



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Síntesis y evaluación de la actividad antibacteriana de
fosforamidatos derivados de arilpiperazina**

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

Presenta:

Flavio Manzano Pérez

Director: Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín

Codirectora: Dra. Julieta Luna Herrera

San Juan Bautista Tuxtepec Oaxaca, 2024.

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la Universidad del Papaloapan para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/281
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 03 de septiembre de 2024

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que, el jurado evaluador del examen para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Químicas** del **C. Flavio Manzano Pérez**, con número de **Matrícula 21130013**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **“Síntesis y evaluación de la actividad antibacteriana de fosforamidatos derivados de arilpiperazina”**, para su posterior presentación y defensa por el sustentante.

Agradezco su atención y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Atentamente
terra uberima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú

Dr. José Abad Zavaleta
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Dr. Oscar Abelardo Ramirez Marroquin – Director de tesis.
C.c.p. Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos – Coordinadora de la Maestría en Ciencias Químicas.
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/282
ASUNTO	Jurado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 03 de septiembre de 2024

FLAVIO MANZANO PÉREZ
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

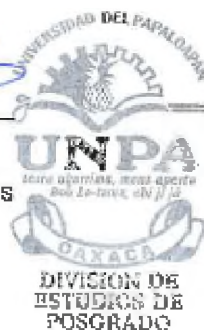
Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Químicas** estará integrado por los siguientes investigadores.

Profesor Investigador	Jurado de Examen
Dra. Roxana Martínez Pascual	Presidente
Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos	Secretario
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín	Vocal
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo	Primer Suplente
Dra. Alma Xóchilt Ávila Alejandre	Segundo Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Eeu Lo-tama, chi ji ju

Dr. José Abad Zavaleta
Jefe de la división de estudios
de posgrado.



M. en C. Héctor López Arjón
Vicerrector Académico
Vo. Bo.



C.c.p. Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín – Director de tesis.
C.c.p. Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos – Coordinadora de la Maestría en Ciencias Químicas.
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo.

RECONOCIMIENTO

La presente Tesis se realizó en los laboratorios de síntesis de moléculas bioactivas del centro de investigaciones de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec bajo la dirección del Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín; y en el laboratorio de inmunología ii de la escuela nacional de ciencias biológicas (IPN) bajo la dirección de la Dra. Julieta Luna Herrera. El financiamiento del presente trabajo provino de los proyectos CONACyT CB-2017-2018 A1-S-10787, INFRA-2015-01-252013 e INFRA-2019-301144. Asimismo, se contó con la beca CONACyT con número de registro 1143526 perteneciente al programa de Maestría en Ciencias Químicas con registro PNP 002517.

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores de la maestría, por su dedicación por transmitir sus conocimientos con pasión y entusiasmo. A mis compañeros y amigos que me acompañaron en el proceso: Mariela, Lidia, Haggeo, Tere, Hideki, Shardy, David, Angie.

Al Dr. Oscar, por su disponibilidad y compromiso para sacar adelante este proyecto. A la Dra. Julieta, por su hospitalidad y las facilidades proporcionadas para el desarrollo de esta tesis.

A mi abue Cata, por haber confiado en mi y sembrar en mi la semilla de la perseverancia.

A doña Ade y especialmente a ti, Adri, por acompañarme durante este proceso.

Y gracias a Dios por permitirme terminar esta etapa en mi vida

Contenido

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN	xi
INTRODUCCION.....	2
MARCO TEÓRICO.....	4
Bacterias patógenas y generación de resistencia a antibióticos.....	4
a) Transferencia horizontal de genes de resistencia.....	4
b) Generación de mutaciones	5
Antibióticos	6
Pruebas de susceptibilidad bacteriana	8
Método Kirby-Bauer	8
Método de dilución en agar	8
ANTECEDENTES	10
Arlpiperazinas.....	10
Fosforamidatos	13
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos.....	18
METODOLOGÍA	19
Síntesis de fosforamidatos	19
Caracterización de fosforamidatos.....	20
Pruebas de susceptibilidad bacteriana	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
Síntesis de compuestos objetivo 16-29	23
Caracterización de los fosforamidatos 16-29	24
Cálculo de las CMI de los compuestos 16-29	29
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXOS	39
Parte experimental.....	39
Información general	39

Metodología general para la obtención de fosforamidatos	40
ESPECTROS DE FOSFORAMIDATOS 16-29	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro comparativo de rendimientos de los compuestos 22 y 23. -----	24
Tabla 2. CMI de los compuestos 16-25 evaluados en E. coli, S. aureus, E. faecalis y P. aeruginosa. -----	29
Tabla 3. CMI'S de los compuestos 16-29 expresados en µg/mL y mM, evaluados en MTB. -----	30

LISTA DE ABREVIATURAS

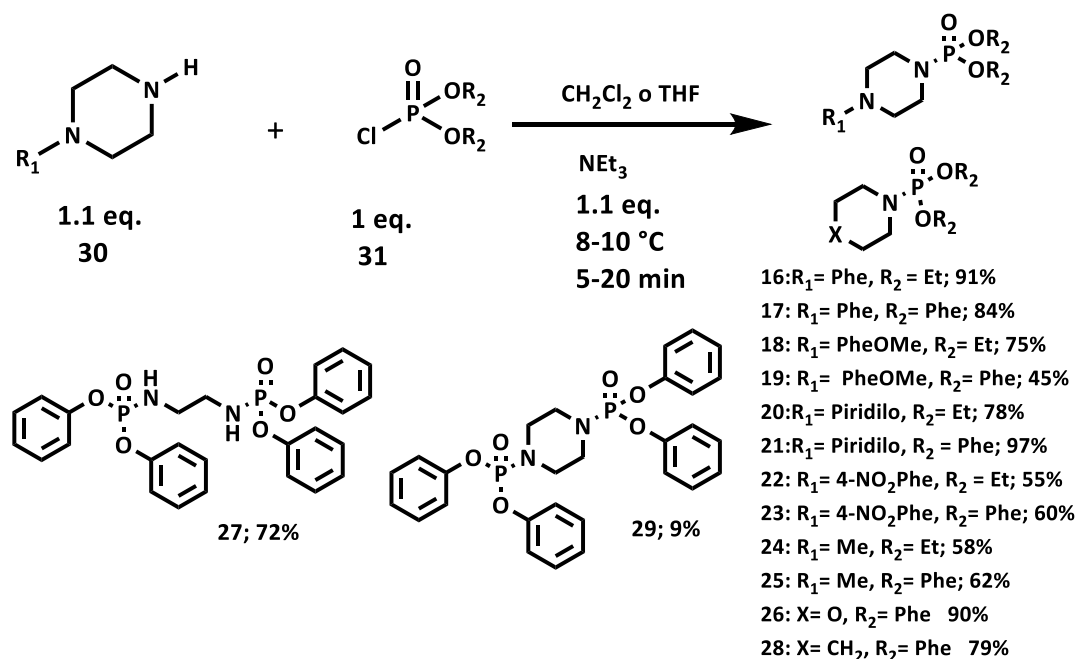
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DEPT	Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización (DEPT por sus siglas en inglés)
DMSO	Dimetilsulfóxido
Eq.	Equivalentes
ESI+	Ionización por electroespray
FT-IR-ATR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (por sus siglas en inglés)
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas de Alta Resolución)
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
-MeO	Metoxilo
MeOH	Metanol
<i>MTB</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
Q-TOF	Cuadripolo de Tiempo De Vuelo (por sus siglas en inglés)
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN ³¹ P	Resonancia Magnética Nuclear de Fósforo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TEA	Trietilamina
TLC	Cromatografía de capa fina (por sus siglas en inglés)
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultravioleta- visible
Δ	Calentamiento
δ	Desplazamiento químico

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud de alcance mundial, la OMS estima que las bacterias resistentes a antibióticos provocarán aproximadamente 10 millones de muertes para el año 2050. Los antibióticos utilizados actualmente en algún momento dejarán de ser efectivos para hacer frente a las infecciones bacterianas. Por esta razón en el siguiente trabajo se sintetizaron **14** nuevos fosforamidatos (**16-29**) derivados de arilpiperazina con potencial actividad antibacteriana y su evaluación en cepas de bacterias aerobias gram positivas: *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* y gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, además de *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.

Se sintetizaron los 14 compuestos mediante la fosforilación de arilpiperazinas, utilizando el respectivo clorofosfato, en presencia de trietilamina, con baño de hielo. Los compuestos objetivo se obtuvieron con rendimientos del 9-97%. Los productos fueron caracterizados mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C , ^{31}P , espectrometría de infrarrojo (FT-IR-ATR) y espectrometría de masas de alta resolución (ESI-HRMS).



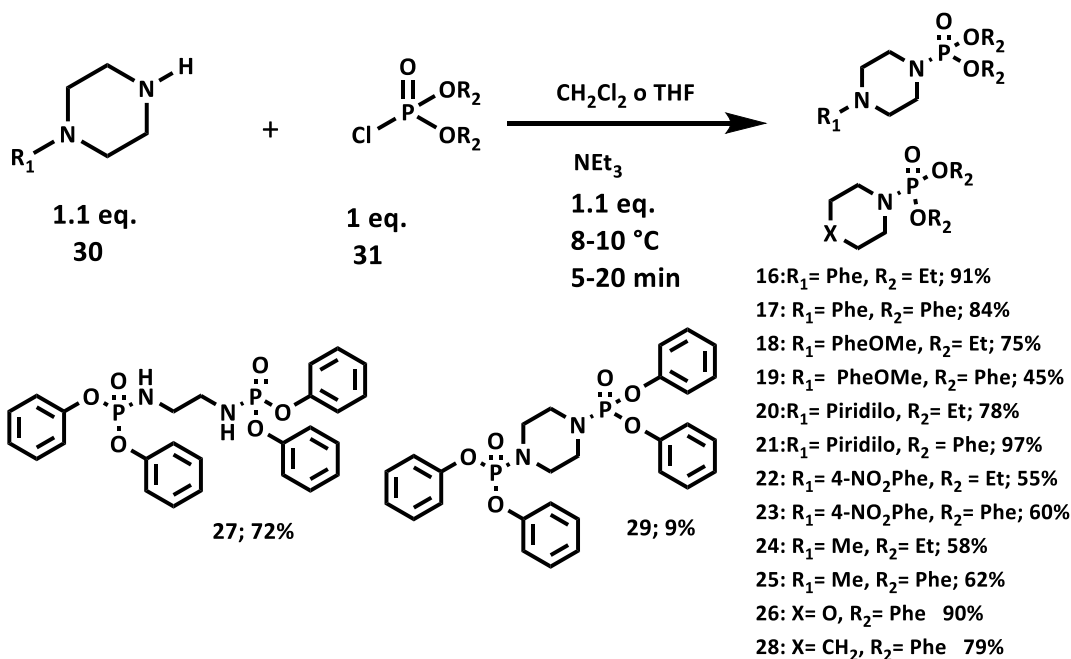
Posteriormente, se realizaron las pruebas de actividad antibacteriana utilizando el método de Alamar azul. Se obtuvieron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y se encontró

que los compuestos **16-25**. Presentaron una CMI $\geq 400 \mu\text{g/mL}$ en las cepas bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, por lo que se consideraron inactivos en estas especies. Por otra parte, se evaluaron los compuestos **16-29** en *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y los compuestos **17, 18, 19, 21, 23, 25 y 28** presentaron una CMI igual o inferior a $100 \mu\text{g/mL}$, por lo que se consideraron activos. Los compuestos **21, 25 y 28** tuvieron la mayor potencia con una CMI de **$50 \mu\text{g/mL}$ (0.12, 0.15, 0.15 mM, respectivamente)**. Por lo tanto, se concluyó que los fosforamidatos derivados de arilpiperazina representan una familia novedosa de compuestos orgánicos que pueden ser optimizados para la generación de nuevos candidatos a fármaco, para el tratamiento de la tuberculosis.

SUMMARY

Antibiotic resistance is a global health problem, the WHO estimates that antibiotic-resistant bacteria will cause approximately 10 million deaths by 2050. The antibiotics currently used will at some point cease to be effective in dealing with the diseases. bacterial infections. For this reason, in the following work, 14 new phosphoramidates (**16-29**) derived from arylpiperazine with potential antibacterial activity were synthesized and their evaluation in strains of gram positive aerobic bacteria: *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* and gram negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, in addition to *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

The 14 compounds were synthesized through the phosphorylation of arylpiperazines, using the respective chlorophosphate, in the presence of triethylamine, with an ice bath. The target compounds were obtained in yields of 9-97%. The products were characterized by ^1H , ^{13}C , ^{31}P nuclear magnetic resonance (NMR), infrared spectrometry (FT-IR-ATR) and high resolution mass spectrometry (ESI-HRMS).



Subsequently, antibacterial activity tests were carried out using the Alamar blue method. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were obtained and it was found that compounds **16-25**. They presented an MIC \geq 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the bacterial strains *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, so they were considered inactive in these species. On the other hand, compounds 16-29 were evaluated in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and compounds **17, 18, 19, 21, 23, 25** and **28** presented an MIC equal to or less than 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, so they were considered active. Compounds **21, 25** and **28** had the highest potency with an MIC of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.12, 0.15, 0.15 mM, respectively). Therefore, it was concluded that arylpiperazine-derived phosphoramidates represent a novel family of organic compounds that can be optimized for the generation of new drug candidates for the treatment of tuberculosis.

INTRODUCCION

El término antibiótico se derivó del latín *antibioticus*, que significa “contra la vida”. Anteriormente, los antibióticos se consideraban compuestos orgánicos producidos por un microorganismo que es tóxico para otros microorganismos (Russell, 2004). Actualmente, los antibióticos son obtenidos también por síntesis química y se cuenta con una amplia gama de antibióticos comerciales para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias en humanos. Una forma de clasificación de los antibióticos es por su estructura molecular, como son: betalactámicos, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas, glicopéptidos y oxazolidinonas (Frank & Tacconelli., 2012).

La resistencia a los antibióticos es un problema que se ha desarrollado con el paso del tiempo y se pronostica que podría ser catastrófico para la salud mundial en el transcurso de las próximas décadas. Dejó de ser un tema solo del ámbito científico y ha pasado a ser tema en los medios de comunicación convencionales como los periódicos, con títulos como “Pandemia silenciosa: las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos matan más personas que la malaria y el SIDA” (BBC News Mundo, 2022).

Las principales razones por las cuales las bacterias patógenas de humanos han adquirido resistencia a los antibióticos son: la adquisición de reservorios de genes de resistencia de manera natural, la interacción que tienen las bacterias patógenas de humanos con las ambientales, las cuales están constantemente bajo condiciones de estrés (Bishop-Lilly *et al.*, 2012; Nesme *et al.*, 2014). Otra razón importante es debida a la presión selectiva de los antibióticos existentes sobre las bacterias patógenas de humanos (Baquero, 2009).

A pesar de la diversidad de los antibióticos empleados actualmente, existen bacterias resistentes a estos que pueden agravar la salud de los pacientes infectados, incluso causándoles la muerte. Las bacterias resistentes a los antibióticos actuales y que representan una amenaza a la salud mundial son, de acuerdo a la OMS en el 2017, por orden de prioridad descendente *Acinetobacter baumannii* (oportunista nosocomial), *Pseudomonas aeruginosa* (causante de infecciones pulmonares graves),

Enterobacteriaceae .spp (causante de infecciones gastrointestinales), *Enterococcus faecium* (causante de endocarditis e infecciones en el tracto urinario), *Staphylococcus aureus* (causante de infecciones en la piel y huesos), *Helicobacter pylori* (causante de ulcera péptica), *Campylobacter spp* (causante de infecciones intestinales) (OMS, 2017); además se considera una amenaza a *Mycobacterium tuberculosis* (causante de tuberculosis pulmonar) (Fonseca & McHugh., 2015).

Las bacterias resistentes a antibióticos son una amenaza para la humanidad y aunque existe una amplia variedad de antibióticos disponibles, estos con el paso del tiempo no serán efectivos, es por ello se tiene la necesidad de descubrir nuevas moléculas que diversifiquen las posibilidades de combatir a microorganismos patógenos desde una perspectiva farmacológica, es por eso que el objetivo de este trabajo fue sintetizar nuevos fosforamidatos derivados de arilpiperazina con potencial actividad antibacteriana.

MARCO TEÓRICO

Bacterias patógenas y generación de resistencia a antibióticos

Las bacterias son microorganismos procariontes unicelulares, estos se encuentran en múltiples ecosistemas del planeta y son de vital importancia para la subsistencia de la vida. En el cuerpo humano existen numerosas especies de bacterias, la mayoría no producen ningún daño, incluso establecen una relación simbiótica, lo que significa que ellas obtienen un beneficio de nuestro organismo, por ejemplo: obtienen la fuente de carbono para su metabolismo, a la vez que forman poblaciones que contribuyen a mejorar la absorción de nutrientes en el tracto digestivo, como por ejemplo la flora intestinal (National Human Genome Research Institute, 2023).

Por otra parte, se encuentran las bacterias patógenas de humanos que son las causantes de enfermedades (Thomas & Elkinton, 2004). Incluso las bacterias normalmente no patogénicas pueden convertirse en una amenaza para la salud del huésped, cuando logran romper la barrera que los mantiene en su microambiente. Un ejemplo es *Escherichia coli* que se encuentra en el tracto intestinal, si llega a haber un deterioro en las mucosas del intestino, pueden ingresar al torrente sanguíneo y causar una infección generalizada (Martí, 2007).

Las bacterias pueden desarrollar mecanismos para adquirir resistencia a los antibióticos y se clasifican en dos tipos principales:

a) Transferencia horizontal de genes de resistencia.

Consiste en la interacción entre dos cepas de bacterias, una es donadora y la otra es receptora. La bacteria donadora transfiere plásmidos con genes de resistencia a la bacteria receptora, que originalmente no es resistente. Al incorporar los plásmidos y expresar los genes de resistencia, la bacteria receptora da origen a una nueva cepa resistente a

antibióticos (Nesme *et al.*, 2014). Un ejemplo de transferencia lateral de genes es la conjugación mediante el *pili*, el cual es un conducto que sobresale sobre la pared celular de las bacterias. Esta estructura se adhiere a la bacteria receptora por acción de la proteína de pared T4CP, mientras que un conjunto de proteínas denominadas relaxosomas, procesan el plásmido para obtener una cadena lineal, así, se facilita su transporte hacia el interior de bacteria receptora por acción de la proteína de T4SS. En la figura 1 se observa con detalle el mecanismo de intercambio de genes entre bacterias (Calvo & Garbisu., 2019).

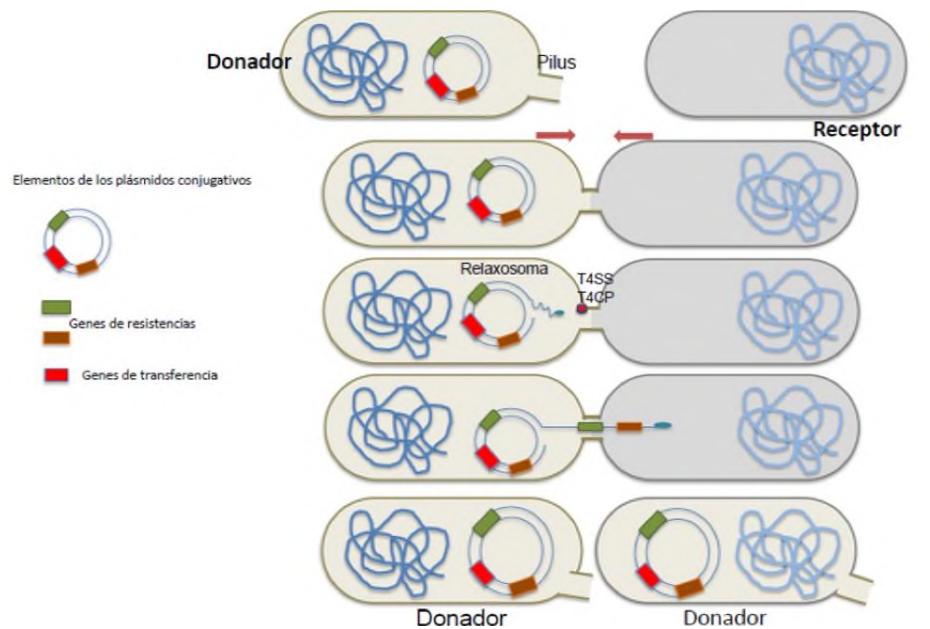


Figura 1. Mecanismo de transferencia de genes de resistencia a antibióticos (Calvo & Garbisu, 2019).

b) Generación de mutaciones

Durante proceso de replicación celular, las bacterias pueden mutaciones que confieren resistencia a los antibióticos. Estas mutaciones permiten a las bacterias sobrevivir a los tratamientos antibióticos. Además, estas bacterias resistentes tienen la capacidad de propagarse activamente incluso en presencia de antibióticos.

En algunos casos, estas mutaciones pueden alterar el objetivo molecular del antibiótico, además, las bacterias pueden desarrollar la capacidad de sintetizar bombas de expulsión,

las cuales transportan los antibióticos fuera de la célula bacteriana antes de que puedan ejercer su efecto antimicrobiano (Allen et al., 2010; Baquero., 2009).

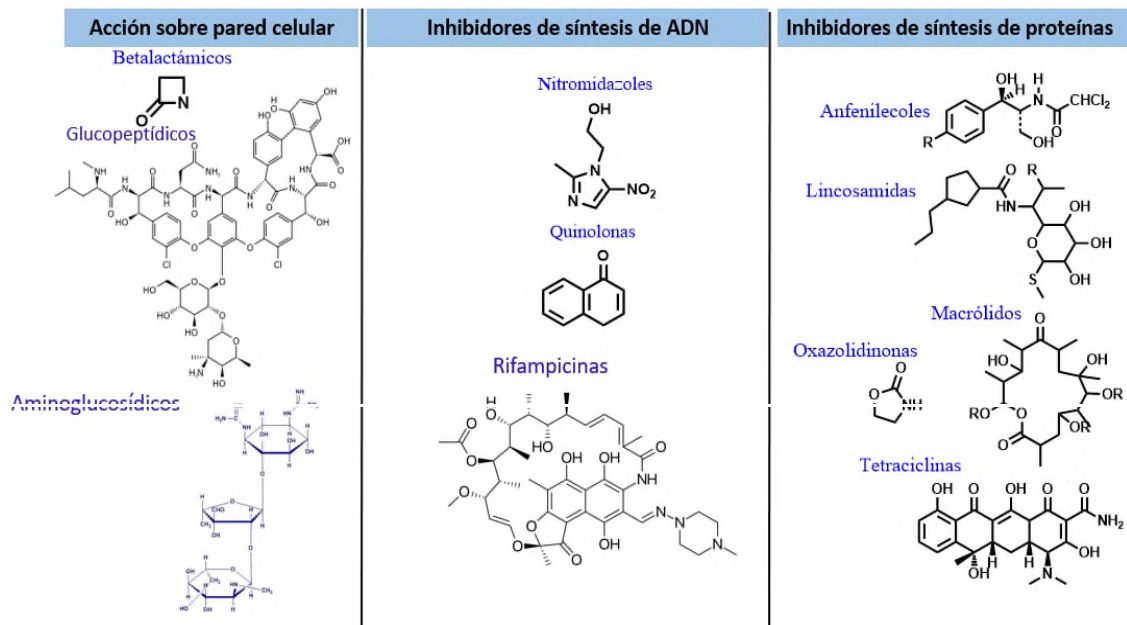
Antibióticos

Los antibióticos son fármacos que se emplean para combatir infecciones bacterianas en humanos y animales, estos tienen la capacidad de matar a las bacterias (bactericidas) o detener su reproducción (bacteriostáticos).

Estos fármacos tienen diversas vías de administración al organismo, las cuales son: oral, tópica, intramuscular e intravenosa.

A su vez, los antibióticos se clasifican por su naturaleza química.

Se clasifican los antibióticos por su mecanismo de acción y se agrupan conforme las regiones celulares sobre las que actúan, por ejemplo: pared celular, síntesis de proteínas, síntesis de ADN. A continuación, se presenta en el esquema 1 los principales grupos de antibióticos aprobados relacionados con su mecanismo de acción (Seija et al., 2006; Li et al., 2022).



