



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica
de Agentes Antiparasitarios.***

Director de Tesis
Dr. Juan Bautista Rodríguez

Lugar de Trabajo
Departamento de Química Orgánica

Sergio Hernán Szajnman

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

Agosto de 2005

A Pato
Porque las palabras no alcanzan...
Gracias por estar a mi lado siempre.

*A mis padres, Judith e Isidoro
A mis hermanas, Brenda y Ianina
A mis sobrinas, Sol y Julieta
A mis cuñados, Gaby y Fer
A mis suegros, Nelida y Natalio
por confiar en mis sueños.*

Gracias Juan
Por abrirme las puertas a la investigación.
Por confiar en mi y ayudarme a dar este paso.
Por todo lo que aprendo del maestro, del profesor y del amigo
Por mostrarme que siguiendo los ideales, se puede llegar a la meta.

Quiero agradecer también a quienes están siempre:

A la Universidad de Buenos Aires y al Departamento de Química Orgánica por darme la posibilidad de desarrollar esta tesis.

A UMYMFOR (CONICET-FCEN) por los recursos técnicos suministrados.

A la Fundación Antorchas, por financiar la pasantía realizada en el laboratorio del Dr. Roberto Docampo en el año 2002.

A la Dra. Liñares (Pupe) por agregarle los acentos en la tesis.

A Esteban, Ele, Javier, Julieta y Constanza por el día a día.

A Andrea, Lydia, Lorena y Juan por los momentos compartidos.

A Adrián por estar hace tanto tiempo junto a mí, entre tubos y probetas.

Al Dr. Roberto Docampo de la Universidad de Illinois (Urbana-Champaign) por los ensayos realizados, por mi paso en su laboratorio y por su interés en nuestro trabajo de investigación.

A Laura y Andrea, por su calidez al recibirme en EE. UU.

Al Dr. Jorge Palermo por las charlas, debates de pasillo y los buenos consejos.

A Marta y a Mery por los microanálisis realizados.

Al Sr. Jorge Aznares, por la realización de los espectros de masa.

Al personal no docente del Departamento de Química Orgánica: Maripi, Olga, Sergio, Mabel y Rosa.

Diseño, síntesis y evaluación biológica de agentes antiparasitarios

El objetivo de la presente tesis fue la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. La búsqueda se centró en dos blancos moleculares: escualeno sintetasa (SQS) y farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS).

Tomando como estructura de referencia a tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo, un potentísimo inhibidor de la actividad enzimática de SQS, se realizó un estudio exhaustivo de relación estructura química/actividad biológica (SAR) como inhibidor del crecimiento de *Trypanosoma cruzi*. Se diseñaron, sintetizaron y evaluaron biológicamente distintas series de compuestos relacionados estructuralmente a tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo, nuestra droga líder.

Por otro lado, se investigó el efecto distintos de bisfosfonatos derivados de ácidos grasos diseñados para actuar como inhibidores de la proliferación de *T. cruzi*. Algunas de estas drogas fueron potentes inhibidores contra la proliferación de la forma clínicamente relevante del parásito. Esta actividad celular correlacionó muy con la actividad enzimática exhibida hacia farnesil pirofosfato sintasa, enzima que fue confirmada como el blanco molecular de esta nueva clase de bisfosfonatos carentes de átomos de nitrógeno en su estructura.

Finalmente, se estudió el comportamiento químico tanto de etilidenbisfosfonato tetraetilo como de su derivado epoxidado oxiránilidenbisfosfonato de tetraetilo como aceptores en reacciones de tipo Michael con diferentes nucleófilos. Se encontró que, en algunos casos, el primer compuesto experimentaba una pérdida de un grupo fosfonato, dependiendo de la naturaleza del nucleófilo. El segundo presentaba un inusual reordenamiento fosfonato-fosfato independientemente del nucleófilo utilizado. Se realizaron distintos estudios mecanísticos encontrándose evidencias que avalaban, dependiendo de las condiciones experimentales, o bien un mecanismo radicalario o un mecanismo polar.

Palabras clave: mal de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; escualeno sintetasa; farnesil pirofosfato sintetasa; bisfosfonatos

Design, synthesis and biological evaluation of antiparasitic agents

The aim of the present Thesis was the search for new and safe chemotherapeutic agents against Chagas' disease. This investigation was focused on two main molecular targets: squalene synthetase (SQS) and farnesyl pyrophosphatase synthetase (FPPS).

Taken the chemical structure of 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate as lead drug, which is a potent inhibitor of the enzymatic activity of SQS, a rigorous chemical structure/biological activity relationship (SAR) was established. A different series of different drugs structurally related to 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate were designed, synthesized, and biologically evaluated against *Trypanosoma cruzi*.

On the other hand, the effect of bisphosphonates derived from fatty acids as inhibitors of *T. cruzi* proliferation was investigated. Some of these drugs were potent growth inhibitors against the clinically more relevant form of the parasite. This cellular activity correlated quite well with the enzymatic activity exhibited by these drugs towards farnesyl pyrophosphate synthase, which was confirmed as the target of non nitrogen-containing bisphosphonates

Finally, the chemical behavior of tetraethyl ethylidenebisphosphonate as well as the corresponding one for its epoxy derivative tetraethyl oxyranylidenebisphosphonate as acceptors in Michael type reactions with different nucleophiles was investigated. It was found that the former compound experienced a loss of a phosphonate group depending on the nature of the nucleophile. The latter one exhibited an unusual phosphonate-phosphate rearrangement regardless of the nature of the nucleophile. Different mechanistic studies were conducted. There were some evidences that supported either a radical or a polar mechanism, depending on the experimental conditions.

Key words: mal de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; escualeno sintetasa; farnesil pirofosfato sintetasa; bisfosfonatos

Introducción

El mal de Chagas o trypanosomiasis americana es una enfermedad endémica causada por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* y constituye uno de los mayores problemas de salud en América latina. Se estima que hay en el mundo de 18 a 20 millones de personas infectadas con *T. cruzi* mientras que 90 millones se encuentran en riesgo de contraer esta infección. Cada año se registran 500.000 nuevos casos y 50.000 personas mueren por esta enfermedad y sus complicaciones. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la trypanosomiasis americana representa, junto a la malaria y la esquistosomiasis, una de las enfermedades parasitarias más importantes del mundo.^{1,2}

Esta enfermedad fue descubierta y descrita en 1909 por el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934), médico sanitarista que a principios de siglo se desempeñaba en el Instituto Bacteriológico de Manguinhos (hoy Instituto Oswaldo Cruz) de Río de Janeiro, Brasil. En el curso de una campaña antimalárica previa al tendido de la vía férrea del Ferrocarril Central del Brasil, en el Noreste del Estado de Minas Gerais, Chagas supo de la existencia de un insecto hematófago, llamado "barbeiro" por los naturales de la región, que pululaba en las chozas de barro y paja de la zona (cafuas) y atacaba al hombre en la oscuridad de la noche. Trabajando en la localidad de Lassance, a orillas del río Bicudo, capturó y analizó estos barbeiros, identificándolos como *Conorrhinus megistus* y halló que el intestino posterior estaba poblado de parásitos "con caracteres morfológicos de *Crithidias*" que supuso formas intermediarias de un *Trypanosoma*. Remitió entonces ejemplares del insecto al Dr. Oswaldo Cruz, quien hizo picar con ellos a un ejemplar de mono de la especie *Callitrix penicillata*. "Pasados veinte o treinta días después de la picadura -dice Chagas-, fueron encontrados en la sangre periférica de aquel mono, trypanosomas en gran número, con morfología distinta a cualquier especie conocida del género *Trypanosoma*. Iniciamos entonces el estudio del flagelado, consiguiendo rápidamente infectar por inoculación diversos animales de laboratorio: cobayos, perros, conejos y otros monos". Cumplió así los postulados clásicos necesarios para caracterizar a una enfermedad infecciosa: el aislamiento del agente responsable, su asociación con manifestaciones y lesiones que se reiteran y, finalmente, la reproducción de la enfermedad mediante la inoculación del agente responsable a un animal.

Chagas llamó entonces a este microorganismo flagelado *Trypanosoma cruzi*, en homenaje a su maestro O. Cruz.³

Los triatominos representan los vectores de la enfermedad de Chagas, constituyendo un temible ectoparásito del hombre y de los animales, por la voraz actividad hematofágica que ejercen apenas nacidos y durante todas las restantes fases de su actividad. Pertenecen al orden Hemiptera (media ala) formada por miles de especies terrestres y acuáticas, todas provistas de una poderosa proboscide picadora, que mantiene flexionada bajo el cuerpo cuando están en reposo y la extienden al comer. Aunque la mayoría de los hemípteros son fitófagos, que se alimentan succionando los jugos de las plantas, otros han evolucionado hacia un hábito predatorio picando a otros insectos para matarlos y sorberles la hemolinfa; finalmente algunas especies se han hecho hematófagas que atacan a los animales y al hombre. Los triatominos o vinchucas pertenecen a la familia *Reduviidae*, especies exclusivamente hematófagas.⁴

Hay más de un centenar de especies de vinchucas, dieciseis de ellas habitan en la Argentina, pero no todas tienen importancia epidemiológica en la transmisión de *T. cruzi*. Un grupo de especies tiene hábitos silvestres y es vector de *T. cruzi* entre los mamíferos salvajes. Otro grupo suele invadir la zona peri domiciliaria, estableciéndose en gallineros, corrales, conejeras, etc.; alimentándose de los animales domésticos y participando en la transmisión del parásito al perro, gato y otros mamíferos que se crían cerca de las viviendas. Estas especies de vinchucas están muy cerca del hombre, pero no llegan a invadir sus viviendas y, por lo tanto, no se alimentan sobre él ni le transmiten la enfermedad.

En nuestro país hay una sola especie de vinchuca que convive habitualmente con el hombre en el interior de las viviendas y se alimenta con su sangre: es *Triatoma infestans* (Figura 1), llamada popularmente chinche gaucha, vinchuca negra, o simplemente vinchuca.

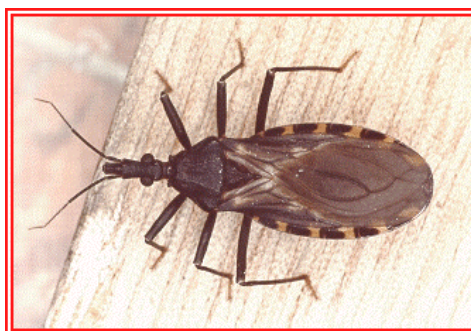


Figura 1. *Triatoma infestans*, vector de la enfermedad de Chagas.

La vinchuca se infecta al picar animales o personas chagásicas que tengan trypomastigotes circulantes en su sangre. Los parásitos entran en activa multiplicación en el lumen del intestino medio del insecto, bajo la forma de epimastigotes, evolucionando luego hacia la de trypomastigotes metacíclicos, altamente infectivos, en el lumen del intestino posterior, desde donde salen al exterior con las deposiciones del insecto. Este es el motivo por el cual resulta peligroso que se produzcan deyecciones durante la picadura, pues las formas infectantes se depositan sobre la piel o mucosa vecina, que pueden ser arrastradas hacia la herida de la picadura por el rasguño o ingresar por las lesiones traumáticas, a veces mínimas, que este mismo rasguño provoca.

La vinchuca transmite *T. cruzi* por contaminación, no por inoculación. Son las deyecciones y no las picaduras las que infectan. Esta forma de transmisión de la enfermedad de Chagas, permite diferenciarlas de otras trypanosomiasis en las cuales el agente se inoculara por el insecto al picar, pues va contenido en la secreción salival.⁵

Como otros parásitos kinetoplástidos, *T. cruzi* tiene un complejo ciclo de vida presentando tres formas morfológicas principales como se ilustra en la Figura 2. El vector se infecta por ingestión de sangre de mamíferos contaminados con trypomastigotes, forma no divisible pero altamente infectiva del parásito (a). Una vez dentro del vector, el parásito prolifera en el lumen del tracto gastrointestinal en la forma epimastigote (b). Como respuesta a un estrés nutricional presente en el vector, el parásito se diferencia a la forma infectiva trypomastigote metacíclico en el recto del animal. El trypomastigote metacíclico se descarga con las heces mientras el vector hematófago se alimenta del mamífero (c), llegando al sistema circulatorio del mamífero a través de lesiones en la piel (d). Esta forma no proliferativa evade al sistema inmune invadiendo una variedad de células, incluyendo células musculares y nerviosas en el corazón y tracto gastrointestinal, como también el sistema retículo-endotelial. Luego de la invasión, el parásito se desprende de su vacuola fagolisosomal y se diferencia a la forma amastigote, la cual prolifera intracelularmente por fusión binaria (e). Eventualmente los amastigotes se diferencian a la forma trypomastigote (g) que normalmente destruye la célula huésped (h) descargándose el contenido parasitario en el torrente sanguíneo (i). Estos trypomastigotes pueden invadir otros tejidos (h) o bien pueden pasar al vector a través de su proboscide cuando éste se alimenta del mamífero (a). Finalmente los trypomastigotes se diferencian a epimastigotes dentro del tracto gastrointestinal del vector, finalizando el ciclo (b).⁶⁻⁸

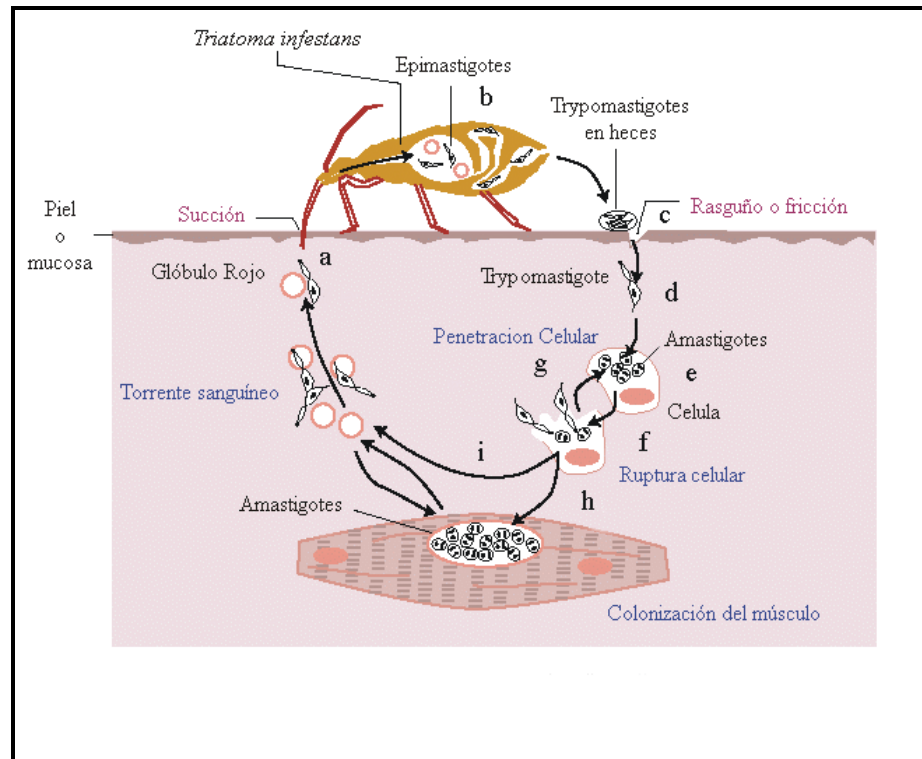


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*.

Existen otras formas de propagación de la enfermedad. Es posible la infección prenatal por pasaje transplacentario de trypanosomas desde la circulación materna con infección aguda o crónica, aunque hay casos de nacimientos de niños no infectados, aun en presencia de placenta con elevada parasitemia. Se ha comprobado, además, la inversa: madre con bajísima parasitemia, placenta sin parásitos y neonato con enfermedad de Chagas franca (distrofia, edemas, fiebre y parasitemia elevada).⁹ Otro considerable número de infecciones se produce mediante la transfusión de sangre proveniente de donadores con infecciones ignoradas, generando cuadros clínicos atípicos. La posibilidad de evolución está condicionada por la cepa infectante y la inmunidad del receptor.¹⁰ La posibilidad de infección del hijo por la leche de madre que padece la enfermedad de Chagas es posible; ha sido verificada clínicamente y cuenta con ratificación experimental. Sin embargo, su aparición es excepcional y muchos especialistas consideran que es un riesgo remoto. No obstante, es prudente que el hijo de una mujer que sufre enfermedad de Chagas aguda, no sea amamantado por su madre. Son múltiples los casos conocidos de enfermedad de Chagas por infección accidental en laboratorios médicos, por manipulación de vinchucas y animales infectados, cultivos de *T. cruzi* o material biológico proveniente de

enfermos graves o de animales infectados. De estas desgracias, es conocida la infección fulminante que costó la vida al argentino Mario Fatala Chaben.¹¹

La severidad e irreversibilidad de las lesiones cardíacas y de otros órganos, provocan invalidez y mortalidad entre los grupos económicamente activos. Sin embargo, las estadísticas sanitarias no reflejan la verdadera magnitud del problema, porque la enfermedad prevalece en zonas suburbanas o rurales donde la atención médica no capta, en su integridad, la importancia de la infección. Además, la mayoría de las compañías farmacéuticas no han desarrollado programas de investigación serios y desarrollo de nuevas drogas, dado que la enfermedad de Chagas no resulta comercialmente atractiva. El ímpetu por diseñar y desarrollar nuevas drogas ha recaído, de esta manera, en instituciones académicas.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la droga ideal para el tratamiento de la enfermedad de Chagas debería cumplir con los siguientes requisitos: (i) cura parasitológica de las fases aguda y crónica; (ii) efectiva en simples y pocas dosis; (iii) accesible a los pacientes, es decir, bajo costo; (iv) no presentar efectos colaterales o teratogénicos; (v) tratamiento sin necesidad de hospitalización; (vi) no inducir resistencia. Existe la necesidad imperiosa de disponer de nuevos agentes quimioterapéuticos que cumplan con las premisas sugeridas por la OMS. Una estrategia quimioterapéutica racional se debe llevar a cabo teniendo en cuenta las diferencias entre los caminos metabólicos del microorganismo patógeno y de los mamíferos. En los últimos años, se ha incrementado el conocimiento sobre la bioquímica y fisiología de *T. cruzi* permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias quimioterapéuticas racionales y específicas.

Nifurtimox y benznidazol

Actualmente no se dispone de un tratamiento efectivo contra la enfermedad de Chagas. Las drogas que se han utilizado clínicamente son nifurtimox (4-([5-nitrofurfuriliden]-amino)-3-metiltiomorfolin-1,1-dióxido, **1**),¹² actualmente discontinuado, y benznidazol (*N*-bencil-2-nitro-1-imidazol acetamida, **2**)¹³ ambas drogas descubiertas empíricamente a finales de la década del 60 (Figura 3).

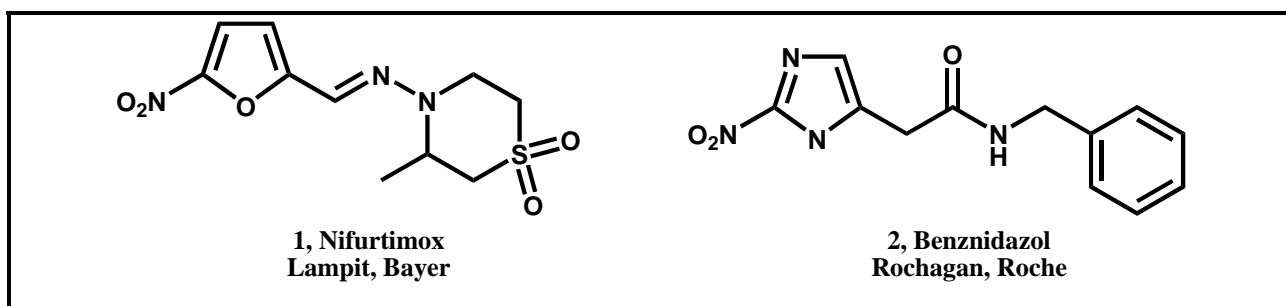


Figura 3. Estructuras químicas de las drogas utilizadas en el tratamiento clínico del mal de Chagas.

Los estudios básicos de las dos últimas décadas han servido para esclarecer las bases moleculares de la actividad anti-*T. cruzi* y la toxicidad de ambos compuestos.^{14,15} Nifurtimox, vía la reducción del grupo nitro a un anión radical inestable, reacciona produciendo metabolitos oxigenados altamente tóxicos (superóxidos, peróxidos). Se demostró que *T. cruzi* es deficiente en mecanismos de detoxificación de metabolitos oxigenados, particularmente peróxidos, resultando de esta manera más sensible al estrés oxidativo que las células de vertebrados.¹¹⁻¹⁶ Benznidazol parece actuar por un mecanismo diferente (estrés reductivo), el cual involucra una modificación covalente de macromoléculas producida por nitroreducción de intermediarios.¹¹⁻¹³ Otra evidencia para este mecanismo de acción proviene de una reciente demostración en que células de *T. cruzi* con sobre-expresión de superóxido dismutasa presentan mayor sensibilidad a benznidazol.

Los resultados obtenidos con ambas drogas varían de acuerdo a la fase de la enfermedad, el período y la dosis del tratamiento, la edad y el área geográfica. Esta observación se puede correlacionar, probablemente, con las diferentes susceptibilidades a dichas drogas por parte de distintas cepas de *T. cruzi*.

Se han obtenido buenos resultados en la fase aguda de la enfermedad, en infecciones crónicas recientes (chicos menores de 12 años), en infecciones congénitas y en accidentes de laboratorio. Para el tratamiento de la fase aguda y casos congénitos, se recomienda de 8 a 10 mg/kg/día de nifurtimox o 5,0 a 7,5 mg/kg/día de benznidazol durante 30 a 60 días consecutivos y dosis repartidas en dos o tres tomas diarias. Los pacientes con menos de 40 kg pueden tolerar 12 mg/kg/día de nifurtimox o 7,5 mg/kg/día de benznidazol durante 30 a 60 días. En infecciones crónicas recientes (chicos menores de 12 años) o en individuos infectados en los últimos 10 años, el tratamiento debería ser 8 mg/kg/día de nifurtimox o 5 mg/kg/día de benznidazol durante 30 a 60 días. En casos de contaminación por accidentes laborales el tratamiento debe comenzar inmediatamente y continuar durante 10 a 15 días consecutivos. En casos de infecciones crónicas

sin manifestaciones clínicas o manifestaciones cardíacas o digestivas leves, se debería realizar un tratamiento por un período de 60 a 90 días, de acuerdo a la tolerancia de la droga.¹⁷

Los efectos colaterales más frecuentes en el tratamiento con nifurtimox son la anorexia, la pérdida de peso, alteraciones psíquicas, excitabilidad o somnolencia y manifestaciones digestivas tales como náuseas, vómitos y, ocasionalmente, cólicos intestinales y diarreas. Los efectos adversos producidos por el tratamiento con benznidazol pueden clasificarse en tres grupos: (i) síntomas de hipersensibilidad, dermatitis con erupciones cutáneas (usualmente aparecen del séptimo al décimo día de tratamiento), edema generalizado, linfadenopatía, dolor muscular y articular; (ii) depresión de médula ósea, trombocitopenia, agranulocitosis, la más severa manifestación; (iii) polineuropatía, parestesia y polineuritis de los nervios periféricos.¹⁷ Benznidazol y nifurtimox no están indicados para el tratamiento de mujeres embarazadas y casos de enfermedades severas asociadas con Chagas tales como infecciones sistémicas, cardíacas, respiratorias, insuficiencias renales o hepáticas, y en personas mayores o inmunosuprimidas.¹⁷

Los pacientes en fase aguda severa y casos de transmisión congénita se deben hospitalizar para su tratamiento. Los casos restantes se pueden tratar en centros básicos de salud, pero bajo el estricto control de un profesional experimentado. Nifurtimox y benznidazol son drogas consideradas como de alta complejidad, y se recomienda el uso de ellas solo a profesionales con sólidos conocimientos sobre sus efectos adversos. Luego de la introducción clínica de nifurtimox y benznidazol, sólo algunos pocos compuestos fueron ensayados clínicamente contra la enfermedad de Chagas.

Alopurinol

Los resultados obtenidos con alopurinol (4-hidroxi pirazolo (3,4-*d*) pirimidina, **3**) en experimentos con animales y el conocimiento sobre su modo de acción motivó la realización de ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Figura 4). Alopurinol es un análogo de hipoxantina que actúa como un sustrato alternativo de la enzima hipoxantina-guanina fosforilbosiltransferasa (HGPRT). En *T. cruzi*, HGPRT interviene en la obtención de purinas exógenas provenientes del huésped ya que los parásitos son deficientes en la ruta biosintética de estos componentes esenciales.^{18,19} Alopurinol se ha utilizado durante mucho tiempo en humanos para el tratamiento de la gota. Este compuesto se transforma en oxipurinol, potente inhibidor de la actividad enzimática de la xantina oxidasa. En *T. cruzi*, parásito deficiente en xantina oxidasa,

este compuesto actúa como un análogo de purinas y se incorpora, a través de HGPRT, en el ADN bloqueando la síntesis de ARN y proteínas (Figura 4).

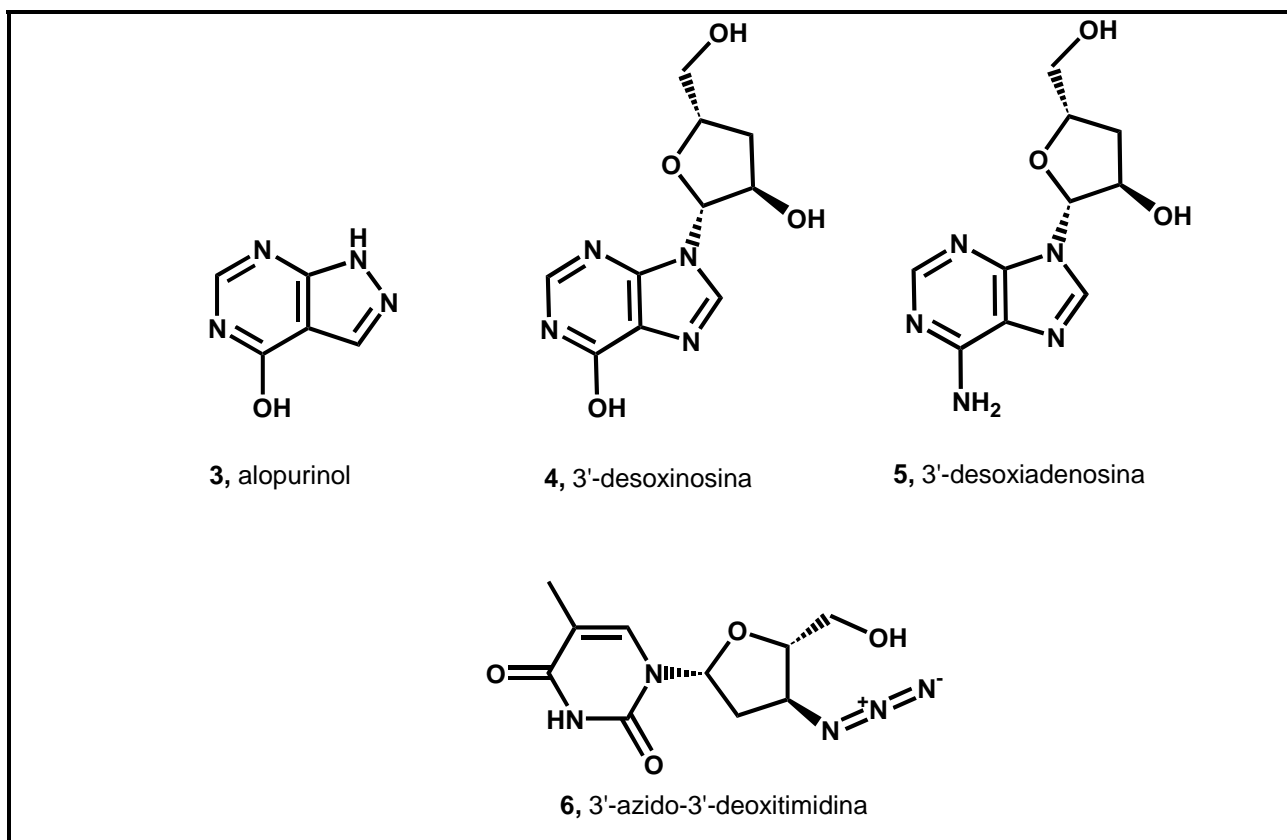


Figura 4. Estructura química de alopurinol (4-hidroxi-pirazol-(3,4*d*)-pirimidina) y derivados purínicos y pirimidínicos inhibidores de HGPRT.

El tratamiento clínico de seis pacientes en fase aguda con alopurinol no fue efectivo, manteniéndose positiva la serología y el xenodiagnóstico.²⁰ Por otro lado, en un estudio con pacientes crónicos, dos grupos de pacientes se trataron con alopurinol durante 60 días y se comparó con otros dos grupos que se trataron con nifurtimox y benznidazol. En los cuatro grupos el porcentaje de negativización del xenodiagnóstico fue de 75–92%, además de que los grupos tratados con alopurinol presentaron menos efectos colaterales que los grupos tratados con nifurtimox y benznidazol. Otro estudio con pacientes crónicos, a los cuales se les administró 8.5 mg/kg/día durante 60 días de alopurinol y se mantuvo un seguimiento clínico, serológico, y se realizaron pruebas de xenodiagnóstico, hemocultivos y electrocardiogramas sobre los pacientes, mostró una cura parasitológica de 44% de los casos.²¹ Por otro lado, un estudio realizado en 1992 en distintos centros de diferentes países fue suspendido por no presentar resultados efectivos.²²

Estos datos no indican que alopurinol represente una terapia eficaz contra *T. cruzi*. La razón de la pérdida de actividad *in vivo* puede incluir la baja incorporación de la droga a *T. cruzi* intracelular^{23,24} y, probablemente, una inadecuada farmacocinética. Sin embargo, HGPRT permanece como un blanco molecular válido resultando claro que se necesita el desarrollo de mejores drogas. Teniendo en cuenta esta idea, se clonó el gen de HGPRT de *T. cruzi*, permitiendo obtener, purificar y caracterizar la enzima. Los análogos purínicos 3'-desoxinosina (4) y 3'-desoxiadenosina (5) inhiben la proliferación de amastigotes en células HeLa. Sin embargo, alopurinol es más potente que ambos análogos. Entre los análogos pirimidínicos, 3'-azido-3'-deoxitimidina (6) fue el más efectivo contra *T. cruzi* (Figura 4).²⁵

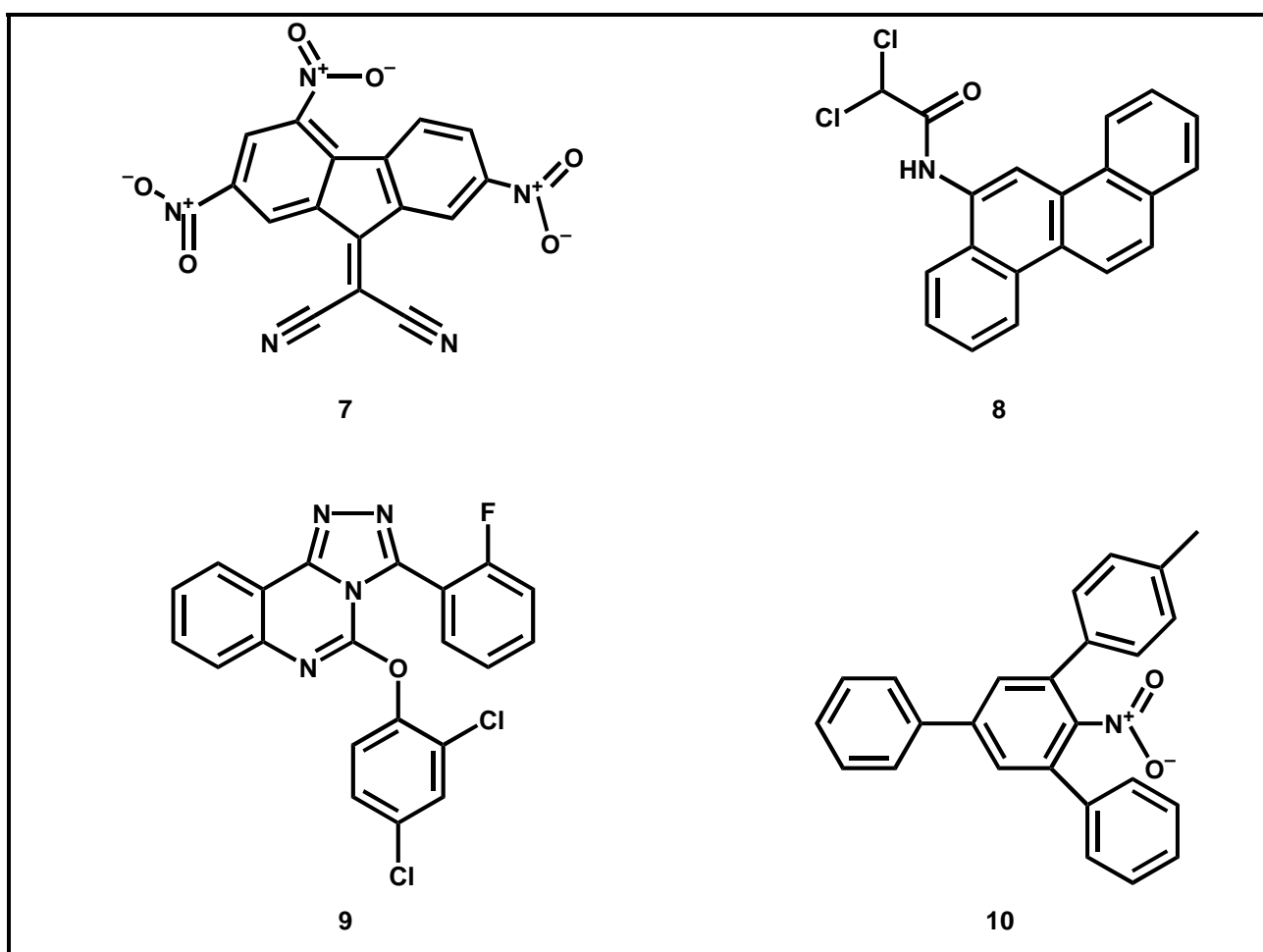


Figura 5. Estructura química de inhibidores de hipoxantina-guanina fosforilbósiltransferasa (HGPRT).

Un estudio de docking utilizando una biblioteca de compuestos químicos identificó veintidós inhibidores potenciales de la enzima HGPRT_{Tc}. Tres de ellos, 2,4,7-trinitro-9-fluorenil-

idenemalononitrilo (**7**), 3-(2-fluorofenil)-5-(2,4-diclorofenoxi)-1,2,4-triazolo(4,3-*c*)-quinazolina (**9**) y 3,5-difenil-4'-metil-2-nitrobifenilo (**10**) fueron efectivos contra amastigotes, mientras que 6-(2,2-dicloroacetamido)criseno (**8**) fue un potente inhibidor de HGPRT de *T. cruzi* (Figura 5).²⁶

Inhibidores de la biosíntesis de esteroides

Las drogas más utilizadas para el tratamiento de enfermedades causadas por hongos y levaduras son compuestos que interfieren con la biosíntesis de esteroides en los organismos responsables de la enfermedad.^{27,28} Los esteroides endógenos son esenciales para la supervivencia de estos microorganismos patógenos, los cuales biosintetizan ergosterol en lugar de colesterol que aparece en mamíferos. En la mayoría de los casos, las drogas empleadas son activas oralmente presentando un amplio espectro de acción. *T. cruzi* tiene un requerimiento absoluto de esteroides endógenos para la viabilidad y proliferación de las células presentando una alta susceptibilidad a inhibidores de la biosíntesis de esteroides *in vitro*. Dentro de estos inhibidores se pueden mencionar a azoles, inhibidores de la desmetilación de esteroides C14- α dependiente de citocromo P-450,^{29,30} inhibidores de escualeno epoxidasa,³¹ inhibidores de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa e inhibidores de $\Delta^{24(25)}$ metil transferasa.

Ketoconazol (*cis*-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il-metil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina, **11**) es un conocido agente antimicótico.³² El modo de acción de este compuesto es la inhibición específica de la desmetilación de lanosterol dependiente de citocromo P-450 en el camino biosintético del ergosterol, no presente en la célula huésped.³³⁻³⁸ Este compuesto bloquea la desmetilación oxidativa 14- α del lanosterol y de otros 14- α metil esteroides uniéndose al sitio activo protohemo Fe citocromo P-450 14- α desmetilasa. Éste interactúa con el sitio lipofílico de la enzima, el cual debería ocuparse por el sustrato (Figura 6).³⁹⁻⁴⁰ La presencia de ergosterol y de otros C-24 metil esteroides en el parásito forma parte de procesos esenciales para la supervivencia de la célula. Ketoconazol bloquea completamente la biosíntesis del ergosterol en *T. cruzi* (epimastigotes) a concentraciones tan bajas como 1,0 μ M sin afectar sustancialmente la velocidad de crecimiento del parásito. Además, no se observan alteraciones estructurales hasta que el ergosterol endógeno se consume siendo necesaria una incubación de 96-120 horas para observar crecimiento celular. Después de 120 horas se observan severas alteraciones del complejo mitocondria-kinetoplasto, seguidas de hipertrofia de la mitocondria que conduce a lisis celular.

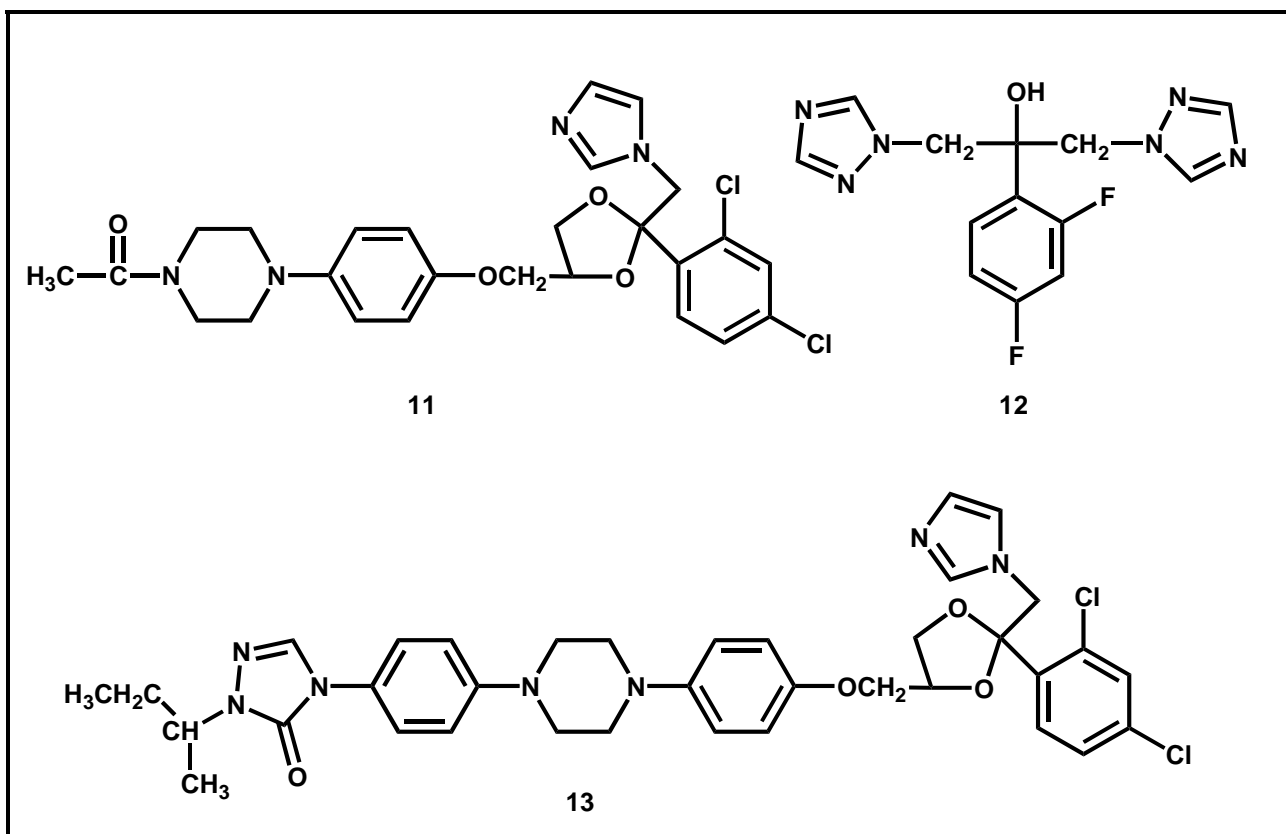


Figura 6. Estructura química de inhibidores de la biosíntesis de esteroides representativos.

Ketoconazol es más efectivo para evitar la proliferación de amastigotes de *T. cruzi*, la forma clínicamente más relevante del parásito, ya que la concentración necesaria para reducir el número de células infectadas a la mitad es de 0,1 nanomolar (nM), mientras que la mínima concentración para erradicar todos los parásitos es de 10 nM. En este caso, se observa una alteración importante en la mitocondria causada por la eliminación de ergosterol inducido por ketoconazol.

Fluconazol (α -(2,4-difluorofenil)- α -(1*H*-1,2,4-triazol-1-il-metil)-1*H*-1,2,4-triazol-1-etanol, **12**) e itraconazol (4-[4-[4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il-metil)-1,3-dioxolan-4-il]-metoxi]fenil]-1-piperazinil]fenil]-2,4-dihidro-2-(1-metil propil)-3*H*-1,2,4-triazol-3-ona, **13**)^{39,41} también son inhibidores de la biosíntesis de ergosterol que presentan, además, una acción antiproliferativa contra *T. cruzi*. El grado de efectividad de fluconazol es similar al de ketoconazol tanto como inhibidor de la biosíntesis del ergosterol como para el control de crecimiento de epimastigotes, mientras que itraconazol es mucho menos potente que cualquiera de las drogas anteriores.

Ketoconazol administrado en 8 pacientes en fase crónica, con dosis entre 3,1 y 8,7 mg/kg/día *via* oral durante 51-96 días mostró hemocultivo positivo en 6 casos y serología positiva en los dos casos restantes. Ketoconazol e itraconazol no fueron efectivos para erradicar el parásito tanto en modelos animales como en pacientes, en la mayoría de los estudios.

Terbinafina ((*E*)-*N*-(6,6-dimetil-2-hepten-4-inil)-*N*-metil-1-naftalenmetilamina, **14**)⁴² es otro agente antimicótico sintético cuyo modo de acción es la ruta biosintética de ergosterol a nivel de escualeno sintetasa o escualeno epoxidasa. Este compuesto también posee un potente efecto antiproliferativo contra *T. cruzi*. Los ensayos biológicos contra *T. cruzi* (epimastigotes) señalan que ocurre lisis celular en menos de 24 horas a concentraciones mayores a 32 μ M, mientras que se observa la detención del crecimiento después de las 48 horas a concentraciones de 1,0 μ M.³⁸ La forma amastigote es más susceptible a esta droga, ya que a concentraciones de 0,1 μ M este compuesto reduce el número de células infectadas al 50%, mientras que para la erradicación total del parásito se requiere una concentración de 1,0 μ M. Por estas razones, terbinafina no es un inhibidor tan potente como ketoconazol, pero tiene un fuerte efecto sinérgico debido a que ambos compuestos actúan en diferentes sitios de la misma ruta biosintética (Figura 7).

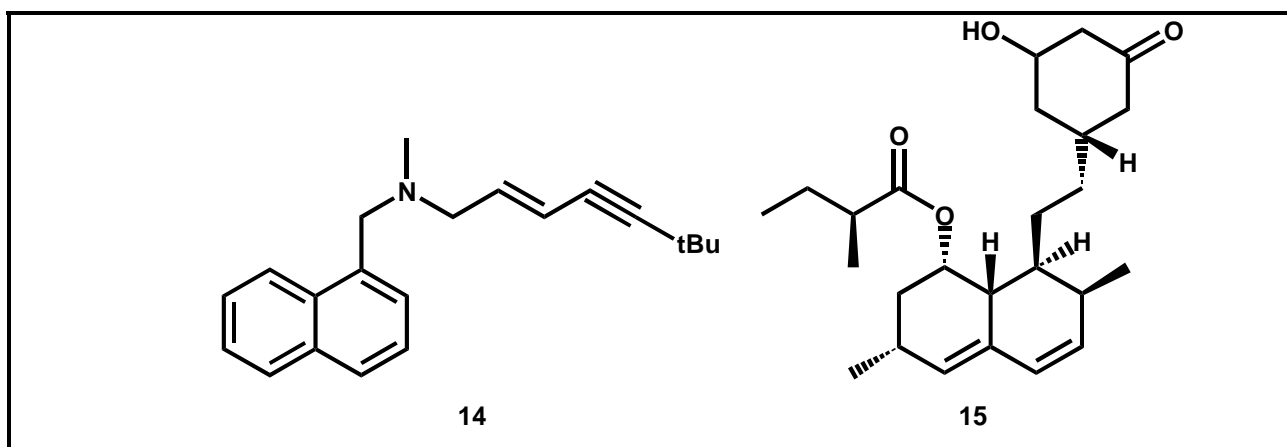


Figura 7. Estructura química de inhibidores de la biosíntesis de esteroides. Terbinafina (**14**) es un inhibidor de la escualeno sintetasa. Lovastatin (**15**) inhibe 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa.

Lovastatin (ácido 1,2,6,7,8,8a-hexahidro- β , δ -dihidro-8-(2-metil-1-oxo-butoxi)-1-naftalen-heptanoico δ -lactona, **15**)⁴³ es una droga hipocolesterolémica para humanos que presenta también un potente efecto inhibidor competitivo hacia 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa (Figura 7). La inhibición de la actividad enzimática de esta enzima correlaciona muy bien con la

acción inhibitoria que exhibe este compuesto contra la replicación de *T. cruzi*. Lovostatin inhibe la forma epimastigote del parásito cuando se emplea a concentraciones mayores que 25 μM . El efecto de este compuesto contra *T. cruzi* se puede revertir por adición de escualeno, pero no de colesterol.⁴⁴ Lovastatin es otro de los compuestos que tiene un efecto sinérgico cuando se lo combina con ketoconazol o terbinafina y también en combinaciones ternarias. Este sinergismo está justificado en el hecho de que los tres compuestos actúan en diferentes puntos de la ruta biosintética de esteroides. Lovastatin empleada a concentraciones mayores a 1,0 μM provoca daños a las células hospedadoras. En ensayos *in vivo* no se observa protección total al tratar ratones infectados con ketoconazol (15 mg/kg/día) detectándose parásitos circulantes luego de 25 días. En combinación con lovastatin (20 mg/kg/día) produce un efecto sinérgico con 100% de supervivencia y erradicación total de la parasitemia.⁴⁵ Con esta dosis de lovastatin sola se observa un 50% de supervivencia con niveles de parasitemia similares a los del control.

El derivado bis-triazólico ICI 195,739 ((*R,S*)-2-(2,4-difluorofenil)-1-(3-[(*Z*)-4-(2,2,3,3-tetrafluoropropoxi)stiril]-1,2,4-triazol-1-il)-propan-2-ol, **16**)³⁸ es un agente antimicótico que presenta también una potente acción inhibitoria contra el crecimiento de *T. cruzi*. A una concentración de 3,0 nM, **16** tiene una marcada influencia en el crecimiento del parásito (epimastigotes), deteniéndose completamente a una concentración de 0,1 μM , 300 veces más baja que la requerida por ketoconazol y terbinafina para obtener el mismo efecto.^{38,46} **16** también es más efectivo contra la forma intracelular del parásito, donde se requiere una concentración de 1,0 nM de **16** para reducir el número de células infectadas al 50%, mientras que se necesita una concentración 10 veces más alta (10 nM) para eliminar completamente el parásito (Figura 8).⁴⁶ La adición de ergosterol o colesterol exógeno no es capaz de evitar lisis celular inducida por este derivado bis-triazólico, lo que sugiere que, además del bloqueo de la síntesis de esteroides, existe otro mecanismo de acción que hace que su efectividad sea notablemente alta. Debido a que **16** es una mezcla racémica, se demostró que dicha actividad se atribuye al enantiómero dextrorrotatorio (*R*).⁴⁷ Este compuesto se denominó D0870. Los estudios *in vivo* de D0870 son muy interesantes. El tratamiento con D0870 con una dosis de 10 mg/kg día por medio conduce a un 80–100% de prevención contra la muerte, 110 días luego de la infección. Además, la evaluación parasitológica tiene en cuenta tres criterios diferentes: xenodiagnóstico, hemocultivo y presencia de anticuerpos específicos. Este derivado bis-triazólico es capaz de inducir altos niveles de cura (70–100%) en 7 de 9 cepas testeadas, incluyendo dos cepas altamente resistentes (SC28 y Yuyo). Desafortunadamente, este compuesto ha sido discontinuado recientemente.

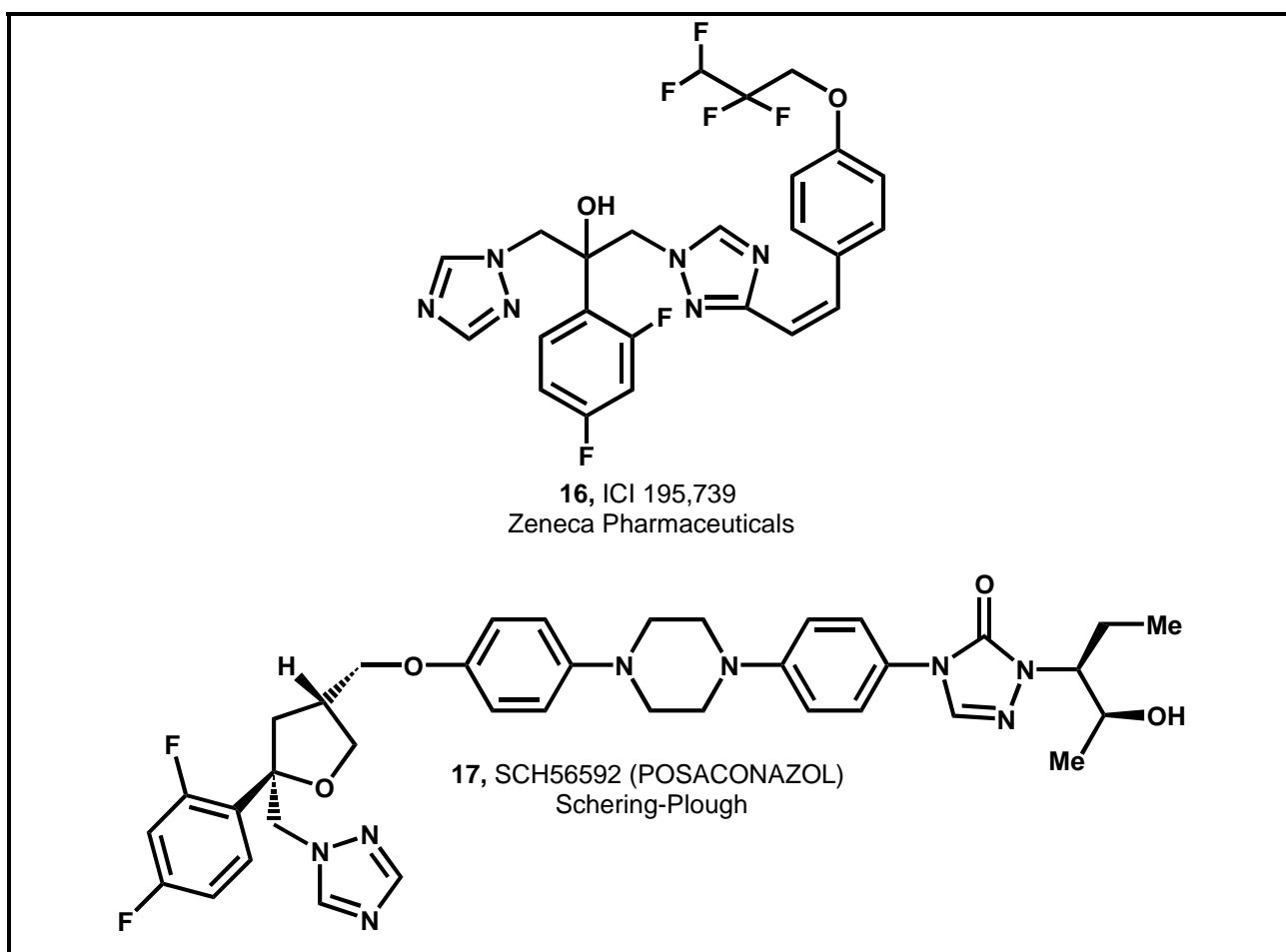


Figura 8. Estructura química de compuestos antimicóticos que presentan actividad contra *T. cruzi*.

Es muy interesante la actividad antiparasitaria de SCH56592 ((-)-4-[4-[4-[4-[(2R-*cis*)-5-(2,4-difluorofenil)-tetrahidro-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il-metil)furán-3-il]metoxi]fenil]-2,4-dihidro-2-[(*S*)-1-etil-2(*S*)-hidroxipropil]-3*H*-1,2,4-triazol-3-ona, **17**), otra droga antifúngica que actúa como inhibidor de la actividad enzimática de C-14 α desmetilasa dependiente de citocromo P450. En efecto, la concentración de SCH56592 requerida para conseguir la eliminación completa de esteroides en epimastigotes y subsiguiente lisis celular es 100 veces menor que la requerida para ketoconazol, D0870 o itraconazol. Este compuesto también es muy potente contra la forma clínicamente más relevante del parásito (amastigotes), donde una concentración de 0,3 nM de **17** es capaz de erradicar el parásito de la célula huésped, concentración 100 veces menor que la requerida para ketoconazol o itraconazol. Además, SCH56592 no afecta la proliferación de las células huésped a una concentración de 100 nM. Los ensayos *in vivo* en modelos de fase aguda

son muy buenos, observándose una cura parasitológica de un 90% cuando se les suministra a los animales dosis de 15 a 25 mg/kg/día, mientras que animales tratados con ketoconazol en similares condiciones provocan una cura parasitológica de solo un 20%. El tratamiento con SCH56592 en modelos de fase crónica también es muy interesante. Una concentración de 10 a 15 mg/kg/día provoca una cura parasitológica del 75%, mientras que con concentraciones de ketoconazol de 30 mg/kg/día no se observa una diferencia significativa en los niveles de cura parasitológica con respecto a los animales no tratados. Recientemente se observó que SCH56592 es efectivo contra infecciones experimentales de diferentes cepas de *T. cruzi* altamente resistentes a benznidazol y nifurtimox.⁴⁸ D0870 y SCH56592 son capaces de producir cura parasitológica tanto en infecciones agudas como en infecciones crónicas de la enfermedad, siendo estas drogas las primeras en mostrar este efecto. Se ha sugerido que la actividad trypanocida mostrada por estos compuestos resulta de la potente y selectiva actividad anti-*T. cruzi*, especialmente, de sus propiedades farmacocinéticas, distinguiéndose largos tiempos de vida media y grandes volúmenes de distribución.^{49,50}

La enzima escualeno sintetasa (SQS) es responsable de catalizar la reacción de dimerización reductiva entre dos moléculas de farnesil pirofosfato para dar lugar a una molécula de escualeno en dos pasos de reacción. Representa el primer paso en la biosíntesis de esteroides. SQS ha sido estudiada muy intensamente como posible blanco molecular para el desarrollo de agentes anticolesterolémicos en humanos; recientemente, se pensó que SQS podría ser un importante blanco molecular para una quimioterapia segura para enfermedades tropicales. En efecto, dos derivados de quinuclidina, los cuales se diseñaron como agentes anticolesterolémicos actuando sobre SQS, exhiben una potente actividad antiparasitaria. E5700 ((3*R*)-3-[[2-bencil-6-[(3*R*,4*S*)-3-hidroxi-4-metoxipirrolidin-1-il]piridin-3-il]etnil]quinuclidin-3-ol, **18**) y ER-119884 ((3*R*)-3-[[2-bencil-6-(3-metoxipropiloxi)piridin-3-il]etnil] quinuclidin-3-ol, **19**) son potentes inhibidores no competitivos de SQS tanto glicosomal y como mitocondrial de *T. cruzi*, con valores de K_i del orden bajo nanomolar. En presencia de 20 μ M de PP_i, E5700 exhibe una K_i en ambas SQS de 0,1 nM, mientras que la K_i de ER-119884 hacia SQS es de 0,8 nM (glicosomal) y 0,7 nM (mitocondrial). Las estructuras de estos inhibidores de la actividad enzimática de SQS se ilustran en la Figura 9.

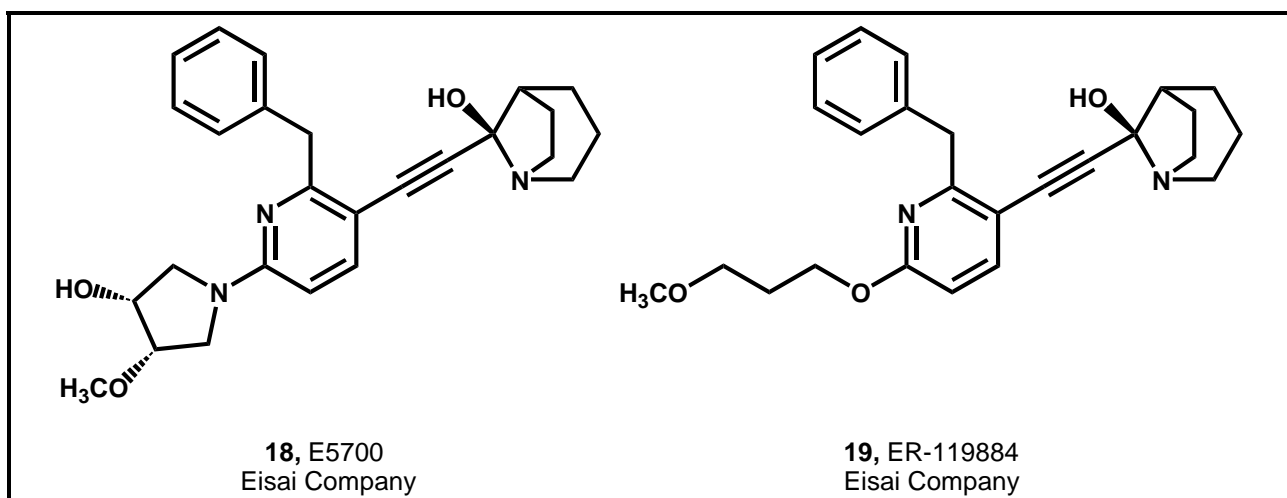


Figura 9. Estructura química de inhibidores representativos de la actividad enzimática de SQS.

La concentración mínima requerida para detener por completo el crecimiento de la forma epimastigote del parásito es de 30 nM y 100 nM para **18** y **19**, respectivamente. La inhibición de crecimiento y la lisis celular inducida por ambos compuestos está asociada a la eliminación de esteroides endógenos del parásito, sin acumulación de lanosterol o escualeno, observándose un incremento del contenido de colesterol externo. Los resultados contra la forma clínicamente relevante del parásito (amastigotes) son muy interesantes, la concentración mínima de **18** contra el parásito es de 100 nM, mientras que para **19** el valor es de 30 nM. Además, no se observa ningún efecto contra las células huésped, incluso a concentraciones 10 veces superiores de ambos compuestos, indicando una acción selectiva de estas drogas. Si bien los dos derivados de quinuclidina tienen actividades anti-*T. cruzi in vitro* comparables, E5700 es claramente más potente en ensayos *in vivo*. Este compuesto es capaz de detener por completo el desarrollo del parásito con dosis de 50 mg/kg/día.⁵¹

Cruzipaína

T. cruzi tiene una cisteína proteasa llamada cruzipaína, que es la enzima responsable de la mayor actividad proteolítica en los diferentes estadios del ciclo de vida del parásito. Cruzipaína, también conocida como cruzaína, es un miembro de la familia C1 de las cisteína proteinasas (CPs), una glicoproteína capaz de degradar azocaseína, albúmina sérica bovina y desnaturalizar hemoglobina a valores de pH ácidos. Además de la función evidente que desarrolla esta enzima en la nutrición del parásito como la principal proteasa lisosomal, existe una evidencia indirecta de una posible participación en la penetración de los trypomastigotes en la célula huésped, en la

defensa del parásito contra el sistema inmune del mamífero huésped, y en los procesos de diferenciación que llevan de un estadio a otro en el ciclo de vida del parásito. Los inhibidores selectivos de esta proteasa bloquean la proliferación de *T. cruzi* epimastigotes y amastigotes y detienen la metacicloogénesis (transformación de epimastigotes en trypomastigotes) *in vitro*, indicando que esta enzima resulta esencial para el parásito.

Se han desarrollado un gran número de inhibidores de cruzipaína. En algunos de estos compuestos, se observa una excelente correlación entre esta inhibición de la actividad enzimática y la inhibición de la proliferación del parásito. Todos estos inhibidores de cisteína proteasa presentan un esquema estructural determinado por la presencia de un fragmento peptídico, necesario para el reconocimiento molecular, que corresponde a una secuencia de dos o más aminoácidos y un grupo funcional unido a este fragmento peptídico que presente características electrofílicas, el cual pueda reaccionar con el residuo cisteína de la enzima dentro del sitio activo de la misma.⁵² De esta manera, se han desarrollado una gran variedad de inhibidores que presentan diversos grupos reactivos, destacándose por su actividad biológica aquellos que presentan como grupos reactivos a diazometil cetonas, aciloximetil cetonas y fluorometil cetonas. Dentro de esta familia de compuestos, se destacan *N*-benciloxycarbonil-fenilalanil-fluorometil cetona (**20**) y *N*-benciloxycarbonil-fenilalanilarginil-fluorometil cetona (**21**), siendo sus $IC_{50} = 2,2 \mu M$ y $0,18 \mu M$, respectivamente (Figura 10).

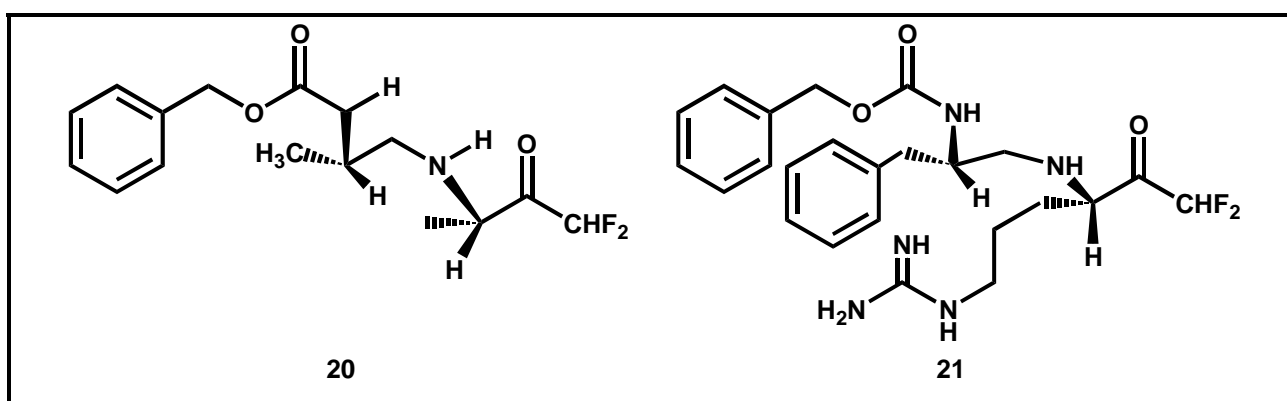


Figura 10. Estructura química de inhibidores de cruzipaína derivados de metil cetonas.

Estos compuestos están prácticamente libres de actividad biológica contra la forma epimastigote del parásito, donde se requiere una concentración de 1,0 mM de **20** para detener su

crecimiento por completo. Sin embargo, son potentes inhibidores contra la replicación de la forma intracelular del parásito en células Vero recientemente infectadas con trypomastigotes.

Se han desarrollado, hace poco tiempo, nuevos inhibidores de la actividad enzimática de cruzipaina que presentan una potente y selectiva acción contra *T. cruzi in vitro*. Estos compuestos son derivados de tiosemicarbazonas que se caracterizan por no presentar un fragmento peptídico en su estructura y actúan como inhibidores no competitivos.

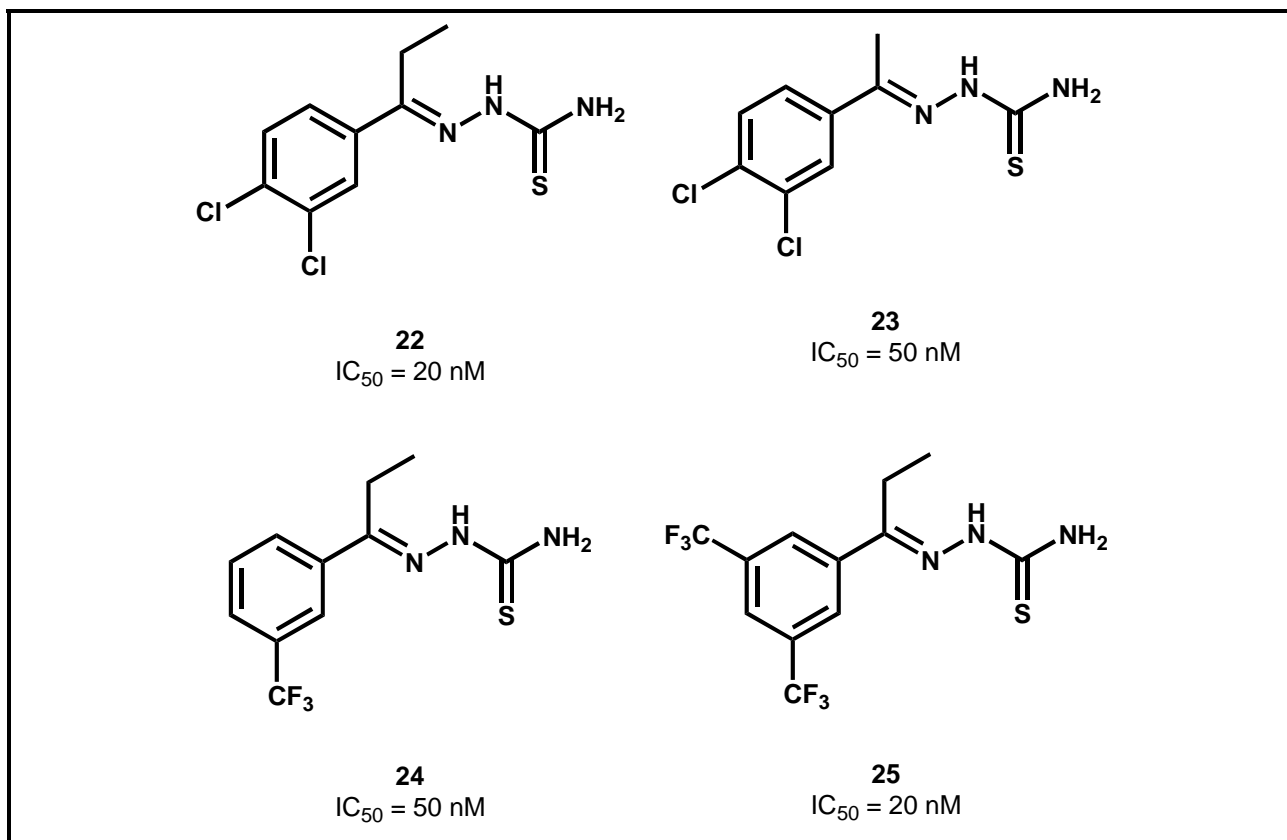


Figura 11. Estructura química de inhibidores de cruzipaina derivados de tiosemicarbazonas.

De esta familia de inhibidores se destaca (*E*)-1-(1-(3,4-diclorofenil)propiliden) tiosemicarbazida (**22**) que presenta un IC₅₀ = 20 nM. El reemplazo del grupo propiliden en **22** por un grupo etiliden para dar (*E*)-1-(1-(3,4-diclorofenil) etiliden) tiosemicarbazida (**23**) produce una disminución de la capacidad inhibitoria en este compuesto. La sustitución del grupo 3,4-diclorofenilo en **22** por un grupo 3,5-bis(trifluorometilo) para dar ((*E*)-1-(1-(3,5-bis(trifluorometil)fenil)propiliden) tiosemicarbazida (**25**) da lugar a valores similares de IC₅₀. En contraste, la sustitución en la posición 3 del anillo aromático por un grupo trifluorometilo para formar **24** produce una pérdida de la efectividad. Sorprendentemente, cuando estos compuestos

se evalúan en cultivos celulares, sólo se observa inhibición de crecimiento con los compuestos **23** y **24**. No se observa actividad en las drogas **22** y **25** (Figura 11).⁵³

Dihidrofolato reductasa

Por otro lado, la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) ha sido utilizada como blanco molecular para una serie de enfermedades tumorales, bacterianas y parasitarias. La enzima cataliza la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato utilizando NADPH como cofactor. Tetrahidrofolato se convierte en metiltetrahidrofolato, el cual está directamente involucrado en la síntesis de timidina (asiste en la metilación de desoxiuridina monofosfato para dar timidina monofosfato). Además, metiltetrahidrofolato está indirectamente comprometido con el metabolismo de aminoácidos y nucleóticos purínicos. De esta forma, la inhibición de DHFR bloquea la síntesis de timidina y, como consecuencia, la biosíntesis de ADN llevando a la muerte celular.

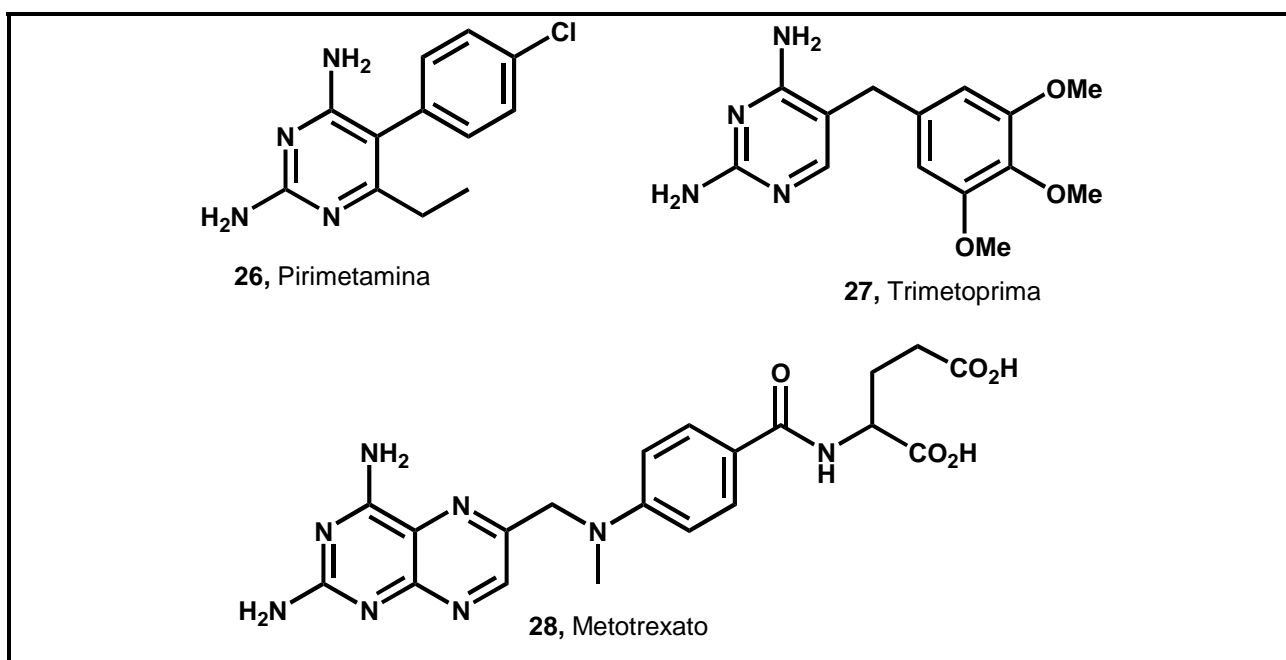


Figura 12. Estructuras químicas de inhibidores de la actividad enzimática de dihidrofolato reductasa.

