

SÍNTESIS DE ÉSTERES DERIVADOS DEL ÁCIDO BENZOICO Y DEL ÁCIDO PARA-NITROBENZOICO Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TÓXICO

Claudemir Batalini¹
Altair Timoteo Araujo²
Jair Marques Junior³

Resumen:

La esterificación de Fischer es un método clásico en Química Orgánica para obtener ésteres de la reacción de ácidos carboxílicos y alcoholes. La industria química hace un amplio uso de este tipo de proceso, con el objetivo de buscar nuevos medicamentos, aromas y nuevas fuentes de biocombustibles. En este trabajo, se sintetizaron seis ésteres aromáticos lineales por esta ruta y se evaluó el potencial tóxico contra las larvas de *Artemia salina* Leach. Tres de los ésteres sintetizados se derivan del ácido benzoico y tres del ácido para-nitrobenzoico, variando la cadena de carbono lateral con dos, cuatro y ocho carbonos lineales: benzoato de etilo (I), benzoato de 1-butilo (II), benzoato de 1-octilo (III), para-nitrobenzoato de etilo (IV), para-nitrobenzoato de 1-butilo (V) y para-nitrobenzoato de 1-octilo (VI). Los productos se purificaron por cromatografía en columna (CC) y se caracterizaron por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando cloroformo como eluyente, todos indicando una única mancha en la placa después del desarrollo. Las estructuras químicas se dilucidaron por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H) y Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN¹³C), con atribuciones de las señales totalmente de acuerdo con las estructuras esperadas. Las seis reacciones mostraron rendimientos reactivos superiores al 50%, tres de ellas con excelente rendimiento. La evaluación del potencial tóxico de los ésteres indicó que uno de ellos no presenta ninguna toxicidad, mientras que los otros cinco están en el rango de débilmente tóxicos, lo que sugiere la posibilidad del uso seguro de las sustancias.

Palabras clave:

Esterificación de Fischer. Ésteres aromáticos. Síntesis orgánica. Toxicidad. *Artemia salina* Leach.

SÍNTESE DE ÉSTERES DERIVADOS DO ÁCIDO BENZOICO E ÁCIDO PARA-NITROBENZOICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO

Resumo:

A esterificação de Fischer é um método clássico em Química Orgânica para obtenção de ésteres a partir da reação de ácidos carboxílicos e álcoois. A indústria química faz uso extensivo desse tipo de processo, visando a busca de novos fármacos, aromas e novas fontes de biocombustíveis. Nesse trabalho, seis ésteres aromáticos lineares foram sintetizados por essa via e avaliados quanto ao potencial tóxico frente às larvas de *Artemia salina* Leach. Três dos ésteres sintetizados são derivados do ácido benzoico e três derivados do ácido para-

¹ Doutorado em Química Orgânica. Universidade Federal de Mato Grosso – ICET/CUA – LAPQUÍM – Pontal do Araguaia (MT). E-mail: pirapotimao@msn.com.

² Farmacêutico/Bioquímico – Secretário Municipal de Saúde de Campo Verde (MT).

³ Farmacêutico - Gerência de Medicina Legal Paul Harris (POLITEC), Instituto Médico Legal (IML) - Barra do Garças (MT).

nitrobenzoico, variando-se a cadeia carbônica lateral com dois, quatro e oito carbonos lineares: benzoato de etila (I), benzoato de 1-butila (II), benzoato de 1-octila (III), para-nitrobenzoato de etila (IV), para-nitrobenzoato de 1-butila (V) e para-nitrobenzoato de 1-octila (VI). Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna (CC) e caracterizados por cromatografia em camada delgada (CCD), usando clorofórmio como eluente, todos indicando uma única mancha na placa após revelação. As estruturas químicas foram elucidadas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN¹³C), com atribuições dos sinais totalmente concordantes com as estruturas esperadas. As seis reações apresentaram rendimentos reacionais acima de 50%, três delas com ótimo rendimento. A avaliação do potencial tóxico dos ésteres indicou que um deles não apresenta qualquer toxicidade, enquanto os cinco outros se encontram na faixa de fracamente tóxicos, sugerindo a possibilidade de uso seguro das substâncias.

Palavras chave:

Esterificação de Fischer. Ésteres aromáticos. Síntese orgânica. Toxicidade. *Artemia salina* Leach.

SYNTHESIS OF ESTERS DERIVED FROM BENZOIC ACID AND PARA-NITROBENZOIC ACID AND EVALUATION OF TOXICITY

Abstract:

Fischer esterification is a classic method in Organic Chemistry to obtain esters from the reaction of carboxylic acids and alcohols. The chemical industry makes extensive use of this type of process, aiming at the search for new drugs, aromas and new sources of biofuels. In this work, six linear aromatic esters were synthesized by this route and evaluated for toxic potential against *Artemia salina* Leach larvae. Three of the synthesized esters are derived from benzoic acid and three derived from para-nitrobenzoic acid, varying the side carbon chain with two, four and eight linear carbons: ethyl benzoate (I), 1-butyl benzoate (II), 1-octyl benzoate (III), ethyl para-nitrobenzoate (IV), 1-butyl para-nitrobenzoate (V) and 1-octyl para-nitrobenzoate (VI). The products were purified by column chromatography (CC) and characterized by thin layer chromatography (TLC), using chloroform as the eluent, all indicating a single spot on the plate after development. The chemical structures were elucidated by Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (¹HNMR) and 13 Carbon Nuclear Magnetic Resonance (¹³CNMR), with assignments of the signals totally in agreement with the expected structures. The six reactions showed reactive yields above 50%, three of them with excellent yield. The evaluation of the toxic potential of the esters indicated that one of them does not present any toxicity, while the other five are in the range of weakly toxic, suggesting the possibility of safe use of the substances.

Keywords:

Fischer Esterification. Aromatic esters. Organic synthesis. Toxicity. *Artemia salina* Leach.

Introducción

La reacción química conocida en la literatura como esterificación de Fischer-Speier o más comúnmente esterificación de Fischer se describió por primera vez en 1895 (FISCHER & SPEIER, 1895). Es una reacción clásica en Química Orgánica, en la cual los alcoholes primarios y secundarios pueden reaccionar con un ácido carboxílico, bajo catálisis de un ácido de Brønsted-Lowry y condiciones de reflujo, en un mecanismo de reacción que implica la sustitución nucleófila bimolecular (SN₂). Sin embargo, para los alcoholes terciarios, estas condiciones favorecen la eliminación (MARCH & SMITH, 2013; VOLLHARDT & SCHORE, 2013). La preparación de ésteres ocupa un lugar destacado en la industria química y farmacéutica, ya que son intermedios importantes para la preparación de diferentes polímeros, aromatizantes, colorantes, fragancias, medicamentos y muchas otras moléculas estructuralmente complejas (COSTA *et al.*, 2004; CHAKRABORTI *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Una de las principales ventajas de las esterificaciones de Fischer está relacionada con su relativa simplicidad. El uso de un catalizador con características ácidas es necesario en estos procesos, donde el uso de ácidos fuertes como el ácido sulfúrico y el ácido fosfórico son los más comunes, que generalmente requieren un tiempo de reacción entre tres y cinco horas. Sin embargo, se pueden usar ácidos más débiles, normalmente condicionados a un aumento del tiempo de reacción.

