



# Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología

## “SÍNTESIS DE CALIX[5]PIRROL MEDIADA POR DNA BAJO CONDICIONES DE QUÍMICA VERDE”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A :

**Santiago José Guevara Martínez.**

**Asesores:**

D. C. Luis Chacón García

M. C. Rosa María Trujillo Aguirre

MORELIA, MICHOACAN. JUNIO DE 2014



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
QUÍMICO – BIOLÓGICAS**

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Síntesis y Diseño Molecular del Instituto de Investigación Químico - Biológicas y el Laboratorio de Biología Acuática de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del D. C. Luis Chacón García y la M. C. Rosa María Trujillo Aguirre.

Se agradece el apoyo de la Coordinación de Investigación Científica de la UMSNH a la realización de este proyecto.

## DEDICATORIA

*La noción de este proyecto está dedicada a mis padres, pilares fundamentales en mi vida, de quienes tengo su entera confianza en cada reto que se me ha presentado, sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora he logrado. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar.*

*A mi novia Rebeca, por sus palabras de aliento, su apoyo infinito, por cambiar mi vida y llenarla de felicidad, por impulsarme a seguir adelante y por estar a mi lado en todo momento. ¡TE AMO!*

## *Un agradecimiento muy especial a:*

*A Dios por permitirme culminar esta etapa académica ya que ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.*

*D.C. Luis Chacón García, por haberme aceptado en su equipo de trabajo y por darme la oportunidad de realizar este proyecto, que indudablemente ha marcado mi formación académica, y por su paciencia y asesoría a lo largo de mi estancia.*

*M.C. Rosa María Trujillo Aguirre por su colaboración, aportaciones y por el apoyo que siempre recibí en el desarrollo de este proyecto.*

*A mis revisores de tesis:*

*A la Q.F.B. Armida Sánchez Gallegos, a la M.C. Sandra Gabriela Barbosa Muños, a la M.C. Roxana Colín Áviles, a la M.C. Yolanda Valencia Barajas y a la M.C. María Gricelda Pérez Ordaz, gracias por su disponibilidad y grandes aportaciones, además de compartir conmigo sus conocimientos.*

*Agradezco a mi familia, en especial a mis padres por darme la vida, creer en mí y apoyarme incondicionalmente en cada una de mis decisiones, por su amor, su confianza y cariño, a mi padre por su mano dura en sus enseñanzas, por sus consejos y regaños MIL GRACIAS.*

*A la Q.F.B. Cecilia Plancarte Naranjo por su apoyo en el desarrollo dentro del laboratorio y su asesoría y colaboración en la parte experimental del proyecto, muchas gracias.*

*A mis compañeros de Laboratorio de síntesis Orgánica y Diseño Molecular y amigos en general, especialmente a Karina, Darío e Iván, gracias por su incondicional amistad y consejos.*

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice general	vi
Lista de abreviaturas	ix
Índice de compuestos	Xi
Índice de esquemas	xv
Índice de figuras	xvi
Índice de Tablas	xvii
Índice de graficas	xvii
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>9</b>
1. Macroциclos reconocedores de aniones.	9
1.1. Métodos propuestos para la obtención de Calix[n]pirroles.	11
1.2. Calix[5]pirrol.	14
2. Estrategias para la regulación iónica.	19
3. Composición iónica.	21
3.1. Clasificación de los solutos según Moyes y Schulte.	22
4. Bioensayos.	24
4.1. Bioindicadores.	25
5. Artemia franciscana	26
5.1. Artemia franciscana como biosensor	31

<b>Justificación</b>	<b>33</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>34</b>
<b>Objetivo General.</b>	<b>35</b>
– Objetivos específicos	<b>35</b>
<b>Discusión y resultados</b>	<b>36</b>
I. FASE QUÍMICA	
– Reacciones con DNA	<b>36</b>
– Caracterización y obtención de calix[5]pirrol	<b>37</b>
II. FASE TOXICOLOGICA	
– Determinación de la toxicidad aguda del producto de reacción de los calix[5]pirrol	<b>40</b>
– Representación gráfica de la toxicidad de los diferentes ácidos de Lewis utilizados en la caracterización de los calix[5]pirrol con y sin DNA.	<b>41</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>44</b>
<b>Referencias</b>	<b>45</b>
<b>Parte experimental</b>	<b>48</b>
I. FASE QUÍMICA GENERALIDADES	
– Generalidades.	<b>48</b>
– Caracterización del Calix[5]pirrol en presencia de DNA	<b>49</b>
II. FASE BIOLÓGICA GENERALIDADES	
– Generalidades.	<b>49</b>
– Obtención de Nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .	<b>50</b>
– Determinación de la toxicidad aguda del Nitrato de bismuto y el ácido nítrico en Nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .	<b>52</b>

– Análisis estadístico. 54

## **Anexos**

Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  300 MHz) del crudo de reacción de calix[5]pirrol en ausencia de DNA y utilizando como catalizador el  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . 55

Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  300 MHz) del crudo de reacción de calix[5]pirrol en presencia de DNA y utilizando como catalizador el  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . 56

Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  300 MHz) del crudo de reacción de calix[5]pirrol en ausencia de DNA y utilizando como catalizador el  $\text{HNO}_3$  57

Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  300 MHz) del crudo de reacción de calix[5]pirrol en presencia de DNA y utilizando como catalizador el  $\text{HNO}_3$ . 58

Artículo 59

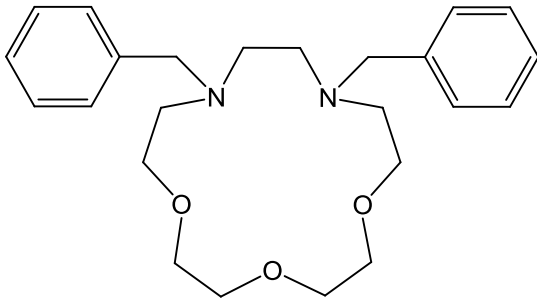


## LISTA DE ABREVIATURAS

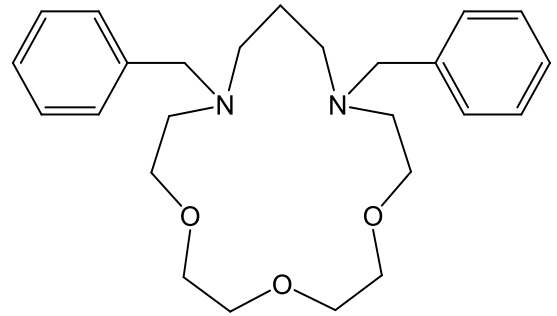
<b>AcOET</b>	Acetato de etilo
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>MeSO<sub>3</sub>H</b>	Ácido metansulfónico
<b>Bi</b>	Bismuto
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>F/m</b>	Faradio/metro, unidades de constante dieléctrica
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Diclorometano
<b>D</b>	Doblete
<b>Equiv</b>	Equivalente químico
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>G</b>	Gramo
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>Hz</b>	Herz
<b>Hr</b>	Horas
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	Ion bifosfato
<b>HSO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	Ion bisulfato
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Ion cloro
<b>CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Ion trifluorosulfonato
<b>I<sup>-</sup></b>	Ion yoduro

<b>LC<sub>50</sub></b>	Concentración Letal 50
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>Mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>Min</b>	Minutos
<b>M</b>	Molar
<b>Ni (II)</b>	Níquel
<b>Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>	Nitrato de bismuto
<b>SiO<sub>2</sub></b>	Oxido de silicio
<b>Ag (II)</b>	Plata
<b>Pb (II)</b>	Plomo
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
<b>s</b>	Singulete
<b>s.a.</b>	Señal ancha en Resonancia Magnética Nuclear de Protón
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetracloruro de Carbono
<b>BF<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	Tetrafluoroborato
<b>Bi(TfO<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b>	Triflato de bismuto
<b>BiI<sub>3</sub></b>	Yoduro de bismuto
<b>UP</b>	Unidades Probit
<b>Zn (II)</b>	Zinc

