



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS DE DERIVADOS DE SORBATO DE ETILO Y
SU DETERMINACION DE ACTIVIDAD BIOLOGICA EN
ARTEMIA SALINA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ALMA ROSA JIMENEZ CRUZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D.F.

1994





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 está 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

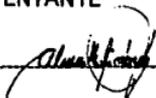
- PRESIDENTE:** Prof. Rocío Pozas Horcasitas
- VOCAL :** Prof. María de Jesús Cerecer Beltrán
- SECRETARIO :** Prof. Agustín Palma de la Cruz
- 1er. SUPLENTE :** Prof. Ernestina Cervera Flores
- 2o. SUPLENTE :** Prof. Baldomero Esquivel Rodríguez

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

DEPARTAMENTO DE QUIMICA ORGANICA DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO , FACULTAD DE QUIMICA , UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO.

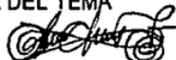
SUSTENTANTE

Alma Rosa Jiménez Cruz .



ASESOR DEL TEMA

Q. Agustín Palma de la Cruz.



*Es mucho mejor atreverse a grandes cosas
obtener triunfos gloriosos aunque estén salpicados por
fracasos, que clasificarse entre esos pobres espíritus
que ni disfrutan mucho ni sufren mucho ,porque viven
en las tinieblas grises que no conocen ni victoria ni
fracaso.*

Teddy Roosevelt.

DEDICATORIA

***Este trabajo se lo dedico a la persona que siempre me ha
apoyado e impulsado a salir adelante :***

Mi Madre

Sra. Rosa Julia Cruz López

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a:

La Dra. Rocío Pozas

y

El M.C. Agustín Palma De La Cruz

Por haberme brindado un tema tesis y su valiosa ayuda para realizarlo.

CONTENIDO

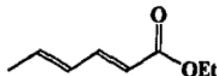
CAPITULO	Página
1.0 INTRODUCCION	1
2.0 ANTECEDENTES	3
2.1 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA	4
2.1.1 FARMACOLOGIA	4
2.1.2 ENSAYOS BIOLOGICOS	5
2.1.3 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA EN <i>Artemia salina</i>	9
2..2 APLICACIONES DE LOS DERIVADOS DEL ACIDO SORBICO Y DEL SORBATO DE ETILO	16
2.2.1 DERIVADOS DE ACIDO SORBICO Y SUS SALES.	16
2.2.2 DERIVADOS DE SORBATO DE ETILO Y DE METILO	18
2.3 METODOS DE SINTESIS DE 6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO Y 6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIEN-1-OL	23
2.3.1 DERIVADOS DE 6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO	23
2.3.2 DERIVADOS DE 6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIEN-1-OL	27
3.0 PARTE EXPERIMENTAL	28
3.1 SINTESIS DE 6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO Y DE 6-ARILOXI -2E,4E-HEXADIEN-1-OL	30
3.2 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLOGICA EN <u><i>Artemia salina</i></u>	40
4.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	44
5.0 CONCLUSIONES	59
6.0 BIBLIOGRAFIA	62

1.0 INTRODUCCION

Los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos en altas dosis sin embargo en bajas concentraciones pueden tener una acción sobre los seres vivos ya sea de curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades. La muerte de un organismo zoológico cuando se realiza una prueba in vivo puede servir convenientemente como un monitor para el descubrimiento de un nuevo producto natural o sintético bioactivo.

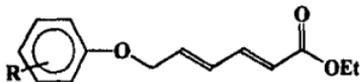
Las pruebas de actividad biológica sobre larvas de *Artemia salina* constituyen un método rápido, reproducible, económico y conveniente como un bioensayo general para compuestos y extractos de plantas³. Se encontró en otros trabajos que éste bioensayo es predictivo de propiedades insecticidas y antiparasitarias de los compuestos probados²⁰.

El sorbato de etilo es un derivado del ácido sórbico con la siguiente fórmula:



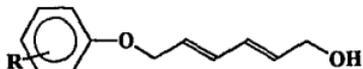
Ambos tienen actividad fungicida por lo que se usan como conservadores de alimentos^{32,27}. En otros trabajos se encontró que algunos derivados de sorbato de metilo tienen actividad biológica en vegetales, como herbicidas, y en algunos casos como reguladores de crecimiento³⁷.

En este trabajo se sintetizaron derivados del sorbato de etilo (6-*ariloxi*-2,4-hexadienoato de etilo) introduciendo en la posición 6 grupos ariloxi con diferentes sustituyentes en el anillo aromático:



R= H ; o-Br; m-Br; p-Br; m-F; m-CF₃ ; p-MeO.

Posteriormente algunos de los ésteres obtenidos (6-ariloxi -2,4-hexadienoato de etilo) se redujeron a su correspondiente alcohol (6-ariloxi -2,4-hexadien-1-ol):



R= H ; o-Br ; m-Br; p-Br.

El objetivo de hacer estas modificaciones en el sorbato de etilo fue el de tratar de incrementar su actividad biológica. Para evaluar ésta actividad se hicieron pruebas de letalidad (Dosis-Respuesta) sobre la larva de camarón (Artemia salina), tomando en cuenta que este estudio es preliminar para sugerir otros bioensayos específicos con los derivados de sorbato de etilo sintetizados.

2.0

ANTECEDENTES

2.1 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

2.1.1 FARMACOLOGÍA

La Farmacología es la ciencia que estudia a las drogas entendiéndose por droga o fármaco en su acepción general, a toda sustancia que tiene acción sobre los seres vivos. Desde el punto de vista médico, fármaco es toda sustancia que puede utilizarse para la curación, mitigación, tratamiento o prevención de las enfermedades del hombre u otros animales.

La Farmacología abarca diversos campos que comprenden la farmacognosia, farmacodinámica, farmacocinética, farmacotécnica, terapéutica y toxicología, como las cuales a continuación :

- a) Farmacognosia. Estudia el origen, caracteres, estructura anatómica y composición química de los fármacos naturales del reino vegetal y animal, así como sus constituyentes, todo lo cual asegura su identificación .
- b) Farmacodinamia. Estudia la acción de los fármacos sobre los organismos vivos, animales y humanos y constituye la parte más importante de la farmacología , ya que el conocimiento de la acción farmacológica es esencial para su aplicación en el tratamiento o prevención de las enfermedades .
- c) Farmacocinética. Comprende el estudio de la absorción, penetración, distribución y excreción de los fármacos en el organismo.
- d) Farmacotécnica. Se encarga de la preparación de los fármacos para su administración al paciente.
- e) Toxicología. Es el estudio de los venenos y sus efectos adversos en el hombre (seres vivos). Veneno o tóxico es una sustancia que por sus propiedades químicas es capaz de destruir la vida o dañar la salud, es decir , una sustancia que puede producir manifestaciones o reacciones perjudiciales, adversas o nocivas .Es así que muchos fármacos son capaces de actuar como venenos y a menudo es difícil la separación de sus propiedades farmacológicas y toxicológicas. La toxicología constituye de por sí una disciplina que incluyen el origen, química, acción tóxica, investigación, diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones, disciplina que guarda íntimas relaciones con la medicina legal, industrial y salud pública, por lo que se considera como una disciplina aparte de la farmacología.

2.1.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS¹

Un tema importante de la farmacodinamia se refiere a la valoración o ensayo biológico de los fármacos, entendiéndose como la medición de la potencia de los fármacos determinando la concentración de los principios activos que contienen. Existen dos tipos de valoraciones:

- a) **Ensayo químico.** Determina por métodos químicos la concentración de principios activos de un compuesto determinado. El ensayo químico es el más exacto.
- b) **Ensayo biológico.** En este tipo de ensayo se determina la concentración de sustancias activas por medición de la respuesta farmacológica que ellas provocan en los animales o tejidos vivos de prueba. Se trata de métodos menos exactos que los químicos y se emplean cuando estos últimos son poco sensibles a las sustancias activas.

El ensayo biológico tiene la desventaja de ser más laborioso que el químico ya que requiere del uso de animales e inversión de tiempo, sin embargo presenta ventajas en cuanto especificidad y en algunas ocasiones llega a ser más sensible que el método químico. Si no existe una concordancia entre los resultados de los métodos biológicos y químicos para la valoración de una sustancia farmacológicamente activa el ensayo biológico se considera más exacto por definición.

CLASIFICACION DE LOS METODOS BIOLÓGICOS^{1,2}

La clasificación de los métodos biológicos depende del tipo de respuesta que generan las sustancias activas en los organismos vivos. Las respuestas pueden ser graduales o cuantales.

a) **Respuestas graduales o cuantitativas:** Son aquellas en las que se mide la magnitud de la respuesta, por ejemplo, el peso de un animal o la amplitud de una contracción muscular.

b) **Respuestas cuantales, cualitativas o del todo o nada.** Es decir existentes o no existentes, por ejemplo la muerte.

Tomando en cuenta estos conceptos los métodos se clasifican en dos grupos :

1. Métodos directos basados en la dosis umbral. Consisten en medir la dosis umbral en cada animal al que se administra el fármaco lentamente, por lo común por vía intravenosa hasta observar el efecto, en general la muerte o sea una respuesta del todo o nada.

2. Métodos indirectos basados en respuestas graduales. Consisten en determinar dichas respuestas en distintos animales, divididos en grupos por lo menos en número de seis para cada uno a los que se suministran diferentes dosis del preparado standard y del desconocido, comparándose los efectos.

CURVAS DOSIS RESPUESTA^{1,2}

Para tratar de establecer el mecanismo de acción de una sustancia, analizando esta acción, es indispensable encontrar primero las relaciones de magnitud entre las dosis del fármaco y la intensidad de los efectos producidos o las respuestas, lo que da lugar a la llamada curva DOSIS-RESPUESTA. Dicha curva puede establecerse mediante estudios efectuados en organismos enteros, aislados o células únicas. Dependiendo del tipo de respuesta (cuantal o gradual) será la curva.

Curva Dosis-Respuesta Gradual : Al establecer la curva-dosis respuesta se toman en las abscisas los logaritmos de las dosis en lugar de las dosis mismas. pues, se ha demostrado que para los cálculos es más exacto ya que en esta forma la distribución de los valores se adapta mejor a la curva normal y en las ordenadas se toma la respuesta en forma absoluta. En todos los casos la curva dosis-respuesta es sigmoidea, pero si se considera la parte central de esa curva es lineal o rectilínea tomando el nombre de línea de regresión lo que facilita los cálculos pertinentes (figura 1).

Curva Dosis-Respuesta cuantal : Al trazar la curva se coloca la dosis en la abscisa, y en la ordenada el porcentaje de los animales con respuesta farmacológica positiva obteniendo una curva sigmoidea denominandose curva característica de la droga, de ésta curva puede deducirse el efecto determinado en el cincuenta por ciento de los casos es decir la dosis efectiva 50% o dosis media (DE_{50}), también se puede deducir la dosis letal 50% (DL_{50}), (figura 2). La curva de la figura 2 puede ser linearizada mediante un tratamiento estadístico de manera que exista proporcionalidad entre el logaritmo de la dosis y la respuesta. Este método se basa en la transformación de la curva sigmoidea o curva de frecuencia integrada en la curva normal de distribución de frecuencias (figura 3), por lo que a cada porcentaje de respuesta positiva (muerte por ejemplo) en la ordenada corresponde a un múltiplo de la desviación standard en las abscisas. A los valores de desviación standar correspondientes si se les suma 5 dá el probit correspondiente a cada porcentaje que también puede leerse directamente en tablas. Si se relacionan los logaritmos de las dosis y los probits correspondientes a los porcentajes de las respuestas cuantales observadas se obtiene una línea de regresión recta que hace posible la comparación entre dos o mas sustancias probadas (figura 4).

