

00570

6  
Key.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE  
N-FENILCARBAMATOS DE METILO 4-SUSTITUIDOS  
COMO ANTIHELMINTICOS Y HERBICIDAS

265145

**T E S I S**

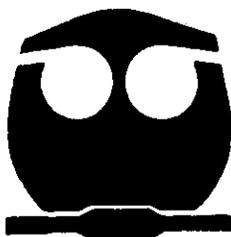
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS**

**(QUIMICA FARMACEUTICA)**

P R E S E N T A

**Q.F.B. SERGIO L RODRIGUEZ MORALES**



MEXICO, D. F.

1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Noráh Barba Behrens
1er. Vocal	Dr. Raymundo Cruz Almanza
Secretario	Dr. Roberto Martínez
Suplente	Dr. Blas Lotina Hensen
Suplente	Dr. Andrés Navarrete Castro

## SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

LABORATORIO 122, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, DIVISION DE BIOQUIMICA Y FARMACIA, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM

### Asesor de Tesis :



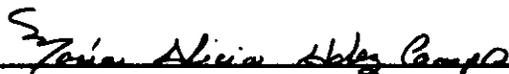
Dr. Rafael Castillo Bocanegra

### Supervisor Técnico de Modelado Molecular :



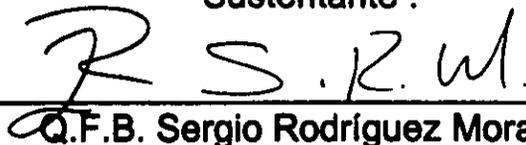
M. en C. Alfonso Lira Rocha.

### Supervisor Técnico de Síntesis y Actividad Antihelmíntica :



M. en C. María Alicia Hernández Campos

### Sustentante :



Q.F.B. Sergio Rodríguez Morales

Para ti señor,  
que me permitiste lograr  
esta meta en mi vida.  
Gracias, Dios.

When the heart rules the mind  
One look and love is blind  
When you want the dream to last  
Take a chance forget the past

Seasons will change  
You must move on  
Follow your dream

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación de excelencia que me ha brindado.

A la Fundación UNAM, por el apoyo económico para realizar la estancia de investigación en la University of Arkansas for Medical Sciences (UAMS), que me permitió realizar la parte de modelado molecular, pero sobretodo por el haberme aceptado como becario

A la Dra. R. Lilia de Compadre y al Dr. Cesar Compadre por haberme aceptado como colaborador, y por todos sus consejos y amistad durante la estancia de investigación en la UAMS.

A mis padres, por su gran amor, sus palabras de aliento, pero sobre todo por los momentos de felicidad que disfruto todos los días con ellos.

A mis Hermanos.

A Mayra: porque hace que las cosas tengan un sentido y una dirección, pero principalmente por su amor y paciencia.

Al Doctor Rafael, no sólo por ser mi asesor de tesis, sino por toda su amistad, y la fortaleza que nos imprime a todos en el laboratorio.

A la Maestra Alicia, por que siempre encuentro en ella una gran amiga.

Al Maestro Alfonso Lira y Pilar, por su valiosa ayuda, ya que sin ellos esta tesis estaría incompleta.

A Daniel y Remedios, por que siempre se necesita quien te demuestre su confianza y crea en ti.

A la maestra Socorro Alpizar, por su gran confianza que me brinda, su invaluable ayuda, pero sobre todo por aprender todos los días a mejorar.

A mis compañeros y amigos de la Maestría de Farmacia: Carlos, Tere, Laura, Maribel,, Samuel, Armando, Lalo, Rosa I., Raúl, Ernestina, Lety.

A Raúl Morales, por las pruebas de actividad sobre *T. Spirallis*, y que forman la parte central de este trabajo.

A todo el lab-115, pero principalmente: Beatriz, Susana, Lahucine, y Lilian, a quienes agradezco toda su ayuda en la pruebas herbicidas.

A los Bioquímicos : José Juan, Alberto, Pilo, Dairo, Carlos, Leonel, Octavio

Y para todas aquellas personas que me brindaron su ayuda y que olvide mencionarlas...

A todos  
Mil Gracias.

## RESUMEN

En esta tesis se describe el Modelado Molecular, la síntesis, la evaluación biológica antihelmíntica y herbicida de los siguientes N-fenilcarbamatos de metilo: 4-propiltio (4), 4-feniltio(7), 4-benzoil(11), 4-hidroxi(12), 4-metoxi(13), 4-nitro(14), y 4-cloro (15).

El modelado molecular se realizó con el programa Spartan, con el que se determinó el mínimo energético global de los bencimidazol carbamatos de metilo: Albendazol, Mebendazol y Fenbendazol como modelos y sus carbamatos análogos propuestos, con el Hamiltoniano AM1. Se calcularon descriptores moleculares y superficies electrónicas para cada molécula, y se comparó la similaridad estructural respecto al volumen compartido, entre los compuestos modelo y los compuestos propuestos.

Al comparar los descriptores moleculares, así como las estructuras obtenidas de la minimización energética de los bencimidazoles modelos y sus respectivos carbamatos análogos propuestos, éstos resultaron casi idénticos, a excepción del coeficiente de partición (Log P) y superficie molecular. La comparación del volumen compartido indicó que existe un 0.59 a un 0.78 de coeficiente de similaridad entre ellos.

Por otra parte, el cálculo de la superficie del potencial electrostático reveló dos potenciales importantes en la serie bencimidazólica: uno positivo inducido por el nitrógeno del carbamato ( presente solo en los compuestos 7 y 10), y otro negativo inducido por el nitrógeno  $sp^2$  del anillo del imidazol (presente en el compuesto 4, pero en el sitio del potencial positivo).

Estas características estructurales (similaridad en volumen) y electrónicas (potencial electrostático) que presentaron los carbamatos con respecto de los bencimidazoles; permiten intuir una actividad antihelmíntica, en el siguiente orden: **11<7<4**.

Los compuestos sintetizados se identificaron por sus datos espectroscópicos de IR, RMN y Masas, los cuales fueron concordantes con las estructuras esperadas, resultando nuevas dos de ellas.

Los ensayos *in vitro* contra *Triquinella spiralis* como modelo de helminto, mostraron una reducción de la actividad de las larvas musculares del  $20.5 \pm 11.2$  % y  $2 \pm 0.9$  % a una concentración de  $1 \mu\text{g/ml}$  para los carbamatos **4** y **11** respectivamente, que no se presentó en los bencimidazoles, y a  $10 \mu\text{g/ml}$  del  $25.2 \pm 11.5$ ,  $28.0 \pm 11.4$ , y  $32.2 \pm 6.1$  para los carbamatos **4**, **7**, **11**, muy similares a los encontrados para los bencimidazoles. Estos resultados comprobaron las predicciones de actividad obtenidas del estudio computacional.

Por otra parte los ensayos de la actividad herbicida de los carbamatos sintetizados mostraron una inhibición total del flujo de electrones desacoplado de la fotosíntesis, en una concentración menor de  $500 \mu\text{M}$ , tres de ellos resultaron nuevas moléculas inhibidoras, de la reacción de Hill con potencial actividad herbicida (Carbamatos **4**, **7**, y **11**), con una potencia de inhibición mucho mayor que los reportados en la literatura (Compuestos **12-15**). Los carbamatos inhibieron el transporte de electrones (basal, desacoplado y fosforilante) comportándose como inhibidores clásicos de la reacción de Hill. Dentro de la cadena fotosintética mostraron tener dos mecanismos de acción, a nivel de Fotosistema II ( $Q_B$ ) para los carbamatos reportados y en el lado reducido de PQ, para las nuevas moléculas. Además presentaron una actividad moderada como herbicidas preemergentes.

## **ABSTRACT.**

In this thesis the molecular modeling, synthesis, anthelmintic and herbicidal activity of the following methyl N-phenylcarbamate derivatives, are described: 4-propylthio (4), 4-phenylthio (7), 4-benzoyl (11), 4-hydroxy (12), 4-methoxy (13), 4-nitro (14), and 4-chloro (15).

The computational study was performed with the Spartan Software, minimizing the active bencimidazoles: Albendazole, Fenbendazole, Mebendazole, and compounds 4, 7, and 11, with the Hamiltonian AM1 (Q.M). Then, molecular descriptors, HOMO-LUMO and electrostatic potential surfaces were calculated for all compounds, and the structural similarity between them, using shared volume as property, were compared.

When the molecular descriptor and the structure obtained from the minimization were compared, these were very similar, only the partition coefficient and the molecular area were different. The comparison of the shared volume showed an 0.59-0.78 coefficient of similarity between them.

On the other hand, the electrostatic potential surface showed two important potentials in the bencimidazole serie: a positive one induced by the nitrogen of the carbamate group (which is only present in the compounds 7 and 11), and another one negative, induced by the nitrogen  $sp^2$  of the imidazole ring, which is present in compound 4, but located on the side of the positive potential.

This structural (volume similarity) and electronic (electrostatic potential) features present in the benzimidazole series is present in the new carbamates, and allowed to predict an anthelmintic activity in the following order **11<7<4**.

All the compounds synthesized were identified by spectroscopy and spectrometric data, also by their physical constants. Two of them are new molecules.

The "in vitro" assays on *Triquinella spiralis* as a helminthic model showed reduction of the larvae activity of  $20.5 \pm 10$  % and  $2 \pm 0.9$  % at 1  $\mu\text{g/ml}$  for compounds **4** and **11**, respectively, the benzimidazoles did not show activity at this concentration. At 10  $\mu\text{g/ml}$ , **4**, **7**, and **11** had a reduction of  $25.2 \pm 11.5$ ,  $28.0 \pm 11.4$ ,  $32.2 \pm 6.1$  % of activity, very similar as those showed by the benzimidazoles. These results demonstrated the prediction made in the computational study.

The herbicidal activity assays of the methyl carbamates showed a total inhibition of the Hill reaction activity at concentrations lower than 500  $\mu\text{M}$ . The three new molecules (compounds **4**, **7**, and **11**) showed potent inhibition, ten times better than the other carbamates reported in the literature (compounds **12-15**). The carbamates inhibited the electron transport (basal, uncoupled, and phosphorylant) from water to methylviologen and behaved as classical inhibitors of Hill's reaction. In the photosynthetic redox chain, the carbamates showed two sites of inhibition, at FS II level (QB) for the reported carbamates and in the reduced side of PQ for the new molecules. Also they showed a weak activity as preemergence herbicides.

## Indice.

Resumen.....	i
Abstract.....	iii
1. Introducción.....	1
2. Objetivos .....	9
3. Generalidades.....	11
3.1. Modelado Molecular.....	11
3.1.1 Mecánica Molecular.....	14
3.1.2 Métodos Teóricos.....	16
3.1.3 Análisis Conformacional.....	18
3.2. Helmintiosis.....	19
3.3. Herbicidas .....	24
3.3.1 Clasificación de Herbicidas.....	26
3.3.2 Mecanismo de Acción.....	27
3.3.3 Fotosíntesis.....	28
3.3.3.1 Generalidades.....	28
3.3.3.2 Transferencia de Electrones.....	30
3.3.3.3 Circuito de Protones.....	32
3.3.4 Mecanismo de Acción de los Herbicidas en la.....	
Fotosíntesis.....	33
4. Desarrollo del Trabajo experimental.....	37
4.1. Modelado Molecular.....	37
4.2. Síntesis de los Carbamatos de metilo Propuestos.....	40
4.2.1. Instrumentación.....	40
4.2.4. Síntesis de los Compuestos 4, 7.....	42
4.2.11. Síntesis del Compuesto 11.....	49
4.2.16. Síntesis de los Compuestos 12-15.....	53
4.3. Actividad antihelmíntica sobre <i>T. spiralis</i> .....	57
4.4. Actividad Herbicida .....	60
4.4.1. Aislamiento y Determinación de la Clorofila.....	60
4.4.2. Determinación de la Síntesis de ATP.....	61
4.4.3. Medición de la Vel. del Transporte de Electrones.....	62
4.4.4. Determinación del sitio de Inhibición en la cadena.....	
fotosintética.....	64
4.4.5. Ensayos preemergentes de los carbamatos.....	66
5. Resultados y Discusión.....	68
5.1. Modelado Molecular.....	68
5.2. Síntesis de los Compuestos Propuestos.....	92
5.3. Actividad Antihelmíntica sobre <i>T. spiralis</i> .....	95
5.4. Actividad Herbicida .....	98
5.4.1. Determinación de la Síntesis de ATP.....	98
5.4.2. Medición de la Vel. del Transporte de Electrones.....	101
5.4.3. Determinación del sitio de Inhibición.....	105
5.4.4. Ensayos Preeemergentes.....	109

6. Conclusiones.....	115
7. Espectros.....	117
8. Bibliografía.....	130

### 1. INTRODUCCION

Dos aspectos importantes que se abordan en esta tesis son el de los compuestos antihelmínticos y el de los compuestos herbicidas. La razón de abordar éstos, es porque los compuestos sintetizados en este trabajo tienen estructuras análogas a compuestos que tienen ambas actividades. A continuación se presentan los antecedentes que dieron pie a los objetivos de esta tesis.

Con relación a las helmintosis<sup>†</sup> podemos decir que éstas son enfermedades parasitarias causadas por los helmintos o gusanos planos y redondos. Estas parasitosis con frecuencia producen severas complicaciones clínicas. Además, constituyen un obstáculo para el crecimiento socioeconómico por causar malnutrición e incapacidad física, lo que lleva a una reducción de la capacidad del trabajo en la gente parasitada.<sup>2</sup>

Más aún, la presencia de helmintos en animales domésticos lleva a una baja producción de leche, carne o lana, lo cual representa una pérdida considerable en la economía de la agricultura y de productos de uso diario en todos los países del mundo. Japón sufre una pérdida de 60 millones de dólares por año por infestaciones con céstodos.<sup>2</sup>

---

<sup>†</sup> En esta tesis se emplea la nueva nomenclatura de enfermedades parasitarias publicada recientemente <sup>1</sup>

La ascariosis causa malnutrición de macronutrientes y vitamina A, lo cual lleva a un pobre crecimiento y una desnutrición en niños. Kenia pierde 2.35 millones de Kg de comida al año, que corresponde a cuatro millones de dólares. Se ha estimado en el Reino Unido, que la pérdida potencial debido a parasitosis no tratadas en rumiantes es de 160 millones de libras esterlinas. En Estados Unidos, las pérdidas son aproximadamente de 500, 000 dólares anualmente por la infección de parásitos en el hígado del ganado vacuno.<sup>2</sup>

Los fármacos antihelmínticos son el medio más ampliamente usado para controlar estas infestaciones, pero debido a costos y logística, estos fármacos no son fácilmente disponibles para la mayoría de la gente en países en vías de desarrollo. Y aunque existen en el mercado fármacos o mezcla de fármacos para la cura de estas enfermedades, la incidencia no ha disminuido y se calcula que más de 2 millones de personas alrededor del mundo sufren de los efectos patogénicos de los helmintos, por otro lado existe un gran número de helmintosis de tipo muscular como la filariosis, triquinosis, cisticercosis e hidantiosis, para las cuales no hay todavía un fármaco ideal.

Encontrar moléculas que curen con seguridad la infestación por helmintos parásitos relacionados filogenéticamente, representa un fuerte reto, el cual sólo se ha cubierto parcialmente a través de probar compuestos sintetizados o extractos de plantas directamente contra el organismo blanco ( modelo ideal ).<sup>3</sup>

Una clase farmacéutica útil de amplio espectro ha sido descubierta una vez por década usando este tipo de método y han pasado casi 20 años desde la presencia de una nueva clase, las avermectinas<sup>3</sup>, por lo que la carencia de una nueva molécula líder es evidente.

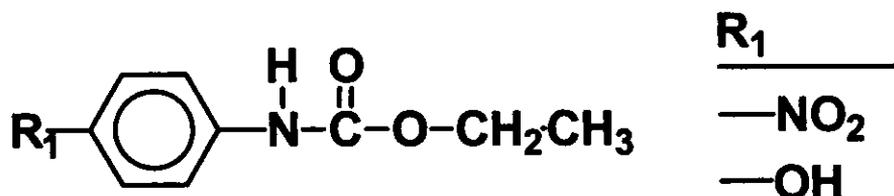
La bibliografía relacionada con los compuestos antihelmínticos de amplio espectro es extensa, en la última década se reporta que existen principalmente tres grupos de fármacos : los imidotiazoles (morantel, levimasol ) , las avermectinas y los bencimidazoles,<sup>4</sup> siendo estos últimos los que han probado ser altamente eficaces en animales<sup>5</sup> y humanos.<sup>6</sup> Los bencimidazoles han mostrado ser capaces de eliminar nemátodos adultos, céstodos y fasciolas. Pertenecen a este grupo el albendazol, mebendazol y fenbendazol, los cuales son empleados como fármacos de primera elección.<sup>2</sup>

Estudios recientes, realizados en México, demostraron que el albendazol es efectivo, a nivel clínico, en el tratamiento de la neurocisticercosis.<sup>7</sup> En otros estudios relacionados con la biodisponibilidad del albendazol, se encontró que este compuesto se absorbe poco (5%) y sólo se detectó su metabolito, el sulfóxido, como único compuesto bencimidazólico en plasma.<sup>8</sup>

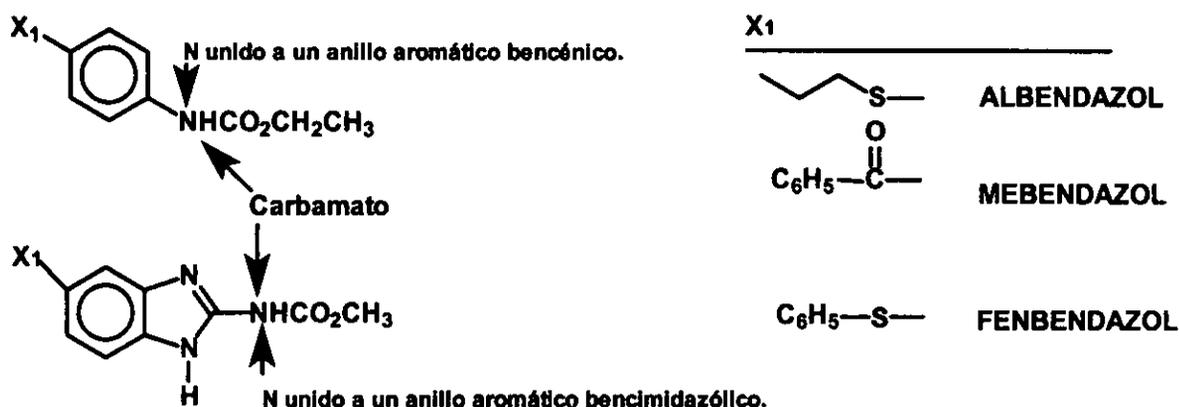
La mayoría de los compuestos antihelmínticos bencimidazólicos fueron diseñados para ejercer su acción en el tracto gastrointestinal. Son muy polares, de punto de fusión alto y muy insolubles en agua; sin embargo, aunque su eficacia es grande, no actúan en todos los estadios de algunos parásitos, ni son efectivos contra parásitos extraintestinales.<sup>9</sup>

Considerando lo anterior y el hecho que estos compuestos son de importación y alto costo, resulta importante contar con nuevas moléculas con potencial antihelmíntico, de estructura sencilla, fáciles de preparar y de bajo costo de producción.

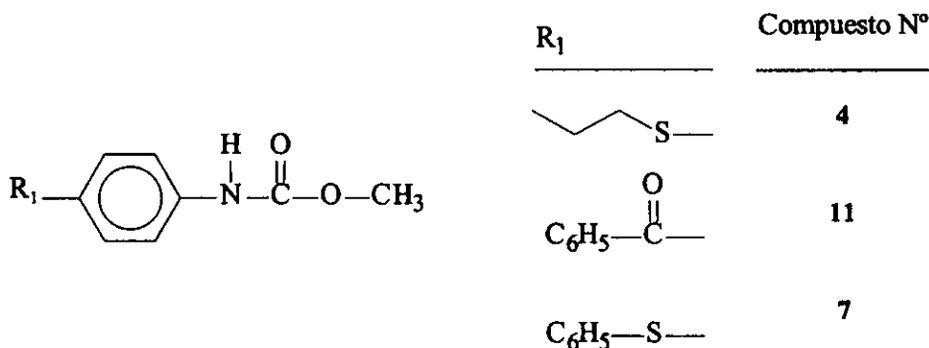
Para poder contar con nuevas moléculas con potencial antihelmíntico, es imprescindible realizar un estudio amplio que permita conocer a fondo cuales son los requerimientos estructurales mínimos para conservar la actividad intrínseca antihelmíntica. Parte de los objetivos de esta tesis están relacionados con dicho estudio amplio. Se ha considerado importantes los estudios realizados en la FES-Cuautitlán,<sup>10</sup> encaminados a la obtención de carbamatos de etilo que llevaron a la preparación del siguiente tipo de compuestos:



El estudio antihelmíntico de estos compuestos sobre *Hymminolepis nana* en ratones, demostró actividad equiparable al Praziquantel.<sup>11</sup> Si se observa la estructura de los compuestos anteriores, se puede apreciar cierta similitud estructural con los carbamatos bencimidazólicos:

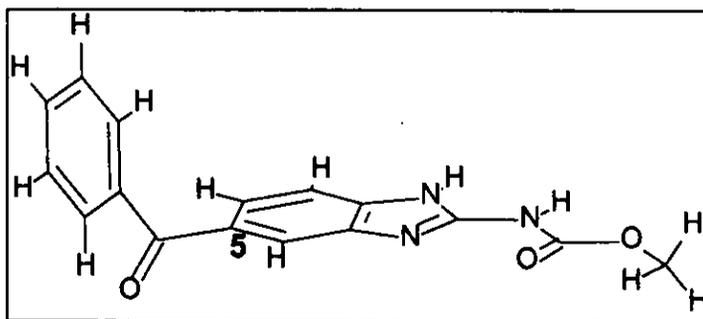


Ambos tipos de estructuras tienen un grupo carbamato unido a un anillo aromático. El hecho de que los fenilcarbamatos de etilo mostraran actividad antihelmíntica contra *H. nana* podría deberse a un mecanismo diferente al de los bencimidazoles o bien a que el anillo bencimidazólico no sea imprescindible para la actividad. Para contar con más datos que soporten la segunda posibilidad, sería interesante sintetizar los carbamatos de metilo siguientes:



La diferencia entre estos compuestos y los análogos bencimidazólicos activos es precisamente el anillo imidazólico. También se ha considerado importante que las estructuras más activas de los bencimidazoles (albendazol, mebendazol y fenbendazol) sólo difieren entre si por el sustituyente en la posición 5 (6) del anillo bencimidazólico.

Estudios realizados usando modelado molecular mostraron que la eficacia en vivo contra *Hymenolepis diminuta* depende de la orientación del grupo en posición 5 (6), el cual debe de adoptar la conformación ortogonal con respecto al plano del anillo bencimidazólico,<sup>12,13,14,15</sup> además de la relación de la actividad con respecto al momento dipolar y del porcentaje del área polar superficial.



Seria interesante realizar también estudios de modelado molecular de los carbamatos de metilo para ver la orientación de los sustituyentes y comparar éstos con la de los bencimidazoles antihelmínticos; de esta forma se contaría con más información para el diseño racional de nuevos antihelmínticos. Este aspecto es también parte del objetivo de esta tesis.

Considerando el aspecto de los herbicidas tenemos que los carbamatos son usados en gran número en el área agrícola, además de la farmacéutica. De aquí que se conozca su actividad biológica, particularmente como plaguicidas. La fórmula general de los carbamatos es  $R_1-NH-COO-R_2$ . Dependiendo de la naturaleza de  $R_1$ , los carbamatos pueden tener una actividad insecticida (ej. metilo, aldicarb), fungicida (ej. bencimidazol, benomyl) o herbicida (ej. fenilo, swep).<sup>16</sup>

Muchos herbicidas en el mercado pertenecen al grupo de N-fenil-carbamatos en los cuales  $R_1$  es un grupo fenilo sustituido y  $R_2$  es una cadena alquílica menor a cuatro carbonos.

Se plantean dos mecanismos de acción de los N-fenilcarbamatos: la inhibición del huso acromático e inhibición de la fotosíntesis, y ésta depende de la sustitución en el fenilo y en menor grado de la cadena alquílica. De tal forma que una cadena alquílica corta como isopropilo, metilo o 4-cloro-2-butinilo (barban) en  $R_2$ , y un patrón de sustitución en la posición 3 del anillo bencénico en  $R_1$ , contribuyen a un mecanismo de inhibición de la mitosis.<sup>17</sup>

De igual forma, una cadena alifática corta (2-metil, propil, cloroetil, propargil) y una sustitución en 4 y 4, 3 en el benceno, dan inhibidores potentes de la fotosíntesis cuyo sitio de ataque es a nivel de Fotosistema II (proteína  $Q_B$ ) actuando como herbicidas foliares.

Dada la estructura de los carbamatos de metilo considerados con anterioridad, resulta interesante el caracterizar estas moléculas como herbicidas, ya que presentan todos los requerimientos como herbicidas de tipo foliar; esto es, cadena corta y sustituyente en posición 4. Por otro lado, presentan los sustituyentes que en la serie benzimidazólica implica una actividad más amplia en helmintos (uno de los principales mecanismos es la inhibición del huso acromático del parásito <sup>4</sup>) y una cadena corta que asegura la actividad herbicida por inhibición del huso acromático.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Generales:**

1.- Realizar la síntesis de los N-fenilcarbamatos de metilo con los mismos sustituyentes presentes en los bencimidazoles de primera elección en el sector salud.

2.- Comparar las características estructurales y electrónicas de los fármacos bencimidazoles con la de los carbamatos análogos, mediante modelado molecular

3.- Evaluar la actividad antihelmíntica de los compuestos sintetizados, *in vitro* e *in vivo* sobre helmintos patógenos ,

4.- Encontrar alguna relación entre los resultados del estudio computacional y de la actividad antihelmíntica (QSAR).

5.- Determinar la actividad herbicida sobre la fotosíntesis y como agentes preemergentes.

### **2.2. Objetivos Particulares:**

Realizar la síntesis de los N-fenilcarbamatos de metilo 4 sustituidos propuestos, así como su caracterización estructural por métodos espectroscópicos.

Determinar las características estructurales y electrónicas a nivel molecular presentes en los bencimidazoles activos: Albendazol, Fenbendazol, y Mebendazol, compararlas con las presentes en los carbamatos análogos (4, 7, y 11 respectivamente), mediante modelado molecular; y tratar de predecir la actividad de estos últimos, en base a las diferencias de estas características.

Evaluar la actividad de los compuestos sintetizados en larvas musculares de *Triquinella spiralis* como modelo de helminto. Correlacionar los resultados del estudio computacional con los datos encontrados en la actividad antihelmíntica, a fin de determinar alguna relación estructura-actividad.

Determinar la actividad herbicida de los N-fenilcarbamatos de metilo 4-sustituidos en dos mecanismo diferentes: como inhibidores de la fotosíntesis *in vitro* utilizando cloroplastos aislados, determinando su sitio de inhibición en la cadena redox fotosintética, y determinando su efecto en la germinación de semillas.

### **3. GENERALIDADES**

#### **3.1. MODELADO MOLECULAR**

El Modelado Molecular es una parte fundamental de la Química Computacional, una área de la ciencia que trasciende las barreras que separan la Biología, Química y Física. El modelado molecular se define como la generación, visualización, manipulación y predicción de la estructura molecular realista y sus propiedades fisicoquímicas asociadas, teniendo como meta el caracterizar y predecir la estructura y estabilidad de sistemas químicos, estimar las diferencias de energía entre diferentes estados, explicar las rutas de reacción y el mecanismo a nivel atómico<sup>18</sup>. También da ideas sobre la relación de la estructura molecular y la actividad biológica, aportando información valiosa que puede asistir en el diseño de nuevos fármacos.<sup>14</sup>

Existen muchas referencias sobre el uso de esta herramienta de investigación,<sup>19</sup> resaltando el obtenido en el desarrollo de un inhibidor de la proteasa del HIV.<sup>20</sup>

Los científicos usan programas para el modelado molecular, ganando ideas en los procesos químicos, ya que su interés principal es el aplicarlo para mejorar el conocimiento químico. El programa está casi siempre basado en información empírica; para usarlo, se necesita comprender como es implementado y la naturaleza de la base de datos usada para parametrizar el método. En general, en cualquier programa de modelado molecular existen al menos 5 módulos básicos los cuales pueden (y deberían ser encontrados):<sup>21</sup>

i) El constructor de moléculas o entrada de datos (Input Skecht Builder).

Este módulo permite la entrada de datos del problema y construye un modelo aproximado (skecht) en 3 dimensiones de la molécula. La entrada de las coordenadas  $x$ ,  $y$ ,  $z$  mediante el teclado es la manera más simple. Muchos programas tienen una interfase para leer coordenadas de bancos de datos cristalográficos (Protein Data Bank (PDB), CCB, etc.) o de un archivo estándar conteniendo coordenadas atómicas y una tabla de conexión . Una entrada de datos más amigable es la gráfica, por medio de un ratón (menos frecuente una pluma ligera) y un despliegue en pantalla gráfico.

El constructor de moléculas trabaja casi siempre como un modelo computarizado Dreiding, el cual permite la sustitución de hidrógenos por otros átomos. Una característica especial en la que se tiene cuidado es en el cierre de anillos, especialmente para sistemas tensionados. Muchos de los programas usan este tipo de entrada. El pseudo-modelo de 3 dimensiones obtenido a este paso necesita refinarse, y los ángulos dihedrales de relajación no han sido optimizados. En la construcción de proteínas se necesitan funcionalidades especiales para ensamblar aminoácidos y péptidos.

### ii) Constructor del modelo de 3 Dimensiones.

El refinamiento del modelo es necesario, especialmente para sistemas tensionados. Este empieza de las coordenadas crudas calculadas por el módulo de construcción de entrada, utilizando ya sea Mecánica Molecular (MM) o Mecánica Cuántica (MQ) para obtener un modelo refinado. Cuando se usa MM, el programa deberá proveer la elección entre muchos campos de fuerza y dejar al usuario elegir entre diferentes algoritmos para minimizar a la molécula [ pasos descendientes, búsqueda de modelo, Montecarlo, Newton Raphson ].

El constructor también incluye un módulo de análisis conformacional, consumidor de tiempo, el cual calcula un mínimo global de una superficie de energía potencial mediante la relajación de varios ángulos dihedrales simultáneos.

### iii) Modelo electrónico.

Los pasos previos dan la geometría conformacional óptima de la molécula. La información acerca de la distribución de los electrones, así como de la carga eléctrica pueden ser solamente calculados por mecánica cuántica. Muchos sistemas tienen interfaces para programas estándares de Mecánica Cuántica. En muchos casos puede ser una interfase de entrada de datos, permitiendo al usuario el empezar un cálculo de MQ de una geometría generada con MM.

### iv).- Visualización y manipulación.

Este módulo, donde la facilidad es lo más importante, permite al usuario el visualizar y manipular el modelo molecular tan convenientemente como sea posible. Esto incluye las siguientes facilidades: modelo de bolas y resortes, modelos de llenado de espacio (CPK), proyecciones de Newman, rotación completa, posicionamiento del modelo (p.e. una selección fácil de un plano molecular para un mejor despliegue en la pantalla), superposición de los modelos moleculares por un método simple o una optimización de la distancia intermolecular, representaciones de cintas y cilindros de proteínas, átomos y definiciones de arreglos de enlace junto con su visualización, representación de orbitales moleculares y despliegue de potenciales electrostáticos.

### v) Cálculo de propiedades.

Este módulo es ciertamente el último desarrollado en muchos sistemas del mercado, es el de más interés para el químico. Este requiere de un modelo matemático específico para cada propiedad y el desarrollo en sistemas químicos de simulación los cuales usan modelos heurísticos y empíricos.

#### **3.1.1. Mecánica Molecular.**

El método de Mecánica Molecular (MM) es usado para calcular estructuras moleculares, energías conformacionales y otras propiedades moleculares usando conceptos de mecánica clásica.

Los electrones no son incluidos explícitamente en el método de MM, el cual es justificado en la base de la aproximación de Born-Oppenheimer la cual dice que los movimientos de los electrones y el núcleo pueden ser separados. Entonces, el núcleo puede ser visto como moviéndose en un campo de potencial eléctrico promedio, el método de MM intenta describir este campo por su campo de fuerza ( Force Field). Un campo de Fuerza de MM consiste de un grupo de funciones de energía potencial y de parámetros para estas funciones. (parámetros de campo de Fuerza).

La MM puede ser vista alternativamente como un modelo de esferas y resortes con fuerzas clásicas entre los átomos. Estas fuerzas clásicas son descritas por funciones de energía potencial de características estructurales como distancias de enlace, ángulos de enlace y torsionales (ángulos dihedrales). Estas funciones contienen un número de parámetros, los cuales son determinados por ajustar propiedades computarizadas con las experimentales ( o en algunos métodos, las propiedades calculadas por métodos ab initio de mecánica cuántica).

Todos los programas de MM pueden procesar geometrías y energías conformacionales. Muchos en adición pueden calcular barreras rotacionales y superficies de energía potencial, así como calores de formación, frecuencias vibracionales y propiedades termodinámicas derivadas de estas frecuencias (p.ej. entropías ).

Muchos programas de MM calculan propiedades geométricas como distancias de enlace y ángulos de enlace de estructuras orgánicas ordinarias no torsionadas razonablemente bien, por lo que se emplean como preoptimizadores de moléculas que se procesarán por métodos que requieren una distancia precisa.

Entre los campos de fuerza mas empleados se encuentran el MM2 y MM3, Sybil (Tripos), Cosmic (Oxford Co.), por citar algunos. En la literatura existen revisiones excelentes sobre las diferencias entre cada uno de ellos, así como los programas que los contienen.<sup>22</sup>

### 3.1.2. Métodos Teóricos.

Existen 2 métodos comúnmente empleados para el estudio teórico de las moléculas, estos están basados en la Mecánica Cuántica: *Ab initio* y semiempíricos. *Ab initio* se refiere a todos aquellos modelos en las cuales todas las integrales de la teoría (variacional o de perturbación), son evaluadas, además de que todos los electrones son considerados, haciendo que los requerimientos de tiempo de máquina y capacidad de disco duro aumenten en un  $n^4$ , donde n es el numero de funciones bases. El nivel de teoría entonces se refiere al tipo de teoría empleado.

Los niveles comunes de teoría pueden incluir la de Hartree Fock, o teoría del orbital molecular, Teoría de la configuración-interacción (CI), teoría de la perturbación, etc.. Se usa la palabra modelo para designar aproximaciones al Hamiltoniano .

Los métodos semiempíricos sólo toman en cuenta los electrones de valencia, asumiendo que los electrones core apantallan al núcleo, p.ej. la carga de los electrones core en el carbono es  $6-2= 4$ . Muchas de las integrales consumidoras del tiempo computacional son omitidas, haciendo que los tiempo de máquina y capacidad de disco disminuyan a  $n^2$ , donde  $n$  es el número de orbitales de valencia.

