

Ex No. 22

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

SINTESIS Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DEL  
2-AMINO-4-METIL-5-CARBOETOXITIAZOL Y DERIVADOS

T E S I S

LORENZO PEREZ PEREZ

Q U I M I C O

1984



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.

## CONTENIDO

1.	Introducción	1
	1.1. Fotosíntesis	3
	1.1.1. Reacciones Fotoquímicas	5
	1.1.2. Modo de Acción de los Herbicidas que Interfieren con la Fotosíntesis	11
	1.2. Química de los 2-Aminotiazoles	17
2.	Objetivo	22
3.	Hipótesis	22
4.	Métodos de Evaluación de Herbicidas	23
	4.1. Modelo Elegido; Cloroplastos Aislados	24
	4.2. Interacción con el PSII	25
5.	Parte Experimental	27
	5.1. Aparatos	27
	5.1.2. Substancias y Materiales	28
	5.2. Parte Química	29
	5.2.1. Síntesis	30
	5.2.2. Resultados. Espectros de IR y RMN	32
	5.3. Parte Biológica	45
	5.3.1. Aislamiento de Cloroplastos	45
	5.3.2. Pruebas Biológicas	46
	5.3.3. Inhibición del transporte de electrones por las Substancias Sintetizadas.	48
	5.3.4. Resultados	50

6.	Discusión de Resultados	52
6.1.	Síntesis	52
6.2.	Parte Biológica	54
7.	Conclusiones	57
8.	Bibliografía	59

## 1. INTRODUCCION

A finales de la década de los 70's el gobierno de los Estados Unidos inició la elaboración de un estudio sobre los cambios probables que habría en el mundo durante el resto del siglo en materia de la población, recursos naturales y ambiente. Este informe serviría de base para la planificación a largo plazo del gobierno estadounidense. el resultado fue un trabajo interdisciplinario cuyo título es "El mundo en el año 2,000, Informe al Presidente". En el capítulo de este informe referente a los alimentos, - las proyecciones del estudio indican que la mayor parte de la producción alimentaria se obtendrá mediante el empleo más intensivo de insumos que aumenten el rendimiento agrícola y utilicen en forma más intensiva la energía y tecnologías tales como la fertilización, aplicación de plaguicidas, herbicidas y riego. Según las proyecciones la extensión de las tierras labrantías aumentaría solo el 4% para el año 2,000 pues la mayor parte de las tierras fértiles ya se encuentran cultivadas. Esto significa que prácticamente con la misma extensión de tierras fértiles se tendrá que alimentar a un número mayor de personas. Si a principios de los años setentas una hectárea de tierra servía para el sostenimiento de 2.6 personas, para el año 2,000 esta misma hectárea tendrá que alimentar a 4 personas. Solamente se alcanzará esta meta si las tierras se -

vuelven más productivas (1).

Desde principios de la historia las malezas han sido un factor limitante en la obtención de alimentos. Se calcula que se pierde actualmente, del 25 al 70% de la producción anual de alimentos en el mundo, por la invasión de malezas esto equivale a que en promedio se pierden 13 millones de toneladas de alimentos por año (2). Las malezas no solo interfieren con la productividad de la tierra sino que también incrementan los costos de las operaciones agrícolas:

- En los EUA se remueven  $250 \times 10^9$  toneladas de tierra por año para preparar al campo y uno de los principales motivos es controlar a las malezas.

- Compiten directamente con el cultivo por los nutrientes, el agua del suelo y por la luz.

- Compiten por los fertilizantes y el agua de riego.

- Interfieren con la maquinaria empleada en la cosecha y pueden llegar a bloquear los canales de riego.

Los altos rendimientos necesarios en las cosechas se lo gran controlando a las malezas antes de la germinación del cultivo (3).

Para el control de las malezas se han empleado muchos métodos a lo largo de la historia tales como: control manual, mecánico, biológico y químico, este último es el que en mayor proporción ha reducido los costos de operación.

El uso de agentes químicos en el control de las malezas data de la antigüedad, se han empleado entre otros: cloruro

de sodio, ácido sulfúrico, arsenito de sodio, clorato de sodio ; a partir de la II Guerra Mundial se han venido desarrollando herbicidas orgánicos sintéticos.

El modo de acción de estos herbicidas es difícil de determinar pues pueden afectar a la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de proteínas, la síntesis de carotenoides o la síntesis de lípidos en las plantas; al afectar a uno de estos procesos generalmente se alteran los otros desencadenando una serie de eventos de modo que es difícil señalar al sitio de acción primario, Los herbicidas que se emplean más ampliamente son aquellos que interfieren con el proceso de la Fotosíntesis.

### 1.1. FOTOSINTESIS

El proceso donde se sintetizan carbohidratos a partir de  $\text{CO}_2$  y agua en presencia de luz se conoce como fotosíntesis y es característico de las plantas verdes. Consecuentemente, los herbicidas que inhiben específicamente este proceso pueden considerarse como relativamente no tóxicos para los mamíferos. El proceso es extremadamente complicado y muchos de sus detalles aún no se comprenden. A continuación se considerará como los herbicidas interfieren con la fotosíntesis y la relación existente entre la inhibición de es

ta y la fitotoxicidad. La inhibición de la fotosíntesis -  
causada por herbicidas se manifiesta en la reproducción, -  
desarrollo, estructura e integridad de los cloroplastos, -  
organelos donde se presenta este fenómeno.

El cloroplasto tiene su propio material genético y es -  
capaz de sintetizar algunas de las proteínas necesarias -  
para su funcionamiento. Dentro del cloroplasto hay un sis-  
tema complejo de membranas apareadas, en el cual los miem-  
bros de cada par se conectan en los bordes para formar una  
estructura discoidal aplanada que tiene un espacio interno  
completamente cerrado. Esta estructura se conoce como tila-  
coide en cuyas membranas se encuentran los pigmentos foto-  
sintéticos (4).

La inhibición de la fotosíntesis en micro-organismos -  
fue reportada desde 1919 por Warburg y en 1920 se informó  
sobre la acción del N-fenilcarbamato de etilo (feniluretano)  
en relación a la fotosíntesis. Sin embargo no fue sino -  
hasta 1945 cuando Templeman y Sexton describieron la utili-  
dad de los feniluretanos como herbicidas. Como consecuencia  
a principios de los años cincuenta se introdujeron en el -  
mercado herbicidas derivados de la fenilurea.

En 1956 Wessels y van der Veen logran demostrar que los  
herbicidas derivados de la fenilurea interfieren con el -  
transporte electrónico inducido fotoquímicamente en cloro-  
plastos aislados. El reconocimiento de la inhibición de la  
fotosíntesis por estos compuestos es considerado como uno  
de los descubrimientos más significativos relacionados con

el modo de acción de los herbicidas. Este descubrimiento - fue confirmado por una serie de enfoques fisiológicos y bioquímicos. Los fotobiólogos que estudian los procesos básicos de la fotosíntesis utilizan al Diuron ( 3-(3,4-diclorofenil urea)) para bloquear la liberación de oxígeno, siendo éste sistema muy eficiente. Poco después aparecieron las triazinas y también se reconoció su capacidad para inhibir la actividad fotoquímica en cloroplastos aislados y en plantas enteras. Más de la mitad de los herbicidas usados actualmente interfieren con la fotosíntesis de alguna manera, habiendo un gran número de investigadores dedicados al estudio del mecanismo y modo de acción de los inhibidores de la fotosíntesis en plantas.

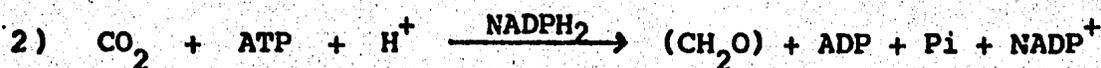
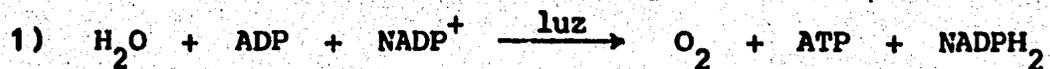
Durante los últimos 30 años se ha considerado especial atención a los herbicidas que afectan una o más de las etapas involucradas en la fotosíntesis.

### 1.1.1. REACCIONES FOTOQUIMICAS

La fuente primaria de la energía en la biósfera resulta de la conversión de la energía química efectuada por las células de las plantas que contienen clorofila. Esta reacción fotosintética se lleva a cabo en los cloroplastos. Estos organelos contienen moléculas específicas de ADN y de ARN, son capaces de efectuar síntesis de proteínas y reproducirse por división. Los cloroplastos como las mitocondrias

cambian de forma durante el transporte electrónico además - el cloroplasto es capaz de acumular iones. Los cloroplastos de las plantas superiores tienen de 4 a 10 micras de diámetro y de 1 a 3 micras de espesor. Dentro de los cloroplastos la clorofila se encuentra concentrada en corpúsculos concidos como grana de aproximadamente 0.4 micras de diámetro. - Las reacciones que se catalizan dentro de los cloroplastos se conocen como; a) reacciones luminosas, que dependen directamente de la energía luminosa y b) reacciones oscuras, que se efectúan en ausencia de luz.

Los dos tipos de reacciones pueden representarse en las siguientes ecuaciones no balanceadas que resumen una serie de eventos complejos.



Las reacciones luminosas asociadas con el transporte --- electrónico se representan en la ecuación 1. El número de moléculas de ATP no se conoce con exactitud. Las reacciones oscuras de la fotosíntesis se indican en la ecuación 2. La reacción luminosa es muy rápida y se satura con luz en 10 - milisegundos. Se necesita de un gran número de moléculas de clorofila para atrapar a los suficientes quanta de luz para - fijar al bióxido de carbono y liberar oxígeno. Se calcula -

que el número de moléculas de clorofila que forman una unidad fotosintética va desde 200-300 hasta 2,500.

En la figura 1 se representa el transporte electrónico - fotoinducido y la fosforilación acoplada. Este modelo a pesar de ser el más aceptado no ofrece todas las respuestas, hay algunos investigadores que cuestionan la ausencia de los intermediarios. Sin embargo basándose en la información actual este esquema parece ser una aproximación razonable y es muy útil para identificar al sitio de acción de los herbicidas.

La absorción de la energía luminosa provoca que los electrones fluyan de un donador de electrones (el agua) hacia un aceptor de electrones ( $\text{NADP}^+$ ). En este proceso están involucradas las reacciones conocidas como fotosistema I y fotosistema II. La unidad que atrapa a la luz en el fotosistema II está formada por moléculas de clorofila a y b así como por otros pigmentos auxiliares. La longitud de onda de la luz atrapada por estas moléculas es de 680 nm o menor. Una molécula de clorofila a no identificada sirve como centro de la reacción (5).

El primer aceptor de electrones del fotosistema II se simboliza como Q, que no ha sido identificado pero se sabe que extingue a la fluorescencia del fotosistema II. La molécula de clorofila oxidada recibe un electrón del donador designado como Y, al oxidarse Y extrae electrones del agua, liberando oxígeno e involucrando de alguna manera a una pro

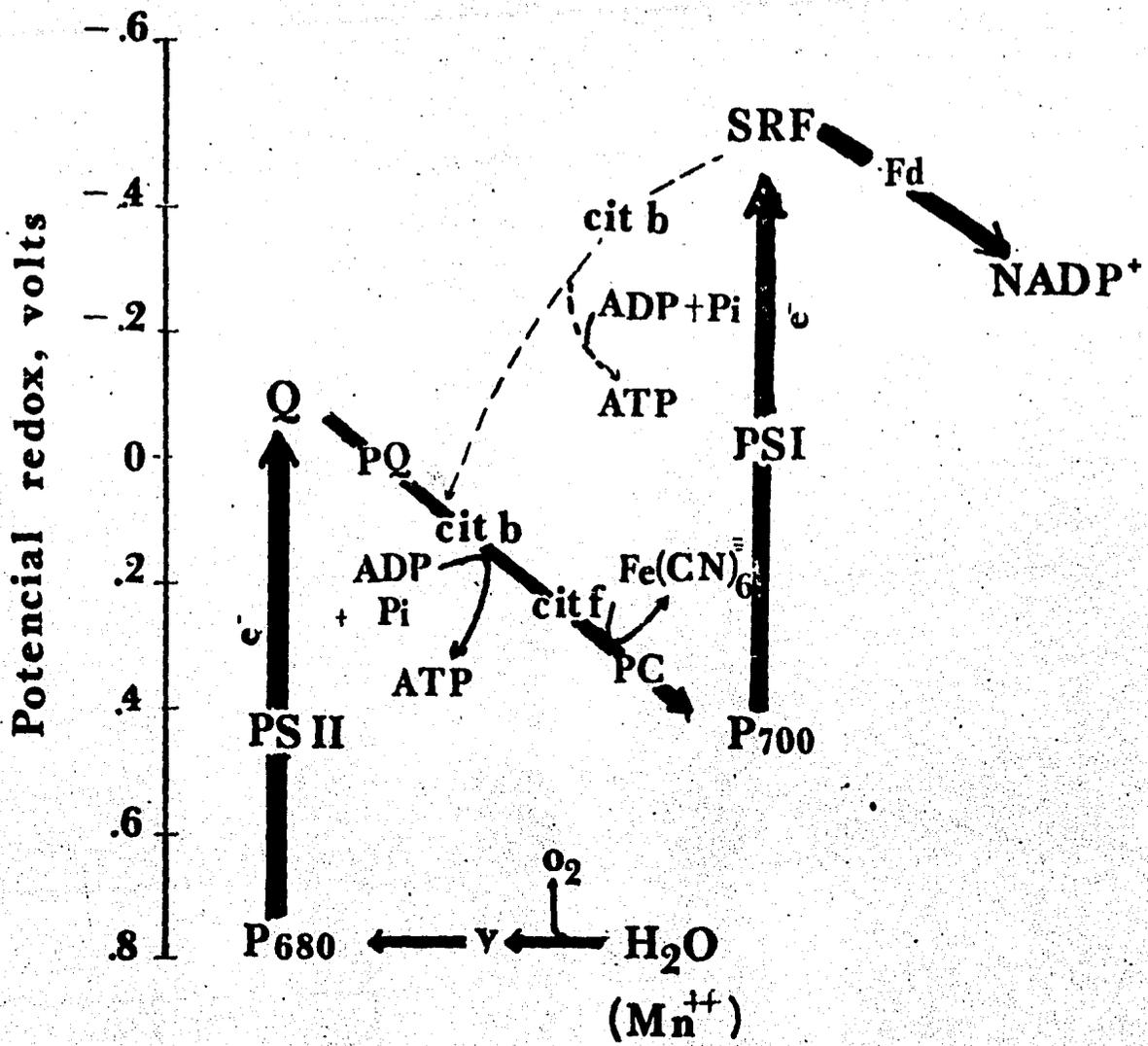


Fig.1 Reacciones luminosas de la fotosintesis.