El cálculo de los probits asegura que la distribución es normal y facilita la linearización de las curvas no lineales. por ejemplo en la figura 4 la distribución es lognormalmente distribuida. En la actualidad este tratamiento es simplificado por medio de programas de computación que invierten menos tiempo.

FIGURA 1

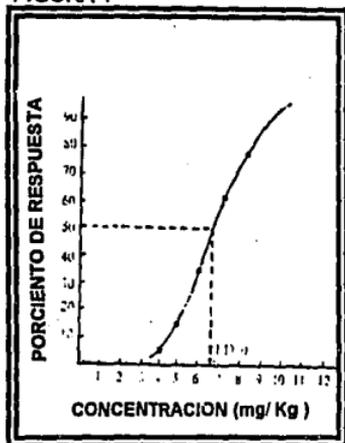


FIGURA 2

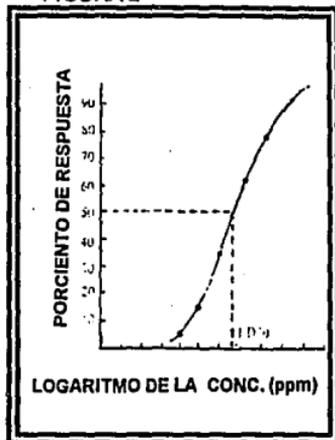


FIGURA 3

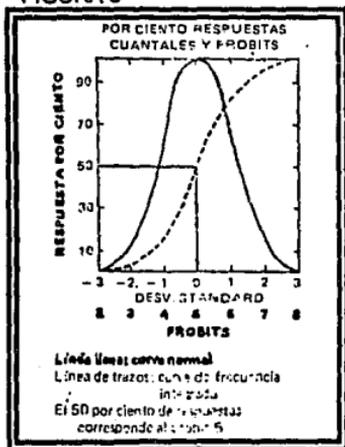
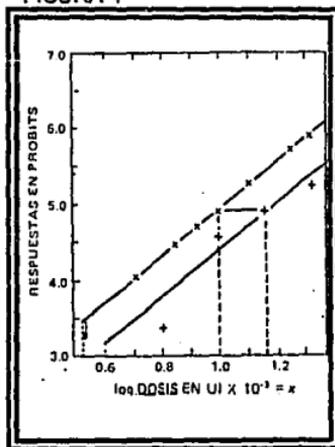


FIGURA 4



2.1.3 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN Artemia salina

Los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos en altas concentraciones sin embargo en bajas concentraciones pueden tener una acción sobre los seres vivos ya sea de curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades. La farmacología es la simple toxicología de una dosis baja o la toxicología es la simple farmacología de una dosis alta³. Por eso la muerte in vivo en un simple organismo zoológico puede ser usado convenientemente como un monitor para descubrir un nuevo producto natural o sintético bioactivo.

Muchos compuestos nuevos ya sean naturales o sintéticos pueden tener una determinada actividad biológica útil, que puede quedarse sin conocerse durante años. Existen bioensayos costosos y complicados que vale la pena aplicarlos a sustancias y extractos con actividad específica importante.

Los productos naturales o sintéticos más activos son tóxicos a elevadas dosis, para detectar una posible actividad biológica se ha desarrollado un bioensayo general efectivo que es simple de demostrar para sustancias tóxicas sobre sistemas zoológicos. Si en alguna sustancia es detectada una actividad importante puede emplearse posteriormente un bioensayo más sofisticado y específico. Dicha prueba general es rápida económica y fácil de realizar en el laboratorio, para esto se emplea un pequeño crustáceo, camarón de aguas salobres (Artemia salina), como una herramienta para monitorear fisiológicamente la actividad de los compuestos puros o extractos de plantas.

Los huevecillos de Artemia salina están disponibles a bajo costo en el mercado como alimento de peces, y permanecen viables por años en estado seco. Los huevecillos se incuban en una solución salada entre 24-48 horas produciéndose un gran número de larvas (*nauplio*), que es la etapa en la que se realiza el bioensayo.

BIOLOGIA DE Artemia salina

El camarón de agua salada muestra un cuerpo delicado y alargado con una característica de ausencia de caparazón . La segmentación es claramente desarrollada y tres regiones son evidentes : cabeza , torax y abdomen. Figura 5 y 6. El individuo tiende a medir de 10 a 12 mm de longitud dependiendo de la especie, aunque esto se ve generalmente afectado por la temperatura y su color es generalmente rojo brillante dependiendo del grado de oxigenación.

Artemia salina es un miembro de los crustaceos anostracas (sin caparazón) y pertenece a la subclase branqueópoda y se encuentra en lagos de aguas saladas en todo el mundo. A. salina en estado seco permanece enquistado , la reanudación de la actividad metabólica y la eclosión (salir del huevo) está resumida en la hidratación sobre un cierto humbral (0.65g H₂O/g de quistes secos) el cual es un valor medio aproximado de la hidratación completa del quiste. El mecanismo no está completamente establecido pero dos fases son clamente establecidas: 1) El "estado de rompimiento", es la fase en la cual el prenauplio estalla completamente y 2) "La emergencia" o la eclosión propiamente dicha es aquella en la cual la membrana cuticular es disuelta y el nauplio emerge nadando libremente. La etapa de eclosión varía notablemente entre los crustáceos, en el caso de A. salina los huevos eclosionan como larvas nauplio. Este crustáceo ha sido extensamente estudiado , puede tolerar salinidades que fluctúan desde 10 % del agua de mar , al punto de saturación del cloruro de sodio.

La presión osmótica varía ligeramente con las condiciones ambientales. Esta presión osmótica nunca cae por debajo del equivalente de aproximadamente 1% de cloruro de sodio, ni excede el 2.8 %, incluso cuando se encuentra en una solución de cloruro de sodio al 30 % . La regulación iónica se conserva por la absorción o excreción de sales a través de las branquias . Se sabe también que A. salina puede excretar orina hiperosmótica respecto a su sangre ; cuando el animal se encuentra en aguas salubres , la presión osmótica de la orina es cuatro veces superior a la de la sangre⁴.

Las primeras referencias sobre A. salina se hicieron por Schlosser (1756) notificando la presencia de un "curioso animal " en las calderas saladas , posteriormente en 1758 , Linneus introduce este animal en el Sistema Natural con el nombre de Cancer Salinus. La descripción más moderna del género es acordada por Leach (1819) .

FIGURA 5

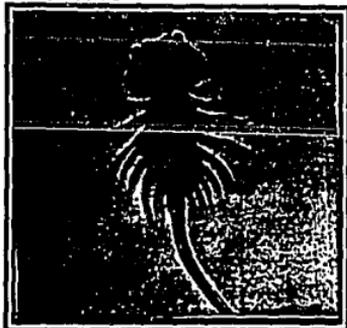


FIGURA 6



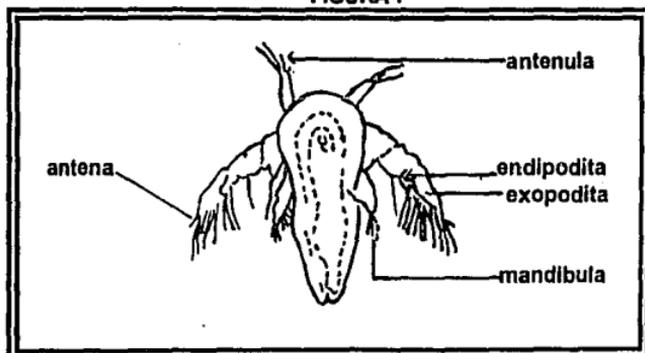
DESARROLLO DE LA LARVA .

El crecimiento es acompañado a través de una serie de estadios , la nomenclatura pura en el estado del crecimiento animal difiere entre autores pero generalmente corresponde a la serie de estadios o modelos. La duración entre cada periodo se vé fuertemente afectada por la temperatura del medio.

Durante los primeros estadios de desarrollo el canal digestivo no es desarrollado completamente sin embargo sobrevive. Las antenas son relativamente largas y sirven como apéndices de locomoción , dando a las larvas su característica de movimiento nadando. Una vez establecida la operación del sistema digestivo la antena actúa como una parte más.

A continuación se muestran los esquemas de los primeros tres estadios de Artemia salina nauplius de California Figuras 7,8 y 9.

FIGURA 7

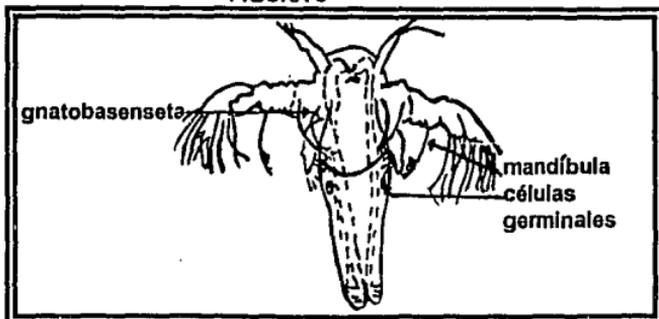


Tiempo de incubación : 10 horas

Temperatura : 20 °C

Tamaño : 450-475 μ

FIGURA 8

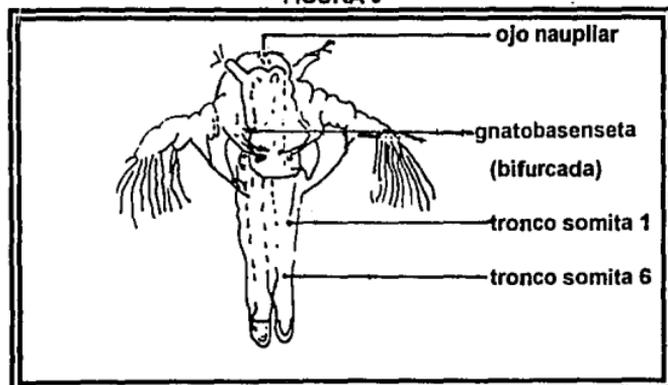


Tiempo de incubación : 20 horas

Temperatura : 20 °C

Tamaño : 630 μ

FIGURA 9



Larva después del segundo estadio larvario

Tiempo de incubación : 40 horas

Temperatura : 20 °C

Tamaño : 725 μ

El uso de Artemia salina en otros bioensayos ya se reportaba desde antes de los años cincuenta, por ejemplo: su aplicación en el análisis de residuos de pesticidas ^{5,6}; como una prueba animal para la determinación de insecticidas por contacto ⁷; como un indicador de componentes tóxicos en aguas residuales ⁸; para determinación de toxicidad de productos como surfactantes, NaOH, Na₂S, CuSO₄, ZnSO₄, en la superficie de aguas ⁹, toxicidad de micotoxinas ^{9,10,13}; toxicidad en taninos ¹¹; detección de insecticidas organofosforados en productos cárnicos ¹²; efecto de la toxicidad de herbicidas en los crustáceos ¹⁴.

En la actualidad se sigue aplicando A. salina para la determinación de toxicidad en diversos campos como: en colorantes para alimentos ^{15,16}; en fungicidas ¹⁷; en la determinación de toxicidad y actividad biológica de productos naturales ³; pruebas de toxicidad en aguas residuales ¹⁸; en anestésicos ¹⁹; toxicidad de micotoxinas ²¹; toxicidad de polímeros de tributil acrilato ²²; como una prueba general para determinar sustancias con posible actividad antitumoral ³.

Artemia salina como una posible alternativa para sustituir una prueba específica para determinar compuestos antiparasitarios y/o insecticidas en análogos de avermectinas ²⁰.