En la selección de un método para la resolución de un problema dado, se tienen que considerar el tamaño de la molécula y el tipo de información que se necesita (cargas, geometría optimizada, potencial de ionización, coordenadas reacción), así como la calidad deseada de los resultados.<sup>19</sup> Este balance tiene que ser evaluado para determinar el costo del cálculo. Este balance es cualitativamente ilustrado por el estudio realizado por Dewar y col.,<sup>23</sup> en donde se compararon métodos *Ab initio* (MP4, MP3; 6-31G\*, 3-21G, STO-3G) y semiempíricos (PM3, AM1, MNDO, MINDO/3, PCILO, INDO, CNDO) mostrando que aparentemente los métodos semiempíricos AM1 y PM3 proveen un efectivo compromiso entre la calidad de los resultados y los recursos de computación.

### **3.1.3. Análisis Conformacional:**

Las conformaciones de una molécula son tradicionalmente definidas como el grupo de arreglos de sus átomos en el espacio, el cual puede ser interconvertido solamente por rotación alrededor de enlaces sigma.

Muchas de las moléculas de interés orgánico, bioorgánico y medicinal pueden adoptar más de una conformación. Las conformaciones de una molécula están típicamente presentes en diferentes cantidades. La interconversión entre conformaciones es debido a vibraciones internas de la molécula.

Relacionando cambios en estos movimientos internos a alguna función de energía potencial, es posible considerar cambios en la conformación de la molécula como movimientos en la superficie multidimensional que describe la relación entre los valores de función y la conformación. Las conformaciones estables de una molécula (llamadas a veces conformeros) corresponden a mínimos locales en la función de energía potencial, la molécula lleva a cabo oscilaciones cerca de cada mínimo, alcanzando una entropía conformacional.

La población relativa de la conformación mínima depende de su peso estadístico, el cual incluye contribuciones tanto de la energía potencial como de la entropía. Una consecuencia importante de esto es que el mínimo de energía global en la superficie de energía potencial no necesariamente corresponde a la estructura con el mayor peso estadístico.

Para realizar una "búsqueda conformacional" es necesario el determinar aquellas conformaciones de mínima energía que se creen contribuyen a toda función de partición conformacional. Esto requiere algún medio de determinar la energía de una conformación dada y un método para determinar el mínimo en la superficie descrita por la función de energía potencial. Las energías conformacionales son calculadas usando mecánica molecular o cálculos semiempíricos.<sup>24</sup>

### **3.2. HELMINTIOSIS**

Los helmintos (nemátodos, céstodos y tremátodos ) son responsables de las helmintosis, enfermedades parasitarias causadas tanto en el hombre, como en los animales, por gusanos redondos o planos, disminuyendo así, la productividad humana y los beneficios que el reino animal nos proporciona, creando de esta manera graves repercusiones de salud y pérdidas económicas.<sup>25</sup>

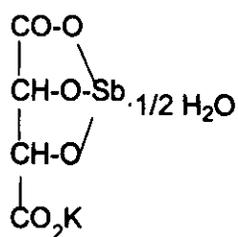
Las helmintosis son las enfermedades más extendidas y comunes en el mundo. Las estadísticas muestran que un tercio de la población humana sufre de este tipo de enfermedades, y en muchos casos son infestaciones múltiples. La mayoría de las infestaciones por helmintos son adquiridas por contacto con animales, contacto con tierra contaminada con excremento humano o de animales, agua infestada con cercarias, ingestión de carne contaminada, etc.

Algunas de estas infestaciones pueden pasar inadvertidas, en cuyo caso se llega a establecer una relación entre el huésped y el parásito que puede durar años, pero también existen otras en las cuales se puede provocar debilitamiento, anemia o hasta la muerte del huésped. Además, estas enfermedades provocan fuertes daños económicos en la ganadería.<sup>25</sup>

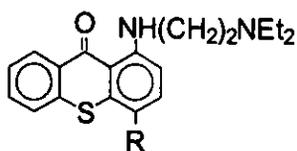
Para el tratamiento de las helmintosis se han empleado a través del tiempo muchos compuestos con gran diversidad en sus estructuras moleculares, que van desde compuestos simples como los hidrocarburos halogenados hasta moléculas tan complejas como la Lucantona o la Hicantona (avermectinas)<sup>25</sup> (Fig.1). Y aunque es difícil definir la acción de muchos antihelmínticos en una fase exacta, su efectividad se debe por lo general a uno de los siguientes mecanismos de acción:

- a).- Necrosis, parálisis o muerte del parásito.
- b).- Irritación o quemaduras en el tejido del parásito.
- c).- Digestión del helminto por un agente proteolítico.
- d).- Agentes químicos que causan disturbios en el helminto, forzándolo a migrar y ser destruido subsecuentemente por fagocitosis.
- e).- Interferencia en algún proceso metabólico del helminto.

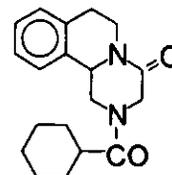
La fisiología y la bioquímica son de consideración para el desarrollo de antihelmínticos efectivos.



Tartar emético



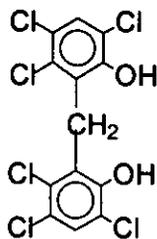
R=Me, Lucantona  
R=CH<sub>2</sub>OH, Hicantona



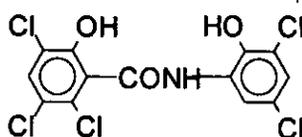
Prazicuantel

CCl<sub>4</sub> Tetracloruro de carbono

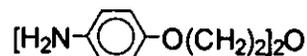
C<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub> Hexacloroetano



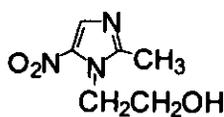
Hexaclorofeno



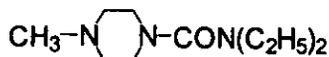
Oxiclozanida



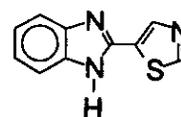
Diamfenetide



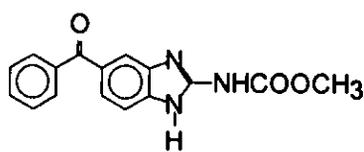
Metronidazol



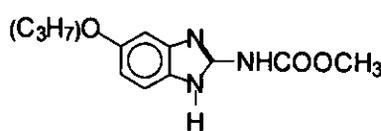
Diethylcarbamazepina



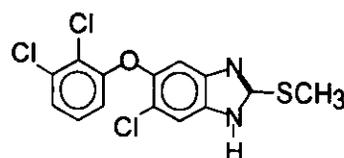
Tiabendazol



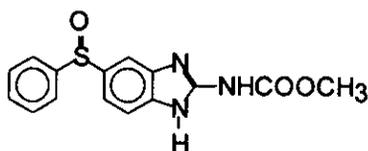
Mebendazol



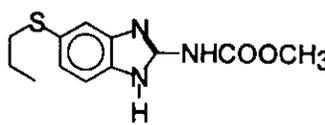
Oxibendazol



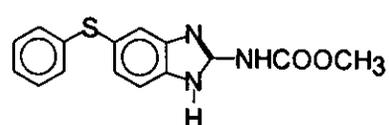
Triclabendazol



Oxfendazol



Albendazol



Fenbendazol

Fig. 1. Fármacos antihelmínticos.

La necesidad de un antihelmíntico con un amplio intervalo de acción parasitaria, alto grado de eficacia; buen margen de seguridad y versatilidad en la administración, apuntó las investigaciones hacia los derivados del bencimidazol.<sup>27</sup>

Fue así como en el año de 1961, investigadores de los laboratorios Merck<sup>28</sup> introdujeron el 2-(4-tiazolil)bencimidazol ( Tiabendazol ). La desventaja que presentó este fármaco fue su rápida inactivación por el metabolismo primario, que lo convierte a 5-hidroxtiabendazol; éste, puede existir ya sea libre o conjugado como glucurónido o sulfato.<sup>28</sup>

Basados en estas características surgieron otros bencimidazoles con la posición 5 substituida para evitar el metabolismo y sin el grupo tiazolilo en la posición 2, en su lugar un grupo metilcarbamato. Con estos cambios se aumentó considerablemente la vida media de los nuevos bencimidazoles; así como su velocidad de eliminación.<sup>29</sup>

De esta forma surgieron fármacos efectivos a bajas dosis y con amplios espectros de acción; como el Mebendazol, el cual fue producido en 1971 por Janssen Farmacéutica, confirmado como antihelmíntico de amplio espectro, marcadamente seguro y además útil en el tratamiento de infestaciones humanas.<sup>30</sup>

En 1976 Química Hoechst sintetizó el Albendazol<sup>31</sup> que ha probado ser efectivo en la neurocisticercosis<sup>7</sup>, desarrollando después al Fenbendazol, el cual es usado en medicina veterinaria contra helmintos intestinales en cabras y ovejas.

En 1978 Ciba-Geigy crea el Triclabendazol bajo el nombre comercial de Fasinex; el cual muestra gran eficacia contra *Fasciola hepatica*<sup>32</sup>, en el cual las posiciones 5 y 6 están sustituidas, impidiéndose el metabolismo temprano.

El mecanismo de acción de los bencimidazoles se puede dividir en tres categorías<sup>33</sup>:

- 1.- Inhibición de la fumarato reductasa (Tiabendazol).
- 2.- Inhibición del transporte de la glucosa (Mebendazol).
- 3.- Interrupción de la función microtubular (Albendazol).

La mayoría de los trabajos<sup>33</sup> coinciden en que la tercera categoría es el camino principal, aunque para algunos fármacos, por ejemplo el Triclabendazol, es todavía desconocido; pero se ha especulado que actúa frente a un sistema enzimático que es específico y vital para el metabolismo de la fasciola y que está ausente o no es esencial para otros parásitos, ya que el Triclabendazol es poco efectivo frente a otros helmintos.

Por otro lado, el Albendazol, Mebendazol y Fenbendazol mostraron ser los compuestos más activos en un estudio realizado sobre el protozooario *Giardia spp.* demostrando un mecanismo aparentemente inhibitor de la tubulina.<sup>34</sup>

### 3.3. HERBICIDAS.

El aumento en la población genera necesidades alimentarias proporcionales que plantea problemas básicos de aumento en la producción agrícola. Así, el hombre para satisfacer sus necesidades de alimento, cultiva frijol, maíz, verduras, frutas, etc. Sin embargo, por la acción de diferentes plagas tales como malezas, insectos, hongos etc., los cuales actúan durante el crecimiento, la recolección y el almacenamiento, se pierde anualmente una tercera parte de la producción mundial de los cultivos. Aunque en los países en vías de desarrollo (Africa, la India y América Latina) las pérdidas son del 40%, en la agricultura mexicana la situación es similar al promedio mundial y se calcula entre un 25 y 30%.<sup>35</sup>

Una de las plagas que afectan a los cultivos es la maleza, la cual entra en competencia con las plantas agrícolas por el agua, luz y nutrientes; lo que hace indispensable el uso de herbicidas y se explica el por qué del total de los plaguicidas que se consumen a nivel mundial, el 43% corresponden a los herbicidas.<sup>36</sup> En sentido amplio un herbicida es todo compuesto químico que inhibe total o parcialmente el crecimiento de malezas; una maleza es una planta que crece donde no se desea o una planta fuera de lugar.<sup>37</sup>

Existen cuatro métodos básicos de control de malezas: (1) medidas preventivas, (2) rotación de cultivos, (3) control biológico y (4) control químico <sup>38</sup>. Este último método ha sido el más efectivo hasta el momento para el combate de la malezas, lo que hace necesario el uso de herbicidas con efectos mínimos en plantas útiles o en otras formas de vida, es decir, no deben de ser tóxicos, se debe poder manejarlos adecuadamente y ser estables en muchas condiciones de suelo y climas <sup>36</sup>.

Los carbamatos y los tiocarbamatos representan a grupos de herbicidas en el mercado. Estos compuestos tienen un amplio intervalo de acción en cultivos agrícolas, con ventas de \$ 640 millones de dólares en 1984. Los primeros carbamatos que salieron al mercado están disminuyendo su uso, pero los compuestos recientes (Fig. 2) y los tiocarbamatos son todavía comerciales. <sup>39</sup>

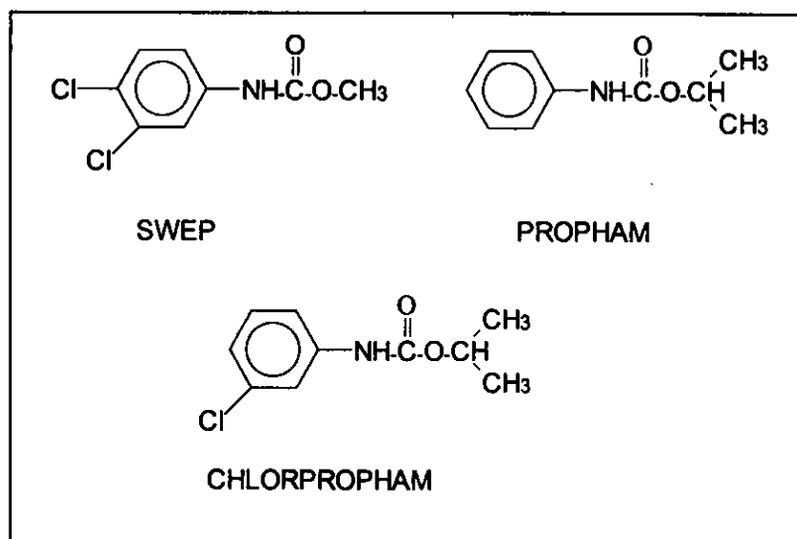


Fig. 2 .- Estructura de los carbamatos comerciales usados en Europa.

El mercado para los carbamatos se ha incrementado constantemente desde 1972, pero se ha predicho que serán retirados lentamente del mercado en esta década<sup>39</sup> debido principalmente a problemas de degradación por bacterias, y la aparición de un plásmido en *Pseudomonas*.<sup>40</sup>

### **3.3.1. CLASIFICACION DE HERBICIDAS.**

Existen muchas clasificaciones de los herbicidas basadas en la selectividad, o en tiempo de aplicación, sitio de acción, por citar algunas. Una de las clasificaciones más empleadas es de acuerdo al tiempo de su aplicación en relación al ciclo de crecimiento de las malezas o del cultivo<sup>38</sup>:

**Tratamientos de preplantación.** El herbicida se incorpora en el suelo antes de sembrar la cosecha. Las plantas de cultivo deben ser tolerantes al herbicida. La acción del herbicida en las malezas puede deberse a que al ser absorbido por la planta, interfiere con varios procesos metabólicos de la planta incluyendo la supresión de la división celular.

**Tratamientos de preemergencia.** Los herbicidas se aplican en la superficie del suelo después de sembrar las semillas pero antes de la emergencia de las plántulas de la maleza, del cultivo o ambas.

Como la germinación de semillas y el estado de plántulas es una etapa débil en el ciclo de vida anual de la planta, los tratamientos de preplantación y preemergencia son frecuentemente los más usados ya que son muy específicos y se requiere muy poca cantidad de herbicida por área cultivada.

Tratamiento de post-emergencia. El tratamiento con el herbicida se sigue después de la emergencia de las plántulas del cultivo, de malezas o ambas. La aplicación es post-emergente para las plantas de cultivo pero de preemergencia para las malezas.

### **3.3.2. MECANISMO DE ACCION.**

La industria química por su lado investiga herbicidas de rendimiento máximo, compuestos que bloqueen determinados procesos químicos de las malas hierbas seleccionadas. Se debe de tener en cuenta que no todos los herbicidas tienen un efecto similar en las plantas y que no todas las plantas tienen una respuesta similar a algún herbicida específico.

La inhibición de la fotosíntesis es uno de los efectos primarios más importantes de las triazinas, piridazinas, fenilcarbaureas, uracilos, etc. El paraquat actúa como aceptor de electrones en la cadena redox del cloroplasto y el paraquat reducido reacciona con el oxígeno produciendo radicales libres de superóxido y éste se convierte en radical hidroxilo que es la especie tóxica.

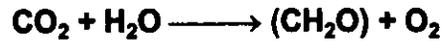
Aproximadamente un cuarto de todos los herbicidas que se encuentran en el mercado actúan inhibiendo la mitosis como un mecanismo primario. Así los herbicidas carbámicos barban, propham y cloroproham (Fig. 2) alteran la organización de los microtúbulos del huso acromático, formando múltiples husos. Los cromosomas se mueven a muchos polos y resultan múltiples núcleos. Las paredes celulares anormales ramificadas se separan parcialmente de las membranas plasmáticas dando como consecuencia que las células no se reproduzcan, aumentando su tamaño, tiempo después mueren.<sup>41</sup> Los clorofenoxialcanos, fenilacéticos, ácido benzoico, dinitroanilinas, nitrilos y piridinas afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos entre otros procesos de la planta. Otros herbicidas afectan la síntesis de pigmentos (carotenos y clorofila *a* y *b*).

Generalmente es deseable, desde el punto de vista agrícola y ambiental, que los herbicidas persistan solo lo bastante para completar su actividad herbicida. Después de un tiempo ideal los herbicidas deben ser degradados por microorganismos a compuestos inofensivos o por fotodescomposición, o ser removidos del biosistema.<sup>42</sup>

### 3.3.3. FOTOSÍNTESIS.

#### 3.3.3.1. GENERALIDADES.

Cuando se ilumina con luz visible a los cloroplastos estos reducen el anhídrido carbónico a compuestos orgánicos principalmente carbohidratos; esta reducción viene acompañada por una liberación de O<sub>2</sub> en un volumen igual al del anhídrido carbónico que se ha reducido.<sup>43</sup> La ecuación global de esta reacción que constituye la fotosíntesis se puede escribir:



**Fase luminosa de la fotosíntesis.**

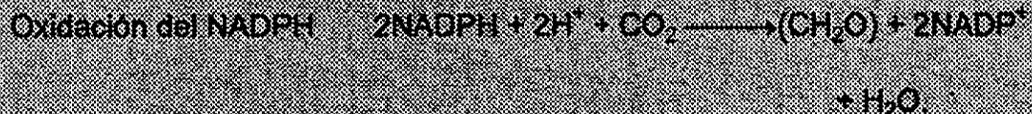
*Membrana del tilacoide*

Luz



**Fase oscura de la fotosíntesis.**

*Estroma*



La membrana tilacoidal del cloroplasto contiene diversas proteínas que están involucradas en la captación de los cuantos de luz, transporte de electrones, captación de protones y otras reacciones enzimáticas, cada una de estas proteínas y complejos están orientados asimétricamente en la membrana tilacoidal.

### **3.3.3.2. TRANSFERENCIA DE ELECTRONES.<sup>44</sup>**

La transferencia de electrones fotosintéticos en los cloroplastos se diferencia de la que tiene lugar en las bacterias en dos aspectos: (1) existe un flujo de electrones no cíclico, produciéndose una oxidación del H<sub>2</sub>O que dona e<sup>-</sup> en el centro reactivo (CR) del FS II y una reducción estequiométrica del NADP<sup>+</sup> al aceptar 2e<sup>-</sup> y H<sup>+</sup>; (2) hay dos reacciones luminosas o fotoeventos independientes que actúan en serie abarcando la amplitud de potencial redox existente entre el par H<sub>2</sub>O/ 1/2 O<sub>2</sub> y el NADP<sup>+</sup>/NADPH.

El Fotosistema II posee una notable capacidad para extraer electrones del H<sub>2</sub>O al oxidarlo (H<sub>2</sub>O/1/2 O<sub>2</sub> E<sub>m,7</sub> = +820 mV) catalizada por la enzima que fotoliza el agua y con 4 fotoeventos se lo transfiere al acarreador Y<sub>D</sub> que es una tirosina de la proteína D<sub>1</sub> del centro de reacción y Y<sub>D</sub> se lo dona CRII. El donador primario de los electrones en el fotosistema II (FS II) se denomina P<sub>680</sub> y es un dímero de clorofila *a* unido a D<sub>2</sub> en donde D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> están interaccionando para formar el complejo del CRII: Al igual que con el FS I, se genera un campo eléctrico en menos de 20 ns. El donador que cede sus electrones al FS II es el H<sub>2</sub>O.

Esta reacción es catalizada por la enzima que fotoliza el agua con cuatro estados "S" de oxidación que cede 4 electrones al  $P_{680}$  antes de oxidar 2 moléculas de  $H_2O$  a  $O_2 + 4H^+ + 4e^-$ . El electrón es transportado vía feofitina (que es de estructura de clorofila a sin la coordinación del ión metálico magnesio) y este electrón es transferido al aceptor secundario una quinona,  $Q_A$ , y a un átomo de Fe para el siguiente aceptor de electrones  $Q_B$ . El electrón del aceptor secundario  $Q_B$  es rápidamente transferido a la plastoquinona, PQ; cuando  $Q_B$  acepta  $2e^-$ , también toma 2 protones del estroma y tanto electrones y protones pasan a lo largo de la cadena transportadora de electrones, cuando  $Q_B$  es subsecuentemente oxidada por la poza vecina de plastoquinonas. Al igual que con el CR de las bacterias, una segunda PQ ligada podría actuar como transductor de  $2e^-$  y  $2H^+$  antes de que éstos sean liberados a la poza de PQ de la membrana.

Cuando se oxida, PQ dona 2 electrones al aceptor del FS I y libera 2 protones para el lado interno del tilacoide dentro del espacio del lumen. Esto provoca un aumento de protones en el lumen que conduce a la formación de ATP, por medio de la unión de la velocidad de fotofosforilación y del transporte de electrones. Mediante el flujo de electrones entre la poza de PQ y la molécula de plastocianina, PC, que sirve como donador primario de electrones para el FS I, que es un complejo citocromo  $b_6/citocromo f$  (cyt  $b_6/f$ ).

El sitio de oxidación para reducir la hidroquinona,  $PQH_2$ , es un sitio Fierro-Azufre (Fe-S) , donde los protones son liberados y los electrones pasan rápidamente al citocromo *f* dentro del complejo. El citocromo *f* reduce a la plastocianina, PC, que entonces reduce al  $P_{700}$  , la naturaleza del aceptor primario es una molécula de clorofila *a* unida a su proteína llamada  $A_0$  y después que se reduce transfiere sus electrones al acarreador de electrones  $A_1$  que tiene a una filoquinona como cofactor unido a su proteína y reducen al aceptor que contiene Fierro, X, ( $[4Fe-4S]_x$ ) que pasan los electrones a los dos centros Fierro-Azufre, A y B ( $[4Fe-4S]_A$  y  $[4Fe-4S]_B$ ). De aquí los electrones se transfieren a la ferredoxina, Fd, (cuyo  $E_m$  es de -530 mV) que a su vez reduce al  $NADP^+$ , transferencia catalizada por la ferredoxina-NADP oxidoreductasa. El donador primario  $P_{700}^+$  vuelve al estado reducido (en menos de 200 ms) al aceptar 1 electrón del donador plastocianina (PC), que tiene un potencial de reducción de  $E_m$  de + 370 mV.<sup>44</sup>

### 3.3.3.3. CIRCUITO DE PROTONES.

Cuando se iluminan cloroplastos que tienen la membrana rota, se produce una toma de protones y se alcaliniza el medio externo que se puede detectar con un microelectrodo combinado sensible.

El  $\Delta E$  inicial que se produce en las reacciones luminosas se convierte en  $\Delta pH$  en cuestión de segundos debido a la capitación de protones con acidificación del lumen y alcalinización del estroma y simultáneamente ocurre una redistribución del  $Mg^{2+}$  que se transporta en la membrana tilacoidal del lumen al estroma.

Las enzimas redox de la cadena transportadora de electrones ordenadas por sus potenciales de reducción predicen que por cada 2 electrones transferidos, 2 protones son transportados vectorialmente en el espacio intratilacoidal debido a la fotólisis del agua y otros dos son depositados en el medio acuoso externo debido a la formación de la PQH<sub>2</sub>.

La estequiometría asociada al FS I dependerá de la naturaleza del aceptor terminal. En el caso de que sea un aceptor ( $2H^+2e^-$ ) desaparecerán 2 protones del medio; la reducción estequiométrica del aceptor natural, el NADP<sup>+</sup>, aceptor de ( $1H^+ + 2e^-$ ), conduce a la toma de un protón, mientras que un aceptor exclusivo de electrones (como el ferricianuro) no conduce a la entrada de ningún protón.

En cualquier caso aparecen 2 protones en el espacio del lumen tilacoidal debido a la reoxidación de la PQH<sub>2</sub> y el agua. La ATP sintetasa de los cloroplastos es muy similar a la de la mitocondria, por eso se observa una entrada de H<sup>+</sup> dependiente de ATP cuando en la oscuridad se crea un  $\Delta MH^+$  artificial. Al igual que con otros sistemas hay desacuerdo sobre la estequiometría H<sup>+</sup>/ATP, habiéndose sugerido los valores 2 y 3.<sup>45</sup>

### 3.3.4. MECANISMO DE ACCION DE LOS HERBICIDAS EN LA FOTOSINTESIS.

La clasificación de los herbicidas se ha revisado extensamente, aunque una clasificación muy útil es la de Moreland<sup>46</sup> :

### a) INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES.

El transporte de electrones es inhibido cuando uno o más intermediarios de la cadena transportadora de electrones son removidos o inactivados. El sitio de acción de muchos herbicidas inhibidores del transporte de electrones estudiados se asocian marcadamente en el fotosistema II, reacciones acopladas al FS II son inhibidas, como el transporte de electrones no cíclico, desacoplado o fosforilado con el H<sub>2</sub>O como donador de e<sup>-</sup> y con varios aceptores de electrones (ferricianuro, NADP, PD, PMS, DPIP oxidado). Herbicidas que interfieren con el transporte de electrones son: alquilanilidas, p-alquitioanilidas, amino-triazinonas, azido-s-triazinas, bis-carbamatos, difeniléteres, piridazinonas, triazinonas, urea-carbamatos, uracilos.

### b) DESACOPLANTES.

Los desacoplantes disocian el transporte de electrones de la formación de ATP por la disipación de alguna vía del estado energizado de la membrana, que ahora se sabe es un gradiente electroquímico de pH y potencial de membrana que después es utilizado por la H<sup>+</sup>-ATPasa para la fosforilación del ADP y formar ATP. La perfluidona es uno de los herbicidas que ha sido reportado que funciona como desacoplante puro en la fotofosforilación a pH = 8. Entre los agentes más conocidos se pueden citar a los siguientes: el cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), el dinitrofenol (DNP), el carbonil-cianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), entre otros.

### c) INHIBIDORES DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGIA.

Los inhibidores de la transferencia de energía actúan uniéndose directamente al complejo  $H^+$ -ATPasa. Al inhibir la fosforilación del complejo  $H^+$  -ATPasa, ellos inhiben los flujos de electrones acoplados para la síntesis de ATP.

Sin embargo, la adición de un desacoplante, que proporciona una ruta alternativa para la disipación de un estado de alta energía elimina la inhibición del flujo de electrones, pero no la formación de ATP. Algunos ejemplos incluyen a la N-etilmaleimida (NEM), la N,N,-díciclohexilcarbodiimida (DCCD) y la florizina.

### d) INHIBIDORES DESACOPLANTES.

El término "inhibidores desacoplantes" es usado para indicar a los herbicidas que simultáneamente tienen propiedades de inhibidores del transporte de electrones y desacoplantes. Estos inhiben el transporte de electrones desacoplado y acoplado de la misma manera que los inhibidores de la reacción de Hill como el Diuron, pero el transporte de electrones basal y/o fosforilante es activado. La fotofosforilación no-cíclica es inhibida y la reacción de fosforilación es más sensible que la reducción del ferricianuro. Algunos dinitrofenoles y dinitrofenoles alquilados son identificados frecuentemente como este tipo de herbicidas .

### e). ACEPTORES DE ELECTRONES.

Los compuestos que se clasifican como aceptores de electrones son capaces de competir con algún componente enzimático de la cadena redox y subsecuentemente sufren una reducción. Como ejemplo tenemos: paraquat o metilviológeno, ferricianuro, DCPIP, DAD, PMS, FMN, etc., que son usados para estudios *in vitro* de reacciones parciales de los fotosistemas .

### **4. DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL**

El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en cuatro etapas las cuales se describen a continuación. Primero se realizó el Modelado Molecular, seguido de la síntesis de los compuestos propuestos y finalmente su evaluación biológica antihelmíntica y herbicida.

#### **4.1 Modelado Molecular.**

Para realizar el estudio de Modelado Molecular comparativo entre los bencimidazoles activos (Albendazol, Fenbendazol y Mebendazol) y los carbamatos de metilo análogos, se utilizó una Silicon Graphics modelo Indy con 32 MB de memoria en RAM. Las estructuras se construyeron, minimizaron y calcularon en el Software Spartan 4.03 G.L. para sistema IRIX 5.2. de la Compañía Wave function.

Todos los bencimidazoles se optimizaron utilizando un método alternativo al utilizado en la literatura<sup>13</sup>, debido principalmente a que el campo de fuerza MM2 utilizado en Spartan no está parametrizado para las amidas y por lo tanto para los carbamatos.

Primero se diseñaron las moléculas en dos dimensiones en el constructor de moléculas de Spartan, seguido de una preoptimización utilizando el campo de fuerza de MM de Tripos; después se realizó una optimización geométrica utilizando el Hamiltoniano semiempírico AM1<sup>48</sup>, usando las siguientes especificaciones:

## DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

- Optimización utilizando el campo de Fuerza Sybil<sup>48</sup> (Tripos Inc) para obtener las geometrías iniciales de cada molécula.
- Todas los moléculas se consideraron especies simples en estado basal.
- Corrección para el grupo amida (MMOK) para AM1, en Spartan.

Al mínimo local encontrado para cada molécula se le determinaron propiedades electrónicas como:

- Descriptores QSAR.

- Superficies de propiedades electrónicas (Homo, Lumo, y Potencial electrostático)

Para el caso de las nuevas moléculas propuestas , estas presentan más de cuatro átomos con enlaces simples, que pueden rotar, lo cual implica que pueden interconvertirse, por lo que se realizó el análisis conformacional utilizando el Método Sistemático.<sup>24</sup>

Primero se construyó el núcleo base del fenilcarbamato de metilo, el cual se preoptimizó, usando el campo de fuerza Sibyl, Una vez optimizado el núcleo base se procedió a la construcción de los moléculas propuestas y se realizó el análisis conformacional usando el Método Sistemático, utilizando un nivel de Mecánica Molecular para el análisis energético de cada molécula con el campo de fuerza Sybil de Tripos (Optimización de un solo punto).

Los enlaces seleccionados fueron los siguientes:

- a).- Para el carbamato análogo al albendazol, el enlace de unión del fenilo con el azufre y los tres enlaces del propilo.

b) .-Para los análogos del Fenbendazol y Mebendazol los enlaces considerados son los que unen al azufre y al carbono con los dos fenilos.

El incremento del ángulo dihedro para todas las moléculas fue de 30 grados ( $360/30 = 12^2$ ). Después de obtener los conformeros de cada molécula (144 conformeros) estos fueron ordenados de mayor a menor energía, se eligieron las conformaciones de menor energía y con mayor peso estadístico, y al mínimo global encontrado se le sometió a un el cálculo semiempírico AM1 , utilizando los mismos parámetros e instrucciones que para los bencimidazoles.

Finalmente se realizó la sobreposición y comparación de cada bencimidazol como modelo con respecto de cada uno de los conformeros encontrados para cada carbamato análogo, usando el módulo de sobreposición dentro de Spartan, y se compararon las moléculas utilizando un criterio de volumen compartido (nivel AM1). Los resultados de estos estudios se muestran en las tablas 1-9; la representación gráfica de las moléculas en las figuras 4-10.

Las figuras en blanco y negro se realizaron en una impresora Hewlett Packard 6P, y las figuras en color se obtuvieron de una impresora fotográfica Kodak en el Departamento de Visualización de Dirección General Super Computo Académico (DGSCA) , con la ayuda de Víctor Hugo Guerrero.

### **4.2 Síntesis de los carbamatos de metilo propuestos.**

En método general para la preparación de las moléculas propuestas se realizó mediante la reacción de la anilina 4-sustituida correspondiente con cloroformiato de metilo, en acetona, y bicarbonato de sodio como base para remover el HCl generado.<sup>10</sup>

Así que primero se realizó la síntesis de las aminas no comerciales, a partir de la reducción del derivado nitrado correspondiente; para enseguida formar los compuestos **4, 7, 11**. Los compuestos **12-15** se obtuvieron a partir de sus aminas comerciales. Todas las síntesis se detallan a continuación.

#### **4.2.1 Instrumentación.**

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer de transformadas de Fourier Modelo FT-IR-1600 en pastilla de bromuro de potasio, las señales se reportan en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de resonancia magnética protónica (RMP) se determinaron en un espectrofotómetro Varian EM-390 usando deuterocloroformo, dimetilsulfóxido o acetona deuterada como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna.

Los desplazamientos químicos se dan en ppm ( $\delta$ ). Los símbolos de las señales son: s = señal simple, sa = señal simple amplia, d = señal doble, t = señal triple, sxt = señal sextuple, m = señal múltiple; las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hertz.

## DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Los espectros de masas se determinaron por un sistema acoplado de Cromatografía de Gases-Espectrómetro de Masas (CG-EM) o por introducción directa de la muestra en un aparato marca JEOL JX102A, mediante la técnica de impacto electrónico. La simbología utilizada es  $M^+$  = ion molecular;  $M+2$ ,  $M+4$  = picos isotópicos, las unidades se dan en relación carga/masa ( $m/z$ ).

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un aparato Büchi Mod. 530 y no están corregidos. Para concentrar se empleó un evaporador rotatorio marca Büchi RE 111, con vacío generado por una bomba Felisa Mod. 1600 ajustada a 55 cm de Hg y condensador de hielo seco. Para las destilaciones a presión reducida se utilizó una bomba de vacío marca EQUATHERM ajustada a 8 mmHg.

Para realizar las hidrogenaciones catalíticas se utilizó un hidrogenador marca Parr Mod. 391EG con 60 lb/plg<sup>2</sup> y 80°C como capacidad máxima, utilizando hidrógeno de tanque de la casa INFRA y como catalizador paladio sobre carbono al 5 y 10% de la casa Aldrich.

### **4.2.2. Cromatografía en Capa Fina.**

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se usaron placas de vidrio recubiertas con gel de sílice GF254 de la casa Merck y para la cromatografía en columna se utilizó una columna de vidrio de 18 cm de altura por 2 cm de diámetro empaquetada con gel de sílice 60, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 35-70 (Merck). Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz UV y por exposición a vapores de yodo.

