

Tesis de Posgrado

Estudio de las propiedades insecticidas de fosfatos y fosforotionatos de dietil-beta R1 R2 bencilidenos : Correlación entre estructura y toxicidad

Arnstein de Licastro, Susana M.

1979

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Arnstein de Licastro, Susana M.. (1979). Estudio de las propiedades insecticidas de fosfatos y fosforotionatos de dietil-beta R1 R2 bencilidenos : Correlación entre estructura y toxicidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1611_ArnsteindeLicastro.pdf

Cita tipo Chicago:

Arnstein de Licastro, Susana M.. "Estudio de las propiedades insecticidas de fosfatos y fosforotionatos de dietil-beta R1 R2 bencilidenos : Correlación entre estructura y toxicidad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1979.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1611_ArnsteindeLicastro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

*Estudio de las Propiedades Insecticidas
de Fosfatos y Fosforotionatos de
Diethyl- β R_1R_2 Bencilidenos - Correlación
entre Estructura y Toxicidad*

Susana M. Arnstein de Licastro

*Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Químicas*

1979

1617 417
2

A MI MADRE

A MI MADRE POLITICA

A MI ESPOSO

A MIS HIJOS

Agradezco muy especialmente al Dr. EDUARDO NICOLAS ZERBA, Director de esta tesis, con quien me he iniciado en la investigación entomotoxicológica, por su constante interés, sus valiosas opiniones y su intensa dedicación en la realización de este trabajo.

AGRADEZCO:

Al Dr. C.Cardini, por su labor como Consejero de Estudios, su apoyo y acción por allanar dificultades.

Al Dr. Edgardo J.Wood y a la Dra. María I.Picollo de Villar por la importante colaboración en muchos de los experimentos realizados, por el constante apoyo en el trabajo diario y por la sincera amistad brindada.

Al Dr. J.A.Castro, quien en todo momento colaboró con las facilidades de su laboratorio (Grupo Biotoxicología - CITEFA).

A la Lic. Norma C.de Malkenson por su colaboración en la lectura del manuscrito y el constante apoyo en la realización de este trabajo.

Al grupo Computación de CITEFA quien hizo posible la realización del análisis de datos de toxicidad y de correlación estructura - actividad, mediante la preparación de un programa de cálculo de dosis letal 50 y otro de Regresión Múltiple.

Al Dr. Alberto Rucci y al Sr. Juan Blanco por la realización de los espectros infrarrojo y la constante colaboración con las facilidades de su laboratorio (Grupo Analítica Especial - CITEFA).

A INSHER S.A. que en todo momento colaboró con la provisión de moscas.

Al Instituto del Diagnóstico y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas-Mazza Dr. Mario Fatała Chaben, que en todo momento colaboró con el mantenimiento de nuestro insectario.

A aquellas instituciones que contribuyeron a la realización de este trabajo en mayor o menor medida : SECYT, Gobierno del Japón, a través de su Agencia de Cooperación Técnica (JICA) y muy especialmente a mi Institución, CITEFA.

INDICE

INTRODUCCION

I)	Generalidades.....	1
II)	Nomenclatura.....	3
III)	Modo de acción.....	5
	a) Generalidades.....	5
	b) Reactividad química.....	8
	c) Actividad insecticida.....	11
IV)	Relación estructura - actividad de insecticidas.....	13
	1) Generalidades.....	13
	2) Parámetros usados en estudios de estructura - actividad.....	16
	a) Parámetros electrónicos.....	16
	b) Parámetros estéricos.....	21
	c) Parámetros hidrofóbicos.....	23
	d) Parámetros experimentales.....	28
	3) Aspectos cuantitativos de las relaciones estructura actividad.....	29
	i) Método empírico.....	29
	ii) Método semiempírico.....	30
	4) Análisis por regresión.....	31
V)	Finalidad de este trabajo.....	31

MATERIALES Y METODOS

I)	Productos químicos utilizados.....	33
II)	Síntesis de p-hidroxibencilidenos sustituidos.....	33

1)	Generalidades.....	33
a)	p-hidroxibenciliden nitroetano.....	34
b)	p-hidroxibenciliden cianoacetato de metilo.....	34
c)	p-hidroxibenciliden malononitrilo.....	34
d)	p-hidroxibenciliden acetilacetona.....	34
e)	p-hidroxibenciliden cianoacetamida.....	35
f)	p-hidroxibenciliden malonato de etilo.....	35
2)	Caracterización de los p-hidroxibenciliden sustitui- dos.....	35
a)	Análisis elemental cuantitativo.....	35
b)	Espectro infrarrojo.....	35
3)	Determinación de la constante de disociación ácida de los p-hidroxibencilidenos sustituidos.....	35
a)	Generalidades.....	36
b)	Materiales utilizados.....	36
c)	Procedimiento.....	36
III)	Síntesis de fosforotionatos y fosfatos de O,O-dietil, O-p-benciliden sustituidos.....	37
1)	Generalidades.....	37
a)	Obtención de fosforotionatos.....	37
b)	Obtención de fosfatos.....	38
2)	Caracterización de los compuestos fosforados.....	39
a)	Resonancia magnética nuclear.....	39
b)	Análisis elemental cuantitativo.....	39
IV)	Ensayos toxicológicos.....	39
1)	Material biológico.....	39
a)	<u>Musca doméstica</u>	39
b)	<u>Triatoma infestans</u>	40
2)	Acetilcolinesterasas.....	40

a)	Acetilcolinesterasas de eritrocitos de bovino.....	40
b)	Acetilcolinesterasas de cabezas de moscas.....	40
3)	Constante de Inhibición bimolecular k_i	40
a)	Generalidades.....	40
b)	Procedimiento de inhibición.....	41
c)	Colinesterasas de eritrocitos de bovino.....	42
d)	Colinesterasas de cabezas de moscas.....	43
4)	Determinación de la dosis letal 50 (DL_{50}).....	43
1)	Aplicación tópica de los tóxicos.....	43
a)	<u>Triatoma infestans</u>	43
b)	<u>Musca doméstica</u>	44
2)	Tratamiento estadístico de los resultados.....	44
V)	Parámetros para la correlación estructura-bioactividad.	45
1)	Parámetros fisicoquímicos.....	45
a)	Constante de Hammett.....	45
b)	Constante de Partición.....	46
2)	Parámetros experimentales.....	47
a)	Constante de disociación de fenoles.....	47
b)	Espectro infrarrojo de fenoles.....	47
c)	Espectro resonancia magnética nuclear.....	47
3)	Procesamiento de datos.....	47

RESULTADOS Y DISCUSION

I)	O,O-dietyl,O-p-benciliden fosforotionatos y fosfatos...	48
a)	Obtención de los p-hidroxibencilidenos.....	48
b)	Obtención de los compuestos fosforilados.....	50
II)	Inhibición de la colinesterasa "in vitro".....	53

III)	Correlación estructura - actividad anticolinesterásica..	59
1)	Constante de Hammett.....	59
2)	Constante de partición.....	61
3)	Constantes experimentales.....	61
4)	Correlación estructura - actividad.....	63
IV)	Toxicidad en insectos.....	69
	RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	77
	BIBLIOGRAFIA.....	79

Introducción

INTRODUCCION

I) GENERALIDADES

Los productos agroquímicos biocidas, llamados comunmente pesticidas, son el mayor grupo de sustancias tóxicas que se conocen hoy día. Los pesticidas incluyen insecticidas, acaricidas, nematocidas, rodenticidas, herbicidas y fungicidas.

Los insecticidas son los más numerosos y los más valiosos pesticidas. Como en el caso de muchas otras sustancias biológicamente activas, los insecticidas han sido desarrollados en su mayor parte por métodos empíricos, especialmente por chequeo de un sin número de compuestos que matan los insectos y no por consideraciones lógicas de sus propiedades y consecuencias de uso. La necesidad de usar a los insecticidas en forma adecuada forzó a los entomólogos a estudiar sus propiedades ya que se requería un mayor conocimiento de la naturaleza del insecto en agricultura y salud pública (1).

El desarrollo de nuevos insecticidas en las últimas tres décadas ha sido tan rápido que sería imposible mencionar todos los productos que fueron publicados. El deseo del hombre de controlar el medio ambiente ha creado muchos productos útiles. La evolución de los insecticidas químicos comenzó cuando se dispuso de materiales como arsenicales, aceites de petróleo e insecticidas naturales (nicotina, piretrinas, rotenona, etc.).

Los primeros insecticidas sintéticos fueron derivados de dinitro y tiocianatos. El descubrimiento más significativo que llevó a la proliferación de nuevas sustancias fué el DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil)etano) en 1874. Pero recién en 1939 se descubrieron sus

propiedades insecticidas. El uso del DDT revolucionó el control de pestes. Siguieron luego otros hidrocarburos clorados como el HCH (hexaclorociclohexano), Clordane (1,2,4,5,6,7,8,8-octacloro-2,3,3a,4,7,7a-hexahidro-4,7-metanoindeno), Toxafeno (canfenoclorado), Dieldrin (1,2,3,4,10,10-hexacloro-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-1,4-endo,exo-5,8-dimetanonaftaleno) y Aldrin (1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4-endo,exo-5,8-dimetanonaftaleno).

El desarrollo de insecticidas orgánicos del fósforo fué debida al trabajo pionero de G.Schrader, en Alemania, a partir de 1934. Desde la publicación de sus estudios en 1947 (2), miles de compuestos fosforados de muchos tipos han sido evaluados por sus propiedades insecticidas y los compuestos que se usan comercialmente incluyen TEPP (tetraetilpirofosfato), DDVP (2,2-diclorovinil dimetilfosfato), Paratión (O,O-dietil-p-nitrofenil-fosforotionato), Metilparatión (O,O-dimetil-p-nitrofenil-fosforotionato), EPN (etil,p-nitrofenil-fenilfosfonotionato), Schradan (octametil pirofosforoamidato), Malatión (O,O-dimetil,S-bis(carbetoxietil)fosforoditioato), Fenitrotión o Sumitión (O,O-dimetil, 3-metil,p-nitrofenil fosforotionato) y muchos más sufren evaluación experimental día tras día. El número de compuestos orgánicos del fósforo altamente tóxicos es aparentemente ilimitado y su adecuabilidad como insecticidas debe ser determinada por sus propiedades químicas de estabilidad, presión de vapor y solubilidad que determinan si son venenos de contacto o sistémicos, con actividad residual o transitoria y su relativa toxicidad a insectos y otros animales que determinan con que grado de seguridad pueden ser usados para cada tipo de control de insectos (3).

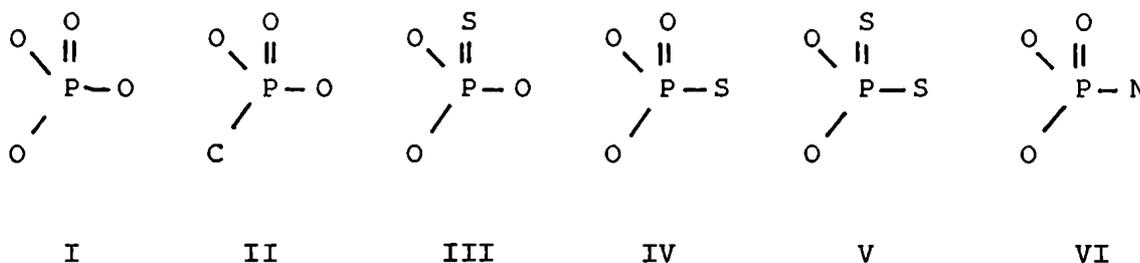
Los insecticidas organofosforados, debido a su relativa baja persistencia y alta efectividad son usados ampliamente en el mundo. Cer-

ca de 140 compuestos organofosforados (OP) son o fueron usados como pesticidas prácticos. Más de 60.000 toneladas por año son producidos solamente por los Estados Unidos de Norteamérica (4).

II) NOMENCLATURA

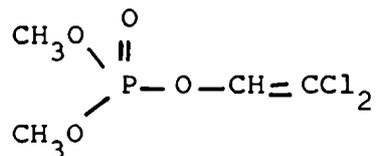
O'Brien (5) dice que es una costumbre emplear el término organofosfatos como término genérico para todos los compuestos tóxicos orgánicos que contienen fósforo.

Cuando el compuesto contiene la estructura I se denomina fosfato, con II fosfonato, con III fosforotionato, con IV fosforotiolato (aunque muchos autores llaman a éste y al anterior fosforotioatos sin distinguir un azufre tiono (=S) de uno tiolo (-S-), con estructura V es un fosforoditioato y con VI un fosforoamidato.

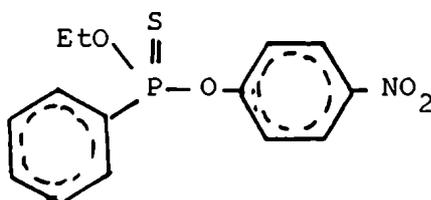


Como ejemplos podemos citar:

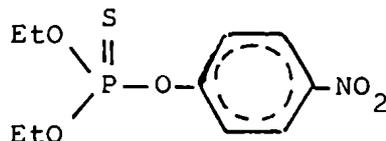
I DDVP O,O-dimetil-2,2-diclorovinil fosfato



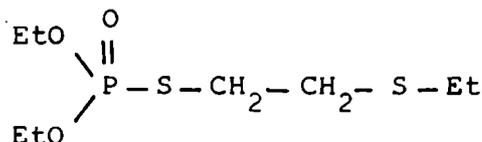
II EPN O,O-etil,p-nitrofenil-fenil fosforotionato



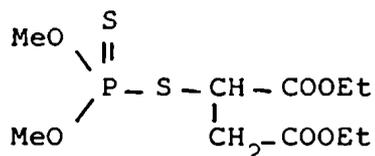
III PARATION O,O-dietil,p-nitrofenil fosforotionato



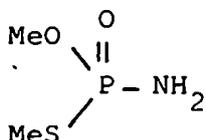
IV DEMETON -S O,O-dietil,S-2-etiltioetil fosforotiolato



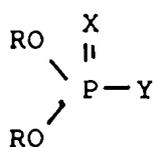
V MALATION O,O-dimetil,S-bis(carbetoxietil)fosforoditioato



VI MONITOR O-metil,S-metil fosforoamidotiolato



En la práctica casi todas las dificultades en nombrar a los organofosfatos reside en el sustituyente de la cadena lateral ya que la gran mayoría de los compuestos comerciales son del tipo dietil o dimetil. La gran variedad de compuestos proviene de la naturaleza del tercer grupo, muchas veces conocido como "leaving group" o grupo que se aleja. En otras palabras, la mayor parte de los compuestos OP responden a la estructura general:



donde

R es metil o etil

X es azufre u oxígeno

Y es un grupo variable

Comercialmente, la mayor parte de los insecticidas OP pertenecen

a los grupos III ó V, es decir fosforotionatos y fosforoditioatos ya que en el correspondiente organismo animal o vegetal son convertidos a los correspondientes compuestos oxigenados que son los verdaderos tóxicos.

La toxicidad de estos compuestos es debida a la actividad inhibitoria de un sistema enzimático llamado colinesterásico, imprescindible para el sistema nervioso de vertebrados e invertebrados. Esta actividad fué encontrada por primera vez por Adrian y colaboradores (6) en 1941. En forma estricta, compuestos OP que no son o no se transformen en vivo en excelentes inhibidores de estas enzimas no son utilizados como insecticidas.

Colinesterasa es un término general que implica dos tipos de enzimas: la acetilcolinesterasa (AChE), llamada también acetilcolina acetilhidrasa(3.1.1.7) o colinesterasa específica, colinesterasa verdadera, colinesterasa de eritrocitos y que se encuentra fundamentalmente en el tejido nervioso, en eritrocitos y en el órgano eléctrico. La otra colinesterasa correspondería a la pseudocolinesterasa llamada también acilcolina acilhidrolasa(3.1.1.8) o colinesterasa no específica, colinesterasa de suero, butirilcolinesterasa (BuChE) y que se encuentra fundamentalmente en el suero, pancreas, corazón e hígado (4).

III) MODO DE ACCION

a) GENERALIDADES

Es ampliamente aceptado que los organofosfatos matan animales, tanto vertebrados como invertebrados, inhibiendo la colinesterasa con la consiguiente ruptura de la actividad nerviosa causada por acumulación de acetilcolina en las terminales nerviosas (7). La evidencia más convincente de esto es a) que la ChE es una enzima vital, a juzgar por el hecho que su inhibición severa está generalmente asociada con la muerte.

b) que los OP matan afectando al sistema nervioso ya que se observan convulsiones y actividad parasimpática excesiva como lacrimación y salivación.

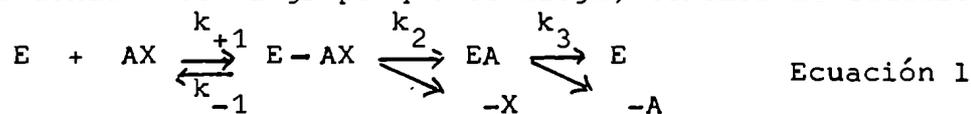
c) que los OP o sus productos de activación son inhibidores extremadamente potentes de la ChE y pobres inhibidores de otras enzimas vitales que han sido estudiadas.

d) que en general muy buenos inhibidores de la ChE son muy tóxicos y pobres inhibidores no lo son.

Es decir que la acción observada es de una inhibición de colinesterasa, llevando primero a una actividad excesiva en la sinapsis colinérgica y luego a un envenenamiento agudo por bloqueo.

Actualmente es universalmente aceptado que los OP reaccionan con la colinesterasa por un mecanismo similar al de los sustratos verdaderos (5). Se denomina así a los compuestos cuya hidrólisis es rápidamente catalizada por una o ambas colinesterasas. En cada caso hay primero una formación de un complejo, caracterizado por una constante de unión K_a que está formado por un paso de ida k_{+1} y uno de vuelta k_{-1} ; luego hay un paso de acilación o fosforilación caracterizada por una constante k_2 . En el caso del sustrato verdadero hay un tercer paso de deacilación k_3 restableciendo la enzima original. En el caso de los OP este paso no existe o es muy lento, permaneciendo la enzima fosforilada.

Llamando E a la enzima original y AX al organofosfato o al sustrato verdadero donde X es el grupo que se aleja, tenemos la ecuación 1



$$\text{luego } K_a = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

Aunque es aceptado que una unión reversible precede al paso k_2 dicha unión no es siempre demostrable experimentalmente. Aldridge(8) recalcó la necesidad lógica de esta unión en el caso de los OP pero pudo sólo demostrarlo cinéticamente para algún fosforado especial (9,10).

Main lo demostró para varios OP (11,12). Es posible obtener para los OP, por el procedimiento cinético de Main (11) un parámetro que denominó K_a como fuera definido anteriormente.

Según O'Brien (13), el parámetro definido por Main no respondería exactamente a la constante de afinidad y podría ser definido como :

$$K_y = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{+1}}$$

llamado así pues proviene de la intersección con el eje "y" de un gráfico de Main (es decir un gráfico de $1/i$ vs $t/2.3 \Delta \log v$) donde i es la concentración de inhibidor, t el tiempo de incubación y $\Delta \log v$ el cambio, en logaritmos, de la velocidad de hidrólisis del sustrato producida por la inhibición. Cuando k_2 es mucho menor que k_{-1} entonces K_y es igual a K_a .

Examinando la relación de los parámetros anteriores y teniendo en cuenta constantes más conocidas como I_{50} y la constante de velocidad bimolecular k_i , los organofosfatos se comportan como si siguieran la siguiente reacción



Se puede medir esta constante k_i . Main (11) demostró que $k_i = \frac{k_2}{K_a}$ para los organofosfatos, cuando k_3 puede ser despreciada. Esta k_i no es una constante de velocidad verdadera, pero sí una razón de una velocidad a una constante de afinidad, de aquí que surge el término de constante de reacción bimolecular.

Ecuación 2 sólo se cumple si se trabaja con concentración de inhibidor mucho menor que la K_a del inhibidor. Esta situación es bastante común y por lo tanto la k_i aparente ha sido usada con éxito.

En cuanto a I_{50} (definida como la concentración del inhibidor que da el 50% de inhibición a un t fijo de incubación), si la enzima sigue la ecuación 2 se obtiene de

$$k_i = \frac{0.695}{I_{50} t}$$

donde t es el tiempo de incubación con el inhibidor (7).