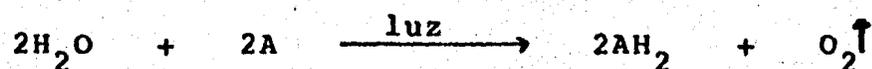
teína que contiene manganeso y a iones cloruro. El símbolo Y es usado por algunos investigadores para designar al complejo enzimático que fotoliza al agua (6).

El siguiente intermediario en la cadena transportadora de electrones posterior a Q es la plastoquinona (PQ), que en su forma reducida, reduce a su vez al citocromo tipo b ( $b_{559}$ ). Este citocromo hace contacto con el citocromo f que es un citocromo tipo c. El citocromo f está en contacto con una proteína que contiene cobre, la plastocianina (PC) que se encuentra adyacente al centro de reacción del fotosistema I. Por lo menos se genera una molécula de ATP a través de este pasaje electrónico.

El fotosistema I absorbe luz con una longitud de onda superior a 680 nm, el centro de esta reacción involucra a una molécula de clorofila a conocida como  $P_{700}$ . El aceptor de electrones inmediato a  $P_{700}$  puede ser una forma de ferredoxina conocida como sustancia reductora de ferredoxina (FRS). Los electrones fluyen subsecuentemente al  $NADP^+$  e involucran la participación de la ferredoxina (Fd) y una flavoproteína (Fp, ferredoxin-NADP oxidoreductasa).

En las reacciones que se llevan a cabo en la lamela, el agua se oxida y se produce ATP y NADPH. Por lo tanto la energía en forma de ATP y el poder reductor (NADPH) requeridos para la fijación de  $CO_2$  se produce por la acción combinada de los dos fotosistemas. En esta situación el transporte electrónico se considera acoplado a la fosforilación; el  $NADP^+$  =

puede substituirse por aceptores artificiales de electrones que dan lugar a la liberación de oxígeno pero involucran solamente a un pequeño segmento de la cadena oxidativa. Esta observación fue hecha por primera vez en 1937 por R. Hill, quien demostró que la liberación de oxígeno se presenta al iluminar a una suspensión de cloroplastos aislados en presencia de un aceptor artificial de electrones de acuerdo a la siguiente reacción:



donde A es el aceptor de electrones y AH<sub>2</sub> es la forma reducida. Esta reacción se conoce universalmente como la reacción de Hill, el aceptor A es el reactivo de Hill y un inhibidor de esta reacción es un inhibidor de Hill. Un reactivo de Hill tal como el ferricianuro o un colorante reducible actúa como aceptor artificial de los electrones provenientes del agua. Usando al ferricianuro como aceptor se puede demostrar la generación de ATP durante la reacción de Hill. Este tipo de fosforilación se conoce como no cíclica. Algunos compuestos en su forma oxidada tales como los viológenos y algunas flavinas pueden interceptar electrones del fotosistema I destinados a reducir al NADP<sup>+</sup>. Estos compuestos se considera que actúan alrededor del FRS y catalizan a un flujo de electrones cíclico, la fosforilación asociada con el flujo cíclico se conoce como fosforilación cíclica.

Varios compuestos además del agua pueden donar electrones

a la cadena transportadora entre los dos sistemas. Entre estos se encuentran los indofenoles reducidos tales como el 2, 6-diclorofenolindofenol (DCPIP) que se mantiene en su forma reducida por medio de un exceso de ácido ascórbico (7).

#### 1.1.2. Modo de Acción de los Herbicidas que interfieren con la Fotosíntesis

Los herbicidas que matan a las plantas al interferir con la fotosíntesis tienen dos modos distintos de acción. La mayoría de los compuestos inhiben la transferencia de electrones probablemente por inhibición de la reacción luminosa II, --- otros compuestos como los radicales de bupiridilo causan un corto circuito en la transferencia de electrones y generan - especies moleculares tóxicas (8).

Diferentes tipos de acción inhibitoria+ Los herbicidas y los inhibidores no herbicidas que afectan las reacciones inducidas fotoquímicamente en los cloroplastos aislados pueden dividirse en las siguientes clases dependiendo de los efectos impuestos: a) inhibidores del transporte electrónico, b) desacoplantes, c) inhibidores de la transferencia de energía, d) desacoplantes inhibitorios (múltiples tipos de inhibición) y e) aceptores de electrones.

Los síntomas fitotóxicos de daño causados por herbicidas que inhiben el transporte de electrones en cloroplastos son - favorecidos por la luz y el oxígeno. Cuando se impide la fija

ción de  $\text{CO}_2$ , el exceso de energía es dirigido a la generación de clorofila triplete de vida media más larga. Si no es disipada por los carotenoides esta puede inducir directamente la abstracción de un protón de los ácidos grasos insaturados o pueden generar oxígeno singulete, el cual induce la formación de peróxidos de los componentes de la membrana. La peroxidación de los lípidos lleva a la destrucción celular y a la muerte.

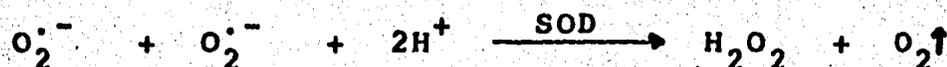
Cuando un fotón es absorbido por una molécula o átomo los afecta cambiando la configuración de la carga electrónica asociada con la valencia o con los electrones externos que se encuentran alrededor del núcleo o núcleos. Debido a que la nueva configuración tiene más energía que la del estado basal se dice que el átomo o molécula están en estado excitado. La energía de un fotón debe ser exactamente la necesaria para provocar la transición.

Los estados singulete y triplete se distinguen por el número total de "espín" que se refiere a la dirección en que se encuentra orientado el espín de los electrones de la molécula. En el estado singulete el espín de un par de electrones es antiparalelo u opuesto, en el estado triplete son paralelos. En el estado doblete, que también se encuentra en algunos pigmentos, ocurre cuando los electrones están desapareados. El estado triplete se llama así porque el par de electrones puede alinearse de tres diferentes maneras en un campo magnético externo, entonces se sobreponen subniveles adicionales de ener

gía al estado cuántico de la molécula. En el estado singulete todas las orientaciones son equivalentes y no hay subniveles energéticos adicionales inducidos.

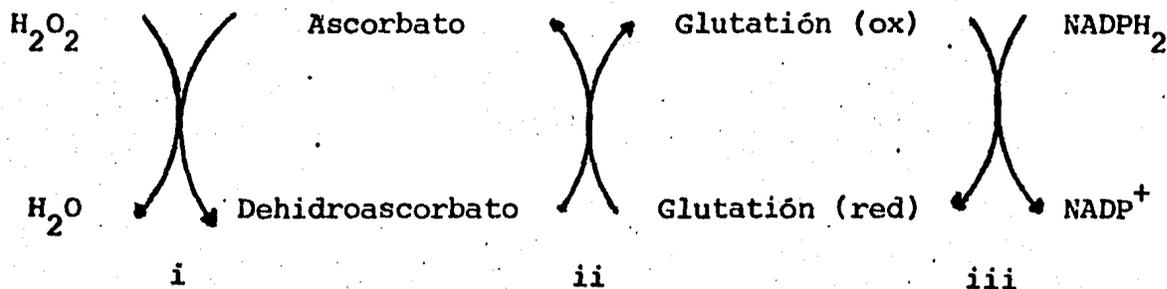
Es evidente que los cloroplastos están provistos con artefactos protectores que son capaces de limitar el daño excepto bajo condiciones extremas. Tales situaciones son favorecidas por la presencia de herbicidas inhibidores de la fotosíntesis.

El oxígeno singulete puede ser desactivado por los carotenoides y por los recolectores de radicales libres localizados dentro de los tilacoides del cloroplasto, tales como el  $\alpha$ -tocoferol. Durante la fotosíntesis se activa la concentración de oxígeno dentro de los cloroplastos y puede llegar a ser alta en comparación con la del citoplasma y los electrones provenientes de los tilacoides podrían dar un anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Posiblemente formado durante el transporte pseudo-cíclico de electrones. Aunque el radical superóxido es aparentemente menos tóxico que el oxígeno singulete, su toxicidad puede estar relacionada a la generación de especies tales como los radicales hidróxilo ( $OH^{\cdot-}$ ). Los cloroplastos tienen Cu-Zn Superóxido dismutasa (SOD) que es un sistema eficiente para recolectar superóxidos



La generación de peróxido de hidrógeno en esta reacción puede ser tolerada por la presencia de un sistema adicional que

catáliza la destrucción de  $H_2O_2$ ; (i) Ascorbato peroxidasa, --  
(ii) Dehidroascorbato reductasa y (iii) Glutación reductasa.



Un gran número de herbicidas inhiben el transporte de electrones fotosintético (Reacción de Hill). El sitio de acción es generalmente a través de un componente proteico localizado en el lado externo de la membrana del tilacoide y afectan a un punto entre los componentes hipotéticos Q y B de la cadena de transporte electrónico. Como resultado de esta interacción el transporte de electrones cesa. Este evento dirige a una rápida inhibición de la fijación del  $CO_2$  que procede con una velocidad similar. Una interrupción de la fotosíntesis conducirá eventualmente a la disminución de las reservas alimenticias y a la subsecuente inanición. La aparición de los síntomas fitotóxicos, tales como la decoloración de la clorofila son claramente favorecidos por la luz. La inhibición del flujo de electrones previene el desprendimiento de oxígeno pero la envoltura del cloroplasto probablemente presenta una pequeña resistencia a la difusión interna del oxígeno (9).

Basados en la interpretación de la inducción de fluorescencia de una gran variedad de potentes herbicidas, se infirió que interrumpen el transporte de electrones en el lado reductor --

del fotosistema II entre el aceptor "primario" Q y la poza de la plastoquinona (PQ). Este sitio parece ser el único blanco para la interferencia de varias sustancias químicas con el PS II. Las propiedades del aceptor del PS-II, del lado reductor lo hacen ver como altamente susceptible a una gran variedad de herbicidas. Experimentos con cloroplastos tratados con Tripsina en condiciones suaves conducen a la postulación de un modelo para la organización funcional y estructural de la transferencia de electrones entre las moléculas de plastoquinona (Q, B y la poza de PQ) el cual asume básicamente que los componentes redox Q y B están embebidos dentro de un componente proteico (10). Se asume que este componente proteico actúe como regulador indispensable para el transporte de electrones y como barrera que evita la reacción redox entre Q y el componente redox exógeno. Además se pretende que el componente proteico con tenga también los sitios de unión para los inhibidores, postulándose por lo tanto un modo alostérico de acción. Un análisis refinado de la correlación estructura-actividad de varios derivados de diferentes herbicidas que actúan en el PS-II conduce a la conclusión de que existe un área de unión con diferentes receptores y subreceptores para todos los inhibidores. Los datos sugieren que el componente proteico envolvente probablemente consiste de dos polipéptidos con un peso molecular de -- 27,000 y 32,000 g/mol respectivamente.

Una amplia variedad de estructuras químicas inhiben la transferencia de electrones y pueden ser usados como herbicidas. En



## 1.2. Química de los 2-Aminotiazoles

Junto con los derivados de la piridina, los tiazoles constituyen una parte importante de la química heterocíclica. Tienen un gran interés en las áreas farmacéutica y biológica, aparecen en la composición de ciertas vitaminas tales como la vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina) y en la de algunas penicilinas. Los tiazoles reducidos sirven en el estudio de polipéptidos y proteínas, también se encuentran frecuentemente como unidades estructurales en -- compuestos de significado biológico, por ejemplo en la luciferina de las luciérnagas y en antibióticos como la bacitrina A. También algunos derivados de los 2-aminotiazoles son usados -- como fungicidas, pesticidas y bactericidas.