**4.2.3. Composición de los sistemas de elución utilizados.**

<b>SISTEMA</b>	<b>COMPOSICION</b>	<b>PROPORCION</b>
I	Hexano-Cloroformo-AcOEt	50:35:15
II	Hexano -AcOEt	95:5
III	Hexano -AcOEt	90:10
IV	Cloroformo-MeOH	97:3
V	Cloroformo-MeOH	90:10

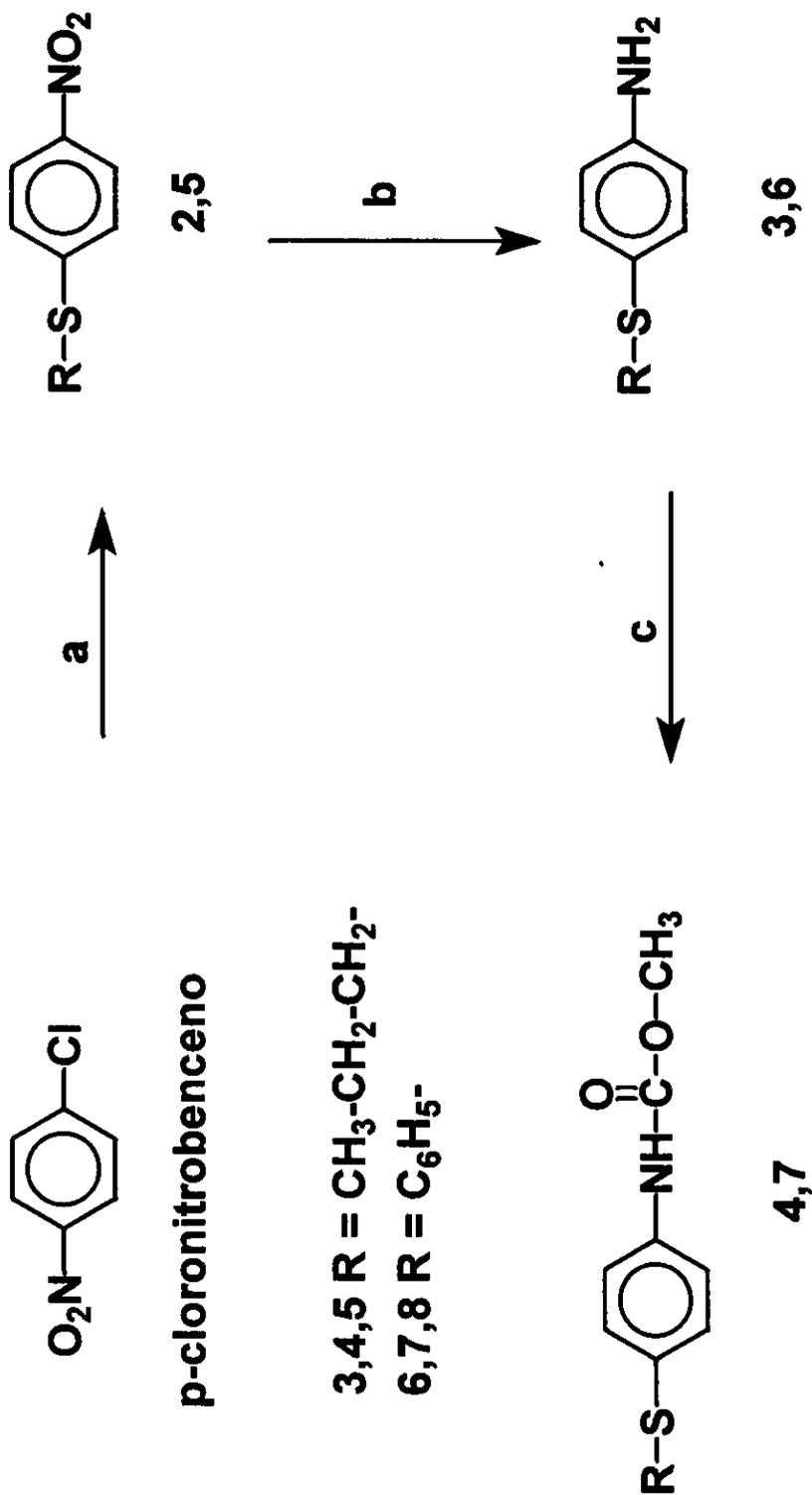
**4.2.4 Síntesis de los Compuestos 4, 7.**

Para la síntesis de los análogos de Albendazol y Fenbendazol, **4** y **7** respectivamente se siguió el esquema de reacción N° 1.

**4.2.5. Síntesis del 4-Propiltionitrobenceno 2.**

En un matraz de bola de 3 litros con 3 bocas, adaptado con agitación magnética, termómetro, condensador en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se colocaron 100 g (0.6346 mol) de p-cloronitrobenceno, 750 ml de dimetilformamida, 106.62 g (1.2692 mol, 2 eq.) de NaHCO<sub>3</sub> y 70 ml de 1-propanotiol, la mezcla se agitó durante 20 min y enseguida se calentó a 80-90 °C durante 28 h.

## Esquema de reaccion N° 1



- a) Para 2:  $\text{NaHCO}_3$ , 1-propanotiol,  $\Delta$ . Para 5:  $\text{NaOH}$ , Tiofenol, etilenglicol  
 b) Para 3:  $\text{SnCl}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$ . Para 6:  $\text{Pd/C}$  al 10%,  $\text{H}_2$ ; c)  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Cl}-\text{CO}_2\text{CH}_3$ .

## DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Después de verificar el consumo de la materia prima por C.C.F., la mezcla de reacción se diluyó con 2 lts de agua y extrajo con acetato de etilo (3 X 200 ml), la fase orgánica reunida se lavó con agua, secó con sulfato de sodio anhidro y concentró con vacío. Se obtuvieron 125.73 g (88 % de rendimiento crudo) de un líquido viscoso amarillo aceitoso, el cual presentó tres manchas en la CCF, la principal con un  $R_f$  de 0.72 (sistema I). El producto crudo se destiló a presión reducida, recolectándose siete fracciones, las cuales destilaron a una presión de 8 mmHg y una temp de 145 °C, las cuatro últimas fracciones mostraron ser un sólo compuesto con  $R_f$  0.72 (sistema I), estas se juntaron dando 60 g. Su espectro (No 1) de IR mostró bandas en 3100 (CH insat), 2964, 2930, 2872 (-CH saturado), 1616-1470 (CH=CH arom), 1578 (Ar-NO<sub>2</sub>). Su espectro de RMP (No 2) mostró señales en 1.0 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.75 (sxt, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 3.0 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-S), y el sistema AA', XX' en 7.3 (d, 2H, H aromático, J= 8-9 Hz, orto al grupo propiltio), 8.1 (d, 2H, H aromático, J= 8-9, orto al NO<sub>2</sub>). El espectro de CG-EM (No 3) presentó un M<sup>+</sup> de 197.25 (100 % de abundancia), un M+1 de 198.25 (12 % de abundancia) y un M+2 de 199.25 (presencia del azufre).

### 4.2.6. Síntesis de la 4-Propiltioanilina 3

#### 4.2.6.1 a) Por reducción catalítica de 2.

En un vaso reactor de 500 ml se colocaron 20.5 g (0.103 mol) de 2, 2.5 g de Pd/C al 10% y 250 ml de etanol, el vaso reactor se adaptó a un hidrogenador, se lavó 3 veces con 35 lb/plg<sup>2</sup> de hidrógeno, eliminando la presión en cada vez con succión, después se llevó a 60 lb/plg<sup>2</sup> de hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente.

## DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

La reducción se llevó a cabo en 15 h, consumiéndose un total de 250 lb/plg<sup>2</sup> de hidrógeno. Al finalizar la reacción, el catalizador se separó por filtración al vacío y el filtrado se concentró a sequedad en el rotaevaporador dando 21.5 g (94.5% ) de un producto resinoso color negro, el cual en CCF presentó seis manchas ( sistema II).

### 4.2.6.2. b) Por reducción de **2** con Cloruro astanoso decahidratado.

En un vaso de precipitados de 400 ml , adaptado con termómetro y agitador magnético, se colocaron 34.70 g (0.1536, 2 eq.) de SnCl<sub>2</sub>·10H<sub>2</sub>O y 50 ml de HCl concentrado. La mezcla de reacción se agitó hasta la disolución completa.

Enseguida se adicionaron 10 g (0.050 mol) de **2**, la temperatura subió a 35 °C. La mezcla se calentó a 100 °C , formándose entonces una solución de color verde. Se dejó enfriar y el sólido que cristalizó se separó por filtración. El sólido cristalino obtenido se suspendió en agua y ajustó el pH a 14 por adición de NaOH en solución concentrada, se extrajo el producto con acetato de etilo (3 X 100 ml), los extractos reunidos se lavaron con agua, secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y concentraron al vacío. Se obtuvieron 11.3 g (86 %) de un sólido blanco, que en CCF mostró una mancha con R<sub>f</sub> de 0.34 (sistema I ). Este sólido cambió a color café rápidamente, por lo que se utilizó enseguida para la siguiente reacción.

El espectro de IR (No 4) dio bandas en 3446 (-NH<sub>2</sub>), 2904, 2600 (CH sat.) 1632-1462 (CH=CH arom), 1494 (Ar-NH<sub>2</sub>), El espectro de RMP (No 5) presentó señales en 1.0 (t, 3H , CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S), 1.60 ( sxt, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S), 3.0 (t , 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S), 7.5 (sa, 4H, H aromático), 9.75 (m, 2H, NH<sub>2</sub>, intercambia con D<sub>2</sub>O).

#### 4.2.7. Síntesis del N-(4-Propiltiofenil)carbamato de metilo 4.

En un matraz de bola de 500 ml con 3 bocas, adaptado con agitación magnética, termómetro y embudo de presiones igualadas, se colocaron 11.3 g (0.067 mol) de 3, 8.5 g (0.101 mol, 1.5 eq.) de NaHCO<sub>3</sub> y 150 ml de acetona. La mezcla se agitó por espacio de 15 min y luego se adicionaron 6.0 ml (7.9 g, 0.08 mol, 1.27 eq.) de cloroformiato de metilo, gota a gota, y con agitación vigorosa, terminada la adición se dejó en agitación por espacio de 30 min a temperatura ambiente.

Después de este tiempo se vertió sobre hielo formándose un sólido crema, el cual se separó por filtración al vacío, lavó tres veces con agua fría y secó al aire. Se obtuvieron 15.7 g (94.0 %) de un sólido oscuro, en CCF presentó una mancha principal con un R<sub>f</sub> de 0.517 ( sistema I). El producto crudo se recristalizó de ciclohexano/ éter de petróleo dando agujas blancas , las cuales fundieron a 123-124 °C.

El espectro (No 6 ) de IR mostró bandas en 3280 (-NH ), 3180 (CH insat.), 2958, 2868 (CH sat), 1704 (C=O), 1600-1538 (C=C arom.); 1236 (C-O-C). El espectro (No 7) de RMP presentó señales en 1.0 (t, 3H , CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S), 1.75 ( sxt, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S), 2.80 (t , 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S), 3.75 (s , 3H, CH<sub>3</sub>O), 7.25 (s, 4H, H del fenilo ), 6.8 (sa, 1H, NH , que intercambia con D<sub>2</sub>O). El espectro (No 8) de CG-EM presentó un M<sup>+</sup> de 225 (100 % de abundancia) el cual era el pico base del espectro y un M+2 de 227 (12 % de abundancia, presencia del azufre).

### 4.2.8. Síntesis del 4-Feniltionitrobenceno 5

En un matraz de bola de 3000 ml con una boca 24/40, adaptado con agitador mecánico, condensador en posición de reflujo y sobre éste un globo con nitrógeno, se colocaron 200.0 g (0.6346 mol) de p-cloronitrobenceno , 200 ml de etilenglicol , un l de agua y una solución de NaOH (31.7 g , 0.7925 mol, 1.2 eq., en 31 ml de agua ). La mezcla de reacción se agitó durante 20 min.

Enseguida se adicionaron 79 ml (83.91 g, 0.7616 mol, 1.2 eq.) de tiofenol. Posteriormente la mezcla de reacción se calentó por medio de baño de aceite hasta llegar al reflujo y se mantuvo así, con agitación, por un lapso de 14.5 h. Cuando se consumió la materia prima , la mezcla se dejó enfriar a 40 °C y se formaron dos fases las cuales se extrajeron con acetato de etilo (3 X 200 ml). Los extractos reunidos se lavaron dos veces con solución de NaOH 1 N y tres con agua. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentró al vacío, cristalizando 147.71 g (81.7 %) de un sólido amarillo. El producto se recristalizó de ciclohexano/ éter de petróleo dando un sólido amarillo que en CCF presentó una sola mancha con un R<sub>f</sub> de 0.47 ( sistema III) y un punto de fusión de 54.5-55.5 °C.

El espectro de IR (No 9) mostró bandas en 3096-3052 (CH insat), 1572 (Ar-NO<sub>2</sub>), 1504 (CH=CH arom), 1338 (Ar-NO<sub>2</sub>). EL espectro de RMP (No 10) presentó señales del sistema AA', XX' en 7.1 ( d, 2H, H aromático, J= 8-9 Hz, orto al azufre ) y 8.0 (d, 2H, H aromático, J= 8-9 Hz, orto al NO<sub>2</sub>), 7.4 (sa, 5H, H aromático, del feniltio).

### 4.2.9 Síntesis de la 4-Feniltioanilina 6

En un vaso reactor de 500 ml se colocaron 12 g (0.05188 mol) de **5**, 1.2 g de Pd/C al 10% y 250 ml de etanol. El vaso reactor se adaptó a un hidrogenador y lavó 3 veces con 35 lb/plg<sup>2</sup> de hidrógeno, eliminando el aire en cada vez con succión, después se llevó a 60 lb/plg<sup>2</sup> de hidrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante 8 h, se consumió un total de 250 lb/plg<sup>2</sup> de hidrógeno.

Al finalizar la reacción, el catalizador se separó por filtración al vacío y el filtrado se concentró a sequedad en el rotaevaporador, se obtuvieron 9.92 g (95 % ) de un producto resinoso color paja, el cual en CCF presentó una mancha principal con un Rf de 0.38 (sistema I). El producto se recristalizó de benceno/hexano dando agujas amarillas con un punto de fusión de 95 °C concordante con el reportado.<sup>53</sup>

### 4.2.10. Síntesis del N-(4-Feniltiofenil)carbamato de metilo 7

El producto **6** crudo de la reacción anterior se disolvió en 250 ml de acetona y se transfirió a un matraz de bola de 500 ml con tres bocas 24/40, adaptado con condensador en posición de reflujo y encima de éste un globo con nitrógeno, termómetro y embudo de adición. Enseguida se adicionaron 6.5 g (0.07738 mol) de NaHCO<sub>3</sub>, y gota a gota , 4 ml (4.9 g , 0.052 mol. 1.03 eq.) de cloroformiato de metilo. La mezcla de reacción agitada se calentó con baño de agua a reflujo suave durante 1 h y se consumió **6**.

## DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

La mezcla fría se vertió sobre 400 ml de agua-hielo, precipitando un sólido gris, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada y secó al aire. Se obtuvieron 11.7 g (87.1%) de **7**, el cual en CCF mostró una sola mancha con un  $R_f$  de 0.47 (sistema I). El producto se recristalizó de ciclohexano obteniéndose agujas blancas con un Pf de 89-90 ° C.

El espectro de IR (No 11) presentó bandas en 3314 (-NH), 3016 (CH insat.), 2948 (CH sat.), 1706 (C=O), 1728 (NH-COO-C), 1314 (C-O-C), 1602-1400 (CH=CH arom.), 1076 (C-O-C). El espectro de RMP (No 12) mostró señales en 3.8 (s, 3H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.2-7.3 (m, 4H, H del fenilo unido al carbamato), 7.3-7.4 (m, 5H, H aromático del fenilo), 6.8-6.9 (sa, NH que simplifica con D<sub>2</sub>O). El espectro de CG-EM (No 13) presentó un M<sup>+</sup> de 259 (100 % de abundancia) y un M+1 de 260 (25% de abundancia), M+2 de 261.

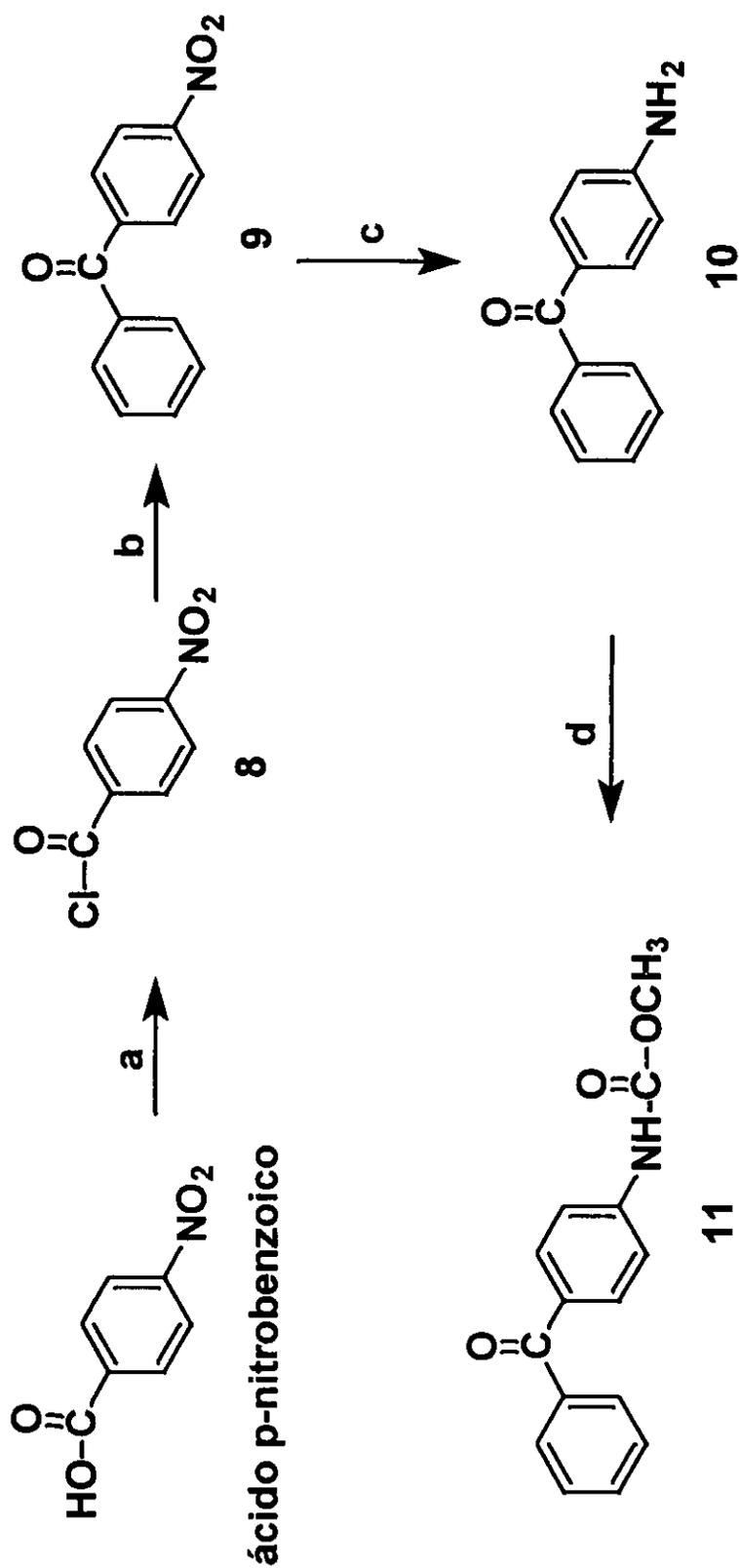
### **4.2.11. Síntesis del compuesto 11**

La síntesis del análogo del Mebendazol se realizó de acuerdo al esquema de reacción N° 2.

### **4.2.12. Cloruro de 4-nitrobenzoílo 8.**

En un matraz de bola de 2000 ml con tres bocas 24/40, acondicionado con agitación magnética, embudo de presiones igualadas, columna vigreux en posición de reflujo y sobre ésta una trampa para el desprendimiento de HCl gas, se colocaron 100 g (0.5984 mol) de ácido 4-nitrobenzoico, enseguida se añadieron en frío, gota a gota, 87.35 ml (133.11 g, 1.118 mol, 1.86 eq. ) de cloruro de tionilo.

## Esquema de reacción N° 2



(a)  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ; (b)  $\text{C}_6\text{H}_6$ ,  $\text{AlCl}_3$ ; (c)  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{HCl}$ ;  
(d)  $\text{ClCO}_2\text{CH}_3$ , acetona,  $\text{NaHCO}_3$

## DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Después de 4 horas de reacción, el sólido no se disolvió y se adicionaron 50 ml de acetonitrilo. La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 hrs, verificándose por CCF la desaparición del ácido. Se destiló el exceso de cloruro de tionilo y acetonitrilo, quedando en el matraz un sólido café, el cual se lavó con éter de petróleo. Se obtuvieron 101 g (95.3%) de producto crudo el cual se utilizó en la siguiente reacción.

### 4.2.13. p-Nitrofenilbenzofenona **9**.

En un matraz de bola de 2 l de tres bocas 24/40, acondicionado con agitación magnética, embudo de presiones igualadas, columna vigreux en posición de reflujo y sobre este una trampa para atrapar HCl gas, se colocaron 100.2 g (0.7514 mol) de  $AlCl_3$  y 300 ml de benceno anhidro.

La mezcla de reacción se enfrió con baño de hielo a  $0^{\circ}C$ , adicionándose enseguida 101.2 g (0.539 mol, 1eq.) de cloruro de ácido (**8**) en cuatro porciones. Después de 30 min en agitación se retiró el baño de hielo y calentó hasta llegar a la temperatura ambiente. Enseguida se verificó por CCF la desaparición de **8**, la mezcla fría se vertió sobre 2000 ml de agua-hielo, precipitando un sólido café claro, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada y secó al aire, dando 105 g (85%) de **9**. El producto se disolvió en cloroformo y lavó con agua, secó con  $Na_2SO_4$  y concentró a sequedad en el rotaevaporador. Se obtuvo un sólido que en CCF da una sola mancha  $R_f$  de 0.52 (sistema IV). Su punto de fusión fue similar al reportado por Aldrich (135-136). Este producto crudo se empleo tal cual para la siguiente reacción.

### 4.2.14. p-Aminobenzofenona 10

En un vaso de precipitados de 500 ml , adaptado con termómetro y agitador magnético, se colocaron 90.5 g (0.4015, 3 eq.) de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 50 ml de HCl concentrado. La mezcla de reacción se agitó hasta la disolución completa. Enseguida se adicionan 30 g (0.13220 mol) del producto 9 crudo, alcanzando una temperatura de 35 °C. La mezcla se calentó a 100 °C , temperatura en la cual se disolvió completamente la materia prima, manteniéndose así por 15 min.

Al enfriarse el medio de reacción, cristalizó un sólido el cual se separo por filtración al vacío. El residuo obtenido se suspendió en agua y llevó a pH 14, extrayéndose el producto con acetato de etilo (3 x 200 ml). Los extractos reunidos se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y concentraron a sequedad. Se obtuvo un sólido blanco en un 76.83, que en CCF mostró una mancha con  $R_f$  de 0.22 (sistema I ) y un punto de fusión concordante con el reportado en el catalogo Aldrich.<sup>49</sup>

### 4.2.15. N-(4-benzoilfenil)carbamato de metilo 11.

En un matraz de 1000 ml de tres bocas, adaptado con agitación magnética, septum, termómetro y embudo de adición de presiones igualadas, se colocaron 20 g (0.101 mol ) de 10 , 200 ml de acetona y 8.517 g (0.101mol , 1 eq.) de  $\text{NaHCO}_3$ ; luego, se añadió gota a gota 8.32 ml (11.48 g , 0.1214 mol , 1.2 eq.) de cloroformato de metilo. La mezcla de reacción se agitó y calentó con baño de agua a reflujo suave durante 1 h, verificando por CCF la desaparición de 10.

Luego se vertió sobre 250 g de hielo picado, precipitando **11**, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua fría y dejó secar al aire. Se obtuvieron 27.7 g (85 %) de un sólido beige, el cual en CCF presentó una mancha principal con  $R_f$  de 0.32 (sistema I). El producto se recristalizó de tolueno y luego de metanol, dando agujas blancas con un p.f. de 154-155 °C, el cual es similar al reportado.<sup>52</sup>

### 4.2.16. Síntesis de los Compuestos 12-15.

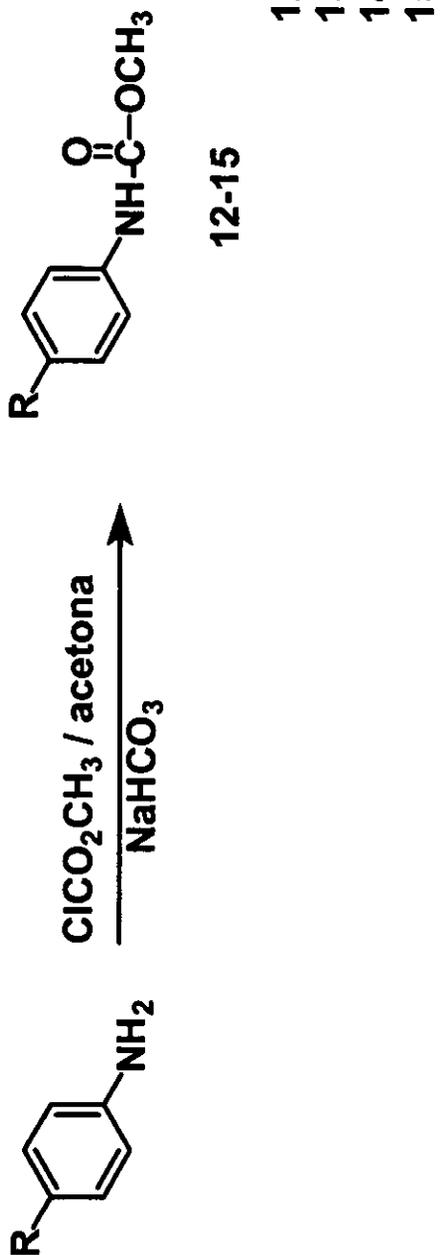
Para sintetizar los carbamatos restantes **12-15**, se siguió la secuencia que se presenta en el esquema de reacción N° 3.

### 4.2.17. N-(4-hidroxifenil)carbamato de metilo **12**

En un matraz bola de 500 ml de tres bocas, adaptado con termómetro, embudo de adición a presiones igualadas y condensador en posición de reflujo, se colocaron 20 g (0.1832 mol) de p-aminofenol Merck y 250 ml de acetona, agitando hasta la disolución de la amina. Enseguida se adicionaron 15.39 g (0.1850 mol) de  $\text{NaHCO}_3$ .

La mezcla de reacción en agitación vigorosa se enfrió con baño de hielo-sal-metanol a 0 °C, temperatura a la cual se adicionó al sistema 16.99 ml (20.78 g, 0.219 mol, 1.2 eq.) de cloroformiato de metilo, gota a gota. Después de la adición, se dejó que la reacción alcanzará la temperatura ambiente, durante 1.5 h. Se verificó la desaparición de la materia prima por CCF, La mezcla de reacción enseguida se vertió sobre 500 ml de una mezcla hielo-agua, con lo que se formaron dos fases.

## Esquema de Reacción N° 3



Estas se extrajeron con acetato de etilo (3 X 100 ml) y los extractos orgánicos reunidos se lavaron con agua cuatro veces. La fase orgánica se seco con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtró y concentró en el rotaevaporador. Se obtuvo un líquido café oscuro, que al enfriarse cristalizó.

El producto se recristalizó de acetato de etilo/hexano y luego de etanol. Se obtuvieron 27.99 g (91.4 % ) de agujas blancas, que en CCF mostraron una sola mancha con un  $R_f$  de 0.46 (sistema I) y un punto de fusión de 115-116 °C, coincidente con el reportado.<sup>49</sup>

### 4.2.18. N-(4-metoxifenil)carbamato de metilo 13.

En un matraz bola de 500 ml con tres bocas, adaptado con agitador magnético, termómetro, condensador en posición de reflujo y embudo de adición a presiones igualadas, se colocaron 7 g (0.056 mol) de p-anisidina, 250 ml de acetona y 5.7 g (0.067 mol, 1.21 eq.) de  $\text{NaHCO}_3$ . La mezcla de reacción agitada vigorosamente se enfrió hasta -5 °C, temperatura a la cual se adicionaron, gota a gota, 5.44 ml (7.5072 g, .0798 mol , 1.42 eq.) de cloroformiato de metilo. Después de la adición , se retiró el baño frío y dejó llegar a la temperatura ambiente permaneciendo así por espacio de 1 h , se verificó la desaparición de la amina por CCF. Posteriormente la mezcla de reacción se vertió sobre 500 ml de hielo picado, precipitando un sólido café claro, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua fría y dejó secar al aire. El producto se recristalizó de tolueno-hexano, obteniéndose 8.5 g (84.1% ) de un sólido blanco cristalino con un  $R_f$  de 0.55 (sistema IV) y un Pf de 89-90 °C, similar al reportado.<sup>49</sup>

### 4.2.19. N-(4-nitrofenil)carbamato de metilo 14.

En un matraz bola de 500 ml con tres bocas, adaptado con agitador magnético, termómetro, condensador en posición de reflujo y embudo de adición a presiones igualadas, se colocaron 19.5 g (0.1406 mol) de p- nitroanilina, 14.7 g (0.175 mol, 1.2 eq.) de  $\text{NaHCO}_3$  y 250 ml de acetona. La mezcla de reacción agitada vigorosamente se enfrió hasta 0 °C, temperatura a la cual se le adicionaron, gota a gota, 12.14 ml (15.18 g, 0.1607 mol, 1.2) de cloroformiato de metilo. Después de la adición, se retiró el baño frío y dejó llegar a la temperatura ambiente, para enseguida calentarlo a reflujo suave con baño de agua, durante 5 h. Al verificar que en CCF había materia prima, se añadieron al sistema 5 ml (6.115 g, 0.0647 mol, 0.5 eq.) de cloroformiato de metilo y 5 g (0.059 mol, 0.4 eq.) de  $\text{NaHCO}_3$ , dejando la mezcla en agitación por toda la noche. Después de verificar la desaparición de la materia prima por CCF, la mezcla de reacción se vertió sobre 500 ml de hielo picado, precipitando un sólido amarillo, el cual se separó por filtración al vacío y lavó con agua fría hasta un pH neutro. Se dejó secar al aire dando un peso de 15 g (94%). El producto se recristalizó de hexano, obteniéndose agujas amarillas cristalinas con un  $R_f$  de 0.46 (sistema IV) y un Pf de 176-177 °C concordante con el descrito en la literatura.<sup>49</sup>

### 4.2.20. N-(4-clorofenil)carbamato de metilo **15**.

En un matraz de 250 ml con 3 bocas, adaptado con termómetro, embudo de adición a presiones igualadas, agitador magnético y condensador en posición de reflujo, se colocaron 5 g (0.039 mol) de p-cloroanilina, 3.9 g (0.48 mol, 1.2 eq.) de  $\text{NaHCO}_3$  y 100 ml de acetona. La mezcla de reacción se agitó por 15 min y enseguida se enfrió hasta 0 °C con baño de hielo-sal-metanol, entonces se trató con 3.6 ml (3.703 g, 0.0391 mol, 1.2 eq.) de cloroformiato de metilo. Se dejó que la mezcla de reacción llegara a la temperatura ambiente y agitó por 30 min, se verificó por CCF la desaparición de la materia prima. La mezcla se vació sobre hielo picado (500 g), dando a **15** como un sólido gris, el cual se separó por filtración al vacío, lavó con agua helada, solución de NaOH diluida y dejó secar al aire. El sólido seco pesó 7g (96 %), en CCF presentó una mancha principal con  $R_f$  de 0.43 (sistema I), . Se recristalizó de benceno/hexano , obteniéndose un sólido blanco brillante, con un punto de fusión de 114-116 °C correspondiente al previamente descrito.<sup>49</sup>

### 4.3. ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA SOBRE *Triquinella spiralis*.

Para la evaluación biológica antihelmíntica se utilizó el ensayo *in vitro* sobre larvas musculares de *Triquinella spiralis* como modelo, el cual se describe a continuación:

Se empleó una cepa de *T. spiralis* que fue aislada de cerdo por el Dr. Martínez-Marañón del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (INDRE). Con el objeto de mantener el ciclo de vida de este parásito, ratas de la cepa Sprague-Dawley de 2 a 3 meses de edad fueron infectadas con 3000 larvas musculares resuspendidas en Bacto agar al 0.02%. La infección se realizó por vía intragástrica con cánula y jeringa.

**Obtención de las larvas musculares de *T. spiralis*.** Las larvas musculares se obtuvieron de acuerdo a lo descrito por Dennis y cols.<sup>51</sup> Ratas de la cepa Sprague-Dawley se infectaron con 3000 larvas musculares de *T. spiralis*. A los 28 días post-infección, los animales fueron sacrificados y el músculo esquelético fue macerado y digerido artificialmente con una solución de pepsina-HCl al 1% durante 3 h a 37°C con medio RPMI 1640 al cual se le adicionaron 500 U/mL de penicilina, 500 µg/mL de estreptomina y 1.25 µg/mL de anfotericina B. Una vez realizado lo anterior, las larvas se lavaron con PBS y se resuspendieron en Bacto agar al 0.02% para contar el número de larvas.

**Ensayo *in vitro* (MTT/PMS) para evaluar el efecto de los carbamatos sobre la larva muscular de *T. spiralis*.** Las larvas musculares de *T. spiralis* se obtuvieron de acuerdo a lo descrito anteriormente y se colocaron 1000 larvas por pozo en cajas de cultivo de 24 pozos (Nunclon) en medio RPMI 1640 conteniendo el fármaco a evaluar a una concentración de 1 µg/mL y 10 µg/mL.

## DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Los parásitos se incubaron por 3 días a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, con cambio diario de medio más fármaco. Como control positivo se incluyeron parásitos en presencia de albendazol, mebendazol y fenbendazol, y como control negativo se incluyeron larvas musculares sin tratamiento. Después de la incubación se determinó la viabilidad de los parásitos mediante un método colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio MTT a formazán de acuerdo a lo descrito por Townson<sup>52</sup>, con algunas modificaciones.<sup>53</sup> Así, los parásitos cultivados con los diferentes compuestos se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 2 mL se centrifugaron a 2500 rpm por 2 min. Posteriormente se realizó un lavado con PBS y se añadió 1 mL de una solución de MTT al 0.75% (Sigma), 50 µL de una solución de metasulfato de fenazina al 5% (PMS; Sigma) como catalizador y 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

Los tubos se incubaron a 37°C durante 50 min, con agitación constante. Después de la incubación se realizó otro lavado con PBS y se agregaron 500 µL de DMSO, los parásitos se resuspendieron y se dejaron a temperatura ambiente por 1 h. Al finalizar este tiempo los tubos se centrifugaron y se transfirió el sobrenadante a placas de ELISA, las cuales se leyeron a 492 nm.

Se calculó el porcentaje de reducción de la densidad óptica en comparación con el control negativo y de acuerdo a esto se calculó el porcentaje de reducción de la viabilidad. Se realizaron 3 experimentos por duplicado cada uno de ellos.

