

302927

2  
24.



**UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO**

**Escuela de Químico Farmacéutico Biólogo  
Incorporada a la UNAM**

**SINTESIS DE N-ISOBUTILCINAMAMIDAS  
Y LA DETERMINACION DE SU ACTIVIDAD  
EN Artemia salina (LEANCH)**

**T E S I S**

**Que para obtener el Título de:  
Licenciado en Químico Farmacéutico Biólogo**

**P r e s e n t a:**

**MARTHA SILVIA GALLEGOS MARTINEZ**

**Directores de Tesis:  
M. en C. Angélica O. Calderón Villagómez  
M. en C. Lino Joel Reyes Trejo**

**México, D. F.**

**1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA.**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 208 del departamento de Química Orgánica, División de estudios de posgrado de la Facultad de Química, UNAM.

## **AGRADECIMIENTOS**

Con todo cariño y gratitud muy en especial al **M. en C. LINO JOEL REYES TREJO** por darme la oportunidad de realizar esta investigación, guiarme en la elaboración de la misma y sobretodo por el apoyo que en todo momento me brindo.

Con sincero agradecimiento a la **M. en C. ANGÉLICA O. CALDERÓN VILLAGÓMEZ** porque gracias a su valiosa ayuda y asesoramiento llego la culminación de este trabajo.

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Por esa energía divina que en todo momento me ha acompañado aún en los momentos que he creído estar sola.

Por permitirme formar parte de la vida de los que amo y que me aman.

### **A MIS PADRES**

Por darme la vida y entregarme su amor incondicional que me ha acompañado siempre dándome la fuerza necesaria para vencer toda adversidad.

Por su comprensión, apoyo, amistad por compartir mis logros como propios y por los sentimientos que con palabras no puedo expresar.

### **A JORGE ARTURO**

Por ser la razón de mi vida, la motivación que necesito para ser mejor cada día y la esperanza para cumplir todos mis sueños.

### **A HERMILO**

Con todo mi amor, por ser mi amigo y apoyo para superarme y sobretodo por ser el complemento de mi vida.

### **A JULIO**

Por ser mi compañero de infancia y por aquellos recuerdos que solo son nuestros.

### **A ERIKA Y LETY**

Por ser mis mejores amigas, por compartir conmigo cada uno de mis triunfos y fracasos, alegrías y tristezas, por darme ánimos para seguir adelante.

Y sobre todo por el cariño y paciencia que le manifiestan al ser que mas amo en la vida.

### **A MIS FAMILIARES Y AMIGOS**

Por el apoyo y confianza que siempre me han brindado.

## INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	4
Objetivos Particulares	4
Hipótesis	5
1. Antecedentes	6
1.1 Fundamento del tema	6
1.2 Importancia del estudio de la <i>Artemia salina</i>	16
1.3 Composición proximal de <i>Artemia salina</i>	18
1.4 Taxonomía	19
1.5 Generalidades Morfológicas	19
1.6 Fisiología	24
1.6.1 Sistema Nervioso	24
1.6.2 Aparato Respiratorio	24
1.6.3 Aparato Digestivo	26
1.6.4 Aparato Reproductor	27
1.7 Reproducción	30
1.7.1 Ciclo Reproductivo	31
2. Material y Método	34
2.1 Bioensayo	34
2.2 Producción de <i>Artemia salina</i>	35
2.3 Determinación de la Actividad Larvívora sobre <i>Artemia salina</i>	35
2.4 De la Síntesis Orgánica	37
2.5 Síntesis de derivados del Ácido Cinámico	40
2.6 Síntesis de N-Isobutilamidas	41
3. Resultados y Discusión	44
3.1 Síntesis de las N-Isobutilcinamidas	44
3.2 Identificación de los compuestos sintetizados	44
3.3 Determinación de la Actividad Larvívora	44

<b>4. Análisis de Resultados</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Síntesis de las Amidas</b>	<b>48</b>
<b>4.2 Identificación</b>	<b>49</b>
4.2.1 Resonancia Magnética Nuclear	49
4.2.2 Espectros de Infrarrojo	50
4.2.3 Espectros de Ultravioleta	50
4.2.4 Espectrometría de Masas	51
<b>4.3 Determinación de la Actividad Larvicida de las     N-Isobutilcinamamidas sobre <i>Artemia salina</i></b>	<b>51</b>
<b>4.4 Correlación entre la actividad larvicida en <i>Culex     quinquefasciatus</i> y <i>Artemia salina</i></b>	<b>53</b>
<b>5. Conclusiones</b>	<b>55</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>56</b>

## RESUMEN.

En el desarrollo de nuevo fármacos han existido varias rutas para descubrir diferentes drogas y darle un uso adecuado, estas pueden proceder de productos naturales (plantas, animales y minerales) o bien por síntesis química.

Una gran variedad de moléculas han sido sintetizadas en décadas pasadas, así como una complejidad de moléculas muy variadas han constituido el tema de estudio para muchos investigadores en nuestros días.

En Tehuacán, Puebla se encontró una planta que se utiliza para curar la amibiasis. Dicha planta pertenece al género *Zanthoxylum*. Uno de los metabolitos de esta planta es el  $\alpha$ -Sanshool (una *N-isobutilamida*) el cual mostró una gran actividad larvicida.

Por lo que en este trabajo se sintetizaron por métodos conocidos 11 compuestos derivados de *N-isobutilamida* sustituidas en diferentes posiciones del anillo aromático.

La identificación de los compuestos se realizó por análisis espectroscópico. El efecto biológico se evaluó con *Artemia salina*.

## INTRODUCCIÓN.

El hombre en su afán por sobrevivir ha realizado diversos estudios sobre todo lo que a su alrededor existe, y nuestro país dada la ubicación geográfica que presenta, cuenta con una basta riqueza de recursos naturales tanto vegetales como animales, lo cual no siempre resulta ser un privilegio para el individuo ya que existen dentro de estos, reinos enemigos muy peligrosos de los que el hombre ha tenido que defenderse como son; los insectos y las malezas. De los primeros podemos decir que son vectores potentes de diversas enfermedades que afectan tanto a hombres como a la misma naturaleza (plantas y animales). Dentro de las enfermedades más frecuentes provocadas por insectos están las virales, las malarías y las gastroentéricas (Hawood, y James, 1787). Por su parte los problemas ocasionados por las malezas son: dificultades en las labores de cultivo, recolección y uso de plaguicidas para su eliminación, disminución en la producción agrícola; lo cual repercute considerablemente sobre la economía del agricultor (Audus, 1979). por lo anterior, el hombre se ha visto en la necesidad de estudiar, investigar y desarrollar diversos insecticidas y herbicidas para combatir estos problemas. las *N-Isobutilamidas* presentan actividad biocida (insecticida, amebicida, antihelmíntica y herbicida). Aunque no se ha esclarecido la relación estructura - actividad por cuya interacción biológica conduzca al organismo atacante (insecto, planta), tampoco se conoce el blanco de ataque de estos compuestos (Mejía, 1995). En este trabajo se hace una correlación de las actividades que presentan 11 *N-Isobutilamidas* sintetizadas, ya que se realizaron dos estudios previos y utilizaron las mismas cinamamidas, en el primer estudio se utilizaron larvas de mosquito (*Culex quinquefasciatus*) como prueba

biológica encontrándose que tiene actividad larvícida (Pineda, 1994); el segundo estudio evaluó su efecto en diferentes actividades de la fotosíntesis *in vitro* en cloroplastos de hojas de espinacas para observar su actividad herbicida (Mejía, 1995) y por último en este trabajo se investigó como es el comportamiento de *N-Isobutilamidas* utilizando un crustáceo llamado, *Artemia salina* con el propósito de establecer una correlación entre ésta última actividad y las ya mencionadas.

## **OBJETIVO.**

Sintetizar diversas *N-Isobutilamidas* derivadas del ácido cinámico sustituido y evaluar su toxicidad en *Artemia salina* para establecer la relación estructura - actividad de este grupo de compuestos observando que tipo de sustitución de las moléculas aumenta la actividad tóxica en *Artemia salina*.

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

Sintetizar *N-Isobutilamidas* con 11 diferentes sustituyentes como son: 3,4-metilendioxi; 3,4-dimetoxi; 3-fluor; 3-Metoxi; 4-metoxi; 4-bromo; 4-cloro; 2-cloro; 2-nitro; 3-nitro; Acido cinámico.

Identificación espectroscópica por RMN, IR, UV y determinación del punto de fusión de cada uno de los compuestos.

Determinar la toxicidad por medio de la concentración letal al 50% en *Artemia salina* de las amidas sintetizadas.

## **HIPÓTESIS**

**La actividad larvica de *N-Isobutilamidas* orto, meta y para sustituidas sobre larvas de *Artemia salina* será mayor o igual que la actividad larvica de las *N-Isobutilamidas* de origen natural.**

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 FUNDAMENTO DEL TRABAJO

El uso de las plantas con fines medicinales ha prevalecido por miles de años y en la medicina herbolaria, tanto antigua como moderna ha sido una fuente de terapias muy útiles. Esto explica que desde los inicios de la investigación química se practique el estudio químico de la vegetación.

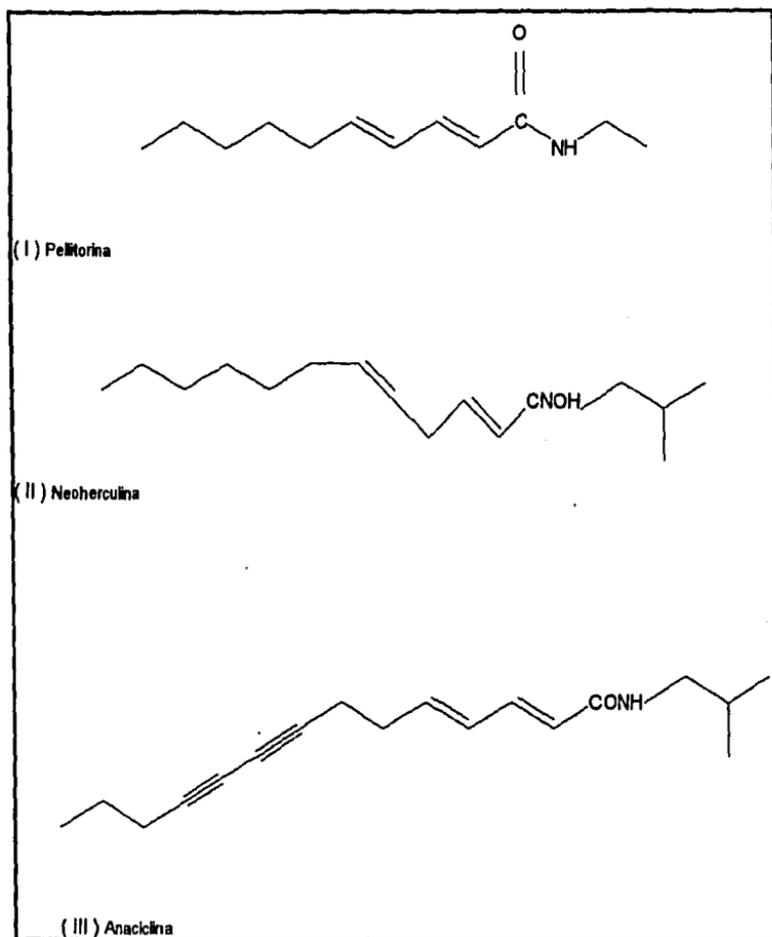
Tal es el caso de la planta medicinal *Zanthoxylum liebmannianum* conocida con el nombre de "colopahtle", que es utilizada como amebicida y antihelmítico por habitantes del valle de Tehuacán Puebla, (Reyes, et al., 1991).