Las primeras síntesis de los anillos tiazólicos fueron he-- chas a finales del siglo pasado, estos trabajos fueron realizados por científicos tales como Hantzsch, Hubacher, Miolatti, -- Tcherniac y Gabriel. En la literatura se pueden encontrar va-- rios métodos para la síntesis de tiazoles, los cuales pueden -- ser clasificados de acuerdo a las estructuras parciales que se muestran en el siguiente esquema



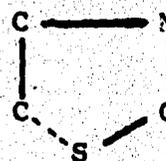
Ia

Hantzsch (1887)



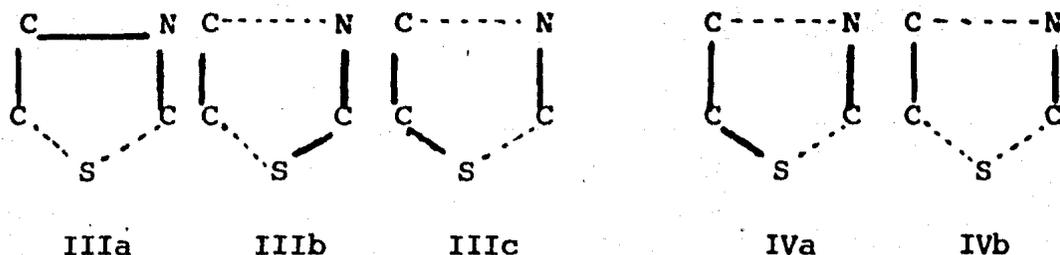
Ib

Tcherniac (1919)



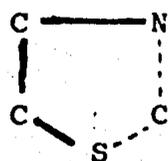
II

Cook-Heilbron (1947)

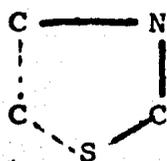


Gabriel (1916)

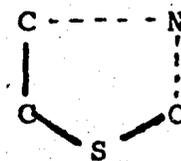
Erlenmeyer (1943)



Va



Vb



VI

Gabriel (1916 )

Hartke-Seib (1971)

Dubus (1974)

El primer esquema representa a la síntesis más útil y versátil. Por medio de una juiciosa elección de los reactivos se llega a obtener tiazoles sustituidos en cualquiera de las posiciones 2,3,4 o 5 del anillo. Este método que es conocido ampliamente con el nombre del científico alemán Hantzsch, quien lo creó en 1887; involucra la condensación de un compuesto que contiene los dos heteroátomos en el mismo átomo de carbono, -- con un compuesto que contiene los dos grupos funcionales halógeno y carbonilo en átomos de carbono adyacentes. En esta reacción pueden servir como reactivos nucleofílicos una gran variedad de compuestos, tales como las tioamidas, tioureas, tiocarbamatos o ditiocarbamatos de amonio y derivados. Los fragmentos de carbono pueden ser alfa-halocarbonilos o sus derivados funcionales. Este método ha sido objeto de investigaciones

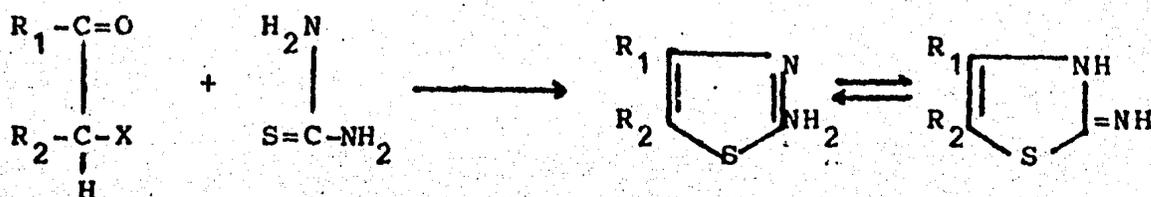
por casi 100 años y es una de las reacciones clásicas en la química de los tiazoles. Es uno de los pocos métodos que a pesar de haberse originado a fines del siglo pasado, su uso es aún vigente. Una variante de este método fue introducida por Tcherniac, quien cicló alfa-tioacetonas (obtenidas de alfa-halocetonas y cianatos metálicos) a tiazoles empleando compuestos con hidrógeno lábil. Esta reacción, dependiendo de las condiciones experimentales conduce a la formación de varios tiazoles sustituidos en la posición 2.

Los anillos del tiazol pueden ser obtenidos por otros métodos, pero que son de aplicación limitada. Un ejemplo es la síntesis de Cook y Heibron usando alfa-aminonitrilos o alfa-aminoamidas y disulfuro de carbono (o derivados tioácidos) como reactivos del tipo II.

La reacción de pentasulfuro de fósforo con alfa-aminoacilcarbónidos del tipo IIIa conducen a la formación de tiazoles. Además una mercaptocetona se puede condensar con un nitrilo del tipo IVa o alfa-mercaptoácido o sus ésteres con bases de Schiff. Esta forma de cerrar el anillo está limitada a las tiazolidinas. En la estructura del tipo Va para cerrar el anillo las beta-mercaptoalquilaminas sirven como materia prima y el formiato de etilo es el reactivo que proporciona el carbono de la posición 2 de anillo. Estas síntesis constituyen las rutas más importantes para la preparación de muchas tiazolidinas y 2-tiazolinas. En la síntesis del tipo Vb, uno de los reactivos cede solamente

el carbono de la posición 5 del anillo resultante (11).

De todos los métodos descritos para la síntesis de los 2-aminotiazoles el más eficiente involucra la condensación de partes equimolares de tiourea y  $\alpha$ -halocetonas o aldehídos para dar los correspondientes 2-aminotiazoles o sus derivados tautoméricos 2-imino- $\Delta$ -4-tiazolinas, sin subproductos



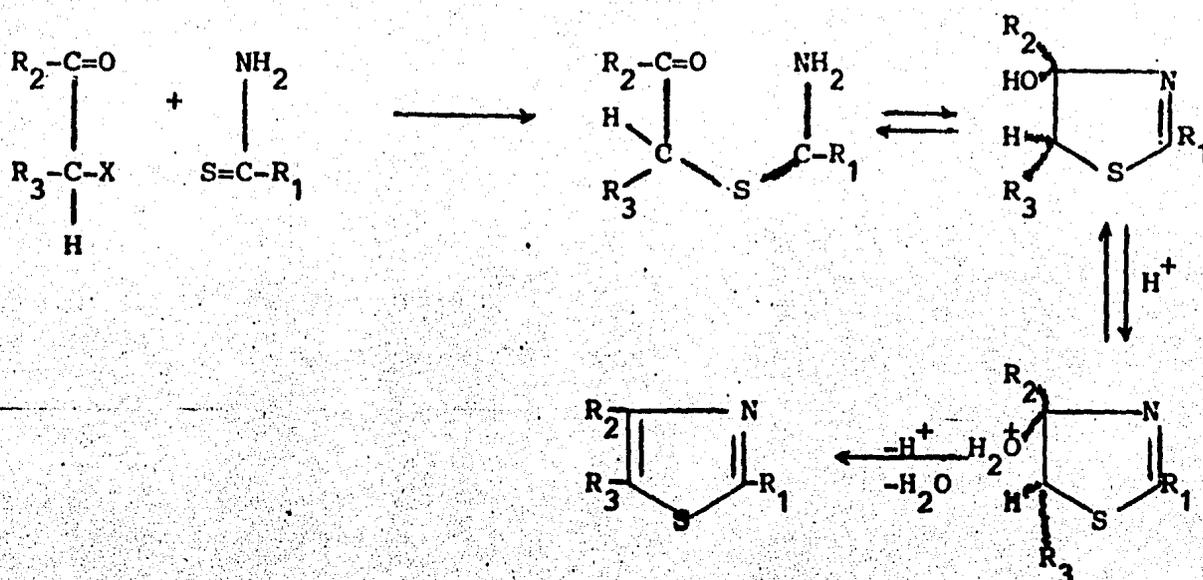
Este método fue inicialmente propuesto por Popp y Traumann (12). Las propiedades antimicrobianas y fungicidas de esta clase de compuestos les confieren una importancia comercial, lo que explica la gran cantidad de trabajos hechos en el campo de los 2-aminotiazoles, empezando a ser usados como materia prima para la obtención de agentes farmacológicos más activos. Los 2-aminotiazoles son también interesantes por su reactividad, que es mayor que la de sus homólogos substituidos en las posiciones 4 y 5.

Esta reacción se lleva a cabo en solución acuosa o solución alcohólica en baño de vapor y es más rápida que la reacción que usa como materia prima tioamidas. El rendimiento es casi cuantitativo con  $\alpha$ -halocetonas y es bajo con  $\alpha$ -haloaldehídos.

El mecanismo de la síntesis de Hantzsch ha sido ampliamente

estudiado y los intermediarios de la reacción han sido aislados e identificados, siendo muchos los trabajos publicados al respecto.

Mecanismo (13):



La influencia del anillo sobre los sustituyentes depende de las características de estos y de la posición en donde se encuentren localizados. La interacción del sustituyente y el átomo de carbono del anillo al cual está enlazado podría relacionarse con algunas de las características electrónicas del anillo no sustituido y especialmente con la carga neta de las diferentes posiciones. En lo que respecta a la carga neta  $\pi$ , indica que el poder de atracción de los electrones de los carbonos del anillo decrece en el orden  $2 > 4 > 5$ . Se ha observado -- que los sustituyentes alquilo no presentan reactividad en las posiciones 4 y 5, solamente presentan una ligera reactividad en la posición 2.

## 2. OBJETIVO

Con base en la información recopilada y a lo expuesto en la introducción de este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

- Sintetizar derivados del 2-aminotiazol que posean actividad herbicida
- Establecer líneas a seguir para la síntesis de otros derivados que tengan altas probabilidades de tener actividad herbicida.

## 3. HIPOTESIS DE TRABAJO

Como se ha señalado en la introducción, se considera que el grupo N-CO- es uno de los factores responsables de la inhibición del transporte de electrones fotosintético y considerando que los 2-Aminotiazoles poseen un amplio espectro de actividad biológica, se considera probable poder encontrar derivados del 2-Aminotiazol que tengan el grupo funcional señalado y que interfieran con la cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis en cloroplastos aislados de plantas verdes.

#### 4. METODOS DE EVALUACION DE HERBICIDAS

Existen varios métodos para la evaluación de herbicidas potenciales y se clasifican según la variable que se elija; transporte de electrones, emisión de luz, aparición o desaparición de especies químicas. En general se consideran tres clases de métodos; Fluorométricos, espectrofotométricos y Electroquímicos, que utilizan como material biológico diferentes sistemas; las membranas de los cloroplastos, las moléculas de clorofila, los cloroplastos o las hojas de las plantas verdes. En el método fluorométrico se mide la fluorescencia de las hojas de algunos vegetales y cereales (soya, espárragos, chícharos, etc.) en presencia de un herbicida por medio de detectores especialmente diseñados. Los métodos espectrofotométricos miden la desaparición o aparición, por cambios en la absorbancia a una longitud de onda dada, del reactivo de Hill, comúnmente ferricianuro de potasio en cloroplastos aislados. Existen varios métodos electroquímicos pero el más ampliamente aplicado al estudio de los herbicidas es el que mide el desprendimiento del oxígeno durante la fotosíntesis (reacción de Hill) usando para ello un electrodo de oxígeno tipo Clark (14). Los otros métodos electroquímicos son de reciente aparición y generalmente utilizan membranas de cloroplastos o modelos sintéticos de las mismas o moléculas de clorofila adsorbidas en electrodos de platino, oro u otros metales, en donde se miden los cam-

bios del potencial eléctrico de estos sistemas en presencia de sustancias que interaccionan con alguna de las características propias del sistema. Son de reciente aplicación en este campo y han abierto nuevas perspectivas para el entendimiento de los fenómenos fotosintéticos.

#### 4.1. Modelo Elegido; Cloroplastos Aislados

De los métodos antes mencionados se escogió el electroquímico que mide el desprendimiento de oxígeno, ya que se contaba en el laboratorio con un oxímetro (método del electrodo de oxígeno). Con este aparato se pueden usar diferentes tipos de cloroplastos (15). Se eligieron los cloroplastos tipo E. Como una primera etapa en el estudio de compuestos con probable actividad herbicida se prueban éstos sobre sistemas biológicos que permitan de manera rápida y confiable detectar si tienen actividad herbicida o no. Prosiguiendo en caso positivo a las demás etapas del estudio. De modo que se requiere que el sistema biológico sea sencillo y el modelo que se eligió tiene las características requeridas.

Los cloroplastos del tipo E se caracterizan por: no tener membrana externa, los tilacoides están irregularmente arreglados y no tienen orientación fija, no fijan  $\text{CO}_2$  y el  $\text{NADP}^+$  y el ferricianuro de potasio penetran fácilmente.

De las características antes mencionadas es importante

para nuestro estudio el que no posean membrana externa, lo - que elimina el problema de la penetración del compuesto a la cadena transportadora de electrones y que el ferricianuro pe netre fácilmente ya que fue el aceptor que mejores resulta-- dos dió en este estudio.

Los cloroplastos se aislaron de hojas de espinacas, sistema ampliamente usado según informes en la literatura, por - las ventajas que presenta tanto por el tiempo de vida media más larga de los cloroplastos como por su alto contenido en clorofila y por la facilidad para aislarlos.

#### 4.2. Interacción con el PS II.

Dado que el PS II se localiza físicamente sobre la membrana del tilacoide y el modelo que se eligido nos proporciona este sistema, el estudio se limitó a moléculas que actuarán en el PS II. En la figura 3 se muestra la cadena transportadora de electrones y el sitio donde interviene el ferricianuro de potasio así como el sitio de acción de los herbicidas más conocidos.

