



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA**

---

**TRABAJO DE TESIS DOCTORAL**

**FORMACION Y COMPORTAMIENTO DE COMPLEJOS DE  $\beta$ -  
CICLODEXTRINA CON PESTICIDAS Y ALCOHOLES**

**ESTUDIO COMPUTACIONAL: METODOS DE MECANICA MOLECULAR Y SEMIEMPIRICOS**

---

Tesista Ethel Noemí Coscarello

Director Eduardo Alberto Castro

**2013**

*El presente trabajo de tesis se presenta a consideración de las autoridades de la facultad para acceder al Título de Doctor en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Exactas.*

## **Agradecimientos**

Deseo agradecer a todos los que me ayudaron a realizar este trabajo. Al Dr. Eduardo Castro que aceptó dirigirme y asesorarme a lo largo de la tesis, y a su invaluable paciencia, y muy especialmente a la Dra. Dora Barbiric que con su generosidad, y su permanente asistencia e invaluable colaboración, me permitió un incipiente crecimiento profesional a lo largo de estos años. A los docentes que me forjaron en especial al Dr. Raúl Rossignoli que me infundió una gran curiosidad por la Física.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de La Plata específicamente al Departamento de Química, la cual respeto y me dio la oportunidad de ampliar mis estudios y de formarme en una manera mucho más profunda.

A los profesores de la Universidad de Morón, que me han dejado sus enseñanzas y valores morales especialmente al Dr. Cesar Micheli (con quien sigo colaborando), al Dr. Eduardo Cozza que me ayuda con su opinión, al Dr. Jorge Casal por su apoyo, y en memoria del Ing. Ariel Feldstein, el Dr. Adolfo Beguet, y de la Dra. Marta Polichenco.

A los profesores de la Universidad de Buenos Aires carrera de Farmacia que también colaboraron en mi formación.

A todos los integrantes de mi familia que tuvieron que soportar mi aislamiento para terminar los trabajos que desarrolle para esta tesis, a todos mis amigos por el apoyo. A mis compañeros de trabajo que tuvieron que vivir el día a día.

Y muy especialmente a mis alumnos que me transmiten el entusiasmo para seguir capacitándome, con el fin de investigar en esta interesante ciencia que es la Química.

Dedicado a mi generosa profesora Dra. Dora Barbiric, a mi querida familia, a mis queridos amigos y muy especialmente en memoria de Mariano Sánchez.

<b>Indice General</b>	<b>Página</b>
<b>Capítulo N° I</b>	
<b>1-1 Introducción General.....</b>	<b>1</b>
<b>1-2 Complejos de las ciclodextrinas.....</b>	<b>3</b>
<b>1-2-1 Generalidades.....</b>	<b>3</b>
<b>1-2-2 Aplicaciones de los Complejos de Ciclodextrinas.....</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo N° II</b>	
<b>2-1 Métodos teóricos.....</b>	<b>18</b>
<b>2-1-2 Generalidades.....</b>	<b>18</b>
<b>2-1-3 Breve descripción de los métodos.....</b>	<b>19</b>
<b>2-2-2-Aplicación de los métodos teóricos al conocimiento de los complejos de inclusión de CDs.....</b>	<b>29</b>
<b>Capítulo III</b>	
<b>3-1 Importancia de la aplicación de métodos teóricos en el conocimiento de estos plaguicidas generalmente usados en forma no responsable.....</b>	<b>33</b>
<b>3-1-1 Plaguicidas.....</b>	<b>33</b>
<b>3-1-2 La situación en nuestro país.....</b>	<b>34</b>
<b>3-1-3 Estructura de los compuestos organofosforados.....</b>	<b>41</b>
<b>3-1-4 Los compuestos OP y su toxicidad.....</b>	<b>43</b>
<b>3-1-5 Métodos basados en Biosensores con fluorescencia para.....</b>	<b>46</b>

## **compuestos OP**

<b>3-1-6 Métodos de detección basados en un sensor químico de fluorescencia</b>	<b>49</b>
<b>3-1-7 Los sensores con múltiples modos de Transducción de Señales</b>	<b>53</b>
<b>3-1-8. Perspectivas para el futuro de los métodos de detección de OP</b>	<b>59</b>
<b>3-2-1 Aporte de los estudios teóricos al conocimiento de las propiedades de los pesticidas.</b>	<b>59</b>
<b>3-2-2 Introduciéndonos en la actividad enzimática</b>	<b>67</b>
<b>3-2-3- Profundizando el mecanismo enzimático y tóxico de los OP</b>	<b>75</b>
<b>3-3-4 Conclusiones</b>	<b>91</b>

## **Capítulo IV**

<b>4-1-1- Análisis comparativo de la complejación por <math>\beta</math>-ciclodextrina de los plaguicidas (fenitrotión, metil paratión, paratión) y sus análogos de ésteres carboxílicos.</b>	<b>93</b>
<b>4-1-2-Introducción</b>	<b>93</b>
<b>4-1-3-Metodología y Resultados</b>	<b>97</b>
<b>4-1-4 Resultados de los complejos producidos por el método PM3</b>	<b>100</b>
<b>4-1-5 Cálculos de mecánica molecular</b>	<b>105</b>
<b>4-1-6 El tratamiento adicional de Fenitrotión</b>	<b>106</b>

**4-2-1 Discusión.....108**

**4-2-2 Conclusión.....112**

## **Capítulo V**

**5-1-1 Una alternativa desde la naturaleza para el control de plagas.....113**

**5-2-1 Una planta aromática que, dentro de sus usos,.....122**

**es control de plagas: La menta.**

**5-2-2 Generalidades:.....122**

**5-3-2¿Cuáles son los componentes de la menta? El mentol.....124**

**5-3-3 Usos del mentol.....125**

## **Capítulo VI**

**6-1-  $\beta$ -Ciclodextrina modificada con L-triptófano actuando.....127**  
**como Selector Molecular y Enantiomérico verificado por**  
**medio de Cálculos Semiempíricos**

**6-1-1 Introducción.....127**

**6-1-2-Materiales y Métodos.....133**

**6-1-3-Resultados y Discusiones.....134**

**6-1-4 Uniones de hidrógeno en el ciclo anfitrión.....144**

**6-1-5 Conclusiones.....145**

## **Capítulo VII**

<b>7-1-1 Síntesis.....</b>	<b>146</b>
<b>7-1-2 Reflexión.....</b>	<b>149</b>
<b>7-1-3 Futuros proyectos.....</b>	<b>149</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>desde 149 a 207</b>
<b>Trabajos publicados .....</b>	<b>207, 208</b>
<b>Presentación en congresos.....</b>	<b>208</b>
<b>Anexo tabla de pesticidas.....</b>	<b>209 al 215</b>

## Capítulo N° I

*No puedo tomarla (la teoría cuántica) en serio, porque...la física debería representar una realidad en el tiempo y en el espacio, libre de fantasmales acciones a distancia.*

*Albert Einstein*

### 1-1 Introducción General

El modelado molecular de sistemas macrocíclicos se halla establecido como una disciplina sólida, bien fundada y realmente útil [1, 2]. Se han registrado avances significativos en el terreno de las aproximaciones computacionales en la química supramolecular, que conducen hacia una perspectiva microscópica de las características estructurales y termodinámicas involucradas en los procesos de reconocimiento molecular y organización supramolecular [1].

Las técnicas de modelado molecular están muy extendidas en su utilización y en muy diversos campos de la química, que van desde pequeñas moléculas orgánicas a las proteínas, los polímeros, los sólidos inorgánicos y los líquidos. El modelado molecular comprende aspectos tales como construir, visualizar y comparar moléculas o efectuar complicados y prolongados cálculos en sistemas más complejos. Como con cualquier modelo, sin embargo, hace falta la intuición y formación del químico para interpretar los resultados de manera apropiada. Sumado a esto y siempre que sea posible, se necesita la comparación con datos experimentales para orientar tanto el trabajo en el laboratorio como el trabajo computacional.

Las metodologías y procedimientos habituales de la Química Cuántica [3] se emplean frecuentemente en un estudio teórico de esta clase aplicado a sistemas complejos [4]. La  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), en particular, está constituida por siete D-(+) glucopiranosas unidas en forma  $\alpha$ -[1-4]. Su forma de cono truncado permite la formación de complejos de inclusión y se la describe habitualmente como un cono truncado, debido a que el borde correspondiente a los hidroxilos primarios es de diámetro más reducido que el borde de los hidroxilos secundarios. La cavidad de la  $\beta$ -CD es hidrofóbica y es característica su tendencia a formar una variedad de complejos de inclusión, en los que la molécula huésped entra parcial o totalmente en la cavidad del macrociclo [5,6]. La complejación de la CD está determinada por diversas interacciones entre el huésped y el ciclo. Estas son

principalmente interacciones de van der Waals, uniones hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, distensión del anillo macrocíclico, efecto electrostático y efecto hidrofóbico. Este proceso de reconocimiento molecular va acompañado con cambios conformacionales o de fuerzas que influyen sobre la molécula de CD y sobre el volumen de agua inicialmente incluida en la cavidad.

Los plaguicidas fosforados como el paratión tuvieron y algunos aún tienen un uso muy difundido, a pesar de su toxicidad. La aplicación del paratión se halla actualmente prohibida, pero su comportamiento químico suscita todavía el mayor interés. Experimentalmente se observó que la hidrólisis del fenitrotión, de metilparatión y del mismo paratión resulta inhibida en presencia de la  $\beta$ -CD [7]. La hidrólisis de los ésteres carboxílicos análogos, en cambio, resulta catalizada. Se sabe [8,9] que la inclusión en la cavidad tanto de los plaguicidas como de los ésteres, ocurre por el extremo del grupo nitro del fenilo y no resulta evidente, por tanto, la razón de los comportamientos diferentes de una y otra familia de huéspedes de la  $\beta$ -CD. Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue, entonces, dilucidar aspectos sobre el proceso de hidrólisis de los plaguicidas tiofosfatos mencionados en presencia de la  $\beta$ -CD.

La complejación por la  $\beta$ -CD del fenitrotión, paratión y metilparatión, y de sus ésteres análogos se analizó usando métodos de mecánica molecular y semiempíricos apropiados. El objetivo de estos cálculos fue aclarar características estructurales y cambios de la energía que acompañan la formación de los complejos, y cómo afectan estos sistemas la hidrólisis del huésped.