El género *Zanthoxylum* de la familia de las rutaceas, es considerado como sinónimo de fagara (Yasuda, et al., 1982): en México se encuentra distribuido en los estados de Michoacán, Puebla, Oaxaca, Chiapas, Zacatecas, Sinaloa, Baja California, Yucatán, Morelos, Veracruz, San Luis Potosí, Nuevo León, Tamaulipas, Jalisco y Nayarit (Reyes, et al., 1991).

Diversos estudios han encontrado *Isobutilamidas* en plantas de las familias *compositae* y *rutacea*. Los metabolitos bioactivos aislados de este género son *N-isobutilamidas* de tipo aromática y/o alifático, algunas de estas se han estudiado

farmacológica y toxicológicamente como es el caso de la amida  $\alpha$ - Sanshool, que poseen una toxicidad relativamente baja para los animales de sangre caliente, característica de gran interés para el desarrollo de insecticidas biodegradables.

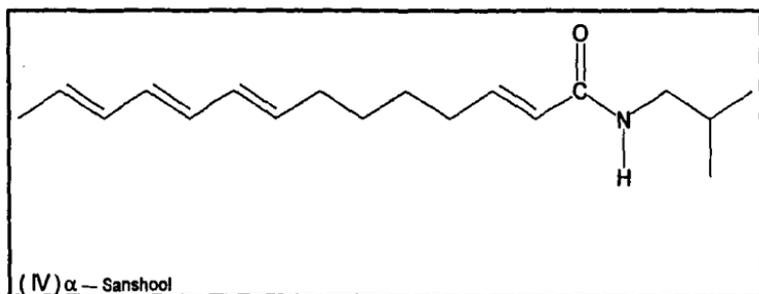
De las N-isobutilamidas alifáticas la primera estructura identificada fue la decadienamida pellitorina (I), después se aislaron e identificaron otras dos más, la neoherculina (II) y anaciclina (III). (Blade, 1990).



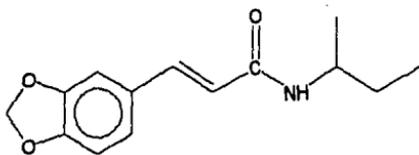
En el oriente de África la planta medicinal *Fagara Macrophylla* es conocida por ser relativamente inmune al ataque de insectos. Un examen químico de los extractos de la corteza realizado para establecer la causa de la resistencia observada, llevó al aislamiento de compuestos inhibidores y/o tóxicos contra insectos, uno de los cuales fue identificado como Pellitorina ( I ) que es el segundo en abundancia con el extracto y

resultó ser una amida muy activa contra las larvas de *Pectinophora gossypiella*, plaga que afecta a la agricultura ( Jacobson, 1971 ).

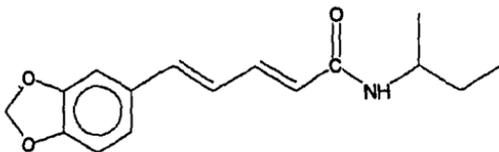
De la corteza y del fruto de diferentes especies de *Zanthoxylum* se han encontrado *isobutilamidas* de 12 a 14 átomos de carbono, con una conjugación de los dobles enlaces con un grupo amida y una geometría E. Ejemplo de algunas *isobutilamidas* aisladas de especies de *Zanthoxylum* ( Haral, 1984 ) son: Neoherculina ( II ) y el  $\alpha$  - sanshool ( IV ).



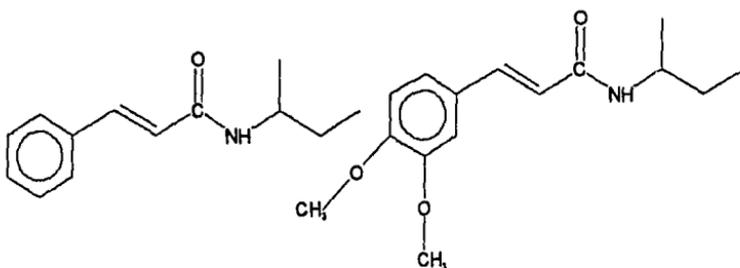
Otro grupo de amidas que resulta de gran interés es de las aromáticas, algunas de estas han sido aisladas de una planta llamada *Piper amalago*, conocida en la India y América central por ser un remedio eficaz en malestares estomacales; estudios recientes reportan la actividad hipotensiva de extractos de la hojas. De la raíz se han aislado 36 amidas, siendo algunas de ellas; Fagaramida ( V ), piperlongumina ( VI ), N-*isobutilcinamamida* (VII) y N-*isobutil-3,4-dimetoxicinamamida* (VIII) (Achenbach.1986).



( V ) Fagaramida



( VI ) Pipertogumida



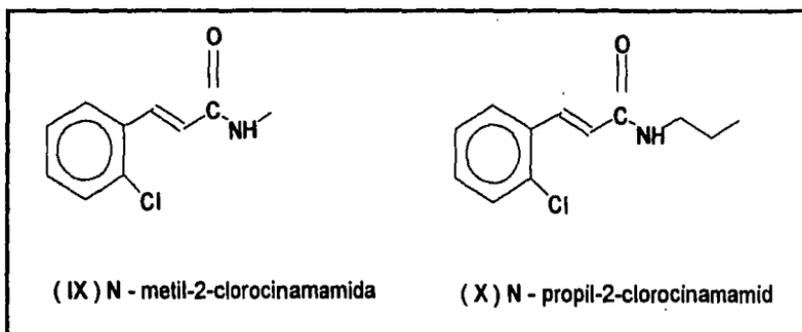
( VII ) N- Isobutilcinamamida

( VIII ) N- Isobutil- 3,4- dimetoxicinamamida

La actividad anticonvulsiva de N-isobutilcinamamidas se ha estudiado por un grupo de Beijing en China para lo cual se sintetizaron una serie de compuestos y entre los más activos fueron la N-Isobutil-3-clorocinamamida y N-isobutil-2,-4diclorocinamamida ( Shuyu y Rentli, 1986 ).

En 1984 Kubo mostró que las N-isobutilamidas de *Fagaria Macrophylla* como la Fagaramida presenta actividad moluscocida ( Kubo, 1991 ).

La actividad herbicida de N-alquilamidas obtenidas de raíces y tallos de diferentes variedades de vegetales, fue evaluada en diversos derivados de clorocinamamidas, dos de los cuales resultaron ser muy activos como herbicidas N-metil-2-clorocinamamidas ( IX ) y N-propil-2-clorocinamamidas ( X ). En este mismo trabajo se estudiaron 30 cinamamidas que presentan efecto potente contra la maleza, ejemplo: *Monochoria vaginalis*, *Rotola Indica*, *Dopetrium junceum*, *Eleocharis acicularis*, *Sagittaria pyramea* y *Scirpus Juncoides* ( Shinohara y Shinizu, 1975 ).

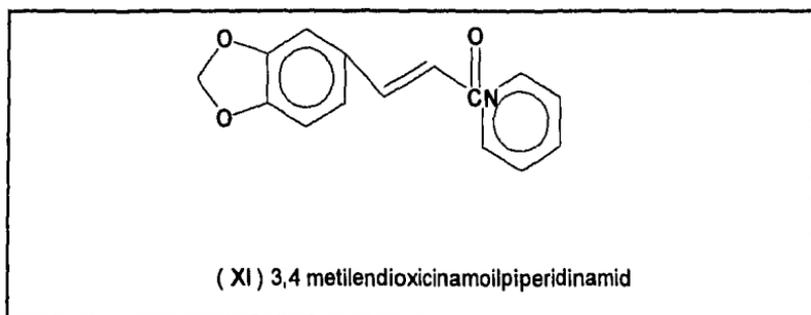


Otro tipo de respuesta farmacológica inducida por estas amidas es el de relajante muscular, las halosustituidas en posición meta como N-butil-3 bromocinamamida y las N-ciclopropil-3-fluorocinamamida, los cuales son derivados de productos naturales ( Grivsky, 1983 ).

En 1987 Michel Elliott inició el estudio de reacción estructura - actividad insecticida de alguna N-Isobutilamidas aisladas de Piperaceas, apoyando sus investigaciones en

estudios previos realizados por Jacobson, Bohlmann y Joshi; por lo que pudo darse cuenta que todos los compuestos naturales con actividad biológica considerable tienen una doble ligadura conjugada con un grupo amida, y que algunas de estas amidas presentan más de un doble enlace.

La importancia de que la molécula contenga en su estructura este doble enlace pudo ser analizada en estudios de actividad anticonvulsiva ( Xiao-Hui, 1980 ) en donde al ser reemplazada la doble ligadura de compuestos como el 3,4 metilendioxicinamoilpiperidinamida ( XI ) por un enlace simple, decreció la actividad.



Son pocos los estudios realizados en la cadena del N-isobutilo para dilucidar en que medida su presencia contribuye a la actividad de la molécula. Por lo que otra parte de este estudio se enfocó a la síntesis y evaluación de la actividad insecticida de amidas aromáticas en donde el grupo N-isobutilo fue sustituido por N-piperidinil, N-isopropilo que al ser aplicados tópicamente a la mosca doméstica revelaron que la actividad se anula con estos cambios ( Elliott, *et al.*, 1987 ).