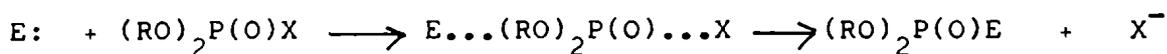
Idealmente I_{50} es una medida cercana a k_i pero no se debe suponer que se mide hasta que se prueba que para un sistema particular tratado, se cumple la ecuación 2; por ejemplo, que la reactividad de la enzima cae exponencialmente durante la reacción. Además se debe especificar el tiempo de incubación t cuando se reporta I_{50} o su logaritmo negativo pI_{50} .

b) REACTIVIDAD QUIMICA

Muchos materiales son activos debido a su habilidad de reaccionar químicamente con grupos funcionales específicos sobre la superficie receptora. El grado de actividad biológica de estos compuestos puede ser correlacionada con características estructurales que determinan la reactividad química de un átomo o grupo específico. La inhibición de la colinesterasa por insecticidas OP constituye un ejemplo importante.

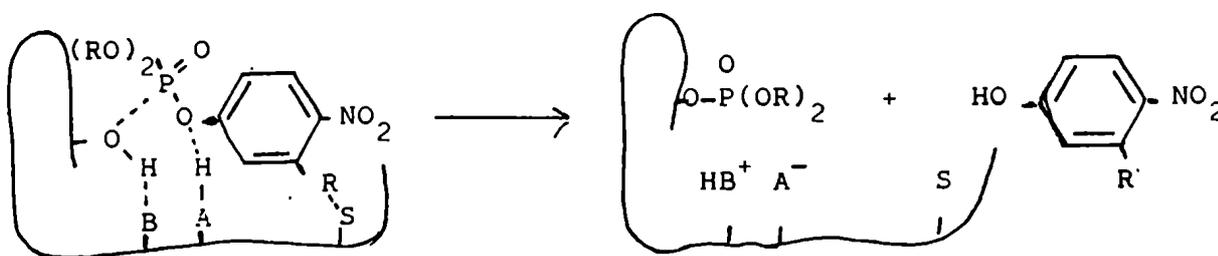
Está actualmente bien establecido que la actividad anticolinestérica de los compuestos OP resultan de un ataque electrofílico del átomo de fósforo sobre un centro nucleofílico activo de la colinesterasa. La ecuación 3 es una verdadera reacción química entre la enzima y el compuesto OP. El proceso de inhibición total lleva por último a la formación de la enzima E fosforilada a través de una unión

covalente y consecuente liberación del llamado "leaving group" o grupo que se aleja o saliente X del compuesto fosforado (13)



Ecuación 3

En cuanto a la enzima, de acuerdo con el modelo del sitio activo dado por Krupka en 1964 (14) y que se puede simbolizar de la siguiente manera



B es el grupo básico, el nitrógeno de la histidina imidazol; OH es el oxhidrilo de la serina o sitio esterático, AH es un grupo ácido (oxhidrilo fenólico de la tirosina) y S es el sitio aniónico. Éste sitio aniónico cuya función normal es atraer al trimetilamonio del sustrato natural acetilcolina al sitio activo de la enzima, puede ser visualizado como un lugar de carga negativa. En ciertos casos un grupo R en posición 3 del anillo fenilo del compuesto OP puede interactuar con el sitio aniónico ayudando o impidiendo el proceso inhibitorio.

El OH de la serina o sitio esterático sería el lugar donde normalmente se produciría la acetilación en el proceso de hidrólisis del sustrato acetilcolina y en el caso de la inhibición por OP sería el lugar donde se produciría la fosforilación.

Si se compara el proceso de fosforilación con una hidrólisis al-

calina de ésteres organofosfóricos se ve que en lugar del OH^- o agente nucleofílico se encuentra el grupo oxhidrilo de la serina activado por el nitrógeno histidina imidazol, que atacará al átomo de fósforo con carga parcial positiva.

Por lo tanto, la actividad anticolinesterásica del compuesto OP depende en gran medida del carácter electrofílico del átomo de fósforo que a su vez es determinado por la naturaleza de los grupos al cual está unido. Debido a la similitud con la hidrólisis alcalina, se observa habitualmente una relación lineal entre la constante de hidrólisis y la constante de velocidad bimolecular para la reacción con colinesterasa (15,16,17).

La inhibición no es determinada únicamente por la facilidad relativa de la reacción de fosforilación sino que también depende de la estabilidad hidrolítica de la enzima fosforilada. Como la reacción de fosforilación, la recuperación de la enzima fosforilada depende de la naturaleza electrofílica del átomo de fósforo. En este caso, sin embargo, la estabilidad de la enzima fosforilada es mejorada si los grupos unidos al fósforo ceden electrones.

Los requerimientos totales para que un anticolinesterásico sea efectivo (18) son: que posea un grupo X atractor de electrones que es desplazado durante la reacción de fosforilación y grupos débilmente atractores de electrones o dadores de electrones en R.

El carácter electrofílico del átomo de fósforo es aumentado por la electronegatividad del átomo de oxígeno del grupo $\text{P}=\text{O}$. La importancia de este grupo es indicada por la pobre actividad anticolinesterásica de los correspondientes tiono derivados en donde el oxígeno es reemplazado por azufre.

La naturaleza de R está generalmente limitada a grupos alcoxilo

pequeños (CH_3O ó $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$) en el caso de los fosfatos y fosforotionatos y grupos alquilos en el caso de fosfonatos y fosfinatos. La disminución de actividad anticolinesterásica con cadenas alquilo más largas aparece asociada con efectos estéricos no favorables (5,19).

c) ACTIVIDAD INSECTICIDA

Cuando una sustancia es aplicada a un insecto el interés general es observar la reacción y muerte del insecto después de un período de tiempo. Sin embargo este fenómeno consiste en una serie de continuas y complejas reacciones entre la droga y el insecto. Es decir que todos los organismos vivientes son sistemas químicos dinámicos, mantenidos en un delicado balance.

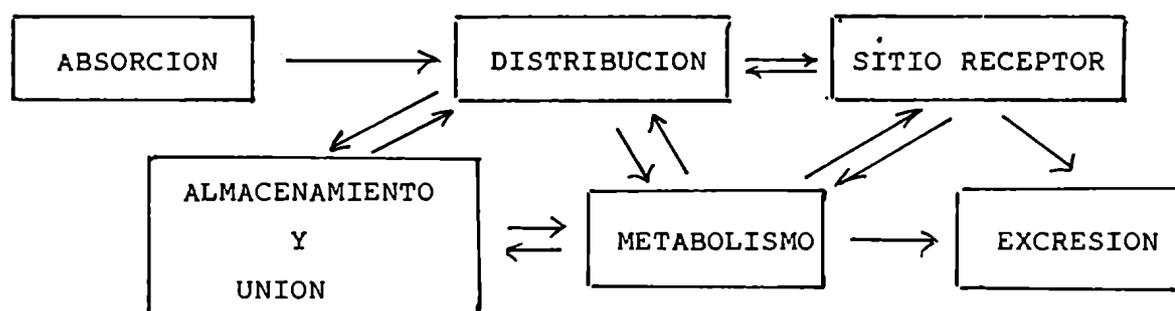
La presencia de un compuesto extraño dentro del sistema viviente puede romper este balance, aumentando, inhibiendo o interaccionando con una o más reacciones químicas o componentes. Dicho producto químico se dice que tiene actividad biológica o en el caso particular de tratarse de insectos, actividad insecticida (13).

Esta puede tomar distintas formas y puede ser medida por distintos caminos. Cuando es un sitio crítico y el mecanismo de acción conocido, la actividad biológica o insecticida puede ser medida directamente en función del grado de inhibición de un sistema enzimático "in vitro" (sería el caso de la colinesterasa para fosforados). Otras veces, la actividad biológica es medida indirectamente a través de observaciones "in vivo" del resultado final de la cadena de eventos iniciados por interacción del producto químico con un componente bioquímico desconocido. En el caso de pesticidas, por ejemplo, se acostumbra medir la actividad biológica en función del % de mortalidad de un organismo, sin tener necesariamente el conocimiento del modo de acción del material a nivel mo-

lecular. Más estrictamente definido, este efecto debería llamarse respuesta o efecto biológico.

Sun (20) resume la interacción total entre los insecticidas y los insectos como sigue:

El tóxico, al tomar contacto con la cutícula del insecto puede volatilizarse antes de penetrar. En la cutícula un insecticida puede ser detoxificado, como ocurre en el caso del DDT (21). Una vez que el insecticida abandona la cutícula se supone que el tóxico es transferido hacia la hemolinfa donde una parte puede ser partida entre lípidos o absorbida y unida a proteínas y otros materiales. También puede ser excretada. Si el insecticida es un veneno nervioso, como los compuestos organofosforados, deberá pasar a través de la vaina nerviosa antes de alcanzar el "target". Durante el transporte un insecticida puede ser también detoxificado (como los organofosforados) o activado y luego detoxificado (como los fosforotiónatos). La velocidad de acumulación de un tóxico en el "target" y la sensibilidad del "target" al tóxico es también importante. Gráficamente se pueden simbolizar todos los pasos:



La importancia relativa de cada uno de los factores depende de las características fisicoquímicas del material en cuestión. La sustancia tóxica deberá poseer no sólo la estructura química adecuada para poder interaccionar con su sitio receptor, sino incorporar aspectos estructurales que permitan pasar con éxito los factores competitivos, cada uno

de los cuales constituyen una barrera potencial para impedir que el tóxico alcance el sitio de acción.

IV) RELACION ESTRUCTURA - ACTIVIDAD DE INSECTICIDAS

1) GENERALIDADES

Drogas y pesticidas de uso corriente son fundamentalmente productos de extensivos programas llevados a cabo de acuerdo al principio de prueba y error por grupos de investigación de las compañías farmacéuticas y químicas. Recientemente fué estimado que estas aproximaciones llevan a un solo compuesto útil de 5000 a 8000 sintetizados (22).

Por esta razón, el estudio de la base molecular de acción de un pesticida o una droga para un desarrollo más racional de estos compuestos puede ser considerado de gran valor científico y económico.

Es importante considerar que aún un conocimiento preliminar de las relaciones estructura molecular - actividad y modo de acción puede ser útil para mejorar las chances de encontrar compuestos bioactivos reduciendo el factor de prueba y error.

La síntesis de compuestos potencialmente útiles sería el primer paso de un proceso multidisciplinario en el desarrollo de un compuesto bioactivo. Sin embargo, se vió en los primeros estudios de relación estructura - actividad que el lenguaje de la química orgánica sintética que hace uso de fórmulas estructurales no sería la más adecuada para este fin (23). El uso de propiedades físicas y fisicoquímicas en lugar de fórmulas estructurales comenzó a principios del siglo XIX. Hasta 1960 esos estudios, en los cuales sólo una propiedad molecular se comparaba con la actividad biológica, no fué exitosa. Algunos resultados positivos se obtuvieron en estudios de correlación de algunos efectos biológicos muy específicos tales como la acción narcótica en animales y actividad

fitotóxica en plantas, con propiedades tales como coeficientes de partición (24,25).

En los últimos 20 años, sin embargo, ha sido reconocido que la posible actividad biológica de un compuesto orgánico puede depender de varios procesos que tienen lugar en el objeto biológico, incluyendo penetración y transporte, metabolismo de drogas e interacción efectiva con el receptor biológico. Como consecuencia de este carácter multicondicional de la relación estructura - actividad, podría ser que, en general, más de una propiedad influya en la bioactividad (26).

El campo del diseño de drogas puede ser dividido en 2 categorías principales. La primera sería el diseño de un tipo completamente nuevo. Para ello son de máxima importancia los estudios de interacciones de droga - receptor. Un esquema más restringido del diseño de drogas y pesticidas sería la optimización de la bioactividad de una nueva clase de compuestos bioactivos por variaciones del esquema de sustitución.

En esta área, contribuciones directas al desarrollo de relaciones de estructura - actividad han sido obtenidos de la fisicoquímica orgánica, donde una aproximación exitosa para la correlación de reactividad química con parámetros de sustituyentes de núcleos aromáticos fué descubierta por Hammett en 1937 y desarrollado posteriormente por él y otros autores (27,28).

A partir de consideraciones extratermodinámicas se obtuvo la ecuación de Hammett

$$\log \frac{k_s}{k_o} = \rho \sigma$$

donde k_s representa la constante de velocidad o equilibrio de un miembro s de un grupo de compuestos de una serie homóloga que sufre una reacción; k_o es la misma constante para el compuesto sin sustituir. La

constante ρ es característica de las condiciones y tipo de reacción y el parámetro de energía libre σ es una medida del efecto electrónico del sustituyente \underline{s} sobre un centro de reacción.

En el período 1950 - 1960 varios fracasos y sólo unos pocos intentos exitosos fueron reportados (25) para correlacionar valores de con cambios de respuesta biológica.

Nuevos trabajos en este campo fueron reportados por Hansch y colaboradores (29). El método utiliza el dato de coeficiente de partición en el sistema octanol - agua, introduciendo la constante de sustituyente π .

En 1964 Hansch y Fujita (30) ampliaron considerablemente el panorama y la utilidad de la correlación de estructura - actividad con la introducción de un modelo de actividad y una ecuación de dos parámetros basados en la constante σ de Hammett y parámetros de solubilidad.

El método de Hansch y Fujita y otras teorías como la de Free Wilson y la de orbitales moleculares (31) han aumentado enormemente nuestro entendimiento del modo de acción de muchos productos biológicos y también mejoró la habilidad de predecir la actividad de una variedad de productos.

Podemos resumir diciendo que ha sido demostrado en muchos estudios que los siguientes 3 tipos de propiedades del sustituyente pueden modular la bioactividad de series homólogas influenciando uno o más de los bioprocesos:

- 1) propiedades electrónicas, descritas por el σ o constante de Hammett u otros parámetros electrónicos de los sustituyentes.
- 2) propiedades hidrofóbicas descritas por las constantes π que son una medida de la energía libre de transferencia del sustituyente de una fase acuosa a una fase lipofílica, por ejemplo biofase.

3) propiedades estéricas descritas por un tercer parámetro de energía libre lineal E_s (32).

Hansch (25) demostró que puede esperarse la siguiente correlación entre la actividad biológica de los miembros de una serie homóloga y las constantes de sustituyentes

$$\log \frac{1}{C_s} = -a\pi^2 + b\pi + c\sigma + dE_s + e$$

donde C_s es la concentración del miembro s que da una respuesta standard (por ejemplo ED_{50}) y a , b , c , d y e son constantes. Estas pueden obtenerse como coeficientes de regresión por análisis de regresión múltiple. En algunos casos se pueden tener en cuenta ecuaciones de órdenes mayores para σ y E_s .

2) PARAMETROS USADOS EN ESTUDIOS ESTRUCTURA - ACTIVIDAD

a - parámetros electrónicos

En 1940 L.P.Hammett publicó su primer trabajo (27) y a partir de allí comenzó una nueva actitud en la química orgánica. Para discutir la reactividad relativa de un grupo de derivados se hizo necesaria una descripción cuantitativa. El postulado de Hammett fué que el efecto electrónico de un grupo de sustituyentes sobre distintas reacciones orgánicas deberían ser similares y si se pudieran asignar números a las funciones como $-NO_2$, Cl, etc., en un sistema standard, estos podrían ser utilizados para estimar velocidades en un nuevo sistema. El ácido benzoico fué elegido como sistema standard y el parámetro electrónico fué definido como:

$$\sigma = \log \frac{K_s}{K_H} \quad \text{Ecuación 4}$$

K_S es una constante de equilibrio (ionización) y se refiere a los derivados meta y para sustituidos del ácido benzoico, mientras que K_H se refiere al ácido benzoico sin sustituir.

Fué reconocido que interacciones estéricas prevalecerían en derivados orto y que la ecuación de Hammett no se cumpliría.

El parámetro σ fué diseñado para aplicarse únicamente a efectos electrónicos. Se supone que la diferencia entre las constantes de ionización K_S y K_H se debe a efectos electrónicos de la función \underline{S} . Esta relación lineal entre el efecto de sustituyentes en dos procesos distintos puede ser ilustrado de la siguiente manera:

$$\log k_S = \rho \log K_S + C \quad \text{Ecuación 5}$$

K_S es la misma constante que antes, ρ y C son constantes y k_S es la velocidad o equilibrio de una reacción en un anillo aromático, como ser la velocidad de hidrólisis de un grupo de esteres del ácido benzoico. Para el caso particular en que se compara ácido benzoico y etil benzoato

$$\log k_H = \rho \log K_H + C \quad \text{Ecuación 6}$$

restando ecuación 6 de la ecuación 5 tenemos

$$\log k_S / k_H = \rho (\log K_S / K_H) \quad \text{Ecuación 7}$$

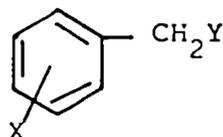
reemplazando ecuación 4 en la ecuación 7 obtenemos la forma usual de la ecuación de Hammett

$$\log \frac{k_S}{k_H} = \rho \sigma \quad \text{Ecuación 8}$$

En la ecuación 8, ρ se refiere a la constante de reacción y varía no sólo de reacción en reacción sino también con las condiciones de la reacción, como ser el solvente. σ es denominada constante del sustituyente y aunque varía levemente de sistema a sistema no se tiene en cuen-

ta para la mayor parte de los casos.

En general la ecuación de Hammett se aplica a sistemas aromáticos y sólo para reacciones en las que el sustituyente y el centro de la reacción estén aislados como en



de modo que no ocurra resonancia entre X e Y, es decir, que mientras X afecta a Y en una forma paralela a la forma que X afecta a la constante de ionización del correspondiente ácido benzoico la ecuación de Hammett se cumple. Dicha condición no prevalece por ejemplo en fenoles o aminas aromáticas. Ocurre aquí una fuerte interacción de resonancia con sustituyentes en para como -NO₂, -CN y -COCH₃. Para estos casos se formuló una constante electrónica especial σ^- (33).

Una situación similar ocurre cuando una carga positiva es generada en el curso de una reacción. Para mejorar estas situaciones Brown y Okamoto (34) formularon la constante σ^+ .

Un review importante fué publicado por Jaffe en 1953 (35) en donde se recopilaron todos los datos existentes hasta esa fecha para las distintas reacciones estudiadas.

Los valores de ρ pueden ser determinados con un pequeño número de medidas experimentales si se eligen bien los sustituyentes. Los valores experimentales de $\log k_s$ o $\log k_s/k_H$ se grafican vs. σ y la mejor recta da ρ . A partir de este valor se obtiene la constante de equilibrio o de velocidad para cualquier otro sustituyente.

Los parámetros σ , σ^- y σ^+ fueron diseñados para sistemas aromáticos. Se encontró rápidamente que dichas constantes no se aplicaban a sistemas alifáticos no rígidos donde los efectos de aproximación no

pueden ser excluidos. Taft (36) formuló el parámetro σ^* para sistemas alifáticos. Esta constante polar se define como

$$\sigma^* = \frac{1}{2.48} \left(\log \left(\frac{k}{k_0} \right)_B - \log \left(\frac{k}{k_0} \right)_A \right) \quad \text{Ecuación 9}$$

En la ecuación 9 el $\log \left(\frac{k}{k_0} \right)_B$ se refiere a la constante de velocidad de hidrólisis de ésteres del tipo XCH_2COOR en solución básica y el $\log \left(\frac{k}{k_0} \right)_A$ a la hidrólisis de los mismos ésteres en condiciones ácidas. Ha sido demostrado que el efecto inductivo de X es pequeño en condiciones ácidas pero que las básicas son muy sensibles. Por lo tanto la diferencia entre ambos se supone como debida al efecto inductivo de X . Como los efectos estéricos son presumiblemente los mismos en ambas hidrólisis se cancelan. El factor 2.48 es usado para colocar a σ^* en la misma escala que σ .

Intentos de extender la ecuación de Hammett a sistemas biológicos han sido poco exitosos (37). Esto ha sido atribuído a la gran cantidad de interacciones estéricas del sustrato con enzimas o membranas.

Aldridge y Davison (38) fueron los primeros que hicieron un estudio bioquímico de la ecuación de Hammett. Demostraron que un gráfico de \log de la constante de hidrólisis para dietilfenilfosfatós en función del $\log I_{50}$ para colinesterasa de eritrocitos de oveja daba una buena relación lineal. Resultados obtenidos de un estudio más extenso realizado por Metcalf y Fukuto (39), usando colinesterasa de cabeza de mosca, mostraron datos similares.

Para obtener las constantes σ de Hammett se utilizaron también otros parámetros electrónicos tales como número de onda en ultravioleta, intensidades de absorción y número de onda en infrarojo y corrimientos químicos en resonancia magnética nuclear. Estos parámetros espectroscópicos pueden ser también utilizados directamente en lugar de σ

para las distintas correlaciones (40).

Es sabido que las frecuencias de stretching originados de vibraciones localizadas en grupos funcionales unidos a anillos aromáticos pueden ser relacionados con la naturaleza electrónica del sustituyente.