Los derivados de avermectina son lactonas macrocíclicas naturales que presentan una alta actividad antiparasitaria, para probar esta actividad biológica en compuestos naturales y sintéticos existen bioensayos utilizando Caenorhabditis elegans. Este bioensayo es apropiado para detectar antihelmínticos sin embargo requiere de mucho trabajo para su realización. Por tal motivo se propuso un bioensayo alternativo que involucra el uso de larvas de Artemia salina ²⁰ el cual se ha venido utilizando por mucho tiempo para determinar toxicidad en compuestos orgánicos ²⁰. A este bioensayo se le hicieron modificaciones para adaptarlo en la determinación de antiparasitarios en estos compuestos (derivados de Avermectinas) y el criterio que se siguió para determinar las dosis de toxicidad fue IC100 (concentración de inmovilización en el 100% de los animales de prueba) obteniéndose valores entre 0.11a > 55.5 ppm:

TABLA I. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE AVERMECTINA EN
LARVAS DE Artemia salina.

COMPUESTO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA IC100 (PPM)
Avermectin B2	0.165
4"-epi-amino-4"-deoxiavermectin B1	1.73
2-epi-avermectin B1	55.5

Se han reportado valores de actividad biológica en Artemia salina de algunos insecticidas comerciales como los que a continuación se presentan ⁷:

TABLA II

INSECTICIDA COMERCIAL	TOXICIDAD DL50 (ppm)
DDT	0.15
THIODAN	0.15
LINDANE	1.00
CLORDAN	1.00
TOXAPHENE	0.60
HEPTACLOR	0.60
ALDRIN	0.60
DIELDRIN	0.60
PARATHION	0.15
CLORTION	0.15
DIAZINON	0.10-0.30
DIPTEREX	0.10-0.30
SYSTOX	>10.0
METASYSTOX	>10.0

· TABLA I. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE AVERMECTINA EN LARVAS DE *Artemia salina*.

COMPUESTO	ACTIVIDAD BIOLÓGICA IC ₁₀₀ (PPM)
Avermectin B2	0.165
4"-epi-amino-4"-deoxiavermectin B1	1.73
2-epi-avermectin B1	55.5

Se han reportado valores de actividad biológica en *Artemia salina* de algunos insecticidas comerciales como los que a continuación se presentan ⁷:

TABLA II

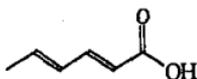
INSECTICIDA COMERCIAL	TOXICIDAD DL ₅₀ (ppm)
DDT	0.15
THIODAN	0.15
LINDANE	1.00
CLORDAN	1.00
TOXAPHENE	0.60
HEPTACLOR	0.60
ALDRIN	0.60
DIELDRIN	0.60
PARATHION	0.15
CLORTION	0.15
DIAZINON	0.10-0.30
DIPTEREX	0.10-0.30
SYSTOX	>10.0
METASYSTOX	>10.0

2.2 APLICACIONES BIOLÓGICAS DE LOS DERIVADOS DE ÁCIDO SORBICO Y SORBATO DE ETILO.

2.2.1 DERIVADOS DEL ÁCIDO SORBICO

El ácido sórbico fue aislado por primera vez de las bayas del fresno en 1859 por A.W. Van Hoffman, un químico alemán. La estructura del ácido sórbico fue determinada alrededor de 1880, y sintetizado por primera vez por O. Doebner en 1900. Más tarde se descubrió que el ácido sórbico era un conservador antimicrobiano poderoso y en 1945 fue patentado en E.A.U. El ácido sórbico es reconocido como un agente fungistático efectivo para alimentos. Desde entonces el ácido sórbico y sus sales han sido usados en alimentos como efectivos inhibidores de hongos y ciertas bacterias²³.

El ácido sórbico es un ácido graso monocarboxílico E,E insaturado con la siguiente fórmula:

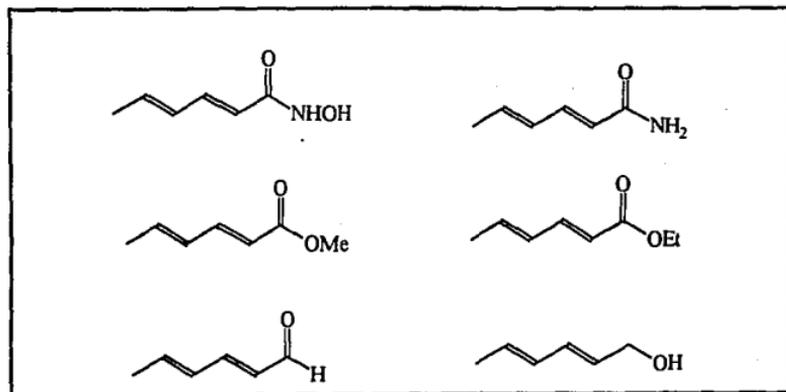


El ácido sórbico tiene mayor actividad antimicrobiana cuando la molécula se encuentra sin disociarse que cuando está disociado, por lo que su efectividad puede alcanzar hasta un pH máximo de 6.0. El ácido sórbico es metabolizado y eliminado por el hombre como cualquier otro ácido graso a través de la β -oxidación y por lo tanto no es tóxico²⁴. Se propone que la acción de este ácido como conservador está basada en la propiedad de unirse a la superficie de las células microbianas, modificando la permeabilidad de la membrana y el metabolismo²⁴. También se ha sugerido que su estructura de dieno interfiere con el sistema enzimático de las deshidrogenasas de los microorganismos²⁴. Otro mecanismo de inhibición propuesto se basa en el hecho de que el ácido sórbico está sujeto a reacciones de oxidación debido a su insaturación, lo que produce radicales libres que atacan a la membrana de la célula, induciendo reacciones secundarias que inhiben el crecimiento microbiano²⁴.

En la actualidad el ácido sórbico y sus sales siguen utilizándose como conservadores de alimentos tales como emulsiones , grasas , quesos , carne, pescado, vegetales y frutos ya que tienen actividad fungicida ^{25,26,27,28,29}. También se reporta en la literatura como un conservador en cosméticos y productos farmacéuticos ³⁰. Se utiliza en la medicina veterinaria como un antibacterial en la prevención de mastitis³¹.

Se han estudiado otros derivados del ác. sórbico tales como ác. sórbihidroxinámico , sorbamida , sorbato de metilo , sorbato de etilo, 2,4-hexadienol y sorbaldehido encontrando que también tienen actividad fungicida. Estos se usan también como conservadores en productos alimenticios y farmacéuticos³² ya que inhiben el crecimiento de *Aspergillus niger* ,evitando el desarrollo de sabores y olores indeseables (Esquema 1).

ESQUEMA 1

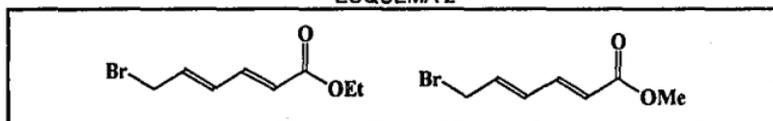


3.2.2 DERIVADOS DE SORBATO DE ETILO Y DE METILO

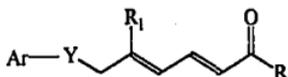
El sorbato de etilo es un líquido transparente y denso, derivado del ácido sorbico, forma parte de los componentes volátiles en la maduración de frutos³³. Es utilizado como un conservador en cosméticos, también se usa para conservar frutos y vegetales empacados en bolsas de polietileno, pues como se ha mencionado posee actividad antifungal^{34,35} (Esquema 1).

El bromo sorbato de etilo es el derivado bromado en la posición 6 del sorbato de etilo. Se encontró que este compuesto fue probado como herbicida y regulador de crecimiento vegetal también se ha probado el sorbato de metilo³⁶ (Esquema 2).

ESQUEMA 2



Los derivados 6-Ariloxi-2,4-hexadienoato de etilo no se han reportado aún en la literatura sin embargo se encontró en una patente de 1983 la síntesis y actividad herbicida de derivados 6-Ariloxi-2,4-hexadienoato de metilo³⁷:



R = OH, SH, NH₂, OCH₃

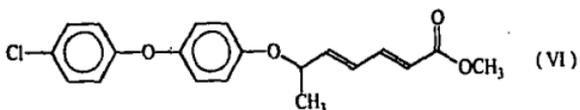
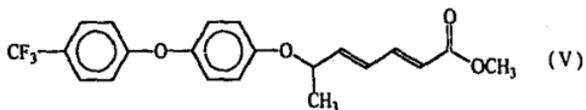
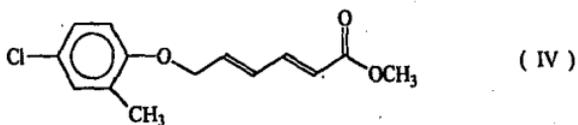
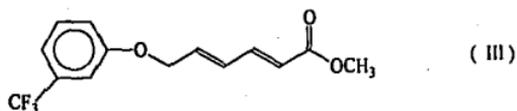
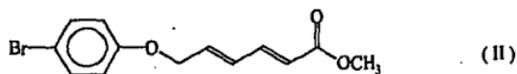
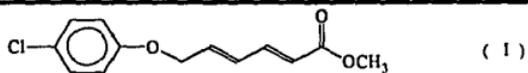
R₁ = H, CH₃

Y = O, S

Ar = fenil, piridil, naftil, quinolil, fenoxifenil y piridiloxifenil ; con sustituyentes halógenos, grupos alquilo, alcoxi, nitro, ciano, trifluorometil, acetoxi, acetamido, metoxicarbonilo

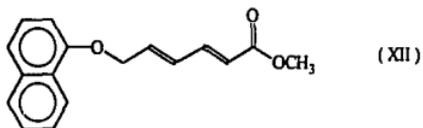
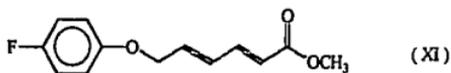
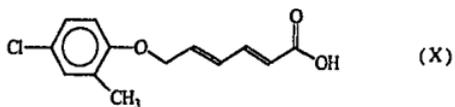
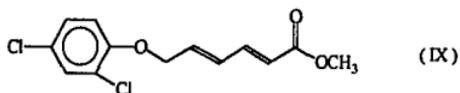
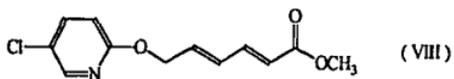
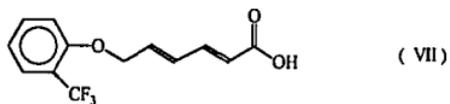
Estos compuestos fueron sintetizados y probados como herbicidas, y en algunos casos se les encontró actividad como reguladores de crecimiento vegetal. Se sintetizaron un total de 33 compuestos de los cuales 10 se reportan como los más activos (Esquema 3). La actividad se midió como fitotoxicidad sobre especies de plantas no deseables en dosis de kilogramo por hectarea (Kg/Ha) observando que los más activos fueron VI y VII³⁷.

ESQUEMA 3



Continúa.....

ESQUEMA 3



Se encontró también que algunos compuestos funcionan como reguladores de crecimiento vegetal mostrando que aceleran la maduración de la flor del tomate , como es el caso de los compuestos I , VIII, IX , X , XI y XII ³⁷.

La actividad se obtuvo midiendo el peso promedio del fruto con respecto a un control encontrando que el peso del fruto de las plantas que fueron tratadas con estos compuestos ,aumenta el doble de lo que pesa un fruto de una planta que no ha sido tratada³⁷.

Otra prueba de actividad como reguladores de crecimiento vegetal se hizo con árboles de manzana y se observó, que al aplicar los compuestos IV, IX, X, y XI , la caída de las hojas disminuía hasta un 0% en el caso del compuesto IX. ³⁷

Derivados de 2,4- hexadienol. El alcohol sórbico fue probado como un agente que evita el crecimiento de hongos en algunos alimentos ³² . También se han hecho estudios en los cuáles se encontró que el alcohol sórbico y derivados funcionan como fotoprotectores de la piel ³⁸ . Con respecto a derivados de 6-ariloxi -2,4 - hexadien-1-ol aún no se ha reportado nada en la literatura.

