



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**Síntesis y evaluación de la actividad antiinflamatoria de nuevos
fosfonatos como potenciales agentes antiartríticos**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

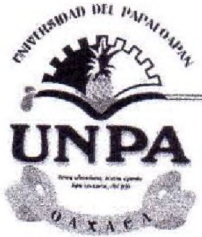
ABIMELEK CORTES PACHECO

Director: Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín

Co-Director: Dra. María Adelina Jiménez Arellanes

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2018.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 14 de junio de 2018 a las 16 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Síntesis y evaluación de la actividad antiinflamatoria de nuevos fosfonatos como potenciales agentes antiartríticos**" presentada por el alumno **Abimelek Cortes Pacheco**, con número de matrícula **12090200**, aspirante al título de **Licenciatura**.

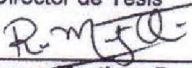
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 15 de junio de 2018


ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA




Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis




Dra. Roxana Martínez Pascual
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



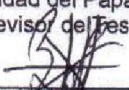
Dr. Miguel Ángel Peña Rico
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



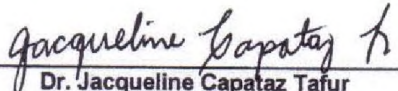
Dra. María Adelina Jiménez Arellanes
Investigadora
Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS
Co-Director de Tesis



Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Lemuel Pérez Picaso
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 26 de junio de 2018
Oficio No. JCIB/009a/06/2018

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Abimelek Cortes Pacheco** titulado "**Síntesis y evaluación de la actividad antiinflamatoria de nuevos fosfonatos como potenciales agentes antiartríticos**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

- Dra. Roxana Martínez Pascual** (Presidente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo** (Vocal, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Miguel Ángel Peña Rico** (Secretario, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Lemuel Pérez Picaso** (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Adolfo López Torres** (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin mas por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



JEFATURA DE INGENIERIA
EN BIOTECNOLOGIA
CAMPUS TUXTEPEC

Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan



UNIVERSIDAD DEL
PAPALOAPAN

27 JUN. 2018

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
VICE-RECTORIA
ACADEMICA



c.c.p. Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín, Director de tesis, PARA SU CONOCIMIENTO SERVICIOS
c.c.p. Dra. María Adelina Jiménez Arellanes Director de tesis, PARA SU CONOCIMIENTO TUXTEPEC
c.c.p. Abimelek Cortes Pacheco, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

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.

La presente Tesis se realizó en el laboratorio de Química Orgánica, Resonancia Magnética Nuclear y Análisis Instrumental de la Universidad del Papaloapan *campus* Tuxtepec bajo la dirección del Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín; y en las instalaciones de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS-Cd. México) bajo la dirección de la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes. El financiamiento del presente trabajo provino de los proyectos F-PROMEP-39/Rev-04 SEP y CONACyT INFRA-2015-01-252013, además del otorgamiento de una beca estudiantil (F-PROMEP-39/Rev-04 SEP).

*Hay que ser generoso, hay que tolerar, hay que comprender, hay que compartir y hay que reírse,
la risa es lo más lindo que tiene el ser humano y estamos enojados!*

Y, tira buena que vuelve...

Por ti y para ti Iker Mathieu.

Agradecimientos

Infinitas gracias a mi mentora, mi tía y madre Teresita, este trabajo que es de mucho orgullo para mí, prácticamente es todo tuyo. Siempre voy a estar agradecido por toda la confianza puesta en mí, y vamos, todo lo bueno que has hecho en esta vida, se te va a regresar, te quiero mucho y hartas gracias. A mi Madre, mis hermanos Edwin y Mateo y a toda su familia, sé que su apoyo no fue como hubiese querido, pero estoy agradecido por todo lo que usted me ha dado y enseñado, muchas gracias. A mi tía Eli y mi ahijado Lalo, también va para ustedes.

Para Abril, te admiro y te quiero mucho, gracias por todos los momentos que me compartiste, el apoyo en los momentos que ya no la veía llegar, en mis momentos de depresión y tristeza, que son muchos, porque tú me has ayudado a salir adelante, muchas gracias. Este trabajo también es tuyo y vas de coautor en mi corazón.

A mis compañeros de generación por la bonita convivencia de más de cinco años, Frank, Samuel, Sosa, Roque, Magda, Mayra, Nuria, Mafer, Celenia, José, Fernando, David, Cristofer, con especial agradecimiento a Betzy por su gran amistad. Me llevo un poquito de cada uno, y siempre los voy a tener presente.

A los compañeros del laboratorio: Flavio, Yuno, Brenda, Karen, Gaby, Yureli, Sam, Ceci, Silvia, Michelle, buen ambiente de trabajo y muy buenos chistes. Gracias por prestarme material, asesorarme y ayudarme en algunos experimentos. Buena vibra.

También quiero agradecer a los profesores, al Dr. Lemuel y al Dr. Omar por asesorarme en las reacciones químicas y capacitarme en el uso del equipo de RMN. Al Dr. Adolfo por apoyarme en el análisis de las muestra por Espectrometría de Masas. A los profesores que indirectamente me apoyaron, a la Dra. María de Jesús, Dra. Blanca y el Dr. Julián.

A mis revisores de tesis, por tomarse el tiempo de corregir el trabajo y hacer sugerencias, gracias a la Dra. Roxana, Dr. Paul, Dr. Miguel, Dr. Lemuel y la Dra. Jacqueline.

A mi co-asesora la Dra. Adelina por todo el apoyo brindado durante la estancia en la CDMX y su tiempo para revisar el trabajo, un gusto trabajar con usted. A su equipo de trabajo, que buena vibra, no había conocido un grupo tan unido, que hasta se los dije, son una familia, no cambien.

Y por supuesto, a mi jefe, al Dr. Oscar Abelardo, gracias por aceptarme en su trabajo, esto muy agradecido con usted por todos los consejos, el apoyo y todo el tiempo que me dedicó. Agradezco las circunstancias que me hicieron trabajar con usted, y pues bueno a seguir trabajando duro en busca de cosas mejores.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente proyecto de investigación dieron lugar a las siguientes presentaciones en congresos y conferencias:

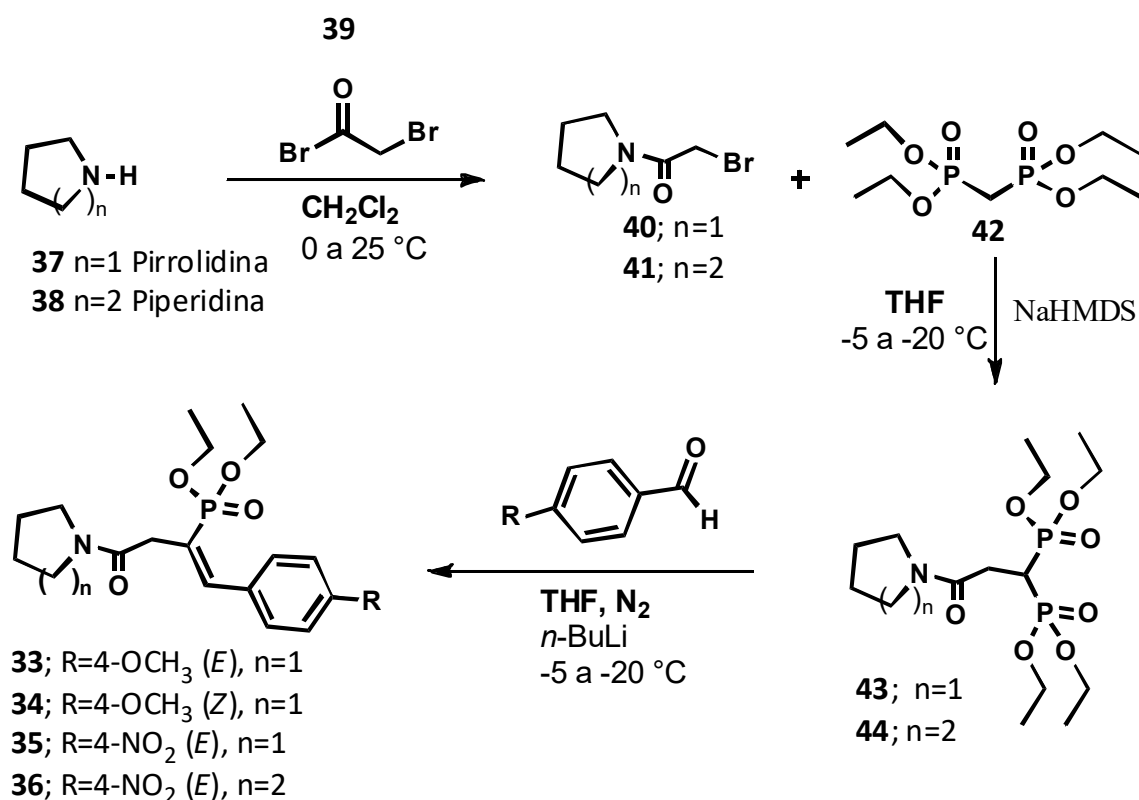
Abimelek Cortes Pacheco, Oscar Abelardo Ramírez Marroquín. Diseño síntesis y caracterización de nuevos fosfonatos como potenciales agentes antiartríticos. 3er Encuentro Regional de Investigación Multidisciplinaria. Tuxtepec, Oaxaca, 21 de septiembre de 2017.

Abimelek Cortes Pacheco, Oscar Abelardo Ramírez Marroquín. Síntesis y caracterización de nuevos fosfonatos como potenciales agentes antiartríticos. 5to Encuentro de jóvenes investigadores COCYT 2017. Oaxaca de Juárez, Oaxaca, 3 al 4 de octubre de 2017.

Abimelek Cortes Pacheco, Oscar Abelardo Ramírez Marroquín, María Adelina Jiménez Arellanes. Síntesis y evaluación de la actividad antiinflamatoria de nuevos fosfonatos. XIV Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica. Mérida, Yucatán, 22 al 23 de marzo de 2018.

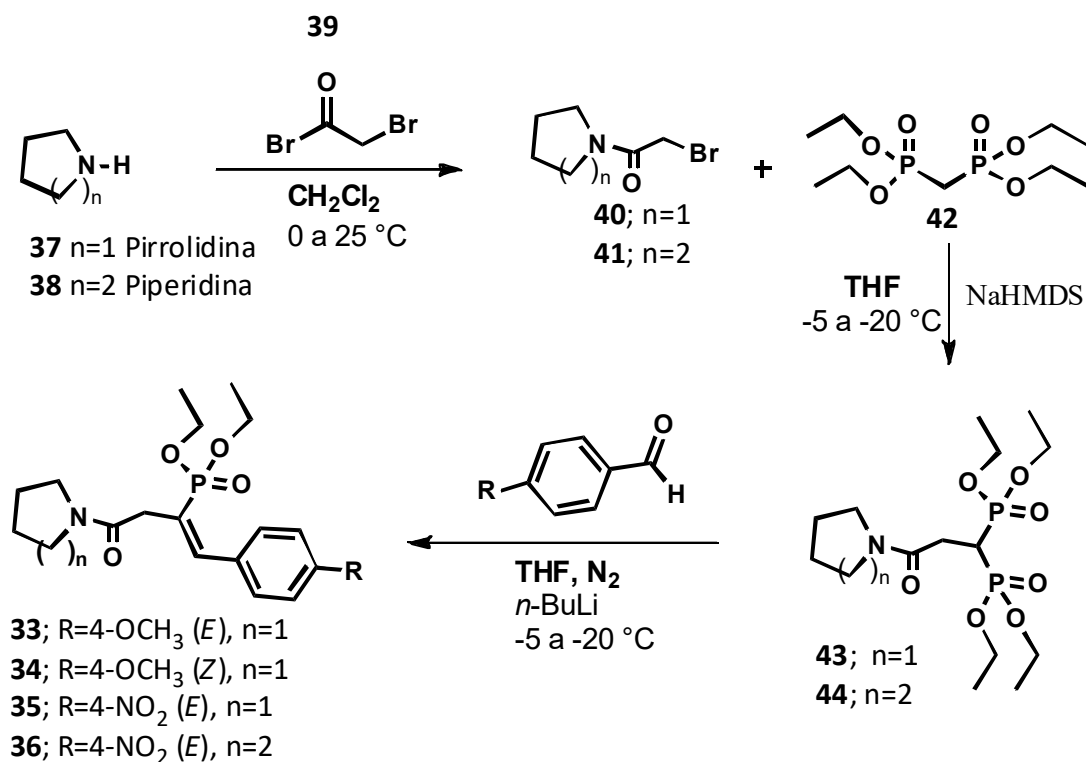
RESUMEN

Basado en la predicción de la actividad farmacológica antiartrítica mediante el programa PASS, nuevos vinilfosfonatos **33-36**, fueron sintetizados y evaluados en dos modelos de inflamación *in vivo*. La síntesis de los compuestos se realizó en tres pasos de reacción: amidación, C-alkilación y reacción Horner Wadsworth Emmons (HWE). Se obtuvieron elevados rendimientos para los productos **40-41** (92 y 87%, respectivamente) y **43-44** (82 y 89%, respectivamente). Finalmente, los vinilfosfonatos **33-36** se obtuvieron en rendimientos moderados (16-32%). Las propiedades antiinflamatorias fueron evaluadas en dos modelos: sistémico inducido por carragenina y tópico, inducido por TPA (12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato). En el modelo sistémico, ningún compuesto tuvo actividad antiinflamatoria significativa, no obstante, los compuestos **33-36** presentaron actividad proinflamatoria superior al grupo control. Para el modelo tópico, todos los vinilfosfonatos mostraron actividad antiinflamatoria, destacando el compuesto **35** con el mejor efecto antiinflamatorio. Por lo anterior, se concluye que la actividad antiinflamatoria es propia de los compuestos **33-36** (modelo de TPA), y su efecto proinflamatorio es producto probablemente de las biotransformaciones resultantes antes de llegar al sitio del daño en el modelo sistémico.



ABSTRACT

Based on the prediction of antiarthritic activity through the PASS program, new vinylphosphonates **33-36** were synthesized and evaluated *in vivo* by two models of acute inflammation. The synthetic route to afford target compounds consisted in a three-step sequence: amidation, C-alkylation and Horner Wadsworth Emmons reaction. Intermediates **40-41** and **43-44** were obtained in high yields while vinylphosphonates **33-36** were obtained in moderate yields. In the last step, vinylphosphonates **33-36** were obtained in moderate yields (16-32%). Anti-inflammatory activity was evaluated in two acute inflammation models: paw edema induced by carrageenan and TPA model (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Through systemic administration, all the evaluated compounds showed not significant anti-inflammatory activity, in addition, compounds **33-36** showed higher proinflammatory activity than the control group. For TPA model (topical administration), all vinylphosphonates exhibited anti-inflammatory activity, highlighting compound **35** with the best anti-inflammatory effect. These results may indicate that proinflammatory effect are probably due to some biotransformation occurred before these compounds reached the site of damage.



CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN..... | XI |
| ÍNDICE DE COMPUESTOS..... | XVIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XIX |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 3 |
| 2.1 Enfermedad blanco..... | 3 |
| 2.2 Identificación de blanco molecular..... | 6 |
| 2.3 Diseño de nuevas sustancias bioactivas | 7 |
| 2.4 Síntesis orgánica | 9 |
| 2.5 Caracterización | 9 |
| 2.6 Evaluación de la actividad farmacológica de nuevas sustancias bioactivas..... | 10 |
| 3. ANTECEDENTES..... | 12 |
| 3.1 Fármacos empleados actualmente en el tratamiento de la AR. | 12 |
| 3.1.1. Acetaminofén | 12 |
| 3.1.2. Fármacos Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs) | 13 |
| 3.1.3. Opioides | 14 |
| 3.1.4. Glucocorticoides..... | 15 |
| 3.1.5. Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad..... | 16 |
| 3.2. Identificación de nuevos blancos moleculares..... | 17 |
| 3.3. Ácidos fosfónicos y fosfonatos | 17 |
| 3.3.1. Fosfonatos como inhibidores de citocinas..... | 18 |
| 3.3.2. Fosfonatos como inhibidores de metaloproteinasas de matriz. | 18 |
| 3.3.3. Fosfonatos como inhibidores de cinasas. | 19 |
| 3.3.4. Fosfonatos y vinilfosfonatos con actividad antiinflamatoria | 20 |
| 3.4. Síntesis de fosfonatos | 22 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 26 |
| 5. HIPÓTESIS..... | 27 |
| 6. OBJETIVOS..... | 28 |
| 6.1. Objetivo general..... | 28 |
| 6.2. Objetivos específicos | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Función básica de la química farmacéutica. Modificada de Roy, 2011. | 5 |
| Figura 2. Diagrama de los modelos de evaluación de la actividad farmacológica de nuevas sustancias bioactivas. Modificada de Wang <i>et al.</i> , 2011..... | 11 |
| Figura 3. Agentes antiartríticos y su aplicación como primera y segunda línea en el tratamiento. Tomada de Laev y Salakhutdinov, 2015; Cheng y Visco, 2012; Hameed y Ihm, 2012. | 12 |
| Figura 4. Estructura de acetaminofén o paracetamol. | 13 |
| Figura 5. Fármacos Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs) selectivos y no selectivos. | 14 |
| Figura 6. Tramadol, un opioide empleado en el tratamiento de la AR..... | 15 |
| Figura 7. Prednisolona, un glucocorticoide empleado en el tratamiento de la AR. | 15 |
| Figura 8. Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad..... | 16 |
| Figura 9. Estructura general del grupo fosfato y fosfonato. | 17 |
| Figura 10. a) Estructura de fosforilcolina y el derivado de ácido fosfónico compuesto 1 , inhibidor de citocinas..... | 18 |
| Figura 11. Péptidos fosfónicos, 2 inhibidor de MMP-8 y 3 , inhibidor de MMP-11. | 19 |
| Figura 12. Derivado 4 , inhibidor potente de MMP-8..... | 19 |
| Figura 13. Inhibidores de cinasa CDK9/CycT1. Derivados 5-8 | 20 |
| Figura 14. Fosfonatos 9, 10, 11a-c y 12 con actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> | 20 |
| Figura 15. Fosfonatos 13a-c y 14a-b con actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> | 21 |
| Figura 16. Moléculas 15, 16 y 17 que comparten el fragmento vinilfosfonato..... | 21 |
| Figura 17. Vinilfosfonatos 18, 19 y 20 con actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> | 22 |
| Figura 18. Representación del dominio vinilfosfonato y descripción de los enlaces presentes. . | 22 |
| Figura 19. Constantes de acoplamiento de los diastereoisómeros <i>E</i> y <i>Z</i> de vinilfosfonatos..... | 25 |
| Figura 20. Análisis del crudo de reacción por RMN de ¹ H (A) y ³¹ P (B) para la identificación de bisfosfonato 43 | 37 |
| Figura 21. Espectros de RMN ¹ H de diastereoisómeros 34 (a) y 33 (b)..... | 40 |
| Figura 22. Actividad antiinflamatoria de los compuestos 33-36 y 43-44 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C..... | 45 |
| Figura 23. Actividad proinflamatoria de los compuestos 35 y 36 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C. | 47 |
| Figura 24. Actividad proinflamatoria de los compuestos 33 y 34 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C. | 48 |
| Figura 25. Actividad proinflamatoria de los compuestos 33 y 35 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C. | 49 |
| Figura 26. Actividad antiinflamatoria aguda tópica de los compuestos 33-36 y 43-44 sobre la formación del edema auricular inducido con TPA en ratones hembra Balb/C..... | 51 |

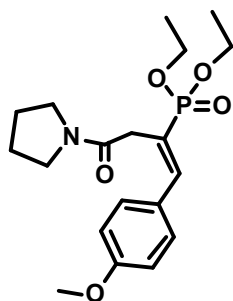
ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Blancos moleculares y su mecanismo de acción en AR..... | 7 |
| Tabla 2. Reglas de Lipinski..... | 8 |
| Tabla 3. Resultados del análisis de predicción de la actividad (PA) farmacológica de los compuestos 33-36 mediante el programa PASS..... | 32 |
| Tabla 4. Amidación de pirrolidina con bromuro de bromoacetilo utilizando diferentes condiciones de reacción..... | 34 |
| Tabla 5. C-alquilación de la amida 40 con el bisfosfonato 42 utilizando diferentes condiciones de reacción..... | 38 |
| Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de los compuestos 33-36 y 43-44 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C..... | 44 |
| Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de los compuestos 33-36 y 43-44 en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C a la quinta hora del tratamiento..... | 46 |
| Tabla 8. Actividad antiinflamatoria de los 33-36 y 43-44 en edema auricular inducido con TPA en ratones Balb/C..... | 50 |

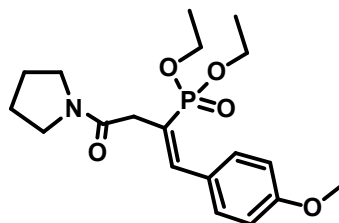
ÍNDICE DE ESQUEMAS

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Métodos generales para la síntesis de vinilfosfonatos | 23 |
| Esquema 2. Reacción adición-eliminación para la síntesis de vinilfosfonatos terminales 23 | 24 |
| Esquema 3. Reacción hidrofosfonilación para la síntesis de vinilfosfonatos 26 | 24 |
| Esquema 4. Reacción de carbopaladación para la síntesis de vinilfosfonato 29 | 24 |
| Esquema 5. Reacción Horner-Wadsworth-Emmons para la síntesis de vinilfosfonatos 32 | 25 |
| Esquema 6. Ruta de síntesis propuesta para la obtención de los compuestos objetivo 33-36 . .. | 29 |
| Esquema 7. | 33 |
| Esquema 8. | 33 |
| Esquema 9. | 34 |
| Esquema 10. | 34 |
| Esquema 11. | 35 |
| Esquema 12. | 35 |
| Esquema 13. | 37 |
| Esquema 14. | 37 |
| Esquema 15. | 38 |
| Esquema 16. | 39 |
| Esquema 17. | 39 |
| Esquema 18. | 41 |
| Esquema 19. | 41 |
| Esquema 20. | 42 |
| Esquema 21. | 42 |
| Esquema 22. | 43 |

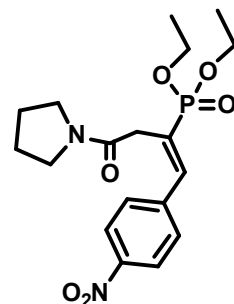
ÍNDICE DE COMPUESTOS



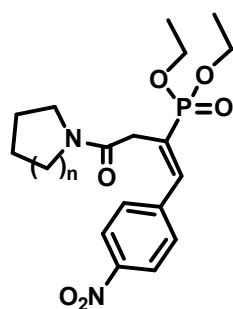
33



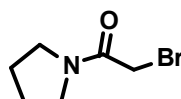
34



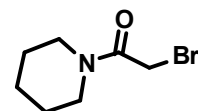
35



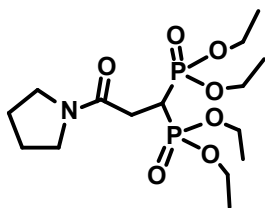
36



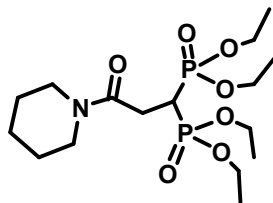
40



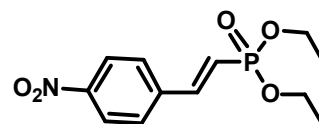
41



43



44



48

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------------------|--|
| AcOEt | Acetato de etilo |
| AR | Artritis Reumatoide |
| Al ₂ O ₃ | Óxido de aluminio (Alúmina) |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| COX-2 | Ciclooxigenasa-2 |
| DAMPs | Patrones moleculares asociados a daños (por sus siglas en inglés) |
| DMARDs | Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (por sus siglas en inglés) |
| equiv. | Equivalentes |
| EROs | Especies reactivas de oxígeno |
| FDA | Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés) |
| HRMS | Espectrometría de Masas de Alta Resolución (por sus siglas en inglés) |
| Hz | Hertz |
| Indo | Indometacina |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |
| LDA | Diisopropil amiduro de Litio (por sus siglas en inglés) |
| MeOH | Metanol |
| MMP | Metaloproteinasas de matriz (por sus siglas en inglés) |
| <i>n</i> -BuLi | <i>n</i> -Butil litio |
| NaHMDS | hexametildisilazuro de sodio |
| n.d | No determinado |
| ONS | Óxido nítrico sintasa |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés) |
| PASS | Prediction of Activity Spectra for Substances (Programa de predicción del espectro de actividad biológica de sustancias) |
| ppm | Partes por millón |
| PRRs | Receptores de reconocimiento de patrones (por sus siglas en inglés) |

| | |
|---------------------|---|
| r.d. | Relación diastereoisomérica |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| t.a. | Temperatura ambiente |
| THF | Tetrahidrofurano |
| TMS | Tetrametilsilano |
| TPA | 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol-13-acetato |
| QSAR | Relación cuantitativa estructura-actividad (por sus siglas en inglés) |
| δ | Desplazamiento químico |
| Δ | Calentamiento |
| RMN ^1H | Resonancia Magnética Nuclear de Protón |
| RMN ^{13}C | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 |
| RMN ^{31}P | Resonancia Magnética Nuclear de Fósforo 31 |

1. INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad articular inflamatoria, autoinmune, crónica y de curso progresivo, que produce discapacidad y disminución de la calidad de vida. Se presenta con más frecuencia en personas con una predisposición genética, sin embargo, no es hereditaria. Además, se han estudiado agentes infecciosos como bacterias y virus como posibles causantes, sin encontrar datos que lo prueben, por lo que su etiología aún es desconocida (Robinson *et al.*, 2016; McInnes, 2011).

Existen más de 100 tipos de artritis, siendo la osteoartritis y AR las más comunes. Los datos de prevalencia en el mundo indican que aproximadamente el 1% de la población la padece. Cabe señalar que la población de Europa y Asia es la más afectada (Davis y Matteson, 2012).

En México diversos estudios estatales, junto con estudios realizados por el Consejo Mexicano de Reumatología estiman que la frecuencia de este padecimiento oscila entre el 0.5 y 2%, estos datos indican que tres mujeres por cada hombre padecen AR, lo cual es un indicativo del riesgo de desarrollo de AR en mujeres para los próximos años. Otro dato relevante indica que seis millones de hogares en México dependen de una mujer, por lo que no solo afecta a quienes la padecen sino también a quienes dependen de ellas (INEGI, 2015).

Los problemas más serios a los que se enfrentan los pacientes es que un tercio de estos experimentan discapacidad laboral debido a la enfermedad, lo que conlleva a la pérdida de la capacidad para mantener su empleo. En cifras se estima que el 80% de los pacientes trabajan durante dos años después del comienzo de la enfermedad y sólo el 68% logra completar cinco años. Por otra parte, la expectativa de vida se acorta de 3 a 5 años, especialmente en pacientes con enfermedad extra articular como los nódulos reumatoides, la anemia y el síndrome del túnel carpiano y aquellos que desarrollan efectos adversos graves relacionados con el tratamiento (Wang *et al.*, 2017; Davis y Matteson, 2012).

Hoy en día, existen tratamientos como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES como ibuprofeno, naproxeno), fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad

(DMARDs, por sus siglas en inglés, como metotrexato, leflunomida), agentes inmunosupresores (ciclofosfamida), entre otros, los cuales sirven para retardar y disminuir la progresión, los síntomas y la discapacidad articular. Sin embargo, se sabe que tales fármacos presentan diversos efectos secundarios como malestar estomacal, úlcera, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, etc., por lo cual, hace falta desarrollar nuevos fármacos que superen estas desventajas (Tanwar *et al.*, 2017).

Por lo anterior, en el presente trabajo se realizó la síntesis y evaluación de la actividad antiinflamatoria de nuevos fosfonatos, en la búsqueda de mejores agentes antiartríticos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedad blanco.

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica y destructiva de las articulaciones, que provoca dolor e incapacidad en gran parte de la población en todo el mundo que la padece. Comienza con una inflamación aguda que al no tener una atención oportuna, puede dar origen a este padecimiento e incluso generar otras enfermedades inmunoasociadas como esclerosis múltiple, diabetes, entre otras (Ashley, Weil y Nelson, 2012). El tiempo de duración es relativamente corto de horas a días y consiste en tres etapas generales caracterizadas por la vasodilatación, exudación de líquido rico en proteínas (plasma) y migración de células (principalmente neutrófilos) al sitio de la lesión y, en algunos casos, la activación de la cascada de coagulación que se presentan en síntomas como el enrojecimiento, dolor, hinchazón y calor (Ashley *et al.*, 2012; Newton y Dixit, 2012; Sherwood y Toliver-Kinsky, 2004).

Existen fármacos para tratar los síntomas y contrarrestar la enfermedad, sin embargo muchos de ellos presentan efectos secundarios y no pueden ser administrados por periodos prologados (Laev y Salakhutdinov, 2015).

Los avances en la comprensión de la enfermedad han fomentado el desarrollo de nuevos compuestos con propiedades farmacológicas optimizadas que presenten mayor efecto antiinflamatorio y disminuyan los efectos secundarios; por ejemplo, celecoxib, fármaco inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa 2 (COX-2).

Antes de entrar en el proceso de elaboración de nuevos fármacos, es necesario definir términos como sustancia bioactiva, fármaco y medicamento.

Una sustancia bioactiva es una entidad química de origen natural o sintético que tiene un efecto farmacológico o toxicológico en humanos y animales (Suleria *et al.*, 2016; Wermuth, 2011).

Por otro lado un fármaco es toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presente en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento (Ley General de Salud, 2013).

A su vez, un medicamento se define como toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas (Ley General de Salud, 2013).

La generación de nuevas sustancias bioactivas tiene por objetivo el desarrollo de fármacos que sean seguros, eficaces y asequibles. Las fases del desarrollo de un nuevo fármaco consisten primeramente en la identificación de un problema de salud (enfermedad), identificación del blanco molecular, el diseño de los compuestos; posteriormente se realiza la síntesis seguida de la caracterización de las sustancias. Después se realiza la evaluación farmacológica mediante bioensayos, la identificación de su farmacodinamia y farmacocinética, perfil toxicológico, elaboración de patentes; y por último, las fases clínicas, tal como se describe en la Figura 1 (Roy, 2011).

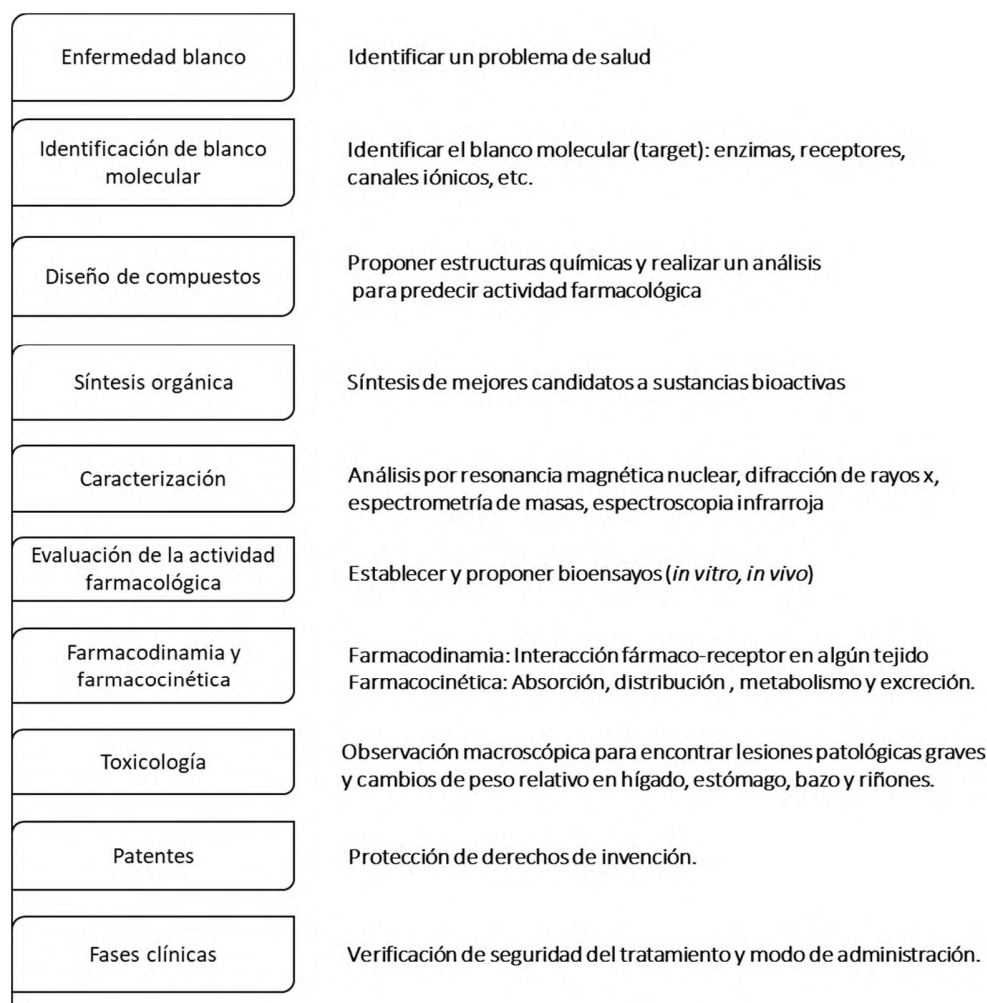


Figura 1. Función básica de la química farmacéutica. Modificada de Roy, 2011.

Cabe mencionar que el proceso completo es bastante regulado, costoso y por consecuencia lleva mucho tiempo realizarlo, por lo que el diseño de sustancias bioactivas, síntesis y evaluación de la actividad farmacológica es una buena base para la formulación de nuevos fármacos (DiMasi, Grabowski y Hansen, 2016; Guerrero y Jiménez, 2009).

Por lo tanto, en el presente proyecto se propone abordar las primeras fases del desarrollo de fármacos antiinflamatorios/antiartríticos, desde el diseño de nuevas sustancias bioactivas hasta su evaluación farmacológica.

2.2 Identificación de blanco molecular.

Para entender las moléculas implicadas en este padecimiento, es necesario conocer el mecanismo de la respuesta inflamatoria, principalmente aguda, para una acción preventiva temprana.

La inflamación es iniciada en minutos ante cualquier agente tóxico e infeccioso como parte del sistema inmune. Comienza con el reconocimiento de la infección por proteínas transmembranales llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) encontradas en células del sistema inmune, capaces de reconocer agentes biológicos (patrones moleculares asociados a patógenos PAMPs) y daños físicos o químicos (patrones moleculares asociados a daños DAMPs). Estas interacciones generan un estímulo que resulta en la transmisión de una señal al núcleo de la célula, resultando en la activación de genes inflamatorios a través de la transcripción y traducción de proteínas proinflamatorias denominadas citocinas, tales como interleucina-1-beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), entre otros. La función de las citocinas es marcar el sitio de daño para el reclutamiento de células efectoras como neutrófilos y monocitos. Una vez identificado el sitio de daño, las células residentes del tejido como macrófagos y mastocito se encargan de la liberación de histaminas, leucotrienos y prostaglandinas, que son sustancias que causan vasodilatación e incrementan la permeabilidad vascular, para así permitir el acceso de células efectoras y fluido rico en proteínas. Los neutrófilos y monocitos producen especies reactivas de oxígeno, especies nitrogenadas y proteinasas, creando de esta forma un ambiente citotóxico hacia el agente infeccioso o el tejido dañado. Por último, en el sitio del daño, células dendríticas, macrófagos y neutrófilos fagocitan partículas extrañas para finalmente ser sacrificados por apoptosis, en un proceso más extenso denominado polarización, y por último resolución de la inflamación (Ahmed, 2011; Ashley *et al.*, 2012; Newton *et al.*, 2012; Sherwood *et al.*, 2004).

En resumen, varias moléculas están implicadas en el desarrollo de la AR por ser un mecanismo de autoinmunidad del organismo. Se sabe de la participación de enzimas COX-2, citocinas, enzimas metaloproteinasas de matriz (MMP por sus siglas en inglés), factores de transcripción

(como NF-kB) y cinasas, las cuales pueden modular el proceso inflamatorio como se describe de manera general en la Tabla 1 (Laev y Salakhutdinov, 2015).