Brown (41) ha demostrado en base a cálculos de orbitales moleculares que dichas correlaciones de parámetros espectroscópicos son razonables, ya que cambios en las distribuciones de electrones que ocurran en la molécula durante distorciones vibracionales son paralelos a los que ocurren en la formación del estado de transición durante una reacción química (42). La correlación del corrimiento químico de protones de grupos amino y los correspondientes σ de Hammett o con valores de pK_a fueron demostrados por Seydel (43) y por Lynch et al. (44) y para fenoles por Tribble y Traynham (45).

El pK_a de un compuesto es por sí mismo un parámetro electrónico que puede ser correlacionado directamente con el efecto biológico del correspondiente compuesto. Esto fué realizado en una de las primeras aproximaciones cuantitativas por Bell y Roblin para sulfonamidas (46).

Otras herramientas útiles para obtener datos electrónicos son la química cuántica o los cálculos de orbitales moleculares (MO). Nuevamente esta aproximación para obtener datos de reactividad química fué primero aplicada en química orgánica y luego aplicada por Pullman y Pullman (47) y Löwdin (48) a problemas de bioquímica.

Otro tipo de relaciones de energía libre fué obtenida por Zahradnik y Chvapil (49) y Zahradnik (50 - 51). Relacionan actividad biológica de series homólogas de compuestos con distintos grupos funcionales. Una constante β que describe los distintos efectos biológicos de los sustituyentes se obtiene en lugar del σ de Hammett y por lo tanto esta aproximación puede ser considerada una modificación de la

ecuación de Hammett.

La magnitud del efecto biológico o toxicidad de los miembros de una serie homóloga de compuestos alifáticos del tipo R - X, en cierto sistema biológico, puede ser correlacionado por una ecuación

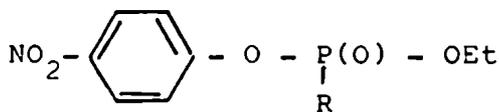
$$\log \frac{\tau_i}{\tau_{Et}} = \beta$$

donde τ_{Et} representa la concentración molar del derivado de etilo que produce cierto efecto, β es una constante característica del sustituyente R. Su valor es independiente del grupo funcional X y del sistema biológico usado. De acuerdo con Zahradnik, la constante β no es una medida de las propiedades polares del sustituyente como en el caso de las constantes de Hammett o Taft, sin embargo sí relacionada con i , la longitud de la cadena, y es por lo tanto una expresión de la partición lípido - agua.

b- parámetros estéricos

Aunque la reactividad es un factor muy importante que determina la actividad anticolinesterásica de un éster organofosforado, las propiedades estéricas de la molécula pueden afectar en gran medida la velocidad de inhibición.

Hay muchos ejemplos de influencia de factores estéricos en la velocidad de reacción entre compuestos OP y AChE. En una serie de Etil, p-nitrofenil alquilsfosfonatos, Fukuto y Metcalf en 1959(52) relacionaron la constante de inhibición bimolecular k_i para AChE de cabezas de moscas con la constante de solvólisis k_{hid} . Los compuestos estudiados respondían a la estructura siguiente:



Un gráfico de k_i vs k_{hid} muestra que si bien k_i aumenta con k_{hid} la relación no es lineal. CH_3- , C_2H_5- , $n-C_3H_7-$ tienen la mayor actividad anticolinesterásica. Cuando la cadena aumenta de 3 a 6 átomos de C la actividad decrece, así como con la ramificación de la cadena. Esto se debe probablemente a problemas estéricos. La disminución en 10 veces de n-Butil a i-Butil, a pesar de hidrólisis parecidas indica que el acomodamiento en el sitio reactivo de la enzima también es un factor importante. El aumento en i-pentilo e i-hexilo indica que la ramificación sería deseable pero en lugares alejados del átomo de Fósforo.

Taft (53) usó los efectos polares de sustituyentes en la hidrólisis de los esteres para obtener los efectos estéricos de los mismos.

Teniendo en cuenta que en la hidrólisis ácida del etilcloroacetato y del etilpropionato los valores de $\log k/k_0$ eran similares y que los valores de σ^* para el clorometil y etil eran muy diferentes, la susceptibilidad de la hidrólisis ácida a efectos polares es prácticamente cero. Por lo tanto supuso que los valores de $\log(k/k_0)_A$ eran una medida casi cuantitativa de los efectos estéricos:

$$E_s \equiv \log \left(\frac{k}{k_0} \right)_A \quad \text{Ecuación 10}$$

Es es una medida casi cuantitativa del efecto estérico total asociado con un dado sustituyente relativo al standard de comparación que en cada caso es el grupo CH_3- .

Un aumento de sustituciones de grupos alquilo, fenilo o halógeno lleva a una reactividad decreciente debido a influencias estéricas como puede observarse con los valores de E_s .

Una modificación de la constante estérica de Taft es la de Hancoch (54) quien define una E_s^C que es esencialmente la misma pero corregida

por hiperconjugación de los átomos de hidrógeno α y está definida como:

$$E_S^C = E_S + 0.306 (n - 3) \quad n = \text{número de átomos H } \alpha$$

c- parámetros hidrofóbicos

Para poder visualizar los efectos hidrofóbicos necesarios en estudios de estructura - actividad, Fujita y Hansch en 1964 (30, 55) desarrollaron una constante de sustituyente π análoga a la constante de Hammett .

Se obtiene de los coeficientes de partición entre octanol y agua y es definida como:

$$\pi = \log P_x - \log P_H \quad \text{ecuación 11}$$

donde P_H es el valor para el compuesto sin sustituir.

Por lo tanto π es útil para evaluar el carácter lipo -hidrofílico de una molécula, importante para la actividad biológica. La influencia de π sería solamente sobre uno de los factores que gobiernan la potencia biológica : la facilidad de llegar al "target" o lugar de acción.

Fujita y Hansch sugirieron que para todos los compuestos tóxicos la DL_{50} (dosis letal para el 50% de la población) se alcanza cuando

$$ACK_x = \text{constante (velocidad de respuesta biológica)}$$

donde A es el factor que describe la probabilidad de alcanzar el "target"

C es la concentración externa

k_x es la constante de velocidad o equilibrio que describe la afinidad por el "target".

De lo anterior surge que

$$\frac{d(\text{respuesta})}{dt} = ACK_x \quad \text{ecuación 12}$$

Por lo tanto se ve que la efectividad total dependería de cuánto se aplica, de cuán bien llega al target y de cuán bien reacciona con él.

Los autores sugirieron que π influencia sólo A y a medida que π aumenta A pasa por un óptimo.

Para relacionar A con una medida experimental se eligió el coeficiente de partición P.

Ha sido demostrado que la velocidad de movimiento de una gran variedad de compuestos orgánicos a través del material celular es aproximadamente proporcional al log. de sus coeficientes de partición entre un solvente orgánico y agua.

En lugar de P se usa π , constante comparativa del sustituyente. π es una constante relacionada con energía libre, similar al σ de Hammett y es una medida del cambio relativo de energía libre al mover un compuesto de una fase a otra. Como sabemos, la célula es compleja y la molécula tendrá que realizar muchas particiones entre fases orgánicas distintas mas o menos fijas al trasladarse, atravesando membranas, el retículo endoplásmico y estructuras membranosas de un órgano particular. El proceso es complejo ya que hay absorción y desabsorción sobre superficies sólidas donde es importante la polaridad de la molécula. Hay poca evidencia si la actividad biológica sigue una distribución gaussiana normal respecto a P o a π . Se supone como hipótesis de trabajo que es normal y el coeficiente A o probabilidad que una molécula alcance el sitio activo en un intervalo de tiempo sea función de π . Entonces

$$A = f(\pi) = a e^{-(\pi - \pi_0)^2 / b}$$

y teniendo en cuenta ecuación 12 resulta

$$d(\text{respuesta}) = a e^{-(\pi - \pi_0)^2 / b} C k_x = \text{constante}$$

Como la mayor parte de las respuestas biológicas se informan como DL₅₀ o I₅₀, aplicando logaritmos y reordenando queda:

$$\log 1/C = -k \pi^2 + k_1 \pi_0 - k_2 \pi_0^2 + \log k_X + k_3$$

Si se utiliza el k_X como en la ecuación de Hammett o sea

$$\log k_X = \rho \sigma + \log k_H$$

queda

$$\log 1/C = -k \pi^2 + k_1 \pi_0 - k_2 \pi_0^2 + \rho \sigma + k_4$$

donde k₄ = k₃ + log k_H

π_0 es el valor ideal para un sustituyente tal que la suma de energía libre sea mínimo; por lo tanto es constante para un grupo de moléculas relacionadas y la ecuación anterior se reduce a:

$$\log 1/C = -k \pi^2 + k_1 \pi + \rho \sigma + k_5 \quad \text{ecuación 13}$$

Habíamos visto que Taft demostró que la actividad biológica podía correlacionarse tratando independientemente las contribuciones de los distintos efectos, por lo tanto puede ampliarse la ecuación anterior agregando E_s y σ^* y generalizando

$$\log 1/C = -a \pi^2 + b \pi + \rho \sigma + d E_s + \delta \sigma^* + \text{cte}$$

ecuación 14

donde C es la concentración molar que produce una respuesta biológica.

π es log P o coeficiente de partición que da cuenta de los parámetros hidrofóbicos.

σ y σ^* son las constantes de Hammett y polar de Taft que tie-

ne en cuenta parámetros electrónicos.

E_s es la constante estérica de Taft o bien se puede usar la E_s^C corregida por hiperconjugación por unión hidrógeno.

En la ecuación anterior no todos los términos son significativos estadísticamente. Se obtienen las llamadas ecuaciones de regresión múltiple o análisis por regresión múltiple ideado por Hansch (56) donde se obtienen coeficientes de correlación.

Uno de los aspectos más útiles de los coeficientes de partición para estudios de estructura - actividad es su carácter aditivo (25). Se puede definir π como el logaritmo del coeficiente de partición para una parte de la molécula. Por ejemplo:

$$\pi_{CH_3} = \log P_{\text{tolueno}} - \log P_{\text{benceno}}$$

$$\pi_{OH} = \log P_{\text{fenol}} - \log P_{\text{benceno}}$$

Si bien el π puede ser determinado para cada familia de compuestos midiendo el coeficiente de partición entre octanol y agua, lo que se hace muchas veces es comparar la serie en estudio con valores de tablas o usar el carácter aditivo.

El trabajo de Fujita y Hansch (55) compara valores de π para una dada función en distintos sistemas (fenoxiacético, fenilacético, ácido benzoico, alcohol bencilico, fenol, anilina, nitrobenzenc y benceno) y encontraron que el π , en forma similar a lo que ocurre con el σ (57) varía continuamente para una dada función, dependiendo del medio que lo rodea, pero que en general el rango sobre el cual varía no es grande. La mayor variancia ocurre cuando hay dos grupos fuertemente interaccionantes entre sí como nitro y amino sobre un mismo anillo. Para grupos inertes como alquilo, los valores son esencialmente constantes.

El hecho que un grupo de constantes satisface los derivados de fenol y anilina recuerda nuevamente la similitud entre π y σ

La relativamente pequeña variación de π entre los distintos sistemas es muy útil ya que unos pocos valores (posiblemente tres π_n , π^- y π^+) servirían para la mayor parte de los análisis $\rho - \sigma - \pi$ que se desearían realizar en la mayor parte de las correlaciones de actividad biológica con estructura química. Los valores de π^- serán aquellos de fenoles cuando grupos fuertemente dadores de electrones estén unidos al sistema conjugado (OH, NH₂, NHR ó NR₂). Los π^+ serían necesarios cuando grupos fuertemente atractores de electrones se conjugan con la función variable (CN, NO₂). π_n representa el caso en donde se compara el derivado monosustituido de benceno con el benceno sin sustituir y $\Delta\pi$ sería el cambio del coeficiente de partición para una función particular si se la colocara en un nuevo sistema aromático comparado con su coeficiente de partición cuando se une al benceno, o bien es el cambio en el coeficiente de partición de un grupo unido al benceno cuando hay otras funciones unidas al anillo. Aunque este parámetro $\Delta\pi$ es complejo en algunas circunstancias pareciera depender simplemente de σ_x es decir:

$$\Delta\pi = k \sigma_x$$

Hansch y Fujita (30) basándose en los trabajos de Metcalf y Fukuto (39, 52) sobre toxicidad de ésteres de fenil fosfatos hacia moscas, muestran como el carácter del sustituyente medido por σ y π afectan la actividad biológica de una serie de derivados. Los valores de π fueron obtenidos directamente de fenoles para la mayor parte de la serie, salvo en los casos de X= SO₂CH₃ y t-butil, que fueron obtenidos del fenoxiacético. Además conociendo π para unos pocos miembros de la serie, determinaron el k y los valores para los otros miembros po-

dían ser calculados.

d-. parámetros experimentales

Además de los parámetros de energía libre discutidos anteriormente un número de parámetros experimentales han sido usados en estudios cuantitativos de relaciones estructura actividad.

Por un lado tienen la gran ventaja que contienen información más detallada sobre las propiedades electrónicas y estéricas de los compuestos estudiados. Por otra parte, tienen la desventaja de que debe disponerse de los compuestos estudiados para su determinación lo cual significa que en general estos parámetros no sirven para fines de predicción.

Un gran número de aproximaciones cuantitativas interesantes han sido formuladas y no han recibido posteriormente un estudio extensivo.

Mullins (58) mostró cómo el parámetro de solubilidad de Hildebrand puede ser usado en estudios de estructura actividad.

El uso de constantes de polarizabilidad fue explorada por Agin et al (59) que mostraron una buena correlación lineal graficando $\log(\text{MBC})$ vs αI_p donde MBC representaba la concentración mínima molar que bloqueaba el músculo de sapo, I_p era el potencial de ionización y α la polarizabilidad.

Zahradnik (49,50,51) usando valores de DL_{50} de ratón, testeados bajo condiciones estrictamente controladas, desarrolló un grupo de constantes para grupos alquilo, utilizando un postulado similar al de Hammett, en el cual $\log \tau_i / \tau_{Et} = \alpha \beta$ donde τ_i representa la concentración molar del miembro de una serie homóloga que produce una respuesta standard y τ_{Et} la concentración del derivado de etilo.

Otros parámetros se basan, como vimos anteriormente, en mecánica cuántica y orbitales moleculares, así como también en momentos dipolares (60) o presión de vapor (61).

Hay otro grupo de parámetros que pueden ser obtenidos a partir de datos espectroscópicos como IR y RMN.

Un tercer grupo de parámetros experimentales se basan en constantes de equilibrio y de velocidad como las constantes de disociación y constantes de hidrólisis que han sido utilizadas muchas veces en estudios cuantitativos.

3) ASPECTOS CUANTITATIVOS DE LAS RELACIONES ESTRUCTURA ACTIVIDAD

La actividad biológica de cualquier sustancia depende en último grado de una combinación favorable de las distintas propiedades fisicoquímicas estructurales y electrónicas.

Salvo en casos aislados, la consideración de cualquier factor por sí solo no proveerá un medio de predecir exactamente la actividad potencial de materiales relacionados o para diseñar compuestos nuevos o más efectivos.

En años recientes, el fácil acceso a las computadoras ha llevado a un mayor interés en los aspectos cuantitativos de las correlaciones entre la estructura química y la actividad biológica.

Dos métodos han sido desarrollados: el método matemático empírico de Free y Wilson (62) y el método semiempírico de Hansch (63).

i) método empírico

El método de Free y Wilson (62) define la actividad biológica total de una sustancia como una función de la suma de las contribuciones individuales de la actividad de cada uno de sus grupos sustituyentes. El método se basa por lo tanto, en la suposición que en una serie

de análogos, al menos alguno de los grupos sustituyentes contribuyen a la actividad total en forma esencialmente aditiva.

Una objeción a este método es que cada una de las constantes empíricas que emplea combina en una sola efectos importantes como solubilidad lipídica y factores estéricos y electrónicos.

ii) método semiempírico

Hansch supuso(63) que el efecto del sustituyente sobre la variación de energía libre en una respuesta hacia la droga puede ser factoreado como sigue:

$$\sigma_x \Delta G = \sigma_x \Delta G_{\text{hidrof}} + \sigma_x \Delta G_{\text{electrónico}} + \sigma_x \Delta G_{\text{estérico}}$$

Si se puede tomar la ecuación descrita en efectos hidrofóbicos

$$\log 1/C = -k_1(\log P)^2 + k_3 \log P + \log k_x + k_4 \quad \text{ecuación 12}$$

como modelo razonable que describe la dependencia del movimiento de una droga con el carácter lipofílico, como fuera definido por los coeficientes de partición octanol - agua, y suponiendo que la respuesta biológica observada es gobernada por una constante de equilibrio o velocidad de reacción física o química k_x , se puede, por combinación lineal de los parámetros de energía libre expandir la aproximación.

El siguiente postulado resultó muy útil:

$$\log k_x = a \log P + \rho \sigma + b E_s + k \quad \text{ecuación 13}$$

En la ecuación 13 cualquiera de los parámetros electrónicos discutidos anteriormente pueden ser usados en lugar de σ . E_s o parámetro estérico de Taft o el de Hancock E_s^C son constantes para efectos intramoleculares. Sustituyendo la ecuación 13 en la 12 se obtiene la ecuación 14 :

$$\log 1/C = -k_1(\log P)^2 + k_2 \log P + \rho \sigma + k_3 E_s + k_4 \quad \text{ecuación 14}$$

En lugar de $\log P$ se utiliza normalmente π y la ecuación 14 resulta la expresión más conocida

$$\log 1/C = -k_1 \pi^2 + k_2 \pi + \int \sigma + k_3 E_s + k_4 \quad \text{Ecuación 15}$$

4) ANÁLISIS POR REGRESION

El análisis por regresión múltiple es un método estadístico de cálculo, empleando métodos de cuadrados mínimos. La validez de las ecuaciones obtenidas y la importancia relativa de los distintos parámetros utilizados pueden ser juzgados por los siguientes criterios estadísticos:

coeficiente de correlación múltiple (r).

valor del test de significancia F .

valor del test de t .

desviación standard (s)

El coeficiente de correlación múltiple r da una indicación del grado de correspondencia entre el dato biológico experimental y el calculado con la ecuación propuesta. $r = 1$ indica que la ecuación es perfecta. El valor de F de significancia es la decisión estadística del test. Cuando n es el número de datos y k el número de variables independientes, el valor de F deberá ser buscado en tablas de distribución bajo los grados de libertad de k y $n-k-1$. El valor de t perteneciente a los distintos coeficientes de regresión a , b , c y d es una medida de la contribución de los correspondientes parámetros a la correlación encontrada.

El mejor procedimiento para el análisis por regresión es el método por etapas, en los cuales los parámetros son sucesivamente adicionados mientras se observa variaciones en los criterios estadísticos.

V) FINALIDAD DE ESTE TRABAJO

Este trabajo tiene como propósito general evaluar la acción insecti-

cida "in vivo" y el poder anticolinesterásico "in vitro" sobre moscas y vinchucas de los p-benciliden fosforotionatos y fosfatos R_1R_2 sustituidos, compuestos fosforados que en su mayor parte no están mencionados en la literatura.

Respecto a la bioacción "in vitro", los datos obtenidos para las respectivas constantes bimoleculares de inhibición de acetilcolinesterasa de cabezas de moscas y acetilcolinesterasa de eritrocitos de bovino para los oxones (>P(O)-) de la serie sintetizada, permitieron correlacionar la estructura de los compuestos con la actividad anticolinesterásica "in vitro". Este hecho representa una contribución a la posibilidad de diseño racional de nuevos insecticidas fosforados.

Materiales y Métodos

I- PRODUCTOS QUIMICOS UTILIZADOS

Como materia prima para la obtención de los p-hidroxibencilidenos sustituidos se utilizó el p-hidroxibenzaldehido (Aldrich, USA) recristalizado de benceno caliente (PF 1162).

Como fuente de metilenos activos para la reacción de condensación se utilizó nitroetano (Aldrich, USA) previamente destilado (PE 1152); cianoacetato de metilo (Aldrich, USA); malononitrilo (Eastman Kodak, USA); acetilacetona (Merck, Alemania occidental); cianoacetamida (Merck, Alemania occidental); y malonato de etilo (Aldrich, USA).

Como catalizador de la reacción se utilizó en algunos casos piperidina (Merck, Alemania occidental) y en otros n-butilamina (Aldrich, USA).

Los solventes utilizados fueron etanol y metanol absolutos (Merck, Alemania occidental) y dioxano (Merck, Alemania occidental). Este último secado sobre tamiz molecular 4 (Merck, Alemania occidental).

La reacción de fosforilación se llevó a cabo en isobutil metil cetona (Merck, Alemania occidental) destilada y guardada sobre tamiz molecular 4; en presencia de carbonato de potasio anhidro (Mallinckrodt, USA) y cloruro cuproso (Merck, Alemania occidental) como catalizador. Como agente fosforilante se utilizó O,O-dietilcloro fosforotionato y O,O-dietilcloro fosfato, ambos Aldrich, USA.