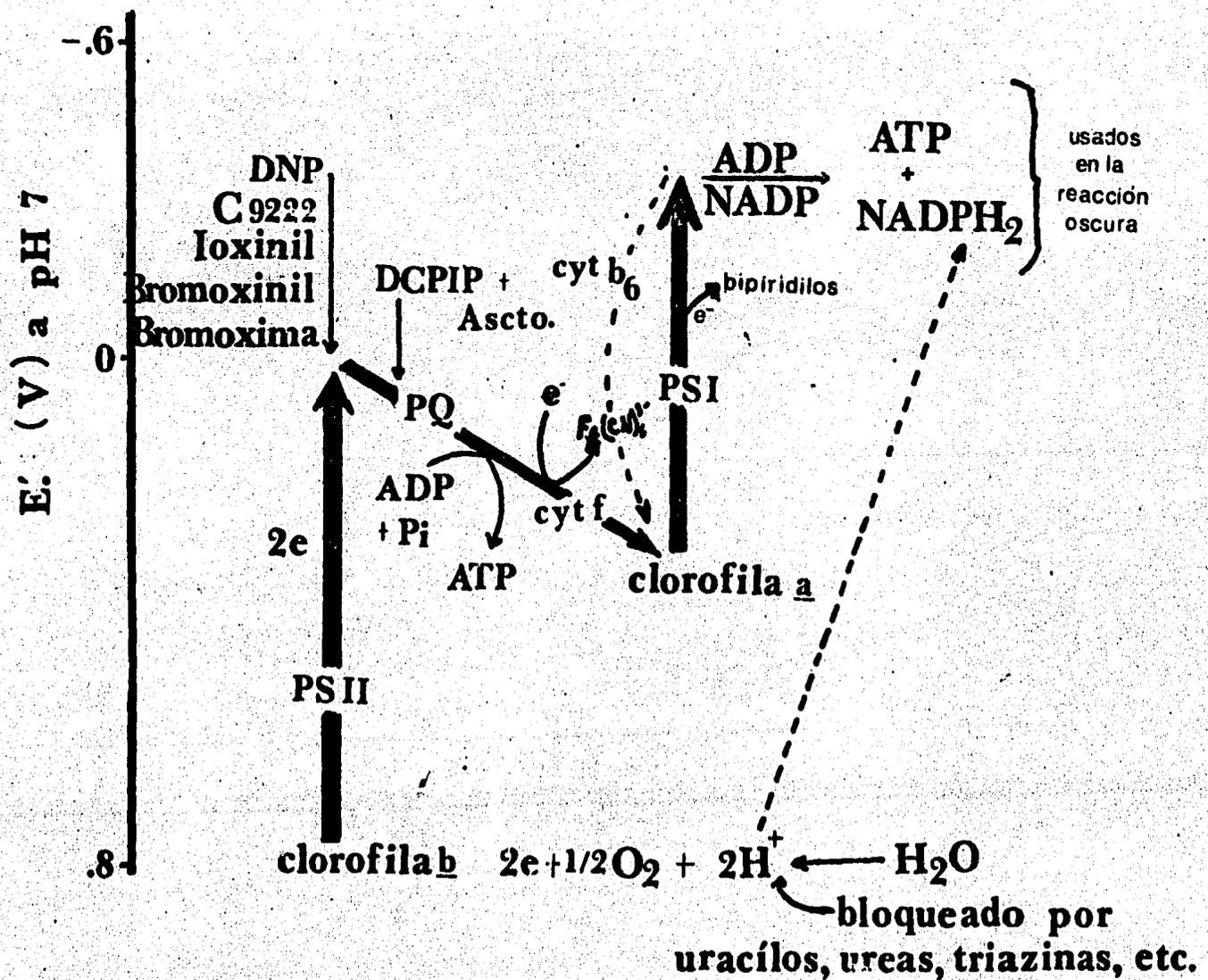
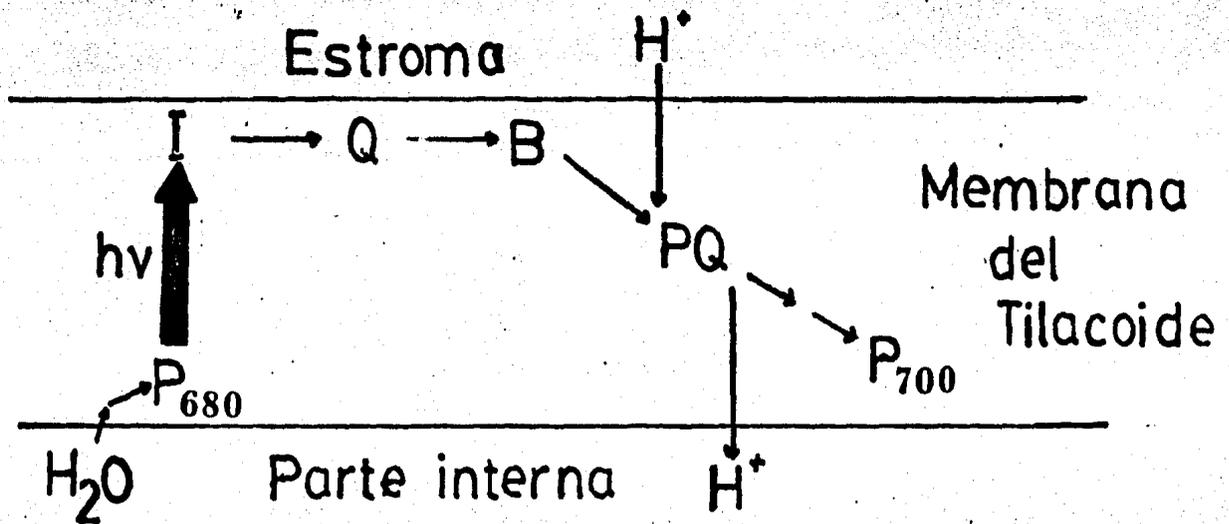


Fig.3 Localización y sitio de acción de algunos herbicidas en la cadena transportadora de electrones.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. Aparatos.

- Para la determinación del punto de fusión se uso un aparato Electrothermal Melting Point de tubo capilar.
- Espectrofotómetro I.R. Perkin-Elmer Modelo 337.
- Para la determinación del RMN del  $H^1$  se uso un aparato Varian EM de 390 a 90 MHz.
- Cromatografía en Capa Fina:
  - Prueba Cualitativa: Placas Merck 60 F<sub>254</sub> con un espesor de capa de 0.25 mm (5x10). Reveladas en una cámara de yodo.
  - C. Preparativa: Placas Merck 60 F<sub>254</sub> con un espesor de capa de 2 mm (20x20). Reveladas con luz U.V.
- Espectrofotómetro: Carl Zeiss PMQ II.
- Centrífugas:
  - Clinica; IEC HN-S Centrifuge, Damon/IEC Division.
  - Ultracentrífuga; Beckman Modelo J2-21 Centrifuge.
- Potenciómetro: Orion Reserch Modelo 701 A/Digital, Ionalyzer
- Oxímetro: El oxímetro utilizado tiene una capacidad de 2.5 ml en la cámara de reacción, mantenida a temperatura constante por una camisa de agua corriente. La iluminación fue proporcionada por una lámpara de 500 watts a una distancia de 30 cm de la cámara de reacción a través de un filtro de una solución al 5% de  $CuSO_4$  en un matraz bola de 500 ml. -

El electrodo fue del tipo clark con membrana de teflón. Se uso un registrador Beckman a un voltaje de 10 mV.

#### 5.1.2. Substancias y Materiales.

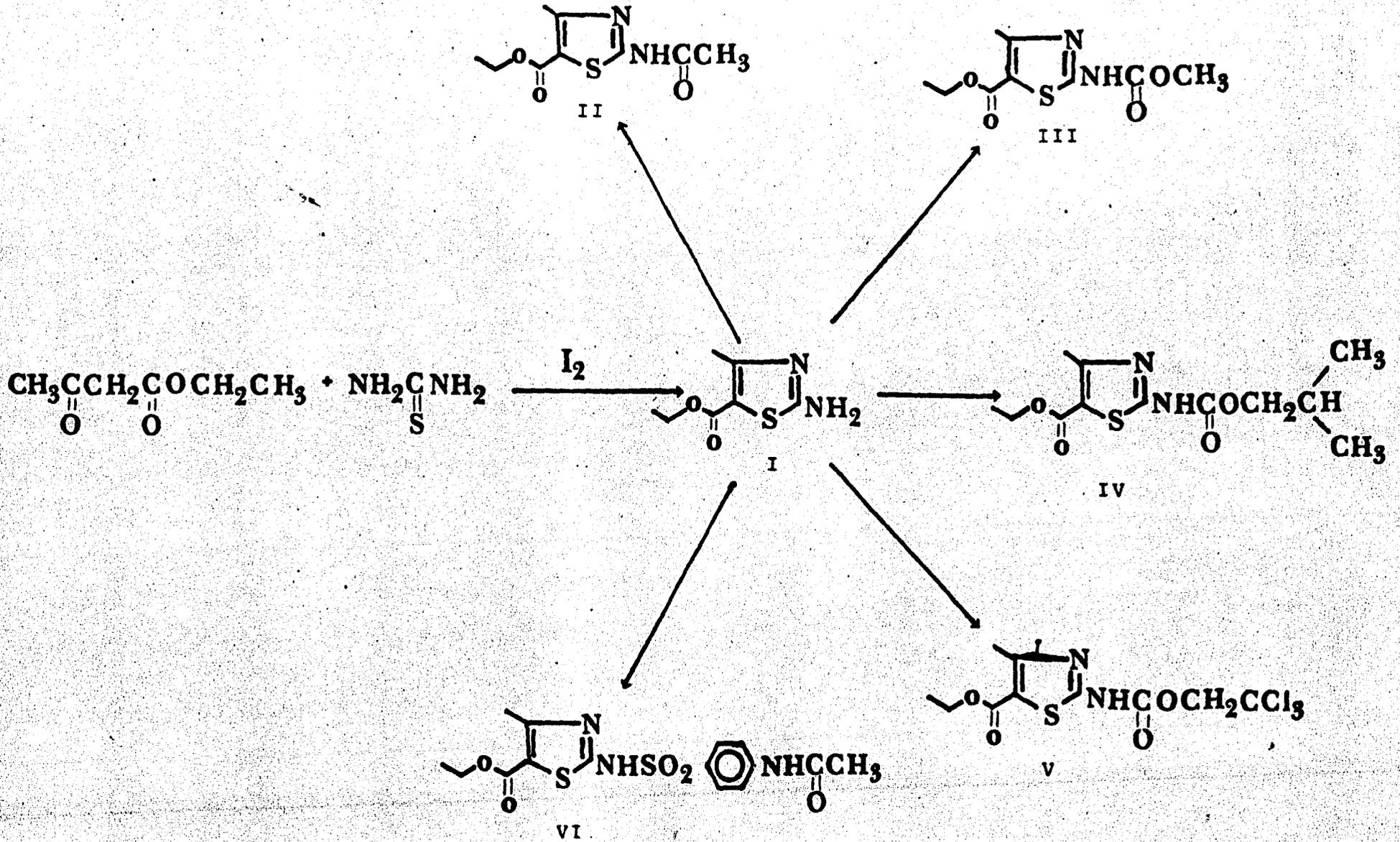
Las substancias empleadas en la parte química y en la parte biológica fueron grado reactivo analítico Merck o Aldrich. Los disolventes se adquirieron grado técnico y se purificaron hasta obtener la pureza deseada (16).

Los disolventes usados en las determinaciones espectroscópicas fueron Merck grado espectroscópico.

Las hojas de espinaca se adquirieron en el comercio se eligieron cuidadosamente tratando de usar solamente las menos mal tratadas y que tuviesen un aspecto fresco. Antes de extraerles los cloroplastos se dejaron en la obscuridad a baja temperatura para que agotasen sus reservas de almidón.

5.2. Parte Química

Síntesis del 2-Amino-4-metil-5-carboetoxitiazol y derivados



### 5.2.1. Síntesis.

2-Amino-4-metil-5-carboetoxitiazol (I).- Se mezclaron 1 mol de Acetoacetato de etilo con 2 moles de Tiourea en presencia de 1 mol de Yodo metálico y se calentaron a 80°C por 15 hs. El residuo se tomó en agua con hielo y se neutralizó con  $\text{NH}_4\text{OH}$  diluido hasta pH 9 o precipitación total. Se filtró y se recristalizó de Etanol. Rend. 70%, P.f. 173-5°C, C.C.F.  $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ ;  $\text{C}_6\text{H}_{12}$  (3:4:4). Este sistema fué usado con los demás compuestos (17).

2-(Acetilamino)-4-metil-5-carboetoxitiazol (II).- A una mol de I en solución etánolica se le adicionó lentamente y con agitación 1.1 moles de Anhídrido Acético y 1.1 moles de Acido Acético glacial, en presencia de Zinc como catalizador. Se calentó a ebullición por 15 min., la mezcla y se dejó reposar por otros 15 min. Se vertió en agua con hielo, se filtró y se lavó el residuo con agua fría. Se recristalizó de etanol. Rend. 84% P.f. 220-2°C, C.C.F. no corre en el sistema de I (18).

2-(Metoxicarbonilamino)-4-metil-5-carboetoxitiazol (III).- A una mol de I en solución etánolica se le agregó una mol de -- Cloro-Formiato de Metilo en presencia de Trietilamina, se dejó toda la noche en agitación y a temperatura ambiente. Se filtró, se secó el residuo y se recristalizó de etanol. Rend. 90%, P.f. 190-2°C CCF Rf 0.39.

2-(Isobutoxicarbonilamino)-4-metil-5-carboetoxitiazol (IV). A una mol de I en solución etánolica se le agregó una mol de -- Cloroformiato de Isobutilo en presencia de Trietilamina, se --

dejó toda la noche en agitación y a temperatura ambiente. Se filtró y se recristalizó de etanol. Rend. 53%, P.f. 136-8°C, CCF Rf 0.8.

2-( $\beta, \beta, \beta$ -Tricloroetoxicarbonilamino)-4-metil-5-carboetoxitiazol (V).- Para la obtención de este compuesto fue necesario ensayar varias veces con diferentes bases y a diferentes tiempos así como a distintas temperaturas. De todos los ensayos no pudo obtenerse el compuesto deseado en forma cristalina sino que se obtuvo un aceite, por lo que se reunieron los aceites obtenidos en cada una de las reacciones y se corrió la CCF preparativa para poder separar e identificar al compuesto esperado. De esta manera se obtuvo el compuesto sólido con un bajo rendimiento. Las reacciones se hicieron mezclando cantidades equimolares de I en solución con Cloroformiato de  $\beta, \beta, \beta$ -Tricloroetilo en presencia de diferentes bases (Piridina, Dietilamina, Trietilamina e NaOH al 10%) a distintas temperaturas (desde 0°C hasta temperatura ambiente, 20°C) y a diferentes tiempos (desde 1 hasta 24 hs). El sólido resultante presentó un punto de fusión de 96-8°C y por CCF un Rf de 0.9. Se identificó por espectroscopía Infrarroja y de RMN del H<sup>1</sup>.

2-(p-Acetilaminobencensulfonamida)-4-metil-5-carboetoxitiazol (VI).- A una mol de I en solución de acetona seca se le agregó Piridina anhidra y después lentamente 1 mol de Cloruro de p-Acetilaminobencensulfonilo, se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente, se filtró y se recristalizó de etanol. Rend. 52%, P.f. 154-6°C, CCF Rf 0.32 (19).

5.2.2. Resultados. Espectros IR y RMN.

Tabla 1. Identificación de los compuestos.

