

00570 3
2eq.

"APLICACIÓN DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA DETERMINAR LA RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CUANTITATIVA (QSAR) DE COMPUESTOS QUIRALES DE LA FAMILIA DE LOS ACIDOS NAFTILPROPIONICOS".

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(FARMACIA-QUIMICA FARMACEUTICA)

PRESENTA:

Q.F.B. KARLA GABRIELA CUEVAS LICEA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2628461998



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE

Dr. Raymundo Cruz Almanza.

PRIMER VOCAL

Dr. Eugene Bratoeff Titeff.

SECRETARIO

Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

PRIMER SUPLENTE

Dra. Rachel Mata Essayag.

SEGUNDO SUPLENTE

Dr. Rogelio Pereda Miranda.

SITIO DONDE SE REALIZO EL TRABAJO:

LABORATORIO 126, CONJUNTO "E", DEPARTAMENTO DE FARMACIA.
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

ASESOR:



Dr. Mario González de la Parra Yrigoyen.

SUSTENTANTE:

Q.F.B. Karla Gabriela Cuevas Licea.

INDICE.

ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	ix
LISTA DE ESPECTROS.....	xvi
AGRADECIMIENTOS.....	xviii
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 LA REACCION INFLAMATORIA.....	3
2.2 LOS FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (NSAIDs).....	4
2.3 ESTRATEGIAS PARA DISMINUIR EFECTOS ADVERSOS DE LOS NSAIDs.....	6
2.4 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD FARMACOLOGICA Y TOXICOLOGICA EN MODELOS ALTERNATIVOS AL USO DE ANIMALES.....	7
2.4.1 ESTUDIOS CON ESPECIES VEGETALES. LAS AUXINAS.....	8
2.4.2 ESTUDIOS CON <i>Artemia salina</i>	10
2.5 LOS ESTUDIOS DE RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD EN LA EVALUACION FARMACOLOGICA DE DERIVADOS DEL NAPROXENO.....	11
2.6 LA UTILIDAD DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN LOS ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y TOXICIDAD DE COMPUESTOS ORGANICOS.....	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
4. HIPOTESIS.....	17
5. OBJETIVOS.....	18
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	19
6.1 PARTE QUIMICA.....	20

6.1.1 S-(+)- Y R-(-)-NAPROXENO.....	20
6.1.2 S-(+)-Y R-(-)-NAPROXENATO DE ETILO.....	21
6.1.3 S-(-)- Y R-(+)-NAPROXOL.....	22
6.1.4 S-(-)- Y R-(+)-ACETATO DE NAPROXILO.....	22
6.2 PARTE BIOLOGICA.....	30
6.2.1 GENERACION DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA <i>A. salina</i>	30
6.2.1.1 CONSIDERACIONES PARA LA GENERACION DEL DISEÑO....	30
6.2.1.2 ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION	39
6.2.1.3 ANALISIS DE VARIANZA DEL MODELO COMPLETO (REGRESION LINEAL MULTIPLE) Y DE LOS MODELOS PARA CADA CONCENTRACION.....	39
A. EFECTO DEL ESTADO DE OXIDACION.....	39
B. EFECTO DE LA CONFIGURACION.....	40
C. EFECTO DE LA ESTERIFICACION.....	40
D. INTERACCIONES SIGNIFICATIVAS ENTRE FACTORES.....	40
6.2.1.4 ESTIMACION DE CL ₅₀ DE LOS COMPUESTOS CONTRA <i>A. salina</i>	42
6.2.1.5 ESTIMACION DE RAZONES DE ACTIVIDADES E INDICES EUDISMICOS CON BASE EN CL ₅₀ CONTRA <i>A. salina</i>	42
6.2.1.6 GENERACION DEL DISEÑO FACTORIAL CON BASE EN CL ₅₀ CONTRA <i>A. salina</i>	44
6.2.1.7 ESTIMACION DE PARAMETROS DE RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CON BASE EN CL ₅₀ CONTRA <i>A. salina</i>	45
A. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA EN <i>A. salina</i> Y LA CONSTANTE DE PARTICION OCTANOL/AGUA.....	45
B. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA EN <i>A. salina</i> Y EL PUNTO DE FUSION.....	47
C. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA EN <i>A. salina</i> , KOCTANOL Y PUNTO DE FUSION.....	49

D. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA EN <i>A. salina</i> , J_m Y PUNTO DE FUSION.....	50
6.2.2 BIOENSAYOS PRELIMINARES DE GERMINACION DE SEMILLAS.	52
6.2.2.1 SELECCION DE SEMILLAS.....	52
6.2.2.2 BIOENSAYOS PRELIMINARES CON NAPROXENO.....	52
6.2.2.3 GENERACION DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE GERMINACION.....	53
A. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO.....	53
6.2.2.4 EXPERIMENTOS CON RABANO (<i>Raphanus sativus</i> L.).....	66
A. ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACIÓN.....	66
B. ANALISIS DE VARIANZA DEL MODELO COMPLETO (REGRESION LINEAL MULTIPLE) Y LOS MODELOS INDIVIDUALES PARA CADA CONCENTRACION.....	66
B.1 EFECTOS DEL ESTADO DE OXIDACION (A).....	67
B.2 EFECTOS DE LA CONFIGURACION.....	67
B.3 EFECTOS DE LA ESTERIFICACION.....	67
B.4 INTERACCIONES SIGNIFICATIVAS ENTRE FACTORES.....	67
6.2.2.5 TRIGO (<i>Triticum vulgare</i>).....	82
A. ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION.....	82
B. ANALISIS DE VARIANZA DEL MODELO COMPLETO (REGRESION LINEAL MULTIPLE) Y LOS MODELOS INDIVIDUALES PARA RADICULA Y TALLUELO DE TRIGO.....	82
B.1 EFECTOS DEL ESTADO DE OXIDACION.....	83
B.2 EFECTOS DE LA CONFIGURACION.....	83
B.3 EFECTOS DE LA ESTERIFICACION.....	83
B.4 INTERACCIONES SIGNIFICATIVAS ENTRE FACTORES.....	83
6.2.2.6 ESTIMACION DE CE_{50} DE LOS COMPUESTOS CONTRA RADICULA Y TALLUELO DE RABANO Y TRIGO.....	88
7. CONCLUSIONES.....	89
7.1 PARTE QUIMICA.....	89

7.2 PARTE BIOLÓGICA.....	89
7.2.1 EXPERIMENTOS CON <i>A. salina</i>	89
7.2.2 EXPERIMENTOS DE GERMINACION DE SEMILLAS.....	90
8. PARTE EXPERIMENTAL.....	91
8.1 INSTRUMENTACION.....	91
8.2 MATERIALES QUÍMICOS.....	91
8.3 MATERIALES BIOLÓGICOS.....	92
8.4 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	92
8.5 METODOS COMPUTACIONALES.....	92
8.6 OBTENCION DEL ACIDO <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2- NAFTALENACÉTICO (<i>S</i> (+)-NAPROXENO) A PARTIR DE TABLETAS COMERCIALES.....	93
8.7 SINTESIS DEL <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO (<i>S</i> (+)-NAPROXENATO DE ETILO).....	93
8.8 SINTESIS DEL <i>S</i> (-)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL (<i>S</i> (-)- NAPROXOL).....	93
8.9 SINTESIS DEL ACETATO DE <i>S</i> (-)-6-METOXI- β -METIL-2- NAFTALENETILO (<i>S</i> (-)-ACETATO DE NAPROXILO).....	94
8.10 SINTESIS DEL <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO (<i>R</i> (-)-NAPROXENATO DE ETILO).....	94
8.11 SINTESIS DEL <i>R</i> (+)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL (<i>R</i> (+)- NAPROXOL).....	94
8.12 SINTESIS DEL ACETATO DE <i>R</i> (+)-6-METOXI- β -METIL-2- NAFTALENETILO (<i>R</i> (+)-ACETATO DE NAPROXILO)	94
8.13 BIOENSAYOS CON <i>A. Salina</i>	95
8.14 BIOENSAYOS CON PLANTAS.....	95
8.14.1 PRUEBAS PRELIMINARES DE GERMINACION.....	96
8.14.2 EXPERIMENTOS PRELIMINARES CON NAPROXENO.....	96
8.14.3 EXPERIMENTOS DE GERMINACION CON LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS.....	96
8.15 ANALISIS ESTADÍSTICO.....	97

9. ESPECTROS.....	98
10. BIBLIOGRAFIA.....	138
11. ANEXO.....	143

ABREVIATURAS.

Å.....	Angström.
α	Nivel de significación en estadística.
$[\alpha]^{20}_D$	Rotación óptica.
ANOVA.....	Análisis de Varianza.
BNOA.....	Acido β -naftoxiacético.
BOA.....	Acido benzotiazol-2-oxiacético.
Brine.....	Solución saturada de cloruro de sodio.
C.....	Concentración.
c.....	Señal cuádruple en RMN.
^{13}C	Carbono 13.
CCF.....	Cromatografía en capa fina.
CDCl_3	Cloroformo deuterado.
$(\text{CD}_3)_2\text{SO}$	Dimetilsulfóxido deuterado.
CE_{50}	concentración de compuesto que afecta el 50% de las especies estudiadas.
CHCl_3	Cloroformo.
CL_{50}	Concentración de compuesto que mata 50% de las especies estudiadas.
COX-1.....	Ciclooxigenasa 1.
COX-2.....	Ciclooxigenasa 2.
D.....	Longitud de onda de la línea D del sodio (5893 Å).
D_2O	Agua deuterada.
d.....	Señal doble en RMN.
dd.....	Doble de dobles en RMN.
ddc.....	Señal múltiple (doble de dobles-cuarteto) en RMN.
DL_{50}	Dosis de compuesto que mata 50% de las especies estudiadas.
δ	Desplazamiento químico en RMN.
δ Arom.....	Banda de elongamiento delta en aromáticos, en IR.
2,4-D.....	Acido 2,4-diclorofenoxiacético.
E.C.1.1.14.99.1.....	Clasificación internacional de la enzima Ciclooxigenasa.
EM.....	Espectrometría de masas.
F.....	Punto porcentual de la distribución estadística de Fisher.
G.R.....	Grado reactivo.
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius, o centígrados.
^1H	Protón.

HETCOR.....	Correlación de desplazamiento químico heteronuclear.
Hz.....	Hertz.
IAA.....	Acido β -indolacético.
IE.....	Impacto electrónico.
llogC.....	Inverso negativo del logaritmo de la concentración molar.
<i>in vitro</i>	Bioensayo realizado sin utilizar organismos completos.
<i>in vivo</i>	Bioensayo realizado en organismos completos.
IR.....	Infrarrojo.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento en RMN.
<i>J_m</i>	Constante de flujo máxima de un compuesto a través de la piel.
2 ^k	Diseño factorial de experimentos con dos niveles.
KBr.....	Bromuro de Potasio.
Koct.....	Constante de partición octanol/agua.
L.....	Linnée (subespecie taxonómica).
Ln.....	Logaritmo natural.
M.....	Concentración molar.
m.....	Señal múltiple en RMN.
MR	Marca Registrada.
m/z.....	Relación masa/carga.
<i>v</i>	Número de onda (cm ⁻¹).
NAA.....	Acido α -naftilacético.
NaOH.....	Hidróxido de sodio.
NSAIDs.....	: Siglas en ingles de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos.
<i>P</i>	Constante de partición octanol/agua de un compuesto.
ρ	Valor de probabilidad en estadística.
pf.....	Punto de fusión.
PGE ₁	Prostaglandina E-1.
PGE ₂	Prostaglandina E-2.
PGF _{1α}	Prostaglandina 1 α .
PGF _{2α}	Prostaglandina F-2 α .
PGI ₂	Prostaglandina I-2.
pH.....	Potencial de Hidrógeno.
pKa.....	Potencial de la constante de acidez.
PM.....	Peso molecular.

POA.....	Acido fenoxiacético.
ppm.....	Partes por millón.
Prob.....	Probabilidad.
PTSA.....	Acido <i>p</i> -toluensulfónico.
π	Diferencia de logs de coeficientes de partición de dos compuestos.
QSAR.....	Estudios de relación estructura-actividad cuantitativa.
r	Coefficiente de regresión.
<i>R</i>	Configuración Absoluta <i>R</i> (<i>rectus</i>).
R.A.....	Reactivo analítico.
R^2	Coefficiente de determinación.
ρ	Constante de reacciones de Hammett.
R_f	Coefficiente de migración diferencial.
RMN.....	Resonancia Magnética Nuclear.
RNA.....	Acido ribonucleico.
<i>s</i>	Señal simple en RMN.
<i>S</i>	Configuración Absoluta <i>S</i> (<i>sinister</i>).
<i>sa</i>	Señal simple amplia en RMN.
<i>sext</i>	Señal séxtuple en RMN.
Soct.....	Solubilidad en octanol.
<i>sp</i>	Especie taxonómica.
<i>Sw</i>	Solubilidad acuosa.
σ	Constante de sustituyentes de Hammett.
<i>T</i>	Transmitancia.
<i>t</i>	Señal triple en RMN.
THF.....	Tetrahidrofurano.
TM	Siglas en inglés de marca registrada.
TMS.....	Tetrametilsilano.
TX ₂	Tromboxano 2.
UV.....	Ultravioleta.
<i>x</i>	Variable independiente en un sistema experimental.
<i>X_o</i>	Solubilidad (fracción molar) en octanol.
<i>y</i>	Variable dependiente en un sistema experimental.
<i>z</i>	Variable no controlable en un sistema experimental.

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.

1.1	ALGUNOS EJEMPLOS DE NSAIDs.....	1
2.1	BIOSINTESIS DE PROSTAGLANDINAS.....	4
2.2	ALGUNOS FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES.....	5
2.3	BIOTRANSFORMACION DE ANALOGOS DEL ESTADO DE OXIDACION...	6
2.4	ALGUNOS PROFARMACOS TOPICOS DEL NAPROXENO.....	7
2.5	ESTRUCTURAS DE ALGUNAS AUXINAS.....	9
2.6	UN SISTEMA EXPERIMENTAL.....	13
3.1	DERIVADOS DEL NAPROXENO.....	15
6.1	PICO BASE DEL NAPROXENO.....	20
6.2	FRAGMENTACION DEL NAPROXENATO DE ETILO.....	21
6.3	PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS...	24
6.4	ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO Y MASAS.....	25
6.5	¹ H RMN PARA EL NAPROXENO.....	26
6.6	¹³ C RMN PARA EL NAPROXENO.....	26
6.7	¹ H RMN PARA EL NAPROXENATO DE ETILO.....	27
6.8	¹³ C RMN PARA EL NAPROXENATO DE ETILO.....	27
6.9	¹ H RMN PARA EL NAPROXOL.....	28
6.10	¹³ C RMN PARA EL NAPROXOL.....	28
6.11	¹ H RMN PARA EL ACETATO DE NAPROXILO.....	29
6.12	¹³ C RMN PARA EL ACETATO DE NAPROXILO.....	29
6.13	CODIFICACION PARA LOS DIFERENTES FACTORES CONSIDERADOS.....	30
6.14	DISEÑO FACTORIAL 2 ³	31
6.15	DISEÑOS FACTORIALES CONSTRUIDOS PARA CADA CONCENTRACION..	31
6.16	CODIFICACION DE LOS COMPUESTOS PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION.....	33
6.17	DISEÑO FACTORIAL GENERADO CON LAS CL ₅₀ DE LOS COMPUESTOS..	33
6.18	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ³ PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻³ M, EN <i>Artemia salina</i>	34
6.19	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ³ PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁴ M, EN <i>Artemia salina</i>	35

6.20	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ³ PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁵ M, EN <i>Artemia salina</i>	36
6.21	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ³ PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁶ M, EN <i>Artemia salina</i>	37
6.22	MODELOS Y ANOVA PARA <i>Artemia salina</i>	38
6.23	GRAFICA DE INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA CONFIGURACION.....	40
6.24	GRAFICAS DE INTERPRETACION PARA LAS CUATRO CONCENTRACIONES PROBADAS EN <i>A. salina</i>	41
6.25	RESULTADOS DEL ANALISIS DE REGRESION PROBIT DE LOS COMPUESTOS CONTRA <i>A. salina</i>	42
6.26	INDICES EUDISMICOS CALCULADOS CON BASE EN CL ₅₀ PARA <i>A. salina</i>	43
6.27	RAZON DE ACTIVIDADES ENTRE LOS COMPUESTOS.....	43
6.28	COEFICIENTES DE REGRESION PARA EL DISEÑO FACTORIAL 2 ³ PARA CL ₅₀ EN <i>A. salina</i>	44
6.29	GRAFICA DE INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA ESTERIFICACION.....	44
6.30	GRAFICA DE INTERPRETACION PARA EL DISEÑO FACTORIAL 2 ³ PARA CL ₅₀ EN <i>A. salina</i>	45
6.31	GRAFICA DE KOCT Vs. ILOGC.....	46
6.32	GRAFICA DE PF VS. ILOGC.....	47
6.33	SEMILLAS SELECCIONADAS PARA EL EXPERIMENTO PRELIMINAR DE GERMINACION.....	52
6.34	PARAMETROS DE REGRESION PROBIT PARA NAPROXENO EN LA GERMINACION DE SEMILLAS.....	53
6.35	CODIFICACION DE LOS COMPUESTOS PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION.....	55
6.36	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻² M, EN RABANO, LONGITUD DE RADICULA.....	56
6.37	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻² M, EN RABANO, LONGITUD DE TALLUELO.....	57
6.38	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻³ M, EN RABANO, LONGITUD DE RADICULA.....	58

6.39	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻³ M, EN RABANO, LONGITUD DE TALLUELO.....	59
6.40	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁴ M, EN RABANO, LONGITUD DE RADICULA.....	60
6.41	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁴ M, EN RABANO, LONGITUD DE TALLUELO.....	61
6.42	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁵ M, EN RABANO, LONGITUD DE RADICULA.....	62
6.43	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁵ M, EN RABANO, LONGITUD DE TALLUELO.....	63
6.44	TABLA DE MODELOS Y ANOVA PARA LN RADICULA DE RABANO.....	64
6.45	TABLA DE MODELOS Y ANOVA PARA LN TALLUELO DE RABANO.....	65
6.46	INTERACCION DEL ESTADO DE OXIDACION Y LA ESTERIFICACION.....	68
6.47	INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA ESTERIFICACION.....	68
6.48	GRAFICAS DE INTERPRETACION PARA LN RADICULA DE RABANO.....	69
6.49	GRAFICAS DE INTERPRETACION PARA LN TALLUELO DE RABANO EN LAS CUATRO CONCENTRACIONES PROBADAS.....	70
6.50	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻² M, EN TRIGO, LONGITUD DE RADICULA.....	72
6.51	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻² M, EN TRIGO, LONGITUD DE TALLUELO.....	73
6.52	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻³ M, EN TRIGO, LONGITUD DE RADICULA.....	74
6.53	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻³ M, EN TRIGO, LONGITUD DE TALLUELO.....	75
6.54	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁴ M, EN TRIGO, LONGITUD DE RADICULA.....	76
6.55	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁴ M, EN TRIGO, LONGITUD DE TALLUELO.....	77
6.56	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁵ M, EN TRIGO, LONGITUD DE RADICULA.....	78

6.57	RESULTADOS DEL FACTORIAL 2 ² PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁵ M, EN TRIGO, LONGITUD DE TALLUELO.....	79
6.58	TABLA DE MODELOS Y ANOVA PARA LN RADICULA DE TRIGO.....	80
6.59	TABLA DE MODELOS Y ANOVA PARA LN TALLUELO DE TRIGO.....	81
6.60	GRAFICA DE INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA CONFIGURACION ABSOLUTA.....	84
6.61	GRAFICA DE INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA ESTERIFICACION, PARA RADICULA DE TRIGO.....	84
6.62	GRAFICA DE INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA ESTERIFICACION, PARA TALLUELO DE TRIGO.....	85
6.63	GRAFICAS DE INTERPRETACION PARA LN DE RADICULA DE TRIGO, A LAS CUATRO CONCENTRACIONES ESTUDIADAS.....	86
6.64	GRAFICAS DE INTERPRETACION PARA LN TALLUELO DE TRIGO.....	87
6.65	RESULTADOS DEL ANALISIS DE REGRESION PROBIT DE LOS COMPUESTOS EN RADICULA Y TALLUELO DE RABANO.....	88
6.66	RESULTADOS DEL ANALISIS DE REGRESION PROBIT DE LOS COMPUESTOS EN TALLUELO DE TRIGO.....	88
8.1	COMPOSICION DE LOS SISTEMAS DE ELUCION UTILIZADOS.....	92
8.2	ESPECIES SELECCIONADAS.....	96
11.1	CODIFICACION DE LOS COMPUESTOS PARA LOS ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION.....	144
11.2	GRAFICA DE DUNNETT PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA <i>A. salina</i>	145
11.3	ANOVA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA LA COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS DEL DISEÑO FACTORIAL 2 ³ CON LA MEDIA DEL CONTROL (EN <i>A. salina</i>).....	145
11.4	GRAFICA DE DUNNETT PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA RADICULA DE RABANO.....	146
11.5	GRAFICA DE DUNNETT PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA TALLUELO DE RABANO.....	146
11.6	ANOVA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA LA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS DEL DISEÑO FACTORIAL 2 ³ CON LA MEDIA DEL CONTROL (LN) (PARA RABANO).....	147

11.7	GRAFICA DE DUNNETT PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA RADÍCULA DE TRIGO.....	148
11.8	GRAFICA DE DUNNETT PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA TALLUELO DE TRIGO.....	148
11.9	ANOVA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA LA COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS DEL DISEÑO FACTORIAL 2 ³ CON LA MEDIA DEL CONTROL (LN) (EN TRIGO).....	149
11.10	ANOVA PARA LA EVALUACIÓN ESTADISTICA DEL MODELO DE REGRESION LINEAL MULTIPLE (<i>Artemia salina</i> , Arco Seno [Fracción] ^{1/4})....	150
11.11	ANOVA PARA LA EVALUACION ESTADISTICA DEL MODELO DE REGRESION LINEAL MULTIPLE (Ln de la longitud, rábano).....	150
11.12	ANOVA PARA LA EVALUACION ESTADISTICA DEL MODELO DE REGRESION LINEAL MULTIPLE (Ln de la longitud, trigo).....	150
11.13	EVALUACION ESTADISTICA DE LOS MODELOS PARA LOS DISEÑOS FACTORIALES 2 ³ EN <i>A. salina</i>	151
11.14	EVALUACION ESTADISTICA DE LOS MODELOS PARA LOS DISEÑOS FACTORIALES 2 ³ EN RADÍCULA DE RABANO.....	152
11.15	EVALUACION ESTADISTICA DE LOS MODELOS PARA LOS DISEÑOS FACTORIALES 2 ³ EN TALLUELO DE RABANO.....	152
11.16	EVALUACION ESTADISTICA DE LOS MODELOS PARA LOS DISEÑOS FACTORIALES 2 ³ EN RADÍCULA DE TRIGO.....	153
11.17	EVALUACION ESTADISTICA DE LOS MODELOS PARA LOS DISEÑOS FACTORIALES 2 ³ EN TALLUELO DE TRIGO.....	153
11.18	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2 ³ , ARCO SENO [FRACCION DE ARTEMIAS MUERTAS] ^{1/2} , PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻³ M.....	154
11.19	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2 ³ , ARCO SENO [FRACCION DE ARTEMIAS MUERTAS] ^{1/2} , PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁴ M.....	154
11.20	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2 ³ , ARCO SENO [FRACCION DE ARTEMIAS MUERTAS] ^{1/2} , PARA LA CONCENTRACION 10 ⁻⁵ M.....	155

11.21	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , ARCO SENO [FRACCION DE ARTEMIAS MUERTAS] ^{1/2} , PARA LA CONCENTRACION 10^{-6} M.....	155
11.22	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN RADICULA DE RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-2} M.....	156
11.23	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN RADICULA DE RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-3} M.....	156
11.24	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN RADICULA DE RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-4} M.....	157
11.25	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN RADICULA DE RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-5} M.....	157
11.26	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN TALLUELO DE RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-2} M.....	158
11.27	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN TALLUELO DE RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-3} M.....	158
11.28	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN TALLUELO DE RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-4} M.....	159
11.29	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN TALLUELO DE RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-5} M.....	159
11.30	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN RADICULA DE TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-2} M.....	160
11.31	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN RADICULA DE TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-3} M.....	160
11.32	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN RADICULA DE TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-4} M.....	161
11.33	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN RADICULA DE TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-5} M.....	161
11.34	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN TALLUELO DE TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-2} M.....	162
11.35	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN TALLUELO DE TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-3} M.....	162
11.36	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN TALLUELO DE TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-4} M.....	163

11.37	EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , LN TALLUELO DE TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-5} M.....	163
11.38	GRAFICAS DE EFECTOS PARA LOS MODELOS FACTORIALES DE A. <i>salina</i>	164
11.39	GRAFICAS DE EFECTOS PARA LOS MODELOS FACTORIALES DE LN RADICULA DE RABANO.....	165
11.40	GRAFICAS DE EFECTOS PARA LOS MODELOS FACTORIALES DE LN TALLUELO DE RABANO.....	166
11.41	GRAFICAS DE EFECTOS PARA LOS MODELOS FACTORIALES DE LN RADICULA DE TRIGO.....	167
11.42	GRAFICAS DE EFECTOS PARA LOS MODELOS FACTORIALES DE LN TALLUELO DE TRIGO.....	168
11.43	DATOS UTILIZADOS PARA EL ANALISIS DE RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CUANTITATIVA (QSAR).....	169
11.44	COEFICIENTES ESTIMADOS Y ANOVA PARA EL MODELO $i\text{Log}C = f(\text{koc}t + \text{koc}t^2)$	170
11.45	COEFICIENTES ESTIMADOS Y ANOVA PARA EL MODELO $i\text{Log}C = f(\text{pf})$	170
11.46	COEFICIENTES ESTIMADOS Y ANOVA PARA EL MODELO $i\text{Log}C = f(\text{pf} + \text{koc}t + \text{koc}t^2)$	171
11.47	COEFICIENTES ESTIMADOS Y ANOVA PARA EL MODELO $i\text{Log}C = f(\text{pf} + J_m)$	171
11.48	COEFICIENTES ESTIMADOS Y ANOVA PARA EL MODELO $i\text{Log}C = f(\text{pf} + J_m + J_m^2)$	172
11.49	MATRIZ DE CORRELACION DE ESTIMADOS PARA EL MODELO $i\text{Log}C = f(\text{pf} + \text{koc}t + \text{koc}t^2)$	173
11.50	MATRIZ DE CORRELACION DE ESTIMADOS PARA EL MODELO $i\text{Log}C = f(\text{pf} + J_m)$	173
11.51	MATRIZ DE CORRELACION DE ESTIMADOS PARA EL MODELO $i\text{Log}C = f(\text{pf} + J_m + J_m^2)$	173

LISTA DE ESPECTROS.

1.	IR (KBr). ACIDO <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.....	99
2.	EM (IE). ACIDO <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.....	100
3.	¹ H RMN. ACIDO <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.....	101
4.	¹³ C RMN. ACIDO <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.....	102
5.	HETCOR. ACIDO <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.....	103
6.	IR (KBr). ACIDO <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.....	104
7.	EM (IE). ACIDO <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.....	105
8.	¹ H RMN. ACIDO <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.....	106
9.	¹³ C RMN. ACIDO <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.....	107
10.	HETCOR. ACIDO <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.....	108
11.	IR (KBr). <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.....	109
12.	EM (IE). <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.....	110
13.	¹ H RMN. <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.....	111
14.	¹³ C RMN. <i>S</i> (+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.....	112
15.	HETCOR. <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.....	113
16.	IR (KBr). <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.....	114
17.	EM (IE). <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.....	115
18.	¹ H RMN. <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.....	116
19.	¹³ C RMN. <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.....	117
20.	HETCOR. <i>R</i> (-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.....	118
21.	IR (KBr). <i>S</i> (-)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.....	119
22.	EM (IE). <i>S</i> (-)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.....	120
23.	¹ H RMN. <i>S</i> (-)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.....	121
24.	¹³ C RMN. <i>S</i> (-)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.....	122
25.	HETCOR. <i>S</i> (-)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.....	123
26.	IR (KBr). <i>R</i> (+)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.....	124
27.	EM (IE). <i>R</i> (+)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.....	125
28.	¹ H RMN. <i>R</i> (+)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.....	126
29.	¹³ C RMN. <i>R</i> (+)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.....	127
30.	HETCOR. <i>R</i> (+)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.....	128
31.	IR (KBr). ACETATO DE <i>S</i> (-)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETILO.....	129
32.	EM (IE). ACETATO DE <i>S</i> (-)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETILO.....	130

33.	¹ H RMN. ACETATO DE <i>S</i> (-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.....	131
34.	¹³ C RMN. ACETATO DE <i>S</i> (-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.....	132
35.	HETCOR. ACETATO DE <i>S</i> (-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.....	133
36.	IR (KBr). ACETATO DE <i>R</i> (+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.....	134
37.	EM (IE). ACETATO DE <i>R</i> (+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.....	135
38.	¹ H RMN. ACETATO DE <i>R</i> (+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.....	136
39.	¹³ C RMN. ACETATO DE <i>R</i> (+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.....	137

AGRADECIMIENTOS.

PAPAS:

Papá, gracias por darme libertad de elección.
Mamá, gracias por predicarme la superación con el ejemplo.

ALEJANDRO E IRMA, LAURA Y JAVIER, JUAN CARLOS Y MARLENÉ:

Gracias por su incondicional apoyo, y su gran compañerismo.

PEPITO Y CARLITOS:

Gracias, día con día me muestran el milagro de la vida.

VERO:

Gracias por tu apoyo y tu solidaridad, en las buenas y en las malas.

HUGO:

Gracias por el árbol, las vitaminas...Y las alas.

MARIO:

Te estaré eternamente agradecida por tu incondicional apoyo, tu entusiasmo y empuje, tus consejos y sobre todo, por tu *FE* en mí.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme esta oportunidad de superación.

A mis profesores, compañeros, amigos, y todos aquéllos que han contribuido a mi crecimiento profesional y personal.

Al CONACYT, por proporcionarme la beca para realizar mis estudios de maestría.

Al subprograma 121, "Formación de profesores", de la UNAM, y especialmente al M. en C. Francisco Hernández Luis.

A las Químicas Maricela Gutiérrez y Graciela Chávez, de la Facultad de Química, por la determinación de rotaciones ópticas e infrarrojo.

Al personal de espectroscopía del Instituto de Química, por la realización de los espectros de masas y resonancia magnética nuclear.

Los sueños son las únicas mentiras que pueden dejar de serlo...

RESUMEN.

En el presente trabajo se describe la aplicación del diseño factorial de experimentos para estudiar los efectos del estado de oxidación, la estereoquímica y la esterificación del naproxeno (Acido *S*-(+)-6-metoxi- α -metil-2-naftalenacético) y de tres derivados del mismo sobre la letalidad de *Artemia salina* y la germinación de *Raphanus sativus* L. y *Triticum vulgare*.

Se sintetizaron tres pares de enantiómeros, el *S* y *R*-naproxenato de etilo (6-metoxi- α -metil-2-naftalenacetato de etilo), el *S* y *R*-naproxol (6-metoxi- β -metil-2-naftalenetanol) y el *S* y *R*-acetato de naproxilo (acetato de 6-metoxi- β -metil-2-naftalenetilo), con el fin de incorporarlos junto con el *S* y *R*-naproxeno en un diseño factorial 2^k .

Se encontró que las actividades de los compuestos en estos sistemas biológicos depende del estado de oxidación y la esterificación, no así de la estereoquímica.

Adicionalmente, pudieron estimarse CL_{50} en *A. salina*, lo que permitió establecer relaciones estructura-actividad con parámetros fisicoquímicos disponibles de los compuestos.

ABSTRACT.

In this dissertation is described the application of factorial design to study the effects of oxidation state, stereochemistry and esterification of naproxen (*S*-(+)-6-methoxy- α -methyl-2-naphthaleneacetic acid) and three derivatives on the letality of *Artemia salina* and the germination of *Raphanus sativus* L. and *Triticum vulgare*.

Three pairs of enantiomers, *S* and *R*-ethyl naproxenate (ethyl 6-methoxy- α -methyl-2-naphthaleneacetate), *S* and *R*-naproxol (6-methoxy- β -methyl-2-naphthalenethanol) and *S* and *R*-naproxyl acetate (6-methoxy- β -methyl-2-naphthalenethyl acetate) were synthesized with the aim of incorporating them, along with *S* and *R*-naproxen into a two-level factorial design.

It was found that the activities of the compounds in these biological systems depend on the oxidation state and esterification, but not on the stereochemistry.

Additionally, LC₅₀ on *A. salina* could be estimated, which allowed the establishment of structure-activity relationships with available physicochemical parameters of the compounds.

1. INTRODUCCION.

Los ácidos arilpropiónicos son compuestos pertenecientes a la familia de los Analgésicos Antiinflamatorios No Esteroidales (*NSAIDs*, por sus siglas en inglés), un grupo relativamente heterogéneo de sustancias que han sido comúnmente usadas en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de curso crónico, como lo son la artritis reumatoidea, la espondilitis anquilosante y la osteoartritis (Goodman, L.S., y Gilman, A., 1970). El primer compuesto de este grupo reconocido por sus propiedades terapéuticas es el ácido salicílico, compuesto de origen natural encontrado en la corteza del sauce (*Salix alba*). A él han seguido moléculas como la aspirina, el acetaminofen, el naproxeno y el ibuprofeno (figura 1.1). Estos dos últimos contienen en sí la estructura de ácido arilpropiónico, y poseen la ventaja de ser muy potentes, aunque, como la aspirina, provocan lesiones en el tracto gastrointestinal que pueden variar desde irritaciones ligeras hasta úlceras gástricas, además de alterar la función plaquetaria y consecuentemente el tiempo de sangrado y coagulación, entre otros efectos secundarios (Adams, R.G., 1969; Cavallini, L. y Lucchetti, G., 1975).

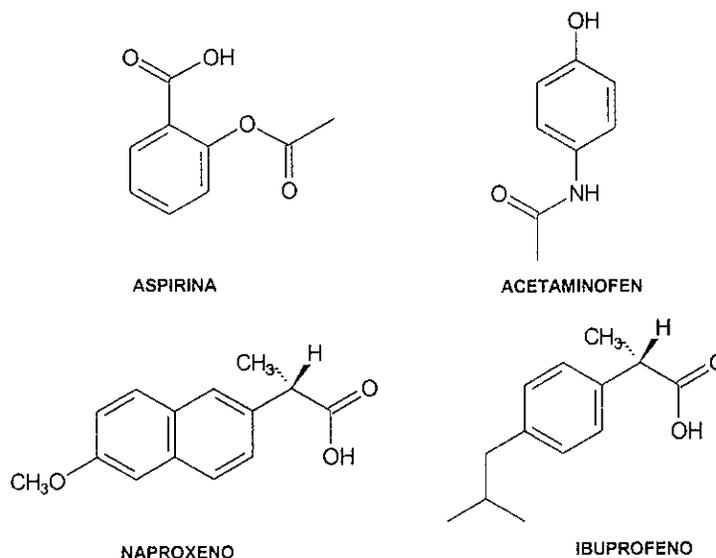


FIGURA 1.1 ALGUNOS EJEMPLOS DE NSAIDs.

El mecanismo de acción en que se basa la actividad terapéutica de los NSAIDs consiste en bloquear el metabolismo de el ácido araquidónico mediante la inhibición de la enzima Ciclooxygenasa (E.C. 1.14.99.1, también conocida como Prostaglandina Sintetasa), deteniendo de esta manera la producción de prostaglandinas, sustancias endógenas que intervienen en procesos piréticos, inflamatorios y de dolor (Lecomte, M., 1994). Otros posibles mecanismos incluyen modulación funcional de las células T, inhibición de la quimiotaxis de las células inflamatorias, estabilización de membranas lisosomales y disminución de la

liberación de los radicales superóxido (Rabasseda, X., Mealy, N., y Castañer, J., 1995).

Tanto el naproxeno como el ibuprofeno son de naturaleza quiral, siendo el enantiómero *S* el antipodo farmacológicamente activo. Actualmente sólo se tiene disponibilidad comercial del naproxeno como fármaco quiral, ya que el ibuprofeno se expende como mezcla racémica. Además, existen evidencias de la hepatotoxicidad del enantiómero *R* del naproxeno y el ibuprofeno (Caron, G., 1994).

Los efectos secundarios gastrointestinales de los NSAIDs se deben mayormente a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, especialmente la PGE₂ y PGI₂, que entre otras funciones inducen a la secreción de moco protector en el estómago. Por otro lado, la inhibición del TX₂ ocasiona el aumento en la duración del sangrado, que puede derivar en anemia.

Una estrategia utilizada para disminuir e incluso abatir estas reacciones secundarias adversas ha sido el uso de profármacos, sustancias donde se pretende optimizar las propiedades farmacéuticas y fisicoquímicas de los principios activos originales, por medio de la generación de moléculas con características modificadas, que a través de reacciones que sufran dentro del organismo generen a la molécula original. Los profármacos se dividen en dos grandes grupos, que son los derivados bioreversibles y los bioprecusores. Se han propuesto en referencias anteriores algunos ésteres y análogos del estado de oxidación del naproxeno como profármacos del mismo (Kasting, G.B., 1992).

Para que el diseño de los profármacos sea válido como una estrategia para modificar ciertas propiedades indeseables de la molécula original, éste debe contemplar rutas sintéticas sencillas y económicas, debe existir en las moléculas algún grupo funcional susceptible a sufrir reacciones de reducción, oxidación, o hidrólisis. Una consideración adicional sería el que estos profármacos no presenten actividad intrínseca diferente de la de el compuesto original, y por lo tanto no posean una probable toxicidad.

Así, resulta conveniente realizar una evaluación preliminar de actividad y/o toxicidad en modelos alternativos al uso de animales, de manera que se puedan generar datos que permitan establecer una relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR) de los compuestos. La información derivada de estos estudios será útil para proponer el diseño de nuevos profármacos con mejores características de solubilidad y menores efectos tóxicos.

2. ANTECEDENTES.

2.1 LA REACCION INFLAMATORIA.

El fenómeno de inflamación representa la respuesta normal al daño tisular. Este daño puede ser originado por lesiones de traumatismo mecánico, radiación, lesión química, infecciones, y, finalmente, lesiones de tipo antígeno-anticuerpo, que constituyen el factor causal más importante de procesos de tipo crónico. Las reacciones inflamatorias se dividen en dos tipos principales: agudas y crónicas; sin embargo, ambas dependen de respuestas celulares y humorales reguladas, entre las cuales se encuentran la acción de los leucocitos polimorfonucleares y linfocitos, y la producción de proteínas (inmunoglobulinas), eicosanoides, interleucinas y citocinas.

Los signos clásicos de una reacción inflamatoria aguda son *calor, rubor, dolor, tumor y pérdida de la función*. Inmediatamente después de la lesión inicial recibida por el tejido aparece una vasodilatación local, con incremento de riego sanguíneo, que ocasiona enrojecimiento (*rubor*) y aumento de la temperatura (*calor*). Los mediadores de la dilatación incluyen la histamina, las cininas y las prostaglandinas. El incremento de la presión capilar provocado por la vasodilatación incrementa el paso de líquido desde el plasma hacia los tejidos (*tumor*). El *dolor* puede depender de estimulación de terminaciones nerviosas sensitivas por sustancias como histamina, serotonina, cininas, etc., y empeora con el movimiento de la región inflamada siendo la causa principal de la pérdida de la función. La presencia de prostaglandinas disminuye el umbral de las terminaciones sensoriales para las sustancias dolorígenas (Bowman, W., y Rand, M.J., 1985).

Cuando el estímulo inicial de una reacción inflamatoria no se elimina, entonces el proceso se convierte en crónico. Este estado se ve en trastornos como la silicosis, la tuberculosis y las enfermedades de tipo autoinmune como son la artritis reumatoidea y la fiebre reumática.

Entre las sustancias mediadoras de la inflamación, la función de las prostaglandinas es de importancia en este contexto, y se tratará a continuación. Las prostaglandinas, al igual que los leucotrienos y los tromboxanos, pertenecen al grupo de los eicosanoides, y se sintetizan en los tejidos a partir de ácidos insaturados de cadena larga liberados por acción de enzimas lisosómicas, en particular la fosfolipasa A. En la figura 2.1 se muestran las principales etapas de la conversión del ácido araquidónico (5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico) a PGE₂ y PGF_{2α}, donde los pasos A, B y C están catalizados por la enzima Ciclooxygenasa (E.C.1.14.99.1, también conocida como Prostaglandina Sintetasa).

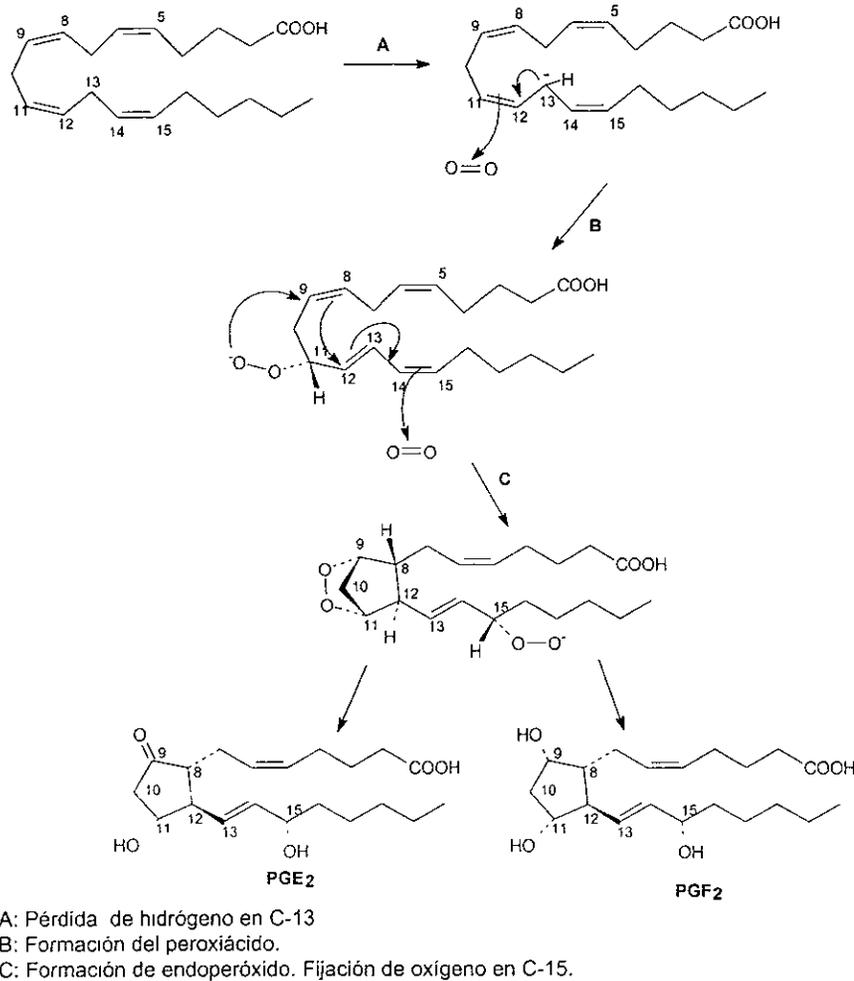


FIGURA 2.1 BIOSINTESIS DE PROSTAGLANDINAS.

2.2 LOS FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (NSAIDs).

El papel de las prostaglandinas en los procesos inflamatorios ha adquirido considerable importancia a partir del descubrimiento de que ciertos fármacos utilizados como antiinflamatorios inhiben su síntesis (Vane, J.R., 1971). Antes de esto, se había identificado PGE₂ en el exudado de inflamaciones provocadas por carragenina en ratas, y una mezcla de prostaglandinas E₁, E₂, F_{1α} y F_{2α} en zonas de eczema alérgica en el hombre (Bowman, W.C., y Land, M.J., 1985).

Estos fármacos, conocidos como antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs, por sus siglas en inglés) bloquean el metabolismo del ácido araquidónico mediante la inhibición de la enzima Ciclooxygenasa (E.C.1.14.99.1). Otros mecanismos posibles de acción de estos agentes incluyen modulación de la función de las células T, inhibición de la quimiotaxis, estabilización de las membranas liposomales y disminución de la liberación de radicales superóxidos,

o bien eliminación de los mismos en el sitio de la inflamación (Gallin, J.I., Goldstein, y I.M., Synderman, R., 1988; Abramson, S., 1985; Parke, A.L., Ioannides, C., Lewis, D.F.V., y Parke, D.V., 1991).

Entre los NSAIDs se encuentra una gran diversidad de compuestos, de los cuales el prototipo es el ácido acetilsalicílico, los derivados del ácido antranílico (como el alclofenaco), la familia de las pirazolonas (como la dipirona) y la familia de los ácidos arilpropiónicos (como el ibuprofeno y el *naproxeno*), siendo estos últimos fármacos quirales cuyo enantiómero *S* es la especie farmacológicamente activa, existiendo evidencia de la hepatotoxicidad de los isómeros *R* (Caron, G., Tseng, G.W., y Kazlauskas, R.J., 1994). (figura 2.2).

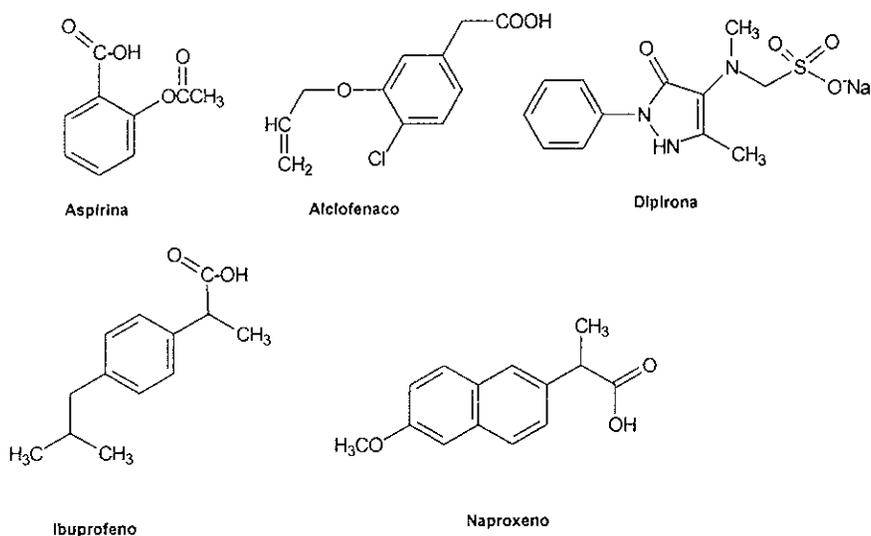


FIGURA 2.2 ALGUNOS FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES.

Estos fármacos, sin embargo, provocan una serie de efectos secundarios, entre los que se encuentran lesiones gastrointestinales (Rainsford, K.D., y Whitehouse, M.W., 1976), nefrotoxicidad (Shelley, J. H., 1978), hepatotoxicidad (Zimmerman, H.J., 1978) y reacciones alérgicas; estos efectos están relacionados directamente con el mecanismo de acción de los NSAIDs, ya que todos los compuestos de este tipo disponibles a la fecha inhiben tanto la COX-1 (ciclooxigenasa constitutiva de los tejidos, asociada con las funciones normales protectoras de las prostaglandinas) como la COX-2 (isozima asociada con los procesos inflamatorios patológicos) (Griswold, D.E. y Adams, J.L., 1996; Kurumbail, R.G., Stevens A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C. y Stallings W.C., 1996; Needleman, P., e Isakson, P.C., 1998). Un agravante lo constituye el hecho de que estos fármacos son usados con gran frecuencia, en algunas ocasiones en forma crónica, y de que muchos de ellos se expenden sin necesidad de receta médica, aumentándose el riesgo de intoxicación, ya sea por sobredosificación o

por interacción con otros fármacos. Así, se ha prohibido la prescripción de más de un NSAID en combinación (Rubin A., 1973; PLM, 1996), o acompañados de antiácidos, anticoagulantes de la familia de las cumarinas, de metotrexato o de ciclosporina, por mencionar algunos ejemplos (Stockley, I., 1981; Miles, S.M., 1996).

2.3 ESTRATEGIAS PARA DISMINUIR EFECTOS ADVERSOS DE LOS NSAIDS.

Una manera de disminuir estas reacciones secundarias adversas ha sido el uso de profármacos, sustancias donde se enmascara algún grupo funcional, en este caso el carboxilo de los derivados del ácido arilpropiónico. La mayoría de los investigadores coinciden en que estas reacciones son el resultado de dos mecanismos: El contacto directo de los tejidos (mayormente gastrointestinales) con el grupo carboxílico, y la inhibición, ya sea local o sistémica, de la síntesis de prostaglandinas. Entre los profármacos se encuentran los llamados *Derivados Bioreversibles*, como podrían ser ésteres o amidas de los correspondientes ácidos, que al llegar al organismo son biotransformados a las moléculas originales por la acción de esterasas plasmáticas y tisulares (Bundgaard, H., y Nielsen, N.M., 1989; Shanbag, V.R., Crider, A.M., Gokhale, R., Harpalani, A., y Dick, R.M., 1992).

Otro tipo de profármacos se denominan *Bioprecursores*. Entre éstos se cuentan los análogos del estado de oxidación, teniendo como ejemplo a los correspondientes alcoholes y aldehídos de los ácidos arilpropiónicos, los cuales, por medio de las correspondientes reacciones metabólicas, en este caso, de oxidación, son susceptibles de transformarse en las moléculas terapéuticamente activas (figura 2.3).

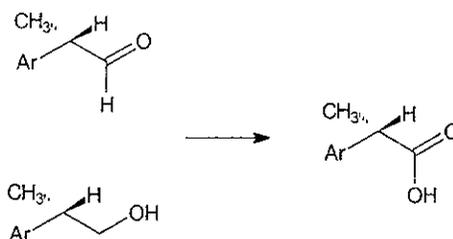
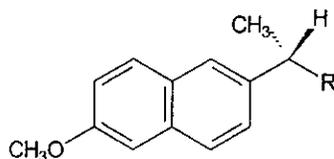


FIGURA 2.3 BIOTRANSFORMACION DE ANALOGOS DEL ESTADO DE OXIDACION.

Particularmente, estos bioprecursores al igual que algunos derivados bioreversibles han sido propuestos como profármacos del naproxeno y el ibuprofeno de aplicación tópica (Kasting, G.B., Smith, R.L., y Anderson, B.D., 1992), y como profármacos orales con menor toxicidad gastrointestinal (Shanbag, V.R., *et al*, 1992; Wallace, J.L., Reuter, B., Cicala, C., McKnight, W., Grisham, M.B., y Cirino, G., 1994). En la tabla 2.4 se muestran algunos de estos compuestos, que han sido utilizados en bioensayos de penetración en piel de cadáveres humanos.

TABLA 2.4 ALGUNOS PROFARMACOS TOPICOS DEL NAPROXENO.



R	
Esteres	COO-Etilo COO-Isopropilo COO-n-Hexilo
Análogos del Estado de Oxidación	CH ₂ OH CHO
Esteres Reversos	CH ₂ O-Acetato CH ₂ O-2-Metilbutirato

La estrategia seguida por estos investigadores fue la siguiente: La preparación de derivados bioreversibles con liposolubilidad maximizada y un mínimo incremento en el tamaño molecular, a través de la conversión de grupos funcionales polares a formas menos polares, o bien a través de la adición de cadenas flexibles que transformaran la cristalinidad de los fármacos originales. Además de esta referencia, la actividad de los compuestos anteriores ha sido escasamente reportada.

2.4 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD FARMACOLOGICA Y TOXICOLOGICA EN MODELOS ALTERNATIVOS AL USO DE ANIMALES.

Un requisito reglamentario para la aceptación clínica de nuevos fármacos y sus derivados es un ensayo exhaustivo de su actividad y toxicidad. El estudio de actividad farmacológica y toxicológica en condiciones controladas en humanos es costoso y puede poner en riesgo la salud de los voluntarios, por lo que generalmente se recurre a modelos con especies animales (Botting, J.H. y Morrison, A.R., 1997). Los ensayos de toxicidad en especies de mamíferos no sólo están restringidos por el costo, la complejidad y duración de los mismos, sino también por el hecho de que se requieren grandes números de animales, lo cual ha sido muy cuestionado por organismos ecologistas y proteccionistas internacionales (Rowan, A.N., 1997; Barnard, N.D., y Kaufman, S.R., 1997).

Los ensayos *in vitro* con cultivos celulares son más rápidos y reproducibles que los ensayos *in vivo*, pero aún así presentan varias desventajas, entre las que

se encuentran una cantidad limitada de fuentes celulares, una tendencia de las células cultivadas a perder su diferenciación, y por lo tanto una aplicabilidad limitada de células indiferenciadas, además de que los cultivos celulares no son adecuados para estudiar efectos a largo plazo.

Los bioensayos de toxicidad preliminar con microorganismos, pequeños crustáceos (como *Artemia salina*) y especies vegetales resultan, pues, una alternativa factible desde el punto de vista económico, ético y práctico.

2.4.1 ESTUDIOS CON ESPECIES VEGETALES. LAS AUXINAS.

Los estudios con especies vegetales ofrecen un bajo costo, condiciones de regulación poco demandantes, un alto grado de reproducibilidad entre bioensayos y una mayor aceptación ética y sociopolítica. Los bioensayos de germinación de semillas, particularmente, permiten una evaluación rápida de los efectos de agentes farmacéuticos o tóxicos sobre el desarrollo de la planta. Varias especies vegetales, entre ellas el berro (*Lepidium sativum*), el rábano (*Raphanus sativus*), la lechuga (*Lactuca sativa*) y el maíz (*Zea mays*), han sido usados para evaluar los efectos toxicológicos de anestésicos y barbituratos (Lowe, K.C., Davey, M.R., Power, J.B., y Clothier, R.H., 1995), siendo los compuestos más liposolubles los que demostraron mayor actividad en el caso de los barbituratos (Kordan, H.K., 1984; Kordan, H.K., 1988; Kordan, H.K., y Rengel, Z., 1988).

Los vegetales responden a una variedad de estímulos externos utilizando hormonas como controladores en sus sistemas estímulo-respuesta. Cuando una semilla germina, el tallo en crecimiento (talluelo) se dirige hacia arriba en busca de luz (fototropismo positivo), y la raíz en crecimiento (radícula) se mueve en dirección contraria, lejos de la luz (geotropismo positivo). Los controladores son ciertas hormonas sintetizadas en la punta de los talluelos (coleoptilos), denominadas *auxinas*, que se difunden hacia la parte no iluminada (radícula), causando elongación de las células y, por lo tanto, un crecimiento vertical de la planta.

En la actualidad, se reconocen cuatro tipos generales de hormonas de las plantas: *Las auxinas, las giberelinas, las citocininas y los inhibidores.*

Auxina es un término genérico que se aplica al grupo de compuestos caracterizados por su capacidad para inducir la extensión de las células de los brotes. Por lo general, estos compuestos son ácidos con un núcleo cíclico insaturado. La auxina más importante es el *ácido β -indolacético (IAA)*, que se forma a partir del triptófano o de la degradación de glucósidos.

Las *antiauxinas* son compuestos que inhiben la acción de las auxinas, compitiendo con ellas por sus receptores. Algunos compuestos, dependiendo de las circunstancias, pueden actuar a la vez como auxinas o como antiauxinas, siendo la *concentración* un factor importante en su acción: Altas concentraciones de algunas auxinas, por ejemplo, inhiben el crecimiento, produciendo deformaciones en hojas, tallos y flores. Estos compuestos pueden ser tanto de origen natural o sintético. Algunos de ellos son usados como herbicidas selectivos (por ejemplo, para interrumpir el crecimiento de plantas dicotiledóneas

en campos que contengan cereales u otras especies monocotiledóneas), en el desarrollo de frutos, defoliación, etc. (Weaver, R.J., 1996).

En la figura 2.5 se muestran algunos ejemplos de auxinas, tanto de origen natural como sintético. Poco después de demostrarse que el IAA era la auxina más abundante en las plantas superiores, Zimmerman y sus colaboradores (Zimmerman, P.W., 1942; Zimmerman, P.W. y Hitchcock, A.E., 1942; Zimmerman, P.W., Hitchcock, A.E., y Wilcoxon, F., 1936) investigaron varios nuevos compuestos sintéticos, entre ellos el ácido α -naftilacético, NAA. Es de relevancia hacer notar que éste y otras estructuras poseen núcleos naftalénicos y resultan muy similares al *naproxeno*.

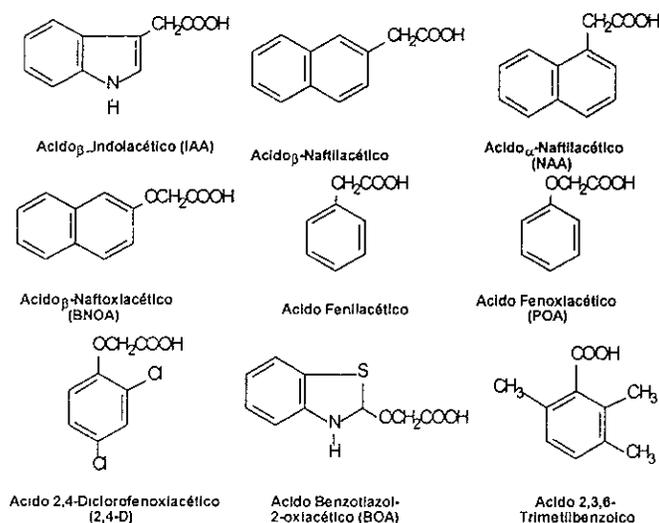


FIGURA 2.5 ESTRUCTURAS DE ALGUNAS AUXINAS.

El mecanismo de acción de las auxinas sobre la expansión celular se desconoce hasta la fecha. Una de las teorías más satisfactorias es la de que las auxinas incrementan la plasticidad de las paredes celulares (Heyn, A.N.J., 1931). Cuando se incrementa la flexibilidad de las paredes, disminuye la presión de ésta alrededor de la célula y la presión de turgencia causada por las fuerzas osmóticas en la savia vacuolar hace que el agua entre a las células, provocando su expansión. La plasticidad es una deformación irreversible de las paredes provocada probablemente por la ruptura de enlaces cruzados entre las microfibrillas de celulosa de las paredes celulares.

Existe además evidencia de que las auxinas, al igual que otras hormonas, influyen sobre la síntesis de proteínas, y sobre la acción de ciertas enzimas. Thimann (1969) sugirió que las auxinas pueden funcionar mediante la activación de un tipo mensajero de RNA, que provoca la síntesis de enzimas específicas. Dichas enzimas generan la inserción de nuevos materiales en las paredes celulares, lo cual da por resultado su expansión.

Las auxinas poseen acciones diferentes a la promoción del crecimiento; se sabe que juegan roles importantes en la división y diferenciación celular, en el desarrollo de los frutos, en la formación de raíces nuevas después del corte de la

planta, y en la caída de las hojas (abscisión). En condiciones experimentales, las auxinas tienden a inhibir el progreso del envejecimiento de vegetales, probablemente debido a su efecto estimulante sobre la síntesis de proteínas.