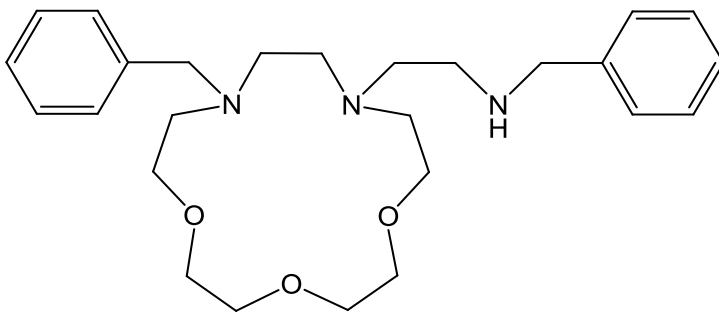
## ÍNDICE DE COMPUESTOS



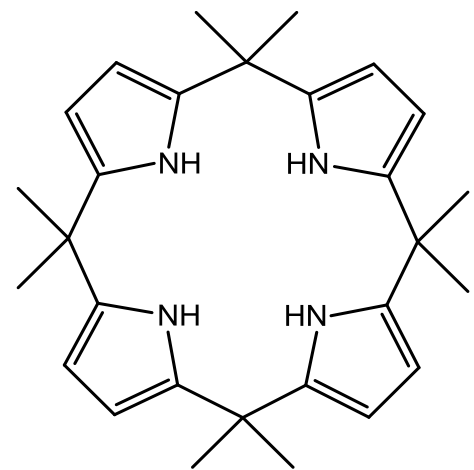
**1**



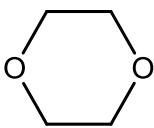
**2**



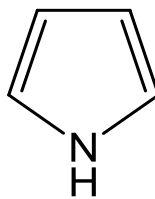
**3**



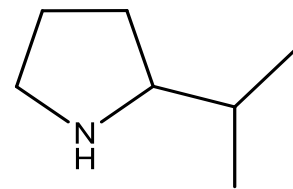
**4**



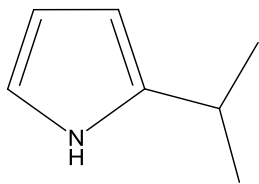
**5**



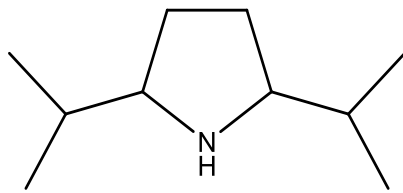
**6**



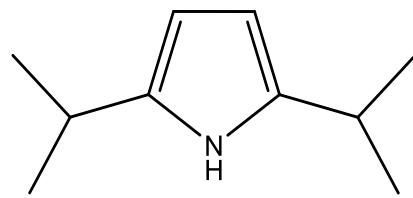
**7**



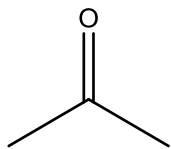
**8**



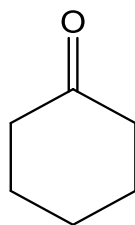
**9**



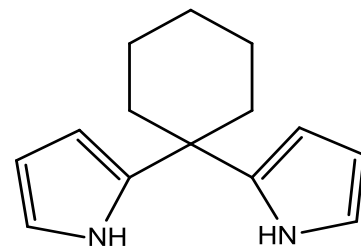
**10**



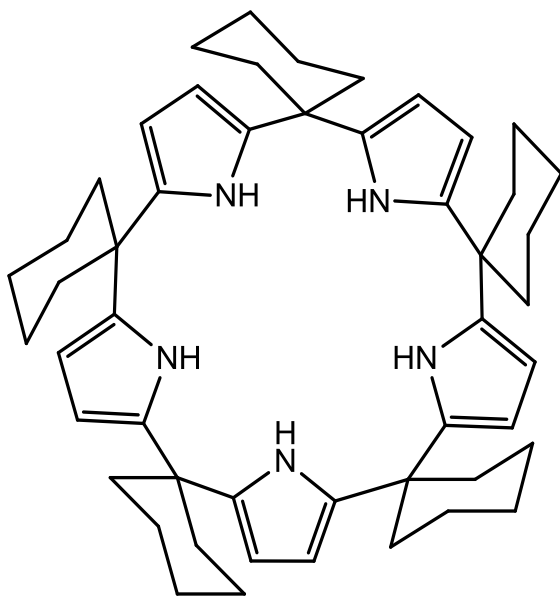
**11**



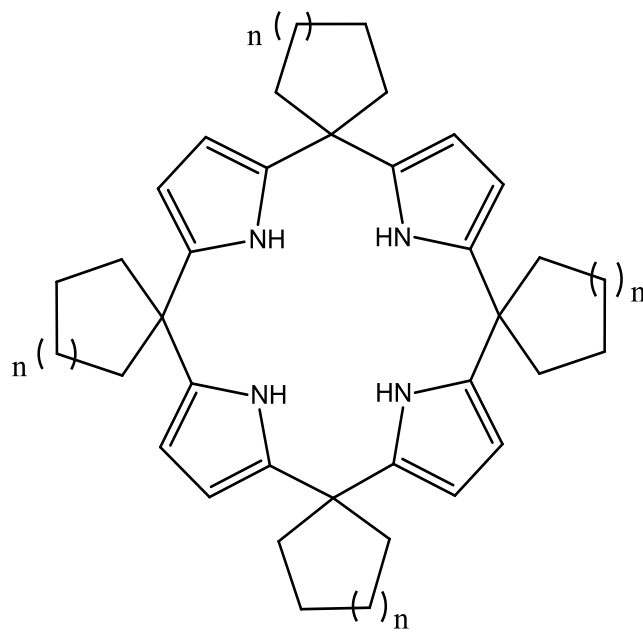
**12**



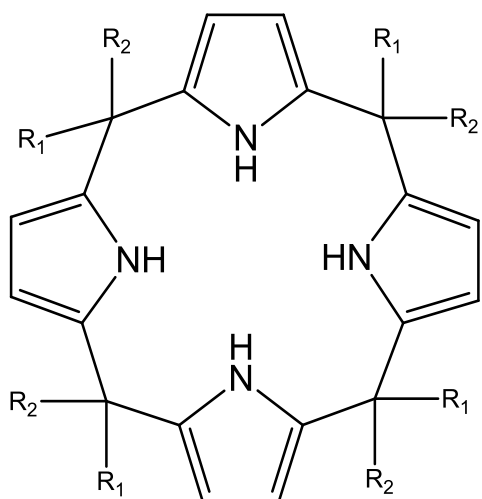
**13**



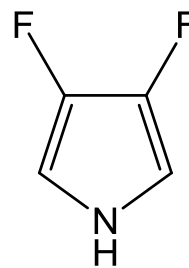
**14**



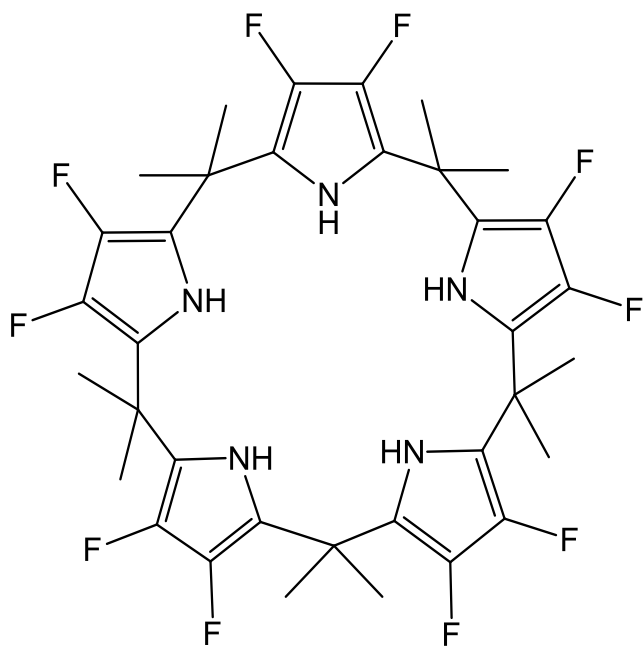
**15**



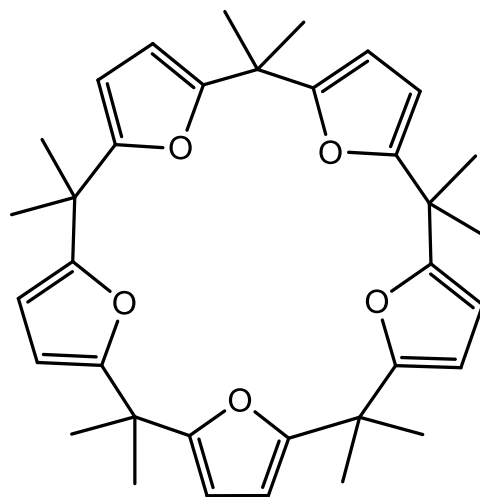
**16**



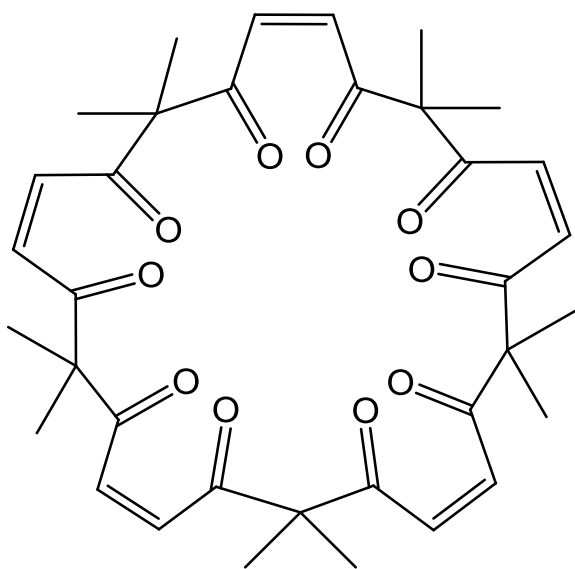
**17**



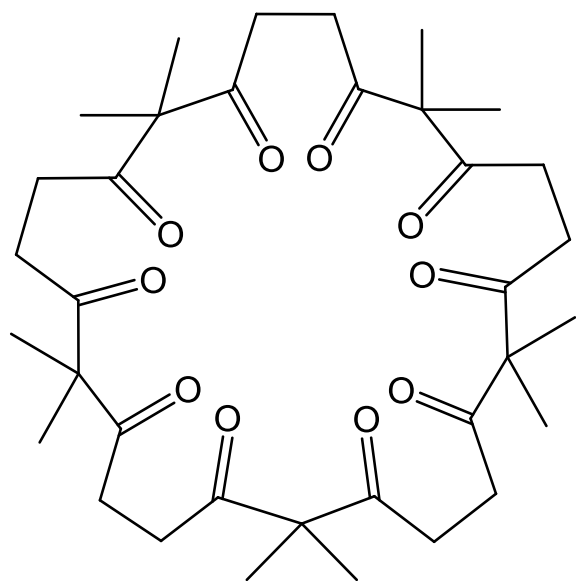
**18**



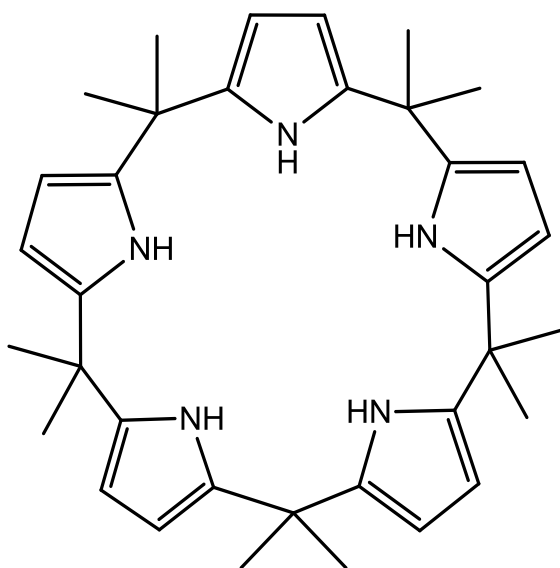
**19**



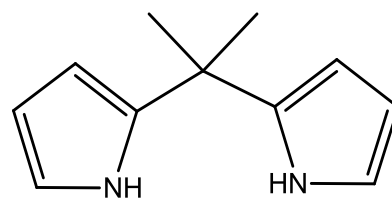
**20**



**21**



**22**



**23**

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

	<b>Página</b>
<b>Esquema 1.</b> Productos de la hidrólisis realizada por Paul Rothemund y Clarke L. Gage en 1954.	<b>12</b>
<b>Esquema 2.</b> Esquema general de síntesis de calixpirroles.	<b>13</b>
<b>Esquema 3.</b> Síntesis de calix[4]pirroles utilizando ácidos de Lewis.	<b>14</b>
<b>Esquema 4.</b> Síntesis del decafluorocalix[5]pirrol.	<b>15</b>
<b>Esquema 5.</b> Síntesis de calix[5]pirrol a partir de calix[5]Furano.	<b>16</b>
<b>Esquema 6.</b> Productos obtenidos en la reacción de pirrol y acetona en presencia de Bismuto.	<b>17</b>
<b>Esquema 7.</b> Cambios externos o internos del organismo a nivel celular provocan cambios que alteran los procesos homeostáticos.	<b>21</b>
<b>Esquema 8.</b> Ciclo biológico de <i>Artemia franciscana</i> .	<b>30</b>
<b>Esquema 9.</b> Condensación entre acetona y pirrol catalizada por diversos ácidos de Lewis ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{HNO}_3$ ), en presencia de DNA.	<b>36</b>
<b>Esquema 10.</b> Obtención de calix[n]pirroles (n=4,5 y 6) en presencia de DNA.	<b>48</b>
<b>Esquema 11.</b> Proceso de obtención de nauplios viables en 24 hrs.	<b>51</b>
<b>Esquema 12.</b> Proceso de eclosión de un quiste de <i>Artemia franciscana</i> .	<b>53</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> a) Estructuras de una porfirina b) hemoglobina y su forma de anclarse con el Fe II.	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura general de Calix[4]pirroles	<b>5</b>
<b>Figura 3.</b> Catalizadores empleados para la condensación entre acetona y pirrol, para la obtención de Calixpirroles.	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Estructuras de calixpirroles.	<b>7</b>
<b>Figura 5.</b> Compuestos aza-sustituidos con capacidad de unir iones metálicos.	<b>9</b>
<b>Figura 6.</b> Calixarenos reconocedores de iones.	<b>10</b>
<b>Figura 7.</b> Calixpirroles reconocedores de aniones a) unión de calix[4]pirrol-anión cloro, b) unión de calix[4]pirroles-anión flúor.	<b>11</b>
<b>Figura 8.</b> Estructura propuesta por Chelintzev y Tronov en 1916, para el “Acetonepyrrole”, y nombrada por Fischer como $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -octametil-porfirinogeno.	<b>12</b>
<b>Figura 9.</b> Estructura de pentaspirocyclohexyl-calix[5]pyrrole.	<b>18</b>
<b>Figura 10.</b> Equilibrio iónico de la célula.	<b>19</b>
<b>Figura 11.</b> Sistema de regulación iónica	<b>22</b>
<b>Figura 12.</b> Regulación iónica en la membrana.	<b>23</b>
<b>Figura 13.</b> Morfología de <i>Artemia franciscana</i>	<b>28</b>
<b>Figura 14.</b> Organismos adultos de <i>Artemia Franciscana</i> .	<b>29</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
<b>Tabla 1</b>	Condiciones de reacción y proporción relativa de los compuestos 1, 2, 3 y 23, detectados en el crudo de la mezcla de reacción por espectroscopia RMN <sup>1</sup> H.	17
<b>Tabla 2</b>	Influencia de DNA en la condensación entre acetona y pirrol.	37
<b>Tabla 3</b>	Proporciones de los productos de reacción obtenidos al utilizar el Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O como catalizador en ausencia de DNA.	38
<b>Tabla 4</b>	Proporciones de los productos de reacción obtenidos al utilizar el HNO <sub>3</sub> como catalizador en ausencia de DNA.	38
<b>Tabla 5</b>	Proporciones de los productos de reacción obtenidos al utilizar el Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O como catalizador y DNA.	39
<b>Tabla 6</b>	Proporciones de los productos de reacción obtenidos al utilizar el HNO <sub>3</sub> como catalizador y DNA.	39
<b>Tabla 7</b>	Resultados de las LC <sub>50</sub> de los productos de reacción de calix[5]pirrol catalizados por Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> y el HNO <sub>3</sub> con y sin DNA	40

## ÍNDICE DE GRAFICAS

		Página
<b>Grafica 1</b>	Efecto del calix[5]pirrol sin DNA catalizado por el Bi (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O con una LC <sub>50</sub> = 0.00745 en nauplios de <i>A. franciscana</i> .	41
<b>Grafica 2</b>	Efecto del calix[5]pirrol con DNA catalizado por el Bi (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O con una LC <sub>50</sub> = 0.0126 en nauplios de <i>A. franciscana</i> .	42
<b>Grafica 3</b>	Efecto del calix[5]pirrol sin DNA catalizado por el HNO <sub>3</sub> con una LC <sub>50</sub> = 0.00693 en nauplios de <i>A. franciscana</i> .	42
<b>Grafica 4</b>	Efecto del calix[5]pirrol con DNA catalizado por el HNO <sub>3</sub> con una LC <sub>50</sub> = 0.0223 en nauplios de <i>A. franciscana</i> .	43

## RESUMEN

**Palabras clave:** Calix[5]pirrol, bioensayo, dosis letal media ( $DL_{50}$ ), *Artemia franciscana*.

La contaminación es causada por la introducción directa o indirecta de sustancias contaminantes (físicos, biológicos y químicos) generadas por actividades antropogénicas y finalmente vertidas a ríos, lagos y mares lo cual causa el deterioro ambiental a escala global.

Los calixpirroles son estructuras macrocíclicas polipirrolícas obtenidas por la condensación de pirrol y acetona en relación equimolar, que tienen la capacidad de reconocer aniones mediante puentes de hidrogeno, esta propiedad puede ser explotada en su uso como sensores ópticos o nanoesponjas. En este proyecto se realiza la caracterización de la síntesis de calix[5]pirrol mediada por DNA, y catalizada por diversos ácidos de Lewis, bajo condiciones amigables al medio ambiente. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la concentración letal ( $LC_{50}$ ) de  $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$  y  $HNO_3$  en nauplios de *Artemia franciscana* (24 hrs de edad) mediante bioensayos de toxicidad con el fin de determinar la influencia que tiene el DNA en la síntesis de calix[5]pirrol, estipulando si estos compuestos que tienen diferentes usos y tratamientos ocasionan un menor riesgo tóxico e impacto ecológico, al utilizar el DNA en dicha caracterización.

Los valores de  $LC_{50}$  resultantes en los bioensayos realizados, nos demuestran que al utilizar el DNA en la caracterización de la reacción de calix[5]pirrol manejando como catalizadores al  $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$  y  $HNO_3$  disminuye la toxicidad e impacto ecológico del compuesto en presencia de DNA y aumenta al no utilizarlo en la reacción.

## ABSTRACT

**Keywords:** Calix[5]pyrrole, bioassay, median lethal dose ( $LD_{50}$ ), *Artemia franciscana*.

The pollution is caused by direct or indirect introduction of pollutants (physical, biological and chemical) generated by anthropogenic activities and finally discharged into rivers, lakes and seas causing environmental degradation on a global scale.

Calixpyrroles are macrocyclic structures that consist of pyrrole rings, which obtained by the condensation of pyrrole and acetone in equimolar ratio, which has the ability to recognize anions through hydrogen bonds, this property can be exploited in its use as optical sensors or nanosponges. In characterizing the project synthesis is performed calix[5]pyrrole -mediated DNA, and catalysed by various Lewis acids, under environment -friendly conditions. Therefore, in this study the lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of  $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$  in  $HNO_3$  and nauplii of *Artemia franciscana* (24 hrs old) bioassay toxicity was evaluated in order to determine the influence DNA synthesis of calix[5]pyrrole, stating whether these compounds have different uses and less toxic treatments cause risk and environmental impact by using the DNA in such characterization.

$LC_{50}$  values resulting in bioassays, we demonstrate that the DNA used in the characterization of the reaction of calix[5]pyrrole driving as catalysts to  $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$  and  $HNO_3$  reduces toxicity and environmental impact of Compound in the presence of DNA and increases when not in use in the reaction.

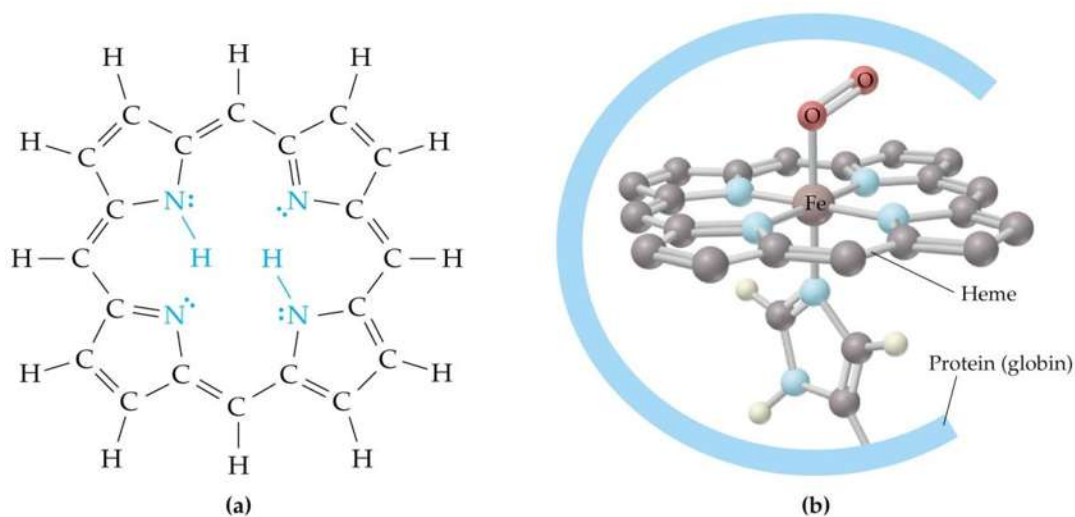
## INTRODUCCIÓN

La presencia cada vez mayor de sustancias tóxicas en el medio ambiente ha llevado al estudio de nuevas metodologías para el control, corrección y regeneración de los ecosistemas afectados, la química verde o beneficiosa, la cual se ocupa del diseño de productos o procesos químicos que reducen o eliminan el uso y producción de sustancias peligrosas para el medio ambiente y la salud humana, ha ido tomando posición en las áreas de investigación, diseño y desarrollo de productos o procesos químicos que reducen o eliminan el uso de sustancias peligrosas. De esta manera en vez de limitar el riesgo mediante el control en la exposición de productos químicos peligrosos, se intenta reducir y preferentemente eliminar la peligrosidad y así neutralizar la necesidad de controlar la exposición.

Cualquier proceso que requiera el uso de materias primas y aplique transformaciones físicas/químicas para obtener un nuevo producto, genera residuos en relación a la cantidad de materia prima entrante en el proceso. Por ello, los residuos son la consecuencia de las actividades humanas en su más amplio sentido. Estas actividades generan cambios sustanciales en el medio ambiente y provocan alteraciones del mismo, cuyos efectos en algunos casos son difíciles de pronosticar.

Dentro de la naturaleza los heterociclos forman parte de moléculas esenciales para la vida, como son el ADN, enzimas, antibióticos, agentes antivirales y antitumorales, entre otros. Dentro del área de síntesis orgánica, presentan una importante materia prima para el diseño y síntesis de nuevas moléculas, ya que dentro de sus propiedades se resume gran parte del comportamiento de la química orgánica.

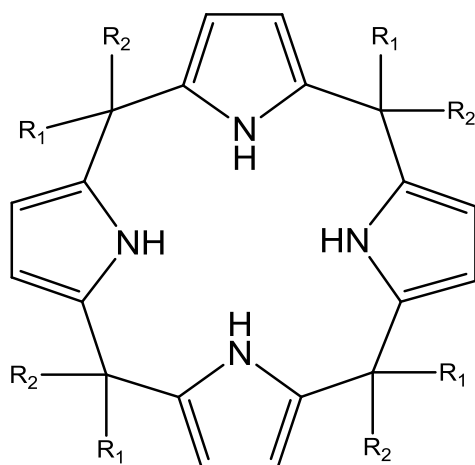
Entre los heterociclos más conocidos se encuentran aquellos en que su estructura contiene un átomo de nitrógeno, por ejemplo el pirrol el cual forma parte de una molécula vital: Hemoglobina, la cual es una porfirina (Figura 1)



**Figura 1.** a) Estructuras de una porfirina b) hemoglobina y su forma de anclarse con el Fe II.

Las estructuras macrocíclicas denominadas calix[n]pirroles, poseen una alta similitud estructural con las porfirinas, con las que comparte además de los calixarenos y los éteres corona, la característica de anclar fácilmente algunos iones metálicos, aniones y pequeñas moléculas, por ejemplo:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .

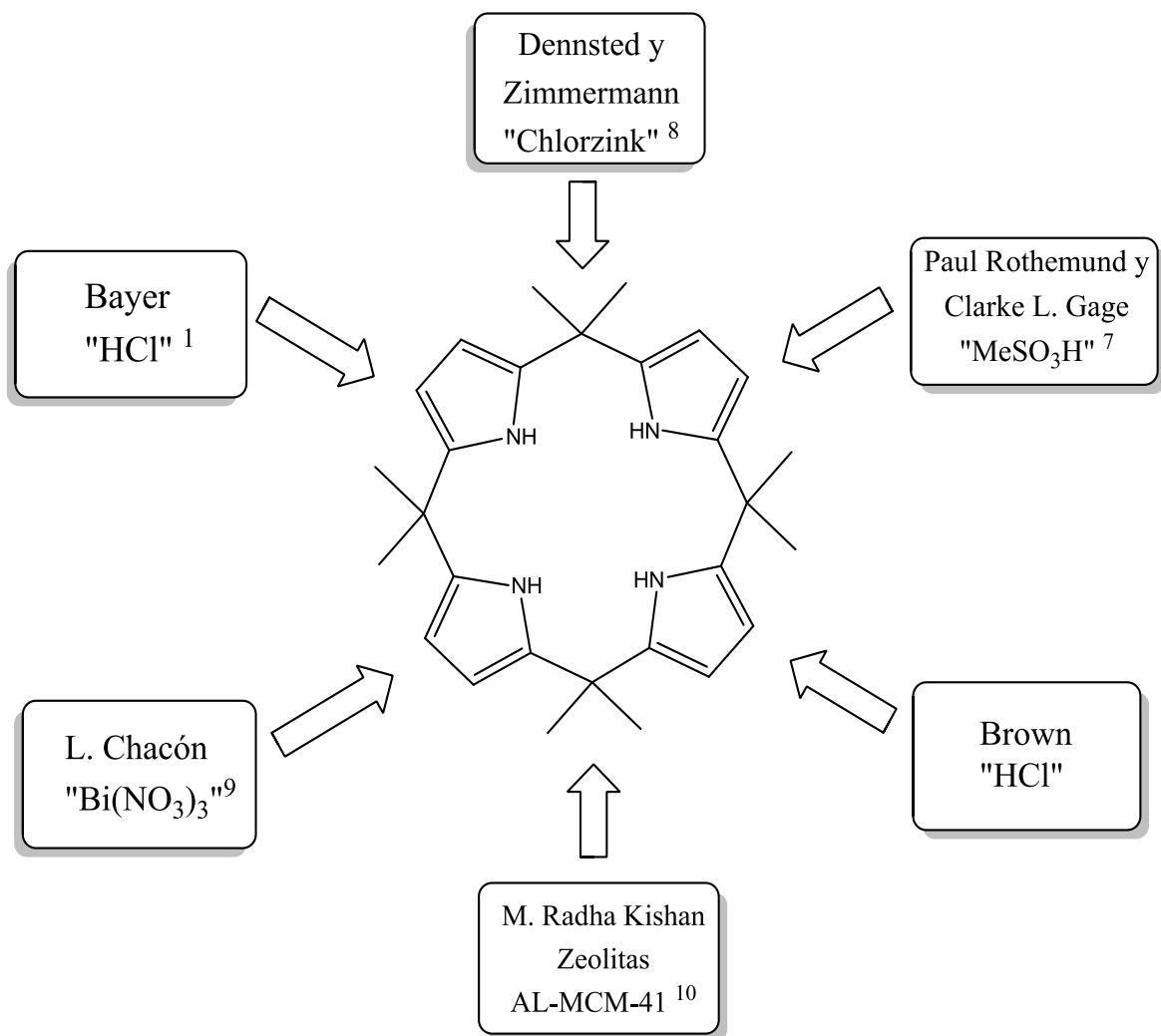
La capacidad de reconocer aniones, le confiere algunos usos en sensores ópticos y algunas aplicaciones en fluorescencia, ya que el complejo formado con dichas especies suele producir un cambio de color característico para cada anión.<sup>3</sup>



**Figura 2.** Estructura general de Calix[4]pirroles

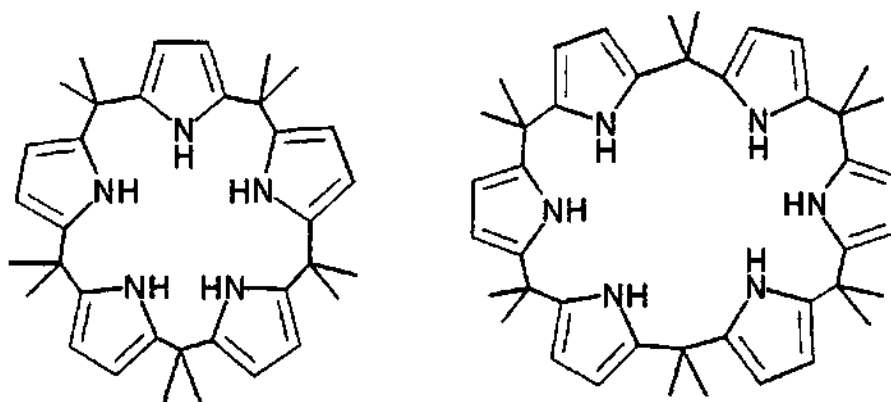
En 1886 se llevó a cabo por Adolf Baeyer, la síntesis de estos compuestos, quien al realizar una condensación de acetona y pirrol, utilizando como catalizador HCl, reporta la obtención de un producto blanco cristalino, al que llamo “Acetonepyrrole”.<sup>1</sup> La elucidación de su estructura se realizó en 1916 por Chelintzev y Tronov.<sup>2</sup>

El descubrimiento de estas estructuras, trascendió y abrió nuevas brechas para su correspondiente estudio, surgiendo el interés de optimizar los tiempos, condiciones y rendimientos de reacción, incluyendo novedosas formas de realizar la síntesis, haciendo uso de catalizadores como ácidos de Bronsted-Lowry y de Lewis. En la figura 3 se indican los catalizadores hasta el momento, para la síntesis de calixpirroles.



**Figura 3.** Catalizadores empleados para la condensación entre acetona y pirrol, para la obtención de Calixpirroles.

Los calix[4]pirroles son moléculas que presenta una mayor estabilidad respecto a sus análogos, los calix[n]pirroles con  $n > 4$ . No obstante es importante mencionar que se ha logrado la síntesis de ellos, entre los que resaltan los calix[5]pirroles siendo estos últimos los más escurridizos en sus intentos de obtención de manera directa.<sup>12</sup>



**Figura 4.** Estructuras de calixpirroles.

En el presente trabajo se lleva a cabo la síntesis para la obtención de calix[5]pirroles, donde se plantea un método corto y directo utilizando el  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  y el  $\text{HNO}_3$  como catalizadores, siendo estos ácidos de Lewis poco contaminantes y con un nivel de toxicidad bajo, e incorporando DNA a las reacciones como un mediador el cual provee condiciones ecológicamente amigables en la síntesis y la obtención selectiva del macrociclo en rendimientos de moderados a buenos.

En los últimos años, el objetivo de muchos laboratorios relacionados con el estudio y síntesis de nuevos compuestos químicos, ha sido desarrollar y utilizar nuevas técnicas que reduzcan o eliminen el uso y producción de sustancias peligrosas o perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana. En la búsqueda de soluciones alternativas a estos problemas, ha surgido el interés de utilizar técnicas como los bioensayos. Su aplicación proporciona un valioso instrumento que contribuye en la búsqueda de nuevas alternativas para el control de residuos perjudiciales al medio ambiente.