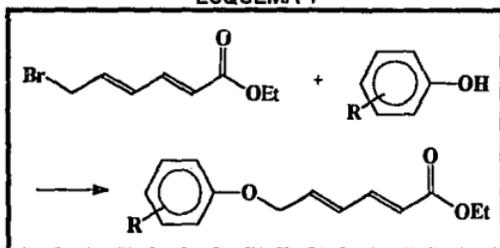
2.3 SINTESIS DE 6-ARILOXI-2,4-HEXADIENOATO DE ETILO Y SUS RESPECTIVOS ALCOHOLES 6-ARILOXI-2,4-HEXADIENOL.

2.3.1 DERIVADOS DE 6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO.

METODOS DE SINTESIS DEL 6-BROMO-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO.

Se ha encontrado en la literatura que para la obtención del eter de fenol (6-ariloxi-2,4-hexadienoato de etilo), se parte del derivado bromado (6-bromo-2,4-hexadienoato de etilo) como se muestra en el esquema 4.

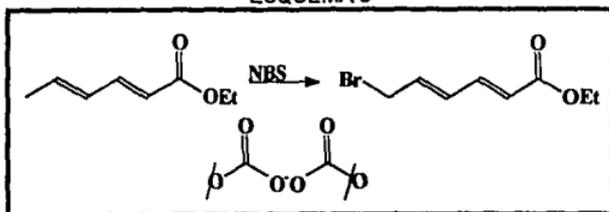
ESQUEMA 4



Existen varios métodos de obtención del 6-bromo-2,4-hexadienoato de etilo:

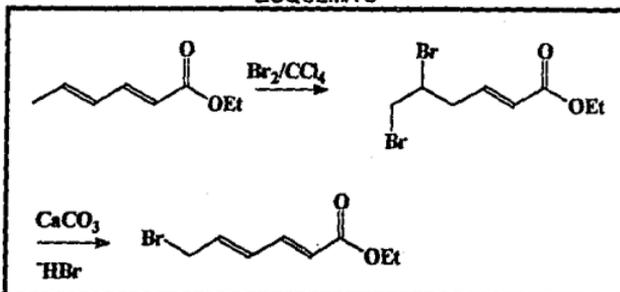
a) El primero parte del sorbato de etilo donde se lleva a cabo una bromación alílica utilizando NBS(N-bromo succinimida) y peróxido de benzilo ^{39,40,41,42}, el disolvente varía , ya que algunos recomiendan clorobenceno, tetracloruro de carbono, benceno , y/o cloroformo. El rendimiento varía de 38 a 45 % . (Esquema 5)

ESQUEMA 5



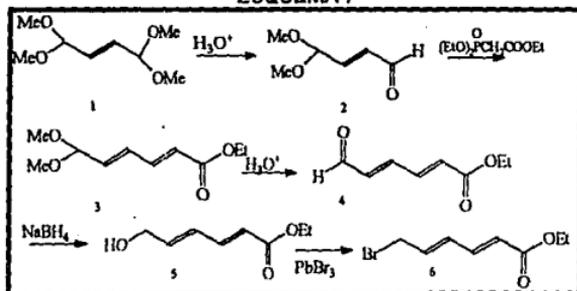
-b) Este método parte del 2,5-hexadienoato de etilo que es bromado con Br_2/CCl_4 y posteriormente una dehidrobromación³⁷, obteniendo un rendimiento de 60%. Esquema 6.

ESQUEMA 6

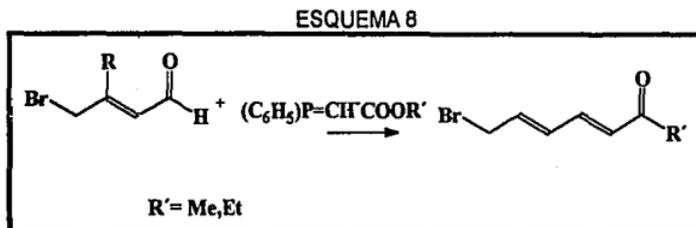


c) En este método se utiliza como materia prima el tetrametoxibuteno (1) el cual a su vez se obtiene con 80% de rendimiento a partir del furano. El tetrametoxibuteno (1) se hidroliza selectivamente al acetal del fumaraldehído(2). Posteriormente se lleva a cabo la reacción de Horner con el fosfonoacetato de trietilo obteniendo (3), el cual sufre una hidrólisis selectiva del grupo acetal obteniendo (4), este fué reducido con borohidruro de sodio obteniendo el hidroxiester (5), finalmente la bromación de (5) con tribromuro de fósforo nos da (6) con un rendimiento de 90%⁴³. Esquema 7.

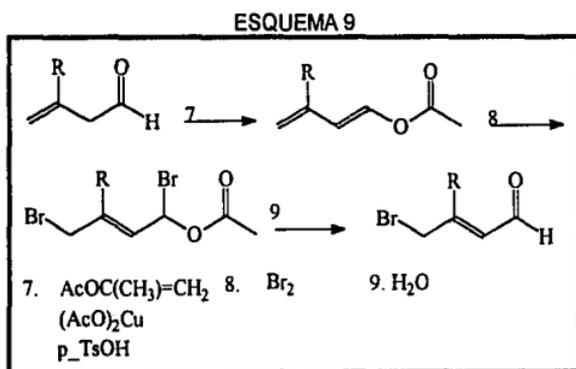
ESQUEMA 7



d) Este método parte de 4-bromocrotonaldehído el cual se trata con alquiloxicarbonilmetilentrifenilfosforano representando un procedimiento conveniente para la preparación de 6-bromosorbatos de alquilo con un 57 % de rendimiento⁴⁴. Esquema 8.



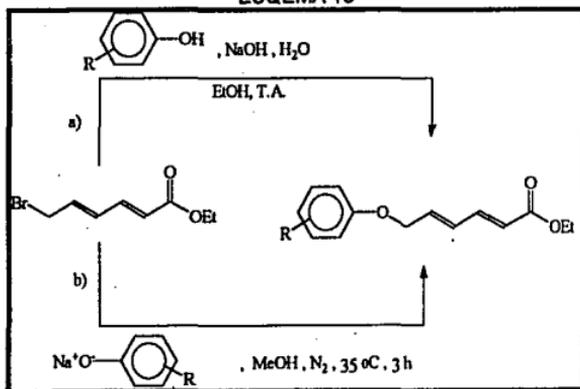
La síntesis del 4-bromocrotonaldehído se obtiene a partir del crotonaldehído por el procedimiento que se muestra en el esquema 9 con un rendimiento de 62%⁴⁵.



OBTENCION DEL ETER DE FENOL

Partiendo del 6-bromosorbato de etilo se lleva a cabo una sustitución nucleofílica al hacerlo reaccionar con las sales de sodio del fenol correspondiente. Uno de estos métodos se realiza a temperatura ambiente en etanol como disolvente obteniendo los derivados de 6-ariloxi-2,4-hexadienoato de etilo ⁴⁶ ruta (a) obteniendo un rendimiento de 38 %, otro método hace una modificación en las condiciones experimentales utilizando atmosfera de nitrógeno a 35 °C y el disolvente es sustituido por MeOH ³⁷ (b) con un rendimiento de 60 %. Esquema 10

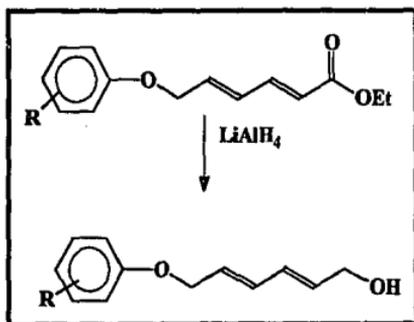
ESQEMA 10



2.3.2 DERIVADOS DE 6-ARILOXI-2,4-HEXADIEN-1-OL

Para la obtención de los derivados de 6-ariloxi-2,4-hexadien-1-ol se hace una reducción de los derivados del 6-ariloxi-2,4-hexadienoato de etilo con hidruro doble de litio y aluminio ⁴⁷. Esquema 11

ESQUEMA 11



3.0 PARTE EXPERIMENTAL.

Esta parte consta de dos secciones :

- La primera la constituyen los métodos que se usaron para la síntesis de los derivados de 6-arioxi-2,4-hexadienoato de etilo y sus correspondientes alcoholes .
- La segunda sección contiene el método para la determinación de la actividad biológica de los derivados de 6-arioxi-2,4-hexadienoato de etilo y sus respectivos alcoholes , utilizando como animal de prueba la larva de camarón salado (Artemia salina) .

Espectroscopía de los productos sintetizados :

- Los espectros de infrarrojo se determinaron en los espectrofotómetros : FRTIR 1600 Perkin Elmer y Espectrofotometro 1320 Perkin Elmer.
- Los espectros de resonancia magnética protónica se determinaron en un espectrómetro Varian EM-390-90 MHZ, usando como referencia el TMS.
- Los espectros de ultravioleta visible se determinaron en un Espectrofotómetro de U.V. 200 HITACHI, Perkin Elmer.

Puntos de fusión :

- Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones, estos no fueron corregidos.

Reactivos :

- Los reactivos que se utilizaron fueron adquiridos de la marca Aldrich y se usaron sin purificación posterior. Los productos obtenidos se purificaron por cromatografía en columna usando Silica Gel 60 tamaño de partícula 0.040- 0.063 mm de Merck y por cromatografía en capa fina preparativa utilizando Silica Gel como fase estacionaria.

3.1 SINTESIS DE 6-ARILOXI- 2,4- HEXADIENOATO DE ETILO Y SUS RESPECTIVOS ALCOHOLES.

SINTESIS DEL 2,4-HEXADIENOATO DE ETILO ^{49,49,50,51}

En un matraz redondo de dos bocas con una capacidad de 250 ml provisto de un refrigerante en posición de reflujo, se mezcla el ácido 2,4-hexadienónico (0.089 mol, 100g), etanol (2.67 mol, 157 ml) y H₂SO₄ con. (5 ml), agregando mallas moléculares para absorber el agua producida en la reacción y se mantiene a reflujo durante 24 horas y al término del tiempo la mezcla se enfría y se filtran las mallas moléculares.

Posteriormente se evapora el etanol restante mediante un evaporador rotatorio. La mezcla de reacción se transvasa a un embudo de separación y se lava con una solución al 10 % de NaHCO₃, después con agua y por último se seca con Na₂SO₄ anhidro. El producto se purifica por destilación fraccionada a presión reducida, colectando la fracción de sorbato de etilo que destila a 65 °C, 3mm obteniendo 97.4g (77.6 %).

U.V. (Etanol) λ máx : 259nm

I.R. ν máx cm⁻¹ (película): 3000-2850 (-CH₃, -CH₂-); 1720 (-C=O); 1645 (-C=C- conjugados); 1190 (-C-O-).

R.M.N-H ¹ δ ppm: 1.2 (t, 3H, -CH₃CH₂); 4.2 (c, 2 H, CH₂-O); 1.85 (d, 3H, CH₃-CH=); 5.6-7.3 (m, 4H, CH=).

SINTESIS DEL 6-BROMO-2,4-HEXADIENOATO DE ETILO ^{39,40,41,42}

En un matraz redondo 500 ml con tres bocas provisto de un refrigerante en posición de reflujo, tapón y termómetro, se mezcla el sorbato de etilo (0.3566 mol, 50 g) y la NBS (0.3820 mol, 68 g) en 312 ml de clorobenceno previamente secado con mallas moleculares y destilado. La mezcla se calienta lentamente hasta 100°C y posteriormente se adiciona el peróxido de benzoilo (0.016 mol, 4 g) lentamente en porciones. Después de la adición se calienta a reflujo por 0.5 horas, manteniendo la temperatura a no más de 110°C.

