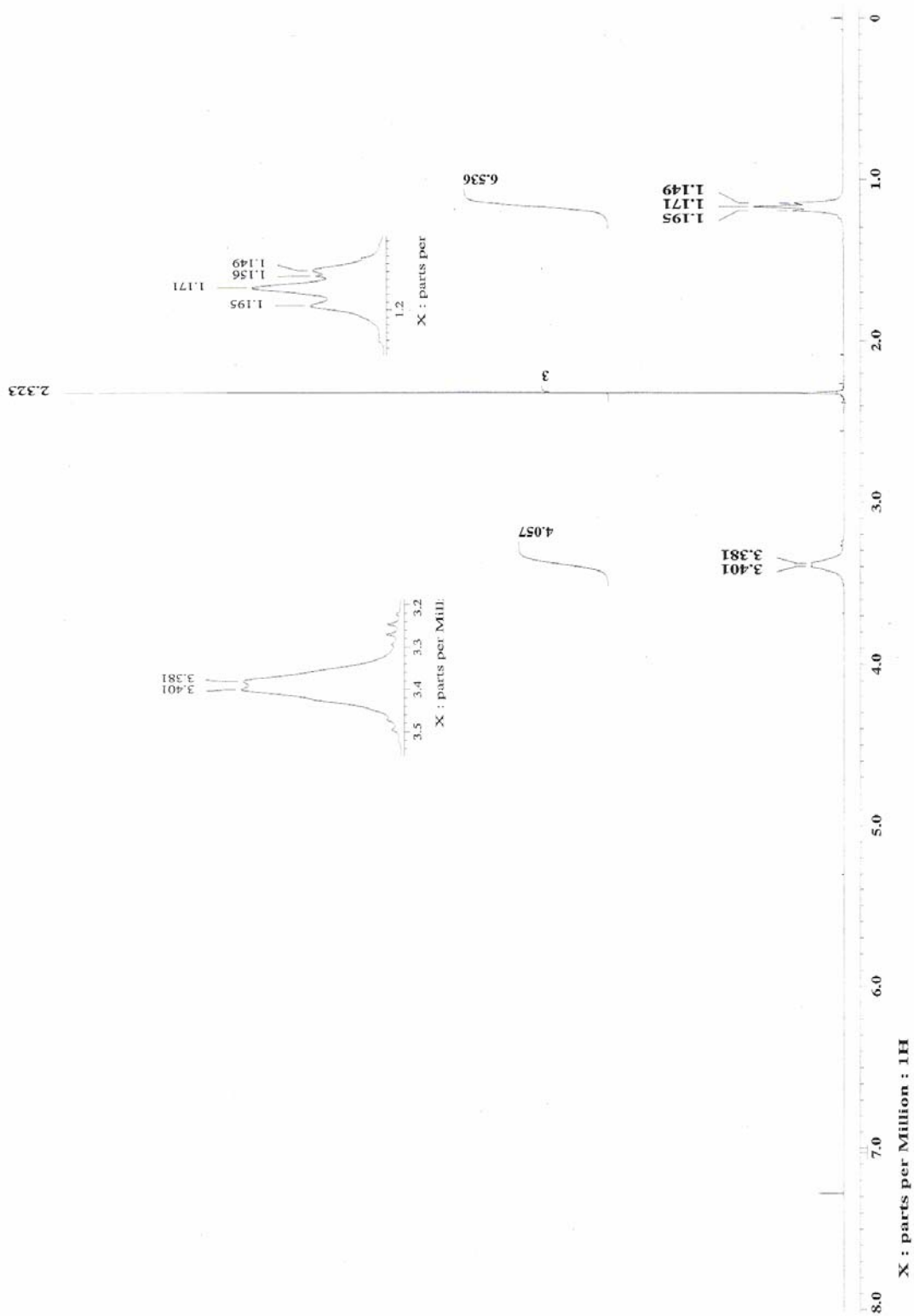
33. Madan, A.; Faiman, M. D. NADPH-dependent, regioselective S-oxidation of a thionosulfur and thioether-containing xenobiotic, diethyldithiocarbamate methyl ester by rat liver microsomes. *J. Pharmacol.* **1994** 22:324-330.
34. Lipsky, J. J.; Shen, M. L.; Naylor, S. *In vivo* inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Chem. Biol. Interact.* **2001** 130-132:93-102.
35. Mays, D.C.; Nelson, N. A.; Fauq, A. H.; Lipsky, J. J. S-methyl *N,N*-diethylthiocarbamate sulfone, a potential metabolite of disulfiram and potent inhibitor of low K_m mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **1995** 49:693-700.
36. Kurys, G.; Ambroziak, W.; Pietruszko, R. Human aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of a third isozyme with low K_m for gamma-aminobutyraldehyde. *J. Biol. Chem.* **1989** 264:4715-4721.
37. Hart, B. W.; Faiman, M. D. *In vivo* pharmacodynamic studies of the disulfiram metabolite S-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamate sulfoxide: inhibition of liver aldehyde dehydrogenase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **1994** 18:340-345.
38. Nagendra, S. N.; Madan, A.; Faiman, M. D. S-methyl-*N,N*-diethylthiolcarbamate sulfone, an *in vitro* and *in vivo* inhibitor of rat liver mitochondrial low K_m aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **1993** 47:1465-1467.
39. Madan, A.; Parkinson, A.; Faiman, M. D. Identification of the human and rat p450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamate (DETC-Me). The terminal step in the bioactivation of disulfiram. *Drug. Metab. Dispos.* **1995** 23:1153-1162.
40. Jin, L.; Davis, M. R.; Hu, P.; Baillie, T. A. Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethyldithiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram *in vivo*. *Chem. Res. Toxicol.* **1994** 7:526-533.
41. Hu, P.; Jin, L.; Baillie, T. A. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary *N*-acetylcysteine conjugates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997** 281:611-617.
42. Kitson, T. M. Effect of some thiocarbamate compounds on aldehyde dehydrogenase and implications for the disulfiram ethanol reaction. *Biochem. J.* **1991** 278:189-192.