La estructura de esta enzima, especialmente su sitio activo, varía significativamente de una especie a otra. Además, una inhibición selectiva de DHFR de *T. cruzi* proporciona una disminución en el crecimiento del parásito, ya que *T. cruzi* no dispone de un mecanismo de transporte de este cofactor desde el huésped. Las enzimas DHFR de *Leishmania major*, *T. cruzi*,

y *T. brucei* han sido clonadas y expresadas, mostrando una gran semejanza en la secuencia, especialmente, entre *T. cruzi* y *T. brucei*. La enzima se encuentra como un dímero bifuncional enlazada a la enzima timidilato sintetasa (TS). Esto es común en protozoarios, pero no en mamíferos y bacterias. Agentes clásicos antimicrobianos, cuyo blanco molecular es DHFR, tales como trimetoprima (5-(3,4,5-trimetoxibencil)piridimin-2,4-diamina, **27**, $K_i = 1,0 \mu\text{M}$) y pirimetamina (5-(4-clorofenil)-6-etilpirimidin-2,4-diamina, **26**, $K_i = 0,1 \mu\text{M}$) presentan una baja actividad y selectividad hacia DHFR de *T. cruzi*. Sin embargo, metotrexato (**28**), un potente inhibidor de la actividad enzimática de DHFR de *T. cruzi* ($K_i = 0,038 \text{ nM}$), correlaciona muy bien esta actividad inhibitoria con la acción exhibida contra amastigotes ($\text{IC}_{50} = 9,2 \mu\text{M}$) (Figura 12).⁵⁴

Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es otra enzima que se utiliza como blanco molecular para el diseño racional de drogas. Existe una fuerte evidencia para suponer que la glicólisis es uno de los principales recursos energéticos en amastigotes. Una acción inhibitoria selectiva de las enzimas glicolíticas del parásito sobre las del huésped es una interesante estrategia para el diseño de nuevas drogas, no sólo para *T. cruzi*, sino también para *T. brucei* y *Leishmania spp.* Ciertos flavonoides aislados de *Neoraptua magnifica* presentan actividad contra GAPDH de *T. cruzi*.⁵⁵ De esta familia de compuestos se destaca 3',4',5',5,7-pentametoxiflavona (compuesto **29**), que es un efectivo inhibidor de la actividad enzimática de GAPDHTc (Figura 13). La estructura cristalina de GAPDH de *T. cruzi* y humana proporcionó detalles de la interacción de esta enzima con NAD^+ . El nucleósido natural adenosina no es un buen inhibidor de GAPDHTc; sin embargo sustituciones lógicas tanto en la posición C-6 de la base heterocíclica como en la posición C-2' del anillo furanósico de ribosa incrementan significativamente la potencia de adenosina. El compuesto resultante N^6 -(1-naftalenometil)-2'-(3-clorobenzoamido)adenosina (**30**) presenta un IC_{50} en el rango bajo micromolar en ensayos contra amastigotes (Figura 7).⁵⁶

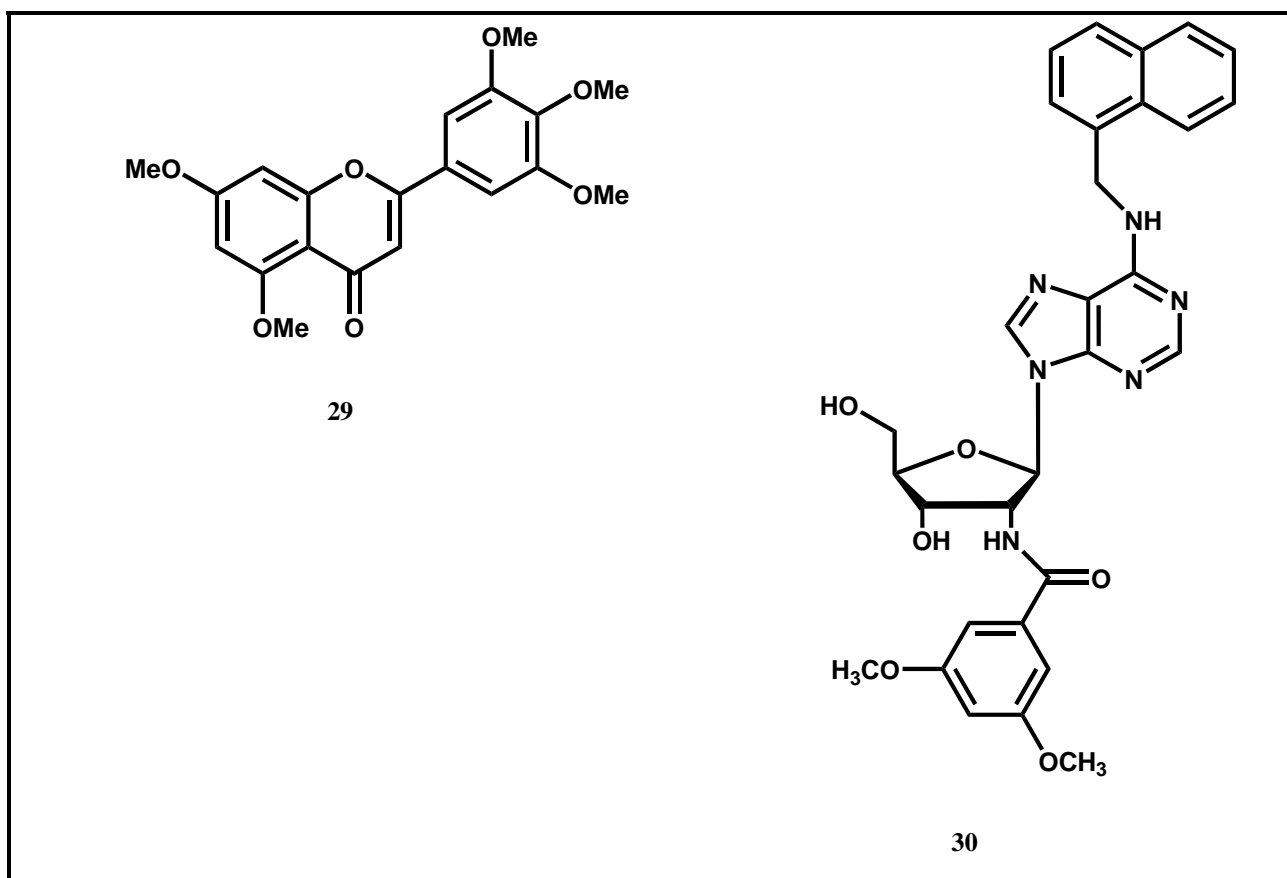


Figura 13. Estructura química de inhibidores de la actividad enzimática de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

Topoisomerasa II

Topoisomerasa II es una enzima que modula la conformación de ADN.⁵⁷ Esta enzima es un blanco potencial para la quimioterapia contra el mal de Chagas teniendo en cuenta que la transformación entre las diferentes formas del parásito involucra importantes cambios en su morfología.⁵⁸ De esta forma, se encontró que diferentes agentes antibacterianos, cuyo modo de acción es el bloqueo de topoisomerasa II, son capaces de inhibir la proliferación y diferenciación de *T. cruzi*. Por ejemplo, ofloxacina (ácido (±)-9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metilpiperazinil)-7-oxo-7*H*-pirido[1,2,3-de]-1,4-benzoxacina-6-carboxílico, **31**) y ácido nalidíxico (ácido 1-etil-1,4-dihidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridin-3-carboxílico, **32**) presentan acciones inhibitorias moderadas contra la replicación de la forma epimastigote del parásito,⁵⁹ mientras que novobiocina (*N*-[7-[[3-*O*-(aminocarbonil)-6-desoxi-5-*C*-metil-4-*O*-metil-β-*L*-lixo-hexapiranosil]-4-hidroxi-8-metil-2-oxo-2*H*-1-benzopirán-3-il]-4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)benzamida, **33**) tiene un efecto modesto contra la velocidad de crecimiento de *T. cruzi*, sólo a concentraciones mayores que 600 µg/ml se observa lisis celular luego de cuatro días. Estos

inhibidores de topoisomerasa II, incluyendo novobiocina, bloquean la transformación de epimastigotes a trypomastigotes metacíclicos (metacicloogénesis) en forma dependiente de la dosis suministrada. El efecto de estas drogas disminuye sustancialmente si se agregan luego de un par de horas de comenzada la metacicloogénesis. La transformación de la forma amastigote del parásito en trypomastigote se bloquea también por efecto de estas drogas. Estos resultados sugieren que la enzima topoisomerasa II es crucial para la diferenciación celular y puede ser un blanco interesante para el diseño racional de nuevas drogas para una quimioterapia segura contra el mal de Chagas (Figura 14).

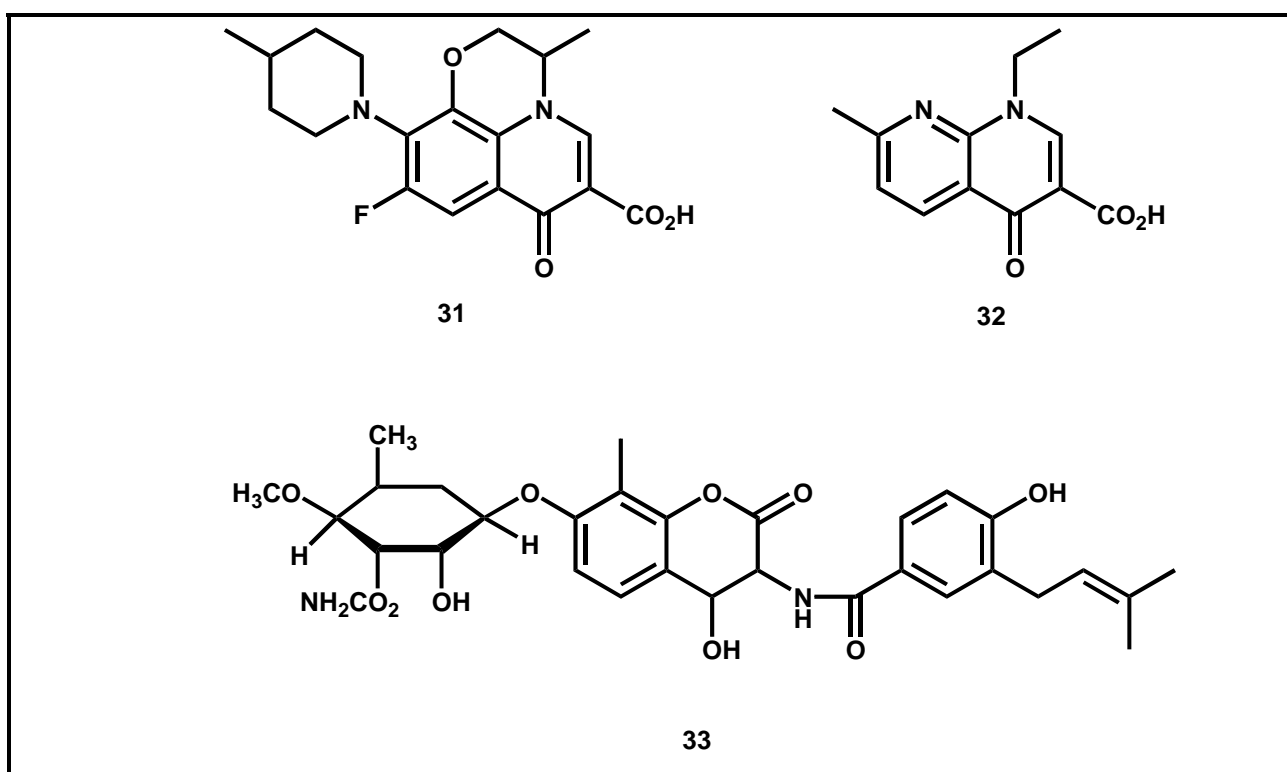


Figura 14. Inhibidores de la actividad enzimática de topoisomerasa II representativos.

Trypanotona reductasa

Durante el metabolismo de oxígeno y de los distintos procesos oxidativos en las células vivas se producen diversas especies reactivas e inestables derivadas del oxígeno, entre las cuales se encuentra el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$). La regulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) no sólo es importante en organismos superiores, sino también en parásitos que ven afectada su integridad dependiendo de su capacidad para resistir el estrés oxidativo, el cual puede proceder de su propio metabolismo o del huésped. Glutatión (**34**) es el

metabolito responsable de mantener el equilibrio redox celular en mamíferos junto con la enzima glutatión reductasa. Frente a distintos agentes oxidantes, glutatión se oxida a glutatión disulfuro, el cual se transforma nuevamente en su forma reducida en una reacción catalizada por la flavoproteína glutatión reductasa dependiente de NADPH. Sin embargo, tanto glutatión como las enzimas relacionadas no constituyen el único sistema responsable de la neutralización de especies oxigenadas reactivas en mamíferos. Este control también está asistido por superóxido dismutasa (catálisis de la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno) y por catalasa (catálisis de la transformación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno).

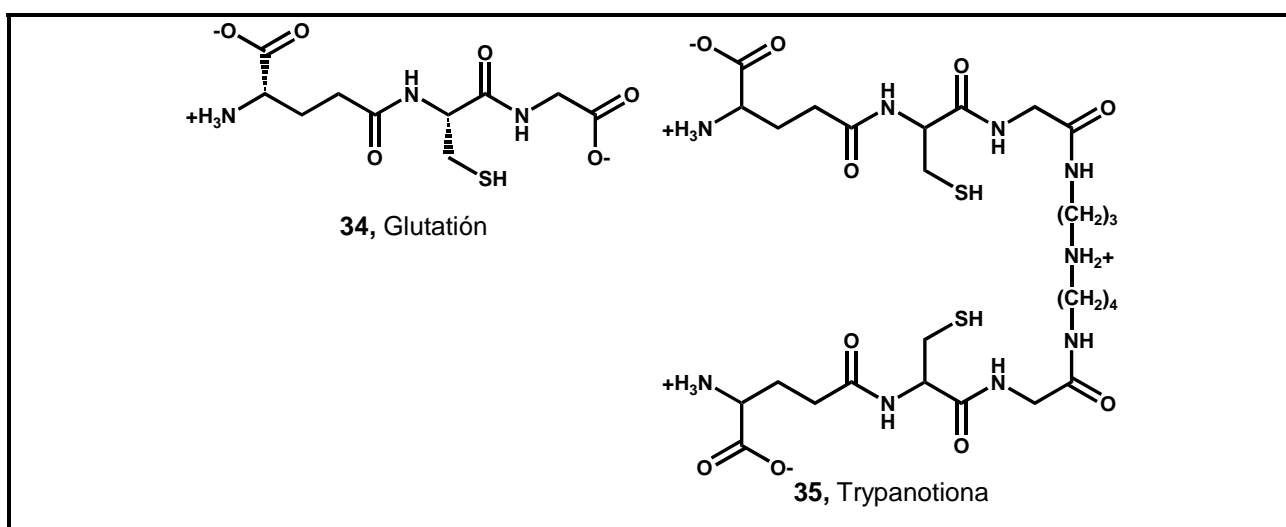


Figura 15. Estructura química glutatión y trypanotina.

Los parásitos del orden Kinetoplastida, como *T. cruzi*, no poseen actividad glutatión reductasa / glutatión oxidasa, para mantener su equilibrio redox. El metabolito responsable de esta función clave es trypanotina (*N*¹,*N*⁸-bis(glutationil)espermidina, **35**) que, al igual que glutatión en mamíferos, desarrolla un rol fundamental en el equilibrio redox de *T. cruzi* (Figura 15). El nivel de trypanotina en *T. cruzi* se mantiene por la actividad de la enzima trypanotina reductasa. Uno de los aspectos más importantes de trypanotina es que *T. cruzi* depende exclusivamente de este metabolito para su defensa contra el estrés oxidativo. Si se bloquea la producción de este metabolito, el parásito se vuelve extremadamente vulnerable a ROS, convirtiéndose, de esta manera, en un importante blanco para el diseño racional de drogas. Por otro lado, la enzima que cataliza los dos últimos pasos de la biosíntesis de trypanotina no se

encuentra presente en mamíferos, hecho que convierte a trypanotona sintetasa en un blanco molecular más que interesante.

Se han realizado varios estudios para validar a trypanotona reductasa como un blanco molecular aceptable para la enfermedad de Chagas. La sobreexpresión de esta enzima incrementa la regeneración de trypanotona en su forma reducida sin afectar la susceptibilidad contra peróxidos. Además, la supresión del gen que codifica para esta enzima inhibe el crecimiento del parásito e incrementa la sensibilidad contra el estrés oxidativo. Si bien este blanco molecular ha sido estudiado exhaustivamente y existe abundante literatura sobre distintos tipos de inhibidores de esta enzima, resulta de mayor interés como blanco molecular la enzima trypanotona sintetasa. La razón de esta preferencia se basa en que trypanotona reductasa tiene su contraparte en mamíferos (glutación reductasa), mientras que trypanotona sintetasa se encuentra exclusivamente en trypanosomátidos.⁶⁰ Trypanotona sintetasa es la enzima que cataliza los dos últimos pasos en la biosíntesis de trypanotona a partir de glutación y espermidina en *T. cruzi*. En otros trypanosomátidos existen dos enzimas bien diferenciadas que catalizan estos dos últimos pasos: glutationilespermidina sintetasa y trypanotona sintetasa.⁶¹ Aún no se conoce la estructura cristalina de trypanotona sintetasa de *T. cruzi*. Sin embargo, las investigaciones de relación estructura-actividad en análogos de glutación indican que el reemplazo del residuo de cisteína en el mismo, por leucina o fenilalanina, convierte a este sustrato en un inhibidor débil de glutationilespermidina sintetasa aislada de *C. fasciculata*. Resultados similares se observan cuando glicina se sustituye por L-Ala. De esta forma, L- γ -Glu-L-Leu-L-Ala presenta una inhibición no competitiva en esta enzima con un $K_i = 0,50$ mM.⁶²

Los derivados de fosfonatos y fosfinatos son conocidos inhibidores de ligasas C:N tales como D-Ala-D-Ala sintetasa y glutamina sintetasa. De esta forma, dentro de una serie de ácidos fosfónicos, fosfínicos y oxofosfónicos estructuralmente relacionados a glutación, se destaca el ácido fosfónico análogo de L- γ -Glu-L-Leu-Gli (**36**), el cual es un potente inhibidor ($K_i = 60$ μ M) hacia glutationilespermidina sintetasa de *C. fasciculata*.⁶³ Combinando la estructura de **36** con un residuo de espermidina se obtienen mejores resultados. El fosfinopéptido **37** presenta un K_i de 6,0 μ M hacia la enzima aislada de *E. coli*,⁶⁴ mientras que **38** es ligeramente más potente que **37** (K_i de 3,2 μ M).⁶⁵ El análogo **39** presenta valores similares de inhibición enzimática.⁶⁶ Sin embargo, la actividad celular (*T. cruzi* o *Leishmania* spp) de ninguno de estos compuestos ha sido ensayada (Figura 16).

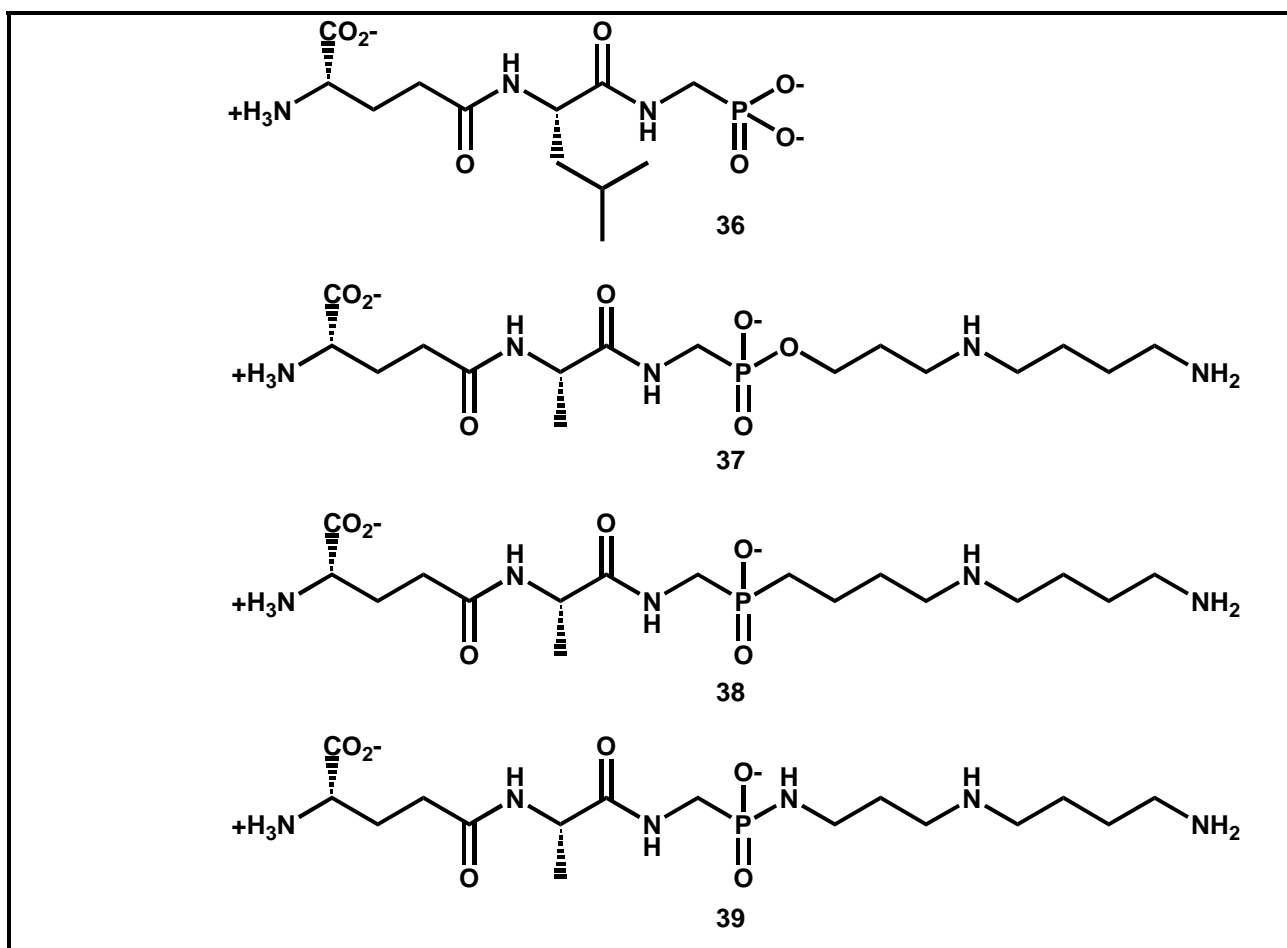


Figura 16. Estructura química de inhibidores de glutationilespermidina sintetasa.

Escualeno Sintetasa

Tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo (**40**) representa una nueva clase de agente antiparasitario. Está relacionado estructuralmente al conocido regulador de crecimiento de insectos fenoxicarb (*N*-{2-[4-fenoxifenoxi)etil]} carbamato de etilo, **41**) (Figura 17).⁶⁷ Esta droga es extremadamente potente en la forma epimastigote de *T. cruzi* con valores de $IC_{50} = 2,2 \mu M$, cuatro veces más potente que nifurtimox ($IC_{50} = 8,6 \mu M$) en las mismas condiciones de ensayo. Este derivado azufrado también es extremadamente efectivo contra la forma intracelular del parásito. La concentración requerida de esta droga tanto para inhibir el 50% de crecimiento del parásito como para reducir el número de células infectadas a la mitad es del rango bajo nanomolar. El modo de acción de esta nueva droga ha sido elucidado recientemente.

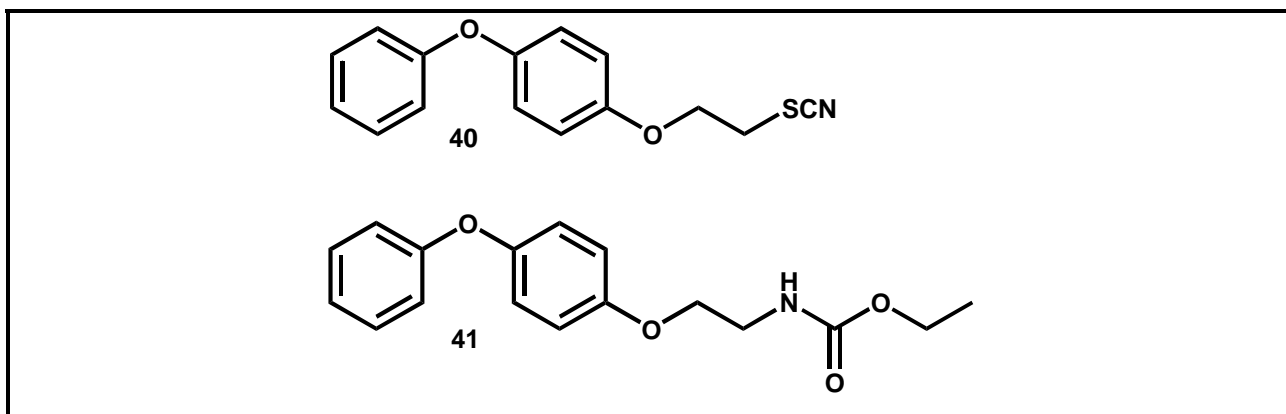


Figura 17. Estructura química de tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo (**40**), inhibidor de escualeno sintasa, y de fenoxicarb (**41**), un conocido regulador de crecimiento de insectos.

La acción inhibitoria de **40** está asociada al bloqueo de la biosíntesis de esteroides endógenos del parásito, esenciales para la supervivencia de estos microorganismos patógenos, tales como ergosterol y sus precursores biosintéticos. Cuando se tratan cultivos de *T. cruzi* (epimastigotes) con **40** se observa un incremento en la proporción relativa de colesterol, que se incorpora por el parásito del medio de cultivo.⁶⁸ Trabajando a 1,0 μM se observa una significativa disminución de la concentración de ergosterol y de sus precursores, sin acumulación de escualeno. Este hecho indica un bloqueo de la ruta biosintética de ergosterol a nivel pre-escualeno. El efecto de **40** contra dos enzimas de la ruta biosintética de esteroides como farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS) y escualeno sintetasa (SQS), ambas de *T. cruzi*, indican que **40** está prácticamente libre de actividad contra FPPS, presentando apenas un 9% de inhibición de la actividad enzimática a una concentración de 4,0 μM . Sin embargo, **40** es un potentísimo inhibidor de la actividad enzimática de SQS tanto glicosomal como mitocondrial presentando valores de IC_{50} de 88 nM y 129 nM, respectivamente. Las curvas de actividad de **40** hacia SQS son coincidentes con una inhibición no competitiva ($K_i = \text{IC}_{50}$) en donde K_i es dos o tres órdenes de magnitud menor que K_m del sustrato. Además, los resultados preliminares de los ensayos *in vivo* de la fase aguda de la enfermedad de Chagas en ratones Swiss indican que **40** reduce significativamente la parasitemia y aumenta la sobrevivencia.⁶⁹ Las razones expuestas anteriormente le dan a este compuesto una gran proyección no sólo como droga líder, sino también como un potencial agente quimioterapéutico. Sobre los intentos de optimización de esta estructura química, cuyo modo de acción es la inhibición de la actividad enzimática de SQS, se tratará en detalle en el capítulo 2.

Farnesil pirofosfato sintetasa

Se ha encontrado hace poco años que *T. cruzi* posee grandes cantidades de pirofosfato y otros polifosfatos almacenados en una organela acídica, descubierta recientemente, denominada el acidocalcisoma.^{70,71} El fósforo inorgánico está distribuido a través de toda la célula, pero se acumula significativamente en el acidocalcisoma, el cual también es muy abundante en Ca^{2+} intracelular.⁷² La entrada y salida de Ca^{2+} del acidocalcisoma está regulada por una serie de mecanismos que incluyen Ca^{2+} ATPasas, intercambiadores de Na^+/H^+ , H^+ ATPasas y pirofosfatasas.⁴⁶ Por otro lado, se conoce la existencia de prenilación de proteínas tanto en *T. cruzi* como en *T. brucei*.⁷³ En mamíferos y hongos, la prenilación involucra la unión de grupos farnesilo y geranilgeranilo a residuos C-terminales de cisteína de un número de proteínas de la célula; principalmente, pequeñas guanina-trifosfatasas (GTPasas), entre las cuales se encuentran Ras, Rac, Rab y Rho y desempeñan un rol importante en la transducción de señales y en el tráfico vesicular intracelular.⁷⁴ La función de estos grupos prenilos es de anclar diversas proteínas a membrana y de servir como mediadores en la interacción entre proteínas. Se han identificado tres enzimas que catalizan la unión de estos grupos prenilos a proteínas: farnesil transferasa (PFT), geranilgeranil transferasa I (PGGT-I) y geranilgeranil transferasa II (PGGT-II) (Figura 18). La inhibición selectiva de PFT reduce la velocidad del crecimiento de tumores debido al bloqueo de la farnesilación sobre el Ras oncogénico. Estos resultados han conducido al desarrollo de varios inhibidores de PFT para emplearse como potenciales agentes anticancerígenos; algunos de ellos son potentes inhibidores del crecimiento tanto de *T. brucei* como de *T. cruzi*. De esta manera, la inhibición selectiva de farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS) o de geranilgeranil pirofosfatofato sintetasa (GGPPS), dos enzimas claves en la ruta de isoprenoides, conducirá al control de la replicación de distintos trypanosomas patógenos a través del bloqueo de la prenilación de proteínas (Figura 18).

Los bisfosfonatos (**42**) son compuestos relacionados con pirofosfato inorgánico (**43**), en los cuales un grupo metileno reemplaza el oxígeno puente presente entre los dos átomos de fósforo. A diferencia de pirofosfato, los bisfosfonatos presentan una mayor estabilidad metabólica dado que estos compuestos no son hidrolizados por pirofosfatasas, además de ser estables a la hidrólisis ácida. FPPS y GGPPS son los blancos moleculares de bisfosfonatos.⁷⁵

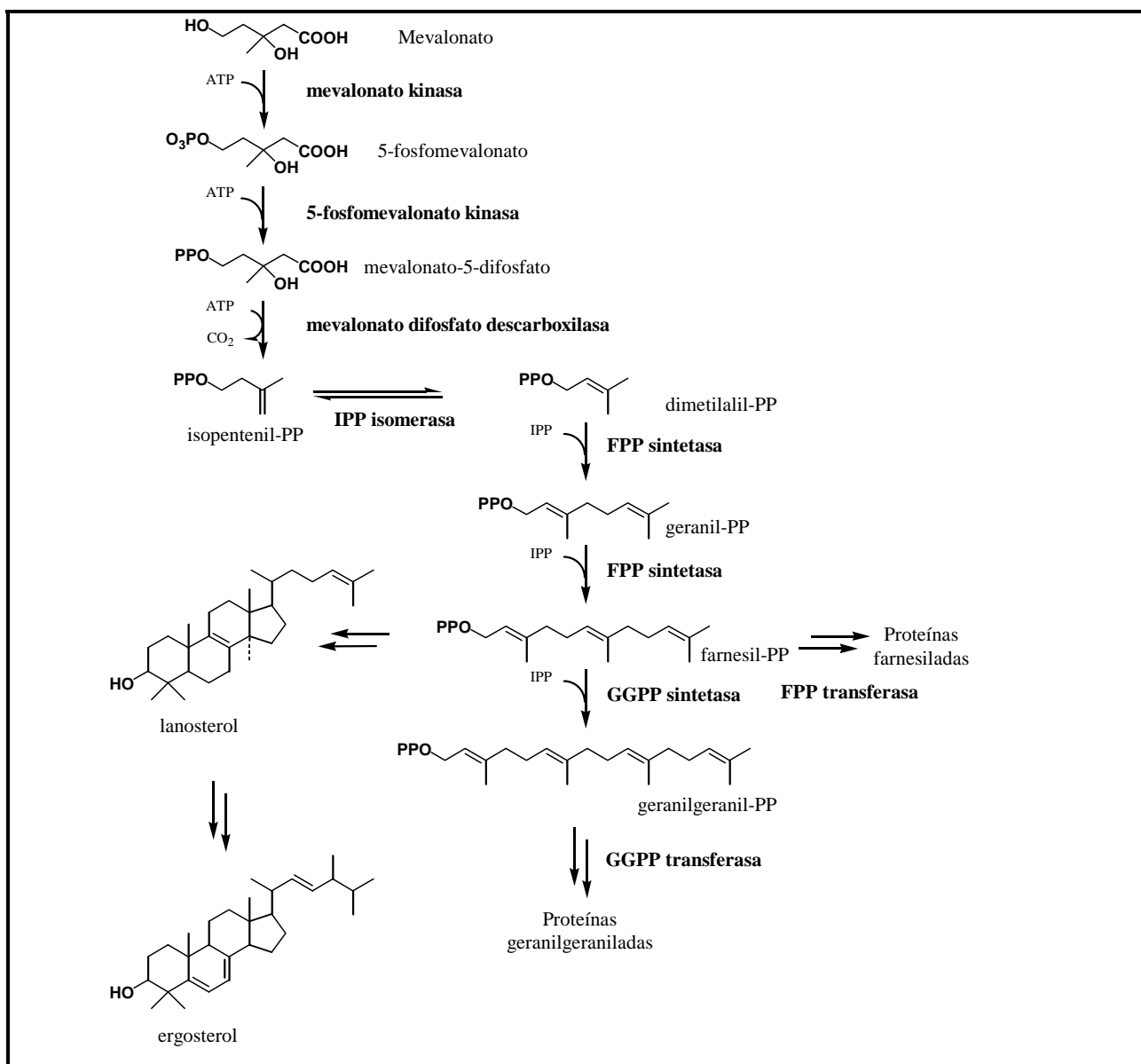


Figura 18. Ruta biosintética de ergosterol y prenilación de proteínas.

Diversos bisfosfonatos tales como etidronato (ácido 1-hidroxietil-1,1-bisfosfónico, **44**), pamidronato (ácido 3-amino-1-hidroxipropil-1,1-bisfosfónico, **45**) y risedronato (ácido 1-hidroxil-2-(piridin-3-il)etil-1,1-bisfosfónico, **46**) son potentes inhibidores de la resorción ósea y son utilizados clínicamente para el tratamiento y prevención de la osteoporosis, hipercalcinemia, metástasis de tumores óseos y diversos trastornos óseos (Figura 19). El modo de acción de estos compuestos es la inhibición de la actividad enzimática de FPPS.

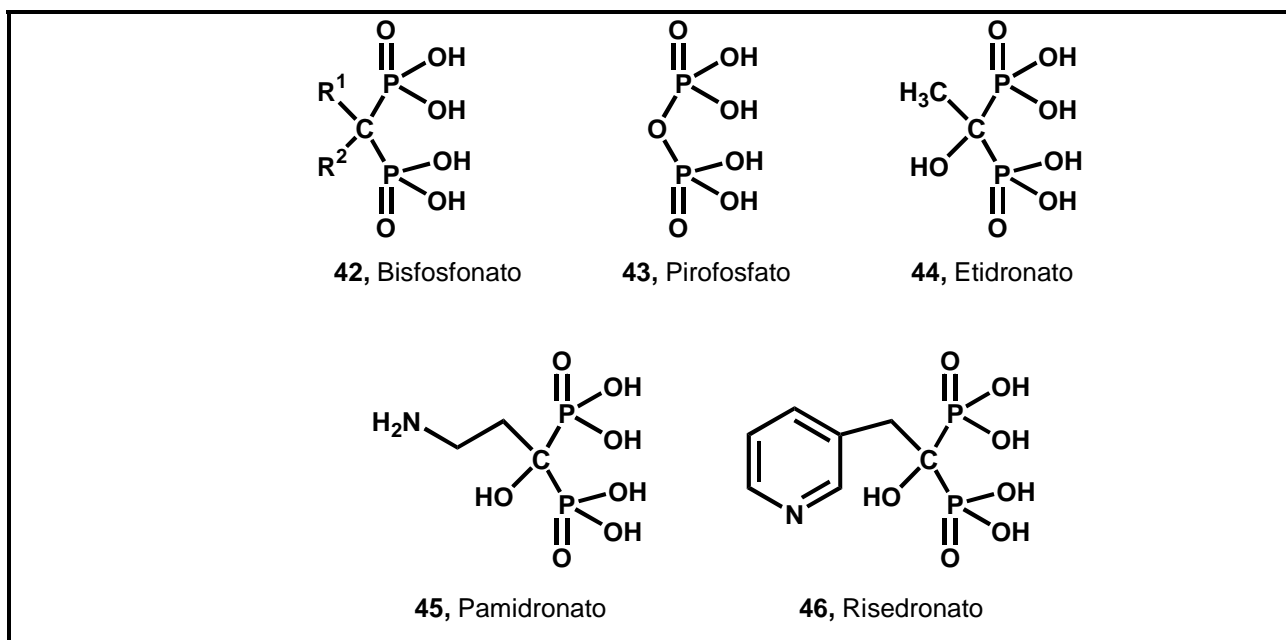


Figura 19. Bisfosfonatos representativos utilizados clínicamente para el tratamiento de trastornos óseos.

Dado que existen numerosos derivados de bisfosfonatos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU. para tratamientos prolongados de resorción ósea, se puede predecir una baja toxicidad en compuestos que posean esta funcionalidad. Por estas razones, estas drogas ofrecen un gran potencial como agentes antiparasitarios.⁷⁶ Distintos bisfosfonatos nitrogenados como etidronato (**44**), pamidronato (**45**) y risedronato (**46**) son potentes inhibidores de la proliferación de *T. cruzi* en ensayos *in vitro* e *in vivo*, sin toxicidad para la célula huésped. Como los bisfosfonatos están estructuralmente relacionados a pirofosfato y polifosfatos, se puede postular que estos compuestos son potenciales inhibidores de los caminos metabólicos relacionados a pirofosfato. El blanco molecular para aminobisfosfonatos en osteoclastos, plantas y *D. discoideum* es farnesil pirofosfato sintetasa, la cual cataliza la formación del sustrato para la prenilación de proteínas. De esta forma, el metabolismo de pirofosfato es un importante blanco molecular para su empleo en enfermedades tropicales, es decir, *gem*-fosfonatos pueden jugar un importante rol en la quimioterapia específica contra el mal de Chagas y otras infecciones causadas por trypanosomas patógenos. En los capítulos 3 y 4 se discutirá en detalle el diseño, síntesis y evaluación biológica de bisfosfonatos y también la química de los mismos.

Capítulo 2

Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica de Derivados de Tiocianato de Ariloxietilo

Tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo (**40**) representa una nueva clase de agente antiparasitario. Como se mencionó anteriormente, este compuesto es un inhibidor potentísimo de las formas proliferativas del parásito, es decir, las formas epimastigote y amastigote, siendo esta última la forma clínicamente más relevante del mismo. Además, el modo de acción de este compuesto se conoce en forma precisa. De esta forma, la actividad como agente antiparasitario estaba asociada a la inhibición de la actividad enzimática de escualeno sintetasa de *T. cruzi* (*TcSQS*). La potencia inhibitoria de este compuesto es del orden bajo nanomolar, un rango muy apropiado para cualquier agente quimioterapéutico potencial. Por las razones expuestas, se tomó como estructura líder al compuesto **40** para su optimización. La estructura química de esta familia de compuesto se puede dividir en dos sectores: un extremo no polar correspondiente a los anillos aromáticos y un extremo polar correspondiente al grupo unido a la posición C-1. La presencia del grupo 4-fenoxifenoxi en el extremo no polar es muy importante para la acción inhibitoria contra el crecimiento de *T. cruzi*.⁷⁷⁻⁷⁹

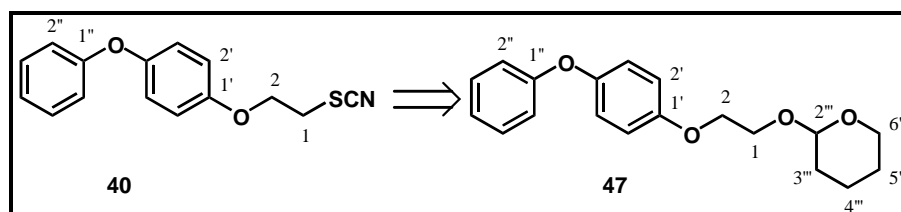


Figura 1. Estructura química de tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo y de 4-fenoxifenoxietil tetrahidropiranil éter.

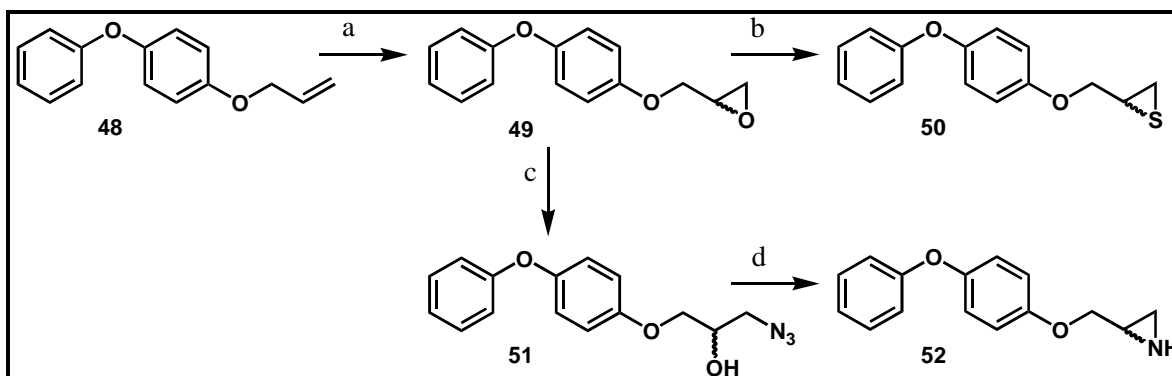
También resulta fundamental para la actividad biológica la presencia del grupo tiocianato en el extremo polar de la molécula.⁶⁷ Es importante destacar que los derivados de tetrahidropiranil éter, como el compuesto **47**, son precursores sintéticos en la síntesis de los correspondientes tiocianatos relacionados estructuralmente a **40**. Como **47** y análogos del mismo eran potentes inhibidores de la proliferación de *T. cruzi*, aunque en el caso de **47** mucho menos efectivo que el tiocianato correspondiente **40**, resultaba interesante comparar la potencia de ambos tipos de compuestos dada la correlación existente entre ambas drogas. Con el objetivo de

optimizar la estructura de **40** se llevó a cabo un estudio exhaustivo de relación estructura química–actividad biológica (SAR), en donde se diseñaron, sintetizaron y evaluaron biológicamente distintas series de derivados estructuralmente relacionados al compuesto **40**.

Diseño y Síntesis.

Modificación del extremo polar.

Como se mencionó anteriormente, la presencia de un átomo de azufre, como un grupo tiocianato u otros derivados azufrados, en el extremo polar de la molécula tienen una marcada influencia en la actividad biológica. Estos grupos que contienen un átomo de azufre poseen cierto carácter electrofílico, hecho que sería muy importante en el reconocimiento molecular de estas drogas por SQS. Inicialmente, se decidió reemplazar el grupo tiocianato por otros grupos funcionales electrofílicos. El grupo episulfuro representaba una alternativa interesante, ya que combinaba la propiedad de poseer dos centros electrofílicos con poseer un átomo de azufre en su estructura. El reemplazo isostérico de este átomo de azufre da lugar a la aziridina correspondiente. Estos derivados se obtuvieron a partir del epóxido **49**, sintetizado previamente en nuestro laboratorio por tratamiento del derivado alil éter **48** con ácido *m*-cloroperbenzoico en cloruro de metileno.⁷⁸ El episulfuro **50** se obtuvo según el método de van Tamelen, en el cual una solución de tiocianato de potasio en *N,N*-dimetilformamida reaccionó con el epóxido **49** para dar **50** (Esquema 1).⁸⁰



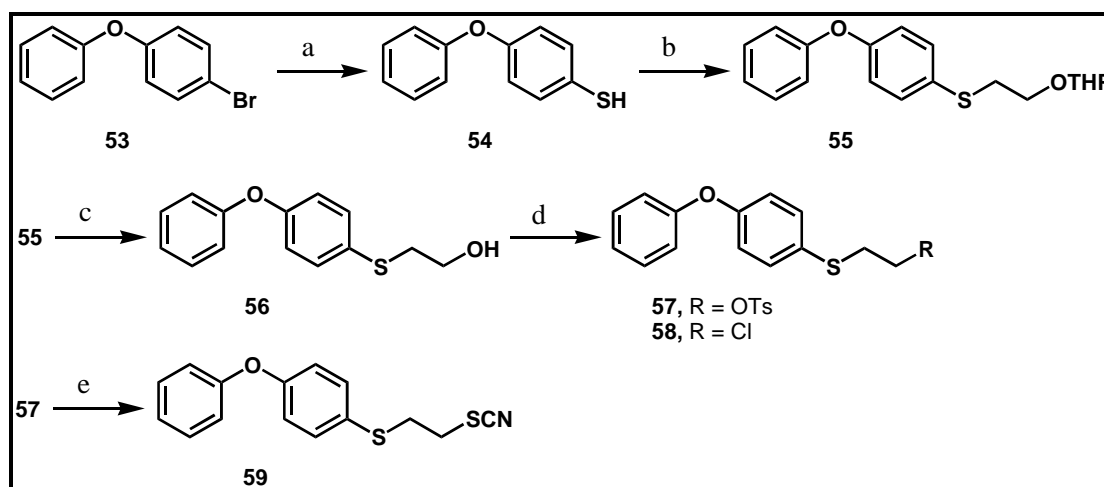
Esquema 1. Reactivos y condiciones: (a) *m*-CPBA, CH₂Cl₂, t.a., 61%; (b) KSCN, DMF, 100 °C, 3 h, 47%; (c) NaN₃, Me₂CO-H₂O, t.a., 48 h, 82%; (d) Ph₃P, THF, t.a., 2 h, 72%.

Los espectros de RMN ^1H y de RMN ^{13}C confirmaron la estructura del episulfuro **50** resultando muy similares a los del epóxido precursor **49**. Sin embargo, en el espectro de masa del compuesto **50** se observaba una señal que correspondía al ión molecular a $m/z = 258$ evidenciando el reemplazo del átomo de oxígeno por el de azufre.

Por otro lado, la apertura regioespecífica del epóxido **49**, por tratamiento con azida de sodio en acetona-agua, condujo exclusivamente a la hidroxiazida **51** con buen rendimiento, la cual, tratada con trifenilfosfina en tetrahidrofurano a temperatura ambiente produjo el producto deseado **52** con 72% de rendimiento.⁸¹

Reemplazo del átomo de oxígeno en C-2.

Teniendo en cuenta que los derivados azufrados en la posición C-1 son extremadamente potentes, era altamente probable que pequeñas modificaciones en las cercanías de esta posición tuvieran un fuerte efecto en la actividad biológica. Para estudiar esta cuestión se reemplazó el átomo de oxígeno que se encontraba entre el grupo fenilo y la cadena alifática (C-2) por otros heteroátomos, tales como azufre o nitrógeno. Los compuestos deseados **55** y **59** se prepararon en forma directa a partir de 4-bromofenilfenil éter (**53**) (Esquema 2).



Esquema 2. Reactivos y condiciones: (a) i. Mg/I_2 , THF, 65°C , 15 min, luego t.a., 2 h; ii. S_8 , 3 h, t.a.; iii. LiAlH_4 , t.a., 30 min, 100%; (b) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OTHP}$, KOH/DMSO , t.a., 16 h, 43%; (c) PPTs, MeOH, t.a., 78%; (d) CITs/py, t.a. 4 h (85% para **57**, 9% para **58**); (e) KSCN , DMF, 100°C , 5 h, 100%.

De esta forma, una solución de **53** en tetrahidrofurano anhidro se trató con magnesio metálico para dar el reactivo de Grignard respectivo, el cual por reacción con azufre y posterior

reducción con hidruro de litio y aluminio condujo al tiofenol **54**.⁸² Este compuesto, tratado con 2-bromoetil tetrahidro-2*H*-piran-2-il éter en una suspensión de hidróxido de potasio en dimetilsulfóxido condujo al compuesto **55**. La remoción del grupo tetrahidropiraniolo se realizó por tratamiento con *p*-toluensulfonato de piridonio en metanol para dar lugar al alcohol **56** que, por tratamiento con cloruro de tosilo en piridina, formó el tosilato **57** y el cloruro **58** como producto secundario de la reacción. Estos productos se purificaron por cromatografía en columna utilizando sílica gel. Finalmente el tiocianato **59** se obtuvo por tratamiento del compuesto **57** con tiocianato de potasio en *N,N*-dimetilformamida a 100 °C (Esquema 2). El espectro de RMN ¹³C de **59** presentó 11 señales, se destacaba aquella que aparecía a 111,57 ppm, indicando la presencia del grupo tiocianato. Las señales que corresponden a C-1 y C-2 aparecían a 33,22 ppm y 35,45 ppm, respectivamente. El espectro se completaba con 8 señales en la zona aromática del espectro, pertenecientes a los anillos A y B del extremo no polar de la molécula (Figura 2).

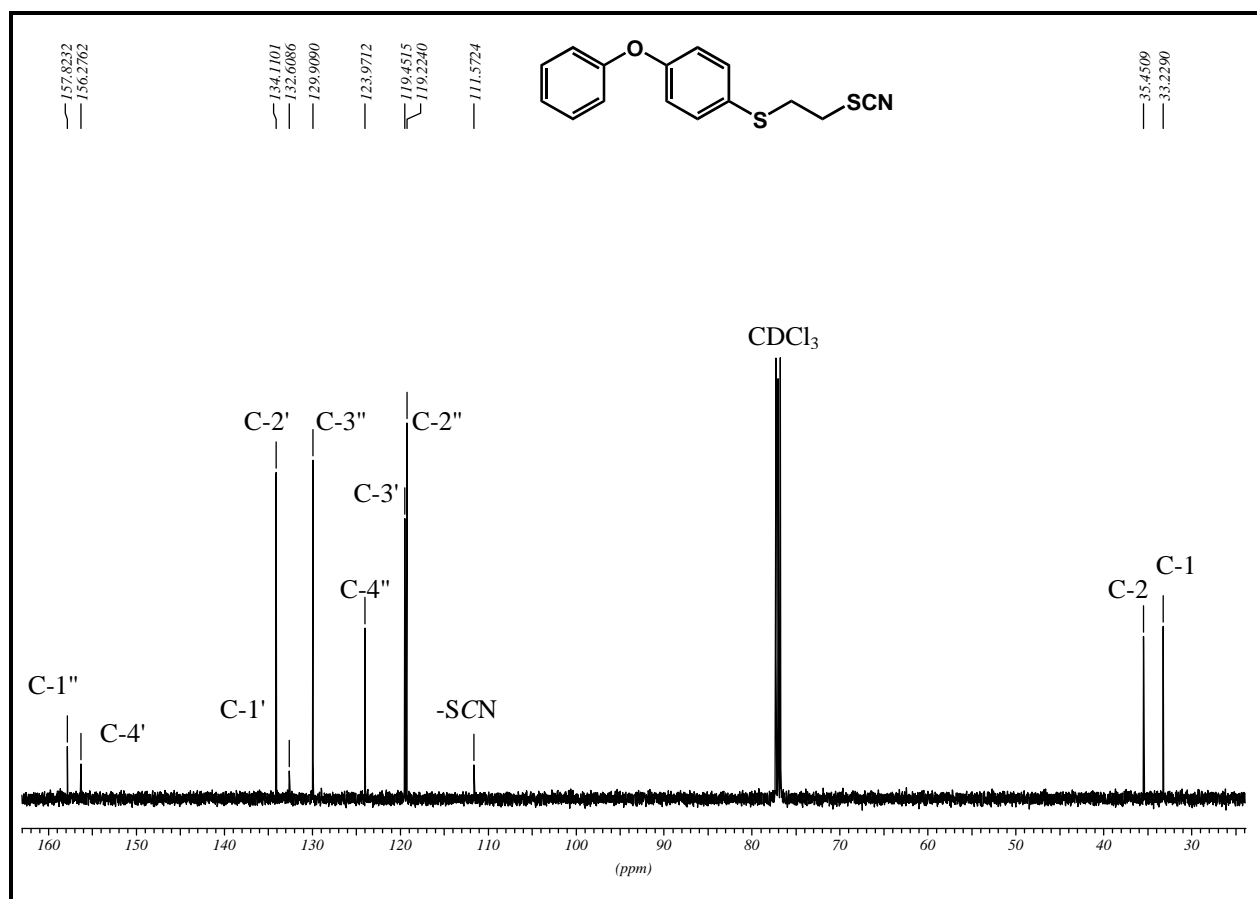
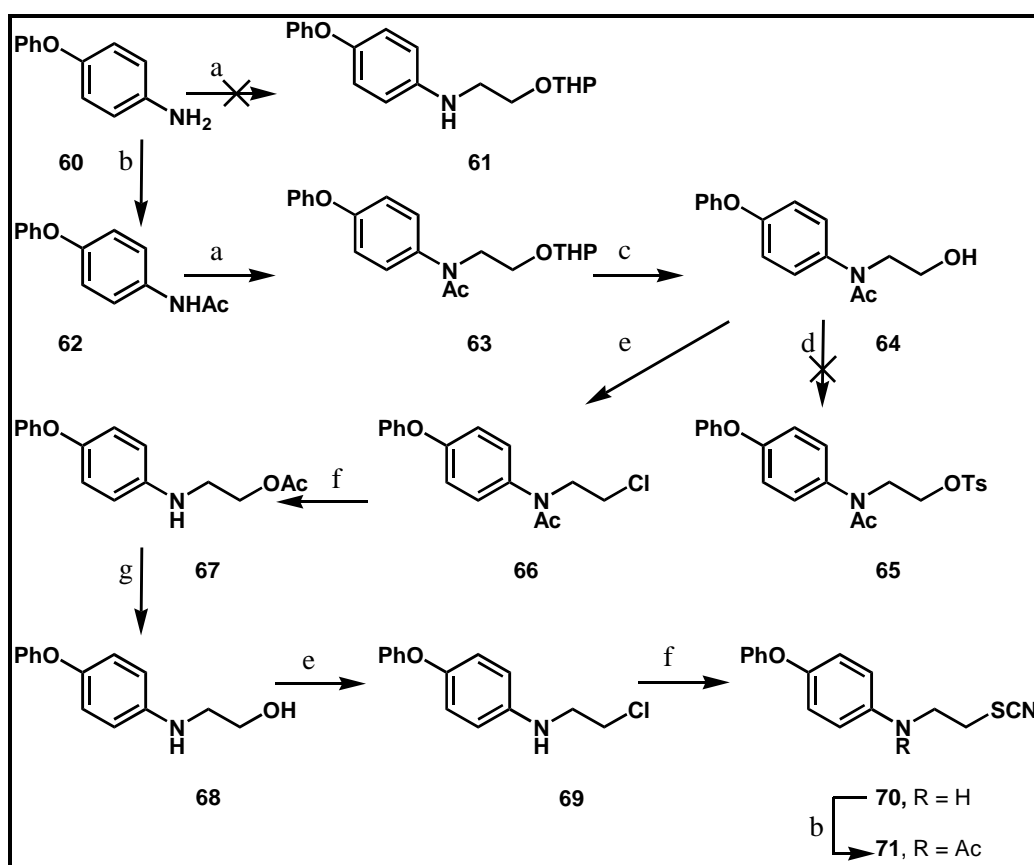


Figura 2. Espectro de RMN ¹³C de tiocianato de 2-(4-fenoxifenil)etilo (**59**).

Para la preparación del derivado nitrogenado en C-2 se empleó 4-fenoxianilina (**60**) como material de partida. Se pensó utilizar la misma estrategia sintética que la empleada para la preparación de los derivados azufrados **55** y **59**; sin embargo, todos los intentos por alquilar el átomo de nitrógeno de **60** con 2-bromoetil tetrahidropiranyl éter para obtener el hipotético precursor **61** resultaron infructuosos. Se decidió incrementar la acidez de los átomos de hidrógeno del grupo amino por acetilación del mismo para dar la acetanilida correspondiente **62**. De esta manera, el compuesto **60** se trató con anhídrido acético en piridina para formar **62** con 98% de rendimiento (Esquema 3).



Esquema 3. Reactivos y condiciones: (a) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OTHP}$, KOH/DMSO , t.a., 16 h, 90%; (b) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{py}$, t.a., 16 h (98% para **62**, 82% para **71**); (c) PPTs, MeOH , t.a., 73%; (d) ClTs/py ; (e) $\text{Ph}_3\text{P}/\text{Cl}_4\text{C}$, MeCN , t.a., 16 h, (51% para **66**, 70% para **69**); (f) KSCN , DMF , 100°C , 5 h (95% para **67**, 39% para **70**); (g) K_2CO_3 , $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}$, t.a., 3 h, 87%.

La incorporación del grupo acetilo en la molécula se confirmó en base al análisis de los espectros de $\text{RMN } ^1\text{H}$ y $\text{RMN } ^{13}\text{C}$. En el espectro de $\text{RMN } ^{13}\text{C}$ se observan, entre otras señales, una a 168,96 ppm, mientras que en el espectro de RMN protónico se observa un singulete a 24,14

ppm, ambos picos son característicos del grupo aceto (Figura 3). La acetanilida **62**, con un pK_a mucho menor que el del compuesto **60**, se alquiló fácilmente por tratamiento con 2-bromoetil tetrahydro-2*H*-piran-2-il éter en una suspensión de hidróxido de potasio en dimetilsulfóxido para dar **63**, el cual por reacción con *p*-toluensulfonato de piridonio en metanol produjo el alcohol **64** con 73% de rendimiento.

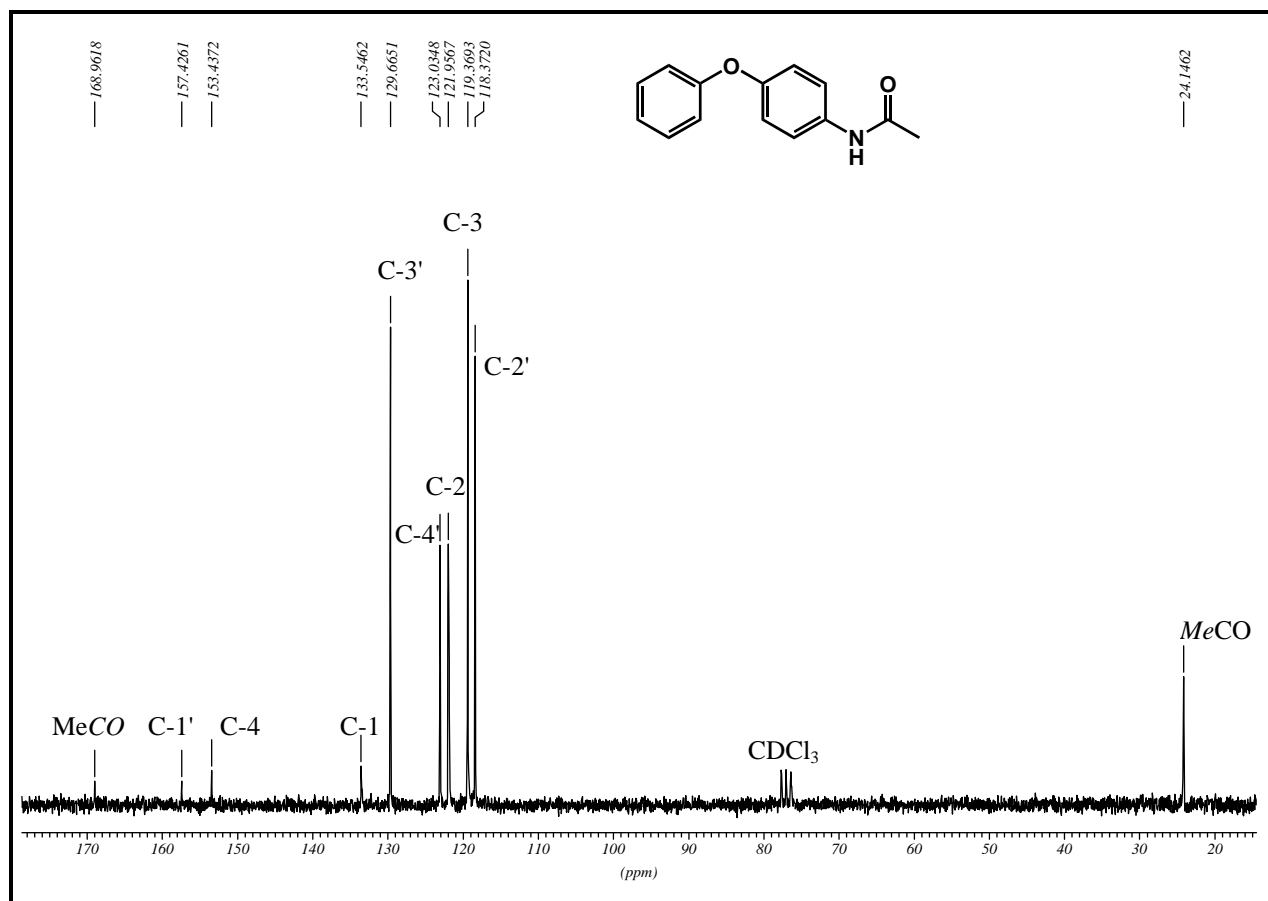
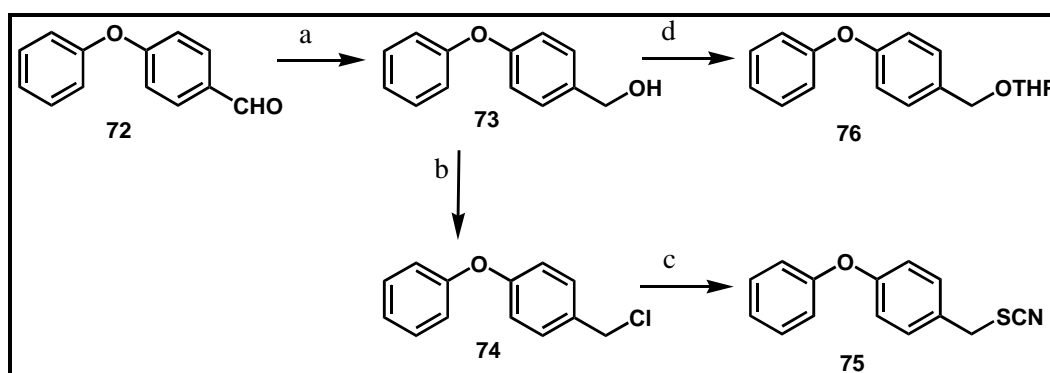


Figura 3. Espectro de RMN ^{13}C de *N*-(4-fenoxifenil) acetamida (**62**).

El camino sintético habitual para la obtención de tiocianatos es el uso del precursor tosilato que, por una sustitución $\text{S}_{\text{N}}2$ producida por el nucleófilo SCN^- , conduce al derivado buscado. Sin embargo, no pudo obtenerse el tosilato correspondiente a partir del alcohol **64**. Se intentó preparar un halogenuro como primera alternativa sintética razonable, ya que se podía preparar fácilmente a partir del alcohol. El alcohol **64** se transformó en el cloruro **66** por tratamiento con trifenilfosfina en tetracloruro de carbono con moderado rendimiento.^{83,84} Sorprendentemente, cuando se llevó a cabo la reacción del cloruro **66** con tiocianato de potasio

en *N,N*-dimetilformamida se obtuvo el acetato **67** en lugar del tiocianato esperado **71**. La formación del compuesto **67** puede justificarse debido a la asistencia anquimérica del grupo acetato vecino. El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C confirmó la migración del grupo acetato desde el átomo de nitrógeno a la posición C-1. Por ejemplo, en el espectro de RMN ^1H aparecían dos señales que indicaban esta transformación: un triplete centrado a 4.23 ppm ($J = 5.5$ Hz), correspondiente a H-1 y un singulete a 2,09 ppm correspondiente al metilo del grupo acetato. Finalmente, se hidrolizó el compuesto **67** por tratamiento con carbonato de sodio para dar el alcohol **68**, el cual se transformó fácilmente en el cloruro **69** por reacción con trifenilfosfina en tetracloruro de carbono. La sustitución nucleofílica del cloruro por el ión tiocianato dio lugar a la formación del tiocianato **70**. Además, se preparó el derivado acetilado **71** por tratamiento de **70** con anhídrido acético en piridina. Esta transformación se llevó a cabo con la idea de correlacionar la actividad biológica de **71** con el correspondiente precursor tetrahidropiranyl éter **63** (Esquema 3).

Como una segunda variación estructural, se consideró el reemplazo de la unidad etoxi de la droga líder **40** por un grupo metileno para dar **75** como molécula blanco. Este compuesto se sintetizó fácilmente a partir de 4-fenoxibenzaldehído (**72**), el cual por reducción con borohidruro de sodio en etanol se convirtió en el alcohol **73**. Este alcohol se transformó en el cloruro **74** por tratamiento con trifenilfosfina en tetracloruro de carbono-acetonitrilo. Finalmente, el tiocianato **75** se obtuvo por reacción entre el cloruro **74** con tiocianato de potasio en *N,N*-dimetilformamida (Esquema 4).



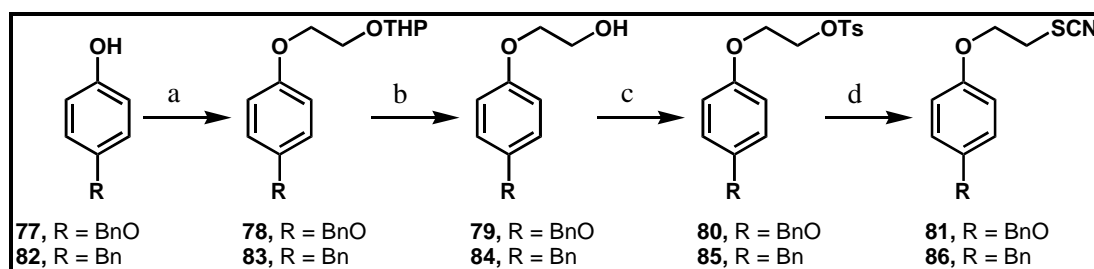
Esquema 4. Reactivos y condiciones: (a) NaBH_4 , EtOH, t.a., 2 h, 84%; (b) $\text{Ph}_3\text{P}/\text{Cl}_4\text{C}$, MeCN, t.a., 16 h; (c) KSCN, DMF, 100 °C, 5 h, 13%; (d) PPTs, DHP, Cl_2CH_2 , t.a., 100%.

Dado que en este camino sintético no se utilizó el tetrahidropiranyl éter, se decidió sintetizarlo con el fin de correlacionar la actividad biológica de éste con **75**. Nuevamente, con el fin de comparar su potencia inhibitoria se decidió preparar el derivado **76**, el cual se obtuvo por tratamiento del alcohol **73** con 3,4-dihidro-2*H*-pirano en presencia de *p*-toluensulfonato de piridonio con rendimiento cuantitativo (Esquema 4).

Modificación del extremo no polar.

Como se discutió anteriormente, la presencia del grupo 4-fenoxifenoxi en el extremo no polar es muy importante para la actividad biológica. Por ejemplo, el reemplazo del grupo fenoxi terminal por un grupo metoxi o benzoilo traía aparejada una pérdida de la potencia inhibitoria.⁷⁹ Debido a la importancia del grupo fenoxi en el extremo no polar, se decidió estudiar la influencia de la disposición espacial del grupo fenilo terminal. Para ello se realizaron pequeñas modificaciones en la estructura aromática tales como el reemplazo del grupo fenoxi por un benciloxi o un bencilo, manteniendo el extremo polar intacto, es decir, con el grupo tiocianato unido a la cadena alifática. De esta forma, 4-(benciloxi)fenol (**77**) se transformó en el derivado tetrahidropiranyl éter **78** por reacción con 2-bromoetil tetrahidropiranyl éter en una suspensión de hidróxido de potasio en dimetilsulfóxido según el método general. El alcohol **79** se obtuvo por hidrólisis del grupo tetrahidropiranyl éter por tratamiento con *p*-toluensulfonato de piridonio en metanol,⁸⁵ el cual tratado con cloruro de tosilo en piridina a 0 °C condujo al correspondiente tosionato **80** que, por posterior reacción con tiocianato de potasio en *N,N*-dimetilformamida a 100 °C dio lugar a **81** (Esquema 5).⁸⁶

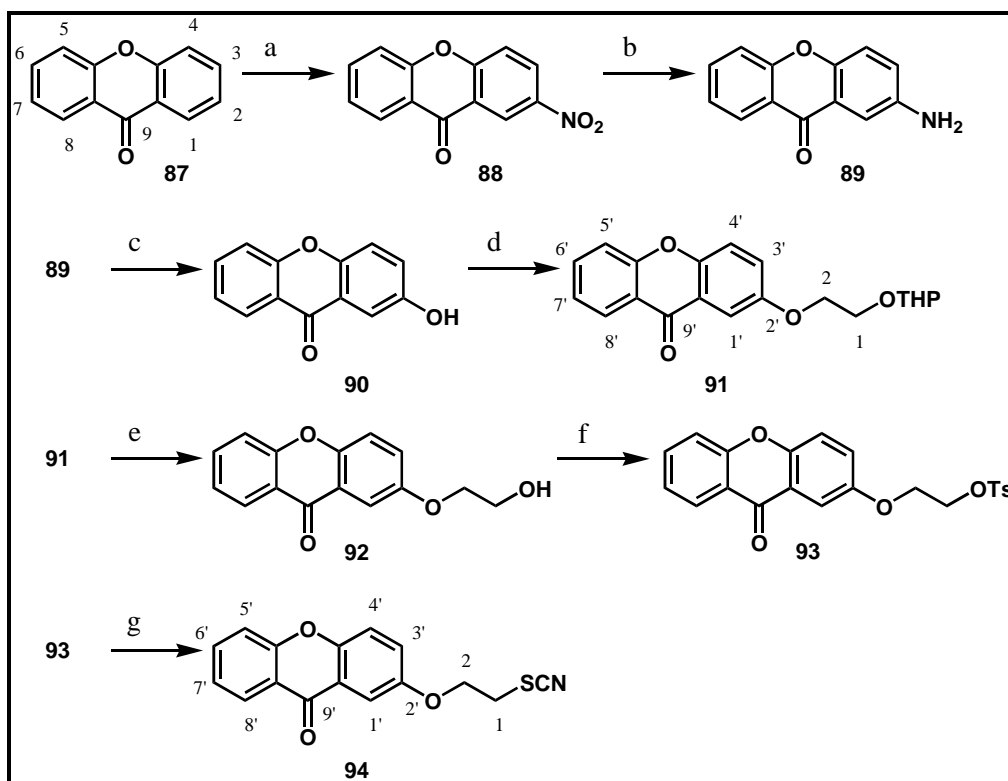
Por otra parte, el tiocianato **86** se obtuvo siguiendo el mismo esquema sintético empleado para la obtención de **81** utilizando como material de partida bencil fenol **82** (Esquema 5).



Esquema 5. Reactivos y condiciones: (a) BrCH₂CH₂OTHP, KOH/DMSO, t.a. (55% para **78**, 65% para **83**); (b) PPTs, MeOH, t.a. (82% para **79**, 77% para **84**); (c) CITs/py, t.a. (82% para **80**, 63% para **85**); (f) KSCN, DMF, 100 °C (70% para **81**, 52% para **86**).

Restricción conformacional en el extremo no polar.

Otra modificación estructural de interés fue la preparación de derivados de tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo conformacionalmente restringidos. Esta familia de compuestos se preparó con el fin de investigar la influencia de la disposición espacial de ambos grupos fenilos en la actividad biológica. El esqueleto de xantona (**87**) resultaba un buen modelo para la preparación de estos derivados rígidos. Las posiciones C-2 y C-4 de xantona eran las más favorecidas frente a la sustitución electrofílica aromática puesto que estaban en posición *para* y *orto* con respecto al grupo ariloxi. Sin embargo, se pensó que la posición C-2 estaría más favorecida que la C-4 por estar estéricamente menos impedida para el electrófilo entrante. La reacción de nitración en C-2 para formar el nitro derivado **88** resultó muy importante para la preparación de estos derivados conformacionalmente rígidos.

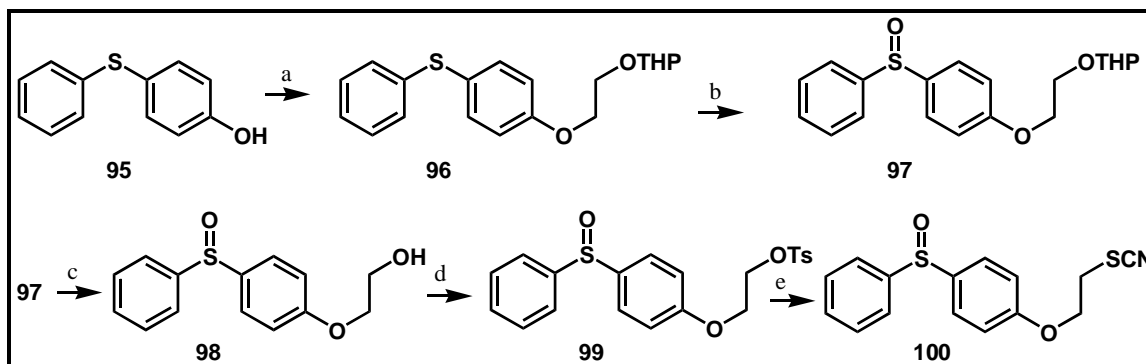


Esquema 6. Reactivos y condiciones: (a) HNO_3 (conc.) H_2SO_4 , 0 °C, 40 min; (b) H_2 , Pd/C 3 atm, t.a., 6 h (91% desde **87**, basado en el numero de equivalentes de HNO_3 empleado); (c) i. $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{AcOH}$, ii. NaNO_2 , H_2O , 0 °C, 20 min, iii. urea, H_2O , iv. $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$, reflujo, 36%; (d) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OTHP}$, KOH/DMSO , t.a. , 45%; (e) PPTs, MeOH , t.a. , 100%; (f) CITs/py, t.a. , 78%; (g) KSCN , DMF , 100 °C, 71%.

La sustitución del H-2 por un grupo nitro fue muy satisfactoria. Esta se llevó a cabo en presencia de baja concentración del agente nitrante (0,5 equivalentes) que se agregó sobre una solución diluida y fría de un equivalente de xantona en ácido sulfúrico concentrado. De esta forma, la concentración de xantona se encontraba siempre en exceso con respecto al agente nitrante, mientras que el producto de la reacción, 2-nitroxantona (**88**), era mucho menos reactivo para la reacción de sustitución electrofílica aromática con el cation NO_2^+ que el material de partida (xantona). El nitroderivado **88** se redujo por hidrogenación catalítica para formar **89**. Este compuesto, por reacción con nitrito de sodio en ácido sulfúrico concentrado en presencia de urea a 0 °C, dio lugar al derivado fenólico **90**, el cual, siguiendo la estrategia habitual de *O*-alquilación de **90**, hidrólisis del derivado tetrahidropiraniilo (**92**), y tosilación del alcohol resultante, produjo **93**. Finalmente, el ataque nucleofílico de ión tiocianato, convirtió **93** en el tiocianato rígido buscado **94** (Esquema 6).