La preocupación de los investigadores, ya sea de la academia o la industria, es cada vez más visible con respecto a la preservación del medio ambiente, con respecto al desarrollo de reacciones o procesos que generan menos impacto ambiental. Se dice que cada acción en este sentido está alineada con la llamada "Green Chemistry" o en la traducción libre "Química Verde". La expansión de los trabajos reportados en la literatura sobre Química Verde es bastante significativa, cabiendo a Sousa-Aguiar *et al.* (2014) un artículo específico sobre este tema.

Las esterificaciones de Fischer, en su forma clásica, representan poco daño al medio ambiente, ya que los reactivos utilizados son directos, causando una baja tasa de productos residuales y daños a los reactivos, sin embargo, se han realizado muchas investigaciones con miras a mejorar el proceso de esterificación de Fischer en relación con los doce principios defendidos por la Química Verde, como encontramos en el trabajo de Chakraborti *et al.* (2009), en el que las esterificaciones de Fischer se realizaron bajo la presencia de ácidos próticos inmovilizados en sílice y con la ayuda de microondas.

Este sistema permitió reacciones más limpias que ahorran átomos. Interesados en las esterificaciones de Fischer que podrían conducir a la producción de biodiesel de alta eficiencia, Björk *et al.* (2017) establecieron un proceso interesante de catálisis heterogénea, en el cual un soporte de carbono inmovilizado en sílice se comporta como un catalizador muy selectivo en las reacciones, incluso si tienen que realizarse con el uso de calentamiento. El catalizador se puede regenerar en el proceso y, por lo tanto, garantiza reacciones más amigables con el medio ambiente.

Algunas pruebas biológicas se desarrollaron con el objetivo de probar el efecto tóxico de extractos de plantas y sustancias puras y también definir si un extracto de plantas dado puede mostrar bioactividad o no. Una de estas pruebas utiliza las larvas de *Artemia salina* (BST - Brine Shrimp Test) (MEYER *et al.*, 1982; NOLDIN *et al.*, 2003). Disponible comercialmente en forma de pequeños huevos, la metodología involucrada es simple, rápida y de bajo costo, por lo tanto, accesible para muchos laboratorios de investigación. Hay estudios que demuestran que existe una buena correlación entre la concentración letal promedio (CL₅₀) de extractos de plantas probados en microcrustáceos como *Artemia salina* y la concentración letal promedio (CL₅₀) de estos mismos extractos cuando son administrados en ratones (PARRA *et al.*, 2001).

Presentamos aquí la preparación, mediante la esterificación Fischer clásica, de seis ésteres aromáticos derivados del ácido benzoico y el ácido para-nitrobenzoico, así como sus purificaciones y aclaraciones de estructuras; también se evaluó el potencial tóxico de las sustancias contra las larvas de *Artemia salina* Leach.

Metodología

Síntesis de ésteres derivados de ácido benzoico y ácido para-nitrobenzoico (I) a (VI)

Las seis reacciones se realizaron de acuerdo con la estrategia clásica de Esterificación de Fischer (CAREY, 2011; MARCH & SMITH, 2013). Los esquemas generales de reacción se muestran en las figuras 1 y 2, respectivamente, productos derivados del ácido benzoico y ácido para-nitrobenzoico.

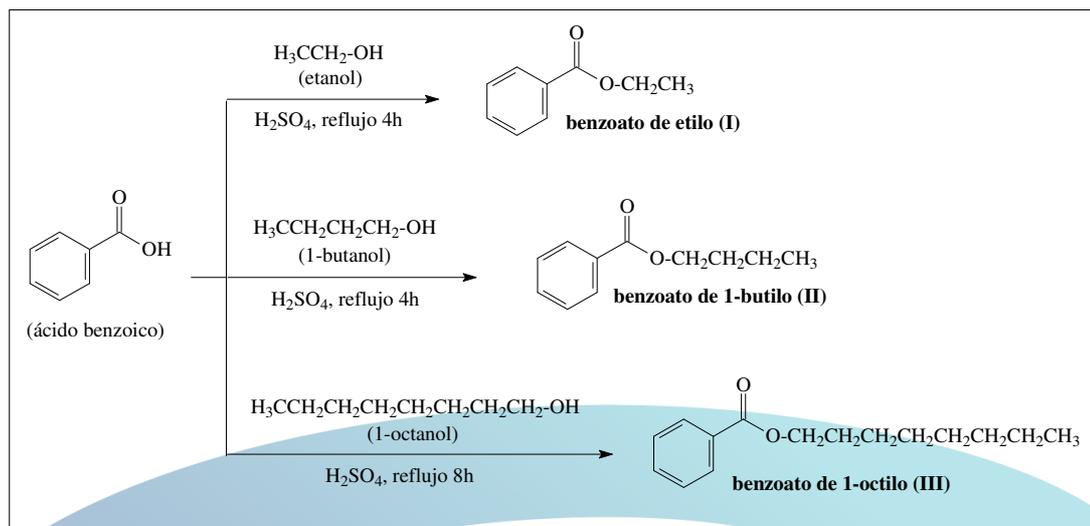


Figura 1 - Esquema general de preparaciones de ésteres aromáticos derivados del ácido benzoico (I), (II) y (III).

Fuente: Los autores.