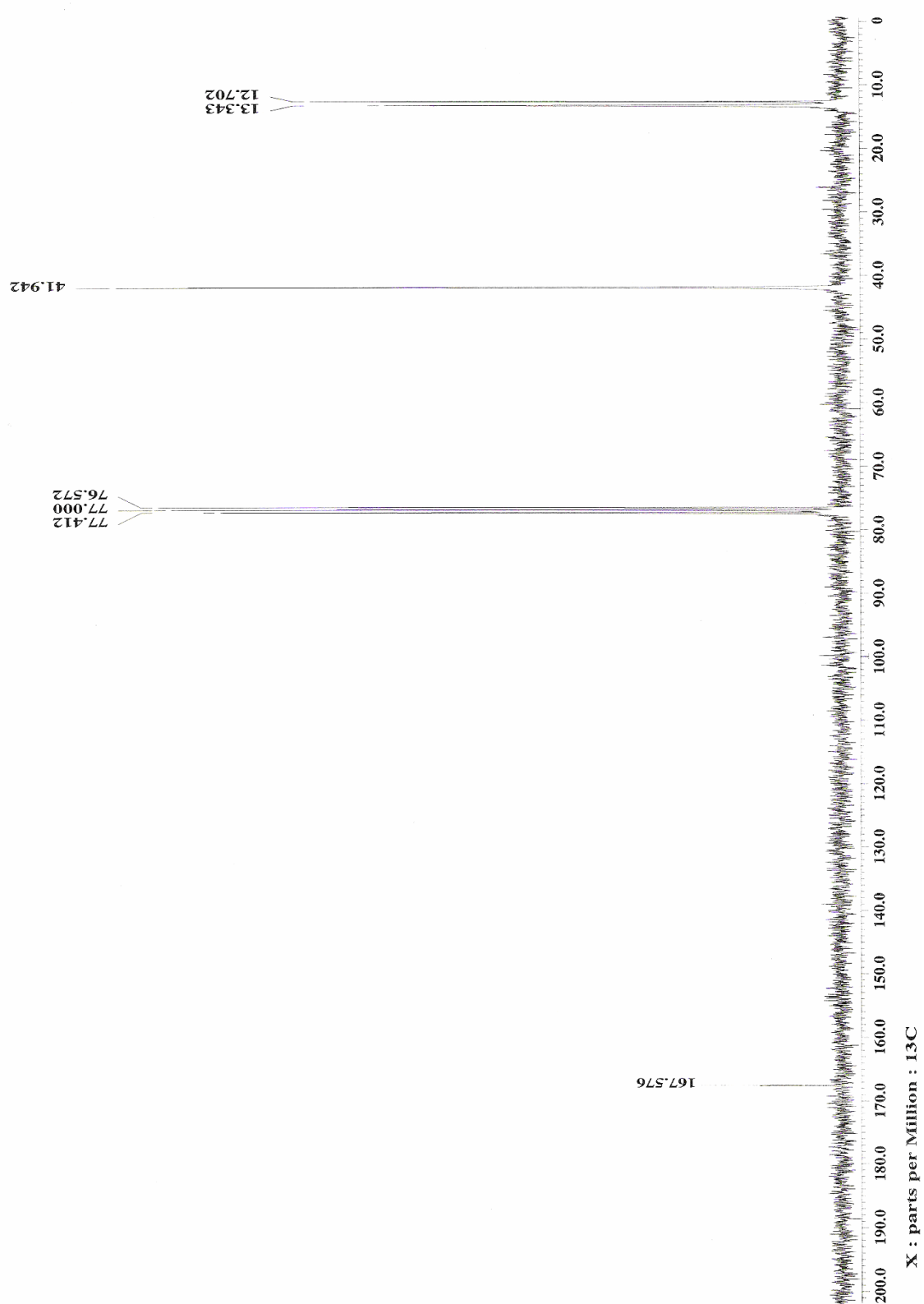
43. Gray, R. A.; Joo, G. K. Stauffer Chemical Co. S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate as a selective herbicide in rice. US Pat. 4,582,528. **1986** April 15.
44. Schloss, J. V. Therapeutic compositions. WO 03/053337 A2. **2003** July 3.
45. Conway, T. T.; DeMaster, E. G.; Lee, M. J.; Nagasawa, H. T. Prodrugs of nitroxyl and nitrosobenzene as cascade latentiated inhibitors of aldehyde dehydrogenase. *J. Med. Chem.* **1998** 41:2903-2909.
46. Shirota, F.; Goon, D. J.; DeMaster, G.; Nagasawa, T. Nitrosyl cyanide, a putative metabolic oxidation product of the alcohol-deterrent agent cyanamide. *Biochem. Pharmacol.* **1996** 52:141-147.
47. Nagasawa H.T.; DeMaster, E. G.; Goon, D. J.; Kawle, S. P.; Shirota, F. N. Carbethoxylating agents as inhibitors of aldehyde dehydrogenase. *J Med Chem.* **1995** 38:1872-1876.
48. Wynne, J. H.; Jensen, S. D.; Snow, A. W. Facile one-pot synthesis of S-alkylthiocarbamates. *J. Org. Chem.* **2002** 68:3733-3735.
49. Nishiyama, Y.; Kawamatsu, H.; Sonoda, N. A facile method for the synthesis of thiocarbamates: palladium-catalyzed reaction of disulfide, amine and carbon monoxide. *J. Org. Chem.* **2005** 70:2551-2554.
50. Mizuno, T.; Takahashi, J.; Ogawa, A. Facile S-alkyl thiocarbamate synthesis by a novel DBU-assisted carbonylation of amines with carbon monoxide and sulfur. *Tetrahedron* **2003** 59:1327-1331.
51. Mizuno, T.; Nishiguchi, I.; Sonoda, N. Novel synthesis of S-alkyl thiocarbamates from amines, carbon monoxide, elemental sulfur, and alkyl halides in the presence of a selenium catalyst. *Tetrahedron* **1994** 50:5669-5680.
52. Mizuno, T.; Nishiguchi, I.; Okushi, T.; Hirashima, T. Facile synthesis of S-alkyl thiocarbamates through reaction of carbamoyl lithium with elemental sulfur. *Tetrahedron. Lett.* **1991** 32:6867-6868.
53. Jacob, J.; Reynolds, K. A.; Jones, W. D.; Goldleski, S. A.; Valente, R. R. Nickel-Mediated selective carbonylation routes to thiocarbamates. *Organometallics* **2001** 20:1028-1031.
54. Kuniyasu, H.; Hiraike, H.; Morita, M.; Tanaka, A.; Sugoh, K.; Kurosawa, H. Palladium-catalyzed azathiolation of carbon monoxide. *J. Org. Chem.* **1999** 64:7305-7308.



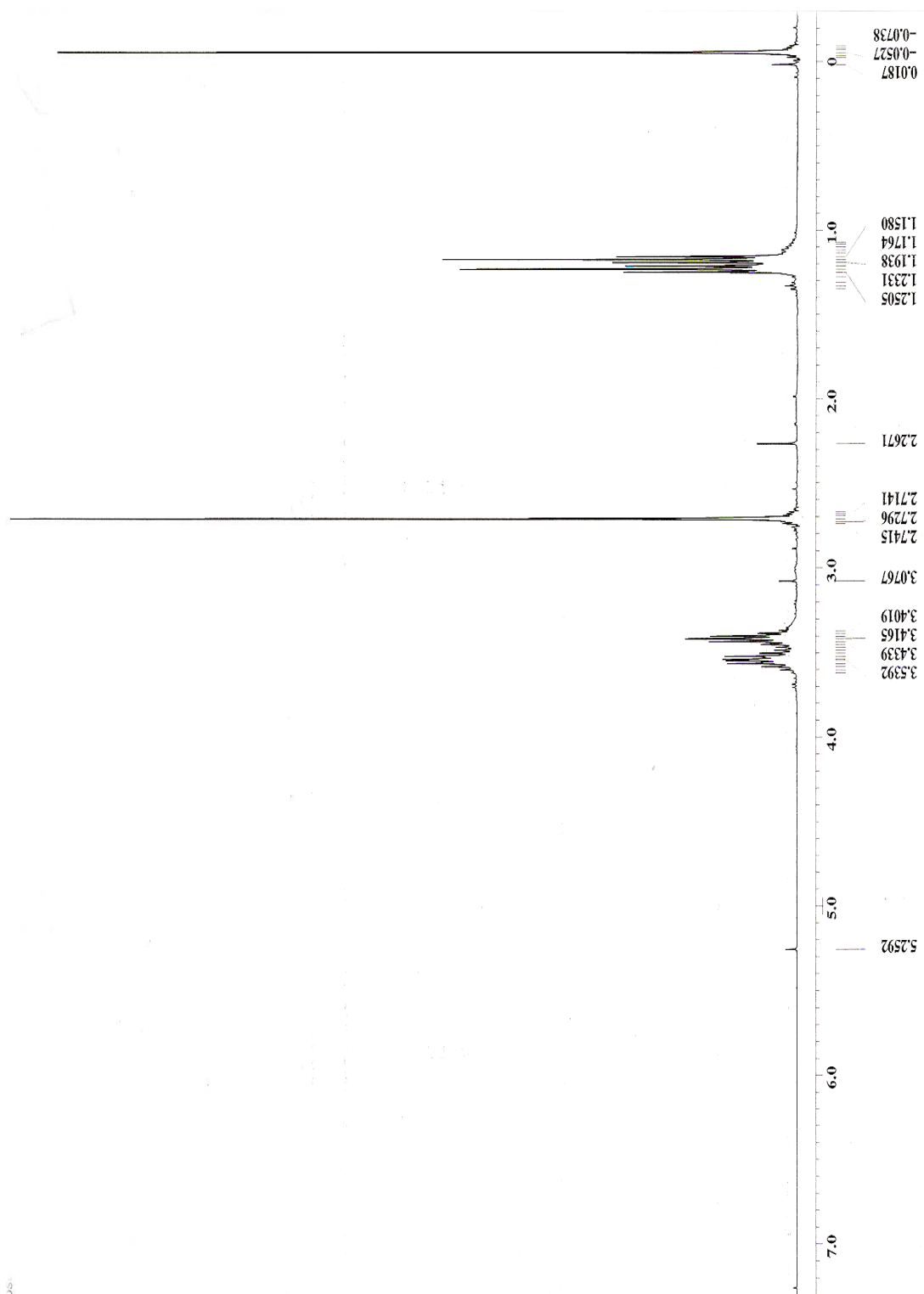
55. Smith, M. B.; March, J. March's. Advanced organic chemistry. 5th ed. Wiley Inter-Science. Canadá. **2001**. pp. 1179-1180, 1542.
56. Hoyle, J. The chemistry of sulphones and sulfoxides. 3a ed. John Wiley & Sons Ltd. **1988**. pp. 970-980.
57. Madesclaire, M. Tetrahedron report number 210. Synthesis of sulfoxides by oxidation of thioetheres. *Tetrahedron* **1986** 42:5459-5495.
58. Bahrami, K. Selective oxidation of sulfides to sulfoxides and sulfones using hydrogen peroxide (H₂O₂) in presence of zirconium tetrachloride. *Tetrahedron Lett.* **2006** 47:2009-2012.
59. Torres-Nava, T. N. Desarrollo de un proceso ambientalmente amigable para la obtención de metomidato y etomidato. Tesis Licenciatura. UNAM, México: **2006**.
60. Fieser, L. F.; Fieser, M. Reagents for organic synthesis. John Wiley and Sons, Inc. USA **1967**, pp. 434.
61. Fox, M. A.; Whitesell, J. K. Química orgánica. 2^a ed. Pearson Educación. México **2000**, pp. 280-302.
62. MacMurry, J. Química orgánica. 5a ed. International Thomson Editores. México 2001, pp. 216-220.
63. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. Structure determination of organic compounds. Springer-Verlag. Germany 2000, pp. 352-357.
64. Kirchner, F. K.; Soria, A. E.; Cavallito, C. J. Quaternary ammonium alkyl sulfide and sulfoxide cholinergic agents. *J. Am. Chem. Soc.* 1955 77:4599-4601.