#### 4.4. ACTIVIDAD HERBICIDA

##### 4.4.1. Aislamiento de cloroplastos y cuantificación de clorofila total:

Se utilizaron cloroplastos intactos aislados de hojas de espinacas de acuerdo al método empleado por Lotina *et al.* como se describe a continuación<sup>55</sup>: Se obtuvieron 30 g de hojas de espinacas frescas ( *Spinacea oleracea* ) verdes sin rupturas ni manchas amarillas, las cuales se lavaron con agua destilada para quitar la tierra, se cortaron en pedazos pequeños eliminando el ápice y la nervadura central. Posteriormente se colocaron en un vaso de una licuadora previamente enfriado, el cual contenía 100 ml de medio para aislar cloroplastos ( sacarosa 400 mM,  $MgCl_2$  5mM, KCl 10 mM, y tricina 30 mM, ajustado a un pH 8.00 con KOH ). A continuación se homogenizaron en la licuadora ( Osterizer, modelo L-21) durante 5 segundos intermitentes a velocidad máxima. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de gasa y el filtrado se centrifugó a 4000 r.p.m. durante 5 min. a 4 °C (en Centrifuga Beckman J2-21, rotor de ángulo fijo JA-20).

Por ultimo el sobrenadante se desechó y el sedimento se suspendió en 1 ml del medio de aislamiento. La cuantificación de clorofila total se realizó utilizando el método de Strain y Colaboradores.<sup>56</sup>

### **4.4.2. Determinación de la síntesis de ATP y captación de protón en cloroplastos intactos lisados en el momento del ensayo:**

La captación de  $H^+$  se midió registrando los cambios de pH en el medio de reacción entre 8.0 y 8.1, para lo cual se utilizó un microelectrodo combinado (Orion) y de respuesta rápida conectado a un potenciómetro (Corning modelo 12) con escala expandida, tal como ha sido señalada por Dilley.<sup>57</sup>

Para medir la síntesis de ATP se realizaron ensayos, los cuales utilizaron 3 ml de medio de reacción de la captación de  $H^+$  ( sacarosa 100 mM,  $MgCl_2$  5 mM, KCl 10 mM, tricina 1mM, MV 50 mM y KCN 0.5 mM ), y se añadió 30  $\mu$ L de fosfato 0.3 M (concentración final 3mM), y 30  $\mu$ L de ADP 0.1 M (concentración final 3mM), además se utilizaron diferentes concentraciones de los compuestos a caracterizar su actividad en el cloroplasto y el equivalente a 60  $\mu$ g de clorofila total se añadió.

El cambio de pH en el medio de reacción se determinó después de un periodo de iluminación de un minuto. El  $H^+$  producido se cuantificó por titulación, agregando 100  $\mu$ L de una solución estándar de KOH 0.001 N al medio de reacción, en presencia de cloroplastos mantenidos en la oscuridad.

### 4.4.3 Medición de la velocidad de transporte de electrones basal, fosforilante y desacoplado.

Basados en el hecho de que al iluminar los cloroplastos hay fotólisis del agua y que por cada mol del agua que cede dos moles de electrones al sistema óxido-reductor de la cadena fotosintética, se liberan dos moles de protones del agua al medio interno del tilacoide liberándose 0.05 moles de oxígeno molecular los cuales se difunden al medio de reacción .La concentración de oxígeno en el medio de reacción se determino utilizando un electrodo tipo Clark conectado a un monitor YSI de oxígeno.

El sistema de Clark<sup>59</sup> esta formado de dos electrodos:

Cátodo de platino, en este electrodo el oxígeno es reducido por la reacción:



Ánodo de plata, donde ocurre la siguiente reacción:



Ambos electrodos están en contacto con una solución concentrada de cloruro de potasio / cloruro de plata, a su vez están cubiertos por una membrana de politetrafluoretileno que está en contacto con el medio de reacción y es permeable al oxígeno. El flujo de corriente resultante en la célula electrolítica es proporcional a la concentración de oxígeno molecular en la muestra , los cambios de corriente eléctrica detectados por el electrodo se transducen a voltaje por un oxímetro, el cual se conecta a un registrador Beckman.

## DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Las mezclas de reacción se iluminaron con luz actínica de una lámpara de proyector de 350 watts. El haz luminoso se hizo pasar a través de 5 cm. de una solución de sulfato de cobre al 1% ( Lente de Izawa) que sirve como filtro luminoso y de calor.

El medio basal que se utilizó para medir el transporte de electrones es de tres ml de medio que contiene sacarosa 100 mM,  $MgCl_2$  15 mM, KCl 10 mM, Tricina 15 mM ajustada a pH 8 con KOH conc.. **En todos los casos se adicionó la cantidad de cloroplastos equivalentes a 60  $\mu$ g de clorofila y se lisó en este medio de reacción en el momento del ensayo.** En este trabajo las siguientes consideraciones experimentales se consideraron.

a) Medición del transporte de electrones no cíclico basal de  $H_2O$  a MV .

Medio basal más metilviológeno (MV) 50  $\mu$ M más compuesto a ensayar en concentraciones crecientes. El MV se adicionó como aceptor artificial de electrones, ya que acepta electrones a nivel de los centros Fe-S del FS I.<sup>60</sup>

b) Medición del transporte de electrones no cíclico fosforilante de  $H_2O$  a MV.

Medio basal más MV 50  $\mu$ M más ADP 1 mM más  $K_2HPO_4$  3 mM más compuesto a ensayar a concentraciones crecientes.

c) Medición del transporte de electrones no cíclico desacoplado de  $H_2O$  a MV.

Medio basal más metilviológeno (MV) 50  $\mu$ M más cloruro de amonio 5 mM ( como desacoplante ) más compuesto a ensayar en concentraciones crecientes.

### 4.4.4. Determinación del sitio de inhibición en la cadena fotosintética

Para las determinaciones que a continuación se mencionan se utilizó el siguiente medio basal: sacarosa 100 mM,  $MgCl_2$  5 mM, KCl 10 mM, Tricina 15 mM, ajustado a pH 8, y 60  $\mu g$  clorofila total de cloroplastos intactos que se lisan en este medio de reacción en el momento del ensayo.

d) Medición del transporte de electrones del Fotosistema II desacoplado de  $H_2O$  a DCPIP, que representa el tramo de cadena redox de agua a PQ oxidado.

Medio basal más ferricianuro de potasio 300  $\mu M$  más DCPIP 50  $\mu M$  más DMBIB 1  $\mu M$  más  $NH_4Cl$  más compuestos a ensayar a diferentes concentraciones. El DMBIB se adicionó para impedir el paso de los electrones hacia el FS I.<sup>60</sup> El DCPIP/ $K_3Fe(CN)_6$  se utilizó como aceptor final de electrones.<sup>61</sup>

e) Medición del transporte de electrones en FS I de DCPIP<sub>red</sub> a MV.

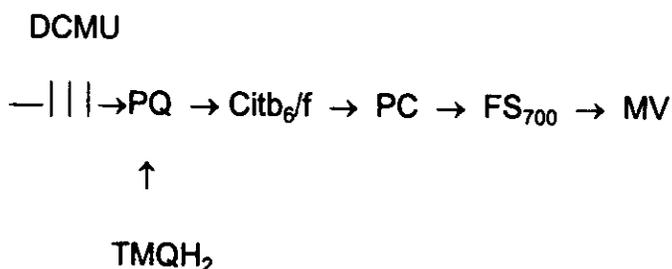
Para determinar el efecto de estos compuestos en FS I se utilizó la siguiente mezcla de reacción: medio basal, MV 50  $\mu M$ , DCMU 10  $\mu M$ , DCPIP 100  $\mu M$ /ascorbato 300  $\mu M$  y compuesto a ensayar en concentraciones crecientes.

f) Medición del transporte de electrones en el tramo de cadena redox de PQ a FeS del FS I (TMQH<sub>2</sub> a MV).

## DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Se utilizó 3 ml de medio basal, con la adición de 10 mM DCMU como inhibidor del FS II, 250 mM TMQH<sub>2</sub> como donador de electrones a nivel de PQ; la TMQH<sub>2</sub> es oxidada por el pool de PQ Oxidado del cloroplasto. Se agregó 50 mM MV como aceptor de electrones.

La reacción parcial del FS I comprende lo que se muestra a continuación:



El DCMU se empleó como inhibidor de la enzima Q<sub>B</sub><sup>62</sup> para impedir el flujo de electrones del FS II al FS I. El DCPIP/ascorbato se utilizó como donador de electrones a nivel del complejo b<sub>6</sub>/f<sup>63</sup> y MV como aceptor final de electrones.<sup>58</sup>

**Controles:** Los controles se realizaron al inicio y al final de cada experimento, éstos consistieron en la mezcla de reacción mencionada para cada experimento a excepción del compuesto a ensayar.

**Titulación.** Se realizó de la siguiente manera: Medio de transporte de electrones (sacarosa 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 10 mM, Triscina 15 mM (pH 8), 10 μL K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 4 mM, cloroplastos equivalentes a 60 μg de clorofila total en 3 mL de medio, en este medio se lisaron los cloroplastos intactos en el medio de ensayo.

Posteriormente se iluminó el tiempo necesario para que el  $K_3Fe(CN)_6$  se redujera completamente, esta determinación nos permitió obtener la cantidad de oxígeno desprendido en  $\mu eq$  de electrones transportados al consumirse  $10 \mu L$   $K_3Fe(CN)_6$   $4 mM$ . Esta velocidad se utilizó como referencia cuando se emplearon otros sistemas en donde el aceptor de electrones fue otro compuesto diferente. En el caso del ferricianuro de potasio se observó una producción neta de oxígeno por la donación de electrones del agua a la cadena fotosintética.

### 4.4.5. ENSAYO PREEMERGENTES DE LOS CARBAMATOS

Para evaluar el efecto preemergente que pudieran tener los carbamatos en la germinación, se realizaron ensayos en las semillas de plantas de importancia económica, tales como una dicotiledonea: tomate (*Physalis ixocarpa*), que es considerada una maleza en otros países, y dos monocotiledoneas: trigo (*Triticum vulgare*) y trébol (*Trifolium alexandrini*), esta última una maleza. Para ello se procedió a lo siguiente:

Se esterilizaron cajas de petri con papel filtro whatman del # 2 y agua destilada en el autoclave a presión de  $18 kg/m^2$  por 15 minutos. En condiciones estériles se desinfectaron las semillas con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 minutos y terminado esto se enjuagaron en agua destilada estéril.<sup>64</sup>

## DESARROLLO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Una vez realizado lo anterior se procedió a colocar el número de semillas que a continuación se indican en el tabla 2, en las cajas de petri, inmediatamente se agregó 7 ml agua estéril que contenía disueltos a los compuestos en las siguientes concentraciones: 50, 250, y 500 mM, se sellaron las cajas con papel parafilm para proporcionar una aeración adecuada y evitar así la evaporación del agua. Las cajas petri se colocaron en una incubadora a 28°C a completa oscuridad durante 5 días.

Pasado el tiempo se procedió a contar el número de semillas que germinaron, medir el tamaño de la raíz y el tallo, para calcular el % de inhibición sobre la germinación, desarrollo radicular y el tallo, esto nos sirve para evaluar a nuestro compuesto con características de herbicida pre-emergente.

TABLA 2. Número de semillas utilizadas en germinación.	
SEMILLA	#
<i>Triticum vulgare</i>	25
<i>Physalis ixocarpa</i>	100
<i>Trifolium alexandrini</i>	100

## **5. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **5.1. Modelado Molecular.**

Todos los carbamatos análogos se minimizaron con el Hamiltoniano AM1, obteniendo los mínimos locales. A las estructuras resultantes se les realizó el análisis conformacional, resultando 144 conformeros para cada molécula, de estas moléculas se tomaron los conformeros más estables energéticamente hablando y con mayor población estadística de Boltzman; las cuales se resumen en las tablas 2, 3, y 4.

De las tablas se puede observar que el conformero N° 1 para los compuestos **7** y **11** ( resaltados en negritas en las tablas, y presentados en el fig. 4 en la pag.73 ) corresponde no sólo al conformero más estable, sino al de mayor peso estadístico, lo cual indica que al menos para estos carbamatos el conformero obtenido de la minimización con AM1 corresponde al mínimo global. Aunque si bien es cierto que la distribución estadística es muy pobre, ya que el mejor mínimo global sólo tiene un pequeño porcentaje (32.29 % para **11**), y la diferencia de energía con respecto a los otros conformeros es menor a 5 Kcal/mol, lo cual implica que la interconversión de conformeros se puede lograr a temperatura ambiente.

Confórmero	Energía	Boltzman Pop
1	-67.455 Kcal	7.37%
12	-66.943 Kcal	3.10%
13	-66.986 Kcal	3.33%
14	-67.416 Kcal	6.89%
25	-66.560 Kcal	1.62%
27	-67.132 Kcal	4.26%
28	-66.634 Kcal	1.84%
65	-66.758 Kcal	2.27%
79	-66.741 Kcal	2.21%
91	-66.567 Kcal	1.64%
92	-66.988 Kcal	3.35%
103	-66.542 Kcal	1.58%
105	-67.247 Kcal	5.18%
118	-67.365 Kcal	6.33%
127	-66.621 Kcal	1.80%
130	-67.552 Kcal	8.68%
142	-66.933 Kcal	3.05%
<b>143</b>	<b>-67.605 Kcal</b>	<b>9.48%</b>

Tabla Nº 2. Conformerros mas estables y con mayor población de Boltzman obtenidos del análisis conformacional del carbamato 4; tomando los enlaces Ar-S-CH<sub>2isop</sub> y con incrementos de 30 °(n), usando el método sistemático. SPARTAN CONFORMATIONAL ANALYSIS (Systematic): SGI 4.0.1.1

Confórmero	Energía Kcal	Boltzman Pop
1	-53.986	11.71%
5	-52.705	1.35%
6	-52.974	2.12%
7	-53.590	6.00%
11	-52.734	1.41%
12	-53.111	2.67%
13	-53.410	4.43%
17	-53.069	2.49%
18	-53.079	2.53%
19	-53.174	2.97%
23	-53.063	2.46%
24	-53.152	2.86%
29	-53.222	3.22%
30	-53.085	2.55%
35	-52.889	1.84%
36	-53.078	2.53%
42	-52.768	1.50%
102	-52.757	1.47%
108	-52.734	1.41%
133	-53.218	3.20%
144	-52.862	1.75%

Tabla N° 3. Conformerros más estables y con mayor población de Boltzman obtenidos del análisis conformacional del compuesto 7; tomando los enlaces Ar-S-Ar y con incrementos de 30 °(n), usando el método sistemático. SPARTAN CONFORMATIONAL ANALYSIS (Systematic): 4.0.1.1

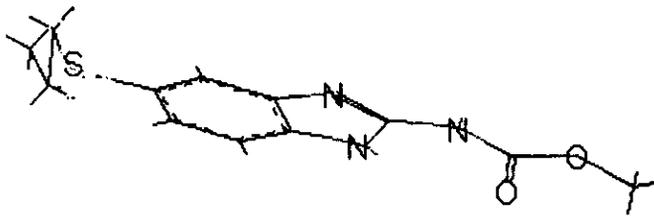
Confórmero	Energía	Boltzman Pop
1	<b>-20.645 Kcal</b>	<b>32.29%</b>
11	-18.400 Kcal	0.73%
12	-19.599 Kcal	5.52%
13	-19.987 Kcal	10.63%
17	-18.630 Kcal	1.07%
24	-18.977 Kcal	1.93%
25	-18.505 Kcal	0.87%
29	-19.130 Kcal	2.50%
41	-19.262 Kcal	3.12%
53	-18.715 Kcal	1.24%
54	-18.650 Kcal	1.11%
66	-18.291 Kcal	0.61%
119	-18.923 Kcal	1.76%
131	-19.329 Kcal	3.50%
132	-19.391 Kcal	3.89%
133	-20.008 Kcal	11.01%
134	-18.527 Kcal	0.90%
143	-18.674 Kcal	1.16%
144	-19.927 Kcal	9.60%

Tabla N° 4. Conformereros mas estables y con mayor población de Boltzman obtenidos del análisis conformacional del compuesto 11; tomando los enlaces Ar-C(=O)-Ar y con incrementos de 30 °(n), usando el método sistemático. SPARTAN CONFORMATIONAL ANALYSIS (Systematic): SGI  
 4.0.1.1. Number of conformers generated:144

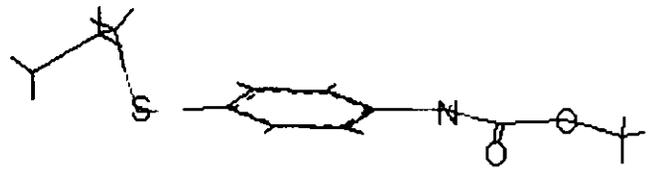
Ahora bien para el compuesto 4, el conformo más estable y de mayor peso estadístico es el N° 143, aunque al igual que los otros carbamatos, la distribución del peso estadístico se reparte entre varios conformeros interconvertibles a temperatura ambiente. Los conformeros generados se utilizaron para compararlos en un estudio posterior con el bencimidazol modelo.

Una vez elegido el carbamato más estable, se minimizó de nuevo (aunque resultó redundante) calculando enseguida los descriptores moleculares dentro del modulo QSAR de Spartan, además de las superficies del potencial molecular electrostático, del HOMO y LUMO. Por otra parte para los bencimidazoles se siguió la misma metodología, sin el análisis conformacional; esto último debido a que en la serie de los carbamatos la distancia interatómica entre el sustituyente en 4 y el nitrógeno (distancia que comprende el anillo bencénico) es más corta que la del bencimidazol (anillo bencimidazólico), y de acuerdo al resultado del análisis conformacional anterior, el resultado obtenido de AM1 es casi cercano al mínimo global.

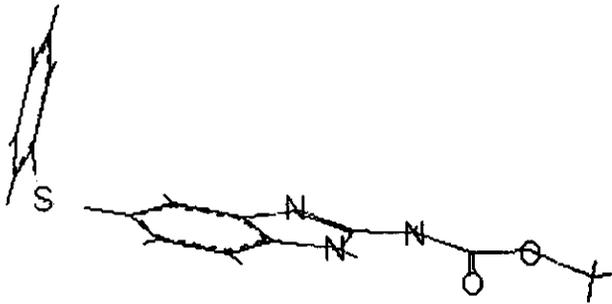
La Fig. 4 muestra los modelos de listón obtenidos para las moléculas modelo y sus carbamatos análogos. Es evidente la similitud en el espacio entre los carbamatos y los bencimidazoles. Ambas moléculas presentan el anillo principal plano, y el grupo carbamato se encuentra en el plano del anillo. Aunque el tamaño de las moléculas es diferente debido a que en los carbamatos falta la distancia interatómica del anillo de imidazol.



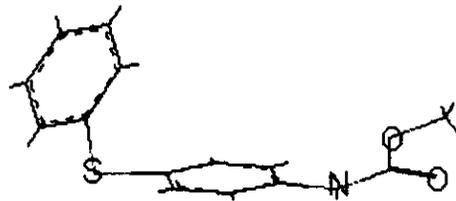
ALBENDAZOL



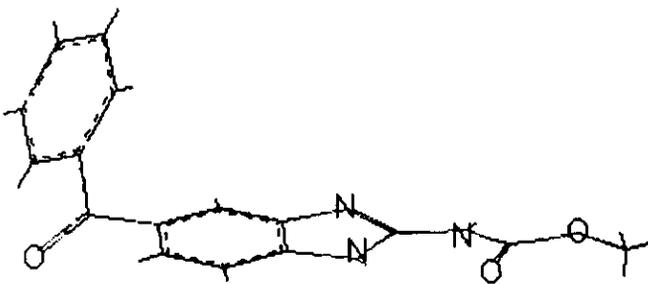
CARBAMATO 4



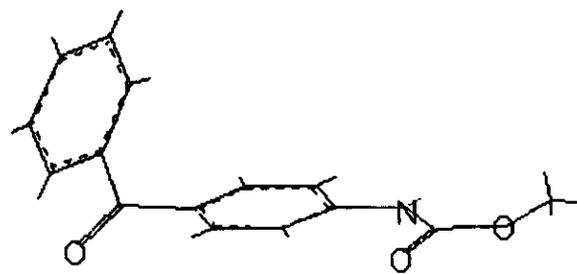
FENBENDAZOL



CARBAMATO 7



MEBENDAZOL



CARBAMATO 11

Fig. 4. Modelos de Liston de los Bencimidazoles modelo y sus respectivos Carbamatos analogos, con una perspectiva con respecto al plano del anillo principal, obtenidos por Q.M. (AM1).

La gran diferencia es el sustituyente en 5 (para el bencimidazol) y en 4 (para los compuestos 4,7 y 11), por que se encuentran en diferentes orientaciones con respecto al plano del anillo principal. Para tener una idea de que tan parecidos son en cuanto su orientación en el espacio ambos sustituyentes, con respecto al plano de los anillos aromáticos, se determino el ángulo de torsión o dihedro de cuatro átomos A-B-C-D, que esta definido como el ángulo entre dos planos, uno conteniendo los átomos A, B y C y el otro conteniendo a los átomos B, C y D.

Para determinar la ortogonalidad del sustituyente se pasa un plano por un par de carbonos del benceno en ambos casos tomando al azufre y el segundo plano por los dos átomos del sustituyente y considerado al átomo de carbono del anillo del benceno. La figura N° 5 muestra el concepto de ángulo dihedro, utilizando al carbamato 4, y la tabla N° 5 muestra los ángulos dihedros de todas las moléculas.

De la tabla resalta el resultado para 11, el cual no sólo tiene la misma orientación, sino también tiene un ángulo dihedro de la misma magnitud. Esto es importante porque los estudios realizados por McCracken<sup>13, 14 y 15</sup> sobre *H. diminuta* revelan que los bencimidazoles más activos presentan el sustituyente en 5 ortogonal al plano del bencimidazol, y correlacionándolo con lo encontrado para los carbamatos, empiezan a aparecer resultados que pueden predecir la posible actividad antihelmintica.

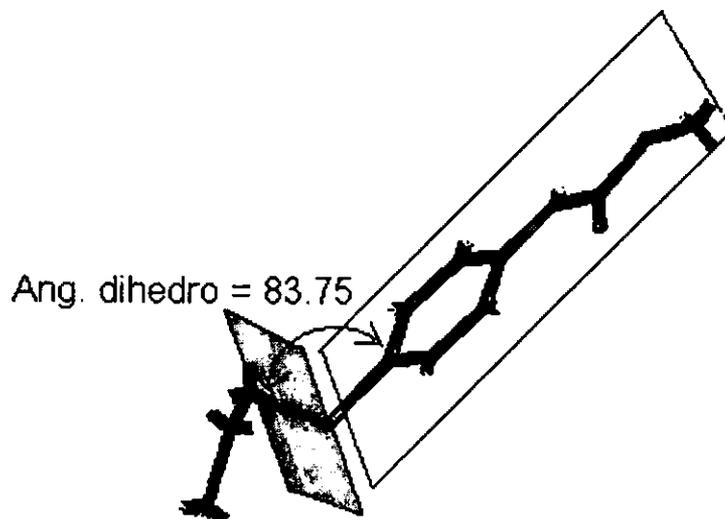


Fig. 5.- Modelo de tubo del compuesto 4 mostrando el ángulo dihedro de los átomos C3-C4-S-C<sub>12</sub> (ángulo dihedro de los átomos C7-C3-S12-C24 definidos por Spartan.).

Molécula	Ang. Dihedro °
Albendazol	-178.85 <sup>a</sup>
<b>4</b>	<b>83.75</b>
Fenbendazol	162.69
<b>7</b>	<b>18.92</b>
Mebendazol	<b>151.23</b>
<b>11</b>	<b>151.37</b>

<sup>a</sup> ángulo entre el C6-C5-X Y, donde X e Y son los primeros dos átomos del sustituyente en 5. (C5-C6-X-Y definidos por Spartan, donde X e Y son los dos primeros átomos del sustituyente en 5)

Tabla N. 5 Angulos dihedros de los bencimidazoles modelo y los carbamatos análogos.

Respecto al Albendazol este muestra un ángulo dihedro de  $-178.85^\circ$ , lo cual indica que el sustituyente se encuentra casi en el plano del anillo bencimidazólico ( $180^\circ$  o  $-180^\circ$  implica un sustituyente en el plano), en cambio **4** si presenta el sustituyente ortogonal (ángulo de  $83.75^\circ$ ). Por otra parte **7** presenta un ángulo parecido al Fenbendazol, pero la orientación del sustituyente esta hacia la izquierda ( $18.92^\circ$ ) mientras que en el Fenbendazol se encuentra hacia la derecha ( $162.69^\circ$ ).

Es importante señalar que en el estudio de McCracken<sup>13</sup> se utilizó el sulfóxido, porque es la especie que presenta la actividad antihelmintica *in vivo*. En este estudio no se utilizó el sulfóxido porque el modulo de AM1 de Spartan no esta parametrizado para el enlace C-S(=O)-C, y los resultados obtenidos eran de alta energía, y por otra parte al ser muy similares las dos moléculas se puede predecir que el metabolismo será igual para ambas, es decir, si se forma el sulfóxido del albendazol como primer metabolito, el sulfóxido de **4** deberá de ser también formado.

Una vez obtenidas las moléculas minimizadas se les calcularon los descriptores moleculares, los cuales se presentan en la tabla N° 6. Los resultados obtenidos para el Mebendazol son muy parecidos a los de McCracken<sup>14</sup>, por lo que sirven como control del trabajo realizado.

Observando los valores y comparándolos, los resultados son muy parecidos, es decir, numéricamente son muy cercanos, excepto para el calor de formación (los carbamatos son más estables) y el Log P (Dixon, que es más exacto), lo cual es importante porque implica que podrán atravesar las membranas celulares más fácilmente, problema que tienen los bencimidazoles, en cuanto a actividad se refiere.

Tanto el área superficial como el volumen molecular indican la parte que le falta a los carbamatos, el anillo de imidazol, porque los bencimidazoles presentan 30 unidades más en promedio. Si los carbamatos presentan una actividad mayor o igual que los bencimidazoles, esto implicaría que el anillo de imidazol no es importante, pero de ser necesario este anillo, la actividad será parcial, debido a que se requiere un tamaño específico para entrar al sitio receptor, si es menor la actividad disminuye, pero si es demasiado grande la molécula no entra al sitio receptor y no hay actividad.

Un descriptor que tiene que ver con la facilidad de que una molécula interactue con un agente electrofílico, nucleofílico ó de radicales libres es el HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital); y el LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)<sup>12,13</sup>, respectivamente. Así, un electrófilo reaccionará con la molécula con mayor valor de HOMO entre dos moléculas. Y un nucleófilo, en cambio, primordialmente con la molécula de menor LUMO.

## RESULTADOS

Si comparamos los valores obtenidos para las moléculas estudiadas, los valores son muy parecidos, pero tanto los carbamatos como los bencimidazoles son más susceptibles a un ataque electrofílico. Por otro lado el valor del HOMO y LUMO reportado corresponde a las contribuciones de cada átomo, pero no da idea de que parte es la que contribuye más a estos descriptores; además de ser dependiente de la orientación en el espacio (p. ej. a diferentes ángulos dihedrales se tienen diferentes contribuciones por parte de cada átomo, o bien el HOMO puede estar dentro o fuera del plano).

Descriptores. Mol.:	ALBZ	4	FBZ	7	MBZ	11
Calor de Formación (kcal/mol):	-22.43	-67.455	-23.525	-53.986	-10.652	-53.986
Peso Molecular: (g)	265.33	225.310	299.352	255.273	295.298	255.273
E(HOMO):	-7.91	-8.481	-7.885	-9.255	-8.905	-9.255
E(LUMO):	-0.12	-0.203	-0.118	-0.573	-0.446	-0.573
Electronegatividad:	4.02	4.340	4.000	4.910	4.680	4.910
Dureza:	3.90	4.140	3.880	4.340	4.230	4.340
Polarizabilidad:	24.14	20.822	25.863	22.075	24.903	22.075
Volumen Mol. : (Ang <sup>3</sup> )	230.21	204.730	250.540	231.930	260.430	231.930
Area superficial: (Ang <sup>2</sup> )	290.27	265.150	309.100	279.750	308.410	279.750
Ovalidad:	1.59	1.578	1.608	1.532	1.564	1.532
LogP (Gho- Cripp):	2.80	2.790	3.130	2.740	2.740	2.740
LogP (Dixon):	2.17	3.530	2.810	3.650	2.630	3.650
Dipolo Total(Debye)		2.670	2.553	3.053	4.803	3.053

Tabla N.6 Descriptores Moleculares calculados por Spartan para los bencimidazoles y los carbamatos análogos.

Para poder ver gráficamente las contribuciones de cada átomo se calculó la superficie del HOMO y LUMO, utilizando el conformero más estable, y se gráfico en cada molécula. Los resultados se muestran en las Fig. N° 6, 7 y 8, donde se presentan al bencimidazol modelo y su análogo.

En la fig. 6a se presenta al albendazol, y se puede observar como las contribuciones que tiene el sustituyente en 5, parte del anillo bencénico, y el nitrógeno del carbamato están presentes en 4 (Fig. 6b), pero en este último, no aparece las contribuciones que presenta el imidazol. Lo mismo sucede con el Fenbendazol (Fig. 7a), donde las nubes del HOMO son idénticas al del análogo, salvo por la del anillo del imidazol, aunque la contribución del carbonilo es mayor en el compuesto 7 (Fig. 7a).

Por otra parte 11 (Fig. 5b) presenta las contribuciones al HOMO iguales a la que presenta el Mebendazol (fig. 5a) en el anillo bencénico, incluso las del nitrógeno y carbonilo del carbamato son muy parecidas, pero faltan las contribuciones del imidazol.

Estas contribuciones similares indican una similitud estructural de los carbamatos y los bencimidazoles, aunque al parecer el anillo imidazólico tiene un papel importante.

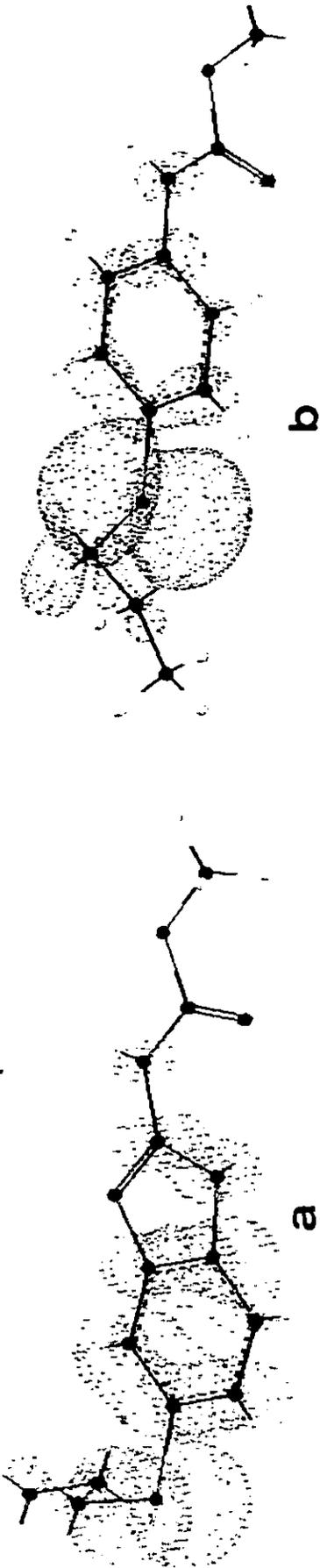


Fig. 6. Modelo de Liston mostrando graficamente la superficie del HOMO-LUMO del Albendazol (a) y de 4, Obtenidos por el modulo gráfico de Spartan.

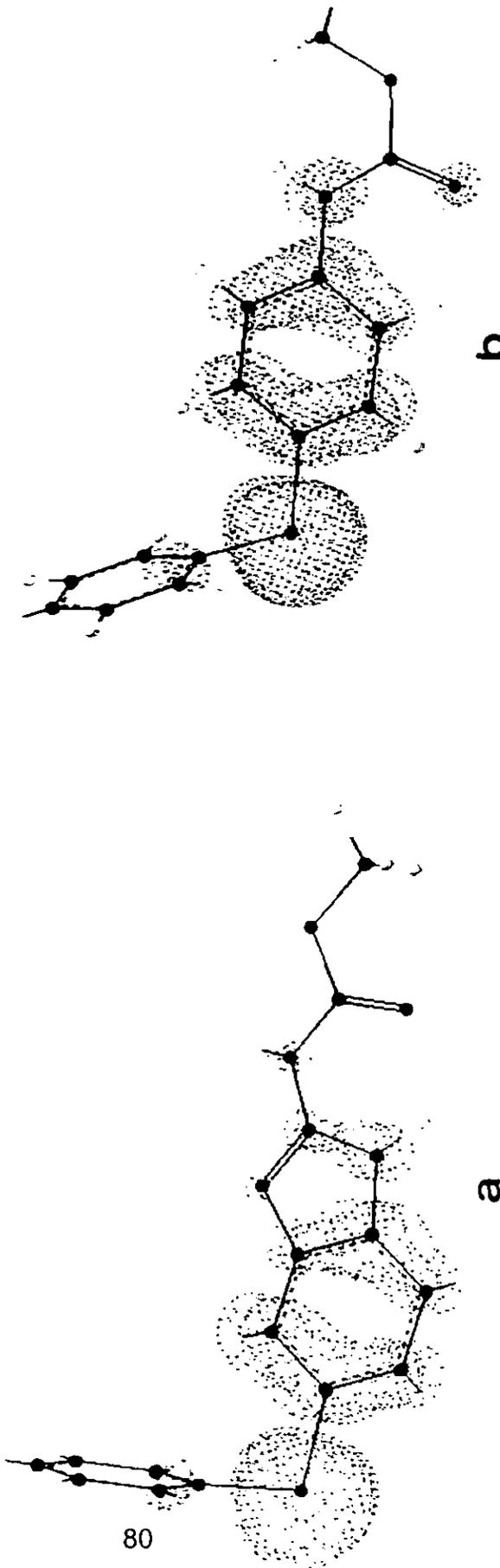


Fig. 7. Modelo de Liston mostrando graficamente la superficie del HOMO-LUMO del Fenbendazol (a) y de 7, Obtenidos por el modulo gráfico de Spartan.

