



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN HUMANA**

**SÍNTESIS DIASTEREOSELECTIVA DE COMPUESTOS
FOSFORADOS ANÁLOGOS DE L-CARNITINA
TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRO EN NUTRICIÓN HUMANA

Presenta
ANAGUIVEN AVALOS SORIANO

Dirigido por
DR. RICARDO DE LA CRUZ CORDERO

SINODALES

DR. RICARDO DE LA CRUZ CORDERO
Presidente

Firma

DR. JORGE LUIS ROSADO LORÍA
Secretario

Firma

DRA. MINERVA RAMOS GÓMEZ
Vocal

Firma

DRA. TERESA GARCÍA GASCA
Suplente

Firma

DRA. MA. LOURDES RODRÍGUEZ FRAGOSO
Suplente

Firma

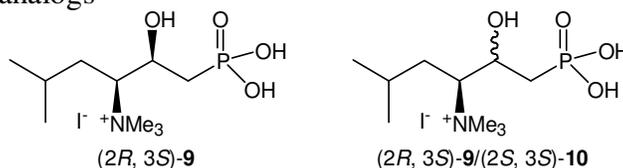
BIÓL. JAIME ÁNGELES ÁNGELES
DIRECTOR DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS NATURALES

DR. LUIS G. HERNÁNDEZ SANDOVAL
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN
Y POSGRADO

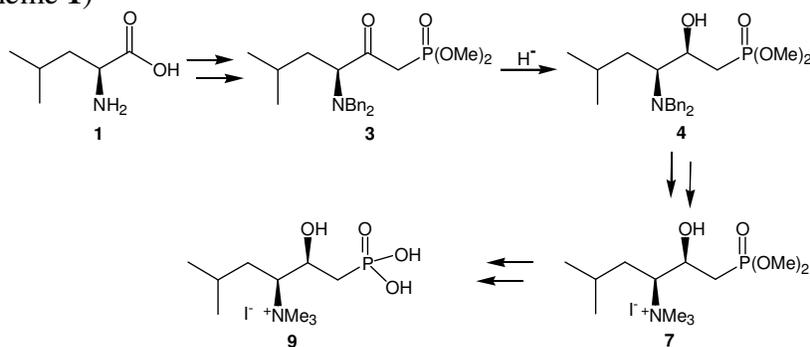
Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre 2008
México

SUMMARY

The *L*-carnitine is an essential nutrient, so endogenously synthesized by the amino acids lysine and methionine, or can be obtained from the diet, mainly meat, the main function of *L*-carnitine is to be the substrate of the enzyme carnitine palmitoiltransferase 1, which catalyzes the initial step in the transport of long-chain fatty acids into the mitochondrial matrix. In recent years the *L*-carnitine analogs or derivatives has attracted considerable attention from groups of researchers because of their biological and pharmacological applications. This study describes a new synthetic methodology that afford of (2*R*, 3*S*)- β -hydroxy- γ -aminophosphonic acid **9** and mixtures of diastereomeric (3*S*)- β -hydroxy- γ -aminophosphonic acids **9/10** phosphocarnitine analogs



The synthetic route was designed to be scalable and thus obtain the quantities needed for subsequent evaluation of these compounds. A key intermediary for the route of synthesis was γ -(*N,N*-dibenzyl)amino- β -hydroxyphosphonate **4** obtained from the diastereoselective reduction of γ -(*N,N*-dibenzyl)amino- β -ketophosphonate **3**, which in turn the was obtained easily from α -aminoacid *L*-leucine **1**. Subsequently, it ordered removal of protective groups and the methylation of the amino group. Finally, the hydrolysis of phosphonic esters provided of (2*R*, 3*S*)- β -hydroxy- γ -aminophosphonic acid **9** (Scheme 1)



Scheme 1

The methodology developed allowed obtaining (2*R*,3*S*)- β -hydroxy- γ -aminophosphonic acid **9** with a high diastereoselectivity and good chemicals yield. The same methodology was developed for obtaining the diastereomeric mixture of (3*S*)- β -hydroxy- γ -aminophosphonic acids **9/10**.

Keywords: *L*-carnitine, diastereoselective reduction, phosphonic analogues

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de esta vida, la salud e inteligencia y la capacidad de elección para la culminación de esta etapa más en mi vida y así poder seguir adelante.

Al Dr. Jorge Luís Rosado Loría, por la confianza otorgada, por el apoyo brindado en la realización y culminación de este proyecto, por favorecerme con una beca para poder cubrir los gastos de la maestría.

A mi asesor Dr. Ricardo Abraham De la Cruz Cordero, por confiar en mí para realizar este proyecto, por todo el apoyo, orientación, estímulo, consejos y gran ayuda en la culminación del presente.

A la Dra. Teresa García Gasca, por apoyarme desinteresadamente en el transcurso de la maestría y por su apoyo en la culminación de la misma y ser un gran ejemplo a seguir

Dra. Minerva Ramos Gómez, por las enormes aportaciones para la realización de esta tesis y por el apoyo brindado.

A cada uno de mis profesores por compartir sus conocimientos y experiencias.

A NUCITEC S.A de C.V. por el soporte económico brindado.

DEDICATORIAS

A mis padres, por apoyarme en todo momento, alentarme a seguir adelante y haberme enseñado a no rendirme nunca y trabajar siempre por lo que quiero.

A Joselyne, por haber estado ahí en todo momento apoyándome y enseñándome a ser mejor.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ESQUÉMAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1. <i>L</i> -carnitina	2
2.1.1. Definición	2
2.1.2. Biosíntesis de <i>L</i> -carnitina	2
2.1.3. Mecanismo de acción de la <i>L</i> -carnitina	4
2.1.4. Consumo de <i>L</i> -carnitina	6
2.1.5. Distribución en tejidos y transportadores de <i>L</i> -carnitina	6
2.1.6. Deficiencia de <i>L</i> -carnitina	11
2.2. Administración de <i>L</i> -carnitina exógena	13
2.2.1. Absorción de <i>L</i> -carnitina exógena	14
2.2.2. Distribución de <i>L</i> -carnitina	15
2.2.3. Excreción y eliminación de <i>L</i> -carnitina	17
2.3. Compuestos análogos de <i>L</i> -carnitina	17

2.3.1. Ácidos aminofosfónicos en la síntesis de fármacos	19
a) Ácidos aminofosfónicos como inhibidores enzimáticos	21
b) Áminofosfonatos como imitadores de aminoácidos	22
c) Bifosfonátos	23
d) Complejos metálicos de aminofosfonatos	24
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVO GENERAL	26
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
7. MÉTODOLÓGÍA	27
7.1. Información general	27
7.2. Método general para la preparación de <i>L</i> -leucina tribencilada 2	28
7.2.1. Preparación de <i>L</i> -leucina tribencilada 2	28
7.2.2. Preparación de <i>L</i> -leucina tribencilada 2 (proceso “one pot”)	28
7.3. Procedimiento general para la preparación del dibencilamino β -cetofosfonato 3	30
7.3.1. Preparación del dibencilamino β -cetofosfonato 3	31
7.3.2. Preparación del dibencilamino β -cetofosfonato 3 (proceso en “one pote”)	32
7.4. Método general para la reducción del dibencilamino β -cetofosfonato 3	33
7.4.1. Preparación de los dibencilamino β -	34

hidroxifosfonátos 4-syn/5-anti (proceso en “one pot”)	
7.4.2. Preparación del dibencilamino β -hidroxifosfonato 4-syn	34
7.4.3. Preparación de los dibencilamino β -hidroxifosfonátos 4-syn/ 5-anti	35
7.5. Método general para la preparación del trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-syn/ 8-anti	36
7.5.1. Preparación de la mezcla trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-syn/ 8-anti (Porceso “one pot”)	37
7.5.2. Preparación del trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-syn	38
7.6. Método general para la preparación de los ácidos <i>N</i> -trimetilamino β -hidroxifosfónicos 9-syn/10-anti	39
7.6.1. Preparación de los ácidos trimetilamino β -hidroxifosfónico 9-syn/10-anti	39
7.6.2. Preparación del ácido trimetilamino β -hidroxifosfónico 9-syn	40
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
9. CONCLUSIONES	69
10. LITERATURA CITADA	70
11. ÁPENDICES	74
11.1. Abreviaturas	74
11.2. Espectros de resonancia magnética nuclear	76

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Biosíntesis de L-carnitina	3
2	Funciones de L-carnitina en el metabolismo de lípidos	5
3	Modelo propuesto para el mecanismo de transporte de L-carnitina y cationes orgánicos por el transportador de cationes OCTN2	9
4	Ruta de síntesis para la obtención de compuestos fosforados análogos de L-carnitina.	41
5	Espectro de RMN ³¹ P para la mezcla de dibencilamino β-hidroxi fosfonatos 4-syn y 5-anti relación 85:15	49
6	Preparación del dimetilamino β-hidroxiceto fosfonato 6	51
7	Espectro de RMN ³¹ P para la mezcla de trimetilamino β-hidroxicetofosfonato 7-syn y 8-anti cristalizados (A) y espectro de RMN ³¹ P de las aguas madres de la cristalización (B)	53
8	Recristalización del trimetilamino β-hidroxi fosfonato	55
9	Espectros de RMN ³¹ P para la mezcla de trimetilamino β-hidroxi fosfonato 7-syn : 8-anti 80:20 (A), y espectro de RMN ³¹ P del trimetilamino β-hidroxi fosfonato 7-syn obtenido de la reacción con el dibencilamino β-hidroxi fosfonato 4-syn purificado por cromatografía en columna (B)	56
10	Preparación del dibencilamino β-hidroxi fosfonato 4-syn : 5-anti a partir del dibencilamino β-cetofosfonato 3	57
11	Espectro de RMN ³¹ P del dibencilamino β-hidroxi fosfonatos 4-syn / 5-anti relación 80:20 A), y Espectro d de RMN ³¹ P del dibencilamino β-hidroxi fosfonatos 4-syn diastereomericamente puro B)	58
12	Preparación del trimetilamino β-hidroxiceto fosfonato 7-syn diastereomericamente puro	59

13	Espectros de RMN ^{31}P para el trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-syn correspondiente a la mezcla 80:20 (A) y trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-syn obtenido de la reacción con el dibencilamino β -hidroxifosfonato 4-syn purificado por cromatografía en columna (B).	60
14	Espectro de RMN ^{31}P de los dibencilamino β -hidroxicetofosfonatos 4-syn:5-anti 65:35.	62
15	Reducción diastereoselectiva a 55°C del dibencilamino β -cetofosfonato 3 .	63
16	Espectro de RMN ^{31}P del dibencilamino β -hidroxifosfonato 5-anti .	64
17	Preparación del trimetilamino β -hidroxifosfonato 8-anti	65
18	Preparación del ácido amino hidroxifosfónico 9-syn diastereoméricamente puro.	66
19	Espectro de RMN ^{31}P del ácido amino hidroxifosfónico 9-syn diastereoméricamente puro.	67
20	Preparación del ácido amino hidroxifosfónico 9-syn: 10-anti	68
21	Espectro de RMN ^{31}P para la mezcla de los ácidos amino hidroxifosfónicos 9-syn:10-anti .	69

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Preparación de la <i>L</i> -leucina tribencilada 2	42
2	Preparación de la <i>L</i> -leucina tribencilada 2 en condiciones optimizadas.	44
3	Preparación del dibencilamino β -cetofosfonato 3	45
4	Preparación del dibencilamino β -cetofosfonato 3 “proceso “one pot”	46
5	Reducción diastereoselectiva del dibencilamino β -cetofosfonato 3	47
6	Proceso en “one pote” para la obtención de la mezcla de los dibencilamino β -hidroxifosfonatos 4-syn y 5-anti	50
7	Preparación de la mezcla trimetilamino β -hidroxifosfonato 7- syn:8-anti .	52
8	Preparación de la mezcla de trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-syn: 8-anti	54
9	Preparación del dibencilamino β -hidroxicetofosfonato 5 bajo diferentes condiciones de reacción.	60

1. INTRODUCCIÓN

En mamíferos, la *L*-carnitina (3-hidroxi-4-*N*-trimetilamino butirato) es un nutrimento esencial, sintetizado de manera endógena por los aminoácidos lisina y metionina o puede ser obtenido a partir de la dieta, principalmente de la carne. Fue descubierta en tejido muscular en 1903 y poco después, en 1927 se aceptó su fórmula química $C_7H_{15}NO_3$. Se trata de un polvo fino, blanco cristalino, con un punto de fusión de 198 °C y rotación óptica de -31° (C=10, H₂O). (Feller y Rudman, 1988). La función principal de la carnitina es la de ser el sustrato de la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1, la cual cataliza el paso inicial en el transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la matriz mitocondrial (Rebouche, 1992). En los últimos años la *L*-carnitina ha atraído considerablemente la atención de grupos de investigadores debido a sus propiedades biológicas y a sus aplicaciones farmacéuticas. En la actualidad existen reportes en los cuales se describe la preparación de mezclas racémicas de carnitina y sus enantiómeros. En estos métodos se involucra la formación de sales quirales y la separación de sus diastereómeros resultantes mediante procesos biológicos, síntesis asimétrica catalítica, descarboxilación oxidativa electroquímica y otros métodos. También se ha descrito la síntesis de análogos de *L*-carnitina, como los análogos cíclicos sustituidos α -, β - y γ -, que contienen uno o dos grupo metilo en estas posiciones y análogos con otro átomo en lugar de un carbono en el grupo carboxílico o en la posición del oxígeno o hidrógeno el grupo hidroxilo (Tadeusiak, 2004). Sin embargo los métodos descritos son escasos, se llevan a cabo con una baja diastereoselectividad, bajos rendimientos químicos, por lo que aun se encuentran bajo investigación, además de que no existen reportes de que estos análogos hayan sido evaluados biológicamente. Es por ello que en el presente trabajo de investigación se abordó la preparación de compuestos fosforados análogos de *L*-carnitina a partir de materias primas de fácil acceso (α -aminoácidos) con una alta diastereoselectividad y alto rendimiento químico y de esta manera poder iniciar con los estudios biológicos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *L*-carnitina

2.1.1 Definición

En mamíferos la *L*-carnitina (3-hidroxi-4-N-trimetilamino butirato) es un nutrimento esencial, sintetizado de manera endógena por los aminoácidos lisina y metionina o puede ser obtenido a partir de la dieta, principalmente de la carne. Su nombre deriva del latín *caro* o *carnis* (carne), fue descubierta en extracto de tejido muscular en 1905. Poco tiempo después se aceptó su fórmula química $C_7H_{15}NO_3$ y en 1927 su estructura (Wolf, 2006). Es una amina cuaternaria de peso molecular de 161.2 g/mol, muy soluble en agua polvo blanco fino cristalino, higroscópico con un punto de fusión de 198 °C, rotación óptica de -31° ($c=10$, H_2O) (Tadeusiak, 2004).

2.1.2 Biosíntesis de *L*-carnitina

La síntesis de la *L*-carnitina inicia con la metilación del aminoácido *L*-lisina por el *S*-adenosilmetionina (SAM) (Figura 1), en conjunto con magnesio, ácido ascórbico, hierro y el cofactor responsable de regenerar SAM de homocisteína (5 metiltetrahidrofolato, metilcibalamina y betaina). En humanos normales, la síntesis de carnitina se estima en 1.2 $\mu\text{mol/kg}$ por día. Es regulada por la disponibilidad del ϵ -N-trimetilisina (Rebouche, 1992).

Se requiere de 3 metilaciones consecutivas del aminoácido *L*-lisina en donde SAM es el donador de los grupos metilo, resultando en la formación de trimetilisina. En el siguiente paso la trimetilisina es hidroxilada a 3-hidroxi-6-N-trimetilisina en una reacción que se requiere de α -cetoglutarato, oxígeno, ácido ascórbico y hierro. Posteriormente en la síntesis endógena de la *L*-carnitina se requiere de pridoxal 5'-fosfato (vitamina B₆) y resulta en la formación de trimetilaminobutiraldehído, que se transforma a trimetilbutirato (o γ -butirobetaina) por acción del NADH (dependiente

de la vitamina B₃). Finalmente, el trimetilbutirato es hidroxilado a carnitina en una reacción en la cual es requerido α -cetoglutarato, oxígeno, ácido ascórbico y hierro (Gregory y Kelly, 1998).

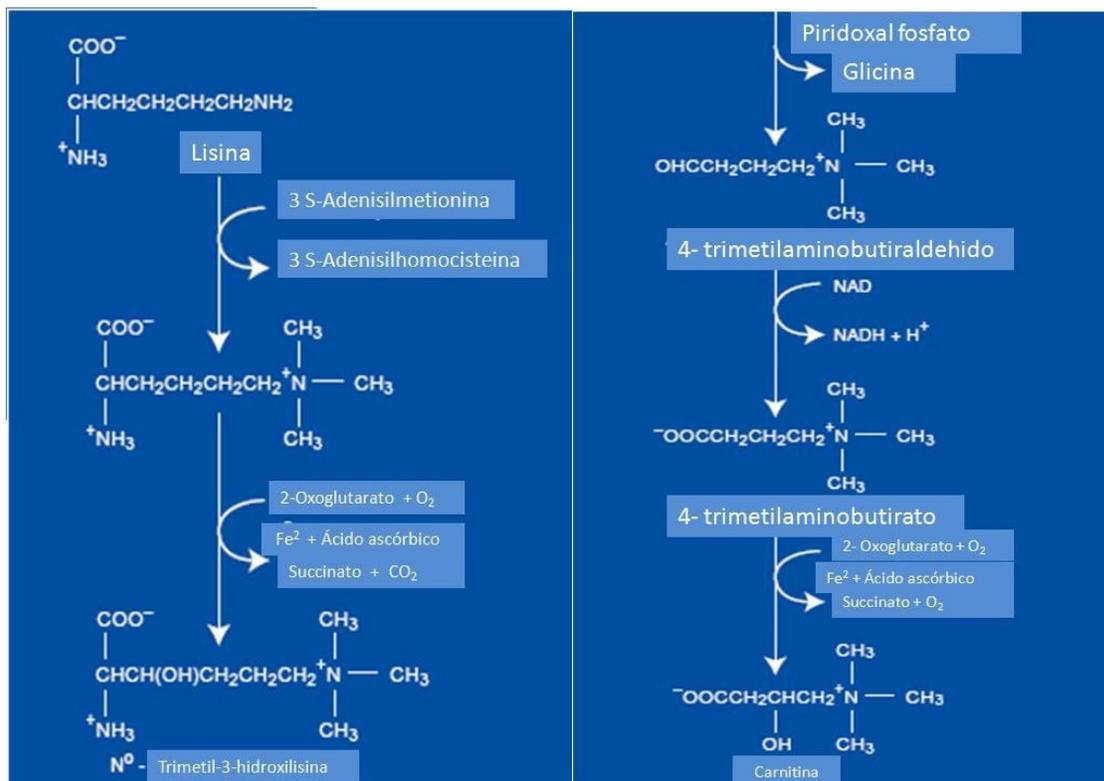


Figura.1. Biosíntesis de L-carnitina (Adaptado de Gregory y Kelly, 1998).

2.1.3. Mecanismo de acción de la *L*-carnitina

La *L*-carnitina es un cofactor vital para la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria. Debido a esto la *L*-carnitina tiene la capacidad de aceptar grupos acilos de cadena corta, mediana y larga de su respectivos tioéster de acil-CoA (Figura 2). Los ácidos grasos de cadena larga son transferidos a *L*-carnitina en una reacción catalizada por la enzima carnitina palmitoiltransferasa I (CPTI) del exterior de la membrana mitocondrial. El éster de acilcarnitina de cadena larga entra a la mitocondria vía carnitina acilcarnitinatranslocasa (CACT). En el interior de la matriz mitocondrial, los ácidos grasos de cadena larga son transferidos a coenzima A catalizados por la carnitinapalmitoiltransferasa II (CPTII) (Vaz y Wanders, 2002).

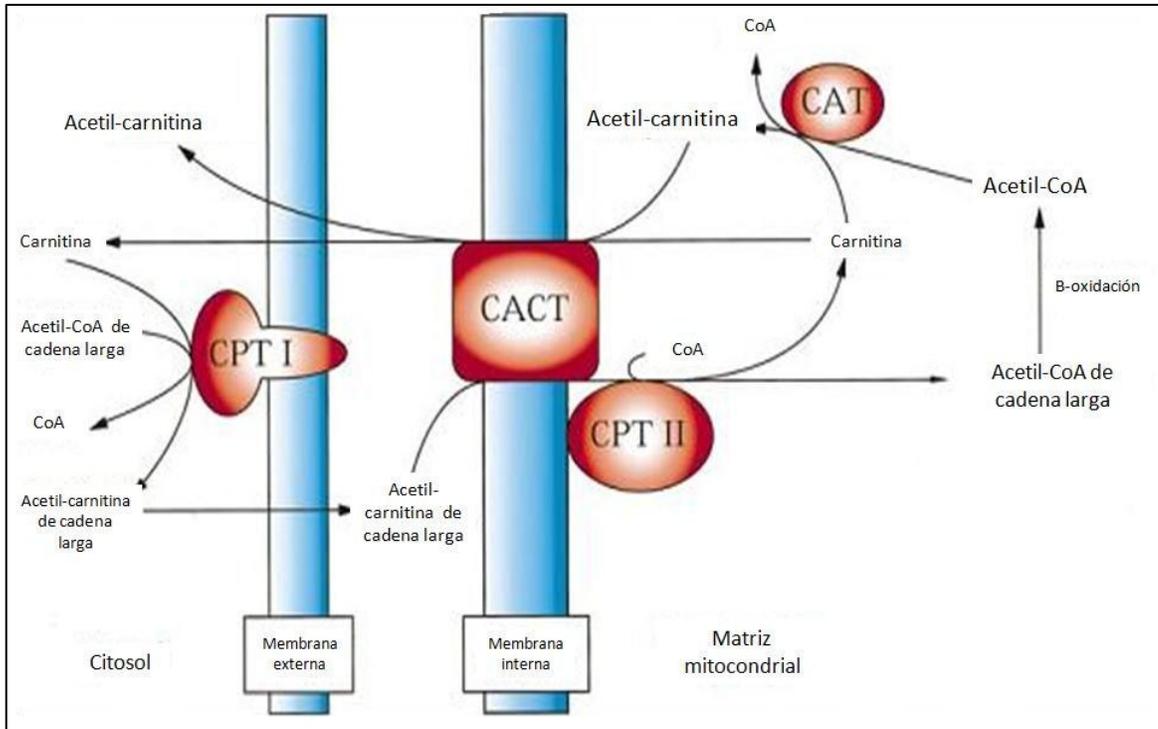


Figura 2. Funciones de la carnitina en el metabolismo de lípidos. En donde CPTI (carnitina palmitoiltransferasa I), CACT (carnitina acetiltranslocasa), CPTII (carnitina palmitoiltransferasa II), CAT (carnitina acetil transferasa). (Adaptado de Vaz y Wanders, 2002).

2.1.4. Consumo de *L*-carnitina.

La principal fuente de carnitina en la dieta es la carne roja y sus productos mientras que las frutas y verduras contienen cantidades mínimas, por lo que el consumo de carnitina puede variar. Un ejemplo lo representan los vegetarianos estrictos que consumen menos del $0.1 \mu\text{mol/kg/día}$, representando cerca de 1 mg/día para un adulto de 70 kg de peso. Mientras que para una persona adulta no vegetariana el consumo diario es de 2 a $12 \mu\text{mol/kg/día}$, o 23 a 135 mg/día (Lombard y col., 1988).

Aunque los niveles de carnitina endógena son afectados por cambios en el consumo de carnitina en la dieta y el estado nutricional, en condiciones normales una persona sana puede sintetizar suficiente cantidad del compuesto, es la razón por lo que no se considera una verdadera vitamina (Vaz y Wanders, 2002).

2.1.5. Distribución en tejidos y transportadores de *L*-carnitina

Las pérdidas de carnitina endógena principalmente ocurren vía excreción renal en forma de *L*-carnitina, acetil-*L*-carnitina y ésteres de cadena larga. En un periodo de 24 horas, una persona sana consumiendo una dieta normal excreta entre 100 y $300 \mu\text{mol}$ del total de carnitina, aunque el nivel de excreción varía de acuerdo al consumo (Lombard y col., 1989). El nivel de acetil-*L*-carnitina a *L*-carnitina en orina tiende a exceder el nivel en plasma, posiblemente a las pérdidas mínimas y a la eficiente reabsorción en los túbulos renales (Rebouche y Hermann, 1988).

La *L*-carnitina está presente en casi todos los tejidos del cuerpo y existen evidencias sobre su transporte a través de las membranas celulares en el hígado, riñón, intestino, cerebro y músculo esquelético. Los altas concentraciones de carnitina en músculo parecen estar relacionadas en parte por el cotransportador de Na⁺/*L*-carnitina (Evans y Fornasini, 2003).

Estudios recientes indican que el transportador principal que participa en la absorción de carnitina es el transportador de cationes orgánicos 2 (OCTN2) el cual se encuentra ampliamente distribuido en una gran cantidad de tejidos en altas concentraciones. El OCTN2 está involucrado en la reabsorción renal tubular de la *L*-carnitina, es relativamente no específico y es inhibido por algunas sustancias que inducen deficiencia de carnitina (Tamai y col., 1998).

La proteína OCTN2 está altamente expresada en placenta, corazón, músculo esquelético, páncreas, riñón, testículos y epidídimo y por el contrario poco expresada en cerebro, pulmones e hígado. Existen otros transportadores de carnitina que se han identificado incluyendo OCTN1, OCTN3, pero las funciones de estos transportadores en el metabolismo de carnitina aun no han sido establecidas (Ohashi y col., 1999).

Por otra parte Ohashi y colaboradores, (2000) propusieron un modelo mediante el cual explican la dependencia de Na^+ para el transporte de carnitina por el OCTN2, así como la independencia para el transporte del catión orgánico tetraetilamonio (TEA) el cual se encuentra distribuido en una gran cantidad de tejidos y excretado en orina por transportadores en el riñón (Figura 3). Después de que el Na^+ se une al OCTN2 fuera de la superficie de la membrana (1), se activa el sitio de unión para la carnitina (2). La carnitina es transportada a través de la membrana hacia el interior (3 y 4) debido a la presencia del gradiente de Na^+ . Ya en la membrana interna, la afinidad del OCTN2 por la carnitina se reduce y subsecuentemente éste se une al tetraetilamonio (TEA) (5 y 6) y es transportado fuera de la célula, en ausencia de Na^+ TEA es transportado hacia el exterior de las células (Ohashi y col., 2000).

Este modelo explica la dependencia de Na^+ para el transporte de carnitina y la no dependencia de Na^+ para el transporte de TEA, además de que los dos sustratos son transportados vía un mecanismo de recambio, presentando un efecto de trans-estimulación mutua. Lo anterior se puede deber a que la carnitina es un zwitterion y el tetraetilamonio es un catión por lo que las fracciones aniónicas de la carnitina requieren de sitios específicos de unión (Wu y col., 1999).