Esquema 1. Clasificación de los principales grupos de antibióticos por su mecanismo de acción (Seija et al., 2006; Matzuzakil., 2010).

Los antibióticos que actúan sobre la pared celular pueden actuar de distintas formas, algunas pueden inhibir la síntesis de precursores de péptido glucano, componente esencial de la pared celular bacteriana, antibióticos como las penicilinas actúan de esta forma (Epanand *et al.*, 2016). Otros antibióticos como la vancomicina, actúa formando poros penetrando la membrana gracias a su capacidad anfipática (Herrmann *et al.*, 2015).

Por otro lado, los antibióticos inhibidores de la síntesis proteica se basan en las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas, esto los vuelve selectivos frente a células humanas. Los ribosomas bacterianos constan de dos subunidades: 30S y 50S (Arenz & Wilson., 2016). La subunidad 30S contiene ARN ribosómico (ARNr 16S) y la subunidad 50S contiene ARNr 5S y ARNr 23S, además de diversas proteínas designadas como S (pequeñas, por su traducción al español) en la subunidad 30S y L (grande, por su traducción al español) en la subunidad 50S. En esta diferencia estructural de los componentes dan lugar a sitios de unión para los antimicrobianos (Bulkley *et al.*, 2012).

Por último, están los antibióticos con acción en la síntesis de material genético de las bacterias.

La replicación del ADN es crucial durante la división celular para asegurar la transmisión de esta información a la descendencia. Este proceso, implica múltiples fases y la acción de diversas enzimas y sustratos, constituyendo así, dianas para varios antibióticos.

Algunos de ellos son, las rifamicinas y las quinolonas, interfieren en las enzimas involucradas en la replicación, mientras que los nitroimidazoles y nitrofuranos dañan directamente el ADN (Fábrega *et al.*, 2008). Generalmente, estos antibióticos presentan baja selectividad y cierta toxicidad para células eucarióticas. La mayoría de ellos son bactericidas rápida acción.

Para el desarrollo y aprobación de los antibióticos se requiere realizar diversos ensayos preclínicos y clínicos que prueben el efecto esperado, además de evaluar la toxicidad que estos compuestos puedan tener y así ser aprobados para su uso farmacológico. Dentro de los ensayos preclínicos se encuentran las pruebas de susceptibilidad bacteriana

Pruebas de susceptibilidad bacteriana

Método Kirby-Bauer

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana son modelos de evaluación *in vitro*, en ellos se pueden probar compuestos bioactivos para conocer si tienen actividad hacia un cultivo bacteriano específico. Estas pruebas además sirven para conocer la potencia y selectividad que tienen los compuestos sobre diversas cepas bacterianas. Los métodos más conocidos y empleados son: Kirby-Bauer, también conocido como difusión en disco o antibiograma y el método de dilución en agar (Balouiri *et al.*, 2016).

Este método fue uno de los primeros en emplearse para la determinación de la actividad antimicrobiana, incluso Alexander Fleming, el descubridor de la penicilina, utilizó una variante de ésta para sus ensayos

Método de dilución en agar

Por otra parte, el método de dilución en agar permite conocer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de una nueva sustancia en la que se desea conocer su actividad antibacteriana (McDermott *et al.*, 2005). La CMI es la concentración mínima de un compuesto que puede inhibir el 99 % de las bacterias después de ser incubadas durante 24 horas (Schumacher *et al.*, 2017).

Adicionalmente, uno de los ensayos para la evaluación de la susceptibilidad bacteriana es el ensayo de Alamar azul (AlamarBlue, como marca registrada). Esta es una prueba colorimétrica y mide de forma indirecta la viabilidad de las bacterias. El principio de este ensayo consiste en utilizar el reactivo AlamarAzul (resazurina), que es un indicador de oxidación-reducción, el reactivo en su forma oxidada es de color azul y no fluoresce.

En el ensayo las bacterias viables o en crecimiento provocan una reducción enzimática de la resazurina a resorufina, la cual pasa de ser azul no fluorescente a rosa fluorescente como se muestra en la **figura 2**. Estas diferencias en coloración pueden detectarse mediante un detector de fluorescencia o de absorbancia (espectrofotómetro UV-Vis) (Präbst *et al.*, 2017).

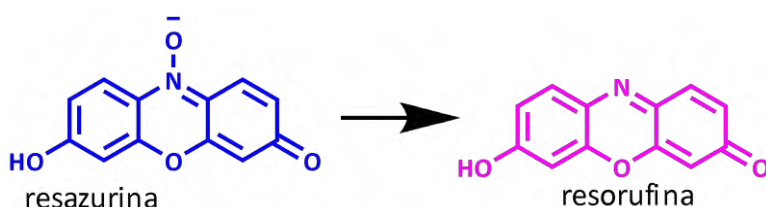


Figura 2. Reacción de reducción de la resazurina a resorufina

Actualmente, los investigadores en todo el mundo realizan esfuerzos en el desarrollo de nuevos compuestos bioactivos para el combate de bacterias que progresivamente se vuelven resistentes a los antibióticos. Se está trabajando en el desarrollo de nuevos compuestos activos contra las bacterias para diversificar las opciones para combatirlos.

Se define compuesto bioactivo, como una sustancia que tiene una actividad biológica, relaciona con su capacidad de moderar algún proceso metabólico dentro de un organismo, para obtener mejores condiciones de salud (Šeregelj *et al.*, 2020).

Los compuestos bioactivos actualmente se pueden clasificar en dos categorías, los naturales y los artificiales o sintéticos.

Los compuestos bioactivos naturales también se les conocen como metabolitos secundarios, se encuentran principalmente en plantas, hongos y bacterias (Patil *et al.*, 2009). Por otra parte, los compuestos bioactivos pueden obtenerse mediante la modificación molecular de fármacos o metabolitos secundarios, o bien, pueden ser diseñados usando herramientas computacionales (Shuto., 2020).

Contribuyendo con los esfuerzos por desarrollar nuevos compuestos con actividad antibacteriana para diversificar los compuestos existentes. En este trabajo se propuso la síntesis de fosforamidatos derivados de arilpiperazinas.

ANTECEDENTES

Arilpiperazinas

La piperazina es un compuesto orgánico heterocíclico de 6 átomos, cuatro carbonos y dos nitrógenos en la posición 1 y 4 del ciclo. Por otra parte, las arilpiperazinas son moléculas derivadas de la piperazina. Para que sea arilpiperazina, al menos un nitrógeno de amina debe estar unido a al menos un anillo aromático, mientras que el otro nitrógeno puede estar unido a cualquier otro grupo funcional como se muestra en la figura 3 (Singh *et al.*, 2019).

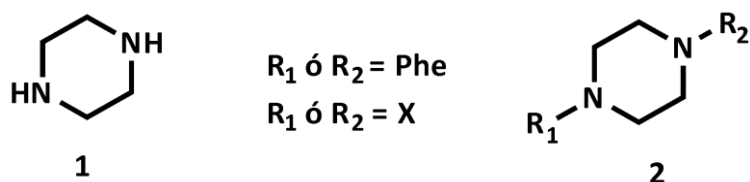


Figura 3. Estructura molecular de la piperazina (1) y arilpiperazina (2).

Algunas de estas arilpiperazinas ya han sido autorizadas para su uso como antibióticos, tal es el caso del ciprofloxacino (3) y eperozolida (4) (figura 4). Estos antibióticos contienen en su estructura a la piperazina unido a un sustituyente fenilo, por esta razón se pueden clasificar como arilpiperazinas (Levy & Borderie., 2021; Liu *et al.*, 2018).

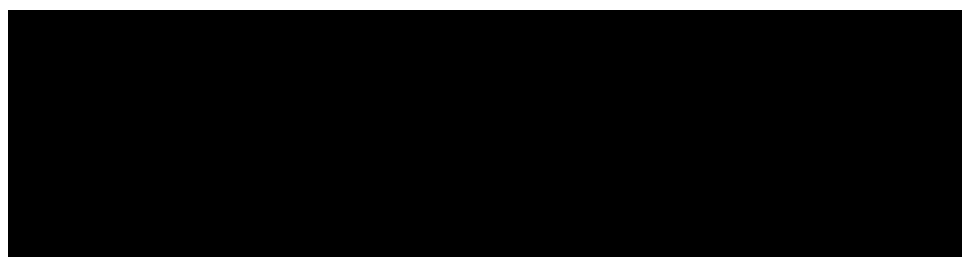


Figura 4. Estructuras de ciprofloxacino (3) y eperozolida (4).

Por otra parte, continúan los esfuerzos por desarrollar más moléculas de la familia fenilpiperazinas y fosforamidatos. Se tiene evidencia de que han presentado actividad antibacteriana sobre *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis pulmonar. Esta es una bacteria clasificada como Gram positiva. En la literatura se encontró que el compuesto **5 (figura 5)** mostró actividad antibacteriana contra MTB con una concentración mínima inhibitoria de 8 nM (Peng *et al.*, 2015).

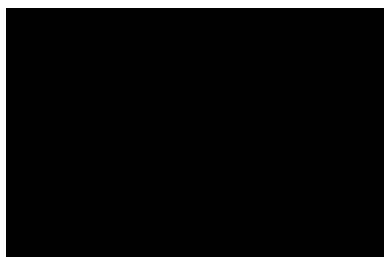


Figura 5. Estructura del compuesto **5** con actividad antibacteriana.

En el compuesto **5** se sustituyó un nitrógeno con un heterociclo y en el otro nitrógeno se realizó la adición del grupo funcional amida.

Aparte se reportó actividad antibacteriana del compuesto **6 (figura 6)** con una CMI de 2.48 μ M sobre MTB, en este compuesto se enlazó un nitrógeno de piperazina con un anillo de *p*-clorobenceno, en el otro nitrógeno se adicionó una amida heterocíclica (Pulipati *et al.*, 2016).

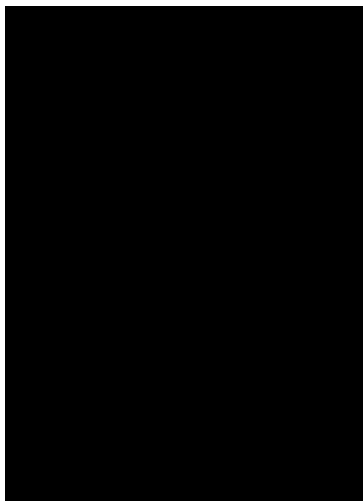


Figura 6. Estructura del compuesto **6** activo sobre *MTB*.

También se reportó actividad antibacteriana del compuesto **7** (**figura 7**) sobre dos cepas de bacterias Gram positivas, *Bacillus subtilis*, con un CIM de 0.236 mg/mL, y sobre *Staphylococcus aureus* con CIM de 0.355 mg/mL, este compuesto tenía en su estructura un *p*-metoxibenceno y cumarina enlazada a la piperazina (Hatnapure *et al.*, 2012).

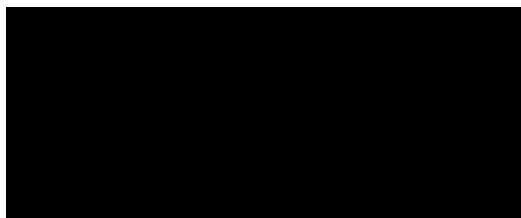


Figura 7. Estructura del compuesto **7**.

Además, se reportó que la actividad del compuesto **7** se potenció cuando se sustituyó el grupo metoxilo en el anillo bencénico de fenilpiperazina, en la posición *para*.

Por otra parte, se reportó actividad antibacteriana del compuesto **8** (figura 8) frente a *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria Gram negativa, con una CIM de 0.5 µg/mL. El compuesto **8** es un derivado del antibiótico comercial ciprofloxacino, como se observa, conserva en su estructura a la piperazina y presentó una importante actividad antibacteriana.

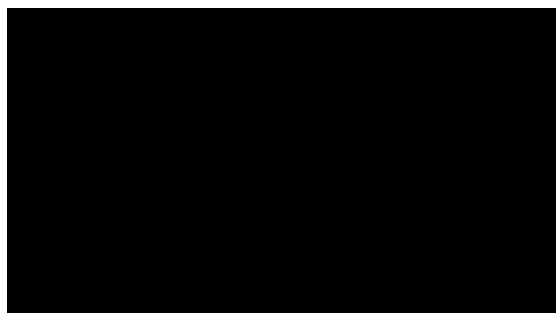


Figura 8. Arilpiperazina derivada de ciprofloxacino.

Fosforamidatos

Por otra parte, se tiene evidencia de que compuestos de la familia de los fosforamidatos han demostrado tener actividad antibacteriana en pruebas preclínicas sobre cepas de bacterias.

Los fosforamidatos son un tipo de compuestos organofosforados, una de sus características es que poseen un enlace covalente único entre el átomo tetra coordinado P (V) y el átomo N (III).

Se conocen 3 tipos de fosforamidatos, clasificados según la sustitución de sus átomos de P y N como se describe en la figura 9.

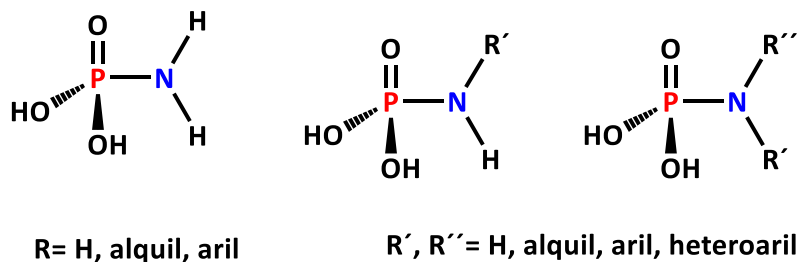


Figura 9. Tipos de fosforamidatos

Los fosforamidatos son una familia muy importante de compuestos, tienen múltiples aplicaciones como en la agricultura como pesticidas para la protección de cultivos, en la industria como nuevos compuestos retardantes de llama de compuestos poliméricos y en medicina como medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades o base para desarrollo de estos (Oliveira et al 2012; Nguyen et al 2013; Kafarski & Talma, 2018). Por ejemplo, los compuestos **9-11 (figura 10)** fueron coadyuvantes de antibióticos como ampicilina y estreptomicina, evaluados en cepas de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. En estos ensayos se observó un incremento en la actividad antibacteriana comparado con el antibiótico solo (Subratti et al., 2021).

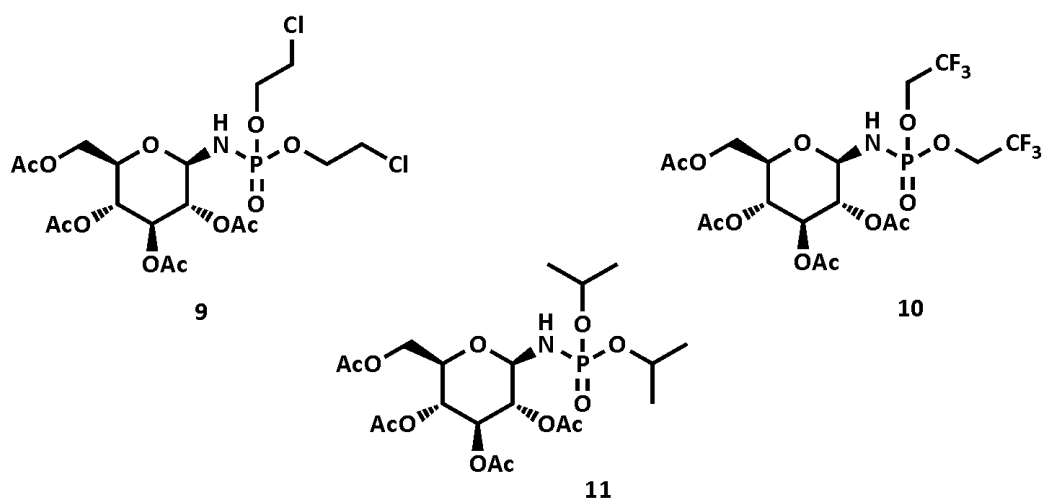
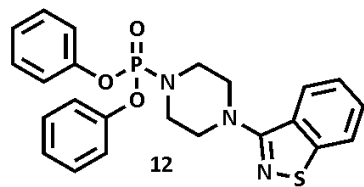
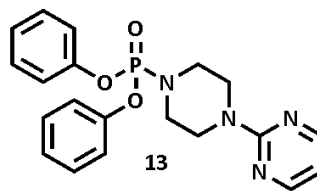


Figura 10. Fosforamidatos con actividad coadyuvante de antibióticos.

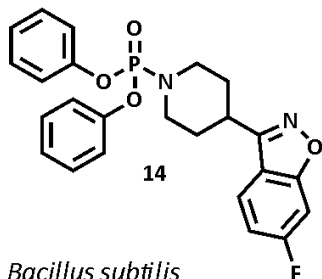
Adicionalmente, de acuerdo con recientes reportes en la literatura, se encontraron que los fosforamidatos **12, 13, 14 y 15** (figura 11) derivados de piperazinas sustituidas fueron activas contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa*, con un mayor halo de inhibición en las pruebas Kirby Bauer teniendo al antibiótico estreptomicina como referencia (Cirandur et al., 2022).



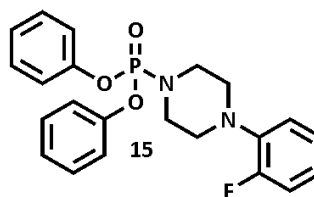
12
Bacillus subtilis
Staphylococcus aureus 6.25 ug/mL
Escherichia Coli
Pseudomonas aeruginosa



13
Bacillus subtilis
Staphylococcus aureus 200 ug/mL
Escherichia Coli
Pseudomonas aeruginosa



14
Bacillus subtilis
Staphylococcus aureus 6.25 ug/mL
Escherichia Coli
Pseudomonas aeruginosa



15
Bacillus subtilis
Staphylococcus aureus 100 ug/mL
Escherichia Coli
Pseudomonas aeruginosa

Figura 11. Fosforamidatos con actividad antibacteriana (Cirandur et al., 2022).

Por todo lo anterior, en este trabajo de investigación se propuso hibridar el anillo heterocíclico de la piperazina con el grupo funcional fosforamidato con el objetivo de obtener nuevos compuestos con actividad antibacteriana, contribuyendo al desarrollo de nuevos candidatos a fármaco.

JUSTIFICACIÓN

La organización mundial de la salud estima que en el año 2050 la mayoría de las defunciones en humanos se deberá a infecciones por bacterias resistentes a antibióticos. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos compuestos con actividad antibacteriana para diversificar las posibilidades de enfrentar a las bacterias que rápidamente adquieren resistencia a los antibióticos existentes en el mercado. Por otra parte, las arilpiperazinas están presentes en la estructura molecular de algunos antibióticos como: ciprofloxacino, gatifloxacina, grepafloxacina, pefloxacino, entre otros. Además, se han reportado diversos fosforamidatos con actividad antibacteriana, por lo que se propone la hibridación de la piperazina con el grupo funcional fosforamidato para la obtención de nuevos compuestos antibacterianos.

HIPÓTESIS

Los fosforamidatos derivados de arilpiperazina **16-29** presentarán actividad inhibitoria en al menos una de las especies bacterianas de interés: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.

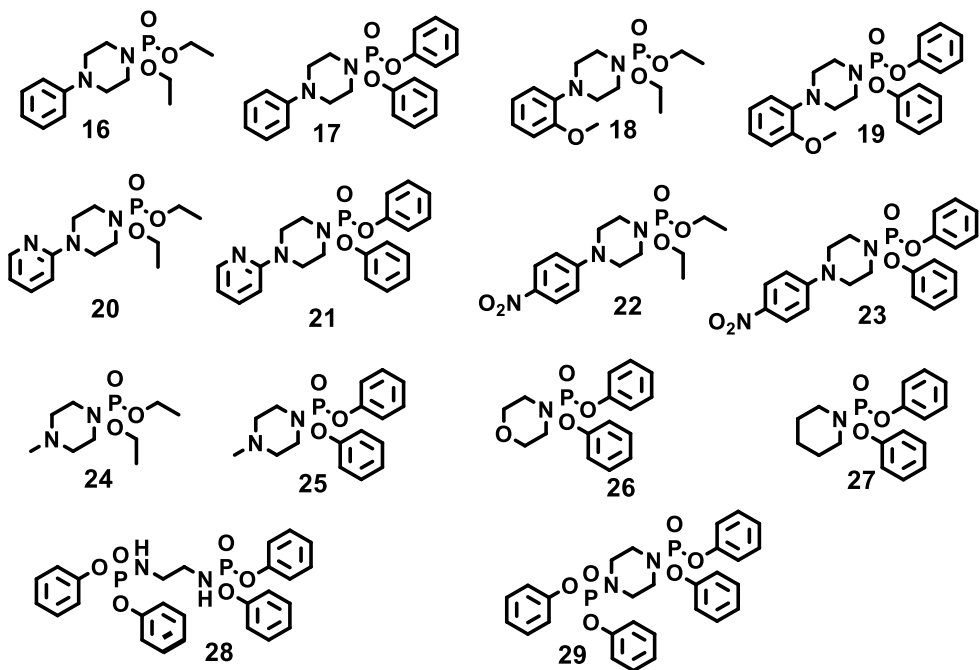
OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener nuevos compuestos antibacterianos mediante la síntesis y evaluación in vitro de los fosforamidatos **16-29** en especies Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*), Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos específicos

- Sintetizar, purificar y caracterizar los compuestos **16-29**.



- Evaluar la actividad antibacteriana mediante ensayo de alamar azul en bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, Gram positivas: *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar la actividad antibacteriana mediante ensayo de alamar azul en *Mycobacterium tuberculosis*.

METODOLOGÍA

Síntesis de fosforamidatos

Para la síntesis de los fosforamidatos se utilizó el método de síntesis reportado por Zamudio-Medina y colaboradores (2021), quienes utilizaron 1.1 equivalentes de una amina (en nuestro caso la arilpiperazina), 1 equivalente sintético del clorofosfato, en presencia de 1.1 equivalentes de trietilamina, en diclorometano, con baño de hielo como se muestra en la figura 12 (Bandyopadhyay *et al.*, 2014).

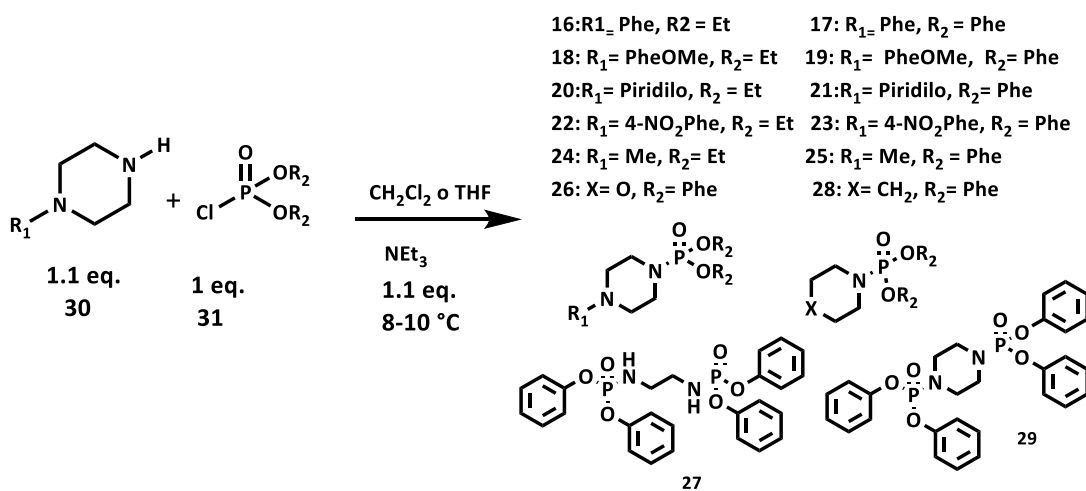


Figura 12. Ruta de síntesis de fosforamidatos objetivo.

Todas las reacciones fueron monitoreadas mediante TLC con diversas mezclas de disolventes para observar la formación del nuevo producto, el cual se esperaba fuera visible bajo la lámpara de UV.