Reemplazo del átomo de oxígeno entre los dos grupos fenilos.

La influencia del átomo de oxígeno presente entre los grupos fenilos era muy importante en la actividad biológica ya que, el reemplazo isostérico del mismo por un átomo de azufre traía aparejada una disminución de la potencia inhibitoria. Se pensó que el estado de oxidación del átomo de azufre podría tener influencia en la actividad biológica. Se tomó como molécula blanco al derivado sulfóxido **100** (Esquema 7).



Esquema 7. Reactivos y condiciones: (a) KOH, DMSO, $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OTHP}$, t.a., 16 h, 62%; (b) NaIO_4 , MeOH-H₂O, t.a., 48 h, 80%; (c) PPTs, MeOH, t.a., 16 h, 91%; (d) CITs, py, t.a., 4 h, 45%; (e) KSCN, DMF, 100 °C, 5 h, 70%.

La preparación de **100** se llevó a cabo partiendo de 4-fenilsulfanilfenol (**95**). El tetrahidropiraniil éter derivado **96** se obtuvo de la manera habitual. Este compuesto se transformó

en el sulfóxido correspondiente **97** por oxidación de **96** con un equivalente de metaperiodato de sodio en metanol-agua con 80% de rendimiento. Es interesante ver la modificación de las señales en la zona aromática de los espectros de RMN ^{13}C de **96** y **97** debida al cambio del estado de oxidación del átomo de azufre. De esta manera, al pasar de un grupo dador a otro atractor de electrones, las señales más afectadas fueron las de aquellos carbonos que se encontraban directamente unidos al átomo de azufre y las correspondientes a los carbonos en las posiciones *orto* y *para* respecto de este átomo de azufre, mientras que las señales restantes no presentaron cambios significativos.

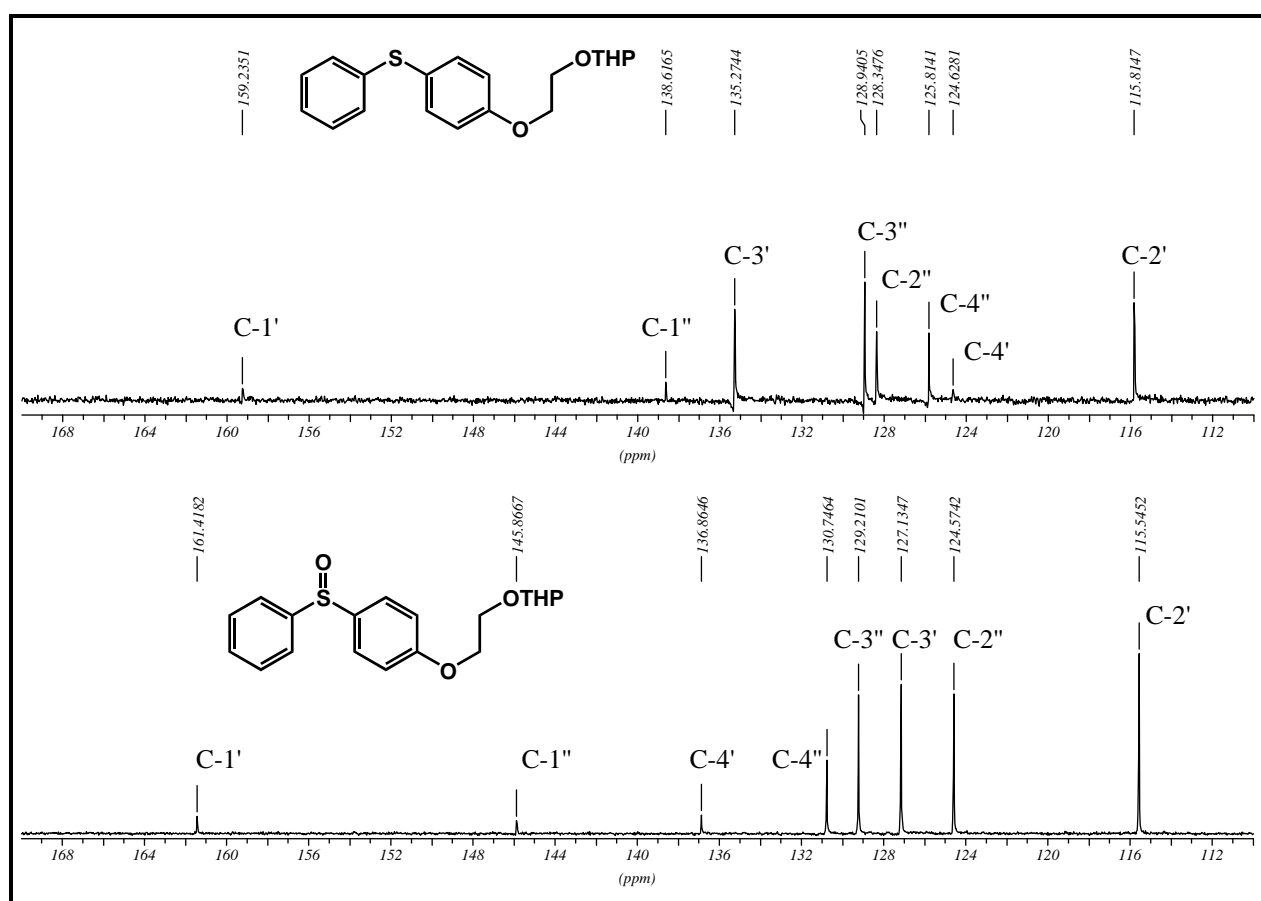


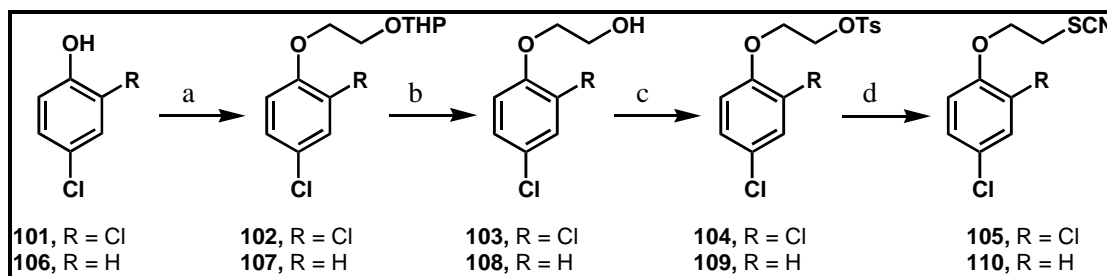
Figura 4. Comparación de la zona aromática de los espectros de RMN ^{13}C de **96** y **97**.

De esta manera, se observó cómo se desplazaron las señales correspondientes a los carbonos 4' y 1'' desde 124,6 ppm y 138,6 ppm a 136,8 ppm y 145,9 ppm, respectivamente. Por otra parte, las señales de los carbonos 3' y 2'', que se encuentran en posición *orto*, experimentaron un desplazamiento desde 135,3 ppm y 128,3 ppm hasta 127,1 ppm y 124,6 ppm, respectivamente.

Finalmente, los carbonos 1' y 4'' se desplazaban desde 159,2 ppm y 125,8 ppm hasta 161,4 ppm y 130,7 ppm. Los carbonos 2' y 3'' no sufrieron desplazamientos (Figura 4). Una vez obtenido el intermediario clave **97**, se continuó con el esquema sintético general para la obtención del tiocianato **100** (Esquema 7).

Reemplazo del grupo 4-fenoxifenoxi en el extremo no polar.

Una evaluación biológica preliminar del compuesto **102** había señalado que esta droga era dos veces más potente que su análogo **47**. La característica estructural más destacada de **102** era su extremo no polar. El grupo fenoxi terminal estaba reemplazado por un átomo de cloro. Además, presentaba una sustitución adicional, con otro átomo de cloro, en la posición C-2'. Por este motivo, era interesante la preparación del derivado tiocianato correspondiente **105**. Este compuesto se preparó en forma directa a partir de **102**, el cual luego de la hidrólisis del grupo tetrahidropiraniilo seguida de reacción con cloruro de tosilo y ataque nucleofílico con tiocianato de potasio condujo a la molécula blanco **105** (Esquema 8).

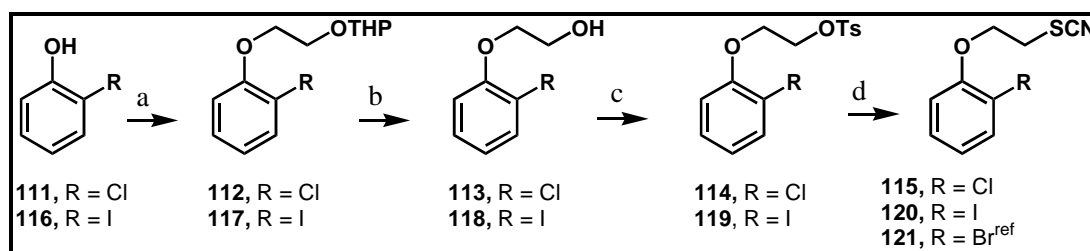


Esquema 8. Reactivos y condiciones: (a) KOH, DMSO, BrCH₂CH₂OTHP, t.a., 16 h (77%); (b) PPTs, MeOH, t.a., (43% para **103**, 78% para **108**); (c) ClTs, py, t.a., 4 h (53% para **104**, 92% para **109**); (d) KSCN, DMF, 100 °C, 5 h (70% para **105**, 63% para **110**)

Teniendo en cuenta la potencialidad de estos compuestos en los cuales el grupo fenoxi terminal estaba ausente, se decidió estudiar la influencia en la actividad biológica del átomo de cloro en la posición C-2'. De esta manera, partiendo de 4-clorofenol (**106**) se obtuvieron los compuestos **107** y **110** siguiendo el procedimiento habitual (Esquema 8).

Por último, se decidió analizar el efecto del átomo de cloro en la posición C-4' reemplazándolo por un átomo de hidrógeno. Luego, se consideró analizar la influencia del tamaño del átomo de halógeno en la posición C-2' en la actividad biológica. De esta forma,

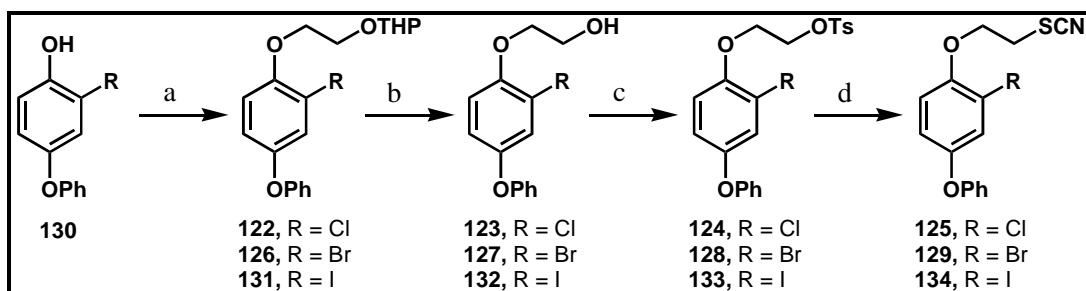
empleando 2-clorofenol (**111**) y 2-iodofenol (**116**) como material de partida se obtuvieron las drogas **115** y **120** siguiendo la estrategia habitual (Esquema 9).



Esquema 9. Reactivos y condiciones: (a) KOH, DMSO, BrCH₂CH₂OTHP, t.a., 16 h (23% para **112**, 66% para **117**); (b) PPTs, MeOH, t.a., 16 h (97% para **113**, 75% para **118**); (c) ClTs, py, t.a., 4 h (62% para **114**, 97% para **119**); (d) KSCN, DMF, 100 °C, 5 h (85% para **115**, 68% para **120**)

Introducción de un átomo de halógeno en la posición C-2' en análogos de 40

Los estudios de la evaluación biológica realizados en nuestro laboratorio señalaban que la sustitución de un átomo de hidrógeno en la posición *orto* en el compuesto **47** por diferentes grupos funcionales tenía una marcada influencia en la actividad biológica. Se encontró que la potencia inhibitoria se incrementaba a medida que el tamaño del sustituyente aumentaba. Puesto que las drogas que contienen al grupo tiocianato en su extremo polar son más efectivas que sus precursores sintéticos, en este caso, los éteres de tetrahidropiraniolo, resultaba razonable pensar que el reemplazo del átomo de hidrógeno en la posición C-2' de **40** por distintos átomos de halógeno u otros grupos funcionales conduciría a drogas más efectivas. Por esta razón, se encaró la preparación de la serie de derivados de tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo con átomos de cloro, bromo y yodo en la posición C-2'. Los derivados clorado (**125**) y bromado (**129**) se sintetizaron a partir de los precursores halogenados correspondientes **122** y **126**, los cuales se habían preparado previamente en nuestro laboratorio,⁶⁷ siguiendo el procedimiento general (Esquema 10). Por otra parte, el derivado iodado **134** se preparó a partir del derivado iodofenol **130** (R = I) utilizando el mismo protocolo general.

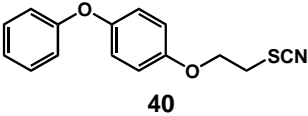
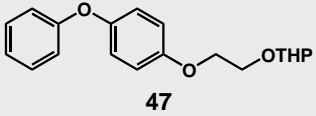
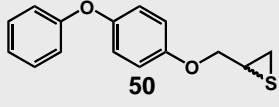
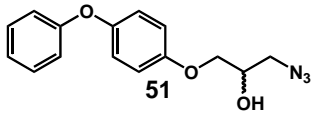
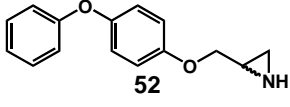
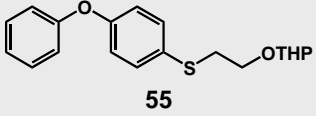
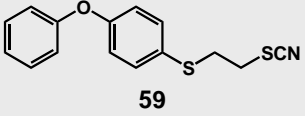
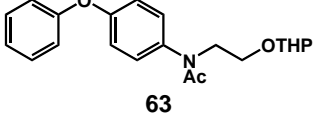
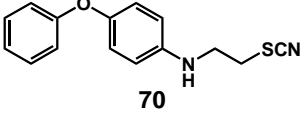
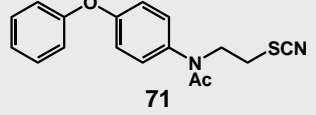
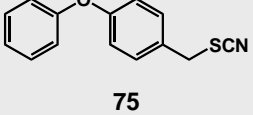


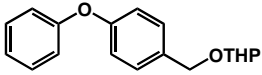
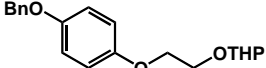
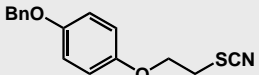
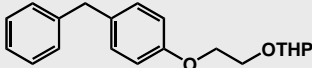
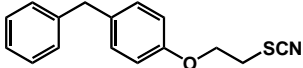
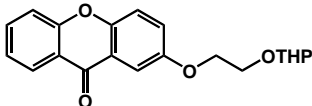
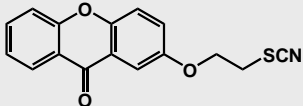
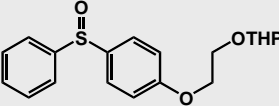
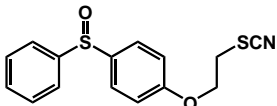
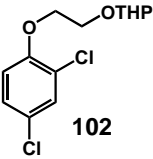
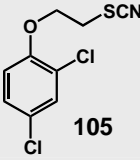
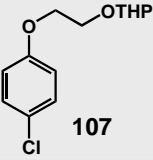
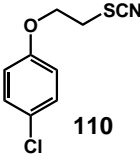
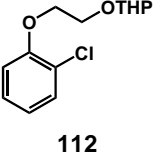
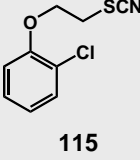
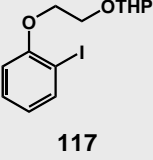
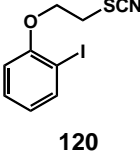
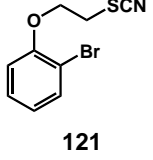
Esquema 10. Reactivos y condiciones: (a) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OTHP}$, KOH/DMSO, t.a., 12 h, (68%); (b) PPTs, MeOH, t.a., (42% para **123**, 64% para **127**, 59% para **132**); (c) CITs/py, t.a., 4 h, (40% para **124**, 94% para **128**, 100% para **133**); (d) KSCN, DMF, 100 °C, 5 h, (73% para **125**, 62% para **129**, 52% para **134**).

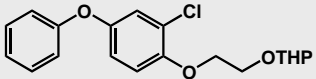
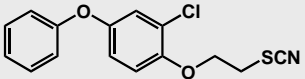
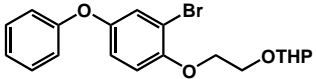
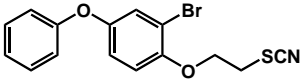
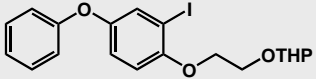
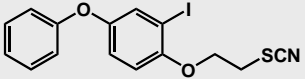
Evaluación Biológica

Los ensayos biológicos se realizaron en el laboratorio del Dr. Roberto Docampo de la University of Illinois at Urbana-Champaign, en los Estados Unidos. La estrategia en la evaluación biológica de los distintos compuestos diseñados era realizar los primeros ensayos contra *T. cruzi* epimastigotes. Estos ensayos resultaban mucho más simples de llevar a cabo que contra la forma clínicamente más relevante del parásito (amastigotes). Se empleó nifurtimox como control positivo. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Inhibición de crecimiento contra *T. cruzi* epimastigotes.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	Compuesto	IC ₅₀ (μM)
Nifurtimox	8,6		2,2 ⁶⁷
	138 ⁷⁸		3,9
	> 70		41,5
	291		0,87 (IC ₉₀ 32 μM)
	211		141
	14,4		18,7

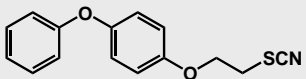
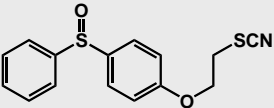
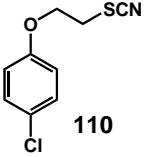
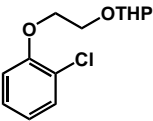
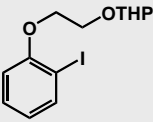
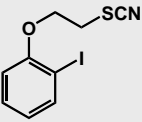
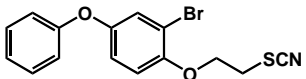
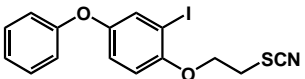
 76	102	 78	121
 81	8,1	 83	282
 86	13,4	 91	> 60 (25%) ^a
 94	54	 97	> 70 (3%) ^a
 100	7,7	 102	93 ⁶⁷
 105	1,0 (IC ₉₀ 30 μM)	 107	> 390
 110	14,1	 112	> 80 (22%) ^a
 115	11,4	 117	> 60 (20%) ^a
 120	18,5	 121	20,2

 122	143 ⁷⁹	 125	24,5
 126	67 ⁷⁹	 129	1,4 (IC ₉₀ 18 μM)
 131	45	 134	1,8 (IC ₉₀ 23 μM)

^aMáximo valor de inhibición obtenido a la concentración indicada.

Por otro lado, las drogas con mejores perspectivas en los ensayos contra epimastigotes se evaluaron luego contra *T. cruzi* amastigotes. El compuesto **40** se utilizó como control positivo. En la Tabla 2 se señalan los valores obtenidos de IC₅₀ contra amastigotes. Los compuestos **50** y **59** no se incluyen ya que fueron tóxicos contra mioblastos.

Tabla 2. Inhibición de crecimiento contra *T. cruzi* amastigote.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	Compuesto	IC ₅₀ (μM)
 40	16,0	 100	58,8
 110	> 100	 112	72,7
 117	29,0	 120	> 70
 129	64,5	 134	> 100

Modificación del extremo polar.

Como se mencionó anteriormente, la presencia de un átomo de azufre en C-1 era muy importante para el reconocimiento molecular aun cuando el grupo tiocianato no se encuentre presente.⁸⁷ Además, puesto que el grupo tiocianato posee un centro electrofílico capaz de producir uniones covalentes con residuos específicos de aminoácidos, se había decidido modificar el centro electrofílico manteniendo o prescindiendo del átomo de azufre. De esta manera, se observó que la azida **51**, la cual posee un centro electrofílico sin átomos de azufre, fue un modesto inhibidor del crecimiento de *T. cruzi* epimastigotes. Por otra parte, la aziridina **52** mostró una moderada potencia inhibitoria con valores de IC₅₀ de 41,5 µM. Sin embargo, la presencia de un centro electrofílico como el grupo episulfuro en el extremo polar en el compuesto **50** condujo a una droga muy potente (IC₅₀ = 3,9 µM). Sin embargo, **50** fue tóxico para mioblastos cuando se ensayó contra la forma intracelular del parásito. Si se analizan estos resultados se deduce que no hay mejoras en la potencia inhibitoria. Se concluye que la sola presencia de un centro electrofílico en C-1 no es suficiente para garantizar efectividad en esta familia de compuestos. Por otro lado, la presencia de un átomo de azufre indicaría que es un requisito necesario para el reconocimiento molecular. Hasta este momento, el grupo tiocianato constituye la mejor unidad para emplearse como extremo polar.

Reemplazos isostéricos del átomo de oxígeno en C-1'.

El reemplazo del átomo de oxígeno por un átomo de azufre en la posición C-1' de **40**, para dar **59**, dio lugar a un significativo incremento de la potencia inhibitoria, mientras que la eliminación de este átomo de oxígeno, como es el caso de **75**, condujo a una leve disminución de la efectividad. Sin embargo, cuando se reemplazó este átomo de oxígeno por un átomo de nitrógeno se observó una disminución significativa de la capacidad antiproliferativa. De este modo, **59** fue extremadamente efectivo para inhibir la proliferación de la forma epimastigote del parásito (IC₅₀ = 0,87 µM) siendo casi tres veces más potente que **40** (IC₅₀ 2,2 µM). Además, **59** produjo un 95% de inhibición a una concentración de 35 µM. Sin embargo, esta droga resultó tóxica en mioblastos. Contrariamente a lo esperado, el compuesto **55**, el cual es el precursor tetrahidropiranyl éter de **59**, fue dos veces menos efectivo que **47** (IC₅₀ 291 µM para **55** vs IC₅₀ 138 µM para **47**). Por otro lado, **75** fue 10 veces menos potente que el compuesto líder **40**. La introducción de la función tetrahidropiranyl éter en **76** produjo un pequeño incremento en la

efectividad (IC_{50} 102 μ M) comparada con **47**. La evaluación del derivado nitrogenado **70** no fue satisfactoria, la sustitución del átomo de oxígeno en C-1' por un átomo de nitrógeno condujo a una significativa reducción de la efectividad comparada con nuestra droga líder (IC_{50} = 141 μ M). Esta disminución de la potencia no fue tan pronunciada en el caso del derivado *N*-acetilado **71** (IC_{50} = 15 μ M), 10 veces más potente que **70**, mientras que el precursor **63** fue un inhibidor moderado del crecimiento de *T. cruzi* epimastigote (IC_{50} = 211 μ M).

Analizando los datos de la evaluación biológica, resulta clara la importancia que tiene esta posición en la actividad biológica. Se observó que la presencia de un átomo de azufre en la posición C-1' condujo a un incremento de la efectividad en epimastigotes. Sin embargo, este reemplazo isostérico también condujo a efectos tóxicos no deseados en células de mamíferos. Por otro lado, el reemplazo del átomo de oxígeno tanto por un grupo metileno como por un átomo de nitrógeno lleva a drogas poco efectivas contra *T. cruzi*.

Modificación del extremo no polar y restricción conformacional.

Si bien el reemplazo del grupo fenoxi terminal por una unidad metoxi da lugar a una pérdida significativa de actividad antiproliferativa, el reemplazo de la unidad fenoxi por un grupo bencilo o benciloxi, en el extremo no polar de la molécula, condujo sólo a una leve disminución en la potencia. Por ejemplo, el benciloxi derivado **81** (IC_{50} = 8,1 μ M) fue 4 veces menos potente que **40**, mientras que **86** (IC_{50} 13,4 μ M) fue 6 veces menos efectivo. Es interesante observar que **78**, es decir, el intermediario sintético de **81**, mostró una mayor efectividad que el derivado tetrahidropiranyl éter **47**, precursor de **40**. De todas maneras, tanto **81** como **86** son potentes inhibidores de la proliferación del parásito.

Cuando se le impuso una restricción conformacional al extremo no polar de la molécula, obligando a los grupos fenilos a permanecer en un mismo plano, se observó una drástica caída de la eficiencia. El derivado **94** resultó 25 veces menos potente que **40** (IC_{50} 54 μ M), valor que está muy alejado de otros valores de IC_{50} de tiocianatos donde el extremo no polar no se encuentra restringido conformacionalmente. El precursor **91** mostró una modesta acción inhibitoria, a una concentración de 60 μ M produjo apenas un 25% de inhibición de crecimiento en epimastigotes. Estos resultados correlacionaron muy bien con la evaluación de otras drogas en las que se había reemplazado el grupo fenoxi por un grupo benzoilo, dando lugar a compuestos potencialmente planos.⁷⁹ Este tipo de derivados estaban prácticamente libres de actividad.

Si bien estos resultados no fueron alentadores, resultaría interesante preparar nuevos análogos conformacionalmente restringidos donde los grupos fenilos estén en otra conformación fija y, naturalmente, con otra orientación espacial.

Reemplazo del átomo de oxígeno entre los dos grupos fenilo.

El reemplazo del átomo de oxígeno que se encuentra entre los grupos fenilo por un átomo de azufre conducía a una pérdida de la potencia inhibitoria.⁶⁷ Sin embargo, cuando se cambió el estado de oxidación de este átomo de azufre, se recuperó la acción inhibitoria. De esta forma, la presencia del grupo sulfóxido en **100** dio lugar a una droga muy potente con valores de IC₅₀ de 7,7 μM, mientras que su precursor **97** estaba prácticamente libre de actividad. Además, **100** fue un potente inhibidor de la forma intracelular de *T. cruzi*, con valores de IC₅₀ de 58,8 μM, apenas 4 veces menos efectivo que **40**. Esta interesante variación estructural brinda nuevas posibilidades para el diseño de nuevas drogas antiparasitarias.

Reemplazo del grupo 4-fenoxifenoxi en el extremo no polar.

Como se había anticipado, la droga **105** fue un agente antiparasitario extremadamente potente siendo dos veces más potente que **40** con un valor de IC₅₀ de 1,0 μM contra epimastigotes. Estos resultados están de acuerdo con la actividad biológica observada para **102** (IC₅₀ = 93 μM), es decir, un 50% más efectivo que el compuesto de referencia **47**. Además, a concentraciones tan bajas como 40 μM se detiene completamente el crecimiento del parásito. Desafortunadamente, no fue tan efectivo en la forma intracelular del parásito. La presencia del átomo de cloro en la posición *orto* con respecto al grupo éter resultaba muy importante para la actividad biológica. La ausencia de éste en **107** condujo a la pérdida total de la actividad biológica, mientras que el derivado tiocianato **110** resultó 15 veces menos potente que el derivado diclorado **102**.

Introducción de un átomo de halógeno en C-2'.

Teniendo en cuenta el aumento de la actividad antiproliferativa que se observa al reemplazar el grupo tetrahidropiranyl éter por el grupo tiocianato sobre el mismo esqueleto no polar, y considerando el incremento provocado en la actividad biológica cuando se incorpora un átomo de halógeno en la posición C-2', era razonable observar el mismo efecto en derivados de

tiocianato conteniendo un átomo de halógeno en C-2'. Con la excepción del derivado clorado **125**, el cual mostró un valor de IC_{50} de 25 μM (7 veces menos potente que **40**), la introducción de un átomo de halógeno en la posición C-2' dio lugar a agentes antiparasitarios muy efectivos. El compuesto **131**, precursor normal para la preparación del tiocianato **134**, mostró un valor de IC_{50} de 45 μM , siendo uno de los tetrahidropiranyl éteres más potentes preparados hasta ese momento. De esta forma, la introducción tanto de un átomo de bromo como de yodo en la estructura líder, condujo a dos agentes muy potentes anti-*T. cruzi* mostrando una acción inhibitoria comparable a **40** contra epimastigotes. Además, si bien el derivado bromado **129** fue muy efectivo contra la forma amastigote del parásito ($IC_{50} = 64,5 \mu\text{M}$), no resultó tan efectivo como **40**. Por otro lado, el derivado iodado **134** no resultó efectivo contra amastigotes ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$).

Síntesis y Evaluación Biológica de Bisfosfonatos Derivados de Ácidos Grasos.

Como se mencionó en la introducción, los bisfosfonatos son compuestos de fórmula general **42** que están relacionados estructuralmente a pirofosfato inorgánico **43** con la característica que el oxígeno puente entre los dos átomos de fósforo está reemplazado por un grupo metileno. Este reemplazo isostérico le confiere a los bisfosfonatos una gran estabilidad metabólica ya que no son hidrolizados por pirofosfatasas y son estables a la hidrólisis en medio ácido.

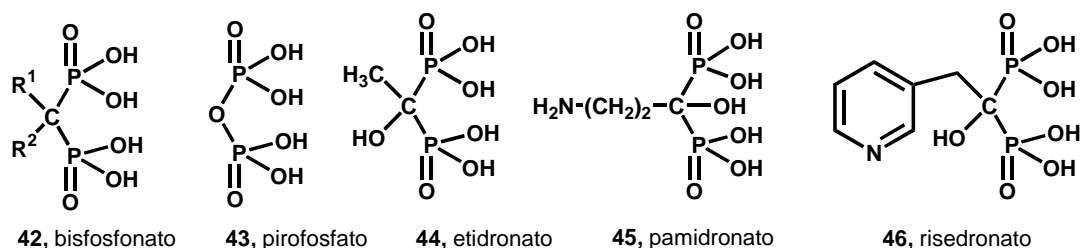


Figura 1. Bisfosfonatos representativos utilizados clínicamente para el tratamiento de la osteoporosis y otros trastornos óseos.

El blanco molecular de amino bisfosfonatos como pamidronato (**45**) y risedronato (**46**) es farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS), la enzima que cataliza la formación de pirofosfato de farnesilo. Estos bisfosfonatos nitrogenados son inhibidores de la proliferación de *T. cruzi* en ensayos *in vitro* e *in vivo*, sin toxicidad para las células huésped. Además, como numerosos bisfosfonatos son drogas aprobadas por la FDA (Food and Drugs Administration) de los Estados Unidos para tratamientos prolongados en distintos trastornos óseos, se puede postular baja toxicidad para drogas que contengan esta funcionalidad.

En el capítulo 2 se trató extensamente el diseño, síntesis y evaluación biológica de tiocianatos de ariloxietilo cuyo blanco molecular es escualeno sintetasa. Los compuestos **40** y **105** son miembros representativos de esta familia por su potencia antiproliferativa contra *T. cruzi*. (Figura 2).⁸⁸

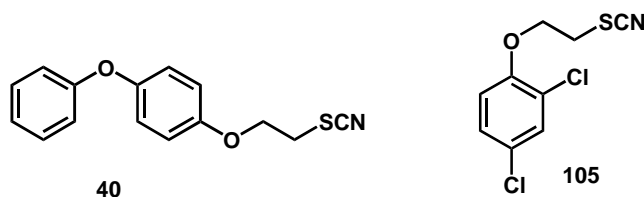
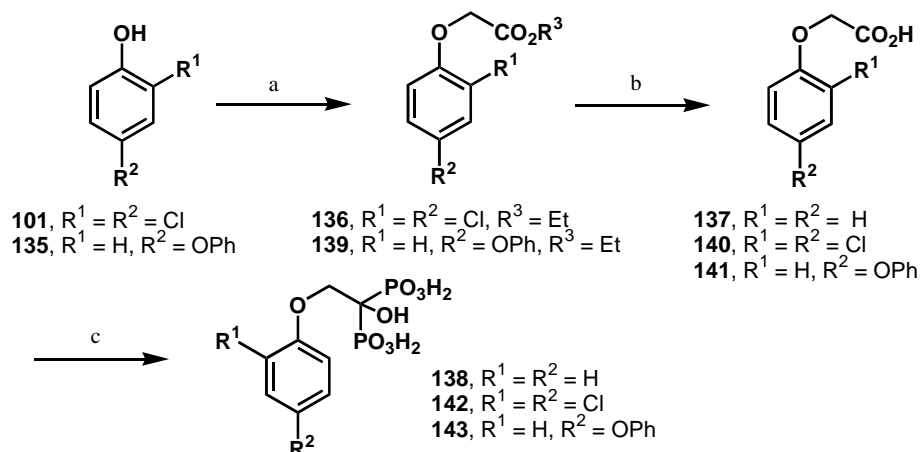


Figura 2. Estructura química de tiocianatos de ariloxietilo representativos.

Como los bisfosfonatos y tiocianatos de ariloxietilo actúan sobre blancos moleculares distintos dentro del mismo camino biosintético (Figura 18, Capítulo 1), se consideró de interés el reemplazo del grupo tiocianato por una unidad bisfosfonato, manteniendo el esqueleto no polar de **40** y **105**, para dar **138**, **142** y **143**, respectivamente. De esta forma, se podía postular un efecto sinérgico intramolecular.

Los ácidos α -hidroxi-1,1-bisfosfónicos se prepararon en forma directa mediante el procedimiento de Kiecykowski y col. ligeramente modificado en condiciones anhidras muy controladas.⁸⁹ Si bien el rendimiento de esta reacción es moderado, el uso de reactivos accesibles y de bajo costo hace de esta reacción una alternativa sintética interesante. Como modelo para optimizar esta reacción se utilizó ácido fenoxiacético (**137**). El tratamiento de **137** con ácido fosforoso y tricloruro de fósforo en presencia de ácido bencensulfónico a 65 °C durante 16 horas y posterior hidrólisis condujo a la formación de ácido 2-fenoxi-1-hidroxi-etil-1,1-bisfosfónico (**138**) como sal monosódica ajustando el pH a 4,3 con 90% de rendimiento (Esquema 1).



Esquema 1. Reactivos y condiciones: (a) KOH, BrCH₂CO₂Et, DMSO, t.a., 16 h (78% para **136**, 86% para **139**); (b) K₂CO₃, MeOH-H₂O, t.a., 3 h (95% para **140**, 92% para **141**); (c) (i) H₃PO₃, PCl₃, PhSO₃H, 65 °C, 16 h, (ii) H₂O, 100 °C, 5 h (90% para **138**, 78% para **142**, 86% para **143**)

El análisis de RMN de **138** mostró las señales típicas para esta clase de compuestos. Por ejemplo, en el espectro de RMN ^{31}P se observó una señal a 14,99 ppm, mientras que el espectro de RMN ^{13}C presentó un triplete centrado a 75,12 ppm con una constante de acoplamiento de 132,7 Hz ($^1J_{\text{C-P}}$) correspondiente al C-1. El espectro de RMN ^{13}C se completaba con una señal a 71,73 ppm correspondiente al C-2, mientras que en la zona aromática del espectro se observaron cuatro señales a 116,11 ppm, 122,39 ppm, 130,78 ppm y 159,61 ppm que correspondían a C-2', C-4', C-3' y C-1', respectivamente (Figura 3).

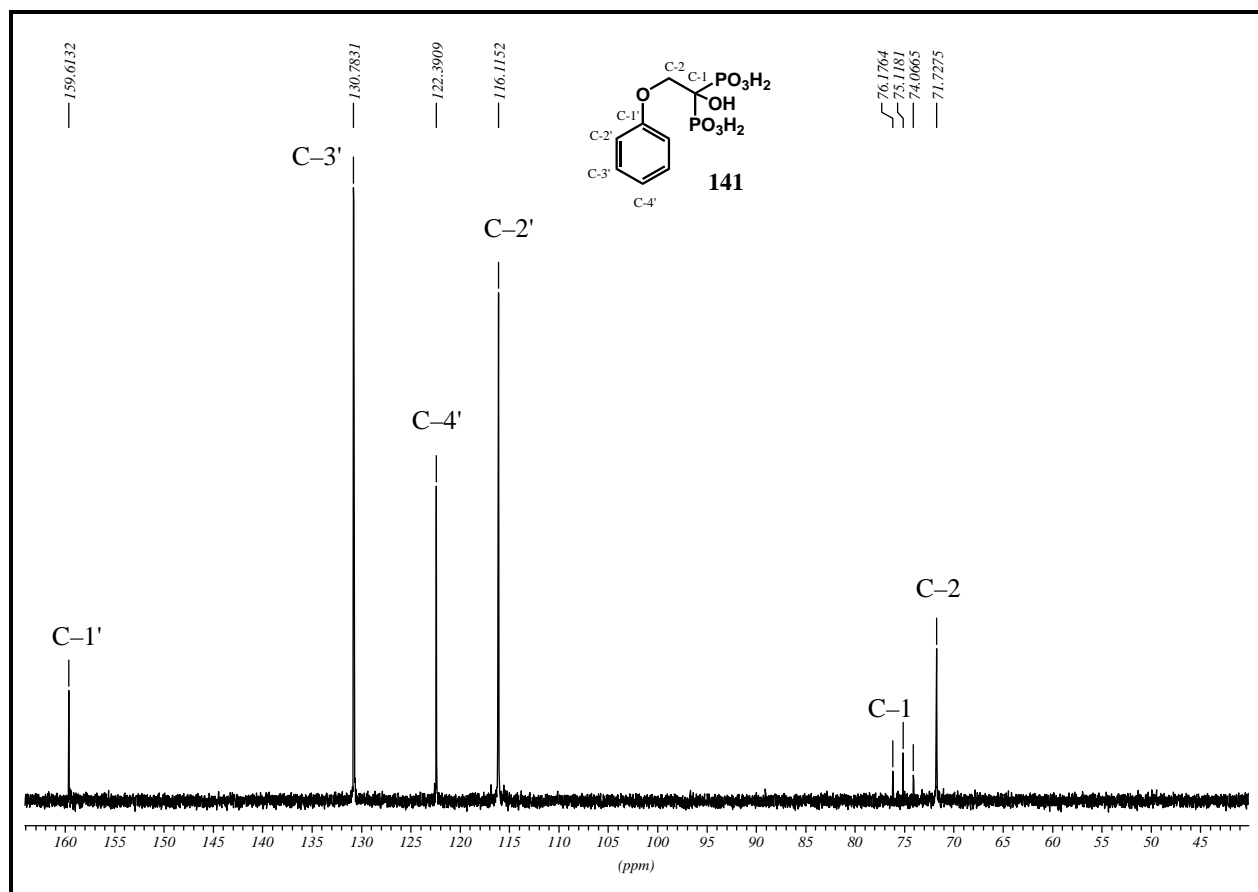
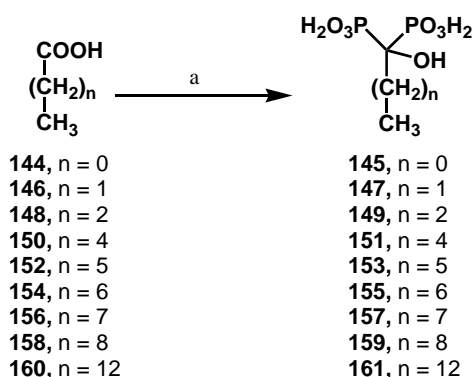


Figura 3. Espectro de RMN ^{13}C del ácido 2-fenoxi-1-hidroxi-1,1-bisfosfónico.

Los ácidos carboxílicos **140** y **141**, empleados como intermediarios sintéticos para la preparación de los ácidos bisfosfónicos **142** y **143**, se obtuvieron a partir de los fenoles **101** y **135**, respectivamente. De esta forma, 2,4-diclorofenol (**101**) tratado con bromoacetato de etilo en una suspensión de hidróxido de sodio en dimetilsulfóxido dio lugar al éster etílico **136**, el cual luego de hidrólisis por tratamiento con carbonato de potasio en metanol-agua produjo el ácido

140. Este compuesto dio lugar al ácido bisfosfónico deseado **142** siguiendo un procedimiento similar al descrito para la preparación de **138**. De igual forma, siguiendo la estrategia mencionada anteriormente, 4-fenoxifenol (**135**) se transformó en **143**.

Los bisfosfonatos que contienen nitrógeno como pamidronato o risedronato inhiben la actividad enzimática de farnesil pirofosfato sintetasa en plantas.^{90,91} Algunos estudios recientes de modelado molecular y cálculos *ab initio* sugieren que estos bisfosfonatos nitrogenados actuarían como análogos carbocatiónicos del estado de transición en la biosíntesis de isoprenoides.⁹² Los grupos bisfosfonatos se coordinarían con los átomos de Mg^{2+} presentes en el sitio activo de la enzima, mientras que el átomo de nitrógeno cargado actuaría mimetizando al carbocatión en el estado de transición. FPPS cataliza la reacción de acoplamiento entre pirofosfato de dimetilalilo con pirofosfato de isopentenilo para formar pirofosfato de geranilo y la reacción de este último con otra molécula de pirofosfato de isopentenilo para formar pirofosfato de farnesilo. Con la intención de estudiar la influencia del átomo de nitrógeno en la actividad biológica, se decidió preparar una serie de ácidos bisfosfónicos que no posean átomos de nitrógenos en su estructura. Los ácidos grasos eran productos de partida asequibles e interesantes porque, además, imitarían las cadenas isoprénicas. La preparación de esta nueva familia de ácidos 1-hidroxi-1,1-bisfosfónicos se llevó a cabo en forma directa siguiendo el procedimiento general desarrollado por nosotros utilizando como productos de partida ácidos grasos comerciales (Esquema 2).



Esquema 2. Reactivos y condiciones: (a) (i) H_3PO_3 , PCl_3 , $PhSO_3H$, 65 °C, 16 h, (ii) H_2O , 100 °C, 5 h (39% para **145**, 75% para **147**, 99% para **149**, 92% para **151**, 84% para **153**, 82% para **155**, 77% para **157**, 74% para **159**, 67% para **161**).

La estructura química de esta familia de ácidos α -hidroxi-1,1-bisfosfónicos se confirmó, principalmente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear. A modo de ejemplo, en el espectro de RMN ^{31}P desacoplado de ácido 1-hidroxi-1-decil-1,1-bisfosfónico **159** se observó una única señal a 24,71 ppm, mientras que en el espectro de RMN ^{31}P acoplado, esta señal se convirtió luego en un triplete centrado a 24,71 ppm con una constante de acoplamiento de 18,6 Hz ($^3J_{\text{P-H}}$) (Figura 4).

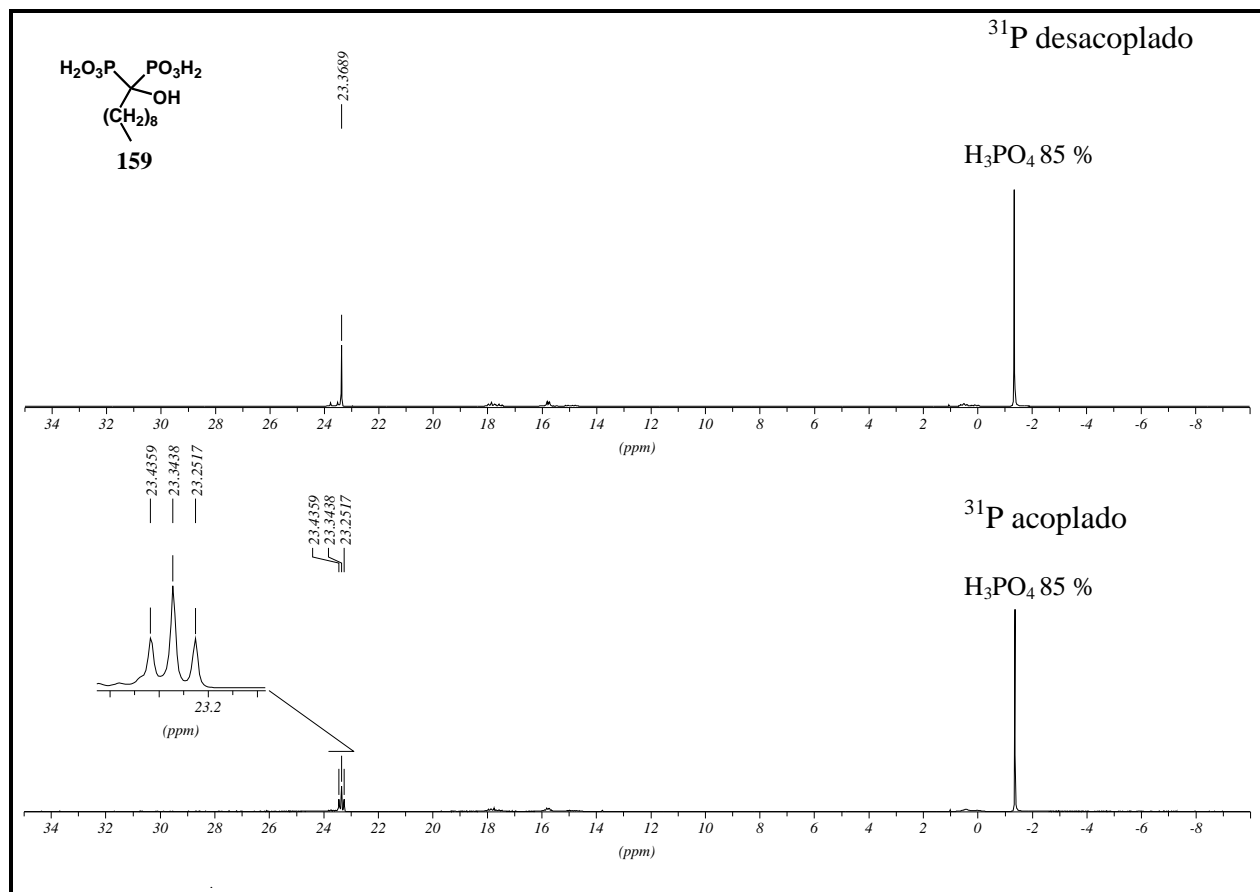


Figura 4. Espectros de RMN ^{31}P desacoplado y acoplado de ácido 1-hidroxi-1-decil-1,1-bisfosfónico.

Por otra parte, los espectros de RMN ^{13}C de esta familia de compuestos presentaban dos señales características. La primera de ellas se observaba como un triplete centrado alrededor de 75 ppm con una constante de acoplamiento alrededor de 130 Hz aproximadamente, correspondiente a C-1; la segunda señal también se observaba como un triplete centrado alrededor de 24 ppm y con una constante de acoplamiento de 6 Hz correspondiente a C-2. Por ejemplo, el espectro de RMN ^{13}C del ácido 1-hidroxi-1-heptil-1,1-bisfosfónico (**153**) presentaba

un triplete centrado a 75,25 ppm con una constante de acoplamiento de 134,8 Hz y otro triplete centrado a 24,43 ppm con una constante de acoplamiento de 5,9 Hz ($^2J_{C-P}$) como señales características. El espectro de RMN ^{13}C se completaba con 5 señales a 14,26 ppm, 22,90 ppm, 30,34 ppm, 31,87 ppm y 34,63 ppm correspondientes a las posiciones C-7, C-6, C-3, C-4 y C-5, respectivamente (Figura 5).

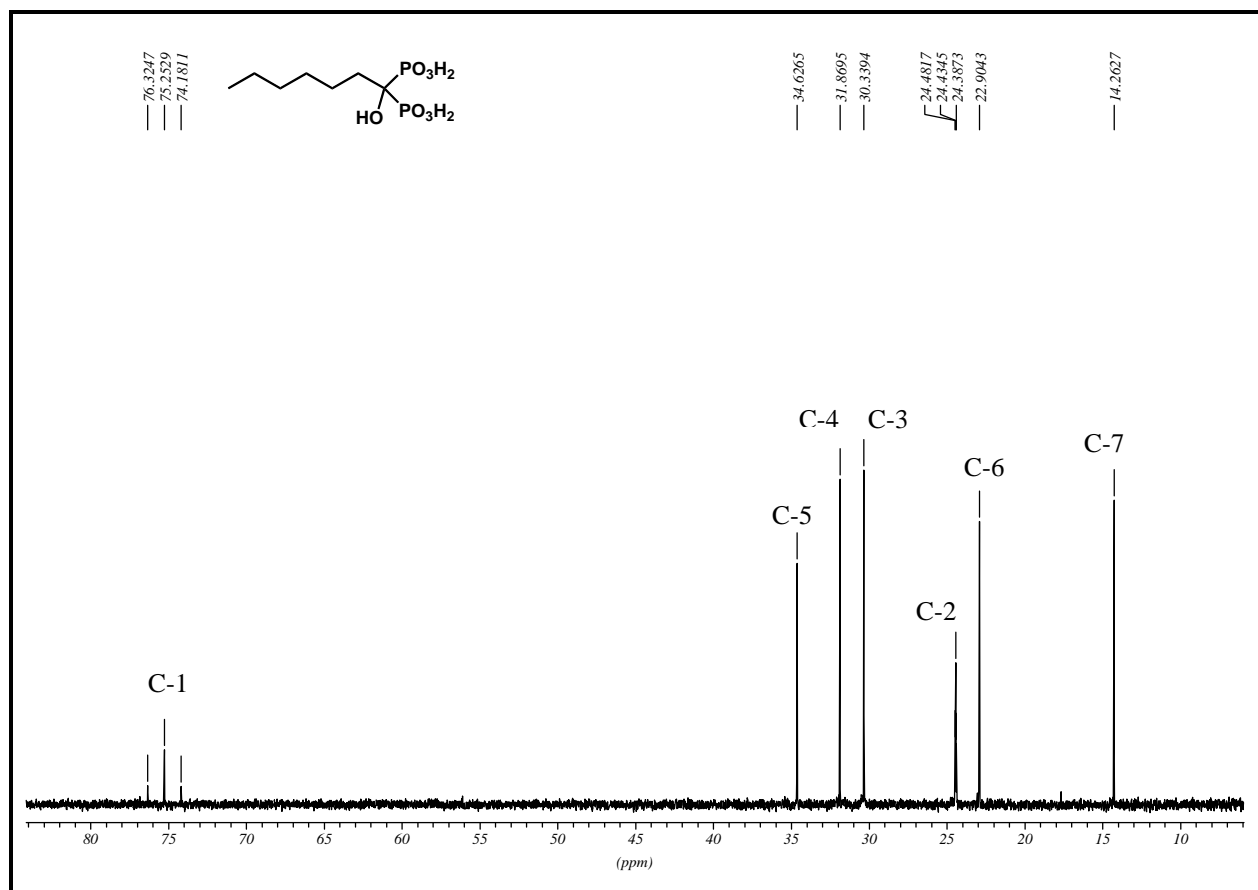


Figura 5. Espectro de RMN ^{13}C de ácido 1-hidroxi-1-heptil-1,1-bisfosfónico (153).

Los ensayos biológicos contra el crecimiento de *T. cruzi* fueron muy alentadores. Algunos bisfosfonatos derivados de ácidos grasos fueron potentes inhibidores del crecimiento de *T. cruzi* amastigotes, la forma clínicamente relevante del parásito. Sin embargo, todos estos compuestos, incluso los bisfosfonatos aromáticos, estaban libres de actividad contra *T. cruzi* epimastigotes. Los resultados se presentan en la Tabla 1. Los bisfosfonatos aromáticos presentaron una inhibición moderada del crecimiento de *T. cruzi* amastigotes; por ejemplo, el derivado que contenía en su estructura un grupo 4-fenoxifenoxi exhibió una inhibición del 37% a una

concentración de 50 μM . Por otro lado, los bisfosfonatos derivados de ácidos grasos fueron potentes inhibidores del crecimiento de la forma intracelular de *T. cruzi*. Las drogas **149** y **153** fueron los más potentes, dentro de estos compuestos, con valores de IC_{50} de alrededor de 20 μM . La eficacia de estos compuestos fue comparable a **40**, el cual se empleó como control positivo ($\text{IC}_{50} = 16 \mu\text{M}$). Los compuestos **149** y **153** fueron incluso más potentes que bisfosfonatos nitrogenados utilizados clínicamente para el tratamiento de la resorción ósea, como pamidronato y risedronato. El resto de los compuestos mostraron una eficacia moderada contra amastigotes. Se demostró que esta acción antiproliferativa estaba asociada con la inhibición de la actividad enzimática de *TcFPPS* por parte de estos compuestos. Entonces, los bisfosfonatos derivados de ácidos grasos fueron inhibidores muy potentes y competitivos de la actividad enzimática de *TcFPPS*. La eficacia exhibida por cada droga hacia la enzima correlacionaba muy bien con la actividad celular. Por ejemplo, **153** fue un inhibidor potente de la actividad de *TcFPPS* con un valor de IC_{50} de 2,37 μM y una K_i de 0,24 μM , datos que concuerdan muy bien con la acción inhibitoria contra *T. cruzi* amastigotes ($\text{IC}_{50} = 18,1 \mu\text{M}$). Estas drogas no poseen nitrógeno en su estructura, por lo tanto, no es posible postular que actúen como análogos del estado de transición carbocatiónico como se ha postulado para los bisfosfonatos que sí contienen nitrógeno.

Tabla 1. Inhibición del crecimiento de *T. cruzi* (epimastigotes y amastigotes) e inhibición enzimática de *TcFPPS* de bisfosfonatos alifáticos y aromáticos.

Compuesto	<i>TcFPPS</i>		epimastigotes	amastigotes
	IC_{50} (μM) ^a	K_i (μM) ^a	IC_{50} (μM) ^a	IC_{50} (μM) ^a
40	-	-	2,2 ⁶⁷	16,0 ⁶⁷
138	6,34 \pm 0,57	0,92 \pm 0,13	ne	> 70,0 (16%) ^b
142	4,27 \pm 0,37	0,69 \pm 0,04	ne	> 50,0 (37%) ^b
143	ne	ne	ne	> 50,0 (23%) ^b
149	42,83 \pm 7,94	5,04 \pm 0,96	> 70	21,4
151	1,94 \pm 0,13	0,40 \pm 0,04	> 70	70,0 (34%) ^b
153	2,37 \pm 0,20	0,238 \pm 0,005	> 70	18,1
155	9,36 \pm 0,37	0,98 \pm 0,07	> 70	> 70,0 (41%) ^b
157	8,45 \pm 1,33	0,59 \pm 0,04	> 70	65,8
159	ne	ne	> 70	> 70,0 (10%) ^b
161	ne	ne	> 70	53,5

^aValor de la media de tres experimentos independientes. (ne, no ensayados)

^bMáximo valor de inhibición obtenido a la concentración indicada.

Es muy importante destacar que 1-hidroxialquil-1,1-bisfosfonatos también fueron inhibidores efectivos de la actividad enzimática de FPPS de *T. brucei* (*TbFPPS*), el agente responsable de la enfermedad del sueño, afectando el sistema nervioso central.⁹³ *TbFPPS* fue más susceptible a la acción de α -hidroxialquil-1,1-bisfosfonatos que *TcFPPS*. Como ejemplo representativo, el compuesto **153** exhibió un valor de IC_{50} de 0.66 μ M (Tabla 2). Otros autores informaron que diversos 1-hidroxialquil-1,1-bisfosfonatos, sin nitrógeno en su estructura, eran potentes inhibidores del crecimiento de *T. brucei*, *L. donovani*, *T. gondii* y *P. falciparum*.⁹⁴ Todos estos datos refuerzan la gran potencialidad de estos compuestos para quimioterapia no sólo de la enfermedad de Chagas, sino también de diversas enfermedades tropicales como la enfermedad del sueño, leishmaniasis, malaria, etc.

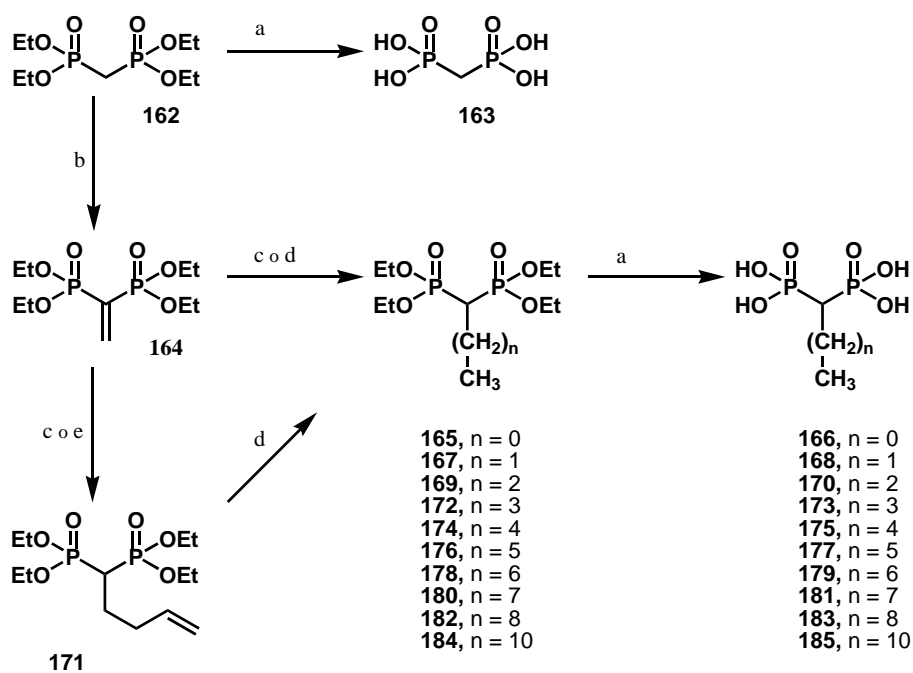
Tabla 2. Efecto de bisfosfonatos sobre *TbFPPS*

Compuesto	IC_{50} (μ M)
149	> 100 ^a
151	3,12 \pm 0,30 ^a
153	0,66 \pm 0,03 ^a
155	3,57 \pm 0,34 ^a
157	4,54 \pm 0,59 ^a

^aValor de la media de tres experimentos independientes.

Teniendo en cuenta la promisoría acción inhibitoria exhibida por α -hidroxialquil-1,1-bisfosfonatos, se decidió estudiar la influencia en la actividad biológica del grupo hidroxilo en la posición C-1. De esta forma, se sintetizó una nueva serie de bisfosfonatos derivados de ácidos grasos en los cuales el grupo hidroxilo estaba ausente. Se pensó que etenilidenbisfosfonato de tetraetilo (**164**)⁹⁵ sería un intermediario sintético apropiado para acceder a alquil-1,1-bisfosfonatos, los cuales, luego de hidrólisis en medio ácido, darían lugar a los correspondientes ácidos alquil-1,1-bisfosfónicos. El intermediario **164** es un buen aceptor de Michael que reacciona en condiciones suaves con distintos nucleófilos nitrogenados, fosforados o azufrados para dar los productos de adición 1,4 correspondientes con elevados rendimientos.⁹⁶ De esta forma, una adición de tipo Michael de un reactivo de Grignard con **164** conduciría al respectivo derivado de alquil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo.⁹⁷ El compuesto **164** se preparó fácilmente a partir de metilidenbisfosfonato de tetraetilo comercial (**162**) empleando dos pasos de reacción de

acuerdo al método de Degenhart.⁹⁸ El método general empleado para la síntesis de los ésteres bisfosfónicos fue el siguiente: el reactivo de Grignard, recientemente preparado a partir del halogenuro de alquilo correspondiente, se agregó lentamente a una solución de **164** en tetrahidrofurano a 0 °C para dar los alquibisfosfonatos deseados con moderados rendimientos. Para la preparación de **167** se empleó metil litio en lugar de yoduro de metilmagnesio, ya que este último reactivo no resultó apropiado. El éster **165** se preparó por hidrogenación catalítica del precursor **164**. Por otro lado, **164** reaccionó con cloruro de alilmagnesio para dar el éster **171**, el cual luego de una hidrogenación catalítica condujo a la formación de **172**. Los correspondientes ésteres bisfosfónicos se transformaron en los ácidos libres por tratamiento con ácido clorhídrico concentrado (Esquema 3).



Esquema 3. Reactivos y condiciones: (a) HCl (conc.), reflujo, 12 horas (74% para **166**, 70% para **168**, 76% para **170**, 71% para **173**, 80% para **175**, 81% para **177**, 98% para **179**, 75% para **181**, 72% para **183**, 79% para **185**); (b) (i) $(\text{CH}_2\text{O})_n$, MeOH, Et_2NH , reflujo, 24 horas; (ii) TsOH, tolueno, reflujo, 12 horas; (c) MeLi, THF, 0 °C, 2 horas, 40% para **167**, $\text{ClCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, Mg, THF, 0 °C (85% para **169**, 18% para **174**, 17% para **176**, 30% para **178**, 40% para **180**, 45% para **182**, 42% para **184**); (d) H_2 , Pd/C, 3 atm, 2 horas (95% para **165**, 85% para **172**).

Los ésteres bisfosfónicos se caracterizaron fácilmente mediante sus espectros de RMN ^1H , principalmente. Los picos correspondientes al grupo $-\text{P}(\text{O})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ resultaron señales muy claras para confirmar su estructura. El grupo metilo se observaba efectivamente como un triplete

alrededor de 1,2 ppm, mientras que el grupo metileno aparecía centrado alrededor de 4,1 ppm. Esta última señal muchas veces resultaba muy compleja, mientras que su multiplicidad era difícil de determinar por el carácter diasterotópico del grupo alquifosfonato. Los dos grupos etilo son químicamente equivalentes, pero como el fósforo es quiral, los protones H_a y H_b del metileno son químicamente no equivalentes (diasterotópicos). Por lo tanto, un reemplazo de H_a o H_b por otro grupo conduciría a diastereoméros (Figura 6).

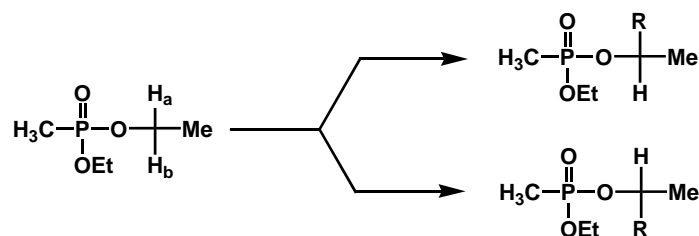


Figura 6. Carácter diasterotópico de H_a y H_b .

En principio, estos protones podrían presentar señales independientes con constantes de acoplamiento entre ellas medibles, haciendo que las señales de estos grupos metileno sean muy complejas. Sin embargo, este efecto no siempre se observa en equipos rutinarios de 300 MHz; en este caso, los desplazamientos de los dos hidrógenos se encuentran demasiado cerca como para observarse, las mismas consideraciones son válidas para las constantes de acoplamiento. Habitualmente, en estos equipos, el grupo metileno se observa como un multiplete de seis líneas.⁹⁹ Sin embargo, cuando el espectro se realiza en un equipo de 500 MHz, estos multiplotes podrían llegar a resolverse en dos señales complejas. Por ejemplo, en el espectro de RMN 1H (500,13 MHz) de 1-heptil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**176**), se observó un multiplete centrado a 4,15 ppm que integraba para 8 hidrógenos correspondiente a $(POCH_2CH_3)$. Por otra parte, el pico correspondiente a los hidrógenos del metilo terminal del éster $(POCH_2CH_3)$ se observó como un triplete centrado a 1,34 ppm con una constante de acoplamiento de 7,1 Hz. Otra señal característica de estos ésteres bisfosfónicos es un triple triplete, en este caso, centrado a 2,27 ppm con constantes de acoplamiento de 24,1 Hz y 6,1 Hz, respectivamente, que integraba para un hidrógeno (H-1). Las señales correspondientes a H-2 y H-3 se observaban como multiplotes centrados a 1,95 ppm y 1,55 ppm, respectivamente. El espectro se completaba con un triplete centrado a 0,88 ppm ($J = 6,4$ Hz) correspondiente al metilo terminal, en este caso H-7, y un grupo de señales superpuestas alrededor de 1,2 ppm correspondientes a los demás grupos metilenos pertenecientes a la cadena alifática, en particular, H-4, H-5 y H-6 (Figura 7).

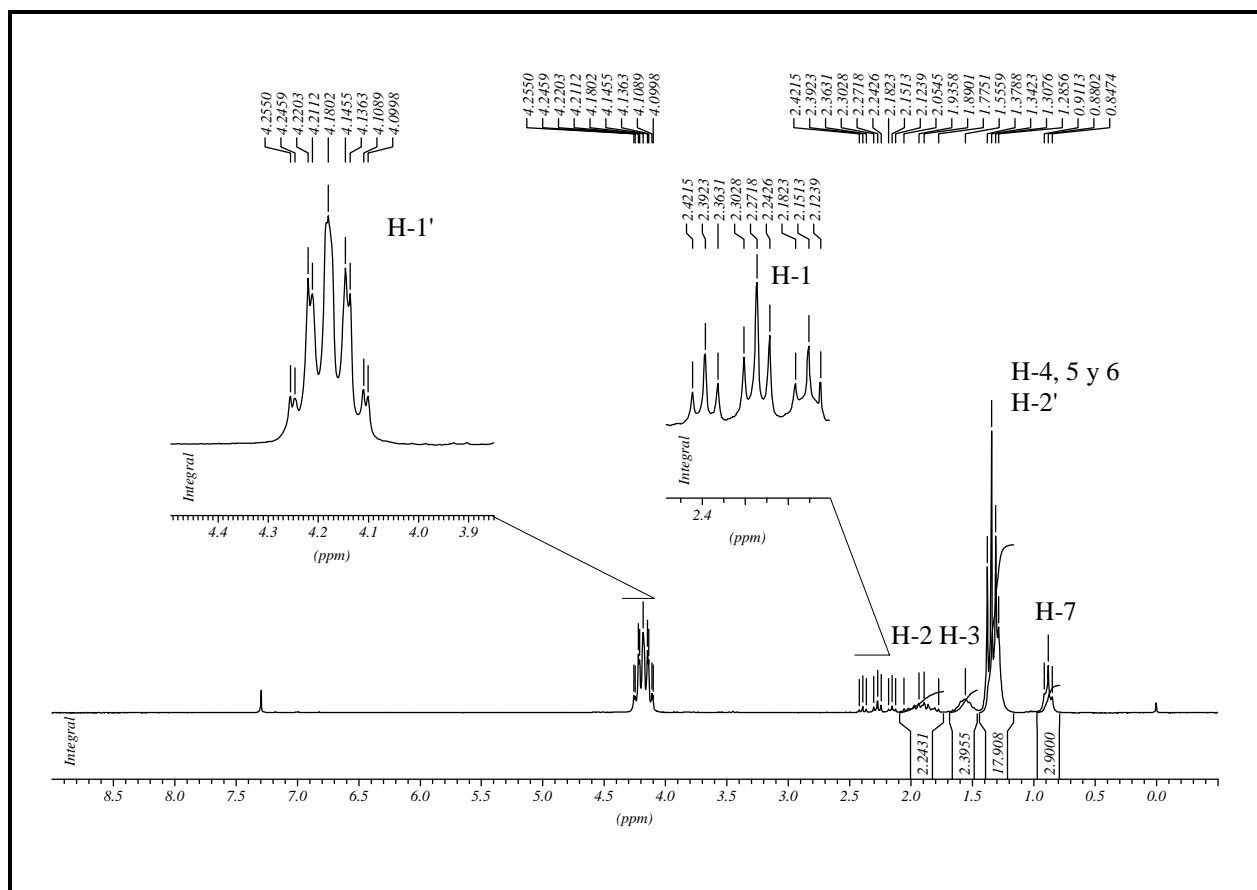


Figura 7. Espectro de RMN ^1H de **176**.

Los espectros de RMN ^{13}C para los ésteres bisfosfónicos también presentaba varias señales características. En primer lugar, se observaban dos señales correspondientes a los etilos del éster fosfónico, la primera señal en la zona oxigenada del espectro debido al metileno C-1', la segunda, en la zona alifática del mismo debido al metilo C-2'. Además, se observaba acoplamiento con aquellos átomos de carbono que se encontraban hasta 3 enlaces de distancia de los átomos de fósforo. Como ejemplo, en el espectro de RMN ^{13}C de **176**, se observó un doblete centrado a 16,33 ppm con una constante de acoplamiento de 5,4 Hz ($^3J_{\text{C-P}}$) y un triplete centrado a 62,39 ppm con una constante de acoplamiento de 6,8 Hz ($^2J_{\text{C-P}}$), correspondientes a C-1' y C-2' de los etilos del éster fosfónico. Además, se observó un triplete centrado a 36,78 ppm con una constante de acoplamiento de 132,9 Hz correspondiente a C-1 ($^1J_{\text{C-P}}$), un triplete centrado a 28,75 ppm con una constante de acoplamiento de 6,1 Hz ($^2J_{\text{C-P}}$) (C-2), y por último, un triplete centrado a 25,45 ppm con una constante de acoplamiento de 4,8 Hz ($^3J_{\text{C-P}}$) correspondiente a C-3. El

espectro se completó con tres singuletes a 31,14 ppm, 22,20 ppm y 13,90 ppm correspondientes a C-5, C-6 y C-7, respectivamente (Figura 8).

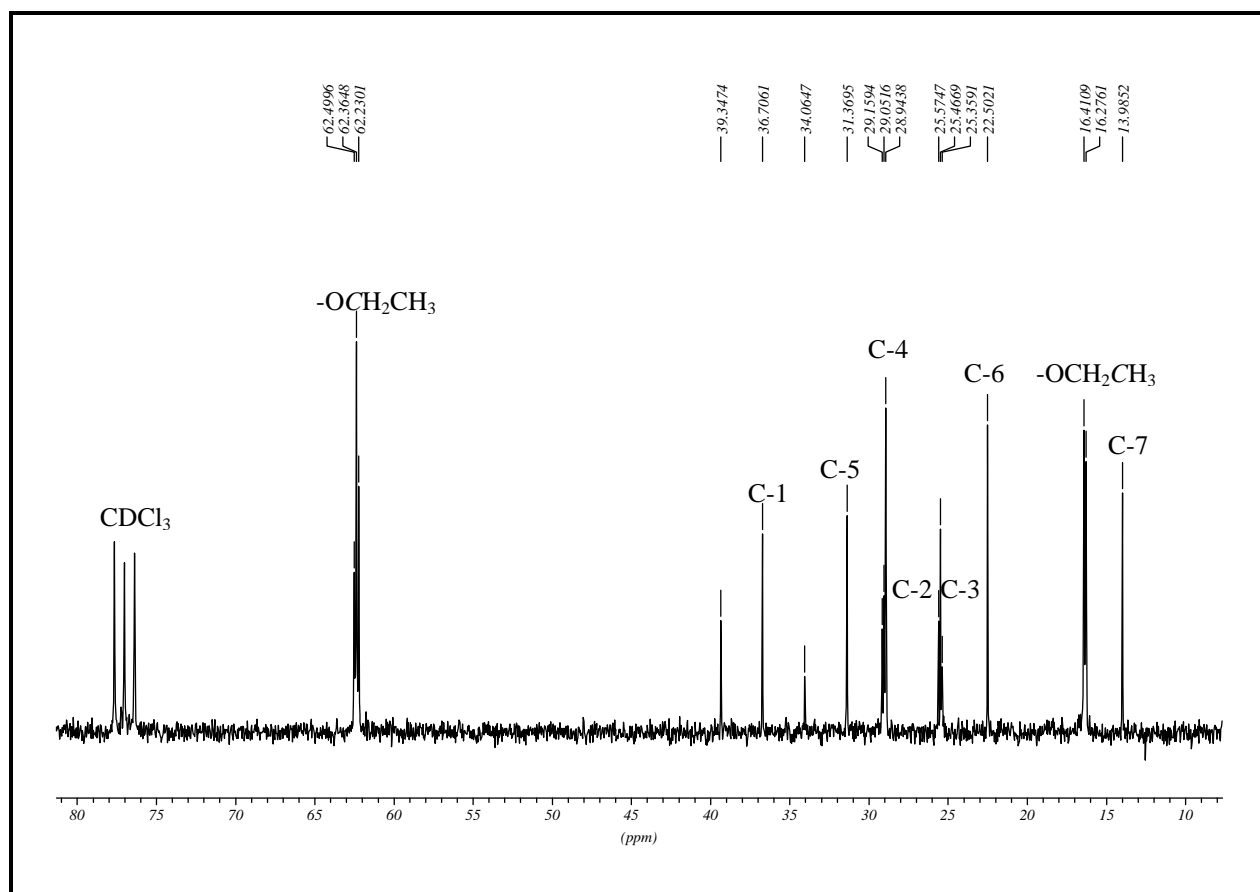


Figura 8. Espectro de RMN ^{13}C de 1-heptil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**176**).