Para purificar los productos obtenidos se utilizó Florisil (Florindin, USA) 60-100 mallas, activado durante 1 hr a 1052 antes de ser usado.

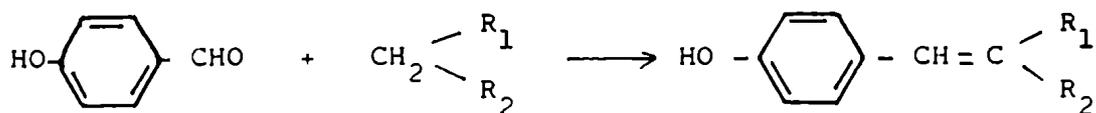
II- SINTESIS DE p-HIDROXIBENCILIDEN SUSTITUIDOS

1) Generalidades

Se obtuvieron todos los compuestos por la condensación de Knoevenagel (65) a partir de p-hidroxibenzaldehido y un compuesto con un grupo metileno activo (en reacción mol a mol), en un solvente anhidro y con una base orgánica como catalizador.

La técnica utilizada, así como las condiciones de trabajo se detallarán para cada producto sintetizado.

La reacción general se puede esquematizar de la siguiente manera:



a) p-hidroxibenciliden nitroetano

Se obtuvo de acuerdo con la literatura (66,67,68) a partir de 0.05 moles de p-hidroxibenzaldehido y 0.05 moles de nitroetano en 12 ml de etanol absoluto y 0.25 ml de n-butil amina. Después de reflujar 8 hr se obtiene un líquido oscuro. Se evapora el solvente en rotavapor (Buchi, USA) obteniéndose como residuo un aceite oscuro que por enfriamiento a -15° solidifica. Se cristaliza por extracciones sucesivas con agua destilada caliente y enfriando en hielo.

b) p-hidroxibenciliden cianoacetato de metilo

De acuerdo con la bibliografía (69) se obtiene a partir de 0.04 moles de p-hidroxibenzaldehido y 0.04 moles de cianoacetato de metilo en 12 ml de dioxano seco, a 0° y agregando 0.16 ml de piperidina. Se deja 24 horas a temperatura ambiente agitando ocasionalmente. Se evapora el solvente en rotavapor y el residuo aceitoso solidifica. Se cristaliza de agua destilada caliente.

c) p-hidroxibenciliden malonitrilo

Se obtuvo de acuerdo con Corson et al. (70) a partir de 0.04 moles de p-hidroxibenzaldehido y 0.04 moles de malonitrilo en 25 ml de metanol absoluto a temperatura ambiente, con agitación mediante una barra magnética y agregando 0.16 ml de piperidina. Se deja 24 horas más a temperatura ambiente, y después de evaporar el solvente en rotavapor el residuo aceitoso oscuro solidifica por enfriamiento. Se cristaliza de agua destilada caliente.

d) p-hidroxibenciliden acetilacetona

Se obtuvo a partir de 0.04 moles de p-hidroxibenzaldehido y 0.04 moles de acetilacetona en 10 ml de etanol absoluto y 0.16 ml de piperidina a temperatura ambiente durante 24 horas. Se evapora el solvente en

rotavapor y el residuo aceitoso oscuro solidifica por enfriamiento. Se cristaliza de agua destilada caliente.

e) p-hidroxibenciliden cianacetamida

Se obtuvo a partir de 0.04 moles de p-hidroxibenzaldehído y 0.04 moles de cianacetamida en 20 ml de dioxano seco. Se calienta a 30° para disolver toda la cianacetamida. A esa temperatura y con agitación se agregan 0.16 ml de piperidina. Se mantiene la agitación y la temperatura 2 horas más, con lo cual todo queda soluble. Luego se deja 24 horas a temperatura ambiente. El sólido formado se filtra y recristaliza de etanol caliente. El filtrado se evapora en rotavapor y el aceite oscuro solidifica por enfriamiento. Se cristaliza de etanol caliente obteniéndose igual producto que el sólido original.

f) p-hidroxibenciliden malonato de etilo

Se obtuvo de acuerdo con Meltzer et al. (71) de 0.03 moles de p-hidroxibenzaldehído y 0.03 moles de malonato de etilo en 60 ml de benceno, agregando 0.7 ml de ácido acético (Atanor, Argentina) y 0.16 ml piperidina. Se refluja con una trampa colectora de agua, obteniéndose un destilado emulsionado. Se continúa hasta no observar más emulsión, se enfría, lava con benceno frío y el sólido obtenido se recristaliza de benceno caliente.

2) CARACTERIZACION DE LOS p-HIDROXIBENCILIDEN SUSTITUIDOS

a) Análisis Elemental: fue realizado por los Laboratorios "Mickroanalytisches Laboratorium" de Alemania Occidental sobre microcantidades de cada uno de los compuestos no mencionados por la literatura.

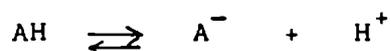
b) Espectro infrarrojo: fue realizado con un espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer 337, en mull de nujol, barriendo la zona entre 3500 y 3000 cm^{-1} , para obtener la frecuencia de vibración del OH^- .

3) DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE DISOCIACION ACIDA DE LOS p-HIDROXIBENCILIDEN SUSTITUIDOS

a) Generalidades

Como es altamente sabido los ácidos y bases se disocian en soluciones acuosas. El grado de esta disociación está gobernada por la constante de disociación del compuesto y del pH de la solución. Ácidos fuertes se ionizan perdiendo protones fácilmente y por lo tanto tienen bajo pKa (pKa = - log Ka).

Para una reacción ácido - base



la constante de disociación Ka se define como

$$K_a = \frac{[A^{-}][H^{+}]}{[AH]}$$

Por otra parte cuando $[A^{-}] = [AH]$, es decir cuando el 50% del ácido está ionizado, por la ecuación de Henderson Hasselbach (72), el pH = pKa.

Para obtener las constantes de disociación de los compuestos sintetizados en II 1) se titulan los mismos en solución hidroalcohólica (debido a problemas de solubilidad de los compuestos en agua) con una base fuerte como el hidróxido de potasio (Merck, Alemania occidental) y el pKa se toma igual al pH en el 50% de la titulación.

b) Materiales utilizados

Hidróxido de potasio: se prepara una solución fresca 0.1N en solución hidroalcohólica pesando 2.80 g de KOH en 500 ml de etanol 96% - agua en relación 1: 1.

c) Procedimiento

Para determinar los pKa de los p-hidroxibencilidenos sustituidos se pesan 100 mg de cada uno de los compuestos objeto de este estudio, y se solubilizan en 5 ml de etanol 96%, completando el volumen a 10 ml con agua destilada.

Para la titulación se utiliza un Titrímetro Radiometer modelo TTT1a con electrodos de vidrio y calomel. Se trabaja a 25 °. Se agita median-

te una barra magnética plana de 1 cm de diámetro. La solución de KOH se agrega en porciones de 0.5 ml desde una bureta de 25 ml. En las cercanías del punto de equivalencia los agregados fueron de 0.1 ml. Se grafica pH vs ml y $\frac{\Delta \text{pH}}{\Delta \text{ml}}$ vs ml obteniéndose las curvas de titulación para cada uno de los compuestos ensayados. A partir del volumen de KOH en el punto de equivalencia se calcula el volumen y pH correspondiente al 50% de la titulación obteniéndose así el pKa.

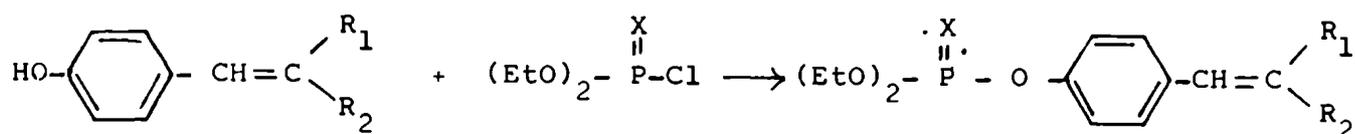
Como compuestos de referencia se titulan de igual manera el p-nitro fenol y p-clorofenol comerciales (Aldrich, USA), obteniéndose los correspondientes pKa en solución hidroalcohólica.

III) SINTESIS DE FOSFOROTIONATOS Y FOSFATOS DE O,O-DIETIL, O-p-BENCILIDEN SUSTITUIDOS

1) Generalidades

Se obtienen por reacción entre los p-hidroxibencilidenos sustituidos y el O,O-dietilcloro fosforotionato y el O,O-dietilcloro fosfato, utilizando como solvente isobutilmetil cetona anhidra (Merck, Alemania occidental), Carbonato de potasio anhidro y Cloruro Cuproso como catalizador (73).

La reacción general corresponde al siguiente esquema



a) Obtención de los fosforotionatos

Todos los compuestos fueron sintetizados a partir de 0.01 mol del p-hidroxibenciliden sustituido correspondiente y 0.60 g de CO_3K_2 anhidro en 15 ml de isobutilmetil cetona anhidra, agitando durante 30 minutos a 80°. Al cabo de ese tiempo se agregan 100 mg de ClCu y 0.01 mol de O,O-dietilclorofosforotionato agitando durante 10 hr a 70- 75°. Una

vez finalizada la reacción, se elimina el solvente en rotavapor y el residuo aceitoso se toma con 30 ml de benceno y lava con CO_3Na_2 5% hasta que la capa acuosa no tome más color (aproximadamente 200 ml). Se lava 3 x 20 ml con agua destilada, se separa la fase bencénica y seca sobre SO_4Na_2 anhidro (Merck, Alemania occidental). Se evapora el solvente en rotavapor y la última porción en corriente de nitrógeno. El aceite obtenido, de color oscuro, se pasa por una columna de Florisil de 15 x 200 mm, recientemente activado. Se eluye de la columna con Cl_3CH (Merck, Alemania occidental), recogiendo fracciones de 5 ml. 20 μl de cada una de estas fracciones se siembran en una cromatoplaaca de Silica Gel GF₂₅₄ (Merck, Alemania occidental), activada a 110 $^{\circ}$ durante 1 hora. El solvente de corrida más apropiado resultó ser una mezcla de n-hexano: acetona:cloroformo en relación 40:10:3. El revelado se realiza con luz ultravioleta. Se utiliza una lámpara ultravioleta marca Ultraviolet modelo UVSL -58 (USA). Las fracciones que revelan una sola mancha se juntan y concentran en corriente de nitrógeno y el residuo, en algunos casos solidifica y en otros queda como un aceite claro, casi incoloro o débilmente amarillento. En los casos en que solidifica se recristaliza de éter de petróleo 40-60 $^{\circ}$.

Todos los compuestos sintetizados fueron puros por Cromatografía en Placa Delgada (TLC) y caracterizados por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y análisis elemental.

b) Obtención de los fosfatos

La síntesis se lleva a cabo en condiciones similares que para los fosforotionatos, pero la reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 5 horas. La purificación de los productos obtenidos se realiza de igual manera que en el caso de los fosforotionatos excepto para los derivados de acetilacetona y nitroetano, en donde la separación por columna de Florisil no es eficiente. En estos casos la purificación se realiza por Cromatografía en placa preparativa sobre placas de Silica Gel GF₂₅₄ y 500 μ de espesor preparadas con un extensor Desaga (Alemania occidental). Como solvente de corrida se utiliza acetona: tolueno: n-hexano: acetato de etilo en relación 2:1:2:1. La visualización de las bandas se realiza con luz ultravioleta a 254 nm.

Las placas preparativas se preparan pesando 55 g de Silica Gel GF₂₅₄ (Merck, Alemania occidental) y 110 ml de agua destilada y agitando vigorosamente durante un minuto. Esta cantidad permite preparar 5 placas de 500 μ .

La banda de interés se eluye de la placa por raspado de la misma y posterior elución con 5 ml de Cl_3CH , mediante agitación ocasional, calentando en baño de agua a 40- 50 $^{\circ}$ durante 15 minutos. Se filtra y evapora el solvente en corriente de nitrógeno.

Se obtienen aceites incoloros o amarillo pálido y en algunos casos sólidos que se cristalizan de éter de petróleo.

En todos los casos se obtienen muestras puras por TLC y se identifican por RMN y análisis elemental.

2) CARACTERIZACION DE LOS COMPUESTOS FOSFORADOS

a) Resonancia magnética nuclear (RMN): se utiliza un espectrómetro Varian T -60 (USA). Las muestras se corren pesando 50 mg de las mismas en 0.5 ml de deuterocloroformo 99% (Merck). Como cero se utiliza Tetrametil silano (TMS) 1%, standard interno (Aldrich, USA). Los corrimientos químicos fueron medidos en partes por millón (ppm) campo descendente respecto del TMS. Para las correlaciones de estructura actividad se tiene en cuenta el pico correspondiente al protón unido a la doble ligadura del grupo sustituyente - $\text{CH} = \text{C} \begin{matrix} \text{R}_1 \\ \text{R}_2 \end{matrix}$.

b) Análisis elemental cuantitativo: Se realiza en el Mikroanalytisches Laboratorium de Alemania, en igual forma que para los p-hidroxiben-
cilidenos sustituidos.

IV) ENSAYOS TOXICOLOGICOS

1) Material biológico

a) se utilizaron ejemplares de Musca doméstica de una colonia susceptible criada y mantenida en INSHER S.A. Una vez nacidas las moscas se pasan a cilindros de cartón con malla de nylon en ambos extremos y fueron alimentadas durante 3 días con una dieta de leche fresca 50% y azúcar 20%. Durante los ensayos de toxicidad se alimentaron sólo

con azúcar 20%.

- b) para los ensayos de toxicidad se utilizaron también ejemplares de ninfa V de Triatoma infestans (vinchuca) de una colonia criada y mantenida en nuestro laboratorio desde el año 1974, en condiciones standard de crianza a 30° y 70% de humedad relativa ambiente. Se alimentan una vez por semana sobre palomas.

2) Acetilcolinesterasas

Las distintas enzimas utilizadas en este estudio fueron:

- a) acetilcolinesterasa de eritrocitos de bovino (AChEB): de tipo comercial obtenida de Sigma (USA), también llamada acetilcolina hidrolasa tipo I (EC Nº 3.1.1.7) como polvo liofilizado de actividad específica 1- 3 unidades por mg de sólido.
- b) acetilcolinesterasa de cabeza de moscas (AChEM): fué preparada a partir de cabezas de moscas de 3-5 días de edad de ambos sexos. Las moscas fueron congeladas a -16° para separar las cabezas y luego fueron homogenizadas en tubo de vidrio previamente enfriado. Para tal fin se utilizó un Homogenizador marca Sorval modelo Omni mixer 17106 con pestle de Teflon. El homogenato crudo , mantenido siempre en baño de hielo, se filtra por lana de vidrio y el filtrado constituyó la correspondiente fracción cruda del preparado enzimático que se utilizó sin posterior purificación.

3) Constante de inhibición bimolecular k_i

a) Generalidades

Una gran variedad de enzimas son inhibidas por compuestos organofosforados.

La reacción entre un inhibidor organofosforado y la enzima colinesterasa (ChE) sigue una cinética de pseudo primer orden y la velocidad de inhibición de la ChE es proporcional a la concentración del inhibidor.

Aldridge (74) propuso que la inhibición irreversible de la AchE por compuestos organofosforados puede ser representada por



donde EI representa la enzima inhibida o fosforilada y deduce una ecuación

$$\ln \frac{A_o}{A_t} = k_i I t$$

donde A_o y A_t son las actividades de la enzima a tiempo cero y t respectivamente, k_i la constante de inhibición bimolecular con unidades de $\text{Mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ y t es el tiempo en minutos e I la concentración molar del inhibidor. Graficando $\ln A_o/A_t$ vs t se obtiene una línea recta de pendiente $k_i I$.

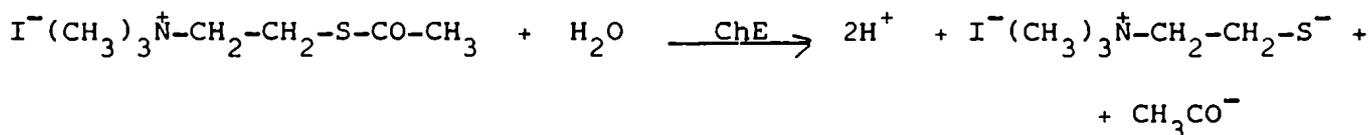
Aunque la potencia inhibitoria de un inhibidor es más adecuadamente expresada por la constante de velocidad k_i , en literatura más antigua es muchas veces expresada por el valor de I_{50} (concentración molar del inhibidor que produce 50% de inhibición de la actividad enzimática a un tiempo fijo de incubación). La relación entre I_{50} y k_i puede ser expresada por la siguiente relación

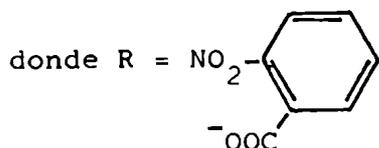
$$I_{50} = \frac{\ln 2}{k_i t}$$

b) Procedimiento de inhibición

La actividad colinesterásica y su inhibición por compuestos organofosforados fue determinada por el procedimiento de Ellman et al. (75).

En este procedimiento, acetiltiocolina (ATC) fue usada como sustrato y el ácido 5,5' ditiobis-(2 - nitro benzoico (DTNB) fue usado como indicador. Cuando el ATC es hidrolizado por las colinesterasas, el anión de tiocolina liberado sufre un intercambio de disulfuro con DTNB. Esto produce el anión del ácido 2-mercapto 5-nitrobenzoico. Este anión tiene una absorción intensa a 412 nm (coeficiente de extinción 1.36×10^4) Las reacciones son ilustradas en las siguientes ecuaciones:





Todas las mediciones espectrofotométricas de la actividad enzimática fueron realizadas a 30°C usando un espectrofotómetro Varian UV-visible 634 de doble haz y celdas de cuarzo de 0.5 cm de paso óptico. Las lecturas se realizaron a 412 nm. El DTNB utilizado fué Aldrich (USA) y el ATC, Flucka (USA). Se preparó una solución de buffer cromógeno pesando 10 mg del ácido DTNB en 100 ml de buffer fosfato 0.2 M pH 7.2. La solución de ATC 12 mM se preparó pesando 34.7 mg en 10 ml de agua destilada, de acuerdo con datos obtenidos de trabajos anteriores de nuestro laboratorio (76).

Procedimiento general

Se coloca en la celda 1 ml de solución buffer cromógeno y 0.05 ml del preparado enzimático, agregando finalmente 0.05 ml del sustrato con lo cual comienza la reacción enzimática que se registra cronometrando la lectura del espectrofotómetro. En la celda de referencia se coloca buffer cromógeno y sustrato, descontándose la autohidrólisis del mismo.

El producto de la reacción es el anión 5-tio,2-nitrobenzoico altamente coloreado ($E_m = 13.600$ a 412 nm).

Se calculó la actividad de la siguiente forma:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{nmoles de sustrato hidrolizado}}{\text{minuto}} = \frac{\Delta \text{Abs/min} \times 2.2 \times 10^3}{13.6}$$

c) Colinesterasa de eritrocitos de bovino

Se hace una dilución de la enzima comercial tal que la lectura de actividad sea 0.160 Δ Abs/min, que correspondería de acuerdo con la expresión antes citada a 35.88 nmoles/min.

Se incubaba a 30°C en baño de agua, utilizando un termostato de circu-

lación Crudo Camaaño 125 (Argentina), y utilizando 0.050 ml de enzima se mide la actividad a tiempo cero (A_0), por agregado de 1 ml de solución buffer cromógeno y 0.050 ml de ATC 12 mM, tal como se describiera anteriormente.

Sobre 0.5 ml de enzima termostatizada a 30°C se agregan 5 µl de solución del inhibidor a ensayar en concentración que en cada caso se detalla, se agita bien para homogenizar y a partir de ese instante se toman los tiempos de inhibición. Las lecturas se realizan sobre 0.050 ml de enzima + inhibidor termostatizado y agregando 1 ml de buffer cromógeno y 0.050 ml ATC, registrando la lectura del espectrofotómetro cada 3 minutos hasta un máximo de 12 minutos.

Finalmente se grafica $\ln A_0/A_t$ vs t para cada compuesto inhibidor ensayado y de la pendiente de las rectas obtenidas se obtiene $k_i I$, de donde, como I se conoce (concentración final de inhibidor) se obtienen los correspondientes valores de k_i .

d) Colinesterasa de cabeza de moscas

Se utilizó un homogenato proveniente de 40 mg de cabezas /ml de solución fisiológica de ClNa 0.7%. Se obtiene una lectura en el espectrofotómetro de aproximadamente 0.150 Δ Abs/min, que corresponde a 24.26 nmoles/min.

Las condiciones de trabajo son iguales que para colinesterasa de eritrocitos de bovino y las concentraciones de inhibidor se indican en cada caso.

4) Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀)

1) Aplicación tópica de los tóxicos

a) Triatoma infestans: Se seleccionaron ninfas V estadio de peso promedio 250 mg. Los insectos se inmovilizan colocándolos en posición dorsal hacia abajo en un cepo diseñado especialmente. Los insectos fueron pesados al mg en una balanza analítica Mettler H 54.

Los compuestos ensayados se prepararon en solución acetónica en concentraciones que en cada caso se indica. Se prepara una solución madre a partir de la cual se hacen las diluciones correspondientes en acetona. Con cada ensayo se hace un blanco topicando con acetona sólo.

Procedimiento

Se topicaron 0.05 μ l / mg de peso de insecto con soluciones de compuesto organofosforado sintetizado en III, utilizando una microjeringa Hamilton (USA) de 50 μ l provista de un "dispenser" repetitivo. La topicación se realiza en la parte ventral del abdomen de los insectos, de acuerdo con lo descrito en bibliografía (77), que habían sido previamente enfriados a 0 $^{\circ}$ para inmovilizarlos. Los insectos controles se trataron de igual manera pero solamente con acetona. Se utilizaron 10 insectos por nivel de concentración de tóxico. Tanto los insectos tratados como los controles, se colocan después del tratamiento en frascos limpios, de vidrio, con un papel plegado en su interior para permitir a los insectos trepar por él. Los frascos se mantienen en una incubadora (Gallenkamp, Inglaterra) a 30 $^{\circ}$. Se observan los resultados de mortalidad a las 24 y 48 horas. Para los cálculos posteriores se tiene en cuenta este último dato si hay diferencias.

- b) Musca doméstica: insectos adultos de 3 días de edad se inmovilizan mediante un flujo continuo de dióxido de carbono (410 ml/ min) en un embudo de vidrio con placa filtrante de 10 cm de diámetro (77). Se separan solamente hembras para los ensayos de toxicidad. Los insectos se topican en la parte ventral del abdomen con una jeringa Hamilton de 50 μ l, con 1 μ l de solución acetónica de los distintos compuestos ensayados, y cuyas concentraciones en cada caso se detallan. Los controles se topican de igual forma con acetona únicamente. Se utilizaron 10 hembras por nivel topicado. Una vez topicados los insectos se pasan a frascos limpios que contienen un algodón prensado embebido en solución de azúcar 20%. Los frascos tapados con gasa se mantienen a temperatura ambiente y los resultados de mortalidad se observan a 24 y 48 horas. Los cálculos se realizan sobre éstos últimos datos.

2) Tratamiento estadístico de los resultados

Existen distintos tratamientos estadísticos de los resultados para evaluar los experimentos de dosis efecto. Se entiende por DL₅₀ la con-

centración de insecticida que mata al 50% de la población.

En nuestro caso para calcular los datos de DL_{50} en base a las lecturas de mortalidad a 48 horas, se utilizó un programa de computación basado en el método estadístico de Lichfield y Wilcoxon (78). Para ello se utilizó la computadora existente en nuestro Instituto, marca DIGITAL PDP modelo 11-60.

Los resultados se obtienen en mg de compuesto ensayado por ml de solución acetónica (las dosis utilizadas se expresan en mg/ ml). Para convertir a $\mu\text{g/g}$ de peso de insecto se utiliza el factor

$$1 \text{ mg / ml} = 50 \mu\text{g / g peso de cuerpo}$$

V) PARAMETROS PARA LA CORRELACION ESTRUCTURA - BIOACTIVIDAD

1) Parámetros fisicoquímicos

a) Constante de Hammett

Dada la expresión

$$\log \frac{K_S}{K_H} = \rho \sigma$$

si conocemos la constante de equilibrio K_S y la constante de Hammett σ para algunos miembros de una serie homóloga en una reacción dada, es posible calcular la constante de reacción ρ y a partir de ese dato calcular los valores de σ de miembros desconocidos de la serie.

En el caso de los fenoles es común utilizar la constante de disociación ácida K_a como constante de equilibrio.

En nuestro trabajo, debido a la poca solubilidad en agua de los p-hidroxibencilidenos sustituidos, se utiliza una solución hidroalcohólica al 50%. Por lo tanto fué necesario calcular la constante de reacción en ese medio. Se obtuvo a partir de los K_a del 4-nitrofenol y 4-clorofenol, obtenidos en iguales condiciones que las muestras en estudio y cuyas constantes de Hammett son $\sigma_{4Cl}^- = 0.23$ y $\sigma_{4NO_2}^- = 1.27$ (30).

Teniendo en cuenta las expresiones

$$\log \frac{K_{a \text{ NO}_2}}{K_{a \text{ H}}} = \rho \sigma_{\text{NO}_2}^- \quad \text{y} \quad \log \frac{K_{a \text{ Cl}}}{K_{a \text{ H}}} = \rho \sigma_{\text{Cl}}^-$$

se deduce que

$$\rho = \frac{\log K_a \text{NO}_2 - K_a \text{Cl}}{\sigma_{\text{NO}_2}^- - \sigma_{\text{Cl}}^-}$$

Una vez obtenido este valor de la constante de reacción, es posible utilizarla para calcular los valores de la constante de Hammett para los sustituyentes de interés en este trabajo. La expresión que se utiliza es la siguiente:

$$\sigma_s^- = \frac{-pK_s + pK_a \text{NO}_2}{\rho} + \sigma_{\text{NO}_2}^- = \frac{11.10 - pK_s}{2.60}$$

Los pKa de los compuestos objeto de este trabajo se determinan como se indicara en II 3).

b) Constante de partición

El coeficiente de partición entre n-octanol (Merck, Alemania occidental) y agua fue determinado para los p-hidroxibencilidenos sustituidos sintetizados según II 1), a partir de los espectros de absorción al ultravioleta.

Se utilizó un espectrofotómetro UV - Visible Varian 634 (USA), acoplado a un registrador Varian A -20 (USA).

Se prepararon soluciones de los compuestos a ensayar de concentraciones $2 \times 10^{-5} \text{M}$ en octanol (saturado en agua).

Se corrió un espectro de absorción para cada uno de los compuestos en estudio entre longitudes de onda de 250 y 360 nm. Después de verificar la proporcionalidad entre absorbancia y concentración se registraron los picos de máxima absorbancia y se utilizó este valor para cuantificar la concentración de los fenoles estudiados en fase octanol (79).

2 ml de la solución octanólica de concentración $2 \times 10^{-5} \text{M}$ de cada uno de los compuestos en estudio, se extraen con 2 ml de agua destilada y se mantienen a 30°C agitando repetidas veces, durante 30 minutos. Una vez completada la partición se repite la medición de absorción.

Los coeficientes de partición se obtienen como

$$P = \frac{\text{concentración en fase octanol}}{\text{concentración en fase acuosa}} = \frac{L_2}{L_1 - L_2}$$

siendo L_1 la lectura inicial de absorción y L_2 la lectura después de la partición con agua.

Teniendo en cuenta el log P del fenol sin sustituir (P_H) obtenido de bibliografía (55) con un valor de $\log 1,46 = 0.1644$, se puede calcular la constante de partición $\tilde{\Pi}$ como

$$\tilde{\Pi} = \log P_S - \log P_H$$

2) Parámetros experimentales

- a) constante de disociación de fenoles
- b) espectro infrarrojo de fenoles
- c) espectro de resonancia magnética nuclear

Las constantes de disociación de fenoles, la frecuencia de vibración de la unión -OH por infrarrojo y el corrimiento químico del protón del grupo -CH = C < fueron utilizados como parámetros experimentales para correlacionar estructura - actividad y sus determinaciones se describen en los puntos II 3), II 2b) y III 2a) respectivamente.

3) Procesamiento de datos

El análisis por regresión múltiple se realizó con un programa de computación especialmente diseñado por el grupo Computación de nuestro instituto y que permite obtener todos los parámetros inherentes a la ecuación de regresión y los datos estadísticos para juzgar la validez de los mismos.

Para este estudio se tomaron en cuenta los coeficientes de correlación múltiples r , los términos independientes, los coeficientes de regresión para cada uno de los parámetros estudiados y como parámetro estadístico los valores de F para la decisión, en base al test F de significancia (80).

Resultados y Discusión

I) O,O-DIETIL,O-p-BENCILIDEN FOSFOROTIONATOS Y FOSFATOS

Los fosforotionatos y fosfatos objeto de este estudio fueron sintetizados a partir de los correspondientes p-hidroxibencilidenos sustituidos en R_1 y R_2 , por condensación con O,O-dietilcloro fosforotionato y O,O-dietilcloro fosfato respectivamente.

a) Obtención de los p-hidroxibencilidenos

Los p-hidroxibencilidenos sustituidos fueron preparados por la reacción de Knoevenagel (65). La condensación de Knoevenagel se definió como una reacción entre un aldehído o cetona y cualquier compuesto que tenga un metileno activo, realizada en presencia de una base orgánica, amoníaco o sus sales. La activación del grupo metileno es debida a la unión directa de un grupo atractor de electrones como son los grupos nitro, ciano o acyl. En la mayor parte de los casos dos de estos sustituyentes son necesarios para producir suficiente activación. El producto primario de la reacción es generalmente un compuesto no saturado (81).

En el presente estudio la reacción transcurre entre el p-hidroxibenzaldehído y como compuestos con metileno activo se utiliza el nitroetano ($\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{NO}_2$), el cianoacetato de metilo ($\text{CN} - \text{CH}_2 - \text{COOCH}_3$), el malonato de etilo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{COOCH}_2\text{CH}_3$), el malononitrilo ($\text{CN} - \text{CH}_2 - \text{CN}$), la cianoacetamida ($\text{CN} - \text{CH}_2 - \text{CONH}_2$) y la acetilacetona ($\text{CH}_3\text{CO} - \text{CH}_2 - \text{COCH}_3$).

Como base orgánica para favorecer la condensación se utilizó piperidina, piridina o n-butilamina, como se indicara en cada caso particular.

Se obtienen productos puros con buenos rendimientos. En la tabla I se resumen las propiedades físicas y químicas, así como la caracterización de los p-hidroxibencilidenos sustituidos en R_1 y R_2 .

TABLA I : Propiedades físicas y químicas y caracterización de los p-hidroxibencilidenos sustituidos

R ₁ , R ₂	Punto fusión	Aspecto físico	Análisis elemental			Rend.
			C	H	H	
a) CH ₃ , NO ₂	125- 6º (lit 125-125.5)	agujas mostaza	--	--	--	15%
b) CN , COOCH ₃	206- 7º	cristales amarillo pálido	calc 65.0 enc 64.84	4.43 4.36		30%
c) CN , CN	187- 9º (lit 188.5-9.5)	cristales amarillo oscuro	--	--	--	35%
d) COCH ₃ , COCH ₃	124- 4.5º	planchuelas amari- llo pálido	calc 70.5 enc 70.49	5.88 5.87		17.4%
e) CN , CONH ₂	>220º D	cristales amarillo pálido	calc 63.8 enc 63.77	4.25 4.19		54%
f) COOEt , COOEt	88- 9º (lit 91- 93º)	cristales blancos	--	--	--	32%

Teniendo en cuenta la formación de compuestos no saturados, cabe esperar la formación de isómeros geométricos. En nuestro caso, la única señal que se obtiene para el protón α bencilidénico $-\text{CH} = \text{C} \begin{matrix} \nearrow \text{R}_1 \\ \searrow \text{R}_2 \end{matrix}$ por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y el definido punto de fusión de los compuestos estudiados permite afirmar que los p-hidroxibencilidenos sustituidos sintetizados, con R_1 distinto a R_2 , no serían mezclas de isómeros cis - trans con respecto a la doble ligadura del sustituyente.

En base a referencias bibliográficas para compuestos de estructura similar (81), podría suponerse que los isómeros obtenidos, en el caso que R_1 fuera un grupo $-\text{CN}$, correspondería a una estructura trans del grupo $-\text{CN}$ con respecto del $-\text{H}$.

b) Obtención de los compuestos fosforilados

Con respecto a la reacción de obtención de los compuestos fosforados, la condensación entre los p-hidroxibencilidenos sustituidos (que en realidad son fenoles sustituidos) y el O,O-dietilcloro fosforotionato o O,O-dietilcloro fosfato, fué realizada en presencia de cloruro cuproso (ClCu) como catalizador y carbonato de potasio (CO_3K_2) como agente salificante (73).

Como métodos alternativos fueron ensayados el uso de trietilamina ($\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$) como catalizador y aceptor de ión cloruro (82) y el uso de metilato de sodio (CH_3ONa) como agente salificante. En ambos casos se obtenían mezclas difícilmente purificables, por lo que el método del ClCu fué adoptado como técnica de rutina para obtener los compuestos objeto de este estudio.

La estructura de los compuestos obtenidos, como ya se mencionara en el caso de los p-hidroxibencilidenos sustituidos, permite prever la existencia de isómeros cis- trans, como ya fuera reportado para otros

insecticidas fosforados (4). En el caso particular del phosdrin, las diferencias de características fisicoquímicas y del espectro de RMN son muy marcadas (83).

Los compuestos objeto de este estudio mostraron puntos de fusión definidos cuando eran productos sólidos y en todos los casos espectros de RMN sin desdoblamientos que hicieran presumir la presencia de mezclas de isómeros. En la tabla II pueden observarse datos fisicoquímicos de los compuestos sintetizados. En ningún caso fué posible establecer si el isómero obtenido fué cis o trans. Cuando R_1 fué un grupo -CN y teniendo en cuenta que la fosforilación de los fenoles no afecta su estructura geométrica y lo ya mencionado para los p-hidroxibencilidenos (punto Ia) podría suponerse también, que en este caso se obtuvieron isómeros trans (del grupo -CN con respecto al -H).

Una técnica apropiada de purificación resultó ser la cromatografía en columna con soporte de Florisil, aunque los rendimientos de los productos fueron en general bajos (5 al 10%).

Excepto el O,O-dietil,O-p-dicianobenciliden fosforotionato y el fosfato correspondiente, que fueron reportados por Sumitomo Chemical Co.(73), los demás compuestos sintetizados, de acuerdo con nuestro conocimiento, no están reportados en literatura.

El análisis por cromatografía en placa delgada (TLC) por la técnica descrita en materiales y métodos, mostró una impureza presente en todos los casos, de R_f intermedio entre el fosforotionato y el fosfato. El producto aislado en el caso del O,O-dietil,O-p-diacetilbenciliden y metilcianoacetil benciliden fosforotionato, permitió obtener un espectro RMN muy similar al producto principal. En base a esta observación y a su comportamiento cromatográfico se atribuyó tentativamente la estructura correspondiente a un producto de reordenamiento:

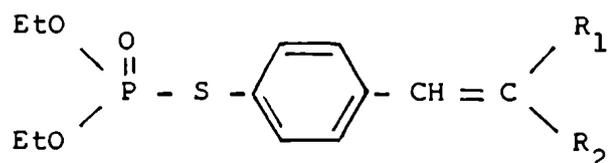
TABLA II : Propiedades físicas y químicas y caracterización de los O,O-dietil,O-p-benciliden fosforotio-
natos y fosfatos R₁ R₂ sustituidos

R ₁ , R ₂	X	Punto fusión	Aspecto físico	Análisis elemental			R _f #		
				C	H	P	S		
a) CH ₃ , NO ₂	S	-----	aceite amarillo	calc enc	47.13 46.92	5.43 5.55	9.37 9.52	9.07 9.05	0.40
b) CN , COOCH ₃	S	61 - 30 [*]	crisetales blancos	calc enc	-- --	-- --	8.73 8.62	9.01 8.91	0.25
c) CN , CN	S	74 - 60 [*] (lit 76-7.5)	crisetales blancos	calc enc	-- --	-- --	-- --	-- --	0.28
d) COCH ₃ , COCH ₃	S	34 - 50 [*]	crisetales blancos	calc enc	53.9 53.73	5.90 5.98	8.71 8.59	8.99 8.95	0.18
e) CN , CONH ₂	S	91 - 20 [*]	crisetales blancos	calc enc	49.4 49.23	5.00 5.01	9.12 9.20	9.41 9.48	0.10
f) COOEt , COOEt	S	-----	aceite amarillo	calc enc	51.92 ---	6.01 --	7.45 7.60	7.92 7.84	0.33
g) CH ₃ , NO ₂	O	-----	aceite amarillo	calc enc	49.52 49.55	5.91 5.93	9.84 9.90		0.13
h) CN , COOCH ₃	O	42 - 50 [*]	crisetales blancos	calc enc	53.10 52.84	5.31 5.40	9.14 9.30		0.06
i) CN , CN	O	52 - 40 [*]	crisetales blancos	calc enc	54.9 54.71	4.90 4.79	10.15 10.23		0.08
j) COCH ₃ , COCH ₃	O	-----	aceite amarillo	calc enc	56.47 56.38	6.20 6.28	9.12 9.05		0.08
k) CN , CONH ₂	O	125 - 60 ⁺	crisetales blancos	calc enc	51.8 51.81	5.24 5.22	9.57 9.76		0.05
l) COOEt , COOEt	O	-----	aceite amarillo	calc enc	54.0 53.95	6.25 6.28	7.75 7.80		0.09

* Los productos fueron cristalizados de éter de petróleo 40 - 600

+ Recristalizado de etanol 960

R_f determinados sobre placa de sílica gel F₂₅₄ Y solvente n-hexano: acetona : Cloroformo (40 : 10 : 3)



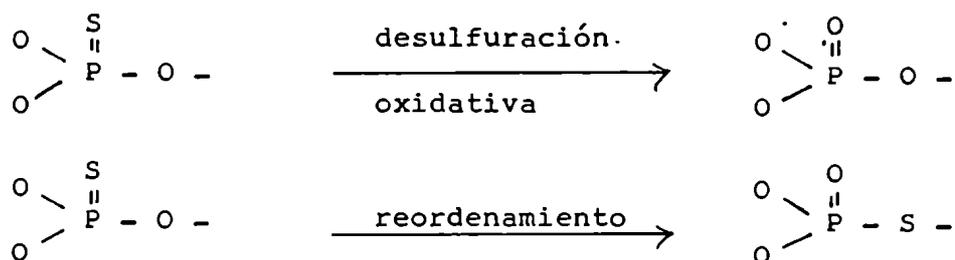
Este reordenamiento entre el azufre y el oxígeno en los fosforotio-
natos ha sido reportado en numerosos compuestos (84).

II) INHIBICION DE LA COLINESTERASA "IN VITRO"

Es sabido que la actividad anticolinesterásica de los fosforotiona-
tos es baja y que su valor tiene poco interés toxicológico ya que la ac-
ción "in vivo" de estos compuestos es debida a los productos de desulfu-
ración oxidativa (conversión de P=S a P=O).

A pesar de esto, la determinación de las constantes bimoleculares
de inhibición de colinesterasa k_i para los fosforotionatos puede ser in-
dicativa de la contaminación de los mismos con fosfatos y fosforotiola-
tos (inhibidores directos)

Estos compuestos pueden ser productos de desulfuración oxidativa o
de reordenamiento



En la tabla III se informan los valores de k_i para los p-benciliden
fosforotionatos R_1R_2 sustituidos, con acetilcolinesterasa de eritrocitos
de bovino(AchEB). Los bajos valores obtenidos indican la poca contamina-
ción de estos compuestos con inhibidores directos.

Nuestras determinaciones de k_i para los p-benciliden fosfatos R_1R_2

TABLA III : Valores para la constante bimolecular de inhibición k_i para la inhibición de acetilcolinesterasa de eritrocitos de bovino para los O,O - dictil, O-p-benciliden fosforotionatos R_1R_2 sustituidos.

	Sustituyente R_1 , R_2		k_i (EB) $\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$
a)	CH_3	, NO_2	360
b)	CN	, COOCH_3	67.5
c)	CN	, CN	460
d)	COCH_3	, COCH_3	960
e)	CN	, CONH_2	360
f)	COOEt	, COOEt	38

sustituídos con acetilcolinesterasa de eritrocitos de bovino (AChEB) y acetilcolinesterasa de cabeza de moscas (AChEM), arrojaron valores de $\ln A_0 / A_t$ en función del tiempo cuya linealidad fué excelente, tal como se observa en figuras 1 y 2 respectivamente.

En tabla IV se recopilan los valores de k_i para los p-benciliden fosfatos R_1R_2 sustituídos con ambas enzimas, (AChEB y AChEM).

Un análisis de los mismos nos indica que estos compuestos son potentes inhibidores de la AChEM y en menor medida de la AChEB. En ambos casos el O,O-dietil,O-p-dicianobenciliden fosfato fué el mejor inhibidor, siendo el más pobre inhibidor el O,O-dietil,O-p-etilmalonobenciliden fosfato.

