

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

186



SINTESIS DE MALEIMIDAS Y BISMALEIMIDAS  
Y SU APLICACION COMO REACTIVOS DE ENTRECruzAMIENTO

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Q U I M I C O

PRESENTA

**ANA LUISA SILVA PORTILLO**

MEXICO, D. F.

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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** DRA. ELVIRA SANTOS DE FLORES  
**VOCAL:** DR. BLAS LOTINA HENNSENN  
**SECRETARIO:** M. en C. EDUARDO MARAMBIO DENNETT  
**1er. SUPLENTE:** Q.F.B. IGNACIO HUERTA BERDEJA  
**2do. SUPLENTE:** Q. JOSE MANUEL MENDEZ STIVALET

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.  
División de Estudios de Posgrado.



DEPTO. DE PASANTES  
EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

**SUSTENTANTE**

*Ana Luisa Silva Portillo*  
\_\_\_\_\_  
ANA LUISA SILVA PORTILLO

**ASESOR DEL TEMA:**

*Eduardo Marambio Dennett*  
\_\_\_\_\_  
M. en C. EDUARDO MARAMBIO DENNETT

- A tí "SEÑOR"  
te doy las gracias  
porque me has dado lo más hermoso:  
LA VIDA

A la memoria de mi PADRE  
JORGE SILVA IZAZAGA  
porque juntos, aunque distantes  
hemos compartido todo.

A la persona más valiosa de mi vida  
mi MADRE  
RAQUEL PORTILLO VDA. DE SILVA  
porque ha sido mi mejor amiga y compañera,  
porque me ha dado todo el apoyo necesario  
y gracias a ella  
he podido alcanzar lo que ahora tengo.

**A mis HERMANOS:  
MA. DE LOURDES y JORGE SILVA PORTILLO  
por el apoyo, cariño y comprensión  
que me han brindado.**

**A mis FAMILIARES  
con el cariño y respeto que se merecen.**

En especial quiero agradecer al  
M. en C. EDUARDO MARAMBIO DENNETT  
quien siempre me otorgo una amistad singular  
y un gran cariño.  
Gracias a su gran calidad profesional y humana  
he podido desarrollar esta tesis.

Con especial cariño a la  
DRA. MARTA ALBORES VELAZCO  
porque ha sido siempre un ejemplo  
y estímulo en mi carrera,  
porque me ha brindado su amistad,  
apoyo y comprensión  
y gracias a su asesoramiento  
he podido realizar esta tesis.



Con agradecimiento a la U.N.A.M  
bajo cuyo patrocinio fué  
posible la culminación de este trabajo.

A mis MAESTROS  
con el respeto que se merecen  
les doy las gracias por su noble labor docente.

Quiero hacer patente mi agradecimiento a  
LUIS CAMILO RIOS CASTAÑEDA  
cuyo cariño, comprensión y estímulo  
he encontrado en todo momento.

A mis AMIGOS y COMPAÑEROS  
por la amistad que me han brindado.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
por los conocimientos que me apporto  
en la etapa más trascendental de mi vida.

Al honorable JURADO.

## I N D I C E

	Pag.
I.- INTRODUCCION .....	1
II.- ANTECEDENTES .....	4
III.- DISCUSION Y RESULTADOS .....	21
IV.- PARTE EXPERIMENTAL .....	55
V.- CONCLUSIONES .....	67
VI.- BIBLIOGRAFIA .....	70

**I N T R O D U C C I O N**

En la fotosíntesis, las reacciones químicas que dependen de la energía luminosa se encuentran localizados en el sistema membranoso laminar del cloroplasto, los productos de estas reacciones fotodependientes son el NADPH y el ATP, los cuales se utilizan en la síntesis de carbohidratos que se llevan a cabo en el estroma del cloroplasto.

Se ha establecido<sup>1</sup> que la membrana de los tilacoides contiene una enzima unida a él, llamada factor de acoplamiento-- (CF<sub>1</sub>), la cual cuando se ve afectada por la luz sufre cambios conformacionales y además, se ha descubierto que dicha enzima es más afectada a ciertos compuestos cuando las reacciones se hacen en presencia de luz que cuando se hacen en la oscuridad.

Los estudios de modificación química se han encaminado a encontrar cual o cuales son los componentes que cambian su configuración estructural al verse afectados por la luz y el papel que estos desempeñan en la fotosíntesis, para lo cual el empleo de reactivos de entrecruzamiento ha sido de gran utilidad.

El uso de reactivos monofuncionales y bifuncionales para modificar la membrana del tilacoide a nivel de grupos sulfhidrilo en condiciones de transporte de electrones y síntesis de ATP ha mostrado actividad diferente.

McCarty et al<sup>2,3</sup> han encontrado que orto-fenilenbismaleimida (OPDM) y ditiobis-N-etilmaleimida (DTEM) inhiben la fosforilación a concentraciones 500 veces más bajas que N-etilmaleimida (NEM).

Así mismo maleimidias bifuncionales<sup>4</sup> tales como: 1,6-hexametilenbismaleimida; 1,4-tetrametilenbismaleimida y bismaleimidometil eter han sido probados como inhibidores de la fosforilación encontrándose que la variación de la longitud de la cadena de los centros reactivos ( $\text{C}=\text{C}$ ) modifica la síntesis de ATP dependiendo de la separación de dichos centros.

Las ideas anteriores conducen a completar el estudio de síntesis de maleimidias bifuncionales con la menor distancia posible de los centros reactivos. Así mismo a efectuar una comparación de la actividad de algunas de estas maleimidias con las antes mencionadas.

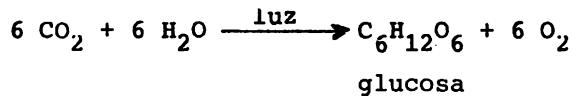
**A N T E C E N D E N T E S**



## BIOQUIMICOS

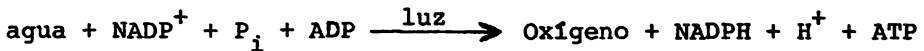
La fotosíntesis<sup>5</sup> que podemos definir como el empleo de la energía de la luz solar por células de las plantas para -- efectuar la biosíntesis de sus componentes celulares, es un-- proceso metabólico fundamental para todos los organismos vivos.

La ecuación general de la fotosíntesis puede representarse como sigue:



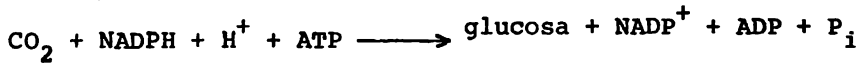
El proceso ocurre en dos fases:

1) La captación de la energía luminosa por los pigmentos que absorben la luz convirtiéndola en la energía química del ATP y de agentes reductores especialmente el NADPH. Esto se puede representar como:



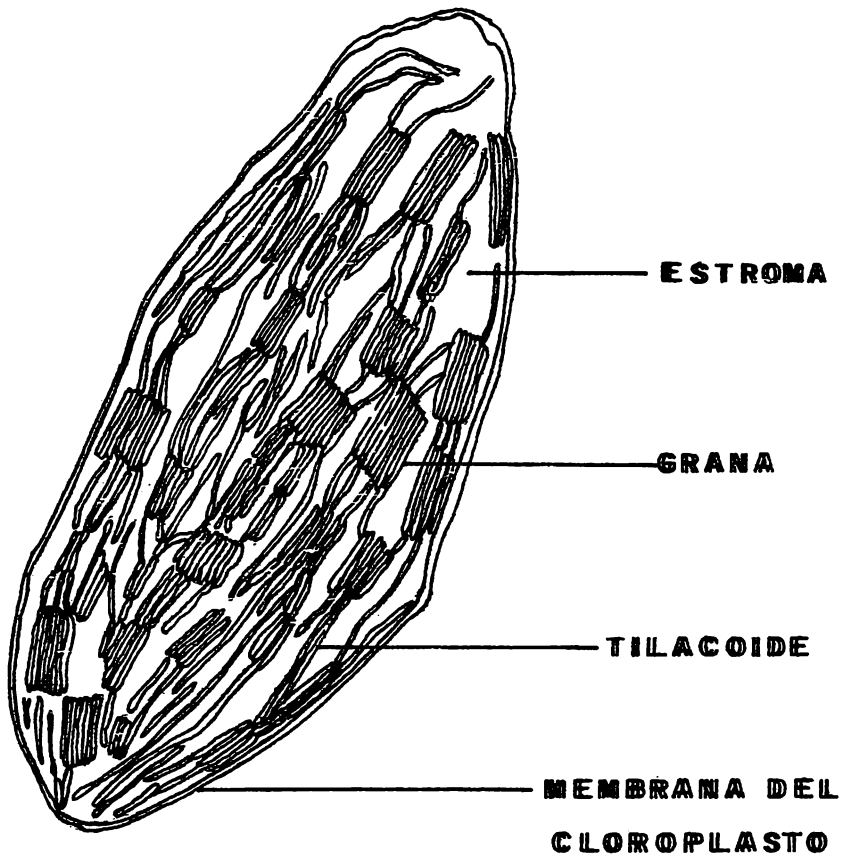
2) En la segunda fase de la fotosíntesis los productos químicos de alta energía de la primera fase, el NADPH y el ATP se emplean como fuente energética para efectuar la reducción del  $\text{CO}_2$  y producir glucosa; simultáneamente el NADPH se reoxida a  $\text{NADP}^+$  y el ATP se es-- ciende de nuevo en ADP mas  $\text{P}_i$ . Esto se representa como:

### Fase oscura



El aparato fotosintético de las células eucarióticas se halla localizado en los cloroplastos que están rodeados de una membrana exterior única que es bastante frágil (Fig. 1). El sistema de la membrana interna, que es continua pero dispuesta en pliegues pareados llamados laminillas, circunda a un compartimiento que contiene el estroma que es comparable a la matriz mitocondrial. A intervalos regulares, las laminillas se ensanchan para formar sacos membranosos aplanados, o vesículas llamadas tilacoides que aparecen en un apilamiento llamado grana. Las membranas apareadas entre los grana se llaman laminillas intergranales. Tanto las membranas de los tilacoides como las laminillas intergranales contienen los pigmentos fotosintéticos del cloroplasto, así como las enzimas que se necesitan para las reacciones primarias dependientes de la luz.

Todas las células fotosintéticas contienen uno o más de los pigmentos conocidos como clorofilas. Las plantas superiores tienen dos clases de clorofila, designados como clorofila a y clorofila b, las cuales son los principales pigmentos absorbentes de la luz. Existen otros pigmentos llamados pigmentos accesorios, los cuales funcionan también como receptores de la energía luminosa. Se hallan entre ellos los carotenos.



ESQUEMA DE UN CLOROPLASTO

Figura 1

tenoides y ficobilinas.

Los pigmentos fotosintéticos de los cloroplastos de las plantas se hallan organizados en dos conjuntos o agrupaciones funcionales, fotosistemas I y II (PS I y PS II), que a su vez están conectados con cadenas de transporte electrónico (Fig.2)

El fotosistema I y el fotosistema II actúan como impulsores de electrones a lo largo de una serie de transportadores electrónicos desde el agua al  $\text{NADP}^+$ . El flujo de electrones a lo largo de la cadena se lleva a cabo de la siguiente manera:

Un cuanto de energía luminosa absorbida en cualquier parte de la unidad fotosintética, ya sea una molécula de carotenoide o de clorofila, emigra a través del conjunto de moléculas de pigmentos, según un proceso llamado transferencia de excitones, hasta que alcanza a una sola molécula de  $\text{P}_{700}$ , la cual es un pigmento formado por clorofila "a" asociado a un tipo específico de proteína que presenta un máximo de absorción a 700 nm, la cual acepta el excitón y como consecuencia pierde un electrón que posee una gran cantidad de energía, quedando éste oxidado ( $\text{P}_{700}^+$ ). La captura de fotones y la transferencia de excitones se produce en el otro sistema hasta que el excitón llega a la otra clorofila especializada  $\text{P}_{680}$ , centro reactivo del fotosistema II que pierde entonces un electrón, quedando también oxidado ( $\text{P}_{680}^+$ ).



Así el electrón que se pierde del pigmento  $P_{700}$  del PS I es transferido a su aceptor electrónico primario, un pigmento designado como  $P_{430}$ . Los electrones entonces fluyen-- por la vía de una cadena de transportadores electrónicos--- hasta el  $NADP^+$  produciendo su reducción para dar NADPH. Después de luego, se precisan de dos electrones para reducir a cada molécula de  $NADP^+$ . Por otro lado, el electrón que pierde el pigmento  $P_{680}$  del PS II, es transferido a  $P_{700}^+$  para efectuar su reducción. Dicha transferencia desde el fotosistema II al fotosistema I se lleva a cabo por medio de transportadores electrónicos. Así los electrones procedentes de  $P_{680}^-$  y dos protones del exterior reducen la plastoquinona (PQ) a  $PQH_2$ . Se liberan electrones en el interior del tilacoide al transferir electrones al citocromo f. En seguida atraviesan la plastocianina (PC) hasta llegar al hueco de  $P_{700}^+$  (ox)-- el cuál se restaura a  $P_{700}$  (red). El electrón que se necesita para reducir a  $P_{680}^+$ , proviene del agua.