Tabla 1. Blancos moleculares y su mecanismo de acción en AR.

| Blanco molecular | Mecanismo de acción |
|--|--|
| Enzimas COX-2 | Producción de la prostaglandina vasodilatadora I2 (PGI ₂). Las prostaglandinas realizan funciones relacionadas con el dolor, la inflamación y el desarrollo de neoplasias. |
| Citocinas | Moléculas marcadoras del sitio de lesión. Aumentan el proceso inflamatorio. |
| Enzimas metaloproteinasas de matriz | Son endopeptidasas que contienen zinc en su sitio activo y desempeñan un papel clave en la degradación y reparación fisiológica y patológica del tejido. |
| Factor de transcripción (NF-kB) | Regula la expresión de una variedad de genes celulares implicados en la respuesta inflamatoria. |
| Cinasas | Son esenciales para el proceso de transducción de señales intracelulares y están asociadas con respuestas inmunes. |

2.3 Diseño de nuevas sustancias bioactivas.

Hoy en día, el diseño de la mayoría de las sustancias bioactivas sintéticas se basa en la correlación entre la estructura de una serie de compuestos y su actividad, mejor conocido como QSAR, acrónimo de Quantitative Structure Activity Relationship (Relación Cuantitativa Estructura-Actividad). Los métodos QSAR pueden ser divididos en dos categorías: Métodos topológicos/estadísticos y métodos de modelado molecular (Docking Molecular). Para el primer método se considera la estructura plana de la molécula y se utilizan técnicas estadísticas o de reconocimientos de patrones para encontrar una posible actividad biológica, por ejemplo el programa PASS, el cual se utiliza ampliamente en la planificación de ensayos *in vitro* o *in vivo*, investigación farmacéutica, consultoría estadística y bioestadística, y la investigación en salud, debido a la capacidad de predecir la probabilidad de una sustancia a presentar actividad en diferentes enfermedades por medio de un cribado en su base de datos (Filimonov *et al.*, 2014).

Por último, las reglas de Lipinski, permiten el diseño y optimización de sustancias bioactivas a partir de similitudes fisicoquímicas y estructurales que comparten la mayor parte de los fármacos administrados por vía oral. Las propiedades y criterios considerados para que un compuesto sea permeable a la membrana y fácilmente absorbido por el cuerpo, principalmente por administración vía oral se describen en la Tabla 2 (Sliwoski *et al.*, 2013; Leeson, 2012; Lipinski *et al.*, 1997).

Tabla 2. Reglas de Lipinski.

| Propiedad | Criterio |
|---|-----------------|
| Peso molecular | < 500 Da |
| Lipofilidad (el logaritmo del coeficiente de partición entre agua y 1-octanol) | logP < 5 |
| El número de grupos en la molécula que puede donar átomos de hidrógeno a enlaces de hidrógeno | < 5 |
| El número de grupos que pueden aceptar átomos de hidrógeno para formar enlaces de hidrógeno | < 10 |

Por otra parte, el *docking* molecular es aplicable en el diseño de nuevas sustancias bioactivas, en la ingeniería de proteínas y en la química de polímeros. El *docking* molecular considera las propiedades de las moléculas en tres dimensiones analizando su conformación y utilizando gráficos moleculares interactivos (Filimonov *et al.*, 2014; Sliwoski *et al.*, 2013).

Para el diseño de sustancias bioactivas para la AR, ambos modelos son apropiados, sin embargo se debe considerar que existe más de un blanco molecular en la enfermedad y que el *docking* molecular es específico en la interacción blanco molecular-ligando, por lo que el diseño podría implicar mayor inversión de tiempo. En este mismo contexto, el programa PASS compara la estructura propuesta con moléculas con actividad farmacológica probada de su base de datos, prediciendo la actividad farmacológica de los nuevos compuestos. Debido a lo anterior, el programa PASS se eligió en este trabajo para el diseño de nuevos agentes antiinflamatorios/antiartríticos.

2.4 Síntesis orgánica.

El origen de las sustancias bioactivas puede ser a partir de fuentes naturales como plantas, animales y microorganismos; biológicos, como cultivos celulares y mediante síntesis química. De 1981 a 2006, la FDA aprobó el 48% de 11,184 nuevas sustancias bioactivas propuestas como fármacos. Dentro de los fármacos aprobados el 5% proviene de productos naturales, 23% de derivados de productos naturales, 20% de compuestos miméticos naturales, y poco más del 50% se obtuvo mediante síntesis orgánica (Wang *et al.*, 2011).

La síntesis de nuevas sustancias bioactivas se ha desarrollado rápidamente en los últimos años con el avance de la química combinatoria y la tecnología de diseño de sustancias bioactivas asistida por ordenador. Actualmente existen bibliotecas con más de 166×10^9 fórmulas estructurales realizadas *in silico*¹, las cuales posibilitan la producción de nuevos compuestos bioactivos (Yang *et al.*, 2017; Filimonov *et al.*, 2014; Sliwoski, *et al.*, 2013).

Dentro de las ventajas de la síntesis orgánica está el control racional de los reactantes empleados, su adición en cualquier lapso del proceso, el manejo de la temperatura en algunos casos, el desarrollo de nuevas reacciones que permitan descubrir rutas de síntesis que mejoren las propiedades físicas, químicas, ópticas y catalíticas de los productos y los hagan mejores como sustancias bioactivas, y quizá la más importante, la síntesis de sustancias que no existen en la naturaleza (Shamaila *et al.*, 2016; Laev y Salakhutdinov, 2015).

2.5 Caracterización.

La caracterización de las sustancias bioactivas tendrá como finalidad conocer su composición, masa molar, grupos funcionales y su estructura, por lo que es fundamental conocer la estructura molecular de los compuestos previo a la evaluación de su actividad farmacológica.

La determinación de las propiedades físicas como el punto de fusión (para compuestos sólidos) y la rotación específica (para compuestos quirales) son herramientas indispensables para la

1. * Hecho por computadora o vía simulación computacional

caracterización de nuevas sustancias bioactivas, así como la aplicación de técnicas de análisis instrumental, tales como espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de rayos X (DRX), espectrometría de masas (EM) y espectrometría de infrarrojo (IR) (Skoog *et al.*, 2001).

La espectrometría de IR es una herramienta para la determinación estructural de especies orgánicas y bioquímicas mediante la identificación de los grupos funcionales que la conforman. Por otro lado, la EM es una herramienta versátil y muy utilizada para determinar la relación masa/carga (m/z) e indirectamente la masa molar, así como el patrón de fragmentación característico del compuesto. Así también, la espectrometría de RMN es una técnica no destructiva que proporciona información estructural del compuesto a partir de núcleos de elementos como: el hidrógeno (^1H), carbono (^{13}C), nitrógeno (^{15}N), fósforo (^{31}P) y flúor (^{19}F). Por su parte, la difracción de rayos X estudia y analiza sustancias en estado sólido determinando polimorfismos, transiciones de fase, y medida del tamaño de partícula. Toda fase cristalina presenta una huella dactilar que es su difractograma y si esa fase sufre un cambio de su estructura o en su composición química, su huella dactilar cambiará (Skoog *et al.*, 2001).

2.6 Evaluación de la actividad farmacológica de nuevas sustancias bioactivas.

Parte crucial en el desarrollo de fármacos es la evaluación de nuevas sustancias bioactivas para determinar su actividad farmacológica. Estos métodos de evaluación pueden clasificarse de manera general en evaluación *in vivo* e *in vitro*, principalmente, y se describen específicamente en la Figura 2. Cabe mencionar que la elección de los modelos está en función de las características de la enfermedad (Yang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2011).

Para el caso de la AR, el estudio *in vivo* en rata y ratón son modelos animales comúnmente utilizados por su similitud en las características fisiopatológicas y clínicas a la de los pacientes, demostrando la eficacia, los efectos secundarios y la toxicidad de las nuevas sustancias bioactivas (Yang *et al.*, 2017; Gutiérrez *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2011).

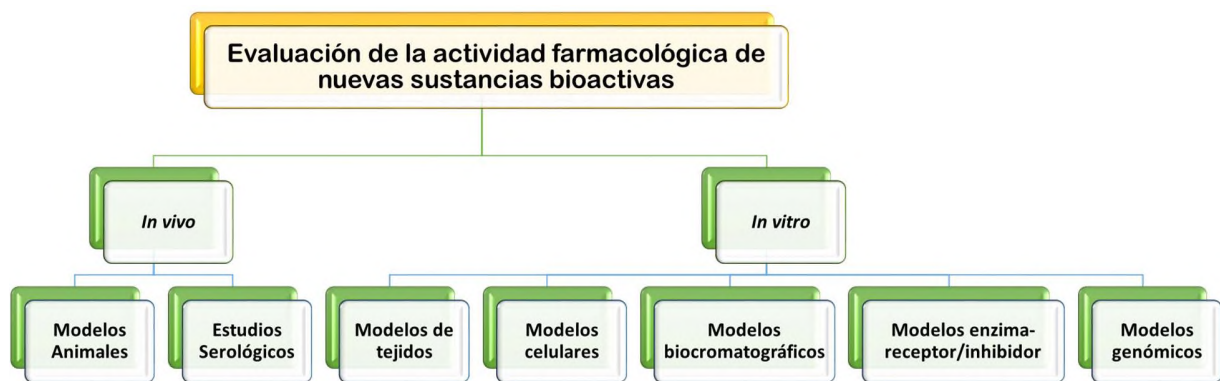


Figura 2. Diagrama de los modelos de evaluación de la actividad farmacológica de nuevas sustancias bioactivas. Modificada de Wang *et al.*, 2011.

3. ANTECEDENTES

3.1 Fármacos empleados actualmente en el tratamiento de la AR.

Actualmente no existe cura para la AR, los tratamientos están encaminados a mitigar los síntomas, restringir el progreso del padecimiento, proporcionando una mejor calidad de vida.

Los principales agentes antiartríticos pueden clasificarse en: opioides, glucocorticoides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad. La Figura 3 muestra su clasificación como primera y segunda línea de tratamiento.

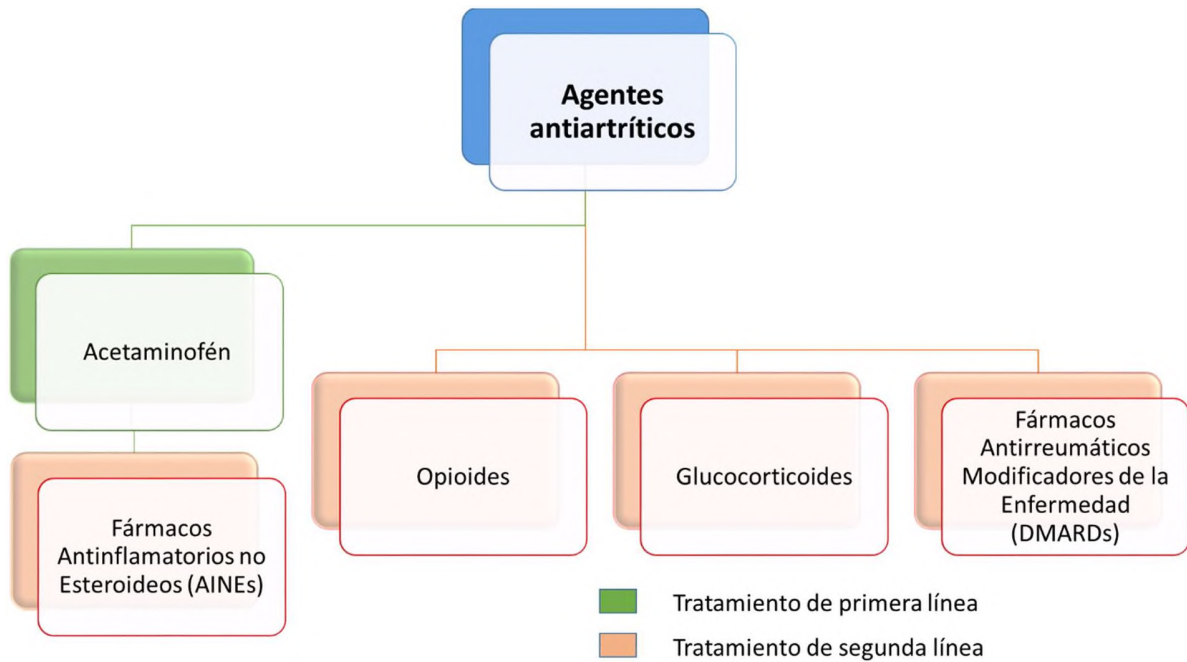


Figura 3. Agentes antiartríticos y su aplicación como primera y segunda línea en el tratamiento. Tomada de Laev y Salakhutdinov, 2015; Cheng y Visco, 2012; Hameed y Ihm, 2012.

3.1.1. Acetaminofén.

Acetaminofén o paracetamol (Figura 4), es el fármaco utilizado como primera línea por su perfil de seguridad relativamente seguro. El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (ONS), receptores de la sustancia P y la síntesis de prostaglandinas.

La enzima ONS aumenta los niveles de óxido nítrico que están asociados con la inflamación en osteoartritis. Los receptores de la sustancia P están asociados a la percepción del dolor, mientras que las prostaglandinas se asocian con procesos inflamatorios y otras funciones clave relacionadas con la resorción de hueso y la modulación de la secreción gástrica. Sus efectos en la inflamación son mínimos actuando mejor como analgésico, y aunque es relativamente seguro, estudios demuestran que pueden aumentar la probabilidad o la progresión de una enfermedad renal, además de que un metabolito del paracetamol es hepatotóxico, por eso no debe administrarse indiscriminadamente (Cheng y Visco, 2012).

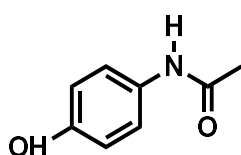


Figura 4. Estructura de acetaminofén o paracetamol.

3.1.2. Fármacos Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs).

Son usados como fármacos de segunda línea para el alivio de dolores moderados a fuertes. Actúan como inhibidores de COX-1 y COX-2, por lo cual pueden ser clasificados en 2 tipos: selectivos (inhibición de COX-2) y no selectivos (inhibición de COX-1, COX-2) (Laev y Salakhutdinov, 2015).

Dentro de los AINEs no selectivos podemos encontrar al ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno, entre otros (Figura 5), ampliamente utilizados en el tratamiento del dolor y la inflamación. Su mecanismo consiste en la inhibición de COX-1 y COX-2, las cuales catalizan la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas, esta última, una de sus funciones es la regulación de la actividad del aparato digestivo, por lo que sólo pueden administrarse durante períodos cortos, ya que su uso prolongado produce ulceración gástrica (Cheng y Visco, 2012; Laev y Salakhutdinov, 2015).

Los fármacos celecoxib, rofecoxib y valdecoxib (Figura 5) son inhibidores altamente selectivos de la enzima COX-2. Esta enzima reduce la síntesis de la prostaglandina vasodilatadora I₂ (PGI₂),

siendo su función principal la prevención de la formación y agregación de trombocitos en relación con la coagulación de la sangre. Aunque evita la ulceración gástrica, estos fármacos están asociados con un alto riesgo de infartos al miocardio y accidentes cerebrovasculares, motivo por el cual rofecoxib y valdecoxib fueron retirados del mercado en 2004 y 2005, respectivamente (Laev y Salakhutdinov, 2015; Wermuth, 2011).

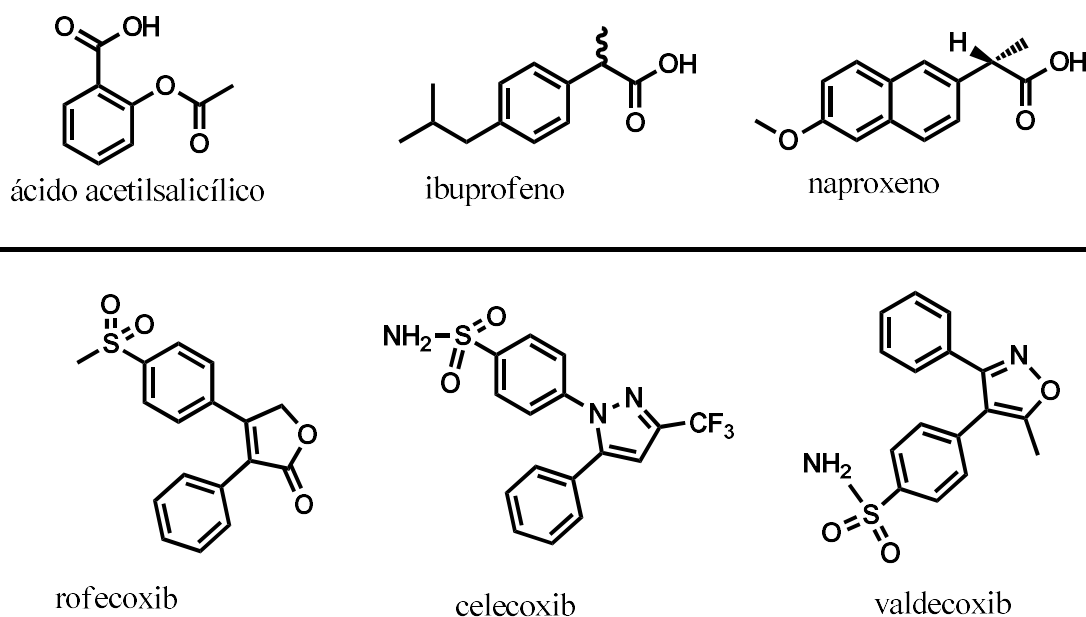
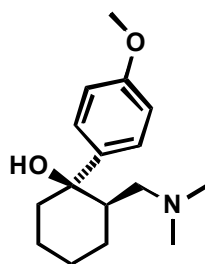


Figura 5. Fármacos Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs) selectivos y no selectivos.

3.1.3. Opioides.

Tramadol (Figura 6) es el fármaco opioide más empleado, aprobado para el tratamiento de dolor de moderado a severo y es recomendado para pacientes no tolerantes a acetaminofén y AINEs. Es un agonista opioide débil de origen sintético, que posee alrededor de un décimo de potencia de la morfina y es comparable con la codeína. Inhibe la recaptación de norepinefrina y serotonina, ayudando así a aliviar el dolor. Es utilizado con extrema precaución en la población geriátrica debido al aumento de la prevalencia de osteoartritis moderada a severa, y son más susceptibles a la sedación, la confusión y el estreñimiento, por lo cual no se recomiendan para el uso crónico (Laev y Salakhutdinov, 2015; Cheng y Visco, 2012).

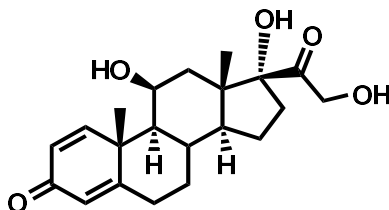


Tramadol

Figura 6. Tramadol, un opioide empleado en el tratamiento de la AR.

3.1.4. Glucocorticoides.

Actúan como agentes antiinflamatorios e inmunosupresores. La prednisolona (Figura 7) es el glucocorticoide de origen sintético más empleado. De manera general la acción de estos fármacos producen cambios en los niveles de glóbulos blancos, alteran los niveles de citocinas y enzimas reduciendo derivados proinflamatorios como prostaglandinas, leucotrienos, bradiquininas e histaminas; específicamente para la prednisolona su principal efecto consiste en inhibir la expresión de múltiples genes inflamatorios (citocinas, enzimas, receptores y moléculas de adhesión), por lo cual la reducción de estos mediadores ayudan a explicar la disminución del dolor en pacientes. No obstante, se ha demostrado que el uso de estos fármacos tiene efectos colaterales como cataratas, hipertensión, niveles elevados de glucosa en sangre (para personas diabéticas) y están asociados con el síndrome de Cushing (aumento de peso, cara de luna, piel fina, debilidad muscular, huesos frágiles) (Laev y Salakhutdinov, 2015; Hameed y Ihm, 2012).



Prednisolona

Figura 7. Prednisolona, un glucocorticoide empleado en el tratamiento de la AR.

3.1.5. Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad.

El mayor tratamiento farmacológico para la AR son los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs, por sus siglas en inglés). Estos fármacos han demostrado retrasar la progresión de la enfermedad, incluyendo la destrucción de las articulaciones. Dentro de este grupo se encuentran: azatioprina, sulfasalazina, leflunomida, D-penicilamina y metotrexato (Figura 8), este último como el de mayor uso. El metotrexato impide la síntesis de *ново* de purinas y pirimidinas, necesaria para la síntesis de ADN y ARN, y por consiguiente inhibe la proliferación celular de los linfocitos implicados en el proceso de inflamación. Además, las propiedades antiinflamatorias se ejercen mediante un aumento de la citocina antiinflamatoria interleucina 10 (IL-10) que disminuye y regular la respuesta inflamatoria, y por la inhibición del factor nuclear potenciador de células B (NF-κB) (molécula proinflamatoria). Sin embargo su administración está relacionada con ulceración bucal, náusea, fatiga, toxicidad renal, entre otras (Tanwar *et al.*, 2017; Ragab *et al.*, 2016; Laev y Salakhutdinov, 2015).

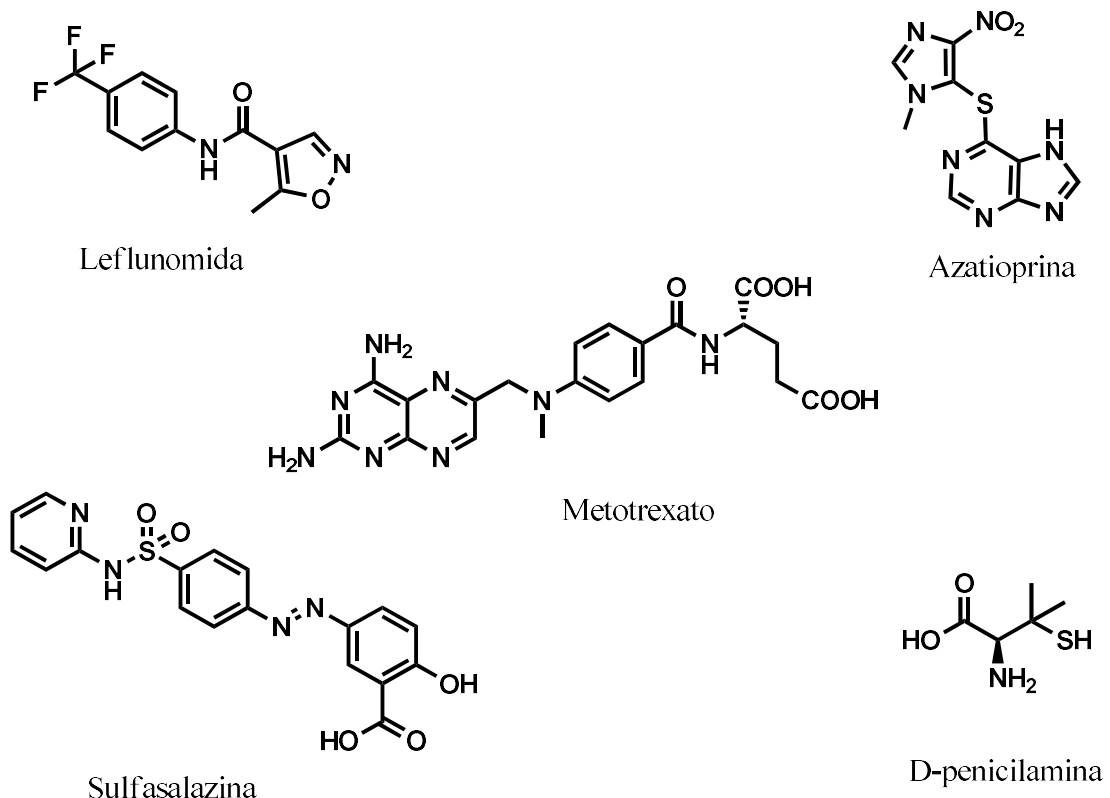


Figura 8. Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad.

3.2. Identificación de nuevos blancos moleculares.

La inflamación se desencadena cuando las células inmunes, mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) en la superficie celular y en el citoplasma, responden a estímulos debido a patógenos o daños en el organismo y activan los factores de transcripción NF- κ B, AP1, CREB, c/EBP, y IRF. A su vez, estos genes codifican proteínas como: citocinas, moléculas de adhesión, metaloproteinasas de matriz y cinasas extracelulares. Estas proteínas promueven el reclutamiento y la activación de leucocitos, los cuales son críticos para eliminar partículas extrañas, sin embargo en el caso de la AR (enfermedad autoinmune) es contraproducente. Por todo esto, la inhibición de citocinas, de enzimas metaloproteinasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés), de factores de transcripción (como NF- κ B) y de cinasas, han surgido como nuevos blancos moleculares, para el desarrollo de agentes antiartríticos potenciales. En este sentido vale la pena mencionar que algunos ácidos fosfónicos y sus derivados (Figura 9) han resultado de especial interés en el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de la AR (Laev y Salakhutdinov, 2015; Newton y Dixit, 2012).

3.3. Ácidos fosfónicos y fosfonatos.

Los ácidos fosfónicos y fosfonatos son sustancias orgánicas que resultan de la sustitución del átomo de oxígeno que une la unidad de fosfato en un esqueleto orgánico ($R-O-P(O)-(O)_2^{2-}$), por un átomo de carbono ($R-C-P(O)-(O)_2^{2-}$), haciéndolo químicamente más estable y resistente a la descomposición mediante hidrólisis enzimática. La Figura 9 muestra la estructura general de los fosfonatos (Galezowska *et al.*, 2012).

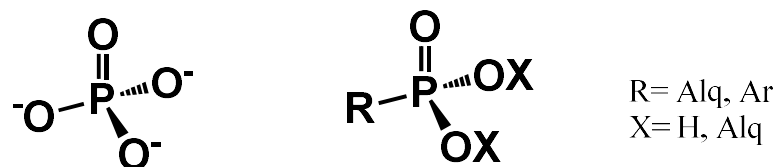


Figura 9. Estructura general del grupo fosfato y fosfonato.

Se sabe de la fuerte relación estructural de los fosfonatos con varios compuestos naturales, además de la fuerte afinidad a iones metálicos, lo que les confiere alta estabilidad y baja toxicidad y les permite competir como inhibidores de sitios activos de enzimas. Por su parte, los bisfosfonatos (dos fosfonatos unidos a un átomo de carbono), son estructuras aún más estables que los fosfonatos, más resistentes a la degradación por hidrólisis enzimática y adecuados para el uso en estudios *in vivo*. Con respecto a la cadena lateral R, permite la introducción de numerosos sustituyentes para la síntesis de un gran número de compuestos con diferentes propiedades. Estas características en conjunto, permiten considerar que los fosfonatos y sus derivados son excelentes candidatos para la generación de nuevas sustancias bioactivas (Galezowska *et al.*, 2012).

3.3.1. Fosfonatos como inhibidores de citocinas.

Harnett y colaboradores sintetizaron una biblioteca de moléculas pequeñas similares a fosforilcolina (**a**), el producto antiinflamatorio de *Acanthocheilonema viteae*, donde el derivado **1**, mostró actividad como inhibidor de citocinas (involucradas en procesos de inflamación) evitando la activación de macrófagos (Figura 10) (Al-riyami *et al.*, 2013).



Figura 10. a) Estructura de fosforilcolina y el derivado de ácido fosfónico compuesto **1**, inhibidor de citocinas.

3.3.2. Fosfonatos como inhibidores de metaloproteinasas de matriz.

Dive y colaboradores sintetizaron inhibidores de metaloproteinasas de matriz con base en la química de péptidos fosfónicos. Los resultados mostraron que el derivado **2** fue un potente inhibidor de MMP-8, mientras que el derivado **3** resultó un potente inhibidor y altamente selectivo, capaz de diferenciar MMP-11 de otras metaloproteinasas principalmente (Figura 11) (Matziari *et al.*, 2004; Vassiliou *et al.*, 1999).

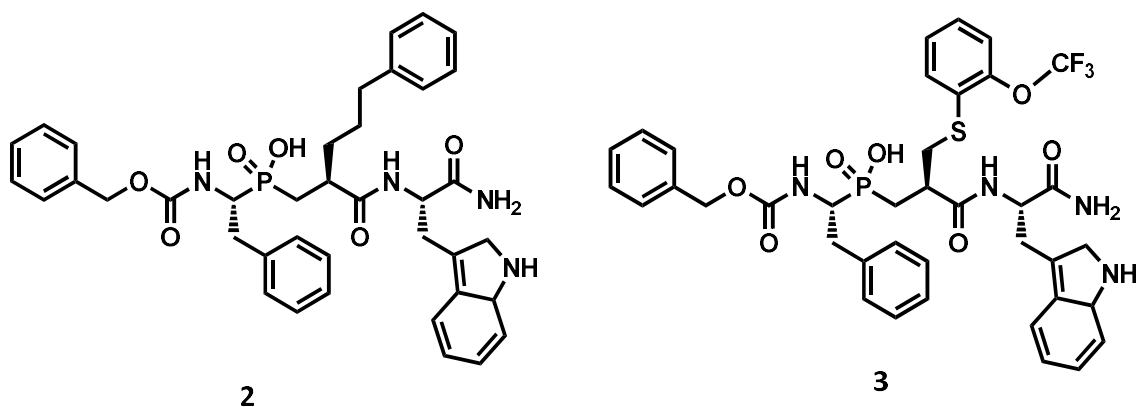


Figura 11. Péptidos fosfónicos, **2** inhibidor de MMP-8 y **3**, inhibidor de MMP-11.

Por su parte, Mazza y colaboradores determinaron la inhibición de tres metaloproteinasas (MMP-2, MMP-3 y MMP-8), desarrollando el derivado **4**, cuya actividad fue selectiva contra MMP-8; cabe mencionar que el isómero *R* mostró un incremento en la actividad 10000 veces mayor que el *S* (Pochetti *et al.*, 2006).

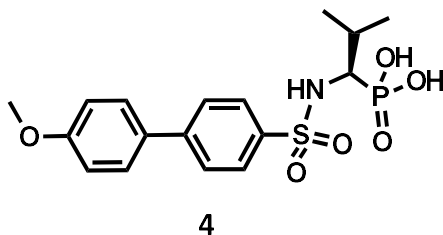


Figura 12. Derivado **4**, inhibidor potente de MMP-8.

3.3.3. Fosfonatos como inhibidores de cinasas.

Németh y colaboradores sintetizaron los derivados **5-8** y probaron su eficacia como inhibidores específicos para la enzima cinasa CDK9/CycT1, hallando los mejores resultados con los derivados **7** y **8**, convirtiéndolos en potenciales agentes antiartríticos (Németh *et al.*, 2014).

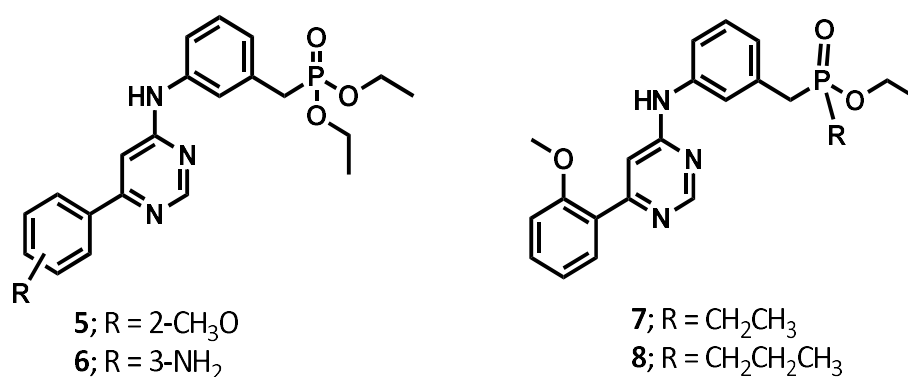


Figura 13. Inhibidores de cinasa CDK9/CycT1. Derivados 5-8.

3.3.4. Fosfonatos y vinilfosfonatos con actividad antiinflamatoria.

Wafaa y colaboradores reportan la actividad antiinflamatoria de nuevos α -aminofosfonatos, diseñados a partir de su predicción farmacológica obtenida mediante el programa PASS. Las propiedades antiinflamatorias de los fosfonatos fueron evaluadas usando el modelo de inflamación sistémico, induciendo edema subplantar con carragenina. Los tratamientos fueron administrados en dosis de 100 mg/kg de peso, usando indometacina como fármaco de referencia. El edema fue medido en intervalos de tiempo de 90, 180, 270 y 360 minutos. Los resultados mostraron que los fosfonatos **9**, **10**, **11a-c** y **12** tuvieron una potencia en la inhibición de la inflamación de 99 a 117% cuando se compararon con el fármaco de referencia (100%) después de 360 min (Figura 14) (Wafaa *et al.*, 2012).

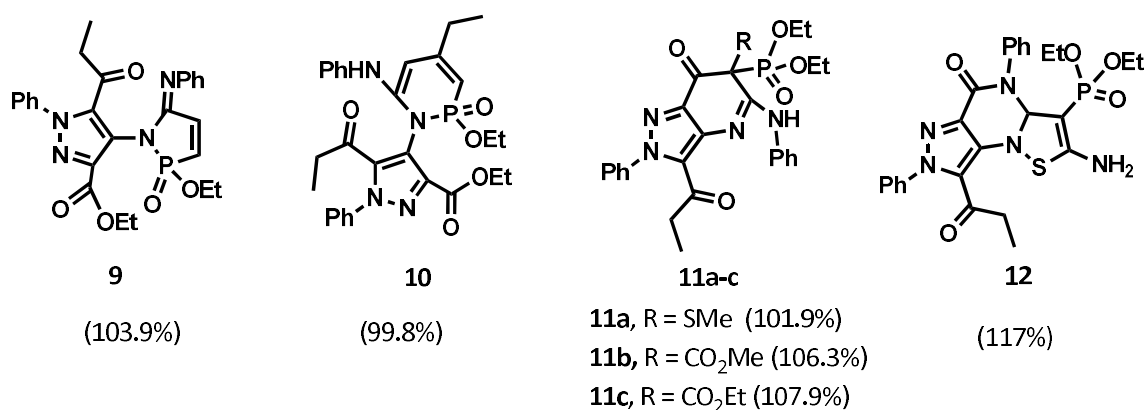
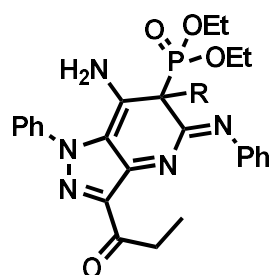


Figura 14. Fosfonatos **9**, **10**, **11a-c** y **12** con actividad antiinflamatoria *in vivo*.

Este mismo autor en 2015, reporta la actividad antiinflamatoria de nuevos fosfonatos, utilizando el mismo modelo de inflamación y condiciones similares. Los compuestos **13a-d**, **14a** y **14b** presentaron una potencia de 90 a 139% en la inhibición de la inflamación comparado con el fármaco de referencia (100%) después de 360 min (Figura 15) (Wafaa *et al.*, 2015).



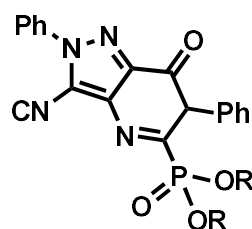
13a-c

13a, R = CO₂Me (110.7%)

13b, R = CO₂Et (127%)

13c, R = C(S)NH₂ (139%)

13d, R = SMe (133.5%)



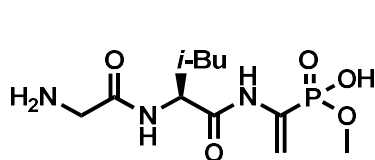
14a-b

14a, R = Me (93.6%)

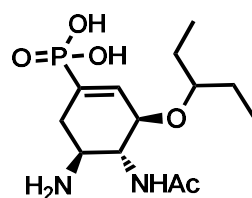
14b, R = Et (90.8%)

Figura 15. Fosfonatos **13a-c** y **14a-b** con actividad antiinflamatoria *in vivo*.

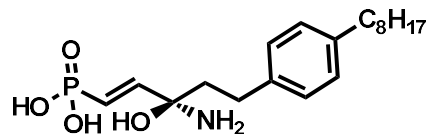
Por otro lado, también llaman la atención los compuestos que contienen en su estructura el fragmento vinilfosfonato (Figura 16). Por mencionar algunos ejemplos de vinilfosfonatos como moléculas con propiedades farmacológicas se encuentra el dehydrophos **15**, como antibiótico de amplio espectro; tamifosfor **16**, inhibidor de neuramidasa (antiviral, tratamiento de influenza), y el inhibidor de quinasa esfingosina (enfermedad de Huntington) FTY720-vinilfosfonato **17** (Figura 16) (Adler *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014).