Compuesto	Pf °C	CCF Rf	%Rend	IR (cm <sup>-1</sup> )	RMN (ppm)
-NH <sub>2</sub>	173-5	0.87	70	3400(Ar-NH <sub>2</sub> ) 3000(CH <sub>2</sub> ) 1700(CO <sub>2</sub> ) 1500(NH <sub>2</sub> ) 1280(S=C) 1020(S-C)	3.3(s,2H,NH <sub>2</sub> ) 2.6(s,3H,CH <sub>3</sub> ) 1.3(t,3H,CH <sub>3</sub> ) 4.2(c,2H,CH <sub>2</sub> )
-NHCOCH <sub>3</sub>	220-2	---	84	3500(C-OH) 3240(Ar-NH) 1680(NH-CO <sub>2</sub> )	12.5(s,1H,NH) 2.1(s,3H,CH <sub>3</sub> )
-NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	190-2	0.39	90	3290(Ar-NH) 1580(NH-CO <sub>2</sub> )	3.1(s,1H,NH) 3.8(s,3H,CH <sub>3</sub> )
-NHCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	136-8	0.8	53	3200(Ar-NH) 1580(NH-CO <sub>2</sub> ) 1390 1110(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	3.1(s,1H,NH) 0.9(d,6H,CH <sub>3</sub> ) 2.0(h,1H,CH) 4.0(d,2H,CH <sub>2</sub> )
-NHCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>	96-8	0.9	bajo	3190(Ar-NH) 1720(CO <sub>2</sub> ) 1570(NH-CO <sub>2</sub> ) 580(C-Cl)	7.2(s,1H,NH) 4.8(s,2H,CH <sub>2</sub> )
-NH <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> ØNHAc	154-6	0.32	52	3300(Ar-NH-) 1600(NH-CO-) 1400(SO <sub>2</sub> ) 1320(SO <sub>2</sub> -NH)	3.3(s,1H,NH) 7.4(d,1H,NH) 7.9(c,4H,pAr) 2.5(s,3H,CH <sub>3</sub> )

Nota: s= singlete; d= doblete; t= triplete; c= cuadruplete y h= heptuplete.

CCF; MeOH:CHCl<sub>3</sub>:Hexano (3:4:4).

2.5 MICROMETERS 3

PERKIN-ELMER

CHART NO. 199-1042



SAMPLE REF. NO.

START OF SWEEP

→H→

END OF SWEEP

0ppm  
5ppm  
2ppm

900Hz

750

600

450

300

150

0

450

375

300

225

150

75

0

180

150

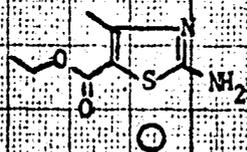
120

90

60

30

0



-Cl<sub>3</sub> millo

-NH<sub>2</sub>

-Cl<sub>2</sub> ester

-Cl<sub>3</sub> ester

ppm (δ)

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

PERKIN-ELMER

CHART NO. 199-1042

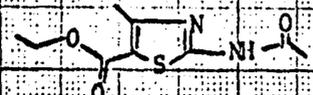
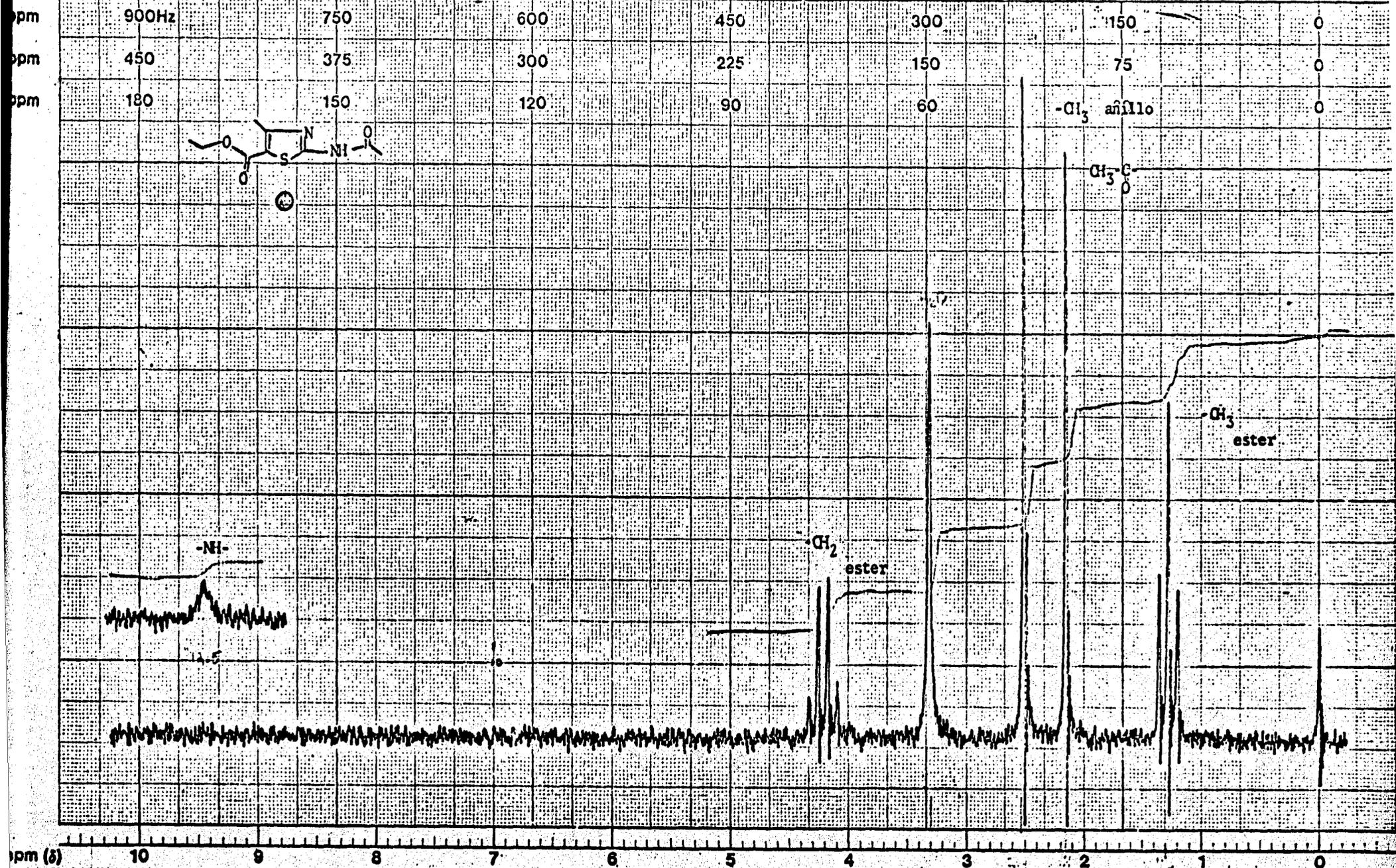


SAMPLE  
REF. NO.

START OF SWEEP



END OF SWEEP



-NH-

1.5

-CH<sub>2</sub>  
ester

-CH<sub>3</sub> anillo

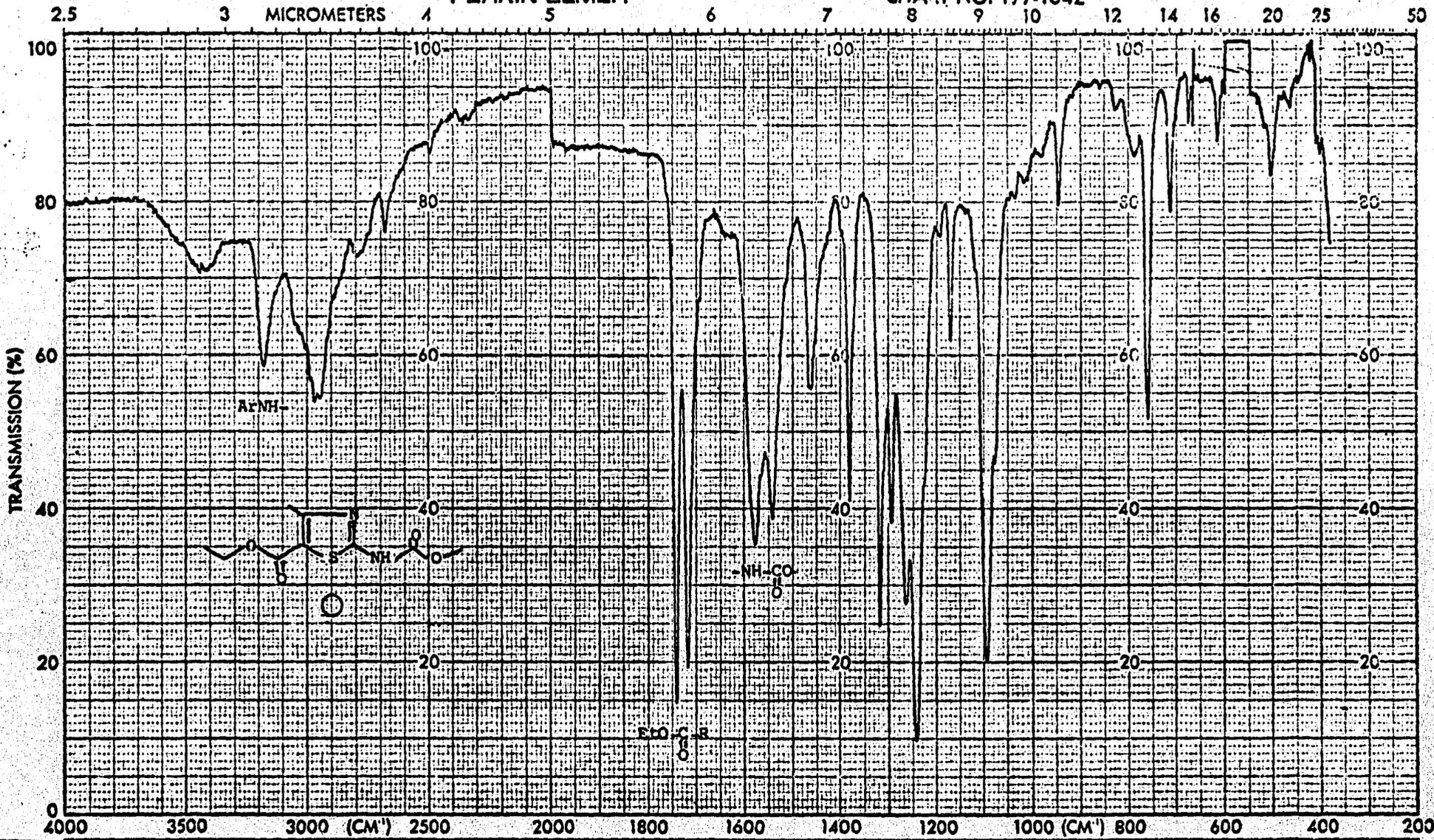
CH<sub>3</sub>  
C  
O

CH<sub>3</sub>  
ester

ppm (δ) 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

PERKIN-ELMER

CHART NO. 199-1042



SAMPLE

REF. NO

START OF SWEEP



END OF SWEEP

900Hz

750

600

450

300

150

0

450

375

300

225

150

75

0

180

150

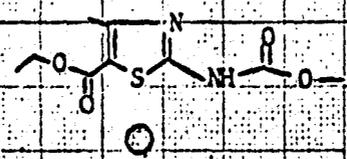
120

90

60

30

0



-CH<sub>3</sub> anillo

CH<sub>3</sub>-O-

-CH<sub>3</sub> ester

-CH<sub>2</sub> ester

-NH-

m (δ)

