

21

*Universidad Nacional Autónoma de México*  
**FACULTAD DE QUIMICA**



---

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE 1,4-OXATINAS  
SOBRE EL VIRUS DE MOSAICO DEL TABACO**



DEPARTAMENTO DE QUIMICA  
LABORATORIO DE QUIMICA

**ROCELIO JIMENEZ JUAREZ**

**Q U I M I C O**

**1981**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

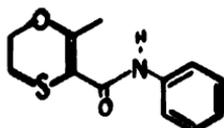
	Página
I. INTRODUCCION.	1
II. ANTECEDENTES.	2
III. RESULTADOS Y DISCUSION.	7
IV. PARTE EXPERIMENTAL.	18
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.	39
VI. BIBLIOGRAFIA.	40-52
VIII. APENDICE.	53-55

## INTRODUCCION

Las 1,4-oxatiinas, Vitavaz y Plantvaz fueron descritos por B. von Schmeling<sup>1</sup> como fungicidas sistémicos. A partir de entonces se hicieron experimentos de toda índole para determinar sus propiedades químicas y biológicas, y se aplicaron intensamente en el control de diversas plagas que ocasionan pérdidas en las cosechas.

En este trabajo se hizo una revisión exhaustiva de la bibliografía existente sobre Vitavaz y Plantvaz. Su aplicación en Agricultura ha sido principalmente como fungicidas, aunque existen tres trabajos que mencionan aplicaciones en el campo de los virus.<sup>144,145,146</sup> Estos trabajos muestran resultados contradictorios, pues en dos de ellos se usan como viricidas y en el otro se muestra su actividad como estimulante del crecimiento de los virus.

Los datos anteriores y los postulados de Matthews sobre los requerimientos de un viricida<sup>147</sup> fueron la base de este trabajo sobre la relación entre la estructura química y la actividad viricida de 1,4-oxatiinas. Se sintetizó Vitavaz.



y análogos (Tabla 1) con diferentes sustituyentes en el anillo aromático y se estudió su actividad en el control químico del virus de mosaico del tabaco sobre plantas de tabaco.

Los resultados que se obtuvieron muestran que existen factores fisiológicos de la planta que hacen que la actividad viricida de las oxatiinas varíen ampliamente cuando se aplican estas sustancias en diferentes edades y estados fisiológicos de las hojas.

## ANTECEDENTES

Las 1,4-Oxatiinas se empezaron a utilizar en Agricultura a partir de 1966 cuando B. von Schmeling<sup>1</sup> informó las propiedades del "Vitavaz" y algunos de sus análogos como fungicidas sistémicos.

El vitavaz (5,6-Dihidro-2-metil-3-carboxanilido-1, 4-Oxatiina) (I) llamado también carboxina, DMOC y D735, ha sido clasificado, junto con su sulfona análoga: 5,6-Dihidro-2-metil-3-carboxanilido-1,4-Oxatiina-4,4-dióxido, (I-A), llamado también Plantvaz, oxicarboxina, DMOCD y D461 como un fungicida sistémico,<sup>2</sup> debido a sus propiedades químicas y biológicas de penetrar y translocarse dentro de la planta.



Estas propiedades se han utilizado ampliamente en plantas de grano para combatir organismos patógenos que merman las cosechas.

La información en la literatura sobre las propiedades sistémicas de Vitavaz y Plantvaz contra hongos y bacterias es muy abundante (ver apéndice, Tabla No. 1) y se encuentran estudios de fungitoxicidad,<sup>3,4,5,6,106,137</sup> modo y sitio de acción,<sup>103,106,139</sup> translocación,<sup>108 a 110,139</sup> relaciones entre estructura y actividad,<sup>125-128</sup> degradación,<sup>113,116,117</sup> análisis<sup>118,119,122,123</sup> y síntesis.<sup>142</sup>

Podemos decir que ambos compuestos se conocen con gran detalle, y por lo tanto, su aplicación es muy amplia.

### Uso de 1,4-oxatiinas como fungicidas.

El uso en la Agricultura de 1,4-oxatiinas se ha limitado a Vitavaz y Plantvaz ya que son los más baratos y activos. A pesar de que algunos análogos tienen actividad similar resultan más caros y por lo tanto su aplicación no ha sido comercial.

La actividad biológica de 1,4-Oxatiinas (Vitavaz y Plantvaz) está en función de diversos factores que incluyen: la respuesta que cada organismo pueda tener frente a ellos, el sistema huésped/parásito, el tratamiento empleado y las condiciones experimentales en cada prueba.

Por ejemplo, algunos basidiomicetos, como Ustilago nuda, Ustilago maydis, Ustilago tritici, Uromyces phaseoli, etc. son muy sensibles a ambos compuestos cuando se encuentran infectando trigo, algodón, frijol, etc. y su desarrollo puede ser inhibido a bajas concentraciones; sin embargo, otros patógenos como Pythium aphanidermatum,<sup>3)</sup> Fusarium graminearum,<sup>2)</sup> Fusarium roseum avanaceum,<sup>2)</sup> etc. resultan más resistentes y muchas veces inafectados a estas concentraciones y se necesita mayor concentración e incluso una mezcla sinérgica (fungicida más un compuesto inerte biológicamente) para que puedan ser afectados.

La aplicación del fungicida mediante el cual se intenta inhibir parcial o totalmente el desarrollo de una plaga puede hacerse en varias formas:

1. Tratamiento en el suelo. Este proceso consiste en aplicar el plaguicida disuelto en agua o en agua/disolvente orgánico en la tierra. Para utilizarlos deben conocerse necesariamente los siguientes factores:

a) El plaguicida debe moverse hacia arriba y repar--  
tirse en toda la planta sin sufrir degradación alguna para que  
pueda cumplir su función.

b) Deben conocerse las caracterfsticas del suelo y  
su posible interacción qufmica y ffsica con el fungicida.

c) Deben tenerse estudio de estabilización del pla--  
guicida en disolución acuosa y ante microorganismos de la tie--  
rra. <sup>113,115-117</sup>

2. Tratamiento por rociado. Es el método más usado, y -  
consiste en rociar parcial o totalmente la planta con una solu-  
ción del fungicida.

3. Recubrimiento o bañado de semillas. Este método tiene  
bastante aplicación, no solamente a nivel investigación, sino -  
también a nivel comercial; y consiste en recubrir o bañar las  
semillas con una disolución del fungicida. En muchas ocasiones  
se combina con el segundo método.

Las pruebas de laboratorio se pueden hacer: a-priori,  
a-posteriori y simultáneamente a la infección patógena, así co-  
mo uno o más tratamientos a un cierto tiempo o una combinación  
de ellos.

Por lo que corresponde al Vitavaz y Plantvaz, la aplica--  
ción que ha dado mejores resultados es el rociado, pues según  
estudios de translocación, <sup>108-110</sup> se ha observado que ambos fun-  
gicidas se mueven poco hacia arriba.

También se ha demostrado en diferentes trabajos que la --  
acción de estos fungicidas es a nivel mitocondrial, específicamen-  
te sobre el ciclo de Krebs, en el que inhiben la actividad

de la enzima succinato deshidrogenasa durante la oxidación del acetato, piruvato y succinato.<sup>103,107</sup> Estos y otros efectos secundarios ocasionados por las perturbaciones anteriores, dan como resultados la inhibición parcial o total del desarrollo del parásito.

Como se mencionó anteriormente, la sensibilidad a estos fungicidas difiere en cada organismo, y hay algunos hongos más resistentes al Vitavaz y Plantvaz porque los degradan rápidamente a otros compuestos no tóxicos. Un ejemplo de ello es *Rhizopus japonicus*<sup>111,112,114</sup> el cual transforma el Vitavaz a acetanilida y en ciertos casos a propionanilida más otros productos no identificados.

#### Uso como Viricidas.

La información concerniente a sustancias químicas aplicadas al campo de las enfermedades causadas por virus es muy escasa y contradictoria.

Existe una patente publicada en 1972 por la compañía Uniroyal<sup>144</sup> en la que se informa que las enfermedades causadas por virus en plantas, incluyendo el virus de mosaico del tabaco (V.M.T), pueden ser reducidas con 1,4-oxatiinas, específicamente con Vitavaz y Plantvaz.

Sin embargo, un año antes, en 1971, Cors, F., et al<sup>145</sup> desarrollaron experimentos al respecto y establecieron que el Vitavaz y Plantvaz promueven la multiplicación de virus en bromeliáceas. Los experimentos se realizaron de las tres formas siguientes:

- a) Translocando el fungicida en la planta, aplicando una

emulsión del mismo en las raíces.

b) Bañando las semillas con una emulsión de los fungicidas, y

c) Rociando el fungicida sobre la planta.

Por otro lado, en 1973 se realizó una serie de experimentos en el Colegio de Postgraduados de Chapingo<sup>146</sup> en los que se probó la actividad viricida del Vitavaz y Plantvaz y, algunos extractos vegetales frente al virus del mosaico del tabaco (V.M.T.). Estos compuestos reúnen cuatro de las cinco características que debe tener una sustancia química para que pueda considerarse un buen viricida (según Matthews); a saber: que sea sistémico, estable, costeable y fácil de producir y, no contaminante al medio ambiente. La toxicidad a los virus es la propiedad que se probó. Los resultados encontrados demostraron que las oxatiinas presentan cierta actividad al V.M.T. cuando se encuentran infectando plantas de tomate.

Un año después, 1974 von A. Grafe, et al publicaron varios trabajos médicos<sup>145-147</sup> sobre la relación entre estructura química y actividad viricida y establecieron que muchos compuestos químicos que tienen agrupamientos  $\text{-}\overset{\cdot}{\text{N}}\text{-}\overset{\cdot}{\text{C}}\text{=O}$  o  $\text{-}\overset{\cdot}{\text{N}}\text{=}\overset{\cdot}{\text{C}}\text{-OH}$  presentan actividad viricida.

Con el fin de esclarecer los resultados anteriores y de encontrar relaciones entre estructura química y actividad viricida de 1,4-Oxatiinas se emprendió este trabajo y se determinó la actividad viricida del Vitavaz, y algunos análogos sintetizados en el laboratorio, así como, del Vitavaz comercial frente al virus del mosaico del tabaco (V.M.T.) en plantas de tabaco.