Al concluir el tiempo de reacción que duró entre los 15 hasta los 40 minutos, para las reacciones de los compuestos **16**, **17** y **18** se concluyeron adicionando 5 mL de agua

destilada al matraz de reacción, posteriormente se realizó una extracción líquido-líquido con diclorometano y agua destilada, después se concentró en el rotavapor, por último, se purificó mediante cromatografía en columna al goteo. Por otra parte, al notar que el compuesto **19** y los consecutivos eran parcialmente solubles en agua, y que, por consiguiente, se pasarían a la fase acuosa durante las extracciones. Se decidió concluir las reacciones adicionando 5 mL de metanol al matraz de reacción, omitiendo las extracciones y concentrando el crudo de reacción directamente en el rotaevaporador.

Caracterización de fosforamidatos

Los análisis de las muestras mediante espectrometría de masas se llevaron a cabo utilizando el equipo SYNAPT G2-Si (Waters), equipado con fuente de ionización por electronebulización (ESI), filtro de masas de cuadrupolo sencillo y analizador de masas de tiempo de vuelo (Q-TOF). Los parámetros de operación del espectrómetro fueron los siguientes: voltaje de capilar de 3 kV, voltaje de cono de 30 V, temperatura del capilar de 120 °C, temperatura del gas de desolvatación de 350 °C, y flujo de gas de desolvatación de 400 L por hora. Se utilizó el compuesto Leucina-encefalina con masa en ESI (+) de 556.2771 Da para la corrección de masa, infundiéndolo continuamente.

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron adquiridos en un espectrómetro Dynascan Perkin Elmer Spectrum 100 mediante la técnica FTIR-ATR. Cada espectro se obtuvo con 3 escaneos a una resolución de 4 cm⁻¹ en el rango espectral de 4000-500 cm⁻¹. Las muestras se aplicaron directamente sobre el porta-muestras del equipo hasta cubrir la superficie.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se registraron en un espectrómetro Bruker de 500 MHz, utilizando CDCl₃ como disolvente deuterado. Los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia interna de tetrametilsilano (TMS). La multiplicidad de los sistemas de espines acoplados se describió utilizando las abreviaturas estándar: s (señal sencilla), d (doblete), t (tripleto), q

(cuarteto), m (multiplete), y sus combinaciones posibles. Las constantes de acoplamiento (J) se reportaron en Hertz (Hz).

Pruebas de susceptibilidad bacteriana

Para realizar las pruebas de susceptibilidad bacteriana, se empleó el ensayo de alamar azul para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias para cada compuesto en las 4 cepas de bacterias aerobias, por ello se realizó lo siguiente: Las bacterias *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 35218, *E. faecalis* ATCC 29212 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 fueron cultivadas en agar Soja tripticaseína por estría cruzada y se incubaron a 37 °C por 18 h; Para obtener la concentración requerida para el ensayo de susceptibilidad se tomaron colonias con una asa bacteriológica, se resuspendieron en un tubo con medio Müller Hinton y se ajustó la turbidez al tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarlan (1.5×10^8 UFC/mL). Para las pruebas en *MTB* la cepa fue crecida en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de Albúmina Oleica Dextrosa Catalasa (OADC, por sus siglas en inglés) e incubados 30 días a 37°C y se ajustó al tubo 1 del Nefelómetro de MacFarlan (3×10^8 UFC/mL).

Posteriormente, todos los compuestos puros **16-29** fueron disueltos en DMSO para obtener una concentración de 10 mg/mL, después se ajustó la concentración en medio Müller Hinton para obtener una concentración de trabajo de 400 µg/mL. Se utilizó esta concentración como la máxima y se realizaron 5 diluciones seriadas, se realizaron 3 controles de crecimiento y un control de medio en los experimentos, todos se realizaron por duplicado. Se incubaron las bacterias durante 24 h a 37 °C.

Después de 24 horas de incubación con los compuestos, se procedió a realizar el ensayo de Alamar azul para determinar la CMI de los compuestos como recomiendan Tyc y colaboradores (2016), para ello se colocaron 3 µL de colorante Alamar a cada pocillo de la caja de trabajo y se incubaron entre 20 minutos a 3 horas mientras viraba el color azul a rosa, por la reducción de la resazurina a resorufina. Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se llevó a cabo una evaluación visual comparativa de la variación

de color del tratamiento con respecto a los pozos de control de crecimiento. Si se observa el cambio en la coloración y vira de azul a rosa, es porque las bacterias permanecen viables, por tanto, el compuesto probado no fue activo o requiere una mayor concentración para mostrar algún efecto antibacteriano. Cuando se iguala la coloración del tratamiento con el control C1 (1% de las bacterias viables), se toma como el valor de CMI (figura 13).

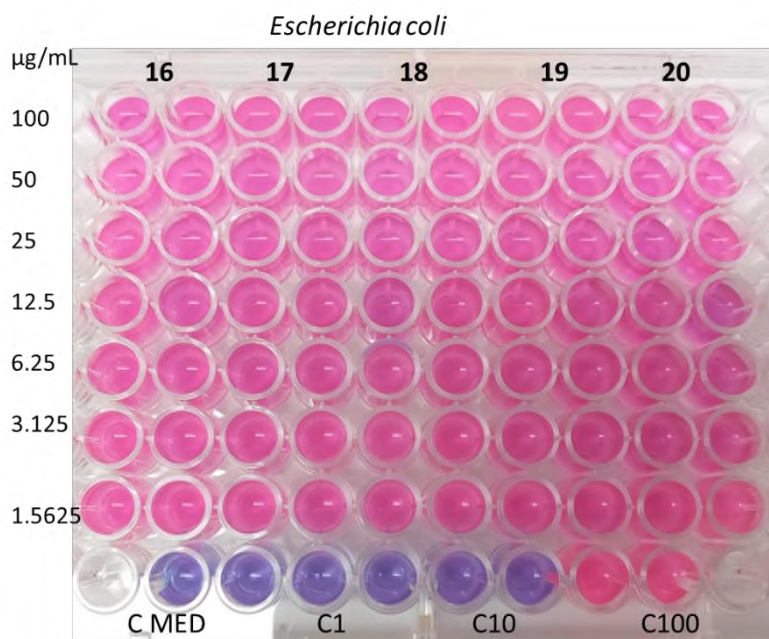


Figura 13. Placa de prueba de susceptibilidad bacteriana en *E. coli* con ensayo de alamar azul.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de compuestos objetivo 16-29

La síntesis de los fosforamidatos **16-29** se realizó mediante una reacción de sustitución entre una piperazina (o la correspondiente amina heterocíclica, 1.1 equivalentes), un clorofosfato de dialquilo (1 equivalente) y trietilamina como base (1.1 equivalentes), en baño de hielo a una temperatura aproximada entre 8-10 °C (Zamudio-Medina.,2021); obteniendo los productos objetivo con rendimientos del 9-97 % (Figura 14).

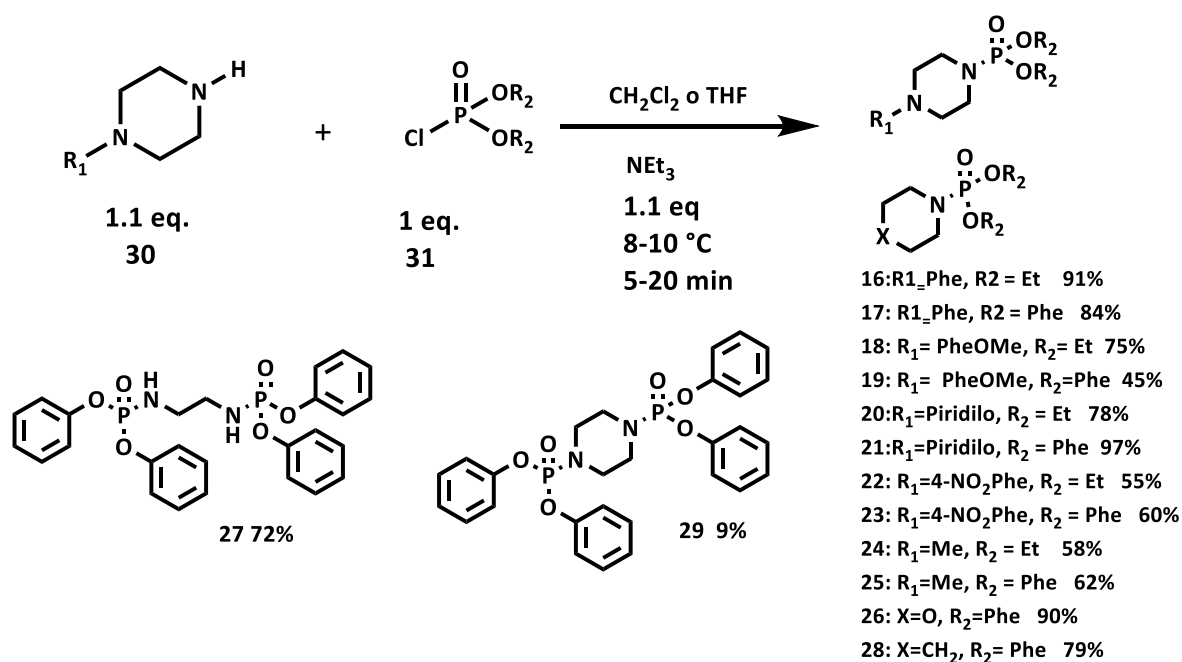
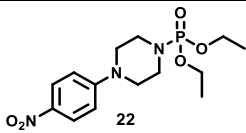
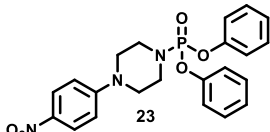


Figura 14. Síntesis de los compuestos objetivo 16-29

Como se observa en la figura 14, se obtuvieron los derivados **16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 25, 26, 27, y 28**, con rendimientos comparables con trabajos previos (45-97 %) (Zamudio-Medina *et al.*, 2021). Por otro lado, los nitroderivados **22** y **23** se obtuvieron con rendimientos de 11 y 18 %, respectivamente. Esto se debió principalmente a la baja solubilidad de los reactivos en diclorometano. Por lo que, se realizó una búsqueda

bibliográfica, y se encontró que Cirandur y colaboradores (2022) obtuvieron mayores rendimientos empleando tetrahidrofurano (THF) como disolvente de reacción. Por lo tanto, al cambiar diclorometano por THF se obtuvieron nuevamente los nitroderivados **22** y **23** con rendimientos de 55 y 60% respectivamente (tabla 1).

Tabla 1. Cuadro comparativo de rendimientos de los compuestos 22 y 23.

Derivado	Rendimiento con CH ₂ Cl ₂ como disolvente (%)	Rendimiento con THF como disolvente (%)
 22	11	55
 23	18	60

Por otro lado, el bajo rendimiento para la obtención del fosforamidato **29** (9%) se explica por las pérdidas que hubo durante su purificación mediante cromatografía en columna, aún cuando se utilizó THF como disolvente de reacción.

Cabe mencionar que después de una revisión bibliográfica se concluyó que los fosforamidatos **16-28** no han sido previamente reportados. Solo el difosforamidato **29** se encontró descrito como retardante de flama en una patente (Campbell *et al.*, 2001).

Caracterización de los fosforamidatos 16-29

Todos los productos puros **16-29** fueron caracterizados mediante HRSMS, IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y RMN-³¹P.

A continuación se presenta la caracterización del compuesto **16** ((4-fenilpiperazin-1-il) fosfonato de dietilo), en la figura 15, se muestra el espectro de IR.

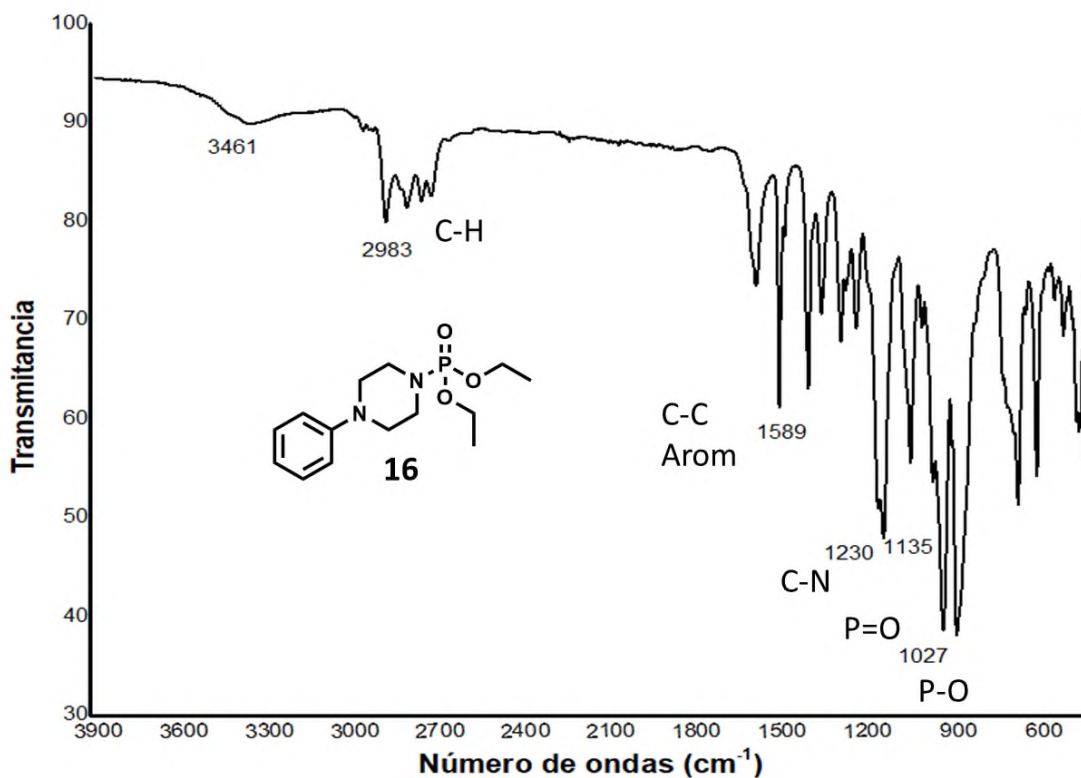


Figura 15. Espectro de IR del compuesto 16

Se puede observar que en $1,135\text{ cm}^{-1}$ aparece la banda de estiramiento del enlace $\text{P}=\text{O}$ del grupo fosfonato, además en 1230 y 1589 cm^{-1} se aprecian las bandas características de la fenil piperazina.

Posteriormente, se adquirió el espectro de masas de alta resolución, en el que se observó el ion molecular $[\text{M}+\text{H}]$ esperado, con una relación $m/z = 299.1521$ para $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{P}$, comparado con la relación m/z calculada = 299.1525 , con un error de -1.3 ppm (Figura 16).

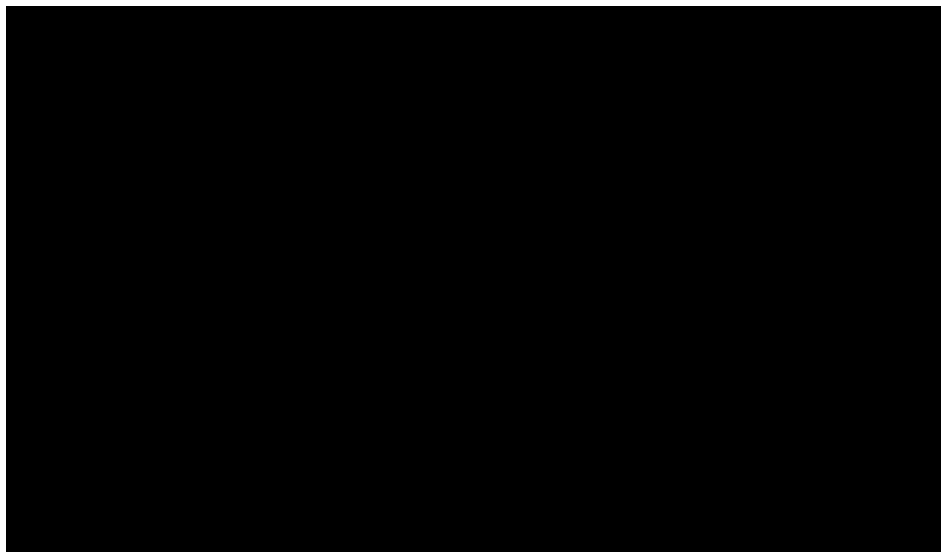


Figura 16. Espectro de masas de alta resolución del compuesto **16** en modo positivo.

A continuación, se discuten los espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C y RMN-³¹P.

En el espectro de RMN-¹H se observó una señal triple en 1.32 ppm que integra para 6 H, correspondiente a los CH₃. De 3.00-3.40 ppm se observó una señal múltiple que integra para 8 H correspondiente a los CH₂ del heterociclo. En 4.07 ppm se observó una señal múltiple que integra para 4 H correspondientes al CH₂O. Por último, se observaron señales múltiples de 6.80-7.22 ppm que integran para 5 H, correspondientes a los hidrógenos aromáticos (Figura 17).

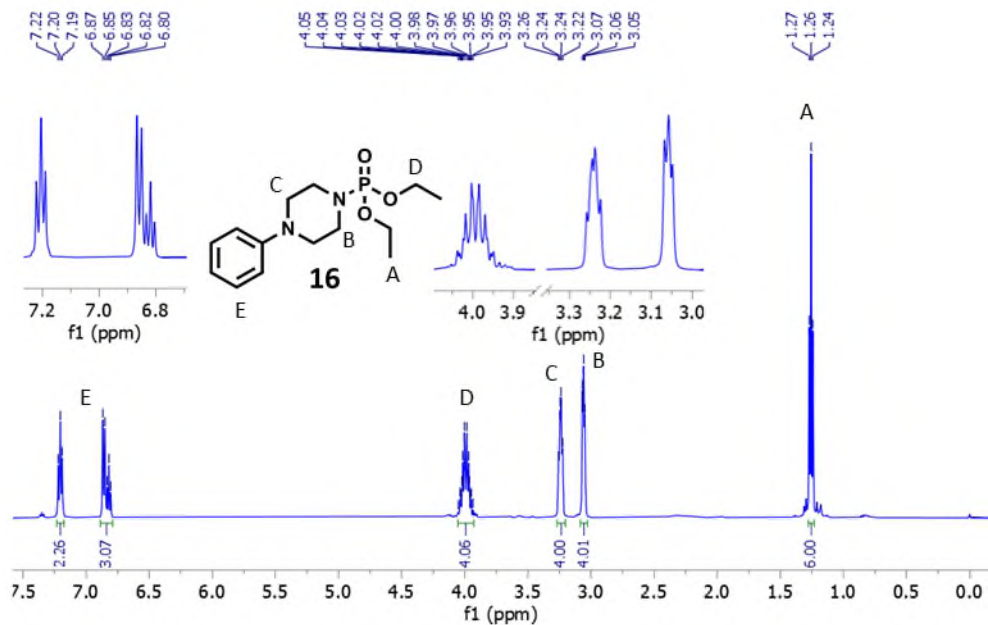


Figura 17. Espectro RMN de protón del compuesto **16**

Para el espectro de RMN-¹³C, se realizó un experimento DEPTQ-135, el cual facilita la identificación de los carbonos de acuerdo con su saturación: primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios. Cuando la orientación de la señal es sobre el plano se atribuyen a carbonos primarios y terciarios, mientras que los que se orientan hacia abajo del plano corresponden a carbonos secundarios, así como los cuaternarios. En el espectro DEPTQ-135 del compuesto **16** observó una señal doble en 16.34 ppm con una $J=6.7$ Hz correspondiente al CH₃, que se acopla a 3 enlaces con el fósforo. En 44.61 ppm se observó una señal simple correspondiente a los carbonos del heterociclo que se encuentran unidos al *N* contiguo al anillo aromático. En 49.7 ppm se observó una señal doble con una $J=5.56$ Hz, correspondiente al CH₂NP, el cual también se acopla al fósforo a dos enlaces. En 62.5 ppm se observó otra señal doble con una $J= 5.6$ Hz, correspondiente al OCH₂ que se acopla al fósforo a dos enlaces. Por último, en 116.7, 120.4, 129.3, 151.6 ppm se observan las señales de los carbonos correspondientes al anillo aromático (Figura 18).

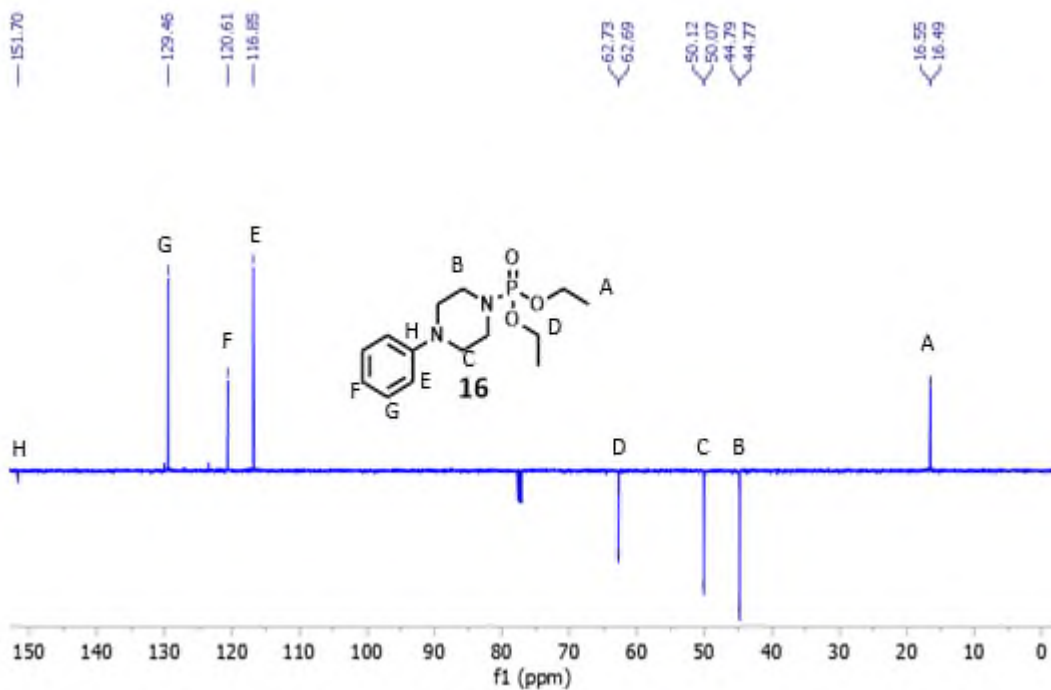


Figura 18. Espectro DEPTQ-135 del fosforamidato **16**.

Finalmente, en la figura 19 se muestra el espectro de ^{31}P del compuesto **16**, en el que se observó una sola señal en 8.36 ppm. tal como se esperaba, ya que solo existe un núcleo de fósforo en la molécula.

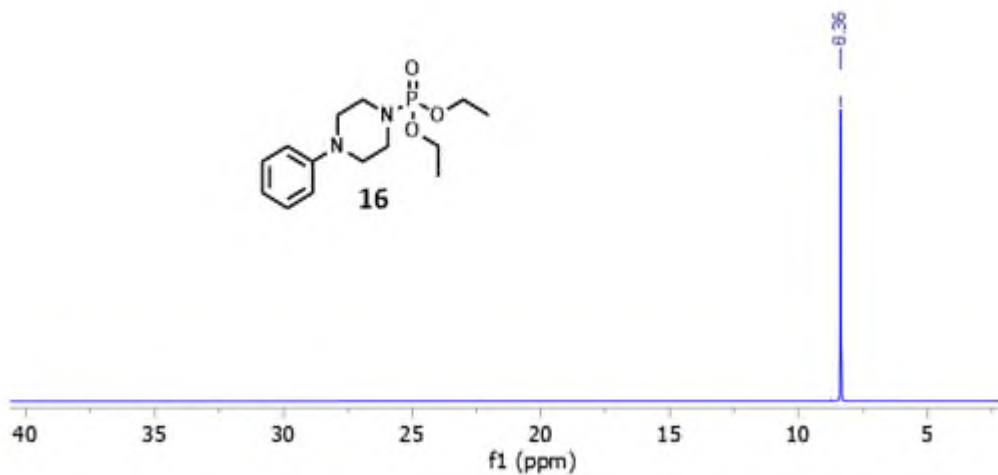
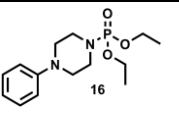
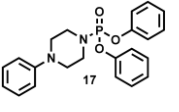
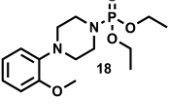

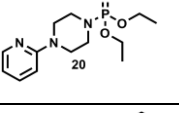
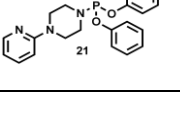


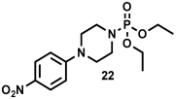

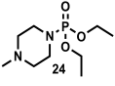
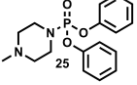
Figura 19. Espectro de ^{31}P del fosforamidato **16**.