Adicionalmente, existe el antecedente de que algunos compuestos pertenecientes a los ácidos arilpropiónicos han demostrado tener actividad sobre la germinación de numerosas especies vegetales, al actuar como auxinas (Lehman, P.A., Rodrigues de Miranda, J.F., y Ariëns, E.J., 1976). Ha sido demostrado, además, que existe selectividad en la respuesta de las plantas hacia las dos formas estereoisoméricas de los mismos (Smith, M.S., Wain, R.L., y Wightman, F., 1952; Jönsson, A., 1961; Åberg, B., 1961).

Por otro lado, la actividad del *naproxeno* y sus derivados bioreversibles así como sus posibles bioprecusores en plantas *no* ha sido reportado con anterioridad. De esta manera, la inhibición de germinación de semillas pudiera representar un modelo de bioensayo con el cual se pueden probar de una manera rápida y eficiente numerosos compuestos de la familia de los ácidos arilpropiónicos con el objeto de evaluar preliminarmente su actividad farmacológica y toxicológica.

2.4.2 ESTUDIOS CON *Artemia salina*.

Por otro lado, una de las respuestas biológicas más simples de observar es la letalidad. Como ésta es una respuesta en escala discreta, su tratamiento estadístico es sencillo (Lien, E.J., 1987). Por lo tanto, un método general de monitoreo de toxicidad que no requiera de mucha especialización es esencial en el estudio de compuestos potencialmente activos. Una especie animal que ha sido usada para este propósito es *Artemia salina* que es un crustáceo halofílico perteneciente a la subclase *Branchiopoda*.

Este crustáceo se encuentra en todo el mundo en aguas marinas con un amplio rango de salinidad (10-220 g/L), y sus huevecillos deshidratados se conservan por largos periodos, lo que lo hace un animal fácil de cultivar y estudiar. Los bioensayos de toxicidad se realizan en todas las etapas de crecimiento de la artemia, pero para estudios de concentraciones letales (DL_{50} ó CL_{50}), generalmente se utiliza la larva de estadio II, que se obtiene sumergiendo los huevecillos en agua salada por aproximadamente 48 horas. Estas larvas tienen un color rojizo debido a las reservas de yema, que persiste por 72 horas más, lo que indica que pueden sobrevivir por este tiempo sin necesidad de alimento (Sam, T.W., 1993). Todas estas ventajas hacen de la prueba con artemia un bioensayo con animales *no mamíferos*, simple y efectivo.

El bioensayo con *Artemia salina* ha demostrado ser un método conveniente para evaluar actividad de extractos vegetales y toxinas (Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B. Nichols, D.E., y McLaughlin, J.L., 1982), anestésicos (Robinson, A.B., Manly K.F, Anthony M.P., Catchpool, J.F. y Pauling, L., 1965), y morfínicos (Richter, J., y Goldstein, A., 1970). Se ha evaluado su potencial predictivo para toxicidad aguda en humanos (Calleja, M. y Persoone, G., 1992; Calleja, M., Persoone, G. y Geladi, P., 1993), se ha comparado con bioensayos en

células animales (Lewan, L., Andersson, M., y Morales-Gomez, P., 1992) y se ha tratado de incluir en un modelo de comparación con propiedades físicas de los compuestos estudiados (Calleja, M., Geladi, P., y Persoone, G., 1994). El método de cultivo de este crustáceo es además fácil, rápido, confiable y poco costoso, por lo que constituye una alternativa idónea para evaluación de actividad y toxicidad de una gran diversidad de compuestos.

2.5 LOS ESTUDIOS DE RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD EN LA EVALUACION FARMACOLOGICA DE DERIVADOS DEL NAPROXENO.

Los compuestos orgánicos que comparten características estructurales o funcionales muy probablemente exhiben efectos biológicos similares. Desde los años 60's a la fecha los científicos han tratado de expresar cuantitativamente la relación entre la estructura química y la actividad biológica con el propósito de llevar a cabo el diseño de nuevos fármacos de manera racional, en muchos casos con gran éxito.

Los estudios cuantitativos de relación estructura actividad (*QSAR*, por sus siglas en inglés) han demostrado tener utilidad en la predicción de actividades farmacológicas, con una reducción en el costo y esfuerzo que implica el diseño y la síntesis de fármacos nuevos. Por otro lado, estos estudios han sido usados para propósitos regulatorios, como una parte importante del análisis de evaluación de riesgo (Nendza, m., Volmer, J., y Klein, W., 1990; Coccini, T., Giannoni, L, Karcher, W., Manzo, L., y Roi, R., 1992). Adicionalmente, se han logrado utilizar datos biológicos derivados de bioensayos *in vitro* para estimar DL_{50} 's por medio de prodedimientos QSAR sin necesidad de efectuar estudios en animales (Phillips, J.C., Gibson, W.B., Yam, J., Andrew, C.L., y Hard, G.C., 1990).

Los modelos cuantitativos clásicos para estudiar la relación estructura-actividad pueden clasificarse en dos categorías: La primera incluye modelos matemáticos en los cuales la actividad biológica observada se expresa en función de algunos parámetros asignados a cada sustituyente o grupo de la molécula; los valores de estos parámetros se obtienen generalmente por medio de un modelo de regresión lineal múltiple en el cual se ajustan las actividades observadas experimentalmente. La segunda categoría incluye a los modelos que atribuyen la actividad biológica a las contribuciones de varios parámetros fisicoquímicos de las moléculas, en los cuales las constantes también son obtenidas por medio de análisis de regresión de las moléculas probadas biológicamente.

Ejemplos del primer método se pueden encontrar en los trabajos de Free y Wilson (1964). El segundo método es mejor conocido como el modelo de sustituyentes de Hansch (Hansch, C., y Fujita, T., 1964), o método de ρ - σ - π , cuya ecuación general se muestra a continuación:

$$\log 1/C_x = -a\pi^2 + b\pi + \rho\sigma + c$$

En donde π es la constante que define la diferencia de logaritmos del coeficiente de partición de la molécula derivada y el logaritmo del coeficiente de partición de la molécula prototipo, σ es la constante de Hammett, que representa los efectos electrónicos de sustituyentes, y a , b , ρ y c son constantes estimadas por medio del análisis de regresión.

A pesar de que hoy en día no es frecuente encontrar trabajos que utilicen el método clásico de Hansch para análisis de relaciones estructura-actividad, existen varios ejemplos recientes en los que los procedimientos convencionales de QSAR han demostrado ser piedras angulares en el desarrollo de nuevos compuestos bioactivos, entre ellos el de agentes contra la migraña (Hara, H., Morita, T., Sukamoto, T. y Culter, F.M., 1995), fungicidas azólicos (Chuman, H., Ito, A., Saishoji, T. y Kumazawa, S., 1995), y especialmente *compuestos antiinflamatorios no esteroideos* (Kuchar, M., Maturova, E., Brunova, B., Grimova, J., Tomkova, H. y Holubek, K.J., 1988), que actualmente se encuentran en fase clínica III o en el comercio (Fujita, T., 1996).

De esta manera, la formulación de ecuaciones de correlación con base en bioensayos en plantas y *A. salina* para posibles profármacos del naproxeno constituye una estrategia simple y directa, ya que usualmente estas ecuaciones incluyen solamente un término para la constante de partición y algún otro parámetro fácilmente disponible o determinable por métodos experimentales o matemáticos.

2.6 LA UTILIDAD DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN LOS ESTUDIOS DE ACTIVIDAD Y TOXICIDAD DE COMPUESTOS ORGANICOS.

La experimentación es un método científico de investigación que consiste en hacer operaciones y prácticas destinadas a demostrar, comprobar o descubrir fenómenos o principios básicos, mediante procedimientos *objetivos, adecuados y precisos*. El planeamiento cuidadoso de los experimentos puede dar la información apropiada para el análisis cuantitativo de los factores que afectan una respuesta. Un experimento diseñado es una prueba o serie de pruebas en las cuales se inducen cambios en las variables de entrada de un sistema de manera que sea posible identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida (figura 2.6). Algunas variables de entrada x pueden ser controlables, de manera que la respuesta y pueda ser correlacionable. Entre los objetivos de un experimento pueden incluirse: La determinación de las variables x que tienen mayor influencia en la respuesta y , del mejor valor de las x que influyen en y de modo que ésta última tenga un valor cercano al valor nominal deseado, o bien tenga menor variabilidad.

Para que un experimento se realice en la forma más eficiente, es necesario emplear métodos científicos en su planeación. El *diseño estadístico de experimentos* es el proceso de planear un experimento para obtener datos apropiados, que pueden ser analizados mediante métodos estadísticos, con el objeto de producir conclusiones válidas y objetivas (Montgomery, D.C., 1991). Así,

puede plantearse un diseño que involucre a uno o varios factores x en diferentes niveles de variación de los mismos.

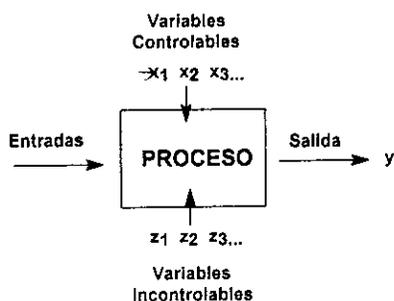


FIGURA 2.6 UN SISTEMA EXPERIMENTAL.

Desde este punto de vista, el diseño de experimentos constituye una herramienta extremadamente útil en el desarrollo de bioensayos de actividad o toxicidad de compuestos potencialmente bioactivos, ya que proporciona condiciones controladas, en las que pueden variarse deliberadamente los factores involucrados en el experimento. Particularmente, en el caso de los estudios QSAR esta metodología es invaluable puesto que proporciona una visión conjunta y general de las variaciones estructurales de las moléculas involucradas en el estudio particular (Lien, E.J., 1987; Hansch, C., 1990).

La metodología estadística es el único enfoque *objetivo* para analizar un problema que involucre datos sujetos a errores experimentales. Existen entonces dos aspectos en un problema experimental: El diseño del experimento y el análisis estadístico de los datos.

Un procedimiento matemático usado frecuentemente para analizar los datos experimentales obtenidos lo constituye el análisis estadístico de varianza. Para un experimento que involucra un sólo factor, este procedimiento utiliza una prueba de hipótesis en la cual se asume que no existe diferencia entre los promedios de los tratamientos, lo que ayuda a determinar si el factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de respuesta. Para diseños experimentales que involucran más de un factor, se puede realizar una prueba de significación para los factores individuales así como para los efectos de interacción de los mismos. Los diseños multifactoriales son entonces más eficientes en la experimentación, ya que se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada ensayo completo o réplica del experimento.

Al efecto de cada uno de los factores seleccionados se le denomina *efecto principal*. En algunos experimentos puede encontrarse que la diferencia en la respuesta entre los niveles de un factor no es la misma en todos los niveles de los otros factores; es decir, la variable de respuesta encontrada para un factor *depende* del nivel en que se encontraba otro factor. A esto se le conoce como *efecto de interacción*. La ventaja de usar experimentos multifactoriales en bioensayos de actividad biológica estriba entonces en la detección de las interacciones entre los factores, misma que por los procedimientos

convencionales de análisis no se puede realizar, dando lugar probablemente a conclusiones engañosas.

El diseño de experimentos se fundamenta además en el método estadístico de mínimos cuadrados, con el cual se puede construir un modelo probabilístico en el cual se pueda describir la relación entre las variables independientes y la variable dependiente o de respuesta del experimento. En este modelo se indica además si la relación entre variables es lineal o curvilínea (cuadrática, etc.)

Las directrices para llevar a cabo un experimento diseñado son:

1. Comprensión y planteamiento del problema.
2. Elección de factores y niveles.
3. Selección de la variable de respuesta.
4. Elección del diseño experimental.
5. Realización del experimento.
6. Análisis de datos.
7. Conclusiones y recomendaciones.

Durante todo este proceso es necesario tener presente que la experimentación es parte importante del proceso de aprendizaje, en la cual se formulan hipótesis acerca de un sistema, se realizan experimentos para investigar dichas hipótesis, y con base en los resultados se formulan nuevas hipótesis. Esto sugiere que la experimentación es iterativa. Es decir, se suele experimentar secuencialmente, y por lo general se saben las respuestas a estas preguntas a medida que la investigación avanza.

Austel ha introducido un método para diseño de series en QSAR que se basa en el diseño factorial de experimentos, una técnica que minimiza el número de compuestos requerido para investigar el efecto de varios parámetros en la actividad biológica. Este método permite manejar tanto variables fisicoquímicas como topológicas (Hansch, C., 1990).

El diseño factorial de análogos se basa en el diseño factorial de experimentos 2^k , donde k se refiere al número de variaciones en la posición de los sustituyentes de las moléculas, o bien al número de variaciones estructurales. Los descriptores son expresados usualmente como variables nominales (sí/no, +/-, nivel superior/inferior), y la prueba es diseñada de tal manera que cada combinación ocurre una vez en la serie.

Este método ha sido aplicado al diseño de series de analgésicos (Austel, V., 1982), cardiotónicos (Austel, V., 1983), agentes *antiinflamatorios* (Austel, V., 1982) y *analgésicos/antipiréticos* (Gomez-Parra, V., Sanchez, F. y Yague, C., 1986).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Dado que los efectos del naproxeno y de sus derivados no han sido reportados para bioensayos en *A. salina* y en sistemas vegetales, se plantea el problema de determinar y donde sea posible cuantificar los efectos de variar el estado de oxidación, la esterequímica y la lipofilia de la molécula modelo de naproxeno.

Con base en estos antecedentes, se decidió hacer la síntesis de tres derivados del naproxeno (ácido *S*-(+)-6-Metoxi- α -metil-2-naftalenacético), en ambas configuraciones, *R* y *S*, con el fin de incorporarlos en un diseño factorial de experimentos, a través de bioensayos en *A. salina* y germinación de semillas vegetales, que permita establecer una relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR) de los compuestos en sus respectivas configuraciones, además de una evaluación preliminar de su actividad en estos sistemas experimentales. Estos derivados han sido preparados anteriormente y propuestos como posibles profármacos tópicos del naproxeno con el fin de mejorar la liposolubilidad y disminuir la irritabilidad de la molécula original (Kasting, G.B., *et al*, 1992).

Estos tres pares de compuestos son:

- *S* y *R*-naproxenato de etilo (*S*, *R*-6-metoxi- α -metil-2-naftalenacetato de etilo).
- *S* y *R*-naproxol (*S*, *R*-6-metoxi- β -metil-2-naftalenetanol).
- *S* y *R*-acetato de naproxilo (acetato de *S*, *R*-6-metoxi- β -metil-2-naftalenetilo). (Figura 3.1).

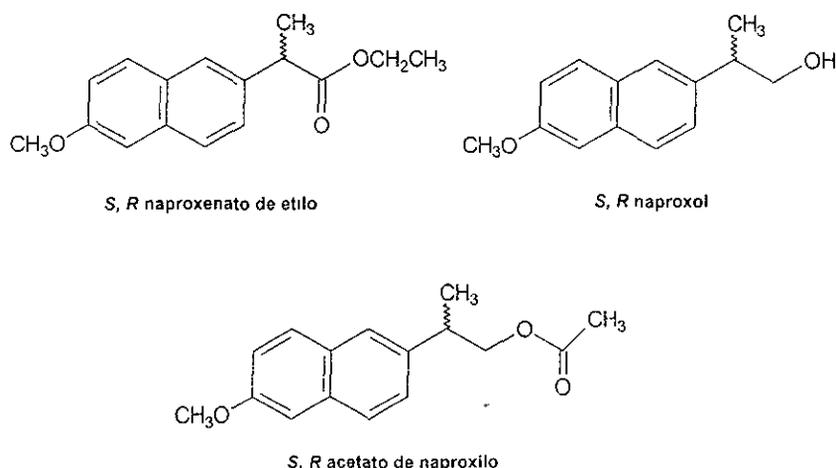


FIGURA 3.1 DERIVADOS DEL NAPROXENO.

El primer compuesto (en su configuración *S*) puede considerarse un derivado bioreversible, ya que constituye un profármaco simple del naproxeno con una mayor lipofilicidad que debe liberarse al ingresar al organismo por medio de hidrólisis con esterasas plasmáticas y tisulares.

El segundo compuesto (en su configuración *S*), al ser un análogo del estado de oxidación se considera un bioprecursor, que para ejercer su efecto requiere sufrir una reacción de oxidación y regenerar al naproxeno *in vivo*.

Por otra parte, el tercer compuesto (en su configuración *S*), al ser un éster inverso del *S*-naproxenato de etilo, puede ser incluido en la clasificación de los pre-profármacos o sistema químicos de liberación ("Soft Drugs", Bodor, N., 1995), lo que aparentemente le proporciona un gran potencial. Este compuesto en teoría necesita primero ser liberado por medio de una hidrólisis y posteriormente sufrir una reacción de oxidación que lo convierta en la molécula original (naproxeno).

4. HIPOTESIS.

Con base en el problema anteriormente planteado, se proponen las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La actividad del naproxeno y sus derivados sobre *A. salina*, expresada como el porcentaje de letalidad, es función de: El estado de oxidación, la estereoquímica y la esterificación de los compuestos.

2. La inhibición de la germinación de semillas monocotiledóneas (trigo, *Triticum vulgare*) y dicotiledóneas (rábano, *Raphanus sativus* L.) es función de: El estado de oxidación, la estereoquímica y la esterificación del naproxeno y sus derivados.

5. OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVOS GENERALES.

1. Aplicación del diseño factorial de experimentos para estudiar la relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR) del naproxeno y de tres de sus derivados, en sus respectivas configuraciones *R* y *S*, con el fin de estudiar los efectos del estado de oxidación, la configuración y la esterificación de los mismos en su actividad biológica, a través de bioensayos con *A. salina* y de germinación de semillas vegetales, tanto en especies monocotiledóneas como dicotiledóneas.

2. Estudio de la factibilidad de emplear los bioensayos en *A. salina* y germinación de semillas vegetales para probar actividad de derivados del naproxeno.

3. Establecer relaciones estructura-actividad biológica basados en las hipótesis derivadas del diseño factorial y métodos clásicos de QSAR.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Síntesis de tres posibles profármacos de aplicación tópica, anteriormente propuestos en la literatura, en sus configuraciones *S* y *R*.

2. Caracterización espectroscópica de los mismos.

3. Diseño de los experimentos factoriales para los bioensayos en *Artemia salina* y especies vegetales.

4. Realización de los experimentos diseñados.

5. Aplicación de métodos estadísticos de los datos obtenidos en los experimentos, con el fin de detectar efectos del estado de oxidación, de la configuración y de la esterificación en la actividad presentada sobre *A. salina* y germinación de semillas.

6. Tratamiento matemático de los datos obtenidos con el objeto de encontrar modelos que expliquen la relación estructura-actividad encontrada para los compuestos probados.

7. Establecimiento de relaciones de estructura-actividad biológica con variables fisicoquímicas disponibles de los compuestos.

TABLA 6.52
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻³ M,
 EN TRIGO, LONGITUD DE RADICULA.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Radícula ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Radícula ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación ° (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	27± 7	-7	3.26±0.25	-0.19	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	35± 10	+1	3.51±0.34	+0.06	96
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	30± 5	-4	3.39±0.17	-0.06	92
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	36± 14	+2	3.53±0.42	+0.07	96
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	35± 14	+1	3.49±0.41	+0.04	96
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	55± 10	+21	3.99±0.18	+0.55	100
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	45± 7	+11	3.79±0.15	+0.34	100
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	25± 11	-9	3.14±0.48	-0.31	96
Control	-	-	-	-	-	34± 13	-	3.45±0.43	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados)

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.

* Diferencia significativa, $p < 0.05$ en la prueba de Dunnett.

TABLA 6.53
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻³ M,
 EN TRIGO, LONGITUD DE TALLUELO.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Talluelo ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Talluelo ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación ^e (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	19± 4	-7	2.94±0.26	-0.31	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	21± 7	-5	2.98±0.40	-0.26	96
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	23± 5	-3	3.12±0.23	-0.12	92
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	23± 6	-3	3.09±0.28	-0.16	96
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	29± 5	+3	3.36±0.18	+0.11	96
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	29± 3	+3	3.38±0.09	+0.13	100
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	28± 2	+2	3.35±0.07	+0.1	100
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	25± 3	-1	3.22±0.12	-0.02	96
Control	- ^f	-	-	-	-	26± 4	-	3.25±0.17	-	99

a. El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b. La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c. La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d. Media ± desviación estándar (N=4 replicados)

e. Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f. No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.

* Diferencia significativa, $p < 0.05$ en la prueba de Dunnett.

TABLA 6.54
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁴ M,
 EN TRIGO, LONGITUD DE RADICULA.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Radícula ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Radícula ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación ° (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	34± 14	0	3.47±0.41	+0.01	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	41± 7	+7	3.71±0.18	+0.25	96
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	22± 12	-12	2.96±0.69	-0.49	88
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	28± 13	-6	3.22±0.53	-0.23	96
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	30± 8	-4	3.36±0.27	-0.09	88
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	35± 16	+1	3.45±0.52	-0.0004	92
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	44± 3	+10	3.77±0.06	+0.32	100
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	33± 19	-1	3.36±0.62	-0.09	100
Control	- ^f	-	-	-	-	34± 13	-	3.45±0.43	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b. La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d. Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e. Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.

TABLA 6.55
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁴ M,
 EN TRIGO, LONGITUD DE TALLUELO.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Talluelo ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Talluelo ^d	Diferencia vs. Control	Porciento de Germinación · (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	26± 4	0	3.26±0.16	+0.01	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	25± 3	-1	3.23±0.12	-0.02	96
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	22± 7	-4	3.06±0.33	-0.19	88
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	28± 3	+2	3.33±0.1	+0.09	96
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	22± 6	-4	3.06±0.26	-0.19	88
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	22± 8	-4	3.04±0.45	-0.21	92
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	28± 2	+2	3.34±0.08	+0.09	100
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	26± 6	0	3.23±0.24	-0.02	100
Control	- ^f	-	-	-	-	26± 4	-	3.25±0.17	-	99

a. El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b. La configuración se expresa como absoluta. La configuración *R*- se consideró el nivel bajo y la *S*- como el nivel alto.

c. La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d. Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e. Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f. No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.

TABLA 6.56
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁵ M,
 EN TRIGO, LONGITUD DE RADICULA.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Radícula ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Radícula ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación e (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	38± 6	+4	3.63±0.16	+0.18	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	40± 18	+6	3.58±0.56	+0.13	92
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	38± 11	+4	3.60±0.28	+0.14	96
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	48± 5	+14	3.88±0.11	+0.42	100
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	37± 19	+3	3.48±0.59	+0.03	92
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	38± 7	+4	3.63±0.2	+0.18	96
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	49± 11	+15	3.88±0.21	+0.43	100
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	33± 13	-1	3.45±0.39	-0.004	88
Control	- ^f	-	-	-	-	34± 13	-	3.45±0.43	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d. Media ± desviación estándar (N=4 replicados)

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.

TABLA 6.57
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁵ M,
 EN TRIGO, LONGITUD DE TALLUELO.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Talluelo ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Talluelo ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación ^e (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	27± 6	+1	3.27±0.22	+0.03	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	27± 2	+1	3.29±0.08	+0.04	92
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	26± 7	0	3.22±0.27	-0.02	96
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	26± 3	0	3.27±0.11	+0.02	100
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	26± 5	0	3.23±0.21	-0.01	92
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	23± 4	-3	3.13±0.20	-0.11	96
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	27± 2	+1	3.30±0.08	+0.06	100
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	25± 2	-1	3.21±0.09	-0.04	88
Control	- ^f	-	-	-	-	26± 4	-	3.25±0.17	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.

ESTA TESIS NO DEBE
 SER PRESTADA
 SIN DE LA BIBLIOTECA

TABLA 6.58
 TABLA DE MODELOS Y ANOVA PARA LN RADICULA
 TRIGO.

FACTOR	10 ⁻² M COEFICIENTES	10 ⁻³ M COEFICIENTES	10 ⁻⁴ M COEFICIENTES	10 ⁻⁵ M COEFICIENTES	TODAS LAS CONCENTRACIONES
[C] ^a	-	-	-	-	-0.1126*
A: Edo. de Oxidación	0.1456*	0.0317	0.0213	-0.0071	0.4787
B: Configuración	0.0412	-0.0501	-0.0839	0.0597	-0.0083
C: Esterificación	0.1505*	0.0932	0.0742	-0.0306	0.7183*
AB	-0.0878	-0.1603*	-0.0614	-0.0307	-0.8508*
AC	0.1963*	-0.0673	-0.1021	-0.0637	-0.0092
BC	-0.0310	-0.0863	0.1647	-0.0055	0.0105
ABC	0.026883	-0.1307*	-0.0649	-0.1144	-0.0708*
Constante	3.2317	3.5147	3.4134	3.6407	3.0561
R ² Ajustada	0.38	0.31	0.06	-0.04	0.1369
F	3.76	2.96	1.26	0.81	3.5183
p	0.0069	0.0218	0.3109	0.5847	0.0011

a: Las concentraciones fueron expresadas como el inverso negativo del logaritmo de la concentración molar.

* Significativa ($\alpha = 005$)

TABLA 6.59
 TABLA DE MODELOS Y ANOVA PARA LN TALLUELO
 TRIGO.

FACTOR	10 ⁻² M COEFICIENTES	10 ⁻³ M COEFICIENTES	10 ⁻⁴ M COEFICIENTES	10 ⁻⁵ M COEFICIENTES	TODAS LAS CONCENTRACIONES
[C] ^a	-	-	-	-	-0.0921*
A: Edo. de Oxidación	0.0829*	-0.0111	0.0135	-0.0173	0.0170
B: Configuración	-0.0069	0.0144	0.0480	0.0102	0.0164
C: Esterificación	0.1123*	0.1471	-0.0264	-0.0222	0.0527*
AB	0.0029	-0.2836	0.0263	0.0049	0.0014
AC	0.1045*	-0.0149	-0.0463	-0.0323	0.0027
BC	-0.0499	-0.0564	0.0709	0.0265	-0.0022
ABC	0.0285	-0.0068	-0.0501	-0.0036	-0.0080
Constante	2.9386	3.1805	3.1932	3.2412	2.8162
R² Ajustada	0.31	0.23	0.00	-0.16	0.14622
F	2.96	2.29	0.99	0.40	3.719
p	0.0219	0.0618	0.4623	0.8946	0.0007

a: Las concentraciones fueron expresadas como el inverso negativo del logaritmo de la concentración molar.

* Significativa ($\alpha = 0.05$)

6.2.2.5 TRIGO (*Triticum vulgare*).

A. ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION.

Las tablas 6.50-6.57 muestran los resultados de cada uno de los factoriales. Se indican los compuestos que de acuerdo con la prueba de Dunnett resultaron diferentes con respecto del tratamiento control. En el caso de radícula de trigo, puede observarse que todos los compuestos estudiados aparentemente se comportan biológicamente como el control; es decir, no se aprecia actividad apreciable, ya sea inhibitoria o estimuladora del crecimiento. Esto podría indicar una diferencia en sensibilidad diferencial a los compuestos entre especies vegetales diferentes, como se esperaría en el caso de las monocotiledóneas, que naturalmente son mucho menos sensibles a la acción de las auxinas. Por otro lado, el *S*(+)-naproxenato de etilo a la concentración 10^{-3} M falló marginalmente el test de significación de Dunnett para estimulación de crecimiento. Esto es muy interesante, porque podría significar que estos compuestos verdaderamente funcionan como auxinas, siendo que estas sustancias se caracterizan por inhibir el crecimiento radicular a concentraciones mayores, mientras que estimulan el crecimiento a concentraciones menores. Sin embargo, para poder llegar a una conclusión válida se requeriría un mayor número de repeticiones en el experimento.

Al analizar las tablas para ln de talluelo de trigo, se puede observar que en este caso hubo varios compuestos que demostraron tener diferencias significativas al compararlos con el control, los cuales son el *S*(+)-naproxeno, el *R*(-)-naproxeno, el *R*(+)-naproxol y el *S*(-)-acetato de naproxilo.

B. ANALISIS DE VARIANZA DEL MODELO COMPLETO (REGRESION LINEAL MULTIPLE) Y LOS MODELOS INDIVIDUALES PARA RADICULA Y TALLUELO DE TRIGO.

Las tablas 6.58 y 6.59 muestran los datos obtenidos de la evaluación estadística y comparativos de los modelos para cada una de las concentraciones utilizadas y para el análisis de regresión múltiple, para las variables de respuesta obtenidas en los experimentos (longitud de radícula y talluelo, expresadas como su logaritmo natural). En estas tablas se observa que para los experimentos con trigo se obtiene un modelo significativo para la concentración 10^{-2} M, únicamente en talluelo. El modelo de ln de talluelo para 10^{-3} M queda en la frontera de la prueba de significación ($p=0.062$), pero debido a que se encuentra muy cercano al nivel fijado ($\alpha=0.05$), puede ser considerado para análisis. Se observa que los efectos de los factores también se difuminan al disminuir la concentración de los compuestos (El coeficiente del inverso de \log_{10} de la concentración es negativo, lo que implica que a una mayor concentración, existe una mayor inhibición del crecimiento). El modelo de regresión lineal múltiple que incluye a los bloques resulta también significativo para ambas variables de respuesta (radícula y talluelo de trigo) y detecta efectos significativos de la concentración ($\log_{10} C$), el factor C (esterificación), la interacción AB (Entre el estado de oxidación y la configuración) y la interacción ternaria (ABC), para

inhibición del crecimiento de radícula, y de la concentración y la esterificación (C) para inhibición de crecimiento de talluelo. El efecto de la concentración resulta significativo según lo esperado. Los efectos de la esterificación (C), la interacción AB (entre el estado de oxidación y la configuración) y la interacción ternaria resultan dignos de consideración porque, como ya se había explicado antes, resultan significativos e independientes de la concentración, y revelan una dependencia compleja de los tres factores para establecer una relación estructura-actividad de los compuestos. Además es importante hacer notar que la configuración resulta un factor involucrado en dos interacciones, que pondría probablemente de manifiesto una diferencia de actividades entre los distintos pares de enantiómeros estudiados.

B.1 EFECTOS DEL ESTADO DE OXIDACION (A).

El efecto del estado de oxidación resultó significativo en los modelos de la concentración 10^{-2} M tanto para radícula como para talluelo de trigo. Los coeficientes para este factor son positivos, lo que indica que los alcoholes resultaron, en este caso, más activos que los ácidos carboxílicos correspondientes.

B.2 EFECTOS DE LA CONFIGURACION (B).

Ningún modelo mostró significación en la configuración, lo que indica una inespecificidad en la actividad de los compuestos sobre radícula o talluelo de trigo.

B.3 EFECTOS DE LA ESTERIFICACION (C).

El efecto de la esterificación resultó significativo para ambos modelos completos (radícula y talluelo), así como para los modelos de la concentración 10^{-2} M para radícula y talluelo.

Los coeficientes para la esterificación son positivos, lo que indica que los compuestos libres son más activos en radícula y talluelo que los compuestos esterificados.

B.4 INTERACCIONES SIGNIFICATIVAS ENTRE FACTORES.

La interacción entre la configuración y el estado de oxidación (AB) resultó significativa en el modelo completo para radícula y en el modelo de la concentración 10^{-3} M, también para radícula. La presencia de esta interacción indica que el efecto de la configuración depende de si los compuestos son

alcoholes (donde la configuración *R* es la más activa) o ácidos (Siendo el enantiómero *S* el de mayor actividad) (figura 6.60).

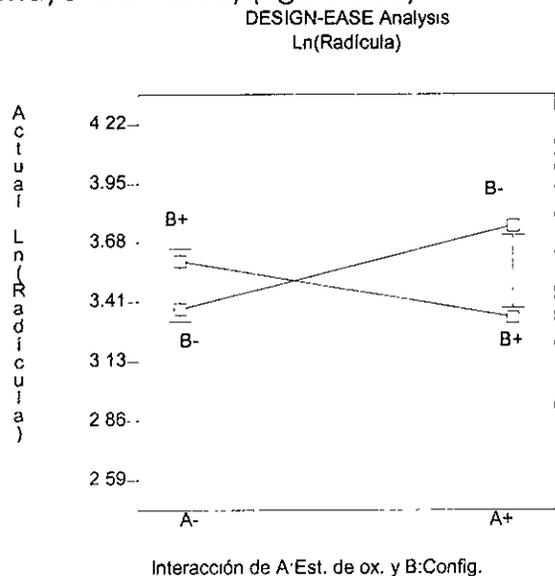


FIGURA 6.60 GRAFICA DE INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA CONFIGURACION ABSOLUTA.

Por otro lado, la interacción entre el estado de oxidación y la esterificación resultó significativa en los modelos de la concentración 10^{-2} M tanto para radícula como para talluelo de trigo. Al igual que lo encontrado anteriormente, existe una dependencia de ambos factores.

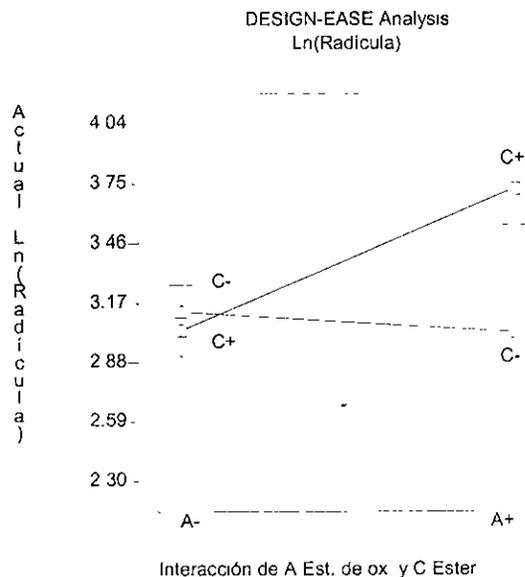


FIGURA 6.61 GRAFICA DE INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA ESTERIFICACION, PARA RADICULA DE TRIGO.

La gráfica de interacción AC para radícula (figura 6.61) indica que los alcoholes libres son ligeramente menos inhibidores que los ésteres correspondientes, mientras que los ácidos carboxílicos son más activos que los ésteres de los mismos.

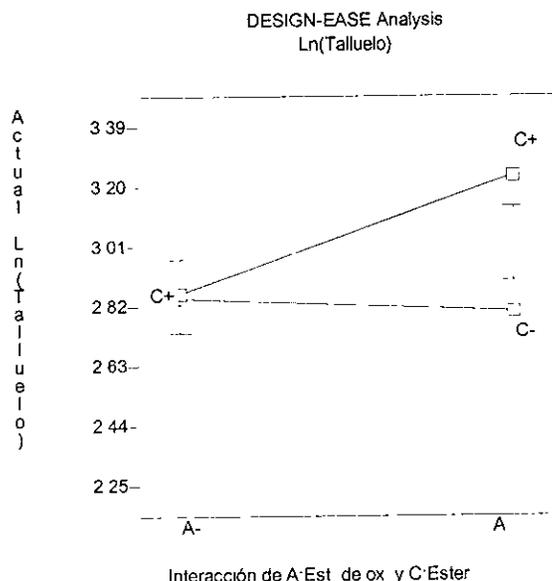


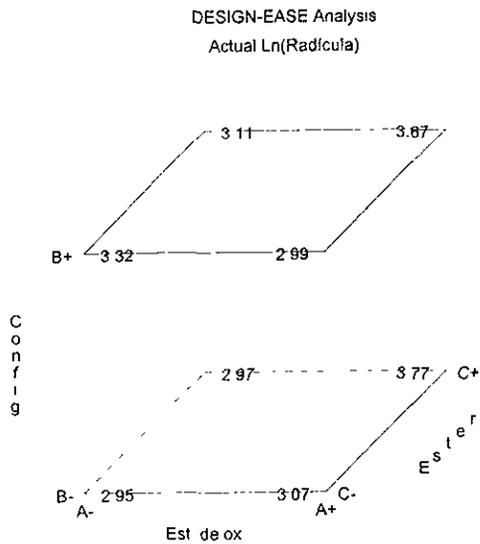
FIGURA 6.62 GRAFICA DE INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA ESTERIFICACION, PARA TALLUELO DE TRIGO.

La figura 6.62 muestra el análisis de la interacción AC para talluelo, que muestra que la esterificación influye sobre la actividad de los compuestos dependiendo si son alcoholes o ácidos, siendo los ésteres de los ácidos carboxílicos menos activos que los ácidos libres, y teniendo los ésteres de alcoholes un comportamiento similar a los alcoholes libres.

Adicionalmente, la interacción ternaria resultó significativa tanto en el modelo completo para radícula como en el modelo de la concentración 10^{-3} M, también para radícula. La interpretación de esta interacción es compleja pero podría significar que hay un requerimiento estructural complejo para actividad biológica sobre radícula y talluelo de trigo.

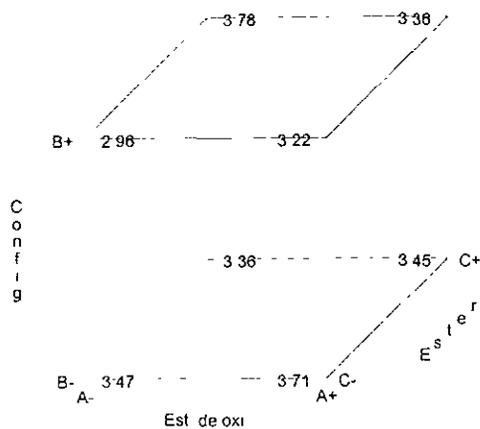
En la figura 6.63 se muestran las gráficas de interpretación para ln de radícula de rábano.

Las gráficas de interpretación para ln talluelo de trigo a las cuatro concentraciones se muestran en la figura 6.64.

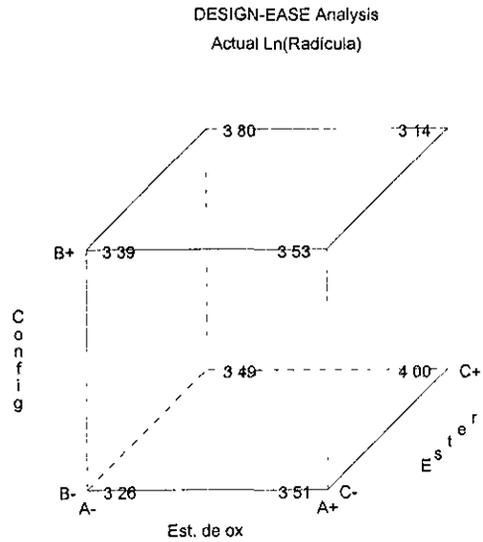


6.63a. Concentración 10^{-2} M

DESIGN-EASE Analysis
Actual Ln(Radicula)

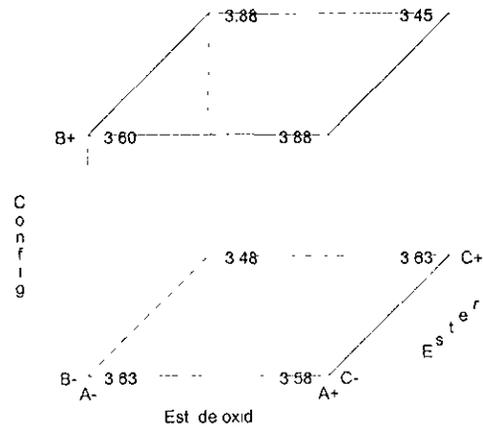


6.63c. Concentración 10^{-4} M



6.63b. Concentración 10^{-3} M

DESIGN-EASE Analysis
Actual Ln(Radicula)



6.63d. Concentración 10^{-5} M

FIGURA 6.63 GRAFICAS DE INTERPRETACION PARA LN DE RADICULA DE TRIGO, A LAS CUATRO CONCENTRACIONES ESTUDIADAS.

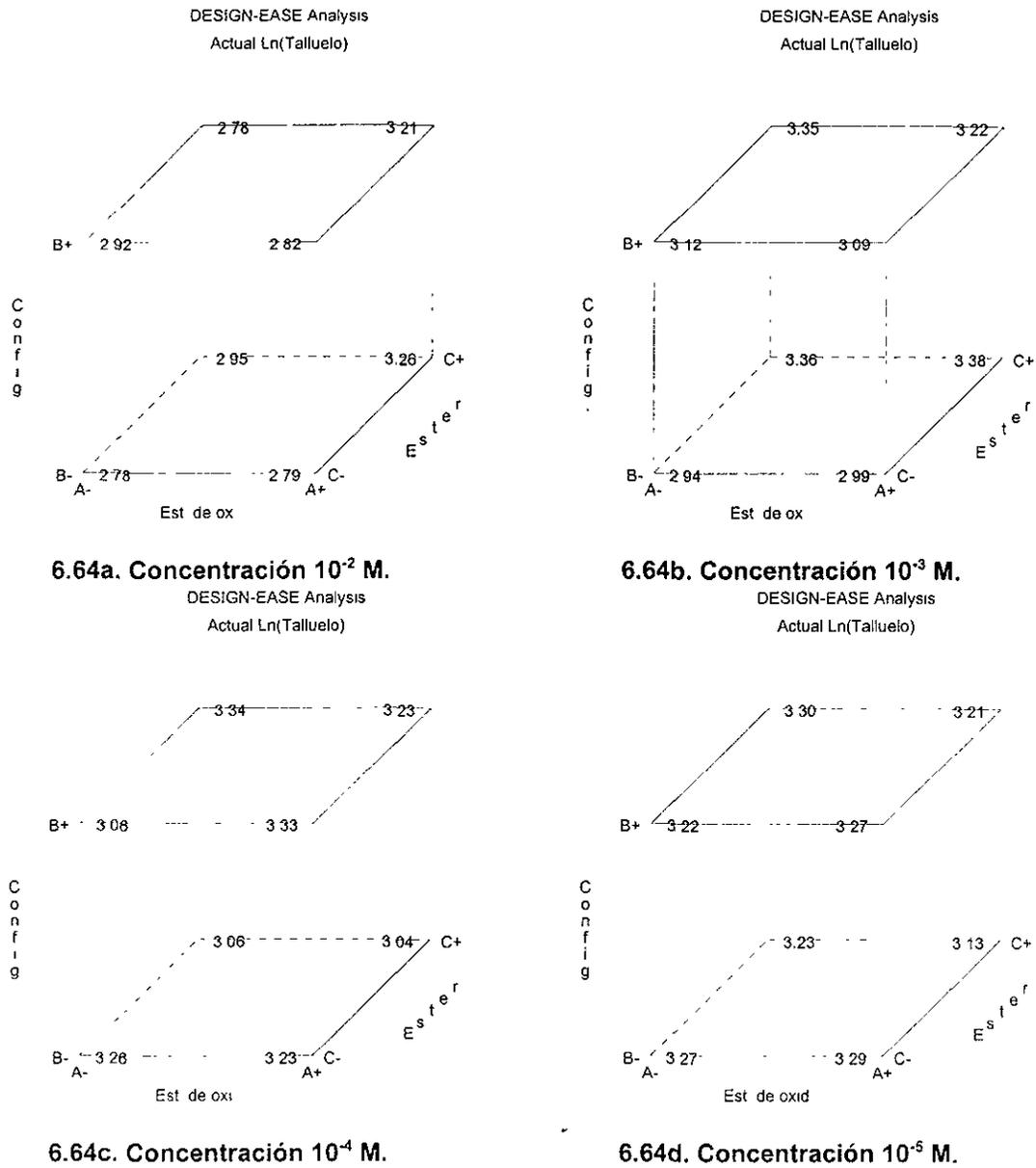


FIGURA 6.64 GRAFICAS DE INTERPRETACION PARA LN TALLUELO DE TRIGO.

6.2.2.6 ESTIMACION DE CE₅₀ DE LOS COMPUESTOS CONTRA RADICULA Y TALLUELO DE RABANO Y TRIGO.

Para estimar las concentraciones efectivas inhibitorias (CE₅₀) de los compuestos sobre la germinación de las dos especies utilizadas, se consideró el 50% del crecimiento promedio de radícula y talluelo en los tratamientos control como punto de referencia. Así, se hizo un conteo de las radículas y talluelos que habían crecido por debajo de esta referencia, para las dos especies, y posteriormente se aplicó la regresión probit a estos datos. Los intervalos de confianza también fueron fijados al 95%. Es importante mencionar que los estimados sólo pudieron realizarse en los compuestos que demostraron tener diferencias estadísticamente significativas con respecto del control en la prueba de Dunnett, y que por lo tanto en el caso de radícula de trigo no se pudo estimar ninguna concentración efectiva. Además, los estimados no son muy confiables puesto que todos resultaron fuera del rango de concentraciones utilizadas en los experimentos. Los resultados se muestran en las tablas 6.65 y 6.66. Debido a la falta de datos significativos de concentraciones efectivas, no se pudo hacer una comparación de actividades de los compuestos, ni cálculo de índices eudísmicos.

TABLA 6.65. RESULTADOS DEL ANALISIS DE REGRESION PROBIT DE LOS COMPUESTOS EN RADICULA Y TALLUELO DE RABANO.

COMPUESTO	CE ₅₀ RADICULA	CE ₅₀ TALLUELO
S-(+)-naproxeno	1.32x10 ⁻² M	2.12x10 ⁻² M
R-(-)-naproxeno	1.76x10 ⁻² M	n.s.
S-(-)-naproxol	n.s.	n.s.
R-(+)-naproxol	n.s.	2.44x10 ⁻² M
S-(+)-naproxenato de etilo	n.s.	n.s.
R-(-)-naproxenato de etilo	n.s.	n.s.
S-(-)-acetato de naproxilo	1.446x10 ⁻² M	n.s.
R-(+)-acetato de naproxilo	n.s.	n.s.

n.s. No significativo.

TABLA 6.66. RESULTADOS DEL ANALISIS DE REGRESION PROBIT DE LOS COMPUESTOS EN TALLUELO DE TRIGO.

COMPUESTO	CE ₅₀ TALLUELO
S-(+)-naproxeno	2.1x10 ⁻² M
R-(-)-naproxeno	3.7x10 ⁻² M
S-(-)-naproxol	n.s.
R-(+)-naproxol	2.44x10 ⁻² M
S-(+)-naproxenato de etilo	n.s.
R-(-)-naproxenato de etilo	n.s.
S-(-)-acetato de naproxilo	1.72x10 ⁻² M
R-(+)-acetato de naproxilo	n.s.

n.s. No significativo.

6. RESULTADOS Y DISCUSION.

6. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1 PARTE QUIMICA.

En la tabla 6.3 se muestran las propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados. Se aprecia consistencia en los valores encontrados de punto de fusión y rotación óptica de los compuestos preparados con respecto a los reportados anteriormente en la literatura (Harrison, I.T., Lewis, B., Nelson, P., Rooks, W., Roszkowski, A., Tomolonis, A. y Fried, J.H., 1970; Bruzzi, G. y Vila Pahí, F. J., 1977; Kasting, G.B., Smith, R.L. y Anderson, B.D., 1992). Las rotaciones ópticas de los pares de enantiómeros poseen valores similares con signos opuestos, lo que indica una conservación de la configuración absoluta de las materias primas a través de las reacciones. Como una manera de establecer un control de calidad de las materias primas utilizadas (en este caso, *S*(+)- y *R*(-)- naproxeno), se determinaron parámetros tanto fisicoquímicos como espectroscópicos de ambos compuestos.

Todas las reacciones se llevaron a cabo de manera sencilla y con buenos rendimientos. Los productos crudos de las reacciones poseían una pureza que permitió su aislamiento por cristalización directa desde el medio de reacción o bien por recristalización simple a partir del disolvente adecuado.

En la tabla 6.4 se muestran las señales de espectroscopía de infrarrojo y masas para los ocho compuestos.

6.1.1 *S*(+)- Y *R*(-)- NAPROXENO.

La espectroscopía de infrarrojo muestra las bandas características para OH del ácido carboxílico ($\approx 3194 \text{ cm}^{-1}$), para carbonilo de ácido (1728 cm^{-1}) y las bandas características para sistemas aromáticos, tanto dentro como fuera del plano (Nakanishi, K., 1962).

Por otro lado, los espectros de masas de ambos compuestos muestran iones de relación m/z 230, que coincide con el peso molecular de los mismos, además de un pico base de relación m/z 185, producido en este caso por una descarboxilación ($M^+ - 45$) (Silverstein, R.M., Bassler, G.C. y Morrill, T.C., 1991) (Figura 6.1).

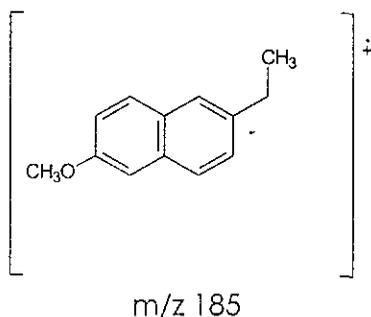


FIGURA 6.1 PICO BASE DEL NAPROXENO.

En las tablas 6.5 y 6.6 se muestran las asignaciones de resonancia magnética nuclear de protón y carbono 13 del *S*(+)- y el *R*(-)-naproxeno.

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (¹H RMN) de ambos enantiómeros muestra una señal amplia en ≈ 9.5 ppm que desaparece por adición de D₂O, correspondiente al protón del grupo carboxilo (H-15). Se aprecian además una señal doble a ≈ 1.5 ppm que integra para tres hidrógenos correspondiente al metilo α al carboxilo (H-13), una señal cuádruple a 3.73 ppm que integra para un protón correspondiente al metino adyacente al carboxilo (H-11), una señal simple en aproximadamente 3.79 ppm que integra para tres protones correspondiente al grupo metoxilo en posición 6- del anillo de naftaleno (H-14), además de las señales características de los protones aromáticos.

El espectro de ¹³C RMN muestra una señal de carbonilo a 180 ppm (C-12), aproximadamente, además de señales a 18 ppm, 45 ppm y 55 ppm, correspondientes al metilo en posición α al carboxilo (C-13), al metino adyacente al carboxilo (C-11), y al metoxilo (C-14), respectivamente, en adición a las señales características de los carbonos del sistema aromático.

6.1.2. *S*(+)- Y *R*(-)-NAPROXENATO DE ETILO.

Para el caso del *S*(+)- y *R*(-)-naproxenato de etilo, el espectro de infrarrojo muestra señales características para carbonilo de éster (1730 cm⁻¹), para estiramiento C-O (1180 cm⁻¹) y las bandas características para sistemas aromáticos.

Los espectros de masas de ambos compuestos muestran iones moleculares de relación m/z 258, además de picos de relación m/z 230 (M⁺-28) y m/z 185, correspondientes a la generación del ácido carboxílico y descarboxilación consecuente.

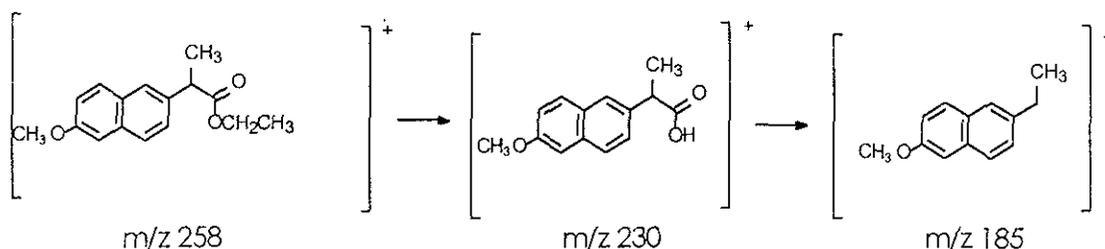


FIGURA 6.2 FRAGMENTACION DEL NAPROXENATO DE ETILO

Además, el espectro ¹H RMN de ambos enantiómeros (tabla 6.7) muestra un sistema ABX₃ conformado por una señal triple en ≈ 1.15 ppm, que integra para tres hidrógenos y que corresponde al metilo del grupo etilo (H-15), y una señal múltiple en 4.125 ppm correspondiente al metileno del grupo etilo (H-14). Existe además una señal doble a ≈ 1.5 ppm que integra para tres hidrógenos correspondiente al metilo α al carbonilo (H-13), una señal cuádruple a ≈ 3.85 ppm

que integra para un protón, correspondiente al metino adyacente al carbonilo (H-11), una señal simple en aproximadamente 3.89 ppm que integra para tres protones correspondiente al grupo metoxilo en posición 6- del anillo de naftaleno (H-16), y las señales características de los protones aromáticos.

El espectro de ^{13}C RMN (tabla 6.8) para estos ésteres muestra una señal de carbonilo a 174.7 ppm (C-12), aproximadamente, además de señales a 14 ppm para el metilo del grupo etilo (C-15), 17.6 ppm para el metilo en posición α al carbonilo (C-13), una señal en 42 ppm del metino adyacente al carboxilo, en 55 ppm, correspondiente al carbono del grupo metoxilo, y en 61 ppm del metileno, adicionalmente a las señales características de los carbonos del sistema aromático.

6.1.3. *S*-(-)- Y *R*-(+)-NAPROXOL.

Las bandas de infrarrojo de importancia son las características para el grupo OH de alcohol en 3370 cm^{-1} , aproximadamente, la banda en 1212 cm^{-1} de estiramiento C-O, además de las bandas características para el sistema aromático.

Los espectros de masas de ambos compuestos muestran iones moleculares de relación m/z 216, cuya pérdida ($M^+ - 31$) forma el pico base en m/z 185 y es indicador de un alcohol.

El espectro ^1H RMN de ambos enantiómeros (tabla 6.9) muestra una señal amplia que corresponde al protón del grupo OH en 1.4 ppm para el antipodo *S* y en 1.8 ppm para el *R* (H-15), una señal doble en 1.34 ppm correspondiente al metilo β al grupo naftilo (H-13), una señal séxtuple en 3.07 ppm, que integra para un protón correspondiente con el metino α al naftilo (H-11), una señal doble en 3.76 ppm que se asigna al metileno α al grupo alcohol (H-12), una señal simple en aproximadamente 3.88 ppm que integra para tres protones correspondiente al grupo metoxilo en posición 6- del anillo de naftaleno (H-14), y las señales características de los protones aromáticos.

El espectro de ^{13}C RMN para los alcoholes (tabla 6.10) muestra señales a 17.46 ppm para el metilo β al naftilo (C-13), en 42 ppm del carbono del grupo metino (C-11), en 55 ppm del metoxilo (C-14), en 68.5 ppm que corresponde al metileno adyacente al grupo alcohol (C-12), además de las señales características de los carbonos del sistema aromático.

6.1.4. *S*-(-)- Y *R*-(+)-ACETATO DE NAPROXILO.

Con respecto a los ésteres de acetato de naproxilo, el espectro de infrarrojo muestra bandas en 1735 cm^{-1} correspondientes al carbonilo del acetato, en 1244.6 cm^{-1} de estiramiento C-O, y las bandas características para el sistema aromático.

Los espectros de masas de ambos compuestos muestran iones moleculares de relación m/z 258, un pico base en m/z 198 ($M^+ - 60$) por pérdida de ácido acético y un pico de importancia en m/z 185.

El espectro ^1H RMN de ambos acetatos (tabla 6.11) muestra una señal doble en 1.38 ppm correspondiente al metilo en posición β al grupo naftilo (H-13), una señal simple en 2 ppm que integra para tres hidrógenos que pertenecen al metilo del grupo acetilo (H-15), un sistema ABX constituido por una señal séxtuple a 3.22 ppm correspondiente al grupo metino (H-11) y una señal múltiple en 4.235 ppm que corresponde al metileno adyacente al oxígeno del éster (H-12), una señal simple en 3.9 ppm del metoxilo en posición 6- del anillo de naftaleno (H-16) y las señales de los protones aromáticos.

El espectro de ^{13}C RMN (tabla 6.12) para los acetatos muestra señales a 18 ppm para el metilo β al naftilo (C-13), a 20 ppm para el metilo del grupo acetilo (C-15), en 38.8 ppm para el metino (C-11), en 55.3 ppm del carbono del grupo metoxilo (C-16), en 69.4 ppm del metileno unido al oxígeno (C-12), y en 171 ppm que corresponde al grupo carbonilo del éster (C-14), además de las señales características de los carbonos del sistema aromático.

TABLA 6.3.
PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS.

COMPUESTO	RENDIMIENTO	PUNTO DE FUSION	Rf	$[\alpha]_D^{25}$ (c. CHCl ₃)	CARACTERISTICAS
S(+)-Naproxeno	-	154-155°C	0.25 ^a 0.35 ^b	+67.25 ^d (0.281)	Polvo blanco
R(-)-Naproxeno	-	154 °C	0.24 ^a 0.36 ^b	-66.82 (0.205)	Polvo blanco
S-(+)-Naproxenato de Etilo	95%	80 °C	0.68 ^a 0.68 ^b	+48.0 (0.125)	Agujas largas blanco-nacaradas
R-(-)-Naproxenato de Etilo	87.5%	79.5 °C	0.69 ^a 0.69 ^b	-49.74 (0.197)	Agujas largas blanco-nacaradas
S-(-)-Naproxol	80%	91 °C	0.35 ^a 0.24 ^b	-17.59 ^e (0.341)	Cristales blanco-nacarados
R-(+)-Naproxol	85%	91-92 °C	0.34 ^a 0.2 ^b	+17.9 (0.162)	Cristales blanco-nacarados
S-(-)-Acetato de Naproxilo	91%	61 °C	0.66 ^a 0.63 ^b	-18.86 (0.265)	Agujas pequeñas blanco-nacaradas
R-(+)-Acetato de Naproxilo	85%	61 °C	0.66 ^a 0.6 ^b	+20.68 (0.29)	Agujas pequeñas blanco-nacaradas

a: Sistema I.

b: Sistema II

c: Concentración en g/100mL.

d: $[\alpha]_D^{25}$ reportado en la literatura, +66.

e: $[\alpha]_D^{25}$ reportado en la literatura, -18.

TABLA 6.4.
ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO Y MASAS.