Por otro lado, estudios experimentales revelaron que la molécula de  $\beta$ -CD sustituida con L-Triptófano (L-Trp- $\beta$ -CD), tiene la habilidad de reconocer diferencias estructurales, incluso mínimas, de distintos alcoholes cíclicos sobre la base de su tamaño, forma, rigidez e hidrofobicidad [10]. En particular, la formación de los respectivos complejos entre  $\beta$ -CD y los isómeros geométricos 1 y 2-adamantanol favorece al segundo isómero, dado que su constante de estabilidad ( $K_s$ ) prácticamente triplica el valor de la constante obtenida experimentalmente para el primero [10]. Otro aspecto de este trabajo de tesis fue, por lo tanto, el estudio computacional de las propiedades de reconocimiento de tipo molecular y enantiomérico, por parte de la ciclodextrina sustituida, para con diversos alcoholes que incluyeron desde el ciclo pentano hasta el ciclooctano, los adamantanoles recién

mencionados y los alcoholes (+)-mentol y (-)-mentol. El objetivo del estudio de estos complejos fue comprender las claves de tal capacidad de diferenciación por parte del macrociclo.

En general, el propósito de este trabajo fue obtener conocimiento acerca de los complejos de  $\beta$ -ciclodextrina, estudiando la influencia de su presencia sobre las propiedades del huésped. Específicamente, en el caso de los plaguicidas este estudio ayudaría a evitar los efectos perjudiciales de los mismos, y además en el caso de alcoholes cíclicos predecir las diferencias estructurales de estos compuestos. Y en ambos, por último, contribuye a las investigaciones de los complejos originados por medio de macromoléculas.

## **1-2 Complejos de las ciclodextrinas**

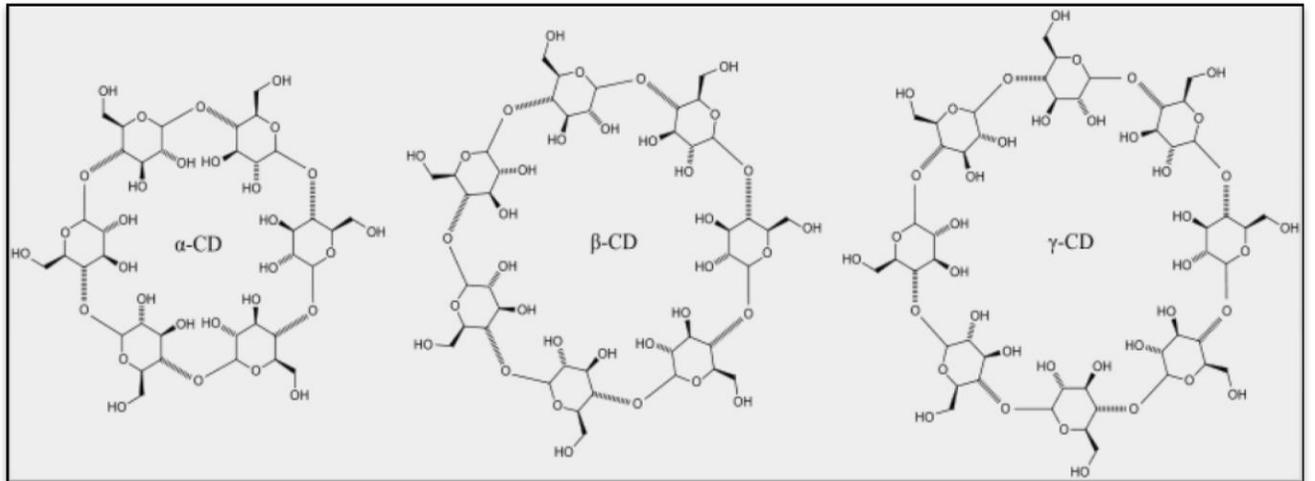
### **1-2-1 Generalidades**

Los complejos de las ciclodextrinas (CDs) con diversos tipos de moléculas, son compuestos del tipo anfitrión o receptor (host) – invitado o huésped (guest), los cuales conforman una de las clases de estructuras pertenecientes al campo de la química supramolecular [2-9].

La degradación enzimática del almidón produce una mezcla de glucosa, maltosa, maltotriosa, etc.; estos son compuestos de una larga serie de cadenas lineales o ramificadas de malto – oligómeros conocidos como dextrinas. Este tipo de degradación es un proceso hidrolítico ya que el producto primario de la separación del enlace glucosídico reacciona con una molécula de agua.

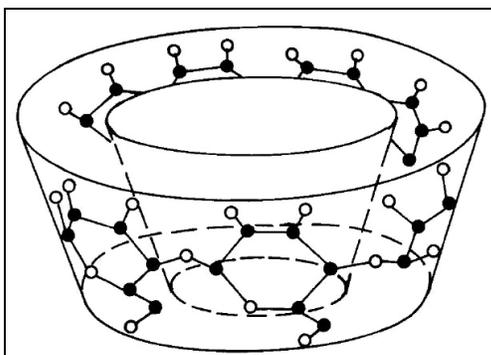
Si en cambio el almidón se degrada por la acción de una enzima glucosiltransferasa, el producto primario de la ruptura de la cadena toma parte de una reacción intramolecular sin la participación de una molécula de agua. En este caso se forman productos cíclicos mediante uniones  $\alpha$ -1,4, los cuales se conocen como ciclodextrinas.

Las tres ciclodextrinas más importantes son la  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, y  $\gamma$ -CD, las cuales están compuestas por 6,7 y 8 respectivamente, D-(+)-glucopiranosas unidas en forma  $\alpha$ -1,4, tal como lo muestra la figura 1.



**Figura 1**

Debido a la conformación C1 de las unidades glucopiranosas, todos los grupos hidroxilos secundarios están situados en uno de los bordes del anillo (el de mayor diámetro) y todos los hidroxilos primarios en el otro (en el de menor diámetro). La cavidad interior se encuentra revestida por los átomos de hidrógeno y los puentes de oxígeno glucosídico respectivamente. Los pares de electrones no enlazantes de estos puentes se encuentran orientados hacia el interior de la cavidad generando una alta densidad electrónica. Entre las propiedades fisicoquímicas del interior de la cavidad se encuentra su carácter hidrofóbico [11] y la existencia de un momento dipolar marcado [12]. El grupo C2-OH de una unidad glucopiranososa puede formar una unión hidrógeno con el grupo C3-OH de la unidad adyacente [13].

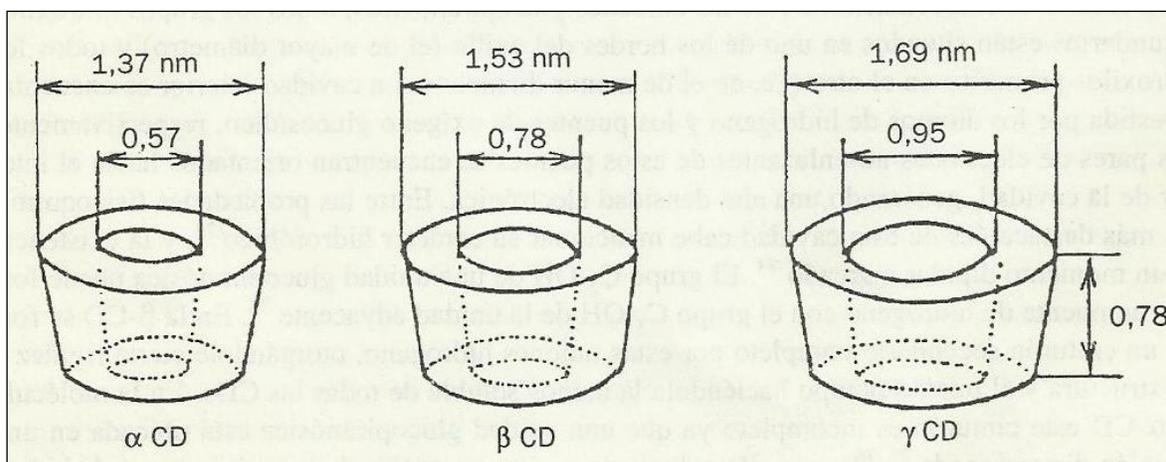


**Figura N°2** detalle de la estructura espacial de la ciclodextrina.

En la  $\beta$ -CD se forma un cinturón secundario completo por estas uniones hidrógeno, otorgándole cierta rigidez a la estructura y haciéndola la menos soluble de todas las CDs.

En la molécula de  $\alpha$ -CD este cinturón es incompleto ya que una unidad glucopiranosica está ubicada en una posición distorsionada [14,15] y por ello solamente se forman cuatro de las seis uniones hidrógeno posibles. La  $\gamma$ -CD no es coplanar, posee una estructura más flexible y en consecuencia es la más soluble de las tres CDs. Los valores experimentales de las constantes de equilibrio para el intercambio hidrógeno–deuterio en la hidrólisis secundaria indican que el sistema más fuerte de uniones hidrógeno es el de la  $\beta$ -CD [16].

Se podría considerar que las CDs tienen una forma cilíndrica, pero la rotación libre de los grupos hidroxílicos primarios reduce el diámetro efectivo de la cavidad del lado donde están ubicados y como resultado de ello es más adecuado asignar a las CDs una geometría cónica. Las dimensiones moleculares aproximadas de las CDs se muestran en la Fig.Nº3.



**Figura N°3:** Dimensiones moleculares de las ciclodextrinas.

La conformación de las CDs es casi idéntica a la existente en el estado cristalino. Las cavidades de las CDs cristalizadas a partir de soluciones acuosas no están vacías sino que

están llenas de moléculas de agua (entre 2 y 8 moléculas) y a su vez otras moléculas de agua son parte del cristal.

Los complejos de inclusión de las CDs se forman por sustitución (total o parcial) del agua incluida por la molécula huésped apropiada.

