

## Tesis de Posgrado

# Sulfenildicarbamatos autosinergistas : Nuevos insecticidas derivados del 3,4- metilendiofenil N-metilcarbamato

Wallace, Guillermo Carlos

1987

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Wallace, Guillermo Carlos. (1987). Sulfenildicarbamatos autosinergistas : Nuevos insecticidas derivados del 3,4-metilendiofenil N-metilcarbamato. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2046\\_Wallace.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2046_Wallace.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Wallace, Guillermo Carlos. "Sulfenildicarbamatos autosinergistas : Nuevos insecticidas derivados del 3,4-metilendiofenil N-metilcarbamato". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2046\\_Wallace.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2046_Wallace.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**SULFENILDICARBAMATOS AUTOSINERGISTAS**

**NUEVOS INSECTICIDAS DERIVADOS**

**DEL 3,4-METILENDIOXIFENIL**

**N - METILCARBAMATO**

**Guillermo Carlos Wallace**

**DIRECTOR: DR. EDUARDO N. ZERBA**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES DE PLAGAS E INSECTICIDAS**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS**

-1987-

- 2046 -  
ef. 2

## FE DE ERRATAS

<u>PAGINA:</u>	<u>REGLON:</u>	<u>DICE:</u>	<u>DEBE DECIR:</u>
VII	27	precencia	presencia
9	21	de las neuronas	de la membrana de las neuronas
9		de la membrana celular	de la misma
11	21	protectora	aisladora
12	23	varía el transporte	varía la normal regulación del transporte
13	2	estímulo	impulso
13	6	el neurotransmisor	el neurotransmisor de la zona postsináptica
14	10	esterático	esterásico
15	Fig. 4b	esterático	esterásico
17	Fig. 5	esterático	esterásico
43	13	reduce	produce
43	15	química, endógena o enzimática	química endógena (enzimática o no)
51	8	(175)	(162)
51	16	CL <sub>50</sub>	concentración letal 50
51	21	(176)	(175)
52	3	(177,178)	(176,177)
52	7	(178)	(177)
61	7	(179)	(178)
61	15	(180)	(179)
62	22	(181,182,183)	(180,181,182)
65	8	(184,185)	(183,184)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10

*A MIS PADRES.*

*A QUIENES SIEMPRE ESTAN.*

...Y al pájaro le basta con algunas semillitas o gusanos, un árbol donde construir su nido, grandes espacios para volar; y su vida transcurre desde su nacimiento hasta su muerte en un venturoso ritmo que no es desgarrado jamás ni por la desesperación metafísica ni por la locura. Mientras que el hombre, al levantarse sobre las dos patas traseras y al convertir en un hacha la primera piedra filosa, instituyó las bases de su grandeza pero también los orígenes de su angustia; porque con sus manos y con los instrumentos hechos con sus manos iba a erigir esa construcción tan potente y extraña que se llama cultura e iba a iniciar así su gran desgarramiento, ya que habrá dejado de ser un simple animal pero no habrá llegado a ser el dios que su espíritu le sugiera. Será ese ser dual y desgraciado que se mueve y vive entre la tierra de los animales y el cielo de sus dioses, que habrá perdido el paraíso terrenal de su inocencia y no habrá ganado el paraíso celeste de su redención. Ese ser dolorido y enfermo del espíritu que se preguntará, por primera vez, sobre el porqué de su existencia. Y así las manos, y luego aquella hacha, aquel fuego, y luego la ciencia y la técnica habrán ido cavando cada día más el abismo que los separa de su raza originaria y de su felicidad zoológica...

SOBRE HEROES Y TUMBAS, ERNESTO SABATO.

## AGRADECIMIENTOS

En el tiempo que llevo trabajando en el CIPEIN, durante el cual realicé esta Tesis, tuve la compañía de un magnífico grupo de gente. Algunos se han ido, otros han ingresado, pero siempre se mantuvo un ambiente cordial, cálido, de amistoso compañerismo, que me permitió realizar con gusto mi tarea. Además de lo que humanamente me brindaron, agradezco:

Muy especialmente a mi Director de Tesis, Dr. Eduardo N. Zerba, por su continua guía, sus valiosas opiniones, y su cooperación en todo momento, durante el trabajo experimental y de escritura de esta Tesis.

A mis compañeros (en orden alfabético para que no haya celos): Dra. Susana Arnstein de Licastro, Sr. Daniel Bazan, Dra. Norma Casabé de Malkenson, Sra. Susana Figueredo de Segovia, Dra. Andrea Fontan de Rodriguez Chatruc, Sr. Fernando Melgar Suarez, Dra. Maria Ines Picollo de Villar, Sra. Emilia Seccacini de Leguizamon, Sra. Maria Segovia de de Arribas, y Dr. Edgardo Wood, es imposible olvidarme de nuestra asidua pasantista, Lic. Adriana Ferrero de Squillo, todos ellos me ofrecieron una gran colaboración en el trabajo diario, desde la explicación de un concepto químico o biológico hasta el cuidado de una columna cromatográfica, pasando por el eficiente cuidado del insectario y la cooperación en el momento y tarea que fueran necesarios.

Agradezco también:

A la Dra. Maria Lourdes Paviolo por su labor como consejera

de estudios.

Al Lic. Dario Bongiovani por la realización de los espectros de RMN <sup>1</sup>H.

A los integrantes del CEITOX, que me han brindado su amistoso apoyo en reiteradas oportunidades.

Al CONICET y CITEFA, instituciones a las que pertenece el CIPEIN, en especial al primero, ya que a través de sus becas se concretó mi trabajo.

A las siguientes instituciones por su cooperación: Organización Mundial de la Salud (a través del UNPD/World Bank/WHO Programme for Research and Training in Tropical Diseases); SECYT (a través de su Programa Nacional de Enfermedades Endémicas); Gobierno de Japón (a través de su Agencia Internacional de Cooperación Técnica, J.I.C.A.).

Al Dr. T. R. Fukuto por la donación de los sulfenildicarbamatos.

A las empresas Bayer y Union Carbide por la donación de los insecticidas propoxur y carbaril respectivamente.

A la Lic. Patricia Eisenberg, quien a través del gran respeto a mi tareas, de su cooperación invaluable en la corrección y copiado de esta Tesis, de su compañía y apoyo sobre todo durante la enfermedad de mi padre, dejando incluso de lado en ocasiones su propia carrera, permitió la conclusión de este trabajo.

A la Analista Programadora y casi Ingeniera Diana Eisenberg, quien con su computadora y ayuda en el copiado y corrección



*facilitó la escritura de esta Tesis.*

*A mis padres, que siempre me apoyaron en todo lo que tuvieron a su alcance y a los que debo mucho de lo que soy.*

## INDICE GENERAL

	Página
INDICE DE FIGURAS .....	IX
INDICE DE TABLAS .....	XI
SULFENILDICARBAMATOS Y SUS PRECURSORES .....	XII
ABREVIATURAS .....	XIII
INTRODUCCION .....	1
I. CARBAMATOS .....	1
I.a. Historia .....	1
I.a.1. Los insecticidas .....	1
I.a.2. Carbamatos insecticidas .....	3
I.b. Química .....	6
I.b.1. Generalidades .....	6
I.b.2. Síntesis .....	8
I.c. Modo de acción .....	9
I.c.1. Sistema nervioso .....	9
I.c.2. Acción de los carbamatos sobre el sistema nervioso .....	12
I.c.3. Mecanismo de inhibición de la AcCE por carbamatos .....	13
I.d. Metabolismo .....	19
I.d.1. Generalidades .....	19
I.d.2. Metabolismo de carbamatos .....	21
II. SINERGISMO DE CARBAMATOS .....	28
II.a. Sinergismo .....	28
II.b. Distintos tipos de sinergistas .....	28
II.c. Sinergistas que poseen el grupo metilendioxi .....	32
II.c.1. Generalidades .....	32
II.c.2. Mecanismo de inhibición de GFH por MDF sinergistas .....	35
II.d. Autosinergismo .....	39
III. CARBAMATOS DERIVADOS .....	40
III. a. Concepción y desarrollo .....	40
III. b. Sulfenil derivados .....	46
III.b.1. Síntesis .....	46
III.b.2. Mecanismo de activación de los sulfenilcarbamatos .....	47
III.c. Ventajas introducidas .....	49
IV. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO .....	52
MATERIALES Y METODOS .....	55
I. DROGAS UTILIZADAS .....	55

	II. SINTESIS .....	55
II.a.	Obtención de carbamatos .....	55
II.b.	Síntesis de clorosulfenilcarbamatos y sulfenildicarbamatos .....	56
	III. PURIFICACION DE SDA .....	58
	IV. CARACTERIZACION .....	60
	V. ACTIVIDAD INSECTICIDA .....	60
V.a.	Insectos .....	60
V.b.	Determinación de la $DL_{50}$ en moscas .....	61
V.c.	Evidencias de activación "in vivo". Cinética de la acción insecticida .....	61
V.d.	Correlación estructura actividad insecticida .....	62
V.d.1.	Determinación del $\log P$ .....	62
V.d.2.	Correlación entre $\log P$ y $DL_{50}$ .....	65
	VI. ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN RATONES .....	66
VI.a.	Ratones .....	66
VI.b.	Determinación de la $DL_{50}$ .....	66
VI.c.	Coefficiente de selectividad en vertebrados .....	67
	VII. MECANISMO DE LA ACCIÓN INSECTICIDA .....	67
VII.a.	Fuentes de AcCE .....	67
VII.b.	Determinación de la $K_1$ .....	68
VII.c.	Determinación de la $k_1$ en presencia de N-etilmaleimida .....	74
VII.d.	Medición de la ruptura tiorítica de la unión N-S .....	74
VII.e.	Inhibición de OFM .....	76
	RESULTADOS Y DISCUSION .....	79
	I. SINTESIS .....	79
I.a.	Obtención de carbamatos .....	79
I.b.	Síntesis de clorosulfenilcarbamatos y sulfenildicarbamatos .....	79
	II. PURIFICACION .....	81
	III. CARACTERIZACION .....	81
	IV. TOXICIDAD AGUDA .....	89
IV.a.	Acción insecticida en moscas .....	89
IV.b.	Correlación estructura actividad insecticida .....	106

IV.c.	Dosis letal 50 en ratones .....	113
IV.d.	Selectividad .....	115
	V. MECANISMO DE LA ACCION INSECTICIDA .....	118
V.a.	Hipótesis .....	118
V.b.	Acción anticolinesterásica .....	119
V.c.	Activación .....	121
V.c.1.	Ruptura de la unión N-S .....	121
V.c.2.	Evidencias "in vitro" .....	126
V.c.3.	Evidencias "in vivo" .....	128
V.d.	Autosinergismo .....	130
V.d.1.	Efecto del BP .....	131
V.d.2.	Inhibición de OFM .....	131
	RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	140
	BIBLIOGRAFIA .....	144

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estructuras de diversos insecticidas. ....	2
Figura 2: Síntesis de fenil N-metilcarbamatos. ....	10
Figura 3: Modelo esquemático de una sinapsis al propagarse un impulso nervioso. ....	10
Figura 4: a) Esquema de la hidrólisis de AcC por AcCE. b) Modelo del sitio activo de la AcCE. ....	15
Figura 5: Reacción de carbamatos con AcCE. ....	17
Figura 6: Rutas para formar el complejo reversible tetraédrico. ....	17
Figura 7: Detoxificación de carbamatos. ....	23
Figura 8: Algunos metabolitos de carbaril en distintos sistemas. ....	25
Figura 9: Estructuras de diversos sinergistas de insecticidas. ....	31
Figura 10: Metabolismo de MDF sinergistas. ....	36
Figura 11: Mecanismo propuesto para la oxidación a través del citocromo P-450. ....	36
Figura 12: Modo de acción de MDF sinergistas. ....	38
Figura 13: Estructuras de diversos autosinergistas. ....	38
Figura 14: Estructuras de derivados de carbamatos en etapa cercana a la comercialización. ....	42
Figura 15: Estructuras de diversos derivados de carbamatos. ....	45
Figura 16: Pasos limitantes de la velocidad de intoxicación por derivados de insecticidas en insectos. ....	50
Figura 17: Estructura general de los SDA. ....	53
Figura 18: Reacciones utilizadas para la medición de la actividad acetilcolinesterásica. ....	72

<i>Figura 19:</i> a) Sulfenildicarbamatos asimétricos. b) Sulfenildicarbamatos simétricos. ....	82
<i>Figura 20:</i> Estructuras y espectros de RMN $^1\text{H}$ de los carbamatos precursores. ....	85
<i>Figura 21:</i> Estructuras y espectros de RMN $^1\text{H}$ y de masas de los SDA. ....	91
<i>Figura 22:</i> Asignación tentativa de las rupturas características de los SDA observadas por espectrometría de masas. ....	103
<i>Figura 23:</i> Curva de regresión de $\log P$ vs. $\log k'$ para aralquil sulfenildicarbamatos. ....	108
<i>Figura 24:</i> Curvas de regresión de $\log P$ vs. $\log 1/C$ para los aralquil SDA ( $C$ : $DL_{50}$ molar). ....	111
<i>Figura 25:</i> Ruptura tioritica de I. ....	124
<i>Figura 26:</i> Cinética de la acción volteante sobre moscas de propoxur y I. ....	129
<i>Figura 27:</i> Autoradiografía obtenida a partir de los metabolitos de $^{14}\text{C}$ -carbaril separados cromatograficamente. ....	134
<i>Figura 28:</i> Mecanismo propuesto para la acción insecticida de los SDA. ....	142

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Estructuras y log P de los sulfenildicarbamatos utilizados como referencia. ....	64
Tabla 2: Caracterización de los carbamatos obtenidos. ....	84
Tabla 3: Caracterización de los SDA. ....	90
Tabla 4: Caracterización de los SDA por espectroscopía. ....	98
Tabla 5: DL <sub>50</sub> y DL <sub>95</sub> en moscas (con y sin BP) de los SDA y sus precursores. ....	105
Tabla 6: Valores de log P de los SDA y sus precursores. ....	110
Tabla 7: DL <sub>50</sub> y DL <sub>95</sub> en ratones de los SDA y sus precursores. ....	114
Tabla 8: Coeficiente de selectividad en vertebrados para los SDA y sus precursores. ....	117
Tabla 9: Constantes de inhibición bimolecular (k <sub>i</sub> ) de carbamatos y SDA sobre AcCECH y AcCEEB. ....	120
Tabla 10: Cocientes entre k <sub>i</sub> de carbamatos y SDA medidas sobre AcCECH y AcCEEB. ....	122
Tabla 11: Tiólisis de I para dar los carbamatos de origen. ....	125
Tabla 12: Cocientes entre k <sub>i</sub> medidas sobre AcCECH y AcCEEB para aril carbamatos y sus SDA derivados. ....	127
Tabla 13: Factores de sinergismo de los aril SDA y sus carbamatos precursores. ....	132
Tabla 14: Identificación tentativa de metabolitos del carbaril. ....	135
Tabla 15: Dpm de las manchas obtenidas en la separación cromatográfica de metabolitos del carbaril. ....	137
Tabla 16: Inhibición de OFM por BP, HDC y SDA. ....	138

SULFENILDICARBAMATOS Y SUS  
PRECURSORES

- I: ..... 3,4-metilendioxifenil- N -(2-isopropoxifenil  
-N-metilcarbamoil sulfenil)-N-metilcarbamato
- II: ..... 3,4-metilendioxifenil - N - (1-naftil - N -  
metilcarbamoil sulfenil)- N -metilcarbamato
- III: ..... 3,4-metilendioxifenil- N -(3-metil fenil-N-  
metilcarbamoil sulfenil)- N -metilcarbamato
- IV: ..... 3,4-metilendioxifenil - N - (n-butil - N -  
metilcarbamoil sulfenil)- N -metilcarbamato
- V: ..... 3,4 - metilendioxifenil - N - (n-octil - N -  
metilcarbamoil sulfenil)- N -metilcarbamato
- VI: ..... 3,4 - metilendioxifenil- N -(n-dodecil - N -  
metilcarbamoil sulfenil)- N -metilcarbamato
- VII: ..... 3,4 - metilendioxifenil- N -(n-hexadecil-N-  
metilcarbamoil sulfenil)- N -metilcarbamato
- Butilcarbamato: ..... n-butil-N-metilcarbamato
- Carbaril: ..... 1-naftil-N-metilcarbamato
- Cetilcarbamato: ..... n-hexadecil-N-metilcarbamato
- Laurilcarbamato: ..... n-dodecil-N-metilcarbamato
- MDC: ..... 3,4-metilendioxifenil-N-metilcarbamato
- Octilcarbamato: ..... n-octil-N-metilcarbamato
- Propoxur: ..... 2-isopropoxifenil-N-metilcarbamato
- Tsumacide: ..... 3-metilfenil-N-metilcarbamato



ABREVIATURAS

<i>AcC:</i>	.....	acetilcolina
<i>AcCE:</i>	.....	acetilcolinesterasa
<i>AcCECM:</i>	.....	acetilcolinesterasa de cabeza de mosca
<i>AcCEEB:</i>	.....	acetilcolinesterasa de eritrocito de bovino
<i>BP:</i>	.....	butóxido de piperonilo
<i>Cis:</i>	.....	cisteína
<i>CSV:</i>	.....	coeficiente de selectividad en vertebrados
<i>DL<sub>50</sub>:</i>	.....	dosis letal cincuenta
<i>DL<sub>95</sub>:</i>	.....	dosis letal noventa y cinco
<i>Dpm:</i>	.....	descomposiciones por minuto
<i>DTNB:</i>	.....	ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico
<i>GSH:</i>	.....	glutación
<i>IATC:</i>	.....	ioduro de acetiltiocolina
<i>k<sub>1</sub>:</i>	.....	constante de inhibición bimolecular
<i>MDC:</i>	.....	3,4-metilendioxifenil-N-metilcarbamato
<i>MDF:</i>	.....	metilendioxifenil
<i>NADH:</i>	.....	nicotinamida adenina dinucleótido
<i>NADPH:</i>	.....	fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
<i>OFM:</i>	.....	oxidasas de función mixta
<i>RMN <sup>1</sup>H</i>	.....	resonancia magnética nuclear protónica
<i>SDA:</i>	.....	sulfenildicarbamatos autosinergistas
<i>SNC:</i>	.....	sistema nervioso central



## INTRODUCCION

### I. CARBAHATOS

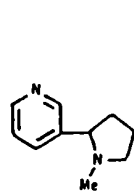
#### I.a. Historia

##### I.a.i. Los insecticidas

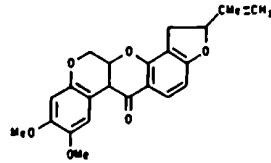
Por un largo tiempo, la naturaleza permitió una pacífica, aunque no siempre agradable, coexistencia del hombre y los insectos. Sin embargo, cuando las costumbres nómades del hombre comenzaron a transformarse hacia la vida en comunidad, los insectos, rápidamente se movilizaron para compartir su hogar, sus ropas, sus alimentos. Naturalmente, los nuevos hábitos del hombre llevaron a la necesidad de criar animales y sembrar plantas, para asegurar el abastecimiento de ropas y alimentos. No pasó mucho tiempo hasta que los granjeros se dieron cuenta, que para que sus monocultivos sobrevivieran, algunas poblaciones de insectos debían ser controladas. Así fue como la guerra entre el hombre y los insectos había comenzado.

Los insecticidas pioneros fueron inorgánicos, el  $S^o$  fue utilizado 1000 años A.C. (1), pasando luego por el  $SO_4Cu$ ,  $FNa$ ,  $AsO_4HPb$  (1) y los insecticidas botánicos, rotenona, nicotina y piretrinas (2) (fig. 1), utilizados a fines del siglo XVIII, en el siglo XIX y principios del XX.

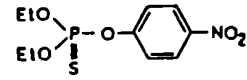
En el siglo XX, fundamentalmente durante la segunda guerra



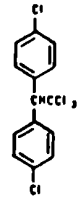
NICOTINA



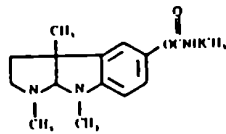
ROTENONA



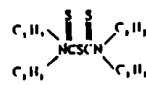
PARATION



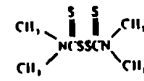
D. D. T.



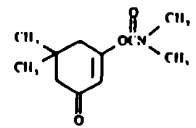
FISOSTIGMINA



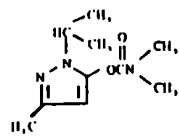
MONOSULFURO DE  
TETRAETILTURAM



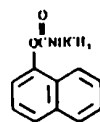
TIRAM



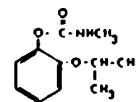
DIMETAN



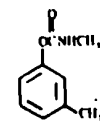
ISOLAN



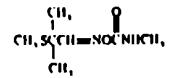
CARBARIL



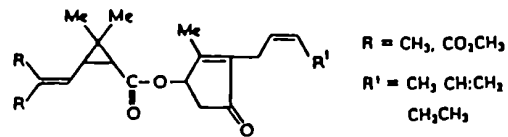
PROPOXUR



TSUMACIDE



ALDICARB



PIRETRINAS

Figura 1 = Estructuras de diversos insecticidas.

mundial, fue cuando evolucionaron los modernos insecticidas sintéticos. El primero fue el DDT (fig. 1), en 1939 y luego una amplia gama de insecticidas clorados y fosforados, entre estos últimos, el aún ampliamente usado Paratión (fig. 1).

A partir de la segunda mitad de la década del 40, también surgieron otras dos familias de insecticidas, los piretroides y los carbamatos, de estos últimos nos ocuparemos de aquí en más.

### I.a.2. Carbamatos insecticidas

La historia de los carbamatos biológicamente activos es larga y colorida remontándose a unos cientos de años atrás (3).

Los habitantes de la zona de Old Calabar, situado ahora en la región sudeste de la provincia de Calabar, en Nigeria, eran pescadores. Los Efiks, así se llamaban, se volvieron prósperos comerciantes de aceite de palma y esclavos durante los siglos XVII y XVIII. Cada pueblo, tenía un jefe, responsable del cumplimiento de las leyes locales. Estas eran cumplidas a través de multas, boycotts comerciales, y a menudo por penas capitales. Para discernir la culpabilidad o no del acusado, se le hacía ingerir una poción lechosa, constituida por el macerado de varias semillas de Habas de Calabar (llamadas esere), en una pequeña cantidad de agua. El nativo entonces, debía caminar en círculos hasta que la justicia decidiera por alguno de los dos caminos, el de la inocencia y libertad, si era tan afortunado como para regurgitar la "leche", o el de la culpabilidad y castigo simultáneos, en caso

contrario, a través de convulsiones y rápida muerte.

La legumbre fue llevada a Escocia e identificada por primera vez a mediados de la centuria del 1800, dandosele el nombre de *Physostigma venenosum*. Simultaneamente, se trató de aislar el tóxico natural, que se supuso un alcaloide en 1863, sugiriendose el nombre de eserina (de esere), aislandose el alcaloide mayoritario un año después y rebautizándolo como fisostigmina (3). En 1925 se estableció su estructura (fig. 1), que corresponde a la de un carbamato (3).

Pero pasemos a los carbamatos insecticidas. Los primeros de este tipo en exhibir una potencial actividad insecticida, fueron derivados del ácido ditiocarbámico, investigados por la E.I. du Pont de Nemours Company en 1931. Como ejemplos tenemos al sulfuro de tetraetil tiuram y al tiram (3)(fig. 1). La buena acción fungicida de estos compuestos, junto con el advenimiento de los insecticidas clorados y fosforados, más efectivos, desalentaron el desarrollo de los ditiocarbamatos como insecticidas. Estos compuestos siguen usandose en la actualidad como fungicidas.

En la segunda mitad de la decada del 40, un químico, el Dr. Hans Gysin, investigador de la Geigy Chemical Company de Suiza, en estudios originalmente dirigidos al desarrollo de repelentes (especialmente amidas aromáticas), sintetizó el primer carbamato insecticida de producción industrial, el dimetan (fig. 1). Los materiales más promisorios fueron los heterociclos derivados de enoles (4), como el isolan (fig. 1), que junto con el dimetan alcanzaron producción comercial en Europa, durante la decada del

50.

Todos los carbamatos sintetizados hasta ese momento por la Geigy, eran dimetilcarbamatos.

Basado parcialmente en lo encontrado por la Geigy, y en el conocimiento de la estructura de carbamatos efectivos como herbicidas, el Dr. Joseph Lambrech de la Union Carbide Corporation de Estados Unidos, sintetizó el UC 7744 en 1953. A diferencia de los anteriores, este compuesto tiene un grupo arilo en lugar del enol y es un carbamato monometílico en lugar de dimetílico. El UC 7744 pasó a conocerse con el nombre comercial de sevin y luego con el nombre común carbaril (fig. 1). Su baja toxicidad en mamíferos, fácil degradabilidad, y amplio espectro como tóxico de insectos, lo llevó a ser uno de los pesticidas más abundantemente fabricados.

Independientemente de los estudios ya detallados, varias universidades y dependencias estatales de los Estados Unidos, comenzaron a experimentar con la fisostigmina y carbamatos relacionados, como potenciales insecticidas. Uno de los más activos grupos, fue el de la Universidad de California, bajo la dirección del profesor Robert Metcalf, quienes sintetizaron una serie de 49 mimicos de la fisostigmina como parte de un clásico trabajo de estructura-actividad. Los resultados de estas investigaciones, que se publicaron en 1954 (5), establecieron la mayor potencia insecticida para las estructuras del tipo aril N-metilcarbamatos (los más usuales de los carbamatos insecticidas modernos).

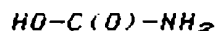
Otra modificación estructural originada en la Union Carbide, fue sintetizar N-metilcarbamatos, con algunas características estructurales similares a los arilos, pero con un parecido más cercano a la AcC, el sustrato de la AcCE (6). El resultado fue el descubrimiento de los carbamatos oxima, por ejemplo el aldicarb (fig. 1), con amplio espectro insecticida (7).

La última innovación introducida en la familia de los carbamatos, es la derivatización. La misma se realiza reemplazando el H unido a N. Una gran cantidad de grupos han sido utilizados como reemplazantes del H. Más adelante nos referiremos a este tema con mayor amplitud.

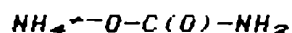
## I. b. Química

### I. b. 1. Generalidades

La columna vertebral de la estructura de los carbamatos, es el ácido carbámico, la monoamida del ácido carbónico:



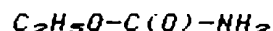
Este ácido no existe en forma libre, se descompone dando  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ . Son más estables sus sales, por ejemplo el carbamato de amonio:



que a sido mezclado con fosforo de aluminio como insecticida y rodenticida comercial (3). El ácido carbámico puede también ser estabilizado por formación de un simple éster alquílico, el de



etilo, dandonos el uretano:



utilizado como anestésico veterinario, tópico bactericida, solubilizante o cosolvente de pesticidas, fumigantes y cosméticos (8).

La estructura general de los insecticidas carbamatos comerciales, contiene un anillo sustituido, un heterociclo aromático, o un naftol. Existen también las oximas carbamatos. Se pueden observar algunos ejemplos en la figura 1.

En general, son sólidos, de poco olor, blancos y cristalinos, de alto punto de fusión y baja presión de vapor, lo que contribuye a la estabilidad al almacenarlos. Solubles en solventes orgánicos pero muy poco en agua, lo que limita su uso como insecticidas sistémicos.

Cuando los compuestos cristalinos son sometidos a altas temperaturas, se produce descomposición con liberación de isocianato de metilo y el correspondiente compuesto aromático (9). La misma reacción ocurre en agua hirviente.

Aunque las condiciones requeridas para la degradación de los carbamatos por aire, luz y calor son muy drásticas, la hidrólisis en medio alcalino ocurre con relativa facilidad, siendo el mayor límite para su estabilidad. La susceptibilidad a la hidrólisis está determinada por la estructura química del insecticida, especialmente por el sustituyente unido al anillo fenólico o al N carbámico (5,10 a 16). Otros factores que influyen en la hidrólisis de los carbamatos son la temperatura (3,15) y la

concentración de ión hidroxilo (3).

La descomposición de carbonatos en solución ácida, generalmente ocurre a bajas velocidades y el camino aún no ha sido bien elucidado. La ruptura depende de la concentración de ión hidrógeno, del pH, de la mono o disustitución del N y de la temperatura. En las condiciones normales de trabajo y manipuleo de carbonatos, la acidez encontrada no produce rupturas (3).

### I.b.2. Síntesis

Casi todos los fenil N-metilcarbonatos estudiados, han sido sintetizados por una de las 3 reacciones que se observan en la figura 2.

Método A: consiste en la esterificación de un fenol con isocianato de metilo. Es generalmente la ruta más fácil y más conveniente, tanto para N-metilcarbonatos aromáticos como alifáticos (5). Posteriormente, la técnica se modificó parcialmente, agregando una cantidad catalítica de trietilamina (17). Esta técnica fue utilizada para sintetizar carbonatos en varios estudios de estructura actividad (18 a 20) o de otro tipo (21,22). Naturalmente, pueden sintetizarse otros carbonatos N-alquilo o aún N-arilo reemplazando el isocianato de metilo por el isocianato requerido (5).

Método B: también parte de un fenol, pero en este caso reacciona con fosgeno para dar un fenol cloroformiato, intermediario que luego reacciona con metilamina para dar el

carbamato deseado. Así pueden sintetizarse carbamatos sin N-sustituir utilizando amoníaco en lugar de metilamina. Algunas aminas exóticas fueron utilizadas, a través de este método, para la síntesis de carbamatos (23).

Método C: raramente empleado, consiste en el agregado de un fenol o su sal a un cloruro de metilcarbamoilo en presencia de una base débil, de ser necesaria, para tomar el ácido liberado (3). Este método ha sido empleado para la síntesis de la mayoría de los N,N-dimetilcarbamatos (3).

## I. c. Modo de acción

### I. c. 1. Sistema nervioso

Muchos de los insecticidas usuales son tóxicos por su capacidad de interrumpir la transmisión del impulso a través del sistema nervioso.

En vertebrados (3), este sistema se divide en una unidad coordinadora central, consistente en el cerebro y la médula espinal o SNC y una organización periférica, compuesta de un sistema autónomo y otro somático.

Un estímulo, viaja a través de las fibras nerviosas en forma de impulso eléctrico. Esto ocurre por una despolarización (variación del potencial normal) de las neuronas o células nerviosas, debido a un cambio en la permeabilidad de la membrana celular a los iones sodio y potasio, que alcanzan concentraciones

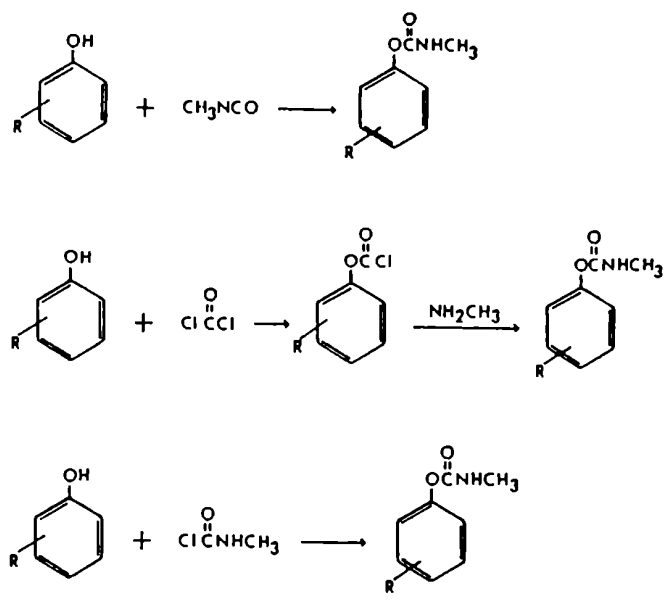


Figura 2: Síntesis de fenil N-metilcarbamatos (3).

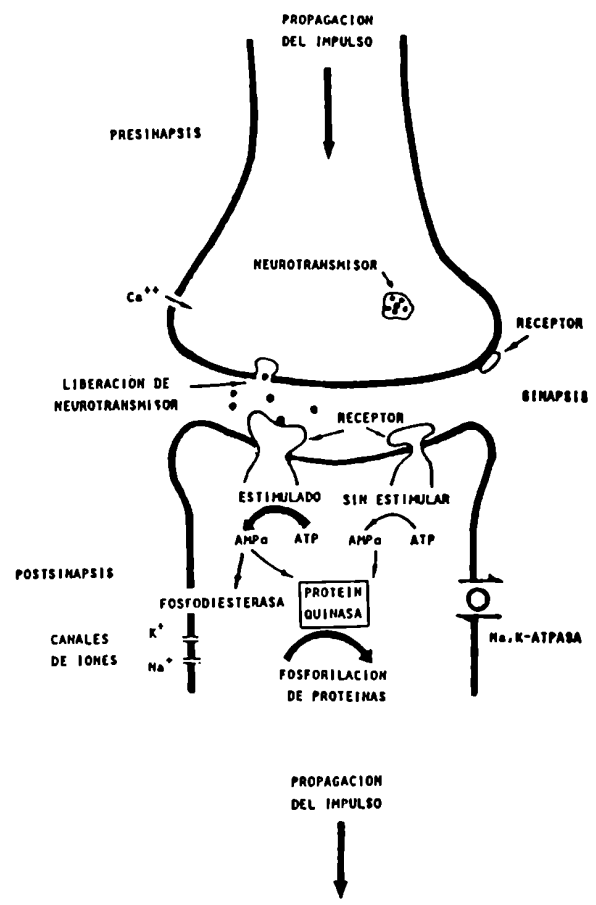


Figura 3: Modelo esquemático de una sinapsis al propagarse un impulso nervioso (25).