Por otro lado, los espectros de RMN ^1H de los ácidos 1-alkil-1,1-bisfosfónicos presentaban el mismo triple triplete característico de sus ésteres precursores correspondientes a H-1. Además, estos espectros se simplificaron por la remoción de los grupos etilo. Como ejemplo, el espectro de RMN ^1H de **170** presentó un triple triplete centrado a 2,08 ppm con constantes de acoplamiento de 23,6 ($^2J_{\text{H-P}}$) y 5,8 ($^3J_{\text{H-H}}$) Hz correspondiente a H-1. Se observó también un triplete centrado a 0,69 ppm con una constante de acoplamiento de 7,3 Hz correspondiente a H-4. El espectro se completó con dos multipletes centrados a 1,60 y 1,35 ppm correspondientes a H-2 e H-3, respectivamente (Figura 9).

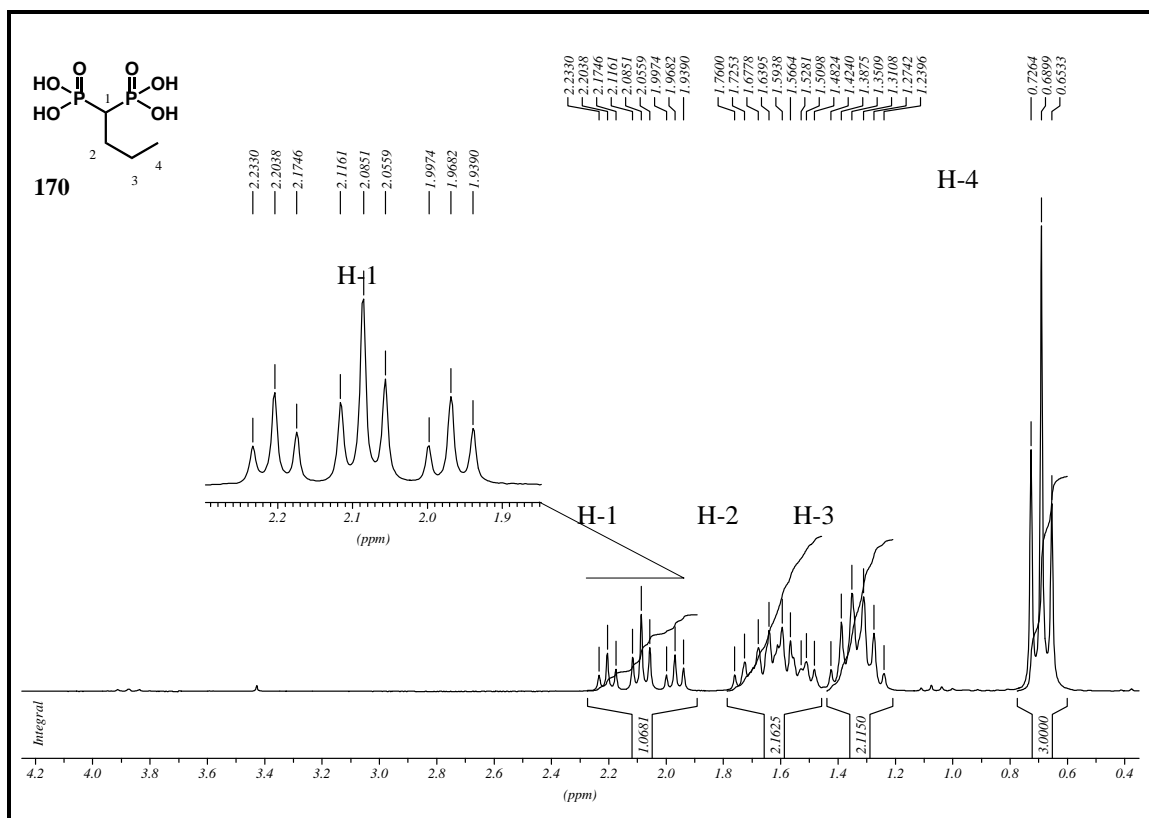


Figura 9. Espectro de RMN ^1H de ácido 1-butil-1,1-bisfosfónico (**170**).

Los espectros de RMN ^{13}C de los ácidos 1-alkil-1,1-bisfosfónicos fueron similares a los de sus ésteres precursores. Nuevamente, se observó que los carbonos C-1, C-2 y C-3 se acoplaban con los átomos de fósforo. Por ejemplo, en el espectro de RMN ^{13}C de **170**, la señal correspondiente a C-1 aparecía como un triplete centrado a 37,84 ppm ($J = 126,8$ Hz); el pico correspondiente a C-2 se observaba como otro triplete centrado a 27,82 ppm ($J = 6,8$ Hz); finalmente, un último triplete centrado a 22,79 ppm ($J = 4,7$ Hz), el cual se asignó a C-3, completaban las señales características de este compuesto (Figura 10).

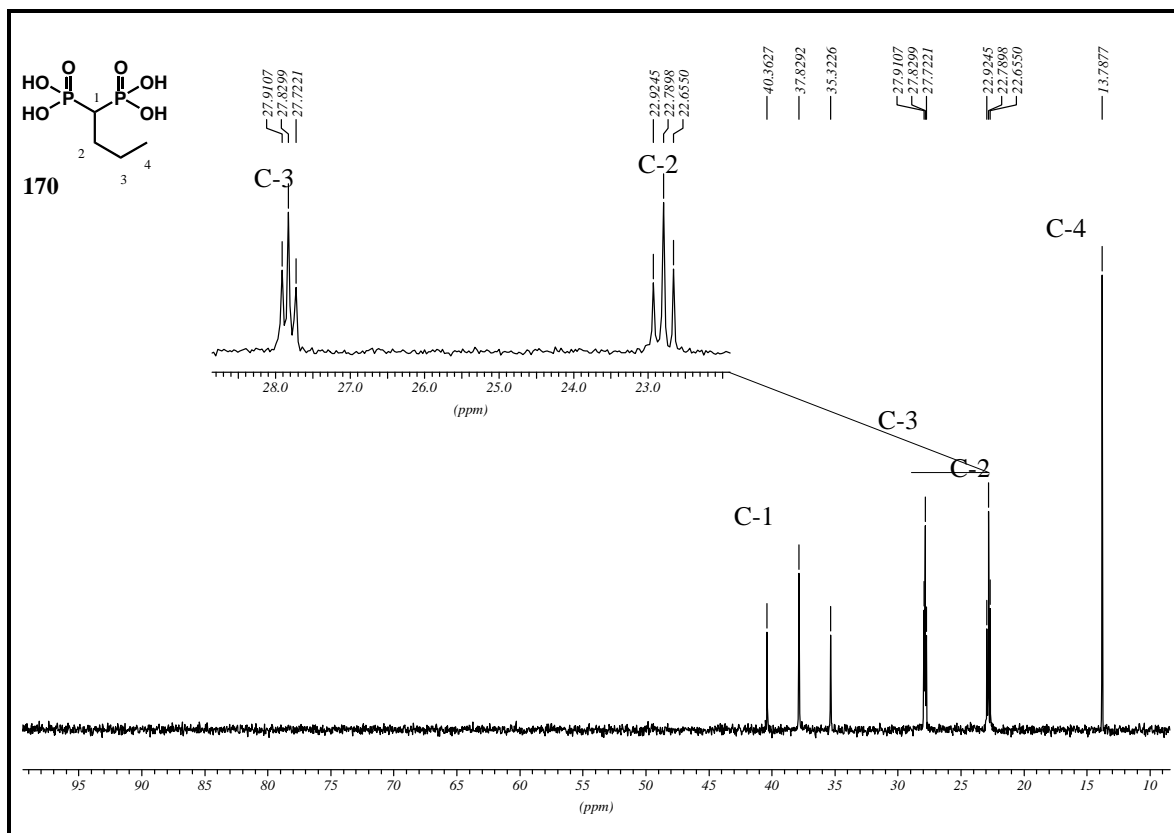


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C de ácido 1-butil-1,1-bisfosfónico (**170**).

Los bisfosfonatos en los cuales el grupo hidroxilo en C-1 estaba ausente fueron potentes inhibidores de *TcFPPS*, aunque en menor grado que sus análogos hidroxilados. Sin embargo, esta inhibición de la actividad enzimática no correlacionó muy bien con la actividad celular observada para esta familia de drogas. Por ejemplo, el compuesto **177** exhibió una moderada actividad contra la forma intracelular del parásito, con un valor de IC_{50} cercano a $70\ \mu\text{M}$, mientras que su análogo hidroxilado **153** presentó un IC_{50} de $18,1\ \mu\text{M}$, es decir, más de tres veces menos efectivo. En resumen, salvo **181** con un valor de IC_{50} de $22,4\ \mu\text{M}$ contra amastigotes, esta familia de 1-alkil-1,1-bisfosfonatos resultó moderadamente efectiva contra la forma intracelular del parásito (Tabla 3). Estos compuestos, al igual que sus análogos hidroxilados, estuvieron libres de actividad contra epimastigotes. Por otro lado, todos los ésteres de tetraetilo intermediarios exhibieron una muy modesta actividad celular contra amastigotes.

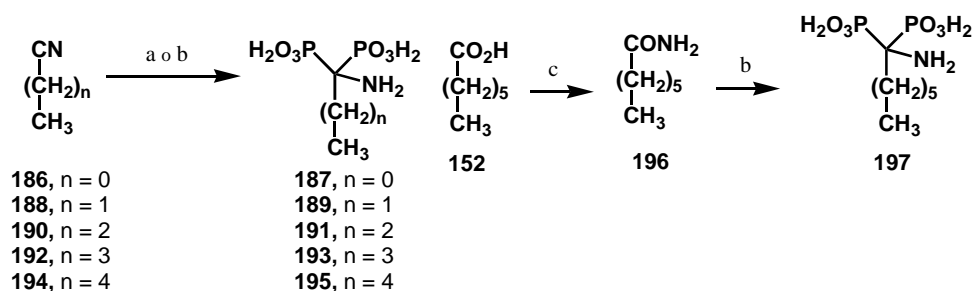
Tabla 3. Inhibición del crecimiento de *T. cruzi* (epimastigotes y amastigotes) e inhibición enzimática de *TcFPPS* de alquil bisfosfonatos

Compuesto	<i>TcFPPS</i>		epimastigotes	amastigotes
	IC ₅₀ (μM) ^a	K _i (μM) ^a	IC ₅₀ (μM) ^a	IC ₅₀ (μM) ^a
166	ne	ne	ne	ne
168	> 100	ne	> 100	> 100 (21%) ^b
170	150,36	16,99	> 100	> 90 (28%) ^b
173	5,71 ± 1,43	0,79 ± 0,06	> 70	> 70
175	5,67	0,47	> 70	ne
177	4,54	0,54	> 70	> 70 (47%) ^b
179	19,7 ± 0,2	1,88 ± 0,24	> 70	> 70 (49%) ^b
181	4,25	0,31	> 70	22,36
183	ne	ne	> 70	ne
185	ne	ne	ne	ne

^aValor de la media de tres experimentos independientes. (ne, no ensayado)

^bMáximo valor de inhibición obtenido a la concentración indicada.

El más potente (**169**) inhibía un 27% la proliferación a una concentración de 70 μM. Esta carencia de actividad biológica se podría atribuir a la imposibilidad de los ésteres de coordinarse con Mg²⁺ presente en el sitio activo de *TcFPPS*. Por otro lado, 1-alkil-1,1-bisfosfonatos son mucho menos efectivos que sus análogos hidroxilados respecto de su actividad celular. Los compuestos **153** y **177** poseen similares valores de K_i en su actividad enzimática, mientras que **153** es tres veces más potente que **177** contra *T. cruzi*. Estos resultados indican que otros factores podrían influir tanto en el reconocimiento molecular hacia *TcFPPS* como en la actividad celular contra amastigotes. Teniendo en cuenta que el grupo hidroxilo era muy importante para la actividad biológica, el reemplazo isostérico del grupo hidroxilo por un grupo amino resultaba de sumo interés. La presencia del grupo amino en C-1 podría conservar o incrementar la capacidad para coordinarse con Mg²⁺ en el sitio activo de la enzima.



Esquema 4. Reactivos y condiciones: (a) MeCN, H₃PO₃, 130 °C, 12 h, 51% para **183**; CH₃CH₂CN, H₃PO₃, 135 °C, 12 h, 70% para **185**; (i) CH₃CH₂CH₂CN, H₃PO₃, PhSO₃H, 65 °C, 10 min, (ii) PCl₃, 70 °C, 6 h, 53% para **187**; CH₃(CH₂)₃CN, H₃PO₃, PhSO₃H, 65 °C, 10 min, (ii) PCl₃, 85 °C, 16 h, 25% para **189**; CH₃(CH₂)₄CN, H₃PO₃, PhSO₃H, 70 °C, 10 min, (ii) PCl₃, 90 °C, 16 h, 15% para **191**; (b) CH₃(CH₂)₄CH₂C(O)NH₂, H₃PO₃, PhSO₃H, 65 °C, 10 min, (ii) PCl₃, 90 °C, 16 h, 10% para **193**; (c) (i) SOCl₂, Δ ; (ii) NH₃ (36%), 0 °C, 80%.

Los ácidos α-amino-1,1-bisfosfónicos se pueden preparar a partir de los correspondientes nitrilos^{100,101} o amidas.¹⁰² Los miembros menores de la serie se prepararon a partir de acetonitrilo o propionitrilo en presencia de ácido fosforoso a 130 °C para formar **187** o **189**. Sin embargo, a partir de butironitrilo fue necesario el agregado de ácido bencensulfónico y de tricloruro de fósforo para la obtención de los productos deseados. Además, se necesitó aumentar la temperatura de reacción a medida que el tamaño del nitrilo aumentaba. Como heptanitrilo se descomponía en estas condiciones, **197** se obtuvo a partir de la amida correspondiente **196**, la cual se preparó a partir de ácido heptanoico (Esquema 4). El compuesto **189** presentó dos señales en el espectro RMN ¹H. La primera señal se observó como un multiplete centrado a 1,69 ppm correspondiente a H-2; la otra se observó como un triplete centrado a 0,83 ppm (*J* = 7,6 Hz) correspondiente al H-3 (Figura 11).

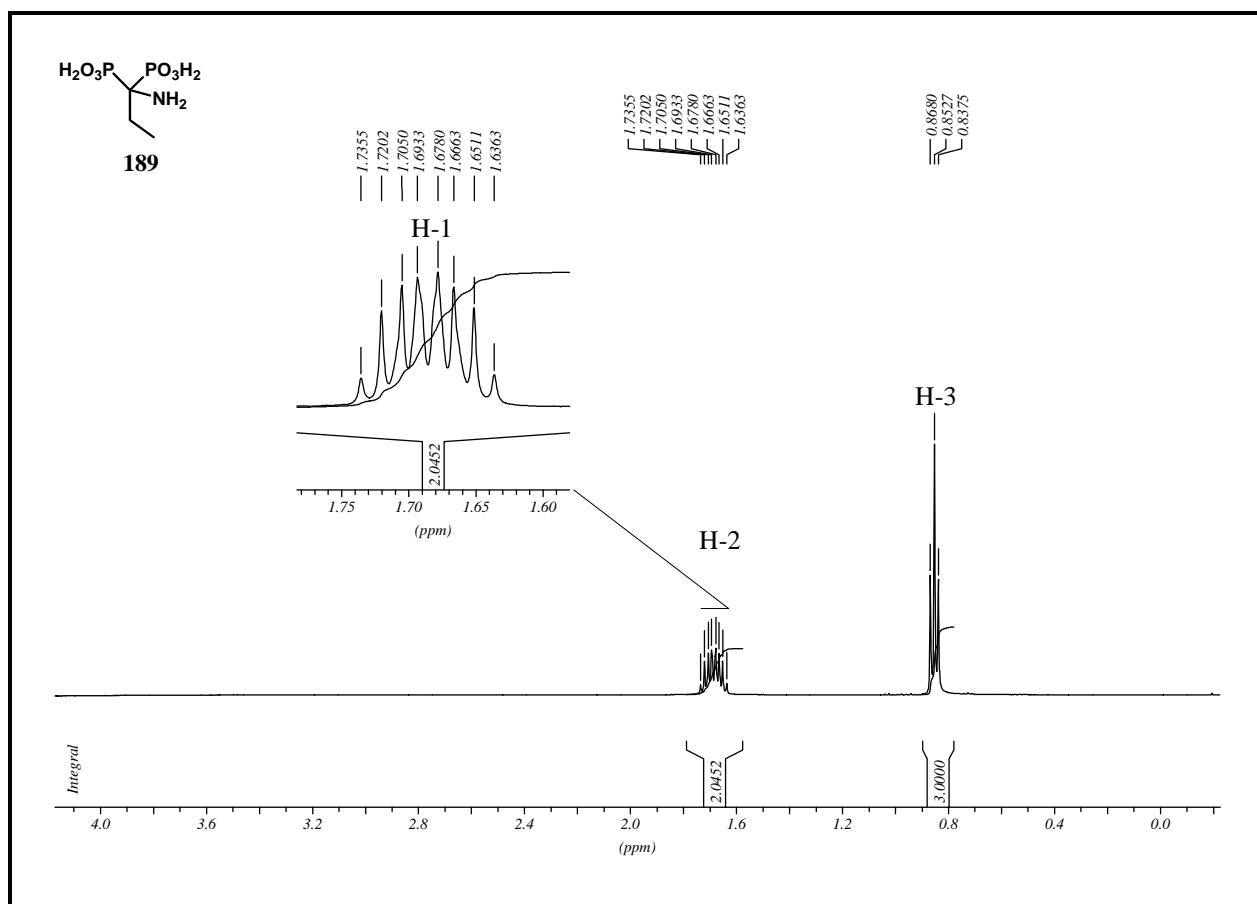


Figura 11. Espectro de RMN ^1H de ácido 1-amino-1-propil-1,1-bisfosfónico **189**.

Los espectros de RMN ^{13}C presentaron señales características para este tipo de compuestos. Se observó nuevamente al C-1 como un triplete centrado a 57,35 ppm con una constante de acoplamiento de 127,6 Hz. La señal que correspondía a C-2 se observaba centrada a 10,43 ppm como un triplete con una constante de acoplamiento de 6,7 Hz. En este caso, la señal asignada a C-3 (singulete centrado a 29,41 ppm) no presentó una constante de acoplamiento con los átomos de fósforo medible como se observaba en los α -hidroxi bisfosfonatos (Figura 12).

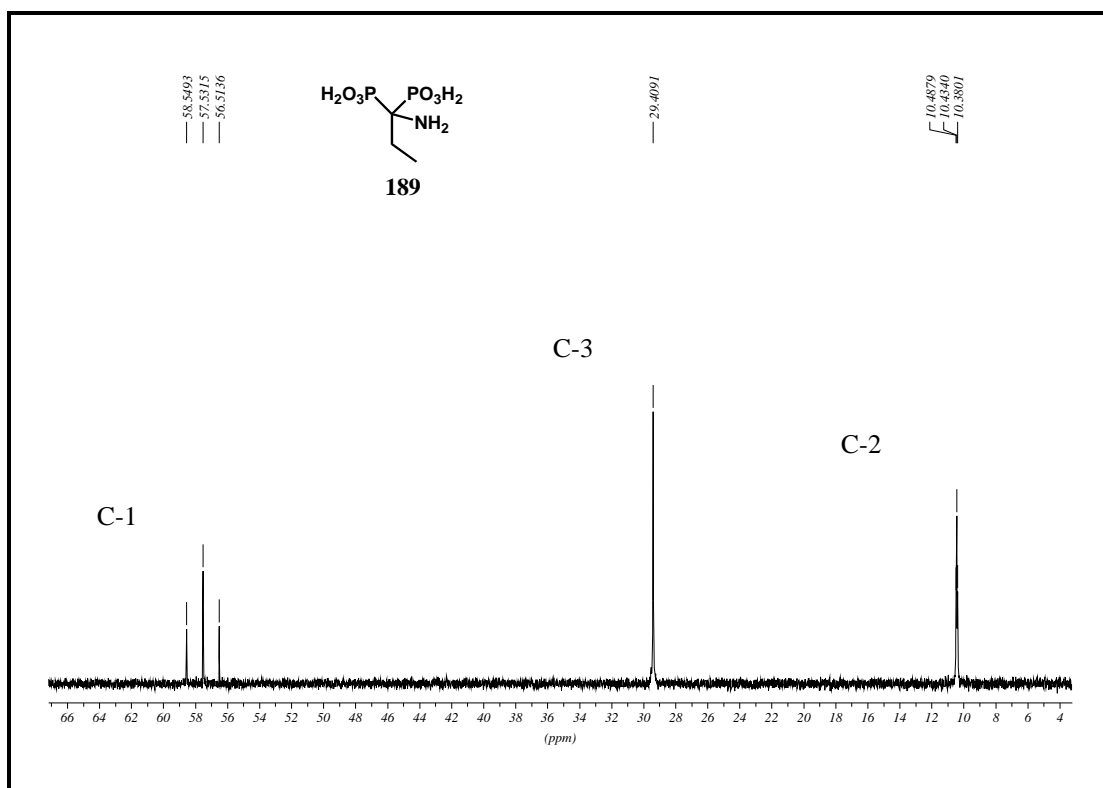


Figura 12. Espectro de RMN ^{31}P de ácido 1-amino-1-propil-1,1-bisfosfónico.

Finalmente, el espectro de RMN ^{31}P de **189** exhibió una única señal centrada a 20,89 ppm.

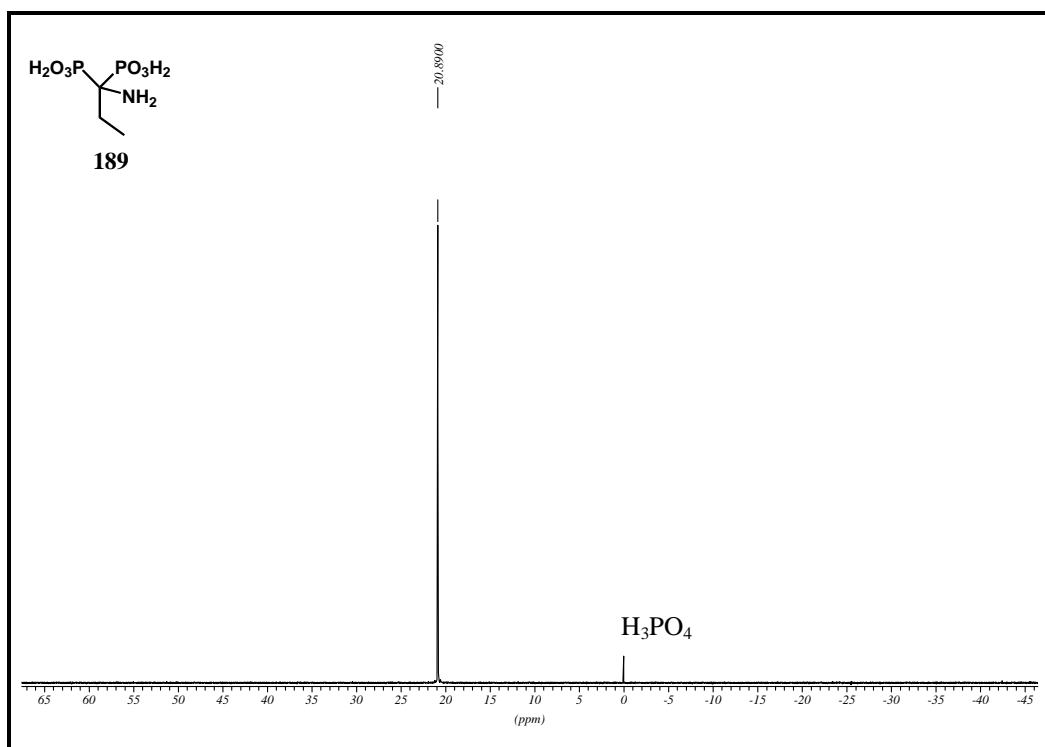


Figura 13. Espectro de RMN ^{31}P de ácido 1-amino-1-propil-1,1-bisfosfónico **189**.

Los ácidos 1-amino-1,1-bisfosfónicos derivados de ácidos grasos fueron potentes inhibidores de la actividad enzimática de *Tc*FPPS, incluso fueron más efectivos que los correspondientes ácidos 1-hidroxi-1,1-bisfosfónicos. Una vez más, la eficacia de cada droga hacia la enzima correlacionaba con la actividad celular exhibida contra *T. cruzi* amastigotes. Por ejemplo, el compuesto **195** fue un potente inhibidor de la actividad enzimática de *Tc*FPPS con valores de IC₅₀ en el rango nanomolar (IC₅₀ = 0,38 μM). Este compuesto también resultó efectivo contra la forma intracelular del parásito con valores de IC₅₀ de 77 μM, algo menos potente que **153**. También se observó una eficacia comparable a **193** y **197** como inhibidores de la actividad de *Tc*FPPS. La pérdida de efectividad de **195** comparada con la que presentó **153** sugiere que 1-amino-1,1-bisfosfonatos no poseen las propiedades farmacocinéticas apropiadas que sí poseen los derivados 1-hidroxi. Por otra parte, los ácidos α-aminoalquil-1,1-bisfosfónicos de cadena corta mostraron una actividad marginal no sólo como inhibidores enzimáticos, sino también contra el crecimiento celular. Todos los ácidos α-amino-1-alkil-1,1-bisfosfónicos fueron inactivos contra la forma epimastigote del parásito, resultados que concuerdan con las evaluaciones indicadas previamente por las otras familias de bisfosfonatos.

Tabla 4. Inhibición del crecimiento de *T. cruzi* (epimastigotes y amastigotes) e inhibición enzimática de *Tc*FPPS de α-amino-1,1-bisfosfonatos

Compuesto	TcFPPS	Epimastigotes	Amastigotes
	IC ₅₀ (μM) ^a	IC ₅₀ (μM) ^a	IC ₅₀ (μM) ^a
187	66,65 ± 3,39	> 100	> 100
189	149,59 ± 30,09	> 100	> 85 (13%) ^b
191	30,77 ± 3,01	> 100	> 85 (13%) ^b
193	3,91 ± 0,58	> 100	> 85 (32%) ^b
195	0,382 ± 0,039	> 100	77,0
197	3,57 ± 0,28	> 100	72,0
40	ne	2,2	16,0

^aValor de la media de tres experimentos independientes. (ne, no ensayado)

^bMáximo valor de inhibición obtenido a la concentración indicada.

Se conoce que FPPS requiere una cierta concentración de Mg²⁺ para lograr una actividad enzimática óptima.¹⁰³ En efecto, la estructura cristalina de esta enzima señala la presencia de dos

o tres átomos de Mg^{2+} en el sitio activo de la enzima.¹⁰⁴ Por otro lado, se había estudiado la capacidad de bisfosfonatos representativos para coordinarse con iones divalentes como Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , etc, mediante técnicas de RMN.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Se consideró interesante estudiar la capacidad de los compuestos **145**, **166** y **187** para coordinar Mg^{2+} y realizar un análisis comparativo (Figura 14).

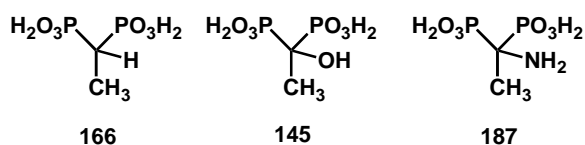


Figura 14. Compuestos seleccionados para estudiar por RMN ^{31}P su capacidad para coordinarse con Mg^{2+} .

Estos compuestos se seleccionaron por su gran solubilidad en agua sin importar su potencia inhibitoria hacia la enzima. Todos ellos poseen diferentes grupos en C-1, amino, hidroxilo y un átomo de hidrógeno, pero mantienen la misma cadena alifática. Los resultados fueron muy alentadores. Se observó, para cada compuesto, el desplazamiento de la señal del grupo fosfórico en los espectros de RMN ^{31}P a medida que la concentración de cloruro de magnesio aumentaba.

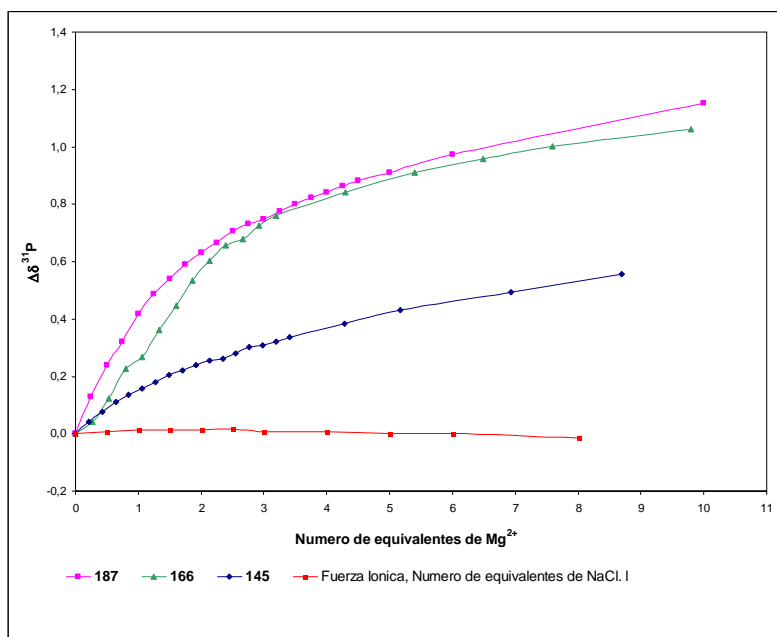


Figura 15. Efecto de la concentración de Mg^{2+} en el desplazamiento químico de ^{31}P para los compuestos **145**, **166** y **187**.

El análisis de los espectros de RMN ^{31}P mostró un desplazamiento químico hacia campos bajos cuando se incrementaba la concentración de Mg^{2+} . Este efecto resultó más importante para los compuestos **145** y **187**, y menos importante para **166**. Estos resultados indicaron inequívocamente que **145** y **187** se coordinan más energicamente con Mg^{2+} que **166**; además, están de acuerdo con la baja eficacia observada cuando un átomo de hidrógeno es el sustituyente en C-1. El desplazamiento químico de estos compuestos no se modificó por el cambio en la fuerza iónica (Figura 15).

Uso de 1,1-Bisfosfonatos como Aceptores en Reacciones de tipo Michael.

Estudios Mecanísticos.

En los últimos años, se ha incrementado el interés en la síntesis de ácidos fosfónicos y sus correspondientes derivados debido a su utilidad como intermediarios sintéticos en reacciones de Diels-Alder¹⁰⁸, adiciones de Michael⁹⁷, preparación de carbociclos¹⁰⁹ y otros métodos sintéticos.^{110,111}

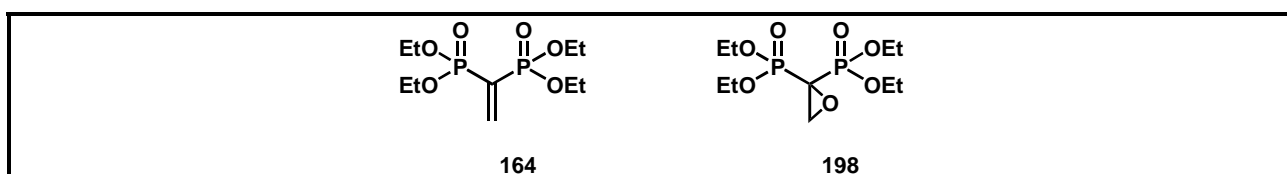
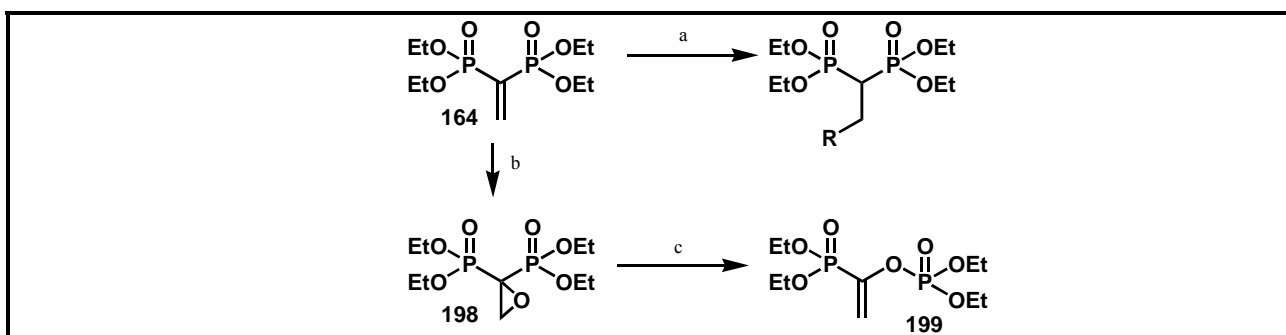


Figura 1. Estructura química de intermediarios sintéticos para el estudio de bisfosfonatos como aceptores de Michael

Teniendo en cuenta la relevancia de estos compuestos no sólo desde un punto de vista sintético, sino también como agentes farmacológicos, se decidió estudiar el comportamiento químico de eteniliden-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**164**) y de su derivado epoxidado oxiranilidenbisfosfonato de tetraetilo (**198**) como aceptores de Michael. Estos estudios estaban motivados con el objeto de obtener un conocimiento más amplio del comportamiento químico y reactividad de estos precursores.

Eteniliden-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**164**), sintetizado a partir de metilénbisfosfonato de tetraetilo (**162**) según el método de Degenhardt,⁹⁸ posee un centro electrofílico en el carbono-2 con la capacidad para reaccionar como aceptor de Michael con una variedad de nucleófilos.⁹⁵ El derivado **198** también posee un centro electrofílico en C-2. Se estudió entonces el comportamiento químico de estos compuestos aceptores de Michael utilizando diferentes nucleófilos que posean átomos de oxígeno, azufre y carbono como centros nucleofílicos y empleando distintas condiciones de reacción.

Como se describió previamente, el aceptor de Michael **164** se ha utilizado como intermediario sintético para la preparación de 1-alkil-1,1-bisfosfonatos de tetraetilo a través de la reacción entre estos compuestos y distintos reactivos organometálicos, tales como reactivos de Grignard y metilítio (Esquema 1).¹¹²



Esquema 1. (a) RMgX o MeLi, THF, 0 °C; (b) *m*-CPBA, CH₂Cl₂, t.a., 75 %; (c) RMgCl(Br), THF, -78 °C (0 °C), 2 h, 42%.

El derivado epoxidado **198** se obtuvo fácilmente por tratamiento de etenilidénbifosfonato de tetraetilo **164** con ácido *m*-cloroperbenzoico en cloruro de metileno a temperatura ambiente (Esquema 1). El espectro de RMN ¹H exhibió las tres señales correspondientes. La primera de ellas correspondía a los hidrógenos 2' observándose como un doble triplete centrada a 1,36 ppm con constantes de acoplamiento de 7,0 Hz (³J_{H-H}) y 1,0 Hz (⁴J_{P-H}), respectivamente.

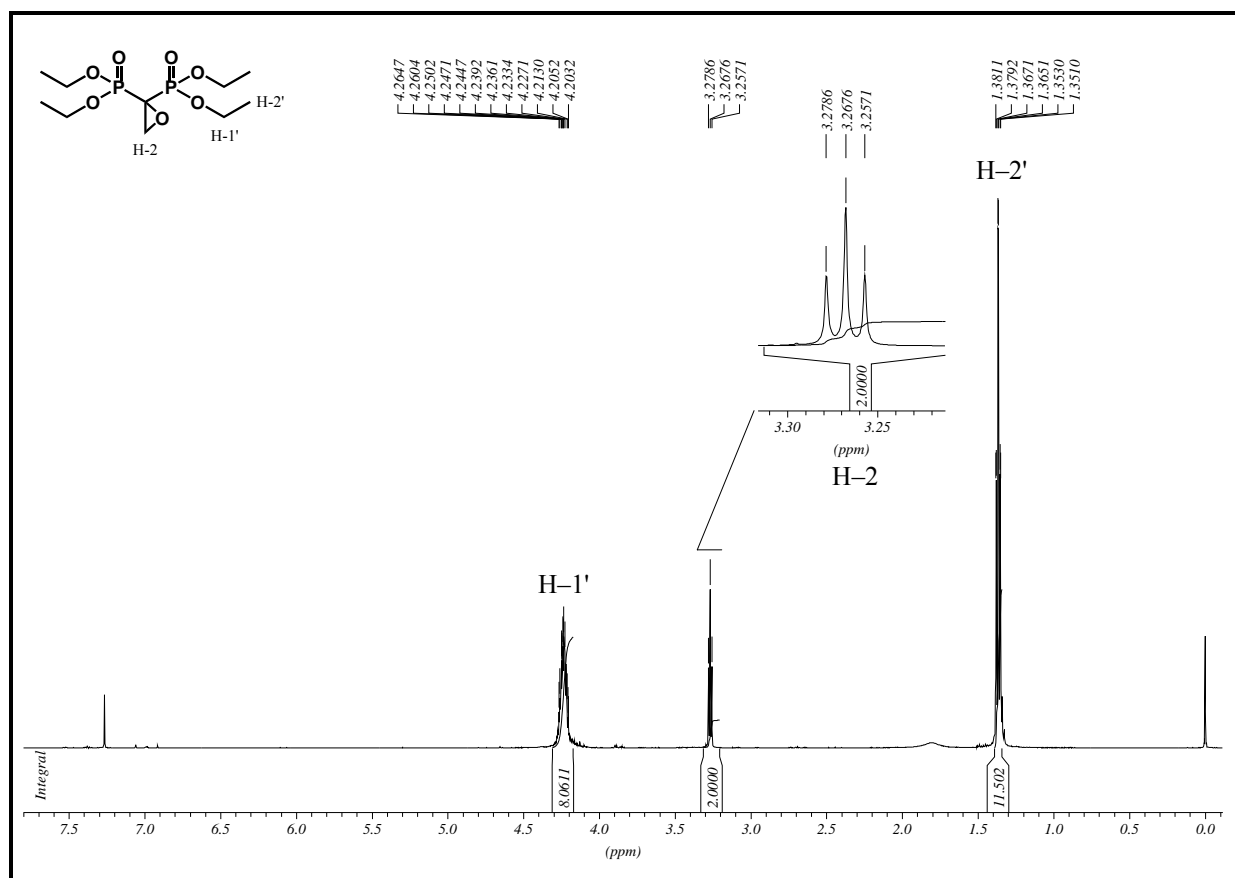


Figura 2. Espectro de RMN ¹H del compuesto **198**.

La segunda señal aparecía centrada a 3,26 ppm como un triplete con una constante de acoplamiento de 5,4 Hz (${}^3J_{P-H}$) correspondiente a H-2. La tercera señal, asignada a H-1', se observaba como un multiplete complejo en el rango 4,20–4,26 ppm (Figura 2).

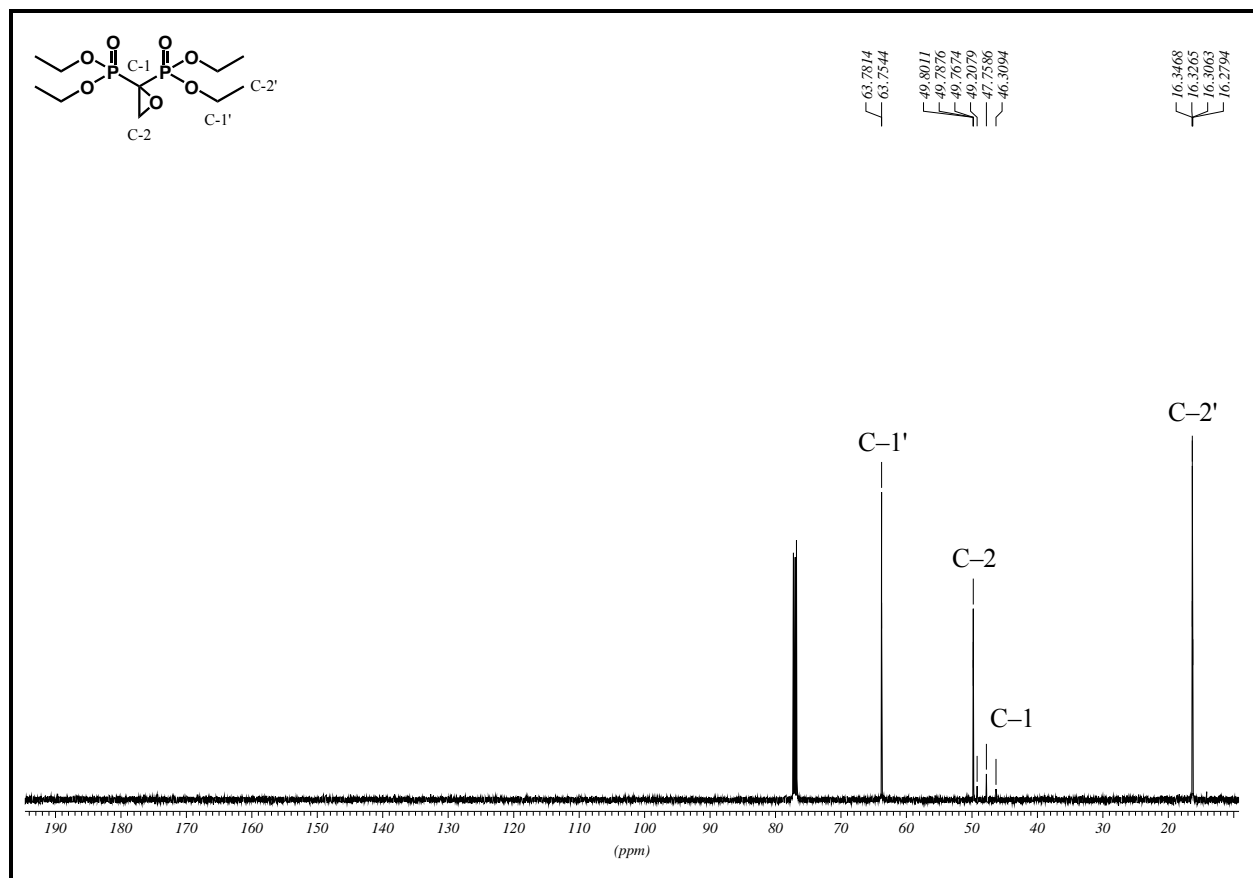


Figura 3. Espectro de RMN ${}^{13}\text{C}$ de 1-2,epoxietil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo en CDCl_3 .

El espectro de RMN ${}^{13}\text{C}$ para este derivado epoxidado presentó cuatro señales; dos de ellas, correspondientes al éster etílico aparecían, la primera era un doble doblete centrado a 16,36 ppm (C-2') con constantes de acoplamiento de 5,5 Hz (${}^3J_{P-C}$) y 3,0 Hz (${}^5J_{P-C}$), respectivamente; la segunda era un doblete (C-1') centrado a 63,76 ppm con constante de acoplamiento 3,1 Hz. Las dos señales restantes correspondían a los carbonos del grupo epóxido. El carbono-1 se observaba centrado a 47,80 ppm como un triplete con una constante de acoplamiento de 182,7 Hz (${}^1J_{P-C}$), mientras que el carbono-2 se observaba centrado a 49,81 ppm como un triplete con una constante de acoplamiento de 1,7 Hz (${}^2J_{P-C}$) (Figura 3).

La reacción entre un reactivo de Grignard y un epóxido representa una transformación muy importante en la síntesis orgánica que conduce a una nueva unión carbono-carbono. En nuestro caso, la reacción entre un reactivo de Grignard con **198** conduciría, por ataque por el carbono menos sustituido (C-2), a los respectivos ésteres de 1-hidroxialquil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo. Sin embargo, cuando se llevó a cabo la reacción entre **198** con distintos reactivos de Grignard se obtuvo como único producto el enol fosfato **199**, independientemente de la naturaleza de los compuestos organometálicos utilizados (Esquema 1).

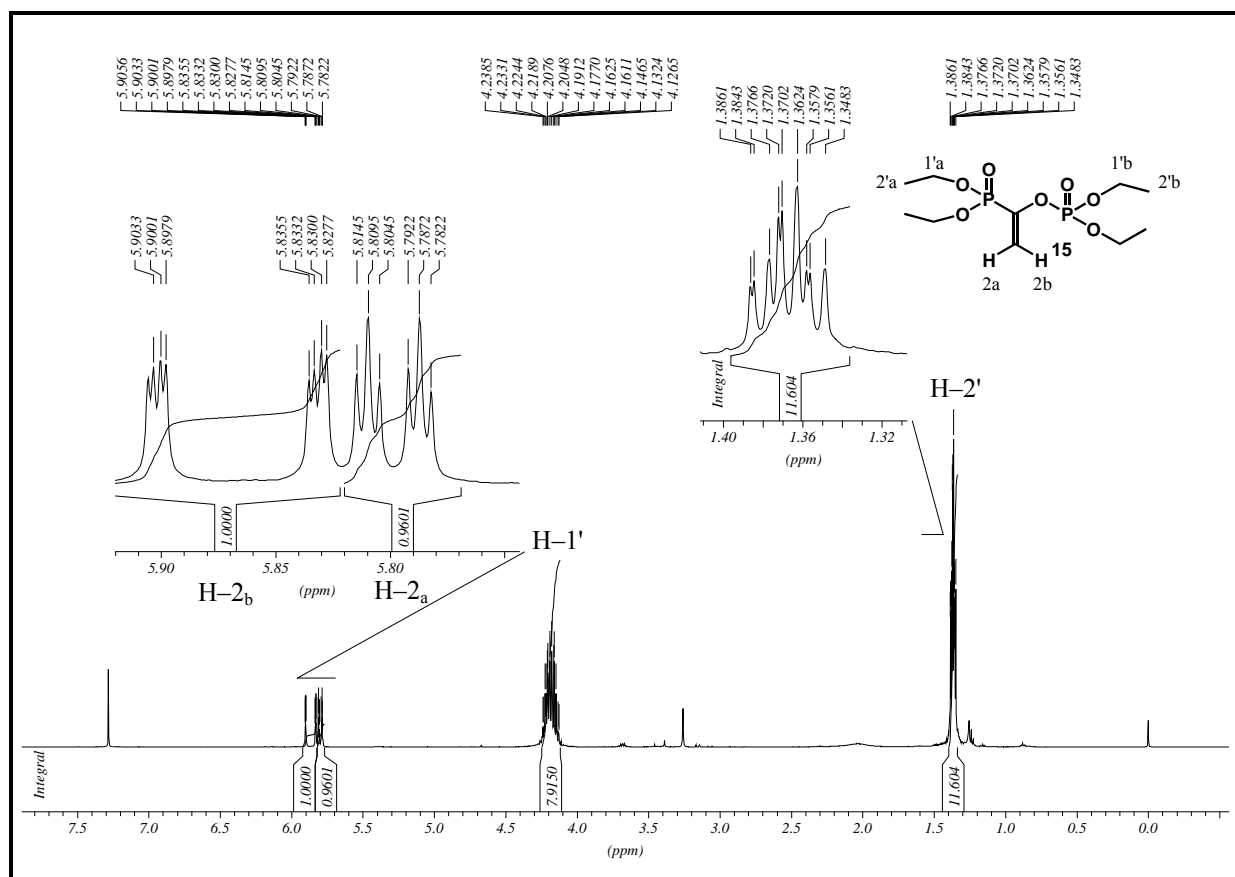


Figura 4. Espectro de RMN ¹H de [1-(dietoxifosforiloxi)-vinil]-fosfonato de dietilo (**199**).

En el espectro de RMN ¹H del enol fosfato **199** se observó un doble doblete centrado a 5.86 ppm correspondiente a H-2_b con constantes de acoplamiento de 35,1 Hz (³J_{P-H_{trans}), 2,7 Hz (²J_{H-H_{gem}) y 1,1 Hz (⁴J_{P-H_{cis}), respectivamente. Además, se observó un doble triplete centrado a 5,80 ppm correspondiente al H-2_a con constantes de acoplamiento de 11,2 Hz (³J_{P-H_{cis}) y 2,5 Hz (²J_{H-H_{gem}), respectivamente. En la región de 1,34 a 1,38 ppm se encontraba otro grupo de señales. En este caso, se pudo observar un doble triplete superpuesto con un triplete,}}}}}

ambas señales correspondían a los H-2'_a e H-2'_b. Si bien estas señales aparecían resueltas, no pudieron ser asignadas utilizando únicamente el espectro de RMN ¹H. Finalmente entre 4,12 y 4,23 ppm aparecían los H-1'a y 1'b, como un multiplete complejo (Figura 4).

El espectro de RMN ¹³C resultó más sencillo de analizar (Figura 5). C-1 se observó como un doble doblete centrado a 146 ppm (¹J_{P-C} = 229,0 Hz, ²J_{P-C} = 10,1 Hz, respectivamente). C-2 también se observó como un doble doblete centrado a 114,65 ppm (²J_{P-C} = 24,6 Hz y ³J_{P-C} = 4,2 Hz, respectivamente). En la región del espectro donde aparecen los carbonos oxigenados se observaron dos dobletes, uno centrado a 63,75 ppm con una constante de acoplamiento de 5,9 Hz (²J_{P-C}) correspondiente a P(O)(OCH₂CH₃)₂ (C-1'_a), el otro centrado a 64,75 ppm con una constante de acoplamiento de 5,9 Hz (²J_{P-C}) correspondiente a OP(O)(OCH₂CH₃)₂ (C-1'_b). Finalmente, el espectro se completaba con dos señales, un doblete centrado a 15,95 ppm (³J_{P-C} = 5,9 Hz) correspondiente a C-2'_a, otro doblete centrado a 16,19 ppm (³J_{P-C} = 5,9 Hz) correspondiente a C-2'_b.

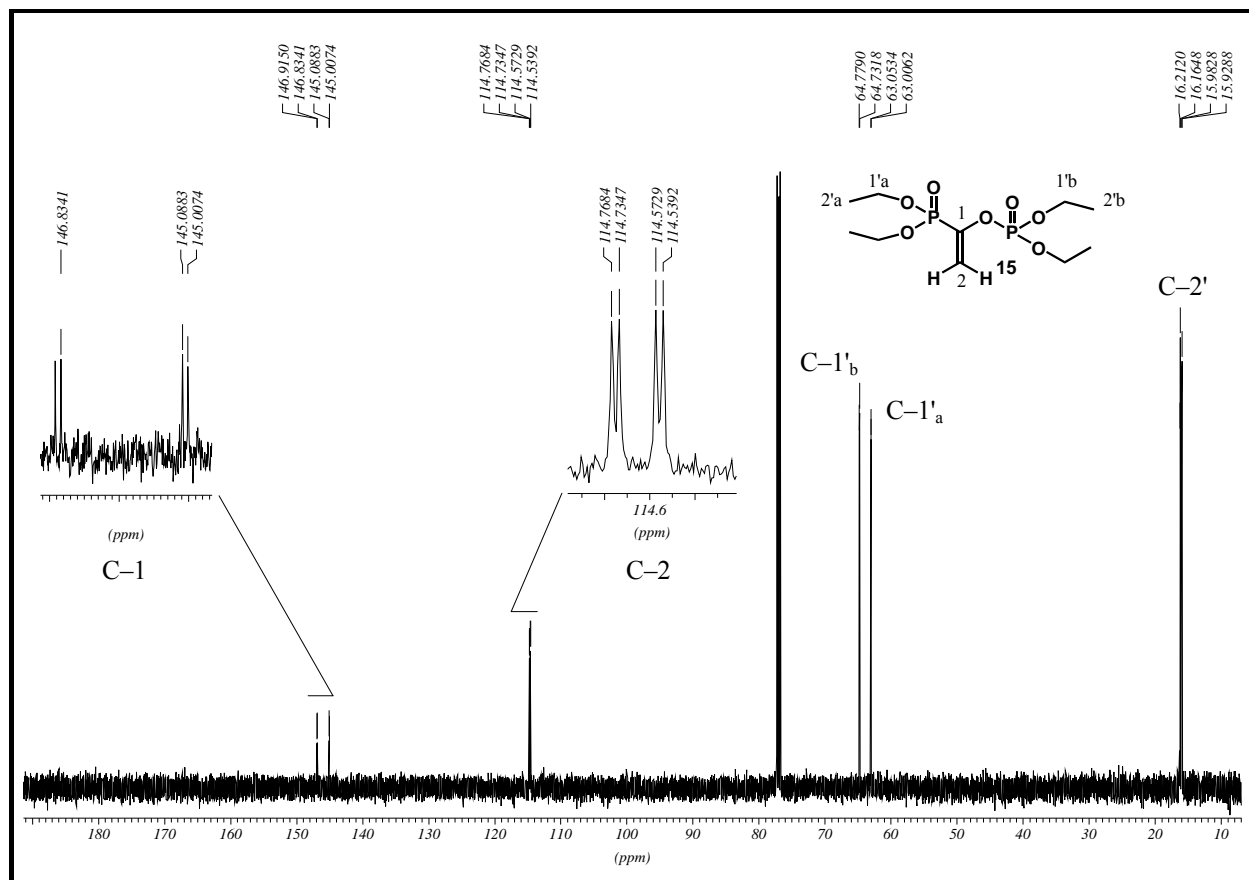


Figura 5 Espectro de RMN ¹³C de [1-(dietoxifosforiloxi)-vinil]-fosfonato de dietilo (199).

Por otro lado, resultó muy interesante el análisis del espectro de RMN ^{31}P desacoplado. En este caso, se observaron dos señales como dobletes indicando la presencia de dos átomos de fósforo diferentes en la molécula. El primer doblete se observó centrado a 8,27 ppm con una constante de acoplamiento de 26,4 Hz ($^3J_{\text{P-P}}$), correspondiente a un fosfonato coincidente a P_a . El otro doblete se observó centrado a -6,14 ppm con una constante de acoplamiento de 25,0 Hz ($^3J_{\text{P-P}}$), correspondiente a un fosfato (P_b) (Figura 6).

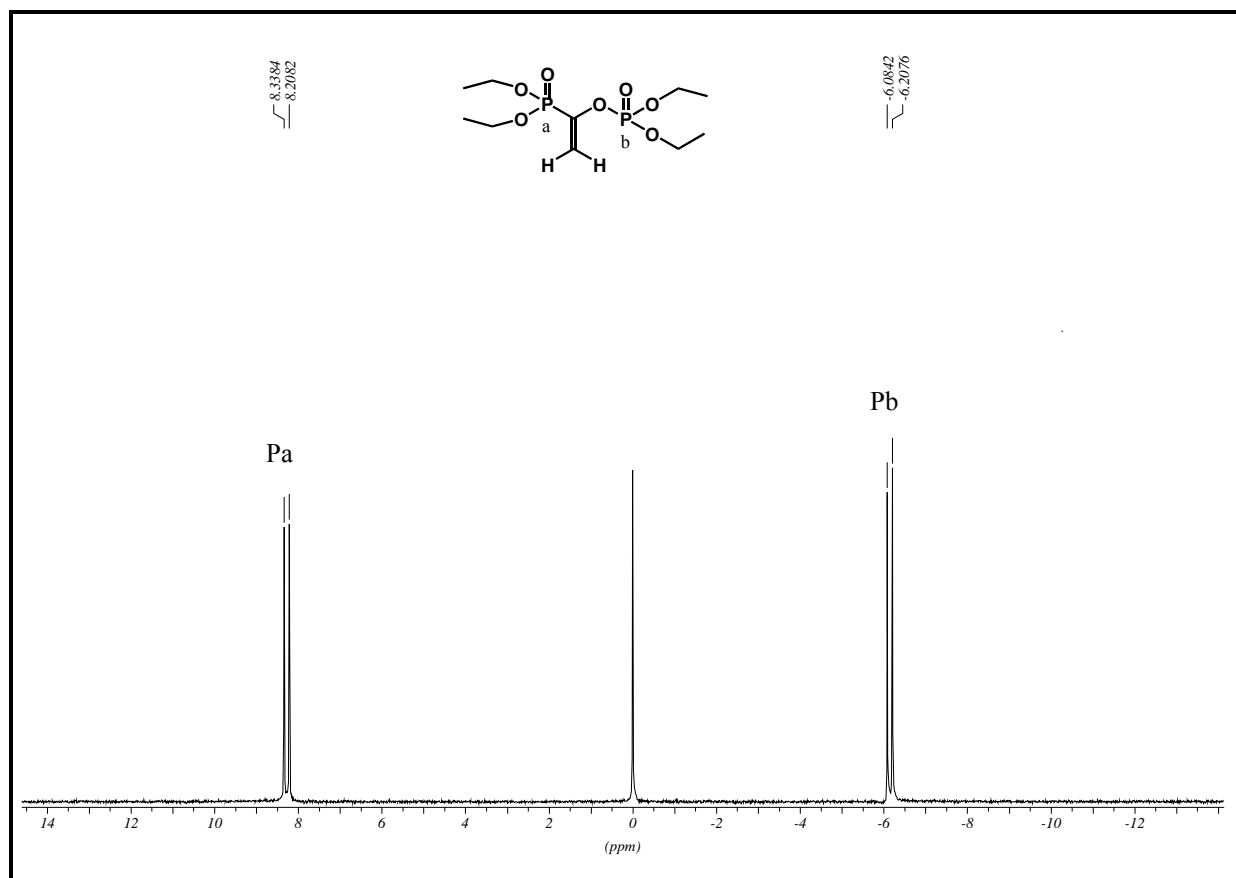


Figura 6 Espectro de RMN ^{31}P de [1-(dietoxifosforiloxi)vinil]-fosfonato de dietilo en CDCl_3 con referencia externa de H_3PO_4 .

Como se mencionó anteriormente, el epóxido **198** reaccionó con bromuro de *n*-butilmagnesio (2 equivalentes) en tetrahidrofurano a -78°C durante una hora para dar, a través de un reordenamiento fosfonato-fosfato, el compuesto **199** con un rendimiento del 50%. Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó cloruro de alilmagnesio, bromuro de *n*-pentilmagnesio o bromuro de *n*-hexilmagnesio, es decir, el mismo producto **199** y rendimientos similares. Además, la temperatura no tuvo influencia en el curso de la reacción, el mismo producto se obtuvo tanto a 0°C como a temperatura ambiente. La concentración del reactivo de

Grignard tampoco influyó en el curso de la reacción. Este reordenamiento inusual fosfonato-fosfato, que involucra la migración de un grupo fosforil desde un átomo de carbono a un átomo de oxígeno, ha sido observado previamente en condiciones básicas.¹¹³

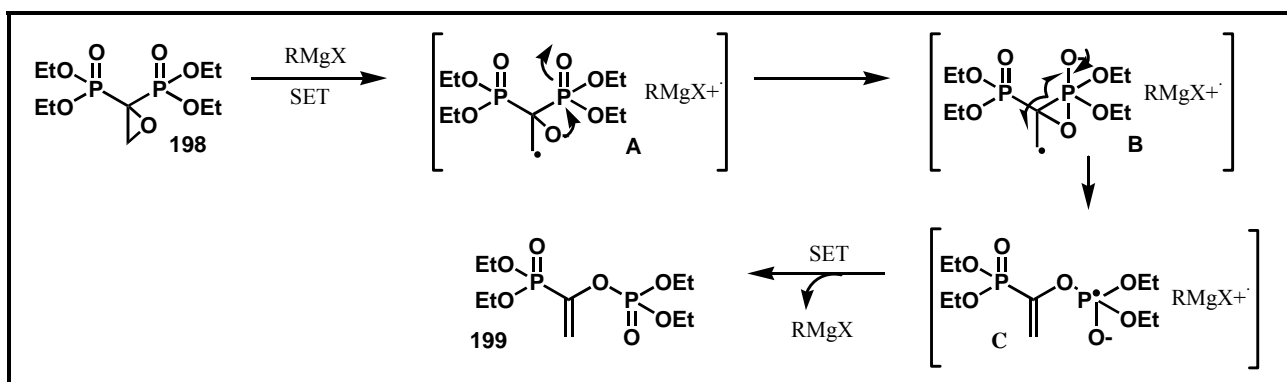
El hecho de que el enol fosfato **199** no incorpore el grupo alquilo del reactivo de Grignard sugiere que la reacción no transcurre por un mecanismo polar, sino que podría ocurrir a través de especies paramagnéticas. La “single-electron transfer” (SET) surge como un mecanismo apropiado para un gran número de transformaciones químicas. Aunque inicialmente la reacción de Grignard fue considerada como una simple adición nucleófila, existen evidencias sólidas para pensar que un proceso SET esté involucrado en muchos casos. Asbhy y col. sugirieron un mecanismo que involucra la formación de un par anión radical/catión radical, basado en evidencias directas por espectroscopía EPR, en la reacción de cetonas aromáticas con una variedad de reactivos de Grignard.¹¹⁴ Además, estos autores demostraron que la velocidad de la transferencia electrónica desde el reactivo de Grignard a la cetona aromática es función del número de átomos de hidrógenos β presentes en el grupo alquilo del reactivo de Grignard.¹¹⁴

La mayoría de los experimentos que conducen a establecer si una transferencia electrónica está involucrada en una transformación química particular consiste en utilizar las propiedades únicas de los intermediarios paramagnéticos que se forman, tales como radicales libres o radicales iónicos. Con la idea de obtener información acerca de si la reacción ocurre via radicalaria, la misma se llevó a cabo en presencia de un inhibidor de la formación de radicales. Quinidrona produce radicales estables, por captura o donación de un electrón. De esta forma, se consideró apropiado el uso de quinidrona para comprobar la presencia de radicales en esta transformación. Se observó una completa inhibición de la formación de **199**, cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de quinidrona, utilizando como reactivo de Grignard tanto cloruro de alilmagnesio como bromuro de *n*-hexilmagnesio o bromuro de *n*-pentilmagnesio; recuperándose, en todos los casos, un 85% del producto de partida **5**. Estos datos sugirieron que la reacción transcurre por un proceso de transferencia electrónica. Además, este resultado es muy sorprendente, ya que no es habitual que reactivos de Grignard primarios den reacciones de tipo SET.¹¹⁵ Sin embargo, existen evidencias que avalan la idea de que reactivos de Grignard primarios podrían estar involucrados en un mecanismo de transferencia electrónica.¹¹⁶

Un posible mecanismo que involucre radicales iónicos se ilustra en el Esquema 2. Una transferencia electrónica desde el reactivo de Grignard al compuesto **198** generaría el par catión radical/anión radical **A**, el cual se reordenaría dentro de la jaula para dar el intermediario **C**. La

formación de **C** se puede racionalizar por un ataque intramolecular del átomo de oxígeno que lleva la carga negativa al átomo de fósforo para dar **B**. Este intermediario podría dar ruptura homolítica de la unión carbono-fósforo en un paso concertado. El intermediario **C** podría evolucionar para regenerar la unión π fósforo-oxígeno. El valor de la entalpía de formación para la unión carbono-fósforo es de 65 kcal/mol, mientras que la correspondiente para la unión oxígeno-fósforo es de 86 kcal/mol. Estos valores de entalpía de formación fortalecen el mecanismo propuesto. Además, se detectó recientemente por EPR la presencia de un anión radical en la reacción de dietoxifosforil ditioformatos con reactivos de Grignard.¹¹⁷

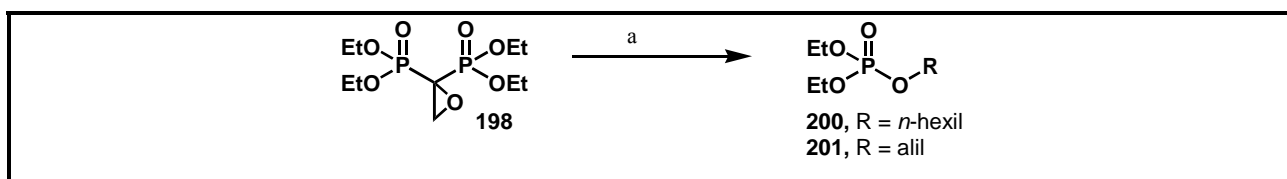
Con la idea de confirmar este mecanismo radicalario propuesto, se llevó a cabo la reacción de **198** con cloruro de alil magnesio en presencia de 2,2,5,5-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) empleando tetrahidrofurano como solvente. El radical estable TEMPO se usa habitualmente para capturar radicales libres que se forman en el curso de una reacción dada. Esta reacción, en presencia de TEMPO, presentó una significativa disminución en el rendimiento de **199**. El análisis de la reacción por CG-MS señaló la presencia de TEMPO, TEMPO-H y pequeñas cantidades de **199**. Sin embargo, no se observaron productos de acoplamiento entre TEMPO e intermediarios radicalarios, pero se identificaron otros productos aleatorios de acoplamiento de radicales libres, tales como etil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo, 2-hidroxietil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo, metilen-1,1-bisfosfonato de tetraetilo, etc. La poca eficacia del TEMPO para atrapar radicales libres y producir un efecto inhibitorio en el curso de una reacción ya había sido descripta. Estos resultados se pueden deber tanto a un efecto estérico del radical TEMPO, como a una inestabilidad térmica de los productos de acoplamiento. La disminución de la velocidad de formación de **199** inducida tanto por la presencia de TEMPO como quinhidrona constituyó una fuerte evidencia experimental de que un mecanismo radicalario está involucrado en el curso de la reacción.



Esquema 2. Mecanismo propuesto para la formación del enol fosfato **199**.

Sorprendentemente, el compuesto **198** no actuó como aceptor de Michael cuando se utilizaron compuestos organolíticos como nucleófilos. Por ejemplo, **198** no reaccionó con *n*-butillitio o metillitio bajo diferentes condiciones de reacción. Estas incluyen rangos de temperatura desde $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, diferentes concentraciones de reactivos y secuencias de agregado. Sin embargo, cuando se utilizó fenillitio como reactivo organometálico a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, se obtuvo **199** como único producto con rendimiento cuantitativo. Se conoce perfectamente que fenillitio actúa como un donador de electrones mientras que los reactivos alquililitados actúan via un mecanismo polar. Una vez más, estos datos avalan que esta reacción ocurre a través de un mecanismo radicalario.

En la reacción del epóxido **198** con los reactivos de Grignard, el tiempo de reacción tiene una marcada influencia en el curso de la reacción. Cuando esta reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por períodos prolongados de tiempo, el producto principal de la reacción fue el dietil fosfato de alquilo, donde el grupo alquilo provenía del reactivo organometálico. De esta forma, el epoxi derivado **198** tratado con bromuro de *n*-hexilmagnesio o con cloruro de alilmagnesio, en diferentes experimentos, a temperatura ambiente durante 16 horas dieron lugar a los ésteres fosfatos **200** y **201** respectivamente (Esquema 3). Como se indicó anteriormente, **199** fue el producto principal cuando se hizo reaccionar a **198** con una variedad de reactivos de Grignard a bajas temperaturas y tiempos cortos de reacción. Cuando la reacción se realizó a temperatura ambiente por periodos prolongados de tiempo, también se detectó la formación de **199**. Sin embargo, la reacción evolucionó para formar el correspondiente dietil fosfato de alquilo involucrando, probablemente, una nueva transferencia electrónica para completar la reacción.



Esquema 3. (a) RMgCl(Br), THF, 0 °C, 1h → t.a., 16 h, 66% para **200**, 57% para **201**.

Del análisis del espectro de RMN ^{13}C de los productos de reacción resultó evidente la pérdida de una unidad fosfato. No se distinguió ningún triplete característico de átomos de carbono unidos directamente a fósforo. Por ejemplo, el espectro de RMN ^{13}C del compuesto **200** presentó 8 señales. En la zona de carbonos oxigenados aparecían dos señales; la primera, un doblete centrado a 63,58 ppm ($^2J_{\text{C-P}} = 5,1$ Hz) correspondiente a C-1', la segunda, un doblete centrado a 67,67 ppm ($^2J_{\text{C-P}} = 6,1$ Hz) asignado a C-1. La señal de C-2 aparecía como un doblete centrado a 30,23 ppm ($^3J_{\text{C-P}} = 1$ Hz). La señal correspondiente a C-2' se observó como un doblete centrado a 16,11 ppm ($^3J_{\text{C-P}} = 6,1$ Hz). Finalmente, el espectro se completaba con 4 señales a 13,92 ppm, 22,49 ppm; 25,09 ppm, y 31,30 ppm correspondientes a C-6, C-5, C-4 y C-3, respectivamente (Figura 7).

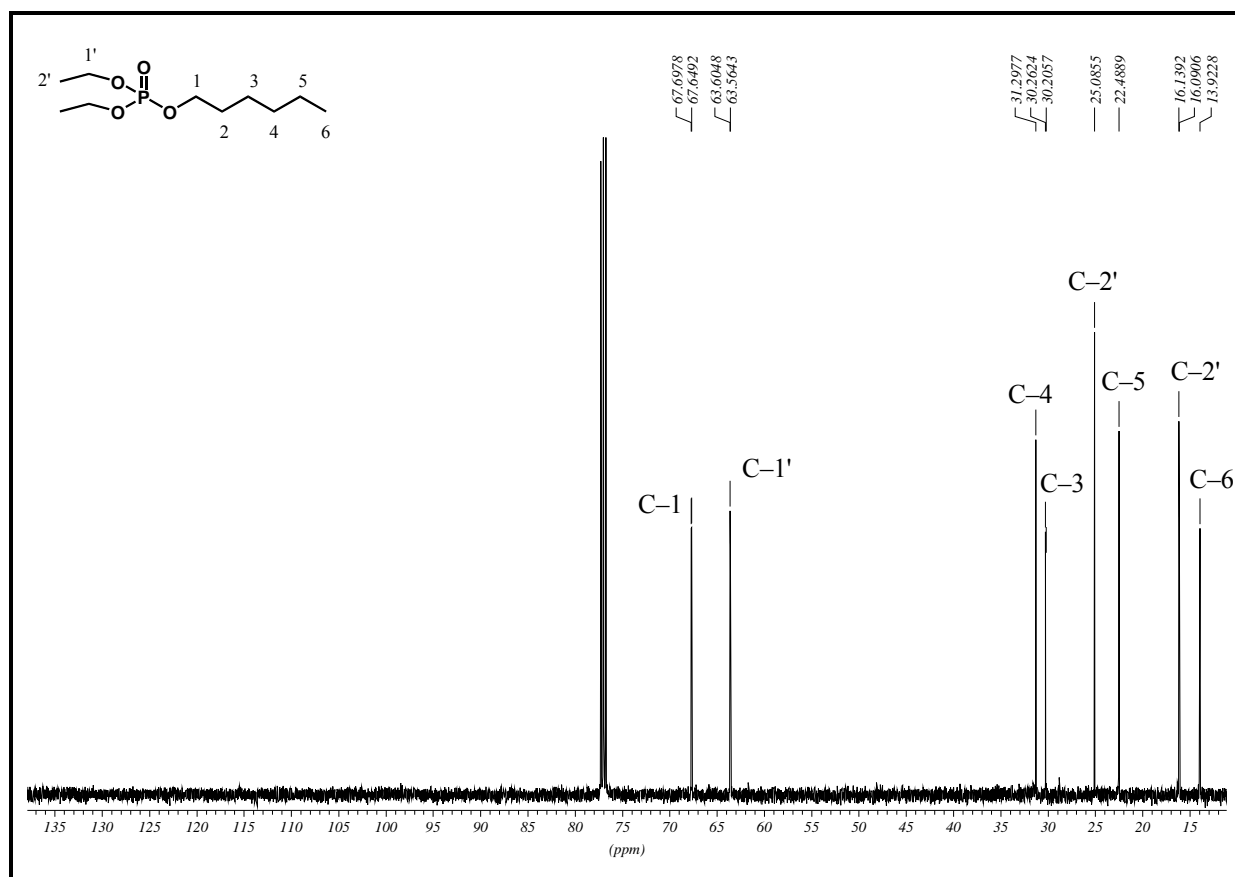


Figura 7. Espectro de RMN ^{13}C de dietil fosfato de *n*-hex-1-ilo (**200**)

El espectro de RMN ^{31}P no dejó dudas del estado de oxidación del átomo de fósforo, observándose una única señal a $-3,38$ ppm, característica de un grupo fosfato (Figura 8).