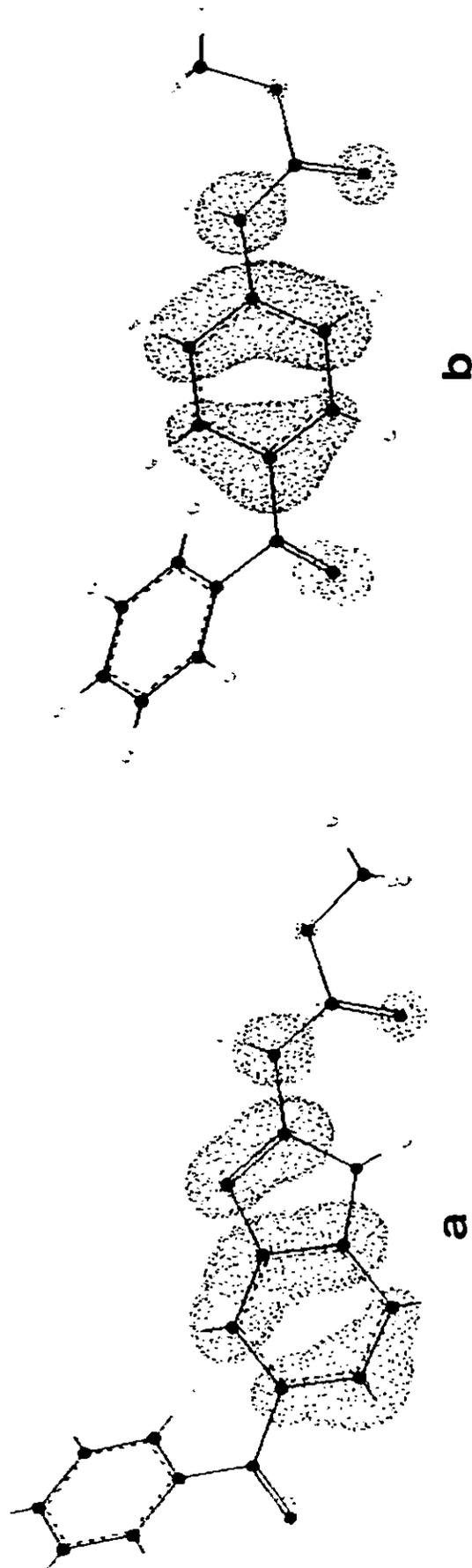


Fig. 8. Modelo de Liston mostrando graficamente la superficie del HOMO-LUMO del Mebendazol (a) y de 11, Obtenidos por el modulo gráfico de Spartan.

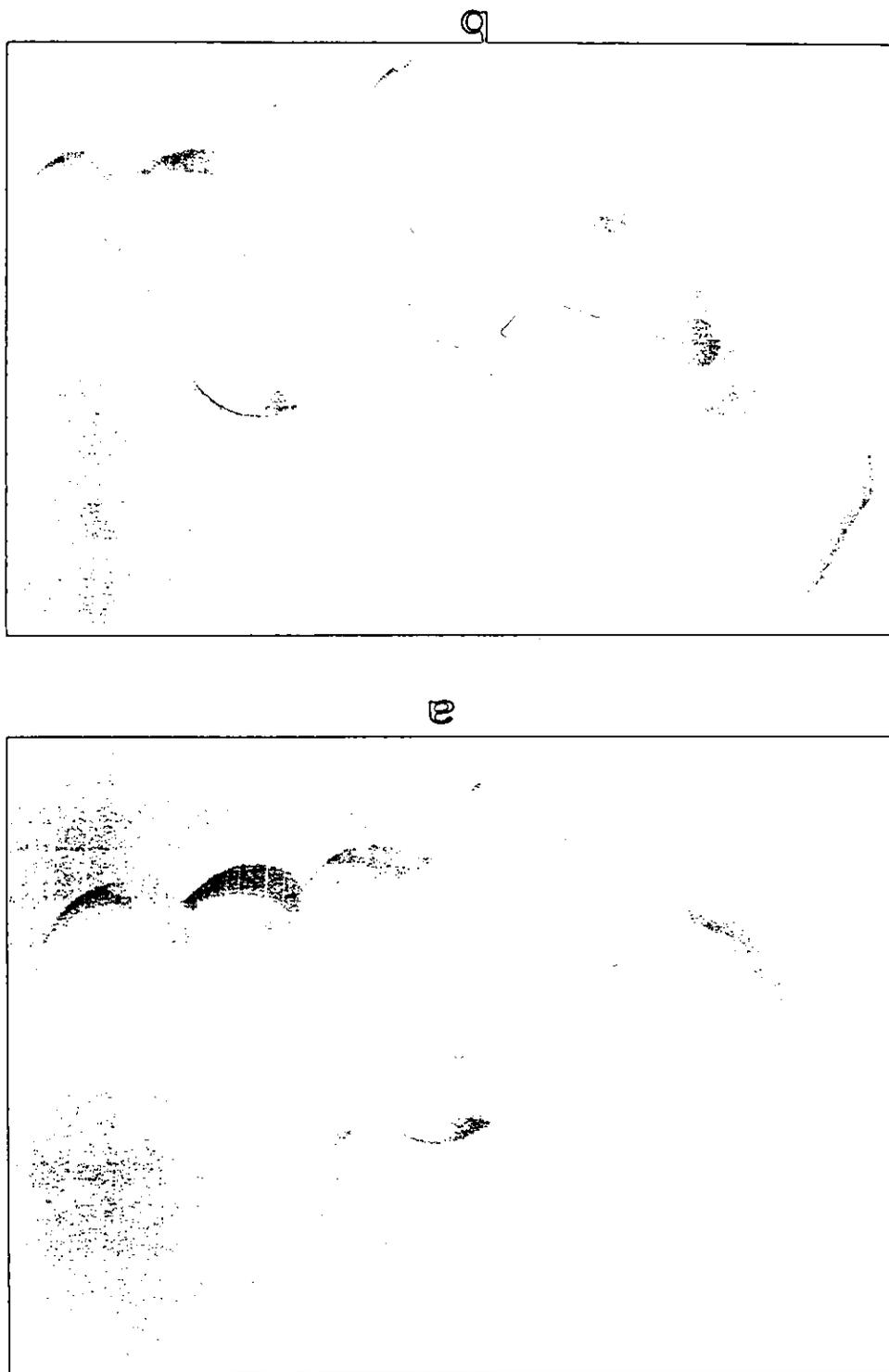
Ahora bien para determinar si electrónicamente existe una similaridad, se determino el potencial electrostático, ya que si dos moléculas presentan un potencial electrostático parecido en el espacio, es muy probable que tengan una actividad bioquímica similar.<sup>22</sup> Este cálculo aparece gráficamente en las figura 9, 10, y 11.

En la fig. 9a se presenta el potencial electrostático del Albendazol, donde sobresalen el potencial positivo (en azul) del nitrógeno en posición 3 del anillo del imidazol y enseguida el potencial electrostático negativo del nitrógeno del grupo carbamato (en rojo), que como veremos en las restantes figuras son característicos de todos los bencimidazoles .

Comparándola con la del compuesto 4 aparece solo el potencial negativo, pero aparece más desplazado ya que es inducido por el carbonilo del carbamato, esto implicaría una unión al receptor muy débil, ya que aparte de tener un potencial negativo, éste se encuentra casi a la distancia de donde debería de estar una región negativa en el receptor.

En la parte baja de la Albendazol aparecen principalmente dos potenciales uno negativo correspondiente al nitrógeno 1 y el potencial positivo del oxígeno del carbonilo, que no es tan negativo como en el compuesto 4 por tener al nitrógeno 1 tan cerca; ambos potenciales están presentes en 4 como se observa en la Fig. 9b, aunque en este caso el oxígeno del metoxilo se encarga de aportar al potencial positivo, llegando incluso a ser muy similares.

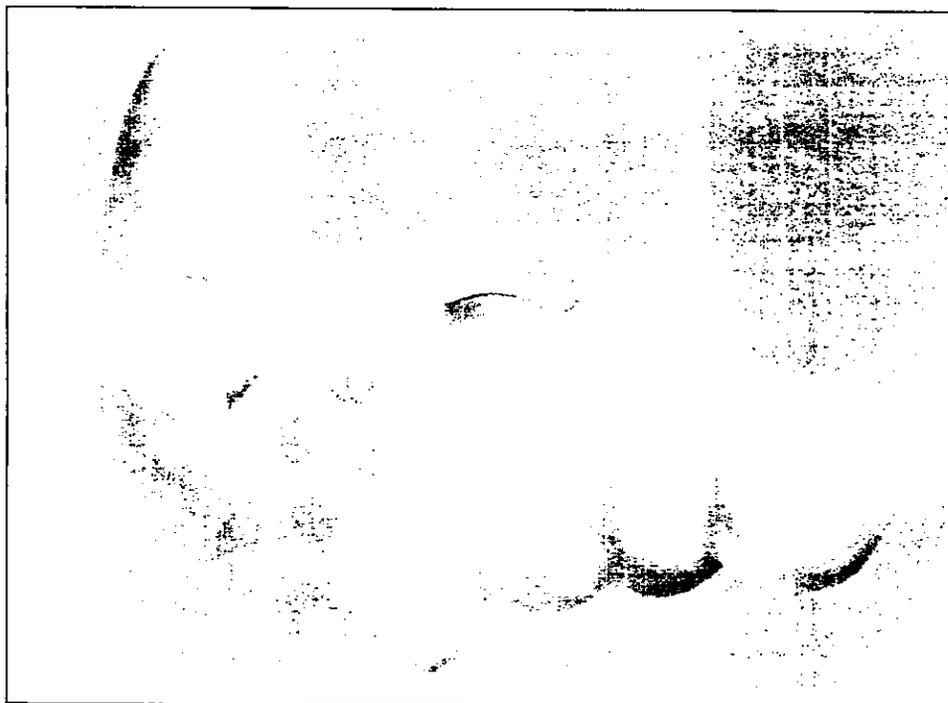
Fig. 9. Modelo de Bolas y resortes del Albendazol (a) y el compuesto 4, mostrando gráficamente la superficie del Potencial electrostático. (Zonas en azul, potencial positivo, zonas en rojo, potencial negativo)



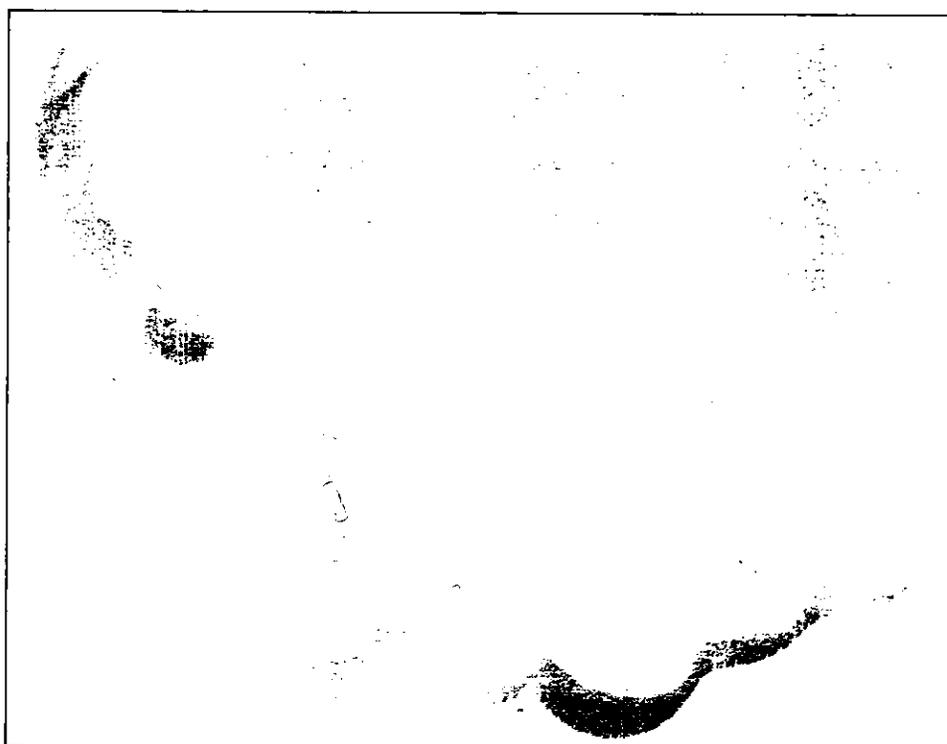
Respecto a la parte central se puede notar la diferencia de potencial parcial positivo (en verde) de **4** con respecto del Albendazol que presenta zonas más positivas (azul claro). Con lo que *a priori* se puede decir que **4** puede presentar actividad antihelmíntica, pero no será tan eficiente como el Albendazol debido a que le falta un potencial positivo en su superficie.

El Fenbendazol presenta también los dos potenciales en la parte superior, pero **7**, a diferencia de **4**, presenta un potencial positivo, incluso casi a la misma distancia, pero en el caso del bencimidazol este potencial está expuesto, mientras que en el **7** este se encuentra hendido. La parte inferior del Fenbendazol muestra los dos potenciales débiles, positivo y negativo, mientras que el **7** sólo presenta el potencial positivo. La parte central y el sustituyente en **5** muestran un potencial casi parecido. Estas características electrónicas hacen al compuesto **7** probable de presentar actividad, y mejor que **4**, ya que existe una potencial en el lugar necesario, aunque no tan expuesto como en el Fenbendazol.

En el caso del Mebendazol y su análogo (Fig 11) aparece la misma situación, de los potenciales de la parte superior de la molécula del bencimidazol, sólo aparece el potencial positivo en **11**; en la parte inferior de los potenciales débiles positivo y negativo, sólo el potencial negativo aparece, pero en cuanto al sustituyente, como se indicó anteriormente, tienen la misma orientación en el espacio y como se puede notar en la fig. 11, el mismo potencial, incluso el potencial negativo inducido por el carbonilo del benzofilo. Todo esto confirma que **11** también puede presentar actividad antihelmíntica.

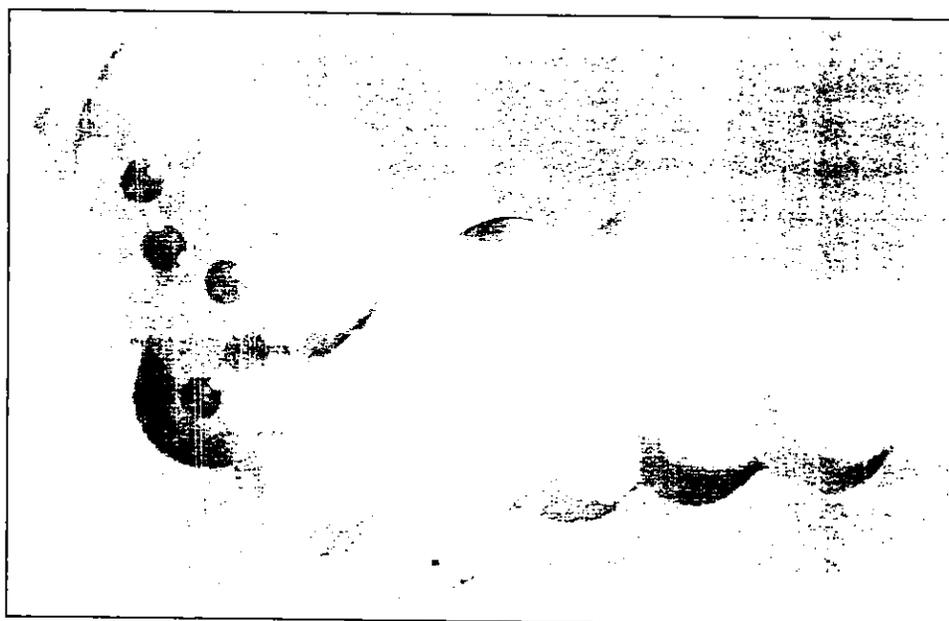


a

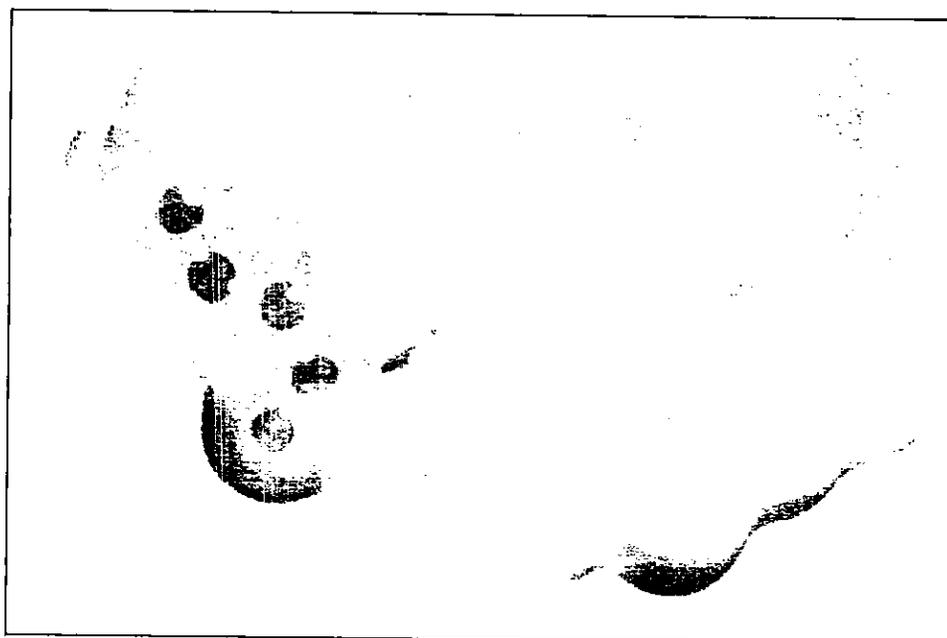


b

Fig. 10. Modelo de Bolas y resortes del Fenbendazol (a) y el compuesto 7, mostrando gráficamente la superficie del Potencial electrostático. (Zonas en azul, potencial positivo, zonas en rojo, potencial negativo)



a



b

Fig. 11. Modelo de Bolas y resortes del Mebendazol (a) y el compuesto 11, mostrando gráficamente la superficie del Potencial electrostático. (Zonas en azul, potencial positivo, zonas en rojo, potencial negativo)

En todo el estudio se habló de similaridad o parecido, pero esto es tan subjetivo, que era interesante saber en que grado era tan similares, por lo que se realizó un estudio de superposición y comparación, utilizando todas las moléculas obtenidas del análisis conformacional, y comparándolas con el bencimidazol como modelo, y como criterio el volumen compartido, usando el módulo de similaridad y superposición dentro de Spartan. A fin de tener un número que reflejara el grado de similaridad. Los resultados de la superposición del albendazol y su análogo (4) se presentan en la tabla N° 7.

De acuerdo con los resultados de la tabla la mejor similaridad es para el conformero 12 con un 77 % de volumen compartido entre el albendazol y 4, la sobreposición se muestra en la fig. 12. Es evidente que la falta del imidazol impide tener un 100 % de identidad.

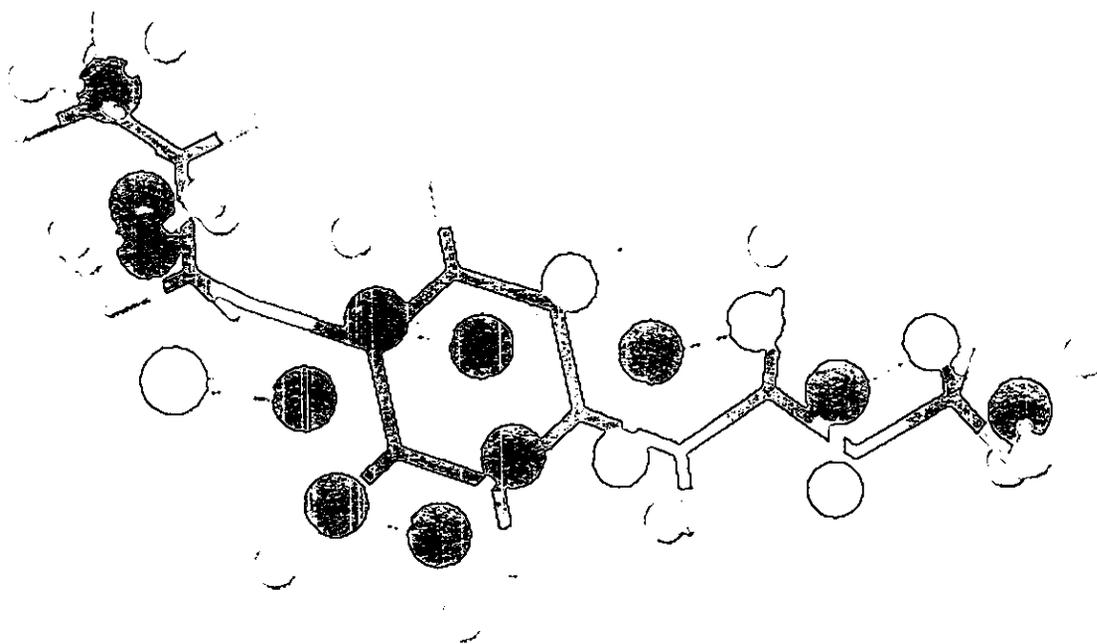


Fig. 12. Sobreposición del Albendazol (Modelo de Esferas y palos) y del conformero N° 11 de 4 (Modelo de tubo)

Por otra parte los resultados para los demás conformeros caen dentro de un rango de 0.62-0.76, lo cual implica que al menos tienen un 60 % del volumen compartido.

En la tabla Nº 8 se resumen los resultados obtenidos para la sobreposición del Fenbendazol y los conformeros de 7. Analizando la tabla, se puede establecer que los rangos de identidad son de 0.604-0.790 lo cual implica una menor similitud, que la encontrada para el carbamato anterior, resultando la mejor para el conformero 25.

Sobreposición del Alben y 4. Conformero N	Nº . de iteraciones	Coefficiente de correlación
01	84	0.75488
12	57	<b>0.77701</b>
13	63	0.74868
14	69	0.73380
27	62	0.69748
92	68	0.67324
105	51	0.62042
118	56	0.66731
130	58	0.74057
143	60	0.74556

Tabla Nº 7. Comparación entre el Albendazol (alben) y de cada uno de los conformeros de 4, donde el coeficiente de correlación significa, que tan similares (1.000) o disimilares son (0.000) entre ellos. (SPARTAN SUPERPOSITIONING PROGRAM: SGI/R4K Release 4.0.1b. Superimpose by shared volume)

**RESULTADOS**

Sobreposición del Fenben y 7 confórmero N°:	N° de iteraciones	Coefficiente de correlación
01	42	0.67023
11	75	0.74920
12	50	0.73011
13	66	0.76745
17	54	0.77601
24	60	0.79037
<b>25</b>	<b>89</b>	<b>0.79270</b>
29	81	0.74453
41	87	0.68486
53	52	0.62235
66	45	0.63038
67	42	0.65151
119	46	0.63438
131	107	0.64562
132	67	0.60785
133	43	0.63902
134	49	0.64736
143	48	0.66408
144	53	0.64174

Tabla N° 13. Comparación entre el Fenbendazol (fenben) y los conformeros del carbamato análogo 7, donde el coeficiente de correlación significa, que tan similares (1.000) o disimilares son (0.000) entre ellos. (SPARTAN SUPERPOSITIONING PROGRAM: SGI/R4K Release 4.0.1b. Superimpose by shared volume)

La sobreposición de este último y del Fenbendazol es mostrado en al fig. 13. En este caso se puede observar la mejor sobreposición del sustituyente que para el caso de 4 , lo cual era lo esperado de acuerdo al ángulo dihedro calculado anteriormente.

Los resultados de la sobreposición del Mebendazol y de 11 se presentan en la tabla N° 14. Para este estudio los resultados indican un rango de similaridad de 0.545-0.804, contradictorio porque para éstas moléculas se presentan el mayor y menor coeficiente de similaridad; que se puede notar bien en la fig. 14 donde se muestra la superposición del confórmero 65 de 11 con el Mebendazol.

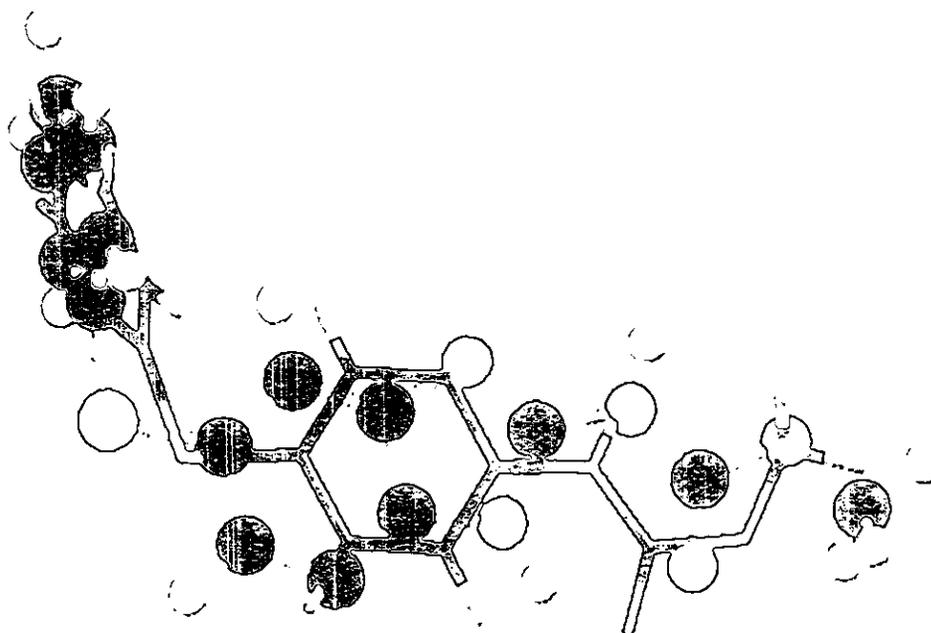


Fig. 13. Sobreposición del Fenbendazol (Modelo de Esferas y palos) y del confórmero N° 25 de 7 (Modelo de tubo)

sobreposición del Meben y 11 Confórmero N°	iteraciones	Coefficiente de Correlación.
01	80	0.62239
05	56	0.60790
06	61	0.62080
11	76	0.59923
12	58	0.62644
13	52	0.76568
17	71	0.73428
18	57	0.74544
19	60	0.76989
23	78	0.67596
24	60	0.74334
29	60	0.65966
35	59	0.65858
36	59	0.58437
42	58	0.55158
79	65	<b>0.80403</b>
102	50	0.58252
108	48	0.58072
133	51	0.55337
144	39	0.54064

Tabla N° 14. Comparación entre el Mebendazol (Meben) y los conformeros del carbamato análogo 11, donde el coeficiente de correlación significa, que tan similares (1.000) o disimilares son (0.000) entre ellos. (SPARTAN SUPERPOSITIONING PROGRAM: SGI/R4K Release 4.0.1b. Superimpose by shared volume)

Con todos estos resultados se puede hacer una integración final, donde las similitudes estructurales y electrónicas indican que las moléculas pueden tener una actividad antihelmintica, Incluso de entre ellas, el orden que se puede esperar de actividad en orden decreciente es 11, 7 y 4.

### 5.2. Síntesis de los carbamatos propuestos.

Después de llevar a cabo las síntesis propuestas, se lograron obtener todos los productos esperados; la tabla N° 15 resume las características físicas más importantes de cada uno de ellos.

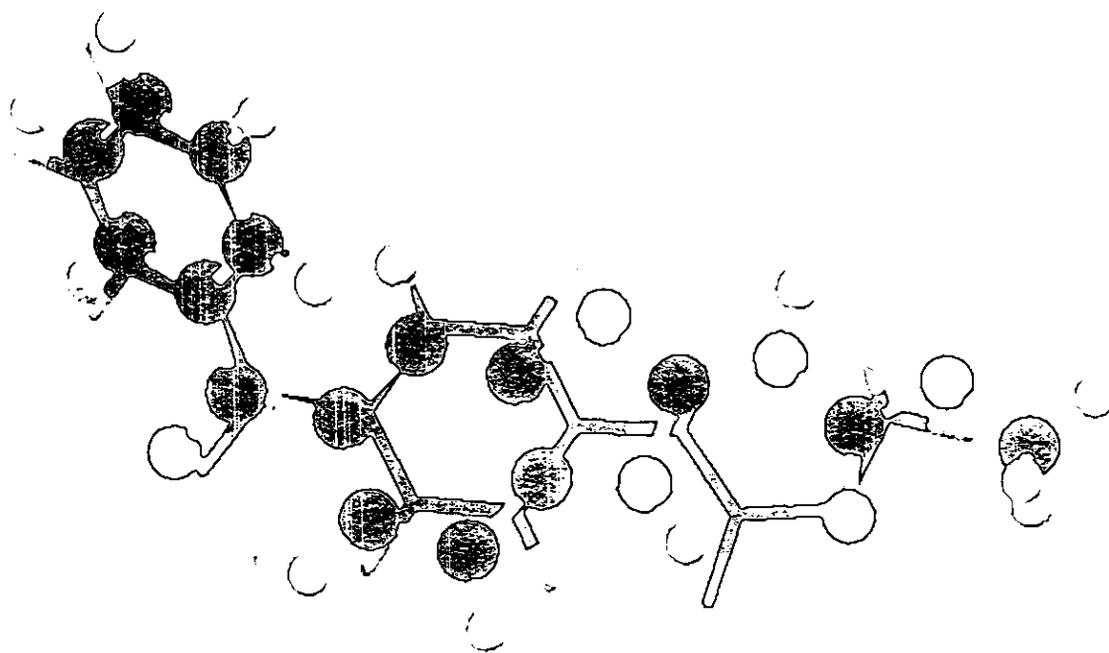


Fig. 14. Sobreposición del Mebendazol (Modelo de Esferas y palos) y del conformero N° 79 de 11 (Modelo de tubo)

Comp. No.	Disolvente de recrist. <sup>a</sup>	p.f. °C	Rend <sup>b</sup> %	Rf.	IR,RMP,EM	Refer.
2		145 (3 mmHg)	88	0.72	+ + +	---
3	HCl	190-5	86	0.34	+ +	---
4	Ciclohex/ éter petróleo.	53-54	94	0.51	+ + +	---
5	Ciclohex/ éter petróleo.	54-55	81.7	0.47	+ + +	49
6	Benceno/Hex	95	95	0.38	+ +	49
7	Ciclohexano	89-90	87.1	0.473	+ + +	---
9	Cloroformo	136-138	85	0.63 7	-----	49
10	Hexano	121-124	78.6	0.22	+ +	50
11	MeOH	158-159	85	0.32	+ +	50
12	MeOH	115-116	91.4	0.47	+ +	51
13	Benceno	89-90	84.1	0.55	+ +	51
14	MeOH	176-177	94.0	0.46	+ +	51
15	Benceno/hex	114-116	96	0.43	+ +	51

b: Rendimiento crudo, c: Sistema I, d: Sistema III, e: Sistema II, f: sistema IV, g: no reportado en la literatura.

Tabla N° 15. Constantes Físicas y espectroscópicas de todos los compuestos sintetizados.

Tres de ellos resultaron nuevas estructuras, las cuales fueron elucidados utilizando las técnicas espectroscópicas. Por lo que respecta a las ruta sintética utilizada fue necesario el cambiar de base para formación del p-propiltionitrobenceno, ya que al utilizar el NaOH daba como resultado un producto con diferente peso molecular al esperado y las señales en RMN indicaban un compuesto con señales de éter, indicando la competencia de la base como nucleófilo, y por otro lado solo se obtenía un rendimiento del 35 %. Por lo que la utilización del NaHCO<sub>3</sub> como base generó al tiolato, mismo que después de un mayor tiempo prolongado dio el producto deseado.

Otra implementación importante fue la reducción selectiva del grupo nitro con SnCl<sub>2</sub> y HCl, ya que la utilización del Pd/C al 10 % e hidrógeno sólo funcionó para la formación de la amina para el compuesto 7 (análogo del Fenbendazol). Para las otras dos reducciones al realizar la reacción se obtenían mezclas complejas, debidas principalmente a la ruptura del propilo (análogo del albendazol) o a la reducción del benzoilo para el análogo del Mebendazol.

En general todas las síntesis parten de materias primas accesibles y con rendimientos globales mayores al 70%, sólo la ruta para la síntesis del compuesto 4 presenta el inconveniente de tener un intermediario líquido a temp ambiente, el cual tendría que ser purificado por destilación a presión reducida, operación difícil en la industria, pero los demás utilizan reacciones que se pueden realizar en una industria farmacéutica.

**5.3. ACTIVIDAD ANTIHELMINTICA SOBRE *Trichinella spiralis*.**

La evaluación biológica como antihelmínticos se realizó utilizando larvas musculares de *Trichinella spiralis* como modelo a dos diferentes concentraciones: 1 y 10 µg/ml; la prueba mide la reducción de formación de formazan, que es traducido a una reducción de viabilidad del parásito. Los experimentos se realizaron 4 veces y se reportan la media de la reducción más menos una desviación estándar de las actividades, todos los resultados se muestran en la tabla N° 16. Se analizaron los resultados mediante el análisis de varianza, con un grado de significancia del 95 %

Compuesto	1 µg/mL	10 µg/mL
Albendazol	NR	31.5 ± 12.5
4	20.5 ± 11.2	25.2 ± 11.5
Fenbendazol	NR	26.6 ± 8.9
7	NR	28.0 ± 11.4
Mebendazol	NR	46.3 ± 3.2
11	2 ± 0.9	32.2 ± 6.1

Tabla N° 16. Porcentaje de reducción de la viabilidad de *Trichinella spiralis* por los carbamatos de metilo 4-sustituídos. El porcentaje de reducción de la viabilidad del parásito se calculó con respecto al control. NR = No Redujo.

Como se puede observar los tres bencimidazoles comerciales usados como controles positivos no reducen la viabilidad a  $1 \mu\text{g/ml}$ , lo cual no ocurre con los carbamatos análogos del Albendazol, Mebendazol (4, 11), los cuales presentan una actividad de  $20.5 \pm 11.2$  y  $2 \pm 0.9$  respectivamente; los demás carbamatos no mostraron actividad.

Si correlacionamos estos datos con las diferencias estructurales encontradas entre los carbamatos y los bencimidazoles en el estudio computacional, principalmente esta actividad a menor concentración puede deberse al mejor balance del coeficiente de partición, con lo cual los carbamatos logran pasar las membranas del parásito más fácilmente, llegando a su sitio de acción, y por consiguiente se requiere una menor concentración o bien que presenten un mecanismo de acción diferente al de los bencimidazoles, inhibiendo algún proceso metabólico importante.

A una concentración de  $10 \mu\text{g/ml}$  la mayor actividad fue para el Mebendazol, y en la serie de los carbamatos también el análogo del mebendazol (11) presentó una efectividad mayor, lo cual era esperado de acuerdo a las inferencias realizadas del modelado molecular, ya que presentaba los descriptores moleculares más parecidos (HOMO, LUMO, coeficiente de similitud más alto al hacer la comparación de los bencimidazoles con sus respectivos carbamatos análogos, y el potencial electrostático.).

Aunque la comparación estadística, en un intervalo de confianza del 95%. ( Análisis de varianza ; Método : Mínima diferencia significativa) entre ambos compuestos revelo una diferencia significativa.

Respecto a 7, análogo del fenbendazol presentó un comportamiento muy similar con respecto del control positivo, ambos no presentaron actividad a 1  $\mu\text{g/ml}$  y a 10  $\mu\text{g/ml}$  tiene una actividad equiparable (no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos), un poco diferente a lo obtenido en modelado molecular, lo cual indicaría entonces que el potencial negativo que presenta el anillo de imidazol no es tan esencial, al menos para la actividad sobre *T. spirallis*, ya que el carbamato presento actividad, este mismo comportamiento se obtuvo para 11.

