



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**SÍNTESIS DE ALGUNOS SULFÓXIDOS Y SULFONAS COMO POTENCIALES
INHIBIDORES DE LA BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA DE
*Pseudomonas aeruginosa***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :
M A N U E L L Ó P E Z O R T I Z

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS

ASESOR DE TESIS: M. en C. MARÍA PATRICIA S. DEMARE NEGRETE



27 NOVIEMBRE DE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mis padres:

Por el enorme apoyo brindado durante toda mi vida.

A Paty y Nacho:

Por todo el apoyo y confianza brindados durante mi formación.

A mis amigos:

Raúl, Uriel, Alfonso, Axel, Araceli, Iván, Cynthia, Cecilia Mary y Miguel por el apoyo y la ayuda brindada durante todo este tiempo.

**CONTENIDO**

Abreviaturas.....	i
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEÓRICO.....	3
3.1. <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	3
3.2. Glicina Betaína.....	3
3.3. Betaína Aldehído Deshidrogenasa: BADH.....	4
3.3.1. Función fisiológica.....	5
3.3.2. Mecanismo de la reacción catalizada por las BADHs.....	5
3.3.3. Cisteína catalítica.....	6
3.3.4. Catálisis enzimática.....	8
3.3.5. Reactividad.....	8
3.3.6. Cinética enzimática.....	9
3.3.7. Inhibición.....	10
3.4. Cinética de la BADH.....	11
3.5. Inhibidores de las Aldehído Deshidrogenasas.....	12
3.5.1. Disulfiram.....	12
3.5.2. S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato-S-óxido (Detc-MeSO).....	14
3.5.3. S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato-S-dióxido (DETC-MeSO ₂)..	14
3.5.4. S-metil- <i>N,N</i> -dietilditiocarbamato-S-óxido (DDTC-MeSO)...	15
3.5.5. S-metil- <i>N,N</i> -dietilditiocarbamato-S-dióxido(DDTC-MeSO ₂)	15
3.6. Inhibidores de la BADH de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
3.7. Síntesis de S-Alquiltiocarbamatos.....	15
3.8. Métodos Generales de Oxidación de Tiocarbamatos y Ditiocarbamatos.....	17
3.8.1. Peróxido de hidrógeno.....	17
3.8.2. Ácido perbenzoico y sus derivados.....	18
3.8.3. Metaperyodato de sodio.....	18
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
5. OBJETIVOS.....	20



6. HIPÓTESIS.....	21
7. METODOLOGIAS.....	22
7.1. Materiales.....	22
7.2. Técnicas Experimentales.....	24
7.3. Síntesis de los Compuestos 1 – 7	25
7.4. Ensayo de Inhibición de la PaBADH de los Compuestos 7 y 8	28
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
9. CONCLUSIONES.....	45
10. PERSPECTIVAS.....	46
11. REFERENCIAS.....	47
12. ANEXO.....	52
12.1. S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato (1).....	52
12.2. S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato- <i>S</i> -dióxido (2).....	55
12.3. S-metil- <i>N,N</i> -dietilditiocarbamato- <i>S</i> -óxido (3).....	58
12.4. S-metil- <i>N,N</i> -dietilditiocarbamato- <i>S</i> -dióxido (4).....	61
12.5. S-Metil-pirrolidiltiocarbamato (5).....	64
12.6. S-Metil-pirrolidiltiocarbamato- <i>S</i> -óxido (6).....	67
12.7. S-Metil-pirrolidiltiocarbamato- <i>S</i> -dióxido (7).....	72



1. RESUMEN

La inhibición de la betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) por compuestos que bloquean la cisteína altamente reactiva del sitio activo de esta enzima, clave en el metabolismo esencial de esta bacteria, impediría el desarrollo microbiano en los tejidos que infecta y, sería, por tanto, un potencial fármaco para la terapia en infecciones ocasionadas por esta bacteria. En este trabajo se reporta la síntesis de los compuestos **2-4** (figura 1.1), los cuales han sido descritos como inhibidores de la PaBADH. Asimismo los nuevos compuestos **6-7** fueron sintetizados, y evaluados como inhibidores de esta.

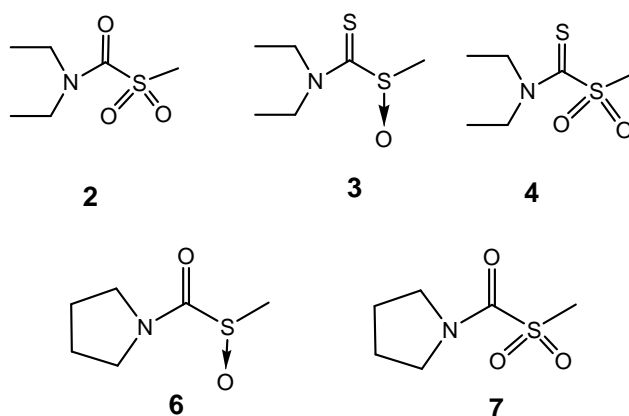


Figura 1.1



2. INTRODUCCIÓN

La *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria oportunista que infecta tejidos de las vías urinarias, el ojo, las heridas causadas por quemaduras y los pulmones de individuos con fibrosis quística, en los que es la principal causa de mortalidad, además infecta tejidos de personas inmunocomprometidas. La quimioterapia para combatir infecciones por esta bacteria es muy complicada debido a que presenta una alta resistencia a la mayoría de los antibióticos. La polimixina es uno de los pocos antibióticos útiles para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*, sin embargo provoca diversos efectos colaterales.

Se ha descrito que *P. aeruginosa* depende de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) para subsistir en los tejidos que infecta, debido a que esta enzima participa en la producción de glicina betaína, la cual es un compuesto osmoprotector necesario para la subsistencia de la bacteria.^{1, 2}

Muñoz y col.³ reportaron recientemente la inhibición *in vitro* de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa* (PaBADH) con disulfiram, el cual ha sido utilizado por más de cincuenta años para el tratamiento del alcoholismo.⁴ Asimismo, estos autores describieron la actividad inhibitoria *in vitro* sobre la BADH de algunos de sus metabolitos.

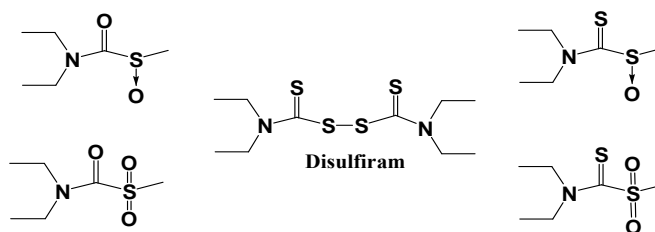


Figura 1.1. Metabolitos del disulfiram

Debido a lo anterior, se planteó la conveniencia de preparar algunos de los metabolitos del disulfiram, descritos como inhibidores de la BADH.⁵ Asimismo, se propone la síntesis y evaluación preliminar *in vitro* de los compuestos **6** y **7** (Fig. 1.2), los cuales, al ser análogos cíclicos de cinco miembros de los metabolitos del disulfiram podrían tener actividad inhibitoria sobre la BADH de *Pseudomonas aeruginosa*. El desarrollo de compuestos que posean actividad inhibitoria sobre la PaBADH pretende llevar a una alternativa terapéutica eficiente contra esta bacteria.

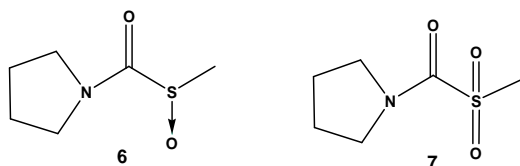


Figura 1.2. Análogos de los metabolitos del disulfiram



3. MARCO TEORICO

3.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Las *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos, rectos o curvos, de tamaño de 0.5-1.0 μm por 1.5-4.0 μm ; generalmente aislados, no forman esporas. Presentan flagelos polares; su metabolismo es respiratorio no fermentativo, aunque pueden producir pequeñas cantidades de ácido a partir de glucosa en anaerobiosis. Sus requerimientos nutritivos son muy simples ya que emplean compuestos orgánicos de bajo peso molecular, debido a que carecen de las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar polímeros a sus monómeros; crecen a pH neutro, en un rango mesofílico de temperaturas. Una de las características de las *Pseudomonas* es la amplia gama de sustratos orgánicos que pueden utilizar como fuentes de carbono y energía.⁶

Algunas especies de *Pseudomonas* son patógenas, como *Pseudomonas aeruginosa*, la cual se halla frecuentemente asociada a infecciones del aparato respiratorio y sistema urinario en humanos. Las infecciones por este patógeno son frecuentes en quemaduras u otros traumatismos severos que afecten amplias zonas de la piel o bien en pacientes con fibrosis quística. Es un oportunista típico, iniciando una infección cuando el individuo se encuentra inmunocomprometido.⁶

Esta bacteria es naturalmente resistente a numerosos antibióticos utilizados comúnmente debido a que posee una membrana externa semipermeable, la cual permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños; sin embargo la permeabilidad es mucho menor para los compuestos hidrofóbicos, como muchos antibióticos, de modo que la quimioterapia es complicada. La polimixina es un antibiótico frecuentemente empleado frente a *P. aeruginosa*, no obstante, este fármaco es usado con precaución en la terapia humana debido a su toxicidad y a los severos efectos colaterales que causa.⁶

3.2. Glicina Betaína

La glicina betaína (*N,N,N*-trimetilglicina) es un compuesto de amonio cuaternario, el cual actúa como soluto compatible u osmoprotector al ser sintetizado y acumulado en concentraciones importantes en el citoplasma de las células de diversos procariontas y eucariontas, en respuesta a un estrés osmótico. Este compuesto, junto con otros compuestos osmóticos, protege a las células de altas concentraciones de sales, calor, deshidratación y congelamiento; es compatible con las funciones celulares y no interfiere con el metabolismo.^{7,8} La glicina betaína puede ser tomada directamente del medio ambiente o sintetizada. Una vía biosintética para glicina betaína es a partir de colina, utilizando la betaína aldehído como intermediario (Figura 3.1).⁹⁻¹¹

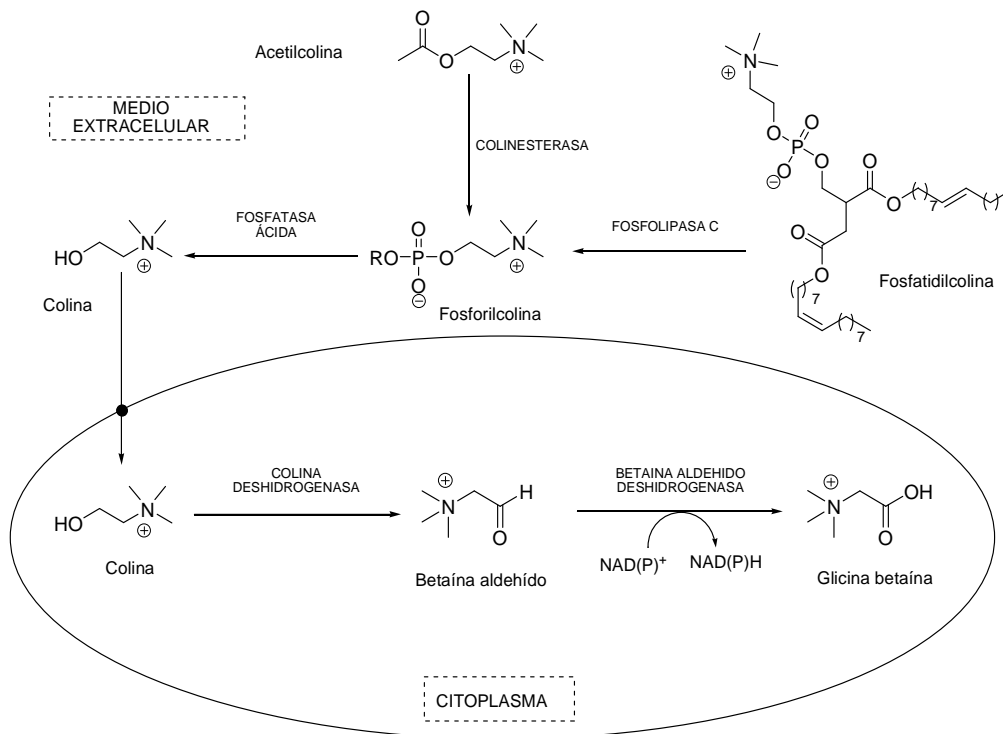


Figura 3.1. Biosíntesis de glicina betaína en *P. aeruginosa*.¹²

Esta vía se conserva en bacterias, plantas y animales, aunque existen diferencias en las enzimas involucradas: las plantas convierten la colina a betaína aldehído por la acción de la colina monooxigenasa, mientras que bacterias y animales catalizan la reacción utilizando colina deshidrogenasa o colina oxidasa.¹²

La presencia de glicina betaína es especialmente abundante en los sitios de infección de *Pseudomonas aeruginosa*, por lo que se ha sugerido la dependencia vital de la bacteria con la BADH, pues se sabe que esta enzima cataliza el último paso en la biosíntesis de glicina betaína (Figura 3.1). Si esta última reacción no se llevara a cabo, la imposibilidad de la bacteria de resistir a un estrés osmótico y la acumulación de betaína aldehído ocasionaría el daño a la célula, ya que este compuesto es sumamente tóxico para ella.¹²

3.3. Betaína Aldehído Deshidrogenasa: BADH

La betaína aldehído deshidrogenasa pertenece a la familia de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs), que son enzimas que catalizan la oxidación irreversible de los aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, con la reducción del NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido) o NADP^+ (nicotinamida



adenina dinucleótido fosfato). Particularmente, las BADHs catalizan la oxidación irreversible de la betaína aldehído.^{12,13}

3.3.1. Función fisiológica

Como se mencionó con anterioridad, en la mayor parte de los organismos la reacción catalizada por las BADHs es el paso final de la ruta biosintética de glicina betaína (Figura 3.1) a partir de la colina o de sus precursores (acetilcolina, fosfatidilcolina o fosforilcolina).¹³

En las bacterias que tienen la capacidad de crecer en colina o en sus precursores como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, la BADH cataliza un paso de la degradación de estos compuestos y al mismo tiempo provee a la bacteria, además de glicina betaína, de sistemas reductores para el catabolismo (NADH) y el anabolismo (NADPH).¹⁴ Un ejemplo de este tipo de BADH anfibólica es el de *P. aeruginosa*. Debido a que la colina o sus precursores se encuentran en los tejidos infectados por esta bacteria, se ha propuesto que la BADH limita la estancia del patógeno en sus sitios de infección.¹⁵

Así, la actividad de la BADH podría ser decisiva para el crecimiento de la bacteria bajo condiciones de infección, ya que la inhibición de esta actividad enzimática podría matar a la bacteria en crecimiento, ya que no solo bloquearía el catabolismo de colina, la síntesis de glicina betaína y disminuiría la producción de NADPH, sino que llevaría a la acumulación de betaína aldehído hasta concentraciones tóxicas. Por lo que se puede especular en una estrategia terapéutica antimicrobiana que involucre esta inhibición.^{15,16}

3.3.2. Mecanismo de la Reacción Catalizada por las BADHs.

La reacción catalizada por las BADHs y el resto de las ALDHs, es la oxidación de un aldehído por transferencia de un hidruro (H^-) al nucleótido NAD^+ o $NADP^+$, lo que implica sustraer un electrón a un átomo de carbono deficiente en electrones. La estrategia que realizan estas enzimas es la de convertir al carbono trigonal plano del aldehído en un carbono tetraédrico no deficiente en electrones, al que le resulta posible sustraerle un hidruro. La formación del carbono tetraédrico se logra mediante una catálisis covalente, en la que intervienen tres residuos del sitio activo: una cisteína, un glutámato y una asparagina.¹⁷ Con la formación de este intermediario, que implica un cambio conformacional del sustrato, se forma un puente de hidrógeno con el grupo amida de la asparagina catalítica y la estructura se estabiliza, permitiendo una eficiente transferencia del hidruro hacia la posición C4 de la coenzima, la cual queda reducida al mismo tiempo que el tiohemiacetal se oxida al correspondiente tioéster (Figura 3.2, paso 2). El glutámato catalítico desprotona



a una molécula de agua, que ataca e hidroliza al tioéster, formando la glicina betaína (paso 3). Con la liberación ordenada de los productos, se regenera la enzima libre (paso 4 y 5).¹⁸

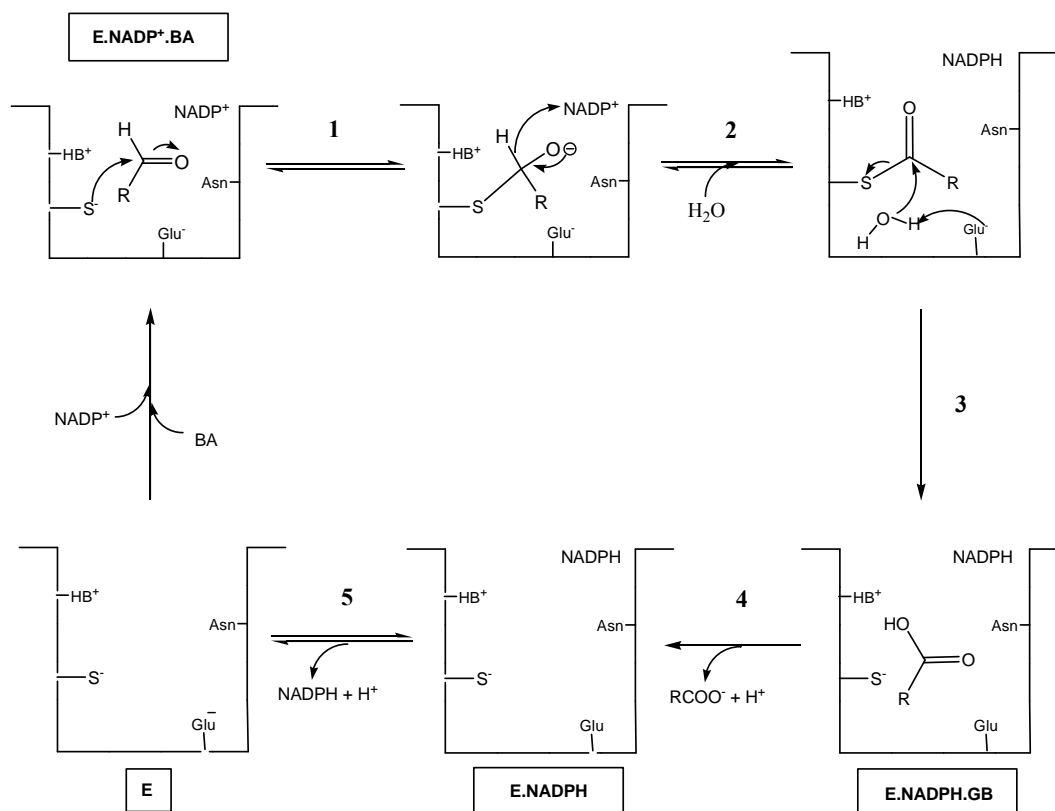


Figura 3.2. Mecanismo de la reacción catalizada por las BADH ¹⁶

3.3.3. Cisteína catalítica

La cisteína es un aminoácido que posee un grupo tiol muy reactivo (Figura 3.3); en las proteínas es el residuo menos abundante, con un porcentaje menor al 3 %. Sin embargo, a pesar de su abundancia relativamente baja, la capacidad del grupo tiol para donar electrones y para oscilar entre un estado reducido (-SH) y diversos estados de oxidación le permite a este residuo participar en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas, como son la estabilidad, el plegamiento, la unión de metales, la catálisis enzimática y la regulación de la actividad proteica.¹⁹

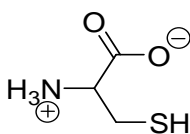


Figura 3.3. Estructura de la cisteína



La cisteína no se ioniza a pH fisiológico y forma puentes de hidrógeno relativamente débiles, por lo que no contribuye significativamente a la estabilidad de las proteínas por medio de enlaces salinos o puentes de hidrógeno. Sin embargo, si los grupos tiol de dos residuos de cisteína de la misma cadena o de cadenas polipeptídicas diferentes están próximos y en la orientación adecuada, pueden unirse por oxidación formando un puente disulfuro, el cual es un enlace covalente fuerte; estos enlaces estabilizan la estructura nativa de la proteína, haciéndola menos susceptible a la degradación por proteasas.

Los diferentes estados de oxidación del grupo tiol de los residuos de cisteína son el ácido sulfénico (-SOH), el ácido sulfinico (-SO₂H), el ácido sulfónico (-SO₃H) y el puente disulfuro (-S-S-). Tanto la oxidación a ácido sulfénico como la que conlleva la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína, son reversibles por agentes reductores, mientras que los otros dos estados de oxidación, ácidos sulfinico y sulfónico, no pueden ser reducidos a cisteína (Figura 3.4).¹⁹

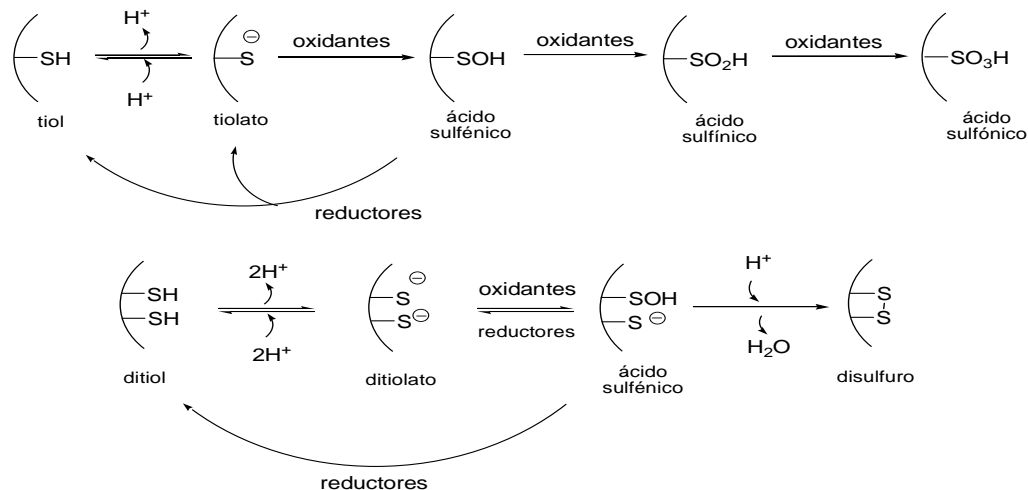


Figura 3.4. Estados de oxidación del grupo tiol de la cisteína.

Al ser oxidados los residuos de cisteína se pierde la función de las proteínas intracelulares involucradas en la catálisis, la expresión génica, la transducción de señales, etc. A este proceso de oxidación responde un mecanismo de regulación basado en modificaciones por óxido-reducción, reversibles y específicas a residuos de cisteína de proteínas. Entre estos sistemas de modificación está la formación y ruptura de puentes disulfuro mixtos con otro tiol, el glutation (γ -glutamil-cistenil-glicina, GSH).



El GSH está distribuido universalmente en bacterias, plantas y animales y probablemente es el péptido simple más abundante (en concentración de 1 a 10 mM). La forma oxidada (GSSG) consiste en dos moléculas de glutatión unidas por un puente disulfuro. La glutatión reductasa (GR) es la enzima que cataliza la reducción, dependiente de NADPH, de GSSG a GSH. Esta reacción es muy importante en los procesos metabólicos y normalmente produce una proporción de GSH:GSSG de más de 100:1, lo que permite al GSH funcionar como un agente reductor intracelular.

3.3.4. Catálisis enzimática.

En el sitio activo de algunas enzimas se encuentra un residuo de cisteína altamente reactivo responsable de la catálisis nucleofílica, en la que el sustrato es modificado por la formación de un enlace covalente con la enzima para dar un intermediario reactivo. Los grupos nucleofílicos de las enzimas que comúnmente funcionan en la catálisis covalente son el grupo imidazol de los residuos de histidina, el grupo hidroxilo de los residuos de serina y el grupo tiol de los residuos de cisteína, este último es el nucleófilo más potente de los tres. Existe una amplia gama de enzimas conocidas que usan el grupo tiol de un residuo de cisteína en catálisis nucleofílica (Tabla 3.1), como las aldehído deshidrogenasas, que catalizan la oxidación irreversible de los aldehídos, dependiente de NADP⁺.

Tabla 3.1. Algunas enzimas que emplean al grupo tiol de un residuo de cisteína como nucleófilo

ENZIMA	INTERMEDIARIO
Aldehído deshidrogenasas	Tiohemiacetal
Tiol proteasas	Tioéster
Carbamoil fosfato sintetetasas	Tioéster
Peroxirredoxinas (1 Cys)	Ácido sulfénico
Peroxirredoxinas (2 Cys)	Ácido sulfénico y disulfuro
NADH peroxidadas	Ácido sulfénico y disulfuro mixto
Proteína tirosina fosfatasas	Tiol-fosfato
Poliquétido sintetasas	Tioéster

3.3.5. Reactividad.

Las BADHs poseen un residuo de cisteína esencial, el cual realiza un ataque nucleofílico sobre el sustrato aldehído para formar el intermediario covalente



tiohemiactal (Figura 3.5). Este residuo, frecuentemente llamado cisteína catalítica, es susceptible a la oxidación.¹⁹

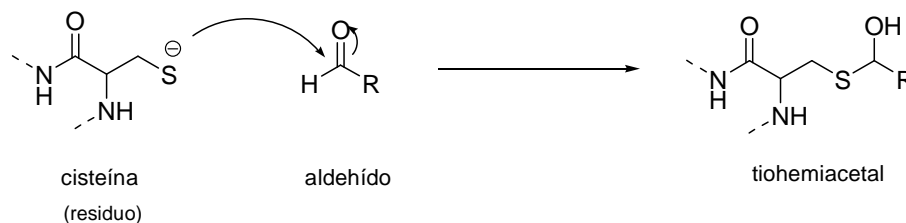


Figura 3.5. Ataque nucleofílico del residuo de cisteína esencial sobre un aldehído para originar un tiohemiactal intermediario

A pesar de que el grupo tiol de los residuos de cisteína es el nucleófilo más potente de los existentes en las proteínas, es el ión tiolato (S^-), no la forma tiol ($-SH$), la especie que es reactiva como nucleófilo, por lo que la reactividad del residuo de cisteína catalítico está determinada por su solubilidad en agua, por la fracción del tiol que está presente en la forma de tiolato y por la reactividad intrínseca de este tiolato.¹²

Los dos factores antes mencionados dependen de la basicidad del grupo tiol, es decir de su pK_a , el cual es de 8.9 para el residuo de cisteína libre. De ser éste el valor para el residuo de cisteína catalítico, estas enzimas no serían activas a valores de pH fisiológicos. Se requiere por lo tanto que el grupo tiol del residuo de cisteína del sitio activo sufra una activación inicial para que esté presente en la forma de tiolato y que el sitio activo esté diseñado de tal manera que el tiol de la cisteína catalítica tenga un valor de pK_a considerablemente disminuido. Así, mediante la formación de un par iónico con un residuo de un aminoácido cargado positivamente, el pK_a del tiol disminuye y el residuo de cisteína catalítica estará, a los valores de pH del medio intracelular, mayoritariamente en su forma de tiolato muy reactivo.¹²

3.3.6. Cinética enzimática

La cinética enzimática es el estudio de la velocidad de las reacciones químicas que son catalizadas por las enzimas. El estudio de la cinética de una enzima permite elucidar los detalles de su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad por fármacos o venenos o potenciada por otro tipo de moléculas.