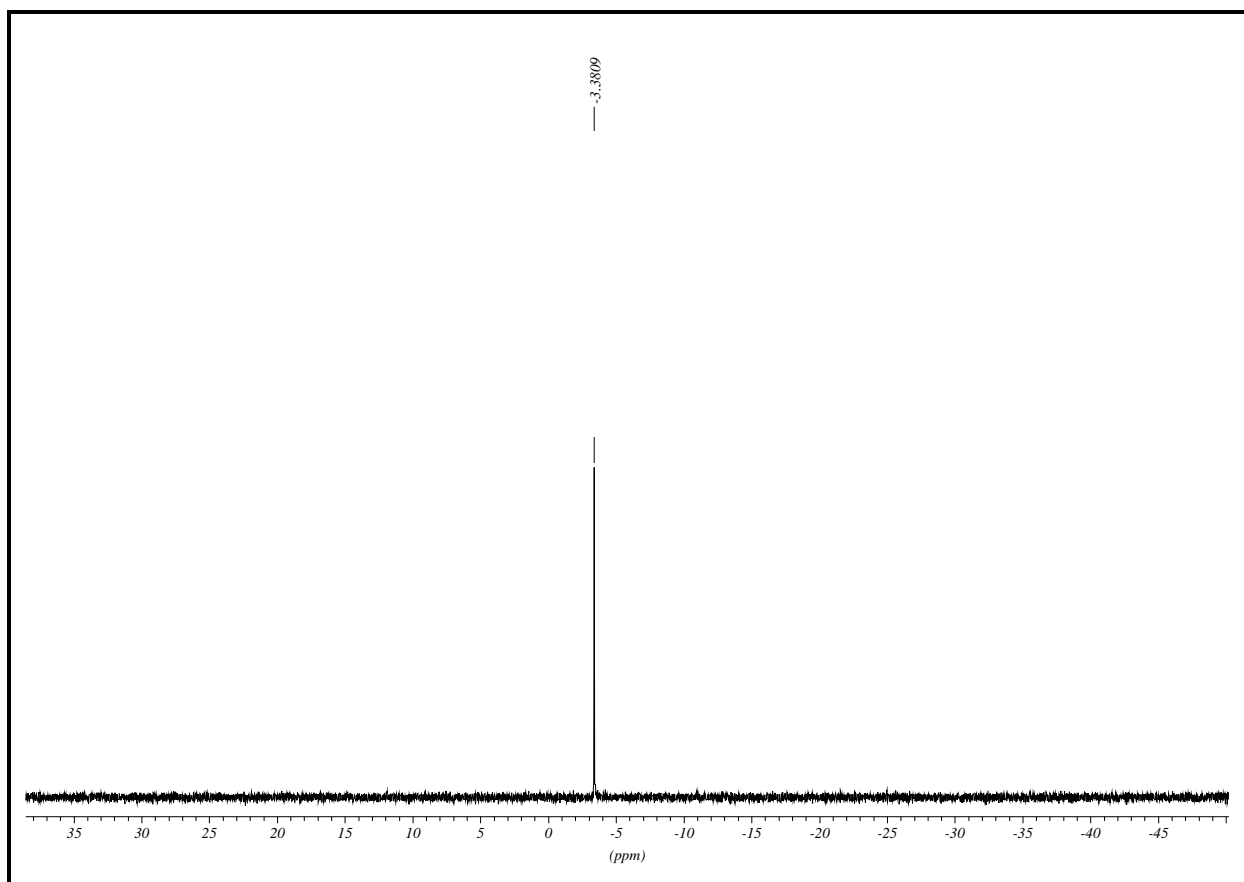
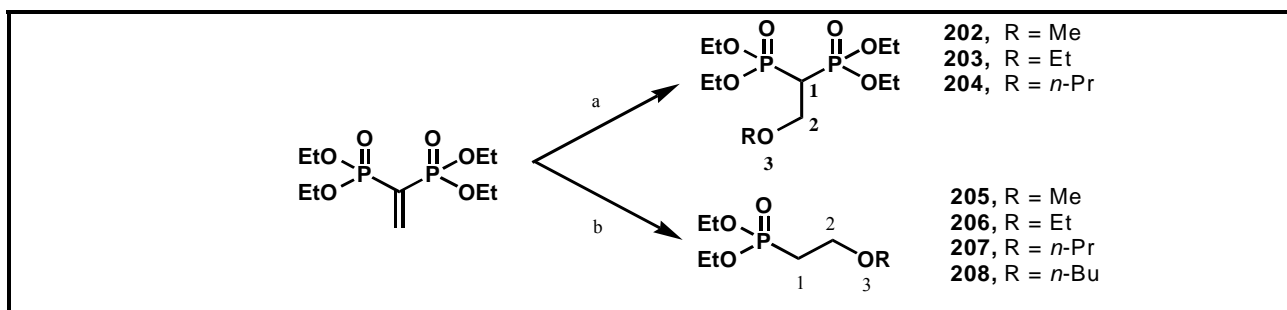


Figura 8. Espectro de RMN ^{31}P de dietil fosfato de *n*-hex-1-ilo (**200**)

Por otro lado, se estudió la reacción del aceptor de Michael **164** con diversos nucleófilos oxigenados y azufrados. La reacción de **164** con distintos alcóxidos fue la primera serie de ensayos considerados (Esquema 4).



Esquema 4. (a) RONA, ROH, 0 °C, 1 h, 40% para **202**, 35% para **203**, 20% para **204**; (b) RONA, ROH, t.a., 16 h, 40% para **205**, 40% para **206**, 92% para **207**, 30% para **208**.

La reacción de **164** con metóxido de sodio a 0 °C condujo al producto de adición 1,4 esperado, 2-metoxietil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**202**). Este compuesto resultó inestable tanto en condiciones débilmente ácidas como básicas, incluso en las etapas de purificación empleando tanto sílica-gel como alúmina, obteniéndose nuevamente el compuesto de partida **164** por pérdida del grupo metoxilo. Este resultado no es sorprendente considerando que **202** es el intermediario natural para la preparación de **164**. De hecho, bajo catálisis ácida **202** se convierte en **164**.⁹⁸ Si bien **164** reaccionó con diferentes alcóxidos como etóxido de sodio y propóxido de sodio dando lugar a los productos de adición 1,4 **203** y **204**, respectivamente, con moderados rendimientos, éstos experimentaron pérdida del grupo alcoxilo fácilmente para regenerar el aceptor de Michael inicial **164**. Este comportamiento también se había observado para los aductos formados por reacción del aceptor de Michael **164** con nucleófilos nitrogenados (Esquema 4).

Cuando la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 16 horas, el producto de adición 1,4 experimentó eliminación de un grupo (PO(OEt)₂) para dar el (2-alcoxietyl)-fosfonato de dietilo, resultado que se pudo confirmar mediante el análisis de los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C. De esta forma, el compuesto **164** tratado con metóxido de sodio, etóxido de sodio, propóxido de sodio y butóxido de sodio, dio lugar a los compuestos **205–208**, respectivamente, con buenos rendimientos (Esquema 4).

Tomando como ejemplo el espectro de RMN ¹H de (2-etoxietil)-fosfonato de dietilo (**206**) de la Figura 5, se observó que presentaba dos señales características. Una de ellas correspondía a H-1, el cual se observaba como un doble triplete centrado a 2,10 ppm (²J_{P-H} = 18,7 Hz, ³J_{H-H} = 7,5 Hz, respectivamente), respectivamente. La segunda, correspondiente a H-2 que aparecía como otro doble triplete centrado a 3,67 ppm (³J_{P-H} = 11,6 Hz y ³J_{H-H} = 7,5 Hz, respectivamente). Además, se observaron dos señales pertenecientes al grupo etoxi unido a la cadena alifática, una de ellas aparecía como un triplete centrado a 1,20 ppm con una constante de acoplamiento de 7,0 Hz (³J_{H-H}) correspondiente a H-5; mientras que la restante se observaba como un cuarteto centrado a 3,50 ppm con una constante de acoplamiento de 7,0 Hz (³J_{H-H}). Esta señal correspondía a H-4. El espectro de RMN ¹H se completaba con las dos señales características del éster etílico, un triplete centrado a 1,32 ppm con una constante de acoplamiento de 7,0 Hz de la posición H-2' y un multiplete centrado a 4,10 ppm (H-1').

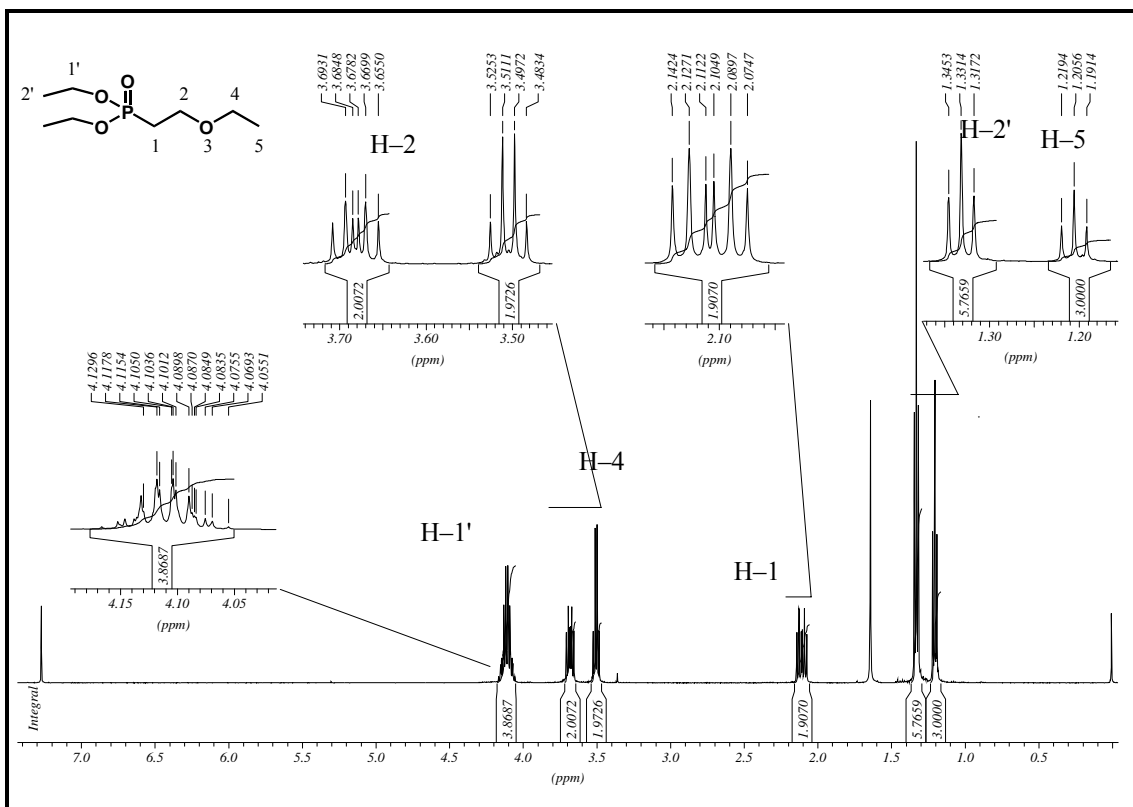


Figura 7. Espectro de RMN ¹H de (2-etoxietil)-fosfonato de dietilo (206).

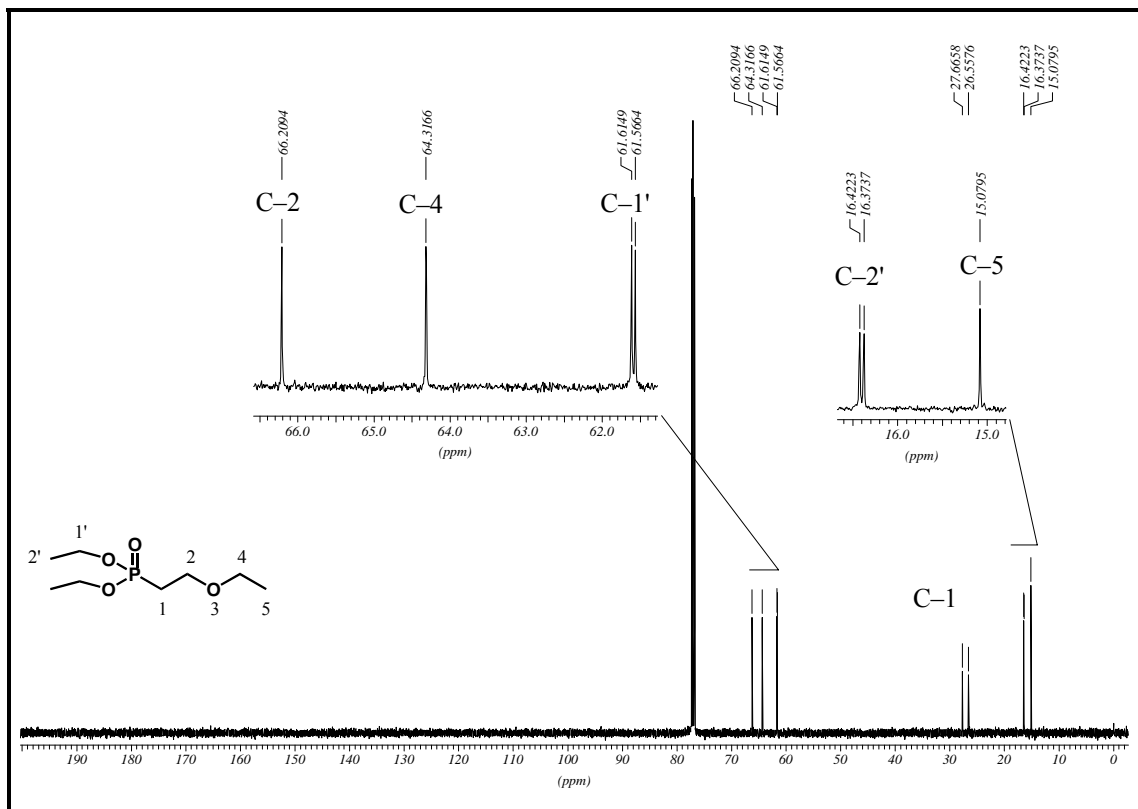


Figura 8. Espectro de RMN ¹³C de (2-Etoxietil)-fosfonato de dietilo (206).

En la Figura 8 se detalla el espectro de RMN ^{13}C de (2-etoxietil)-fosfonato de dietilo. Se confirmó la presencia de un único átomo de fósforo dado que el C-1 aparecía como un doblete centrado a 27,11 ppm con una constante de acoplamiento de 139,4 Hz ($^1J_{\text{P-C}}$). El espectro se completaba con una señal a 15,08 ppm correspondiente a C-5, un doblete centrado a 16,40 ppm ($^3J_{\text{P-C}} = 6,1$ Hz) correspondiente a C-2', un doblete centrado a 61,59 ppm ($^3J_{\text{P-C}} = 6,1$ Hz) correspondiente a C-1', y dos señales a 64,32 ppm (C-4) y 66,21 ppm (C-2). Por otro lado, en el espectro de RMN ^{31}P se observaba una única señal a 26,25 ppm, característica de un grupo fosfonato (Figura 9).

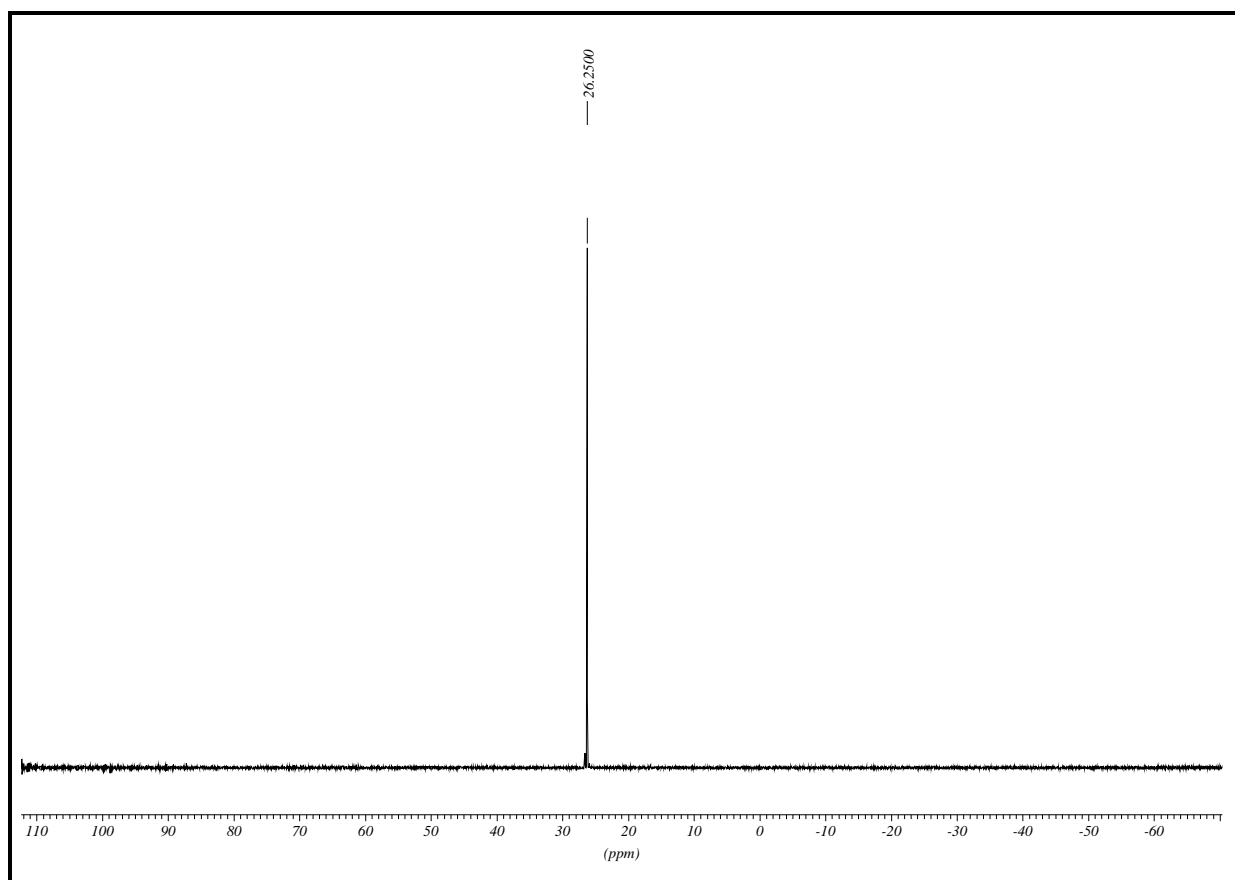
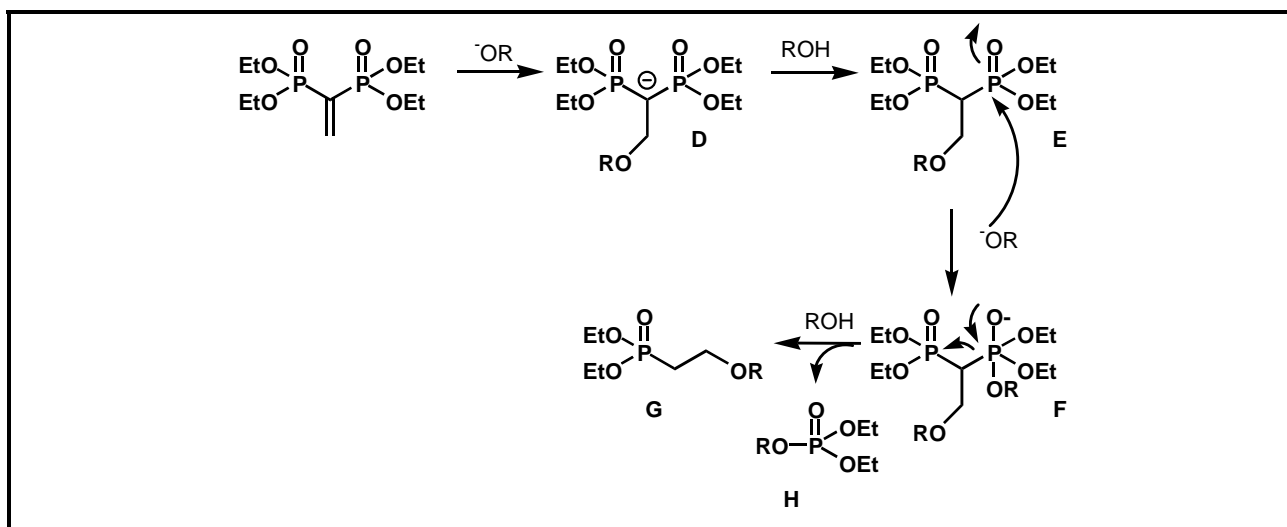


Figura 9. Espectro de RMN ^{31}P de (2-etoxietil)-fosfonato de dietilo (206).

La pérdida de una unidad de fosfato bajo estas condiciones de reacción no es usual. Esta eliminación se observa en olefinación de aldehídos y otros compuestos relacionados donde se requieren condiciones de Wadsworth-Emmons,¹¹⁸⁻¹²⁰ y en β -hidroxifosfonatos no estabilizados.¹²¹ En estos casos, el intermediario que conduce a la olefina correspondiente posee

un átomo de oxígeno que soporta una carga negativa unido al carbono β respecto a la unidad de fosfonato. Este intermediario forma el anillo común de cuatro miembros oxafosfetano, el cual sufre una fragmentación para dar la olefina y el ión fosfato. En nuestro caso, sin embargo, la eliminación del grupo fosfonato no ocurrió según el mecanismo mencionado. Es el átomo de carbono puente, que se encuentra entre las dos unidades de fosfonato, quien soporta la carga negativa luego de la adición 1,4 del nucleófilo sobre el aceptor de Michael **164**, en este caso, el grupo alcóxido. Se ha descrito en literatura un intermediario carbaniónico relacionado estructuralmente al formado en el curso de esta reacción como una especie estable en diversas reacciones de alquilación de fosfonatos geminales.^{122,123} Por lo tanto, otro mecanismo debería estar involucrado para esta eliminación. El primer paso propuesto en el mecanismo de la eliminación es una típica adición 1,4 del alcóxido al respectivo aceptor de Michael **164** para dar la especie carbaniónica **D**. La captura de un protón del solvente por **D** llevaría a la formación del intermediario **E** que, por ataque de otro ión alcóxido, ahora sobre el átomo de fósforo, conduciría a **F**, en el cual el átomo de oxígeno soporta la carga negativa. Finalmente, la eliminación del éster fosfato conduciría a la formación de compuestos de fórmula general **G** (compuestos **205–208**) (Esquema 5).



Esquema 5. Mecanismo postulado para la formación (2-alcóxietil)fosfonatos de fórmula general **G**.

Para verificar esta hipótesis se llevó a cabo la reacción entre **164** y metóxido- d_3 de sodio en metanol- d_4 . El análisis del contenido de deuterio por RMN ^1H del compuesto **205** indicó una incorporación de deuterio cercana al 95%. La señal asignada a H-1 en **202**, que aparecía como un

triple triplete centrada en 2,69 ppm, no se observó; mientras que la señal correspondiente a H-2, la cual había sido previamente observada como un doblete triple centrada en 3,89 ppm, colapsó a un triplete con una constante de acoplamiento de 16,1 Hz. Luego de 16 horas de reacción, la mezcla de reacción se analizó por CG-MS donde se observaron, como señales diagnósticas, las correspondientes al derivado pentadeuterado **G** [$\text{CD}_3\text{OCH}_2\text{CD}_2\text{P}(\text{O})(\text{OEt})_2$] con un pico que correspondía a $[\text{M}]^+$ ($m/z = 201$, $t_r = 6,15$ min) junto con el grupo saliente fosfato trideuterado **H** [$\text{CD}_3\text{OP}(\text{O})(\text{OEt})_2$] ($m/z = 171$, $t_r = 5,33$ min) (Figura 11). Estos resultados indicaron que la incorporación de deuterio en la posición C-1 de los productos **E** y **F** avalaban el mecanismo de reacción propuesto.

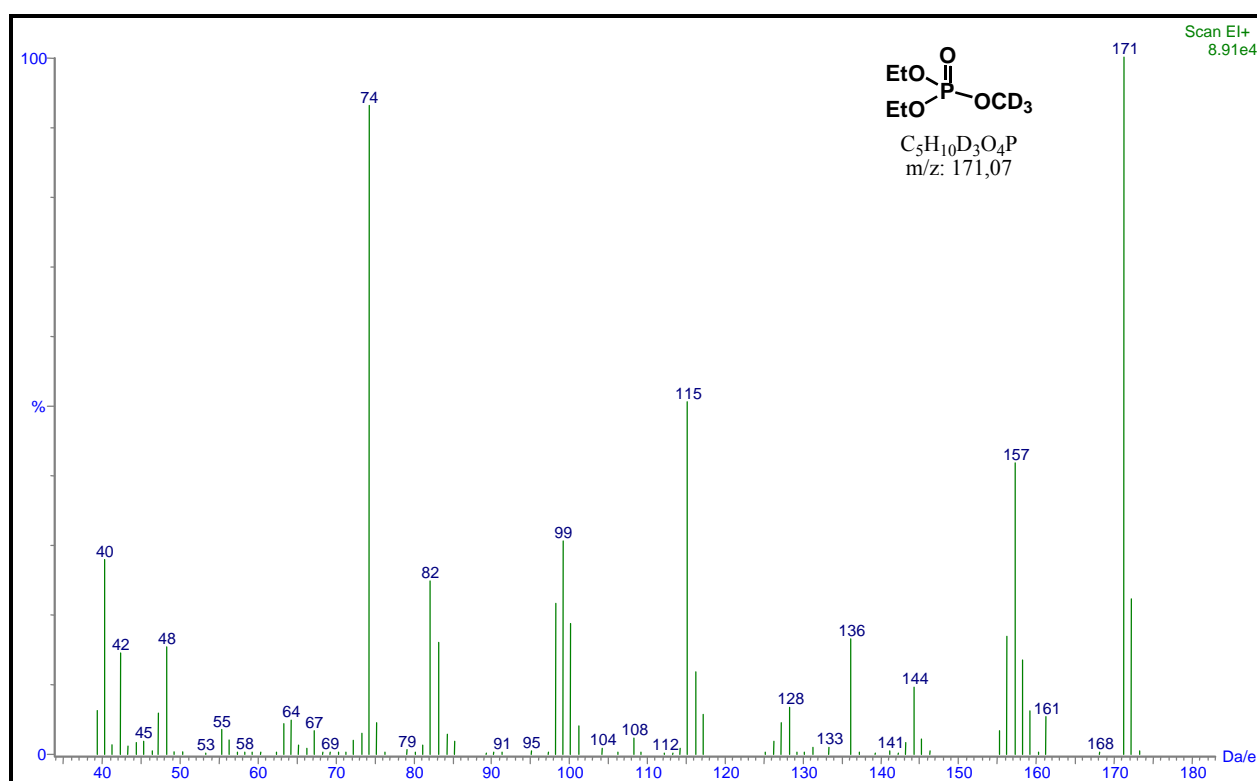
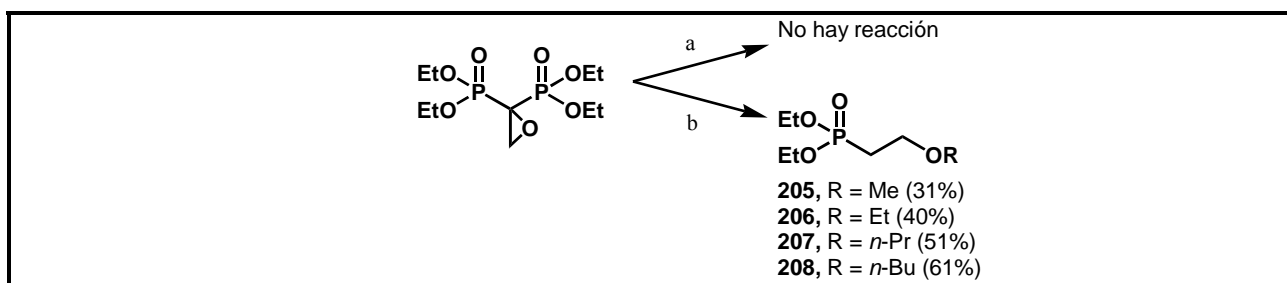


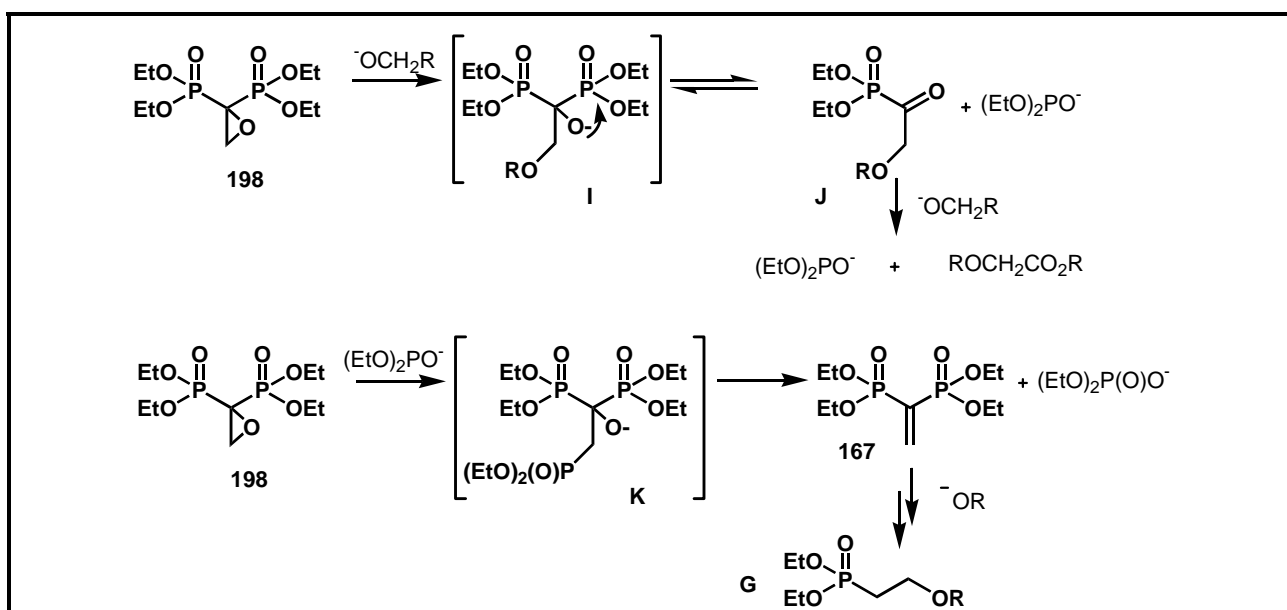
Figura 11. Espectro de masas de fosfato trideuterado **E**.

Los resultados cuando se empleó 1-2, epoxietil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**198**) como sustrato fueron muy interesantes. Este compuesto no reaccionó con ninguno de los alcóxidos que habían sido usados como nucleófilos tales como metóxido, etóxido, propóxido y butóxido de sodio a 0 °C. Sin embargo, cuando la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, se obtuvieron los 2-alcóxetilfosfonatos de dietilo correspondiente de fórmula general **G**, como se ilustra en el esquema 6.



Esquema 6. (a) RO⁻/ROH, 0 °C; (b) RO⁻/ROH, t.a., 16 h.

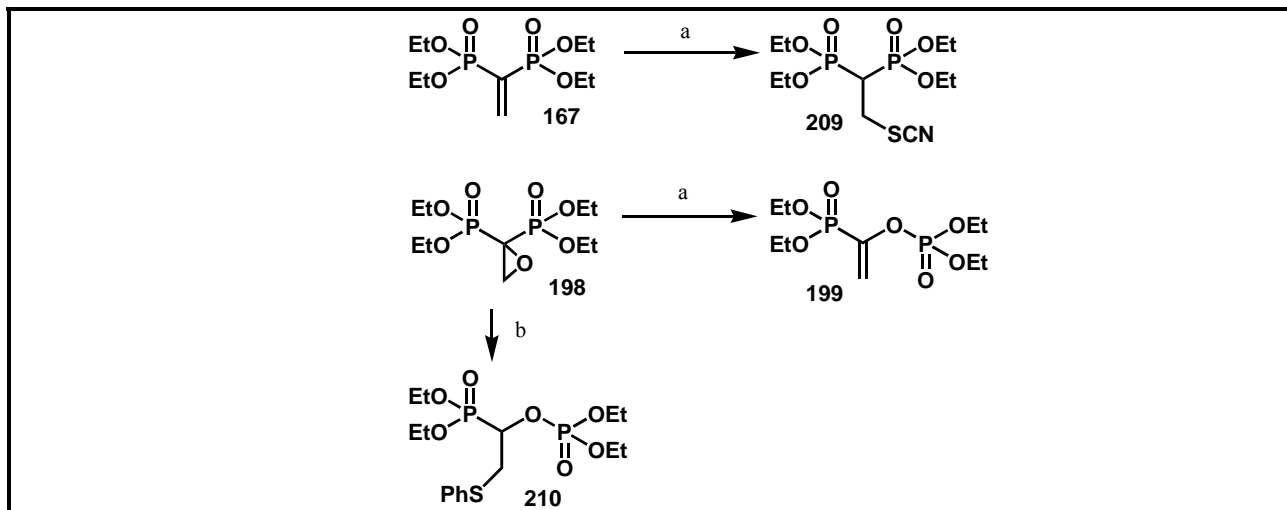
El mecanismo propuesto para este inusual reordenamiento se ilustra en el Esquema 7. La adición del ión alcóxido al epóxido **198**, para dar el intermediario **I**, representaría el primer paso de la reacción. **I** podría descomponerse *via* una reacción de retro-Abramov¹²⁴ al correspondiente acilfosfonato **J** y al ión fosfito. El acilfosfonato **J** podría reaccionar con otro ión alcóxido para dar, *via* una nueva reacción de retro-Abramov, un segundo ion fosfito. Este ión reaccionaría nucleofílicamente con **198** para dar el intermediario **K**, el cual a través de una reacción de tipo Wittig formaría **164**. Finalmente, **164** evoluciona de acuerdo al mecanismo postulado en el Esquema 5 para dar **G**. Los bajos rendimientos de **G** (**205–208**) sustentan este mecanismo.



Esquema 7. Mecanismo de reacción propuesto para la eliminación de un grupo fosfato en la reacción entre epóxido **5** y un alcóxido.

Finalmente, se estudiaron algunos nucleófilos conteniendo azufre. El compuesto **164** se comportó como un buen aceptor de Michael con nucleófilos azufrados como tiocianato de potasio. En efecto, **164** reaccionó con tiocianato de potasio en agua para dar el correspondiente

producto de adición 1,4, **209** (Esquema 9). Este resultado está de acuerdo con aquellos que señalan que **164** actúa como aceptor de Michael con nucleófilos cuyo centro nucleofílico es un átomo de azufre.⁹⁶

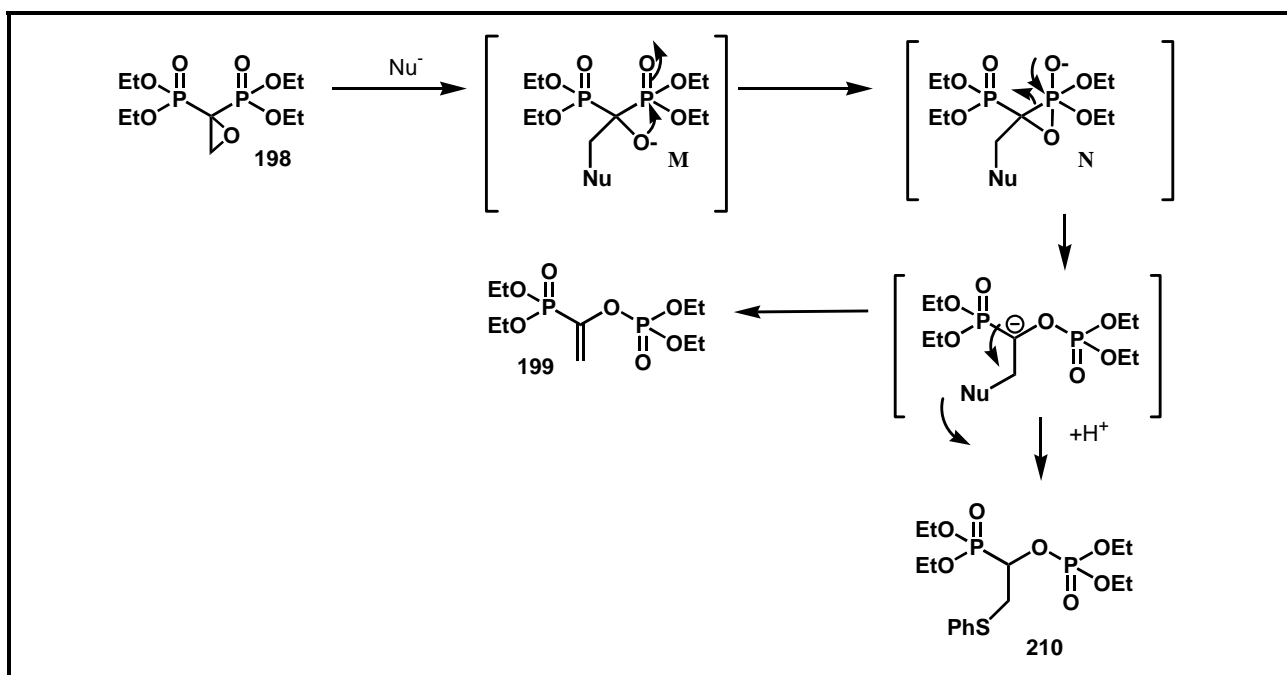


Esquema 8. (a) KSCN, H₂O, t.a., 24 hs, 72 % para **209**, 90 % para **199**; (b) KPhS, H₂O, t.a., 30 min, 30 %.

La reacción del epóxido **198** con nucleófilos azufrados fue notable. Cuando un epóxido se trata con tiocianato de potasio el producto esperado es el episulfuro correspondiente. Sin embargo, cuando **198** se trató con tiocianato de potasio, el producto principal de la reacción fue nuevamente el producto de reordenamiento fosfonato-fosfato **199** con 90% de rendimiento, en lugar del episulfuro esperado. En otras palabras, se obtuvo el mismo producto que se formó cuando **198** se trató con distintos reactivos de Grignard. En vista de estos resultados, se consideró el uso de otros iones nucleofílicos que contenían azufre. De esta manera, el tratamiento de **198** con tioacetato de potasio dio nuevamente el compuesto reordenado **199** con un 82 % de rendimiento, mientras que la reacción de **198** con tiofenóxido de potasio dio lugar al compuesto **210**. La formación de este último compuesto fue totalmente inesperada. Además, los rendimientos con que se obtenía **210** eran independientes del número de equivalentes empleados. Asimismo, existían antecedentes de que la reacción de **198** con algunas aminas, bajo estas condiciones de reacción, conducían al reordenamiento fosfonato-fosfato señalado anteriormente.¹²⁵

Con el objeto de estudiar el mecanismo de esta transformación, se llevó a cabo la reacción en presencia de quinhidrona y TEMPO en experimentos independientes. La ausencia de efectos

de estos compuestos en el curso de la reacción sugirió que la misma no ocurría a través de especies paramagnéticas. El mecanismo postulado para la reacción de **198** con nucleófilos azufrados se ilustra en el Esquema 9. El ataque del ión tioacetato o tiofenóxido sobre el epóxido **198** formaría el intermediario **M**, el cual podría dar lugar al reordenamiento fosfonato-fosfato con expulsión del ión tiocianato, pero no del ión tiofenóxido, el cual es un grupo saliente más débil. En este último caso, el carbanión formado (**O**) se protonaría. La tendencia a producir anillos de tres miembros que posee un átomo de oxígeno unido al carbono- α de un grupo alquilfosfonato específico ha sido descrito en otras reacciones que involucran compuestos organofosforados. La formación del doble enlace carbono-carbono es la fuerza impulsora que lleva a la pérdida del nucleófilo. Sin embargo, cuando el nucleófilo es un ión tiofenóxido, en vez de llevarse a cabo la eliminación del nucleófilo, el carbanión **O** toma un protón del medio para dar el compuesto **210**.



Esquema 9. Mecanismo propuesto para la reacción de 1,2-epoxietil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo con nucleófilos azufrados.

Como conclusión, eteniliden-1,1-bisfosfonato de tetraetilo se comporta como un típico aceptor de Michael y que puede experimentar una eliminación de un fosfato dependiendo de la naturaleza del agente nucleofílico y las condiciones de reacción.

Por otro lado, el epóxido derivado **198** experimenta un interesante e inusual reordenamiento fosfonato-fosfato que conduce a la formación del enol fosfato **199** independientemente del nucleófilo empleado. Además, **199** se puede transformar en derivados de

alquilfosfato dietilo por tratamiento con reactivos de Grignard controlando condiciones de reacción. Las diferencias de reactividad observadas entre **164** y **198** indican que la presencia de un átomo de oxígeno induce una tendencia a formar anillos oxafosfiranos de tres miembros, los cuales se convierten rápidamente en estos productos inusuales. Por último, se encontró una fuerte evidencia que este mecanismo involucra especies radicalarias.

Parte Experimental

Generalidades.

En todos los casos las reacciones sensibles a la humedad se llevaron a cabo con material de vidrio previamente flameado y bajo atmósfera estática de nitrógeno o argón.

Los solventes utilizados fueron de calidad “para análisis” o superior. Tetrahidrofurano: se destiló previamente sobre sodio-benzofenona; cloruro de metileno y acetonitrilo se refluaron en presencia de pentóxido de fósforo, se destilaron y se guardaron sobre tamices moleculares de 4 Å; *N,N*-dimetilformamida y dimetil sulfóxido anhidros se utilizaron como se suministraron de Aldrich; Metanol, etanol, propanol y butanol se secaron según el método descrito en literatura *via* el alcóxido de magnesio correspondiente. Los halogenuros de alquilo empleados se purificaron por una columna de alúmina básica. El ácido bencensulfónico se secó al vacío a 40 °C sobre pentóxido de fósforo.

Cromatografía en placa delgada: se utilizaron cromatofolios de silica gel F₂₅₄ y de fase reversa (RP-18, F₂₅₄) de 0,20 mm de espesor sobre soporte de aluminio (Merck). Los sistemas de solventes empleados se indican en cada caso. Se utilizó la técnica ascendente para el desarrollo de las mismas. El revelado se realizó por: (a) exposición a luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm); (b) inmersión en solución 0,04 M de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 3 mM de Ce(SO₄)₂ en H₂SO₄-H₂O (9:1) y posterior calentamiento.

Cromatografía en columna: se realizó con silica gel 60 de malla 230–400 (Merck), fase reversa (ocatadecyl-functionalized silica gel, Aldrich) y óxido de aluminio 60 malla 70–230 (Merck). Los solventes de elución se indican en cada caso.

Puntos de fusión: se determinaron con un aparato Fisher-Johns y no se encuentran corregidos.

Resonancia magnética nuclear: los espectros de resonancia magnética nuclear se adquirieron con espectrómetros Bruker AC-200 (operando a 200 MHz para ¹H y 50 MHz para ¹³C) y AM 500 (operando a 500.13 MHz para ¹H, 125,76 MHz para ¹³C y 202,45 MHz para ³¹P) a 303 K. Se utilizaron los siguientes solventes deuterados según se indica en cada caso: CDCl₃, CD₃OD, DMSO-*d*₆, D₂O, NaOD (40% p/p D₂O), DCl (36% p/p D₂O). Los desplazamientos químicos se indican en partes por millón (ppm) respecto de la señal del tetrametilsilano (TMS). Se utilizó H₃PO₄ (85%) como referencia externa para los espectros de ³¹P. Las constantes de acoplamiento se expresan en Hz. Las señales se describen como s (singulete), d (doblete), t (triplete), q (cuarteto),

dd (doble doblete), ddd (doble doble doblete), dt (doble triplete), t dist (triplete distorsionado), sa (singulete ancho) y m (multiplete)

En algunos casos, la asignación de las señales correspondientes a los espectros de resonancia magnética de ^1H , ^{13}C o ^{31}P se realizó utilizando una combinación de técnicas mono y bidimensionales, tales como experimentos de correlación heteronuclear $^1\text{H}-^{13}\text{C}$, $^1\text{H}-^{31}\text{P}$ HMBC y/o homonuclear (COSY-45).

Espectrometría de masa: Se utilizó como técnica de ionización por impacto electrónico (IE). Los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro VG TRIO 2 a 70 eV o 20 eV. Los espectros de masa de alta resolución se llevaron a cabo en un espectrómetro VG ZAB BeqQ.

Espectroscopía IR: los espectros IR se llevaron a cabo en un espectrómetro Nicolet Magna 550.

Análisis elemental: los microanálisis se realizaron en UMYMFOR, CONICET-FCEyN y en Atlantic Microlab, Inc., Norcross, Georgia, en los Estados Unidos de Norteamérica.

La evaluación biológica de los compuestos se realizó en el laboratorio del Dr. Roberto Docampo, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, USA. Nifurtimox se utilizó como control positivo en los ensayos.

Evaluación biológica contra *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (Cepa Y).

Se cultivó *T. cruzi* epimastigotes (Cepa Y) en tubos con tapa a rosca a 28 °C en un medio líquido que contiene infusión de cerebro-corazón (37 g/l), clorhidrato de hemina (20 mg/l, disuelto en 50% de trietanolamina) y 10% de suero de ternero neonato. La inoculación inicial contenía $2-3 \times 10^6$ células/ml (determinada en una cámara de Neubauer por conteo) en un volumen final de 1,0 ml. La concentración de células se determinó por la medida de la absorbancia del medio líquido conteniendo los parásitos a 600 nm, se tomó como blanco el medio de cultivo solo. Cada droga se testeó a cuatro concentraciones diferentes (1, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$), cada una por cuadruplicado. Las drogas se disolvieron en etanol. Se hizo un control sin droga para cada grupo que se evaluó.

El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$100 - \frac{(\Delta A_d \times 100)}{\Delta A_c} = \% \text{ Inhibición} \quad .$$

donde ΔA_c y ΔA_d son las diferencias en la absorbancia del cultivo control y de los cultivos tratados con los distintos compuestos, respectivamente, al principio y al final del experimento. La máxima cantidad de solvente utilizado (1% etanol) no tuvo ningún efecto significativo en el crecimiento del parásito. Los valores de IC_{50} se estimaron por una regresión lineal y polinomial.

Evaluación de la actividad biológica contra *Trypanosoma cruzi* amastigotes (Cepa Y).

Se expuso a 2000 rad de radiación γ a un cultivo de mioblastos L₆E₉ ($1,2 \times 10^7$ células/plato) en medio DMEN, el cual contenía 20% de suero fetal bovino en un volumen total de 10 ml. Luego de 24 horas de incubación a 35 °C, las células se expusieron a una suspensión de 5×10^7 trypomastigotes/plato durante 2 horas. El cultivo se lavó dos veces con Dulbecco' PBS y el medio de cultivo se reemplazó para eliminar los trypomastigotes extracelulares. En este momento, se agregó 1.0 μ Ci de [5,6-³H]uracilo/frasco (actividad específica, 40-50 Ci/mmol; NEN Research Products, Boston, MA) junto con diferentes concentraciones de la droga y el cultivo se incubó durante otras 72 horas. Se midió la incorporación de [³H]uracilo, y el porcentaje de inhibición de incorporación de [³H]uracilo se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \left[\frac{(A - B)}{A} \right] \times 100$$

donde *A* es la media de las cuentas por minuto correspondientes a mioblastos infectados control, y *B* es la media de las cuentas por minuto de mioblastos tratados con drogas.

Expresión y purificación de farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS) de *T. cruzi*.

Para la expresión de FPPS comenzó con la transformación de la bacteria *E. Coli* BL21 (DE3) con el vector pETcFPPs. Una vez que la inducción se llevó a cabo, la bacteria transformada se cultivó en un medio de cultivo LB que contenía 50 μ g/ml de kanamicina en condiciones de agitación y a 37 °C. Cuando la A_{600} alcanzó el valor de 0,6, se procedió a la inducción de la bacteria por agregado de 1,0 nM de isopropil β -D-tiogalactósido (IPTG). Luego de 6 horas de crecimiento con agitación a 37 °C, se detuvo el crecimiento colocando el cultivo en hielo durante

15 minutos. Luego se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos, obteniéndose un pelet, el cual se resuspendió en 4,0 ml de una solución 5 nM de imidazol, 500 nM de NaCl, 20 nM Tris-HCl (pH 7.9) que se sometió a sonicación. El extracto resultante se mezcló con una columna de afinidad de níquel-agarosa. La proteína se eluyó siguiendo las indicaciones del kit (Novagen). La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford, utilizando albúmina de suero bovino como estándar, Su pureza se confirmó por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS page).

Determinación de la inhibición de la actividad enzimática hacia FPPS de *T. cruzi* y *T. brucei*.

Una solución de buffer que contiene [10 mM HEPES, pH 7,4), 5 mM de MgCl₂, 2,0 mM de ditioneitol, 4-[¹⁴C]IPP (47 μM, 10 μCi/μmol), 55 μM de GPP o GMAPP y el compuesto a evaluar se precalentó a 37 °C. El ensayo se inició con el agregado de la proteína recombinante (10–20 ng). Se incubó a 37 °C for un período de 30 minutos. La reacción finalizó por el agregado de una solución 6,0 N de HCl (10 μl). La reacción se alcalinizó por agregado de una solución 6 N de NaOH (15 μl). La mezcla se diluyó con agua (475 μl) y se extrajo con hexano (1,0 ml). La fase orgánica se lavó con agua (1,0 ml) y se transfirió a un vial de centelleo para su conteo. La fase orgánica se lavó con H₂O (1,0 ml) y se transfirió posteriormente a un vial. Se agregó solución de centelleo (4,0 ml) y finalmente se realizó la medición correspondiente. Se define como una unidad de actividad enzimática como la actividad requerida para incorporar 1 nmol de [4-¹⁴C]IPP en [14-¹⁴C]FPP en un minuto. Para determinar los valores de IC₅₀ y K_i de cada droga se realizaron dos ensayos independientes. Para cada ensayo se realizaron medidas a 4 o 5 concentraciones diferentes. Estas concentraciones dependían de cada droga en particular. Para el cálculo de K_i se utilizó la ecuación de Dixon.

Preparación de éteres de tetrahidropirano.

Método general

Una solución de fenol (1 equivalente) en dimetilsulfóxido (5 ml) se trató con hidróxido de potasio (4 equivalentes). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se agregó 2-(2-bromoetoxi)-tetrahydro-2H-pirano (1,2 equivalentes) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se particionó entre agua (50 ml) y cloruro de

metileno (50 ml). Se extrajo la fase acuosa con cloruro de metileno (2×30 ml) y se combinaron las fases orgánicas. La fase orgánica resultante se lavó con solución saturada de cloruro de sodio (5×50 ml), se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) según se indica en cada caso.

Preparación de alcoholes.

Método general

A una solución de tetrahidropiranyl éter (1 equivalente) en metanol (30 ml) se agregó *p*-toluensulfonato de piridonio (0,05 equivalentes). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se particionó entre agua (50 ml) y cloruro de metileno (50 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2×30 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio (2×50 ml). La fase orgánica resultante se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) según se indica en cada caso.

Preparación de tosilatos.

Método general

Una solución de alcohol (1 equivalente) en piridina (5 ml) a 0°C se trató con cloruro de *p*-toluenosulfonilo (3 equivalentes). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 4 horas. Luego se agregó una solución acuosa de ácido clorhídrico 5% (50 ml) y se continuó con la agitación durante 1 hora. La mezcla se extrajo con cloruro de metileno (2×40 ml). La fase orgánica resultante se lavó con solución de ácido clorhídrico 5% (3×50 ml), con agua (3×50 ml), se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) según se indica en cada caso.

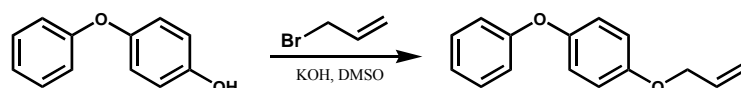
Preparación de tiocianatos.

Método general.

Una solución del tosilato correspondiente (1 equivalente) en *N,N*-dimetilformamida (anhidra) se trató con tiocianato de potasio (4 equivalentes). La mezcla de reacción se agitó a 100°C durante 3 h. Luego, la mezcla se llevó a temperatura ambiente y se particionó entre agua (50 ml) y cloruro de metileno (50 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2×20 ml). Las

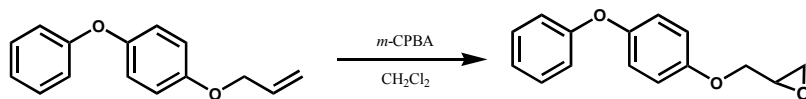
fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio (5 × 50 ml). La fase orgánica resultante se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) según se indica en cada caso.

4-Fenoxifenil Alil Eter (48)



Una solución de 4-fenoxifenol (3,00 g, 16,13 mmol) en dimetilsulfóxido (5 ml) se trató con hidróxido de potasio (3,71 g, 66,25 mmol) y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se agregó bromuro de alilo (1,6 ml, 18,54 mmol) siguiendo el método general descrito para la preparación de tetrahidropiranos. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) eluyendo con una mezcla de hexano–AcOEt (19:1) para dar 2,27 g (63% de rendimiento) de **48** como un aceite incoloro: R_f 0,34 (hexano–AcOEt, 95:5); IR (film, cm⁻¹) 3050, 2950, 1580, 1470, 1200, 1100, 900, 800; RMN ¹H (CDCl₃) δ 4,55 (dd, $J = 5,1, 0,7$ Hz, 2 H, H-1), 5,33 (d, $J = 10,1$ Hz, 1 H, H-3_{cis} al H-2), 5,46 (dd, $J = 17,3, 1,2$ Hz, 1 H, H-3_{trans} al H-2), 6,10 (ddt, $J = 17,3, 10,1, 5,2$ Hz, 1 H, H-2), 6,90-7,37 (m, 9 H, protones aromáticos); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 69,31 (C-1), 115,81 (C-2"), 117,59 (C-3), 117,67 (C-2'), 120,67 (C-3'), 122,45 (C-4"), 129,58 (C-3"), 133,35 (C-2), 150,35 (C-4'), 154,87 (C-1'), 158,42 (C-1"); EM (m/z , intensidad relativa) 226 (26, M⁺), 185 (51), 129 (28), 77 (100).

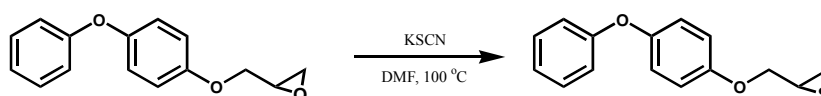
(±)-(2,3-Epoxi-prop-1-il) 4-fenoxifenil éter (49)



A una solución de 4-fenoxifenil alil éter **48** (500 mg, 2,21 mmol) en cloruro de metileno (10 ml) se agregó gota a gota una solución de ácido *m*-cloroperbenzoico (3,29 g, 19,3 mmol) en cloruro de metileno (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se extrajo con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (3 × 10 ml), agua (2 ×

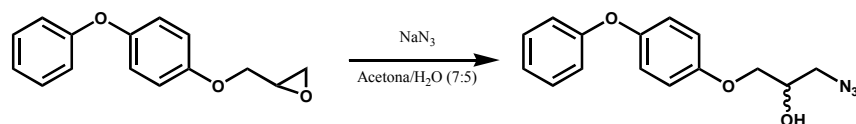
10 ml), se secó (MgSO_4) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando como solvente de elución hexano–AcOEt (19:1) para dar 206,5 mg (39% de rendimiento) del epóxido **49** como un aceite amarillo: R_f 0,41 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3059, 3001, 2924, 1589, 1504, 1489, 1219, 1036, 844, 756, 692, 513; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,77 (dd, $J = 4,9, 2,7$ Hz, 1 H, H-3_a), 2,92 (dd, $J = 4,8, 4,2$ Hz, 1 H, H-3_b), 3,36 (m, 1 H, H-2), 3,96 (dd, $J = 11,1, 5,6$ Hz, 1 H, H-1_a), 4,22 (dd, $J = 11,1, 3,2$ Hz, 1 H, H-1_b), 6,89–7,35 (m, 9 H, protones aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 44,74 (C-3), 50,23 (C-2), 69,45 (C-1), 115,90 (C-2''), 117,85 (C-2'), 120,76 (C-3'), 122,65 (C-4''), 129,69 (C-3''), 154,83 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 242 (M^+ , 100), 186 (72), 77 (72).

(±)-(2,3-Epissulfí-prop-1-il) 4-fenoxifenil éter (**50**)

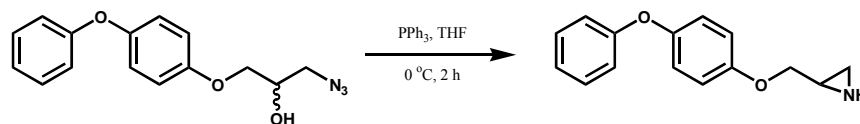


Una solución de epóxido **49** (186 mg, 0,77 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (3 ml) se trató con tiocianato de potasio (500 mg) y se agitó a 100 °C durante 3 horas. La mezcla se llevó a temperatura ambiente y se agregó agua (70 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2 × 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio (5 × 50 ml) y agua (2 × 50 ml). La fase orgánica se secó (MgSO_4) y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 93 mg (47% de rendimiento) de episulfuro **50** como un sólido blanco: R_f 0,38 (hexano–AcOEt, 9:1); mp 60 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3070, 2872, 1593, 1508, 1302, 1244, 1105, 1034, 839, 773, 743, 613; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,33 (dd, $J = 5,2, 1,4$ Hz, 1 H, H-3_a), 2,62 (d, $J = 6,2$ Hz, 1 H, H-3_b), 3,28 (m, 1 H, H-2), 3,92 (dd, $J = 10,2, 6,9$ Hz, 1 H, H-1_a), 4,19 (dd, $J = 10,2, 5,4$ Hz, 1 H, H-1_b), 6,86–7,36 (m, 9 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 23,92 (C-3), 31,44 (C-2), 73,31 (C-1), 115,98 (C-2''), 117,83 (C-2'), 120,78 (C-3'), 122,63 (C-4''), 129,69 (C-3''), 150,85 (C-4'), 154,73 (C-1'), 158,37 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 258 (M^+ , 35), 185 (19), 129 (18), 83 (20), 73 (100).

Anal. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}$: C 69,74, H 5,46; encontrado C 69,55, H 5,45.

(±)-2-Azido-3-[4-fenoxifenoxi]propanol (51)

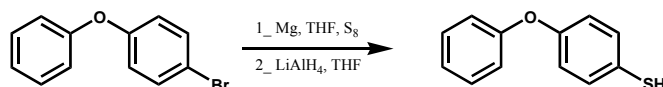
A una solución de azida de sodio (247 mg, 3,8 mmol) en acetona–agua (7:5, 10 ml) se agregó epóxido **49** (200 mg, 0,83 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Luego, se evaporó la acetona y la mezcla se particionó entre agua (50 ml) y cloruro de metileno (50 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2 × 30 ml). La fase orgánica se lavó con agua (2 × 50 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (9:1) como eluyente para dar 194 mg (82% de rendimiento) de **51** como un aceite incoloro: IR (film, cm⁻¹) 3421, 3042, 2928, 2874, 2104, 1589, 1504, 1489, 1221, 1045, 843, 692; RMN ¹H (CDCl₃) δ 2,47 (s, 1 H, OH), 3,55 (m, 2 H, H-1), 4,02 (m, 2 H, H-3), 4,16 (m, 1 H, H-2), 6,87-7,34 (m, 9 H, hidrógenos aromáticos); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 53,4 (C-2), 69,3 (C-1), 69,7 (C-3), 115,7 (C-2''), 117,8 (C-2'), 120,7 (C-3'), 122,7 (C-4''), 129,6 (C-3''), 151,0 (C-4'), 154,4 (C-1'), 158,2 (C-1''); EM (*m/z*, intensidad relativa) 285 (M⁺, 48), 228 (7), 186 (73), 77 (100); EMAR Calculado para C₁₅H₁₅O₃N₃: 285,1113; encontrado 285,1121.

4-Fenoxifenoximetil Aziridina (52)

Una solución de azidoalcohol **51** (100 mg, 0,35 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10,0 ml) se trató con trifenilfosfina (92 mg, 0,35 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se evaporó el solvente y el residuo se adsorbió sobre silica gel y se purificó por columna cromatográfica (silica gel) usando hexano–AcOEt (7:3) como eluyente para dar 64 mg (72% de rendimiento) de la aziridina **52** como un sólido blanco: pf 88–90 °C; IR (KBr, cm⁻¹) 3360, 3294, 1589, 1508, 1292, 1242, 1194, 814, 741, 691; RMN ¹H

(CDCl₃) δ 2,99 (m, 4 H, H-1, H-2, NH), 3,96 (m, 2 H, H-3), 6,87-7,32 (m, 9 H, hidrógenos aromáticos); RMN ¹³C (CD₃OD-CDCl₃) δ 43,8 (C-1), 69,8 (C-2), 70,4 (C-3), 115,4 (C-2''), 117,5 (C-2'), 120,5 (C-3'), 122,4 (C-4''), 129,4 (C-3''), 150,4 (C-4'), 154,7 (C-1'), 158,1 (C-1''); EMAR Calculado para C₁₅H₁₅O₂N: 241,1103; encontrado 241,1098.

4-Fenoxitiofenol (54)

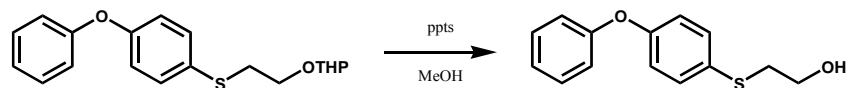


Una solución de 4-bromofenil feniléter (2,00 g, 8,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) se trató con magnesio metálico (297 mg, 12,2 mmol) y una cantidad catalítica de yodo (30 mg). La mezcla se calentó a reflujo durante 15 minutos bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se continuó agitando durante 2 horas. La solución grisácea resultante se trató con azufre (3,125 g) y la mezcla se agitó durante 3 horas. Luego, se enfrió a 0 °C y se agregó hidruro de litio y aluminio (1,00 g) en pequeñas porciones y se continuó agitando durante 30 minutos. La reacción finalizó por el agregado de acetato de etilo (2 ml) y la mezcla se particionó entre cloruro de metileno (70 ml) y una solución acuosa saturada de tartrato de sodio y potasio (100 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2 × 50 ml) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 × 100 ml). La fase orgánica resultante se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (50:1) como eluyente para dar 1,61 g (100% de rendimiento) de **54** como un jarabe: *R_f* 0,71 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm⁻¹) 3447, 3063, 3038, 2567, 1490, 1242, 1170, 828, 760, 690; RMN ¹H (CDCl₃) δ 3,36 (s, 1 H, SH), 6,85 (d, *J* = 8,7 Hz, 2 H, H-3), 6,91-7,50 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos), 7,21 (d, *J* = 8,7 Hz, 2 H, H-2); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 118,70 (C-2'), 119,55 (C-3), 123,28 (C-4'), 129,68 (C-2, C-3'), 132,55 (C-1), 155,75 (C-4), 156,97 (C-1').

2-(4-Fenoxifeniltio)etil Tetrahidro-2H-piran-2-il Eter (55)

Una solución de tiofenol **54** (1,046 g, 5,2 mmol) en dimetil sulfóxido (5,0 ml) se trató con hidróxido de potasio (1,165 g, 20,4 mmol) y bromoetil tetrahidropiraniléter (1,30 g, 6,2 mmol) de acuerdo al procedimiento general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) usando una mezcla de hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 739 mg (43% de rendimiento) del compuesto **55** como un líquido incoloro: R_f 0,49 (hexano–AcOEt, 17:3); IR (film, cm^{-1}) 2942, 2877, 1590, 1498, 1354, 1238, 1122, 1032, 974, 870; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,52-1,86 (m, 6 H, H-3''', H-4''', H-5'''), 3,09 (t, $J = 6,8$ Hz, 2 H, H-2), 3,50 (m, 1 H, H-6'''_a), 3,64 (m, 1 H, H-6'''_b), 3,73-4,03 (m, 2 H, H-1), 4,61 (dist t, $J = 3,2$ Hz, 1 H, H-2'''), 6,92 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-3'), 6,91-7,39 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos) 7,37 (d, $J = 8,7$ Hz, 2 H, H-2''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,37 (C-4'''), 25,37 (C-5'''), 30,51 (C-3'''), 34,76 (C-2), 62,18 (C-6'''), 66,43 (C-1), 98,87 (C-2'''), 118,91 (C-2''), 119,26 (C-3'), 123,42 (C-4''), 129,74 (C-2', C-3''), 132,28 (C-1'), 156,32 (C-4'), 156,94 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 330 (M^+ , 1), 250 (19), 248 (20), 141 (20), 85 (100); EMAR Calculado para ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{S}$) 330,1290; encontrado 330,1289.

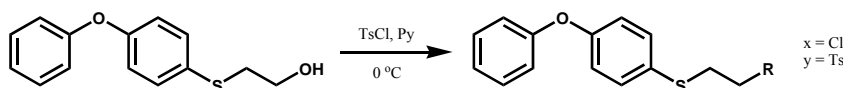
Anal. Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{S}$: C 69,06, H 6,71; encontrado C 69,37, H 6,96.

2-(4-Fenoxifeniltio)etanol (56)

Una solución de compuesto **55** (720 mg, 2,2 mmol) en metanol (30 ml) se trató con *p*-toluensulfonato de piridonio (30 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 h de acuerdo al procedimiento general. La evaporación del solvente dio lugar a 420 mg (78% de rendimiento) de alcohol **56** como un aceite incoloro que se usó como tal en la siguiente etapa de reacción: R_f 0,14 (hexano–AcOEt, 17:3); IR (film, cm^{-1}) 3385, 3063, 2947, 2878, 1582, 1483, 1238, 1167, 1045, 756, 692; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,21 (s ancho, 1 H, -OH), 3,06 (t, $J = 6,0$

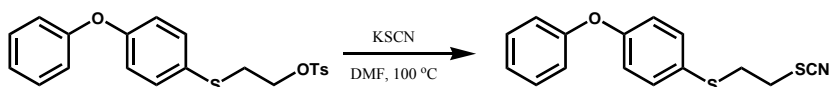
Hz, 2 H, H-2), 3,73 (t, $J = 6,0$ Hz, 2 H, H-1), 6,95 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-3'), 6,94-7,36 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos), 7,40 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-2'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 38,51 (C-2), 60,23 (C-1), 119,07 (C-2''), 119,23 (C-3'), 123,61 (C-4''), 129,78 (C-2'), 133,09 (C-3''), 135,39 (C-1'), 156,68 (C-4'), 156,86 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 246 (M^+ , 100), 215 (43), 202 (14), 181 (25), 77 (50).

2-(4-Phenoxyphenylthio)ethyl 4-Toluenesulfonate (57); 2-(4-Phenoxyphenylthio)ethyl chloride (58)



Una solución de alcohol **57** (400 mg, 1,6 mmol) en piridina (5 ml) a 0 °C se trató con cloruro de *p*-toluenesulfonilo (389 mg, 5,0 mmol) con agregados en pequeñas porciones. Luego del procedimiento habitual el producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando una mezcla de hexano–AcOEt (17:1) como eluyente para dar 550 mg (85% de rendimiento) de tosilato **57** y 39 mg de cloruro **58** como aceites incoloros. Compuesto **57**: R_f 0,68 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 2939, 2870, 1584, 1484, 1238, 1132, 1032, 868, 756, 692; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,44 (s, 3 H, *Me*), 2,93 (t, $J = 7,1$ Hz, 1 H, H-2), 4,25 (t, $J = 7,0$ Hz, 2 H, H-1), 6,93 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-3'), 7,00-7,40 (m, 8 H, hidrógenos aromáticos), 7,42 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-2'), 7,78 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H, H-2''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 21,59 (Ph), 33,81 (C-2), 67,94 (C-1), 119,19 (C-2'', C-3'), 123,71 (C-4''), 127,91 (C-2''), 129,85 (C-3'', C-3'''), 133,45 (C-1', C-4'''), 133,66 (C-2'), 144,90 (C-1'''), 156,57 (C-4'), 157,27 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 400 (M^+ , 18), 278 (20), 201 (73), 77 (100). Compuesto **58**: RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,14 (m, 2 H, H-2), 3,60 (m, 2 H, H-2), 6,94 (d, $J = 8,7$ Hz, 2 H, H-3'), 6,93-7,40 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos), 7,39 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-2'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 37,53 (C-2), 42,34 (C-1), 119,24 (C-2'')*, 119,28 (C-3'')*, 123,79 (C-4''), 133,01 (C-1'), 133,70 (C-2'), 156,56 (C-4'), 157,40 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 266 (M^+ , 37), 264 (M^+ , 100), 215 (27), 201 (34), 108 (10), 129 (18), 181 (12), 77 (77).

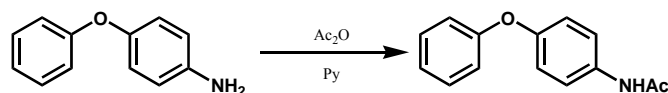
Tiocianato de 2-(4-Fenoxifeniltio)etilo (59)



Una solución de tosilato **57** (530 mg, 1,3 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (5 ml) se trató con tiocianato de potasio (520 mg, 5,4 mmol) de acuerdo al procedimiento general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando una mezcla de hexano–AcOEt (24:1) como eluyente para dar 380 mg (100% de rendimiento) de tiocianato **59** como un aceite amarillo pálido: R_f 0,58 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3061, 2924, 2853, 2154, 1582, 1485, 1240, 1167, 868, 756, 692; RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 3,08 (m, 2 H, H-1), 3,20 (m, 2 H, H-2), 6,96 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-3'), 6,97-7,42 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos), 7,40 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-2'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 33,26 (C-1), 35,44 (C-2), 111,57 (SCN), 119,23 (C-2''), 119,42 (C-3'), 123,93 (C-4''), 129,87 (C-3''), 132,98 (C-1'), 134,05 (C-2'), 156,34 (C-4'), 157,80 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 287 (M^+ , 83), 274 (3), 215 (20), 201 (96), 77 (100); EMAR Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ONS}_2$: 287,0439, encontrado 287,0441.

Anal. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ONS}_2$: C 62,69, H 4,56; encontrado C 62,69, H 4,67.

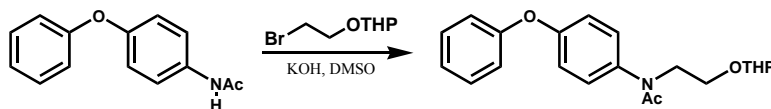
***N*-(4-Fenoxifenil) acetamida (62)**



Una solución de 4-fenoxianilina (**60**; 2,00 g, 10,8 mmol) en piridina anhidra (3 ml) se trató con anhídrido acético (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Luego, se agregó una solución acuosa de ácido clorhídrico 5% (20 ml) y agitó la mezcla durante 1 hora. La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2×50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa de ácido clorhídrico 5% (3×50 ml) y agua (2×50 ml). La fase orgánica se secó (MgSO_4), se filtró, y se evaporó el solvente para dar 2,408 g (98% de rendimiento) de la amida **62** como un sólido marrón: pf 128–129 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3290, 3258, 3194, 3136, 3067, 1661, 1607, 1549, 1549, 1506, 1489, 1406, 1373, 1315, 1244, 856, 831, 754, 691; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,15 (s, 3 H, COCH_3), 6,96 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-3), 6,95-7,35 (m, 5 H, protones aromáticos), 7,45 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 24,15 (MeCO), 118,37

(C-2'), 119,40 (C-), 121,96 (C-4'), 123,03 (C-2), 129,66 (C-3') 133,55 (C-1), 153,43 (C-4), 157,43 (C-1'), 168,96 (CO); EM (m/z , intensidad relativa) 227 (M^+ , 66), 185 (100), 156 (11), 108 (75).

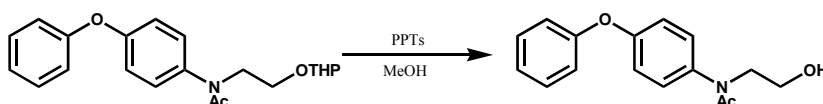
N-Acetil, *N*-(4-Fenoxifenil)aminoetil Tetrahidro-2*H*-piran-2-il Eter (**63**)



Una solución del acetato **62** (3,405 g, 15 mmol) en dimetilsulfóxido (5 ml) se trató con hidróxido de potasio (1,70 g, 30 mmol). La mezcla se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó tetrahidropiranyl bromoetil éter (3,923 g, 15,75 mmol) siguiendo el método general para la preparación de tetrahidropiranyléteres. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando como solvente de elución hexano–AcOEt (7:3) para dar 4,801 g (90% de rendimiento) de **63** como un aceite amarillo: IR (film, cm^{-1}) 3292, 3065, 2941, 2870, 1663, 1506, 1489, 1406, 1240, 1072, 1036, 872, 754, 692; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,52-1,89 (m, 6 H, H-3''', H-4''', H-5'''), 1,87 (s, 3 H, COCH_3), 3,53 (m, 1 H, H-6'''_a), 3,63 (m, 1 H, H-6'''_b), 3,60-4,00 (m, 4 H, H-1, H-2), 4,56 (m, 1 H, H-2'''), 6,95-7,41 (m, 9 H, protones aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,37 (C-4'''), 22,73 (COCH_3), 25,34 (C-5'''), 30,51 (C-3'''), 48,92 (C-2), 62,17 (C-6'''), 64,49 (C-1), 98,64 (C-2'''), 119,02 (C-2''), 119,30 (C-3'), 121,56 (C-2'), 123,86 (C-4''), 129,85 (C-3''), 138,07 (C-1'), 156,32 (C-4'), 156,89 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 355 (M^+ , 5), 254 (10), 227 (89), 198 (20), 185 (100), 108 (65), 43 (77); EMAR calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{N}$: 355,1799; encontrado 355,1791.

Anal. Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{N}$: C 70,96, H 7,09; encontrado C 70,76, H 6,87.

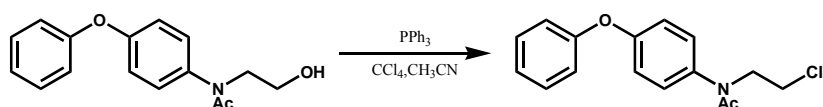
N-Acetil, *N*-(4-Fenoxifenil)aminoetanol (**64**)



Una solución de **63** (3,834 g, 10,8 mmol) en metanol (100 ml) se trató con 4-toluenosulfonato de piridonio (200 mg) siguiendo el método general para la preparación de

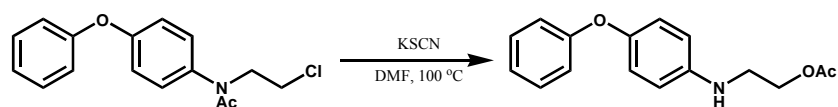
alcoholes. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando hexano–AcOEt (7:3) como solvente de elución para dar 2,155 g (73% de rendimiento) de alcohol **64** como un sólido blanco. Se recuperaron 900 mg de producto de partida: pf 90–92 °C; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,89 (s, 3 H, COCH_3), 3,40 (dist t, $J = 4,9$ Hz, 1 H, OH), 3,78 (dist t, $J = 4,8$ Hz, 2 H, H-2), 3,83 (m, 2 H, H-1), 6,99 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-3'), 7,02-7,07 (m, 3 H, hidrógenos aromáticos), 7,18 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-2'), 7,33-7,37 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 22,58 (MeCO), 52,38 (C-2), 60,94 (C-1), 119,15 (C-2''), 119,39 (C-3'), 123,97 (C-4''), 129,15, 129,85 (C-3''), 137,92 (C-1'), 156,21 (C-4'), 157,17 (C-1''), 172,54 (CO); EM (m/z , intensidad relativa) 271 (M^+ , 21), 227 (8), 198 (100), 43 (85).