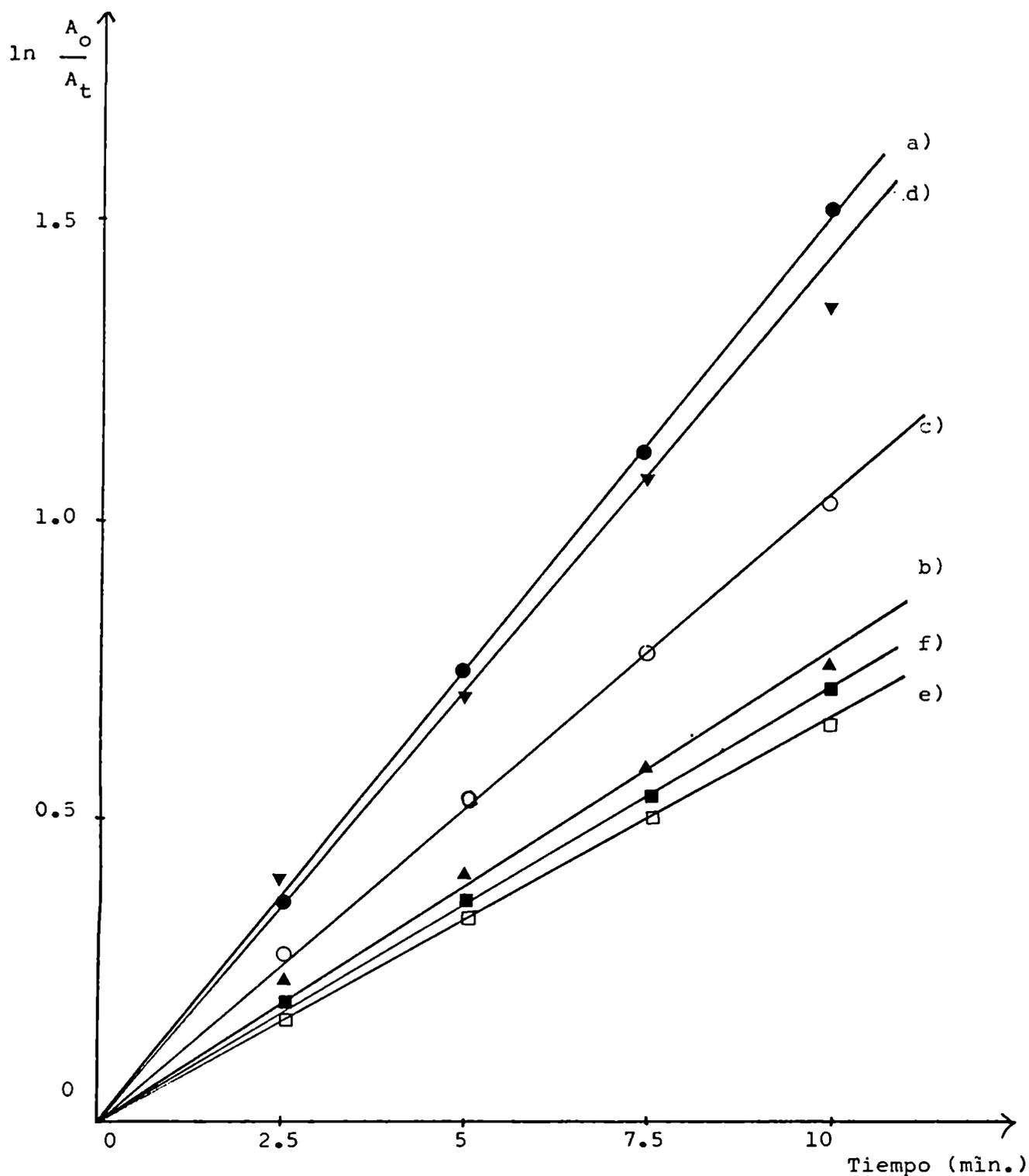
En la tabla IV se indican también los valores de k_i para el O,O-dietil,O-p-nitrofenil fosfato (paraoxón) con AChEB y AChEM, con fines comparativos. La muy alta potencia anticolinesterásica de este compuesto es ampliamente conocida (4, 85).

Una comparación de los k_i en mosca y en eritrocitos de bovino de este compuesto con los valores obtenidos para los p-benciliden fosfatos, nos muestra que son del mismo orden cuando la enzima proviene de cabezas de moscas pero el valor del k_i para el paraoxón es mucho más alto cuando la fuente de enzima es de eritrocitos de bovino. Trabajos anteriores sugieren que marcadas diferencias entre la capacidad anticolinesterásica de los compuestos sobre AChEM y AChEB podrían ser un importante factor de selectividad (86, 87, 88). En el caso particular del O,O-dietil,3-metil,4-nitrofenil fosfato (sumioxón) esta diferencia fué atribuída a una distinta conformación de ambas enzimas, específicamente en lo que hace a la distancia entre sitio aniónico y sitio esterático (87).

En nuestros compuestos, la marcada diferencia entre los k_i para ambas enzimas, también podría atribuirse a diferencias conformacionales entre ambas enzimas. Esta diferencia podría estar ligada al gran volumen

FIGURA 1

Curvas de pseudo primer orden que representan la relación entre $\ln \frac{A_0}{A_t}$ vs tiempo para la inhibición de acetilcolinesterasa de eritrocitos de bovino por p-benciliden fosfatos sustituidos.



a)- ●- diciano $10^{-6}M$; b)- ▲- cianoacetato de metilo $10^{-6}M$; c)- ○- acetilacetona $2 \times 10^{-5}M$; d)- ▼- nitroetano $2 \times 10^{-5}M$; e)- □- cianoacetamida $10^{-6}M$; f)- ■- malonato de etilo $5 \times 10^{-5}M$.

FIGURA 2:

Curvas de pseudo primer orden que representan la relación entre $\ln \frac{A_0}{A_t}$ vs tiempo para la inhibición de acetilcolinesterasa de cabeza de moscas para los p-benciliden fosfatos sustituidos

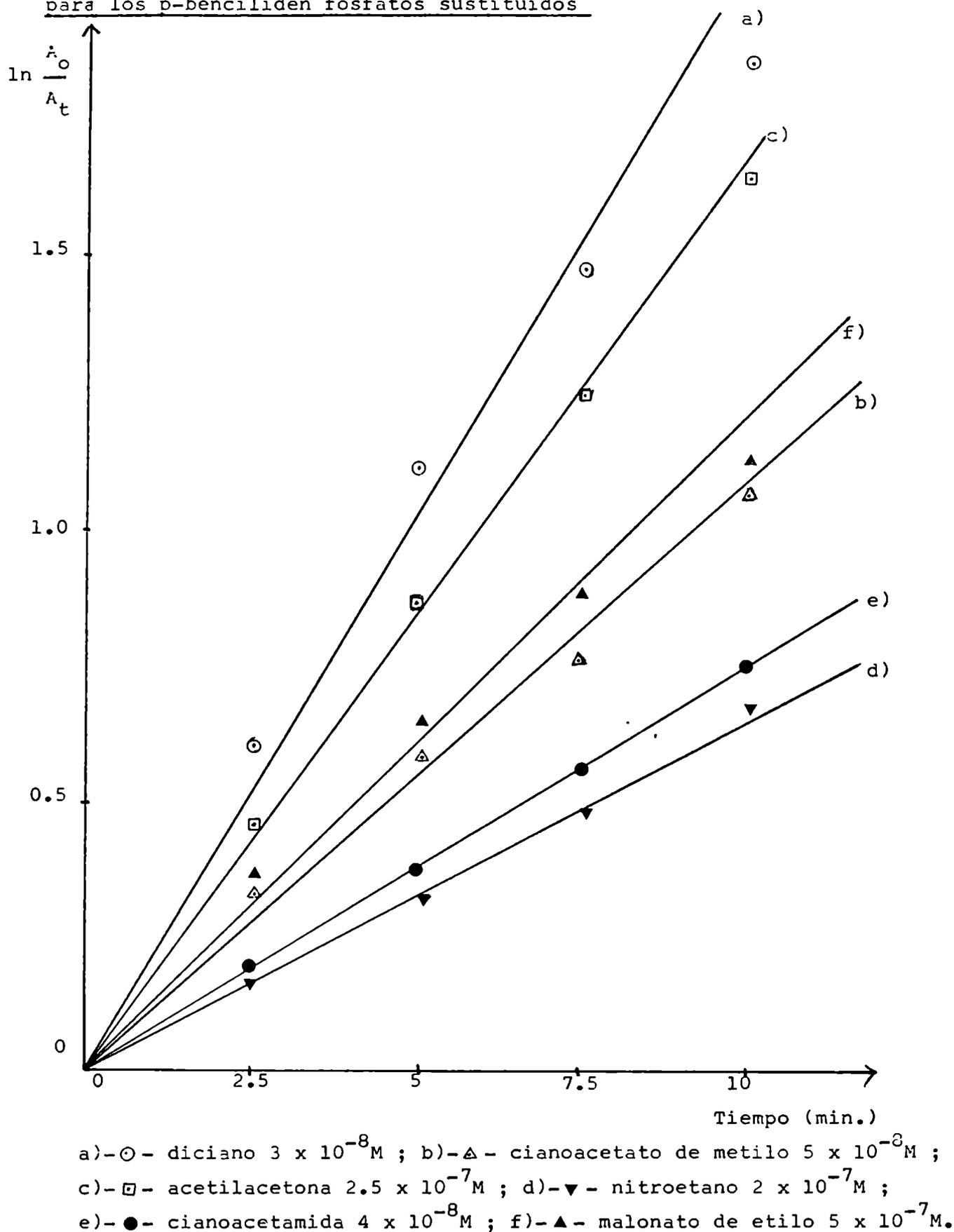


TABLA IV : Valores para la constante bimolecular de inhibición k_i para la inhibición de acetilcolinesterasa de eritrocitos de bovino y de moscas para los O,O dietil, O-p-benciliden fosfatos R_1 - R_2 sustituidos comparados con paraoxón.

Sustituyentes R_1 , R_2	Acetilcolinesterasas			
	Eritrocitos bovino		Moscas	
	k_i mol ⁻¹ min ⁻¹	log k_i	k_i mol ⁻¹ min ⁻¹	log k_i
a) CH ₃ , NO ₂	7.1 x 10 ³	3.8713	3.3 x 10 ⁵	5.5181
b) CN , COOCH ₃	7.9 x 10 ⁴	4.8976	2.3 x 10 ⁶	6.3617
c) CN , CN	1.5 x 10 ⁵	5.1761	6.9 x 10 ⁶	6.8388
d) COCH ₃ , COCH ₃	5.3 x 10 ³	3.7243	6.8 x 10 ⁵	5.8325
e) CN , CONH ₂	6.9 x 10 ⁴	4.8388	1.9 x 10 ⁶	6.2787
f) COOEt, COOEt	2.2 x 10 ³	3.3424	2.4 x 10 ⁵	5.3802
g) NO ₂ (paraoxón)	3.4 x 10 ⁶	6.5315	1.17x 10 ⁶	6.0681

de los sustituyentes R_1 y R_2 de los p-benciliden fosfatos ya que en el caso del paraoxón, que es análogo estructural pero con un sustituyente mucho más pequeño, esta diferencia entre enzimas no se observa.

III) CORRELACION ESTRUCTURA - ACTIVIDAD ANTICOLINESTERASICA

1) Constante de Hammett (σ)

A los fines de evaluar la influencia electrónica de los sustituyentes R_1 y R_2 en los p-hidroxibencilidenos se determinaron las correspondientes constantes de Hammett. Los valores para sustituyentes del tipo $-CH = C-R_1R_2$ no son mencionados en la literatura existente.

Para tal fin se determinaron las correspondientes constantes de disociación ácida y a partir de ese valor se calculó la constante de Hammett para cada sustituyente, tal como se indicara en materiales y métodos. Los valores obtenidos, ya que se trata de fenoles, son σ_p^- (33). En la tabla V se recopilan los valores de K_a y σ_p^- para todos los sustituyentes ensayados.

Dado el considerable error que hubiera introducido en nuestras condiciones (solución hidroalcohólica 50% y método titrimétrico con electrodos de vidrio) calcular la constante de disociación del fenol sin sustituir como referencia para calcular la constante de Hammett, se prefirió obtener ese valor indirectamente utilizando dos fenoles p-sustituídos cuyos σ_p^- fueran conocidos en bibliografía; por ejemplo el p-Cl y p-NO₂ (55) para los cuales se determinó el K_a en iguales condiciones.

Un análisis de los datos obtenidos en tabla V nos muestra que el sustituyente dicianobenciliden ($-CH=C(CN)_2$) resultó ser el mas electronegativo como era de esperar por la doble contribución del grupo -CN, fuerte atractor de electrones ($\sigma_p^- = 0.90$) (89). El menor σ_p^- correspondió al nitrometilbenciliden ($-CH=C \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{NO}_2 \end{matrix}$). Si bien este sustituyente incluye un grupo -NO₂, fuerte atractor de electrones ($\sigma_p^- = 1.27$) (89) su capacidad atractora de electrones está parcialmente neutralizada por el grupo -CH₃, dador de electrones ($\sigma_p^- = -0.17$) (89).

TABLA V : Valores obtenidos para la constante de disociación ácida y para la constante de Hammett σ_s para los p-hidroxibencí-liden R_1R_2 sustituidos.

	Sustituyente R_1 , R_2	pKa	σ_s
a)	NO_2 , CH_3	9.32	0.684
b)	CN , COOCH_3	7.70	1.300
c)	CN , CN	7.40	1.420
d)	COCH_3 , COCH_3	8.95	0.820
e)	CN , CONH_2	8.30	1.070
f)	COOEt , COOEt	9.20	0.730
g)	p- NO_2 (p- NO_2 fenol)	7.80	1.270 #
h)	p-Cl (p-Cl fenol)	10.50	0.230 #

Valores obtenidos de Bibliografía (89).

2) Constante de partición (π)

Con el objeto de evaluar las contribuciones hidrofóbicas de los sustituyentes R_1 y R_2 en los p-benciliden fosfatos, se determinaron los correspondientes coeficientes de partición entre octanol y agua para los p-hidroxibencilidenos objeto de este estudio, de acuerdo con lo establecido en la literatura existente (79).

A partir de estos valores y teniendo en cuenta que el coeficiente de partición para el fenol sin sustituir es 1.46 (55) se calcularon las constantes de partición π para cada uno de los sustituyentes. Los valores obtenidos se recopilan en la tabla VI.

Un análisis de los mismos nos indica que el valor más alto corresponde al p-hidroxibenciliden malonato de etilo ($\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH} = \text{C} (\text{COOEt})_2$) como era de esperar teniendo en cuenta la contribución a la liposolubilidad de los grupos carboxiéster. En cambio el grupo $-\text{CH}=\text{C}(\text{CN})_2$ mostró el menor valor de π indicando la muy baja contribución de los grupos polares $-\text{CN}$ ($\pi = 0.14$) (55) a la liposolubilidad del sistema.

3) Constantes experimentales

Como ya se mencionara en la introducción, los efectos electrónicos de los sustituyentes pueden ser evaluados teniendo en cuenta otros parámetros electrónicos como número de onda de ultravioleta, intensidades de absorción y longitud de onda de infrarrojo, corrimientos químicos en resonancia magnética nuclear, es decir parámetros provenientes de medidas espectrales.

Estos parámetros espectroscópicos son extremadamente valiosos para correlaciones de estructura actividad en lugar de la constante de Hammett (40).

En nuestro caso se utilizaron las frecuencias de vibración del $-\text{OH}$

TABLA VI : Valores obtenidos para el coeficiente de partición P y la constante de partición π para los p-hidroxibencilidenos R₁-R₂ sustituidos.

Sustituyentes R ₁ , R ₂	λ abs nm	L ₁	L ₂	L ₁ - L ₂	$P = \frac{L_2}{L_1 - L_2}$	log P	π #
a) NO ₂ , CH ₃	286	1.12	1.02	0.10	10.2	1.0086	0.844
b) CN , COOCH ₃	352	0.51	0.47	0.04	11.75	1.0700	0.906
c) CN , CN	361	0.81	0.69	0.12	5.75	0.7597	0.595
d) COCH ₃ , COCH ₃	331	0.74	0.70	0.04	17.5	1.2430	1.079
e) CN , CONH ₂	346	1.07	1.00	0.07	14.29	1.1550	0.991
f) COOEt , COOEt	320	1.03	1.02	0.01	102	2.0086	1.844

fue calculado teniendo en cuenta que $\log P_H = \log 1.46 = 0.164$ (55).

de los p-hidroxibencilidenos en el infrarrojo (ν) y el corrimiento químico del protón α bencilidénico en RMN (δ) como parámetros cuyo mayor o menor corrimiento podría indicar una mayor o menor capacidad atractora de electrones por parte de los sustituyentes.

En la tabla VII se dan los valores para las frecuencias de vibración del -OH para los p-hidroxibencilidenos por IR y los corrimientos químicos del protón α de los p-benciliden fosfatos sustituidos.

4) Correlación estructura - actividad anticolinesterásica

Como ya se mencionara en la introducción está ampliamente aceptada la influencia de los efectos inductivos de los sustituyentes de los O,O-di-*alquil* fenil fosfatos sustituidos, sobre la actividad anticolinesterásica de los mismos (55, 74, 84). En algunos casos también ha sido reportada la influencia de las interacciones hidrofóbicas entre colinesterasa y los fosfatos en la capacidad inhibitoria de los mismos (55).

En el caso particular de los fosforoamidatos, se encontró también que los efectos estéricos de los grupos unidos al nitrógeno amídico influenciaba la actividad inhibitoria de los mismos (84, 88), pero no ha sido reportado a nuestro conocimiento similar influencia del efecto estérico de los sustituyentes de los fenil fosfatos.

En nuestro caso intentamos verificar la influencia electrónica e hidrofóbica de los sustituyentes de los p-benciliden fosfatos sobre la actividad anticolinesterásica de los mismos en AchEM y AchEB.

Como parámetros representativos de efectos electrónicos usamos la constante de Hammett del sustituyente, el corrimiento químico del protón α bencilidénico de los fosfatos y la frecuencia de vibración del -OH en IR de los p-hidroxibencilidenos R_1 y R_2 sustituidos.

En la tabla VIII se informan los tipos de correlación obtenidos en

TABLA VII : Valores obtenidos para las constantes experimentales basados en espectros infrarrojo (ν) y resonancia magnética nuclear (δ).

Sustituyentes	ν cm ⁻¹ #	δ (ppm) *
a) NO ₂ , CH ₃	3390	8.08
b) CN , COOCH ₃	3345	8.23
c) CN , CN	3360	7.97
d) COCH ₃ , COCH ₃	3322	7.40
e) CN , CONH ₂	3200	8.10
f) COOEt , COOEt	3318	7.67

Valores obtenidos a partir de los p-hidroxibencilidencs.

* Valores obtenidos a partir de los p-benciliden fosfatos.

TABLA VIII : Parámetros estadísticos y ecuaciones de regresión obtenidas para acetilcolinesterasa de eritrocitos de bovino y acetilcolinesterasa de cabeza de moscas y los O,O-dietil, O-p-bencilidien fosfatos sustituidos.

VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLE DEPENDIENTE	N	r	F	SIGNIFICACION ESTADISTICA	ECUACION DE REGRESION
$\log k_i$ (EB)	σ^-	6	0.9280	24.81	>97.5%	$\log k_i$ (EB) = $2.27 \sigma^- + 2.03$
$\log k_i$ (EB)	σ^-, π	6	0.9606	17.91	>95 %	$\log k_i$ (EB) = $1.82 \sigma^- - 0.55 \pi + 3.05$
$\log k_i$ (EB)	δ	6	0.1775	0.13	<95 %	$\log k_i$ (EB) = $- 0.002 \delta + 11.12$
$\log k_i$ (EB)	δ, π	6	0.8255	3.21	<95 %	$\log k_i$ (EB) = $- 0.004 \delta - 1.48 \pi + 19.62$
$\log k_i$ (EB)	δ	6	0.7158	4.20	<95 %	$\log k_i$ (EB) = $1.58 \delta - 8.25$
$\log k_i$ (EB)	δ, π	6	0.8606	4.28	<95 %	$\log k_i$ (EB) = $1.05 \delta - 0.96 \pi - 3.05$
$\log k_i$ (M)	σ^-	6	0.9648	53.92	>99.5%	$\log k_i$ (M) = $1.74 \sigma^- + 4.29$
$\log k_i$ (M)	σ^-, π	6	0.9807	37.77	>95 %	$\log k_i$ (M) = $1.50 \sigma^- - 0.29 \pi + 4.82$
$\log k_i$ (M)	δ	6	0.1327	0.07	<95 %	$\log k_i$ (M) = $- 0.001 \delta + 9.78$
$\log k_i$ (M)	δ, π	6	0.7707	2.19	<95 %	$\log k_i$ (M) = $- 0.003 \delta - 1.02 \pi + 15.66$
$\log k_i$ (M)	δ	6	0.4695	1.13	<95 %	$\log k_i$ (M) = $0.76 \delta - 0.02$
$\log k_i$ (M)	δ, π	6	0.7314	1.73	<95 %	$\log k_i$ (M) = $0.31 \delta - 0.83 \pi + 4.46$

cuanto al coeficiente de correlación r , la ecuación de regresión y la significancia estadística de la misma a través del parámetro estadístico F .