La reacción catalizada por una enzima utiliza la misma cantidad de sustrato y genera la misma cantidad de producto que una reacción no catalizada. Al igual



que ocurre en otros tipos de catálisis, las enzimas no alteran en absoluto el equilibrio de la reacción entre sustrato y producto. Sin embargo, al contrario que las reacciones químicas, las enzimas se saturan, lo que significa que a mayor cantidad de sustrato, un mayor número de centros catalíticos estarán ocupados, lo que incrementará la eficiencia de la reacción, hasta el momento en que todos los sitios posibles estén ocupados. En ese momento se habrá alcanzado el punto de saturación de la enzima y, aunque se añada más sustrato, no aumentará más la eficiencia. La reacción catalizada por una enzima puede expresarse como se observa en la figura 3.6.²⁰



Figura 3.6. Reacción catalizada por una enzima

Las dos propiedades cinéticas más importantes de una enzima son el tiempo que tarda en saturarse con un sustrato en particular y la máxima velocidad de reacción que pueda alcanzar. El conocimiento de estas propiedades hace posible el estudio del comportamiento de una enzima en el ambiente celular y predecir cómo responderá frente a un cambio de esas condiciones.

La forma básica para describir la cinética enzimática es por medio de la ecuación de Michaelis-Menten, donde la constante de Michaelis (K_m) es la concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de la máxima; es decir si se tiene un valor de K_m pequeño, la eficiencia máxima se dará a concentraciones bajas. La ecuación de Michaelis puede expresarse como se muestra en la figura 3.7.

$$K_m = \frac{K_{-1}}{K_1} + \frac{K_2}{K_1} = K_s + \frac{K_2}{K_1}$$

Figura 3.7. Ecuación de Michaelis-Menten

3.3.7. Inhibición

Existen sustancias que alteran la actividad de una enzima al combinarse con ésta en una forma que afecta la fijación con el sustrato provocando una reducción de la actividad. A estas sustancias se les denomina inhibidores.

Muchos de estos inhibidores son sustancias que tienen un parecido estructural al sustrato de la enzima, sin embargo, en comparación con el sustrato, reaccionan muy lentamente o no reaccionan. Existen tres tipos de inhibición:

a) Inhibición competitiva. Es aquella donde una sustancia compete directamente con el sustrato natural por un sitio de fijación enzimático. Este



inhibidor generalmente tiene una semejanza estructural al sustrato; de esta manera se fija específicamente al sitio activo; sin embargo difiere en que no genera un producto (figura 3.8 a).

b) Inhibición no competitiva. En este caso el inhibidor se une al complejo enzima-sustrato, provocando una distorsión estructural del sitio activo, inactivando la enzima (figura 3.8 b).

c) Inhibición mixta. Se lleva a cabo cuando el inhibidor se fija a la enzima y al complejo enzima-sustrato en los sitios que participan tanto en la fijación del sustrato como en la catálisis (figura 3.8 c).

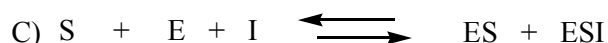


Figura 3.8. Inhibición enzimática: a) inhibición competitiva, b) inhibición no competitiva, c) inhibición mixta

3.4. Cinética de la BADH

Hasta la fecha son pocas las BADHs que han sido estudiadas cinéticamente a fondo, sin embargo en todos los casos se han encontrado cinéticas michaelianas, tanto para el sustrato aldehído como para la coenzima. El NAD^+ es la coenzima preferida en la mayor parte de ellas, incluidas las enzimas de plantas y de animales, pero unas pocas bacterianas usan indistintamente NAD^+ y NADP^+ , siendo un ejemplo de estas últimas la enzima de *P. aeruginosa*. El grado de especificidad con respecto al sustrato aldehído también es variable, aunque en forma general es alto.

En el caso de la BADH de *P. aeruginosa* (PaBADH), el mecanismo es al azar, es decir la enzima libre se puede unir inicialmente al nucleótido oxidado o a la betaína aldehído, aunque la ruta preferida es aquella en la que el primer sustrato es el nucleótido oxidado.²¹

Aun cuando el mecanismo cinético no se haya determinado en todos los casos, se conocen valores para los parámetros cinéticos aparentes de varias de estas enzimas. En general la afinidad por el nucleótido y el aldehído, medida por los valores de K_m , es mayor en las enzimas de bacterias, plantas, y animales que usan preferentemente al NAD^+ , con valores de K_m que van de 20 a 80 μM para el NAD^+ y de 50-310 μM para la betaína aldehído, que en aquellas enzimas bacterianas que usan ambos nucleótidos, en las que estos valores están en los intervalos de 70-1075 μM y de 36-507 μM , respectivamente. Este último grupo



de enzimas bacterianas presenta valores de V_{max} muy superiores, cercanos a los 200 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.²¹

3.5. Inhibidores de las Aldehído Deshidrogenasas

3.5.1. Disulfiram

A mediados del siglo pasado surgió una estrategia terapéutica en contra del alcoholismo basada en el uso de disulfiram (bis(dietilcarbamoil)disulfuro) una sustancia que al ser administrada previamente a una ingestión de alcohol, provoca una serie de malestares como son náuseas, vómito, taquicardia e hipotensión, debido a la acumulación de acetaldehído en el torrente sanguíneo (figura 3.9). La acción farmacológica del disulfiram deriva de la inhibición de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial hepática (ALDH2), enzima que cataliza el último paso de la oxidación del etanol.^{22, 23}

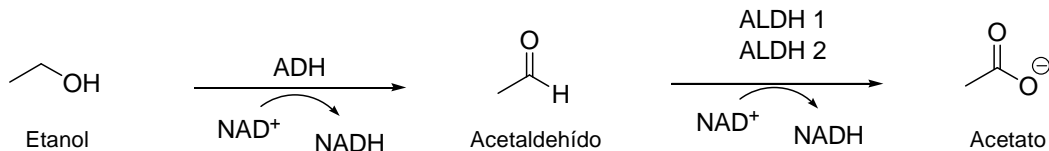


Figura 3.9. Vía de oxidación del etanol en hígado. El etanol es oxidado al aldehído mediante la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), posteriormente el acetaldehído es oxidado hasta el ácido carboxílico, mediado por la aldehído deshidrogenasa de clase 1 (citoplásmica) o clase 2 (mitocondrial).²⁴

Desde que el disulfiram empezó a ser empleado en la terapia humana, numerosas investigaciones surgieron en busca de establecer su mecanismo de inhibición. En 1977, Cobby y col.²⁵ demostraron que el disulfiram no es el principio activo que ejerce la influencia sobre el metabolismo de oxidación del etanol pues encontraron que, después de ser ingerido, es reducido rápidamente a dietilditiocarbamato (DDTC) por acción de la glutatión reductasa (figura 3.10). Con ello, justificaron la presencia predominante de esta sustancia en el torrente sanguíneo después de la administración del disulfiram; sin embargo, para entonces ya se había reportado la existencia del metabolito DDTC.²⁶

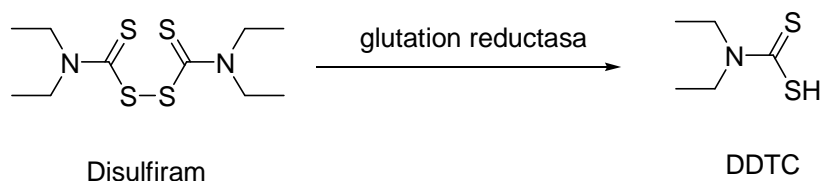


Figura 3.10. Reducción del disulfiram en sangre por acción de la glutathion reductasa.

Otras investigaciones en torno al mecanismo de acción del disulfiram proponen que, después de ser ingerido, se combina con un tiolato de la enzima para formar un aducto ditiocarbamato (figura 3.11, ruta A). Vallari y col.²⁷ describieron que, en estudios *in vitro*, el disulfiram inhibió directamente a la ALDH mitocondrial de hígado de rata. Ellos propusieron que la inhibición surge de la formación de un enlace disulfuro intramolecular entre dos de las tres cisteínas contiguas presentes en el sitio activo de la enzima (figura 3.11, ruta B). Sin embargo, algunos autores opinan que estos mecanismos son poco factibles *in vivo*, dado el momentáneo tránsito del disulfiram en el torrente sanguíneo.^{25, 28,29}

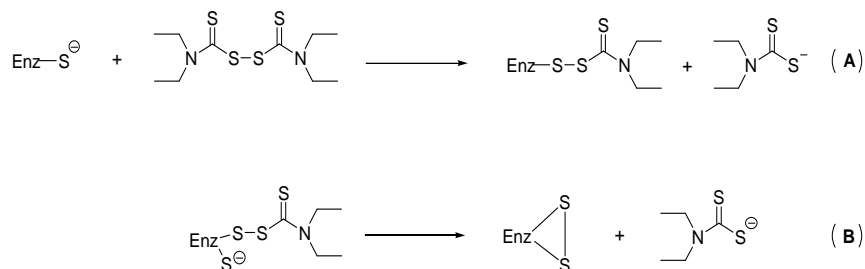


Figura 3.11. Mecanismos de inactivación de la ALDH mitocondrial. A) Propuesta de Kitson, 1975;²⁸ B) propuesta de Vallari y col., 1982.²⁷

Hart y col.³⁰ propusieron la ruta metabólica de disulfiram mostrada en la figura 3.12. Se estableció que el *N,N*-dietilditiocarbamato (DDTC), sufre una reacción de metilación para formar el *S*-metil-*N,N*-dietilditiocarbamato (DDTC-Me), el cual es activado metabólicamente por desulfuración oxidativa y oxidación para formar el *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato (DETC-Me) y el *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-óxido (DETC-MeSO) respectivamente. Éste es el precursor de la sulfona *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-dióxido (DETC-MeSO₂). En varios estudios, el potencial de inhibición *in Vitro* e *in Vivo* de los metabolitos del disulfiram sobre la ALDH de hígado de rata quedó establecido con el siguiente orden: DETC-MeSO > DETC-Me > DDTC-Me > DDTC.³¹⁻³⁴

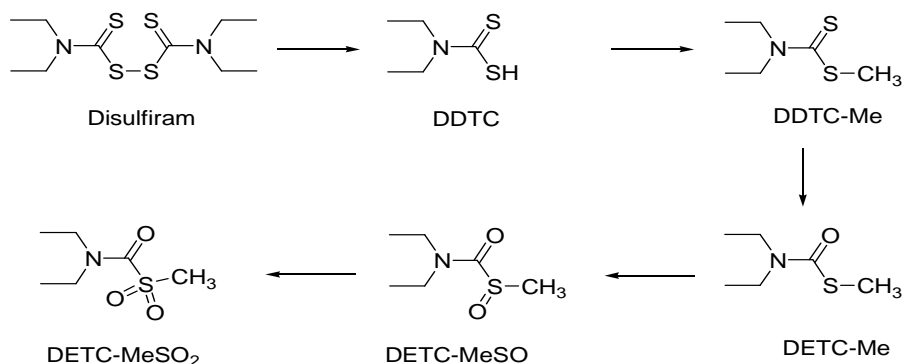


Figura 3.12. Vía metabólica propuesta por Hart y col. para la bioactivación del disulfiram.

3.5.2. S-Metil-N,N-Dietiltiocarbamato-S-Óxido (DETC-MeSO)

Desde 1992, con los estudios reportados por Hart y Faiman, se planteó la hipótesis de que este compuesto era el principal responsable de la actividad inhibitoria sobre la ALDH. Estudiando la inhibición de la enzima con otros tiocarbamatos, estos autores afirman que la inhibición se lleva a cabo previa formación del correspondiente sulfóxido (DETC-MeSO), en lo que coincidieron otros estudios *in vitro* e *in vivo*.³⁵⁻³⁹

Se ha descrito la síntesis del S-Metil-N,N-Dietiltiocarbamato (DETC-Me) a partir de cloruro de dietilcarbamoilo y tiometóxido de sodio.⁴⁰ Hart y Faiman describieron la oxidación de DETC-Me a DETC-MeSO con metaperyodato de sodio.⁴¹ Recientemente, Schloss reportó la oxidación con peróxido de hidrógeno y ácido acético,⁴² describiendo además la baja estabilidad del DETC-MeSO, el cual sufre una transposición espontánea al correspondiente sulfenato (figura. 3.13). Con esta última información se pone en duda la parte de las investigaciones realizadas previamente en las que se caracterizó y evaluó erróneamente al sulfenato como DETC-MeSO.

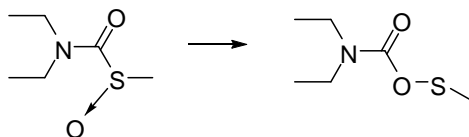


Figura 3.13. Reacción de transposición del DETC-MeSO.

3.5.3. S-Metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (DETC-MeSO₂)

Faiman y col. evaluaron la actividad del DETC-MeSO₂ *in vitro* e *in vivo*, resultando en ambos casos un inhibidor de la ALDH mitocondrial de hígado de rata más potente que el sulfóxido (2). Se demostró la formación *in vivo* del



metabolito como resultado de la oxidación del DETC-MeSO, aunque, debido a su alta reactividad, es difícil detectarlo en sangre, excepto conjugado a proteínas. La síntesis química de **3** a partir de **1** ha sido descrita con metaperyodato de sodio y con ácido *m*-cloroperbenzoico.⁴²

3.5.4. S-Metil-*N,N*-dietilditiocarbamato-S-óxido (DDTC-MeSO)

Hu y col. describieron en 1997 al DDTC-MeSO como un metabolito del disulfiram con actividad inhibitoria sobre la ALDH.³⁹ Este compuesto ha sido sintetizando por oxidación del dietilditiocarbamato de sodio con peróxido de hidrógeno³⁷ y posterior alquilación con yoduro de metilo y por oxidación del DDTC-Me con metaperyodato de sodio.⁵⁵

3.5.5. S-metil-*N,N*-dietilditiocarbamato- S-dióxido (DDTC-MeSO₂)

También reportado por primera vez por Hu y col.³⁹ como un metabolito del disulfiram, el cual resultó un potente inhibidor de la ALDH de hígado de rata. La síntesis fue realizada por reacción de metansulfinato de sodio con cloruro de dietiltiocarbamato en una mezcla bifásica de benceno agua.

3.6. Inhibidores de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa*

En estudios recientes, Zaldivar y col. reportan la inhibición de la betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa* con disulfiram y los metabolitos anteriormente mencionados, encontrando el siguiente orden decreciente de actividad: MeDTCSO₂ > Disulfiram > DDTC-MeSO₂ > DTC-MeSO con una cinética de primer orden.³ En otro estudio reportan, para el caso de la inhibición con el disulfiram, una desestabilización de la estructura cuaternaria de la BADH y una agregación de la misma.⁴³ Los estudios en relación con el efecto inhibitorio de este tipo de compuestos sobre la PaBADH representan un campo abierto a la investigación que podría dar lugar a importantes aplicaciones en la terapéutica contra este patógeno.

3.7. Síntesis de S-Alquiltiocarbamatos y S-Alquilditiocarbamatos

Los S-alquiltiocarbamatos o S-alquiltiouretanos son un grupo de compuestos que ha ganado gran importancia debido a su variedad de aplicaciones, alcanzado un gran interés como anestésicos, fungicidas, bactericidas, pesticidas, antivirales y particularmente como herbicidas.⁴⁴

Los tiocarbamatos han sido y son objeto de numerosas investigaciones como fungicidas, bactericidas e insecticidas. Sus complejos metálicos son usados como pesticidas y pueden ser utilizados además en los tratamientos del



alcoholismo crónico, envenenamiento con níquel y la acumulación de cobre. Además, han encontrado aplicación en la industria de la goma como aceleradores de la vulcanización y como aditivos para aceites y grasas por su propiedad antioxidante ⁴⁵

Entre los métodos generales de síntesis descritos para estos compuestos se encuentra la reacción de una amina con fosgeno y ya sea con un tiol o con sulfuro de carbonilo, seguido por alquilación con halogenuros de alquilo (figura 3.14).

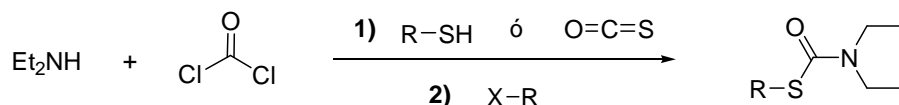


Figura 3.14.

Mizuno y col. ⁴⁶ reportaron la síntesis de tiocarbamatos *N,N*-disustituídos a partir de monóxido de carbono a presión atmosférica, azufre y una amina secundaria, utilizando como base carbonato de sodio, con posterior alquilación de la sal intermedia con yoduro de metilo (figura 3.15).

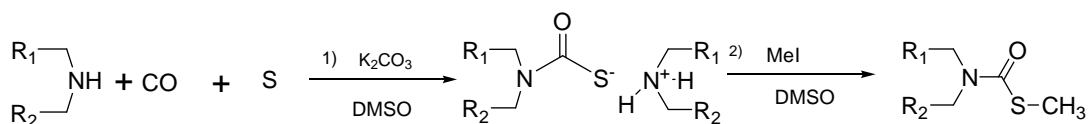


Figura 3.15.

Wynne y col. ⁴⁷ reportaron la obtención de alquiltiocarbamatos *N,N*-disustituídos a partir de tioles y aminas secundarias en una secuencia de dos pasos con dos estrategias que involucran ambas al cloruro de tricloroacetilo, como se ilustra en la figura 3.16.

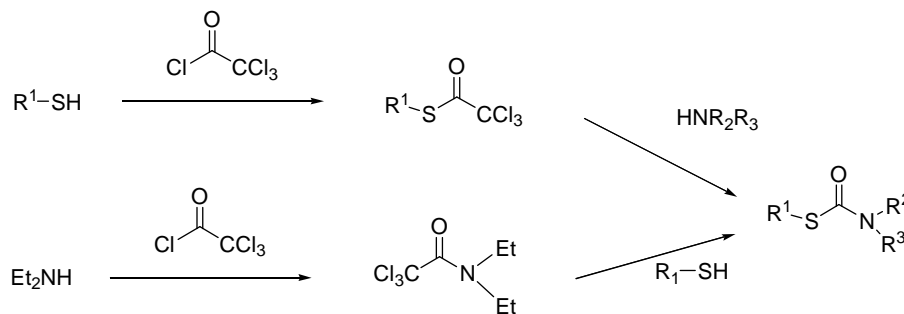


Figura 3.16.



Nishiyama y col.⁴⁸ describen recientemente un nuevo método para la síntesis de tiocarbamatos, el cual consiste en hacer reaccionar disulfuros con aminas secundarias y monóxido de carbono, en presencia de una cantidad catalítica de un complejo de paladio, como se ilustra en la figura 3.17.

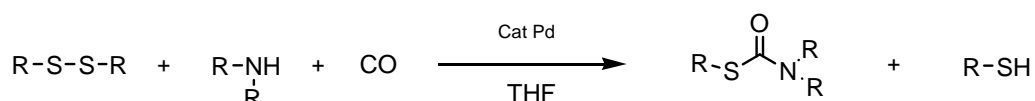


Figura 3.17.

Los ditiocarbamatos han despertado interés en los últimos años debido a sus aplicaciones como fungicidas para la agricultura y como inmunomoduladores por su capacidad para prevenir el desarrollo de inmunodeficiencias inducidas por retrovirus y su actividad frente a las infecciones oportunistas que ocurren en el SIDA.^{49,50}

Azizi y col.⁵¹ reportan la síntesis de S-alquilditiocarbamatos a partir de una amina secundaria, disulfuro de carbono y un halogenuro de alquilo sin la necesidad de disolvente (figura 3.18).

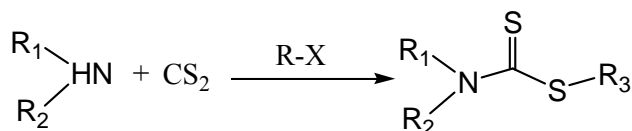


Figura 3.18.

3.8. Métodos Generales de Oxidación de Tiocarbamatos y Ditiocarbamatos

La oxidación de tiocarbamatos es la alternativa más simple en la síntesis de los correspondientes sulfóxidos y sulfonas. Para estas reacciones se ha reportado una extensa variedad de oxidantes y generalmente, dependiendo de las condiciones de reacción y de la proporción del oxidante, es posible obtener el sulfóxido o la sulfona. Los oxidantes usualmente empleados son peróxido de hidrógeno, oxígeno, ozono, perácidos, peróxidos, N-bromosuccinimida, halógenos y compuestos halogenados como peryodato e hipoclorito.^{35,39,52-54}

3.8.1. Peróxido de hidrógeno

Este oxidante puede ser usado solo o en presencia de un catalizador; con frecuencia se emplea ácido acético como disolvente, con lo que se genera el



ácido peracético, un oxidante más fuerte. En años recientes, muchos procesos industriales privilegian el uso de peróxido de hidrógeno acuoso como oxidante, por su efectivo contenido de oxígeno, bajo costo, seguridad de almacenamiento y operación y por ser un reactivo ambientalmente amigable. El activador (un ácido de Lewis) es esencial para esta reacción porque el peróxido de hidrógeno oxida a los sulfuros lentamente. La oxidación puede ser llevada directamente hasta la sulfona cuando se usa un exceso de peróxido.^{36, 53}

3.8.2. Ácido perbenzoico y sus derivados

El ácido *m*-cloroperbenzoico es un oxidante que permite transformar sulfuros a sulfóxidos o a sulfonas dependiendo de la proporción en que se emplee. Se ha usado en una gran variedad de sustratos como tioéteres, tioésteres, heterocíclicos multifuncionales, (Figura 3.19) tioacetales, disulfuros y penicilinas, por mencionar algunos.⁵⁴

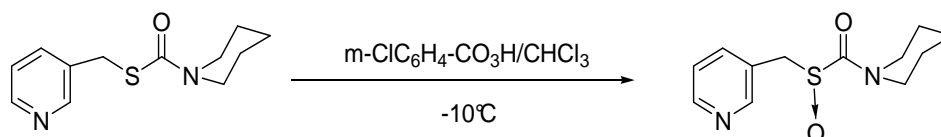


Figura 3.19. Oxidación de tioésteres heterocíclicos multifuncionales con ácido *m*-cloroperbenzoico.

3.8.3. Metaperiodato de sodio

Faiman y col. describieron la oxidación de ditiocarbamatos utilizando metaperiodato de sodio en metanol-agua (figura 3.20) y dependiendo de la proporción del oxidante se puede obtener el S-óxido o el S-dióxido.⁵⁵

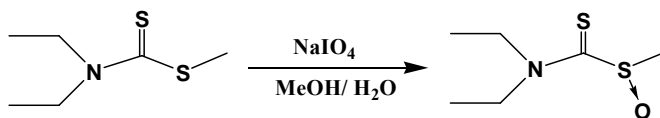


Figura 3.20. Oxidación de algunos ditiocarbamatos con periodato de sodio.



4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La *P. aeruginosa* es una bacteria resistente a la mayoría de los antibióticos lo cual hace difícil el tratamiento de infecciones causadas por ésta. La polimixina es uno de los pocos antibióticos capaces de combatir a este patógeno; sin embargo, la terapéutica usando este fármaco presenta una problemática derivada de su toxicidad y los numerosos efectos colaterales que provoca.

Diferentes estudios sugieren que las *Pseudomonas* dependen de la actividad BADH para subsistir en los tejidos que infectan, por lo cual resulta conveniente la búsqueda de compuestos capaces de inhibir específicamente esta enzima y con ello generar nuevas alternativas terapéuticas. Al igual que para otras aldehído deshidrogenasas, se ha descrito la inhibición de la BADH de *P. Aeruginosa* con el disulfiram y otros compuestos relacionados, lo cual sugiere que este tipo de compuestos podrían eventualmente ser útiles en la terapéutica contra esta bacteria.

Debido a lo anterior, en este trabajo se ha planteado la síntesis de los compuestos **2**, **3** y **4** (figura 4.1), los cuales han sido evaluados como inhibidores de la BADH de *P. aeruginosa*. Asimismo se plantea la síntesis y evaluación de los compuestos **6** y **7**(figura 4.1) ya que ambos presentan similitud estructural con los compuestos anteriormente evaluados y por consiguiente pueden presentar actividad inhibitoria sobre esta enzima.