NOMBRE DEL COMPUESTO	DATOS ESPECTROSCOPICOS
S-(+)-Naproxeno	IR (KBr) ν : 3194 (OH, 52.4% T); 1728 (C=O, 3% T); 1604, 1506, 1452 (δ Arom., 28.5, 67.4, 74.9% T) cm^{-1} . EM (IE) m/z: M ⁺ 230 (66%); 185 (100%).
R-(-)-Naproxeno	IR (KBr) ν : 3192 (OH, 44.1% T); 1728 (C=O, 6% T); 1604, 1506, 1452 (δ Arom., 23.8, 59.7, 66.5% T) cm^{-1} . EM (IE) m/z: M ⁺ 230 (70%); 185 (100%).
S-(+)-Naproxenato de Etilo	IR (KBr) ν : 2980 (Alif., 100.4% T); 1730 (C=O, 93.4% T); 1604, 1450 (δ Arom., 99.9%, 100.7% T); 1180 (C-O, 91.8% T) cm^{-1} . EM (IE) m/z: M ⁺ 258 (25%); 230 (23%); 185 (100%).
R-(-)-Naproxenato de Etilo	IR (KBr) ν : 2980 (Alif., 68.8% T); 1730 (C=O, 11.7% T); 1604, 1504, 1442 (δ Arom., 55.1, 75.2, 70.0% T); 1182 (C-O, 17.8% T) cm^{-1} . EM (IE) m/z: M ⁺ 258 (40%); 185 (100%).
S-(-)-Naproxol	IR (KBr) ν : 3366 (OH, 57.7% T); 1606, 1502, 1462 (δ Arom., 29.8, 72.2, 57.1% T); 1212 (C-O, 24.7% T) cm^{-1} . EM (IE) m/z: M ⁺ 216 (60%); 185 (100%).
R-(+)-Naproxol	IR (KBr) ν : 3372 (OH, 91.8% T); 1604, 1458 (δ Arom., 87.9, 91.7% T); 1212 (C-O, 86.9% T) cm^{-1} . EM (IE) m/z: M ⁺ 216 (35%); 185 (100%).
S-(-)-Acetato de Naproxilo	IR (KBr) ν : 2974.3 (Alif., 70.7% T); 1735.2 (C=O, 34% T); 1605.4, 1500, 1450 (δ Arom., 66, 84, 75.5% T); 1244.6 (C-O, 25.5% T) cm^{-1} . EM (IE) m/z: M ⁺ 258 (47%); 198 (100%); 185 (68%).
R-(+)-Acetato de Naproxilo	IR (KBr) ν : 2974.3 (Alif., 75.7% T); 1735.4 (C=O, 40% T); 1605.6, 1443 (δ Arom., 71, 81% T), 1244.6 (C-O, 25.5% T) cm^{-1} . EM (IE) m/z: M ⁺ 258 (65%); 198 (100%); 185 (86%).

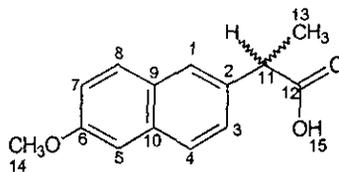


TABLA 6.5 ¹H RMN PARA EL NAPROXENO.

Numeración	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
H-1	7.57	s	-	1H
H-2	-	-	-	-
H-3	7.34	dd	$J_{3,4} = 8.5, J_{3,1} = 2$	1H
H-4	7.57	s	-	1H
H-5	7.002	sa	-	1H
H-6	-	-	-	-
H-7	7.02	d	-	1H
H-8	7.565	m	-	1H
H-9	-	-	-	-
H-10	-	-	-	-
H-11	3.73	c	$J_{11-13} = 7$	1H
H-12	-	-	-	-
H-13	1.47	d	$J_{11-13} = 7$	3H
H-14	3.79	s	-	3H
H-15	~9.4	sa	-	1H

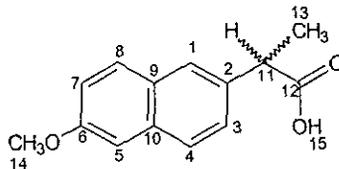
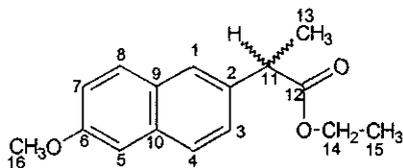
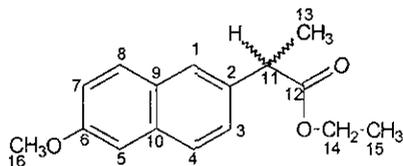


TABLA 6.6 ¹³C RMN PARA EL NAPROXENO.

Numeración	δ (ppm)
C-1	126.13
C-2	134.80
C-3	126.89
C-4	127.19
C-5	118.99
C-6	157.64
C-7	105.52
C-8	128.84
C-9	133.77
C-10	129.26
C-11	45.29
C-12	180.95
C-13	18.39
C-14	55.25

TABLA 6.7 ^1H RMN PARA EL NAPROXENATO DE ETILO.

Numeración	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
H-1	7.68	s	-	1H
H-2	-	-	-	-
H-3	7.405	dd	$J_{3,4}=8.7, J_{3,1}=1.8$	1H
H-4	7.72	s	-	1H
H-5	7.1	s	-	1H
H-6	-	-	-	-
H-7	7.13	dd	$J_{7,8}=9.5, J_{7,5}=2.5$	1H
H-8	7.66	m	-	1H
H-9	-	-	-	-
H-10	-	-	-	-
H-11	3.825	c	$J_{11,13}=7$	1H
H-12	-	-	-	-
H-13	1.56	d	$J_{11,13}=7$	3H
H-14	4.125	ddc	$J_{AX} \cong J_{BX} = 7.3, J_{AB} = 8$	2H
H-15	1.19	t	Porción X, $J=7.3$	3H
H-16	3.91	s	-	3H

TABLA 6.8 ^{13}C RMN PARA EL NAPROXENATO DE ETILO.

Numeración	δ (ppm)
C-1	126.26
C-2	138.77
C-3	125.79
C-4	127.13
C-5	118.8
C-6	157.46
C-7	105.74
C-8	129.06
C-9	133.54
C-10	133.54
C-11	42.34
C-12	174.7
C-13	17.59
C-14	55.26
C-15	14.1
C-16	55.25

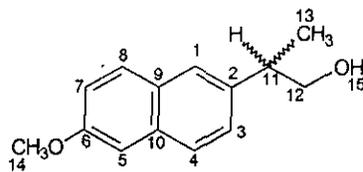


TABLA 6.9 ¹H RMN PARA EL NAPROXOL.

Num.	δ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)	Integración
H-1	7.59	sa	-	1H
H-2	-	-	-	-
H-3	7.35	dd	$J_{3-4} = 8.4, J_{3-1} = 1.7$	1H
H-4	7.71	d	$J_{3-4} = 8.4$	1H
H-5	7.1-7.155	m	-	1H
H-6	-	-	-	-
H-7	7.14	dd	$J_{7-8} = 11, J_{7-5} = 2$	1H
H-8	7.67	d	$J_{7-8} = 8.4$	1H
H-9	-	-	-	-
H-10	-	-	-	-
H-11	3.06	sext.	$J_{11-12} = 7, J_{11-13} = 7$	1H
H-12	3.757	d	$J_{11-12} = 7$	2H
H-13	1.34	d	$J_{11-13} = 7$	3H
H-14	3.89	s	-	3H
H-15	1.8	sa	-	1H

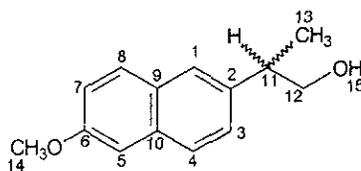


TABLA 6.10 ¹³C RMN PARA EL NAPROXOL.

Num.	δ (ppm)
C-1	125.73
C-2	138.76
C-3	126.24
C-4	127.03
C-5	118.73
C-6	157.29
C-7	105.48
C-8	128.98
C-9	133.4
C-10	133.4
C-11	42.19
C-12	68.41
C-13	17.45
C-14	55.11

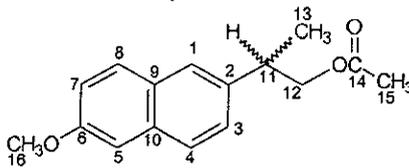


TABLA 6.11 ¹H RMN PARA EL ACETATO DE NAPROXILO.

Numeraçión	δ (ppm)	Multiplicidad	Constantes de acoplamiento	Integración
H-1	7.58	d	$J_{1-3}=1.8$	1H
H-2	-	-	-	-
H-3	7.324	dd	$J_{3-4}=8.7$ $J_{3-1}=1.8$	1H
H-4	7.7	d	$J_{3-4}=8.7$	1H
H-5	7.105	s	-	1H
H-6	-	-	-	-
H-7	7.125	dd	$J_{7-8}=8.4$ $J_{7-5}=1.8$	1H
H-8	7.68	d	$J_{7-8}=8.4$	1H
H-9	-	-	-	-
H-10	-	-	-	-
H-11	3.22	sext.	$J_{11-13}=6.9$, $J_{AX} \cong J_{BX}=7.2$	1H
H-12	4.235	dd	$J_{AX} \cong J_{BX}=7.2$, $J_{AB}=11$	2H
H-13	1.37	d	$J_{11-13}=6.6$	3H
H-14	-	-	-	-
H-15	2.0	s	-	3H
H-16	3.9	s	-	3H

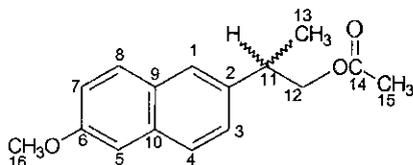


TABLA 6.12 ¹³C RMN PARA EL ACETATO DE NAPROXILO.

Numeraçión	δ (ppm)
C-1	125.51
C-2	138.33
C-3	126.26
C-4	126.95
C-5	118.84
C-6	157.46
C-7	105.64
C-8	129.01
C-9	133.52
C-10	129.12
C-11	38.83
C-12	69.39
C-13	18.17
C-14	171.07
C-15	20.91
C-16	55.29

6.2 PARTE BIOLOGICA.

6.2.1 GENERACION DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA *A. salina*.

6.2.1.1 CONSIDERACIONES PARA LA GENERACION DEL DISEÑO.

Para estudiar simultáneamente los efectos del estado de oxidación, de la configuración y de la esterificación de los compuestos en la letalidad de larvas de *A. salina*, se seleccionó un diseño factorial de experimentos de 2 niveles (2^k) para tres factores (2^3).

Los niveles de cada factor son: Para el estado de oxidación, el nivel bajo (-1) corresponde a los alcoholes primarios, mientras que el nivel alto (+1) del diseño corresponde a los ácidos carboxílicos. Para la configuración, el nivel bajo se asignó a la configuración absoluta *R*, mientras que el nivel alto fue para la configuración absoluta *S* de los compuestos. Asimismo, para la esterificación el nivel bajo fue considerado para los compuestos libres (ácidos o alcoholes) y el nivel alto para los productos de esterificación de los mismos. Esto se encuentra ejemplificado en la tabla 6.13.

TABLA 6.13 CODIFICACION PARA LOS DIFERENTES FACTORES CONSIDERADOS.

Factor	Nivel	Codificación	Asignación
A: Estado de Oxidación	Alto	+1	Acido Carboxílico (Naproxeno)
	Bajo	-1	Alcohol (Naproxol)
B: Configuración	Alto	+1	Configuración Absoluta <i>S</i>
	Bajo	-1	Configuración Absoluta <i>R</i>
C: Esterificación	Alto	+1	Esterificado
	Bajo	-1	Grupo Funcional Libre

Debido a que la actividad biológica varía con la concentración de los compuestos, se decidió realizar el experimento con 4 concentraciones diferentes, con el fin de poder estimar las dosis efectivas (DE_{50}) de los compuestos. Para poder incorporar el efecto de la concentración en sus cuatro niveles, ésta fue considerada como una variable de bloque. De esta manera, para cada una de las concentraciones se construyó un diseño factorial 2^3 completo, con ocho puntos experimentales, y se aleatorizó dentro de cada bloque.

En la figura 6.14 se muestra la representación gráfica de cada uno de los diseños construidos.

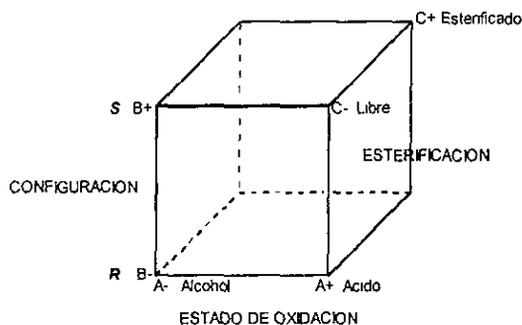


FIGURA 6.14 DISEÑO FACTORIAL 2³.

Este diseño factorial se realizó para cada concentración de las soluciones de prueba del experimento (figura 6.15).

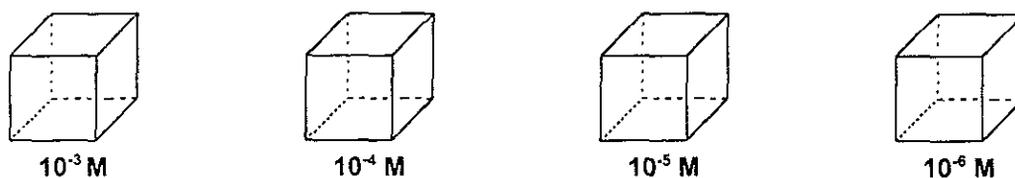


FIGURA 6.15 DISEÑOS FACTORIALES CONSTRUIDOS PARA CADA CONCENTRACION.

Esto llevó a 32 puntos experimentales (8 por cada concentración) que se replicaron 4 veces.

Las cuatro concentraciones a las que se decidió trabajar fueron, en este caso, 10⁻³ M a 10⁻⁶ M, que aseguraba una concentración mínima de aproximadamente 200 µg/mL (200 ppm) para la solución más concentrada de cualquiera de los compuestos, dentro de un rango adecuado para realizar la prueba (Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. y McLaughlin, J.L., 1982) y poder hacer estimación de dosis efectivas letales (DE₅₀ o DL₅₀). El efecto de la concentración se incorporó como variable de bloque.

De esta manera, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple, para ajustar los datos experimentales en un modelo completo, que incluyera a los factores y los bloques (concentraciones):

$$Y_{ijklm} = \mu + \tau_i + A_j + B_k + C_l + (AB)_{jk} + (AC)_{jl} + (BC)_{kl} + (ABC)_{jkl} + \varepsilon_{ijklm}$$

Donde:

y = Variable dependiente (fracción de artemias muertas).

μ = Efecto medio general (media de los tratamientos).

τ_i = Efecto de los Bloques (Concentraciones).

A_j = Efecto del j -ésimo nivel del factor A (Estado de Oxidación).

B_k = Efecto del k -ésimo nivel del factor B (Configuración).

C_l = Efecto del l -ésimo nivel del factor C (Esterificación).

$(AB)_{jk}$ = Efecto de la interacción entre el j -ésimo nivel del factor A y el k -ésimo nivel del factor B.

$(AC)_{jl}$ = Efecto de la interacción entre el j -ésimo nivel del factor A y el l -ésimo nivel del factor C.

$(BC)_{kl}$ = Efecto de la interacción entre el k -ésimo nivel del factor B y el l -ésimo nivel del factor C.

$(ABC)_{jkl}$ = Efecto de la interacción entre el j -ésimo nivel del factor A, el k -ésimo nivel del factor B y el l -ésimo nivel del factor C.

ε_{ijkl} = Componente del error experimental.

Además, se realizó el diseño factorial de acuerdo a los procedimientos convencionales (Montgomery, D.C., 1991) para obtener modelos individuales de efectos fijos para cada concentración específica con la siguiente ecuación general:

$$y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

y = Variable dependiente (fracción de artemias muertas).

μ = Efecto medio general (media de los tratamientos).

A_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor A (Estado de Oxidación).

B_j = Efecto del j -ésimo nivel del factor B (Configuración).

C_k = Efecto del k -ésimo nivel del factor C (Esterificación).

$(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel del factor A y el j -ésimo nivel del factor B.

$(AC)_{ik}$ = Efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel del factor A y el k -ésimo nivel del factor C.

$(BC)_{jk}$ = Efecto de la interacción entre el j -ésimo nivel del factor B y el k -ésimo nivel del factor C.

$(ABC)_{ijk}$ = Efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel del factor A, el j -ésimo nivel del factor B y el k -ésimo nivel del factor C.

ε_{ijkl} = Componente del error experimental.

En el caso del bioensayo con *A. salina*, se obtuvo como variable de respuesta el número de artemias muertas en cada vial, que luego se expresó como una fracción de artemias muertas sobre el total de artemias por vial (Fracción = muertas/total), con el fin de manejar esta variable como una proporción constante y comparable. Al momento de hacer el tratamiento matemático de los datos obtenidos, la variable de respuesta fue transformada al arco seno de la raíz cuadrada de la fracción (Arc Sen [fracción]^{1/2}), transformación recomendada para mejorar la homogeneidad de las varianzas (Homoscedasticidad) (Montgomery, D.C., 1991).

Adicionalmente, con el objeto de contrastar los efectos de los compuestos probados con respecto del control sobre la fracción de artemias muertas, se realizó también un análisis de varianza de un criterio de clasificación, acompañado de una prueba de Dunnett (Dunnett, C.W., 1955). La codificación de los compuestos para este análisis fue la siguiente:

TABLA 6.16 CODIFICACION DE LOS COMPUESTOS PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION.

Compuesto	10 ⁻³ M Codificación	10 ⁻⁴ M Codificación	10 ⁻⁵ M Codificación	10 ⁻⁶ M Codificación
S-(+)-Naproxeno	13	14	15	16
R-(-)-Naproxeno	23	24	25	26
S-(-)-Naproxol	33	34	35	36
R-(+)-Naproxol	43	44	45	46
S-(+)-Naproxenato de etilo	53	54	55	56
R-(-)-Naproxenato de etilo	63	64	65	66
S-(-)-Acetato de Naproxilo	73	74	75	76
R-(+)-Acetato de Naproxilo	83	84	85	86

Además, se hicieron estimaciones de concentraciones letales (CL₅₀), que dan lugar a la generación de otro diseño factorial con 8 puntos, uno por cada valor de CL₅₀ de los compuestos probados. Esto permite hacer una comparación directa de las actividades encontradas en los compuestos, de acuerdo con la figura 6.17.

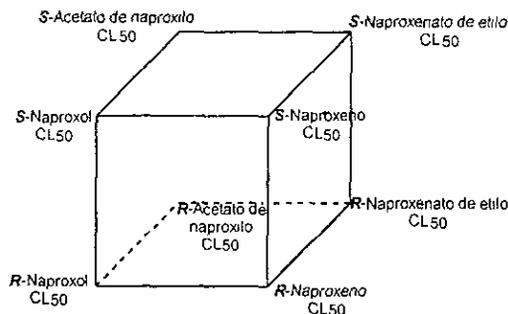


FIGURA 6.22. DISEÑO FACTORIAL GENERADO CON LAS CL₅₀ DE LOS COMPUESTOS.

TABLA 6.18
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻³M, EN *Artemia salina*.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta			
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Fracción de Artemias muertas ^d	Diferencia vs. control	Arco Seno [Fracción] ^{1/2, d, e}	Diferencia vs. control
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	1.00±0.0	+0.93	1.00±0.0	+0.86*
Naproxeno	+1	R	-1	Libre	-1	0.38±0.26	+0.31	0.53±0.36	+0.39*
Naproxol	-1	S	+1	Libre	-1	1.00±0.0	+0.93	1.00±0.0	+0.86*
Naproxeno	+1	S	+1	Libre	-1	0.39±0.17	+0.32	0.61±0.14	+0.47*
Naproxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	1.00±0.0	+0.93	1.00±0.0	+0.86*
Naproxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	0.49±0.17	+0.72	0.69±0.12	+0.55*
Naproxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	1.00±0.0	+0.93	1.00±0.0	+0.86*
Naproxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	0.56±0.38	+0.49	0.70±0.29	+0.56*
Control	- ^f	-	-	-	-	0.06±0.12 ^g	-	0.14±0.22 ^g	-

- a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido como el estado de más alta oxidación.
 b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.
 c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y la forma esterificada como el nivel alto.
 d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).
 e: Las proporciones de mortalidad fueron transformadas mediante el tratamiento matemático Arco Seno (Fracción)^{1/2}.
 f: No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.
 g: Media ± desviación estándar (N=12 replicados)
 * Diferencia significativa, α=0.05 en la prueba de Dunnett

TABLA 6.19
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁴M, EN *Artemia salina*.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta ^{d, e}			
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Fracción de Artemias muertas ^d	Diferencia vs. control	Arco Seno [Fracción] ^{f, d, e}	Diferencia vs. control
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	0.65±0.21	+0.58	0.8±0.13	+0.66*
Naproxeno	+1	R	-1	Libre	-1	0.13±0.25	+0.06	0.18±0.35	+0.04
Naproxol	-1	S	+1	Libre	-1	0.59±0.31	+0.53	0.75±0.2	+0.61*
Naproxeno	+1	S	+1	Libre	-1	0.0	-0.07	0.0	-0.14
Naproxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	1.00±0.0	+0.93	1.00±0.0	+0.86*
Naproxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	0.51±0.35	+0.45	0.62±0.41	+0.48*
Naproxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	1.00±0.0	+0.93	1.00±0.0	+0.86*
Naproxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	0.36±0.12	+0.29	0.60±0.1	+0.46*
Control	-	-	-	-	-	0.06±0.12 ^g	-	0.14±0.22 ^g	-

- a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido como el estado de más alta oxidación.
 b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.
 c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y la forma esterificada como el nivel alto.
 d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).
 e: Las proporciones de mortalidad fueron transformadas mediante el tratamiento matemático Arco Seno (Fracción)^{1/2}.
 f: No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.
 g: Media ± desviación estándar (N=12 replicados)
 * Diferencia significativa, $\alpha=0.05$ en la prueba de Dunnett

TABLA 6.20
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁵M, EN *Artemia salina*.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta			
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Fracción de Artemias muertas ^d	Diferencia vs. control	Arco Seno [Fracción] ^{e, d, g}	Diferencia vs. control
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	0.03±0.05	-0.04	0.08±0.16	-0.06
Naproxeno	+1	R	-1	Libre	-1	0.03±0.05	-0.04	0.08±0.16	-0.06
Naproxol	-1	S	+1	Libre	-1	0.03±0.06	-0.03	0.09±0.18	-0.05
Naproxeno	+1	S	+1	Libre	-1	0.0	-0.07	0.0	-0.14
Naproxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	0.1±0.08	+0.03	0.27±0.19	+0.13
Naproxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	0.20±0.11	+0.14	0.44±0.13	+0.29
Naproxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	0.53±0.22	+0.46	0.71±0.18	+0.57*
Naproxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	0.13±0.18	+0.06	0.24±0.29	+0.10
Control	-	-	-	-	-	0.06±0.12 ^g	-	0.14±0.22 ^g	-

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido como el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y la forma esterificada como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados)

e: Las proporciones de mortalidad fueron transformadas mediante el tratamiento matemático Arco Seno (Fracción)^{1/2}.

f: No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.

g: Media ± desviación estándar (N=12 replicados).

* Diferencia significativa, $\alpha=0.05$ de la prueba de Dunnett.

RESULTADO DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁶M, EN *Artemia salina*.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta			
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Fracción de Artemias muertas ^d	Diferencia vs. control	Arco Seno [Fracción] ^{1/2}	Diferencia vs. control
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	0.03±0.05	-0.04	0.08±0.16	-0.06
Naproxeno	+1	R	-1	Libre	-1	0.08±0.09	+0.01	0.19±0.23	+0.05
Naproxol	-1	S	+1	Libre	-1	0.05±0.1	-0.01	0.11±0.22	-0.03
Naproxeno	+1	S	+1	Libre	-1	0.03±0.05	-0.04	0.08±0.16	-0.06
Naproxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	0.08±0.05	+0.01	0.24±0.16	+0.1
Naproxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	0.13±0.18	+0.06	0.24±0.30	+0.1
Naproxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	0.05±0.06	-0.01	0.16±0.19	+0.02
Naproxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	0.05±0.06	-0.01	0.16±0.19	+0.02
Control	- ^f	-	-	-	-	0.06±0.12 ^g	-	0.14±0.22 ^g	-

- a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido como el estado de más alta oxidación.
 b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.
 c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y la forma esterificada como el nivel alto.
 d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).
 e: Las proporciones de mortalidad fueron transformadas mediante el tratamiento matemático Arco Seno (Fracción)^{1/2}.
 f: No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.
 g: Media ± desviación estándar (N=12 replicados).

TABLA 6.22
 MODELOS Y ANOVA PARA *Artemia salina*.

FACTOR	10 ⁻³ M COEFICIENTES	10 ⁻⁴ M COEFICIENTES	10 ⁻⁵ M COEFICIENTES	10 ⁻⁶ M COEFICIENTES	TODAS LAS CONCENTRACIONES
[C] ^a	-	-	-	-	0.3538*
A: Estado de Oxidación	-0.4190*	-0.4338*	-0.0579	0.0119	-0.2248*
B: Configuración	0.0256	-0.0361	0.0324	-0.0309	-0.0022
C: Esterificación	0.0529	0.3025*	0.1928*	0.0444	0.1481*
AB	0.0256	-0.0348	-0.1025*	-0.0208	-0.0331
AC	0.0529	-0.0078	-0.0353	-0.0082	3.15x10 ⁻⁴
BC	0.0067	0.0143	0.050	-0.0108	0.0150
ABC	0.0067	0.0130	-0.0799*	0.0171	-0.0108
Constante	1.1518	0.8267	0.2556	0.1627	2.1911
R ² Ajustada	0.74	0.77	0.60	-0.16	0.6513
F	13.41	15.56	7.59	0.40	30.6459
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.8951	<0.0001

a: Las concentraciones fueron expresadas como el inverso negativo del logaritmo de la concentración molar.

* Coeficiente significativo, $\alpha=0.05$.

6.2.1.2 ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION.

Las tablas 6.18-6.21 muestran los resultados de cada uno de los análisis factoriales. Se indican los compuestos que de acuerdo a la prueba de Dunnett resultaron diferentes con respecto del control.

Todos los compuestos resultaron con diferencias estadísticamente significativas a la concentración 10^{-3} M, mientras que a la concentración 10^{-4} M los naproxenos dejan de tener efectos tóxicos contra *A. salina*. El único compuesto activo a la concentración 10^{-5} M es el *S*-acetato de naproxilo. Esto, como se verá más adelante, coincide con lo visto en el análisis de los modelos, ya que se aprecia que los alcoholes son más activos que los ácidos correspondientes contra *A. salina*, y que los compuestos esterificados son en general más activos que sus correspondientes compuestos libres.

6.2.1.3 ANALISIS DE VARIANZA DEL MODELO COMPLETO (REGRESION LINEAL MULTIPLE) Y DE LOS MODELOS PARA CADA CONCENTRACION.

La tabla 6.22 muestra los coeficientes de regresión estimada para los modelos obtenidos, tanto individuales como el modelo completo, para cada una de las concentraciones probadas en *A. salina*.

El modelo completo de regresión lineal múltiple que incluye a los bloques resulta significativo ($p < 0.0001$) y detecta efectos significativos de la concentración ($\log_{10} C$), el factor A (Estado de oxidación) y C (esterificación).

Los modelos para las concentraciones 10^{-3} M, 10^{-4} M y 10^{-5} M también resultan significativos ($p < 0.0001$). Conforme cambia la concentración, los modelos detectan efectos significativos de diferentes factores, detectándose efectos significativos del estado de oxidación (A) para el primer modelo, del estado de oxidación (A) y la esterificación (C) para el modelo de 10^{-4} M, y de la esterificación (C) en el tercer modelo.

A. EFECTO DEL ESTADO DE OXIDACION (A).

El efecto de el estado de oxidación (A) resultó significativo en el modelo completo y en los modelos de 10^{-3} M y 10^{-4} M. Este efecto es de interés en el modelo completo que incluye a todas las concentraciones porque resulta significativo e independiente de la concentración a la cual se realice el experimento.

El efecto del estado de oxidación tiene un coeficiente negativo, lo que indica que los alcoholes son más activos que los ácidos carboxílicos contra *A. salina*.

B. EFECTO DE LA CONFIGURACION (B).

Ningún modelo presentó significación en el efecto de la configuración. Esto habla de que la prueba de letalidad con *A. salina* es estereoespecífica, lo cual no le resta importancia como indicativa de toxicidad de los compuestos.

Sin embargo, en el modelo para la concentración 10^{-4} M resulta significativa la interacción AB (entre el estado de oxidación y la configuración), que se tratará más adelante.

C. EFECTO DE LA ESTERIFICACION (C).

El efecto de la esterificación resultó significativo en el modelo completo y los modelos para las concentraciones de 10^{-4} y 10^{-5} M. El coeficiente para la esterificación es positivo, lo que nos indica que los derivados esterificados son más activos que los compuestos libres, lo que lógicamente puede deberse a su mayor liposolubilidad, y por lo tanto a su mayor facilidad para atravesar membrana de artemia. Además, no se puede dejar de considerar que al pH utilizado del medio salino en el que se desarrolla la prueba (7.2-7.4) los ácidos carboxílicos libres se encuentran altamente ionizados, lo que dificultaría su absorción por parte del crustáceo.

D. INTERACCIONES SIGNIFICATIVAS ENTRE FACTORES.

Las únicas interacciones entre factores que resultaron significativas fueron la interacción AB (entre el estado de oxidación y la configuración) y la ABC (interacción ternaria), únicamente para el modelo de la concentración 10^{-4} M.

La gráfica de interacción AB (Figura 6.23) indica que en los alcoholes, la configuración *S* es la más activa, mientras que al referirse a los ácidos carboxílicos, la configuración *R* es la que manifiesta mayor toxicidad contra *A. salina*.

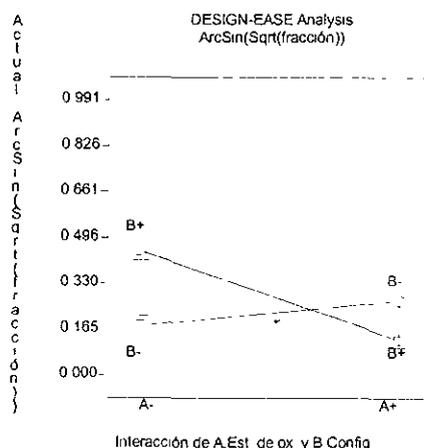
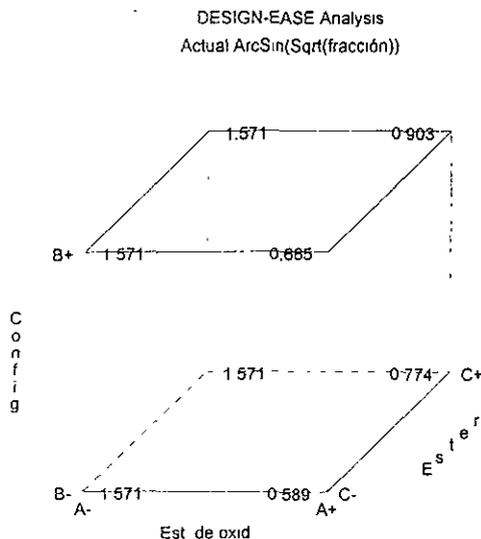


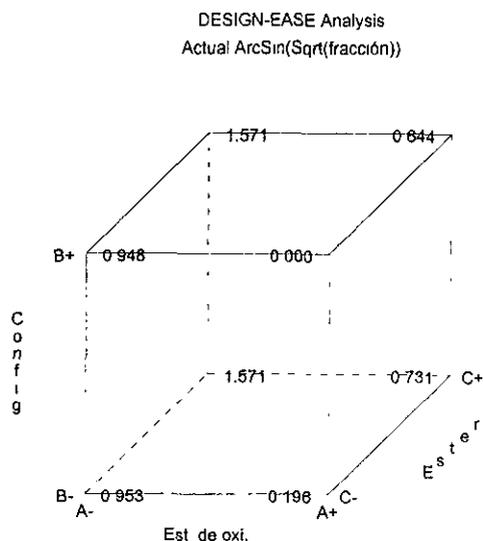
FIGURA 6.23 GRAFICA DE INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA CONFIGURACION.

La interacción ternaria es difícil de interpretar, pues abarca un número grande de combinaciones entre los tres factores. Sin embargo, el hecho que resulte positiva en al menos uno de los diseños indica una gran complejidad y exigencia en la relación estructura-actividad de los compuestos.

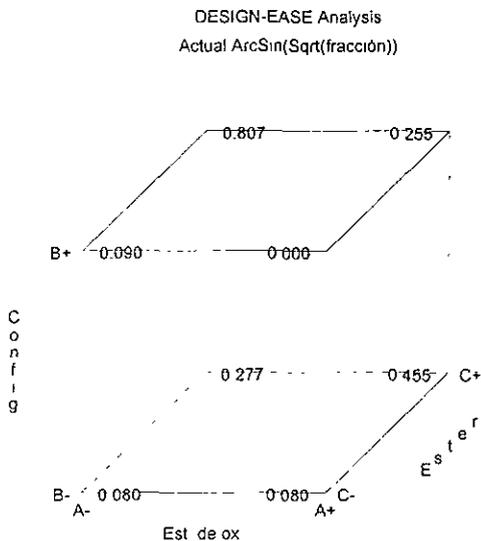
La figura 6.24 muestra los gráficos de interpretación obtenidos de cada uno de los diseños factoriales individuales.



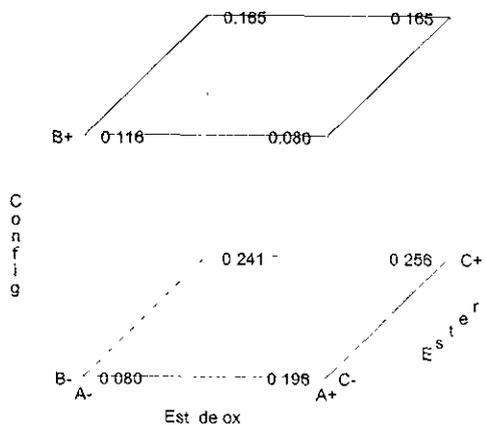
6.24a Concentración 10⁻³ M



6.24b Concentración 10⁻⁴ M



6.24c. Concentración 10⁻⁵ M



6.24d. Concentración 10⁻⁶ M

FIGURA 6.24 GRAFICAS DE INTERPRETACION PARA LAS CUATRO CONCENTRACIONES PROBADAS EN *A. salina*.

6.2.1.4 ESTIMACION DE CL₅₀ DE LOS COMPUESTOS CONTRA *A. salina*.

Para estimar CL₅₀ de los compuestos utilizados, se realizó un análisis de regresión Probit de la fracción de artemias muertas sobre el total, tomando como referencia un control de artemias realizado simultáneamente con los tratamientos de los compuestos. Los intervalos de confianza se fijaron al 95% ($\alpha=0.05$). Los resultados se muestran en la tabla 6.25.

TABLA 6.25 RESULTADOS DEL ANALISIS DE REGRESION PROBIT DE LOS COMPUESTOS CONTRA *A. salina*.

COMPUESTO	CL ₅₀
S-(+)-naproxeno	$3.89 \times 10^{-3} M^a$
R-(-)-naproxeno	$9.88 \times 10^{-3} M^a$
S-(-)-naproxol	$6.17 \times 10^{-5} M (9.7 \times 10^{-6}, 5.45 \times 10^{-4})^b$
R-(+)-naproxol	$6.03 \times 10^{-5} M (7 \times 10^{-6}, 7.94 \times 10^{-4})^b$
S-(+)-naproxenato de etilo	$5.63 \times 10^{-4} M (1.38 \times 10^{-4}, 1.8 \times 10^{-2})^b$
R-(-)-naproxenato de etilo	$4.29 \times 10^{-4} M^a$
S-(-)-acetato de naproxilo	$8.11 \times 10^{-5} M (5.4 \times 10^{-6}, 1.2 \times 10^{-5})^b$
R-(+)-acetato de naproxilo	$1.84 \times 10^{-5} M (8.55 \times 10^{-6}, 4.6 \times 10^{-5})^b$

a: No pudo determinarse el intervalo de confianza.

b. Intervalo de confianza superior, intervalo de confianza inferior ($\alpha=0.05$)

De acuerdo con la tabla 6.25, los alcoholes y sus derivados esterificados manifiestan una mayor toxicidad contra *A. salina* que los naproxenos y sus ésteres. Esto podría indicar que los naproxoles pueden poseer un grado de actividad o toxicidad diferente de los compuestos referencia (los naproxenos), por lo que debe tenerse cuidado al considerar a estos compuestos como profármacos.

6.2.1.5 ESTIMACION DE RAZONES DE ACTIVIDADES E INDICES EUDISMICOS CON BASE EN CL₅₀ CONTRA *A. salina*.

La estimación de las concentraciones letales contra artemia permitió establecer una relación de actividades entre los diferentes compuestos. Además se intentó hacer una estimación de los índices eudísmicos, de acuerdo con los procedimientos anteriormente descritos (Lehman, P.A., Rodríguez de Miranda, J.F. y Ariëns, E.J., 1976). Los índices eudísmicos son una manera simple de distinción respecto a la actividad mostrada por fármacos quirales, entre los que se encuentran los ácidos nafilpropiónicos. Para una acción particular, el isómero más activo es considerado como *eutómero*, mientras que el isómero menos activo se denomina *distómero*. La razón de actividades, o razón eudísmica, constituye un indicativo de enantioselectividad. El índice eudísmico es sencillamente el logaritmo de las razones eudísmicas encontradas para los compuestos. De esta manera, es posible encontrar variaciones en actividades entre ambos enantiómeros de los cuatro pares de compuestos probados, aún a pesar de que en los diseños factoriales la configuración del compuesto no haya

sido un factor determinante en la actividad contra *A. salina*. Las relaciones de actividades e índices eudísmicos se presentan en las tablas 6.26 y 6.27.

TABLA 6.26 INDICES EUDISMICOS CALCULADOS CON BASE EN CL₅₀ PARA *A. salina*.

Par de enantiómeros	Isómero	Potencias relativas (CL ₅₀)	Razon Eudísmica	Índice Eudísmico
Naproxeno	S-(+)-naproxeno	100	2.587	0.412
	R-(-)-naproxeno	38.65		
Naproxol	S-(-)-naproxol	97.73	0.9773	-0.0099
	R-(+)-naproxol	100		
Naproxenato de etilo	S-(+)-naproxenato	76.19	0.7619	-0.1181
	R-(-)-naproxenato	100		
Acetato de Naproxilo	S-(-)-acetato	100	2.2688	0.3558
	R-(+)-acetato	44.076		

Como se puede apreciar en la tabla 6.26, los valores estimados de los índices eudísmicos son no significativos, ya que los únicos pares de compuestos donde el valor del índice eudísmico es positivo son el S-naproxeno y el S-acetato de naproxilo, y este valor es muy pequeño. Anteriormente se había visto que la configuración no fue significativa en los diseños factoriales, por lo que estas estimaciones confirman el hecho de que la prueba con *A. salina* no tiene especificidad entre enantiómeros.

TABLA 6.27 RAZON DE ACTIVIDADES ENTRE LOS COMPUESTOS.

RAZON	S-NAXEN	R-NAXEN	S-NAXOL	R-NAXOL	S-NAXENATO	R-NAXENATO	S-ACETATO	R-ACETATO
S-NAXEN	-	2.58	0.0159	0.0156	0.1458	0.1111	2.1X10 ⁻³	4.76X10 ⁻³
R-NAXEN	0.39	-	6.17X10 ³	6.04X10 ⁻³	0.0563	0.04295	8.11X10 ⁻⁴	1.84X10 ⁻³
S-NAXOL	62.56	161.88	-	0.9773	9.12	6.95	0.1314	0.2982
R-NAXOL	64.01	165.50	1.02	-	9.34	7.11	0.1344	0.3051
S-NAXENATO	6.85	17.72	0.11	0.1071	-	0.76	0.0144	0.0326
R-NAXENATO	8.99	23.28	0.14	0.1405	1.31	-	0.0189	0.0429
S-ACETATO	475.95	1231.56	7.61	7.43	69.42	52.89	-	2.2688
R-ACETATO	209.78	542.82	3.35	3.28	30.59	23.31	0.4407	-

Por otro lado, al observar la tabla 6.27, puede fácilmente apreciarse que, independientemente de la configuración de los compuestos, los alcoholes y sus derivados acetilados son mucho más letales contra *A. salina* que los correspondientes derivados carboxílicos. Los naproxoles, particularmente, poseen más o menos la misma actividad contra artemia, y en general los únicos compuestos que se diferencian significativamente en sus actividades son el S y el R-naproxeno.

6.2.1.6 GENERACION DEL DISEÑO FACTORIAL CON BASE EN CL₅₀ CONTRA *A. salina*.

Como ya se explicó anteriormente, la estimación de las concentraciones letales de los compuestos contra *A. salina* permitió realizar un nuevo diseño factorial, en donde los factores considerados son los mismos (El estado de oxidación A, la configuración B y la esterificación C), siendo la diferencia el tipo de variable de respuesta seleccionado, que en este caso es la CL₅₀, expresada como el inverso negativo del log₁₀ de la concentración obtenida en los bioensayos. La tabla 6.28 muestra los coeficientes para dicho modelo.

TABLA 6.28 COEFICIENTES DE REGRESION PARA EL DISEÑO FACTORIAL 2³ PARA CL₅₀ EN *A. salina*.

FACTOR	COEFICIENTE DE REGRESION
A: ESTADO DE OXIDACION	-0.9028*
B: CONFIGURACION	0.0803
C: ESTERIFICACION	0.4498*
AB	0.00
AC	0.1009*
BC	-0.0204
ABC	-0.1122*
CONSTANTE	3.6606

* Factor significativo ($\alpha=0.05$)

El modelo resulta significativo ($p = 0.0119$), y detecta efectos significativos de los factores A (Estado de oxidación) y C (Esterificación), además de la interacción AC y la ternaria ABC. Todo esto en franca consistencia con lo observado en el análisis de los modelos factoriales anteriores.

El coeficiente del estado de oxidación es negativo, lo que indica una vez más que los alcoholes son más activos en la prueba de letalidad con *A. salina* que los ácidos carboxílicos. Por otro lado, el coeficiente de la esterificación es positivo, lo que nuevamente indica que los derivados esterificados son más letales que los compuestos libres.

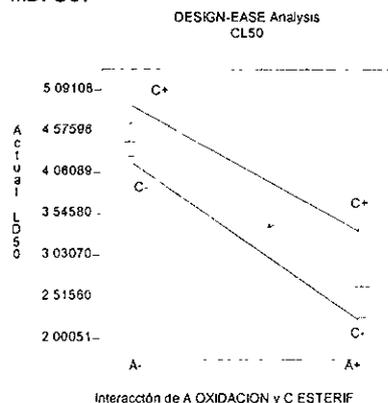


FIGURA 6.29 GRAFICA DE INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA ESTERIFICACION.

En la figura 6.29 se observa la gráfica para la interacción AC, en la cual se observa que los alcoholes provocan mayor letalidad en la prueba con *A. salina*, y que los compuestos esterificados son más activos que los análogos libres.

En la figura 6.30 se observa la gráfica de interpretación para este diseño factorial.

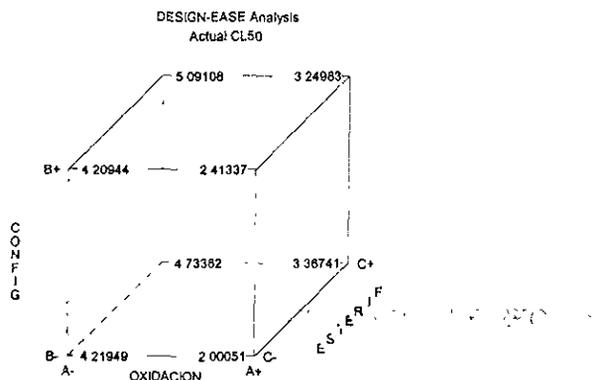


FIGURA 6.30 GRAFICA DE INTERPRETACION PARA EL DISEÑO FACTORIAL 2^3 PARA CL_{50} EN *A. salina*.

6.2.1.7 ESTIMACION DE PARAMETROS DE RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CON BASE EN CL_{50} CONTRA *A. salina*.

Todos los derivados sintetizados de configuración *S* ya se encuentran reportados en la literatura. Se han propuesto estos compuestos como posibles profármacos para sistemas de liberación dérmica de antiinflamatorios (Kasting, G.B., Merrit, E.W., Smith, R.L., Walker, D., Mueller, L.G. y Estelle, A.F., 1987; Mueller, L.G., Estelle, A.F., Kasting, G.B., Merrif, E.W., Tulich, L.J., Smith, R.L., Walker, D. y Cooper, E.R., 1987; Mueller, L.G., 1990).

Debido a que se disponía de información sobre ciertas propiedades fisicoquímicas de los compuestos (Kasting, G.B., Smith, R.L., y Anderson, B.D., 1992), como la constante de partición octanol/agua y la constante de flujo máximo de los compuestos a través de la piel (J_m), se decidió buscar correlaciones de las actividades de los compuestos con dichas propiedades fisicoquímicas.

A. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN *A. salina* Y LA CONSTANTE DE PARTICION OCTANOL/AGUA.

Con el objeto de encontrar un modelo que permitiera correlacionar las actividades encontradas para los compuestos con algún parámetro fisicoquímico disponible, se decidió tratar primero de establecer un modelo para relacionar la actividad biológica con la constante de partición octanol-agua, mejor conocida como P (o $\log P$, si se expresa como su logaritmo). Este parámetro ha sido extensamente estudiado por varios autores (Meyer, K.H. y Hemmi, H., 1935; Collander, R., 1954; Hansch, C., 1968) y se ha tratado de relacionar con otros

parámetros fisicoquímicos en estudios de relación estructura-actividad de muchos compuestos (Leo, A., Hansch, C. y Church, C., 1969; Hansch, C. y Fujita, T., 1964).

Los datos de partición octanol/agua se tomaron de Kasting, G.B., *et al.* (1992). Se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados de los valores de $\log k_{oct}$ ($\log P$) contra CL_{50} , expresada como el inverso negativo del logaritmo de la concentración ($-\log C$). La gráfica de la figura 6.31 muestra el modelo.

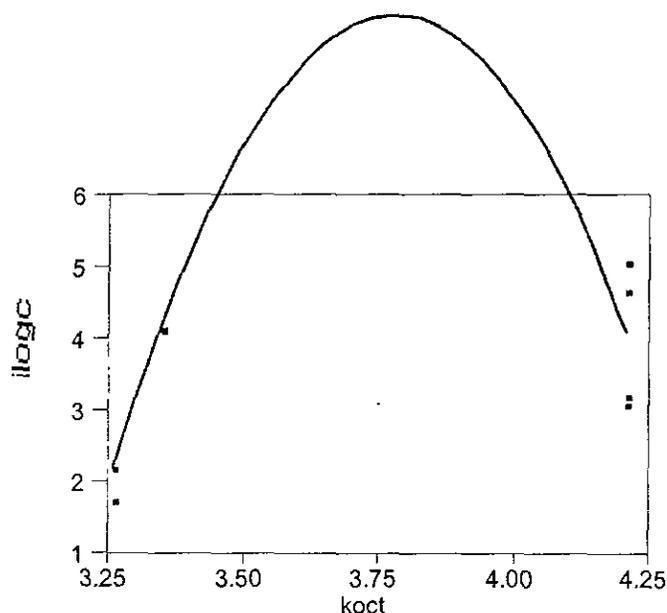


FIGURA 6.31 GRAFICA DE KOCT Vs. ILOGC.

Se obtuvo la siguiente ecuación cuadrática, con $\log k_{oct}$ como el término cuadrático.

$$-\log C = 178.35 \log k_{oct} - 23.61 \log k_{oct}^2 - 328.32$$

(R^2 ajustada=0.5441, n=8)

Cada uno de los términos resultaron significativos ($p < 0.05$). A pesar de que el modelo no resulta ser muy bueno ni tampoco resulta significativo en el análisis de varianza ($p = 0.0605$), es interesante considerar que la relación entre la actividad biológica y el $\log P$ muestra una tendencia parabólica, tal y como se ha reportado anteriormente en muchos estudios de estructura-actividad (Hansch, C., Stewart, A.R., Iwasa, J., y Deutsch, E.W., 1965; Hansch, C., y Deutsch, E.W., 1966; Singer, J.A. y Purcell, W.P., 1967). En estos estudios mencionan lo que consideran "toxicidad inespecífica" como una alta correlación entre la actividad biológica, con respecto a una sola constante física, que usualmente es el $\log P$. Esto

confirma que la prueba de *A. salina* es referida a una "toxicidad inespecífica", y de ahí la falta de diferenciación de actividad entre isómeros. Sin embargo, esto no explica la diferencia de actividades entre los naproxenatos de etilo y los acetatos de naproxilo, siendo que su log*P* reportado es el mismo.

B. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA EN *A. salina* Y EL PUNTO DE FUSION.

Otro parámetro disponible de origen experimental es el punto de fusión, el cual se ha relacionado con las fuerzas intermoleculares, y por lo tanto con la estructura molecular, la forma de la red cristalina, la solubilidad y la afinidad de la molécula por determinados receptores (Lien, E.J., 1987; Hansch, C., 1990; Sloan, K.B., 1992). También se calculó una ecuación por mínimos cuadrados (en este caso lineal) que tratara de correlacionarse con la actividad biológica observada en artemia. El modelo resultó mucho mejor, las constantes pudieron explicar el 73% de la variación de los datos (R^2 ajustada: 0.7305) y el modelo resulta significativo al efectuar el análisis de varianza ($p=0.0042$).

$$\text{ilogC} = -0.02542\text{pf} + 6.12$$

(R^2 ajustada= 0.7305, n= 8)

En la figura 6.32 se muestra la gráfica obtenida para el modelo. Puede apreciarse que al aumentar el punto de fusión disminuye la actividad biológica; aquí aparentemente se explica la diferencia de actividades de los dos tipos de ésteres (naproxenato y acetato). Considerando ésto como de carácter predictivo, pudiera realizarse la síntesis de nuevos derivados de tipo éster con bajo peso molecular y probablemente podría estimarse o compararse su actividad contra *A. salina*.

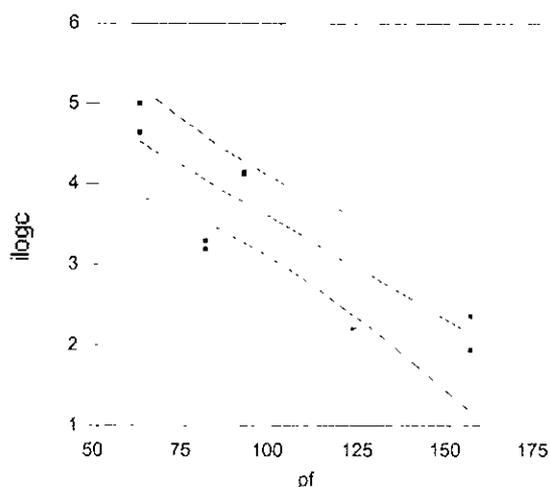


FIGURA 6.32 GRAFICA DE PF VS. ILOGC.

El hecho de que el punto de fusión resulte significativo para explicar la actividad biológica es interesante, puesto que el punto de fusión, por un lado, es un parámetro puramente experimental y que constituye una propiedad característica e invariable de las moléculas, al contrario de la constante de partición, que, además de ser afectada por una serie de factores como la temperatura y el método utilizado para su determinación, constituye una variable puramente artificial ideada para tratar de emular el paso de las moléculas a través de las membranas biológicas.

El punto de fusión, como se ha mencionado anteriormente, lógicamente se relaciona con la presencia de fuerzas intermoleculares del compuesto, siendo las fuerzas de Van der Waals (fuerzas de London) las que más lo determinan. La medición de estas fuerzas se ha correlacionado con la actividad biológica de algunos compuestos antivirales (Pressman, D., y Grossberg, A.L., 1968), y con la interacción fármaco-receptor en varios estudios (Belleau, B., y Lacasse, G., 1964; Belleau, B., 1965).

Por otro lado el punto de fusión es representativo de las fuerzas intermoleculares y de red cristalina que determinan tanto la solubilidad acuosa como en disolventes orgánicos. Yalkowsky y Valvani (1980, 1983) argumentando que la ecuación derivada por Hansch y colaboradores (Hansch, C., Quinlan, J.E., y Lawrence, G.L., 1968), que incluía únicamente la constante de reparto, no era válida para solutos sólidos (que poseían una determinada red cristalina que podía ser representada por la entropía de fusión), han postulado una ecuación general que relaciona la constante de reparto y el punto de fusión con la solubilidad acuosa de solutos no electrolitos a 25 °C:

$$\log S_w = -\log P - 0.01 pf + 1.05$$

$$(r=0.989, n=155)$$

Además, estos investigadores también postularon otra ecuación que determina la solubilidad en octanol, tanto para electrolitos como para no electrolitos:

$$\text{No Electrolitos: } \log X_o = -0.01 pf + 0.25$$

$$(r=0.92, n=36)$$

$$\text{Electrolitos: } \log X_o = -0.011 pf + 0.15$$

$$(r=0.985, n=36)$$

Estas ecuaciones coinciden en gran medida con lo encontrado en el modelo de *Artemia salina*. La ecuación postula que la solubilidad acuosa de un no electrolito disminuye conforme aumenta el punto de fusión, encontrándose entonces una concentración efectiva menor de los compuestos de mayor punto de fusión con respecto de los de menor punto de fusión, afectando posiblemente de este modo su actividad contra artemia. De esta manera, podría decirse que la solubilidad y la liposolubilidad en el medio salino utilizado para la prueba

determina grandemente la actividad de los compuestos probados contra artemia; sin embargo, es importante mencionar que al pH de la prueba, los naproxenos ($pK_a=3.5$) se encontraban altamente ionizados y menos disponibles para su acción contra el crustáceo.

C. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN *A. salina*, KOCTANOL Y PUNTO DE FUSION.

Con la finalidad de encontrar un modelo que explicara mejor la actividad biológica encontrada en *A. salina*, y teniendo en cuenta los antecedentes proporcionados por Yalkowsky, se combinaron las dos variables anteriores en un modelo de regresión. La constante de partición se tomó de forma cuadrática (k_{oct} , k_{oct}^2), debido al comportamiento parabólico mostrado anteriormente. El modelo encontrado resultó bastante bueno, explicando la varianza de los datos en un 97% (R^2 ajustada=0.9674). Además, en el análisis de varianza tanto el modelo ($p=0.0006$) como cada uno de los parámetros ($k_{oct}=0.0020$, $k_{oct}^2=0.0006$, $p.f=0.0013$) resultaron significativos.

$$\text{ilogC} = -285.3k_{oct} + 37.46k_{oct}^2 - 0.0844pf + 547.31$$

(R^2 ajustada= 0.9674, $n=8$)

Esta ecuación puede muy bien relacionarse con el modelo anterior encontrado solamente para el punto de fusión. Anteriormente, existe una referencia en la cual se encuentran buenas correlaciones entre la solubilidad acuosa, el $\log P$ y el punto de fusión, en una variedad de compuestos, con coeficientes de determinación arriba de 0.9 (Nouwen, J., y Hansen, B., 1996). Estos modelos, según describen los investigadores, poseen una gran capacidad predictiva. El modelo encontrado con *A. salina* es entonces coherente, siendo que la solubilidad en agua y el coeficiente de partición son parámetros de gran importancia en el estudio de relaciones estructura-actividad, adicionándose el hecho de que, de acuerdo con Yalkowsky, el incorporar la variable del estado físico de la sustancia (punto de fusión) aumenta grandemente la correlación de los parámetros en el modelo para estudiar la actividad.

Como una manera de evaluar el modelo en busca de una dependencia entre el punto de fusión y la constante de partición octanol/agua, se obtuvo la matriz de correlación entre el punto de fusión y la kcoctanol/agua, en donde se encontró una colinearidad entre la constante de reparto y el punto de fusión (R^2 ajustada =0.9523, $p=0.0002$).

Esto indica que, aunque el modelo aparentemente es bueno, no resulta un modelo predictivo muy confiable, al existir interdependencia entre los valores de punto de fusión y los de la constante de reparto.

D. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN *A. salina*, J_m Y PUNTO DE FUSION.

La constante de flujo máximo a través de la piel (J_m , $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) se refiere a la cantidad máxima de compuesto que penetra la piel en un periodo de 48 a 72 horas. Kasting y colaboradores (Kasting, G.B., Smith, R.L, y Cooper, E.R., 1987) han desarrollado un método para calcular esta constante en experimentos de penetración dérmica utilizando piel humana tomada de cadáveres. Estos investigadores mencionan que la constante de flujo máximo depende mayormente de la solubilidad en octanol (S_{oct}) y del peso molecular (PM), o bien del volumen molecular del compuesto, asumiendo un modelo de membrana simple. Es interesante hacer notar que este parámetro no depende del coeficiente de partición (P), sino sólo de la liposolubilidad, que en este caso se representa por medio de la solubilidad en octanol. De esta manera, Kasting propone una ecuación del siguiente tipo:

$$\log J_m = A \log S_{\text{oct}} - b \log \text{PM} + C.$$

Donde el valor de la constante es igual a D/h_{lip} (siendo D el coeficiente de difusión del compuesto y h_{lip} es el grosor del estrato córneo), A tiene un valor cercano a la unidad y b tiene valores experimentales mayores a 3 para membranas poliméricas, bicapas lipídicas y otras biomembranas (Lieb, W.R. y Stein, W.D., 1969; Cohen, B.E., y Bangham, A.D., 1972; Lieb, W.R. y Stein, W.D., 1986).

El valor de la constante de flujo máximo J_m ha sido un parámetro importante en estudios de desarrollo de profármacos de compuestos antiinflamatorios no esteroideos como el naproxeno y el ibuprofeno, entre otros (Kasting, G.B., *et al*, 1992). Debido a que este parámetro no depende directamente de la constante de reparto octanol/agua, se consideró que podría buscarse un modelo que lo relacionara con la actividad biológica en artemia, puesto que es un indicativo de penetración y absorción de los compuestos.

Así pues, se calculó el modelo por mínimos cuadrados, tomando J_m y pf como parámetros lineales. El modelo resultó muy bueno ($p = 0.0010$, R^2 ajustada=0.91), con un mínimo de autocorrelación entre J_m y el punto de fusión. Así, el modelo es significativo y altamente predictivo, al no existir colinearidad de los parámetros usados.

$$\begin{aligned} \log C &= 0.0632J_m - 0.0211pf + 5.0157 \\ (R^2 \text{ ajustada} &= 0.911, n = 8) \end{aligned}$$

El modelo que incorporaba a la constante de flujo como un término cuadrático resultó también muy bueno ($p = 0.0006$, R^2 ajustada=0.97), sin encontrarse tampoco correlación entre la constante de flujo y el punto de fusión.

$$\text{ilogC} = 0.2276J_m - 0.0068J_m^2 - 0.02069\text{pf} + 4.3244$$

(R²ajustada=0.9673, n=8)

Sin embargo, el modelo cuadrático no mejora considerablemente en relación al modelo lineal, por lo que el que involucra a la constante de flujo máximo lineal resulta el ideal para utilizarse, debido a su mayor sencillez y alta capacidad predictiva. Además, debido a que se dispone de información sobre propiedades fisicoquímicas de otros derivados de ácidos naftilpropiónicos, sería interesante comparar las actividades encontradas para estos compuestos con las que podría predecir el modelo encontrado, con el fin de hacer una evaluación subsecuente del mismo.

6.2.2 BIOENSAYOS PRELIMINARES DE GERMINACION DE SEMILLAS.

6.2.2.1 SELECCION DE SEMILLAS.

Las pruebas preliminares de germinación se realizaron con el objeto de seleccionar las semillas que manifestaran menor variabilidad (expresada como su % C.V.) y mayor porcentaje de germinación. Inicialmente, se escogieron 6 semillas, 3 monocotiledóneas y 3 dicotiledóneas.