Al término de la reacción la mezcla se enfría y se filtra la succinimida, esta se lava con clorobenceno, el filtrado y el clorobenceno del lavado se evaporan a presión reducida, finalmente el producto se purifica a presión reducida, obteniendo un líquido amarillo y denso con p. eb. 114-117 °C, 3mm Hg (17.3 % ,72% pureza *).

U.V. (Etanol) λ máx: 211 nm.

I.R. ν máx cm^{-1} (película): 2982,2938 (-CH₂-CH₂-); 1720 (C=O); 1645(C=C conjugados); 1194 (C-O).

R.M.N-H δ ppm: 1.2 (t, 3H, CH₂CH₂); 4.0 (d, 2H, Br-CH₂-); 4.2 (c, 2H, -CH₂-O-); 5.8-7.4 (m, 4H, CH=).

* La pureza se determinó utilizando la técnica de análisis de mezclas por RMN-H ¹

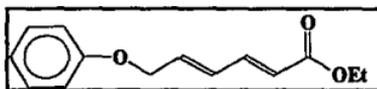
SINTESIS DE DERIVADOS DE 6-ARILOXI-2,4-HEXADIENOATO DE ETILO 46

Método General.

En un vaso de precipitados de 25 ml se disuelve el derivado de fenol correspondiente (0.085 mmol) y el hidróxido de sodio (0.81mmol) en la mínima cantidad de agua y se adicionan a un matraz de 100 ml provisto de un refrigerante en posición de reflujo que contiene una solución de bromo sorbato de etilo (0.081 mmol) en 10 ml de etanol manteniéndose en agitación durante 1.5 horas .

Al término de la reacción el etanol se evapora en un evaporador rotatorio, el producto transvasa a un embudo de separación, se extrae con acetato de etilo y se lava con porciones de NaOH 10% , hasta eliminar todo el fenol. Posteriormente se lava con agua destilada ,se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente. Finalmente los productos obtenidos se purifican por cromatografía en columna o por cromatografía en placa fina preparativa.

PRODUCTOS OBTENIDOS



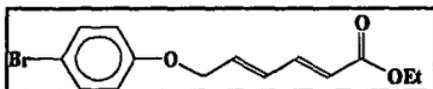
6-fenoxi -(2E,4E) -hexadienoato de etilo

Líquido amarillo y denso.

Rend. 23% ; U.V. (Etanol) λ máx : 258 nm.

I.R. umáx. cm^{-1} (película) : 2940 (CH_3 , $-\text{CH}_2-$) ; 1715 ($\text{C}=\text{O}$) ; 1645 ($\text{C}=\text{C}$ conjugados) ; 1240 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) ; 1190 ($\text{C}-\text{O}$) ; 700,760 (monosustituido).

RMN-H $^1\delta$ ppm : 1.25 (t,3H, CH_3CH_2); 4.2(c, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}-$);4.55 (d,2H,Ar-O- CH_2);5.7-6.65(m,4H, $\text{CH}=\text{}$);6.7-7.6(m, 5H, Ar-H).



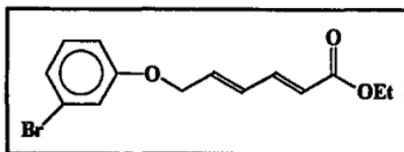
6-(4-bromofenoxi)-(2E,4E)-hexadienoato de etilo

Sólido blanco. Cristalizado de eter de petroleo en forma de agujas .

p.f. 38-39 °C Rend. 14,68% U.V.(Etanol) λ máx : 254 nm

I.R.umáx cm^{-1} (película):2982(- CH_3 , $-\text{CH}_2-$) ;1712($\text{C}=\text{O}$);1650 ($\text{C}=\text{C}$ conjugados) ; 1238($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) ;1178($\text{C}-\text{O}$) ; 822 (paradisustituido).

R.M.N-H $^1\delta$ ppm: 1.25(t,3H, CH_3-CH_2); 4.2(c;2H, $-\text{CH}_2-\text{O}-$),4.6(d,2H,Ar-O- CH_2-); 5.6 - 7.45(m,8H, $-\text{CH}=\text{}$,Ar-H).



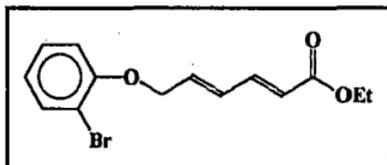
6-(3-bromofenoxi)-(2E,4E)-hexadienoato de etilo

Líquido amarillo y denso.

Rend. 16% U.V.(etanol) λ máx : 256 nm

I.R. ν máx cm^{-1} (película) : 2970 (-CH₃, -CH₂-); 1710 (C=O); 1620 (C=C, conjugados); 1230 (C-O-C); 1175 (C-O); 680, 770 (metadisustituido).

R.M.N-H δ ppm : 1,25 (t, 3H, CH₃-CH₂); 4,2 (c, 2H, -CH₂-O-); 4,6 (d, 2H, Ar-O-CH₂); 5,6 - 7,5 (m, 8H, -CH=, Ar-H).



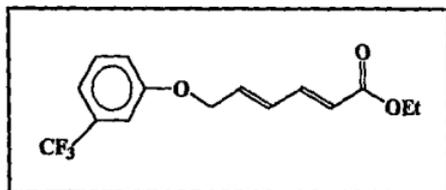
6-(2-bromofenoxi)-(2E,4E)-hexadienoato de etilo

Líquido amarillo y denso.

Rend. 18,5% U.V. (etanol) λ máx : 255 nm

I.R. ν máx cm^{-1} (película) : 2980-2930 (-CH₃, -CH₂-); 1710 (C=O); 1620 (C=C, conjugados); 1236 (C-O-C); 1180 (C-O); 748 (ortodisustituido).

R.M.N-H δ ppm : 1,25 (t, 3H, CH₃-CH₂); 4,2 (c, 2H, -CH₂-O-); 4,6 (d, 2H, Ar-O-CH₂); 5,7 - 7,5 (m, 8H, CH=, Ar-H).

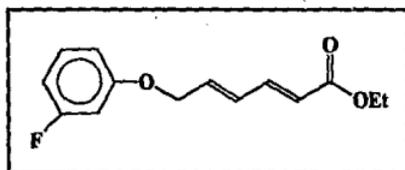


6 - (3 - (α,α,α - trifluorometil)-fenoxi) - (2E,4E) - hexadienoato de etilo
 Líquido amarillo y denso.

Rend. 12.3 % U.V. (etanol) λ : 257 nm

I.R. $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (película) : 2985- 2910 (-CH₃ , -CH₂-); 1710(C=O); 1620 (C=C , conjugados); 1230 (C-O-C); 1170 (C-O); 790,690 (metadisustituido).

R.M.N-H¹ δ ppm : 1,25 (t,3H,CH₃-CH₂); 4.2(c,2H,-CH₂-O-);4,6(d, 2H ,Ar-O-CH₂);5,6 - 7.7(m,8H,CH=,Ar-H).



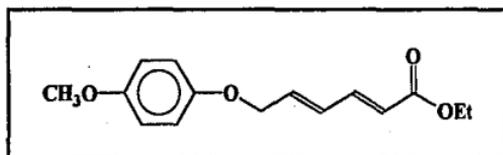
6 - (3 - fluorofenoxi) - (2E,4E) - hexadienoato de etilo

Líquido denso y amarillo.

Rend. 10 % U.V. (etanol) λ máx : 259 nm

I.R. $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} (película) : 2985-2820(-CH₃ , -CH₂-);1700(C=O);1620(C=C , conjugados); 1250(C-O-C); 1180(C-O) ; 770,690 (metadisustituido).

R.M.N-H¹ δ ppm: 1,25 (t,3H,CH₃-CH₂); 4.2(c, 2H,-CH₂-O-);4,6(d,2H,Ar-O-CH₂); 5,6 - 7.6 (m, 8H, CH=, Ar-H).



6 - (4- metoxifenoxi) - (2E,4E) - hexadienoato de etilo

Líquido denso y amarillo.

Rend. 18% U.V. (etanol) λ máx : 257 nm

I.R. ν máx cm^{-1} (película): 2936 (-CH₃, -CH₂-); 1712 (C=O); 1620 (C=C, conjugados)
1230 (C-O-C); 1182 (C-O); 826 (paradisustituido).

R.M.N-H¹ δ ppm : 1,25 (t, 3H, CH₃-CH₂); 3.8 (s, 3H, CH₃-Ar); 4.2 (c, 2H, -CH₂-O-),
4.6 (d, 2H, Ar-O-CH₂); 5.8-7.6 (m, 4H, CH=); 6.85 (s, 4H, Ar-H).

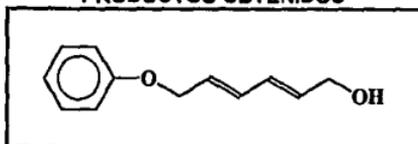
SINTESIS DE DERIVADOS DE 6-ARILOXI-2,4-HEXADIEN-1-OL

Método general.

En un matraz redondo de 500 ml con tres bocas, provisto de un refrigerante en posición de reflujo y un embudo de adición previamente secados en una estufa, se coloca una suspensión de hidruro doble de litio y aluminio (0.0675 mol) en 150 ml de éter seco enfriando externamente a 0°C con un baño de hielo-sal. La mezcla se agita y se agrega a través del embudo de adición el ester sórbico (0.0706 mol) disuelto en éter seco (150 ml) y se continúa agitando durante 30 min.

Al término de este tiempo la reacción se destruye adicionando lentamente agua, seguido por la adición de H_2SO_4 al 10%. La mezcla de reacción se transvasa a un embudo de separación, se extrae con éter, se lava con bicarbonato de sodio diluido y posteriormente con agua. Finalmente se seca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora el disolvente en un evaporador rotatorio. Los productos se purifican por cromatografía en columna o en capa fina preparativa.

PRODUCTOS OBTENIDOS



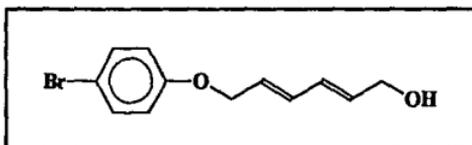
6-fenoxi-(2E,4E)-hexadien-1-ol

Líquido transparente y denso

Rend. 43.5 % U.V. (etanol) λ máx : 227 nm

I.R. ν máx cm^{-1} (película): 3350(O-H) ; 2920(-CH₂) ; 1610(C=C , conjugados)
1050(alcohol primario); 765,700 (monosustituido).

R.M.N-H¹ δ ppm: 1.3 - 1.7 (1H,O-H) ; 4.2(d,2H,CH₂-OH);4.6(d, 2H,CH₂-O-Ar);
5.6 - 7.5 (m,9H,CH=,Ar-H).



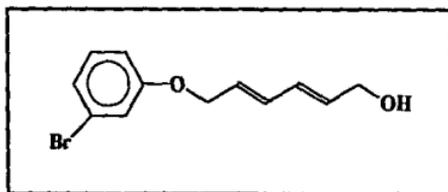
6-(4-bromofenoxi) - (2E,4E) - hexadien-1-ol

Sólido blanco. Cristales en forma de agujas.

Rend. 43% p.f. :64-65 oC U.V. (etanol) λ máx : 232nm

I.R. ν máx cm^{-1} (pélicula) :3308(O-H) ;2858(-CH₂);1600 (C=C , conjugados) ;
1076 (alcohol primario);824 (paradisustituido).

R.M.N-H¹ δ ppm: 1.3 - 1.7 (1H,O-H) ;4.2((d, 2H ,CH₂-OH);4.6(d, 2H,CH₂-O-Ar) ;
5.7 - 7.6 (m, 8H,CH=,Ar-H).