Así el transporte de electrones en los cloroplastos genera un gradiente de pH a través de la membrana. Este gradiente de pH formado provee la energía necesaria para la--- síntesis de ATP. Por lo que se puede decir que la fotofosforilación esta acoplada al flujo de electrones por un intermediario común: el gradiente prótonico.

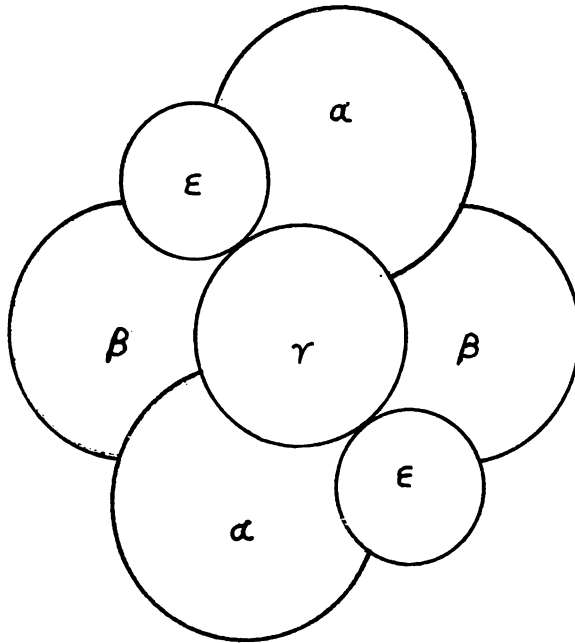
La síntesis de  $ATP^1$  acoplada al flujo de electrones se

lleva a cabo en el factor de acoplamiento ( $CF_1$ ) que es una enzima incolora, insoluble en agua y su peso molecular es de --- 325,000. Con ayuda de la electroforesis en gel se demostró --- que la proteína  $CF_1$  esta constituida por cinco componentes polipeptídicos designados de alfa a epsilon en orden decreciente a su peso molecular. Su esteoquímica probable es  $\alpha_2\beta_2\gamma\delta\epsilon_2$  (Fig. 3).

Dichas subunidades contienen grupos -SH necesarios para que se realice la fosforilación. Se ha demostrado que dichos grupos participan en la síntesis de ATP a través de la modificación de la conformación de la proteína inducida por la luz.<sup>6</sup>

La síntesis de ATP en los cloroplastos puede inhibirse<sup>7</sup> de diferentes maneras: por reactivos que inhiben el transporte de electrones o por sustancias que aumentan la permeabilidad del cloroplasto hacia protones pues desacoplan la fosforilación del flujo de electrones. Los inhibidores directos de la fosforilación que se llaman frecuentemente inhibidores de la transferencia de energía bloquean la fosforilación.

El comportamiento de las proteínas se ha podido establecer gracias al uso de reactivos de entrecruzamiento<sup>8</sup> los cuales nos ayudan a localizar las proteínas involucradas en los cambios que sufre la membrana, el papel que estos desempeñan en las funciones biológicas y la información acerca de la es



FACTOR DE ACOPLAMIENTO ( $CF_1$ )

PARA FOTOFOSFORILACION.

Figura 3



estructura de la proteína.

Aunque los detalles estructurales que se obtienen no son tan precisos como los que se tienen con la ayuda de técnicas espectroscópicas, éstas no se pueden usar en éste intervalo de dimensiones.

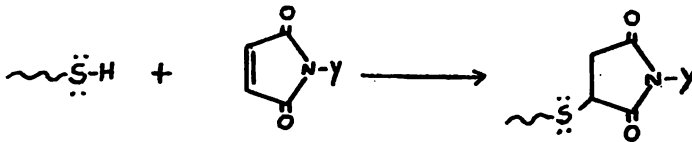
Las diferencias en entrecruzamiento en reactivos relacionados que difieren únicamente en la longitud de la cadena pueden proporcionar información sobre la cercanía de las asociaciones, además las distancias entre los centros reactivos del reactivo de entrecruzamiento pueden variarse e idealmente -- las uniones formadas deben ser lábiles a condiciones específicas de tal manera que se puedan romper y analizar para establecer las moléculas constituyentes.

Es muy importante la elección de los reactivos de entrecruzamiento y las condiciones de reacción. Las principales variables a considerar son el pH y la fuerza iónica. La hidrofili-  
licidad o hidrofobicidad de los reactivos de entrecruzamiento puede revelar el ambiente alrededor del entrecruzamiento y la penetración puede estar influida por las cargas o por la neutralidad del reactivo.

Una objeción importante al uso de reactivos de entrecruzamiento en estudios de membranas ha sido la posibilidad de--

que el entrecruzamiento ocurra frecuentemente, de manera azarosa.

Se han usado maleimididas como reactivos de entrecruzamiento ya que se sabe que estos reaccionan con grupos  $-SH^9$  formando uniones covalentes de la siguiente manera:

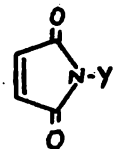


La primera maleimida probada como reactivo de modificación química en cloroplastos la efectuó McCarty et al<sup>6,10</sup>, con la N-etilmaleimida (NEM), encontrándose que se inhibía parcialmente la fosforilación cuando se iluminaban los cloroplastos en su presencia antes del ensayo de la fosforilación, y que no había inhibición cuando la reacción se efectuaba en la oscuridad.

Así mismo, McCarty et al han demostrado que las maleimididas bifuncionales de entrecruzamiento, o-fenilbismaleimida (OPDM) y ditiobis-N-etilmaleimida (DTEM) son inhibidores 500-veces más efectivos que la maleimida monofuncional N-etilmaleimida (NEM),<sup>2,3</sup>.

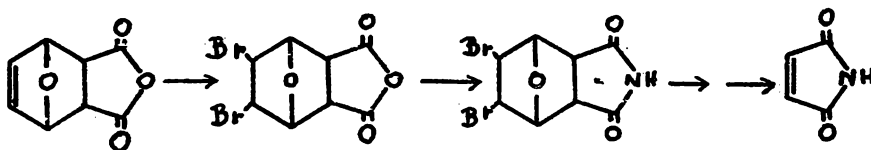
## SINTESIS DE MALEIMIDAS.

Las maleimidias N- substituidas son compuestos con fórmula general:



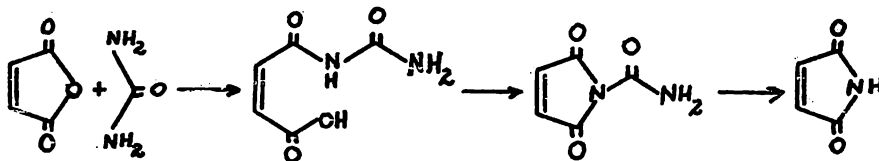
La más sencilla de todas es la maleimida (1-H-pirrol-2,5-diona, Y=H) cuya preparación data de 1904 en que Plancher y Cattadori<sup>11</sup> la obtuvieron a partir de la oxidación del pirrol con ácido crómico con rendimientos del 9%.

Berson y Swiller<sup>12</sup> considerando la baja temperatura para la reacción de retro Diels-Alder en la serie de furano prepararon el aducto furano-anhidrido maleico y siguiendo las transformaciones señaladas a continuación obtuvieron maleimida con un rendimiento total del 55%.

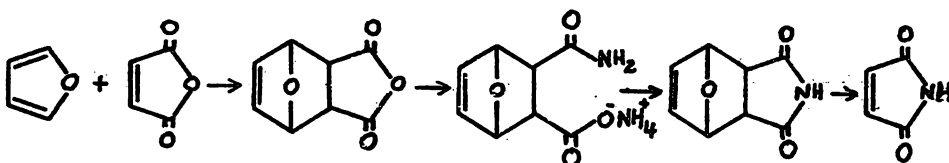


Otro método informado es el efectuado por Tawney et al<sup>13</sup> en el cuál prepararon maleimida a partir del anhidrido maleico y urea, formando en primera instancia el ácido N-carbamil-maleámico el cuál se cicliza en anhidrido acético dando la---

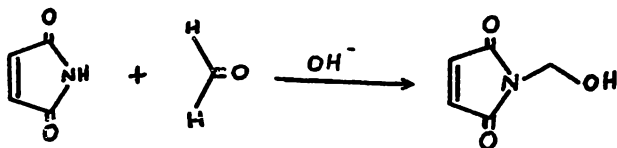
N-carbamilmaleimida que por pirólisis en N,N-dimetilformamida (DMF) da maleimida y ácido cianúrico.



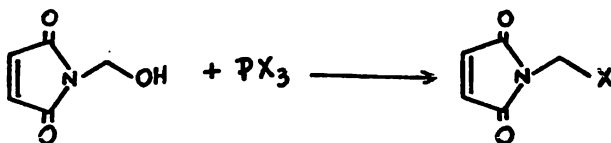
Otra ruta alternativa efectuada también por Tawney et al es por medio de la descomposición térmica de 3,6-endo-metilen- $\Delta^4$ -tetrahydroftalimida.



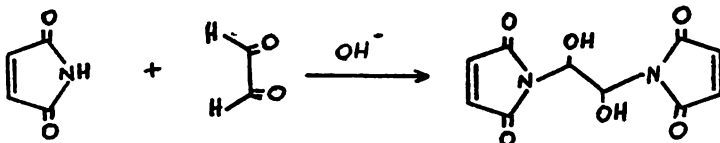
Considerando la química de las maleimidas se sabe que--- existen dos sitios reactivos sobre el anillo. La función carboximida y la doble ligadura. Cada uno tiene influencia sobre la reactividad del otro, causando que la maleimida sea un poco diferente a la carboximida de tipo cíclico u olefina cíclica. Aprovechando las ventajas de la función carboximida se han--- preparado<sup>14</sup> derivados N-sustituídos tales como N-metilolmaleimida, obtenida a partir de maleimida y formaldehído al 40% por medio de catálisis básica.



N-metilolmaleimida es materia prima para una serie de derivados como las N-halometilmaleimidias obtenidas por reacción de la N-metilolmaleimida con trihalogenuro de fósforo (PX<sub>3</sub>).



La N,N'-dihidroxietilenbismaleimida fue sintetizada a partir de maleimida con glioxal pero dicha síntesis esta limitada por adiciones catalíticas de base<sup>15</sup>. Estas adiciones deben de estar bien controladas con respecto al pH, ya que a pH mayor de 8 la imida se hidroliza, debe considerarse también que la reacción de Cannizzaro compite consumiendo el álcali y la solución llega a ser ácida. En tales casos la adición de bicarbonato de sodio a la reacción fue mejor que hidróxido de sodio para mantener la solución a un pH alcalino<sup>16</sup>.



Distintas maleimidas se pueden obtener con la reacción de anhídrido maleico y la amina correspondiente. En dichas síntesis se obtienen primero los ácidos maleámicos correspondientes los cuales pueden conducir a maleimidas o isomaleimidas dependiendo de la naturaleza de dichos ácidos y de las condiciones de deshidratación. Los reactivos más comunmente empleados para efectuar la deshidratación de ácidos maleámicos a maleimidas son: pentóxido de fósforo, anhídrido acético mas acetato de sodio, cloruro de acetilo y cloruro de tionilo<sup>17,18,19</sup>.

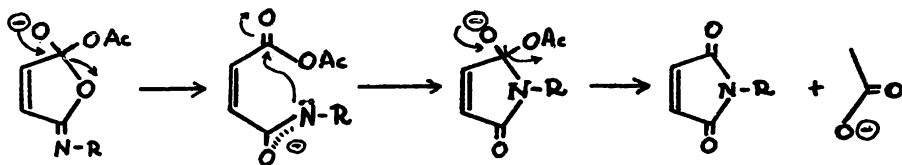
También pueden obtenerse las maleimidas por calentamiento directo de anhídrido maleico y la monoamina en xileno<sup>20</sup>.

Los reactivos informados para la síntesis de isomaleimidas son: cloruro de acetilo, oxiclóruo de fósforo, anhídrido-trifluoroacético más trietilamina, otros anhídridos halogenados de ácidos alifáticos más trietilamina, cloroformiato de etilo más trietilamina, N,N'-diciclohexilcarbodiimida, y anhídrido acético más acetato de sodio (solo bajo ciertas condiciones)<sup>21,22</sup>.