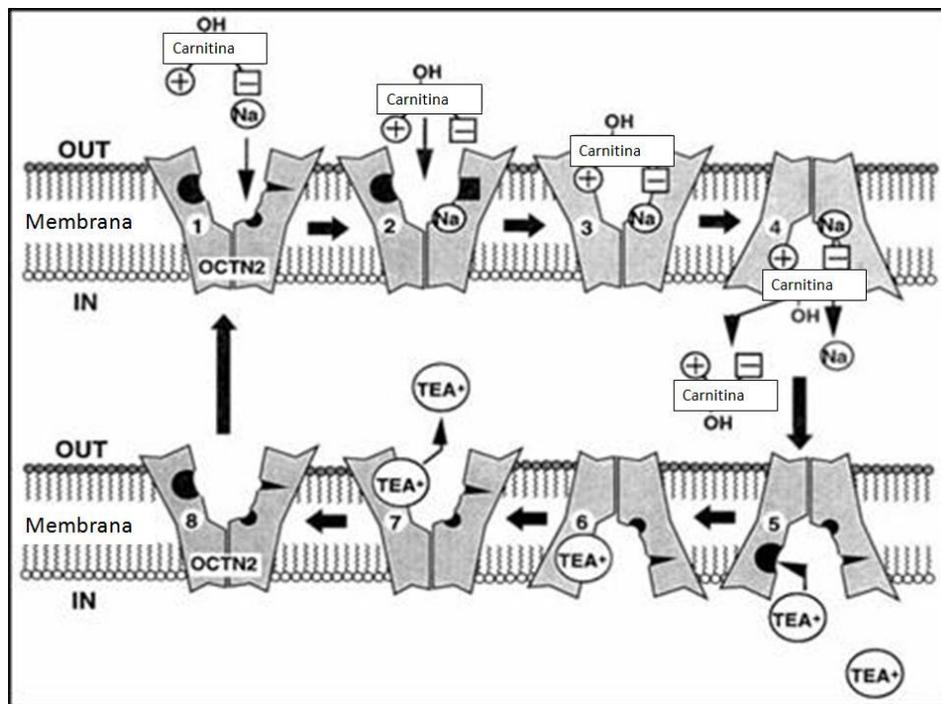


Figura 3. Modelo propuesto para el mecanismo de transporte de carnitina y cationes orgánicos por OCTN2 (Adaptado de Ohashi y col., 2000).

Así mismo, el contenido de carnitina en varios tejidos y órganos del cuerpo humano es notablemente diferente, un ejemplo es la concentración de carnitina en músculo esquelético (2000-4000 $\mu\text{mol/kg}$ de peso) es 100 veces más alta que en plasma (Bertoli y col., 1981). Órganos como riñón, hígado, y cerebro contienen valores intermedios de 300 a 1000 $\mu\text{mol/kg}$. Sin embargo, las concentraciones reportadas de carnitina en plasma, músculo esquelético y otros tejidos varían de acuerdo al método de determinación (Wu y col., 1999). Los niveles de *L*-carnitina en plasma en adultos sanos están generalmente reportados en valores de 40-50 $\mu\text{mol/L}$. Los niveles de acetil-*L*-carnitina, el éster más abundante, está normalmente en el rango de 3-6 $\mu\text{mol/L}$. la concentración total de *L*-carnitina (incluyendo *L*-carnitina y acetil-*L*-carnitina) es de 50-60 $\mu\text{mol/L}$ (Lombard y col., 1988).

2.1.6. Deficiencia de *L*-carnitina

La deficiencia principal de carnitina, puede ser categorizada como miopatía sistémica, que puede deberse a diferentes causas, incluyendo defectos en la biosíntesis, pérdidas excesivas en riñones, problemas de absorción en los tejidos, excesivo catabolismo y mala absorción de la *L*-carnitina dietaria (Rebouche y col., 1983). La deficiencia secundaria de carnitina puede ocurrir debido a pérdidas excesivas durante hemodiálisis o por alteración en el metabolismo durante nutrición parenteral total. La administración de algunos medicamentos también se ha asociado con el desarrollo de deficiencias secundarias de carnitina. Rose y colaboradores (1992) reportaron un paciente el cual desarrollo miopatía en músculo esquelético asociado con deficiencia de carnitina después de 3 meses de tratamiento con Pivampicilina, el cual inhibe al OCTN2, que está involucrado de manera directa con la movilización de *L*-carnitina en el músculo esquelético y reabsorción tubular. El medicamento es eliminado como pivaloil-carnitina, interfiriendo en el metabolismo de *L*-carnitina.

A largo plazo la administración de ácido valpróico puede conducir a una disminución de los niveles plasmáticos de carnitina, así como la administración de zidovudina e ibuprofeno. A medida que se conoce más sobre las funciones del OCTN2 en el transporte de *L*-carnitina se conoce también la forma en que algunos fármacos interfieren en el transporte de *L*-carnitina (antibióticos β -lactámicos, quinidina, verapamil) (Ohashi y col., 2000).

Dada la función del hígado en la síntesis de *L*-carnitina así como la importancia del riñón en su conservación, es de esperar que los pacientes que padecen algún tipo de enfermedad tanto en hígado como en riñón presenten algún grado de deficiencia. La *L*-carnitina es eficientemente removida de la sangre durante hemodiálisis y en conjunto con la disminución progresiva de los niveles de *L*-carnitina con el aumento del tiempo de hemodiálisis, los niveles en el músculo esquelético se ven afectados (Sakurauchi y col., 1998).

La *L*-carnitina administrada ya sea para suplementación o para uso terapéutico muestra las características farmacocinéticas que caracterizan a los pequeños compuestos polares endógenos incluyendo la dependencia de transportadores de membrana.

2.2. Administración de *L*-carnitina exógena

En la actualidad existen reportes del uso de carnitina en padecimientos de anorexia, fatiga crónica (Bremer, 1983), enfermedades vasculares coronarias, difteria, infertilidad masculina, miopatías, síndrome de Retts, pacientes con diálisis (Brass, 1995) y personas infectadas con VIH (Hoopel, 2003). La *L*-carnitina ha atraído considerablemente la atención en los últimos años debido a sus interesantes propiedades biológicas y farmacéuticas, un ejemplo lo constituye el estudio realizado por Derosa y colaboradores (2003) en cual evaluaron el efecto de la suplementación de *L*-carnitina sobre los niveles de lipoproteínas en pacientes diabéticos tipo 2 con hipercolesterolemia. Se reportó una disminución considerable en los niveles de lipoproteína en el grupo al que se le asignó tratamiento respecto a el grupo placebo, concluyendo que en un periodo de 3 a 6 meses la *L*-carnitina disminuye considerablemente los niveles de lipoproteínas en plasma frente a un grupo placebo en pacientes hipercolesterolémicos con diagnostico de diabetes mellitus 2. Así mismo Rahbar y colaboradores (2005) investigaron el efecto de la administración oral de *L*-carnitina sobre los niveles de glucosa en plasma, hemoglobina glucosilada, triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja densidad, apolipoproteínas y lipoproteínas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, observando una disminución significativa en los niveles de glucosa pero un incremento en los niveles de triglicéridos.

La *L*-carnitina exógena, se puede administrar de forma oral, en solución, tabletas, tabletas efervescentes y como infusión intravenosa. Los rangos de las dosis van desde 10 a 50 mg/kg/día (Evans y Fornasini, 2003).

2.2.1. Absorción de *L*-carnitina exógena

Se han realizado una gran cantidad de ensayos, que van desde preparación de intestinos de animales, muestras de intestino humano y células epiteliales, encaminados a determinar el empleo de carnitina en células epiteliales del intestino delgado. Se ha encontrado que la absorción de *L*-carnitina en las células epiteliales del intestino delgado se lleva a cabo en parte vía acarreadores, y en parte por difusión pasiva (Pace y col., 1978).

La absorción de la *L*-carnitina se caracteriza por ser baja en mucosas, presenta prolongado tiempo de retención y lenta eliminación. En humanos, el tiempo en el que se alcanza la concentración máxima en plasma después de una administración oral es de 4 a 6 horas, de igual manera la acetilación de la *L*-carnitina se lleva a cabo durante los procesos de absorción (Evans y Fornasini, 2003).

Estudios realizados por Reboche y colaboradores (1994), encontraron que sólo el 4% de una dosis administrada de *L*-carnitina marcada (0.09 μmol) fue recobrada en heces. Esto sugiere que las dosis grandes de *L*-carnitina saturan el sistema de acarreadores involucrados en el proceso de absorción del compuesto. La difusión pasiva es la vía de absorción principal de carnitina tanto en humanos como en ratas, para una dosis administrada por vía oral (Li y col., 1992).

A pesar de que algunos estudios farmacocinéticos indican que la biodisponibilidad de la *L*-carnitina es incompleta, en todos los estudios en los que se ha determinado su biodisponibilidad, los niveles después de la administración intravenosa exceden a aquellos que se administran en forma oral. Tal es el caso de estudios realizados por Shahajwalla y colaboradores (1995) en el cual los niveles en plasma de carnitina fueron de 700 $\mu\text{mol/L}$ inmediatamente después de una administración intravenosa y aún cercana a 200 $\mu\text{mol/L}$ dos horas después. En contraste, los niveles de *L*-carnitina en plasma observados después de una administración oral fueron de 70-80 $\mu\text{mol/L}$, dando una gran disparidad (Evans y Fornasini, 2003).

La incompleta absorción de la *L*-carnitina probablemente se deba a la alta polaridad del compuesto la cual impide que se difunda libremente por la membrana celular y a la limitada capacidad de los transportadores en el intestino. En adición la acetilación del compuesto durante el movimiento en las células epiteliales puede afectar su biodisponibilidad (Mancinelli y col., 2000).

2.2.2. Distribución de *L*-carnitina

La *L*-carnitina y sus ésteres de cadena corta no se unen a proteínas. Después de una administración intravenosa el volumen inicial de *L*-carnitina es de 0.2-0.3 L/kg el cual corresponde al volumen del fluido extracelular. Los niveles de *L*-carnitina en plasma declinan dos o tres veces de manera exponencial con una vida media inicial de 0.5 a 1 hora y una vida media terminal de 3-12 horas, por lo que el valor de la vida media terminal puede variar (Brass, 1985).

El movimiento de la *L*-carnitina en el músculo esquelético es un proceso muy lento y difícil de caracterizar cinéticamente, particularmente si solo se determinan concentraciones en plasma. Los cambios en la concentración de carnitina en el músculo son mínimos en administraciones por periodos y cantidades pequeñas en sujetos sanos, esto es porque el movimiento de carnitina dentro y fuera del músculo esquelético es un proceso lento (Rebouche y col., 1993).

Después de una administración intravenosa, la *L*-carnitina es excretada principalmente por riñones con un recobro del 70-90% en orina con una dosis de 2 g en un periodo de 24 horas. El resto de la dosis es incorporado en los tejidos como *L*-carnitina u otros componentes (Evans y Fornasini, 2003). En estudios en humanos no se ha detectado metabolitos de *L*-carnitina después de una administración intravenosa, lo que sugiere una degradación insignificante, con la excepción de la acilación (proceso reversible), el metabolismo de la *L*-carnitina administrado por vía intravenosa es similar en ratas y en perros (Rebouche y col., 1993).

Por otra parte, en 1991 Rebouche estimó cuantitativamente el destino de una dosis marcada de *L*-carnitina (*L*-[metil-3H]carnitina) en 5 hombres los cuales recibieron una dieta alta en *L*-carnitina y suplementación de *L*-carnitina. Después de la administración, se monitoreó la excreción urinaria y fecal por un periodo de 5 a 11 días. A la par se colectaron muestras de suero para determinar el curso de la *L*-carnitina marcada y sus metabolitos. Se observó que la absorción de *L*-[3H] carnitina es lenta e incompleta con valores de t_{max} de 2-4.5 horas. Entre 20 y 50 horas después de la administración las concentraciones de *L*-carnitina en suero permanecieron virtualmente constantes. Solo el 6.3% de la dosis fue recobrada sin cambios en orina y un 34% como metabolito la mayoría [3H]-oxido-*N*-trimetilamina y alrededor de 22% de la dosis se recobró en heces mayoritariamente como γ -butirobetaina.

2.2.3. Excreción y eliminación de *L*-carnitina

La *L*-carnitina intravenosa se elimina casi exclusivamente por vía renal. Debido a que no se une a proteínas plasmáticas, la filtración es similar al rango de filtración glomerular (GFR) (100-120 mL/min) y en concentraciones normales en plasma de 40-50 $\mu\text{mol/L}$ es filtrada alrededor de 8-9 mmol de carnitina por día (considerando que el total de carnitina en el cuerpo es alrededor de 128 mmol, y que diariamente por biosíntesis y absorción por la dieta entra alrededor de 0.1-0.3 mmol). En adultos sanos, bajo estas condiciones, la filtración renal de carnitina (1-3 mL/min) es menos que el GFR, lo que implica que el manejo renal de la *L*-carnitina involucra una amplia reabsorción tubular, el grado de reabsorción normalmente es de 98-99% bajo estas condiciones (Rebouche y col., 1993).

2.3. Compuestos análogos de *L*-carnitina

La importancia de la carnitina en la biología de la células, en la fisiología del cuerpo humano y algunos aspectos importantes en farmacología ha inducido a muchos grupos de investigadores para el desarrollo de potentes análogos farmacológicos, entre ellos son muy importantes los análogos fosfónicos. Actualmente se han publicado algunos métodos de preparación para la mezcla racémica y sus enantiómeros. Estos métodos comprenden la formación de sales quirales y su separación en los respectivos diastereómeros, síntesis asimétrica, síntesis asimétrica catalítica y descarboxilación electroquímica oxidativa. Se han descrito también la síntesis de análogos de carnitina cíclicos, análogos α -, β -, γ -sustituidos los cuales contienen uno o dos grupos metilo en esta posición y análogos con heteroátomo en el grupo carboxílico, en el oxígeno o nitrógeno o bien con diversos sustituyentes en el grupo hidroxilo (Tadeusiak y col., 2004).

Tadeusiak y colaboradores (1999) prepararon la sal de potasio de fosfocarnitina, a partir del éster fosfónico obtenido de la epíclorhidrina y del dimetil (trimetilsilil) fosfito, el éster fosfónico se sometió a una desalquilación a ácido 3-cloro-2-hidroxi-propilfosfónico en trimetilsilano (Me₃Sil) en una mezcla de metanol/agua. El rendimiento del ácido 3-cloro-2-hidroxi-propilfosfónico fue del 81%, el siguiente paso consistió en la sustitución del cloro por el grupo trimetilamonio en un tratamiento con exceso de trimetilamina en calentamiento a 40°C por 40 horas en un medio acuoso, el rendimiento de la sal obtenida fue del 72%. El producto obtenido se trató con una cantidad equimolar de carbonato de potasio y de esta manera se obtuvo la sal de fosfocarnitina con un rendimiento del 57%. La mezcla racémica de sal de potasio de monopotasio de fosfocarnitina fue cristalizada y su estructura fue confirmada por análisis elemental y espectroscopía de masas, espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ¹H), Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³C) y Resonancia Magnética Nuclear de fósforo (RMN ³¹P) (Tadeusiak y col., 1999).

Por otra parte Mikolajczyk y colaboradores (2002) obtuvieron los enantiómeros *R* y *S* de fosfocarnitina con un alto rendimiento mediante síntesis enzimática. Los precursores de carnitina (*R*)-(+ y (*S*)-(-) fueron obtenidos de una mezcla racémica. En el siguiente paso cada uno fue desalquilado utilizando bromotrimetilsilano y así obtuvieron ácidos fosfónicos los cuales fueron tratados en solución acuosa de trietilamina resultando en sales de trietilamonio. Estas sales fueron purificadas y separadas por cromatografía en columna para obtener fosfocarnitina (*R*) y (*S*).

De igual manera Wang y colaboradores. (2003) llevaron a cabo la síntesis enzimática de fosfocarnitina utilizando resolución cinética mediada con lipasa, el rendimiento total fue de 45% partiendo del 3-cloro-2-oxofosfonato. Se llevó a cabo una esterificación seguida de una posterior reducción con borohidruro de sodio. El producto de la reducción se trató con lipasa *Mucor miehei* (IM) para lograr una resolución cinética adecuada. El siguiente paso consistió en una aminación seguida de una posterior desalquilación.

2.3.1 Ácidos aminofosfónicos en la síntesis de fármacos

El papel de los aminoácidos en la química de la vida como unidades estructurales de péptidos y proteínas ha cobrado gran interés en la química orgánica y la biología. Es por ello que en la búsqueda de compuestos que permitan suplir o mejorar las propiedades biológicas y químicas de los aminoácidos se han descubierto y preparado compuestos que imitan sus características y funciones. Una clase interesante son los ácidos aminofosfónicos, definidos básicamente como análogos de aminoácidos en los cuales el grupo carboxílico ha sido remplazado por un grupo fosfónico o fosfínico (Kafarski y Lejczak, 2001).

Los ácidos aminofosfónicos fueron casi desconocidos hasta 1959 cuando Horiguchi y Kandatsu aislaron el ácido 2-aminoetilfosfónico (ciliatina) de ácido hidrolizado de una preparación de proteolípidos de rumen de oveja. Subsecuentemente Kittredge y colaboradores, en 1962, obtuvieron evidencias de que el mismo compuesto está presente en la anemona de mar *Anthopleura elegantissima* (Dawson y Kemp, 1967). La poca toxicidad que representan y su excelente capacidad de imitar a los aminoácidos los convierte en antimetabolitos muy importantes ya que compiten con sus contrapartes carboxílicos por sitios activos de enzimas y otros receptores celulares. La sustitución de los grupos carboxílicos por fracciones fosfónicas tiene una serie de consecuencias de gran importancia derivadas de sus diferencias tales como, forma, arreglo tetrahédrico (el átomo de fósforo frente a un plano del átomo de carbono), acidez (el grupo fosfónico es significativamente más ácido), el radio del átomo de fósforo es mucho más grande que el de carbono, las propiedades diácidas del átomo de fósforo con hibridación sp^3 modifican el tamaño y estructura di y tridimensionales, así como el punto isoeléctrico. Estas diferencias influyen de manera notable en su reactividad química y por consiguiente en su actividad biológica (Kafarski y Lejczak, 2001).

Los ácidos aminofosfónicos se consideran como análogos estructurales de sus correspondientes aminoácidos, ya que pueden actuar como inhibidores competitivos y como falsos sustratos durante el metabolismo de un aminoácido. Por otra parte se han encontrado numerosas aplicaciones para los ácidos aminofosfónicos, en el diseño de inhibidores enzimáticos, como reguladores en el desarrollo de plantas, agentes antibacteriales, compuestos neuroactivos, agentes antifúngicos, herbicidas y agentes anti-VIH (Naydenova y col., 2006).

a) Ácidos aminofosfónicos como inhibidores enzimáticos

La inhibición de la actividad enzimática se lleva a cabo de manera más controlada y mejor en sistemas biológicos por pequeñas moléculas. Para un fármaco, el objetivo podría ser una enzima implicada en el trastorno patológico o una enzima del mismo patógeno. El conocimiento de la estructura del sustrato y de la reacción química catalizada por la enzima es esencial para el diseño de fármacos (Kafarski y Lejczak, 2001).

La historia de los ácidos aminofosfónicos como inhibidores enzimáticos data de 1959 e inició con el reporte de la inhibición de la enzima glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) por los ácidos fosfónico y fosfínico análogos del ácido glutámico (Naydenova y col., 2006).

Muchas proteasas están involucradas en una gran cantidad de enfermedades, estas enzimas han sido el objetivo para el desarrollo y diseño de inhibidores como nuevos agentes terapéuticos potenciales. La actividad de la enzima leucina aminopeptidasa (EC 3.4.11.1) se ha asociado con algunos desordenes patológicos incluyendo cáncer, cataratas de ojos y participa de manera importante en algunos eventos durante la infección por VIH. Basándose en la estructura cristalográfica del complejo que forma con el análogo fosfónico de la leucina, uno de los inhibidores más potentes de esta enzima, se han estudiado y propuesto varios modelos para determinar el mecanismo de interacción de otros aminofosfonatos inhibidores de la leucina aminopeptidasa (Kafarski y Lejczak, 2001).

La aminopeptidasa A es una proteasa unida a membrana homodimérica dependiente de zinc la cual cuenta con residuos N-terminal de glutamina y aspartato. Se ha observado que está involucrada en el metabolismo de angiotensina II y colecistoquinina en el cerebro. La identificación del papel fisiológico y la comprensión del mecanismo de la acción de la enzima han sido posibles gracias a la capacidad de inhibidores específicos. Los análogos fosfónicos del ácido glutámico, los cuales parecen ser uno de los más potentes inhibidores de la enzima han sido usados como sujetos de estudio en el papel de algunos aminoácidos presentes en la amino peptidasa como sitio activo (Lejczak y col., 1987).

El éster difenil-1-aminoalcanofosfonato es uno de los más efectivos inhibidores de la serin proteasas. Este actúa como un inhibidor del sitio activo de manera irreversible justo después de la formación del complejo enzima-sustrato. El mecanismo de acción de este inhibidor presumiblemente comprende un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de la serina por el átomo de fósforo con la formación de la enzima fosforilada el cual reensambla el intermediario tetrahédrico formado durante la hidrólisis del sustrato del péptido (Olekszyn y col., 1991).

b) Aminofosfonatos como imitadores de aminoácidos

Las diferencias estructurales entre el grupo carboxílico y el grupo fosfónico no interfiere en la posibilidad de que el ácido aminofosfónico pueda ser utilizado como sustrato por algunas enzimas que normalmente utilizan aminoácidos. Un ejemplo es la interacción del análogo fosfónico de tirosina con la enzima tirosinasa. La simple sustitución del grupo carboxílico por el grupo fosfónico da lugar a una fracción la cual es utilizada como un buen sustrato sintético de la tirosinasa. Esto indica que la tirosinasa no diferencia entre la función carboxílica y la función fosfónica (Cook y col., 1978).

El melanoma maligno es una enfermedad difícil de tratar, no existe terapia debido a su alto riesgo del estado I al estado III. La quimioterapia para el cáncer ha dado malos resultados, la inmunoterapia resulta virtualmente inefectiva. La característica biológica de las células de melanoma radica en su tendencia a alterar la bioquímica de los organelos involucrados en la conversión de tirosina a melanina. Este proceso comprende la conversión gradual de tirosina a un número de compuestos que polimerizan a productos finales. La reacción inicial de esta ruta catalizada por la tirosinasa es altamente elevada en melanoma. Por lo tanto los análogos de los precursores son capaces de afectar el mecanismo de acción de esta enzima como potenciales agentes anticancerígenos. En estudios preliminares se ha visto que los ácidos aminofosfónicos que demostraron actividad para la tirosinasa fueron citotóxicos para las células de melanoma B16 de ratón (Lejczak y col., 1987).

c) Bifosfonatos.

La osteoporosis es la enfermedad metabólica de los huesos más común en mujeres de edad avanzada, afectando de un 40-50% del total y de un 10-15% en hombres. La enfermedad comprende la pérdida gradual de masa ósea dando como resultado un desbalance en la reabsorción ósea de los osteoclastos y la formación de huesos por los osteoblastos. Los bifosfonatos con estructura no hidrolizable P-C-P son análogos del pirofosfato e inhiben fuertemente la reabsorción del hueso, se han utilizado como tratamiento para desordenes óseos como la enfermedad de Paget, cáncer relacionado con hipercalcemia y osteoporosis postmenopausica. Alteran la reabsorción de los huesos a través de acción directa e indirecta sobre los osteoclastos. Los bifosfonatos se unen a los cristales de hidroxipatita lo que hace más difícil su reconocimiento por los osteoclastos, la unión a los cristales de hidroxipatita, hace más difícil para los osteoclastos de reconocer las superficies desmineralizadas de los huesos y con esto son directamente tóxicos para los osteoclastos (Rogers y col, 2000).

d) Complejos metálicos de aminofosfonatos

El gran interés en los complejos del platino (II) se debe a la ya establecida gran actividad anticáncer de estos compuestos. El descubrimiento del cisplatino y sus sucesivas aplicaciones en las terapias de varios tipos de tumores ha originado cerca de 3000 complejos de platino (II) y platino (IV) como agentes anticáncer. Algunos complejos de aminofosfonatos, con platino (II), han demostrado ser agentes anticáncer más efectivos resistentes a la acción de otros fármacos. El mayor problema clínico de los pacientes con osteosarcoma es causada por la diseminación del tumor, la cual ocurre en los pulmones. La situación clínica de los pacientes se ve mejorada con respecto al tratamiento de la neoplasia inicial especialmente después de la introducción de la quimioterapia preoperativa, pero el problema de la metástasis es un problema que aun no se resuelve satisfactoriamente. Los complejos de platino con fosfonatos son prometedores no solo en la actividad antitumoral contra el osteosarcoma inicial en ratas, al parecer presenta buena eficacia terapéutica contra la metástasis. Se ha observado que este efecto es significativamente elevado cuando el compuesto se aplica en combinación con un agente estándar antimetastático (Rogers y col., 2000).

3. JUSTIFICACIÓN.

Actualmente se han desarrollado métodos de síntesis de *L*-carnitina y sus análogos con la finalidad de mejorar o incrementar la interacción con los receptores en la membrana plasmática, con los receptores de membrana mitocondrial, disminuir la degradación en el tracto gastrointestinal o aumentar la vida media. Los reportes de preparaciones de compuestos análogos de carnitina comprenden la formación de sales quirales con la separación de los diastereómeros resultantes, procesos biológicos, síntesis asimétrica, síntesis catalítica asimétrica y descarboxilación oxidativa electroquímica. Los métodos descritos no han permitido una buena recuperación y se llevan a cabo con muy baja diastereoselectividad, bajos rendimientos químicos y aún se encuentran bajo investigación. Así mismo no existen reportes de que estos análogos hayan sido evaluados biológicamente. Es por ello que en el presente trabajo de investigación se abordará el desarrollo de una ruta de síntesis que permita la obtención de compuestos fosforados análogos de *L*-carnitina con una alta diastereoselectividad y excelente rendimiento químico, a partir de materias primas de fácil acceso (aminoácidos); además el proceso deberá de ser escalable para poder obtener las cantidades necesarias para la realización de los estudios preclínicos.

4. HIPÓTESIS

La reducción diastereoselectiva del dibencilamino β -cetofosfonato preparado a partir del α -aminoácido *L*-leucina proporcionará los dibencilamino β -hidroxifosfonatos *syn:anti*. La hidrólisis e hidrogenólisis proporcionarán los ácidos amino β -hidroxifosfónicos los cuales son análogos fosforados de la *L*-carnitina.

5. OBJETIVO GENERAL

Obtener análogos fosforados de *L*-carnitina con una alta diastereoselectividad y buen rendimiento químico a partir de materias primas de fácil acceso (aminoácido *L*-leucina).

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar una ruta de síntesis que permita obtener compuestos fosforados análogos de *L*-carnitina con una alta diastereoselectividad y buen rendimiento químico.
2. Obtener la mezcla diastereomérica de compuestos análogos de carnitina.
3. Preparar uno de los diastereómeros análogos de carnitina ópticamente puro.
4. Identificar y elucidar la estructura de cada uno de los intermediarios y productos finales de la ruta de síntesis diseñada.

7. METODOLOGÍA.

7.1 Información General.

El material de vidrio, barras de agitación magnéticas, cánulas, columnas cromatográficas, solventes, materias primas, equipos e instrumentos requeridos para la realización del proyecto de investigación fueron proporcionados por el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Enfermedades Crónicas A.C. (CINDETEC).