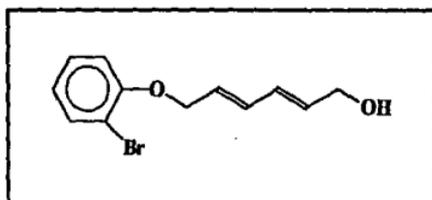
6-(3-bromofenoxi)-(2E,4E)-hexadien-1-ol

Líquido amarillo y denso.

Rend. 40% U.V. (etanol) λ máx : 230 nm

I.R. ν máx cm^{-1} (película): 3332(O-H); 2866(-CH₂); 1600(C=C conjugados) ; 1068 (alcohol primario); 770, 690 (metadisustituido).

R.M.N-H¹ δ ppm: 1.3 - 1.7(1H, O-H); 4.2(d, 2H, CH₂-OH); 4,6(d, 2H, CH₂-O-Ar); 5.5 -7.4 (m, 8H, CH=, Ar-H).



6-(2-bromofenoxi)-(2E,4E)-hexadien-1-ol

Líquido amarillo y denso.

Rend. 42% U.V. (etanol) λ máx : 230 nm

I.R. ν máx cm^{-1} (película): 3340(O-H); 2864 (-CH₂-); 1600(C=C conjugados) ; 1074(alcohol primario); 750(ortodisustituido).

R.M.N-H¹ δ ppm : 1.9(1H, O-H); 4.2(d, 2H, CH₂-OH); 4,6(d, 2H, CH₂-O-Ar); 5.5 -7.5 (m, 8H, CH=, Ar-H) .

3.2. PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN Artemia salina

MATERIAL:

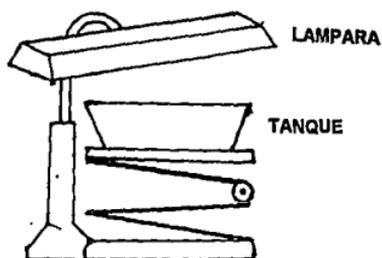
- Artemia salina Leach (larvas de camarón)
- Sal de mar (Marca comercial: Instant Ocean)
- Un tanque pequeño con una división perforada por la parte inferior (Esquema 12).
- Lámpara de luz blanca
- Geringas de 5ml ,0.5ml , 100 µl y 10 µl .
- Frascos viales de 10 ml (9 tubos por muestra mas un control)

PROCEDIMIENTO :

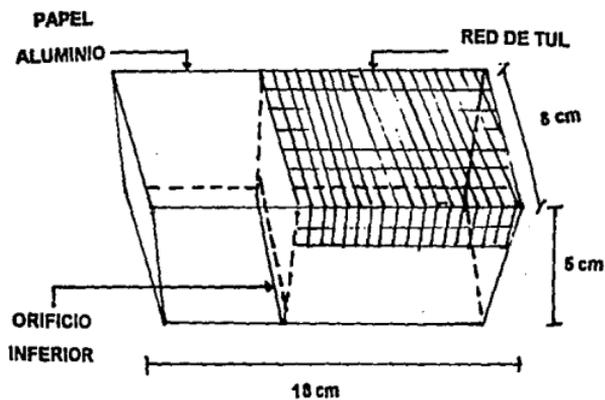
A) Obtención de las larvas de A. salina

El agua de mar se prepara disolviendo 38 g de sal de mar en un litro de agua destilada; posteriormente se filtra para eliminar las partículas suspendidas. Se agrega suficiente agua de mar en un pequeño tanque (Esquema 12) y se adicionan aproximadamente 50 mg de los huevecillos de Artemia salina en una de las divisiones de el tanque y ésta se tapa con papel aluminio para evitar que entre la luz . La otra parte se tapa con una red o un pedazo de tul para evitar que los insectos entren y contaminen el agua. El tanque se coloca debajo de una lámpara de luz blanca durante 48 horas para que los huevecillos maduren a su fase de larvas (Esquema 12).

ESQUEMA 12



TANQUE



B) Preparación de las muestras.

Preparar los viales para la prueba : para cada muestra la prueba inicial es de 1000 , 100 , 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ que es lo mismo que 1000 , 100 , 10 ppm ; preparar 3 viales de cada concentración dando un total de 9 viales por muestra. Para 20 mg de muestra se adicionan 2 ml de el disolvente orgánico volátil , quedando una concentración de 20 mg/ 2ml ; de esta dilución transferir alicuotas de 500 , 50 y 5 μl a los viales correspondientes a 1000 , 100 , 10 ppm respectivamente . Se evapora el disolvente con alto vacío ó dejándolo volatilizar toda la noche . Para lograr una mejor solubilidad de la muestra en el agua puede adicionarse posteriormente dimetil sulfóxido (DMSO) hasta una concentración máxima de 50 $\mu\text{l} / 5 \text{ ml}$. Después adicionar agua de mar a cada vial y 10 larvas de Artemia salina aforando el volumen hasta 5 ml con el agua de mar. Dejar las larvas en contacto con la muestra durante 24 horas , cumplido el tiempo contar los sobrevivientes o los muertos según sea el caso.

Los datos son analizados por medio de un programa de computadora que determina los valores de DL₅₀% con intervalos de 95 % de confiabilidad ⁵².

Para una muestra muy activa es necesario hacer diluciones adicionales a menos de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (menos de 10 ppm). Las concentraciones pueden ser preparadas y probadas para buscar intervalos más pequeños usando 2mg/ml. Para esta concentración las diluciones serán de 100 , 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ppm) . De esta manera se encontraran concentraciones intermedias confiables que se acerquen más a el DL₅₀% .

Para la obtención de buenos resultados se hicieron las siguientes consideraciones:

- Los frascos viales y las geringas fueron lavados hasta quedar exentos de detergente u otro compuesto ajeno al analizado .
- Los compuestos que se analizaron fueron purificados y las cantidades utilizadas para preparar las dosis fueron pesadas lo más exacto posible.
- El agua de mar fue preparada a una conc. de 38 g/l y se filtró para evitar tener cualquier sólido suspendido.
- La intensidad de iluminación y temperatura durante la incubación de las larvas fueron constantes durante el experimento.
- Para facilitar la solubilidad de los compuestos probados en el agua se utilizó DMSO (dimetil sulfoxido) hasta 50 µl, el volumen de este disolvente no interfiere en la actividad ya que a esta concentración resulta inócua para la larva de Artemia salina^{53,54}. El DMSO es un solvente polar aprótico lo cual facilita la solubilidad de compuestos orgánicos con el agua .

En general el ensayo biológico utilizado para la determinación de la actividad biológica de los derivados de sorbato de etilo y sus respectivos alcoholes , es un método fácil de realizar , reproducible, económico y el animal de prueba (Artemia salina) es un organismos ideal, ya que los resultados de toxicidad fueron reproducibles .

En la mayoría de los ensayos biológicos el error principal proviene de la variabilidad de la respuesta en el organismo de estudio , por tal razón Artemia salina debe ser cultivada bajo condiciones constantes de T, salinidad, pH, intensidad de luz , oxígeno y adecuada circulación de agua para obtenerse en el estado o forma deseada minimizando la variabilidad de respuesta biológica⁵⁵.

. Los primeros tres estados de la larva tienen diferencia en sensibilidad a sustancias con actividad biológica, es por esta razón que el cultivo es un factor crítico cuando se diseña y se realiza un experimento de toxicidad .

EL criterio que se tomó para considerar una larva muerta es la total inmovilización causada por el compuesto probado .

4.0

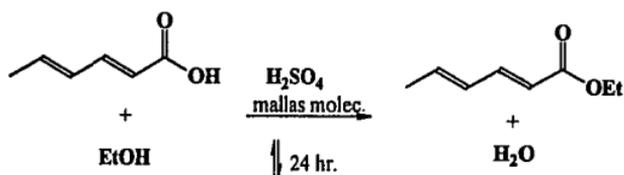
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

4.1 METODOS DE SINTESIS

Los métodos de síntesis para los derivados de 6-ariloxi-2,4-hexadienoato de etilo y sus respectivos alcoholes fueron seleccionados de acuerdo a las materias primas disponibles, también se tomó en cuenta que las reacciones se llevaran a cabo en menor número de pasos.

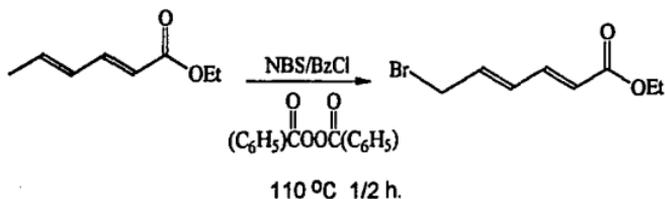
• OBTENCIÓN DEL 2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO

Para la obtención del 2,4-hexadienoato de etilo se partió del ácido sórbico, el cual fue esterificado con el etanol. En esta reacción se hizo una modificación a la técnica descrita al adicionar mallas moleculares para absorber el agua producida por la reacción de esterificación, obteniendo un incremento en el rendimiento, de 69% a 77.5%^{48,49,50,51}.



• OBTENCIÓN DEL 6-BROMO-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO.

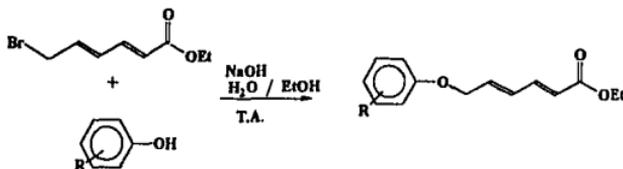
Se utilizó el método (a) descrito en la parte experimental el cual parte del sorbato de etilo (2,4-hexadienoato de etilo) obtenido en la reacción anterior. Se seleccionó este método porque se lleva en un sólo paso y por la disponibilidad del reactivo NBS:



Durante la realización de esta reacción se observó que la temperatura no debe subir a más de 110 °C con una duración de no más de 30 minutos ya que de lo contrario disminuye el rendimiento por descomposición del producto . En cuanto a la purificación del producto hubo pérdidas por calentamiento durante la destilación fraccionada, además de que el producto que se obtiene no es totalmente puro ya que tiene 20 % de sorbato de etilo (este dato fue obtenido por integración de áreas en RMN-H).

•SINTESIS DE LOS DERIVADOS DE 6 ARILOXI -2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO.

Para la obtención de los derivados de 6-ariloxi-2E,4E-hexadienoato de etilo partimos del 6-bromo-2E,4E-hexadienoato de etilo obtenido en la reacción anterior en el cual se sustituyó el Br de la posición 6 por un grupo ariloxi:



Esta reacción se lleva en un sólo paso. Primeramente se formó el fenolato de sodio que es posteriormente adicionada al 6-bromo -2E,4E-hexadienoato de etilo, obteniendo así el llamado eter de fenol . Durante la reacción no se tuvo ningún problema, sin embargo en la fase de purificación de los productos hubo dificultades ya que se tuvieron que separar por cromatografía en capa fina preparativa pues las polaridades tanto de los productos como de la materia prima son muy parecidas .

La principal desventaja de este método de síntesis es el bajo rendimiento. Para tratar de incrementarlo se hicieron modificaciones utilizando K₂CO₃ como base y acetona seca como disolvente ⁴⁰ . En esta reacción se observa que hay dos productos identificados por cromatografía en placa fina . Uno de ellos es el producto deseado caracterizado por sus espectroscopías.

Dado el bajo rendimiento obtenido en la síntesis de los éteres de fenol (10 a 23 %) por el método utilizado en este trabajo , se propone probar el método reportado en una patente Alemana³⁷ donde parten del 6-bromo 2E,4E-hexadienoato de metilo y las correspondientes sales de los fenolatos realizando la sustitución nucleofílica en un sólo paso y a diferentes condiciones de reacción obteniendo un rendimiento mucho mayor (60 %) .