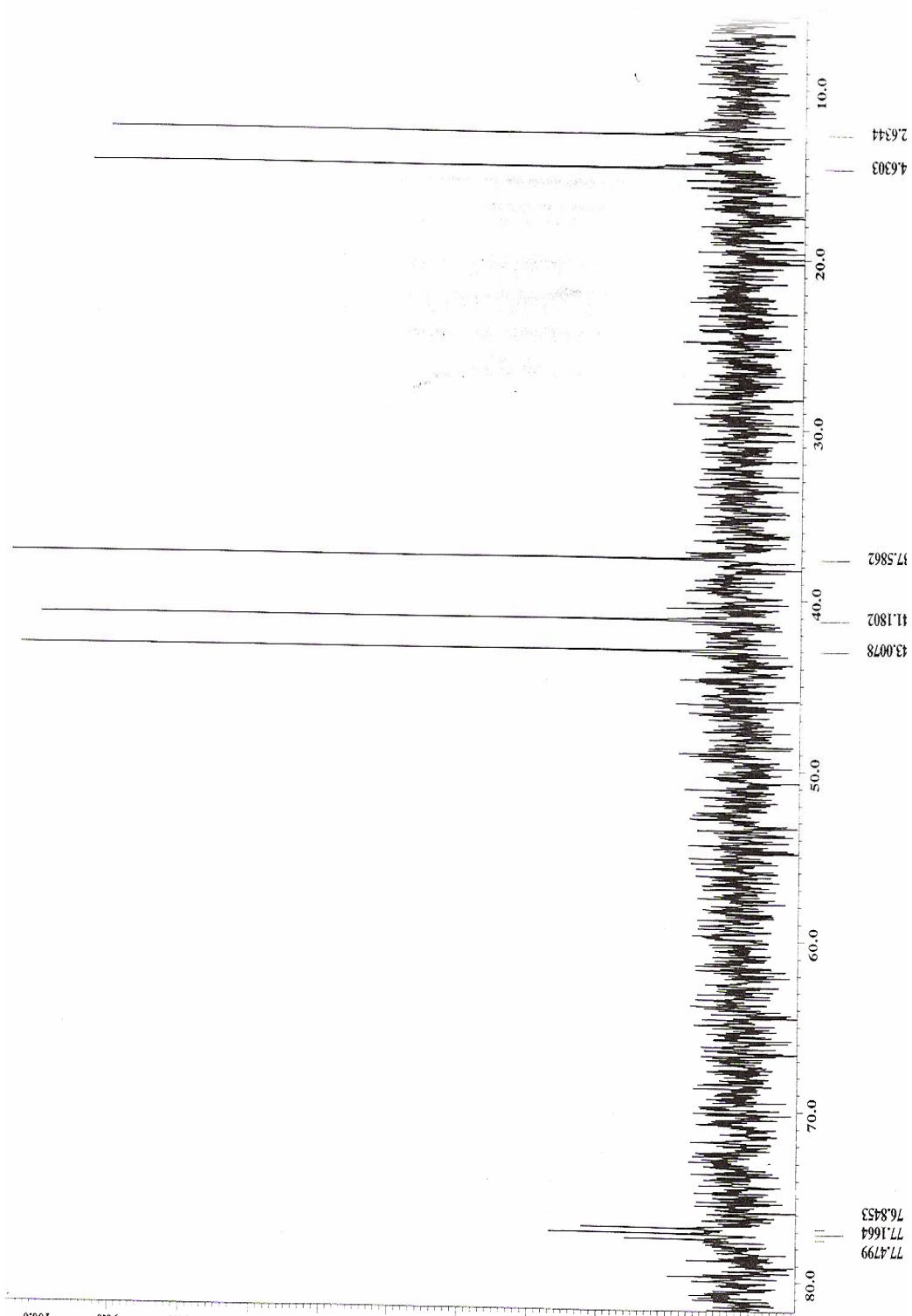
Espectro 1. RMN ¹H para el DETC-Me (1).