TABLA 6.33 SEMILLAS SELECCIONADAS PARA EL EXPERIMENTO PRELIMINAR DE GERMINACION.

MONOCOTILEDONEAS	DICOTILEDONEAS
Trigo (<i>Triticum vulgare</i>)	Lenteja (<i>Lens esculenta</i>)
Maíz (<i>Zea mays</i>)	Rábano (<i>Raphanus sativus</i> L.)
Pasto (<i>Axonopus compressus</i>)	Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)

Las siembras se realizaron empleando únicamente acetona R.A. como control. Después de cuatro días de germinación, se midieron longitudes de radículas y talluelos y se determinó el porcentaje de germinación. Se determinaron parámetros de estadística descriptiva, como promedio de las medidas, desviaciones estándar, coeficientes de variación e intervalos de confianza para los datos.

De estos resultados se decidió eliminar de las monocotiledóneas al maíz, ya que presentó un porcentaje de germinación menor a 20%, y al pasto, ya que su coeficiente de variación era ligeramente mayor que el del trigo, además de que las plántulas no tenían un tamaño suficiente como para hacer mediciones confiables de sus radículas y talluelos.

Entre las dicotiledóneas, se decidió eliminar al frijol, ya que también presentó un porcentaje bajo de germinación (< 30%); la lenteja fue la que menor variabilidad y mayor porcentaje de germinación tuvo, pero se decidió hacer las pruebas preliminares con compuestos incluyendo también al rábano, ya que existen referencias anteriores que describen el uso del mismo en ensayos de toxicidad de anestésicos y barbituratos (Lowe, K.C., Davey, M.R., Power, J.B., y Clothier, R.H., 1995).

6.2.2.2 BIOENSAYOS PRELIMINARES CON NAPROXENO.

Una vez seleccionadas las semillas, se sembraron con concentraciones conocidas de Naproxeno (10^{-1} M- 10^{-4} M) en acetona, además de los controles, según la metodología descrita en la parte experimental. Se realizaron 10 replicados de cada concentración y del control, con 5 semillas por replicado.

Los datos obtenidos sirvieron para hacer una estimación preliminar de la concentración efectiva (CE_{50}) del naproxeno, con el fin de determinar el rango de concentraciones en que se iban a realizar los experimentos factoriales con los 8 compuestos.

Las concentraciones efectivas (CE_{50}) de inhibición de crecimiento de radícula y talluelo se determinaron por medio de la regresión probit, estimando la concentración que presentaba un 50% de inhibición de la longitud presentada por el control corrido en el mismo experimento (Tabla 6.34).

TABLA 6.34 PARAMETROS DE REGRESION PROBIT PARA NAPROXENO EN LA GERMINACION DE SEMILLAS.

Parámetros de Regresión	Lenteja	Rábano	Trigo
R^2 (radícula)	0.9069	0.9157	0.7725
CE_{50} Estimada (Radícula)	$4.98 \times 10^{-2} M$	$1.98 \times 10^{-3} M$	$9.39 \times 10^{-2} M$
R^2 (talluelo)	0.9992	0.9188	0.8622
CE_{50} Estimada (Talluelo)	$1.41 \times 10^{-1} M$	$5.61 \times 10^{-2} M$	2.17 M

Con estos datos se seleccionó el rábano, ya que presentaba una mayor sensibilidad al naproxeno con respecto a la otra especie dicotiledónea (lenteja) que se probó.

Por otro lado, las dosis estimadas fijaban el rango de concentraciones desde $10^{-1} M$, pero se decidió trabajar entre $10^{-2} M$ y $10^{-5} M$, debido a que la cantidad disponible de derivados *R* era pequeña, además de que se consideró que en ese rango se podían obtener diferencias estadísticamente significativas que permitieran evaluar los efectos principales de los tres factores y sus interacciones.

6.2.2.3 GENERACION DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE GERMINACION.

A. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO.

Al igual que con los experimentos efectuados con *A. salina*, se deseaba estudiar simultáneamente los efectos del estado de oxidación, de la configuración y de la esterificación de los compuestos, en este caso en la inhibición del crecimiento de radícula y talluelo de las especies vegetales escogidas, para lo cual se seleccionó un diseño factorial de experimentos de 2 niveles (2^k) para tres factores (2^3).

Los tres factores son, al igual que en los experimentos anteriores, el estado de oxidación de los compuestos (factor A), la configuración (B) y la esterificación (C). Los niveles de cada factor poseen la misma codificación.

También se decidió realizar el experimento con 4 concentraciones diferentes, con el fin de poder estimar las concentraciones efectivas (CE_{50}) de los

compuestos. Para poder incorporar el efecto de la concentración en sus cuatro niveles, ésta fue considerada como una variable de bloque. De esta manera, para todas las concentraciones se construyó un diseño factorial 2³ completo, además de un diseño para cada concentración con ocho puntos experimentales, y se aleatorizó dentro de cada bloque.

Esto también llevó a 32 puntos experimentales (8 por cada concentración) que se replicaron 4 veces.

Se obtuvieron dos variables de respuesta, la longitud de la radícula y la longitud del talluelo (expresadas en mm). Estas variables de respuesta fueron transformados como logaritmos naturales para su análisis estadístico, debido a la desigualdad de varianzas observadas con los datos sin transformar (Heterosedasticidad). Con la transformación logaritmo natural se logró mejorar la homogeneidad de las varianzas (Homosedasticidad).

De esta manera, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple, para ajustar los datos experimentales en un modelo completo, que incluyera a los factores y los bloques (concentraciones):

$$Y_{ijklm} = \mu + \tau_i + A_j + B_k + C_l + (AB)_{jk} + (AC)_{jl} + (BC)_{kl} + (ABC)_{jkl} + \epsilon_{ijklm}$$

Donde:

y= Variable dependiente (ln longitud de radícula o talluelo).

μ = Efecto medio general (media de los tratamientos).

τ_i = Efecto de los Bloques (Concentraciones).

A_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor A (Estado de Oxidación).

B_k = Efecto del k-ésimo nivel del factor B (Configuración).

C_l = Efecto del l-ésimo nivel del factor C (Esterificación).

$(AB)_{jk}$ = Efecto de la interacción entre el j-ésimo nivel del factor A y el k-ésimo nivel del factor B.

$(AC)_{jl}$ = Efecto de la interacción entre el j-ésimo nivel del factor A y el l-ésimo nivel del factor C.

$(BC)_{kl}$ = Efecto de la interacción entre el k-ésimo nivel del factor B y el l-ésimo nivel del factor C.

$(ABC)_{jkl}$ = Efecto de la interacción entre el j-ésimo nivel del factor A, el k-ésimo nivel del factor B y el l-ésimo nivel del factor C.

ϵ_{ijkl} = Componente del error experimental.

Además, se realizó el diseño factorial para obtener modelos individuales de efectos fijos para cada concentración específica con la siguiente ecuación general:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

y = Variable dependiente (ln longitud de radícula o talluelo).

μ = Efecto medio general (media de los tratamientos).

A_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor A (Estado de Oxidación).

B_j = Efecto del j -ésimo nivel del factor B (Configuración).

C_k = Efecto del k -ésimo nivel del factor C (Esterificación).

$(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel del factor A y el j -ésimo nivel del factor B.

$(AC)_{ik}$ = Efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel del factor A y el k -ésimo nivel del factor C.

$(BC)_{jk}$ = Efecto de la interacción entre el j -ésimo nivel del factor B y el k -ésimo nivel del factor C.

$(ABC)_{ijk}$ = Efecto de la interacción entre el i -ésimo nivel del factor A, el j -ésimo nivel del factor B y el k -ésimo nivel del factor C.

ε_{ijkl} = Componente del error experimental.

Adicionalmente, con el objeto de contrastar los efectos de los compuestos probados con respecto del control sobre el crecimiento de radícula y talluelo, se realizó un análisis de varianza de un criterio de clasificación, acompañado de una prueba de Dunnett. Para ello, se codificaron los diferentes compuestos de acuerdo a la tabla 6.35.

TABLA 6.35 CODIFICACION DE LOS COMPUESTOS PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION.

Compuesto	10 ⁻² M Codificación	10 ⁻³ M Codificación	10 ⁻⁴ M Codificación	10 ⁻⁵ M Codificación
S-(+)-Naproxeno	12	13	14	15
R-(-)-Naproxeno	22	23	24	25
S-(-)-Naproxol	32	33	34	35
R-(+)-Naproxol	42	43	44	45
S-(+)-Naproxenato de etilo	52	53	54	55
R-(-)-Naproxenato de etilo	62	63	64	65
S-(-)-Acetato de Naproxilo	72	73	74	75
R-(+)-Acetato de Naproxilo	82	83	84	85

TABLA 6.36
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻² M,
 EN RABANO, LONGITUD DE RADICULA.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Radícula ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Radícula ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación ^e (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	28± 6	-9	3.31± 0.24	-0.28	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	11± 3	-26	2.34± 0.28	-1.24*	96
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	31± 8	-6	3.42± 0.24	-0.17	100
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	5± 1	-32	1.50± 0.23	-2.09*	88
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	27± 6	-10	3.29± 0.23	-0.29	96
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	36± 8	-1	3.56± 0.21	-0.03	96
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	20± 13	-17	2.85± 0.64	-0.74*	88
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	42± 5	+5	3.74± 0.11	+0.15	100
Control	- ^f	-	-	-	-	37± 9	-	3.59± 0.24	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el punto control se encuentra fuera del dominio experimental del diseño factorial.

* Diferencia significativa, $p < 0.05$ en la prueba de Dunnett

TABLA 6.37
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻² M,
 EN RABANO, LONGITUD DE TALLUELO.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Talluelo ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Talluelo ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación ° (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	10± 1	-5	2.35±0.10	-0.36*	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	12± 2	-3	2.46±0.2	-0.24	96
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	13± 2	-2	2.56±0.18	-0.15	100
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	9± 2	-6	2.17±0.18	-0.53*	88
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	12± 2	-3	2.48±0.16	-0.22	96
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	14± 1	-1	2.64±0.06	-0.06	96
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	10± 3	-5	2.31±0.31	-0.34	88
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	14± 2	-1	2.64±0.13	-0.06	100
Control	- ^f	-	-	-	-	15± 3	-	2.70±0.22	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados)

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el punto control se encuentra fuera del dominio experimental del diseño factorial.

* Diferencia significativa, $p < 0.05$ en la prueba de Dunnett

TABLA 6.38
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻³ M,
 EN RABANO, LONGITUD DE RADICULA.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Radícula ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Radícula ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación · (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	38± 6	+1	3.64±0.16	+0.05	100
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	29± 13	-8	3.29±0.41	-0.29	88
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	35± 7	-2	3.53±0.21	-0.06	100
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	30± 3	-7	3.41±0.12	-0.18	100
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	43± 4	+6	3.77±0.10	+0.18	96
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	39±13	+2	3.62±0.32	+0.03	96
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	29± 8	-8	3.33±0.34	-0.26	96
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	47± 14	+10	3.81±0.37	+0.22	100
Control	- ^f	-	-	-	-	37± 9	-	3.59±0.24	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el punto control se encuentra fuera del dominio experimental del diseño factorial.

TABLA 6.39
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻³ M,
 EN RABANO, LONGITUD DE TALLUELO.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Talluelo ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Talluelo ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación • (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	14± 1	-1	2.67±0.06	-0.04	100
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	14± 3	-1	2.59±0.26	-0.11	88
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	15± 2	0	2.70±0.15	-0.001	100
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	18± 3	+3	2.87±0.14	+0.17	100
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	16± 3	+1	2.76±0.16	+0.06	96
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	16± 2	+1	2.78±0.14	+0.08	96
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	15± 2	0	2.68±0.14	-0.03	96
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	15± 1	0	2.68±0.08	-0.02	100
Control	- ^f	-	-	-	-	15± 3	-	2.70±0.22	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración *R*- se consideró el nivel bajo y la *S*- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el punto control se encuentra fuera del dominio experimental del diseño factorial.

TABLA 6.40
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁴ M,
 EN RABANO, LONGITUD DE RADICULA.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Radícula ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Radícula ^d	Diferencia vs. Control	Porciento de Germinación . (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	33± 9	-4	3.46± 0.29	-0.12	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	35± 4	-2	3.56±0.12	-0.03	96
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	31± 10	-9	3.38±0.4	-0.21	96
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	34± 7	-3	3.5±0.20	-0.09	96
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	39± 7	+2	3.65±0.18	+0.06	100
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	47± 9	+8	3.82±0.23	+0.23	96
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	29± 8	-8	3.33±0.31	-0.26	88
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	39± 4	+2	3.66±0.11	+0.08	92
Control	-	-	-	-	-	37± 9	-	3.59±0.24	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b. La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el punto control se encuentra fuera del dominio experimental del diseño factorial.

TABLA 6.41
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁴ M,
 EN RABANO, LONGITUD DE TALLUELO.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Talluelo ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Talluelo ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación • (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	14± 5	-1	2.57± 0.36	-0.13	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	12± 3	-3	2.47± 0.24	-0.23	96
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	11± 3	-4	2.5± 0.37	-0.20	96
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	13± 2	-2	2.57± 0.17	-0.13	96
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	15± 2	0	2.68± 0.12	-0.02	100
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	16± 1	+1	2.72± 0.02	+0.02	96
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	11± 2	-4	2.39± 0.19	-0.31	88
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	13± 1	-2	2.59± 0.09	-0.11	92
Control	- ^f	-	-	-	-	15± 3	-	2.70± 0.22	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración *R*- se consideró el nivel bajo y la *S*- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el punto control se encuentra fuera del dominio experimental del diseño factorial.

TABLA 6.42
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁵ M,
 EN RABANO, LONGITUD DE RADICULA.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Radícula ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Radícula ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación • (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	44± 11	+7	3.75±0.28	+0.17	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	39± 12	+2	3.62±0.33	+0.03	100
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	37± 5	0	3.59±0.15	+0.01	96
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	39± 17	+2	3.54±0.59	-0.04	92
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	41± 6	+4	3.72±0.14	+0.13	92
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	36± 13	-1	3.52±0.37	-0.07	100
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	41± 9	+4	3.7±0.23	+0.11	100
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	45± 10	+8	3.78±0.25	+0.20	92
Control	-	-	-	-	-	37± 9	-	3.59±0.24	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el punto control se encuentra fuera del dominio experimental del diseño factorial.

TABLA 6.43
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻⁵ M,
 EN RABANO, LONGITUD DE TALLUELO.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Talluelo ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Talluelo ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación ^e (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	15± 3	0	2.68±0.22	-0.02	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	15± 4	0	2.65±0.30	-0.05	100
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	14± 3	-1	2.66±0.22	-0.05	96
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	15± 3	0	2.71±0.20	+0.007	92
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	15± 2	0	2.73±0.13	+0.03	92
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	16± 3	+1	2.76±0.18	+0.06	100
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	16± 2	+1	2.79±0.14	+0.09	100
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	17± 2	+2	2.81±0.12	+0.11	92
Control	- ^f	-	-	-	-	15± 3	-	2.70±0.22	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b. La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f. No es aplicable, ya que el punto control se encuentra fuera del dominio experimental del diseño factorial

TABLA 6.44
 TABLA DE MODELOS Y ANOVA PARA LN RADICULA
 RABANO.

FACTOR	10 ⁻² M COEFICIENTES	10 ⁻³ M COEFICIENTES	10 ⁻⁴ M COEFICIENTES	10 ⁻⁵ M COEFICIENTES	TODAS LAS CONCENTRACIONES
[C] ^a	-	-	-	-	-0.1938*
A: Edo. de Oxidación	-0.2192*	-0.01546	0.09045	-0.0381	-0.0459
B: Configuración	-0.1199*	-0.03002	-0.0783	0.0024	-0.0562
C: Esterificación	0.3621*	0.0829	0.0705	0.0260	0.1357*
AB	-0.0472	0.1058	0.0234	0.0453	0.0315
AC	0.5014*	0.0992	0.0366	0.0105	0.1616*
BC	0.0619	-0.0316	-0.0415	0.0593	0.0123
ABC	0.1925*	0.0507	0.0167	0.0247	0.0709
Constante	3.0056	3.5503	3.5452	3.6545	2.7608
R² Ajustada	0.86	0.18	0.14	-0.16	0.3477
F	28.22	1.94	1.71	0.38	9.3954
p	<0.0001	0.1063	0.1552	0.9074	<0.0001

a: Las concentraciones fueron expresadas como el inverso negativo del logaritmo de la concentración molar

* Significativa ($\alpha = 0.05$)

TABLA 6.45
 TABLA DE MODELOS Y ANOVA PARA LN TALLUELO
 RABANO.

FACTOR	10 ⁻² M COEFICIENTES	10 ⁻³ M COEFICIENTES	10 ⁻⁴ M COEFICIENTES	10 ⁻⁵ M COEFICIENTES	TODAS LAS CONCENTRACIONES
[C] ^a	-	-	-	-	-0.0655*
A: Edo. de Oxidación	0.0260	0.0145	0.0273	0.0095	0.0185
B: Configuración	-0.0304	0.0174	-0.0485	0.0179	-0.0100
C: Esterificación	0.0682*	0.0084	0.0329	0.0498	0.0407*
AB	-0.0421	0.0289	0.0411	0.0087	0.0083
AC	0.0942*	-0.0086	0.0343	0.0043	0.0302
BC	-0.0099	-0.0622	-0.0558	0.0085	-0.0290
ABC	0.0835*	-0.0329	-0.0005	-0.0132	0.0084
Constante	2.4503	2.7150	2.5612	2.7232	2.3842
R² Ajustada	0.39	0.06	-0.02	-0.16	0.1275
F	3.85	1.27	0.90	0.38	3.3017
p	0.0060	0.3054	0.5236	0.9045	0.0019

a: Las concentraciones fueron expresadas como el inverso negativo de la concentración molar.

* Significativa ($\alpha = 005$)

6.2.2.4 EXPERIMENTOS CON RABANO (*Raphanus sativus* L.).

A. ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION.

Las tablas 6.36-6.43 muestran los resultados de cada uno de los factoriales, indicándose los compuestos que de acuerdo con la prueba de Dunnett resultaron con diferencias respecto del control.

Los compuestos que resultaron con diferencias estadísticamente significativas con respecto del control para radícula de rábano son el *S*(+)-naproxeno, el *R*(-)-naproxeno y el *S*(-)-acetato de naproxilo, a la concentración de 10^{-2} M.

Con respecto a los efectos sobre el crecimiento de talluelo, los compuestos que muestran un efecto significativo sobre el crecimiento de talluelo de rábano son el *S*(+)-naproxeno y el *R*(+)-naproxol, a la concentración de 10^{-2} M, siendo éste último menos activo que el naproxeno. El *S*(-)-acetato de naproxilo quedó en el margen de significación de la prueba, aunque puede apreciarse la tendencia de su efecto sobre el crecimiento de talluelo. Se aprecia así que en rábano los ácidos carboxílicos son en general más activos que los alcoholes y que los compuestos libres son más activos que los esterificados.

B. ANALISIS DE VARIANZA DEL MODELO COMPLETO (REGRESION LINEAL MULTIPLE) Y LOS MODELOS INDIVIDUALES PARA CADA CONCENTRACION.

Las tablas 6.44 y 6.45 muestran los datos obtenidos de la evaluación estadística y comparativa de los modelos obtenidos para cada una de las concentraciones y para el análisis de regresión múltiple, para las variables de respuesta obtenidas en los experimentos (longitud de radícula y talluelo, expresadas como su logaritmo natural). En estas tablas se observa que se obtienen modelos significativos únicamente para la concentración 10^{-2} M. Es decir, los efectos de los factores se difuminan al disminuir la concentración de los compuestos. Aún así, el modelo de regresión lineal múltiple que incluye a los bloques (todas las concentraciones) resulta significativo y alcanza a detectar efectos significativos de la concentración ($\log_{10} C$), el factor C (esterificación) y la interacción AC (Entre el estado de oxidación y la esterificación), para inhibición del crecimiento de radícula, y de la concentración ($\log_{10} C$) y la esterificación (C) para inhibición de crecimiento de talluelo. El hecho de que el efecto de la concentración resulte significativo es lógico puesto que se espera un grado de actividad diferente a diferentes concentraciones. Los efectos de la esterificación (C) y la interacción AC (entre el estado de oxidación y la esterificación) resultan interesantes porque son significativos e independientes de la concentración a la cual se realice el experimento.

B.1 EFECTOS DEL ESTADO DE OXIDACION (A).

El efecto del estado de oxidación (A) resulta significativo únicamente en el modelo de la concentración 10^{-2} M en radícula. El signo del coeficiente es negativo, lo que indica que los ácidos carboxílicos son más activos que los correspondientes alcoholes para inhibir la radícula o talluelo de rábano.

B.2 EFECTOS DE LA CONFIGURACION.

El efecto de la configuración resulta significativo únicamente en el modelo de 10^{-2} M para radícula. El coeficiente que lo determina es negativo, lo que significa que en este caso los derivados S aparentan ser más activos que los derivados de configuración R.

B.3 EFECTOS DE LA ESTERIFICACION.

El factor C resulta significativo en los modelos completos para radícula y talluelo y en los modelos de concentración 10^{-2} M para radícula y talluelo de rábano.

Como se observa en las tablas 6.41 y 6.42, estos coeficientes son positivos, lo que significa que los compuestos esterificados son menos activos contra radícula y talluelo de rábano que los correspondientes derivados libres. Es decir, la esterificación deprime la actividad de los compuestos sobre la inhibición de radícula y talluelo.

B.4 INTERACCIONES SIGNIFICATIVAS ENTRE FACTORES.

Las interacciones que resultaron significativas son la interacción entre el estado de oxidación y la esterificación (AC), para los dos modelos completos y los dos modelos de concentración 10^{-2} M, para radícula y talluelo de rábano. Todos los coeficientes son positivos. Al analizar un ejemplo de las gráficas de interacción (AC) obtenidas (En este caso para radícula), puede observarse una dependencia de ambos factores. Es decir, el efecto del estado de oxidación sobre la actividad de los compuestos depende de la esterificación de los mismos. La interacción se puede explicar por la inactividad de los esteres respecto de los correspondientes compuestos libres.

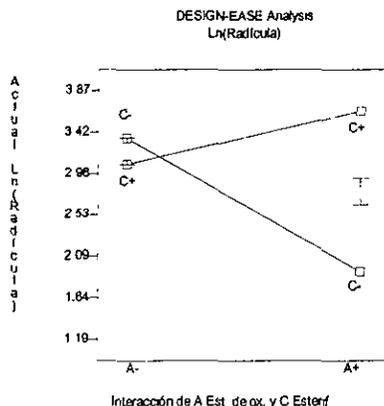


FIGURA 6.46 INTERACCION DEL ESTADO DE OXIDACION Y LA ESTERIFICACION.

En la figura 6.46 puede apreciarse que en los alcoholes (es decir, el nivel bajo del estado de oxidación A), la esterificación de los mismos tiene un efecto ligeramente inhibitorio en el crecimiento de la radícula de rábano, que prácticamente se pierde en el error experimental. Lo contrario ocurre con los ácidos (el nivel alto de estado de oxidación), ya que se observa que los ácidos carboxílicos libres son notablemente más activos que los correspondientes ésteres.

En la figura 6.47 se observa la gráfica de la interacción AC para talluelo de rábano; puede observarse, al igual que para radícula, una dependencia de ambos factores.

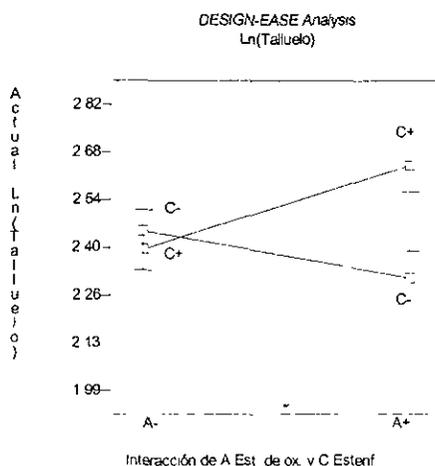


FIGURA 6.47 INTERACCION ENTRE EL ESTADO DE OXIDACION Y LA ESTERIFICACION.

La figura 6.47 muestra que los ácidos libres (el nivel alto de estado de oxidación), al igual que en radícula, son más activos que los ésteres correspondientes.

Otra interacción que resultó significativa es la interacción ternaria (ABC) para ambos modelos de la concentración 10^{-2} M, el de radícula y el de talluelo de rábano. Esta interacción es difícil de interpretar debido al grado de combinaciones posibles de factores, pero refleja un requerimiento estructural complejo para que la actividad inhibitoria sobre radícula o talluelo se manifieste.

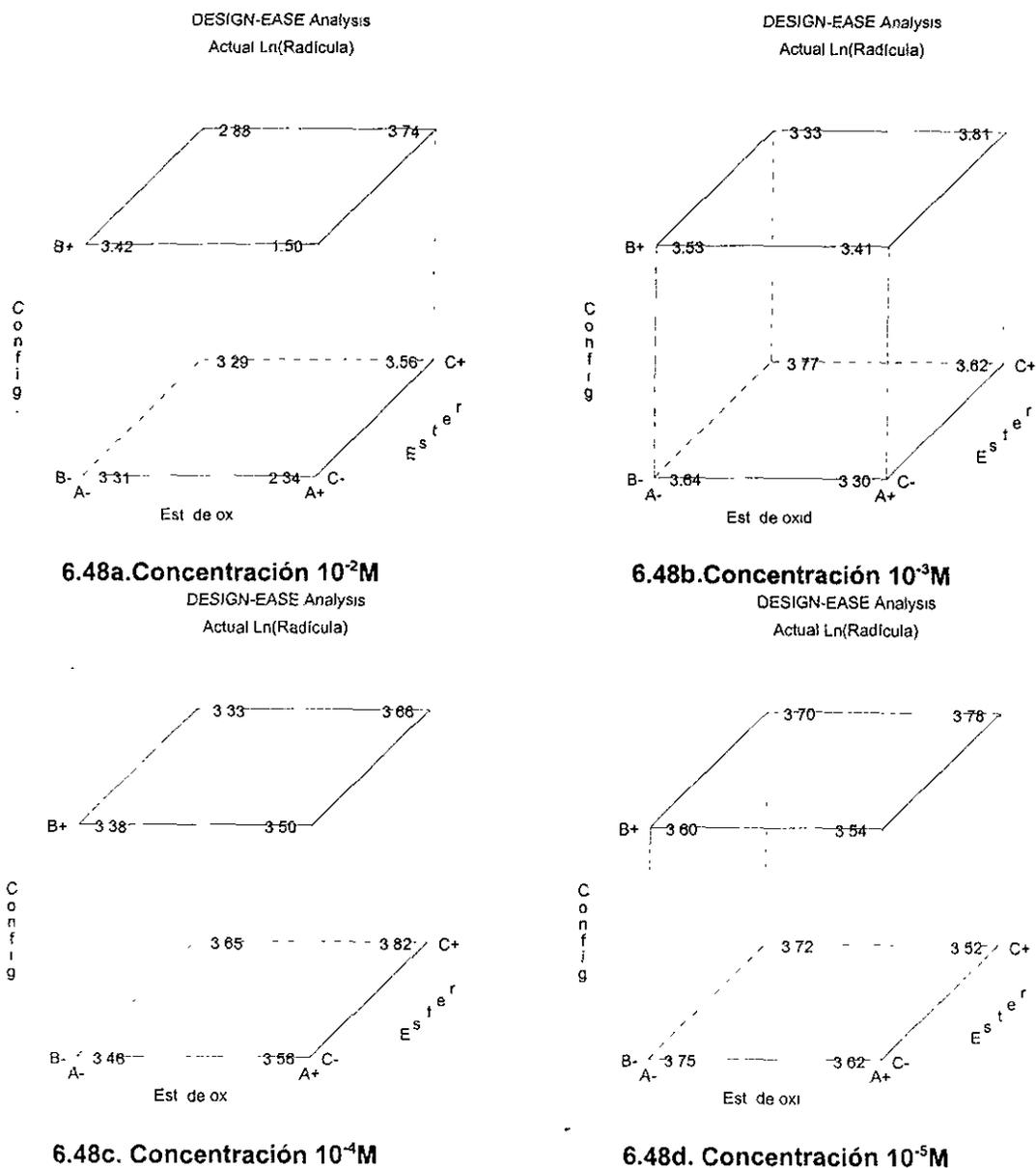


FIGURA 6.48 GRAFICAS DE INTERPRETACION PARA LN RADICULA DE RABANO.

La gráfica de interpretación para radícula de rábano, para la concentración 10^{-2} M (figura 6.48) muestra los efectos sobre el crecimiento de cada uno de los compuestos. A pesar de que los dos enantiómeros de naproxeno poseen actividad inhibitoria notable sobre el crecimiento de radícula, puede

apreciarse una tendencia de mayor actividad del antípodo *S* (Que es el enantiómero biológicamente activo como antiinflamatorio) sobre el *R*. El *S*(-)-acetato de naproxilo también mostró poseer actividad inhibitoria, aunque en grado menor que los ácidos carboxílicos.

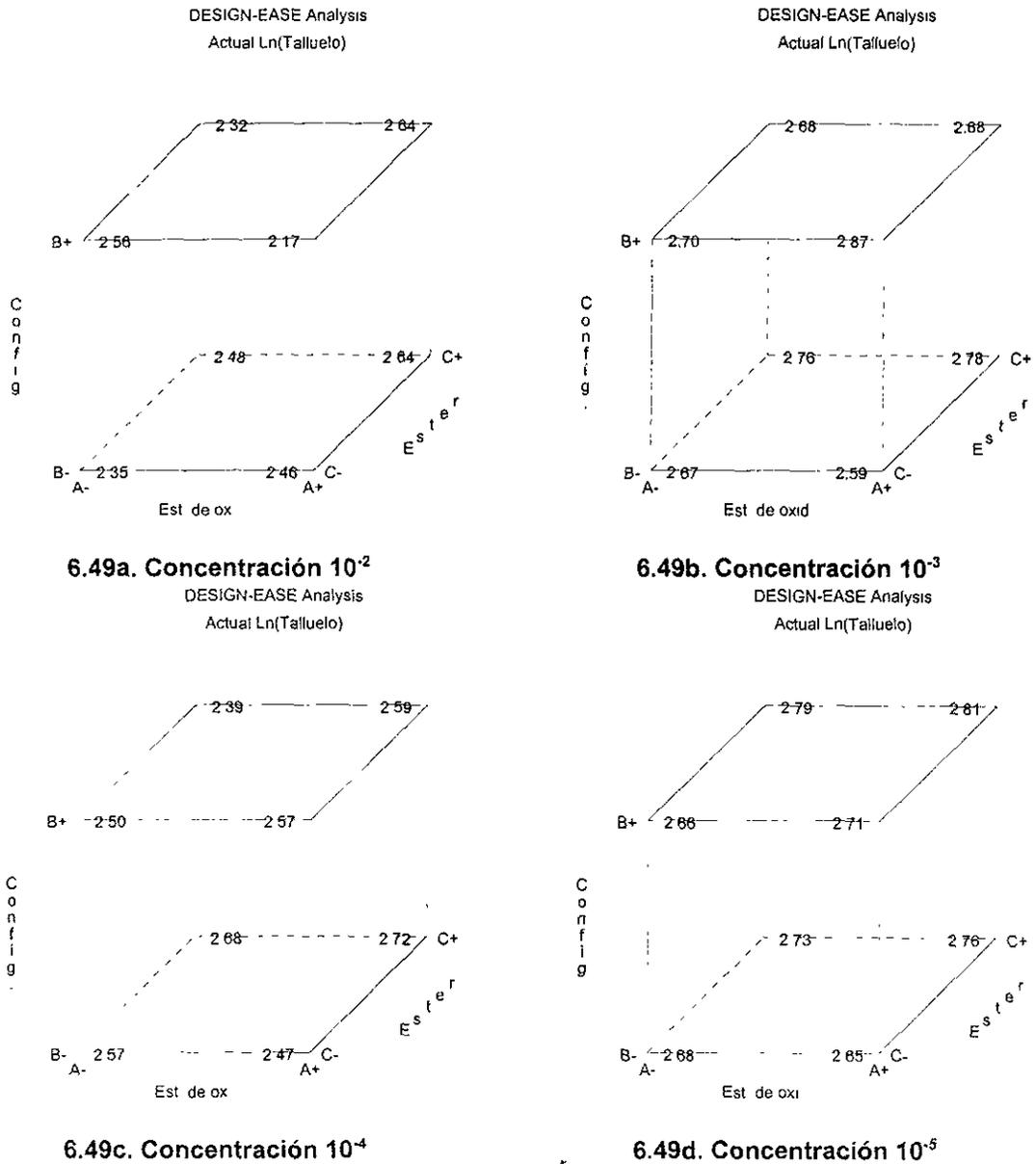


FIGURA 6.49 GRAFICAS DE INTERPRETACION PARA LN TALLUELO DE RABANO EN LAS CUATRO CONCENTRACIONES PROBADAS.

A pesar de que los modelos de ln de radícula para las otras concentraciones probadas (10^{-3} - 10^{-5} M) resultaron no significativos, debido a que los compuestos manifiestan efectos en el crecimiento de radícula similares al

crecimiento del control, las tendencias de actividad de los compuestos se mantienen. Sus gráficas de interpretación se incluyen en la figura 6.48.

Por otro lado, la figura 6.49 muestra las gráficas de interpretación para talluelo de rábano. El talluelo resultó ser bastante menos sensible que la radícula, como se esperaba si los compuestos probados tuviesen actividad de auxina, puesto que en el proceso de germinación, las auxinas de origen natural se concentran en la raíz y es ahí donde ejercen su efecto regulador del crecimiento, esperándose entonces que un compuesto exógeno con propiedades de auxina y a una concentración determinada afecte mayormente el crecimiento de radícula con respecto del crecimiento del talluelo

TABLA 6.50
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻² M,
 EN TRIGO, LONGITUD DE RADICULA.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Radícula ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Radícula ^d	Diferencia vs. Control	Porcentaje de Germinación · (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	20± 8	-14	2.95±0.39	-0.51	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	22± 5	-12	3.07±0.27	-0.38	88
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	28± 6	-6	3.32±0.22	-0.13	96
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	20± 2	-14	2.99±0.08	-0.46	96
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	22± 11	-12	2.97±0.54	-0.48	83
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	44± 9	+10	3.77±0.19	+0.32	100
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	24± 11	-10	3.11±0.49	-0.34	79
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	40± 9	+6	3.67±0.25	-0.09	96
Control	- ^f	-	-	-	-	34± 13	-	3.45±0.43	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d. Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.

TABLA 6.51
 RESULTADOS DEL FACTORIAL 2³ PARA LA CONCENTRACION 10⁻² M,
 EN TRIGO, LONGITUD DE TALLUELO.

Estado de Oxidación ^a		Configuración ^b		Esterificación ^c		Variables de Respuesta				
Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Nivel	Codificado	Talluelo ^d (mm)	Diferencia vs. Control (mm)	Ln Talluelo ^d	Diferencia vs. Control	Porciento de Germinación e (%)
Naxol	-1	R	-1	Libre	-1	16± 3	-10	2.78±0.19	-0.47*	96
Naxeno	+1	R	-1	Libre	-1	16± 2	-10	2.78±0.12	-0.46*	88
Naxol	-1	S	+1	Libre	-1	19± 4	-7	2.92±0.21	-0.33	96
Naxeno	+1	S	+1	Libre	-1	17± 1	-9	2.82±0.08	-0.42*	96
Naxol	-1	R	-1	Esterificado	+1	19± 2	-7	2.95±0.11	-0.29	83
Naxeno	+1	R	-1	Esterificado	+1	26± 1	0	3.26±0.05	+0.02	100
Naxol	-1	S	+1	Esterificado	+1	17± 8	-9	2.77±0.49	-0.47*	79
Naxeno	+1	S	+1	Esterificado	+1	25± 6	-1	3.21±0.25	+0.22	96
Control	-	-	-	-	-	26± 4	-	3.25±0.17	-	99

a: El alcohol fue considerado como el estado de más baja oxidación y el ácido el estado de más alta oxidación.

b: La configuración se expresa como absoluta. La configuración R- se consideró el nivel bajo y la S- como el nivel alto.

c: La forma libre del compuesto se consideró como el nivel bajo, y el compuesto esterificado como el nivel alto.

d: Media ± desviación estándar (N=4 replicados).

e: Porcentaje de 24 semillas (6 semillas por replicado) para los problemas y 72 semillas (6 semillas por contenedor) para el control.

f: No es aplicable, ya que el control queda fuera del dominio experimental del diseño factorial.

* Diferencia significativa, $p < 0.05$ en la prueba de Dunnett

7. CONCLUSIONES.

7.1 PARTE QUIMICA.

Fueron obtenidos 6 compuestos de naturaleza quiral derivados de los ácidos *S*(+)- y *R*(-)- 6-metoxi- α -metil-2-naftalenacéticos, con rendimientos de buenos a excelentes (85-95%). Las propiedades fisicoquímicas así como las señales espectroscópicas de los compuestos fueron consistentes con lo anteriormente reportado en la literatura.

7.2 PARTE BIOLÓGICA.

Se pudieron comprobar las hipótesis de que la actividad encontrada del naproxeno y derivados en *A. salina* depende del estado de oxidación y la esterificación, no así de la configuración, que resulta no significativa. En el caso del rábano, la configuración sí resulta significativa para radícula, aunque la diferencia en actividad entre los dos enantiómeros del naproxeno es pequeña.

La aplicación del diseño factorial de experimentos resultó útil y apropiada en la evaluación preliminar de actividad y/o toxicidad de los compuestos a través de bioensayos en *Artemia salina* y de germinación de semillas. Estos bioensayos, a su vez, podrían constituir una herramienta rápida y eficiente para evaluación de actividad o de toxicidad de numerosos compuestos.

El diseño de experimentos resultó particularmente valioso para evaluar interacciones entre factores estructurales de los compuestos, que difícilmente hubieran podido detectarse con el uso de los procedimientos experimentales convencionales para estudios de relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR).

7.2.1 EXPERIMENTOS CON *A. salina*.

El diseño de experimentos factorial mostró efectos significativos en el estado de oxidación y la esterificación, pero no de la configuración, sobre la actividad de los compuestos en *A. salina*.

La interacción entre la configuración y el estado de oxidación resultó significativa, además de la interacción entre los tres factores, lo que revela una gran complejidad estructural en los requerimientos de actividad para el modelo estudiado.

Los alcoholes primarios y sus correspondientes ésteres mostraron una mayor letalidad contra *A. salina* que los naproxenos y sus derivados esterificados.

Pudo hacerse la estimación de CL_{50} de los compuestos en artemia, lo que permitió incorporar estas estimaciones en modelos de relación estructura-actividad cuantitativa, al poderlos relacionar con parámetros fisicoquímicos disponibles de los compuestos.

Con respecto a los estudios de estructura-actividad cuantitativa (QSAR), pudo encontrarse un modelo estadísticamente significativo que relaciona el punto de fusión de los compuestos con su actividad sobre *Artemia salina* (R^2 ajustada = 0.7305, $p=0.0042$). Con el fin de hacer una evaluación subsecuente, podría realizarse la síntesis de otros derivados esterificados, la estimación de su actividad biológica, y de esta manera evaluar la predictibilidad del modelo.

Además se encontró un modelo altamente significativo ($p=0.001$) que relaciona el punto de fusión y la constante de flujo máxima a través de la piel (J_m) con la actividad biológica en *A. salina*. El coeficiente de determinación encontrado (R^2 ajustada=0.97) indica que el modelo pudiera tener un gran potencial predictivo. Adicionalmente, como se dispone de información acerca de las constantes de flujo máximas para otros derivados tanto del naproxeno como de otros antiinflamatorios no esteroideos, podría realizarse una síntesis subsecuente de los mismos y así poder estimar su actividad sobre *A. salina*.

7.2.2 EXPERIMENTOS DE GERMINACION DE SEMILLAS.

El diseño de experimentos factorial para radícula y talluelo de rábano y trigo mostró efectos significativos en el estado de oxidación, la configuración y la esterificación, además de la interacción entre el estado de oxidación y la esterificación y la interacción de los tres factores sobre la actividad de los compuestos en la germinación. La especie monocotiledónea (trigo) manifestó una menor sensibilidad a los compuestos en radícula que la dicotiledónea (rábano), como se podría esperar de compuestos con propiedades de auxina.

El hecho de que la interacción ternaria haya resultado significativa revela una gran complejidad estructural en los requerimientos para manifestación de actividad sobre radícula o talluelo.

En el caso de los modelos de germinación los ácidos carboxílicos (naproxenos) resultaron más activos sobre radícula y talluelo que los alcoholes primarios (naproxoles). Por otro lado, los ésteres en general manifestaron menor actividad sobre la germinación que sus correspondientes derivados libres. Casos especiales son el del *R*-naproxol, que aparentemente manifiesta mayor actividad en talluelo en ambas especies estudiadas, y el *S*-acetato de naproxilo, que mostró gran actividad en inhibición de crecimiento de radícula de rábano y talluelo de trigo.

La actividad del *S*-acetato de naproxilo coincidió con lo encontrado en el bioensayo con *A. salina*, lo que sugiere una toxicidad mayor de este derivado.

Así pues, la información obtenida en estos diseños experimentales podrá ser útil para proponer nuevas hipótesis en el diseño de profármacos de los compuestos antiinflamatorios no esteroideos, con posible impacto en la terapéutica y toxicología humana.

8. PARTE EXPERIMENTAL.

8.1 INSTRUMENTACION.

Todas las pesadas se realizaron en una balanza analítica marca Ohaus modelo AS120S.

Para concentrar se empleó un rotavapor Büchi B-480, con vacío y refrigerante de serpentín con corriente de agua.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns A-169296 y no están corregidos.

Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 202 con una celda de 10 cm de longitud.

Los espectros de Infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 1605 FT-IR, en pastilla de bromuro de potasio. Las señales se dan en cm^{-1} (ν).

Los Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H RMN) y de carbono 13 (^{13}C RMN) se determinaron en dos equipos (Instituto de Química): Varian Gemini 200, a 200 MHz y 50 MHz, respectivamente, o Varian VXR-300 a 300MHz y 75 MHz. En ambos se utilizó dimetilsulfóxido ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) o cloroformo (CDCl_3) deuterados como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos se dan en ppm (δ).

Los espectros de Masas se realizaron en un aparato JEOL-JMS-AX505-HA, por introducción directa de la muestra en el modo de impacto electrónico.

8.2 MATERIALES QUIMICOS.

A continuación se enlistan los disolventes y reactivos químicos utilizados:

- Acetato de etilo (Mallinckrodt, R.A.).
- Acetona (Baker, G.R.).
- Acido acético glacial (Técnica Química, R.A.).
- Acido p-toluensulfónico (PTSA, Aldrich, G.R.).
- Anhídrido acético (Mallinckrodt, R.A.).
- Ciclohexano (Mallinckrodt, R.A.).
- Cloroformo (Mallinckrodt, R.A.).
- Dimetilsulfóxido (Mallinckrodt, R.A.).
- Etanol absoluto (Mallinckrodt).
- Hexanos (Mallinckrodt, R.A.).
- Hidruro de litio y aluminio (Aldrich, G.R.).
- Piridina (Merck, R.A.).
- Sulfato de sodio anhidro (Mallinckrodt, R.A.).
- Tetrahidrofurano estabilizado (Mallinckrodt, R.A.).
- Tolueno (Mallinckrodt, R.A.).
- S-Naproxeno, que fue obtenido por extracción de tabletas comerciales (Naxen^{MR}, Syntex), mediante el procedimiento descrito más adelante.
- R-Naproxeno, que fue una donación del Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

8.3 MATERIALES BIOLÓGICOS.

Para realizar los bioensayos con *Artemia*, se preparó medio salino utilizando sal Instant Ocean™ (Aquarium Systems), a una concentración total de 38 g/L.

Se utilizaron además huevecillos de *Artemia* sp. (*A. franciscana*) de la marca San Francisco Bay Brand Inc.

Para realizar los bioensayos en plantas, se utilizaron semillas de trigo (*Triticum vulgare*), maíz (*Zea mays*) y pasto inglés (*Axonopus compressus*), como ejemplos de monocotiledóneas. Estas semillas fueron de tipo comercial, especiales para siembra. Las especies de dicotiledóneas que se utilizaron fueron lenteja (*Lens esculenta*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), y rábano (*Raphanus sativus* L.); las dos primeras de tipo comercial, y la última de la variedad French Breakfast de la marca Lone Star Seed Co. (Sn. Antonio, Texas). Se utilizaron 5 ó 6 semillas por replicado (vaso), de acuerdo con el experimento particular.

Las pruebas de germinación se llevaron a cabo en vasos de vidrio de 10 cm de alto por 7 cm de diámetro exterior y 5.4 cm de diámetro interior.

Para estos bioensayos se utilizó papel Whatman No. 1.

8.4 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios de aluminio recubiertos con gel de sílice 60F₂₅₄ (Merck). Los compuestos se revelaron con luz UV y por exposición a vapores de yodo.

TABLA 8.1 COMPOSICION DE LOS SISTEMAS DE ELUCION UTILIZADOS.

SISTEMA	COMPOSICION	PROPORCION
I	Hexano:CHCl ₃ :Acetato de etilo	50:35:15
II ^a	Tolueno:THF:Acido acético 6M	180:18:6

a. Según fórmula encontrada en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, VI edición.

8.5 METODOS COMPUTACIONALES.

Se realizaron métodos de estadística descriptiva por medio del programa Excel™ (Microsoft Co.).

Los análisis de varianza de un criterio de clasificación y la prueba de Dunnett, además de los análisis de regresión por mínimos cuadrados se realizaron en el programa computacional JMP™ 3.1.4 (SAS Institute, Inc.).

Para realizar los análisis de regresión PROBIT y regresión múltiple se utilizó el programa computacional SPSS™ 6.0 for Windows (SPSS, Inc.)

Los análisis de Diseño de Experimentos se llevaron a cabo en el programa computacional Design-Ease™ (Versión 3), de la marca STAT-EASE, Inc.

8.6 OBTENCION DEL ACIDO *S*(+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO (*S*(+)-NAPROXENO) A PARTIR DE TABLETAS COMERCIALES.

Se tomaron 10 tabletas de Naxen^{MR} (Syntex) de 250 mg c/u (Aproximadamente 2.5 g, 10.86 mmol) y se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo amarillo fino. Se vertió el polvo en un vaso de precipitados con 15 mL de acetato de etilo caliente, agitando vigorosamente hasta que en el fondo del vaso sólo quedó un residuo pegajoso amarillento. Se filtró la solución caliente en un Büchner, se concentró la solución por calor, y se dejó cristalizar sobre baño de hielo. Se obtuvieron 2.3075 g de polvo blanco no cristalino (10.03 mmol, 92.3%, p.f. 154-155°C, $[\alpha]^{25}_D=+67.5$, 0.281 g/100mL; reportado en la literatura, p.f. 155°C, $[\alpha]^{25}_D=+66$).

8.7 SINTESIS DEL *S*(+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO (*S*(+)-NAPROXENATO DE ETILO).

Una solución de 5g de *S*(+)Naproxeno (21.7 mmol), 75 mL de etanol absoluto y 0.56 g de ácido *p*-toluensulfónico (PTSA, 3.26 mmol) se calentó a reflujo por 6 horas, después de lo cual la mezcla de reacción se dejó toda la noche a temperatura ambiente, formándose agujas largas blanco-nacaradas (2.51g) que se filtraron en un Büchner a vacío y se lavaron con etanol helado y agua helada. Las aguas madres etanólicas se concentraron a vacío y cristalizaron sobre baño de hielo (2.82g). Se obtuvo en total 5.33g (20.61 mmol, 95%) de agujas largas blanco-nacaradas (Rf: 0.68, sistema I, p.f. 80 °C, $[\alpha]^{25}_D=+48.0$, 0.125 g/100mL; p.f. reportado en la literatura, 75°C).

8.8 SINTESIS DEL *S*(-)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL (*S*(-)-NAPROXOL).

1g de hidruro de litio y aluminio (26 mmol) se suspendió en 35 mL de tetrahidrofurano anhidro sobre baño de hielo. Por otro lado una solución de 5g de *S*-Naproxenato de etilo (15 mmol) en 15 mL de tetrahidrofurano anhidro se adicionó gota a gota a la suspensión del hidruro. Terminada la adición, se retiró el baño de hielo y se dejó agitar por media hora más, confirmándose la terminación de la reacción por CCF.

Se adicionaron entonces gota a gota 15 mL de agua, seguidos de 20 mL de NaOH al 30%, formándose una suspensión que se filtró en un embudo Büchner a vacío. Se puso el filtrado en un embudo de separación, adicionando 10 mL de acetato de etilo y haciéndose lavados con NaOH al 10%, Brine y agua hasta pH neutro. Se separó la fase orgánica, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a vacío, resultando un sólido blanco que se cristalizó de acetato de etilo obteniéndose 3.36 g (12 mmol, 80%) de cristales blanco nacarados (Rf: 0.35, sistema I, p.f. 91 °C, $[\alpha]^{25}_D=-17.59$, 0.341 g/100mL; p.f. reportado en la literatura, 88-89°C, $[\alpha]^{25}_D$ reportado en la literatura, -18).

8.9 SINTESIS DEL ACETATO DE *S*-(-)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETILO (*S*-(-)-ACETATO DE NAPROXILO).

1g de *S*-(-)-Naproxol (4.63 mmol) se disolvió en 2 mL de piridina, poniéndose sobre baño de hielo. Se adicionó gota a gota 5 mL (4.53g, 44 mmol) de anhídrido acético con 0.5 mL de piridina. Se dejó agitar por 1 hora en baño de hielo. Se vació la mezcla de reacción sobre 30 mL de agua-hielo, formándose un polvo blanco (1.13g, 4.35 mmol, 94%) que se filtró en Büchner a vacío. Por cristalización de ciclohexano se obtuvo 1.09g (4.21 mmol, 91%) de agujas pequeñas blanco-nacaradas (Rf: 0.66, sistema I, p.f. 61 °C, $[\alpha]_D^{25} = -18.86$, 0.265 g/100mL; p.f. reportado en la literatura, 61 °C).

8.10 SINTESIS DEL *R*-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO (*R*-(-)-NAPROXENATO DE ETILO).

Esta síntesis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito par el *S*-(+)-Naproxenato de etilo. Las cantidades utilizadas de reactivos fueron: 0.5g de *R*-(-)-Naproxeno (2.17 mmol), 10 mL de etanol absoluto y 60 mg de ácido *p*-toluensulfónico (PTSA, 0.326 mmol). Se obtienen agujas largas blanco-nacaradas (0.4907g, 1.89 mmol, 87.5%. Rf: 0.69, sistema I, p.f. 79.5 °C, $[\alpha]_D^{25} = -49.74$, 0.197 g/100mL).

8.11 SINTESIS DEL *R*-(+)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL (*R*-(+)-NAPROXOL).

Esta síntesis se realizó siguiendo el procedimiento descrito para el *S*-(-)-Naproxol. Se utilizaron 50 mg de hidruro de litio y aluminio (1.16 mmol), 3.5 mL de tetrahidrofurano anhidro y 250 mg de *R*-(-)-Naproxenato de etilo (0.968 mmol).

Resultó un sólido blanco amarillento (202.3 mg, 0.93 mmol, 96%) que se recrystalizó de ciclohexano, obteniéndose 176.3 mg (0.81 mmol, 85%) de cristales blanco-nacarados (Rf: 0.34, sistema I, p.f. 91-92 °C, $[\alpha]_D^{25} = +17.9$, 0.162 g/100mL).

8.12 SINTESIS DEL ACETATO DE *R*-(+)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETILO (*R*-(+)-ACETATO DE NAPROXILO).

Se siguió el procedimiento descrito para sintetizar *S*-(-)-Acetato de naproxilo, utilizándose 100mg (5 mmol) de *R*-Naproxol, 0.2 mL de Piridina y 1 mL (1.1g, 9 mmol) de anhídrido acético. Se formó un polvo blanco amarillento (p.f. 59 °C) que por recrystalización de ciclohexano da 99 mg (4.25 mmol, 85%) de agujas pequeñas blanco-nacaradas (Rf: 0.66, sistema I, p.f. 61 °C, $[\alpha]_D^{25} = +20.68$, 0.29 g/100mL).

8.13 BIOENSAYOS CON *A. Salina*.

1. Se preparó 1 L de medio salino Instant Ocean™ (38 g/1000 mL de agua destilada), se colocó en una pecera con aireación y se estabilizó por 2 horas previas a la siembra de artemias a 28 °C de temperatura.
2. Se pesaron 150 mg de huevecillos de *Artemia* (*A. franciscana*, marca San Francisco Bay), se suspendieron en solución etanólica al 70%, agitando por 2 minutos, se filtraron y se realizaron varios lavados con medio salino. Se suspendieron en el medio salino preparado y estabilizado y se dejaron bajo iluminación de luz blanca, con aireación y a la temperatura indicada por 48 horas aproximadamente, hasta que los huevecillos eclosionaron liberando las artemias.
3. Se prepararon soluciones de concentración 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M y 10^{-6} M de los 8 compuestos en Acetona.
4. Se puso 1 mL de la solución correspondiente a cada vial, según el orden de aleatorización generado por el programa de computadora Design-Ease™.
5. Se dejan evaporar los viales bajo campana de extracción.
6. Se colocan 50 μ L de DMSO a cada vial, agitándose para disolver la mayor cantidad de compuesto.
7. Se prepara más medio salino Instant Ocean™, colocándose aproximadamente 2 mL a cada vial.
8. Se depositan 10 artemias en cada vial, siguiendo el esquema de aleatorización generado por el Design-Ease™(Ver Anexo).
9. Se afora cada vial a 5 mL con más medio salino.
10. Se dejan los viales tapados con vidrio a temperatura constante (28 °C) y con iluminación de luz blanca por 24 horas.
11. Se realizan las lecturas de los viales. Se cuentan artemias vivas, muertas y totales, respetando la aleatorización generada por el Design-Ease™.

8.14 BIOENSAYOS CON PLANTAS.

Los bioensayos con semillas se realizaron de acuerdo al siguiente procedimiento general:

1. Se prepararon soluciones de los compuestos en acetona, de acuerdo al experimento particular. Como control se utilizó acetona grado analítico.
2. Se colocaron círculos de papel filtro Whatman No. 1 cortados al tamaño del fondo de los vasos (5.3 cm de diámetro). Los discos se impregnaron con 1 mL de la solución correspondiente.
Nota: El orden de aplicación de las soluciones fue establecido aleatoriamente, de acuerdo con el programa computacional Design Ease™.
3. Los vasos se dejan secar en condiciones ambientales por 18-24 horas.

4. Las semillas seleccionadas se lavaron con agua destilada varias veces, y se dejaron remojar en agua destilada por aproximadamente dos horas antes de realizar la siembra.
5. Se colocaron 2 mL de agua destilada en cada uno de los vasos.
6. Se colocaron 5 ó 6 semillas en cada vaso (de acuerdo con el experimento particular), lo más espaciadas posible.
7. Se taparon con cuadros de papel aluminio grueso de 10 x 10cm.
8. Se mantuvieron a temperatura ambiente en la oscuridad por 4 días.
9. Se realizaron mediciones tanto de las radículas como de los talluelos de cada una de las plantas. También se determinó el porcentaje de germinación de cada especie, por medio de estadística descriptiva.

8.14.1 PRUEBAS PRELIMINARES DE GERMINACION.

Se realizaron pruebas preliminares de selección de semillas en función a su porcentaje de germinación y variabilidad (medida como su coeficiente de variación, C.V.). Se utilizaron las siguientes especies:

TABLA 8.2 ESPECIES SELECCIONADAS

MONOCOTILEDONEAS	DICOTILEDONEAS
Trigo (<i>Triticum vulgare</i>)	Lenteja (<i>Lens esculenta</i>)
Maíz (<i>Zea mays</i>)	Rábano (<i>Raphanus sativus</i> L.)
Pasto inglés (<i>Axonopus compressus</i>)	Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)

8.14.2 EXPERIMENTOS PRELIMINARES CON NAPROXENO.

Se prepararon soluciones de Naproxeno en acetona, a concentraciones de 10^{-1} M, 10^{-2} M, 10^{-3} M y 10^{-4} M. Se utilizó acetona R.A. como control.

Las semillas seleccionadas fueron rábano, trigo y lenteja. Se colocaron 5 semillas en cada contenedor.

Se realizaron mediciones (en mm) tanto de las radículas como de los talluelos de cada una de las plantas. También se determinó el porcentaje de germinación.

8.14.3 EXPERIMENTOS DE GERMINACION CON LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS.

Se prepararon soluciones de los 8 compuestos en acetona. Se utilizó acetona como control.

Las semillas seleccionadas fueron rábano y trigo. Se colocaron 6 semillas en cada vaso, haciéndose cuatro replicados por compuesto por concentración.

Se realizaron mediciones tanto de las radículas como de los talluelos de cada una de las plantas, expresadas en mm. También se determinó el porcentaje de germinación de cada especie (número de semillas que germinaron con

respecto al total de semillas empleadas). Posteriormente se realizó el tratamiento de los datos por medio de diseño factorial, análisis de regresión múltiple y probit.

8.15 ANALISIS ESTADISTICO.

La siguiente metodología estadística fue empleada, además de la estadística descriptiva.

1. Análisis de Varianza de un criterio de clasificación, acompañado de la prueba de Dunnett, para determinar diferencias significativas de los compuestos con respecto de los controles.

2. Análisis de varianza multifactorial de efectos fijos e interacciones de los mismos para cada una de las concentraciones empleadas en los bioensayos particulares.