Los análisis de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (^1H), carbono 13 (^{13}C) y fósforo 31 (^{31}P) se realizaron en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrómetro Varian Mercury 200 a 200 MHz para ^1H y ^{31}P y a 50 MHz para ^{13}C y en un espectrómetro Varian Inova 400 a 400 MHz para ^1H y a 100 MHz para ^{13}C , utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y metanol deuterado (CD_3OD) según fue el caso y como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Para el desplazamiento químico se utilizó el parámetro δ en ppm con referencia al TMS. La multiplicidad de las señales se denotó con las siguientes abreviaturas: s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuarteto), m (múltiplete), dd (doble de dobletes), dc (doble de cuartetos), dt (doble de tripletes), ddd (doble de doble de dobletes), dddd (doble de doble de doble de dobletes).

La purificación de los productos obtenidos de las reacciones realizadas se llevó a cabo por cromatografía en columna flash según Still y colaboradores (1978) utilizando sílica gel Merck 60 (0.040-0.063mm ó 0.2-.5mm) o por cristalización, según sea el caso.

7.2 . Procedimiento general para la preparación de la *L*-leucina tribencilada 2.

En un matraz redondo de tres bocas provisto de agitación magnética, refrigerante y termómetro se colocó el α -aminoácido *L*-leucina **1** (1 equivalente), una mezcla de metanol/agua (4 volúmenes) y carbonato de potasio (K_2CO_3) (1.7 equivalentes). A esta disolución se le adicionó lentamente bromuro de bencilo (BnBr) (3.25 equivalentes.). Terminada la adición la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 25 horas. El avance de reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina. Transcurrido el tiempo de reacción el metanol se evaporó a presión reducida y el aceite resultante se suspendió en acetato de etilo (4 volúmenes), se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. Finalmente, el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna o se utilizó sin purificar (De la Cruz y col., 2005).

7.2.1 Preparación de *L*-leucina tribencilada 2.

En un matraz redondo de tres bocas de 250 mL provisto de agitación magnética, refrigerante y termómetro se colocaron 5.0 g, (38.11 mmol) del α -aminoácido *L*-leucina **1**, 20 mL de mezcla metanol/agua y 8.95 g, (64.79 mmol) de K_2CO_3 . A esta disolución se le adiciona lentamente 21.18 g, (123.8 mmol) de BnBr, terminada la adición la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 25 horas. El avance de reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el metanol a presión reducida y el aceite resultante se suspendió en 20 mL de acetato de etilo, se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. Finalmente, el residuo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla Hex/AcOEt (20:1), obteniendo 12.27 g de un aceite ligeramente amarillo (80.2 % de rendimiento). $[\alpha]_D = -102.1$ ($c=3.6$, $CHCl_3$). **RMN** 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.59 (d, $J=6.8$ Hz, 3H, $(CH_3)_2CH$), 0.81 (d, $J=6.8$ Hz, 3H,

(CH₃)₂CH), 1.50 (ddd, J=14.0, 8.4, 6.0 Hz, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.70 (ddd, J=14.0, 8.8, 5.2 Hz, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 1.73-1.80 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 3.42 (dd, J=8.4, 6.0 Hz, 1H, CHN), 3.49 (AB, J=13.6 Hz, 2H, NCH₂Ph), 3.89 (AB, J=13.6 Hz, 2H, NCH₂Ph), 5.14 (AB, J=12.4 Hz, 1H, OCH₂Ph), 5.26 (AB, J=12.4 Hz, 1H, OCH₂Ph), 7.18-7.44 (m, 15H, H_{arom}). **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 21.7 ((CH₃)₂CH), 23.4 ((CH₃)₂CH), 24.6 (CH(CH₃)₂), 38.75 (CH₂CH(CH₃)₂), 54.6 (NCH₂Ph), 58.9 (CHN), 66.1 (OCH₂Ph), 127.1 (C_{para}), 128.3 (C_{meta}), 128.4 (C_{orto}), 128.6 (C_{para}), 128.8 (C_{meta}), 129.1 (C_{orto}), 136.3 (C_{ipso}), 139.8 (C_{ipso}), 173.4 (C=O).

7.2.2 Preparación de *L*-leucina tribencilada 2 (Proceso “One pot”).

En un matraz redondo de tres bocas de 500 mL provisto de agitación magnética, refrigerante y termómetro se colocaron 10.0 g, (76.23 mmol) del α-aminoácido *L*-leucina **1**, 40 mL de metanol y 17.91 g, (129.59mmol) de K₂CO₃. A esta disolución se le adiciona lentamente 29.42 mL, 42.37 g, (247.75 mmol) de BnBr, terminada la adición la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 25 horas. El avance de reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el metanol a presión reducida y el aceite resultante se suspendió en 20 mL de acetato de etilo, se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida, para obtener 34.96 gr de un aceite (crudo de rxn. 1) el cual se utilizó sin purificar en la siguiente reacción.

7.3 .Procedimiento general para la preparación del dibencilamino β -cetofosfonato

3.

En un matraz de 3 bocas provisto de agitación magnética, termómetro de baja temperatura y bajo atmósfera de nitrógeno se colocó metilfosfonato de dimetilo (3 equivalentes), tetrahidrofurano (THF) anhidro (3 volúmenes). El matraz se colocó en baño de hielo seco-acetona entre -50°C y -60°C , se adicionó lentamente vía cánula n-Butillitio 2.4 M en hexano (3.3 equivalentes.), cuidando que la temperatura no suba de este rango. Terminada la adición, la disolución se agitó de 30 a 60 minutos a una temperatura de -50°C a -60°C (durante este tiempo la disolución se hizo lechosa, lo cual indicó que la reacción de formación del carbanión se realizó). El carbanión se transfirió vía cánula a otro matraz que contenía una disolución del éster bencílico **2** (1 equivalente.) en THF anhidro (2 volúmenes), concluida la adición la mezcla de reacción se agitó a -45°C durante 2 horas. Transcurrido este tiempo la reacción se terminó mediante la adición de ácido clorhídrico al 2%. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se diluyó en agua destilada (1 volumen) y se extrajo con acetato de etilo (4x). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida. Finalmente, el producto obtenido se purificó por cromatografía en columna o se utilizó sin purificar en la siguiente reacción según sea el caso.

7.3.1 Preparación del dibencilamino β -cetofosfonato 3.

En un matraz de 3 bocas de 250 mL provisto de agitación magnética, termómetro de baja temperatura y bajo atmósfera de nitrógeno se colocaron 6.94 g, (55.90 mmol) de metilfosfonato de dimetilo, 20 mL de THF anhidro, el matraz se colocó en baño de hielo seco/acetona entre -50°C y -60°C , se adicionó lentamente vía cánula n-Butillitio 2.4 M (24.63 mL, 61.59 mmol) en hexano, cuidando que la temperatura no subiera de este rango. Terminada la adición, la disolución se agitó de 45 minutos a una temperatura de -50°C a -60°C (durante este tiempo la disolución se hizo lechosa, lo cual indicó que la reacción de formación del carbanión se realizó). El carbanión se transfirió vía cánula a otro matraz que contenía una disolución de 7.02 g, (17.49 mmol) del éster bencílico **2** en 15 mL de THF anhidro, concluida la adición la mezcla de reacción se agitó a -45°C durante 2 horas. La reacción se terminó mediante la adición de ácido clorhídrico al 2%. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se diluyó en 10 mL de agua destilada y se extrajo con acetato de etilo (4 x 10 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de Hex/AcOEt (8:1) obteniendo 6.98 g de un aceite ligeramente colorido (96.8% de rendimiento). $[\alpha]_{\text{D}} = -99.9$ ($c = 3.8$, CHCl_3). **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ 0.80, (d, $J=6.6$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 0.91 (d, $J=6.6$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1.34 (ddd, $J=13.0, 9.2, 3.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.41-1.51 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.84 (ddd, $J=13.0, 9.2, 3.2$ Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.94 (dd, $J=23.2, 14.0$ Hz, 1H, CH_2P), 3.42 (AB, $J=13.0$ Hz, 2H, CH_2Ph), 3.45 (c, $J=3.2$ CHN), 3.48 (d, $J=11.2$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}$), 3.64 (dd, $J=23.2, 14.0$ Hz, 1H, CH_2P), 3.65 (d, $J=11.2$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}$), 3.68 (AB, $J=13.0$ Hz, 2H, CH_2Ph), 7.24-7.36 (m, 10H, H_{arom}). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ 22.1 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 23.8 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 25.6 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.5 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 37.9 (d, $J=128.3$ Hz, CH_2P), 52.8 (d, $J=6.1$ Hz, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}$), 52.9 (d, $J=6.1$ Hz, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}$), 54.7 (CH_2Ph), 64.7 (CHN), 127.5 (C_{para}),

128.6 (C_{meta}), 129.3 (C_{orto}), 139.3 (C_{ipso}), 201.8 (d, $J=6.8$ Hz, $C=O$). **RMN ^{31}P** (200 MHz, $CDCl_3$) δ 24.59.

7.3.2 Preparación del dibencilamino β -cetofosfonato **3** (Proceso “One Pot”).

En un matraz de 3 bocas de 500 mL provisto de agitación magnética, termómetro de baja temperatura y bajo atmósfera de nitrógeno se colocaron 35.1 g, (282.96 mmol) metilfosfonato de dimetilo, 70 mL de THF anhidro, el matraz se colocó en baño de hielo seco-acetona entre $-50^{\circ}C$ y $-60^{\circ}C$, se adicionó lentamente vía cánula 122.5 mL, (306.46 mmol) de n-Butilitio 2.4 M en hexano, cuidando que la temperatura no suba de este rango. Terminada la adición, la disolución se agitó 60 minutos a una temperatura de $-50^{\circ}C$ a $-60^{\circ}C$ (durante este tiempo la disolución se hizo lechosa, lo cual indicó que la reacción de formación del carbanión se realizó). El carbanión se transfirió vía cánula a otro matraz que contenía una disolución de 34.96 g, (87.06 mmol) del éster bencílico **2** (crudo de reacción 1) en 70 mL de THF anhidro, concluida la adición la mezcla de reacción se agitó a $-45^{\circ}C$ durante 2 horas. Transcurrido este tiempo la reacción se terminó mediante la adición de ácido clorhídrico al 2%. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se diluyó en 40 mL de agua destilada y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y evaporó a presión reducida, obteniendo 26.53 g de un aceite ligeramente amarillo (crudo de reacción 2) El cual se utilizó sin purificar en la siguiente reacción.

7.4 Método general para la reducción del dibencilamino β -cetofosfonato **3.**

En un matraz de 3 bocas provisto de agitación magnética y termómetro se colocó el dibencilamino β -cetofosfonato **3** (1 equivalente), se disolvió en una mezcla de THF/MeOH 10:1 (4 volúmenes). La disolución resultante se llevó a la temperatura de reacción deseada y se adicionó lentamente y en pequeñas porciones borohidruro de sodio (NaBH_4) (0.91 a 1.2 equivalentes). Terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó por espacio de 4 horas. Transcurrido el tiempo la reacción se terminó mediante la adición de ácido clorhídrico hasta que el pH de la solución fuera de entre 7 y 8. Posteriormente se evaporó el disolvente mediante presión reducida y el residuo obtenido se diluyó en agua destilada (3 volúmenes) y se extrajo con acetato de etilo (3x). Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y evaporaron a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna o se utilizó sin purificar en la siguiente reacción, según sea el caso.

7.4.1 Preparación de los dibencilamino β -hidroxifosfonatos 4-*syn*/5-*anti* (Proceso “One Pot”)

En un matraz de 3 bocas de 250 mL provisto de agitación magnética y termómetro se colocaron 9.5 g, (22.75mmol) del dibencilamino β -cetofosfonato **3** (crudo de reacción 2), se disolvió en 40 mL de una mezcla de THF/MeOH 10:1. La disolución resultante se llevó a una temperatura de 0-5°C agitando vigorosamente, a esta temperatura se adicionó lentamente y en pequeñas porciones 0.77 gr; (20.48 mmol) de NaBH₄ Terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó por espacio de 4 horas. Transcurrido el tiempo la reacción se terminó mediante la adición de ácido clorhídrico, hasta que el pH de la solución fuera de entre 7 y 8, posteriormente se evaporó el disolvente mediante presión reducida y el residuo obtenido se diluyó en 20 mL de agua destilada y se extrajo con acetato de etilo (3x). Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y evaporaron a presión reducida, posteriormente se purificaron por columna utilizando como eluyente una mezcla de Hex/AcOEt (3:1), obteniendo 8.7 g (92 % de rendimiento) de la mezcla .de los β -hidroxifosfonatos 4-*syn* y 5-*anti* (86:14), respectivamente. RMN ³¹P (200 MHz, CDCl₃) δ 34.671 para el diastereómero 4-*syn* y δ 35.367 para el 5-*anti*.

7.4.2 Preparación del dibencilamino β -hidroxifosfonato 4-*syn*

En un matraz de 3 bocas de 250 mL provisto de agitación magnética y termómetro se colocaron 9.38 g, (22.48 mmol) del dibencilamino β -cetofosfonato **3**, se disolvió en 40 mL de una mezcla de THF/MeOH 10:1. La disolución resultante se llevó a la temperatura de 0-5°C agitando vigorosamente, a esta temperatura se adicionó lentamente y en pequeñas porciones 1.02 g, (26.98 mmol) de NaBH₄. Terminada la adición, la mezcla de reacción se agitó por espacio de 4 horas. Transcurrido el tiempo la reacción se terminó mediante la adición de ácido clorhídrico. Hasta que el pH de la solución fuera de entre 7 y 8, posteriormente se evaporó el disolvente mediante presión

reducida y el residuo obtenido se diluyó en agua destilada (3 volúmenes) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y evaporaron a presión reducida. El crudo de reacción se percoló por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de Hex/AcOEt (3:1), obteniendo 8.98 g de la mezcla de los β -hidroxifosfonatos 4-*syn* y 5-*anti* (86:14), respectivamente. **RMN ^{31}P** (200 MHz, CDCl_3) δ 34.67 para el diastereómero 4-*syn* y δ 35.36 para el 5-*anti*. Posteriormente, se volvió a purificar para la obtención del β -hidroxifosfonatos 4-*syn* como un aceite un aceite ligeramente amarillo; $[\alpha]_{\text{D}} = -5.7$ ($c = 2.9$, CHCl_3). **RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3) δ 0.1 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 0.93 (d, $J=6.4$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1.33 (ddd, $J=13.6$, 6.8, 6.8 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.58 (ddd, $J=13.6$, 8.0, 4.8 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.65-1.74 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.77 (ddd, $J=20.0$, 15.2, 2.0 Hz, 1H, CH_2P), 1.95 (ddd, $J=15.2$, 15.2, 10.0 Hz, 1H, CH_2P), 2.48 (ddd, $J=8.0$, 8.0, 4.8 Hz, 1H, CHN), 3.43 (AB, $J=13.4$ Hz, 2H, CH_2Ph), 3.71 (d, $J=11.0$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}$), 3.75 (d, $J=11.0$ Hz, 3H, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}$), 3.86-2.92 (m, 1H, CHOH), 3.92 (AB, $J=13.4$ Hz, 2H, CH_2Ph), 7.21-7.32 (m, 10H, H_{arom}). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3) δ 23.0 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 23.6 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 26.4 ($\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.8 ($J=140.4$ Hz, CH_2P), 34.9 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 52.5 (d, $J=6.6$ Hz, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}$), 52.8 (d, $J=6.6$ Hz, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}$), 54.6 (CH_2Ph), 60.8 (d, $J=18.2$ Hz, CHOH), 67.3 (d, $J=6.1$ Hz, CHN), 127.3 (C_{para}), 128.6 (C_{meta}), 129.3 (C_{orto}), 139.7 (C_{ipso}). **RMN ^{31}P** (200 MHz, CDCl_3) δ 34.72.

7.4.3 Preparación de los dibencilamino β -hidroxifosfonatos 4-*syn*/5-*anti*.

En un matraz de 3 bocas de 500 mL provisto de agitación magnética y termómetro se colocó 24.11 g del dibencilamino β -cetofosfonato **3** (crudo de reacción 2), se disolvió en una mezcla de THF/MeOH 10:1. La disolución resultante se llevó a una temperatura de reacción de 50-55°C agitando vigorosamente, a esta temperatura se adicionó lentamente y en pequeñas porciones 1.817 g, (49.08 mmol) de NaBH_4 . y se agitó por espacio de 3 horas. Transcurrido el tiempo la reacción se terminó mediante la adición de ácido clorhídrico. Hasta que el pH de la solución fuera de entre 7 y 8,

posteriormente se evaporó el disolvente mediante presión reducida y el residuo obtenido se diluyó en 40 mL de agua destilada y se extrajo con acetato de etilo (4 x 10 mL). Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y evaporaron a presión reducida. El crudo de reacción se percoló por cromatografía en columna utilizando como eluyente una mezcla de Hex/AcOEt (3:1), obteniendo 22.2 g.(91.6% de rendimiento) de la mezcla de los β -hidroxifosfonatos 4-*syn* y 5-*anti* (64:26), respectivamente. RMN ^{31}P (200 MHz, CDCl_3) δ 34.61 para el diastereómero 4-*syn* y δ 35.25 para el 5-*anti*.

7.5 Método general para la preparación del trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-*syn*/8-*anti*.

En un matraz de 3 bocas provisto de agitación magnética y termómetro se colocó el β -hidroxifosfonato 4-*syn* o la mezcla 4-*syn*/5-*anti* (1 equivalente), metanol (4 volúmenes), se adicionó paladio/carbono al 10% (2-3% en peso). El sistema se cerró herméticamente, se agitó vigorosamente por 26 horas bajo atmósfera de hidrógeno a una temperatura de 38 a 40°C. El avance de reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina. Transcurrido el tiempo de reacción el residuo obtenido se filtró al vacío sobre celita y se lavó con metanol (2 volúmenes), el filtrado se pasó a un matraz de redondo de 3 bocas y se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol (2 volúmenes), se adicionó K_2CO_3 (2 equivalentes), iodometano (CH_3I) (3.5 equivalentes). Terminada la adición la disolución resultante se agitó por 4 horas a una temperatura de 30-34°C., la reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se diluyó en 2 volúmenes de etanol, se agitó por 1 hora a una temperatura de 40 °C, transcurrido el tiempo el matraz se sumergió en baño de hielo a una temperatura de 5 a 10°C. Luego se filtró al vacío y se lavó con etanol (2 x),

posteriormente el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se recristalizó de metanol/acetato de etilo.

7.5.1 Preparación de la mezcla trimetilamino β -hidroxifosfonato *7-syn/8-anti* (Proceso “One Pot”).

En un matraz de 3 bocas de 250 mL provisto de agitación magnética y termómetro se colocaron 2.5 g, (5.95 mmol) la mezcla de los dibencilamino β -hidroxifosfonatos *4-syn/5-anti*, 10 mL de metanol, se adicionó 0.625 g paladio/carbono al 10%. El sistema se cerró herméticamente, se agitó vigorosamente por 26 horas bajo atmósfera de hidrógeno a una temperatura de 38 a 40°C. El avance de reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina. Transcurrido el tiempo de reacción el residuo obtenido se filtró al vacío sobre celita y se lavó con 5 mL de metanol, el filtrado se pasó a un matraz redondo de 3 bocas y se evaporó el disolvente a presión reducida, el residuo se disolvió en 5 mL de metanol, se adicionó 1.40 g, (10.1 mmol) de K_2CO_3 , 2.95 g, (20.8 mmol) de CH_3I , terminada la adición la disolución resultante se agitó por 4 horas a una temperatura de 30-34°C., la reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina, transcurrido el tiempo de reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se diluyó en 5 mL de etanol, se agitó por 1 hora a una temperatura de 40°C. Transcurrido el tiempo el matraz se sumergió en baño de hielo a una temperatura de 5 a 10°C, se lavó con etanol (2x), posteriormente el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se recristalizó de metanol/acetato de etilo, para obtener 0.72g. (33.87 % rendimiento) de la mezcla de los *N*-trimetil β -hidroxifosfonatos *7-syn* y *8-anti* (89:11), respectivamente. **RMN ^{31}P** (200 MHz, $CDCl_3$) δ 31.30 para el diastereómero *7-syn* y δ 30.82 para el *8-anti*.

7.5.2 Preparación del trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-*syn*.

En un matraz de 3 bocas de 500 mL provisto de agitación magnética y termómetro se colocaron 10.365 g, (24.70 mmol) del β -hidroxifosfonato 4-*syn*, 40 mL de metanol, se adicionó 2.07 g de paladio/carbono al 10%. El sistema se cerró herméticamente, se agitó vigorosamente por 26 horas bajo atmósfera de hidrógeno a una temperatura de 38 a 40°C. El avance de reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina. Transcurrido el tiempo de reacción el residuo obtenido se filtró al vacío sobre celita y se lavó con 20 mL de metanol, el filtrado se pasó a un matraz de redondo de 3 bocas y se evaporó el disolvente a presión reducida, el residuo se disolvió en 20 mL de metanol, se adicionó 6.82 g, (49.4 mmol) de K_2CO_3 , 3.08 mL (49.4 mmol) de CH_3I , terminada la adición la disolución resultante se agitó por 4 horas a una temperatura de 30-34°C, la reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina, transcurrido el tiempo de reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se diluyó en 20 mL de etanol, se agitó por 1 hora a una temperatura de 40°C, transcurrido el tiempo el matraz se sumergió en baño de hielo a una temperatura de 5 a 10°C. Luego se filtró y se lavó con etanol (2x), posteriormente el filtrado se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se recrystalizó de metanol/acetato de etilo. Para obtener 5.02g. (49.1 % rendimiento) del *N*-trimetil β -hidroxifosfonato 7-*syn*. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.06 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, $(CH_3)_2CH$), 1.08 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, $(CH_3)_2CH$), 1.50 (dd, $J = 13.6, 9.2$ Hz, 1H, CH_2CH), 1.73 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 1.89 (ddd, $J = 13.6, 8.8, 4.2$ Hz, 1H, CH_2CH), 2.49 (ddd, $J = 18.6, 15.6, 8.6$ Hz, 1H, CH_2P), 2.63 (ddd, $J = 19.2, 15.6, 4.8$ Hz, 1H, CH_2P), 3.45 (s, 9H, $(CH_3)_3N$), 3.78 (d, $J = 10.8$ Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 3.80 (d, $J = 10.8$ Hz, 3H, $(CH_3O)_2P$), 3.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, CHN), 4.43 (m, 1H, CHOH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 21.95 ($(CH_3)_2CH$), 23.76 ($(CH_3)_2CH$), 26.78 ($CH(CH_3)_2$), 32.47 (d, $J = 135.1$ Hz, CH_2P), 38.03 (CH_2CH), 53.35 ($(CH_3O)_2P$), 54.12 ($(CH_3)_3N$), 67.30 (CHN), 73.63 (CHOH). ^{31}P NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 31.31.

7.6 Método general para la preparación de los ácidos *N*-trimetilamino β -hidroxifosfónicos *9-syn/10-anti*.

En un matraz redondo de 250 mL provisto de agitación magnética y bajo atmósfera de nitrógeno se colocó el trimetilamino β -hidroxifosfonato *7-syn* o la mezcla *7-syn/8-anti* (1 equivalente) y cloruro de metileno (2 volúmenes), se adicionó lentamente bromuro de trimetilsilano (TMSBr) (2 equivalentes). Terminada la adición, la solución resultante se agitó por 4 horas a temperatura ambiente. Después del periodo de tiempo el exceso de TMSBr se evaporó a presión reducida y el sólido resultante se arrastró con cloruro de metileno (1 volumen), enseguida se le adicionó agua destilada (1 volumen) y se dejó bajo agitación toda la noche. Posteriormente, el agua se evaporó a presión reducida y el residuo se disolvió en agua (2 volúmenes) y se lavó con acetato de etilo (1 volumen), finalmente la fase acuosa se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se recristalizó de metanol/acetato de etilo.

7.6.1 Preparación del ácido trimetilamino β -hidroxifosfónico *9-syn/10-anti*.

En un matraz redondo de 250 mL provisto de agitación magnética y bajo atmósfera de nitrógeno se colocaron 11.3 g, (26.96 mmol) de la mezcla de los trimetilamino β -hidroxifosfonato *7-syn/8-anti*. y 20 mL de cloruro de metileno, se adicionó lentamente 6.98 mL, (53.9 mmol) de TMSBr. Terminada la adición, la solución resultante se agitó por 4 horas a temperatura ambiente. Después del periodo de tiempo el exceso de TMSBr se evaporó a presión reducida y el sólido resultante se arrastró con 10 mL de cloruro de metileno, enseguida se le adicionó 10 mL de agua destilada y se dejó bajo agitación toda la noche. Posteriormente, el agua se evaporó a presión reducida. El residuo se redisolvió en 20 mL de agua y se lavó con 10 mL de acetato de etilo, finalmente la fase acuosa se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se recristalizó de metanol/acetato de etilo, para obtener 5.32g (78% rendimiento) de la mezcla de los ácidos *N*-trimetil β -hidroxifosfónicos *9-syn/10-anti*

(67:23), respectivamente. RMN ^{31}P (200 MHz, CDCl_3) δ 25.6 para el diastereómero **9-syn** y δ 24.7 para el **10-anti**.

7.6.2 Preparación del ácido trimetilamino β -hidroxifosfónico **9-syn**.

En un matraz redondo de 250 mL provisto de agitación magnética y bajo atmósfera de nitrógeno se colocaron 10 g, (23.84 mmol) del *N*-trimetil β -hidroxifosfonato **7-syn** y 20 mL de cloruro de metileno, se adicionó lentamente 6.40 mL, (47.64 mmol) de TMSBr. Terminada la adición, la solución resultante se agitó por 4 horas a temperatura ambiente. Después del periodo de tiempo el exceso de $\text{C}_3\text{H}_9\text{BrSi}$ se evaporó a presión reducida y el sólido resultante se arrastró con 10 mL de cloruro de metileno, enseguida se le adicionó 10 mL de agua destilada y se dejó bajo agitación toda la noche. Posteriormente, el agua se evaporó a presión reducida, el residuo se disolvió en 20 mL de agua y se lavó con 10 mL de acetato de etilo, finalmente la fase acuosa se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se recrystalizó de metanol/acetato de etilo. para obtener 5.13g. (85% rendimiento) del ácido *N*-trimetil β -hidroxifosfónico **9-syn**. RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) δ 1.04 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 1.73 (m, 3H, CH_2CH , $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.29 (m, 2H, CH_2P), 3.28 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{N}$), 3.57 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, CHN), 4.33 (m, 1H, CHOH). RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) δ 21.64 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 23.92 ($(\text{CH}_3)_2\text{CH}$), 27.43 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 36.48 (d, $J = 134.1$ Hz, CH_2P), 38.52 (CH_2CH), 53.98 ($(\text{CH}_3)_3\text{N}$), 68.89 (CHN), 73.48 (d, $J = 11.0$ Hz, CHOH). RMN ^{31}P (81 MHz, CD_3OD) δ 24.898.