15



16



17

Figura 16. Moléculas **15**, **16** y **17** que comparten el fragmento vinilfosfonato.

Quntar y colaboradores reportan la síntesis y evaluación de la actividad antiinflamatoria de los vinilfosfonatos **18**, **19** y **20**, midiendo su capacidad de bloquear la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), óxido nítrico (ON) y la liberación de la citoquina factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), a partir de cultivos de macrófagos murinos. Los resultados mostraron capacidad de los tres compuestos para inhibir significativamente la generación de EROs, ON y TNF- α . Sin embargo, el compuesto **20** fue el más activo para la supresión de EROs y ON, mientras que los compuestos **18** y **19** tuvieron mejor efecto contra TNF- α (Figura 17) (Quntar *et al.*, 2007).

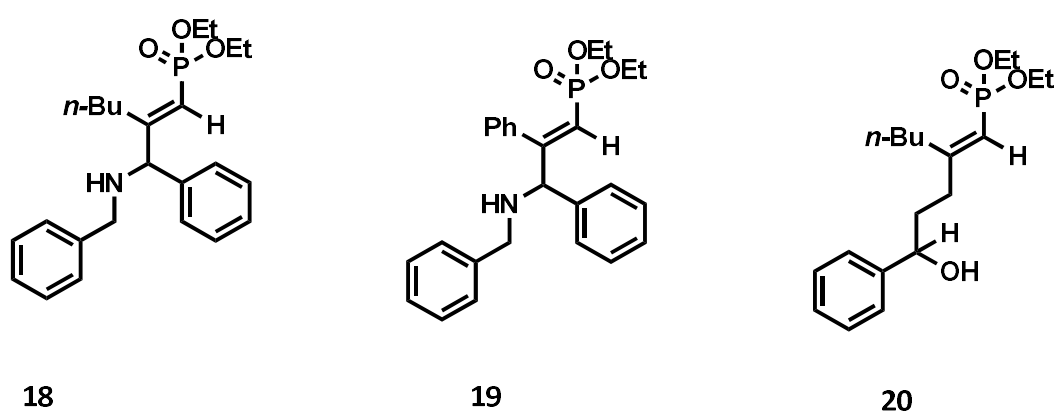


Figura 17. Vinilfosfonatos **18**, **19** y **20** con actividad antiinflamatoria *in vitro*.

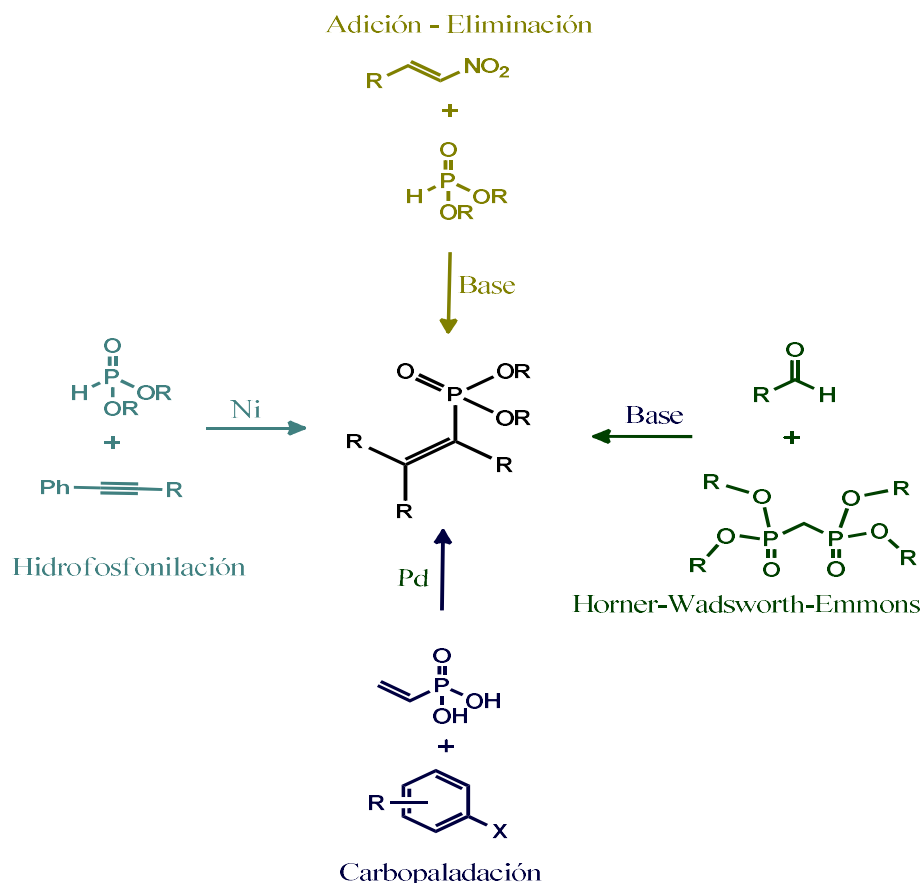
3.4. Síntesis de fosfonatos.

Los métodos para la síntesis de los vinilfosfonatos son extensos y dependen del enlace a formar, los mayormente documentados en la literatura son mediante la formación del enlace carbono-carbono o carbono-fósforo (Figura 18).



Figura 18. Representación del dominio vinilfosfonato y descripción de los enlaces presentes.

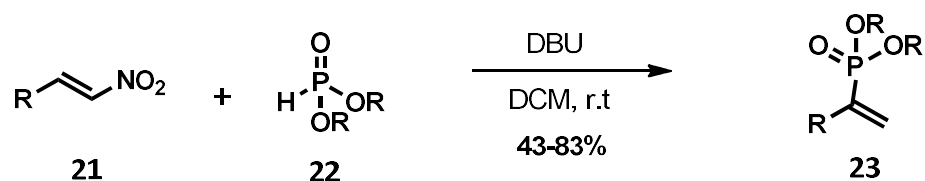
A continuación se describen los métodos generales para la síntesis de vinilfosfonatos (Esquema 1) y algunos ejemplos de ellos.



Esquema 1. Métodos generales para la síntesis de vinilfosfonatos.

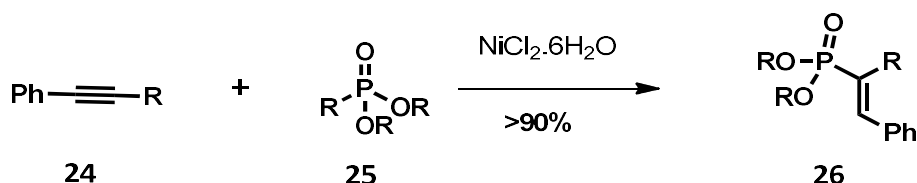
El Esquema 1 en general, muestra cuatro tipos de reacción para sintetizar vinilfosfonatos: Hidrofosfonilación, carbopaladación, reacción de Horner-Wadsworth-Emmons y adición-eliminación.

Por ejemplo, Chen H. y colaboradores describen una reacción de adición-eliminación para la síntesis de vinilfosfonatos terminales **23**. Utilizaron diferentes (*E*)- β -nitroalquenos **21** y fosfonatos **22**, encontrando rendimientos de reacción de moderados a buenos (43-83%), con condiciones suaves al utilizar 1,8-Diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU, por sus siglas en inglés) como base, diclorometano como disolvente a temperatura ambiente (Esquema 2) (Chen *et al.*, 2014).



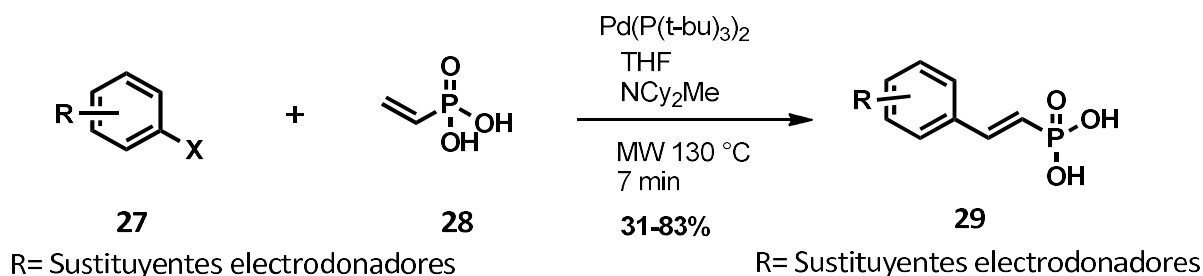
Esquema 2. Reacción adición-eliminación para la síntesis de vinilfosfonatos terminales **23**.

Islas y García reportan la síntesis de vinilfosfonatos a partir de la formación del enlace C-P mediante hidrofosfonilación (Esquema 3) usando diferentes alquinos **24** y fosfitos **25**, a través de un sistema catalítico basado en Ni. Los rendimientos fueron altos (>90%), así también su elevada estereoselectividad favoreciendo la configuración (*E*)-**26** (Islas y García, 2017).



Esquema 3. Reacción hidrofosfonilación para la síntesis de vinilfosfonatos **26**.

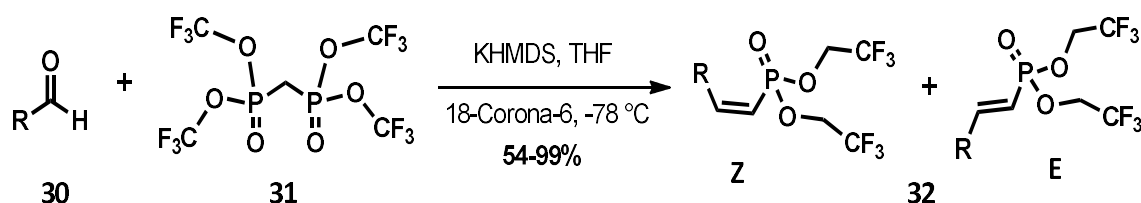
También es interesante la síntesis de compuestos vinilfosfonatos **29**. McNichols y colaboradores mediante una reacción de carbopalmación (Esquema 4), sintetizaron una amplia variedad de estos compuestos, los cuales fueron sintetizados a partir del acoplamiento directo de haluros de arilo (con sustituyentes electrodonadores) **27** con el ácido vinilfosfónico **28** catalizado con paladio. Los rendimientos fueron de moderados a buenos (31-83%) con una alta formación del isómero *E* (McNichols *et al.*, 2017).



Esquema 4. Reacción de carbopalmación para la síntesis de vinilfosfonato **29**.

Por otro lado, Davis y colaboradores describieron la preparación de vinilfosfonatos a través de la formación del doble enlace C=C, mediante la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)

(Esquema 5). Para ello utilizaron el bisfosfonato **31** con diferentes aldehídos **30**, hexametildisilazuro de potasio/18-corona-6 como base, THF como disolvente, a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los rendimientos fueron de moderados a muy buenos (54-99%), obteniendo (*Z*)-**32** como producto mayoritario (Esquema 5) (Davis *et al.*, 1998).



Esquema 5. Reacción Horner-Wadsworth-Emmons para la síntesis de vinilfosfonatos **32**.

Ahora bien, la configuración *E-Z* de las moléculas está relacionada con su actividad biológica, por lo cual es necesario asignarla. Para ello es necesario separar los diastereoisómeros de la mezcla de reacción, de lo contrario, asignar la proporción de la mezcla. Esta determinación es fácil de hacer por RMN de ^1H y ^{13}C a través de la constante de acoplamiento entre fósforo-hidrógeno ($J_{\text{H-P}}$) y fósforo-carbono ($J_{\text{C-P}}$) en la posición β . La constante de acoplamiento entre $J_{\text{H-P}}$ es de 30 a 50 Hz para la configuración *Z* y 10 a 30 Hz en la configuración *E*. La constante de acoplamiento $J_{\text{C-P}}$ para el isómero *E* es de 14 a 22 Hz, mientras que para el *Z* es de 5 a 7 Hz (Figura 19) (Adler *et al.*, 2014).

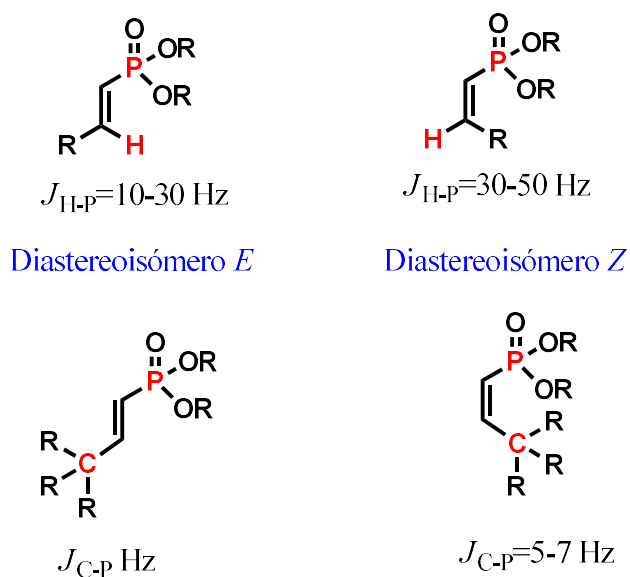


Figura 19. Constantes de acoplamiento de los diastereoisómeros *E* y *Z* de vinilfosfonatos.

4. JUSTIFICACIÓN

La AR es un padecimiento que actualmente afecta a muchos mexicanos en edad productiva, implicando un deterioro en su calidad de vida, mermando su productividad laboral y elevando los costos de salud pública dirigidos a mitigar los síntomas y avance de la enfermedad. No existe una cura para este trastorno y los fármacos que clásicamente se han empleado presentan limitaciones, principalmente la manifestación de importantes efectos colaterales. Como parte de la búsqueda continua de mejores agentes antiartríticos, se propuso en el presente proyecto la síntesis y evaluación de la actividad antiinflamatoria de nuevos vinilfosfonatos.

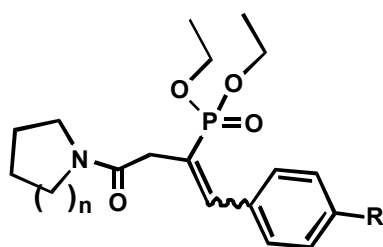
5. HIPÓTESIS

La síntesis de nuevos vinilfosfonatos **33-36** permitirá obtener sustancias bioactivas, que presentarán actividad antiinflamatoria en ensayos de inflamación aguda en ratones Balb/C, generando potenciales agentes antiartríticos.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general.

Sintetizar, purificar, caracterizar y evaluar la actividad antiinflamatoria de los vinilfosfonatos **33-36** derivados de pirrolidina y piperidina, en busca de nuevos agentes terapéuticos potenciales en el tratamiento de la AR.



33; R = 4-OCH₃ (*E*), n=1

34; R = 4-OCH₃ (*Z*), n=1

35; R = 4-NO₂ (*E*), n=1

36; R = 4-NO₂ (*E*), n=2

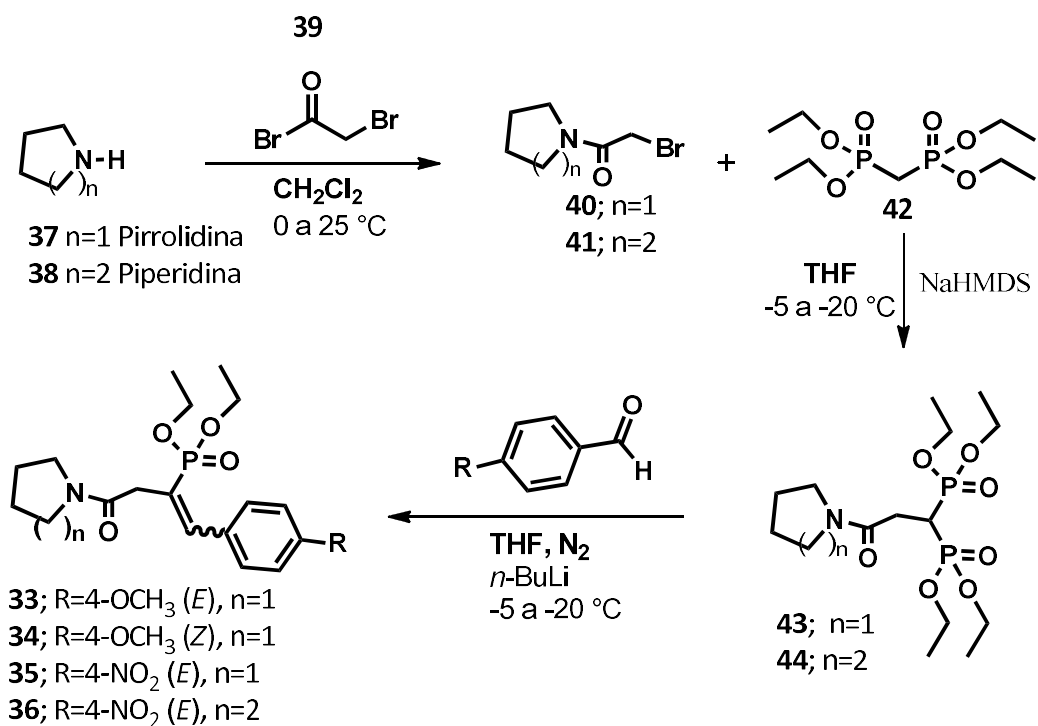
6.2. Objetivos específicos.

1. Sintetizar los productos objetivo **33-36** mediante una secuencia de tres pasos, primero la formación de las amidas **40** y **41**, posteriormente la preparación de los bisfosfonatos **43** y **44** y por último, su conversión en los productos **33-36** mediante la reacción Horner-Wadsworth-Emmons.
2. Purificar los productos de reacción **33-36**, **40-41** y **43-44** por cromatografía en columna.
3. Caracterizar los productos **33-36** mediante espectrometría de RMN y espectrometría de masas.
4. Evaluar la actividad antiinflamatoria de los productos **33-36** en un modelo *in vivo* con ratones machos Balb/C por inducción de inflamación aguda con 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y carragenina.

7. METODOLOGÍA

7.1. Síntesis orgánica.

Se propuso la obtención de los compuestos objetivo **33-36** mediante la siguiente ruta de síntesis: se inició con la amidación de pirrolidina o piperidina (**37** y **38**) con bromuro de bromoacetilo **39**, para obtener los productos **40** y **41**. Posteriormente, se procedió a la C-alkilación del metilenbisfosfonato de tetraetilo **42** con los intermediarios **40** y **41**, utilizando diferentes bases y condiciones de reacción, para obtener los bisfosfonatos **43** y **44**. Luego, los bisfosfonatos **43** y **44** se hicieron reaccionar con una base y un benzaldehído (reacción de Horner-Wadsworth-Emmons) para obtener los vinilfosfonatos **33-36** (Esquema 6).



Esquema 6. Ruta de síntesis propuesta para la obtención de los compuestos objetivo **33-36**.

7.2. Evaluación de la actividad antiinflamatoria aguda.

Esta actividad se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS-Cd. México). Se utilizaron ratones machos y hembras Balb/C de 25 ± 3 g de peso provenientes del bioterio del CMN siglo XXI, IMSS, los cuales se mantuvieron en ciclos de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura controlada de 25 ± 2 °C, con un porcentaje de humedad de 55-80%, con agua y alimento RodentChow *ad libitum*. El manejo de los animales de experimentación fue apegado a los estatutos del Comité Internacional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) revisada en agosto del 2016. Como análisis preliminar, los modelos de inflamación se realizaron una sola vez. Cada compuesto fue administrado por separado a sus dosis correspondientes.

- Inducción del proceso inflamatorio agudo con 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).

En este experimento se indujo el edema auricular con la aplicación de TPA siguiendo la metodología descrita por Pérez-González y colaboradores (2017); como control positivo se empleó indometacina aplicada por vía tópica disuelta en acetona. Para este ensayo se formaron cinco grupos de 6 ratones hembras c/u, a todos los grupos se les administró en la oreja derecha con 50 μ L de acetona (vehículo) y en la oreja izquierda con 50 μ L de TPA (0.05 μ g/ μ L) y después de 30 min se le administraron los tratamientos como se describe a continuación: grupo I (control TPA) aplicando en la oreja izquierda únicamente el vehículo (acetona), grupo II (fármaco de referencia) se le aplicó indometacina a dosis de 2 mg/oreja disuelto en 50 μ L de acetona y los grupos III, IV y V recibieron 50 μ L del compuesto **33-36** y **43-44** en dosis de 2 mg/oreja disuelto en acetona. Seis horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente se obtuvo el tejido auricular de ambas orejas realizando cortes de 6 mm de diámetro. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la diferencia del peso entre ambas orejas con respecto al grupo control. La inflamación se comprobó como el incremento en el peso de la oreja en donde se aplicó el TPA de acuerdo a las fórmulas reportadas por Pérez-González y colaboradores (2017), calculando el porcentaje de inhibición de inflamación con la siguiente fórmula:

$\% \text{ de inhibición} = [(W_s - W_o) \text{ Control} - (W's - W_o) \text{ Tratamiento} / (W_s - W_o) \text{ Control}] \times 100.$

W_o = Peso de la oreja derecha tratada únicamente con el vehículo.

W's = Peso de la oreja izquierda tratada únicamente con TPA disuelto en el vehículo (control positivo).

W_s = Peso de la oreja izquierda tratada con TPA y los tratamientos disueltos en el vehículo.

- Inducción del proceso inflamatorio agudo con Carragenina.

Para este estudio se utilizó la metodología descrita por Pérez-González y colaboradores (2017); para ello se formaron grupos de 5 ratones machos seleccionados al azar que se administraron de la siguiente forma, Grupo I: control de carragenina que recibió únicamente el vehículo, Grupo II: tratado con indometacina (20 mg/kg) vía oral (v.o) solubilizado en SSI, Grupos III-VI: tratados con el compuesto **33-36** y **43-44** a dosis de 50 mg/kg por v.o. Todos los tratamientos se administraron una hora antes de la carragenina (agente flogístico, 2%, disuelta en SSI). El vehículo elegido para solubilizar las muestras problema fue un sistema compuesto por Tween 80:Agua (1:9) y se administraron en un volumen no mayor a 10 mL/kg de peso por v.o. A cada grupo se le administró 20 µL de carragenina al 2% disuelta en SSI vía subcutánea (s.c.) en el cojinete plantar.

El desarrollo del edema se registró midiendo el diámetro del mismo con un micrómetro digital cada hora. El tiempo cero se consideró como la medición del cojinete antes de la aplicación de la carragenina y los tiempos posteriores correspondieron a las 1, 3, 5 y 7 h después de la administración del agente flogístico. El porcentaje de inhibición del edema se calculó para cada grupo comparándolo contra el control de carragenina sin tratamiento, para esto se siguieron las fórmulas descritas por Pérez-González y colaboradores (2017), calculando el porcentaje de inhibición de inflamación con la siguiente fórmula:

$\% \text{ de inhibición} = [(E_t - E_o) \text{ Carragenina} - (E_t - E_o) \text{ Tratamientos} / (E_t - E_o) \text{ Carragenina}] \times 100$

E_t = Formación del edema a diferentes tiempos (1, 3, 5 y 7 h).

E_o = Formación del edema al tiempo basal.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Predicción de la actividad farmacológica.

El análisis de predicción de la actividad farmacológica de los compuestos objetivo **33-36** se realizó mediante el programa PASS², de acceso gratuito. Como se puede apreciar en la Tabla 3, todos los vinilfosfonatos (**33-36**) propuestos tienen elevada probabilidad de tener actividad antiartrítica, además, otra probable actividad que arrojó este análisis, es que estos compuestos pueden ser inhibidores de la sustancia P, la cual está relacionada con la percepción del dolor. Estos dos resultados de gran interés justifican la síntesis y evaluación antiinflamatoria de los vinilfosfonatos **33-36** y permiten hacer un acercamiento preliminar en busca de mejores agentes antiartríticos.

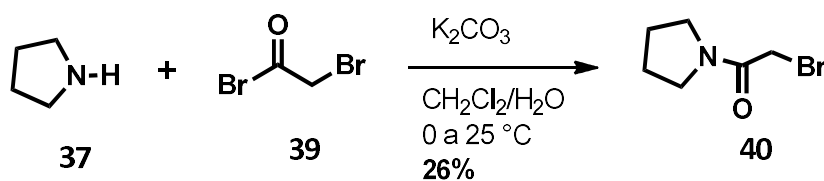
Tabla 3. Resultados del análisis de predicción de la actividad (PA) farmacológica de los compuestos **33-36** mediante el programa PASS.

| Actividad Farmacológica | Compuesto Objetivo | | | |
|-------------------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| | 33 | 34 | 35 | 36 |
| Antiartrítico | 0.921 | 0.921 | 0.895 | 0.890 |
| Antagonista de la sustancia P | 0.786 | 0.786 | 0.747 | 0.735 |
| Cardiotónico | 0.717 | 0.717 | 0.685 | 0.677 |

2. * <http://www.way2drug.com/passonline/>

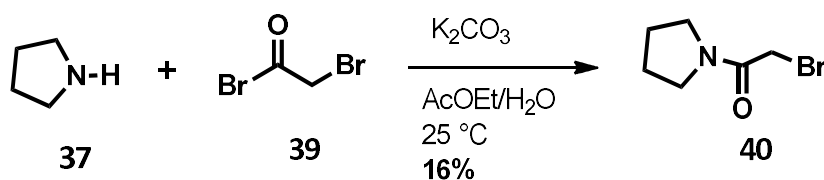
8.2. Síntesis de los productos **40** y **41**.

La síntesis de los productos **33-36** se llevó a cabo en tres pasos de reacción. El primer paso inició con la amidación de la pirrolidina **37** con bromuro de bromoacetilo **39** para la formación de la amida **40**. En un primer ensayo se hizo reaccionar **37** y **39** en presencia de K_2CO_3 en una mezcla CH_2Cl_2/H_2O (3:1) de 0 a 25 °C, obteniéndose el compuesto **40** con un rendimiento químico del 26% (Esquema 7).



Esquema 7.

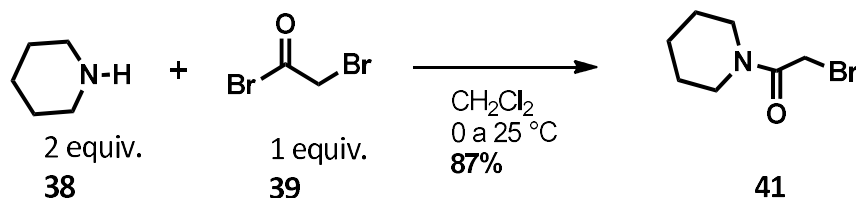
Debido al bajo rendimiento obtenido, en un segundo ensayo se modificó el disolvente, utilizando una mezcla $AcOEt/H_2O$ (1:1) a temperatura ambiente, sin embargo, bajo estas condiciones de reacción el rendimiento obtenido del compuesto **40** fue del 16% (Esquema 8).



Esquema 8.

Por lo anterior, se continuó buscando condiciones de reacción más eficientes. En un tercer ensayo, se utilizaron los mismos equivalentes de los compuestos **37** y **39**, agregando en este caso, *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) como base, CH_2Cl_2 como disolvente y una temperatura de 0 a 25 °C. El resultado fue una mezcla compleja de productos que no fueron identificados (Esquema 9).

compuesto **41**, separándolo por extracción líquido-líquido y obteniendo un rendimiento del 87% (Esquema 11).

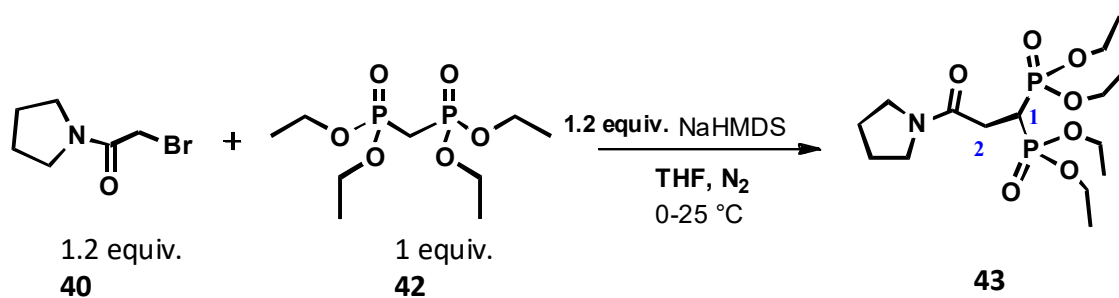


Esquema 11.

8.3. Síntesis de los productos **43** y **44**.

Continuando con la ruta de síntesis, el siguiente paso consistió en una reacción de C-alkilación del metileno-bisfosfonato de tetraetilo **42** con el intermediario **40**, para la formación del bisfosfonato **43**.

En un primer ensayo se hicieron reaccionar 1.2 equivalentes de **40** y 1 equivalente de **42** utilizando como base 1.2 equivalentes de hexametildisilazuro de sodio (NaHMDS) en THF de 0 a 25 °C, en atmósfera de nitrógeno (Esquema 12). Se formó una mezcla compleja difícil de separar por cromatografía en columna. Sin embargo se dedujo que sí hubo la formación del producto **43** porque se observaron las señales de los hidrógenos presentes en los carbonos α (1) y β (2) al fosfonato en el espectro de RMN de ^1H del crudo de la reacción (Figura 20).



Esquema 12.

En la Figura 20 se muestran los espectros de RMN de ^1H y ^{31}P del crudo de reacción. En 3.49 ppm, se observa una señal triple de triple que se asignó a los protones del carbono α , dado el

acoplamiento que tiene con los dos átomos de fósforo y con los protones de carbono β . Por su parte, la señal triple de doble en 2.80 ppm corresponde a los protones del carbono β , teniendo acoplamiento con dos fósforos geminales y con un hidrógeno del carbono α al fosfonato. Además, el crudo de reacción se analizó por RMN ^{31}P , encontrado únicamente dos señales, una correspondiente al fósforo de la materia prima (**42**), con un desplazamiento químico en 20.22 ppm y la otra señal en 24.21 ppm, que se atribuyó al bisfosfonato **43**. Estos análisis sirvieron de referencia para identificar por RMN la formación del producto de interés (**43**) en posteriores ensayos.

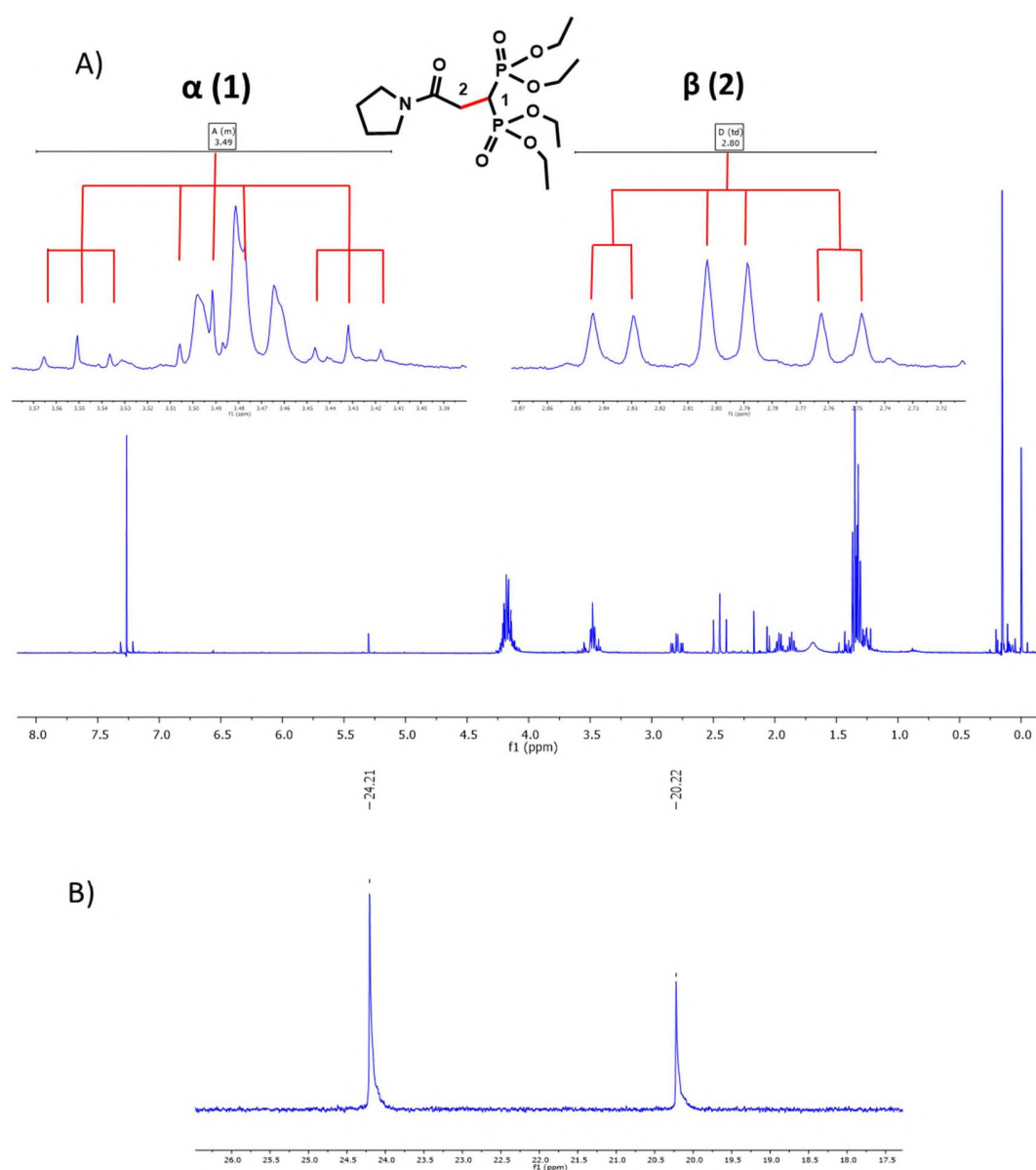
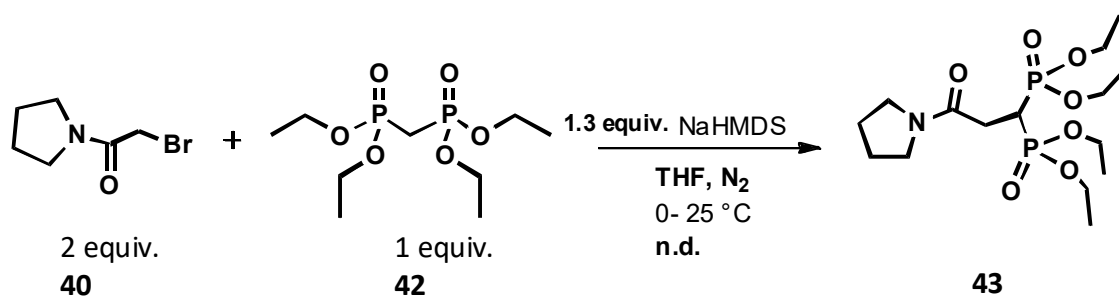


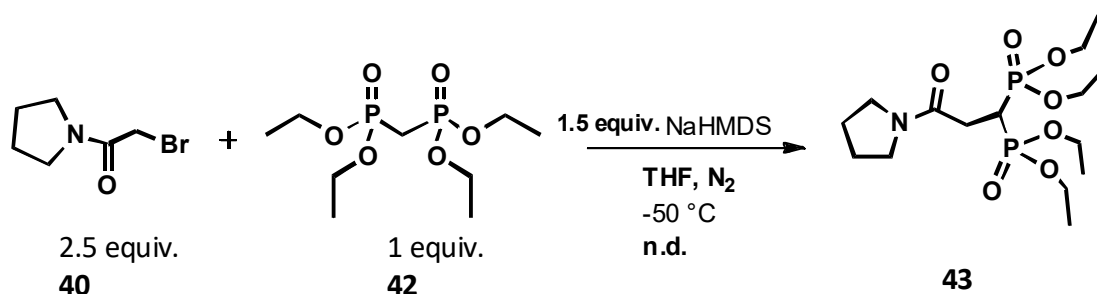
Figura 20. Análisis del crudo de reacción por RMN de ^1H (A) y ^{31}P (B) para la identificación de bisfosfonato **43**.

En busca de una reacción más selectiva, se decidió modificar el número de equivalentes en los reactivos, utilizando 1.3 equivalentes de NaHMDS, 2 equivalentes del intermediario **40** y THF como disolvente a una temperatura de 0 a 25 °C en atmósfera de nitrógeno (Esquema 13). Bajo estas condiciones se formaron varios subproductos. El producto **43** se logró aislar de la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna, sin embargo, se encontraron impurezas al analizarlo por RMN de ^1H . Esto al parecer por descomposición al interactuar con la fase estacionaria (SiO_2). Por lo anterior, no se obtuvo un rendimiento.