Cálculo de las CMI de los compuestos 16-29

Con los compuestos puros y caracterizados se realizó el ensayo de Alamar azul, el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los compuestos 16-25 probados en las 4 bacterias aerobias se realizó mediante una evaluación visual comparativa de la variación de color, con respecto a los pozos de control de crecimiento. Se obtuvieron los resultados presentados en la tabla 2.

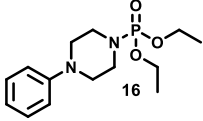
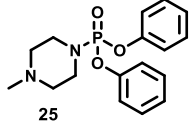
Tabla 2. CMI de los compuestos 16-25 evaluados en *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*.

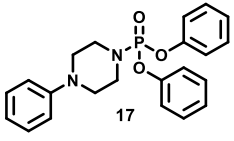
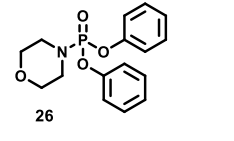
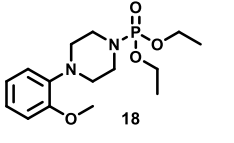
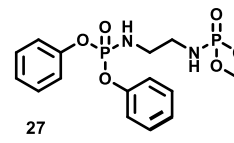
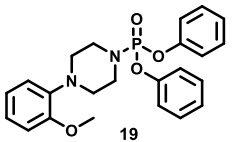
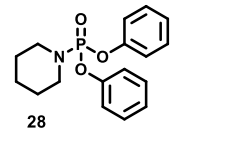
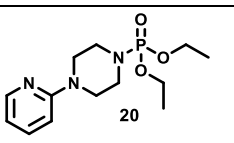
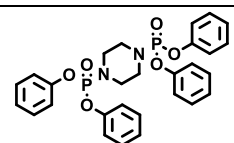
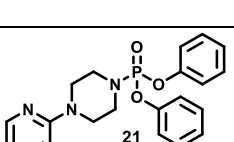
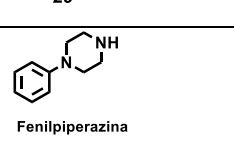
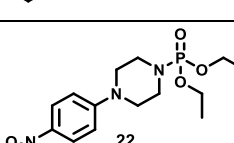
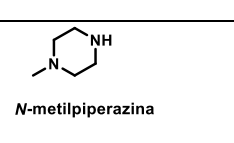
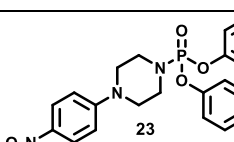
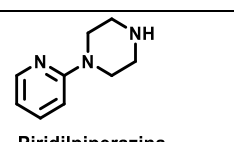
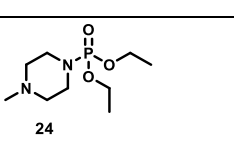
Compuesto	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CMI (mM)	CMI (µg/mL)	CMI (mM)	CMI (µg/mL)	CMI (mM)	CMI (µg/mL)	CMI (mM)	CMI (µg/mL)
	>1.32	>400	1.32	400	>1.32	>400	1.32	400
	>1	>400	>1	>400	>1	>400	>1	>400
	>1.2	>400	1.2	400	>1.2	>400	>1.2	>400
	>0.92	>400	>0.92	>400	>0.92	>400	>0.92	>400
	1.32	400	>1.32	>400	>1.32	>400	1.32	400
	>0.96	>400	>0.96	>400	>0.96	>400	>0.96	>400

	>1.16	>400	>1.16	>400	>1.16	>400	>1.16	>400
	>0.88	>400	>0.88	>400	>0.88	>400	>0.88	>400
	>1.68	>400	>1.68	>400	>1.68	>400	>1.68	>400
	>1.2	>400	>1.2	>400	>1.2	>400	>1.2	>400

De acuerdo con los resultados que se presentan en la tabla 2, las especies bacterianas: *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa* no fueron susceptibles a las concentraciones probadas, incluso a la máxima concentración (400 µg/mL). Sin embargo, se encontró que al aplicar los tratamientos de los compuestos **16-29** en *Mycobacterium tuberculosis*, esta especie bacteriana fue susceptible con CMI de 50-100 µg/mL (se estableció una MIC = 100 µg/mL como valor de corte para considerar activos a los compuestos) con excepción de **16**, **20**, **22**, **24**, **26**, **27** y **29** donde sus CMI fueron superiores a 100 µg/mL, en la tabla 2 se muestran los detalles.

Tabla 3. CMI'S de los compuestos 16-29 expresados en µg/mL y mM, evaluados en MTB.

Compuesto	CMI (µg/mL)	CMI (mM)	Compuesto	CMI (µg/mL)	CMI (mM)
	>100	>0.33		50	0.15

 17	100	0.25	 26	200	0.62
 18	100	0.30	 27	>200	>0.76
 19	100	0.23	 28	50	0.15
 20	>100	>0.33	 29	>200	>0.72
 21	50	0.12	 Fenilpiperazina	200	2.46
 22	>100	>0.29	 N-metilpiperazina	>200	>2.88
 23	100	0.22	 Piridilpiperazina	>200	>2.44
 24	>100	>0.42			

Como se observa en la tabla 3, los compuestos **21**, **25** y **28** presentaron una mayor potencia, con una CMI de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.12, 0.15 y 0.15 mM, respectivamente), todos estos tienen en común que contienen dos grupos fenilo en el fosforamidato. El efecto observado al probar los compuestos en las 5 especies bacterianas sugiere una selectividad de los compuestos hacia *MTb*. Esto es muy importante, ya que una gran desventaja de los antibióticos es que,

al momento del tratamiento, estos también afectan las bacterias endógenas de la flora intestinal.

Además, los compuestos probados mostraron la siguiente relación estructura-actividad:

Entre los fosforamidatos derivados de dietilo y difenilo, presentaron mayor potencia los derivados de difenilo; por ejemplo, los compuestos **17**, **21** y **25** (CMI de **0.25**, **0.12**, **0.15 mM**, respectivamente) fueron más potentes en comparación con los compuestos **16**, **20** y **24** (CMI **>0.33**, **> 0.33** y **0.44 mM**, respectivamente) que contienen al dietilo (Tabla 2).

Por otra parte, la sustitución de la piperazina en derivados de dietilo no mostró un efecto relevante. Por ejemplo, el compuesto **16** tuvo una CMI >0.33 mM en *MTb* y al momento de sustituir la fenilpiperazina con un grupo metoxilo en la posición 2 del fenilo, la CMI fue igual a 0.30 mM para el compuesto **18**. Cuando se reemplazó el fenilo por piridilo en el compuesto **20**, la CMI fue >0.33 mM. Se observó el mismo efecto al introducir un grupo electroatractor nitro a la fenilpiperazina en el compuesto **22**, con una CMI >0.29 mM. Por último, la sustitución del anillo aromático por metilo en la N-metilpiperazina del compuesto **24** no mejoró el efecto de este (CMI >0.42 mM).

El efecto inhibitorio aumentó con el reemplazo de dietilo por difenilo. Por ejemplo, en el caso de **20** se mejoró la CMI de >0.33 a 0.12 mM para el compuesto **21**. Además, la tendencia se mantiene para **24**, donde se mejoró la CMI de >0.42 mM a 0.15 mM en el compuesto **25**).

Debido a que el sustituyente difenilo fue el de mayor potencia en la primera serie evaluada, se decidió probar la actividad de los derivados **26-29** que lo contienen, donde se modificó el anillo de piperazina: mediante su apertura (**27**), doble fosforilación (**29**), así como su reemplazo por anillo de morfolina (**26**) o piperidina (**28**) (Tabla 2). Al observar que la sustitución de difenilo en el grupo fosforamidato en los productos mejoraba el efecto sobre *MTb*, se introdujo otro fosforamidato difenil sustituido (**29**). Sin embargo, esto condujo a la pérdida de la actividad (CMI >0.72 mM). A continuación, con la apertura de la piperazina se obtuvo el derivado difosforilado de etilendiamina **27**, sin embargo, tampoco fue activo (CMI >0.76 mM).

Por otra parte, para comprobar el efecto del segundo átomo de nitrógeno en la piperazina, se sustituyó ésta por morfolina (26) y mostró una baja actividad con una CMI de 0.62 mM. Posteriormente, al sustituir piperazina por piperidina en el compuesto **28**, se obtuvo uno de los derivados más potentes, con una CMI = 0.15 mM.

Adicionalmente, se incluyeron en el bioensayo las piperazinas: fenilpiperazina, *N*-metilpiperazina y piridilpiperazina (tabla3), observando que fueron inactivas en *Mycobacterium tuberculosis*, obteniendo CMI de 2.46, >2.88 y >2.44 mM, respectivamente. Por lo que se concluye que el grupo fosforamidato es indispensable para lograr la actividad antimicobacteriana en los derivados evaluados.

También se concluyó que la sustitución en el fosforamidato es más relevante para el efecto inhibitorio en MTb que la sustitución de la piperazina. Y que el reemplazo del anillo de piperazina por piperidina preserva el efecto inhibitorio en MTb; siendo los compuestos **21**, **25** y **28** los más potentes (CMI de 0.12, 0.15 y 0.15 mM, respectivamente).

CONCLUSIONES

Se sintetizaron 14 fosforamidatos derivados de piperazina **16-29** mediante un solo paso de reacción, siendo 13 de estos compuestos inéditos, a excepción del compuesto **29**. Los rendimientos obtenidos fueron del 9 % para el compuesto **29** y del 45-97 % para los compuestos **16-28**.

Se realizó la evaluación de la actividad antibacteriana de los compuestos **16-25** mediante el método de Alamar azul, encontrándose que todos los compuestos tuvieron una CMI igual o superior que 400 µg/mL en las bacterias aerobias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

Posteriormente, se evaluaron los compuestos **16-29** en la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, y se encontró que 7 compuestos fueron activos (se consideró una CMI ≤ 100 µg/mL para considerarlo activo)(**17, 18, 19, 21, 23, 25 y 28**); siendo **21, 25 y 28** los más potentes (50 µg/mL) (0.12, 0.15 y 0.15 mM, respectivamente). Estos fosforamidatos tenían al grupo difenilo en su estructura. Además, se concluyó que no es indispensable el anillo de piperazina para el efecto inhibitorio porque se observó que realizando la sustitución del anillo por uno de piperidina se obtuvo uno de los derivados más potentes (**28**).

La presencia del grupo fosforamidato en los compuestos evaluados fue indispensable para su actividad inhibitoria en *Mycobacterium tuberculosis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arenz, S., & Wilson, D. N. (2016). Bacterial protein synthesis as a target for antibiotic inhibition. *cold spring harbor perspectives in medicine*, 6(9), a025361.

B.B.C.N.M. (2022). «Pandemia silenciosa»: las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos matan más personas que la malaria y el sida. Recuperado 1 de febrero de 2022, de <https://www.bbc.com/mundo/noticias-60073805>

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.

Bishop, K.A., Plaut, P.E., Chen, A. Akmal, K.M. Willner, A. Butani, S. Dorsey, V. Mokashi, A.J. Mateczun,. Chapman, D. (2012) Whole genome sequencing of phage resistant *Bacillus anthracis* mutants reveals an essential role for cell surface anchoring protein CsaB in phage AP50c adsorption *Vitol. J.*, 9, p. 246

Brower, M. (2019). Resistencia bacteriana a los antibióticos | *Lab Tests Online-ES*. Recuperado 2 de febrero de 2022, de <https://labtestsonline.es/articulos/resistencia-bacteriana-los-antibioticos>

Bulkley, D., Johnson, F., & Steitz, T. A. (2012). The antibiotic thermorubin inhibits protein synthesis by binding to inter-subunit bridge B2a of the ribosome. *Journal of molecular biology*, 416(4), 571-578.

Calvo, I. A., & Garbisu, C. (2019, 6 febrero). Así se propaga la resistencia a los antibióticos en el medioambiente. Recuperado 2 de febrero de 2022, de <https://theconversation.com/asi-se-propaga-la-resistencia-a-los-antibioticos-en-el-medioambiente-110390>

Campbell, J.R., Cela, J.A., Gillete, G.R., Kochanowski, J.E., Reitz, M.L. (2001). Solvent-free method for preparing sterically hindered phosphoramidates (U.S. Patent No. WO 01/16143 A1). *U.S PCT* <https://patentscope.wipo.int/>.

Cavaliere, S. J. & American Society for Microbiology. (2009). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano. Seattle, Washington: *American Society for Microbiology*.

Cirandur, S. R., Sarva, S., Gundluru, M., & Kolathur, V. (2022). Green synthesis and antimicrobial activities of diphenyl substituted aryl phosphoramidates. *Organic Communications*, 2, 212-224. <https://doi.org/10.25135/acg.oc.134.2204.2410>

Contreras, R., & Velásquez P, J. (2008). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.

Deiss, F., Funes-Huacca, M. E., Bal, J., Tjhung, K. F., & Derda, R. (2014). Antimicrobial susceptibility assays in paper-based portable culture devices. *Lab Chip*, 14(1), 167–171.

Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 980-987.

Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., & Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial biotechnology*, 2(1), 40-61.

Fonseca, J., Knight, G., & McHugh, T. (2015). The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Infectious Diseases*, 32, 94–100.

Frank U. & Tacconelli E. (2012). The Daschner Guide to In-Hospital Antibiotic Therapy. *European standards*. Available online at: <http://www.springer.com/978-3-642-18401-7>. 300p.

Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathogens*, 7(7), 2158.

Herrmann, M., Schneck, E., Gutschmann, T., Brandenburg, K., & Tanaka, M. (2015). Bacterial lipopolysaccharides form physically cross-linked, two-dimensional gels in the presence of divalent cations. *Soft matter*, 11(30), 6037-6044.

Huang, T. H., Chen, C. L., Hung, C. J., & Kao, C. T. (2012). Comparison of antibacterial activities of root-end filling materials by an agar diffusion assay and Alamar blue assay. *Journal of Dental Sciences*, 7(4), 336-341.

Leitão, J. H. (2020). Microbial Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5320.

Levy, A., Knoeri, J., & Borderie, V. (2021). Dépôts de ciprofloxacine (Ciloxan®) sous une greffe de membrane amniotique. *Journal Français d'Ophtalmologie*, 44(3), 454–455.

Liu, R., Miller, P. A., Vakulenko, S. B., Stewart, N. K., Boggess, W. C., & Miller, M. J. (2018). A Synthetic Dual Drug Sideromycin Induces Gram-Negative Bacteria To Commit Suicide with a Gram-Positive Antibiotic. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(9), 3845–3854.

Martí, C. I. (2007). Otra forma de clasificar las enfermedades infecciosas para el estudio de un brote. Recuperado 9 de febrero de 2022, de https://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/2007/07/09/69s.

Matsuzaki, K. (2010). ChemInform Abstract: Molecular Action Mechanisms and Membrane Recognition of Membrane- Acting Antimicrobial Peptides. *ChemInform*, 28(44).

McDermott, P. F., Bodeis-Jones, S. M., Fritsche, T. R., Jones, R. N., Walker, R. D., & Campylobacter Susceptibility Testing Group, T. (2005). Broth Microdilution Susceptibility Testing of Campylobacter jejuni and the Determination of Quality Control Ranges for Fourteen Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6136–6138.

Nesme, J., Cécillon, S., Delmont, T., Monier, J. M., Vogel, T., & Simonet, P. (2014). Large-Scale Metagenomic-Based Study of Antibiotic Resistance in the Environment. *Current Biology*, 24(10), 1096–1100.

NHGRI. (s. f.). Recuperado 2 de febrero de 2022, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bacteria>

Nielsen, J., & Caruthers, M. H. (1988). Directed Arbuzov-type reactions of 2-cyano-1,1-dimethylethyl deoxynucleoside phosphites. *Journal of the American Chemical Society*, 110(18), 6275–6276.

OMS (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. (2017, 27 febrero). Recuperado de <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Patil, B. S., Jayaprakasha, G. K., Chidambara Murthy, K. N., & Vikram, A. (2009). Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8142–8160.

Peng, C. T., Gao, C., Wang, N. Y., You, X. Y., Zhang, L. D., Zhu, Y. X., ... & Yu, L. T. (2015). Synthesis and antitubercular evaluation of 4-carbonyl piperazine substituted 1, 3-benzothiazin-4-one derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(7), 1373-1376.

Russell A. D. (2004). Types of antibiotics and synthetic antimicrobial agents. *Pharmaceutical microbiology*. 7th Ed. *Blackwell Science*, UK. Pp. 152-186.

Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología médica*, 2, 631-633.

Šregelj, V., Vulić, J., Četković, G., Čanadanovć-Brunet, J., Tumbas, V., & Stajčić, S. (2020). Natural bioactive compounds in carrot waste for food applications and health benefits. *Bioactive Natural Products*, 307–344.

Tyc, O., Tomás-Menor, L., Garbeva, P., Barrajon-Catalán, E., & Micol, V. (2016). Validation of the AlamarBlue® Assay as a Fast Screening Method to Determine the Antimicrobial Activity of Botanical Extracts. *PLOS ONE*, 11(12), e0169090.

Zamudio-Medina, A., Pérez-Hernández, N., Castrejón-Flores, J. L., Romero-García, S., Prado-García, H., Bañuelos-Hernández, A., & Franco-Pérez, M. (2021). Obtaining symmetric and asymmetric bisphosphoramidates and bisphosphoramidothioates by a single step multicomponent reaction. *Phosphorus, Sulfur, And Silicon And The Related Elements*, 196(7), 634-642.

ANEXOS

Parte experimental

Información general

Todos los reactivos empleados se adquirieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin ningún tratamiento adicional. El avance de las reacciones se monitoreó por cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios Merck 60 F254, mezclas de disolventes de diferente polaridad como fase móvil y agentes reveladores como UV y yodo. Durante las purificaciones por cromatografía en columna se utilizó sílica gel 60[®] 230-400 mesh.

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Magritek Spinsolve 80 MHz y un espectrómetro Bruker 500 MHz. Se utilizó CDCl₃ como disolvente deuterado durante los análisis de RMN. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia interna de tetrametilsilano (TMS). La multiplicidad de los sistemas de espín acoplados se describe de acuerdo con las siguientes abreviaturas: s (señal sencilla), d (doblete), t (tripleto), c (cuadruplete), m (multiplete) y sus posibles combinaciones. Las constantes de acoplamiento (*J*) se reportan en Hertz.

Para la adquisición de los espectros de ¹H se pesaron 15 mg del producto puro y disueltos en 500 μ L de CDCl₃ y se analizó con un equipo de RMN de 80 MHz. Mientras que para la adquisición de los espectros de ¹³C se emplearon 50 mg del compuesto en 500 μ L de CDCl₃ y se analizó a 20 MHz, y se acumularon hasta por 15 h.

Los análisis por espectrometría de masas se realizaron por infusión directa en un equipo SYNAPT G2-Si (Waters) equipado con fuente de ionización por electronebulización (ESI), filtro de masas de cuadrupolo sencillo y analizador de masas de tiempo de vuelo (Q-TOF). Los parámetros de operación del espectrómetro de masas fueron los siguientes: voltaje de capilar de 3 kV, Voltaje de cono 30 V, temperatura del capilar 120 °C, temperatura de gas de desolvatación 350 °C, flujo de gas de desolvatación 400 L por hora. Para la corrección de masa se infundió continuamente el compuesto Leucina-encefalina con masa en ESI (+) de 556.2771 Da.

La preparación de las muestras se realizó primero diluyendo 3 mg del compuesto en 1 mL de metanol (MeOH), del stock de trabajo se tomaron 10 μ L, el cual se mezcló con 2 μ L de ácido fórmico (HCOOH) al 50% y 1 mL de MeOH.

Los espectros de IR fueron adquiridos en un equipo Dynascan Perkin Elmer Espectrum 100 mediante la técnica FTIR-ATR. El espectro se adquirió con un número de 4 escaneos con resolución de 4 cm^{-1} y una ventana espectral de 4000-500 cm^{-1} .

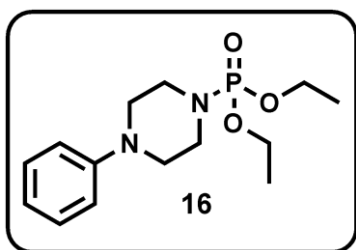
Metodología general para la obtención de fosforamidatos

Para la síntesis de todos los compuestos se emplearon las mismas condiciones. Se añadió CH_2Cl_2 o THF (solo para la reacción para los compuestos **22** y **23**) (2 mL) en un matraz de fondo redondo de 100 mL, posteriormente, se enfrió con un baño de hielo durante 10 minutos. Luego, se colocó 1 equivalente de $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$ o $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O})_2\text{POCl}$ o según era el caso. Tras 10 minutos de enfriamiento se prosiguió a adicionar la Arilpiperazina (1.1 eq.) correspondiente para cada caso, por último, se adicionó TEA (1.1 eq.) para cada caso.

Para la purificación de los compuestos se realizó cromatografía en columna empleando una columna de 2 cm de diámetro y una cantidad de silica de entre 10-14 cm de altura en la columna, se emplearon mezclas de diferentes proporciones de hexano, acetato de etilo y metanol de acuerdo con la polaridad requerida para cada caso. La purificación se realizó al goteo para todos los casos. Por último, se concentraron las fracciones en donde se encontró la presencia del compuesto de interés para posteriormente concentrar al vacío en rotaevaporador.

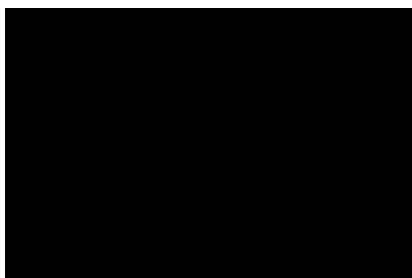
(4-fenilpiperazin-1-il) fosfonato de dietilo (**16**)

Rendimiento: 236 mg (91 %), aceite ligeramente café; **RMN** ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ = 1.26 (t, J =7.1



Hz, 6H, CH_3), 3.05-3.07 (m, 4H, CH_2), 3.22-3.26 (m, 4H, CH_2N), 3.95-4.04 (m, 4H, CH_2OP), 6.80-6.87 (m, 3H, H_{arom}), 7.19-7.22 (m, 2H, H_{arom}) ppm; **RMN** ^{13}C (126 MHz, CDCl_3): δ = 16.3 (d, J = 7.0 Hz, CH_3), 44.6 (d, J = 1.8 Hz, CH_2N), 49.9 (d, J = 5.6 Hz, CH_2N), 62.5 (d, J = 5.7 Hz, CH_2OP), 116.7, 120.4, 129.3, 151.5 (C_{ipso}) ppm; **RMN** ^{31}P

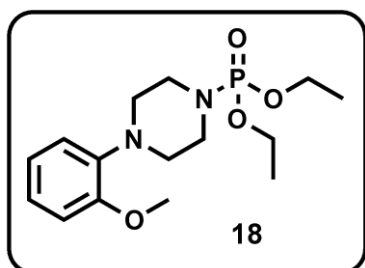
(202 MHz, CDCl₃): δ = 8.17 ppm; ESI (+)-HRMS: m/z 299.1525 calculado para C₁₄H₂₄N₂O₃P, encontrado 299.1521.