Al probar la N-( 2,2-dimetilpropil ) decreció solo un poco la actividad comparada con la N-( 2-metilpropil ), mientras que las versiones cíclicas fueron nulas, o con poca actividad como la N-( ciclopropilmetil ).

Al introducir el grupo fenilo en lugar del grupo 2-metilpropil o remplazarlo por flúor se anula toda actividad. Un grupo metil en C-1 o en C-2 de isobutilo favorece un poco la actividad, mientras que la ramificación en C-3 decrece drásticamente la actividad.

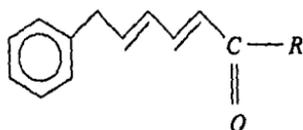
La introducción de un grupo metilo extra sobre el nitrógeno del grupo N-isobutilo, o un metileno extra en la cadena isobutilo adyacente al nitrógeno anula completamente la actividad, pero si son dos los metilos introducidos en C-1 la actividad se incrementa considerablemente. Sin embargo, ninguno de los compuestos evaluados presento mayor actividad que la amida secundaria N-isobutilo, como se ve en la tabla 1 de actividades relativas.

El efecto de los sustituyentes sobre el grupo fenilo de las N-isobutilamidas aromáticas, fue el punto a tratar en otros estudios ( Elliott, *et al.*, 1987 ); estas observaciones resultaron interesantes pues también están relacionadas con la actividad que presentan dichos compuestos con insecticidas, los cuales fueron probados con moscas domésticas. Durante el desarrollo de investigaciones, se encontró que los halosustituyentes en el anillo aromático confieren a la amida la mayor actividad que la obtenida con otro tipo de sustituyentes, sin embargo esta no llega a ser mayor que cuando la molécula no tiene sustituyentes.

En el caso de la monohalogenación, la posición orto es la menos favorable para la actividad, anulándola completamente; en la posición meta la actividad disminuye conforme se incrementa el tamaño del halógeno, la posición para tiene un grado de actividad muy aceptable.

De los compuestos metoxilados en las tres posiciones, el 3-metoxi fue el único que tuvo actividad, siendo esta muy baja. Dentro de las polisustituciones, las halogenadas en posición 3,4 y 3,5 fueron las que presentaron mayor actividad.

TABLA 1. ALGUNAS AMIDAS SINTETIZADAS POR M. ELLIOTT Y SUS ACTIVIDADES INSECTICIDAS RELATIVAS.



R	Actividad Insecticida Contra Mosca Doméstica
	3.9
	NT
	1.0
	NT
	1.0
	2.0
	0.6
	2.8
	NT
	NT

POTENCIA RELATIVA A BIORESMETRINA (DL<sub>50</sub>=100PPM), NT = NO TÓXICO.

## 1.2 LA IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE ARTEMIA SALINA.

La *Artemia* es una especie de crustáceo que desde hace muchos años se ha utilizado como alimento para tribus indígenas de América y África, pero solo circunstancialmente ( Amat, 1980). También se observa que la calidad de la sal mejoraba al encontrarse en las charcas salineras la presencia de la *Artemia salina*, ahora se sabe que esto se debe a que la *Artemia* es un organismo filtrado no selectivo, por lo que los carbonatos y sulfatos impuros, que forman parte de las salmueras, son filtrados por la *Artemia salina*, mas no son digeridos y por lo tanto son expulsados en las heces, pero ya puros, pues todas las impurezas que contenían son asimiladas por la *Artemia salina* ( Dees, 1961; Sorgeloos, 1983 ).

Hasta 1979 se tenía conocimiento de 240 localidades en el mundo, donde se encuentran poblaciones de *Artemia*. En Canadá y Estados Unidos, la zona más estudiada, se tiene un registro de 37 y 34 lugares respectivamente, haciendo un total de 71 sitios para América del Norte, en Europa se encuentran registrados 77, en África 33, en Asia y Sudamérica 19 en cada uno, en Centro América 11 y Austria 10 lugares ( Persoone y Sorgeelos 1980 ); sin embargo existen muchos lugares en los que los hábitats de *Artemia salina* se encuentran distribuidos o abandonados, como es el caso de muchos países Europeos. En México se encuentran localizados 18 poblaciones naturales de *Artemia salina*, distribuidas en 7 estados de la República los cuales son Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Oaxaca, San Luis Potosí, Chiapas, Yucatán ( Olguin, 1987 ).

Su fácil cultivo en el laboratorio, su corto ciclo biológico, su alta tasa de fecundidad y su accesible manejo en forma de quiste, son condiciones que hacen que sea empleada en la investigación y enseñanza de varias ramas de la ciencia, como son: la toxicología, en donde se utilizan pruebas para insecticidas, ya que este crustáceo es sensible a un rango amplio de estos compuestos ( Dees, 1961 ). Y en genética, ya que se han observado fenómenos de mutagénesis de esta especie ( Browen, 1963 ).

### 1.3 COMPOSICIÓN PROXIMAL DE ARTEMIA SALINA.

La información sobre la composición proximal de los nauplios y adultos de *Artemia* es muy variable, ya que esta depende del lugar de la cepa de este crustáceo y de su tipo de alimentación (Iveva, 1969).

Componente		Estadio	
Base seca	Quiste	Nauplio	Adulto
% proteínas	48.0	41-71	50-69
% grasa	18.0	23.0	16.0
% carbohidratos	14.0	6-23	9-17
% cenizas	3.5	6-21	9-29

#### **1.4 TAXONOMIA.**

La *Artemia* se encuentra clasificada de la siguiente forma: Phylum Arthropoda, Subphylum Euarthropoda, Clase Crustácea, Subclase Branchiopoda, Orden Phyllopoda, Suborden Anostraca, Familia Artemiidae, Género *Artemia*, Especie *Salina*. ( Heip, et al. 1976 ).

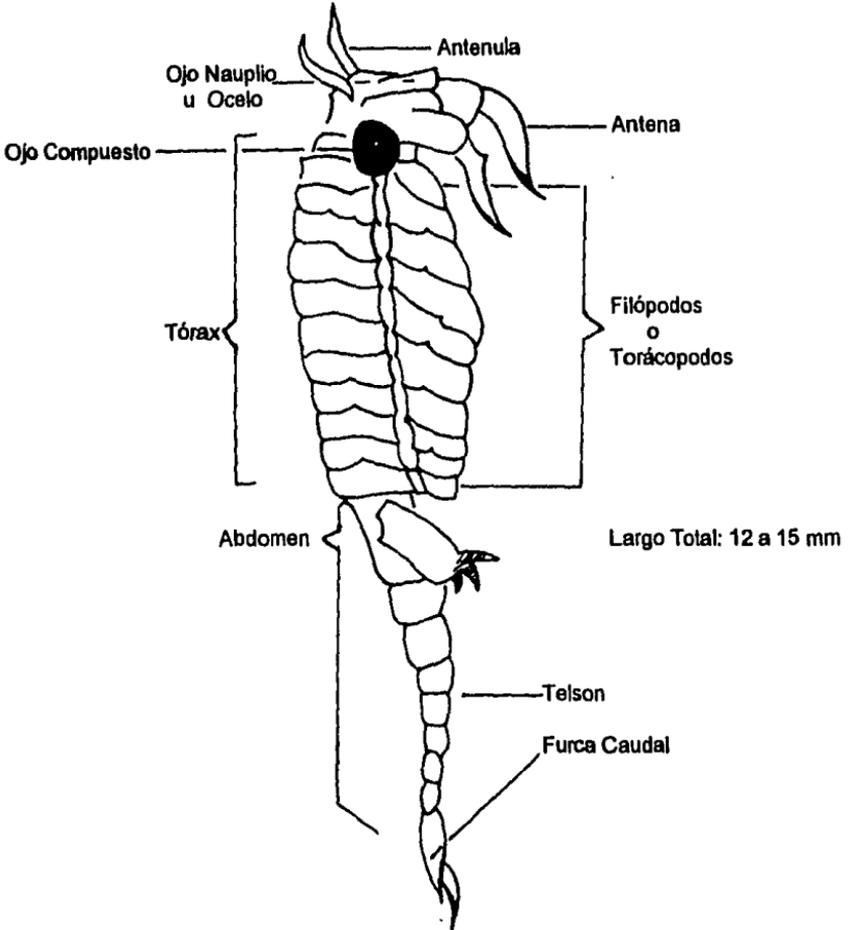
#### **1.5 GENERALIDADES MORFOLOGICAS.**

La primera etapa, por la que pasa la *Artemia* durante su desarrollo es la nauplio, esta presenta un color naranja debido a la presencia del vitelo y carotenos, mide aproximadamente 0.4 mm y pesa 0.002 mg ( Sorgeloos y Parsoone, 1975 ). Externamente se puede observar 3 pares de apéndices: las antenas, cuya función es locomotora y los extremos son filtradores de alimentos llevándolos hasta la boca; la antenula, función sensorial; y un par de mandíbulas rudimentarias ( Ver figura 1 ).

Se distingue también, un ocelo de color rojizo, que se sitúa en la región media de la cabeza entre las antenulas y los ojos compuestos, los cuales no se observan fácilmente puesto que aún carecen de pigmentación. El ojo naupliar tiene una función fototáctica positiva, esta se va perdiendo hasta llegar a la etapa adulta, que es cuando presenta un fototactismo negativo, aunque puede cambiarlo a positivo o viceversa, por lo que el comportamiento fototáctico de *Artemia salina* es más complejo de lo que parece.

**FIGURA No.1**

**Características Morfológicas  
de  
*Artemia* - Adulto**



En la porción de la cabeza, ventralmente se presenta un gran labio ( labrum ), de forma casi rectangular, que recubre la base de los apéndices; esta estructura capta las partículas alimenticias y por debajo de el se encuentra la abertura oral ( fig. 2 ).

El nauplio continua se desarrollo, en los primeros 2 o 3 dias de vida se nutre de sus reservas de vitelo y sufre 4 transformaciones más en 24-48 hrs; al llegar a las fases de metanauplio I y II se empieza alimentar del medio externo y sufre su primera muda. Progresivamente se va transformando en juvenil y después en adulto, en aproximadamente 21-25 dias ( Ileva, 1969 ).

En los primeros estadios de vida a la *Artemia* se le distingue la cabeza, el tórax y el abdomen. En el tórax se le observa lóbulos laterales, que al desarrollarse formarán 11 pares de toracopodos. El abdomen se observa con una furca terminal, la cual es igual en los machos y en las hembras. En los machos el segundo par de antenas que poseen, sufren un cambio completo en su morfología al llegar a adultos: las cerdas de los exopoditos se pierden, se desarrollan sus musculos y se convierten en unos fuertes apéndices prensibles; en las hembras no ocurre este desarrollo y durante toda la vida funcionan como órganos sensoriales; esta es una de las características que sirven para diferenciar los sexos de este crustáceo.