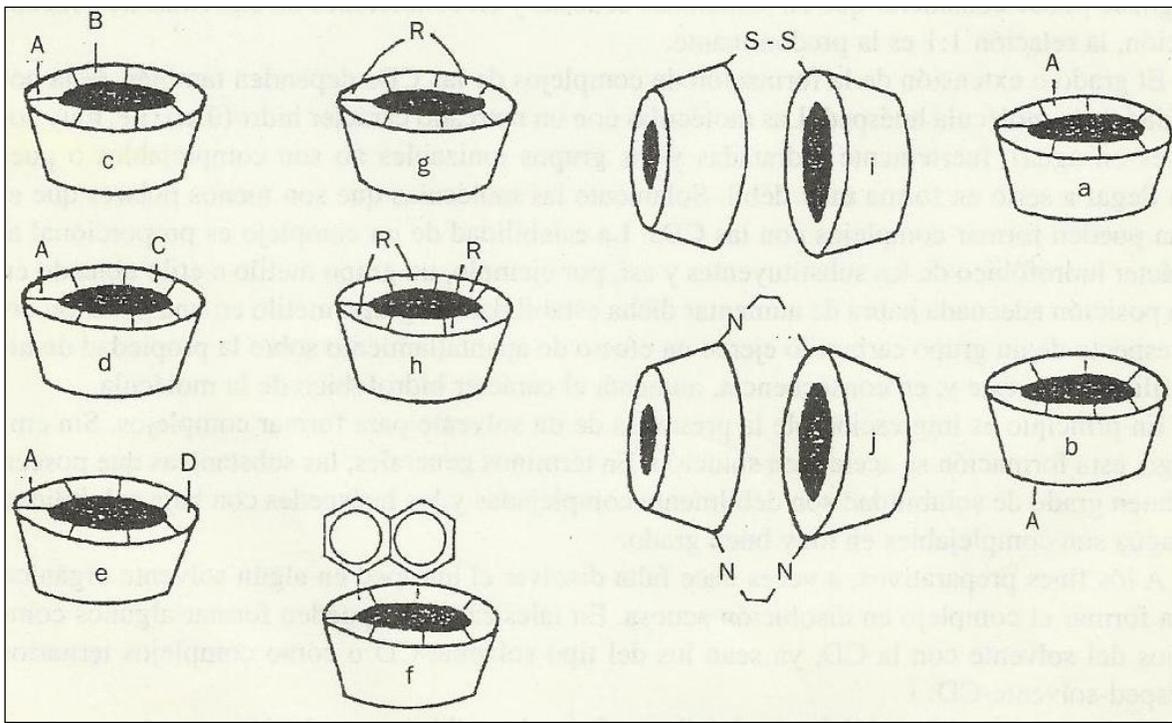
Al eliminarse las moléculas de agua de las CDs se produce una marcada modificación de los respectivos espectros de NMR, difracción neutrónica y de rayos X, lo cual se debe al consecuente cambio del grado de distorsión en los macroanillos. Tampoco en solución se puede considerar que la cavidad de las CDs esté vacía.

Las CDs no poseen grupos terminales reducibles y por ello dan un producto coloreado al reaccionar con antrona. Asimismo, no se forman ni ácido fórmico, ni formaldehído en la reacción con periodato, evidenciando de esta manera que las moléculas no contienen grupos libres terminales [17].

Los derivados de las CDs se pueden obtener mediante las siguientes modificaciones:

- a) Substitución de uno o más átomos de H de los hidroxilos primarios y /o secundarios (ésteres –éteres, glucosil-CDs).
- b) Substitución de uno a más hidroxilos primarios o secundarios (desoxi-halógeno, amino, etc.):
- c) Eliminación de los átomos de H del grupo  $C_5-CH_2OH$  ( $C_5-COOH$ ) y ruptura de uno o más enlaces  $C_2-C_3$  por oxidación con periodato (CD-dialdehído o luego de la reducción éteres macro coronas).

La Figura N° 4 ilustra esquemáticamente algunas variedades estructurales de los derivados de CDs.



**Figura N°4:** Estructuras de los derivados de las ciclodextrinas. **a:** monosustituido sobre el lado de los hidroxilos secundarios; **b:** monosustituido sobre el lado de los hidroxilos primarios; **c:** disustituidos A-B; **e y d :**disustituido A-D y A-C; **f:**anexado; **g:**coronado; **h:**doblemente coronado, **i:** doble con un solo puente; **j:**doble con dos puentes.

Los complejos de inclusión son compuestos moleculares que poseen la estructura características de un aducto, en el cual un compuesto (molécula anfitriona o receptora) encierra espacialmente y contiene de un modo total o parcial a otra (huésped o invitada). El compuesto encerrado se sitúa en una cavidad que provee el anfitrión y modifica en grado variable la estructura de este. O sea que las medidas y la forma de la cavidad disponible sufren distintos tipos y grados de deformaciones según sea la naturaleza de la molécula incluida. Estos complejos de inclusión de las CDs se forman cuando se satisfacen varios requerimientos en la relación receptor – huésped. Uno de ellos es que los sitios de unión de ambas moléculas deben ser esteroelectrónicamente complementarias. La propiedad característica de la molécula anfitriona es que sus sitios de unión están orientados en la misma dirección espacial mientras que los de la moléculas huésped lo están de un modo divergente en el complejo por lo tanto la asociación de estos lugares de unión convergente

y divergentes determina la base esencial de la formación de estos complejos de inclusión donde se establecen uniones químicas no covalentes entre el receptor y el invitado.

Naturalmente las CDs forman complejos con aquellos compuestos que además de satisfacer los requerimientos de complementariedad estereoelectrónica posean dimensiones compatibles con las de las respectivas cavidades [19] y por ende los factores geométricos son decisivos al momento de determinar qué moléculas invitadas pueden penetrar dentro de las cavidades de las CDs.

Las estructuras de los complejos de inclusión de las CDs son significativamente distintas en estado cristalino y en solución. En este último caso la molécula huésped reside en la cavidad que puede albergar al mismo tiempo un par de moléculas del solvente y todo el complejo está rodeado por una capa de solvatación de moléculas de agua.

En el estado cristalino se da una situación diferente ya que no sólo se acomodan las moléculas huéspedes en la cavidad accesible sino también en las cavidades intermoleculares formadas por el retículo cristalino o entre dos moléculas de complejo en una disposición tipo “emparedado”. Inclusive algunas moléculas de las CDs permanecen sin ocupar o incluyen solamente agua. Como consecuencia de estas características, los complejos cristalinos raramente tienen una composición estequiométrica, mientras que en solución las relaciones molares son generalmente 1:1.

Las moléculas incluidas se orientan normalmente dentro del receptor, de modo tal de posicionarse favorablemente para alcanzar un contacto máximo con la parte hidrofóbica del anfitrión. La parte hidrofílica de la molécula huésped permanece en la zona exterior del complejo tanto como le sea posible. De esta manera, la molécula huésped se asegura un máximo contacto con el solvente y con los grupos hidroxílicos del anfitrión.

Es posible la formación de complejos con moléculas cuyas dimensiones exceden con holgura las de las cavidades de las CDs. Esto sucede cuando solamente penetran en la cavidad del carbohidrato ciertos grupos o cadenas laterales del huésped, los que a su vez, deben hallarse en una disposición espacial libre de obstrucción o impedimento estérico por parte de otros grupos voluminosos.

De acuerdo con ciertas consideraciones teóricas [20] y varias observaciones experimentales, los complejos de las CDs en estado puro están caracterizados por

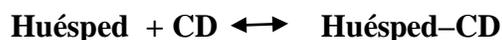
relaciones anfitrión: huésped bien definidas y estrictamente constantes. Sin embargo, en la realidad de los hechos varios factores tienden a variar la composición ideal del complejo. Así en solución, el equilibrio asociación /disociación determina la relación complejo / sin complejar para el huésped y el receptor. Como en cualquier equilibrio de complejos, a su vez, la dependencia de las dimensiones y de la forma del anfitrión hace que puedan coexistir en solución complejos de relación estequiométrica 1:2, 2:1 o 2:2, además de la habitual 1:1. Al mismo tiempo, esto dependerá de la concentración de CD y/o del huésped. Sin embargo, se puede considerar que en soluciones acuosas y en condiciones no extremas de concentración, la relación predominante es la de 1:1.

El grado o extensión de la formación de las CDs dependen también de la polaridad de la molécula huésped. Las moléculas con un marcado carácter hidrofílico (por ejemplo muy solubles en agua), fuertemente hidratadas y los grupos ionizables no forman fácilmente un complejo y si lo forman son compuestos débiles. Solamente las moléculas que son menos polares que el agua pueden formar complejos con las CDs.

La estabilidad de un complejo de este tipo es proporcional al carácter hidrofóbico de los sustituyentes y así por ejemplo un grupo metilo o etilo ubicado en una posición adecuada habrá de aumentar dicha estabilidad; un grupo metilo en la posición orto respecto de un grupo carbonilo ejerce un efecto de apantallamiento sobre la propiedad de hidrofilidad de este, y en consecuencia, aumenta el carácter hidrofóbico de la molécula.

En principio, no es imprescindible la presencia de un solvente para formar complejos. Sin embargo, esta formación se acelera en solución. En términos generales, las sustancias que tienen un alto grado de solubilidad en agua son débilmente complejadas y los huéspedes con baja solubilidad en agua son complejables fácilmente. Experimentalmente, a veces hace falta utilizar algún solvente orgánico para disolver el huésped y luego formar el complejo en disolución acuosa. Hay que regular el tipo de solvente porque si no, en estos casos, se pueden formar algunos complejos del solvente con la CD ya sean los tipos solvente –CD o como complejos ternarios huésped –solvente –CD.

El equilibrio del complejo se puede considerar de la siguiente forma



No existe una correlación directa entre la estabilidad del complejo en solución y su grado de solubilidad. Por otra parte, los complejos de baja estabilidad pueden resultar fácilmente cristalizables de su solución y los complejos muy estables pueden llegar a ser difíciles de aislar. Lo opuesto también se cumple. Cuando se detecta la existencia en solución acuosa de un complejo de CD bien definido, ello no significa necesariamente que el producto sólido aislado, ya sea por cristalización o por deshidratación por congelamiento, también sea un verdadero complejo de inclusión. Todas las peculiaridades hacen que no existan métodos preparativos universales y que el procedimiento a seguir se deba ajustar en cada caso, según las características de la molécula huésped.

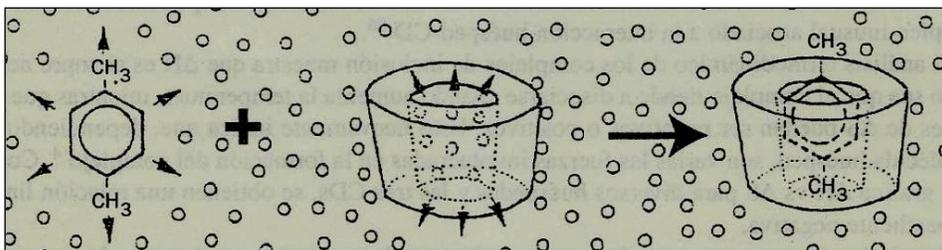
La inclusión de un huésped en la cavidad de la CD en solución es esencialmente un proceso de sustitución de moléculas de agua incluidas en la cavidad por la del huésped menos polar (ver Figura 5). Este proceso es una interacción energéticamente favorecida de la molécula incluida, relativamente no polar, con la cavidad hidrofóbica parcialmente solvatada, en la cual tanto los cambios entrópicos como los entálpicos juegan un papel relevante.

Si bien se han realizado muchos estudios vinculados a la determinación de la naturaleza de las fuerzas que se originan en el proceso de complejamiento, puede quedar alguna cuestión todavía sin resolver [11, 12, 15, 21,-24]. En lo que sí hay acuerdo es que son varias y bastante diversas las contribuciones posibles a la unión química entre el huésped y la CD, siendo las más importantes las que se enuncian a continuación:

- Interacciones tipo van der Waals.
- Uniones hidrógeno.
- Interacciones dipolo- dipolo.
- Impulsión hidrofóbica
- Liberación de agua de mayor energía desde la cavidad.
- Liberación de energía de tensión del anillo macrocíclico
- Efectos de tensión solvente – superficie.