Para el caso del albendazol, este mostró una actividad de reducción del 30 %, pero el análogo presentó una actividad muy parecida a la obtenida a 1  $\mu\text{g/ml}$ , lo cual no era la respuesta en la forma esperada, pues al parecer existe una inhibición parcial, esto era lo predecido por estudio computacional.

Si correlacionamos esta actividad con el estudio computacional, o más bien con los potenciales electrostáticos, se puede notar que el potencial negativo que induce el anillo del imidazol no es tan importante, porque tanto 7, como el 11 no lo presentaban, y su comportamiento es muy parecido al de los bencimidazoles modelo, en cambio el potencial positivo parece ser necesario, ya que 4 sólo presentaba al potencial negativo en la parte superior de la molécula , presenta una actividad de tipo parcial, diferente del bencimidazol modelo.

Por otro lado la actividad de los carbamatos es un poco menor que la de los bencimidazoles que puede ser atribuida al tamaño y volumen molecular, así como las diferencias con respecto a los potenciales electrostáticos.

#### **5.4. Actividad Herbicida :**

Los resultados de la actividad herbicida se detallan a continuación :

##### **5.4.1 SÍNTESIS DE ATP.**

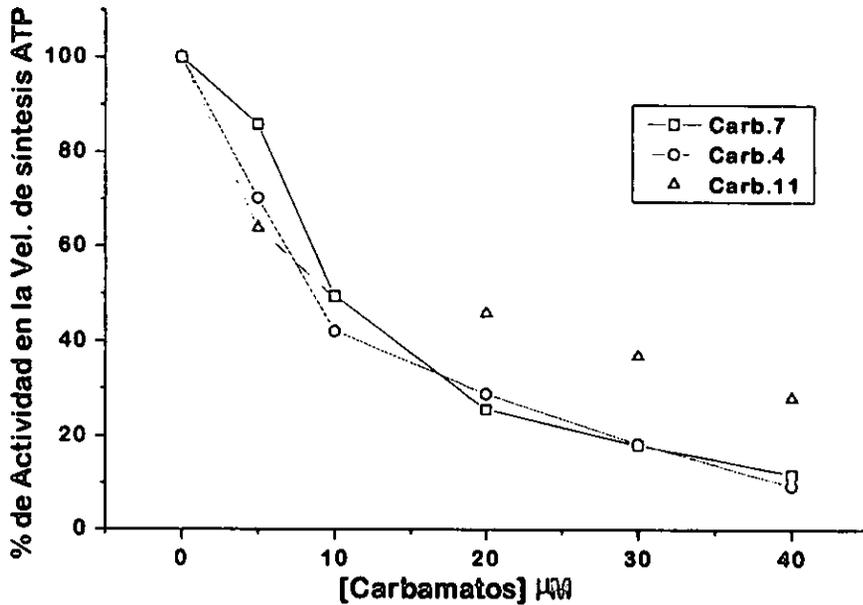
En las gráficas 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos de los efectos de los diferentes carbamatos, en la síntesis de ATP los cuales se dividieron en 2 grupos. En la gráfica N° 1 se observa que los tres nuevos carbamatos sintetizados (4, 7 y 11) inhibieron la fotofosforilación con un  $pl_{50}$  ( $pl_{50} = -\log [ \text{Carb} ]_{50}$ ) de 5.09, 4.99, 4.30 respectivamente. Por otro lado en la gráfica N° 2 se muestra el efecto inhibitorio de la síntesis de ATP de los carbamatos reportado por Micherel y col.<sup>17</sup>, observando que son menos potentes, ya que muestran un  $pl_{50}$  de 3.45, 3.42, 3.50, 4.07 para los compuestos 12, 13, 14 y 15 respectivamente. Estos datos indican que se requieren 20 veces más concentración de compuesto para producir la misma inhibición que tienen los nuevos compuestos..

De las gráficas anteriores se calcula el  $pl_{50}$ , el cual se define como

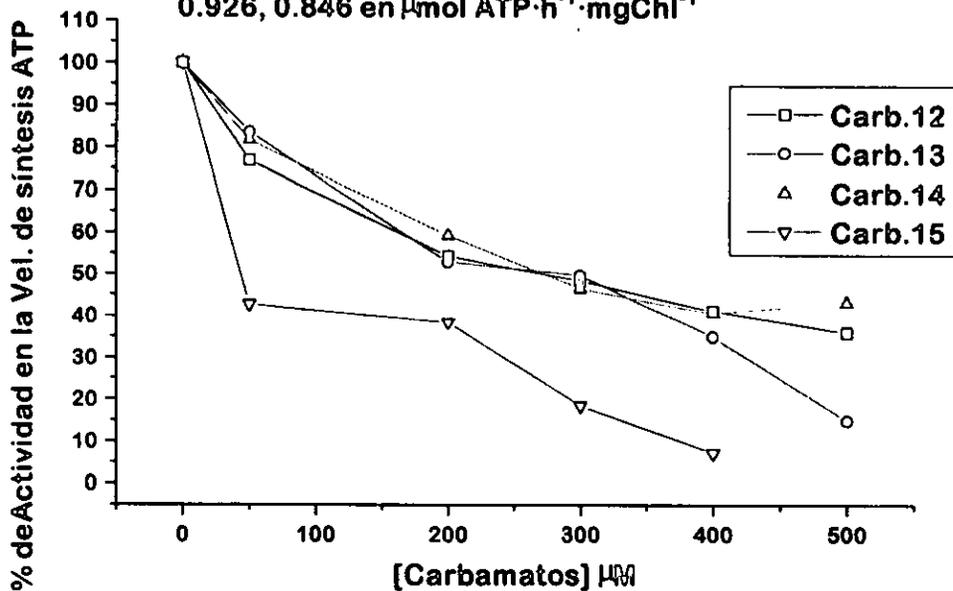
$$pl_{50} = -\log [ \text{Carb} ]_{50}$$

La  $[ \text{Carb} ]_{50}$  se obtiene extrapolando al 50 % de inhibición de la actividad en las gráficas. Todos estos datos se resumen en la tabla N° 17.

Gráfica N° 1. Inhibición de la velocidad de síntesis de ATP inducidos por los nuevos carbamatos 4, 7, 11. La velocidad de síntesis de ATP control son 1.247, 1.132, 1.240 en  $\mu\text{mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mgChl}^{-1}$



Gráfica N° 2. Inhibición de la Velocidad de síntesis de ATP de los carbamatos reportados por Micherel y col.<sup>17</sup> con actividad inhibitoria de la fotosíntesis. La velocidad de síntesis de ATP control son 1.421, 0.926, 0.846 en  $\mu\text{mol ATP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mgChl}^{-1}$



De los resultados obtenidos resalta que los nuevos carbamatos presentan mayores valores de  $pl_{50}$ , lo cual indica una mayor potencia en la inhibición de la síntesis de ATP comparado con los ya descritos<sup>16</sup> y determinados en este trabajo, nos sirven como control positivo de la potencia. Esta diferencia de potencia es debida principalmente al aumento del coeficiente de partición que le infieren los nuevos grupos, la característica principal de estos grupos es el de tener un heteroatomo (azufre en 4 y 7, y oxígeno en 11) y un grupo no polar como el isopropilo en 4 y fenilos en 7 y 11; por otro lado 4 presenta un  $pl_{50}$  muy similar al carbamato de metilo comercial empleado en Japón para los cultivos de arroz (swep), el cual tiene un  $pl_{50}$  de 5.3.

No. de carbamato	[ Carb] <sub>50</sub> X 10 <sup>-6</sup>	$pl_{50}$	$pl_{50}$ Reportado	Log P ( Calc )
4	8	5.09	nr <sup>a</sup>	3.22
7	10.20	4.99	nr <sup>a</sup>	4.00
11	49.19	4.30	nr <sup>a</sup>	3.16
12	349.20	3.45	nr <sup>a</sup>	1.02
13	374.37	3.42	4.30	1.72
14	271.62	3.50	3.30	2.23
15	83.24	4.07	4.30	2.76

Tabla N° 16. Valores del  $pl_{50}$  de la inhibición de la velocidad de síntesis de ATP de los diferentes carbamatos. <sup>a</sup> nr= no reportados.

#### **5.4.2 Inhibición de la velocidad del transporte de electrones:**

##### **Inhibición del Transporte de electrones basal de agua a metilviológico:**

Las gráficas 3 y 4 muestran los resultados obtenidos para los diferentes carbamatos presentados en dos grupos diferentes debido a la diferencia en las concentraciones que requieren para inhibir el flujo de electrones basal. De las gráficas se puede observar que los carbamatos 7, 12 y 15 inhibieron completamente el transporte de electrones basal y los otros carbamatos requieren mayor concentración ya que a 500  $\mu\text{M}$  solo inhibieron parcialmente este transporte de electrones basal (gráfica 4, curva N° 1 y 2).

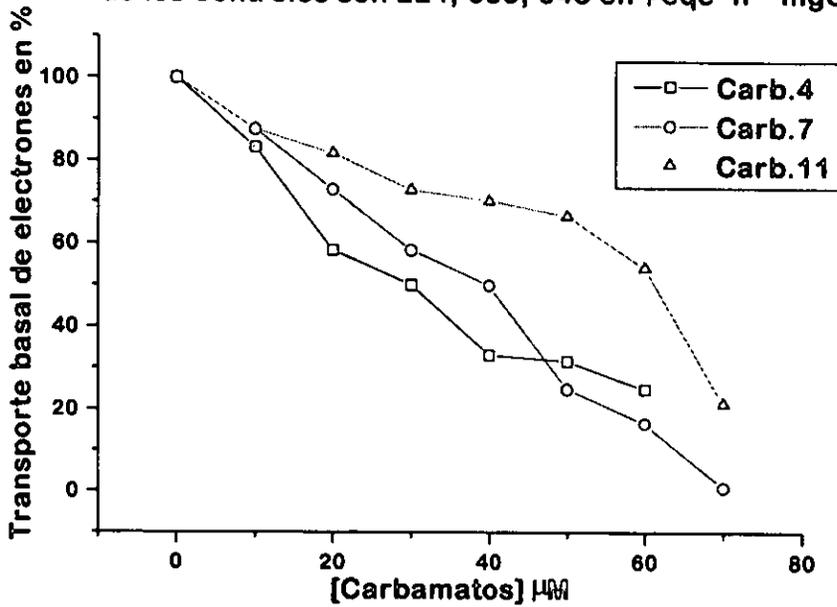
##### **Inhibición del transporte de electrones desacoplado**

En las gráficas N° 5 y 6 se presentan las gráficas de los resultados obtenidos en la inhibición del transporte de electrones desacoplado por los carbamatos. Como se puede observar sólo dos compuestos (7, 11) llegan a inhibir completamente esta actividad, mientras que los demás carbamatos lo hacen en un 75 %.

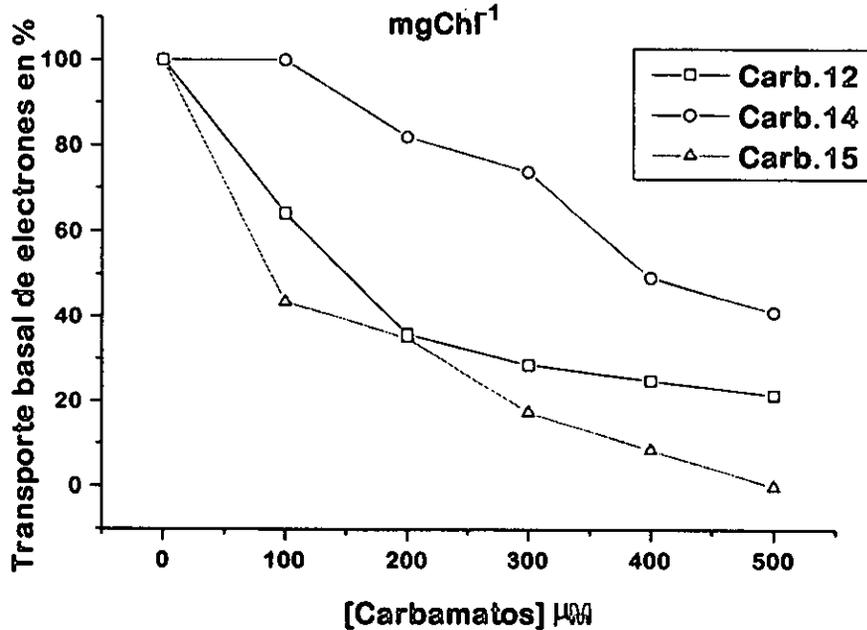
##### **Inhibición del transporte de electrones fosforilante:**

Las gráficas N° 7, 8 muestran los resultados de la inhibición de los carbamatos sobre el transporte de electrones fosforilante. Resalta la inhibición del carbamato con el cloro como sustituyente (15) el cual ha inhibido completamente el transporte de electrones basal. En el caso de las nuevas moléculas sólo el carbamato con el sustituyente Feniltio (7) inhibe completamente.

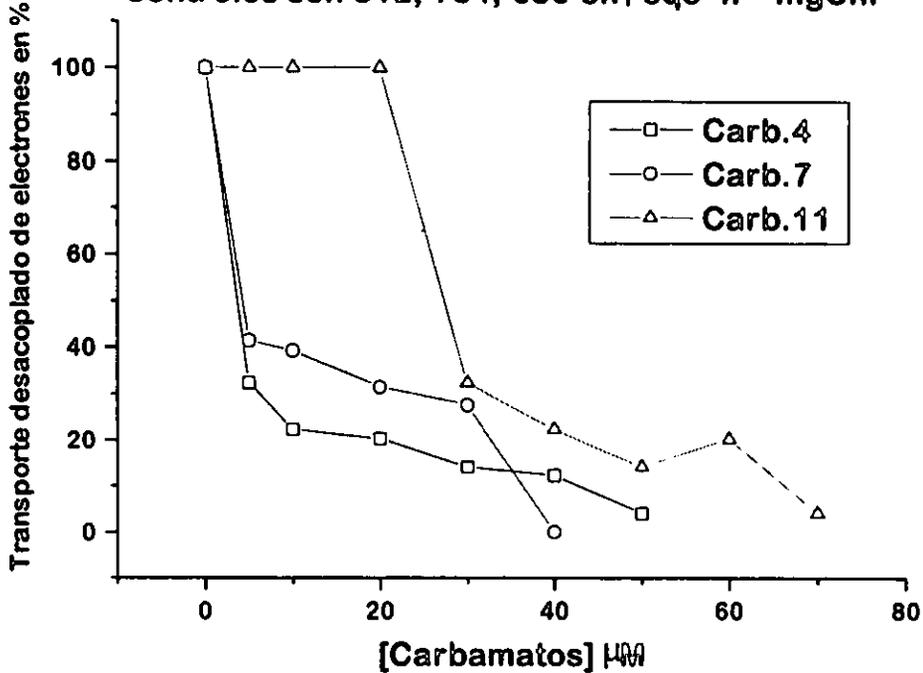
Gráfica N° 3. Inhibición del transporte de electrones basal de agua a metilviológeno por los carbamatos nuevos. La velocidad de los controles son 224, 685, 648 en  $\mu\text{eqe}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mgChl}^{-1}$



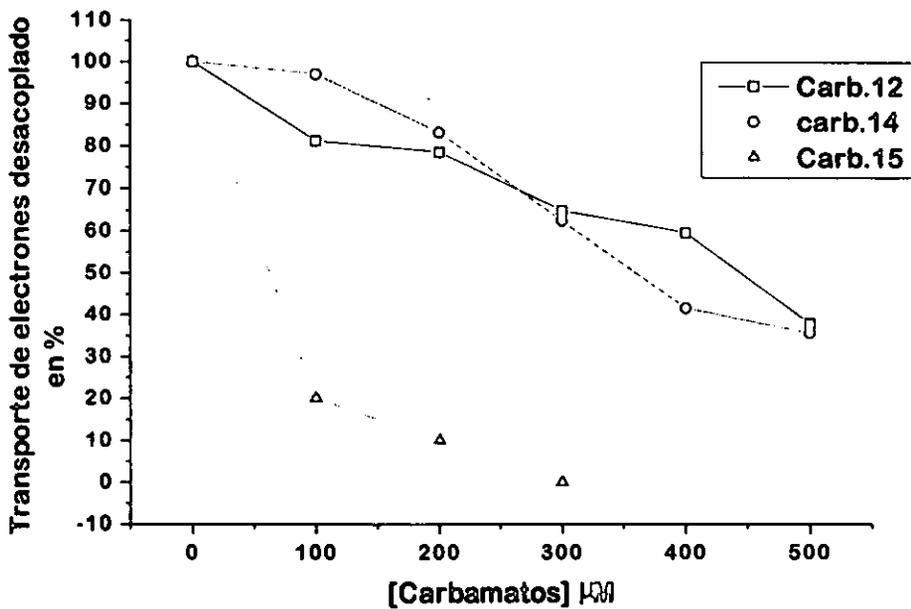
Gráfica N° 4. Inhibición del transporte de electrones basal agua a metilviológeno por los carbamatos reportados. La velocidad de los controles son 993, 526, 733 en  $\mu\text{eqe}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mgChl}^{-1}$



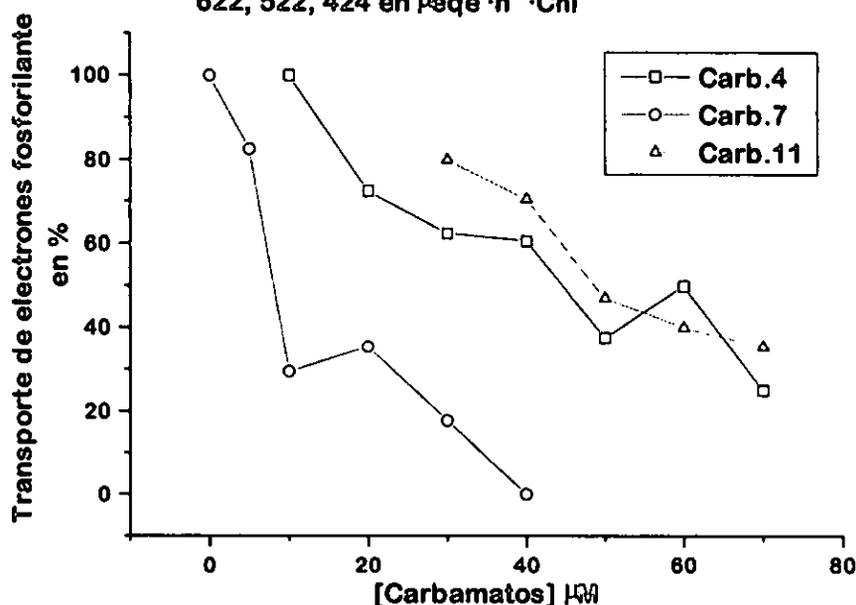
Gráfica N° 5. Inhibición del transporte desacoplado de agua metilviológico inducido por los carbamatos nuevos. La velocidad de transporte de electrones desacoplado de los controles son 812, 784, 680 en  $\mu\text{eqe} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mgChl}^{-1}$



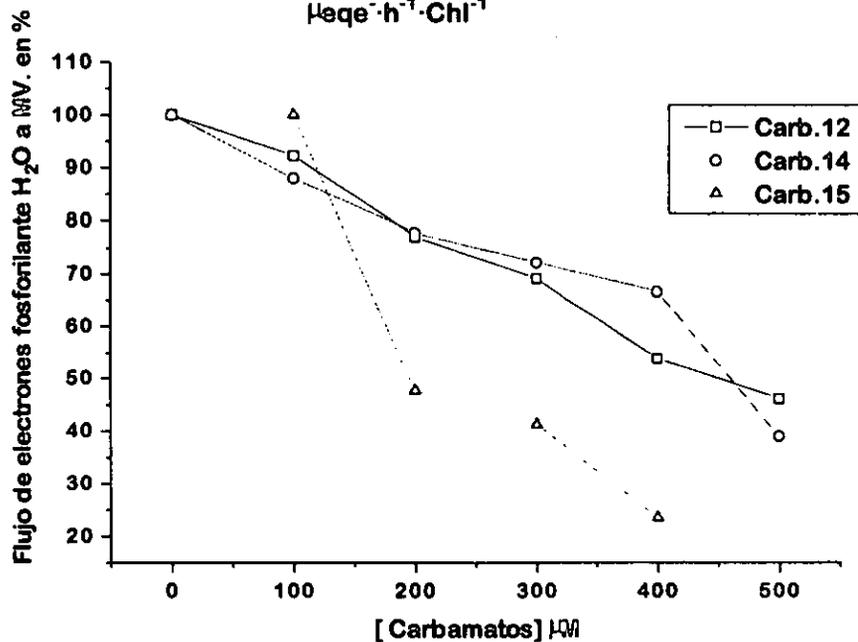
Gráfica N° 6. Inhibición del transporte de electrones desacoplado inducido por los carbamatos reportados. La velocidad del transporte de electrones desacoplado determinado es de 1233, 608, 1333 en  $\mu\text{eqe} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Chl}^{-1}$



Gráfica N° 7. Inhibición del transporte de electrones fosforilante de agua a metilviológeno producida por los nuevos carbamatos. El transporte de electrones fosforilante de los controles es de 622, 522, 424 en  $\mu\text{eqe} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Chl}^{-1}$



Gráfica N° 8. Inhibición del transporte de electrones fosforilante de agua a metilviológeno producida por los carbamatos reportados. La velocidad del transporte fosforilante para los controles son de 733, 757, 666 en  $\mu\text{eqe} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{Chl}^{-1}$



De los datos encontrados en el efecto de los carbamatos en el flujo de electrones basal, fosforilante y desacoplado, así como de la síntesis de ATP, mostraron que estas actividades fueron inhibidas, indicando que estos carbamatos actúan como inhibidores de la reacción de Hill.

#### **5.4.3 Determinación del sitio de inhibición en la cadena redox fotosintética**

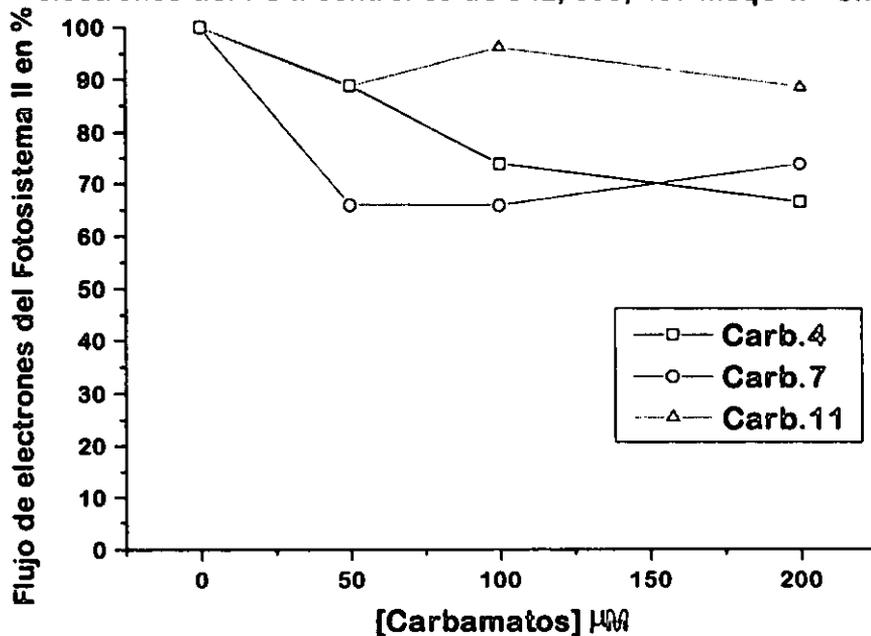
Para delucidar el sitio de inhibición en una o más enzimas acarreadoras de electrones de la cadena redox, se estudio el efecto de estos compuestos en los FOTOSISTEMAS I y II, así como las reacciones parciales de éstos FOTOSISTEMAS.

##### **Inhibición del flujo de electrones del FOTOSISTEMA II desacoplado.**

Los resultados encontrados y que se pueden observar en la gráfica N° 9, indican que los carbamatos nuevos inhiben parcialmente y de forma muy débil (aproximadamente del 35 % para el carbamato 4 a 50  $\mu\text{M}$ ) el flujo de electrones de agua a DCPIP en el FOTOSISTEMA II (FS II), cuando presentan un  $\text{pl}_{50}$  de 8  $\mu\text{M}$  en toda la cadena la fotosintética.

Esta débil inhibición no era esperada ya que se reporta en la literatura que los carbamatos inhiben precisamente en el lado reductor del FOTOSISTEMA II. Por lo tanto se deduce que el sitio de inhibición de estos compuestos se localiza en el FS I, por lo que se determinó su efecto en este tramo de la cadena, de PCPIP/ ascorbato a MV.

Gráfica N° 9. Inhibición del transporte de electrones del Fotosistema de agua a DCPIP/[Fe(CN<sub>6</sub>)]K<sub>3</sub>. La velocidad del transporte de electrones del PS II control es de 342, 399, 457 meqe<sup>-</sup>·h<sup>-1</sup>·Chl<sup>-1</sup>

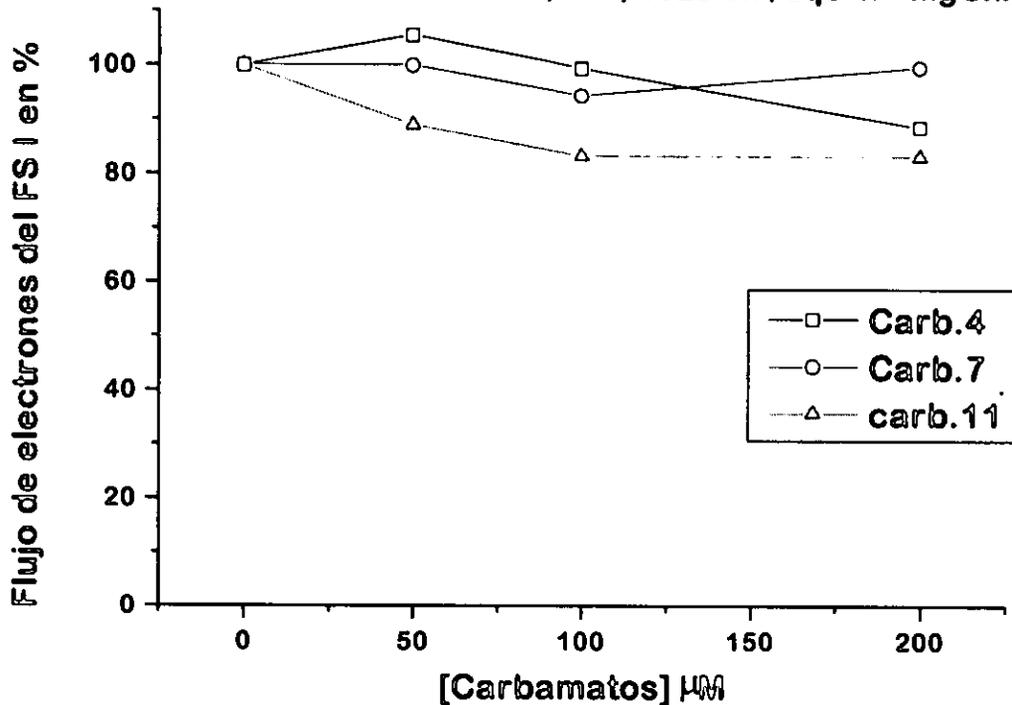


### Inhibición del Fotosistema I

Como se observa en la gráfica N° 10 , se presenta una inhibición parcial muy débil del flujo de electrones del Fotosistema I, mucho menor que para el Fotosistema II De hecho se utilizaron hasta concentraciones 4 veces más de las requeridas para inhibir completamente el flujo de electrones de toda la cadena de agua a MV.

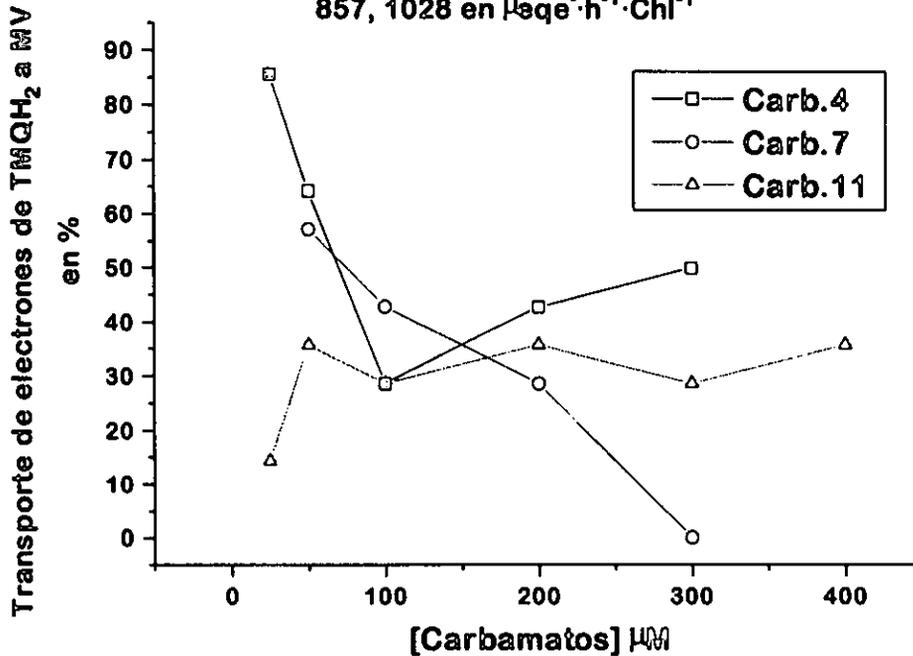
Con los ensayos del Fotosistema I y II utilizando aceptores, donadores e inhibidores del flujo de electrones adecuados, no se mide el flujo de electrones a nivel de PQ. Con el objeto de ver si estos carbamatos inhiben a este nivel, se les determinó su efecto utilizando el sistema TMQH<sub>2</sub> a MV y correlacionar así la inhibición al flujo de electrones de H<sub>2</sub>O a MV.

Gráfica N° 10. Inhibición del transporte de electrones del Fotosistema de DCPIP/Ascorbato a MV. La velocidad del transporte de electrones de los controles es de 1142, 857, 1028 en  $\mu\text{eqe}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mgChl}^{-1}$



De los resultados encontrados y que se muestran en la gráfica N° 11, se observa una mejor inhibición por los nuevos carbamatos 4, 7, y 11 a 100  $\mu\text{M}$  casi del 60 %, incluso 11 a 5  $\mu\text{M}$  presentó una inhibición del 90 %, pero a mayor concentración activo un 20% el flujo de electrones, en cambio 7 presenta una inhibición total a 300  $\mu\text{M}$ .

Gráfica N° 11. Inhibición del transporte de electrones de  $\text{TMQH}_2$  a  $\text{W}$   
 La velocidad del transporte de electrones de los controles son 1142,  
 857, 1028 en  $\mu\text{eqe}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{Chl}^{-1}$



Para el carbamato 4 la mejor inhibición encontrada fue de 75. Por lo que se deduce que el blanco principal de inhibición de estos carbamatos se localiza a nivel de PQ del lado reducido del FS II, aunque éste último es inhibido débilmente.

Cabe hacer notar que la mayoría de los carbamatos reportados (inclusive los comerciales) que inhiben la fotosíntesis actúan a nivel de la proteína D1 que tiene unido a  $\text{Q}_\text{B}$ , en cambio nótese que los carbamatos 4, 7 y 11 que se sintetizaron por primera vez actúan inhibiendo la oxidación de  $\text{PQH}_2$  quien es oxidado por el complejo Cit.  $\text{b}_6/\text{f}$ . El cambio de sitio de inhibición en la cadena redox, probablemente se deba al mayor tamaño molecular de los sustituyentes que tienen y a su mayor liposolubilidad ( véase el Log P en la tabla N° 1).

**5.4.4. ENSAYOS PRE-EMERGENTES EN GERMINACIÓN DE SEMILLAS.**

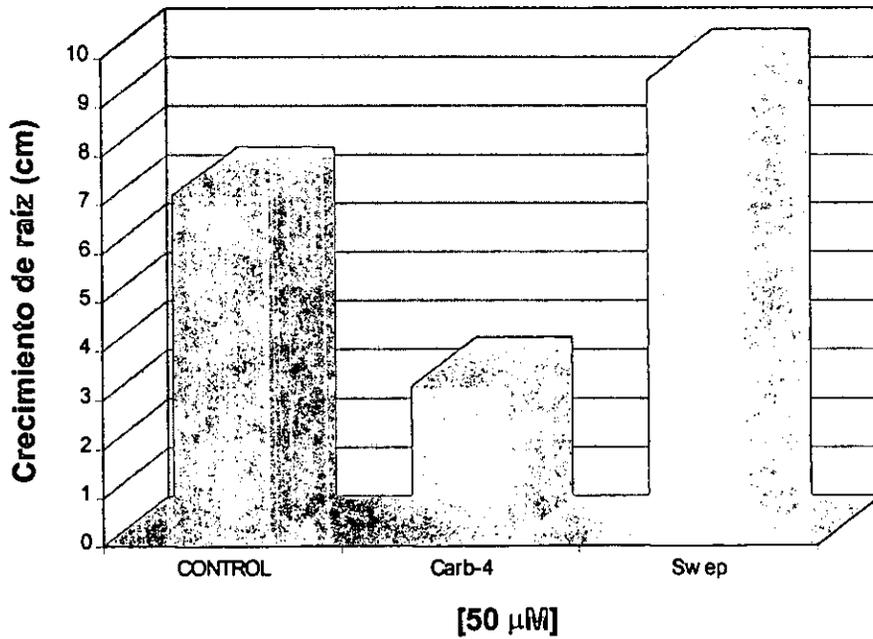
Se ensayaron las concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de los nuevos compuestos en las cajas petri, utilizando DMF como disolvente en un 0.1 % y todos los compuestos fueron disueltos al momento de los ensayos.