Para evaluar el impacto ambiental en los ecosistemas de las sustancias químicas, en las últimas décadas, se han utilizado nuevos procedimientos de bioensayos; tratando de fomentar métodos baratos y fáciles de utilizar, manipulando bioindicadores tales como peces, vertebrados, algas, crustáceos y en ocasiones algunos tipos de hongos, los cuales proporcionan información



estadística para valorar la toxicidad de una sustancia química. Cada investigador realiza sus propios bioensayos de manera rápida, reproducible y obtiene resultados confiables estadísticamente. De esta manera, son detectados y aislados con rapidez compuestos bioactivos novedosos a través del cribado y fraccionamiento biodirigido de nuevos compuesto químicos.

El objetivo principal de la investigación no es solamente aislar moléculas con estructuras novedosas, sino aislar nuevos compuestos bioactivos que tengan aplicaciones potenciales o puedan servir como compuestos guías para las modificaciones sintéticas.<sup>23</sup>

Un lugar sobresaliente dentro del grupo de bioindicadores en diversos bioensayos, lo ocupa *Artemia* spp, este es un ensayo general de amplio uso que determina el efecto letal de los materiales en larvas de *Artemia* spp., y de esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos.

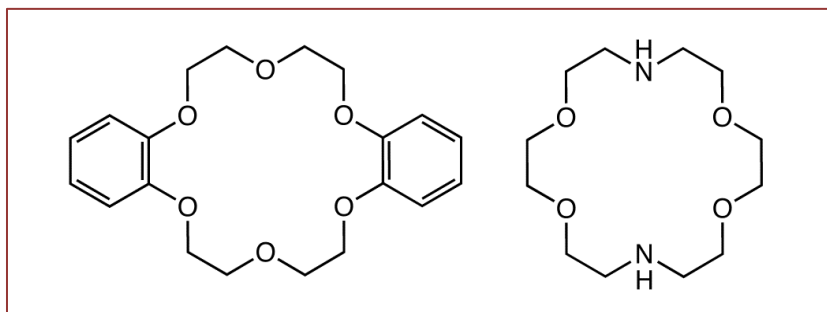
Este proyecto pretende aprovechar y promover los aspectos fundamentales relacionados con el desarrollo histórico de este ensayo, sus distintas variantes experimentales y posibles aplicaciones en la ecotoxicología y química de productos sintéticos y naturales.<sup>17, 20, 29</sup>

## ANTECEDENTES

### 1. MACROCICLOS RECONOCEDORES DE IONES.

Un gran número de macrociclos receptores han sido sintetizados en las últimas tres décadas para evaluar cualidades de unión a cationes, recientemente se ha incrementado la atención hacia receptores de aniones e iones metálicos. Muchos de esos receptores sintéticos son moléculas sin carga que operan en disolventes orgánicos.

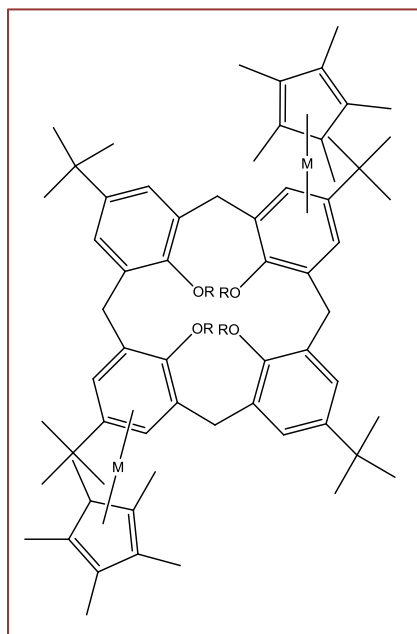
Entre estos macrociclos figuran los éteres corona, que con el fin de aumentar su selectividad hacia iones metálicos, han sido sometidos a diversas variaciones estructurales. Prueba de ello es la publicación hecha por Leonard F. Lindoy en 2001, en la cual modifican tanto la estructura base, como adiciones de cadenas laterales, por ejemplo los compuestos aza-sustituidos, mostrados en la figura 5.



**Figura 5.** Compuestos aza-sustituidos con capacidad de unir iones metálicos.

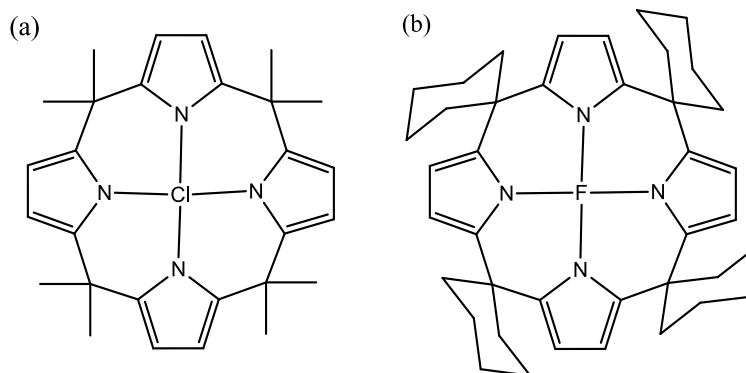
Los compuestos aza-sustituidos 1-3, presentan afinidad por ciertos metales como: Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), Ag(I) y Pb(II). Forman complejos que pueden ser aislados en forma de cristales y analizados por difracción de rayos X.<sup>3</sup>

Los calixarenos son otra clase de ciclooligomeros formados a través de una condensación de fenol-formaldehído, los cuales adoptan una conformación en forma de copa. Su rígida conformación permite anclar selectivamente algunos iones, por ejemplo  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  y pequeñas moléculas, tales como  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ . (Figura 6).<sup>4</sup>



**Figura 6.** Estructura base que une iones, llamada  $[\{M(\text{C}_5\text{Me}_5)\}_2(\text{p-tert-butylcalix-}[\text{4}]\text{arene-H})][\text{BF}_4]_4$  Calixarenos reconocedores de iones.

Los calixpirroles son un grupo de moléculas estructuralmente similares a los calixarenos, los cuales también presentan una cavidad, donde se puede unir selectivamente aniones, por ejemplo:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HSO}_4^-$ . Ya sea en estado sólido o en solución, motivo por el cual se han empleado en la producción de medios de separación de aniones y especies neutras. En la figura 7 se muestran dos estructuras de calix[4]pirroles, provenientes de condensación de pirrol con acetona (a) y ciclohexanona (b), que reconocen iones yoduro y cloruro.<sup>5</sup>

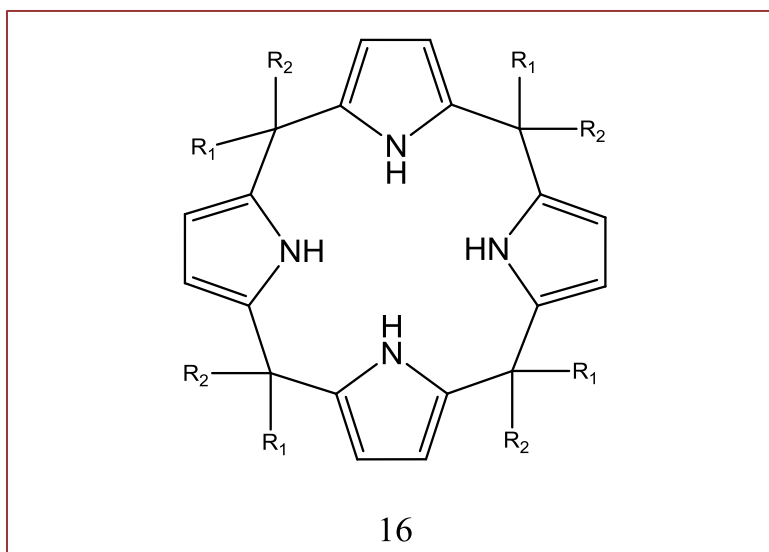


**Figura 7.** Calixpirroles reconocedores de aniones a) unión de calix[4]pirrol-anión cloro, b) unión de calix[4]pirroles-anión flúor.

### 1.1. METODOS SINTETICOS PROPUESTOS PARA OBTENCÓN DE CALIX[N]PIRROLES.

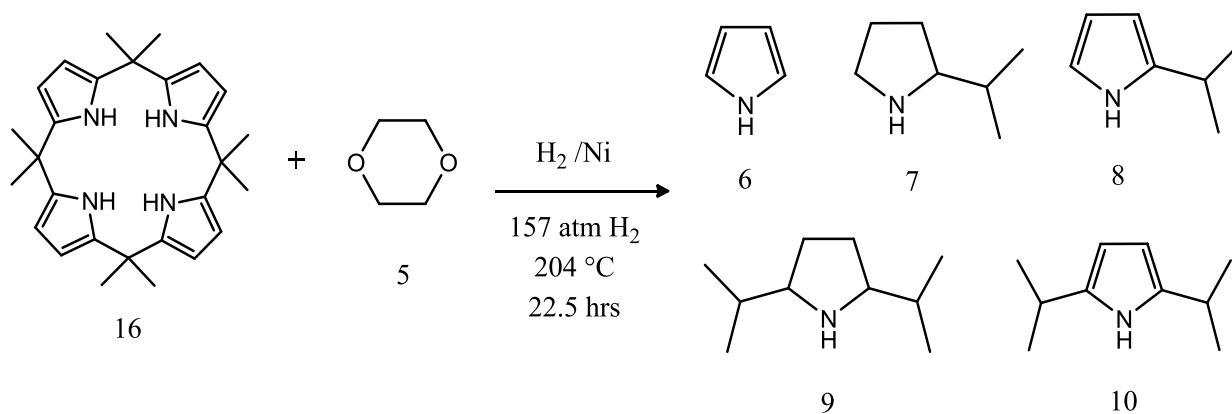
En el año de 1886 se realizó la primer síntesis de los macrociclos conocidos hoy en día como calix[n]pirroles por el alemán Adolf Baeyer, quien describió su reacción como un proceso de condensación catalizado por un ácido prótico, HCl, entre pirrol y acetona, obteniendo como resultado un producto cristalino blanquecino, al cual otorgó el nombre de “Acetonepyrrole”.<sup>1</sup>

En 1916 Chelintzev y Tronov propusieron empíricamente la formula condensada:  $C_{28}H_{36}N_4$ , y la estructura de dicho compuesto, en la que sugirieron que el carbono proveniente de la acetona se une a la posición  $\alpha$  del núcleo del pirrol.<sup>2</sup> Fischer en su publicación “Die Chemie des Pyrrols”, en 1934 le otorgo el nombre de  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -octametil-porfirinogeno (Figura 8).<sup>6</sup>



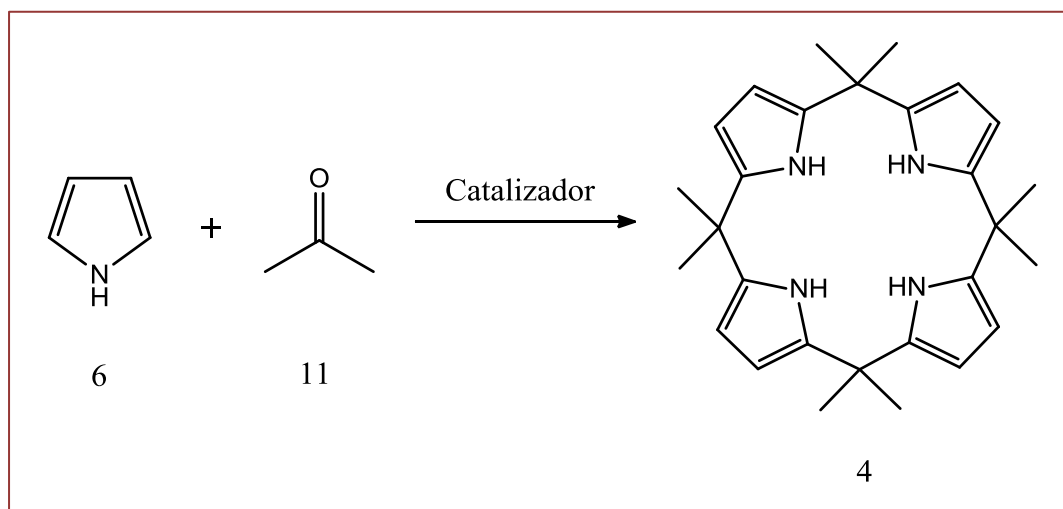
**Figura 8.** Estructura propuesta por Chelintzev y Tronov en 1916, para el “Acetonepyrrole”, y nombrada por Fischer como  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -octametil-porfirinogeno.

Paul Rothemund y Clarke L. Gage en 1954, realizaron la hidrogenólisis del producto sintetizado por Bayer, con el cual corroboraron la estructura propuesta por Chelintzev y Tronov.<sup>2</sup>



**Esquema 1.** Productos de la hidrólisis realizada por Paul Rothemund y Clarke L. Gage en 1954.

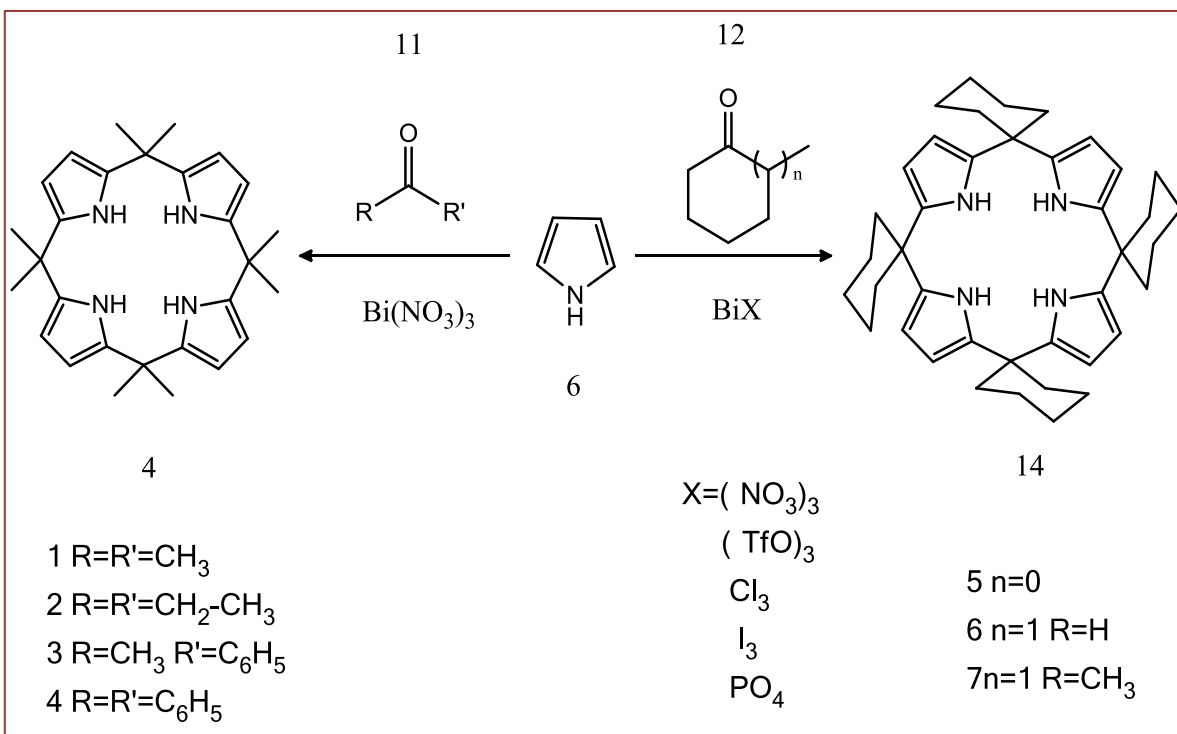
Estas aportaciones sentaron las bases del área sintética de los Calixpirroles, lo cual despertó el interés de los investigadores de época, quienes adoptaron el reto de mejorar las condiciones de reacción. Con el fin de optimizar los rendimientos, basan acertadamente los métodos sintéticos en la variación de los catalizadores como se plasma en el Esquema 2, utilizando innumerables ácidos de Bronsted-Lowry, y recientemente de Lewis.



**Esquema 2.** Esquema general de síntesis de calixpirroles.

Los métodos de Dennstedt y Zimmermann. Reprodujeron la metodología reportada por Bayer <sup>1</sup>, utilizando como catalizador: “CHLORZINK”, obteniendo buenos rendimientos <sup>8</sup>. Paul Rothmund y Clarke L. Gage en 1954 mejoraron estos rendimientos utilizando ácido metansulfónico como catalizador, logrando incrementar el rendimiento hasta un 88%.<sup>7</sup>

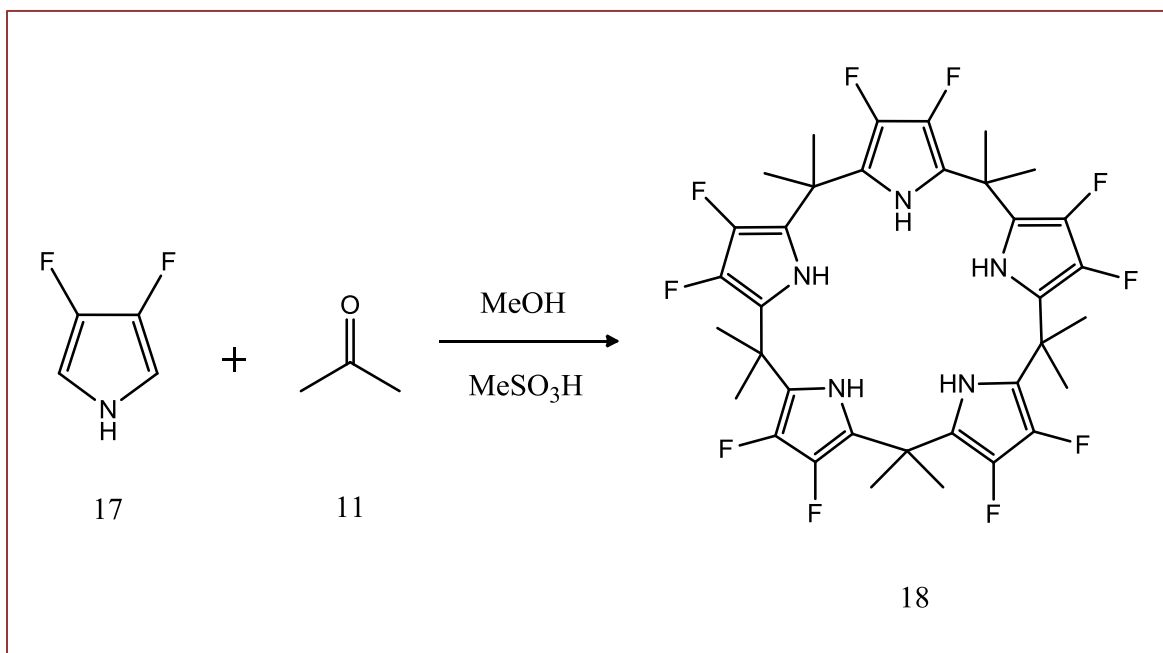
En el 2009, nuestro grupo de trabajo describió la primera síntesis directa de calix[5]pirroles,<sup>10</sup> y anteriormente la síntesis de calix[4]pirroles,<sup>9</sup> utilizando como catalizador ácidos de Lewis, particularmente como sales de bismuto; describiendo rendimientos de moderados a buenos pero en poco tiempo de reacción y en condiciones amigables, un resumen de dicho trabajo se muestra en el Esquema 5.<sup>9</sup>



**Esquema 3.** Síntesis de calix[4]pirroles utilizando ácidos de Lewis.

## 1.2. Calix[5]pirroles

Uno de los primeros métodos para la obtención de este macrociclo fue la obtención de  $\beta$ -decafluoro-meso-decametilcalix[5]pirrol. El cual se obtuvo directamente utilizando 3,4-difluoropirrol como subproducto de la condensación de este con acetona, donde dicho producto es estable bajo las condiciones de reacción y purificación en columna cromatográfica, de sílica gel. (Esquema 4).<sup>11</sup>