La primera evidencia de la existencia de una isomaleimida fue dada por Hoogewerff y Van Dorp<sup>23</sup> quienes la sintetizaron usando cloruro de acetilo. Los productos que obtienen son cristalinos, sus puntos de fusión son mucho más bajos que el de las imidas correspondientes, son básicos y fácilmente des-

compuestas en la presencia de agua formando el ácido correspondiente. Van der Meulen encontró que cuando isoimidas fueron calentadas se interconvirtieron en las imidas correspondientes. Así las isomaleimidas se isomerizan a las maleimidas en presencia de cantidades catalíticas de base o temperaturas elevadas.

En presencia de acetato de sodio la isomerización procede a través de un ataque nucleofílico del ión acetato sobre el carbonilo de la isomaleimida, una apertura posterior del anillo seguida por desplazamiento del ión acetato debido al ataque del nitrógeno produce la maleimida.



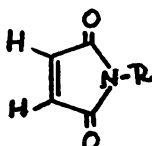
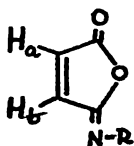
Se ha sugerido<sup>21,24,25,26</sup> que las isomaleimidas son los primeros productos de la reacción de deshidratación a temperaturas moderadas y que la imida se forma por rearrreglo de la isomaleimida. Así las isomaleimidas son los productos cinéticos que se rearrreglan para formar las maleimidas los cuales son los isómeros termodinámicamente más estables.

Los datos espectroscópicos tanto de las isomaleimidas como de las maleimidas han sido exhaustivamente analizados y aunque no hay datos concluyentes estos son suficientes para

su diferenciación.

En infrarrojo la imida de 5 miembros tiene la presencia de una o dos bandas (dependiendo de la resolución del aparato concentración y naturaleza de la imida) alrededor de 1720-1740  $\text{cm}^{-1}$  con presencia en algunas ocasiones da una pequeña señal en 1780  $\text{cm}^{-1}$ . Las isoimidas presentan dos absorciones características una fuerte correspondiente al carbonilo a 1780  $\text{cm}^{-1}$  y una mediana correspondiente a la imina en 1670  $\text{cm}^{-1}$ .

En resonancia magnética protónica para las isomaleimidas es posible observar un sistema AB clásico para los protones--olefínicos, debido a la diferencia del medio que los rodea obteniéndose dos dobletes, en contraste con la simetría en el-- caso de las maleimidas que sólo dan un singulete.<sup>27,28.</sup>

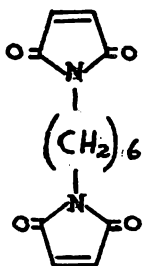




**DISCUSION Y RESULTADOS**

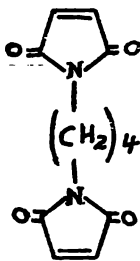
Dada la importancia de las maleimidias bifuncionales como reactivos de entrecruzamiento para la localización de los grupos -SH responsables de la síntesis de ATP y que o-fenilbismaleimida (OPDM), inhibe la fotofosforilación en cloroplastos de espinacas 500 veces más que la maleimida monofuncional N-etilmaleimida (NEM)<sup>2</sup> se han llevado a cabo síntesis de diferentes maleimidias bifuncionales.

Así diferentes bismaleimidias han sido sintetizadas<sup>4</sup> y probadas como inhibidores de la fotofosforilación. Dichas maleimidias son:



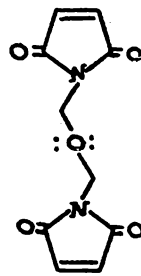
1,6-hexametilen-  
bismaleimida

11.5 Å<sup>o</sup> \*



1,4-tetrametilen-  
bismaleimida

9.2 Å<sup>o</sup> \*



bismaleimidóme-  
tíl eter

8.8 Å<sup>o</sup> \*

De los resultados obtenidos se encontró que dichas bismaleimidias eran inhibidores más potentes que la OPDM cuya distancia a los centros reactivos es 10 Å<sup>o</sup> \*, siendo la bismaleimidómetil eter la más efectiva. Por lo que se atribuyó que la actividad de las maleimidias bifuncionales estaba relacionada con la distancia de los centros reactivos -

\* Dichas distancias se calcularon, en base a modelos Dreiding en su extensión máxima.

( $\text{C}=\text{C}$ ). Las ideas anteriores conducen a completar el estudio con la síntesis y actividad de maleimidias con la menor distancia posible (diagrama I).

N,N'-ETILENBISMALEIMIDA (BEM) y N,N'-BISMALEIMIDA (BM).

Estas maleimidias se pueden obtener como se muestra en el diagrama II por dos métodos distintos lo cuales se describen a continuación.

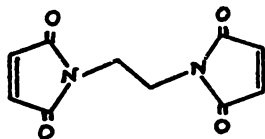
1o. Por adición en el caso de la BEM de la dietilamina y para la BM del hidrato de hidrazina en ácido acético sobre el anhídrido maleico disuelto en ácido acético glacial produciéndose casi instantáneamente los ácidos N,N'-etilenbismaleámicos I y N,N'-bismaleámico II.

La obtención de dichos ácidos procede sin ninguna dificultad, siendo el paso clave para la obtención de las bismaleimidias la deshidratación de dichos ácidos.

Se han informado una gran variedad de agentes deshidratantes que pueden producirnos dos posibilidades: las isomaleimidias o las maleimidias <sup>17,18,19,21,22</sup>.

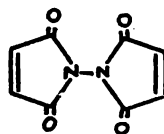
La elección de acetato de sodio/anhídrido acético como deshidratante se debe a que este produce maleimidias ya sea directamente o por rearreglo de las isomaleimidias.

Diagrama I



N,N'-etilenbis-  
maleimida (VI)

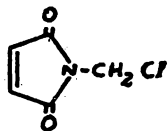
7.5 A°



N,N'-bismaleimida

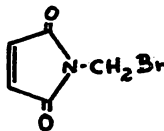
(VII)

5.5 A°



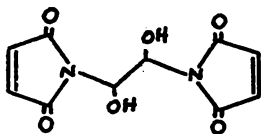
N-clorometilma-  
leimida (XIV)

3.5 A°



N-bromometilma-  
leimida (XV)

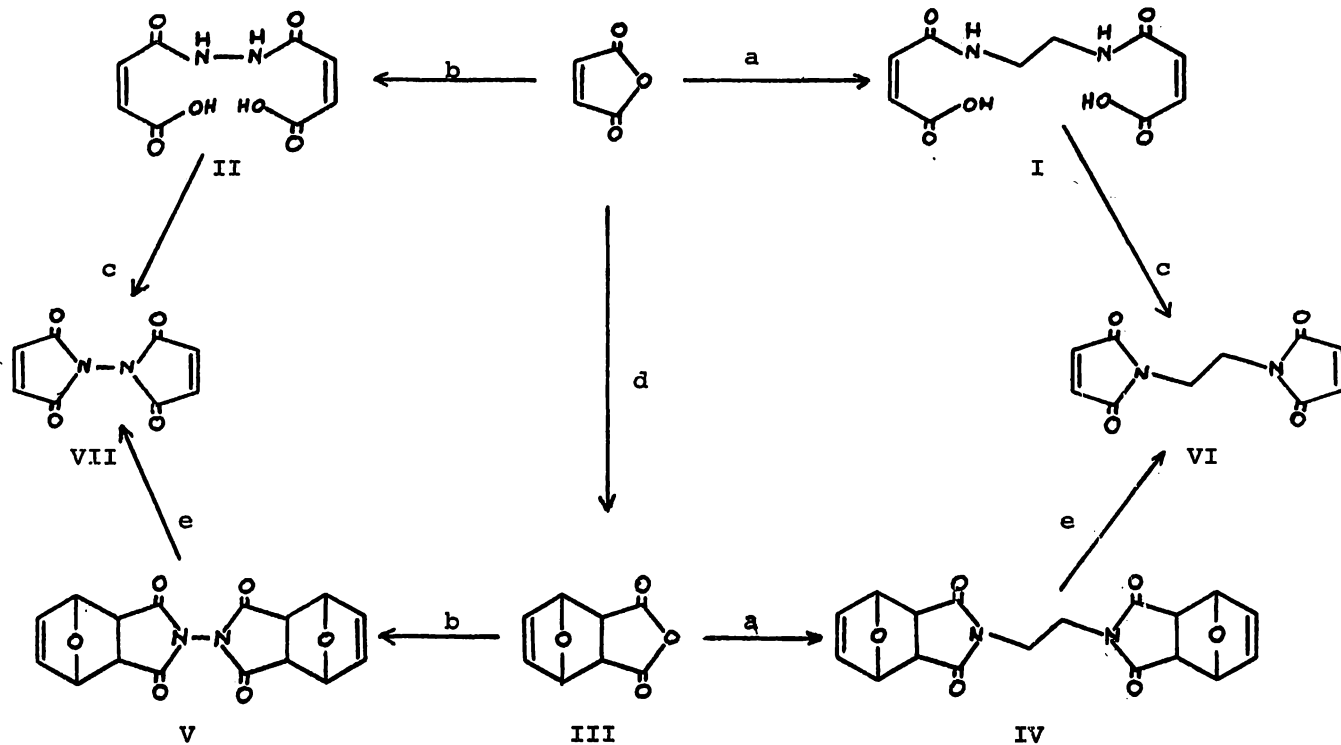
3.5 A°



N,N'-dihidroxi-etilenbis  
maleimida (XVI)

7.5 A°

Diagrama II



a= NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>  
 b= NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub><sup>2+</sup>  
 c= AcO Na<sup>2+</sup>/Ac<sub>2</sub>O  
 d= furano  
 e= calor

Así los ácidos N,N'-etilenbismaleámico y N,N'-bismaleámico se ponen con la mezcla acetato de sodio/anhidrido acético y se calientan en un rango de temperatura entre 60-70°C. Dicha temperatura es menor que la informada (92°C), ya que las diferentes pruebas efectuadas revelaron que los mejores rendimientos se obtienen cuando la temperatura se mantiene en dicho rango y que si se excede de esta temperatura se obtienen productos de polimerización.<sup>29</sup>

Después de un período de reacción de 15 min, la mezcla de reacción se vierte en agua fría y el precipitado obtenido se filtra y se lava con solución al 10% de NaHCO<sub>3</sub>, dando las maleimidas correspondientes con un rendimiento de 21.95% para la BEM (p.f. 191-3°C) y para BM de 13.3% (p.f. 177-9°C).

2o. El segundo método<sup>30</sup> consiste en la obtención del anhidrido 3,6-endoxo-1,2,3,6-tetrahidroftálico a partir de furano mas anhidrido maleico, la cuál en una reacción de Diels-Alder que produce un rendimiento del aducto en forma cuantitativa.

Se ha informado<sup>14</sup> que la obtención de las maleimidas también se puede efectuar empleando en lugar de furano, el ciclo pentadieno. El uso de éste se ve limitado, a pesar de ser más barato, dado que el retro Diels-Alder se efectúa a temperatura más elevada (400-415°C), temperatura a la cuál se pueden obtener productos de descomposición.

El anhídrido así obtenido se disuelve en ácido acético--glacial y se le adiciona, en el caso de la obtención de BEM,-la etilendiamina y en el caso de la BM el hidrato de hidrazi-na durante un periodo de 15 min. La mezcla se mantiene a tem- peratura ambiente por 1 hora y a 50-60°por 1 1/2 hrs., se ---vierte en agua y el precipitado se filtra y se lava con meta- nol produciendose N,N'-etilenbis(7-oxabicyclo-2,2,1-5-hepten- dicarboximida) y N,N'-Bi(7-oxabicyclo-2,2,1-5-heptendicarboxi- mida) respectivamente (IV y V).

El paso siguiente consiste en la pirólisis<sup>14</sup> de los dife- rentes aductos IV y V. Dicha pirólisis esta informada<sup>30</sup> que - se efectúa calentando los aductos IV y V por medio de un baño de arena a 180-200°C, pero se efectuaron diversas pruebas sin obtener resultados, por lo que se optó por hacer la pirólisis en un horno marca Lindberg arrastrando los aductos IV y V en- forma sólida por medio de nitrógeno como gas acarreador a tra- vés de la columna, la cuál ha sido previamente calentada a -- 300°C. El uso de N<sub>2</sub> es para arrastrar los aductos por la co- lumna en un mínimo de tiempo y evitar el calentamiento exce- sivo de las maleimidas formadas, lo cuál reduce la formación- de polímeros (Fig. 4).

Así se obtuvo la N,N'-etilenbismaleimida y la N,N'-bis-- maleimida en rendimientos del 10% y 13.15% respectivamente.