3. Regresión lineal múltiple para el análisis de los diseños factoriales.

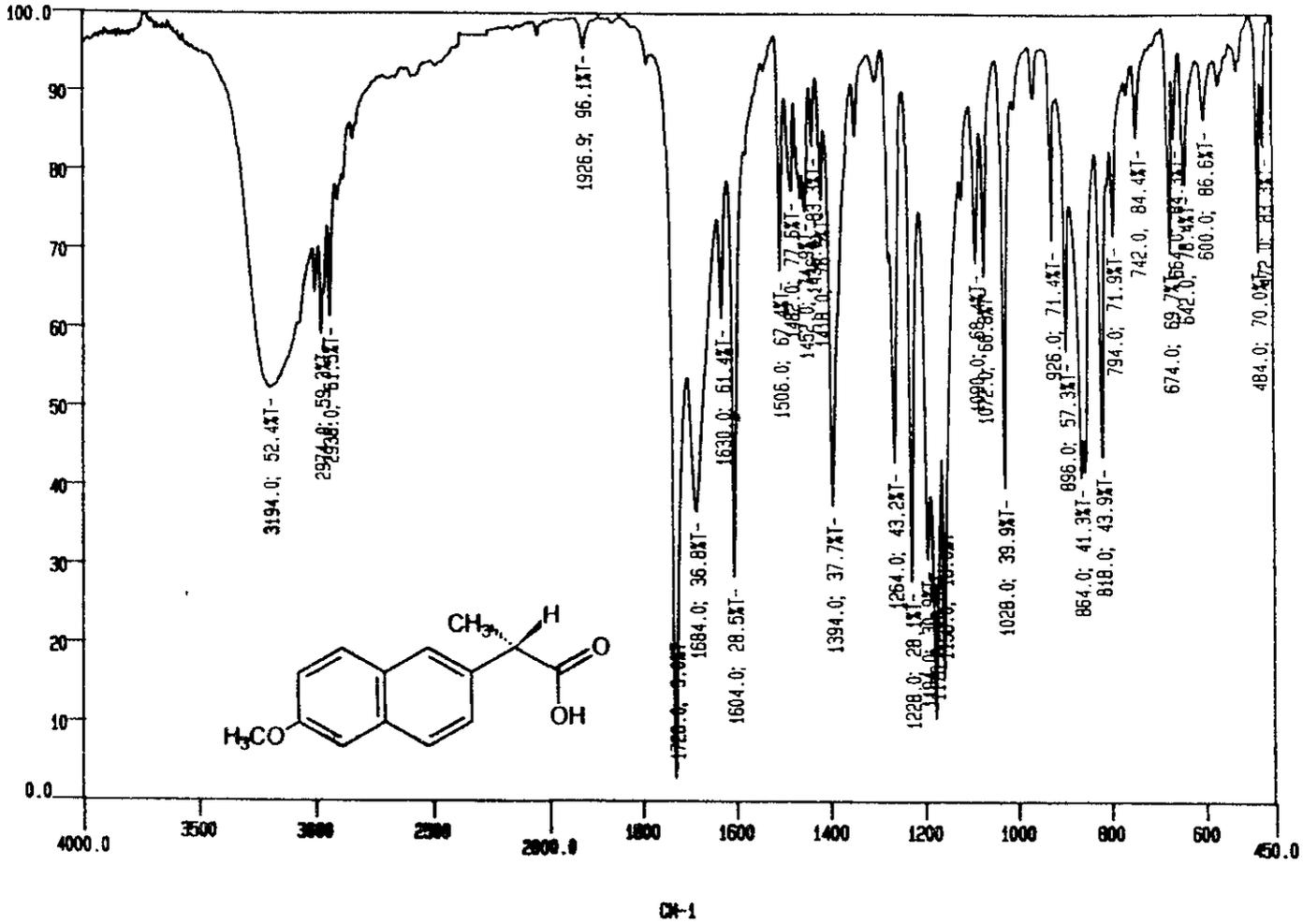
4. Regresión PROBIT para la estimación de las dosis efectivas al 50% (DE_{50}) de los compuestos.

5. Regresión por mínimos cuadrados para los estudios de estructura actividad.

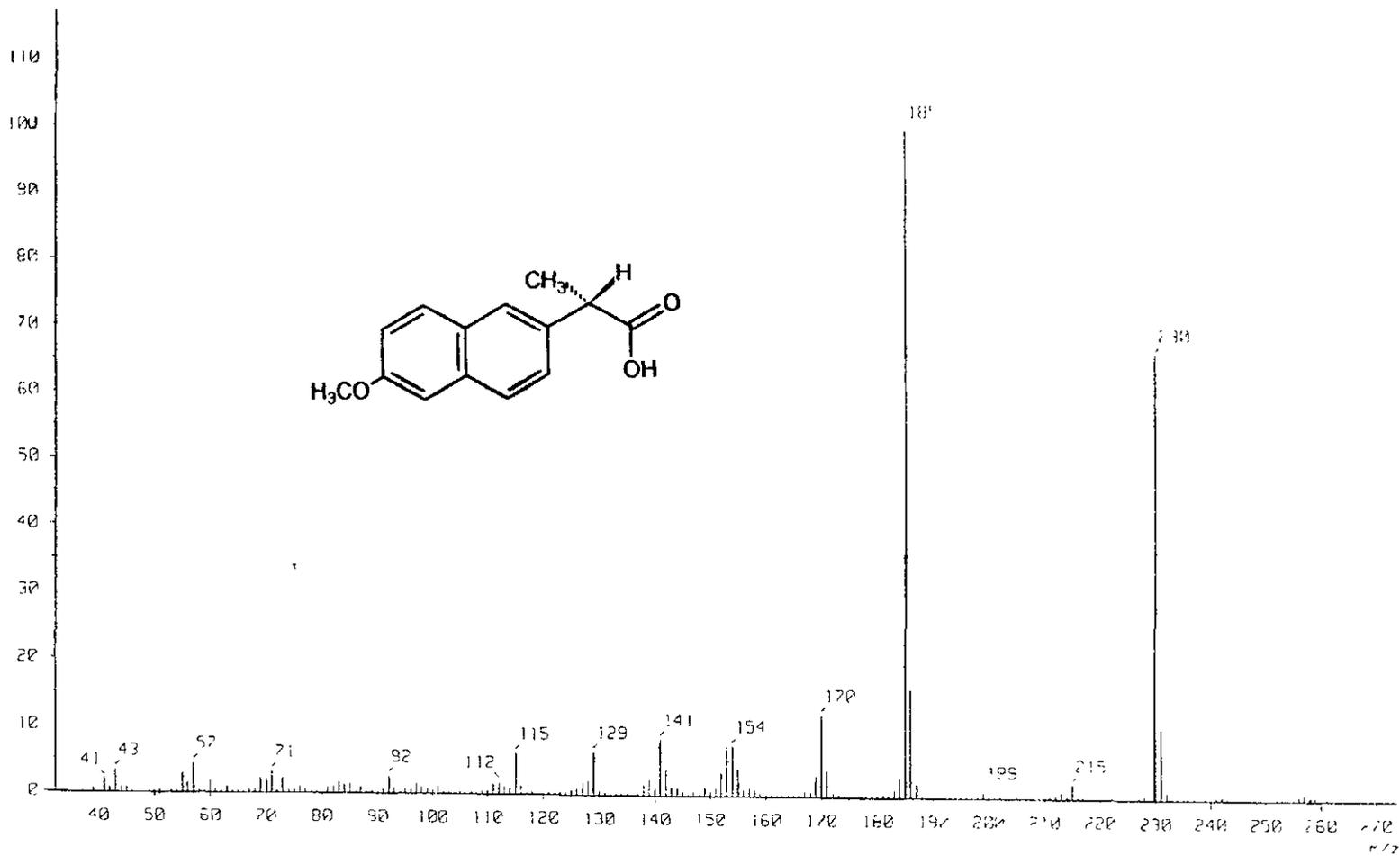
El nivel de significación para todas las pruebas estadísticas fue fijado al 5% ($\alpha = 0.05$).

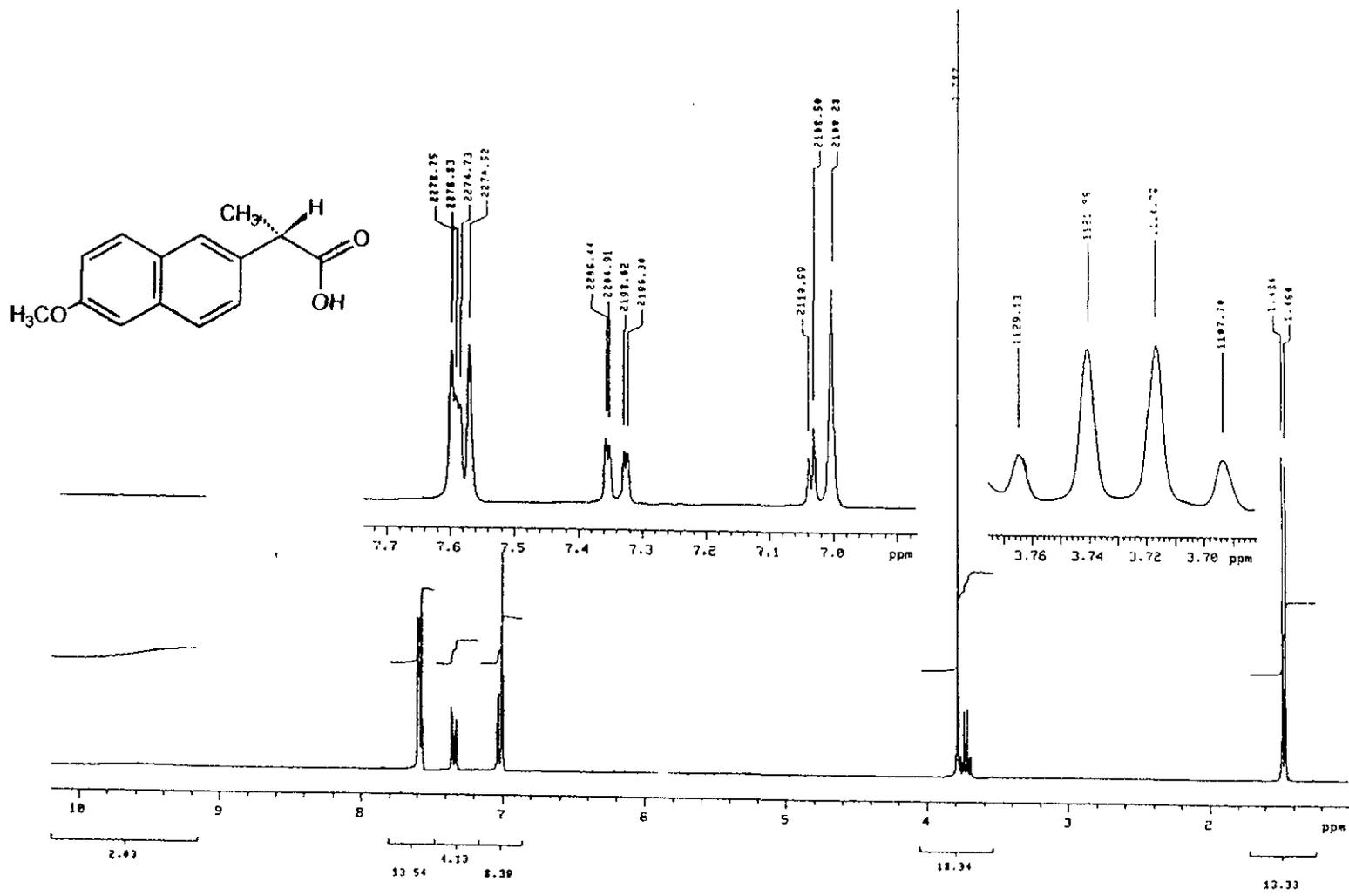
9. ESPECTROS.

KT

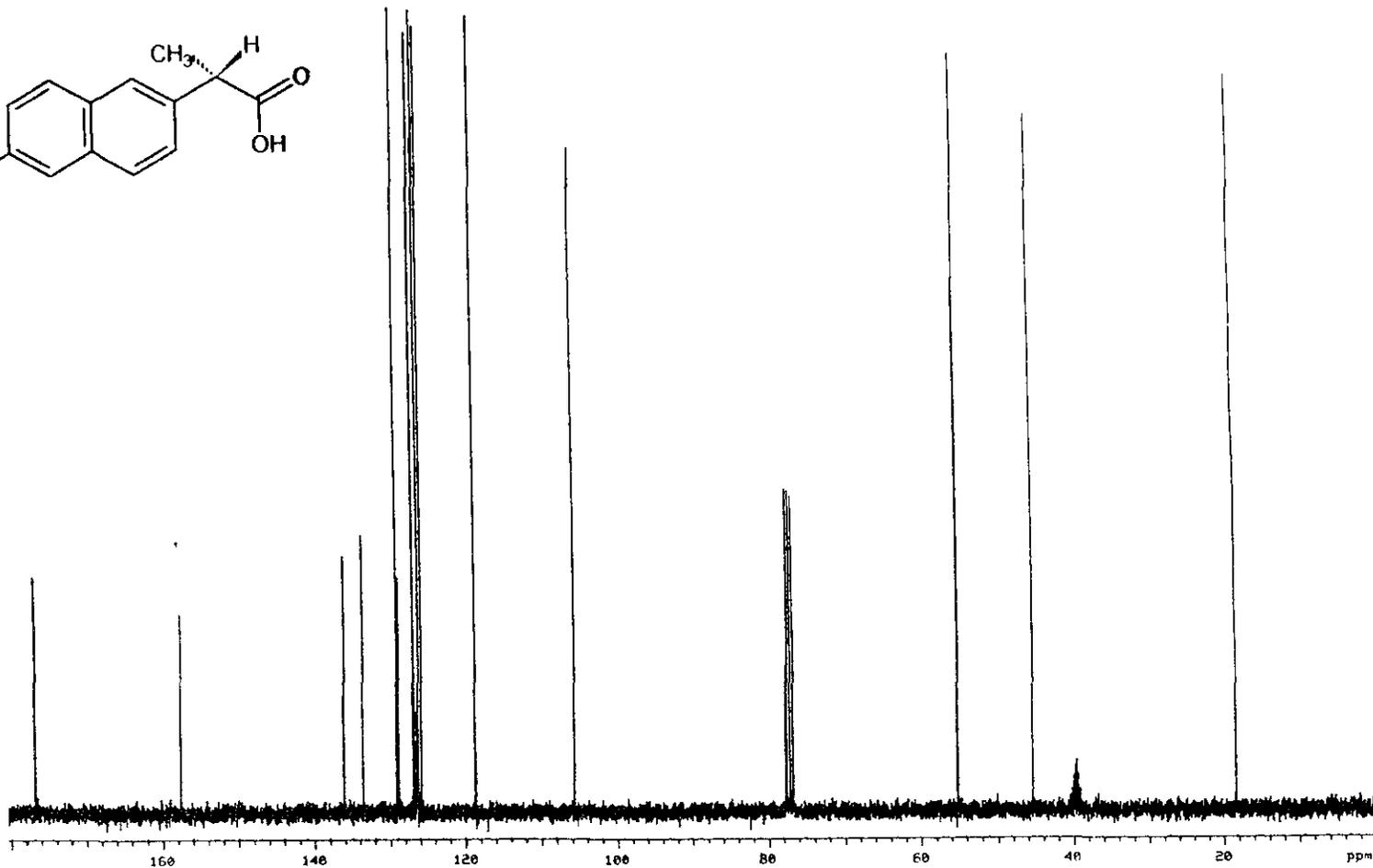
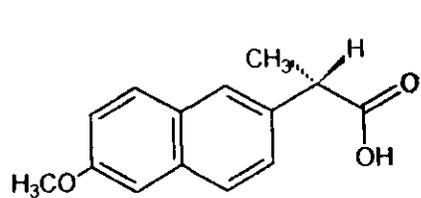


ESPECTRO NO. 1 IR (KBr). ACIDO S-(+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.

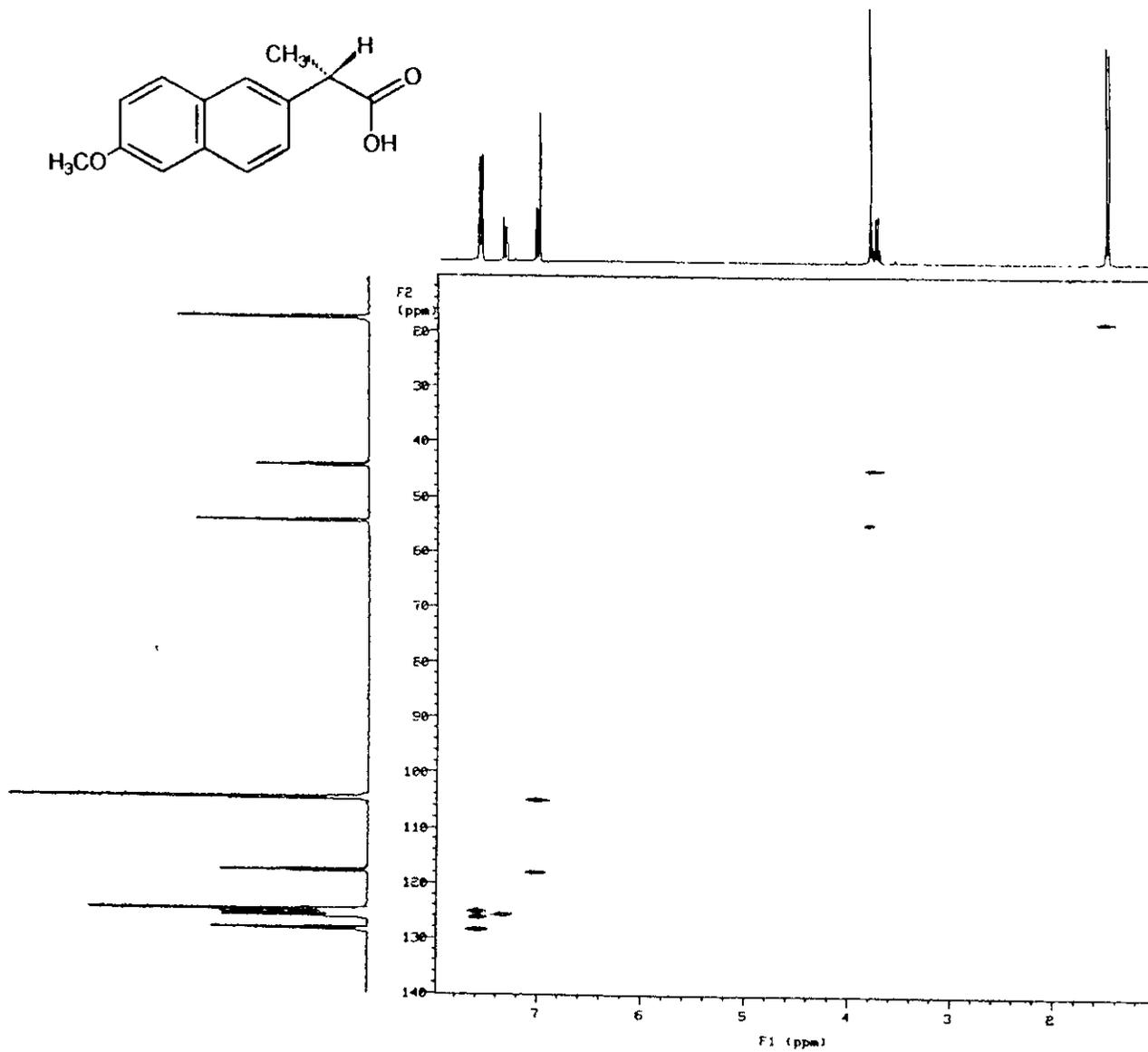
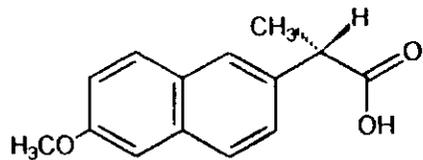
ESPECTRO NO. 2 EM (IE). ACIDO S-(+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.



ESPECTRO NO. 3 ¹H RMN. ACIDO S-(+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.

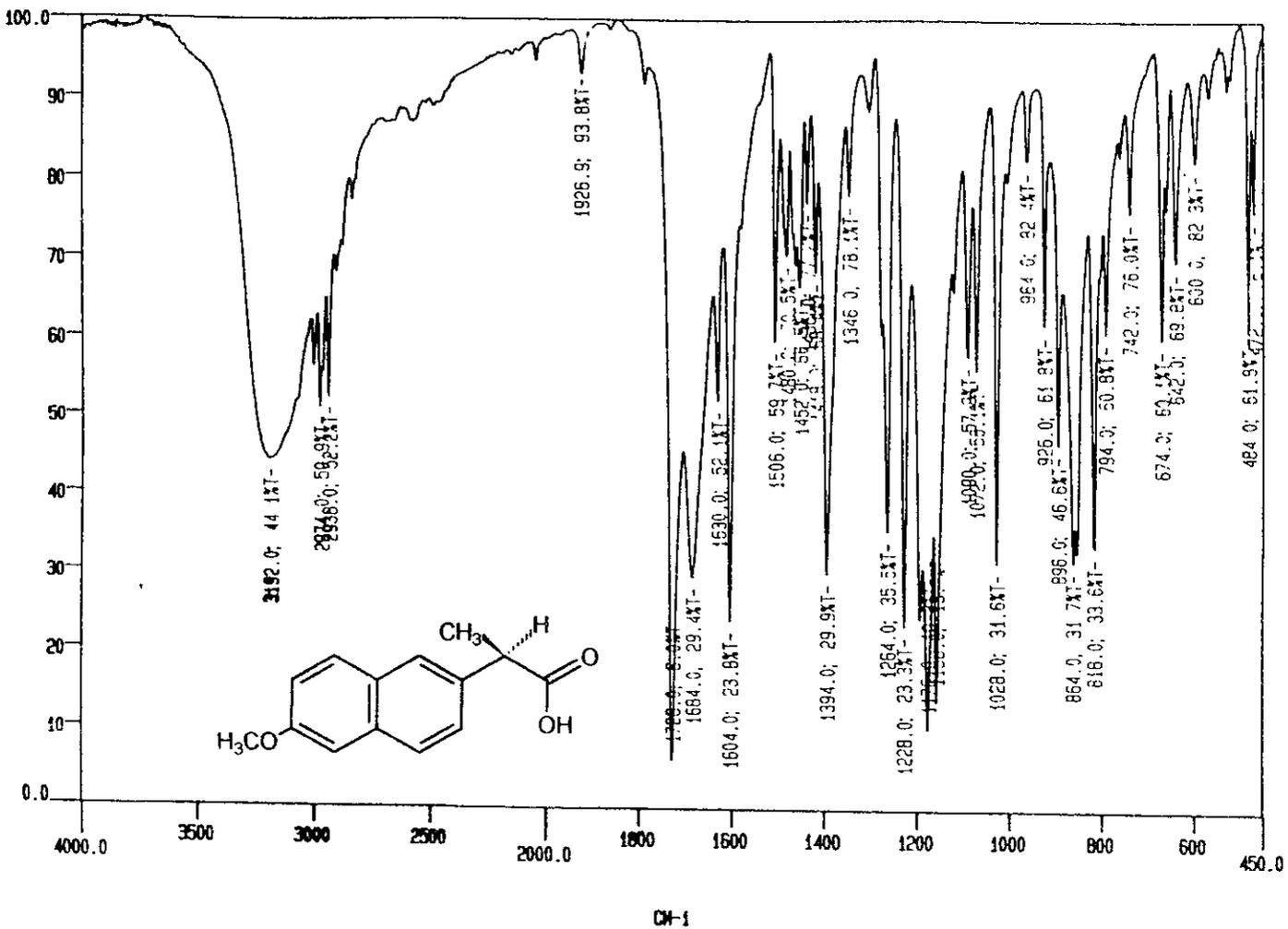


ESPECTRO NO. 4 ¹³C RMN. ACIDO S-(+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.

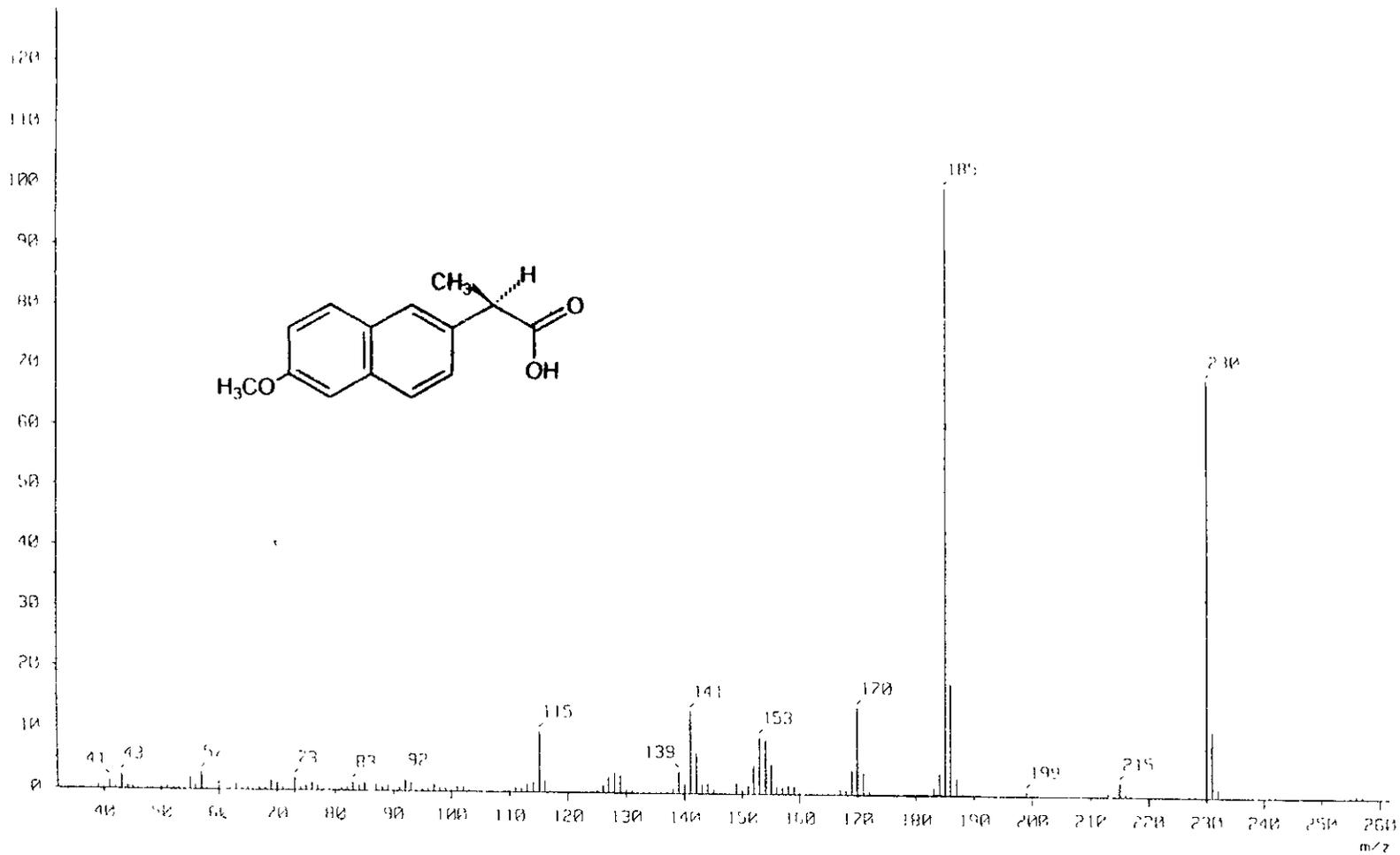


ESPECTRO NO. 5 HETCOR. ACIDO S-(+)-6-METOXI-1-METIL-2-NAFTALENACETICO.

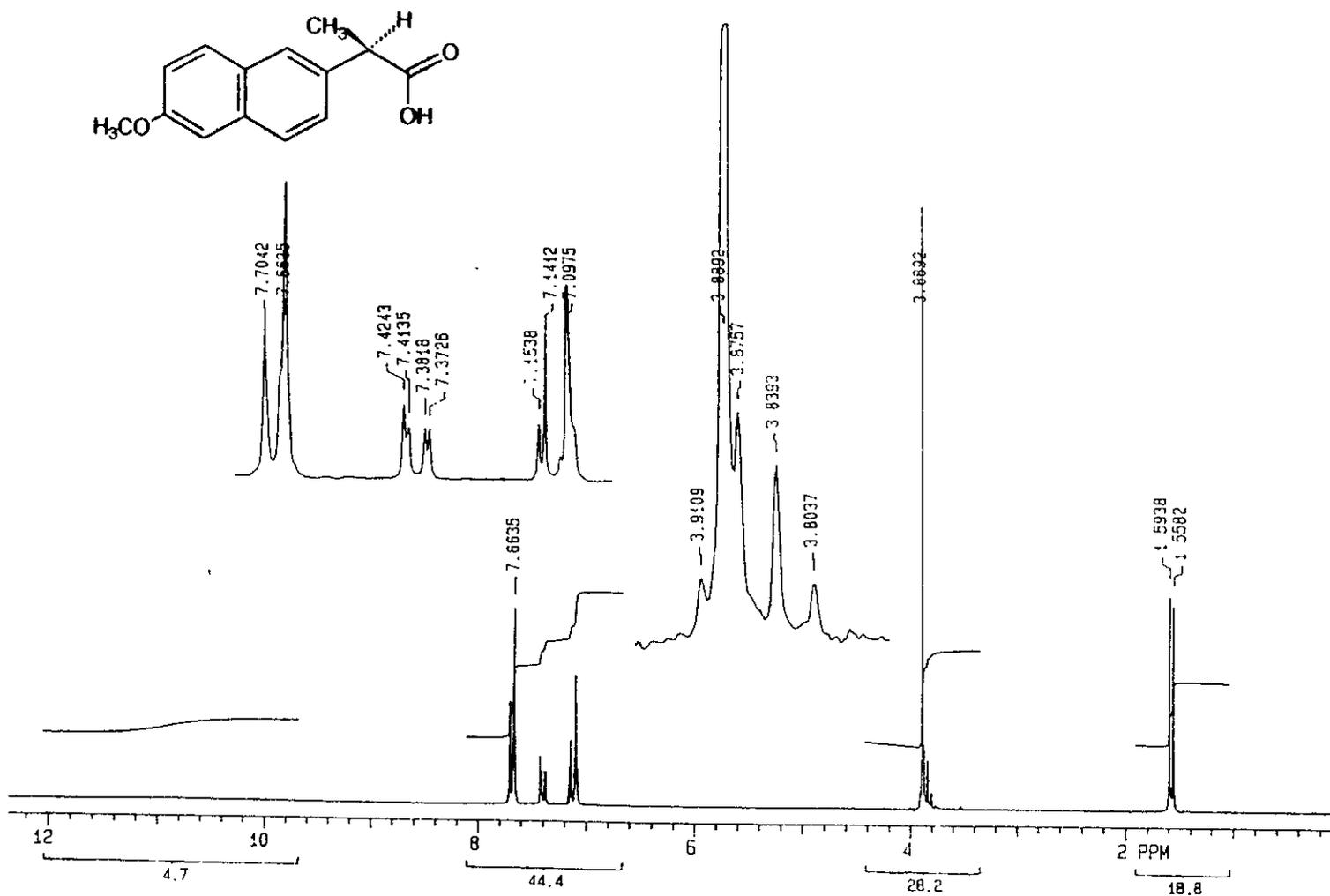
IR



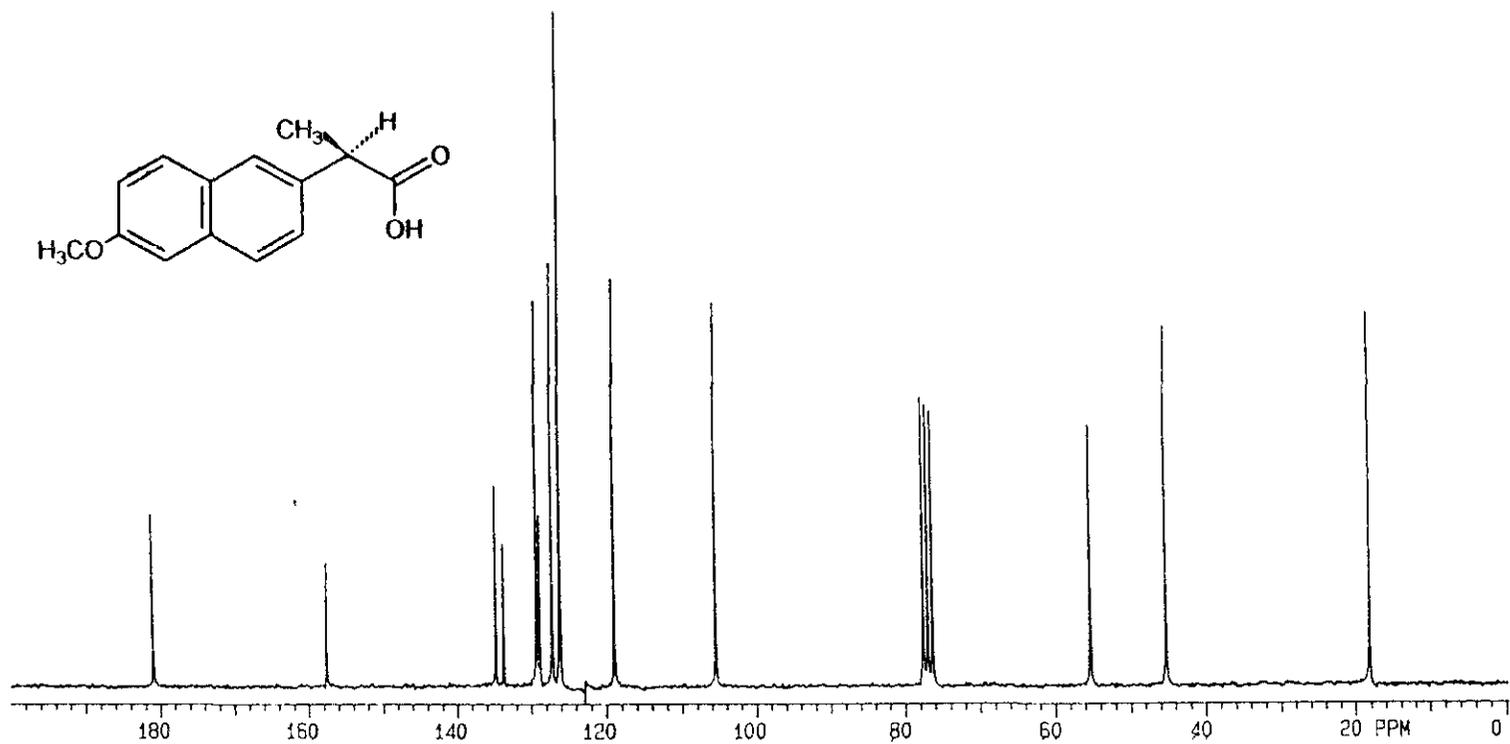
ESPECTRO NO. 6 IR (KBr) ACIDO R-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.



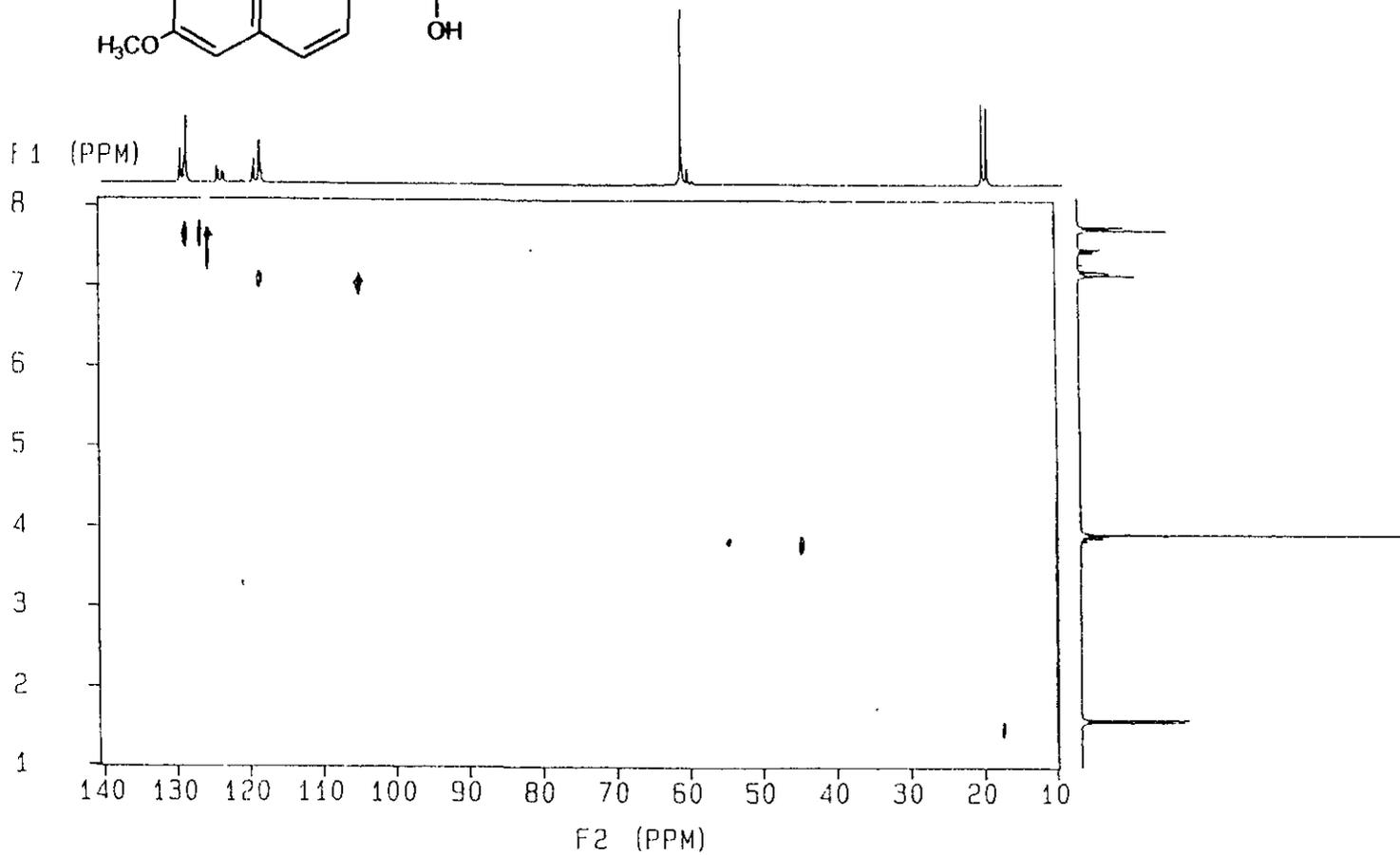
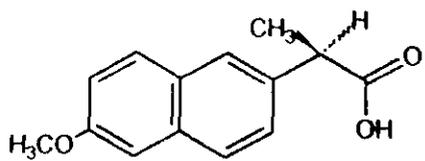
ESPECTRO NO. 7 EM (IE). ACIDO R-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.



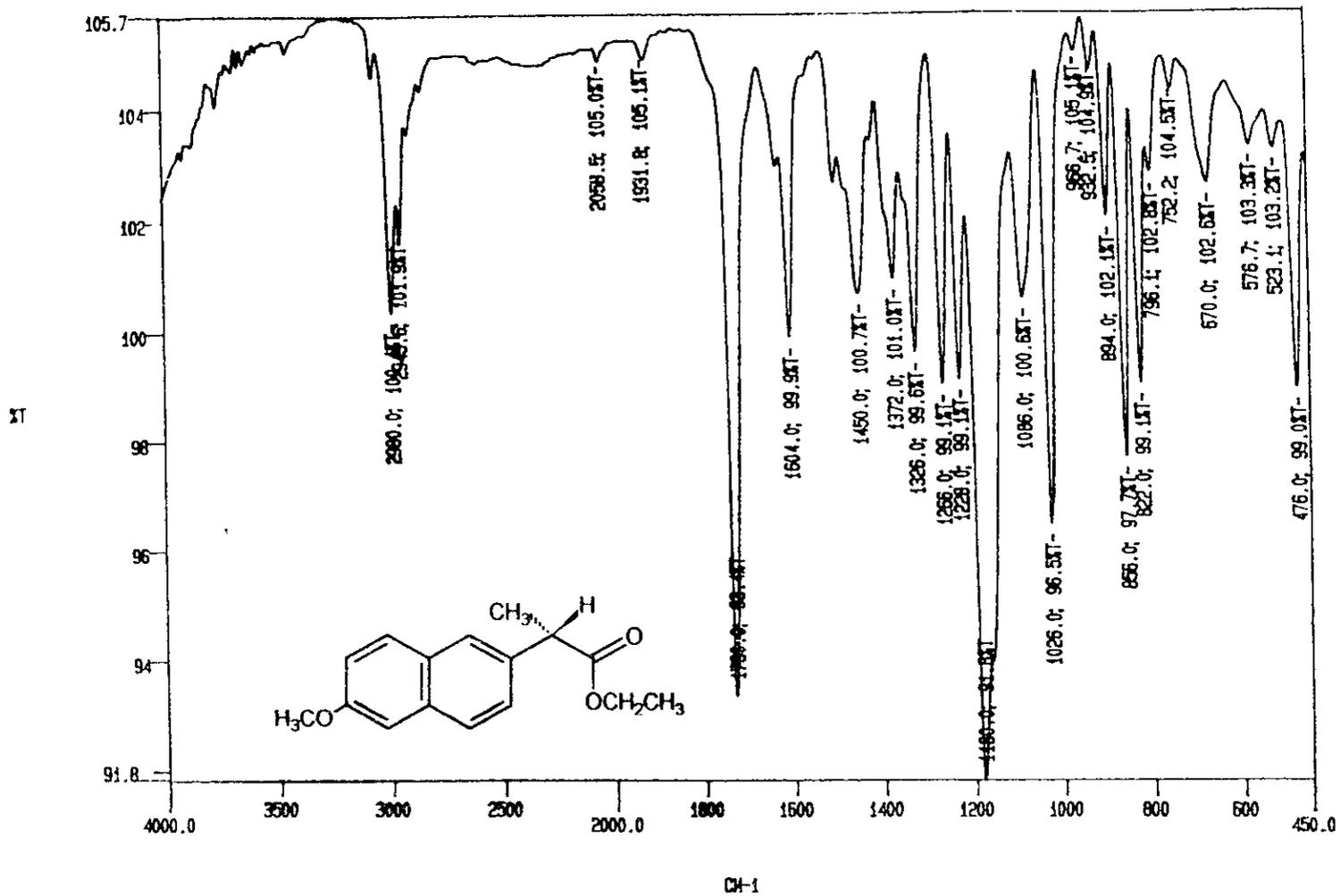
ESPECTRO NO. 8 ^1H RMN. ACIDO R-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.



ESPECTRO NO. 9 ^{13}C RMN. ACIDO R-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.



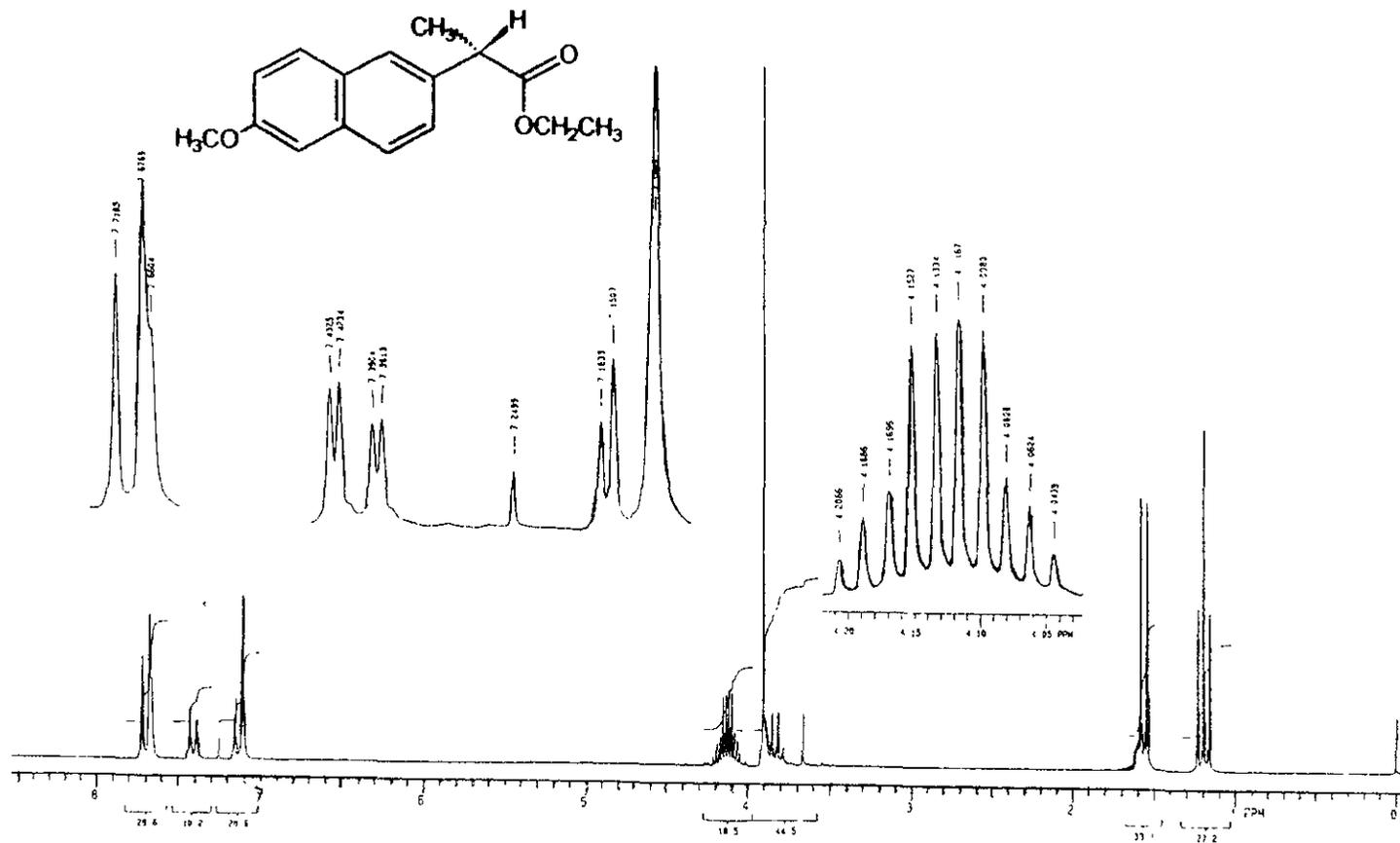
ESPECTRO NO. 10 HETCOR. ACIDO R-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETICO.



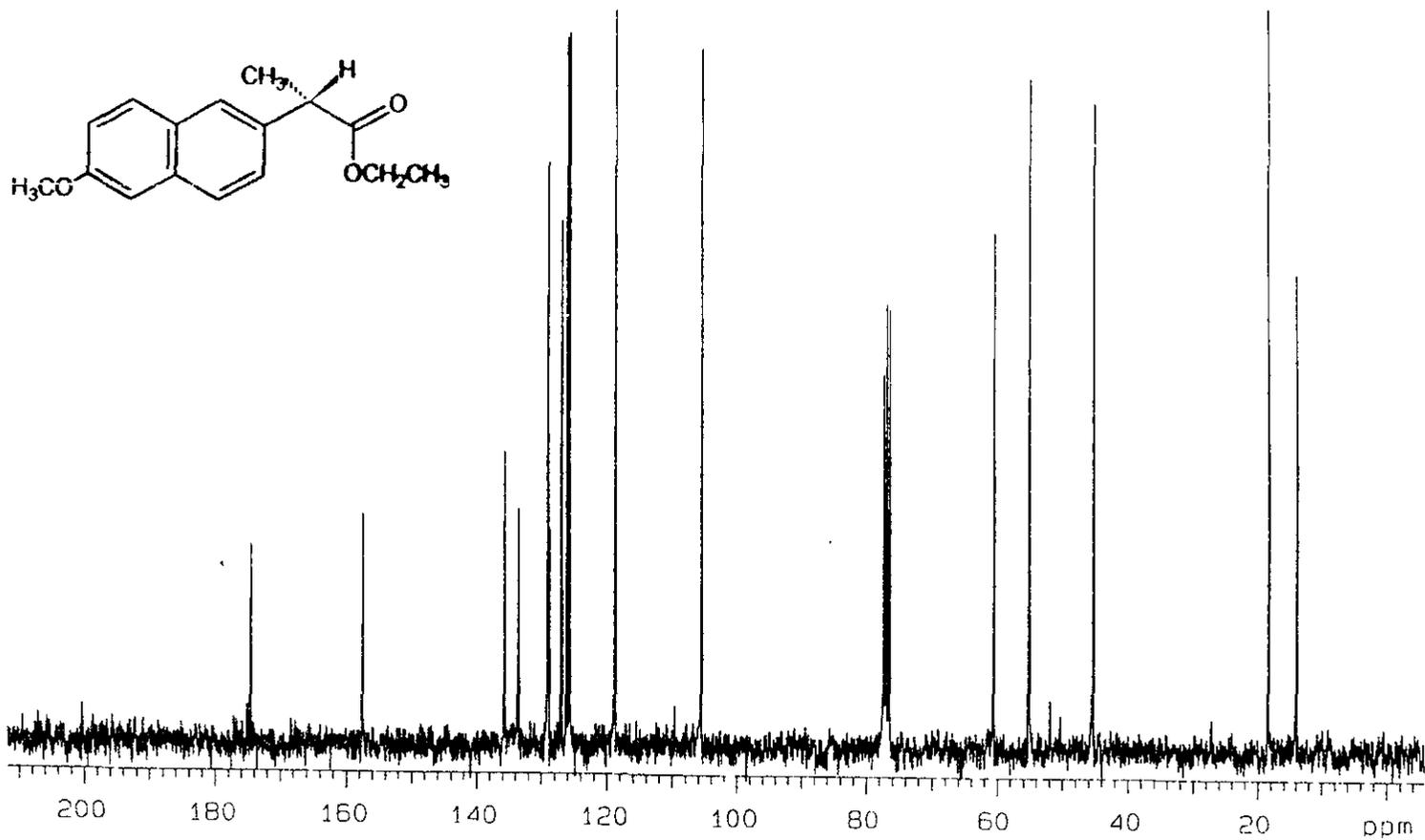
ESPECTRO NO. 11 IR (KBr). S-(+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.



ESPECTRO NO. 12 EM (IE). S-(+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.

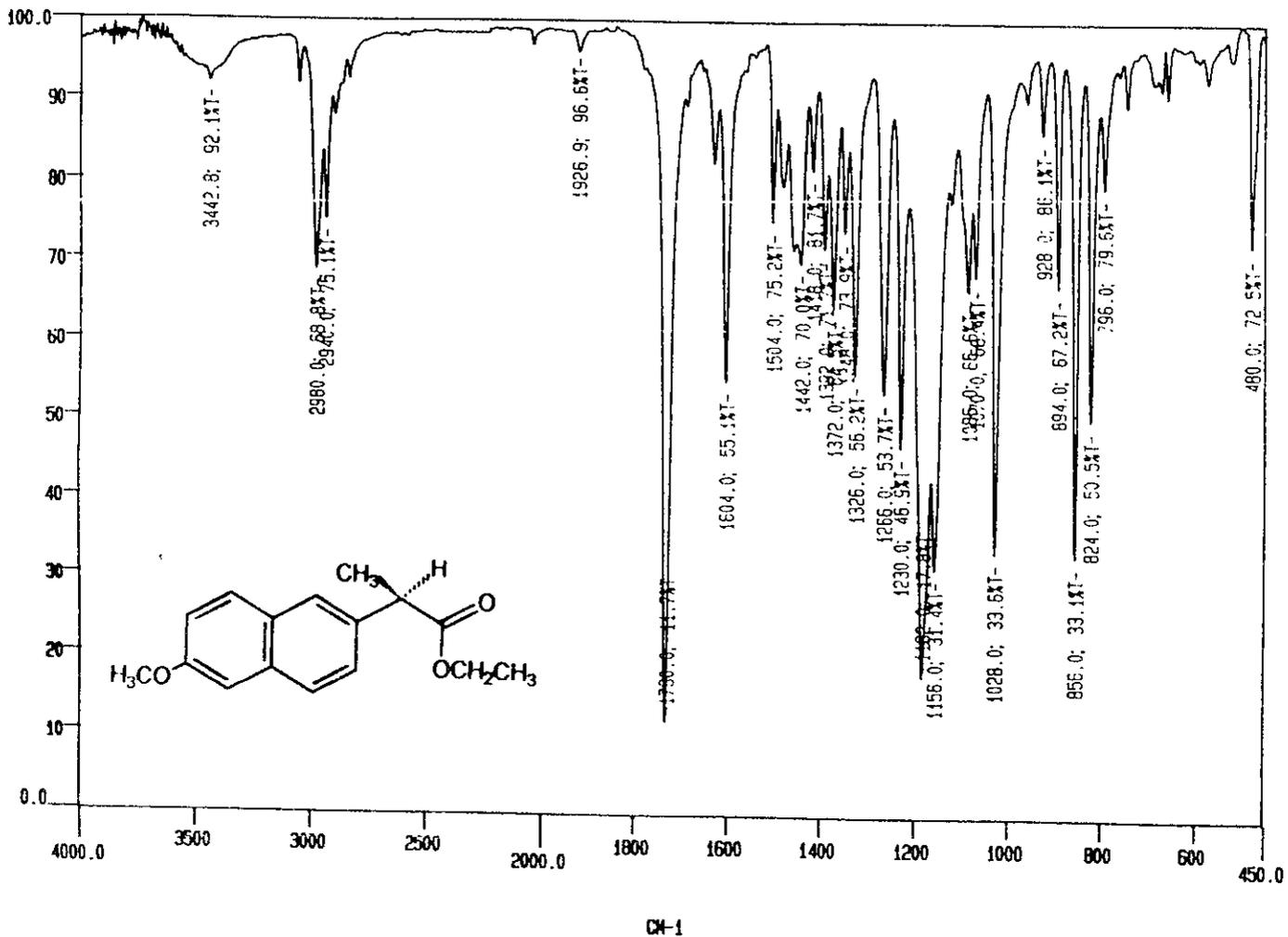


ESPECTRO NO. 13 ^1H RMN. S-(+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.

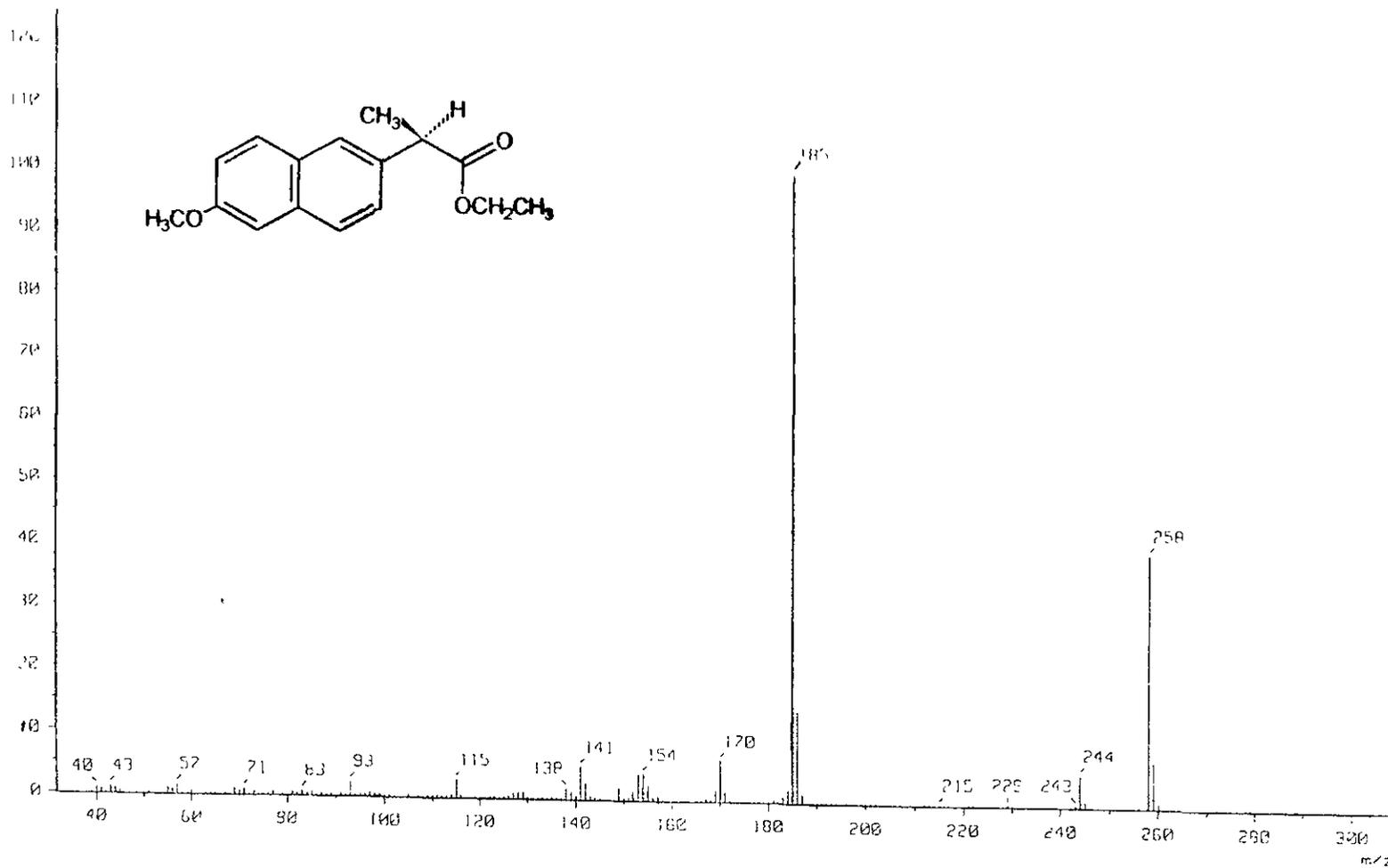


ESPECTRO NO. 14 ¹³C RMN. S-(+)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.