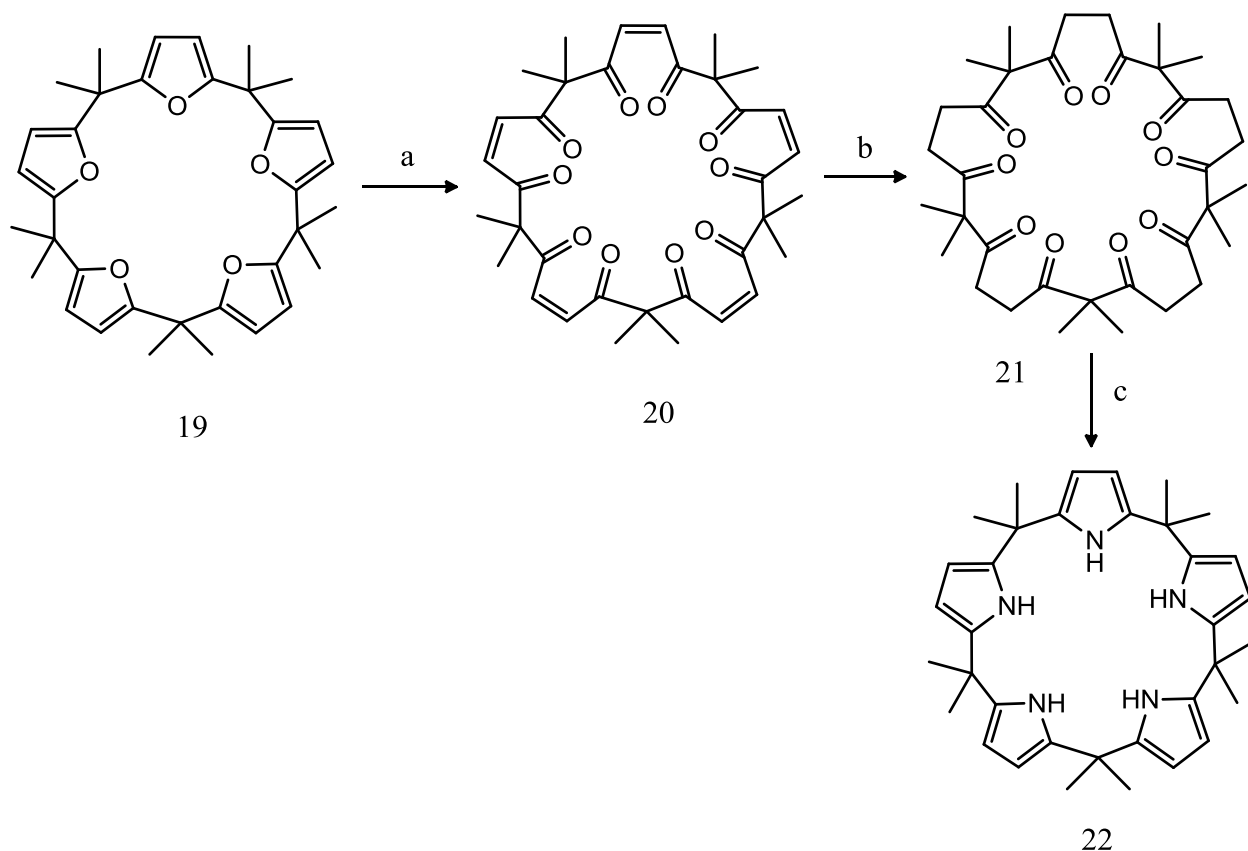


**Esquema 4.** Síntesis del decafluorocalix[5]pirrol.

La inestabilidad del calix[5]pirrol, se justificó como, lo que los autores llamaron, “reacción de mitosis”, es decir mediante una ruptura del ciclo dando paso a la formación de productos de menor tamaño y mayor estabilidad, por ejemplo el calix[4]pirrol.

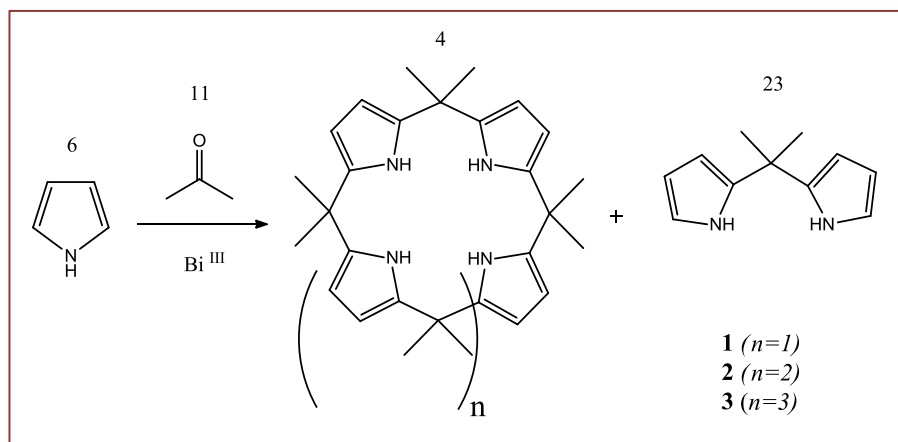
La obtención del calix[5]pirrol a partir del calix[5]furano, el cual se abre a la decacetona poliinsaturada mediante una oxidación con MPCA en CHCl<sub>3</sub>, misma que es reducida con Zn/CH<sub>3</sub>COOH para obtener la decacetona. Finalmente mediante la condensación de Paal-Knor con CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> se obtiene el calix[5]pirrol con un rendimiento del 1% una vez recristalizado en etanol.<sup>10</sup>





**Esquema 5.** Síntesis de calix[5]pirrol a partir de calix[5]Furano. a) MPCa,  $\text{CHCl}_3$ ,  
 b) Zn, AcOH, c)  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , EtOH.

Hasta ese momento, la obtención de calix[5]pirrol fue considerada como no posible mediante condensación directa, sin embargo se demostró lo contrario al llevar a cabo la primer síntesis directa en el año de 2009, por nuestro grupo de trabajo mediante la condensación de pirrol y acetona con bajas concentraciones de catalizador,  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  y DNA.<sup>9</sup>



**Esquema 6.** Productos obtenidos en la reacción de pirrol y acetona en presencia de Bismuto.

Cuando se analizó el papel de disolvente, catalizador y DNA se encontró que el calix[5]pirrol se obtenía sin DNA y al disminuir la concentración del ácido, es decir, que la formación de este producto está en función de la concentración del catalizador y aparentemente el DNA disminuía la concentración del ácido.<sup>10</sup>

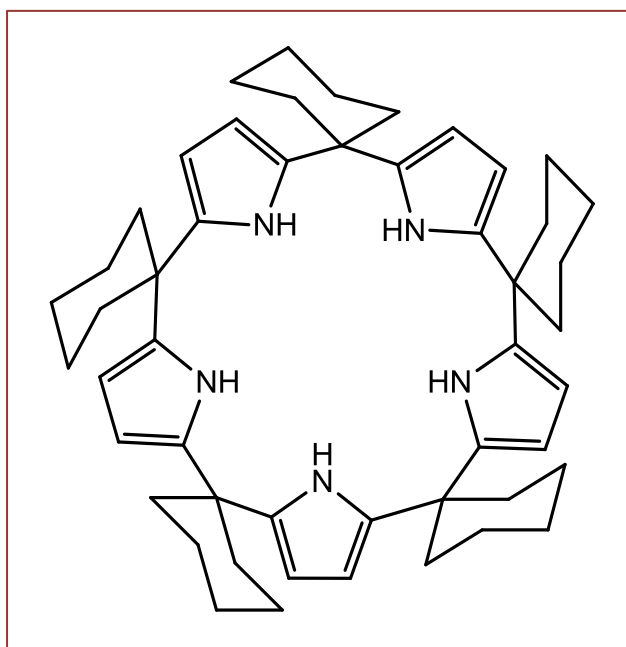
Posteriormente se demostró que ciertamente, el calix[5]pirrol corresponde al producto cinético, mientras que el calix[4]pirrol al termodinámico.<sup>30</sup> Los resultados se resumen en la tabla 1.

Ensayo	Catalizador	% mol	1	2	3	23
1	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	9.5	-	-	-	-
2	CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	9.5	100	-	-	-
3	ZnCl <sub>2</sub>	9.5	80	-	-	20
4	AlCl <sub>3</sub>	5	-	-	-	100
5	BiCl <sub>3</sub>	9.5	50	40	10	-
6	BiI <sub>3</sub>	9.5	44	42	12	2
7	BiPO <sub>4</sub>	9.5	53	45	-	2
8	Bi(OTf) <sub>3</sub>	9.5	80	20	-	-

9	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.095	-	-	-	100
10	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.18	40	-	-	60
11	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.32	50	50	-	-
12	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.65	33	67	-	-
13	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.95	90	10	-	-
14	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	9.5	95	<5	-	-
15	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	25	100	-	-	-

**Tabla 1.** Condiciones de reacción y proporción relativa de los compuestos 1, 2, 3 y 23, detectados en el crudo de la mezcla de reacción por espectroscopia RMN <sup>1</sup>H.

La misma metodología se aplicó después a la condensación de pirrol con ciclohexanona, síntesis que llevó a un nuevo calix[5]pirrol, el pentaspirociclohexyl calix[5]pyrrole (Figura 9), que demuestran que los calix[5]pirroles obtenidos por una condensación directa.<sup>12</sup>

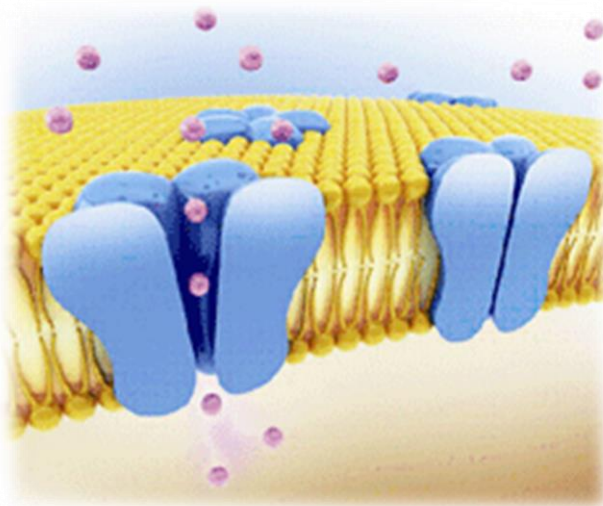


**Figura 9.** Estructura de pentaspirociclohexyl-calix[5]pyrrole

Aunque quedó completamente demostrado que el papel del DNA fue únicamente disminuir el pH y la el pKa del ácido utilizado, salta a la vista que éste puede ser aprovechado entonces para “absorber” el catalizador y ser utilizado en el medio de reacciones diversas como una esponja reduciendo entonces el impacto ecológico de los materiales utilizados en una determinada reacción que involucre ácidos de Lewis contaminantes.

## 2. ESTRATEGIAS PARA LA REGULACIÓN IÓNICA.

El funcionamiento normal de un organismo depende de la correcta regulación entre las relaciones físicas y químicas del entorno en donde se encuentra, así como de los diferentes procesos bioquímicos que debe de llevar al cabo para su mantenimiento. Los niveles de las relaciones son muy amplios, ya sea que hablemos del mundo externo que lo rodea o el mundo externo citoplasmático aún de una enzima intracelular (Fig. 10). Lo que en realidad es importante es que todos los individuos deben mantener una concentración deseable de solutos y soluciones en sus fluidos corporales, ya sea de forma intracelular o extracelular, sobre todo por medio de los tejidos epiteliales, que son los que forman la principal barrera en contra del exterior.<sup>13</sup>



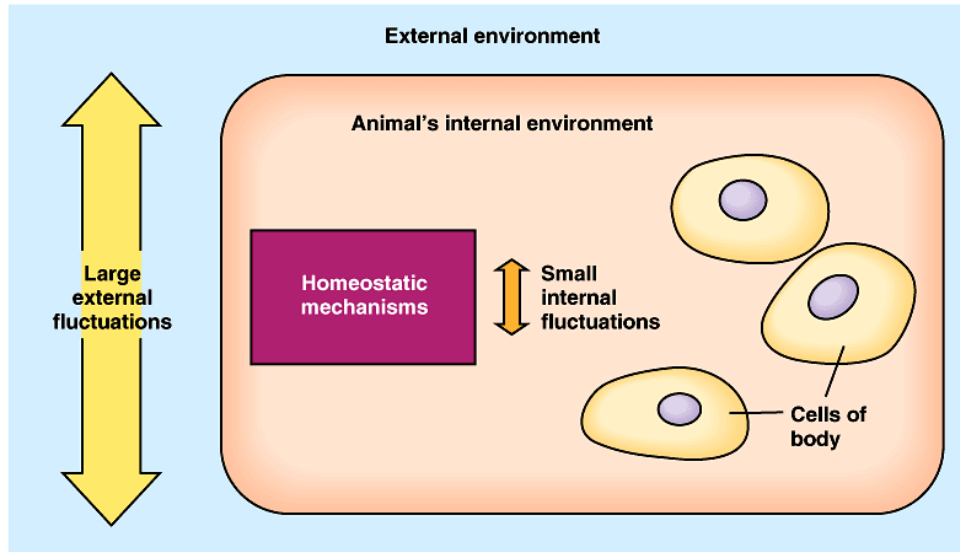
**Figura 10.** Equilibrio iónico de la célula.

Cada grupo, sean animales o plantas, utilizan diferentes combinaciones de células, estructuras, órganos o tejidos, para mantener y controlar el equilibrio iónico e hídrico de su cuerpo. Estas estructuras regulan tres procesos homeostáticos para asegurar una composición química adecuada en el interior del cuerpo y así poder realizar diferentes funciones o que estas no se vean alteradas.<sup>14</sup>

Estos tres procesos son:

- Regulación osmótica, que controla la presión de los tejidos o de la célula según sea el caso y determina la fuerza impulsora del movimiento del agua a través de las membranas biológicas.
- Regulación iónica que controla la composición de estos en los líquidos corporales.
- Eliminación de compuestos nitrogenados como producto final del catabolismo de los organismos en conjunción con el sistema excretor.

Cada tipo de hábitat que los organismos ocupan impone una cierta combinación de retos a nivel iónico e hídrico para mantener la homeostasis (Fig. 10). Cuando los individuos habitan un ambiente marino, deberán de mantener un equilibrio iónico estable al verse influenciados o expuestos a niveles altos de concentración de iones y mantener el agua en el cuerpo; mientras que aquellos que habitan ambientes de agua dulce, deberán de conseguir este equilibrio por medio del alimento, ya que en realidad su problema es hacerle frente a una entrada constante de agua. En cuanto a los especímenes terrestres, que viven en ambientes de constante deshidratación, los iones deberán ser incorporados también por la comida, pero además deberán hacer frente a la obtención suficiente de agua para mantener su homeostasis.<sup>13</sup>



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

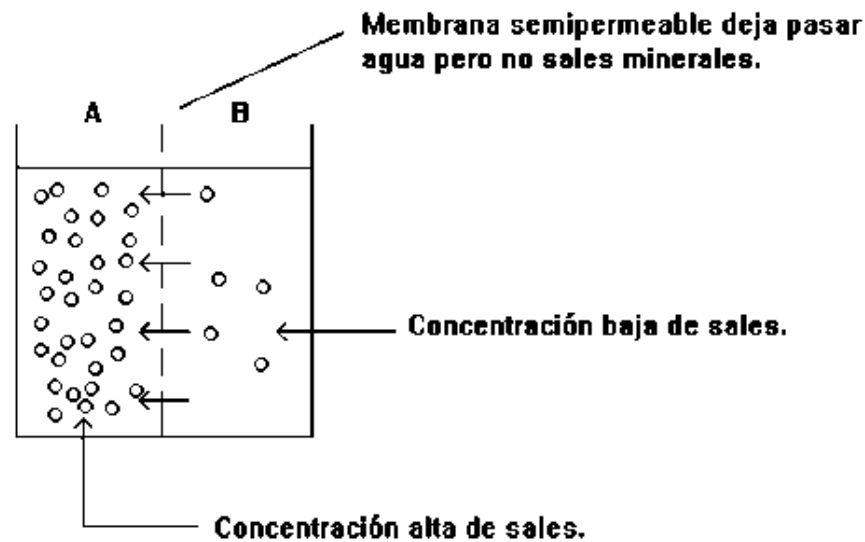
**Esquema 7.** Cambios externos o internos del organismo a nivel celular provocan cambios que alteran los procesos homeostáticos.

### 3. COMPOSICIÓN IÓNICA.

Todos los animales o plantas, ejercen un control sobre la presencia o ausencia de solutos en sus tejidos o células y esto lo han hecho, dependiendo de la relación existente entre las condiciones internas que deben mantener y las condiciones físico químicas que guarda el hábitat que ocupan. Los organismos tienen la necesidad de regular un equilibrio iónico de los líquidos intracelulares que poseen, los cuales pueden diferir dependiendo de la naturaleza de la composición iónica del líquido extracelular, ya que dependiendo de su hábitat, la mayor o menor concentración de sales deberán de mantenerse afuera o adentro del compartimiento celular según sus necesidades (Esquema 8).

Según la clasificación de Moyes y Schulte (2007), existen individuos que son ionoconformadores u osmoconformador que ejercen poco control sobre el perfil de solutos en su espacio extracelular; son organismos que habitan en medios marinos, sin grandes cambios, ya que solamente así pueden mantener sus

líquidos extracelulares que son muy semejantes al agua marina que los rodea, ya sea que el componente iónico sea sodio ( $\text{Na}^{2+}$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) y los aniones como cloruros ( $\text{Cl}^-$ ) o sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ).<sup>13</sup>



**Figura 11.** Sistema de regulación iónica.

### 3.1. Clasificación de los solutos según Moyes y Schulte (2007).

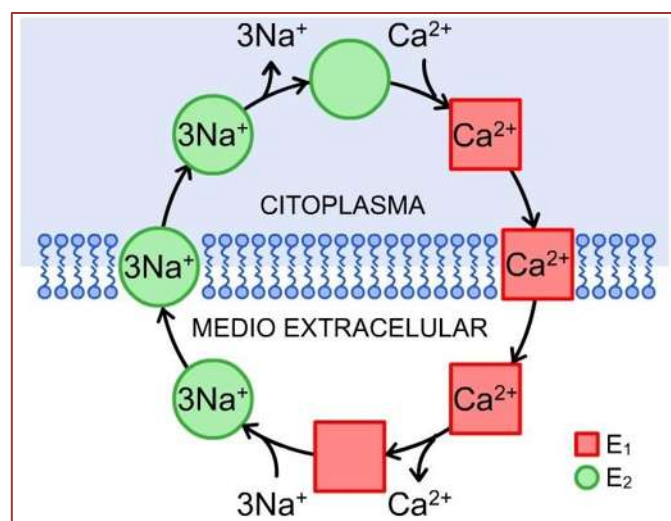
Tres clases de solutos es posible distinguir si se valoran los efectos que ocasionan sobre las estructuras y la función de las macromoléculas:

- Solutos desestabilizadores. Ocasionan que se desestabilice la función de las macromoléculas en concentraciones normales presentes en el interior del cuerpo. En este caso se encuentran los iones inorgánicos como el sodio ( $\text{Na}^+$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ), cloruros ( $\text{Cl}^-$ ) y sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), al igual que algunos solutos orgánicos como los aminoácidos.
- Solutos compatibles. Influyen levemente en la función macromolecular y pueden acumularse en altas concentraciones sin ocasionar un efecto perjudicial en los procesos celulares. Como ejemplos están: la trehalosa, el glicerol y la glucosa; así como aminoácidos sin cargas negativas libres.

- Solutos contrarrestantes. Sólo se utilizan si existe la combinación de ambos, ya que por separado cada uno se contrarresta.

El papel del tejido epitelial en la regulación iónica Todos los individuos cambian o modifican el perfil del líquido extracelular mediante la entrada y salida de agua y iones, a través de aquellos tejidos epiteliales que interactúan con el medio externo, sea piel, branquias o al interior como las luces del sistema excretor y sistema digestivo. Desafortunadamente estos tejidos no solamente cumplen esa función fisiológica, sino que además pueden ser usados para la respiración, el movimiento, la excreción de desechos y por lo tanto el organismo debe mantener un equilibrio entre todas estas funciones y el equilibrio iónico y osmótico (Figura. 12).