N-Acetil-(4-Fenoxifenil)-2-cloroetilamina (66)



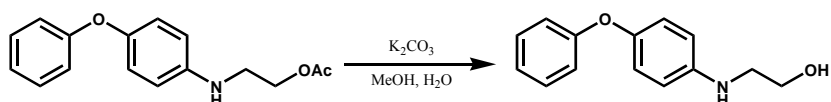
A una solución de trifenilfosfina (900 mg, 3,4 mmol) en una mezcla de tetracloruro de carbono–acetonitrilo (4:1; 25 ml) se agregó el alcohol **64** (650 mg, 2,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Se evaporó el solvente y el residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) eluyendo con una mezcla de hexano–AcOEt (7:3) para dar 355 mg (51% de rendimiento) de cloruro **66** como un aceite amarillo pálido: R_f 0,52 (hexano–AcOEt, 1:1); RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,88 (s, 3 H, C(O)CH_3), 3,64 (t, $J = 6,5$ Hz, H-2), 3,99 (d, $J = 6,5$ Hz, H-1), 6,99-7,42 (m, 9 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 20,87 (C(O)CH_3), 50,35 (C-2), 58,06 (C-1), 119,35 (C-2''), 119,62 (C-3'), 124,38 (C-4''), 124,70 (C-2'), 130,04 (C-3''), 141,15 (C-1'), 158,29 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 291 (M^+ , 2), 289 (M^+ , 6), 271 (20), 247 (5), 211 (10), 198 (100).

Acetato de (4-Fenoxifenil) aminoetilo (67)

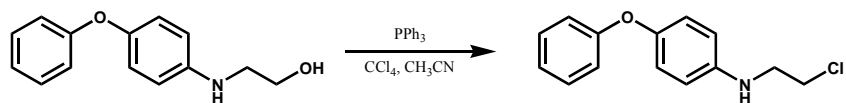


Una solución de **66** (154 mg, 0,53 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (3 ml) se trató con tiocianato de potasio (500 mg, 5,1 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 6 h siguiendo el método general para la preparación de tiocianatos. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 130 mg (95% de rendimiento) de acetato **67** como un aceite incoloro: R_f 0,56 (hexano–AcOEt, 7:3); RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,08 (s, 3 H, CH_3CO), 3,38 (t, $J = 5,5$ Hz, 2 H, H-2), 4,23 (t, $J = 5,5$ Hz, 2 H, H-1), 6,63 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-2'), 6,91 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-3'), 6,89-7,03 (m, 3 H, hidrógenos aromáticos), 7,23-7,31 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 20,73 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 43,39 (C-2), 63,09 (C-1), 113,90 (C-2'), 117,10 (C-2''), 121,13 (C-3'), 121,93 (C-4''), 129,42 (C-3''), 144,21 (C-1'), 148,05 (C-4'), 158,91 (C-1''), 170,93 (CO); EM (m/z , intensidad relativa) 271 (M^+ , 24), 211 (13), 198 (100).

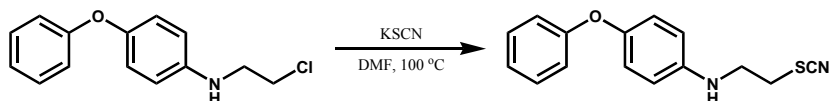
2-[(4-Fenoxifenil)amino]etanol (**68**)



Una solución de acetato **67** (250 mg, 0,93 mmol) en metanol–agua (10:3; 13ml) se trató con carbonato de potasio. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se particionó en agua (50 ml) y cloruro de metileno (70 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2×50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (3×70 ml), se secaron (MgSO_4), se filtraron y se evaporó el solvente para dar 200 mg (87% de rendimiento) de aminoalcohol **68** como un sólido blanco: R_f 0,24 (hexano–AcOEt, 7:3); RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,37 (s ancho, 1 H, OH), 3,26 (t, $J = 5,2$ Hz, 2 H, H-2), 3,81 (t, $J = 5,2$ Hz, 2 H, H-1), 6,63 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-2'), 6,83-7,03 (m, 3 H, hidrógenos aromáticos), 6,90 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-3'), 7,26 (t, $J = 7,8$ Hz, 2 H, H-3''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 46,66 (C-2), 61,20 (C-1), 114,29 (C-2'), 117,17 (C-2''), 121,14 (C-3'), 122,00 (C-4''), 129,46 (C-3''), 144,70 (C-1'), 148,11 (C-4'), 158,91 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 229 (M^+ , 29), 198 (100).

2-Cloroetil (4-Fenoxietil)amina (69)

A una solución de trifenilfosfina (400 mg, 1,5 mmol) en una mezcla de tetracloruro de carbono–acetonitrilo (4:1; 25 ml) se agregó el aminoalcohol **68** (200 mg, 0,87 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 26 horas. Se evaporó el solvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como eluyente para dar 152 mg (70% de rendimiento) del compuesto **69** como un aceite incoloro: IR (film, cm^{-1}) 2957, 2835, 1589, 1508, 1489, 1233, 868, 835, 754, 692; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,46 (t, $J = 5,8$ Hz, 2 H, H-2), 3,70 (t, $J = 5,8$ Hz, 2 H, H-1), 6,62 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-2'), 6,87-7,04 (m, 3 H, hidrógenos aromáticos), 6,91 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-3'), 7,22-7,32 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 43,47 (C-1), 46,03 (C-2), 114,35 (C-2'), 117,26 (C-2''), 121,18 (C-3'), 122,07 (C-4''), 129,48 (C-3''), 143,58 (C-1'), 148,42 (C-4'), 158,85 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 249 (M^+ , 10), 247 (M^+ , 31), 198 (100).

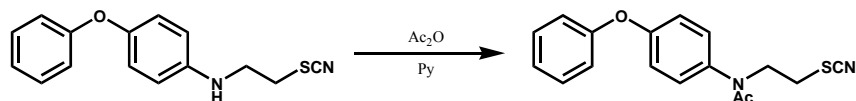
Tiocianato de 4-Fenoxifenilaminoetilo (70)

Una solución de compuesto **68** (150 mg, 0,6 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (3 ml) se trató con tiocianato de potasio (200 mg, 2,1 mmol) siguiendo el método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 63 mg (39% de rendimiento) de **70** como un sólido blanco y 72 mg de cloruro **68** recuperado: R_f 0,09 (AcOEt); IR (KBr, cm^{-1}) 2918, 2851, 2156, 1491, 1244, 1171, 1094, 1032, 827, 667; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,26 (t, $J = 6,7$ Hz, 2 H, H-1), 4,04 (t, $J = 6,7$ Hz, 2 H, H-2), 7,01 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-2'), 7,02-7,32 (m, 5 H hidrógenos aromáticos), 7,34 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 26,83 (C-1), 54,39 (C-2), 118,75 (C-2''), 119,32 (C-3'), 123,27 (C-4''), 125,19 (C-2'), 129,66 (C-3''), 135,72 (C-1'), 154,45 (C-4'), 157,05 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa)

270 (M^+ , 100), 243 (4), 215 (9), 210 (10), 198 (16), 84 (74); EMAR calculado para $(C_{15}H_{14}ON_2S)$ 270,0826; encontrado 270,0827.

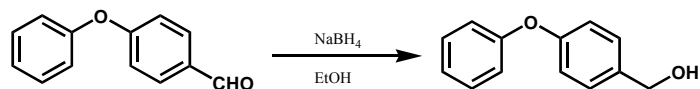
Anal. Calculado para $C_{15}H_{14}ON_2S \cdot H_2O$: C 62,48, H 5,59; encontrado C 62,88, H 5,60.

***N*-Acetil-(4-fenoxifenil)-2-tiocianoetilamina (71)**



A una solución de compuesto **70** (30 mg, 0,11 mmol) en piridina (3 ml) se agregó anhídrido acético (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Luego se agregó una solución acuosa de ácido clorhídrico 5% (20 ml) y se agitó durante 1 h más. La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2 × 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa de ácido clorhídrico 5% (3 × 50 ml) y agua (2 × 50 ml), se secaron ($MgSO_4$), se filtraron y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (4:1) como eluyente para dar 28 mg (82% de rendimiento) de **71** como un aceite incoloro: R_f 0,55 (AcOEt); RMN 1H ($CDCl_3$) δ 1,89 (s, 3 H, $C(O)CH_3$), 3,20 (t, $J = 6,9$ Hz, 2 H, H-2), 4,03 (t, $J = 6,8$ Hz, 2 H, H-1), 7,02-7,43 (m, 9 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ 26,84 (C-1), 27,41 ($C(O)CH_3$), 52,53 (C-2), 118,67 (C-2''), 119,33 (C-3'), 123,75 (C-4''), 126,03 (C-2'), 129,85 (C-3''), 155,70 (C-4'), 156,68 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 312 (M^+ , 17), 297 (7), 270 (10), 198 (90), 43 (100); EMAR calculado para $C_{17}H_{16}O_2N_2S$: 312,0933; encontrado 312,0929.

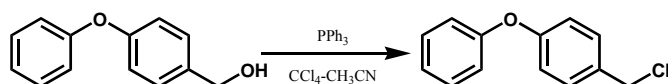
4-Fenoxifenilmetanol (73)



Una solución de 4-fenoxibenzaldehído (1,00 g, 5,2 mmol) en etanol absoluto (20 ml) se trató con borohidruro de sodio (210 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego se agregó cuidadosamente una solución acuosa de ácido clorhídrico 5% (2

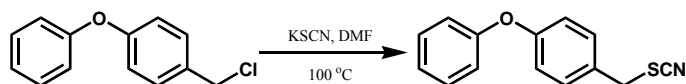
ml) y la mezcla se particionó entre agua (50 ml) y cloruro de metileno (70 ml). La fase orgánica se lavó con solución saturada de cloruro de sodio (3×50 ml), se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el solvente para dar 876 mg (84% de rendimiento) del alcohol **73** como un sólido blanco: pf 94–96 °C; R_f 0,61 (hexano–AcOEt, 3:2); IR (KBr, cm^{-1}) 3358, 3059, 2930, 2881, 1590, 1526, 1489, 1245, 1005, 845, 697; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,79 (s, 1 H, -OH), 4,65 (s, 2 H, PHCH_2), 6,99 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, H-3'), 7,00 (d, $J = 8,7$ Hz, 2 H, H-2''), 7,05-7,13 (m, 1 H, H-4''), 7,31 (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H, H-2'), 7,32 (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H, H-3''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 64,84 (PhCH_2), 118,83 (C-3'), 118,91 (C-2''), 123,26 (C-4''), 128,63 (C-1', C-3''), 135,73 (C-2'), 156,81 (C-4'), 157,20 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 200 (M^+ , 100), 183 (18), 171 (19), 153 (21), 107 (44), 94 (54), 77 (66).

4-Fenoxifenilclorometano (**74**)



A una solución de trifetilfosfina (450 mg, 1,71 mmol) en tetracloruro de carbono–acetonitrilo (1:1, 20 ml) se agregó alcohol **73** (314 mg, 1,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El solvente se evaporó y el residuo se suspendió en hexano (50 ml), se filtró y se evaporó el solvente. El cloruro **74** resultó inestable y se usó como tal en el siguiente paso de reacción: RMN ^1H (CDCl_3) δ 4,58 (s, 2 H, PHCH_2), 6,90-7,40 (m, 9 H, hidrógenos aromáticos).

Tiocianato de 4-fenoxifenilmetilo. (**75**)

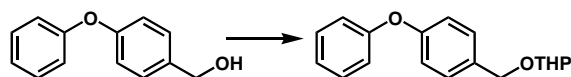


Una solución del compuesto **74** en *N,N*-dimetilformamida anhidra (5 ml) se trató con tiocianato de potasio (500 mg, 5,1 mmol). La mezcla se agitó a 100 °C durante 3 h. Luego, la mezcla se llevó a temperatura ambiente y se particionó entre agua (50 ml) y cloruro de metileno (50 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2×20 ml). Las fases orgánicas

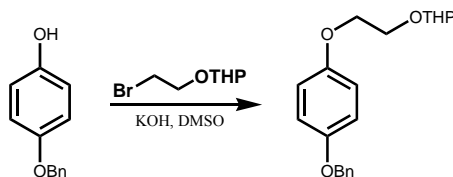
combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio (5×50 ml), se secaron (MgSO_4) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por cromatografía en columna (silica gel) empleando como solvente de elución hexano–AcOEt (9:1) para dar 50 mg (13% de rendimiento) de **75** como un sólido amarillo pálido: pf 52–53 °C; IR (film, cm^{-1}) 3056, 2995, 2933, 2154, 1595, 1516, 1493, 1460, 1430, 1239, 1110, 1076; RMN ^1H (CDCl_3) δ 4,15 (s, 2 H, H-1), 6,97-7,39 (m, 9 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 38,01 (C-1), 118,86 (C-3'), 119,45 (C-2''), 123,88 (C-4''), 128,67 (C-1'), 129,87 (C-3''), 130,50 (C-2'), 156,38 (C-4'), 158,15 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 241 (M^+ , 4), 183 (100), 155 (10), 91 (22), 77 (40); EMAR Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ONS}$ 241,0561; encontrado 241,0569.

Anal. Calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ONS}$.0,1 C_6H_{14} : C 70,17, H 5,00, N 5,60, S 12,83; encontrado C 70,40, H 4,81, N 5,49, S 13,14.

(±)-4-Fenoxifenilmetil Tetrahidro-2H-piran-2-il Eter (**76**)

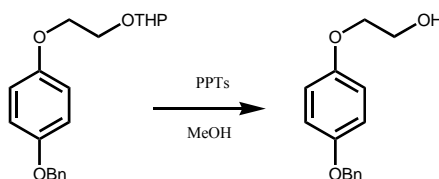


Una solución de alcohol **73** (158 mg, 0,79 mmol) en cloruro de metileno anhidro (50 ml) se trató con 3,4-dihidro-2H-pirano (1 ml) en presencia de 4-toluenesulfonato de piridonio (20 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La fase orgánica se lavó con agua (3×50 ml), se secó (MgSO_4) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano-EtOAc (19:1) como solvente de elución para dar 224 mg (100% de rendimiento) del compuesto **76** como un aceite incoloro: R_f 0.41 (hexano-EtOAc, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 2943, 2869, 1589, 1508, 1489, 1238, 1134, 1038, 871, 692; NMR ^1H (CDCl_3) δ 1,56-1,88 (m, 6 H, H-3''', H-4''', H-5'''), 3,51-3,59 (m, 1 H, H-6'''_a), 3,87-3,96 (m, 1 H, H-6'''_b), 4,46 (d, $J = 11,8$ Hz, 1 H, H-1_a), 4,72 (dist t, $J = 3,4$ Hz, 1 H, H-2'''), 4,75 (d, $J = 11,9$ Hz, 1 H, H-1_b); NMR ^{13}C (CDCl_3) δ 19,34 (C-4'''), 25,47 (C-5'''), 30,57 (C-3'''), 62,13 (C-6'''), 68,38 (C-1), 97,73 (C-2'''), 118,76 (C-3'), 118,79 (C-2''), 123,16 (C-4''), 129,42 (C-1'), 129,67 (C-3''), 133,18 (C-2'), 156,69 (C-4'), 157,29 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 284 (M^+ , 37), 183 (100), 85 (72).

2-(4-Benciloxifenoxi)etil Tetrahidro-2H-piran-2-il Eter (78)

Una solución de 4-benciloxifenol (**77**; 2,00 g, 9,9 mmol) en dimetilsulfóxido (5 ml) se trató con bromoetil tetrahidropirani éter siguiendo el método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (4:1) como solvente de elución para dar 1,786 g (55% de rendimiento) de **78** como un aceite incoloro: R_f 0,39 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3051, 2943, 2872, 1508, 1454, 1231, 1034, 826, 737, 525; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,53–1,87 (m, 6 H, H-3''', H-4''', H-5'''), 3,51 (m, 1 H, H-6'''a), 3,46–4,00 (m, 3 H, H-6'''a H-2), 4,03–4,12 (m, 2 H, H-1), 4,67 (dist t, $J = 3,3$ Hz, 1 H, H-2'''), 5,00 (s, 2 H, PhCH_2O), 6,87 (m AB, 4 H, hidrógenos aromáticos), 7,24–7,42 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,32 (C-4'''), 25,39 (C-5'''), 30,48 (C-3'''), 62,11 (C-6'''), 65,89 (C-1), 68,08 (C-2), 70,65 (PhCH_2), 98,91 (C-2'''), 115,76 (C-2' y C-3'), 127,39 (C-4'''), 127,78 (C-2'''), 128,46 (C-3'''), 137,29 (C-1'''), 153,07 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 328 (M^+ , 20), 129 (77), 91 (99), 85 (100).

Anal. Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$: C 73,15, H 7,37; encontrado C 72,89, H 7,46.

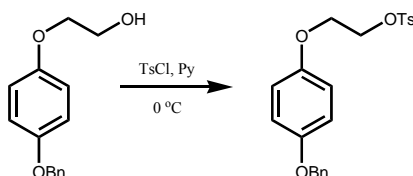
2-(4-Benciloxifenil)etanol (79)

Una solución de compuesto **78** (1,496 g, 4,6 mmol) en metanol (30 ml) se trató con *p*-toluenosulfonato de piridonio (30 mg) siguiendo el método general para la preparación de alcoholes. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (7:3) como solvente de elución para dar 919 mg (82% de rendimiento) de alcohol **79** como un sólido blanco: R_f 0,10 (hexano–AcOEt, 4:1); pf 103 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3491, 2961, 2914, 1612,

1512, 1454, 1250, 1055, 903, 802, 729, 698, 604; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,20 (s, 1 H, OH), 3,92 (m, 2 H, H-1), 4,01 (m, 2 H, H-2), 5,00 (s, 2 H, PhCH_2O), 6,87 (m AB, 4 H, H-2' y H-3'), 7,27-7,43 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 61,53 (C-1), 69,89 (C-2), 70,70 (PhCH_2O), 115,93 (C-2' y C-3'), 127,42 (C-4''), 127,86 (C-2''), 128,51 (C-3''), 137,23 (C-1''), 153,00 (C-4'), 153,33 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 244 (M^+ , 55), 153 (21), 109 (63), 91 (100).

Anal. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_3$: C 73,74, H 6,61; encontrado C 73,67, H 6,83.

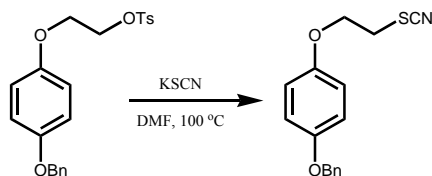
4-Toluensulfonato de 2-(4-benciloxifenil)etilo (80)



Una solución de alcohol **79** (909 mg, 3,72 mmol) en piridina anhidra (3 ml) se trató con cloruro de *p*-toluensulfonilo siguiendo el método general para la preparación de toluensulfonatos. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 1,217 g (82% de rendimiento) de tosilato **80** como un sólido blanco: R_f 0,74 (hexano–AcOEt, 8:2); pf 90–92°C; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,44 (s 3 H, Me), 4,10 (m, 2 H, H-2), 4,34 (m, 2 H, H-1), 5,00 (s, 2 H, PhCH_2O), 6,72 (d, $J = 9,2$ Hz, 2 H, H-2'), 6,87 (d, $J = 9,2$ Hz, 2 H, H-3'), 7,26-7,40 (m, 8 H, hidrógenos aromáticos), 7,81 (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H, H-2''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 21,56 (Me), 66,22 (C-1), 68,23 (C-2), 70,62 (PhCH_2O), 115,79 (C-2' and C-3'), 127,39 (C-4''), 127,85 (C-2''), 127,94 (C-2'''), 128,49 (C-3''), 129,79 (C-3'''), 132,93 (C-4'''), 137,15 (C-1''), 144,84 (C-1'''), 152,34 (C-4'), 153,47 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 398 (M^+ , 14), 199 (41), 155 (16), 91 (100).

Anal. Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{S}$: C 66,31, H 5,56; encontrado C 66,75, H 5,56.

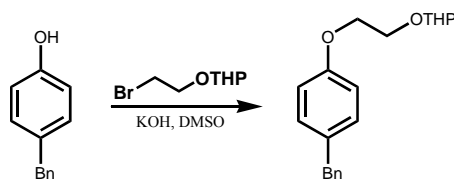
Tiocianato de 2-(4-benciloxifenil)etilo (81)



Una solución de **80** (500 mg, 1,26 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (5 ml) se trató con tiocianato de potasio siguiendo el método general para la preparación de tiocianatos. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano-CH₂Cl₂ (7:3) como solvente de elución para dar 251 mg (70% de rendimiento) de tiocianato **81** como un sólido blanco: *R_f* 0,33 (hexano-AcOEt, 1:1); pf 78°C; IR (KBr, cm⁻¹) 2928, 2882, 2156, 1516, 1464, 1402, 1296, 1242, 1045, 833, 737, 694; RMN ¹H (CDCl₃) δ 3,30 (t, *J* = 5,9 Hz, 2 H, H-1); 4,26 (t, *J* = 5,9 Hz, 2 H, H-2), 5,02 (s, 2 H, PhCH₂O), 6,89 (mAB, 4 H, H-2', H-3'), 7,31–7,44 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 33,26 (C-1), 66,55 (C-2), 70,57 (PhCH₂O), 115,51 (C-2'),* 115,89 (C-3'),* 127,34 (C-2''), 127,82 (C-4''), 128,45 (C-3'''), 137,03 (C-1'''), 152,04 (C-4'), 153,69 (C-1'); EM (*m/z*, intensidad relativa) 285 (M⁺, 70), 186 (64), 185 (48), 129 (25), 77 (100).

Anal. Calculado para C₁₆H₁₅O₂NS: C 67,35, H 5,30, N 4,91; encontrado C 67,57, H 5,27, N 4,95.

2-(4-Bencilfenoxi)etil Tetrahidro-2*H*-piran-2-il Eter (**83**)

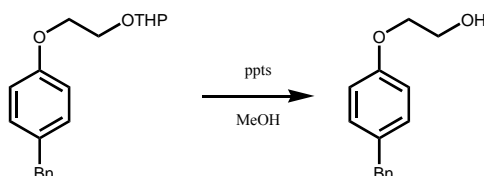


Una solución de 4-bencilfenol (867 mg, 4,7 mmol) se trató con hidróxido de potasio (655 mg, 11,7 mmol) y bromoetil tetrahidropiranyl éter (1,360 g, 6,5 mmol) siguiendo el método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano-AcOEt (19:1) como eluyente para dar 966 mg (65% de rendimiento) de compuesto **83** como un aceite incoloro: *R_f* 0,24 (hexano-AcOEt, 19:1); IR (film, cm⁻¹) 3028, 2941, 2872, 1612, 1510, 1454, 1246, 1126, 1034, 729, 698; RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,54-1,80 (m, 6 H, H-3''', H-4''', H-5'''), 3,54 (m, 1 H, H-6'''_a), 3,77-4,02 (m, 3 H, H-6'''_b, H-2), 3,91 (s, 2 H, PhCH₂), 4,04-4,15 (m, 2 H, H-1), 4,69 (dist t, *J* = 3,3 Hz, 1 H, H-2'''), 6,85 (d, *J* = 8,6 Hz, 2 H, H-2'), 7,08 (d, *J* = 8,6 Hz, 2 H, H-3'), 7,14-7,25 (m, 5 H,

hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,30 (C-4'''), 25,39 (C-5'''), 30,46 (C-3'''), 40,99 (PhCH₂), 62,07 (C-6'''), 65,80 (C-1), 67,42 (C-2), 98,88 (C-2'''), 114,69 (C-2'), 125,89 (C-4''), 128,34 (C-2''), 128,75 (C-3''), 129,75 (C-3'), 133,36 (C-4'), 141,51 (C-1''), 157,28 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 318 (M^+ , 18), 184 (23), 129 (81), 85 (100).

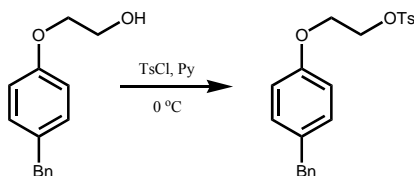
Anal. Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_3$: C 76,89, H 7,74; encontrado C 76,50, H 8,02.

2-(4-Bencilfenoxi)etanol (**84**)



Una solución de **83** (966 mg, 3,04 mmol) en metanol (30 ml) se trató con *p*-toluenosulfonato de piridonio siguiendo el método general. Se obtuvieron 536 mg (77% de rendimiento) de alcohol **84** como un sólido blanco. El alcohol se utilizó como tal en la siguiente etapa de reacción: R_f 0,11 (hexano–AcOEt, 4:1); pf 64–65°C; IR (KBr, cm^{-1}) 3491, 2961, 2914, 1612, 1512, 1454, 1250, 1055, 903, 802, 729, 698, 604; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,13 (s, 1 H, OH), 3,91 (m, 2 H, H-1), 4,04 (m, 2 H, H-2), 6,83 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-2'), 7,09 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-3'), 7,14-7,30 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 41,02 (PhCH₂), 61,48 (C-1), 69,25 (C-2), 114,60 (C-2'), 125,98 (C-4''), 128,42 (C-2''), 128,80 (C-3''), 129,93 (C-3'), 133,79 (C-4''), 141,45 (C-1''), 157,03 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 228 (M^+ , 100), 184 (76), 183 (74), 165 (32), 106 (39), 91 (49).

4-Toluenosulfonato 2-(4-bencilfenoxi)etilo (**85**)

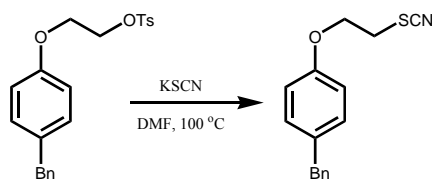


Una solución del alcohol **77** (500 mg, 2,19 mmol) en piridina (5 ml) se trató con cloruro de tosilo (500 mg, 2,63 mmol) como se describió en el método general. El producto se purificó por

columna cromatográfica (silica gel) eluyendo con una mezcla de hexano–AcOEt (85:15) para dar lugar a 528 mg (63% de rendimiento) de **85** como un sólido blanco: R_f 0,27 (hexano–AcOEt, 4:1); pf 49–51 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3028, 3924, 1610, 1599, 1510, 1494, 1454, 1358, 1073, 1020, 922, 813, 781, 734; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,43 (s, 3 H, Me), 3,90 (s, 3 H, PhCH_2), 4,12 (m, 2 H, H-2), 4,34 (m, 2 H, H-1), 6,70 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-2'), 7,06 (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H, H-3'), 7,17–7,33 (m, 8 H, hidrógenos aromáticos), 7,80 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-2''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 21,55 (Me), 40,97 (PhCH_2), 65,49 (C-1), 68,12 (C-2), 114,60 (C-2'), 125,97 (C-4''), 127,94 (C-2''), 128,39 (C-2''), 128,75 (C-3''), 129,77 (C-3'), 129,82 (C-3'''), 134,05 (C-4'), 141,33 (C-1''), 144,83 (C-1'''), 156,38 (C-1').

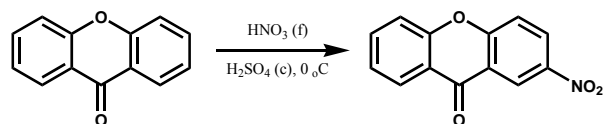
Anal. Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{S}$: C 69,09, H 5,80; encontrado C 68,87, H 5,67.

Tiocianato de 2-(4-bencilfenoxi)etilo (**86**)

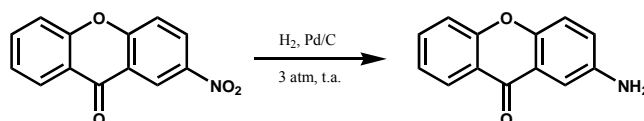


A una solución de tosilato **85** (286 mg, 0,74 mmol) se agregó tiocianato de potasio (363 mg, 3,74 mmol). Luego del procedimiento habitual, el producto se purificó por cromatografía en columna empleando (hexano–AcOEt, 19:1) como eluyente para dar 104 mg (52% de rendimiento) de tiocianato **86** como un aceite incoloro: R_f 0,36 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3028, 2918, 2872, 2154, 1611, 1508, 1242, 1177, 1030, 729, 698, 602; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,25 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-1), 3,91 (s, 2 H, PhCH_2), 4,24 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-2), 6,83 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-2'), 7,11 (d, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-3'), 7,17–7,30 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 33,28 (C-1), 40,99 (PhCH_2), 65,89 (C-1), 114,72 (C-2'), 126,02 (C-4''), 128,41 (C-2''), 128,75 (C-3''), 130,01 (C-3'), 132,52 (C-4'), 141,25 (C-1''), 156,18 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 269 (M^+ , 50), 242 (19), 182 (64), 91 (100).

Anal. Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NOS}$: C 71,35, H 5,61, N 5,20; encontrado C 71,21, H 5,64, N 5,44.

2-Nitroxantona (88)

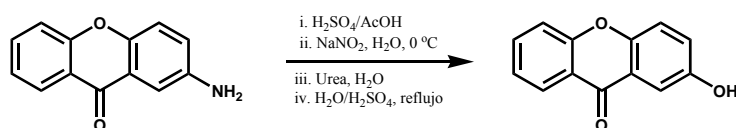
A una solución de xantona (5,00 g, 25,5 mmol) en ácido sulfúrico concentrado (14 ml) a 0 °C se agregó gota a gota una mezcla de ácido nítrico fumante (0,9 ml, 12,8 mmol) y ácido sulfúrico concentrado (3 ml). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 40 minutos. Luego, la mezcla se volcó sobre hielo molido. El sólido formado se filtró y se lavó con agua fría hasta pH = 7. El residuo se utilizó como tal en la siguiente reacción. Una muestra analítica se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (4:1) como solvente de elución para dar el compuesto **88** como un sólido blanco: R_f 0,50 (tolueno); pf 195–198 °C; IR (KBr, cm⁻¹) 1668, 1614, 1533, 1462, 1348, 833, 770, 746, 669; RMN ¹H (CDCl₃) δ 7,34–7,58 (m, 3 H, H-5, H-7), 7,64 (d, J = 9,1 Hz, 1 H, H-4), 7,81 (m, 1 H, H-6), 8,35 (dd, J = 8,0, 1,6 Hz, 1 H, H-8), 8,55 (dd, J = 9,2, 2,8 Hz, 1 H, H-3), 9,21 (d, J = 2,8 Hz, 1 H, H-1); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 118,21 (C-5), 119,66 (C-4), 121,43 (C-8_a), 123,56 (C-7), 123,92 (C-9_a), 125,27 (C-4), 126,75 (C-2), 126,97 (C-3), 129,01 (C-8), 135,89 (C-6), 155,88 (C-5_a), 159,20 (C-4_a); EM (m/z , intensidad relativa) 241 (M⁺, 36), 196 (100), 168 (49), 139 (88).

2-Aminoxantona (89)

Una suspensión de nitroxantona **88** en acetato de etilo (100 ml) en presencia de 10% Pd/C (200 mg) se trató con hidrógeno a 3 atmósferas en un aparato Parr. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Luego, la mezcla se filtró y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando hexano–AcOEt como solvente de elución para dar 2,465 g (46% desde xantona, 91% tomando los equivalentes de ácido nítrico utilizado) de aminoxantona **89** como un sólido amarillo: R_f 0,72 (hexano–AcOEt, 1:1); pf

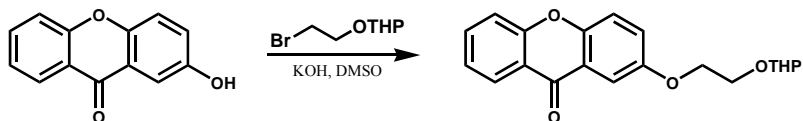
190–192 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3412, 3321, 1641, 1618, 1593, 1491, 1466, 1327, 1209, 1147, 881, 756, 625; RMN ^1H (CDCl_3) δ 7,18 (dd, $J = 8,8, 2,8$ Hz, 1 H, H-3), 7,32-7,55 (m, 3 H, H-1, H-7, H-5), 7,37 (d, $J = 8,9$ Hz, 1 H, H-4), 7,72 (m, 1 H, H-6), 8,29 (dd, $J = 8,0, 1,5$ Hz, 1 H, H-8), 8,48 (s, 1 H); RMN ^{13}C (CDCl_3 - CD_3OD , 20%) δ 108,45 (C-1), 117,78 (C-5), 118,67 (C-4), 120,85 (C-8_a), 121,82 (C-9_a), 123,27 (C-7), 124,08 (C-3), 126,13 (C-8), 134,43 (C-6), 143,24 (C-2), 156,07 (C-5_a), 168,52 (C-4_a); 177,80 (C-9); EM (m/z , intensidad relativa) 211 (M^+ , 59), 196 (15), 69 (100).

2-Hidroxixantona (90)



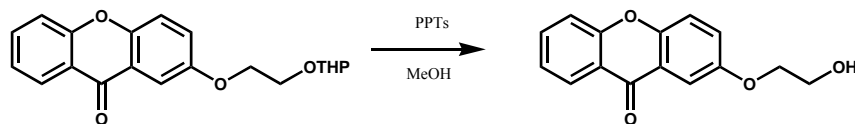
Una solución del compuesto **89** (770 mg, 3,65 mmol) en ácido acético glaciar (10 ml) se trató con ácido sulfurico concentrado (3,25 ml), se llevó a 0 °C y se agregó gota a gota una solución de nitrito de sodio (250 mg, 3,71 mM) en agua (1,8 ml). La reacción se agitó durante 20 minutos a 0 °C. Luego, se agregó una solución de urea (110 mg) en agua fría (10,8 ml) manteniendo la mezcla de reacción 0 °C, esta se volcó cuidadosamente sobre una mezcla de agua (21,6 ml) y ácido sulfurico concentrado (5,41 ml) a ebullición y se continuó agitando durante 10 minutos manteniendo la ebullición. Finalmente, se llevó a temperatura ambiente y se particiono entre cloruro de metileno (100 ml) y agua (70 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2 × 70 ml), se combinó las fases orgánicas, se lavó con solución saturada de cloruro de sodio (2 × 50 ml), secó (MgSO_4) y se evaporó el solvente. Se obtuvieron 280 mg (36% de rendimiento) de **90** como un sólido rojo: R_f 0,10 (hexano–AcOEt, 3:2); pf 176–177 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3312, 1659, 1628, 1487, 1460, 1348, 1237, 1153, 1109, 876, 821, 788, 757, 626; RMN ^1H (CDCl_3) δ 7,32-7,61 (m, 6 H, hidrógenos aromáticos), 7,73 (m, 1 H, H-6), 8,28 (dd, $J = 8,0, 1,5$ Hz, H, H-8); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 108,69 (C-1), 117,72 (C-5), 118,97 (C-4), 120,58 (C-8_a), 121,70 (C-9_a), 123,38 (C-7), 124,47 (C-3), 126,00 (C-8), 134,56 (C-6), 150,09 (C-4_a), 153,37 (C-2), 156,02 (C-5_a); EM (m/z , intensidad relativa) 212 (M^+ , 54), 184 (9), 69 (46), 55 (85), 43 (100).

2-[2-(Tetrahidro-2H-piran-2-il)oxiet-1-il]xantona (91)



Una solución de fenol **90** (270 mg, 1,3 mmol) en dimetil sulfóxido (3 ml) se trató con bromoetil tetrahidropiranil éter siguiendo el método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) eluyendo con hexano–AcOEt (19:1) para dar 200 mg (45% de rendimiento) de **91** como un sólido blanco: R_f 0,42 (hexano–AcOEt, 3:2); pf 92–93 °C; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,55–1,81 (m, 6 H, H-3", H-4", H-5"), 3,53 (m, 1 H, H-6"_a), 3,80–3,97 (m, 2 H, H-6"_b, H-1_a), 4,10 (dt, $J = 11,3, 4,5$ Hz, 1 H, H-1_b), 4,27 (t, $J = 5,4$ Hz, 2 H, H-2), 4,72 (t, $J = 3,3$ Hz, 1 H, H-2"), 7,32–7,41 (m, 3 H, hidrógenos aromáticos), 7,47 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H, H-4'), 7,68 (dd, $J = 7,0, 1,6$ Hz, 1 H, H-5'), 7,73 (d, $J = 2,4$ Hz, 1 H, H-1'), 8,34 (dd, $J = 8,0, 1,7$ Hz, 1 H, H-8'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,35 (C-4"), 25,43 (C-3"), 30,53 (C-5"), 62,20 (C-2"), 65,73 (C-1), 68,22 (C-2), 99,02 (C-2"), 107,04 (C-1'), 117,94 (C-5'), 119,31 (C-4'), 121,31 (C-8_a'), 122,13 (C-9_a'), 123,68 (C-7'), 125,32 (C-3'), 126,70 (C-8'), 134,53 (C-6'), 151,06 (C-4_a'), 155,35 (C-2'), 156,15 (C-5_a'); EM (m/z , intensidad relativa) 340 (M^+ , 9), 240 (26), 225 (20), 212 (62), 155 (11), 139 (21), 129 (26), 85 (80), 73 (74), 41 (100); EMAR Calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_5$: 340,1311; encontrado 340,1315.

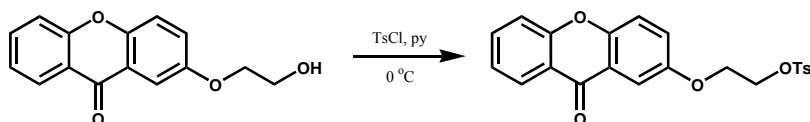
2-(2-Hidroxi-et-1-il)xantona (92)



El grupo tetrahidropiranilo del compuesto **91** (150 mg, 0,44 mmol) se removió de acuerdo al método general para dar 112 mg (100% de rendimiento) de alcohol **92** como un sólido blanco: pf 119–120 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 3428, 2943, 1651, 1617, 1488, 1467, 1326, 1219, 1151, 1074, 1049, 919, 753; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,13 (s, 1 H, -OH), 4,02 (dist t, $J = 4,5$ Hz, 2 H, H-1), 4,22 (dist t, $J = 4,5$ Hz, 2 H, H-2), 7,36–7,51 (m, 4 H, hidrógenos aromáticos), 7,68–7,76 (m, 2 H, H-2), 8,24 (dd, $J = 8,0, 1,7$ Hz, 1 H, H-8'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 61,34 (C-1), 69,94 (C-2), 106,95 (C-1'), 117,94 (C-

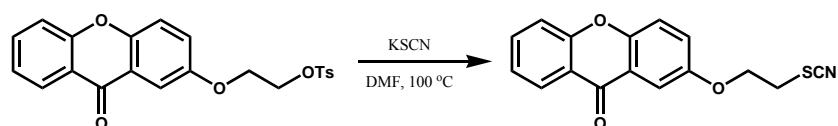
5'), 119,53 (C-4'), 121,23 (C-8_a'), 122,12 (C-9_a'), 123,76 (C-7'), 125,05 (C-3'), 126,67 (C-8'), 134,65 (C-6'), 151,17 (C-4_a'), 155,00 (C-2'), 156,13 (C-5_a'), 177,02 (C-9'); EM (*m/z*, intensidad relativa) 256 (M⁺, 31), 225 (17), 212 (100), 197 (7), 184 (24), 155 (10).

2-[2-(4-Toluensulfoniloxi)et-1-il]xantona (**93**)



Una solución de alcohol **92** (100 mg, 0,39 mmol) en piridina a 0 °C se trató con cloruro de *p*-toluenosulfonilo (110 mg, 0,58 mmol). Luego del procedimiento habitual, el producto se purificó columna cromatografica (silica gel) empleado una mezcla de hexano–AcOEt (95:5) como eluyente para dar 125 mg (78% de rendimiento) de **93** como sólido blanco: IR (KBr, cm⁻¹) 2967, 2941, 1662, 1619, 1495, 1473, 1222, 1175, 1148, 1071, 1029; RMN ¹H (CDCl₃) δ 2,43 (s, 3 H, PhMe), 4,25 (m, 2 H, H-2), 4,40 (m, 2 H, H-1), 7,19-7,25 (m, 1 H, hidrógenos aromáticos), 7,34 (d, *J* = 8,2 Hz, 2 H, H-3"), 7,38-7,57 (m, 4 H, hidrógenos aromáticos), 7,83 (d, *J* = 8,2 Hz, 2 H, H-2"), 7,67-7,75 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos), 8,31 (dd, *J* = 8,0, 1,6 Hz, 1 H, H-8'); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 21,56 (PhMe), 66,03 (C-1), 67,93 (C-2), 106,84 (C-1'), 117,91 (C-5'), 119,52 (C-4'), 121,12 (C-8_a'), 121,93 (C-9_a'), 123,78 (C-7'), 124,98 (C-3'), 126,57 (C-8'), 127,96 (C-2"), 129,85 (C-3"), 134,65 (C-6'), 144,97 (C-1"), 151,20 (C-4_a'), 154,27 (C-2'), 156,03 (C-5_a'), 176,77 (C-9'); EM (*m/z*, intensidad relativa) 410 (M⁺, 26), 211 (22), 199 (96), 155 (52), 91 (100).

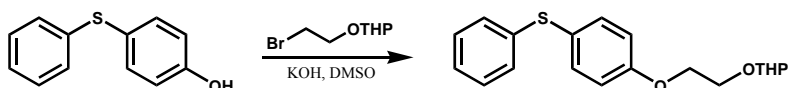
2-(2-Tiacianoetoxi)xantona (**94**)



Una solución de tosilato **93** (114 mg, 0,28 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (3 ml) se trató con tiocianato de potasio (300 mg, 3,1 mmol) de acuerdo al método general. Luego del tratamiento habitual, el producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando una mezcla de

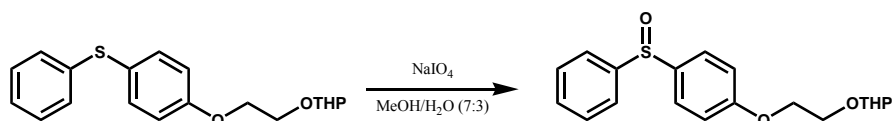
hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 59 mg (71% de rendimiento) de tiocianato **94** como un sólido blanco: pf 140–141 °C; IR (KBr, cm^{-1}) 2924, 2852, 2153, 1647, 1616, 1495, 1465, 1320, 1235, 1219, 1161, 1028, 888, 755; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,40 (t, $J = 5,7$ Hz, 2 H, H-1), 4,46 (t, $J = 5,7$ Hz, 2 H, H-2), 7,36–7,52 (m, 4 H, hidrógenos aromáticos), 7,70–7,78 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos), 8,31 (dd, $J = 9,0, 1,6$ Hz, 1 H, H-8'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 33,12 (C-1), 66,46 (C-2), 106,92 (C-1'), 117,89 (C-5'), 119,69 (C-4'), 121,05 (C-8_a'), 121,95 (C-9_a'), 123,74 (C-7'), 124,94 (C-3'), 126,48 (C-8'), 134,64 (C-6'), 151,63 (C-4_a'), 154,04 (C-2'), 155,97 (C-5_a'), 176,66 (C-9'); EM (m/z , intensidad relativa) 297 (M^+ , 82), 274 (24), 211 (100), 184 (25), 155 (47); EMAR Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{NS}$: 297,0460; encontrado 297,0459.

4-Fenilsulfanilfenoxietil Tetrahidro-2H-piran-2-il Eter (**96**)



Una solución de fenol **95** (454 mg, 2,2 mmol) en *N,N*-dimetilformamida se trató con hidróxido de potasio y bromoetil tetrahidropiraniéter de acuerdo al método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (49:1) como eluyente para dar 462 mg (62% de rendimiento) de éter **96** como un aceite incoloro: R_f 0,63 (hexano–AcOEt, 7:3); RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,55–1,87 (m, 6 H, H-3''', H-4''', H-5'''), 3,55 (m, 1 H, H-6'''_a), 3,84 (m, 2 H, H-1), 4,02 (m, 1 H, H-6'''_b), 4,16 (t, $J = 4,9$ Hz, 2 H, H-2), 4,70 (dist t, $J = 3,0$ Hz, 1 H, H-2'''), 6,92 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7,18 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos), 7,40 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-2', H-6'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,3 (C-4'''), 25,4 (C-5'''), 30,5 (C-3'''), 62,2 (C-6'''), 65,8 (C-1), 67,6 (C-2), 99,0 (C-2'''), 115,8 (C-2'), 124,6 (C-4'), 125,8 (C-4''), 128,3 (C-3''), 128,9 (C-2''), 135,2 (C-3'), 138,6 (C-1''), 159,2 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 330 (M^+ , 49), 202 (43), 129 (100).

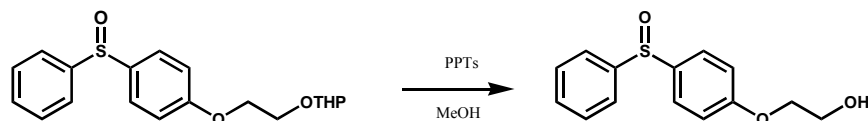
4-Fenilsulfonilfenoxietil Tetrahidro-2H-piran-2-il Eter (**97**)



Una solución de **96** (412 mg, 1,2 mmol) en metanol-agua (20 ml, 7:3) se trató con metaperiodato de sodio (301 mg, 1,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Luego, la mezcla se particionó entre una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (60 ml) y cloruro de metileno (50 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2 × 30 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 × 50 ml), se secaron (MgSO_4) y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano-AcOEt (9:1) como eluyente para dar 334 mg (80% de rendimiento) de **97** como un aceite incoloro: R_f 0,13 (hexano-AcOEt, 7:3); IR (film, cm^{-1}) 3059, 2943, 2872, 1593, 1495, 1304, 1254, 1036, 831, 750, 691; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,53-1,78 (m, 6 H, H-3''', H-4''', H-5'''), 3,51 (m, 1 H, H-6''',_a), 3,82 (m, 2 H, H-1), 3,92 (m, 1 H, H-6''',_b), 4,16 (t, $J = 5,0$ Hz, 2 H, H-2), 4,68 (dist t, $J = 3,3$ Hz, 1 H, H-2'''), 6,99 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7,42-7,63 (m, 5 H, hidrógenos aromáticos), 7,56 (d, $J = 9,1$ Hz, 2 H, H-2', H-6'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,1 (C-4'''), 25,2 (C-5'''), 30,2 (C-3'''), 61,9 (C-1'''), 65,3 (C-1), 67,4 (C-2), 98,7 (C-2'''), 115,2 (C-2'), 124,27 (C-2''), 126,8 (C-3'), 128,9 (C-3''), 130,4 (C-4''), 136,6 (C-4'), 145,6 (C-1''), 161,1 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 346 (M^+ , 14), 303 (11), 255 (34), 169 (28), 129 (39), 86 (100).

Anal. Calculado para ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{S}$) C 65,87, H 6,40, S 9,25; encontrado C 65,74, H 6,53, S 9,03.

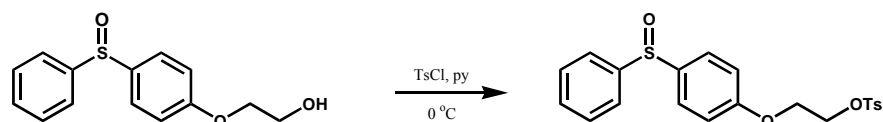
4-Phenylsulfinylphenoxyethanol (**98**)



Una solución de compuesto **97** (320 mg, 0,88 mmol) en metanol (10 ml) se trató con *p*-toluenosulfonato de piridonio (15 mg). Luego del procedimiento habitual, se obtuvieron 210 mg (91% de rendimiento) de alcohol **98** como un aceite incoloro. El producto se utilizó como tal en el paso siguiente: R_f 0,12 (hexano-AcOEt, 1:1); RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,95 (t, $J = 4,2$ Hz, 2 H, H-1), 4,09 (t, $J = 4,4$ Hz, 2 H, H-2), 6,97 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7,43-7,63 (m, 5 H, hidrógenos

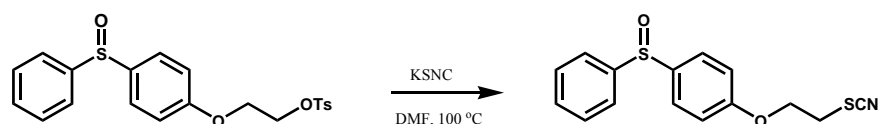
aromáticos), 7,57 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-2', H-6'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 61,2 (C-1), 69,5 (C-2), 115,4 (C-2'), 124,6 (C-2''), 127,2 (C-3'), 129,2 (C-3''), 130,8 (C-4'), 156,8 (C-1').

4-Toluensulfonato de 4-Fenilsulfinilfenoxietilo (**99**)



Una solución de alcohol **98** (200 mg, 0,76 mmol) en piridina (3 ml) a 0 °C se trató con cloruro de *p*-toluensulfonilo siguiendo el método general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (4:1) como eluyente para dar 138 mg (45% de rendimiento) de **99** como un aceite incoloro: R_f 0,38 (hexano–AcOEt, 1:1); RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,43 (s, 3 H, *Me*), 4,15 (m, 2 H, H-1), 4,36 (m, 2 H, H-2), 6,84 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-3'), 7,31 (d, $J = 8,0$ Hz, 2 H, H-3''), 7,43-7,62 (m, 7 H, hidrógenos aromáticos), 7,78 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, H-2''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 21,6 (*Me*), 65,7 (C-1), 67,7 (C-2), 115,3 (C-2'), 124,5 (C-2''), 127,1 (C-3'), 127,9 (C-2''), 129,2 (C-3'), 129,8 (C-3''), 130,8 (C-4'), 132,7 (C-1''), 137,7 (C-4'), 145,0 (C-4''), 160,3 (C-1').

Tiocianato de 4-Fenilsulfinilfenoxietilo (**100**)

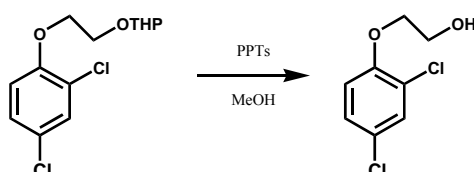


Una solución de **99** (113 mg, 0,27 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (5 ml) se trató con tiocianato de potasio de acuerdo al método general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (7:3) como solvente de elución para dar 58 mg (70% de rendimiento) de **100** como un aceite incoloro: IR (film, cm^{-1}) 3059, 2997, 2931, 2878, 2154, 1593, 1593, 1495, 1249, 1173, 1042, 831, 750, 691; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,32 (d, $J = 5,8$ Hz, 2 H, H-1), 4,32 (d, $J = 5,8$ Hz, 2 H, H-2), 6,98 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-3'), 7,46 (m, 3 H, hidrógenos aromáticos), 7,60 (m, 4 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 33,0 (C-1),

66,0 (C-2), 115,4 (C-2'), 124,6 (C-2''), 127,2 (C-3'), 129,3 (C-3''), 130,9 (C-4''), 160,1 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 303 (M^+ , 14), 255 (36), 194 (13), 169 (24), 86 (100).

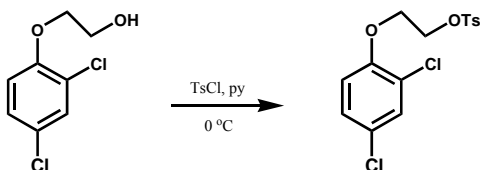
Anal Calculado para $C_{15}H_{13}O_2NS_2$: C 59,38, H 4,32, N 4,62, S 21,13; encontrado C 59,08, H 4,50, N 4,63, S 21,22.

2,4-Diclorofenoxietanol (103)



Una solución de **102** (746 mg, 2.6 mmol) en metanol (30 ml) se trató con *p*-toluensulfonato de piridonio de acuerdo a la técnica general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando una mezcla de hexano–AcOEt (9:1) como eluyente para dar 230 mg (43% de rendimiento) de compuesto **103** como un aceite incoloro: R_f 0.14 (hexane-EtOAc, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3238, 2932, 1487, 1389, 1267, 1107, 1063, 930, 829, 799; RMN 1H ($CDCl_3$) δ 2,53 (s, 1 H, OH), 3,90 (m, 2 H, H-1), 4,03 (t, $J = 4,4$ Hz, 2 H, H-2), 6,78 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H, H-6'), 7,09 (dd, $J = 8,8, 2,5$ Hz, 1 H, H-5'), 7,28 (d, $J = 2,5$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ 61,07 (C-1), 71,01 (C-2), 114,67 (C-6'), 123,91 (C-2'), 126,28 (C-4'), 127,62 (C-5'), 129,96 (C3'), 153,00 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 210 (M^+ , 5), 208 (M^+ , 27), 206 (M^+ , 42), 166 (18), 164 (97), 162 (100).

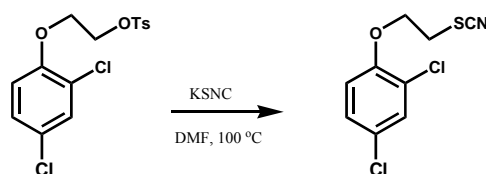
4-Toluensulfonato de 2,4-diclorofenoxietilo (104)



Una solución de alcohol **103** (254 mg, 1,30 mmol) en piridina (3 ml) a 0 °C se trató con cloruro de *p*-toluensulfonilo siguiendo el método general para la preparación de tosilatos. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (9:1) como eluyente para dar 190 mg (53% de rendimiento) de tosilato **104** como un aceite

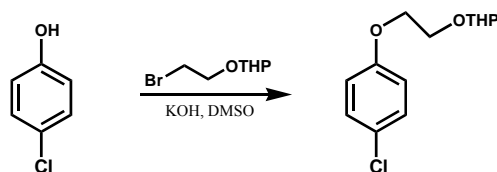
incoloro: IR (film, cm^{-1}) 1599, 1481, 1452, 1356, 1294, 1190, 1032, 930, 812, 665; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,44 (s, 3 H, *Me*), 4,20 (m, 2 H, H-2), 4,39 (m, 2 H, H-1), 6,76 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H, H-6'), 7,17 (dd, $J = 8,8, 2,5$ Hz, 1 H, H-5'), 7,28 (d, $J = 2,5$ Hz, 1 H, H-3'), 7,34 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, H-3'), 7,81 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, H-2''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 21,59 (*Me*), 67,03 (C-1), 67,68 (C-2), 114,87 (C-6'), 124,57 (C-2'), 126,83 (C-4'), 127,59 (C-5'), 127,96 (C-2''), 129,90 (C-3'', C-4''), 130,20 (C-3'), 145,05 (C-1''), 152,57 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 362 (M^+ , 5), 360 (M^+ , 8), 199 (86), 155 (48), 91 (100).

Tiocianato de 2,4-Diclorofenoxietilo (105)

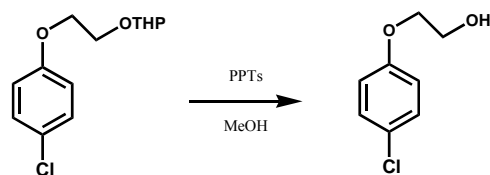


Una solución de **103** (178 mg, 0,5 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (2 ml) se trató con tiocianato de potasio durante 6 horas a 100 °C de acuerdo al método general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 90 mg (70% de rendimiento) de **104** como un aceite incoloro: IR (film, cm^{-1}) 3074, 2933, 2880, 2156, 1585, 1483, 1389, 1288, 1250, 1105, 1063, 1024, 870, 804, 731; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,37 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-1), 4,34 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-2), 6,88 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H, H-6'), 7,21 (dd, $J = 8,8, 2,5$ Hz, 1 H, H-5'), 7,39 (d, $J = 2,5$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 32,99 (C-1), 67,30 (C-2), 114,97 (C-6'), 124,24 (C-2'), 127,07 (C-4'), 127,64 (C-5'), 130,15 (C-3'), 152,19 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 251 (M^+ , 3), 249 (M^+ , 12), 247 (M^+ , 17), 166 (1), 164 (8), 162 (12), 137 (2), 135 (9), 133 (15), 86 (100).

Anal Calculado para ($\text{C}_9\text{H}_7\text{ONCl}_2\text{S}$) C 43.57, H 2.84, N 5.64, S 12.92. encontrado C 43.80, H 2.31, N 5.39, S 12.53.

4-Clorofeniletil Tetrahidro-2H-piran-2-il Eter (107)

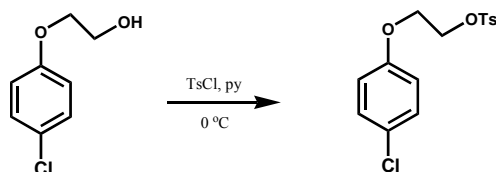
Una solución de fenol **106** (386 mg, 3,0 mmol) en *N,N*-dimetilformamida se trató con hidróxido de potasio (350 mg, 6,2 mmol) y bromoetil tetrahidropiraniéter (650 mg, 3,1 mmol) de acuerdo al método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 592 mg (77% de rendimiento) de **107** como un aceite incoloro: IR (film, cm^{-1}) 2943, 2874, 1597, 1492, 1456, 1284, 1248, 1140, 1080, 1036, 989, 824, 667; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,55-1,81 (m, 6 H, H-3'', H-4'', H-5''), 3,55 (m, 1 H, H-6''_a), 3,77-4,03 (m, 3 H, H-1, H6''_b), 4,06-4,15 (m, 2 H, H-2), 4,69 (dist t, $J = 3,5$ Hz, 1 H, H-2''), 6,85 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-2'), 7,21 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,32 (C-4''), 25,36 (C-5''), 30,45 (C-3''), 62,15 (C-6''), 65,72 (C-1), 67,75 (C-2), 98,99 (C-2''), 115,98 (C-2'), 125,63 (C-4'), 129,19 (C-3'), 157,52 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 258 (M^+ , 5), 256 (M^+ , 14), 129 (64), 85 (100), 73 (58).

4-Clorofenoxietanol (108)

Una solución de **107** (500 mg, 2.0 mmol) en metanol (20 ml) se trató con *p*-toluensulfonato de piridonio de acuerdo a la técnica general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando una mezcla de hexano–AcOEt (9:1) como eluyente para dar 260 mg (78% de rendimiento) de **108** como un aceite incoloro: IR (film, cm^{-1}) 3370, 2934, 2876, 1597, 1493, 1452, 1287, 1246, 1092, 1053, 916, 824, 667; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,01 (dist t, $J = 6,0$ Hz, 1 H, OH), 3,98 (m, 2 H, H-1), 4,06 (m, 2 H, H-2), 6,86 (d, $J = 9,0$ Hz, 2 H, H-2'), 7,25 (d, $J = 9,0$ Hz, 2

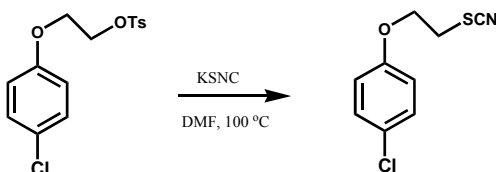
H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 61,29 (C-1), 69,54 (C-2), 115,85 (C-2'), 126,00 (C-4'), 129,35 (C-3'), 157,25 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 174 (M^+ , 20), 172 (M^+ , 63), 130 (46), 128 (100).

4-Toluensulfonato de 4-Clorofenoxietilo (109)



Una solución de alcohol **108** (195 mg, 1.13 mmol) en piridina (3 ml) a 0 °C se trató con cloruro de *p*-toluensulfonilo (300 mg, 1.74 mmol) siguiendo el método general para la preparación de tosilatos. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 301 mg (92% de rendimiento) de tosilato **109** como un aceite incoloro: RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,44 (s, 3 H, Me), 4,12 (m, 2 H, H-2), 4,36 (m, 2 H, H-1), 6,71 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-2'), 7,19 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-3'), 7,33 (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H, H-3''), 7,80 (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H, H-2''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 21,55 (Me), 65,74 (C-2), 67,91 (C-1), 115,87 (C-2'), 126,26 (C-4'), 127,89 (C-2''), 129,29 (C-3'), 129,80 (C-3''), 132,79 (C-4'') 144,97 (C-1''), 156,97 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 328 (M^+ , 1), 326 (M^+ , 3), 199 (35), 172 (19), 155 (26), 128 (97), 91 (100).

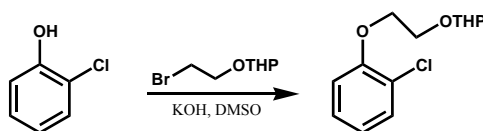
Tiocianato de 4-Clorofenoxietilo (110)



Una solución de **109** (250 mg, 0.77 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (3 ml) se trató con tiocianato de potasio (500 mg, 5,1 mmol) durante 6 horas a 100 °C de acuerdo al método general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (19:1) como solvente de elución para dar 105 mg (63% de rendimiento) de **110** como un aceite incoloro: IR (film, cm^{-1}) 2941, 2878, 2156, 1597, 1491, 1464, 1283, 1244, 1171, 1092, 1030, 824, 664; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,30 (t, $J = 5,8$ Hz, 2 H, H-1), 4,26 (t, $J = 5,8$ Hz, 2 H, H-2), 6,85 (d,

$J = 9,0$ Hz, 2 H, H-2'), 7,25 (d, $J = 9,0$ Hz, 2 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 33,07 (C-1), 66,12 (C-2), 115,94 (C-2'), 126,66 (C-4'), 129,45 (C-3'), 156,37 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 215 (M^+ , 10), 213 (M^+ , 28), 128 (13), 99 (17), 86 (100).

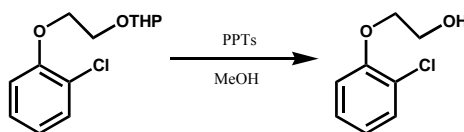
2-Clorofenoxietil Tetrahidro-2H-piran-2-il Eter (112)



El compuesto **112** se preparó a partir de 2-clorofenol (1,00 g, 7,77 mmol) de acuerdo al método general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 462 mg (23% de rendimiento) de **112** como un aceite incoloro: R_f 0,19 (hexano–AcOEt, 4:1); RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,74-1,85 (m, 6 H, H-3'', H-4'', H-5''), 3,52 (m, 1 H, H-6''_a), 3,90 (m, 2 H, H-1), 4,07 (m, 1 H, H-6''_b), 4,22 (t, $J = 4,9$ Hz, 2 H, H-2), 4,76 (m, 1 H, H-2''), 6,92 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos), 7,19 (dt, $J = 7,3, 1,5$ Hz, 1 H, H-5'); 7,35 (dd, $J = 8,0, 1,5$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,3 (C-4''), 25,4 (C-5''), 30,5 (C-3''), 62,1 (C-6''), 65,5 (C-1), 68,8 (C-2), 99,0 (C-2''), 113,9 (C-2', C-6'), 121,6 (C-4'), 127,6 (C-5'), 130,3 (C-3'), 154,5 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 258 (M^+ , 1), 256 (M^+ , 2), 172 (4), 129 (24), 128 (24), 85 (100).

Anal. Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{Cl}$: C 60,82, H 6,67, Cl 13,81; encontrado C 61,07, H 6,75, Cl 13,61.

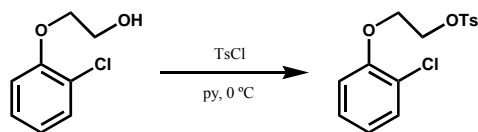
2-Clorofenoxietanol (113)



Una solución de **112** (341 mg, 1,3 mmol) en metanol (20 ml) se trató con *p*-toluensulfonato de piridonio de acuerdo al método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como eluyente para dar 217 mg (97% de rendimiento)

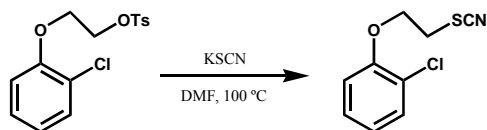
de alcohol **113** como un aceite incoloro: R_f 0,14 (hexano–AcOEt, 4:1); RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,98 (t, $J = 4,5$ Hz, 1 H, H-1), 4,14 (t, $J = 4,5$ Hz, 1 H, H-2), 6,92 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos), 7,21 (dt, $J = 7,9, 1,5$ Hz, 1 H, H-5'); 7,36 (dd, $J = 7,7, 1,5$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 61,3 (C-1), 70,8 (C-2), 114,1 (C-6') 114,2 (C-2'), 122,0 (C-4'), 127,8 (C-5'), 130,3 (C-3'), 154,2 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 174 (M^+ , 12), 172 (M^+ , 39), 130 (33), 128 (100).

4-Toluensulfonato de 2-Clorofenoxietilo (**114**)



El alcohol **113** (137 mg, 0,78 mmol) se trató con cloruro de tosilo siguiendo el método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como eluyente para dar 159 mg (62% de rendimiento) de tosilato **114** como un aceite incoloro: R_f 0,25 (hexano–AcOEt, 4:1); RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,43 (s, 3 H, *Me*), 4,23 (m, 2 H, H-1), 4,39 (m, 2 H, H-2), 6,84 (dd, $J = 8,4, 1,5$, 1 H, H-6'), 6,91 (dt, $J = 7,7, 1,5$ Hz, 1 H, H-4'), 7,15 (dt, $J = 7,7, 1,5$ Hz, 1 H, H-5'), 7,32 (d, $J = 7,7$ Hz, 2 H, H-3''), 7,83 (d, $J = 7,9$ Hz, 2 H, H-2''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 21,6 (*Me*), 66,6 (C-1), 67,9 (C-2), 114,1 (C-2', C-6'), 122,3 (C-4'), 127,7 (C-5'), 128,0 (C-2''), 129,9 (C-3''), 130,4 (C-3'), 132,8 (C-1''), 144,9 (C-4''), 153,7 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 328 (M^+ , 4), 326 (M^+ , 11), 199 (72), 155 (48), 91 (100).

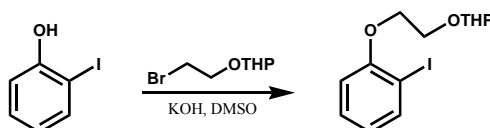
Tiocianato de 2-Clorofenoxietilo (**115**)



Una solución de **114** (111 mg, 0,34 mmol) en *N,N*-dimetilformamida se trató con tiocianato de potasio según el método general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (19:1) como solvente de elución para dar 62 mg (85% de rendimiento) de tiocianato **115** como un aceite incoloro: R_f 0,37 (hexano–AcOEt, 4:1); RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,38

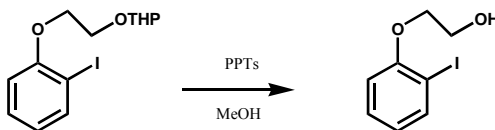
(t, $J = 6,1$ Hz, 2 H, H-1), 4,29 (t, $J = 6,1$ Hz, 2 H, H-2), 6,98 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos), 7,24 (m, 1 H, hidrogenos aromáticos), 7,38 (dd, $J = 8,0, 1,5$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 33,2 (C-1), 67,2 (C-2), 111,6 (SCN), 114,5 (C-6'), 122,8 (C-4'), 123,6 (C-2'), 127,8 (C-5'), 130,6 (C-3'), 153,5 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 215 (M^+ , 4), 213 (M^+ , 12), 128 (11), 86 (100); EMAR Calculado para $\text{C}_9\text{H}_8\text{ONSCl}$: 213,0015; encontrado 213,0018.

2-Iodofenoxietil Tetrahidro-2H-piran-2-il Eter (117)



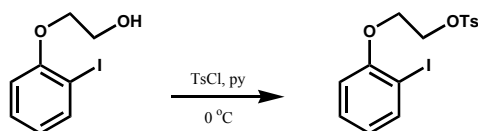
El compuesto **117** se obtuvo a partir de 2-iodofenol (910 mg, 4,1 mmol) de acuerdo al método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 940 mg (66% de rendimiento) de **117** como un aceite incoloro: R_f 0,61 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 2941, 2870, 1582, 1497, 1439, 1277, 1248, 1138, 1034, 750; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,53-1,81 (m, 6 H, H-3'', H-4'', H-5''), 3,55 (m, 1 H, H-6''_a), 3,91 (m, 2 H, H-1), 4,04 (m, 1 H, H-6''_b), 4,20 (t, $J = 4,8$ Hz, 2 H, H-2), 4,82 (dist t, $J = 3,3$ Hz, 1 H, H-2''), 6,71 (dt, $J = 7,7, 1,2$ Hz, 1 H, H-4'), 6,85 (dd, $J = 8,0, 1,1$ Hz, 1 H, H-6'), 7,28 (dt, $J = 7,7, 1,5$ Hz, 1 H, H-5'), 7,77 (dd, $J = 7,7, 1,4$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,2 (C-4''), 25,4 (C-5''), 30,5 (C-3''), 62,0 (C-6''), 66,6 (C-1), 70,4 (C-2), 86,7 (C-2'), 99,0 (C-2''), 112,4 (C-6'), 122,6 (C-4'), 129,3 (C-5'), 139,4 (C-3'), 157,5 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 348 (M^+ , 6), 246 (3), 220 (4), 129 (37), 85 (100); EMAR Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{I}$: 348,0222, encontrado 348,0218.

2-Iodofenoxietanol (118)



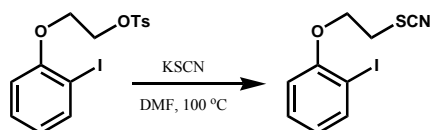
El compuesto **117** (900 mg, 2,6 mmol) se trató con *p*-toluensulfonato de piridonio siguiendo el método general para la obtención de alcoholes. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) usando una mezcla de hexano–AcOEt (17:3) como solvente de elución para dar 514 mg (75% de rendimiento) de alcohol **118** como un aceite incoloro: R_f 0,28 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3383, 2937, 1582, 1474, 1439, 1277, 1248, 1051, 1018, 920, 748, 650; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,39 (sa, 1 H, OH), 3,96 (m, 2 H, H-1), 4,11 (m, 2 H, H-2), 6,73 (dt, $J = 7,7$, 1,3 Hz, 1 H, H-4'), 6,83 (dd, $J = 8,4$, 1,4 Hz, 1 H, H-6'), 7,28 (dt, $J = 7,7$, 1,4 Hz, 1 H, H-5'), 7,76 (dd, $J = 7,7$, 1,4 Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 61,3 (C-1), 70,8 (C-2), 87,0 (C-2'), 112,8 (C-6'), 123,1 (C-4'), 129,6 (C-5'), 139,4 (C-3'), 157,0 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 264 (M^+ , 45), 220 (100).

4-Toluensulfonato de 2-Iodofenoxietilo (**119**)



El alcohol **118** (460 mg, 1,7 mmol) se trató con cloruro de tosilo siguiendo el método general. La evaporación del solvente dió 691 mg (97% de rendimiento) de **119** como un aceite incoloro que se empleó como tal en la siguiente etapa: R_f 0,32 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3063, 2953, 2876, 1597, 1495, 1439, 1360, 1250, 1177, 1040, 932, 750; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,43 (s, 3 H, Me), 4,21 (t, $J = 4,9$, 2 H, H-1), 4,41 (t, $J = 4,9$, 2 H, H-2), 6,73 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos), 7,26 (dt, $J = 7,7$, 1,1 Hz, 1 H, H-5'), 7,32 (d, $J = 8,0$ Hz, 2 H, H-3"), 7,74 (dd, $J = 7,5$, 1,2 Hz, 1 H, H-3'), 7,79 (dd, $J = 7,7$, 1,4 Hz, 1 H, H-3'), 7,84 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H, H-2"); EM (m/z , intensidad relativa) 418 (M^+ , 11), 199 (71), 155 (38), 91 (100).

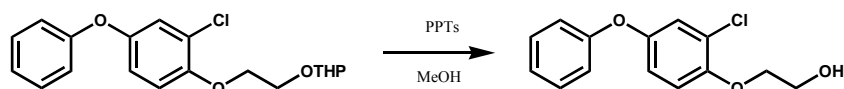
Tiocianato de 2-Iodofenoxietilo (**120**)



Una solución de **119** (309 mg, 0,74 mmol) en *N,N*-dimetilformamida se trató con tiocianato de potasio según el método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 153 mg (68% de rendimiento) de tiocianato **120** como un aceite incoloro: R_f 0,30 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3061, 2939, 2876, 2154, 1580, 1489, 1277, 1246, 1018, 750; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,39 (t, $J = 5,8$ Hz, 2 H, H-1), 4,34 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-2), 6,81 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos), 7,32 (dt, $J = 7,6, 1,4$ Hz, 1 H, H-5'), 7,79 (dd, $J = 7,7, 1,4$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 33,3 (C-1), 67,0 (C-2), 86,7 (C-2'), 112,8 (C-6'), 123,8 (C-4'), 129,6 (C-5'), 139,7 (C-3'), 156,5 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 305 (M^+ , 23), 220 (9), 178 (13), 86 (100).

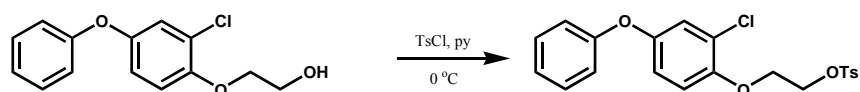
Anal. Calculado para $\text{C}_9\text{H}_8\text{IONS}$: C 35,43, H 2,64, N 4,59, S 10,51; encontrado C 35,59, H 2,79, N 4,46, S 10,25.