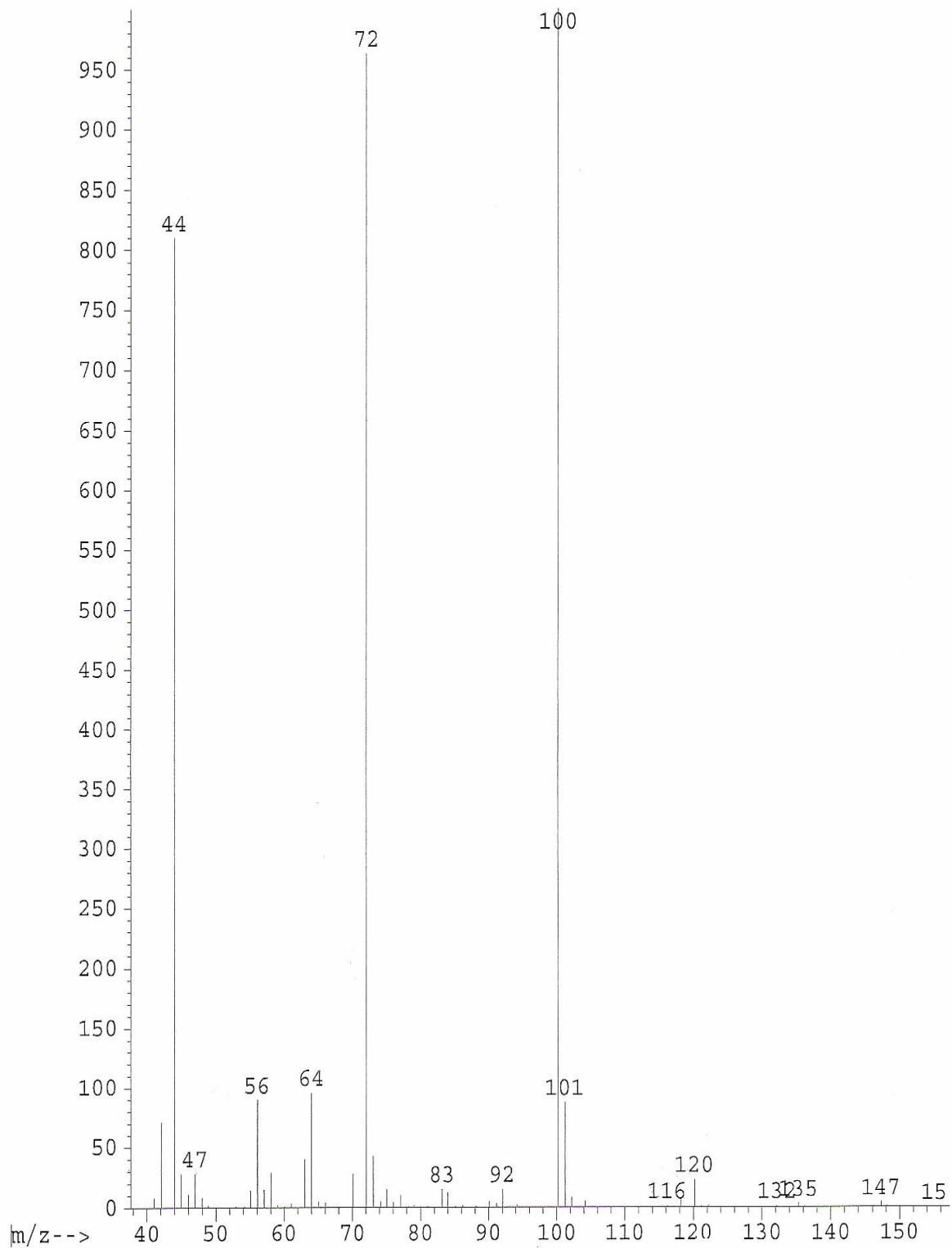
Espectro 2. RMN ^{13}C para el DETC-Me (1).



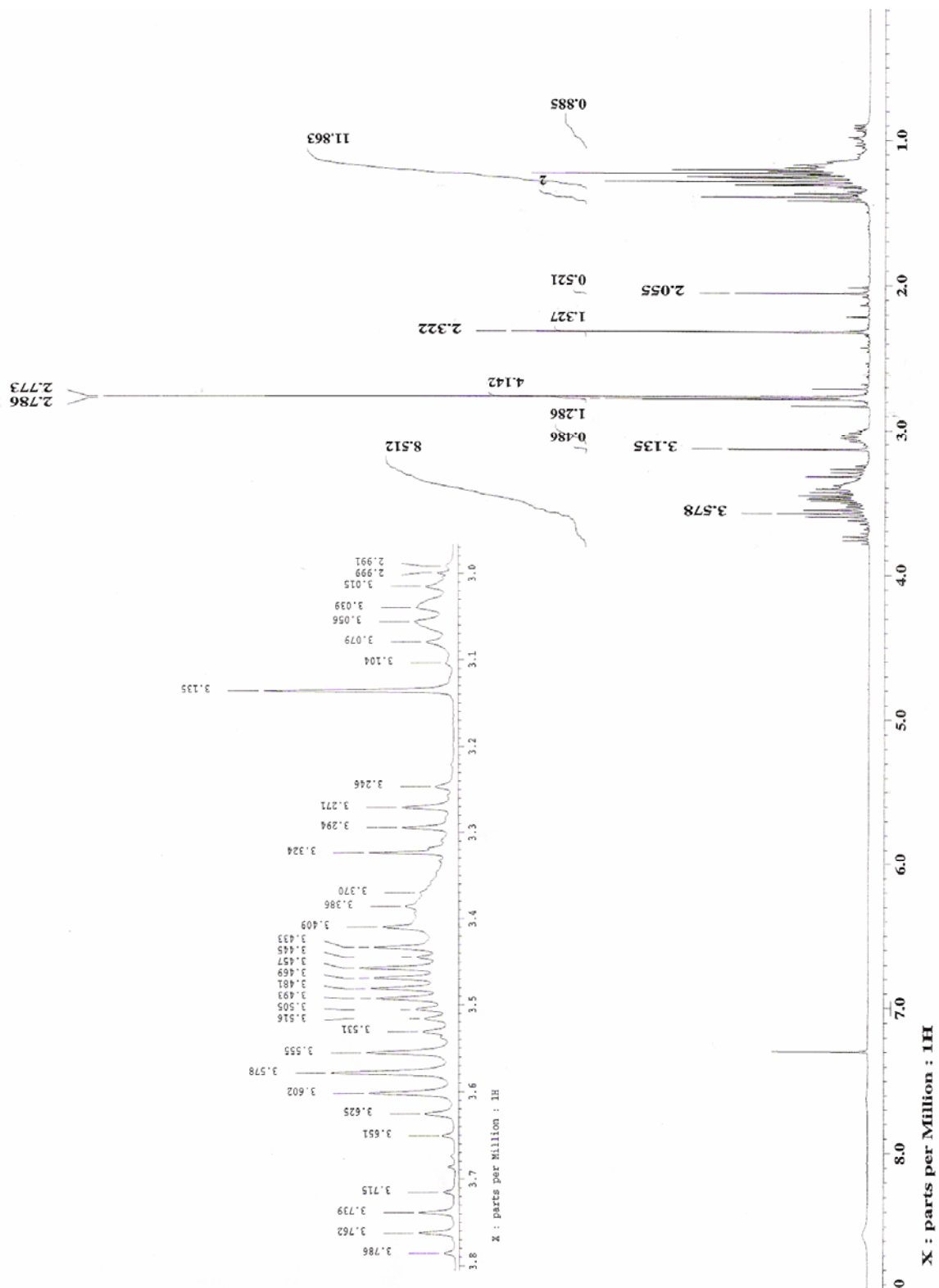
Espectro 3. RMN ^1H para el DECOS-Me (3).