*distintas a las normales.*

*Cuando el impulso llega al final de un cordón nervioso, sustancias neurotransmisoras (AcC o noradrenalina) cubren la pequeña distancia (sinapsis) que separa esta terminal y el comienzo de otro nervio o músculo efector, produciendo una continuidad del estímulo o una acción según el caso.*

*El sistema somático posee nervios aferentes, que recogen los estímulos del medio, y eferentes, que devuelven una respuesta elaborada a realizarse por un músculo voluntario. La primera vía no posee sinapsis y la segunda sí, siendo éstas colinérgicas (AcC como neurotransmisor).*

*El sistema autónomo, regula glándulas y músculos involuntarios a través de fibras simpáticas o parasimpáticas, que transportan órdenes opuestas. Las primeras, en general poseen sinapsis colinérgica cerca del SNC y adrenérgica (noradrenalina como neurotransmisor) en el efector. En las fibras parasimpáticas ambas sinapsis son colinérgicas.*

*En insectos, el SNC es mucho más primitivo (3), está compuesto de un "cerebro" menos complejo o ganglio supraesofágico y un sistema de ganglios ventrales. Como en mamíferos, el SNC está recubierto con una "vaina" protectora, mientras que a diferencia de ellos el sistema periférico no posee tal protección. La parte autónoma solo se compone de un sistema simpático y las sinapsis entre cordones nerviosos no son periféricas, están ubicadas dentro del SNC. La mayor diferencia en el sistema somático, es que la unión con el músculo*

efector no es colinérgica, el neurotransmisor es desconocido, se ha sugerido la posibilidad de que algún aminoácido (un aspartato) sea el que actúa como tal (24). Por lo tanto, no hay sinapsis colinérgicas en el sistema nervioso periférico de los insectos pero si las hay indudablemente en el SNC (24).

### I.c.2. Acción de los carbamatos sobre el sistema nervioso

Focalizemos la atención en las sinapsis colinérgicas (figura 3)(25), la llegada del impulso eléctrico, aparentemente produce en la presinapsis un ingreso de calcio que lleva a la liberación de AcC por exocitosis (26). La AcC liberada cruza la sinapsis y se une a receptores postsinápticos. Existen receptores en el área presináptica, presumiblemente actuando como reguladores. Cuando el neurotransmisor se une al receptor, causa alteraciones por interacciones directas o alostéricas, que finalmente a través de la actividad enzimática, generan o inhiben impulsos eléctricos. Una de las alteraciones más importantes (25) sería aumentar la actividad de la adenilato ciclasa, lo que aumenta la síntesis de fosfato cíclico de adenosina (AMPC). El AMPC puede degradarse por una fosfodiesterasa o actuar sobre una proteinquinasa, cuya actividad es dependiente de este nucleótido cíclico. Las enzimas fosforiladas por la proteinquinasa alteran a su vez su actividad. Por ejemplo la adenosintrifosfatasa (ATPasa) varía el transporte de cationes (sodio y potasio) fenómeno importante en la

generación del impulso eléctrico, y que permite seguir transmitiendo el estímulo a lo largo del nervio. En insectos podría actuar otro nucleótido cíclico, el fosfato cíclico de guanosina (24).

Una vez transmitido el estímulo, es necesario eliminar rápidamente el neurotransmisor, para evitar que la señal se perpetúe. Esto se realiza a través de una enzima presente en las membranas pre y postsinápticas (27), la AcCE, que hidroliza la AcC liberando colina y ácido acético.

Es aquí donde actúan los carbamatos insecticidas, inhibiendo la AcCE, lo que implica una acumulación de AcC que lleva al bloqueo sináptico. Esto se manifiesta, a nivel orgánico, con una sucesión de síntomas: irritabilidad, estremecimientos, incoordinación, parálisis y muerte (28).

Mientras que la causa final de muerte es fácil de determinar en mamíferos, como por ejemplo colapso respiratorio cardiovascular, no es lo mismo en insectos, donde el sistema respiratorio traqueal no es crucial para la vida y el bombeo del corazón no es totalmente necesario. Aparentemente en insectos, la muerte sobreviene por el efecto destructivo sobre la homeóstasis causada por la liberación múltiple de hormonas. Se produciría un desbalance iónico e hídrico que haría incompatible la composición de la hemolinfa con la vida celular (26).

### I.c.3. Mecanismo de inhibición de la AcCE por carbamatos

Se basa primariamente en el esquema propuesto para la hidrólisis del sustrato natural de la AcCE, la AcC (figura 4a) (29).

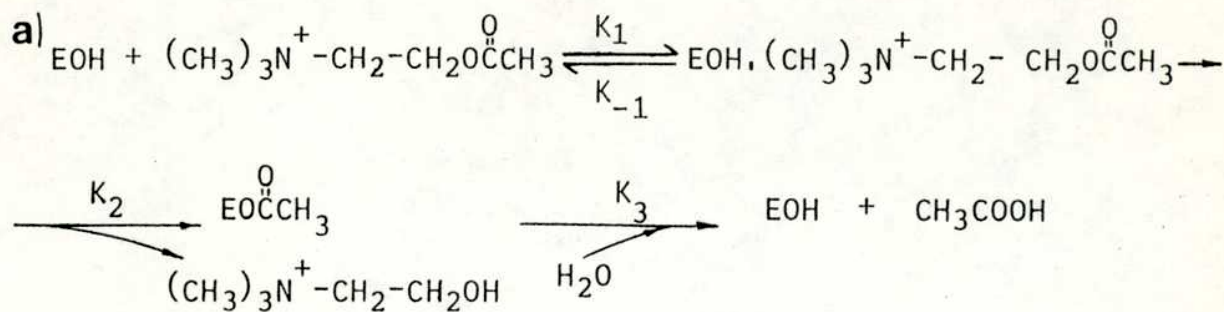
Según se observa en la figura 4b existiría en la AcCE un sitio aniónico (o sitio Alfa) compuesto por un ácido carboxílico ionizado (glutamato o aspartato), rodeado de una zona hidrofóbica (sitio Beta). El primero sería el responsable de la atracción de la parte cargada de la AcC. Luego de la formación del complejo enzima-sustrato ( $k_1$ ) actuaría el verdadero sitio activo, el esterático en el cual el hidroxilo de una serina, activado por un nitrógeno histidínico, produciría un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico de la AcC, que liberaría colina y produciría la enzima acetilada ( $k_2$ ). Un grupo ácido débil, probablemente un hidroxilo de una tirosina, cooperaría en la reacción. El paso final es la hidrólisis, que libera ácido acético y la enzima regenerada ( $k_3$ ) (25).

La AcCE posee un sitio alostérico, pero no hay indicios sobre unión de pesticidas en este lugar (30).

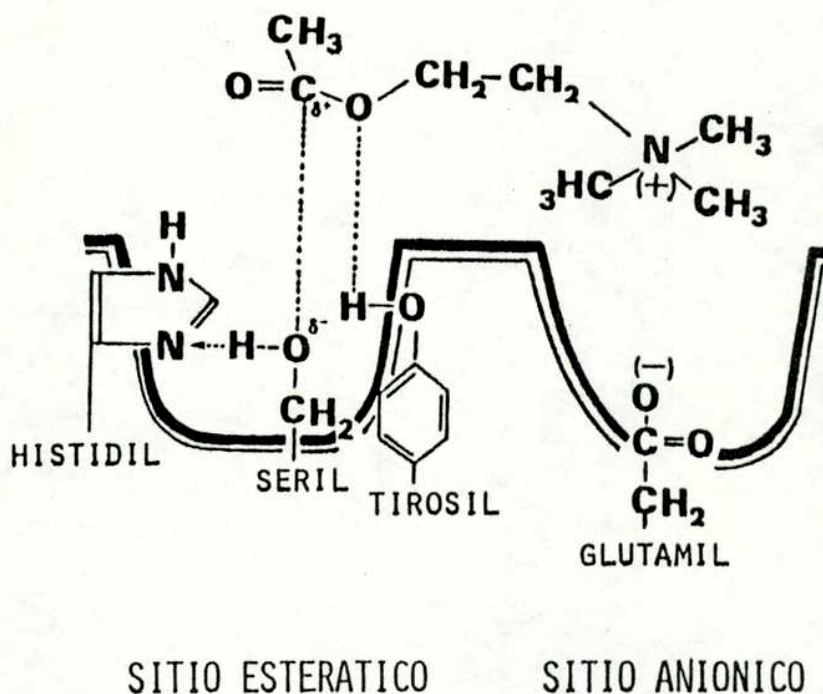
Ha sido propuesto un sitio de unión de acetato de indofenilo (sitio Gamma) sobre la AcCE, al cual no se unen ni el sustrato natural ni los pesticidas (30).

El sitio catalítico de la AcCE estaría rodeado de una zona hidrofóbica, considerablemente más amplia en la enzima de insectos que en la de mamíferos, esta zona, sería responsable de las interacciones necesarias para formar el complejo enzima-inhibidor con insecticidas (31).





b)



**Figura 4:** a) Esquema de la hidrólisis de AcC por AcCE (3).  
 b) Modelo del sitio activo de la AcCE (25)

En la figura 5 puede observarse el mecanismo propuesto para carbamatos (15). Estos se unen a la AcCE para dar un complejo ( $k_1$ ), que puede disociarse a los productos originales ( $k_{-1}$ ) descomponerse en una enzima carbamoilada y un grupo saliente ( $k_2$ ). Este paso es cientos de veces más lento que la acetilación correspondiente al reaccionar con AcC. Finalmente la enzima, se regenera por hidrólisis ( $k_3$ ). La enzima carbamoilada es mucho más estable que la acetilada, con lo cual el tercer paso se hace alrededor de un millón de veces más lento que la desacetilación, razón por la cual, la enzima permanece incapaz de cumplir su función por un tiempo considerable (3).

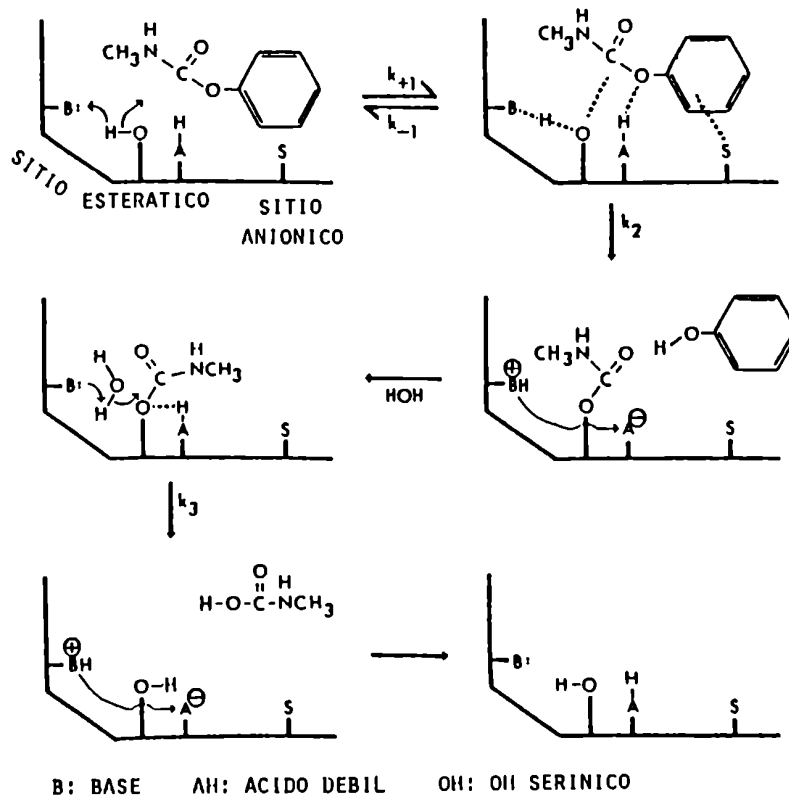
La usualmente denominada constante de afinidad ( $k_m$ ), definida como:

$$k_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

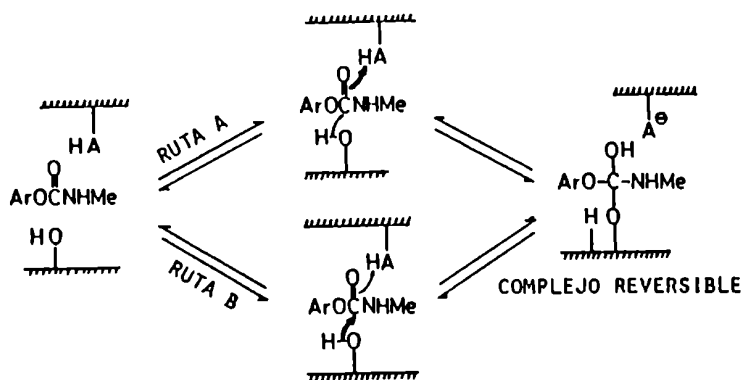
nos indicaría la facilidad con que se disocia o no el complejo reversible. A mayor afinidad, mayor será la constante  $k_1$ , menor  $k_{-1}$  y menor  $k_m$  (el equilibrio se desplaza hacia la derecha). La velocidad de carbamoilación está dada por  $k_2$ , a mayor  $k_2$  más rápida es la reacción.

La potencia total de un inhibidor, está representada por las dos constantes antes mencionadas, a través de la constante de reacción bimolecular ( $k_i$ ):

$$k_i = \frac{k_2}{k_m}$$



**Figura 5:** Reacción de carbamatos con AcCE (15).



**Figura 6:** Rutas para formar el complejo reversible tetraédrico (32,33).

Cuanto más grande sea  $k_1$  más rápidamente se producirá la inhibición. La velocidad de decarboxilación está dada por  $k_3$  y es muy pequeña respecto de  $k_2$  (constante de carboxilación). A menor  $k_3$  más estable será la enzima carboxilada.

Otro parámetro utilizado, además de  $k_1$ , para determinar la potencia de un inhibidor es  $I_{50}$ , definida como la concentración molar de inhibidor necesaria para reducir un 50% la velocidad de hidrólisis de la AcC, o sea producir un 50% de inhibición de la AcCE.

Estudios sobre la relación estructura-actividad con fenil N-metilcarbamatos (32,33) mostraron que cuando las posiciones 2 y 3 del anillo son ocupadas por sustituyentes lipofílicos, las uniones hidrofóbicas eran más importantes que si éstas estuvieran en 4. También las posiciones 2 y 3 se ven beneficiadas con un puente hidrógeno (si hay en ellas un grupo aceptor como alcoxi, ciano, nitro, etc.) que ayuda en la formación del complejo.

Existen además efectos electrónicos, que influyen en la ruta usada para formar el complejo reversible tetraédrico (figura 6). Sustituyentes donores de electrones en 4, que ceden electrones hacia el carbamato (haciendo más negativo el carbonilo), siguen la ruta A, mientras los atractores (tomando electrones del carbonilo), siguen la ruta B. En el caso de compuestos 2-sustituídos, impedimentos estéricos los llevan a tomar la ruta B. Se considera que los 3-sustituídos forman el complejo reversible vía ruta A.

Mientras que  $k_1$  varía con la estructura del carbamato,  $k_2$  lo hace en menor proporción, por lo cual, las mayores diferencias

entre carbamatos se deberian a la estabilidad del complejo reversible.

## I.d. Metabolismo

### I.d.1. Generalidades

Un insecticida, antes de llegar al sitio de acción, debe cruzar varias barreras, una de ellas, es la capacidad de los organismos vivos para transformarlo químicamente hasta hacerlo inocuo. Esta capacidad, se logra gracias a una serie de mecanismos, que sin embargo en algunos casos, pueden producir la activación del xenobiótico y no su detoxicación, como ocurre para algunos insecticidas fosforados (34).

La detoxicación, llevada a cabo en general por un complejo grupo de enzimas relativamente no específicas, se divide en dos fases (35). Durante la fase I, se introducen en la molécula modificaciones que llevan a grupos polares, aumentando la solubilidad en agua y facilitando que el xenobiótico sea utilizado como sustrato en las reacciones involucradas en la fase II. En esta última, los compuestos alterados o no, según el caso, se combinan con sustratos endógenos, dando productos de conjugación hidrosolubles fácilmente excretables.

En la fase I ocurren (35): diversas oxidaciones mediadas por oxidasas de función mixta, oxidaciones no microsomales, reacciones de reducción, e hidrólisis.

Dentro de la fase II, aparecen reacciones de síntesis denominadas conjugaciones con las que se facilita la excreción (36), éstas pueden ser de dos tipos:

Tipo I: el agente conjugante activado reacciona con un dado sustrato.

Tipo II: el sustrato debe activarse antes de reaccionar con el agente conjugante (solo la conjugación con aminoácidos encaja en esta categoría).

Las reacciones son: conjugaciones con glucosa, ácido glucurónico, sulfatos, fosfatos, acilaciones, productos de la acción de metiltransferasas y glutatión S-transferasas.

Este amplio espectro de reacciones, se distribuye en forma inhomogénea entre los distintos animales y plantas. Es imposible generalizar un mapa metabólico para un compuesto en distintas especies, o para distintos compuestos en una misma especie. Pueden superponerse metabolitos pero usualmente no todos, y probablemente nunca coincidan los porcentajes obtenidos cuando esta superposición ocurre.

Las variaciones no solo son interespecies. En conejos se han encontrado diferencias de más de veinte veces en la actividad de OFM de hígado para seis cepas diferentes (37).

También los factores externos como la alimentación, el medio ambiente, se ven reflejadas en la capacidad de detoxicación. Animales de habitat terrestre, poseen una mayor facilidad para procesar xenobióticos a través de OFM que organismos acuáticos (37). En el caso de insectos, hay una gran variación de los

niveles enzimáticos a lo largo del ciclo de vida, con la repercusión consecuente en la susceptibilidad a insecticidas (38,39). Otro ejemplo destacable es la diferencia en la actividad oxidante mediada por OFM en grillos, debido a la edad y al sexo (40).

El hombre es a menudo considerado con escasa habilidad para detoxicar, en comparación con animales vertebrados de laboratorio.

La comparación entre los caminos metabólicos en ratas y humanos para veintiuna drogas, llevó a concluir que la rata era un buen modelo metabólico en cuatro casos, pobre modelo en nueve y estaba invalidada como modelo por la gran diferencia en ocho casos (41).

Esto lleva a tener mucha cautela al extrapolar resultados de animales al hombre, sobre todo en el caso de ratas o ratones en los que la actividad de OFM es mucho mayor que en humanos.

### I.d.2. Metabolismo de carbamatos

Los carbamatos la mayoría de los xenobióticos son susceptibles "in vivo", a una gran variedad de reacciones catalizadas por enzimas, sin embargo, se detoxican principalmente por hidrólisis, oxidación y conjugación (3).

Existe una enorme cantidad de trabajos publicados sobre metabolismo de insecticidas en insectos y mamíferos, y un número bastante menor en plantas y humanos. De ellos se concluye que existe una superposición en los tipos de metabolitos producidos

para un dado insecticida en casos muy diversos, pero con variaciones en la velocidad de formación que hace diferente el resultado cuantitativo final. Hay diferencias además, en el tipo de conjugación empleada. Un panorama general de las distintas posibilidades que pueden encontrarse, se observa en las figuras 7a, b y c.

Utilizando los datos hasta ahora disponibles, pueden hac las siguientes generalizaciones:

#### METABOLISMO DE CARBAMATOS EN PLANTAS:

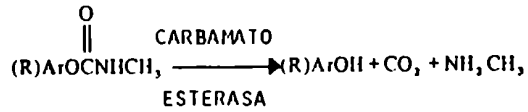
Hay un predominio del metabolismo oxidativo, aunque existe algo de hidrólisis, incluso de los metabolitos de oxidación. La hidroxilación es el principal camino empleado a través de las OFM.

Tomemos como ejemplo el carbaril (1 - naftil - N - metilcarbamato), uno de los carbamatos más estudiados, se degrada en plantas para dar 4-hidroxi, 5-hidroxi y 5,6 - dihidro dihidroxi - 1 - naftil - N - metilcarbamato además de 1 - naftil - N - hidroximetil carbamato y 1-naftol (figura 8) (42 a 48).

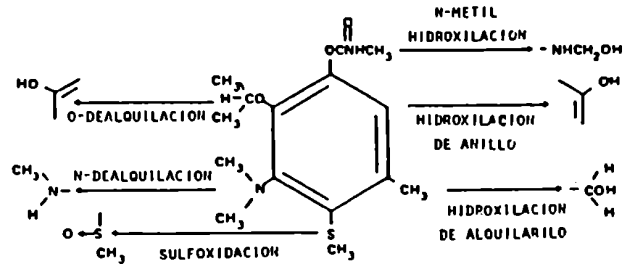
La recuperación de los metabolitos hidroxilados libres es baja, ya que la conjugación e incorporación a constituyentes de las plantas es rápida (42). La mayor parte de los productos de conjugación son glucócidos (42,44,46,48).

A diferencia de mamíferos e insectos, las plantas no eliminan sus productos de conjugación y permanecen almacenados por largo tiempo, usualmente algunos metabolitos se incorporan al tejido de la planta y no son extraíbles por solventes acuosos u orgánicos

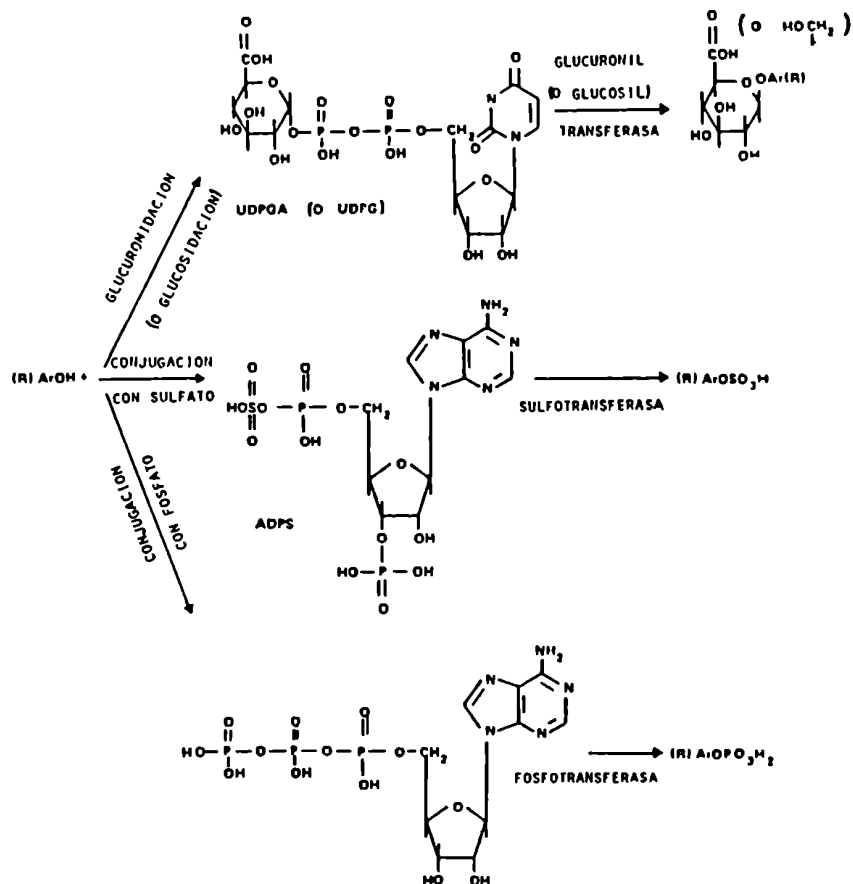




a) *Hidrólisis mediada por esteratas.*



b) *Oxidación a través de OFM sobre un metilcarbamato hipotético.*



c) *Conjugación de alcoholes y fenoles.*

Figura 7: *Detoxificación de carbamatos (3).*

(42,44,46,49,50).

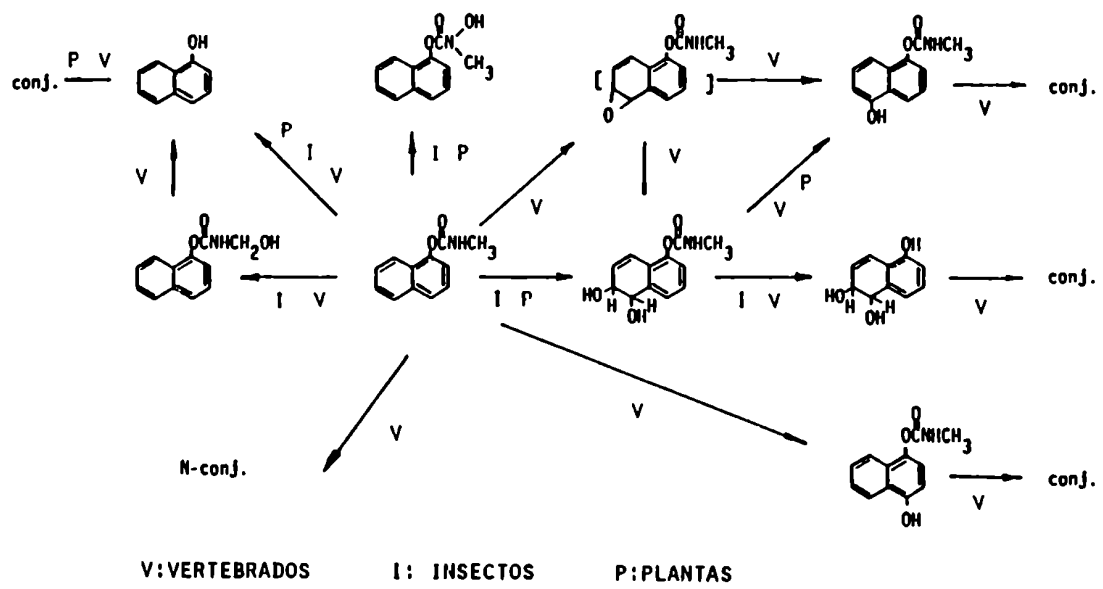
Es importante recordar que estos resultados fueron obtenidos con un número limitado de plantas (habas, algodón, brócoli, naranja), y no necesariamente representan un cuadro detallado para todas las plantas.

#### METABOLISMO DE CARBAMATOS EN INSECTOS:

En 1964 se determinó, invalidando suposiciones anteriores, que el carbaril y el propoxur (2 - isopropoxifenil - N - metilcarbamato) eran metabolizados en mosca y en cucaracha (americana), mayoritariamente a través de caminos no hidrolíticos (50). El mismo mapa metabólico general fue encontrado en otros estudios "in vivo" con moscas, gorgojo del algodón, gusano del maíz, gorgojo del arroz, abeja de la alfalfa y orugas de ciertos árboles (42,51 a 55). En la figura 8, vemos como ejemplo el metabolismo del carbaril en insectos. Se observa un predominio de la acción de OFM, dando metabolitos hidroxilados como 4 - hidroxil, 5 - hidroxil y 5,6 - dihidro , dihidroxil - 1 - naftil - N - metilcarbamato y 1 - naftil - N - hidroximetil carbamato.

Los metabolitos identificados como productos de hidrólisis, rara vez exceden el 10% de la dosis aplicada, y en algunos casos la hidrólisis del éster carbámico es virtualmente inexistente. Una posible excepción a este metabolismo no hidrolítico, aparece en cucaracha (germánica) al actuar sobre carbaril (56).

La presencia de inhibidores endógenos de OFM en homogenatos totales de moscas, llevó al empleo de abdomenes de mosca o dializados de homogenato total para obtener una buena actividad



**Figura 8:** Algunos metabolitos de carbaril en distintos sistemas.

enzimática (57,58).

En especies de insectos resistentes y en otras tolerantes a insecticidas, debido a la acción metabólica aumentada, ésta es mediada la mayoría de las veces por OFM (3,54,59 a 61).

En el caso de insectos, los metabolitos son conjugados formando glucúcidos, sulfatos y fosfatos (54,62 a 64).

#### METABOLISMO DE CARBAMATOS EN VERTEBRADOS

Son rápidamente metabolizados y excretados. Un 80% de la dosis es eliminada en orina y 0,5 a 15% en heces, 24 horas después del tratamiento (65).

Aunque la hidrólisis no es el único camino involucrado en el metabolismo de carbamatos en vertebrados, es el mecanismo predominante para algunos compuestos y debe ser considerado una vía importante en todos los casos (47,65,66). Por ejemplo, los metabolitos encontrados en orina de aves de corral y orina de ganado tratados oralmente con carbamatos, indican la presencia de productos de hidrólisis en alto porcentaje (67,68). Una excepción, parece ser el metabolismo del carbaril en monos y cerdos (69), en los que la hidrólisis es mucho menos importante. Esterasas de cerebro de ratón, actúan hidrolizando carbamatos (70), en cerebro humano se observa el mismo fenómeno (3). En plasma humano (14) y de conejo (3), se ha demostrado la importancia de la albúmina en la hidrólisis de varios carbamatos.

Pasando al metabolismo oxidativo, luego de identificar los productos obtenidos por acción de las OFM de microsomas de hígado de rata (50), se encontraron mapas metabólicos similares al

exponer a carbaril hígado de cobayo (71), ratón y conejo (72).

Cualitativamente los productos de la acción de OFM sobre carbamatos, son similares a los observados en plantas e insectos, con algunas excepciones. Esto se ve ejemplificado con el carbaril en la figura 8 y con diversos carbamatos en la literatura (63,73 - 77).

Mientras que la hidrólisis de los ésteres carbámicos, es una evidente reacción de detoxicación, el metabolismo oxidativo de carbamatos puede producir compuestos menos, igualmente o más tóxicos que los originales (65).

En cuanto a la conjugación, los carbamatos o sus metabolitos hidrolíticos u oxidativos, son conjugados en vertebrados a glucurónidos o sulfatos (65,67,69,71,72,73,78,79).

Solo pequeñas cantidades de la dosis oral consumida de carbamatos o sus metabolitos (0,1 a 1%), son excretados en la leche de animales de tambo, durante 24 horas. La alimentación continua con carbamatos, no implica un crecimiento continuo de residuos en la leche (65).

Apuntando específicamente al metabolismo de carbamatos en humanos, la importancia de la hidrólisis sobre la oxidación, parece ser mayor aún. Así, mientras algunos autores indican que un 30% del propoxur ingerido es hidrolizado (3), otros sostienen que el metabolismo hidrolítico supera con creces al oxidativo (80):

hombre (aprox. 100%) > ratas y otros mamíferos (20-40%) >  
insectos (1-20%) > plantas (aprox. 0%)

(entre paréntesis se indica el metabolismo hidrolítico respecto al oxidativo, para propoxur).

## II. SINERGISMO DE CARBAMATOS

### II.a. Sinergismo

Definiremos sinergistas a las sustancias capaces de aumentar la eficacia de un tóxico como tal, cuando actúan simultáneamente, mientras que "per se" y a la concentración empleada, no son tóxicas o lo son levemente.

La mayoría de las interacciones de sinergistas involucran la inhibición de sistemas enzimáticos metabolizantes de xenobióticos. De esta manera, al bloquear las enzimas que detoxican insecticidas, es posible utilizarlos en menor cantidad para lograr el efecto deseado sobre los insectos. Esto redundará en un menor costo en el control de plagas y una reducción de la contaminación ambiental.

Un sinergista a menudo amplía el espectro de acción de los insecticidas a especies tolerantes y cepas resistentes de insectos (81-86). Puede prevenirse además, el desarrollo de resistencia a insecticidas si su aplicación es simultánea con la de sinergistas, aun durante varias generaciones (87,88).

### II.b. Distintos tipos de sinergistas

Los resultados obtenidos en los estudios metabólicos, nos sugieren posibles sitios de acción para sinergistas, en lugares en los que la inhibición de enzimas degradativas sería útil. Existen distintos blancos para la acción de los sinergistas, entre ellos podemos nombrar:

Dehidroclorinasas:

sobre esta enzima actúa por ejemplo el clorfenetol (1, 1 bis (4-clorofenil) etanol) (89).

Esterasas:

son inhibidas por DEF (S, S, S - tributilfosfotioato), TOCP (tri - o - cresilfosfato), DFP (di - isopropilfosfofluorato), EPPAT (O - etil - S - fenilfosfoamidotioloato), TFP (1, 1, 1 - trifluorotetradecan - 2 - ona), Curacrom (O - etil - O - 1 - cloro - 4 - bromofenil - S - propilfosfotioloato) (90).

Carboxiesterasas:

actúan sobre ellas inhibiéndolas (90) el TPP (trifenilfosfato); IBP (O, O - diisopropil - S - bencil fosfotioloato); EPN (O - etil - O - p - nitrofenil fenilfosfonotioloato).

Epóxido hidrolasas:

un ejemplo de inhibidor (90) es el ETP (1, 1 - tricloropropano - 2,3 - epóxido).

Glutación-S-transferasas:

un sinergista que actúa sobre este tipo de enzimas es el DEM (maleato de dietilo) (90).

### OFM:

Los resultados obtenidos "in vivo" e "in vitro" al trabajar con insectos, nos muestran como mayoritaria la participación de este sistema enzimático en la detoxicación de insecticidas carbamatos. Dentro de los inhibidores de OFM existen varias familias:

#### - Organotiocianatos:

el compuesto con el que se demostró la posibilidad de sinergismo por estructuras de este tipo fue el thanite (91,92) (figura 9 I). Estudios posteriores llevaron a cambios en la molécula, siendo muy promisorio el 4-nitrobencil tiocianato (93) (figura 9 II).

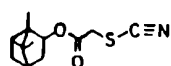
#### - Propiniléteres:

también llamados propargilfenil éteres o propargiloxi bencenos. Conforman un grupo bastante nuevo de sinergistas, patentados en 1966 (3) y con muy buena actividad (94-96). Entre ellos tenemos al 1-naftil - 3 - butinil éter y al R05-1557 (figura 9 III y IV).

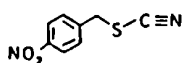
#### - Ariloxialquilaminas:

durante años se utilizaron el SKF 525 y el Lilly 18947 (figura 9 V y VI) para prevenir el metabolismo "in vivo" de drogas. No fue entonces sorprendente, encontrar que actuaban como sinergistas de carbamatos en insectos (92,97). Posteriormente se realizaron diversos estudios con compuestos de estructura similar, que también fueron efectivos como sinergistas (98-100).