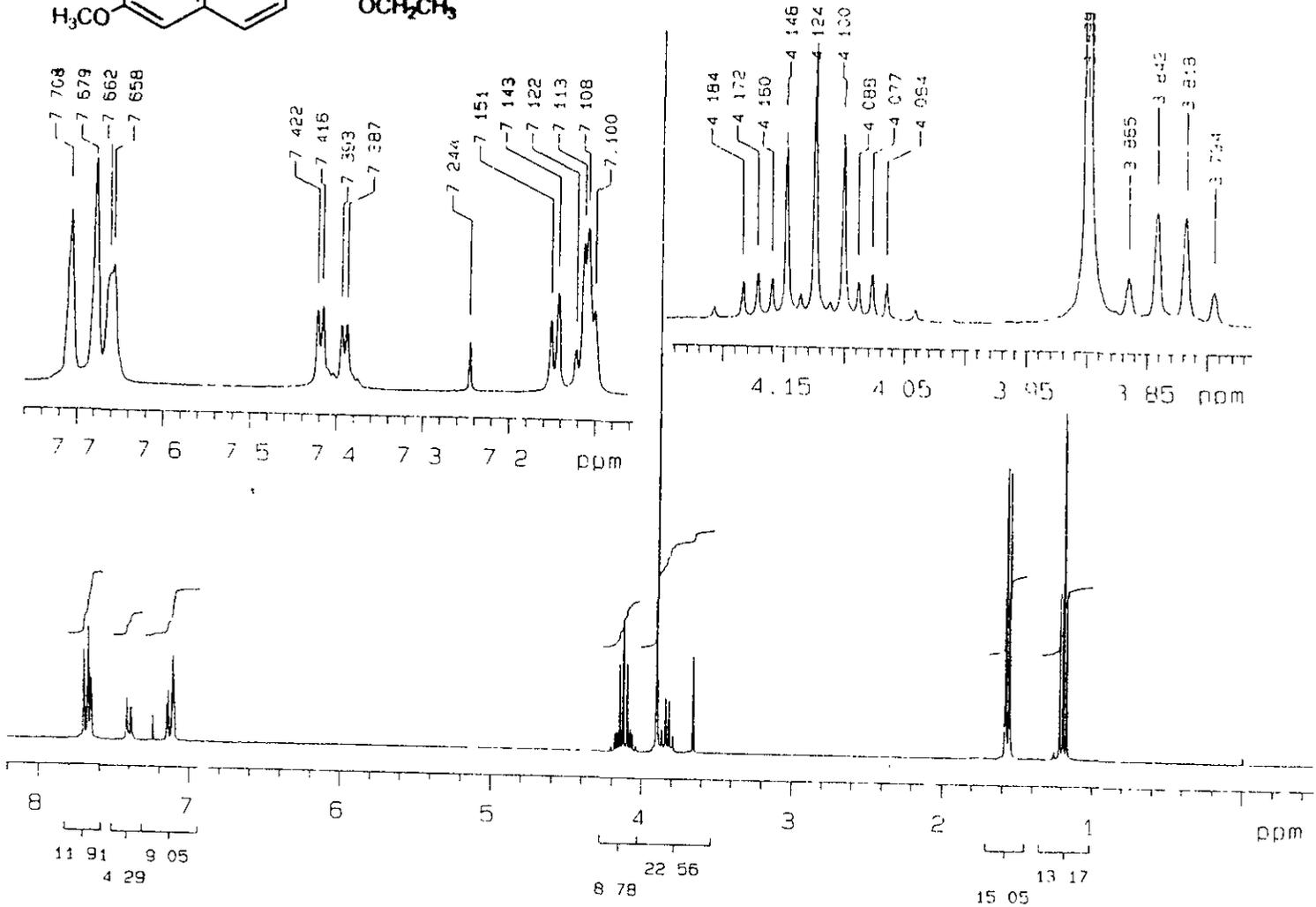
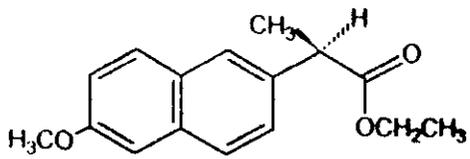
KT



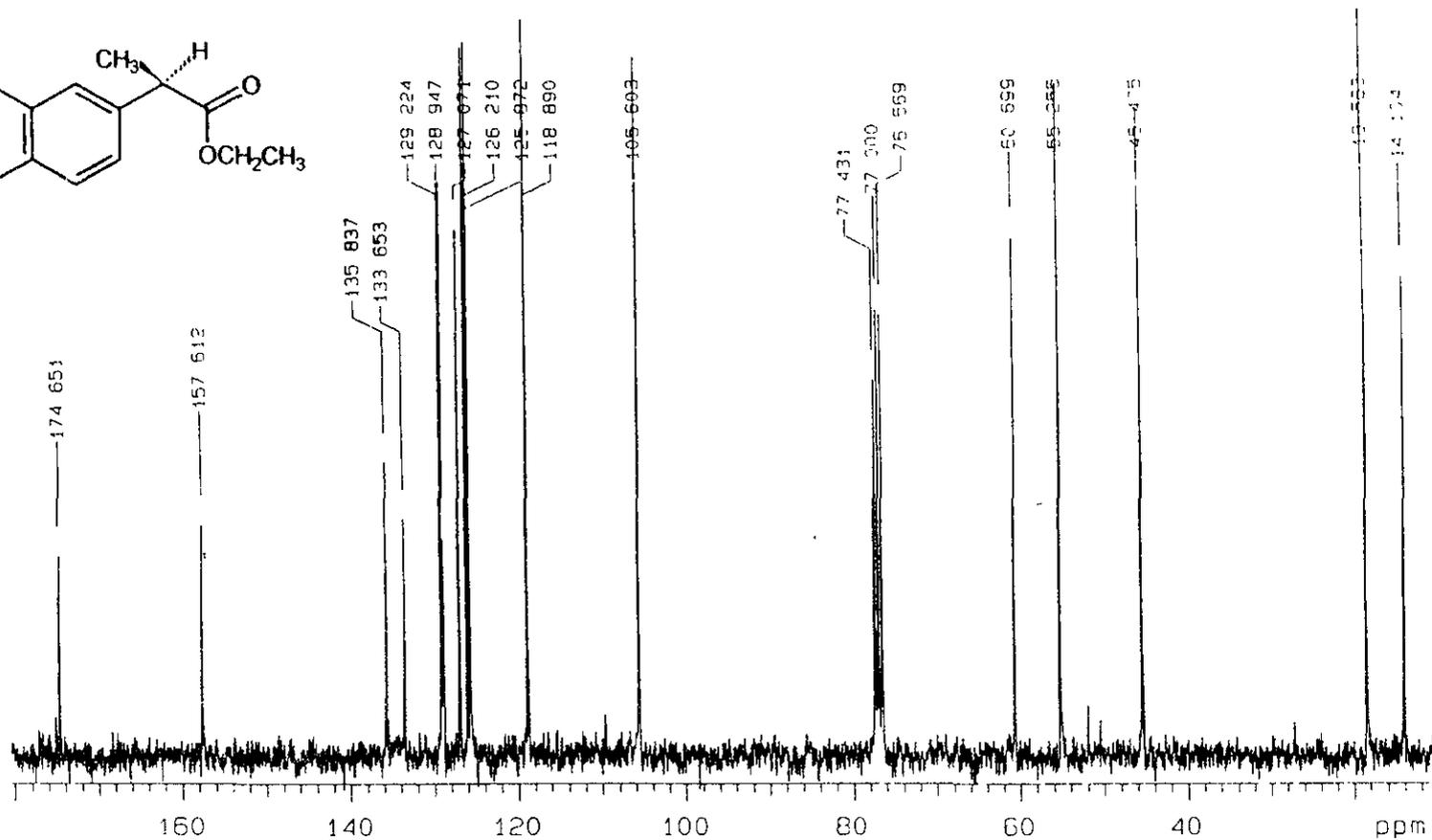
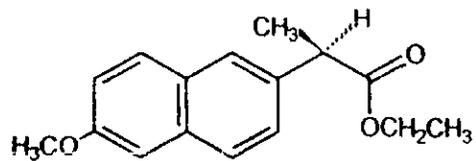
ESPECTRO NO. 16 IR (KBr). R-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.



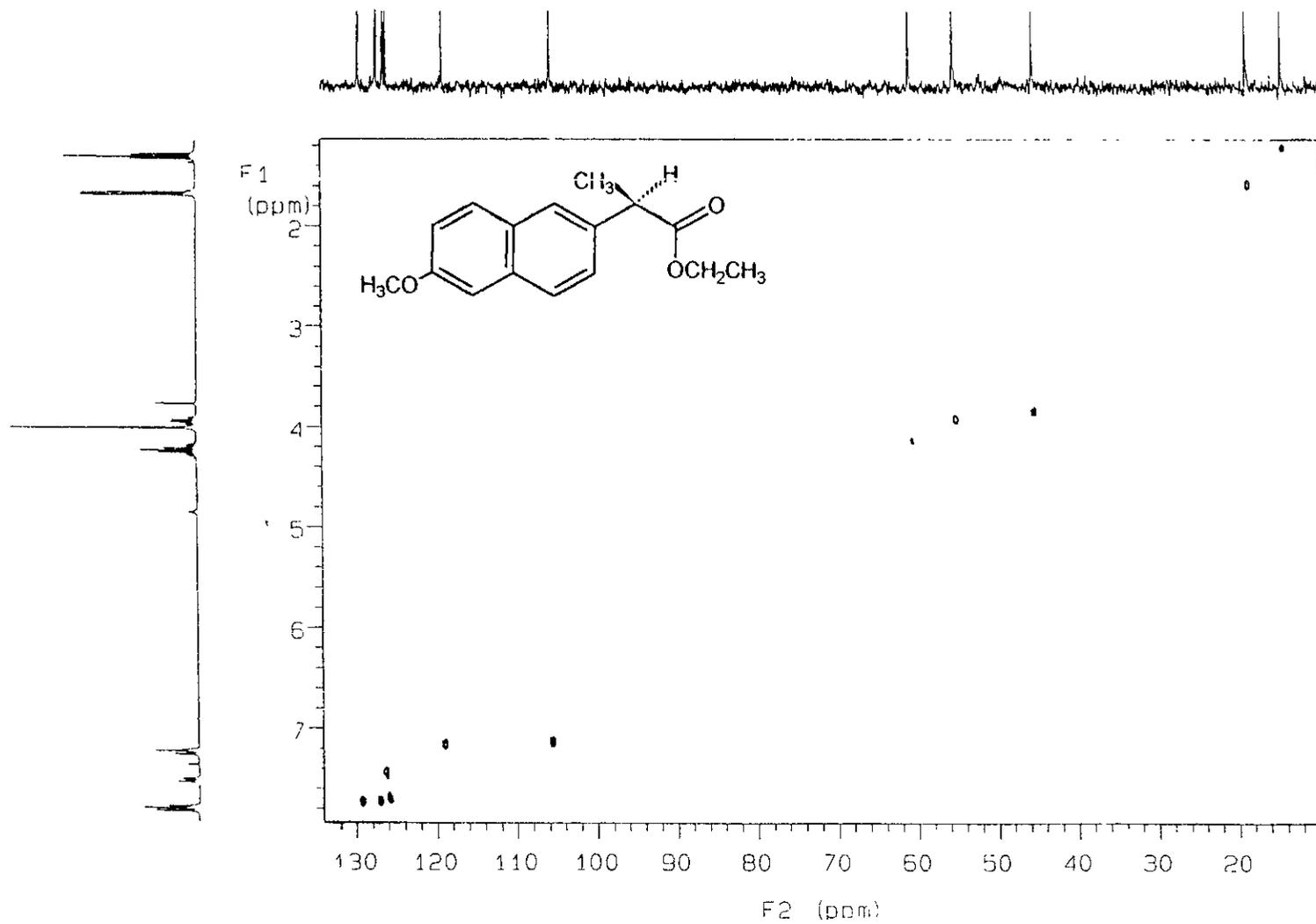
ESPECTRO NO. 17 EM (IE). R-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.



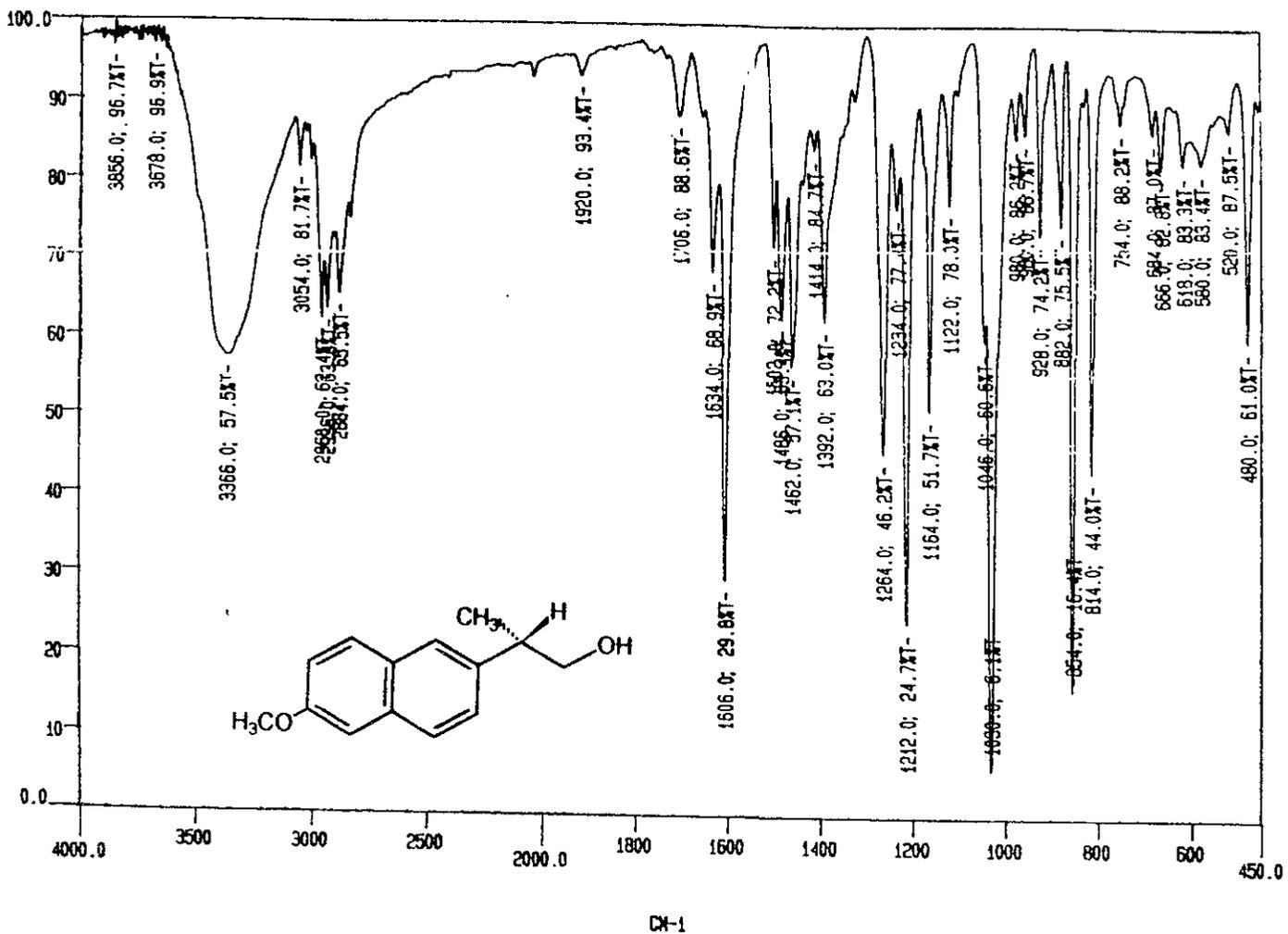
ESPECTRO NO. 18 ^1H RMN. *R*-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.



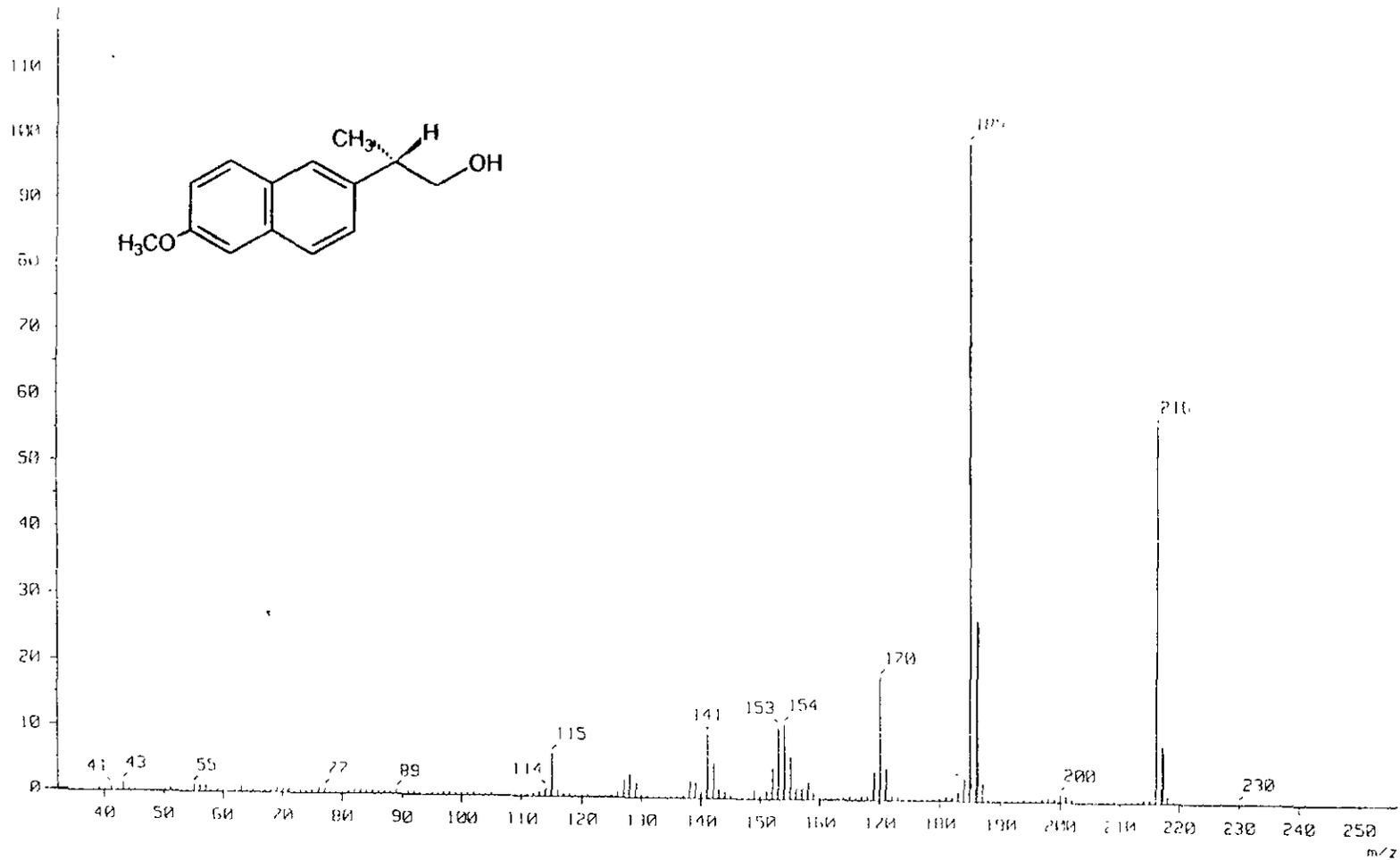
ESPECTRO NO. 19 ¹³C RMN. R-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.

ESPECTRO NO. 20 HETCOR. *R*-(-)-6-METOXI- α -METIL-2-NAFTALENACETATO DE ETILO.

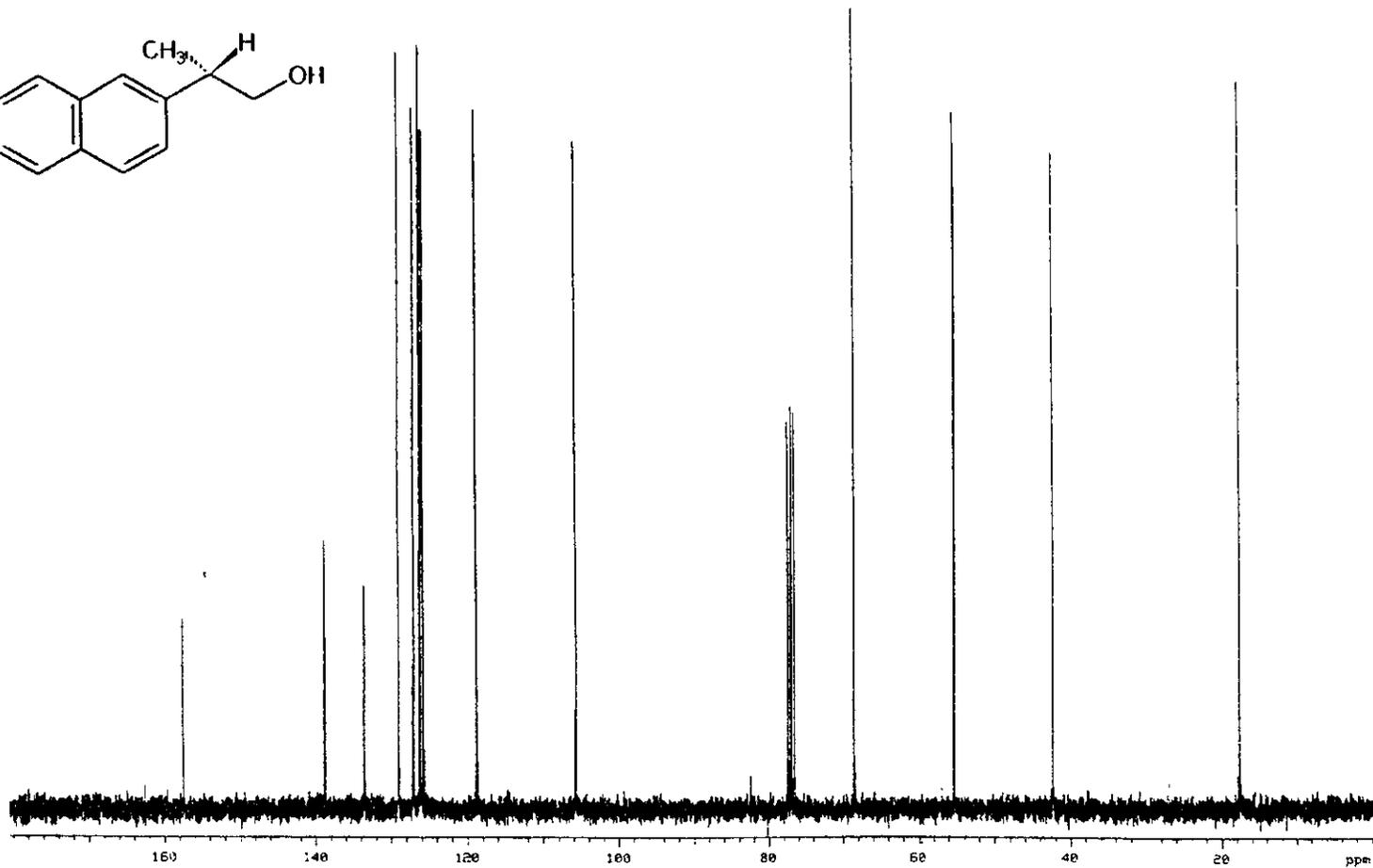
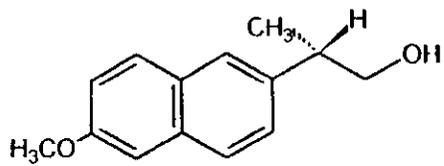
KT



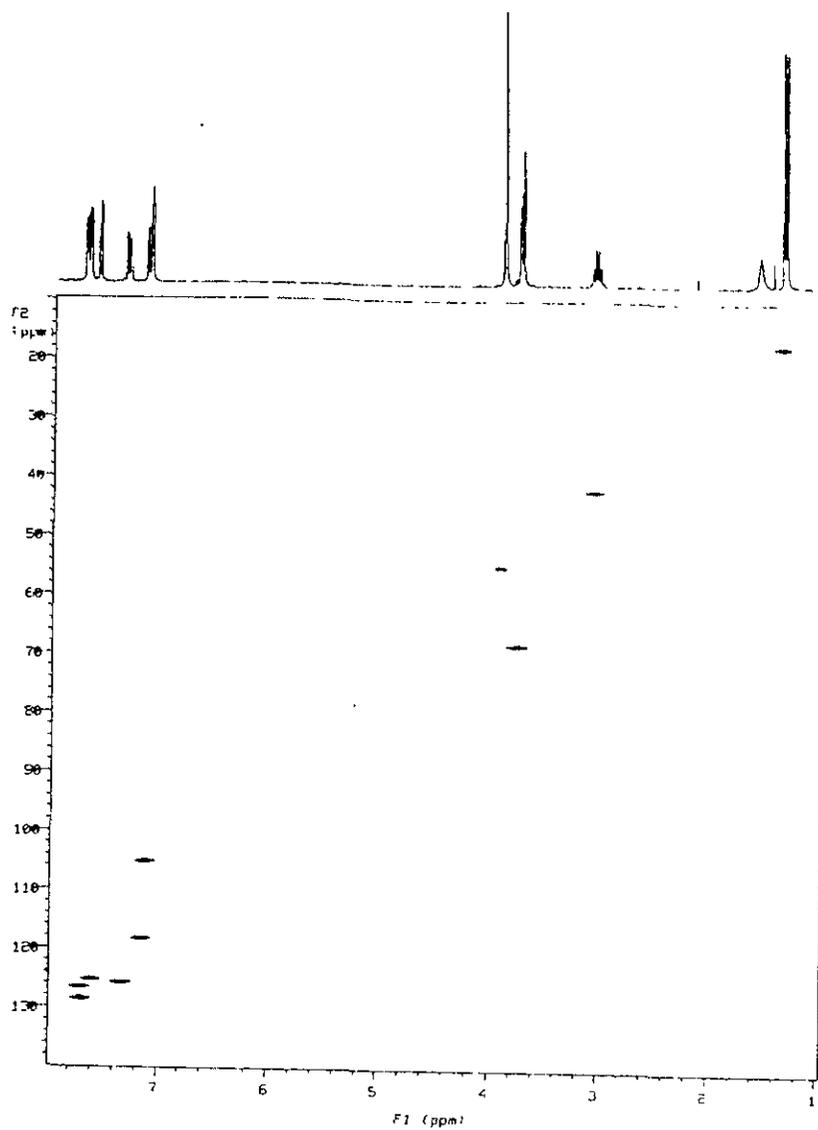
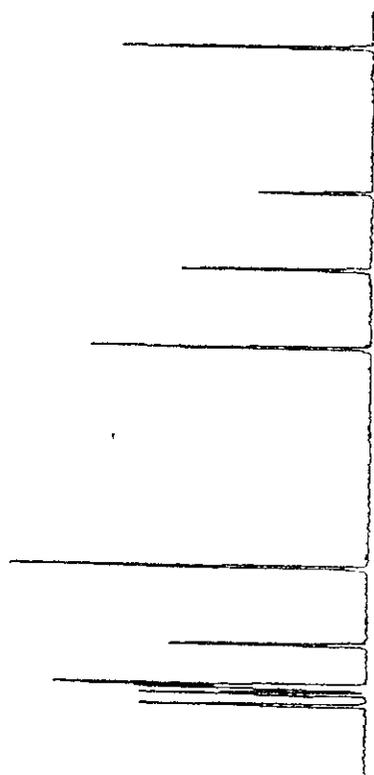
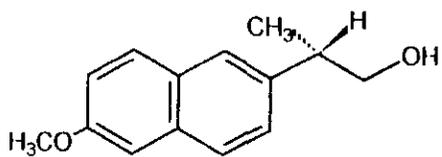
ESPECTRO NO. 21 IR (KBr). S-(-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETANOL.



ESPECTRO NO. 22 EM (IE). S-(-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETANOL.

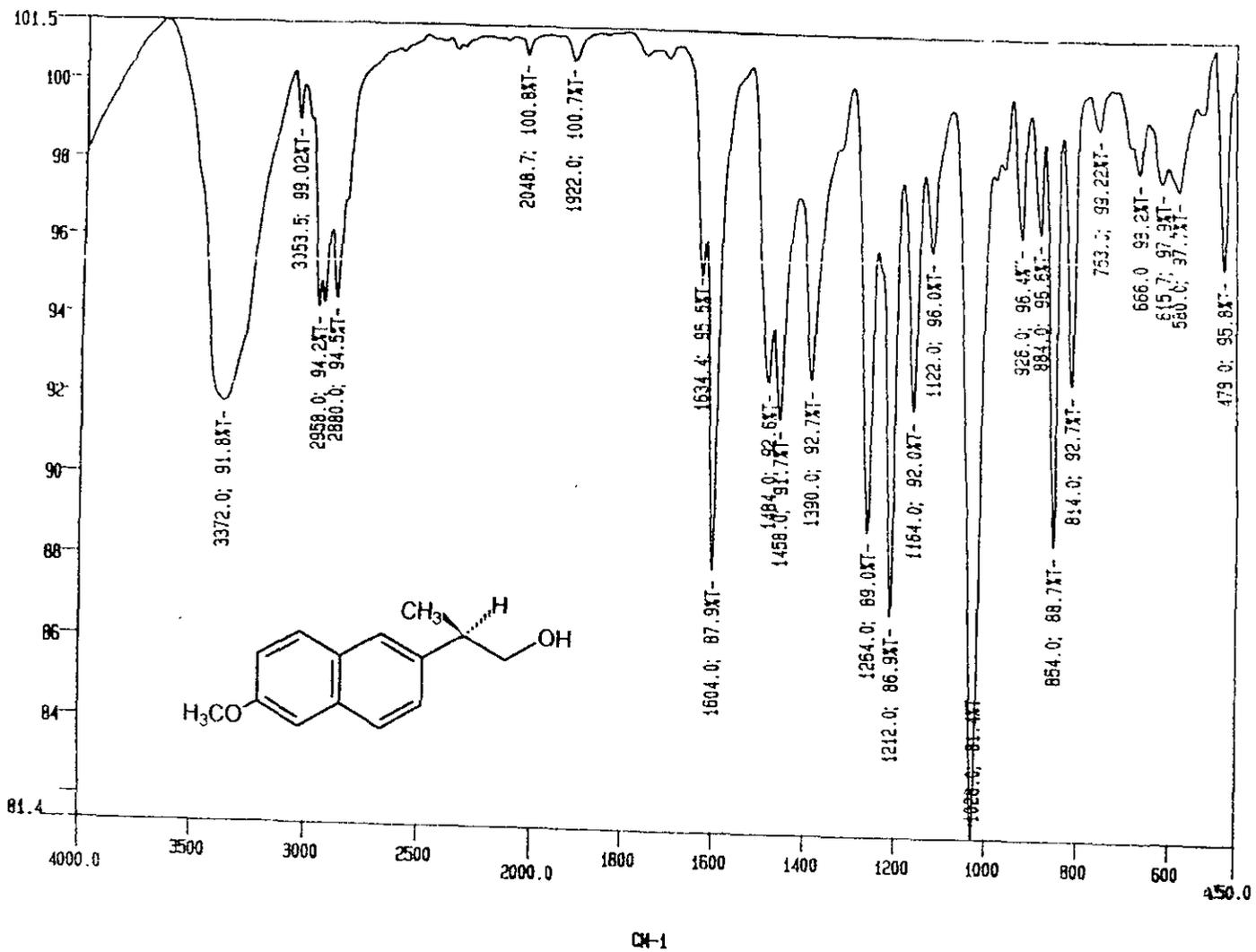


ESPECTRO NO. 24 ¹³C RMN. S-(-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETANOL.

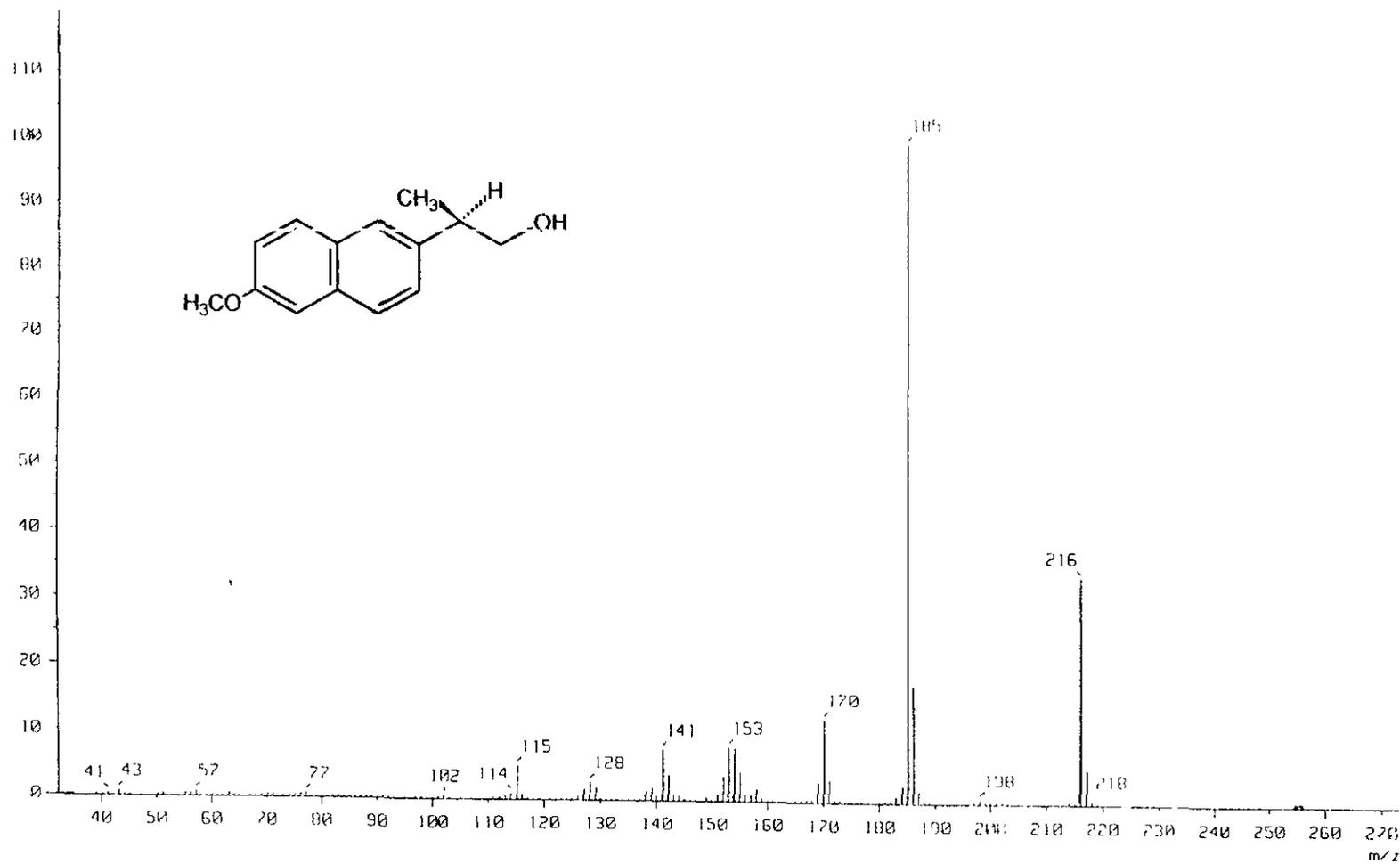


ESPECTRO NO. 25 HETCOR. S-(-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETANOL.

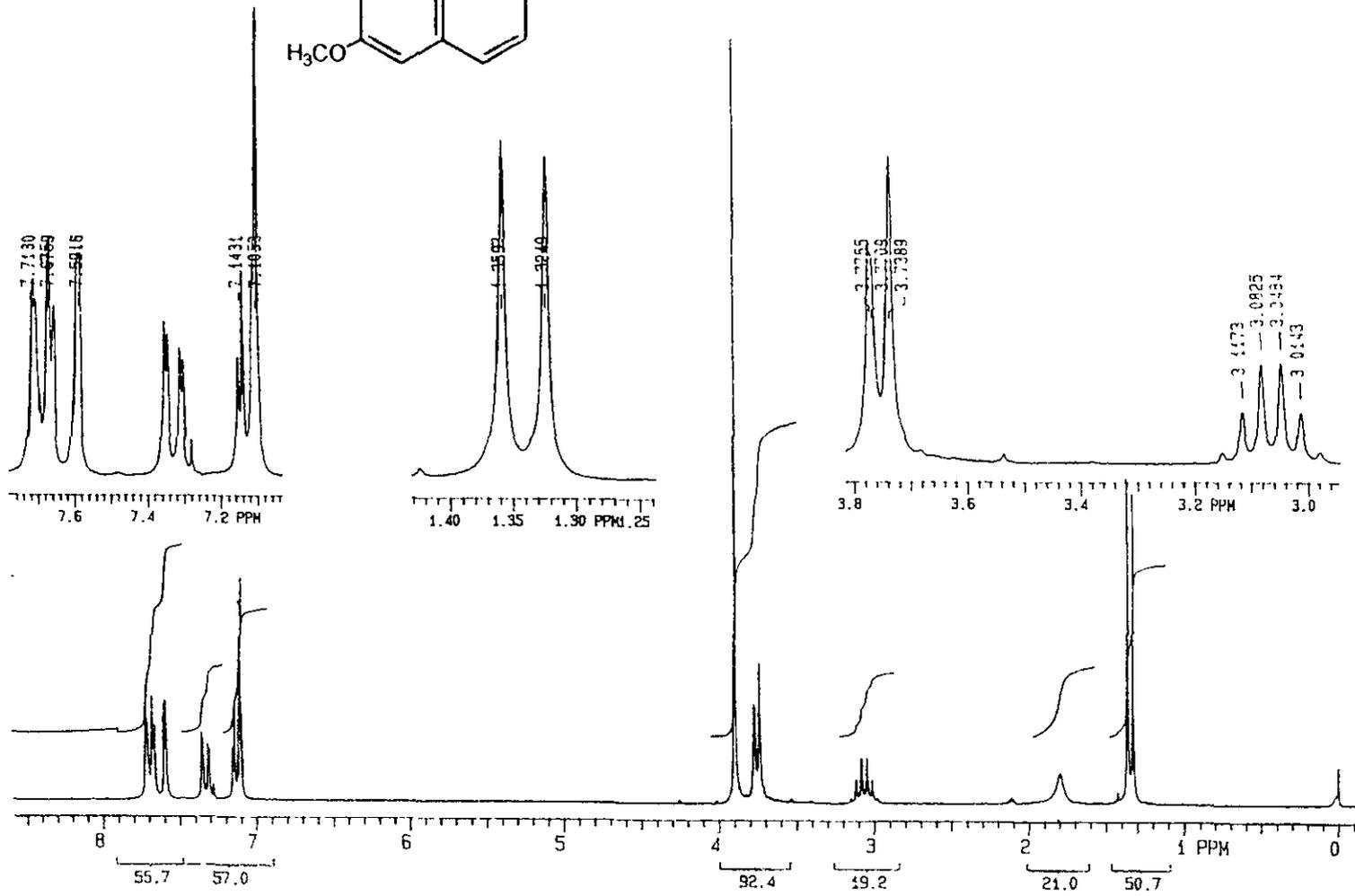
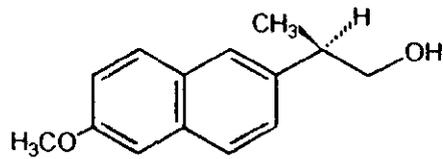
XT



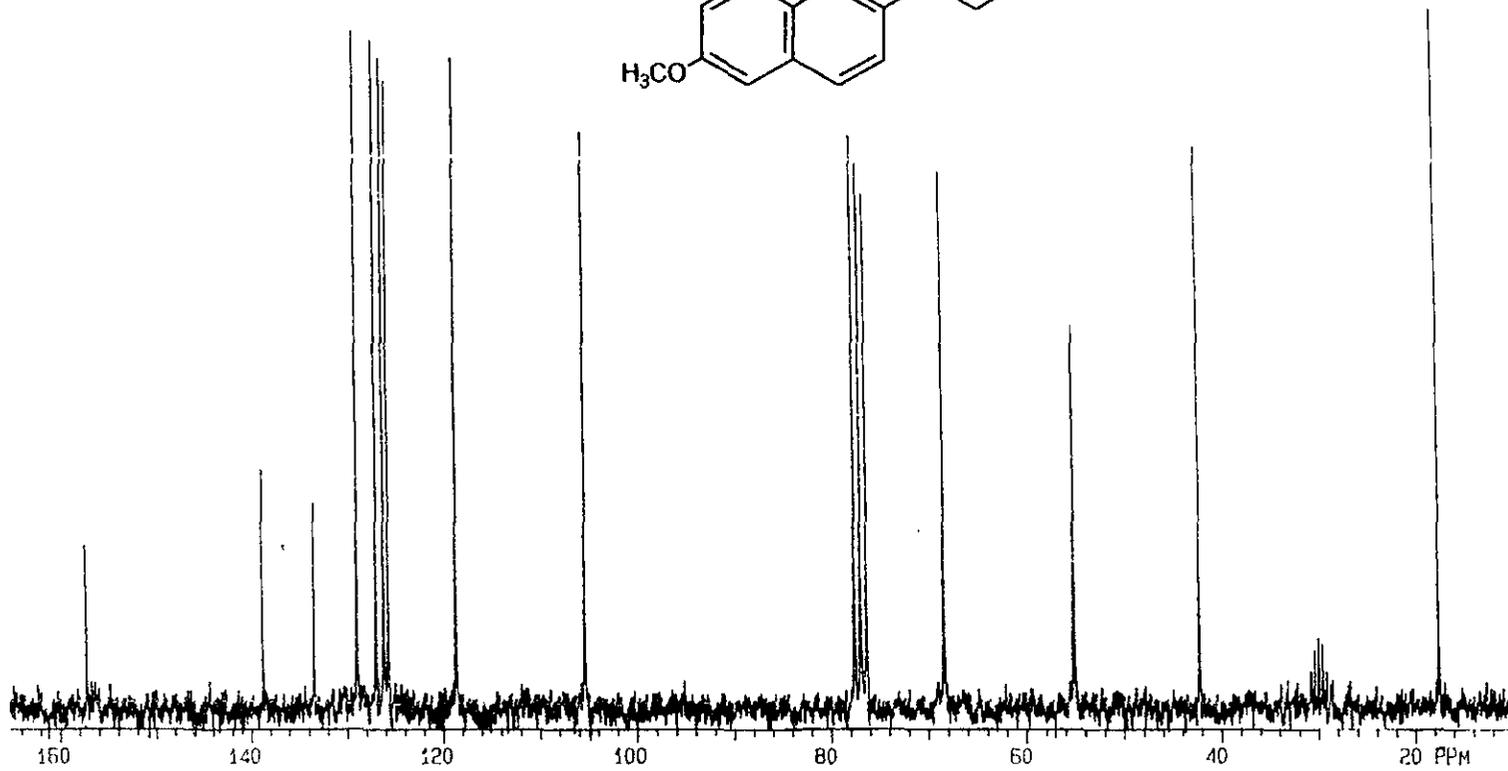
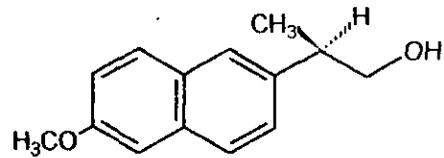
ESPECTRO NO. 26 IR (KBr). R-(+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETANOL.



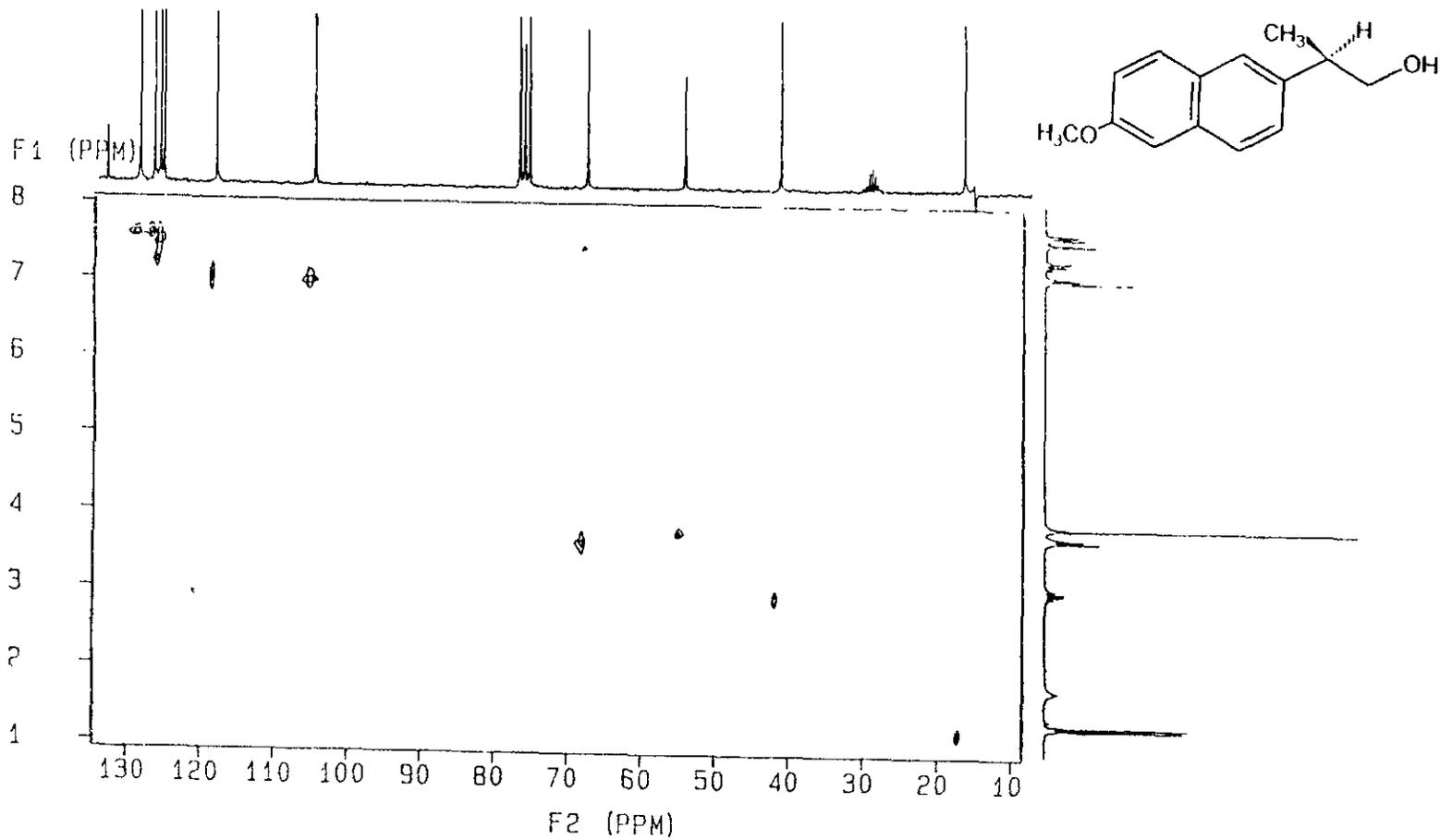
ESPECTRO NO. 27 EM (IE). R-(+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETANOL.



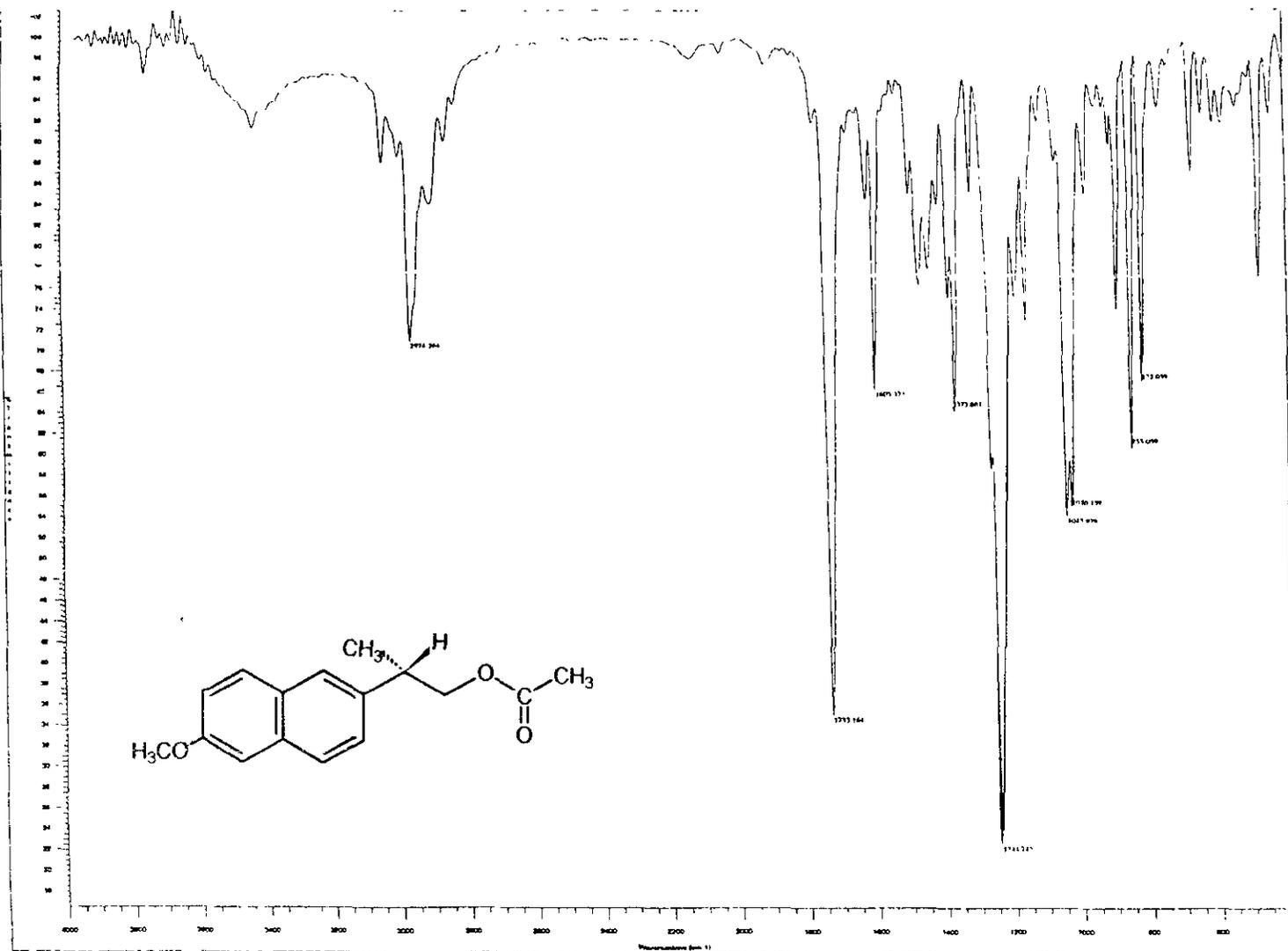
ESPECTRO NO. 28 ¹H RMN. R-(+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETANOL.



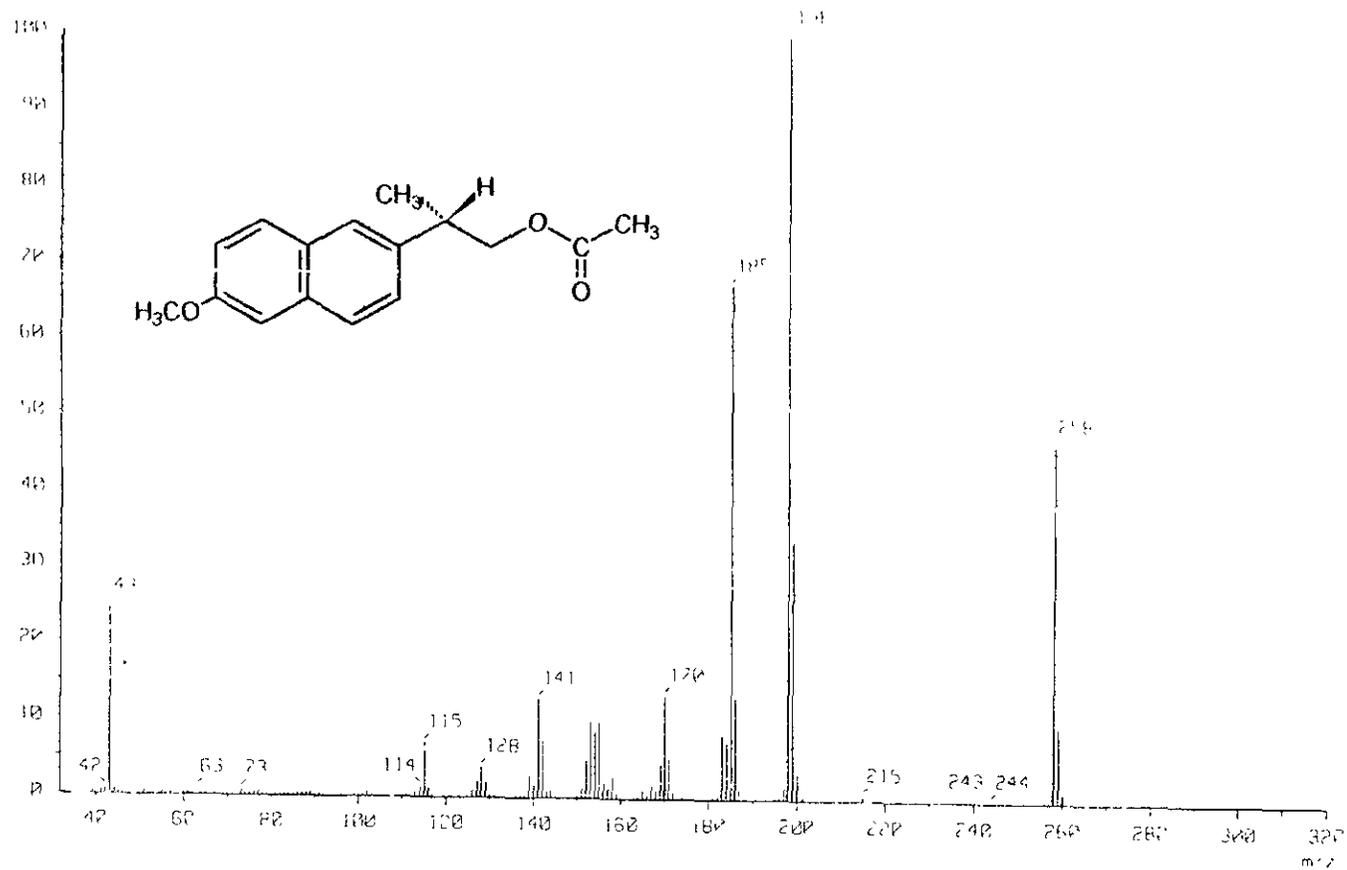
ESPECTRO NO. 29 ¹³C RMN. R-(+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETANOL.



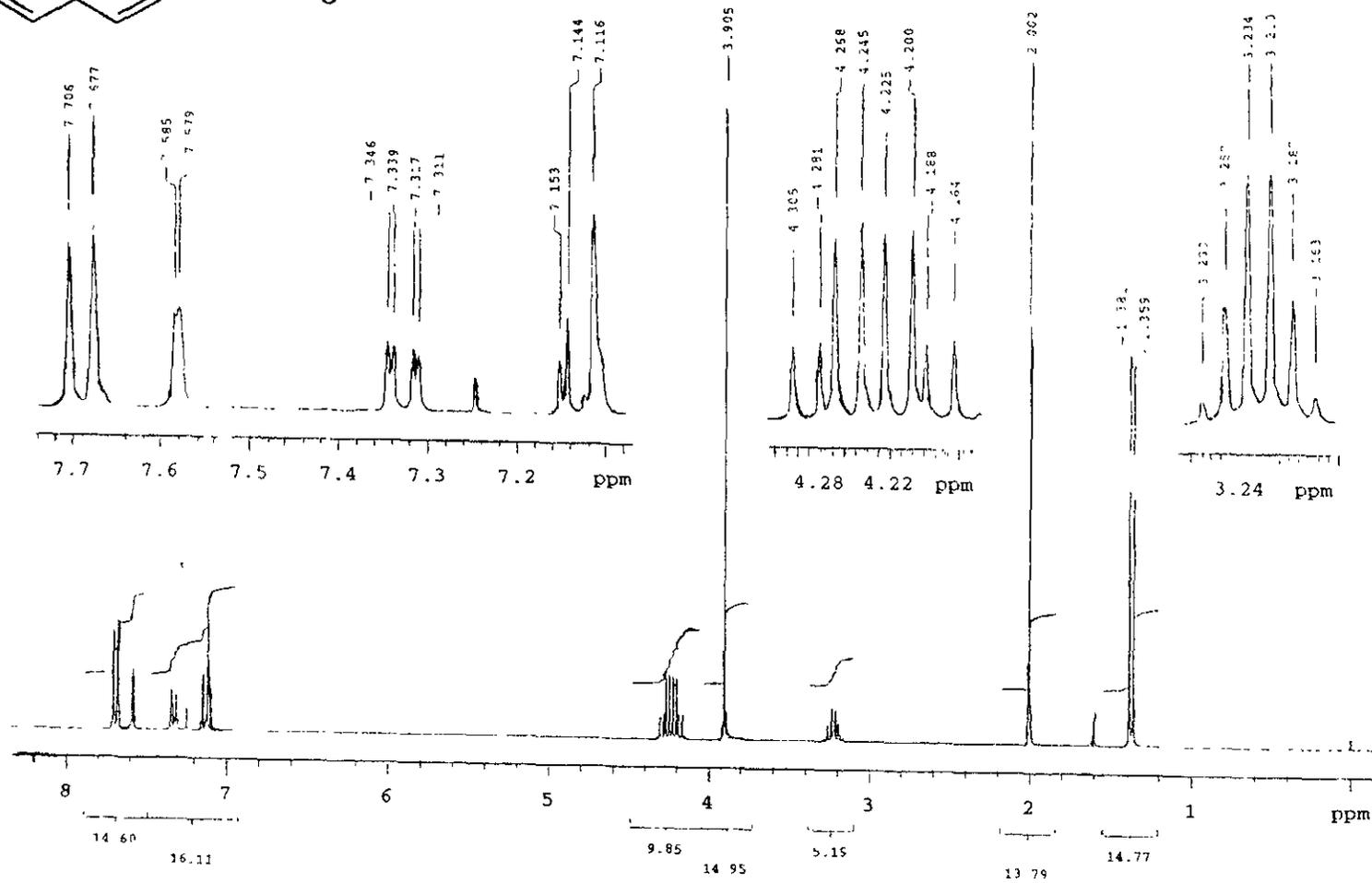
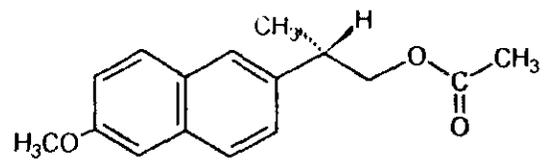
ESPECTRO NO. 30 HETCOR. R-(+)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETANOL.