## RESULTADOS Y DISCUSION

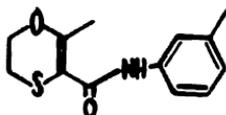
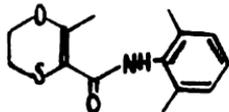
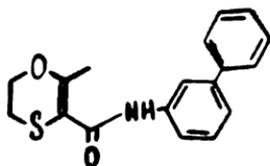
El control de enfermedades producidas por virus en las plantas ha avanzado poco. Generalmente se ha reducido al uso de variedades resistentes a enfermedades específicas, y esta resistencia es a veces muy difícil de alcanzar y de mantener.

El uso de compuestos químicos para inhibir el desarrollo de virus no ha tenido éxito en Agricultura; sin embargo, la investigación en este campo ha sido intensa.<sup>144, 145, 146</sup>

Uno de los posibles enfoques para encontrar viricidas es el uso de fungicidas sistémicos. Estas sustancias cumplen con cuatro de los cinco requisitos que señala Matthews<sup>149</sup> y el requisito faltante podría suplirse considerando que muchas veces la modificación de las condiciones fisiológicas de la planta modificaría el crecimiento del virus.

Algunos resultados de tratamientos con fungicidas sistémicos aplicados como protectores de semillas o incorporados al suelo<sup>144, 149</sup> indican que efectivamente se modifica el crecimiento del virus pero ya que estos compuestos afectan el crecimiento de plantas, es de suponerse que probablemente el efecto sobre el virus refleja las condiciones fisiológicas de la planta.

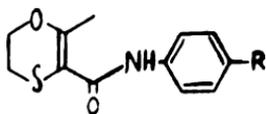
Estudios previos llevados a cabo en el Colegio de Postgraduados de Chapingo mostraron que si se aplicaba Vitavaz en hojas o en el suelo en concentraciones de 270 ppm y 70 ppm, se inhibía en cierto grado el crecimiento del V.M.T. en plantas de tomate; también hay una patente<sup>144</sup> que indica que compuestos relacionados con Vitavaz, específicamente los siguientes:



inhiben el desarrollo del virus del mosaico del tabaco (V.M.T.). Por otro lado existen informes en la literatura<sup>140</sup> que indican que el mismo Vitavaz promueve el desarrollo de virus en las bromeliáceas.

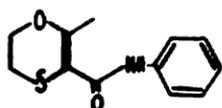
También se han hecho estudios médicos que relacionan estructura química con actividad viricida; los compuestos que inhiben el desarrollo de virus tienen agrupamientos  $\overset{\cdot}{\text{N}}-\overset{\cdot}{\text{C}}=\text{O}$  o  $\overset{\cdot}{\text{N}}=\overset{\cdot}{\text{C}}-\text{OH}$ .

Con el objeto de esclarecer los resultados contradictorios que se han informado y de hacer un estudio de la relación entre la estructura química y la actividad viricida de compuestos análogos a Vitavaz, se sintetizaron en este trabajo Oxatinas sustituidas de fórmula general.

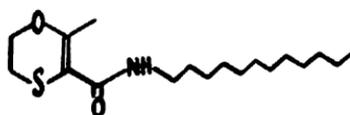


Se sintetizaron Vitavaz y seis análogos; cinco modificando el sustituyente en la posición para del anillo aromático y uno cambiando el anillo aromático por una cadena alifática de doce carbonos, con el fin de modificar la densidad electrónica del posible centro de interacción viricida y la solubilidad de los compuestos de prueba; Los compuestos sintetizados se muestran en la Tabla No. 2.

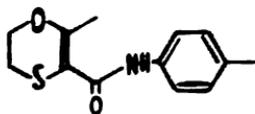
Tabla No. 2



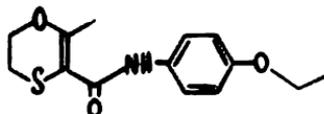
(I)



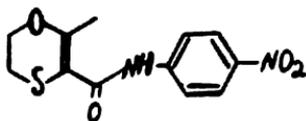
(II)



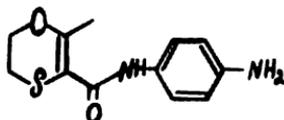
(III)



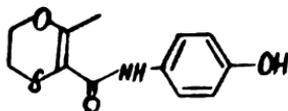
(IV)



(V)



(VI)



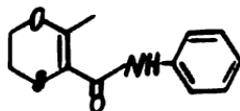
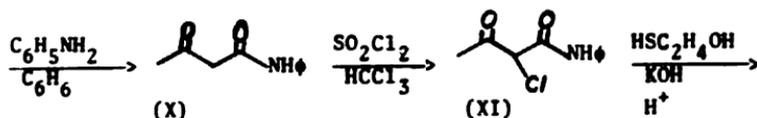
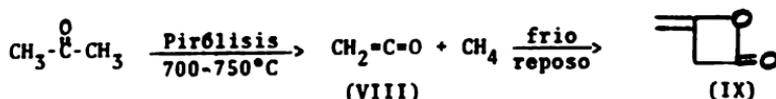
(VII)

La síntesis de Vitavaz se llevó a cabo usando dos procedimientos informados en la literatura en patentes de la compañía Uniroyal,<sup>1,2</sup> con el propósito de evaluar la eficiencia de cada uno de ellos.

En el primer método (Ver Esquema A pág.11 ) se usó como materia de partida dicetena (IX), la cual se preparó pirolizando acetona comercial a 700-750°C en un compartimiento exento de oxígeno para evitar explosiones, seguida de dimerización a baja temperatura y reposo. Según describe Jonathan W. Williams y -- John A. Krynisky;<sup>1,2</sup> la preparación de acetoacetanilida (X) se efectúa mezclando a temperatura ambiente anilina y dicetena (IX) seguida de calentamiento a reflujo. Cuando se trató de reproducir esta técnica los resultados fueron negativos y no se aisló producto. Sin embargo, cuando la dicetena obtenida se hizo reaccionar con anilina pura y seca en benceno por 72 horas y a temperatura ambiente se obtuvo acetoacetanilida (X) que una vez aislada y purificada muestra en el espectro de IR las bandas características de amida en  $\nu$  1675 y  $\nu$  1620  $\text{cm}^{-1}$ . La acetoacetanilida se hizo reaccionar con cloruro de sulfurilo en benceno y a temperatura ambiente por media hora para obtener  $\alpha$ -Cloroacetoacetanilida (XI) que se aisló por destilación y cuyas características espectroscópicas concuerdan con lo esperado; este producto, a su vez, se hizo reaccionar con 2-mercaptoetanol en benceno y en medio básico para efectuar la sustitución del cloro, lo cual se hizo aparente por la precipitación de cloruro de potasio que se filtró media hora después. El filtrado se deshidrató calentando a reflujo durante 6 horas y catalizando la reacción con ácido p-toluensulfónico, para obtener finalmente Vitavaz (I), esquema A. Las señales espectroscópicas del producto en el IR a  $\nu$  1650 y  $\nu$  1630  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a las bandas de amida I y II respectivamente y el espectro de RMN, en el que se tienen singuletes en  $\delta$  2.2 y  $\delta$  7.9 que integran para 3 y un

protones, tripletes en  $\delta$  2,9 y  $\delta$  4,3 de los hidrógenos alifáticos y el multiplete en  $\delta$  7,9 que corresponde a los protones aromáticos, demuestran la identidad del producto.

ESQUEMA A.



(I)

Para el segundo método (Esquema B pág.12 ) se partió de -acetoacetato de etilo que se hizo reaccionar con cloruro de sulfurilo entre 0-5°C y después a temperatura ambiente por 18 horas para obtener 2-Cloroacetoacetato de etilo según muestran - las señales espectroscópicas (ver parte experimental).

El 2-Cloroacetoacetato de etilo se hizo reaccionar con 2-mercaptoetanol en benceno y en medio básico para efectuar la --sustitución del cloro.

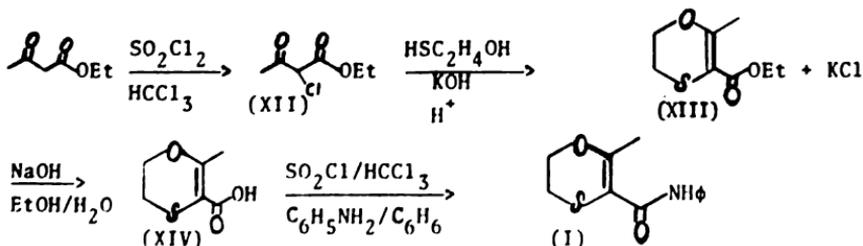
La reacción procede desde el primer momento y se hace aparente por la precipitación de cloruro de potasio que se separa

por filtración media hora después. El filtrado se calienta a reflujo durante 6 horas para ciclar y deshidratar, catalizando la reacción con ácido p-toluensulfónico y obtener de esta forma 5,6-dihidro-2-metil-3-carboxi-1,4-oxatiina (XIII), cuyo punto de ebullición fue  $100^{\circ}\text{C}/0,5 \text{ mmHg}$ , el espectro de infrarrojo muestra una banda de carbonilo en  $\nu 1710 \text{ cm}^{-1}$  y RMN concuerda con la estructura esperada (ver parte experimental).

El ester obtenido anteriormente se calentó a reflujo por 5 horas con hidróxido de sodio, y etanol para obtener el ácido correspondiente 5,6-dihidro-2-metil-3-carboxi-1,4-oxatiina -- (XIV). Punto de fusión  $175-180^{\circ}\text{C}$ . La espectroscopia infrarrojo muestra una banda de carbonilo en  $\nu 1700 \text{ cm}^{-1}$  y una banda de OH en  $\nu 2900 \text{ cm}^{-1}$ .

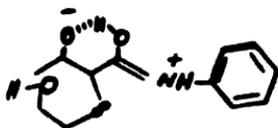
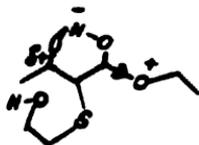
Se preparó el cloruro de ácido respectivo calentando a -- reflujo el compuesto anterior con cloruro de tionilo en cloroformo durante tres horas; enseguida se evaporó el disolvente y el exceso de cloruro de tionilo y se agregó anilina pura y seca y benceno para efectuar la acilación y obtener de esta forma Vitavaz, 5,6-Dihidro-2-Metil-3-Carboxanilida-1,4-Oxatiina (I) cuyas señales espectroscópicas están de acuerdo (ver parte experimental). Esquema B.