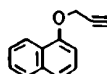




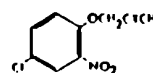
I: THANITE



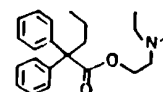
II: 4-NITROBENCIL  
TIOCIANATO



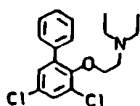
III: 1-NAFTIL  
3-BUTIRIL  
ETER



IV: RO 5-1557



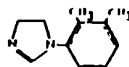
V: SKF 525-A



VI: LILLY 18947



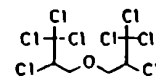
VII: BENZOTIADIAZOL



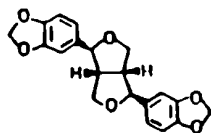
VIII: IMIDAZOL



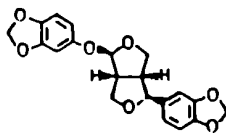
IX: FENIL N,N-DIBUTIL  
CARBAMATO



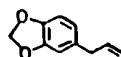
X: OCTACLORO  
DIPROPILETER



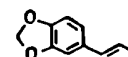
XI: SESAMIN



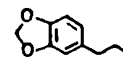
XII: SESAMOLIN



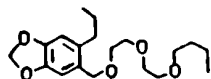
XIII: SAFROLE



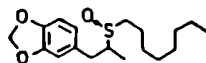
XIV: ISOSAFROLE



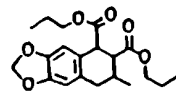
XV: DIHIDROSAFROLE



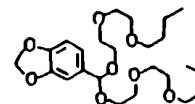
XVI: BUTOXIDO DE  
PIPERONILO



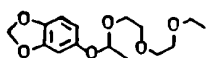
XVII: SULFOXIDO



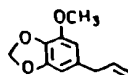
XVIII: PROPIL ISOME



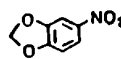
XIX: TROPITAL



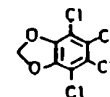
XX: SESAMEX



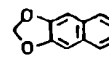
XXI: MIRISTICIN



XXII: NITROMETILEN  
DIOXIBENCENO



XXIII:  
TETRACLOROMETILEN  
DIOXIBENCENO



XXIV: METILENDIOXI  
NAFTALENO

**Figura 9: Estructuras de diversos sinergistas de insecticidas.**

*- Benzotiadiazoles e imidazoles:*

además del benzotiadiazol (figura 9 VII), un grupo de moléculas relacionadas son efectivas como sinergistas (101). Los imidazoles, fueron descubiertos recientemente (102), como potentes inhibidores de OFM de insectos y mamíferos. Estructuras como la del 1-(2,3-dimetilfenil) imidazol (figura 9 VIII) son muy activas, probablemente esta alta actividad en mamíferos impida su explotación comercial.

*- Compuestos que poseen el grupo metilendioxi:*

son los más importantes sinergistas desde todo punto de vista, por su historia, uso corriente y número de compuestos activos. Este grupo será desarrollado con más detalle en el ítem II.c.

*- Misceláneos:*

existen otros compuestos, como algunos carbamatos no insecticidas, que sinergizan por competir por el sitio de acción de las OFM (85,103), como el fenil N,N-dibutil carbamato (figura 9 IX). Una molécula utilizada comercialmente para aumentar la actividad insecticida de carbamatos es el octaclorodipropil éter (figura 9 X)(82,104). También algunos ácidos borónicos alquílicos y arílicos actúan sinergizando carbamatos (103).

**II.c. Sinergistas que poseen el grupo metilendioxi**

**II.c.1. Generalidades**

El sesamin (figura 9 XI) fue el primero de los compuestos del grupo en ser aislado e identificado en 1942 (105,106), como uno de los ingredientes activos del aceite de sésamo, un sinergista patentado para ser usado con piretrinas insecticidas. Muchos otros compuestos naturales y sintéticos (figura 9 XII a XXIV), aparecieron posteriormente, pero los más usados comercialmente son el butóxido de piperonilo, sulfóxido, propil isome y tropital (38). Algunos compuestos más han tenido un menor suceso comercial (107).

Los primeros indicios de aumento en la toxicidad de carbamatos por MDF compuestos, aparecieron en 1958. Isolan, carbaril y otros carbamatos fueron sinergizados por cotratamiento con sesamex, butóxido de piperonilo, sulfóxido o propil isoma en moscas, cucaracha germanica y algunos áfidos (3).

En los años siguientes, varios estudios establecieron la efectividad del sinergismo con metil y dimetilcarbamatos, de una variedad de MDF compuestos sobre especies tolerantes y resistentes a la acción de insecticidas organoclorados y organofosforados (88,104,108 a 110). En trabajos posteriores, se observó que a través de MDF sinergistas se restauraba la toxicidad de carbamatos sobre cepas de insectos carbamato-resistentes (30,82,83,87,97,111).

Esto llevó a una reevaluación de la toxicidad de carbamatos en moscas, a través del uso de sinergistas. Los resultados muestran una mayor uniformidad en la toxicidad de distintos carbamatos, respecto de las grandes variaciones entre los valores sin sinergizar (112). La diferencia en la toxicidad observada, es

atribuible a variaciones en la penetración a través de la cutícula, metabolismo, excreción, etc. (113,114). Con MDF sinergistas también pueden eliminarse las notables diferencias de toxicidad entre insectos de la misma cepa pero de distinta edad, sexo o estadio de desarrollo, debido a la inhibición del sistema de OFM (115).

Usualmente cuanto mayor es la relación sinergista/carbamato, más eficaz es la combinación (62,91,93,113). El entusiasmo por el uso de estos sinergistas con carbamatos se debe parcialmente a la baja relación sinergista-carbamato que es efectiva (94,116,117). Obviamente, la combinación sinergista-carbamato, no debería ser más tóxica para las especies no blanco que el carbamato solo. Afortunadamente hay varios factores que llevan a que esto ocurra, particularmente en mamíferos. El primero de ellos es el metabolismo de los carbamatos insecticidas, el cual se lleva a cabo en animales superiores primariamente vía hidrólisis (47,65,66). Este metabolismo detoxicante, no es afectado por los MDF sinergistas. En segundo lugar el sistema de OFM de insectos parece ser mucho más sensible a la inhibición que su equivalente en mamíferos (38,118 a 120). Por último, los mamíferos poseen una mayor capacidad para metabolizar sinergistas, por lo cual persisten por cortos periodos de tiempo "in vivo" (38,119,121 a 123).

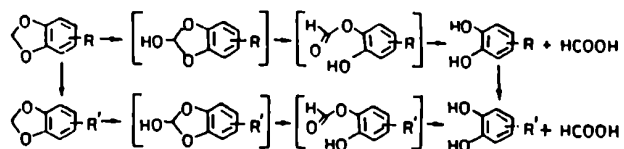
Los MDF sinergistas también son detoxicados a través de OFM. Además de los productos de oxidación de las cadenas unidas al anillo aromático, se produce la ruptura de la unión del metileno

a los oxígenos, dando una variedad de alcoholes, catecoles y ácidos carboxílicos (figura 10) (38,123,124).

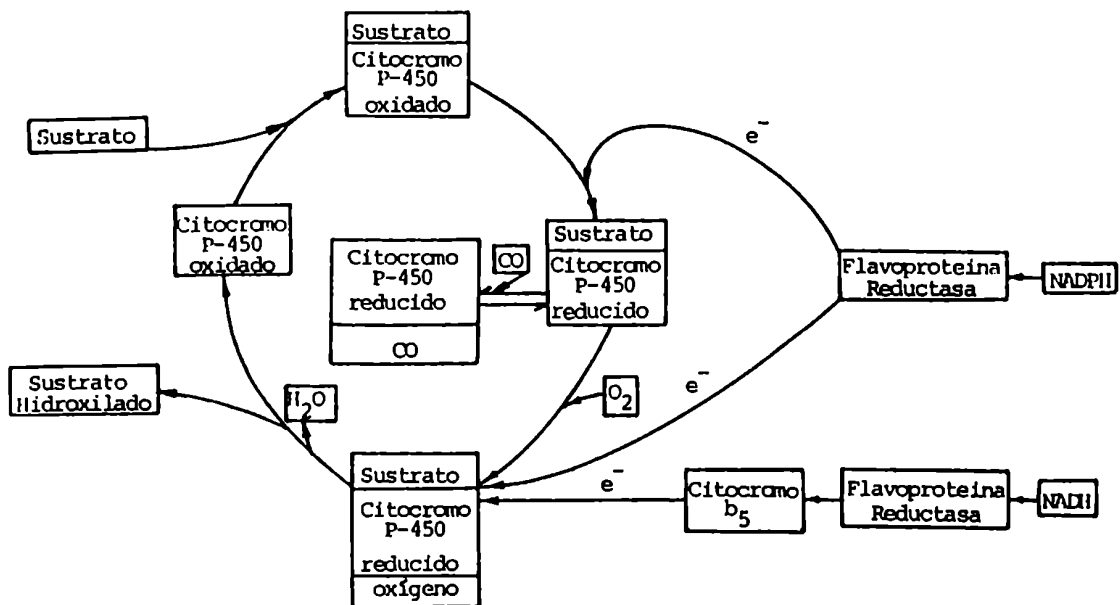
### II.c.2. Mecanismo de inhibición de OFM por MDF sinergistas

El sistema de OFM u oxidasas microsomales, es llamado así por su ubicación en la fracción microsomal de los homogenatos celulares. Más específicamente, el retículo endoplasmático liso es el que usualmente se asocia con la deactivación y eliminación de xenobióticos en animales. El sistema necesita como sustratos, además de la sustancia a detoxificar, NADPH y oxígeno molecular. Comprende dos hemoproteínas, el citocromo  $b_5$  y el citocromo P-450 y al menos dos flavoproteínas (3).

Aunque el mecanismo por el cual actúan el citocromo P-450 y otras enzimas del sistema de OFM, no está completamente dilucidado, se conocen muchas de sus características (figura 11)(125). El primer paso en el proceso de oxidación es la combinación del sustrato con la forma oxidada del citocromo P-450, para formar un complejo citocromo P-450-sustrato. Este es reducido por un equivalente de reducción derivado de un NADPH, a través de una flavoproteína reductasa. Se desconoce si otro componente forma parte de la cadena de electrones hacia el citocromo P-450 en este sitio. La forma reducida del complejo, puede reaccionar con CO para formar otro complejo, con un pico característico en el espectro diferencial a alrededor de 450 nm (que le da el nombre al



**Figura 10:** Metabolismo de MDF sinergistas (38).

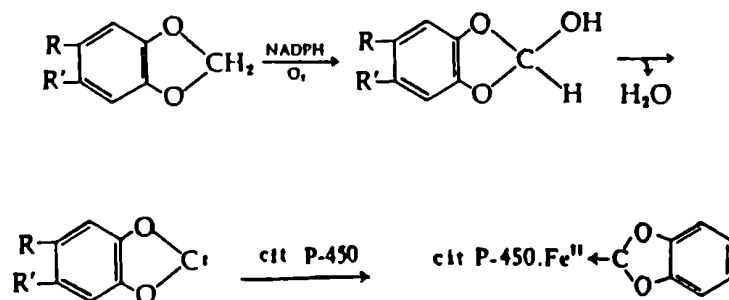


**Figura 11:** Mecanismo propuesto para la oxidación a través del citocromo P450 (125).

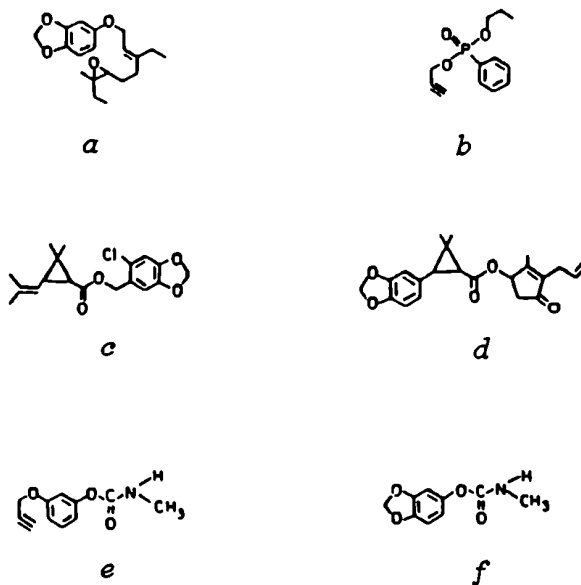
citocromo), en presencia de oxígeno molecular forma un intermediario oxigenado. Un segundo paso de reducción ocurre probablemente a través del citocromo  $b_5$ . En este caso el electrón puede provenir de un NADPH o un NADH. Luego, vía una reacción de dismutación no totalmente comprendida, se libera el producto oxidado, agua, y la forma oxidada del citocromo P-450.

Los MDF sinergistas interfieren con el metabolismo oxidativo de insecticidas, formando un complejo con el citocromo P-450, que puede ser reconocido por sus características espectrales (126). Esto es apoyado por una gran cantidad de evidencias, que correlacionan la formación de un tipo de complejo particular con la inhibición de la oxidación microsomal. Para algunos compuestos sin embargo, la correlación no es absoluta (125,127), aunque están comenzando a ser explicadas algunas anomalías espectrales (128). En general, se acepta que el complejo se forma por interacción del metileno de los MDF sinergistas con el citocromo P-450. La naturaleza exacta de las reacciones no se conoce, pero se postula la formación de un carbeno a través de NADPH y oxígeno por pérdida de agua (figura 12). El carbeno reaccionaría con el hierro del grupo hemo, involucrando uniones  $\pi$ , así como un enlace sigma dativo, formado por el par de electrones libres (129). La formación de este complejo bloquea la unión del CO (y presumiblemente del oxígeno) e inhibe el metabolismo de xenobióticos.

Los sustituyentes unidos al grupo fenilo, también influyen en la actividad sinergista, ya que pueden afectar la penetración



**Figura 12:** Modo de acción de HDF sinergistas (129).



**Figura 13:** Estructuras de diversos autosinergistas.



cuticular, el transporte al sitio de acción y la unión al mismo (103,130).

### II.d. Autosinergismo

Una manera interesante de utilizar la actividad sinergista asociada a ciertos grupos, es incorporarlos directamente a la estructura de la molécula de insecticida. El éxito de esta combinación radica en que el grupo sinérgico, no interfiera con la acción del grupo toxóforo, siendo probablemente ésta la razón por la cual los autosinergistas no han tenido un gran suceso en muchos casos.

De todas formas, ha sido preparada una serie de compuestos autosinergistas de diversos tipos. Entre ellos hay miméticos de hormonas, que actúan como sus propios sinergistas e impiden además la oxidación de las hormonas propias de los insectos. Las estructuras son muy variadas, como por ejemplo éteres terpenoides (131) y 0-2-propinil fosfonatos (131) (figura 13 a y b), también se han incorporado grupos MDF a insecticidas piretroides, tanto en la mitad correspondiente al ácido como en la del alcohol, con distinto grado de éxito (38,133) (figura 13 c y d). En el caso de los carbamatos, la incorporación de grupos tiocianato (103) o tiadiazol (40) no dió resultados positivos en lo que respecta a autosinergismo. La combinación con grupos propinilo fue efectiva en 2- y 3-(2-propiniloxi)fenil N-metil carbamato (97) (figura 13e). Asimismo el 3,4-metilendioxfenil N-metilcarbamato (MDC),

demostró tener capacidad autosinergista (17,97,112,134) (figura 13 f). Este compuesto, a pesar de no tener muy buena actividad anticolinesterásica, es tóxico en moscas y no es sinergizado por BP (lo que sugiere que actúa como su propio sinergista). Los N-metilcarbamatos de fenilcetoximas tuvieron cierto grado de autosinergismo al incorporarles el grupo MDF (135).

La molécula de insecticida autosinergista, tiene la ventaja de transportar al mismo tiempo y lugar al sinergóforo y al toxóforo, lo cual es ideal para su acción conjunta. No menos importante es la posibilidad de disminuir a la mitad al menos, el número de moléculas bioactivas liberadas al medio ambiente.

### III. CARBAMATOS DERIVADOS

#### III.a. Concepción y desarrollo

La derivatización es una parte significativa de la optimización de la relación entre la estructura y la actividad biológica de una dada sustancia. La derivatización sin embargo, se caracteriza por ser diferente de otras modificaciones estructurales de moléculas biologicamente activas. El derivado está diseñado para que su ruptura libere el compuesto original. De esta manera, diferentes derivados ejercen su bioacción del mismo modo que la estructura de origen. Los derivados de pesticidas, pueden poseer enormes ventajas sobre el producto de partida en áreas tan importantes como: toxicidad selectiva, translocación en

plantas, estabilidad foliar y limitación de la fitotoxicidad.

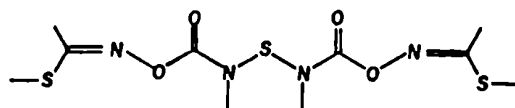
Recién en la última década, una serie de derivados de carbamatos han llegado a un estado de desarrollo ya próximo o en la etapa de comercialización. Entre ellos tenemos el tiodicarb larvin (de Union Carbide, USA), el oncol (de Otsuka, Japón), el carbosulfan (de FMC, USA), el U-46.855 (de Upihon, USA) y el CGA-73.120 (de Ciba-Geigy, Suiza) (figura 14). Estos derivados son superiores a los carbamatos de los cuales provienen, en algunas características de su acción en campo, y son sin excepción, menos tóxicos en mamíferos (136).

Desde el punto de vista químico, los carbamatos tienen propiedades muy favorables. Son generalmente cristalinos, obtenidos relativamente libres de contaminantes, inodoros y bastante estables en el medio ambiente, aunque biodegradables. El punto débil es su alta toxicidad aguda en mamíferos, en muchos casos similar a la toxicidad aguda en insectos (197).

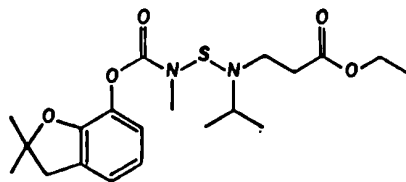
La síntesis de proinsecticidas, inertes en virtud de su estructura, pero que alterados química o biológicamente liberan el carbamato original, lleva a una toxicidad selectiva. La acción tóxica selectiva de estos derivados es atribuida a (137):

- a) Un factor de demora provisto por el grupo funcional incorporado.
- b) Diferencias en el camino metabólico entre insectos y mamíferos.
- c) Diferencias en las propiedades físicas de los derivados.

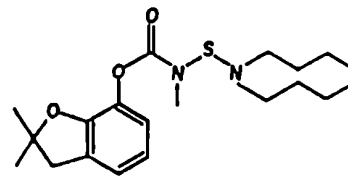
Estos factores, independientemente y muchas veces en forma simultánea, operan reduciendo la concentración del insecticida



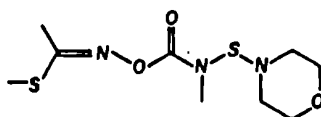
thiodicarb (Union Carbide)



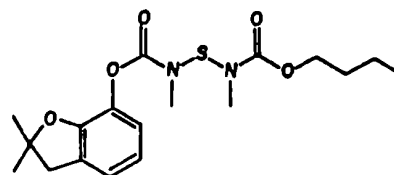
Oncol (Otsuka)



carbasulfan (FMC)



U-46,855 (Upjohn)



CGA-73,120 (Ciba-Geigy)

**Figura 14** Estructuras de derivados de carbamatos en etapa cercana a la comercialización.

original liberada en mamíferos y permitiendo su acumulación en insectos. La utilidad del "factor de demora" ya ha sido propuesta anteriormente para insecticidas fosforados (138). En estos compuestos el lapso necesario para la activación, permite al eficiente sistema metabólico de los mamíferos degradar la molécula, disminuyendo la bioacumulación del o los metabolito tóxicos. La toxicocinética es sustancialmente distinta en insectos. Un sistema detoxicante mucho menos eficiente conduce a la intoxicación con dosis notablemente menores.

La aplicación a los carbamatos del concepto de proinsecticida, se basa en (139):

- a) La introducción de un grupo químico en su estructura, que reduce la disminución del poder anticolinesterásico.
- b) La liberación, a partir de la estructura modificada, del insecticida por vía química, endógena o enzimática, a una velocidad significativa en insectos. De esta manera, el factor de demora proporcionaría una reducción de la actividad intrínseca, resultando en una amplia oportunidad de detoxicación en mamíferos, y una mucho menor en insectos.

El reemplazo del átomo de hidrógeno unido al nitrógeno carbámico, ha dado los resultados esperados, lograndose con diversos grupos funcionales un factor de demora para carbamatos. Los grupos utilizados en la derivatización son diversos, entre ellos tenemos:

Carbamatos N-acilados:

es el primer grupo de derivados en los

que se encontró selectividad entre insectos y mamíferos (140) (figura 15 a). Se demostró que el tóxico presente era el carbamato sin derivatizar, originado a partir del N-acil derivado (141). Inmediatamente después, se realizaron algunos estudios cambiando el hidrógeno del nitrógeno carbámico por otros átomos (23).

N-fosforotioil carbamatos:

el diseño de estos derivados incluyó también el probable factor de demora introducido por el grupo fosforado (figura 15 b). Los resultados fueron los esperados en la mayoría de los casos (142).

N-aril y N-alquilsulfenil carbamatos:

también poseen un perfil favorable de toxicidad (143,144) (figura 15 c). En este grupo aparecen varios compuestos elevadamente tóxicos sobre larvas de mosquito (145).

Dialquilaminosulfenil carbamatos:

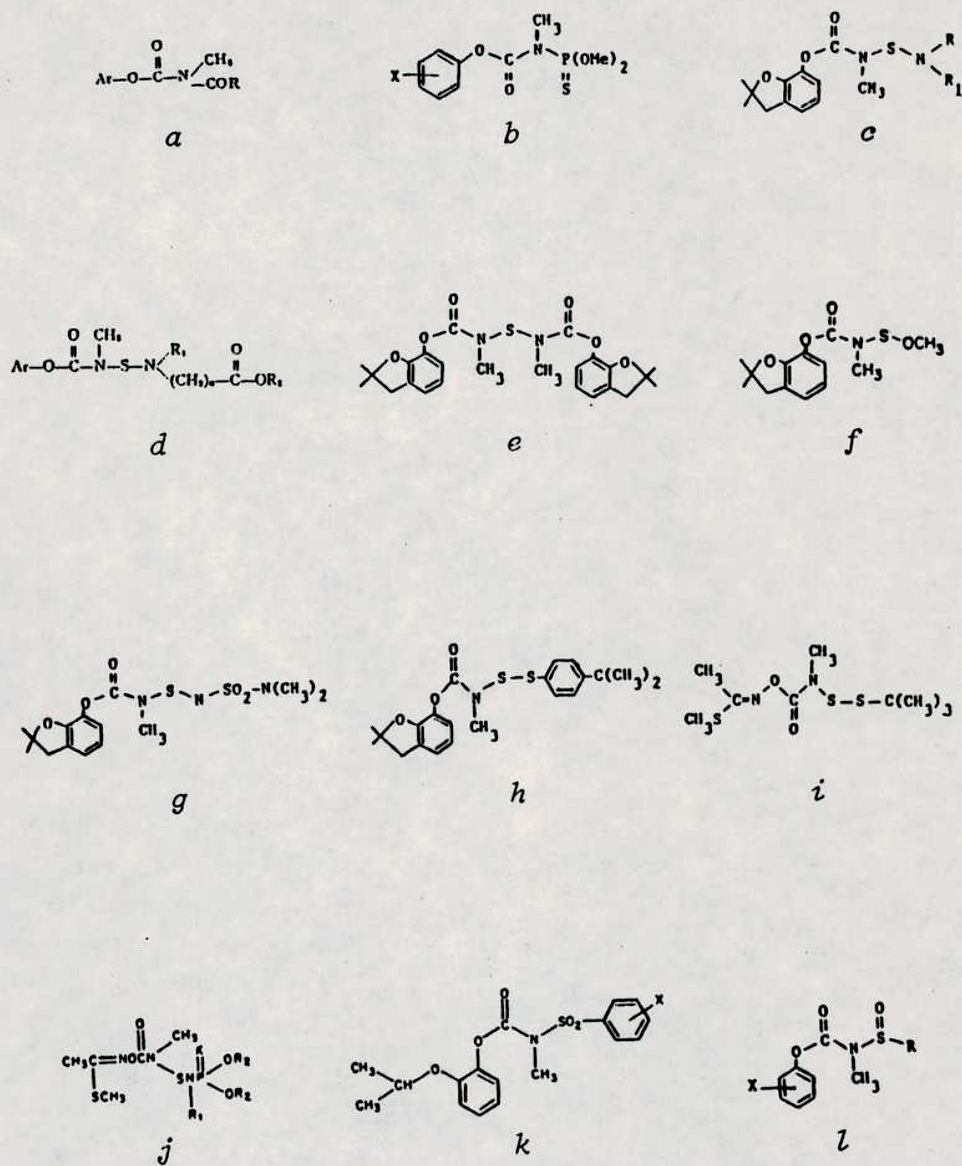
algunos de estos compuestos poseen además de selectividad, mayor vida residual foliar (146) (figura 15 c).

Esteres de aminosulfenil carbamatos con aminoácidos:

uno de los compuestos de este grupo ya está en vías de comercialización (147) (figura 15 d).

Sulfenil dicarbamatos:

se sintetizaron en gran número, en algunos casos mejorando notablemente su selectividad (148-151)



**Figura 15:** Estructuras de diversos derivados de carbamatos.

(figura 15 e).

Alcoxisulfenil dicarbamatos:

fueron obtenidos durante estudios de reactividad de alquilaminosulfenil carbamatos. Posteriormente fueron sintetizados y caracterizados como insecticidas (152) (figura 15 f).

Sulfonamido ariltio y alquiltiosulfenil carbamatos:

fueron patentados como selectivos (153) (figura 15 g, h, i).

Fosforamidossulfenil carbamatos:

en este grupo se encuentran los derivados de mayor selectividad sintetizados a partir de carbamatos (154,155) (figura 15 j).

Arilsulfonil carbamatos:

presentaron pobre actividad insecticida y baja toxicidad en mamíferos (156) (figura 15 k).

Sulfinil carbamatos:

se ha sintetizado una amplia gama, con estructuras similares a los sulfenil derivados ya mencionados. En muchos casos la selectividad es mayor que para éstos últimos (157) (figura 15 l).

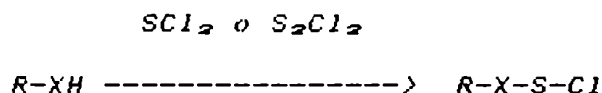
III.b. Sulfenil derivados

III.b.1. Síntesis

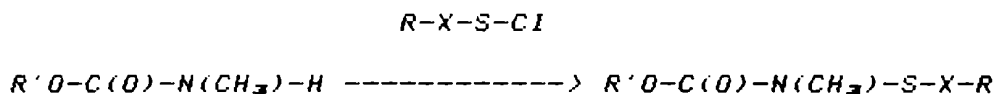


Via cloruro de sulfenilo:

los cloruros de sulfenilo reaccionan con carbamatos produciendo el sulfenil derivado (143). El cloruro de sulfenilo, puede obtenerse a partir de monocloruro o dicloruro de azufre y una serie de sustancias que poseen un hidrógeno lábil, de acuerdo a:

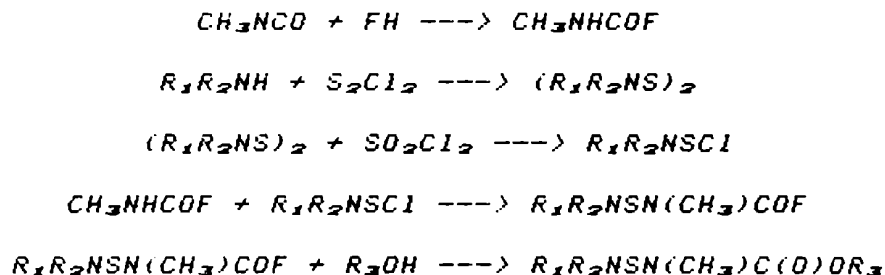


La reacción del cloruro de sulfenilo con un carbamato da origen a un sulfenil carbamato.



Via fluoruro de carbamoilo:

se utiliza en la síntesis de dialquilamino sulfenilcarbamatos, sin emplear un carbamato como materia prima (158). El número de pasos es mayor, y el proceso general se puede resumir de la siguiente forma:



III.b.2. Mecanismo de activación de los sulfenilcarbamatos

Aunque varios trabajos indican la acumulación de carbamatos tóxicos en insectos envenenados con carbamatos derivatizados (159-162), permanece poco claro si esta liberación ocurre por una reacción de naturaleza puramente química o enzimática.

La mayoría de los carbamatos derivatizados son susceptibles a la ruptura en medio ácido (139,163). También ha sido reportada la ruptura enzimática del enlace N-S (164). Sin embargo, se observó un proceso de activación no enzimático, a través de una ruptura tiolítica del enlace N-S, para varios sulfenil carbamatos (165). Fracciones subcelulares de hígado de ratón, enzimas microsomales desnaturalizadas por el calor, sangre de ratón, proteínas comerciales y homogenatos de mosca, rápidamente afectan la unión N-S. El efecto inhibitorio de la reacción por compuestos tales como la N-etilmaleimida y p-cloromercuribenzoato (inhibidores de sulfhidrilos), sugieren que los grupos tiol de los tejidos biológicos, están involucrados en la acción tiolítica. Resultados cinéticos y análisis de los productos de la tiólisis también sugieren esta conclusión. El mecanismo propuesto para la activación de sulfenilcarbamatos es el siguiente:



A pesar de la forma aparentemente inespecífica de activarse de los sulfenilcarbamatos, la aparición del carbamato de origen en ratones y ratas a los que se administró oralmente un proinsecticida, es mucho menor que en insectos, lograndose la deseada selectividad (159-161,166). Estudios de las alteraciones de sulfenilcarbamatos producidas en medio ácido (163,167) y en

estómago de rata (168), indican la conversión de éstos en polisulfuros menos tóxicos aún que el derivado. La baja actividad en mamíferos puede ser atribuida en parte a este hecho. Estos factores de demora, permitirían el ataque metabólico al resto de la molécula de carbamato según los mecanismos normales para los mismos.

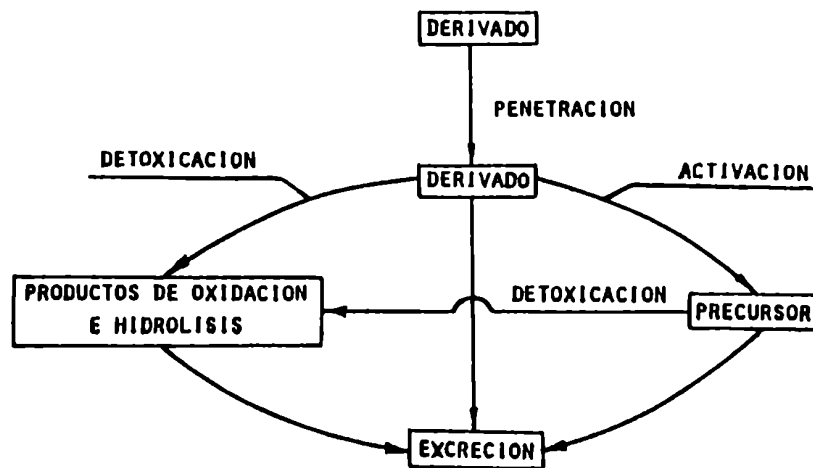
En plantas, se ha demostrado, en algunos casos, la liberación del insecticida de origen luego de aplicar proinsecticida (169). En otros casos este fenómeno no fue observado (170).

En estudios de degradación de sulfenilcarbamatos en suelo también se demostró la liberación del carbamato de partida (171-173).

### III.c. Ventajas introducidas

El complejo interjuego de varios factores que afectan la toxicidad selectiva de derivados de insecticidas, se ilustra en la figura 16 (136). Este diagrama, es una representación parcial de las barreras y pasos limitantes bioquímicos y fisiológicos, para la intoxicación de un insecto por un proinsecticida aplicado externamente. En la mayoría de los casos, la toxicidad de un proinsecticida depende de la compleja interacción de los procesos de penetración, activación, detoxicación, y excreción del derivado y del insecticida de origen.

Variaciones en el grupo utilizado para la derivatización, introducen distintas particularidades a un dado derivado, lo cual,



**Figura 16:** Pasos limitantes de la velocidad de intoxicación por derivados de insecticidas en insectos (136).

manejado adecuadamente, puede volcar a nuestro favor uno o varios de los procesos que van desde la penetración a la intoxicación.

Veamos algunos ejemplos:

El 2-metil 4 - terbutilbencenosulfenil derivado del propoxur, es tóxico para moscas pero poco tóxico para abejas (174), esta excepcional selectividad se debe, aparentemente, a la reducida penetración del proinsecticida a través de la cutícula de abeja (175).

Las propiedades lipofílicas de los derivados se vuelven muy importantes en algunos casos. En larvas de mosquitos, cuya cutícula es muy cerosa, la cantidad de sulfenilcarbamato absorbida desde el agua, aumenta al crecer la cadena de carbonos presente. Al mismo tiempo, el aumento de carbonos en cadenas lineales disminuye la toxicidad en mamíferos (150). En el mismo trabajo se llega a correlacionar la toxicidad en larvas de mosquito, medida por la  $CL_{50}$ , con el  $\log P$ , siendo  $P$  el coeficiente de partición octanol:agua, un parámetro muy utilizado en la medición de la hidrofobicidad.

También existe el caso opuesto, el de los sulfenilcarbamatos derivados de azúcares, en los cuales se aumenta la polaridad para mejorar su actividad sistémica en plantas (176).

Además de la lipofobicidad de derivados, también existen otras mejoras, como puede ser el aumento de la vida residual foliar (144), la disminución de la fitotoxicidad (155), sin dejar de lado la selectividad entre insectos y mamíferos. En algunos casos la  $DL_{50}$  de derivados en mamíferos supera los 8000 mg/kg (155).

#### IV. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Existe en nuestros días, una necesidad ecológica creciente de contar con nuevos insecticidas, cada vez más activos y selectivos (177,178).

Hasta la actualidad, el mecanismo de desarrollo de nuevas moléculas para el control de plagas, por compañías privadas, arranca de la síntesis al azar de estructuras para las cuales se presume actividad insecticida (178).

Este trabajo, pretende encarar una modalidad distinta en el desarrollo de moléculas insecticidas, a través del diseño molecular. Este tipo de estudios, hasta ahora reservados a los laboratorios de investigación, parte de conocimientos previos del comportamiento en medios biológicos de determinados grupos uniones químicas. Esto permitiría predecir la bioactividad de nuevas moléculas que los contengan.