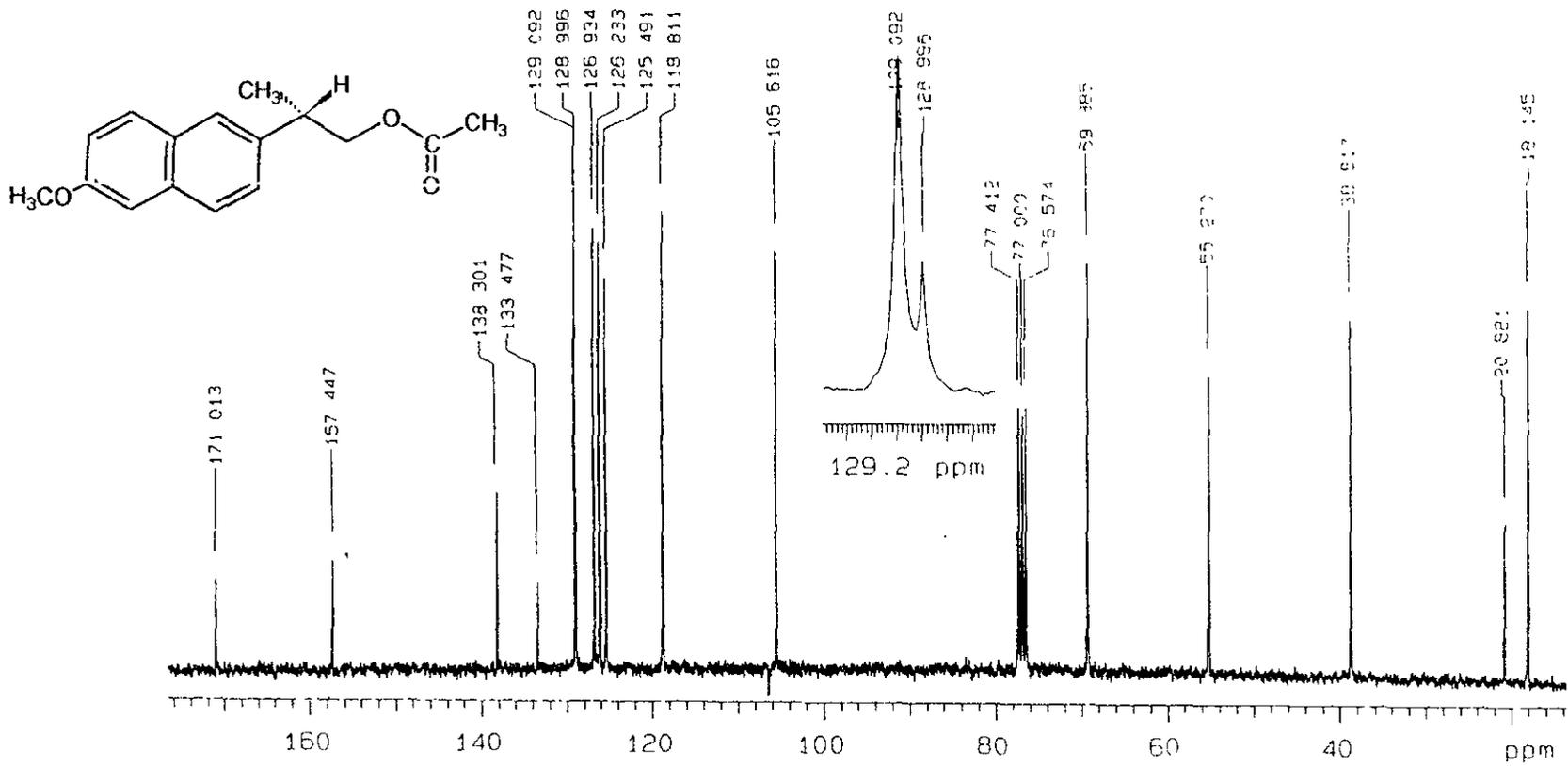
ESPECTRO NO. 31. IR (KBr). ACETATO DE S-(-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.



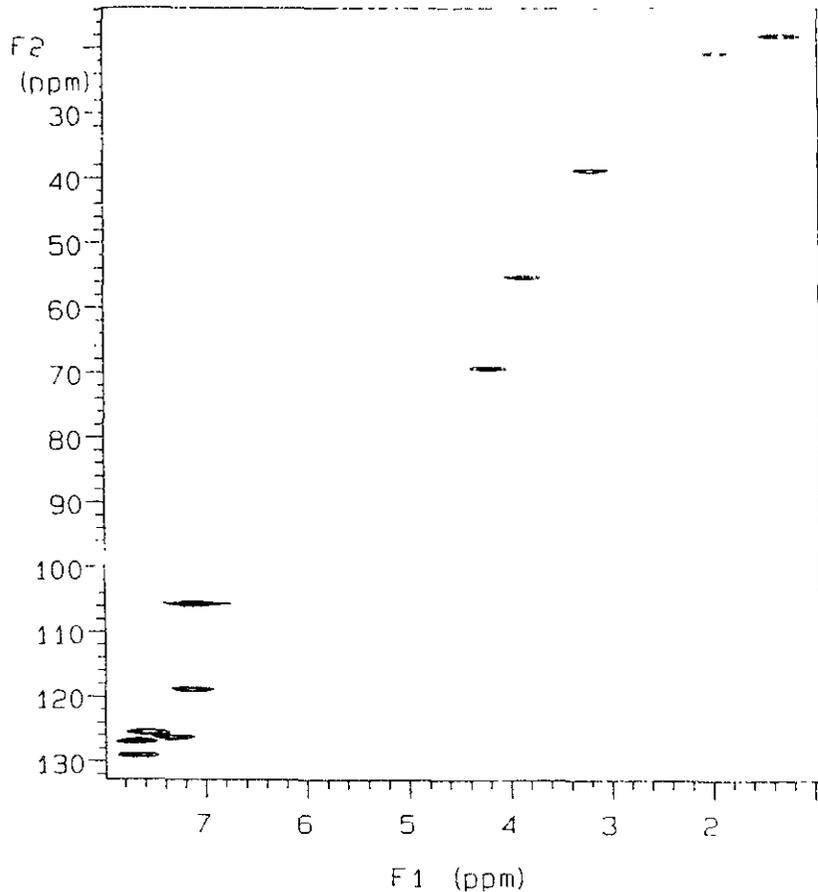
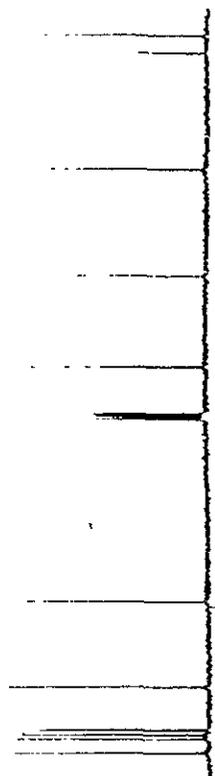
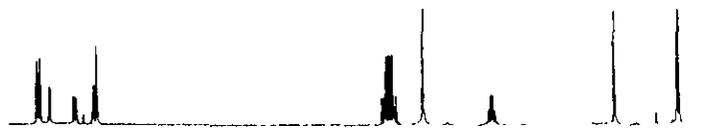
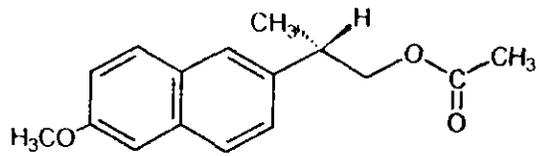
ESPECTRO NO. 32. EM (IE). ACETATO DE S-(-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.



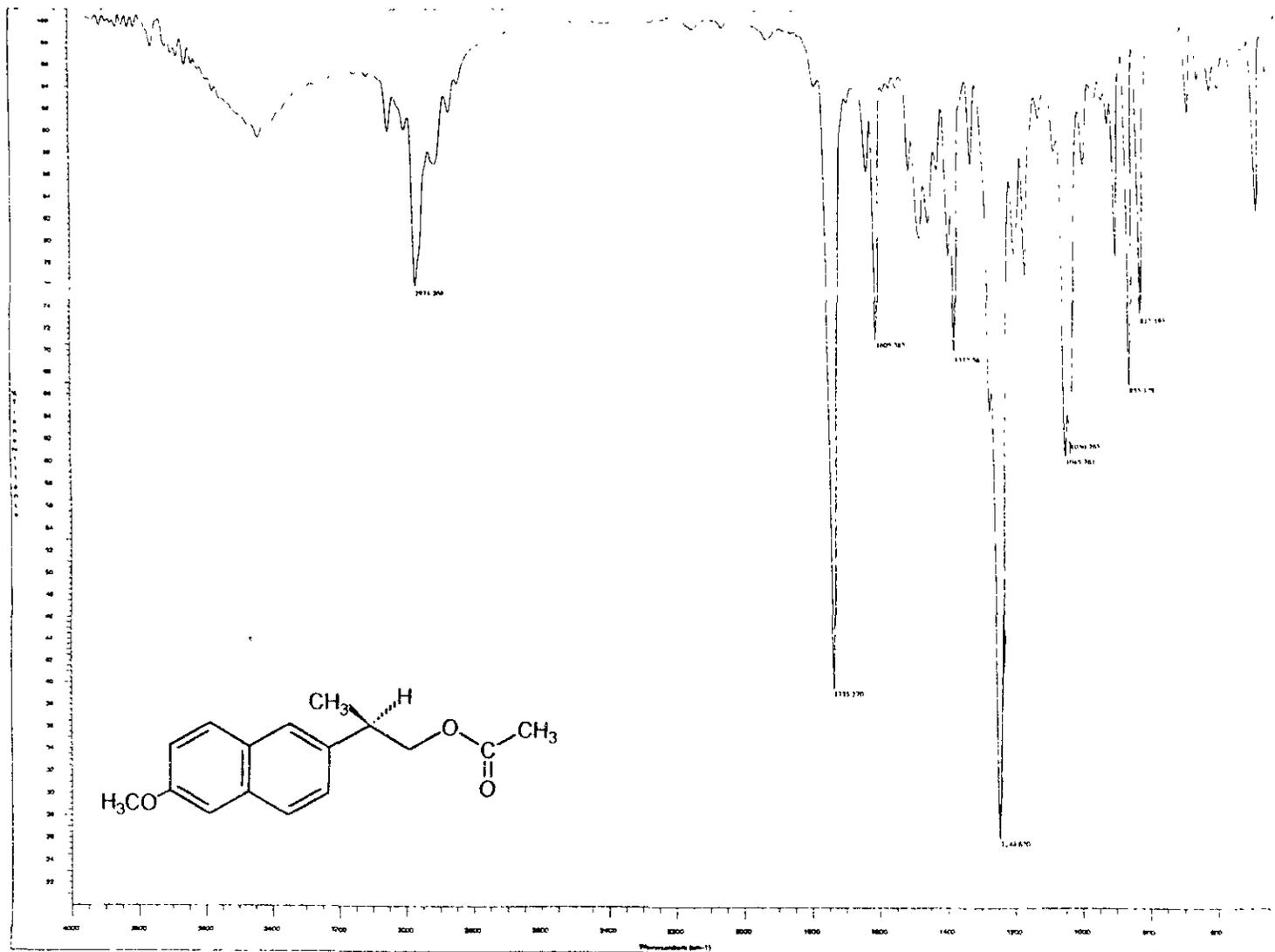
ESPECTRO NO. 33. ¹H RMN. ACETATO DE S-(-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.



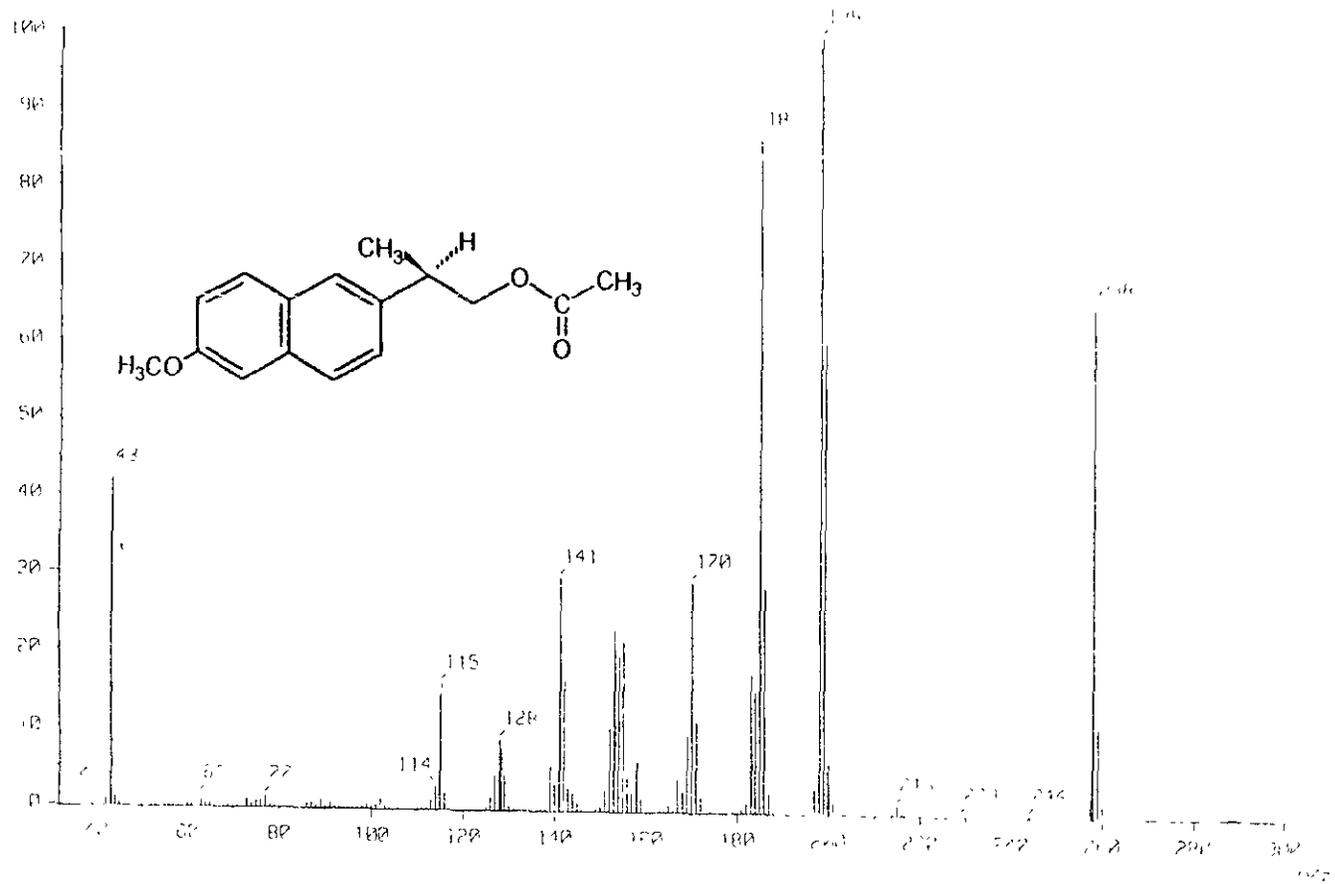
ESPECTRO NO. 34. ¹³C RMN. ACETATO DE S-(-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.



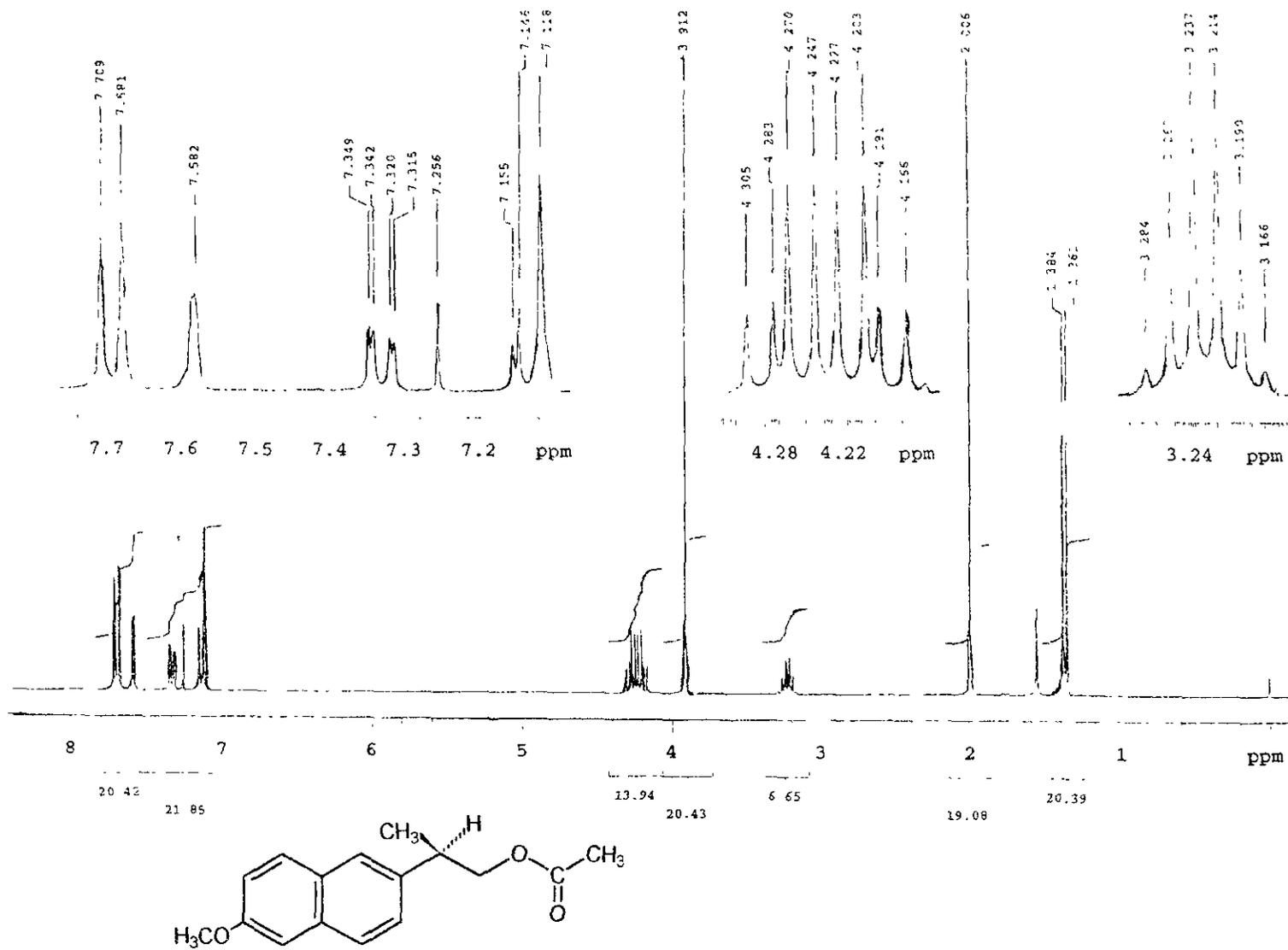
ESPECTRO NO. 35. HETCOR. ACETATO DE S-(-)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.



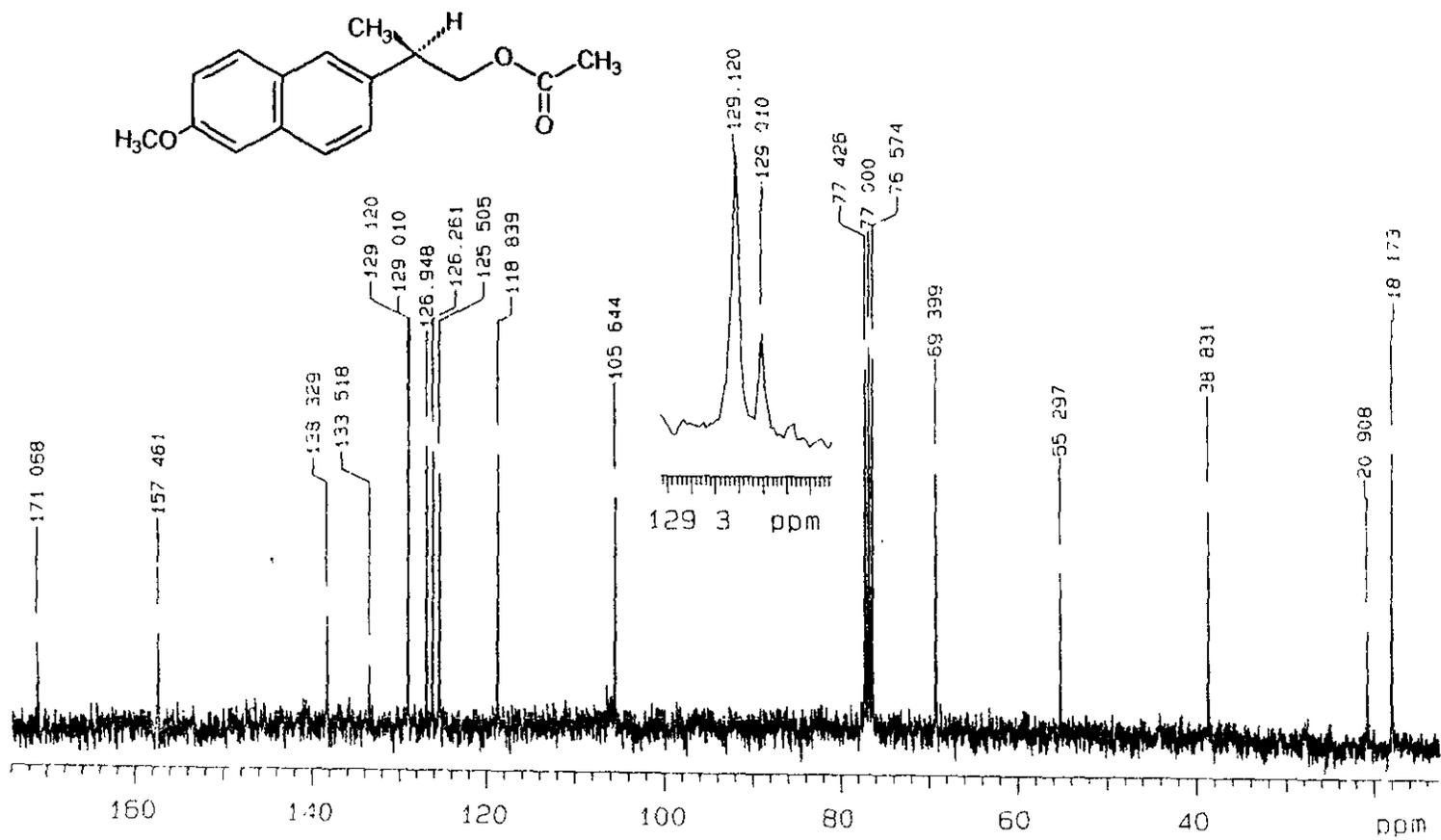
ESPECTRO NO. 36. IR (KBr). ACETATO DE R-(+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.



ESPECTRO NO. 37. EM (IE). ACETATO DE R-(+)-6-METOXI- β -METIL-2-NAFTALENETILO.



ESPECTRO NO. 38. ¹H RMN. ACETATO DE R-(+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.



ESPECTRO NO. 39. ¹³C RMN. ACETATO DE R-(+)-6-METOXI-β-METIL-2-NAFTALENETILO.

10. BIBLIOGRAFIA.

1. Åberg, B. (1961), en *4th International Conference on Plant Growth Regulation*, Ames, Iowa, State University Press, Yonkers, N.Y.
2. Abramson, S. (1985). Modes of action of aspirin-like drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 7227.
3. Adams, R.G. (1969). Absorption, distribution and toxicity of Ibuprofen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 15, 310.
4. Austel, V. (1982). Selection of test compounds from a basic set of chemical structures. *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.* 17,9.
5. Austel, V. (1983), en *Quantitative Approaches to Drug Design*, Dearden, J.C., Ed. Pharmacochemistry Library, vol. 6. Elsevier, N.Y.
6. Barnard N.D. & Kaufman, S.R. (1997). Animal Research is Wasteful and Misleading. *Scientific American*, 247, 64.
7. Belleau, B. (1965). Correlation between the biological activity of alkyl trimethyl ammonium ions and their mode of interaction with acetyl cholinesterase. *Advan. Drug Res.* 2, 89.
8. Belleau, B., & Lacasse, G. (1964). Basis for cholinomimetic and cholinolytic activity. IV. Molecular theory of drug action based on induced conformational perturbations of receptors. *J. Med. Chem.* 7, 768.
9. Bodor, N. (1995). Design of Biologically Safer Chemicals. *Chemtech*, Oct, 22.
10. Botting, J.H., & Morrison, A.R. (1997). Animal Research is Vital to Medicine. *Scientific American*, 247, 67.
11. Bowman, W. y Rand, M.J. (1985). *Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas.* 2^o. Edición. Nueva Editorial Interamericana, México.
12. Bruzzi, G. y Vila Pahí, F. J. (1977). Nuevo Procedimiento para la obtención del ácido (d)-2-(6-metoxi-2-naftil)-propiónico. *Pat. Esp.* 455064, clasif. Intern. CO7C//AG1K.
13. Bundgaard, H., & Nielsen, N.M. (1989). Evaluation of Glycolamide Esters and Various other Esters of Aspirin as True Aspirin Prodrugs. *J. Med. Chem.*, 30, 451.
14. Calleja, M. & Persoone, G. (1992). Cyst-Based Toxicity Tests. IV. The Potential of Ecotoxicological Tests for the Prediction of Acute Toxicity in Man as Evaluated on the First Ten Chemicals of the MEIC Programme. *ATLA*, 20, 396.
15. Calleja, M., Geladi, P., & Persoone, G. (1994). Modelling of human acute toxicity from physicochemical properties and non-vertebrate acute toxicity of the 38 organic chemicals of the MEIC priority list by PLS regression and neural network. *Food Chem. Toxic.*, 32, 10, 923.
16. Calleja, M., Persoone, G. & Geladi, P. (1993). The Predictive Potential of a Battery of Ecotoxicological tests for Human Acute Toxicity, as Evaluated with the First 50 MEIC Chemicals. *ATLA*, 21, 330.

17. Caron, G., Tseng, G.W., & Kazlauskas, R.J. (1994). Kinetic resolutions concentrate the minor enantiomer and aid measurement of high enantiomeric purity. *Tetrahedron: Assymetry*, 5, 83.
18. Cavallini, L. & Lucchetti, G. (1975). Clinical and pharmacological features of Ibuprofen. *Gazz. Med. Ital.*, 134, 7.
19. Coccini, T., Giannoni, L., Karcher, W., Manzo, L., & Roi, R. (1992). *Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in Toxicology*. Commission of the European Communities, Luxembourg.
20. Cohen, B.E., & Bangham, A.D., (1972). Diffusion of small nonelectrolytes across liposome membranes. *Nature*, 236, 173.
21. Collander, R., (1954). *Physiol. Plantarum*, 7, 420.
22. Chuman, H., Ito, A., Saishoji, T. & Kumazawa, S. (1995), en *Classical and Three-Dimensional QSAR in Agrochemistry*. Hansch, C. & Fujita, T., Eds. ACS Symp. Ser. No. 606, American Chemical Society, Washington, D.C.
23. Dunnett, C.W. (1955). A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *Journal of the American Statistical Association*, 50.
24. Free, S.M. & Wilson, J.W. (1964). Mathematical contribution to structure-activity studies. *J. Med. Chem.*, 7, 395.
25. Fujita, T. (1996). Recent Success Stories Leading to Commercializable Bioactive Compounds with the Aid of Traditional QSAR Procedures. *Quant. Struc-Act. Relat.*, 16, 107.
26. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. & Synderman, R. (1988). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Raven Press, N.Y.
27. Gomez-Parra, V., Sanchez, F., & Yague, C. (1986). Syntheses of 1-aryl-2-[4-[4-(3-oxobutyl)phenyl]piperazin-1-yl]ethanones. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* 319, 552.
28. Goodman, L.S., & Gilman, A. (1970). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 4th Edition. The Macmillan Company, U.S.A.
29. Griswold, D.E., & Adams, J.L. (1996). Constitutive Cyclooxygenase (COX-1) and Inducible Cyclooxygenase (COX-2): Rationale for Selective Inhibition and Progress to Date. *Medicinal Research Reviews*, 16, 2, 181.
30. Hansch, C. & Fujita, T., (1964). A method for the correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *JACS*, 86, 1616.
31. Hansch, C. Ed. (1990). *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study & Therapeutic Applications of Chemical Compounds*. Vol. 4: Quantitative Drug Design. Pergamon Press, U.K.
32. Hansch, C., & Deutsch E.W. (1966). Structure-activity relation in amides inhibiting photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 112, 381.
33. Hansch, C., (1968). *Ann. Rept. Med. Chem.*, 1966, 347.
34. Hansch, C., Quinlan, J.E., & Lawrence, G.L. (1968). The Linear Free-Energy Relationship between Partition Coefficients and the Aqueous Solubility of Organic Liquids. *JOC*, 33, 1, 347.
35. Hansch, C., Stewart, A.R., Iwasa, J., & Deutsch, E.W. (1965). The use of a hydrophobic bonding constant for structure-activity correlations. *Mol. Pharmacol.*, 1, 205.

- 36.Hara, H., Morita, T., Sukamoto, T. & Culter, F.M. (1995). *CNS Drug Reviews*, 1, 204.
- 37.Harrison, I.T., Lewis, B., Nelson, P., Rooks, W., Roszkowski, A., Tomolonis, A. & Fried, J.H. (1970). Nonsteroidal Antiinflammatory Agents I. 6-Substituted 2-Naphthylacetic Acids. *J. Med. Chem.* 13, 203.
- 38.Heyn, A.N.J. (1931). Der Mechanismus der Zellstreckung. *Rec. Trav. Bot. Néerland*, 28, 113.
- 39.Jönsson, A. (1961), en *Handbuch der Pflanzenphysiologie*. W. Ruhland, Ed. Vol. 14, 959. Springer, Heidelberg.
- 40.Kasting, G.B., Merrit, E.W., Smith, R.L., Walker, D., Mueller, L.G. & Estelle, A.F., (1987). *Pharmaceutical Research*, 4, S-59.
- 41.Kasting, G.B., Smith, R.L. & Cooper, E.R., (1987). *Pharmacology and the skin*. Vol. 1. Shroot, B., & Schaefer, H., eds. Karger, Basel.
- 42.Kasting, G.B., Smith, R.L. & Anderson, B.D. (1992). 3. "Prodrugs for Dermal Delivery: Solubility, Molecular Size, and Functional Group Effects", en *Prodrugs. Topical and Ocular Drug Delivery*. Ed. Kenneth B. Sloan. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. A series of textbooks and monographs. Vol. 53. Marcel Dekker, Inc., N.Y.
43. Kordan, H.A.. (1988). Barbiturate effects on germinating plant seedlings. *ATLA*, 15, 251.
- 44.Kordan, H.A., (1984). *J. Biol. Edn.* 18, 266.
- 45.Kordan, H.A., & Rengel, Z. (1988). Effects of alkali metal cations on root extension in the germination of tomato seedlings. *Ann. Bot.* 61, 221.
- 46.Kuchar, M., Maturova, E., Brunova, B., Grimova, J., Tomkova, H. y Holubek, K.J. (1988). *Coll. Czech. Chem. Comm.* 53, 1862.
- 47.Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C., & Stallings, W.C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384, 644.
- 48.Lecomte, M. (1994). *J. Biol. Chem.*, 269, 13207.
- 49.Lehman, P.A., Rodrigues de Miranda, J.F., & Ariëns, E.J. (1976). Stereoselectivity and Affinity in Molecular Pharmacology. *Arzneimittel-Forschung/Recherches Pharmaceutiques/Drug Research*, 20, 101.
- 50.Leo, A., Hansch, C. & Church, C., (1969). Comparison of Parameters Currently used in the Study of Structure-Activity Relationships. *J.Med.Chem.* 12, 766.
- 51.Lewan, L. Andersson, M., & Morales-Gomez, P. (1992). The use of *Artemia salina* in Toxicity Testing. *ATLA*, 20, 297.
- 52.Lieb, W.R. & Stein, W.D., (1969). *J. Membr. Biol.*, 92, 111.
- 53.Lieb, W.R. & Stein, W.D., (1986). Non-stokesian nature of transverse diffusion within human red cell membranes. *Nature*, 224, 240.
- 54.Lien, E.J., Ed. (1987). *Structure-Activity Relationships. Side Effects & Drug Design*. Medicinal Research Series, Vol 11. Marcel Dekker, Inc., N.Y.
- 55.Lowe, K.C., Davey, M.R., Power, J.B., & Clothier, R.H. (1995). Plants as Toxicity Screens. *Pharmaceutical News*, 2, 4, 17.

56. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. & McLaughlin, J.L. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica* 45, 31.
57. Meyer, K.H. & Hemmi, H., (1935). Theory of narcosis (III). *Biochem. Z.*, 277, 39.
58. Miles, S.M., *et al* (1996). *Clin. Immunotherapeutics*, 5, 205.
59. Montgomery, D.C. (1991). *Diseño y Análisis de Experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V., México.
60. Mueller, L.G., (1990). *U.S. Patent No.* 4,912,248 (March 27, 1990).
61. Mueller, L.G., Estelle, A.F., Kasting, G.B., Merritt, E.W., Tulich, L.J., Smith, R.L., Walker, D. & Cooper, E.R., (1987). *Pharmaceutical Research*, 4, S-71.
62. Nakanishi, K. (1962). *Absortion Spectroscopy; Practical*. Holden Day Publishers, U.S.A.
63. Needleman, P., & Isakson, P. (1998). Selective Inhibition of Cyclooxygenase 2. *Science & Medicine*, Jan/Febr, 26.
64. Nendza, m., Volmer, J., & Klein, W. (1990). "Risk Assessment based on QSAR estimates", en *Practical Applications of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in Environmental Chemistry and Toxicology*. Devillers, J., & Karcher, W., Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
65. Nouwen, J., & Hansen, B. (1996). Correlation Analysis between Watersolubility, Octanol-water Partition Coefficient and Melting Point Based on Clustering. *Quant. Struc.-Act. Relat.* 15, 17.
66. Parke, A.L., Ioanides, C., Lewis, D.F.V., & Parke, D.V. (1991). Molecular pathology of drug-disease interactions in chronic autoimmune inflammatory diseases. *Inmunopharmacology*, 1.
67. Phillips, J.C., Gibson, W.B., Yam, J., Andrew, C.L., & Hard, G.C. (1990). Survey of the QSAR and *in vitro* approaches for developing non-animal methods to supersede the *in vivo* LD₅₀ test. *Food Chem. Toxicol.*, 28, 375.
68. PLM (1996). *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*. Emilio Rosenstein, Ed. 42ª edición, México.
69. Pressman, D., & Grossberg, A.L., (1968). *The Structural Basis of Antibody Specificity*. Benjamin, N.Y.
70. Rabasseda, X., Mealy, N., & Castañer, J. (1995). ML-3000. *Drugs Fut.*, 20, 10, 1007.
71. Rainsford, K.D., & Whitehouse, M.W. (1976). Gastric irritancy of aspirin and its congeners: Antiinflammatory activity without this side-effect. *J. Pharm. Pharmac.*, 28, 599.
72. Richter, J., & Goldstein, A. (1970). Effects of morphine-like compounds on the light response of the brine shrimp *Artemia-salina*. *Psychopharmacologia*, 17, 327.
73. Robinson, A.B., Manly K.F, Anthony M.P., Catchpool, J.F. & Pauling, L. (1965). *Science*, 149, 1255.
74. Rowan, A.N. (1997). The Benefits and Ethics of Animal Research. *Scientific American*, 247, 63.
75. Rubin, A., *et al* (1973). Interactions of Aspirin with NSAIDs in Man. *Clin. Pharmacol. Ther.* 15, 374.

- 76.Sam, T.W. (1993). "Toxicity Testing using the Brine Shrimp: *Artemia salina*", en *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*. Colegate, S.M., & Molyneux, R.J., Eds. CRC Press, Boca Ratón.
- 77.Shanbag, V.R., Crider, A.M., Gokhale, R., Harpalani, A., & Dick, R.M. (1992). Ester and Amide Prodrugs of Ibuprofen and Naproxen: Synthesis, Antiinflammatory activity, and Gastrointestinal Toxicity. *J. Pharm. Sci.*, 81, 149.
- 78.Shelley, J.H. (1978). Pharmacological mechanisms of analgesic nephropathy. *Kidney International*, 13, 15.
- 79.Silverstein, R.M., Bassler, G.C., & Morrill, T.C. (1991). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 5th Ed. John Wiley & Sons, Inc., Singapore.
- 80.Singer, J.A., & Purcell, W.P. (1967). Relationships among Current Quantitative Structure-Activity Models. *J.Med.Chem.*, 10, 1000.
- 81.Sloan, K.B. (1992). Prodrugs. Topical and Ocular Drug Delivery, en *Drugs and the Pharmaceutical Sciences. A series of textbooks and monographs*. Ed. Kenneth B. Sloan Vol. 53. Marcel Dekker, Inc., N.Y.
- 82.Smith, M.S., Wain, R.L., y Wightman, F. (1952). Antagonistic Action of Certain Stereoisomers on the Plant Growth-regulating Activity of their enantiomorphs. *Nature*, 169, 4308, 883.
- 83.Stockley, I. (1981). *Drug Interactions: A source book of adverse interactions, their clinical importance, mechanisms and management*. Blackwell Scientific Publications, U.S.A.
- 84.Thimann, K.V. (1969). "The auxins", en *The Physiology of Plant Growth and Development*. McGraw-Hill, N.Y.
- 85.Vane, J.R. (1971). Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nature New Biology*, 231, 232.
- 86.Wallace, J.L., Reuter, B., Cicala, C., McKnight, W., Grisham, M.B., & Cirino, G. (1994). Novel Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Derivatives With Markedly Reduced Ulcerogenic Properties in the Rat. *Gastroenterology*, 107, 173.
- 87.Weaver, R.J. (1996). *Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura*. Editorial Trillas, México.
- 88.Yalkowsky, S.H., & Valvani, S.C. (1980). Solubility and Partitioning I: Solubility of Nonelectrolytes in Water. *J. Pharm. Sci.* 69, 8, 913.
- 89.Yalkowsky, S.H., Valvani, S.C., & Roseman, T.J. (1983). Solubility and Partitioning VI: Octanol Solubility and Octanol-Water Partition Coefficients. *J. Pharm. Sci.* 72, 8, 866.
- 90.Zimmerman, H.J. (1978). "Antiinflammatory and other drugs employed in the treatment of rheumatic and musculoskeletal diseases", en *Hepatotoxicity*. Appleton-Century-Crofts, N.Y.
- 91.Zimmerman, P.W. & Hitchcock, A.E. (1942). Substituted phenoxy and benzoic acid growth substances and the relation of structure to psychological activity. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 12, 321.
- 92.Zimmerman, P.W. (1942). Formative influences of growth substances on plants. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 10, 152.
- 93.Zimmerman, P.W., Hitchcock, A.E., & Wilcoxon, F. (1936). Several esters as plant hormones. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 8, 105.

11. ANEXO.

TABLA 11.1
 CODIFICACION DE LOS COMPUESTOS PARA LOS ANALISIS
 DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION.

Compuesto	10 ⁻² M Codificación	10 ⁻³ M Codificación	10 ⁻⁴ M Codificación	10 ⁻⁵ M Codificación	10 ⁻⁶ M Codificación
S-(+)-Naproxeno	12	13	14	15	16
R-(-)-Naproxeno	22	23	24	25	26
S-(-)-Naproxol	32	33	34	35	36
R-(+)-Naproxol	42	43	44	45	46
S-(+)-Naproxenato de etilo	52	53	54	55	56
R-(-)-Naproxenato de etilo	62	63	64	65	66
S-(-)-Acetato de Naproxilo	72	73	74	75	76
R-(+)-Acetato de Naproxilo	82	83	84	85	86

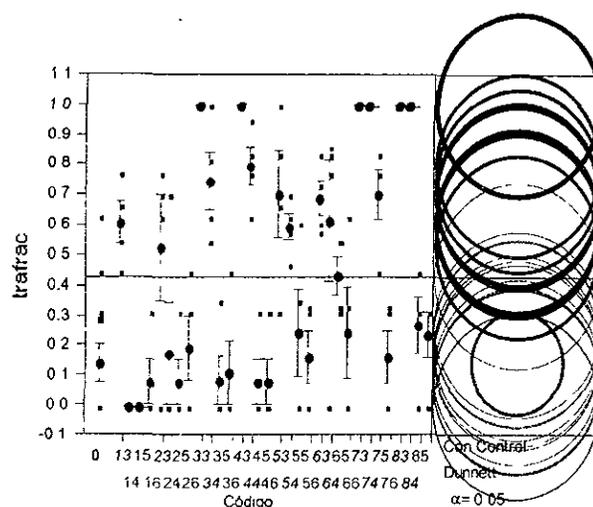


FIGURA 11.2 GRAFICA DE DUNNETT PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA *A. SALINA*.

TABLA 11.3 ANOVA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA LA COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS DEL DISEÑO FACTORIAL 2^3 CON LA MEDIA DEL CONTROL. (EN *A. SALINA*).

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de Significación
Tratamientos (Letalidad en <i>A. salina</i>)	17.8586	32	0.5581	23.5352	<0.0001
Residual	2.5372	107	0.0237		
Total	20.3959	139			
Diferencia Crítica de Dunnnett ($\alpha=0.05$)	0.3483				
R^2 Ajustada	0.84				

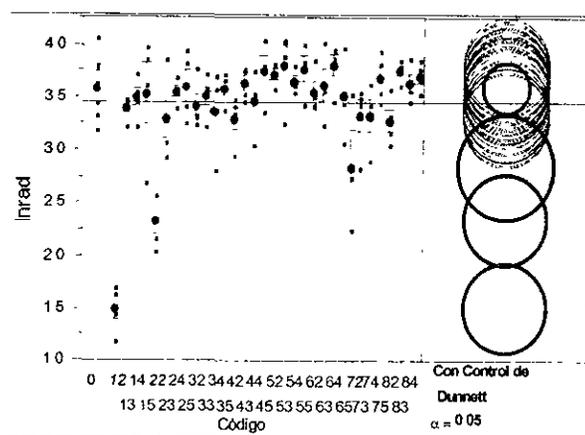


FIGURA 11.4 GRAFICA DE DUNNETT PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA RADICULA DE RABANO.

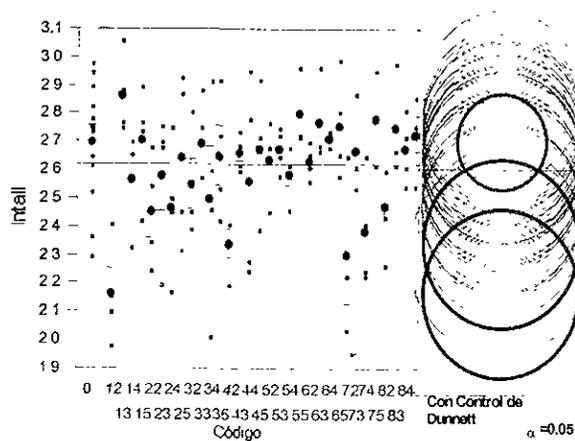


FIGURA 11.5 GRAFICA DE DUNNETT PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA TALLELO DE RABANO.

TABLA 11.6 ANOVA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION
 PARA LA COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS
 DEL DISEÑO FACTORIAL 2³ CON LA MEDIA DEL CONTROL (Ln) (PARA RABANO)

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de significación
Tratamientos (Ln del Crecimiento de Radícula)	25.9641	32	0.8114	10.3605	<0.0001
Residual	8.3014	106	0.0783		
Total	34.2655	138			
Diferencia crítica de Dunnett ($\alpha=0.05$)	0.6332				
R ² Ajustada	0.6846				
Tratamientos (Ln del Crecimiento de Talluelo)	3.0674	32	0.0958	2.5858	0.0002
Residual	3.9294	106	0.0371		
Total	6.9968	138			
Diferencia crítica de Dunnett ($\alpha=0.05$)	0.4358				
R ² Ajustada	0.2688				

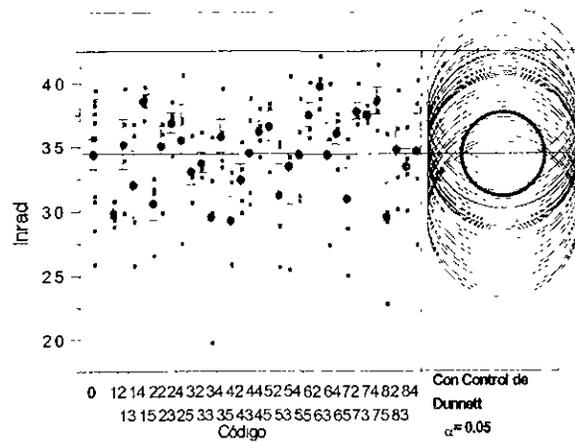


FIGURA 11.7 GRAFICA DE DUNNETT PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA RADICULA DE TRIGO.

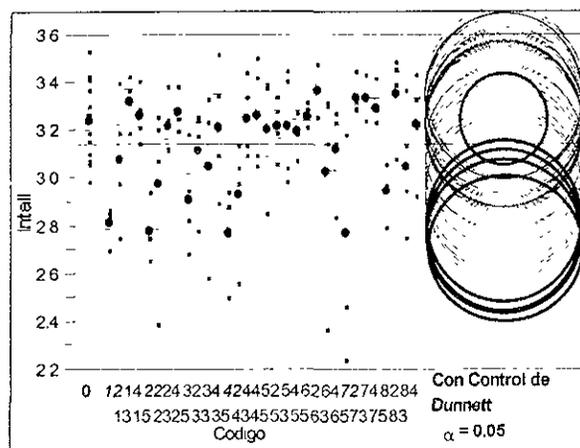


FIGURA 11.8 GRAFICA DE DUNNETT PARA EL ANALISIS DE VARIANZA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION PARA TALLUELO DE TRIGO.

TABLA 11.9 ANOVA DE UN CRITERIO DE CLASIFICACION
 PARA LA COMPARACION DE LAS MEDIAS DE LOS TRATAMIENTOS
 DEL DISEÑO FACTORIAL 2³ CON LA MEDIA DEL CONTROL (Ln) (EN TRIGO)

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de significación
Tratamientos (Ln Crecimiento de Radícula)	10.60	32	0.3312	2.2994	0.0008
Residual	15.4146	107	0.14406		
Total	26.014	139			
Diferencia crítica de Dunnett ($\alpha=0.05$)	0.8585				
R ² Ajustada	0.2302				
Tratamientos (Ln Crecimiento de Talluelo)	4.3377	32	0.1355	2.8562	<0.0001
Residual	5.078	107	0.0474		
Total	9.4159	139			
Diferencia crítica de Dunnett ($\alpha=0.05$)	0.4942				
R ² Ajustada	0.2994				

TABLA 11.10 ANOVA PARA LA EVALUACION ESTADISTICA
DEL MODELO DE REGRESION LINEAL MULTIPLE
(*Artemia salina*, Arco Seno [Fracción]^{1/2})

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de significación
Modelo de Regresión (Arco Seno[Fracción] ^{1/2})	13.0489	8	1.6311	31.211	<0.0001
Residual	6.2191	119	0.0523		
Total	19.268	127			
R ² Ajustada	0.6555				

TABLA 11.11 ANOVA PARA LA EVALUACION ESTADISTICA
DEL MODELO DE REGRESION LINEAL MULTIPLE
(Ln de la longitud, rábano)

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de significación
Modelo de Regresión (In Radícula)	12.9986	8	1.6248	9.39536	<0.0001
Residual	20.4069	118	0.17294		
Total	33.4055	126			
R ² Ajustada	0.3477				
Modelo de Regresión (In Talluelo)	1.1694	8	0.1462	3.30165	0.0019
Residual	5.2245	118	0.0443		
Total	6.3939	126			
R ² Ajustada	0.1275				

TABLA 11.12 ANOVA PARA LA EVALUACION ESTADISTICA
DEL MODELO DE REGRESION LINEAL MULTIPLE
(Ln de la longitud, trigo).

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de significación
Modelo de Regresión (In Radícula)	4.5831	8	0.5729	3.5183	0.0011
Residual	19.3769	119	0.1628		
Total	23.96	127			
R ² Ajustada	0.1369				
Modelo de Regresión (In Talluelo)	1.7929	8	0.2241	3.7187	0.0007
Residual	7.1718	119	0.0603		
Total	8.9647	127			
R ² Ajustada	0.1462				

TABLA 11.13 EVALUACION ESTADISTICA DE LOS MODELOS PARA LOS DISEÑOS FACTORIALES 2³ EN A. SALINA.

Parámetro		10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M
Suma de Cuadrados	Modelo	5.8425	9.0447	1.9922	0.1271
	Residual	1.4943	1.9932	0.8998	1.0995
	Total	7.3367	11.038	2.8920	1.2266
Grados de Libertad	Modelo	7	7	7	7
	Residual	24	24	24	24
	Total	31	31	31	31
Cuadrado Medio	Modelo	0.8346	1.2921	0.2846	0.0182
	Residual	0.0623	0.0831	0.0375	0.0458
F		13.41	15.56	7.59	0.40
Significación		<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.8951
R ² Ajustada		0.74	0.77	0.60	-0.16

TABLA 11.14 EVALUACION ESTADISTICA DE LOS MODELOS PARA LOS DISEÑOS FACTORIALES 2³ EN RADICULA DE RABANO.

Parámetro		10 ² M	10 ³ M	10 ⁴ M	10 ⁵ M
Suma de Cuadrados	Modelo	15.6160	1.0440	0.7412	0.2697
	Residual	1.8973	1.8412	1.4897	2.4598
	Total	17.5133	2.8852	2.2310	2.7295
Grados de Libertad	Modelo	7	7	7	7
	Residual	24	24	24	24
	Total	31	31	31	31
Cuadrado Medio	Modelo	2.2309	0.1491	0.1059	0.0385
	Residual	0.0791	0.0767	0.0621	0.1025
F		28.22	1.94	1.71	0.38
Significación		<0.0001	0.1063	0.1552	0.9074
R ² Ajustada		0.86	0.18	0.14	-0.16

TABLA 11.15 EVALUACION ESTADISTICA DE LOS MODELOS PARA LOS DISEÑOS FACTORIALES 2³ EN TALLUELO DE RABANO.

Parámetro		10 ² M	10 ³ M	10 ⁴ M	10 ⁵ M
Suma de Cuadrados	Modelo	0.7673	0.2062	0.3253	0.1035
	Residual	0.6825	0.5559	1.2413	0.9319
	Total	1.4497	0.7621	1.5665	1.0354
Grados de Libertad	Modelo	7	7	7	7
	Residual	24	24	24	24
	Total	31	31	31	31
Cuadrado Medio	Modelo	0.1096	0.0294	0.0465	0.0148
	Residual	0.0284	0.0232	0.0517	0.0388
F		3.85	1.27	0.90	0.38
Significación		0.006	0.3054	0.5236	0.9045
R ² Ajustada		0.39	0.06	-0.02	-0.16

TABLA 11.16 EVALUACION ESTADISTICA DE LOS MODELOS PARA LOS DISEÑOS FACTORIALES 2³ EN RADICULA DE TRIGO.

Parámetro		10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M
Suma de Cuadrados	Modelo	2.9917	2.1434	1.8742	0.7253
	Residual	2.7262	2.4793	5.0994	3.0551
	Total	5.7179	4.6228	6.9736	3.7803
Grados de Libertad	Modelo	7	7	7	7
	Residual	24	24	24	24
	Total	31	31	31	31
Cuadrado Medio	Modelo	0.4274	0.3062	0.2677	0.1036
	Residual	0.1136	0.1033	0.2125	0.1273
F		3.76	2.96	1.26	0.81
Significación		0.0069	0.0218	0.3109	0.5847
R ² Ajustada		0.38	0.31	0.06	-0.04

TABLA 11.17 EVALUACION ESTADISTICA DE LOS MODELOS PARA LOS DISEÑOS FACTORIALES 2³ EN TALLUELO DE TRIGO.

Parámetro		10 ⁻² M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M
Suma de Cuadrados	Modelo	1.081	0.8395	0.4343	0.0858
	Residual	1.2518	1.2583	1.5054	0.7404
	Total	2.3326	2.0977	1.9397	0.8262
Grados de Libertad	Modelo	7	7	7	7
	Residual	24	24	24	24
	Total	31	31	31	31
Cuadrado Medio	Modelo	0.1544	0.1199	0.0620	0.0122
	Residual	0.0522	0.0524	0.0627	0.031
F		2.96	2.29	0.99	0.40
Significación		0.0219	0.0618	0.4623	0.8946
R ² Ajustada		0.31	0.23	0.0	-0.16

FIGURA 11.18 EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , ARCO SENO (FRACCION DE ARTEMIAS MUERTAS) $^{1/2}$, PARA LA CONCENTRACION 10^{-3} M

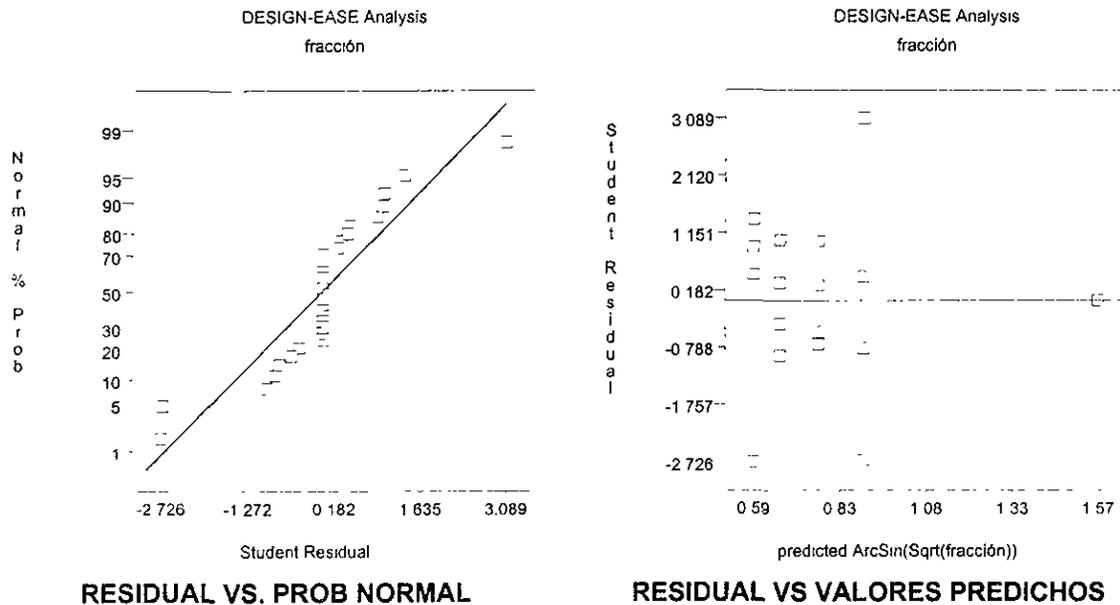


FIGURA 11.19 EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , ARCO SENO (FRACCION DE ARTEMIAS MUERTAS) $^{1/2}$, PARA LA CONCENTRACION 10^{-4} M

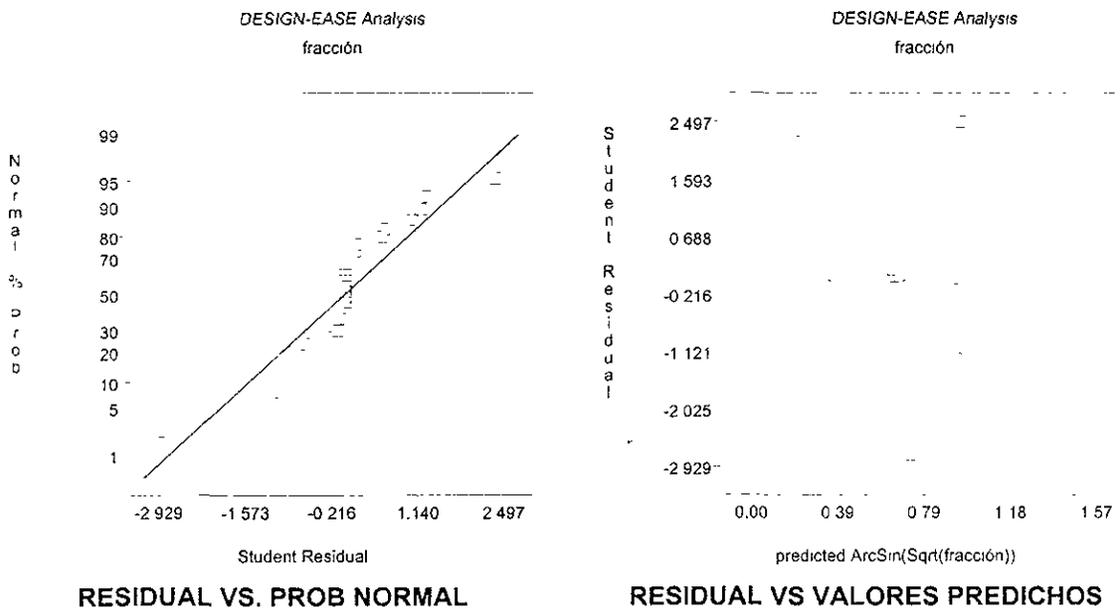


FIGURA 11.20 EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , ARCO SENO (FRACCION DE ARTEMIAS MUERTAS)^{1/2}, PARA LA CONCENTRACION 10^{-5} M

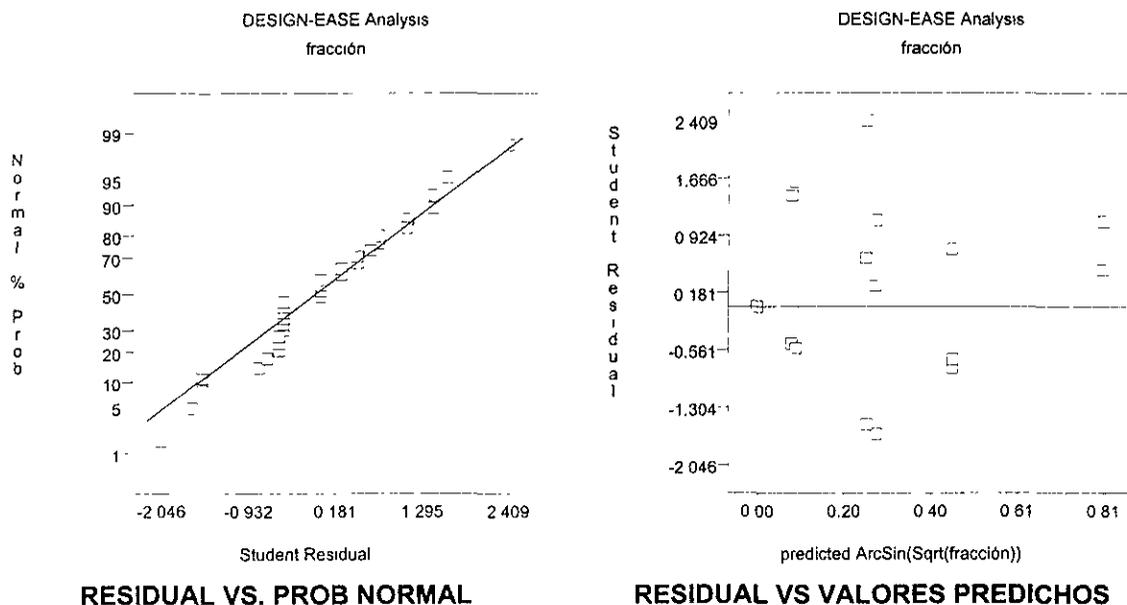


FIGURA 11.21 EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , ARCO SENO (FRACCION DE ARTEMIAS MUERTAS)^{1/2}, PARA LA CONCENTRACION 10^{-6} M

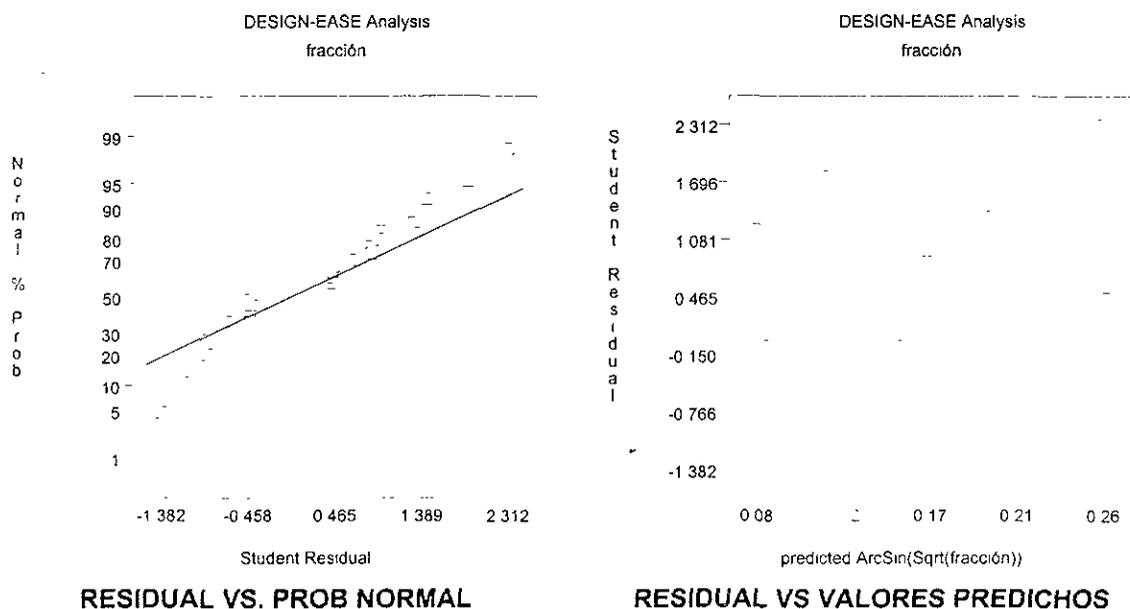
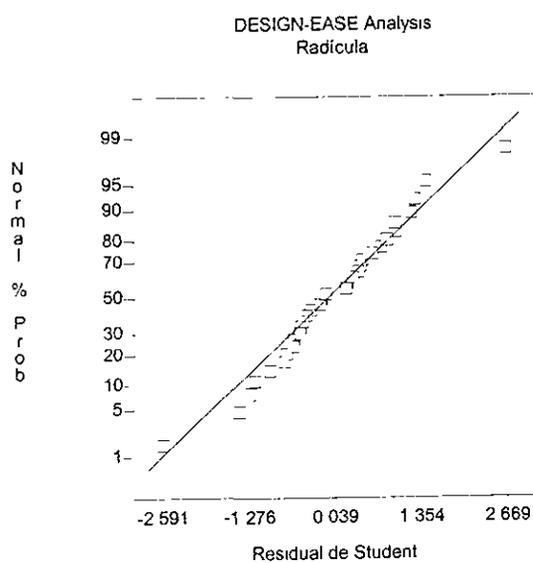
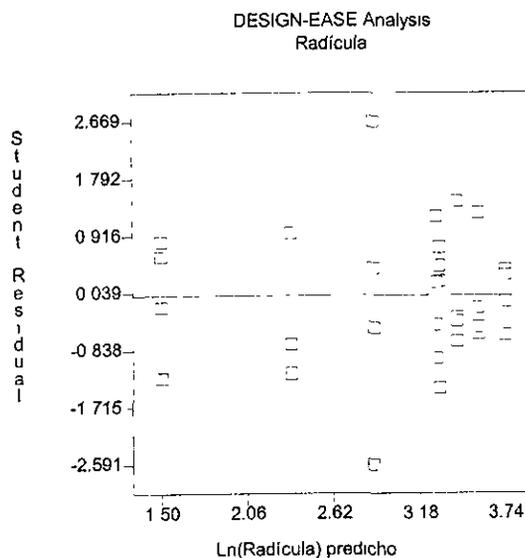


FIGURA 11.22 EVALUACION DIAGNOSTICA DEL FACTORIAL 2^3 , Ln RADICULA DE RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-2} M

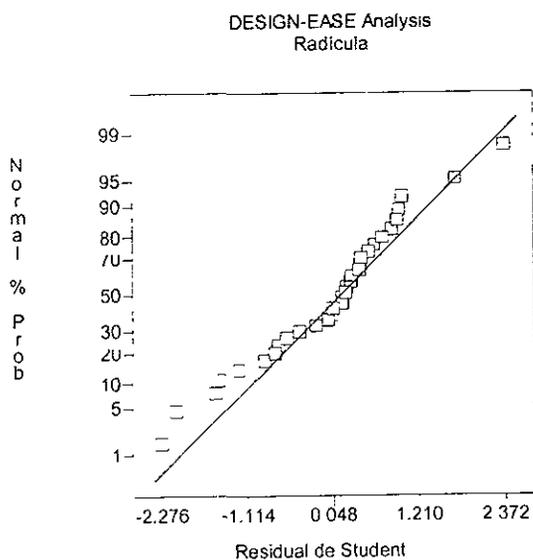


RESIDUAL VS. PROB NORMAL

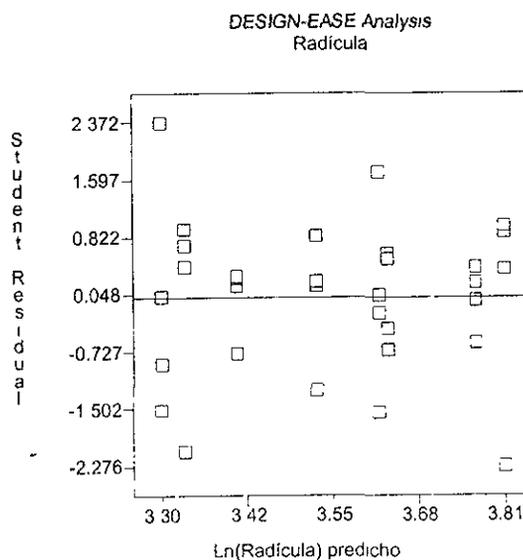


RESIDUAL VS VALORES PREDICHOS

FIGURA 11.23 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln RADICULA RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-3} M.