#### Esquema B



La eficiencia de los métodos no fué equivalente para preparar Vitavaz, ya que, cuando se usó el segundo método se obtuvo el producto con mejor rendimiento y más puro.

Por otro lado, durante la preparación del Vitavaz (I), -- por el primer método que se sintetizó haciendo reaccionar  $\alpha$ -Cloroacetacetanilida (XI), que se obtuvo en bajos rendimientos, con 2-mercaptoetanol en medio básico, la primera fase de la preparación, es decir, la reacción de sustitución de cloro, fué fácil, ya que la realización de la misma se hizo evidente por la precipitación de cloruro de potasio; sin embargo, la formación del heterociclo (I) y la deshidratación fueron muy lentas y los rendimientos fueron muy bajos. Esto es difícil de explicar si se considera que la única diferencia entre los intermediarios del primer método (XI) y del segundo método (XII) en el que se cicliza el éster antes de reacción con amina es -OEt en un caso y -NH $\phi$  en el otro; sin embargo podría proponerse una disminución del carácter electrofílico del carbonilo que forma el hemiacetal para ciclizar la molécula.



El segundo método fué más satisfactorio ya que tanto los intermediarios como el Vitavaz, se obtuvieron en buenos rendimientos y en la mayoría de los casos exentos de subproductos.

La síntesis, aparentemente más larga, resultó ser más

rápida y sencilla. Solamente se preparó el intermediario ácido (XIV) y de aquí se partió para sintetizar Vitavaz y sus análogos con solo variar la amina durante la acilación.

Con tres excepciones, los productos se obtuvieron con buenos rendimientos y se cristalizaron del medio de reacción.

Para purificar el derivado nitrado hubo que usar cromatografía en columna usando alúmina ácida para retener la amina sin reaccionar.

El derivado hidroxilado se purificó lavando primero con ácido clorhídrico para arrastrar la amina sin reaccionar, carbonato de sodio para arrastrar el ácido sobrante, agua y sosa al 10% para extraer el producto que precipitó al acidular.

Por otro lado el derivado aminado se purificó lavando con carbonato de sodio al 5% para quitar el exceso de ácido y luego con hidróxido de sodio al 10% para separar la amina sobrante. El producto se obtuvo al evaporar parcialmente el disolvente orgánico.

Los espectros IR de las oxatiinas presentan la banda de absorción del carbonilo al rededor de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la vibración longitudinal del carbonilo (amida I) además de las bandas de amida II y III en  $1500$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.

R	Amida I	Amida II	Amida III
-OH	1625	1520	1390
-OEt	1635	1525	1375
-H	1640	1550	1330
-CH <sub>3</sub>	1650	1550	1420
-NH <sub>2</sub>	1650	1515	
-NO <sub>2</sub>	1690	1500	

rápida y sencilla. Solamente se preparó el intermediario ácido (XIV) y de aquí se partió para sintetizar Vitavaz y sus análogos con solo variar la amina durante la acilación.

Con tres excepciones, los productos se obtuvieron con buenos rendimientos y se cristalizaron del medio de reacción.

Para purificar el derivado nitrado hubo que usar cromatografía en columna usando alúmina ácida para retener la amina sin reaccionar.

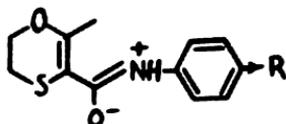
El derivado hidroxilado se purificó lavando primero con ácido clorhídrico para arrastrar la amina sin reaccionar, carbonato de sodio para arrastrar el ácido sobrante, agua y sosa al 10% para extraer el producto que precipitó al acidular.

Por otro lado el derivado aminado se purificó lavando con carbonato de sodio al 5% para quitar el exceso de ácido y luego con hidróxido de sodio al 10% para separar la amina sobrante. El producto se obtuvo al evaporar parcialmente el disolvente orgánico.

Los espectros IR de las oxatiinas presentan la banda de absorción del carbonilo al rededor de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la vibración longitudinal del carbonilo (amida I) además de las bandas de amida II y III en  $1500$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.

R	Amida I	Amida II	Amida III
-OH	1625	1520	1390
-OEt	1635	1525	1375
-H	1640	1550	1330
-CH <sub>3</sub>	1650	1550	1420
-NH <sub>2</sub>	1650	1515	1400
-N <sub>2</sub>	1690	1500	1400

Es notable que la posición de esta banda cambia con el -- sustituyente, y, de acuerdo a lo esperado, esto se puede explicar sabiendo que la vibración de estiramiento del carbonilo se modifica por la contribución de la estructura resonante siguiente:



Por lo tanto, los sustituyentes que atraigan electrones, disminuirán la probabilidad de esta contribución, y la banda del -- carbonilo estará menos desplazada.

Los espectros de RMN muestran claramente los tripletes correspondientes a los protones alifáticos, así como el singulete del metilo del anillo y el protón de la amina intercambiable con agua deuterada.

#### Actividad viricida.

Se evaluaron tres métodos de aplicación del Vitavaz y -- análogos con el propósito de tener condiciones experimentales que se pudieran reproducir.

En el primero de los métodos se seleccionaron de tres a seis hojas de plantas del mismo estado fisiológico aproximadamente y se aplicó la sustancia en el haz y envés de la misma para que la hoja la absorbiera; enseguida se inoculó el haz de la hoja con virus del mosaico de tabaco y se dejó de 4 a 5 --- días para poder contar las lesiones aparecidas.

En la Tabla No. 3 pág. 35 se aprecian los resultados para concentraciones de  $10^{-3}M$  y nos indican que no existe repetibilidad en el experimento, pues mientras que en algunos bioensayos se tiene inhibición, en otros tenemos promoción del crecimiento de virus. Un ejemplo lo tenemos con el compuesto (I) el cual presenta inhibición en los bio-ensayos 3, 4, 5 y 6 y promoción en los bio-ensayos 1 y 7.

En la tabla No. 4 pág.36 observamos los resultados a una concentración de 2000 ppm de bio-ensayos hechos en la misma forma anterior. De todos los compuestos, solamente el (III) y (II) presentan repetibilidad de inhibición.

Con el propósito de aumentar la repetibilidad de resultados se inoculó en una área foliar constante. La aplicación de la sustancia se hizo de la misma forma anterior.

En los resultados que se presentan en la Tabla No. 5 pág. 37 podemos apreciar que la repetibilidad se consiguió parcialmente, ya que de los tres experimentos realizados en la misma forma, solamente (III) y (II) no presentaron uniformidad de resultados; así podemos observar que el compuesto (III) presenta inhibición en el experimento 12, mientras que en los experimentos 11 y 13 presenta promoción. Por otro lado, el compuesto (II) presenta inhibición en el experimento 11 y promoción en los experimentos 12 y 13.

Por lo tanto, en un intento de lograr mayor reproducibilidad, se cambió la forma de suministrar las sustancias en la planta; para esto se evaluó el efecto producido al aplicar la sustancia directamente sobre las hojas en comparación con el efecto producido por translocación del compuesto a través del peciolo. Se seleccionaron tres hojas de plantas del mismo estado fisiológico aproximadamente y se pusieron sobre emulsiones

de las sustancias para que translocaran durante dos horas,

Una vez translocadas las sustancias se inocularon en una área foliar constante y se mantuvieron por tres a cuatro días a temperaturas y humedad controladas con períodos de luz y sombras de doce horas.

Los resultados que se muestran en la Tabla No. 6 pág. 38 nos indica que de los dos bio-ensayos realizados en la misma forma, solamente los compuestos (III), (VI) y (II) presentan reproducibilidad de resultados, mientras que los compuestos (I), (V), (VII) y (IV) no presentan reproducibilidad, ya que algunas veces inhiben y otras promueven.

Puede sugerirse que probablemente la acción de los compuestos sobre el virus del mosaico del tabaco (V.M.T) sea a través de la modificación de las características fisiológicas de la planta. Se requieren estudios más amplios para explicar totalmente la actividad viricida de 1,4-Oxatiinas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Métodos Químicos

#### Cetena (VIII).

Se siguió el procedimiento descrito por A. Vogel<sup>133a</sup> como sigue:

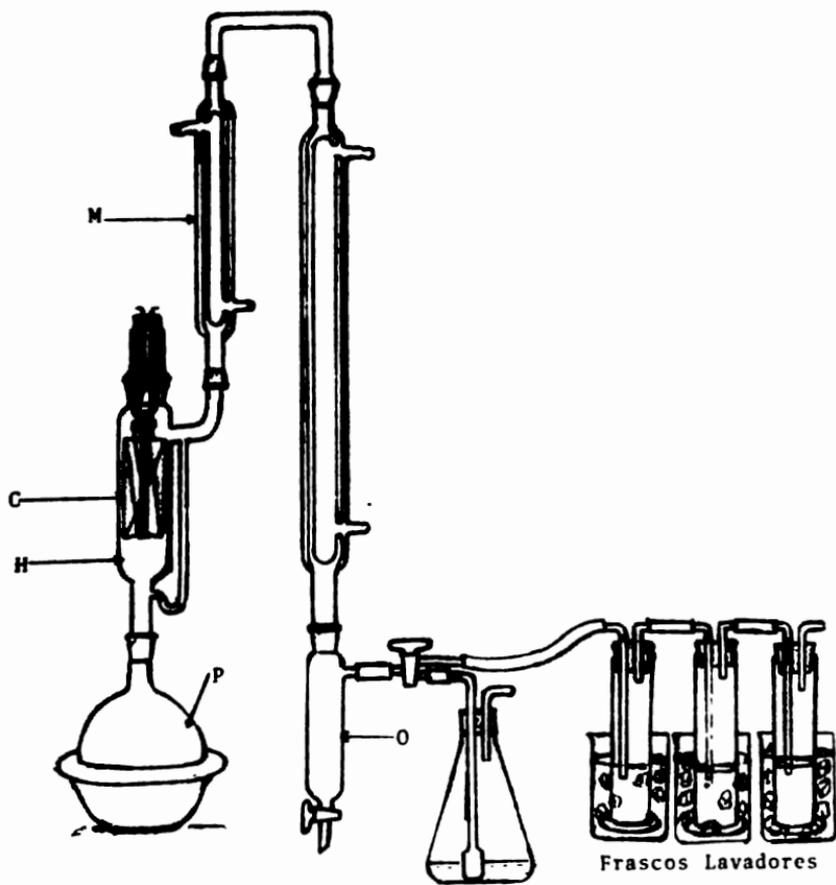
Al matraz de dos litros (P) del aparato que se esquematiza en la Figura No. 1 se puso acetona comercial y se calentó -- hasta obtener un reflujo constante del primer refrigerante (M) que se mantuvo por 5 min aproximadamente para sacar todo el aire de la cámara (H). Enseguida se calentó el filamento (C) gradualmente hasta obtener un tono rojo-sombra (700-750°C). La Cetena se formó casi inmediatamente y se recibió en trampas de hielo seco/acetona para dimerizarla.