**Ensayos en semillas de trigo:**

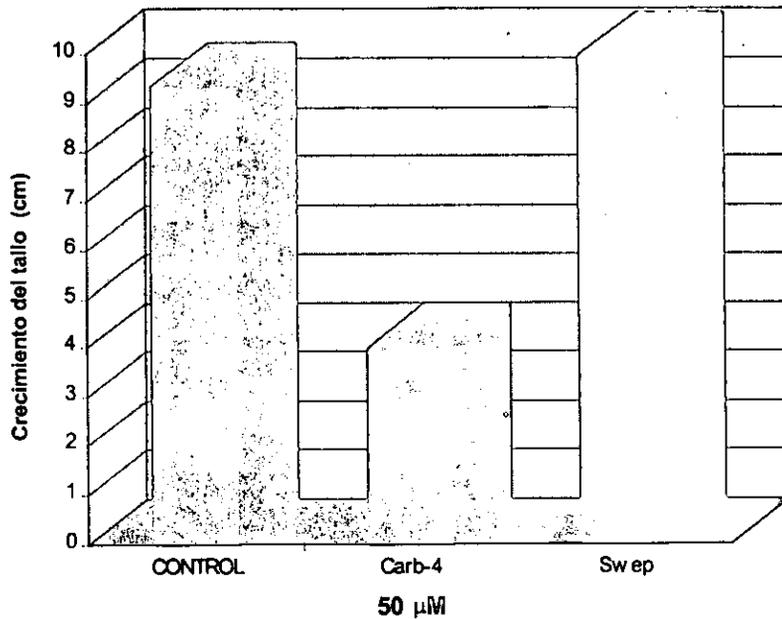
A una concentración de 50  $\mu\text{M}$  la germinación no fue inhibida por ninguno de los carbamatos, y respecto al crecimiento de la raíz y el tallo, la gráfica N° 12 y 13 muestran los resultados obtenidos. En ellas se observa que es notable la inhibición que presenta el carbamato 4 con respecto del control (una inhibición del 50% aproximadamente). Por otra parte, se pueden observar la activación del crecimiento radicular del compuesto comercial (swep). Los demás compuestos no mostraron actividad ya que crecieron igual que el control.

En las gráficas 14 y 15 se presentan los resultados de inhibición de la germinación, crecimiento radicular y del tallo, a una concentración de 250  $\mu\text{M}$ . Como se observa en la gráfica N.14, el carbamato 4 inhibió la germinación de las semillas en un 69%, superando al producto comercial swep, el cual muestra una germinación igual a la del control y a la de los otros carbamatos. Respecto a la plántula, sólo el crecimiento de la raíz es parcialmente inhibida por el carbamato carbamato 4 (4-propiltio) como se observa en la gráfica N. 15, mostrando una mejor inhibición a la inducida por el swep.

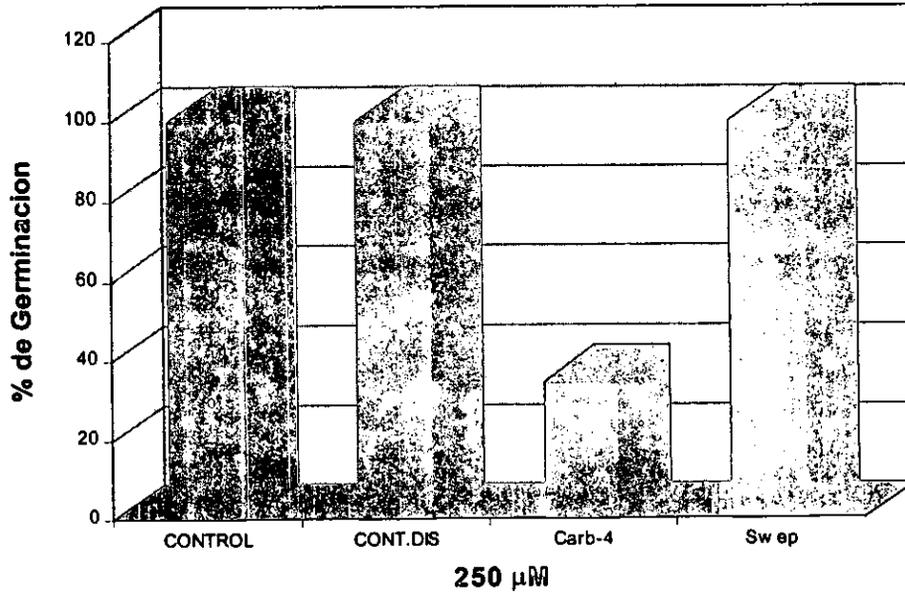
Gráfica N° 12. Efecto de la inhibición de los carbamatos sobre el crecimiento de la raíz en trigo (*Triticum vulgare*)



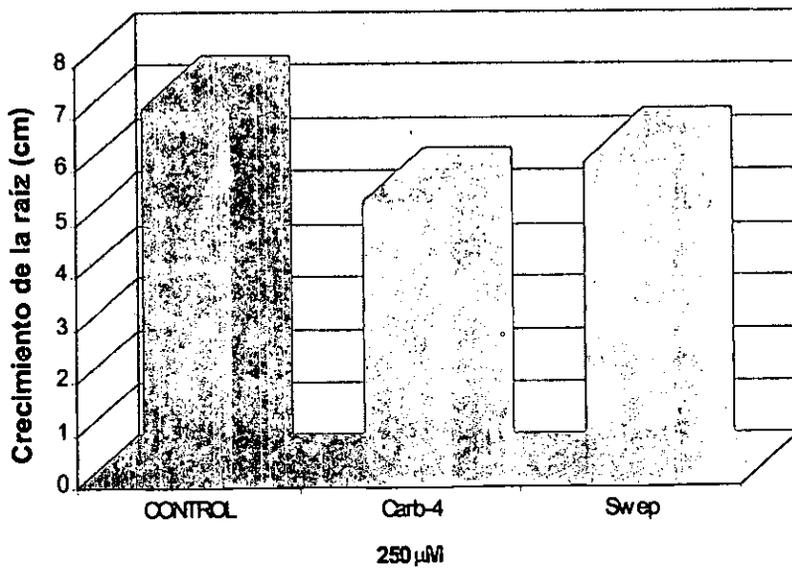
Gráfica N° 13. Efecto de Inhibición de los carbamatos sobre el crecimiento del tallo en Trigo (*Triticum vulgare*)



Gráfica N°. 14. Efecto de la inhibición de los carbamatos sobre la germinación de las semillas de trigo (*Triticum vulgare*)



Gráfica N°. 15 Efecto de inhibición de los carbamatos sobre el crecimiento de la raíz en Trigo (*Triticum vulgare*)



### **Ensayos en semilla de tomate:**

Los resultados más significativos se presentan en las gráficas N° 16, 17 y 18. Los carbamatos no graficados mostraron una inhibición similar a la del control. En la germinación de las semillas no hay efecto de inhibición a 50 y 250  $\mu\text{M}$ , pero en cambio a 500  $\mu\text{M}$ , el carbamato 7 induce una reducción de la germinación en un 22% aproximadamente (gráfica N. 16), un poco mejor que la inducida por el swep.

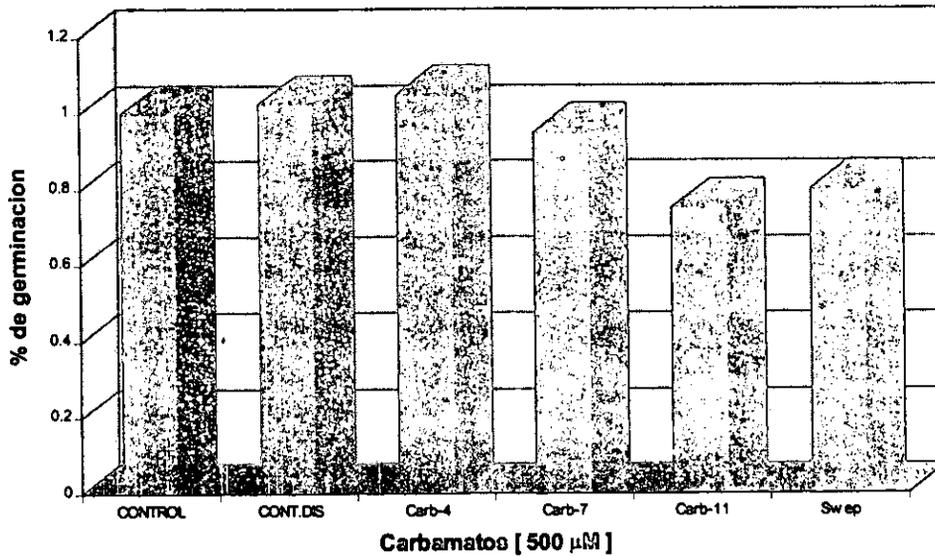
Con respecto al crecimiento de la raíz, la gráfica N° 17 muestra la inhibición inducida por los carbamatos a 50  $\mu\text{M}$  y, como se observa, el carbamato 4 (propiltio) muestra una reducción del crecimiento superando al swep, que incluso este último activa el crecimiento de la raíz. En las concentraciones de 250 y 500  $\mu\text{M}$ , no existe una inhibición significativa.

Por lo que respecta al crecimiento del tallo, sólo hay un débil efecto inhibitorio a 500  $\mu\text{M}$  (Gráfica N° 18) nducido por lo nuevos carbamatos, pero el swep presenta la mayor actividad.

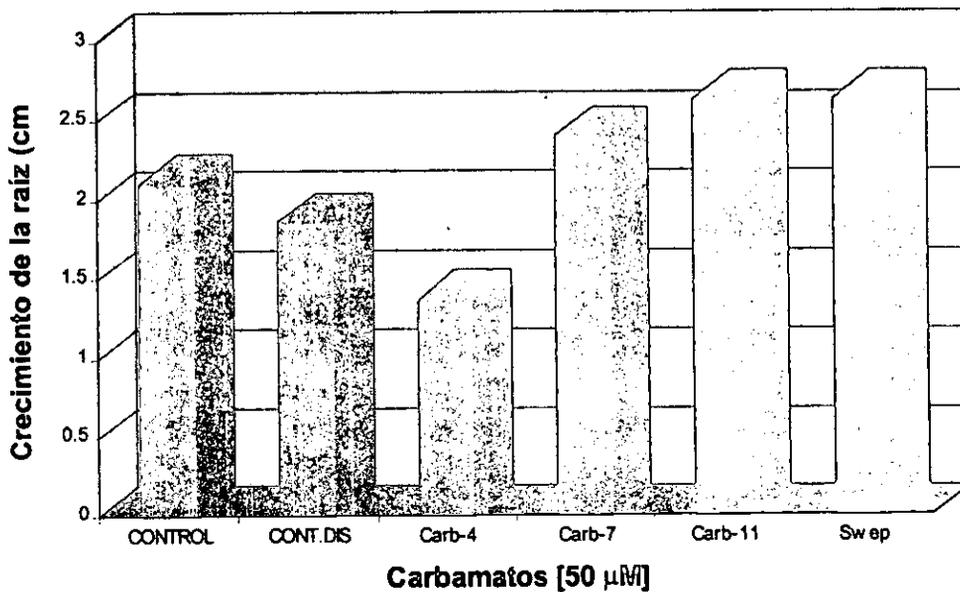
### **Ensayos en semillas de Trébol**

Con respecto a los ensayos con semillas de trébol, no existió una inhibición a las diferentes concentraciones, debido principalmente a la resistencia adquirida por las semillas obtenidas, ya que ni el swep mostró una inhibición, incluso a 500  $\mu\text{M}$ . datos no mostrados.

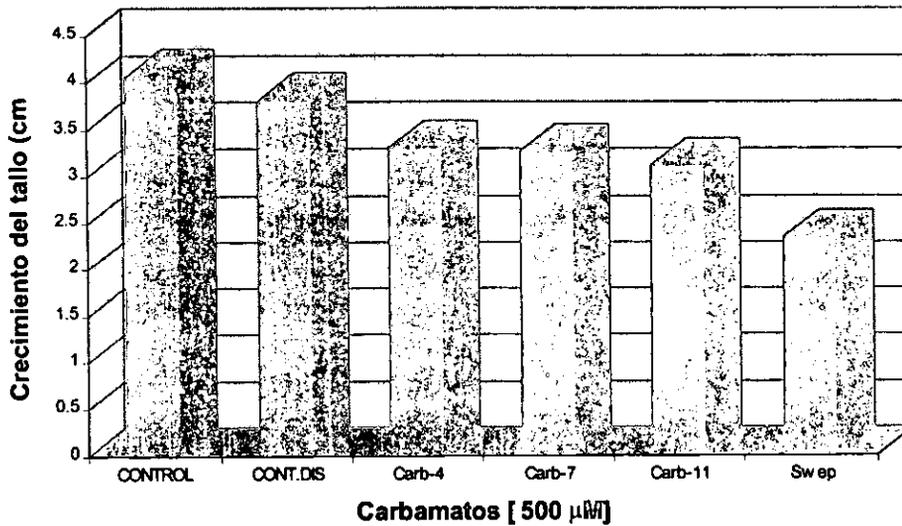
Gráfica N° 16. Efecto de Inhibición de los carbamatos sobre la germinación semillas de Tomate (*Physalis ixocarpa*)



Gráfica N° 17. Efecto de los carbamato sobre crecimiento de la raíz en Tomate (*Physalis ixocarpa*)



Gráfica N° 18 efecto de inhibición de los carbamatos sobre el crecimiento del tallo en semillas de Tomate (*Physalis Ixocarpa*)



Los resultados en cloroplastos aislados, así como de preemergencia en semillas, revelan que el mecanismo principal de los nuevos carbamatos es inhibiendo la fotosíntesis. También muestran un débil efecto como herbicidas preemergentes, lo cual era lo esperado de acuerdo con lo reportado en la literatura.

Pero el mayor volumen de los sustituyentes, así como el coeficiente de partición de los nuevos carbamatos, aumenta su potencial inhibitorio y, por otra parte, cambia el sitio de inhibición en la cadena redox, siendo éste a nivel del lado reducido de PQ, y no en el FS II como en los carbamatos clásicos.

## **6. CONCLUSIONES**

Después de haber realizado el trabajo experimental y cubierto todos los objetivos planteados al inicio de este trabajo, se puede concluir lo siguiente:

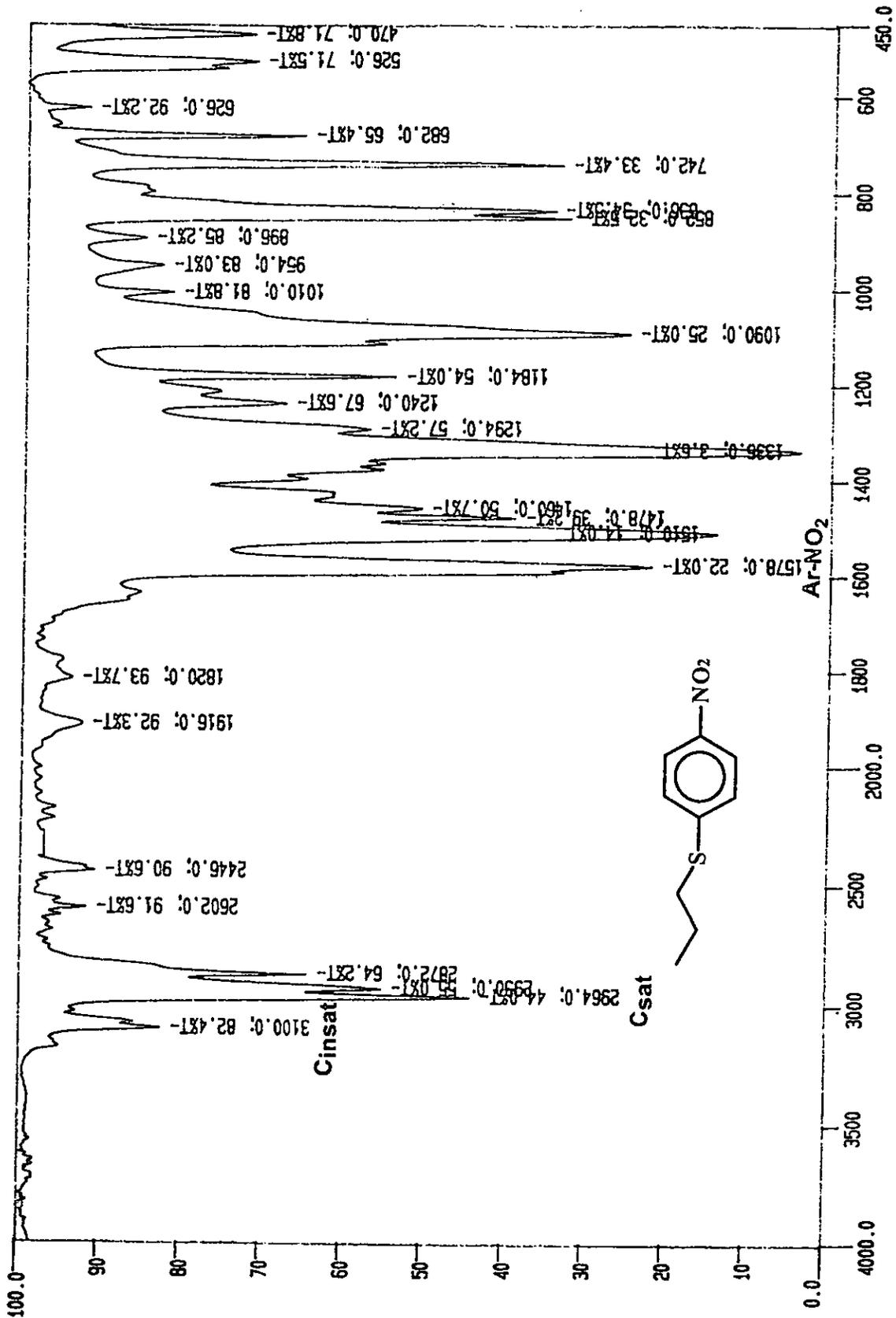
Se prepararon los carbamatos de metilo 4-sustituidos análogos del Albendazol (4), Fenbendazol (7) y Mebendazol (11), así como los compuestos con los siguientes sustituyentes: 4-hidroxi (12), 4-metoxi (13), 4-nitro (14) y 4-cloro (15), con buenos rendimientos generales (mayores al 70 %), resultando nuevos los compuestos con los sustituyentes propiltio (4), y feniltio (7). La estructura de los compuestos terminales así como la de los intermediarios se elucidó por técnicas espectroscópicas.

La comparación teórica mediante el Modelado Molecular de los bencimidazoles activos y los carbamatos de metilo sintetizados reveló una similitud estructural y electrónica, que indico no solo la posible actividad antihelmíntica, sino también el orden esperado de la actividad: 11, 7, y 4 en orden decreciente; mismo que fue corroborado por las pruebas de actividad. De igual forma el estudio teórico reveló características electrónicas (potencial electrostático negativo inducido por el imidazol, no presente en los carbamatos) que se deberán tomar en cuenta para tener nuevas moléculas mas activas, resaltando la utilidad de esta herramienta.

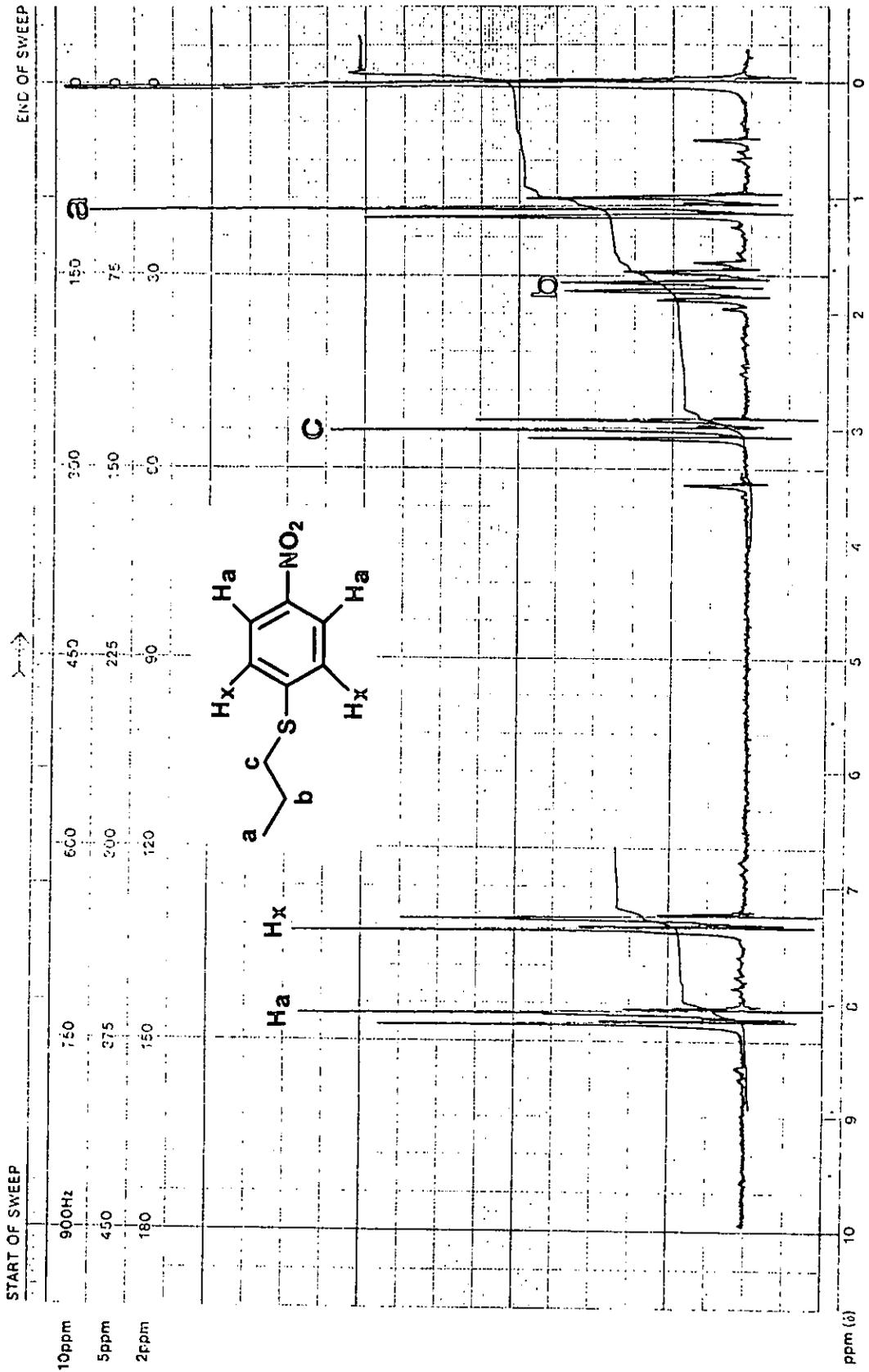
No es prescindible el anillo de bencimidazol para la actividad antihelmíntica en *Trichinella spiralis*, porque los carbamatos de metilo tienen una actividad equiparable a sus análogos bencimidazólicos a 10 µg/ml, e incluso a una concentración diez veces menor el compuesto 4 presentó actividad significativa, mientras que esta no se presenta en el Albendazol.

Con respecto a su actividad herbicida, los tres nuevos carbamatos 4, 7, y 11 presentaron una inhibición 10 veces más potente sobre la fotosíntesis que los carbamatos reportados (12-15). Todos se comportaron como inhibidores clásicos de la reacción de Hill, al inhibir el transporte basal, desacoplado y fosforilante. 4, 7, y 11 tienen su sitio de inhibición en la cadena redox. en el lado reducido de PQ y no en el Fotosistema II, como es reportado para los carbamatos (11-15).

Como herbicidas preeemergentes 4, 7 y 11 demostraron tener una débil acción sobre las semillas de trigo, tomate, lo cual indica un doble mecanismo de acción, pero su mecanismo primario sería como herbicidas de tipo foliar.



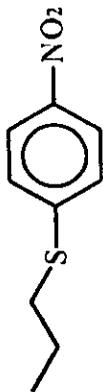
Espectro N° 1. IR (KBr). 4-Propilnitrobenzeno 2