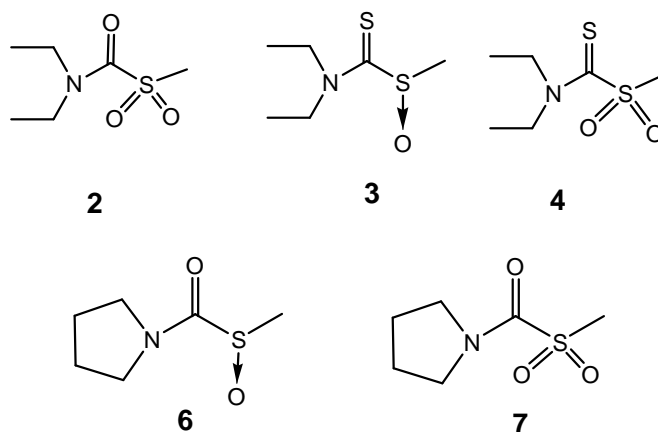


Figura 4.1. Compuestos propuestos para ser sintetizados y evaluados como posibles inhibidores de la BADH: *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-dióxido (**2**), *S*-metil-*N,N*-dietilditiocarbamato-*S*-óxido (**3**), *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-dióxido (**4**), *S*-Metil-pirrolidiltiocarbamato-*S*-óxido (**6**), *S*-Metil-pirrolidiltiocarbamato-*S*-dióxido (**7**).



5. OBJETIVOS

- Realizar la síntesis eficiente de los compuestos **1-4** (figura 5.1) reproduciendo o en su caso adaptando las metodologías descritas en la literatura, para su posterior evaluación como inhibidores de la betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* (como parte del proyecto UNAM PAPIIT IN206505).
- Desarrollar un método de síntesis para los compuestos **5-7** y caracterizar los productos obtenidos.
- Realizar la evaluación *in Vitro* de **6** y **7** como inhibidores de la BADH.

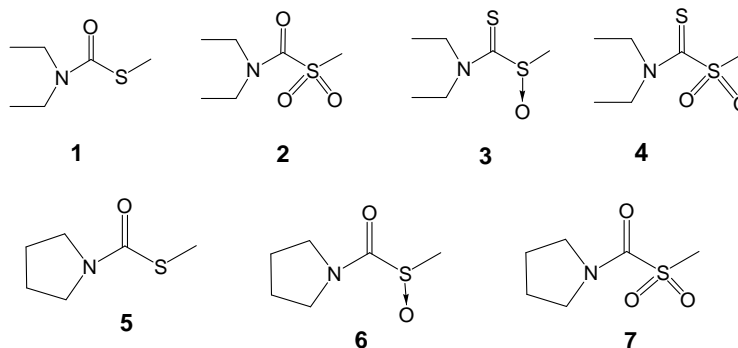


Figura 5.1. Compuestos propuestos como potenciales inhibidores de la BADH: S-metil - N,N-dietiltiocarbamato (**1**), S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (**2**), N,N- S-metil-dietilditiocarbamato- S-óxido (**3**), S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-dióxido (**4**) S-Metil-pirroliditiocarbamato, (**5**), S-Metil-pirroliditiocarbamato-S-óxido (**6**), S-Metil-pirroliditiocarbamato-S-dióxido (**7**).



6. HIPÓTESIS

- Es posible desarrollar metodología eficiente para la síntesis de los compuestos **2-4** para ser evaluados como inhibidores de la BADH de *P. aeruginosa*.
- Los análogos cíclicos de cinco miembros de los metabolitos del disulfiram pueden tener actividad inhibitoria sobre la betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* debido a la mayor rigidez del anillo nitrogenado con la consecuente mejoría de las interacciones con sitio activo de la enzima.



7. METODOLOGÍA

7.1. Materiales

7.1.1. Reactivos (R.A. de Aldrich[®], a menos que se indique lo contrario)

- Ácido acético glacial (Baker[®])
- Ácido *m*-cloroperbenzoico
- Ácido peracético 42%
- Azufre precipitado
- Bicarbonato de sodio comercial
- Carbonato de potasio anhidro
- Cloruro de dietilcarbamoilo (97%)
- Cloruro de dietiltiocarbamoilo (95%)
- Cloruro de sodio comercial
- Celita
- Dietilamina
- Dietilditiocarbamato de sodio trihidratado
- Metansulfonato de sodio (85%)
- Monóxido de carbono_(g) (Praxair[®])
- Nitrógeno_(g) (Infra[®])
- Peróxido de hidrógeno 30 %
- Pirrolidina (Baker[®])
- Sulfato de sodio anhidro
- Sulfato de dimetilo
- Gel de sílice para columna (malla 70-230)
- Gel de sílice flash (malla 200-400)
- Trietilamina
- Tiometóxido de sodio (95%)
- Yodo
- Yoduro de metilo

7.1.2. Disolventes (grado q. p. o destilados fraccionadamente antes de su uso)

- Acetonitrilo (Baker[®])
- Acetato de etilo
- Agua destilada
- Acetona
- Cloruro de metileno
- Dimetilsulfóxido (Aldrich[®])
- Hexano



- Metanol

7.1.3. Material

- Celdas de plástico de 500 μ L para espectrofotómetro
- Capilares
- Cámaras de elución
- Columna cromatográfica
- Cromatofolios de sílica gel Alugram[®] SIL G/UV₂₅₄
- Embudos de vidrio de diferentes diámetros
- Embudos de adición de diferentes capacidades
- Embudos de separación de diferentes capacidades
- Equipo de destilación simple, fraccionada y a presión reducida
- Mangueras para vacío
- Manómetro
- Matraz esférico de tres bocas diferentes capacidades
- Matraz esférico de diferentes capacidades
- Matraz Erlenmeyer de diferentes capacidades
- Micropipetas de 10, 200, 1000, y 5000 μ L
- Papel indicador de pH
- Papel indicador de óxido-reducción
- Pipetas Pasteur
- Pipetas graduadas de diferentes capacidades
- Probetas graduadas de diferentes capacidades
- Pinzas de tres dedos
- Refrigerantes
- Soporte universal
- Termómetro -10 a 250 °C
- Termómetro de alcohol de -80 a -20 °C
- Trampa de humedad
- Tubos Eppendorf de 0.6 y 1.5 mL
- Vasos de precipitados de diferentes capacidades
- Vasos para hidrogenación de diferentes capacidades

7.1.4. Equipos e Instrumentos

- Agitador mecánico Cole-Palmer Mod Stir-Pak 4454-10
- Balanza analítica Ohaus
- Balanza semianalítica Mettler PB300
- Barras magnéticas de diferentes tamaños
- Bomba de alto vacío
- Canastillas de calentamiento



- Difractómetro Bruker Smart Apex CCD
- Equipo de RMN 300 MHz (^1H) y 75 MHz (^{13}C) Eclipse Jeol
- Espectrofotómetro UV- visible Perkin Elmer
- Espectrofotómetro de IR FT IR 1600 Perkin Elmer
- Espectrómetro de masas Jeol AX505HA
- Estufa
- Lámpara UV 254/366 nm Mineraligh
- Parrilla de agitación y calentamiento
- Recirculador de agua Lauda K2RD
- Reóstato Staco Energy
- Rotavapor Buchi R-124

7.2. Técnicas Experimentales

7.2.1. Cromatografía en capa fina.

Con esta técnica se realizó el monitoreo de las reacciones, empleando cromatofolios de gel de sílice Alugram® SIL G/UV₂₅₄ como fase estacionaria.

7.2.2. Caracterización espectroscópica.

La caracterización de los compuestos obtenidos se realizó por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) y de carbono 13 (RMN ^{13}C), para lo cual se contó con el apoyo del Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Química, UNAM. Los espectros de RMN se obtuvieron en un espectrómetro Eclipse Jeol a 300 MHz. Se utilizaron como disolventes CDCl_3 y D_2O ; TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en ppm a partir del TMS y la constante de acoplamiento (J) en Hertz. Para indicar la multiplicidad de las señales en RMN ^1H se utilizan las siguientes abreviaturas: (s) simple, (d) doble, (c) cuarteto, (q) quintuple, (m) múltiple y (brd) para señales anchas. Los espectros de masas fueron realizados en un Espectrómetro de masas Jeol AX505HA, utilizando como técnicas de ionización impacto electrónico y FAB. Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en un espectrofotómetro de IR FT IR 1600 Perkin Elmer, por las técnicas de pastilla de KBr en el caso de compuestos sólidos y película en el caso de líquidos. El estudio de difracción de rayos X se realizó en un difractómetro Bruker Smart Apex CCD.

7.3. Síntesis de los compuestos 1 - 7



7.3.1. S-Metil-N,N-dietiltiocarbamato (1)

En un frasco de hidrogenación de 250 mL conteniendo una suspensión formada por 150 mL de dimetil sulfóxido, 3.2 g (100 mmoles) de azufre precipitado y 20.6 g (150 mmoles) de carbonato de potasio anhidro se adicionaron 20.7 mL (200 mmoles) de dietilamina. El frasco se colocó en el equipo de hidrogenación Parr, se purgó dos veces con monóxido de carbono a 30 lb/pulg² (2 atm), se llevó a 60 lb/pulg² (4 atm) con monóxido de carbono y se agitó a temperatura ambiente hasta que cesó el consumo de monóxido de carbono (aproximadamente 2 h). La mezcla se filtró sobre algodón y se transfirió a un matraz esférico de tres bocas, se enfrió a 15 °C y con agitación mecánica se adicionaron 10.4 mL (110 mmoles) de sulfato de dimetilo. Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, después de lo cual se adicionaron 100 mL de solución 1N de HCl, se agitó durante 5 min y se extrajo con hexano (2 X 100 mL). El extracto orgánico, después de secado sobre sulfato de sodio anhidro, fue purificado mediante destilación a presión reducida (0.1 mmHg). Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 8.1.

7.3.2. S-Metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (2)

Método A

6.8 g (46.2 mmoles) del tiocarbamato 1 se disolvieron en 70 mL de acetonitrilo, se enfrió a 5 °C y se adicionaron, con agitación constante, 27.46 mL (115.6 mmoles) de ácido peracético (32 %), manteniendo la temperatura entre 5 y 10 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y se verificó el término de la reacción mediante cromatografía en capa fina (hexano-acetato de etilo 1:1). Se evaporó el disolvente en rotavapor; el residuo se suspendió en 20 mL de agua y se extrajo con cloruro de metileno (3 X 20 mL). Se lavó la fase orgánica con porciones de solución saturada de bicarbonato de sodio hasta eliminar reacción ácida, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad, obteniéndose un producto líquido de color amarillo que fue purificado mediante destilación a presión reducida. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 8.2.

7.3.3. S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (2)

Método B



A una suspensión de 6 g (81.12 mmoles) de tiometóxido de sodio en 160 mL de acetonitrilo, enfriada a 5 °C, se adicionaron lentamente 10.3 g (73.75 mmoles) de cloruro de dietilcarbamoilo, manteniendo la misma temperatura. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente y con agitación por 24 horas. El curso de la reacción fue seguido por cromatografía en capa fina, empleando como sistema de elución *n*-hexano-AcOEt 95:5. La mezcla de reacción se filtró sobre celita y se lavó con pequeñas porciones de acetonitrilo. La solución resultante fue enfriada a 5 °C y se adicionaron, lentamente y con agitación constante, 87.6 mL (368.75 mmoles) de ácido peracético (32 %), manteniendo la misma temperatura. Posteriormente, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y se verificó el término de la reacción mediante cromatografía en capa fina (hexano-acetato de etilo 1:1). Se evaporó el disolvente en rotavapor; el residuo se suspendió en 60 mL de agua y se extrajo con cloruro de metileno, (3 X 60 mL). La fase orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad en un rotavapor, obteniéndose un líquido amarillo claro que fue purificado mediante destilación a presión reducida. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 8.2.

7.3.4. S-Metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido (3)³²

Una solución de 2 g de dietilditiocarbamato de sodio (11.69 mmoles) en 100 mL de agua se enfrió a 0 °C y se adicionaron, en un lapso de 30 segundos, 1.32 mL (11.69 mmoles) de peróxido de hidrógeno al 30% (p/v). La solución se dejó con agitación por dos minutos más, después de lo cual la temperatura se elevó a 3 °C y el color cambió a amarillo claro. De inmediato se adicionaron 100 mL de metanol y 1.6 g (11.69 mmoles) de yoduro de metilo y se agitó a 4 °C por 12 h. Se evaporó el metanol en un rotavapor a 25 °C y el residuo acuoso se extrajo con cloruro de metileno (3 X 30 mL). El extracto orgánico se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en un rotavapor. El producto ($R_f = 0.3$; hexano:AcOEt 80:20) se purificó por cromatografía en columna (hexano-AcOEt 90:10). Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 8.3.

7.3.5. S-Metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-dióxido (4)³⁹

En un matraz esférico de 250 mL, conteniendo una solución de 6 g (50 mmoles) de metansulfinato de sodio (85%) y 60 mL de agua, se adicionó una solución de 6 g (37.62 mmoles) de cloruro de dietiltiocarbamoilo en 60 mL de benceno. La mezcla bifásica fue agitada vigorosamente a temperatura ambiente durante 24 horas, verificando el fin de la reacción mediante



cromatografía en capa fina (hexano-acetato de etilo 85:15). Posteriormente se separó la fase orgánica, se secó con sulfato de sodio y se evaporó hasta peso constante. Finalmente, el residuo fue purificado mediante cromatografía en columna (gel de sílice; hexano-acetato de etilo 85:15). Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 8.4.

7.3.6. S-Metil-pirrolidiltiocarbamato (5)⁴⁶

En un frasco de hidrogenación de 250 mL se mezclaron 3.2 g (100 mmoles) de azufre precipitado (finamente pulverizado), 150 mL de dimetil sulfóxido, 20.6 g (150 mmoles) de carbonato de potasio anhidro y 16.7 mL (200 mmoles) de pirrolidina. La suspensión, de color oscuro, se colocó en el equipo de hidrogenación de baja presión Parr, se purgó dos veces con monóxido de carbono a 2 atm para evacuar el aire del sistema y se llevó, con el mismo gas, hasta 4 atm. La agitación se continuó a temperatura ambiente, manteniendo la presión de CO para reponer el gas consumido. La mezcla resultante fue filtrada y transferida a un matraz esférico de tres bocas, donde se enfrió a 4 °C y, con agitación mecánica, se adicionaron 10.4 mL (110 mmoles) de sulfato de dimetilo y se agitó a temperatura ambiente durante 22 hrs. Posteriormente se adicionaron 100 mL de solución 1N de HCl, se agitó durante 5 min, se extrajo con hexano (5 X 100 mL), se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad, obteniéndose un producto sólido que fue recrystalizado en hexano. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 8.5.

7.3.7. S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (6)

En un matraz esférico de 250 mL se disolvieron 7 g (53.43 mmoles) del compuesto **5** en 100 mL de acetonitrilo, se enfrió a 4 °C en un baño de hielo-agua, se adicionaron lentamente y con agitación constante 15.22 mL (64.12 mmoles) de ácido peracético (42 %) y se mantuvo con agitación a la misma temperatura durante 8 h, siguiendo el curso de la reacción mediante cromatografía en capa fina (hexano-acetona 1:1). Posteriormente se adicionó 1 mL de solución de bisulfito de sodio (5 %), se agitó durante 10 minutos y se evaporó el acetonitrilo en rotavapor. Se adicionaron al residuo 50 mL de agua y se realizaron tres extracciones de 35 mL de cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente. Finalmente, el residuo fue



recristalizado en hexano. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 8.6.

7.3.8. S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido (7)

En un matraz esférico de 250 mL se disolvieron 4 g (27.59 mmoles) de S-Metil-N-pirrolidiltiocarbamato (5) en 80 mL de cloroformo y la solución se enfrió a 0 °C en un baño de hielo. Se adicionaron, con agitación constante, 12.07 g (68.96 mmoles) de ácido *m*-cloroperbenzoico y se mantuvo agitando a 0 °C durante 6 h, siguiendo el curso de la reacción por cromatografía en capa fina (hexano-acetona 7:3). Posteriormente se filtró el precipitado y al filtrado se le adicionaron 50 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio y se dejó agitar durante 12 h. La fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro y evaporada a sequedad. El residuo blanco se recristalizó en metanol. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 8.7.

7.4. Ensayo de inhibición de la PaBADH con los compuestos 6 y 7

El ensayo de inhibición de la PaBADH se realizó empleando una técnica espectrofotométrica como se explica a continuación:

a) Preparación de las muestras de ensayo

Se prepararon cuatro tubos Eppendorf marcados como A, B, C y D con 100 µL de muestra de ensayo cada uno con la composición que se describe en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Composición de las muestras de ensayo

	A	B	C	D
	Control (-)	Problema (6)	Problema (7)	Control (+)
BADH	30 µg	30 µg	30 µg	30 µg
Disulfiram (5 mM/EtOH)	-	-	-	1µL
Compuesto 6 (5 mM/EtOH)	-	1 µL	-	-



Compuesto 7 (5 mM/EtOH)	-	-	1 μ L	-
Etanol	1 μ L	-	-	-
Amortiguador	cbp	cbp	cbp	cbp
Volumen final	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L

b) Determinación de la actividad enzimática

En un espectrofotómetro, se midió el porcentaje de actividad de la enzima de cada una de las cuatro muestras de ensayo a 340 nm durante 30 s en el tiempo cero, y posteriormente se incubaron a 37 °C durante todo el experimento.

La lectura del porcentaje de actividad se realizó a los siguientes tiempos: 30 segundos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 45, 60, 75, 90, 110, 120 minutos o hasta que la enzima se hubiese inactivado por completo.

Para la lectura de cada muestra se realizó el protocolo siguiente:

Se adicionó 1 μ L de la muestra de ensayo a una celda para espectrofotómetro conteniendo 499 μ L de medio de ensayo a 30 °C (ver la composición del medio de ensayo en la Tabla 7.2) y se leyó el porcentaje de actividad en el espectrofotómetro de UV, registrando las lecturas para su posterior análisis.

La actividad inhibitoria de los compuestos 6 y 7 se determinó a partir de la constante de inactivación obtenida mediante la linealización de los datos obtenidos mediante el método anterior, considerando que la BADH tiene una cinética de primer orden.^{3,12}

Tabla 7.2. Preparación del medio de ensayo*

Reactivos	Concentración
Betaina aldehído	1 mM
NADP ⁺	0.3 mM
EDTA	1 mM
Buffer fosfatos (K ⁺)	100 mM

*Después de preparada la solución, se ajusta a pH 8 con KOH 0.1N



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la preparación del S-metil-N,N-dietiltiocarbamato (**1**), se evaluaron dos metodologías. Inicialmente se reprodujeron las condiciones descritas por Mizuno y col.,⁴⁶ quienes reportaron la obtención de alquiltiocarbamatos por reacción entre aminas secundarias, azufre y monóxido de carbono en dimetil sulfóxido a una atmósfera de presión y temperatura ambiente, con posterior alquilación de la sal intermediaria con halogenuros de alquilo. Con las condiciones reportadas no se logró obtener el producto deseado, por lo que se estudió la modificación del proceso, encontrando que una presión de 60 lb/pulg² (4 atm) de monóxido de carbono y una agitación eficiente, que se logró adaptando un equipo Parr, dio mejores resultados en cuanto a rendimiento del producto esperado. Al utilizar un reactor de alta presión de CO (800 lb/pulg²), no se lograron buenos rendimientos del producto **1**, probablemente debido a que la agitación con la que contaba el equipo no era eficiente.

Para la segunda etapa de este proceso, la alquilación de la sal intermediaria (inestable) los autores reportan la reacción con yoduro de metilo a 0° C en atmósfera de argón. Sin embargo, a esta temperatura el DMSO solidifica, haciendo la reacción difícil de homogeneizar y por tanto, más lenta. Esta misma reacción a temperatura ambiente dio lugar a bajos rendimientos de **1**. Para superar estos inconvenientes, se cambió el agente alquilante por sulfato de dimetilo y se operó a 15 °C durante la adición y luego a temperatura ambiente por 16 horas más, obteniendo el producto con buen rendimiento. (Ver Fig. 8.1 y Tabla 8.1)

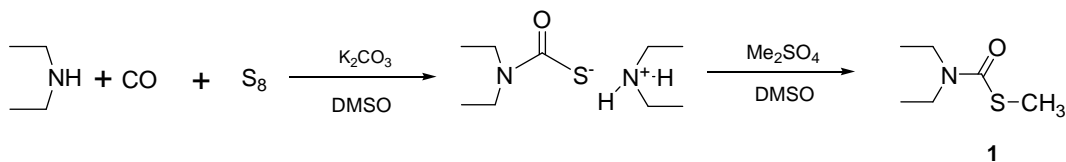


Figura 8.1.

Otro método utilizado para la preparación del compuesto **1** fue el descrito por Gray y col.⁴⁴ a partir de cloruro de dietilcarbamoilo y tiometóxido de sodio. Los autores reportan esta reacción en tolueno a reflujo. Ramírez⁵⁶ optimizó el procedimiento cambiando el disolvente por éter metil terbutílico y la temperatura a 20 °C, con lo que obtuvo un mayor rendimiento de **1** con un



aislamiento más sencillo. Para nuestra conveniencia se realizó otra modificación al procedimiento cambiando el disolvente por acetonitrilo. Esta modificación permitió evitar el protocolo de aislamiento de este compuesto al poder utilizarlo como disolución del producto crudo para la preparación del compuesto **2** (figura 8.2).

En ambos casos, para fines de análisis, el compuesto **1** fue purificado mediante destilación a presión reducida (ver Tabla 8.1). Las propiedades espectroscópicas de **1** coinciden con las reportadas en la literatura.⁴⁴

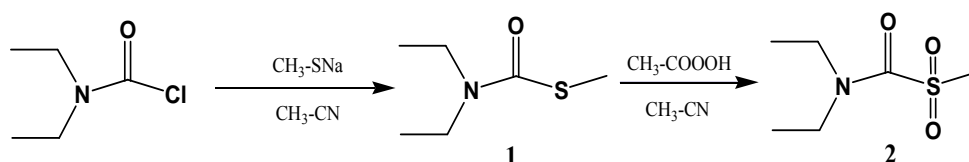
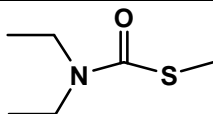


Figura 8.2.

Tabla 8.1



S-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato (1).

Líquido incoloro con p. eb. 39-46 °C / 0.1 mmHg.

Rendimiento: 83 %

RMN ¹H (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm) = 1.17 [t, $J=7$ Hz, 6H], 2.32 [s, 3H], 3.39 [c, $J=6.9$ Hz, 4H].

RMN ¹³C (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) = 12.7, 13.3, 41.9, 167.5.

IR (película) ν_{max} (cm^{-1}) = 2975.6, 2932.7, 1649.8, 1458.8, 1407, 1307.8, 1250.6, 1117.5, 861.1.



La obtención de S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (**2**) mediante la oxidación del tiocarbamato **1** con ácido *m*-cloroperbenzoico, por los métodos reportados en la literatura^{30,42} implica un aislamiento laborioso y, en consecuencia, bajos rendimientos. Se encontró que **1** puede ser oxidado eficientemente con 5 equivalentes de ácido peracético en acetonitrilo (fig. 8.3), permitiendo obtener la sulfona **2** con buenos rendimientos. Esta reacción se realizó con el tiocarbamato **1** purificado (método A) y con el mismo compuesto sin aislar, obtenido en disolución de acetonitrilo a partir de cloruro de dietilcarbamoilo (método B). Los resultados obtenidos para estos experimentos y los datos espectroscópicos del compuesto **2** se muestran en la Tabla 8.2.

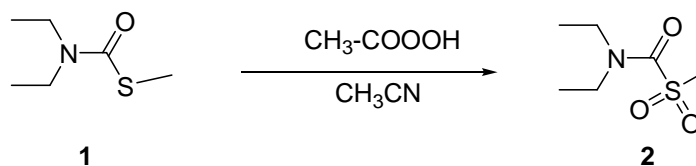
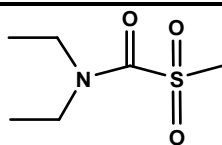


Figura 8.3.

Tabla 8.2.



S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (2)

Líquido incoloro poco viscoso con p. eb. 71-74 °C / 0.1 mm de Hg.

Método A. Rendimiento: 77% (desde **1**)

Método B. Rendimiento: 73% (desde cloruro de dietilcarbamoilo)

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) = 1.22 [t, J₁= 7.2 Hz], 1.30 [t, J₂= 7.2 Hz, 3H], 3.13 [s, 3H], 3.42[c, J= 7.1 Hz, 2H], 3.75 [c, J= 7, 3H].

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) =12.1, 13.7, 39.5, 41.4, 42.6, 160.6.

IR(película) ν_{max} (cm⁻¹)= 2980.1, 2938.3, 1648.9, 1460.4, 1428.4, 1301.4, 1262.8, 1151.6, 1115.9.



Para la preparación del S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido (**3**) se intentó inicialmente la oxidación del dietilditiocarbamato de metilo con peryodato de sodio en metanol-agua (fig. 8.4), según el método reportado por Hart y col.⁴¹ La misma reacción se intentó con otros oxidantes, como peróxido de hidrógeno, ácido peracético y ácido *m*-cloroperbenzoico, dando lugar en todos los casos a mezclas complejas de reacción.

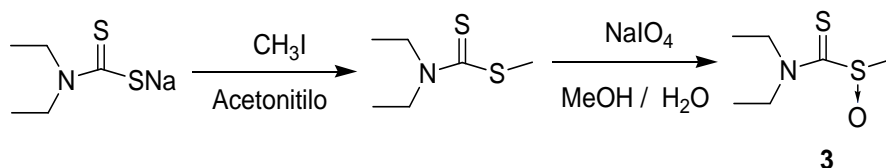


Figura 8.4.

El procedimiento descrito por Madan y col.,³⁶ consistente en la oxidación del dietilditiocarbamato de sodio comercial con peróxido de hidrógeno durante un minuto a 0 °C, con posterior alquilación de la sal intermediara con yoduro de metilo (Fig. 8.5) permitió obtener el sulfóxido **3**, aunque con bajos rendimientos.