Al final del proceso se hicieron las siguientes manipulaciones:

1. Se quitó la fuente de calor del matraz (P).
2. Se quitó la corriente del filamento (C).
3. Se abrió la llave de la trampa (O).

Se hizo pasar cetena durante 15 minutos a través de una solución de anilina en benceno para calcular la cantidad de cetena producida por minuto. De acuerdo con la cantidad de acetanilida producida se calculó que se producen 0,4 g de cetena por minuto.

**FIGURA No. 1**



### Dicetena (IX).

Se siguió el procedimiento descrito por Jonathan W. Williams et al<sup>134</sup> como sigue:

Los tres frascos que se muestran en la figura No. 1, se colocaron en baños de hielo seco/acetona que los cubrió exteriormente hasta la mitad. En el segundo y tercero se pusieron 100 ml de acetona seca y pura.

El gas cetena preparado por pirólisis de acetona comercial se pasó a través del sistema hasta obtener una cantidad -- aproximada de 2 moles. Este proceso requirió de 4.0 a 6.0 horas.

Así, después de 1 1/2 horas de haber pasado el gas cetena a través del sistema, se quitó la mezcla frigorífica del termo No. 1; 4.0 horas después del termo No. 2 y 6.0 horas del termo No. 3. El sistema se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 horas después de haber terminado el proceso.

Al final, se reunió el líquido de los tres frascos lavados, y se evaporó la acetona en rotavapor a temperatura ambiente. Posteriormente se destiló fraccionadamente la dicetena a 74 mm de Hg.

De esta forma se obtuvieron 42 g de un líquido incoloro - muy picante y lacrimógeno a 64-5°C/74 mm de Hg que se almacenó inmediatamente a temperaturas inferiores a 0°C.

El infra-rojo del compuesto corresponde al descrito en la literatura:<sup>150</sup>

$\nu 2985 \text{ cm}^{-1}$  m(C-H);  $\nu 2945 \text{ cm}^{-1}$  d(C-H);  $\nu 1900 \text{ cm}^{-1}$  f,  $\nu 1880 \text{ cm}^{-1}$  f,  $\nu 1745 \text{ cm}^{-1}$  f y  $\nu 1700 \text{ cm}^{-1}$  f (lactona).

### Acetoacetanilida (X).

Se modificó el procedimiento descrito por Jonathan W. Williams y John A. Krynitsky<sup>135</sup> como sigue:

En un matraz de bola de dos bocas equipado con refrigerante, agitador magnético y embudo de adición se puso una solución de 4.6 g (0.0494 moles) de anilina pura y seca en 12.5 ml de benceno seco; agitando vigorosamente se agregó a través de un embudo de adición una solución de 4.2 g (0.05 moles) de dicetena en 7.5 ml de benceno seco gota a gota durante 60 min.

Después de 72 horas de agitación a temperatura ambiente se obtuvo por filtración directa de la mezcla de reacción un compuesto blanco cristalino que después de recrystalizar de agua/alcohol se aislaron 4.23 g (47.7% del teórico) con p. de fusión de 81-3°C.

### Espectroscopia Infra-rojo.

$\nu 3285 \text{ cm}^{-1}$  f(N-H);  $\nu 3260 \text{ cm}^{-1}$  f(N-H);  $\nu 3190 \text{ cm}^{-1}$  m(N-H)  
 $\nu 3185 \text{ cm}^{-1}$  m(C-H);  $\nu 3075 \text{ cm}^{-1}$  m(C-H);  $\nu 1725 \text{ cm}^{-1}$  f(-C-);  $\nu 1675$   
 $\text{cm}^{-1}$  f(NH-C(=O)-)  $\nu 1620 \text{ cm}^{-1}$  f(NH-C(=O)-).

### Resonancia Magnética Nuclear:

62.3 singulete (3H); 62.9 singulete (2H); 67.4 multiplete (5H).

$\alpha$ -Cloroacetoacetanilida (XI).

Se siguió el procedimiento descrito en la patente - - -  
No. 6 605, 525 US.<sup>1,2</sup> como sigue:

En un matraz de bola equipado con trampa para humedad, -  
agitador magnético y embudo de adición se pusieron 1.73 g ----  
(0.0097 moles) de (X) disueltos en 11.5 ml de benceno seco. -  
Lentamente se agregaron 0.83 ml (0.0102 moles) de cloruro de -  
sulfurilo con agitación vigorosa a temperatura ambiente.

La agitación se mantuvo por 30 min.

Al final de este tiempo se obtuvo un compuesto crystali  
no que una vez recristalizado de hexano rindió 0.85 g (41.4 %  
del teórico) de  $\alpha$ -Cloroacetoacetanilida, con un punto de fusión  
de 136-8°C.

Espectroscopia Infra-rojo:

$\nu$ 3225  $\text{cm}^{-1}$  f(N-H);  $\nu$ 1740  $\text{cm}^{-1}$  f( $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}$ -);  $\nu$ 1660  $\text{cm}^{-1}$  f(NH- $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}$ -).

Resonancia Magnética Nuclear:

62.3 singulete (3H); 62.9 singulete (H); 65.15 singulete  
(H); 67.4 múltiplete (5H).

5,6-Dihidro-2-metil-3-carboxanilido-1,4-Oxatiina (I). A partir de  $\alpha$ -cloroacetoacetanilida.

Se siguió el procedimiento descrito en la patente No. 6 605,525 U.S.<sup>142</sup> como sigue:

En un matraz de bola equipado con agitador magnético y un embudo de adición se pusieron 0,1 g ( $0,47 \times 10^{-3}$  moles) de (XI) en benceno seco.

Lentamente y con agitación vigorosa se añadieron 0,04 ml ( $0,55 \times 10^{-3}$  moles) de 2-mercaptoetanol y 0,03 g ( $0,57 \times 10^{-3}$  moles) de hidróxido de potasio en metanol conservando la temperatura inferior a 30°C con un baño de agua/hielo.

Se dejó la reacción por 30 min, al final de los cuales se eliminó parte del disolvente por destilación, se filtró el sólido formado, se diluyó con benceno, se acidificó con 1 mg ( $0,0073 \times 10^{-3}$  moles) de ácido p-toluensulfónico y se calentó a reflujo con una trampa Dean-Stark por 6 horas para separar el agua formada. Se evaporó el benceno, se disolvió en cloroformo, se extrajo con agua y el producto se purificó por cromatografía en capa fina, eluyente empleado  $C_6H_6$ : AcOEt (1:3). Después de cristalizar de agua/etanol se obtuvieron 24 mg --- (21,62 % del teórico) de 5,6-Dihidro-2-metil-3-carboxanilido-1,4-Oxatiina también llamado Vitavaz con punto de fusión de 90-1°C.

**Espectroscopía Infra-rojo:**

$\nu_{3228} \text{ cm}^{-1}$  m;  $\nu_{3215} \text{ cm}^{-1}$  m,  $\nu_{3195} \text{ cm}^{-1}$  m(N-H);  $\nu_{2960} \text{ cm}^{-1}$  d(C-H);  $\nu_{2925} \text{ cm}^{-1}$  d(C-H);  $\nu_{1640} \text{ cm}^{-1}$  f(-C-);  $\nu_{1600} \text{ cm}^{-1}$  f(NH-C-).

Resonancia Magnética Nuclear:

$\delta$  2.3 singulete (3H);  $\delta$  2.7 singulete (H);  $\delta$  3.0 triplete (2H);  $\delta$  4.3 triplete (2H);  $\delta$  7.2 multiplete (5H).

2-Cloroacetoacetato de Etilo (XII).

Se siguió el procedimiento descrito en la patente No. -- 6 605,525 U.S.<sup>1,2</sup> como sigue:

En un matraz de bola de dos bocas equipado con agitador mecánico, refrigerante y embudo de adición se pusieron 26 g - (0.2 moles) de acetoacetato de etilo comercial. Lentamente y con agitación vigorosa se adicionaron 16.2 ml de cloruro de - sulfurilo (0.2 moles) en 30 minutos a 0-5°C. La mezcla se dejó bajo estas condiciones 18 horas.

Se destiló el exceso de cloruro de sulfurilo utilizando una trampa de hidróxido de sodio al 5% para evitar la salida de vapores irritantes; enseguida a presión reducida y fraccionadamente con lo que se obtuvieron 27.6 g (84% del teórico) - de 2-Cloroacetoacetato de Etilo con punto de ebullición de 80°C/13 mm Hg.

Espectroscopía Infra-rojo:

$\nu$ 2975  $\text{cm}^{-1}$  m(C-H);  $\nu$ 2925  $\text{cm}^{-1}$  d(C-H);  $\nu$ 1750  $\text{cm}^{-1}$  f( $\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{C}$ ).

Resonancia Magnética Nuclear:

$\delta$  1.5 multiplete (5H);  $\delta$  2.5 singulete (3H);  $\delta$  3.5 singulete (H);  $\delta$  4.5 multiplete (5H); a bajo campo un singulete (H).

5,6-Dihidro-2-metil-3-carbetoxi-1,4-Oxatiina (XIII).