Espectro N° 2. RMN <sup>1</sup>H. 4-Propilnitrobenzene 2

Mass Spectrum J  
Data : SRM-223

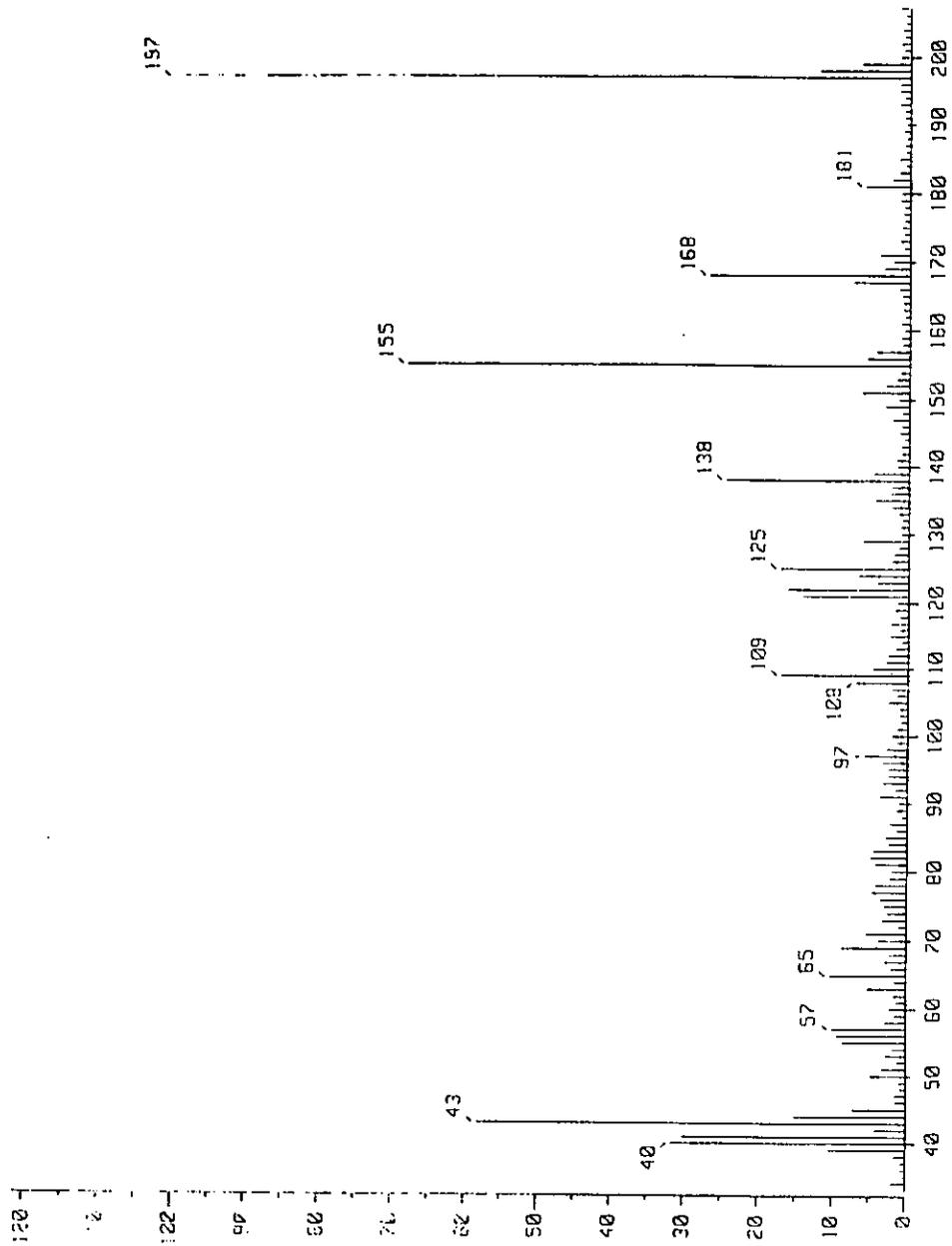
Date : 17-Sep-86 21:38



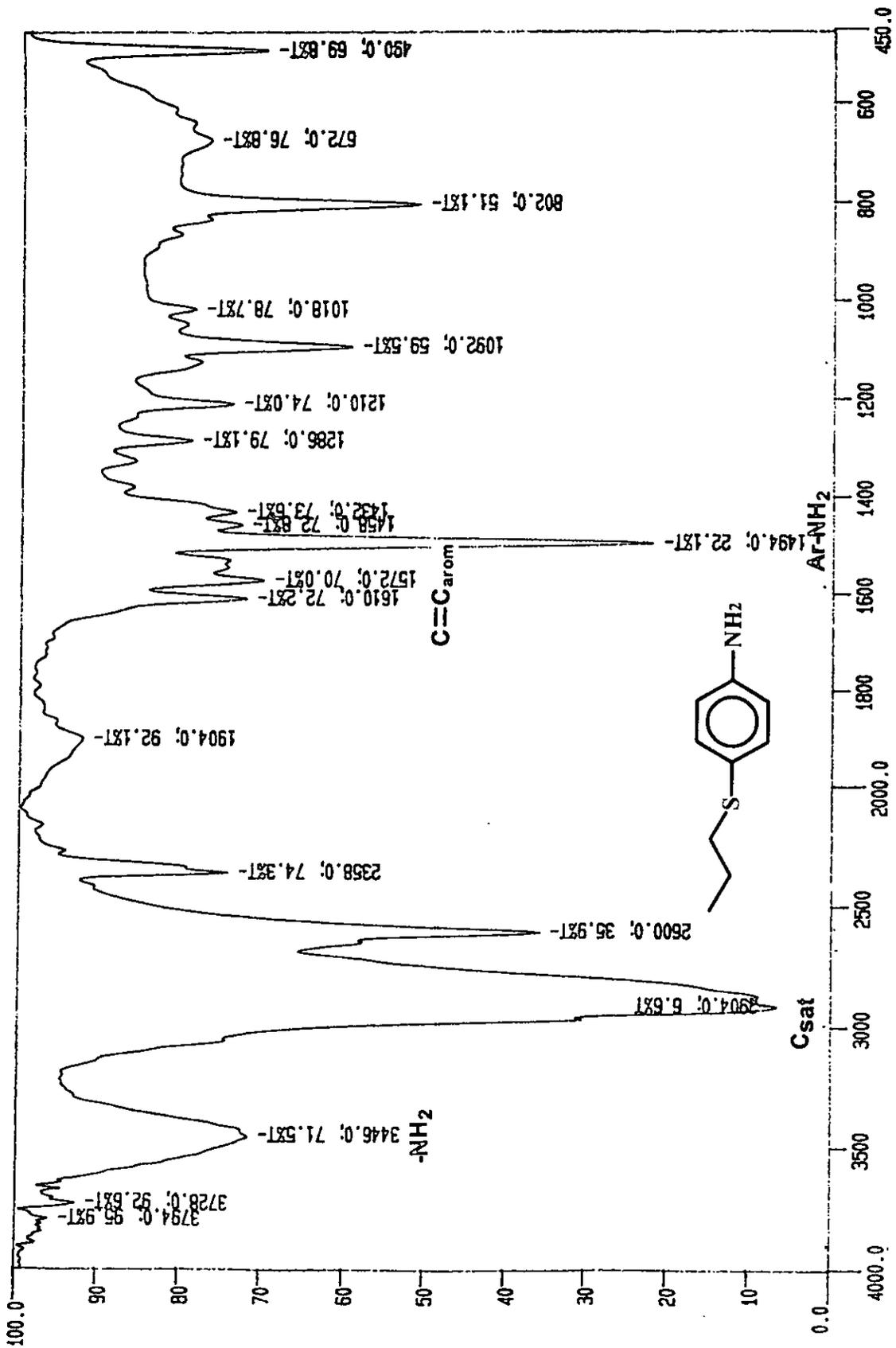
Mode : EI+

Temp : 57.3 deg.C

Cut Level : 0.00 %

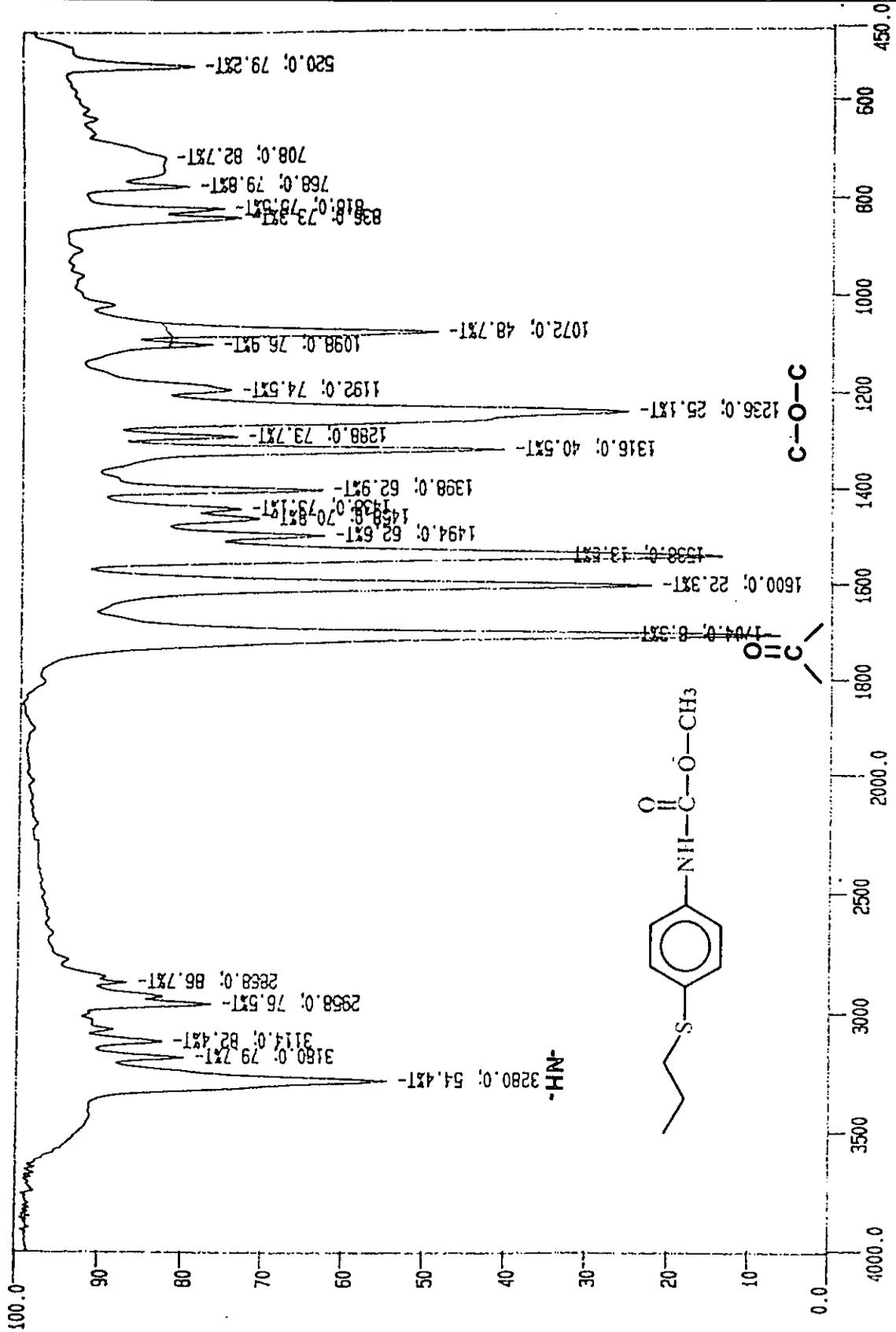


Espectro Nº 3. EM (IE). 4-Propiltionitrobenceno 2

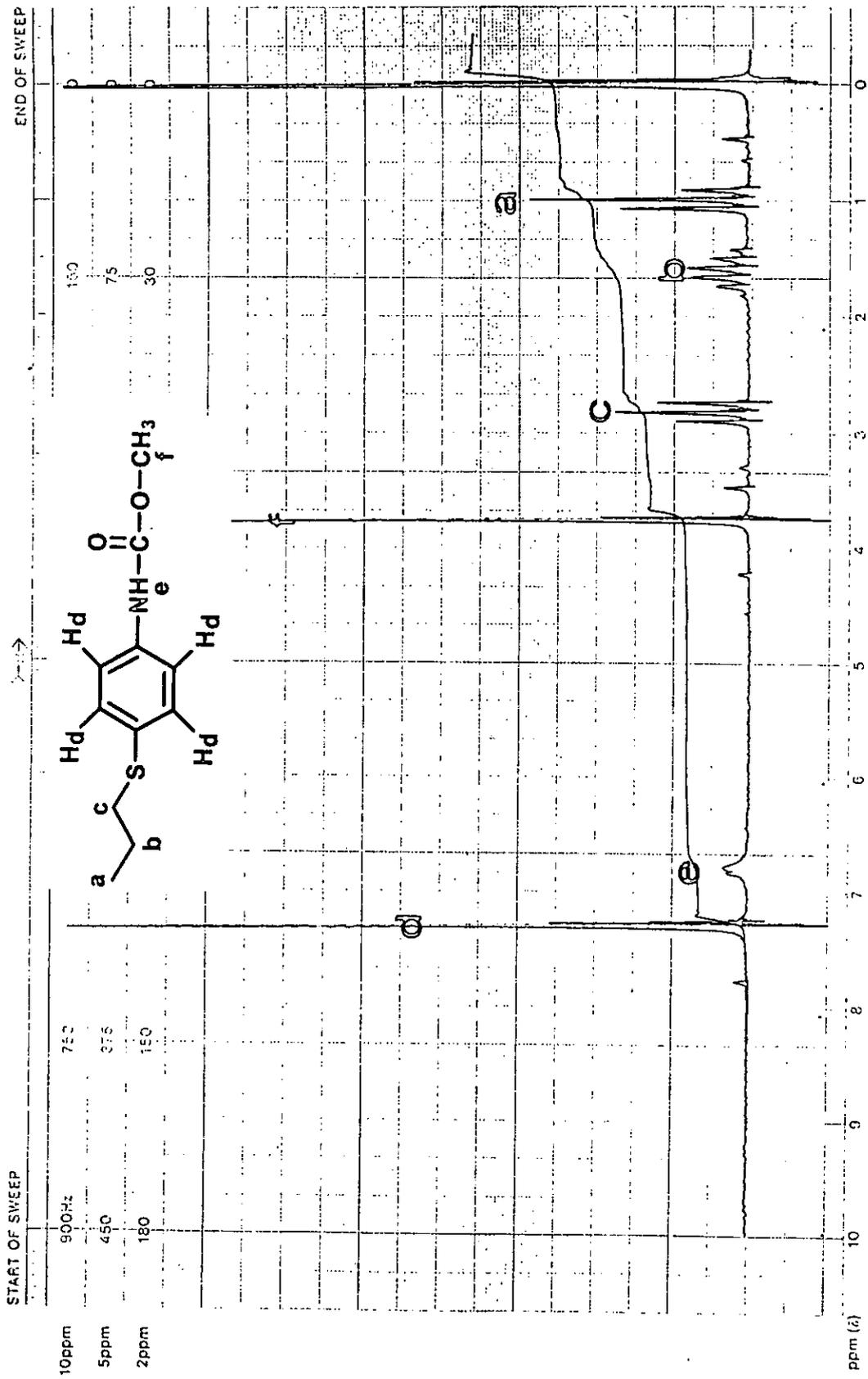


Espectro N° 4. IR (KBr). 4-Propiltioanilina 3

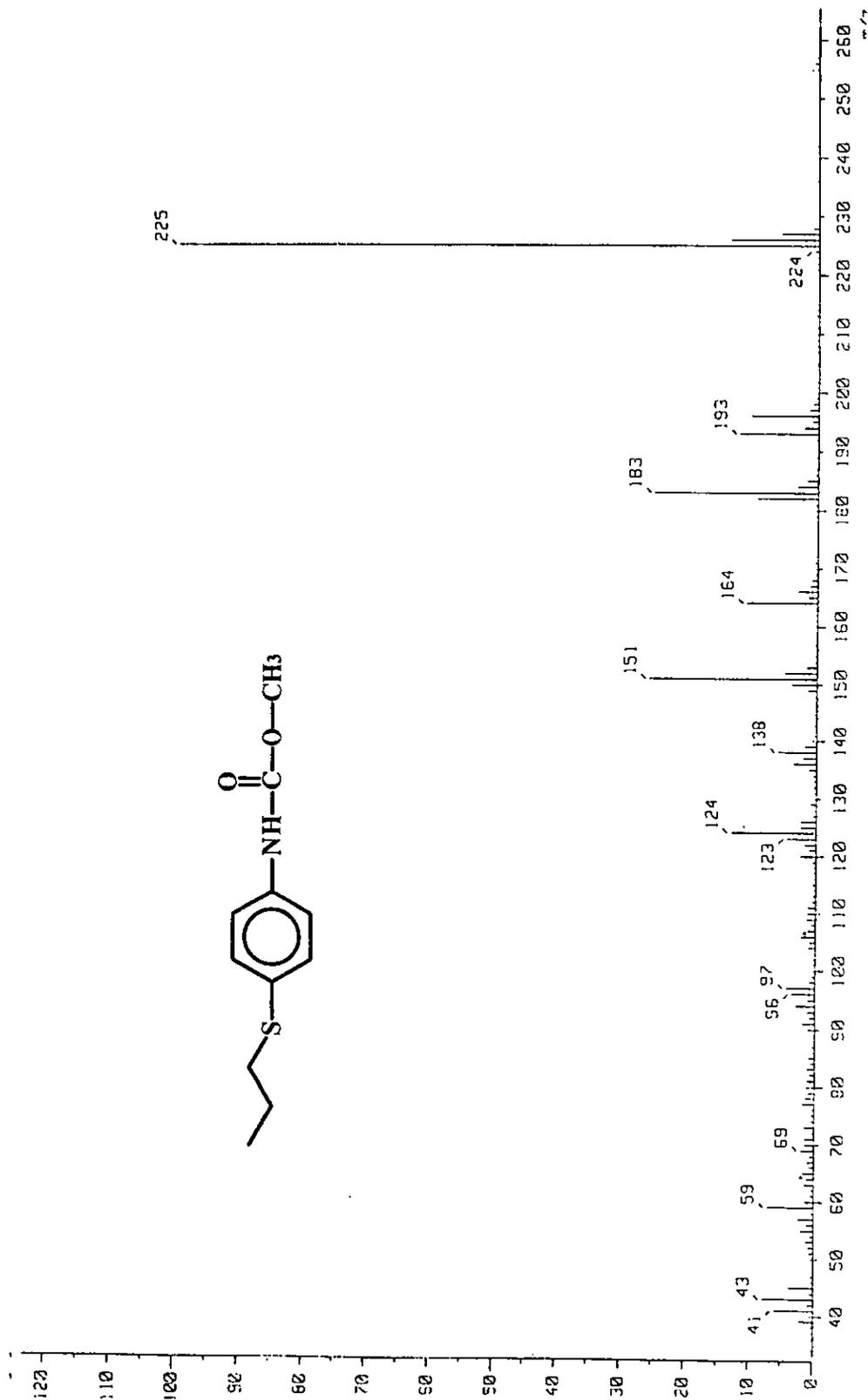




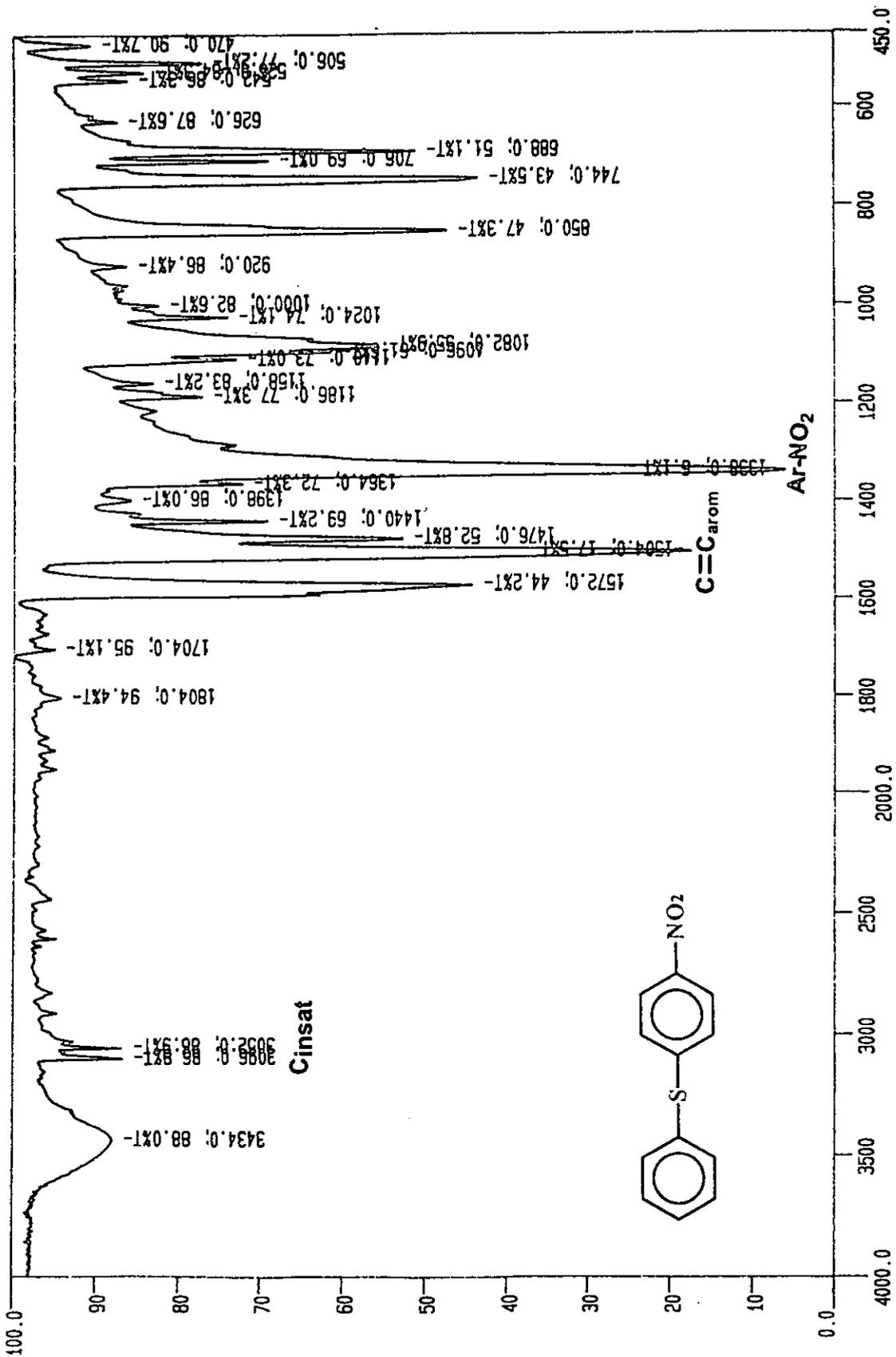
Espectro N° 6. IR (KBr). N-(4-Propilfenil)carbamato de metilo 4



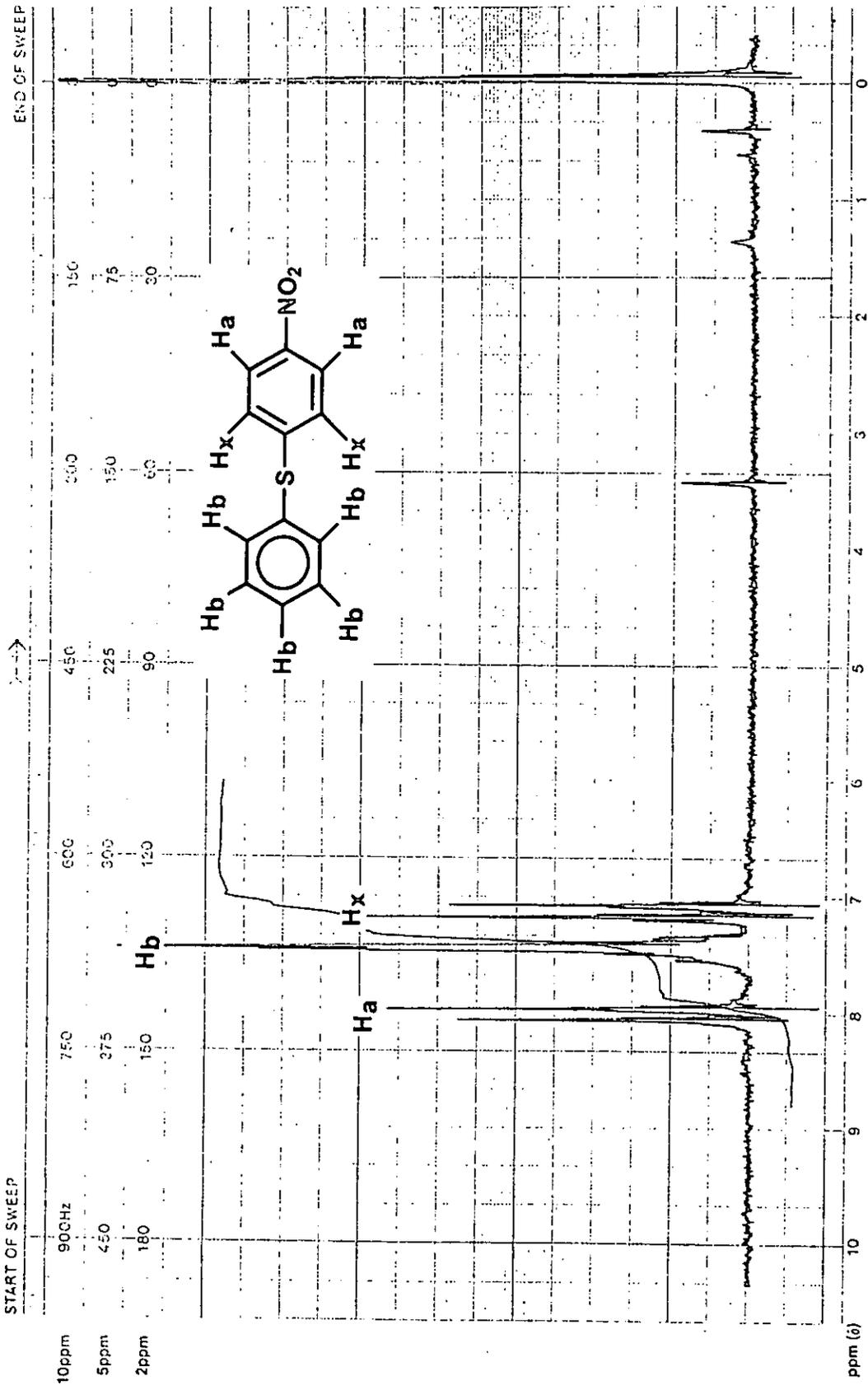
Espectro N° 7. RMN <sup>1</sup>H. N-(4-Propiltiofenil)carbamato de metilo 4



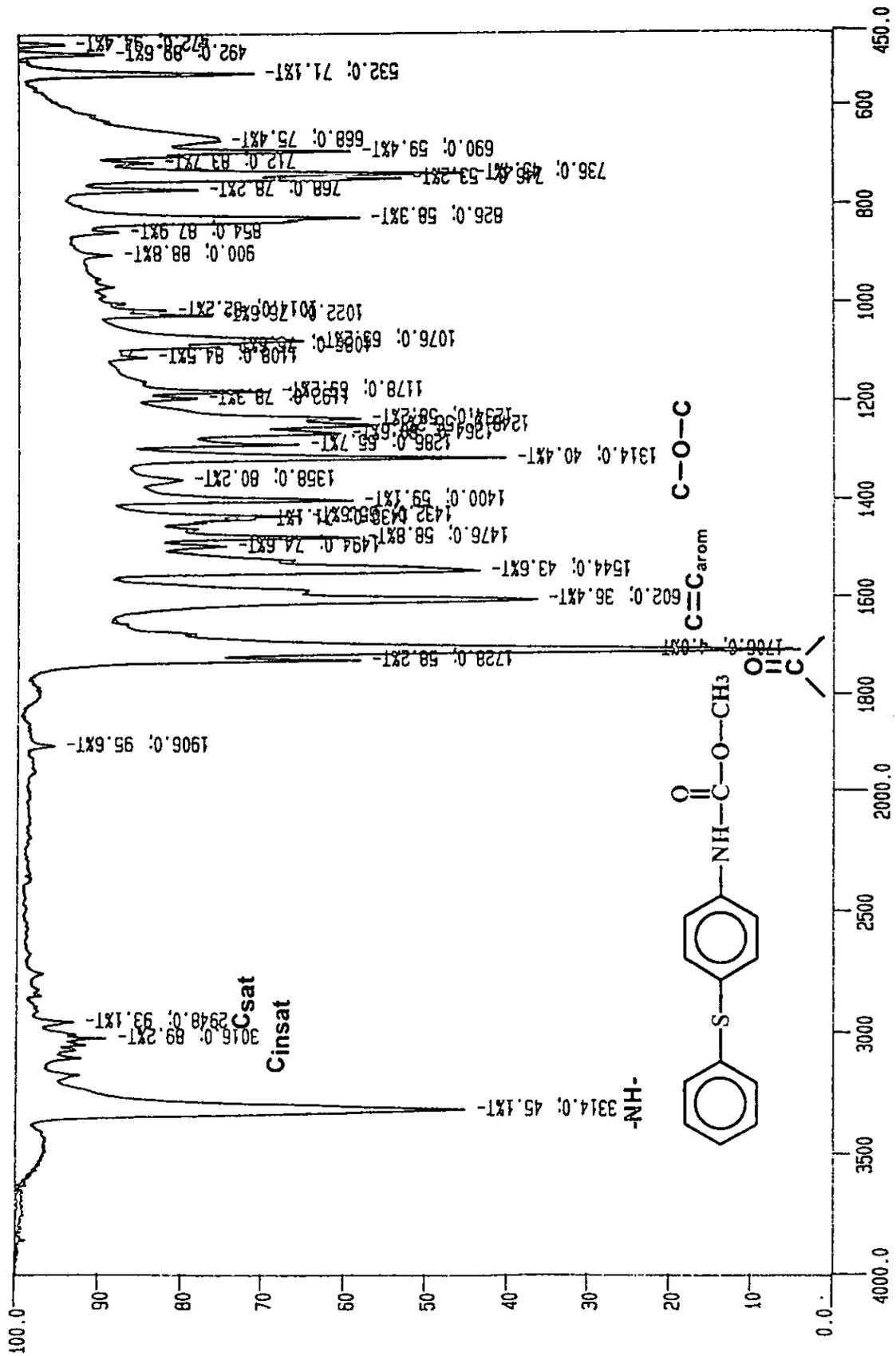
Espectro N° 8. EM (IE). N-(4-Propiltiofenil)carbamato de metilo 4



Espectro Nº 9. IR (KBr). 4-Feniltionitrobenceno 5

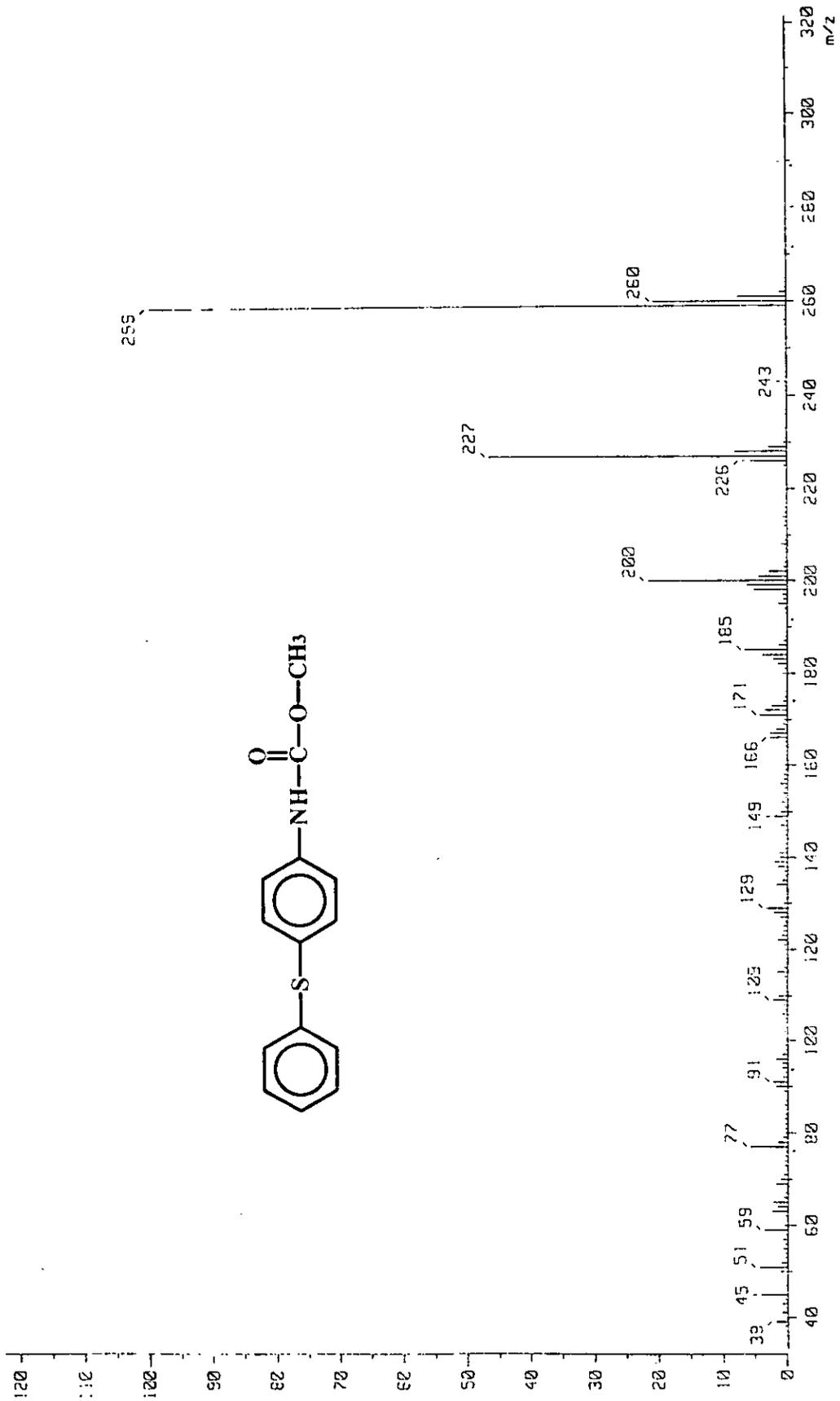


Espectro N° 10. RMN <sup>1</sup>H. 4-Feniltionitrobencono 5



Espectro N° 11. IR (KBr). N-(4-Feniltiofenil)carbamato de metilo 7





Espectro N° 13. EM (IE). N-(4-Feniltiofenil)carbamato de metilo 7

**8. BIBLIOGRAFIA.**

- 1.- Zapater, R.C. "*Parasitosis intestinales*", Ed. El Ateneo. (Argentina) 1997.
- 2.- Sharma, S.; "Treatment of helminth disease- Challenges and Achievements". *Progress in Drug Research*, 1987, 38, 4-100.
- 3.- Geary, T.G., Bowman, J.W., Friedman, A.R.; Maule, A.G., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R. D., Thompson D.P. "The pharmacology of FMRFamide-related neuropeptides in nematodes: New opportunities for rational Anthelmintic discovery". *Int. J. Parasitol.* 1995, 25, 1273-1280.
- 4.- Ross, M.H.; Marcel, S.G.. "Molecular aspect of Drug resistance in parasitic helminths." *Pharmacol. Ther.* 1993, 60 : 331-6
- 5.- Bruce, J. I.; "New Anthelmintics". *Int. J. Parasit.* 1987, 17: 31.
- 6.- Van der Bossche, H.; Rochette, F.; Horig, C. "Mebendazole and Related Anthelmintics". *Adv. Pharmacol. Chemother.* 1987, 19: 67.
- 7.- Escobedo, F.; Penagos, P.; Rodríguez, J. and Sotelo J. "Albendazole Therapy for Neurocysticercosis". *Arch. Int. Med.* 1987, pp 738-741.
- 8.- Jung, H.; Hurtado, M.; Sánchez, M.; Medina, M. T. and Sotelo, J. "Plasma and CSF Levels of Albendazole and Praziquantel in Patients with Neurocysticercosis". *Clin. Neuropharm.* 1990, 13, 559.
- 9.- McKraken, R. O.; Stillwell, W.H. "A Possible Biochemical Mode of Action for Benzimidazole Anthelmintics". *Int. J. Parasit.* 1991, 21: (1) 99.

10.- Angeles, E.; Moreno, E.; Martinez, R., Martínez, P.; Minero. "A simple method for the synthesis of carbamates", *Synthetic Communications*. 1994, 24, 244.

11.- Martínez, P.; Minero, C.; Angeles, E.; Moreno, E.; Martinez, R. "Eficacia anticestodica de carbamatos utilizando como modelo *H. nana* en ratones CDI". *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 1995, 26: (4) 83.

12.- McCracken, R.O.; Lipkowitz, K.B. "Structure-activity relationship of Benzothiazole and Benzimidazole anthelmintics: a Molecular Modeling Approach to in vivo efficacy". *J. Parasitol.* 1990, 76: 853-864.

13.- McCracken, R.O.; Lipkowitz, K.B. " Experimental and theoretical studies of albendazole, oxibendazole, and tioxidazole. " *J. Parasitol.* 1990, 76: 180-5.

14.- McCracken, R.O.; Lipkowitz, K.B. "Molecular Modeling: a tool for predicting anthelmintic activity in vivo". *Parasitol. Res.* 1993, 79: 475-9.

15.- McCracken, R.O.; Lipkowitz, K.B. " A Molecular Modeling approach to in vivo efficacy of triclabendazole". *J. Parasitol.* 1991, 77: 998-1005.

16.- Takematsu, T; Konnai, M, Takeuchi, Y. 1986. "The relation of chemical structure to the herbicidal activities and properties of carbamates". *Utsunomiya Daigaku Gabuki Kennu.* 1986, 17 :396-402. C.A. 19692, 29515y, 1968.

17.- Tissut, M.; Nurit, F.; Ravanel, P.; Macherel, D.; "Herbicidal Modes of action depending on substitution in a phenylcarbamates series". *Physiol. Vég.* **1986**, *24*, 523-535.

18.- Dearing, A. "Computer Aided Molecular Modelling: Research study or research tool". *J. Comp. Aid. Mol. Des.* **1988**, *2* : 179-189.

19.- Boyd, B. D. "Successes of Computer-Assisted Molecular Design". en Boyd and LipKowitz. "*Reviews in Computational Chemistry*". Vol II. VCH. Pub. 1991. (USA).

20.-Lunney, E.A. Hagen, S.E, Domagala, J.H, Humblet, CH., Kosinki, J., Baldwin, E.T., Erickson, J.W. "A novel Nonpeptide HIV-1 Protease Inhibitor: Elucidation of the binding mode and its application in the design of related analogs" *J.Med. Chem.* **1994**, *37* : 2664-2677

21.- Chopin, F. "Computers and the medicinal Chemist" in *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Hansch, C., Sammens, G.P, Taylor, B.J. 1era. Ed. Vol. IV. Pergamon P. (1990) U.K.

22.-Pettersson, I & Liljefords, T. "Molecular Mechanics Calculated Conformational Energies Of Organic Molecules: A comparision of Force Fields". en Boyd and LipKowitz. "*Reviews in Computational Chemistry*". Vol IX. VCH. Pub. 1996. (USA).

23.- Dewar, M.S.J. & Stroch, D.M. "Comparative test of theoretical procedures of studying Chemical Reactions". *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* : 3898.

- 24.-Leach, A.R. "A survey of methods for searching the conformational space of small and medium sized molecules". En Boyd and LipKowitz. "Reviews in Computational Chemistry". Vol II. VCH. Pub. 1991. (USA).
- 25.- Sharma. S.; and Abusar, S., *Prodrug Research*. 1983, 27, 86.
- 26.- Islip, P.J. *Burger's Medicinal Chemistry*, 4th. ed., Part II. Cap 21, 1981.
- 27.- Booth, N.H and Mcdonal. L.E., "Veterinary Pharmacology and therapeutics" , 5th Ed. The Iowa State University Press Aries, Section 16, 1982
- 28.- Brown, H.D., Matzuk, A.R., et. al., *J. Am. Chem. Soc.* 1961, 83, 1764.
- 29.-Townsend, L.B; Wisse, D.S. "The synthesis and chemistry of Certain Anthelmintic Benzimidazoles". *Parasitology Today*. 1990, 6(4) : 107-112.
- 30.- Theodorites, V.J., Gujvrick, R.J., *Experimentia*, 1976, 32, 702-703.
- 31.- Theodorites, V.J., Gujvrick, R.J., Vassilios, J. Pat. U.S.A 3915986, 1975.
- 32.- (a) Cyba Geygi, AG. Suiza, Pat. Belga 865870, 1978. (b) C.A. 1979, 90, 137817z.
- 33.-New, R.S, and Fettrener, R.H. , "Mode of action of antinematodal drugs" in *Chemotherapy of parasitic disease*. William, C. , Campbell and Robert S, Rew, Ed Plenum, 1986, pag 321.
- 34.- Morgan, U.M.; Reynoldson, J.A.; Thompson, R.C. "Activities of several benzimidazoles and tubulin inhibitors against *Giardia* spp. in vitro. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1993, 37 : 328-31.

- 35.- Romero, M. A.; James, M. G.; Miramontes, F. B. y Haro, C. J.. "Síntesis de herbicidas y pruebas biológicas para determinar su actividad sobre maleza". *Rev. Soc. Quím. Mex.* **1995**, 39:15-23.
- 36.- Lotina-Hennsen, B.; Albores-Velasco, M. y García, Ch. L. "Herbicidas y productividad agrícola". *Rev. Soc. Quím. Mex.* **1989**, 33:109-117.
- 37.- González, V. J. G. "Herbicidas Inhibidores de la fotosíntesis". Tesis de Licenciatura. UNAM.1981.
- 38.- Hartmann, T. H.; et. al. "Plant Science growth, development and utilization of cultivated plants". Prentice Hall, 1988.
- 39.- Cole, D.J.; Edwards, R. in Hudson, H. and Roberts, D. "*Progress in pesticide Biochemistry and Toxicology*". Jhon Wiley and Sons. U.K. (1987) pp 19-22.
- 40.- Marti, J.L.; Khafif, T.; Vega, D. Degradation of phenyl carbamate herbicides by *Pseudomonas alcaligenes* isolated from soil". *Soil-biol. Biochem.* **1986**, 18 (6), 649-653.
- 41.- 5. Vaugh, K.C.; Lehnen, P.C. "Mitotic disrupter herbicides". *Weed Science.* **1991**, 39, 450-457.
- 42.- Linscott, D.L., *Handbook of Pest Management in Agriculture*, Vol 3: 75-112 (Pimentel, D. de.) CRC Press. Florida USA. 1981.
- 43.- Berkaloff., *Biología y Fisiología Celular*, Vol. III, Omega, Barcelona, 1893.

- 44.- Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J. *Bioenergetics*. Academic Press. San Diego. 1992.
- 45.- Trebst, A. "Structure activity correlation of herbicides affecting plastoquinone reduction by photosystem II: Electron density distribution in inhibitors and plastoquinone species". *Z. Naturforsch.* 1984 , 39C :405-411.
- 46.- Moreland, D. E. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 1980, 31 :597-638.
- 47.- Vinter, J.G, Davies, A., Saunders, M.R. "Strategic Approaches to Drug Design I. An Integrate software framework for Molecular Modelling" *J. Comp. Aided Mol. Design* 1987, 1 :31.
- 48.- Clark, M., Cramer III, R.D., and Van Opdenbosh, N. "Validation of the general purpose Tripos 5.2 Force Field" . *J. Comp. Chem.* 1989, 10 :982
- 49.- Catálogo Aldrich, (1990-1991), 13.
- 50.- Ayyangar, N.R.; Lahoti, R.J.; Thomas, D. "An Alternate synthesis of 3,4-diaminobenzophenone an of Mebendazole". *Org. Preparat. and Proc.Int.*, 1991, 23, 627-631
- 51.- Bergon, M.; Hamida, B.; Calmon, J.P. "Isocyanate formation in the decomposition of phenmediaphan in aqueous media". *J. Agri. Food Chem.* 1985, 33, 577-83.
- 52.- Dennis, D.T., Despommier, D.D., Davis, N. "Infectivity of the newborn Larvae of *Trichinella spiralis* in the rat". *J. Parasitol.* 1970, 56 : 974-997.

53.-Townson, D.H, Morris, D.L. "Echinococcus granulosus in vivo maintenance of whole cyst and the assesment of effect of albendazole sulphoxide and praziquantel on the germinal layer". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989, 83 :664-669.

54.- Cedillo-Rivera, R., Ramirez, A., Muñoz, O. "A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT phenazine methosulfato (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*". *Arch. Med. Res.* 1992, 23 :59-61 (Special Issue).

55.- Peña Valdivia, C.; Rodriguez-Flores, L.; Lotina-Hennsen, B. "Inhibition of photophosphorilation and electron transport by N, N-dimethylformamide" *Biophysical Chemistry.* 1991, 41, 169-174.

56.- Strain , H.H.; Cuppe, B.T. y Suec, W.A. "Analytical procedures for the isolation, identification, estimation and investigation of the clorophylls". En: *Methods in Enzimology.* (San Pietro, A. de) Acad. Press. Nueva York. 1971, XXIII : 452-466.

57.- Dilley, R. A. "*Methods in Enzymology*". (San Pietro, A. de) Acad. Press. Nueva York. 1972, XXIV(B): 64-68.

58.- Fork, D.C. "*Methods in Enzymology*". XXIV(B):64-68 (San Pietro, A. de) Acad. Press. Nueva York. 1972, XXIV(B): 64-68.

59.- Zeiyeng, G. Shavit, N.; Avron, M. *Biochim. Biophys. Acta* 1965, 109: 332.

- 60.- Izawa, S y Pan, R. L. "Photosystem I electron transport and phosphorylation supported by electron donation to the plastoquinone region". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1978, 83:1171-1177.
- 61.- Gromet-elhanan, Z & Avron, M . *Bichim. Biophysica Res. Commun.* 1963, 10 (3): 215
- 62.- Astier, Ch. ; Boussac, A. & Elienne anee-lise. *FEBS letters.* 1984, 167.
63. Huska, G.A.; McCarty, R.E. & Racker, E. *Biochim. Biophys. Acta.* 1970, 197, 206.
- 64.- Horak, J., Sweat, M.y. "Germination, emergence and seedling establishment of Buffalo gourd (*Curcubita foetidissima*)". *Weed Science.* 1994, 4, 358-363.