8 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los métodos de síntesis de compuestos fosforados análogos de carnitina que se encuentran reportados en la literatura presentan una baja diastereoselectividad y bajos rendimientos químicos, es por ello que en el presente trabajo de investigación se desarrolló una metodología para la síntesis de análogos de *L*-carnitina con una alta diastereoselectividad (Figura 4)

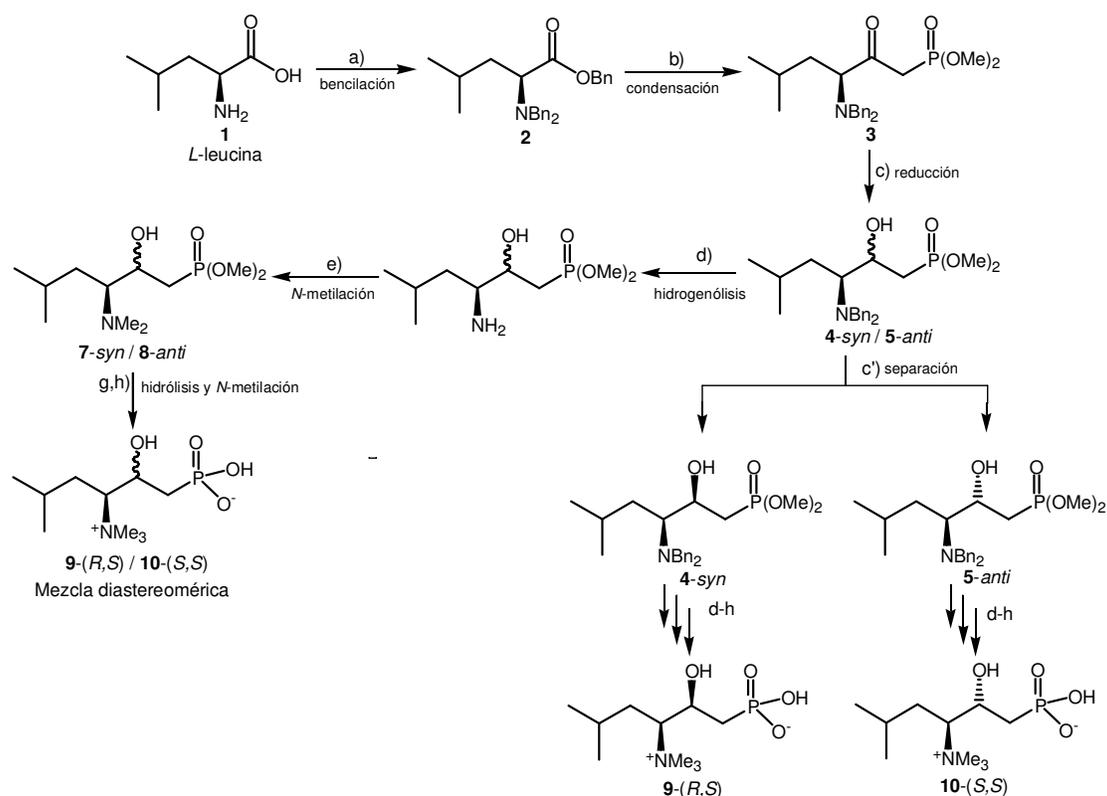
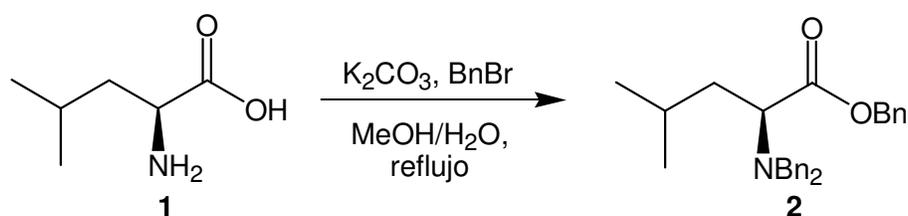


Figura 4. Ruta de síntesis para la obtención de compuestos fosforados análogos de carnitina. En donde el α -aminoácido *L*-leucina 1 es esterificado y posteriormente se hace reaccionar con dimetil metil fosfonato y así obtener el cetofosfonato 3, el cual es sometido a reducción diastereoselectiva para obtener la mezcla de alcoholes 4-*syn*/5-*anti* finalmente estos son sometidos a hidrogenólisis, metilación e hidrólisis.

En base al esquema de síntesis diseñado se decidió preparar el éster tribencilado **2** a partir del α -aminoácido *L*-leucina **1**, el cual se puso a reaccionar con un exceso de K_2CO_3 y bromuro de bencilo. Ordoñez y colaboradores (2004) reportaron la preparación de ésteres tribencilados con rendimientos del 76-87%, por otra parte De la Cruz y colaboradores (2005) reportaron la preparación de aminoácidos tribencilados con buenos rendimientos químicos. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de la *L*-leucina tribencilada **2**



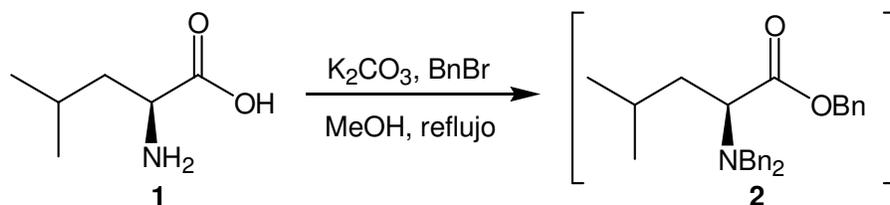
Experimento	<i>L</i> -leucina (gramos)	K_2CO_3 (Eq)	BnBr (Eq)	Disolvente (Vol)	Rendimiento. (%)
1 ^a	2.5 ^a	3.5	4.0	MeOH/H ₂ O	77
2	2.5	1.70	4.0	MeOH/H ₂ O	79.4
3	5.0	1.70	3.25	MeOH/H ₂ O	80.2
4	10	1.70	3.25	MeOH/H ₂ O	82.3

a. Condiciones reportadas en la literatura

Debido a que se pretendía desarrollar un método escalable, se optimizaron las condiciones de reacción. El experimento 1 en la Tabla 1 muestran las condiciones reportadas en la literatura, las variables se fueron cambiando una a una por ejemplo, se inició con la disminución del carbonato de potasio, los mejores resultados se obtuvieron utilizando sólo 1.7 equivalentes (experimento 2). Posteriormente, se procedió a optimizar los equivalentes de bromuro de bencilo, los resultados obtenidos fueron reproducibles cuando se incrementó el lote a 10 g (experimentos 3 y 4).

Debido a la incorporación de 3 grupos bencilos al aminoácido el peso molecular se triplicó, por lo que al preparar lotes de 10 g se complicó la purificación del producto obtenido por cromatografía en columna. Debido a ello, se dio a la tarea de modificar el método reportado, con la finalidad de utilizar directamente el crudo de reacción en la siguiente etapa. El procedimiento inicial implicó el uso de una mezcla metanol/agua, una vez finalizada la reacción se eliminó el disolvente y se disolvió en acetato de etilo, realizando lavados exhaustivos con agua. Debido a que en el paso siguiente implicó la utilización de un carbanión (especie muy reactiva, susceptible a la humedad), era imprescindible eliminar el uso de agua en la reacción. Así pues, se realizó la reacción utilizando sólo metanol como disolvente y, una vez concluida la reacción, se eliminó el disolvente en rotavapor. Posteriormente se hicieron arrastres con acetato de etilo para después redissolver el producto en acetato de etilo, filtrar los sólidos y el filtrado volverlo a evaporar a total sequedad. El aceite obtenido se utilizó sin purificación adicional en la siguiente reacción. (Experimento 1, Tabla 2) Para finalizar, se hizo un ajuste en los volúmenes de metanol utilizados, llegando a utilizar sólo 4 volúmenes. (Experimento 2, Tabla 2).

Tabla 2. Preparación de *L*-leucina tribencilada **2 condiciones optimizadas.**



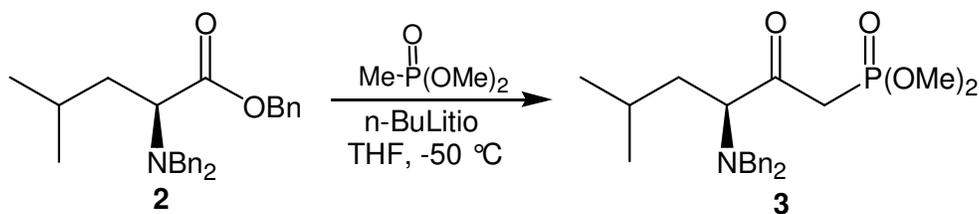
Experimento	<i>L</i> -leucina (g)	K ₂ CO ₃ (Eq)	BnBr (Eq)	Disolvente (Vol)	Rendimiento (%)
1 ^a	2.5 ^a	3.5	3.5	MeOH/H ₂ O (100)	77
2	10	1.70	3.5	MeOH (10)	n.d.
3	10	1.70	3.25	MeOH (4)	n.d.

a. Condiciones reportadas en la literatura

La identificación de los productos se realizó por cromatografía en capa fina y RMN de ¹H; correspondiendo a lo reportado en la literatura.

Una vez obtenido el éster tribencilado **2** y determinadas las mejores condiciones de reacción, éste se puso a reaccionar a una temperatura de -50 a -60°C con el anión de litio del dimetil metil fosfonato obteniendo el β-cetofosfonato **3**; los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Preparación del dibencilamino β -cetofosfonato 3.



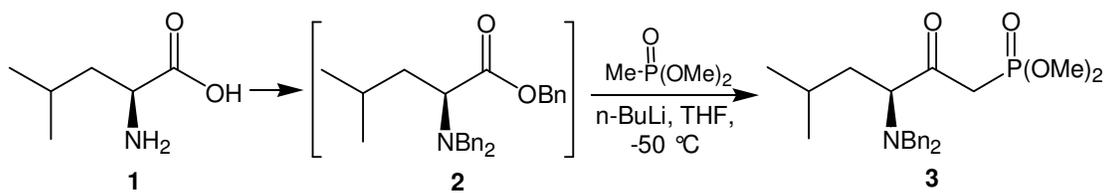
Experimento	Éster bencílico 2 (g)	Dimetil fosfonato (Eq)	Temperatura (°C)	<i>n</i> -BuLi (Eq)	Rendimiento (%)
1 ^a	2.5 ^a	3.5	-78	3.6	96.0
2	7.0	2.4	-50 a -55	2.64	96.8
3	10	2.4	-50 a -55	2.64	97.1

a. Condiciones reportadas en la literatura

Siguiendo con el objetivo planteado de desarrollar un método que sea escalable, al igual que en la etapa anterior se dio a la tarea de optimizar las condiciones de reacción. El experimento 1 en la Tabla 3 muestra las condiciones reportadas en la literatura. De esta manera se inició con la disminución del dimetil metilfosfonato. Los mejores resultados se obtuvieron con 2.4 equivalentes y realizando la generación y adición del carbanión a una temperatura de -50 a -60 °C (experimento 2. Tabla 3). Resultados similares se obtuvieron cuando se hizo el escalamiento a lotes de 10 g de materia prima.

Una vez optimizadas las condiciones de reacción, se propuso la obtención del β -cetofosfonato **3** mediante un proceso de síntesis “One Pot”, es decir, preparar el éster tribencilado **2** y directamente del crudo de reacción obtener el β -cetofosfonato **3**. El desarrollo de este método sería de mucha importancia, porque permitiría la preparación de lotes de éster bencílico **2** de hasta 30 g. En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos, en el experimento 1 se resume el rendimiento global de las 2 etapas del método reportado en la literatura, mientras que el experimento 2, el crudo de reacción de la obtención del éster bencílico **2** a partir de 2.5 g de *L*-leucina **1** condujo a un rendimiento global de 82.4%. Además se redujo considerablemente la cantidad de THF utilizada. Los mejores resultados obtenidos se muestran en el experimento 3, en donde a partir de 10 g de *L*-leucina se obtuvo un crudo del éster bencílico **2** de aproximadamente 30 g, los cuales, después de hacerlos reaccionar con el carbanión, condujeron a un rendimiento final del 83.7%. Así también fue posible disminuir aún más los volúmenes de THF utilizados.

Tabla 4. Preparación del dibencilamino β -cetofosfonato **3 proceso “one pot”.**



Experimento	<i>L</i> -leucina 1 (g)	Dimetil fosfonato (Eq)	<i>n</i> -BuLi (Eq)	THF (Vol)	Rendimiento ^b (%)
1 ^a	2.5	3.2	3.52	36	73.9
2	7.5	2.4	2.64	10	82.4
3	10.0	2.4	2.64	5	83.7

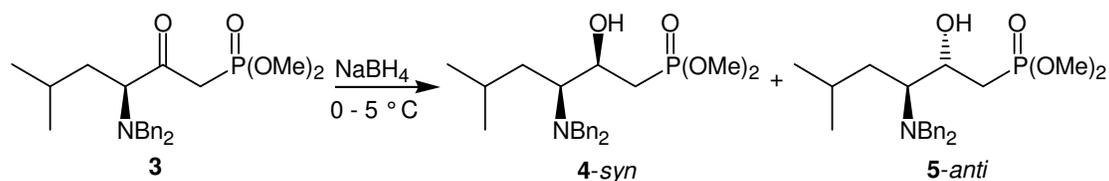
a. Condiciones reportadas en la literatura, materia prima purificada.

b. Rendimiento global de los 2 pasos.

Todos los compuestos fueron identificados por RMN ^1H , ^{13}C y ^{31}P , mostrando patrones de acoplamiento similares a los descritos en la literatura.

Una vez obtenido el dibencilamino β -cetofosfonato **3**, el siguiente paso fue llevar a cabo la reducción diastereoselectiva para así obtener los dibencilamino β -hidroxicetofosfonatos **4-syn** y **5-anti**. La reducción se llevó a cabo con NaBH_4 , se establecieron las condiciones óptimas de reacción evaluando diferentes cantidades de reactivos y disolventes, los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Reducción diastereoselectiva del dibencilamino β -cetofosfonato **3.**



Experimento	Cetofosfonato 3 (g)	NaBH_4 (Eq)	Condiciones	4-syn : 5-anti	Rendimiento (%)
1 ^a	2.5	4.0	MeOH, 20 vol	86 : 14	94.0
2	2.5	2.0	MeOH, 10 vol	85 : 15	95.7
3	9.3	1.5	MeOH/THF, 6 vol	85 : 15	96.1
4	10	1.2	MeOH/THF, 4 vol	85 : 15	96.8

a. Condiciones reportadas en la literatura

Por ejemplo se inició con la disminución de NaBH₄ obteniendo buenos resultados con 2 equivalentes y utilizando como disolvente MeOH, (experimento. 2). Con la finalidad de poder disminuir aún más los equivalentes del agente reductor, se sustituyó el metanol por una mezcla metanol/THF, ya que de esta forma se evitaría la reacción inicial del NaBH₄ con el metanol. Se probaron diferentes proporciones, encontrando que con una mezcla MeOH/THF 1:10 se reproducían los resultados en cuanto a diastereoselectividad y rendimiento (experimento. 3). Finalmente, los mejores resultados se dieron cuando se escaló el lote a 10 g optimizando el uso de NaBH₄ a 1.2 equivalentes y utilizando sólo 4 volúmenes de la mezcla MeOH/THF (experimento. 4), la identificación de los dibencilamino β-hidroxifosfonatos **4-syn** y **5-anti** se realizaron por RMN ³¹P (Figura 5.).

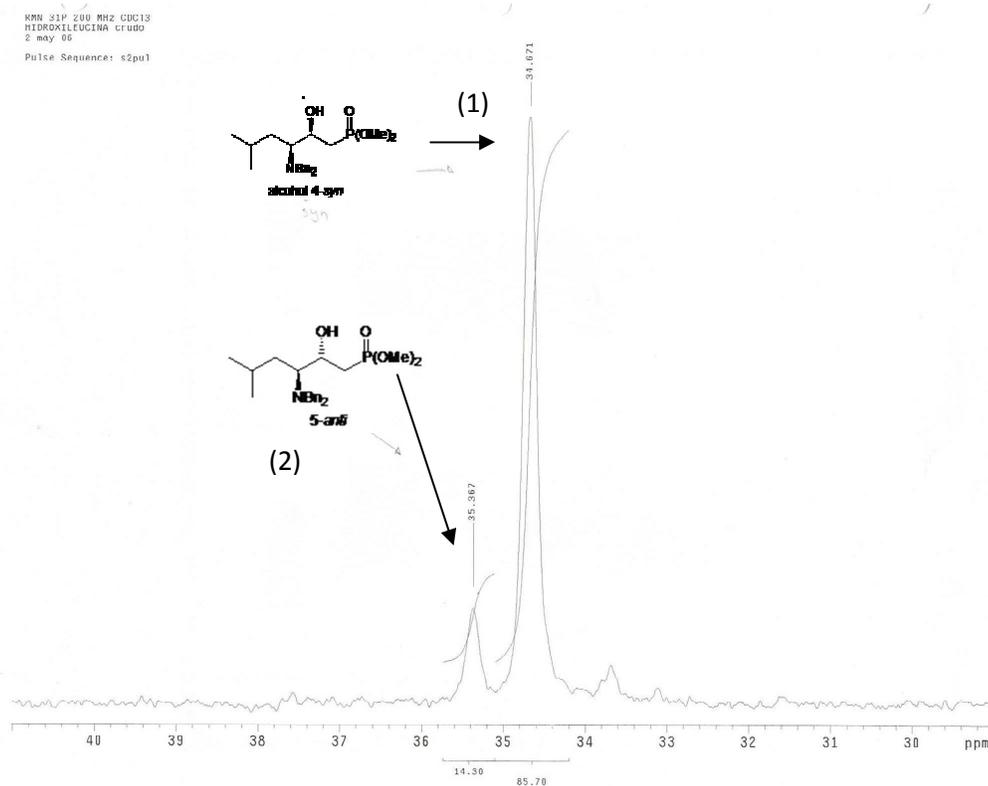
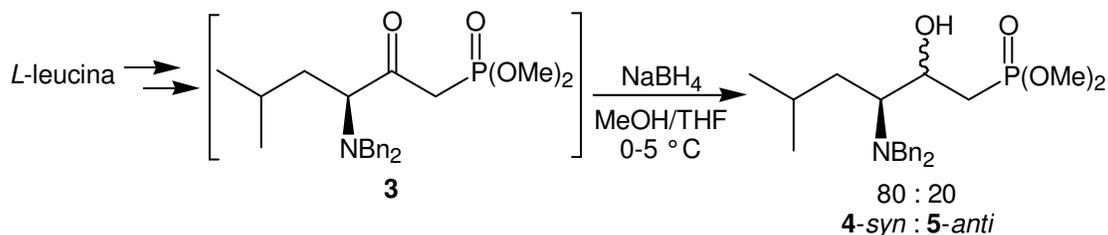


Figura 5. Espectro de RMN ^{31}P para la mezcla de los dibencilamino β -hidroxifosfonatos 4-*syn* y 5-*anti*. Relación 85:15, experimento 4. En donde la señal (1) corresponde al diastereomero 4-*syn* y la señal (2) al diastereomero 5-*anti*.

Posteriormente; una vez optimizadas las condiciones de reacción en esta etapa de la ruta de síntesis, se incorporó el proceso “one pot”. En la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 6. Proceso “one pot” para la obtención de la mezcla de los dibencilamino β -hidroxifosfonatos 4-*syn* y 5-*anti*.



Experimento	<i>L</i> leucina 1 (g)	NaBH ₄ (Eq)	disolvente (vol)	Rendimiento ^b (%)
1 ^a	2.5	4.0	MeOH, 20	69.4
2 ^b	7.5	1.2	MeOH/THF, 4	82.1
3	10.0	1.0	MeOH/THF, 4	84.6

a. Condiciones reportadas en la literatura

b. Rendimiento global de los 3 pasos.

En el experimento 2 se muestran los resultados obtenidos partiendo de un lote de 2.5 g de *L*-leucina. El rendimiento obtenido fue mayor al obtenido por etapas. Además de que se acortan considerablemente los tiempos de obtención, se obtuvieron mejores resultados cuando se escaló el lote partiendo de 7.5 g de *L*-leucina (Experimento 3).

De esta manera, con la mezcla de los dibencilamino β -hidroxifosfonatos en mano, se procedió a realizar la preparación de los dimetilamino β -hidroxifosfonato **6**, iniciando con la remoción de los grupos protectores (bencilos) del átomo de nitrógeno mediante hidrogenólisis. La reacción se realizó en metanol y usando paladio sobre carbón al 10% como catalizador bajo atmósfera de hidrógeno. Una vez completada la reacción, la cual se fue monitoreando por cromatografía en capa fina, se hicieron

reaccionar con 2.5 equivalentes de CH_3I con el objetivo de dimetilar al grupo amino (Figura 6.)

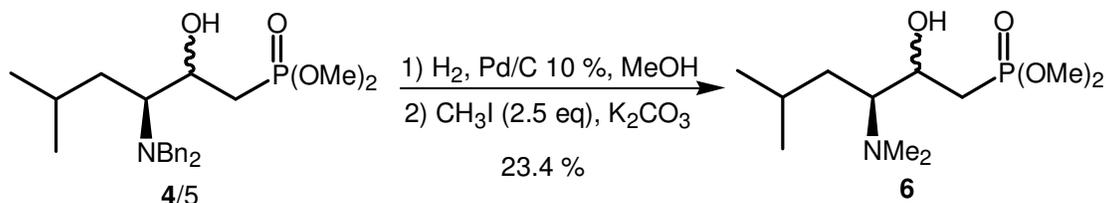


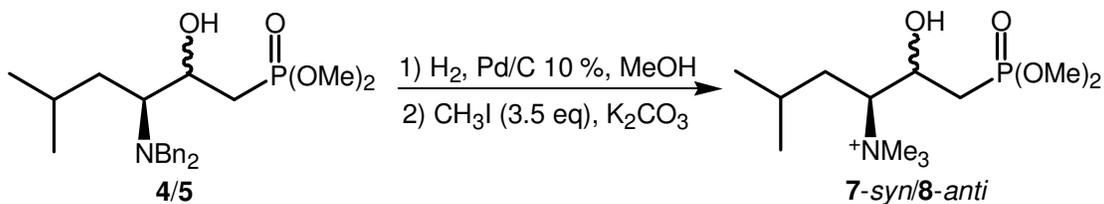
Figura 6. Preparación del dimetilamino β -hidroxifosfonato 6. La reacción de hidrogenólisis 1) se llevó a cabo a una temperatura de 45°C , mientras que la reacción de metilación 2) a una temperatura de 30°C .

Al finalizar la reacción, el crudo se purificó por cromatografía en columna obteniendo 2 productos principales con muy bajo rendimiento. El análisis por RMN de ^1H de los productos aislados mostraron lo siguiente: El producto menos polar aislado correspondió al producto dimetilamino β -hidroxifosfonato **6**, mientras que el producto más polar indicó la formación del producto trimetilado, solo que no se encontraba completamente puro, dificultando la total confirmación. Estos resultados parecen indicar que conforme va reaccionando el grupo $-\text{NH}_2$ con el yodometano, el nitrógeno se va haciendo más nucleofílico, de tal forma que la reacción no se detiene en el producto dimetilado, sino que procede hasta el producto trimetilado.

El bajo rendimiento, a pesar de observarse consumo total de materia prima, pudiera deberse a la alta polaridad del producto trimetilado, el cual al ser purificado quedó retenido en la columna.

En base a los resultados obtenidos, se decidió aumentar los equivalentes de CH_3I (Experimento 2, Tabla 7) y así obtener de manera directa el producto trimetilado. Además aprovechando de que el producto trimetilado era sólido, se sustituyó la cromatografía en columna por la purificación por cristalización.

Tabla 7. Preparación de la mezcla de trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-syn / 8-anti



Experimento	Hidroxifosfonato (g)	Pd/C (% peso)	K ₂ CO ₃ (Eq)	CH ₃ I (Eq)	7/8 (%)
1	2.5	2.5	3.5	3.5	22.5
2	2.5	2.5	1.7	3.5	25.7

Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento, pero disminuyendo los equivalentes de K₂CO₃, los rendimientos fueron similares al experimento 1. A pesar de que por placa se observaba buena formación de producto, al momento de cristalizar el rendimiento era muy bajo. Por lo tanto se analizaron las aguas madres, observando que en ellas quedaba considerable cantidad de producto (Figura 7. Tabla 7).

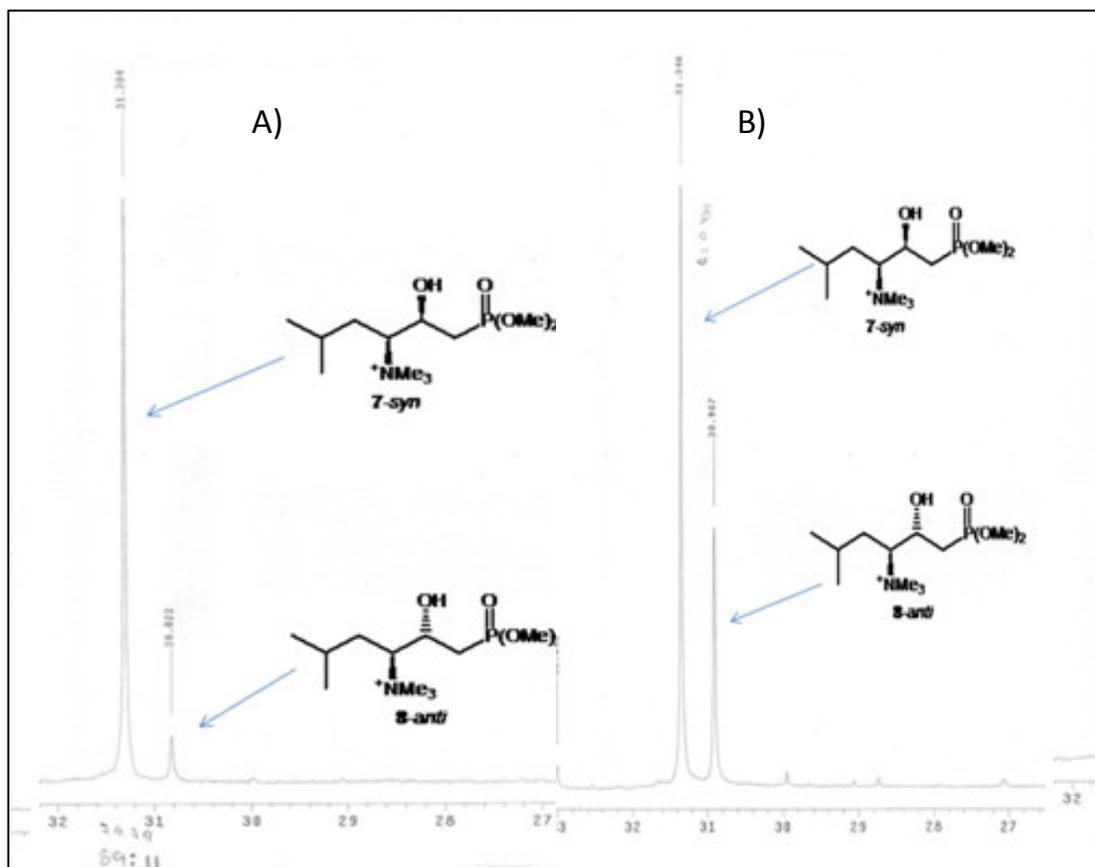
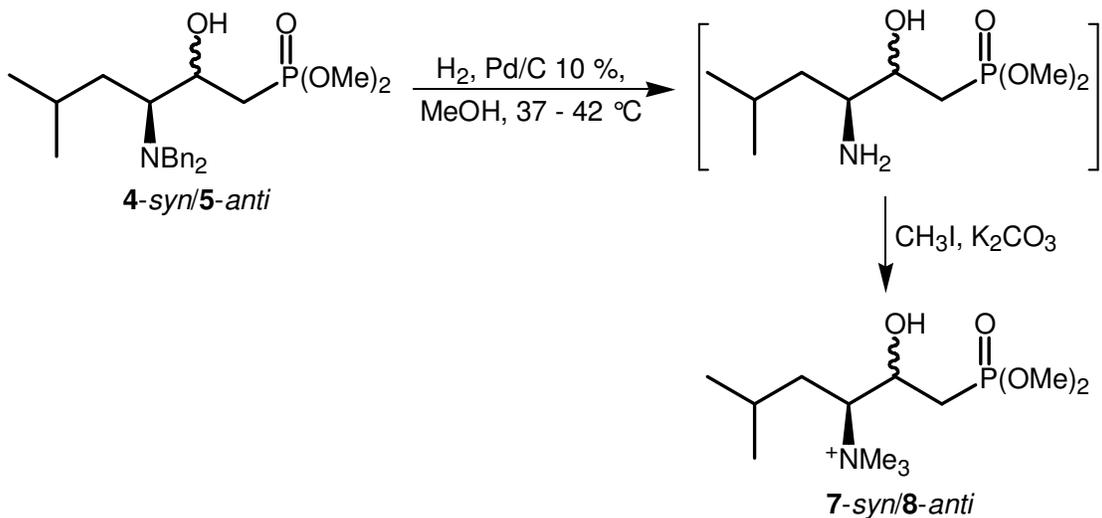


Figura 7. Espectro de RMN ^{31}P del trimetilamino β -hidroxifosfonato 7 cristalizado (A), espectro de RMN ^{31}P de aguas madres de la cristalización (B). Al igual que en el espectro de RMN ^{31}P del trimetilamino β -hidroxifosfonato 7 cristalizado (A) se observa una gran cantidad de producto en las aguas madres (B).