- **SINTESIS DE 6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIENO-1-OL.**

Para la obtención de los alcoholes correspondientes no hubo ningún problema ya que se realizó una clásica reducción del ester al alcohol utilizando hidruro doble de litio y aluminio $LiAlH_4$. En cuanto a la purificación de los productos se hizo una cromatografía en columna siendo los rendimientos aceptables (40-43 %).

Al realizar la revisión bibliográfica en Chemicals Abstracts sobre la posible síntesis de los derivados de 6-ariloxi-2E,4E-hexadienoato de etilo y 6-ariloxi-2E,4E-hexadien-1ol se encontró que estos compuestos no han sido reportados en la literatura , excepto el 6-bromo-2E,4E-hexadienoato de etilo y el 6 -fenoxi-2E,4E-hexadienoato de etilo⁴⁰.

4.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA SOBRE LARVAS DE Artemia salina .

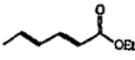
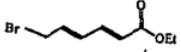
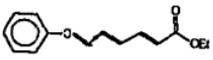
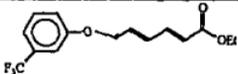
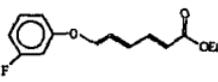
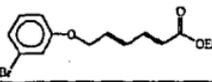
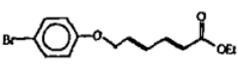
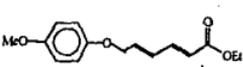
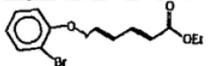
Para la determinación de la actividad biológica de los derivados del sorbato de etilo y sus respectivos alcoholes se realizaron pruebas con larvas de Artemia salina , que como ya habíamos mencionado en los antecedentes es una prueba preliminar y general que sólo nos ayuda a detectar si un compuesto es o no activo frente a organismos vivos. Esta información da una pauta para seguir bioensayos más específicos y sofisticados en el caso de que un compuesto tenga una actividad biológica significativa.

RELACION ESTRUCTURA - ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad biológica en larvas de Artemia salina se muestran en la tabla III donde se observa que al introducir algunos grupos funcionales en la posición 6 de el sorbato de etilo la actividad aumenta :

- Al introducir un Br en la posición 6 del sorbato de etilo la actividad biológica aumenta más de cuarenta veces , lo cual se ve reflejado en la DL₅₀ de más de 1000 ppm para el sorbato de etilo y de 23.7 para el bromo sorbato de etilo (Tabla III) .
- Cuando se introduce un grupo fenóxi en la posición 6 (DL₅₀ de 13.1 ppm) la actividad biológica aumenta prácticamente al doble en relación a la actividad del bromosorbato de etilo(Tabla III) .
- Un grupo electroattractor en el anillo aromático (Br) aumenta la actividad biológica de cinco a ocho veces más con respecto a 6-fenoxisorbato de etilo, según sea la posición donde se encuentra el sustituyente. Se observa también que no hay mucha diferencia entre las actividades que presentan los derivados bromados en las distintas posiciones en el anillo aromático (*p*- Br , DL₅₀= 2.27ppm ; *m*-Br , DL₅₀ = 1.74 ppm ; *o*-Br , DL₅₀= 2.48 ppm). (Tabla III).
- La actividad biológica de un grupo electrodonador (MeO), DL₅₀=1.69 aumenta ligeramente con respecto a la de un grupo electroattractor (Br) , DL₅₀=2.27 en la posición *para* de el anillo aromático (tabla III) .

TABLA III. RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLOGICA DE DERIVADOS DE SORBATO DE ETILO EN LARVAS DE *Artemia salina*.

NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA	DL ₅₀ (ppm)
2E,4E-hexadienoato de etilo		no activo a > 6 = de 1000
6-bromo -2E,4E-hexadienoato de etilo.		23.7
6-fenoxi-2E,4E-hexadienoato de etilo.		13.11
6-(3-trifluorofenoxi)-2E,4E-hexadienoato de etilo.		54.17
6-(3-fluorofenoxi)-2E,4E-hexadienoato de etilo.		2.18
6-(3-bromofenoxi)-2E,4E-hexadienoato de etilo		1.74
6-(4-bromofenoxi)-2E,4E-hexadienoato de etilo		2.27
6-(4-metoxifenoxi)-2E,4E-hexadienoato de etilo		1.69
6-(2-bromofenoxi)-2E,4E-hexadienoato de etilo		2.48

• En la Tabla IV se muestra la comparación de la estructura y actividad biológica de algunos de los ésteres sintetizados y su respectivo alcohol , donde se observa que la actividad biológica de los alcoholes son notablemente menor a las de los correspondientes ésteres ,sin embargo en el caso del 6-(4-bromofenoxi)-2E,4E-hexadien-1-ol no existe mucha diferencia entre su actividad y la de el éster correspondiente.

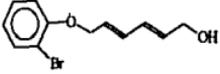
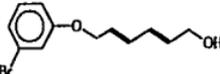
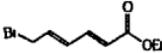
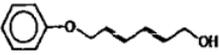
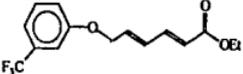
TABLA IV . COMPARACION DE LA ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE ALGUNOS DERIVADOS DE 6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO Y SU CORRESPONDIENTE ALCOHOL 6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIEN-1-OL EN *Artemia salina*.

ESTRUCTURA DEL ESTER	ED 50 (ppm)	ESTRUCTURA DEL ALCOHOL	DI, 50 (ppm)
	13.11		53.48
	2.48		14.96
	1.74		16.49
	2.27		3.17

En la tabla V se presentan todos los compuestos sintetizados con su respectiva actividad biológica en orden decreciente, observando que el compuesto de mayor actividad es el **6-(4-metoxifenoxi)-2E,4E-hexadienoato de etilo** y el de menor actividad el **6-(3-(α,α,α -trifluorometil)-fenoxi)-2E,4E-hexadienoato de etilo**. También en esta tabla podemos observar que en general los resultados de actividad biológica tanto de los ésteres como de los alcoholes son valores significativos ya que están por debajo de las 100 ppm³.

En la tabla VI se muestra un ejemplo de los datos experimentales obtenidos en la determinación de la actividad biológica en este caso para el compuesto **6-(4-metoxifenoxi)-2E,4E-hexadienoato de etilo** (clave E-7), los cuales fueron procesados en un programa de computadora para la obtención de la respuesta en **Probits** (Unidad probabilística que asegura que la distribución sea normal). El cálculo de los probits facilita la linealización de las **Curvas Dosis-Respuesta**. En la Gráfica 1 podemos observar la **Curva Dosis-Respuesta** trazada con estos datos. También podemos observar las **Curvas Dosis-Respuesta** para los demás compuestos probados. En esta gráfica podemos observar simultáneamente la actividad biológica de cada uno de los compuestos probados así como la dosis a la que se encontró su DL₅₀, es decir que un 50% de respuesta es equivalente a 5 Probits.

TABLA V. RELACION ESTRUCTURA - ACTIVIDAD BIOLOGICA EN LARVAS DE *Artemia salina* SOBRE LOS DERIVADOS DE SORBATO DE ETILO EN ORDEN DECRECIENTE.

ESTRUCTURA DEL COMPUESTO	DL50 (ppm)
	14.9
	16.62
	23.7
	53.47
	54.17
	No activo a > ò = 1000

.....Continuación.

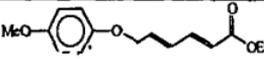
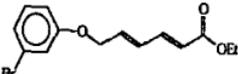
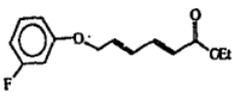
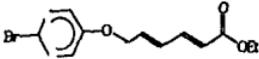
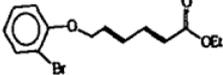
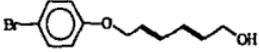
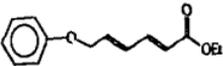
ESTRUCTURA DEL COMPUESTO	DL50 (ppm)
 <chem>CCOC(=O)CCCCCOc1ccc(OC)cc1</chem>	1.69
 <chem>CCOC(=O)CCCCCOc1cccc(Br)c1</chem>	1.74
 <chem>CCOC(=O)CCCCCOc1cccc(F)c1</chem>	2.17
 <chem>CCOC(=O)CCCCCOc1cccc(Br)c1</chem>	2.27
 <chem>CCOC(=O)CCCCCOc1ccccc1Br</chem>	2.48
 <chem>OCCCCCOc1cccc(Br)c1</chem>	3.22
 <chem>CCOC(=O)CCCCCOc1ccccc1</chem>	13.11

TABLA VI. FORMACION DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA CUANTAL

DATOS DE EL EXPERIMENTO:

Número total de larvas	Número de larvas que respondieron	Concentración aplicada (ppm)	Respuesta en PROBITS	Log de la Conc.
30	30	11.1	8.1	1.05
30	28	3.7	6.3	0.57
30	8	1.2	4.4	0.08

$$\text{PROBIT} = 5, \text{DL}_{50} = 1.69$$

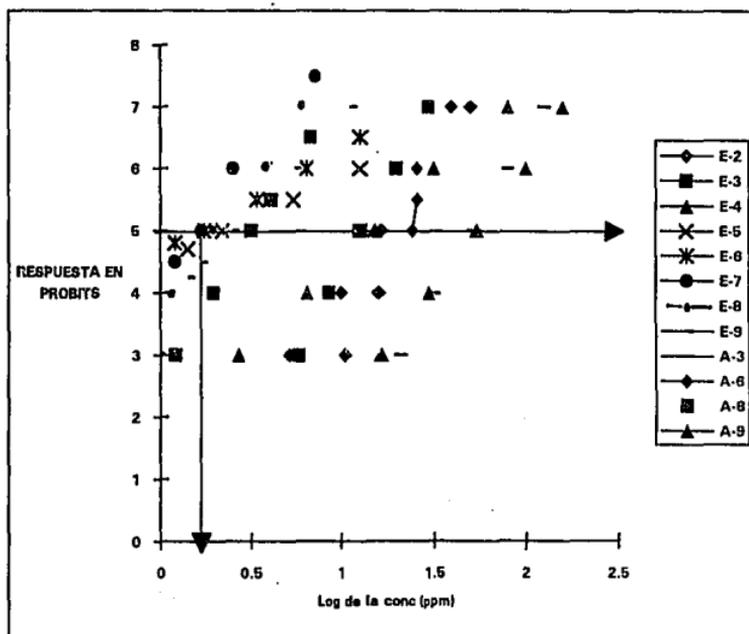
Límite confidencial superior = 2.14

Límite confidencial inferior = 1.29

* Estos datos fueron obtenidos para el compuesto 6-(4-metoxifenoxi) -2E,4E - hexadienato de etilo. Los cuales fueron procesados en un programa de computadora (BASICA FINNEY).

En la gráfica1 que a continuación presentamos, observamos la actividad biológica de los compuestos sintetizados (DL₅₀%) donde se graficaron las dosis aplicadas de cada compuesto en ppm contra los Probits obtenidos al procesar los datos en la computadora .