10

9

8

7

6

5

4

3

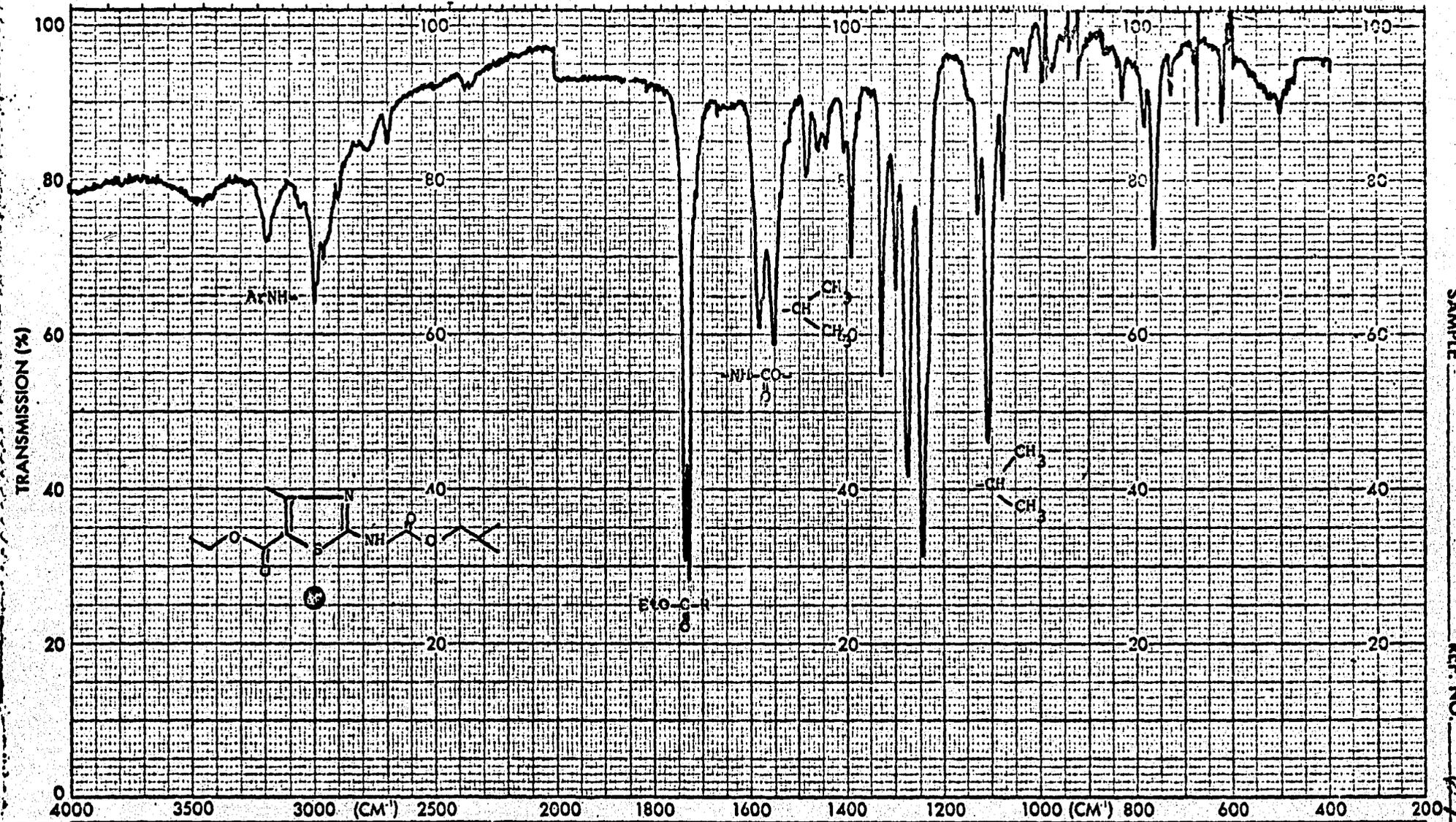
2

1

0

PERKIN-ELMER

CHART NO. 199-1042



SAMPLE

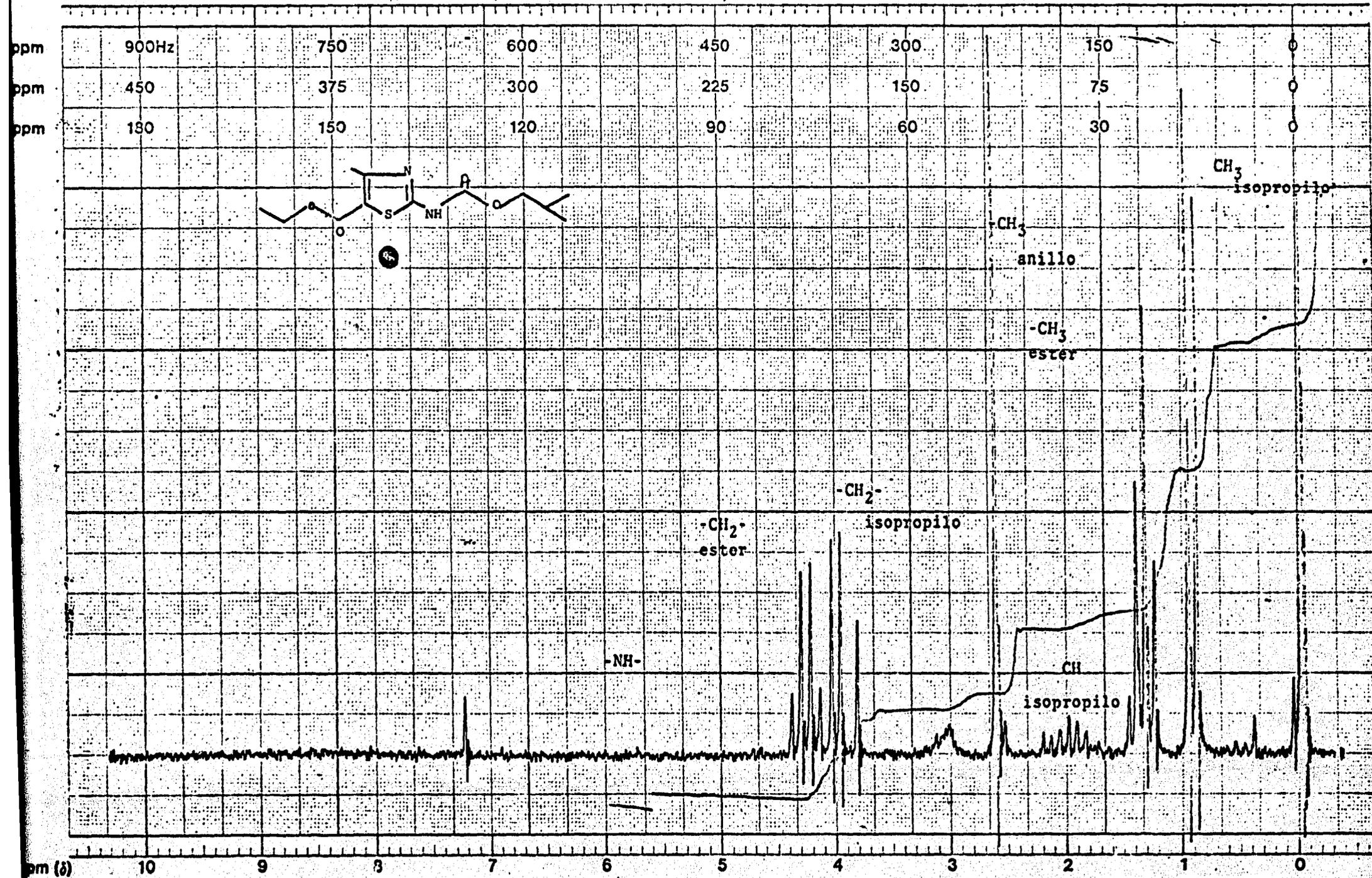
REF. NO.