2-Cloro-4-fenoxi-fenoxietanol (**123**)



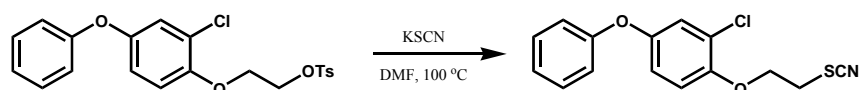
Una solución del compuesto **122** (635 mg, 1,8 mmol) en metanol (20 ml) se trató con *p*-toluensulfonato de piridonio (30 mg) de acuerdo al método general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando una mezcla de hexano–AcOEt (9:1) como eluyente para dar 200 mg (42% de rendimiento) de compuesto **123** como un aceite incoloro: IR (film, cm^{-1}) 3385, 3076, 2941, 1596, 1491, 1266, 1216, 1057, 913, 758, 695; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,33 (sa, 1 H, OH), 3,97 (m, 2 H, H-1), 4,12 (t, $J = 4,4$ Hz, 2 H, H-2), 6,89–7,36 (m, 9 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 61,29 (C-1), 71,53 (C-2), 115,31 (C-2''), 118,27 (C-5'), 118,39 (C-6'), 121,36 (C-3'), 123,28 (C-4''), 129,77 (C-2'), 150,43 (C-4'), 151,29 (C-1), 157,42 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 266 (M^+ , 20), 264 (M^+ , 60), 222 (26), 220 (96), 84 (49), 77 (60), 49 (100).

4-Toluensulfonato de 2-Cloro-4-fenoxi-fenoxietilo (**124**)



A solución de alcohol **123** (180 mg, 0,68 mmol) en piridina (3 ml) se trató con cloruro de tosilo (250 mg, 1,3 mmol) de la forma habitual. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) eluyendo con hexano–AcOEt (19:1) para dar 113 mg (40% de rendimiento) de **124** como un aceite incoloro: RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,42 (s, 3 H, *Me*), 4,19 (m, 2 H, H-2), 4,38 (m, 2 H, H-1), 6,82-7,35 (m, 10 H, hidrógenos aromáticos), 7,82 (d, $J = 5,3$ Hz, 2 H, H-2''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 21,55 (*Me*), 67,47 (C-2), 67,92 (C-1), 115,52 (C-2''), 118,15 (C-5'), 118,31 (C-6'), 121,28 (C-3'), 123,33 (C-4''), 124,19 (C-2'), 127,89 (C-2'''), 129,76 (C-3'''), 129,83 (C-3'''), 132,71 (C-4'''), 144,91 (C-1'''), 149,86 (C-4'), 151,49 (C-1'), 157,27 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 420 (M^+ , 6), 418 (M^+ , 15), 221 (4), 219 (10), 199 (100), 155 (31), 91 (86), 77 (47).

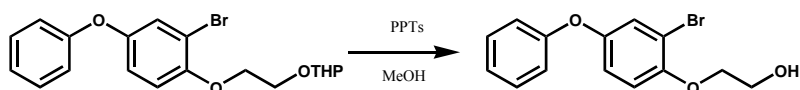
Tiocianato de 2-Cloro-4-fenoxi-fenoxietilo (**125**)



Una solución de **124** (120 mg, 0,29 mmol) en *N,N*-dimetilformamida (3 ml) se trató con tiocianato de potasio (300 mg, 3,09 mmol) de acuerdo al procedimiento general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) eluyendo con hexano–AcOEt (9:1) para dar 65 mg (73% de rendimiento) de tiocianato **125** como un aceite incoloro: IR (film, cm^{-1}) 2918, 2850, 2156, 1481, 1217, 1055, 1024, 924, 876, 824, 961; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,38 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-1), 4,34 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-2), 6,91-7,38 (m, 8 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 33,26 (C-1), 68,10 (C-2), 116,06 (C-2'), 118,26 (C-5'), 118,51 (C-6'), 121,38 (C-3'), 123,49 (C-4''), 124,63 (C-2''), 129,84 (C-3''), 149,64 (C-4'), 152,09 (C-1'), 157,16 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 307 (M^+ , 7), 305 (M^+ , 20), 221 (13), 219 (36), 86 (42), 77 (100).

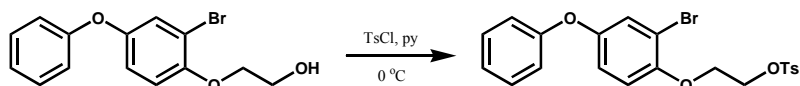
Anal. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{NSCl}$: C 58,92, H 3,96; encontrado C 59,06, H 4,22.

2-Bromo-2-fenoxifeniletanol (**127**)



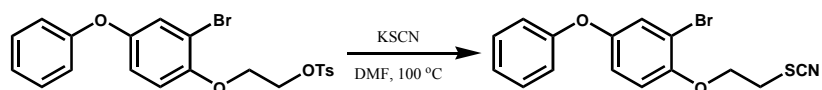
El compuesto **127** se preparó a partir de **126** (510 mg, 1,3 mmol) siguiendo el método de preparación general. La purificación por columna cromatográfica (silica gel) eluyendo con hexano–AcOEt (17:1) dio lugar a 256 mg (64% de rendimiento) de alcohol **127** como un aceite incoloro: R_f 0,20 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3391, 2930, 2858, 1589, 1490, 1457, 1217, 1047, 870, 750; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,39 (dist t, $J = 5,9$ Hz, 1 H, OH), 3,97 (m, 2 H, H-1), 4,11 (t, $J = 4,5$ Hz, 2 H, H-2), 6,87-7,37 (m, 8 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 61,29 (C-1), 71,62 (C-2), 113,03 (C-2'), 114,96 (C-2''), 118,24 (C-5'), 119,17 (C-6'), 123,25 (C-4''), 124,28 (C-3'), 129,78 (C-3''), 151,33 (C-4'), 151,41 (C-1'), 157,48 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 310 (M^+ , 93), 308 (M^+ , 100), 266 (68), 264 (69), 157 (25), 77 (75).

4-Toluensulfonato de 2-Bromo-4-fenoxifeniletilo (**128**)



El alcohol **127** (220 mg, 0,71 mmol) se trató con cloruro de tosilo de acuerdo al procedimiento general. Una vez finalizada la reacción se obtuvieron 310 mg (94% de rendimiento) de **128** que se usó como tal en el siguiente paso sintético: R_f 0,30 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3067, 2953, 2876, 1589, 1496, 1360, 1267, 1215, 1020, 910, 814, 754, 692; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,43 (s, 3 H, Me), 4,19 (m, 2 H, H-2), 4,39 (m, 2 H, H-1), 6,77-7,35 (m, 10 H, hidrógenos aromáticos), 7,83 (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H, H-2'''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 21,63 (Me), 67,60 (C-1), 67,89 (C-2), 113,25 (C-2'), 115,38 (C-2''), 118,33 (C-5'), 118,93 (C-6'), 123,36 (C-4''), 124,33 (C-3'), 128,00 (C-2'''), 129,81 (C-3''), 129,89 (C-3'''), 144,97 (C-1'''), 150,90 (C-4'), 157,37 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 464 (M^+ , 6), 462 (M^+ , 6), 310 (15), 308 (13), 266 (33), 264 (33), 199 (86), 155 (32), 91 (73), 77 (100).

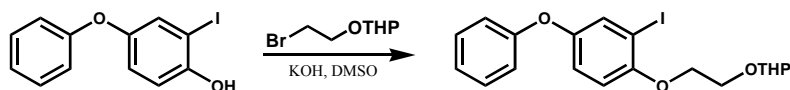
Tiocianato de 2-Bromo-4-fenoxi-fenoxietilo (**129**)



El compuesto **128** (273 mg, 0,60 mmol) se trató con tiocianato de potasio como se describió en el método general. La purificación por columna cromatográfica (silica gel) empleando hexano–AcOEt (9:1) como eluyente condujo a 130 mg (62% de rendimiento) de **129** como un aceite incoloro: R_f 0,36 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3067, 2934, 2877, 2156, 1587, 1483, 1265, 1215, 1070, 1043, 1022, 910, 874, 756, 699; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,37 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-1), 4,33 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-2), 6,88-7,37 (m, 8 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 33,26 (C-1), 67,98 (C-2), 113,40 (C-2'), 115,60 (C-2''), 118,43 (C-5'), 119,01 (C-6'), 123,46 (C-4''), 124,34 (C-3'), 129,83 (C-3''), 150,59 (C-4'), 152,28 (C-1'), 157,24 (C-1''); EM (m/z , intensidad relativa) 351 (M^+ , 69), 349 (M^+ , 66), 265 (60), 263 (61), 128 (19), 86 (32), 77 (100).

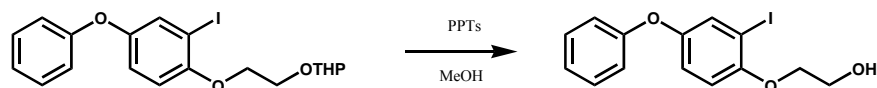
Anal. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{NSBr}$: C 51,44, H 3,45; encontrado C 51,12, H 3,65.

2-Iodo-4-fenoxifenoxietil Tetrahidro-2H-piran-2-il Ether (131)

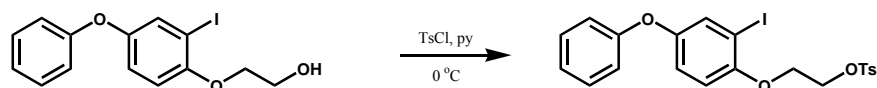


Una solución de iodofenol **130** (225 mg, 0,72 mmol) en dimetil sulfóxido se trató con hidróxido de potasio y bromoetil tetrahidropiranyléter de acuerdo al método general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando una mezcla de hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 216 mg (68% de rendimiento) de **131** como un aceite incoloro: R_f 0,45 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3063, 2941, 1872, 1587, 1479, 1456, 1265, 1219, 1140, 1034, 891, 814, 750, 692; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,50-1,80 (m, 6 H, H-3''', H-4''', H-5'''), 3,56 (m, 1 H, H-6'''_a), 3,83-4,07 (m, 3 H, H-1, H-6'''_b), 4,17 (dist t, $J = 4,7$ Hz, 2 H, H-2), 4,80 (dist t, $J = 3,1$ Hz, 1 H, H-2'''), 6,82 (d, $J = 8,9$ Hz, 1 H, H-6'), 6,92-7,09 (m, 4 H, hidrógenos aromáticos), 7,25-7,34 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos), 7,46 (d, $J = 2,8$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 19,22 (C-4'''), 25,40 (C-5'''), 30,50 (C-3'''), 62,05 (C-6'''), 65,60 (C-1), 69,53 (C-2), 86,74 (C-2'), 99,02 (C-2'''), 113,07 (C-6'), 117,91 (C-2''), 120,18 (C-5'), 122,95 (C-4''), 129,67 (C-3'), 130,35 (C-3''), 151,02 (C-4'), 154,14 (C-1''), 157,80 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 440 (M^+ , 10), 356 (2), 312 (23), 129 (100); EMAR Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{I}$: 440,0485; encontrado 440,0483.

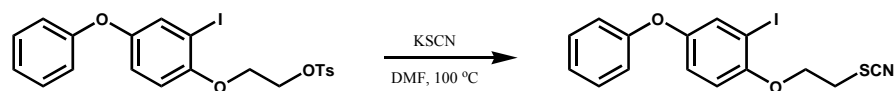
Anal. Calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{IO}_4$: C 51,83, H 4,81; encontrado C 51,98, H 4,68.

2-Iodo-4-fenoxifenoxietanol (132)

Una solución de compuesto **131** (190 mg, 0,43 mmol) en metanol se trató con *p*-toluensulfonato de piridonio de acuerdo al método general. La evaporación del solvente dio lugar a 91 mg (59% de rendimiento) de alcohol **132** como un aceite incoloro: R_f 0,16 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3366, 3065, 3034, 2936, 2874, 1475, 1456, 1265, 1217, 1074, 1043, 889, 816, 750, 692; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,40 (sa, 1 H, OH), 3,96 (m, 2 H, H-1), 4,10 (t, $J = 4,6$ Hz, 2 H, H-2), 6,80 (d, $J = 8,9$ Hz, 1 H, H-6'), 6,91-7,11 (m, 4 H, hidrógenos aromáticos), 6,94 (d, $J = 9,0$ Hz, 1 H, H-5'), 7,27-7,35 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos), 7,45 (d, $J = 2,7$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 61,26 (C-1), 71,59 (C-2), 87,07 (C-2'), 113,40 (C-6'), 118,08 (C-2''), 120,25 (C-5'), 123,14 (C-4''), 129,74 (C-3'), 130,10 (C-3''), 151,47 (C-4'), 153,53 (C-1''), 157,60 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 356 (M^+ , 59), 312 (97), 264 (12), 230 (16), 220 (20), 186 (30), 77 (100).

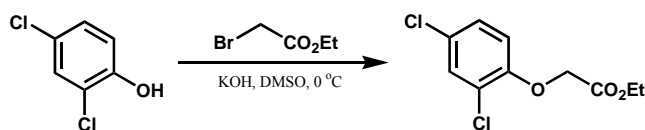
4-Toluensulfonato de 2-Iodo-4-fenoxifenoxietilo (133)

Una solución de alcohol **132** (80 mg, 0,22 mmol) en piridina se trató con cloruro de *p*-toluensulfonilo a 0 °C de acuerdo al procedimiento general. La evaporación del solvente dió lugar a 119 mg (100% de rendimiento) de tosilato **133** como un aceite incoloro: R_f 0,35 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 2924, 2872, 1477, 1456, 1267, 1217, 1176, 1022, 928, 891, 816, 777; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2,42 (s, 3 H, Me), 4,16 (m, 2 H, H-2), 4,39 (m, 2 H, H-1), 6,70 (d, $J = 8,9$ Hz, 2 H, H-6'), 6,93 (m, 7 H, hidrógenos aromáticos), 7,42 (d, $J = 2,8$ Hz, 1 H, H-3'), 7,83 (d, $J = 8,3$ Hz, 2 H, H-2'''); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 21,55 (Me), 61,20 (C-1), 67,56 (C-2), 86,85 (C-2'), 113,47 (C-6'), 118,08 (C-2''), 119,97 (C-5'), 123,17 (C-4''), 127,92 (C-2'''), 129,71 (C-3'''), 129,84 (C-3'), 130,18 (C-3''), 132,74 (C-4'''), 144,87 (C-1'''), 151,73 (C-4'), 153,16 (C-1''), 157,43 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 510 (M^+ , 16), 311 (13), 199 (100), 155 (34), 91 (82).

4-Tiocianato de 2-Iodo-4-fenoxifenoxietilo (134)

Una solución de tosilato **133** (110 mg, 0,22 mmol) en *N,N*-dimetilformadida anhidra se trató con tiocianato de potasio de acuerdo al procedimiento general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (19:1) como eluyente para dar 45 mg (52% de rendimiento) de tiocianato **134** como un aceite incoloro: R_f 0,31 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}) 3063, 3040, 2926, 2876, 2154, 1585, 1481, 1387, 1267, 1215, 1070, 1038, 878, 816, 773, 692; RMN ^1H (CDCl_3) δ 3,39 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-1), 4,31 (t, $J = 5,9$ Hz, 2 H, H-2), 6,81 (d, $J = 8,9$ Hz, 1 H, H-6'), 6,93-7,13 (m, 4 H, hidrógenos aromáticos), 7,29-7,37 (m, 2 H, hidrógenos aromáticos), 7,46 (d, $J = 2,8$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 33,31 (C-1), 67,90 (C-2), 87,04 (C-2'), 113,80 (C-6'), 118,28 (C-2''), 120,11 (C-5'), 123,33 (C-4''), 129,80 (C-3'), 130,31 (C-3''), 152,17 (C-4'), 152,94 (C-1''), 157,39 (C-1'); EM (m/z , intensidad relativa) 397 (M^+ , 69), 311 (45), 128 (74), 77 (100).

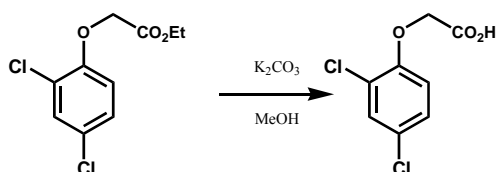
Anal. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{NSI}$: C 45,36, H 3,53; encontrado C 45,51, H 3,43.

2-(2,4-diclorofenoxi) acetato de etilo (136)

Una solución de 2,4-diclorofenol (3,00 g, 18,4 mmol) en dimetil sulfóxido (10 ml) se trató con hidróxido de potasio (4, 12 g, 73,6 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se agregó bromoacetato de etilo (2,45 ml, 22 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se particionó entre agua y cloruro de metileno. La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2 \times 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (2 \times 50 ml), se secaron (MgSO_4), se filtraron y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (19:1) como solvente de elución para dar 3.55 g (78% de rendimiento) de **136**

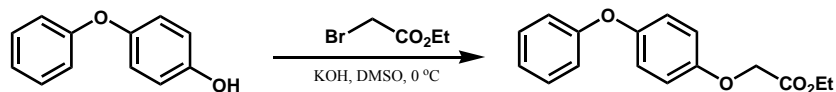
como un aceite incoloro: R_f 0,63 (hexano–AcOEt, 4:1); RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,29 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 4,26 (q, $J = 7,1$ Hz, 2 H, CH_2CH_3), 4,67 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 6,78 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H, H-5'), 7,16 (dd, $J = 8,8, 2,6$ Hz, 1 H, H-4'), 7,38 (d, $J = 2,2$ Hz, 1 H, H-2'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 14,09 (CH_2CH_3), 61,55 (CH_2CH_3), 66,62 (C-1), 114,92 (C-6'), 122,40 (C-2'), 127,19 (C-4'), 127,51 (C-5'), 130,31 (C-3'), 142,55 (C-1'), 168,04 (C-2); EM (m/z , intensidad relativa) 252 (M^+ , 10), 250 (M^+ , 55), 248, (M^+ , 84), 213 (45), 185 (72), 175 (100), 147 (48), 111 (68), 59 (77).

Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi) acético (137)



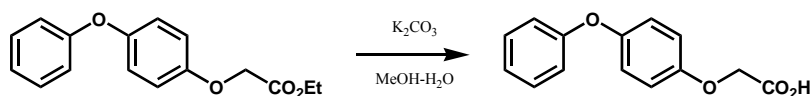
Una solución de **136** (2,88 g, 11,61 mmol) en metanol–agua (4:1, 15 ml) se trató con carbonato de potasio (0,50 g, 4,0 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego, se llevó a $\text{pH} = 4$ y se particionó entre agua (50 ml) y cloruro de metileno (50 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2×50 ml). La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el solvente para dar 2,42 g (95% rendimiento) de ácido **137** como un sólido blanco: R_f 0,5 (hexano–AcOEt, 4:1); pf 135–138 °C; RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$) δ 4,68 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 6,84 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-6'), 7,18 (dd, $J = 8,8, 2,6$ Hz, 1 H, H-5'), 7,38 (d, $J = 2,6$ Hz, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$) δ 65,97 (C-1), 114,60 (C-6'), 121,26 (C-2'), 126,70 (C-4'), 127,34 (C-5'), 129,93 (C-3'), 152,36 (C-1'), 170,04 (C-2); EM (m/z , intensidad relativa) 224 (M^+ , 5), 222 (M^+ , 30), 220 (M^+ , 53), 185 (6), 175 (22), 162 (100).

2-(4-Fenoxifenoxi)acetato de etilo (139)



Una solución de 4-fenoxifenol (1,00 g, 5,37 mmol) en dimetil sulfóxido (5 ml) se trató con hidróxido de potasio (1,00 g, 3,18 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se agregó bromoacetato de etilo (1,2 ml, 10,8 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se particionó entre agua (60 ml) y cloruro de metileno (50 ml). La fase acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2×50 ml). La fase orgánica resultante se lavó con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio (2×50 ml), se secó (MgSO_4), se filtró y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (19:1) como solvente de elución para dar 750 mg (86% de rendimiento) de **139** como un aceite incoloro: R_f 0,39 (hexano–AcOEt, 8:2); RMN ^1H (CDCl_3) δ 1,30 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 4,27 (q, $J = 7,1$ Hz, 2 H, OCH_2CH_3), 4,59 (s, 2 H, H-1), 6,86–7,33 (m, 9 H, hidrógenos aromáticos); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 14,15 (OCH_2CH_3), 61,34 (OCH_2CH_3), 66,11 ($\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 115,94 (C-2'), 117,91 (C-2''), 120,58 (C-3'), 122,68 (C-4'), 129,61 (C-3''), 151,22 (C-4'), 154,08 (C-1'), 158,13 (C-1''), 168,93 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$); EM (m/z , intensidad relativa) 272 (M^+ , 100), 244 (2), 199 (8), 185 (74), 77 (45).

Ácido 2-(4-fenoxifenoxi) acético (**140**)



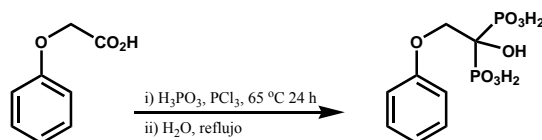
Una solución de **139** (600 mg, 2,20 mmol) en metanol–agua (4:1, 65 ml) se trató con carbonato de potasio (300 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se trató de manera similar a la descrita para la preparación de **137** para dar 490 mg (92% de rendimiento) de ácido **140** como un sólido blanco: R_f 0,66 (AcOEt); pf 114–116 °C; RMN ^1H (CDCl_3) δ 4,63 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 6,85–7,32 (m, 9 H, hidrógenos aromáticos), 9,72 (s, 1 H, CO_2H); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 65,38 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 115,89 (C-2'), 117,94 (C-2''), 120,53 (C-3'), 122,74 (C-4''), 129,61 (C-3''), 151,44 (C-4'), 153,54 (C-1'), 157,91 (C-1''), 174,01 (CO_2H); EM (m/z , intensidad relativa) 244 (M^+ , 49), 185 (48), 129 (34), 77 (100).

Preparación de ácidos 1-hidroxi-1,1-bisfosfónicos

Método general.

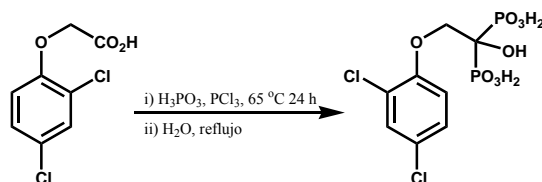
En un balón de tres bocas equipado con una ampolla compensadora y un refrigerante por el cual circula agua a 0 °C, se agregó el ácido carboxílico correspondiente (1 equivalente), ácido fosforoso (1 equivalente) y ácido bencensulfónico anhidro (15,0 g) bajo atmósfera de argón. La reacción se calentó a 65 °C. Luego, se agregó tricloruro de fósforo (2 equivalentes) gota a gota con agitación vigorosa. La mezcla de reacción se agitó a 65 °C durante 16 horas y posteriormente se llevó a temperatura ambiente. Se agregó agua (60 ml) gota a gota y se calentó a 100 °C durante 5 horas. Se dejó enfriar y se ajustó el pH a 4,3 con una solución acuosa de hidróxido de sodio 50%. Se agregó etanol (20 ml) y la mezcla resultante se enfrió a 0 °C por 24 horas. El producto resultante se filtró y se recristalizó a partir de mezclas de agua-etanol según se indica en cada caso.

Ácido fenoxi-1-hidroxietil-1,1-bisfosfónico (138)



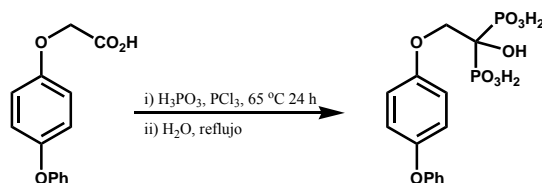
Se siguió el método general: ácido fenoxiacético (2,00 g, 13,2 mmol), ácido fosforoso (1,08 g, 13,2 mmol) y ácido bencensulfónico anhidro (10 g) bajo atmósfera de argón. La reacción se calentó a 65 °C. Luego se agregó tricloruro de fósforo (2,78 ml, 27,7 mmol) gota a gota con agitación vigorosa. La reacción se agitó a 65 °C durante 16 horas y posteriormente se llevó a temperatura ambiente. Se agregó H₂O (40 ml) gota a gota y se calentó a 100 °C durante 5 horas. Se dejó enfriar y se ajustó el pH a 4,3. Se agregó etanol (20 ml) y la mezcla resultante se enfrió a 0 °C por 24 horas. El producto resultante se filtró y recristalizó de agua-etanol para dar 3,54 g (90% de rendimiento): IR (BrK, cm⁻¹) 3372, 1600, 1496, 1236, 1182, 902; RMN ¹H (D₂O) δ 4,44 (t, *J* = 9,7 Hz, 2 H, H-2), 7,05 (t, *J* = 7,3 Hz, 2 H, H-3'), 7,01 (d, *J* = 7,5 Hz, 2 H, H-2'), 7,38 (t, *J* = 7,7 Hz, 2 H, H-4'); RMN ¹³C (D₂O) δ 71,73 (C-2), 75,12 (t, *J* = 132,7 Hz, C-1), 116,11 (C-2'), 122,39 (C-4'), 130,78 (C-3'), 159,61 (C-1'); RMN ³¹P (D₂O) δ 14,99.

Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)-1-hidroxietil-1,1-bisfosfónico. (142)



Se siguió el procedimiento general: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (3,09 g, 14,0 mmol), ácido fosforoso (1,15 g, 14,0 mmol) y ácido bencensulfónico anhidro (10 g). Luego se agregó tricloruro de fósforo (2,81 ml, 28,0 mmol). El producto resultante se filtró y recrystalizó con agua-etanol para dar 3,99 g (78% de rendimiento): IR (BrK, cm^{-1}) 3286, 1645, 1487, 1238, 1126, 1064, 937, 875, 563; RMN ^1H (D_2O) δ 4,27-4,31 (m, 2 H, H-2), 7,11 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H, H-6'), 7,30 (dd, $J = 8,8, 2,6$ Hz, 1 H, H-5'), 7,47 (d, $J = 2,6$, 1 H, H-3'); RMN ^{13}C (D_2O) δ 73,10 (C-2), 74,88 (t, $J = 133,5$ Hz, C-1), 116,49 (C-6'), 123,95 (C-2'), 126,74 (C-4'), 128,90 (C-5'), 130,28 (C-3'), 153,77 (C-1'); RMN ^{31}P (D_2O) δ 15,01.

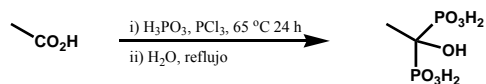
Ácido 2-(4-fenoxifenoxi)-1-hidroxi-etil-1,1-bisfosfónico. (143)



En un balón de tres bocas equipado con una ampolla compensadora y un refrigerante por el cual circula agua a 0 °C, se agregó ácido 2-(4-fenoxifenoxi)acético (3,43 g, 14 mmol), ácido fosforoso (1,15 g, 14 mmol) y ácido bencensulfónico anhidro (10,0 g) bajo atmósfera de argón de acuerdo al procedimiento general. La reacción se calentó a 65 °C. Luego se agregó tricloruro de fósforo (2,81 ml, 28 mmol). El producto resultante se filtró y recrystalizó de agua-etanol para dar 4,69 g (86% de rendimiento) de **143** como un sólido blanco: pf > 270 °C; IR (BrK, cm^{-1}) 3430, 1597, 1511, 1501, 1215, 1063, 933, 515. RMN ^1H (KOD 40% (w/w) en D_2O) δ 3,91 (t, $J = 8,6$ Hz, 2 H, H-2), 6,30 (d, $J = 7,9$ Hz, 2 H, H-3'), 6,36 (t, $J = 7,2$ Hz, 1 H, H-4''), 6,41 (d, $J = 8,8$ Hz, 2 H, H-2''), 6,59 (d, $J = 7,0$ Hz, 2 H, H-2'), 6,61 (d, $J = 9,0$ Hz, 2 H, H-3''); RMN ^{13}C (KOD 40% (w/w) en D_2O) δ 75,05 (C-2), 76,57 (t, $J = 130,8$ Hz, C-1), 116,78 (C-2'), 118,12 (C-2''), 121,36 (C-3'),

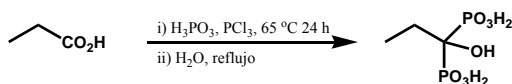
123,45 (C-4"), 130,45 (C-3"), 150,21 (C-4'), 156,18 (C-1'), 158,18 (C-1"); RMN ^{31}P (KOD 40% (w/w) en D_2O) δ 16,54.

Ácido 1-hidroxietil-1,1-bisfosfónico (145)



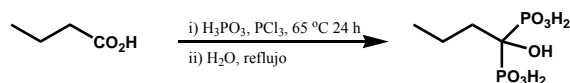
En un balón de tres bocas equipado con una ampolla compensadora y un refrigerante por el cual circula agua a 0 °C, se agregó ácido acético glaciar (1,5 g, 25 mmol), ácido fosforoso (2,04 g, 25 mmol) y ácido bencensulfónico anhidro (10,0 g) bajo atmósfera de argón. La reacción se calentó a 65 °C. Luego se agregó tricloruro de fósforo (5,02 ml, 50 mmol) gota a gota y se siguió el procedimiento general. El producto resultante se filtró y se recristalizó de agua-etanol para dar 1,97 g (39% de rendimiento) de **145** como un sólido blanco: $\text{pf} > 270$ °C; IR (BrK, cm^{-1}) 3444; RMN ^1H (D_2O) δ 1,48 (t, $J = 15,2$ Hz, 3 H, H-2); RMN ^{13}C (D_2O) δ 20,60 (C-2), 72,14 (t, $J = 143,1$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (D_2O) δ 18,72.

Ácido 1-hidroxipropil-1,1-bisfosfónico (147)



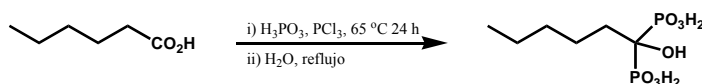
Una mezcla de ácido propiónico anhidro (2,00 g, 26,9 mmol), ácido fosforoso (2,20 g, 26,9 mmol) y ácido bencensulfónico anhidro (10 g) bajo atmósfera de argón y luego se se agregó tricloruro de fósforo (5,40 ml, 53,8 mmol) de acuerdo al método general. El producto resultante se filtró y se recristalizó de agua-etanol para dar 5,2 g (75% de rendimiento) de **147** como un sólido blanco: $\text{pf} > 270$ °C; IR (BrK, cm^{-1}): 3471, 2331, 1178, 1060, 933; RMN ^1H (D_2O) δ 1,00 (t, $J = 7,7$ Hz, 3 H, H-3), 1,78-2,04 (m, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (D_2O) δ 9,18 (t, $J = 6,1$ Hz, C-2), 27,40 (C-3), 75,42 (t, $J = 133,6$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (D_2O) δ 19,81.

Ácido 1-hidroxibutil-1,1-bisfosfónico (149)



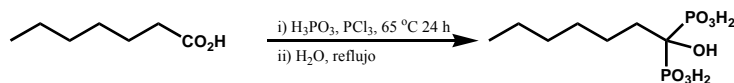
Una mezcla de ácido butírico anhidro (1,23 g, 14,0 mmol), ácido fosforoso (1,15 g, 14,0 mmol) y ácido bencensulfónico anhidro (10 g) se trató de acuerdo al método general seguido de tratamiento con tricloruro de fósforo (3,85 g, 28,0 mmol). El producto resultante se filtró y se recrystalizó de agua–etanol para dar 3.27 g (99% de rendimiento) de **149** como un sólido blanco: $p_f > 270$ °C; IR (BrK, cm^{-1}) 3448, 2345, 1652, 1176, 1060, 941; RMN ^1H (D_2O) δ 0,83 (m, 3 H, H-4), 1,48 (m, 2 H, H-3), 1,80 (m, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (D_2O) δ : 15,12 (C-4), 18,04 (t, $J = 6,6$ Hz, C-2), 36,94 (C-3), 75,28 (t, $J = 132,2$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (D_2O) δ 18,68; ^{31}P RMN (acoplado con H, D_2O) δ 18,67 (t, $J = 14,4$ Hz)

Ácido 1-hidroxihexil-1,1-bisfosfónico (151)



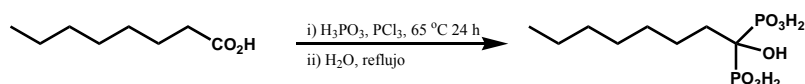
Una mezcla de ácido hexanoico anhidro (1,62 g, 14,0 mmol), ácido fosforoso (1,15 g, 14,0 mmol) y ácido bencensulfónico anhidro (10 g) se trató de acuerdo al método general seguido de tratamiento con tricloruro de fósforo (3,85 g, 28,0 mmol). El producto resultante se filtró y se recrystalizó de agua–etanol para dar 3,59 g (98% de rendimiento) de **151** como un sólido blanco: $p_f > 270$ °C; IR (BrK, cm^{-1}) 3450, 2958, 2316, 1699, 1176, 1062, 927; RMN ^1H (D_2O) δ 0,87 (t, $J = 7,3$ Hz, 3 H, H-6), 1,17-1,23 (m, 2 H, H-5), 1,24-1,31 (m, 2 H, H-4), 1,43-1,49 (m, 2 H, H-3), 1,67-1,77 (m, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (D_2O) δ 14,31 (C-6), 22,74 (C-5), 24,13 (t, $J = 6,4$ Hz, C-2), 32,93 (C-3), 34,61 (C-4), 75,26 (t, $J = 134,8$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (D_2O) δ 18,13.

Ácido 1-hidroxieptil-1,1-bisfosfónico (153)



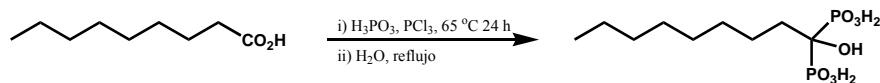
Una mezcla de ácido heptanoico anhidro (1,82 g, 14,0 mmol), ácido fosforoso (1,15 g, 14,0 mmol) y ácido bencensulfónico anhidro (3,0 g) se trató de acuerdo al método general. Luego se agregó tricloruro de fósforo (2,81 ml, 28,0 mmol). El producto resultante se filtró y se recrystalizó de agua-etanol para dar 3.86 g (84% de rendimiento) de **153** como un sólido blanco: pf > 270 °C; IR (BrK, cm^{-1}): 3444, 2356, 1652, 1193, 1051, 920; RMN ^1H (D_2O) δ 0,79 (dist t, $J = 5,9$ Hz, 3 H, H-7), 1,20-1,26 (m, 6 H, H-4, H-5, H-6), 1,46-1,52 (m, 2 H, H-3), 1,80-1,89 (m, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (D_2O) δ 14,26 (C-7), 22,90 (C-6), 24,43 (t, $J = 5,9$ Hz, C-2), 30,34 (C-3), 31,87 (C-4), 34,63 (C-5), 75,25 (t, $J = 134,8$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (D_2O) δ 19,59 (t, $J = 15,0$ Hz) acoplado con H.

Ácido 1-hidroxiocetil-1,1-bisfosfónico (155)



Una mezcla de ácido octanoico anhidro (1,00 g, 6,94 mmol), ácido fosforoso (0,59 g, 6.94 mmol) y ácido bencensulfónico anhidro (3,0 g) se trató de acuerdo al método general. Luego se agregó tricloruro de fósforo (1,39 ml, 13.88 mmol). El producto resultante se filtró y se recrystalizó de agua-etanol para dar 1,65 g (82% de rendimiento) de **155** como un sólido blanco: IR (BrK, cm^{-1}): 3537, 2958, 2927, 2326, 1176, 1062, 920; RMN ^1H (D_2O) δ 0,79 (t, $J = 6,7$ Hz, 3 H, H-8), 1,21-1,23 (m, 8 H, H-7, H-6, H-5, H-4), 1,47-1,52 (m, 2 H, H-3), 1,81-1,90 (m, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (D_2O) δ 14,26 (C-8), 22,85 (C-7), 24,36 (t, $J = 6,4$ Hz, C-2), 29,18 (C-3), 30,56 (C-4), 32,02 (C-5), 34,49 (C-6), 74,97 (t, $J = 136,5$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (D_2O) δ 19,79.

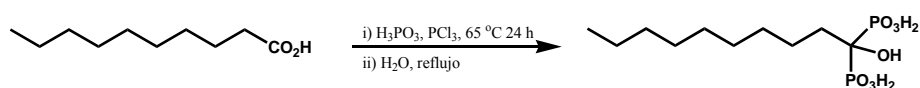
Ácido 1-hidroxinonil-1,1-bisfosfónico (157)



Una mezcla de ácido nonanoico anhidro (2,20 g, 1,40 mmol), ácido fosforoso (1,50 g, 1.4 mmol) y ácido metansulfónico anhidro (3,0 g) se trató de acuerdo al método general. Luego se

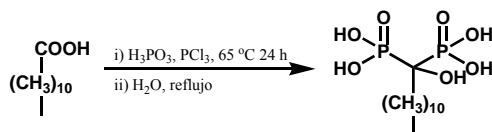
agregó tricloruro de fósforo (3,85 ml, 2.80 mmol). El producto resultante se filtró y se recrystalizó de agua-etanol para dar 0,65 g (77% de rendimiento) de **157** como un sólido blanco: pf > 290 °C; RMN ¹H (D₂O) δ 0,78 (dist t, *J* = 5,70 Hz, 3 H, H-9), 1,18-1,26 (m, 10 H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8), 1,40-1,61 (m, 2 H, H-3), 1,74-1,97 (m, 2 H, H-2); RMN ¹³C (D₂O) δ 14,27 (C-9), 22,85 (C-8), 24,43 (t, *J* = 6,4 Hz, C-2), 29,51 (C-3), 29,54 (C-4), 30,66 (C-5), 32,03 (C-6), 34,53 (C-7), 75,06 (t, *J* = 135,6 Hz, C-1); RMN ³¹P (D₂O) δ 19,52.

Ácido 1-hidroxidecil-1,1-bisfosfónico (159)



Una mezcla de ácido decanoico anhidro (2,40 g, 1,40 mmol), ácido fosforoso (1,50 g, 1.4 mmol) y ácido metansulfónico anhidro (3,0 g) se trató de acuerdo al método general. Luego se agregó tricloruro de fósforo (3,85 ml, 2.80 mmol). El producto resultante se filtró y se recrystalizó de agua-etanol para dar 3,29 g (74% de rendimiento) de **159** como un sólido blanco: pf 285–287 °C; IR (BrK, cm⁻¹): 3514, 2958, 2923, 2854, 1247, 929; RMN ¹H (10% H₂SO₄ (c) en D₂O) δ 0,78 (dist t, *J* = 5,8 Hz, 3 H, H-10), 1,15-1,30 (m, 12 H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), 1,45-1,60 (m, 2 H, H-3), 1,75-2,00 (m, 2 H, H-2); RMN ¹³C (10% H₂SO₄ (c) en D₂O) δ 12,70 (C-10), 21,40 (C-9), 21,63 (t, *J* = 5,6 Hz, C-2), 27,64 (C-3),* 27,85 (C-4),* 28,01 (C-5),* 28,34 (C-6),* 30,56 (C-7), 31,73 (C-8), 72,75 (t, *J* = 163,8 Hz, C-1); RMN ³¹P (10% H₂SO₄ (c) en D₂O) δ 24,72 ; RMN ³¹P (10% H₂SO₄ (c) en D₂O) δ 24,71 (t, *J* = 18,6 Hz) acoplado con H.

Ácido 1-hidroxidodecil-1,1-bisfosfónico (161)



Una mezcla de ácido dodecanoico anhidro (2,94 g, 1,40 mmol), ácido fosforoso (1,50 g, 1.4 mmol) y ácido metansulfónico anhidro (3,0 g) se trató de acuerdo al método general. Luego, se agregó tricloruro de fósforo (3,85 ml, 2.80 mmol). El producto resultante se filtró y se recrystalizó de agua-etanol para dar 3,04 g (61% de rendimiento): RMN ¹H (10% H₂SO₄ (c) en D₂O) δ 0,68-

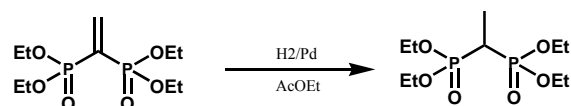
0,72 (m, 3 H, H-12), 1,08-1,12 (m, 16 H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11), 1,41-1,51 (m, 2 H, H-3), 2,03-2,19 (m, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (10% H_2SO_4 (c) en D_2O) δ 12,96 (C-12), 21,72 (C-11), 21,82 (t, $J = 5,1$ Hz, C-2), 28,02 (C-3),* 28,43 (C-9),* 28,50 (C-4),* 28,59 (C-5),* 28,66 (C-6),* 29,73 (C-7),* 28,91 (C-8),* 31,01 (C-10), 72,68 (t, $J = 164,8$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (10% H_2SO_4 (c) en D_2O) δ 24,70 ; RMN ^{31}P (10% H_2SO_4 (c) en D_2O) δ 24,69 (t, $J = 17,8$ Hz) acoplado con H.

Preparacion de alquil-1,1-bisfosfonatos de tetraetilo

Método general

Una solución de halogenuro de alquilo (10 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (15 ml) se trató con magnesio metálico (10 mmol) y una cantidad catalítica de yodo bajo atmósfera de argón. Para halogenuros de alquilo de mas de 5 átomos de carbono en su estructura fue necesario calentar la mezcla para iniciar la reacción. Una vez que se consumió el magnesio, se observó la formación de una solución gris oscura y se enfrió la mezcla a 0 °C. Luego, una solución de etiliden-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (1 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) se agregó con jeringa gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 hora. La reacción finalizó por agregado de una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (10 ml). La mezcla se extrajo con cloruro de metileno (2×20 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro de sodio (2×20 ml), se secaron (MgSO_4) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó utilizando columna cromatográfica (sílica gel). El sistema de solventes de elución utilizado se detalla en cada caso.

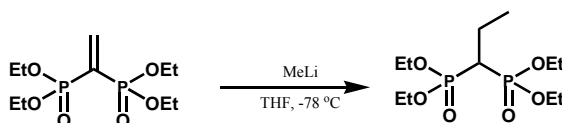
Etil 1,1-Bisfosfonato de Tetraetilo (165)



A una solución de etilidén-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (200 mg, 0,66 mmol) en acetato de etilo (10ml) en presencia de paladio 10% sobre carbón como catalizador, se trató con hidrógeno a 3 atmósferas en un aparato Parr. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se filtró y se evaporó el solvente para dar 190 mg (95% rendimiento) de **165** como un aceite incoloro: R_f 0,2 (AcOEt); IR (film, cm^{-1}) 2985, 1645, 1251, 1022, 968, 819; RMN ^1H

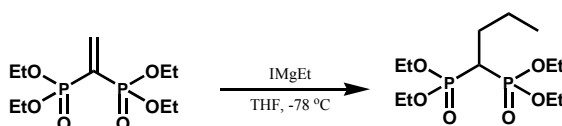
(CDCl₃) δ 1,34 (t, $J = 7,1$ Hz, 12 H, H-2'), 1,46 (dt, $J = 17,4, 7,3$ Hz, 3 H, H-2), 2,39 (tq, $J = 30,8, 7,2$ Hz, 1 H, H-1), 4,11-4,25 (m, 8 H, H-1'); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 10,12 (t, $J = 6,1$ Hz, C-2), 16,27 (d, $J = 5,4$ Hz, C-2'), 31,00 (t, $J = 136,3$ Hz, C-1), 62,46 (d, $J = 6,8$, C-1'); RMN ³¹P (CDCl₃) δ 21,47; EM (m/z , intensidad relativa) 302 (M⁺, 1), 275 (5), 247 (6), 191 (13), 165 (100).

Propil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (167)



Una solución de etiliden-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (200 mg, 0,66 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) mantenida a -78 °C se trató con una solución 1,5 M de metililitio en tetrahidrofurano anhidro (0,4 ml) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos. Luego se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (2 ml) y se dejó calentar hasta temperatura ambiente. La fase acuosa se extrajo con cloroformo (3×10 ml). La fase orgánica se secó (MgSO₄), se filtró y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como eluyente para dar 83,2 mg (40% de rendimiento) de **167** como un aceite incoloro: R_f 0,67 (CH₂Cl₂–*s*-PrOH, 19:1); IR (KBr, cm⁻¹) 3664, 2983, 1246, 1024, 962; RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,15 (t, $J = 7,3$ Hz, 3 H, H-3), 1,33 (t, $J = 7,1$ Hz, 12 H, H-2'), 1,82-2,06 (m, 2 H, H-2), 2,20 (tt, $J = 23,9, 5,8$ Hz, 1 H, H-1), 4,09-4,25 (m, 8 H, H-1'); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ 14,02 (t, $J = 6,8$ Hz, C-2), 16,37 (dd, $J = 6,8, 3,4$ Hz, C-2'), 19,27 (t, $J = 5,1$ Hz, C-3), 38,50 (t, $J = 133,1$ Hz, C-1), 62,40 (dd, $J = 15,7, 6,4$ Hz, C-1'); RMN ³¹P (CDCl₃) 21,49; EM (m/z , intensidad relativa) 316 (M⁺, 1), 301 (11), 288 (17), 261 (14), 233 (15), 179 (100), 123 (45).

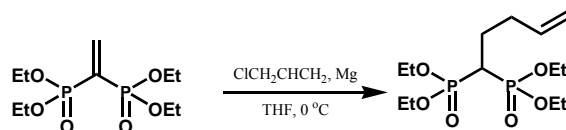
Butil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (169)



Una solución de yoduro de etilo (1,0 ml, 8,3 mmol) en éter etílico anhidro (10 ml) en presencia de yodo se trató con magnesio metálico (204,8 mg, 8,3 mmol) bajo atmósfera de argón. Una vez consumido el magnesio la solución gris oscura se llevó a 0 °C. Luego, una solución de etiliden-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (500 mg, 1,6 mmol) en éter etílico anhidro (5 ml) se agregó lentamente *via* jeringa y se procedió según el método general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (4:1) como solvente de elución para dar 450 mg (85% rendimiento) de **169** como un aceite incoloro: R_f 0,72 (AcOEt–*s*-PrOH–H₂O, 6:3:1); IR (KBr, cm⁻¹) 2980, 1394, 1245, 1165, 1033, 969; RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 0,89 (t, J = 7,3 Hz, 3 H, H-4), 1,31 (t, J = 6,9 Hz, 12 H, H-2'), 1,45-1,64 (m, 2 H, H-3), 1,72-2,00 (m, 2 H, H-2), 2,25 (tt, J = 24,1, 5,8 Hz, 1 H, H-1), 4,06-4,22 (m, 8 H, H-1'); RMN ¹³C (125,77 MHz, CDCl₃) δ 13,71 (C-4), 16,28 (d, J = 6,8 Hz, C-2'), 26,26 (t, J = 6,8 Hz, C-2), 27,50 (t, J = 4,7 Hz, C-3), 36,45 (t, J = 133,6 Hz, C-1), 62,36 (d, J = 7,5 Hz, C-1'); RMN ³¹P (202,45 MHz, CDCl₃) δ 21,51; EM (m/z , intensidad relativa) 331 ([M+1]⁺, 11), 301 (34), 288 (69), 261 (38), 193 (100), 165 (53), 152 (67), 137 (81);

Anal. Calculado para C₁₂H₂₈O₆P₂·H₂O: C. 41,38, H. 8,68; encontrado C 41,64, H 8,78.

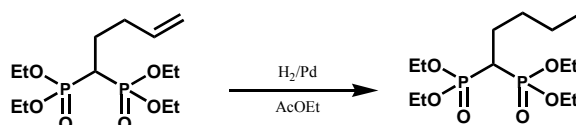
4-Penten-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (171)



Una solución de cloruro de alilo (0,4 ml, 5,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) en presencia de yodo se trató con magnesio metálico (121,5 mg, 5,0 mmol) bajo atmósfera de argón. Una vez consumido el magnesio, la mezcla se llevó a 0 °C y una solución de etiliden-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (415,7 mg, 1,38 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) se agregó lentamente según el método general. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (1:1) como solvente de elución para dar 150 mg (31% de rendimiento) de **171** como un aceite incoloro: R_f 0,75 (AcOEt–*s*-PrOH–H₂O, 6:3:1); IR (KBr, cm⁻¹) 2983, 2933, 2910, 1641, 1456, 1392, 1247, 1165, 1024, 972; RMN ¹H (CDCl₃) δ 1,35 (t, J = 7,1 Hz, 12 H, H-2'), 1,89-2,49 (m, 5 H, H-1, H-2, H-3); 4,11-4,26 (m, 8 H, H-1'), 5,01-5,12 (m, 2 H, H-5), 5,77 (ddt,

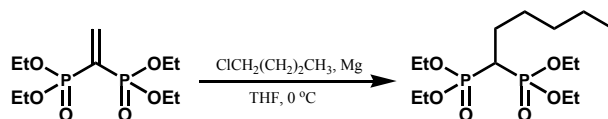
$J = 17,1, 10,2, 6,7$ Hz, 1 H, H-4); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 16,32 (t, $J = 6,8$ Hz, C-2'), 24,59 (t, $J = 4,7$ Hz, C-2), 32,65 (t, $J = 6,1$ Hz, C-3), 35,56 (t, $J = 133,6$, C-1), 62,47 (t, $J = 6,8$ Hz, C-1'), 116,03 (C-5), 137,13 (C-4); RMN ^{31}P δ (CDCl_3) 21,31; EM (m/z , intensidad relativa) 343 ($[\text{M}+1]^+$, 5), 288 (70), 261 (51), 233 (45), 205 (100), 152 (92), 109 (50).

Pentil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (172)



Una solución de **171** (100 mg, 0,29 mmol) en acetato de etilo (10 ml) en presencia de paladio 10% sobre carbón (catalizador), se trató con hidrógeno a 3 atmósferas de presión en un aparato Parr. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla se filtró y se evaporó el solvente para dar 85,1 mg (85% rendimiento) de **172** como un aceite incoloro: IR (film, cm^{-1}) 2960, 1662, 1471, 1247, 1024, 970; RMN ^1H (CDCl_3) δ 0,91 (t, $J = 7,1$ Hz, 3 H, H-5), 1,35 (t, $J = 7,1, 12$ H, H-2'), 1,48-1,98 (m, 6 H, H-2, H-3, H-4), 2,28 (tt, $J = 24,1, 6,0$ Hz, 1 H, H-1) 4,08-4,26 (m, 8 H, H-1'); RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ 13,55 (C-5), 16,24 (d, $J = 6,8$ Hz, C-2'), 22,23 (C-4), 25,08 (t, $J = 4,7$ Hz, C-3), 31,12 (t, $J = 6,1$ Hz, C-2), 36,58 (t, $J = 133,6$ Hz, C-1), 62,28 (t, $J = 7,5$ Hz, C-1'); RMN ^{31}P (CDCl_3) δ 21,54; EM (m/z , intensidad relativa) 344 (M^+ , 5), 301 (12), 288 (28), 207 (21), 152 (27), 57 (46), 41 (100).

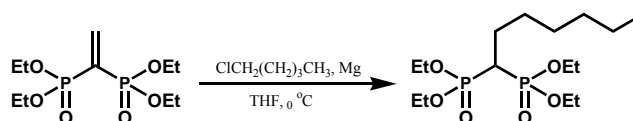
Hexil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (174)



Una solución de 1-clorobutano (0,42 ml, 4,3 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) se trató con yodo y magnesio metálico (100 mg, 4,3 mmol) bajo atmósfera de argón. Una vez consumido el magnesio, la solución resultante gris se enfrió a 0°C y se agregó gota a gota una solución de etiliden-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (119,8 mg, 0,4 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml). Luego del procedimiento habitual, el residuo se purificó por columna

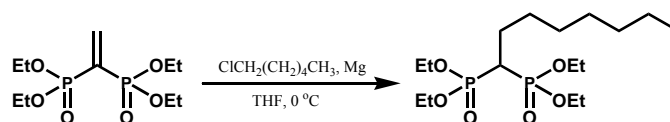
cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (4:1) como solvente de elución para dar 48 mg (33% rendimiento) de **174** como un aceite incoloro: R_f 0,2 (AcOEt–*s*-PrOH, 19:1); IR (film, cm^{-1}) 2983, 281, 1662, 1458, 1394, 1247, 1165, 1026, 972, 804, 526; RMN ^1H (CDCl_3) δ 0,88 (t, $J = 6,6$ Hz, 3 H, H-6), 1,33 (t, $J = 7,1$ Hz, 12 H, H-2'), 1,25-1,4 (m, 4-H, H-5 H-4) 1,49-1,69 (m, 2 H, H-3), 1,77-2,05 (m, 2 H, H-2), 2,26 (tt, $J = 24,1, 5,8$ Hz, 1 H, H-1), 4,09-4,25 (m, 8 H, H-1'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 13,9 (C-6), 16,33 (d, $J = 5,4$ Hz, C-2'), 22,20 (C-5), 25,45 (t, $J = 4,8$ Hz, C-3), 28,75 (t, $J = 6,1$ Hz, C-2), 31,45 (C-4), 36,78 (t, $J = 132,9$ Hz, C-1), 62,39 (t, $J = 6,8$ Hz, C-1'); RMN ^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 21,51; EM (m/z , intensidad relativa) 359 ($[\text{M}+1]^+$, 2), 301 (39), 288 (97), 261 (47), 233 (32), 221 (100), 165 (55), 152 (88).

Heptil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (176)



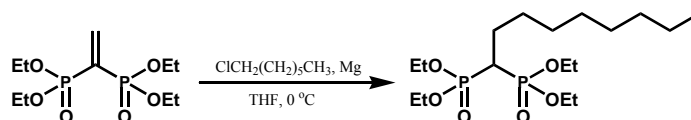
Una solución de 1-bromopentano (0,62 ml, 5,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) se trató con yodo y magnesio metálico (121,5 mg, 5,0 mmol) bajo atmósfera de argón. Una vez consumido el magnesio la mezcla se enfrió a 0 °C y se agregó gota a gota una solución de etilideno-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (300 mg, 1,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) según el método general. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (4:1) como solvente de elución para dar 63,2 mg (17% de rendimiento) de **176** como un aceite incoloro: R_f 0,23 (AcOEt–*s*-PrOH, 19:1); IR (film, cm^{-1}) 2981, 2929, 2860, 1647, 1471, 1394, 1249, 1165, 1026, 970, 839, 792, 526; RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 0,88 (t, $J = 6,4$ Hz, 3 H, H-7), 1,34 (t, $J = 7,1$ Hz, 12 H, H-2'), 1,2-1,4 (m, 6 H, H-4, H-5, H-6), 1,45-1,65 (m, 2 H, H-3), 1,77-2,05 (m, 2 H, H-2), 2,27 (tt, $J = 24,1, 6,1$ Hz, 1 H, H-1), 4,0-4,23 (m, 8 H, H-1'); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 13,98 (C-7), 16,34 (d, $J = 6,8$ Hz, C-2'), 22,50 (C-6), 25,74 (t, $J = 5,4$ Hz, C-3), 28,94 (C-4), 29,05 (t, $J = 5,4$ Hz, C-2), 31,37 (C-5), 36,70 (t, $J = 132,9$ Hz, C-1), 62,36 (t, $J = 6,8$ Hz, C-1'); RMN ^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 21,54; EM (m/z , intensidad relativa) 373 ($[\text{M}+1]^+$, 10), 301 (39), 288 (90), 261 (40), 235 (100), 207 (24), 189 (15), 179 (42), 165 (24), 152 (72), 137 (27), 125 (21).

Anal. Calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{P}_2$: C 46,92, H 9,00; encontrado C 47,41, H 9,13.

Octil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (178)

Una solución de 1-bromohexano (0,7 ml, 5,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) se trató con yodo y magnesio metálico (121,5 mg, 5,0 mmol) bajo atmósfera de argón. Luego del tratamiento habitual, se agregó lentamente una solución de **164** (300 mg, 1,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) a 0 °C. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (2:3) como solvente de elución para dar 112,6 mg (30% de rendimiento) de **178** como un aceite incoloro: R_f 0,22 (AcOEt–*s*-PrOH, 19:1); IR (film, cm^{-1}) 2927, 2856, 1652, 1465, 1394, 1247, 1165, 1026, 970, 856, 800, 526; RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 0,87 (t, $J = 6,8$ Hz, 3 H, H-8), 1,27-1,37 (m, 20 H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-2'), 1,48-1,62 (m, 2 H, H-3), 1,79-2,04 (m, 2 H, H-2), 2,27 (tt, $J = 24,2, 6,1$ Hz, 1 H, H-1), 4,0-4,23 (m, 8 H, H-1'); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 14,06 (C-8), 16,37 (d, $J = 6,8$ Hz, C-2'), 22,58 (C-7), 25,49 (t, $J = 5,4$ Hz, C-3), 28,88 (C-4), 29,12 (t, $J = 6,8$ Hz, C-2), 29,26 (C-5), 31,72 (C-6), 36,71 (t, $J = 133,6$ Hz, C-1) 62,40 (t, $J = 7,5$ Hz, C-1'); RMN ^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 21,56; EM (m/z , intensidad relativa) 387 ($[\text{M}+1]^+$, 3), 301 (42), 288 (100), 261 (37), 249 (96), 193 (30), 152 (67), 109 (35), 99 (21), 91 (20), 81 (20).

Anal. Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{P}_2 \cdot 0,2\text{H}_2\text{O}$: C 49,27, H 9,41; encontrado C 49,26, H 9,61.

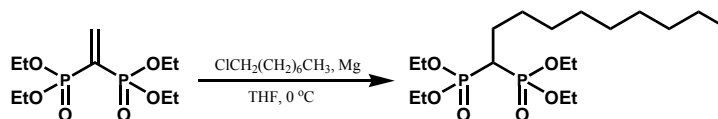
Nonil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (180)

Una solución de 1-cloroheptano (0,76 ml, 5,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) se trató con yodo y magnesio metálico (121,5 mg, 5,0 mmol) bajo atmósfera de argón. Siguiendo el procedimiento habitual, se agregó una solución de **164** (300 mg, 1,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) a 0 °C. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando

hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 160 mg (40% de rendimiento) de **180** como un aceite incoloro: R_f 0,28 (AcOEt–*s*-PrOH, 19:1); IR (film, cm^{-1}) 2927, 2856, 1647, 1467, 1444, 1392, 1251, 1165, 1024, 970, 835, 794, 528; RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 0,87 (t, $J = 6,4$ Hz, 3 H, H-9), 1,34 (t, $J = 7,1$ Hz, 12 H, H-2'), 1,26-1,37 (m, 10 H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8), 1,49-1,62 (m, 2 H, H-3), 1,76-2,04 (m, 2 H, H-2), 2,26 (tt, $J = 23,9, 6,0$ Hz, 1 H, H-1), 4,17 (m, 8 H, H-1'); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 14,03 (C-9), 16,37 (d, $J = 6,8$ Hz, C-2'), 22,61 (C-8), 25,49 (t, $J = 5,4$ Hz, C-3), 25,68 (C-4), 29,10 (t, $J = 6,5$ Hz, C-2), 29,18 (C-5),* 29,29 (C-6),* 31,80 (C-7), 36,70 (t, $J = 133,6$ Hz, C-1), 62,39 (t, $J = 7,5$ Hz, C-1'); RMN ^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 21,54; EM (m/z , intensidad relativa) 401 ($[\text{M}+1]^+$, 28), 301 (38), 288 (100), 263 (90), 261 (35), 152 (58).

Anal. Calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{P}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C 48,80, H 9,64; encontrado C 48,48, H 9,57.

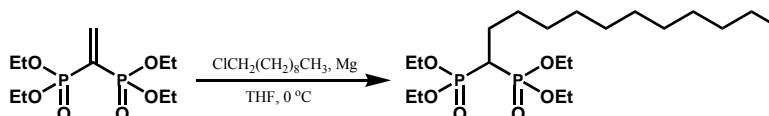
Decil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (**182**)



Una solución de 1-clorooctano (0,85 ml, 5,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) se trató con yodo y magnesio metálico (121,5 mg, 5,0 mmol) bajo atmósfera de argón. Luego se agregó una solución de **164** (300 mg, 1,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) a 0 °C según el método general. El producto se purificó por columna cromatografica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (19:1) como solvente de elución para dar 186,3 mg (45% de rendimiento) de **182** como un aceite incoloro: R_f 0,12 (hexano–AcOEt, 4:1); IR (film, cm^{-1}): 2979, 2929, 2873, 1458, 1392, 1251, 1165, 1026, 968, 813, 528; RMN ^1H (CDCl_3) δ 0,89 (t, $J = 6,7$ Hz, 3 H, H-10), 1,24-1,31 (m, 12 H, H-9, H-8, H-7, H-6, H-5, H-4), 1,34 (t, $J = 6,7$ Hz, 12 H, H-2'), 1,49-1,53 (m, 2 H, H-3), 1,83-1,95 (m, 2H, H-2), 2,22 (tt, $J = 24,3, J = 5,8$ Hz, 1H, H-1), 4,15-4,19 (m, 8 H, H-1'); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 13,99 (C-10), 16,26 (d, $J = 6,8$ Hz, C-2'), 22,96 (C-9), 21,72 (t, $J = 5,4$ Hz, C-3), 29,12 (t, $J = 6,2$ Hz, C-2), 29,50 (C-4, C-7), 28,70 (C-5, C-6), 32,42 (C-8), 36,97 (t, $J = 133,6$ Hz, C-1), 62,32 (t, $J = 6,1$ Hz, C-1'); RMN ^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 21,60; EM (m/z , intensidad relativa) 415 ($[\text{M}+1]^+$, 20), 385 (5), 371 (5), 357 (6), 315 (10), 301 (28), 288 (100), 277 (67), 261 (32), 165 (23), 152 (49).

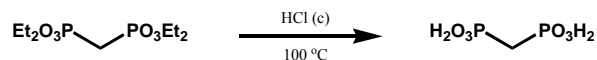
Anal. Calculado para $C_{18}H_{40}O_6P_2 \cdot H_2O$: C 49,99, H 9,79; encontrado C 50,39 H 9,76.

Dodecil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (184)



Una solución de 1-clorodecano (0,84 ml, 4,11 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) se trató con yodo y magnesio metálico (100 mg, 4,11 mmol) bajo atmósfera de argón de la forma habitual. Se agregó una solución de **164** (300 mg, 1,0 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) a 0 °C. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 39,8 mg (9% de rendimiento) de **184** como un aceite incoloro: R_f 0,56 (AcOEt–*s*-PrOH, 19:1); IR (film, cm^{-1}) 2925, 2854, 1652, 1465, 1392, 1249, 1165, 1026, 970, 798, 528; RMN 1H (500,13 MHz, $CDCl_3$) δ 0,88 (t, $J = 6,4$ Hz, 3 H, H-12), 1,2-1,3 (m, 16 H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11), 1,34 (t, $J = 7,1$, 2 H, H-2'), 1,49-1,65 (m, 2 H, H-3), 1,77-2,00 (m, 2 H, H-2), 2,27 (tt, $J = 23,9, 6,0$ Hz, 1 H, H-1), 4,10-4,25 (m, 8 H, H-1'); RMN ^{13}C (125,77 MHz, $CDCl_3$) δ 14,06 (C-12), 16,41 (d, $J = 5,4$ Hz, C-2'), 22,60 (C-11), 25,49 (t, $J = 4,8$ Hz, C-3), 29,06 (t, $J = 6,1$ Hz, C-2), 29,21 (C-9), * 29,29 (C-4), * 29,50 (C-5, C-6), 29,56 (C-7, C-8), 31,85 (C-10), 36,72 (t, $J = 133,6$ Hz, C-1), 62,40 (t, $J = 7,5$ Hz, C-1'); RMN ^{31}P (202,45 MHz, $CDCl_3$) δ 21,56; EM (m/z , intensidad relativa) 403 ($[M+1]^+$, 2), 305 (66), 288 (100), 261 (28), 152 (42), 109 (24).

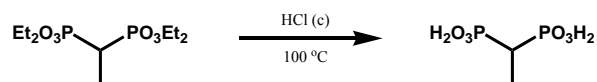
Ácido metil-1,1-bisfosfónico (163)



Metil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (230 mg, 0,79 mmol) se trató con ácido clorhídrico concentrado (5 ml). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego, se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se recrystalizó de etanol para dar 63,7 mg (74% de rendimiento) de **163** como un sólido blanco: IR (BrK, cm^{-1}) 2974, 2932, 2310, 1207, 1157, 1034, 927; RMN 1H (500,13 MHz, D_2O) δ 2,36 (t, $J =$

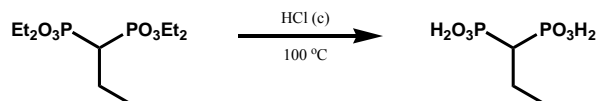
20,8 Hz, 2 H, H-1); RMN ^{13}C (125,77 MHz, D_2O) δ 27,85 (t, $J = 129,5$ Hz, C-2); RMN ^{31}P (202,45 MHz, D_2O) δ 18,36; EM (m/z , intensidad relativa) 176 (M^+ , 3), 156 (1), 125 (1), 97 (5), 82 (30), 44 (100).

Ácido etil-1,1-bisfosfónico (166)

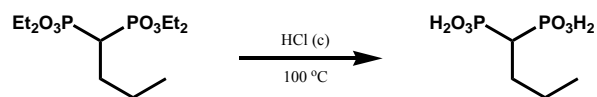


Etil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (79,1 mg, 0,26 mmol) se trató con ácido clorhídrico concentrado (4 ml). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se recrystalizó de etanol para dar 35 mg (70% de rendimiento) de **166** como un sólido blanco: RMN ^1H (500,13 MHz, D_2O) δ 1,23 (dt, $J = 17,4, 7,3$ Hz, 3 H, H-2), 2,08-2,43 (m, 1 H, H-1); RMN ^{13}C (125,77 MHz, D_2O) δ 10,2 (t, $J = 5,4$ Hz, C-2), 32,51 (t, $J = 130,2$ Hz, C-1).

Ácido propil-1,1-bisfosfónico (168)

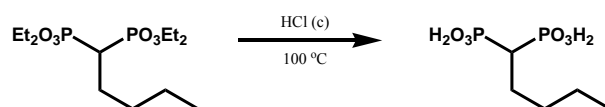


El compuesto **167** (70 mg, 0,22 mmol) se trató con ácido clorhídrico (c) (4 ml) a reflujo durante 2 horas. Luego, se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se recrystalizó en etanol para dar 34 mg (77% de rendimiento) de **168** como un sólido blanco: IR (BrK, cm^{-1}) 2999, 2885, 1230, 1180, 1010, 931, 518, 441; RMN ^1H (500,13 MHz, D_2O) δ 0,92 (t, $J = 7,1$ Hz, 3 H, H-3), 1,59-1,83 (m, 2H, H-2), 2,02 (tt, $J = 23,5, 5,7$ Hz, 1 H, H-1); RMN ^{13}C (125,77 MHz, D_2O) δ 14,25 (t, $J = 7,5$ Hz, C-3), 19,46 (t, $J = 4,7$ Hz, C-2), 39,85 (t, $J = 126,1$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (202,45 MHz, D_2O) δ 23,69.

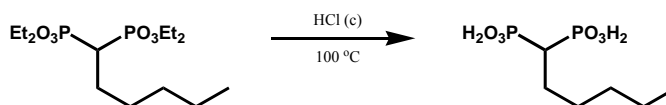
Ácido butil-1,1-bisfosfónico (170)

n-Butil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (200 mg, 0,60 mmol) se trató con ácido clorhídrico concentrado (4 ml). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 5 horas. Luego, se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica (fase reversa C-18) utilizando metanol como solvente de elución para dar 100 mg (76% de rendimiento) de **170** como un sólido blanco: pf 181–183 °C; IR (KBr, cm⁻¹) 3392, 2972, 2266, 1467, 1105, 931; RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 0,69 (t, *J* = 7,3 Hz, 3 H, H-4), 1,24-1,42 (m, 2 H, H-3), 1,48-1,76 (m, 2 H, H-2), 2,08 (tt, *J* = 23,6, 5,9 Hz, 1 H, H-1); RMN ¹³C (125,77 MHz, D₂O) δ 13,79 (C-4), 22,79 (t, *J* = 6,8 Hz, C-2), 27,82 (t, *J* = 4,7 Hz, C-3), 37,84 (t, *J* = 126,8 Hz, C-1); RMN ³¹P (202,45 MHz, D₂O) δ 22,84; EM (*m/z*, intensidad relativa) 217 (M⁺, 1), 155 (3), 125 (9), 111(17), 97 (28), 71 (45), 57 (100).

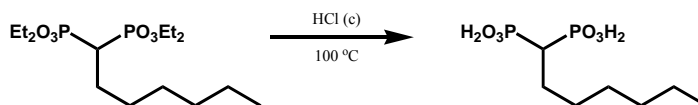
Anal. Calculado para C₄H₁₂O₆P₂: C 22,03, H 5,55; encontrado C 22,02, H 5,65

Ácido pentil-1,1-bisfosfónico (173)

n-Pentil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (60 mg, 0,17 mmol) se trató con ácido clorhídrico concentrado (4 ml) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego, se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se recrystalizó de etanol para dar 6,8 mg (17% de rendimiento) de **173** como un sólido blanco: RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 0,68 (t, *J* = 7,3 Hz, 3 H, H-5), 1,23-1,42 (m, 4 H, H-3 H-4), 1,48-1,76 (m, 2 H, H-2), 2,08 (tt, *J* = 23,6, 5,8 Hz, 1 H, H-1); RMN ¹³C (125,77 MHz, D₂O) δ 14,01 (C-5), 22,07 (C-4), 25,70 (t, *J* = 4,1 Hz, C-3), 31,12 (t, *J* = 6,0 Hz, C-2), 38,05 (t, *J* = 125,5 Hz, C-1); RMN ³¹P (202,45 MHz, D₂O) δ 22,95; EM (*m/z*, intensidad relativa) 231 ([M+1]⁺, 1), 203 (1), 149 (6), 136 (6), 121 (6), 109 (5), 95 (12), 81 (46), 77 (26), 69 (100).

Ácido hexil-1,1-bisfosfónico (175)

n-Hexil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (63,8 mg, 0,19 mmol) se trató con ácido clorhídrico concentrado (4 ml) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 5 horas. Luego, se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica (fase reversa C-18) utilizando H₂O–MeOH (1:1) como solvente de elución para dar 35,3 mg (80% de rendimiento) de **175** como un sólido blanco: IR (BrK, cm⁻¹) 2960, 2860, 1641, 1471, 1209, 1174, 1022, 929, 808, 717; RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 0,70 (t, *J* = 6,4 Hz, 3 H, H-6), 1,13-1,16 (m, 4 H, H-5 H-4), 1,21-1,46 (m, 2 H, H-3), 1,46-1,84 (m, 2 H, H-2), 2,11 (tt, *J* = 23,6, 5,7 Hz, 1 H, H-1); RMN ¹³C (125,77 MHz, D₂O) δ 14,03 (C-6), 22,38 (C-5), 25,70 (t, *J* = 4,1 Hz, C-3), 29,12 (t, *J* = 6,0 Hz, C-2), 31,52 (C-4), 38,15 (t, *J* = 125,5 Hz, C-1); RMN ³¹P (202,45 MHz, D₂O) δ 22,91.

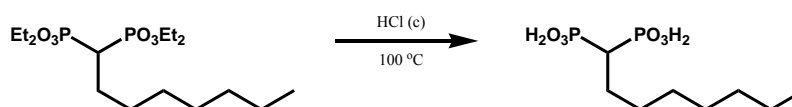
Ácido heptil-1,1-bisfosfónico (177)

n-Heptil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (100 mg, 0,23 mmol) se trató con ácido clorhídrico concentrado (5 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 5 horas. Luego se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica (fase reversa C-18) utilizando H₂O–MeOH (1:1) como solvente de elución para dar 48 mg (81% de rendimiento) de **177** como un sólido blanco: pf 163–165 °C; IR (BrK, cm⁻¹) 2923, 2303, 1207, 1157, 1026, 918; RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 0,68 (t, *J* = 6,4 Hz, 3 H, H-7), 1,06-1,18 (m, 6 H, H-6, H-5, H-4), 1,30-1,44 (m, 2 H, H-3), 1,56-1,86 (m, 2 H, H-2), 2,11 (tt, *J* = 23,6, 6,0 Hz, 1 H, H-1); RMN ¹³C (125,77 MHz, D₂O) δ 14,17 (C-7), 22,74 (C-6), 25,86 (t, *J* = 4,7 Hz, C-3), 29,03 (C-4), 29,51 (t, *J* = 7,2 Hz, C-2), 31,57 (C-5), 38,34 (t, *J* = 124,6 Hz, C-1); RMN ³¹P

(202,45 MHz, D₂O) δ 23,03; EM (m/z , intensidad relativa) 260 (M⁺, 44), 207 (4), 57 (12), 55 (15), 44 (100).

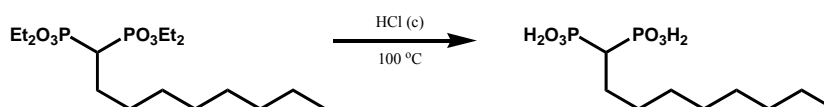
Anal. Calculado para C₇H₁₈O₆P₂: C 32,32, H 6,97; encontrado C 32,17, H. 7,01.