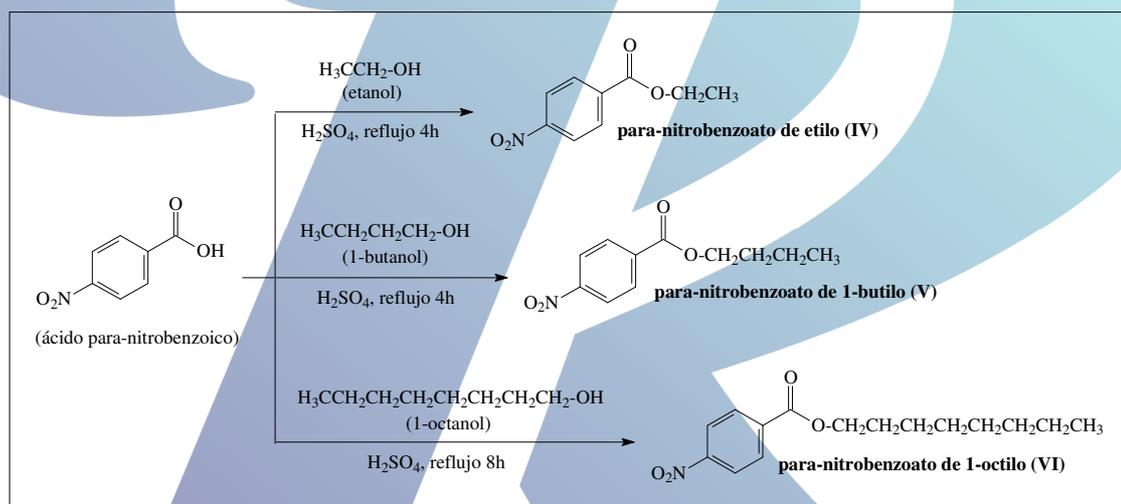


Figura 2 - Esquema general de preparaciones de ésteres aromáticos derivados del ácido para-nitrobenzoico (IV), (V) y (VI).

Fuente: Los autores.

Para la síntesis de los ésteres (I) a (VI), la proporción de cantidades en número de moles fue: 0,25 moles de ácido carboxílico inicial (ácido benzoico y ácido p-nitrobenzoico), 2,0 moles de alcoholes iniciales (exceso de ocho veces) y 0,05 moles de catalizador de ácido sulfúrico concentrado (que corresponde a aproximadamente 10 gotas). Los reactivos se transfirieron a globos de vidrio de fondo redondo que contenían perlas de vidrio, ajustados en un condensador de reflujo. Las reacciones se llevaron a cabo a reflujo durante 4 horas, excepto las reacciones con 1-octanol, en el que el reflujo se realizó durante 8 horas. Al final de cada reacción, el producto bruto se transfirió a un embudo separador y se añadieron

aproximadamente 200 mL de agua destilada. La fase orgánica se extrajo luego con tres porciones de 40 mL de cloroformo. Las porciones de cloroformo combinadas se sometieron a lavado con tres porciones de 20 mL de solución acuosa de bicarbonato de sodio al 5% (masa/volumen) hasta que no hubo más evolución de gas CO₂ y luego se lavaron con dos porciones de 20 mL de agua destilada. Se agregaron de dos a tres espátulas de sulfato de magnesio (MgSO₄) a la fase orgánica (cloroformo) para secar y el sistema se almacenó en el refrigerador durante un día. Luego, el MgSO₄ restante se eliminó por filtración y el disolvente de cloroformo se eliminó en un dispositivo de evaporación rotatorio (Quimis). El producto oleoso crudo se almacenó luego en una botella apropiada en un refrigerador para una purificación adicional por cromatografía en columna y solo después de la purificación se calculó el rendimiento de las reacciones.

Método general para purificar los productos (I) a (VI)

Los ésteres (I) a (VI) se purificaron por cromatografía en columna (CC), usando cloroformo (CHCl₃) P.A. como disolvente/eluyente (Tabla 1). Las fracciones se monitorizaron por cromatografía en capa fina (CCF), en el mismo disolvente. Para CC, se utilizó una columna cromatográfica de vidrio que contenía un grifo de teflón, de 50 cm de alto y 3 cm de diámetro, se empaquetó con gel de sílice de malla 70-230. Para la cromatografía CCF, se usaron placas de vidrio (10 cm x 5 cm x 0,3 cm), previamente preparadas con gel de sílice G 60 (COLLINS, BRAGA & BONATO, 1997). Las manchas en las placas cromatográficas se desarrollaron en una cámara oscura de una lámpara ultravioleta visible con longitudes de onda de 365 nm y 254 nm (Biothec) y en una cuba de vidrio que contenía cristales de yodo.

Caracterización/aclaración de las estructuras químicas de los productos (I) a (VI)

Después de la purificación de los productos (I) a (VI) por cromatografía en columna (CC), las sustancias se caracterizaron por cromatografía en capa fina (CCF), empleando CHCl₃ P.A. como eluyente (Tabla 2). La elucidación de las estructuras de éster sintetizado se realizó mediante (RMN¹H) y Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN¹³C) -

(Tablas 3 y 4), utilizando un dispositivo Varian - Mercury 300 de 300 MHz, a una temperatura 25°C en el Centro Analítico de la UFMT - campus de Cuiabá - MT (SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2005; PAVIA *et al.*, 2010).

Evaluación de la toxicidad de los ésteres (I) a (VI) y de los compuestos de partida contra las larvas de *Artemia salina* Leach

La evaluación del potencial tóxico de los ésteres (I) a (VI) (tabla 5), así como los compuestos de partida de ácido benzoico y ácido para-nitrobenzoico se llevaron a cabo contra larvas de *Artemia salina* Leach, siguiendo los procedimientos de Meyer *et al.* (1982), con algunas modificaciones, además de la literatura Sorgeloos, Van Der Wielen & Persoone (1978), Parra (2001) y Pour & Sasidharan (2011). Para obtener las larvas de *Artemia salina*, los huevos se mantuvieron en una solución acuosa de sal marina de 0,037 g.mL⁻¹ (m/v), con un pH ajustado a 7,0 (al agregar una solución acuosa de NaOH 0,1 mol.L⁻¹), bajo aireación e iluminación constante con una lámpara de 40 W (alrededor de 27-28°C) durante 24 horas para eclosionar. Luego, se preparó una solución de concentración de 5 mg.mL⁻¹ a partir de la dilución de 50 mg de cada uno de los ésteres y compuestos de partida en etanol. De esta solución estándar, 15 µL, 50 µL, 100 µL, 500 µL, 700 µL, 1000 µL, 1300 µL, 1700 µL y 2000 µL se transfirieron a tubos de ensayo, que se mantuvieron en un horno a 50°C hasta la evaporación total del solvente. Este procedimiento se realizó por triplicado. Después de la evaporación total del solvente, se agregaron 3 mL de solución salina a cada tubo, 10 larvas de *Artemia salina* Leach y el volumen del tubo de ensayo se completó con la adición de solución salina a 5 ml, obteniendo las concentraciones finales en los tubos de 15 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹, 500 µg.mL⁻¹, 700 µg.mL⁻¹, 1000 µg.mL⁻¹, 1300 µg.mL⁻¹, 1700 µg.mL⁻¹ y 2000 µg.mL⁻¹, respectivamente. El tubo de control se preparó con solo 5 mL de solución salina y las 10 larvas de *Artemia salina*. Después de 24 horas de exposición, con la ayuda de una lupa y un palo de vidrio, se contó el número de larvas supervivientes, considerándose muertas aquellas larvas que permanecieron inmóviles durante más de 10 segundos después de agitar levemente los tubos. La concentración letal promedio (CL₅₀) de cada éster investigado y compuestos de partida se calculó a partir de las concentraciones estudiadas utilizando el programa Statplus 2008 (LHULLIER, HORTA & FALKENBERG, 2006).