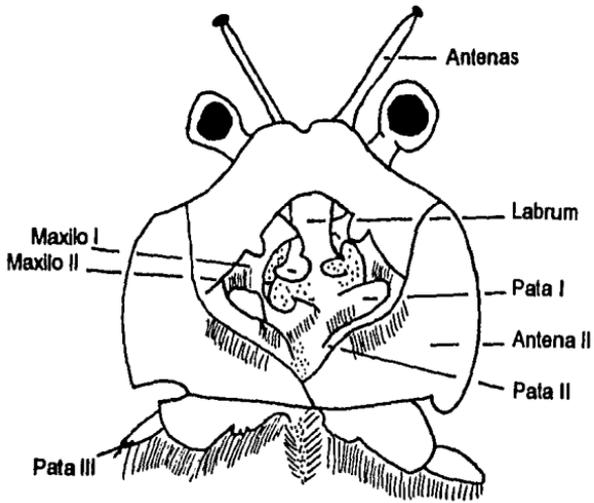
Al llegar al estado adulto, las *Artemias* pueden llegara a medir 12-15 mm de largo total, y pesar aproximadamente entre 6-7 mg ( Ileva, 1969 ); presentan gran variedad de tonos en su coloración, aunque se ven generalmente rojizas.

El cuerpo de la *Artemia salina* adulta se divide también en : cabeza, tórax y abdomen. La cabeza esta formada por cinco segmentos fusionados: en ella se encuentran dos ojos compuestos, un ocelo, las antenulas o segundas antenas, y en posición más ventral las primeras antenas verdaderas, transformándose en el macho. ( fig. 1 ).

El tórax esta formado por los 11 toracopodos, ya desarrollados, segmentos bien delimitados, cada uno de ellos esta dotado por apéndices foliaceos ( filópodos o toracopodos ). Estos realizan tres funciones: respiratoria, de alimentación y locomotriz. En la respiratoria están involucrados porque presentan branquias en cada uno de los toracopodos, por lo que respecta a la alimentación y la función locomotriz, estos actúan en el agua que tiene partículas filtradas por la *Artemia salina*, las impulsa al canal ventral y después por medio de movimientos rotativos acarrear el alimento hasta la región bucal.

El abdomen consta de ocho segmentos, los dos más próximos al tórax son los segmentos digitales; seis restantes, propiamente abdominales y al final el telson provisto de la furca caudal.

**FIGURA No. 2**



**Características sexuales de una *Artemia* Macho**

## **1.6 FISILOGIA.**

La *Artemia* es un crustáceo primitivo, como puede observarse en sus funciones fisiológicas, que no son altamente complejas, los sistemas que comprende cada uno de ellas se menciona a continuación brevemente ( fig. 3 ).

### **1.6.1 Sistema Nervioso:**

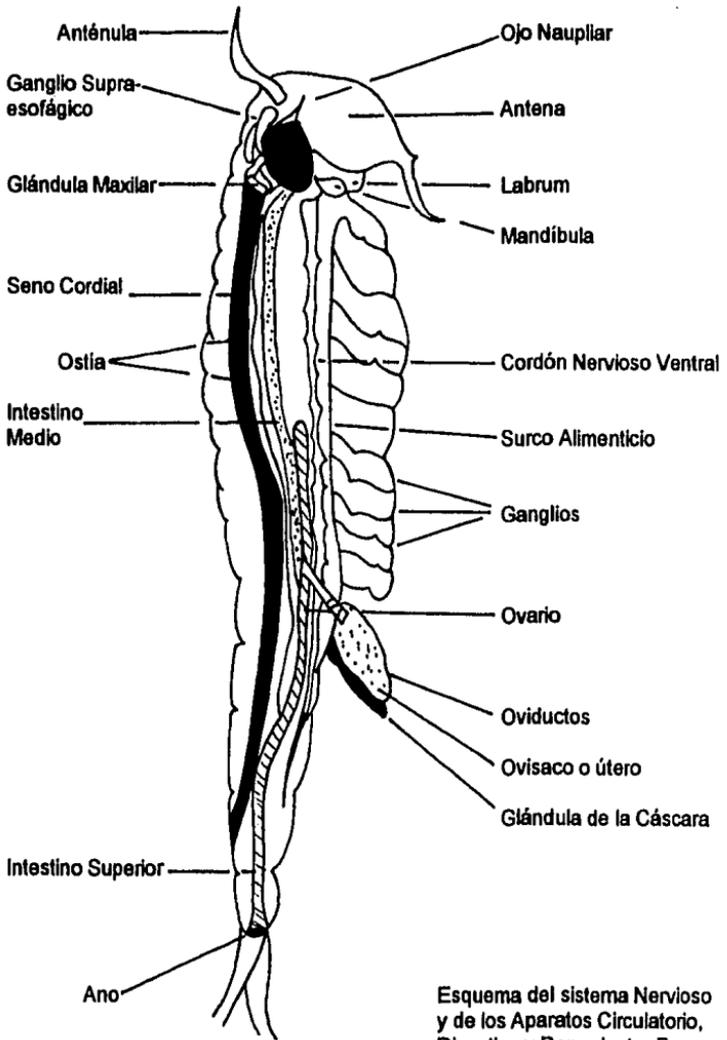
Este esta formado por un ganglio cefálico unido a un sistema que recorre el cuerpo, y que consta de las siguientes partes: un par de ganglios en cada segmento, unido entre si tanto longitudinal como transversalmente por los nervios. Hay un ganglio periesofágico en la porción anterior del ganglio cefálico, a el llega los nervios que proceden de los ojos compuestos, del ojo naupliar y de otras áreas sensitivas.

### **1.6.2 Aparato Respiratorio:**

Está íntimamente ligado con la actividad locomotriz e indirectamente con la excreción, particularmente de cloruro de sodio, por tanto forma parte del mecanismo de regulación osmótica.

La respiración y excreción de lones se efectúa a través de los exopoditos de los toracopodos, que actúan a manera de branquias, y del tegumento del cuerpo, formado principalmente por quitina.

Figura No. 3



Esquema del sistema Nervioso y de los Aparatos Circulatorio, Digestivo y Reproductor Femenino de *Artemia*.

Como ya se dijo, la *Artemia* presenta branquias en sus 11 toracopodos; cuando estos se encuentran bien desarrollados el nivel de oxígeno es mayor en comparación con las primeras etapas larvianas que no tienen toracopodos desarrollados; en compensación con esta deficiencia existe, en los nauplios, la glándula de sal en la región de la cabeza, con lo cual el organismo excreta la sal y regula la presión osmótica; esto permite que los nauplios en su primer estadio, puedan transferirse de una baja salinidad ( 5% ) hasta una alta ( 150% ), sin que muera, en cambio las *Artemias* adultas no sobreviven a cambios tan drásticos.

La *Artemia* tiene capacidad para sintetizar hemoglobina, y el aumento de su concentración les asegura una captación intensa de oxígeno del medio, aún a bajas concentraciones. Debido a la gran capacidad de regulación de la presión osmótica que tiene la *Artemia*, puede vivir en aguas con muy diversos rangos de salinidad y temperatura.

### **1.6.3 Aparato Digestivo:**

Este aparato consta de un atrio bucal, un esófago, un par de pequeños divertículos globulares, que abarcan los segmentos cefálicos 2° y 3°. ( *se asemejan a un estómago que continúa con un tracto o tubo intestinal que termina en el ano*); las partículas alimenticias son digeridas con ayuda de movimientos musculares rítmicos de contracción.

#### **1.6.4 Aparato Reproductor.**

Los adultos de *Artemia* presentan características muy particulares para cada sexo. El macho se diferencia fácilmente de la hembra por la presencia de un par de apéndices ( antenas ) cefálicos muy desarrollados y semejantes a unas pinzas, los cuales van a servir para sujetar a la hembra; estos apéndices prensiles se adhieren firmemente alrededor de la hembra y justamente al ovisaco, mediante un órgano intromisor, se efectúa la fecundación.

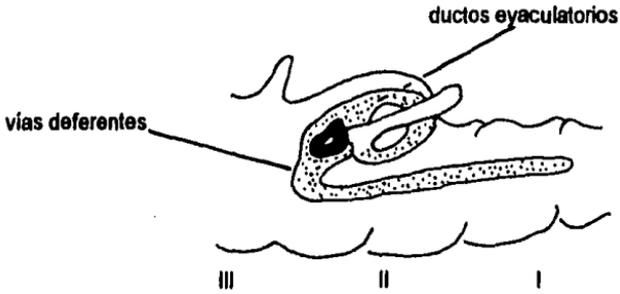
El aparato reproductor del macho presenta todas las estructuras en pares. Los testículos son largos y tubulares, colocados a cada lado del aparato digestivo. La histología de estos testículos es igual en todo su trayecto, con células germinales y células de soporte, en forma de racimos, y los espermatozoides maduros se localizan en la cavidad del tubo; son de forma esférica ( sin movimiento y sin reflejo ), estas células son llevadas a través de los testículos hasta los conductos o vasos deferentes, los cuales secretan el líquido seminal y lo almacenan; el tejido de esta estructura es igual en toda su longitud, y consta de un epitelio secretor que lo rodea y de músculos longitudinales y circulares ( fig. 4 ).

El aparato reproductor de la hembra esta formado por los ovarios, que al igual que los testículos, son dos tubos colocados a cada lado del aparato digestivo; a lo largo de los ovarios se observan bandas de oogonias, las cuales son muy abundantes en el lado ventral, algunas de estas oogonias se agrandan y siguen la vitelogenésis, en la cual participan numerosas células nutritivas ( fig. 4 ).

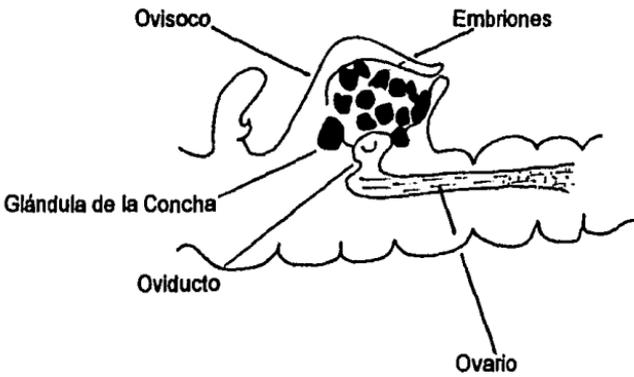
A medida que prosiguieron este desarrollo las células entran en profase de la primera división meiótica ( oocitos primarios ), y permanecen en esta etapa hasta llegar a la entrada de los oviductos, donde alcanzan metafase de la primera división meiótica. Cuando los oocitos están en la parte lateral de los oviductos, la fecundación es efectiva.