Esquema 13.

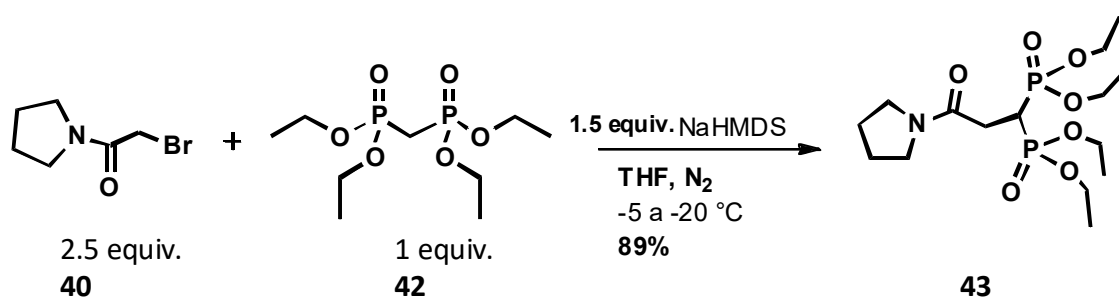
En un ensayo adicional, la mezcla de los reactivos en THF se enfrió por debajo de -50 °C utilizando un baño de acetona-nitrógeno líquido, 1.5 equivalentes de NaHMDS y un exceso del compuesto **40** (2.5 equivalentes) (Esquema 14). Con estas condiciones de reacción se logró que la reacción fuera más selectiva generando sólo dos productos. El producto **43** fue purificado por cromatografía en columna, sin embargo, una parte del mismo sufrió descomposición, por lo cual no se obtuvo rendimiento.



Esquema 14.

Dadas las dificultades para acceder al nitrógeno líquido, se tuvieron que buscar otras condiciones de reacción. En un quinto ensayo, se probó la misma relación estequiométrica que

el ensayo anterior, utilizando un baño de hielo/sal para mantener una temperatura de reacción a -5 °C, THF como disolvente y agitación magnética durante los primeros 20 minutos de reacción. Posteriormente, se enfrió a -20 °C durante 18 h. Bajo estas condiciones se observó la formación de dos productos, los cuales fueron purificados por cromatografía en columna utilizando Al₂O₃ como fase estacionaria. El rendimiento obtenido del bisfosfonato **43** fue del 89% (Esquema 15).

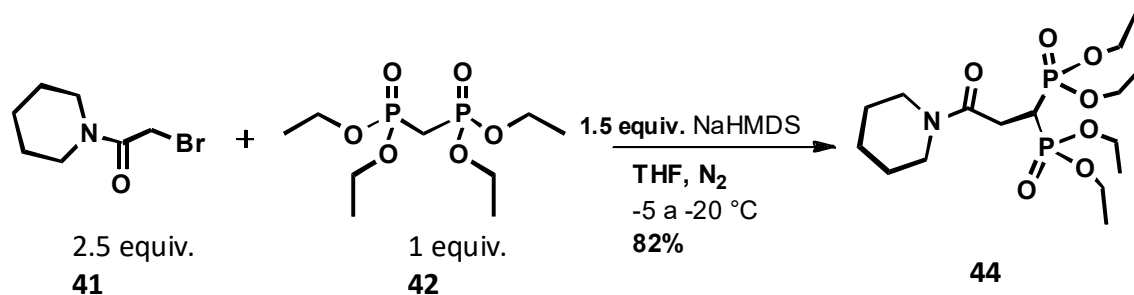


Esquema 15.

Tabla 5. C-alkilación de la amida **40** con el bisfosfonato **42** utilizando diferentes condiciones de reacción.

| Ensayo | Equiv. de 40 | Equiv. de NaHMDS | Temperatura | Rendimiento |
|--------|---------------------|------------------|-------------|-------------|
| 1 | 1.2 | 1.2 | 0 a 25 °C | n.d |
| 2 | 1.2 | 2 | 0 a 25 °C | n.d. |
| 3 | 2.5 | 1.5 | -50 °C | n.d. |
| 4 | 2.5 | 1.5 | -5 a -20 °C | 89% |

Como se puede observar en la Tabla 5, el cuarto ensayo proporcionó las mejores condiciones para la formación del bisfosfonato **43**, mismas que fueron extrapoladas para la preparación de bisfosfonato **44**. El rendimiento obtenido para el compuesto **44** fue del 82% (Esquema 16).

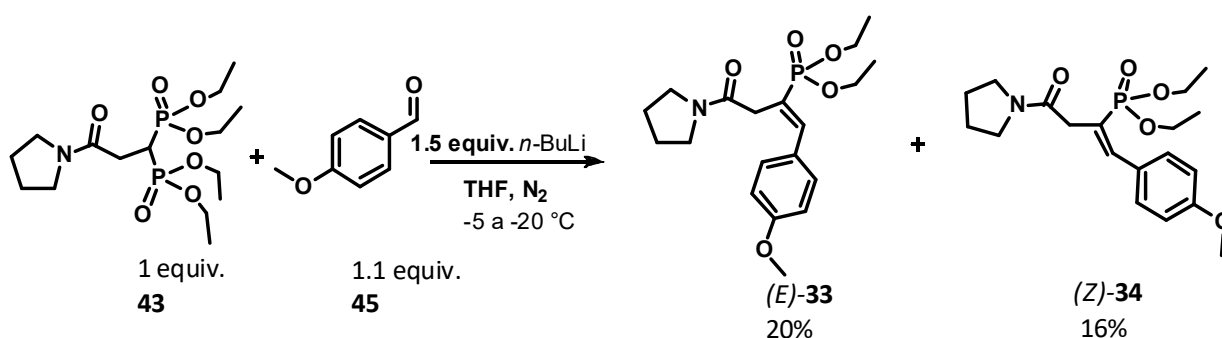


Esquema 16.

8.4. Síntesis de los productos 33-36.

Alcanzando altos rendimientos de los intermediarios **43** y **44**, se procedió a la reacción de HWE para la obtención de los vinilfosfonatos.

En un primer ensayo, se hizo reaccionar 1 equivalente de **43** con 1.5 equivalentes de *n*-BuLi, seguido de la adición del 1.1 equivalentes de *p*-anisaldehído **45**; bajo atmósfera de nitrógeno, utilizando THF como disolvente, a una temperatura de reacción de -5 a -20 °C. La reacción no fue selectiva, sin embargo, se detectó la formación de los isómeros *E/Z* en el crudo de reacción en una relación 17:83, los cuales pudieron ser separados por cromatografía en columna y posteriormente caracterizados por experimentos de RMN de una y dos dimensiones. El rendimiento obtenido para el isómero *E* fue del 20%, mientras que para el isómero *Z* fue de 16% (Esquema 17).



Esquema 17.

Como se mencionó anteriormente (Figura 19), la configuración *E* y *Z* de los estirilfosfonatos puede ser identificada por la constante de acoplamiento hidrógeno-fósforo. Con esta información, los productos **33** y **34** pudieron ser identificados por análisis de RMN de ^1H a través de la constante de acoplamiento entre el hidrógeno del carbono β (marcado en negritas en la Figura 21) y el fósforo; la señal asignada a dicho protón en el isómero *E* se observó en 7.66 ppm mostrando una constante de acoplamiento $J_{\text{H-P}}$ de 23.9 Hz. Por su parte, en el isómero *Z*, esta señal se desplazó en 7.66 ppm, teniendo una constante de acoplamiento $J_{\text{H-P}}$ de 47.1 Hz.

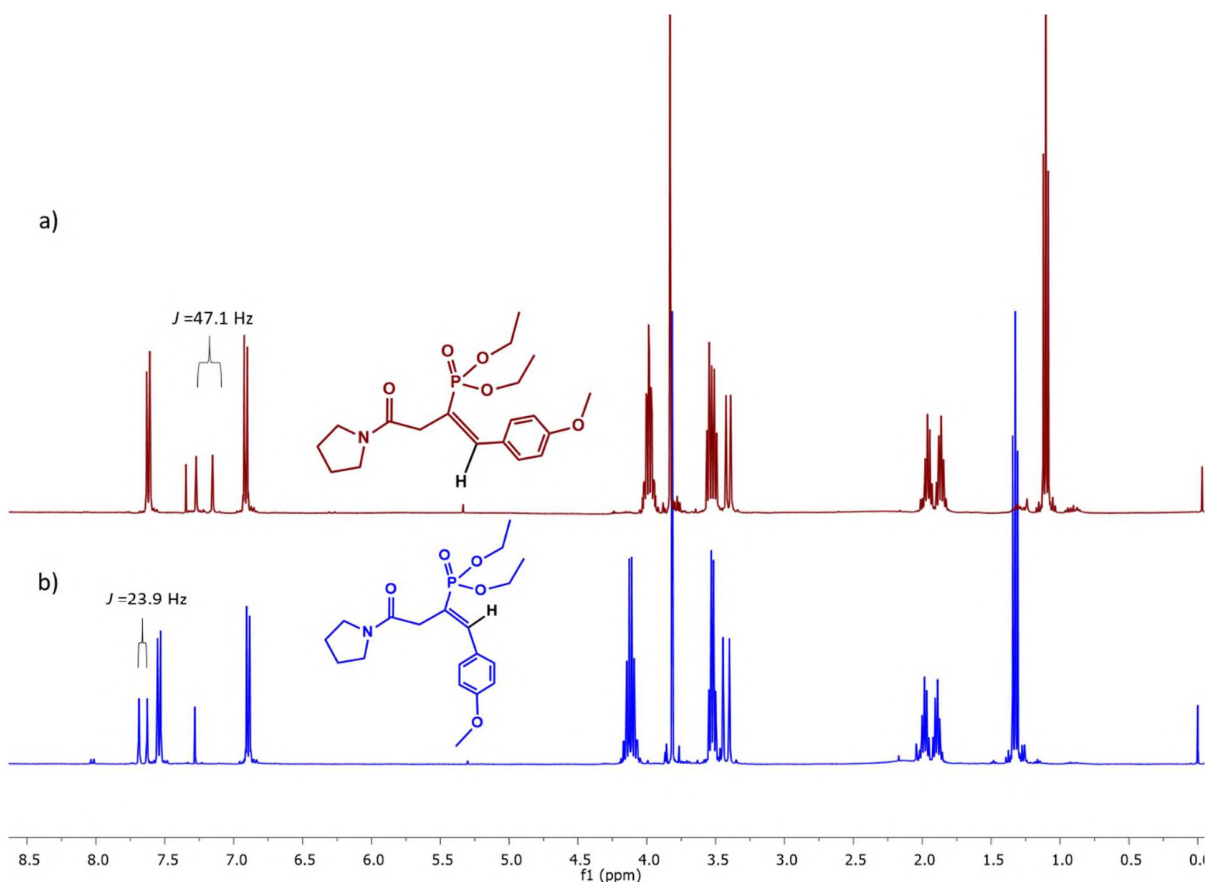
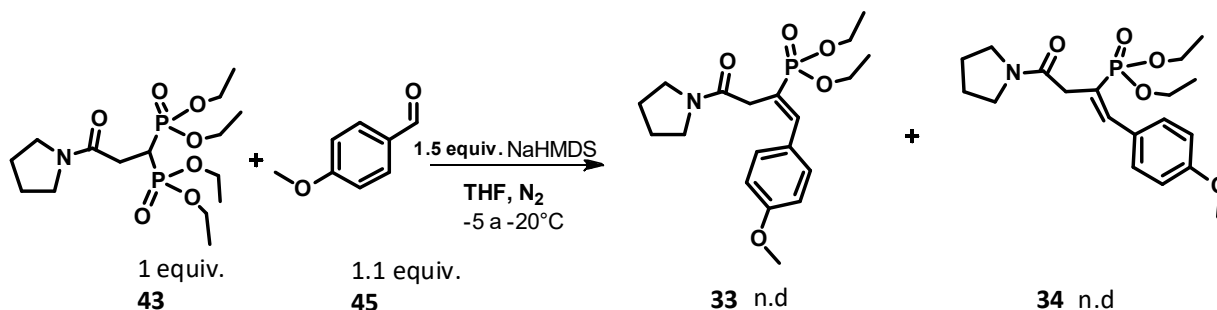


Figura 21. Espectros de RMN ^1H de diastereoisómeros **34** (a) y **33** (b).

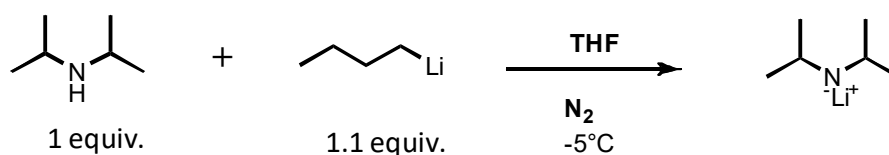
En una segunda prueba para obtener **33** y **34**, se decidió modificar la base, utilizando NaHMDS en la misma relación molar y condiciones de reacción que en el ensayo anterior (Esquema 18). Se dio seguimiento a la reacción por CCF (cromatografía en capa fina) y después de 19 h de reacción, se observó que se había consumido muy poca cantidad del bisfosfonato **43**, además de la baja formación de los isómeros *E* y *Z*. En vista de estos resultados, se realizó un análisis de

RMN de ^{31}P del crudo de reacción, observándose una baja proporción (95:5) entre la señal del reactivo limitante **43** y los productos **33-34** y una relación *E/Z* de 65:35. Por lo anterior, no se realizó la purificación.



Esquema 18.

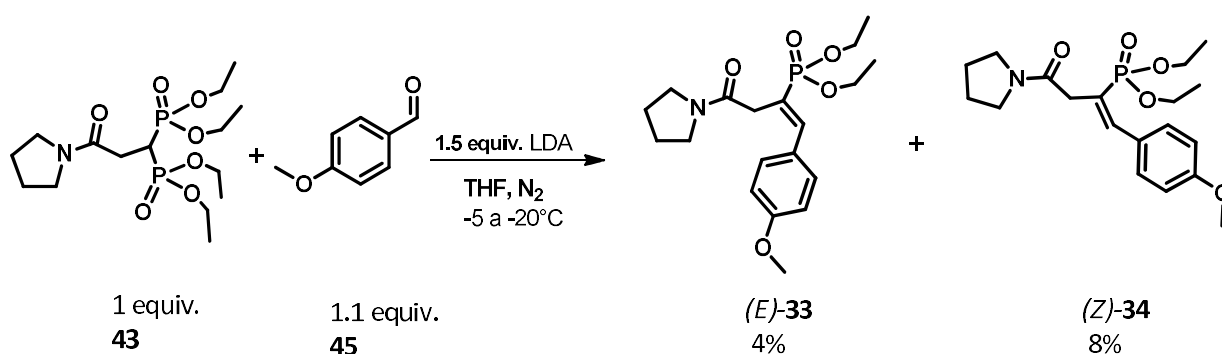
En un tercer ensayo se modificó nuevamente la base, utilizando diisopropil amiduro de litio (LDA, por sus siglas en inglés), el cual se preparó haciendo reaccionar diisopropilamina con *n*-BuLi en atmósfera de nitrógeno, THF anhidro como disolvente a -5°C (Esquema 19).



Esquema 19.

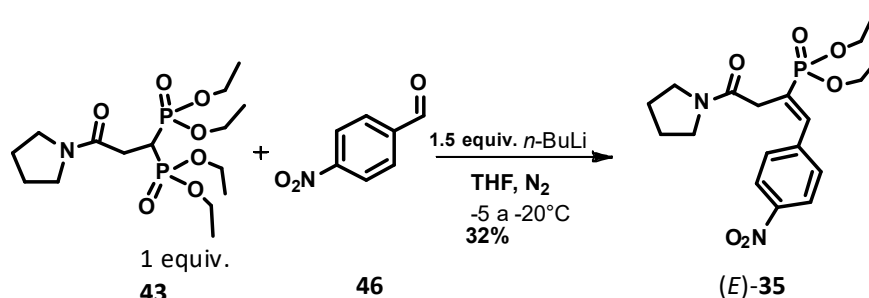
De la base preparada (LDA) se utilizó 1.5 equivalentes, la misma relación molar que en el ensayo anterior del bisfosfonato **43** y el aldehído **45** e idénticas condiciones de reacción (Esquema 20). Se dio seguimiento a la reacción por CCF y después de 20 h de reacción, se realizó el análisis por RMN de ^{31}P demostrando que la reacción no fue selectiva debido a la formación de más de seis productos. Se identificó que la relación señal producto/sustrato (isómero *Z*/intermediario **43**) fue de 57:43 y la relación *E/Z* de 13:87, por lo cual no se demuestran condiciones idóneas de reacción.

Los productos pudieron ser purificados por cromatografía en columna obteniendo rendimientos del 4 y 8% para los isómeros *E* y *Z*, respectivamente.



Esquema 20.

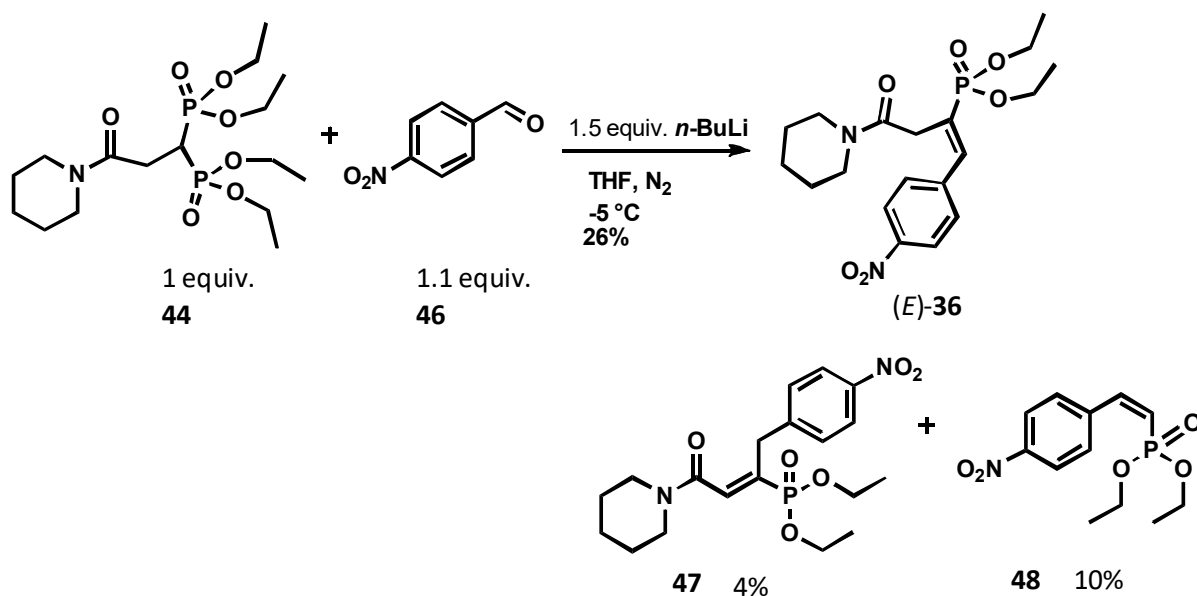
Tomando las mejores condiciones de reacción, se hizo reaccionar 1 equivalente de **43** con 1.5 equivalentes de *n*-BuLi, seguido de la adición de 1.1 equivalentes de *p*-nitrobenzaldehído **46**, en atmósfera de nitrógeno, THF como disolvente de -5 a -20 °C. La reacción generó más de cinco productos, los cuales pudieron ser separados por cromatografía en columna utilizando sílica como fase estacionaria y un sistema AcOEt/MeOH (90:10) como fase móvil. Cada uno fue analizado por RMN, verificando la presencia del producto objetivo *E*, por su constante de acoplamiento $J_{\text{H-P}}$; mientras que el isómero *Z*, no fue detectado. El rendimiento del vinilfosfonato (*E*)-**35** fue del 32% (Esquema 21).



Esquema 21.

Para la formación del compuesto **36** se tomaron las mismas condiciones que el ensayo anterior. Se hizo reaccionar 1 equivalente del bisfosfonato **44** con 1.5 equivalentes de *n*-BuLi, seguido de la adición del 1.1 equivalentes de *p*-nitrobenzaldehído (Esquema 22). La reacción no fue selectiva, porque se formaron más de cinco productos, sin embargo, al igual que el ensayo anterior, solo hubo formación del isómero *E*, mientras que el isómero *Z* no pudo ser detectado.

Tal producto pudo ser separado de la mezcla por cromatografía en columna, obteniéndose un rendimiento del 26%. Además, pudieron ser aislados los productos **47** y **48** e identificados por RMN de ^1H , ^{13}C , ^{31}P y experimentos bidimensionales.



Esquema 22.

Finalmente, los vinilfosfonatos **33-36** y los bisfosfonatos **43** y **44** fueron utilizados para los bioensayos de inflamación, estos últimos intermediarios se decidieron evaluar porque comparten el grupo fosfonato al igual que los vinilfosfonatos, además de su actividad biológica asociada a enfermedades de los huesos como la osteoporosis.

8.5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria aguda inducida por carragenina.

Para el modelo de inflamación sistémica aguda, se utilizaron ratones machos Balb/C de 25 ± 3 g de peso, administrando los tratamientos **33-36** y **43-44**, y el fármaco de referencia al inicio, para después de 1 h, inducir inflamación por la administración de 20 μ L de carragenina al 2% en una solución salina isotónica (SSI) vía subcutánea (s.c.) en el cojinete plantar. El desarrollo del edema se registró midiendo el diámetro del mismo con un micrómetro digital a diferentes tiempos 1, 3, 5, 7 y 24 h; los resultados se muestran en la Tabla 6. Por otra parte, se conoce que el mayor efecto de la indometacina comienza a la quinta hora, esto debido a que siguiendo el desarrollo de la inflamación, la fase temprana (1-3 horas) no es inhibida por los AINEs por su incapacidad de bloquear histaminas y bradiquininas. Mientras que en la segunda fase está relacionada con la producción de prostaglandinas y COX, las cuales sí pueden ser bloqueadas por los AINEs, resultando en el mayor efecto de la indometacina (Necas & Bartosikova, 2013).

Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de los compuestos **33-36** y **43-44** en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C.

| Tratamiento | Formación de edema subplantar (mm) | | | | |
|---------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | 1 h | 3 h | 5 h | 7 h | 24 h |
| Control | 0.309 \pm 0.05 | 0.416 \pm 0.09 | 0.572 \pm 0.09 | 0.561 \pm 0.06 | 0.445 \pm 0.08 |
| Indo (20 mg) | 0.158 \pm 0.04 | 0.217 \pm 0.07 | 0.308 \pm 0.11 ^a | 0.339 \pm 0.13 | 0.328 \pm 0.07 |
| 43 (50 mg) | 0.355 \pm 0.12 | 0.389 \pm 0.11 | 0.554 \pm 0.13 | 0.397 \pm 0.13 | 0.461 \pm 0.17 |
| 44 (50 mg) | 0.286 \pm 0.07 | 0.345 \pm 0.11 | 0.519 \pm 0.13 | 0.432 \pm 0.19 | 0.531 \pm 0.10 |
| 33 (50 mg) | 0.461 \pm 0.08 ^b | 0.734 \pm 0.06 ^{a,b} | 1.153 \pm 0.10 ^{a,b} | 1.068 \pm 0.03 ^{a,b} | 0.805 \pm 0.09 ^{a,b} |
| 34 (50 mg) | 0.387 \pm 0.03 ^b | 0.481 \pm 0.06 ^b | 0.754 \pm 0.06 ^b | 0.751 \pm 0.09 ^b | 0.593 \pm 0.02 ^b |
| 35 (50 mg) | 0.436 \pm 0.04 ^b | 0.645 \pm 0.03 ^{a,b} | 0.802 \pm 0.08 ^{a,b} | 0.783 \pm 0.10 ^b | 0.598 \pm 0.10 ^b |
| 36 (50 mg) | 0.282 \pm 0.03 | 0.455 \pm 0.07 ^b | 0.668 \pm 0.07 ^b | 0.668 \pm 0.11 ^b | 0.595 \pm 0.07 ^b |

Cada grupo representa la media \pm error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA), post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); n=5 para cada grupo.

^a vs. Control carragenina; ^b vs. Indometacina;

También los datos de la Tabla 6 son expresados gráficamente en la Figura 22, en donde se puede apreciar un efecto proinflamatorio de los vinilfosfonatos **33-36**, al presentar un volumen de inflamación superior al tratamiento control, el cual solo tiene el vehículo y el agente flogístico; incluso el compuesto **33** tuvo el doble de inflamación que el grupo control. Por su

parte, los bisfosfonatos **43** y **44**, tienen poca actividad antiinflamatoria comparada con el fármaco de referencia. El compuesto **43** presentó el 3%, mientras que **44** el 9% a la quinta hora.

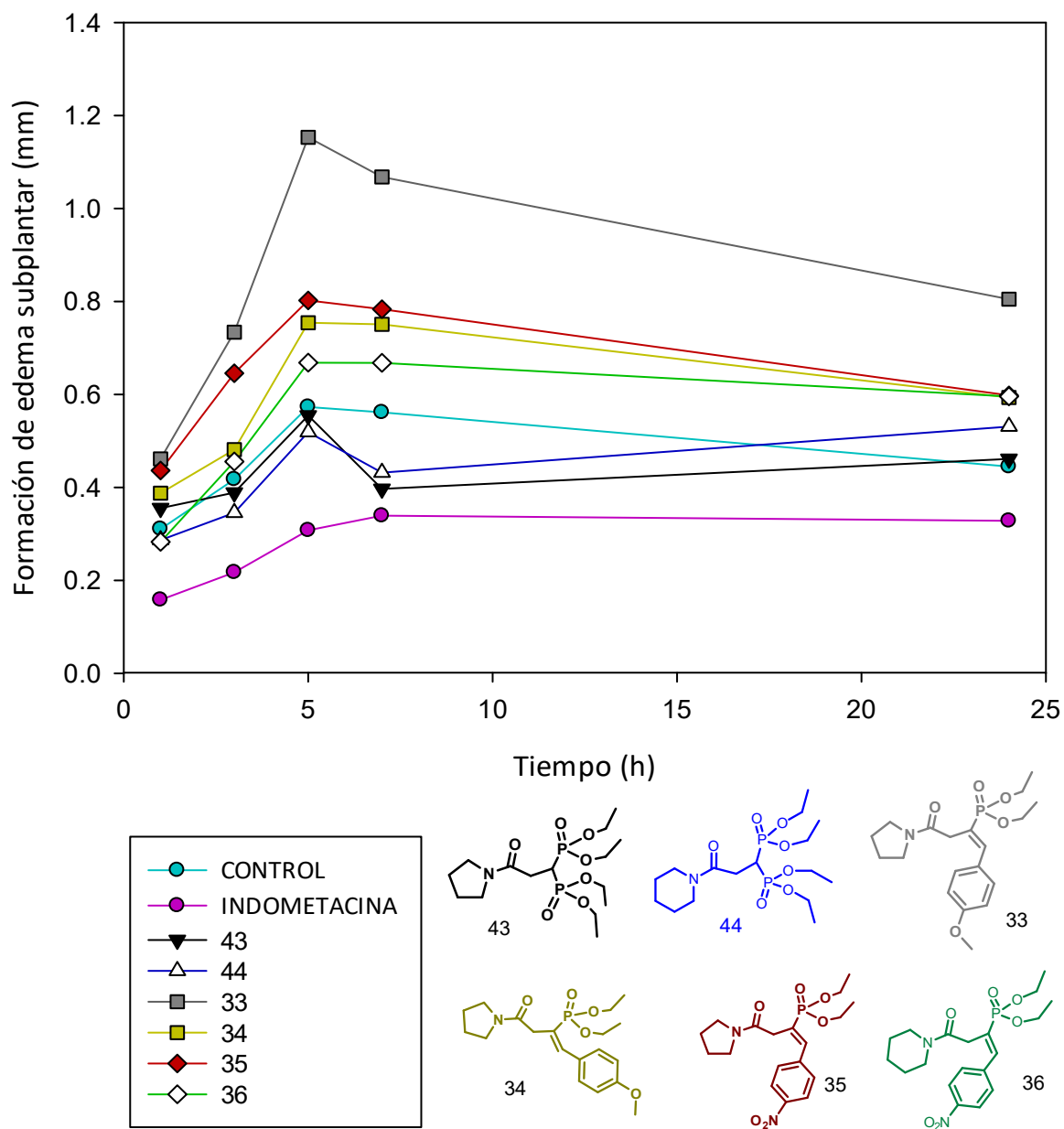


Figura 22. Actividad antiinflamatoria de los compuestos **33-36** y **43-44** en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C.

A continuación en la Tabla 7 se presenta el porcentaje de inhibición de la inflamación de todos los tratamientos a la quinta hora. Como se puede observar, los datos con signo negativo en los vinilfosfonatos **33**, **34**, **35** y **36**, demuestran un efecto proinflamatorio.

Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de los compuestos **33-36** y **43-44** en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C a la quinta hora del tratamiento.

| Tratamiento | Dosis (mg/kg) | Formación de edema subplantar (mm) | % de Inhibición |
|---------------------|---------------|------------------------------------|-----------------|
| Control | -- | 0.572±0.09 | -- |
| Indo (20 mg) | 20 | 0.308±0.11 ^a | 64.654 |
| 43 (50 mg) | 50 | 0.554±0.13 | 3.111 |
| 44 (50 mg) | 50 | 0.519±0.13 | 9.297 |
| 33 (50 mg) | 50 | 1.153±0.10 ^{a,b} | -101.468 |
| 34 (50 mg) | 50 | 0.754±0.06 ^b | -31.772 |
| 35 (50 mg) | 50 | 0.802±0.08 ^{a,b} | -40.161 |
| 36 (50 mg) | 50 | 0.668±0.07 ^b | -16.742 |

Cada grupo representa la media ± error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA), post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); n=5 para cada grupo.

^a vs. Control carragenina; ^b vs. Indometacina;

No obstante, no podemos asegurar que el efecto pueda ser propio de los vinilfosfonatos **33-36**. Tomando en cuenta las interacciones y los compartimentos que recorre el compuesto antes de llegar al sitio de la inflamación, quizás se deba a procesos de biotransformación que resulte en un compuesto diferente y por ende, en un efecto proinflamatorio.

Ahora bien, si el efecto proinflamatorio es directamente de los vinilfosfonatos **33-36**, resulta de bastante interés su capacidad para inflamar, además de que después de una semana los ratones no murieron, y a diferencia de los demás tratamientos con los bisfosfonatos **43** y **44**, aún continuaba el edema. Esto es de interés para someterlos a evaluación como agentes inmunomoduladores, buscando estimular el sistema inmunológico en enfermedades como el cáncer.

Con respecto a la relación estructura-actividad de esta evaluación biológica se describe a continuación. Primero, comparando la amina heterocíclica en los compuestos **35** y **36** (Figura 23), se observa un mayor efecto proinflamatorio de la pirrolidina **35**, teniendo la misma tendencia que el compuesto **36** hasta las 24 horas, pero con mayor potencia. Ambos alcanzan su mayor efecto proinflamatorio a las cinco horas. Para fines antiinflamatorios no se observó efecto alguno.

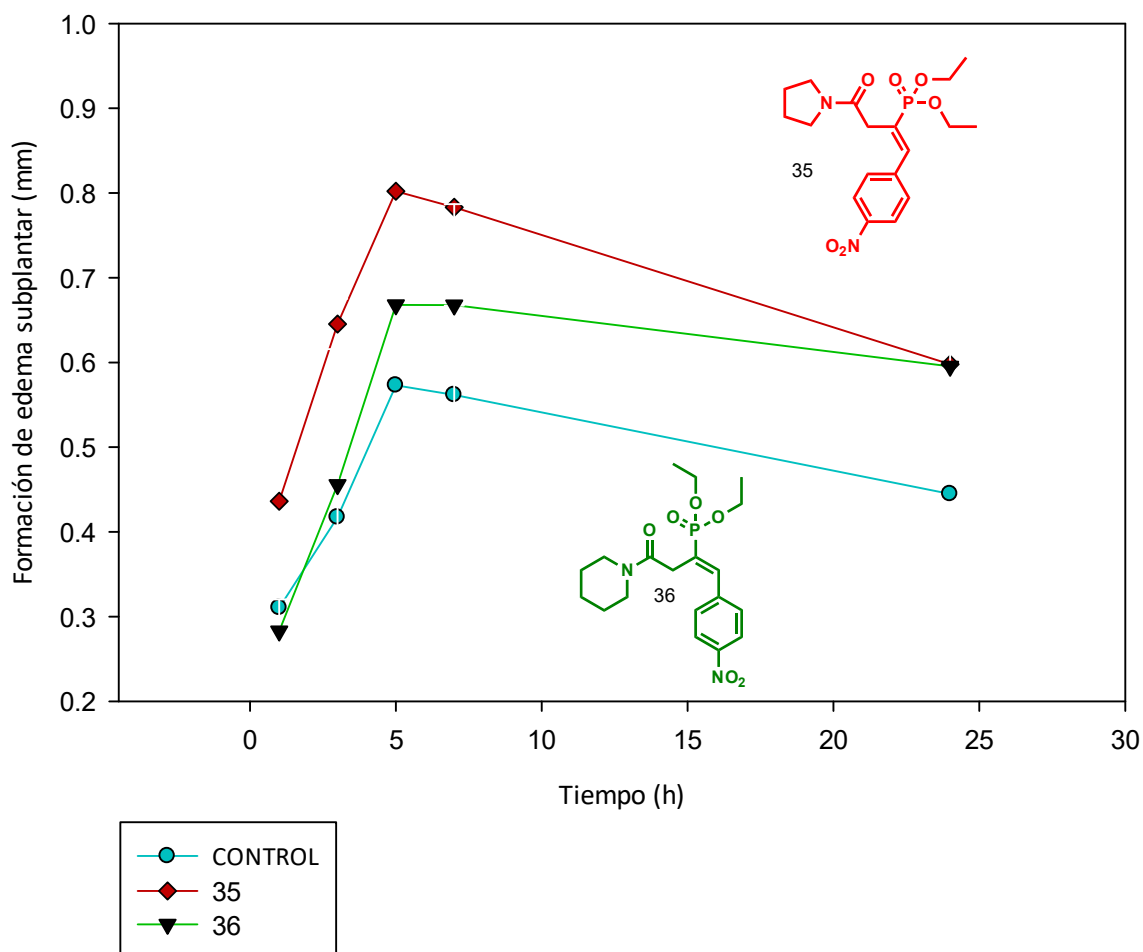


Figura 23. Actividad proinflamatoria de los compuestos **35** y **36** en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C.

Comparando el efecto en cuanto a la configuración *E* y *Z* (Figura 24) podemos observar en los compuestos **33** y **34** que la configuración *Z* tiene un menor efecto proinflamatorio. Por su parte, la configuración *E* sigue la misma tendencia pero con mayor efecto proinflamatorio; dado que durante las 24 h del tratamiento presentó más del doble de inflamación que el tratamiento control, el cual solo contiene al agente flogístico. Ambos alcanzan su efecto máximo a las cinco horas. Por esto, ninguna configuración tuvo actividad antiinflamatoria. En el caso de los productos **35** y **36** solo se pudo obtener la configuración *E*.