Debido a los bajos rendimientos obtenidos, se decidió probar un cambio en la realización de la reacción, el cambio consistió en realizar la filtración del catalizador una vez concluida la reacción de hidrogenólisis y posteriormente realizar la metilación con el crudo de reacción obtenido. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8:

Tabla 8. Preparación de la mezcla trimetilamino β-hidroxfosfonato 7-syn/8-anti.



Experimento	4-syn/5-anti (g)	Pd/C (% peso)	K ₂ CO ₃ (Equiv.)	CH ₃ I (Equiv.)	7-syn/8-anti (%)
1	2.5	2.5	1.7	3.5	35.2
2	2.5	2.5	1.7	3.5	43.4

Los cambios realizados en la metodología mejoraron el rendimiento de los productos trimetilados. El crudo obtenido fue más limpio pero aún así, después de la cristalización las aguas madres quedaban más sucias, esto hizo pensar que probablemente durante la cristalización había descomposición. Por lo anterior se repitió el experimento pero en esta ocasión la cristalización se llevo a cabo a una temperatura inferior a los 45 °C, mejorando considerablemente el rendimiento (experimento. 2)

Por otra parte con la intención de obtener una muestra más pura para la recopilación de todos los datos espectroscópicos, los productos cristalizados se recrystalizaron, y sorprendentemente se observó que la mezcla se había enriquecido a favor del trimetilamino β -hidroxifosfonato **7-syn** (Figura 8), en la Figura 9 se muestra el espectro RMN ^{31}P .

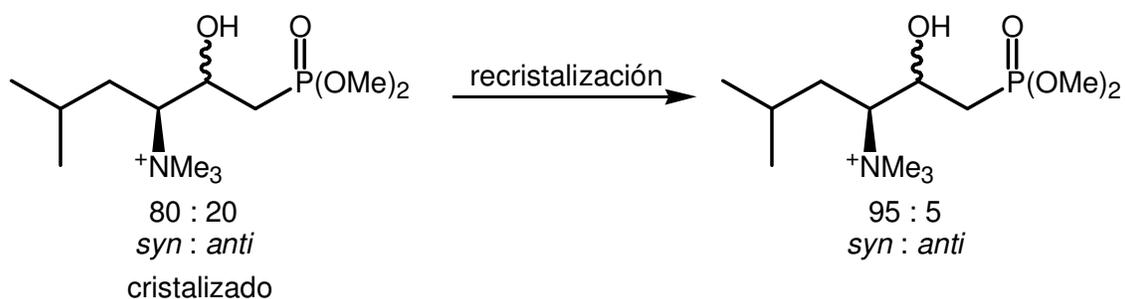


Figura 8. Recristalización de la mezcla de trimetilamino β -hidroxifosfonato **7-syn/8-anti**, la recrystalización se llevo a cabo con una mezcla de MeOH/AcOEt

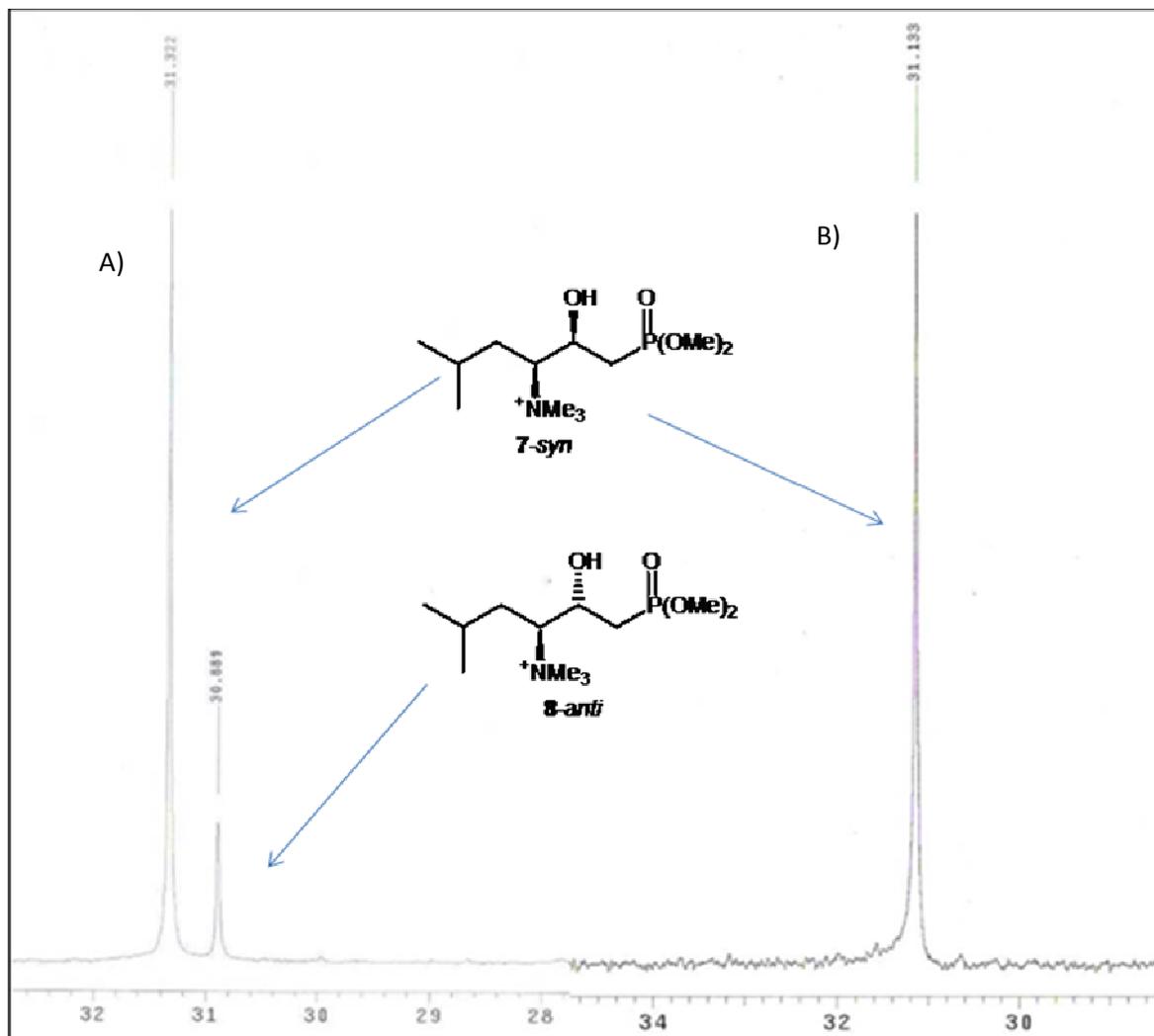


Figura 9. Espectro de RMN ^{31}P para la mezcla de trimetilamino β -hidroxifosfonato *7-syn/ 8-anti*, cristalizados (A) y posterior recrystalización (B). en la figura (a) se observa una relación 80:20 *syn/anti*, posterior a la recrystalización se observa una relación 95:5 *syn/anti* (b).

Una vez establecidas las mejores condiciones de reacción para obtener los productos trimetilados. Primero se decidió preparar un lote del dibencilamino β -hidroxifosfonato **4-syn** diastereoméricamente puro mediante cromatografía en columna (Figura 10).

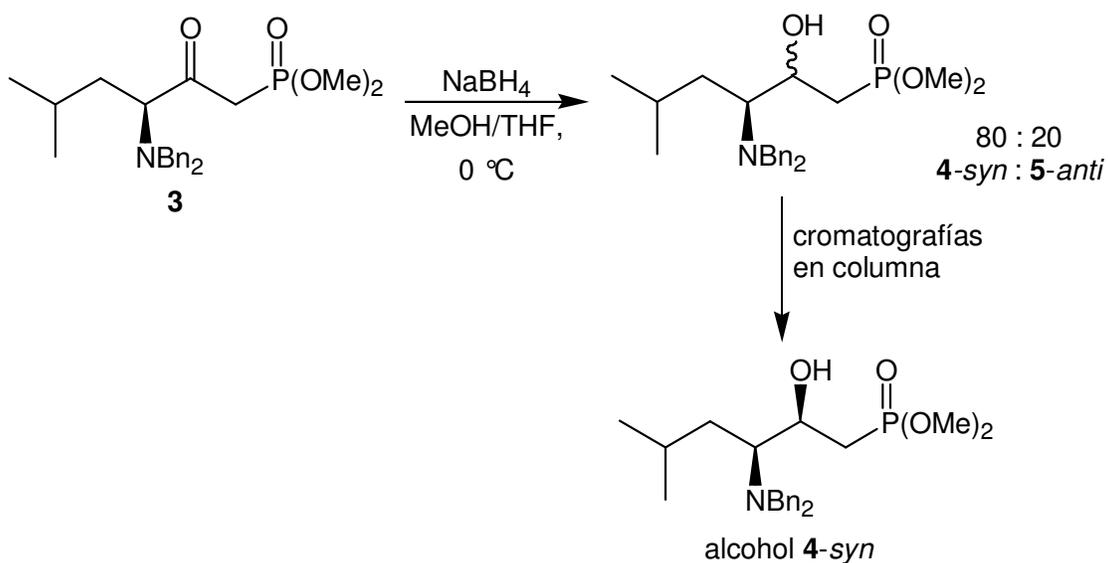


Figura 10. Preparación del dibencilamino β -hidroxifosfonato **4-syn:5-anti a partir del dibencilamino β -cetofosfonato **3**.** El dibencilamino β -cetofosfonato **3** se hizo reaccionar con NaBH_4 en una mezcla de MeOH/THF a 0°C de esta manera se obtuvo la mezcla **4-syn: 5-anti** en una relación 80:20, posteriormente se realizaron una serie de purificaciones por cromatografía en columna para obtener el dibencilamino β -hidroxifosfonato **4-syn** diastereoméricamente puro.

Posteriormente una vez obtenido el dibencilamino β -hidroxifosfonato **4-syn** diastereoméricamente puro (Figura 11) se realizó la hidrogenólisis y metilación para poder obtener el correspondiente trimetilamino β -hidroxifosfonato **7-syn** diastereomericamente puro (Figura 12).

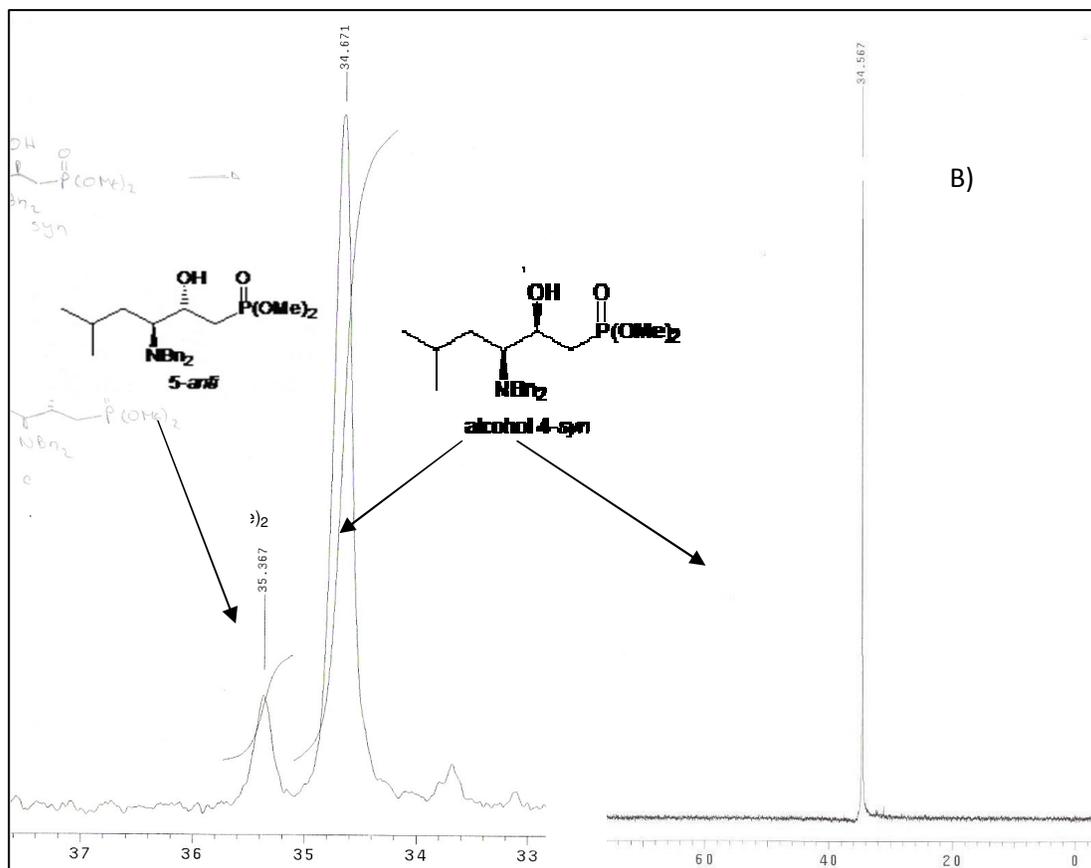


Figura 11. Espectro de RMN ^{31}P del dibencilamino β -hidroxifosfonatos **4-syn/5-anti** relación 80:20 A), y Espectro d de RMN ^{31}P del dibencilamino β -hidroxifosfonatos **4-syn** diastereomericamente puro B): la purificación se llevo a cabo mediante cromatografías sucesivas hasta la obtención del dasitereómero puro.

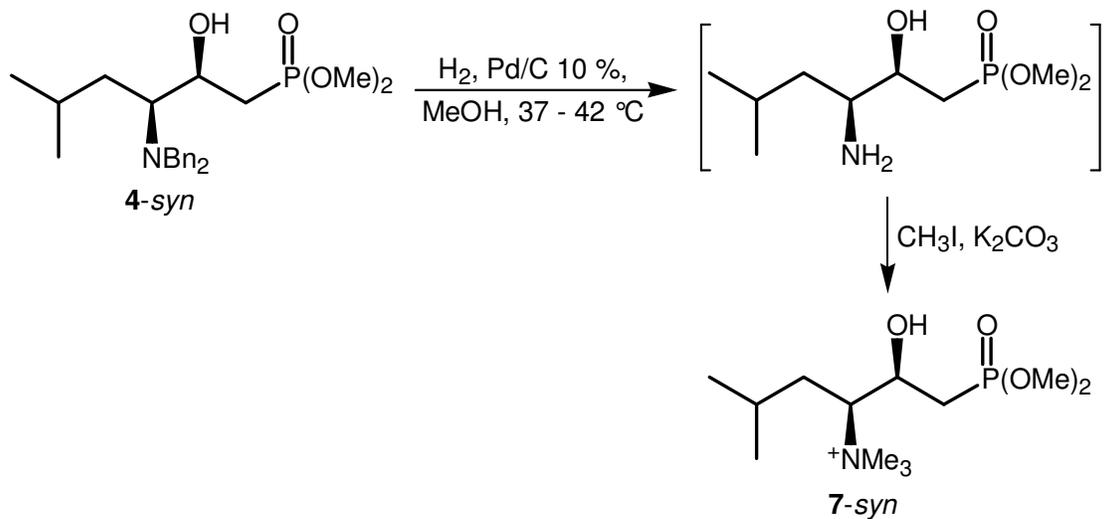


Figura 12. Preparación del trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-syn diastereoméricamente puro. El dibencilamino β -cetofosfonato 4-syn diastereoméricamente puro fue sometido a hidrogenólisis para obtener el aminohidroxi β -hidroxifosfonato diastereoméricamente puro el cual se filtró y se hizo reaccionar con CH_3I y K_2CO_3 para finalmente obtener el trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-syn diastereoméricamente puro.

Se comprobó que el desplazamiento por RMN ^{31}P , del trimetilamino β -hidroxifosfonato 7-syn diastereoméricamente puro cristalizado correspondió al desplazamiento por RMN ^{31}P del producto mayoritario obtenido de la reacción de la mezcla de dibencilamino β -hidroxifosfonato 4-syn/5-anti que se encontraba en proporción 80:20 y que fue llevado hasta trimetilamino β -hidroxifosfonato 7 (Figura 13).

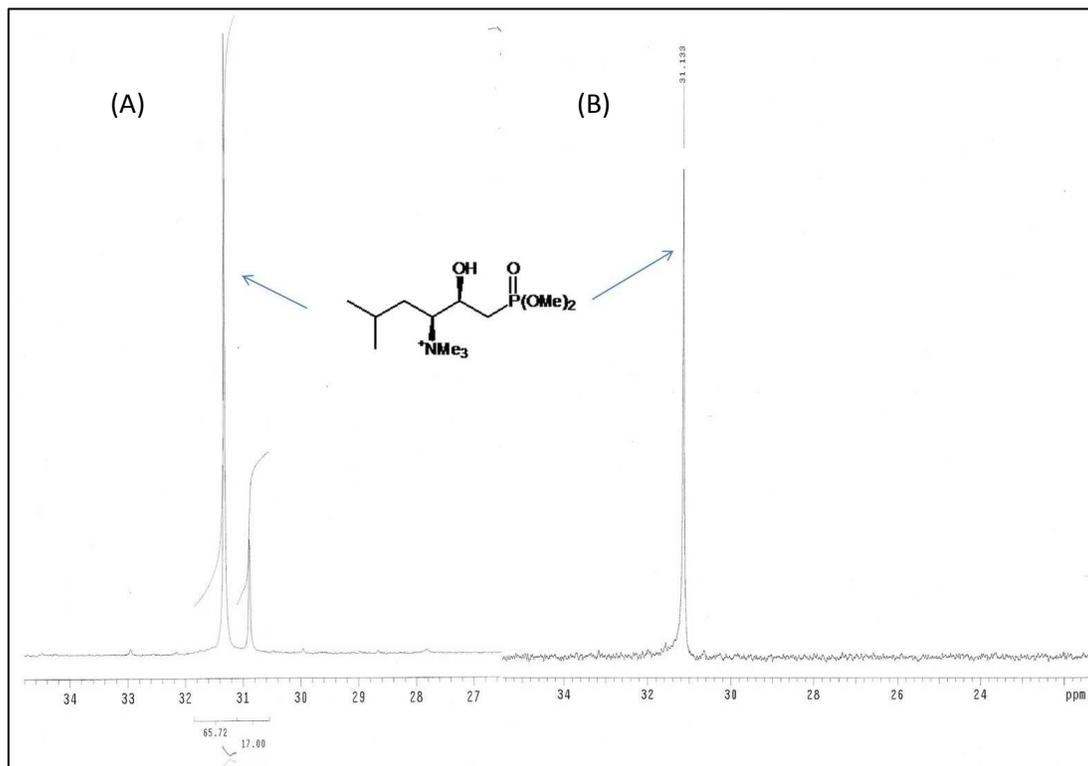
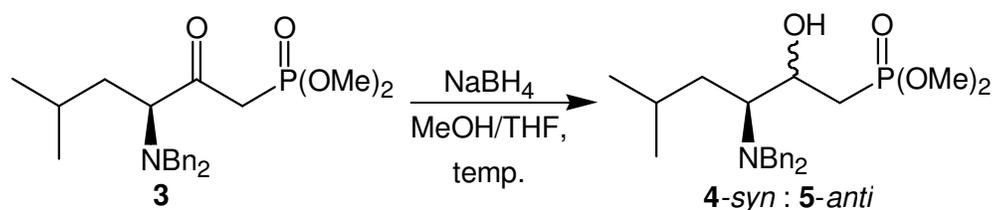


Figura 13. Espectro de RMN ^{31}P para la mezcla 80:20 de los trimetilamino β -hidroxifosfonatos *7-syn/8-anti* (A) y trimetilamino β -hidroxifosfonato *7-syn* obtenido de la reacción con el dibencilamino β -hidroxifosfonato *4-syn* purificado por cromatografía en columna (B). En el espectro de RMN ^{31}P se observa como el desplazamiento en una de las señales mayoritaria corresponde al trimetilamino β -hidroxifosfonato *7-syn*.

Hasta este momento se logró la preparación e identificación del trimetilamino β -hidroxicetofosfonato *7-syn* con una alta diastereoselectividad. El siguiente paso consistió en determinar la configuración del trimetilamino β -hidroxifosfonato *8-anti*, para ello se decidió preparar un lote de dibencilamino β -hidroxifosfonato *5-anti*.

Se probaron diferentes condiciones de reacción hasta encontrar la que incrementaba la proporción del producto *anti*. (Tabla 9).

Tabla 9. Preparación del dibencilamino β -hidroxifosfonato **5-anti bajo diferentes condiciones de reacción.**



Experimento.	Cetofosfonato (g)	NaBH ₄ (Eq)	Condiciones	<i>syn/anti</i>
1	2.5	1.5	MeOH/THF, 40°C	78 : 22
2	5.0	1.2	MeOH/THF 45°C	75 : 25
3	5.0	1.0	MeOH/THF, 55°C	65 : 35

De los resultados obtenidos del experimento 3 en el cual se observa un aumento del diastereómero **5-anti** se establecieron las mejores condiciones de reacción ya que se comprobó que la proporción por RMN ³¹P de los dibencilamino β -hidroxifosfonatos **4 syn 5:anti** bajo estas condiciones se encontraban en una relación 65:35 (Figura 14).

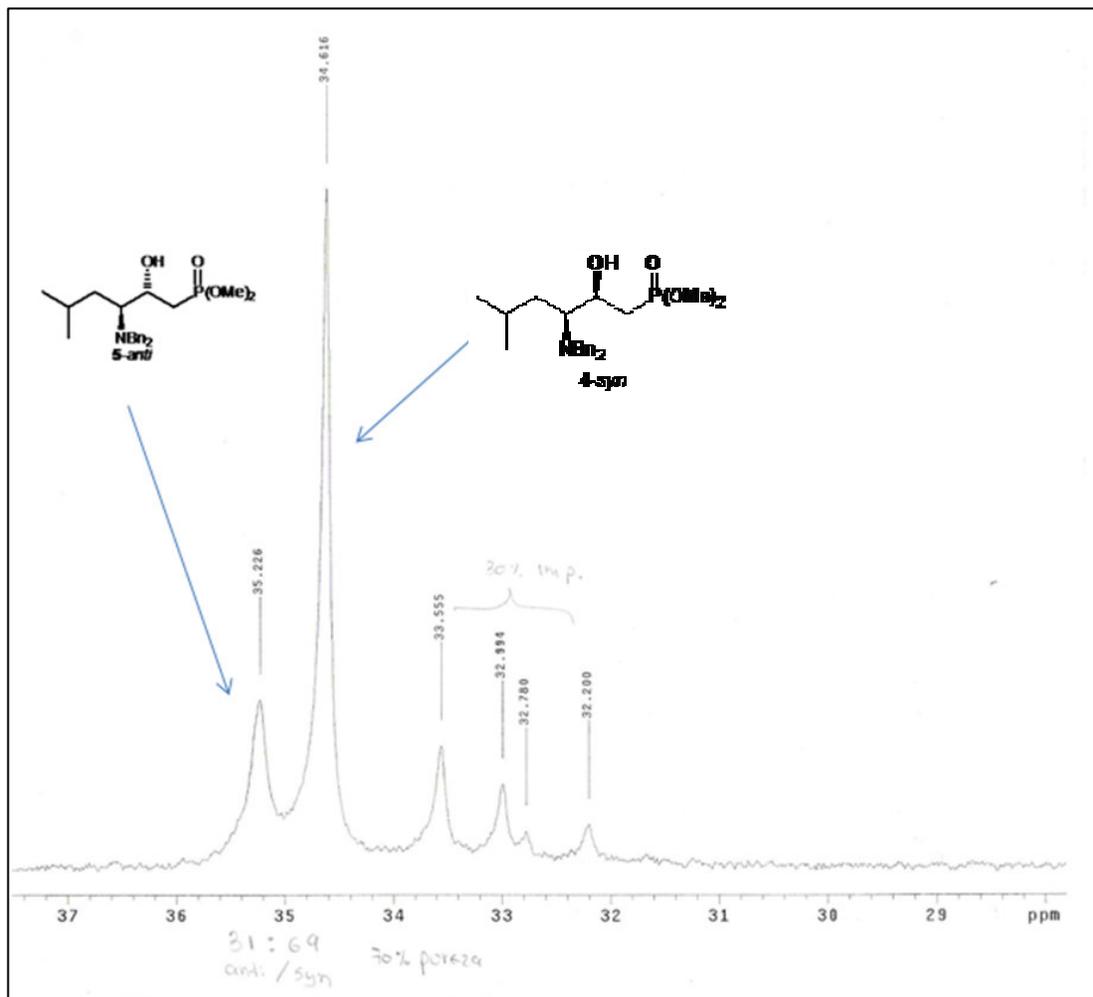


Figura 14. Espectro de RMN ^{31}P de los dibencilamino β -hidroxifosfonatos **4-syn:5-anti** **65:35** la señal a 34.510 ppm corresponde al dibencilamino β -hidroxifosfonato **4-syn** mientras que la señal a 35.22 ppm corresponde al dibencilamino β -hidroxifosfonato **5-anti**

De esta manera, el siguiente paso consistió en reducir una cantidad mayor de dibencilamino β -cetofosfonato **3** bajo las condiciones optimizadas (1.0 equivalentes de NaBH_4 , MeOH/THF, 55°C) (Figura 15) y así someter a la mezcla de los dibencilamino β -hidroxifosfonatos **4** *syn*: **5-anti** 65:35 a una serie de purificaciones sucesivas por cromatografía en columna para obtener una buena cantidad del dibencilamino hidroxifosfonato **5 anti** y continuar con las siguientes reacciones.