RESIDUAL VS. PROB NORMAL



RESIDUAL VS VALORES PREDICHOS

FIGURA 11.24 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln RADICULA RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-4} M.

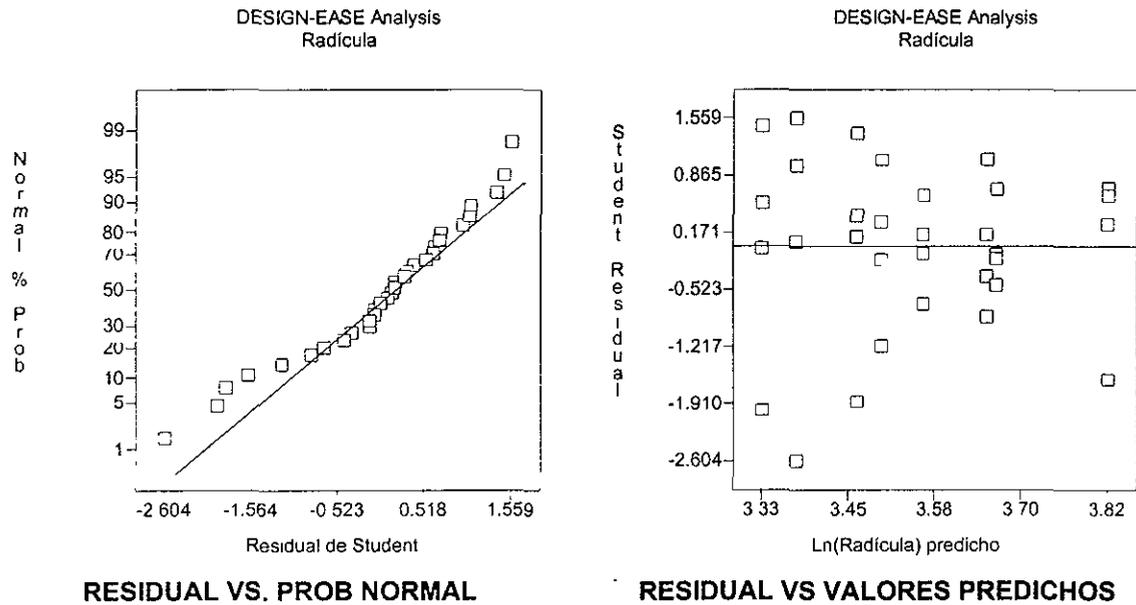


FIGURA 11.25 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln RADICULA RABANO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-5} M.

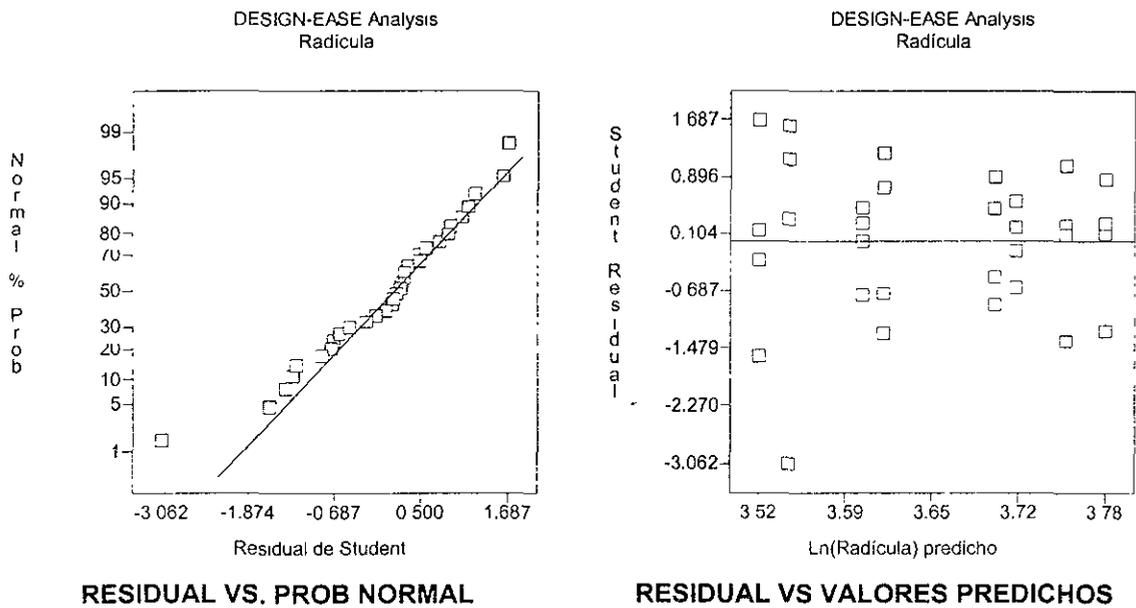


FIGURA 11.26 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln TALLUELO RABANO, PARA LA CONCENTRACION $10^{-2}M$.

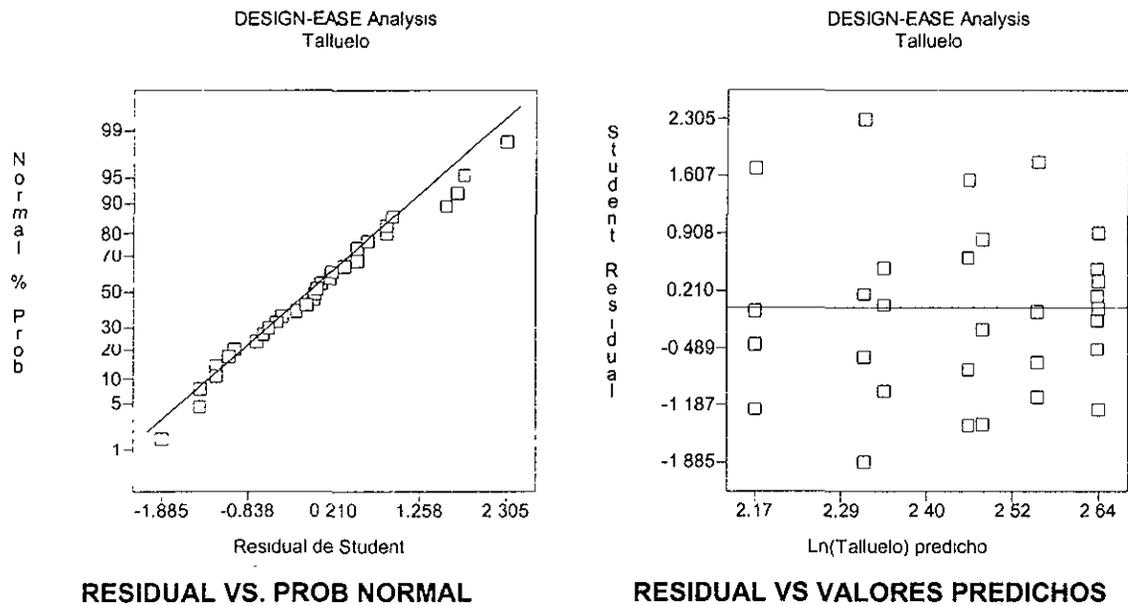


FIGURA 11.27 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln TALLUELO RABANO, PARA LA CONCENTRACION $10^{-3}M$.

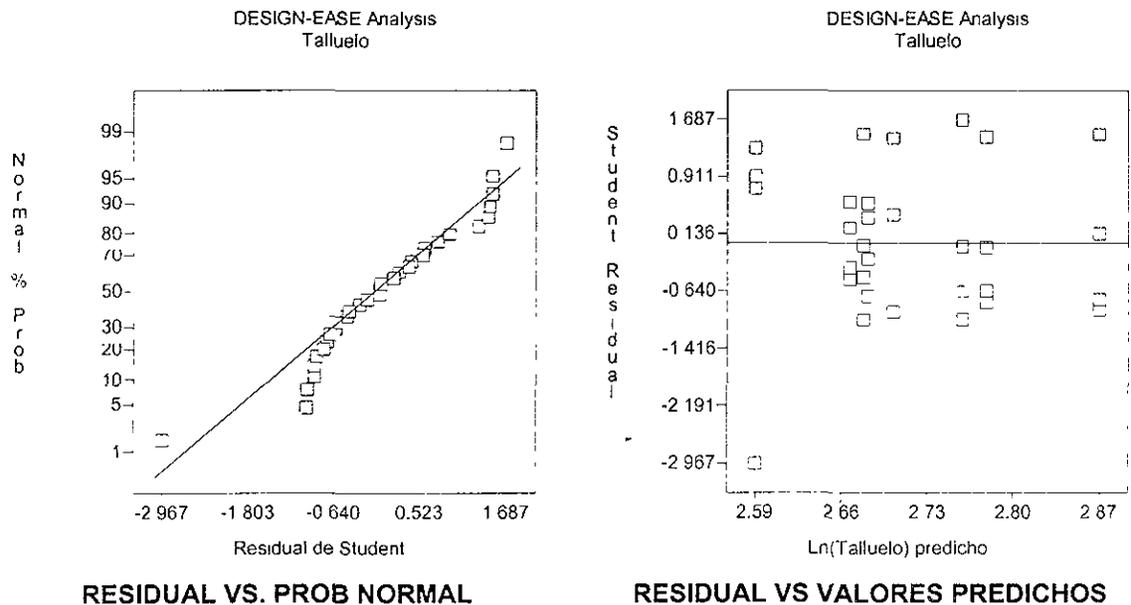
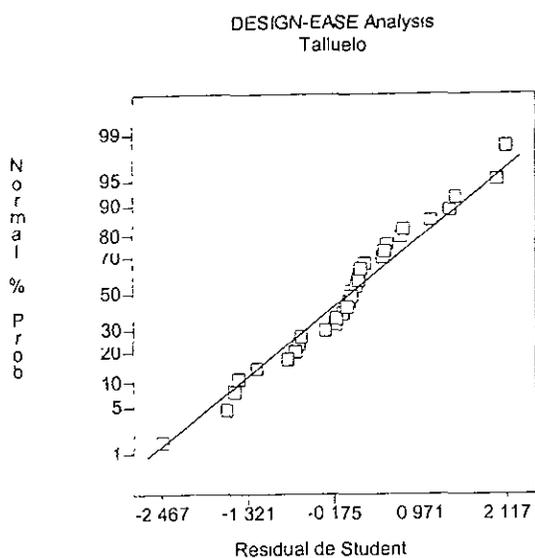
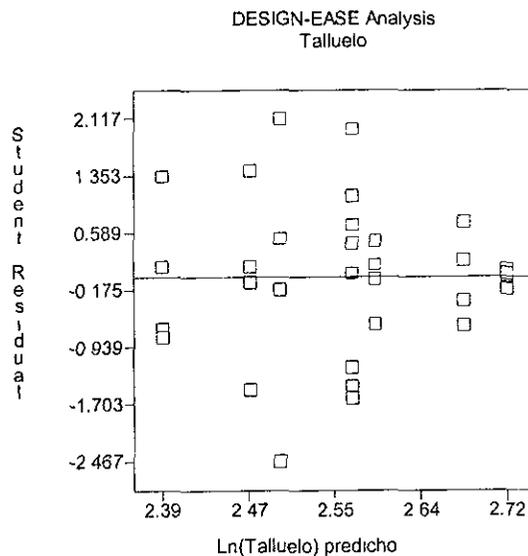


FIGURA 11.28 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln TALLUELO RABANO, PARA LA CONCENTRACION $10^{-4}M$.

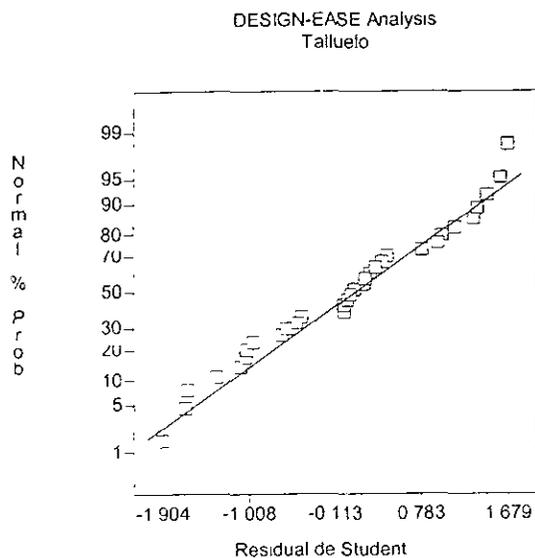


RESIDUAL VS. PROB NORMAL

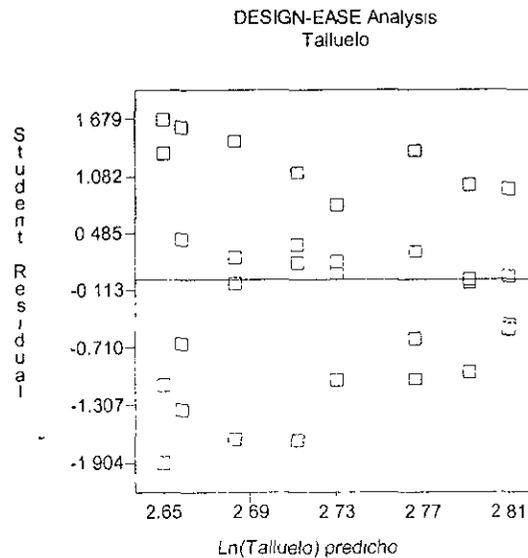


RESIDUAL VS VALORES PREDICHOS

FIGURA 11.29 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln TALLUELO RABANO, PARA LA CONCENTRACION $10^{-5}M$.

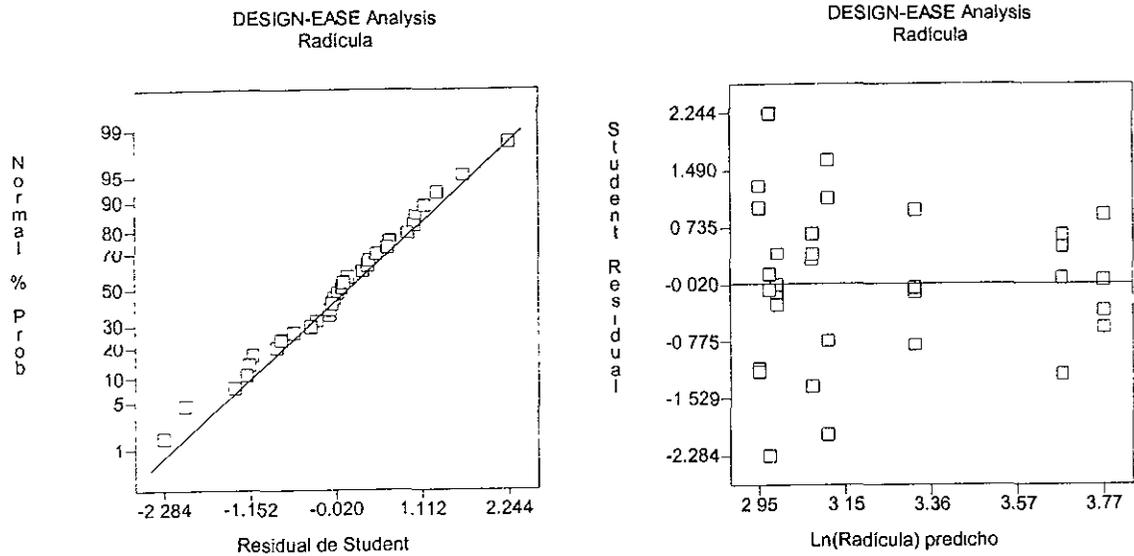


RESIDUAL VS. PROB NORMAL



RESIDUAL VS VALORES PREDICHOS

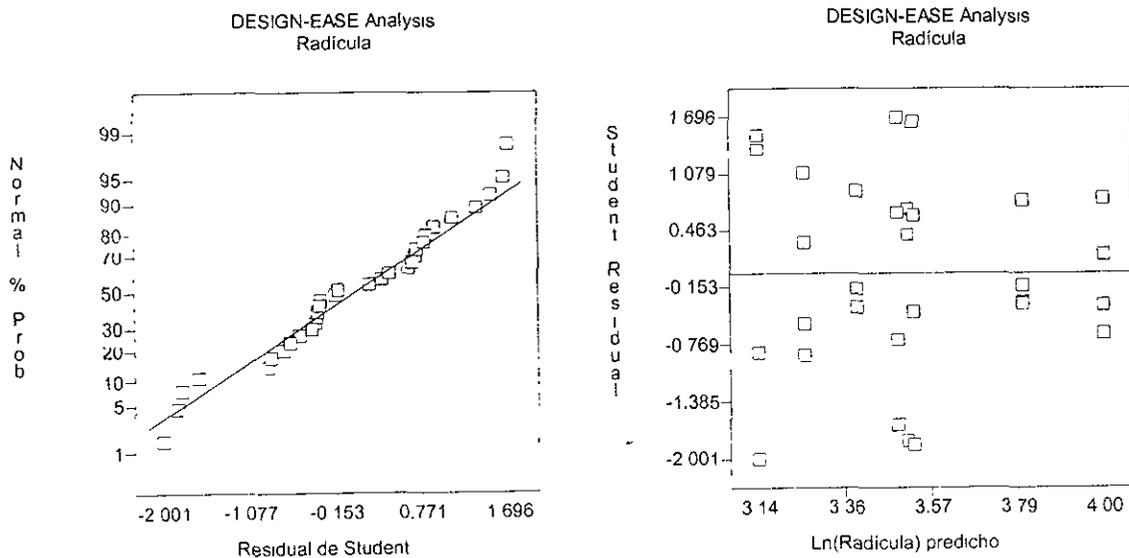
FIGURA 11.30 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln RADICULA TRIGO, PARA LA CONCENTRACION $10^{-2}M$.



RESIDUAL VS. PROB NORMAL

RESIDUAL VS VALORES PREDICHOS

FIGURA 11.31 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln RADICULA TRIGO, PARA LA CONCENTRACION $10^{-3}M$.



RESIDUAL VS. PROB NORMAL

RESIDUAL VS VALORES PREDICHOS

FIGURA 11.32 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln RADICULA TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-4} M.

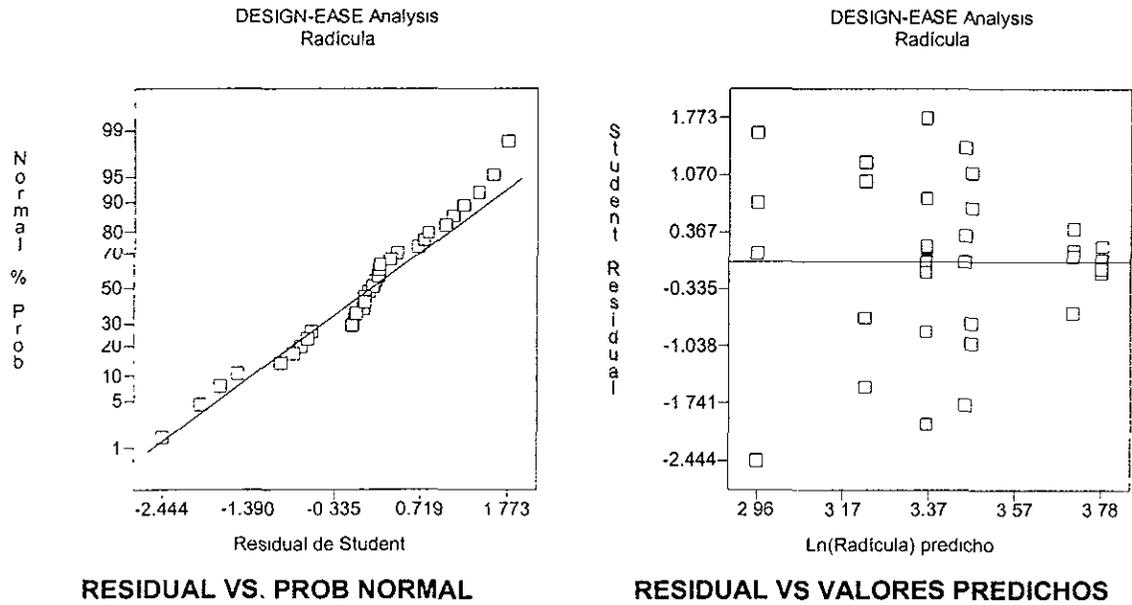


FIGURA 11.33 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln RADICULA TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-5} M.

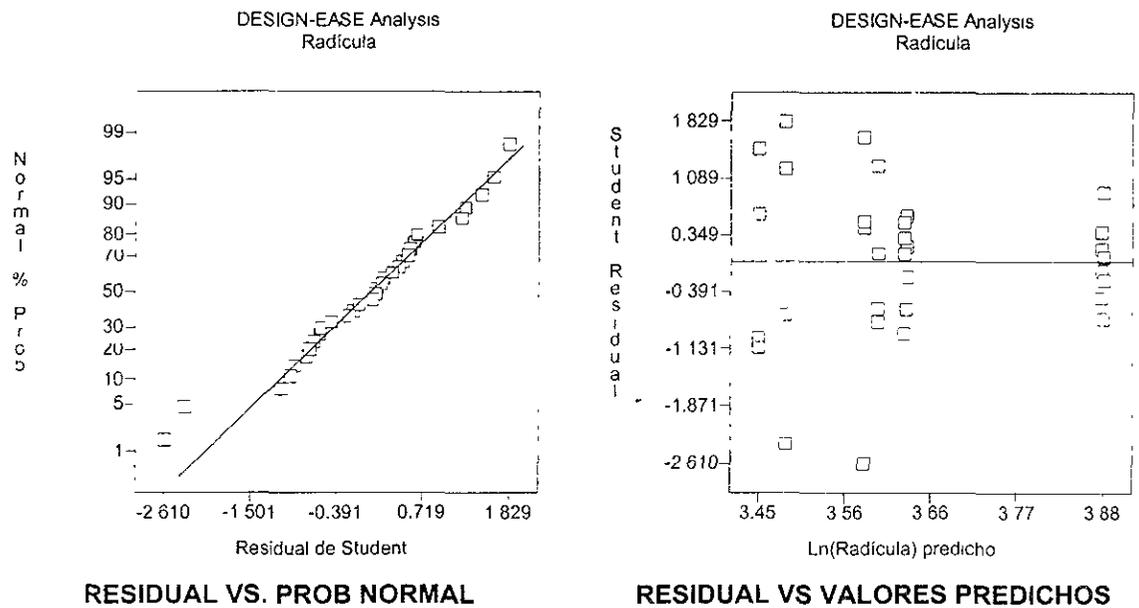


FIGURA 11.34 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln TALLUELO TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-2} M.

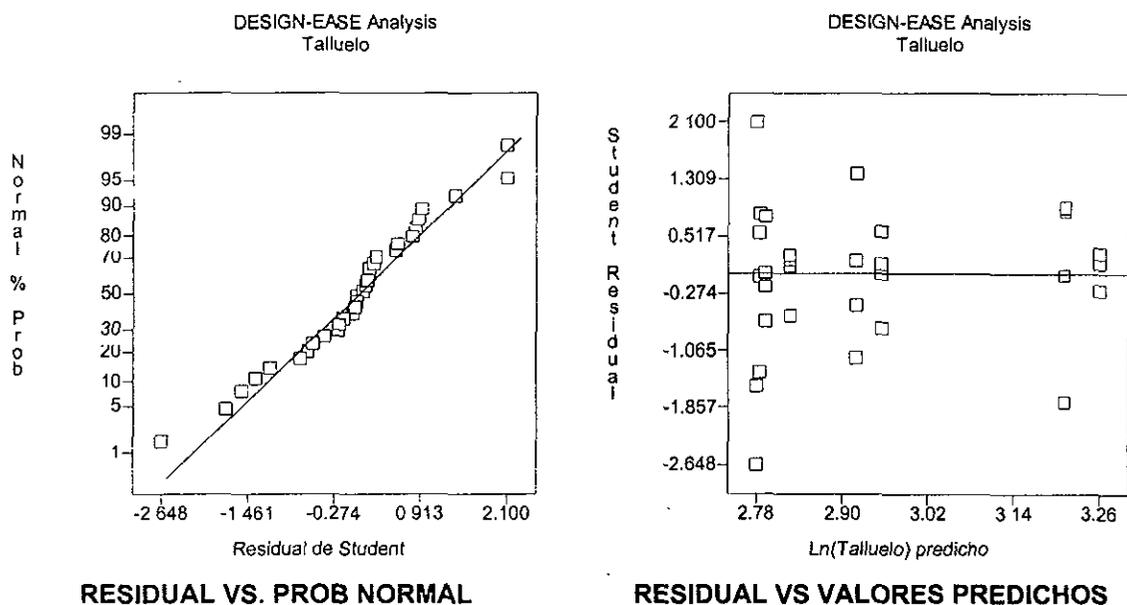


FIGURA 11.35 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln TALLUELO TRIGO, PARA LA CONCENTRACION 10^{-3} M.

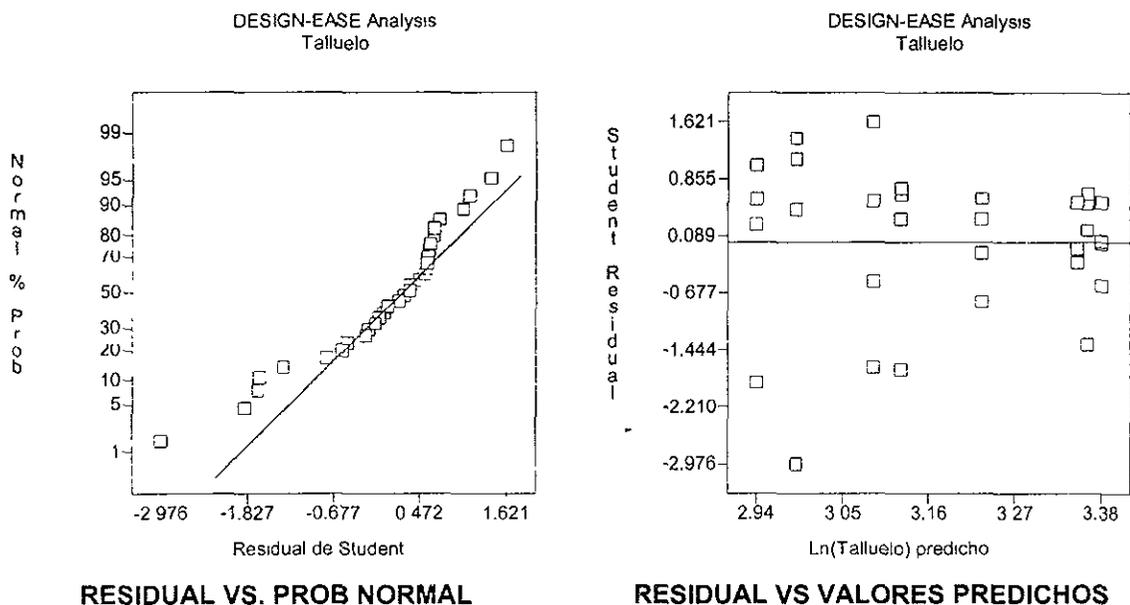
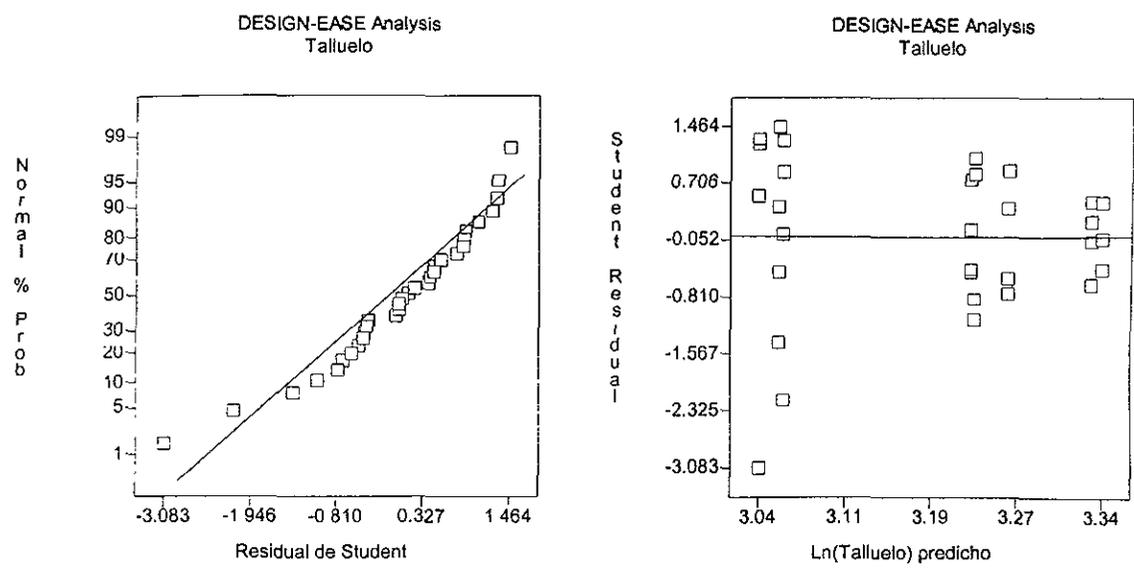


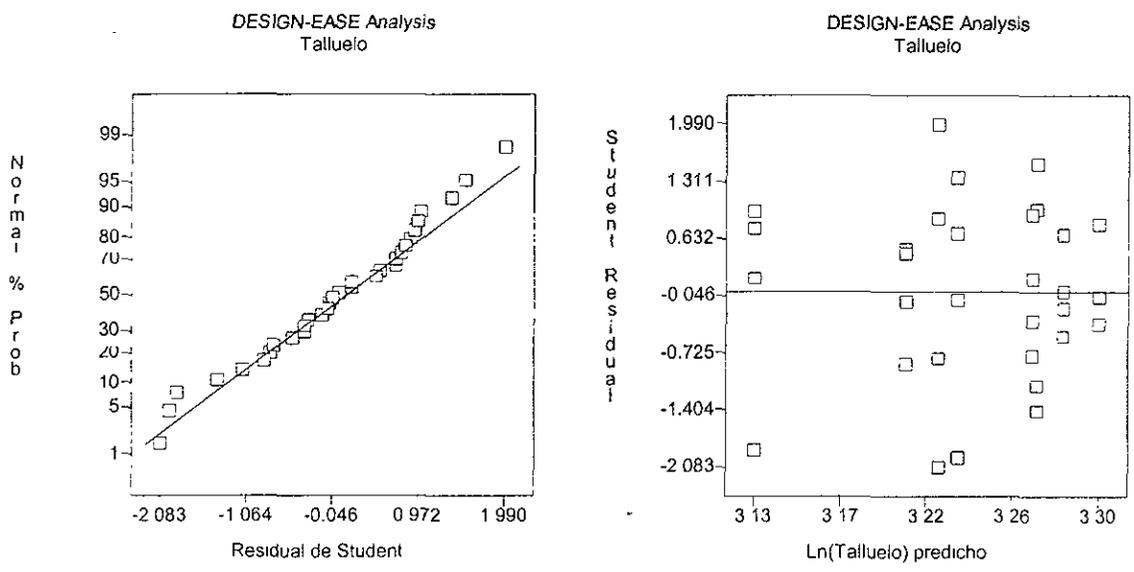
FIGURA 11.36 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln TALLUELO TRIGO, PARA LA CONCENTRACION $10^{-4}M$.



RESIDUAL VS. PROB NORMAL

RESIDUAL VS VALORES PREDICHOS

FIGURA 11.37 EVALUACION DIAGNOSTICA PARA EL FACTORIAL 2^3 , Ln TALLUELO TRIGO, PARA LA CONCENTRACION $10^{-5}M$.



RESIDUAL VS. PROB NORMAL

RESIDUAL VS VALORES PREDICHOS

FIGURA 11.38 GRAFICAS DE EFECTOS PARA LOS MODELOS FACTORIALES DE A. Salina.

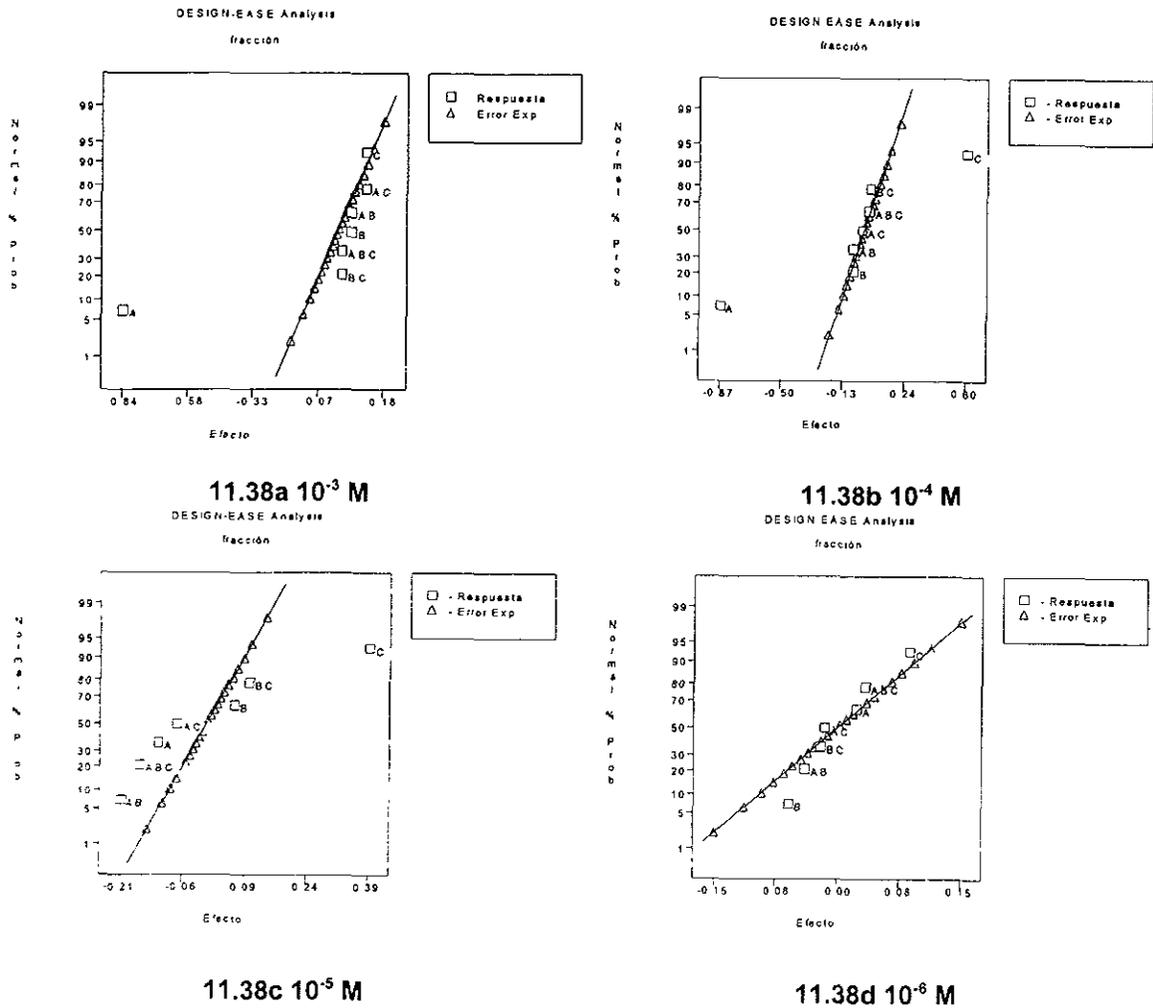


FIGURA 11.39 GRAFICAS DE EFECTOS PARA LOS MODELOS FACTORIALES DE Ln RADICULA DE RABANO.

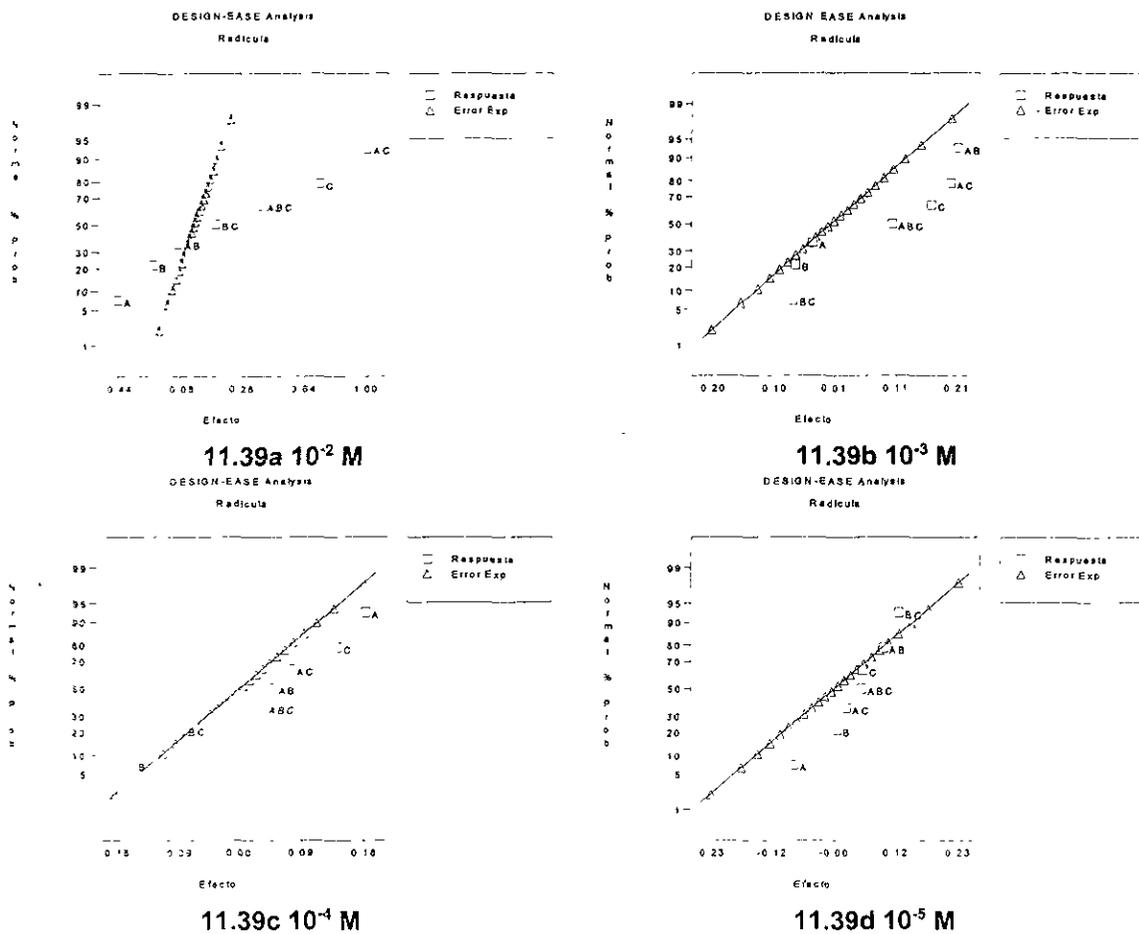


FIGURA 11.40 GRAFICAS DE EFECTOS PARA LOS MODELOS FACTORIALES DE Ln TALLUELO DE RABANO.

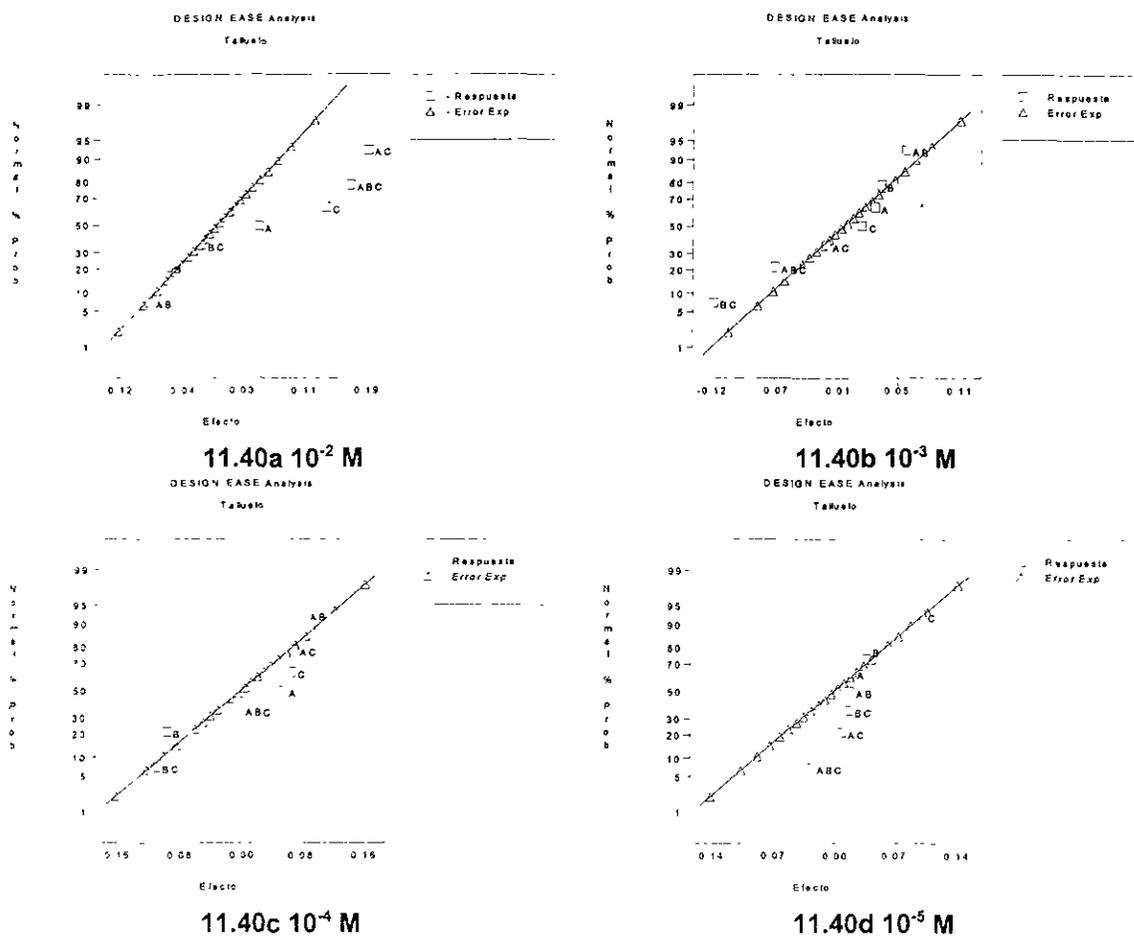
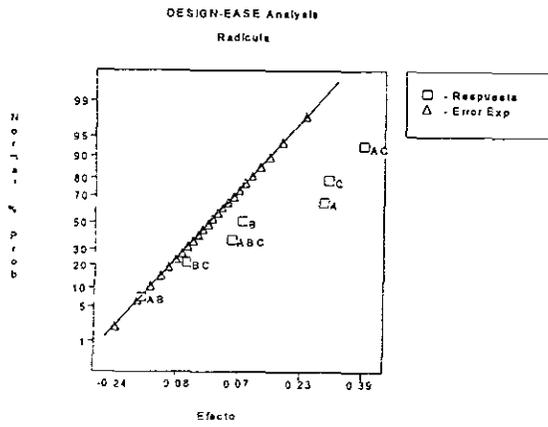
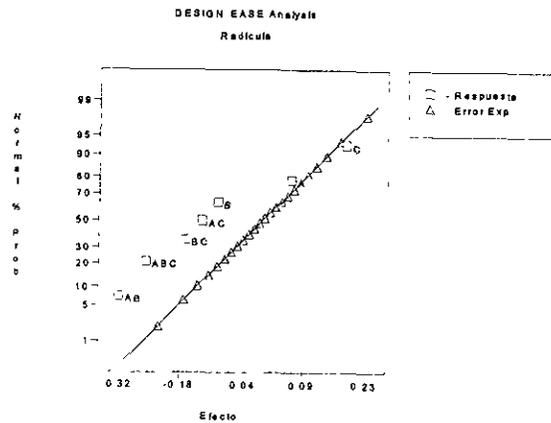


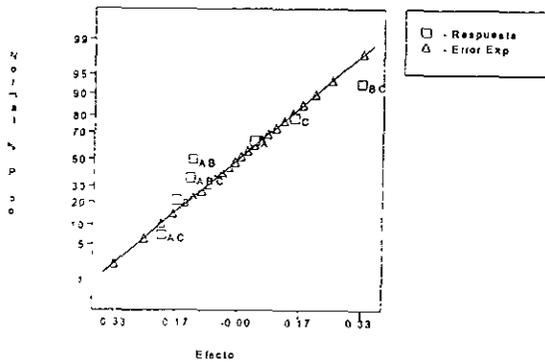
FIGURA 11.41 GRAFICAS DE EFECTOS PARA LOS MODELOS FACTORIALES DE Ln RADICULA DE TRIGO.



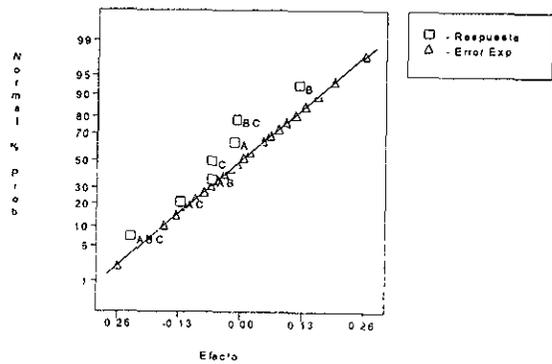
11.41a 10^{-2} M
DESIGN-EASE Analysis



11.41b 10^{-3} M
DESIGN EASE Analysis



11.41c 10^{-4} M



11.41d 10^{-5} M

FIGURA 11.42 GRAFICAS DE EFECTOS PARA LOS MODELOS FACTORIALES DE Ln TALLUELO DE TRIGO.

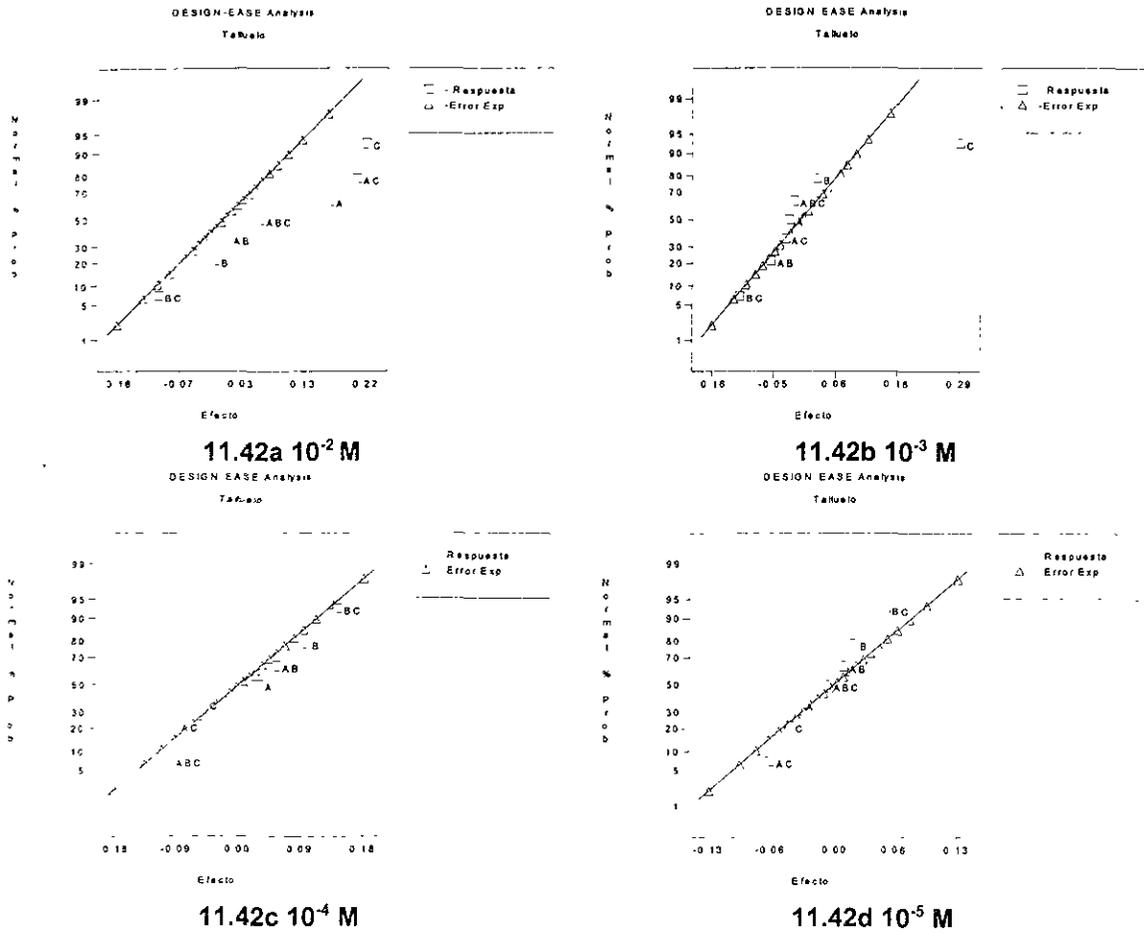


TABLA 11.43 DATOS UTILIZADOS PARA EL ANALISIS DE
RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD CUANTITATIVA
(QSAR).

COMPUESTO	illogC	J_m^a	KOCT ^a	KOCT ^{2,a}	PUNTO DE FUSION ^b
S-Naproxeno	2.41337	5.8	3.26	10.6276	155
R-Naproxeno	2.0051	5.8	3.26	10.6276	155
S-Naproxol	4.2094	21	3.35	11.2225	91
R-Naproxol	4.2195	21	3.35	11.2225	91
S-Naproxenato de etilo	3.2498	3.1	4.21	17.7424	80
R-Naproxenato de etilo	3.3674	3.1	4.21	17.7424	80
S-Acetato de naproxilo	5.0911	14	4.21	17.7424	61
R-Acetato de naproxilo	4.7336	14	4.21	17.7424	61

a: Tomados de Kasting, *et al*, 1992.

b: Determinados experimentalmente.

TABLA 11.44 COEFICIENTES ESTIMADOS Y ANOVA
 PARA EL MODELO $i\text{LogC} = f(\text{Koc}t + \text{koc}t^2)$.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de Significación
Modelo	5.6494	1	6.4423	19.9752	0.0042
Residual	2.7280	6	0.3225		
Total	8.3774	7			
R ² ajustada	0.5441				
Ecuación		$i\text{LogC} = -328.32 + 178.34\text{koc}t - 23.61\text{koc}t^2$.			

TABLA 11.45 COEFICIENTES ESTIMADOS Y ANOVA
 PARA EL MODELO $i\text{LogC} = f(\text{pf})$.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de Significación
Modelo	6.4423	1	6.4423	19.9752	0.0042
Residual	1.9351	6	0.3225		
Total	8.3774	7			
R ² ajustada	0.7305				
Ecuación		$i\text{LogC} = 6.12 - 0.0254\text{pf}$			

TABLA 11.46 COEFICIENTES ESTIMADOS Y ANOVA
 PARA EL MODELO $i\text{LogC} = f(\text{pf} + \text{koc}t + \text{koc}t^2)$.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de Significación
Modelo	8.2213	3	2.7404	70.2324	0.0006
Residual	0.1561	4	0.03902		
Total	8.3774	7			
R ² ajustada	0.9674				
Ecuación		$i\text{LogC} = 547.31 - 0.0844\text{pf} - 285.3057\text{koc}t + 37.4567\text{koc}t^2$			

TABLA 11.47 COEFICIENTES ESTIMADOS Y ANOVA
 PARA EL MODELO $i\text{LogC} = f(\text{pf} + J_m)$.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de Significación
Modelo	7.8457	2	3.9228	36.8881	0.0010
Residual	0.5317	5	0.1063		
Total	8.3774	7			
R ² ajustada	0.9111				
Ecuación		$i\text{LogC} = 5.0157 - 0.02117\text{pf} + 0.06316J_m$			

TABLA 11.48 COEFICIENTES ESTIMADOS Y ANOVA
 PARA EL MODELO $i\text{LogC} = f(\text{pf} + J_m + J_m^2)$.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F	Nivel de Significación
Modelo	8.2213	3	2.7404	70.2324	0.0006
Residual	0.1561	4	0.0390		
Total	8.3774	7			
R ² ajustada	0.9674				
Ecuación		$i\text{LogC} = 4.3244 - 0.02069\text{pf} + 0.2276J_m - 0.0068J_m^2$			

TABLA 11.49 MATRIZ DE CORRELACION DE ESTIMADOS
PARA EL MODELO $i\log C = f(pf + koct + koct^2)$.

CORRELACION	INTERCEPTO	KOCT	KOCT ²	pf
INTERCEPTO	1.000	-11.00	0.999	-0.954
KOCT	-11.00	1.000	-0.981	0.9523
KOCT ²	0.999	-0.981	1.000	-0.951
pf	-0.954	0.9523	-0.951	1.000

TABLA 11.50 MATRIZ DE CORRELACION DE ESTIMADOS
PARA EL MODELO $i\log C = f(pf + J_m)$.

CORRELACION	INTERCEPTO	J_m	pf
INTERCEPTO	1.000	-0.67	-0.882
J_m	-0.67	1.000	0.3371
pf	-0.882	0.3371	1.000

TABLA 11.51 MATRIZ DE CORRELACION DE ESTIMADOS
PARA EL MODELO $i\log C = f(pf + J_m + J_m^2)$.

CORRELACION	INTERCEPTO	J_m	J_m^2	pf
INTERCEPTO	1.000	-0.719	0.6300	-0.729
J_m	-0.719	1.000	-0.981	0.1364
J_m^2	0.6300	-0.981	1.000	-0.072
pf	-0.729	0.1364	-0.072	1.000