En este caso, el punto de partida fue una serie de trabajos realizados en la Universidad de California, Estados Unidos, acerca de la sulfenilación de N-metilcarbamatos insecticidas, como método para aumentar la selectividad de dichos compuestos. A este concepto se incorporó la posibilidad de incluir un grupo sinérgico, el metilendioxfenil, potencial generador de autosinérgico. En base a tales premisas, se planeó sintetizar una serie de sulfenildicarbamatos derivados del 3,4-metilendioxfenil N-metilcarbamato. La estructura general de los derivados puede observarse en la figura 17. Se planteó como hipótesis que estos

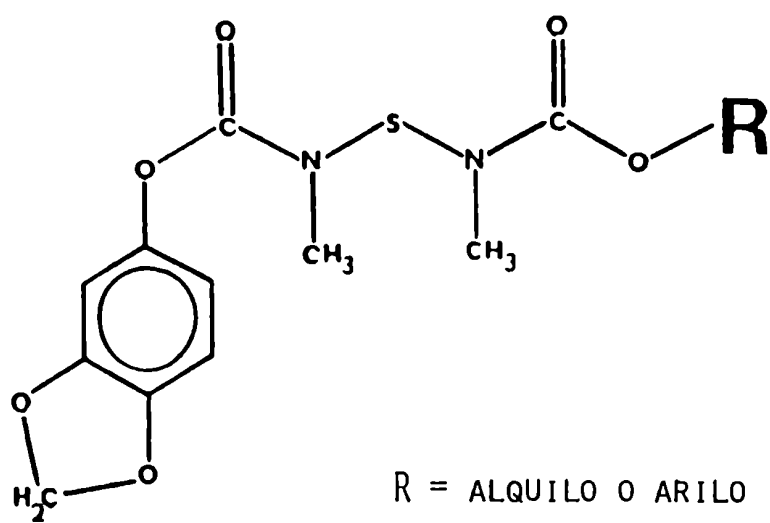


Figura 17: Estructura general de los SDA.

*compuestos poseerian buena actividad insecticida, selectividad y capacidad autosinergista.*

*El presente estudio consiste en la síntesis de estos nuevos sulfenildicarbamatos y la caracterización de sus propiedades toxicológicas, principalmente su selectividad y su actividad autosinergista.*





## MATERIALES Y METODOS

### 1. DROGAS UTILIZADAS

Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico marca Aldrich (USA) o Merck (Alemania Occidental), salvo que se especifique lo contrario. Los solventes (Merck, Alemania Occidental), fueron deshidratados con tamiz molecular de 4 A (Aldrich, USA) antes de ser utilizados. Los solventes para cromatografía líquida de alta resolución (Baker, USA) fueron degaseados por filtración al vacío, a través de vidrio sinterizado y aplicando ultrasonido.

### 11. SINTESIS

#### 11.a. Obtención de carbamatos

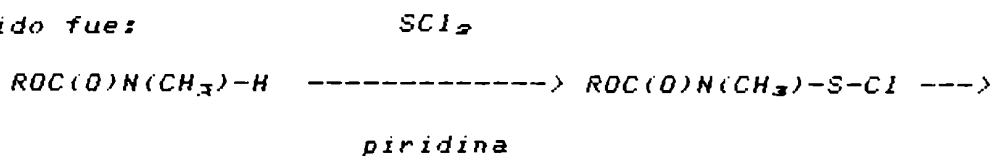
Como materia prima de los SDA se utilizaron ocho carbamatos, cuatro aromáticos y cuatro alifáticos. Dos de los carbamatos aromáticos, carbaril (1 - naftil - N - metilcarbamato) y propoxur (2 - isopropoxifenil - N - metilcarbamato), de grado técnico, fueron donados por Union Carbide y Bayer respectivamente. Ambos fueron recrystalizados de etanol-agua. El resto de los carbamatos fueron sintetizados. El método general de preparación empleado (17) (figura 2A) se desarrolla en el siguiente ejemplo:

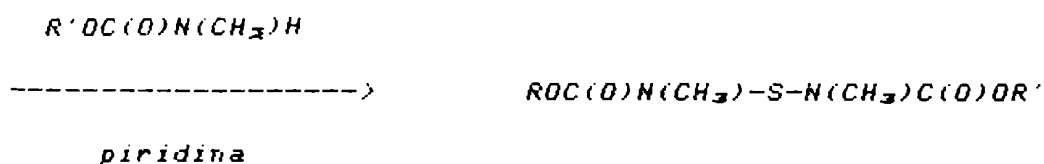
A 4,95 g (0,03 moles) de 3-metilfenol disueltos en 15 ml de éter etílico anhidro, se agregaron 5 gotas de trietilamina y 0,97 ml (1,8 g, 0,0315 moles) de isocianato de metilo (exeso del 5%), disueltos en 2 ml de éter etílico anhidro. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente y luego de 24 horas se destiló el solvente a 40°C y a presión reducida en un evaporador Wheaton Heidolph modelo mikro Heigbad. Se obtuvieron 5,2 g de tsumacide (3-metilfenil - N - metilcarbamato), como cristales blancos forma de agujas (rendimiento 78%), que fueron recristalizados de etanol-agua.

En el caso de los carbamatos alifáticos, el tiempo de reacción fue de 4-5 días. El butilcarbamato se purificó por destilación a presión reducida. Los carbamatos obtenidos fueron: propoxur, carbaril, tsumacide, MDC (3,4 - metilendioxfenil N metilcarbamato), n-butil, n-octil, n-dodecil y n-hexadecil - N - metilcarbamatos.

II.b. Síntesis de clorosulfenil-carbamatos y sulfenildicarbamatos.

En todos los casos la técnica utilizada fue similar (150) con algunas adaptaciones respecto de la bibliografía. El esquema seguido fue:





*Un ejemplo que ilustra la técnica empleada es el siguiente:*

*A 0,4 ml (0,65 g, 0,0063 moles) de dicloruro de azufre (SCl<sub>2</sub>) (exeso del 5%), disueltos en 0,5 ml de cloruro de metileno, se agregaron lentamente 0,99 g de tsumacide (0,006 moles) y 0,51 ml (0,50 g, 0,0063 moles) de piridina (en exeso 5%), disueltos en la mínima cantidad posible de cloruro de metileno. La mezcla de reacción fue mantenida desde el comienzo a 0°C con agitación constante y bajo corriente de nitrógeno secada con silicagel. Se dejó reaccionar durante 15 minutos, observándose la aparición de un precipitado de clorhidrato de piridina, índice de la formación de clorosulfenilcarbamato. A la mezcla de reacción cruda se le agregaron 1,17 g (0,006 moles) de 3,4-metilendioxfenil - N - metilcarbamato) y 0,5 ml (0,5 g, 0,0063 moles) de piridina (en exeso 5%), disueltos en la mínima cantidad posible de cloruro de metileno. Se dejó reaccionar 16 horas con agitación a 0°-5°C en recipiente cerrado con atmósfera de nitrógeno, llegando así al sulfenildicarbamato crudo. Luego de sucesivas purificaciones (ver punto III de Materiales y Métodos) se obtuvieron 0,42 g del sulfenildicarbamato puro (18% de rendimiento con respecto al carbamato de partida).*

*Con esta metodología se sintetizaron los siguientes*

derivados del MDC:

I: 3,4 - metilendioxfenil - N - (2 - isopropoxifenil - N - metilcarbamoil sulfenil) - N - metilcarbamato.

II: 3,4 - metilendioxfenil - N - (1 - naftil - N - metilcarbamoil sulfenil) - N - metilcarbamato.

III: 3,4 - metilendioxfenil - (3 - metilfenil - N - metilcarbamoil sulfenil) - N - metilcarbamato.

IV: 3,4 - metilendioxfenil - N - (n - butil - N - metilcarbamoil sulfenil) - N - metilcarbamato.

V: 3,4 - metilendioxfenil - N - (n - octil - N - metilcarbamoil sulfenil) - N - metilcarbamato.

VI: 3,4 - metilendioxfenil - N - (n - dodecil - N - metilcarbamoil sulfenil) - N - metilcarbamato.

VII: 3,4 - metilendioxfenil - N - (n - hexadecil - N - metilcarbamoil sulfenil) - N - metilcarbamato.

### III. PURIFICACION DE SDA

El procedimiento descrito a continuación fue similar en todos los casos.

El producto crudo de la reacción fue filtrado a través de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro (desechado 4 horas a  $105^\circ\text{C}$ ), eliminando así el clorhidrato de piridina precipitado. Luego de evaporado el solvente a  $40^\circ\text{C}$  y presión reducida en un evaporador marca Wheaton Heidolph, modelo vv mikro Heigbad, se realizó una purificación preliminar por cromatografía en columna a presión

atmosférica, utilizando silicagel para cromatografía en columna Kieselgel 60 de 0,040-0,063 mm, Merck, como adsorbente y diversos solventes de elución según el derivado. Se emplearon:

Tolueno:éter etílico:hexano (90:10:5) (compuesto I,  $R_f$ : 0,31).

Hexano:acetona:cloroformo (60:20:5) (compuesto II,  $R_f$ : 0,42).

- Hexano:éter etílico:cloroformo (10:3:8) (compuesto III,  $R_f$ : 0,38).

Tolueno:éter etílico (9:1) (compuesto IV,  $R_f$ : 0,43).

- Hexano:éter etílico:cloroformo (15:4:7) (compuestos V, VI y VII,  $R_f$ : 0,43, 0,46 y 0,48 respectivamente).

Luego, se realizaron en cada caso dos purificaciones por cromatografía en columna a presión levemente superior a la atmosférica, utilizando silicagel para cromatografía preparativa en placa delgada Kieselgel 60 HF<sub>254</sub> Merck como adsorbente y los mismos solventes que en las purificaciones preliminares, salvo para el compuesto II con el que se usó hexano:éter etílico:cloroformo (10:3:8) ( $R_f$ :0,35). En el caso de los compuestos V y VI, para obtener un óptimo grado de pureza, debieron además purificarse por cromatografía en placa delgada de fase invertida, Whatman KC 18F 0,2 mm, utilizando como solvente acetonitrilo:agua (80:20) ( $R_f$  0,61 para el compuesto V y  $R_f$ :0,59 para el compuesto VI). Las purificaciones por cromatografía en columna fueron controladas por cromatografía en placa delgada, utilizando D.C. Plastikfolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 0,2 mm Merck.

#### IV. CARACTERIZACION

Los puntos de fusión fueron tomados en un fusiómetro ISV modelo 7911.

Las determinaciones de análisis elemental fueron realizadas en la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos en Química Orgánica (UHIMFOR, CONICET-FCEyN-UBA).

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H fueron obtenidos en un espectrómetro marca Varian Modelo EM-360L, 60 Hz, utilizando cloroformo deuterado como solvente y tetrametilsilano como referencia interna.

Los espectros de masa fueron obtenidos por inserción directa en un espectrómetro de masa marca Varian Mat, Modelo CHT7 A, procesador de datos y periféricos sistema MAT 166, potencial de ionización 70 ev. Estos fueron realizados en la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos en Química Orgánica (UHIMFOR, CONICET-FCEyN-UBA).

#### V. ACTIVIDAD INSECTICIDA

##### V.a. Insectos

En todos los casos en que se utilizaron moscas (*Musca doméstica*), éstas fueron hembras, cepa RAC (susceptible), de dos-tres días de edad, mantenidas a 25°C y 50% de humedad relativa y alimentadas "ad libitum" con leche en polvo, azúcar y

agua.

### V.b. Determinación de la DL<sub>50</sub> en moscas

Las moscas utilizadas fueron anestesiadas con corriente de CO<sub>2</sub> previamente burbujeado en agua para mantener una humedad adecuada. Luego, se las topicó ventralmente con 1  $\mu$ l de solución acetónica conteniendo el compuesto en estudio (179). Se utilizaron diez moscas por dosis y cuatro dosis por determinación de DL<sub>50</sub>. Simultáneamente se topicaron diez moscas con acetona como control. Luego de topicados, los insectos se dejaron 24 horas con agua a disposición, transcurrido éste lapso, se observó la mortalidad en cada nivel.

Los valores obtenidos fueron procesados en una computadora Hewlett Packard HP-85 con un programa de cálculo de DL<sub>50</sub> basado en el método de Litchfield y Wilcoxon (180), el cual además informa el intervalo de confianza de la DL<sub>50</sub> y la DL<sub>95</sub>.

El mismo procedimiento fue empleado para determinar la DL<sub>50</sub> en presencia de butóxido de piperonilo. Este fue incorporado a la solución acetónica del compuesto en prueba, en todos los casos a una concentración de 2 mg/ml.

### V.c. Evidencias de activación "in vivo". Cinética de la acción insecticida



Para ésta experiencia se emplearon 30 moscas por compuesto. Las mismas fueron anestesiadas con  $CO_2$  previamente burbujeado en agua para mantener una humedad adecuada, topicándolas luego con 1 ul de solución acetónica del compuesto en ensayo.

Se utilizaron propoxur y I, en una concentración equivalente a la  $DL_{50}$  en cada caso. Simultaneamente se topicaron 30 moscas con acetona como control. Luego de topicados, los insectos se dejaron con agua a disposición. Posteriormente a la recuperación de todos los insectos control (menos de 30 minutos) se procedió a observar la mortalidad cada 30 minutos, durante las siguientes once horas. La lectura de mortalidad, se inició nuevamente a las veintidós horas de comenzado el ensayo, y se repitió cada hora hasta las treinta horas.

Se graficó luego el número de moscas volteadas en función del tiempo.

### V.d. Correlacion estructura actividad insecticida

### V.d.1. Determinacion del $\log P$

Fue obtenido, en forma indirecta, el valor de los logaritmos de los coeficientes de partición octanol-agua ( $P$ ) de los SDA y sus precursores, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (181,182,183). Se empleó un cromatógrafo marca Jasco, modelo Familic-300S, un detector UV marca Jasco,

modelo Uvidec-100-V1 y una columna de fase invertida US-Finepak Sil C18T de 25 cm de longitud y 2 mm de diámetro interno.

Se utilizó como referencia una familia de sulfenildicarbamatos de log P ya informado en bibliografía (150). Estos fueron provistos por el Dr. Fukuto de la Universidad de California, Estados Unidos. La estructura de los mismos y el log P correspondiente pueden observarse en la Tabla 1.

El eluyente fue una mezcla de acetonitrilo:agua (80:20) con un flujo de 0,2 ml/min. La absorción fue medida a 200 nm.

Luego de obtenidos los tiempos de retención ( $t_r$ ) de cada compuesto de referencia, se calculó el factor de capacidad ( $k'$ ) de cada uno de ellos según:

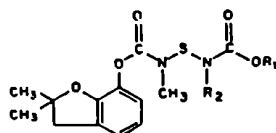
$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Se determinó entonces la curva de regresión para log P vs. log  $k'$ , utilizando un programa de computación estadístico estandar, provisto por Hewlett Packard para la computadora de la misma marca modelo HP-85.

Utilizando las constantes de la recta determinada y los valores de log  $k'$  de los SDA y sus precursores se determinó el log P para cada uno de ellos según:

$$\log k' = a \log P + b$$

**Tabla 1:** Estructuras y log P de los sulfenildicarbamatos utilizados como referencia.



	Compuesto		Log P
	R <sub>2</sub>	R <sub>1</sub>	
1	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	2,28
2	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	2,78
3	-CH <sub>3</sub>	n-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	3,28
4	-CH <sub>3</sub>	i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	3,08
5	-CH <sub>3</sub>	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	3,78
6	-CH <sub>3</sub>	n-C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	4,28
7	-CH <sub>3</sub>	n-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	5,78
8	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-CH <sub>3</sub>	2,78
9	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	3,28

$$\log P = \frac{\log k' - b}{a}$$

Se obtuvo otra serie de valores de  $\log P$  por un método alternativo, basado en que el valor de  $\log P$  de una serie homóloga, puede ser calculado a partir del  $\log P$  del primer compuesto del grupo (determinado experimentalmente), sumándole 0,5 unidades por metileno incorporado en la serie (184,185). Por lo tanto, luego de obtener el valor experimental de  $\log P$  para el compuesto IV se calcularon por este método los  $\log P$  de V, VI y VII.

### V.d.2. Correlación entre $\log P$ y $DL_{50}$

En el caso de la serie de alquil SDA obtenidos, se intentó correlacionar la hidrofobicidad con la actividad biológica a través de la ecuación propuesta por Hansch (186):

computadora de la misma marca modelo HP-85, se obtuvo la curva de regresión, tanto en el caso de los log P experimentales como en el de los calculados.

## VI. ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN RATONES

### VI.a. Ratones

Los ratones (*Mus musculus*) para esta experiencia, fueron hembras cepa NIH de dos a tres meses de edad (20-25 g de peso), mantenidos a 22°C y 50% de humedad relativa y alimentados con alimento balanceado. Los mismos fueron obtenidos en la Comisión Nacional de Energía Atómica.

### VI.b. Determinación de la DL<sub>50</sub>

Los animales empleados fueron ayunados 24 horas antes del ensayo. Los compuestos a ensayar fueron disueltos de acuerdo a su solubilidad en propilenglicol (propoxur, carbaril, tsumacide, MDC) o aceite de oliva (los SDA y los carbamatos lineales), de manera tal de lograr una total solubilización. Se administraron oralmente 0,2 ml de solución por animal, utilizando una jeringa graduada de 1 cc y una aguja con una pequeña esfera colocada en la punta, para evitar daños a los ratones (187). La mortalidad fue observada a las 72 horas. En las primeras 24 horas se les

dejó agua a disposición, y luego también alimento balanceado. Para cada compuesto se emplearon cuatro dosis con tres animales por dosis, en base a lo recomendado por algunos autores incorporados a nuevas corrientes, que demuestran la validez del uso de pocos animales en los ensayos de  $DL_{50}$  (187,188).

Los valores obtenidos fueron procesados por una computadora Hewlett Packard HP 85 con un programa de cálculo de  $DL_{50}$  basado en el método de Litchfield y Wilcoxon (180), el cual además informa el intervalo de confianza de la  $DL_{50}$  y la  $DL_{95}$ .

### V1.c. Coeficiente de selectividad en vertebrados

El CSV se obtuvo realizando el cociente entre la  $DL_{50}$  del compuesto ensayado, determinada oralmente en ratones, y la  $DL_{50}$  determinada por tópico en moscas, ambas expresadas en mg/kg (191).

$$CSV = \frac{DL_{50} \text{ (oral ratones)}}{DL_{50} \text{ (tópico moscas)}}$$

## VII. MECANISMO DE LA ACCION INSECTICIDA

### VII.a. Fuentes de AcCE

Se utilizaron enzimas provenientes de eritrocitos bovino de cabezas de moscas.

La AcCEEB fue de tipo comercial marca Sigma con una actividad de 2,90 unidades uM/mg de polvo. La misma fue disuelta en buffer fosfato pH 7,6 (0,1 M) (13,8 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  se disolvieron en 800 ml de agua destilada, se llevó a pH 7,6 con  $\text{HONa}$  0,1 N y luego se completó el volumen a un litro), a una concentración tal que produjera una variación de absorbancia de 0,35 unidades por minuto en la determinación de  $A_{600}$  (ver VII.b.). Se fraccionó en frascos conteniendo 0,5 ml de solución cada uno y se congeló a  $-16^\circ\text{C}$  hasta su uso.

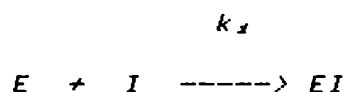
La AcCECH se obtuvo de la siguiente manera: luego de congelar las moscas a  $-16^\circ\text{C}$  se les separó la cabeza con bisturí, homogeneizando entonces en frío (baño de hielo) 50 cabezas por ml de buffer fosfato pH 7,6, en un homogeneizador Sorvall modelo Omni-mixer 17.106 con vástago de teflón. Se filtró por lana de vidrio y se fraccionó en frascos conteniendo 0,5 ml de homogenato cada uno, los cuales se congelaron a  $-16^\circ\text{C}$  hasta el momento de su uso. El homogenato así preparado conserva la actividad enzimática varios meses (192).

### VII.b. Determinación de la $K_x$

Este parámetro se utiliza para medir la potencia de un inhibidor.

Como se comentó en la introducción, la inhibición de la

AcCE podría representarse por (192):

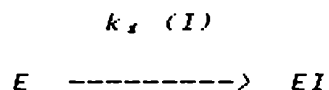


donde E, I y EI representan a la enzima, inhibidor y enzima inhibida respectivamente. Esta reacción de segundo orden obedece a la ecuación:

$$\frac{d(EI)}{dt} = k_1 (E - (EI)) (I - (EI))$$

donde (E), (I) y (EI) son las concentraciones totales de la enzima, inhibidor y enzima inhibida respectivamente.

Como la concentración de inhibidor es mucho mayor que la de enzima, permanece prácticamente constante en el curso de la reacción, esto permite tomar la reacción como de pseudo primer orden:



en tal caso, la reacción obedece la ecuación:

$$\frac{d(EI)}{dt} = k_1(I) (E - (EI))$$



integrando esta ecuación:

$$\ln \frac{(E)}{(E) - (EI)} = k_i (I) t$$

con lo cual podemos obtener:

$$\ln \frac{A_0}{A_t} = k_i (I) t$$

donde  $A_0$  y  $A_t$  representan las actividades enzimáticas a tiempo 0 y  $t$  respectivamente,  $k_i$  es la constante de inhibición bimolecular cuyas unidades son  $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ ,  $t$  es el tiempo en minutos y  $(I)$  es la concentración molar del inhibidor. Esta ecuación permitió graficar  $\ln A_0/A_t$  en función del tiempo, obteniéndose una recta cuya pendiente es  $k_i (I)$ , de la cual puede obtenerse fácilmente  $k_i$  conociendo la concentración del inhibidor.

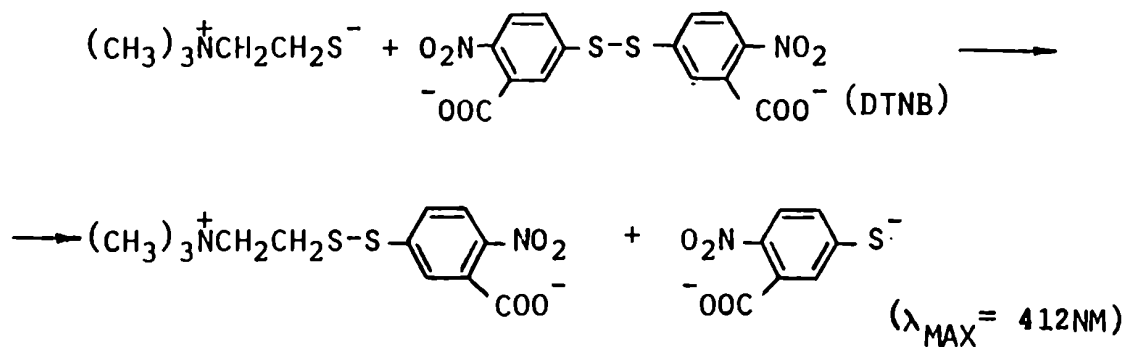
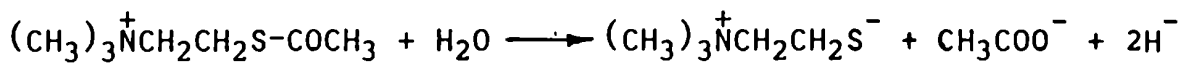
En este trabajo, la determinación de la actividad acetilcolinesterásica se realizó por el método de Ellman (193) adaptado.

El procedimiento general utilizado para la determinación de las  $k_i$  de los SDA y sus carbamatos precursores sobre AcCECM y ALCEEB, se basó en la hidrólisis del ioduro de acetiltiocolina

(IATC) por AcCE, liberando yoduro de tiocolina, el cual reaccionó a su vez con el ácido 5,5' - ditio - bis - 2 - nitrobenzoico (DTNB), dando el ácido 2 - mercapto - 5 nitrobenzoico. Este anión presenta una banda de absorción intensa a 412 nm (coeficiente de extinción  $1,36 \times 10^4 \text{ l M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Las reacciones son ilustradas en la figura 18.

La rapidez del aumento de la absorbancia indicó la magnitud de la actividad enzimática y por lo tanto de la inhibición de la AcCE.

La técnica empleada consistió el homogenato conteniendo la enzima, congelado, se llevó a 30°C en un agitador-incubador Dubnoff (15 minutos de agitación a dicha temperatura). En una celda de espectrofotómetro de 0,5 cm de paso óptico se colocaron 0,95 ml de buffer cromógeno (9,9 mg de DTNB disueltos en 100 ml de buffer fosfato pH 7,6), 100 ul de sustrato (IATC 12 mM: 34,7 mg de IATC disueltos en 10 ml de agua destilada), y 50 ul de homogenato. Luego de agitar se colocó la celda en un espectrofotómetro Varian UV-Visible modelo 634 de doble haz con graficador Varian aerograph modelo 20, cronometrándose desde ese momento 2 minutos de lectura espectrofotométrica a 412 nm. En la celda de referencia se colocó buffer cromógeno y sustrato, descontándose así la autohidrólisis del mismo si la hubiera. De esta manera se determinó el valor de la actividad enzimática sin inhibidor ( $A_0$ ) según:



**Figura 18:** Reacciones utilizadas para la medición de la actividad acetilcolinesterásica.

$$\begin{aligned} \text{Actividad enzimática} &= \frac{\text{nanomoles de sustrato hidrolizado}}{\text{minuto}} \\ &= \frac{\text{variac. abs./min} \times 1,1 \times 10^{-3}}{13,6 \times 0,5} \end{aligned}$$

Para el cálculo de  $A_t$ , a 300  $\mu$ l de homogenato se le agregaron 3  $\mu$ l de solución etanólica del presunto inhibidor a una concentración adecuada para la medición. Se dejó a 30°C en un agitador-incubador Dubnoff. A los 3, 6, 9 y 12 minutos se tomaron 50  $\mu$ l del homogenato inhibido y se agregaron a 0,95 ml de buffer cromógeno y 100  $\mu$ l de sustrato contenidos en una celda de espectrofotómetro de 0,5 cm de paso óptico, procediéndose a la lectura y cálculo de la actividad enzimática como en el caso de  $A_0$ .

Con los valores de  $A_0$  y  $A_t$  obtenidos se determinó la curva de regresión para  $\log A_0/A_t$  vs.  $t$  utilizando un programa de computación estadístico estándar provisto por Hewlett Packard para la computadora de la misma marca modelo HP-85. Todas las curvas fueron razonablemente lineales, con un coeficiente de correlación mayor que 0,97.

Con el valor de la pendiente de la recta y la concentración de inhibidor utilizado, se calculó en cada caso la  $k_i$  a través de:

pendiente

$$k_1 = \text{-----}$$

(I)

### VII.c. Determinación de la $k_1$ en presencia de N-etilmaleimida

Se trató de obtener la  $k_1$  del compuesto II sobre AcCECH, en presencia de una concentración de N-etilmaleimida que en la bibliografía se indica como adecuada para bloquear gran parte de los -SH libres, reduciendo sustancialmente (a menos del 1%) la ruptura de carbamatos derivados (162), pero conservando una actividad acetilcolinesterásica suficiente para realizar la determinación.

El procedimiento fue idéntico al detallado en VII.b., utilizando una concentración del compuesto II similar a la empleada para calcular la  $k_1$  correspondiente ( $5 \times 10^{-6}$ ).

La variación introducida fue tratar previamente el homogenato con una cantidad de N-etilmaleimida (1,25 mg/ml) tal que la concentración final fuera  $10^{-2}$  M (162), durante 45 minutos a 30°C.

### VII.d. Medición de la ruptura tiolítica de la unión N-S

Para establecer la posible ruptura de los SDA en medios

biológicos se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución. A través de la misma se determinó cuali - cuantitativamente, la presencia de los carbamatos de origen al poner en contacto en solución acuosa el compuesto I y cisteína (Cis) o glutatión (GSH), ambos compuestos sulfhidrúlicos de importancia en fluidos biológicos.

Para ello se preparó una solución  $10^{-5}$  M en I y  $10^{-4}$  M en Cis (0,016 g/l) o GSH (0,03 g/l) (preparada disolviendo 4,34 mg de I en la mínima cantidad posible de etanol, llevando a 100 ml con agua destilada, y diluyendo al 1/10 con agua destilada, en este paso se agrega cantidad suficiente de Cis o GSH para lograr una concentración molar 10 veces mayor que la del compuesto I). Luego de dejar reaccionar 2 horas a 30°C en un agitador-incubador Dubnoff, la solución (10 ml) se extrajo con tres porciones de 5 ml cada una de cloroformo, los extractos clorofórmicos se mezclaron y secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , luego se evaporó el solvente a presión reducida en un evaporador Wheaton Heidolph modelo vv mikro Heigbad y se disolvió el residuo en una solución de 0,6 ml de acetonitrilo más 0,4 ml de agua, conteniendo benzoato de bencilo en una concentración de 1 mg/100 ml como estándar interno cromatográfico. La muestra así preparada se inyectó en el cromatógrafo utilizando como eluyente acetonitrilo:agua (60:40) con un flujo de 0,1 ml/min. Además se cromatografió un blanco sin Cis ni GSH para descontar hidrólisis si la hubiera.

Por otro lado, se midió la recuperación cromatografiando una solución acuosa patrón procesada en forma idéntica a las

muestras, pero sin el agregado de Cis o GSH y sin las 2 horas de incubación, conteniendo el compuesto I, propoxur y HDC, todos en una concentración de  $10^{-5}$  M y benzoato de bencilo en una concentración de 1 mg/100 ml como estándar interno.

En base a las relaciones entre las áreas de cada compuesto y el estándar interno, descontando el pequeño porcentaje de hidrólisis obtenido y teniendo en cuenta la recuperación, se determinó el porcentaje de ruptura tiolítica ocurrido en cada caso para liberar la cantidad de carbamatos precursores observada.

#### VII.e. Inhibición de OFM

Se midió la capacidad de inhibición del metabolismo oxidativo de homogenato de abdomen de mosca por los SDA, comparando con BP y HDC según la siguiente técnica:

Luego de congeladas las moscas a  $-16^{\circ}\text{C}$  se les separó el abdomen con un bisturí y se homogeneizaron los mismos en frío ( $0-5^{\circ}\text{C}$ ), con un homogeneizador marca Sorvall modelo Omni-mixer 17.106, a una concentración de 40 abdómenes por ml en buffer pH 7,5, 0,25 M en sacarosa y 0,15 M en fosfatos, con el agregado de albúmina bovina al 1,5%, la cual permite conservar la actividad enzimática sin pérdidas significativas durante un mes congelada (58) (se disolvieron 8,56 g de sacarosa, 2,01 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,02 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1,5 g de albúmina en 80 ml de agua destilada, se llevó a pH 7,5 y se completó a 100 ml con

agua destilada). Se centrifugó en frío (0°-5°C) a 10.000 g durante 30 minutos en una centrifuga refrigerada marca Tomy Seiko, modelo RS-18 III y el sobrenadante fue filtrado por lana de vidrio, utilizándose inmediatamente. Se preincubó el homogenato (1 ml por recipiente) 15 minutos a 30°C (incubador-agitador Dubnoff) con agitación, agregando en los distintos viales :

1- 5 umoles (4,2 mg) de NADPH y 10 ul de etanol (para observar las rupturas normales del carbaril)

10 ul de etanol (para determinar metabolismo NADPH no dependiente, es decir no oxidativo)

3- 5 umoles de NADPH y 10 ul de solución etanólica conteniendo 0,1 umol de BP (4,26 mg/ml) (para determinar inhibición de OFM por BP)

4- 5 umoles de NADPH y 10 ul de solución etanólica conteniendo 0,1 umol de MDC (1,95 mg/ml) (para determinar inhibición de OFM por MDC)

5- 5 umoles de NADPH y 10 ul de solución etanólica conteniendo 0,1 umol del compuesto II (4,23 mg/ml) (para determinar inhibición de OFM por II)

Luego de la preincubación, se agregaron 10 ul de una solución etanólica conteniendo 0,1 umol de carbaril (2,01 mg/ml) y 0,0038 umol de carbaril(naftil-<sup>14</sup>C)(Pathfinder Laboratories Inc.) (107.345 dpm) en cada uno de los viales, incubando en vial abierto 2 horas a 30°C con agitación en un agitador-incubador Dubnoff.



Se extrajo luego con cuatro porciones de 5 ml cada una de éter etílico agregando una punta de espátula de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para evitar emulsiones. Se reunieron los extractos etéreos, se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro (secado su vez a  $105^\circ\text{C}$  4 horas) y se evaporaron en baño de agua caliente con corriente de nitrógeno en un evaporador N-Evap marca Organomation modelo 112. El residuo se tomó con acetona y se sembró en una placa cromatográfica DC-Fertigplatten Kiesegel 60 F<sub>254</sub> 0,25 mm Merck; realizándose una precorrida con hexano (para eliminar por arrastre una parte de los lípidos) y luego la corrida con éter etílico:hexano (4:1) (50).

El cromatograma se reveló por autoradiografía, utilizando película radiográfica médica 3M de 18 cm x 24 cm, la cual fue expuesta durante 35 días y revelada bajo luz roja con revelador radiográfico marca Tac, hasta aparición de las manchas a intensidad adecuada. Se utilizó una solución al 2% de ácido acético como detenedor, y el fijador radiográfico fue marca Tac.

Una vez ubicadas, las manchas fueron raspadas del cromatograma y colocadas en viales. La radiactividad se cuantificó utilizando un cóctel de centelleo universal (Aquasol-2 marca Du Pont, New England Nuclear) en un contador de centelleo marca Beckman modelo LS 7.000.



## RESULTADOS Y DISCUSION

### I. SINTESIS

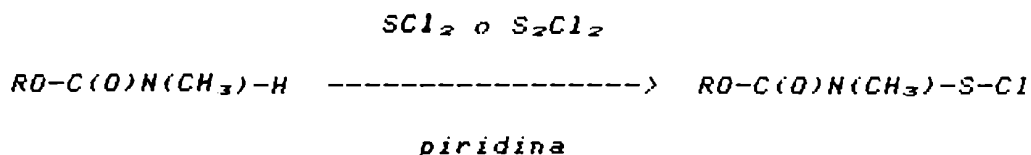
#### I.a. Obtencion de Carbamatos

De los carbamatos utilizados como materia prima para la síntesis de los SDA, seis debieron ser sintetizados. El método utilizado fue el indicado en el ítem II.a. de Materiales y Métodos (17) (figura 2 A), sin inconvenientes que merezcan comentarios, con rendimientos que variaron entre el 75% y el 80%.