Como puede apreciarse, son variadas las fuerzas que eventualmente se deben considerar en cada paso. El papel de la sustitución del agua por un huésped de dimensiones, forma y polaridad apropiadas parece ser universal. Las CDs se pueden considerar como hidrofóbicas en el sentido de que su solubilidad aumenta levemente cuando se agrega al agua una pequeña cantidad de un solvente apolar. Esto demuestra que la cavidad de la CD es hidrofóbica en relación al agua [25]. La solvatación de esta región hidrofóbica está lejos de ser ideal.

Las moléculas de agua localizadas en la cavidad de la CD no pueden satisfacer su capacidad de formar uniones hidrógeno tetraédricas, tal como sucede en el seno del solvente. Entonces se las puede considerar como moléculas de energía o entalpía acrecentada.



**Figura N° 5** Representación esquemática del complejo de inclusión de la ciclodextrina, un ejemplo, el p-xileno es una molécula huésped y los círculos pequeños representan las moléculas de agua.

Se logra una disminución de energía del sistema por el aumento de interacción solvente – solvente ya que el contacto superficial entre el solvente y el huésped, así como entre el solvente y la cavidad se reduce con el ingreso del huésped en esta última [26]. La liberación de la energía de tensión del macrociclo, o sea la transición del anillo de CD del estado tensionado a otro más relajado por la penetración del huésped, parece ser cuantitativamente significativa solo en el caso de la  $\alpha$ -CD. Las  $\beta$ -CD y las  $\gamma$ -CD “vacías” no se encuentran tensionadas.

La formación de un complejo de inclusión con CDs comprende las siguientes etapas elementales [19, 22, 26,27].

- ❖ Las moléculas de agua salen de la cavidad de la CD y pasan a un nivel energético correspondiente al estado gaseoso. Como consecuencia de ello, disminuye el número de uniones hidrógeno y de interacciones de van der Waals, mientras que aumentan los grados de libertad rotacional de las moléculas de agua.
- ❖ Disminuye la energía conformacional del anillo de la CD por relajación, especialmente para la  $\alpha$ -CD.
- ❖ La molécula huésped apolar se desprende de su capa de solvatación y también asume el estado de un gas ideal. La capa hidratada vacía colapsa y se reordena.
- ❖ La molécula huésped, considerada en el estado de gas ideal, se introduce en la cavidad vacía de la CD y el complejo se estabiliza estableciendo interacciones del tipo van der Waals y eventualmente uniones hidrógeno. La molécula huésped retiene un grado de libertad rotacional.
- ❖ Las moléculas de agua desplazadas se condensan (pasan del estado gaseoso al estado líquido). Los cambios de entalpía y entropía se consideran iguales a los de la sustancia pura.
- ❖ Se restablece la estructura del agua alrededor de la parte expuesta de la molécula huésped y se integra con la capa de hidratación del anillo de la CD.

Si bien los aportes individuales de cada tipo posible entre la CD y el huésped son pequeños, el establecimiento de un número grande de uniones débiles permite alcanzar una estabilidad

al complejo que es análoga a la suministrada por la unión de tipo covalente. Naturalmente, la contribución de cada clase de unión dependerá del tipo de CD y del huésped particular.

Sí consideramos atentamente la interacción hidrofóbica o solvofóbica, el agua desempeña un papel esencial en la formación del complejo, ya que la hidratación de este se encuentra energéticamente favorecida cuando se la compara con la hidratación de cada componente por separado. Este fenómeno se llama “interacción hidrofóbica” y no se debe a la atracción mutua de dos componentes sino que es debida a la cohesión intrínseca del agua.

El papel de la unión hidrógeno no es universal pues también se forman complejos estables con huéspedes tales como el benceno que no puede establecer este tipo de enlace químico. Por otra parte la inclusión restringe moderadamente la rotación libre alrededor del eje de simetría de la molécula incluida. Esta restricción en la rotación es uno de los componentes del término entrópico inusual asociado a la interacción huésped – CD [21].

El análisis termodinámico de los complejos de inclusión muestra que  $\Delta H$  es siempre negativa, o sea que el complejo tiende a disociarse cuando aumenta la temperatura, mientras que los valores de  $\Delta S$  pueden ser negativos o positivos. Esto nuevamente indica que, dependiendo de la molécula huésped, son varias las fuerzas involucradas en la formación del complejo [18]. Cuando se grafica  $\Delta H$  vs  $\Delta S$  para diversos huéspedes y las tres CDs, se obtienen una relación lineal con pendiente negativa.

Uno de los factores que contribuyen al cambio entrópico es el agua. A partir de una situación inicial de rodear a la molécula huésped apolar de una manera ordenada, el agua finaliza en un estado desordenado. Al mismo tiempo, hay una pérdida de los grados de libertad translacionales y rotacionales debido a la asociación de las dos moléculas. Estos dos factores opuestos son de magnitud semejante, de modo que el cambio neto de entropía es muy pequeño o nulo.

El cambio entálpico también se debe a varios factores. La pérdida de las moléculas de agua altamente ordenadas en derredor del sustrato orgánico es desfavorable ya que esto puede originar un decrecimiento en el número de uniones hidrógeno en el sistema. Esto se compensa casi totalmente por el cambio entálpico favorable debido a la separación de las moléculas de agua en la molécula huésped. Las moléculas de agua con energía alta separadas de la cavidad de CD se integran al seno del solvente con el consiguiente aumento de uniones solvente –solvente [28].

La alta densidad electrónica prevaleciente dentro de la cavidad de la CD moviliza a los electrones de la molécula incorporada. Como consecuencia de ello resultan cambios característicos en varias propiedades espectrales tanto en el huésped como en el anfitrión [29]. De especial importancia es la espectroscopia de NMR, ya que en base a ella se puede determinar qué átomos del huésped se encuentran localizados dentro de la cavidad de las CDs y además cómo se encuentran orientados. Como el huésped no se encuentra inmovilizado dentro de la CD, su movilidad en la cavidad se puede monitorear determinando la relajación del  $^1\text{H}$  y del  $^{13}\text{C}$ .

Algunos resultados experimentales parecen indicar que los complejos de los compuestos con  $\alpha$ -CD son sistemas débilmente acoplados en el aspecto dinámico o sea que las moléculas del huésped y el anfitrión puede realizar movimientos moleculares diferenciados. Esto se puede explicar en base al hecho de que las fuerzas responsables de la interacción de las dos especies poseen poca especificidad direccional.

Un complejo ternario es aquél con dos huéspedes distintos, ninguno de los cuales es agua, que se incorporan a la misma cavidad de la CD. En algunos casos se registra al hecho de que moléculas que no poseen la capacidad de formar complejos binarios pueden incorporarse a la cavidad de la CD, aun con otra molécula más [30].

Los métodos fisicoquímicos que se utilizan en el estudio experimental de las CDs y sus complejos de inclusión, varían desde cristalografía de rayos X [31], espectroscopia NMR, espectroscopia ESR [32], métodos electroquímicos[24,25], medidas cinéticas termodinámicas [22,23,35,37], termogravimetría, calorimetría de barrido diferencial, espectroscopia IR y UV, espectrometría de fluorescencia, dicroísmo circular, difracción de neutrones, doble resonancia electrónica (ENDOR) y espectroscopia Raman.

### **1-2-2 Aplicaciones de los Complejos de Ciclodextrinas.**

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos naturales que se descubrieron hace menos de 100 años atrás [38] sin embargo solo recientemente fueron purificadas y están disponibles y se utilizan como excipiente.

En la industria farmacéutica han sido principalmente usadas como agentes complejantes para aumentar la solubilidad acuosa de fármacos poco solubles, y para favorecer su biodisponibilidad y su estabilidad. Además, las ciclodextrinas pueden, reducir la irritación gastrointestinal que producen algunos principios activos, modificar los medicamentos líquidos y convertirlos en un polvo amorfo o microcristalino. También se pueden prevenir las interacciones del tipo fármaco-fármaco y las interacciones del tipo fármaco-excipientes. En el mercado mundial se encuentran 30 productos farmacéuticos diferentes que contienen CDs. Un número importante de libros y de artículos de revisión se han publicado en las aplicaciones farmacéuticas de las ciclodextrinas [39-51].

Debido a la forma silla de las unidades de glucopiranosas, las moléculas de ciclodextrina tienen la forma de conos con grupos hidroxilos secundarios que se extiende en el borde más amplio y los grupos primarios que se extienden en el borde estrecho. Esto da a las moléculas de las ciclodextrinas una superficie exterior hidrofílica, Considerando que la lipofilia de su cavidad central es comparable a una solución etanólica acuosa [41].

Las CDs más común son las que constan de seis unidades ( $\alpha$ -ciclodextrina), siete ( $\beta$ -ciclodextrina) y ocho unidades ( $\gamma$ -ciclodextrina) de glucopiranosas. Aunque las ciclodextrinas naturales y sus complejos son hidrófilos, su solubilidad acuosa es bastante limitada, especialmente la de  $\beta$ -ciclodextrina. Esto se cree que es debido a una unión relativamente fuerte de las moléculas de ciclodextrina en su estado cristalino (es decir, su energía reticular cristalina es relativamente alta) [42].

La sustitución aleatoria de los grupos hidroxilos, incluso por restos como lo son el metóxido, resultará en un dramático cambio en su solubilidad (Tabla N°1).

La principal razón para la mejora de su solubilidad es que la sustitución aleatoria transforma las ciclodextrinas cristalinas en mezclas racémicas de derivados isoméricos. Derivados de ciclodextrina de interés farmacéutico incluyen los derivados de ciclodextrinas hidroxipropilo de  $\beta$ -y  $\gamma$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina metilada en forma aleatoria, la  $\beta$ -ciclodextrina sulfobutiléter, y la denominada ciclodextrinas ramificadas tales como glucosil- $\beta$ -ciclodextrina.

Tabla N°1. Ciclodextrinas: Solubilidad y Aplicación en los productos farmacéuticos.

Tipos	Sustitución *	Masa molecular en Dalton	Solubilidad en agua a 25°C mg/mL	Aplicación
$\alpha$ -Ciclodextrina	-	972	145	Oral, parenteral, tópica
$\beta$ -Ciclodextrina	-	1135	18.5	Oral, tópica
2-Hidroxiopropil- $\beta$ -Ciclodextrina	0.65	1400	>600	Oral, parenteral, tópica
$\beta$ -Ciclodextrina metilada en forma aleatoria	1.8	1312	>500	Oral, tópica
Ciclodextrina sulfobutiléter sal sódica	0.9	2163	>500	Oral, parenteral, tópica
$\gamma$ -Ciclodextrina	-	1297	232	Oral, parenteral, tópica
2-Hidroxiopropil- $\gamma$ -Ciclodextrina	0.6	1576	>500	Oral, parenteral, tópica

\*Número promedio de sustituyentes por unidad de glucopiranososa.