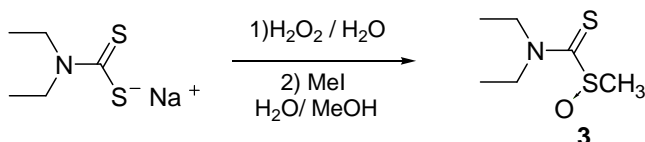
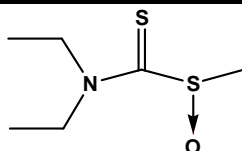


Figura 8.5.

Después de una serie de experimentos tendientes a mejorar el rendimiento por modificación de las variables tiempo y temperatura, se logró un rendimiento de 36 % del compuesto **3** con un tiempo de dos minutos a 0 °C para la oxidación del dietilditiocarbamato de sodio. El producto, descrito en la literatura como líquido, cristalizó después de una purificación por cromatografía en columna (Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8.3). Con el fin de mejorar el rendimiento se realizaron experimentos donde se modificó el agente oxidante utilizando los mencionados anteriormente sin embargo se obtenían mezclas complejas de reacción sin alcanzar a observar el compuesto **3** y en algunos casos el producto principal fue el correspondiente dímero bis(dietiltiocarbamoil)disulfuro (disulfiram).



Tabla 8.3.



S-metil-*N,N*-dietilditiocarbamato-S-óxido (3)

Cristales de color verde con p. f. 50-52 °C

Rendimiento 20-36 %

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) = 1.33 [t, J= 7.2 Hz, 3H], 1.36 [t, J= 7 Hz, 3H], 2.83 [s, 3H], 3.82-4.13 [m, 4H].

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) = 10.8, 14.3, 42.4, 44.9, 50.3, 201.0.

IR(película) ν_{max} (cm⁻¹)= 3423.6, 2972.2, 1672.2, 1505.6, 1463.9, 1427.9, 1353.7, 1276.2, 1081.5.

Para la preparación de S-metil-*N,N*-dietilditiocarbamato-S-dióxido (4) se utilizó el método reportado por Hu y col.³⁹ consistente en la reacción bifásica (benceno/agua) de cloruro de dietiltiocarbamoilo con metansulfonato de sodio (fig. 8.6). Los autores reportan un rendimiento del 63 % con este método. Aunque los intentos por utilizar un disolvente de menor toxicidad no dieron resultados favorables, el rendimiento se elevó a 77 % optimizando el método de aislamiento. (Ver Tabla 8.4).

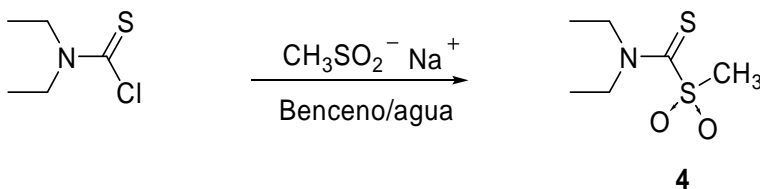
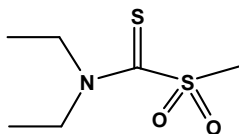


Figura 8.6.



Tabla 8.4.



S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-dióxido (4)

Líquido amarillo claro.

Rendimiento 77 %

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) = 1.30 [t, J= 7 Hz, 3H], 1.37 [t, J= 7 Hz, 3H], 3.46 [s, 3H], 3.87 [c, J= 7 Hz, 2H], 4.08 [c, J= 7 Hz, 2H].

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) = 10.1, 13.4, 43.5, 47.9, 49.7, 188.1.

IR (película) ν_{max} (cm⁻¹)= 2978.1, 2935.9, 2877.2, 1670.0, 1504.1, 1430.7, 1301.6, 1131.4.

La preparación del S-metil-pirrolidiltiocarbamato (5) se realizó empleando una metodología similar a la desarrollada para la obtención del tiocarbamato 1 (figura 8.7), a partir de pirrolidina y azufre en dimetilsulfóxido y monóxido de carbono a una presión de 4 atm, con la posterior alquilación de la sal intermedia con sulfato de dimetilo. El compuesto 5, purificado por recristalización, fue obtenido con 74 % de rendimiento. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 8.5.

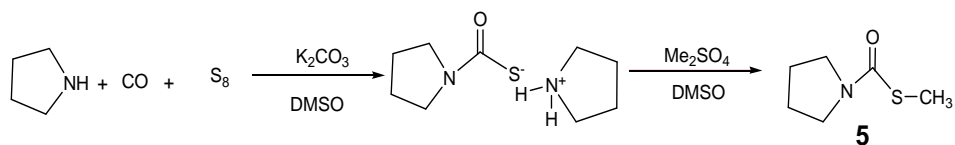
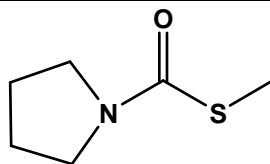


Figura 8.7 Síntesis del compuesto 5



Tabla 8.5.



S-Metil-pirrolidiltiocarbamato (5)

Cristales ligeramente amarillos con p. f. 26-28 °C .

Rendimiento 74%.

RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) = 1.83-1.99 [m, 4H], 2.34 [s, 3H], 3.36 [t, J = 6.5 Hz, 2H], 3.52 [t, J = 6.5 Hz, 2H].

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz) δ (ppm) = 12.5, 24.5, 25.5, 45.8, 47.0, 166.2.

IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹) = 3446.5, 3028.8, 3005.2, 2924.2, 1685.9, 1397.5, 1294.1, 1121.6, 963.6.

La oxidación del tiocarbamato **5** para preparar el S-metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (**6**) fue evaluada con varios agentes oxidantes y diferentes condiciones de reacción, encontrándose que la adición, a 4 °C, de 1.2 equivalentes de ácido peracético, en dos adiciones con espacio de 6 h, permitió la obtención del sulfóxido **6** con 41.2 % de rendimiento (Tabla 8.6). Los intentos por mejorar el rendimiento modificando el agente oxidante o las condiciones de reacción no tuvieron éxito.

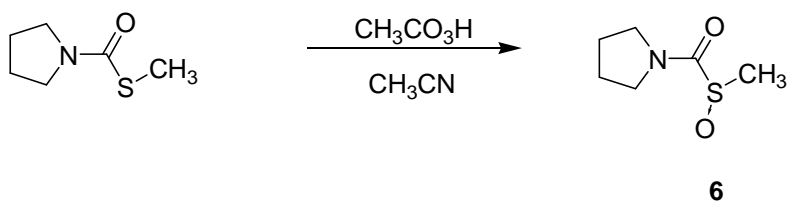
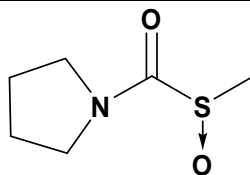


Figura 8.8



Tabla 8.6.



S-Metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (6)

Cristales incoloros con p.f. de 78-79 °C

Rendimiento 41.2 %

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) = 1.94 [q, 2H], 2.024 [q, 2H], 2.81 [s, 3H], 3.55-3.70 [m, 3H], 3.90 [dt $J_1=11$ Hz, $J_2=13.61$ Hz, 1H].

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) = 23.5, 26.1, 37.0, 46.1, 48.5, 166.5.

IR(KBr) ν_{max} (cm^{-1}) = 3458.25, 3368.53, 2990.34, 2882.08, 1695.9, 1386.54, 1068.14, 872.59, 561.42.

EM (EI) $m/z(\%)M^+$ = 162(1), 98(100), 82(1), 70(10), 55(87).

De los experimentos realizados para obtener la sulfona **7**, el mejor método encontrado fue la oxidación de **5** con 2.5 equivalentes de ácido *m*-cloroperbenzoico a baja temperatura. La oxidación de **5** con un exceso de ácido peracético, contrariamente a lo esperado, llevó a una mezcla compleja, dentro de la cual se pudo apreciar inicialmente la formación del sulfóxido **6**. Los resultados experimentales de esta transformación se reportan en la Tabla 8.7.

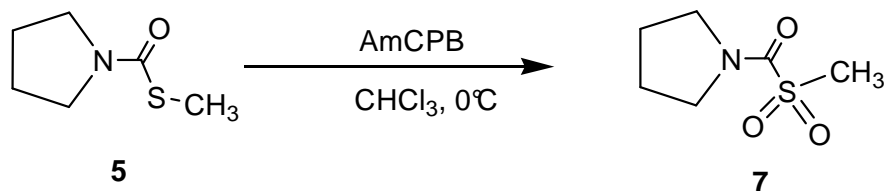
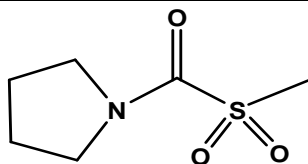
Figura 8.9. Síntesis del compuesto **7**



Tabla 8.7.



S-Metil-pirrolidil tiocarbamato-S-dióxido (7)

Cristales incoloros con p.f. de 112-114 °C

Rendimiento 66%

RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) = 1.92 [q, 2H], 2.03 [q, 2H], 3.13 [s, 3H], 3.57 [t, $J=6.9$ Hz, 2H], 3.91 [t, $J=6.9$ Hz, 2H].

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm) = 23.3, 26.1, 38.5, 45.83, 48.1, 158.9.

IR(KBr) ν_{max} (cm^{-1}) = 3446.2, 2991.7, 2880.1, 1694.9, 1385.6, 1301.3, 1068.4, 947.2, 873.5.

EM (FAB $^+$) $m/z(\%)M^+$ = 178(29), 176(4), 137(17), 98(99), 70(12), 55(15).

Espectroscopia

Los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C de la mayoría de los compuestos sintetizados demuestran la no equivalencia de los grupos etilo presentes sobre el nitrógeno. Esto se puede explicar por la participación mayoritaria de la forma canónica (doble enlace $\text{C}=\text{N}$) que se muestra en la Figura 8.10, con lo que se puede especular que uno de los grupos etilo sobre el nitrógeno de **2** recibe una mayor influencia de los oxígenos enlazados al átomo de azufre, como se ilustra en la Figura 8.11. Los tiocarbamatos **1** y **5** no presentaron este comportamiento.

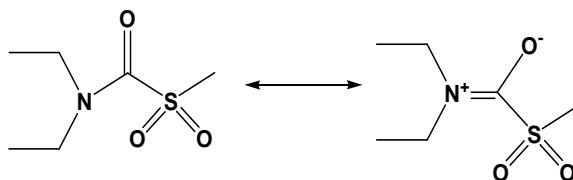


Figura 8.10.

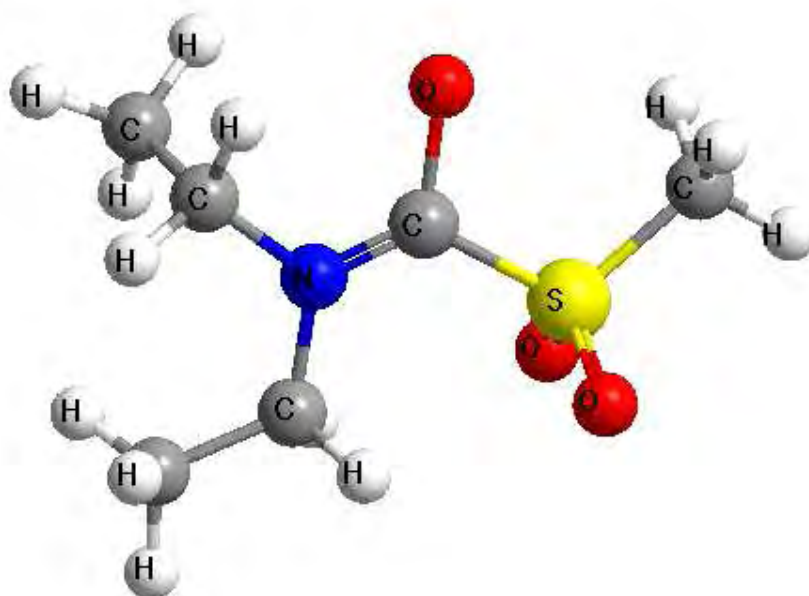


Figura 8.11. Simulación de la estructura de resonancia del compuesto **2**, obtenida mediante mecánica molecular a nivel MM2, donde se observa el doble enlace C=N que restringe el giro de este enlace, generando la no equivalencia de los grupos etilo sobre el átomo de nitrógeno.

En el espectro de RMN ^1H del S-metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (**6**) se puede observar, además de la diastereotopicidad esperada para los protones del anillo, que uno de éstos se desplaza a mayor frecuencia (3.9 ppm). Lo anterior se puede explicar con ayuda del modelo obtenido mediante mecánica molecular a nivel MM2 mostrado en la figura 8.12, en el que se observa que uno de los protones de los grupos metileno adyacentes al nitrógeno del anillo recibe la influencia de la nube electrónica del oxígeno del S-óxido.

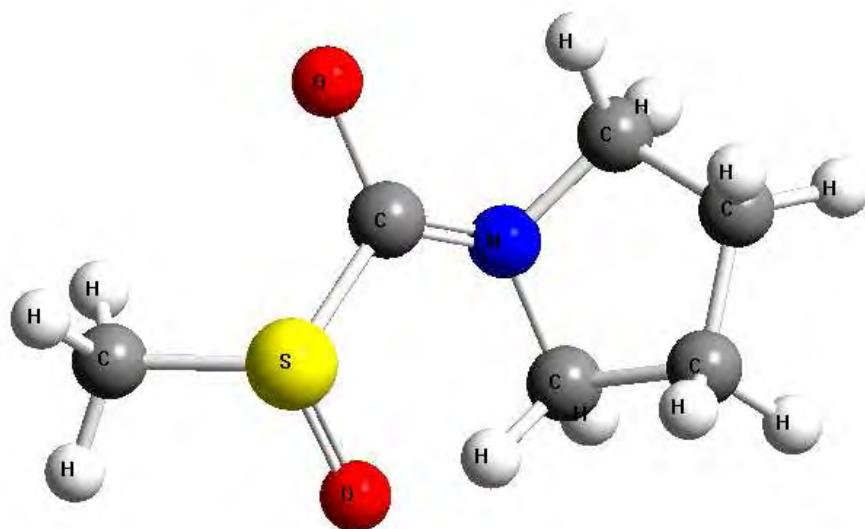


Figura 8.12. Modelo obtenido del compuesto **6** mediante mecánica molecular a nivel MM2

Por otro lado, se ha reportado una baja estabilidad para este tipo de sistemas.⁴² En el caso del *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-óxido se ha descrito⁵⁶ la transposición espontánea al *S*-metil-*O*-(*N,N*-dietilcarbamoil) sulfenato (Figura 8.13). Para el sulfóxido **6** se podría esperar el mismo comportamiento; sin embargo, en este caso no se observó este fenómeno. Lo anterior se pudo demostrar con el análisis del espectro de RMN ¹H y con la imagen de difracción de rayos X del compuesto **6** (Figura 8.14)

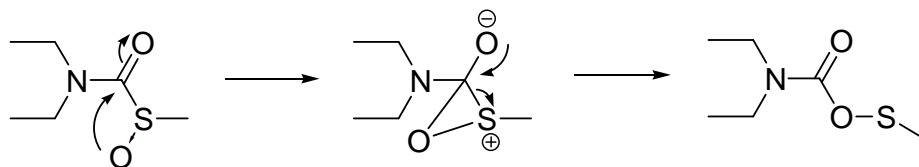


Figura 8.13. Transposición del *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato-*S*-óxido

Con el estudio de difracción de rayos X se corroboró la estructura del compuesto **6**, demostrando así que el compuesto obtenido es el sulfóxido y no el correspondiente producto de transposición. Lo anterior nos lleva a conjeturar



que la estructura cristalina le confiere una mayor estabilidad con respecto a su análogo *N,N*-dietilo.

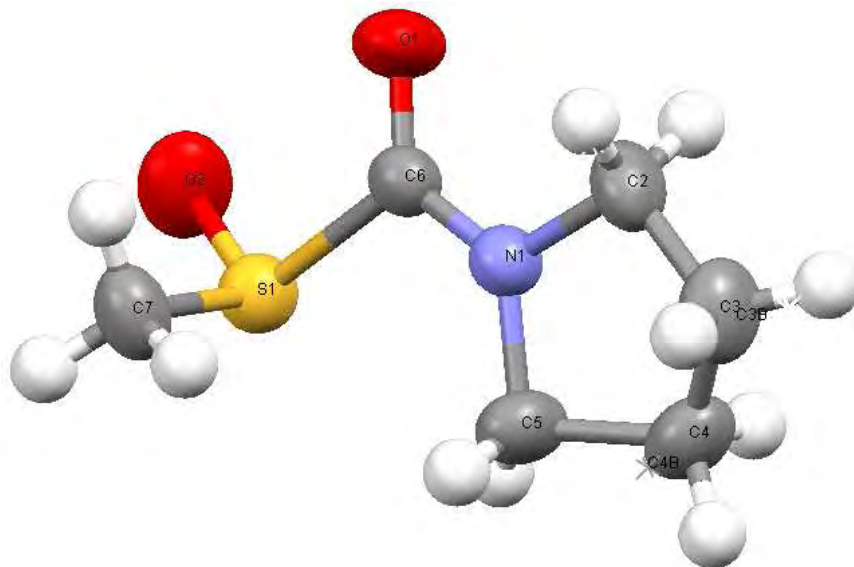


Figura 8.14. Estructura del sulfóxido **6** obtenida mediante difracción de rayos X

En la comparación del modelo (figura 8.12) y de la imagen de difracción de rayos X (figura 8.14) del sulfóxido **6** se observa que la longitud de enlace entre el átomo de nitrógeno y el carbono del carbonilo es más corta, con lo que se confirma el supuesto de la formación del doble enlace carbono-nitrógeno. Por otra parte, se observa que la conformación del grupo sulfóxido encontrada en el estudio de difracción de rayos X difiere de la predicción realizada mediante mecánica molecular y de los datos espectroscópicos, los cuales sugieren que uno de los hidrógenos de los grupos metileno se encuentra más cercano al átomo de oxígeno, por lo que recibe una mayor influencia de éste y por tanto tiene un mayor desplazamiento. Lo anterior se puede atribuir a que en una red cristalina la molécula tiende a tomar la conformación más favorable para la red cristalina.



Ensayos de inhibición enzimática

Los compuestos **2-4** han sido evaluados con anterioridad como inhibidores de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa*, encontrándose este estudio en una fase avanzada.⁵⁷

Los compuestos **6** y **7** fueron sometidos a un protocolo de pruebas preliminares de inhibición enzimática sobre esta enzima. Estos ensayos consisten en determinar la velocidad de inhibición que provoca el compuesto a evaluar sobre la enzima *in vitro*, midiendo la cantidad de producto generado en la reacción que cataliza.

El ensayo de inhibición de la PaBADH se realizó empleando una técnica espectrofotométrica de cuantificación del NADPH producido en la reacción que se ilustra en la figura 8.15.

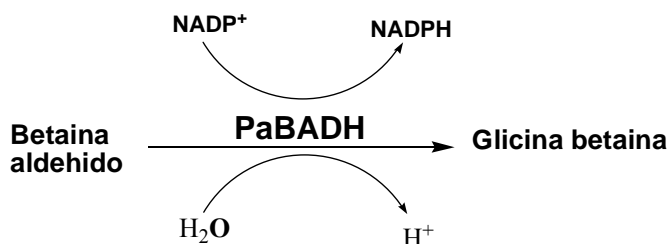


Figura 8.15. Reacción de producción de glicina betaína a partir de betaína aldehído mediada por la PaBADH.

La gráfica de la Figura 8.16 muestra los resultados del estudio preliminar realizado por el método descrito por Zaldivar y col.⁵⁷ Calculando la constante de inactivación de la enzima, provocada por los compuestos **6** y **7**. Como se puede observar en la gráfica, la velocidad de inactivación de la BADH por la sulfona **7** resultó mayor a la inducida por el disulfiram y la del sulfóxido **6** fue menor que la correspondiente al mismo compuesto, el cual es usado como comparativo debido a que se ha descrito como inhibidor de la BADH.

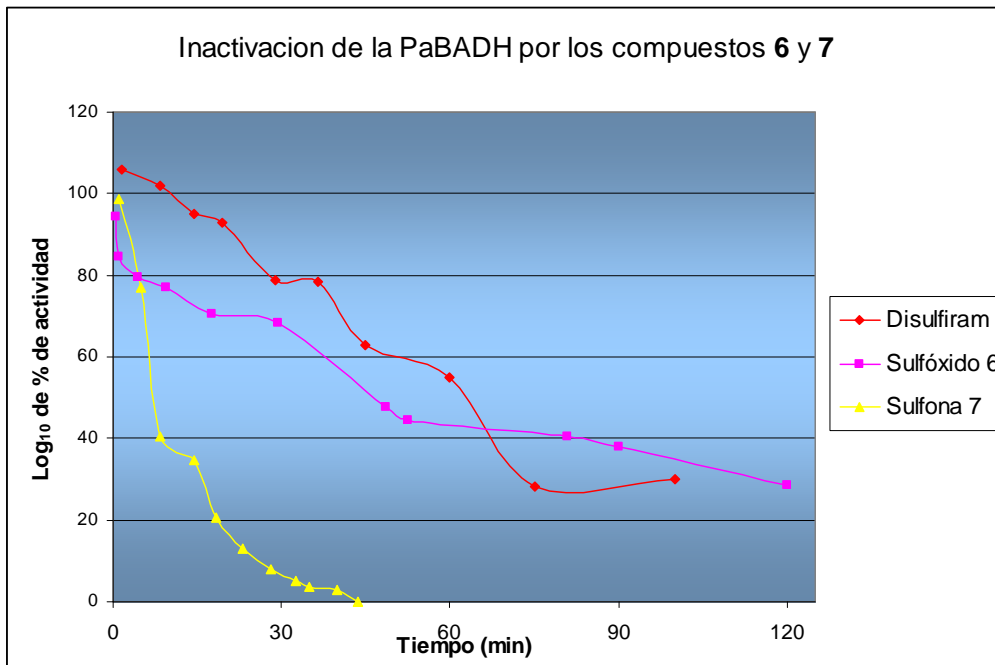


Figura 8.16. Gráfica de inactivación de la PaBADH por los compuestos 6 y 7

Para el cálculo de las constantes de inactivación (K_d) se llevó a cabo la linealización de los datos al graficar el logaritmo del porcentaje de actividad contra tiempo (ver figura 8.17). Con los datos obtenidos se llevó a cabo una regresión lineal, de modo que la pendiente de cada recta obtenida es igual la constante de inactivación.

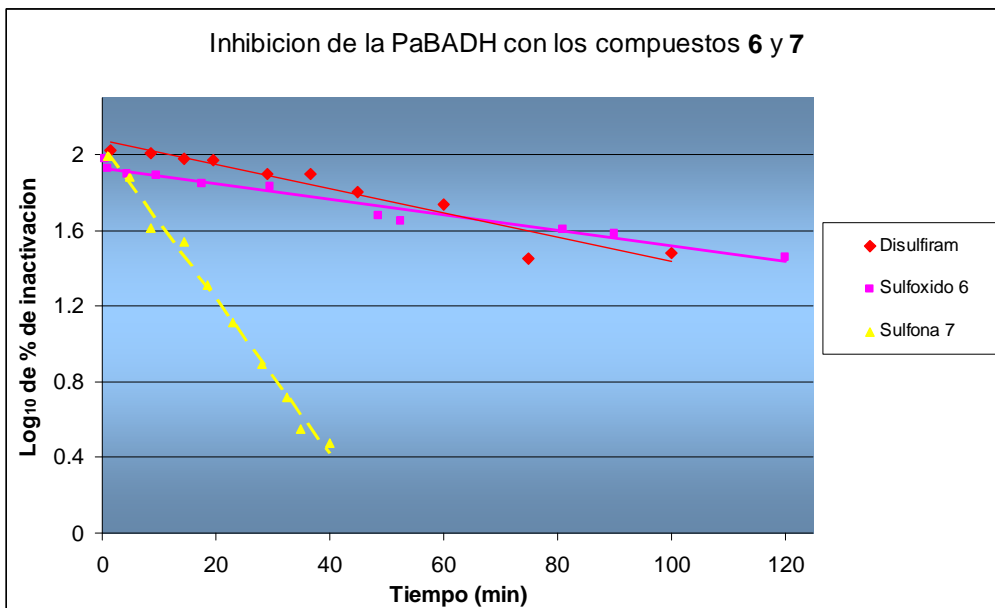


Figura 8.17. Gráfica linealizada de inhibición de la PaBADH por los compuestos 6 y 7



Tabla 8.8

Compuesto	Constante de inactivación K_d (min^{-1})
Disulfiram	<i>0.0065</i>
Sulfóxido 6	<i>0.0040</i>
Sulfona 7	<i>0.0406</i>

Como se puede observar en la Figura 8.17 y en la Tabla 8.8, la sulfona **7** tiene una pendiente mayor al disulfiram y el sulfóxido **6** tiene una pendiente parecida a éste. De lo anterior, se plantea que la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre la PaBADH tiene el siguiente orden de potencia: **7** > Disulfiram > **6**, por lo que ambos compuestos son candidatos para un estudio más detallado como inhibidores de la enzima y potenciales agentes terapéuticos contra *P. aeruginosa*.



9. CONCLUSIONES

Se logró cumplir con los objetivos propuestos para este trabajo al sintetizar la serie de compuestos propuesta y obtener las cantidades solicitadas para los ensayos bioquímicos, además de la mejora de algunas metodologías para la síntesis y estrategias de purificación de estos.

Se desarrolló una metodología eficiente y original para la preparación de tiocarbamatos, este método desarrollado tiene ventajas sustanciales frente al método reportado en la literatura debido a que no requiere de condiciones especiales y los aislamientos son muy simples.

A pesar de la aparente simplicidad de las estructuras químicas de los compuestos obtenidos, la síntesis de cada uno de ellos representó diversas dificultades derivadas de su baja estabilidad que en muchos casos complicó el aislamiento además del olor desagradable que los caracteriza.

Se logró la obtención de los compuestos **6** y **7** análogos a los metabolitos del disulfiram de los cuales no se tenían reportes en la literatura.