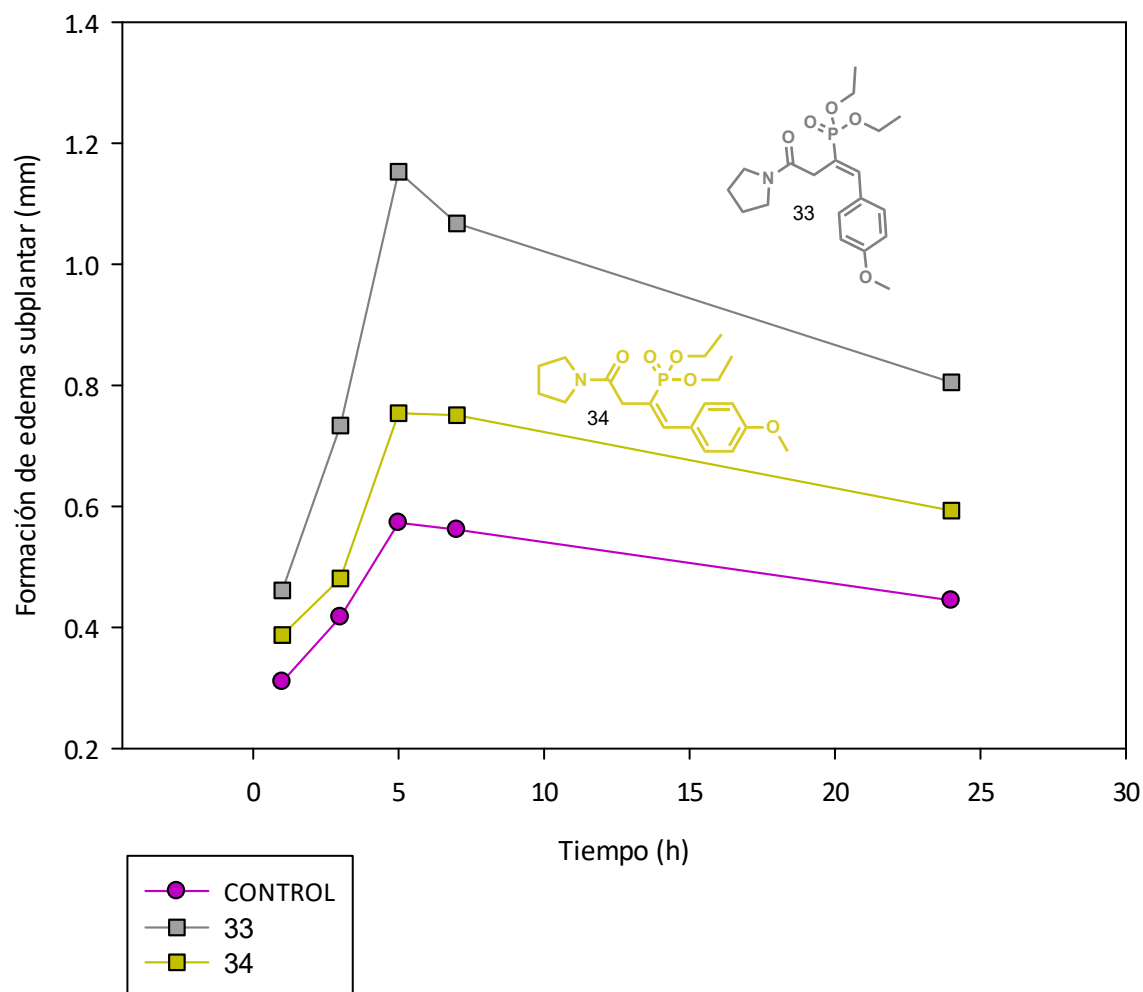


Figura 24. Actividad proinflamatoria de los compuestos **33** y **34** en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C.

Ahora, analizando el efecto del sustituyente en el anillo aromático, se tiene al compuesto **33** con un sustituyente electrodonador metoxilo ($-\text{OCH}_3$), el cual presentó un mayor efecto proinflamatorio que el compuesto **35** con sustituyente electroatractor ($-\text{NO}_2$). Entonces, para efectos antiinflamatorios, no hubo actividad, mientras que para efectos proinflamatorios los mejores sustituyentes pueden ser los electrodonadores (Figura 25).

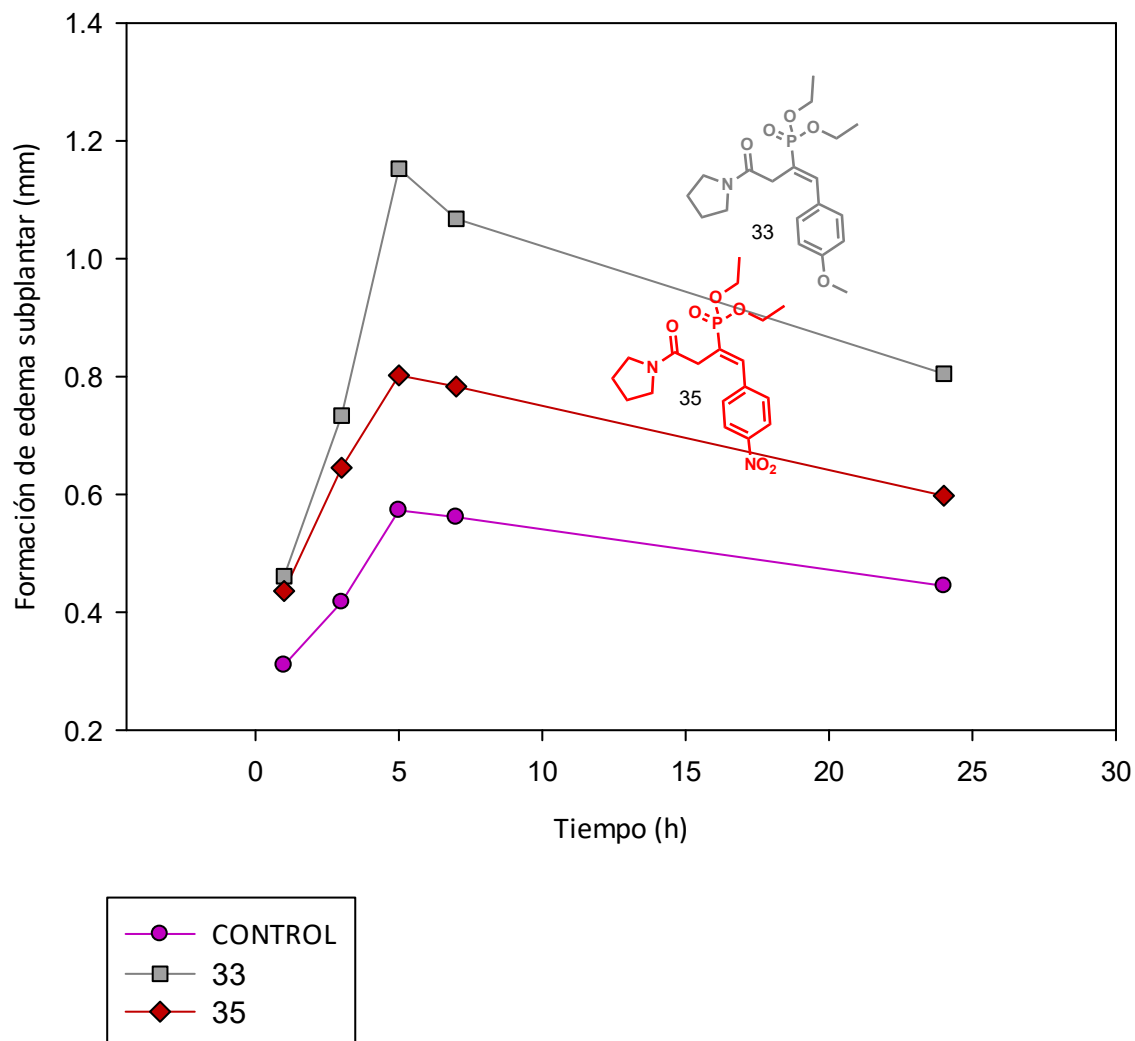


Figura 25. Actividad proinflamatoria de los compuestos **33** y **35** en inflamación aguda inducida por carragenina en ratones Balb/C.

Agrupando todas las comparaciones anteriores, podemos concluir que el conjunto de características estructurales para obtener la mayor actividad proinflamatoria se encontró en el compuesto **33**, el cual consiste en: un anillo de pirrolidina, configuración *E* en el dominio vinilfosfonato y un sustituyente electrodonador en el anillo aromático.

8.6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria tópica inducida por TPA.

Esta prueba fue realizada en ratones hembras Balb/C de 25 ± 5 g, induciendo inflamación en la oreja izquierda por la aplicación tópica de TPA ($0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). Media hora después, los compuestos objetivo **33-36**, así como los intermediarios **43** y **44**, fueron evaluados a dosis de 2 mg por oreja vía tópica (tratamientos) y los resultados que se describen a continuación en la Tabla 8, corresponden a los datos obtenidos a la sexta hora después de la aplicación de cada tratamiento.

Tabla 8. Actividad antiinflamatoria de los **33-36** y **43-44** en edema auricular inducido con TPA en ratones Balb/C.

| TRATAMIENTO | DOSIS | EDEMA AURICULAR | % INHIBICIÓN |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|
| CONTROL | 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ | 6.30 mg \pm 1.20 | -- |
| INDOMETACINA | 2 mg/oreja | 2.80 mg \pm 0.38 ^a | 55.14 |
| 43 | 2 mg/oreja | 6.10 mg \pm 0.80 ^b | 2.81 |
| 44 | 2 mg/oreja | 7.10 mg \pm 0.60 ^b | -12.01 |
| 33 | 2 mg/oreja | 3.20 mg \pm 0.20 ^a | 49.08 |
| 34 | 2 mg/oreja | 3.50 mg \pm 0.50 ^a | 44.38 |
| 35 | 2 mg/oreja | 2.90 mg \pm 0.60 ^a | 54.75 |
| 36 | 2 mg/oreja | 3.50 mg \pm 0.50 ^a | 45.12 |

Cada grupo representa la media \pm error estándar de la media (ESM). Análisis de varianza (ANOVA), post-hoc Student Newman Keuls ($p \leq 0.05$); n=6 para cada grupo.

^a vs. Control carragenina;

^b vs. Indometacina;

Los compuestos **35** y **33** tuvieron el mejor efecto antiinflamatorio tópico con un porcentaje de inhibición de 54 y 49%, respectivamente, en comparación con indometacina. Esto es bastante interesante, porque vía sistémica en el modelo de carragenina, el compuesto **33** es el más proinflamatorio, mientras que por vía tópica como se observa en la Tabla 8, es el segundo con mayor efecto antiinflamatorio. Por su parte, los compuestos **34** y **36** tuvieron menor efecto antiinflamatorio, mientras que los intermediarios **43** y **44** no presentaron efecto, e incluso el compuesto **44**, mostró un efecto proinflamatorio. A su vez, resulta atractivo porque fue uno de los dos (compuesto **43** y **44**) que por vía sistémica tuvo un ligero efecto antiinflamatorio. Esto se puede visualizar de mejor manera en la Figura 26.

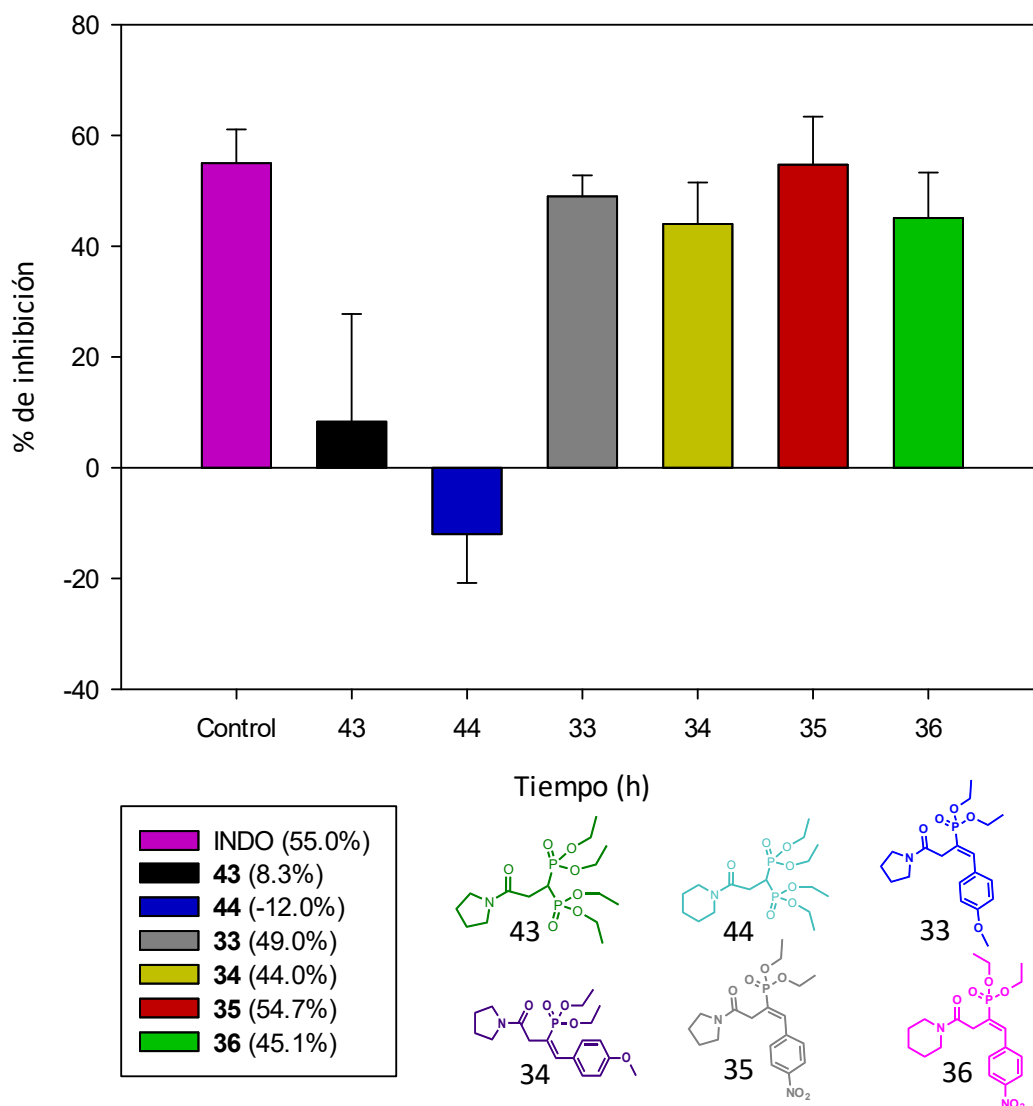


Figura 26. Actividad antiinflamatoria aguda tópica de los compuestos **33-36** y **43-44** sobre la formación del edema auricular inducido con TPA en ratones hembra Balb/C.

9. CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones de reacción de la ruta de síntesis para la obtención de los vinilfosfonatos **33-36**, obteniendo altos rendimientos de los intermediarios **40-41** y **43-44**, y rendimientos moderados para los productos **33-36**, los cuales son de interés farmacológico por su elevado potencial de actuar como agentes antiartríticos y no han sido reportados en la literatura.

Los diastereoisómeros (*E*)-**33** y (*Z*)-**34** productos de la reacción HWE fueron separados por cromatografía en columna e identificados por RMN de ¹H a través del acoplamiento $J_{H,P}$.

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria sistémica en el modelo de carragenina, la mayor actividad proinflamatoria se encontró en los compuestos conteniendo el anillo de pirrolidina, la configuración *E* en el fragmento vinilfosfonato y un sustituyente electrodonador en el anillo aromático [compuesto (*E*)-**33**].

El mayor efecto antiinflamatorio vía administración tópica en el modelo de TPA se encontró para el compuesto **35**, el cual contiene un anillo de pirrolidina, configuración *E* en el dominio vinilfosfonato y sustituyente electroattractor en el anillo aromático.

Por administración vía tópica, que consiste en aplicar directamente los tratamiento en el sitio de daño, los vinilfosfonatos **33-36** sí presentaron actividad antiinflamatoria, mientras que por administración vía oral tuvieron un efecto proinflamatorio. Por lo anterior, podemos decir que la actividad antiinflamatoria es propia de los compuestos **33-36**, y su efecto proinflamatorio posiblemente es producto de las biotransformaciones resultantes antes de llegar al sitio de la inflamación.

10. PERSPECTIVAS

Para complementar este estudio, resulta de gran interés ampliar la biblioteca de compuestos en busca de explorar su potencial antiinflamatorio.

Realizar reacciones de hidrólisis, hidrogenación, entre otras, y evaluar los nuevos compuestos para ver el efecto del doble enlace o del grupo fosfonato en la actividad anti y proinflamatoria.

Realizar análisis informáticos para conocer el posible metabolismo, propiedades farmacocinéticas y toxicológicas e interacciones ligando-receptor de los vinilfosfonatos.

Sería interesante realizar ensayos como inmunomoduladores utilizando los compuestos **33-36**, debido a su capacidad de actuar como proinflamatorios.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdou, W. M., Barghash, R. F., & Bekheit, M. S. (2012). Carbodiimides in the synthesis of enamino- and α -aminophosphonates as peptidomimetics of analgesic/antiinflammatory and anticancer agents. *Archiv Der Pharmazie*, 345(11), 884–895.
- Adler, P., Fadel, A., & Rabasso, N. (2014). Strategies for the synthesis of α - and β -amino vinylphosphonate. *Tetrahedron*, 70(30), 4437–4456.
- Ahmed, A. U. (2011). An overview of inflammation: mechanism and consequences. *Frontiers of Biology in China*, 6(4), 274–281.
- Al-riyami, L., Pineda, M. A., Rzepecka, J., Huggan, J. K., Khalaf, A. I., Suckling, C. J., ... Harnett, W. (2013). Designing Anti-inflammatory Drugs from Parasitic Worms: A Synthetic Small Molecule Analogue of the *Acanthocheilonema viteae* Product ES-62 Prevents Development of Collagen-Induced Arthritis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(24), 9982–10002.
- Ashley, N. T., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2012). Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), 385–406.
- Chen, H. X., Huang, L. J., Liu, J. B., Weng, J., & Lu, G. (2014). Synthesis of Terminal Vinylphosphonates Via Dbu-Promoted Tandem Phospha-Michael/Elimination Reactions. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 189(12), 1858–1866.
- Cheng, D. S., & Visco, C. J. (2012). Pharmaceutical Therapy for Osteoarthritis. *PM&R*, 4(5), S82–S88.
- Davis, A. A., Rosén, J. J., & Kiddle, J. J. (1998). A new bisphosphonate reagent for the synthesis of (Z)-olefins and Bis(trifluoroethyl) phosphonates. *Tetrahedron Letters*, 39(35), 6263–6266.
- Davis, J. M., & Matteson, E. L. (2012). My treatment approach to rheumatoid arthritis. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(7), 659–673.
- De Salud, L. G., & ÚNICO, C. Ley General de Salud, Mexico: Editorial ISEF (2013).
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics*, 47(1), 20–33.
- Filimonov, D. A., Lagunin, A. A., Glorizova, T. A., Rudik, A. V., Druzhilovskii, D. S., Pogodin, P. V., & Poroikov, V. V. (2014). Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50(3), 444–457.
- Galezowska, J., & Gumienna-Kontecka, E. (2012). Phosphonates, their complexes and bio-applications: A spectrum of surprising diversity. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(1-2), 105–124.
- Guerrero, G. A. M., & Lorenzana-Jiménez, M. (2009). Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Revista de La Facultad de Medicina UNAM*, 52(6), 260–264.
- Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Garduño-Siciliano, L., García-Rodríguez, R. V., Pérez-González, M. Z., Chávez, M. I., Bah, M., ... Jiménez-Arellanes, M. A. (2016). Anti-inflammatory and toxicological evaluation of *Moussonia deppeana* (Schldl. & Cham) Hanst and Verbascoside

- as a main active metabolite. *Journal of Ethnopharmacology*, 187(1), 269–280.
- Hameed, F., & Ihm, J. (2012). Injectable Medications for Osteoarthritis. *PM&R*, 4(5), S75–S81.
- Islas, R. E., & García, J. J. (2017). Hydrophosphonylation of Alkynes with Trialkyl Phosphites Catalyzed by Nickel. *ChemCatChem*, 9(21), 4125–4131.
- Laev, S. S., & Salakhutdinov, N. F. (2015). Anti-arthritic agents: Progress and potential. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(13), 3059–3080.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3–26.
- Matziari, M., Beau, F., Cuniasse, P., Dive, V., & Yiotakis, A. (2004). Evaluation of P 1' -Diversified Phosphinic Peptides Leads to the Development of Highly Selective Inhibitors of MMP-11. *Society*, 47(2), 325–336.
- McInnes, I. (2011). The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine*, 365(23), 2205–2219.
- McNichols, B. W., Koubek, J. T., & Sellinger, A. (2017). Single-step synthesis of styryl phosphonic acids *via* palladium-catalyzed Heck coupling of vinyl phosphonic acid with aryl halides. *Chemical Communications*, 53(92), 12454–12456.
- Necas, J., & Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: A review. *Veterinarni Medicina*, 58(4), 187–205.
- Németh, G., Greff, Z., Sipos, A., Varga, Z., Székely, R., Sebestyén, M., ... Orfi, L. (2014). Synthesis and evaluation of phosphorus containing, specific CDK9/CycT1 inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(10), 3939–3965.
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3), 1–18.
- Pérez-González, M. Z., Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Yépez-Mulia, L., Rojas-Tomé, I. S., Luna-Herrera, J., & Jiménez-Arellanes, M. A. (2017). Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidocolus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89(1), 89–97.
- Pochetti, G., Gavuzzo, E., Campestre, C., Agamennone, M., Tortorella, P., Consalvi, V., ... Mazza, F. (2006). Structural insight into the stereoselective inhibition of MMP-8 by enantiomeric sulfonamide phosphonates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(3), 923–931.
- Quntar, A. A. A. Al, Gallily, R., Katzavian, G., & Srebnik, M. (2007). Potent anti-inflammatory activity of 3-aminovinylphosphonates as inhibitors of reactive oxygen intermediates, nitric oxides generation, and tumor necrosis factor- α release. *European Journal of Pharmacology*, 556(1), 9–13.
- Ragab, O. M., Zayed, H. S., Abdelaleem, E. A., & Girgis, A. E. (2016). Effect of early treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs and treatment adherence on disease outcome in rheumatoid arthritis patients. *The Egyptian Rheumatologist*, 39(2), 69–74.

- Robinson, D. E., Dennison, E. M., Cooper, C., van Staa, T. P., & Dixon, W. G. (2016). A review of the methods used to define glucocorticoid exposure and risk attribution when investigating the risk of fracture in a rheumatoid arthritis population. *Bone*, *90*(1), 107–115.
- Roy, J. (2011). *An Introduction To Pharmaceutical Sciences: Production, Chemistry, Techniques and Technology*. Elsevier.
- Shamaila, S., Sajjad, A. K. L., Ryma, N. ul A., Farooqi, S. A., Jabeen, N., Majeed, S., & Farooq, I. (2016). Advancements in nanoparticle fabrication by hazard free eco-friendly green routes. *Applied Materials Today*, *5*(1), 150–199.
- Sherwood, E. R., & Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, *18*(3), 385–405.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. McGraw-Hill Interamericana de España.
- Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J., & Lowe, E. W. (2013). Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*, *66*(1), 334–395.
- Suleria, H. A. R., Gobe, G., Masci, P., & Osborne, S. A. (2016). Marine bioactive compounds and health promoting perspectives; innovation pathways for drug discovery. *Trends in Food Science and Technology*, *50*(1), 44–55.
- Tanwar, A., Chawla, R., Ansari, M. M., Neha, Thakur, P., Chakotiya, A. S., ... Khan, H. A. (2017). In vivo anti-arthritic efficacy of *Camellia sinensis* (L.) in collagen induced arthritis model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *87*(1), 92–101.
- Vassiliou, S., Mucha, A., Cuniasse, P., Georgiadis, D., Lucet-Levannier, K., Beau, F., ... Dive, V. (1999). Phosphinic pseudo-tripeptides as potent inhibitors of matrix metalloproteinases: A structure-activity study. *Journal of Medicinal Chemistry*, *42*(14), 2610–2620.
- Wafaa M., A., Reham F., B., & Mohamed S., B. (2015). Carbodiimides-Key Mediated in Synthesis of Novel Cytotoxic and Analgesic/ Antiinflammatory Motifs-Based α -Amino-, Enaminophosphonates, and Azaphosphones. *RSC Advances*, *3*(5), 1528–1540.
- Wang, B., Deng, J., Gao, Y., Zhu, L., He, R., & Xu, Y. (2011). The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. *Fitoterapia*, *82*(8), 1141–1151.
- Wang, X., Zu, Y., Huang, L., Yu, J., Zhao, H., Wen, C., ... Xu, Z. (2017). Treatment of rheumatoid arthritis with combination of methotrexate and *Tripterygium wilfordii*: A meta-analysis. *Life Sciences*, *171*(1), 45–50.
- Weaver, W. E., & Whaley, W. M. (1947). Organic Fungicides. I. The Preparation of Some α -Bromoacetamides. *Journal of the American Chemical Society*, *69*(3), 515–516.
- Wermuth, C. G. (2011). *THE PRACTICE OF MEDICINAL CHEMISTRY*. Academic Press.
- Yang, X.-X., Gu, W., Liang, L., Yan, H.-L., Wang, Y.-F., Bi, Q., ... Rao, G.-X. (2017). Screening for the bioactive constituents of traditional Chinese medicines—progress and challenges. *RSC Adv.*, *7*(6), 3089–3100.

12. ANEXOS

12.1 Parte experimental.

12.1.1 Información general.

Todos los reactivos empleados se adquirieron de Sigma-Aldrich y se utilizaron sin ningún tratamiento adicional. Durante las purificaciones por cromatografía en columna se utilizó sílica gel 60[®] de 230-400 mesh y alúmina neutra. 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, yodo y *p*-anisaldehído.

El THF manipulado se obtuvo utilizando malla molecular como desecante bajo atmósfera de nitrógeno, partiendo de THF anhidro comercial.

Los espectros de RMN se registraron en un espectrómetro Varian MR 400 MHz. 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 denotó 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. Se utilizó CDCl₃ como disolvente deuterado durante los análisis de RMN.

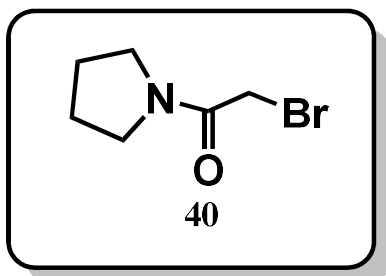
Los análisis de las muestras por espectrometría de masas se llevaron a cabo por infusión directa utilizando el equipo SYNAPT G2-Si (Waters) equipado con fuente de ionización por electronebulización (ESI), filtro de masas de cuadrupolo sencillo y analizador de masas de tiempo de vuelo (Q-TOF).

Los parámetros de operación del espectrómetro 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-enkefalina con masa en ESI(+) de 556.2771 Da.

La preparación de las muestras para el análisis de masas se realizó primero diluyendo 3 mg del compuesto en 1 mL de metanol (MeOH), para después centrifugar la disolución a 18000 xg por 10 minutos. Del sobrenadante se tomaron 10 μ L, el cual se mezcló con 2 μ L de ácido fórmico (HCOOH) al 50% y 1 mL de MeOH.

12.2 Métodos de síntesis.

12.2.1 Síntesis de 2-bromo-1-(pirrolidin-1-il) etanona (**40**).

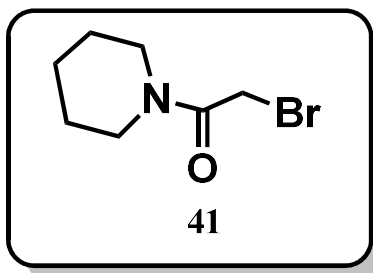


En un matraz redondo provisto de agitación magnética se colocaron 1.2 mL (2.78 g, 14.38 mmol) de bromuro de bromoacetilo en 20 mL de CH₂Cl₂. La disolución resultante se enfrió en un baño de hielo de 0 a 5 °C y se le adicionaron gota a gota vía embudo de adición 2.4 mL (2.4 g, 28.75 mmol) de pirrolidina disuelto en 30 mL de CH₂Cl₂. La mezcla de reacción se agitó de 0 a 25 °C durante 5 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se finalizó la reacción adicionando 20 mL de agua destilada, se trasvasó a un embudo de adición, separando el producto por bipartición en la fase orgánica. A la fase acuosa resultante se le extrajo el producto remanente (3 X 20 mL CH₂Cl₂). Al extracto orgánico combinado se adicionaron 20 mL de HCl 0.2 M en un embudo de adición para eliminar la pirrolidina remanente a través de la fase acuosa. La fase orgánica final se desecó sobre Na₂SO₄, se filtró y concentró a presión reducida, obteniendo 2.416 g (92%) de **40** como un sólido blando que funde a temperatura ambiente.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.87-1.9 (m, 2H, CH₂); 1.98-2.05 (m, 2H, CH₂); 3.50 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N), 3.54 (t, *J* = 6.8, 3.82 Hz, 2H, CH₂N); 3.82 (sistema AB, *J* = 20.0 Hz, 2H, CH₂Br). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ = 24.31 (s, CH₂Br); 26.15 (s, CH₂); 27.39 (s, CH₂); 46.43 (s, CH₂N); 47.06 (s, CH₂N); 165.0 (s, NCO).

HRMS [FAB⁺]: calculado para C₆H₁₀NOBr [M+H]⁺, *m/z* 192.0024; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 192.0095.

12.2.2 Síntesis de 2-bromo-1-(piperidin-1-il) etanona (**41**).

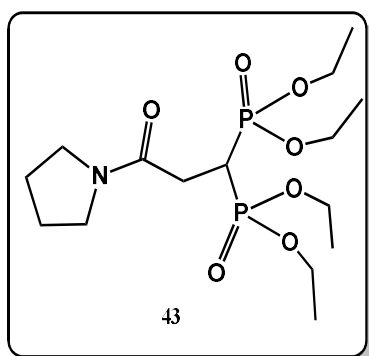


En un matraz redondo provisto de agitación magnética se colocaron 1.2 mL (2.78 g, 13.78 mmol) de bromuro de bromoacetilo en 20 mL de CH₂Cl₂. La disolución resultante se enfrió en un baño de hielo de 0 a 5 °C y se le adicionaron gota a gota vía embudo de adición 2.72 mL (2.348 g, 27.56 mmol) de pirrolidina disuelto en 30 mL de CH₂Cl₂. La mezcla de reacción se agitó de 0 a 25 °C durante 5 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se finalizó la reacción adicionando 20 mL de agua destilada, se trasvasó a un embudo de adición separando el producto por bipartición en la fase orgánica. A la fase acuosa resultante se le extrajo el producto remanente (3 X 20 mL CH₂Cl₂). Al extracto orgánico combinado se adicionaron 20 mL de HCl 0.2 M en un embudo de adición para eliminar la pirrolidina remanente a través de la fase acuosa. La fase orgánica final se desecó sobre Na₂SO₄, filtró y concentró a presión reducida, obteniendo 2.47 g (87%) de **32** como un líquido amarillo claro.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.55–1.60 (m, 2H, CH₂); 1.63–1.69 (m, 4H, CH₂); 3.41–3.46 (m, 2H, CH₂N); 3.52–3.62 (m, 2H, CH₂N); 3.87 (sistema AB, *J* = 20.0 Hz, 2H, CH₂Br). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ = 24.25 (s, CH₂Br); 25.34 (s, CH₂); 26.17 (s, CH₂); 43.22 (s, CH₂N); 47.90 (s, CH₂N); 164.98 (s, NCO).

HRMS [FAB⁺]: calculado para C₆H₁₀NOBr [M+H]⁺, *m/z* 206.0180; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 206.0184

12.2.3 Síntesis de (3-oxo-3-(pirrolidin-1-il) propano-1,1-diil) bis(fosfonato) de tetraetilo (43).



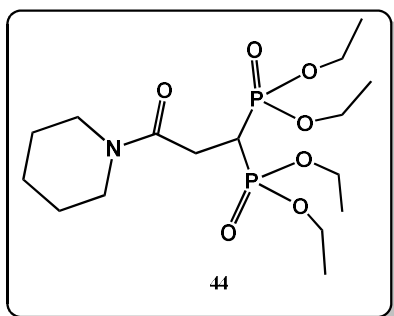
En un matraz redondo se depositó una barra de agitación, se selló, purgó y mantuvo en atmosfera de nitrógeno. Se agregó 0.48 mL (1.93 mmol) de difosfonato de tetraetilo y disolvió en 8 mL de THF anhidro. La disolución resultante se mantuvo en agitación y se enfrió en un baño de hielo a -5 °C. A la par, en otro matraz sellado, purgado, en atmosfera de nitrógeno gas se depositaron 0.93 g (4.8 mmol) del intermediario **40** en 8 mL

de THF anhidro y se agitó en un baño de hielo a -5 °C. Después de 20 min en agitación se adicionaron gota a gota 1.5 equivalentes de NaHMDS al primer matraz. A la mezcla de reacción resultante se adicionó el compuesto **40** gota a gota y se mantuvo en agitación durante 10 min a -5 °C y posteriormente 18 h sin agitación a una temperatura de -20 °C en un congelador. Habiendo transcurrido el tiempo de reacción, la solución se concentró a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna flash utilizando alúmina como fase estacionaria y una mezcla de CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH (50:49:1) como fase móvil, obteniendo 0.687 g (89%) del intermediario **43** como un aceite amarillo ligeramente verdoso.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.33 (t, *J* = 7 Hz, 12H, CH₃); 1.83-2.00 (m, 2H, CH₂); 2.79 (td, *J* = 16.2, 5.8 Hz, 2H, OCH₂); 3.47 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂N); 3.48 (tt, *J* = 20.4, 6.0 Hz, 1H, CHP₂); 3.5 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂N); 4.10-4.25 (m, 8H, OCH₂). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ = 16.00 (d, *J* = 6.1 Hz, CH₃); 24.37 (s, CH₂); 25.99 (s, CH₂); 30.31 (t, *J* = 4.1 Hz, CH₂); 31.59 (t, *J* = 135.4 Hz, CHP₂); 46.08 (s, CH₂N); 46.42 (s, CH₂N); 62.70 (dd, *J* = 40.7, 6.5 Hz, OCH₂); 167.69 (t, *J* = 7.6 Hz, NCO); **RMN ³¹P** (161.9 MHz, CDCl₃): δ = 23.86 (s).

HRMS [FAB⁺]: calculado para C₁₅H₃₁NO₇P₂ [M+H]⁺, *m/z* 400.1654; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 400.1720.

12.2.4 Síntesis de (3-oxo-3-(piperidin-1-il) propano-1,1-diil) bis(fosfonato) de tetraetilo (44).

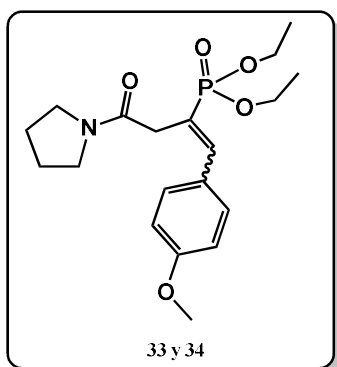


En un matraz redondo se depositó una barra de agitación, se selló, purgó y mantuvo en atmosfera de nitrógeno. Se agregó 0.48 mL (1.93 mmol) de difosfonato de tetraetilo y disolvió en 8 mL de THF anhidro. La disolución resultante se mantuvo en agitación y se enfrió en un baño de hielo a -5 °C. A la par, en otro matraz sellado, purgado, en atmósfera de nitrógeno, se depositaron 0.99 g (4.8 mmol) del intermediario **41** en 8 mL de THF anhidro y se agitó en un baño de hielo a -5 °C. Después de 20 min en agitación se adicionaron gota a gota 1.5 equivalentes de NaHMDS al primer matraz. A la mezcla de reacción resultante se adicionó el compuesto **41** gota a gota y se mantuvo en agitación durante 10 min a -5 °C y posteriormente 18 h sin agitación a una temperatura de -20 °C en un congelador. Habiendo transcurrido el tiempo de reacción, la solución se concentró a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna flash utilizando alúmina como fase estacionaria y una mezcla de CH₂Cl₂/AcOEt/MeOH (50:49:1) como fase móvil, obteniendo 0.78 g (82 %) del intermediario **44** como un aceite amarillo.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 12H, CH₃); 1.52–1.59 (m, 4H, CH₂); 1.61–1.72 (m, 2H CH₂); 2.85 (td, *J* = 16.3, 5.5 Hz, 2H, OCH₂); 3.39–3.50 (m, 4H, CH₂N); 3.48–3.68 (m, 1H, CHP₂); 4.07–4.26 (m, 8H, OCH₂). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ = 16.33 (d, *J* = 6.4 Hz, CH₃); 24.48 (s CH₂); 25.53 (s, CH₂); 26.34 (s, CH₂); 28.73 (t, *J* = 3.9 Hz, CH₂); 31.62 (t, *J* = 135.4 Hz, CHP₂); 43.55 (s, CH₂N); 46.43 (s, CH₂N); 62.71 (dd, *J* = 39.6, 6.6 Hz, OCH₂); 167.30 (t, *J* = 7.4 Hz, NCO). **RMN ³¹P** (161.9 MHz, CDCl₃): δ = 23.99.