Las estructuras de los ocho carbamatos empleados para la realización de este estudio, pueden ser observadas en la figura 20.

#### I.b. Síntesis de clorosulfenil-carbamatos y sulfenildicarbamatos

De los métodos existentes en bibliografía para la síntesis de los SDA (143,148), surgió la necesidad de evaluar el uso de mono o dicloruro de azufre como reactivo para la obtención del cloruro de sulfenilo según:

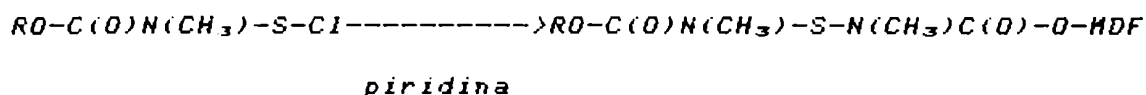


La experiencia indicó que el monocloruro de azufre al producir azufre libre, complicaba la purificación. Por tal motivo se adoptó como reactivo de síntesis el dicloruro de azufre. Este reactivo fue usado tal cual, pues al destilar descompone.

Se intentó el uso de trietilamina y piridina como aceptores de protones. Se prefirió piridina, dado que su menor reactividad reducía la formación de productos laterales, como mostraron los seguimientos por cromatografía en capa delgada.

La posibilidad de obtener el cloruro de sulfenilo del MDC fue desechada, dado que se obtenía muy bajo rendimiento, con gran abundancia de productos laterales, probablemente debido a la reactividad del grupo MDF. Por lo enunciado, la secuencia de reacción utilizada fue la síntesis del cloruro de sulfenilo de la otra mitad carbónica, la que luego se hace reaccionar con MDC según:

MDC



La experiencia realizada modificando distintas variables de reacción, indicó que resultaba crítico mantener baja la temperatura y libre de humedad el sistema de reacción para mejorar el rendimiento.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, se adoptó finalmente la técnica descrita en la sección II.b. de Materiales y Métodos.

Luego de la purificación (ítem II. de Resultados y

Discusión) el rendimiento fluctuó entre 17% y 20% respecto del carbamato de origen, para los distintos SDA. Las estructuras de los siete SDA obtenidos pueden ser observadas en la figura 21.

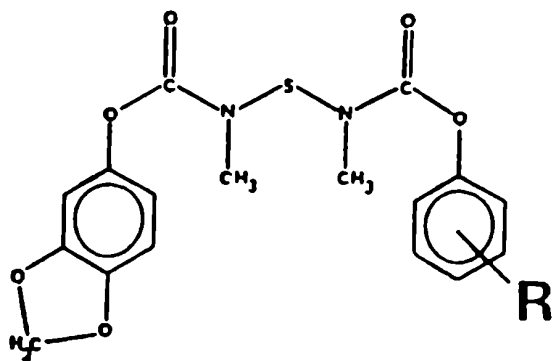
## II. PURIFICACION

La obtención de sulfenildicarbamatos simétricos como productos laterales en la síntesis de los sulfenildicarbamatos asimétricos, adicionó una complicación al paso de purificación. Fue inevitable la formación de los sulfenildicarbamatos simétricos, de gran similitud química con los compuestos que se deseaban obtener (figura 19). Dicha similitud hizo muy difícil la purificación.

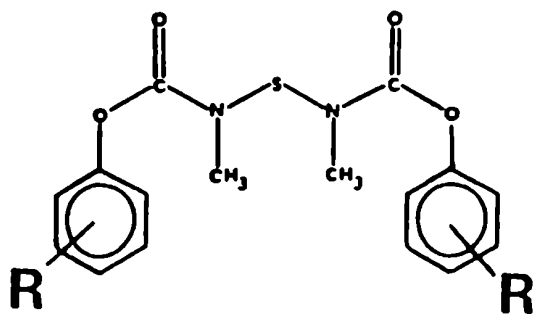
Se adoptó como técnica de separación la cromatografía en columna a presión levemente superior a la atmosférica, utilizando silicagel como adsorbente. Fueron necesarias sucesivas purificaciones por cromatografía en columna en todos los casos, seguidas de otra purificación en placa delgada de fase invertida, para VI y VII. Resultó crítica la elección de los distintos solventes y de la relación entre los mismos utilizada en la purificación cromatográfica, cuyo detalle se indica en Materiales y Métodos.

## III. CARACTERIZACION

Los carbamatos obtenidos como intermediarios para la



**a**



**b**

Figura 19: a) Sulfenildicarbamatos asimétricos;  
b) Sulfenildicarbamatos simétricos

síntesis de los SDA, fueron identificados por su punto de fusión o ebullición y espectros de RMN  $^1\text{H}$  cuyas asignaciones se observan en la tabla 2 y figura 20.

Los SDA sintetizados fueron sólidos con punto de fusión definido, exceptuando el compuesto VI como se muestra en la tabla 3. Los resultados del análisis elemental correspondieron en todos los casos a la estructura supuesta (tabla 3).

En la figura 21 y tabla 4a se pueden observar las asignaciones de las señales correspondientes a cada grupo de protones, y el valor de las constantes de acoplamiento obtenidas de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los SDA, que correspondieron en todos los casos a los valores esperados de acuerdo a los carbamatos de origen.

Se realizaron los espectros de masas de los SDA con el objeto de intentar determinar sus rupturas características a los fines de confirmar sus estructuras (figura 21, tabla 4b). Se observaron iones moleculares abundantes (variando la intensidad entre el 48,5% y el 76,7%). Los mismos fueron acompañados en varios casos con una señal a  $M+1$  de intensidad también elevada. Esto ya fue observado en otros sulfenil derivados de carbamatos (152), como así también la señal a  $M-57$  (cuya asignación tentativa es la pérdida de  $\text{OCNCH}_3$ ), que aparece en el caso de carbamatos aromáticos derivatizados o no. Para los SDA diarílicos por lo tanto, se observa dos veces dicha pérdida. En los arilalquil SDA sólo se observa esta ruptura en la mitad arílica.

Otra ruptura general de los SDA es la del enlace N-S.

Tabla 2: Caracterización de los carbamatos obtenidos.

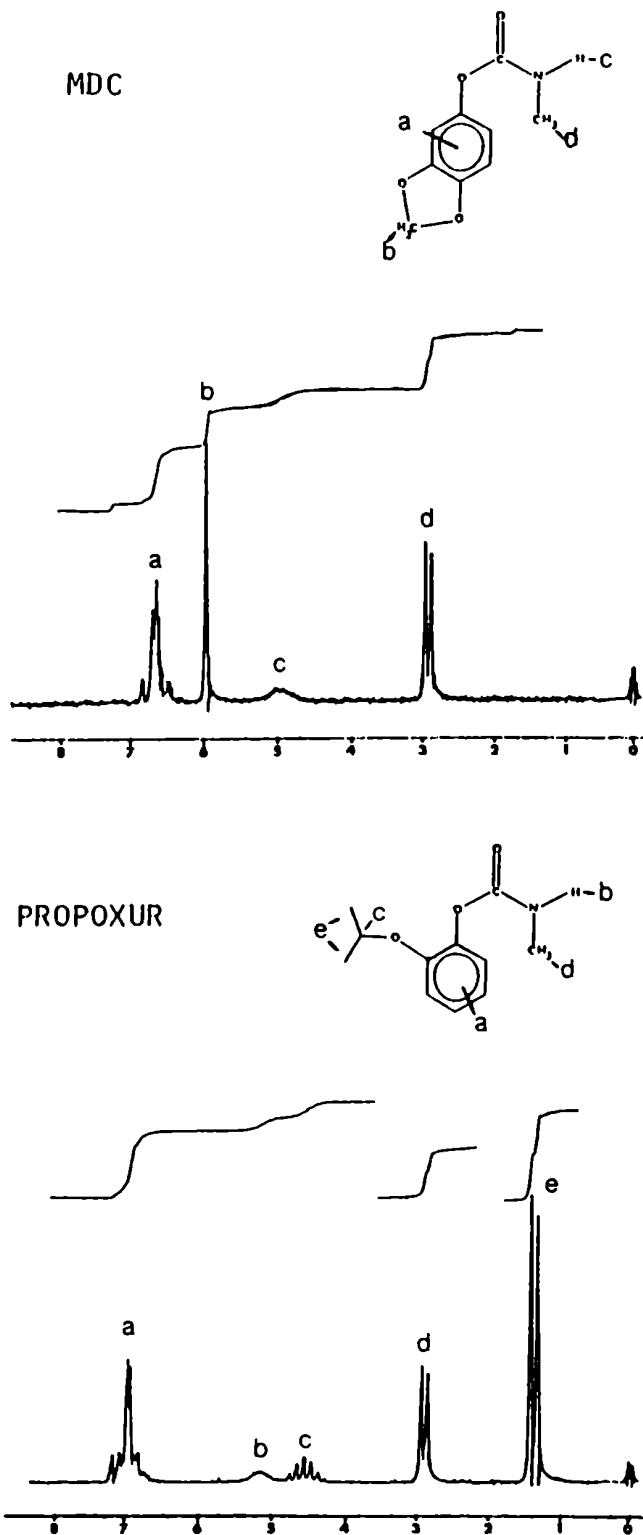
Carbamato	P.F. o P.E./mm. Hg	RMN <sup>1</sup> H *			
		H aromáticos(a) o alifáticos(b)	N-H	N-CH <sub>3</sub>	Ar-X
Propoxur	89°-91°C	m <sub>a</sub> 4H 6,7-7,3	s 1H 5,15	d 3H 2,85 J <sup>5</sup> = 5	d <sup>1</sup> 6H 1,3 m <sup>2</sup> 1H 4,5 J = 6
Carbaril	141°-142°C	m <sub>a</sub> 7H 7,15-8,1	s 1H 5,25	d 3H 2,85 J = 5	---
Tsumacide	75°-77°C	m <sub>a</sub> 4H 6,7-7,4	s 1H 5,05	d 3H 2,85 J = 5	s <sup>2</sup> 3H 2,35
MDC	103°-105°C	m <sub>a</sub> 3H 6,5-6,9	s 1H 5,00	d 3H 2,85 J = 5	s <sup>3</sup> 2H 5,95
Butil carbamato	46°C/0,3	t <sub>b</sub> 2H 4,05 J = 6 m <sub>b</sub> 7H 0,7-1,9	s 1H 4,7	d 3H 2,8 J = 5	---
Octil carbamato	31°-32°C	t <sub>b</sub> 2H 4,05 J = 6 m <sub>b</sub> 15H 0,7-1,9	s 1H 4,7	d 3H 2,75 J = 5	---
Lauril carbamato	58°-59°C	t <sub>b</sub> 2H 4,05 J = 6 m <sub>b</sub> 23H 0,5-1,9	s 1H 4,8	d 3H 2,75 J = 5	---
Cetil carbamato	67°-69°C	t <sub>b</sub> 2H 4,05 J = 6 m <sub>b</sub> 31H 0,5-1,9	s 1H 4,85	d 3H 2,75 J = 5	---

1: X= (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>HCO-.2: X= -CH<sub>3</sub>.3: X= -OCH<sub>2</sub>O-.

4: desplazamiento químico en ppm.

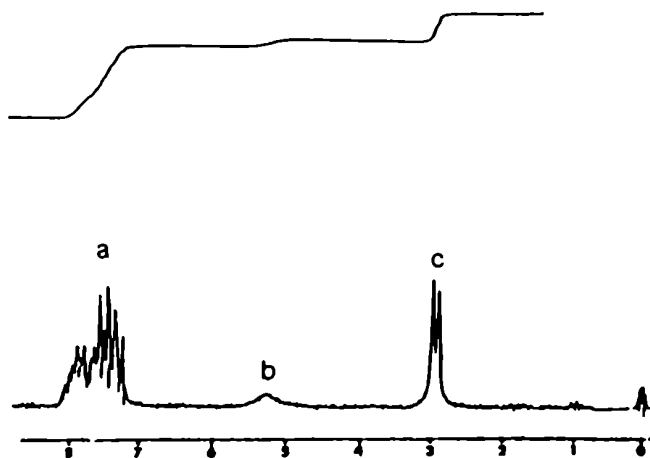
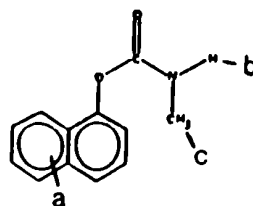
5: constante de acoplamiento en Hz.





**Figura 20:** Estructuras y espectros de RMN <sup>1</sup>H de los carbonatos precursores.

CARBARIL



TSUMACIDE

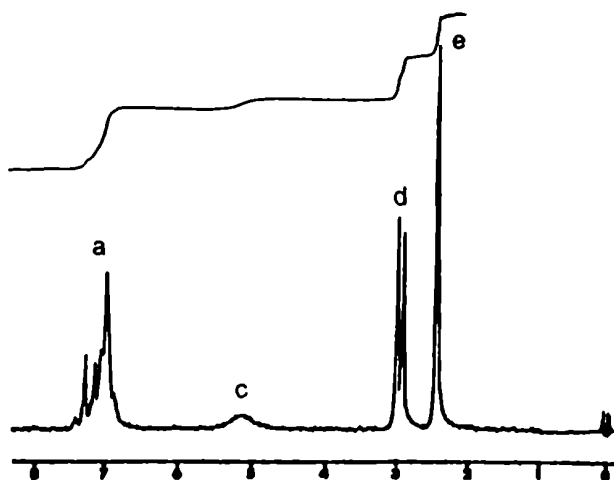
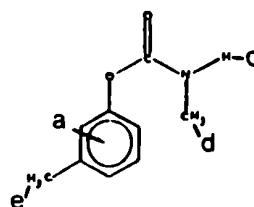
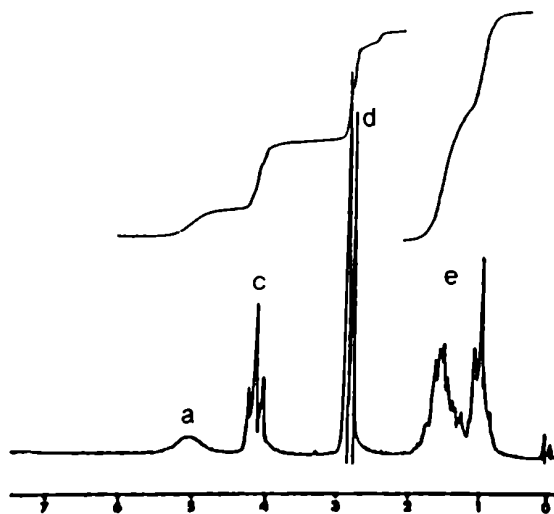
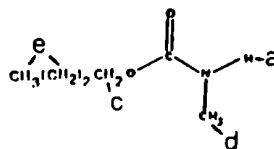


Figura 20 (Continuación).

BUTILCARBAMATO



OCTILCARBAMATO

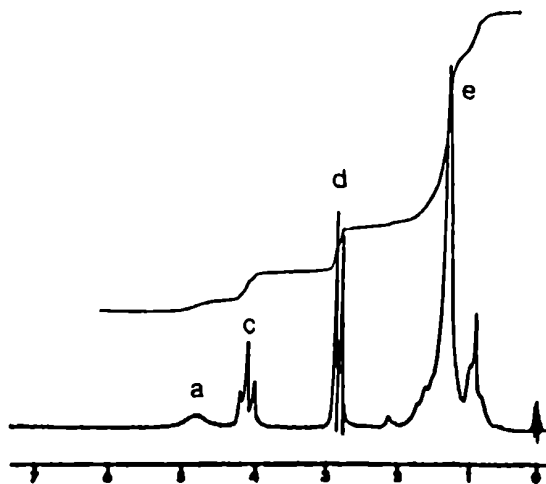
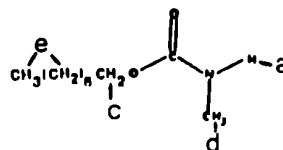
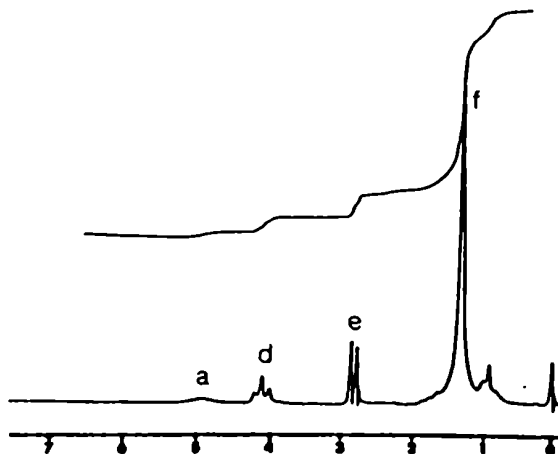
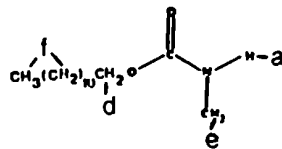


Figura 20 (Continuación).

LAURILCARBAMATO



CETILCARBAMATO

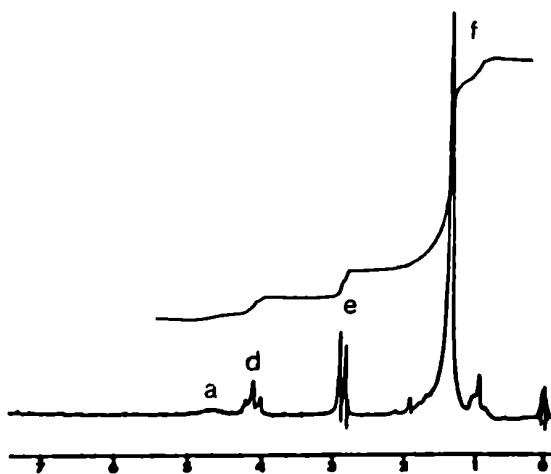
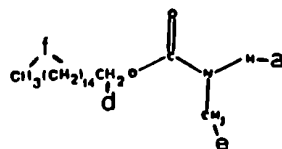


Figura 20 (Continuación).

En todos los casos se observa la aparición de la señal correspondiente al fenol (con pérdida de 1H) del cual derivan los carbamatos aromáticos precursores. Debido a ello las rupturas subsiguientes fueron las usuales para fenoles (201) y similares a las obtenidas para los carbamatos sin derivatizar, que a su vez, sufrieron rupturas similares a las informadas por otros autores para los casos hallados en bibliografía (propoxur y carbaril (202)).

En los arilalquil SDA, para la mitad no aromática, ocurren en general rupturas que liberan la cadena hidrocarbonada lineal y la misma unida a oxígeno. Estos fragmentos producen las señales usuales para los compuestos hidrocarbonados lineales (201). Varios de los picos obtenidos fueron acompañados de otros correspondientes al mismo protonado o a la pérdida de uno o más protones.

No puede descartarse la existencia de algún caso de disociación térmica observada en otros carbamatos (203).

En la figura 22 puede observarse un esquema de las fragmentaciones generales de los SDA.

#### IV. TOXICIDAD AGUDA

##### IV.a. Acción insecticida en moscas

Se determinó la  $DL_{50}$  y  $DL_{95}$  por tóxico de los carbamatos

**Tabla 3:** Caracterización de los SDA.

Compuesto	P.F. (°C)	Análisis Elemental <sup>7</sup>								R <sub>v</sub>
		% Calculado				% Obtenido				
		C	H	N	S	C	H	N	S	
I	103-105	55,29	5,07	6,45	7,37	55,41	5,35	6,19	7,40	0,31 <sup>1</sup>
II	99-100	59,15	4,23	6,57	7,51	59,30	4,43	6,56	7,85	0,42 <sup>2</sup> -0,35 <sup>3</sup>
III	89,5-90,5	55,38	4,62	7,18	8,21	55,55	4,85	6,96	7,95	0,38 <sup>3</sup>
IV	44-45	50,56	5,22	7,87	8,99	50,78	5,50	8,11	9,25	0,43 <sup>4</sup>
V	aceite	55,34	6,80	6,80	7,77	55,33	6,93	6,51	7,56	0,43 <sup>5</sup> -0,61 <sup>6</sup>
VI	32,5-33	58,97	7,69	5,98	6,84	59,12	7,86	6,15	7,04	0,46 <sup>5</sup> -0,59 <sup>6</sup>
VII	48,5-49,5	61,83	8,40	5,34	6,11	61,54	8,39	5,78	6,32	0,48 <sup>5</sup>

1: Tolueno:éter etílico:hexano (90:10:5)

2: Hexano:acetona:cloroformo (60:20:5)

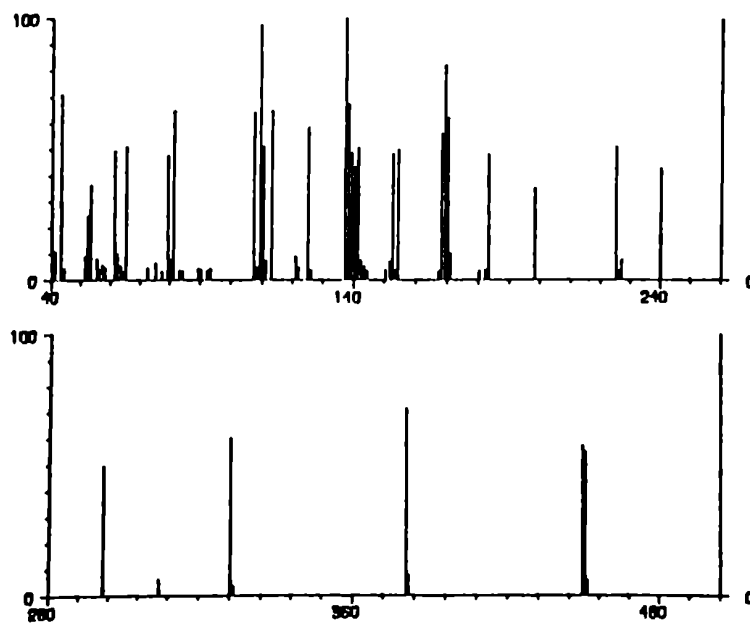
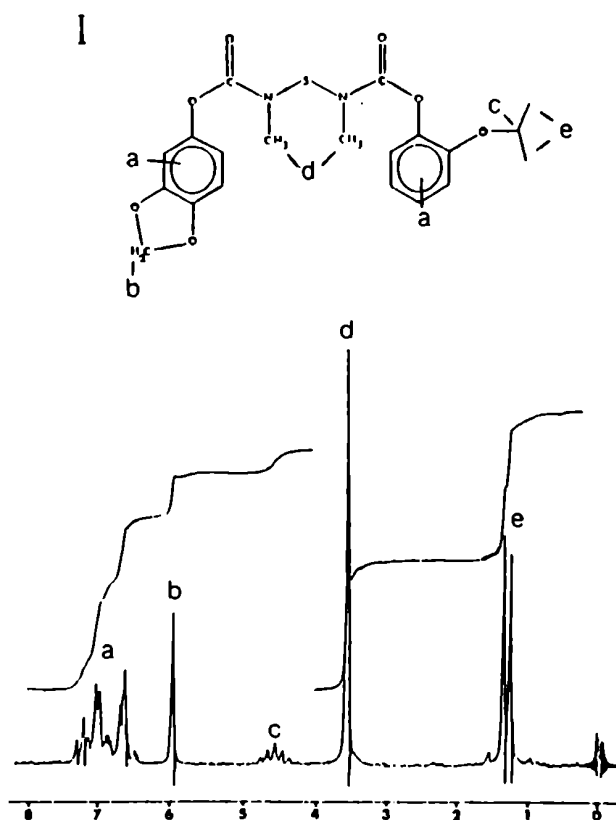
3: Hexano:éter etílico:cloroformo (10:3:8)

4: Tolueno:éter etílico (9:1)

5: Hexano:éter etílico:cloroformo (15:4:7)

6: Acetonitrilo:agua (80:20) (fase invertida)

7: +/- 0,3 para los valores obtenidos.



**Figura 21:** Estructuras y espectros de RMN  $^1\text{H}$  y de masas de los SDA.

II

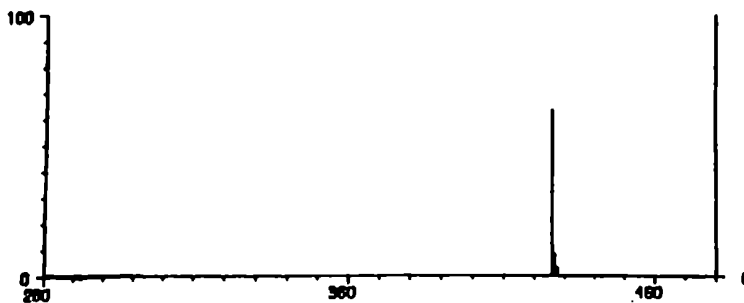
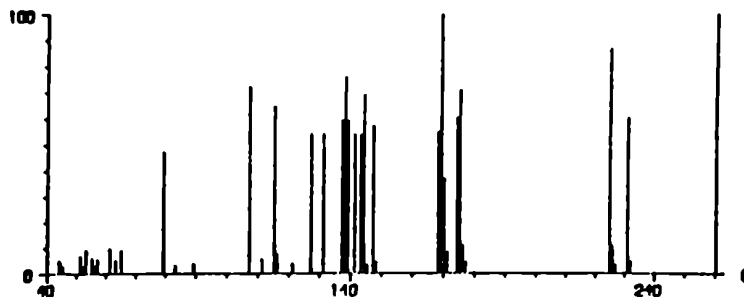
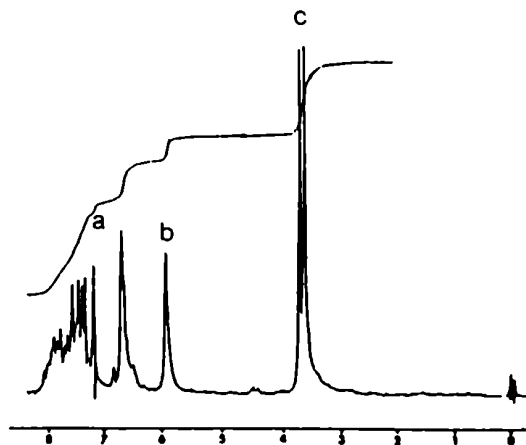
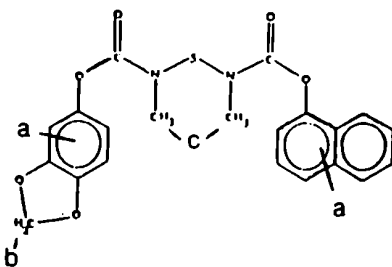


Figura 21 (Continuación).



III

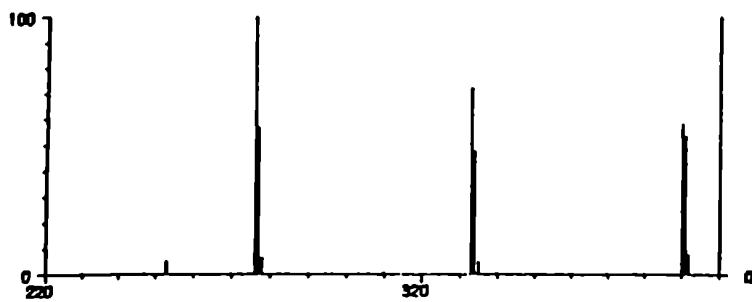
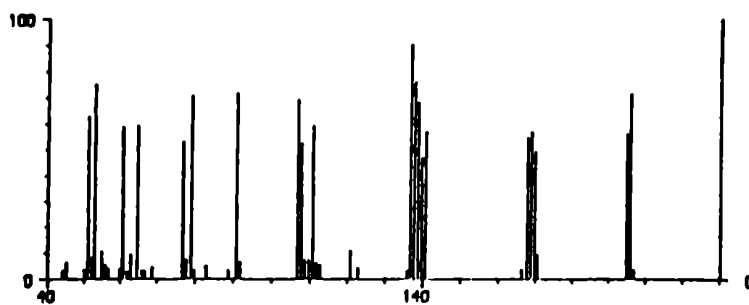
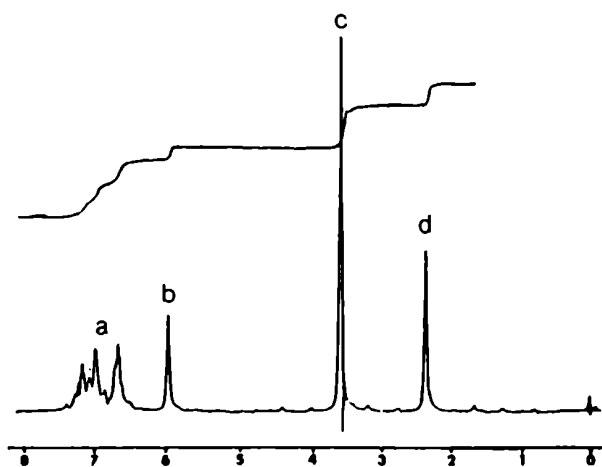
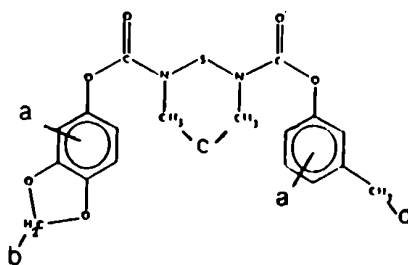


Figura 21 (Continuación).

IV

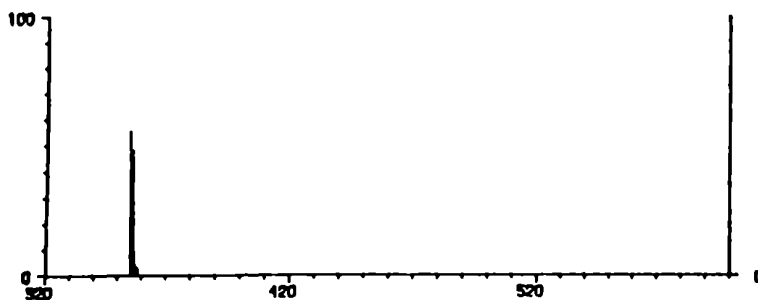
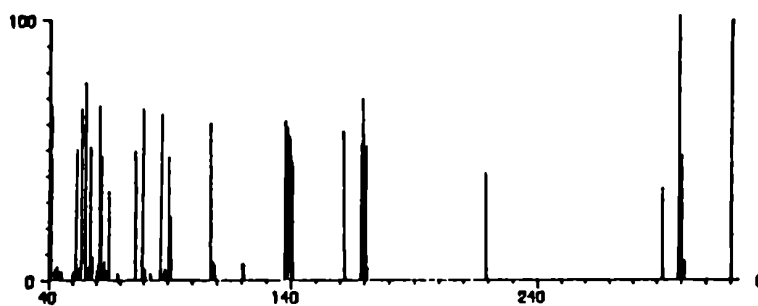
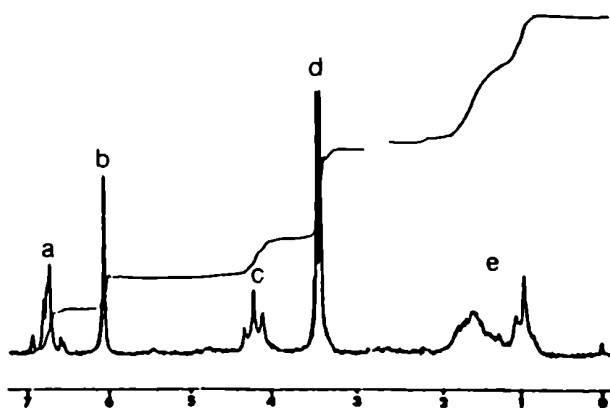
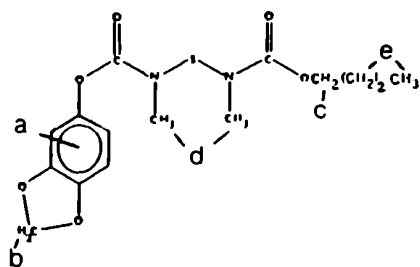


Figura 21 (Continuación).

V

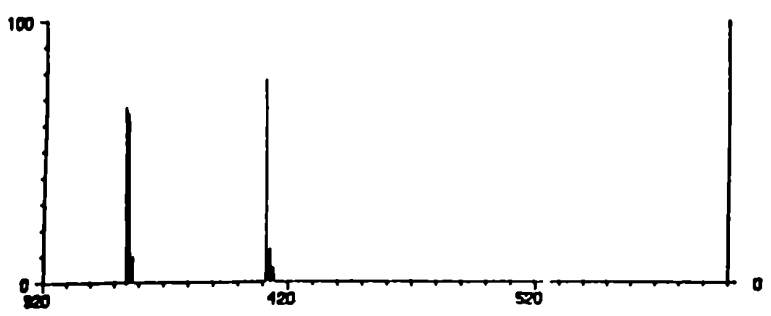
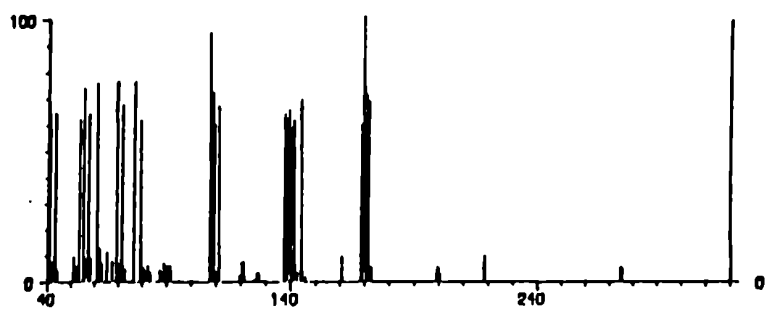
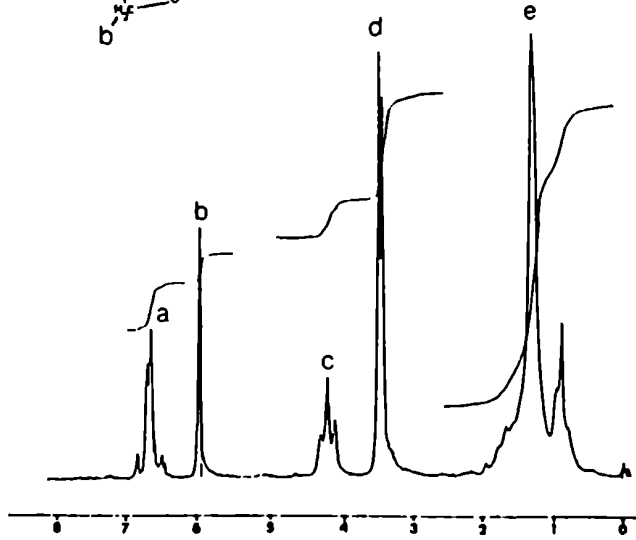
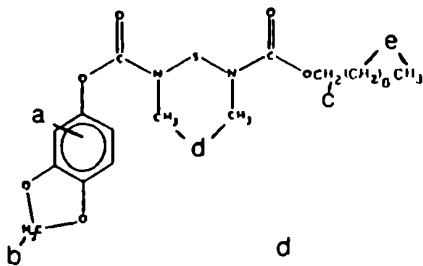


Figura 21 (Continuación).