Las moléculas de ciclodextrina son relativamente grandes (masa molecular de 1000 a 2000 Dalton) y son poco absorbidas a través de las membranas biológicas. La  $\gamma$ -ciclodextrina no puede ser hidrolizada por amilasas humanas salivales y pancreáticas, en cambio en el caso de las  $\alpha$ -y  $\beta$ -ciclodextrina es posible [52,53], pero las tres están sometidas a la fermentación de la microflora intestinal. Las ciclodextrinas hidrofílicas no son tóxicas a bajas y moderada dosis orales [44,48]. Las ciclodextrinas naturales y sus derivados se utilizan en formulaciones tópicos y orales, pero sólo las  $\alpha$ -ciclodextrina y los derivados hidrófilos de  $\beta$ -y  $\gamma$ -ciclodextrina se pueden utilizar en las formulaciones parenterales.

Las preparaciones parenterales son preparaciones estériles destinadas a su administración por inyección, perfusión o implantación en el cuerpo humano. Como no pierden concentración como las orales en el proceso de metabolización y llegan directamente al torrente sanguíneo, deben ser muy seguras en cuanto a la no toxicidad.

La  $\gamma$ -ciclodextrina forma agregados visibles en soluciones acuosas y, por lo tanto, no es adecuada para formulaciones parenterales [54]. Debido a su nefrotoxicidad, la  $\beta$ -ciclodextrina no se puede utilizar en formulaciones parenterales. Los derivados lipofílicos de la ciclodextrina, tales como las ciclodextrinas metiladas son en cierta medida absorbidos desde el tracto gastrointestinal a la circulación sistémica y se ha demostrado que es tóxico en la administración parenteral [44]. Actualmente, la administración oral de  $\beta$ -ciclodextrina metilada es limitada por su potencial de toxicidad.

Las monografías de la ciclodextrina se pueden encontrar en varias farmacopeas. Por ejemplo,  $\alpha$ -ciclodextrina y  $\beta$ -ciclodextrina se enumeran en la Farmacopea de los EE.UU., Farmacopea Europea y en la Farmacopea Japonesa. Y la  $\gamma$ -ciclodextrina pronto será incluido en la Farmacopea de EE.UU. y, posteriormente, en la Farmacopea europea. La monografía del 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina recientemente apareció en la Farmacopea Europea. La  $\beta$ -ciclodextrina y  $\gamma$ -ciclodextrina también se enumeran como compuestos "generalmente considerados como seguros en la lista de la FDA para su uso como aditivo alimentario".

En soluciones acuosas las ciclodextrinas son capaces de formar complejos de inclusión con muchos fármacos mediante la adopción de una molécula del fármaco, o más frecuentemente con algún resto lipofílico de la molécula, en la cavidad central. [55, 56,57]. Otra aplicación muy importante es el uso de la formación de estos complejos como herramienta en técnicas analíticas en diversos métodos instrumentales.

Las más comunes son en Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) y en electroforesis capilar (EC), en donde las CDs se utilizan en las columnas y capilares de estos métodos separativos y de cuantificación. En cuanto la capacidad de discernir en la estructura espacial se utiliza en la determinación de isómeros en columnas de cromatografía denominadas quirales las cuales se pueden conseguir en el mercado, y más amplio y variado es su uso en electroforesis capilar, en esta técnica el operador arma el capilar y puede desarrollar diferentes métodos de separación muy eficientes. Los resultados

experimentales provenientes del empleo de todas estas técnicas forman un rico y diverso sustrato para completar los hallazgos provenientes de los estudios teóricos y viceversa.

## Capítulo N°II

*Pienso que una partícula debe tener una realidad separada, independiente de las mediciones. Es decir un electrón tiene espín, localización y demás. Aunque no esté siendo medido.*

*Me gusta pensar que la luna está ahí aunque no la esté mirando.*

*Albert Einstein.*

### 2-1 Métodos teóricos

#### 2-1-2 Generalidades

Con el fin de encontrar un grado adecuado de comprensión acerca de la capacidad que poseen las CDs para unirse a una o más moléculas huéspedes, es necesario conocer detalladamente a nivel molecular el origen e interrelación de las fuerzas que operan en estos complejos de inclusión así como las respectivas geometrías relativas de los grupos funcionales reactivos que se aproximan en el acto de unión. Si bien puede obtenerse una buena cantidad de información valiosa a partir de las medidas experimentales, estas no son suficientes como para acceder a una visión completa y abarcativa de todos los aspectos atinentes al fenómeno del enlace químico.

De tal forma, el modelado molecular suministra un medio poderoso y versátil, a la vez que suma al arsenal de métodos experimentales señalados en el capítulo anterior para el estudio de las CDs y sus complejos de inclusión.

La evolución de los equipos informáticos ha puesto a disposición del usuario un gran potencial computacional en prácticamente todos los campos de la química. Las computadoras personales en la actualidad tienen una velocidad de cálculo y una capacidad de almacenamiento que superan holgadamente a los supercomputadoras antiguas. La Química Computacional y el Modelado Molecular son áreas de la Química Teórica con énfasis en los problemas moleculares orientados a las aplicaciones y ayudan a comprender y resolver una amplia gama de sistemas. Por lo tanto, se trata de áreas que, de manera casi natural, han permeado en otras ciencias aplicadas como, por ejemplo, en el estudio de suelos.

La mayoría de los estudios de modelado molecular se desarrolla en tres etapas [58].

En la primera etapa se selecciona un modelo para describir las interacciones intra e inter-moleculares en el sistema. Dos modelos muy comunes que se utilizan son la mecánica cuántica (QM) y mecánica molecular (MM). Estos modelos permiten calcular la energía de cualquier arreglo de átomos y moléculas en un sistema, y permiten que el investigador determine, por ejemplo, cómo se modifica la energía del sistema al variar las posiciones de las partículas que lo constituyen.

La segunda etapa de un estudio de modelado molecular es el cálculo mismo, esto es, la minimización de la energía, o una dinámica molecular o una simulación Monte Carlo, o una búsqueda conformacional.

Por último, los resultados del cálculo deben ser analizados, no solo para hallar otras propiedades, sino también para comprobar que se ha procedido de manera correcta.

Las aproximaciones más importantes para la obtención de propiedades moleculares en este marco son por un lado, los métodos ab initio y la teoría funcional de la densidad (DFT), y los métodos semiempíricos; por el otro, los métodos de mecánica molecular.

### **2-1-3 Breve descripción de los métodos.**

Una molécula puede considerarse como un número de electrones alrededor de núcleos cargados positivamente; la atracción coulombica entre estos dos tipos de partículas constituye la base para la formación de átomos y moléculas. El potencial entre dos partículas de cargas  $q_i$  y  $q_j$  separadas una distancia  $r_{ij}$  viene dado por la siguiente expresión:

$$V_{ij} = V(r_{ij}) = \frac{q_i \cdot q_j}{r_{ij}} \quad \text{Ec. N}^\circ 1$$

También se necesita una expresión para describir la evolución del sistema en el tiempo.

En la mecánica clásica, esto viene dado por la segunda ley de Newton:

$$\mathbf{F} = m \cdot \mathbf{a}$$

$$-\frac{dV}{dr} = m \frac{d^2r}{dt^2}$$

Los electrones no pueden, sin embargo, describirse con la mecánica clásica. Por su comportamiento dual de características ondulatorias y de partículas, pueden analizarse en términos de una función de onda  $\Psi$ . La ecuación de la mecánica cuántica correspondiente a la segunda ley de Newton es la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo

$$\mathbf{H} \Psi = i\hbar \frac{\delta \Psi}{\delta t}$$

Donde  $\hbar$  es la constante de Planck dividido por  $2\pi$ .

Si el operador hamiltoniano es independiente del tiempo, la dependencia temporal de la función de onda puede separarse y escribirse como un factor de fase; veamos:

$$\mathbf{H}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{H}(\mathbf{r})$$

$$\Psi(\mathbf{r}, t) = \Psi(\mathbf{r}) \cdot e^{-iEt/\hbar}$$

$$\mathbf{H}(\mathbf{r}) \Psi(\mathbf{r}) = E \Psi(\mathbf{r})$$

La ecuación de Schrödinger independiente del tiempo describe la dualidad onda-partícula; el cuadrado de la función de onda da la probabilidad de encontrar la partícula en una determinada posición.

Para un sistema de N partículas, el operador Hamiltoniano contiene la energía cinética (T) y la energía potencial (V) para todas las partículas.

$$\mathbf{H} = \mathbf{T} + \mathbf{V}$$

$$\mathbf{T} = \sum_{i=1}^N \mathbf{T}_i = \sum_{i=1}^N \frac{\hbar^2}{2m_i} \nabla_i^2$$

$$\nabla_i^2 = \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2}$$

$$\mathbf{V} = \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \mathbf{V}_{ij}$$

Donde el operador energía potencial es el potencial de coulomb, es decir la ecuación N° 1. Como los núcleos son mucho más pesados que los electrones, su velocidad es mucho menor. Esto permite realizar una aproximación: la ecuación de Schrödinger se separa en una parte que describe la función de onda electrónica para una geometría nuclear fija, y una parte que describe la función de onda nuclear, donde la energía correspondiente a la función de onda electrónica representa una energía potencial. Esta separación se conoce como la aproximación de Born-Oppenheimer (BO).

La función de onda electrónica depende paramétricamente de las coordenadas nucleares, y solamente de las posiciones de los núcleos y no de sus momentos. La aproximación de Born-Oppenheimer [59] desacopla el movimiento de los electrones del de los núcleos dando dos ecuaciones independientes.

Los núcleos se mueven sobre superficies de energía potencial (PES, por sus siglas en inglés), constituidas por diferentes soluciones de la ecuación de Schrödinger.