199

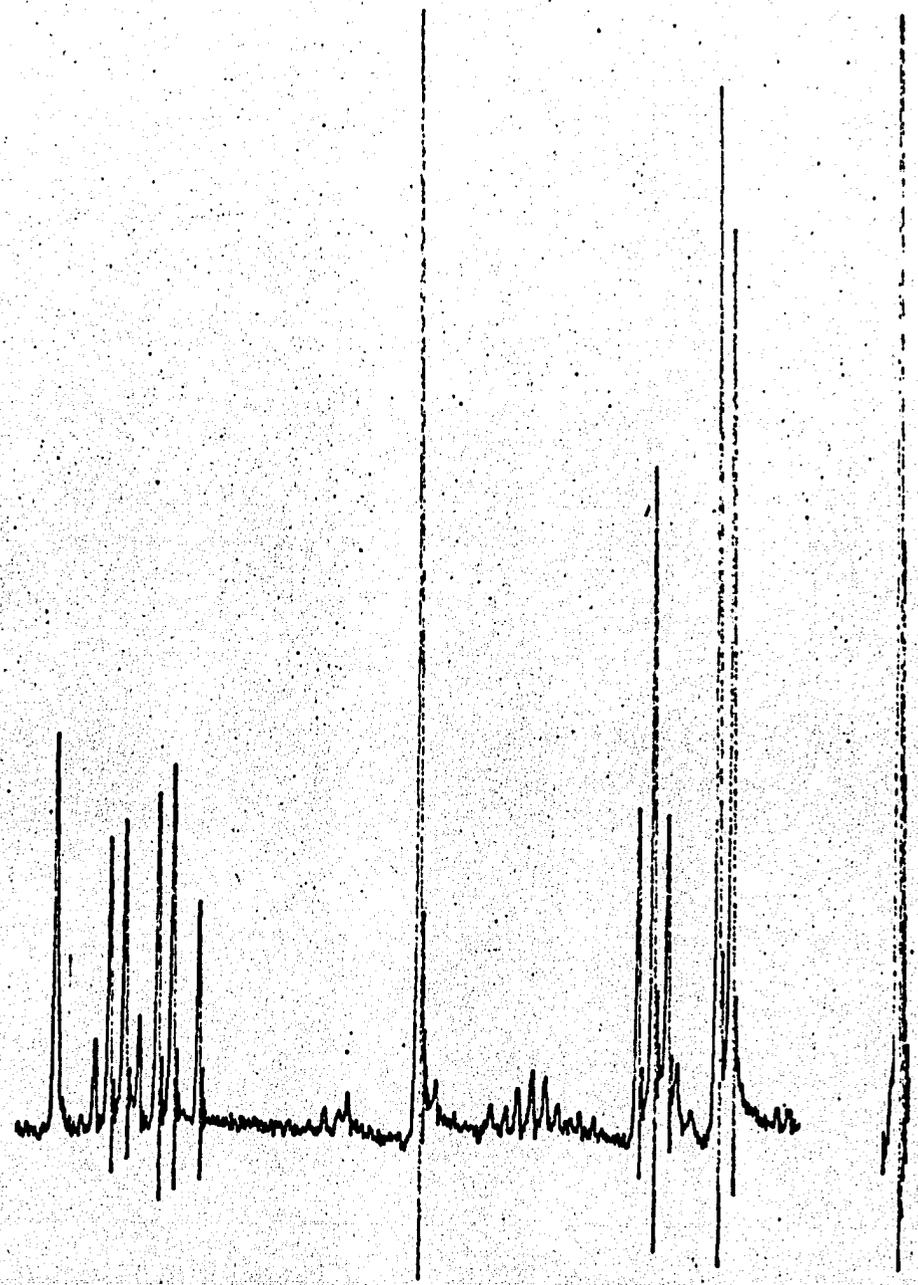
START OF SWEEP



END OF SWEEP



10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0



PERKIN-ELMER

CHART NO. 199-1042



SAMPLE  
REF. NO.  
DATE

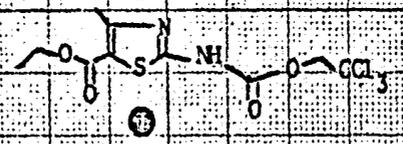
START OF SWEEP



END OF SWEEP

cm  
cm  
cm

900Hz	750	600	450	300	150	0
450	375	300	225	150	75	0
180	150	120	90	60	30	0



-CH<sub>3</sub> anillo

-CH<sub>2</sub>-CCl<sub>3</sub>

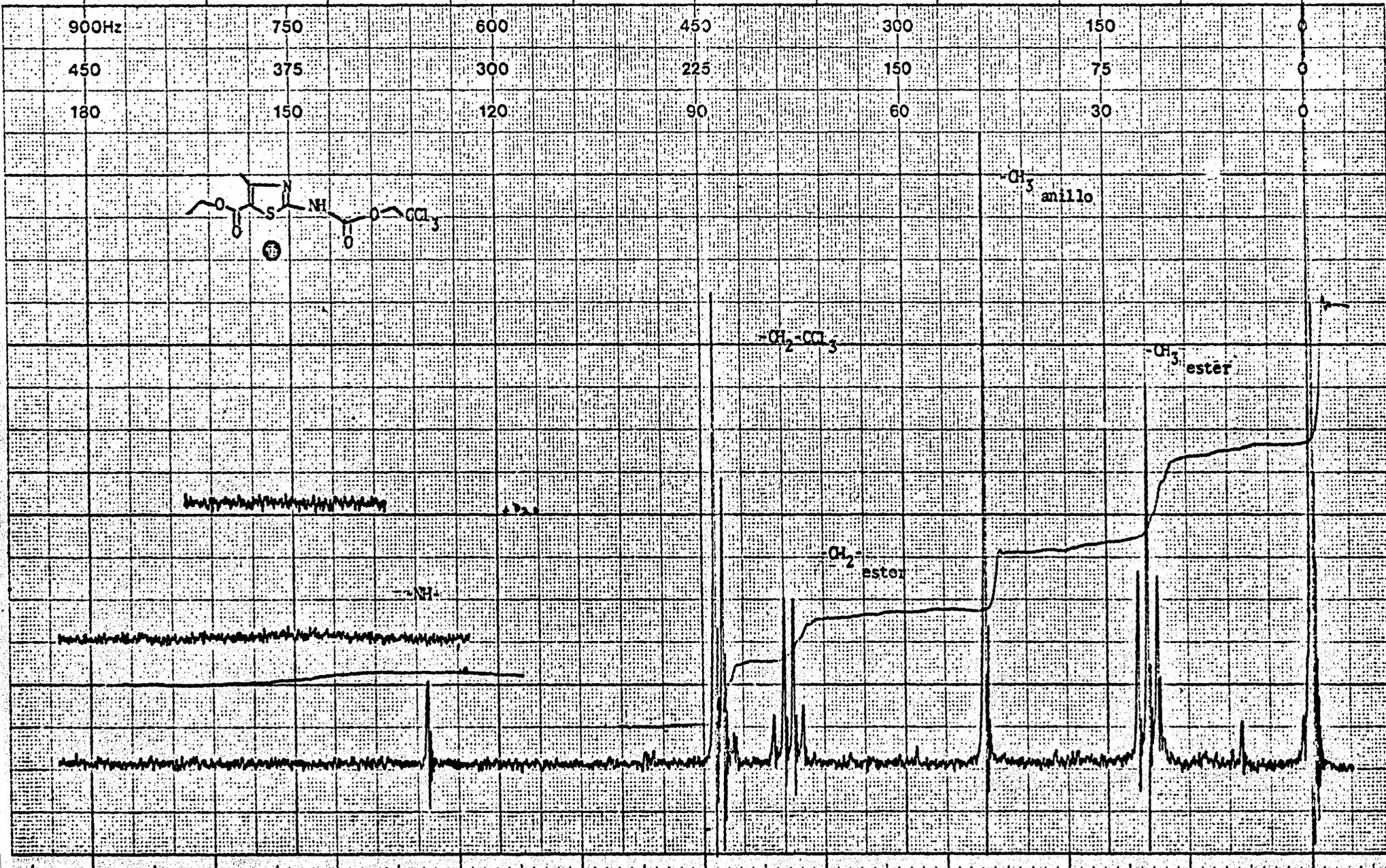
-CH<sub>3</sub> ester

-CH<sub>2</sub>- ester

-NH-

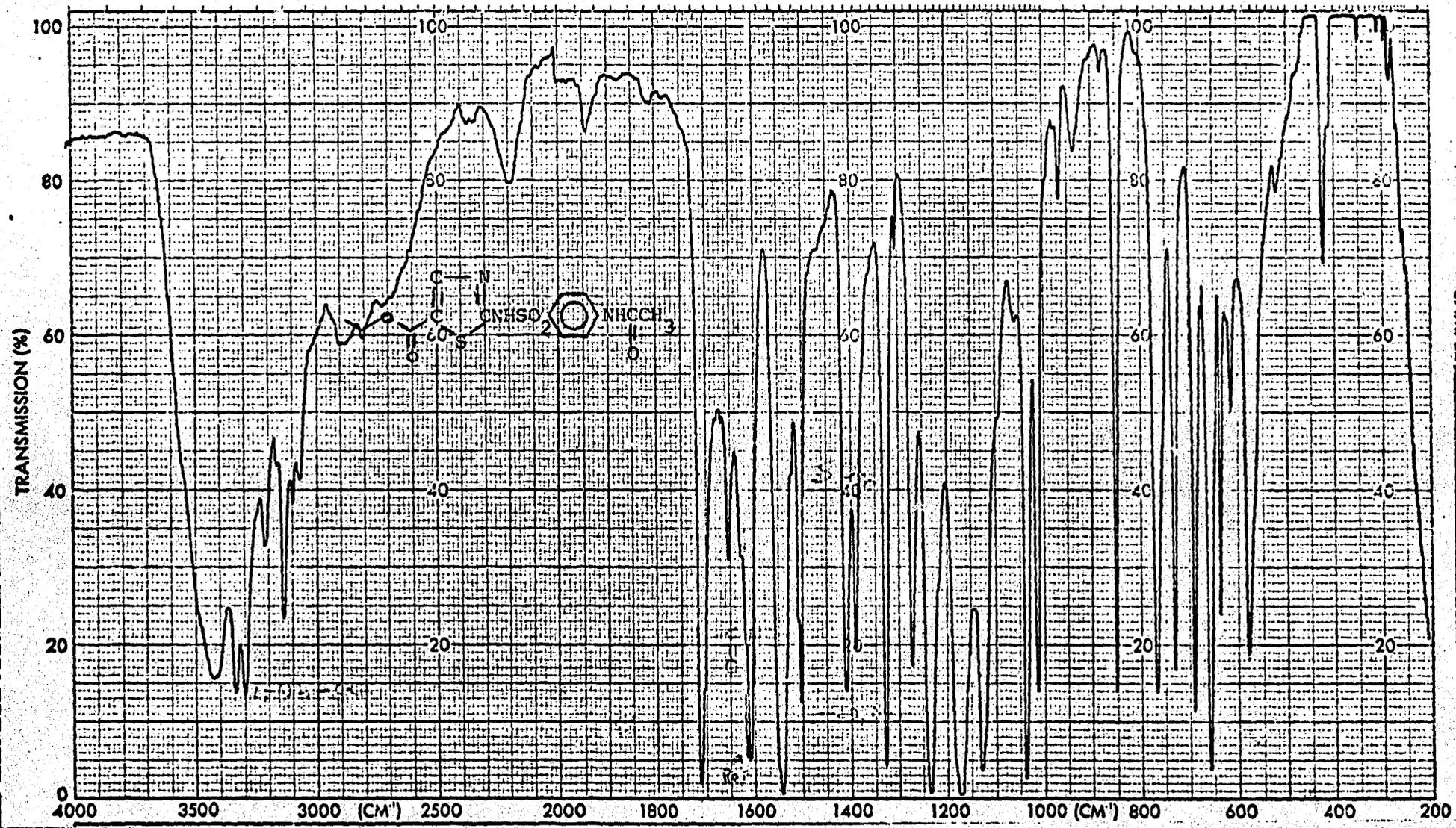
10 9 3 7 6 5 4 3 2 1 0

5)



PERKIN-ELMER

CHART NO. 199-10-42



SAMPLE

REF. NO.

### 5.3. Parte Biológica.

#### 5.3.1. Aislamiento de cloroplastos.

- 1.- 5g de hojas de espinaca se homogeneizan con 50 ml de medio de extracción por 30 seg. a 4°C.  
Medio de Extracción: 5 mM de Triazina, 300 mM de NaCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.01% de Albúmina Bovina (pH 7).
- 2.- El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de gasa y se centrifugó a 2,000 rpm durante 30 seg.
- 3.- El sobrenadante se decantó y se recentrifugó a 5,000 rpm - durante 1 minuto a 4°C (Cloroplastos Tipo E).
- 4.- El residuo se resuspendió en 8 ml del medio indicado a 4°C  
Medio de Resuspensión: 5 mM de Triazina, 100 mM de Sacarosa 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de EDTA y 0.1% de albumina Bovina (pH - 7.5).
- 5.- A los fragmentos de cloroplastos obtenidos se les determinó el contenido de clorofila de la siguiente manera: a 100 l de los fragmentos se les añadió 4 ml de acetona al 80% y se centrifugó a 3,000 rpm durante 2-3 minutos en una centrífuga clínica. El sobrenadante claro se decantó y se aforó a 5 ml con acetona al 80%. Se midió la absorbancia de la solución a 645 y 663 nm (20)

$$(\mu\text{g de clorofila/l} = A_{645} \times 20.2 + A_{663} \times 8.02)$$

El valor obtenido se dividió entre 200 obteniéndose el valor de los  $\mu\text{g}$  de clorofila/ 5 ml, que es igual a los  $\mu\text{g}$ / de clorofila/ 100  $\mu\text{l}$  de fragmentos de cloroplastos.

### 5.3.2. Pruebas Biológicas.

Para normalizar el oxímetro se usó el equivalente aproximado de 100  $\mu\text{g}$  de clorofila con diferentes volúmenes de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ , 10 mM para determinar la velocidad de desprendimiento del oxígeno con este aceptor de electrones.

Antes de usar el electrodo de oxígeno se calibró con Ditiona to de Sodio para determinar la desoxigenación completa de la solución. (en nuestro trabajo y con nuestro aparato la desoxigenación fue igual a 55 divisiones del papel registrador, por lo que si 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  a  $20^\circ\text{C}$  contienen 0.52 moles de  $\text{O}_2$ , entonces una división equivale a 0.0095 moles de  $\text{O}_2$ .)

Como control se usó la mezcla descrita a continuación que se adicionó en el orden siguiente:

- 1<sup>o</sup> 0.2 ml de Triazina 200 mM, pH 7.5
- 2<sup>o</sup> 1.355-1.625 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada
- 3<sup>o</sup> 25-200  $\mu\text{l}$  de ferricianuro de potasio
- 4<sup>o</sup> El volumen de cloroplastos equivalente a 100  $\mu\text{g}$  de clorofila.

La velocidad máxima de desprendimiento de  $\text{O}_2$ , con 250  $\mu\text{l}$  de cloroplastos (aproximadamente 100  $\mu\text{g}$  de clorofila) y 50  $\mu\text{l}$  de -

El valor obtenido se dividió entre 200 obteniéndose el valor de los  $\mu\text{g}$  de clorofila/ 5 ml, que es igual a los  $\mu\text{g}$ / de clorofila/ 100  $\mu\text{l}$  de fragmentos de cloroplastos.

### 5.3.2. Pruebas Biológicas.

Para normalizar el oxímetro se usó el equivalente aproximado de 100  $\mu\text{g}$  de clorofila con diferentes volúmenes de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ , 10 mM para determinar la velocidad de desprendimiento del oxígeno con este aceptor de electrones.

Antes de usar el electrodo de oxígeno se calibró con Ditionato de Sodio para determinar la desoxigenación completa de la solución. (en nuestro trabajo y con nuestro aparato la desoxigenación fue igual a 55 divisiones del papel registrador, por lo que si 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  a  $20^\circ\text{C}$  contienen 0.52 moles de  $\text{O}_2$ , entonces una división equivale a 0.0095 moles de  $\text{O}_2$ .)

Como control se usó la mezcla descrita a continuación que se adicionó en el orden siguiente:

- 1<sup>o</sup> 0.2 ml de Triazina 200 mM, pH 7.5
- 2<sup>o</sup> 1.355-1.625 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada
- 3<sup>o</sup> 25-200  $\mu\text{l}$  de ferricianuro de potasio
- 4<sup>o</sup> El volumen de cloroplastos equivalente a 100  $\mu\text{g}$  de clorofila.

La velocidad máxima de desprendimiento de  $\text{O}_2$ , con 250  $\mu\text{l}$  de cloroplastos (aproximadamente 100  $\mu\text{g}$  de clorofila) y 50  $\mu\text{l}$  de -

ferricianuro de potasio, fue de  $0.072 \mu\text{mol}$  de  $\text{O}_2$  / min /  $100 \mu\text{g}$  de clorofila4 equivalente a aproximadamente  $0.7 \mu\text{mol}$  de  $\text{O}_2$  / min /  $\mu\text{g}$  de clorofila4 siendo estas las condiciones para la reducción de  $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$ .

Bajo estas condiciones el sistema se probó con Ioxinil 1 mM para determinar la velocidad de inhibición de este herbicida. La solución de Ioxinil fue agregada en diferentes volúmenes para obtener las concentraciones requeridas en la mezcla de reacción; para concentraciones más bajas se utilizó una solución 0.01 mM. El Ioxinil fue agregado a la mezcla de reacción después que el agua.

Conc.de Ioxinil:	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	$10^{-6}$	$5 \times 10^{-7}$	$10^{-7}$
Molar						
% de Inhibición:	100	93.3	62.9	46.5	20.0	14.7

El valor del  $\text{pI}_{50}$  (-log de la concentración que causa el 50% de la inhibición,  $\text{I}_{50}$ , en el transporte de electrones) fue de aproximadamente 6.1 que está dentro del intervalo de valores reportados 6.0-6.8 (21). Este dato da una indicación de que el sistema está en condiciones óptimas para el transporte de electrones al ferricianuro de potasio.

Si las soluciones de los compuestos por probar no son acuosas, se hace la corrección necesaria haciendo la verificación con el disolvente a usar en la prueba.

### 5.3.3. Inhibición del Transporte de Electrones por las Substancias Sintetizadas.

Para probar la actividad de los compuestos obtenidos sobre la cadena transportadora de electrones del PSII se usó el siguiente medio de reacción:

0.2 ml de Triazina 200 mM, 50  $\mu$ l de Ferricianuro de potasio 10 mM, 0.02 ml del disolvente o de la solución del compuesto por probar, 0.2 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM, 100  $\mu$ g de clorofila y se ajusta el pH de la suspensión con NaOH 300 mM a 8 (22).

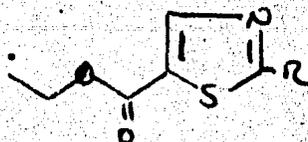
Las soluciones etanólicas de los compuestos se probaron en concentraciones de  $10^{-6}$  a  $10^{-3}$  M. Como se introducía un disolvente diferente del agua, había que comprobar que el etanol no interfería apreciablemente con el transporte de electrones y no modificaría apreciablemente la concentración de oxígeno, por lo que se hizo la siguiente medición:

A la solución control descrita en páginas anteriores se le agregó 20  $\mu$ l de Etanol y 100  $\mu$ l de ferricianuro de potasio 10 mM y se observó que la concentración de oxígeno disminuye de forma no significativa y por lo tanto no afectó las mediciones con el Ioxinil como lo muestran los resultados del  $\text{PI}_{50}$  para este herbicida comercial.

Como a los compuestos se les probó en cuatro ocasiones con cloroplastos aislados por separado y de hojas de espinaca diferentes, esto es cuatro mediciones independientes, en cada una se

comprobó que el etanol no altera apreciablemente la concentración de oxígeno en la mezcla de reacción. Así en la primera medición se observó que la concentración de oxígeno disminuyó de 1.489 --  $\mu$ moles de  $O_2$ / min/ $\mu$ g de clorofila en el medio acuoso a 1.215 --  $\mu$ moles de  $O_2$ / min/ $\mu$ g de clorofila en el medio acuoso más el etanol, en la segunda medición disminuyó de 0.782 a 0.360  $\mu$ moles de  $O_2$ / min/ $\mu$ g de clorofila, en la tercera de 0.391 a 0.100 y en la cuarta medición de 1.398 a 0.979  $\mu$ moles de  $O_2$ / min/ $\mu$ g de clorofila. De las cuatro mediciones se sacó el promedio, y este es el que se reporta a continuación.

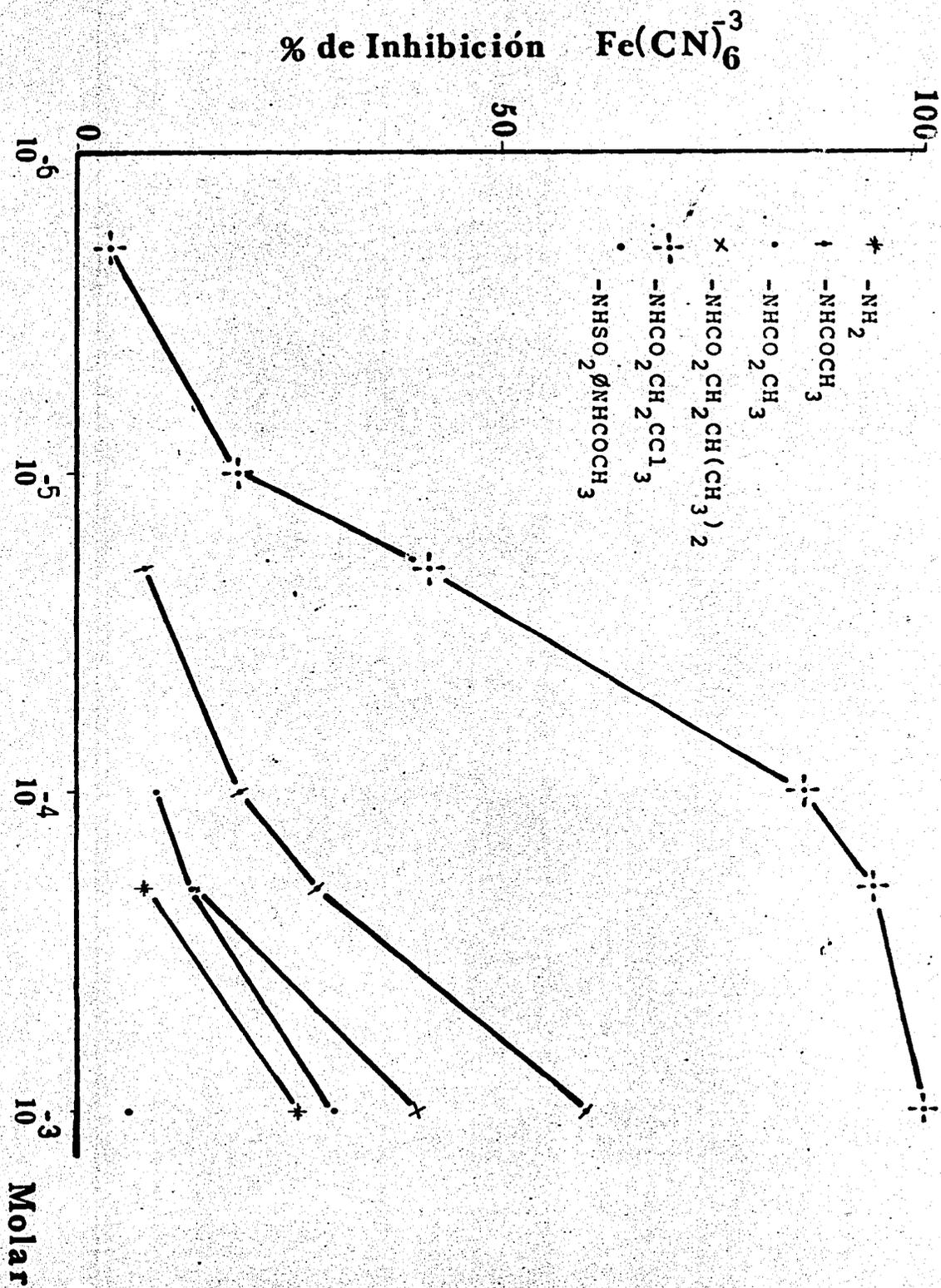
## 5.3.4. Resultados.