VI

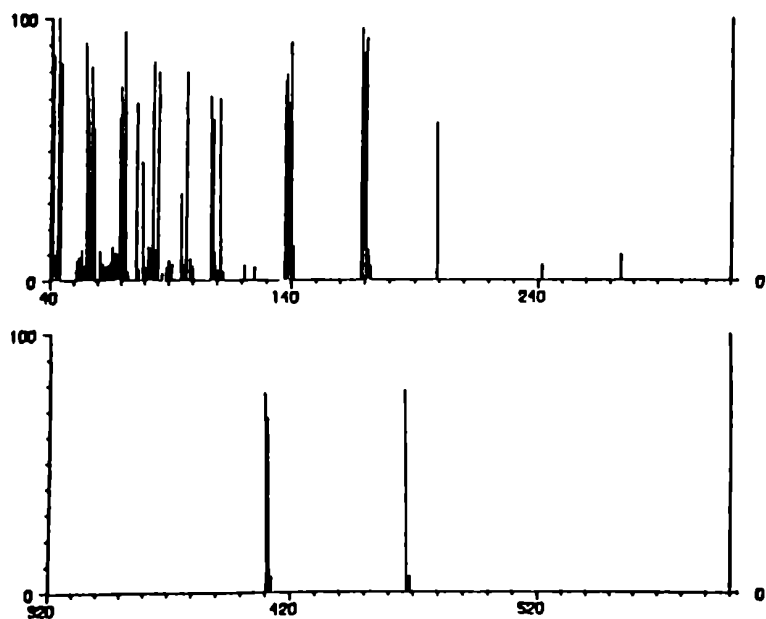
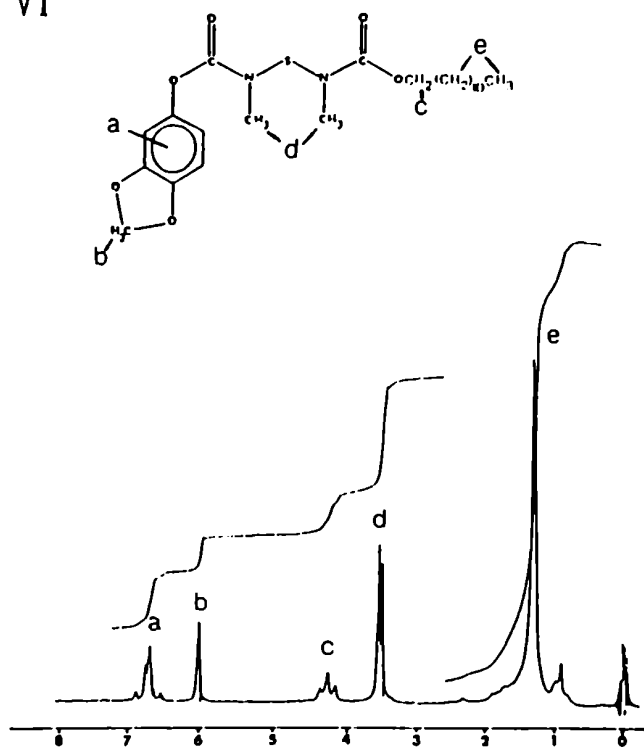
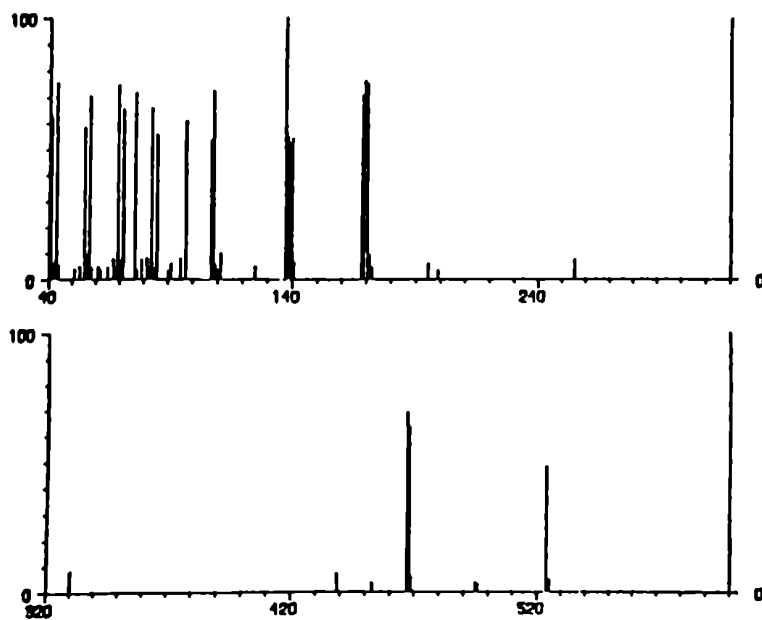
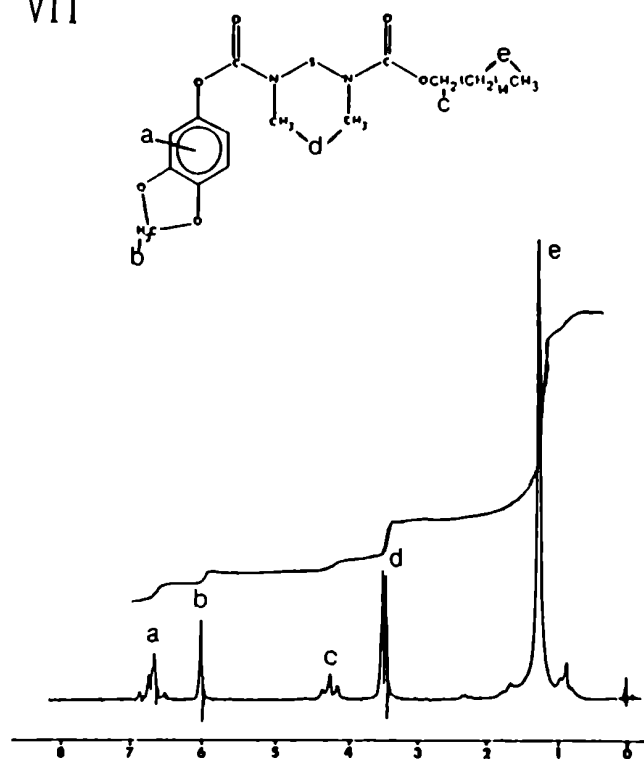


Figura 21 (Continuación).

VII



*Figura 21* (Continuación).

**Tabla 4:** Caracterización de los SDA por espectroscopia.

a) Espectros de RMN <sup>1</sup>H.

SDA	RMN <sup>1</sup> H *		
	H aromáticos(a) o alifáticos(b)	N-CH <sub>3</sub>	Ar-X
I	m <sub>a</sub> 7H 6,4-7,4	s 6H 3,55	d <sup>2</sup> 6H 1,3 m <sup>1</sup> 1H 4,5 J <sup>5</sup> = 6 s <sup>2</sup> 2H 5,95
II	m <sub>a</sub> 10H 6,2-8,2	s 3H 3,55 s 3H 3,65	s <sup>2</sup> 2H 5,95
III	m <sub>a</sub> 7H 6,35-7,45	s 6H 3,55	s <sup>3</sup> 3H 2,35 s <sup>2</sup> 2H 5,95
IV	t <sub>b</sub> 2H 4,15 J = 6 m <sub>b</sub> 7H 0,7-2,1 m <sub>a</sub> 3H 6,5-6,95	s 3H 3,40 s 3H 3,45	s <sup>2</sup> 2H 6,0
V	t <sub>b</sub> 2H 4,15 J = 6 m <sub>b</sub> 15H 0,7-2,0 m <sub>a</sub> 3H 6,4-6,9	s 3H 3,40 s 3H 3,45	s <sup>2</sup> 2H 5,95
VI	t <sub>b</sub> 2H 4,15 J = 6 m <sub>b</sub> 23H 0,7-2,0 m <sub>a</sub> 3H 6,4-6,9	s 3H 3,40 s 3H 3,45	s <sup>2</sup> 2H 5,95
VII	t <sub>b</sub> 2H 4,15 J = 6 m <sub>b</sub> 31H 0,6-2,0 m <sub>a</sub> 3H 6,4-6,9	s 3H 3,40 s 3H 3,45	s <sup>2</sup> 2H 5,95

1: X = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>HCO-.

2: X = -OCH<sub>2</sub>-.

3: X = -CH<sub>3</sub>.

4: desplazamiento químico en ppm.

5: constante de acoplamiento en Hz.



Tabla 4 (Continuación).

III

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
48	1.9	2.7	1.6	1.1	3.2	6.1	1.2	0.9	5.2	1.9	1.8
58	3.5	5.8	3.8	2.5	2.2	1.9	3.4	4.2	1.2	1.9	4.6
68	3.4	1.6	1.4	1.1	1.0	1.5	1.6	1.0	5.2	7.6	7.3
78	3.6	1.6	1.4	1.1	1.0	1.5	1.6	1.0	1.0	1.3	1.6
88	2.4	2.0	1.4	1.1	1.0	1.5	1.6	1.0	1.0	1.3	1.6
98	2.4	2.0	1.4	1.1	1.0	1.5	1.6	1.0	1.0	1.3	1.6
108	7.3	5.9	6.0	5.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1
118	2.0	1.1	1.5	4.0	1.4	1.2	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1
128	4.7	5.4	2.3	2.7	1.6	1.5	3.4	3.0	7.6	5.68	5
138	4.7	5.4	2.3	2.7	1.6	1.5	3.4	3.0	7.6	5.68	5
148	4.7	5.4	2.3	2.7	1.6	1.5	3.4	3.0	7.6	5.68	5
158	4.7	5.4	2.3	2.7	1.6	1.5	3.4	3.0	7.6	5.68	5
168	4.7	5.4	2.3	2.7	1.6	1.5	3.4	3.0	7.6	5.68	5
178	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
188	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
198	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
208	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
218	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
228	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
238	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
248	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
258	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
268	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
278	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
288	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
298	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
308	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
318	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
328	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
338	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
348	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
358	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
368	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
378	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
388	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1
398	5.0	9.7	1.2	1.0	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.1	1.1

IV

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
48	8	66	1	3	6	1	1	1	1	1	1
58	3	7	66	4	1	1	1	1	1	1	1
68	3	7	66	4	1	1	1	1	1	1	1
78	4	8	1	9	2	1	1	1	1	1	1
88	4	8	1	9	2	1	1	1	1	1	1
98	4	8	1	9	2	1	1	1	1	1	1
108	4	8	1	9	2	1	1	1	1	1	1
118	1	4	8	1	9	2	1	1	1	1	1
128	1	4	8	1	9	2	1	1	1	1	1
138	1	4	8	1	9	2	1	1	1	1	1
148	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
158	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
168	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
178	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
188	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
198	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
208	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
218	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
228	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
238	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
248	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
258	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
268	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
278	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
288	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
298	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
308	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
318	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
328	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
338	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
348	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
358	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
368	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
378	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
388	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2
398	4	6	5	4	5	3	2	4	5	5	2









precursores y sus SDA derivados, en moscas hembras, cepa RAC (susceptibles). Asimismo, se evaluó el efecto sinergista del butóxido de piperonilo (BP), sobre la acción insecticida (en moscas) de los compuestos en estudio y sus carbamatos precursores. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.

Para los compuestos arílicos precursores de SDA (propoxur, carbaril, tsumacide y MDC), se observó una toxicidad en moscas similar a la publicada por otros autores (17,112). Exceptuando el carbaril, todos ellos mostraron buena acción insecticida. Los SDA derivados de compuestos arílicos evidenciaron alta toxicidad, en todos los casos mayor que los insecticidas comerciales que sirvieron como precursores. El compuesto I mostró la máxima acción insecticida, aún mayor que la del MDC.

El BP mostró un efecto sinergista variable sobre los carbamatos precursores (tabla 5). Esta acción fue mayor en los compuestos menos tóxicos como fuera descrito por otros autores (38). El bajo sinergismo observado en el MDC puede ser atribuible a su grupo sinergóforo (MDF), que le otorgaría propiedades autosinergistas (38,123).

Los SDA arílicos resultaron pobremente sinergizados por el BP, siendo este efecto mucho menor que el observado sobre los precursores. Esta diferencia fue máxima en el caso del carbaril (tabla 5). En efecto, de un factor de sinergismo mayor que 1.170 para el carbaril, en el derivado II este factor se reduce a solo 3,4. Un posible fenómeno de autosinergismo, como causa de lo

**Tabla 5:**  $DL_{50}$  y  $DL_{95}$  en moscas (con y sin BP) de los SDA y sus precursores.

Compuesto	Solo		+ BP	
	$DL_{50}$ (ug/mosca)	$DL_{95}$ (ug/mosca)	$DL_{50}$ (ug/mosca)	$DL_{95}$ (ug/mosca)
HDC	0,30 (0,29-0,31) <sup>1</sup>	0,54	0,18 (0,17-0,19)	0,40
Propoxur	0,59 (0,58-0,60)	0,85	0,26 (0,25-0,28)	0,67
I	0,22 (0,21-0,23)	0,57	0,16 (0,15-0,17)	0,31
Carbaril	>200	>200	0,17 (0,12-0,23)	0,59
II	1,12 (1,07-1,17)	2,81	0,33 (0,21-0,52)	1,46
Tsumacide	6,61 (6,52-6,70)	9,60	0,57 (0,56-0,58)	1,04
III	0,37 (0,36-0,38)	0,64	0,13 (0,12-0,14)	0,38
Butil carbamato	163 (158-169)	310	91 (69-120)	
IV	0,47 (0,46-0,48)	0,68	0,55 (0,54-0,57)	
Octil carbamato	180 (173-187)	381	164 (158-169)	310
V	1,01 (0,97-1,06)	2,22	0,55 (0,53-0,57)	1,22
Lauril carbamato	178 (170-186)	355	177 (171-183)	353
VI	2,00 (1,97-2,03)	2,91	1,51 (1,47-1,56)	2,72
Cetil carbamato	>40 <sup>2</sup>	>40 <sup>2</sup>	>40 <sup>2</sup>	>40 <sup>2</sup>
VII	22,5 (15-30)	81	5,69 (3,89-8,39)	20,2

1: Intervalo de confianza.  
2: Limite de solubilidad.

expuesto, será analizado en la sección V.d.1.

La toxicidad en moscas de los SDA arilalquílicos (IV,V,VI,VII) fue variable, observándose una tendencia decreciente al aumentar la longitud de la cadena alquílica. Los precursores alquílicos de los SDA presentaron muy baja acción insecticida. Tanto en el caso de los alquil carbamatos precursores como sus SDA derivados, el efecto sinergista del BP fue muy bajo o nulo.

#### IV.b. Correlación estructura actividad insecticida

Como se expuso anteriormente, los SDA alquílicos mostraron una actividad insecticida en moscas decreciente a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica (tabla 5). Por ésta razón, fue de interés establecer la existencia de una correlación entre los valores de  $DL_{50}$  de estos compuestos y su hidrofobicidad. Como parámetros de hidrofobicidad, se utilizan actualmente el coeficiente de partición octanol-agua (P) y el parámetro de energía libre asociado  $P_i$  (185).

La bibliografía abunda en comentarios sobre dificultades experimentales para la determinación de los valores de P, especialmente en moléculas de muy alta hidrofobicidad (180-182). Por lo tanto, se han desarrollado metodologías indirectas para determinar este parámetro. En la mayor parte de los casos se utilizaron técnicas cromatográficas de capa delgada (180) y

*cromatografía líquida de alta resolución (180-182). Asimismo, en el caso de compuestos pertenecientes a series homólogas, se estableció la posibilidad de calcular los valores de log P a partir de la aditividad de los parámetros de hidrofobicidad, sumando 0,5 unidades de log P por metileno incorporado, al valor obtenido experimentalmente para el primer miembro de la serie (183,184).*

*Para este trabajo se determinaron dos series de valores de log P de los alquil SDA, la primera mediante cromatografía líquida de alta resolución (utilizando una columna de fase invertida) y la segunda por cálculos de adición a partir del valor de log P del compuesto IV (primer compuesto de la serie) también determinado por cromatografía líquida de alta resolución.*

*Para la determinación cromatográfica de log P de los SDA se utilizó como referencia una familia de arilalquil sulfenil-dicarbamatos, cuyos log P se encuentran descritos en la literatura (150) (tabla 1). Se determinó la curva de regresión para log P vs. log k' (siendo k' el factor de capacidad obtenido por cromatografía líquida de alta resolución) de dicha familia (figura 23), obteniéndose:*

$$\log k' = - 0,348 + 0,167 \log P$$

$$R = 0,995$$

$$F = 804,4 \text{ (puntos superiores al } 0,1\%, F_{0,999})$$

*Luego, utilizando las constantes de la recta obtenida y el*

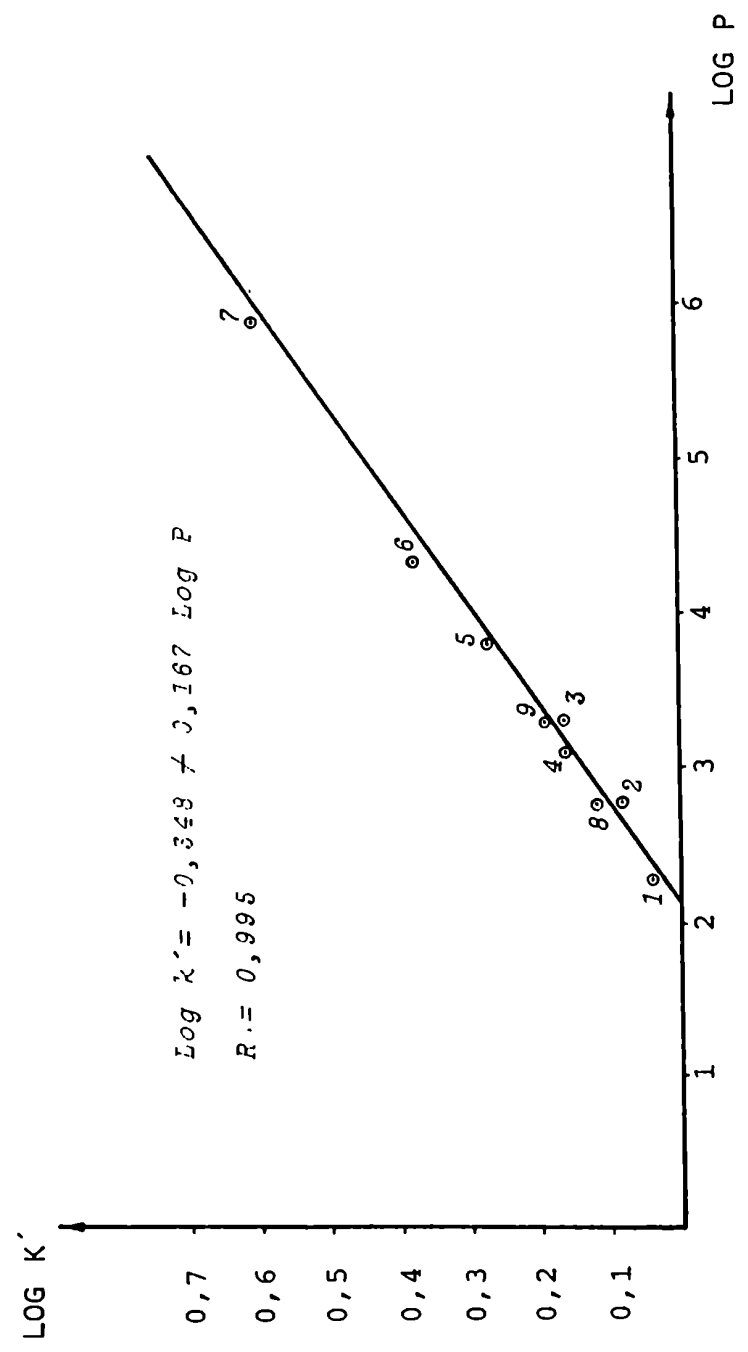


Figura 23 Curva de regresión de Log P vs. Log k' para araquil sulfenildicarbamatos.



valor de  $\log k'$  para los arilalquil SDA en estudio se determinaron los valores de  $\log P$  de los mismos.

En la tabla 6 se recopilan los valores de  $\log P$  de los arilalquil SDA, y a modo comparativo de los aril SDA y de los carbonatos sin derivatizar. En la misma tabla se informan los valores de  $\log P$  calculados por la regla de la aditividad. Puede observarse que a medida que aumenta la longitud de la cadena de los arilalquil SDA, se incrementa la discrepancia entre los valores de  $\log P$  calculados y experimentales.

Con los valores de  $\log P$  obtenidos para los arilalquil SDA, se intentó correlacionar la hidrofobicidad con la actividad biológica, de acuerdo a la ecuación propuesta por Hansch (185):

$$\log \frac{1}{DL_{50} \text{ (molar)}} = a \log P + b$$

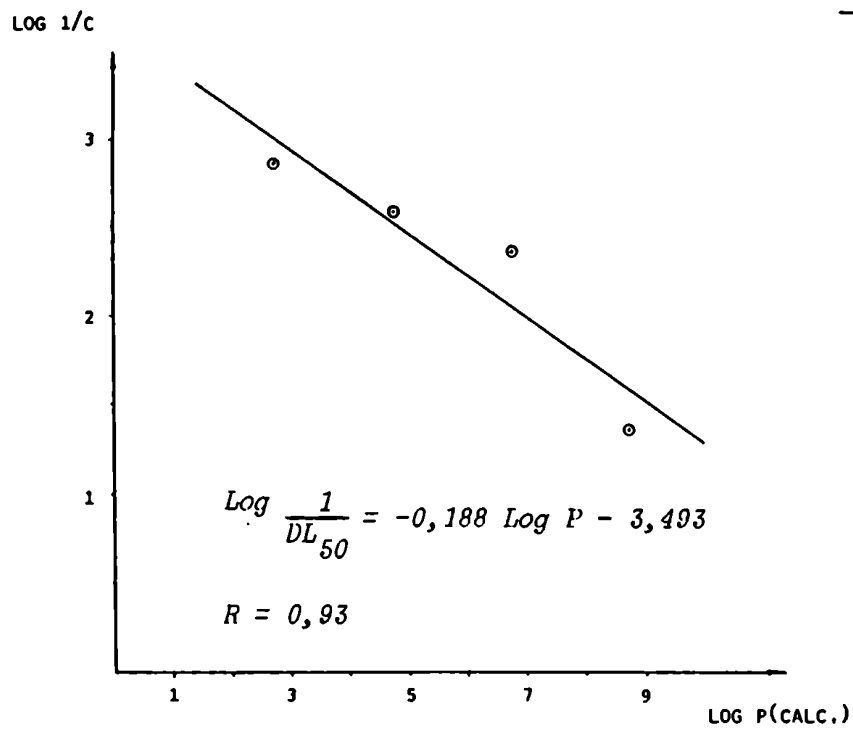
Introduciendo los valores experimentales en la ecuación general, se obtuvieron dos rectas correspondientes a las dos series de valores de  $\log P$ .

Para los valores calculados (figura 24 a):

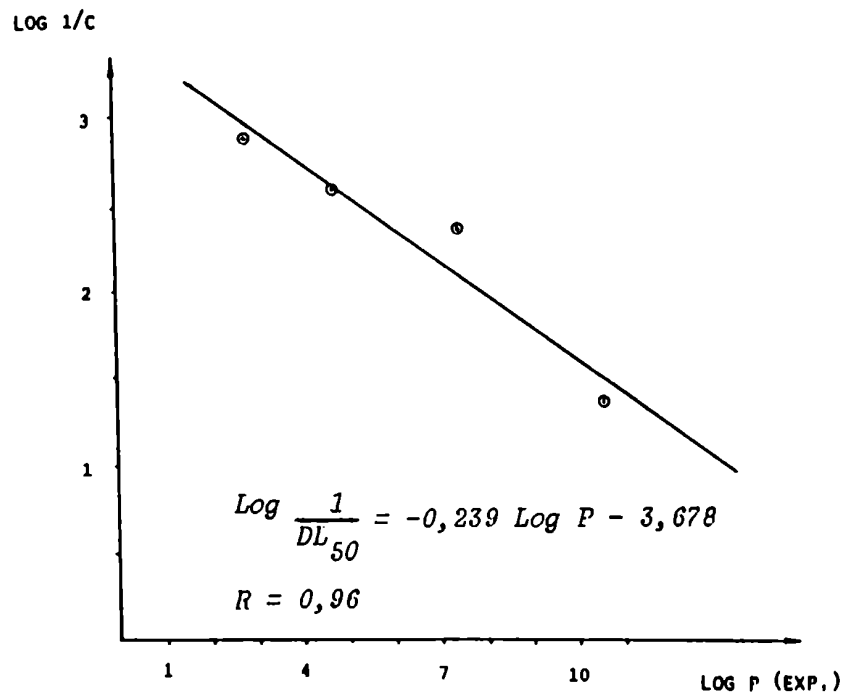
$$\log \frac{1}{DL_{50} \text{ (molar)}} = -0,188 \log P + 3,493$$

Tabla 6: Valores de log P de los SDA y sus precursores.

<i>Compuesto</i>	<i>Log P</i>	
	<i>Experimental</i>	<i>Calculado</i>
<i>HDC</i>	1,12	---
<i>Propoxur</i>	1,50	---
<i>Carbaril</i>	1,54	---
<i>Tsumacide</i>	1,51	---
<i>Butilcarbamato</i>	1,77	---
<i>Octilcarbamato</i>	3,47	---
<i>Laurilcarbamato</i>	5,50	---
<i>Cetilcarbamato</i>	9,31	---
<i>I</i>	2,70	---
<i>II</i>	2,83	---
<i>III</i>	2,66	---
<i>IV</i>	2,74	---
<i>V</i>	4,67	4,74
<i>VI</i>	7,39	6,74
<i>VII</i>	10,51	8,74



a) Valores calculados.



b) Valores experimentales.

R: 0,93

F: 13,7 (puntos superiores al 10%;  $F_{0,90}$ )

Para los valores determinados por cromatografía (figura 24 b):

$$\log \frac{1}{DL_{50} \text{ (molar)}} = -0,239 \log P + 3,678$$

R: 0,96

F: 23,3 (puntos superiores al 5%;  $F_{0,95}$ )

Estos resultados indican una clara correlación entre la  $DL_{50}$  y la hidrofobicidad medida por el  $\log P$  en los arilalquil SDA sintetizados. Esta correlación se explica teniendo en cuenta que los fenómenos de absorción, distribución y almacenamiento, factores que condicionan la toxicidad, son modulados por la hidrofobicidad de las moléculas (184). Es de destacar que los valores de  $\log P$  experimentales presentan una mejor correlación que los calculados, esto podría deberse a que los fenómenos cromatográficos de interacción, representan un modelo adecuado de las interacciones hidrofóbicas que influyen en los ya mencionados fenómenos de absorción, distribución y almacenamiento de los arilalquil SDA.

Los valores de  $DL_{50}$  utilizados para esta correlación fueron

los obtenidos sin aplicación simultánea de BP. La influencia de la misma no es de importancia en los valores de  $DL_{50}$ , pues el sinergismo es bajo o nulo según el caso. Además el BP puede modificar la penetración de carbamatos. Ya fueron informadas variaciones en la toxicidad de insecticidas sobre insectos al topicarlos con insecticidas en distintas matrices oleosas, incluyendo sinergistas (192-194).

#### IV. c. Dosis letal 50 en ratones

La toxicidad aguda de los SDA en mamíferos, como también la de sus precursores, fue determinada mediante el tratamiento oral de ratones con dichos compuestos.

Los SDA y carbamatos lineales se solubilizaron en aceite de oliva, y los carbamatos arílicos en propilenglicol, debido a la diferencia de solubilidad y a la necesidad de trabajar a altas concentraciones.

La cuantificación del efecto tóxico se realizó mediante el cálculo de la  $DL_{50}$ . Estos valores se informan en la tabla 7.

Un análisis de los mismos nos indica que los alquil carbamatos y sus SDA derivados no mostraron acción letal hasta las máximas dosis ensayadas. De acuerdo a los resultados obtenidos, estos compuestos pueden ser considerados de muy baja o nula toxicidad aguda según clasificación de la bibliografía (80).

Las  $DL_{50}$  de los aril carbamatos precursores que se

Tabla 7: DL<sub>50</sub> y DL<sub>05</sub> en ratones de los SDA y sus precursores.

Compuesto	DL <sub>50</sub> (mg/kg)	DL <sub>05</sub> (mg/kg)
MDC <sup>1</sup>	566 (562-570) <sup>3</sup>	682
Propoxur <sup>1</sup>	83 (81-84)	120
I <sup>2</sup>	500 (493-507)	727
Carbaril <sup>1</sup>	>1400 ---	---
II <sup>2</sup>	707 (702-712)	852
Tsumacide <sup>1</sup>	283 (281-285)	341
III <sup>2</sup>	447 (446-448)	475
Butilcarbamato <sup>2</sup>	>1500 ---	---
IV <sup>2</sup>	>1000 ---	---
Octilcarbamato <sup>2</sup>	>1500 ---	---
V <sup>2</sup>	>1000 ---	---
Laurilcarbamato <sup>2</sup>	>1500 ---	---
VI <sup>2</sup>	>1000 ---	---
Cetilcarbamato <sup>2</sup>	>1500 ---	---
VII <sup>2</sup>	>1000 ---	---

1: Solubilizado en propilenglicol

2: Solubilizado en aceite de oliva

3: Intervalo de confianza.

obtuvieron, fueron similares a las informadas por otros autores. Para el propoxur el valor de la  $DL_{50}$  obtenida fue 83 mg/kg, mientras que el valor publicado es de 100 mg/kg (195). Para el tsumacide, la bibliografía indica una  $DL_{50}$  de 268 mg/kg (195), y el valor obtenido fue de 283 mg/kg. En el caso del carbaril y el HDC, no se encontraron publicados valores de  $DL_{50}$  en ratones.

Los aril SDA presentaron una toxicidad variable, entre moderada y leve, de acuerdo a las definiciones de Matsumura (80).

La derivatización dió como resultado un compuesto cuya toxicidad es menor que la de su precursor más tóxico.

Otros autores han informado que la derivatización de carbamatos en general y la formación de sulfenil derivados en particular, es una forma de reducir la toxicidad de estos insecticidas en mamíferos (136,147).

#### IV.d. Selectividad

Hollingworth (189) define como parámetro indicador de toxicidad selectiva de un compuesto, al coeficiente de selectividad en vertebrados (CSV). Este resulta de dividir la  $DL_{50}$  oral en un vertebrado por la  $DL_{50}$  obtenida por tópico en un insecto. Obviamente un valor alto de CSV indica que un compuesto es mucho más tóxico para insectos que para vertebrados.

La gran mayoría de los insecticidas comerciales presentan al menos cierto grado de selectividad, con CSV entre 1 y 10. Sin embargo, entre los carbamatos podemos encontrar compuestos de muy

baja selectividad, como el aldicarb y el carbofuran (189). El tsumacide y en menor medida el propoxur, dentro de los carbamatos precursores incluidos en este trabajo, representan casos de pobre selectividad. En cambio en los SDA objeto de este estudio, se observa una aceptable selectividad, como se muestra en la tabla 8.

En el caso de los aril SDA, todos los valores de CSV fueron superiores a 10. Resulta particularmente interesante el caso de los compuestos I y III, ya que sus respectivas selectividades se incrementan notablemente con respecto a sus precursores, propoxur y tsumacide. No fue de interés la determinación de valores finitos de CSV en el caso de los arilalquil SDA, que a las dosis ensayadas, pueden ser considerados de baja toxicidad en mamíferos. Un análisis de las  $DL_{50}$  obtenidas en moscas y ratones, sugiere que estos derivados son significativamente más selectivos que sus alquil precursores, compuestos de muy baja acción insecticida.

Algunos autores interpretan la selectividad de los sulfenil derivados a través de la ruptura activante de la unión N-S (143,148,150), tema que se discutirá en el ítem V.c.

Si bien existen claras evidencias de la existencia de una ruptura activante en medios biológicos (ítem V.c.) (165), para algunos autores la misma sería de baja eficiencia relativa en ratones (143). Por otra parte, la necesidad de activación en mamíferos es clara para los SDA, dada la muy baja actividad anticolinesterásica de estos compuestos sobre AcCEEB (ítem V.b).



**Tabla 8:** Coeficiente de selectividad en vertebrados para los SDA y sus precursores.

Compuesto	DL <sub>50</sub> (mg/kg)		CSV
	Moscas	Ratones	
MDC	16	566	35
Propoxur	31	83	2,7
I	12	500	42
Carbaril	>10.600	>1.400	--
II	60	707	12
Tsumacide	352	283	0,8
III	20	447	22
Butilcarbamato	8.700	>1.500	>0,2
IV	25	>1.000	>40
Octilcarbamato	9.600	>1.500	>0,2
V	54	>1.000	>19
Laurilcarbamato	9.500	>1.500	>0.2
VI	106	>1.000	>9
Cetilcarbamato	>2.100	>1.500	--
VII	1.200	>1.000	>0,8

Adicionalmente, debiera considerarse como factor contributivo a la selectividad el efecto autosinergista, que se discutirá en V.d.. Este autosinergismo podría ser menos importante en ratones que en moscas, lo que contribuiría a la selectividad observada. Esta posibilidad se ve avalada por los resultados de otros autores, que adjudican a la vía degradante oxidativa, menor importancia en mamíferos que en insectos (80), como ya se mencionara en la Introducción.