Con las coordenadas nucleares denotadas mediante  $\mathbf{R}$  y subíndice  $n$ , y las coordenadas electrónicas mediante  $\mathbf{r}$  y subíndice  $e$ , se puede expresar lo anterior como:

$$\begin{aligned} \mathbf{H}_{\text{tot}} \Psi_{\text{tot}}(\mathbf{R}, \mathbf{r}) &= \mathbf{E}_{\text{tot}} \Psi_{\text{tot}}(\mathbf{R}, \mathbf{r}) \\ \mathbf{H}_{\text{tot}} &= \mathbf{H}_e + \mathbf{T}_n \\ \mathbf{H}_e &= \mathbf{T}_e + \mathbf{V}_{ne} + \mathbf{V}_{ee} + \mathbf{V}_{nn} \\ \Psi_{\text{tot}}(\mathbf{R}, \mathbf{r}) &= \Psi_n(\mathbf{R}) \Psi_e(\mathbf{R}, \mathbf{r}) \\ \mathbf{H}_e \Psi_e(\mathbf{R}, \mathbf{r}) &= \mathbf{E}_e(\mathbf{R}) \Psi_e(\mathbf{R}, \mathbf{r}) \\ (\mathbf{T}_n + \mathbf{E}_e(\mathbf{R})) \Psi_n(\mathbf{R}) &= \mathbf{E}_{\text{tot}} \Psi_n(\mathbf{R}) \end{aligned}$$

La aproximación BO es generalmente muy buena, en especial para núcleos más pesados.

Por lo tanto, la ecuación mecano-cuántica fundamental para determinar las propiedades de los sistemas atómicos y moleculares es la ecuación de Schrödinger, aquí independiente del tiempo:

$$\mathbf{H} \Psi = \mathbf{E} \Psi$$

Donde  $\mathbf{H}$  es el hamiltoniano para el sistema,  $\Psi$  es la función de onda que lo describe y  $\mathbf{E}$  es la energía correspondiente. La solución analítica de la ecuación de Schrödinger sólo es

posible para unos pocos casos simples, pero los programas actuales de computación que se han ido desarrollando permiten el tratamiento cuántico de átomos y moléculas complejos.

Los cálculos ab initio utilizan el hamiltoniano completo y correcto y no utilizan otros datos experimentales, salvo las constantes físicas fundamentales. Una alternativa, el método de resolución mediante el funcional de la densidad, no tiene por meta hallar la función de onda molecular, sino que calcula la densidad de probabilidad electrónica  $\rho$  ( $\rho$ ) y calcula la energía electrónica molecular a partir de  $\rho$  [67]. Los métodos ab initio y el de la Teoría Funcional de la Densidad (DFT) [58] son computacionalmente más costosos, pero por lo general producen los resultados más confiables.

Los métodos semiempíricos son menos costosos computacionalmente, utilizan un hamiltoniano más simple en la ecuación Schrödinger pero, para una aplicación exitosa, requieren de un conjunto de parámetros. Estos métodos tratan la ecuación para el movimiento electrónico como en un cálculo ab initio, pero aproximan muchas de las integrales involucradas mediante parámetros cuyos valores se asignan sobre la base de cálculos ab initio o de datos experimentales.

Los métodos semiempíricos pueden ser categorizados considerando su nivel de precisión. Si la parametrización es buena, el cálculo proporciona una descripción del sistema molecular y una predicción de su energía razonablemente aceptables.

Métodos como el MNDO [61], el AM1 [62] y PM3 [63] son parametrizaciones del modelo anterior NDDO [64], cuya mejora, en comparación con modelos precedentes, fue que las propiedades electrostáticas de los pares electrónicos libres, se hallan mejor descriptas.

El modelo MNDO fue superado por los modelos AM1 y PM3, persistiendo sin embargo algunas limitaciones. Por ejemplo, interacciones más débiles como las uniones hidrógeno no siempre se predicen bien. Aun así, los métodos semiempíricos son adecuados para calcular propiedades de series de moléculas similares [65].

Los métodos de origen clásico, que consideran campos de fuerza y potenciales interatómicos, es decir los métodos de mecánica molecular (MM), son los menos costosos de implementar computacionalmente. No son métodos cuánticos, no utilizan el operador

hamiltoniano ni buscan una función de onda molecular para el sistema a tratar. Se basan en el ajuste de parámetros empíricos. Las moléculas son generalmente visualizadas como un conjunto de átomos conectados por uniones, y la energía molecular se expresa como una suma de términos generalmente denotados:

$$\mathbf{E}_{\text{total}} = \mathbf{E}_{\text{enlace}} + \mathbf{E}_{\text{est.}} + \mathbf{E}_{\text{tors}} + \mathbf{E}_{\text{vdw}} + \mathbf{E}_{\text{elec}} + \mathbf{E}_{\text{otras}}$$

En la expresión anterior,  $\mathbf{E}_{\text{enlace}}$  y  $\mathbf{E}_{\text{est.}}$  son las contribuciones de energía debidas al estiramiento y compresión de las uniones entre átomos y a la flexión de los ángulos de unión.  $\mathbf{E}_{\text{tors}}$  es la contribución debida a cambios torsionales,  $\mathbf{E}_{\text{vdw}}$  es el término de energía debido a las interacciones de van der Waals y  $\mathbf{E}_{\text{elec}}$  es la contribución debida a las interacciones electrostáticas.  $\mathbf{E}_{\text{otras}}$  describe términos cruzados u otras condiciones especiales, por ejemplo, uniones hidrógeno. La forma matemática de estos términos de energía varía según el campo de fuerzas considerado. La función potencial del sistema depende de las posiciones relativas de los átomos y la energía se obtiene en función de la conformación del sistema. Los métodos difieren en la complejidad de las funciones de energía potencial utilizadas para calcular las contribuciones de la energía y por la calidad de los parámetros del campo de fuerzas [66]

Los dos métodos más comunes utilizados en las técnicas de simulación molecular son la dinámica molecular (MD) y el método Monte Carlo (MC).

MD es una técnica de simulación de computación donde la evolución en el tiempo de un conjunto de partículas que interactúan (átomos, moléculas) está en relación con la integración de sus ecuaciones de movimiento, siguiendo las leyes de la mecánica clásica [58,59]. Las velocidades son gobernadas por las fuerzas que los átomos del sistema ejercen entre sí. La fuerza sobre un átomo puede ser calculada a partir de la diferencia en la energía, cambiada de signo, entre su posición actual y su posición a una pequeña distancia. El conocimiento de las fuerzas atómicas y las masas puede utilizarse para resolver las ecuaciones y para dar las posiciones de cada átomo a lo largo de una serie de pasos de tiempo extremadamente pequeños del orden de femtosegundos ( $10^{-15}$  segundos). La serie resultante de instantáneas de los cambios estructurales en el tiempo se denomina trayectoria. Aunque determinista, MD es un método de mecánica estadística: es un medio para obtener un conjunto de configuraciones distribuidas de acuerdo con alguna estadística,

una función de distribución, o un conjunto estadístico. Una trayectoria obtenida por MD proporciona un conjunto de configuraciones, y el valor de una magnitud física se obtiene como una media aritmética de sus valores instantáneos arrojados durante la ejecución de MD.

El método MC [58,59] comienza a partir de una geometría dada, y una nueva configuración se genera haciendo cambios aleatorios en las posiciones de uno o más átomos. La nueva geometría se acepta como punto de partida para el paso siguiente, en el caso de que la energía sea más baja que la actual. Si es superior, se evalúa si puede existir en equilibrio con configuraciones de menor energía potencial a una temperatura dada. Se hace calculando la relación de las poblaciones de los dos estados que se tratan (con diferencia de energía  $\Delta E$ ), es decir,  $\exp^{(-\Delta E/kT)}$  donde  $k$  es la constante de Boltzmann. El valor se compara a un número aleatorio entre 0 y 1. Si el factor es mayor que este número, entonces la configuración es aceptada, si el factor no lo es, la configuración es rechazada y el siguiente paso se toma de la geometría anterior. Se genera una secuencia de configuraciones a partir de la cual, se pueden seleccionar geometrías para una minimización posterior.

Los cálculos MC son similares a los cálculos MD. Pero mientras que en las simulaciones MD utilizan una ecuación de movimiento como base para la generación de nuevas configuraciones, las simulaciones realizadas con MC emplean una técnica de muestreo estadístico para generar las configuraciones que representan una trayectoria. MD calcula promedios de conjunto mediante el cálculo de los promedios en el tiempo, mientras que MC evalúa los cálculos promedios del conjunto de configuraciones del muestreo de la estadística de conjunto. En principio y en un largo plazo, ambos deben conducir a los mismos resultados medios en un mismo sistema.

En el ámbito del modelado molecular, existen muchos problemas a resolver que implican el estudio de sistemas demasiado grandes como para ser tratados a un nivel mecánico cuántico. Este nivel incluye un cálculo detallado del sistema, considerando todos los electrones además de los núcleos involucrados.

Los métodos de campo de fuerzas (también conocidos como de mecánica molecular) ignoran los movimientos electrónicos y calculan la energía de un sistema como función únicamente de las posiciones nucleares.

Así, este método puede ser usado para realizar cálculos en sistemas que contienen un número significativo de átomos sin afectar sensiblemente el costo computacional. En algunos casos inclusive, los métodos de campo de fuerzas pueden dar resultados que son muy aproximados incluso a los niveles más elevados de cálculo de la mecánica cuántica, pero en una fracción de tiempo computacional.

Sin embargo, resulta evidente que este tipo de método de cálculo no puede proveer resultados sobre propiedades que dependan explícitamente de la distribución electrónica del sistema.

Además de la aproximación de Born-Oppenheimer para los movimientos nucleares, como se describió anteriormente, los métodos de mecánica molecular están basados en una descripción clásica para la energía de un sistema. Haciendo uso de modelos simples, describen todas las interacciones clásicas presentes como contribuciones de estiramientos de enlace, apertura y cierre de ángulos, y rotaciones alrededor de un enlace utilizando la ley de Hooke para movimientos armónicos simples, e interacciones de largo alcance (interacciones de no enlace) utilizando tanto un potencial del tipo coulombico (para la interacción electrostática) como un potencial del tipo Lennard-Jones (para las interacciones de van der Waals).

Lo anterior puede ser interpretado observando la ecuación 2, en la cual la descripción se basa en cuatro términos independientes, relativamente sencillos para la fuerza de interacción intra e inter molecular en el sistema.

$$V(r^N) = \sum_{\text{bonds}} \frac{1}{2} k_b (l - l_0)^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsions}} \frac{1}{2} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \\ + \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N \left\{ \epsilon_{i,j} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right\}$$

Ec. 2: cuatro componentes para la descripción clásica de la energía de un sistema.

Existen numerosas variaciones para la expresión anterior, utilizando términos adicionales pero invariablemente contienen al menos estas cuatro contribuciones. La elección entre todas estas posibilidades resulta de un compromiso entre la precisión requerida y el tiempo de cálculo computacional.

Puede observarse que de esta manera, se le asigna un costo energético asociado con la desviación de los enlaces, ángulos, etc. de sus posiciones de equilibrio. Entonces, una correcta definición del campo de fuerzas requiere conocer su forma funcional, luego a partir de ella y mediante cálculos a nivel cuántico, se pueden obtener del sistema los distintos parámetros involucrados (constantes como  $k_a$ ,  $k_b$ ,  $q_i$ ,  $q_j$ ,  $v_n$ ,  $\omega$ ,  $\gamma$ , etc.), en esta etapa de la parametrización.