Resultados y discusión

Mecanismo de reacción de esterificación de Fischer

En la Figura 3 se muestra la reacción general de esterificación de Fischer utilizada en este trabajo, así como los pasos mecanísticos de la esterificación.

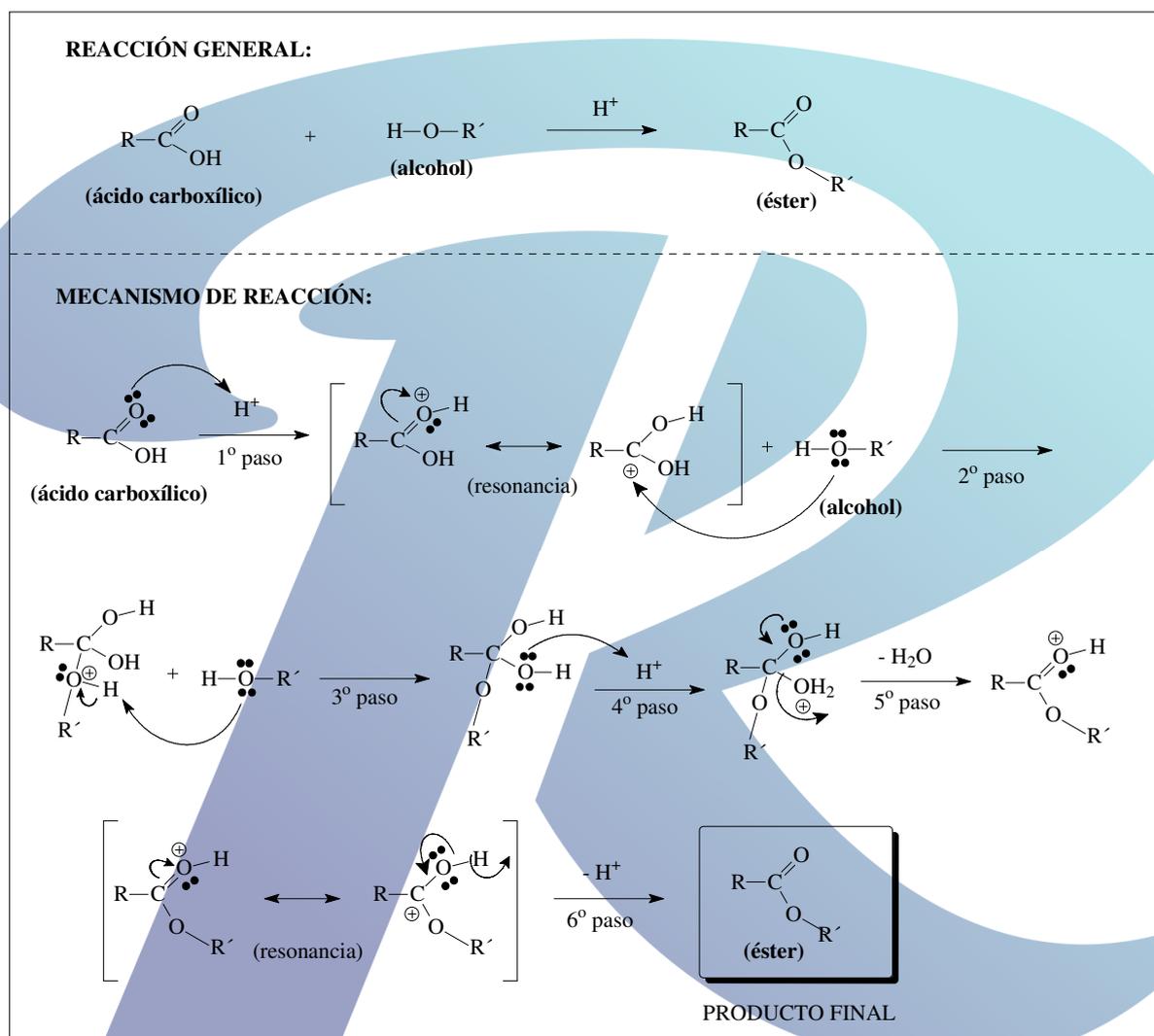


Figura 3 - Reacción general y los seis pasos del mecanismo de reacción de esterificación de Fischer (SAVIN, 2014; SYKES, 2017, con adaptaciones).

Fuente: Los autores.

Los ésteres (I) a (VI) se obtuvieron de la reacción, en un medio ácido, de un ácido carboxílico y un alcohol, cuyo mecanismo de reacción se conoce en la literatura como sustitución nucleófila bimolecular (SN2). Lo que sucede, de hecho, es la sustitución del hidroxilo del ácido carboxílico (que se elimina en forma de agua) por un grupo $\text{O}-\text{R}'$ que

proviene de un alcohol. Mecánicamente, como se muestra en la figura 3 (SAVIN, 2014; SYKES, 2017, con adaptaciones), en la primera etapa, el medio ácido favorece la protonación de oxígeno carbonílico, en una especie de activación inicial del ácido carboxílico inicial. Con esta protonación, la reacción intermedia se estabiliza por resonancia, haciendo que el carbono unido al oxígeno acomode una carga positiva. Este estado resonante intermedio es importante para la aparición de la segunda etapa, la del ataque del alcohol propio al carbono positivo del ácido carboxílico activado. En la tercera etapa, el hidrógeno se pierde para formar un diol hermanado (gem-diol). Debido a su inestabilidad, uno de los hidroxilos del gem-diol protona en el ambiente ácido y se produce la pérdida de agua (cuarta y quinta etapas, respectivamente). El intermedio que emerge se estabiliza por resonancia y la sexta etapa se realiza con la pérdida de hidrógeno con vistas a la formación del éster como producto final. El paso determinante de la reacción es la protonación inicial del ácido carboxílico, lograda en este trabajo con un medio fuertemente ácido, ya que se usó ácido sulfúrico concentrado.

Características de los productos sintetizados y rendimientos de reacción.