Se modificó el método descrito en la patente No. - -  
6 605,525 U.S.<sup>1,2</sup> como sigue:

En un matraz de bola de una boca equipado con agitador magnético y embudo de adición se pusieron 27.6 g (0.1678 moles) de (XII) y 163 ml de benceno. Lentamente y con agitación vigorosa, se añadió una mezcla de 11 g (0.1964 moles) de hidróxido de potasio, 12 ml (0.1714 moles) de 2-mercaptoetanol y 24 ml de metanol durante 1.5 horas, manteniendo la temperatura a bajo de 30°C y se dejó la reacción 18 horas.

Se concentró parcialmente la mezcla de reacción y se filtró. El filtrado se diluyó en benceno y se aciduló con ácido p-toluensulfónico; enseguida se puso a reflujo durante 6 horas usando una trampa Dean-Stark para separar el agua formada durante la hidrólisis. La mezcla resultante se concentró parcialmente en rotavapor y después se destiló fraccionadamente y a presión reducida para obtener 24.2 g (73% del teórico) de un producto que es líquido incoloro con punto de ebullición de 100°C/0.5 mm de presión.

**Espectroscopía Infra-rojo:**

$\nu$ 3960  $\text{cm}^{-1}$  f(C-H);  $\nu$ 3925  $\text{cm}^{-1}$  f(C-H);  $\nu$ 1710  $\text{cm}^{-1}$  f(-C-<sup>O</sup>);  
 $\nu$ 1590  $\text{cm}^{-1}$  f(C=C).

**Resonancia Magnética Nuclear:**

1.2 triplete (2H); 62.2 singulete (3H); 62.8 triplete (2H); 64.2 multiplete (5H).

5,6-Dihidro-2-metil-3-carboxi-1,4-Oxatiina (XIV).

Se siguió el procedimiento descrito en la patente No. -- 6 605,525<sup>1\*2</sup> como sigue:

En un matraz de bola de una boca equipado con agitador magnético y refrigerante se pusieron 16 g (0.0851 moles) de (XIII) en 7 ml de alcohol y 5.1 g (0.1275 moles) de hidróxido de sodio en 34 ml de agua y se calentó a reflujo durante 5 horas.

Se evaporó totalmente el alcohol y se extrajo la solución acuosa resultante con acetato de etilo. La parte acuosa se aciduló con ácido clorhídrico conc. y precipitó inmediatamente un sólido blanco que se filtró y secó para dar 10.1 g (77% del teórico) de producto blanco con punto de fusión de 175-80°C (sublima). No se recrystalizó.

Espectroscopía Infra-rojo:

$\nu 2900 \text{ cm}^{-1}$  f(-OH y C-H);  $\nu 1700 \text{ cm}^{-1}$  f( $\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}$ );  $\nu 1600 \text{ cm}^{-1}$  f(C=C).

Resonancia Magnética Nuclear;

62.3 singulete (3H); 62.9 triplete (2H); 64.3 triplete (2H).

5,6-Dihidro-2-metil-3-carboxanilido-1,4-Oxatiina (I).

Se siguió el procedimiento descrito en la patente No. 6 605,525 U.S.<sup>142</sup> como sigue:

En un matraz de bola de una boca equipado con agitador magnético y refrigerante se pusieron 3,12 g (0,0195 moles) de (XIV), 19 ml de cloroformo y 3 ml (0.0413 moles) de cloruro de tionilo. La mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas.

Se evaporó el disolvente y el exceso de cloruro de tionilo y se diluyó con benceno. Enseguida se agregaron lentamente y con agitación vigorosa y sobre un baño de agua/hielo, 7.26 g (0.0780 moles) de anilina pura y diluida en benceno.

Se evaporó el disolvente, se agregó agua y se extrajo con acetato de etilo, obteniéndose de esta forma un sólido blanco cristalino que se recristalizó de alcohol/agua para dar 2.83 g (61% del teórico) de 5,6-Dihidro-2-metil-3-carboxanilido-1,4-Oxatiina (Vitavaz) con punto de fusión de 90-1°C.

**Espectroscopía Infra-rojo:**

$\nu$ 3265  $\text{cm}^{-1}$  f(N-H);  $\nu$ 2910  $\text{cm}^{-1}$  d(C-H);  $\nu$ 2860  $\text{cm}^{-1}$  d(C-H);  $\nu$ 1650  $\text{cm}^{-1}$  f( $\overset{\text{O}}{\text{C}}$ -);  $\nu$ 1630  $\text{cm}^{-1}$  f(NH- $\overset{\text{O}}{\text{C}}$ -);  $\nu$ 1600  $\text{cm}^{-1}$  f(C=C).

**Resonancia Magnética Nuclear:**

62.2 singulete (3H); 62.9 triplete (2H); 64.3 triplete (2H); 67.3 multiplete (5H); 67.9 singulete (H).

Usando la técnica anterior se sintetizaron 5,6-Dihidro-2-metil-3(N-dodecilcarboxanilido)-1,4-Oxatiina (II), 5,6-dihidro-2-metil-3(4'-metilcarboxanilido)-1,4-oxatiina (III) y 5,6-dihidro-2-metil-3(4'-Etoxicarboxanilido)-1,4-oxatiina (IV) cuyas propiedades espectroscópicas se dan a continuación:

### Compuesto (II)

**Espectroscopía Infra-rojo:**

$\nu$ 1398  $\text{cm}^{-1}$  m(amida III);  $\nu$ 1510  $\text{cm}^{-1}$  m(amida II);  $\nu$ 1610  $\text{cm}^{-1}$  f(amida I);  $\nu$ 2900  $\text{cm}^{-1}$  f(alifáticos).

**Resonancia Magnética Nuclear:**

δ1.15 singulete (22H); δ2.1 singulete (3H); δ2.8 triplete (2H); δ3.15 doblete (H); δ4.25 triplete (2H).

### Compuesto (III)

**Espectroscopía Infra-rojo:**

$\nu$ 1410  $\text{cm}^{-1}$  m(amida III);  $\nu$ 1505  $\text{cm}^{-1}$  m(amida II);  $\nu$ 1650  $\text{cm}^{-1}$  f(amida I);  $\nu$ 1900  $\text{cm}^{-1}$  m(alifáticos).

**Resonancia Magnética Nuclear:**

δ2.32 singulete (3H); δ2.4 singulete (3H); δ3.05 triplete (2H); δ4.45 triplete (2H); δ7.35 multiplete (4H); δ8.05 singulete (H).

Compuesto (IV).

Espectroscopía Infra-rojo:

$\nu$ 1375  $\text{cm}^{-1}$  m(amida III);  $\nu$ 1510  $\text{cm}^{-1}$  f(amida II);  $\nu$ 1630  $\text{cm}^{-1}$  f(amida I);  $\nu$ 1995  $\text{cm}^{-1}$  m(alifáticos).

Resonancia Magnética Nuclear:

61.2 triplete (3H); 62.0 singulete (3H); 63.05 triplete (2H); 64.0 cuadruplete (2H); 64.3 triplete (2H); 66.95 doblete (2H); 67.6 doblete (2H); 69.8 singulete (H).

5,6-Dihidro-2-metil-3(4'-nitrocarboxanilido)-1,4-Oxatiina (V).

Se aplicó el procedimiento descrito por Paul Ruggli Jürg Rohner<sup>1,2</sup> como sigue:

En un matraz de bola de una boca equipado con agitador magnético y refrigerante se pusieron 1 g (0.0062 moles) de -- (XIV), 40 ml de cloroformo y 1 ml (0.0137 moles) de cloruro de tionilo. La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas.

Al final de este tiempo se evaporó el disolvente y el ex<sup>o</sup>ceso de cloruro de tionilo. El residuo se diluyó en benceno y lentamente y con agitación vigorosa se agregaron 0.7 g (0.005 moles) de p-nitroanilina disuelta en dietilamina. La mezcla se puso a reflujo durante 10 horas sobre baño de agua hirviendo.

Se evaporó totalmente el disolvente, se agregó agua y

se extrajo con acetato de etilo. La fracción orgánica se filtró a través de una columna de alúmina ácida para retener el exceso de amina, eluyendo con benceno. Enseguida se evaporó parcialmente el disolvente; el residuo obtenido se recristalizó de benceno/hexano para dar 0.79 g (87% del teórico) de producto amarillo cristalino con punto de fusión de 138-9°C.

#### Espectroscopía Infra-rojo:

$\nu$ 3340  $\text{cm}^{-1}$  f(N-H);  $\nu$ 3050  $\text{cm}^{-1}$  m(C-H);  $\nu$ 2925  $\text{cm}^{-1}$  d(C-H);  
 $\nu$ 1690  $\text{cm}^{-1}$  f(-C-);  $\nu$ 1605  $\text{cm}^{-1}$  (NH-C-);  $\nu$ 1585  $\text{cm}^{-1}$  f(C=C).

#### Resonancia Magnética Nuclear:

$\delta$ 2.1 singulete (3H);  $\delta$ 3.1 triplete (2H);  $\delta$ 4.3 triplete (2H);  $\delta$ 8.2 multiplete (4H); singulete a bajo campo.

#### 5,6-Dihidro-2-metil-3(4'-aminocarboxanilida)-1,4-Oxatiina (VI).

Se modificó el procedimiento descrito en la patente No. 6 605, 525 U.S.<sup>142</sup> como sigue:

En un matraz de hola de una boca equipado con agitador magnético y refrigerante se pusieron 6 g (0.0375 moles) de -- (XIV), 37 ml de cloroformo y 6 ml de cloruro de tionilo. La mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas.

Posteriormente se destiló el disolvente y el exceso de cloruro de tionilo. El residuo se diluyó en benceno y lentamente y con agitación vigorosa se adicionaron 18 g (0.1616 moles) de p-fenilendiamina diluida en dioxano.

Se evaporó totalmente el dioxano, se agregó agua y se -

extrajo el producto con acetato de etilo. La parte orgánica se lavó con bicarbonato de sodio al 10%, seguido de sosa al 10% y agua. Se evaporó parcialmente el disolvente orgánico y se recristalizó de acetato de etilo/hexano, para dar 2.08 g (22.2% del teórico) de producto con punto de fusión de 123-4°C.

**Espectroscopia Infra-rojo:**

$\nu 3410 \text{ cm}^{-1}$  m(N-H);  $\nu 3280 \text{ cm}^{-1}$  f(N-H);  $\nu 2915 \text{ cm}^{-1}$  (C-H);  
 $\nu 1650 \text{ cm}^{-1}$  f( $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}$ -);  $\nu 1600 \text{ cm}^{-1}$  (NH- $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}$ -).