**Figura No. 4**

**Vista del aparato reproductor de un Macho - Adulto de *Artemia*.**



**Vista Lateral del Aparato Reproductor de una Hembra - Adulta de *Artemia*.**



## **1.7 REPRODUCCIÓN.**

Esta es iniciada por los machos en una etapa de preadulto, abrazando a la hembra con sus antenas entre el ovisaco y el último par de toracopodos; en esta posición la pareja puede nadar por largos periodos.

La hembra libera oocitos maduros, que pasan desde los ovarios hasta los oviductos en menos de dos horas, y permanecen ahí de 1 a 40 horas. El abdomen del macho se encorva hacia el de la hembra, y uno de los órganos introductores entra al ovisaco. Más tarde, los óvulos ya fecundados, permanecen ahí de 3 a 5 días.

Del ovisaco de la hembra se pueden liberar embriones enquistados, llamados quistes oocíticos, a este proceso se le conoce como reproducción ovípara; en lugar de estos quistes se pueden dar origen a una larva nauplio que sería la reproducción ovovípara.

Se han observado dos tipos de embriones enquistados: uno que produce nauplios casi inmediatamente después de haber sido expulsados del ovisaco; y otros que permanecen en estado de latencia ( diapausa ), que pesa aproximadamente 0.0040 mg y mide 0.2 mm, en este último estado puede permanecer por largos periodos, hasta 10 años ( Dees, 1961 ): estos quistes deshidratados requieren ser activados para que eclosionen, son altamente higroscópicos por lo que se colocan en agua, con suficiente oxígeno, se hidratan y reinician el metabolismo suspendido en etapas de gástrula. El

## 1.7 REPRODUCCIÓN.

Esta es iniciada por los machos en una etapa de preadulto, abrazando a la hembra con sus antenas entre el ovisaco y el último par de toracopodos; en esta posición la pareja puede nadar por largos periodos.

La hembra libera oocitos maduros, que pasan desde los ovarios hasta los oviductos en menos de dos horas, y permanecen ahí de 1 a 40 horas. El abdomen del macho se encorva hacia el de la hembra, y uno de los órganos introductores entra al ovisaco. Más tarde, los óvulos ya fecundados, permanecen ahí de 3 a 5 días.

Del ovisaco de la hembra se pueden liberar embriones enquistados, llamados quistes oocíticos, a este proceso se le conoce como reproducción ovípara; en lugar de estos quistes se pueden dar origen a una larva nauplio que sería la reproducción ovovípara.

Se han observado dos tipos de embriones enquistados: uno que produce nauplios casi inmediatamente después de haber sido expulsados del ovisaco; y otros que permanecen en estado de latencia ( diapausa ), que pesa aproximadamente 0.0040 mg y mide 0.2 mm, en este último estado puede permanecer por largos periodos, hasta 10 años ( Dees, 1961 ): estos quistes deshidratados requieren ser activados para que eclosionen, son altamente higroscópicos por lo que se colocan en agua, con suficiente oxígeno, se hidratan y reinician el metabolismo suspendido en etapas de gástrula. El

tiempo que tarde en eclosionar el quiste y la salinidad del agua en que se efectúa ésta, depende de la cepa con que se este trabajando, sin embargo, existen reportados en la bibliografía rangos en los que se han tenido una eficiencia de eclosión óptima ( 90-95% ) la salinidad debe oscilar entre los 5-3.5‰ y el tiempo de eclosión puede variar entre 24-36 horas ( Smith, et al 1978; Nash, 1973 ); el embrión que eclosiona se llama prenauplio, y presenta parcialmente la forma de la larva nauplio características de los crustáceos; posteriormente, sale completamente de la cascara y después de un par de horas, se transforma en la larva nadadora nauplio. Este proceso depende de las condiciones de incubación. ( fig. 5 ).

No se encuentran todavía bien establecidos los factores que influyen para que se presente la ovoviviparidad o la oviparidad en la bibliografía se mencionan varios de ellos, que quizá puedan influir en este proceso, talés como la salinidad, la presión osmótica, la calidad y la cantidad de alimento, la baja concentración de oxígeno disuelto que induce a la oviparidad, la correlación existente entre la síntesis de hemoglobina y la producción de quistes, la presencia de clorofila en el medio de cultivo y la densidad de animales entre otros ( Versichele y Sorgeloos, 1980 ).

### **1.7.1 Ciclo Reproductivo:**

La *Artemia* se reproduce por partenogénesis y sexualmente, tanto las cepas bisexuales como las partenogénéticas pueden reproducirse vivipara y ovoviviparamente.

En las hembras partenogénéticas, la formación de óvulos se inicia con los oocitos en los ovarios; después de dos días; dichos oocitos se transforman en óvulos y pasan a

los oviductos laterales, en los cuales permanecen un día y después pasan al ovisaco donde continúan su desarrollo hasta la gástrula, o bien alcanza el estado de nauplio y son liberados por la hembra; en ellos intervienen factores externos como los ya mencionados: calidad de alimento, salinidad, temperatura, oxígeno, etc. Se ha observado que las hembras expulsan de 7 a 80 huevos en un periodo de 3 a 11 días (Ivleva, 1969). Las *Artemias* partenogenéticas produce machos que pueden fecundar a *artemias* bisexuales también.

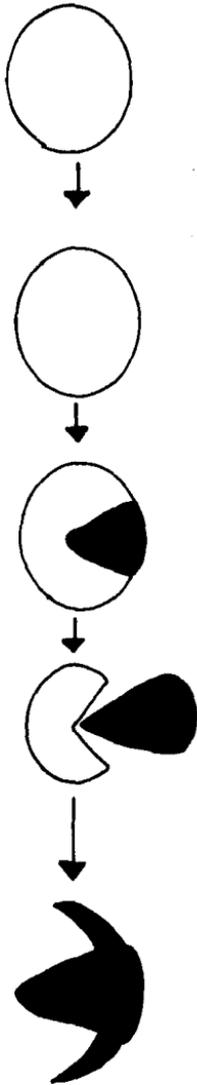
En el caso de la ovoviviparidad, la glándula de la cascara o glándula de Brown desarrolla gran actividad, debido a la formación de los quistes, y es en este tipo de reproducción cuando se puede observar la glándula secretora de la sustancia que forma la concha o cascara de dichos huevos, esta es formada antes de que los quistes sean liberados por la hembra.

Durante el desarrollo de los embriones, en el saco ovigero, se continúan formando y desarrollando nuevos oocitos; por esto, la *Artemia* origina una descendencia numerosa, es decir, tiene una alta tasa de fecundidad.

En la reproducción sexual, la fecundación es un movimiento reflejo breve, de unos cuantos segundos. Para cada ciclo de puestas de huevos se requieren de una fecundación, ya que la hembra no almacena espermatozoides maduros. Si los oocitos no están en los oviductos la hembra rechaza el cortejo del macho. Aún no se han observado producciones mixtas de nauplios y de quistes, pero puede alternarse la ovoviviparidad y la oviparidad repetidamente durante los desoves viables de la misma hembra.

**Figura No. 5**

**Desarrollo de una Gástrula Enquistada.**



Gástrula Hidratada

A



Desarrollo de preemergencia

B



Etapas de Prenauplio

C



Primera Etapa de Nauplio

## **2. MATERIAL Y MÉTODO DEL BIOENSAYO.**

### **2.1 BIOENSAYO**

#### **MATERIAL BIOLÓGICO.**

*Artemia salina* Leach

Sal de mar

#### **MATERIAL DE LABORATORIO.**

Matraz Erlenmeyer

Pipetas

Espátula

Frascos viales

Jeringas 5 ml, 0.5 ml, 100  $\mu$ l, 10  $\mu$ l

Recipiente pequeño con perforación en el divisor

Cubierta para el recipiente ( tela o malla )

Lámpara de luz blanca

#### **DISOLVENTES.**

Acetona

Etanol

## **2.2 PRODUCCIÓN DE ARTEMIA SALINA ( Meyer et al., 1982 ).**

Se preparó agua de mar artificial, mezclando 38g de sal marina en un litro de agua. Se colocó en el recipiente y se adicionaron 50mg de huevecillos de *Artemia salina*. Se cubrió con tela o malla ( para protegerlos de los mosquitos ) y del otro lado se colocó al descubierto la lámpara para atraer las larvas a través de la perforación del dique. Se dejan pasar 2 días para que el crustáceo eclosione y madure.

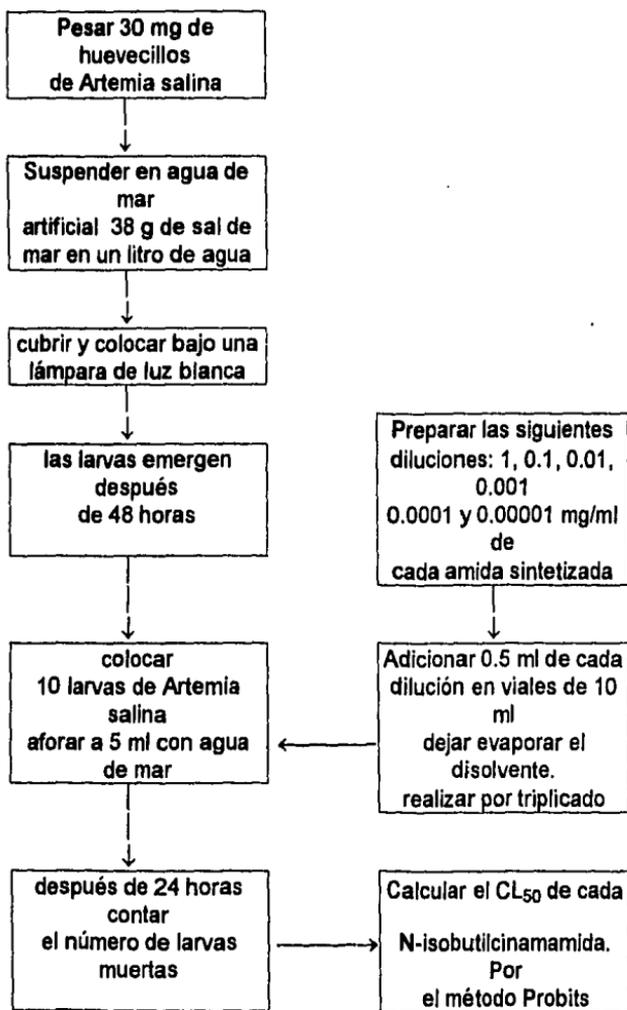
## **2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA SOBRE ARTEMIA SALINA.( Meyer,et al., 1982 ).**

Se pesaron 50 mg de cada uno de los compuestos, y se disolvieron en 5 ml de acetona ( 10 mg/ml ). Se tomaron 0.5 ml de la dilución anterior y se agregaron 4.5 ml de acetona ( 1 mg/ml ), se repitió esta operación en forma sucesiva para obtener las concentraciones de 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 mg/ml. Se prepararon 3 viales para cada concentración, marcando previamente el aforo a 5 ml., se utilizaron un total de 18 viales de prueba y 3 viales para control, por cada compuesto evaluado.