De esta manera, esta etapa resulta ser un paso previo fundamental para un posterior cálculo representativo, en el marco de la dinámica molecular.

Algo realmente destacable es la transferibilidad asociada con este tipo de descripción. Es una característica clave de un campo de fuerzas, ya que permite que un conjunto de parámetros desarrollados y probados, en un número relativamente pequeño de casos, pueda aplicarse a una gama mucho más amplia de problemas.

Esta característica significa que un mismo set de parámetros pueda ser usado para el modelado de otros sistemas moleculares, sin necesidad de una redefinición total de dichos valores.

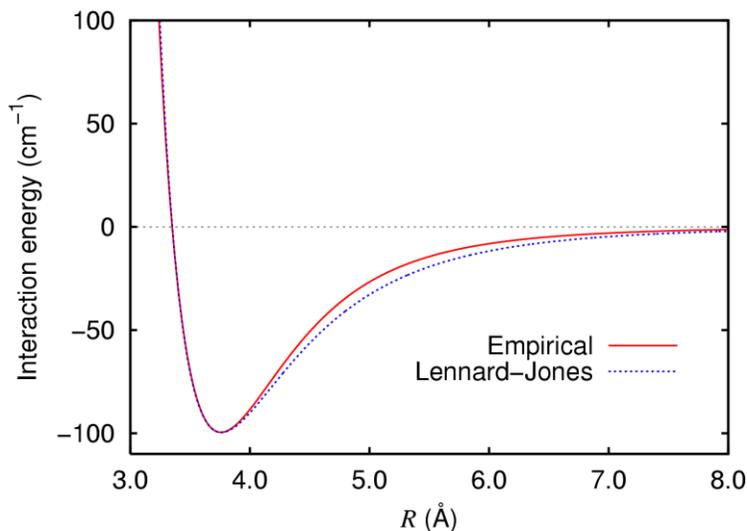
Un ejemplo lo constituyen los n-alcenos: numerosos resultados experimentales muestran un parecido estructural entre todos ellos; resulta entonces esperable que los parámetros para sus enlaces, ángulos, etc. no varíen significativamente entre todos ellos.

Un concepto comúnmente utilizado en los campos de fuerzas es el de "ATOM TYPE" (tipo de átomo). Para un campo de fuerzas la carga total y la multiplicidad de spin del sistema, no son requeridas explícitamente ya que resultan irrelevantes (a diferencia de lo indispensable en un cálculo mecánico cuántico), pero sí es necesario asignar un tipo de átomo a cada átomo del sistema. El concepto es más que simplemente asignar el número atómico de un átomo, contiene además información acerca de su estado de hibridación (que determina la geometría local), la carga propia del átomo, estado de protonación, etc.

El conocimiento de las interacciones moleculares sirve para comprender las fuerzas que existen dentro de ellas, y entre ellas y su entorno. Como ya se mencionó, la energía se puede dividir en potencial y cinética, si bien no es exactamente así es una buena aproximación. Manejamos una escala de energía para definir si las interacciones son

débiles o fuertes. La superficie de la energía potencial depende de las conformaciones e interacciones de la estructura.

Como ya se expresó, uno de los recursos para estudiar interacciones intermoleculares es la curva del potencial de Lennard-Jones, propuesto en 1924 por John Lennard-Jones en un modelo matemático sencillo



Potencial de Lennard-Jones para un dímero de argón.

EL potencial de Lennard-Jones es de la forma:

$$V(r) = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

Donde  $\epsilon$  es la profundidad del potencial,  $\sigma$  es la distancia (finita) en la que el potencial entre partículas es cero y  $r$  es la distancia entre partículas. Estos parámetros pueden ser ajustados para reproducir datos experimentales o pueden ser deducidos de resultados muy precisos de cálculos de QM. El término  $r^{-12}$  describe la repulsión y el término  $r^{-6}$  describe la atracción. La función que describe la fuerza a la que están sujetas las partículas es opuesta al gradiente del potencial arriba descrito

$$\vec{F}(r) = -\vec{\nabla}V(r) = -\frac{dV(r)}{dr}\hat{r} = 4\epsilon \left( 12 \frac{\sigma^{12}}{r^{13}} - 6 \frac{\sigma^6}{r^7} \right) \hat{r}$$

El potencial de Lennard-Jones (L-J) es una aproximación. La forma del término que describe la repulsión no tiene ninguna justificación teórica; la fuerza repulsiva debe depender exponencialmente de la distancia, pero el término de la fórmula de L-J es más conveniente debido a la facilidad y eficiencia de calcular  $r^{12}$  como el cuadrado de  $r^6$ . Su origen físico está relacionado con el principio de exclusión de Pauli: cuando dos nubes electrónicas que rodean los átomos se empiezan a sobreponer, la energía del sistema aumenta abruptamente. El exponente 12 fue elegido exclusivamente por su facilidad de cálculo. Donde  $r_{min} = 2^{1/6}\sigma$  es la distancia en la que el potencial se encuentra en un mínimo [69].

Con toda esta información que deriva de los distintos métodos, se pueden elaborar distintas estrategias para complementar los diferentes datos experimentales y llegar a entender diferentes comportamientos químicos de diversas moléculas de diferentes sustancias.

### **2-2-2-Aplicación de los métodos teóricos al conocimiento de los complejos de inclusión de CDs.**

Dada la habilidad de las CDs para formar complejos con gran cantidad de compuestos, se estudian estos compuestos en varias aplicaciones, dos de ellas son las catálisis [73] y las separaciones quirales [74,75].

Un factor decisivo de los complejos de inclusión es que la molécula huésped pueda introducirse dentro de la cavidad, las fuerzas de conducción hacia ella, comienzan en forma más o menos independiente de la naturaleza de la molécula que tiene que introducirse [70]. Sin embargo, la geometría no es solo el factor determinante de la estabilidad del complejo, algunos resultados experimentales muestran que algunas moléculas pueden ser compatibles por ejemplo con la  $\alpha$ -CD y no llenan la cavidad de la macromolécula [70,75]. La formación del complejo también depende de la polaridad de la molécula huésped y en la orientación en la cual se consigue el máximo contacto entre su parte hidrofóbica y la superficie interna de la cavidad de la CD. La parte hidrofílica de la molécula huésped queda

como un remanente, en una posición tan lejos como es posible sobre la superficie externa del complejo.

Se considera a la actuación de las interacciones de van der Waals como un factor importante en las fuerzas de conducción hacia la interacción entre la CD y las moléculas del huésped.

Se supone esto por numerosos cálculos de mecánica cuántica realizados sobre  $\alpha$  y  $\beta$ -CD con una molécula huésped [76,77]. Sin embargo estos estudios fueron enfocados sobre las propiedades energéticas y estructurales de los complejos de inclusión de las CDs con un tipo específico de moléculas huéspedes (por ejemplo alcoholes, ésteres, aminas, etc.) lo cual no permite una generalización para moléculas de diferentes tamaños y/o formas.

Alvira evaluó la energía de fisisorción de diferentes moléculas de distintos tamaños [78]; analizó este punto presentando un simple modelo y métodos diseñados para determinar la evaluación de la energía de fisisorción de moléculas de diferentes tamaños en algunas CDs. Este estudio está minuciosamente relacionado con otras contribuciones trascendentes sobre las interpretaciones de la adsorción en cavidades con diferentes geometrías [79,80], principalmente cilíndricas y esféricas. La energía de interacción entre la molécula huésped y la CD fue modelada para una suma de pares de potenciales de Lennard Jones [71,72] y fue usada para una descripción de la pared de la cavidad, asumiendo dos tipos de geometrías, cilíndrica y cónica. Esta simple interacción permitió establecer el parámetro  $\sigma$  (distancia en el potencial de Lennard-Jones) de la molécula huésped, al formar el complejo de inclusión más estable con cada CD, así como el tamaño máximo de la molécula huésped por encima del cual los complejos de inclusión no pueden ser formados.

Bodor y otros [94, 95], interpretan una serie de cálculos semiempíricos usando el método AM1 realizados sobre los complejos de inclusión de  $\alpha$  y  $\beta$ -CD con ácido benzoico y fenol en dos posiciones, la primera introduciendo el grupo funcional primero, y la segunda introduciendo el huésped al revés. Los resultados mostraron que, en los complejos de inclusión con  $\alpha$ -CD, los más estables son aquellos en los que cada huésped introduce primero el grupo funcional en la cavidad. Mientras que los complejos con  $\beta$ -CD resultan más estables en el caso del ácido benzoico cuando éste introduce primero su grupo funcional, sin embargo en el caso del fenol cuando ocurre lo contrario.

Las fuerzas de conducción para la formación del compuesto fue investigado basado en diferentes interacciones intramoleculares e intermoleculares, dipolo – dipolo, uniones de hidrógeno intermolecular e intramolecular y las entalpías de formación de las moléculas del anfitrión y del huésped calculadas en su geometría en el complejo y en sus geometrías optimizadas.

El [Poli (R)-hidroxibutanoato] (P(3HB)) es el activo biopolíester sintetizado como reserva del material de carbón y de energía presente en algunos microorganismos procariotas. Fue descubierto P(3HB) y relacionado con los derivados [Poli (R)-3-hidroxibutanoatos]. Estos compuestos tienen un gran interés para la investigación básica y en las aplicaciones industriales debido a su biodegradabilidad y su biocompatibilidad lo cual permite que sean considerados sustitutos biodegradables del material plástico convencional. Li y otros [82] informaron resultados experimentales de RMN sobre los complejos entre 3HB, d3HD (el isómero D) y  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD. Demostraron que los complejos obtenidos en forma selectiva entre d3HD y  $\beta$ -CD mantienen una estequiometría 1 a 1 [82]. Sobre la base de los resultados obtenidos del análisis termodinámico, existen en este trabajo discusiones sobre cuáles son las principales contribuciones de las fuerzas de conducción a la formación de estos últimos complejos. Con la intención de aclarar estos ítems Castro y Jubert [83], recurriendo a métodos de mecánica molecular (MM) estudiaron teóricamente estos complejos. Se representaron todos los modelos posibles de los complejos anfitrión-huésped entre 3HB, d3HD,  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD usando MM+ [84] implementado por el HyperChem® package prediciendo que el complejo formado por d3HD y  $\beta$ -CD es el más estable de todos.