Compuesto -R	Concentración en la mezcla mM	% Inhibición	PI <sub>50</sub>
-NH <sub>2</sub>	1	25.5	-
	0.2	7.3	
-NHCOCH <sub>3</sub>	1	60.3	3.21
	0.2	27.6	
	0.1	19.3	
	0.02	5.0	
-NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1	30.6	-
	0.2	14.8	
	0.1	0.8	
-NHCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1	40.6	-
	0.2	14.5	
	0.1	10.7	
-NHCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CCl <sub>3</sub>	1	100	4.57
	0.2	92.9	
	0.1	82.7	
	0.02	41.3	
	0.01	19.1	
	0.002	1.6	
-NHCO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COCH <sub>3</sub>	1	3.2	-

TABLA 2: Porcentaje de Inhibición del Transporte de Electrones por los Compuestos Sintetizados.

Gráfica 1. Inhibición del PS-II



## 6. DISCUSION DE RESULTADOS.

### 6.1. Síntesis.

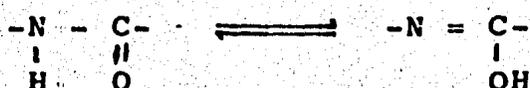
El compuesto V se obtuvo con un rendimiento bajo debido a que los aceites que resultaron al final de cada reacción no pudieron cristalizarse. El problema principal fue la poca estabilidad del formiato de  $\beta,\beta,\beta$ -Tricloroetilo, que se comprobó en la CCF al observarse varias manchas que al parecer correspondían a fragmentos de este compuesto. en todas las reacciones se recuperó parte del compuesto I y por lo tanto el producto deseado no se obtuvo con un rendimiento alto, aunque la cantidad obtenida fue suficiente para su identificación y para las pruebas biológicas.

La identificación de los compuestos I y VI por comparación de los puntos de fusión obtenidos con los reportados en la literatura no resultó ser de gran ayuda pues se encuentran valores para estos compuestos de 177 y 225°C para I y de 154-6, 246 y 258°C para VI. Así que la confirmación se obtuvo por los datos del IR y RMN, donde se identificaron las señales para I en ambas espectroscopías y para VI la confirmación de la estructura la dan las señales correspondientes al enlace  $\text{SO}_2\text{-NH}$  en el IR ( $1320\text{ cm}^{-1}$ ) y en RMN la correspondiente al protón (7.4 ppm).

Para los otros derivados de I no hay datos en la literatura, pues son compuestos nuevos, su estructura fue confirmada por las dos espectroscopías antes mencionadas, por el punto de fusión y por CCF en diferentes sistemas de elución.

Se pueden dividir los compuestos en dos grupos según la espectroscopia de RMN del  $H^1$ , con respecto a I. El primer grupo corresponde a las aminas sustituidas en las que la señal del protón no sufre desplazamiento significativo con respecto a los protones de la amina libre. Las señales solamente se desplazan de 3.3 ppm de la amina libre a 3.1 ppm para los derivados III y IV. La señal de 3.3 ppm del compuesto VI es la que corresponde al protón del grupo -NH de la amida unida al anillo del benceno por lo que no se incluye en este grupo, pues el efecto que se considera es sobre la amina del anillo tiazólico.

El segundo grupo corresponde a los derivados que tienen un efecto de desprotección electrónica sobre el protón del grupo NH de la amida por lo que desplaza la señal a campos bajos. El efecto de cada uno de los sustituyentes es de alguna manera semejante para el derivado acetilado el efecto se debe a un tautomerismo

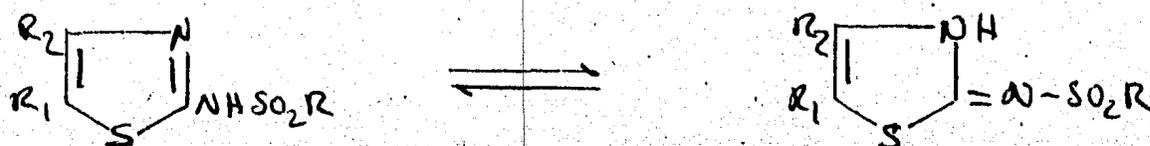


que también se aprecia en la señal doble del espectro del IR en 1690 y 1740  $\text{cm}^{-1}$ .

El efecto del derivado que tiene en la posición  $\alpha$  al carbonilo tres cloros se debe a una polarización de los enlaces que resulta en la atracción de electrones hacia los cloros dejando más desprotegido al protón



Aunque los análisis térmicos de los sulfonamidotiazoles indican que en ellos tiene lugar el tautomerismo imida-amida, se sabe que en solución se encuentran cantidades apreciables de los iminotiazoles correspondientes



Además de que es posible comparar la influencia de los diferentes anillos aromáticos sobre una misma clase de protón, NH-Ac -- como podemos observar en la tabla 1 el protón del grupo -NH de la amida unida al tiazol está mucho más desprotegido que el del -NH de la amida unida al anillo del benceno.

## 6.2. Parte Biológica.

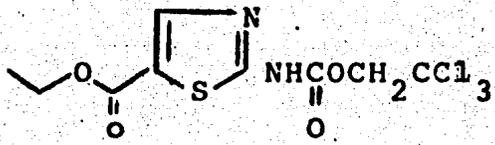
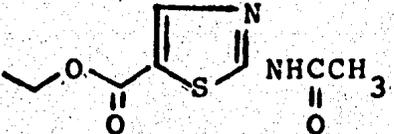
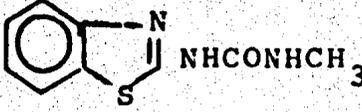
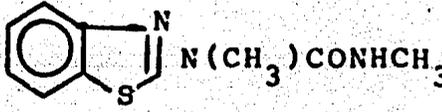
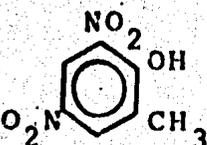
En la gráfica de la actividad inhibitoria del PSII por los compuestos sintetizados sólo se graficaron las concentraciones en las que se considera que la substancia probada tiene acción al interferir con alguna de las funciones del sistema biológico

(PSII) y no por dañar a la membrana y sus componentes. En la gráfica se puede observar el orden en que aumentó la actividad de los 2-aminotiazoles: V > II > IV > III > I > VI. Tomando como punto de referencia el comportamiento del compuesto I, observamos que el sustituyente aumenta la actividad cuando se tiene el grupo -NH-CO- unido al anillo del tiazol, según lo demuestra el comportamiento del compuesto VI que no tiene actividad significativa. De los otros derivados se puede decir que las cadenas alifáticas unidas al grupo -NH-CO- no contribuyen significativamente al aumento de la actividad y sí en cambio los derivados con los sustituyentes electronegativos. No todos ellos tienen la actividad suficiente como para obtener un valor de  $I_{50}$  (concentración a la cual se inhibe el 50% del transporte de electrones), en el intervalo de concentraciones deseables. Dentro del intervalo reportado para herbicidas comerciales se obtuvieron valores de  $I_{50}$  similares para los compuestos V y II, siendo los  $pI_{50}$  ( $-\log I_{50}$ ) de 4.57 y 3.21 respectivamente. En la tabla 3 se comparan valores de  $pI_{50}$  de herbicidas comerciales que tienen el anillo del tiazol en sus estructuras y se observa que el valor de los compuestos sintetizados está dentro del mismo intervalo.

Por otro lado es interesante observar que a pesar de tener el grupo funcional considerado como uno de los responsables de la actividad de los herbicidas que interfieren con el PSII, esta familia de compuestos es totalmente diferente estructuralmente hablando a las otras familias ya conocidas de herbicidas. Puesto que en el estudio efectuado no es posible el considerar que la

substancia sufra algún tipo de transformación, significa que si existe una inhibición a nivel del componente proteico de tipo -- alostérico y que este debe tener un subreceptor para este tipo - de compuestos, sumando uno más a los ya existentes en el modelo.

TABLA 3. Valores de  $I_{50}$  de algunos herbicidas comerciales y de los compuestos sintetizados.

NOMBRE	FORMULA	$I_{50}$
V		$2.69 \times 10^{-5}$
II		$6.16 \times 10^{-4}$
Benzotiazuron		$3.98 \times 10^{-7}$
Metabenzotiazuron		$3.16 \times 10^{-7}$
Monuron		$3.98 \times 10^{-6}$
DNOC		$1.9 \times 10^{-4}$ a $2.5 \times 10^{-7}$

## 7. CONCLUSIONES.

De lo anteriormente expuesto se pueden sacar las siguientes conclusiones: los objetivos del trabajo se cumplen y se puede hacer una serie de recomendaciones o líneas a seguir, así como una evaluación de las limitaciones del trabajo y las subsecuentes etapas a seguir.

De las mediciones efectuadas se observa que si es posible sintetizar derivados del 2-Aminotiazol con actividad inhibitoria de la fotosíntesis en cloroplastos aislados siempre y cuando contengan al grupo  $-N-CO-$  en su estructura y en la posición 2. Se puede decir también que el sustituyente del carbonilo debe ser un grupo atrayente de electrones tal como los halógenos en una cadena alifática, además se podría comparar la actividad de los grupos que pueden substituir el protón del nitrógeno de la amida.

Para poder suponer que los compuestos sintetizados tengan la misma actividad sobre las malezas es necesario considerar una serie de experimentos más biológicos que se saldrían de los objetivos actuales, como es el de probarlos sobre: a) hojas verdes bajo condiciones controladas, b) en plantas completas en condiciones de invernadero y c) en cultivo a nivel de campo experimental. También es necesario hacer pruebas de toxicidad sobre animales. Todas las pruebas nos indicarían si el compuesto por si mismo penetraría en la planta o si requiere de regímenes óptimos de temperatura y humedad para su acción. También

resulta importante el estudiar si el compuesto activo es transportado en la planta o si es metabolizado y en que metabolitos se transforma.

Lo anterior puede aplicarse a la investigación aplicada, - además es posible hacer observaciones sobre investigación básica con respecto a los estudios del comportamiento electroquímico del compuesto ya que está actuando en un sistema donde existe transferencia de electrones y por lo tanto sería de -- mucha utilidad conocer el potencial redox para saber a que nivel del sistema actúa. Los estudios basados en la relación -- estructura-actividad de la familia de compuestos tiazólicos - serían de utilidad en la proposición de síntesis de nuevos -- compuestos derivados de los ya estudiados. Otro de los estu--dios que resulta de interés en este tipo de trabajos es el - predecir como se comporta el compuesto frente a las membranas de las células y para esto se estudia la liposolubilidad del compuestos. Algunos de estos puntos servirán de trabajos subsecuentes que se efectuarán en el laboratorio donde se hizo - este trabajo.

Como se ve el presente trabajo se refiere a la primera etapa en el campo de la investigación de los herbicidas, que es el de la síntesis de compuestos con probable actividad biológica y las pruebas preliminares correspondientes.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ciencia y Desarrollo. No.52/ año IX pp.5-8 (1983)
- 2.- Shetty and Krantz. Weed Reserch at ICRISAT. Wedd Sci. 28  
p. 451 (1980).
- 3.- Matthews,L.J. Developments in the Use of Herbicides. J.  
of Agriculture. No. 7, 51 (1977).
- 4.- Miller,K.R. The Photosythetic Membrane. Sci.Am. 236 102  
(1979).
- 5.- Govidjee,G.R. The Absorption of Light in Photosynthesis.  
Sci.Am. 231 68 (1974).
- 6.- Levie R.P. The Mechanism of Photosynthesis. Sci.Am. 226  
58 (1969).
- 7.- Hilton,J.L., Moreland,D.E. Actions on Photosynthetic --  
System. Cap. 16 en Audus. Herbicides Vol. 1.
- 8.- Corbett,J.R. Biochemical Mode of Action of Pesticides.  
Academic Press, Londres (1974).
- 9.- Dodge,A.D. The Role of Light and Oxygen in the Action of  
Photosynthetic Inhibition Herbicides. ACS Symposium Series  
No.81 (1982).
- 10.-Renger,G. Studies about the Mechanism of Herbicides Inter  
action with Photosistem II in Isolated Chloroplasts. Z. -  
Naturforsch. 34 1010 (1979).
- 11.-Metzger4J.V. Thiazole and its derivatives. en The Chemis-  
try of Heterocyclic compounds; A series monographs. V.34  
Wiley (1979).

- 12.- Popp, G. Justus Liebigs Ann.Chem. 250 257 (1889), 249 31 (1888).
- 13.- Babadjamian, Gallo, Metzger and Chanox. J. Heterocyclic Chem. 13 1205 (1976).
- 14.- Wentuort, T., Brady, A.L. J.Chem.Soc. 117 1042 (1920).
- 15.- Hall, D.O. Nomenclature of Isolated Chloroplasts. Nature New Biology. 235 125 (1972).
- 16.- Perrin, D.D. et al. Purification of Laboratory Chemicals. 2<sup>o</sup> Ed. Pergamon Press. USA (1980).
- 17.- Chaurasia, M.R. et al. Synthesis of some New 2-Sulphanilamidotiazoles as Potential Fungicides. Agric.Biol. 45 - 1129 (1981).
- 18.- Vogel, A.I. A Textbook of Practical Organic Chemistry. 3<sup>o</sup> Ed. Logman, Londres (1956).
- 19.- Ibid. 4<sup>o</sup> Ed. (1978).
- 20.- Arnor, D.J. Cooper enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenol oxidase in Beta vulgaris. Plant Physiology 24 (1949)
- 21.- Fedtke, C. Biochemistry and Physiology of Herbicides Action Springer Verlag (1980)
- 22.- Pallett and Sanders. Studies into the different Response of the three Weed Species to the Hidroxy-benzonitriles. - Proceeding 1982 British Crop Protection Conference-Weed.