Se adicionaron 0.5 ml de cada dilución en los viales de prueba correspondientes, a los viales de control se les adicionaron 0.5 ml de acetona, se dejó evaporar a temperatura ambiental por 24 horas, se adicionó un poco de agua de mar y se agitó, se colocaron 10 larvas de *Artemia salina* por vial, después se aforó a 5 ml con agua de mar artificial. Para contar las larvas se utilizó una pipeta pasteur larga. Después de 24 horas se contaron y se registraron las larvas muertas.

Se determinó la concentración letal 50 % (  $CL_{50}$  ) por medio del análisis estadístico probit, mediante un programa de computo ( Infante y Zarate, 1984 ).

### **DETERMINACIÓN DEL $CL_{50}$ EN LARVAS DE ARTEMIA SALINA.**



## **2.4 MATERIAL Y MÉTODO DE LA SÍNTESIS DE LAS CINAMAMIDAS.**

### **MATERIAL DE LABORATORIO.**

Agitador magnético

Anillo de fierro

Adaptador de termómetro

Agitador de vidrio

Capilares

Cámara de elución

Cabeza de destilación

Canastilla de calentamiento

Colector para vacío

Espátula

Embudo de separación

Embudo buchner

Matraz redondo de 2 bocas

Matraz Erlenmeyer

Probeta

Placas de sílica

Pipeta graduada de 0.2, 1, 2.5, 10 ml.

Pipeta volumétrica de 1 ml.

Pinzas de tres dedos con nuez

Refrigerante con manguera

Soporte universal

Trampa para vacíos

Termómetro

Vaso deprecipitado

Vidrio de Reloj

### **EQUIPO.**

Equipo de Fisher Johns

Balanza analítica

Lámpara de luz ultravioleta

Parrilla de calentamiento con agitación

Rotavapor

Espectrofotómetro de IR, Nicolet FT-IR 5X de un solo haz.

Espectrómetro de RMN FT-80.

### **REACTIVOS :**

Ácido Cinámico

Ácido 2-Clorocinámico

Ácido 2-Nitrocinámico

Ácido 3-Fluorocinámico

Ácido 3-Clorocinámico

Ácido 3-Bromocinámico

Ácido 3-Metoxicinámico

Ácido 3-Nitrocínámico

Ácido 4-Metoxicinámico

Ácido 4-Bromocínámico

Ácido 3,4-Dimetoxicinámico

Ácido Piperonal

Ácido Malónico

Ácido Clorhídrico

Benzaldehído

Bicarbonato de Sodio

Piridina

Piperidina

Cloruro de Tionilo

**DISOLVENTES:**

Etol

Éter

Acetona

Hexano

Diclorometano

Benceno

Acetato de Etilo

## **MÉTODO DE LA SÍNTESIS ORGÁNICA.**

### **2.5 SÍNTESIS DE DERIVADOS DEL ÁCIDO CINAMICO ( Mundy, 1985 ).**

En un matríz bola de 100 ml. equipado con agitador magnético, canastilla de calentamiento y refrigerante en posición de reflujo provisto de una trampa de humedad, se agregan 0.33 moles de benzaldehído y 0.72 moles de ácido malónico a una mezcla de 8.2 ml de piridina y 0.22 ml de piperidina. Se calienta a reflujo con agitación continua durante 8 hrs., después se enfrían y se adicionan en baño de hielo 10 ml de ácido clorhídrico concentrado en 30 ml de agua.

El precipitado obtenido se filtra al vacío, se lava con una solución de ácido clorhídrico al 10 %, continuando con un lavado abundante de agua hasta obtener un pH neutro, el ácido obtenido se purifica por cristalización simple, se determina el punto de fusión.

## **2.6 SÍNTESIS DE N-ISOBUTILAMIDAS (Elliott, et al, 1987)**

En un matríz de bola de 100 ml equipado con refrigerante y trampa de humedad, se colocan 5.7 mmoles de ácido cinámico correspondiente y se adiciona 27.3 mmoles de cloruro de tionilo.

La mezcla de reacción se calentó a reflujo con agitación magnética durante 5 horas aproximadamente ( la reacción se sigue por cromatografía en capa fina ).

Pasado este tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente, después se adicionan 20 ml de benceno seco, el exceso de cloruro de tionilo se destilo a temperatura no mayor de 70° C.

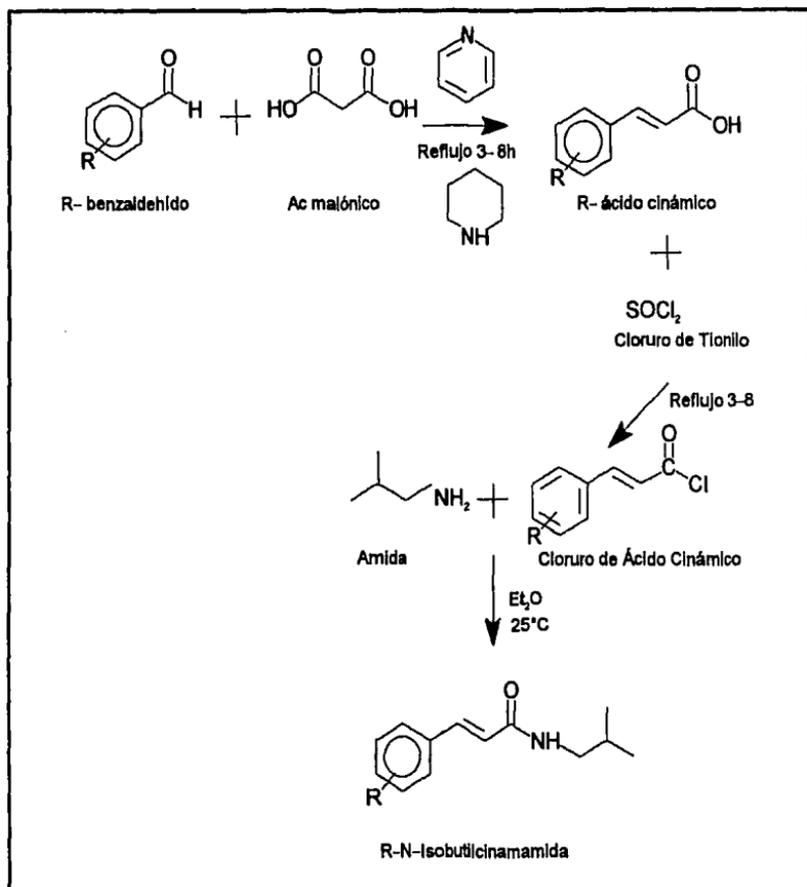
Una vez que el cloruro de tionilo dejo de destilar, se suspende el calentamiento y se añaden 50 ml de benceno seco el cual se destila nuevamente hasta obtener un pH neutro.

El cloruro del ácido obtenido se disuelve en 5 ml de éter etílico (seco); se enfría en un baño de hielo con agitación magnética y trampa de humedad se adiciona una solución de isobutilamina ( 13 mmoles en 50 ml de éter ).

La mezcla se agitó por 24 horas a temperatura ambiente, terminado este tiempo la mezcla de reacción se filtró al vacío en un rotavapor para evaporar el éter. El producto se disuelve en acetato de etilo.

La fase orgánica se lavó en un embudo de separación tres veces con ácido clorhídrico al 5 % y tres veces con bicarbonato de sodio al 5 %, finalmente con agua destilada hasta obtener un pH neutro, después se separó la fase no acuosa y se secó con sulfato de sodio anhidro, el disolvente se evaporó a presión reducida en rotavapor. El producto se purificó por cristalización en una mezcla de hexano - acetato de etilo y se identificó por medio de la determinación de sus propiedades físicas y espectroscópicas.

## Síntesis de N-Isobutilcinamamidas.



### **3. RESULTADOS.**

#### **3.1 SÍNTESIS DE LAS N-ISOBUTILCINAMAMIDAS.**

Se sintetizaron 11 N-Isobutilamidas, una de ellas la N-Isobutilcinamamida y 9 mono sustituidas ( 2-NO<sub>2</sub>, 2 Cl, 2 OH, 2F, 3-OCH<sub>3</sub>, 3-BI, 4 NO<sub>2</sub>, 3, 4-( O-CH<sub>2</sub>-O ) y 4 Cl ) una disustituida 3, 4 ( OCH<sub>3</sub> )<sub>2</sub>.

#### **3.2 IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS.**

En la tabla 2 se presentan los puntos de fusión de cada amida sintetizada así como su peso molecular encontrado por espectrometría de masas. También se menciona el rendimiento obtenido y los máximos de absorción de los compuestos sintetizados en los espectros de U.V. ( tabla 2 ) y las principales bandas en los espectros de IR ( tabla 3 ).

#### **3.3 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA.**

Para determinar la actividad larvicida de las N-Isobutilamidas se realizó un bioensayo con larvas de *Artemia salina*.

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos de la actividad larvicida de las amidas sintetizadas sobre *Artemia salina*.