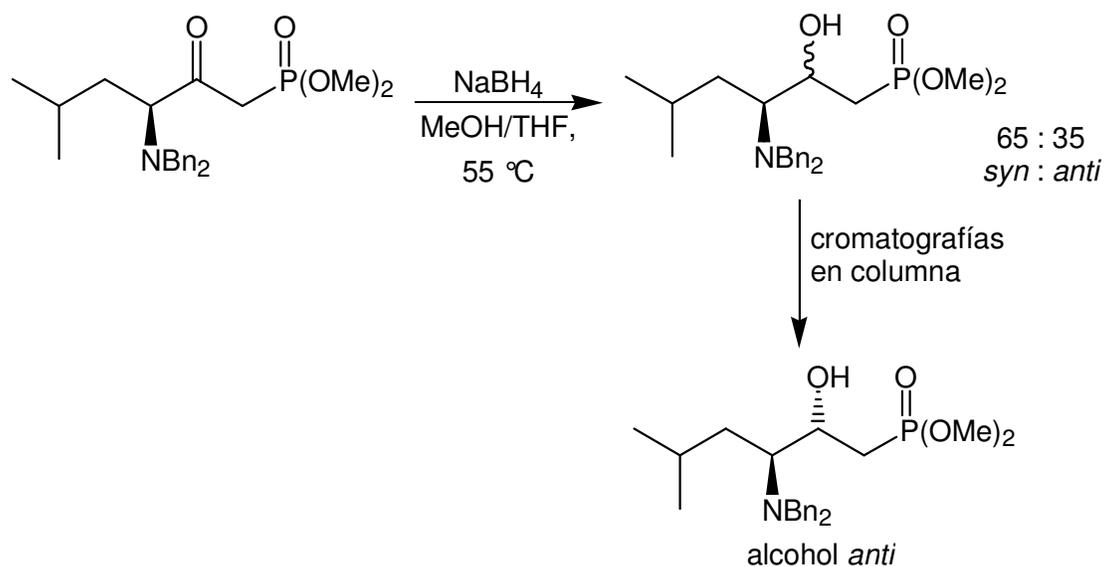


Figura 15 Reducción diastereoselectiva a 55°C del dibencilamino β -cetofosfonato **3.** El dibencilamino β -cetofosfonato **3** fue reducido con NaBH_4 a una temperatura de 55°C , la cual jugó un papel muy importante en esta reacción ya que al aumentar la temperatura aumentó la formación del diastereomero *anti*.

Una vez obtenido el dibencilamino β -hidroxifosfonatos **5-anti**, lo cual se comprobó por RMN (Figura 16). Se procedió a realizar la preparación del trimetilamino β -hidroxifosfonato **8-anti**, iniciando con la remoción de los grupos protectores (bencilos) del átomo de nitrógeno mediante hidrogenólisis, realizando la reacción en metanol y usando paladio sobre carbón al 10% como catalizador bajo atmósfera de hidrógeno. Una vez completada la reacción, la cual se fue monitoreando por cromatografía en capa fina, se hizo reaccionar con 3 equivalentes de CH_3I con el objetivo de dimetilar al grupo amino (Figura 17).

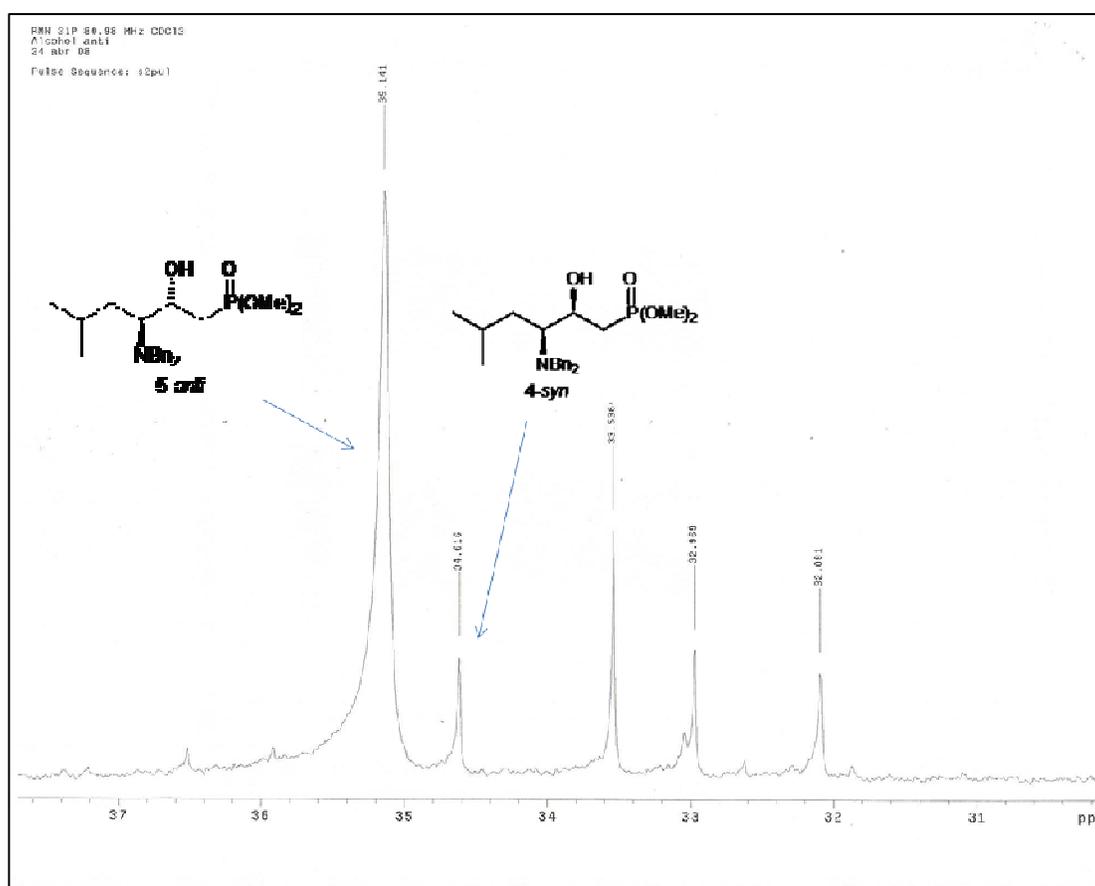


Figura 16. Espectro de RMN ^{31}P del dibencilamino β -hidroxifosfonato **5-anti**. El dibencilamino β -cetofosfonato **3** fue reducido con NaBH_4 a una temperatura de 55°C , la cual jugó un papel muy importante en esta reacción ya que al aumentar la temperatura aumentó la formación del diastereomero *anti*.

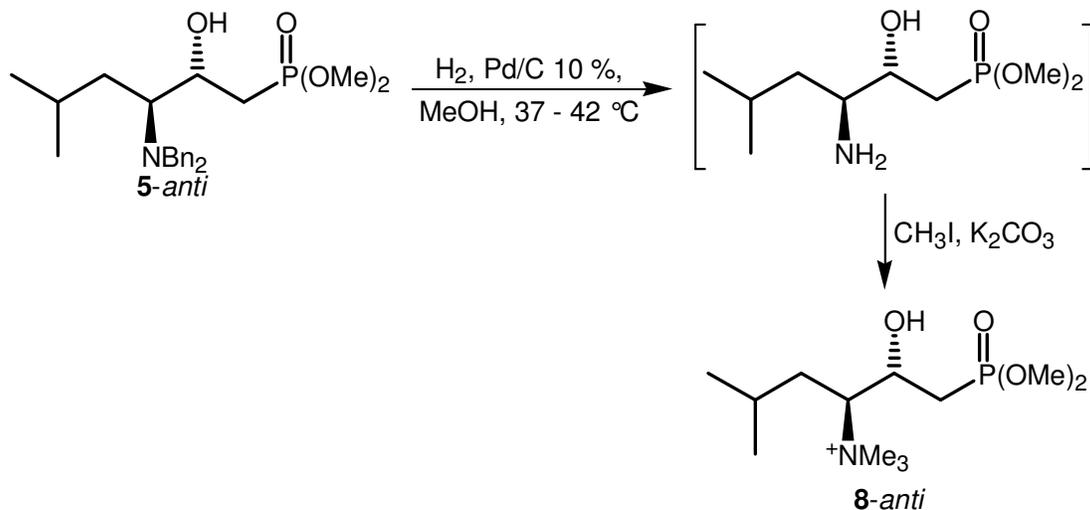


Figura 17. Preparación del trimetilamino β -hidroxifosfonato **8-anti.** El dibencilamino β -hidroxifosfonato **5-anti** fue sometido a hidrogenólisis a una temperatura de 37-42°C bajo atmósfera de hidrógeno para obtener el hidroxiamino β -fosfonato que se hizo reaccionar con CH₃I y K₂CO₃ para finalmente obtener el trimetilamino β -hidroxifosfonato **8-anti**.

Posteriormente, se comprobó que el desplazamiento por RMN ³¹P del trimetilamino β -hidroxifosfonato **8-anti** diastereoméricamente puro correspondió al desplazamiento por RMN ³¹P del producto minoritario obtenido de la reacción de la mezcla de dibencilamino β -hidroxifosfonato **4/5** que se encontraba en proporción 80:20 y que fue llevado hasta trimetilamino β -hidroxifosfonato **7-syn** y **8-anti** (Figura.17).

Finalmente, una vez purificados e identificados los trimetilamino β -hidroxifosfonatos **7-syn** y **8-anti**, se procedió a realizar la etapa final de la ruta de síntesis. El primer diastereómero en ser sometido a hidrólisis fue el trimetilamino β -hidroxifosfonato **7-syn**, el procedimiento implicó el uso de 2 volúmenes de cloruro de metileno, así como 2.2 equivalentes de bromo trimetil silano bajo atmósfera de

nitrógeno. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y una vez consumida la materia prima se eliminó el disolvente y se le hicieron arrastres con acetato de etilo, para después disolver el producto en agua. Posteriormente se le realizaron lavados exhaustivos con acetato de etilo y se volvió a evaporar a total sequedad (Figura 18). Finalmente, el producto diastereoméricamente puro fue cristalizado y plenamente identificado por RMN ^{31}P (Figura 19)



Figura 18. Preparación del ácido aminohidroxifosfónico 9-syn. El trimetilamino β -hidroxifosfonato **7-syn** se hizo reaccionar con TMSBr a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno, finalmente el ácido aminofosfónico **9-syn** fue cristalizado.

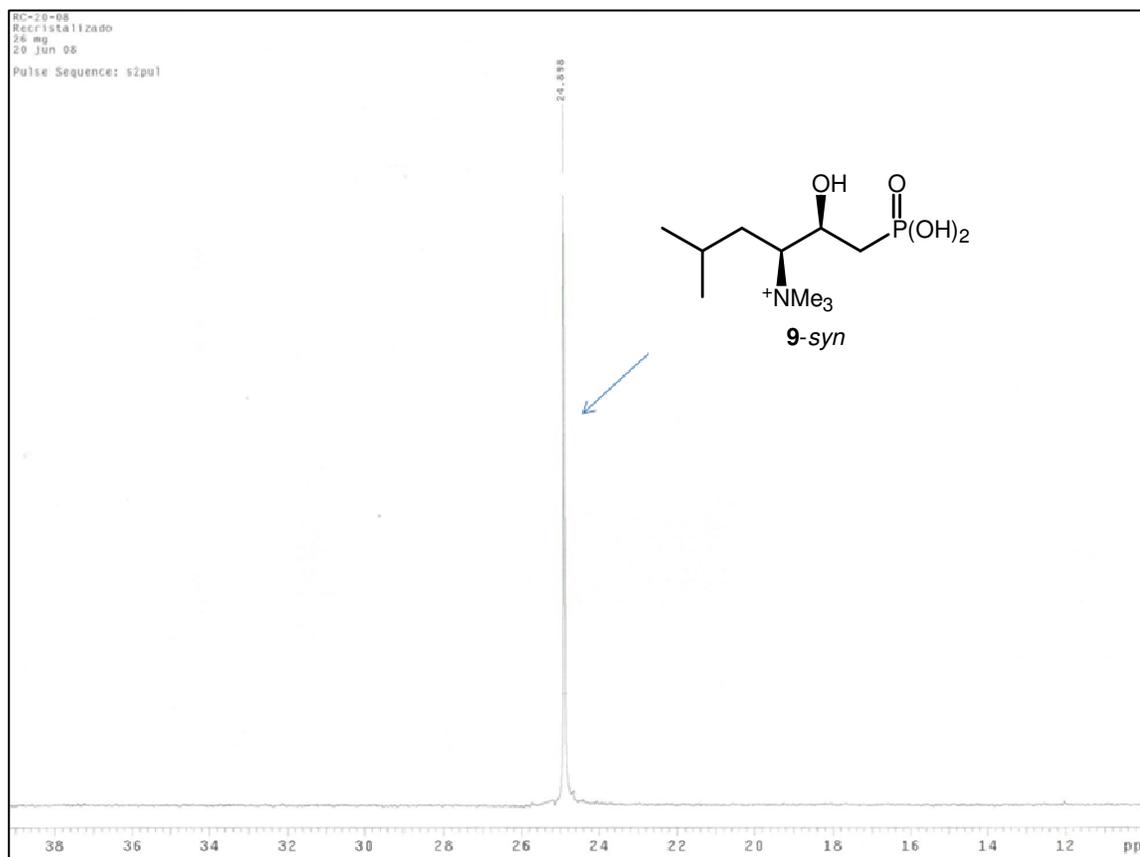


Figura 19. Espectro de RMN ^{31}P del ácido amino hidroxifosfónico **9-syn** diastereoméricamente puro. El desplazamiento del ácido amino hidroxifosfónico **9-syn** diastereoméricamente puro coincide con el desplazamiento de la mezcla de los ácidos amino hidroxifosfónico **9-syn**: **10-anti**.

Adicionalmente se sometió a hidrólisis la mezcla de trimetilamino β -hidroxifosfonato **7-syn**: **8-anti**, el procedimiento al igual que para el trimetilamino β -hidroxifosfonato **7-syn** implicó el uso de 2 volúmenes de cloruro de metileno, así como 2 equivalentes de TMSBr bajo atmosfera de nitrógeno. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente. Una vez concluida se eliminó el disolvente y se le hicieron arrastres con acetato de etilo para después disolver el producto en agua. Posteriormente se le realizaron lavados exhaustivos con acetato de etilo y se volvió a evaporar a total sequedad (Figura 20). Finalmente, el producto fue cristalizado y analizado por RMN de ^{31}P (Figura 21).



Figura 20. Preparación del ácido aminohidroxifosfónico **9-syn:**10-anti**** la mezcla de trimetilamino β -hidroxifosfonato **7-syn**/**8-anti** fue puesta a reaccionar con TMSBr en cloruro de metileno, el producto obtenido fue lavado exhaustivamente con acetato de etilo y cristalizado para poder obtener la mezcla de ácidos aminofosfónicos **9-syn**: **10-anti** los cuales son compuestos análogos fosforados de *L*-carnitina.

Cabe mencionar que los ácidos aminofosfónicos análogos de *L*-carnitina fueron plenamente identificados por RMN ^{31}P (Figura 21) y estos se obtuvieron en excelentes cantidades para poder dar inicio con los estudios biológicos.

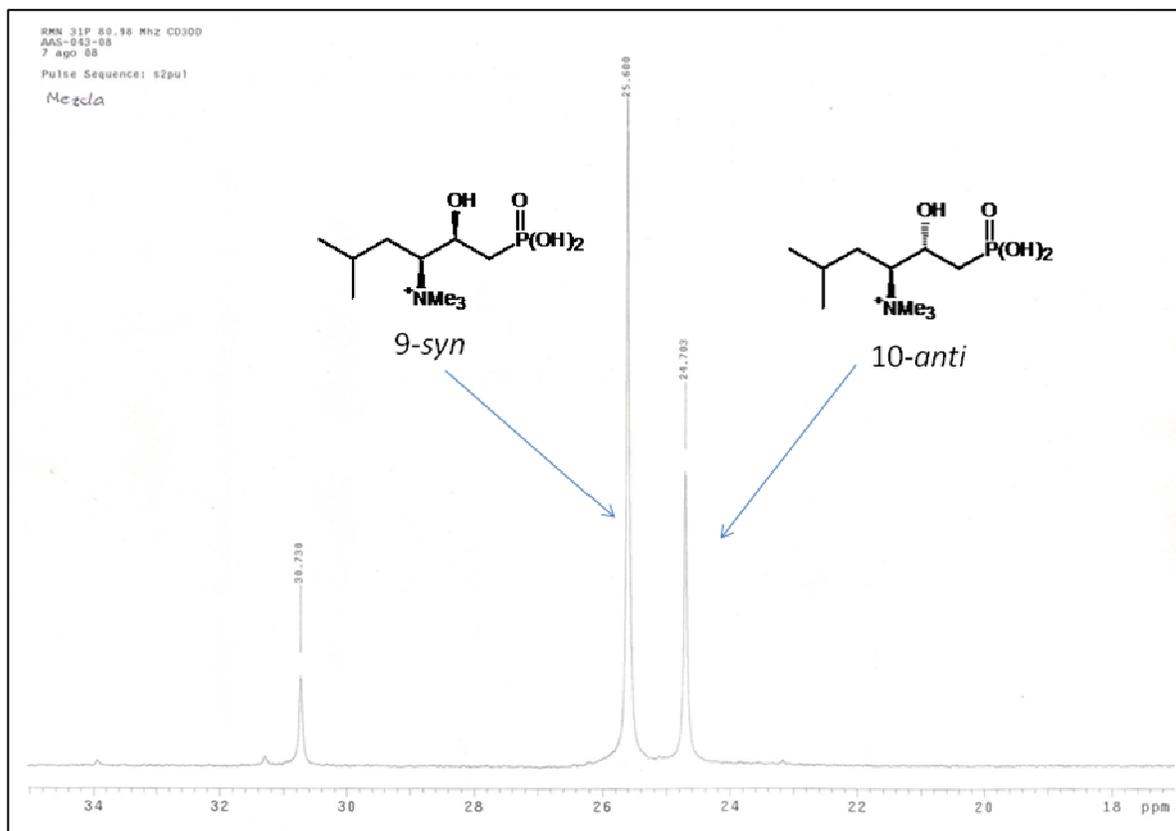


Figura 21. Espectro de RMN ^{31}P para la mezcla de los ácidos aminohidroxifosfónicos **9-syn:10-anti**. El desplazamiento del ácido amino hidroxifosfónico **9-syn** de la mezcla de los ácidos amino hidroxifosfónico **9-syn:10-anti** corresponde al desplazamiento del ácido amino hidroxifosfónico **9-syn** diastereoméricamente puro.

9 CONCLUSIONES

Se logró la preparación y escalamiento del éster tribencilado **2** de la *L*-leucina mediante la modificación del método reportado en la literatura, además se desarrollaron las condiciones necesarias para ser utilizado sin purificar en la siguiente etapa.

Se logró la preparación y escalamiento del β -cetofosfonato dibencilado **3** optimizando las condiciones de reacción en relación al uso de reactivos y disolventes, además se hizo el escalamiento hasta un lote de 30 g obteniendo excelentes rendimientos.

Se logró la preparación y escalamiento de los hidroxifosfonatos **4-syn/5-anti** con una alta diastereoselectividad y buen rendimiento químico, mediante el uso de NaBH_4 como agente reductor en una mezcla de MeOH:THF.

Se logró la obtención de los hidroxifosfonatos **4-syn:5-anti** mediante un proceso “one pot” a partir de la *L*-leucina, en el cual se optimizaron tanto reactivos, disolventes y procesos de obtención, logrando con ello la obtención de lotes de hasta 30 g con rendimiento químico superior a la síntesis realizada por etapas.

Se desarrolló un método de cristalización fraccionada, para la obtención del hidroxifosfonato trimetilado **7-syn** diastereomericamente puro, a partir de una mezcla **7-syn/8-anti** 80:20.

Se logró la preparación y escalamiento de los ácidos trimetilamino hidroxifosfónicos **9-syn** y de la mezcla **9-syn:10-anti**, los cuales son compuestos análogos de *L*-carnitina para obtener las cantidades necesarias para realizar los estudios biológicos.

10 LITERATURA CITADA.

- Bertoli, M., Battistella, P.A., Vergani, L., Naso-Agostino, M. S., Gasparoto, M.D., Romagnoli, M.D., Angelini, C. 1981. Carnitine deficiency induced during hemodialysis and hyperlipidemia: effect of replacement therapy. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 1496-1500.
- Brass, E.P. 1995. Pharmacokinetic considerations for the therapeutic use of carnitine in hemodialysis patients. *Clin. Ther.* 17 (2):176-185.
- Bremer, J. 1983. Carnitine- Metabolism and functions. *Am. Physiol. Soc.* 63 (4): 1420-1476.
- Cook, M.A., Daughton, G.C., Alexander, M. 1978. Phosphonate Utilization by Bacteria. *J. Bacter.* 133 (1): 85-90.
- Dawson, C.M., and Kemp, P. 1967. The aminoethylphosphonate-containing lipids of rumen protozoa. *J. Biochem.* 105. 837.
- De la Cruz, C. R., Labastida, G.V., Fernández, Z. M., O, M. 2005. Preparation of phosphostatine analgesics from *L*-amino acids. *J. Mex. Chem. Soc.* 49 (4): 312-321.
- Derosa, G., Arriego, F. G., Gaddi, A., Mugellini, A., Ciccarelli L., Fogari, R. 2003. The effect of *L*-carnitine on plasma lipoprotein (a) levels in hypercholesterolemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Exc. Med.* 0149-18. 1429-1435.
- Evans, A., and G. Fornasini. 2003. Pharmacokinetics of *L*-carnitine. *Clin. Pharmacokinet.* 42 (11): 941-967.
- Feller, A., and Rudman D. 1988. Role of carnitine in human nutrition. *J. Nutr.* 118:541-547.
- Gregory, S., Kelly, N. D. 1998. *L*-carnitine: therapeutic applications of a conditionally –essential amino acid. *Alt. Med. Rev.* 3:5. 345-360.

- Hoopel, C. 2003. The role of carnitina in normal and altered fatty acid metabolism. *Am. J. of Kidney. Dis.* 41:4. (supl. 4). S4-S12.
- Kafarski, P., and Lejczak. B. 2001. Aminophosphonic acids of potential medical importance. *Curr. Med. Chem. –Anti-Cancer Agents*, 1: 301-312.
- Lejczak, B., Kafarski, P., Makowiecka, E. 1987. Phosphonic analogues of tyrosine and 3, 4-dihydroxyphenilalanine (dopa) influence mushroom tyrosinase activity. *J. Biochem.* 242: 81-88.
- Li, B., Lloyd, L.M., Gudjonsson, H., Shung, L. A., Olsen, A. W. 1992. The effect of enteral carnitina administration in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 55. 838-845.
- Lombard, K. A., Olson, A. L., Nelson, S. E., Rebouche, C.J. 1988. Carnitine status of lactoovovegetarians and strict vegetarian adults and children. *Am. J. Clin. Nutr.* 50 (2): 301-306.
- Mancinelli, A. Longo, A., Shanahan, K., Evans, A. M. 2000. Disposition of *L*-carnitine and acety*L-L*-carnitine in the isolated perfused rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274 (3) 112-118.
- Mikolajczyk, M. Luczak, J. Kiebasinski P. 2002. Chemoenzymatic Synthesis of Phosphocarnitine Enantiomers. *J.Org.Chem.* 67 (22): 7872-7875.
- Naydenova, E., Topashka-Ancheva, M., Todorov, P., Yordanova, T., Troev, K. 2006. Novel α -aminophosphonic acids. Design, characterization, and biological activity. *Bioorg. And Medic. Chem.* 14: 2190-2196.
- Ohashi, R., Tamai, I., Nezu, J., Nikaido, H., Hasimoto, N., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M., Tsuji, A. 2000. Molecular and physiological evidence for multifunctionality of carnitina/organic cation transporter OCTN2. *J. Molecular of Pharmac.* 5(2): 358-365.
- Ohashi, R., Tamai, I., Yabuuchi H., Nezu, J., Oku, A., Sai, Y., Shimane, M., Tsuji, A. 1999. Na⁺ dependent carnitina transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J. Pharm and Exp. Therap.* 291(2): 778-784.

- Oleksyszyn, J., Powers, J., Kliszczak, M., Sienczyk, M. 1991. Synthesis of isocyanide derivatives of α -aminoalkylphosphonate diphenyl esters. *Tetrahedron Lett.* 47(25): 4209-4211.
- Ordoñez, M., De la cruz, C. R., Quiñones, C., González, M. A. 2004. Highly diastereoselective synthesis of anti- γ -N-benzylamino- β -hydroxyphosphonates. *Chem. Commun.* 672-674.
- Pace, J.A., Wannemacher, R.W., Neufel, H.A., 1978. Improved radiochemical assay for carnitine and its derivatives in plasma and tissue extracts. *Clin. Chem.* 24 (1): 32-35.
- Rahbar, A.R., Shakerhosseini, R., Saadat, N., Taleban, F., Pordal, A., Gollestan, B. 2005. Effect of *L*-carnitine on plasma glycemic and lipidemic profile in patient with type II diabetes mellitus. *Eu. J. Clin. Nutr.* 59. 592-596.
- Rebouche, C.J., Lombardi, K. A., Chenard, A., 1993. Renal adaptation to dietary carnitina in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 58: 660-665.
- Rebouche, C.J. 1992. Carnitine function and requirements during the life cycle. *J. FASEB.* 6.3379-3386.
- Rebouche, C.J. 1991. Quantitative estimation of absorption and degradation of a carnitine supplement by human adults. *Metabolism.* 40 (12): 1305-1310.
- Rebouche, C.J., Hermann, S. 1988. Carnitine metabolism and its regulation in microorganism and mammals. *Annu. Rev. Nutr.* 18.39-61.
- Rogers, M., Gordon, S., Benford, L.H., Coxon, F.P., Luckman, S. P., Monkkonen, J., Frith, J.C. 2000. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Am. Cancer. Soc. (suppl.)* 88: 2961-2978.
- Rose, S.J., Stokes, T.C, Patel, S., Cooper, M. B., Betteridge, D.J. Paine, J.E. 1992. Carnitine deficiency associated with long-term pivampicillin treatment: the effect of a replacement therapy regime. *J. Postgrad. Med.* 68: 932-934.
- Saeed, A., and Ashraf, Z. 2006. Sodium borohydride reduction of aromatic carboxylic acids via methyl esters. *J. Chem. Sci.* 118(5):419-423.