En la Tabla 1 se encuentran las características de los productos sintetizados antes y después de la purificación por cromatografía en columna (CC):

Tabla 1 - Características de los productos (I) a (VI) antes y después de la purificación por cromatografía en columna.*

Productos	Productos Crudos (antes de la purificación)	Productos Finales (después de la purificación)
benzoato de etilo (I)	aceite amarillo claro	aceite incoloro
benzoato de 1-butilo (II)	aceite amarillo oscuro	aceite amarillo claro
benzoato de 1-octilo (III)	aceite marrón oscuro	aceite incoloro
para-nitrobenzoato de etilo (IV)	cristales amarillo oscuro	cristales amarillo claro
para-nitrobenzoato de 1-butilo (V)	aceite amarillo oscuro	aceite amarillo claro
para-nitrobenzoato de 1-octilo (VI)	aceite marrón oscuro	aceite amarillo claro

* Eluyente: CHCl₃ (cloroformo).

Fuente: Los autores.

Con la purificación por cromatografía en columna se observó que los productos finales se presentaban en tonos más suaves que los productos crudos. El análisis de los factores de retención (FR) de los productos finales por cromatografía en capa fina (CCF) (Tabla 2), reveló una única mancha, cuyos valores están de acuerdo con las estructuras químicas esperadas, ya que el valor de retención aumenta a medida que aumenta la cadena carbónica de la parte alquilo del producto, es decir, el aumento de la apolaridad del producto

se traduce en una mayor afinidad del producto con el disolvente cloroformo, que no es muy polar.

Tabla 2 - Datos de cromatografía en capa fina (CCF) y rendimiento de las reacciones de esterificación.

Productos	Factores de Retención (FR) – CCF *	Rendimiento (%)
benzoato de etilo (I)	0,72	72,0
benzoato de 1-butilo (II)	0,78	65,8
benzoato de 1-octilo (III)	0,82	90,2
para-nitrobenzoato de etilo (IV)	0,66	52,0
para-nitrobenzoato de 1-butilo (V)	0,80	84,5
para-nitrobenzoato de 1-octilo (VI)	0,82	77,7

* Eluyente: CHCl₃ (cloroformo).

Fuente: Los autores.

Los rendimientos de reacción encontrados para las esterificaciones de Fischer (Tabla 2), calculados después de la purificación por cromatografía en columna, fueron superiores al 50%. Calculando el promedio de las seis reacciones procesadas, el valor encontrado es 73,7%, lo que puede considerarse un buen rendimiento. Aunque la literatura (CAREY, 2011; VOLLHARDT & SCHORE, 2013) considera que las esterificaciones de Fischer para cadenas laterales por encima de seis carbonos pueden estar en desventaja, nuestro procedimiento experimental, duplicando el tiempo de reacción para las preparaciones de ésteres con las cadenas de carbono más grandes (productos III y VI), condujeron a rendimientos relativamente altos (90,2 y 77,7%, respectivamente). Una variante para la preparación de ésteres, como los realizados en este trabajo, sería la reacción a partir de cloruro de ácido (más reactivo que el ácido carboxílico) con un alcohol, en un medio acuoso básico. Sin embargo, esto conduciría a un aumento en el número de etapas de reacción, ya que habría una necesidad inicial de transformaciones de ácido benzoico y ácido para-nitrobenzoico en sus correspondientes cloruros de ácido, ya que estos reactivos no están disponibles. Estas preparaciones, generalmente a temperatura ambiente y en un medio acuoso, también implican un mecanismo SN₂, caracterizado en procesos que están bien sintonizados con la Química Verde (ANASTAS & WARNER, 1998, apud: LENARDÃO *et al.*, 2003). Aunque este tipo de reacción no se ha explorado en este trabajo, se alienta al grupo de investigación a llevar a cabo estas reacciones en el futuro.

Elucidación de las estructuras químicas de los ésteres sintetizados

En la Tabla 3 se muestra los datos de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H) de los seis ésteres sintetizados y purificados.

Tabla 3 - Datos de RMN¹H (Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno) de los ésteres sintetizados (I) a (VI).

Productos	Desplazamiento químico, δ (ppm)
benzoato de etilo (I)	1,2-1,5 (t, 3H); 4,2-4,5 (q, 2H); 7,3-7,6 (m, 3H ar.); 8,0-8,2 (m, 2H ar.)
benzoato de 1-butilo (II)	0,9-1,1 (t, 3H); 1,3-1,6 (m, 2H); 1,7-1,9 (m, 2H); 4,2-4,4 (t, 2H); 7,3-7,6 (m, 3H ar.); 7,9-8,1 (m, 2H ar.)
benzoato de 1-octilo (III)	0,8-1,0 (t, 3H); 1,2-1,4 (m, 4H); 1,5-1,6 (m, 2H); 1,7-1,8 (m, 2H); 3,3-3,5 (m, 4H); 4,3-4,5 (t, 2H); 7,4-7,5 (m, 1H ar.); 7,5-7,6 (m, 2H ar.); 8,0-8,1 (m, 2H ar.)
para-nitrobenzoato de etilo (IV)	1,3-1,5 (t, 3H); 4,2-4,5 (q, 2H); 8,0-8,3 (m, 4H ar.)
para-nitrobenzoato de 1-butilo (V)	0,9-1,0 (t, 3H); 1,3-1,6 (m, 2H); 1,7-1,9 (m, 2H); 4,3-4,5 (t, 2H); 8,1-8,4 (m, 4H ar.)
para-nitrobenzoato de 1-octilo (VI)	0,7-1,0 (t, 3H); 1,1-1,4 (m, 4H); 1,5-1,6 (m, 2H); 1,7-1,9 (m, 2H); 3,2-3,4 (m, 4H); 4,3-4,4 (t, 2H); 8,1-8,3 (m, 4H ar.)

Legenda: s = singlete; d = duplete; t = tripleto; q = quarteto; m = multiplete; ar. = aromático.

Fuente: Los autores.

Los datos de RMN¹H obtenidos para los seis ésteres sintetizados, después de su purificación, indican un alto nivel de pureza, ya que permitieron la atribución inequívoca de todas las señales esperadas para los productos, sin ningún signo que se refiera a impurezas. Para garantizar la elucidación, también se realizaron espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN¹³C) para los seis productos, como se muestra en la Tabla 4, donde nuevamente todas las señales esperadas se observan correctamente, sin signos de impurezas.

Tabla 4 - Datos de RMN¹³C (Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13) de los ésteres sintetizados (I) a (VI).