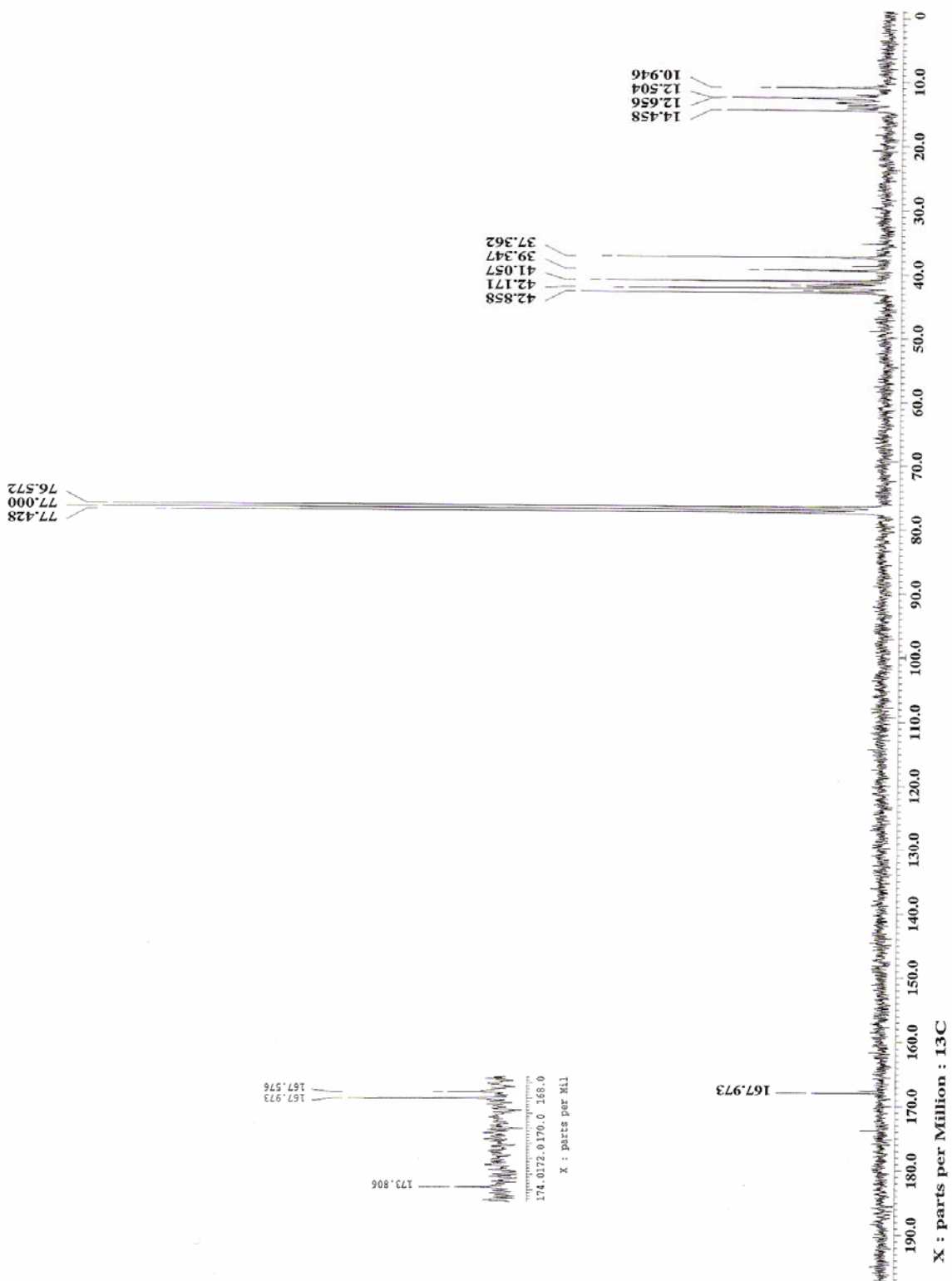
Espectro 4. RMN ^{13}C para el DECOS-Me (3).



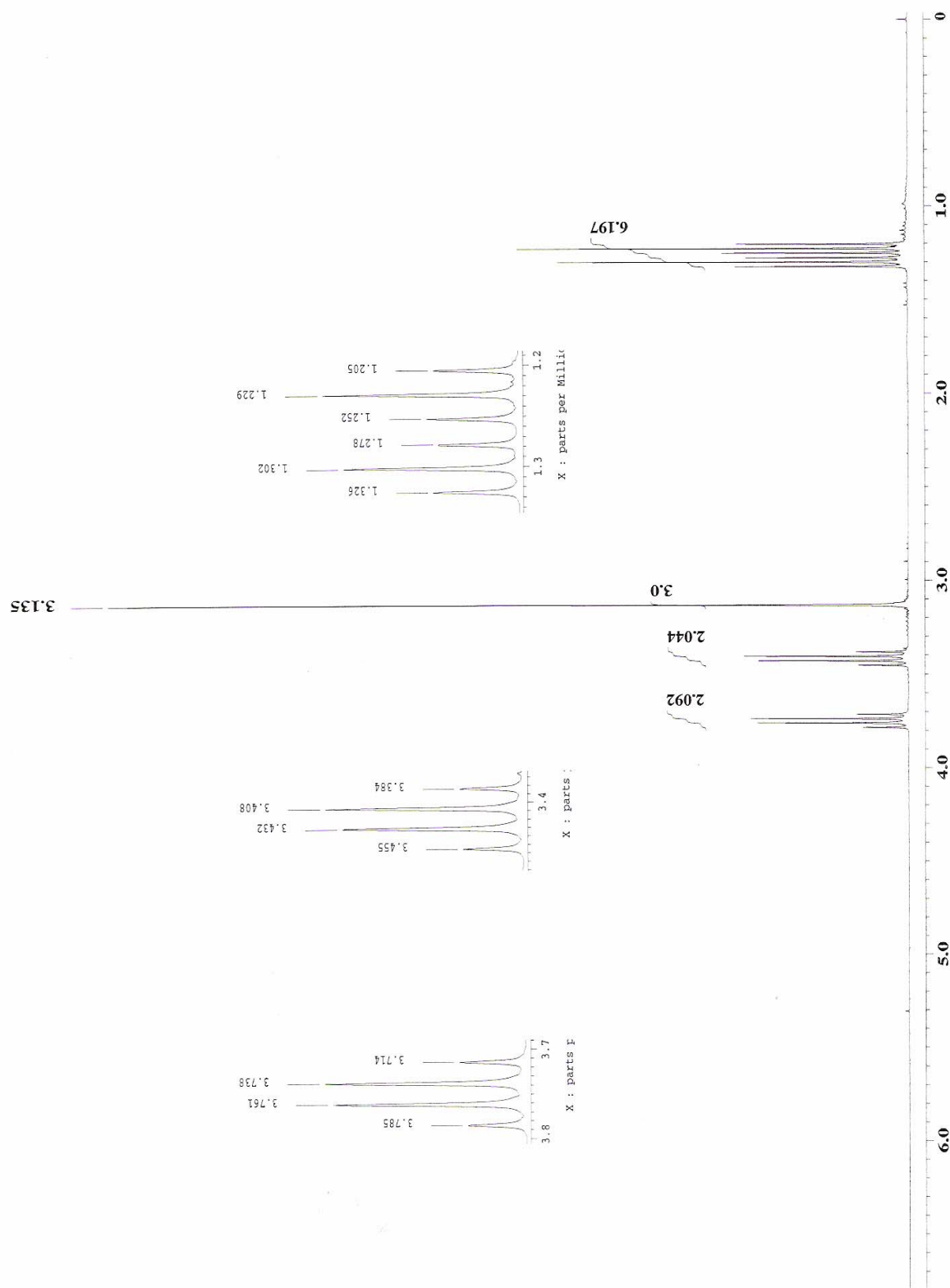
Espectro 5. Masas para el DECOS-Me (3).