A veces, el equilibrio de esta función, llega a alterar otras funciones metabólicas importantes como es la reproducción, debido al gasto energético que el organismo tiene que hacer para mantener su homeostasis. Cuando no se da el equilibrio, todavía se tiene la posibilidad de alterar totalmente sus funciones metabólicas y fisiológicas para mantener la homeostasis y si esto es insostenible, el organismo que pueda desplazarse, tenderá a escapar del ambiente que lo está perturbando.<sup>15</sup>



**Figura 12.** Regulación iónica en la membrana



#### 4. BIOENSAYOS

Los bioensayos son pruebas biológicas que deben de llevarse a cabo bajo condiciones estandarizadas, el ensayo establece el efecto que es producido por un agente químico o físico sobre los organismos expuestos, de modo que permite establecer los niveles permisibles para los contaminantes que son liberados al ambiente,<sup>21</sup> también se presenta el caso donde el organismo es expuesto a la mezcla de estos agentes, de manera que se pueda obtener el tipo de interacción de modo sinérgicamente o antagónicamente estimando el riesgo potencialmente en ecosistemas acuáticos.<sup>17</sup>

La finalidad que presentan los bioensayos son:

- Establecimiento de niveles permisibles de los contaminantes que son liberados al ambiente.
- Establecimientos de sitios prioritarios que requieren acciones de limpieza.
- Determinación de impactos ambientales que son posibles con el uso de biomarcadores.
- Evaluación y previsión del efecto que es causado por los nuevos productos químicos en el ambiente.
- Estudios de biodisponibilidad y bioconcentración de contaminantes.
- Comparación de la sensibilidad de varias especies.
- Evaluación de la efectividad de los sistemas de tratamiento de agua y establecimiento de las condiciones óptimas de operación de plantas tratadoras.
- Evaluación de la eficiencia de los métodos de remediación.<sup>18</sup>

#### 4.1. BIOINDICADORES

Los indicadores de contaminación son sistemas biológicos que responden a las condiciones del medio en el que se desarrollan, el uso de estos organismos permiten obtener el conocimiento de un contaminante o cualquier otro sistema que se encuentre alterando al ambiente, afectando a organismos y provocando cambios, cuya magnitud dependerá en gran medida del tiempo de la perturbación, intensidad y de su naturaleza.<sup>19</sup>

Los microorganismos: bacterias, hongos, protozoarios y algas, son catalizadores vivos, que permiten un suficiente número de procesos en el agua. La mayor parte de las reacciones químicas importantes que tienen lugar en el agua, en muy particular modo aquellas están implicando materiales orgánicos y procesos oxidación – reductivos, que atraviesan los intermediarios bacterianos, otra diferencia que hay de estos microorganismos es la localización de los sitios respiratorios, los mecanismos de la fotosíntesis, los medios de locomoción y procesos reproductivos.

Los microorganismos pueden producir esporas, cuerpos metabólicamente inactivos que se forman y sobreviven en ciertas condiciones y en un estado de reposo antes de encontrarse en condiciones favorables a su crecimiento.<sup>22</sup> Los hongos, las bacterias y protozoarios (a excepción de las bacterias y los protozoarios fotosintéticos) son clasificados como reductores, en condiciones de degradación a los compuestos químicos en especies más simples, de donde recaban la energía necesaria para su metabolismo y su crecimiento, por esto los microorganismos anteriormente mencionados pueden considerarse como catalizadores ambientales. Los protozoarios son animales microscópicos, que están constituidos por una célula eucariota, algunos protozoarios contienen cloroplastos y están en condición de dar lugar a la fotosíntesis, estos microorganismos juegan un papel relativamente pequeño en los procesos bioquímicos en el ambiente.<sup>20</sup>

Los buenos organismos indicadores deben presentar las siguientes características: ser abundantes, sensibles al medio de vida, fácil y rápida identificación, estudiados en cuanto a su ecología y ciclo biológico, y tener poca movilidad.

Reish y Oshida en 1987, indicaron que para la realización de bioensayos es conveniente el uso de zooplancton por su pequeña talla, requiere equivalentemente poco espacio de laboratorio, poco volumen de agua, poca cantidad de tóxico, ciclo de vida corto, requerimientos nutricionales generalmente conocidos, lo cual lo hace ideal para estudios de bioacumulación.

Ventajas que presentan los bioindicadores son:

- Los índices biológicos dan testimonio del impacto del contaminante durante un periodo de tiempo.
- La toxicidad de contaminantes es estimada por sus efectos.
- Permiten evaluación detallada de la capacidad de respuesta del medio.
- Presenta menor costo para el seguimiento biológico comparado con el seguimiento fisicoquímico cuando son elevados los números de contaminantes.
- Los resultados obtenidos del análisis son fáciles de interpretar.<sup>18</sup>

## **5. *Artemia franciscana***

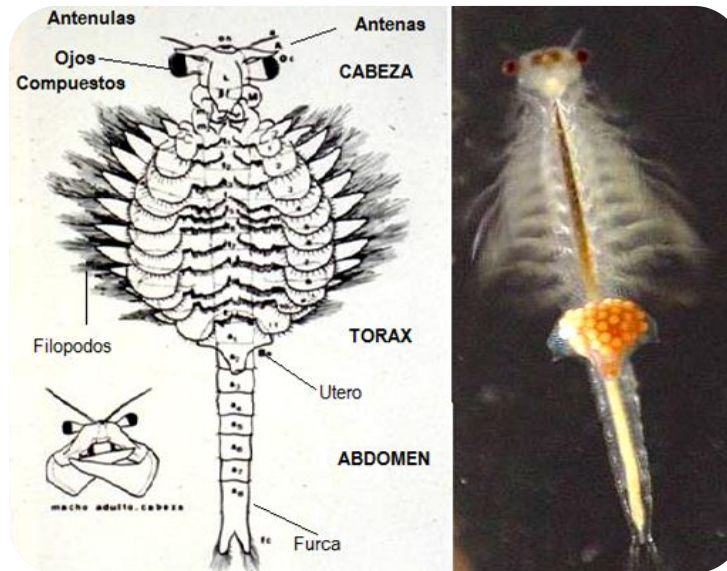
El pequeño crustáceo conocido como artemia o camarón de salmuera, es un artrópodo perteneciente a la familia *Artemiidae*, de subclase *Branchiopoda*, a la orden *Anostraca*. La extensa distribución que presenta *Artemia* es ya sea por causas naturales como la anemocoria o la zoocoria, o porque es deliberada por el hombre. Persoone en 1980 demostró que *Artemia* se comporta como un modelo

**biosensor** de contaminación acuática de alta calidad y se utiliza ampliamente para los estudios de toxicidad.<sup>16</sup>

Morfológicamente *Artemia* presenta un cuerpo alargado, delgado y cubierto por un caparazón blando, su abdomen es constituido por ocho segmentos llamados ápodos, aquellos dos segmentos que se localizan más próximos al tórax son los segmentos de genitales, los dos primeros segmentos se encuentran hipertrofiados en su cara ventral, dando lugar a los aparatos sexuales, el último segmento es llamado telson, provisto de la furca caudal con el borde erizado de largas sedas, en la escotadura entre los lóbulos se abre el orificio anal.<sup>24</sup>

*Artemia* es un crustáceo **filtrador obligado**, obtienen su alimento del medio en el que viven, ya que este pueden ser algas unicelulares, pequeños protozoos y detritos, esto es llevado a cabo mediante el batido rítmico de sus apéndices pues los telepoditos de los toracópodos actúan como filtradores, estos movimientos hacen que se crean dos corrientes en direcciones opuestas; anal y oral. El alimento es arrastrado con dirección al atrio bucal para ingresar al esófago, posteriormente a un par de ventrículos globulares que asimilan a un estómago, en donde sufren la acción digestiva. Por consiguiente el alimento ingresa por el tubo intestinal, formando aquí una capa sencilla de células epiteliales y una membrana peritrófica, por último lo remanente es eliminado por el ano, las heces llegan a tener diferente coloración, consistencia y adoptan la forma de cordones, dependiendo del alimento que ingieren. Su sistema circulatorio es conformado por un corazón largo, tubular con un ostiolo en extremo posterior y varios senos en diversas zonas del cuerpo. Sistema por el cual circula hemolinfa, que incluye células específicas y hemoglobina. El sistema respiratorio se encuentra conectado con la actividad locomotriz por ser llevada a cabo en los exopoditos de los toracópodos que funcionan a modo de branquias, dotados de cavidades para la hemolinfa muy amplias y desarrolladas con una cutícula permeable a los iones.

La cutícula de estos apéndices se presenta más fina que en el resto del cuerpo teniendo en el interior cavidades que llena la hemolinfa, de modo que es más fácil el contacto del medio externo con la hemoglobina.<sup>23, 25, 26</sup>



**Figura 13.** Morfología de *Artemia franciscana*

Artemia es un organismo con un hábitat que debe estar de acuerdo con las siguientes condiciones para que lograr un desarrollo óptimo:

**Salinidad:** Factor que influye en la morfología de este crustáceo, es la razón por la cual este crustáceo se encuentra en medio de salinidades elevadas hay una reducción general de su tamaño corporal, característica relacionada a su gran capacidad de osmorregulación, su hemolinfa se mantiene hipotónica con respecto a su medio ambiente, las concentraciones de salinidad pueden encontrarse entre  $10\text{-}20\text{g/l}^{-1}$  y  $300\text{g/l}^{-1}$  esto se debe a la gran capacidad de osmorregulación que presenta, por lo que la hemolinfa estará hipotónica con respecto al ambiente, la hemolinfa se mantiene cuando la salinidad es de  $150\text{mg/L}$ , y es más concentrada cuando este por  $35\text{mg/L}$ , y mediante la cubierta que se forma en las cavidades de las branquias es por donde se excreta el NaCl a partir de la hemolinfa cuando el organismo se encuentra en un medio hipertónico, el órgano nusal se encarga de esta función. La relación que presenta *Artemia franciscana* con las altas salinidades también es debido que en estas hay una gran ausencia de predadores y competidores.<sup>27</sup>

**Temperatura:** La temperatura necesaria para la vitalidad de la *Artemia* es alrededor de 25-27°C, umbrales mínimos y máximos de supervivencia oscilan entre 5 y 35°C, límite que está ligado a la característica de cada población.<sup>28</sup>

**Oxígeno;** Este es un crustáceo que puede tolerar niveles de oxígeno de 1g l<sup>-1</sup>. Al igual que sucede en algunos otros invertebrados, cuando están en un medio que tiene carencia de oxígeno, desarrollando estos una intensa coloración rojiza a causa de un aumento de las concentraciones de hemoglobina en la hemolinfa, ayudando de esta manera a la captación de oxígeno, sin una elevación apreciable de su tasa respiratoria.

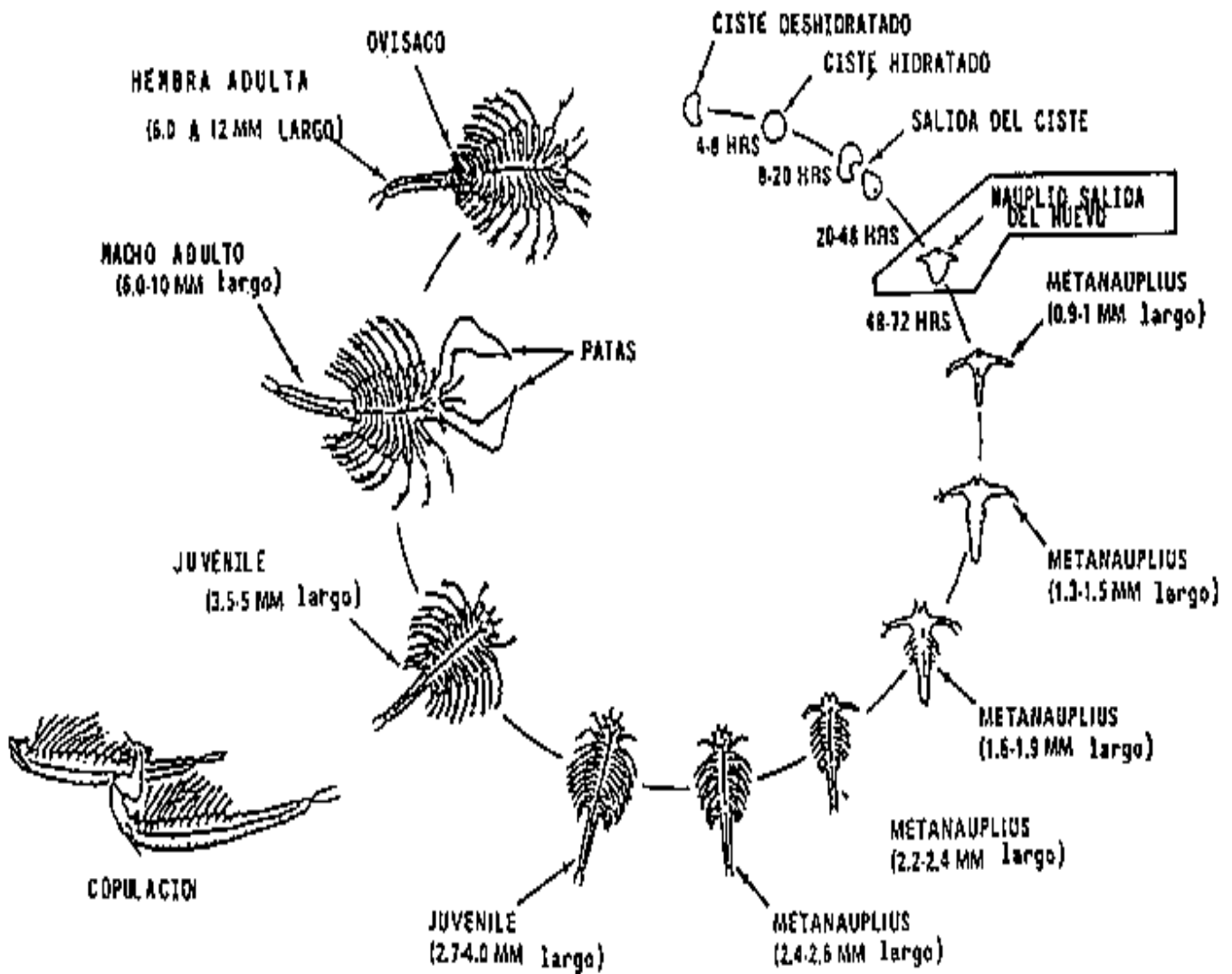
**Alimentación;** El estadio naupliar es nutrido de las reservas vitelinas acumuladas en el llamado “órgano nupal”, hasta el estado II de modo que el alimento es capturado mediante filtración por las segundas antenas, dado por que los telepoditos de los filópodos se desarrollan paulatinamente, y se van incorporando a estas funciones. Estas son las condiciones que debe cumplir el medio para que el crustáceo *Artemia* pueda iniciar con su ciclo de vida.<sup>22</sup>



**Figura 14.** Organismos adultos de *Artemia Franciscana*.

Las formas de reproducción de este crustáceo son; bisexual, anfigónica o zigogénica, con presencia de machos y hembras, y la partenogénica en la cual la existencia de organismos es auténtico de machos.

En ambas formas de reproducción tienen lugar dos tipos de huevos; los que terminan su desarrollo embrionario en el interior del útero resultando un nauplio completamente formado, llamado proceso ovovivíparo y aquellos que detienen su desarrollo en el estado de blástula avanzada o gástrula incipiente, cubiertos por un corión que proviene de las glándulas de la cáscara y al final tiene forma de quiste o huevo cístico. <sup>27, 28</sup> Cuando se encuentran disecados toman una forma semiesférica, al ser alojados por la hembra estos no se encuentran en un medio inconveniente para la sobrevivencia ya que no presenta el alimento, la elevada salinidad con deficiencias de oxigenación. <sup>25</sup>



Esquema 8. Ciclo biológico de *Artemia franciscana*.

El ciclo biológico de *Artemia\_Salina* es de aproximadamente de 14 a 17 días, aunque llega a tener ciclos más cortos que duran hasta 9 días en *Artemia* las variaciones de tamaño, rapidez de desarrollo, frecuencias de mudas, varían según la especie, y a la influencia de factores físico-químicos y ambientales, tales como la salinidad, temperatura, concentración de oxígeno, pH, tipo de alimento y densidad poblacional.<sup>23</sup>

### 5.1. *Artemia franciscana* como biosensor

- **Artemia** es un biosensor de contaminación acuática con muy alta calidad, ya que forma parte de los primeros niveles de la cadena trófica (zooplancton) en medios salinos.
- Se trata de un organismo de manipulación fácil y costo económico
- Su obtención es sencilla, de manera que se pueden adquirir como huevos encapsulados para rehidratarlos y tener poblaciones homogéneas, lo cual también facilita su almacenaje.
- Su ciclo biológico es corto, lo que permite cortos periodos de experimentación.<sup>23</sup>

**Artemia franciscana** es hasta la fecha el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, como fuente de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave en su utilización en ensayos biológicos.



Por razones prácticas, las especies con un estado criptobiótico, durante su ciclo de vida son más adecuadas para el desarrollo de un bioensayo estándar.

La disponibilidad permanente de huevos (quistes) a partir de los cuales pueden ser obtenidas las larvas ofrece las siguientes ventajas:

No hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente,

Las pruebas pueden realizarse dónde y cuándo sea necesario,

Se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica.

## JUSTIFICACIÓN

Mucho se ha discutido en relación al impacto que la actividad humana ha alcanzado sobre el medio ambiente a través de la ciencia y su desarrollo, generando problemas de dimensiones globales. Sin embargo, en el propio desarrollo de la ciencia, han aparecido propuestas dirigidas a minimizar el impacto de esta actividad. Los efectos dependen en gran parte de la cantidad de contaminante que es expuesto, por ejemplo; un elemento indispensable para el ser vivo se ocupa en bajas concentraciones, de lo contrario cuando se sobrepasan las concentraciones llega a ser tóxico, lo mismo ocurre en los sistemas ambientales.

Debido a las alteraciones provocadas por los contaminantes sobre ecosistemas, se ha visto en la necesidad de diseñar bioensayos con diversos bioindicadores, que permiten evaluar la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos, eligiendo como bioindicador para la elaboración de este trabajo la *Artemia franciscana*, por ser un organismo importante dentro de la cadena trófica, y ha llegado a presentar una amplia eficacia para la evaluación de sustancias químicas que pueden dañar el medio ambiente.

En el presente trabajo se realizaron ensayos toxicológicos para determinar el efecto toxico agudo ( $LC_{50}$ ) que pueden provocar el  $Bi(NO_3)_3$  y el  $HNO_3$ , en la reacción de condensación de pirrol y acetona en presencia y ausencia de DNA. La determinación de la toxicidad aguda en presencia y ausencia de catalizadores en la síntesis de los calixpirroles, realizando bioensayos con nauplios de *Artemia franciscana*, puede representar un modelo útil que ayude a reducir el impacto ambiental en reacciones que involucren estos ácidos.

## **HIPÓTESIS**

La presencia de DNA en la reacción de condensación de pirrol y acetona para generar calix[n]pirroles contribuye a llevar a cabo condiciones amigables con el medio ambiente.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la toxicidad aguda de la fase acuosa del producto de reacción de los calix[5]pirroles catalizadas con ácidos de Lewis como  $\text{Bi}_3(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{HNO}_3$  en presencia por DNA, utilizando nauplios de *Artemia franciscana*, y así estipular la concentración letal 50, deduciendo el impacto ambiental que pueden provocar.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar la reacción de obtención de calix[5]pirrol en presencia y ausencia de DNA, utilizando el  $\text{Bi}_3(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y el  $\text{HNO}_3$  como catalizadores, y manteniendo las mismas condiciones de reacción.
- Determinar la concentración letal 50 ( $\text{LC}_{50}$ ) del sobrenadante del producto de reacción de los calix[5]pirroles catalizada por  $\text{Bi}_3(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en nauplios de *Artemia Franciscana*.
- Determinar la concentración letal 50 ( $\text{LC}_{50}$ ) del sobrenadante del producto de reacción de los calix[5]pirroles catalizada por ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) en nauplios de *Artemia Franciscana*.