Productos	Desplazamiento químico, δ (ppm)
benzoato de etilo (I)	14,5 (CH ₃); 61,1 (CH ₂); 128,2 (1C para a C=O); 129,5 (2C meta a C=O); 130,3 (2C orto a C=O); 132,4 (1C conectado a C=O); 166,8 (C=O)
benzoato de 1-butilo (II)	13,9 (CH ₃); 19,5 (CH ₂); 31,0 (CH ₂); 65,0 (CH ₂ conectado a O); 128,5 (1C para a C=O); 129,7 (2C meta a C=O); 130,8 (2C orto a C=O); 133,0 (1C conectado a C=O); 166,9 (C=O)
benzoato de 1-octilo (III)	14,1 (CH ₃); 22,2 (CH ₂); 26,1 (CH ₂); 29,2 (CH ₂); 29,8 (CH ₂); 30,5 (CH ₂); 31,9 (CH ₂); 71,6 (CH ₂ conectado a O); 128,2 (1C para a C=O); 128,9 (2C meta a C=O); 130,4 (2C orto a C=O); 132,5 (1C conectado a C=O); 166,3 (C=O)
	14,4 (CH ₃); 62,1 (CH ₂); 123,6 (2C orto a C=O); 130,8 (2C

para-nitrobenzoato de etilo (IV)	orto a NO ₂); 136,1 (1C conectado a C=O); 150,7 (1C conectado a NO ₂); 164,8 (C=O)
para-nitrobenzoato de 1-butilo (V)	13,9 (CH ₃); 19,4 (CH ₂); 30,8 (CH ₂); 66,0 (CH ₂ conectado a O); 123,7 (2C orto a C=O); 130,8 (2C orto a NO ₂); 136,1 (1C ligado a C=O); 150,7 (1C conectado a NO ₂); 165,0 (C=O)
para-nitrobenzoato de 1-octilo (VI)	14,1 (CH ₃); 22,5 (CH ₂); 26,1 (CH ₂); 29,5 (CH ₂); 30,2 (CH ₂); 30,9 (CH ₂); 32,0 (CH ₂); 71,8 (CH ₂ conectado a O); 123,9 (2C orto a C=O); 131,1 (2C orto a NO ₂); 136,0 (1C conectado a C=O); 150,3 (1C conectado a NO ₂); 164,9 (C=O)

Fuente: Los autores.

Evaluación de la toxicidad de los ésteres (I) a (VI) y compuestos de partida contra las larvas de *Artemia salina* Leach

En la metodología, el rango de concentración estudiado fue entre 15 µg.mL⁻¹ a 2000 µg.mL⁻¹, ya que fue en la concentración de 2000 µg.mL⁻¹ que encontramos el mayor número de muertes por larvas. Los valores encontrados de la concentración letal media (CL₅₀) de los compuestos de partida ácido benzoico y ácido para-nitrobenzoico, así como los seis ésteres aromáticos sintetizados y purificados (I) a (VI) se presentan en la Tabla 5 y en las figuras 4 a 7:

Tabla 5 - Resultados de la concentración letal media (CL₅₀) de los compuestos de partida y los ésteres sintetizados (I) a (VI).

Productos	CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
ácido benzoico *	925,0
benzoato de etilo (I)	1500,0
benzoato de 1-butilo (II)	850,0
benzoato de 1-octilo (III)	1000,0
ácido para-nitrobenzoico *	775,0
para-nitrobenzoato de etilo (IV)	1000,0
para-nitrobenzoato de 1-butilo (V)	600,0
para-nitrobenzoato de 1-octilo (VI)	510,0

* Compuestos de partida para las síntesis.

Fuente: Los autores.

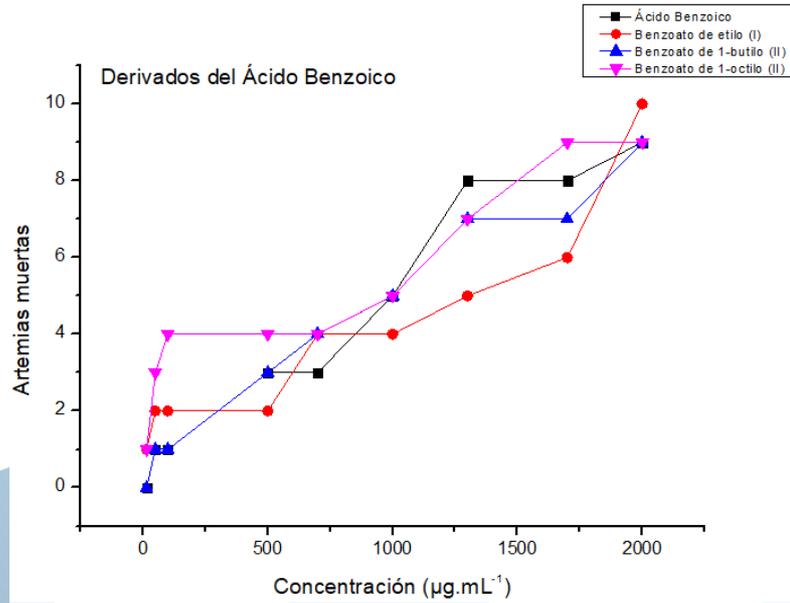


Figura 4 - Gráfico de líneas que indica la respuesta de concentración de la mortalidad de las larvas de *Artemia salina* del ácido benzoico y de los ésteres sintetizados (I) a (III).

Fuente: Los autores.

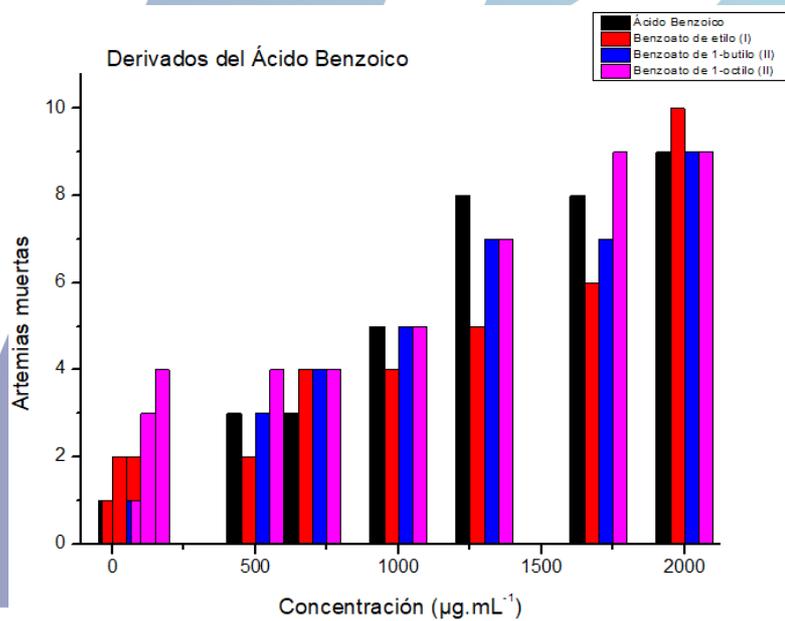


Figura 5 - Gráfico de barras que indica la respuesta de concentración de la mortalidad de las larvas de *Artemia salina* del ácido benzoico y de los ésteres sintetizados (I) a (III).

Fuente: Los autores.