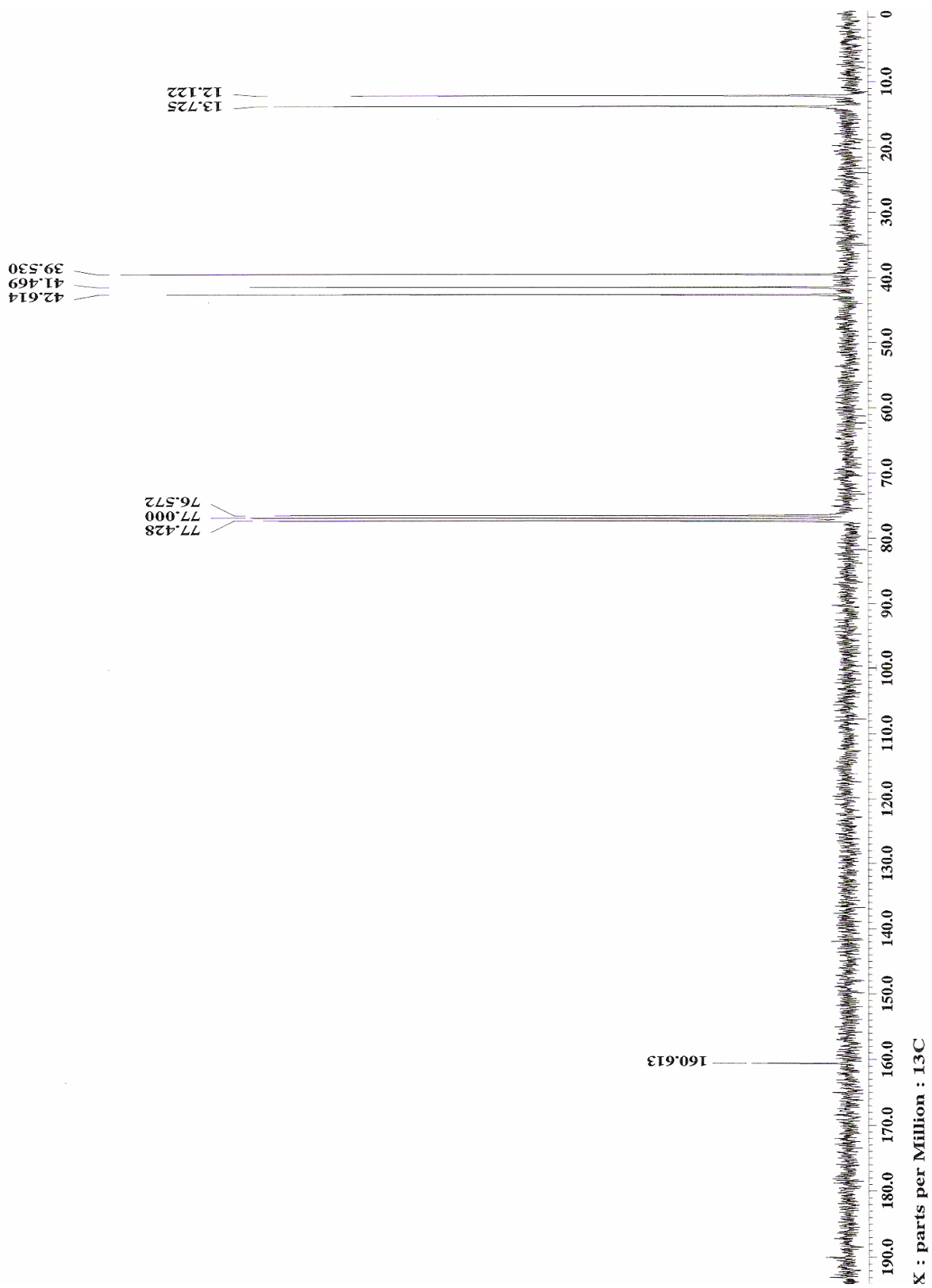
Espectro 6. RMN ^1H de mezcla DETC-MeSO (2) y DECOS-Me (3).



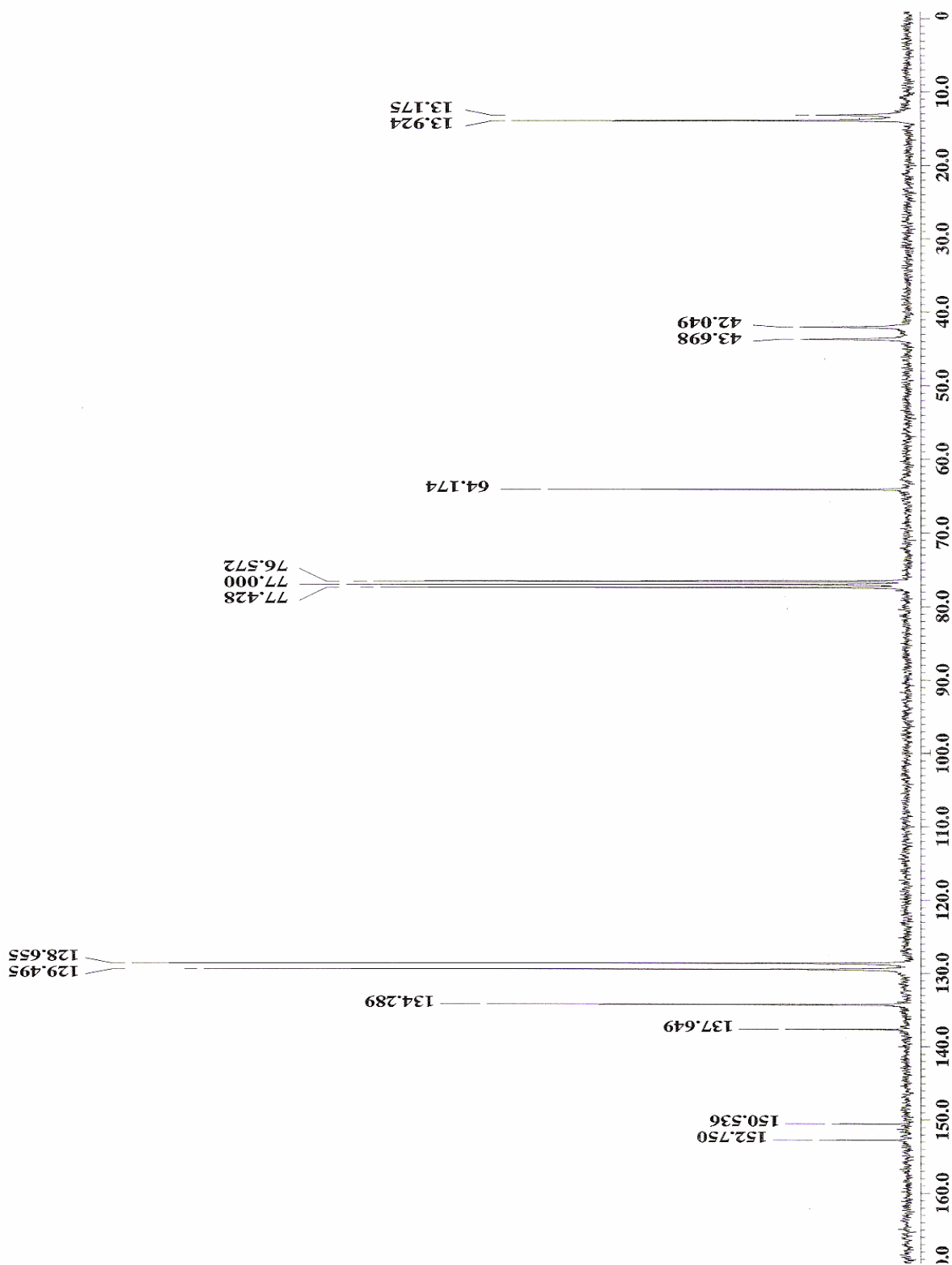
Espectro 7. RMN ^{13}C de mezcla DETC-MeSO (2) y DECOS-Me (3).