HRMS [FAB⁺]: calculado para C₁₆H₃₃NO₇P₂ [M+H]⁺, *m/z* 414.1810; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 414.1809.

12.2.5 Síntesis de (1-(4-metoxifenil)-4-oxo-4-(pirrolidin-1-il)but-1-en-2-il) fosfonato de dietilo (**33-34**).



En un matraz redondo se depositó una barra de agitación, se selló, purgó y mantuvo en atmósfera de nitrógeno. Se agregó 0.35 g (0.883 mmol) de difosfonato de pirrolidina **43** y se disolvió en 7 mL de THF anhidro. La disolución resultante se mantuvo en agitación y se enfrió en un baño de hielo/sal a -5 °C. A la par, en otro matraz sellado, purgado, en atmósfera de nitrógeno, se depositaron 0.12 mL (0.97 mmol) de *p*-anisaldehído en 7 mL de THF anhidro y se agitó por 5 min hasta disolver completamente y después se enfrió en un baño de hielo a -5 °C. Después de 20 min en agitación se adicionaron gota a gota 1.5 equivalentes de *n*-BuLi al primer matraz. Se dejó reaccionar 15 min en el baño y 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente la reacción se mantuvo en baño de hielo donde se le adicionó la disolución de *p*-anisaldehído vía cánula. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 10 min a -5 °C y 18 h sin agitación a una temperatura de -20 °C en un congelador. Habiendo transcurrido el tiempo de reacción, la solución se concentró a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna flash utilizando sílica como fase estacionaria y una mezcla de AcOEt/MeOH (90:10) como fase móvil, logrando separar los diastereoisómeros *E* y *Z*, obteniendo 69 mg (20%) y 54 mg (16%) de los productos **33** y **34**, respectivamente, ambos con aspecto de aceite viscoso color amarillo claro.

Isómero (*E*)-**33**

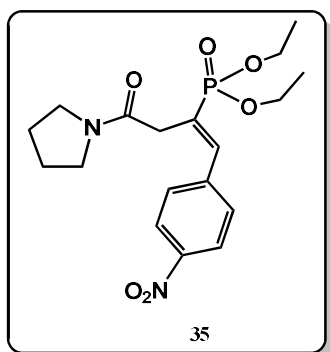
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃); 1.85-2.03 (m, 4H, CH₂); 3.41 (d, *J* = 18.7 Hz, 2H, COCH₂), 3.49-3.57 (m, 4H, CH₂N), 3.82 (s, 3H, OCH₃); 4.05-4.20 (m, 4H, OCH₂); 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, CH₂); 7.55 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH₂); 7.66 (d, *J* = 23.9 Hz, 1H, CHAr). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ = 16.48 (d, *J* = 6.9 Hz, CH₃); 24.67 (s, CH₂); 26.35 (s, CH₂); 33.73 (d, *J* = 10.5 Hz, CCH₂); 46.20 (s, CH₂N); 47.05 (s, CH₂N); 55.43 (s, OCH₃); 62.08 (d, *J* = 5.1 Hz, OCH₂); 113.99 (s, Ar); 121.99 (d, *J* = 181.2 Hz, CHP); 127.88 (d, *J* = 22.7 Hz, Ar); 130.90 (s, Ar); 146.61 (d, *J* = 11.7 Hz, CHAr); 160.25 (s, Ar); 168.35 (d, *J* = 1.8 Hz, NOC). **RMN ³¹P** (161.9 MHz, CDCl₃): δ = 22.07.

HRMS [FAB⁺]: calculado para C₁₉H₂₈NO₅P [M+H]⁺, *m/z* 382.1783; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 382.1952.

Isómero (Z)-**34**

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.11 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, CH₃); 1.84-2.01 (m, 4H, CH₂); 3.40 (d, *J* = 13.3 Hz, 2H, COCH₂), 3.48-3.55(m, 4H, CH₂N), 3.82 (s, 3H, OCH₃); 3.92-4.01 (m, 4H, OCH₂); 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, CH₂); 7.16 (d, *J* = 47.1 Hz, 1H, CHAr); 7.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, CH₂). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ = 15.98 (d, *J* = 7.0 Hz, CH₃); 24.43 (s, CH₂); 26.13 (s, CH₂); 41.79 (d, *J* = 12.0 Hz, CCH₂); 45.90 (s, CH₂N); 46.77 (s, CH₂N); 55.22 (s, OCH₃); 61.80 (d, *J* = 5.6 Hz, OCH₂); 113.12 (s, Ar); 121.35 (d, *J* = 178.8 Hz, CHP); 128.13 (d, *J* = 7.4 Hz, Ar); 131.13 (s, Ar); 146.76 (d, *J* = 8.8 Hz, CHAr); 159.85 (s, Ar); 169.04 (d, *J* = 4.7 Hz, NOC). **RMN ³¹P** (161.9 MHz, CDCl₃): δ = 18.12 (s). **HRMS** [FAB⁺]: calculado para C₁₉H₂₈NO₅P [M+H]⁺, *m/z* 382.1783; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 382.1952.

12.2.6 Síntesis de (*E*)-(1-(4-nitrofenil)-4-oxo-4-(pirrolidin-1-il)but-1-en-2-il) fosfonato de dietilo (**35**).



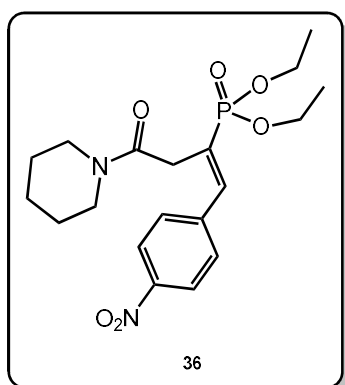
En un matraz redondo se depositó una barra de agitación, se selló, purgó y mantuvo en atmósfera de nitrógeno. Se agregó 0.3 g (0.75 mmol) del difosfonato de pirrolidina **43** y disolvió en 7 mL de THF anhidro. La disolución resultante se mantuvo en agitación y se enfrió en un baño de hielo/sal a -5 °C. A la par, en otro matraz sellado, purgado, en atmósfera de nitrógeno, se depositaron 0.136 g (0.9 mmol) del *p*-nitrobenzaldehído en 7 mL de THF anhidro y se

agitó por 5 min hasta disolver completamente y después se enfrió en un baño de hielo a -5 °C. Después de 20 min en agitación se adicionaron gota a gota 1.5 equivalentes de *n*-BuLi al primer matraz. Se dejó reaccionar 15 min en el baño de hielo y 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente la reacción se mantuvo en el baño donde se le adicionó la disolución del *p*-nitrobenzaldehído vía cánula. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 10 min a -5 °C y 18 h sin agitación a una temperatura de -20 °C en un congelador. Habiendo transcurrido el tiempo de reacción, la solución se concentró a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna flash utilizando sílica como fase estacionaria y una mezcla de AcOEt/MeOH (90:10) como fase móvil, obteniendo únicamente 94 mg (32%) del diastereoisómero (*E*)-**35** como un aceite viscoso color amarillo oscuro.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃); 1.86–2.05 (m, *J* = 36.5 Hz, 4H, CH₂); 3.36 (d, *J* = 18.6 Hz, 2H, COCH₂); 3.49–3.58 (m, 4H, CH₂N); 4.05–4.25 (m, 4H, OCH₂); 7.75 (d, *J* = 23.6 Hz, 1H, CHAr); 7.80 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, CH₂); 8.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, CH₂). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ = 16.31 (d, *J* = 6.8 Hz, CH₃); 24.49 (s, CH₂); 26.12 (s, CH₂); 33.44 (d, *J* = 9.9 Hz, CCH₂); 46.12 (s, CH₂N); 46.99 (s, CH₂N); 62.30 (d, *J* = 5.2 Hz, OCH₂); 123.63 (s, Ar); 128.27 (d, *J* = 179.3 Hz, CP); 129.78 (d, *J* = 1.4 Hz, Ar); 141.56 (d, *J* = 22.3 Hz, CCH); 144.05 (d, *J* = 11.8 Hz, CH); 147.71 (s, ArNO₂); 167.36 (d, *J* = 1.6 Hz, NCO). **RMN ³¹P** (161.9 MHz, CDCl₃): δ = 19.21 (s).

HRMS [FAB⁺]: calculado para C₁₈H₂₅N₂O₆P [M+H]⁺, *m/z* 397.1528; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 397.1576.

12.2.7 Síntesis de (*E*)-1-(4-nitrofenil)-4-oxo-4-(piperidin-1-il)but-1-en-2-il fosfonato de dietilo (**36**).

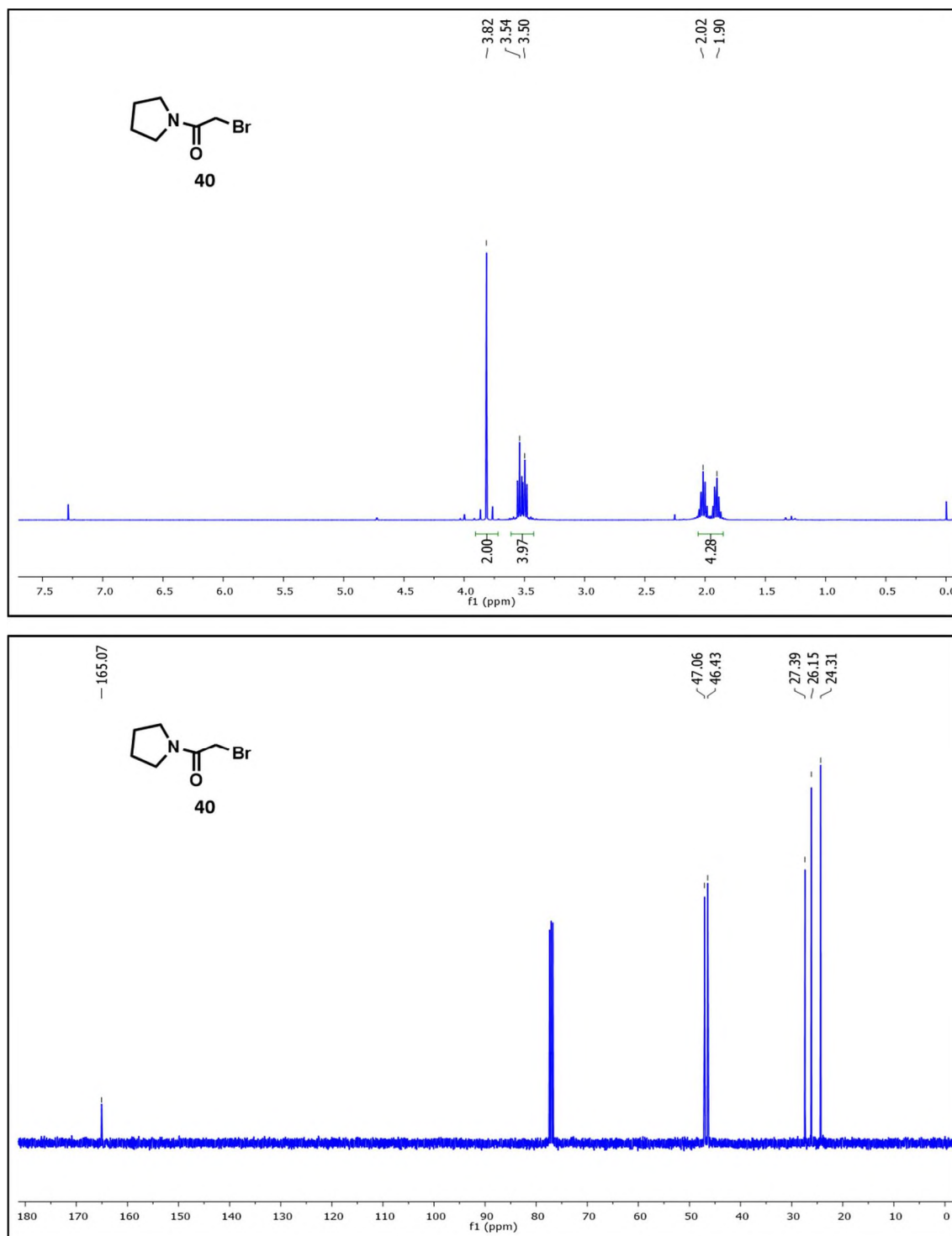


En un matraz redondo se depositó una barra de agitación, se selló, purgó y mantuvo en atmósfera de nitrógeno. Se agregó 0.45 g (1.08 mmol) de difosfonato de piperidina **44** y disolvió en 7 mL de THF anhidro. La disolución resultante se mantuvo en agitación y se enfrió en un baño de hielo/sal a -5 °C. A la par, en otro matraz sellado, purgado, en atmósfera de nitrógeno gas, se depositaron 0.19 g (1.3 mmol) del *p*-nitrobenzaldehído en 7 mL de THF anhidro y se agitó por 5 min hasta disolver completamente y después se enfrió en un baño de hielo a -5 °C. Después de 20 min en agitación se adicionaron gota a gota 1.5 equivalentes de *n*-BuLi al primer matraz. Se dejó reaccionar 15 min en el baño de hielo y 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente la reacción se mantuvo en baño de hielo donde se le adicionó la disolución del *p*-nitrobenzaldehído vía cánula. La mezcla de reacción se dejó en agitación por 10 min a -5 °C y 18 h sin agitación a una temperatura de -20 °C en un congelador. Habiendo transcurrido el tiempo de reacción, la solución se concentró a presión reducida y el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna flash utilizando sílica como fase estacionaria y una mezcla de AcOEt/MeOH (90:10) como fase móvil, obteniendo únicamente 115 mg (26%) del diastereoisómero (*E*)-**36** como un aceite viscoso color amarillo oscuro.

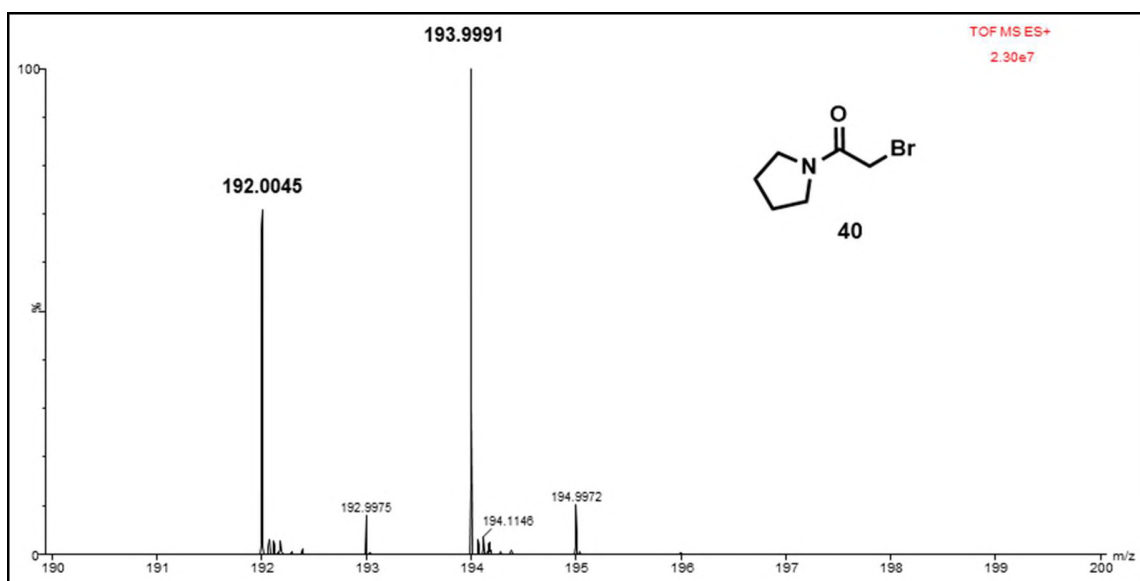
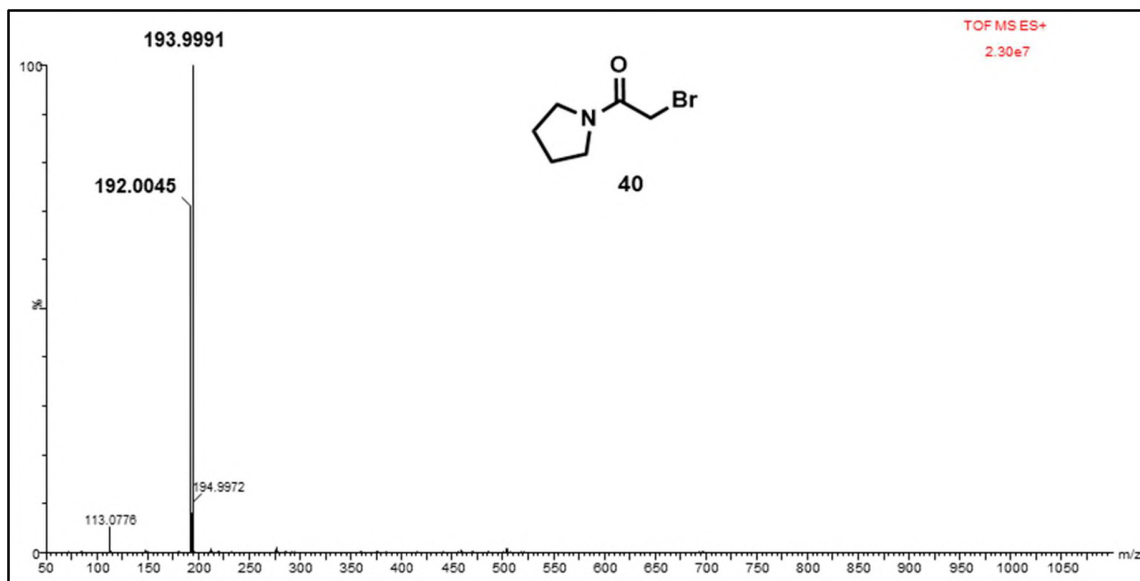
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, CH₃); 1.54–1.73 (m, 6H, CH₂CH₂CH₂); 3.40 (d, *J* = 18.3 Hz, 1H, COCH₂); 3.46 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂N); 3.60 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂N); 4.10–4.21 (m, 4H, OCH₂); 7.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, CH₂); 7.74 (d, *J* = 23.8 Hz, 1H, CHAr); 8.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, CH₂). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ = 16.31 (d, *J* = 6.7 Hz, CH₃); 24.46 (s, CH₂); 25.67 (s, CH₂); 26.08 (s, CH₂); 31.87 (d, *J* = 9.5 Hz, CH₂C); 43.35 (s, CH₂N); 47.25 (s, CH₂N); 62.33 (d, *J* = 5.3 Hz, OCH₂); 123.62 (s, Ar); 128.87 (d, *J* = 180.0 Hz, CP); 129.71 (d, *J* = 1.4 Hz, Ar); 141.63 (d, *J* = 22.6 Hz, CCH); 143.69 (d, *J* = 11.7 Hz, CH); 147.61 (s, ArNO₂); 167.15 (d, *J* = 1.7 Hz, NCO). **RMN ³¹P** (161.9 MHz, CDCl₃): δ = 19.45 (s).

HRMS [FAB⁺]: calculado para C₁₉H₂₇N₂O₆P [M+H]⁺, *m/z* 411.1684; encontrado para [M+H]⁺, *m/z* 411.1690.

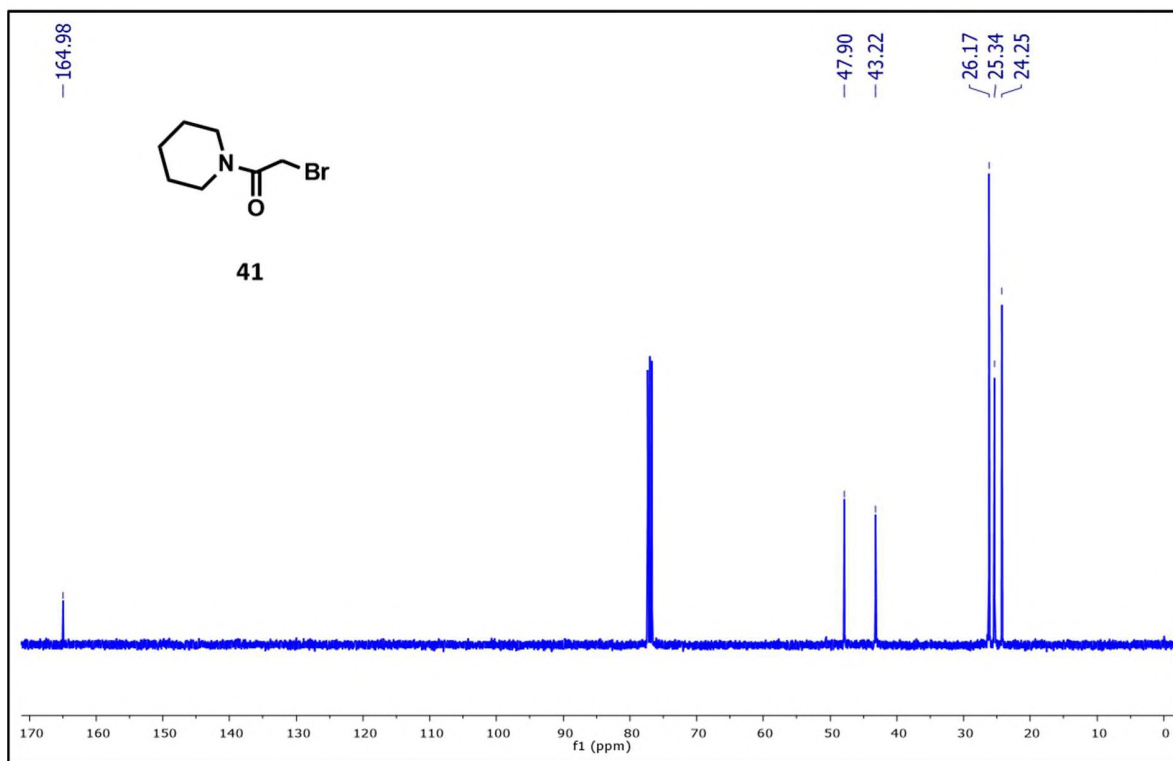
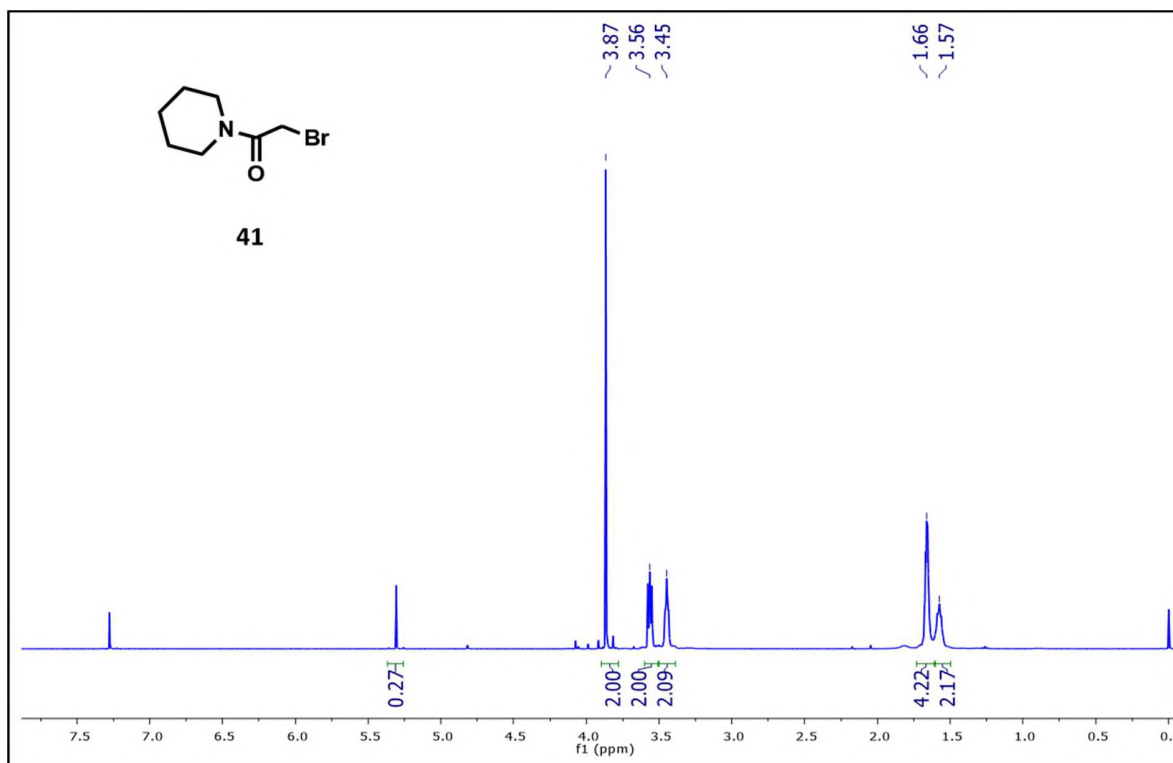
12.2.8 Caracterización de intermediarios y productos de síntesis.



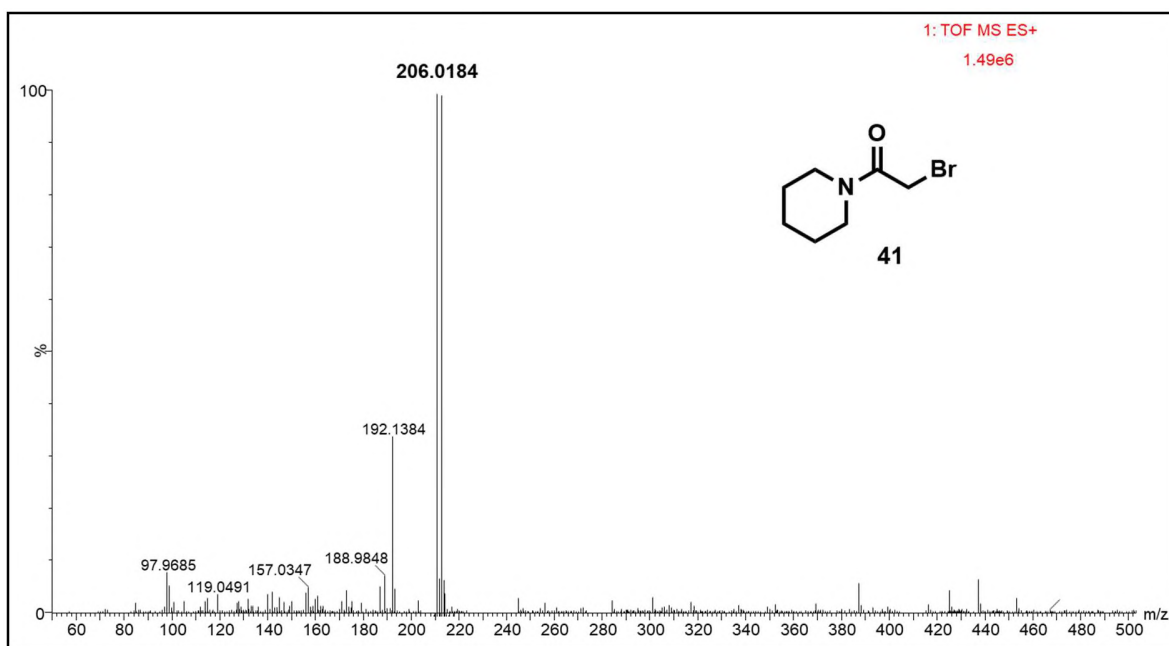
Espectros de ¹H (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C (100 MHz, CDCl₃) del bromuro **40**.



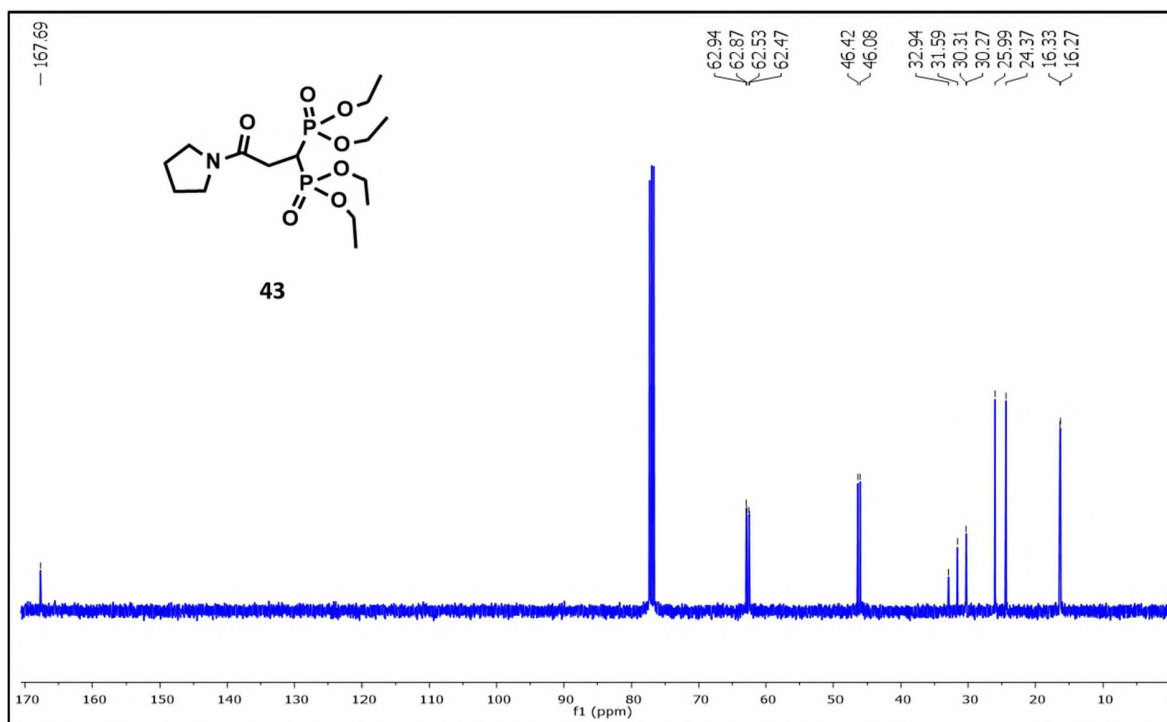
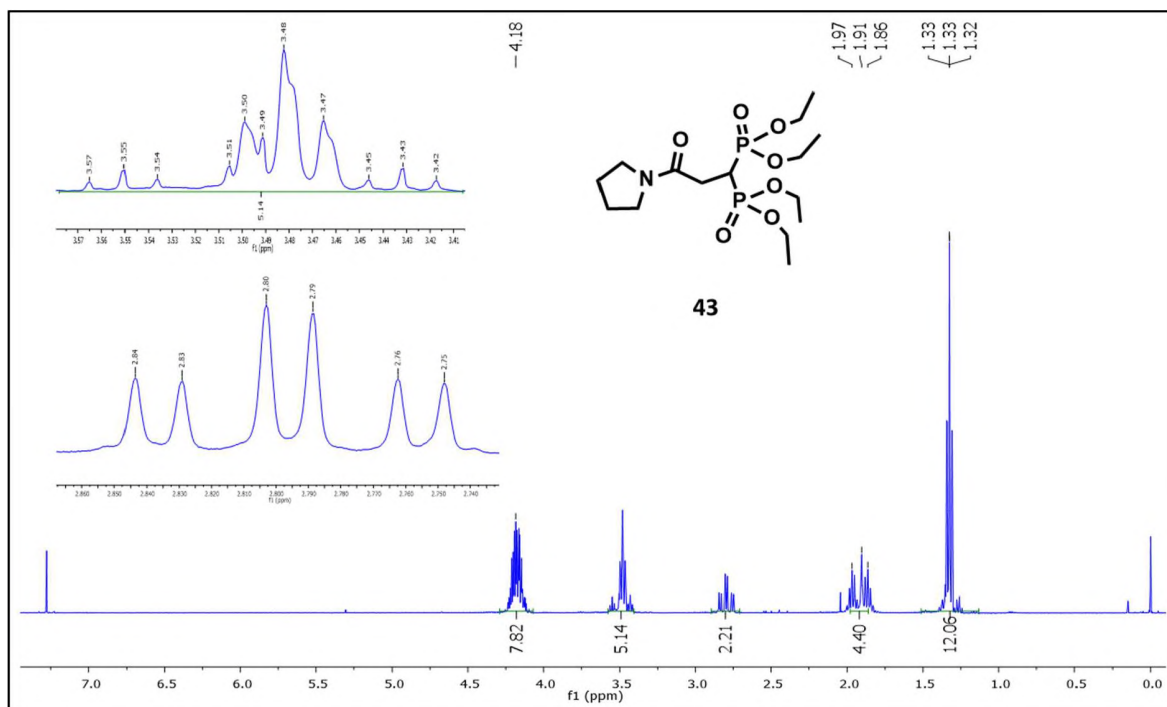
Espectros HRMS del bromuro **40**.



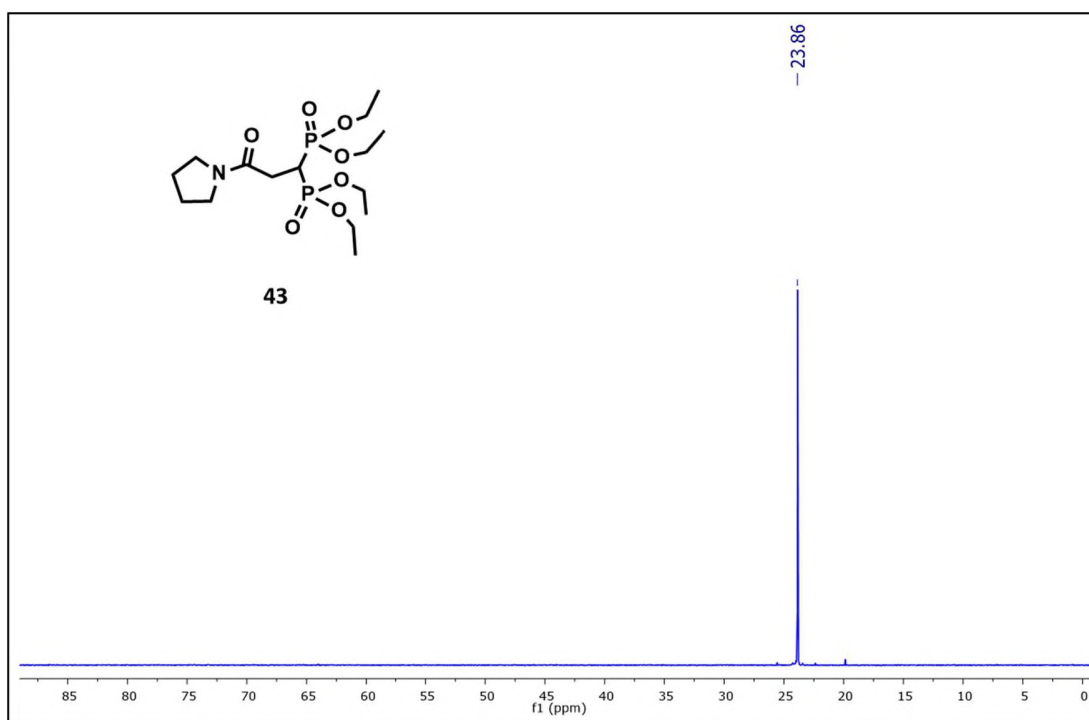
Espectros de ^1H (400 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del bromuro **41**.