**GRAFICA 1. CURVA DOSIS-RESPUESTA CUANTAL
PARA LOS DERIVADOS DE 6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO Y
6-ARILOXI-2E,4E-HEXADIEN-1-OL.**



5 PROBIT = DL 50%

Conc (ppm)	Log Conc
1	0
10	1
100	2

DATOS DE LA GRAFICA 1

CLAVE	NOMBRE DEL COMPUESTO	DL50 (ppm)
E-1	2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO	> 1000
E-2	6-BROMO-2E,4E--HEXADIENOATO DE ETILO	23.7
E-3	6-FENOXI-2E,4E--HEXADIENOATO DE ETILO	13.11
E-4	6-(3-(α,α,α -TRIFLUOROMETIL)-FENOXI)- 2E,4E--HEXADIENOATO DE ETILO	54.17
E-5	6-(3-FLUOROFENOXI)-2E,4E- HEXADIENOATO DE ETILO	2.17
E-6	6-(3-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO	1.74
E-7	6-(4-METOXIFENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO	1.69
E-8	6-(4-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO	2.27
E-9	6-(2-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO	2.48
A-3	6-FENOXI-2E,4E-HEXADIEN-1-OL	53.47
A-6	6-(3-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIEN-1-OL	16.62
A-8	6-(4-BROMOFENOXI)-2E,4E -HEXADIEN-1-OL	3.22
A-9	6-(2-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIEN-1-OL	14.92

En general, el ensayo biológico utilizado para la determinación de la actividad biológica de los derivados de sorbato de etilo y sus respectivos alcoholes, es un método fácil de realizar, reproducible, económico y la especie de prueba (Artemia salina) es un organismo ideal para este tipo de ensayos³.

Los valores de actividad biológica obtenidos para los derivados de 6-ariloxi-2E,4E-hexadienoato de etilo y 6-ariloxi-2E,4E-hexadien-1-ol están dentro de un intervalo de actividad significativa ya que presentan un DL₅₀ menor de 100 ppm y de acuerdo con Meyer y MacLaughlin³, compuestos o extractos con valores de este orden son fisiológicamente activos. Con base en lo anterior se sugiere realizar pruebas biológicas más específicas como las que a continuación se mencionan:

- **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA**

En el Capítulo de Antecedentes se mencionó el uso del bioensayo con larvas de A.salina como una alternativa para sustituir un bioensayo específico para compuestos con actividad antiparasitaria²⁰. En la Tabla 1 se muestran algunos de los resultados de actividad biológica en A. salina, de los derivados de avermectina, un antiparasitario. Tomando en cuenta estos resultados (IC₁₀₀ = 0.11 - 55.5 ppm) y comparandolos con los valores obtenidos en la misma prueba para los compuestos sintetizados en este trabajo, que presentan un intervalo de DL₅₀ = 1.7 - 13 ppm es posible que estos compuestos presenten actividad antiparasitaria.

- **ACTIVIDAD INSECTICIDA.**

También en los antecedentes se mencionó el uso de la prueba con A.salina para detectar toxicidad de insecticidas comerciales. En la Tabla II se muestran los resultados de Toxicidad para diversos insecticidas comerciales. En esta tabla se observa que, no obstante que estos insecticidas tienen estructuras variadas, en su mayoría presentan valores de actividad biológica de DL₅₀ = 0.15-0.60 ppm en Artemia salina.

En este trabajo se realizaron pruebas de actividad biológica con algunos insecticidas comerciales obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla VII.

TABLA VII

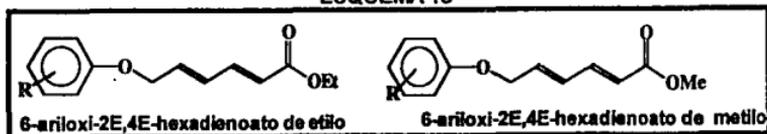
INSECTICIDA COMERCIAL	ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN <i>A. salina</i> . DL50 (ppm)
ETIL PARATION	3.63
METIL PARATION	4.80
NEOPINAMINA(PIRETRINA)	86.02

Comparando los valores de actividad biológica de la Tabla VII y la Tabla II de los antecedentes con los obtenidos para la mayoría de los compuestos sintetizados (6-*ariloxi-2E,4E-hexadienoato de etilo* y 6-*ariloxi-2E,4E-hexadien-1-ol*) que están entre DL₅₀ = 1.69- 3.22 ppm, Tabla V, se observa que algunos de los compuestos (Claves : E-5, E-6, E-7, E-8, E-9, A-8 y A-9 ; ver datos de la Grafica 1) son mucho más activos que los insecticidas comerciales analizados. Por tal motivo se propone realizar pruebas de actividad insecticida para los compuestos sintetizados, ya que existe la posibilidad de obtener resultados satisfactorios .

• **ACTIVIDAD HERBICIDA .**

Ya se había mencionado en los antecedentes que los derivados de 6-*ariloxi-2E,4E-hexadienoato de metilo* presentan actividad herbicida ³⁷. Los compuestos que se sintetizaron en este trabajo (6-*ariloxi-2E,4E-hexadienoato de etilo*) tienen una estructura similar a estos compuestos (ver esquemas 3 y 13) . Por tal motivo se sugiere que se realicen este tipo de pruebas .

ESQUEMA 13



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

5.0 CONCLUSIONES

1.-Se realizó la síntesis de siete compuestos derivados de 6-ariloxi-2E,4E-hexadienoato de etilo y cuatro de sus respectivos alcoholes 6-ariloxi-2E,4E-hexadien-1-ol. Diez de estos compuestos no han sido reportados en la literatura:

6-FENOXI-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO (ya está reportado en la literatura ⁴⁰)

6-(3-(α,α,α -TRIFLUOROMETIL)-FENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO

6-(3-FLUOROFENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO

6-(3-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO

6-(4-METOXIFENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO

6-(4-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO

6-(2-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO

6-FENOXI-2E,4E-HEXADIEN-1-OL

6-(3-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIEN-1-OL

6-(4-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIEN-1-OL

6-(2-BROMOFENOXI)-2E,4E-HEXADIEN-1-OL

2.-Se determinó la actividad biológica de todos los compuestos sintetizados en *Artemia salina*, encontrando que la mayoría muestran alta actividad biológica :DL₅₀ entre 1.69-3.22 ppm.

3.- Con relación al efecto de los sustituyentes sobre la actividad de los compuestos sintetizados se puede mencionar lo siguiente:

- Un grupo Ariloxi en la posición 6 del sorbato de etilo incrementa más de setenta y seis veces la actividad biológica .
- Un grupo electroattractor (Br) en el anillo aromático incrementa la actividad aproximadamente seis veces con respecto al 6-fenoxi-2E,4E-hexadienoato de etilo .
- La posición en la que se encuentra el grupo electroattractor no afecta considerablemente a la actividad biológica de los compuestos obtenidos .

- Un grupo electrodonador (MeO) en la posición *para* del anillo aromático confiere mayor actividad que un grupo electroattractor.

4.- El compuesto más activo fue el 6-(4-METOXIFENOXI)-2E,4E-HEXADIENOATO DE ETILO con un DL₅₀ = 1.69 ppm.

5.- Los ésteres 6-arioxi-2E,4E-hexadienoato de etilo presentan mayor actividad biológica que sus correspondientes alcoholes 6-arioxi-2E,4E-hexadien-1-ol.

6.- Seis de los compuestos sintetizados mostraron mayor actividad biológica en A.salina que algunos insecticidas comerciales como Etil Paratión, Metil Paratión y Neopinamina (piretrina).

7.- Con base en los valores obtenidos de actividad biológica en Artemia salina para los compuestos sintetizados, se propone realizar bioensayos más específicos tales como actividad insecticida, actividad herbicida y actividad antiparasitaria .

6.0

BIBLIOGRAFIA

1. Litter, M. Compendio de farmacología . 4a. Edición , Editorial El Ateneo. pp. 3-9, 174-175, 1988.
2. Tallarida, R.J. ; Jacob, L.S. : The Dose-Response relation in Pharmacology, Ed. Springer-Verlag , pp 85-110 y 174-175, 1979.
3. Meyer, B.N.; Ferrini, N.R.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L. : *Planta médica* 45 (1), 31-4, 1982.
4. Barnes, R.D.: *Zoología de los invertebrados* Capítulo 14 Editorial Interamericana 1984.
5. Michael, A.S.C.G. Thompson y M. Abramovitz. : *Science*, 123, 464 (1956).
6. Grosch, D.S. *Sciencia* pp 155, 592 (1967).
7. C.A. : 57 (1962) 12957 d
8. C.A. : 67 (1967) 93784 e
9. Brown, R.F. ; Wildman J.D. y Eppley R.M. : *J.Assoc. off Anal.Chem.* 51, 905 (1968).
10. Eng-Wilmot, D. and Martin D.F. : *J. Pharm.Sci.* 68, 963 (1979)
11. C.A. : 63 (1965) 10371a
12. C.A. : 73 (1970) 75714b
13. C.A. : 77 (1972) 110301w
14. C.A. : 83 (1975) 54200x
15. C.A. : 89 (1978) 81779u
16. C.A. : 92 (1980) 4804n
17. C.A. : 90 (1979) 81779u
18. C.A. : 98 (1983) 120855e
19. C.A. : 110 (1989) 108081f
20. Blizzard, Timothy A. ; Ruby, Carol L.; Mrozik, Helmut; Preiser, Franz A.; Fisher, Michel H. : *J. Antibiotics* 42 (8), 1304-7, 1989.
21. C.A. : 113 (1990) 225865n
22. C.A. : 114 (1991) 76663m
23. Braner A.L. *Food Additives*. Editorial Marcel Dekker INC pp 87-92, 1989.
24. Badui Dergal S. : *Química de los Alimentos* Editorial Alhambra pp 322, 1986.
25. C.A. : 115 (1991) 179158a
26. C.A. : 115 (1991) 179197n

27. C.A. :114(1991) 80201b
28. C.A. :114(1991)R120334f
29. C.A. :114(1991)R120335g
30. C.A. :113(1990) 138303j
31. C.A. :113(1990)P237853v
32. C.A. :Troller J.A. y Olsen R.A.: J.Food Sci. 32 (2),228-31, 1967.
33. C.A. :115(1991) 134540c
34. C.A. :111(1989) P56151c
35. C.A. :105(1986)P178251g
36. C.A. :106(1987)P115242e
37. Foa, Marco; Preziuso,Ciro; Bencini, Elena;Signorini Ernesto; Siddi, Giorgio; Sabarino, Giampiero. Ger.Offen.D.E. 3,226,009 (Cl.C07 C69/736), 20 Jan 1983. IT Appl. 81/22,890, 13 Jul 1981.
38. C.A. :115(1991) 45194a
39. C.A. :Durrant G.; Green R.H.; Lambeth P.F.; Lester M.; y Taylor N.R.: J.Chem.Soc. Perkin Trans (9) 2211-14 , 1983.
40. Ungnade H.E. y Hopkins T. R. : J.Amer. Chem. Soc. , 73 3091, 1951.
41. Karrer P. y Schwizer R. : Helv. Chim. Acta, 29, 1191 (1946).
42. Heilbron I. , Jones E.R.H. y O' Sullivan D.G. : J.Chem.Soc., 866 (1946).
43. De Koning H. , Subramanian-Erhart K.E.C., Huisman H.O. Synth.Commum. 3,25(1973).
44. Berenguer J. , Castells J., Fernández J., y Golard R. :Synthesis, 12,794 (1973)
45. Berenguer J. , Castells J., Fernández J., y Golard R. : Tetrahedron Lett., 493, (1971).
46. Elliott M ; Farnham A.W. ; Janes N.F. ; Jhonson D.M. and Pulman D.A. Pestic. Sci. 18 ,203 -209 (1987).
47. Masagoshi, Ito :Phar. Bull. 36 (9) 3328-3346 (1988).
48. Voguel's. Texbook of Practical Organic Chemistry Fifth .Edition Ed. Longman Scientif and technical pp. 695-99.19
49. Haynes H. ,Eisenbraun A., : Chem. Ind. (London) !568 (1968).

50. Haslam. :Tetrahedron 36 2409-2433 (1980).
51. March J. Advanced Organic Chemistry , Third Edition pp348.
52. Finney, D.J, Probit analyses , 3ra. Ed. Mc.Graw-Hill, 1971.
53. C.A. :11(1989) 110637f
54. C.A. : 68 (1968) 47406f
55. Foster G. y Tullis R. : Acuatic Toxicology, 5,45-254(1984)