Otro punto que merece comentario, es el de los trabajos que para justificar la selectividad de los derivados de carbamatos, sugieren que en el estómago de mamíferos tratados oralmente, se transformarían en otros derivados polisulfurados, de menor toxicidad (168).

## V. MECANISMO DE LA ACCION INSECTICIDA

### V.a. Hipotesis

Teniendo en cuenta los trabajos previos sobre sulfenil dicarbamatos (148,150) y sobre compuestos que incluyen el grupo MDF (17,97,112), se supuso que los SDA, objeto de este estudio, manifestarían su acción insecticida a través del siguiente mecanismo:

1) Ruptura de la unión N-S para dar los carbamatos de origen, que serían los metabolitos activos responsables de la

*inhibición de la AcCE.*

*2) Autosinergismo, a través de la inhibición de OFM por los SDA tal cual y los metabolitos que posean el grupo MDF.*

*Fue de interés entonces, obtener evidencias experimentales de los pasos del mecanismo propuesto.*

### **V.b. Acción anticolinesterásica**

*Está ampliamente aceptado, que la lesión bioquímica primaria en la intoxicación tanto de insectos como de mamíferos por carbamatos, es la inhibición de la AcCE del sistema nervioso (138).*

*La acción anticolinesterásica de los SDA sintetizados, como asimismo la de los carbamatos precursores, se midió como constante bimolecular de inhibición, utilizando cabeza de mosca y eritrocito bovino, como fuentes de AcCE. Los resultados obtenidos se informan en la tabla 9, junto a las concentraciones de los presuntos inhibidores utilizados.*

*Un análisis de dicha tabla, nos indica que los SDA derivados de alquil carbamatos, son pobres inhibidores de la AcCEEB y la AcCECM, como lo eran los compuestos lineales de origen.*

*Si se compara el poder anticolinesterásico de los carbamatos arílicos derivados, respecto del de sus precursores, se observa claramente la disminución del mismo luego de la derivatización. Una buena medida de esta diferencia, está dada por el cociente*

**Tabla 9:** Constantes de inhibición bimolecular ( $k_i$ ) de carbamatos y SDA sobre AcCECM y AcCEEB.

Compuesto	$k_i$ ( $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ )			
	Cabeza de (concentración mosca de inhibidor)		Eritrocito (concentración de bovino de inhibidor)	
MDC	3.200 (+/-100)	$(2.10^{-5} M)$	323 (+/-10)	$(2.10^{-4} M)$
Propoxur	540.000 (+/-4.000)	$(2.10^{-7} M)$	43.300 (+/-2.800)	$(1,5.10^{-7} M)$
I	80.000 (+/-3.500)	$(2.10^{-6} M)$	<50	$(1.10^{-3} M)^a$
Carbaril	230.000 (+/-5.000)	$(2.10^{-7} M)$	28.000 (+/-500)	$(2.10^{-6} M)$
II	27.400 (+/-1.500)	$(5.10^{-6} M)$	<50	$(2.10^{-3} M)^a$
Tsumacide	10.200 (+/-200)	$(1.10^{-5} M)$	3.500 (+/-70)	$(2.10^{-5} M)$
III	890 (+/-30)	$(1.10^{-4} M)$	<50	$(1.10^{-3} M)^a$
Butilcarbamato	<50	$(6.10^{-2} M)$	<50	$(6.10^{-2} M)$
IV	234 (+/-15)	$(5.10^{-4} M)$	<50	$(2.10^{-3} M)^a$
Octilcarbamato	<50	$(6.10^{-2} M)^a$	<50	$(6.10^{-2} M)^a$
V	127 (+/-15)	$(1.10^{-3} M)^a$	<50	$(1.10^{-3} M)^a$
Laurilcarbamato	<50	$(2.10^{-4} M)^a$	<50	$(2.10^{-4} M)^a$
VI	67 (+/-30)	$(1.10^{-3} M)^a$	<50	$(1.10^{-3} M)^a$
Cetilcarbamato	<50	$(1.10^{-4} M)^a$	<50	$(2.10^{-4} M)^a$
VII	<50	$(1.10^{-3} M)^a$	<50	$(1.10^{-3} M)^a$

a: Limite de solubilidad.

Los valores son promedio de dos determinaciones +/- desviación estandar.

entre las constantes de inhibición de los carbamatos precursores y sus SDA correspondientes (tabla 10). Esta disminución de la acción inhibitoria ejercida por los SDA, ya fue observada por algunos autores en otros sulfenil derivados de carbamatos e interpretada en base a efectos estéricos que desfavorecen la reacción de inhibición (143).

El cociente de las constantes de inhibición (tabla 10) resalta, además, una inesperada diferencia en la capacidad anticolinesterásica de los aril SDA, relacionada con la fuente de enzima. Estos compuestos demostraron una mayor acción inhibitoria en enzima proveniente de homogenato de mosca, que en la de eritrocito bovino. Además, a pesar de los mayores valores de  $k_i$  obtenidos en el caso de AcCECH, la acción anticolinesterásica de los SDA, en general no justifica por sí misma su toxicidad en moscas. Para explicar estos fenómenos, deberíamos basarnos en procesos de activación y autosinergismo, temas que trataremos con posterioridad.

### V.c. Activación

#### V.c.1. Ruptura de la unión N-S

En la bibliografía se plantea como hipótesis que los sulfenildicarbamatos, manifiestan su acción tóxica luego de la ruptura de la unión N-S (148,150). Esto está bien establecido en otros sulfenil derivados de carbamatos no dicarbámicos (165).

**Tabla 10:** Cocientes entre  $k_1$  de carbamatos y SDA medidas sobre AcCECH y AcCEEB.

Compuestos	$k_1$ (carbamato)/ $k_1$ (SDA)	
	AcCECH	AcCEEB
Propoxur/I	6,8	>866
Carbaril/II	8,4	>560
Tsumacide/III	11,5	>70
HDC/IV	13,7	>6,5
HDC/V	25,2	>6,5
HDC/VI	47,8	>6,5
HDC/VII	>64	>6,5

A los fines de este trabajo, fue de interés buscar evidencias experimentales de dicha ruptura en los SDA en estudio.

Se demostró entonces, la reactividad de la unión N-S frente a compuestos de interés biológico, conteniendo grupos -SH. La reacción del compuesto I con cisteína y glutatión mostró una considerable tiólisis, para dar como productos de reacción propoxur y MDC (figura 25), los que fueron identificados y cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución (tabla 11). Los resultados obtenidos demuestran claramente la reactividad de la unión N-S frente a compuestos sulfhidrúlicos típicos de medios biológicos.

Esto representa una evidencia de la factibilidad de un mecanismo no enzimático, responsable de la activación. Si bien la activación no enzimática producida por compuestos sulfhidrúlicos no ha merecido demasiados estudios, representa un mecanismo reconocido en los fenómenos de intoxicación de insectos por insecticidas. Como ejemplo conocido, tomemos el caso del insecticida fosforado dibrom, que pasa a diclorvos (DDVP), el cual es el causante de la lesión bioquímica primaria (34). Otro ejemplo es la tralometrina, la cual es activada rápidamente por los -SH presentes en fluidos biológicos, para dar el insecticida piretroide deltametrina (196). Otro caso demostrado de activación por -SH, más cercano al postulado para los compuestos en estudio, es el de los derivados sulfenilados de carbamatos ya mencionado (165).

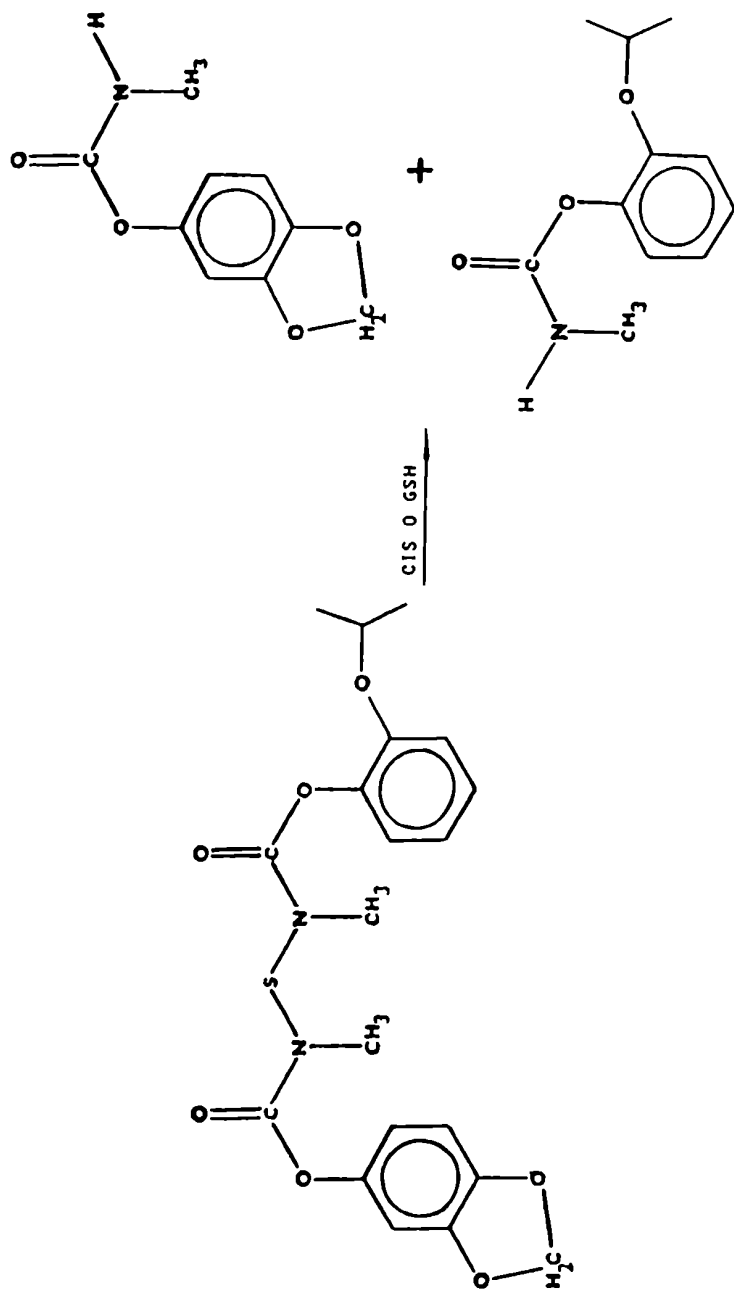


Figura 25 Ruptura tiolítica de I.



Tabla 11 = Tióllisis de I para dar los carbonatos de origen.

Reacción con:	% de ruptura para dar propoxur:	% de ruptura para dar HDC:
Cisteína	17,6 +/-0,8	16,5 +/-0,9
Glutación	5,8 +/-0,9	7,6 +/-0,7

Los resultados son promedio de tres determinaciones independientes +/-desviación estandar.

## V.c.2. Evidencias "in vitro"

Los cocientes entre las  $k_i$  de AcCECH y AcCEEB de los aril SDA y sus precursores (tabla 12), indican una marcada selectividad de la acción inhibitoria sobre enzima de mosca, en favor de los aril SDA.

En la literatura se discuten diferencias estructurales entre el sitio activo de AcCECH y AcCEEB, que explican la mayor inhibición de la primera por insecticidas anticolinesterásicos (186). Estas variaciones estructurales entre enzimas de distinto origen, sin embargo, no parecen ser factores determinantes en las diferencias de inhibición de AcCE por aril SDA, evidenciados a través de los cocientes presentados en la tabla 12.

Algunos autores mencionan que las mediciones "in vitro" de la inhibición de AcCE por sulfenil derivados de carbamatos, no proporcionan una idea real de la capacidad inhibitoria de estos derivados (161). En base a los resultados observados en V.c.1. se supuso que la tiólisis que producirían los -SH presentes en el homogenato crudo de cabeza de mosca (que poseen una concentración mucho más alta que los de la solución de enzima de eritrocito bovino purificado), liberaría los carbamatos precursores, inhibidores mucho más potentes que sus derivados. Se decidió entonces, analizar la posible ocurrencia de esta tiólisis para los SDA en estudio. Para tal fin, se agregó la misma concentración del compuesto II, utilizada para determinar la  $k_i$  sobre AcCECH, a un homogenato de cabeza de mosca,

Tabla 12: Cocientes entre  $k_1$  medidas sobre AcCECM y AcCEEB para arilcarbamatos y sus SDA derivados.

Compuesto	$\frac{k_1 \text{ AcCECM}}{k_1 \text{ AcCEEB}}$
Propoxur	12,5
I	>1.600
Carbaril	8,2
II	>548
Tsumacide	2,9
III	>18

pretratado con N-etilmaleimida. Se utilizó una concentración de N-etilmaleimida suficiente como para bloquear parcialmente los -SH presentes en el homogenato (162), pero dejando una actividad acetilcolinesterásica remanente adecuada como para medir posibles efectos inhibitorios del compuesto II. En estas condiciones dicho compuesto no produjo inhibición medible.

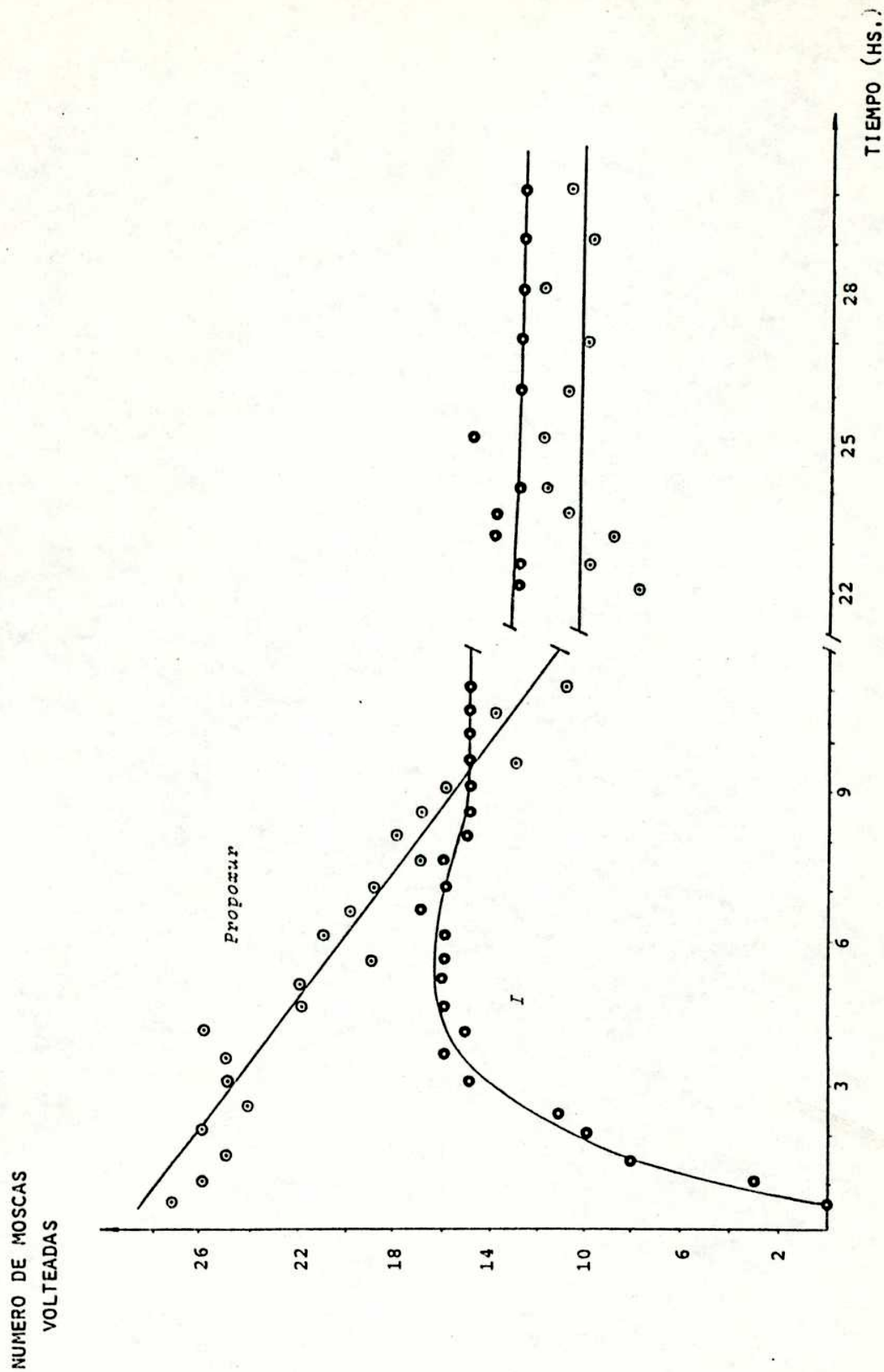
Estos resultados sugieren la factibilidad del proceso de activación tiolítico por -SH biológicos, como asimismo que las  $k_1$  de SDA sobre AcCECM serían menores que las obtenidas experimentalmente.

Lo expuesto avalaría el mecanismo de activación por ruptura de la unión N-S propuesto.

### V.C.3. Evidencias "in vivo"

La cinética del proceso de intoxicación observada a través de la mortalidad de insectos en función del tiempo, da idea de los procesos involucrados en el fenómeno. Aquellos insecticidas que requieren un proceso de activación, intoxican más lentamente que aquellos que no lo requieren (197).

En este caso, fue de interés comparar la velocidad de intoxicación en moscas (seguida a través del volteo de insectos), entre I y su precursor, el propoxur. Las respectivas velocidades, medidas por el número de insectos volteados en el tiempo, se grafican en la figura 26. Como se observa, el comportamiento toxicocinético de ambos compuestos es muy



**Figura 26.** Cinética de la acción volteante sobre moscas de propoxur y I.

diferente. El propoxur, mostró un rápido y casi total efecto de volteo inicial a la dosis ensayada (comportamiento típico de inhibidores directos de la AcCE), el cual fue revertido parcialmente durante las 11 horas posteriores al tratamiento (figura 26). En cambio el compuesto I, mostró un paulatino incremento en la acción de volteo (comportamiento típico de proinsecticidas), durante las 4 horas posteriores al tratamiento, no observandose recuperación (figura 26).

Las diferencias observadas entre propoxur y el compuesto I pueden ser adjudicadas al proceso de activación de I.

La cinética de penetración a través de integumento, podría ser considerada un factor importante en la regulación de la velocidad de intoxicación. Sin embargo, dado que la hidrofobicidad de los compuestos, no permite presumir sustanciales diferencias, se puede suponer que este paso toxicocinético no aporta significativamente a la diferencia comentada.

El posible efecto autosinergista del compuesto I (el cual se discutirá en el ítem V.d), podría ser un factor contributivo a la irreversibilidad del proceso de volteo observado. Ya fue demostrado que el BP, en el caso de las intoxicaciones de insectos con piretroides, impide la recuperación luego del volteo inicial (198).

#### V.d. Autosinergismo

### V.d.1. Efecto del BP

Está ampliamente reconocido el sinergismo que el BP ejerce sobre el efecto insecticida de carbamatos, a través del bloqueo de la detoxicación mediada por OFM.

En la tabla 5 se recopilan las DL<sub>50</sub> de los SDA y sus precursores cotratados con BP. En el caso de los aril SDA el efecto sinergista del BP fue mucho menor que en sus precursores, salvo en el caso del MDC que es el que incorpora el grupo sinérgico a la molécula. Esto queda demostrado con los factores de sinergismo (F.S.) individuales y el cociente entre el factor de sinergismo del precursor y su SDA derivado, que se observan en la tabla 13. Estos resultados sugieren que el grupo sinérgico MDF genera, tanto en la molécula del MDC como en las de aril SDA, un autosinergismo que reduce o anula el efecto similar que produciría el BP.

En el caso de los arilalquil SDA, el BP casi no produce efecto sinergista sobre los precursores. De estos resultados puede inferirse que la degradación microsomal no juega un rol importante en la toxicocinética de los carbamatos alquílicos en insectos. Por tal razón en los correspondientes SDA, no tiene sentido hablar de un fenómeno de autosinergismo sobre esta parte de la molécula.

### V.d.2. Inhibición de OFM

**Tabla 13:** Factores de sinergismo de los aril SDA y sus carbamatos precursores.

Compuesto	DL <sub>50</sub> (nanomoles/mosca)		F.S.	$\frac{\text{F.S. (carbamato)}}{\text{F.S. (SDA)}}$
	solo	+ BP		
HDC	1,5	0,92	1,7	---
Propoxur	2,8	1,2	2,3	1,6
I	0,51	0,37	1,4	
Carbaril	>995	0,85	>1.170	>344
II	2,6	0,77	3,4	
Tsumacide	40	3,5	11,4	
III	0,95	0,33	2,9	3,9



A los fines de justificar la hipótesis de autosinergismo, se intentó establecer un posible efecto inhibitorio del MDC y sus SDA derivados, sobre la degradación de carbamatos mediada por OFM. Para tal fin, se tomó como sistema modelo el carbaril, ya que se trata de un insecticida cuya eficiente degradación por OFM está profusamente estudiada (199).

Se incubó naftil-<sup>14</sup>C-carbaril con homogenato de abdomen de mosca y se determinaron, en algunos casos cuali y en todos cuantitativamente por cromatografía en capa delgada, los correspondientes metabolitos producidos. Para el fraccionamiento subcelular y la separación cromatográfica se reprodujeron condiciones establecidas (50,58).

Con el objeto de evidenciar posibles inhibiciones del sistema de OFM por compuestos que poseen el grupo MDF, se comparó un incubado control de naftil-<sup>14</sup>C-carbaril, con incubados similares conteniendo BP, MDC y SDA.

El análisis cromatográfico reveló por autoradiografía la presencia de ocho manchas (figura 27), cuyos  $R_f$  e identificación tentativa mediante patrones, o por informaciones bibliográficas (50) se recopilan en la tabla 14. Se identificaron:

- 1-naftol (A) (mediante patrón).
- 5-hidroxi-1-naftil-N-metilcarbamato (D)  
(por datos de  $R_f$  bibliográficos).
- 4-hidroxi-1-naftil-N-metilcarbamato (E)  
(por datos de  $R_f$  bibliográficos).
- 1-naftil-N-hidroximetilcarbamato (F)

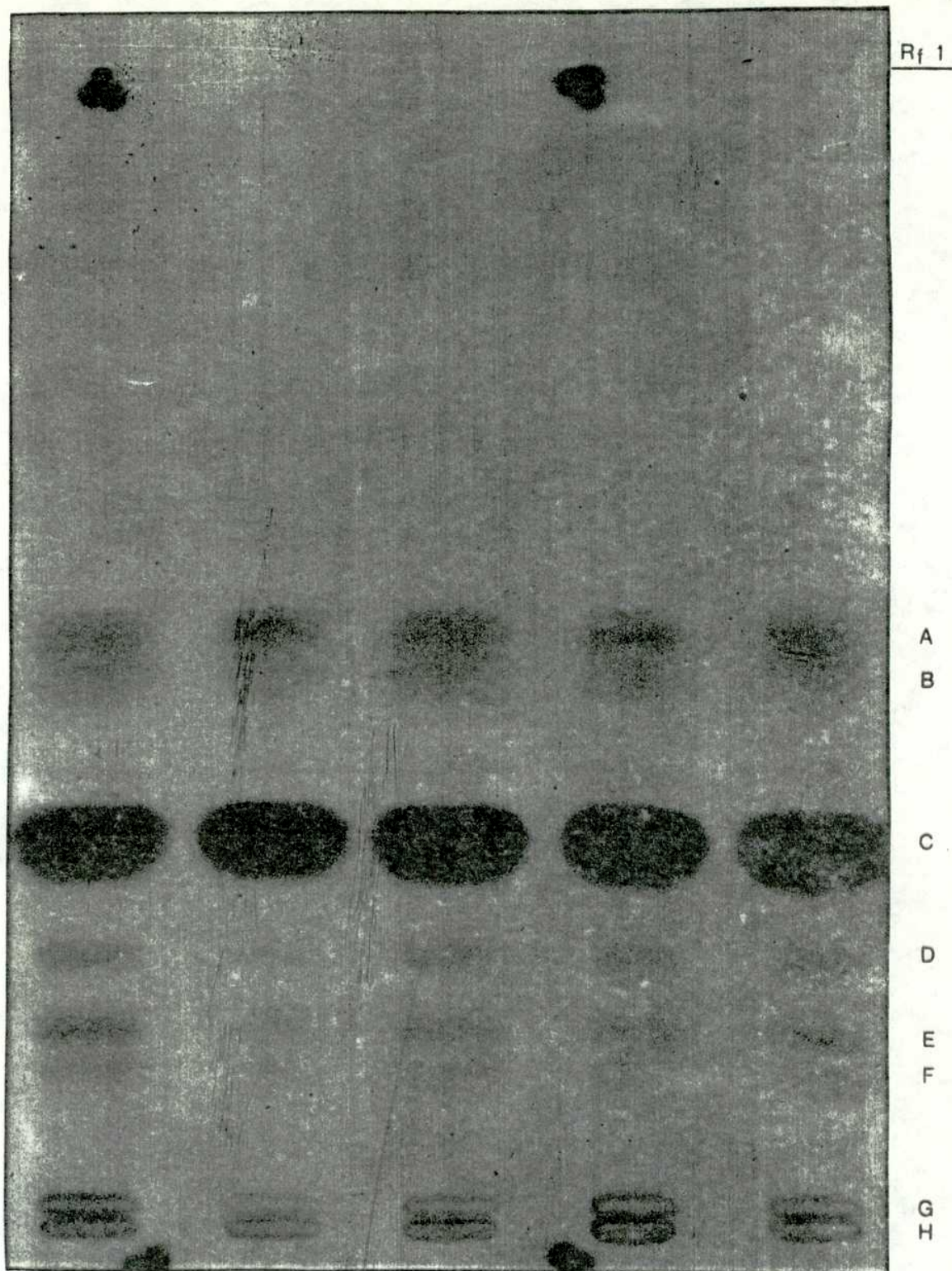


Figura 27: Autoradiografía obtenida a partir de los metabolitos de <sup>14</sup>C-carbaril separados cromatográficamente.

Tabla 14: Identificación tentativa de metabolitos del carbaril.

Mancha	$R_f^1$	Identificación tentativa	Metabolito de OFM
A	0,52	1-naftol <sup>2</sup>	NO
B	0,48	--	SI
C	0,34	carbaril <sup>2</sup>	NO
D	0,24	5-OH-carbaril <sup>3</sup>	SI
E	0,17	4-OH-carbaril <sup>3</sup>	SI
F	0,14	N-OH-metilcarbaril <sup>3</sup>	SI
G	0,02	--	SI
H	0	--	SI

1: Eter etílico:hexano (4:1).

2: Identificación contra patrón.

3: Identificación por bibliografía (50).

(por datos de  $R_f$  bibliográficos).

Se observan también otros tres metabolitos NADPH dependientes (B,G,H). El patrón de degradación metabólico cualitativo obtenido es análogo al reportado por otros autores tanto en mamíferos como en insectos (199). En la misma tabla se informa la posible mediación de OFM en la formación de cada metabolito, para tal fin, se tomó en cuenta si la formación del metabolito es NADPH dependiente (200).

La radiactividad encontrada en cada mancha, revelada autoradiográficamente, tanto en el incubado control como en los que se incluyeron inhibidores, se informa en la tabla 15. Los valores de radiactividad de metabolitos del carbaril (tabla 15), muestran que las concentraciones de aquellos NADPH dependientes (B,D,E,F,G,H), resultaron deprimidas en presencia de BP, MDC y SDA.

En la tabla 16, se recopilan los valores de dpm de los metabolitos provenientes de OFM, de los metabolitos no oxidativos, como asimismo el porcentaje de degradación debido a OFM y el de inhibición que sobre el mismo producen los mencionados inhibidores. Un análisis de la tabla 16 nos indica la alta incidencia del metabolismo oxidativo en la degradación del carbaril por moscas, como ya indicaron otros autores (57). En la misma tabla se puede observar la elevada inhibición que sobre este metabolismo provocan los MDF inhibidores ensayados. Estos resultados sugieren, que tanto el MDC como el SDA se comportan en forma análoga al BP, produciendo un efecto

**Tabla 15:** Dpm de las manchas obtenidas en la separación cromatográfica de metabolitos del carbaril.

Mancha	Carbaril + NADPH	Carbaril sin NADPH	Carbaril + NADPH + BP	Carbaril + NADPH + HDC	Carbaril + NADPH + II
A	919	911	1.056	991	1.140
B	977	694	787	735	613
C	68.756	70.652	75.450	76.889	79.889
D	813	233	580	448	490
E	1.294	298	580	594	562
F	642	239	372	425	396
G	1.101	357	587	579	524
H	533	280	409	470	417
Acuoso	27.390	27.155	22.096	18.892	18.290
Total	102.425	100.819	101.917	95.723	102.321
% recup.	95,4	93,9	94,9	93.2	95,3
B+D+E+F+G+H	5.360	2.101	3.315	3.311	3.002
% del total que representan B+D+E+F+G+H	5,23	2.08	3,25	3,31	2,93

Tabla 16: Inhibición de OFM por BP, MDC Y SDA.

	Control	+ BP	+ MDC	+ SDA
Dpm de metabolitos oxidativos	5.360	3.315	3.311	3.002
Dpm de metabolitos no oxidativos	919	1.056	991	1.140
% de degradación debida a OFM	85	76	77	
% de inhibición de la degradación por OFM	0	40,4* (+/-2,2)	41,3* (+/-3,2)	42,8* (+/-1,3)

\*: Promedio de dos determinaciones independientes +/-desviación estandar.

autosinergista. Este autosinergismo estaría asociado tanto al SDA tal cual como a su probable producto de ruptura, el MDC, sin descartar la posibilidad de que otros MDF metabolitos también ejerzan este efecto. En todos los casos el grupo sinérgico sería el MDF, cuyo modo de acción inhibitoria sobre OFM ya se discutiera en la Introducción.

**RESUMEN Y CONCLUSIONE**



## RESUMEN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se sintetizó una serie de aril y alquil SDA aún no descriptos en la literatura, con la estructura general observada en la figura 17, que nos muestra al grupo metilendioxfenil incorporado a la molécula como factor de autosinergismo.

Los carbamatos precursores se sintetizaron a partir del fenol o alcohol correspondiente e isocianato de metilo, purificandolos por recristalización. Fueron caracterizados por sus puntos de fusión o ebullición y espectros de RMN  $^1\text{H}$  (tabla 2, figura 20).

La síntesis de los SDA fue realizada a partir del MDC,  $\text{SCl}_2$  y un segundo carbamato. Como segunda molécula carbámica se utilizaron propoxur, carbaril, tsumacide, n-butil, n-octil, lauril y cetil carbamatos.

Dada la similitud de los productos laterales de reacción con el producto deseado, la purificación de éste resultó compleja. No obstante, mediante cromatografía en columna y en capa delgada, se obtuvieron los compuestos buscados con un óptimo grado de pureza.

Las estructuras se confirmaron por análisis elemental y espectrometrías de resonancia magnética nuclear protónica y de masas (figura 21, tablas 3 y 4).

Los SDA sintetizados mostraron una buena acción insecticida determinada como  $\text{DL}_{50}$  en moscas (tabla 5). En los arilalquil SDA se observó una correlación lineal entre el aumento de la

hidrofobicidad medida por el logaritmo del coeficiente de partición octanol:agua ( $\log P$ ) y el decremento de la actividad insecticida medida por la  $DL_{50}$  en moscas (figura 24). Se obtuvo una mejor correlación al utilizar los valores de  $\log P$  experimentales que al emplear el método de cálculo de  $\log P$  a partir del valor experimental del primer compuesto de la serie.

Los aril SDA sintetizados presentaron una toxicidad variable entre moderada y leve en ratones, mientras que los aralquil SDA no causaron mortalidad en ratones a las altas dosis ensayadas (tabla 7). Los derivados obtenidos muestran una aceptable selectividad ya que en todos los casos su acción biocida es notablemente mayor en insectos que en mamíferos. Es de destacar que el elevado valor de los coeficientes de selectividad en vertebrados obtenidos para I y III con respecto a sus precursores propoxur y tsumacide (tabla 8). Estos resultados sugieren que la derivatización conduce a compuestos de mayor selectividad que los carbamatos comerciales involucrados en la síntesis.