En los compuestos **6** y **7** se encontró en los ensayos preliminares que tienen actividad inhibitoria sobre la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* por lo que estos compuestos son candidatos para un estudio formal y detallado.

Las características estructurales de estos sistemas dieron lugar a espectros de RMN que demostraron características especiales para cada compuesto y particularmente, en el caso del sulfóxido **6**, fue pertinente la realización de estudios de difracción de rayos X para comprobar la estructura de este.



10. PERSPECTIVAS

- Dado que los resultados preliminares señalaron que los compuestos **6** y **7** resultaron tener actividad inhibitoria sobre la PaBADH, ambos compuestos son candidatos a un estudio más detallado.
- Este trabajo se puede ampliar realizando la síntesis y evaluación como inhibidores de la PaBADH de los S-óxidos de los ditiocarbamatos mostrados en la figura 10.1.

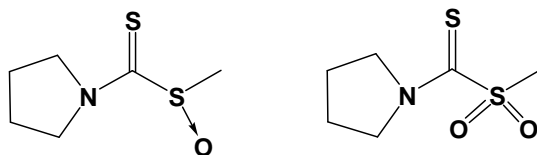


Figura 10.1. Ditiocarbamatos análogos a los compuestos **6** y **7** con posible actividad inhibitoria de la BADH de *P. aeruginosa*.



11. REFERENCIAS

- ¹ Velasco, G. R.; Chacón, A. V.; Hervert, H. D.; Muñoz, C. R. Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves by disulfiram *Chem. Biol. Interact.* **2003** 143-144, 149-158.
- ² González, L. R.; Velasco, G.; Muñoz, C. R. Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **2002** 361, 577-585.
- ³ Zaldívar-Machorro, V. J.; Demare, P.; Ramírez, M. R.; Regla, I.; Muñoz-Clares, R. A. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 13. Henry Weiner, Edmund Maser, Ronald Lindahl and Bryce Plapp (Eds). Purdue University Press, West Lafayette, Indiana: **2007**. ISBN 978-1-55753-447-7.
- ⁴ Tomlinson A.; Johnson K.; Lam-Halt J.; May D. C.; Lipsky J. J.; Naylor S.; Inhibition of Human Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase by the Disulfiram Metabolite S-Methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl Sulfoxide. *Biochem. Pharm.* **1997** 54, 1253-1260.
- ⁵ V. J. Zaldívar-Machorro, G. Garza-Ramos, P. Demare, I. Regla, R. A. Muñoz-Clares. "Structural Effects of the Chemical Modification of the Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* by Disulfiram and its Metabolites", 2nd Latin American Protein Society Meeting. Primer Congreso de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas. México, D.F., 4 a 8 de noviembre de **2007**.
- ⁶ Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. Brock. *Biología de los microorganismos*. 10a. ed. Ed. Pearson Prentice Hall. España. **2004**. pp. 368-371.
- ⁷ Pollard, A.; Wyn, J. Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. *Planta* **1979** 144:291-298.
- ⁸ Lippert, K.; Galinski, E. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992** 37:61-65.
- ⁹ Hanson, A. D.; Rhodes, D. ¹⁴C tracer evidence for synthesis of choline and betaine via phosphoryl base intermediates in salinized sugarbeet leaves. *Plant. Physiol.* **1983** 71:692-700.
- ¹⁰ D'Souza-Ault, M. R.; Smith, L. T.; Smith, G. M. Roles of N-acetylglutaminyl-glutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993** 59:473-478.
- ¹¹ Lisa, T. A.; Casale, C. H.; Doménech, C. E. Cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic conditions in a high-phosphate medium. *Curr. Microbiol.* **1994** 25:71-76.
- ¹² Muñoz, C. R.; Velasco, G. R. Genio y figura de la betaína aldehído deshidrogenasa. *Mensaje bioquímico*, **2004**, 28: 203-222.



- ¹³ Conway, T. T.; DeMaster, E. G.; Goon, D. J.; Shiota, F. N.; Nagasawa, H. T. Diethylcarbamoylating/nitroxylating agents as dual action inhibitors of aldehyde dehydrogenase: a disulfiram-cyanamide merger. *J. Med. Chem.* **1999** 42:4016-4020.
- ¹⁴ Nagasawa, T. Y.; Kagabata, Y.; Ogata, K. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agric. Biol. Chem.* **1976** 40:1743-1749.
- ¹⁵ Velasco, G. R.; González, S. L.; Muñoz, C. R. Steady-state kinetic mechanism of NADP⁺ and NAD⁺ dependent reactions catalyzed by betayne aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **1999** 352:675-683.
- ¹⁶ Velasco, G. R.; Mujica, J. C.; Mendoza, H. G.; Muñoz, C. R. Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1999** 181:1292-1300.
- ¹⁷ Farrés, J.; Wang, T.; Cunningham, J.; Weiner, H. Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **1995** 34:2592-2598.
- ¹⁸ Marchal, S.; Cobessi, D.; Rahuel, C. S.; Teté, F. F.; Aubry, A.; Briant, G. Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP⁺ dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Biol. Interact.* **2001** 130-132:15-28.
- ¹⁹ González, S. L.; Muñoz, C. R. El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas. *Rev. Educ. Bioq.* **2003** 22-1:2-10.
- ²⁰ Voet D. D., Voet J. G.; Bioquímica ; Ediciones Omega; Barcelona España; **1992**
- ²¹ Muñoz-Clares R. A, Valenzuela-Soto E. M., Advances in Protein Physical Chemistry, Betaine aldehyde dehydrogenases: Evolution, physiological functions, mechanism, kinetics, regulation, structure, and stability, García-Hernández E., (ed), **2008**, ISBN: 978-81-7895-324-3.
- ²² Hald, J.; Jacobensen, E.; Larsen V. The sensitizing effect of tetraethylthiuramdisulphide (Antabuse) to ethylalcohol. *Acta Pharmacol.* **1948** 4:285-296.
- ²³ Lundwall, L.; Bakeland, F. Disulfiram treatment of alcoholism. *J. Nerv. Ment. Dis.* **1971** 153:381-394.
- ²⁴ Kwo, P.Y.; Crabb, D. W. Ethanol and the liver. Mechanism and management. Taylor & Francis. U. S. A. **2002**. pp. 98-100.
- ²⁵ Cobby, J.; Mayersohn, M.; Selliah, S. The rapid reduction of disulfiram in blood and plasma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1977** 202:724-731.
- ²⁶ Wells, J.; Koves, E. Detection of carbon disulfide (a disulfiram metabolite) in expired air by gas chromatography. *J. Chromatogr.* **1974** 92:442-444.
- ²⁷ Vallari, R. C.; Pietruszko, R. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition by disulfiram. *Science* **1982** 216:637-639.



- ²⁸ Kitson, T. M. The effect of disulfiram on the aldehyde dehydrogenase of sheep liver. *Biochem. J.* **1975** 151:407-412.
- ²⁹ Kitson, T. M. Mechanism of inactivation of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Biochem. J.* **1983** 213:551-554.
- ³⁰ Hart, B. W.; Yourick, J. J.; Faiman, M. D. S-methyl-*N,N*-diethylthiolcarbamate: a disulfiram metabolite and potent rat liver mitochondrial low K_m aldehyde dehydrogenase inhibitor. *Alcohol* **1990** 7:165-9.
- ³¹ Johansson, B.; Petersen, E. N.; Arnold, E. Diethylthiocarbamic acid methyl ester: a potent inhibitor of aldehyde dehydrogenase found in rats treated with disulfiram or diethyldithiocarbamic acid methyl ester. *Biochem. Pharmacol.* **1989** 38:1053-1059.
- ³² Madan, A.; Faiman, M. D. NADPH-dependent, regioselective S-oxidation of a thionosulfur and thioether-containing xenobiotic, diethyldithiocarbamate methyl ester by rat liver microsomes. *J. Pharmacol.* **1994** 22:324-330.
- ³³ Hart, B. W.; Faiman, M. D. Bioactivation of S-methyl-*N,N*-diethylthiolcarbamate to S-methyl-*N,N*-diethylthiolcarbamate sulfóxide. Implications for the role of cytochrome p450. *Biochem. Pharmacol.* **1993** 43:2285-2290.
- ³⁴ Mays, D.C.; Nelson, N. A.; Fauq, A. H.; Lipsky, J. J. S-methyl *N,N*-diethylthiocarbamate sulfone, a potential metabolite of disulfiram and potent inhibitor of low K_m mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **1995** 49:693-700.
- ³⁵ Hart, B. W.; Faiman, M. D. *In vivo* pharmacodynamic studies of the disulfiram metabolite S-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamate sulfoxide: inhibition of liver aldehyde dehydrogenase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **1994** 18:340-345.
- ³⁶ Nagendra, S. N.; Madan, A.; Faiman, M. D. S-methyl-*N,N*-diethylthiolcarbamate sulfone, an *in vitro* and *in vivo* inhibitor of rat liver mitochondrial low K_m aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **1993** 47:1465-1467.
- ³⁷ Madan, A.; Parkinson, A.; Faiman, M. D. Identification of the human and rat p450 enzymes responsible for the sulfoxidation of S-methyl-*N,N*-diethylthiocarbamate (DETC-Me). The terminal step in the bioactivation of disulfiram. *Drug. Metab. Dispos.* **1995** 23:1153-11.
- ³⁸ Jin, L.; Davis, M. R.; Hu, P.; Baillie, T. A. Identification of novel glutathione conjugates of disulfiram and diethyldithiocarbamate in rat bile by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Evidence for metabolic activation of disulfiram *in vivo*. *Chem. Res. Toxicol.* **1994** 7:526-533.
- ³⁹ Hu, P.; Jin, L.; Baillie, T. A. Studies on the metabolic activation of disulfiram in rat. Evidence for electrophilic S-oxygenated metabolites as inhibitors of aldehyde dehydrogenase and precursors of urinary *N*-acetylcysteine conjugates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997** 281:611-617.
- ⁴⁰ Kitson, T. M. Effect of some thiocarbamate compounds on aldehyde dehydrogenase and implications for the disulfiram ethanol reaction. *Biochem. J.* **1991** 278:189-192.



- ⁴¹ Hart, B. W.; Faiman, M. D. *In vitro* and *in vivo* inhibition of rat liver aldehyde dehydrogenase by S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate sulfoxide, a new metabolite of disulfiram. *Biochem. Pharmacol.* **1992** 43:403-406.
- ⁴² Schloss, J. V. Therapeutic compositions. WO 03/053337 A2. **2003**.
- ⁴³ Velasco-García R., Zaldivar-Machorro V., Mújica-Jiménez C., González-Segura L., Muñoz-Clares R. A., Disulfiram irreversibly aggregates betaine aldehyde dehydrogenase—A potential target for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2006** 341:408–415.
- ⁴⁴ Gray, R. A.; Joo, G. K. Stauffer Chemical Co. S-methyl-N,N-diethylthiocarbamate as a selective herbicide in rice. US Pat. 4,582,528. **1986** April 15.
- ⁴⁵ Renoux G., Inmunofarmacología y farmacología del dietilditiocarbamato, *J Pharmacol*, **1982**; 13:95-134.
- ⁴⁶ Mizuno, T.; Iwai, T.; Ito, T., Practical synthesis of S-Akil thiocarbamate herbicides by carbonylation of amines with carbon monoxide and sulfur, *Tetrahedron* **2004**, 60, 2869-2873.
- ⁴⁷ Wynne, J. H.; Jensen, S. D.; Snow, A. W. Facile one-pot synthesis of S-alkylthiocarbamates. *J. Org. Chem.* **2002**, 68: 3733-3735.
- ⁴⁸ Nishiyama, Y.; Kawamatsu, H.; Sonoda, N. A facile method for the synthesis of thiocarbamates: palladium-catalyzed reaction of disulfide, amine and carbon monoxide. *J. Org. Chem.* **2005**, 70: 2551-2554.
- ⁴⁹ Oldham RK. Biological response modifiers program. Journal of biological response modifiers from Raven Press. **1982**; 1(1):81.
- ⁵⁰ Hersh EM, Funk C, Petersen EA, Moiser DE. Biological activity of dietilditiocarbamate in an animal model of retrovirus-induced immunodeficiency disease and clinical trials in patients with HIV infection. *Dev Biol Stand* **1990**;72:355-63.
- ⁵¹ Azizi N, Aryanasab F, Saidi M R, Straightforward and highly efficient catalyst-free one-pot synthesis of ditiocarbamates under solvent-free conditions, *Organic letters*, **2006** 8:23 5275-5277.
- ⁵² Hoyle, J. The chemistry of sulphones and sulfoxides, 3^a ed. John Wiley & Sons Lid, 1988. pp. 970-980.
- ⁵³ Bahrami, K. Selective oxidation of sulfides to sulfoxides and sulfones using hydrogen peroxide (H₂O₂) in presence of zirconium tetrachloride. *Tetrahedron. Lett.* **2006**, 47: 2009-2012.
- ⁵⁴ Hoyle, J. The chemistry of sulphones and sulphoxides. 3a ed. John Wiley & Sons Lid. **1988**. pp. 970-980.
- ⁵⁵ Faiman M, Hart B, United States Patent, 5,153,219, October 6, **1992**.
- ⁵⁶ Ramirez Z. M. R.; Síntesis de potenciales inhibidores de la betaina aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de licenciatura, UNAM, FES Zaragoza, **2007**.

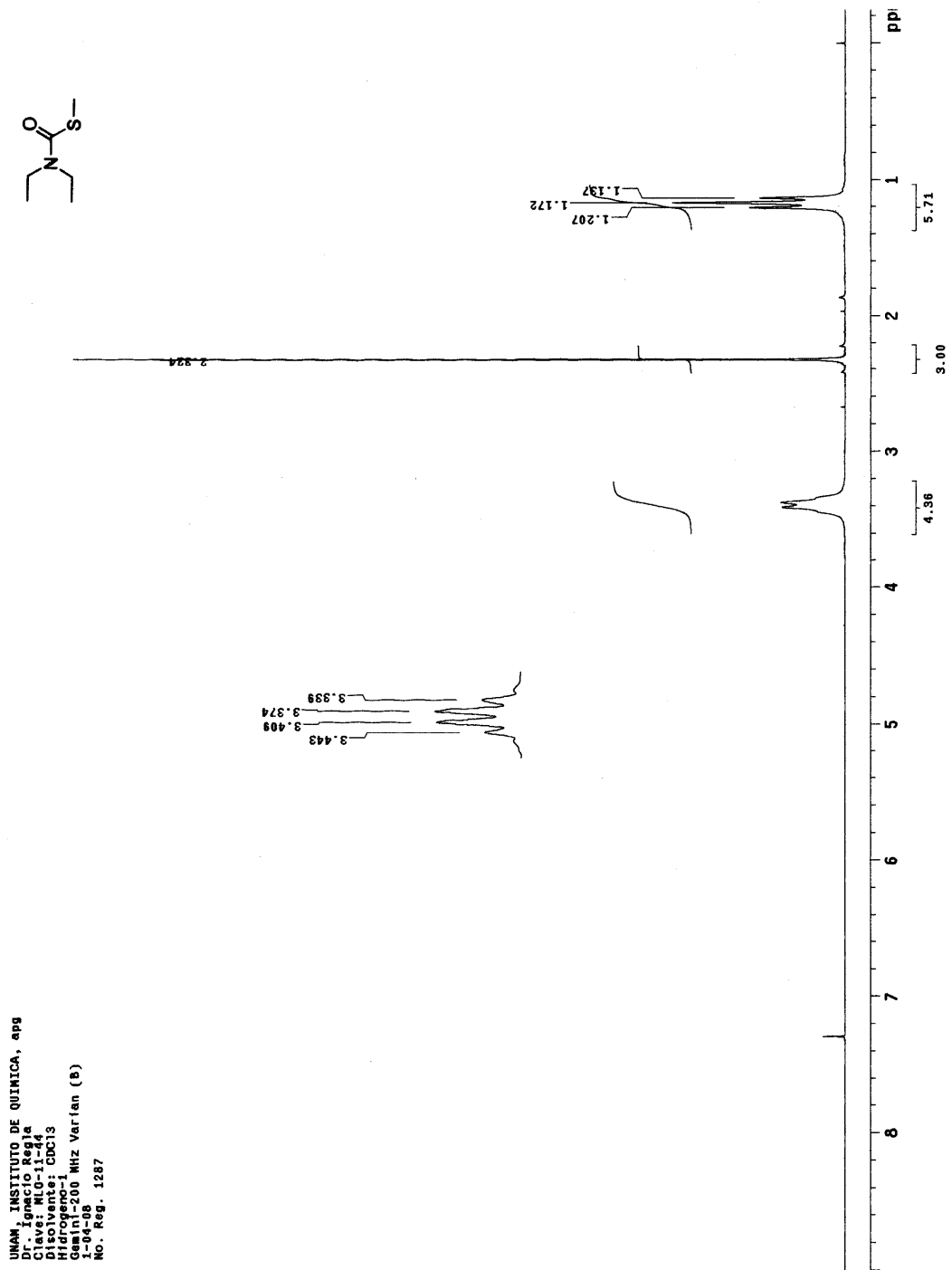


- ⁵⁷ Velasco R, Machorro V, Hervert D. Muñoz R, Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram, *Chemico-Biological Interactions*, **2003**, 143-144.

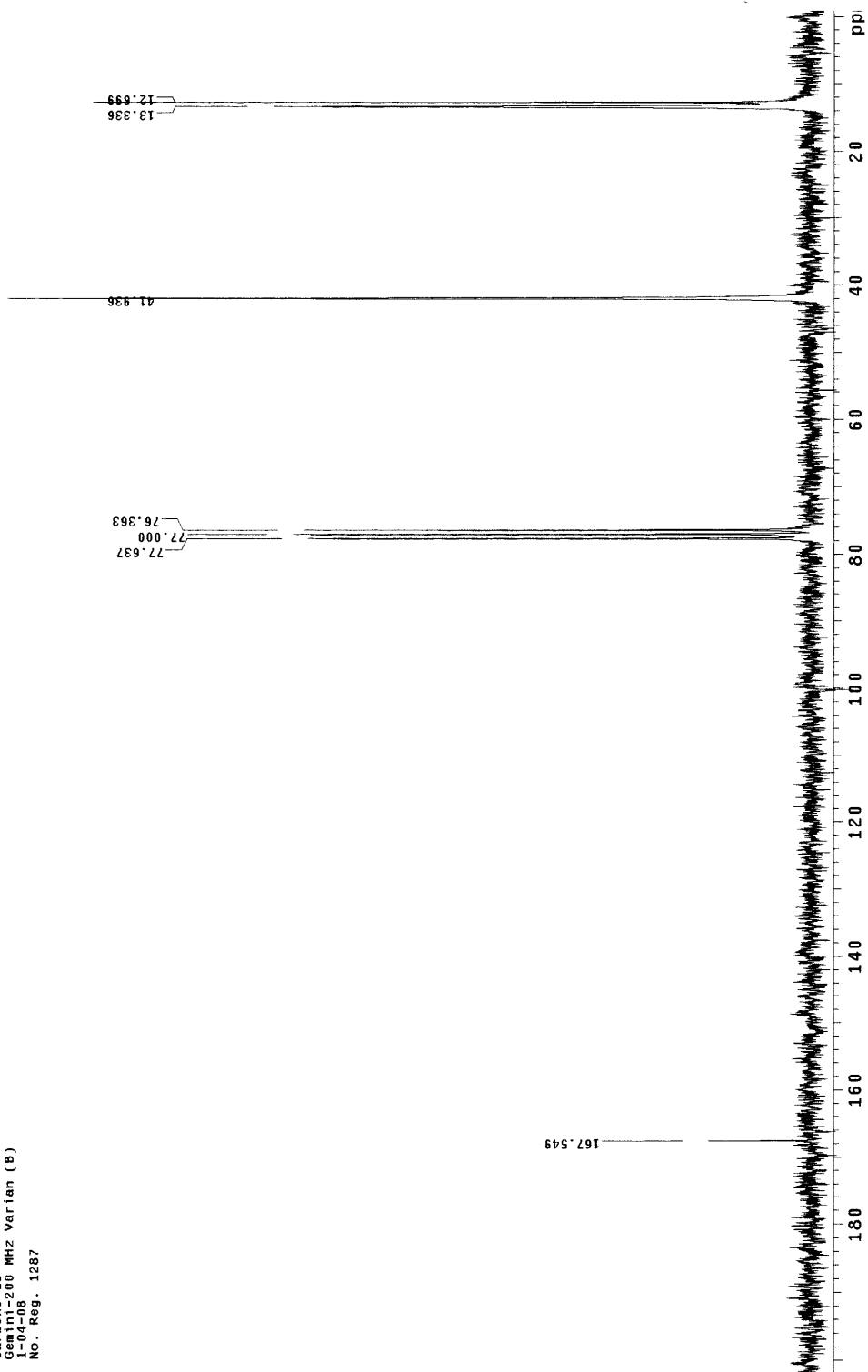
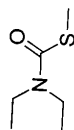


12. ANEXO

12.1. S-metil-N,N-dietiltiocarbamato (1).

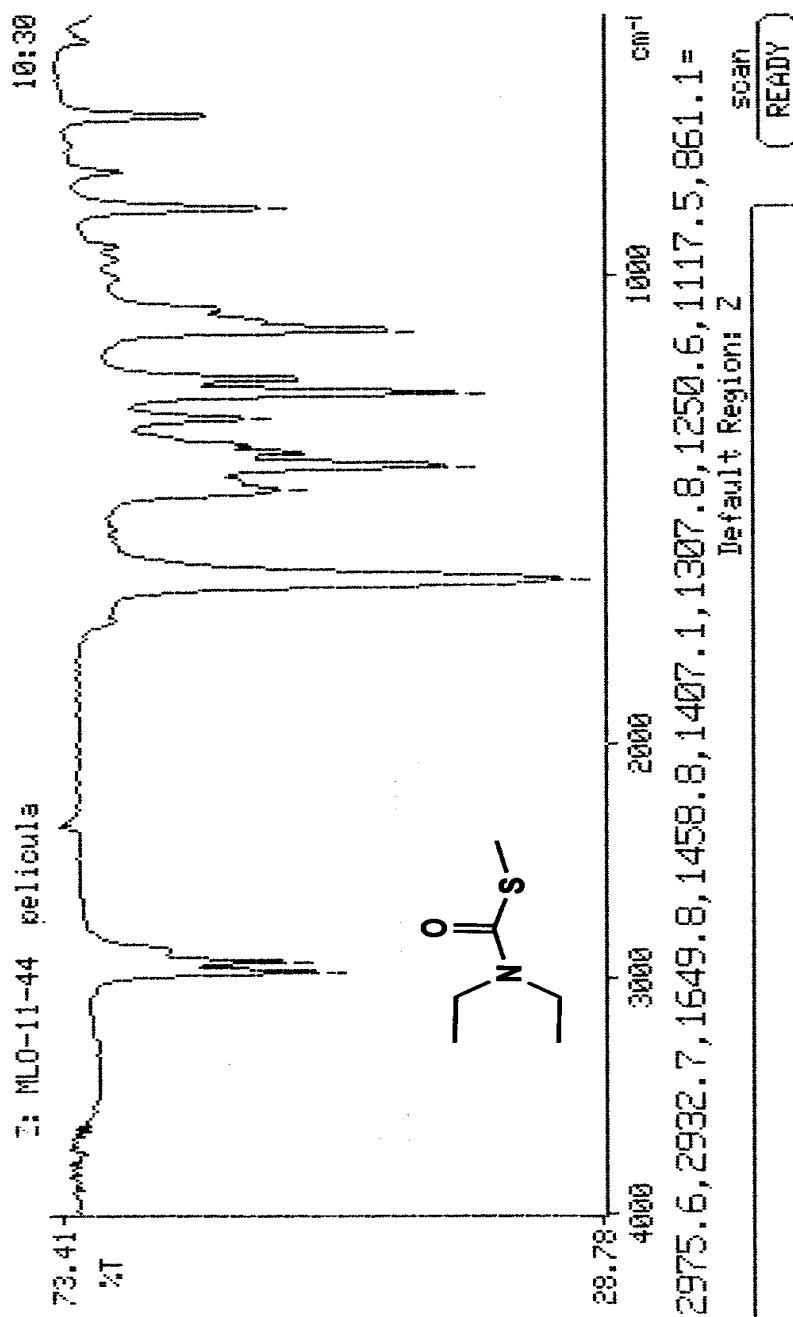


Espectro 12.1.1. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃, TMS).



UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
Dr. Ignacio Regla
Clave: MLO-11-44
Disolvente: CDCl₃
Carbono-13
Gemini 200 MHz Varian (B)
40-48g
No. Reg. 1287

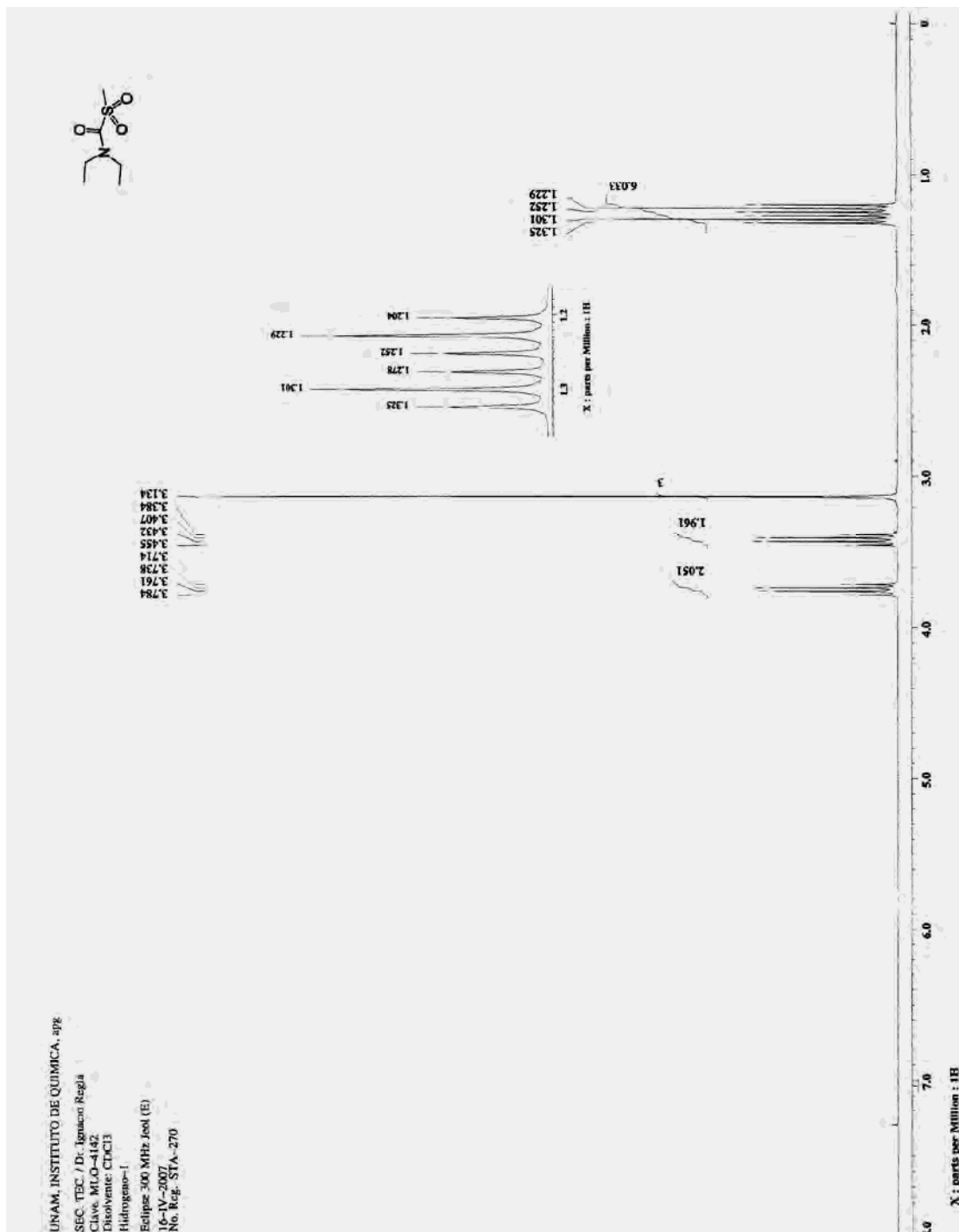
Espectro 12.1.2. RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃, TMS).



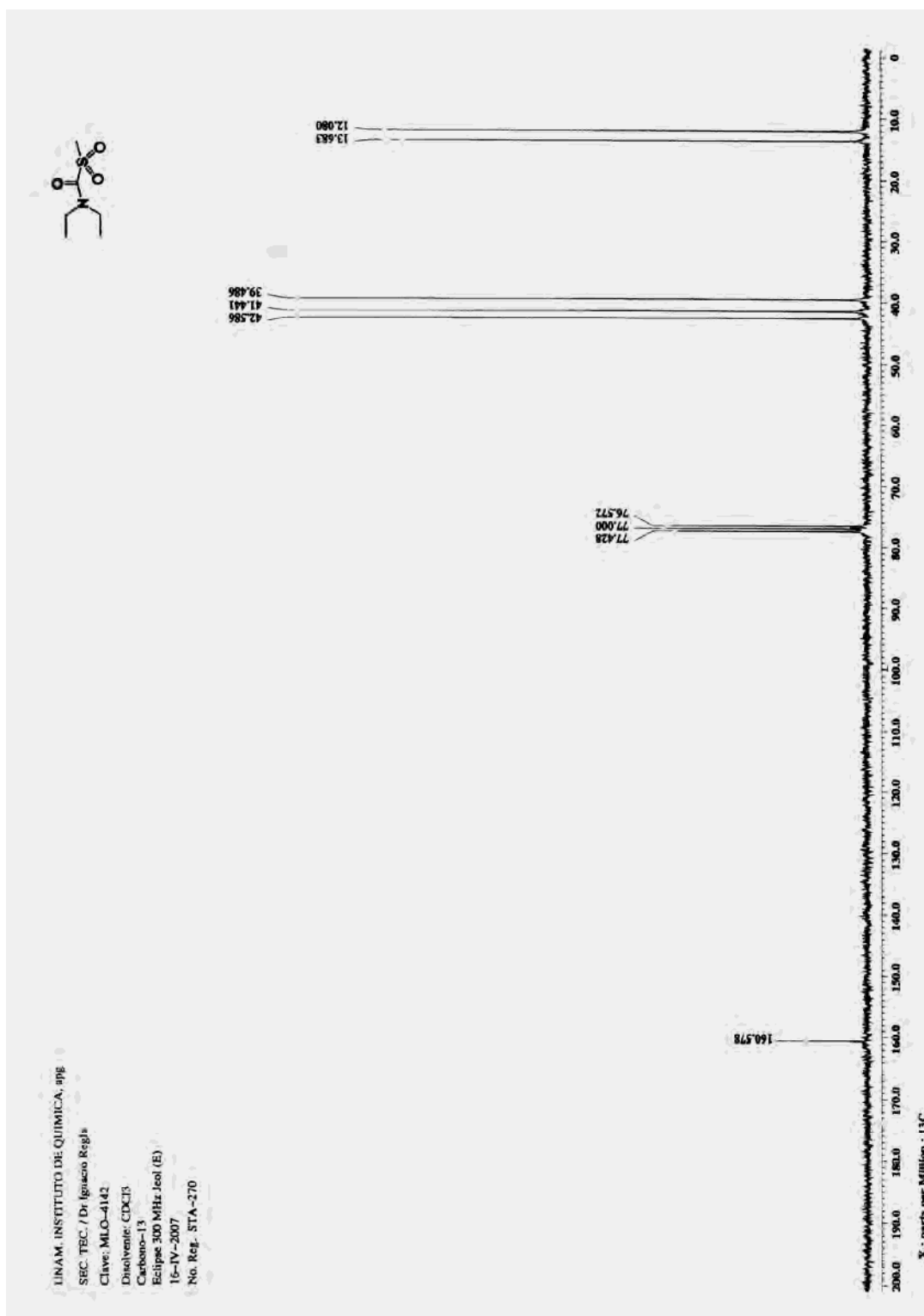
Espectro 12.1.3. IR (pelicula).



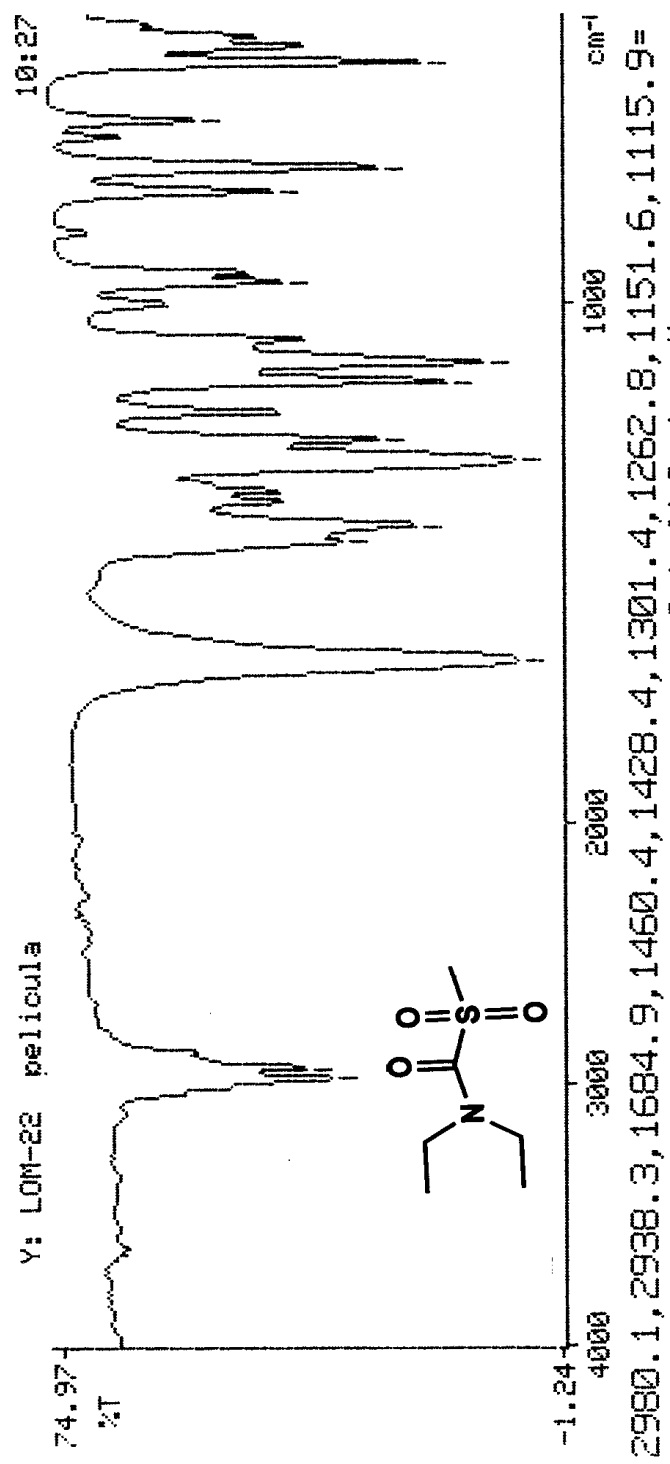
12.2. S-metil-N,N-dietiltiocarbamato-S-dióxido (2).



Espectro 12.2.1. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS).



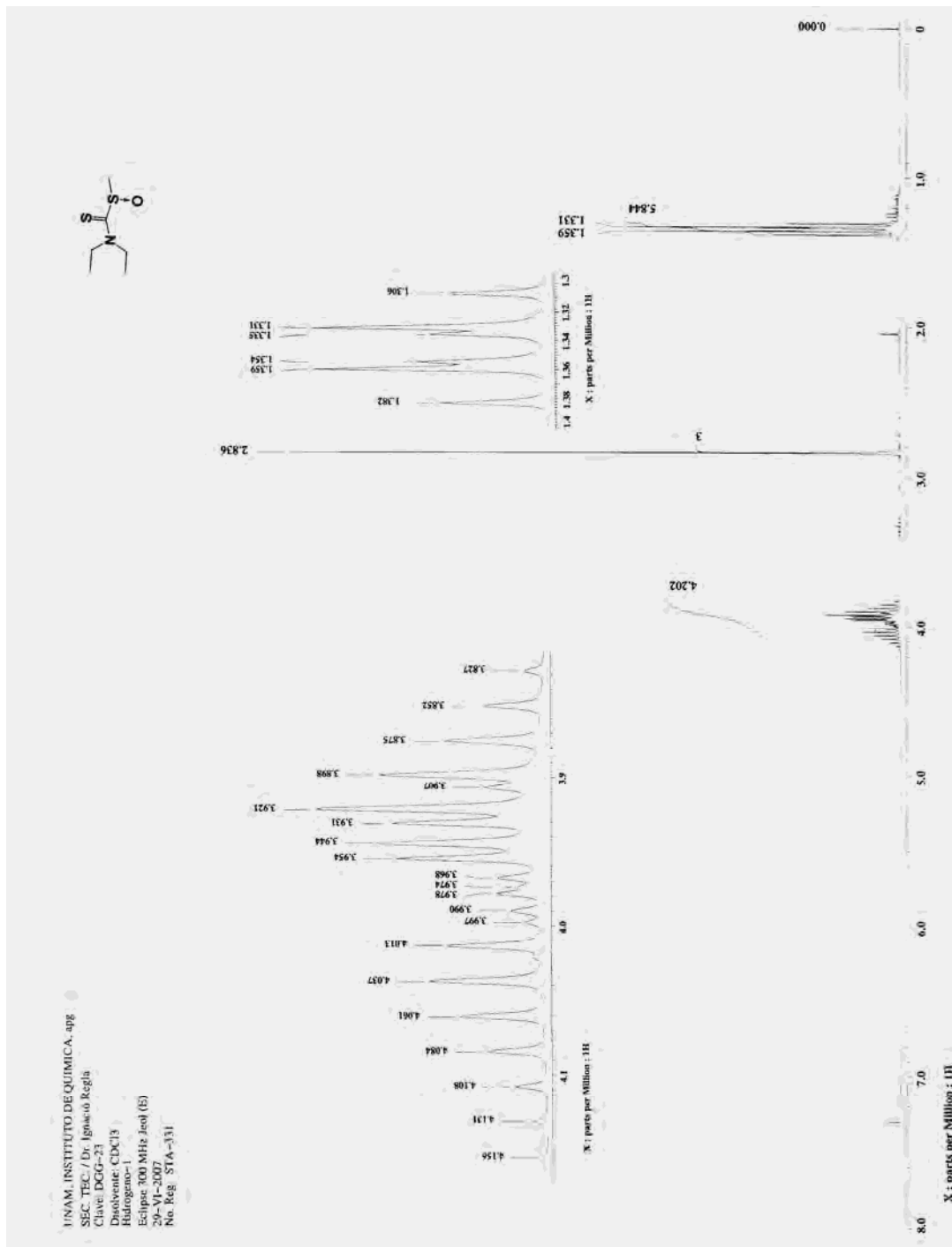
Espectro 12.2.2. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS).



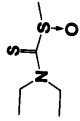
Espectro 12.2.3. IR (película).



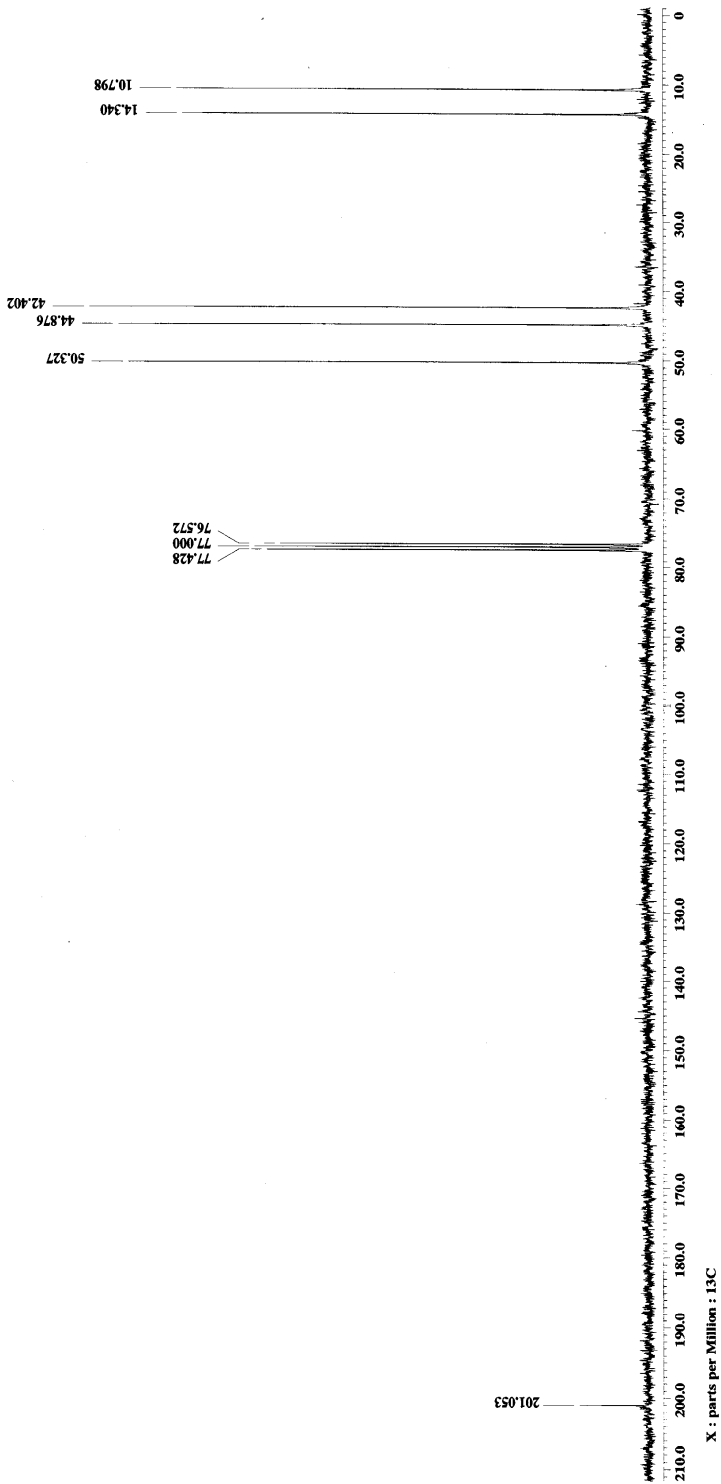
12.3. S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-óxido (3).



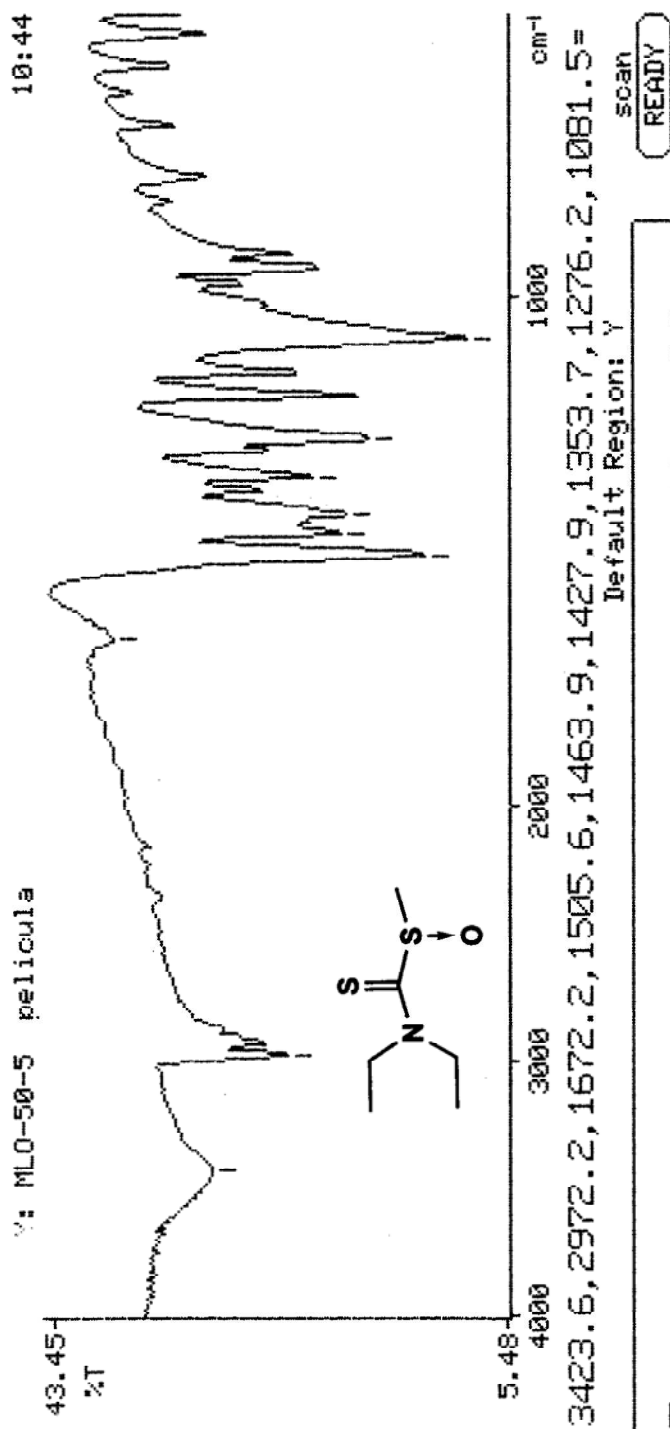
Espectro 12.3.1. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS).



UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
SEC. TEC. / Dr. Ignacio Regia
Clave: DGG-23
Disolvente: CDCl₃
Carbono-13
Eclipse 300 MHz jeol (E)
29-VI-2007
No. Reg. STA-331



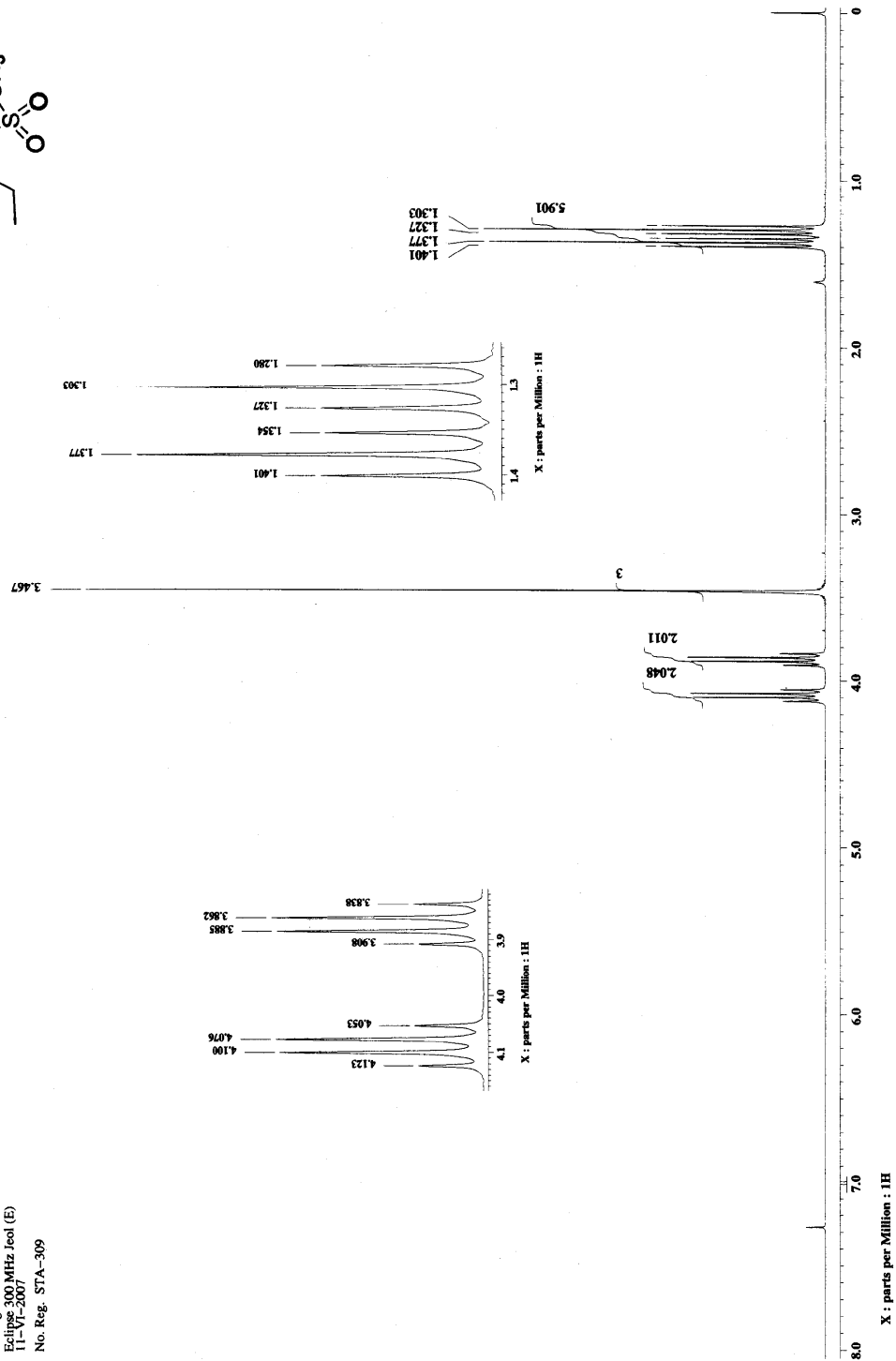
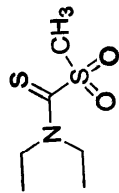
Espectro 12.3.2. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS).



Espectro 12.3.3 IR (película).