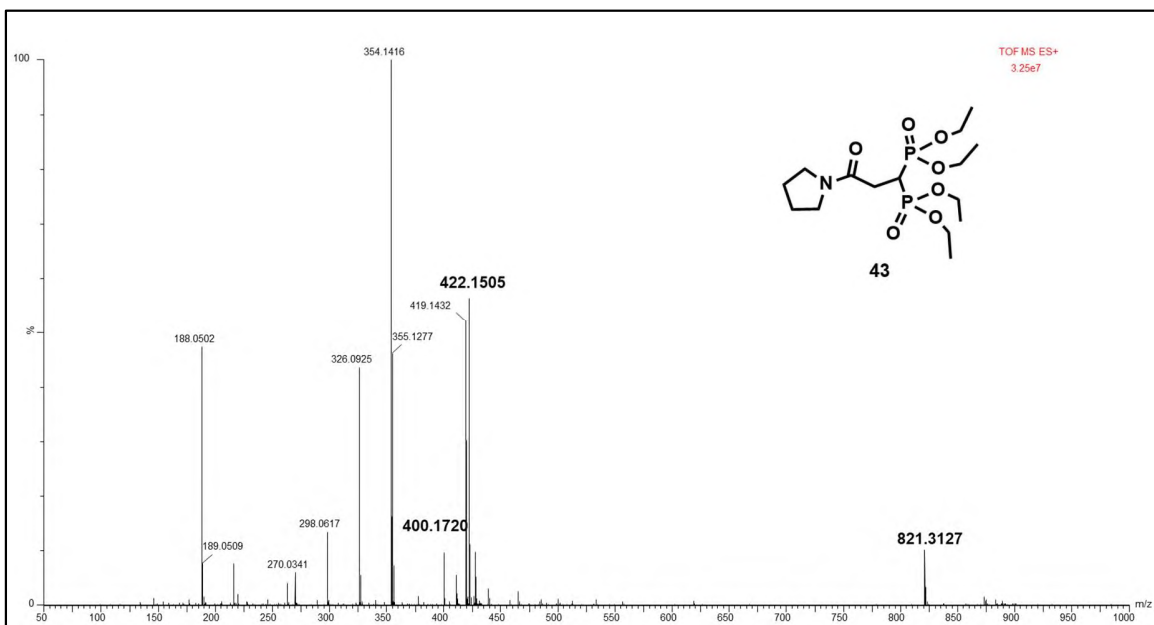
Espectros HRMS del bromuro **41**.



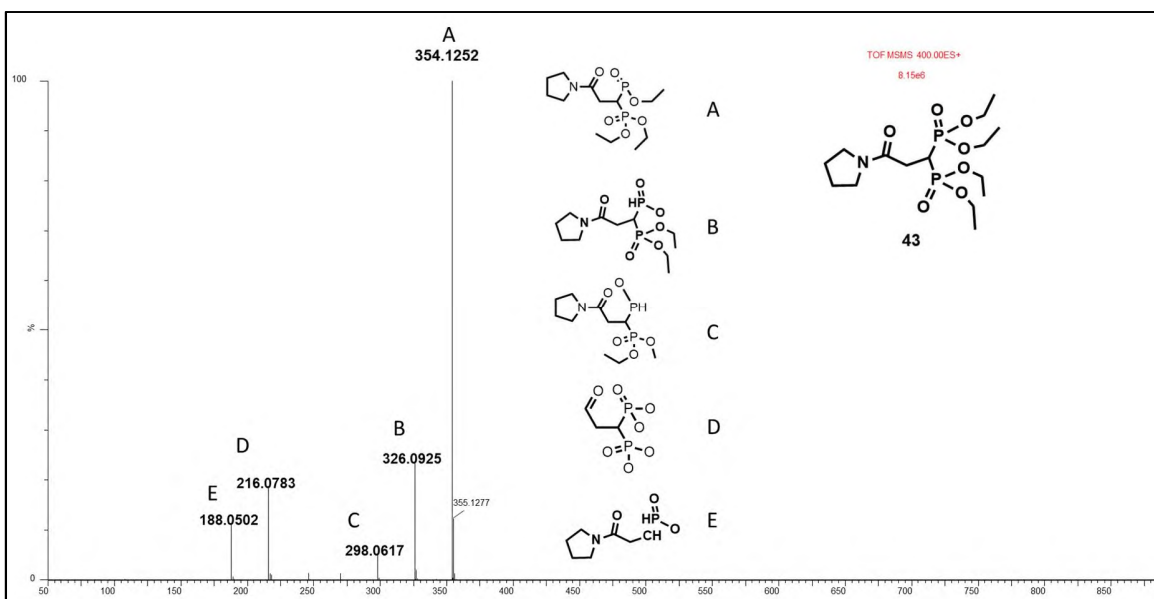
Espectros de ^1H (400 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del bisfosfonato **43**.



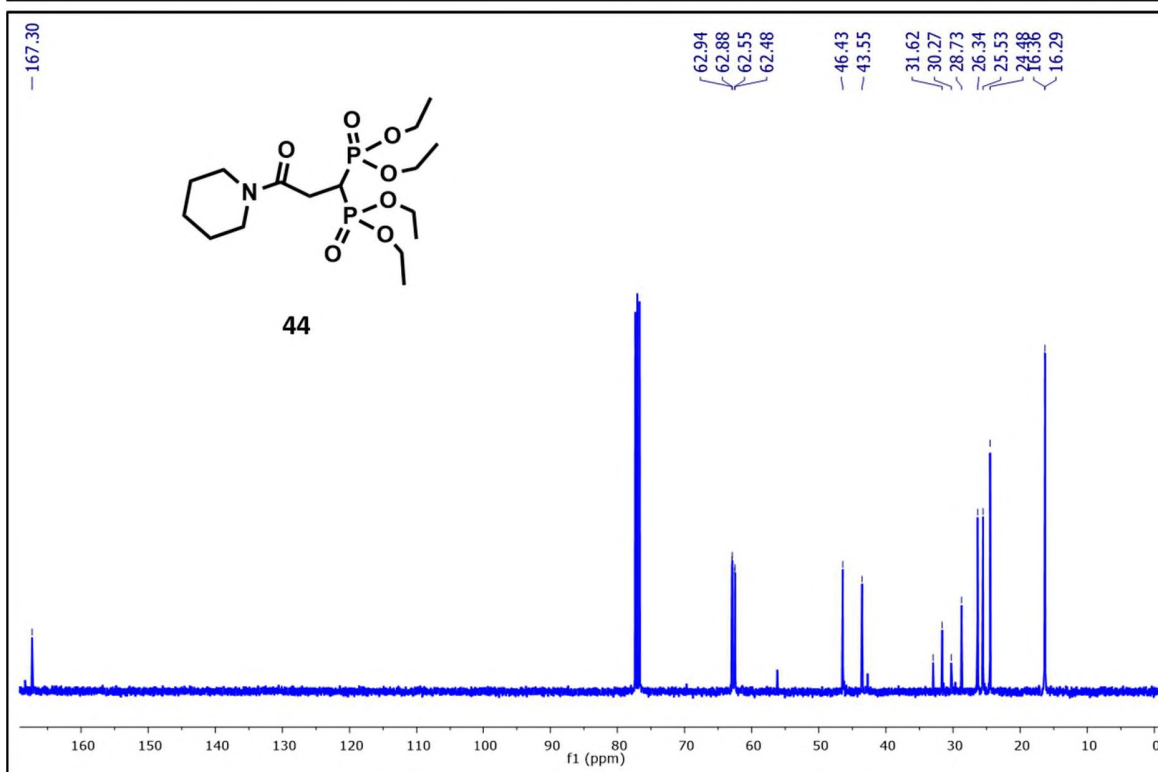
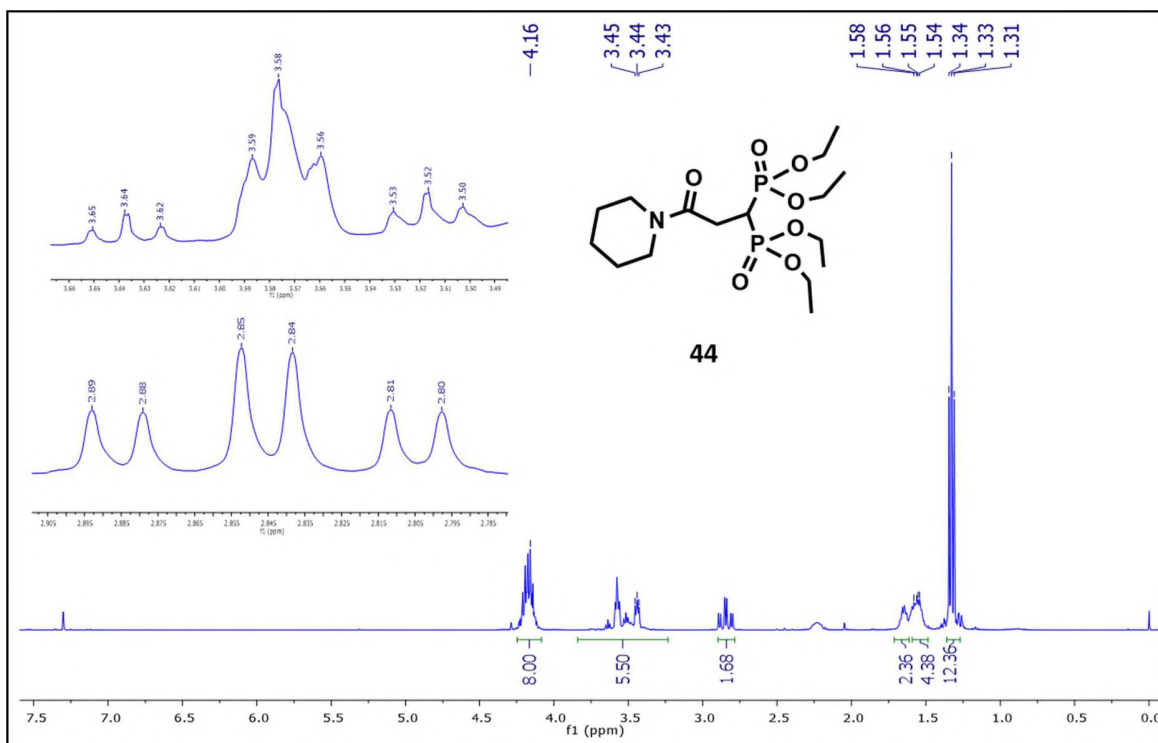
Espectro de ^{31}P (161.9 MHz, CDCl_3) del bisfosfonato **43**.



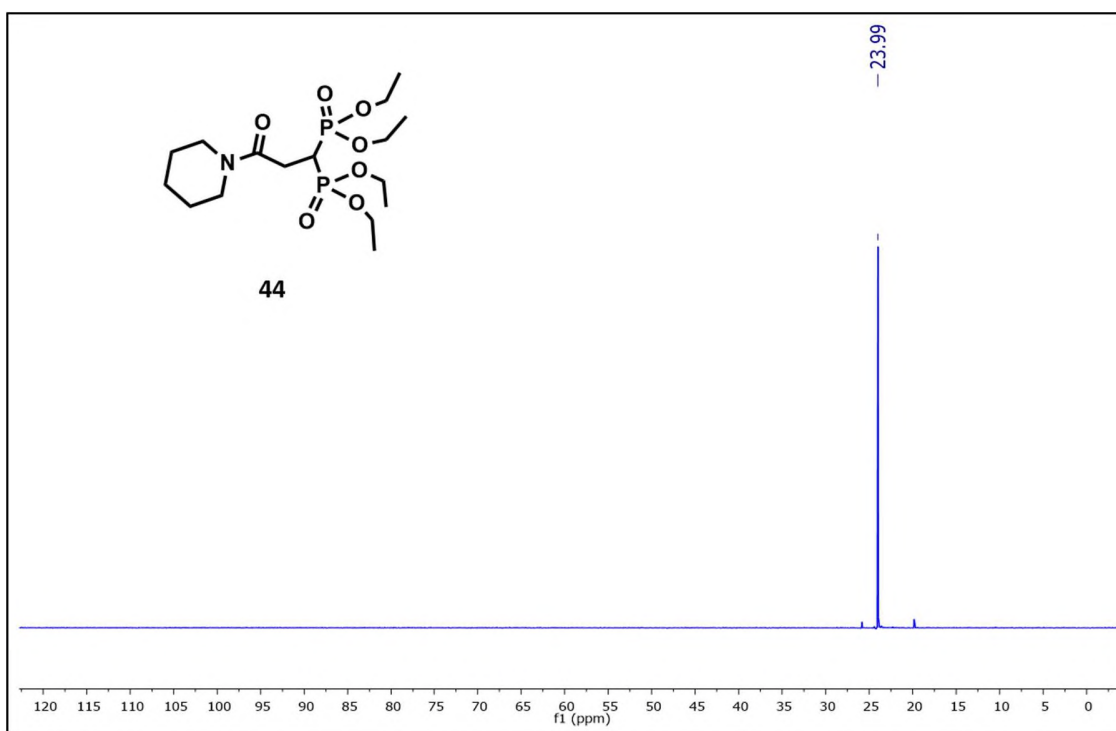
Espectros HRMS TOF MS ES+ del bisfosfonato **43**.



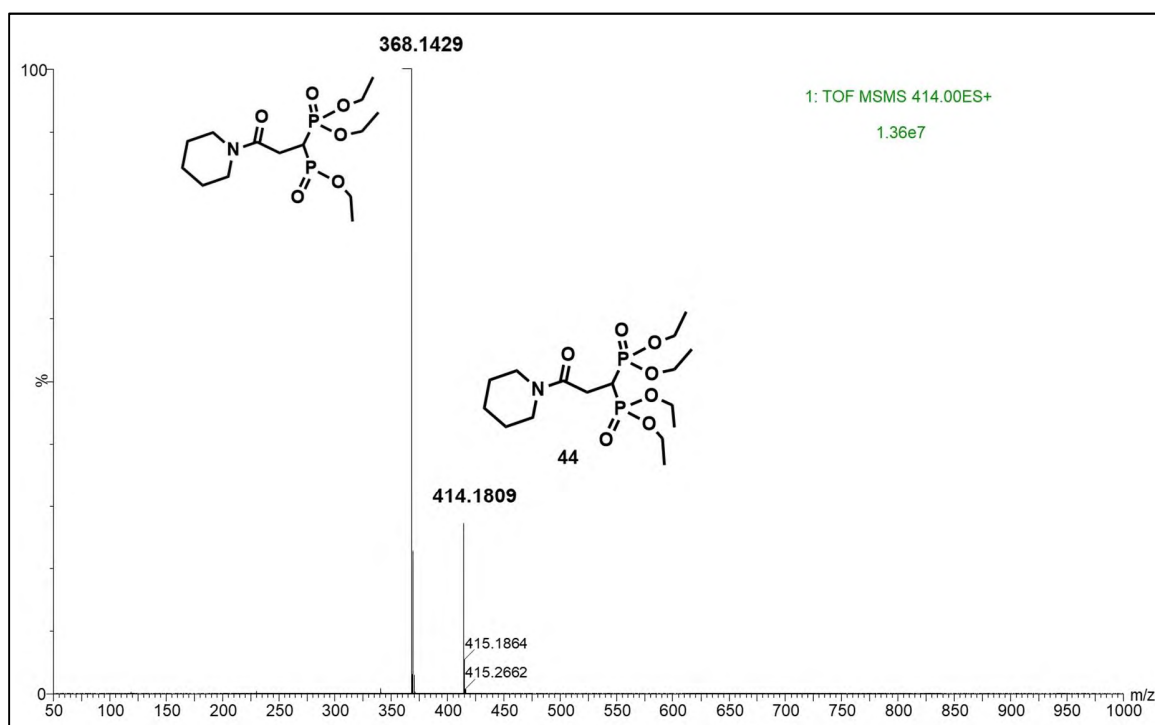
Espectros HRMS TOF MSMS 400.00 ES+ del bisfosfonato **43** y patrón de fragmentación propuesto.



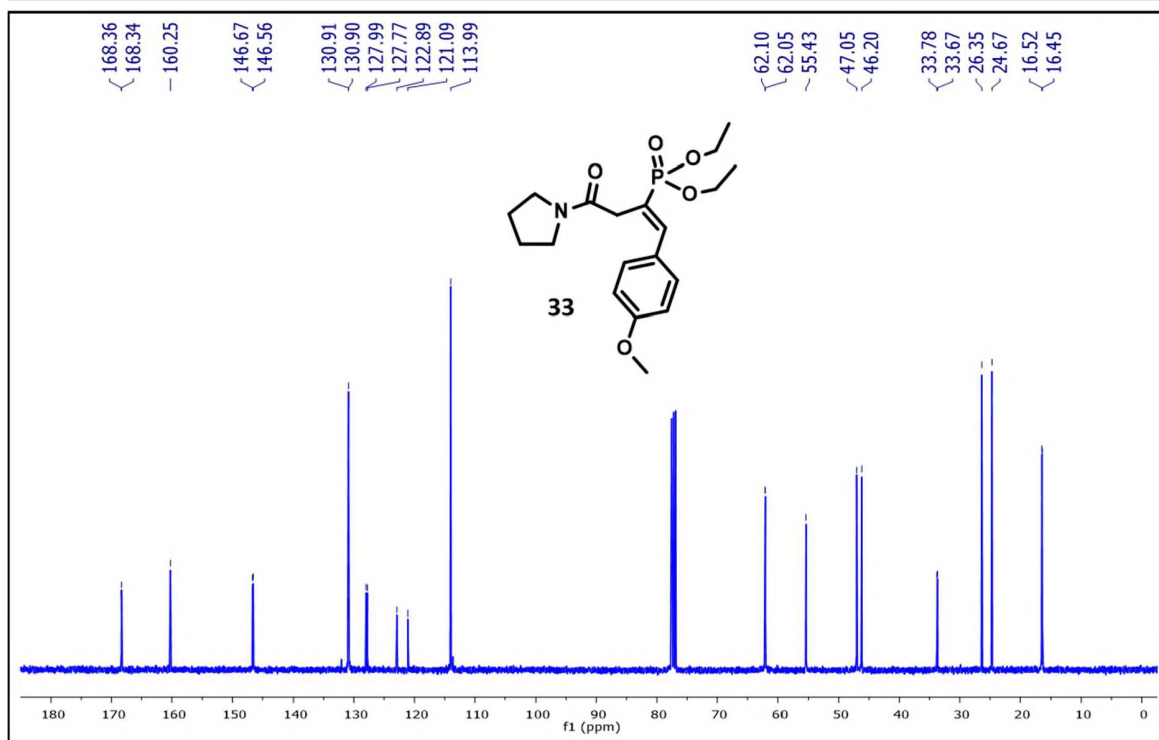
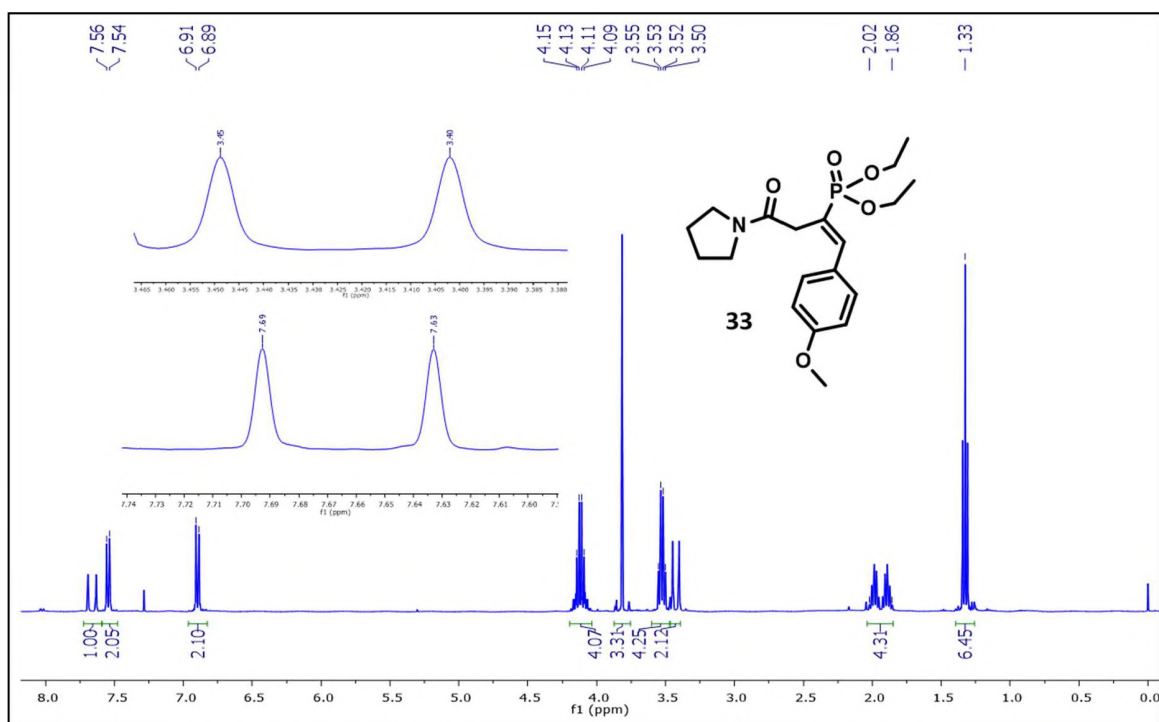
Espectros de ^1H (400 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del bisfosfonato **44**.



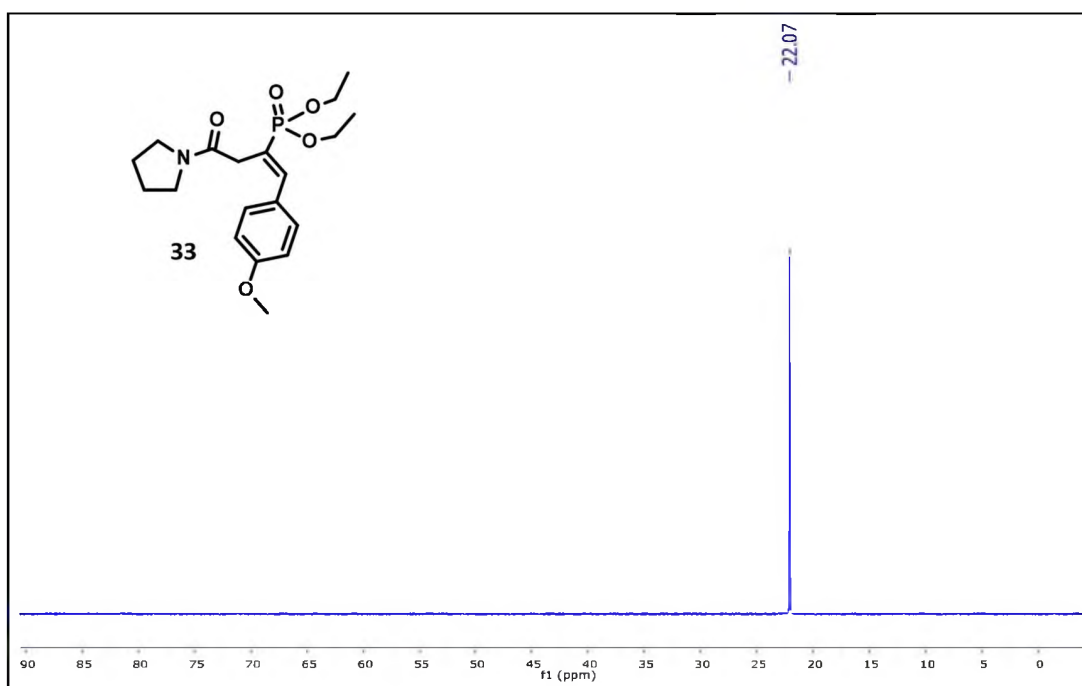
Espectro de ^{31}P (161.9 MHz, CDCl_3) del bisfosfonato **44**.



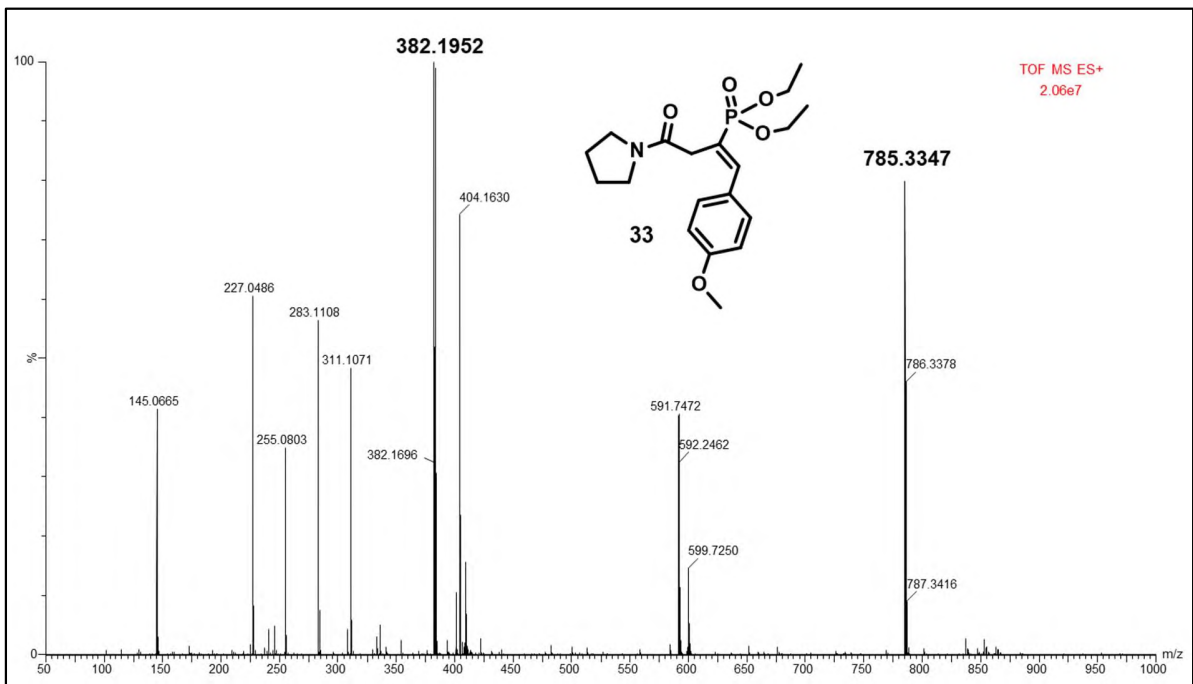
Espectros HRMS TOF MSMS 414.00 ES+ del bisfosfonato **44** y patrón de fragmentación propuesto.



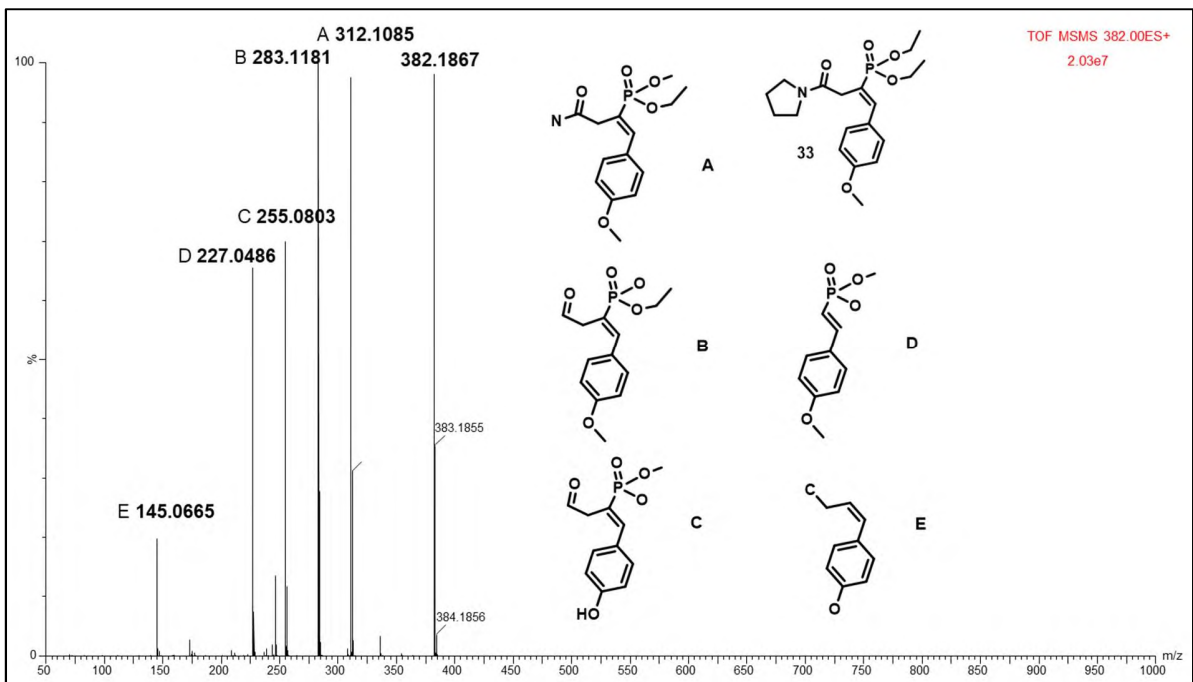
Espectros de ^1H (400 MHz, CDCl_3) y ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del vinilfosfonato **33**.



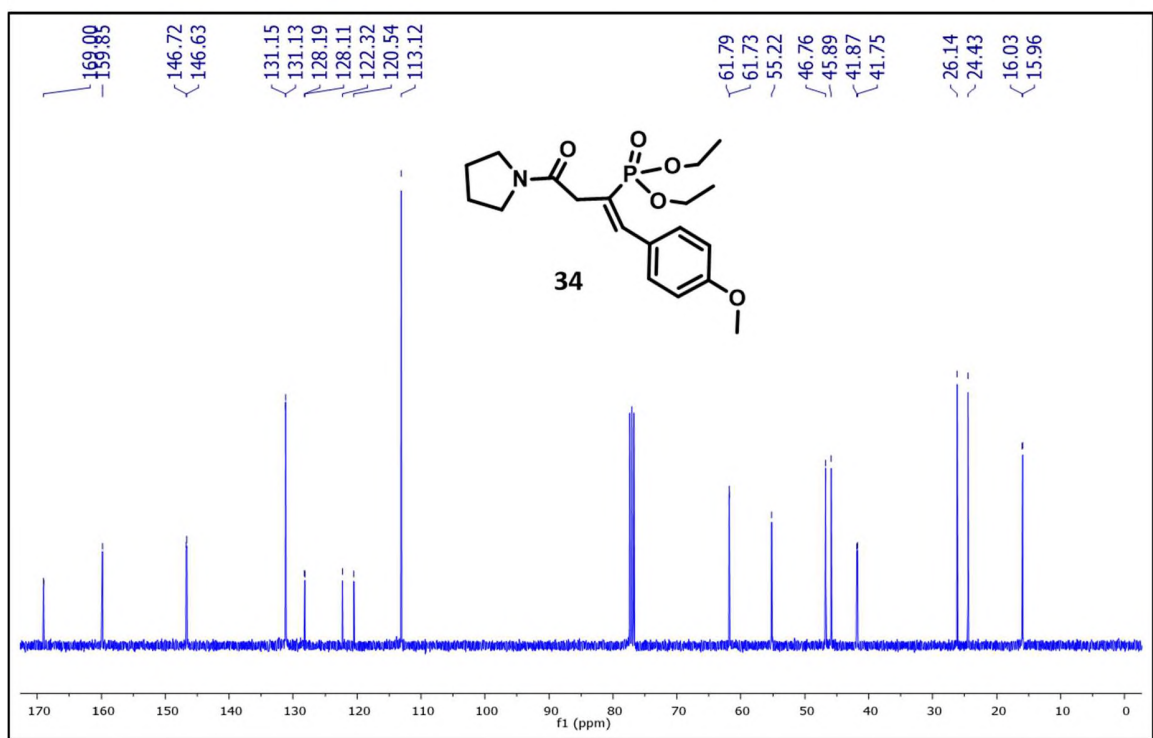
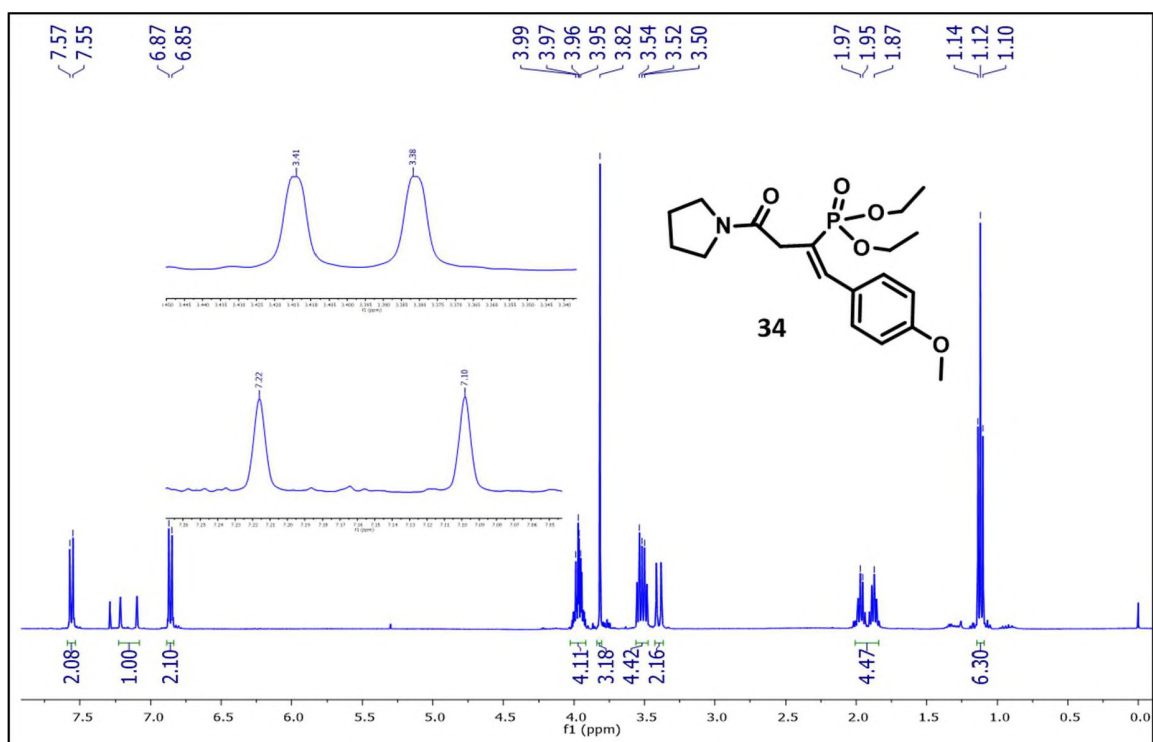
Espectro de ^{31}P (161.9 MHz, CDCl_3) del vinilfosfonato **33**.



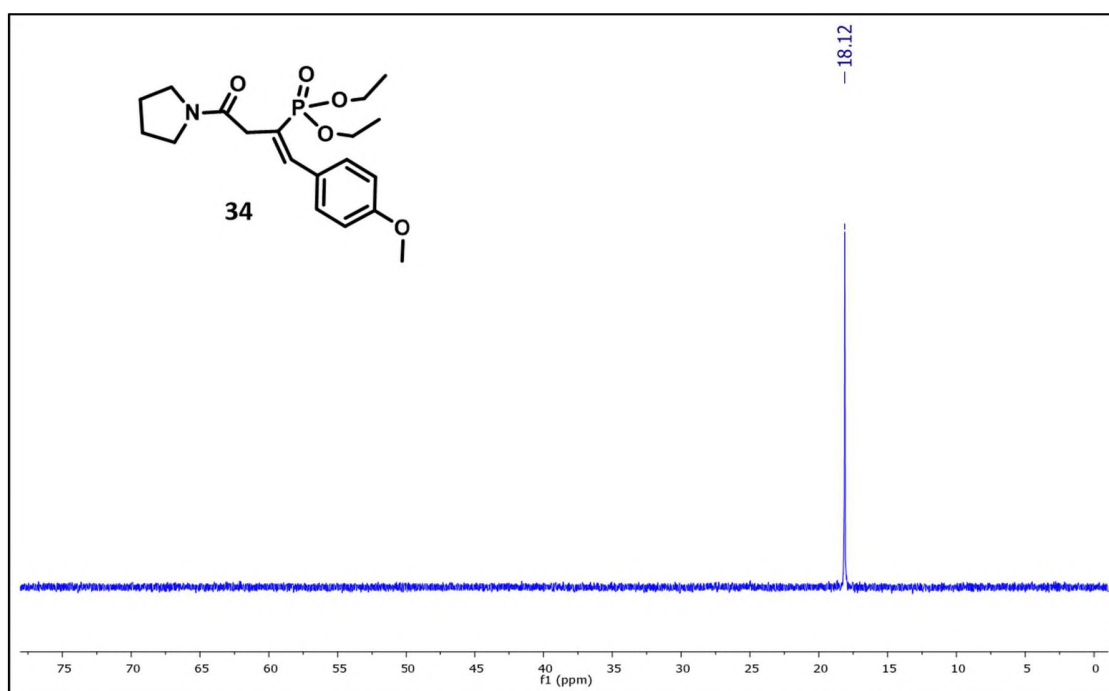
Espectro HRMS TOF MS ES+ de vinilfosfonato **33**.