## DISCUSIÓN Y RESULTADOS

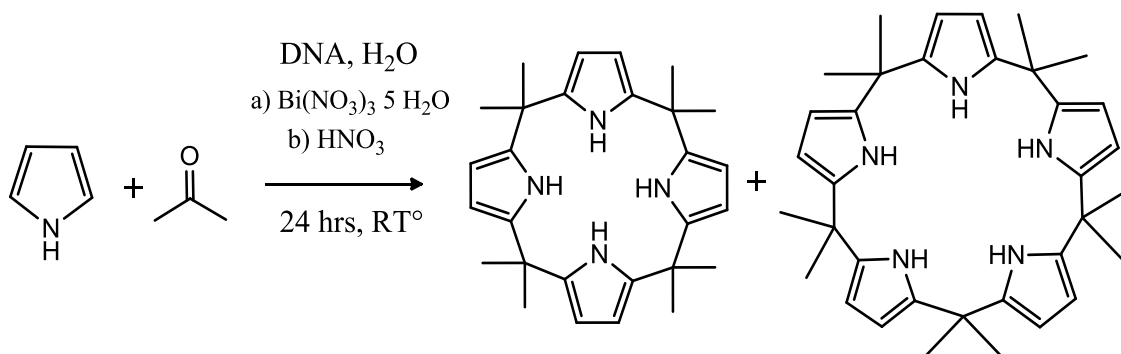
El desarrollo de este proyecto se llevó cabo en dos fases, la parte química donde se optimizó la síntesis de los calix[n]pirrol realizando una serie de reacciones mediadas con y sin DNA, para determinar en cuál de estas se obtienen los mejores rendimientos de calix[5]pirrol.

Por consiguiente en la parte biológica se trabajó con bioensayos toxicológicos utilizando la *Artemia franciscana* como un bioindicador para determinar la  $LC_{50}$  que pueden provocar al medio ambiente diversos ácidos de Lewis como el  $Bi(NO_3)_3$  y el  $HNO_3$ , los cuales fueron utilizados como catalizadores en las reacciones de calix[5]pirrol de la fase química.

### I.- FASE QUÍMICA

#### Reacciones con DNA

En la primera etapa, la reacción se llevó a cabo utilizando diferentes concentraciones de ácido de Lewis en presencia y ausencia de ADN, para determinar las mejores condiciones para la exploración de los efectos de esta biomolécula. La reacción se llevó a cabo en presencia de agua para proporcionar condiciones de reacción amigables al medio ambiente.



**Esquema 9.** Condensación entre acetona y pirrol catalizada por diversos ácidos de Lewis ( $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$  y el  $HNO_3$ ), en presencia de DNA.

## Caracterización y obtención del Calix[5]pirrol.

Para optimizar la proporción de calix[5]pirrol sobre la de calix[4]pirrol, se realizó una serie de experimentos variando la cantidad de DNA con 0.020 g, 0.040 g, 0.080 g y 0.100 g bajo las mismas cantidades de pirrol, acetona y  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Los resultados se resumen en la tabla 1.

**Tabla 2.** Influencia de DNA en la condensación entre acetona y pirrol.

Prueba	Equiv. Pirrol	Equiv. Acetona	Cantidad de DNA (g)	Cantidad en (mg) de catalizador	Proporciones	
					C5	C4
1	1	1	0.020	0.095	60	40
2	1	1	0.040	0.095	70	30
3	1	1	0.080	0.095	65	35

Se determinó que al incrementar la cantidad de DNA arriba de 80 mg las proporciones del producto se mantienen constantes. De igual forma, independientemente de la fuente de DNA (vegetal, animal o plasmídico), todos los ensayos llevaban al mismo resultado de productos y proporciones de los mismos.

Una vez estudiado el papel del DNA, bajo las mismas condiciones de reacción, se decidió explorar el papel de diversos ácidos de Lewis como el  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y el  $\text{HNO}_3$ . Los cuales fueron utilizados como catalizadores de la reacción, estos fueron colocados a diversas concentraciones o porcentajes obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 2 y la tabla 3.

**Tabla 3.** Proporciones de los productos de reacción obtenidos al utilizar el  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  como catalizador en ausencia de DNA.

Prueba	Equiv. Pirrol	Equiv. Acetona	Cantidad de DNA (g)	%mol de catalizador	Proporciones
					C5 / C4
1	1	1	-	1	NC
2	1	1	-	3	1 : 1
3	1	1	-	5	2 : 1
4	1	1	-	10	2 : 1
5	1	1	-	20	1.8 : 1
6	1	1	-	40	1.8 : 1
7	1	1	-	80	0.2 : 1
8	1	1	-	100	0.2 : 1

Con los resultados obtenidos en la tabla 2, de la caracterización de la reacción utilizando  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  como catalizador y diversas cantidades de DNA, se determinó que al utilizar 80 mg de DNA y 40 mg del catalizador bajo las mismas condiciones de reacción, se obtiene una proporción de (1.5 : 1) de calix[5]pirrol con respecto al calix[4]pirrol. En base a lo anterior se demuestra que la influencia del DNA utilizado en la reacción, proporciona un mayor porcentaje de calix[5]pirrol como producto de reacción.

**Tabla 4.** Proporciones de los productos de reacción obtenidos al utilizar el  $\text{HNO}_3$  como catalizador en ausencia de DNA.

Prueba	Equiv. Pirrol	Equiv. Acetona	Cantidad de DNA (g)	%mol de catalizador	Proporciones
					C5 / C4
1	1	1	-	10	0.2 : 1
2	1	1	-	20	1.2 : 1
3	1	1	-	40	3.2 : 1

4	1	1	-	60	2.1 : 1
5	1	1	-	80	2 : 1
6	1	1	-	100	1.3 : 1
7	1	1	-	200	0 : 1

Con la finalidad de definir si el DNA participa en la formación de los Calix[n]pirroles, se caracterizó la reacción en ausencia de DNA.

**Tabla 5.** Proporciones de los productos de reacción obtenidos al utilizar el  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  como catalizador y DNA.

Prueba	Equiv. Pirrol	Equiv. Acetona	Cantidad de DNA (mg)	Cantidad en (mg) de catalizador	Proporciones
					C5 / C4
1	1	1	5	40	1 : 1
2	1	1	10	40	1.2 : 1
3	1	1	20	40	1.25 : 1
4	1	1	40	40	1.3 : 1
5	1	1	80	40	1.5 : 1

**Tabla 6.** Proporciones de los productos de reacción obtenidos al utilizar el  $\text{HNO}_3$  como catalizador y DNA.

Prueba	Equiv. Pirrol	Equiv. Acetona	Cantidad de DNA (g)	Cantidad en (mg) de catalizador	Proporciones
					C5 / C4
1	1	1	10	100	1 : 1
2	1	1	20	100	1.5 : 1
3	1	1	40	100	1.8 : 1
4	1	1	80	100	1.7 : 1



## II.- FASE TOXICOLÓGICA.

Una vez que se caracterizaron las reacciones con las cuales se tiene la mayor proporción de calix[5]pirrol y no de los otros productos, bajo las condiciones de reacción establecidas con los diferentes ácidos de Lewis ( $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  y el  $\text{HNO}_3$ ), se llevó a cabo la determinación de los estudios de toxicidad aguda  $\text{LC}_{50}$  para cada una de ellas.

Para realizar las pruebas de  $\text{LC}_{50}$  donde se utilizó la *Artemia franciscana* como modelo biológico de prueba. Los valores de la  $\text{LC}_{50}$ -24h en cada uno de los bioensayos fueron calculados a través del análisis Probit (Finney, 1971), en la tabla 6, se muestran las  $\text{LC}_{50}$  de cada uno de los bioensayos realizados.

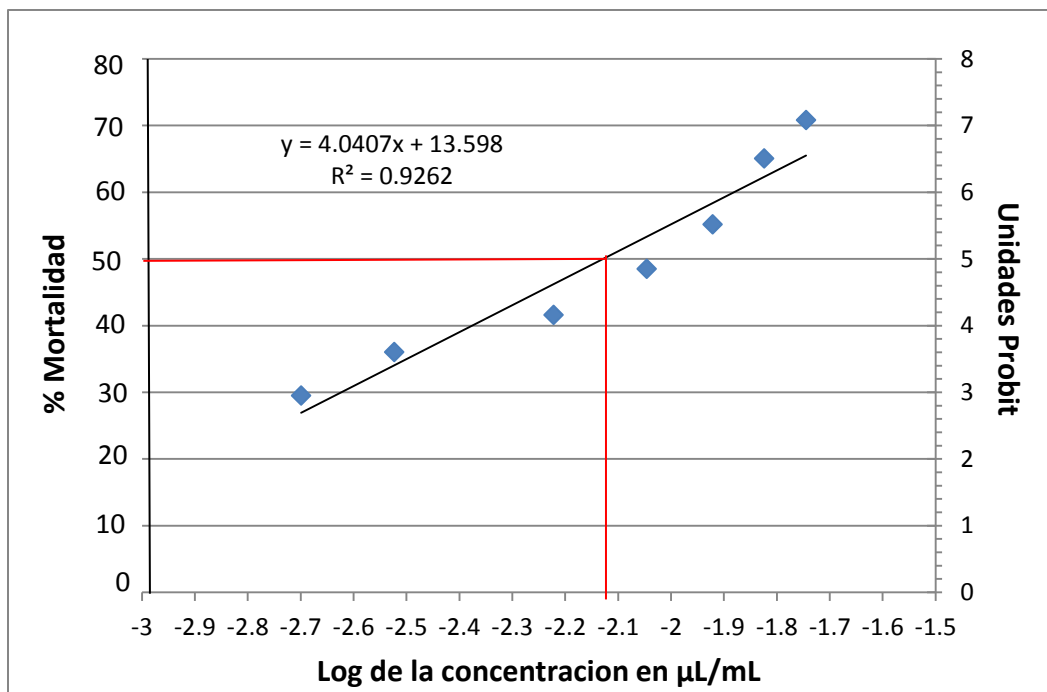
**Tabla 7.** Resultados de las  $\text{LC}_{50}$  de los productos de reacción de calix[5]pirrol catalizados por  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  y el  $\text{HNO}_3$  con y sin DNA

Determinación de $\text{CL}_{50}$ del sobrenadante de reacción en Nauplios de <i>A. franciscana</i> .		
Catalizador utilizado	$\text{CL}_{50}$ en presencia de DNA ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	$\text{CL}_{50}$ en ausencia de DNA ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )
<b><math>\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}</math></b>	0.0126	0.00745
<b><math>\text{HNO}_3</math></b>	0.0223	0.00693

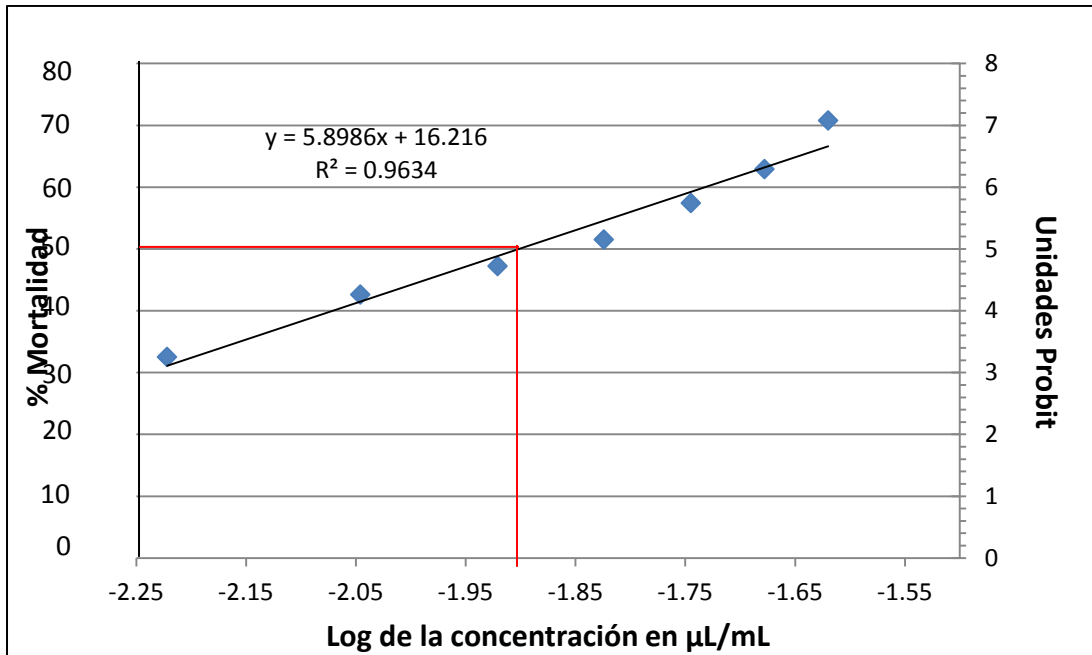
Estadísticamente se representaron los resultados de los bioensayos toxicológicos realizados a los productos de reacción de los calix[5]pirrol, donde se observa claramente que al utilizar DNA se obtiene una mayor proporción de cali[5]pirrol como producto final de la reacción, y esto varía dependiendo de la cantidad de catalizador utilizado.

## Representación gráfica de la toxicidad de los diferentes ácidos de Lewis utilizados en la caracterización de los calix[5]pirrol con y sin DNA.

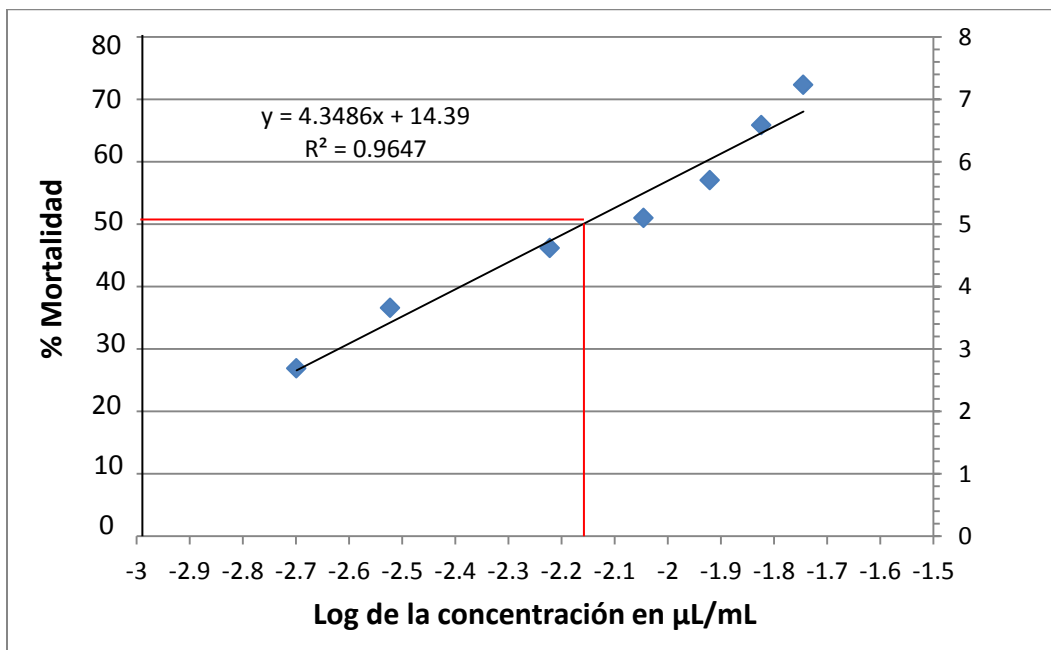
A continuación se muestran las gráficas de los resultados de cada uno de los bioensayos realizados en el laboratorio de biología acuática, utilizando como biosensor los nauplios de *Artemia franciscana*.



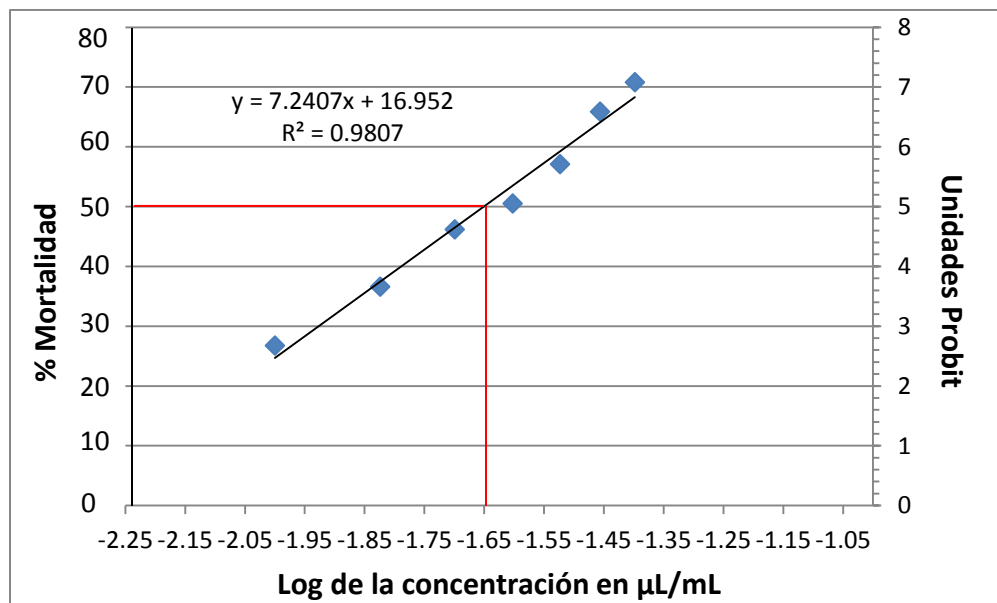
**Grafica 1.** Efecto del calix[5]pirrol sin DNA catalizado por el  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  con una  $\text{LC}_{50} = 0.00745$  en nauplios de *A. franciscana*.



**Grafica 2.** Efecto del calix[5]pirrol con DNA catalizado por el  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  con una  $\text{LC}_{50} = 0.0126$  en nauplios de *A. franciscana*.



**Grafica 3.** Efecto del calix[5]pirrol sin DNA catalizado por el  $\text{HNO}_3$  con una  $\text{LC}_{50} = 0.00693$  en nauplios de *A. franciscana*.



**Grafica 4.** Efecto del calix[5]pirrol con DNA catalizado por el HNO<sub>3</sub> con una LC<sub>50</sub> = 0.0223 en nauplios de *A. franciscana*.

Al utilizar DNA y los catalizadores Bi (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O y HNO<sub>3</sub> la reacción muestra condiciones amigables con el medio ambiente, por el contrario al utilizar los mismos productos de reacción en ausencia de DNA, se produce más del doble de mortalidad en los bioensayos realizados.

## CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se realizó un estudio toxicológico de la caracterización de una serie de reacciones para la síntesis directa de los calix[5]pirrol, utilizando  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y el  $\text{HNO}_3$ , mediadas por DNA bajo condiciones de química verde, utilizando como modelo biológico la *A. Franciscana*. La ( $\text{LC}_{50} = 0.00745 \mu\text{L}/\text{mL}$ ) de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y ( $\text{LC}_{50} = 0.00693 \mu\text{L}/\text{mL}$ ) de  $\text{HNO}_3$ , en ausencia de DNA en comparación con la ( $\text{LC}_{50} = 0.0126 \mu\text{L}/\text{MI}$ ) de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y ( $\text{LC}_{50} = 0.0223 \mu\text{L}/\text{mL}$ ) de  $\text{HNO}_3$ , permiten demostrar que a una concentración mayor y en ausencia de DNA, aumenta la toxicidad e impacto toxicológico del sobrenadante del producto de reacción con los diversos catalizadores utilizados.