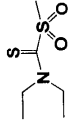


12.4. S-metil-N,N-dietilditiocarbamato-S-dióxido (4).

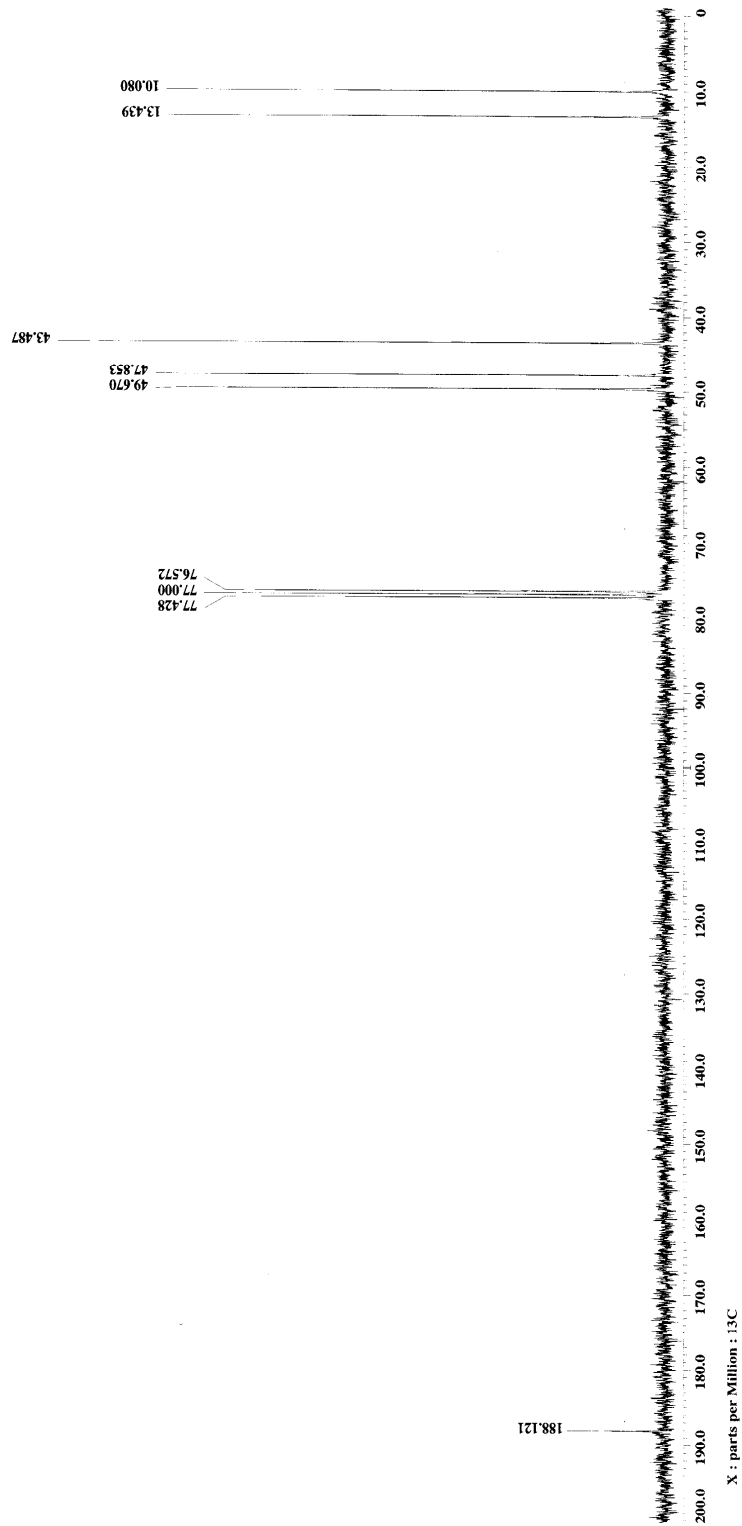


UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, 486
SEC. TEC. / Dr. Ignacio Regla
Clave: MLO-II-47
Disolvente: CDCl₃
Hidrogeno-1
Ecuipos: 300 MHz Jeol (E)
11-VI-2007
No. Reg. STA-309

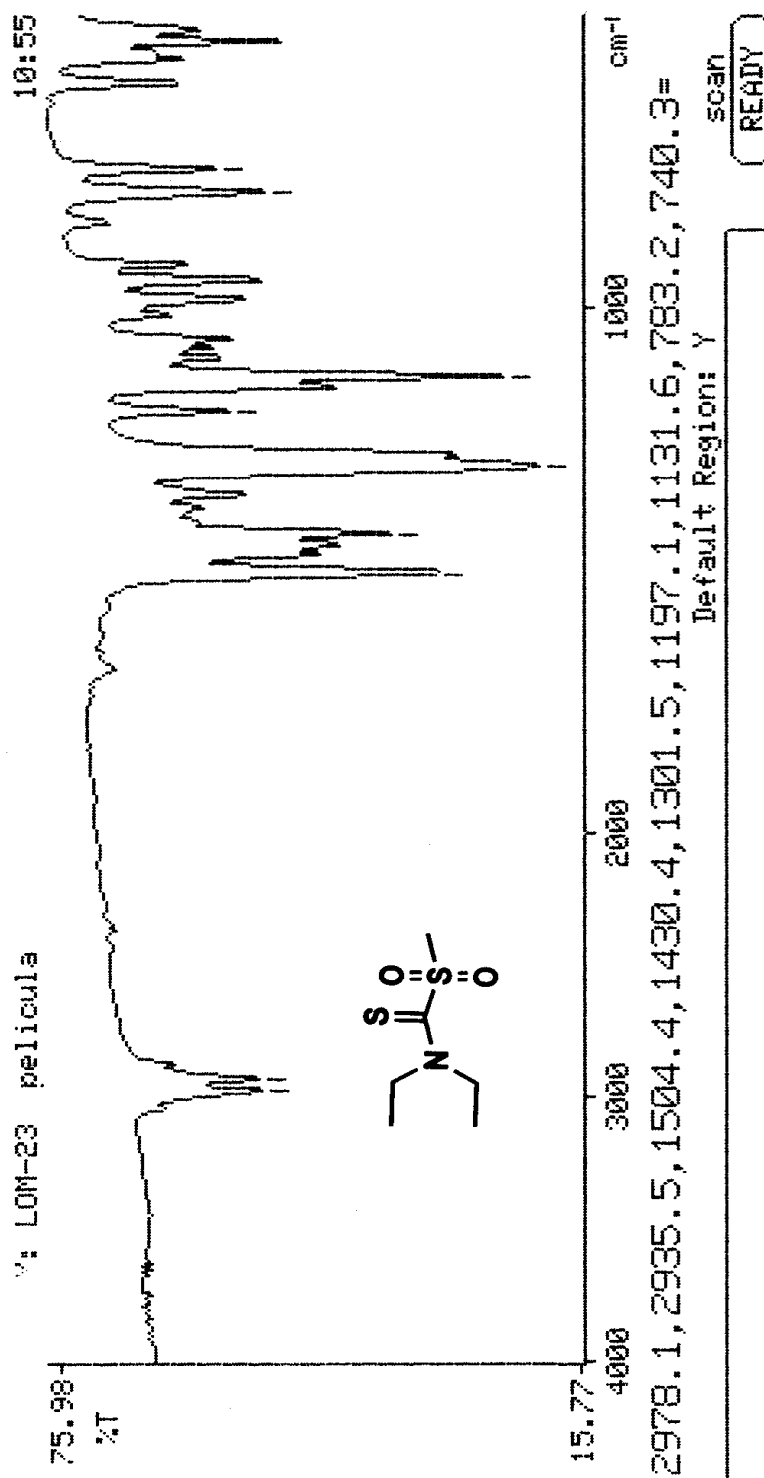
Espectro 12.4.1. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS).



UNAM, INSTITUTO D QUIMICA, apg
SEC. TEC. / Dr. Ignacio Regia
Clave: MLO-II-47
Disolvente: CDCl₃
Carbono-13
Eclipse 300 Mhz Teol (E)
11-VI-2007
No. Reg. STA-309



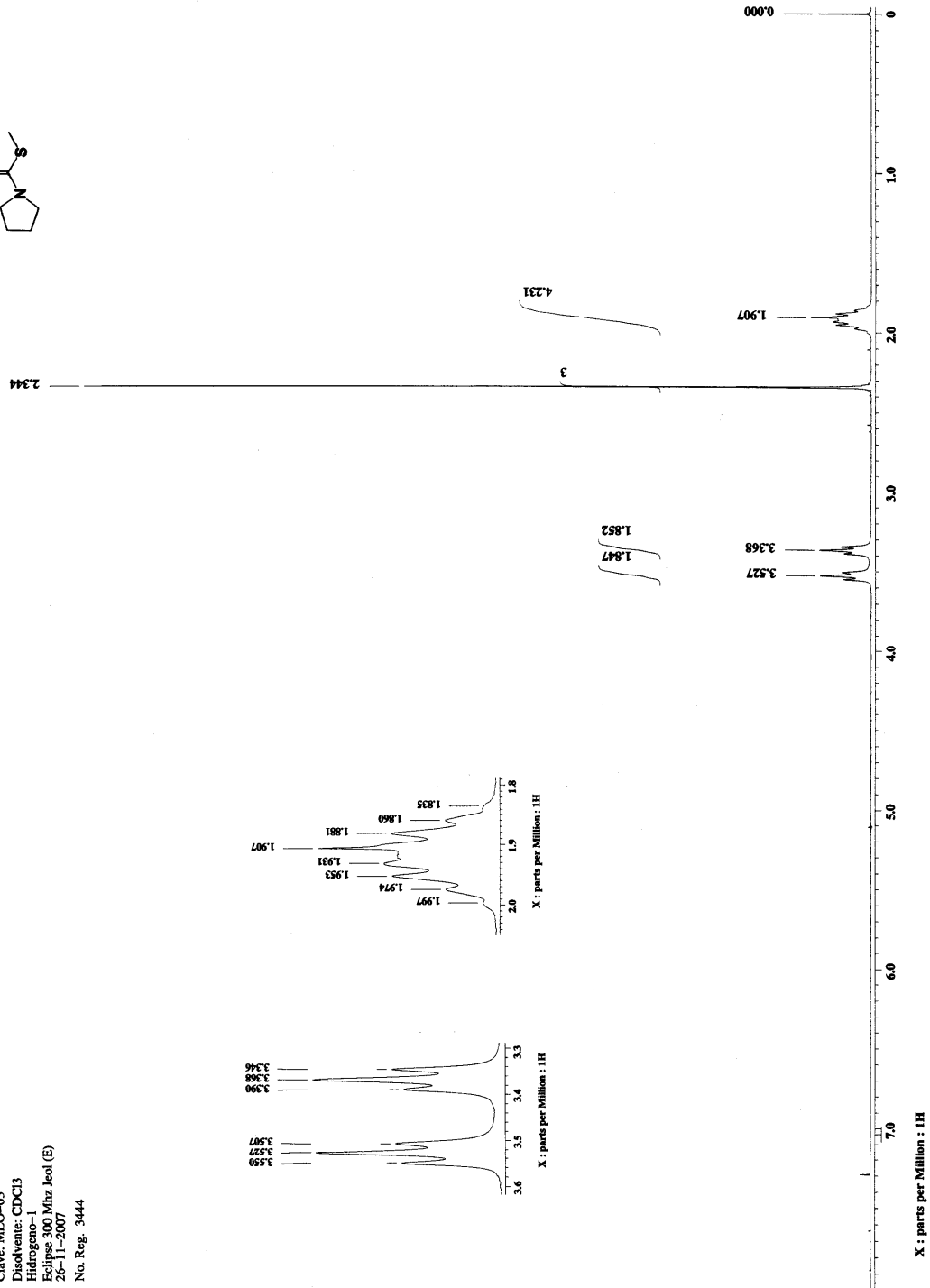
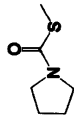
Espectro 12.4.2. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS).



Espectro 12.4.3. IR (película).

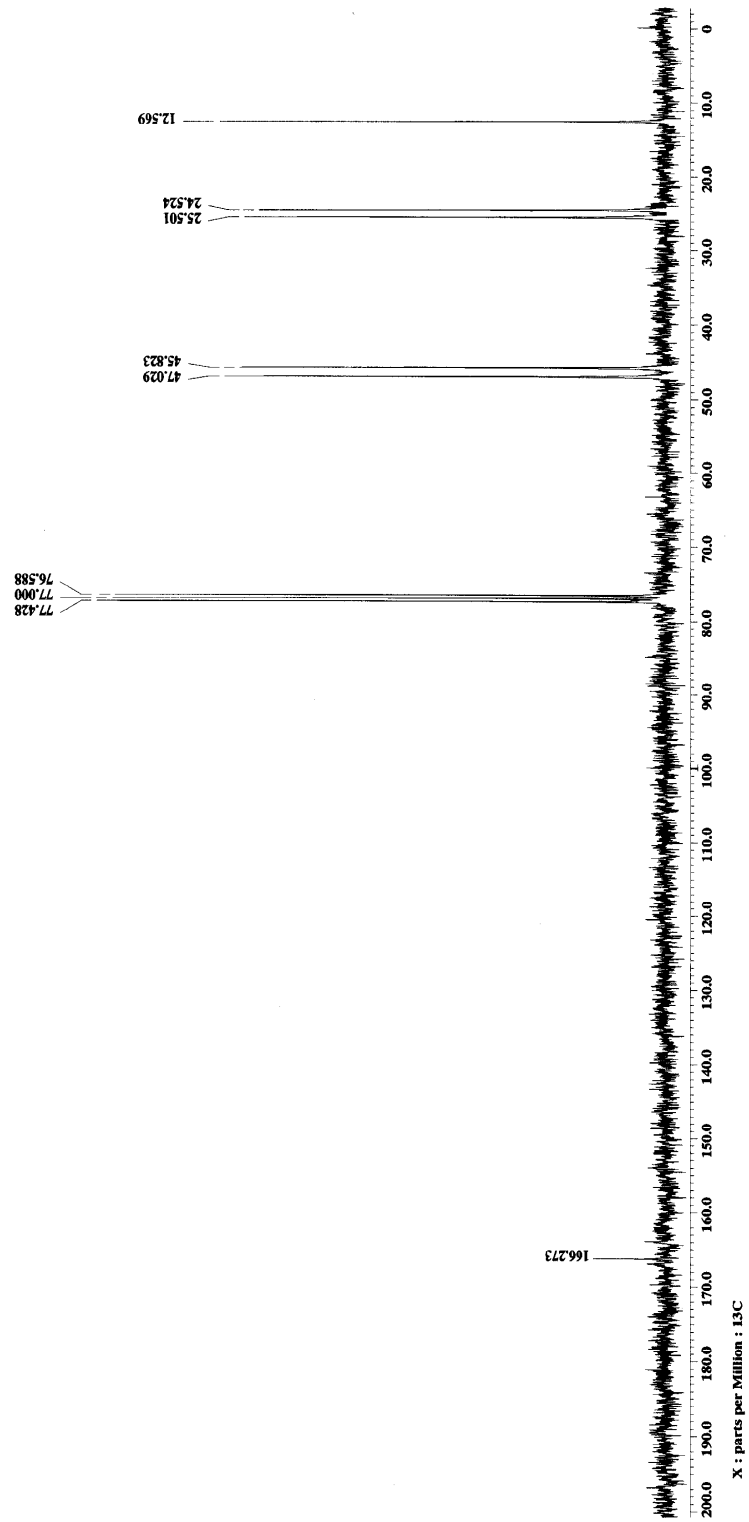
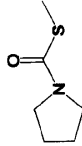


12.5. S-metil-pirrolidiltiocarbamato (5)



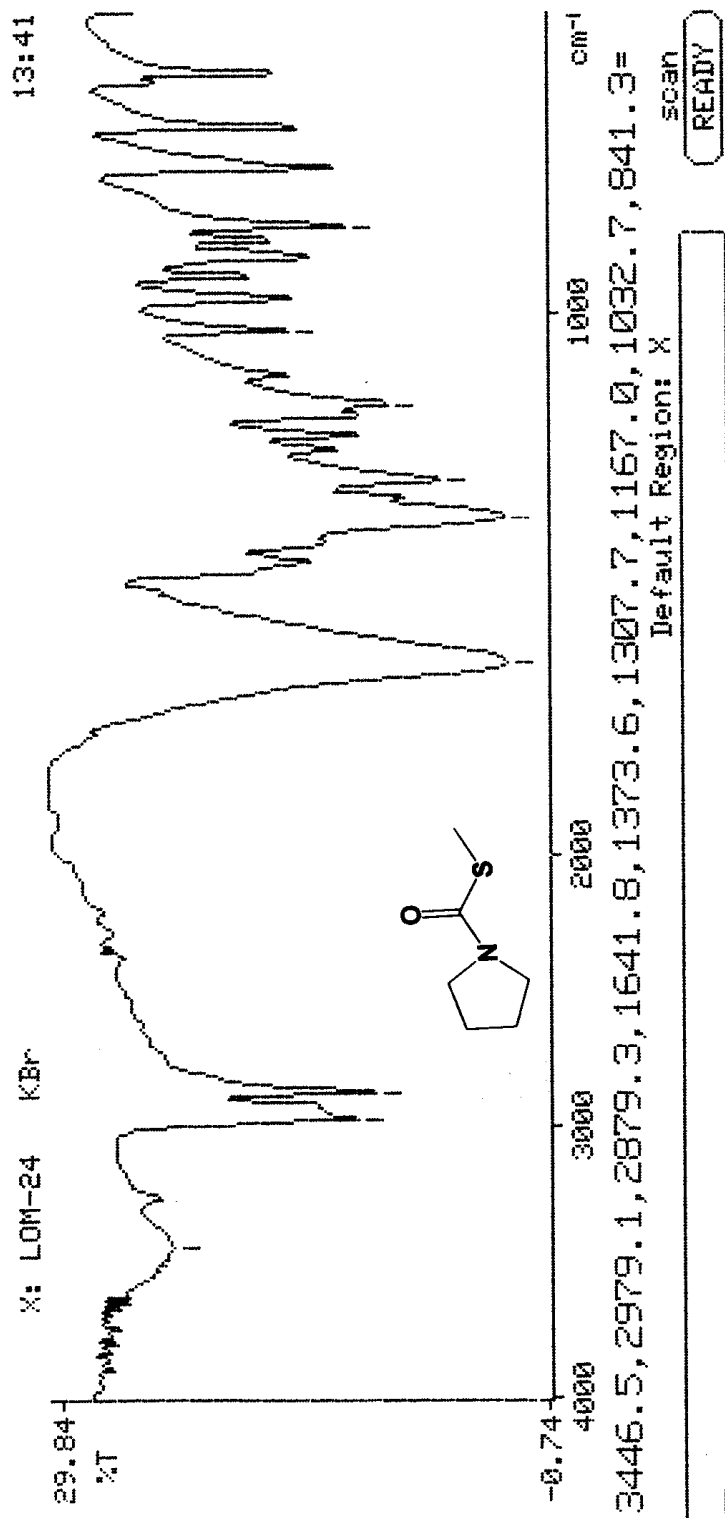
UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, 498
Dr. Ignacio Regla
Clave: MLO-63
Disolvente: CDCl₃
Eltromagn.: 1
Ez: 200 Mhz Jeol (E)
20-11-2007
No. Reg. 3444

Espectro 12.5.1. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS).



UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
Dr. Ignacio Regla
Clave: MI.O.-63
Disolvente: CDCl3
Carbóno-13
Eclipse 300 MHz Jeol (E)
26-11-2007
No. Reg. 3444

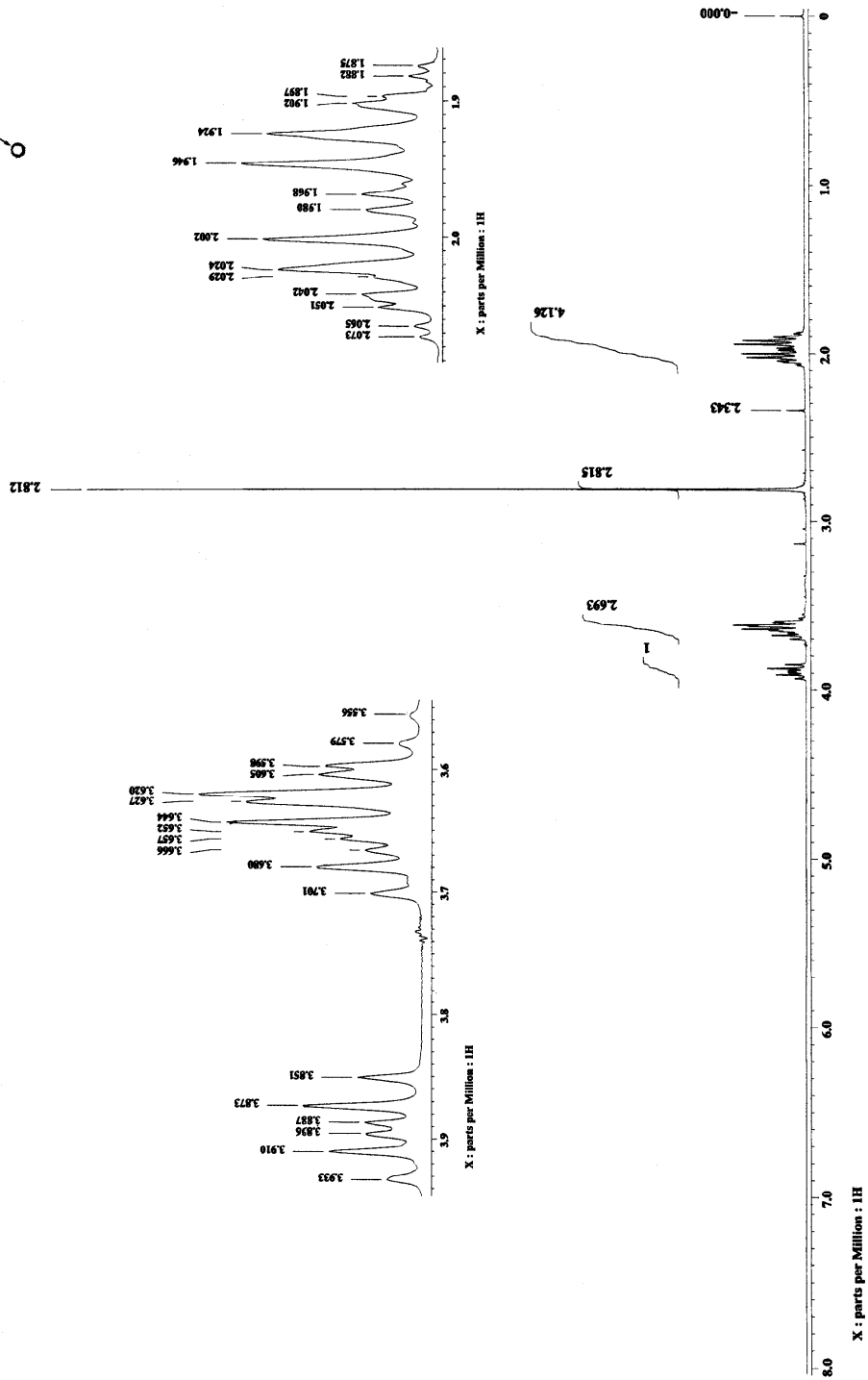
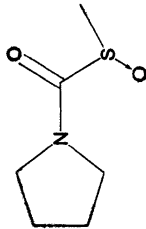
Espectro 12.5.2. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS).



Espectro 12.5.3. IR (KBr).

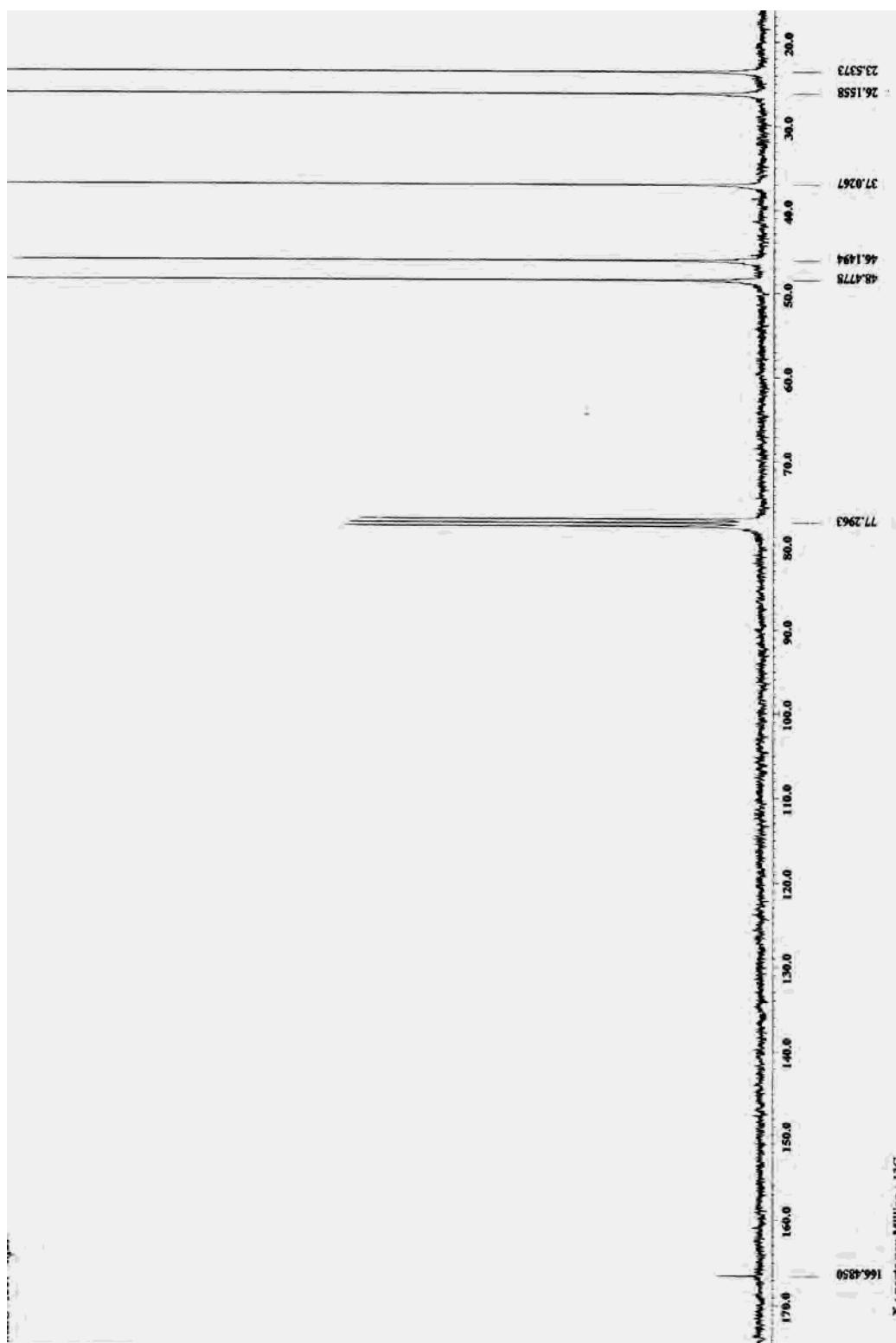


12.6. S-metil-pirrolidiltiocarbamato-S-óxido (6).

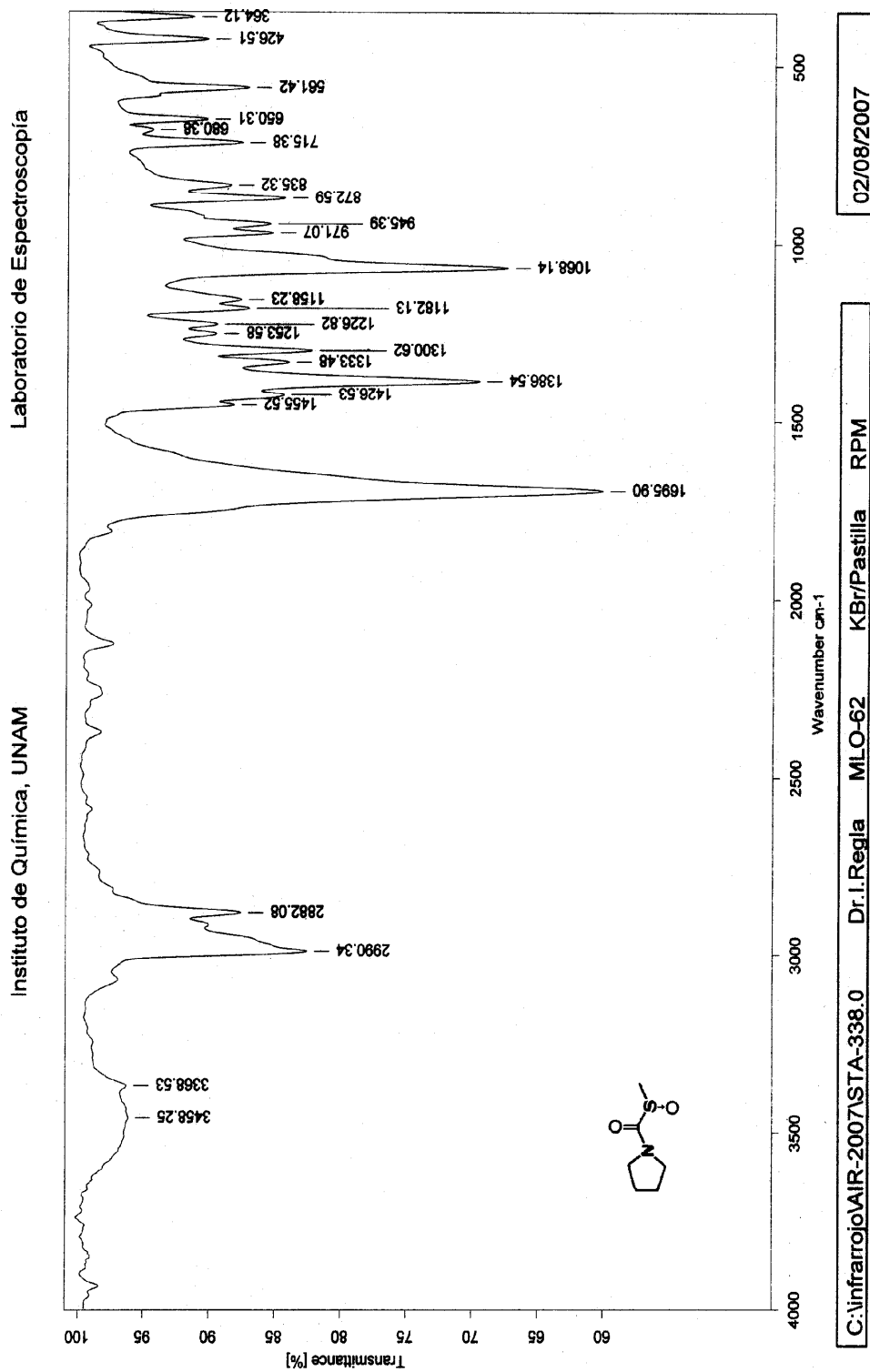


UNAM: INSTITUTO DE QUIMICA, apg
Dr. Ignacio Regla
Clave: MLO-68
Disolvente: CDCl3
Instrumento: Bruker
Equipos: 300 MHz Jeol (E)
S-X-2007
No. Reg. 2798