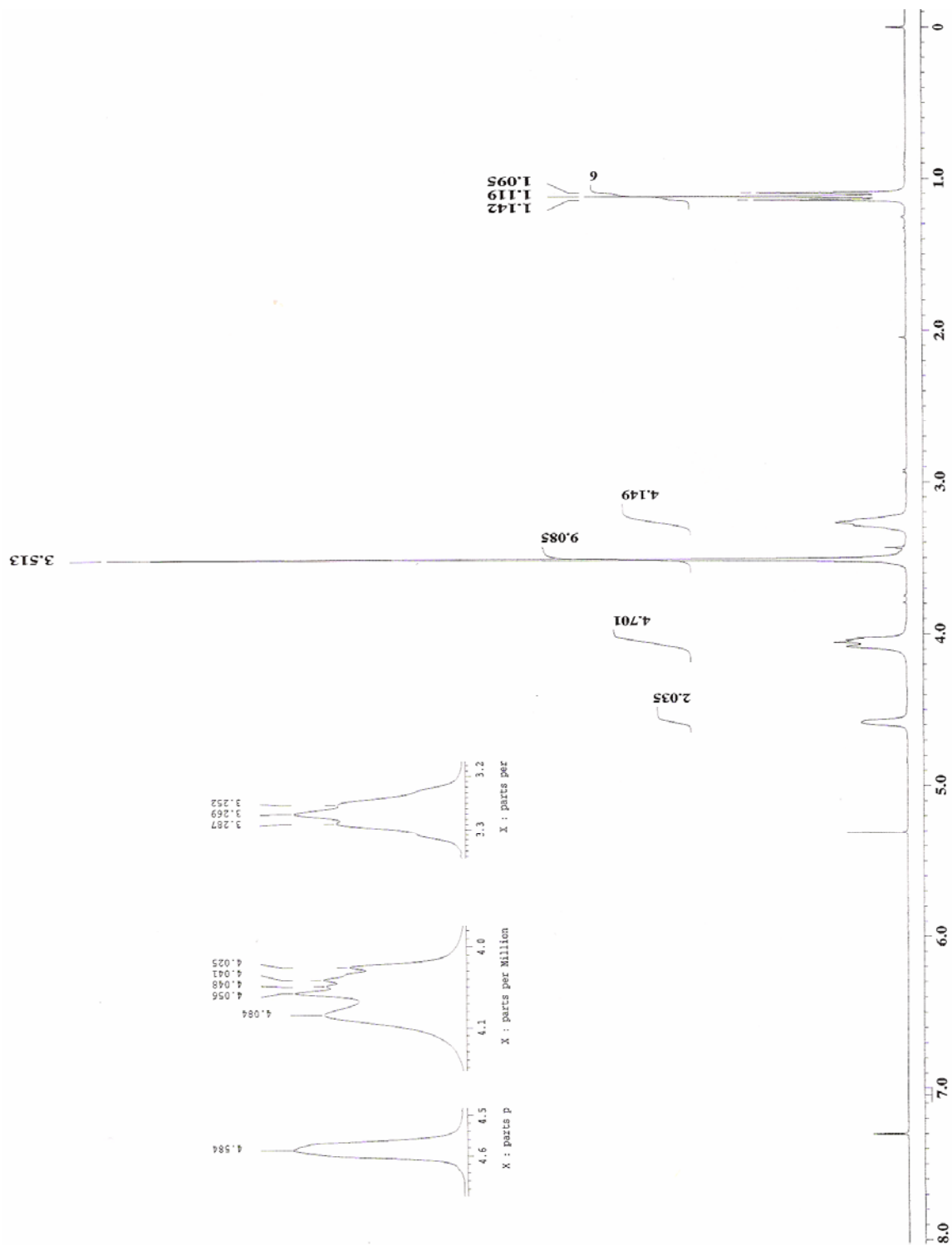
Espectro 8. RMN ^1H para DETC-MeSO₂ (4).



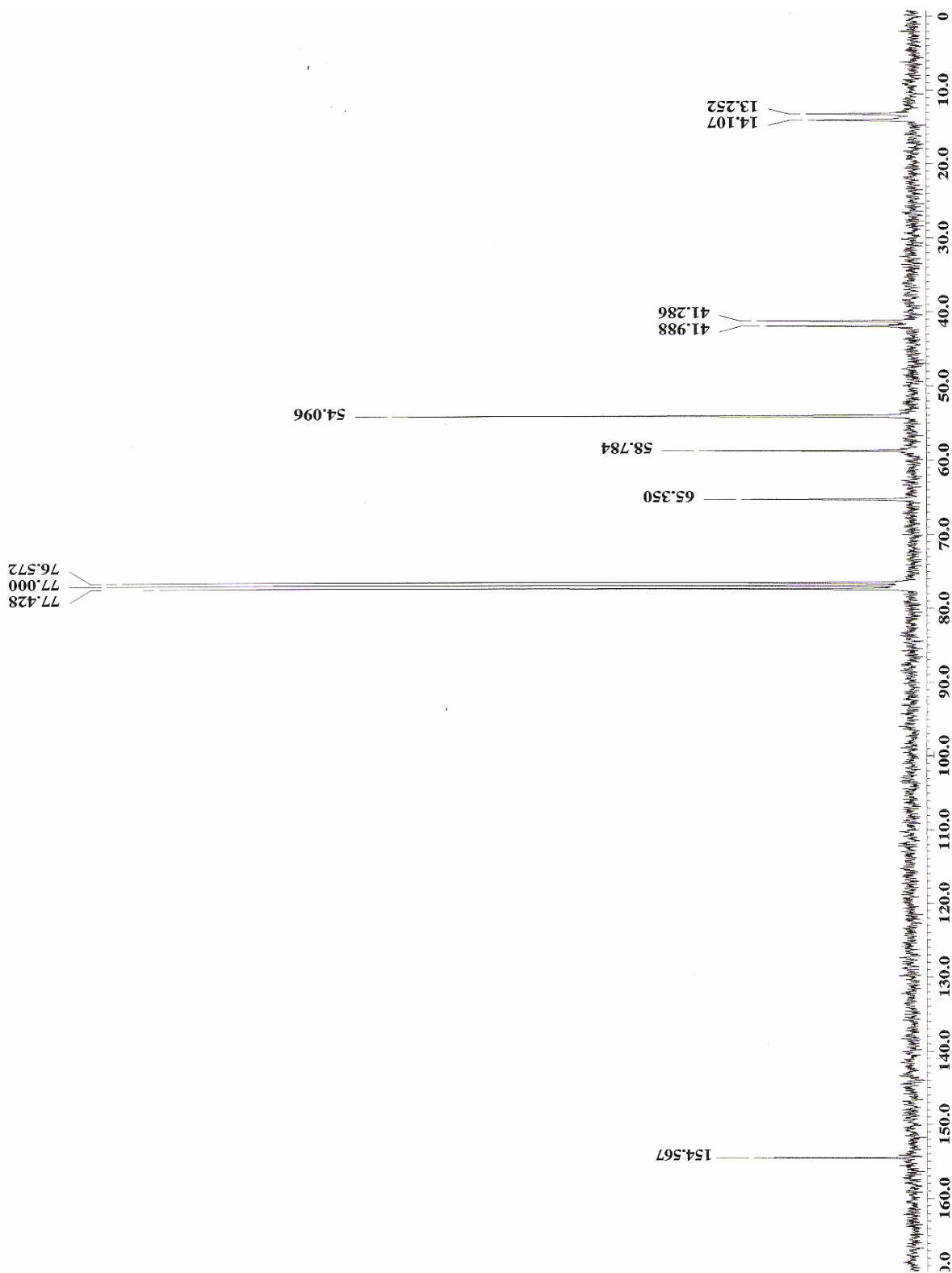
Espectro 9. RMN ^{13}C para DETC-MeSO₂ (4).