Ácido octil-1,1-bisfosfónico (179)



n-Octil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (54,7 mg, 0,14 mmol) se trató con ácido clorhídrico concentrado (4 ml). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 5 horas. Luego, se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica (fase reversa C-18) utilizando H₂O–MeOH (1:1) como solvente de elución para dar 38 mg (100% de rendimiento) de **179** como un sólido blanco: IR (BrK, cm⁻¹) 2927, 2858, 1465, 1217, 1126, 1029, 929, 704; RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 0,67 (t, J = 6,0 Hz, 3 H, H-8), 1,22-1,26 (m, 8 H, H-7, H-6, H-5, H-4), 1,47-1,53 (m, 2 H, H-3), 1,77-1,85 (m, 2 H, H-2), 2,19 (tt, J = 23,3, 5,9 Hz, 1 H, H-1); RMN ¹³C (125,77 MHz, D₂O) δ 14,23 (C-8), 22,81 (C-7), 25,87 (t, J = 4,7 Hz, C-3), 28,93 (C-5), 29,33 (C-4), 29,58 (t, J = 6,8 Hz, C-2), 31,88 (C-6), 38,36 (t, J = 125,0 Hz, C-1); RMN ³¹P (D₂O) δ 23,60; EM (m/z , intensidad relativa) 274 (M⁺, 1), 165 (1), 149 (2), 125 (3), 111 (5), 97 (9), 85 (11), 71 (21), 57 (43), 44 (100).

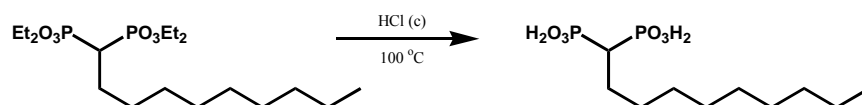
Ácido nonil-1,1-bisfosfónico (181)



n-Nonil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (58,2 mg, 0,15 mmol) se trató con ácido clorhídrico concentrado (4 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 5 horas. Luego se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica (fase reversa C-18) utilizando MeOH como solvente de elución para dar 31,4 mg (75 % de rendimiento) de **181** como un sólido blanco: RMN ¹H (500,13 MHz, D₂O) δ 0,83 (t, J = 6,0 Hz, 3 H, H-9), 1,22-1,29 (m, 10 H, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8), 1,47-1,59 (m, 2 H, H-3), 1,77-1,9

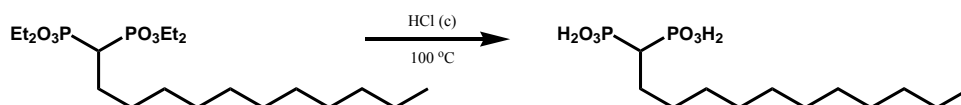
(m, 2 H, H-2), 2,21 (m, 1 H, H-1); RMN ^{13}C (125,77 MHz, D_2O) δ 14,35 (C-9), 23,05 (C-8), 26,02 (t, $J = 5,5$ Hz, C-3), 29,60 (C-6, C-4), 29,75 (C-5), 29,86 (t, $J = 6,4$ Hz, C-2), 32,23 (C-7), 38,51 (t, $J = 123,3$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (202,45 MHz, D_2O) δ 23,01.

Ácido decil-1,1-bisfosfónico (183)



n-Decil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (39,5 mg, 0,09 mmol) se trató con ácido clorhídrico concentrado (4 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 5 horas. Luego, se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica (fase reversa C-18) utilizando MeOH como solvente de elución para dar 21 mg (72% de rendimiento) de **183** como un sólido blanco: RMN ^1H (D_2O) δ 0,75 (t, $J = 7,4$ Hz, 3 H, H-10), 1,18-1,21 (m, 12 H, H-9, H-8, H-7, H-6, H-5, H-4), 1,42-1,48 (m, 2 H, H-3), 1,73-1,85 (m, 2 H, H-2), 1,89-2,04 (m, 1 H, H-1); RMN ^{13}C (CD_3OD) δ 13,45 (C-10), 26,44 (C-9), 26,39 (t, $J = 5,4$ Hz, C-3), 29,41 (C-2),* 29,43 (C-4, C-7), 28,70 (C-5, C-6), 32,31 (C-8), 36,41 (t, $J = 128,6$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (D_2O) δ 23,59; EM (m/z , intensidad relativa) 302 (M^+ , 1), 165 (10), 125 (9), 111 (16), 97 (23), 85 (25), 71 (44), 57 (100).

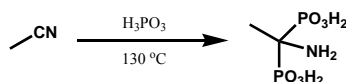
Ácido dodecil-1,1-bisfosfónico (185)



n-Dodecil-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (120 mg, 0,23 mmol) se trató con ácido clorhídrico concentrado (4 ml). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 5 horas. Luego, se agregó agua (10 ml) y se evaporó a sequedad. El proceso se repitió 3 veces. El sólido obtenido se purificó por columna cromatográfica (fase reversa C-18) utilizando metanol como solvente de elución para dar 46 mg (61% de rendimiento) de **185** como un sólido blanco: RMN ^1H (CD_3OD) δ 0,94 (t dist, $J = 6,8$ Hz, 3 H, H-12), 1,29-1,44 (m, 16 H, H-11 H-10 H-9 H-8 H-7 H-6 H-5 H-4), 1,58-1,67 (m, 2

H, H-3), 1,85-2,00 (m, 2 H, H-2), 2,21 (m, 1 H, H-1); RMN ^{13}C (CD_3OD) δ 16,74 (C-12), 19,03 (C-11), 29,04 (t, $J = 4,7$ Hz, C-3), 33,77 (C-4, C9), 32,88 (t, $J = 6,8$ Hz, C-2), 33,05 (C-5, C-6, C-7, C-8), 35,36 (C-10), 41,57 (t, $J = 128,2$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (CD_3OD) δ 24,01.

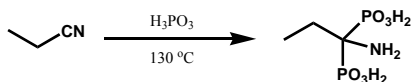
Ácido 1-aminoetil-1,1-bisfosfónico (187)



Una mezcla de ácido fosforoso (4,1 g, 50 mmol) y acetonitrilo (1,0 ml, 20 mmol) bajo atmósfera de argón se calentó a 130 °C con agitación vigorosa durante 12 h. La mezcla de reacción se enfrió y se agregó metanol (5,0 ml), el precipitado resultante se filtró y se recristalizó de agua–metanol para dar 2,10 g (51% de rendimiento) de **187** como un sólido blanco: pf 266–269 °C; IR (BrK, cm^{-1}) 3232, 2951, 1604, 1512, 1138, 925, 779; RMN ^1H (D_2O) δ 1,54 (t, $J = 14,2$ Hz, 3 H, H-2); RMN ^{13}C (D_2O) δ 18,28 (t, $J = 3,0$ Hz, C-2), 54,39 (t, $J = 131,8$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (202,45 MHz, D_2O) δ 13,36.

Anal. Calculado para $\text{C}_2\text{H}_9\text{O}_6\text{P}_2\text{N}$: C 11,72, H 4,42, N 6,83; encontrado C 11,63, H 4,55, N 6,73.

Ácido 1-aminopropil-1,1-bisfosfónico (189)

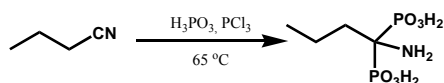


Una mezcla de ácido fosforoso (3,57 g, 43,5 mmol) y propionitrilo (0,77 ml, 10,8 mmol) se calentó a 135 °C bajo atmósfera de argón con agitación intensa durante 12 h. Se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta alcanzar la temperatura ambiente y se agregó metanol (5 ml). El precipitado resultante se filtró y se recristalizó de una mezcla 1,0 N HCl–etanol para dar 1,67 g (70% de rendimiento) de **189** como un sólido blanco: pf 250–251 °C; IR (BrK, cm^{-1}) 3011, 2953, 1624, 1535, 1195, 1049, 929; RMN ^1H (D_2O) δ 0,82 (t, $J = 7,6$ Hz, 3 H, H-3), 1,65 (tq, $J = 13,5$,

7,4 Hz, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (D_2O) δ 10,43 (t, $J = 6,7$ Hz, C-2), 29,39 (s, C-3), 57,51 (t, $J = 127,6$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (202,45 MHz, D_2O) δ 20,89.

Anal. Calculado para $\text{C}_3\text{H}_{11}\text{O}_6\text{P}_2\text{N}$: C 16,45, H 5,06, N 6,39; encontrado C 16,50, H 5,00, N 6,33.

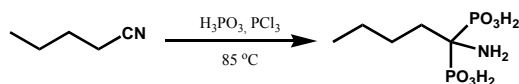
Ácido 1-aminobutil-1,1-bisfosfónico (191)



Se siguió la técnica general empleada para la preparación de **187**. Una mezcla de ácido fosforoso (1,86 g, 22,7 mmol), butironitrilo (1,26 ml, 11,3 mmol) y ácido bencensulfónico (10,0 g) se calentó a 65 °C bajo atmósfera de argón. Luego, se agregó tricloruro de fósforo (1,14 ml, 11,3 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 6 h a 70 °C. Luego, se enfrió a temperatura ambiente y se agregó agua fría (40 ml) continuando con la agitación durante 1 hora. Finalmente, se agregó etanol (20 ml), se filtró el precipitado resultante y se recristalizó de HCl (c)–etanol para dar 1,77 g (53% de rendimiento) de **191** como un sólido blanco: pf 255–257 °C; IR (BrK, cm^{-1}) 2982, 1604, 1535, 1172, 1160, 1057, 929; RMN ^1H (D_2O) δ 0,77 (t, $J = 7,3$ Hz, 3 H, H-4), 1,29–1,49 (m, 2 H, H-3), 1,73–1,95 (m, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (D_2O) δ 12,28 (C-4), 15,50 (t, $J = 5,4$ Hz, C-2), 31,25 (C-3), 55,26 (t, $J = 127,7$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (202,45 MHz, D_2O) δ 20,94.

Anal. Calculado para $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{O}_6\text{P}_2\text{N}$: C 20,61, H 5,62, N 6,01; encontrado C 20,70, H 5,64, N 6,05

Ácido 1-aminopentil-1,1-bisfosfónico (193)

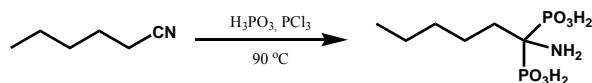


Siguiendo el método general una mezcla de ácido fosforoso (1,86 g, 22,7 mmol), valeronitrilo (1,26 ml, 11,3 mmol) y ácido bencensulfónico (10 g) se calentó a 65 °C bajo atmósfera de argón. Luego se agregó gota a gota tricloruro de fósforo (1,14 ml, 11,3 mmol) con

agitación intensa. La mezcla de reacción se agitó a 85 °C durante 16 h. Luego, se enfrió a temperatura ambiente y se agregó agua fría (40 ml) continuando con la agitación durante 1 hora. Finalmente, se agregó etanol (20 ml), se filtró el precipitado resultante y se recrystalizó de HCl (c)–etanol para dar 720 mg (25% de rendimiento) de **193** como un sólido blanco: pf 245–247 °C; IR (BrK, cm^{-1}) 3018, 2975, 1633, 1554, 1164, 1063, 962, 919; RMN ^1H (KOD 40% (p/p) en D_2O) δ 0,77 (t, $J = 7,4$ Hz, 3 H, H-5), 1,08-1,15 (m, 2 H, H-4), 1,26-1,32 (m, 2 H, H-3), 1,47-1,55 (m, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (KOD 40% (p/p) en D_2O) δ 14,39 (C-5), 24,24 (C-4), 27,53 (t, $J = 5,4$, C-2), 36,90 (C-3), 57,26 (t, $J = 128,2$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (202,45 MHz, KOD 40% (p/p) en D_2O) δ 20,82.

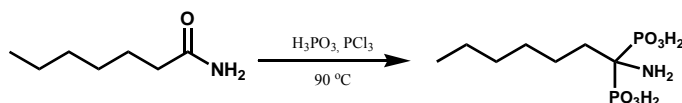
Anal. Calculado para $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{O}_6\text{P}_2\text{N}$: C 24,30, H 6,12, N 5,67; encontrado C 24,42, H 6,13, N 5,67.

Ácido 1-aminohexil-1,1-bisfosfónico (**195**)



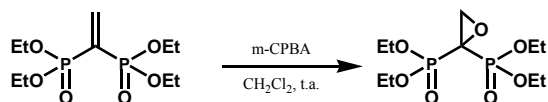
Una mezcla de ácido fosforoso (1,68 g, 20 mmol), hexanonitrilo (1,25 ml, 10 mmol) y ácido bencensulfónico (10 g) se calentó a 65 °C bajo atmósfera de argón. Luego, se agregó gota a gota tricloruro de fósforo (1 ml, 10 mmol) con agitación intensa. La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 16 horas. Luego, se enfrió a temperatura ambiente y se agregó agua fría (40 ml) continuando con la agitación durante 1 hora. Finalmente, se agregó etanol (20 ml), se filtró el precipitado resultante y se recrystalizó de HCl (c)–etanol para dar 652 mg (25% de rendimiento) de **195** como un sólido blanco: pf 240–242 °C; IR (BrK, cm^{-1}) 2962, 2959, 1628, 1550, 1165, 1057, 929; RMN ^1H (KOD 40% (p/p) en D_2O) δ 0,64 (t, $J = 7,6$ Hz, 3 H, H-6), 0,98-1,02 (m, 2 H, H-5), 1,05-1,10 (m, 2 H, H-4), 1,22-1,28 (m, 2 H, H-3), 1,48-1,57 (m, 2 H, H-2); RMN ^{13}C (KOD 40% (p/p) en D_2O) δ 14,50 (C-6), 22,96 (C-5), 25,09 (t, $J = 6,0$ Hz, C-2); 33,56 (C-3), 37,11 (C-4), 57,34 (t, $J = 127,6$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (202,45 MHz, KOD 40% (p/p) en D_2O) δ 20,95.

Anal. Calculado para $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{O}_6\text{P}_2\text{N}$: C 24,30, H 6,12, N 5,67; encontrado C 24,42, H 6,13, N 5,67.

Ácido 1-aminoheptil-1,1-bisfosfónico (197)

Una mezcla de ácido fosforoso (508 mg, 6,2 mmol), heptamida (0,8 g, 6,2 mmol) y ácido bencensulfónico (10 g) se calentó a 70 °C bajo atmósfera de argón. Luego, se agregó gota a gota tricloruro de fósforo (1,86 ml, 18,6 mmol) con agitación violenta. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a 90 °C. Luego, se llevó a temperatura ambiente y se agregó agua fría (40 ml) continuando con la agitación durante 2 h. Se agregó etanol (20 ml), y la mezcla resultante se dejó a 0 °C durante 24 horas. Se filtró el precipitado resultante y se recristalizó de agua-etanol para dar 170 mg (10% de rendimiento) de **197** como un sólido blanco: pf 246–248 °C; IR (BrK, cm⁻¹) 2962, 2935, 1628, 1550, 1162, 1048, 937; RMN ¹H (KOD 40% (p/p) en D₂O) δ 1,08 (t, *J* = 6,9 Hz, 3 H, H-7), 1,42-1,49 (m, 6 H, H-6, H-5, H-4), 1,63 (m, 2 H, H-3), 1,79-1,88 (m, 2 H, H-2); RMN ¹³C (KOD 40% (p/p) en D₂O) δ 14,30 (C-7), 23,09 (C-6), 25,52 (t, *J* = 6,7 Hz, C-2), 31,07 (C-3), 32,24 (C-4), 37,18 (C-5), 57,54 (t, *J* = 124,3 Hz, C-1); RMN ³¹P (202,45 MHz, KOD 40% (p/p) en D₂O) δ 20,96.

Anal. Calculado para C₇H₁₅O₆P₂N: C 30,55, H 6,96, N 5,09; encontrado C 30,65, H 6,99, N 5,13.

1,2-Epoxietil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (198)

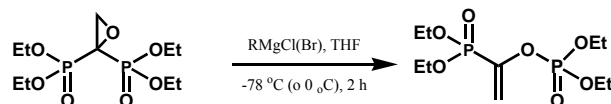
A una solución de **164** (1,00 g, 3,3 mmol) en cloruro de metileno (15 ml) se agregó gota a gota una solución de ácido *m*-cloroperbenzoico (2,27 g, 6,6 mmol) en cloruro de metileno (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se extrajo con una solución saturada de bicarbonato de sodio (3 × 10 ml) y agua (2 × 10 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando como solvente de elución una mezcla de hexano-AcOEt (1:1) para dar 783,3 mg (75% de rendimiento)

del epóxido **198** como un aceite incoloro: R_f 0,30 (AcOEt–*s*-PrOH, 9:1); IR (film, cm^{-1}) 2990, 1255, 1179, 1034, 977; RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 1,37 (t, $J = 7,1$ Hz, 12 H, CH_2CH_3), 3,27 (t, $J = 5,3$ Hz, 2 H, H-2), 4,24 (m, 8 H, CH_2CH_3); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 16,21 (t, $J = 3,1$ Hz, CH_2CH_3), 47,78 (t, $J = 182,7$ Hz, C-1), 49,81 (t, $J = 1,7$ Hz, C-2), 63,81 (t, $J = 3,1$ Hz, CH_2CH_3); RMN ^{31}P (202,45 MHz, D_2O) δ 12,57; EM (m/z , intensidad relativa) 316 (M^+ , 12), 289 (5), 271 (14), 261 (8), 244 (21), 215 (30), 187 (92), 155 (100), 127 (95).

Anal. Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{P}_2$: C 37,98, H 7,01; encontrado C 38,12, H 7,04.

[1-(Dietoxifosforiloxi)-vinil]-fosfonato de Dietilo (**199**).

Metodo A

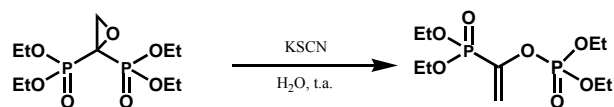


A una solución de 1,2-epoxietil-bisfosfonato de tetraetilo (113 mg, 0,38 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) enfriada a -78 °C se agregó una solución de cloruro de alilmagnesio (0,75 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (4 ml) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a -78 °C (o 0 °C) durante 2 horas. La reacción finalizó por el agregado de una solución acuosa de cloruro de amonio (1 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3×10 ml). La fase orgánica resultante se lavó con agua (2×10 ml), se secó (MgSO_4) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (7:3) como solvente de elución para dar 47 mg (42% de rendimiento) del compuesto **199** como un aceite incoloro. Rendimientos similares se obtuvieron utilizando otros reactivos de Grignard (cloruro de *n*-hexil magnesio o bromuro de *n*-butil magnesio): R_f 0,48 (AcOEt–MeOH, 9:1); IR (film, cm^{-1}) 2987, 1622, 1394, 1271, 1220, 1164, 1042, 825; RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 1,36 (t, $J = 7,1$ Hz, 6 H, CH_2CH_3), 1,37 (dt, $J = 7,1, 0,9$ Hz, 6 H, CH_2CH_3), 4,18 (m, 8 H, CH_2CH_3), 5,80 (dt, $J = 11,2, 2,5$ Hz, 1 H, H-2_a), 5,86 (ddd, $J = 35,1, 2,7, 1,1$ Hz, 1 H, H-2_b); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 15,95 (d, $J = 5,9$ Hz, CH_2CH_3), 16,19 (d, $J = 5,9$ Hz, CH_2CH_3), 63,75 (d, $J = 5,9$ Hz, CH_2CH_3), 64,75 (d, $J = 5,9$ Hz, CH_2CH_3), 114,65 (dd, $J = 24,6, 4,2$ Hz, C-2), 146,00 (dd, $J = 229,0, 10,1$ Hz, C-1); RMN ^{31}P (202,45 MHz, D_2O) δ $-6,14$ (d, $J = 25,0$ Hz, O–P(O)(OEt)₂), 8,27

(d, $J = 25,0$ Hz, C-P(O)(OEt)₂); EM (m/z , intensidad relativa) 316 (M^+ , 5), 261 (5), 244 (11), 216 (12), 187 (43), 155 (54), 127 (61), 99 (92), 81 (100).

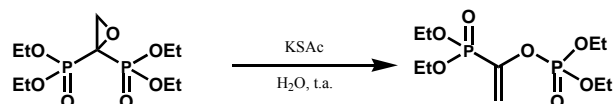
Anal. Calculado para C₁₀H₂₂O₇P₂: C 37,98, H 7,01; encontrado C 37,87, H 7,22.

Metodo B



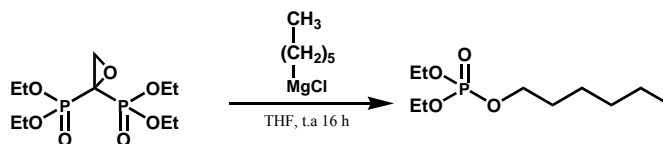
A una solución de **198** (300 mg, 0,95 mmol) en agua se agregó tiocianato de potasio (920 mg, 9,49 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se extrajo con cloruro de metileno (3 × 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (5 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (7:3) como solvente de elución para dar 270 mg (90% de rendimiento) del compuesto **199** como un aceite incoloro.

Metodo C



A una solución de **198** (300 mg, 0,95 mmol) en agua (5 ml) se agregó tioacetato de potasio (920 mg, 4,74 mmol). La reacción se llevó a cabo de forma similar a la descrita en el *Método B*. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (7:3) como solvente de elución, para dar 240 mg (80% de rendimiento) de **199** como un aceite incoloro.

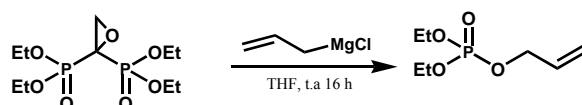
Dietil Fosfato de *n*-Hexilo (200)



Una solución de **198** (400 mg, 1,26 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) se trató con una solución de bromuro de hexilmagnesio (12,6 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) a 0 °C bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0 °C y a temperatura ambiente durante 16 h. Finalmente, se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (5 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 × 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (2 × 10 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 198 mg (66% de rendimiento) del compuesto **200** como un aceite incoloro: R_f 0,78. (AcOEt–MeOH, 95:5); RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 0,89 (t, J = 6, 9 Hz, 3 H, H-6), 1,29 (m, 4 H, H-4, H-5), 1,34 (dt, J = 7,1, 0,8 Hz, 6 H, CH₂CH₃), 1,37 (p, J = 7,1 Hz, 2 H, H-3), 1,68 (p, J = 6,9 Hz, 2 H, H-2), 4,03 (q, J = 6,9 Hz, 2 H, H-1), 4,11 (dq, J = 8,0, 7,1 Hz, 2 H, CH₂CH₃); RMN ¹³C (125,77 MHz, CDCl₃) δ 13,92 (C-6), 16,11 (d, J = 6,1 Hz, CH₂CH₃), 22,49 (C-5); 25,09 (C-4), 30,23 (d, J = 6,1 Hz, C-2) 31,30 (C-3), 63,58 (d, J = 5,1 Hz, CH₂CH₃), 67,67 (d, J = 6,1 Hz, C-1); RMN ³¹P (202,45 MHz, D₂O) δ –3,28; EM (m/z , intensidad relativa) 239 ([M + 1]⁺, 1), 155(93), 127 (84), 99 (100).

Anal. Calculado para C₁₀H₂₃O₄P: C 50,41, H 9,73; encontrado C 50,25, H 9,70.

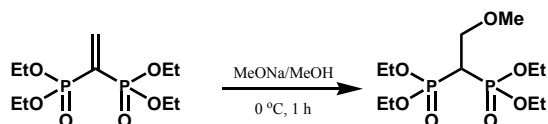
Dietil Fosfato de Alilo (**201**)



A una solución de **198** (350 mg, 1,10 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (5 ml) se agregó una solución de cloruro de alilmagnesio (3 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (10 ml) a 0 °C bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 16 h. La reacción finalizó por agregado de una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (5 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 × 10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (2 × 10 ml), se secó (MgSO₄) y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 114 mg (57% de rendimiento) de **201** como un aceite incoloro: R_f 0,42 (AcOEt–MeOH, 95:5); RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,35 (dt, J = 7,1, 1,0 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 4,12 (p, J = 7,2 Hz, 2 H, CH₂CH₃), 4,52 (ddt, J = 8,2, 5,6, 1,3 Hz, 2 H, H-1), 5,27 (dd, J = 10,2, 1,0 Hz, 1 H, H-3_a), 5,38

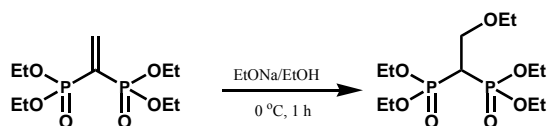
(dq, $J = 17,2, 1,4$ Hz, 1 H, H-3_b), 5,95 (m, 1 H, H-2); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 15,58 (d, $J = 7,1$ Hz, CH_2CH_3), 63,88 (d, $J = 6,1$ Hz, CH_2CH_3), 67,89 (d, $J = 6,1$ Hz, C-1), 117,97 (C-3), 132,00 (d, $J = 7,1$ Hz, C-2); RMN ^{31}P (202,45 MHz, D_2O) δ -3,90; EM (m/z , intensidad relativa) 194 (M^+ , 1), 193 (33), 189 (14), 161 (24), 137 (43), 111 (45), 80 (100).

2-Metoxietil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (202)



A una solución de metóxido de sodio preparada recientemente a partir de sodio metálico y metanol anhidro, se agregó una solución de **164** (200 mg, 0,66 mmol) en metanol anhidro (5 ml) bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 1 hora. Luego, se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (1,0 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3×10 ml). La fase orgánica se lavó con agua (2×5 ml), se secó (MgSO_4) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (C-18 silica gel) utilizando metanol-agua (4:1) como solvente de elución para dar 50 mg (40% de rendimiento) de **202** como un aceite incoloro: RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 1,34 (t, $J = 7,1$ Hz, 12 H, CH_2CH_3), 2,69 (tt, $J = 23,9, 5,4$ Hz, 1 H, H-1), 3,37 (s, 3 H, H-4), 3,89 (dt, $J = 16,1, 5,5$ Hz, 2 H, H-2), 4,18 (m, 8 H, CH_2CH_3).

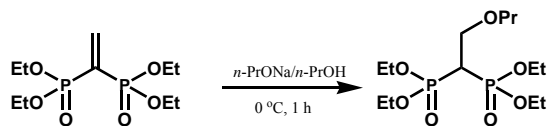
2-Etoxietil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (203)



Una solución de **164** (166 mg, 0,6 mmol) en etanol anhidro se trató como se describió la preparación de **202**. El residuo se purificó por columna cromatográfica (C-18 silica gel) utilizando metanol-agua (4:1) como solvente de elución para dar 71 mg (35% de rendimiento) de **203** como un aceite incoloro: RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 1,20 (t, $J = 6,9, 2$ H, H-5), 1,34 (t, $J = 6,9$ Hz, 12 H, CH_2CH_3), 2,69 (tt, $J = 23,7, 5,4$ Hz, 1 H, H-1), 3,53 (q, $J = 6,9, 2$ H, H-4), 3,92 (dt, $J = 16,3, 5,5$ Hz, 2 H, H-2), 4,15 (m, 8 H, CH_2CH_3); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 14,92 (C-5), 16,30

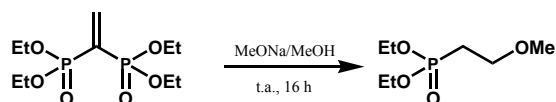
(d, $J = 6,1$ Hz, CH_2CH_3), 38,89 (t, $J = 132,6$ Hz, C-1), 61,83 (d, $J = 5,1$ Hz, CH_2CH_3), 65,97 (t, $J = 4,1$ Hz, C-2), 66,50 (C-4); RMN^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 20,87.

2-Propoxietil-1,1-bisfosfonato de Tetraetilo (204)



Una solución de **167** (90 mg, 0,3 mmol) en *n*-propanol anhidro se trató como se describió la preparación de **202**. El residuo se purificó por columna cromatográfica (C-18 silica gel) utilizando metanol–agua (4:1) como solvente de elución para dar 20 mg (20% de rendimiento) de **204** como un aceite incoloro: RMN^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 0,92 (t, $J = 7,4$, 2 H, H-6), 1,34 (t, $J = 6,9$ Hz, 12 H, CH_2CH_3), 1,59 (sxt, $J = 7,1$ Hz, 2 H, H-5), 2,68 (tt, $J = 23,9$, 5,4 Hz, 1 H, H-1), 3,42 (t, $J = 6,7$ Hz, 2 H, H-4), 3,92 (dt, $J = 16,3$, 5,2 Hz, 2 H, H-2), 4,17 (m, 8 H, CH_2CH_3); RMN^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 10,46 (C-6), 16,29 (t, $J = 7,2$ Hz, CH_2CH_3), 22,70 (C-5), 38,88 (t, $J = 133,1$ Hz, C-1), 72,96 (C-4); RMN^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 20,41; EM (m/z , intensidad relativa) 361 ($[\text{M} + 1]^+$, 1), 302 (9), 223 (100), 165 (74).

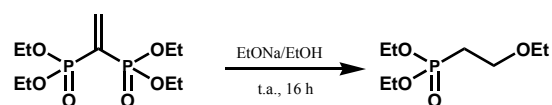
(2-Metoxietil)-fosfonato de Dietilo (205)



Una solución del compuesto **167** (200 mg, 0,66 mmol) en metanol anhidro se agregó a una solución 1,0 M de metóxido de sodio (10 ml) recién preparada bajo atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Luego, se agregó una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (1,0 ml). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3×10 ml). Las fases orgánicas combinados se lavaron con agua (5 ml), se secaron (MgSO_4) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 50 mg (40% de rendimiento) del compuesto **205** como un aceite incoloro: R_f 0,35 (AcOEt); RMN^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 1,33 (t, $J = 7,1$, 6 H,

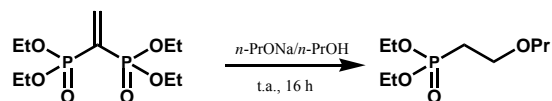
CH_2CH_3), 2,10 (dt, $J = 18,7, 7,5$ Hz, 2 H, H-1), 3,35 (s, 3 H, H-4), 3,64 (dt, $J = 12,1, 7,4$ Hz, 2 H, H-2), 4,10 (m, 4 H, CH_2CH_3); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 16,33 (d, $J = 6,1$ Hz, CH_2CH_3), 26,87 (d, $J = 140,4$ Hz, C-1), 58,40 (C-4), 61,57 (d, $J = 6,1$ Hz, CH_2CH_3), 66,37 (C-2); RMN ^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 26,07; EM (m/z , intensidad relativa) 195 ($[\text{M} - 1]^+$, 22), 179 (22), 165 (13), 139 (13), 111 (14), 71 (100).

(2-Etoxietyl)-fosfonato de Dietilo (206)



Una solución del compuesto **164** (200 mg, 0,66 mmol) en etanol anhidro (5 ml) se trató con una solución 1,0 M de etóxido de sodio como se describió para el compuesto **205**. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 50 mg (40% de rendimiento) del compuesto **206** como un aceite incoloro: R_f 0,32 (AcOEt); RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 1,20 (t, $J = 7,0$, Hz, 3 H, H-5), 1,32 (t, $J = 7,0$ Hz, 6 H, CH_2CH_3), 2,10 (dt, $J = 18,7, 7,5$ Hz, 2 H, H-1), 3,50 (q, $J = 7,0$ Hz, 2 H, H-4), 3,67 (dt, $J = 11,6, 7,5$ Hz, 2 H, H-2), 4,10 (m, 4 H, CH_2CH_3); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 15,08 (C-5), 16,40 (d, $J = 6,1$ Hz, CH_2CH_3), 27,11 (d, $J = 139,4$ Hz, C-1), 61,59 (d, $J = 6,1$ Hz, CH_2CH_3), 64,32 (C-4), 66,21 (C-2); RMN ^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 26,25; EM (m/z , intensidad relativa) 210 (M^+ , 2), 195 (21), 179 (20), 165 (17), 71 (100).

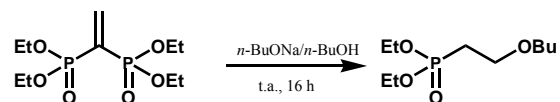
(2-Propoxietil)-fosfonato de Dietilo (207)



Una solución de **164** (200 mg, 0,66 mmol) en propanol anhidro (5 ml) se trató con una solución 1,0 M de propóxido de sodio como se describió para el compuesto **205**. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 145 mg (92% de rendimiento) del compuesto **207** como un aceite incoloro: R_f 0,38

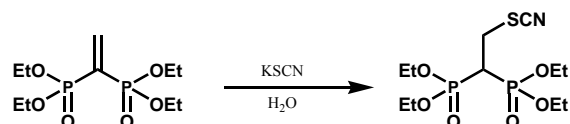
(AcOEt); RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 0,92 (t, $J = 7,4$, Hz, 3 H, H-6), 1,32 (t, $J = 7,1$ Hz, 6 H, CH_2CH_3), 1,59 (sxt, $J = 7,1$ Hz, 2 H, H-5), 2,10 (dt, $J = 18,9$, 7,4 Hz, 2 H, H-1), 3,39 (t, $J = 6,2$ Hz, 2 H, H-4), 3,67 (dt, $J = 11,6$, 7,4 Hz, 2 H, H-2), 4,10 (m, 4 H, CH_2CH_3); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 10,50 (C-6), 16,40 (d, $J = 5,9$ Hz, CH_2CH_3), 22,82 (C-5), 27,06 (d, $J = 139,0$ Hz, C-1), 61,60 (d, $J = 6,8$ Hz, CH_2CH_3), 64,50 (C-2), 72,66 (C-4); RMN ^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 26,36; EM (m/z , intensidad relativa) 225 ($\text{M}^+ + 1$, 4), 195 (7), 181 (73), 166 (40), 138 (66), 125 (100), 109 (77), 81 (42).

(2-Butoxietil)-fosfonato de Dietilo (208)



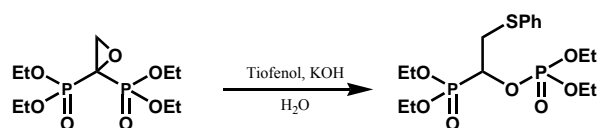
Una solución del compuesto **164** (179 mg, 0,60 mmol) en *n*-butanol anhidro (5 ml) se trató con una solución 1,0 M de *n*-butóxido de sodio como se describió para el compuesto **205**. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando hexano–AcOEt (9:1) como solvente de elución para dar 25 mg (30% de rendimiento) de **208** como un aceite incoloro: R_f 0,60 (AcOEt); RMN ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) δ 0,92 (t, $J = 7,4$, Hz, 3 H, H-7), 1,32 (t, $J = 7,0$ Hz, 6 H, CH_2CH_3), 1,35 (sxt, $J = 7,4$ Hz, 2 H, H-6), 1,55 (m, 2 H, H-5), 2,10 (dt, $J = 18,7$, 7,5 Hz, 2 H, H-1), 3,43 (t, $J = 6,7$ Hz, 2 H, H-4), 3,67 (dt, $J = 11,6$, 7,5 Hz, 2 H, H-2), 4,10 (m, 4 H, CH_2CH_3); RMN ^{13}C (125,77 MHz, CDCl_3) δ 13,74 (C-7), 16,29 (d, $J = 6,1$ Hz, CH_2CH_3), 19,17 (C-6), 26,99 (d, $J = 139,4$ Hz, C-1), 31,61 (C-5), 61,46 (d, $J = 6,1$ Hz, CH_2CH_3), 64,44 (C-2), 70,64 (C-4); RMN ^{31}P (202,45 MHz, CDCl_3) δ 26,26; EM (m/z , intensidad relativa) 239 ($[\text{M} + 1]^+$, 6), 195 (11), 181(100), 166 (55), 138 (70).

2-Tiocianoetil-fosfonato de Tetraetilo (209)



Una solución de **164** (50 mg, 0,16 mmol) en agua (2 ml) se trató con tiocianato de potasio (22 mg, 0,22 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Luego se extrajo la mezcla con cloruro de metileno (3 × 5 ml). La fase orgánica resultante se secó (MgSO₄) y se evaporó el solvente. El producto se purificó por columna cromatográfica (silica gel) utilizando una mezcla de hexano–AcOEt (7:3) como eluyente para dar 43 mg (72% de rendimiento) del compuesto **209** como un aceite incoloro: *R_f* 0,1 (AcOEt–MeOH 97:3); RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,35 (t, *J* = 7,1 Hz, 12 H, CH₂CH₃), 2,61 (tt, *J* = 23,2, 5,5 Hz, 1 H, H-1), 4,08 (dt, *J* = 17,1, 5,5 Hz, 2 H, H-2), 4,18 (m, 8 H, CH₂CH₃); RMN ¹³C (125,77 MHz, CDCl₃) δ 16,30 (d, *J* = 6,8 Hz, CH₂CH₃), 40,47 (d, *J* = 131,8 Hz, C-1), 58,59 (t, *J* = 5,1 Hz, C-2) 62,73 (d, *J* = 6,8 Hz, CH₂CH₃), 63,03 (d, *J* = 6,8 Hz, CH₂CH₃), 149,03 (C-3); RMN ³¹P (202,45 MHz, D₂O) δ 19,10; EM (*m/z*, intensidad relativa) 333 (M⁺, 1), 319 (2), 301(6), 288 (12), 261 (20), 195 (45), 181 (100), 171 (43), 163 (58).

[1-(Dietoxifosforiloxi)-2-fenilsulfaniletil]-fosfonato de Dietilo (**210**)



Una solución de tiofenol (1,04 g, 9,5 mmol) en agua se trató con hidróxido de potasio (530 mg, 9,5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego, se agregó el epóxido **198** (300 mg, 0,94 mmol) y se continuó agitando 30 minutos. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 × 10 ml). La fase orgánica resultante se secó (MgSO₄) y se evaporó el solvente. El residuo se purificó por columna cromatográfica (silica gel) empleando hexano–AcOEt (7:3) como solvente de elución para dar 123 mg (30% de rendimiento) de **210** como un aceite incoloro: *R_f* 0,66 (AcOEt–*s*-PrOH, 9:1); IR (film, cm⁻¹) 2983, 2931, 1538, 1481, 1440, 1394, 1263, 1164, 792, 746, 534; RMN ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) δ 1,328 (t, *J* = 7,1 Hz, 6 H, CH₂CH₃), 1,329 (dt, *J* = 7,1, 1,2 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 1,335 (dt, *J* = 7,1, 1,2 Hz, 3 H, CH₂CH₃), 3,27 (dt, *J* = 14,4, 9,2 Hz, 1 H, H-2_a), 3,48 (dddd, *J* = 14,4, 7,1, 3,3, 2,8 Hz, 1 H, H-2_b), 4,19 (m, 8 H, CH₂CH₃), 4,74 (dddd, *J* = 10,5, 9,6, 8,3, 3,4 Hz, 1 H, H-1), 7,23 (tt, *J* = 7,5, 1,9 Hz, 1 H, hidrógeno aromático), 7,31 (m, 2 H, hidrógeno aromático), 7,46 (m, 2 H, hidrógeno aromático); RMN ¹³C (125,77 MHz, CDCl₃)

δ 15,99 (t, $J = 6,8$ Hz, CH_3), 16,36 (t, $J = 5,5$ Hz, CH_3), 36,11 (t, $J = 3,8$ Hz, C-2), 63,19 (dd, $J = 6,8, 5,1$ Hz, CH_2), 64,27 (dd, $J = 37,3, 5,9$ Hz, CH_2), 71,46 (dd, $J = 165,3, 7,6$ Hz, C-1), 126,98 (C-6), 129,12 (C-5), 130,69 (C-4), 134,87 (C-3); RMN ^{31}P (202,45 MHz, D_2O) δ -4,03 (d, $J = 16,6$ Hz, O-P(O)(OEt) $_2$), 15,45 (d, $J = 16,6$ Hz, C-P(O)(OEt) $_2$); EM (m/z , intensidad relativa) 427 ($[M + 1]^+$, 2), 272 (57), 195 (18), 163 (100), 135 (23), 109 (24).

Anal. Calculado para $C_{16}H_{28}O_7P_2S \cdot 0,75H_2O$: C. 43,83, H. 6,74; encontrado C 43,87, H 7,03.

Resumen

Resumen

Con la intención de optimizar la actividad biológica de tiocianato de 4-fenoxifenoxietilo (**40**), en el presente trabajo de Tesis se diseñaron, sintetizaron y evaluaron 30 análogos nuevos estructuralmente relacionados a **40** como inhibidores del crecimiento de *Trypanosoma cruzi*.

Los compuestos sintetizados mostraron una amplia gama de valores de inhibición de la proliferación del parásito. Algunos de estos compuestos fueron, incluso, más potentes como inhibidores de la proliferación de *T. cruzi* que **40**, compuesto utilizado como droga líder.

De esta manera, teniendo a **40** como droga de referencia, se realizaron, en primer lugar, modificaciones en el extremo polar de la molécula sustituyendo al grupo tiocianato por distintos grupos electrofílicos, conteniendo, o no, átomos de azufre. A partir del alil éter **48** se obtuvo el episulfuro **50**, la azida **51** y la aziridina **52**. Teniendo en cuenta los ensayos biológicos realizados sobre estas drogas, sumados a otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio, se concluyó que la presencia de un centro electrofílico en C-1 de estas drogas no era suficiente para asegurar una alta efectividad como inhibidores de *T. cruzi*. Por otro lado, el átomo de azufre resultaba muy importante para garantizar una buena potencia inhibitoria. El grupo tiocianato sigue siendo hasta el presente el grupo más efectivo como centro electrofílico en el extremo polar de la molécula.

La segunda variación estructural realizada en **40** fue el reemplazo isostérico del átomo de oxígeno por un átomo de azufre o nitrógeno en la posición C-1'. El derivado azufrado **59** se preparó directamente a partir del tiofenol **54** utilizando la estrategia sintética habitual. La incorporación del átomo de azufre en esta posición se realizó a través de una reacción entre un reactivo de Grignard, formado a partir de 4-bromofenil éter fenil, con azufre seguido de una reducción con hidruro de litio y aluminio. Por otro lado, la preparación del derivado nitrogenado **70** resultó más compleja. En primer lugar, no se pudo lograr la alquilación del átomo de nitrógeno del compuesto **60**, se necesitó incrementar la acidez de los átomos de hidrógeno del grupo amino mediante una acetilación del mismo. En segundo lugar, se preparó el derivado clorado **66**, dado que no se pudo obtener el tosilato correspondiente, el intermediario habitual. Finalmente, se observó un reordenamiento cuando se intentó obtener el tiocianato **71**, por reacción entre el cloruro **66** con tiocianato de potasio. Sin embargo, el acetato **67**, producto del reordenamiento anterior, se pudo hidrolizar fácilmente dando lugar al alcohol **68** que, en dos pasos sintéticos, dio lugar al tiocianato buscado **70**. Finalmente, se consideró el reemplazo de la unidad etoxi de la droga líder **40** por un grupo metileno dando lugar a **75** como molécula blanco.

En base a los resultados biológicos observados, resultaba evidente la importancia que tenía esta posición en la acción inhibitoria contra *T. cruzi*. Se observó que la presencia de un átomo de azufre en la posición C-1' conducía a un incremento de la efectividad en epimastigotes (**59**, $IC_{50} = 0,87 \mu\text{M}$), desafortunadamente **59** tuvo efectos tóxicos no deseados en células de mamíferos. Por otro lado, el reemplazo del átomo de oxígeno tanto por un grupo metileno como por un átomo de nitrógeno conducía a drogas poco efectivas contra *T. cruzi*.

Además, se decidió realizar pequeñas modificaciones sobre el extremo no polar de la droga líder **40**. Para ello se realizaron pequeñas modificaciones en la estructura aromática de **40**. El reemplazo de la unidad fenoxi tanto por un grupo bencilo como por una unidad benciloxi, en el extremo no polar de la molécula, condujo sólo a una leve disminución de la potencia inhibitoria contra epimastigotes. No obstante, tanto **81** ($IC_{50} = 8,1 \text{ mM}$) como **86** ($IC_{50} = 13,4 \text{ mM}$) resultaron potentes inhibidores de la proliferación del parásito. Sin embargo, cuando al extremo polar de la molécula se le impuso una restricción conformacional, obligando a los grupos fenilo a permanecer en un mismo plano, se observó una drástica disminución de la capacidad inhibitoria de las drogas conformacionalmente rígidas. El derivado **94** ($IC_{50} = 50 \mu\text{M}$) resultó 25 veces menos potente que **40**, valor muy alejado de otros compuestos donde no existe esta restricción conformacional.

Cuando se reemplazó isostéricamente el átomo de oxígeno que une los grupos fenilo por un átomo de azufre, el estado de oxidación del mismo tuvo una marcada influencia en la actividad biológica. Si este azufre puente está como sulfuro, el compuesto resultante presentaba una modesta acción biológica. Sin embargo, la oxidación del átomo de azufre para dar un grupo sulfóxido condujo a una droga muy potente (**100**, $IC_{50} = 7,7 \mu\text{M}$). Además, **100** fue un potente inhibidor de la forma intracelular del parásito ($IC_{50} = 58,8 \mu\text{M}$).

Teniendo en cuenta la actividad biológica exhibida por **102**, en el cual el cambio del grupo fenoxi por un átomo de cloro se destacaba como un cambio estructural desigual, se decidió preparar el tiocianato correspondiente. El reemplazo del grupo 4-fenoxifenoxi en el extremo no polar por el grupo 2,4-diclorofenoxi dio lugar a otra droga muy potente contra epimastigotes (**105**, $IC_{50} = 1,0 \mu\text{M}$) de acuerdo a lo esperado. La presencia de un átomo de cloro en la posición *orto* con respecto al grupo éter fue muy significativa en la acción farmacológica de esta nueva clase de compuestos, mientras que la ausencia de este átomo de cloro conducía a una pérdida de

la eficiencia. Desafortunadamente, **105** no fue tan efectivo como se esperaba contra la forma intracelular del parásito.

Finalmente, se decidió sintetizar derivados de tiocianato donde el átomo de hidrógeno en la posición *orto* (C-2') se sustituía por distintos átomos de halógeno. Esta transformación estuvo motivada por estudios de evaluación biológica, realizados en nuestro laboratorio, que indicaban la mejoras en la acción que presentaban análogos del tetrahidropiranyl derivado **47**. Exceptuando al derivado clorado **125**, la introducción de un átomo de halógeno en la posición C-2' dio lugar a agentes antiparasitarios muy efectivos. Merece destacarse el derivado iodado **131**, precursor normal para la preparación del tiocianato **134**, que resultó uno de los tetrahidropiranyl éteres más potentes sintetizados hasta el momento ($IC_{50} = 45 \mu M$). Si bien el derivado bromado **129** fue muy efectivo contra la forma amastigote del parásito ($IC_{50} = 64,5 \mu M$), no fue tan potente como **40**. Por otra parte, el derivado iodado **134** presentó una acción marginal contra amastigotes.

En el segundo capítulo, se desarrolló el diseño, la síntesis y evaluación biológica de una nueva familia de bisfosfonatos, los derivados de ácidos grasos. Estas drogas fueron potentes inhibidores de la proliferación de *T. cruzi*; especialmente, contra la forma intracelular del parásito mostrando valores de IC_{50} en el rango bajo micromolar. Por ejemplo, el derivado del ácido heptanoico **153** presentó un valor de IC_{50} de $18,1 \mu M$, siendo incluso más potente que numerosos amino bisfosfonatos representativos. Además, se confirmó que el blanco molecular de estos 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos derivados de ácidos grasos era la farnesil pirofosfato sintetasa de *T. cruzi* (*TcFPPS*). Es muy importante destacar que esta familia de bisfosfonatos también resultó efectiva para la inhibición de la actividad enzimática de FPPS de *T. brucei* (*TbFPPS*). De hecho, *TbFPPS* fue más susceptible a la acción de 1-hidroxi-1,1-bisfosfonatos que *TcFPPS*. Como ejemplo representativo, el compuesto **153** mostró un valor de $IC_{50} = 0,66 \mu M$ en *TbFPPS* mientras que el valor de IC_{50} en *TcFPPS* fue de $2,37 \mu M$. Este hecho indica la gran potencialidad de estos compuestos no sólo para su uso en quimioterapia para la enfermedad de Chagas, sino también para otras enfermedades tropicales.

La validación de *TcFPPS* como blanco molecular para este tipo de compuestos fue notable, ya que se había postulado la hipótesis de un análogo del estado de transición carbocatiónico en el sitio activo de la enzima para bisfosfonatos que contienen nitrógeno en su estructura. Estos compuestos no poseen nitrógeno y su potencia, en muchos casos, es superior a varios bisfosfonatos representativos.

También se estudió la influencia del grupo hidroxilo en la posición C-1 de bisfosfonatos derivados de ácidos grasos. Estos alquil-1,1-bisfosfonatos se sintetizaron a través de una adición de tipo Michael de un reactivo de Grignard con etenilidenbisfosfonato de tetraetilo y posterior hidrólisis del éster fosfónico. Estos bisfosfonatos resultaron potentes inhibidores de la actividad enzimática de *TcFFPS*, pero en menor grado que sus análogos hidroxilados. Sin embargo, estos ácidos alquil-1,1-bisfosfónicos exhibieron una acción inhibitoria moderada contra la forma intracelular del parásito (amastigotes).

Finalmente, se realizó un reemplazo isostérico del grupo hidroxilo por un grupo amino en la posición C-1. Los miembros menores de esta serie se sintetizaron a partir del nitrilo correspondiente y ácido fosforoso, mientras que para los miembros superiores se necesitó algunas modificaciones. Los ácidos 1-amino-1,1-bisfosfónicos derivados de ácidos grasos fueron potentes inhibidores de la actividad enzimática de *TcFPPS*, incluso más efectivos que los correspondientes ácidos 1-hidroxi-1,1-bisfosfónicos, pero exhibieron una menor potencia contra la forma intracelular del parásito en comparación con sus análogos hidroxilados.

Por otro lado, se estudió la afinidad de las distintas familias de *gem*-bisfosfonatos por el ion Mg^{2+} mediante técnicas de RMN ^{31}P . Se observó que los ácidos 1-hidroxi y 1-amino bisfosfónicos se coordinaron más fuertemente al ion Mg^{2+} que el 1-alquil bisfosfonato correspondiente. Estos resultados estaban de acuerdo con los valores obtenidos de actividad enzimática donde se observó una modesta eficacia cuando el sustituyente en C-1 era un átomo de hidrógeno.

En el último capítulo se realizaron estudios acerca de la química de eteniliden-1,1-bisfosfonato de tetraetilo (**164**) y de su derivado epoxidado oxiranilidenbisfosfonato de tetraetilo (**198**). Este derivado epoxidado experimentaba un atractivo e interesante reordenamiento fosfonato-fosfato dando lugar al enol fosfato **199**, independientemente del nucleófilo utilizado.

Se encontraron evidencias que el reordenamiento que sufría **198** con cualquier reactivo de Grignard trascurriría *via* un mecanismo SET. Estos resultados fueron muy relevantes ya que no es común observar este tipo de procesos con reactivos de Grignard primarios. El tiempo de reacción tuvo una marcada influencia en esta reacción; a tiempos largos, se observó la eliminación de un grupo fosfato dando lugar a los dietil fosfatos de alquilo, donde la fuente del grupo alquilo era el reactivo de Grignard. Si bien se observó el mismo producto cuando **198** reaccionó con nucleófilos azufrados (tiocianato, tioacetato), las evidencias experimentales indicaron que este reordenamiento ocurriría a través de un mecanismo polar. Sin embargo, cuando el nucleófilo

fue un ión tiofenóxido no se observó eliminación del nucleófilo que conduciría al enol fosfato **199**, sino que se obtuvo el compuesto **210**.

Por otra parte, etenilidenbisfosfonato de tetraetilo (**164**) reaccionó como un típico aceptor de Michael con una variedad de nucleófilos. Además, se observó que **164** experimentó una eliminación de un grupo fosfato cuando se utilizaron nucleófilos oxigenados. Se estudió esta reacción y se postuló su mecanismo.

Las diferencias de comportamiento químico observadas entre **164** y **198** indicaron que la presencia de un átomo de oxígeno induce una tendencia a formar anillos oxafosfiranos de tres miembros, los cuales se convierten rápidamente en estos productos inusuales. Además, estos anillos oxafosfiranos pueden formarse a través de un mecanismo polar como también a través de un mecanismo radicalario.

Parte del presente trabajo de Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

"Structure-Activity Relationship of New Growth Inhibitors of *Trypanosoma cruzi*."

Güendalina M. Cinque, Sergio H. Szajnman, Li Zhong, Roberto Docampo, Andrea J. Schwartzapel, Juan B. Rodríguez, and Eduardo G. Gros.

J. Med. Chem. **1998**, *41*, 1540–1554.

"Design and Synthesis of Aryloxyethyl Thiocyanate Derivatives as Potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi*."

Sergio H. Szajnman, Wen Yan, Brian N. Bailey, Roberto Docampo, Eleonora Elhalem, and Juan B. Rodriguez.

J. Med. Chem. **2000**, *43*, 1826–1840.

"Design, Síntesis, and Biological evaluation of Aryloxyethyl Thiocyanate Derivatives against *Tripanosoma cruzi*."

Eleonora Elhalem, Brian N. Bailey, Roberto Docampo, István Ujváry, Sergio Szajnman, and Juan B. Rodriguez.

J. Med. Chem. **2002**, *45*, 3984–3999

"Bisphosphonates Derived from Fatty Acids are Potent Growth Inhibitors of *Trypanosoma cruzi*."

Sergio H. Szajnman, Brian N. Bailey, Roberto Docampo and Juan B. Rodríguez.

Bioorg. Med. Chem. Lett. **2001**, *11*, 789–792.

"Bisphosphonates Derived from Fatty Acids are Potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Farnesyl Pyrophosphate synthase."

Sergio H. Szajnman, Andrea Montalvett, Youhong Wang, Roberto Docampo and Juan B. Rodriguez.

Bioorg. Med. Chem. Lett. **2003**, *13*, 3231–3235.

"Synthesis and Biological Evaluation of 1-Amino-1,1-Bisphosphonates Derived from Acids against *Trypanosoma cruzi* targeting Farnesyl Pyrophosphate Synthase."

Sergio H. Szajnman, Esteban L. Ravaschino, Roberto Docampo, and Juan B. Rodríguez.

Bioorg. Med. Chem. Lett En prensa.

"New Insights into the Chemistry of *gem*-Bis(phosphonates): Unexpected Rearrangement of Michael-Type Acceptors."

Sergio H. Szajnman, Guadalupe García Liñares, Pablo Moro, and Juan B. Rodríguez.

Eur. J. Org. Chem. **2005**, 3687-3696.

Referencias

- [1] Moncayo, A. In Eleventh Programme Report Of the UNPD/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), World Health Organization, Geneva, **1993**, pp.67–75.
- [2] Anónimo. *Control of Chagas' Disease*. Geneva, World Health Organization, **1991**. WHO Technical Report Series, No 811.
- [3] Kirchhoff, L.V.; American Trypanosomiasis (Chagas' Disease), Chapter 14b in *Principles and Practice of Clinical Parasitology* edited by Gillespie, S. and Pearson, R. D., **2001**, John Wiley & Sons Ltd.
- [4] Reyes, H; Triatomidos y Cimicidos en Parasitología Clínica, Atias, A; Neghme; Mediterraneo, 1996, pp 513–521.
- [5] Atias, A.; Apt, W.; Enfermedad de Chagas en Parasitología Clínica, Atias, A; Neghme; Mediterraneo, 1996, pp 255–268.
- [6] Burleigh, B. A.; Andrews, N. W. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 175–200.
- [7] De Souza, W. *Int. Rev. Cytol.* **1984**, *86*, 197–283.
- [8] Macedo, A. M.; Oliveira, R. P.; Pena, S. D. J. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **2002**.
- [9] Freilij, H.; Altcheh, J. *Clin. Infect. Dis.* **1995**, *21* (3), 551–555.
- [10] Schmunis, G. A. *Transfusion* **1991**, *31*, 547–557.
- [11] Herwaldt, B. L. *Clinical Microbiology Reviews* **2001**, 659–688.
- [12] Hoffman, K. *Arsneim.-Forsch./DrugRes.* **1972**, *22*, 1590.
- [13] Yoneda, S; Kimura, E.; Castellani, B. R.; *Experiencia* **1977**, *13*, 1201–1202.
- [14] Docampo, R. *Chem. Biol. Interactions* **1990**, *73*, 1–27.
- [15] Docampo, R.; Moreno, S. N. J. *Federation Proc.*, **1986**, *45*, 2471–2476.
- [16] Stoppani, A. O. M. *Medicina* **1999**, *59* (supl. II), 147–165.
- [17] OPAS/OMS, 1998. Tratamiento etiológico de la Enfermedad de Chagas. OPC/HCP HCT /140/99.
- [18] Marr, J. J.; *J Lab Clin Med.* **1991**, *118*, 111–119.
- [19] Gutteridge, W. E., Gaborak, M., *Int. J. Biochem.* **1979**, *10*, 415–422.
- [20] Lauris-pires, L.; Castro, C. N.; Emanuel, A.; Prata, A. *Rev. Soc. Med. Trop.* **1988**, *21*, 79.
- [21] Apt, W.; Aguilera, A.; Arribada, A.; Perez, C.; Miranda, C.; Sanchez, G.; Zulantay, I.; Cortez, P.; Rodríguez, J.; Juri, D. *Am. J. Trop. Med Hyg.* **1998**, *59*, 133–138.
- [22] World Health Organization, *WHO, Ginebra*, **1995**, 129.
- [23] Avila, J. L.; Avila, A.; Muñoz, E.; *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1981**, *30*, 769–774.

- [24] de Castro, S. L. *Acta Tropica*, **1993**, *53*, 83–98.
- [25] Nakajima-Shimada, J.; Hirota, Y.; Auki, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2455–2458.
- [26] Freymann, D. M.; Wenck, M. A.; Engel, J. C.; Feng, J.; Focia, P. J.; Eakin, A. E.; Craig, S. *P. Chem. Biol.* **2000**, *7*, 957–968.
- [27] Lyr, H. *Modern Selective Fungicides*, Gustav Fisher Verlag: Jena, **1995**.
- [28] Yamaguchi, H; Kobayashi, G. S.; Takahashi, H. *Recent Progress in Antifungal Chemotherapy*, Marcel Dekker: New York, **1992**.
- [29] Docampo, R.; Moreno, S. N. J.; Turrens, J. F.; Katzin, A. M.; Gonzalez-Cappa, S. M.; Stoppani A. O. M. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1981**, *3*, 169–180.
- [30] Urbina, J. A.; Payares, G.; Contreras, L. M.; Liendo, A.; Sanoja, C.; Molina, J.; Piras, M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P.; Loebenberg, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1771–1777.
- [31] Urbina, J. A.; Lazard, K.; Marchan, E.; Visbal, G.; Aguirre, T.; Piras, M. M.; Piras, R.; Maldonado, R. A.; Payares, G.; de Souza, W.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 580–591.
- [32] Heeres, J.; Backx, L. J. J.; Mostmans, J. H.; Van Cutsem J.; *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 1003–1005.
- [33] Beach, D. H.; Goad, J. L.; Otis, Jr., G. G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *136*, 851–856.
- [34] Docampo, R.; Moreno, S. N. J.; Turnes, J. F.; Katzin, A. M.; Gonzales-Cappa, S. M.; Stoppani, A. O. M. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1981**, *3*, 169–180.
- [35] McCabe, R. E.; Remington, J. S.; Araujo, E. G. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1987**, *81*, 613–615.
- [36] McCabe, R. E.; Remington, J. S.; Araujo, E. G. *J. Infect. Dis.* **1984**, *150*, 594–601.
- [37] Van den Bosshe, H.; Willemsens, G.; Cools, W.; Cornelissen, F.; Lauwers, W. F. J.; Van Cutsem, J. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1980**, *11*, 922.
- [38] Urbina, J. A.; Lazard, K.; Aguirre, T.; Piras, M. M.; Piras, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 1237–1242.
- [39] Goad, L. J.; Berens, R. L.; Marr, J. J.; Beach, D. H.; Holz, Jr., G. G. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1989**, *32*, 179–189.
- [40] Yoshida, Y.; Aoyama, Y. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 229–235.

- [41] McCabe, R. E.; Remington, J. S.; Araujo, E. G. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1986**, *35*, 280–284.
- [42] Petranyi, G.; Ryder, N. S.; Stütz, A. *Science* **1984**, *224*, 1239–1241.
- [43] Alberts, A. W.; Chen, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; UHF, J.; Hoffman, C.; Rothrock, J.; Lopez, M.; Joshua, H.; Harris, E.; Patchett, A.; Monaghan, R.; Currie, S.; Stapley, E.; Albers-Schonberg, G.; Hensens, O.; Hirshfield, J.; Hoogsteen, K.; Liesch, J.; Springer, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 3957–3961.
- [44] Florin-Christensen, M.; Florin-Christensen, J.; Garin, C.; Isola, E.; Brenner, R. R.; Rasmussen, L. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1990**, *166*, 1441–1445.
- [45] Urbina, J. A.; Lazard, K.; Marchan, E.; Visbal, G.; Aguirre, T.; Piras, M. M.; Piras, R.; Maldonado, R. A.; Payares, G.; de Souza, W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 580–591.
- [46] Urbina, J. A.; Lazard, K.; Aguirre, T.; Piras, M. M.; Piras, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 730–735.
- [47] Clemons, K. V.; Stevens, D. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 778–780.
- [48] Urbina, J. A.; Payares, G.; Contreras, L. M.; Liendo, A.; Sanoja, C.; Molina, J.; Piras, M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P.; Loebenberg, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *7*, 1771–1777.
- [49] Urbina, J. A. *J. Mol. Med.* **1999**, *77*, 332–338.
- [50] Urbina, J. A. *Curr. Opin. Anti-infect. Invest. Drugs* **2000**, *2*, 40–46.
- [51] Urbina, J. A.; Concepcion, J. L.; Caldera, A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Otomo, T.; Hiyoshi, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *7*, 2379–87.
- [52] Otto, H.; Schirmeister, T. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133–171.
- [53] Du, X.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; McKerrow, J. H.; Cohen, F. E. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2695–2707.
- [54] Gilbert, I. H.; *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1587*, 249–257.
- [55] Tomazela, D. M.; Pupo, M. T.; Passador, E. A. P.; da Silva, M. F. das G. F.; Vieira, P. C.; Fernandes, J. B.; Rodrigues, E.; Oliva, G.; Pirani, J. R.; *Phytochemistry* **2000**, *55*, 643–651.
- [56] Bressi, J. C.; Verlinde, C. L. M. J.; Aronov, A. M.; Le Shaw, M.; Shin, S. S.; Nguyen, L. N.; Suresh, S.; Buckner, F. S.; Van Voorhis, W. C.; Kuntz, I. D.; Hol, W. G. J.; Gelb, M. H.; *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2080–2093.

- [57] Sorensen, B. S.; Sinding, J.; Andersen, A. H.; Alsner, J.; Jensen, P. B.; Westergaard, O. J. *Mol. Biol.* **1992**, *228*, 778–786.
- [58] Goldenberg, S. *Men. Inst Oswaldo Cruz* **1992**, *87 Supl. II*, 21.
- [59] Gonzales-Perdomo, M.; de Castro, S. L.; Meirelles, M. N.; Goldenberg, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 1707–1714.
- [60] Oza, S. L.; Tetaud, E.; Ariyanayagam, M. R.; Warnon, S. S.; Fairlamb, A. H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *39*, 35853–35861.
- [61] Smith, K.; Nadeau, K.; Bradley, M.; Walsh, C.; Fairlamb, A. H. *Protein Science* **1992**, *1*, 874–883.
- [62] De Craecker, S.; Verbruggen, C.; Rajan, P. K.; Smith, K.; Haemers, A.; Fairlamb, A. H. *Mol Biochem Parasitol.* **1997**, *84*, 25–32.
- [63] Verbruggen, C.; De Craecker, S.; Rajan, P.; Yun Jiao, X.; Borloo, M.; Smith, K.; Fairlamb, A.; Haemers, A. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 253–258.
- [64] Chen, S.; Lin, C-H.; Kwon, D. S.; Walsh, C. T.; Coward J. K. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3842–3850.
- [65] Chen, S.; Lin, C-H.; Walsh, C. T.; Coward, J. K. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 505–510.
- [66] Chen, S.; Coward, J. K. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 502–509.
- [67] Cinque, G. M., Szajnman, S. H., Zhong, L., Docampo, R. Rodríguez, J. B., Gros, E. G. *J. Med Chem.* **1998**, *41*, 1540–1554.
- [68] Urbina, J. A.; Concepcion, J. L.; Montalvetti, A.; Rodriguez, J. B. Docampo, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2047–2050.
- [69] Rodriguez, J. B.; Zhong, L.; Docampo, R.; Wimmer, Z.; Gros, E. G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3257–3260.
- [70] Urbina, J. A.; Moreno, B.; Vierkotter, S.; Oldfield, E.; Payares, G.; Sanoja, C.; Bailey, B. N.; Yan, W.; Scott, D. A.; Moreno, S. N.; Docampo, R., *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33609–33615.
- [71] Moreno, B.; Urbina, J. A.; Oldfield, E.; Bailey, B. N.; Rodríguez, C. O.; Docampo, R., *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28356–62.
- [72] Docampo, R.; Moreno, S. N., *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *33*, 151–1599.
- [73] Field, H.; Blench, I.; Croft, S.; Field, M. C. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, *82*, 67.
- [74] Glomset, J. A.; Gelb, M. H.; Farnsworth, C. C. *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 139.

- [75] Bergstrom, J. D.; Bostedor, R. G.; Masarachia, P. J.; Reszka, A. A.; Rodan, G. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, *373*, 231–241
- [76] Rodan, G. A.; *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1998**, *38*, 375–388.
- [77] Rodriguez, J. B.; Gros, E. G.; Stoka, A. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 679–682.
- [78] Schvartzapel, A. J.; Fichera, L.; Esteva, M.; Rodriguez, J. B.; Gros, E. G. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 1207–1214.
- [79] Schvartzapel, A. J.; Zhong, L. Docampo, R.; Rodriguez, J. B.; Gros, E. G. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2314–2322.
- [80] van Tamelen, E. E. *Organic Syntheses*; Wiley & Sons: New York, **1963**; Collect. Vol. IV, pp 232–234.
- [81] Ittah, Y.; Shahak, I.; Tsaroom, S.; Blum, J. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4271–4273.
- [82] Rundel, W. *Chem. Ber.* **1968**, *101*, 2956–2962.
- [83] Appel, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 801–812.
- [84] Slage, J. D.; Huang, S. K.; Franzus, B. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3526–3530.
- [85] Miyashita, N; Yoshikoshi, A.; Grieco, P. A. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3772–3774.
- [86] Witzack, Z. J. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1986**, *44*, 91–145.
- [87] Rodriguez, J. B.; Docampo, R.; Gros, E. G. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *13*, 215–218.
- [88] Urbina, J. A.; Concepcion, J. L.; Montalvetti, A.; Rodriguez, J. B. Docampo, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2047–2050.
- [89] Kieczkowski, G. R.; Jobson, R. B.; Melillo, D. G.; Reinhold, D. F.; Grenda, V. J.; Shinkai, I. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8310–8312.
- [90] Van Beek, E.; Pieterman, E.; Cohen, L.; Lowik, C.; Papapoulos, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *255*, 491–494.
- [91] Cromartie, T. H.; Fisher, K. J.; Grossman, J. N. *Pest. Biochem. Physiol.* **1999**, *63*, 114–126.
- [92] Martin, M. B.; Arnold, W.; Heath III, H. T.; Urbina, J. A.; Oldfield, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *263*, 754–758.
- [93] Kull, K. *Curr. Pharm Des.* **2002**, *8*, 241–256.
- [94] Martin, M. B.; Grimley, J. S.; Lewis, J. C.; Heath III, H. T.; Bailey, B. N.; Kendrick, H.; Yardley, V.; Caldera, A.; Lira, R.; Urbina, J. A.; Moreno, S. N. J.; Docampo, R.; Croft, S. L.; Oldfield, E. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 909–916.
- [95] Sturtz, G.; Guervenou, J. *Synthesis*, **1991**, 661–662.
- [96] Hutchinson, D. W.; Thornton, D. M.; *J. Organomet. Chem.* **1988**, *346*, 341–348.

- [97] Lolli, M. L.; Lazzarato, L.; Di Stilo, A.; Frutero, R.; Gasco, A. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *650*, 77–83.
- [98] Degenhardt, C. R.; Burdsall, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3488–3490.
- [99] Quin, L. D. *A Guide to Organophosphorus Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., New York, **2000**, Chapter 7, pp. 208.
- [100] Papapoulos, S.; van Beek, E. R.; Lowick, C. W. G. M.; Labriola, R.; Vecchioli, A. *EP 0 753 523 A1*.
- [101] Olive, G.; Le Moigne, F.; Mercier, A.; Tordo, P. *Synth. Commun.* **2000**, *34*, 617–629.
- [102] Bulman Page, P. C.; Moore, J. P. G.; Mansfield, I.; McKenzie, M. J.; Bowler, W. B.; Gallagher, J. A. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1837–1847.
- [103] Montalvetti, A.; Bailey, B.; Martin, M. B.; Severin, G. W.; Oldfield, E.; Docampo, R. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 33930–33937.
- [104] Tarshis, L. C.; Proteau, P. J.; Kellogg, B. A.; Sachettini, J. C.; Poulter, C. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 15018–15023.
- [105] Gumienna-Kontecka, E.; Silvagni, R.; Lipinski, R.; Lecouvey, M.; Cesare Marincola, F.; Crisponi, G.; Nurchi, V. M.; Leroux, Y.; Kozlowski, H. *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, *339*, 111–118.
- [106] Gumienna-Kontecka, E.; Jezierska, J.; Marc Lecouvey, M.; Leroux, Y.; Kozlowski, H. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *89*, 13–17.
- [107] Matczak-Jon, E.; Kurzak, B.; Kamecka, A.; Kafarski, P. *Polyhedron* **2002**, *21*, 321.
- [108] Ruzziconi, R.; Ricci, G.; Gioiello, A.; Couthon-Gourvès, H.; Gourvès, J-P. *J. Org. Chem.* **2002**, *68*, 736–742.
- [109] Minami, T.; Utsunomiya, T.; Nakamura, S.; Okubo, M.; Kitamura, N.; Okada, J.; Ichikawa, J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6717–6727.
- [110] Shen, Y., Li, P. *J. Fluorine Chem.* **2003**, *121*, 219–222.
- [111] Minami, T.; Motoyoshiya, J. *Synthesis* **1992**, 333–349.
- [112] Capitulo 3 de la presente tesis.
- [113] Ruel, R.; Bouvier, J-P.; Young, R. N. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5209–5213.
- [114] Ashby, E. C.; Goel, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4983–4985.
- [115] Holm, T.; Crossland, I. *Acta Chem. Scand.* **1971**, *25*, 59.
- [116] Ashby, E. C.; Bowers, J.; Depriest, R. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3541–3541.

- [117] Alberti, A.; Benaglia, M.; Della Bona, M. A.; Macciantelli, D.; Heuzé, B.; Masson, S.; Hudson, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1996**, 1057–1063.
- [118] Prashad, M. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1585–1588.
- [119] Gilmore, W. F.; Huber III, J. W. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1423–1424.
- [120] Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1733–1738.
- [121] Reichwein, J. F.; Pagenkopf, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1821–1824.
- [122] Holstein, S. A.; Cermak, D. M.; Wiemer, D. F.; Lewis, K.; Hohlb, R. J. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 687–694.
- [123] Xu, Y.; Qian, L.; Prestwich, G. D. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2267–2270.
- [124] Gancarz, R.; Gancarz, I.; Deron, A. *Phosphorus, Sulfur and Silicon* **2000**, *161*, 61–69.
- [126] Burgos-Lepley, C. E.; Mizesak, S. A.; Nugent, R. A.; Johnson, R. A. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4159–4161.

Índice.

Capítulo 1: Introducción.....	9
Nifurtimox y benznidazol.	13
Alopurinol.	15
Inhibidores de la biosíntesis de esteroides.	18
Cruzipaina.	24
Dihidrofolato Reductasa.	27
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.	28
Topoisomerasa II.	29
Trypanotona reductasa.	30
Escualeno sintetasa.	33
Farnesil pirofosfato sintetasa.	35
Capítulo 2: Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica de Derivados de Tiocianato de Ariloxietilo.....	39
Diseño y Síntesis.	40
Evaluación Biológica.	53
Capítulo 3: Síntesis y Evaluación Biológica de Bisfosfonatos Derivados de Ácidos Grasos.....	61
Capítulo 4: Uso de 1,1-bisfosfonatos como Aceptores de Tipo Michael. Estudios Mecanísticos.....	83
Capítulo 5: Parte Experimental.....	104
Generalidades.	104
Evaluación Biológica contra <i>T. cruzi</i> epimastigotes (cepa Y).	105
Evaluación Biológica contra <i>T. cruzi</i> amastigotes (cepa Y).	106
Expresión y Purificación de FPPS de <i>T. cruzi</i> .	106
Determinación de la actividad enzimática contra <i>Tc</i> FPPS y <i>Tb</i> FPPS.	107
Métodos Generales.	107
Descripción de compuestos.	109
Resumen.....	184
Publicaciones.....	189
Referencias.....	191