- Sahajwalla, C.G., Helton, E. D. Purich, E. D., Hopel, Ch. L, Cabana, B. 1995. Comparison of *L*-carnitine pharmacokinetics with and without baseline correction following administration of single 20 mg/kg intravenous dose. *J. Pharm. Sci.* 84(5):634-639.
- Sakurauchi, Y., Matsumoto, Y., Shinzato, T., Takai, I., Nakamura, Y., Sato, M., Nakai, S., Mies, M., Morita, H., Miwa, T., Amanol, I., Maeda, K. 1998. Effects of *L*-carnitine supplementation on muscular symptoms in hemodialyzed patients. *Am. J. Kidney Dis.* 32 (2): 258- 264.
- Still, C.W., Kahn, M., Mitra A., 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* 14 (43): 2923.
- Tadeusiak, J. E. 2004. Synthesis of phosphonic analogues of carnitina and γ -amino- β -hydroxybutyric acid. *Bioor. Chem.* 32: 473-482.
- Tadeusiak, J. E., Krawiecka. B., Michalski, J. 1999. Synthesis of phosphocarnitine. *Tetrahedron Lett.* 40: 1791-1792.
- Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J., Yabuuchi, H., Oku, Asuka., Shimane, M., Sai, Y., Tsuji, A. 1998. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitina transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.* 273(32): 20378-20382.
- Vaz, F. M., and Wanders, R.J. A. 2002. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* 361. 417-429.
- Wang, K., Zang, Y., Yuan, Ch. 2003. Enzymatic synthesis of phosphocarnitine, phosphogabob and fosfomycin. *Org. Biomol. Chem.* 1: 3564-3569.
- Wolf, G. 2006. The discovery of a vitamin role for carnitine: the first 50 years. *J. Nutr.* 136. 2131-2134.

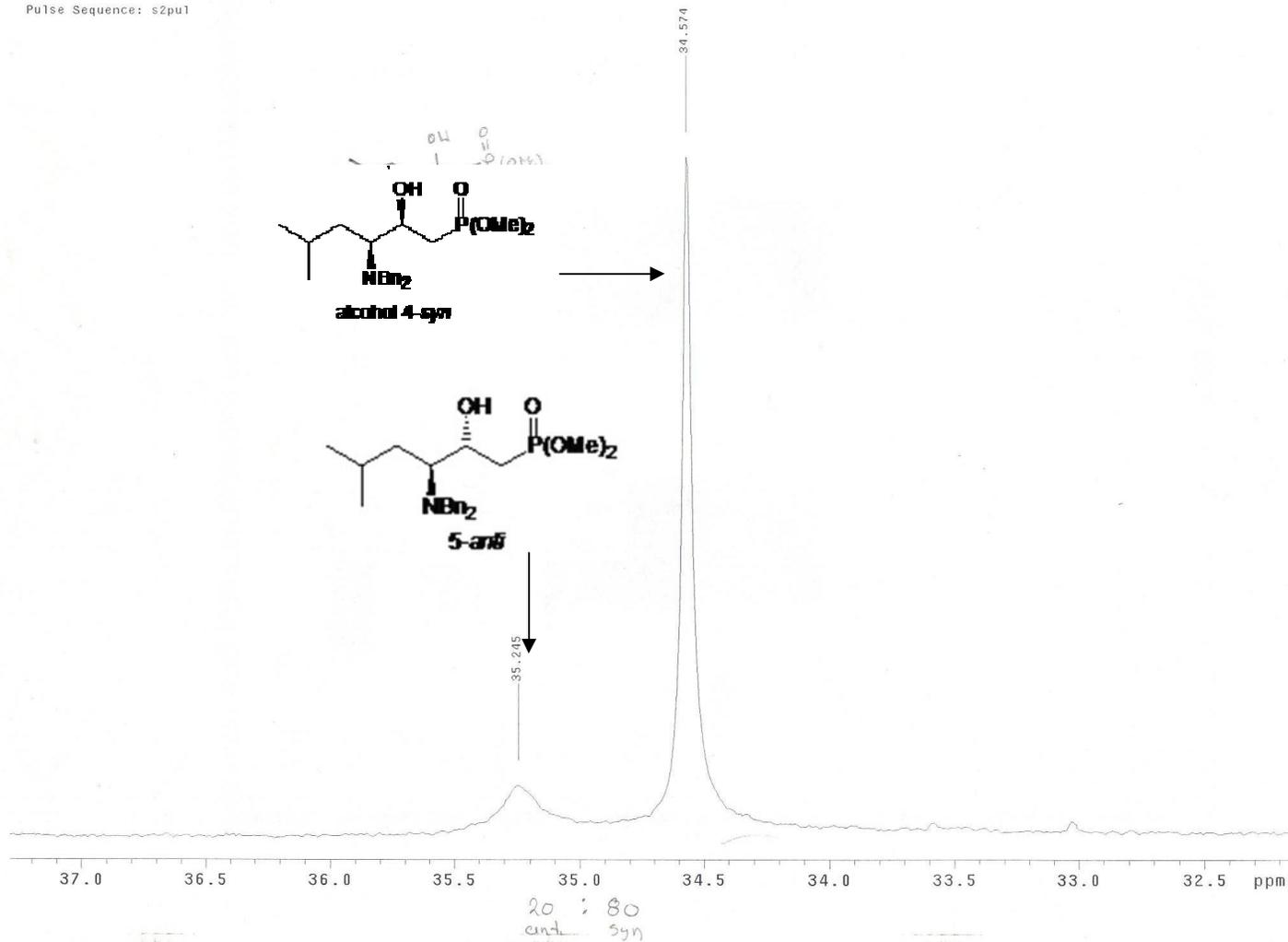
11. ANEXOS

11.1. Abreviaturas

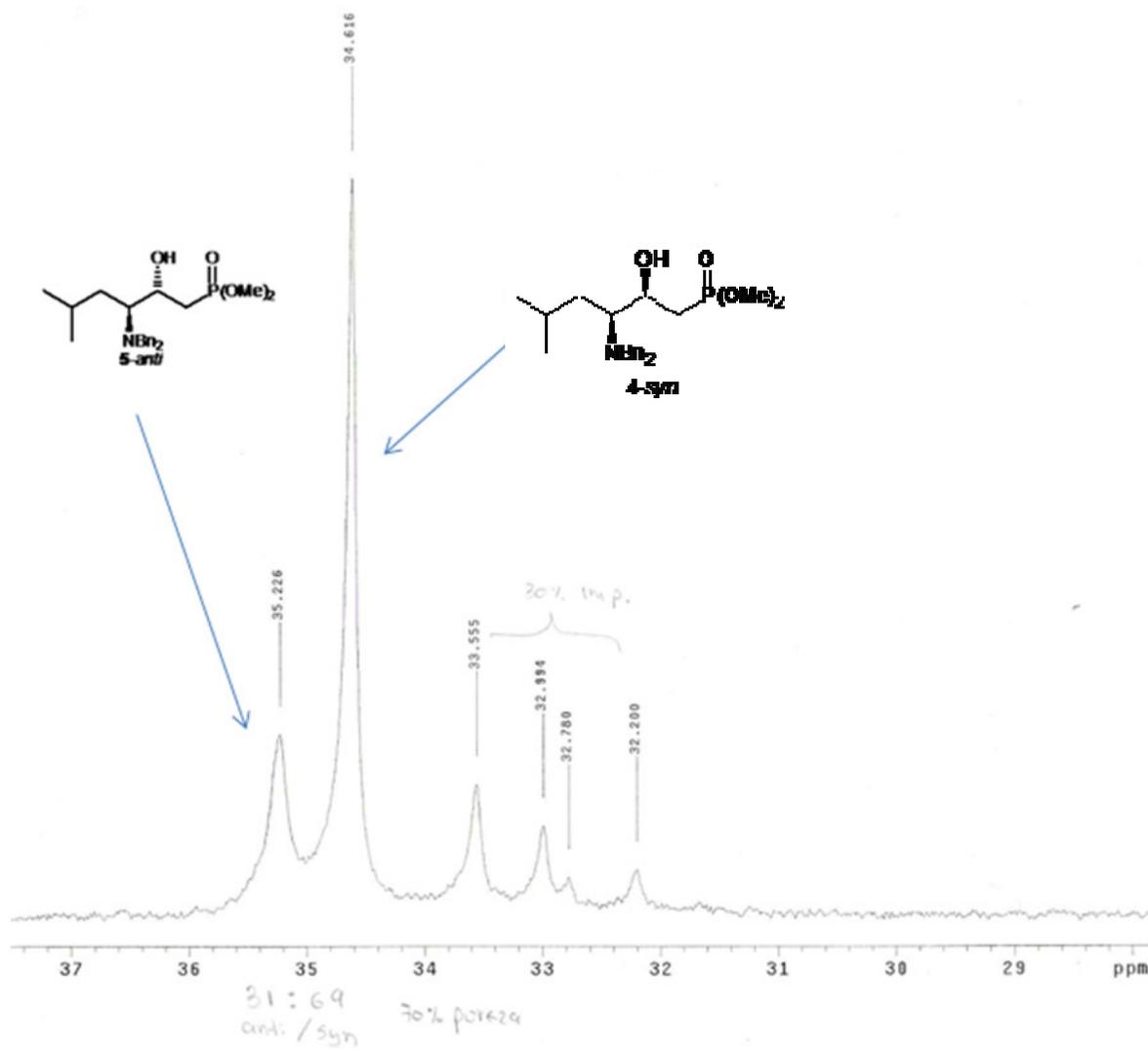
• AcOEt	Acetato de etilo
• C	cuarteto
• d	doblete
• dc	doble de cuartetos
• dd	doble de dobletes
• ddd	doble de doble de dobletes
• dddd	Doble de doble de doble de dobletes
• dt	doble de tripletes
• Hex	Hexano
• MeOH	Metanol
• N-BuLi	n-Butilitio
• Pd/C 10%	Paladio sobre carbón al 10%
• RMN	Resonancia Magnética Nuclear
• THF	Tetrahidrofurano
• TMSBr	tetrametilsilano
• t	tripleto
• s	singuleto

11.2. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear

RMN ^{31}P 80.98 MHz CDCl₃
AAS-025-07
Mat. prima
1 ene 08
Pulse Sequence: s2pu1

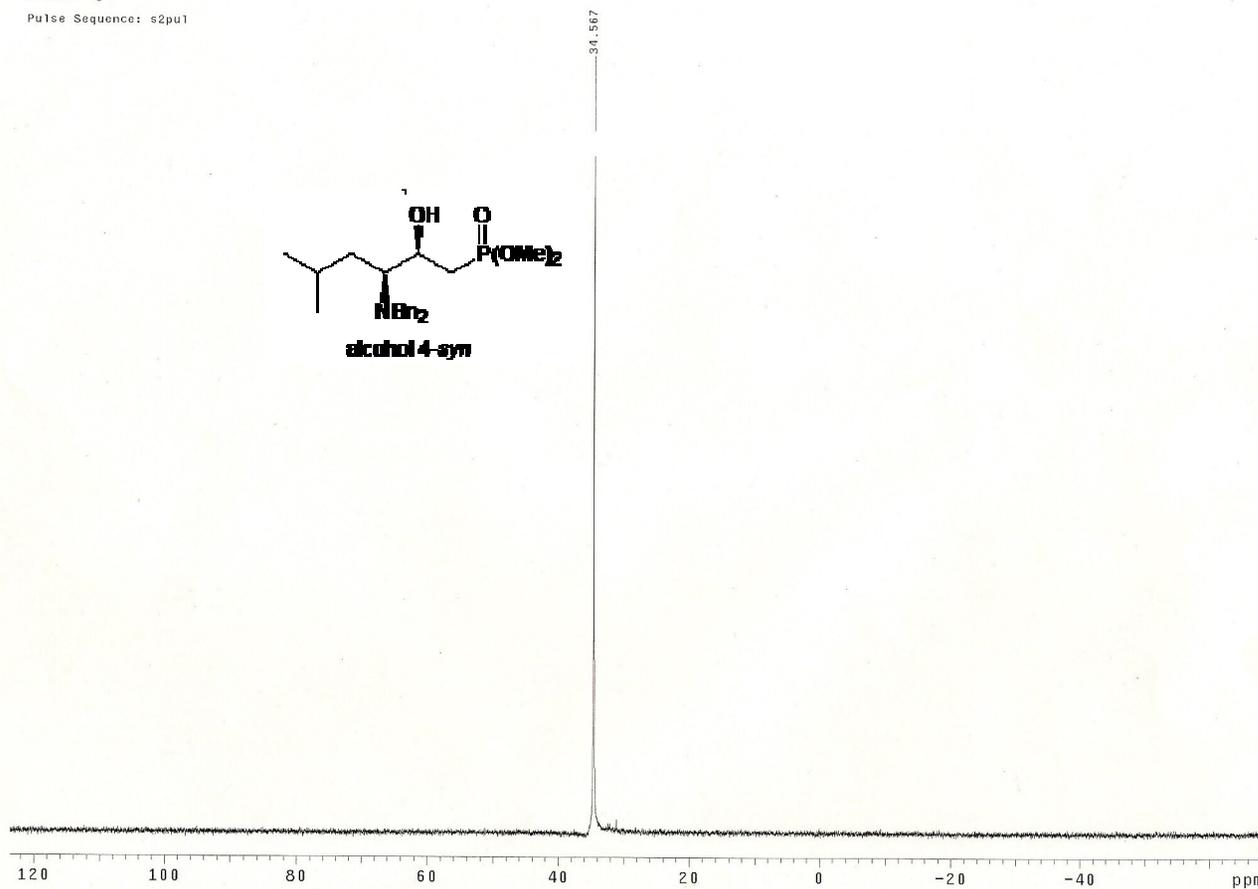
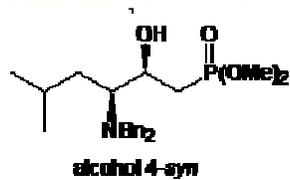


Espectro de RMN ^{31}P para la mezcla de dibencilamino β -hidroxifosfonato **4-syn**/**5-anti** relación 80:20



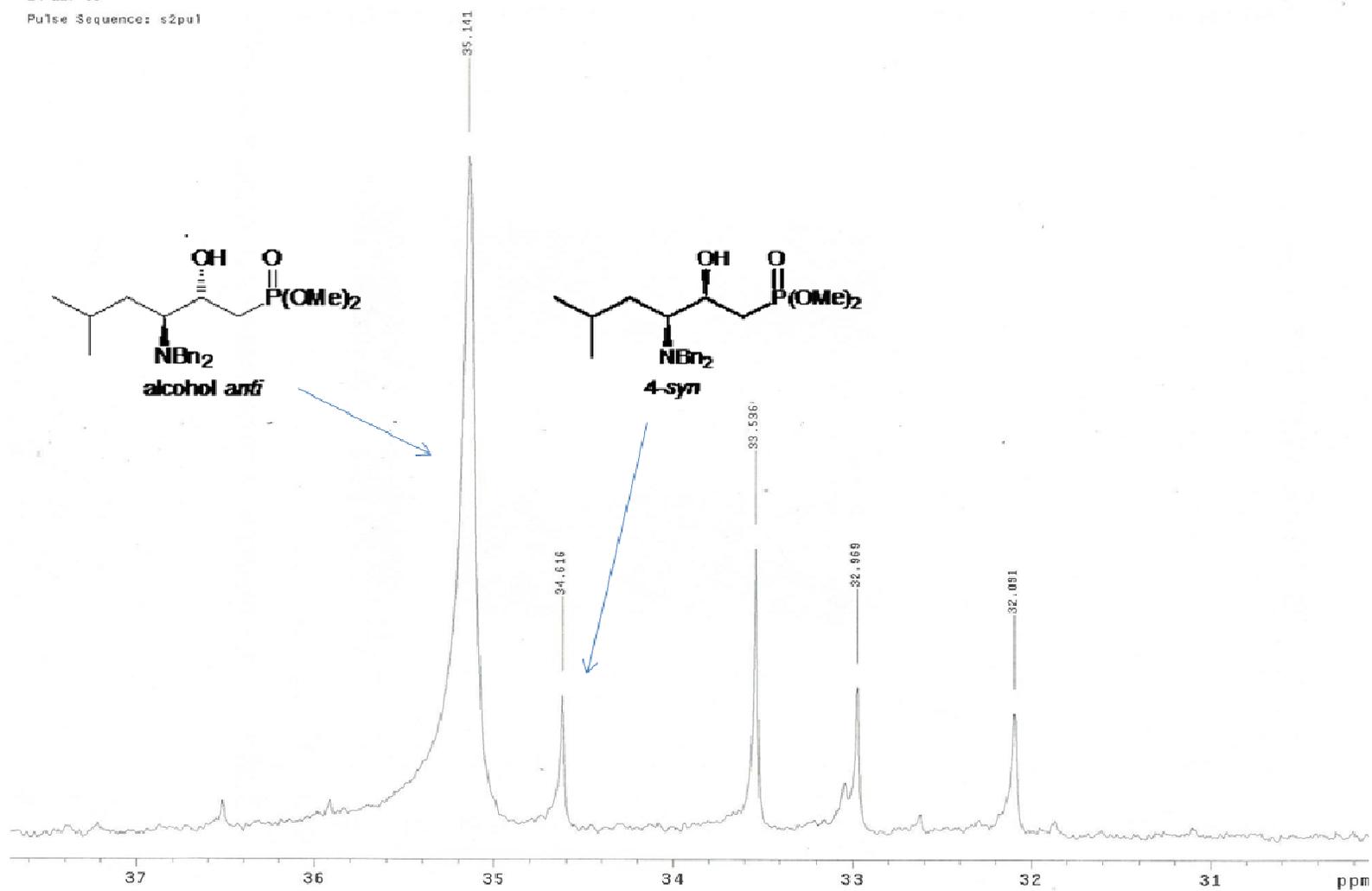
Espectro de RMN ³¹P para la mezcla de dibencilamino β-hidroxifosfonato **4-syn**/**5-anti** relación 65:35

RMN 31, 80.98 MHz
RC-068-07
Materia prima q(Rx C90-D9
Alcohol syn
Pulse Sequence: s2pu1



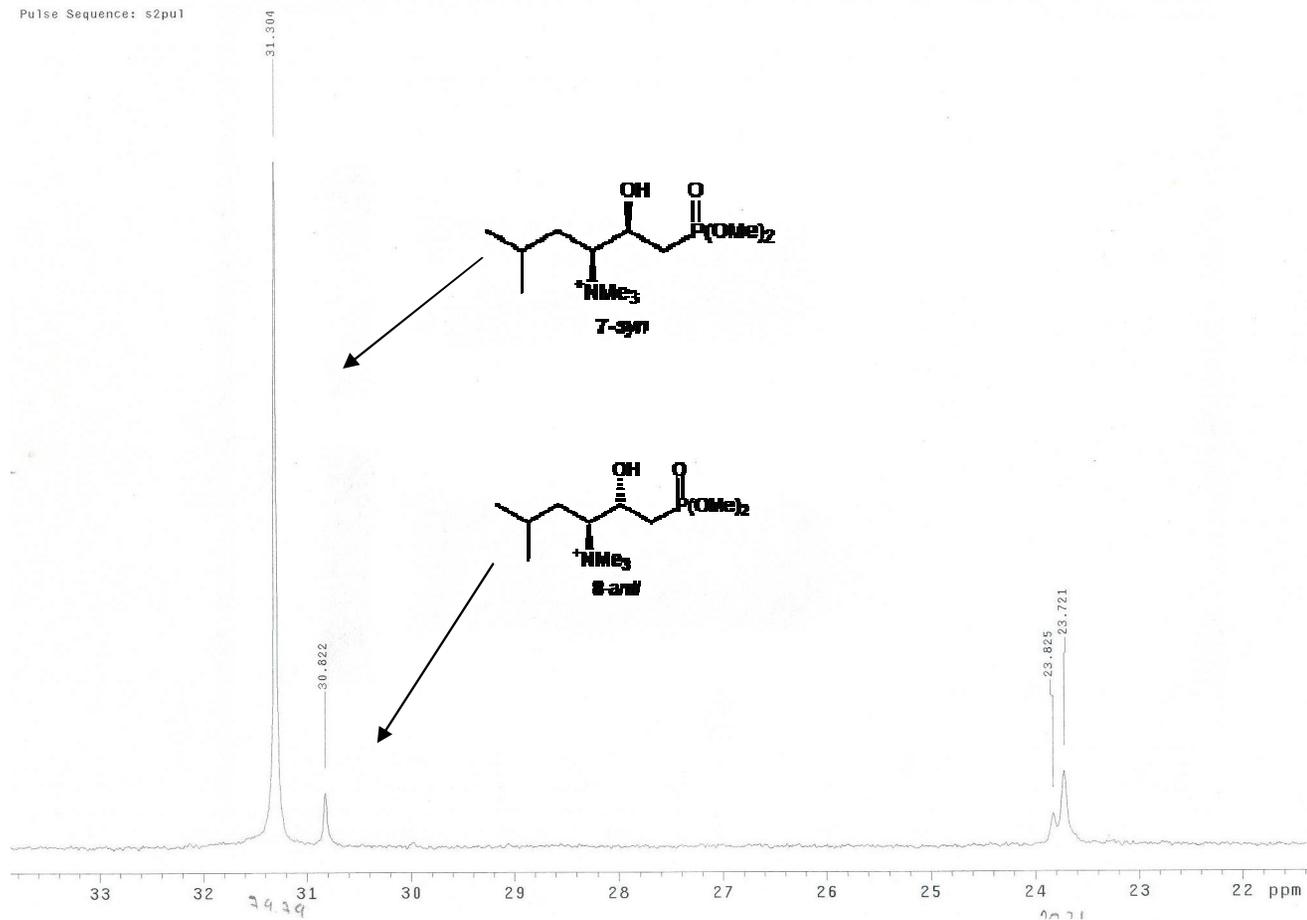
Espectro de RMN ^{31}P para el Dibencil amino β -hidroxifosfonato **4-syn**, diastereomericamente puro

RMN 31P 80.98 MHz CDCl3
Alcohol anti
24 abr 08
Pulse Sequence: s2pu1



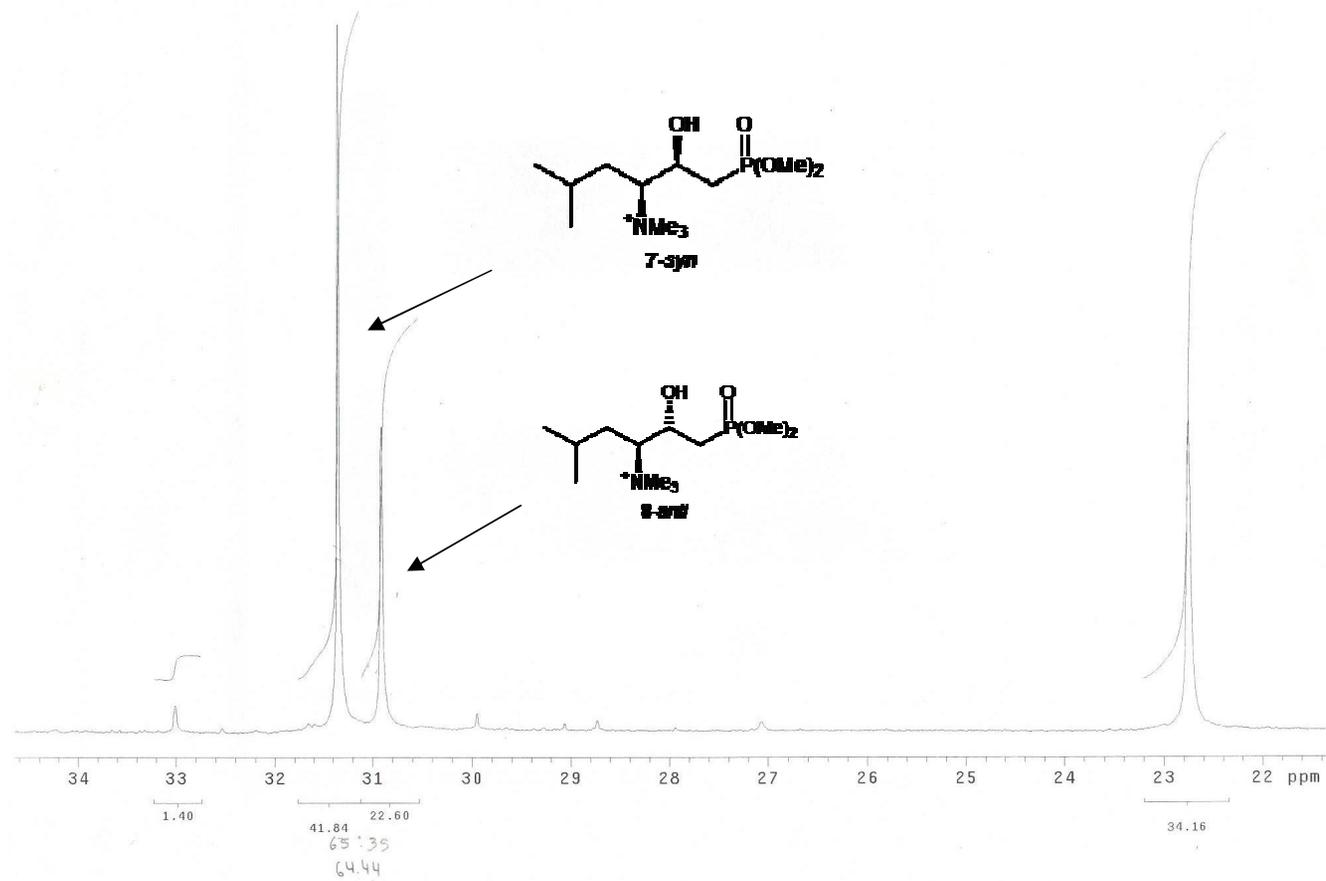
Espectro de RMN ^{31}P para la mezcla de dibencilamino β -hidroxifosfonato **4-syn**/**5-anti** relación 9:91

RMN ^{31}P 80.98 MHz CDCl₃
RC-01-08-3
Cristalizado
1 feb 08
Pulse Sequence: s2pu1