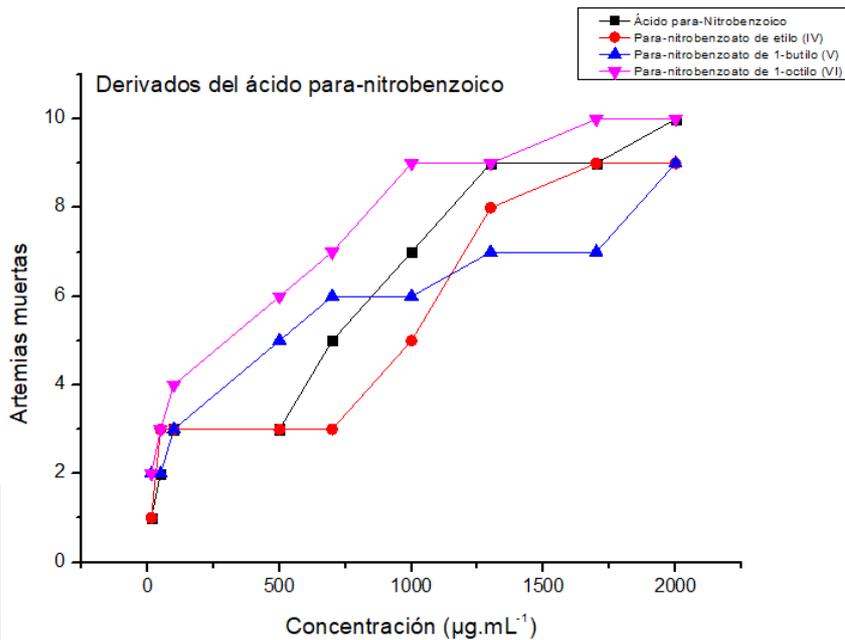


Figura 6 - Gráfico de líneas que indica la respuesta de concentración de mortalidad de las larvas de *Artemia salina* del ácido para-nitrobenzoico y de los ésteres sintetizados (IV) a (VI).
Fuente: Los autores.

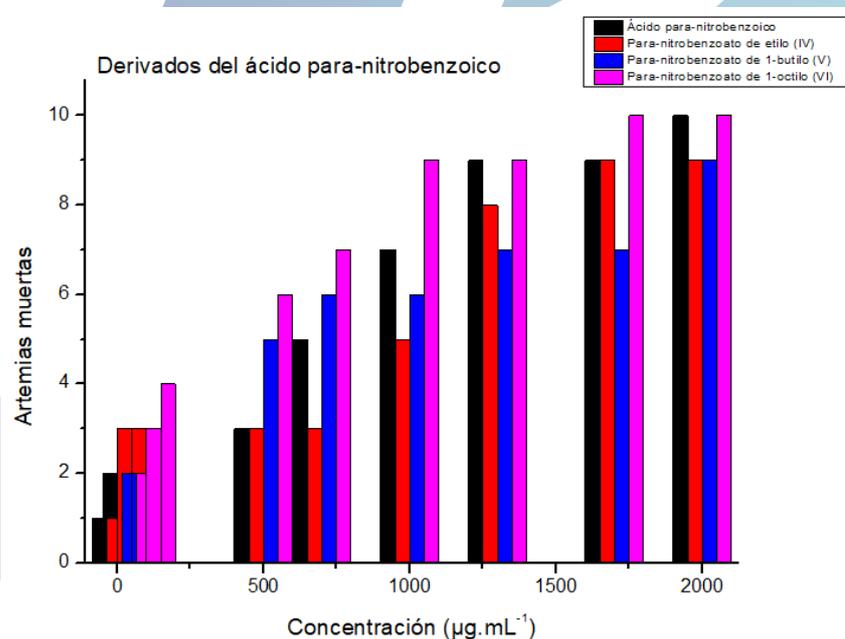


Figura 7 - Gráfico de barras que indica la respuesta de concentración de mortalidad de las larvas de *Artemia salina* del ácido para-nitrobenzoico y de los ésteres sintetizados (IV) a (VI).
Fuente: Los autores.

A través de pruebas de dosis-respuesta basadas en análisis probit (significación estadística $p < 0,05$) fue posible determinar la susceptibilidad de cada individuo

considerándola como una variable aleatoria con distribución normal o logit en casos de utilizar la función logística, actuando como una transformación de sigmoide a lineal en el gráfico, validando así el perfil de concentración letal para matar el 50% de las larvas de *Artemia salina* en contacto con los compuestos de partida y los ésteres sintetizados derivados del ácido benzoico y el ácido para-nitrobenzoico (I) a (VI) (HOCAYEN *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016).

En la literatura, Nguta *et al.* (2011), investigando el potencial tóxico de los extractos de plantas contra las larvas de *Artemia salina*, se considera una estandarización en la que tanto los extractos orgánicos como los extractos acuosos con valores de CL_{50} inferiores a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se clasifican como muy tóxicos, CL_{50} entre 100 y $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se considera moderadamente tóxico, CL_{50} entre 500 y $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ tiene baja toxicidad y CL_{50} por encima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se considera no tóxico. Comparando nuestros resultados con esta referencia, ninguno de los valores encontrados para el CL_{50} para los dos compuestos de partida y los seis ésteres sintetizados (tabla 5) se clasifican como muy tóxicos o moderadamente tóxicos, ya que ninguno de los valores obtenidos para el CL_{50} estaba por debajo $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. El éster (I), benzoato de etilo, se presentó como no tóxico, con CL_{50} por encima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Todos los demás mostraron valores de CL_{50} que se clasifican como débilmente tóxicos (CL_{50} entre 500 y $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$), con la observación de que el resultado de CL_{50} de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obtenido para dos de los productos – benzoato de 1-octilo (III) y para-nitrobenzoato de etilo (IV) están en el límite del valor de CL_{50} para sustancias no tóxicas.

Las sustancias puras también pueden evaluarse mediante esta metodología, como se verifica en algunos trabajos en la literatura. En el trabajo de Noldin *et al.* (2003), en concentraciones de hasta $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, no se encontró mortalidad significativa para las sustancias puras cinaropicrina (un éster macrocíclico) y cinarósido (un polifenol glicosilado), que pueden clasificarse como no tóxicos. En este mismo grupo de investigación, la fracción de hexano obtenida de extractos de las hojas de *C. scolymus* (alcachofa) condujo a una alta mortalidad larval, con $CL_{50} = 358,0 \pm 72 \mu\text{g.mL}^{-1}$, un valor cercano al encontrado para el control positivo, sulfato de quinidina, que en la clasificación de Nguta *et al.* (2011) los ubicaría como de toxicidad moderada.