**Resonancia Magnética Nuclear:**

62.05 singulete (3H); 63.05 triplete (2H); 64.3 triplete (2H); 64.85 singulete (2H); 66.9 multiplete (4H); 69.5 singulete (H).

**5,6-Dihidro-2-metil-3(4'-hidroxicarboxanilida)-1,4-Oxatiina (VII).**

Se modificó el procedimiento descrito en la patente No. 6 605, 525 U.S.<sup>1,2</sup> como sigue:

En un matraz de bola de una boca equipado con agitador magnético y refrigerante se pusieron 2 g (0.0125 moles) de -- (XIV), 100 ml de cloroformo y 4 ml (0.055 moles) de cloruro de tionilo. La mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas.

Al cabo de este tiempo se destiló el disolvente y el exceso de cloruro de tionilo y el residuo se diluyó con benceno para adicionar lentamente y con agitación vigorosa 5.4 g (0.0495 moles) de p-hidroxilamina diluida en dioxano. Se agitó

toda la noche,

Al final de este tiempo se lavó la mezcla de reacción con ácido clorhídrico al 10% para quitar el exceso de amina y después con carbonato de sodio al 10% para extraer el exceso de (XIV) seguido de agua para quitar la basicidad. Enseguida se extrajo el producto con hidróxido de sodio al 10%. Se aciduló con ácido clorhídrico conc. y precipitó el producto que se separó por filtración. Se recrystalizó de metanol rindiendo de esta forma 1.43 g (46% del teórico) de producto, con -- punto de fusión de 165-6°C (sublima).

**Espectroscopía Infra-rojo:**

$\nu 3260 \text{ cm}^{-1}$  f(-OH);  $\nu 2915 \text{ cm}^{-1}$  d(C-H);  $\nu 1625 \text{ cm}^{-1}$  f(-C<sup>O</sup>-);  
 $\nu 1620 \text{ cm}^{-1}$  f(NH-C<sup>O</sup>-);  $1580 \text{ cm}^{-1}$  f(C=C).

**Resonancia Magnética Nuclear:**

62.0 singulete (3H); 63.0 triplete (2H); 64.25 triplete (2H); 67.2 multiplete (4H); 69.3 singulete (H); 69.65 singulete (H).

**Métodos Biológicos.**

Una vez preparados los compuestos que se presentan en la Tabla No. 2 se procedió a realizar la parte biológica del trabajo en la forma siguiente:

Se usaron tres tipos de bio-ensayos:

**Bio-ensayo A.**

1. Se prepararon dos emulsiones de cada compuesto (ver Tabla No. 2 en la pág. 10) a una concentración de  $10^{-3}$ M y

2000 ppm usando como emulsificante Tween 80.

2. Se seleccionaron plantas de tabaco de la misma edad y se marcaron de 3 a 6 hojas.

3. Se limpiaron las hojas con solución buffer de fosfatos pH 9.5 por ambos lados, procurando no lastimarlas.

4. Se aplicaron las emulsiones a las hojas de tabaco seleccionadas.

5. Se inocularon las hojas con Virus del Mosaico del tabaco (VMT) en emulsión preparada con buffer de fosfatos pH 9.5. Se usó carborundum para facilitar la penetración del VMT.

6. Se hizo una determinación control en la forma que se ha descrito, pero sin aplicar sustancia química.

7. Se dejaron pasar de 4 a 5 días y se contaron las lesiones causadas por el VMT sobre las hojas de tabaco y se midió el área foliar para calcular el número de lesiones por centímetro cuadrado.

8. Comparando el número de lesiones por centímetro cuadrado en hojas no tratadas (control) se calculó el % de crecimiento de VMT que se informa en las Tablas Nos. 3 y 4 respectivamente.

#### Bio-ensayo B.

Los pasos 1, 2, 3 y 4 se hicieron como en el bio-ensayo A.

El paso 5 se inoculó con VMT en emulsión, preparada con buffer 9.5 en una área constante de  $15.88 \text{ cm}^2$  que se marcó sobre las hojas usando tinta para sellos.

Los pasos 6, 7 y 8 se realizaron en la misma forma que en el bio-ensayo A. El % de crecimiento de VMT en relación a un control se muestra en la Tabla No. 5.

### Bio-ensayo C.

1. Se seleccionaron 4 hojas para cada sustancia de tamaño similar y se cortaron cuidadosamente por el peciolo.

2. Las hojas seleccionadas se colocaron en un vaso de precipitados que contenía la emulsión de la sustancia a prueba.

3. Se colocaron en una cámara con temperatura y humedad controladas para que se translocaran las sustancias durante 2 horas.

4. Se seleccionaron las tres mejores hojas, se eliminó el peciolo y se limpiaron cuidadosamente con solución buffer pH 9.5.

5. Se inoculó el VMT en emulsión en una área foliar - constante de  $7.068 \text{ cm}^2$  marcada en las hojas con tinta para sellos.

6. Se pusieron las hojas en cajas petri sobre papel filtro húmedo (2 ml de agua) y se colocaron en una cámara a temperatura y humedad controladas con períodos de luz/sombra de 12 horas durante 3 a 4 días.

7. Se contó el número de lesiones visibles y se estimó el % de crecimiento del VMT con relación a un control como en los bio-ensayos A y B. Los resultados se dan en la Tabla No. 6.

**Tabla No. 3. Desarrollo del V.M.T. en comparación con un control, por tratamiento de plantas con las sustancias de prueba con una concentración de  $10^{-3}M$  de acuerdo con el bio-ensayo A.**

---

Compuesto <sup>†</sup>	Experimento: (Desarrollo del virus en %)						
	1	2	3	4	5	6	7
I	170	181	90	96	53	48	115
III	144	72	50	--	--	88	82
V	117	92	59	--	--	48	62
VI	102	346	128	--	--	87	59
IV	142	281	160	--	--	62	128
VII	70	155	92	--	--	92	63
II	153	251	164	--	--	54	72
Control	100	100	100	100	100	100	100

---

<sup>†</sup>Ver pág. 9 para las estructuras de los compuestos.

Tabla No. 4. Desarrollo del V.M.T. en comparación con un --- control, por tratamiento de plantas de tabaco de acuerdo con el bio-ensayo A, en una concentración de 2000 p.p.m.

Compuesto	Desarrollo del virus en %		
	Experimento No.		
	8	9	10
I	9	63	121
III	--	49	64
V	--	55	168
VI	--	100	99
IV	--	88	186
VII	--	114	174
II	--	70	82
Control	100	100	100

Tabla No. 5. Desarrollo del V.M.T. por tratamiento de plantas de tabaco de acuerdo con el bio-ensayo B, a una concentración de  $10^{-3}$ M.

Compuesto	Experimento: (Datos en % del control)		
	11	12	13
I	38	51	--
III	108	60	131
V	64	49	--
VI	51	33	--
IV	62	41	--
VII	56	56	--
II	51	189	137
Control	100	100	100

Tabla No. 6, Desarrollo de V.M.T. por tratamiento de plantas de tabaco con las substancias de prueba a una concentración de 2000 ppm, de acuerdo con el bio-ensayo C.

---

Compuesto	Experimento (Datos en % de desarrollo del virus respecto a un control)	
	14	15
I	20	103
III	47	93
V	48	135
VI	10	74
IV	60	152
VII	10	170
II	29	98

---

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

1. Se sintetizaron vitavaz (5,6-Dihidro-2-metil-3carboxanilido-1,4-Oxatiina) y seis de sus análogos.
2. Se probó su actividad viricida contra el virus de mosaico del tabaco.
3. Los resultados de las pruebas biológicas parecen indicar que aunque hay inhibición del crecimiento en algunos casos, probablemente el estado fisiológico de la planta es muy importante y los resultados no fueron suficientemente reproducibles.
4. En necesario seguir investigando como influye el estado fisiológico de la planta en la acción viricida.

## BIBLIOGRAFIA

1. Muller, M.; Def. Veg., 22 (133), 239-248 (1968).
2. Ribrioue, M.; Def. Veg., 20 (165), 30-42 (1974).
3. B. Von Schmeling; Kulka, M.; Science, 152 (3722), 659-660 (1966).
4. Edgington, L. V.; Walton, G. S.; Miller, P. M.; Science, 153 (3733), 307-308 (1966).
5. Sekhon, A. S.; Colotelo, N.; Ac. Biol., 24 (1-2), 73-80 (1973).
6. Crisan, A.; Contrib. Bot. Gradina. Bot., 261-266 (1974).
7. Bhaskaran, R.; Madros Agric. J., 60 (7), 646-647 (1973).
8. Sankhla, B.; Sankhla, H. C.; Dalela, G. G.; Mathur, R. L.; Indian Phytopathol, 25 (2), 210-214 (1972).
9. Gupta, S. P.; Shukla, T. N.; Singh, P. P.; Indian J. Microbiol., 12 (2), 131 (1972).
10. Maude, R. B.; Kyle, Ann. M.; Ann. Appl. Biol., 66 (1), 37-41 (1970).
11. Manning W. J.; Glickman, M.; Plant Dis. Rep., 53 (6), 412-415 (1969).

12. Mills, J. T.; Wallace, H.A.H.; Can. J. Plant Sci., 48 (6), 587-594 (1968).
13. Mills, J. T.; Wallace, H.A.H.; Can. J. Plant Sci., 49 (5), 543-548 (1969).
14. Mills, J. T.; Wallace, H.A.H.; Can. J. Plant Sci., 50 (2), 129-136 (1970).
15. Richardson, L.T.; Can. J. Plant Sci., 52 (6), 949-953 (1972).
16. Chand. J. N.; Dang, J. K.; Kapoor, T. R.; Sci. Cult., 40 (2), 69-70 (1974).
17. Vir, D.; Gaur, A.; Pesticides, 7 (5), 15-22 (1973).
18. Shukla, U.S.; Nayar, S.K.; Sci. Cult., 39 (10), 454-455 (1973).
19. Perrotta, G.; Pacetto, M.; Tirro, A; Notiz Nat. Piante, (82-83), 51-63 (1970).
20. Mohanty, N. N.; Proc. Indian Nat. Sci. Acad. Part B, 37 (6), 433-440 (1971).
21. Granger, C.A.; Res. Life Sci., 16 (1), 15-17 (1968).
22. Maric, A.; Klocokar, Z.; Zast. Biljia, 21 (110-111), 269-283 (1970).
23. Haware, M. P.; Indian J. Mycol. Plant Pathol., 2 (2), 136-138 (1972).