(4-fenilpiperazin-1-il) fosfonato de difenilo (17)

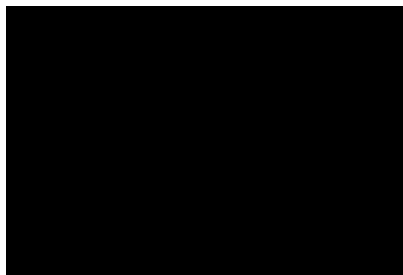
Rendimiento: 289 mg (84 %), aceite ligeramente café; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ = 3.07-3.09 (m, 4H, CH₂N), 3.47-3.51 (m, 4H, CH₂N), 6.91-6.95 (m, 3H, H_{arom}), 7.19-7.22 (m, 2H, H_{arom}), 7.29-7.40 (m, 10H, H_{arom}) ppm; **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃): δ = 44.8 (d, J = 1.7 Hz, CH₂N), 49.6 (d, J = 5.4 Hz, CH₂N), 116.7, 120.3 (d, J = 5.0 Hz), 120.5, 125.1, 129.3, 129.9, 150.8 (d, J = 6.8 Hz, C_{ipso}), 151.3 (C_{ipso}) ppm; **³¹P NMR** (202 MHz, CDCl₃): δ -1.51 ppm; ESI(+)-HRMS: 395.1525 m/z calculado para C₂₂H₂₄N₂O₃P, encontrado 395.1521.

(4-(2-metoxifenil) piperazin-1-il) fosfonato de dietilo (18)



Rendimiento: 198 mg (75 %), aceite ligeramente café; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.31 (t, J =7.1 Hz, 6H, CH₃), 2.99 (bs, 4H, CH₂N), 3.31-3.34 (m, 4H, CH₂N), 3.85 (s, 3H, CH₃O), 4.01-4.09 (m, 4H, CH₂OP), 6.85-7.02 (m, 4 H, H_{arom}) ppm; **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃): δ = 16.3 (d, J =7.0 Hz, CH₃), 44.8 (d, J =1.5 Hz, CH₂N), 51.2 (d, J = 5.8 Hz, CH₂N), 55.5 (CH₃O), 62.4 (d, J = 5.6 Hz, CH₂OP), 111.3, 118.4, 121.1, 123.4, 141.3, 152.3 (C_{ipso}) ppm; **RMN** ³¹P (202 MHz, CDCl₃): δ = 8.36 ppm; ESI(+)-HRMS: m/z 329.1630 calculada para C₁₅H₂₆N₂O₄P, encontrado 329.1622.

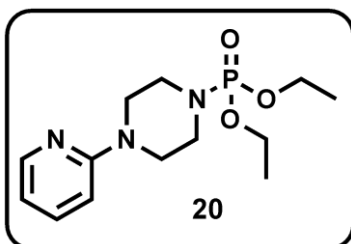
(4-(2-metoxifenil) piperazin-1-il) fosfonato de difenilo (19)



Rendimiento: 153 mg (45 %), sólido blanco, p.f. 84 °C; **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ = 2.94-2.95 (m, 4H, CH₂N), 3.47-3.50 (m, 4H, CH₂N), 3.85 (s, 3H, CH₃O), 6.83-6.93 (m, 3H, H_{arom}), 7.00-7.03 (m, 1H, H_{arom}), 7.16-7.19 (m, 2H, H_{arom}), 7.29-7.37 (m, 8H, H_{arom}) ppm; **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃): δ = 45.0 (d, J = 1.6 Hz,

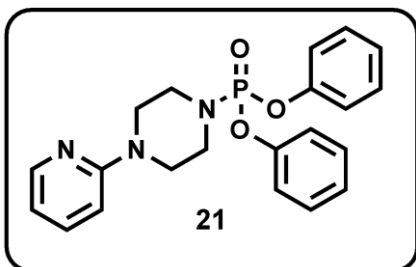
CH₂N), 50.8 (d, *J* = 5.60 Hz, CH₂N), 55.5 (CH₃O), 111.3, 118.4, 120.3 (d, *J* = 5.0 Hz), 121.0, 123.5, 125.0, 129.8, 141.0, 150.8 (d, *J* = 6.7 Hz, C_{ipso}), 152.2 (C_{ipso}) ppm; **RMN ³¹P** (202 MHz, CDCl₃): δ = -1.41 ppm; ESI(+)-HRMS: *m/z* 425.1630 calculado para C₂₃H₂₆N₂O₄P, encontrado 425.1627.

(4-(piridin-2-il) piperazin-1-il) fosfonato de dietilo (20)



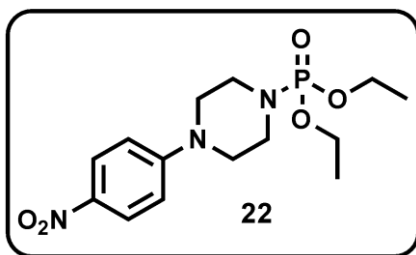
Rendimiento: 212 mg (78 %), aceite ligeramente amarillo; **RMN ¹H** (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃), 3.21-3.24 (m, 4H, CH₂N), 3.45-3.47 (m, 4H, CH₂N), 3.97-4.08 (m, 4H, CH₂OP), 6.60-8.15 (m, 4H, H_{arom}) ppm; **RMN ¹³C** (126 MHz, CDCl₃): δ = 16.3 (d, *J* = 7.0 Hz, CH₃), 44.3 (d, *J* = 1.8 Hz, CH₂N), 45.7 (d, *J* = 5.4 Hz, CH₂N), 62.5 (d, *J* = 5.7 Hz, CH₂OP), 107.4, 113.8, 137.7, 148.0, 159.5 (C_{ipso}) ppm; **RMN ³¹P** (202 MHz, CDCl₃): δ = 8.18 ppm; ESI (+)-HRMS: *m/z* 300.1477 calculado para C₁₃H₂₃N₃O₃P, encontrado 300.1466.

(4-(piridin-2-il) piperazin-1-il) fosfonato de difenilo (21)



Rendimiento: 315 mg (97 %), sólido blanco; **RMN ¹H** (500 MHz, CDCl₃): δ = 3.40-3.43 (m, 8H, CH₂N), 6.57-8.18 (m, 14H, H_{arom}) ppm; **RMN ¹³C** (126 MHz, CDCl₃): δ = 44.3 (d, *J* = 1.6 Hz, CH₂N), 45.2 (d, *J* = 5.2 Hz, CH₂N), 107.2, 113.7, 120.0 (d, *J* = 5.0 Hz), 124.9, 129.7, 137.5, 147.8, 150.6 (d, *J* = 6.8 Hz, C_{ipso}), 159.0 (C_{ipso}) ppm; **RMN ³¹P** 202 MHz, CDCl₃): δ = -1.52 ppm; ESI(+)-HRMS: *m/z* 396.1477 calculado para C₂₁H₂₃N₃O₃P, encontrado 396.1469.

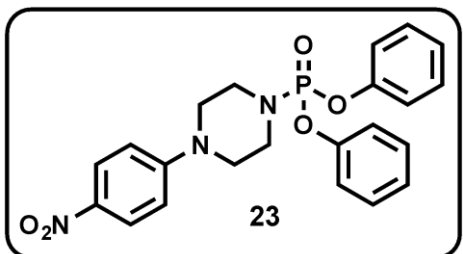
(4-(4-nitrofenil) piperazin-1-il) fosfonato de dietilo (22)



Rendimiento: 168 mg (55 %), sólido café, p.f. = 121 °C; **RMN ¹H** (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃), 3.26-3.30 (m, 4H, CH₂N), 3.35-3.37 (m, 4H, CH₂N), 4.00-4.09 (m, 4H, CH₂OP), 6.80 (AA'BB', *J* = 9.3 Hz, 2H, H_{arom}), 8.08 (AA'BB', *J* = 9.3 Hz, 2H, H_{arom}) ppm; **RMN ¹³C** (126 MHz, CDCl₃): δ = 16.3 (d, *J* = 6.9 Hz, CH₃), 44.1 (d, *J* = 1.8 Hz, CH₂N), 47.6 (d, *J* = 5.4 Hz, CH₂N), 62.7 (d, *J* = 5.8 Hz,

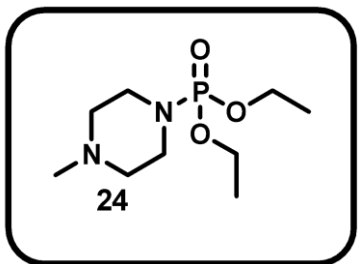
CH₂OP), 113.2, 126.0, 138.9, 155.0 (C_{ipso}) ppm; **RMN** ³¹P (202 MHz, CDCl₃): δ= 7.79 ppm; ESI(+)-HRMS: *m/z* 344.1375 calculado C₁₄H₂₃N₃O₅P, encontrado 344.1367.

(4-(4-nitrofenil) piperazin-1-il) fosfonato de difenilo (23).



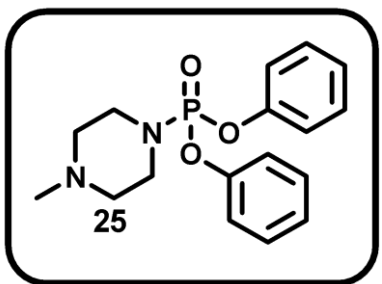
Rendimiento: 186 mg (60%) sólido amarillo, p.f. = 129 °
C. **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ=3.22-3.24 (m, 4H, CH₂N), 3.36-3.39 (m, 4H, CH₂N), 6.71 (AA'BB', *J* = 9.4 Hz, 2H, H_{arom}), 7.09-7.29 (m, 10H, H_{arom}), 8.03 (AA'BB', *J* = 9.3 Hz, 2H, H_{arom}) ppm; (126 **RMN** ¹³C MHz, CDCl₃): δ= 44.3 (d, *J* = 2.0 Hz, CH₂N), 47.5 (d, *J* = 5.2 Hz, CH₂N), 113.3, 120.2 (d, *J* = 5.1 Hz), 125.3, 126.0, 130.0, 139.1, 150.7 (d, *J* = 6.8 Hz, C_{ipso}), 154.8 (C_{ipso}) ppm; **RMN** ³¹P (202 MHz, CDCl₃): δ= -2.04 ppm; ESI(+)-HRMS: *m/z* 440.1375 calculado para C₂₂H₂₃N₃O₅P, encontrado 440.1368.

(4-metilpiperazin-1-il) fosfonato de dietilo (24)



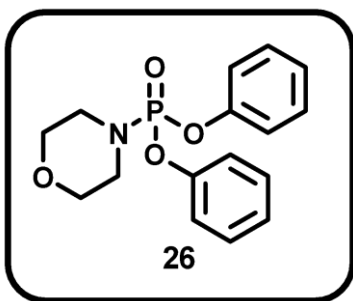
Rendimiento: 137 mg (58 %), aceite ligeramente amarillo. **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ=1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃), 2.27 (s, 3H, CH₃N), 2.35 (bs, 4H, CH₂N), 3.15-3.16 (m, 4H, CH₂N), 3.96-4.08 (m, 4H, CH₂OP) ppm; **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃): δ= 16.3 (d, *J* = 7.1 Hz, CH₃), 44.5 (d, *J* = 2.0 Hz, CH₂N), 46.5 (CH₃N), 55.3 (d, *J* = 5.8 Hz, CH₂N), 62.4 (d, *J* = 5.6 Hz, CH₂OP) ppm; **RMN** ³¹P (202 MHz, CDCl₃): δ= 8.34 ppm; ESI(+)-HRMS: *m/z* 237.1368 calculado para C₉H₂₂N₂O₃P, encontrado 237.1358.

(4-metilpiperazin-1-il) fosfonato de difenilo (25)



Rendimiento: 206 mg (62%) de un sólido blanco, p.f.= 38 °C. **RMN** ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ= 2.23 (bs, 3H, CH₃N), 2.29 (bs, 4H, CH₂N), 3.31 (bs, 4H, CH₂N), 7.15-7.36 (m, 10H, H_{arom}) ppm; **RMN** ¹³C (126 MHz, CDCl₃): δ= 44.6 (d, *J* = 1.8 Hz, CH₂N), 46.4 (CH₃N), 54.8 (d, *J* = 5.6 Hz, CH₂N), 120.2 (d, *J* = 5.0 Hz), 125.0, 129.7, 150.8 (d, *J* = 6.7 Hz, C_{ipso}) ppm; **RMN** ³¹P (202 MHz, CDCl₃): δ= -1.39 ppm; ESI(+)-HRMS: *m/z* 333.1368 calculado para C₁₇H₂₂N₂O₃P, encontrado 333.1360.

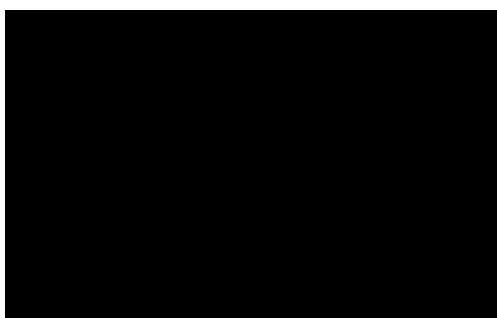
Morfolinfosfonato de difenilo (26)



$C_{16}H_{19}NO_4P$, encontrado 320.1044.

Rendimiento: 287 mg (90%) de un sólido blanco, p.f. = 71 °C; **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.30-3.33 (m, 4H, CH_2N), 3.58-3.60 (m, 4H, CH_2O), 7.19-7.39 (m, 10H, H_{arom}) ppm; **RMN ^{13}C** (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 44.9 (CH_2N), 66.8 (d, J = 5.3 Hz, CH_2O), 120.2 (d, J = 5.0 Hz), 125.2, 129.9, 150.8 (d, J = 7.2 Hz, C_{ipso}) ppm; **RMN ^{31}P** (202 MHz, $CDCl_3$): δ = -2.00 ppm; ESI(+)-HRMS: m/z 320.1052 calculado para

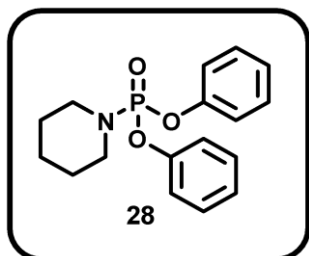
tetrafeniletano-1,2-diilbis(fosforamidato) (27)



ppm; ESI(+)-HRMS: m/z 525.1344 calculado para $C_{26}H_{27}N_2O_6P_2$, encontrado 525.1344.

Rendimiento: 280 mg (72%) de un sólido blanco, p.f. = 134 °C. **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.10-3.14 (m, 4H, CH_2N), 4.32-4.37 (m, 2H, NH), 7.14-7.30 (m, 20H, H_{arom}) ppm; **RMN ^{13}C** (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 43.0 (d, J = 5.4 Hz, CH_2N), 120.4 (d, J = 4.9 Hz), 125.2, 129.9, 150.8 (d, J = 6.9 Hz, C_{ipso}) ppm; **RMN ^{31}P** (202 MHz, $CDCl_3$): δ = -0.39

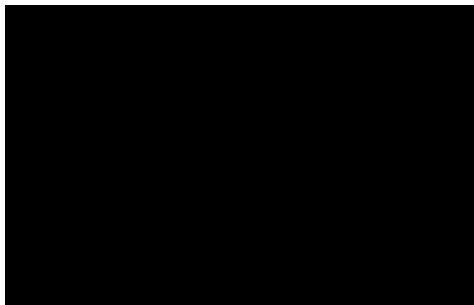
Difenilpiperidin-1-ilfosfonato (28)



$C_{17}H_{21}NO_3P$, encontrado 318.1256.

Rendimiento: 250 mg (79%) de un sólido blanco, p.f. = 75 °C; **RMN 1H** (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.45-1.58 (m, 6H, CH_2), 3.23-3.27 (m, 4H, CH_2N), 7.17-7.37 (m, 10H, H_{arom}) ppm; **RMN ^{13}C** (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 24.3 (CH_2), 25.8 (d, J = 4.7 Hz, CH_2), 45.7 (d, J = 2.3 Hz, CH_2N), 120.3 (d, J = 5.1 Hz), 124.8, 129.8, 151.1 (d, J = 6.7 Hz, C_{ipso}) ppm; **RMN ^{31}P** (202

Tetrafenilpiperazina-1,4-diilbis (fosfonato) (29)



Rendimiento: 50 mg (9%) de un sólido blanco, p.f. = 150°

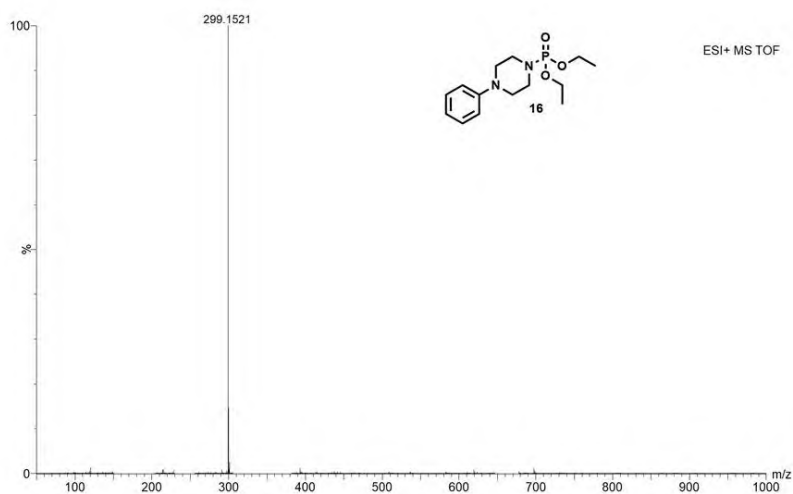
C. **RMN ¹H** (500 MHz, CDCl₃): δ= 3.17-3.18 (m, 8H, CH₂N), 7.16-7.21 (m, 12H, H_{arom}), 7.31-7.35 (m, 8H, H_{arom}) ppm;

RMN ¹³C (126 MHz, CDCl₃): δ= 44.7 (d, *J* = 5.0 Hz, CH₂N), 120.2 (d, *J* = 5.0 Hz), 125.2, 129.9, 150.7 (d, *J* = 6.9 Hz, C_{ipso})

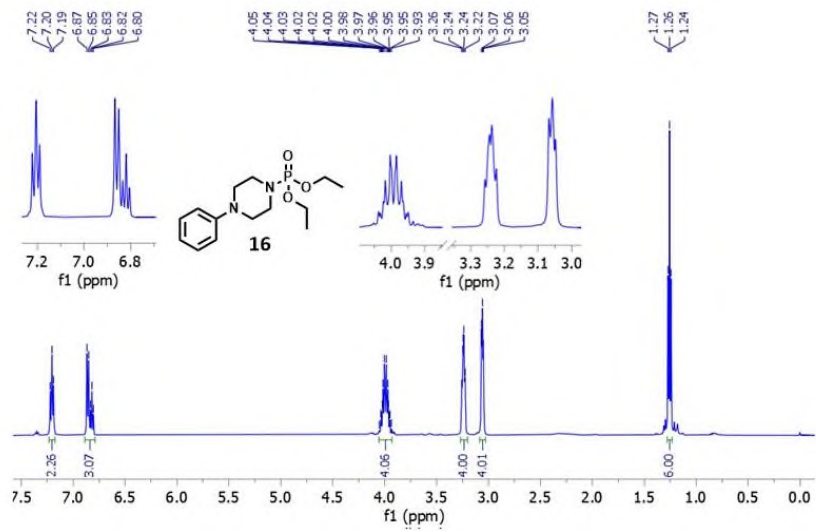
ppm; **RMN ³¹P** (202 MHz, CDCl₃): δ= -1.94 ppm; ESI(+)-

HRMS: *m/z* 551.1496 calculado para C₂₈H₂₉N₂O₆P₂.

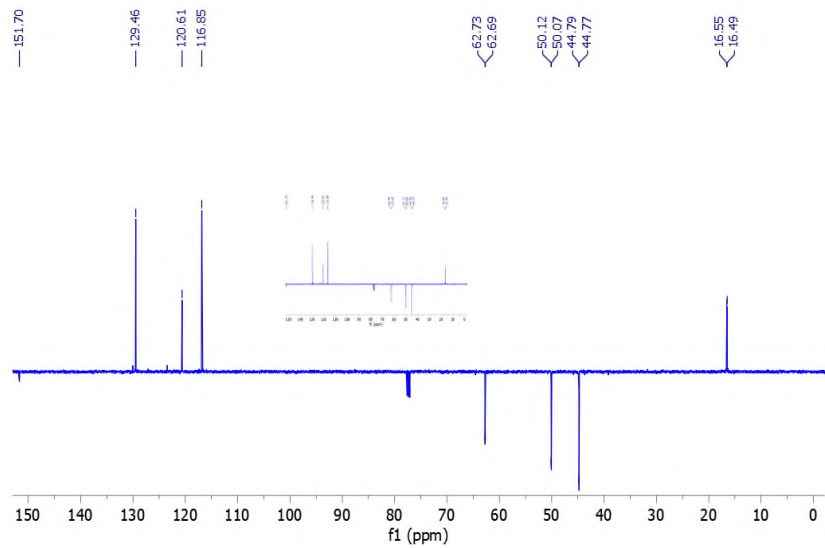
ESPECTROS DE FOSFORAMIDATOS 16-29



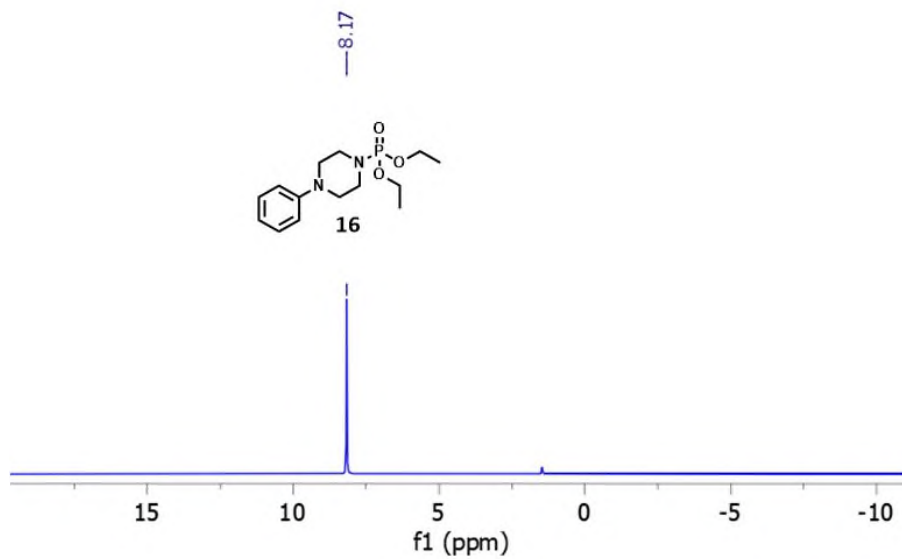
Espectro HRMS TOF MS ESI+ de 16.



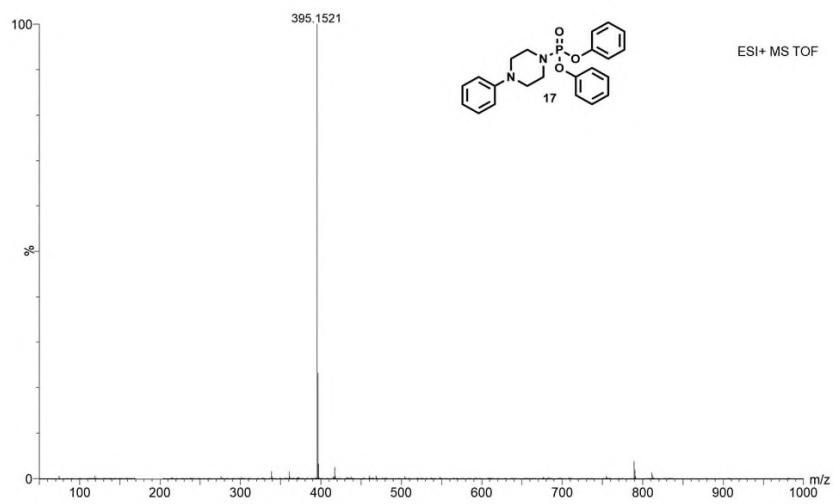
Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 16.