Las ventajas que se presentan en un método y otro, es --

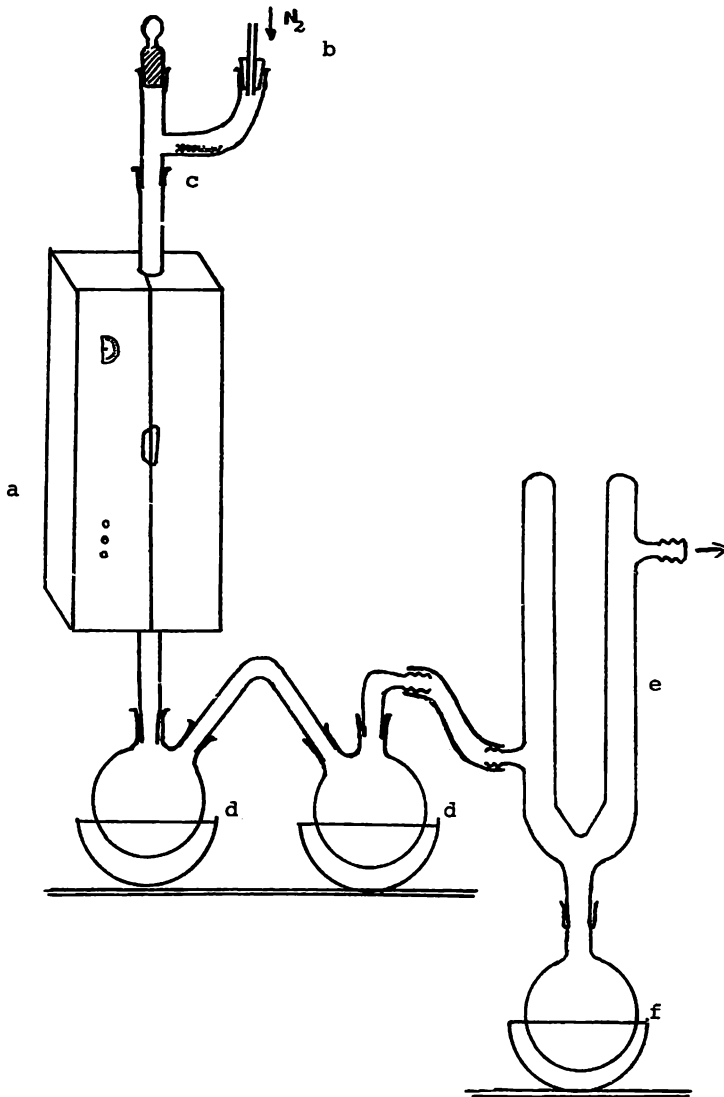


Figura 4

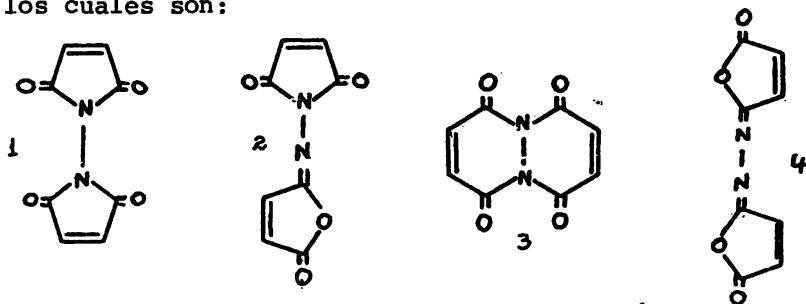
- a = horno
- b = entrada de nitrógeno
- c = compuesto
- d = matraz con producto de pirólisis
- e = trampa de hielo seco-acetona
- f = matraz para recoger el furano



que en el primer método descrito las condiciones de reacción son suaves, pero puede existir la formación de isomaleimidas. En el segundo caso la obtención de las maleimidas es el único producto factible de formarse, por lo que esta síntesis se ha informado como inequívoca<sup>30</sup>, eliminándose la posibilidad de formación del isómero; pero las condiciones de reacción son tan elevadas al efectuar el retro Diels-Alder que existe posibilidad de pérdida de producto debido a polimerizaciones.

La razón de efectuar la síntesis de las maleimidas por este segundo método es tan solo para llevar a cabo la corroboración de la estructura de las maleimidas obtenidas por el primer método, encontrándose que los datos espectroscópicos son los mismos para los productos obtenidos por cualquiera de las dos rutas sintéticas.

La comprobación de la estructura se hace necesaria ya que se ha informado<sup>30</sup> la posibilidad de 4 isómeros de la BM-- los cuales son:



y se diferencian por sus datos espectroscópicos.

Heday<sup>30</sup> et al obtienen la BM por la ruta propuesta a través de la formación del aducto Diels-Alder del furano, pero los da

tos espectroscópicos que reportan para maleimidias e isomaleimidias presentan controversia con los reportados por Narita et al<sup>27,28</sup> y los obtenidos empleando el segundo método. Los datos espectroscópicos se resumen a continuación:

Hedaya	IR	RMN
maleimidias	1754-1667	singulete en 6 ppm
isomaleimidias	1786 y 1695	no se informa
Narita		
maleimidias	1780(m)y1730(f)	singulete 6.7-7 ppm
isomaleimidias	1780(f)y1670(m)	dos dobletes 6.3-6.6 y 7.2-7.6
m= mediano	f= fuerte	

De lo anterior se puede observar que los datos en el infrarrojo pueden causar controversia en cuanto a la estructura de las maleimidias, dado que se pueden observar 1 ó 2 bandas, dependiendo de la resolución del aparato, concentración y naturaleza de la imida, alrededor de  $1724-1720 \text{ cm}^{-1}$ . Pero la estructura puede ser aclarada gracias al uso de RMP. dado que en las isomaleimidias es posible observar un sistema AB clásico-- de los protones olefinicos, observándose dos dobletes, en--- contraste con la simetría en el caso de las maleimidias que so lo dan un singulete.

Así es posible diferenciar por RMP entre las estructuras 1,3 y 2,4 ya que estas últimas darían dos dobletes para los-- protones vinílicos, y para diferenciar entre las estructuras--

1,3 el uso del infrarrojo será importante puesto que en un caso se tiene un anillo de 5 miembros con un nitrógeno y en el otro uno de 6 con dos nitrógenos.

	$\nu_{\text{C=O}}$	medio	$\lambda_{\text{max}}^{\text{UV}}$	$\epsilon \cdot 10^{-4}$	solvente
1	1739 (5.75)	KBr	215	1.92	95% etanol
2	1786 (5.6), 1693 (6.10)	KBr	292	1.8	CH <sub>3</sub> CN
3	1727 (5.79), 1689 (5.92)	Nujol	228	1.10	Dioxano
			340	0.20	

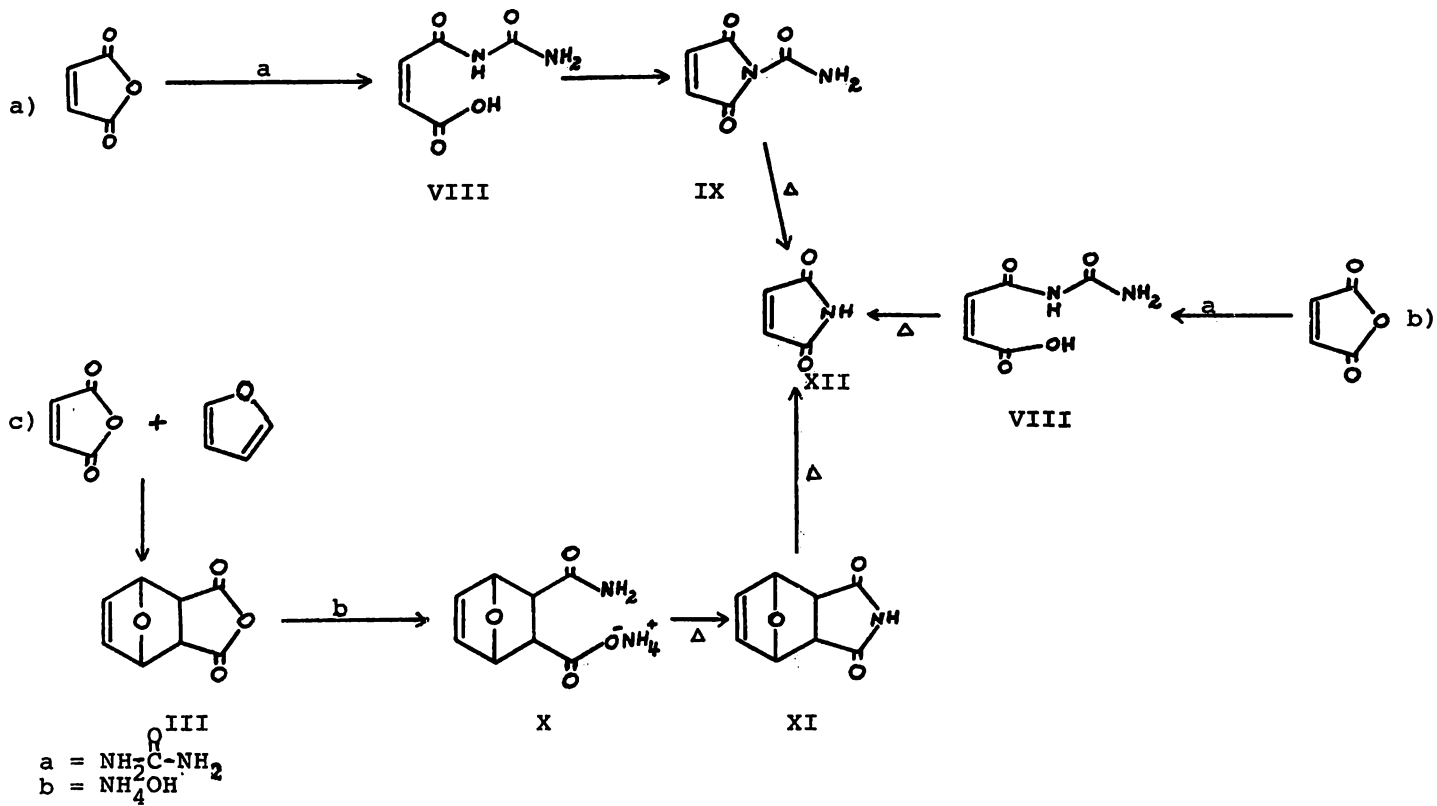
Cabe destacar la diferencia en el dato de RMP de 7.02ppm encontrado al de 6.0 ppm informado por Hedaya.

#### N,N' - DIHIDROXIETILENBISMALEIMIDA.

La N,N'-dihidroxi-etilenbismaleimida cuya longitud estimada (7.5 Å) es la misma que para la BEM, pero teniendo la característica de presentar grupos polares en su molécula, quedan mayor carácter hidrofílico a la molécula. Por lo que se sintetizó ésta con el fin de analizar el efecto de dichos grupos polares en la inhibición de la fosforilación y poder establecer si existe alguna relación entre el carácter hidrofílico e inhibición.

Para preparar dicho producto se requiere como materia prima la maleimida, la cuál se puede sintetizar de varias maneras esquematizándose tres de ellas en el diagrama III.

Diagrama III



a) Obtención de maleimida según Tawney<sup>13</sup>.

La formación del ácido N-carbamilmaleámico (VIII) a partir de urea mas anhídrido maleico en ácido acético calentando a 50° por 12 hr produce rendimientos buenos si las aguas madres son usadas en reacciones subsecuentes. Las condiciones anhidras son necesarias ya que un 4% de agua en el solvente inhibe completamente la reacción. Es necesario mantener la temperatura en un rango de 50-60° para obtener buen rendimiento del producto. A altas temperaturas, la reacción llega a ser tan violenta que se dificulta su control y se desprende dioxido de carbono vigorosamente. Esta evolución de gas debida a la descomposición del producto fue indicada por el hecho de que un simple reflujo de ácido N-carbamilmaleámico en ácido acético causa evolución de CO<sub>2</sub>. Otras posibles reacciones laterales incluyen rearrreglo del ácido N-carbamilmaleámico a ácido N-carbamilfumárico. Los productos de estas reacciones pueden complicar seriamente el aislamiento y purificación del ácido N-carbamilmaleámico.

La ciclización del ácido N-carbamilmaleámico fué mejor por el calentamiento de una suspensión del compuesto en dos o tres veces su peso de anhídrido acético a 80-100°C durante 35 min tiempo en el que el sólido se disolvió, después de enfriar se obtuvo 82.08% de rendimiento de N-carbamilmaleimida p.f. 157-8°C.

La descomposición térmica de N-carbamilmaleimida a malei

mida se logra en DMF a 100°C dando un rendimiento de 84.95% p.f. 92-4°C. El rendimiento total a partir de anhídrido maleico es de 33.5%.

b) Otra forma de obtener la maleimida es por la ciclización y pirólisis del ácido N-carbamilmaleámico que por calentamiento directo<sup>31</sup> a 130°C/5 mm de Hg da la maleimida con un rendimiento de 26.73% p.f. 92-4°C.