24. Massenot, M.; Raynal, G.; Ferrari, F.; Ann. Phytopathol., 4 (3), 297-299 (1972).
25. Novakova, J.; Suchoman, K.; Agrochemia, 14 (6), 161-164 (1974).
26. Papavizas, G. C.; Lewis, J. A.; Plant Dis. Rep., 59 (1), 24-28 (1975).
27. Slattery, R.J.; Plant Dis. Rep., 52 (9), 692-695 (1968).
28. Kuehnel, W.; Manfred, A.; Nachrichtenbl. Pflanzenschutzdienst DDR, 27 (8), 165-169 (1973).
29. Kommedahl, T.; Lang, D. S.; Phytopathol., 63 (1), 138-140 (1973).
30. Lim, S. M.; Kinsey, J. G.; Plant Dis. Rep.; 57 (4), 344-346 (1973).
31. Saur, R.; Schoenbeck, F.; Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz, 82 (3), 173-175 (1975).
32. Kushwaha, L. S.; Khare, M. N.; JNKVV Res. J., 8 (1), 58-59 (1974).
33. Shanmugan, N.; Govindaswamy, G. V.; Madras Agric. J., 60 (7), 500-503 (1973).
34. Ilyas, M. B.; Ellis, M. A.; Sinclair, J. B.; Plant Dis. Rep., 59 (4), 360-364 (1975).
35. Spiers, A.G.; N. Z. J. Exp. Agric., 2 (4), 433-436 (1974).

36. Froiland, G. E.; Littlefield, L. J.; Plant Dis. Rep., 56 (9), 737-739 (1972).
37. Gorska, P.; J. Acta Phytopathol., 6 (1-4), 393-398 (1971).
38. Sangawongse, P. T.; J. Agric. Sci., 6 (2), 165-169 (1973).
39. Okaisabor, E. K.; Phytopathol. Z., 69 (2), 125-130 (1970).
40. Manco, G.R.; Rev. Theobroma, 3 (1), 3-13 (1973).
41. Srinivasan, N.; Jeyarajan, R.; Hind. Antibiot. Bull., 17 (1-2), 7-11 (1974).
42. Patil, B.P.; Pesticides, 8 (8), 23-25 (1974).
43. Foschi, S.; Suampa, G.; Inform. Fitopatol., 23 (4), 5-9, (1973).
44. Suampa, G.; Inf. Fitopatol., 24 (4), 23-25 (1974).
45. Singh, J.P.; Plant Dis. Rep.; 59 (2), 200-202 (1975).
46. Zadoks, J.C.; Kodde, A.; Hoogkamer, W.; Neth. J. Plant Pathol., 75 (112), 193-196 (1969).
47. Grouet, D.; Allaire, L.; Phytiat. Phytopharm., 22 (2), 177-188 (1973).

48. Murdoch, C.L.; Laemmlen, F.F.; Parvin, P.E.; Plant Dis. Rep., 57 (3), 317-319 (1973).
49. Noeddegaard, E.; Hansen, K.E.; tidsskr. Planteavl., 78 (5), 635-651 (1974).
50. Lewartowski, R.; Biul. Inst. Ochr. Rosl., 54, 327-337 (1974).
51. Grover, R.K.; Deitt, S.; Indian J. Mycol. Plant. Pathol., 2 (2), 98-102 (1972).
52. Ahmadinajab, A.; Iran J. Plant. Pathol., 9 (3-4), 129-141 (1973).
53. Bochow, H.; Luc., L. H.; Sung., Ph. Q. Acta Phyto. Pathol. 6 (1-4), 399-414 (1971).
54. Garg, F. C.; Tauro, P.; Grover., R.K.; Indian J. Microbiol. 13 (3) 179-81 (1973).
55. Jain, N. K.; Khare, M.N.; Mysore J. Agric. Sci., 6 (4), 461-65 (1972).
56. Fr. Pat. 477,062; Schmelling, B. V.; Kulka, M.; Thiara, D.S.
57. Darrag, I.E.A., Sinclair, J. B.; Plant. Dis. Rep. 52 (5) 399-403 (1968).
58. Borum, D.E.; Sinclair, J.B.; Phytopathol. 58, (7) 976-980 (1968).

59. Ab-Beldawi, A.S.; Diss. Abstr. Int. B, 30 (7) 2980-2981 (1970).
60. Ab-Beldawi, A.S.; Pinckard, J.A.; Plant Dis. Rep. 54 (6) 524-528 (1970).
61. Kiewnick, L.; Meded, Rijksfac. Landbouwwetensch. Gent., 34 (3) 862-868 (1969).
62. Follin, J. C.; Diallo, D.; Cotton Fibres Trop. 26 (3) 303-308 (1971).
63. Patil-Kulkarni, B.G.,; Mysore J. Agr. Sci., 6 (1) 1-4 (1972).
64. Ab-Beldawi, A.S.; Welleed, B.K.; Phytopathol. Mediterr., 12 (1) 87-88 (1973).
65. Ramaswamy, R.; Mathar, A.S.; Ramakrishnan, C.; Rajamahan, N.; Madras, Agric. J. 60 (7) 595 (1973).
66. Wazny, J.; My Dung Van.; Grzwacz, Andrzed.; Zesz. Nauk. Akad. Rold. Warszawie, Lesn 22 39-41 (1975).
67. Mukhopadhyay, A.N.; Thakur, R.P. Plant. Dis. Rep. 55 (7) 630-634 (1971).
68. Alfieri, S. A. Jr.; Knauss, J. F. Proc. Fla. State Hort. Soc. (Pub. 1973) 85 352-357 (1972).
69. Bahadur, P.; Sinha, V. C.; Upadhyaya, Y.M.; Pesticides 8 (9) 42-44 (1974).

70. Agnihotri, V.P.; Sen., C.; Srivastava, S.N.; Indian J. Exp. Biol. 13 (1) 89-91 (1975).
71. Maiti, S.; Chaudhuri, S.; Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz, 82 (4) 233-235 (1975).
72. Koishibaer, M.; Khim. Sel'sk. Khoz. 12 (10) 765-766 (1974).
73. Manninger, I.; J. Acta Phytopathol. 6 (1-4) 423-425 (1971).
74. Koch, W.; Pestic. Sci. 2 (5) 207-210 (1971).
75. Hoffman, J. A.; Plant. Dis. Rep. 55 (12) 1132-1135 (1971).
76. Mulholland, R. I.; Proc. N. Z. Weed Pest. Control Conf. 25 165-168 (1972).
77. Baicu, T.; Nagler, M.; Rascanescu, M. Paulian, Fl., Agr. Silvice 9 425-431 (1971) pub. 1973.
78. Doncher, N.; Govedarov, I.; Dimov, A.; Dobrev, D.; Rastenievud, Nauki 11 (6) 121-127 (1974).
79. Wells, H. D.; Plant. Dis. Rep. 51, (6) 468-469 (1967).
80. England Pat. 1, 124310 (1968).
81. Hardison, J.R.; Crop. Sci., 6 (4), 384 (1966).
82. Crete, R.; Tartier, L.; Phytoprotection, 54 (1), 32-42 (1973).

83. Garibaldi, A.; Pergola, G.; Not. Mal. Piante, 81-89 (1973).
84. Glaser, T.; Bilinski, W.; Glaser, J.; Pr. Inst. Sadow. Skierniewice, Ser. E., 4, 1-7 (1974).
85. Hegde, R. K.; Patil-Kulkarni, B.G.; Shetty, K.P.V.; Gowda, N.; Pesticides, 8 (10), 21-22 (1974).
86. Del Rivero, J.M.; Gasco, J.L.; Tuset, J. J.; Roig, F.J.; Tecnol. Aliment., 9 (2), 258-261 (1969).
87. Formigani, A.; Not. Mal. Piante, 57-66, 90-91 (1974).
88. Yamamoto, T.; Campacci, C.A.; Suzuki, U.; Oi, A.; Biológico, 37 (10), 266-271 (1971).
89. Maric, A.; Klokocar, Z.; Zast. Biljia, 21 (110-111), 357-363 (1970).
90. Kuiper, J.; Aust. J. Exp. Agr. Anim. Husb.; 8 (31), 232-237 (1968).
91. Richard, G.; Cognet, J.; Meded. Rijksfac. Landbouwwetensch. Gent., 33 (3), 1093-1102 (1968).
92. Maude, R.B.; Shuring, C. G.; Ann. Appl. Biol., 64 (2), 259-263 (1969).
93. Macer, R.C.F.; Cook, I.K.; Dasch, C. R.; Proc. Brit. Insectic Fungic. Conf. 5th. 1, 55-64, (1969). Pub. 1970.
94. Eade, R.P.; Proc. No. 7 Wee Pest Control Conf., 25, 155-159 (1972).

95. Thompson, W.J.; Mulholland, R.I.; Proc. N.Z. Weed Pest. Control Conf. 25, 160-164 (1972).
96. Hulea, A.; Sandru, I.; Bunescu, S.; Piticas, Gh. Probl. Ag. 24 (9), 55-61 (1972).
97. Mishra, R.P.; Jain, A. C.; Pesticide, 7 (3), 19, 21 (1973).
98. Krojny, P.; Agrochemia 15 (1), 23-26 (1975).
99. Tyler, L. J.; Plant Dis. Rep.; 53 (9), 733, 736 (1969).
100. Tyagi, P. D.; Indian J. Agr. Sci., 42 (9), 845-846 (1972).
101. Dang, J.K.; Tyagi, R.C.; Pesticides, 7 (11), 19-20 (1973).
102. Gothwal, B.D.; Gupta, I. J.; Gandhi, S. M.; Sharma, B.S.; Indian J. Mycol. Plant. Pathol., 2 (2), 183-184 (1972).
103. Ragsdale, N. N.; Sisler, H.D.; Phytopathol., 60 (10), 1422-1427 (1970).
104. Shiveley, O. D.; Mathre, D. E.; Can. J. Microbiol., 17 (11), 1465-1470 (1971).
105. Mathre, D.E.; Pestic. Biochem. Physiol., 1 (2), 216-224 (1971).
106. Georgopoulos, S. G. Alexandrin, E.; Chrysayi, M.; J. Bacteriol., 110 (3), 809-817 (1972).