**TABLA 2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LOS DERIVADOS DE N-ISOBUTILCINAMIDAS.**

R	Peso Molecular ( g / mol )	Rendimiento ( % )	Punto de Fusión (°C)	Ultravioleta
H	203	90	110 - 111	268
2 - NO <sub>2</sub>	193	73	129 - 130	254
2 - Cl	237	82	126 - 127	268
2 - OCH <sub>3</sub>	233	85	109 - 110	271 - 316
2 F	221	78	94 - 95	266
3-OCH <sub>3</sub>	233	85	70 - 71	272
3-Br	282	81	108 - 109	269
4 -Cl	237	80	142 - 143	373
4 -NO <sub>2</sub>	248	73	153 - 154	309
3,4-(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	263	79	106 - 107	328
3,4-(O-CH <sub>2</sub> -O)	247	75	107 - 108	318

**TABLA 3. PRINCIPALES BANDAS DE LOS ESPECTROS DE INFRARROJO.**

GRUPO FUNCIONAL	FRECUENCIA
NH	3220 - 3300
C - H ( Insaturado )	3020 - 3080
C - H ( Saturado )	2915 - 2960
Aromático	1600 - 1624
-CONH	1530 - 1564
C = O	1640 - 1654
- CH = CH -	955 - 990
Sustitución Orto	740
Sustitución Meta	655 - 800
Sustitución Para	816 - 825

**TABLA 4. CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA Y POTENCIA RELATIVA DE LAS N-ISOBUTILAMIDAS.**

R	CL <sub>50</sub>	Potencia Relativa %
H	31.95	8.13
m - F	17.66	14.72
m - Cl	22.63	11.48
m - OCH <sub>3</sub>	26.22	9.91
m - NO <sub>2</sub>	> 1000.00	-
p - OCH <sub>3</sub>	48.26	5.38
p - Br	51.39	5.05
o - Cl	434.77	0.59
o - NO <sub>2</sub>	497.99	0.52
3,4 - (OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	629.20	2.92
3,4 - (O-CH <sub>2</sub> -O)	139.00	1.87
α-Sanshool	1.82	100

## **4. ANALISIS DE RESULTADOS.**

### **4.1 SÍNTESIS DE LAS AMIDAS.**

Se sintetizaron 9 N-Isobutilcinamidas, mono sustituidas en diferentes posiciones del anillo, una disustituida y la N-Isobutilcinamida. La síntesis se realizó tal como se mencionó en la sección de materiales y métodos.

Las reacciones fueron seguidas por cromatografía en capa fina, en donde por lo general se utilizó una mezcla de acetato de etilo-hexano como eluyente. La mezcla de reacción se trabajó cuando ya no se observó la presencia de la materia prima.

La purificación de las amidas sintetizadas se realizó por cristalización, utilizando una mezcla de disolventes, esto se determinó realizando pruebas de solubilidad de cada uno. En general se utilizó una mezcla de acetato de etilo ( 70% ) hexano ( 30% ).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

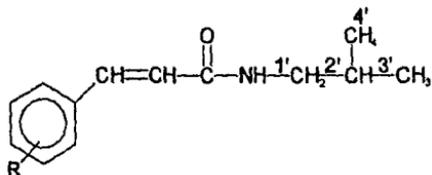
#### 4.2 IDENTIFICACIÓN.

Se determinó el punto de fusión de cada compuesto, en un aparato de Fisher Johns ( tabla 2 ).

La identificación de las N-Isobutilacnamidas sintetizadas se realizó por medio de el análisis espectroscópico, de resonancia magnética nuclear, de Infrarrojo, de Ultravioleta y de masas.

#### 4.2.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

En los espectros de Resonancia Magnética se observaron las siguientes señales:



- a) Un doblete (  $J=Hz$  ) entre 0.9 - 1.0 ppm, correspondiente a los metilos de la cadena Isobutilica (  $C_3$  y  $C_4$  ).
- b) La señal múltiple ( hepteto ), que aparece aproximadamente en 1.9 ppm que corresponde al metino del Isobutilo (  $C_2$  ).
- c) El ( dd ) que aparece en forma de triplete aproximadamente 3.2 ppm, corresponde al metileno (  $C_1$  ) del Isobutilo. Esta banda se transformó en un doble (  $J=6 Hz$  ) al adicionarle  $D_2O$  debido a la sustitución del hidrógeno del nitrógeno por deuterio.

- d) La señal del protón del nitrógeno aparece en un rango de 5.5 a 6.3 ppm de acuerdo al compuesto, como una señal ancha, que al adicionarle D<sub>2</sub>O desaparece.
- e) Para el doble enlace se observa dos dobletes ( J=15 Hz ), uno aparece entre 6.2 -6.5 ppm y otro entre 7.5 - 7.9 ppm, el valor de acoplamiento confirma la geometría E.
- f) Las señales características del anillo aromático en general aparecieron entre 6.2 a 7.5 ppm cada compuesto presentó el patrón de sustitución característico para el anillo bencénico.
- g) Las señales de los compuestos metoxilados aparecen de 3.5 a 4.0 ppm.

#### **4.2.2. ESPECTROS DE INFRARROJO.**

En los espectros de Infrarrojo se encontraron las siguientes bandas correspondientes al grupo amida, la del nitrógeno, la del carbonilo, la del doble enlace en donde se confirmó la configuración trans y las correspondientes al esquema de sustitución del anillo aromático. Se indican en la tabla 3 de manera general debido a que los compuestos sintetizados presentan una estructura similar por lo que los espectros de Infrarrojo son similares, solamente el esquema de sustitución del anillo aromático es diferente.

#### **4.2.3. ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA.**

En los espectros de Ultravioleta se determinaron los máximos de absorción de cada una de las amidas sintetizadas, en la tabla 2 se indican los máximos de absorción.

Estos máximos de absorción se deben a la presencia del anillo aromático el cual forma un sistema conjugado con el doble enlace y la amida.

#### **4.2.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.**

Con la espectrometría de masas confirmamos por medio del peso molecular la estructura de las amidas sintetizadas. En la tabla 2, se mencionan los pesos moleculares encontrado por esta técnica.

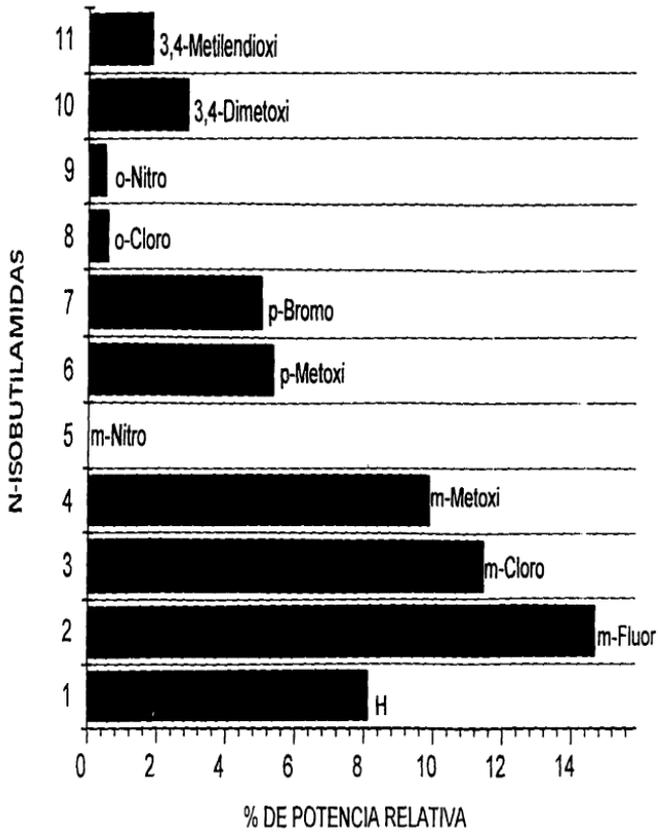
#### **4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE LAS N-Isobutlicinamidas SOBRE *Artemia salina*.**

Al comparar los resultados experimentales se observa que en general la sustitución del anillo aromático disminuye la actividad larvicida, excepto para el caso de los compuestos m-F, m-Cl y m-OCH<sub>3</sub>, de los anterior puede notarse que la posición meta favorece la toxicidad y a mayor electronegatividad aumenta. (fig. 1)

Considerando la actividad del compuesto m-NO<sub>2</sub> podemos decir que grupos polares atrayentes de electrones no presentan ventajas con respecto al compuesto patrón (R = H).

Tampoco la disustitución de la posición 3,4- con grupos que contengan oxígeno.

GRAFICA No.1 ACTIVIDAD LARVICIDA DE LAS N-ISOBUTILAMIDAS  
 SOBRE *Artemia salina*.



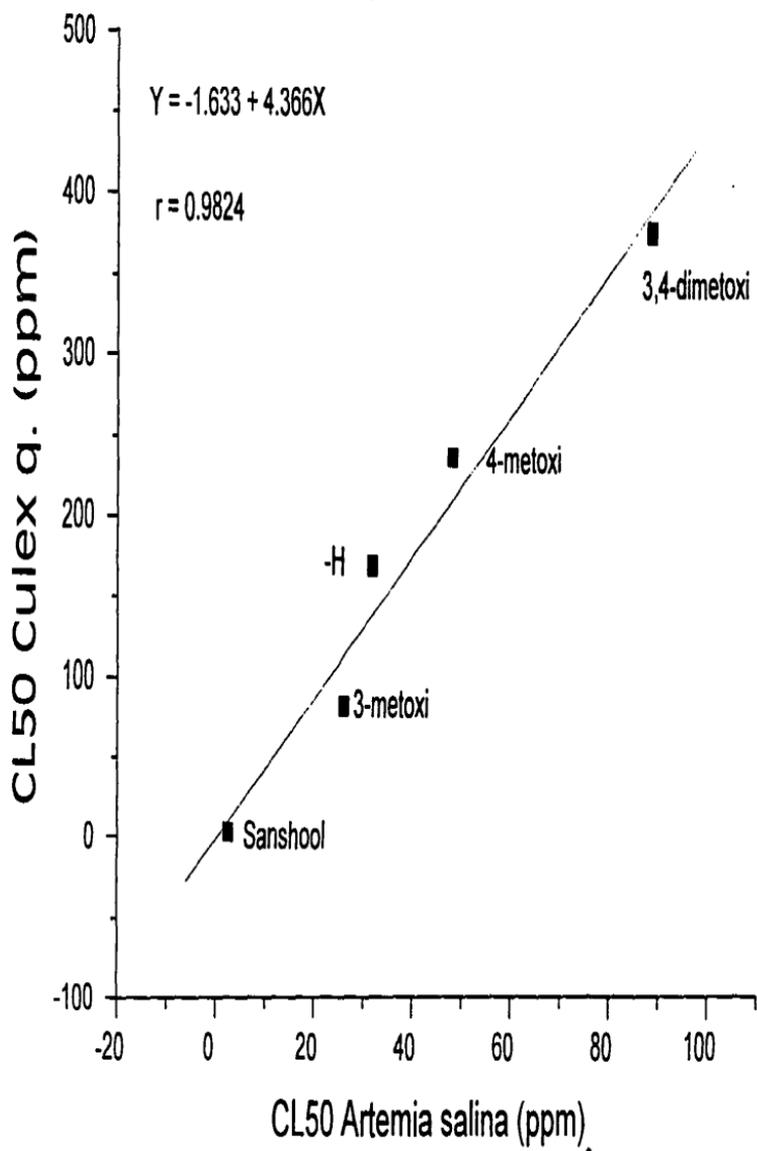
#### 4.4 CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD LARVICIDA EN *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina*.