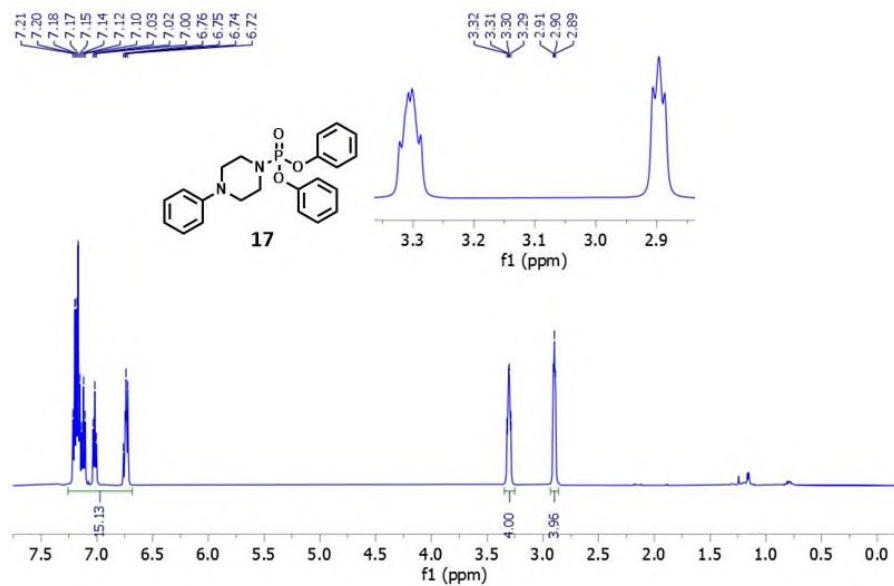
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl₃) de 16.



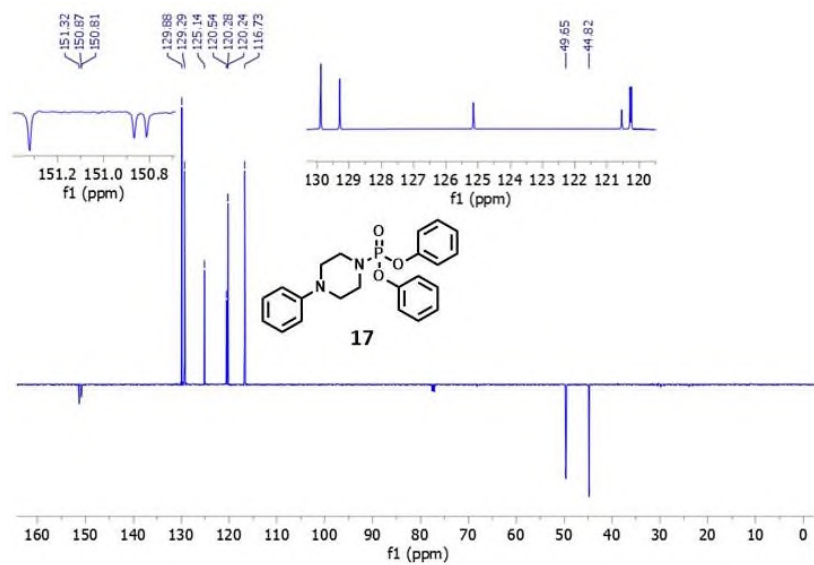
Espectro RMN de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de 16.



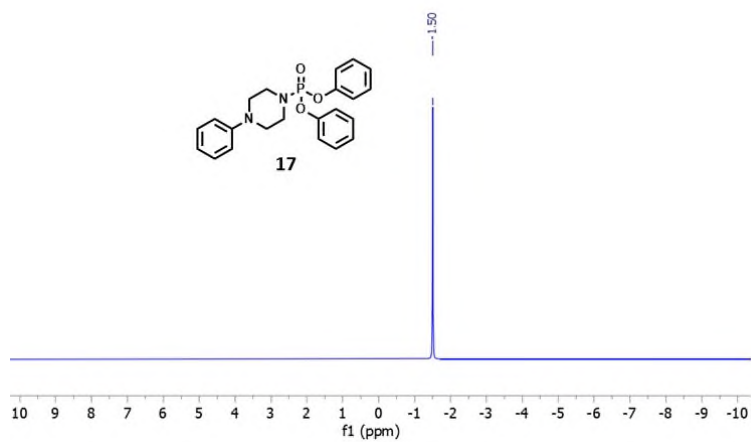
Espectro HRMS TOF MS ESI+ de **17**.



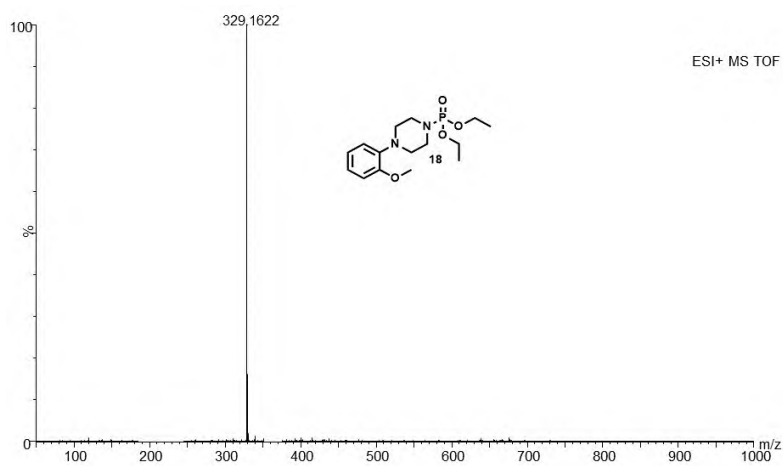
Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **17**.



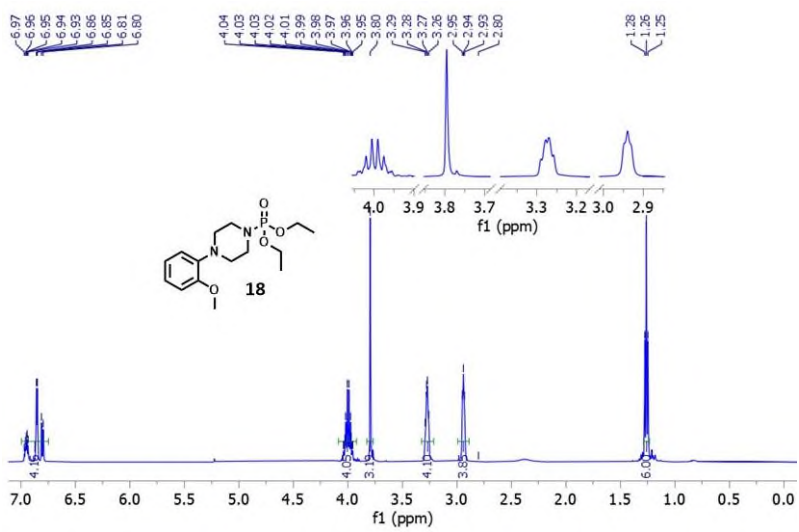
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl_3) de **17**.



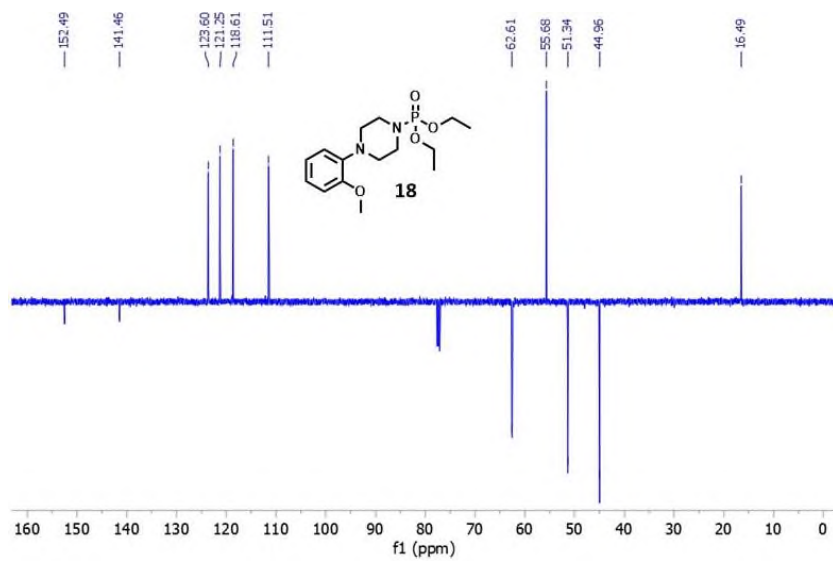
Espectro RMN de ^{31}P (202 MHz, CDCl_3) de **17**.



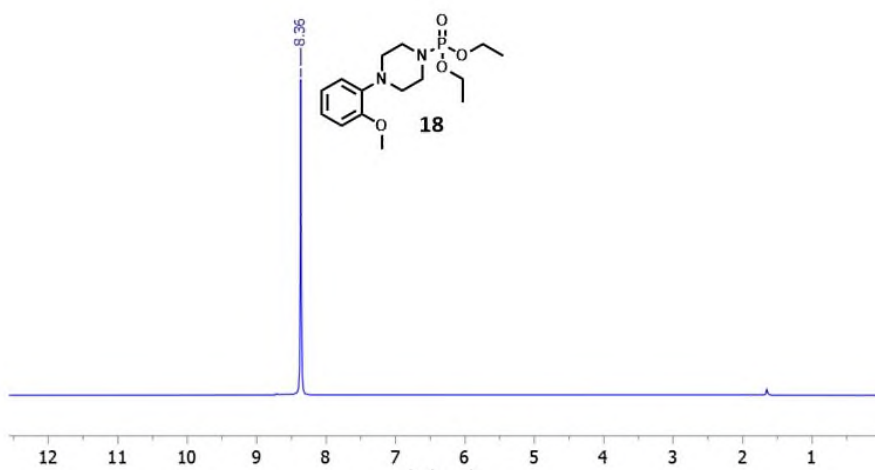
Espectro HRMS TOF MS ESI+ de **18**.



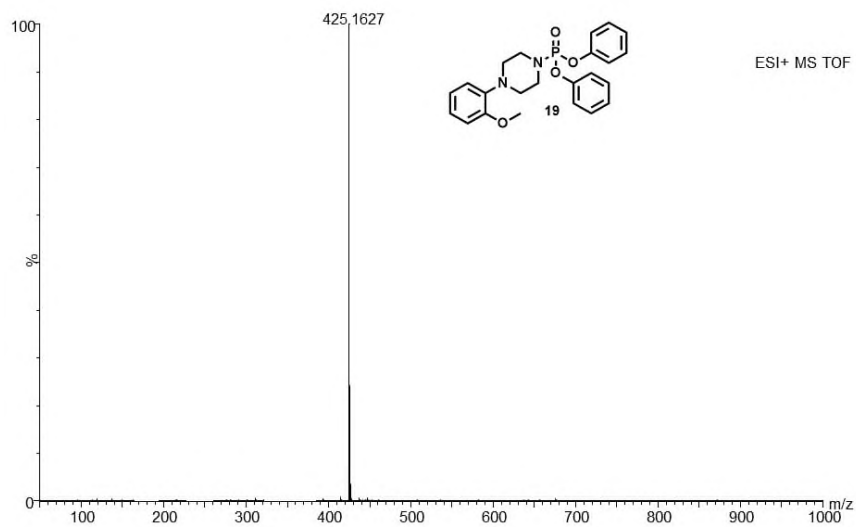
Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **16**.



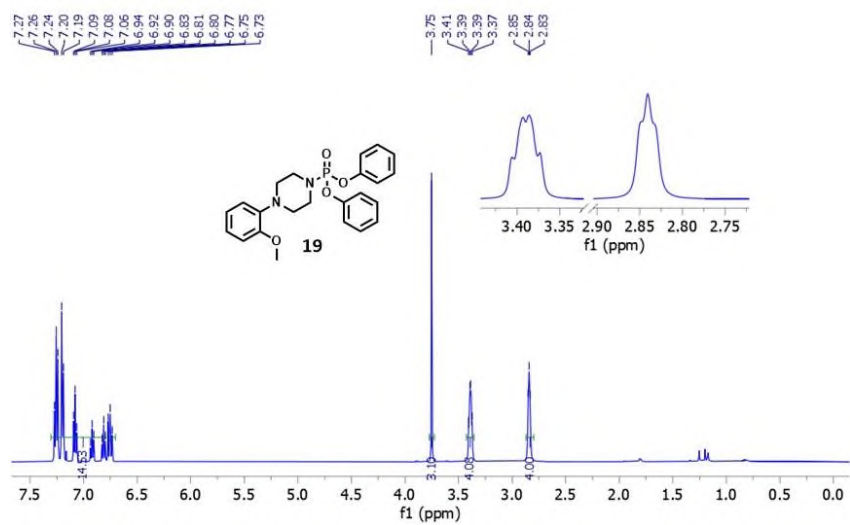
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl₃) de **18**.



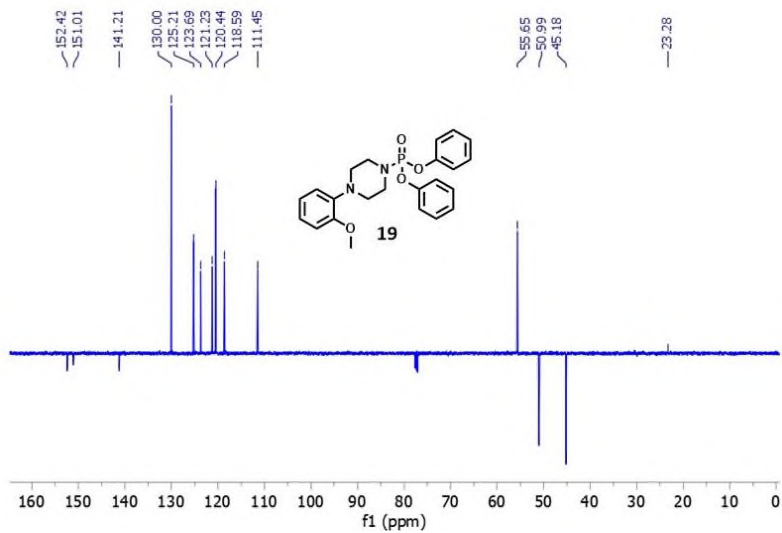
Espectro RMN de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de **18**.



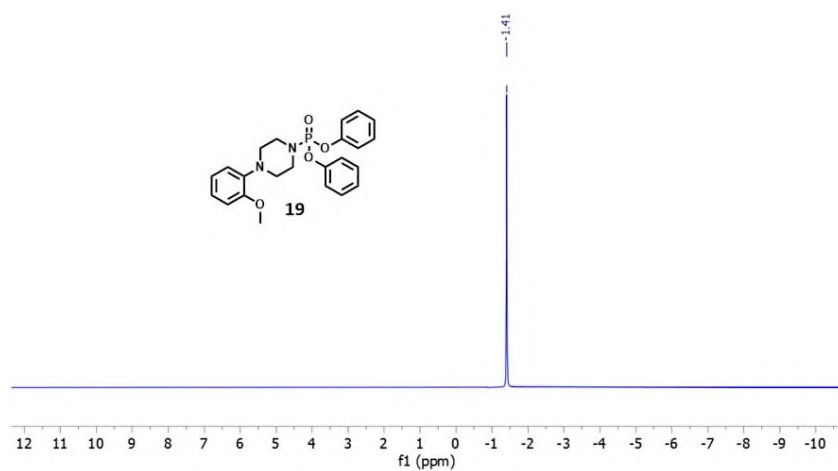
Espectro HRMS TOF MS ESI+ de **19**.



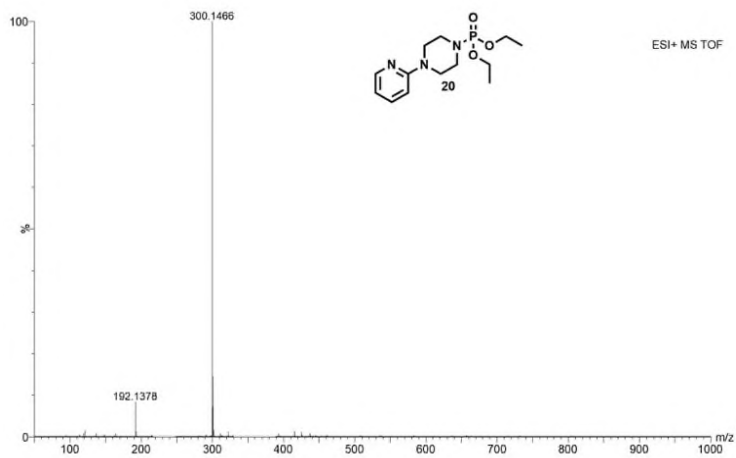
Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **19**.



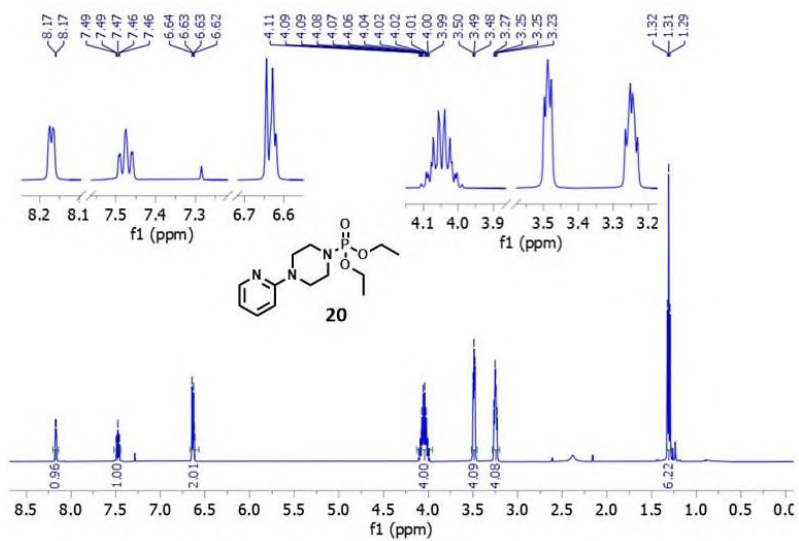
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl₃) de **19**.



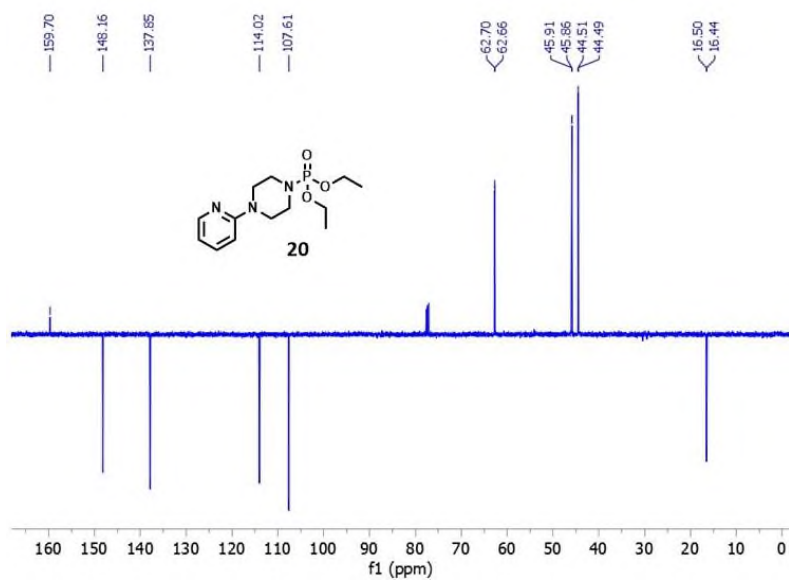
Espectro RMN de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de **19**.



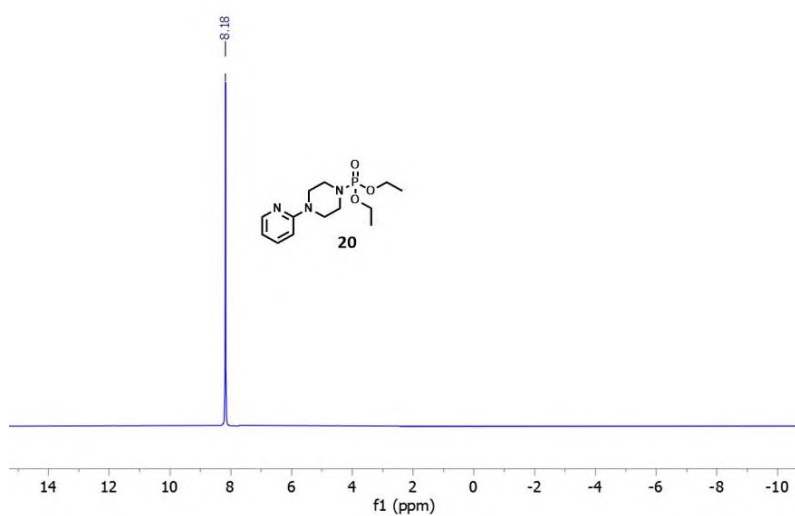
Espectro HRMS TOF MS ESI+ de 20.



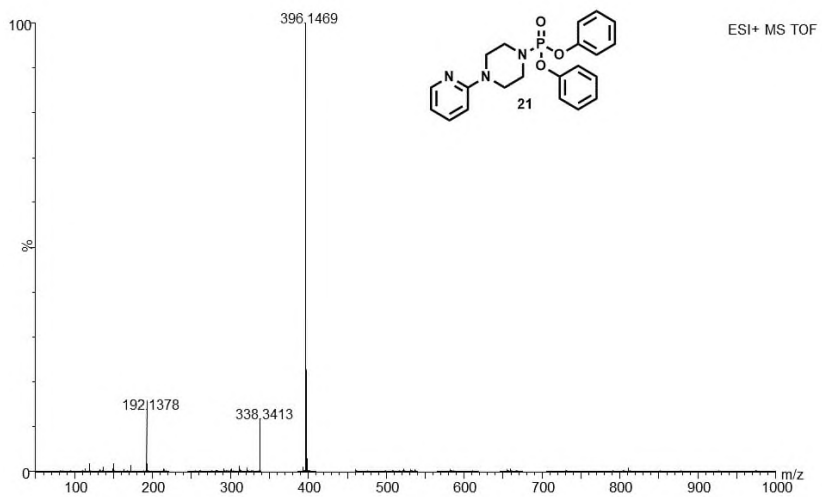
Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 20.



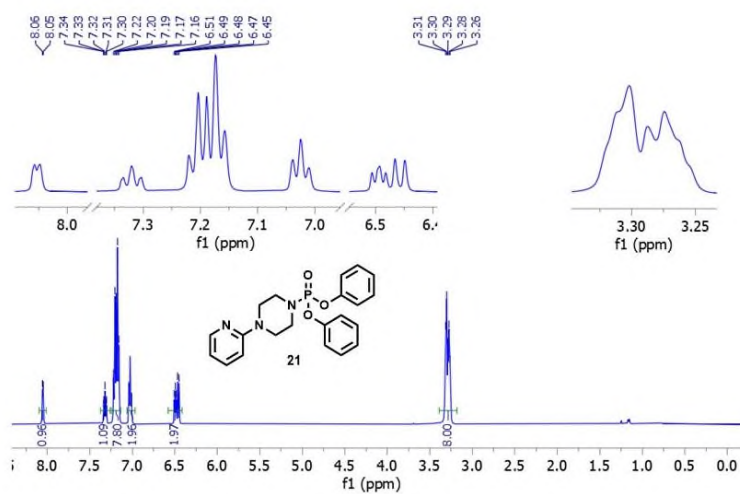
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl_3) de **20**.