107. Mathre, D.E.; *Phytopathol.* 60 (4), 671-676 (1970).
108. Kirk, B.T.; Sinclair, J. B.; Lambremont, E.N.; *Phytopathol.*, 59 (10), 1473-1476 (1969).
109. Snel, M.; Edgington, L.I. V.; *Phytopathol.*, 60 (12), 1708-1716, (1970).
110. Gray, L.E.; Sinclair, J. B.; *Phytopathol.*, 60 (10), 1486-1488 (1970).
111. Wallnoefer, P.; *Naturwissenschaften*, 55 (7), 351 (1968).
112. Wallnoefer, P.; *Arch. Mikrobiol.*, 64 (4), 319-326 (1969).
113. Allain, A. I.; Sinclair, J. B.; *Phytopathol.*, 59 (10), 1548-1549 (1969).
114. Wallnoefer, P.R.; Koeniger, M.; Safe, S.; Hutzinger, O.; *Int. J. Environ, Anal. Chem.*, 2 (1), 37-43 (1972).
115. Chin, Wei-Tsung; Kucharczyk, N.; Smith, A. E.; *J. Agr. Food Chem.* 21 (3), 506-507 (1973).
116. Chin, Wei-Tsung; Stone, G.M.; Smith, A. E.; *J. Agr. Food Chem.* 18 (4), 709-712 (1970).
117. Chin, Wei-Tsung; Stone, G. M.; Smith, A. E.; *J. Agr. Food Chem.* 18 (4), 731-732 (1970).
118. Lane, J.R.; *J. Agr. Food Chem.*; 18 (3), 404-412 (1970).

119. El-Dib, M. A.; Aly, O.A.; J. Ass. Off. Anal. Chem. 55 (6), 1276-79 (1972).
120. Kaker, P.B.; Farrow, J. E.; Hoodless, R. A.; J. Chromatogr., 81 (1), 174-177 (1973).
121. Onuska, F.I.; Comba, M.E.; J. Chromatogr., 100 (1), 247-248 (1974).
122. Wolkoff, A. W.; Onuska, F.I.; Comba, M.E.; Larose, R.H.; Anal. Chem., 47 (4), 754-756 (1975).
123. Sinha, O.K.; Uyas, S.C.; Joshi, L. K.; J. Chromatogr., 110 (2), 403-405 (1975).
124. Tripathi, R.K.; Bhaktovatsalam, G.; J. Chromatogr., 87 (1), 283-286 (1973).
125. Snel, M.; Schmeling B.V.; Edgington, L. V.; Phytopathol., 60 (8), 1164-1169 (1970).
126. Hardison, J. R.; Phytothol., 61 (6), 731-735 (1971).
127. Mathre, D. E.; J. Agr. Food Chem., 19 (5), 872-974 (1971).
128. White, G.A.; Thorn, G. D.; Pestic. Biochem. Physiol., 5 (4), 380-395 (1975).
129. U. S. Pat. 3, 249, 499 (1966); Schmeling, B. V.; Kulka, M.; Thiara, D. S.; Harrison, W. A.

130. U.S. Pat. 3, 728, 357 (1973); Knight, B. I.; Gurcumelli-Rodostamo, M.; Kulka, M.; Schmeling, B. V.
131. Op. Cit. # 129 vide supra.
132. Op. Cit. #130 vide supra.
- 133a. Vogel A. I.  
A Text-book of Practical Organic Chemistry  
Third Edition (1956)  
Editorial Longman  
Pag. 372-374.
- 133b. Fieser L. F.; Fieser, M.  
Reagents for Organic Syntheses  
John Wiley and Sons, Inc.  
Pag. 528-535 (1967).
- 133c. Williams, J. W.; Hurd, Ch. D.; J. Org. 5, 122-125 (1940).
- 134 Williams, J. W.; Krynitsky, J. A.  
Organic Syntheses. Coll. Vol. 3; John Wiley and Sons.  
Inc., Pag. 508-509 (1967).
135. Williams J. W.; Krynitsky, J. A.  
Organic Syntheses. Coll. Vol. 3; John Wiley and Sons.  
Inc.; Pag. 10-11 (1967).
136. L. V. Edgington; G. L. Barron; Phytopathological, 57  
(11), 1256-1257 (1967).
137. Allam, A.I.; Sinclair, J.B.; Schilling, P. E.; J.  
Bacteriology, 110 (2), 628-632 (1972).

138. Helling, C. S.; Dennison, D. G.; Kaufman, D.D.; *Phytopathol.* 64 (8), 1091-1100 (1974).
139. Ulrich, J.T.; Mathre, D.E.; *J. Bacteriol.* 110 (2), 628-632 (1972).
- 140.
141. Op. Cit. #135 vide supra.
142. *Neth. Pat.* 6,605,525 (1966).
143. Ruggli, P.; Rohner, J.; *Helv. Chem. Acta*, 25, 1533-1542 (1942).
144. *U.S. Pat.* 3,657,449 (1972).
145. Grafe, A.; Liebig, H.; Pfetzing, H.; *Arzneimittel-Forschung* 24 (2), 153-157 (1974).
146. Liebig, H.; Pfetzing, H.; Grafe, A.; *Arzneimittel-Forschung*, 24 (6), 887-892 (1974).
147. Grafe, A.; Liebig, H.; Pfetzing, H.; *Arzneimittel-Forschung*, 24 (7), 1048-1051 (1974).
148. Cors, F.; Kummert, J.; Semal, J.; Meded, *Fac. Landbouwetensch Rijksuniv Gent* 36 (3), 1066-1070 (1971).
149. Tesis de Magdalena Carbajal.- Tesis de Maestría-Chapingo México (1975).
150. Whiffen, D.H.; Thompson, H.W.; *J. Chem. Soc.*, 1005-1009 (1946).

APENDICE

Tabla No. 1

Microorganismos susceptibles a la acción de Vitavaz y Plantvaz.

- Altenaria brassicae.<sup>6</sup>
- Alternaria macrospora.<sup>7</sup>
- Alternaria triticina.<sup>8</sup>
- Alternaria pisi.<sup>9</sup>
- Aspergillus niger.<sup>10</sup>
- Botrytis cinerea.<sup>11</sup>
- Cochliobolus sativus.<sup>12,13,14,15</sup>
- Colletrotrichum arbutulare.<sup>6</sup>
- Colletrotrichum falcatum.<sup>16</sup>
- Colletrotrichum psidii.<sup>17</sup>
- Dematophora necatrix.<sup>18</sup>
- Deuterophoma tracheiphila.<sup>19</sup>
- Ephelis crysae.<sup>20</sup>
- Exobasidium vaccinnii.<sup>21</sup>
- Fusarium graminearum.<sup>22</sup>
- Fusarium lini.<sup>23</sup>
- Fusarium roseum avanaceum.<sup>24</sup>
- Fusarium septoria.<sup>25</sup>
- Fusarium solani.<sup>26</sup>

*Gymnosporangium juniper-virginianae*.<sup>27</sup>  
*Helminthosporium gramineum*.<sup>28</sup>  
*Helminthosporium maydis*.<sup>29,30</sup>  
*Helminthosporium sativum*.<sup>31</sup>  
*Helminthosporium torulosum*.<sup>32</sup>  
*Macrophomina phaseoli*.<sup>33</sup>  
*Macrophomina phaseolina*.<sup>34</sup>  
*Melampsora larici-populina*.<sup>35</sup>  
*Melampsora lini*.<sup>36</sup>  
*Nigrospora cryzae*.<sup>22</sup>  
*Ophiobolus graminis*.<sup>37</sup>  
*Phakopsora pachyrhizi*.<sup>38</sup>  
*Phytophthora palmivora*.<sup>39,40</sup>  
*Plasmopora viticola*.<sup>41</sup>  
*Puccinia arachidis*.<sup>42</sup>  
*Puccinia graminis*.<sup>43,44</sup>  
*Puccinia helianthi*.<sup>45</sup>  
*Puccinia horiana*.<sup>46,47</sup>  
*Puccinia striiformis*.<sup>48,49</sup>  
*Puccinia triticina*.<sup>50</sup>  
*Pythium aphanidermatum*.<sup>51,52</sup>  
*Pythium debaryanum*.<sup>53</sup>  
*Rhizobium meliloti*.<sup>54</sup>  
*Rhizoctonia bataticola*.<sup>55</sup>  
*Rhizoctonia solani*.<sup>56,57,58,59,60,61,62,63,64</sup>

Rhizopus sp.<sup>65</sup>  
Schizophyllum commune.<sup>66</sup>  
Sclerotium rolfsii.<sup>61,67,68,69,70,71</sup>  
Sphacelotheca panici-miliacei.<sup>72</sup>  
Sphacelotheca reiliana.<sup>73</sup>  
Sphaerotheca fuliginea.<sup>74</sup>  
Tilletia caries.<sup>75,76</sup>  
Tilletia foetida.<sup>77</sup>  
Tilletia levis.<sup>78</sup>  
Tilletia tritici.<sup>74</sup>  
Tolyposporium penicillariae.<sup>79</sup>  
Trichophyton mentagrophytes.<sup>80</sup>  
Typhula incarnata.<sup>81</sup>  
Urocystis agropyri.<sup>81</sup>  
Uronyctis mágica.<sup>82</sup>  
Uromyces caryophyllinus.<sup>83,84</sup>  
Uromyces fabae.<sup>85</sup>  
Uromyces phaseoli.<sup>3,86,87</sup>  
Uromyces phaseoli tipica.<sup>86,88</sup>  
Ustilago hordei.<sup>89</sup>  
Ustilago maydis.<sup>4,5</sup>  
Ustilago nuda<sup>3,89,90,91,92,93,94,95,96,97,70</sup>  
Ustilago tritici.<sup>70,90,92,99,100,101,102</sup>