La buena correlación encontrada entre el $\log k_i$ EB y el $\log k_i$ M (coeficientes de correlación 0.9280 y 0.9648 respectivamente) con la constante de Hammett de los sustituyentes $-CH = C-R_1R_2$ demuestra la decisiva influencia electrónica de los mismos sobre la constante bimolecular de inhibición. Esta observación está de acuerdo con similares realizadas sobre otros sustituyentes de fenil fosfatos (55, 74, 84).

La introducción de la constante hidrofóbica π mejora ligeramente la correlación para ambas enzimas (coeficiente de correlación 0.9606 y 0.9807 respectivamente) y la significación estadística de la nueva correlación es mayor del 95%. A pesar de esto la introducción de π no demostró ser estrictamente significativa ($F = 2.39$ y 2.42 respectivamente). Estas observaciones sugieren que la interacción hidrofóbica entre los p-benciliden fosfatos y las acetilcolinesterasas ensayadas no tendría mayor influencia sobre la constante bimolecular de inhibición.

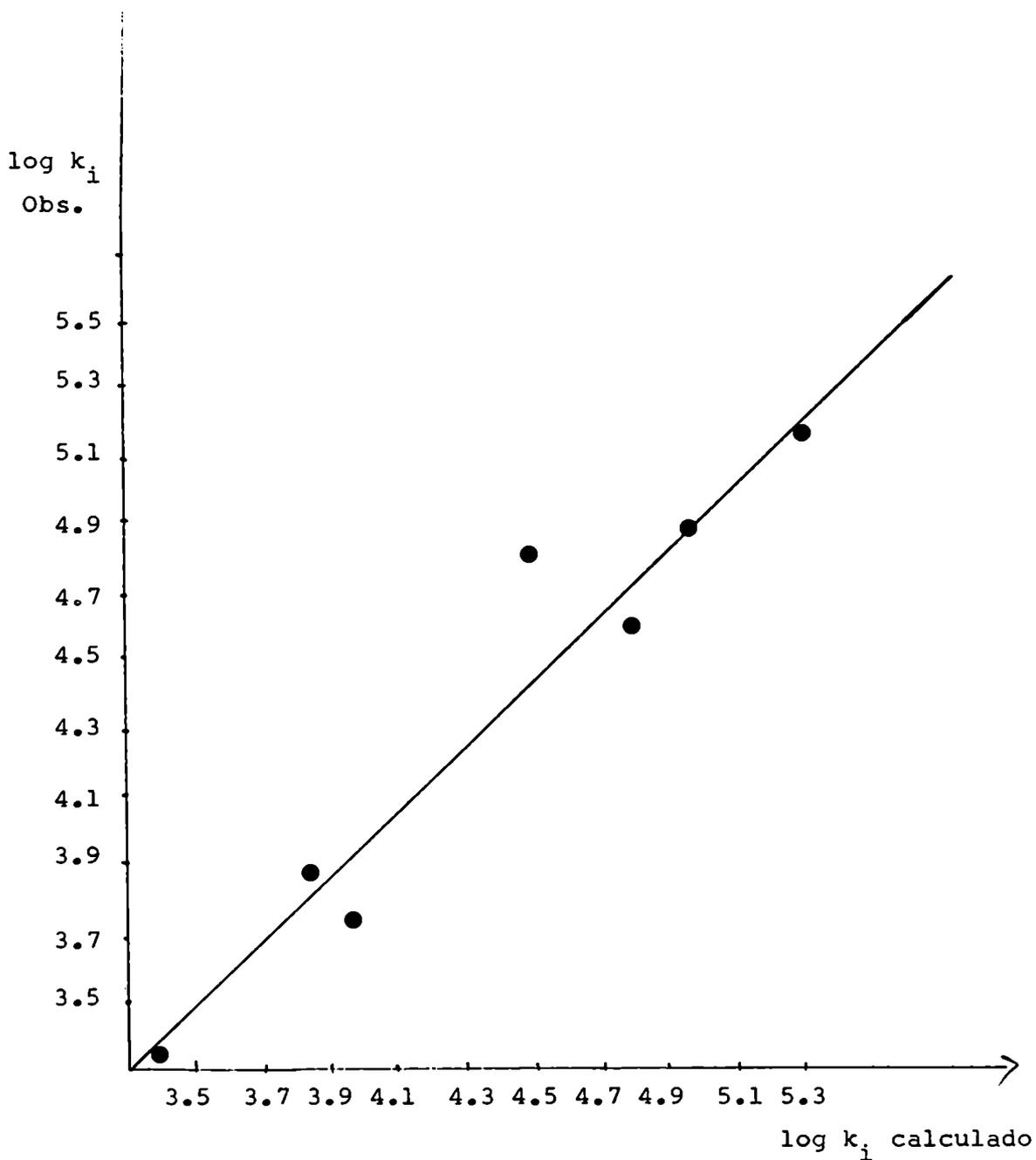
En las figuras 3 y 4 se pueden observar los gráficos que vinculan los valores observados con los calculados para el $\log k_i$ para AchE de eritrocitos de bovino y de moscas. La buena linealidad que se aprecia en los mismos demuestra el alto grado de correlación obtenido.

En la tabla VIII también pueden observarse las correlaciones obtenidas con los parámetros experimentales espectroscópicos ν y δ que serían indicativos también, de efectos electrónicos. Un análisis de estos resultados nos muestra que ninguno de estos parámetros es significativo, como queda claramente demostrado por los bajos coeficientes de correlación obtenidos. La introducción de la constante hidrofóbica π , mejora sensiblemente la correlación.

Esta inesperada falta de correlación al utilizar las constantes

FIGURA 3 :

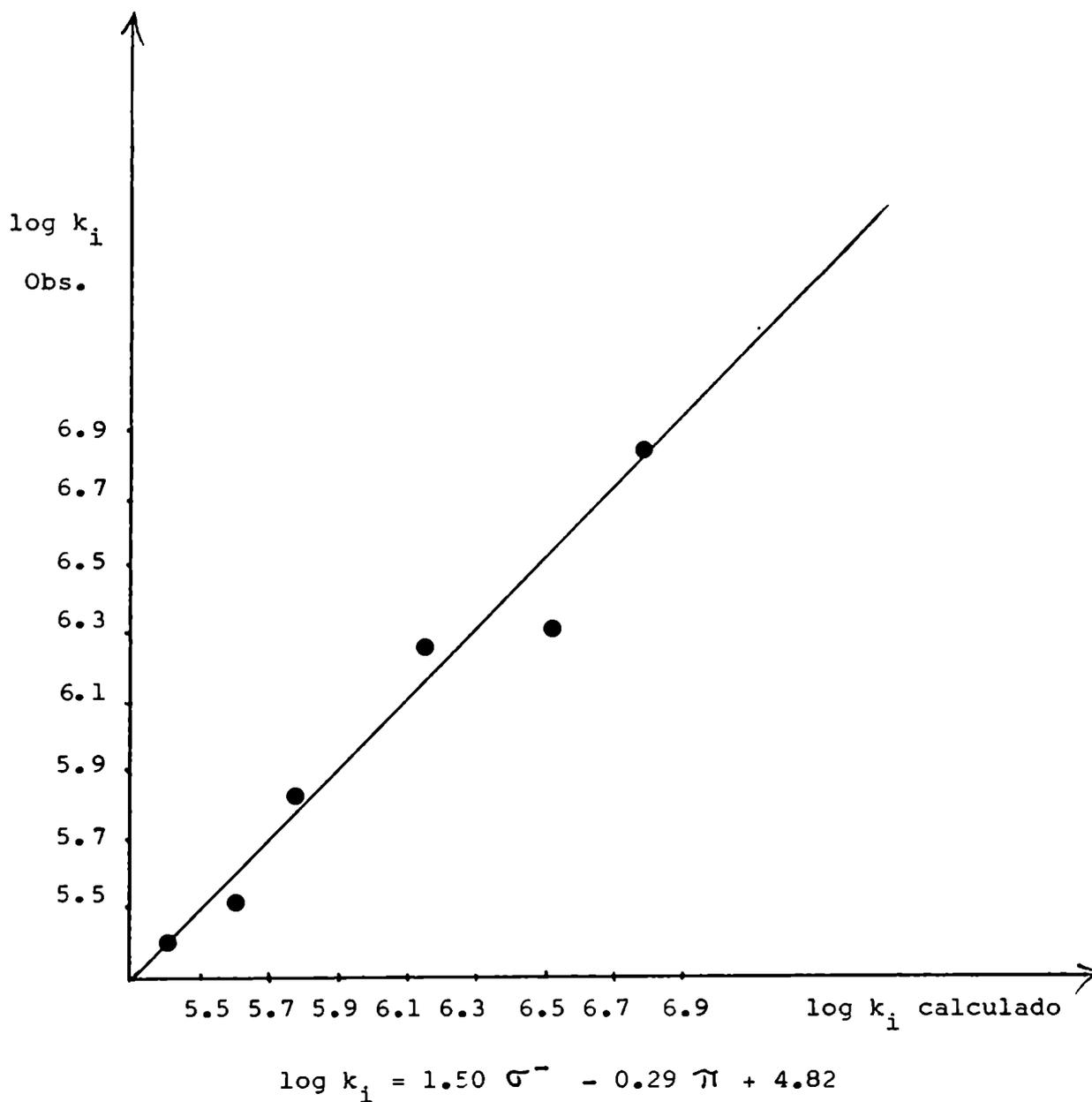
Relación entre el $\log k_i$ para acetilcolinesterasa de eritrocitos de bovino y el $\log k_i$ calculado por regresión para los p-benciliden fosfatos sustituidos.



$$\log k_i = 1.82 \sigma^- - 0.55 \tilde{\pi} + 3.05$$

FIGURA 4:

Relación entre el $\log k_i$ para acetilcolinesterasa de cabeza de moscas y el $\log k_i$ calculado por regresión para los p-benciliden fosfatos sustituidos.



espectroscópicas no es fácil de explicar ya que se podría suponer que las mismas representaban los efectos electrónicos de los sustituyentes y en ese caso los $\log k_i$ correlacionarían muy bien con los correspondientes σ . Un intento de verificar si δ y δ correlacionaban con σ arrojaron coeficientes de correlación de 0.0628 y 0.4893 respectivamente demostrando que las constantes espectroscópicas estarían influenciadas por otros efectos además de los electrónicos, probablemente se trate de efectos estéricos (80).

Como ya se mencionara en el punto II, la comparación de los valores de k_i de eritrocitos de bovino y de moscas de los p-benciliden fosfatos sustituidos con los correspondientes a paraoxón (Tabla IV), sugieren una diferencia notable entre este compuesto y los sintetizados por nosotros, respecto a la capacidad anticolinesterásica frente a las distintas enzimas. Esta diferencia queda claramente evidenciada cuando se incluyen en la correlación los valores del $\log k_i$ (EB), $\log k_i$ (M), σ y π para el paraoxón. Las ecuaciones, los valores de r y F obtenidos incluyendo el paraoxón fueron los siguientes:

$\log k_i$ (EB) = 2.95 σ^- + 1.55	r= 0.8143	F= 9.84
$\log k_i$ (EB) = 1.87 σ^- - 1.13 π + 3.76	r= 0.8866	F=12.40
$\log k_i$ (M) = 1.55 σ^- + 4.42	r= 0.9172	F=26.49
$\log k_i$ (M) = 1.49 σ^- - 0.07 π + 4.56	r= 0.9183	F=21.48

IV) TOXICIDAD EN INSECTOS

Los p-benciliden fosforotionatos y fosfatos R_1R_2 sustituidos fueron ensayados en sus propiedades insecticidas sobre cepas susceptibles de moscas (Musca doméstica) y vinchuca (Triatoma infestans).

Los valores de DL_{50} obtenidos se resumen en la tabla IX. Un análisis de los valores obtenidos para los fosforotionatos nos indica que excepto

TABLA IX : Valores que representan la acción letal sobre moscas y vinchucas de los O,O-diethyl O-p-benciliden fosforotona-
tos y fosfatos correspondientes comparados con Parati6n.

	SUSTITUYENTE		X	DL ₅₀ µg/g	
	R ₁	R ₂		MOSCAS	VINCHUCAS
a)	NO ₂	CH ₃	S	128.7 (186.1 - 88.5)	>>300
b)	CN	COOCH ₃	S	255 (384 - 169)	>>300
c)	CN	CN	S	>800	>> 300
d)	COCH ₃	COCH ₃	S	84 (43 - 16)	114(161-15)
e)	CN	CONH ₂	S	>7800	>>300
f)	COOEt	COOEt	S	613.2(777.9 - 483.4)	>>300
g)	Parati6n		S	2.4 (2.95 - 1.95)	---
h)	NO ₂	CH ₃	O	>>700	>>700
i)	CN	COOCH ₃	O	21 (78 - 11.5)	>>800
j)	CN	CN	O	933 (2308 - 377)	>>700
k)	COCH ₃	COCH ₃	O	>>300	>>300
l)	CN	CONH ₂	O	> 1000	>>300
m)	COOEt	COOEt	O	>>300	>>800

los derivados de cianoacetamida y dinitrilo, los compuestos tienen cierta acción insecticida sobre moscas. El más activo resultó ser derivado de diacetilo.

En figuras 5 y 6 se grafican las rectas de mortalidad (log dosis vs mortalidad en escala probit) para cada uno de los compuestos ensayados.

Inesperadamente los fosfatos, excepto los derivados de cianoacetato de metilo y del dinitrilo, fueron totalmente inactivos. En efecto, como ya se mencionara, la acción tóxica de los fosforotionatos es debida a su activación "in vivo" a los correspondientes análogos oxigenados. De acuerdo con esto, siendo los fosfatos los compuestos más activos, se debiera esperar una mayor toxicidad si se aplican directamente estos compuestos. En nuestro caso se observa una mayor toxicidad para los fosforotionatos que para los correspondientes fosfatos, como puede apreciarse en tabla IX, excepto para los derivados de cianoacétato de metilo y de dinitrilo.

Para encontrar una explicación para esta aparente anómala diferencia de toxicidad, debieran tenerse en cuenta los distintos procesos parciales que en conjunto determinan la toxicidad. Sun (20) analizó el proceso de intoxicación con insecticidas en base a los tres procesos fundamentales de penetración, activación y detoxificación. En su análisis gráfico este autor hace énfasis en la acumulación del metabolito activo como condicionante de la toxicidad. Esta acumulación está regulada por la eficiencia de los tres procesos. La posibilidad que un oxón penetre más lentamente que un fosforotionato, sumado a eficientes mecanismos de detoxificación alejados del target, podrían resultar en una menor acumulación del compuesto si se compara con la penetración y posterior activación del correspondiente fosforotionato.

Probablemente los mecanismos de detoxificación que vuelven inocuos a los oxones sean oxidativos, a través de enzimas microsomales oxidasas

FIGURA 5 :

Curvas de mortalidad de Musca doméstica por aplicación tópica de los p-benciliden fosforotionatos y fosfatos R_1R_2 sustituidos.

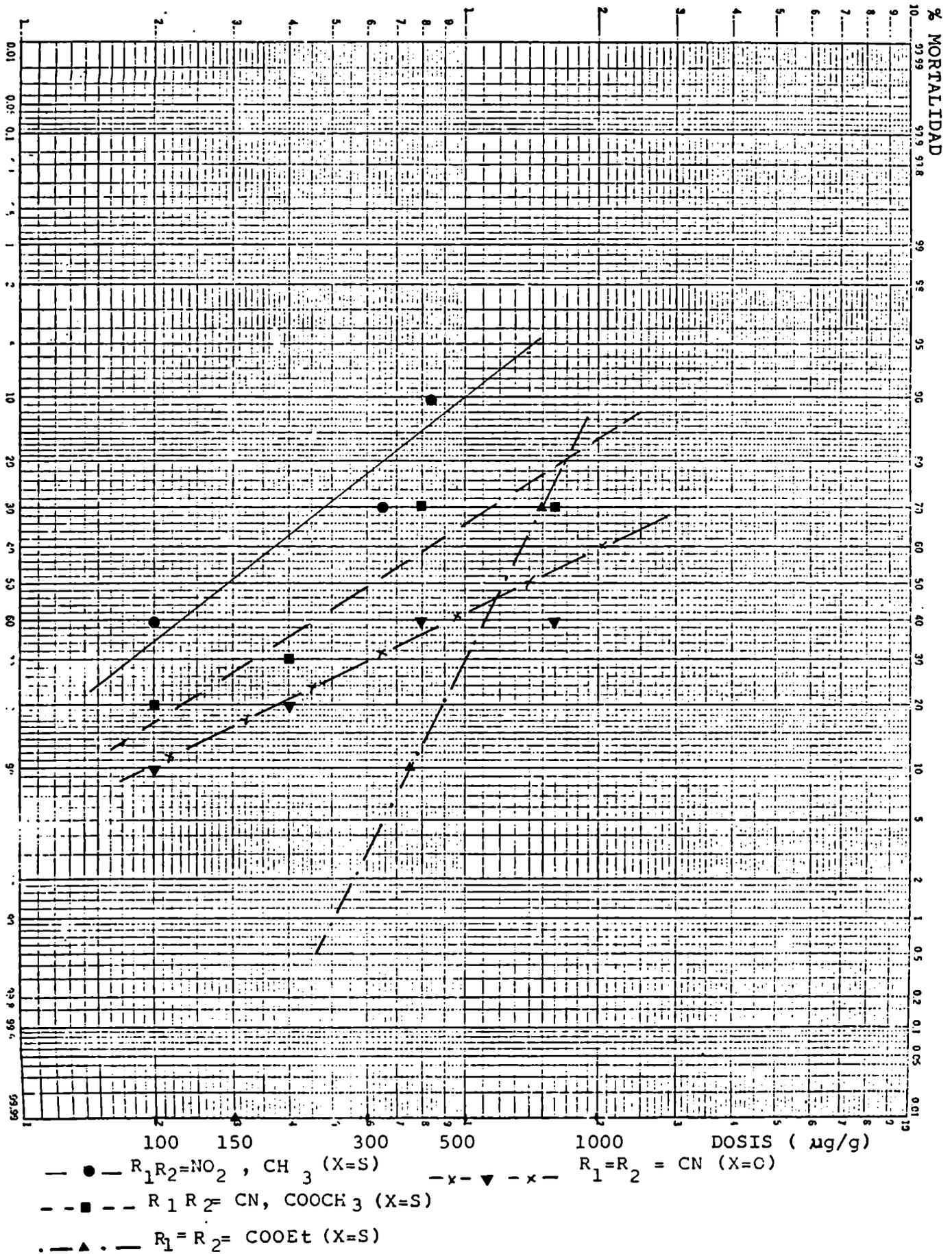
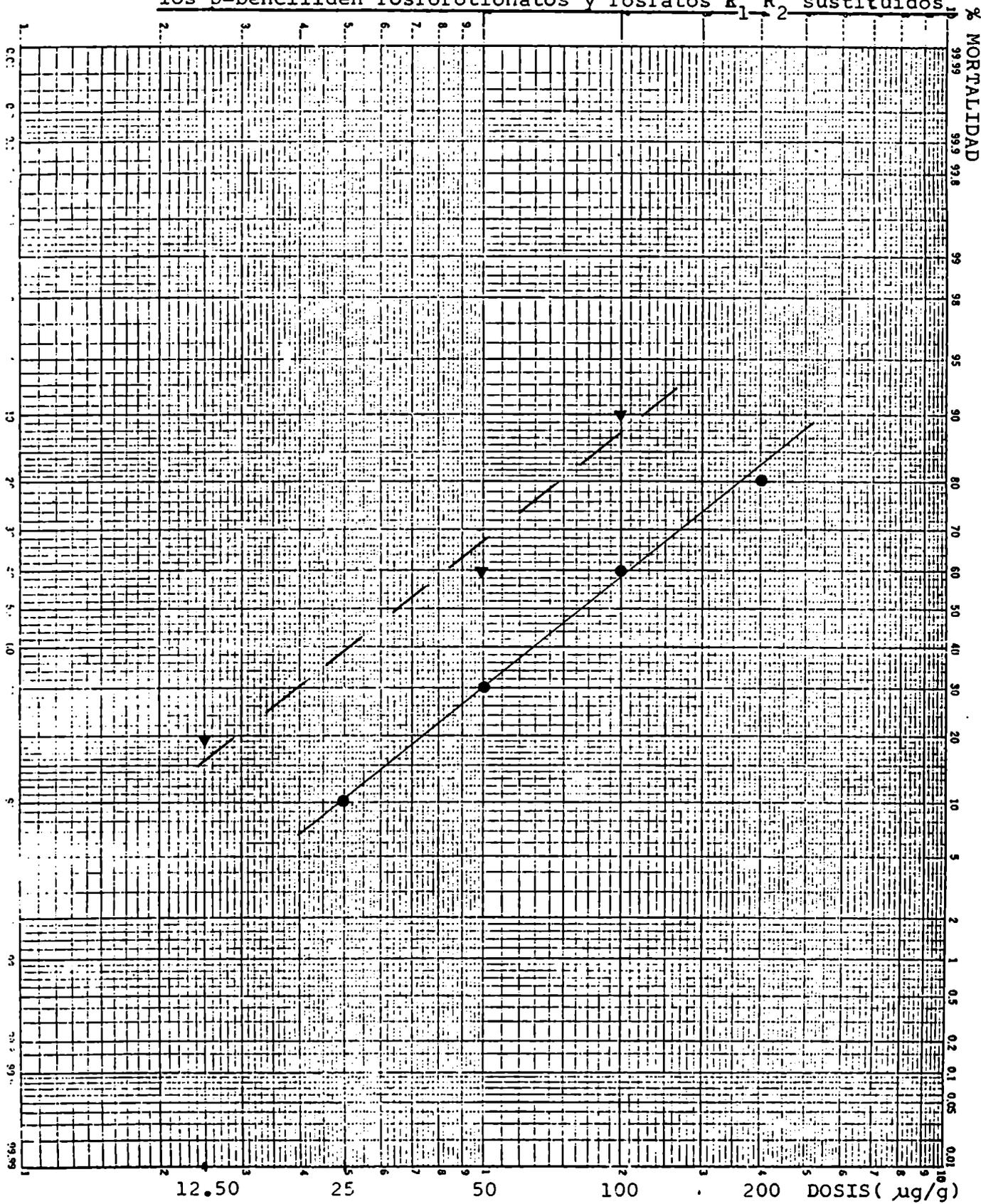