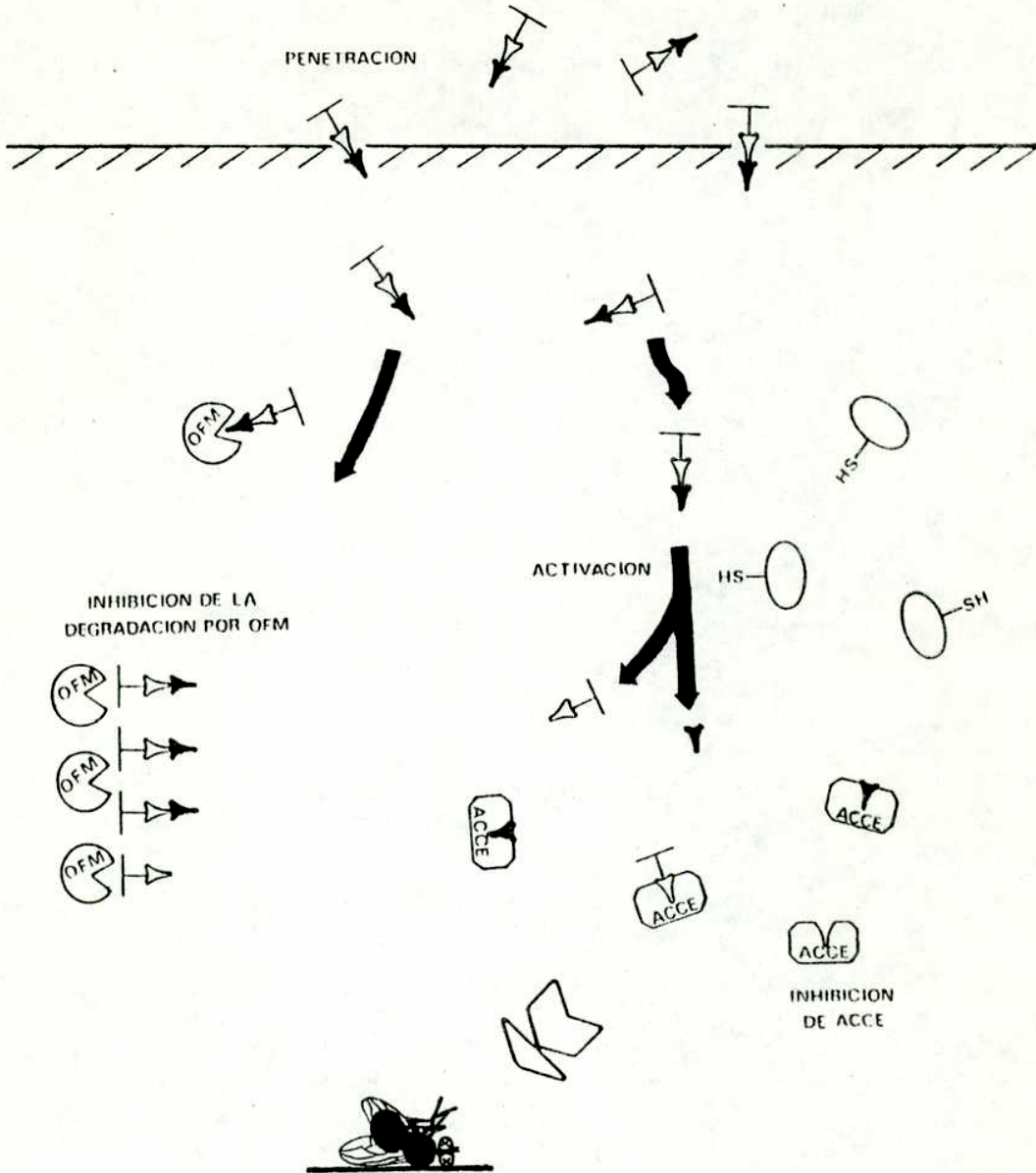
Se supuso que los SDA manifestarían su acción insecticida a través de tres pasos fundamentales (figura 28):

Ruptura de la unión N-S promovida por -SH endógenos (activación).

Inhibición de la AcCE por los carbamatos precursores productos de la ruptura (lesión bioquímica primaria).

- Inhibición de la acción detoxicante de las OFM por los SDA y los metabolitos de SDA que contengan el grupo sinérgico MDF (autosinérgico).

⊣▶ : SDA      ⊣▶ : MDC      ▶ : CARBAMATO INSECTICIDA



**Figura 28:** Mecanismo propuesto para la acción insecticida de los SDA.

Las evidencias experimentales que avalan el mecanismo propuesto son:

- a) Ruptura de los SDA por reacción con grupos sulfhidrilos para dar los carbamatos precursores (tabla 11).
- b) Cinética de intoxicación por SDA en moscas interpretable como correspondiente a compuestos que requieren activación (figura 26).
- c) Baja capacidad inhibitoria de AcCE por los SDA (tabla 9). La misma puede reducirse aún más al bloquear los -SH libres del homogenato con N-etilmaleimida, impidiendo la formación de los carbamatos precursores.
- d) Efecto sinergista del BP significativamente menor sobre SDA que sobre sus precursores carentes de grupo sinérgico (tabla 13).
- e) Inhibición "in vitro" por SDA y MDC de la oxidación degradativa de  $^{14}\text{C}$ -carbaril mediada por OFM (tabla 16).

En base a lo expuesto, se puede afirmar que los nuevos insecticidas sintetizados presentan interesantes y favorables propiedades toxicológicas como la selectividad y el autosinergismo.

El caso de un autosinergismo previamente razonado en teoría y llevado luego a la práctica, posibilitando así la disminución de la cantidad de insecticida necesaria para el control de una plaga, pretende ser un aporte encuadrado dentro de la filosofía del diseño molecular de nuevos insecticidas más efectivos y selectivos.



## BIBLIOGRAFIA

- 1 - Cremlyn R.  
*Pesticides. Preparation and mode of action.* 2th edn.  
John Wiley & Sons Eds. Great Britain. 1979..
- 2 - Metcalf R.  
*Organic insecticides*  
Interscience Publishers, Inc. New York, USA. 1955.
- 3 - Kuhr R. J., and Dorough H. W.  
*Carbamate Insecticides: Chemistry, Biochemistry and Toxicology.*  
C.R.C. Press. New York, USA. 1977.
- 4 - Ferguson G. R., and Alexander C. C.  
*Heterocyclic carbamates Having systemic insecticidal action.*  
*J. Agric. Food Chem.* 1,888,(1953).
- 5 - Kolbezen M. J., Metcalf R. L., and Fukuto T. R.  
*Insecticidal activity of carbamate cholinesterase inhibitors.*  
*J. Agric. Food Chem.* 2,864,(1954).
- 6 - Payne L. K. Jr., Stansburg H. A. Jr., and Weiden M. H. J.  
*The synthesis and insecticidal properties of some cholinergic trisubstituted acetaldehyde O-(methylcarbamoyl) oximes.*  
*J. Agric. Food Chem.* 14,356,(1966).
- 7 - Weiden M. H. J., Moorefield H. H., and Payne L. K.  
*O-(methylcarbamoyl) oximes: a new class of carbamate insecticide - acaricide.*  
*J. Econ. Entomol.* 58,154,(1965).
- 8 - Hawley G. G.  
*Diccionario de Quimica y productos quimicos.*  
Editorial Omega . Barcelona, España. 1975.
- 9 - Krishna J. G., Dorough H. W., and Casida J. E.  
*Synthesis of N-methylcarbamates via methyl isocyanate-<sup>14</sup>C and Chromatographics purification.*  
*J. Agric. Food Chem.* 10,462,(1962).

- 10 - O'Brien R. D., Hilton B. D., and Gilmour L.  
The reaction of carbamates with cholinesterase.  
*Mol. Pharmacol.* 2,593,(1966).
- 11 - Jones R. L., Fukuto T. R., and Metcalf R. L.  
Structure, reactivity, and biological activity of  
O-(methylcarbamoyl) oximes of substituted benzaldehydes.  
*J. Econ. Entomol.* 65,28,(1972).
- 12 - Fukuto T. R., Metcalf R. L., Jones R. L., and Myers R. O.  
Structure, reactivity, and biological activity of  
O-(diethylphosphoryl) oximes and O-(methylcarbamoyl) oximes of  
substituted acetophenones and alpha substituted benzaldehydes.  
*J. Agric. Food Chem.* 17,923,(1969).
- 13 - Metcalf R. L., and Fukuto T. R.  
Some effects of molecular structure upon anticholinesterase and  
insecticidal activity of substituted phenyl N-methylcarbamates.  
*J. Agric. Food Chem.* 15,1022,(1967).
- 14 - Casida J. E., Augustinsson K. B., and Jonsson G.  
Stability, toxicity, and reaction mechanism with esterases of  
certain carbamate insecticides.  
*J. Econ. Entomol.* 53,205,(1960).
- 15 - Fukuto T. R., Fahmy M. A. H., and Metcalf R. L.  
Alkaline Hydrolysis, anticholinesterase, and insecticidal  
properties of some nitro-substituted phenyl carbamates.  
*J. Agric. Food Chem.* 15,273,(1967).
- 16 - Bender M. L., and Homer R. B.  
The mechanism of the alkaline hydrolysis of p-nitrophenyl  
N-methylcarbamate.  
*J. Org. Chem.* 30,3975,(1965).
- 17 - Metcalf R. L., Fukuto T. R., and Winton M. Y.  
Alkoxiphenyl N-methylcarbamates as insecticides.  
*J. Econ. Entomol.* 53,828,(1960).
- 18 - Metcalf R. L., Fukuto T. R., and Winton M. Y.  
Insecticidal carbamates: position isomerism in relation to  
activity of substituted phenyl N-methylcarbamates.  
*J. Econ. Entomol.* 55,889,(1962).

21 - Kilsheimer J. R., Kaufman H. A., Foster H. H., Driscoll P. R., Glick L. A., and Napier R. P.  
Benzo(b) thienyl carbamate insecticides.  
*J. Agric. Food Chem.* 17,91,(1969).

22 - Sacher R. M., Alt G. H., and Darlington W. A.  
Insecticidal and anticholinesterase activity of benzotriazolyl methyl and dimethylcarbamates.  
*J. Agric. Food Chem.* 21,132,(1973).

23 - Fahmy M. A. H., Metcalf R. L., Fukuto T. R., and Hennessey D. J.  
Effects of deuteration, fluorination, and other structural modifications of the carbamyl moiety on the anticholinesterase and insecticidal activities of phenyl N-methylcarbamates.  
*J. Agric. Food Chem.* 14,79,(1966).

24 Pitman R. H.  
Nervous system, en *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. Volume 11. Cerkut G. A., and Gilbert L. I. Eds. Pergamon Press. USA. 1985.

25 - Mailman R. B.  
Biochemical toxicology of the central nervous system, en *Introduction to biochemical toxicology*. Hodgson E. and Guthrie F. F. E. Eds. Elsevier. New York, USA. 1980.

26 - Lund A. E.  
Insecticides: Effects on the nervous system. en volumen 12 de



30 - Corbett J. K., Wright K., and  
The Biochemical mode of action of pes  
Academic Press.USA. 1984.

31 - Helebrand K., and Krupka R. M.  
The comparative biochemistry of  
acetylcholinesterase with reference t  
by organophosphates and carbamates.  
Croatia Chemica Acta 43,345,(1975).

32 - Nishioka T., Fujita T., Kamoshi  
Mechanism of inhibition reaction  
phenyl N-methylcarbamates.  
Pestic. Biochem. Physiol. 7,107,(1977

*Metabolism of toxicants: Phase II reactions, en referencia 25.*

37 - Hollingworth R. M.  
*Comparative metabolism and selectivity of organophosphate and carbamate insecticides.*  
*Bull. Wld. Hlth Org.* 44,155,(1971).

38 - Casida J. E.  
*Mixed function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergist.*  
*J. Agric. Food Chem.* 18,753,(1970).

39 - Hodgson E., and Plapp F. W. Jr.  
*Biochemicals characteristics of insects microsomes.*  
*J. Agric. Food Chem.* 18,1048,(1970).

40 - Wilkinson C. F..  
*Effects of synergist on the metabolism and toxicity anticholinesterases.*  
*Bull. Wld. Hlth. Org.* 44,171,(1971).

41 - Bandal S. K., Marco G. D., Golberg L., and Leng H. L.  
*The pesticide chemist and modern toxicology. Based on a symposium sponsored by the Division of Pesticide Chemistry of The American Chemical Society.*  
*American Chemical Society. Washington D.C., USA. 1981.*

42 - Kuhr R. J.  
*Metabolism of carbamate insecticide chemicals in plants and insects.*  
*J. Agric. Food Chem.* 18,1023,(1970).

43 - Fukuto T.R., and Metcalf R.L.  
*Metabolism of insecticides in plants and animals.*  
*Annals of the New York Academy of Sciences* 160,97,(1969).

44 - Mumma R. O., Khalifa S., and Hamilton R. H.  
*Spectroscopic identification of metabolites of carbaryl plants.*  
*J. Agric. Food Chem.* 19,445,(1971).

45 - Locke R. K., Bartone V. B.,and Baron R. L.

Studies of carbamate pesticides metabolism utilizing plant and mammalian cells in culture.

*J. Agric. Food Chem.* 19,1205,(1971).

46 Kuhr R. J., and Casida J. E.

Persistent glycosides of metabolites of methylcarbamate insecticide chemicals formed by hidroxilation in bean plants.

*J. Agric. Food Chem.* 15,814,(1967).

47 - Knaak J. B.

Biological and nonbiological modifications of carbamates.

*Bull. Wld. Hlth. Org.* 44,121,(1971).

48 - Abdel-Wahab A. M., Kuhr R. J., and Casida J. E.

Fate of <sup>14</sup>C-carbonil labeled aryl methylcarbamate insecticide Chemicals in and on bean plants.

*J. Agric. Food Chem.* 14,290,(1966).

49 - Dorough H. W., Leeling N. C., and Casida J. E.

Non-hidrolitic pathway in metabolism of N-methylcarbamate insecticides.

*Science* 140,170,(1973).

50 Dorough H. W., and Casida J. E.

Nature of certain carbamate metabolites of the insecticide sevin.

*J. Agric. Food Chem.* 12,294,(1964).

51 Andrawes N. R., and Dorough H. W.

Metabolic fate of carbaryl naphthyl-<sup>14</sup>C in boll weevils and bollworms.

*J. Econ. Entomol.* 60,453,(1967).

52 Camp H. B., and Arthur B. W.

Absorption and metabolism of carbaryl by several insect species.

*J. Econ. Entomol.* 60,803,(1967).

53 - Guirguis N. G., and Brindley W. A.

Carbaryl penetration into and metabolism by alfalfa leafcutting bees, *Megachile pacifica*.

*J. Agric. Food Chem.* 23,274,(1975).

- 55 - Kuhr R. J.  
Comparative metabolism of carbaryl by resistant and susceptible strains of cabbage looper.  
*J. Econ. Entomol.* 64,1373,(1971).
- 56 - Ku T. Y., and Bishop J. L.  
Penetration, excretion and metabolism of carbaryl in susceptible and resistant german cockroaches.  
*J. Econ. Entomol.* 60,1328,(1967).
- 57 - Tsukamoto M., and Casida J. E.  
Metabolism of methylcarbamate insecticides by the NADPH<sub>2</sub> requiring enzyme system from houseflies.  
*Nature* 213,49,(1967).
- 58 - Tsukamoto M., and Casida J. E.  
Albumin enhancement of oxidative metabolism of methylcarbamate insecticides chemicals by the house fly microsome-NADPH<sub>2</sub> system.  
*J. Econ. Entomol.* 60,617,(1967).
- 59 - Hanna M. A., and Attallah Y. H.  
Penetration and biodegradation of carbaryl in susceptible and resistant strains of the egyptian cotton leafworm.  
*J. Econ. Entomol.* 64,1391,(1971).
- 60 - Viluppillai A., and Georghiou G.  
Carbamate resistance in *Anopheles albimanus*.  
*Bull. Wld. Hlth. Org.* 51,655,(1974).
- 61 - Hama H., Iwata T., and Tomigawa Ch.  
Absorption and degradation of propoxur in susceptible and resistant green rice leafhoppers, *Nephotettix cincticeps* Uhler (Homoptera: Cicadellidae).  
*App. Ent. Zool.* 14,333,(1979).

TOXICOL. J. 203,42,(1971).

5 - Dorough H. W.  
Metabolism of insecticidal methylcarbamates  
. Agric. Food Chem. 18,1015,(1970).

6 - Pekas J. C., and Paulson G. D.  
Intestinal Hydrolysis and conjugation of a  
in vivo.  
Science 170,77,(1970).

7 - Paulson G. D., Zylkie R. G., Zeln M.  
and V.  
Metabolites of carbaryl (1-naphthyl methylcarbamate)  
. Agric. Food Chem. 18,110,(1970).

8 - Dorough H. W.  
Carbaryl-<sup>14</sup>C metabolism in a lactating cow.  
. Agric. Food Chem. 15,261,(1967).

The metabolism of carbaryl in the rat, guinea pig and man.  
*J. Agric. Food Chem.* 13,537,(1965).

72 - Leeling M. C., and Casida J. E.  
Metabolites of carbaryl (1-naphthyl methylcarbamate) in mammals  
and the enzymatic system for their formation.  
*J. Agric. Food Chem.* 14,281,(1966).

73 - Baron R. L., and Doherty J. D.  
Metabolism and excretion of an insecticide (6 - chloro - 3,4  
dimethylphenyl N-methylcarbamate) in the rat.  
*J. Agric. Food Chem.* 15,830,(1967).

74 - Krishna J. G., and Casida J. E.  
Fate in rats of the radiocarbon from ten variously labeled methyl  
and dimethylcarbamate-<sup>14</sup>C insecticide chemicals and their  
hydrolysis products.  
*J. Agric. Food Chem.* 14,98,(1966).

75 - Donnithan E., and Casida J. E.  
Oxidations of methyl and dimethylcarbamates insecticide chemicals  
by microsomal enzymes and anticholinesterase activity of the  
metabolites.  
*J. Agric. Food Chem.* 16,28,(1968).

76 - Metcalf R. L. Fukuto T. R., Collins C., Borack K., El-Aziz  
A., Hunoz R., and Carril C. C.  
Metabolism of 2,2 - dimethyl - 2,3 - dihydrobenzofuranyl - 7 - N  
- methylcarbamate (furan) in plants, insects, and mammals.  
*J. Agric. Food Chem.* 16,300,(1968).

77 Andrawes N. R., Dorough H. W., and Lindquist D.A.  
Degradation and elimination of temik in rats.  
*J. Econ. Entomol.* 60,979,(1967).

78 - Holder G. H., and Ryan A. J.  
Metabolism of propham (isopropyl - N - methylcarbamate) in the  
rat.  
*Nature (London)* 220,77,(1968).

79 - Sullivan L. S. Eldridge J. M., Knaak J. B., and Tallant M.  
J.  
5,6 dihydro - 5,6 - dihydroxycarbaryl glucoside as a

31 - Eldefrawi M. E., Miskus R., and Hotkins W. M.  
Resistant to sevin by DDT and parathion resistant house flies  
sesoxane as sevin synergist.  
*Science* 129,898,(1959).

32 - Georghiou G. P., and Metcalf R. L.  
Synergism of carbamates insecticides with octachlorodipr  
ether.  
*J. Econ. Entomol.* 54,150,(1961).

33 - Georghiou G.P., and Metcalf R. L.  
The absorption and metabolism of 3-isopropylphenyl - N  
methylcarbamate by susceptible and carbamate selected strains  
house flies.  
*J. Econ. Entomol.* 54,231,(1961).

34 - Plapp F. W. Jr., and Tong H. H. C.  
Synergism of malathion and parathion against resistant inse  
phosphorus esters with synergistic properties.  
*J. Econ. Entomol.* 59,11,(1966).

35 - Plapp F. W. Jr., and Valeza T. M.  
Synergism of carbamate and organophosphate insecticides  
noninsecticidal carbamates.  
*J. Econ. Entomol.* 60,1094,(1967).

- 88 - Georghiou G. P.  
Carbamate insecticides: toxic action of synergized carbamates against twelve resistant strains of the house fly.  
*J. Econ. Entomol.* 55,768,(1962).
- 89 - March R. B.  
Synergist for DDT against insecticide resistant house flies.  
*J. Econ. Entomol.* 45,851,(1953).
- 90 - Georghiou G. P., and Saito T.  
Pest resistant to pesticides.  
Plenum Press. New York, USA. 1983.
- 91 - El-Sebae A. H., Metcalf R. L., and Fukuto T. R.  
Carbamate insecticides: synergism by organothiocyanates.  
*J. Econ. Entomol.* 57,478,(1964).
- 92 - Metcalf R. L., Osman M. F., and Fukuto T. R.  
Metabolism of <sup>14</sup>C-labeled carbamate insecticides to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in house fly.  
*J. Econ. Entomol.* 60,445,(1967).
- 93 - Bakry N., Metcalf R. L., and Fukuto T. R.  
Organothiocyanates as insecticides and carbamates synergist.  
*J. Econ. Entomol.* 61,1303,(1968).
- 94 - Barnes J. R., and Fellig J.  
Synergism of carbamate insecticides by phenyl - propynylethers.  
*J. Econ. Entomol.* 62,86,(1969).
- 95 - Fellig J., Barnes J. R., Rachlin A. I., O'Brien J. P., Focella A.  
Substituted phenyl - 2 - propynylethers as carbamates synergist.  
*J. Agric. Food Chem.* 18,78,(1970).
- 96 - Sacher R. M., Metcalf R. L., and Fukuto T. R.  
Propynyl naphthyl ethers as selective carbamate synergist.  
*J. Agric. Food Chem.* 16,779,(1968).



- Haller &  
Ivan W. N.  
synergistic  
org. Chem. Z,

- 109 - Georghiou G. P.  
Carbamate insecticides: the cross resistance spectra of four carbamate resistant strains of the house fly after protracted selection pressure.  
*J. Econ. Entomol.* 55,494,(1962).
- 110 - Eldefrawi M. E., Miskus R., and Sutchter V.  
Methylenedioxyphenyl derivatives as synergist for carbamate insecticides on susceptible, DDT- and parathion-resistant house flies.  
*J. Econ. Entomol.* 53,231,(1960).
- 111 - Clark P. H., and Cole H. M.  
Laboratory studies on resistance of the body louse to insecticide.  
*J. Econ. Entomol.* 57,205,(1964).
- 112 - Fukuto T. R., Metcalf R. L., Winton M. Y., and Roberts P. A.  
The synergism of substituted phenyl N-methylcarbamates by piperonyl butoxide.  
*J. Econ. Entomol.* 55,341,(1962).
- 113 - Brattsten L. B., and Metcalf R. L.  
The synergistic ratio of carbaryl with piperonyl butoxide as an indicator of the distribution of multifunction oxidases in the insecta.  
*J. Econ. Entomol.* 63,101,(1970).

penetration, metabolism, and synergistic activity with carbaryl and some simple derivatives of 1,3-benzodioxole in the house fly. *Agric. Food Chem.* 15,139,(1967).

2 - Metcalf R. L., Fukuto T. R., Wilkinson C., Fahmy M. H., El-Aziz S. A., and Metcalf E. R. Mechanism of action of carbamate synergist. *Agric. Food Chem.* 14,555,(1966).

3 - Philleo W. W., Schonbrod R. D., and Terriere L. C. Mechanism of insecticide synergism: methylenedioxyphenyl compounds as inhibitors of hydroxylation of naphthalene in house flies. *Agric. Food Chem.* 13,113,(1965).

4 - Wilkinson C. F., and Hicks L. J. Mitochondrial metabolism of the 1,3-benzodioxole ring and its possible significance in synergistic action. *Agric. Food Chem.* 17,829,(1969).

5 - Chakraborty J., and Smith J. N. Enzymatic oxidation of some alkylbenzenes by insects and vertebrates. *Biochem. J.* 102,498,(1967).

6 - Casida J. E., Engel J. L., Essac E. G., Kamiensky F. X., and Ikuwatsuma S. Methylene <sup>14</sup>C-dioxyphenyl compounds: metabolism in relation to their synergistic action. *Agric. Food Chem.* 153,1130,(1966).

synergist in house flies.  
*J. Agric. Food Chem.* 17,539,(1969).

123 - Sacher R. M., Metcalf R. L., and Fukuto T. R.  
Selectivity of carbaryl - 2,3-methylenedioxy-naphthalene  
combination. Metabolism of the synergist in two strains of house  
flies and in mice.  
*J. Agric. Food Chem.* 17,551,(1969).

124 - Kuwatsuka S., and Casida J. E.  
Synthesis of methylene - <sup>14</sup>C - dioxyphenyl compounds: radioactive  
safrole, dihydrosafrole, myristicin, piperonyl butoxide and  
diastereoisomers of sulfoxide.  
*J. Agric. Food Chem.* 13,528,(1965).

125 - Hodgson E., and Tate L. C.  
Cytochrome P-450 interactions, en referencia 27.

126 - Hodgson E., and Kulkarni A. P.  
Interaction of pesticides with cytochrome P-450, en referenc  
115.

127 - Chang K., Wilkinson C. F., and Hetnarsky K.  
Spectral and inhibitory interaction of methylenedioxyphenyl  
compounds with southern armyworm (*Spodoptera eridania*) midgut  
microsomes.  
*Pestic. Biochem. Physiol.* 15,32,(1981).

128 - Wilkinson C. F., Murray M., Marcus C., and Dube C.  
Mechanism studies on the inhibition of cytochrome P-450 mediated  
mixed function oxidation, en *Pesticide chemistry: human welfare  
and the environment. Volume 3. Proceeding of the 5th International  
Congress of Pesticide Chemistry, Kyoto, Japan, 29 august-4  
september 1982. Miyamoto J., and Kearney P. C. Eds.  
Pergamon press, USA. 1983.*

129 - Mansuy D., Battioni J. P., Chottard J. C., and Ullrich V.  
Preparation of a porphyrin-iron-carbene model for the cytochrome  
P-450 complexes obtained upon metabolic oxidation of the  
insecticide synergist of the 1,3-benzodioxole series.  
*J. Amer. Chem. Soc.* 101,3971,(1979).

130 - Wilkinson C., Metcalf R. L., and Fukuto T. R..

the activity of natural and synthetic synergist.  
*J. Econ. Entomol.* 61, 1057, (1968).

L. E. K.  
of cyclopropane pyrethroids ethers against  
of resistant strains of the house fly, *Musca  
domestica*.  
*J. Econ. Entomol.* 79, 1057, (1986).

R. L.  
of insecticide synergists.  
*J. Econ. Entomol.* 60, 229, (1967).

, and Mukerjee S. K.  
of the piperonyl group on the toxicity of so  
of carbamate insecticides: a quantitative structure  
relationship.  
*J. Econ. Entomol.* 72, 355, (1979).

A. H.

*Sci. Food Agric.* 16,615,(1965).

- Miskus R. P., Andrews L. T., and Look M.  
abolic pathway affecting toxicity of N-acetyl zectran.  
*Agric. Food Chem.* 17,842,(1969).

- Fahmy M. A. H., Fukuto T. R., Myers R. D., and March R. B.  
selective toxicity of new N-phosphorothioylcarbamate esters.  
*Agric. Food Chem.* 18,793,(1970).

- Black A. L., Chiu Y. C., Fahmy M. A. H., and Fukuto T. R.  
ective toxicity of N-sulfenylated derivatives of insecticidal  
hylcarbamate esters.  
*Agric. Food Chem.* 21,747,(1973).

- Fukuto T. R., Black A. L., Chiu Y. C., and Fahmy M. A. H.  
ective toxicity of derivatized aromatic and heterocyclic  
hylcarbamates.  
*ironen. Quality Safety, suppl. vol. III* 394,(1975).

- Schaefer C. H., and Wilder H. W.  
ew carbamate insecticide, RE-11775, with promising activity  
inst organophosphorus resistant mosquitoes.  
*Econ. Entomol.* 63,480,(1970).

- Gearich II E. G., Lee L., Nelson S. J., Rizzo V. L.  
erticidal aminothio derivatives of the pesticidal carbamate

, Nishioka T., and Fukuta  
oxysulfenyl derivatives  
lysis of carbosulfan.  
hem. 32,765,(1984).

R., and Fahmy M. A. H.  
ticide action, en Sulfur  
n D., Magre P. S.,  
, USA, Am. Chem. Soc. 19

E., Gemrich II E. G., L  
d Seaman W. J.  
osphoramidothio derivat.  
hem. 29,1111,(1981).

E., Hemrich II E. G., L  
d Seaman W. J.  
sphorinarylaminothio der.  
hem. 29,1114,(1981).

159 - Black A. L., Chiu Y. C., Fukuto T. R., and Miller T. A.  
Metabolism of 2,2 - dimethyl - 2,3 - dihydrobenzofuranyl - 7 -  
- methyl - N - (2-toluenesulfonyl) carbamate in the house fly  
and white mouse.  
*Pestic Biochem. Physiol.* 3,435,(1973).

160 - Krieger R., Lee P. W., Fahmy M. A. H., Chen M., and Fuk  
T. R.  
Metabolism of 2,2 - dimethyl - 2,3 - dihydrobenzofuranyl - 7 -  
- dimethoxyphosphinothioyl - N - methylcarbamate in the ho  
fly, rat, and mouse.  
*Pestic. Biochem. Physiol.* 6,1,(1976).

161 - Marsden P. J., Kuwano E., and Fukuto T. R.  
Metabolism of carbosulfan (2,3 - dihydro - 2,2  
dimethylbenzofuran - 7 - yl (di - n - butylaminoth  
methylcarbamate in the rat and house fly..  
*Pestic. Biochem. Physiol.* 18,38,(1982).

162 - Mallipudi N. M., and Fukuto T. R.  
Penetration and metabolism of 2 - isopropoxyphenyl - N - methy  
N - (2 - methyl - 4 - tertbutylphenylsulfonyl) carbamate in  
house fly and honeybee.  
*Pestic. Biochem. Physiol.* 12,55,(1979).

163 - Umetsu N., Takaaki N., and Fukuto T. R.  
Acid catalyzed alteration of 2,3 - dihydro - 2,2 - dimethyl -  
benzofuranyl (di - n - butylaminosulfonyl) methylcarbamate  
nitrogen-sulfur bond cleavage. Formation of polysulf  
derivatives.  
*J. Agric. Food Chem.* 29,711,(1981).

164 - Cheng H. M., and Casida J. E.  
Metabolites and photoproducts of 3 - (2 - butyl) phenyl - N  
methylcarbamate and N - benzenesulfonyl - N - methylcarbamate.



Umetsu N., and Fukuto T. R.  
Absorption of carbofuran (2,3 - dihydro - 2,2 - dimethyl - 7 - benzofuran-5-yl (di - n - butylaminosulfonyl) methylcarbamate) in the rat stomach.  
*J. Agric. Food Chem.* 30,555,(1982).

- Umetsu N., Tanaka A. K., and Fukuto T. R.  
Absorption, translocation and metabolism of the insecticide uracarb in plants.  
*Plant Physiol. Biochem.* 10,501,(1985).

- Nishioka T., Umetsu N., and Fukuto T. R.  
Metabolism of dibutyl - <sup>14</sup>C - labeled dibutylaminosulfonyl derivative of carbofuran in the cotton plant.  
*Plant Physiol. Biochem.* 16,141,(1981).

- Clay V. E., Fahmy M. A. H., Martin J. P., and Fukuto T.  
Absorption and translocation of 2,3 - dihydro - 2,2 - dimethyl - 7 - benzofuran-5-yl (di - n - butylaminosulfonyl) methylcarbamate in cosad sandy loam.  
*J. Agric. Food Chem.* 28,1122,(1980).

allipudi N. M., and Fukuto T. R.  
of N-sulfenylated derivatives of insectic  
rbamate esters to the honeybee.  
. Food Chem., 27,261,(1979).

ojima T., Fahmy M. A. H., and Fukuto T. R.  
lyceryl, and (pyridylalcoxy) sulfinyl derivatives  
rbamate insecticides.  
. Food Chem. 31,613,(1983).

enn J. J.  
rary frontiers in chemical pesticide research.  
. Food Chem. 28,2,(1980).

asida J. E.  
e research to maintain and improve plant protection,  
in pesticide science, Part 1. Geisbuhler H.  
Press, USA. 1979.

etcalf R. L., Kapoor I. P., and Irwe A. S.  
dable analogues of DDT.  
d. Hlt. Org. 44,363,(1971).

itchfield J. T., and Wilcoxon F.  
fied method of evaluating dose-effects experiments.  
. Therap. 26,99,(1949).

llgehausen H., D'Hondt C., and Faerer R.  
-phase chromatography as a general method for determi  
ol / water partition coefficients.

Doake D. N., Dobbs A. J., and Williams N.  
Water coefficients (P): measurement, estimation,  
and prediction; particularly for chemicals with  $P > 10^5$ .  
*Environ. Safety* 11,251,(1986).

Wajsbort T., Iwasa J., and Hansch C.  
Substituent constant,  $\pi$ , derived from partition  
coefficients.  
*J. Pharm. Soc.* 86,5175,(1964).

Hansch C.  
Quantitative structure-activity relationships in drug design.  
Ed. Ariens E. J. Ed.  
Plenum Press. USA. 1971.

Hansch C., Leo A. J.  
Substituent constants for correlation analysis in chemistry.  
John Wiley & Sons. USA. 1979.

Williamson R. M., Fukuro T. R., and Metcalf R. L.  
Effect of structure on anticholinesterase activity of  
parathion compared with methyl parathion.  
*J. Food Chem.* 15,235,(1967).

Wan A.  
Correlation of  $LD_{50}$  values and acute toxicity tests  
for parathion.  
*Environ. Toxicol.* 52,52,(1983).

Wan A.  
Evaluation of alternative techniques for the assessment of

Toxicology and metabolism of the chiral enantiomers of O - ethyl - S - Phenyl ethylphosphorodithioate (fonofos) and oxygen analogs.

A dissertation submitted in partial satisfaction of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Entomology. University of California. 1976.

191 - Ellman G. L., Courtney K. D., Andres Jr. V., and Featherstone R. H.

A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.

Biochem. Pharmacol. 7,88,(1961).

192 - Licastro S. A. de, Zerba E. N., Casabé N.

The relation between viscosity and penetration of some diethyl substituted phenyl phosphorothionates and oil carriers into the cuticle of *Triatoma infestans*.

Pestic. Biochem. Physiol. 19,53,(1983).

193 - Fontan A. and Zerba E. N.

Mode of entry of insecticides in *Triatoma infestans*.

Arch. Insect Biochem. Physiol. 1987 (en prensa).

194 Chang S. C., and Kearns C. W.

Metabolism in vivo of <sup>14</sup>C-labeled pyrethrin I and Cinerim I by house flies with special references to the synergistic mechanism.

J. Econ. Entomol. 57,397,(1964).

195 - Martin H., Worthning C. R.

Pesticide Manual. 4<sup>th</sup> Ed.

British Crop Protection Council. England. 1974.

196 - Cole L., Rizzo L., Wood E., Casida J.

Pyrethroid metabolism: comparative fate in rats of tralomethrin, traloccythrin, deltamethrin and (1R-alfa S) - cis cypermethrin.

J. Agric. Food Chem. 30,631,(1982).

197 - Sun Y. P.

Dinamics of insects toxicology and its relationships to performance synergism, and structure-activity relationships of insecticides, en Biochemical toxicology of insecticides. O'Brien R. D., Yanamoto Y. Ed.

Academic Press. USA. 1970.