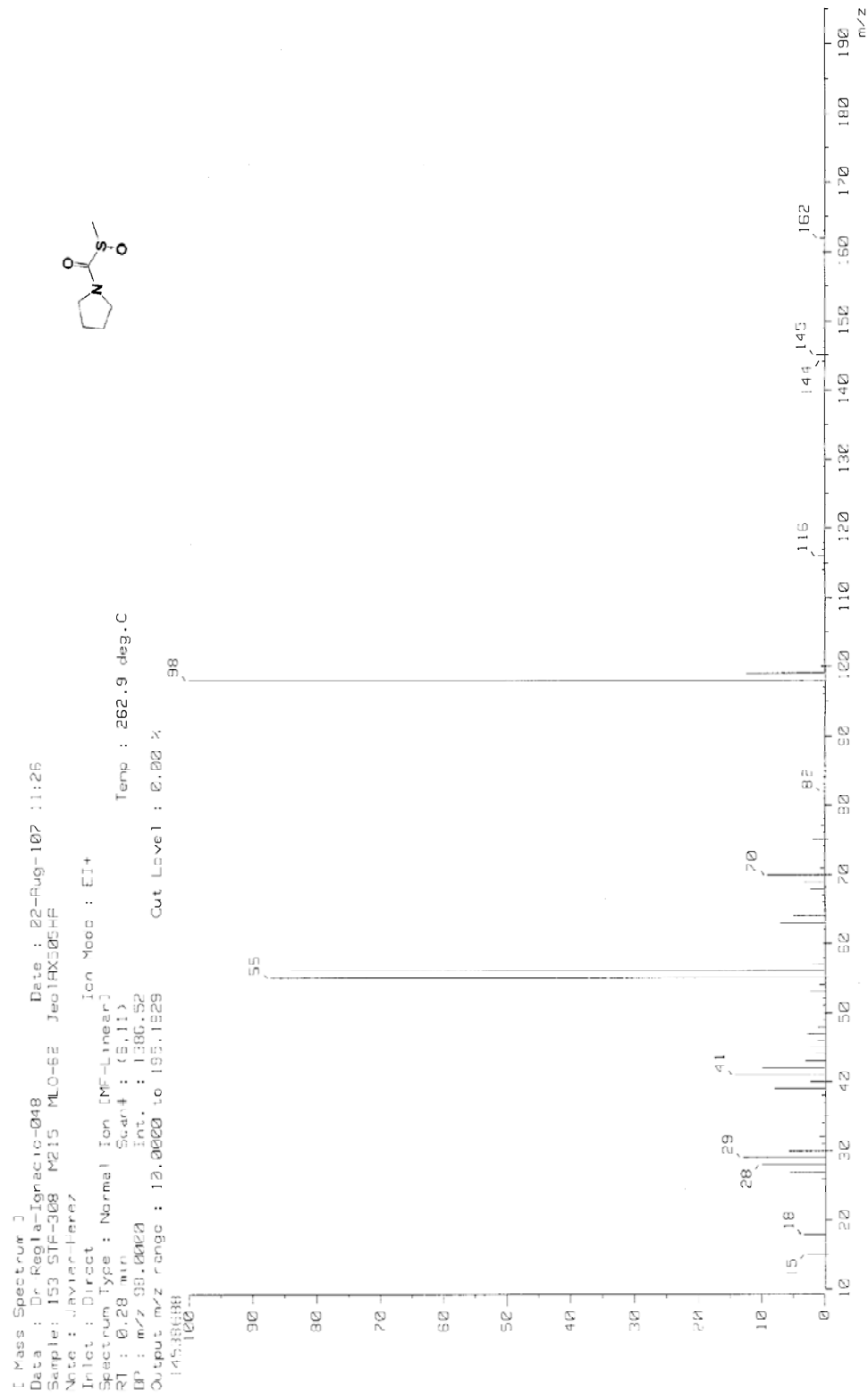
Espectro 12.6.1. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS).



Espectro 12.6.2. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , TMS).



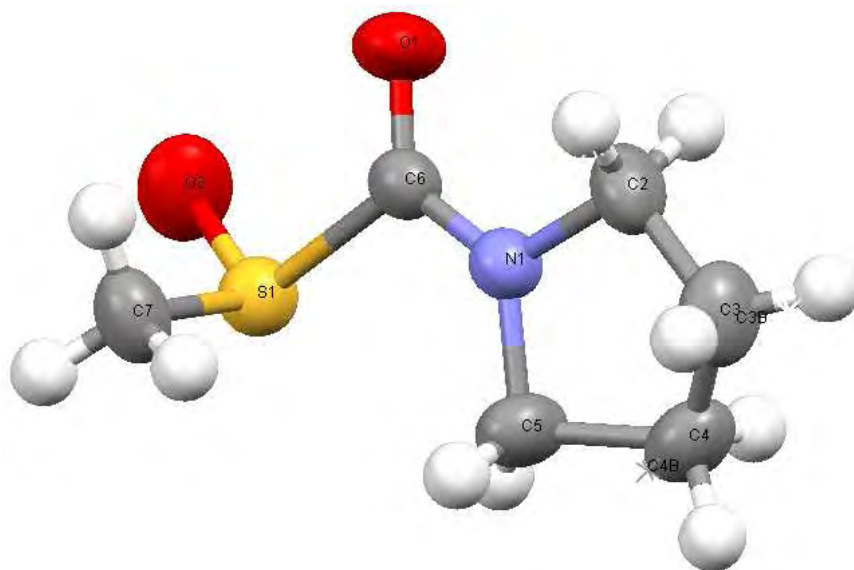
Espectro 12.6.3. IR (KBr).



Espectro 12.6.4. EM (EI) m/z(%)M⁺.

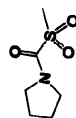
**Tabla 12.6.1.** Datos Cristalográficos de *S*-metil-pirrolidiltiocarbamato-*S*-dióxido (7).

Fórmula empírica	C ₆ H ₁₁ NO ₂ S
Masa molecular	161.22
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Grupo espacial	$a = 11.057 (5) \text{ \AA}$ $b = 10.993 (5) \text{ \AA}$ $c = 12.871 (6) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90^\circ$
Volumen	1564.5 (13) \AA^3
Tamaño de cristal	0.336 x 0.274 x 0.096 mm ³
<i>R</i> 1	0.0422 (<i>wR</i> 2 = 0.1014)

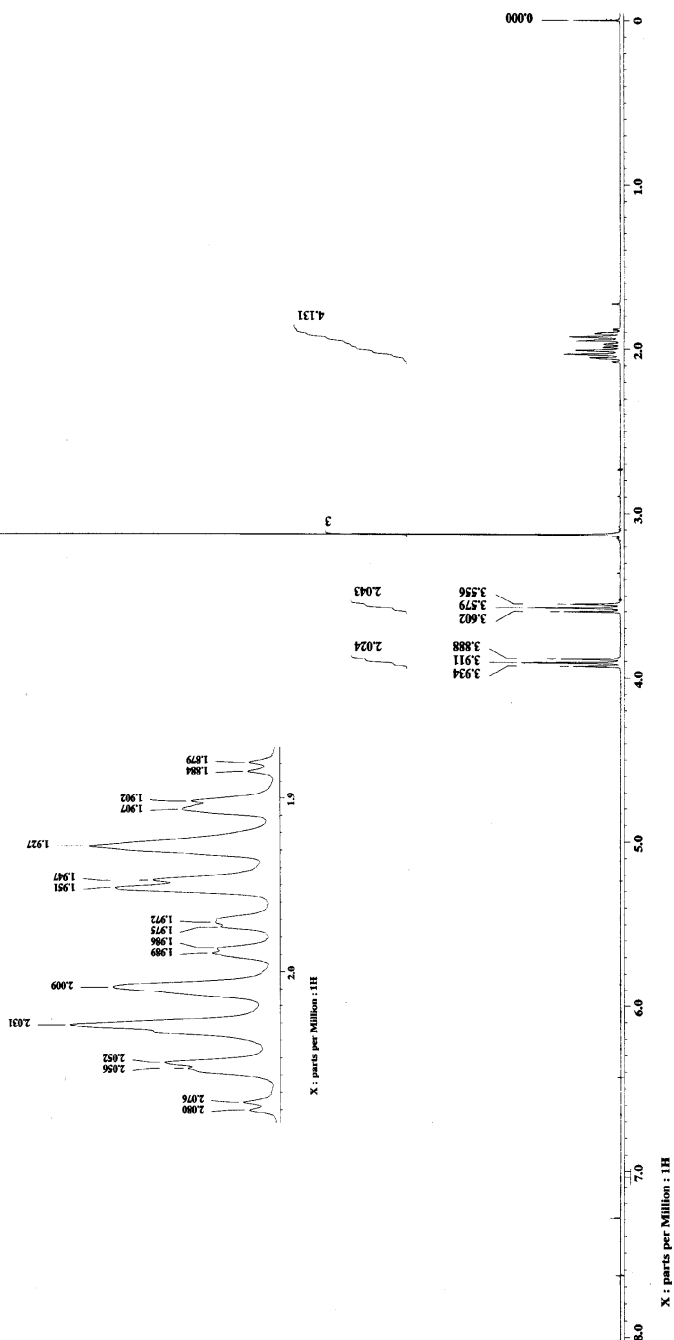




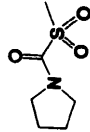
12.7. S-metil-pirrolidiltiocarbamato-S-dióxido (7).



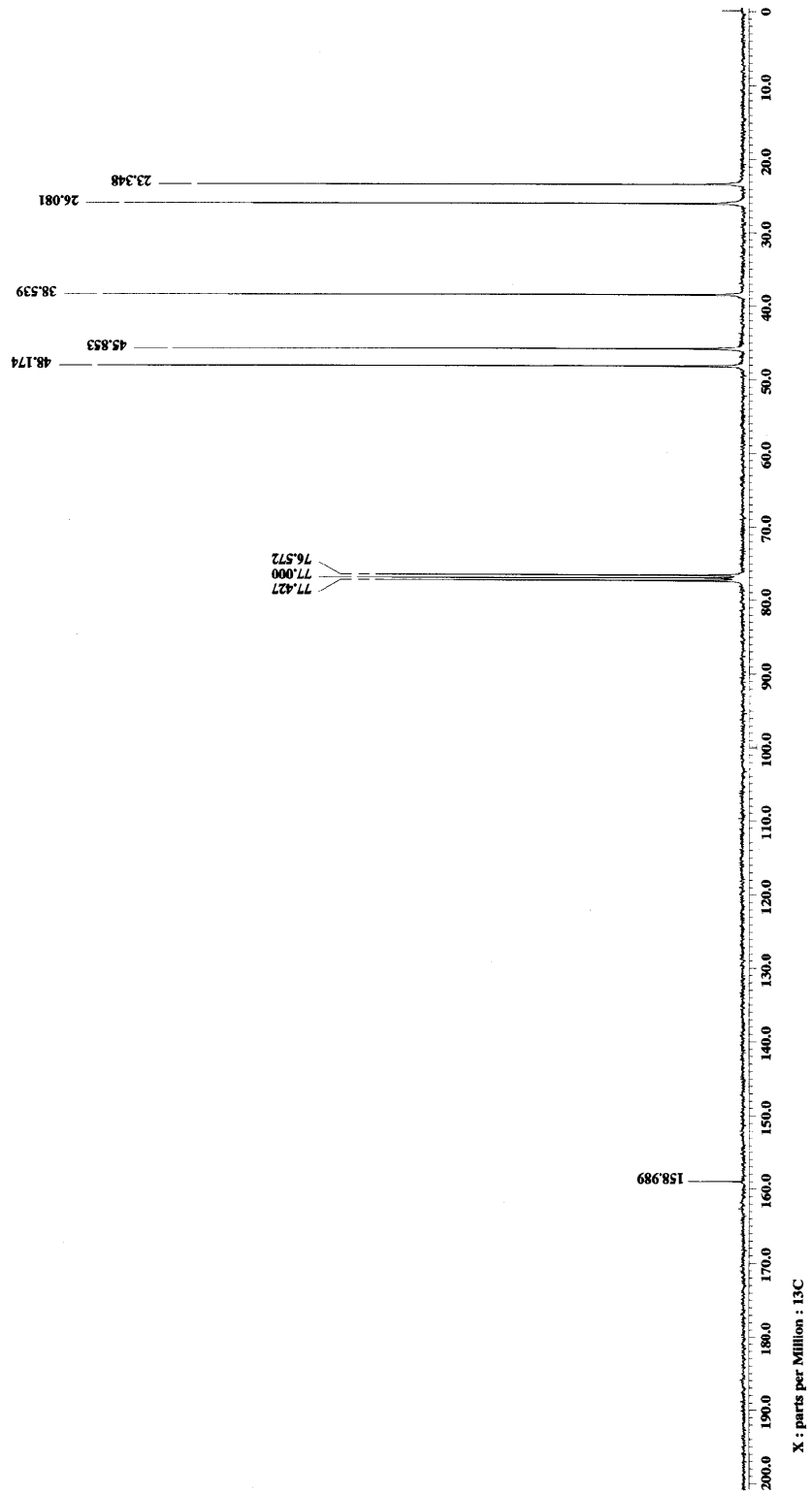
UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apq
Dr. Ignacio Regla
Clave: LOM-16
Disolvente: CDCl₃
Hidrogeno-1
Eclipse 300 MHz Jeol (E)
3-12-2007
No. Reg. 3506



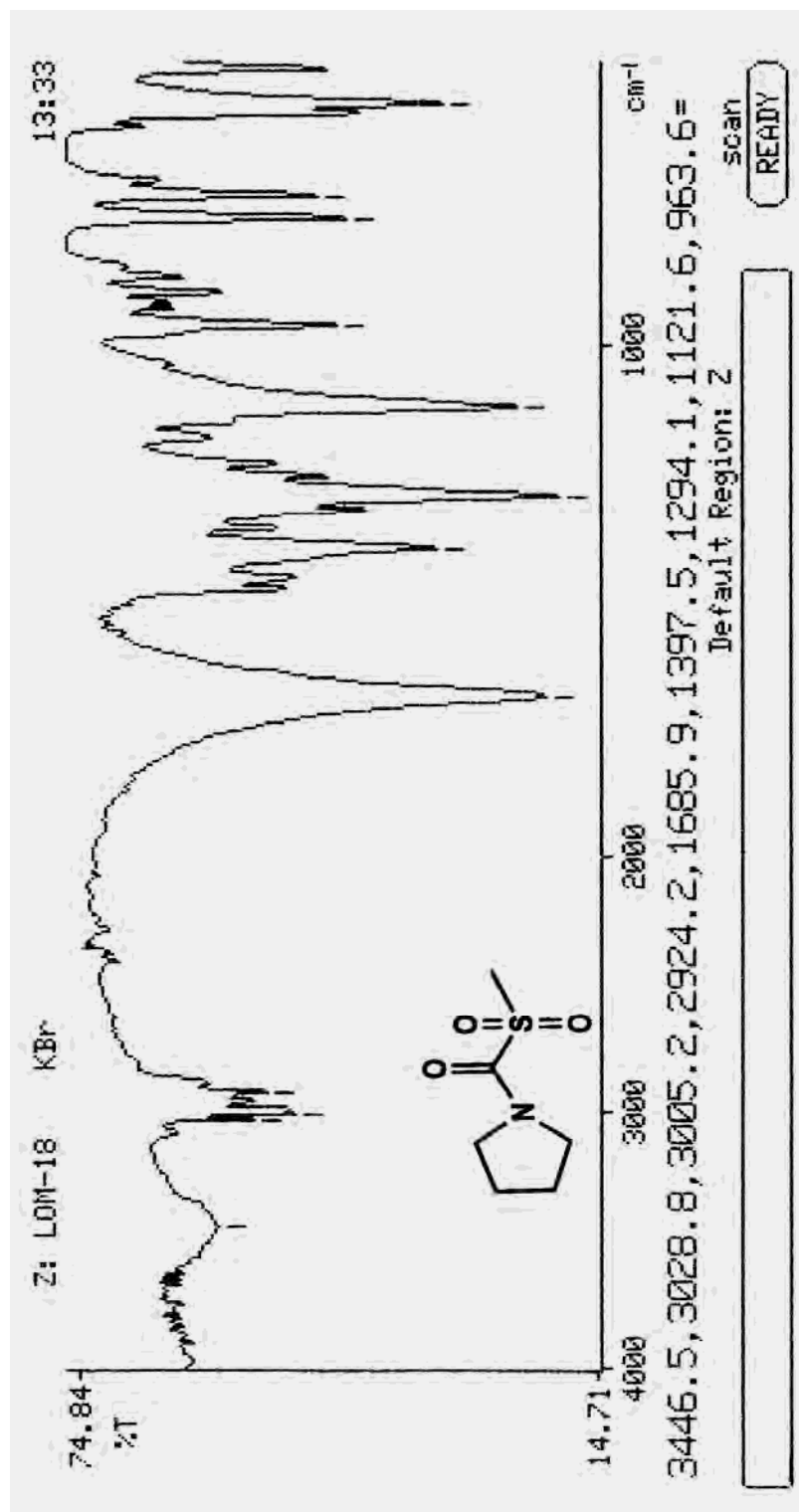
Espectro 12.7.1. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS).



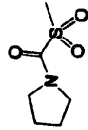
UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
Dr. Ignacio Regla
Clave: LOM-16
Disolvente: CDCl₃
Carbóno-13
Eclipse: 300 Mhz Jeol (E)
3-12-2007
NO. Reg. 3506



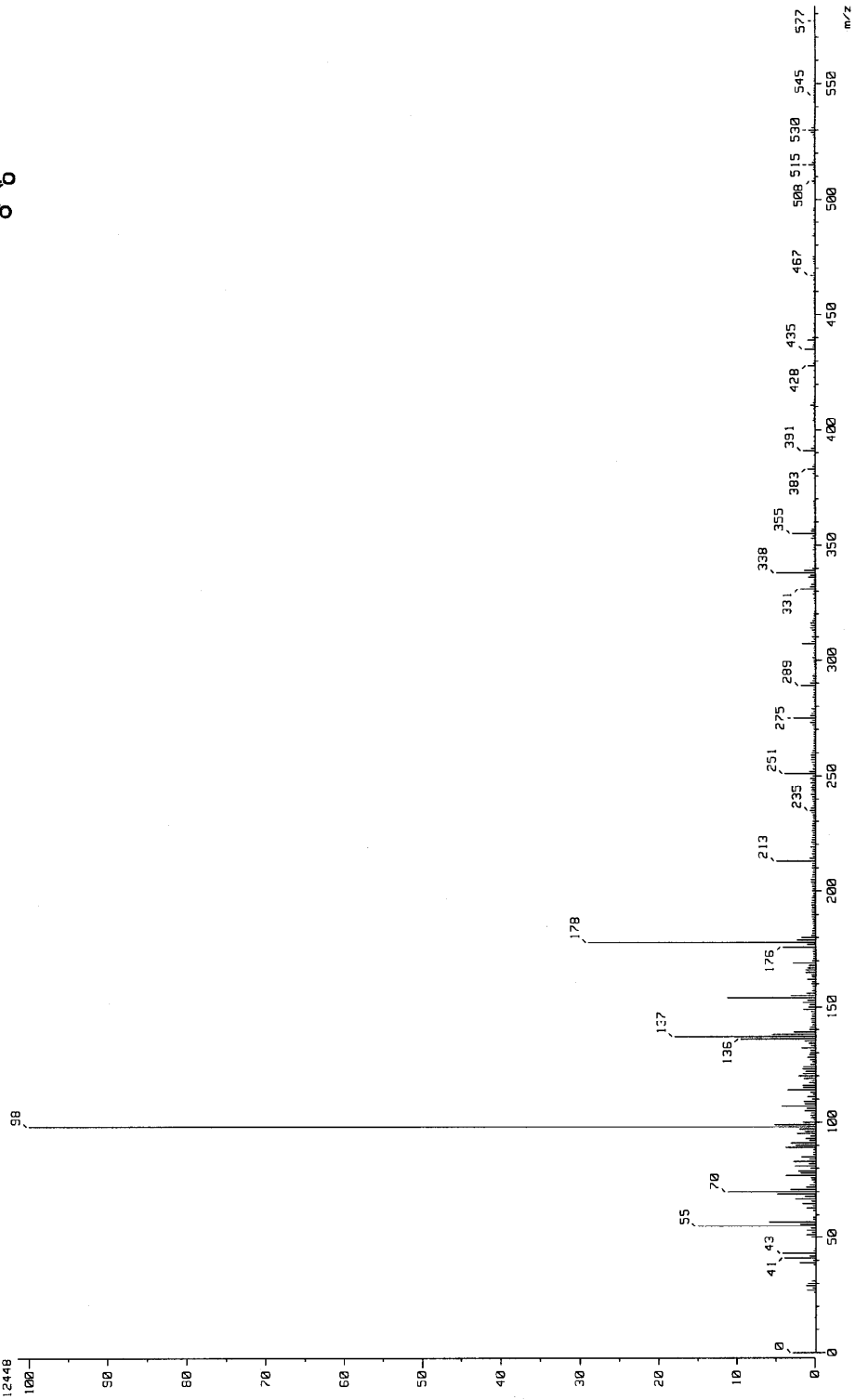
Espectro 12.7.2. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, TMS).



Espectro 12.7.3. IR (KBr).



[Mass Spectrum]
Data : D:\ignacio\Regla\08 Date : 30-Jun-2008 17:13
Sample: 1714 LOM-18 Jeol-102
Note : Luis-Velasco
Inlet : Direct Ion Mode : FRET
Spectrum type : Normal Ion [M⁺-1, peak]
SI : 1.24 min Scan# : (3,6)
BP : m/z 98.6002 Int. : 146.51
Output m/z range : 0.0000 to 593.5512 Cut Level : 0.00 %
15812446



Espectro 12.7.4. EM (FAB⁺) m/z(%)M⁺.



ABREVIATURAS

ALDH	Aldehído deshidrogenasa
BADH	Betaína aldehído deshidrogenasa
NADP ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
GSH	Glutation
DETC-Me	S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato
DETC-MeSO	S-metil- <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato-S-óxido
DECOS-Me	S-metil- <i>O</i> -(<i>N,N</i> -dietilcarbamoil)sulfenato
DETC-MeSO ₂	<i>N,N</i> -dietiltiocarbamato-S-metil-S-dióxido
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
MHz	Mega Hertz
TMS	Trimetilsilano
T. a.	Temperatura ambiente
CCF	Cromatografía en capa fina
p. eb.	Punto de ebullición
p. f.	Punto de fusión
lbs/pulg ²	Libras por pulgada cuadrada
δ	Desplazamiento químico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
EM	Espectrometría de masas
m/z	Relación masa carga