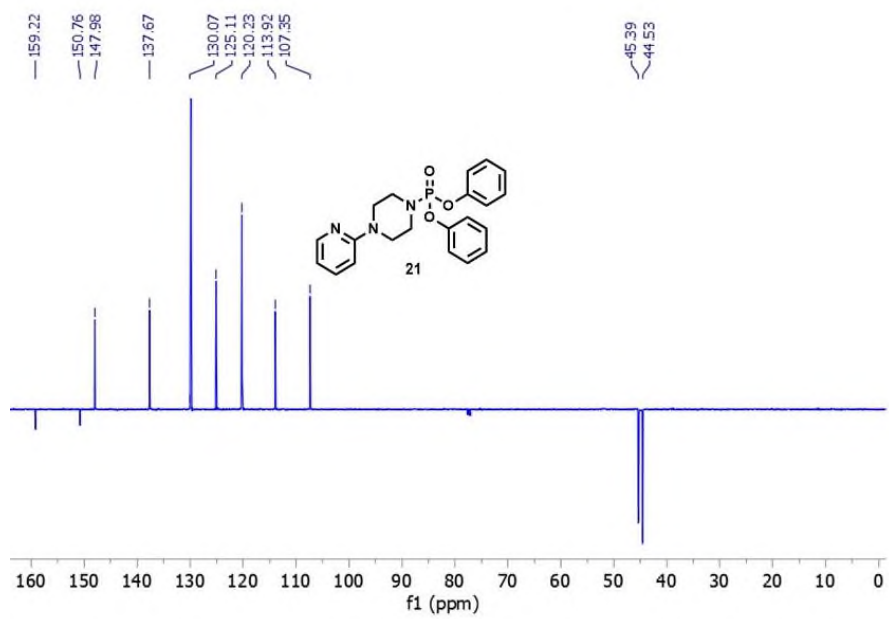
Espectro RMN de ^{31}P (202 MHz, CDCl_3) de **20**.



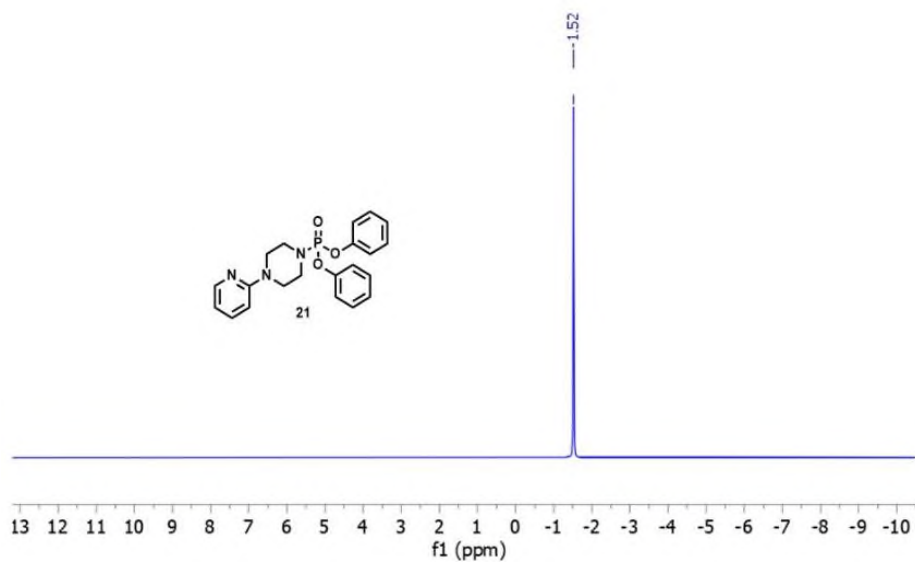
Espectro HRMS TOF MS ESI+ de 21.



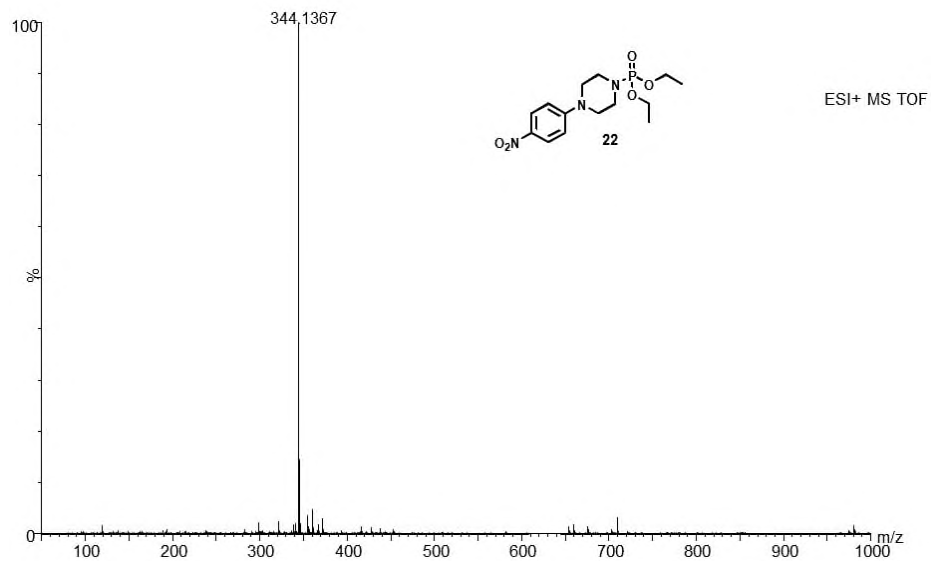
Espectro RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de 21.



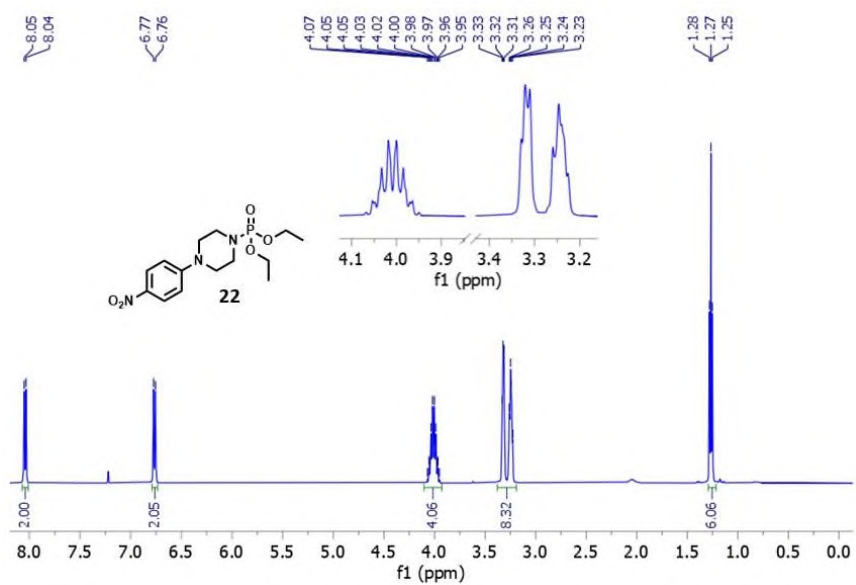
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl₃) de **21**.



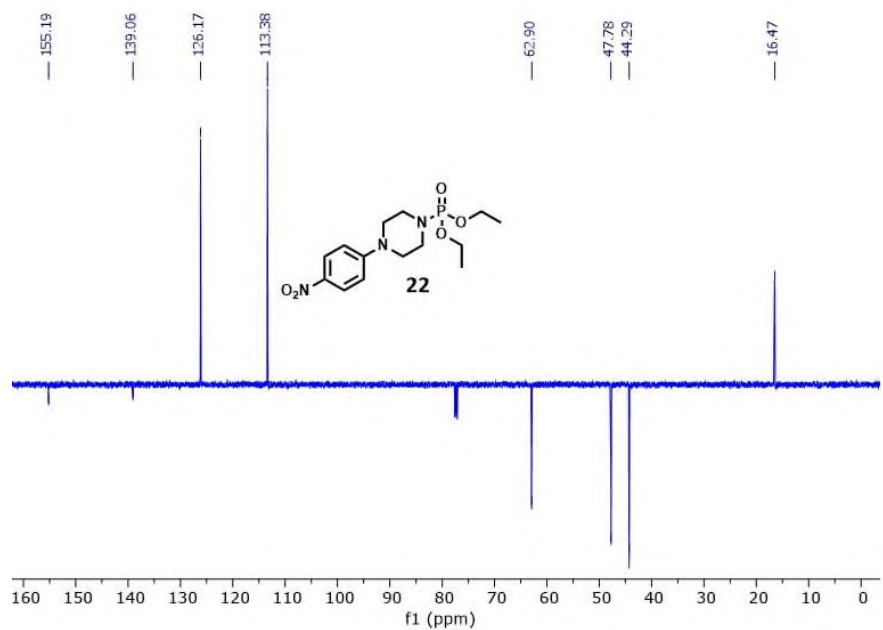
Espectro RMN de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de **21**.



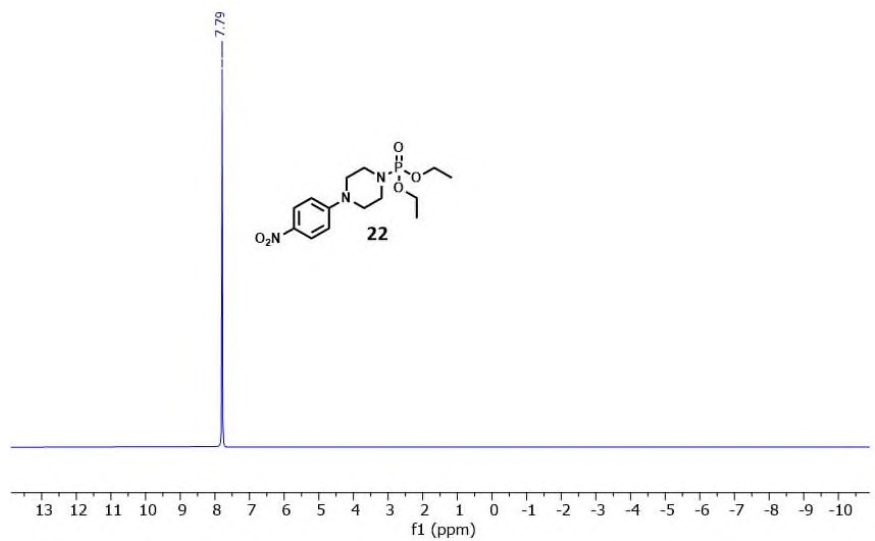
Espectro HRMS ESI(+) de **22**.



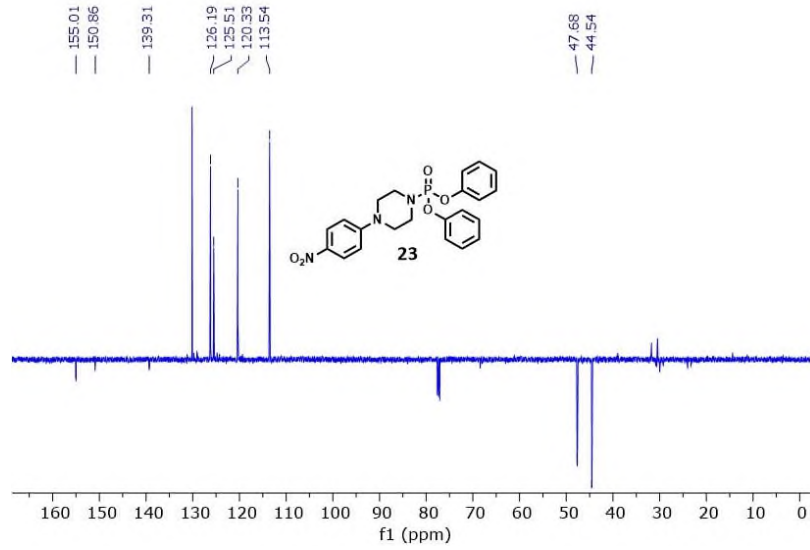
Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **22**.



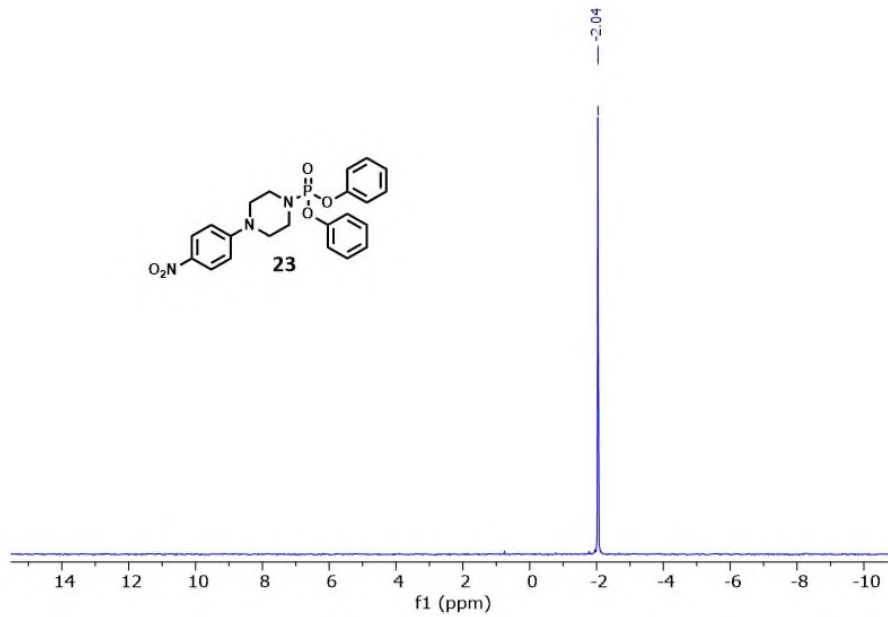
Espectro RMN DEPTQ-135 (126 MHz, CDCl₃) de **22**.



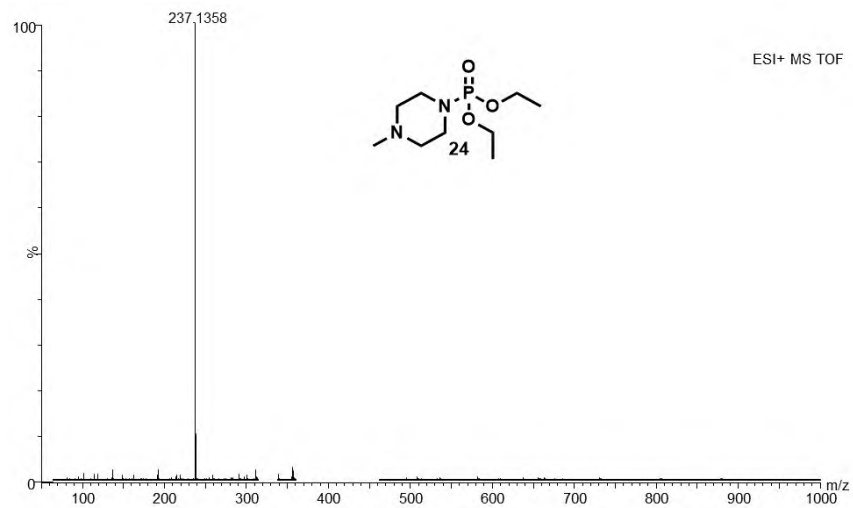
Espectro RMN de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de **22**.



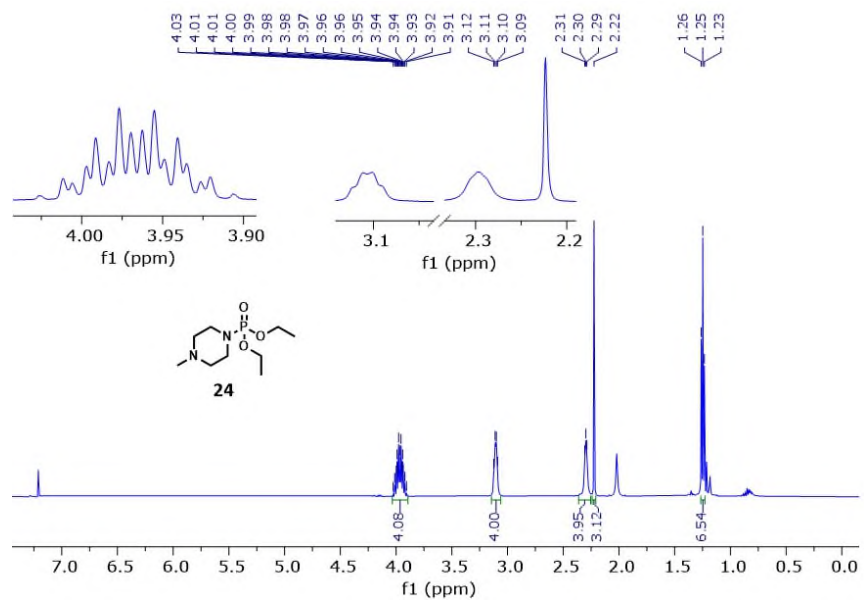
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl₃) de **23**.



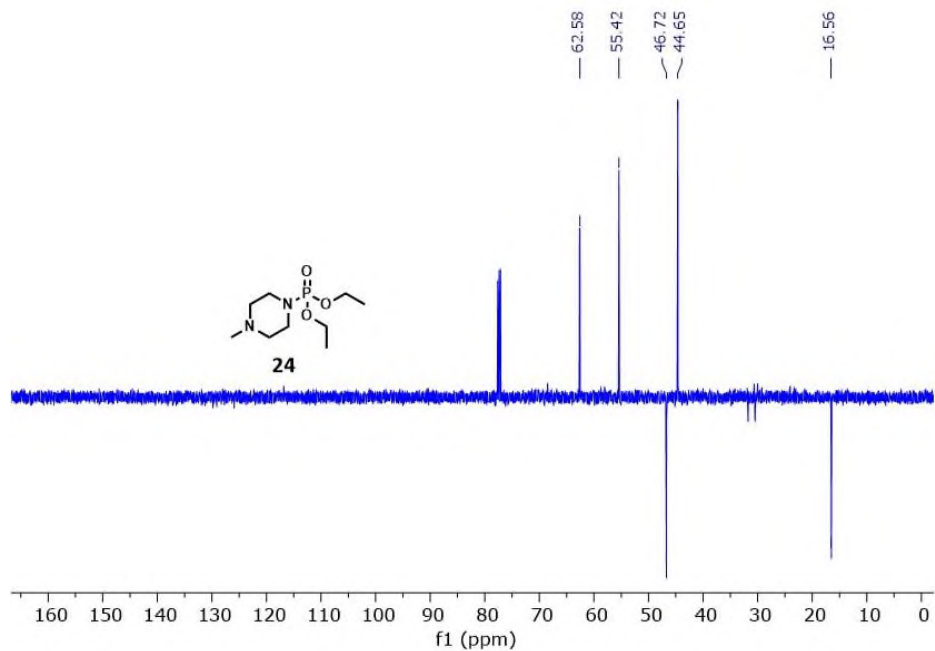
Espectro RMN de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de **23**.



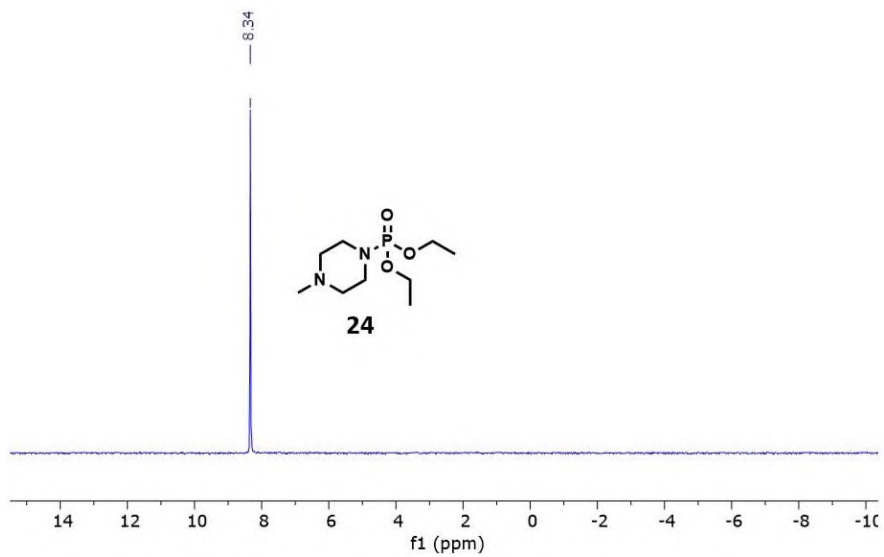
Espectro HRMS TOF MS ESI+ de **24**.



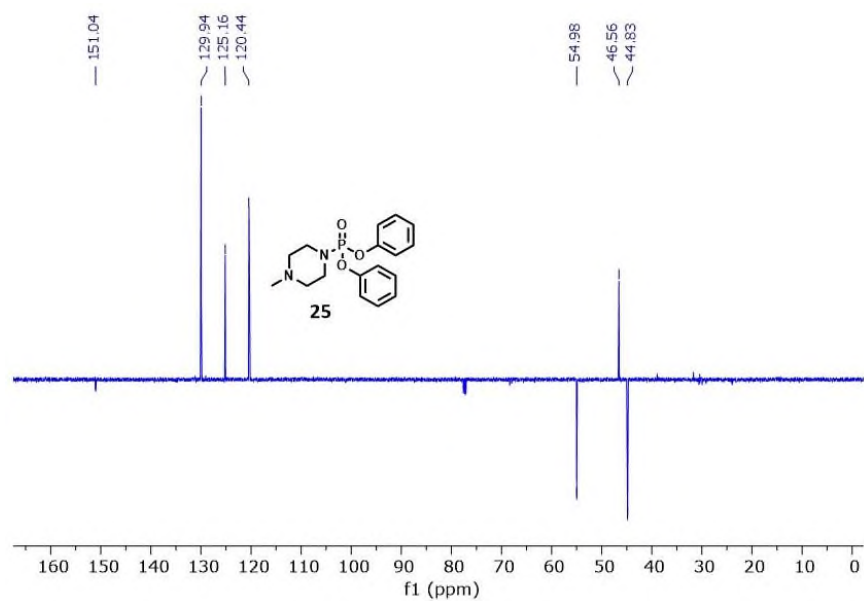
Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **24**.



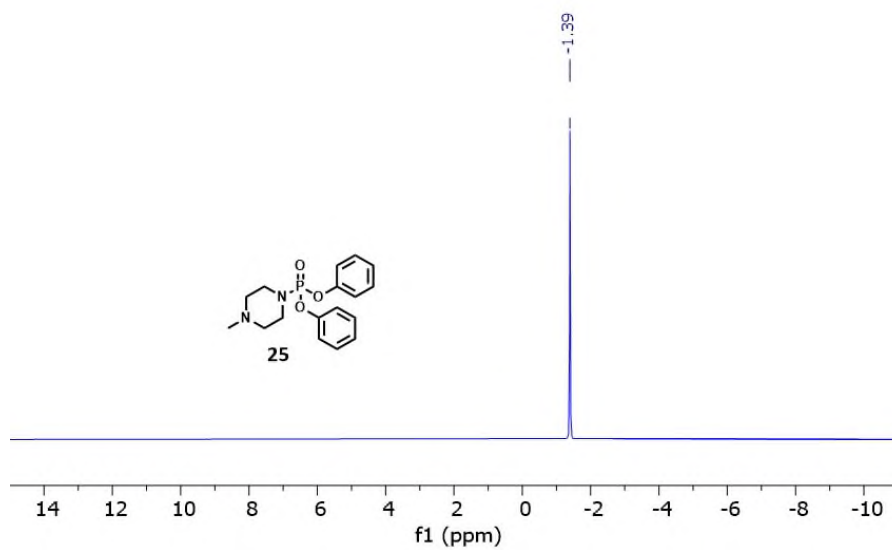
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl_3) de **24**.