Cansian *et al.* (2017) comentan que los compuestos bioactivos naturales son casi siempre tóxicos en dosis altas. Estos investigadores probaron la actividad tóxica contra la *Artemia salina* del aceite de clavo ($CL_{50} = 0,599 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y su producto esterificado acetato

de eugenilo ($CL_{50} = 0,117 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Tanto el aceite como el derivado esterificado mostraron un alto potencial tóxico, siendo el derivado potencialmente cinco veces más tóxico. Estos resultados demuestran el uso potencial de aceite de clavo y acetato de eugenilo en formulaciones de insecticidas.

La metodología para evaluar el potencial tóxico utilizando las larvas de *Artemia salina* se extiende a los sistemas de nanopartículas, con miras a la aplicación segura de ingredientes activos con actividad biológica. Rajabi *et al.* (2015) exploraron la simplicidad de la técnica en la investigación de la actividad tóxica en nanoespersiones de algunas sustancias utilizadas como drogas. Se obtuvieron valores de toxicidad moderados para las nanospersiones de ibuprofeno ($CL_{50} = 373,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y atorvastatina ($CL_{50} = 417,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$), mientras que la ciclosporina ($CL_{50} = 531,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$) y repaglinida ($CL_{50} = 807,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$) mostró baja toxicidad.

Por lo tanto, todos los resultados de CL_{50} encontrados para los ésteres aromáticos sintetizados (I) a (VI) mostraron valores que indican su uso seguro en futuras aplicaciones, ya que se presentaron como no tóxicos o moderadamente tóxicos.

Conclusiones

A través de una ruta simple y eficiente, seis ésteres aromáticos derivados del ácido benzoico y ácido para-nitrobenzoico que varían la cadena lineal se sintetizaron y purificaron con éxito. El rendimiento de todas las reacciones fue superior al 50%, tres de estas reacciones con rendimiento óptimo. Las caracterizaciones por cromatografía en capa fina están de acuerdo con lo previsto para cada producto y las aclaraciones de las estructuras por RMN¹H y RMN¹³C revelaron todos los signos esperados, lo que indica un alto nivel de pureza.

El análisis del potencial tóxico de los seis ésteres sintetizados contra las larvas de *Artemia salina* indicó que uno de ellos no es tóxico, mientras que los otros cinco ésteres aromáticos se presentaron como débilmente tóxicos. Estos datos de toxicidad encontrados para los ésteres pueden acreditarlos para futuras aplicaciones en el desarrollo de drogas o intermedios de drogas, posibles aromatizantes, entre otros.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a UFMT-CUA y al Laboratorio de Investigación em Química de Produtos Naturales (LAPQUÍM/UFMT-CUA) por su apoyo científico. También agradecen ao profesor Juan E. V. Zeballos (UFMT-CUA) la revisión del texto.

Referencias

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. **Green chemistry: theory and practice**. Oxford: Oxford University Press, 1998.

BJÖRK, E. M.; MILITELLO, M. P.; TAMBORINI, L. H.; RODRIGUEZ, R. C.; PLANES, G. A.; ACEVEDO, D. A.; MORENO M. S.; ODÉN, M.; BARBERO, C. A. Mesoporous silica and carbon based catalysts for esterification and biodiesel fabrication: the effect of matrix surface composition and porosity. **Applied Catalysis A**, v. 533, p. 49-58, 2017.

CANSIAN, R. L. VANIN, A. B.; ORLANDO, T.; PIAZZA, S. P.; PUTON, B. M. S.; CARDOSO, R. I.; GONÇALVES, I. L.; HONAISSER, T. C.; PAROUL, N.; OLIVEIRA, D. Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 155-161, 2017.

CAREY, F. A. **Organic chemistry**. 9. ed. New York: McGraw-Hill Higher Education, 2011.

CHAKRABORTI, A. K.; SINGH, B.; CHANKESHWARA, A. R.; PATEL, A. R. Protic acid immobilized on solid support as an extremely efficient recyclable catalyst system for a direct and atom economical esterification of carboxylic acids with alcohols. **Journal Organic Chemistry**, v. 74, p. 5967-5974, 2009.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: UNICAMP, 1997.

COSTA, T. S.; ORNELAS, D. L.; GUIMARÃES, P. I. C.; MERÇON, F. Confirmando a esterificação de fischer por meio dos aromas. **Química Nova na Escola**, n. 19, p. 36-38, 2004.

FISCHER, E.; SPEIER, A. Darstellung der Ester. **Chemische Berichte**, v. 28, n. 3, p. 3252–3258, 1895.

HOCAYEN, P. A. S.; CAMPOS, L. A.; POCHAPSKI, M. T.; MALFATTI, C. R. M. Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **INSULA Revista de Botânica**, n. 42, p. 23-31, 2012.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. “Green chemistry”: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.

LHULLIER, C.; HORTA, P.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

MARCH, J.; SMITH, M. B. **Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure**. 7. ed. John Wiley & Sons, 2013.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacology on line**, v. 2, p. 458-78, 2011.

NOLDIN, V. F.; FILHO, V. C.; MONACHE, F. D.; BENASSI, J. C.; CHRISTMANN, I. L.; PEDROSA, R. C.; YUNES, R. A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, A. C. J.; SANTOS, A. P. B.; SILVA, B. V.; LACHTER, E. R.; PINTO, A. C. Síntese de ésteres de aromas de frutas: um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 152-167, 2014.

PARRA, A. L. ; SARDIÑAS, I. G. ; YHEBRA, R. S. ; BUELBA, L. I. Comparative study of the assay of *artemia salina* leach and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. trad. 4. ed. norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

POUR, B. M.; SASIDHARAN, S. In vivo toxicity study of *Lantana camara*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 3, p. 230-232, 2011.

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 20-30, 2015.

SAVIN, K. **Writing reaction mechanisms in organic chemistry**. 3. ed. USA: Academic Press, 2014.

SILVA, S. L.; NASCIMENTO, A. A.; RIBEIRO, E. F. B.; RIBEIRO, R. B.; ALVES, C. M.; SANTOS, A. M.; BURMANN, A. P. R.; MIRA NETO, R. A. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amazônica**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed. USA: John Wiley & Sons, 2005.

SORGELOOS, P.; Van Der WIELEN, C. R.; PERSOONE, G. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests: a critical analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 2, n. 3-4, p. 249-255, 1978.

SOUSA-AGUIAR, E. F.; ALMEIDA, J. M. A. R.; ROMANO, P. N.; FERNANDES, R. P.; CARVALHO, Y. Química verde: a evolução de um conceito. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1257-1261, 2014.

SYKES, P. **A guidebook to mechanism in organic chemistry**. 6. ed. Pearson, 2017.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. **Química orgânica: estrutura e função**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.