Se encontró una buena correlación entre la actividad en mosco y en larvas de crustáceo (Grafica 2) un coeficiente de 0.98.

La correlación encontrada da la pauta para afirmar que determinando la actividad en *Artemia salina* es posible predecir la actividad en *Culex quinquefasciatus*. Esto es importante debido a que el bioensayo en larvas de *Artemia salina* es mucho más sencillo que en larvas de mosco. Los huevecillos de *A. salina* son fácilmente obtenidos en el comercio, permanecen viables por mucho tiempo y solo es necesario colocarlos en agua de mar artificial para obtener las larvas para el bioensayo. Sin embargo para obtener las larvas de mosco es necesario establecer el ciclo biológico, además que el desarrollo se ve afectado por condiciones ambientales, estacionales y los propios del ciclo biológico de este insecto.

Finalmente, cabe mencionar que este trabajo forma parte de una investigación más amplia, en la cual se están sintetizando mayor número de N-Isobutilcinamidas con diferentes sustituyentes, y con los cuales se realizará un estudio de relación estructura-actividad, para el cual se consideran algunos parámetros fisicoquímicos como momento dipolar, afinidad electrónica, coeficiente de reparto, etc.

GRAFICA No.2 CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD EN  
A. salina y C. quinquefasciatus.



## 8. CONCLUSIONES.

1.- Se sintetizó N-Isobutilcinamida y 10 derivados con diferentes sustituyentes 2-NO<sub>2</sub>, 2-OCH<sub>3</sub>, 2-Cl, 2-F, 3-OCH<sub>3</sub>, 3-Br, 4-Cl, 4-NO<sub>2</sub>, 3,4-COCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 3;4-( O-CH<sub>2</sub>-O ). Los rendimientos de la síntesis para la producción de estas amidas, oscilaron entre el 73-90%.

2.- Para cada amida se determinaron los puntos de fusión y se confirmó su estructura por medio del análisis espectroscópico en donde se determinaron los espectros de RMN, IR, U.V. y masas.

3.- Se evaluaron 11 compuestos en la prueba de actividad larvícida a la *Artemia salina* (CL50), una de ellas, el  $\alpha$ -sanshool se usó con fines comparativos por ser este un compuesto de origen natural

4.- Ninguna de las amidas presentó una actividad mayor o igual que el  $\alpha$ -sanshool 2.6  $\mu$ g/ml.

5.- Se encontró una buena correlación entre la actividad larvícida de estos compuestos en *Artemia salina* y en *Culex quinquefasciatus*. Lo que indica que determinando la actividad larvícida en *Artemia salina* se puede predecir la actividad larvícida en *Culex quinquefasciatus*.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Achenbach H. (1986); *Planta Médica*; 52, 12.
2. Amat, F. ( 1980 ). Antecedentes, estado actual y perspectivas del empleo de Artemia salina en Acuicultura, *Inf. Técn. Int. Inv. Pesq.*, Vol. ( 75 ), pp. 3 - 22
3. Audus, L. J. ( 1979 ). " The Physiology and Biochemistry of Herbicides ". 4ª ed, edit. Academic Press, Londres, Inglaterra. pp. 1 - 20, 394 - 395
4. Blade, J. R.: ( 1990 ) Some Aspects Of Synthesis and Structure - Activity in Insecticida Lipid Amides, Recent Advances in the Chemistry of Insect Control. The Royal Society of Chemistry, 151 - 169.
5. Bowen, T. S. ( 1963 ). The Genetics of Artemia salina. White eye, a sex-linked mutation, Reprinted from *Biological Bulletin* ( 124 ), pp. 117 - 123.
6. Dees, T. L. ( 1961 ). Brine Shrimp Fishery, Fishery Leaflet 527, September, Reimpresión Agosto 1961, p. 1 - 5
7. Elliott, M., Famham, A., Janes, N. F., Johnson, D. M. y Pulman, D. ( 1987 ). Synthesis and Insecticidal Activity of Lipophilic Amides. Part I: Introductory Survey, and Discovery of an Active Synthetic Compound. *Pestic Sci.* 18, 191 - 201.
8. Elliott, M., Famham, A., Janes, N. F., Johnson, D. M. y Pulman, D. ( 1987 ). Synthesis and Insecticidal Activity of Amides. Part II: *Pestic Sci.* 18, 203 - 209.
- 7.2 Elliott, M., Famham, A., Janes, N. F., Johnson, D. M. y Pulman, D. ( 1987 ). Synthesis and Insecticidal Activity of Amides. Part V: *Pestic Sci.* 18, 219.

- 7.3 Elliott, M., Farnham, A., Janes, N. F., Johnson, D. M. y Pulman, D. ( 1987 ).  
Synthesis and Insecticidal Activity of Amides. Part IV: Pestic Sci. 18, 223.
- 7.4 Elliott, M., Farnham, A., Janes, N. F., Johnson, D. M. y Pulman, D. ( 1987 ).  
Synthesis and Insecticidal Activity of Amides. Part VI: Pestic Sci. 18, 239.
8. Grivsky E. (1983), Cinamamidas Chemical Abstracts; 98, 16431a.
9. Haral, G. ( 1984 ). Alkamides: Structural Relationships, Distribution and Biological Activity. Planta Medical. 80, 366 - 375.
10. Harwood, R. F. y James, M. T. ( 1987 ). Entomología Médica y Veterinaria. Limusa. México D.F. 9 - 25, 61 - 93, 139 - 169, 201 - 270, 343 - 485.
11. Help, J.; Chaffoy, D; Mettrie, L.; Moens, L.; Slegers, H.; Swemmwn, L.; Van Broekhoven, A. y Kondo M. L. ( 1976 ). Biochemical aspect of development of brine shimp, Artemia Salina ( L ). Report on an informal workshop heldo on December 20, at the " Universitaire Instelling Antwerpun ". Belgium, pp. 19 - 36.
12. Infante, Said y Zárate de Lara, Guillermo. ( 1984 ). Métodos Estadísticos. Trillas. México. 181 - 236.
13. Ileva, Y. V. ( 1969 ). Bases Biológicas y Métodos Alimentarios para cultivos masivos de invertebrados. De " Ciencias ", Moscú, pp. 40 - 56.
14. Jacobson, Crosby. (1971); Naturally Occurring Insecticides; 137, cap IV.
15. Kubo, Y. ( 1991 ). Screening Techniques for Plant-Insect Interactions. Methods in Plant Biochemistry. 6, 179 - 193.
16. Mejía Flores, Haydee, (1994); Síntesis de N-isobutilcinamamidas y caracterización del efecto en al fotosíntesis. Tesis de Q.F.B. " Universidad Nacional Autónoma de México ".

17. Meyer B. N., Ferrigni N. R. Putnam J. G., Jacobsen L. B., Nichols D. E. y McLaughlin J. M: ( 1982 ). Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Médica*, 45, 31 - 34.
18. Mundy. P. E. ( 1985 ). Name Reactions and Reagentes in Organic Synthesis. A Wiley-Interscience Publication. 120 - 121, 158 - 159.
19. Nash, C. E. ( 1973 ). Automated mass-production of Artemia Salina nauplii for hatcheries, *Aquaculture*, 2, 289 - 298.
20. Olguin, P. M. ( 1987). Cultivo de Artemia Salina utilizando alimento no convencional. En: *Memorias del 1er. Simposium sobre aprovechamiento de recursos naturales*, Instituto Tecnológico de Mérida.
21. Persoone, G. and Sorgeloos, P. ( 1980 ). General Aspects of the ecology and biogeography of artemia. In.: *The Brine shrimp artemia*, Vol. ( 3 ), Persoone, G. et al. ( Eds ) Universsa Press, Wetere, Belgium, pp. 3 - 23.
22. Pineda Gutiérrez Patricia, (1994); Síntesis de N-Isobutilcinamidas metoxicas y determinación de su actividad Larvicida en *Culex Quinquenotatus* y en *Artemia salina*. (UNAM)
23. Reyes, Benito., Navarrete, Andres., Sixto, Carmen., Aguirre, Estela., Jimenez, Sabino y Estrada, Erick. ( 1991 ). Constituyentes Químicos de *Zanthoxylum Liebmannianum* ( eng) p. Wilson " Colopahle ", una planta medicinal Mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 21 ( 5 ), 30 - 34.
24. Shinohara A.; Shintzu M. (1975); Chlorocinnamamide Herbicides *Chemical Abstracts*; 83, 109795c.
25. Shuyu W.; Renli L. (1986); Structure - anticonvulsant activity relationship of some cinnamides with a substituted aromatic ring. *Chemical Abstracts*; 105, 218297k.

26. Smith, T. Y. J.; Hopkins, J. S. and Sandifer, P. A. ( 1978 ). Development of a large-scale artemia hatching system utilizing recirculated water. In: Proc. 9th, Ann Meeting World Mericult. Soc., pp. 701 - 714.
27. Sorgeloos. P. and Parsoone, G. ( 1975 ). Technological improvements for the cultivation of invertebrates as food for fishes and crustaceans. Aquaculture, Vol ( 6 ), pp. 231 - 245.
28. Versichele, D. and Sorgeloos, P. ( 1980 ). Controlled production of artemia cysts in batch cultures. In: The brine shrimp artemia. Vol. ( 3 ), Persoone, G. et al. ( Eds ), Universsa, Press, Wetteren, Belgium, pp. 231 - 245.
29. Van haecke, P. and Sorgeloos, P. ( 1983 ). Hatching data for ten commercial sources of brine shrimp cysts and reevaluation of the " hatching efficiency " concept, Aquaculture, Vol. ( 30 ), pp. 43 - 52.
30. Xiao-Hui Z.; Ren-Li L. (1980); Chemical Abstracts; 93, 142676u.
31. Yasuda Y.; Takeya K. (1982); Distribution of unsaturated aliphatic Acid amides in Japanese Zanthoxylum species. Phytochemistry; 21 ( 6 ), 1295.