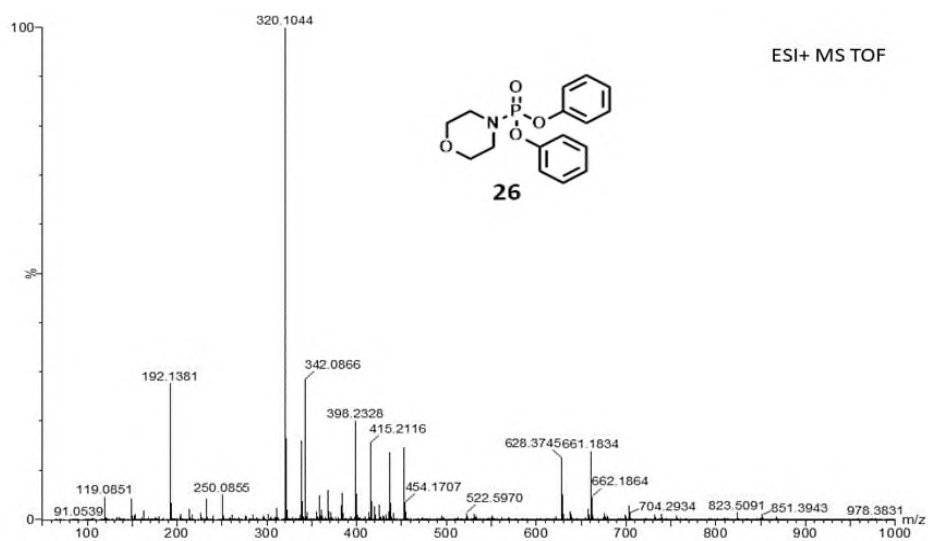
Espectro RMN de ^{31}P (202 MHz, CDCl_3) de **24**.



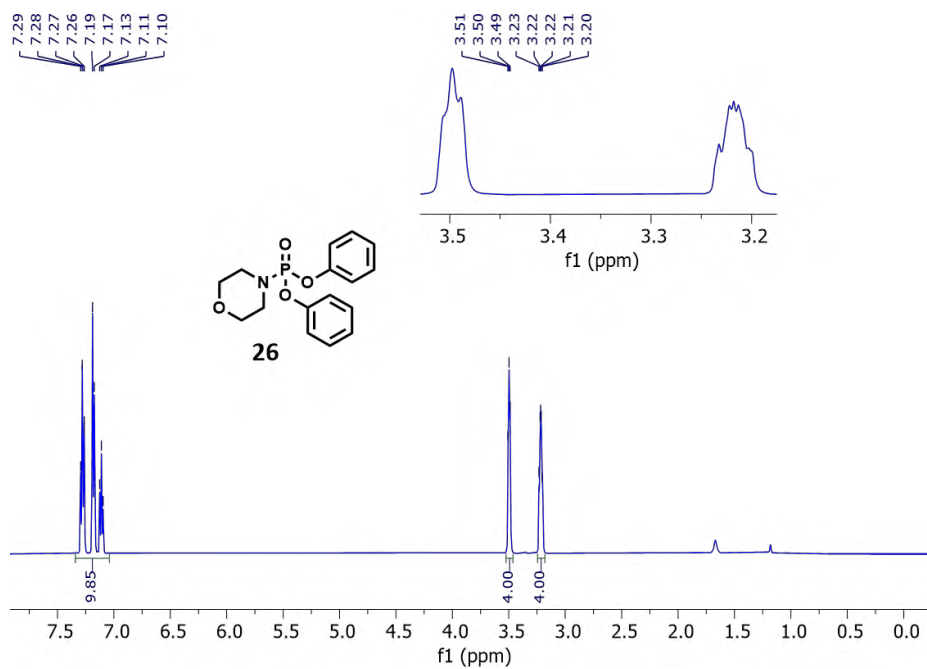
Espectro RMN DEPTQ (126 MHz, CDCl₃) de **25**.



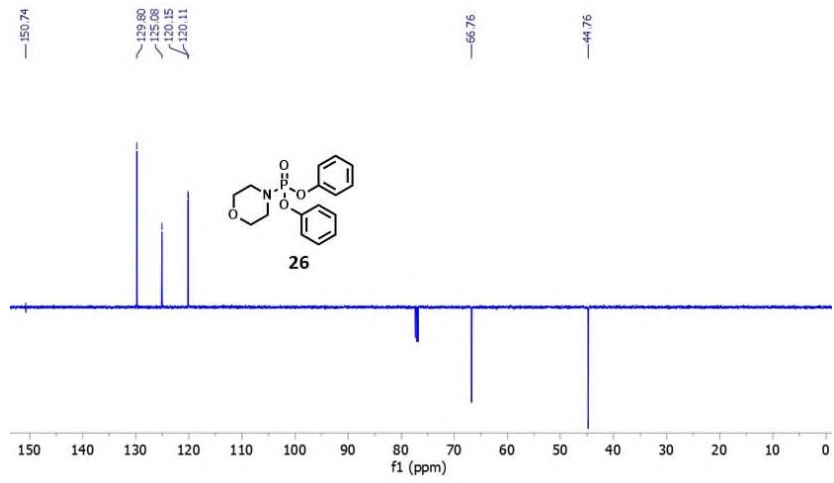
Espectro RMN de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de **25**.



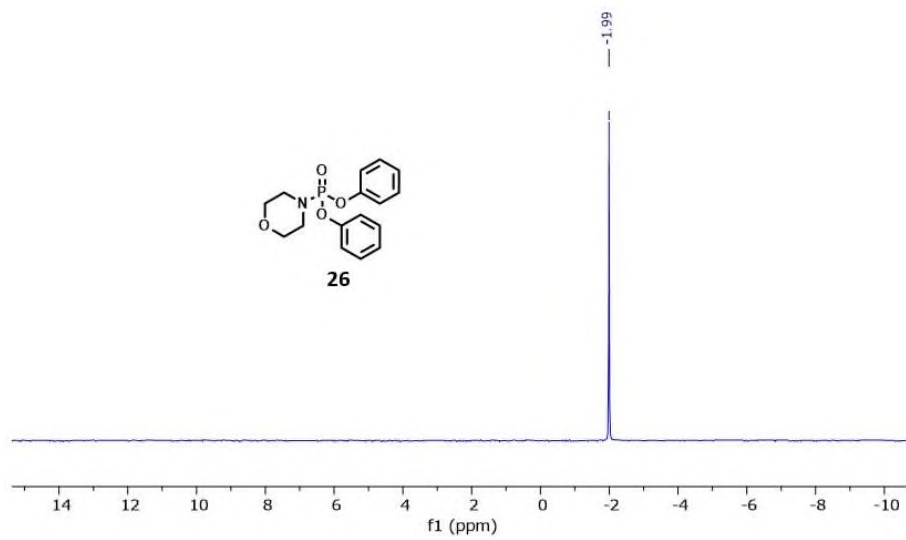
Espectro HRMS TOF MS ESI+ de **26**.



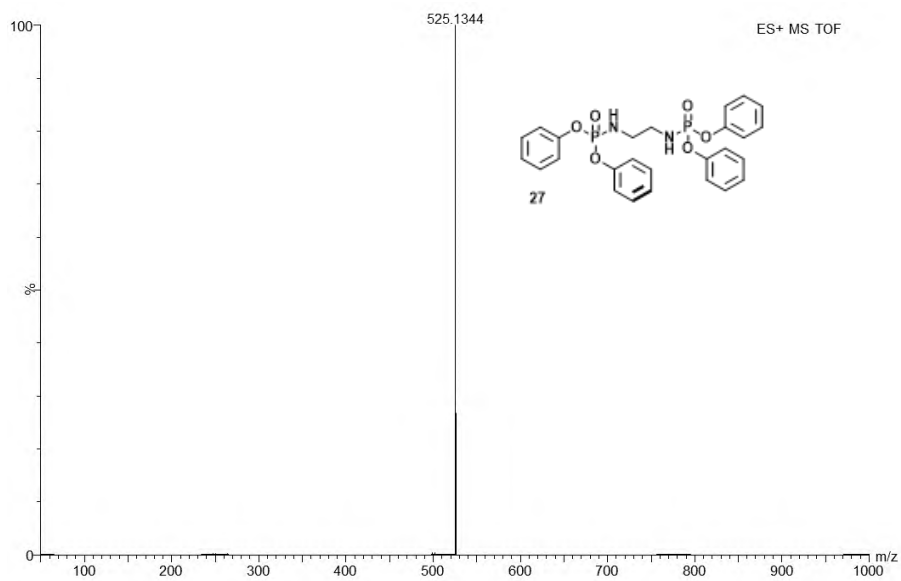
Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **26**.



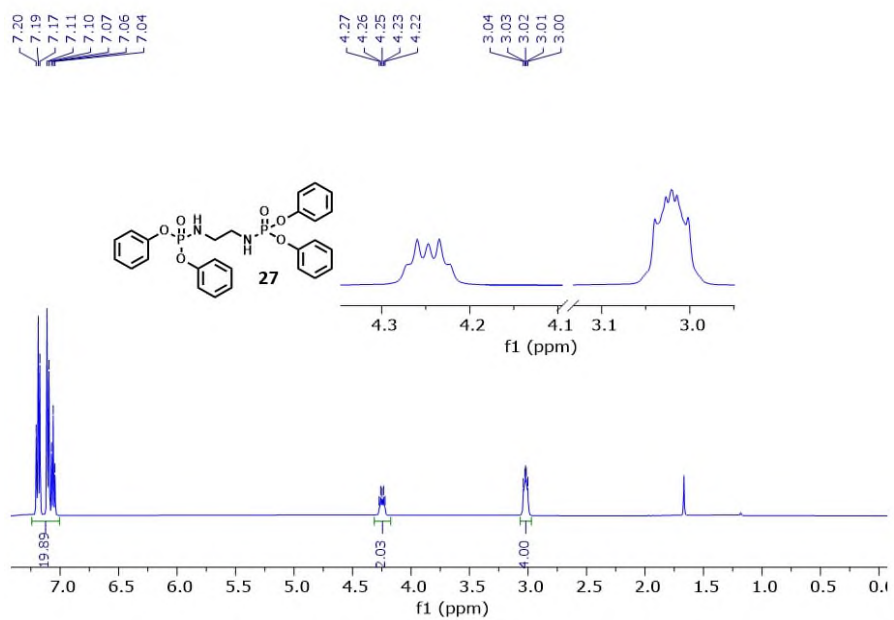
Espectro RMN DEPTQ-135 (126 MHz, CDCl₃) de **26**.



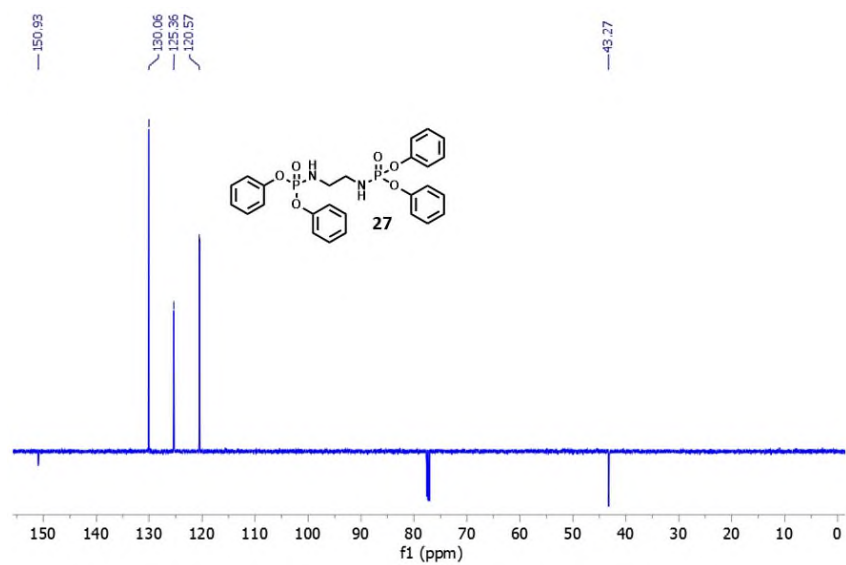
Espectro RMN de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de **26**.



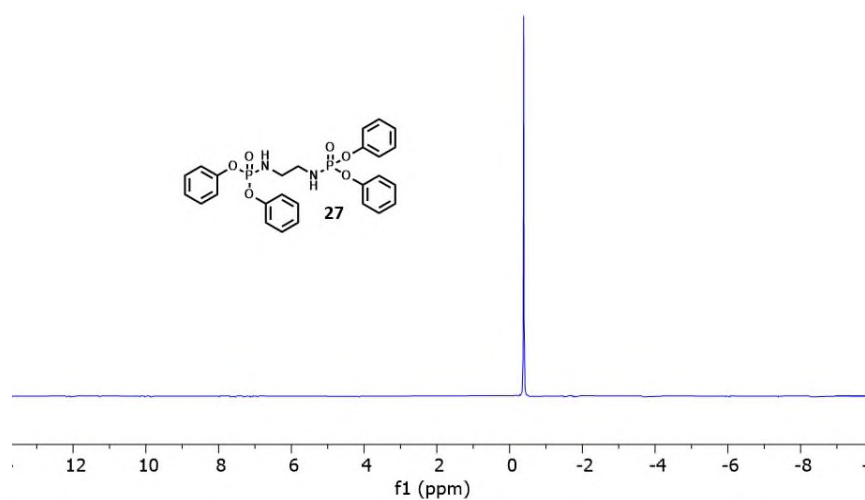
Espectro HRMS TOF MS ESI+ de 27.



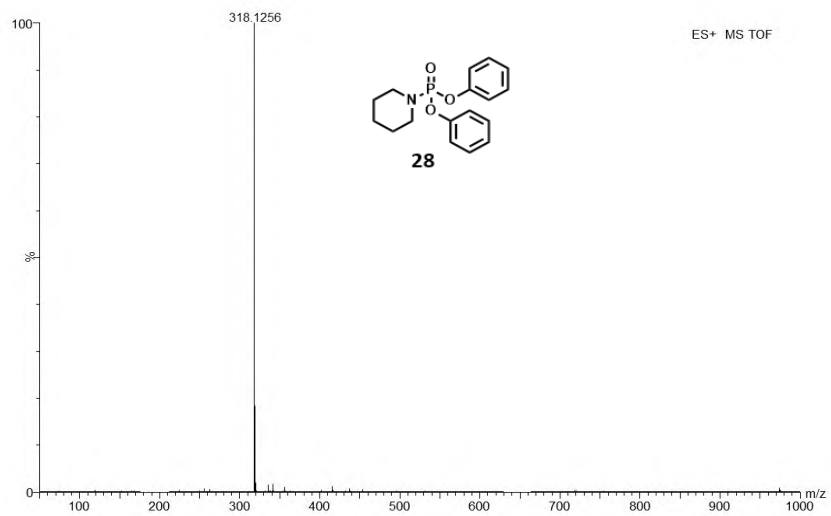
Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de 27.



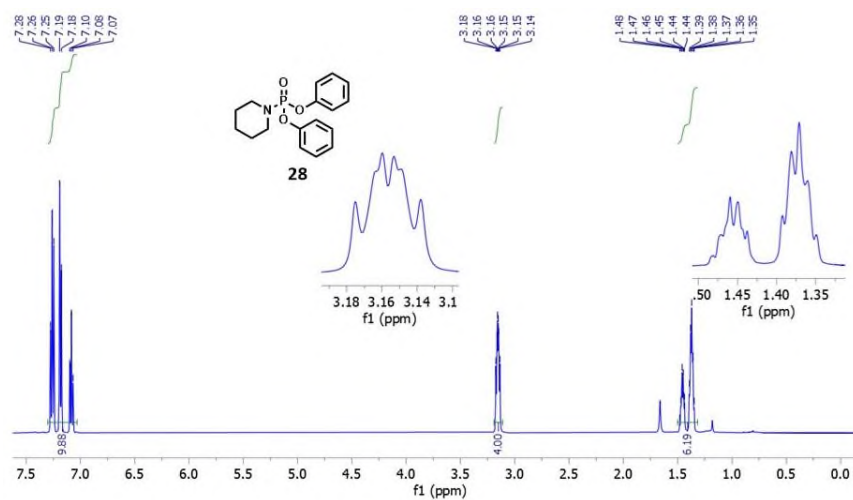
Espectro RMN DEPTQ-135 (126 MHz, CDCl₃) de 27.



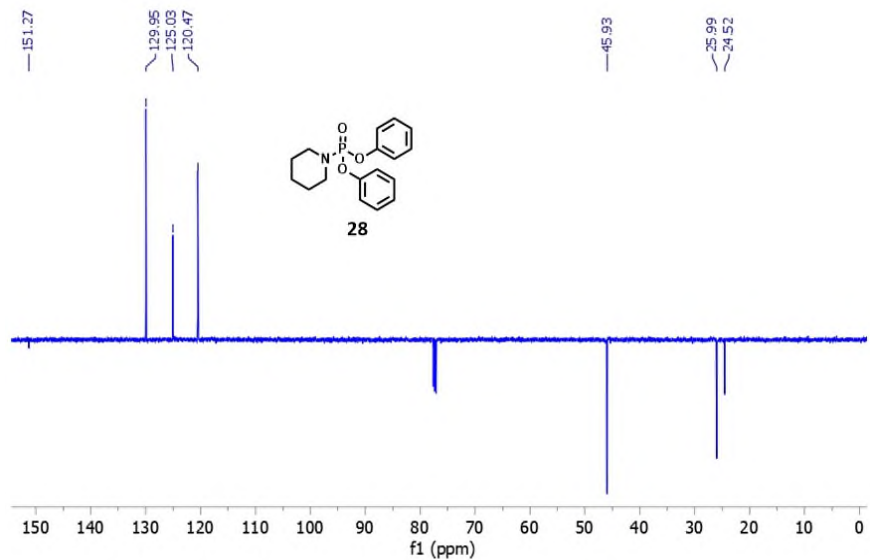
Espectro RMN de ³¹P (202 MHz, CDCl₃) de 27.



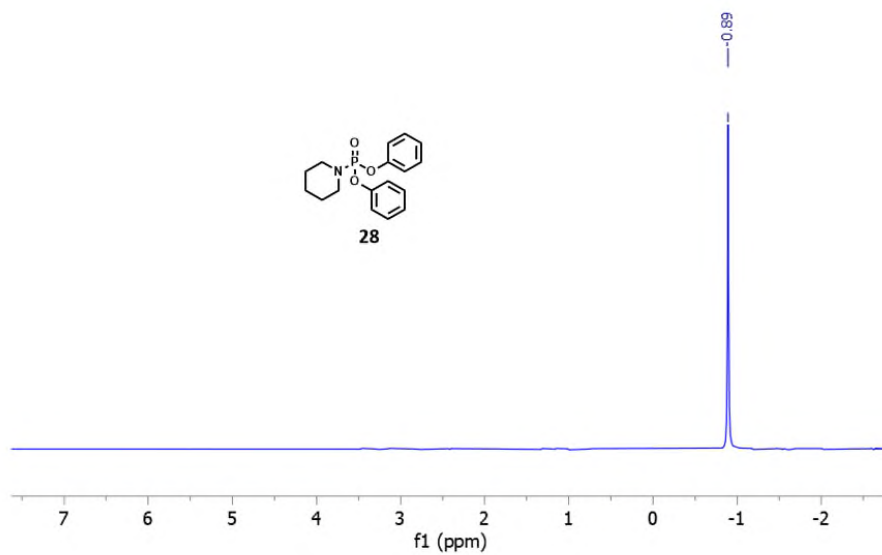
Espectro HRMS TOF MS ESI+ de **28**.



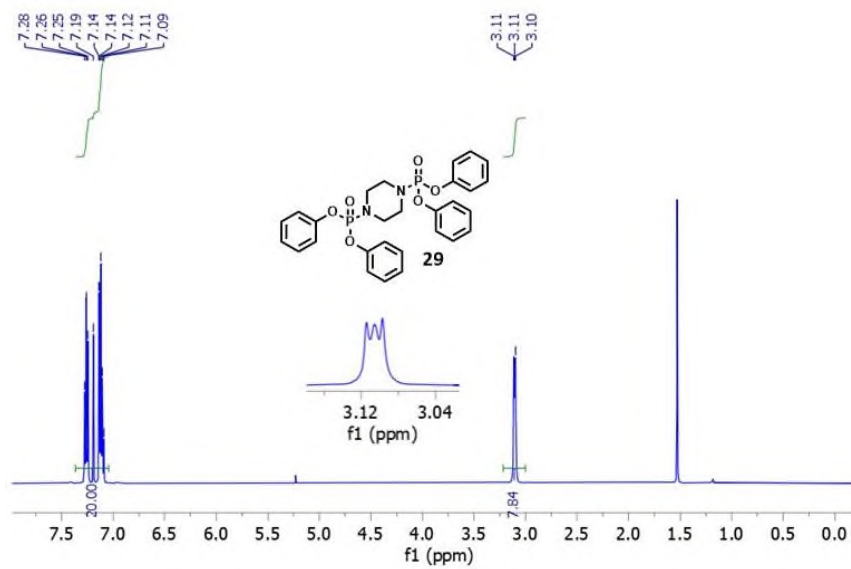
Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **28**.



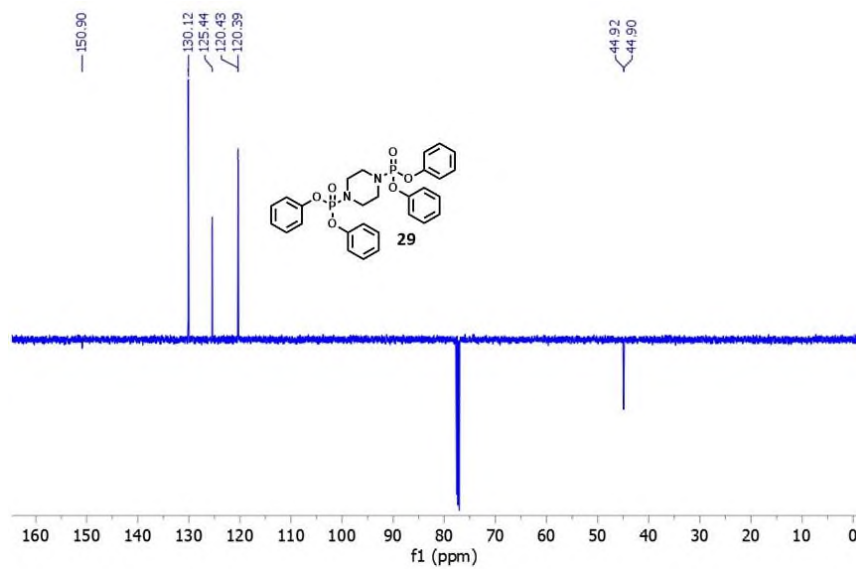
Espectro RMN DEPTQ-135 (126 MHz, CDCl_3) de **28**.



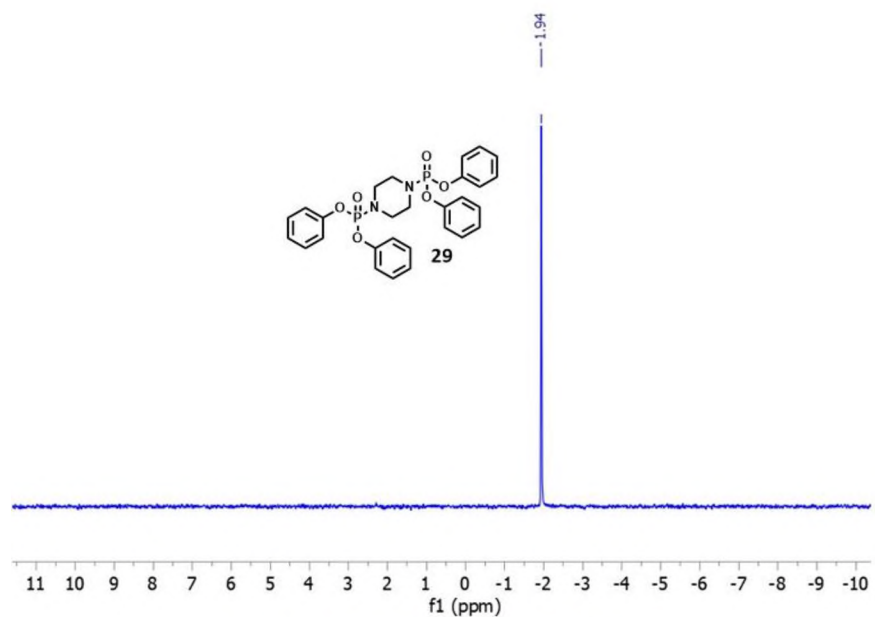
Espectro RMN de ^{31}P (202 MHz, CDCl_3) de **28**.



Espectro RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **29**.



Espectro RMN DEPTQ-135 (126 MHz, CDCl_3) de **29**.



Espectro RMN de ^{31}P (202 MHz, CDCl_3) de 29.