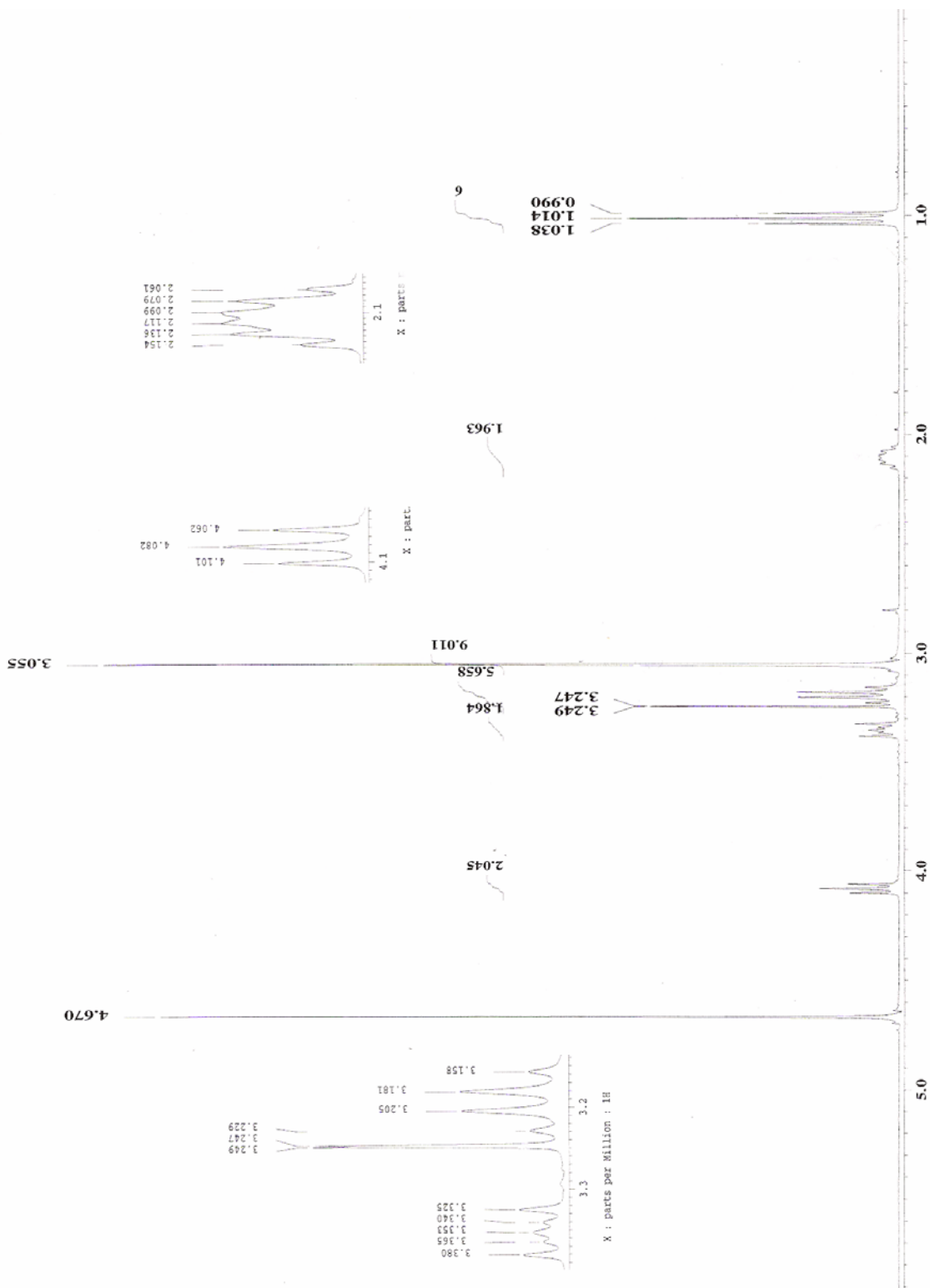
Espectro 11. RMN ^{13}C para el ácido *N*-(etoxicarbonil)-*O*-(dietilcarbamoil) bencensulfohidroxámico (**7**).



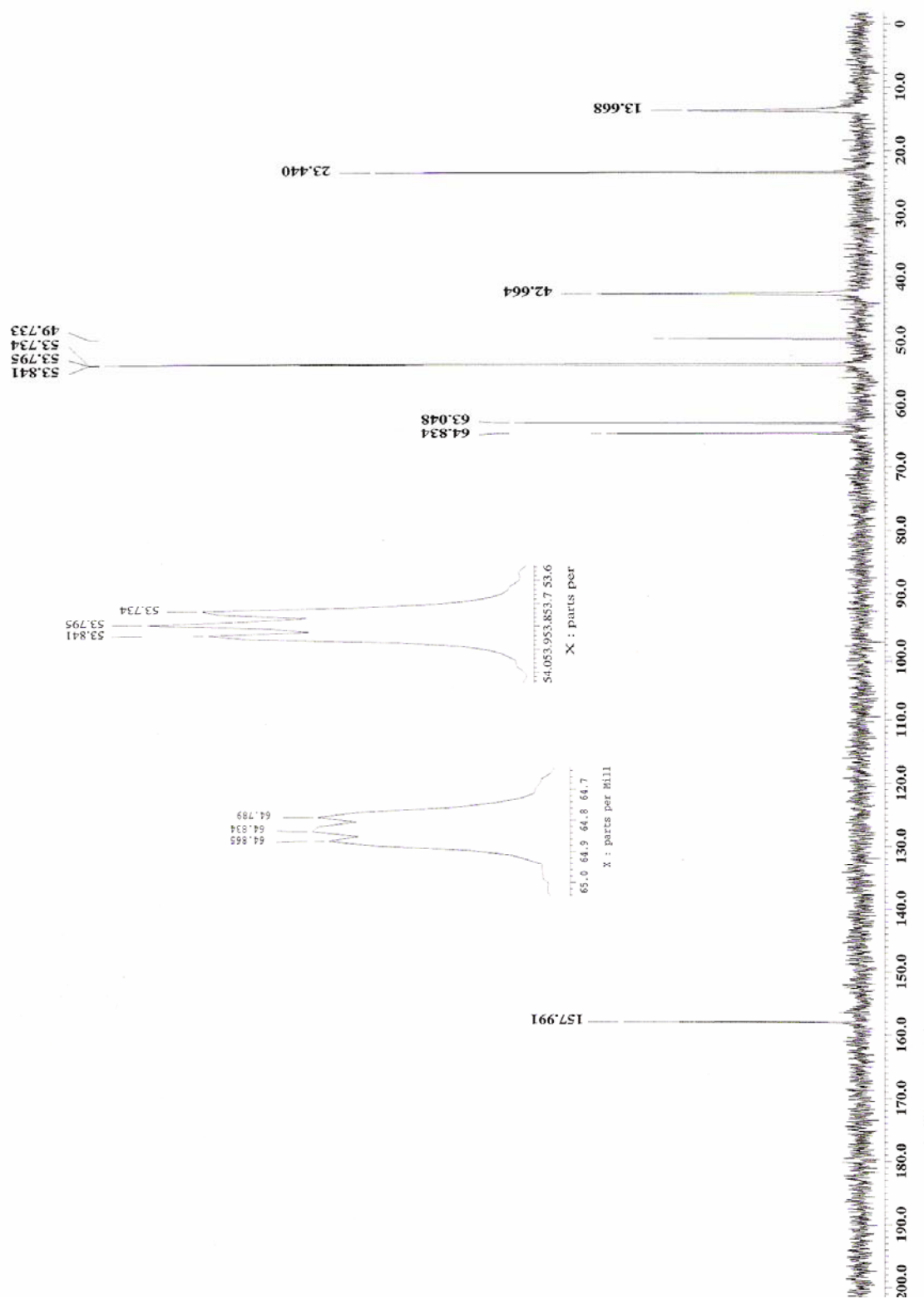
Espectro 12. RMN ¹H para el cloruro de 2-(((dietilamino)carbonil)oxi)-N,N,N-trimetiletilamonio (**9**).



Espectro 13. RMN ^{13}C para el cloruro de 2-(((diethylamino)carbonyl)oxi)-*N,N,N*-trimetiletilamonio (**9**).



Espectro 14. RMN ^1H para el cloruro de 2-(((diethylamino)carbonil)oxi)-N,N,N-trimetilpropilamonio (**11**).



Espectro 15. RMN ^{13}C para el cloruro de 2-(((diethylamino)carbonyl)oxi)-*N,N,N*-trimetilpropilamonio (**11**).

**ABREVIATURAS**

ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AcOEt	Acetato de etilo
D ₂ O	Agua deuterada
BADH	Betaína aldehído deshidrogenasa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
<i>J</i>	Constante de acoplamiento en Hertz
CCF	Cromatografía en capa fina
δ	Desplazamiento químico (ppm)
EM	Espectrometría de masas
<i>R_f</i>	Factor de retención
GSH	Glutación reducido
I. E.	Impacto electrónico
lbs/pulg ²	Libras por pulgada cuadrada
MHz	Megahertz
MTBE	Metil terbutil éter
MeOH	Metanol
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
p. eb.	Punto de ebullición
p. f.	Punto de fusión
<i>m/z</i>	Relación masa carga
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
T. amb.	Temperatura ambiente
TMS	Trimetilsilano



THF

Tetrahidrofurano