Cuando se efectúa la pirólisis el producto va destilando y se solidifica por lo que se debe tener cuidado de que las conexiones sean lo suficientemente anchas para que no se tapen.

c) También se puede obtener la maleimida por el método informado por Tawney<sup>14</sup>.

Se prepara el anhídrido 3,6-endoxo-1,2,3,6-tetrahidrof-tálico III como se describe anteriormente (pag.26). Este anhídrido se trata a temperatura ambiente con NH<sub>4</sub>OH y agua formandose después de varias horas en baño de hielo un sólido - el cuál se filtra y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se combinó con el sólido de filtración. Este sólido se calienta a 180°C formandose la imida, la cuál se procede a pirolizar de igual manera que como se describió para la obtención de la BEM (esquema II).

Dicha pirólisis da maleimida en rendimientos muy bajos (5-10%) ya que mucho producto de la imida se quema en la columna por lo que dicho método no es muy recomendable..

Los datos espectroscópicos de la imida se presentan en la tabla I.

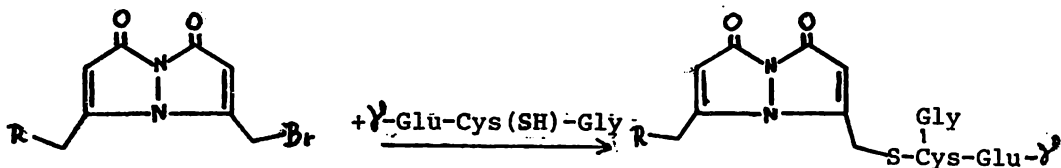
La N,N'-~~di~~hidroxi-etilenbismaleimida se prepara (diagrama IV) a partir de maleimida con glioxal al 40% el cuál ha sido llevado a medio ligeramente alcalino (pH=8) con NaHCO<sub>3</sub>. El control sobre el pH se realiza con una base adecuada tal como NaHCO<sub>3</sub> ya que el empleo de NaOH produce con el glioxal -- reacción de Cannizzaro y el medio de la reacción se vuelve ácido, medio en el cual no existe reacción.

La mezcla de la reacción se deja agitando toda la noche alcanzándose un pH de 6. El precipitado se filtra y lava con agua destilada obteniéndose 32% de un producto cristalino de p.f. 172-4°C.

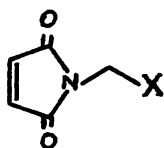
Los datos espectroscópicos muestran la presencia de dicho producto (Tabla I).

Dado que la distancia mínima posible obtenible en bismaleimida es de 5.5 Å se pensó en sintetizar otras maleimidas cuya distancia entre los centros reactivos se pudiese hacer menor.

Es conocido que los grupos  $-SH^{32,33}$  también reaccionan con grupos fácilmente salientes como en el caso de los bismanos. La reacción con dichos reactivos se muestra a continuación:



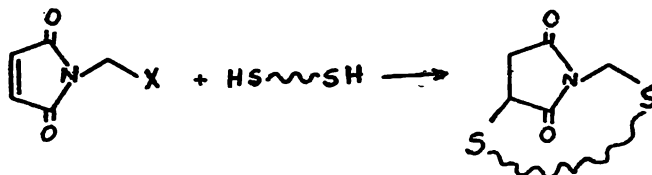
Con lo anterior se penso en sintetizar maleimidias que presentarán grupos salientes como:



X = -Cl

-Br

generando de esta manera una maleimida heterobifuncional. - Asi la distancia que existe para que se realice el entrecruzamiento es de  $3.5 \text{ \AA}$ . En dichas maleimidias el entrecruzamiento se realiza tanto por adición del  $-SH$  a la doble ligadura como por sustitución del grupo  $-X$





La obtención de estos derivados: N-bromometilmaleimida y N-clorometilmaleimida se efectuó como se muestra en el diagrama IV. Es necesario la obtención primero de la N-metilol maleimida, la cuál se prepara siguiendo la técnica descrita por Tawney et al<sup>14</sup>.

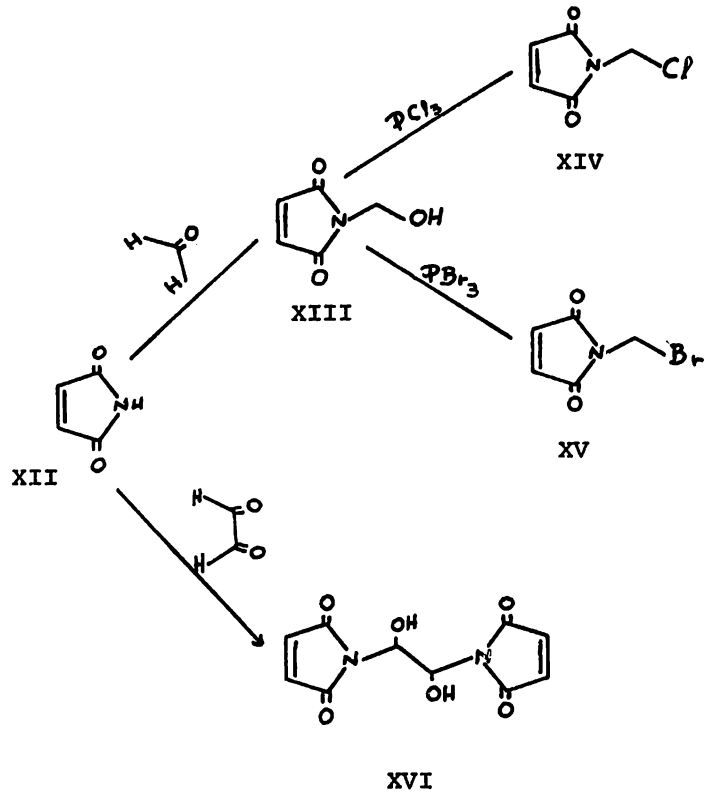
La síntesis se lleva a cabo a partir de maleimida y formaldehído al 37%, dando excelentes rendimientos del producto. La reacción no ocurre en solución de maleimida-formaldehído teniendo un pH cerca de 3, pero tiene lugar cuando el pH se ajusta cerca de 5 por la adición de pequeñas cantidades de solución de NaOH.

El precipitado que se forma después de 2 1/2 hrs se filtra y el producto se recrystaliza de acetato de etilo obteniendo un rendimiento del 74.94% p.f. 100-1°C.

#### N-CLORO y N-BROMOMETILMALEIMIDA.

N-metilolmaleimida es una fuente de una serie de derivados entre los que figuran los N-halógenuros de metilmaleimida. Así N-clorometilmaleimida se prepara por reacción de la N-metilmaleimida con  $\text{PCl}_3$  usando como disolvente acetona seca. Después de 45 min de agitación se evapora la acetona

Diagrama IV



na y al residuo se le adicionan 5 ml de agua, se filtra el producto obteniéndose 77.18% con p.f. 78-79°C.

De la misma manera se obtiene la N-bromometilmaleimida pero dicho producto se informa que es muy inestable y difícil de aislar. El hecho de que no se pudiese aislar con certeza es debido a que la forma de tratar el producto una vez obtenido no es la adecuada dado que la N-bromometilmaleimida no se puede lavar con agua porque es muy inestable y debido a que en los subproductos de la reacción se forma ácido bromhídrico, éste se debe eliminar ya que descompone el producto que se forma. Por lo que se optó por eliminar impurezas y subproductos de reacción pasando la mezcla rápidamente a través de una columna que contiene florisil y  $\gamma$ -carbón activado usando como eluyente benceno-acetato de etilo 80-20. El disolvente se evaporó a presión reducida obteniéndose un rendimiento de 50% y p.f. 80-2°C.

Dada la similitud de estructura de las diferentes maleimidias, se muestran sus datos espectroscópicos resumidos en la Tabla I.

De la tabla de infrarrojo se observa que todas las maleimidias muestran ciertas bandas características las cuales son:

Las bandas en  $3100\text{ cm}^{-1}$ ,  $1150\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  y  $840\text{ cm}^{-1}$ .

De la tabla es posible observar que en el infrarrojo - las maleimidas presentan una o dos bandas en la región del carbonilo.

Dicha banda puede variar de forma dependiendo de concentración, del compuesto y forma de hacer el espectro ya sea en pastilla de KBr, solución de  $\text{CHCl}_3$  ó suspensión. Lo anterior se ilustra para la N,N'-etilenbismaleimida (Figura 5).

TABLA I  
BANDAS CARACTERISTICAS EN EL  
INFRARROJO DE DIFERENTES MALEIMIDAS

	-O-H	N-H	C-H	>C=O	CH <sub>2</sub>	C-OH	C-O-H	C-H	C-H	O-H	C-Cl	C-Br
BEM	-----	-----	3100	1740 y 1710	1450	-----	-----	1130	840	-----	-----	-----
BM	-----	-----	3100	1760 y 1740	-----	-----	-----	1150	840	-----	-----	-----
M	-----	3250-3150	3100	1720	-----	-----	-----	1120	840	-----	-----	-----
BMM	3500-3400	-----	3100	1700	-----	1400	1150	1080	840	-----	-----	-----
MM	3500-3300	-----	3100	1700	-----	1360	1160	1000	840	650-200	-----	-----
MMCl	-----	-----	3100	1710	-----	-----	-----	1150	840	-----	610	-----
BrMM	-----	-----	3100	1720	-----	-----	-----	1150	840	-----	-----	580

**TABLA 1**  
**BANDAS CARACTERISTICAS DE**  
**RESONANCIA MAGNETICA PROTONICA PARA MALEIMIDAS**

	N-H	O-H	vinilicos	-CH-	-CH <sub>2</sub> -
BEM	----	-----	6.7 S 4H	----	3.7 S 4H
BM	----	-----	7.02 S 4H	----	----
M	9-10 S i D <sub>2</sub> O	-----	6.84 S 2H	----	----
BMM	----	7.5-7.7 S i D <sub>2</sub> O	6.9 S 4H	6.05 S 2H	----
MM	----	5.42-5.63 S i D <sub>2</sub> O	6.88 S 2H	----	4.98 S 2H
ClMM	----	-----	6.88 S 2H	----	5.36 S 2H
BrMM	----	-----	6.89 S 2H	----	5.33 S 2H

BEM = N,N'-etilenbismaleimida;

BM = N,N'-bismaleimida;

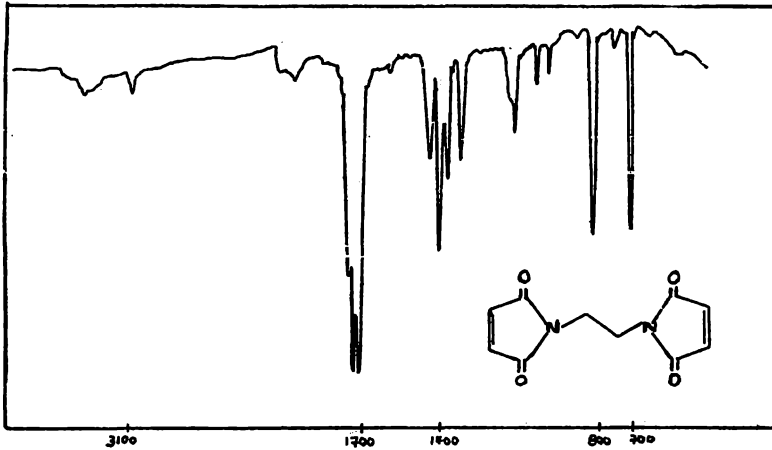
M = Maleimida;

BMM = N,N'-dihidroxietilenbismaleimida;

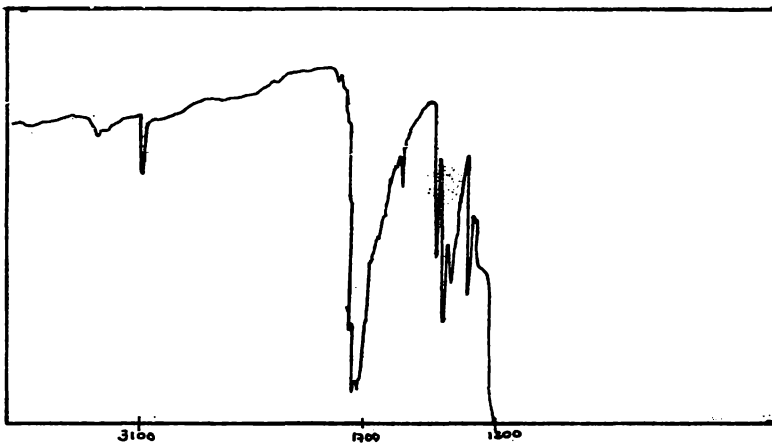
MM = N-metilol maleimida;

ClMM = N-clorometilmaleimida; y

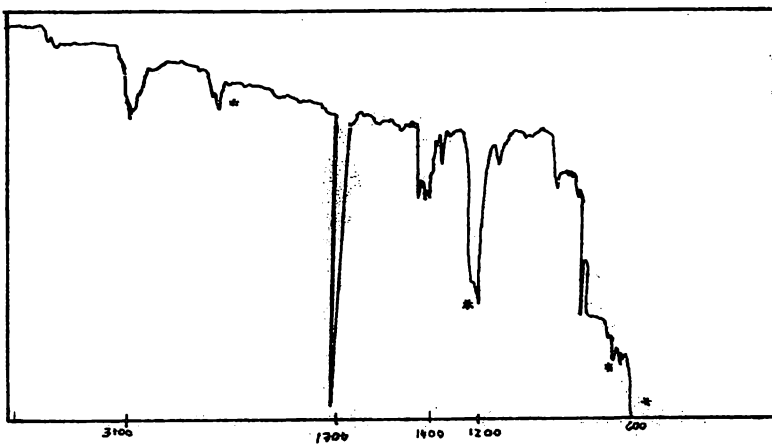
BrMM = N-Bromometilmaleimida.



pastilla KBr



suspensión Fluoroluble



solución  $\text{CHCl}_3$

\* bandas correspondientes a  $\text{CHCl}_3$

## REACTIVIDAD DE MALEIMIDAS CON CISTEINA.

Dicho estudio se realiza con el fin de conocer si---<sup>1</sup> existe alguna relación entre inhibición de la síntesis de ATP con la reactividad de las maleimidias hacia los grupos -SH.