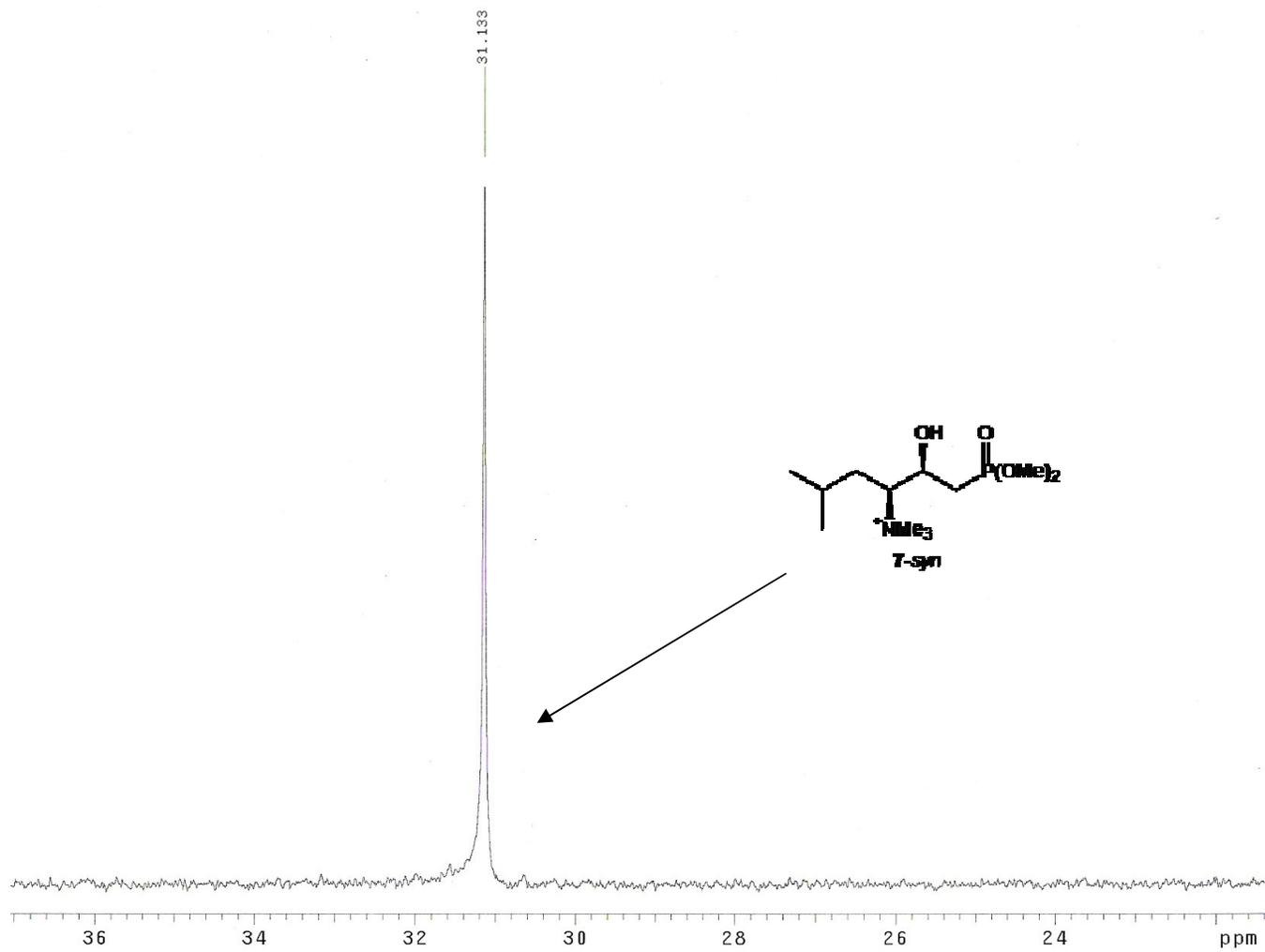


Espectro de RMN ^{31}P para la mezcla de trimetil amino β -hidroxifosfonatos **7-syn**: **8-anti**

RMN 31P 80.98 MHz CDC13
RC-01-08-B
ASMS
1 Feb 08
Pulse Sequence: s2pu1

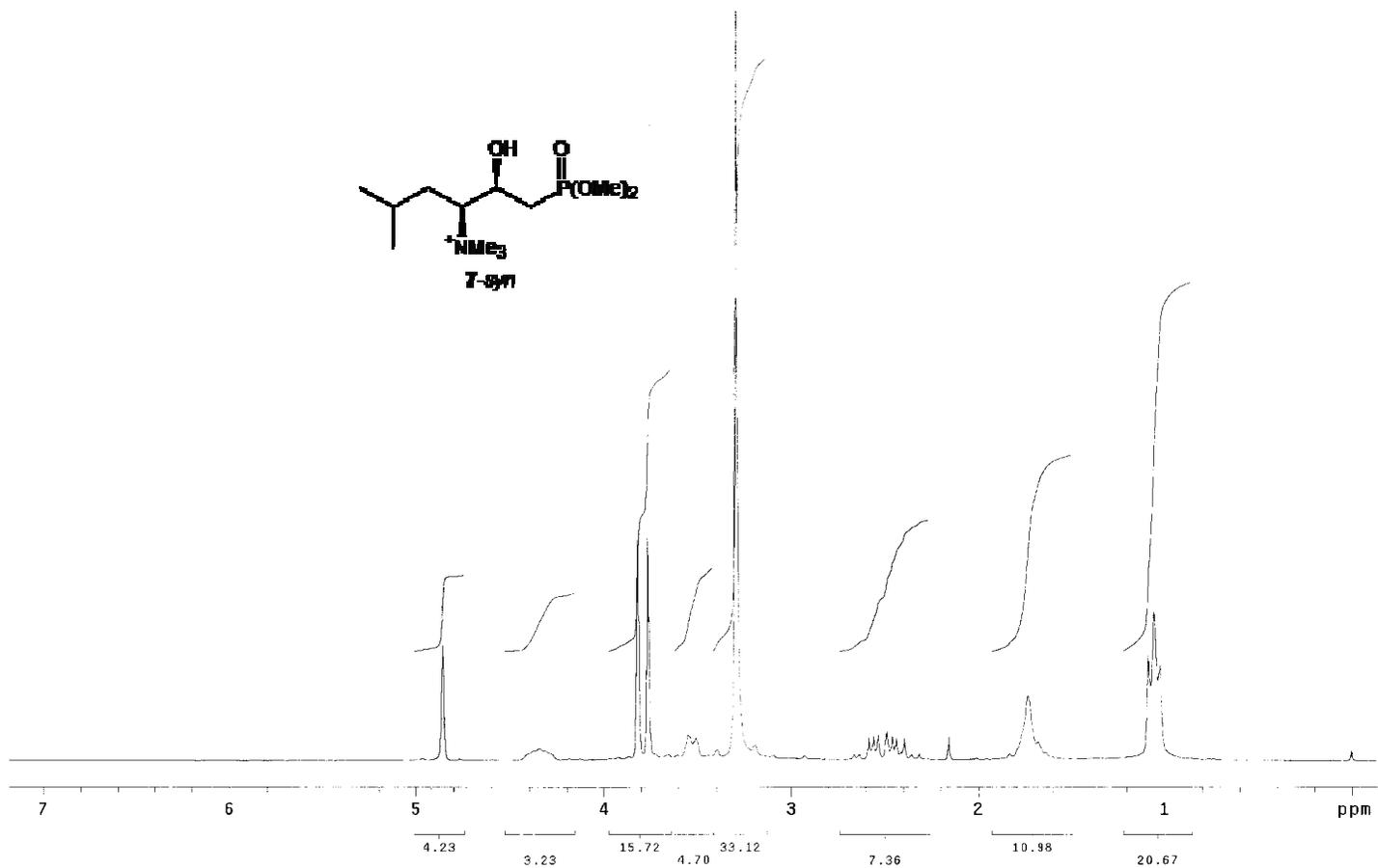


Espectro de RMN ^{31}P de las aguas madres de la cristalización del trimetilamino β -hidroxifosfonato **7-syn**: **8-anti**



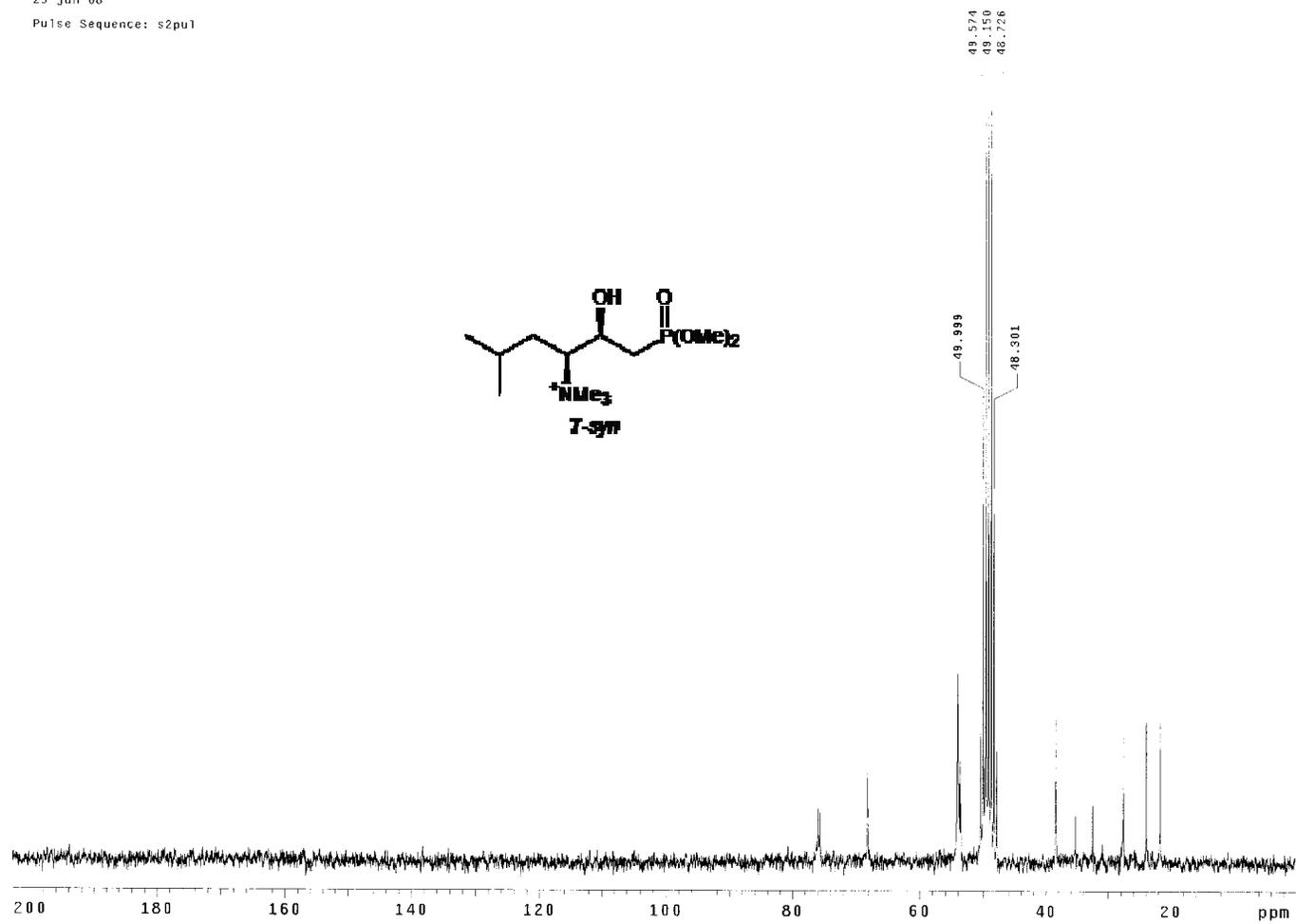
Espectro de ^{31}P de la recristalización del trimetil amino β -hidroxifosfonato **7-syn**

RMN 1H 200 MHz CD3OD
Trimetilado syn
Ester
33 mg
20 jun 08
Pulse Sequence: s2pu1



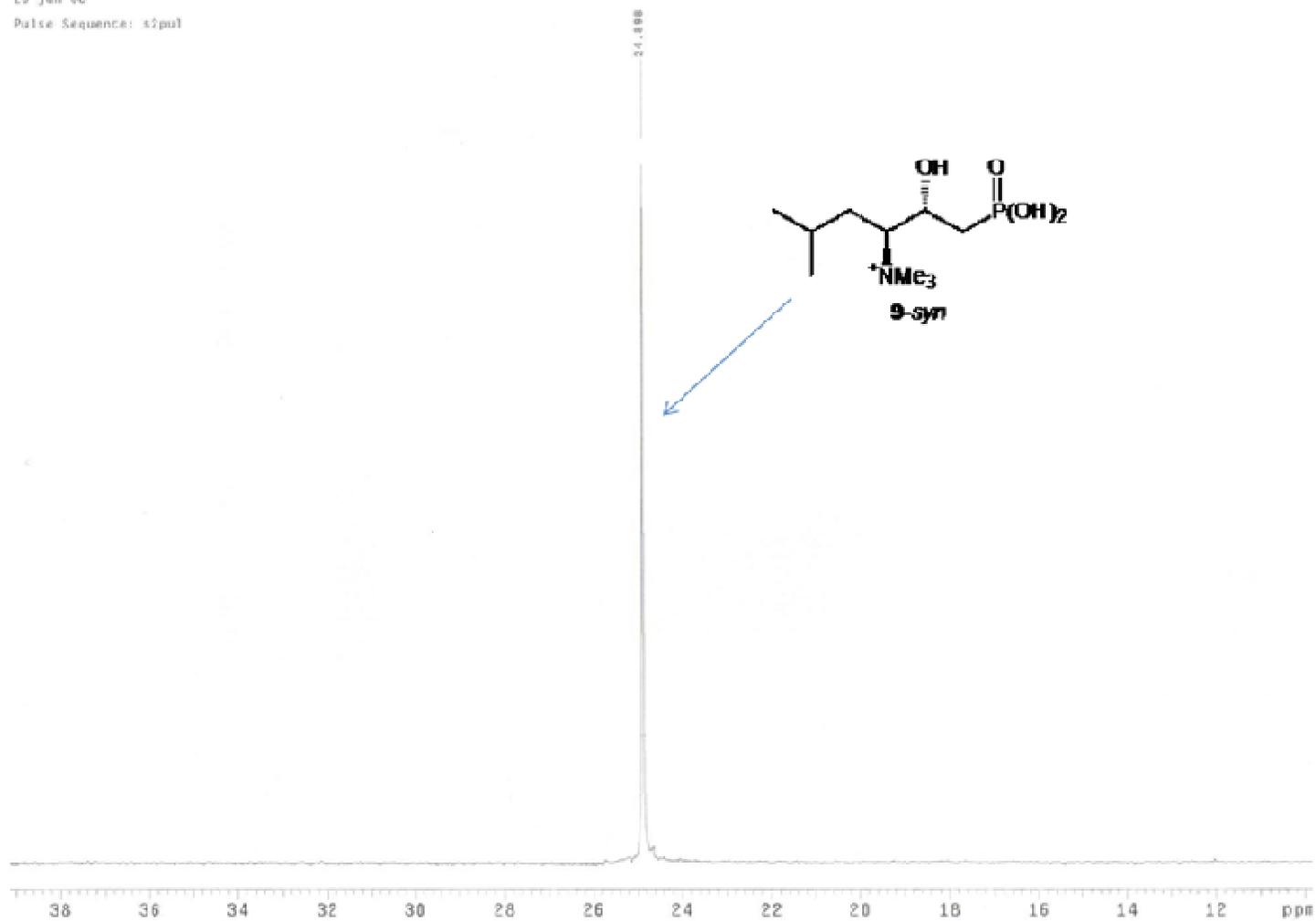
Espectro de RMN ¹H del trimetilamino β-hidroxifosfonato **7-syn**

RMN 13C 50 MHz CD300
Ester trimetilado syn
25 Jun 08
Pulse Sequence: s2pu1



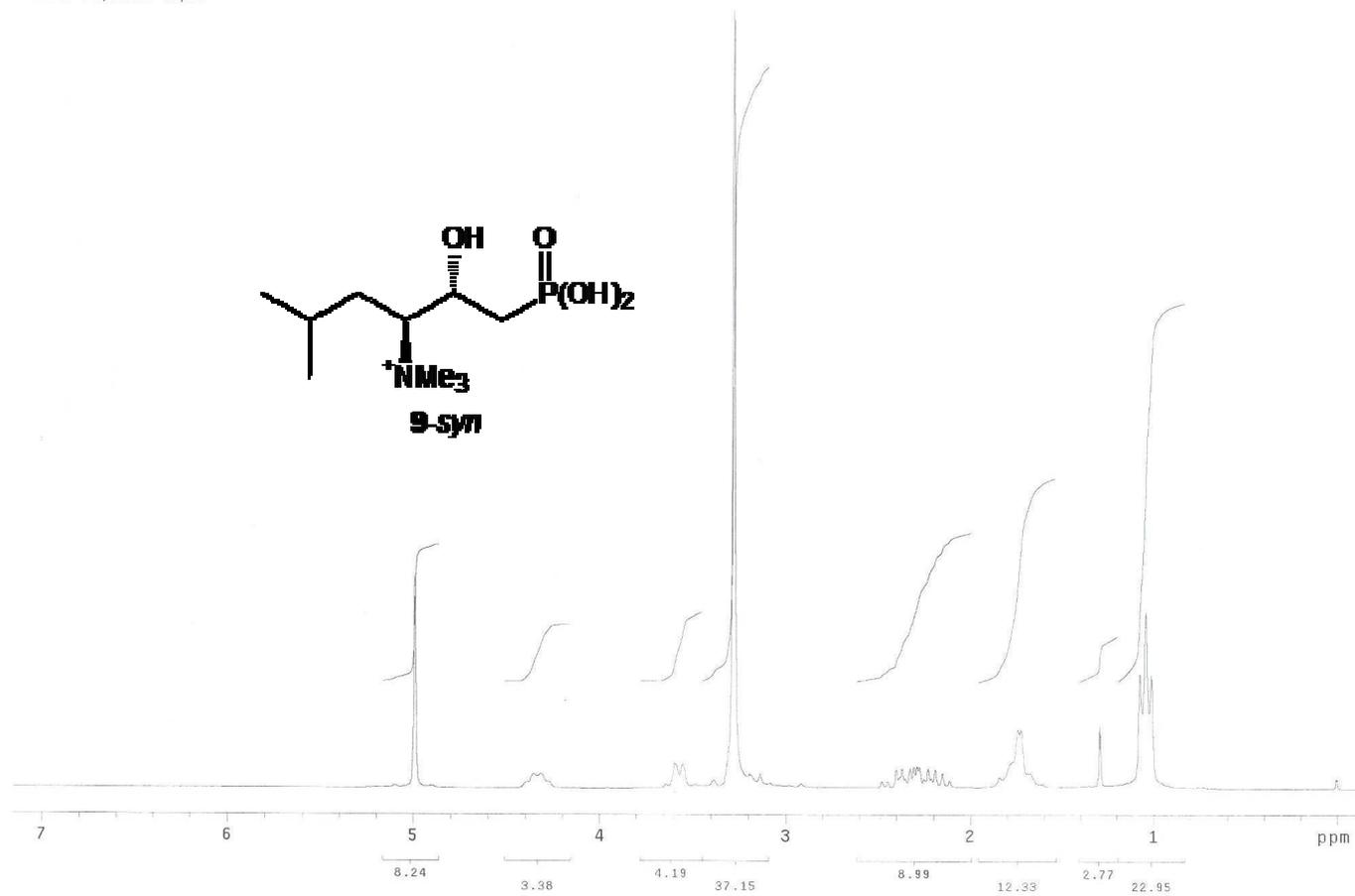
Espectro de RMN ¹³C del trimetilamino β-hidroxfosfonato **7-syn**

80-38-08
Recristalizado
26 mg
23 Jun 68
Pulse Sequence: s2pu1



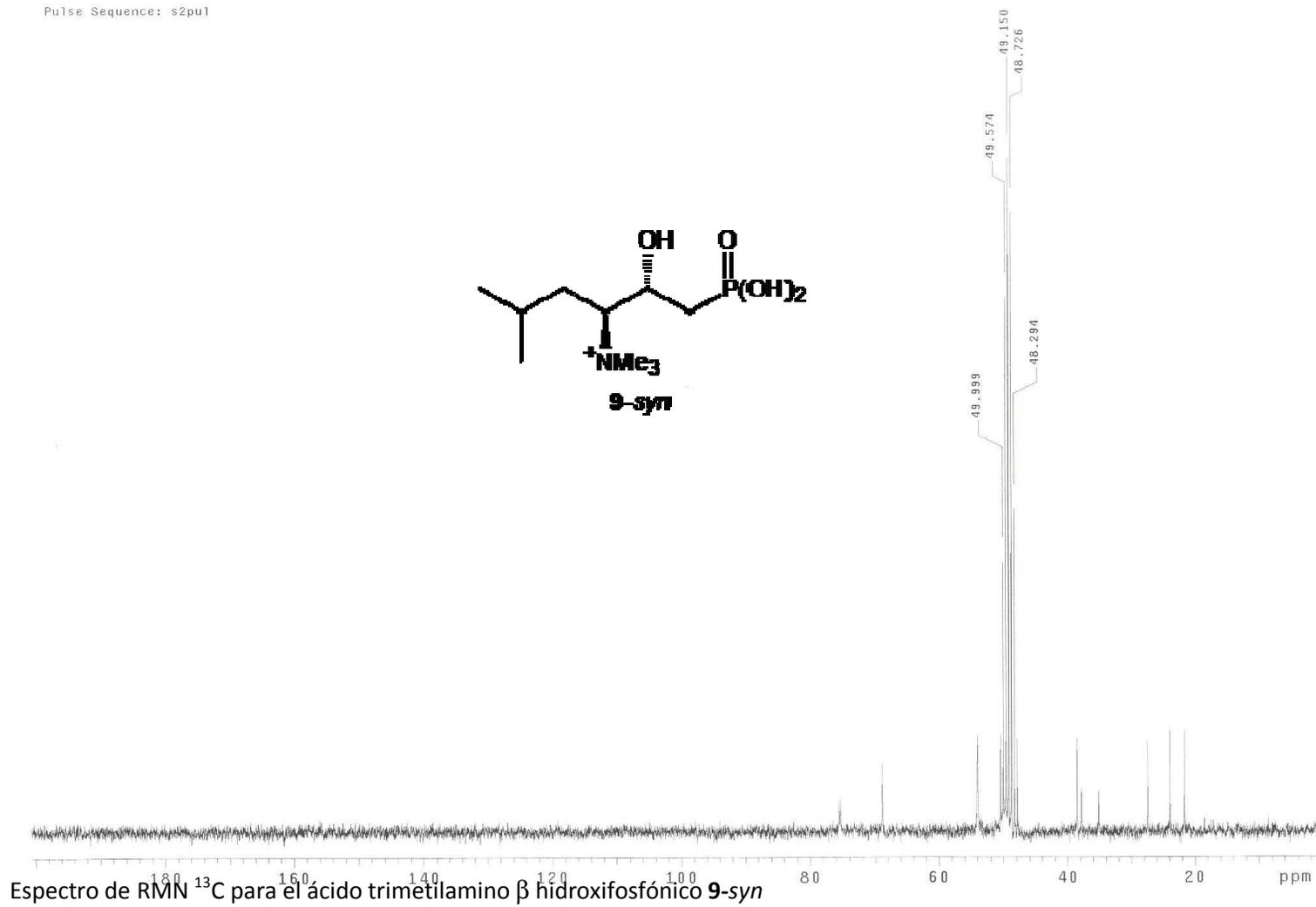
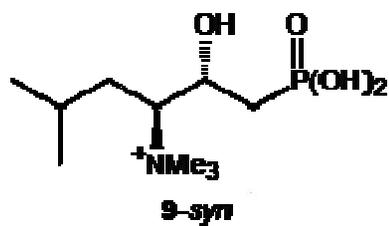
Espectro de RMN ^{31}P del ácido trimetilamino β hidroxifosfónico **9-syn**

RMN 1H 200 MHz CD300
RC-20-08
Recristalizado
26 mg
20 jun 08
Pulse Sequence: s2pu1



Espectro de RMN ¹H para el ácido trimetilamino β hidroxifosfónico **9-syn**

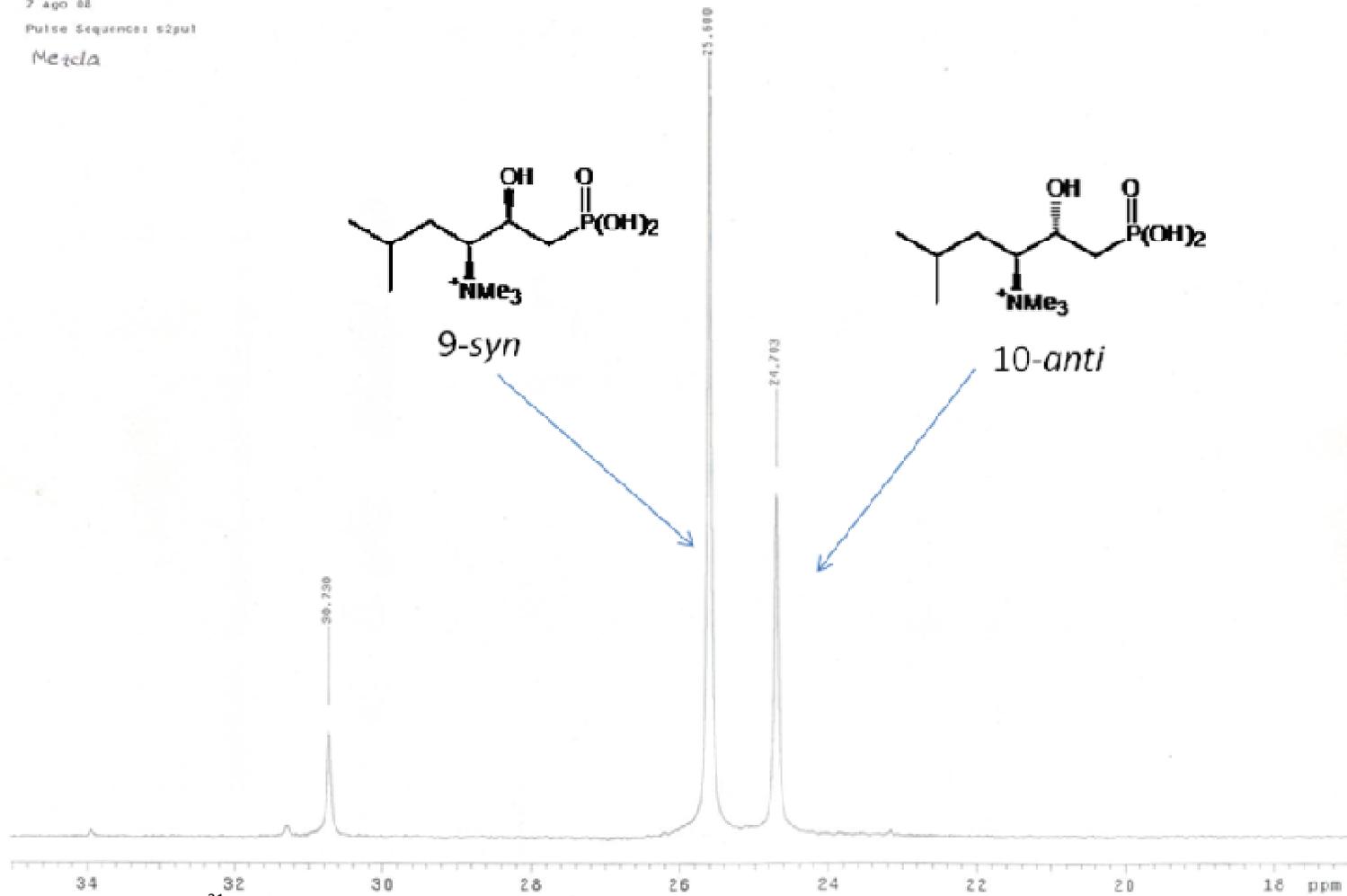
RMN 13C 50 MHz CD3OD
RC-20-08
Recristalizado
24 Jun 08
Pulse Sequence: s2pu1



RMN 31P 80.98 MHz CD3OD
AAS-043-05
7 ago 88

Pulse Sequence: s2pul

Mezcla



Espectro de RMN ^{31}P para los ácidos trimetilamino β -hidroxifosfónicos **9-syn**/**10-anti**.