## REFERENCIAS

- [1] Baeyer. Ver. Dtsch. Ges. **1886**, 2184
- [2] V. V. Chelintzev and B. V. Tronov, J. Russ. Phys. Chem. Soc., **1916**, 105,127.
- [3] Gale, P. A., Sessler, J. L., Král, V., and Lynch, V. J. Am. Chem. Soc. **1996**, 5140-5141.
- [4] Gillian McMahan, Shane O`Malley, and Kieran Nolan, Arkivok, **2003**, 23-31.
- [5] Mara Staffilani, Kirty S. B. Hancock, Jonathan W. Steed, K. Travis Holman, Jerry L. Atwood, Ravindra K. Juneja, and Robert S. Burkhalter, J. Am. Chem. Soc. **1997**, 6324-6335.
- [6] H. Fischer and H. Orth, Leipzig, **1934**, 20.
- [7] Paul Rothemound and Clarke L. Gage, J. Am. Chem. Soc, **1954**, 3340-3372.
- [8] (a) M. Dennstedt and J. Zimmerman, Chem. Ber. Dtsch. Ges., **1886**, 2189.  
(b) M. Dennstedt and J. Zimmerman, Chem. Ber. Dtsch. Ges., **1887**, 850.  
(c) M. Dennstedt and J. Zimmerman, Chem. Ber. Dtsch. Ges., **1890**, 1370.
- [9] Mejía I., Chacón L., Celedón C., Aviña J. Letters in Organic Chemistry , **2008**, 237-239.
- [10] Chavez L., Chacón L., Denisse R. Cacho and Altamirano J. The first direct synthesis of  $\beta$ -unsubstituted-meso-decamethylcalix[5]pyrrole, Belilstein Journal of Organic Chemistry **2009**, 5, No. 2
- [11] Bedolla-Medrano, M.; Chacón-García, L.; Contreras-Celedon, C.; Campos-García, J. Synthesis of a new calix[n]pyrrole: Meso-pentaspirciclohexyl calix[5]pyrrole. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 136–138.
- [12] Cafeo, G.; Kohnke, F.H.; Parisi, M.F.; Nascone, R.P.; La Torre, G.L.; Williams, D. The Elusive  $\beta$ -Unsubstituted Calix[5]pyrrole Finally Captured. *J. Org. Lett.* **2002**, 4, 2695–2697.
- [13] Moyes, C. D. y Schulte, P. M., Principios de fisiología animal. Pearson Educación, S:A., Madrid, España. **2007**, pp.767.

- [14] Medina, G. R., Goenaga, J., Hontoria, F., Cohen, G. y Amat, F., Effects of temperature and salinity on prereproductive life span and reproductive traits of two species of *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca) from Argentina: *Artemia franciscana* and *A. persimilis*, *Hydrobiologia* 579, pp.41-53, **2007**.
- [15] Soniraj, N., Effect of salinity on the life span and reproductive characteristics of brine shrimps in the salt pans at Tuticorin, *Journal of the Marine Biological Association of India* 46 [2], pp. 133-140, **2004**.
- [16] Persoone, G. y Sorgeloos, P. General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia*, En Persoone G, Sorgeloos P, Roels O y Jaspers E. (eds). *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Universa Press, Wetteren, Belgium, **1980**, pp. 3-24.
- [17] Proyecto Nitrato del Perú (PNP). **2009**. Estudios del Impacto Ambiental y Social-000463.
- [18] Álvarez Arango Luisa Fernanda. **2005**. Metodología para la evaluación de los macroinvertebrados acuáticos como indicadores de los recursos hidrobiológicos. Instituto Alexander Von Humboldt. No. 05-01-24843-0424PS: 3-5
- [19] Giraud-Billoud, M Clement, Castro Vázquez. **2010**. Bioindicadores de la contaminación del agua. Jornadas de Investigación.
- [20] Sánchez P., Pablos M.V., Valdovinos C.E., Bay-Schmith E., Tarazona J.V. y Larrain A. **2000**. Los bioensayos como instrumentos legales en la gestión medioambiental. En: *Globalización medioambiental. Perspectivas agrosanitarias y urbanas*. Secretaría General Técnica, MAPA. Madrid. Pp. 455-463.
- [21] Semanart **2009**, Ecotoxicología. Semanart, México actualización 17-Agosto-**2009**.
- [22] Tanguay A. Joshua, Reyes C.Reno and Clegg S. James. **2004**. Habitat diversity and adaptation to environmental stress in encysted embryos of the crustacean *Artemia*. California USA.Vol.29, Number 4, 489-501.

- [23] Pino Pérez Oriela y Jorge Lazo Fanny. **2010**. *Artemia* bioassay: Useful working tool for ecotoxicologist and chemists of natural products. Scielo revista de protección vegetal. v.25, n.1
- [24] Jorge Castro Mejía\*, Talía Castro Barrera, José Luis Arredondo Figueroa1, La salinidad y su efecto en la reproducción del crustáceo *Artemia* sp., **2009**. Pág. 3-7
- [25] Abatzopoulos Th.J., Beardmore J.A., Clegg J.S. and Sorgeloos P. **2002**. Biology of Aquatic Organisms-Artemia basic and applied biology, *Artemia* morphology and structure, Netherlands .40:1-28.
- [26] Murra Graziella, Moscatello Salvatore and Illias Kappas. **2006**. Morphological and molecular data reveal the presence of the invasive *Artemia franciscana* in Margherita di Savoia Salterns. Italy. Vol.91.539-554.
- [27] Ruiz Pérez Olga, Julio **2008**. Caracterización de diversas poblaciones de *Artemia* desde el punto de vista de su composición en ácidos grasos y de sus patrones moleculares, 7-14.
- [28] Castro Mejía Jorge, Castro Barrera Talía y Arredondo Figueroa José Luis. **2009**. La salinidad y su efecto en la reproducción del crustáceo *Artemia* sp. 73, 5-15.
- [29] Tanguay A. Joshua, Reyes C.Reno and Clegg S.James. **2004**. Habitat diversity and adaptation to environmental stress in encysted embryos of the crustacean *Artemia*. California USA.Vol.29, Number 4, 489-501.
- [30] Oriela Pino Pérez, Fanny Jorge Lazo. Ensayo de *artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. Rev. Protección Veg. Vol. 22 No. 1 (**2010**): 34-43.



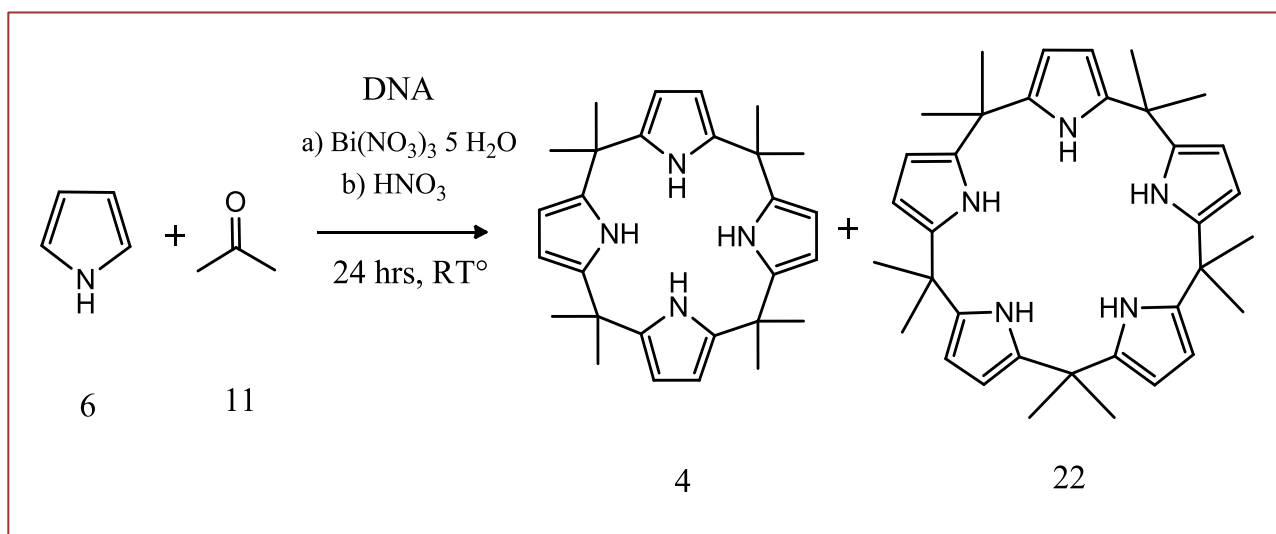
## PARTE EXPERIMENTAL

### I.- FASE QUÍMICA GENERALIDADES.

Para llevar a cabo la caracterización de la síntesis de calix[5]pirroles, se utilizó H<sub>2</sub>O destilada, acetona ACS de JT. Baker, pirrol 98% no destilado SIGMA-ALDRICH Y diversos ácidos de Lewis como Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O 98% ALDRICH, el HNO<sub>3</sub> y MeSO<sub>3</sub>H, ADN de núcleo de salmón.

Los espectros de RMN fueron sacados en espectrómetros Barian Mercury Plus a 400 MHz, en cuanto a <sup>1</sup>H, los de <sup>13</sup>C se sacaron a 100 MHz. Se utilizó cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>).

#### Caracterización de Calix[5]pirrol en presencia de DNA.



**Esquema 10.** Obtención de calix[n]pirroles (n=4 y 5) en presencia de DNA.

Para la caracterización de la reacción de calix[5]pirrol, se utilizaron tres ácidos de Lewis como catalizadores (Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O y el HNO<sub>3</sub>), bajo las mismas condiciones de reacción.

En un matraz de 10 mL provisto de agitación magnética se suspenden 0.020 g de DNA de núcleo de salmón en 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada, posteriormente se le adicionan 2 mL de acetona, 0.09 mL de pirrol y 0.020 g de Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, se hace reaccionar durante 24 hrs a presión atmosférica y temperatura ambiente. Al transcurrir el tiempo de reacción, el crudo el filtrado para eliminar el catalizador y el DNA, se lava el filtrado con acetona y se evapora el disolvente con nitrógeno.

### **Caracterización de Calix[5]pirrol en ausencia de DNA.**

Para la caracterización de la reacción de calix[5]pirrol en ausencia de DNA, se utilizaron los mismos ácidos de Lewis y bajo las mismas condiciones de reacción, y así obtener los mejores rendimientos.

En un matraz de 10 mL provisto de agitación magnética se suspenden 20 mg de DNA de núcleo de salmón en 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada, posteriormente se le adicionan 2 mL de acetona, 0.09 mL de pirrol y 10 mg de Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, se hace reaccionar durante 24 hrs a presión atmosférica y temperatura ambiente. Al transcurrir el tiempo de reacción, el crudo el filtrado para eliminar el catalizador y el DNA, se lava el filtrado con acetona y se evapora el disolvente con nitrógeno.

## **II.- FASE BIOLÓGICA GENERALIDADES.**

Para realizar los estudios toxicológicos en la segunda fase del presente proyecto, se utilizó agua marina sintética marca Sera (USA), quistes (huevos) de *Artemia franciscana* (Argent Chemical Laboratories, Washington, USA utilizando la línea ARGENTEMIA Grade II Silver Label) y que garantiza un mínimo de 260.000 huevos/g), también se utilizó una solución clorada al 10% y H<sub>2</sub>O destilada.

## **Agua marina sintética**

Para la preparación de agua de mar artificial se utilizó sal marina de la marca Sera (USA). Para lo cual se preparó una disolución al 3.3% de salinidad con agua destilada, ajustando el pH con una disolución de HCl 1M hasta alcanzar un intervalo de 8.2 a 8.4.

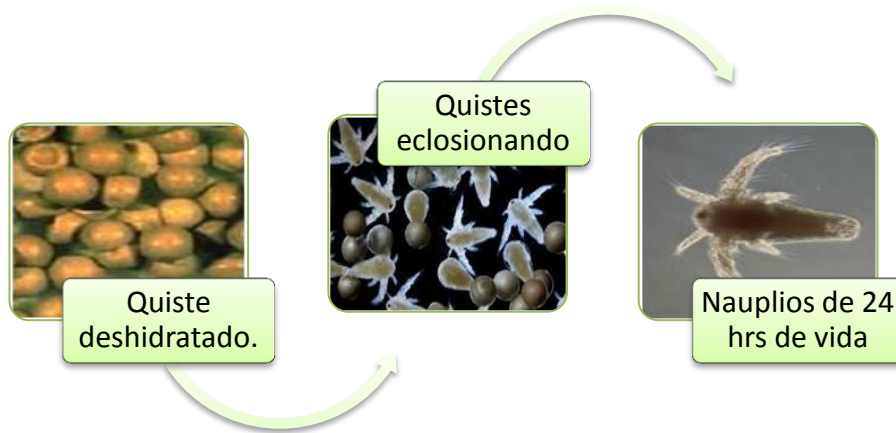
## **Preparación de los quistes para eclosionar.**

Antes de colocar a eclosión los quistes de *Artemia franciscana*, se les realiza un lavado con una solución de HCl al 10%, después se realizan una serie de lavados más para eliminar el exceso de la solución clorada.

## **Obtención de los nauplios de *Artemia franciscana***

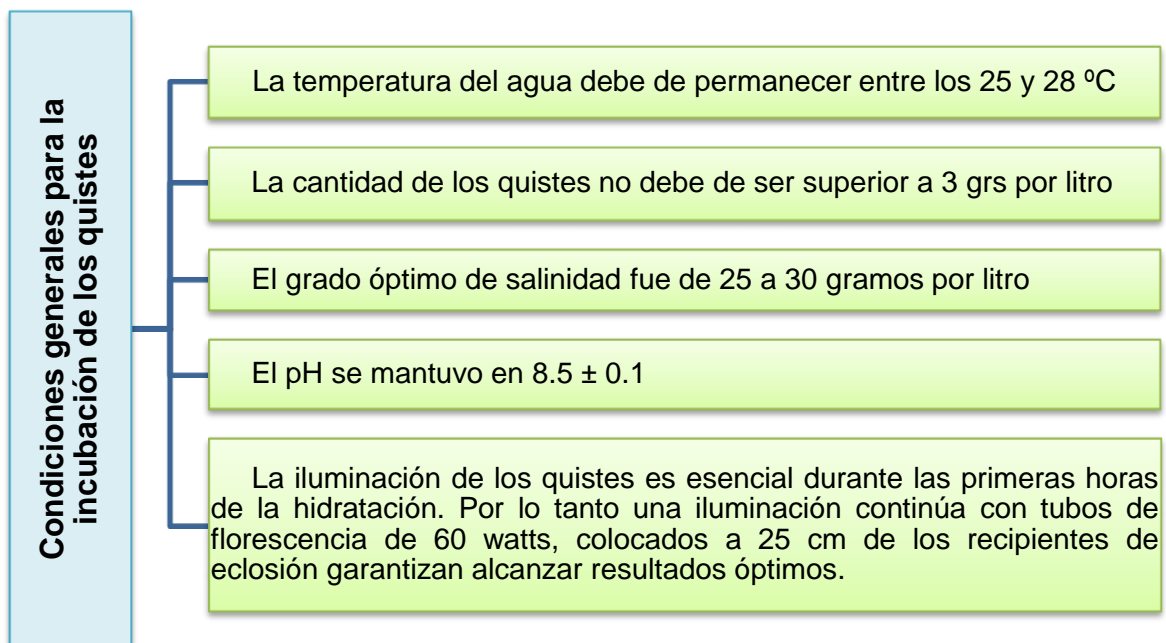
Las mudas en *A. salina* son muy frecuentes y las nauplios de 24 h presentan una cutícula muy fina lo que las hace especialmente sensibles al tóxico (calix[5]pirrol), el cual penetra a través de las barreras fisiológicas absorbiéndose rápidamente y provocando diferentes alteraciones en estos organismos, que van desde efectos sub-letales sobre la movilidad, la reproducción y la hematología hasta la muerte de la larva.

Una vez que se hidrataron los quistes (huevos) de *Artemia franciscana* se colocaron a eclosionar para obtener poblaciones homogéneas de nauplios viables para llevar a cabo el presente proyecto.



**Esquema 11.** Proceso de obtención de nauplios viables en 24 hrs.

A partir de los quistes de *Artemia franciscana*, se obtuvieron poblaciones homogéneas de nauplios (92% eclosión), con un tamaño de 500-525  $\mu\text{m}$ . Para la obtención de nauplios se pasaron 0.1g de quistes de *Artemia franciscana* y se incubaron durante 24h en 150 mL de agua marina sintética, manteniendo una oxigenación saturada y una temperatura de 25°C de baño María, aplicando iluminación con una lámpara de luz de 60 watts.



El oxígeno se mantuvo cercano a la concentración de saturación (6 mg/L). El burbujeo además ayudo a mantener los quistes en suspensión hasta su eclosión y obtención de los nauplios. La aeración se mantuvo constante con ayuda de una turbina aireadora. Este proceso duro de 20 a 24 hrs.

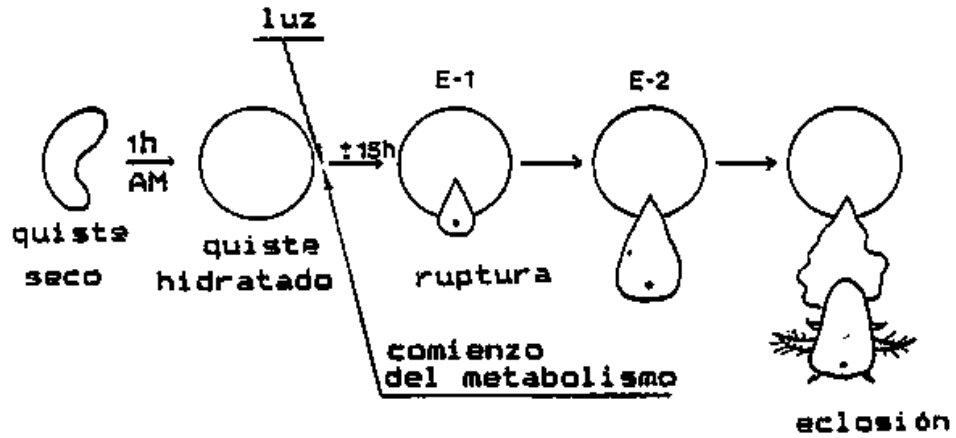
### **Determinación de la toxicidad aguda del Nitrato de bismuto y el ácido nítrico en nauplios de *Artemia franciscana*.**

Para realizar los estudios de toxicidad aguda (LC<sub>50</sub>) de los catalizadores utilizados en la reacciones para la síntesis de los calix[5]pirrol, se utilizó el producto de reacción de los calixpirroles del cual el calix[5]pirroles esta en mayor proporción.

La prueba letal 50 (LC<sub>50</sub>) se realizó siguiendo la metodología propuesta por Meyer *et al.*, 1982, la cual se basa en la determinación de la concentración que causa la muerte del 50% de los nauplios de *Artemia* en 24 horas.

Para determinar la LC<sub>50</sub> se colocaron a hidratar los quistes de *Artemia franciscana* en agua marina sintética. Posteriormente, los nauplios libres se depositaron en una caja de petri en la que se adicionaron 5mL de agua de mar artificial, previamente preparada. Desde esta se transfirieron hacia la placa multiposillo, colocando 10 nauplios en 97µl del agua de mar sintética y se le agregaron 3 µl de las soluciones patrón por cada pocillo; con cinco repeticiones por concentración. Como control se utilizaron 3 µl de agua destilada.

La incubación se realizó a 25°C en obscuridad (ausencia de luz) y durante un periodo de 24h. Una vez transcurrido este tiempo, se continuó con la lectura de la placa realizando la contabilidad del número de nauplios vivos y muertos en cada uno de los pocillos de cada concentración. La muerte de los nauplios se estableció por falta total de movimiento durante 10 segundos de observación bajo el estéreo-microscopio (10 y 40 X).