Dado que las maleimidias muestran un máximo de absorción característico en la región del ultravioleta, dicha propiedad es usada para determinar la reactividad de las diferentes maleimidias con grupos -SH<sup>34,35,36</sup>. Así las maleimidias se hacen reaccionar con cisteina a un pH adecuado y el cambio de absorbancia que ocurre se determina a diferentes intervalos de tiempo<sup>37,38</sup>

El ajuste de pH es importante ya que los grupos sulfhidrilos reaccionan más rapido con las maleimidias en medio neutro que en medio ácido y una hidrolisis ocurre en medio básico.

Las maleimidias a las que se les determinó su reactividad fueron aquellas que se ha probado su actividad inhibidora de la síntesis de ATP, siendo: la N,N'-etilenbismaleimida, N,N'-bismaleimida, 1,6-hexametilenbismaleimida.

Dicho estudio se efectuó de la siguiente manera:

La medición de los cambios de absorbancia se efectuó por medio de un espectrofotómetro Perkin Elmer Hitachi 200.



Se pesan entre 0.5-1 mg de maleimida, disolviendo con gotas de acetato de etilo y aforando a 10 ml con etanol anhidrido. Se toman 2 ml y se colocan en las celdas de cuarzo y se mide la absorbancia de esta solución a una longitud de onda de 330 a 230 nm recibiendo la señal en un graficador. A continuación se determina la absorbancia de la maleimida una vez que se hizo reaccionar con 1.5 ml de una solución de clorhidrato de cisteína (4 mg/ml). Se mide a varios intervalos de tiempo la concentración de maleimida que todavía existe. Se observa que en un mayor o menor tiempo el  $\lambda_{\text{max}}$  correspondiente a la maleimida disminuye conforme la reacción procede.

De los datos obtenidos se observa que en el caso de la 1,6-hexametilenbismaleimida con cisteína el máximo de absorción en el ultravioleta disminuye poco a poco desapareciendo la señal en un período de 6 hrs. En el caso de la N,N'-etilenbismaleimida la señal desaparece en un período de 1 1/2 hrs. En cambio para la N,N'-bismaleimida se observa un cambio brusco en la absorbancia a los dos minutos de haber adicionado la cisteína, por lo que se puede indicar que la maleimida más reactiva hacia los grupos -SH es la N,N'-bismaleimida, siguiendo la N,N'-etilenbismaleimida y luego la 1,6-hexametilenbismaleimida.

Esto también indica que las maleimidias más reactivas son aquellas cuya longitud entre los centros reactivos ( $\text{C}=\text{C}$ ) es menor.

REACTIVIDAD DE MALEIMIDAS CON CISTEINA

1,6-hexametilenbismaleimida		N,N'-etilenbismaleimida		N,N'-bismaleimida	
A	t (min)	A	t (min)	A	t (min)
0.413	0	0.22	0	0.62	0
0.391	10	0.167	7	0.019	2
0.368	25	0.182	15		
0.347	40	0.149	30		
0.306	70	0.102	60		
0.245	130	0.012	90		
0.195	190				
0.157	250				
0.131	310				
0.113	370				
0.086	490				

## DETERMINACION DE LOS COEFICIENTES DE PARTICION.

Otro de los parámetros importantes para el empleo de estos reactivos de entrecruzamiento es la distribución en las fases celulares para poder llevar a cabo el entrecruzamiento. Para poder evaluar que tanto se reparten las maleimidadas en condiciones celulares se determinan sus coeficientes de partición usando como sistema agua/octanol<sup>39</sup>. El uso del sistema agua/octanol es para simular las condiciones de las fases celulares.

El coeficiente de partición se determinó para las siguientes maleimidadas:

N,N'-etilenbismaleimida (BEM), N,N'-bismaleimida (BM), 1,4-tetrametilenbismaleimida (1,4), 1,6-hexametilenbismaleimida (1,6), bismaleimidometil eter (eter), N-etilmaleimida (NEM), y N-metilol maleimida (metilol).

El octanol que se usa debe purificarse perfectamente para eliminar las impurezas que puedan absorber en la región del ultravioleta; para lo cual la purificación se efectuó de la siguiente manera;

- 1.- Lavar el octanol con NaOH al 10%, con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluido y finalmente con solución de NaHCO<sub>3</sub>.
- 2.- Secar con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- 3.- Destilar a presión reducida  $\pm$  10 mm Hg a 80°C desechando el 10% como cabeza y el 20% de residuo

El octanol destilado se satura con agua destilada.

La determinación de los coeficientes de partición se efectuó de la siguiente manera:

- 1.- Pesar de 10-20 mg de maleimida y agregarle un poco de acetato de etilo y agitar en el vortex hasta disolución completa.
- 2.- Aforar con acetato de etilo a 10 ml.
- 3.- Tomar de la solución anterior 1 ml y aforar a 10 ml con octanol (solución II).
- 4.- De esta solución hacer el espectro.
- 5.- Por otro lado poner 0.5 ml de la solución I mas 4.5 ml de octanol en dos tubos de centrifuga.
- 6.- Hacer un blanco con 4.5 ml de octanol y 0.5 ml de agua.
- 7.- Agitar los tubos de 5 y 6 con 5 ml de agua.
- 8.- Determinar la absorbancia de la fase octanol.

Se usó el espectrofotómetro Perkin Elmer Hitachi 200. Se mide la absorbancia de la solución II de 330 nm a 230 nm recibiendo la señal en un graficador. A continuación se determina la absorbancia en la fase octanólica después de centrifugar. Debido a que la maleimida se ha repartido en el agua implica que la absorbancia disminuye obteniéndose una absorbancia menor que la de la solución II, la cuál es registrada por el graficador.

La determinación del coeficiente de distribución se---

efectúa de la siguiente manera:

- 1.- Conociendo el peso de la muestra se saca su concentra  
ción tomando en cuenta todas las diluciones efectua--  
das.
- 2.- Esta concentración en g/l se transforma en concentra-  
ción molar, para lo cual la concentración anterior se  
divide entre el peso molecular. Dicha concentración--  
corresponde a la maleimida en fase octanólica, (solu-  
ción II)
- 3.- Haciendo uso de la ley de Lambert-Beer  $A = \epsilon lc$ , pode--  
mos calcular el coeficiente de absorción molar dado--  
que se conoce la concentración inicial en la fase oc-  
tanólica, la absorbancia inicial y que  $l = 10$  cm.
- 4.- Conociendo el coeficiente de absorción molar de---  
maleimida y la absorbancia en la fase octanol una----  
vez efectuado el reparto, se puede calcular la con---  
centración final en la fase octanólica.
- 5.- Dado que  $C_{\text{inicial}}^{\text{octanol}} = C_{\text{final}}^{\text{octanol}} + C^{\text{agua}}$  se puede calcu--  
lar la concentración en la fase acuosa.
- 6.- Conociendo así la concentración de maleimida en la fa  
se orgánica y en la fase acuosa se determina su coefi  
ciente de partición definido como:

$$D = \frac{C_{\text{octanol}}^{\text{maleimida}}}{C_{\text{agua}}^{\text{maleimida}}}$$

Los datos obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

	$C_{\text{maleimida}}^{\text{mol/l}}$	$A_{\text{max}}^{\text{octanol}}$	$\epsilon_{\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}}$	$A_{\text{max}}^{\text{octanol/H}_2\text{O}}$	$C_{\text{reparto}}^{\text{maleimida}}$	$C_{\text{agua}}^{\text{maleimida}}$	$\bar{D}$
BEM	$7.52 \times 10^{-4}$ $6.72 \times 10^{-4}$	0.613 0.56	815 833.33	0.351 0.33	$4.306 \times 10^{-4}$ $3.96 \times 10^{-4}$	$3.214 \times 10^{-4}$ $2.76 \times 10^{-4}$	1.343
BM	$1.125 \times 10^{-3}$ $8.02 \times 10^{-4}$	0.278 0.4	247.1 500	0.1885 0.3175	$0.7628 \times 10^{-3}$ $6.35 \times 10^{-4}$	$0.3622 \times 10^{-3}$ $1.67 \times 10^{-4}$	2.953
1,4	$5.72 \times 10^{-4}$ $3.38 \times 10^{-4}$	0.62 0.3	1080 887.57	0.365 0.16	$3.38 \times 10^{-4}$ $1.8 \times 10^{-4}$	$2.34 \times 10^{-4}$ $1.58 \times 10^{-4}$	1.29
1,6	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
eter	$6.779 \times 10^{-4}$ $5.9 \times 10^{-4}$	0.262 0.19	386 322.03	0.11 0.085	$2.848 \times 10^{-4}$ $2.6 \times 10^{-4}$	$3.931 \times 10^{-4}$ $3.3 \times 10^{-4}$	0.7522
NEM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
meti- lol	$1.63 \times 10^{-3}$ $1.197 \times 10^{-3}$	0.518 0.32	317.8 267.3	0.0615 0.04	$0.1935 \times 10^{-3}$ $1.49 \times 10^{-4}$	$1.436 \times 10^{-3}$ $1.048 \times 10^{-3}$	0.1384

De la 1,6-hexametilenbismaleimida y de la N-etilén bismaleimida no dieron datos reproducibles, por lo que no se informan.

Los coeficientes de partición que se esperaban en base a sus grupos polares y su peso molecular son:

D mayor

D menor

1,6 > 1,4 > BEM > NEM > BM > eter metilol

y los resultados obtenidos fueron:

BM > BEM > 1,4 > eter > Metilol

Se observa que los resultados esperados son diferentes a los experimentales, por lo que no se puede establecer ninguna relación de los coeficientes de reparto con la inhibición y se hace necesario ensayar otro método para confirmar o rechazar una hipótesis.

## RESULTADOS BIOQUIMICOS:

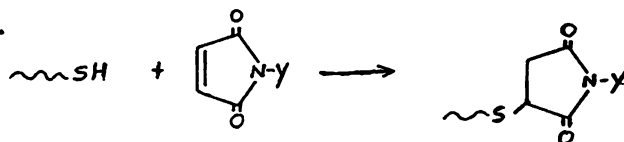
Algunas maleimidias sintetizadas fueron probadas en -- el departamento de Bioquímica (División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM) por el Dr. Blas Lotina-- como parte en la tesis profesional de Jorge A. Morales,--- Las pruebas que se efectuaron fueron la medición de la fosforilación una vez que se han incubado los cloroplastos -- con las maleimidias y adicionando las condiciones fosforilantes ADP y  $P_i$ , para medir la inhibición hacia la síntesis de ATP causada por esta maleimidias.

Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica de la página 54.