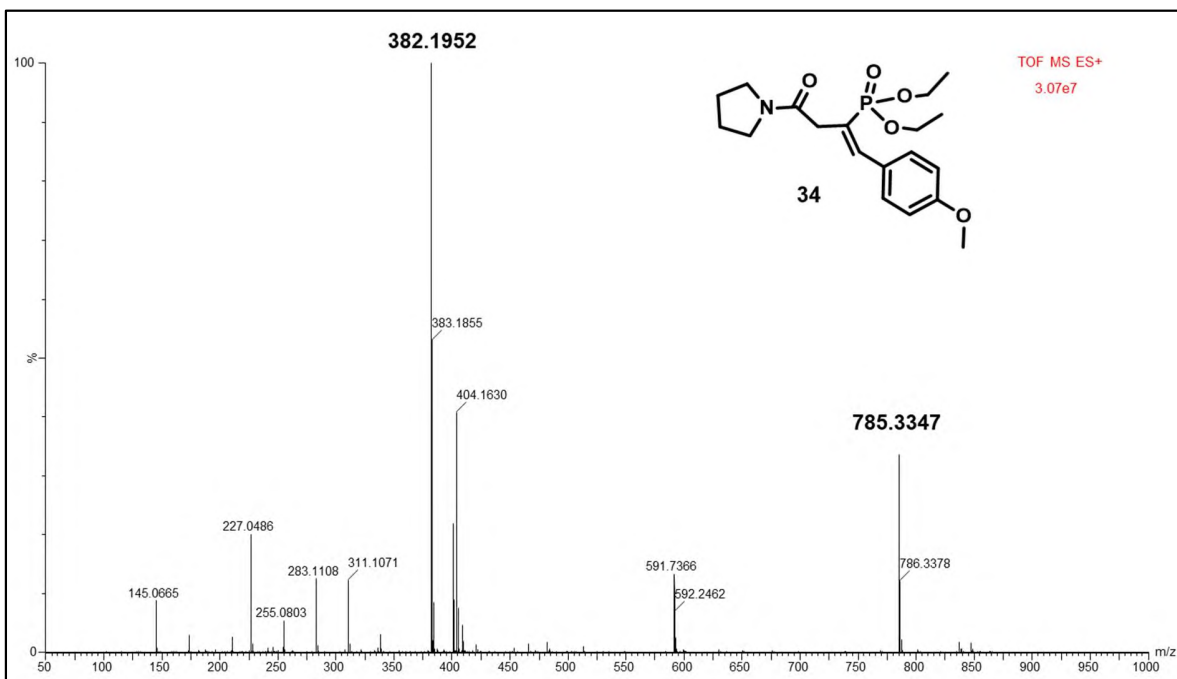
Espectro HRMS TOF MSMS 382.00 ES+ de vinilfosfonato **33** y patrón de fragmentación propuesto.



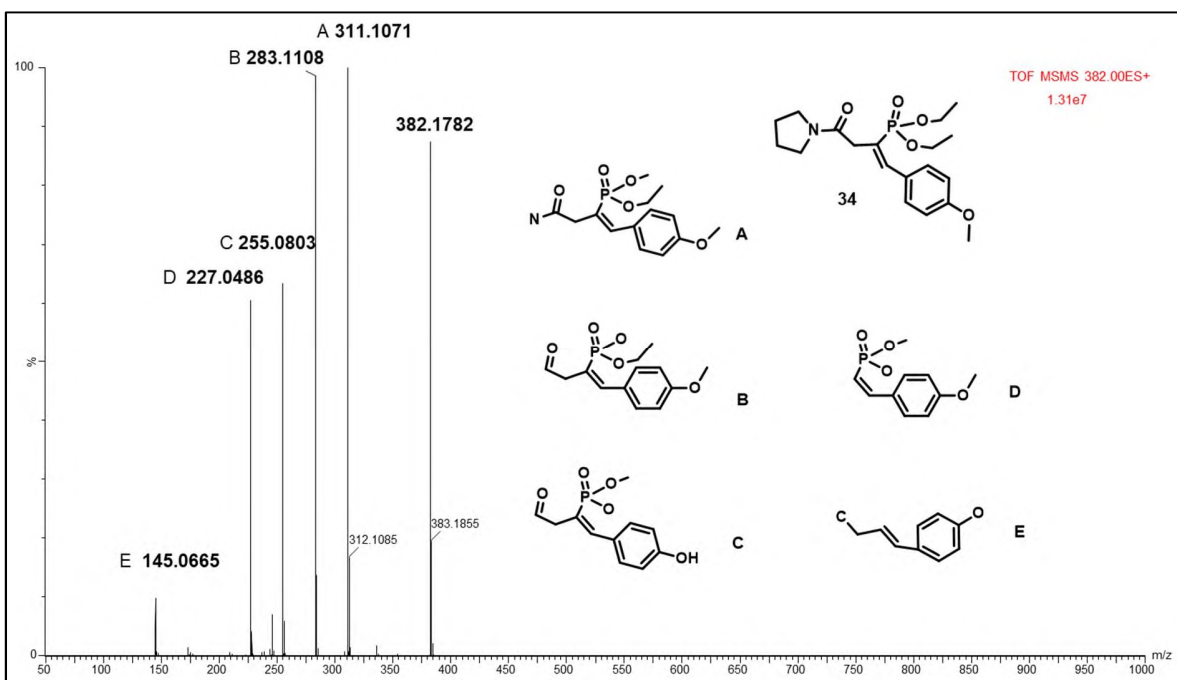
Espetros de ¹H (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C (100 MHz, CDCl₃) del vinilfosfonato **34**.



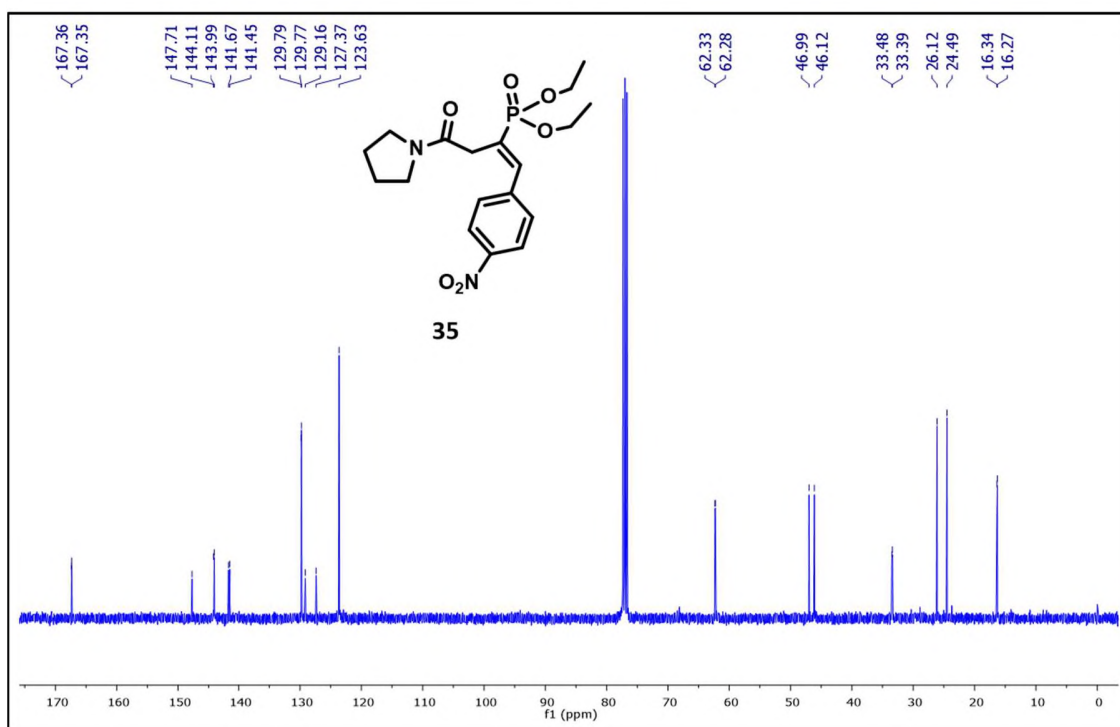
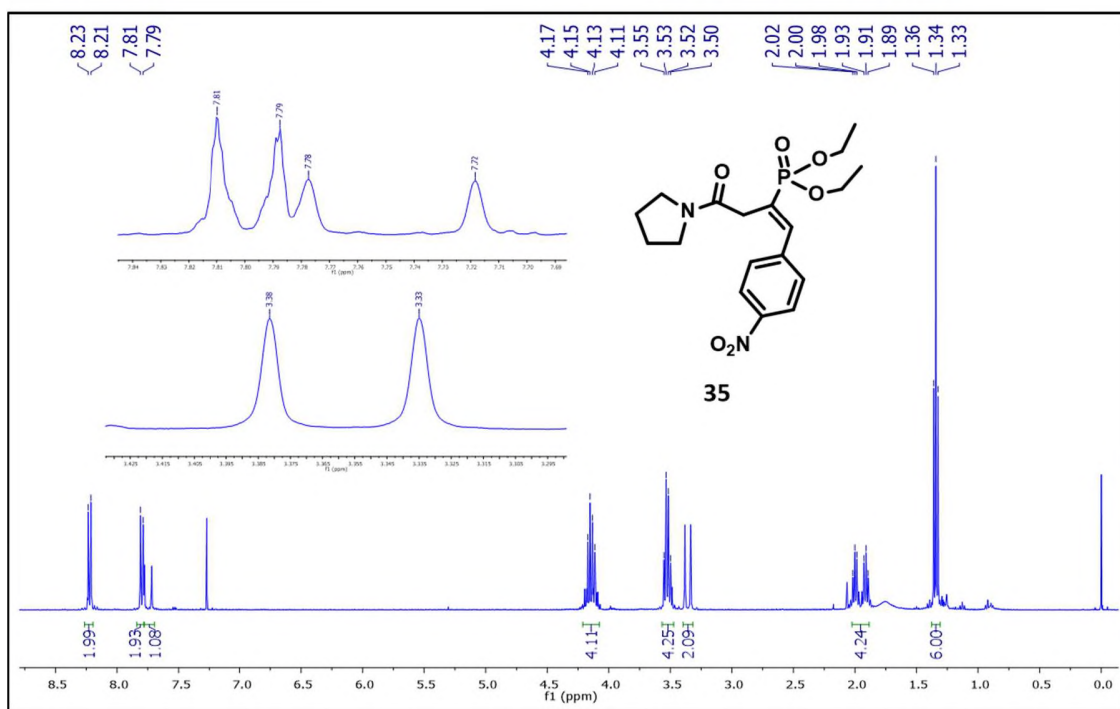
Espectro de ^{31}P (161.9 MHz, CDCl_3) del vinilfosfonato **34**.



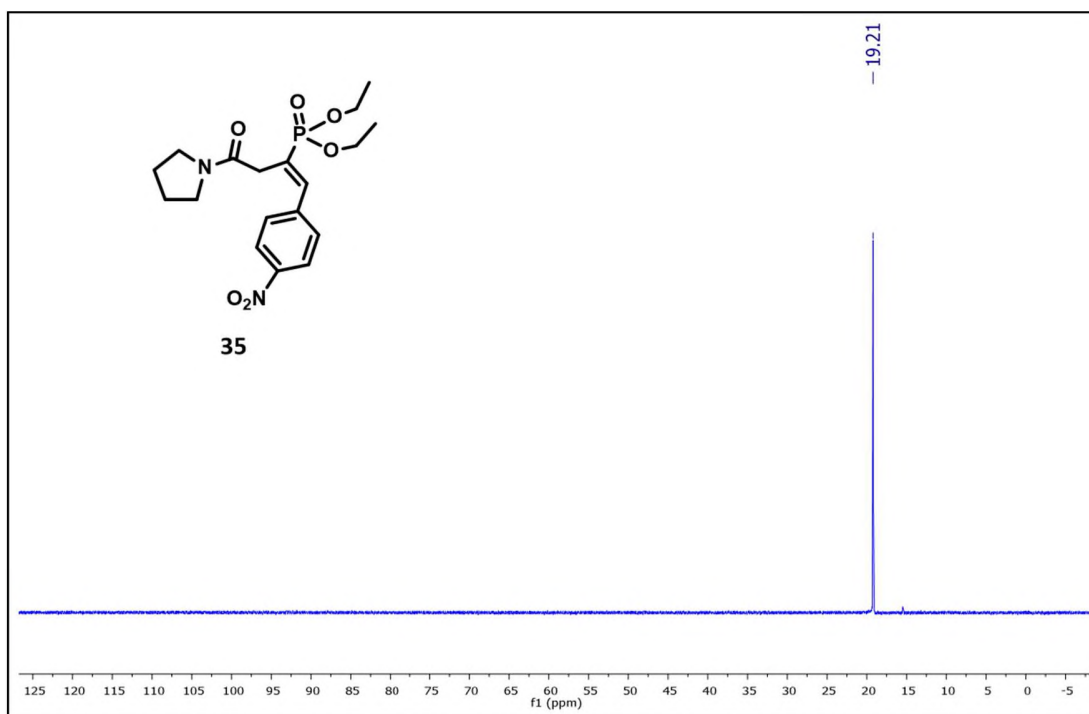
Espectro HRMS TOF MS ES+ de vinilfosfonato **34**.



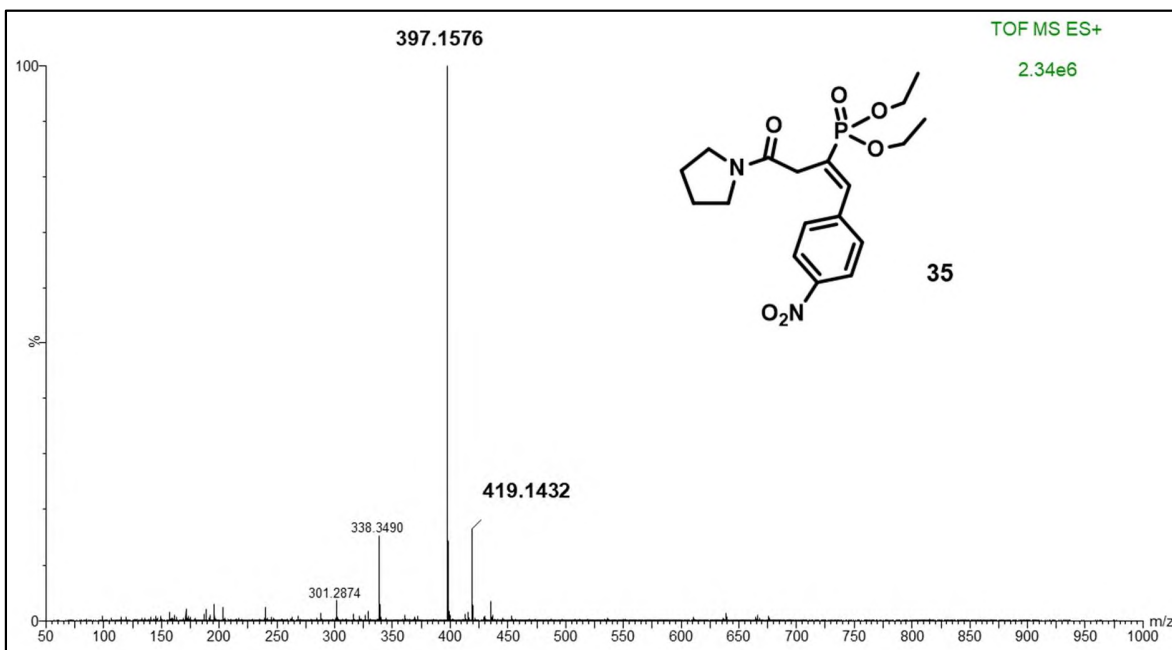
Espectro HRMS TOF MSMS 382.00 ES+ de vinilfosfonato **34** y patrón de fragmentación propuesto.



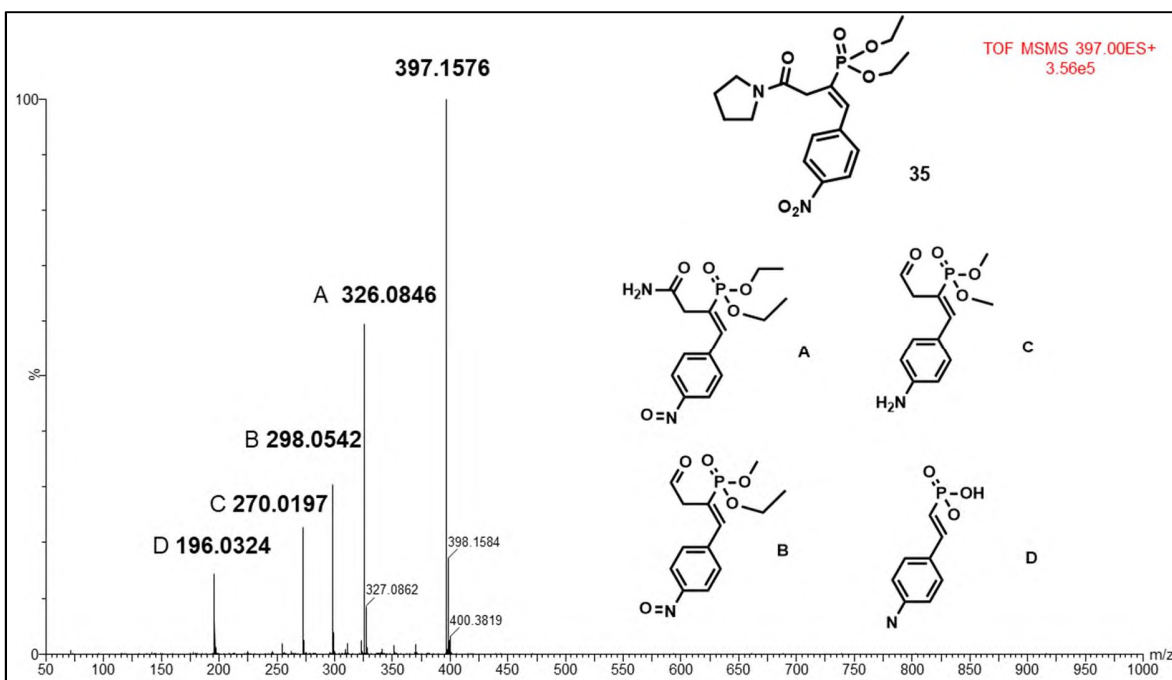
Espectros de ¹H (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C (100 MHz, CDCl₃) del vinilfosfonato **35**.



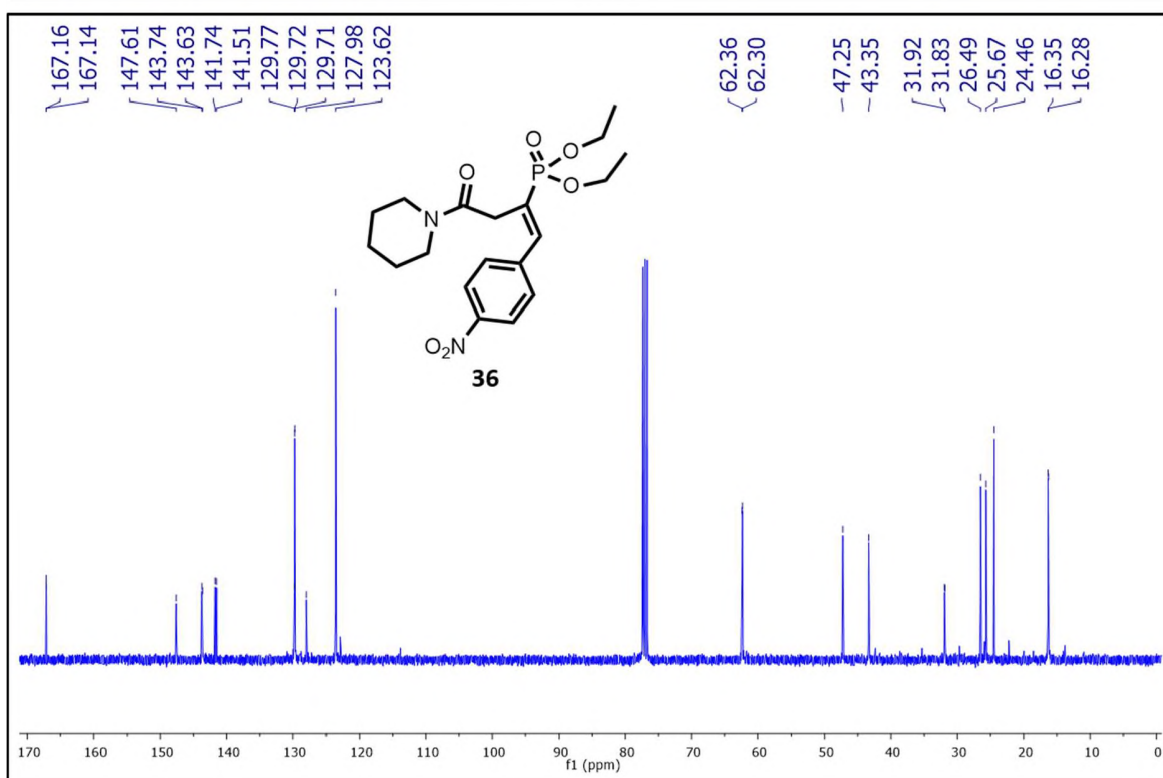
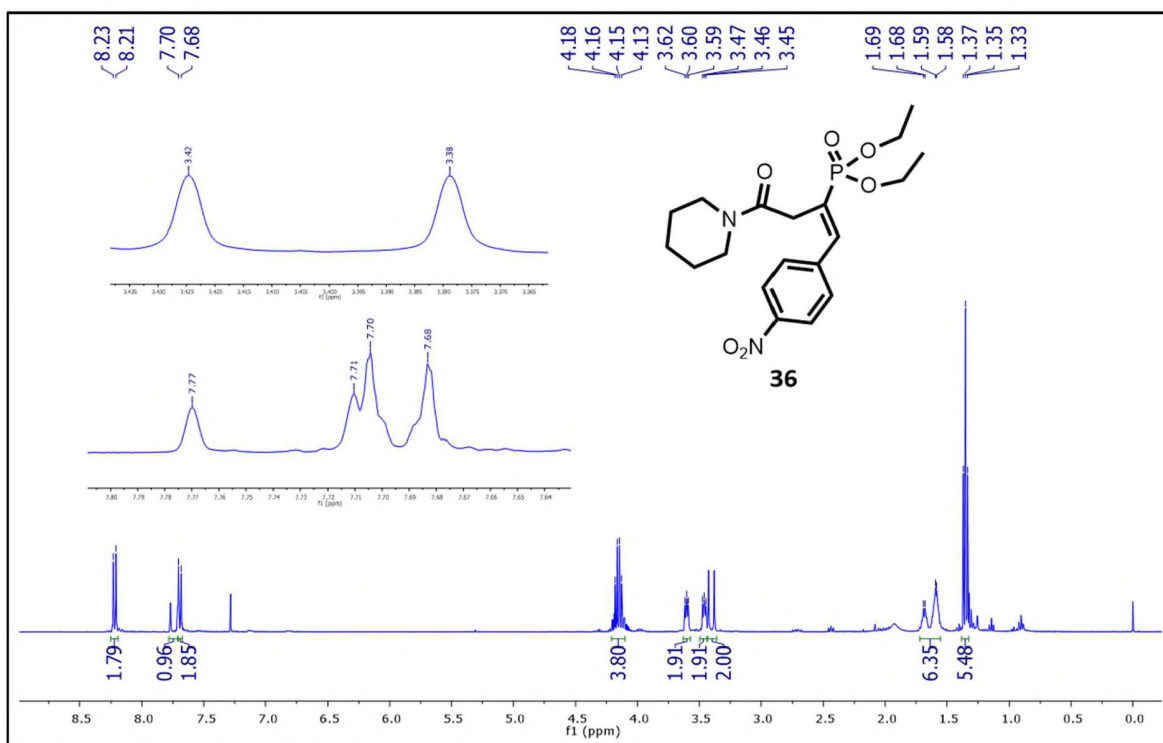
Espectro de ^{31}P (161.9 MHz, CDCl_3) del vinilfosfonato **35**.



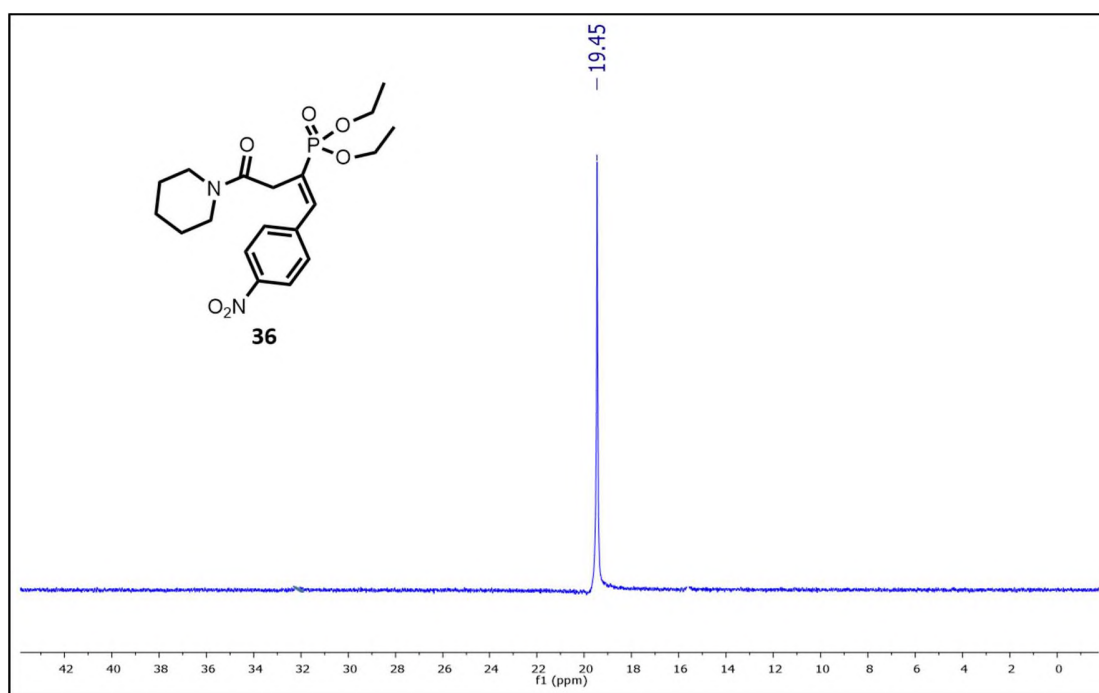
Espectro HRMS TOF MS ES+ de vinilfosfonato **35**.



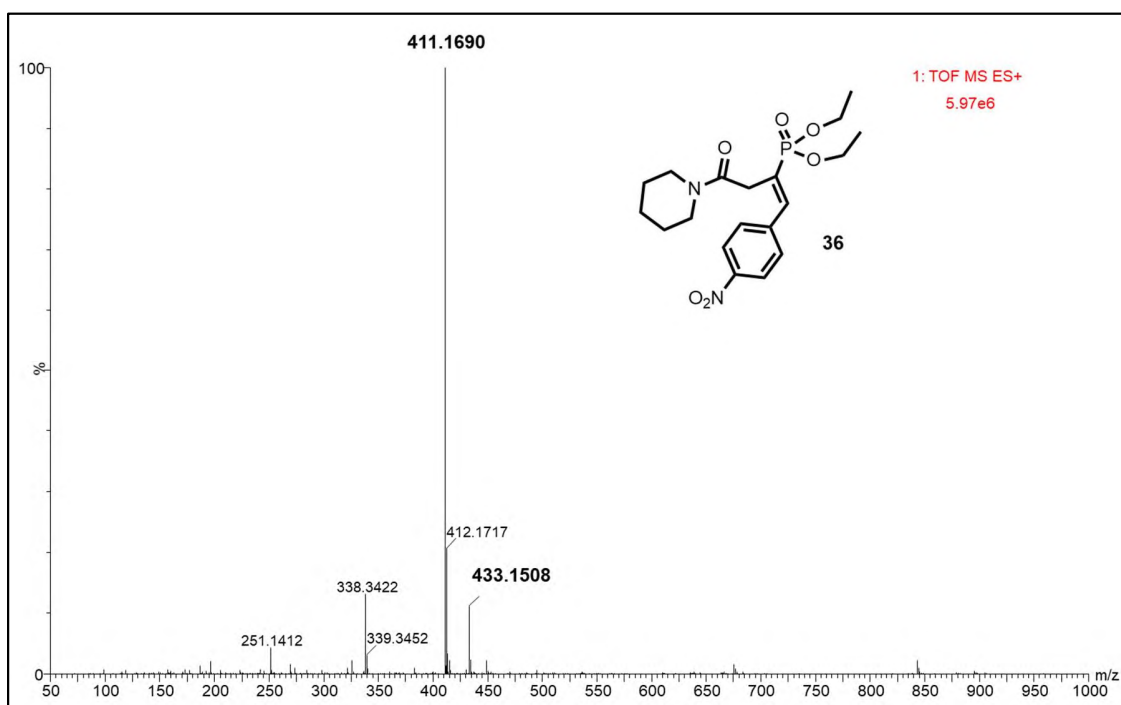
Espectros HRMS del vinilfosfonato **35** y patrón de fragmentación propuesto.



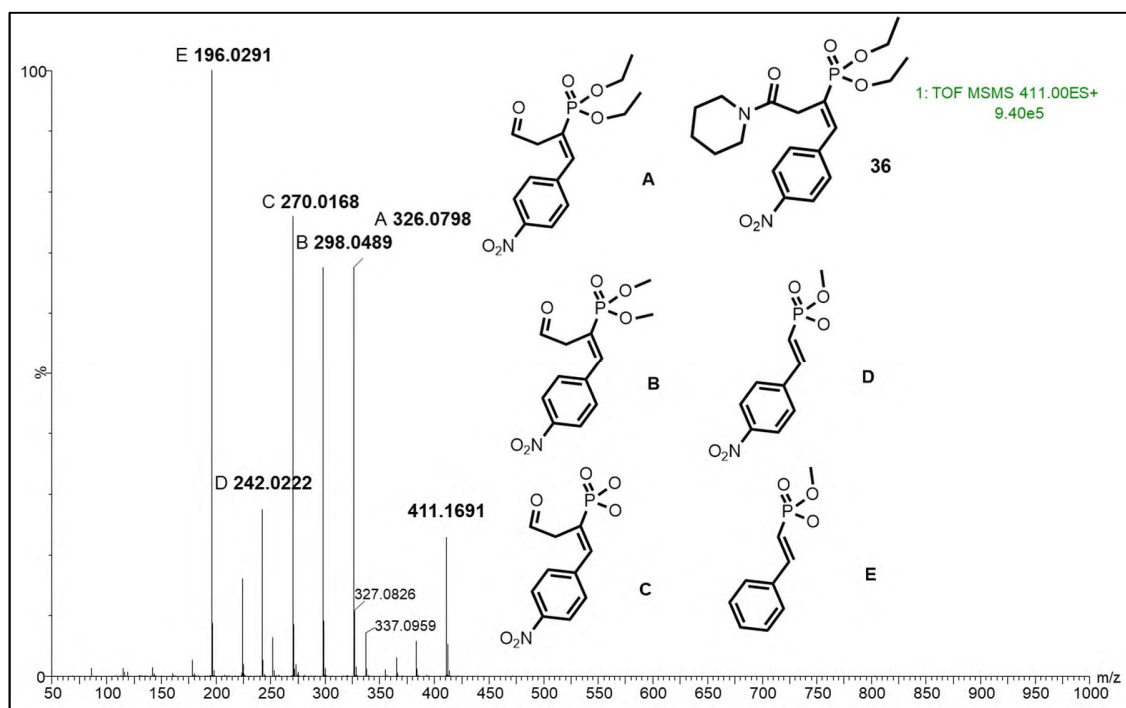
Espectros de ¹H (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C (100 MHz, CDCl₃) del vinilfosfonato **36**.



Espectro de ^{31}P (161.9 MHz, CDCl_3) del vinilfosfonato **36**.



Espectro HRMS TOF MS ES+ del vinilfosfonato **36**.



Espectros HRMS del vinilfosfonato **36** y patrón de fragmentación propuesto.

12.3 Evaluación de actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación aguda.



Grupos de ratones para evaluación antiinflamatoria.



Comparación del edema subplantar en el tratamiento control. Primera hora y quinta hora, izquierda y derecha respectivamente. Modelo de carragenina.



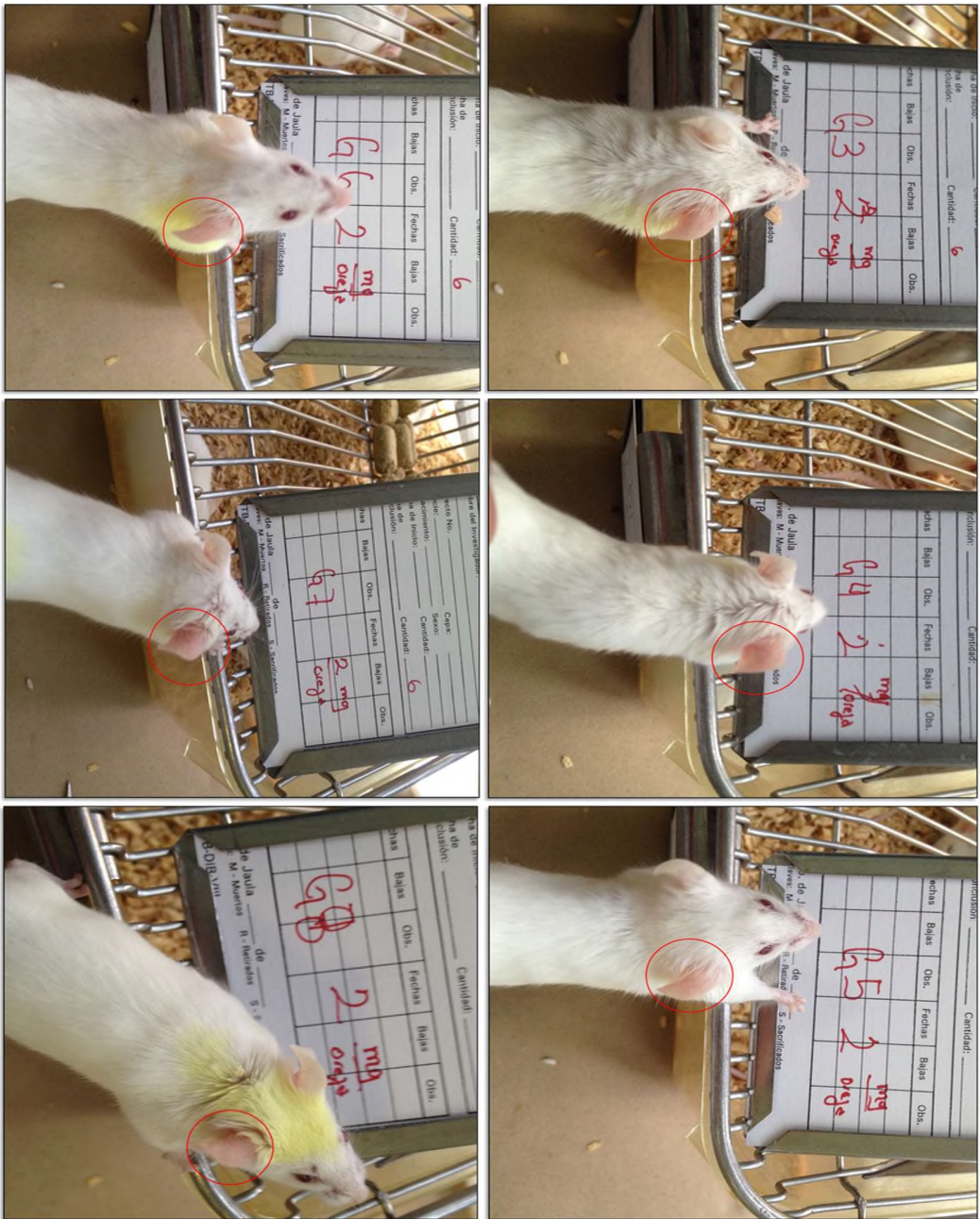
Medición del edema subplantar en ratones. Modelo de carragenina.



Aplicación de TPA en orejas de ratones. Modelo de inflamación tópica.



Edema auricular a la sexta hora en el tratamiento control. Modelo de inflamación tópica.



Edema auricular a la sexta hora con los tratamientos **43-44** y **33-36**. Modelo de inflamación tópica