**Esquema 12.** Proceso de eclosión de un quiste de *Artemia franciscana*.

Los valores de  $LC_{50}$  se obtuvieron calculando los logaritmos de las concentraciones de las soluciones patrón, relacionados con el porcentaje de mortalidad (% mortalidad vs Log Concentración).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

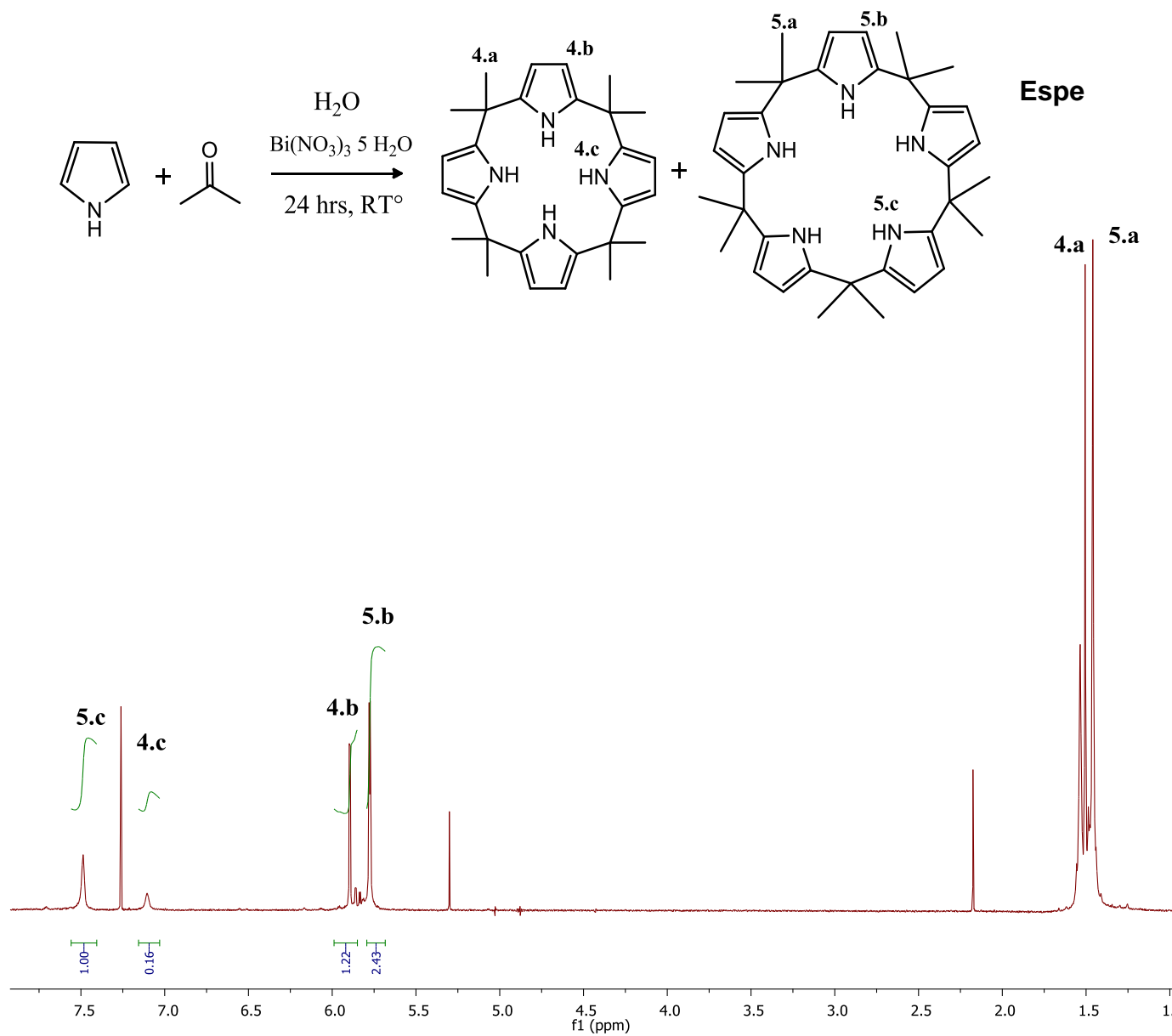
Para el tratamiento de datos de los ensayos realizados tanto individual como para el productos de reacción, se diseñó una estructura de bloques constituido por seis niveles (cinco concentraciones con su respectivo control), elaborando cinco repeticiones para cada una y con una mortalidad prácticamente nula para los controles, este último dato ayuda a comprobar si el estrés al que se somete el organismo tiene un efecto apreciable. Con los resultados de mortalidad obtenidos para cada dilución se les aplico el Teorema de Chebyshev ( $\mu \pm 2*s$ ) para determinar los límites tanto inferiores como superiores y posteriormente determinar la relación entre los biocidas y el porcentaje de respuesta mediante el gráfico concentración-respuesta y adquirir la estimación de la  $LC_{50}$ .

Los valores de la  $LC_{50-24h}$  en cada uno de los bioensayos fueron calculados a través del análisis Probit (Finney, 1971) y del análisis de regresión polinomial (ecuación polinómica cúbica)  $f(x) = y_0 = ax^3 + bx^2 + cx + b$  modelos que representaron mejor el comportamiento de los datos.

Para el primer experimento se calculó el parámetro tóxico de manera individual para cada compuesto haciendo uso del modelo regresión polinomial, para ambos compuestos se empleó la ecuación polinómica cúbica.

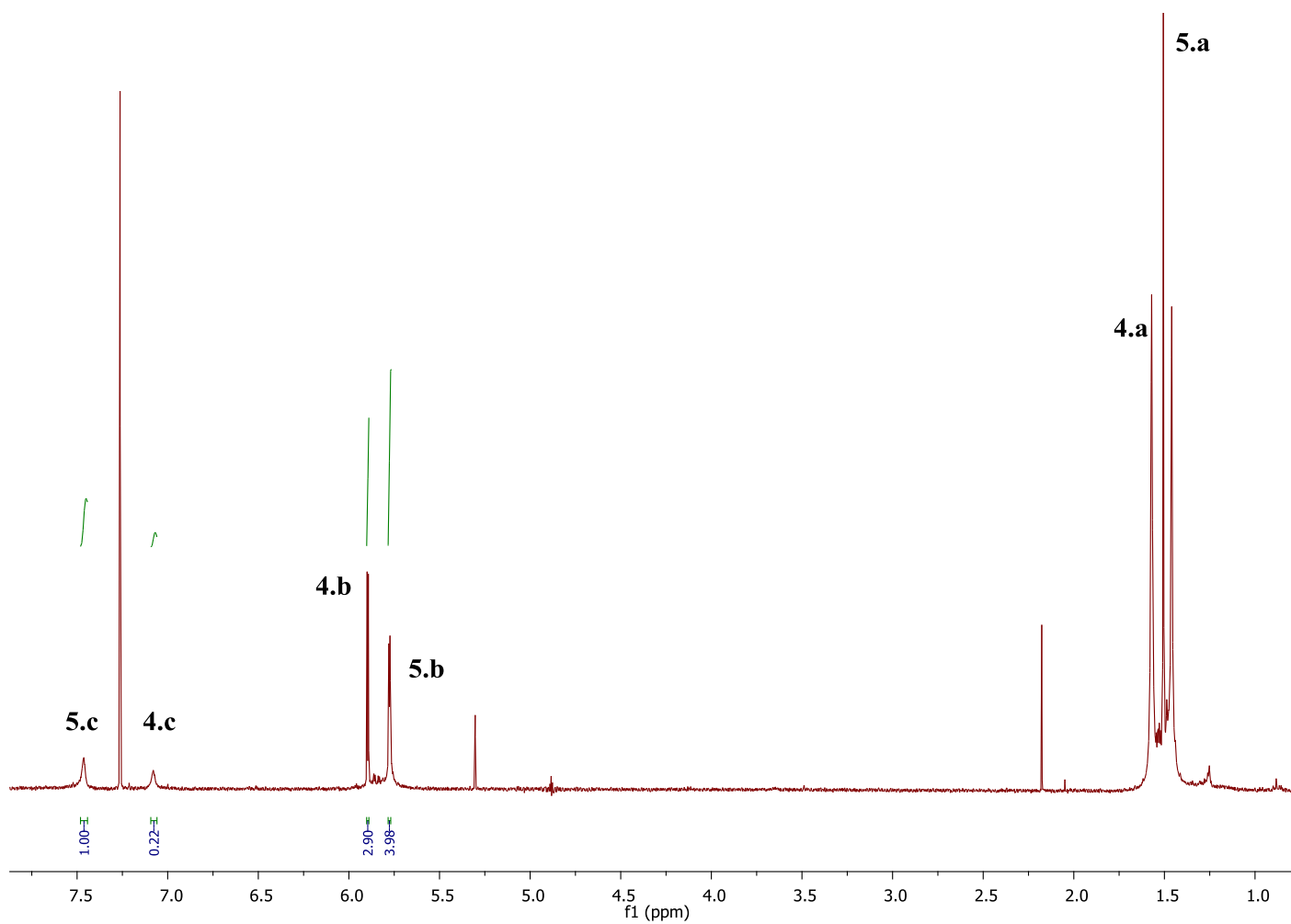
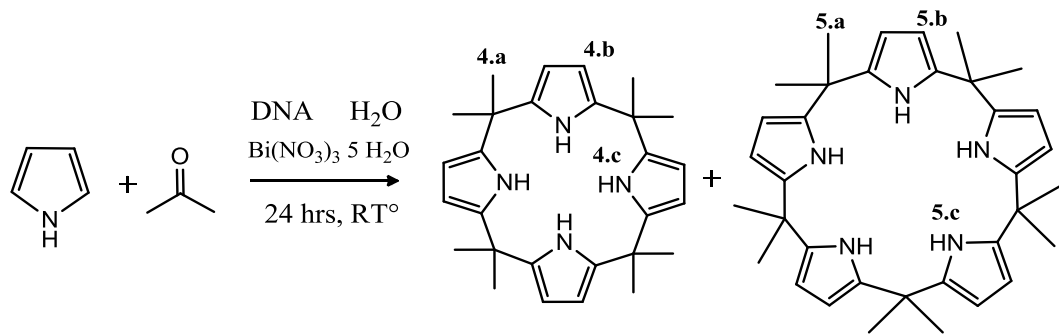
Donde ( $x$ ) representa la concentración y ( $y$ ) la mortalidad Los resultados se expresan como la media  $\pm Z * \mathcal{E}$  y la media  $\pm 2 * S$  (teorema de Tchebysheff) de 5 experimentos ( $n=10$ ). Usando las curvas de concentración-respuesta y sus intervalos de confianza (95%).

# ANEXOS

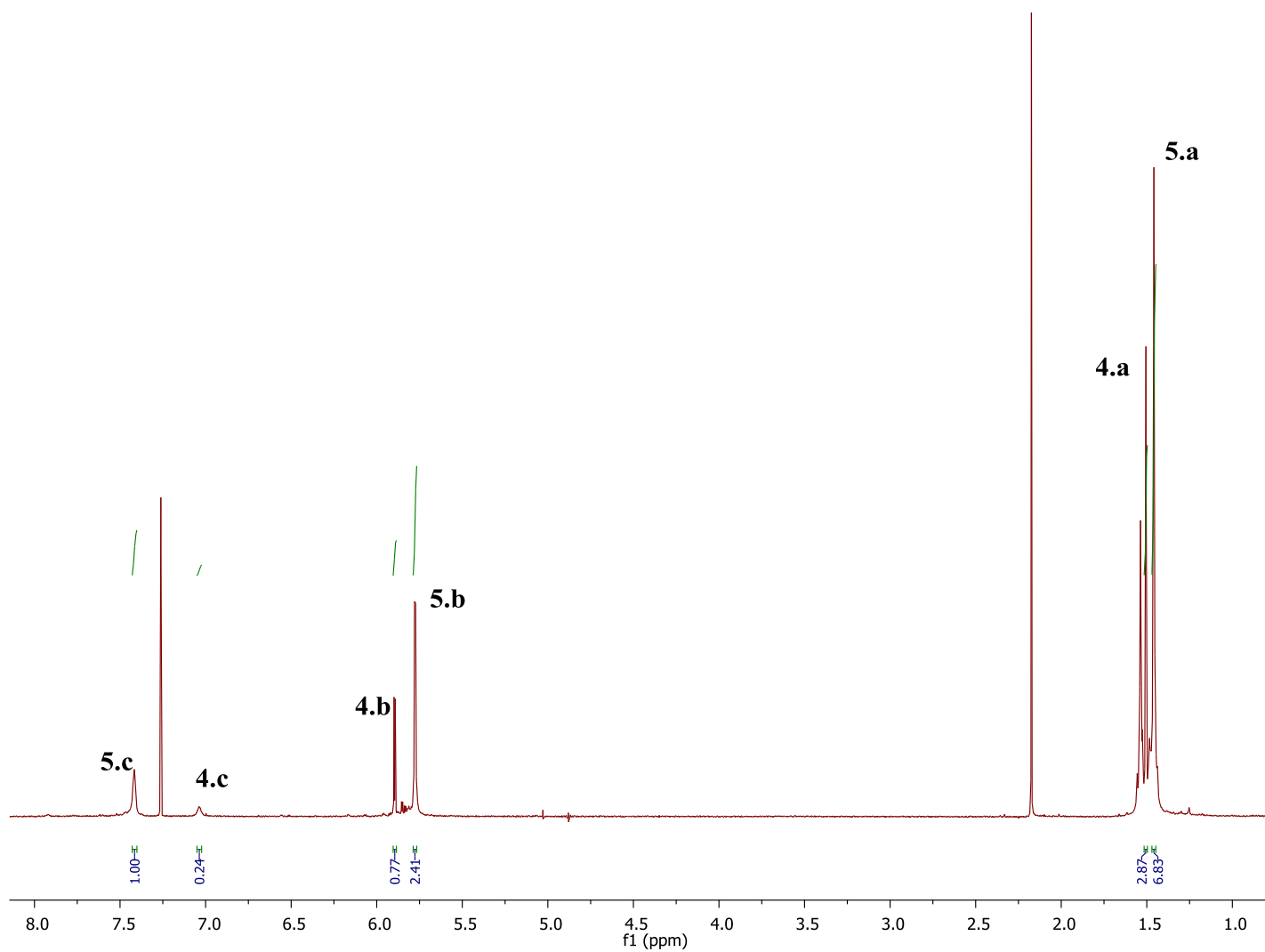
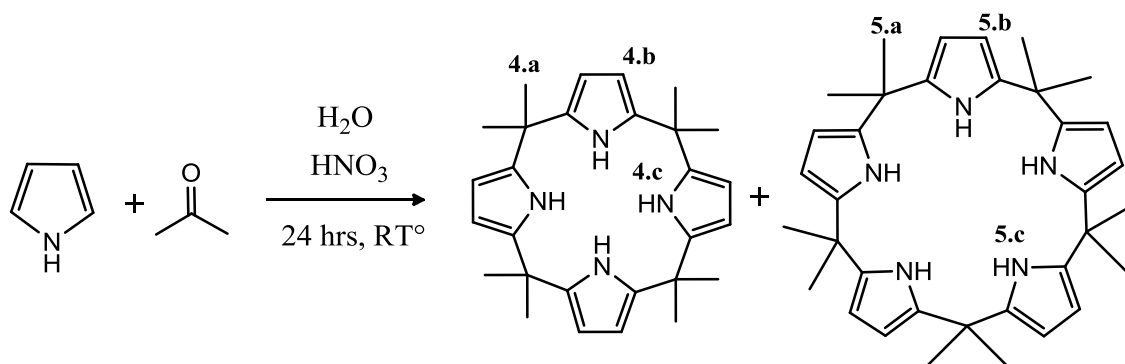


ctro  $^1\text{H}$  RMN (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz) del crudo de reacción de calix[5]pirrol en ausencia de DNA y utilizando como catalizador el  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

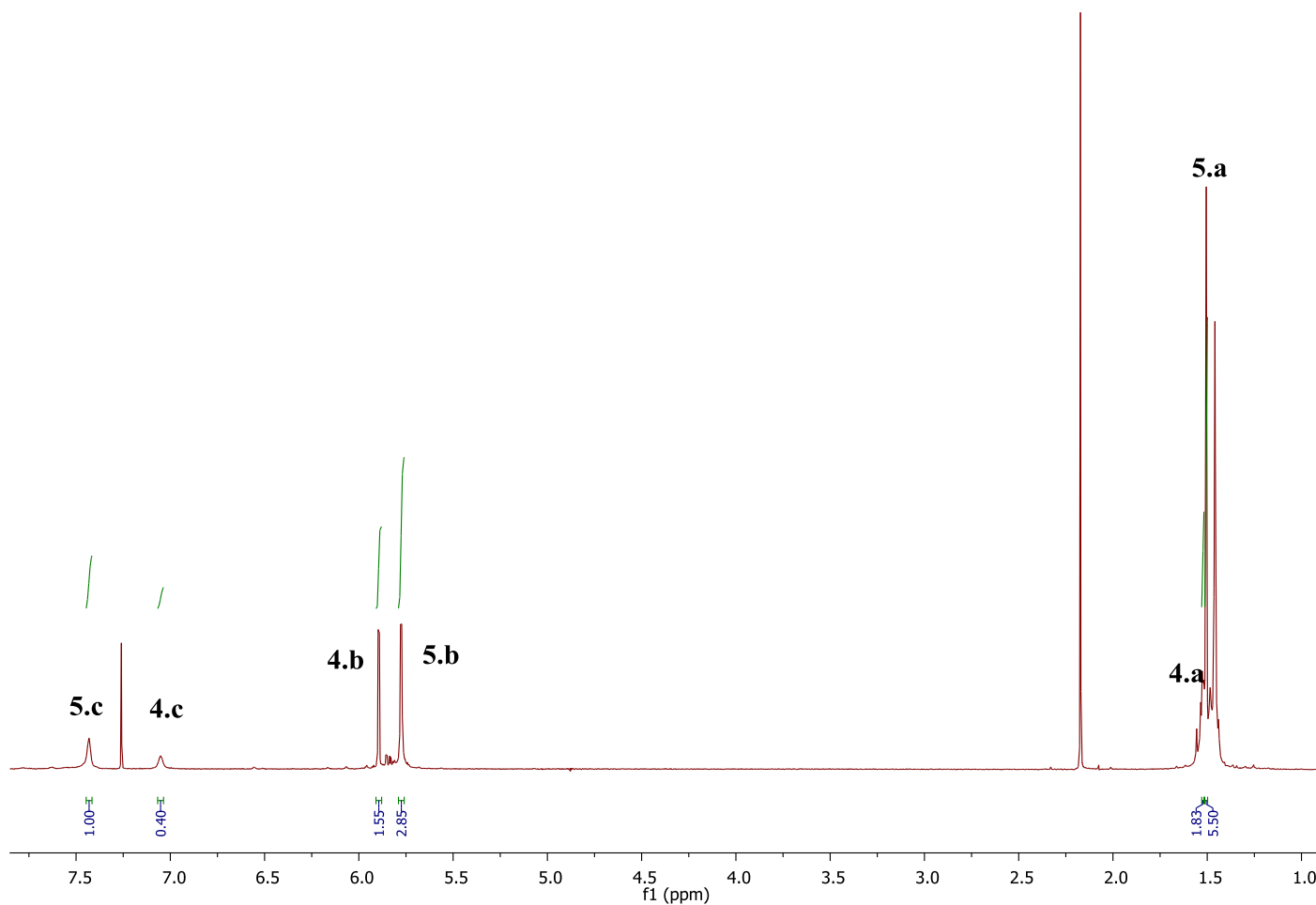
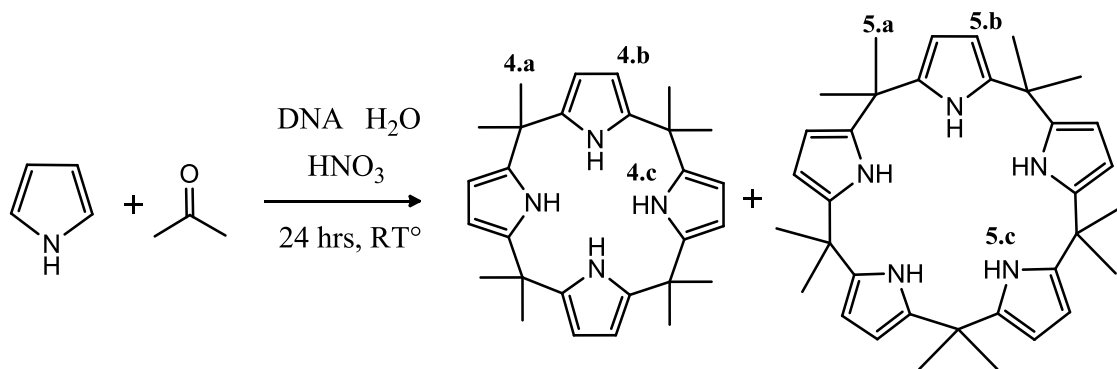




**Espectro <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz) del crudo de reacción de calix[5]pirrol en presencia de DNA y utilizando como catalizador el Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-5H<sub>2</sub>O.**



**Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  300 MHz) del crudo de reacción de calix[5]pirrol en ausencia de DNA y utilizando como catalizador el  $\text{HNO}_3$ .**



**Espectro  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$  300 MHz) del crudo de reacción de calix[5]pirrol en presencia de DNA y utilizando como catalizador el  $\text{HNO}_3$ .**