De lo anterior se puede concluir que:

Entre los diferentes factores que determinan inhibición de la síntesis de ATP por las maleimidias son:

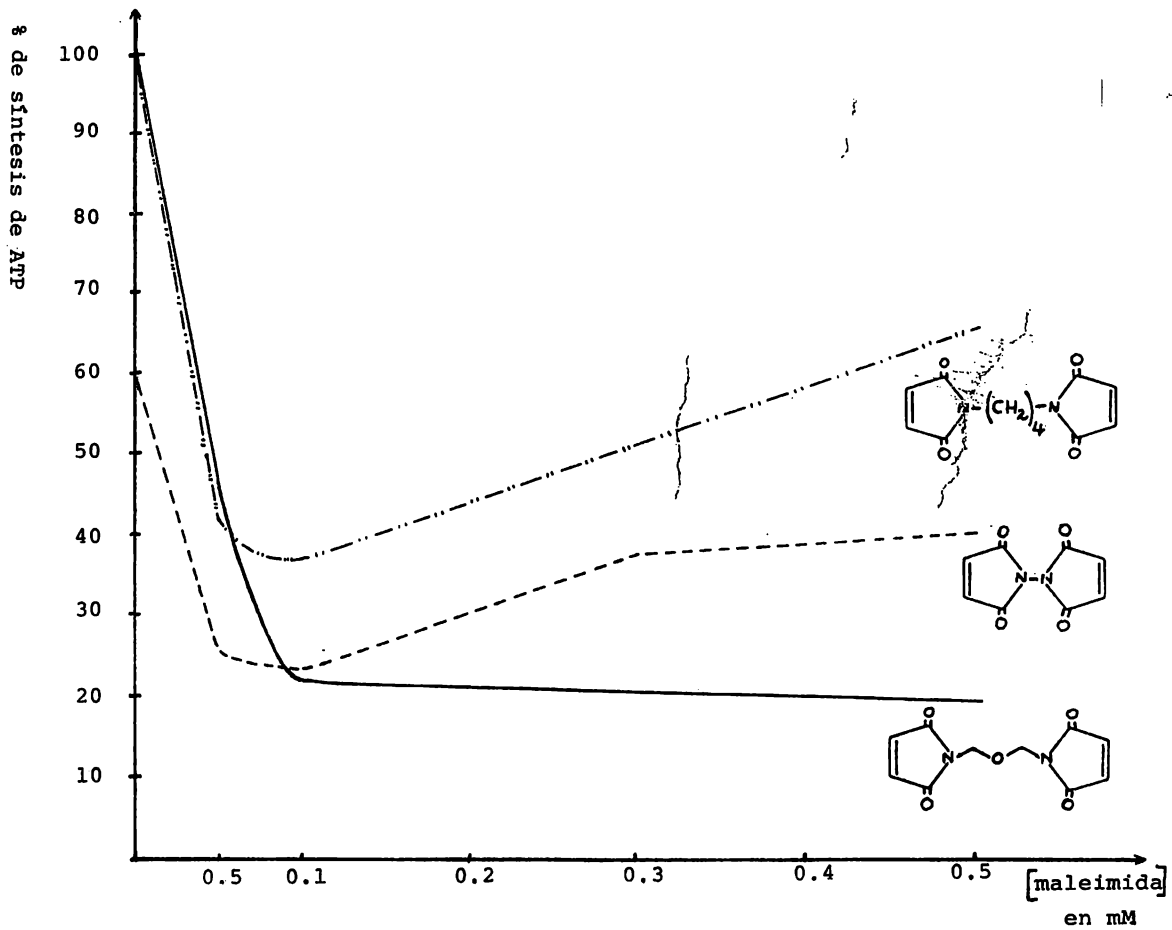
- a) la reactividad de las maleimidias hacia los grupos -SH.
- b) el coeficiente de partición, no dice nada con respecto a la inhibición, ya que si el reparto de las maleimidias es bajo en las fases celulares y la reactividad alta la constante de equilibrio de la reacción de inhibición se desplaza hacia la derecha.





El desplazamiento de la reacción anterior hacia la derecha modifica la constante de reparto, volviéndose a efectuar el reparto de la maleimida en las dos fases hasta alcanzar de nuevo el equilibrio y por lo tanto la inhibición es alta. En cambio si el coeficiente de partición es alto y la reactividad baja el equilibrio de la reacción anterior no se desplaza hacia la derecha y por lo tanto la inhibición es más baja.

Otro factor importante es la existencia de la distancia adecuada de los centros reactivos ya que la maleimida puede ser muy reactiva hacia los grupos -SH pero si no se encuentran a la distancia adecuada de los grupos responsables de la actividad de la enzima no va a existir la inhibición adecuada. Encontrándose que la mayor inhibición se presenta cuando la distancia que separa a los centros reactivos de la maleimida es de  $5.5-8 \text{ \AA}$ .



P A R T E   E X P E R I M E N T A L

En el desarrollo del trabajo experimental, el revelador para cromatografía que se empleo fueron vapores de Iodo. La observación de las cromatoplas de las sustancias que presentan absorción en el U.V. se hizo mediante una lampara de U.V. S.L.-25. Las cromatoplas se prepararon de silica-gel 60 de 70-230 mallas para columna y para placa fina marca Merck.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fischer Johns y se informan sin corregir.

Para efectuar la pirólisis de los retro Diels-Alder se uso el aparato marca Lindberg.

Todos los productos se guardaron en recipientes sellados y en refrigeración para evitar hidrólisis.

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un aparato Perkin-Elmer 599. Los espectros de resonancia magnética de protones (rmp) se determinaron en un espectrometro Varian A-390 y/o A-360, usando tetrametilsilano como referencia interna y como disolvente  $\text{CDCl}_3$  a menos que se indique otro.

Las constantes de reparto y la reactividad de las maleimidas se efectuaron en el aparato Perkin Elmer Hitachi 200 de doble haz en la longitud de onda de 330 nm a 230 nm con celdas de cuarzo de 1 dm de longitud de paso óptico.

1-H-PIRROL-2,5-DIONA (Maleimida) (XII)

Se preparó de acuerdo a la referencia 13.

a) Acido N-carbamilmaleámico (VIII).

En un matraz Erlermeyer de 500 ml se colocaron 200 g de ácido acético glacial  $\int_{25}^{25} = 1.049$ , 60 g (1 mol) de urea y 100 g (1.02 mol) de anhídrido maleico, la mezcla se agitó y calentó a 50° hasta completar un periodo de 12 hrs y entonces se dejó a temperatura ambiente toda la noche. El producto cristalino, se filtró a través de un filtro de vidrio poroso, se lavó con 50 ml de ácido acético glacial y se secó a 50°, se obtuvo un peso de 82.5 g (52.21%) de VIII con punto de fusión de 161-162°C.

Las aguas madres se hicieron reaccionar nuevamente -- con 60 g de urea y 100 g de anhídrido maleico obteniéndose 124.17 g (78.59%). El rendimiento total promedio de la primera y de la segunda carga fue 65.4%.

b) N-carbamilmaleimida (IX).

En un matraz bola de 500 ml se calentaron 300 g de anhídrido acético ( $\int = 1.048$ ) a 90-95°C y se adicionó el ácido N-carbamilmaleámico (IX). La suspensión se agitó a 90-97°C. Durante 35 min tiempo en el cuál se disolvió el sólido. La solución se filtró en caliente, se enfrió a temperatura ambiente, y el sólido precipitado se filtró y lavó --

con acetona. El producto seco peso 60 g (82.08%) p.f. de -154-7°C.

c) 1-H-pirrol-2,5-diona (XII).

En un matraz bola de dos bocas de 250 ml provisto de un agitador y termómetro se calentaron 120 g de N,N'-di-metilformamida (DMF)  $d_4^{25} = 0.9445$  a 90-5°C. El calentamiento se paró y 60 g (0.428 mol) de N-carbamilmaleimida (IX) se adicionaron con agitación. La reacción es exotérmica -- por lo que se cuidó que la temperatura no excediera de 111°C. Al final de este período exotérmico se aplicó calor para mantener la temperatura a 90-9°C por un período de reacción total de 1 hr. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche precipitando el ácido cianúrico el cual se filtró. Se removió la DMF del filtrado por medio de una destilación a presión reducida. A continuación 1-H-pirrol-2,5-diona (XII) se destiló entre 96-105°C a 5 mm de Hg. El producto crudo se recristalizó de acetato de etilo obteniéndose 35.315 g (84.95%) con p.f. de 92-4°C.

IR (KBr) 3250-3150 (N-H), 3100 (C-H), 1720 (C=C), 1120 (C-H), 840 (C-H).

RMP ( $C_2D_6CO$ ) en  $\delta$ ; entre 9-10 ppm (señal ancha, 1H, N-H)

$^1D_2O$ , 6.84 ppm (S, 2H,  $H_2C=C-H$ ).

Obtención de 1-H-pirrol-2,5-diona (XII) por pirolisis directa del ácido N-carbamilmaleámico (VIII).

Se siguió la técnica descrita en la referencia 31.

En un matraz bola de 150 ml se colocaron 100 g de ácido N-carbamilmaleámico (VIII). Se calienta a 110°C a 5 mm de Hg por 3 hrs con el fin de deshidratar y pirolizar, obteniéndose 16.4136 g (26.73%) p.f. 92-4°C.

#### N,N'-ETILENBISMALEIMIDA (VI)

a) Acido N,N'-etilenbismaleámico (I).

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml se colocaron 100 ml de ácido acético  $\frac{25}{250} = 1.049$  y 10 g (0.102 mol) de anhídrido maleico, se agitó la mezcla hasta disolución completa del anhídrido maleico.

En otro matraz Erlenmeyer de 150 ml enfriado por un baño de hielo se pusieron 50 ml de ácido acético y se le adicionaron 3.06 g (0.051 mol) de etilendiamina gota a gota.

La mezcla anterior se adicionó sobre el anhídrido maleico disuelto en ácido acético. Se agitó por 1 hr, tiempo en el cuál se formó un precipitado blanco correspondiente al ácido etilenbismaleámico (I) el cuál se filtró y lavó con ácido acético obteniéndose 10.04 g (76.82%) con p.f. 180-2°C.

b) N,N'-etilenbismaleimida (VI)

En un matraz bola de 100 ml se colocaron 5 g (0.009--mol) del ácido N,N'-etilenbismaleámico, 6.64 gr (0.065 mol) de anhídrido acético y 0.889 g (0.108 mol) de acetato de sodio. La mezcla se agitó y calentó en un intervalo de temperatura de 60-70°C, a los 15 min. se vertió la solución en un recipiente con hielo, precipitando el producto. Se filtró el sólido y se lavó con solución al 10% de bicarbonato de sodio. El sólido se recristalizó de acetato de etilo obteniéndose 0.9418 g (21.95%) p.f. de 192-193°C.

IR(KBr) 3100(=C-H), 1740 y 1710 (C=O), 1450(-CH<sub>2</sub>-) y 840---(=C-H)

RMP (CDCl<sub>3</sub>+DMSO) : 6.7 (S, 4H, H-C=C-H) y 3.7 (S, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)

-Síntesis de N,N'-etilenbismaleimida por pirólisis del aducto N,N'-etilen-bis(7-oxabicyclo-2,2,1-5 heptendicarboximida)<sup>30</sup> (IV).

a) Anhídrido 3,6-endoxo- 1,2,3,6-tetrahidroftálico---(III).

En un matraz Erlenmeyer de 100 ml se colocaron 13.6 g de furano y 19.6 g (0.2 mol) de anhídrido maleico en cloroformo. La mezcla se agitó a temperatura ambiente obteniéndose 33.3 g de anhídrido 3,5-endoxo-1,2,3,6-tetrahidroftálico. (III).



b) N,N'-etilenbis(7-oxabicyclo-2,2,1-5 heptendicarboximida) (IV)

En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se colocaron 16.6 g (0.1 mol) de anhídrido (III) en 100 ml de ácido acético---glacial y se agitó hasta disolución. Se adicionaron en el matraz 3 g (0.05 mol) de etilendiamina durante un período de 15 min con agitación. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente 1 hr y a 50-60° por 1 1/2 hrs y entonces se dejó a temperatura ambiente toda la noche. Se formó un precipitado blanco de N,N'-etilenbis(7-oxabicyclo-2,2,1-5 heptendicarboximida) (IV) el cuál se filtró y lavó con metanol.

c) Pirólisis del aducto N,N'-etilenbis(7-oxabicyclo-2,2,1-5 heptendicarboximida) (IV).

Se efectuó el retro Diels-Alder calentando la columna del aparato de pirólisis a 300°C. Se pasaron 0.3 g de IV-- (0.00084 mol) por el aparato caliente usando nitrógeno como gas acarreador y se recogió la N,N'-etilenbismaleimida (VI) en una bola enfriada por hielo seco/acetona colocada en la parte inferior del aparato de pirólisis. El producto se recrystalizó de acetato de etilo, se obtuvieron 0.018 g (10%) de cristales con p.f. 190-2°C.

Sus datos espectroscópicos son los mismos que el obtenido a partir del ácido N,N'-etilenbismaleámico.

## N,N'-BISMALEIMIDA (VII)

### a) Acido N,N'-bismaleámico (II).

En un matraz Erlenmeyer de 500 ml se colocaron (0.2-- mol) de anhídrido maleico y 200 ml de ácido acético, la--- mezcla se agitó hasta disolución completa del anhídrido a--- cético.