FIGURA 6:

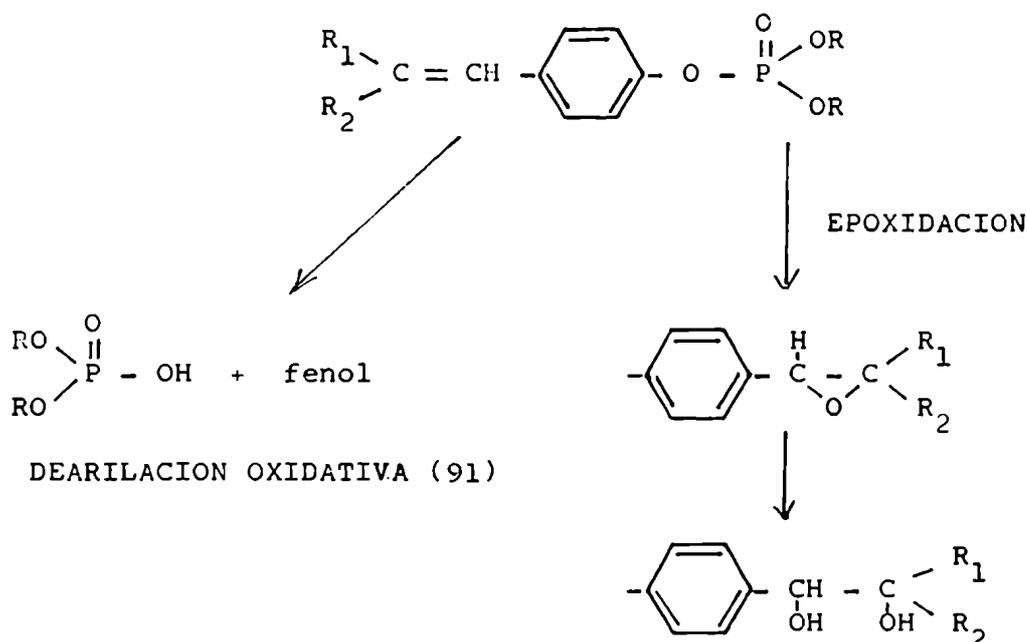
Curvas de mortalidad de Musca doméstica por aplicación tópica de los p-benciliden fosforotioatos y fosfatos R₁ R₂ sustituidos.



— ● — R₁ = R₂ = COCH₃ (X=S)

- - ▼ - - R₁, R₂ = CN, COOCH₃ (X=O)

de función mixta (MFO), a través de las siguientes vías hipotéticas:



Para evaluar estas vías metabólicas se utilizó el butóxido de piperonilo, reconocido inhibidor de enzimas microsomales (92).

20 moscas fueron tratadas con p-benciliden dinitrilo fosfato y butóxido de piperonilo en solución acetónica, en dosis de 5 mg/ml y 25 mg/ml por separado y en conjunto, con los siguientes resultados:

COMPUESTO	DOSIS mg/ ml	MORTALIDAD
Butóxido de piperonilo	25	5%
derivado de dinitrilo	5	30%
mezcla de ambos	5 + 25	95%

Los valores obtenidos muestran un claro efecto sinergista del butóxido de piperonilo sobre el derivado fosforado del dinitrilo. Esta potenciación de la toxicidad avalaría la expuesta hipótesis respecto a po-

sibles mecanismos oxidativos degradativos de los p-benciliden fosfatos como causa de su baja acción insecticida in vivo. Suprimida esta vía por el butóxido de piperonilo se incrementa considerablemente la toxicidad de los oxones.

Cuando la acción insecticida fue ensayada sobre vinchucas, se observó que los compuestos eran inactivos, excepto el derivado de acetilacetona (tabla IX). Para este compuesto la DL_{50} fué de 114 $\mu\text{g}/\text{gr}$ lo que indica una discreta actividad si se compara con valores para otros insecticidas comerciales utilizados para combatir la vinchuca (92) (malatión $DL_{50} = 32 \mu\text{g}/\text{g}$; DDVP = 26.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ (77).

Respecto a una posible correlación entre la estructura de los compuestos y la actividad insecticida "in vivo" sobre moscas, la toxicidad de los distintos p-benciliden fosforotionatos debería ser función del π y de su actividad anticolinesterásica intrínseca. Esto surge de tener en cuenta que la cantidad de un compuesto bioactivo externamente aplicado a un organismo vivo que llega al sitio de acción debiera ser proporcional al coeficiente de partición entre octanol - agua, si no se consideraran diferencias en la velocidad de metabolismo degradante y activante (93).

El análisis por regresión de los valores de DL_{50} obtenidos para moscas en función de los correspondientes π y k_i es muy pobre y por lo tanto no se cumpliría lo anterior.

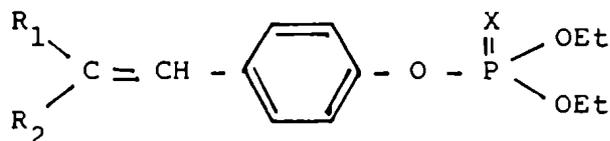
Otra posibilidad de correlacionar la actividad "in vivo" con la estructura de los compuestos activos es a través de la aproximación de Hansch (56), que sugiere que el $\log 1/C$ (donde C es la actividad biológica) es proporcional a interacciones hidrofóbicas (π) y a efectos electrónicos (σ) y estéricos (E_s). Esta aproximación tampoco se cumple, aunque cabe destacar que los factores estéricos no pudieron ser considerados ya que los valores para estos sustituyentes no figuran en tablas ni fué posible calcularlos.

Estos resultados son lógicos si se tiene en cuenta que el modelo propuesto no tiene en cuenta diferencias de velocidad en el metabolismo activante de los compuestos ($P=S$ a $P=O$) o en el metabolismo degradante. Por otra parte es posible que existan diferencias cualitativas en el metabolismo degradante, por ejemplo acción de carboxiesterasas sobre grupos $R=COOEt$, o sea que la suposición de similar velocidad de metabolismo activante o degradante probablemente sea errónea pese a la analogía estructural de los compuestos.

Resumen y Conclusiones

RESUMEN Y CONCLUSIONES

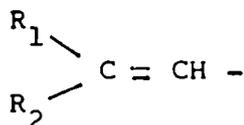
1 - Se sintetizaron nuevos compuestos fosforados de estructura general



y se caracterizaron sus estructuras.

2 - Se determinó la potencia anticolinesterásica de los correspondientes fosfatos, con X = O, midiendo las constantes bimoleculares de inhibición (k_i) sobre acetilcolinesterasa de cabeza de moscas y de eritrocitos de bovino.

3 - Se obtuvieron experimentalmente las constantes σ y π , que representan los efectos electrónicos e hidrofóbicos respectivamente, para cada uno de los sustituyentes del núcleo aromático.



4 - Se encontró una buena correlación entre el poder anticolinesterásico sobre enzimas de cabezas de moscas y de eritrocitos de bovino para los compuestos estudiados y los efectos electrónicos e hidrofóbicos de los respectivos sustituyentes. El análisis por regresión arrojó las siguientes ecuaciones:

$$\begin{array}{l} \log k_i \text{ (EB)} = 1.82 \sigma^- - 0.55 \pi + 3.05 \quad r = 0.9606 \quad F = 17.91 \\ \log k_i \text{ (M)} = 1.50 \sigma^- - 0.29 \pi + 4.82 \quad r = 0.9807 \quad F = 37.77 \end{array}$$

5 - El intento de incluir en las correlaciones al paraoxón conjuntamente con los compuestos sintetizados evidenció una diferencia básica

- -

de comportamiento entre ambas enzimas ensayadas. En el caso de acetilcolinesterasa de cabeza de moscas, el paraoxón mostró un poder inhibitorio discretamente correlacionable con nuestros compuestos, mientras que para enzima de eritrocitos de bovino no fué así. Este distinto comportamiento fué atribuído a factores estéricos que pondrían en evidencia diferencias estructurales entre las enzimas.

6 - Los fosforotionatos mostraron acción insecticida sobre moscas, no así los fosfatos. Esta anómala diferencia de toxicidad fué interpretada como debida a un eficiente metabolismo microsomal degradante que actuaría sobre los fosfatos. La incidencia de esta vía metabólica detoxificante en la falta de toxicidad de estos compuestos fué demostrada al determinarse un considerable sinergismo por parte del butóxido de piperonilo.

7 - Los compuestos sintetizados no evidenciaron actividad insecticida sobre Triatoma infestans excepto el derivado con $R_1 = R_2 = \text{COCH}_3$, cuya DL_{50} fué 114 $\mu\text{g/g}$.

Bibliografia

1. Matsumura F., "Toxicology of Insecticides" Plenum Press, N.Y.(1965).
2. Schrader G., Monographie N^o 62, Verlag Chemie, Wienheim(1952).
3. Metcalf R.L., "Organic Insecticides. Their Chemistry and Mode of Action" , Interscience N.Y.(1955).
4. Eto M., "Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry" CRC Press,(1974).
5. O'Brien R.D., "Drug Design" Ed. E.J.Ariens, Vol II, Cap 3, Academic Press, N.Y.(1971).
6. Adrian E.D.,Feldberg W.,y Kilby B.A., Br.J.Pharmacol.,2, 56 (1947).
7. O'Brien R.D., "Toxic Phosphorus Esters, Chemistry, Metabolism and Biological Effects" Academic Press, N.Y. (1960).
8. Aldridge W.N., Biochem.J., 54, 601 (1953).
9. Aldridge W.N. y Reiner E., "Structure and Reactions of DFP sensitive Enzymes" Ed. E.Heilbronn (1967). pag. 125.
10. Reiner E. y Aldridge W.N., Biochem.J., 105, 171 (1967).
11. Main A.R., Science 144, 992 (1964).
12. Main A.R., "Structure and Reactions of DFP Sensitive Enzymes", Ed. E.Heilbronn (1967). pag. 129.
13. O'Brien R.D., Mol.Pharmacol., 4, 121 (1968).
14. Krupka R.M., Biochemistry, 5 1988 (1966).
15. Fukuto T.R., Boletin de la Organización Mundial de la Salud 44,31(1971]
16. Fukuto T.R., Adv.Pest.Cont.Res.,1, 147 (1957).
17. O'Brien R.D.,Ann.Rev.Entomol.,11, 369 (1966).
18. Aldridge W.N. y Davison A.N., Biochem.J.,52, 663 (1952).
19. Olson W.P. y O'Brien R.D., J.Insect Physiol.,9, 777 (1963).
20. Sun J.P., J.Econ.Entomol., 61, 949 (1968).
21. Sternburg J.y Kearns C.W.,J.Econ.Entomol.,45,497 (1952).
22. Gysin H., Soc.Chem.Ind., London, Monographia 36, 207 (1970).

23. Albert A., *Ann.Rev.Pharmacol.*, 11, 13 (1971).
24. Albert A., "Selective Toxicity and Related Topics", Methuen, London (1968).
25. Hansch C., "Drug Design" Ed. E.J.Ariens, Vol I, cap. 2, Academic Press N.Y. (1971).
26. Ariens E.J., *Pure Appli.Chem.*, 19, 187 (1969).
27. Hammett L.P., "Physical Organic Chemistry", Mc.Graw Hill, N.Y. (1940).
28. Wells P.R. "Linear Free Energy Relationships", Academic Press (1968).
29. Hansch C., Maloney P.P., Fujita T. y Muir R.M., *Nature*, London 194, 178 (1962).
30. Hansch C. y Fujita T., *J.Am.Chem.Soc.*, 86, 1616 (1964).
31. Neely W.B., *Mol.Pharmacol.*, 13, 108 (1967).
32. Charton M., *J.Am.Chem.Soc.*, 91, 615 (1969).
33. Biggs A.I. y Robinson R.A., *J.Chem.Soc.*, 388 (1961).
34. Brown H.C. y Okamoto Y., *J.Am.Chem.Soc.*, 80, 4979 (1958).
35. Jaffe H.H., *Chem.Revs.*, 53, 191 (1953).
36. Taft R.W. Jr., *J.Am.Chem. Soc.*, 74, 3120 (1952); 75, 4231 (1953).
37. Hansch C., *Ann.Rep.Med.Chem.*, 347 (1967).
38. Aldridge W.N. y Davison A.N., *Biochem.J.*, 51, 62 (1952).
39. Metcalf R.L. y Fukuto T.R., *J.Econ.Entomol.*, 55, 340 (1962).
40. Seydel J.K., "Drug Design" Ed. E.J.Ariens, vol I, cap 3, Academic Press N.Y. (1971).
41. Brown T.L., *J.Phys,Chem.*, 64, 1798 (1960).
42. Seydel J.K., *Z.Naturforsch.*, B 16, 419 (1961).
43. Seydel J.K., *Proc.Int.Pharmacol.Meet.* 3rd 1966, vol 7 (1968).
44. Lynch B.H., McDonald B.C. y Webb J.G.K., *Tetrahedron* 24, 3595 (1968).
45. Tribble T. y Traynham J.G., *J.Am.Chem.Soc.*, 91, 379 (1969).
46. Bell P.H. y Roblin R.O., *J.Am.Chem.Soc.*, 64, 2905 (1942).
47. Pullman B. y Pullman A., "Quantum Biochemistry" J.Wiley, Interscien-

- ce, N.Y. (1963).
48. Lowdin P.O. y Pullman B., "Molecular Orbitals in Chemistry, Physics and Biology" Academic Press, N.Y. (1964).
 49. Zahradnik R. y Chvapil M., *Experientia* 16, 511 (1960).
 50. Zahradnik R., *Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.*, 135, 311 (1962).
 51. Zahradnik R., *Experientia* 18, 534 (1962).
 52. Fukuto T.R. y Metcalf R.L., *J.Agric.Food Chem.*, 4, 930 (1956); *J. Am.Chem.Soc.*, 81, 372 (1959).
 53. Taft R.W. "Steric effects in Organic Chemistry", J.Wiley N.Y. (1956), Ed.M.S.Newman.
 54. Hancock C.K., Meywers F.A. y Jager B.Y., *J.Am.Chem.Soc.*, 83, 4211 (1961).
 55. Fujita T., Iwasa J y Hansch C., *J.Am.Chem.Soc.*, 86, 5175 (1964).
 56. Fujita T., "Biological Correlations. The Hansch Approach" *Advances in Chemistry Series. American Chemical Society. Cap. 1*, (1972).
 57. Van Bekkum H., Verkade P.F. y Wepster B.M., *Rec.Trav.Chim.*, 78, 815 (1959).
 58. Mullins L.J., *Chem.Revs.*, 54, 289 (1954).
 59. Agin D., Hersch L. y Holtzman D., *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.* 53, 952 (1965)
 60. Tute M.S., *J.Med.Chem.*, 13, 48 (1970).
 61. Turner N.J. y Battershell R.D., 155th *Nat.Meet.Amer.Chem.Soc.* (1968).
 62. Free S.M. y Wilson J.W., *J.Med.Chem.*, 7, 395 (1964).
 63. Hansch C., *Ann.Repts.Med.Chem.* (Ed. C.K.Cain), Academic Press, cap. 34 - 35 (1967).
 64. Hansch C., *Farmace Ed.Sci.*, 23, 293 (1968).
 65. Knoevenagel, *Ber.*, 27, 2346 (1894).
 66. Gairaud C.B. y Lappin G.R., *J.Org.Chem.*, 18, 33 (1953).
 67. Hass H.B., Susie A.G. y Heider L.R., *J.Org.Chem.*, 15, 8 (1950).

68. Schales O. y Graefe H.A., J.Am.Chem.Soc., 74, 4486 (1952).
69. Popp F.D., J.Org.Chem., 25, 646 (1960).
70. Corson B.B. y Stoughton R.W., J.Am.Chem.Soc., 50, 2828 (1928).
71. Meltzer R.I., Lustgarten D.M. y Fischman A., J.Org.Chem., 22, 1577 (1957).
72. Albert A. y Serjeant E.P., "Ionization Constants of Acids and Bases" Methuen, London (1962).
73. Patente Sumitomo Chemical Co. Japan 6812587 (1968).
74. Aldridge W.N., Biochem.J. 7, 451 (1950).
75. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. y Featherstone R.H., Biochem. Pharmacol., 7, 88 (1961).
76. Wood E.J., Malkenson D.L., Picollo M.I., Zerba E.N., Licastro S.A. de Rúveda M.A. Bioquímica Clínica IX(2) 77 (1975).
77. Picollo M.I., Wood E.J., Zerba E.N., Licastro S.A. de y Rúveda M.A., Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana X(1) 67 (1976).
78. Lichfield J.T. y Wilcoxon F., J.Pharmacol.Exptl.Therap., 96, 99 (1949).
79. Fahmy M.A.H., Khasawinah A. y Fukuto T.R., J.Org.Chem., 37, 617 (1972).
80. Verloop A., "Drug Design" Ed. E.J.Ariens, Vol III, cap. 2, Academic Press, N.Y. (1972).
81. Jones G., "Organic Reactions" vol 15, cap. 2 . Ed. R.Adams. J.Wiley, N.Y.(1967).
82. Kosolapoff G.M. "Organophosphorus compounds" J.Wiley N.Y. (1950).
83. Stiles A.R., Reilly C.A., Pollard G.R., Tieman C, Ward L.F., Phillips D., Soloway S.B., Whetstone R.R., J.Org.Chem., 26, 3960 (1961).
84. Fukuto T.R. y Metcalf R.L., J.Am.Chem.Soc., 76, 5103 (1954).
85. O'Brien R.D., "Insecticides, Action and Metabolism" Academic Press N.Y. (1967).
86. Vinopal J.H., "Tesis doctoral" Univ. California - Riverside (1970).

87. Hollingworth R.M., Fukuto T.R. y Metcalf R.L., J.Agric.Food Chem., 15, 235 (1967).
88. Zerba E.N. y Fukuto T.R., J.Agric.Food Chem., 26, 1365 (1978).
89. Fujita T., Kamoshita K., Nishioka T. y Nakajima M., Agr.Biol.Chem., 38(8) 1521 (1974).
90. Hollingworth R.M., Bol.Organización Mundial de la Salud 44, 155 (1971).
91. Casida J.E., J.Agric.Food Chem., 18(5), 753 (1970).
92. Rabinovich A. y Barbuto S.A. , "Control por Plaguicidas de Enfermedades del Hombre transmitidas por Artrópodos" Primera Reunión COPANT - CIPA de Plaguicidas y Residuos de Plaguicidas. Buenos Aires, Argentina (1973).
93. Hansch C., Mol Pharmacol., 1, 205 (1965).

Two handwritten signatures in cursive script. The signature on the left is larger and more prominent, while the one on the right is smaller and more compact.