En otro matraz Erlenmeyer de 250 ml enfriado por un-- baño de hielo se colocaron 100 ml de ácido acético y se a-- dicionaron 5.1 g (0.102 mol) de hidrato de hidrazina.

La mezcla anterior se adicionó al anhídrido maleico-- disuelto en ácido acético. Se agitó por un período de 1 hr tiempo en el cuál se formó un precipitado amarillo corres-- pondiente al ácido N,N'-bismaleámico (II), el cuál se fil-- tró y lavó con ácido acético.

### b) N,N'-bismaleimida (VII).

En un matraz bola de 100 ml se colocaron 5 g (0.02192 mol) del ácido N,N'-bismaleámico(II), 0.999 g (0.012 mol)- de acetato de sodio y 7.75 g (0.076 mol) de anhídrido acé-- tico. La mezcla se agitó y calentó en un intervalo de tem-- peratura de 60-70°. A los 15 min se virió la solución en-- un recipiente con hielo precipitando el producto, se fil-- tró el sólido y se lavó con solución al 10% de bicarbonato de sodio. Se recrystalizó de acetato de etilo obteniéndose 0.56 g (13.3%) p.f. 177-9°C.

IR (KBr) 3100 (=C-H), 1760 y 1740 (C=O), 1150 (C-H) y 840- (=C-H).

RMP (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 7.02 ppm (H<sub>2</sub>C=C<sub>2</sub>H).

Síntesis de N,N'-bismaleimida por pirólisis del aducto N,N'-bis(7-oxabicyclo-2,2,1-5 heptendicarboximida) (V).

a) Obtención del aducto N,N'-bis(7-oxabicyclo-2,2,1-5 heptendicarboximida) (V).

En un matraz Erlenmeyer de 100 ml se colocaron 16.6g (0.1 mol) del anhídrido III en 100 ml de ácido acético glacial y se agitó hasta disolución. Se adicionaron al matraz 2.5 g (0.05 mol) de hidrato de hidrazina durante 15 min -- con agitación. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente 1 hr y a 50-60° por 1 1/2 hrs dejándose a temperatura ambiente toda la noche. Se formó un precipitado blanco de N,N'-bis(7-oxabicyclo-2,2,1-5 heptendicarboximida) (V). El cual se filtro y lavó con metanol, se obtuvieron 8.2 g -- (50%).

b) Pirólisis del aducto N,N'-bis(7-oxabicyclo-2,2,1-5 heptendicarboximida). (V).

Se efectuó el retro Diels-Alder para lo cual se calentó la columna del aparato de pirolisis a 300°C. El producto V se pasó a través de la columna caliente usando nitrógeno como gas acarreador recogiendo la N,N'-bismaleimida (VII) en la parte inferior del aparato en una bola enfria-

da por hielo seco/acetona. El producto se recristalizó de acetato de etilo obteniéndose 0.6312 g (13.15%) p.f. 176--178°C.

Su infrarrojo y resonancia son iguales a los obtenidos por el ácido N,N'-bismaleámico.(II)

#### N-METILOLMALEIMIDA (XIII).

Su síntesis se efectuó como se describe en la referencia 14.

En un matraz bola de 50 ml se colocaron 10 g (0.1 mol) de maleimida (XII) con 8.35 g (0.1 mol) de formaldehído al 37% y se mantuvo con agitación a una temperatura de 30°.-- Se adicionaron 3 gotas de hidróxido de sodio al 5%. A los 10 min toda la maleimida se disolvió y alcanzó una temperatura de 35°C debido a que la reacción es exotérmica. Después de 2.5 hrs a temperatura ambiente se forma un precipitado que se filtró y el producto se recristalizó de acetato de etilo obteniéndose 9.81 g (74.94%) p.f. 100-1°C.

IR (KBr) 3500-3300 (O-H), 3100 (=C-H), 1700 (C=O), 1360 (C-O-H), 1160 (C-O), 1000 (C-H), 840 (C-H) y 650-200 (O-H).

RMP (CDCl<sub>3</sub>) δ: 6.88 (s, 2H, H<sub>2</sub>C=C<sub>2</sub>H), 5.52-5.63 (señal ancha 1H, OH) i<sub>D</sub><sub>2</sub>O, y 4.98 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

#### N-CLORO-METILMALEIMIDA (XIV).

En un matraz bola de 50 ml enfriado por un baño de -- hielo se colocó 1g (0.008 mol) de N-metilolmaleimida XIII-- disuelta en 5 ml de acetona seca se adicionaron a continua-- ción 0.43 g (0.003 mol) de tricloruro de fósforo. La solu-- ción se agitó por 45 min y se evaporó la acetona a presión-- reducida, el residuo cristalino se le adicionaron 5ml de-- agua fría, obteniéndose 0.8838 g de XIV (77.18%) p.f. 78-- 79°C.

IR (KBr) 3100 (=C-H), 1710 (C=O), 1580 (C=C), 1150 (-CH<sub>2</sub>-) y 840 (=C-H).

RMP (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 6.88 ppm (s, 2H, H<sub>2</sub>C=C-H), 5.36 ppm (s, 2H, --- -CH<sub>2</sub>-).

#### N-BROMOMETILMALEIMIDA (XV)

En un matraz bola de 50 ml enfriado por un baño de -- hielo se colocaron 2 g de (0.0157 mol) de metilolmaleimida (XIII) en 10 ml de acetona seca, a continuación se agrega-- ron gota a gota 1.6 g (0.006 mol) de tribromuro de fósforo  $\delta$ =2.88 . La solución se agitó por media hora luego se e-- vaporó parte de la acetona a presión reducida. La solución-- resultante se purificó pasándola rápidamente a través de -- 20 g de florisisil en una columna de 2 cm de diámetro usando benceno-acetato de etilo 80-20 como eluyente. Se evaporó -- el disolvente obteniéndose 2.72 g de unos cristales blan-- cos purificados por sublimación de XV cuyo rendimiento co-- rresponde a 50% y cuyo p.f. es 80-2°C.

IR (KBr) 3100 (=C-H), 1720 (-CH<sub>2</sub>-), 1150 (C-H), 840 (C-H)-  
y 840 (C-Br).

RMP CDCl<sub>3</sub> δ: 6.89 (S, 2H, H<sub>2</sub>C=C-H) y 5.33 (S, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

N,N'-DIHIDROXIETILENBISMALEIMIDA (XV).

En un vaso de precipitado de 100 ml se colocaron 5 g. (0.051 mol) de maleimida (XII) y 50 ml de agua. En otro vaso de precipitado de 100 ml se colocaron 3.7 g de glioxal al 40% con bicarbonato de sodio hasta pH=8. La mezcla anterior se adicionó en el vaso de precipitados que contenía la maleimida, precipitando un producto cristalino al poco tiempo. Se adicionaron durante el periodo de reacción tres porciones de NaHCO<sub>3</sub> al 10% para mantener el pH cerca de 8, usando un potenciómetro con un electrodo de vidrio y calomel como referencia. La mezcla se dejó a temperatura ambiente toda la noche, alcanzándose un pH de 6. El precipitado se filtró y lavó con agua destilada obteniéndose 2.08 g (32%) del producto XVI p.f. 172-4°.

IR(KBr) 3500-3400 (OH-), 3100 (=C-H), 1700 (C=O), 1400 (C-O-H), 1150 (C-O), 1080 (C-H), 840 (=C-H).

RMP (DMSO + CDCl<sub>3</sub>) δ: entre 7.7-7.9 (señal ancha, 2H, i<sub>D</sub><sub>2</sub>O), 6.9 (S, 2H, H<sub>2</sub>C=C-H), 6.05 (S, H, -CH-CH-)

C O N C L U S I O N E S

- 1 - Se describe la síntesis de: 1-H-pirrol-2,5-diona; N,N'-etilenbismaleimida; N,N'-bismaleimida; N-metilolmaleimida; N-clorometilmaleimida; N-bromometilmaleimida y N,N'-dihidroxi-etilenbismaleimida.
- 2.- Se discute la comprobación de la estructura de N,N'-etilenbismaleimida y N,N'-bismaleimida a través de síntesis inequívoca y datos espectroscópicos.
- 3.- Con respecto al comportamiento de las maleimidias como reactivos de entrecruzamiento, se determinaron diferentes propiedades las cuales nos pueden ayudar a determinar cuales son los parámetros involucrados en la inhibición.

con respecto a la reactividad de las maleimidias hacia los grupos -SH se encontró que las maleimidias más reactivas fueron N,N'-etilenbismaleimida y N,N'-bismaleimida y respecto a las maleimidias como inhibidores de la síntesis de ATP se encontró que las más activas fueron: bismaleimidometil eter; N,N'-etilenbismaleimida, y N,N'-bismaleimida lo cual nos revela que la inhibición puede estar determinada por:

- 1) la reactividad de las maleimidias hacia los grupos -SH.
- 2) la distancia de los centros reactivos, encontrán-



dose mayor inhibición cuando dicha distancia es de  
5.5-8 A°

3) la presencia de grupos hidrofílicos en la molécula.

- B I B L I O G R A F I A

- 1.- McCarty, R. E. Ann. Rev. Plant. Physiol, 30, 79-104, (1979).
- 2.- Weiss, M. A. and McCarty, R. The Journal of Biological Chemistry 252, (22), 8007-12, (1977).
- 3.- Moroney, J. and McCarty, R.E. The Journal of Biological Chemistry. 8951-5, (1980).
- 4.- II Congreso de Química del Continente de América del Norte, Las Vegas, (1979), (Albores Velasco, Marta y Lotina Hennssen, Blas.
- 5.- Lehninger, A. L. Bioquímica, pp. 599-627. 2a. Edición, Ediciones Omega (1979).
- 6.- McCarty, R.E., et. al. The Journal of Biological Chemistry, 247 (10) 3048-51 (1972).
- 7.- Moroney, J. V. et al. The Journal of Biological Chemistry 255 (14), 6670-4, (1980).
- 8.- Finn Wold. Methods in Enzymology XXV. Enzymes Structure Part. B p.p. 623-651, (1972).
- 9.- Moore, J. E and Ward, W. H. JACS 78, 2414-18, (1956)
- 10.- Farron, F. and Racker, E. Biochemistry 9 (15), 3829-36, (1970).
- 11.- Kwart, H. and Burchuk, I. JACS 74, 3094-7, (1952).
- 12.- Berson, J.A. and Swidler, R. JACS 74, 2835-6, (1954).
- 13.- Tawney, P. O. et al JOC 25, 56-60, (1960).
- 14.- Tawney et al JOC 26, 15-21, (1961).
- 15.- Vail, S. L. and Pierde, A. G. Jr. JOC 37 (3), 391-3, (1972).

- 16.- Vail, S. L. et al JOC 30,1195-9, (1965).
- 17.- Tsuo, K-C. et al JACS 77, 4613-16, (1955)
- 18.- Roderick, W. R. JACS 79, 1710-12, (1957).
- 19.- Feuerver, H. and Rubinstein, H. JACS 80,5873-7, (1958).
- 20.- Coleman,L. E. et al JOC 24, 135-6, (1959).
- 21.- Cotter, R. J. et al JOC 26, 10-15, (1961).
- 22.- Roderick, W. R. and Bhatia, D. L. JOC 28, 2018-24, (1963)
- 23.- Sherrill, M. L. et al JACS 50, 474-85, (1928).
- 24.- Hedaya, E. et al JOC 31, 1317-1326, (1966)
- 25.- Sauers, C. K. JOC 34, 2275-9, (1969).
- 26.- Pyriadi, T. M. y Harwood, H. J. JOC 36, 821-3, (1971).
- 27.- Narita, M. et al Bull. Chem. Soc. of Japan 44, 437-441, (1971).
- 28.- Narita, M. et al Bull. Chem. Soc. of Japan 44. (4),1084-1089, (1971).
- 29.- Kovacic, P. and Hein, R. W. JACS 81, 1187-90, (1959).
- 30.- Hedaya et al. JOC 31(5),1311-6, (1966).
- 31.- C.A. 83,78646.
- 32.- Kosower, E. M. et al JACS 6516-8, (1978).
33. Kosower, N. et al Proc. Nat. Acad Sci. 76,3382-6, (1979)
- 34.- Gregory, J. D. JACS 77, 3922-3, (1955).
- 35.- Alexander, N. H. Analytical Chemistry 30 (7),1292-4,--- (1958).
- 36.- Mustata, A. et al JOC 26,787-9, (1961).
- 37.- Roberts, E. and Rouser G. Analytical Chemistry 30 (7),-1291-2, (1958).

38.- Lee, C. C. and Samiels, E. R. Canadian Journal of Chemistry 42, 167-9, (1964).

39.- Hansch, C. and Fujita, T. JACS 86, 1616-24, (1964).