Steiner y otros, informaron resultados de cálculos de química cuántica sobre una débil interacción polar anfitrión- huésped en ciclomaltoheptona cristalina ( $\beta$ -CD)-But-2-ine-1,4diol heptahidratada. Este estudio fue motivado por el hecho de que moléculas polares incluidas en las cavidades de las CDs, ven restringidas las oportunidades de satisfacer su potencial para formar uniones hidrógeno. Típicamente, las moléculas huésped que portan grupos hidroxilo se orientan de modo tal que las uniones hidrógeno se pueden formar, a través de las aberturas de la cavidad, con otras CD vecinas o con moléculas de agua en el cristal.

En esta estructura las uniones hidrógeno pueden también ser formadas con el O-6 del grupo del HO<sup>-</sup> primario, el cual se encuentra en la superficie del borde angosto de la cavidad abierta. El átomo O-4 interglucosídico es pobre desde el punto de vista estérico, es decir poco accesible y sirve solo ocasionalmente como aceptor de uniones hidrógeno O-H...O [92,93]. Las uniones hidrógeno anfitrión – huésped con otros grupos se consideran posibles en otros casos, como por ejemplo, O/N-H...O. Se encontraron evidencias de uniones hidrógeno C-H...O [85,89], y también interacciones C-H... $\pi$  [86] en un número de complejos de inclusión de la CD.

La energía típica de uniones de hidrógeno C-H...O y C-H... $\pi$  depende de la naturaleza de la unión del donador C-H. En el caso del muy débilmente polarizado grupo CH<sub>3</sub> donador, las uniones C-H...O son de alrededor de 0.5 kcal/mol, no mucho más que las interacciones de van der Waals. Pero en el cloroformo o en los terminales alcanos son frecuentemente polarizados como C-H, las energías de las uniones C-H...O pueden ser mayores de 12 kcal/mol [90], para otros tipos de C-H donador las energías de las uniones hidrógeno se hallan en general entre estos extremos. El grupo C-H formado en la superficie de la cavidad de las CDs, C-3-H y C-5-H son de una actividad significativa.

Steiner y otros [85-89], informan los datos de esta estructura en particular. Calculan las energías de unión de las interacciones débiles polares del cristal empaquetado de  $\beta$ -CD-but-2-ine-1.4 diol heptahidratado y son valores bajos que oscilan entre 0.7 y 1.1 kcal/mol. Esto es llamativamente alrededor de un cuarto del valor de uniones hidrógeno de O-H...O en carbohidratos, pero claramente arriba de las energías de dispersión. Los autores concluyeron que el arreglo de átomos que envolvía débilmente a los enlaces de hidrógeno es más propenso al desorden que aquellos estabilizados por las convencionales uniones de hidrógeno.

La entropía aumenta debido al desorden que puede fácilmente excederse o superar la pérdida de entalpía que se produce debido al rompimiento de los débiles enlaces de hidrógeno [68]

Estas consideraciones de las uniones hidrógeno son muy importantes al momento de evaluar la estabilidad de los complejos de inclusión de las CDs en general, por esta razón se analiza con mucho interés este tipo de uniones.

## Capítulo III

*El campo del intelectual es por definición la conciencia.*

*Rodolfo Walsh*

*Lo que se entiende por conciencia no requiere discusión, está más allá de toda duda*

*Sigmund Freud*

### **3-1 Importancia de la aplicación de métodos teóricos en el conocimiento de plaguicidas, generalmente usados en forma no responsable.**

#### **3-1-1 Plaguicidas**

En este capítulo se realiza una revisión de los trabajos que aparecieron durante los últimos años, en los que se refiere a las características más importantes de los plaguicidas también denominados pesticidas, desde su toxicidad hasta su detección, con el fin de obtener una visión más amplia de la necesidad de profundizar en el conocimiento de estas sustancias. Y se analiza muy especialmente el aporte de la modelización molecular, aplicada al análisis de estas sustancias, desde su modo de acción hacia el mecanismo enzimático y sus propiedades químicas.

Existe un gran interés en el desarrollo de estrategias para la detección y desintoxicación de los compuestos organofosforados. Ellos a menudo se utilizan como plaguicidas y agentes de guerra. Debido a su alta toxicidad, existe una gran demanda de técnicas sofisticadas y útiles para la detección y la descomposición de estas sustancias, así también con la finalidad de obtener información sobre sus propiedades termoquímicas, o para determinar su comportamiento químico y biológico.

Muchos compuestos organofosforados (OP) son altamente tóxicos y potentes inhibidores de las enzimas colinesterasa y producen un grave daño al ambiente y a la salud humana.

Los compuestos con un grupo funcional tiofosforilo ( $P = S$ ) constituyen una amplia clase de estos plaguicidas. Los compuestos organofosforados que están relacionados con un fosforilo más reactivo ( $P = O$ ), incluyen agentes nerviosos muy letales y agentes de guerra química, tales como, VX, sarín y somán. Desafortunadamente, de uso comercial frecuente, el uso de compuestos OP utilizados en la agricultura ha dado lugar a su presencia como

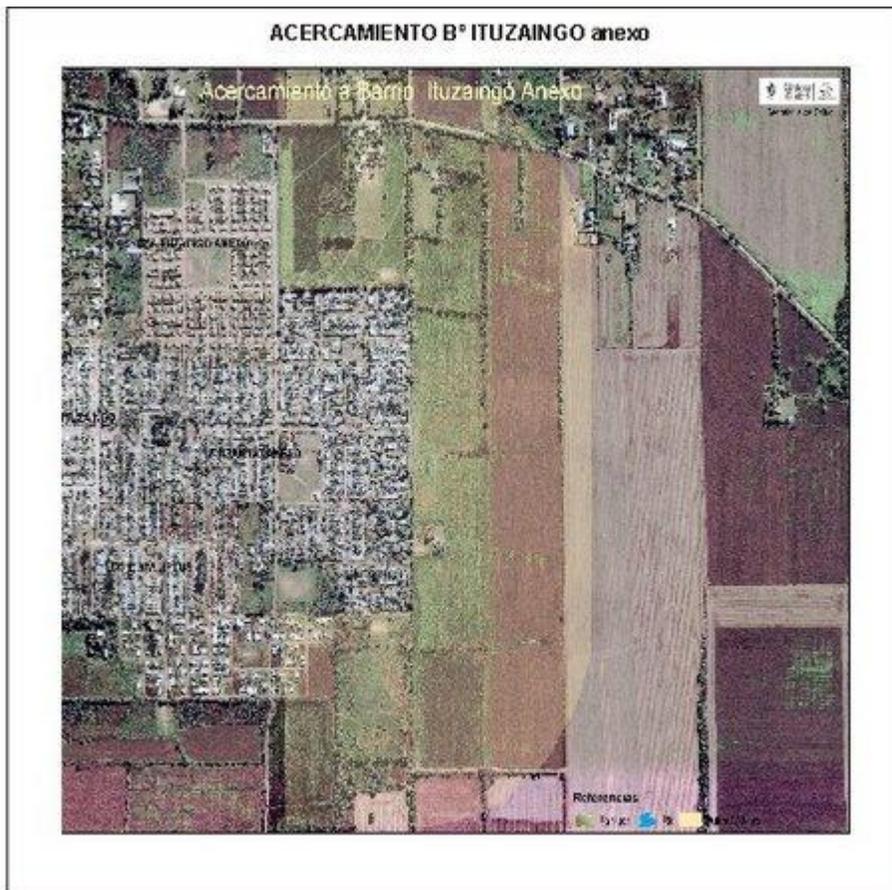
residuos en los cultivos, el ganado y en los productos avícolas y llega su migración hacia los acuíferos. Por lo tanto, el diseño de nuevos sensores con selectividad y sensibilidad mejoradas para determinar este analito es de primordial importancia en esta área. Se realizaron avances en el desarrollo de sensores químicos fluorescentes para plaguicidas OP tóxicos y sus compuestos relacionados. También se propician desafíos y avances hacia el diseño de sensores químicos futuros con dos modos de la transducción de señales.

La contaminación ambiental por sustancias químicas orgánicas, sigue siendo uno de los retos más importantes del mundo al desarrollo sostenible. Los países modernos desarrollados y en vías de desarrollo utilizan millones [94,97] de compuestos orgánicos sintéticos en sus sectores civiles, comerciales y de defensa con gran diversidad de usos. Las aplicaciones más comunes incluyen plásticos, lubricantes, refrigerantes, combustibles, solventes, conservantes, surfactantes, dispersantes y pesticidas. Como resultado del amplio uso mundial acoplado con las prácticas de manipulación inadecuadas, muchos de estos compuestos orgánicos entran al medio ambiente y causan contaminación en el aire, el agua y suelo. Los plaguicidas y específicamente los herbicidas se aplican directamente a las plantas y a los suelos, mientras que las emisiones accidentales originadas por derrames, fugas de tuberías, tanques de almacenamiento subterráneo, los residuos de los vertederos y depósitos de desechos, quedan en el ambiente. Muchos pesticidas son rociados en grandes cantidades con sólo el 1% del alcance al objetivo previsto, el resto se dispersa y contamina. Algunos de estos compuestos tienen vidas medias largas y por lo tanto persisten en mayor o menor grado en el medio ambiente. Migran a través de grandes regiones del suelo hasta que alcanzan un recurso hídrico, en los que pueden presentar una amenaza ecológica y a la salud humana [95]. La vegetación, los animales y los seres humanos se ven afectados por diversas sustancias químicas a través de la absorción, inhalación o ingestión.

Estos contaminantes producen graves riesgos fatales para la salud, tales como defectos de nacimiento, asma y muerte. Por lo tanto, el monitoreo ambiental es necesario para proteger al público y al medio ambiente de posibles toxinas orgánicas liberadas a la atmósfera, al suelo y al agua.

### 3-1-2 La situación en nuestro país

En la Argentina no tenemos registros de situaciones donde se evidencie la contaminación salvo en los últimos años. En la localidad de Ituzaingó, provincia de Córdoba recientemente se llevó a cabo un juicio por contaminaciones provenientes de fumigaciones con agroquímicos. En el 2001, había poco conocimiento sobre la toxicidad de los agroquímicos, en los pobladores de esa zona, pero la cantidad de mujeres rapadas por la quimioterapia y los niños con leucemia cubiertos con barbijos aumentaba por las calles de la capital cordobesa, donde vive Sofía Gatica, una mujer que dio a luz un niño sin riñones y le causó la muerte en pocos minutos de nacer. Luego de esto ella realizó encuestas por el pequeño poblado de cinco mil habitantes, y descubrió que el número de patologías era superior a lo normal, presentó denuncias y conformó el colectivo de Madres del Barrio Ituzaingó reuniendo a personas con el mismo problema. Este grupo de madres empieza con estos reclamos que derivaron en un juicio y sentencia ejemplares.



De todas maneras, se llevaron adelante medidas de mitigación de las fuentes de contaminación ambiental, que también podrían tener influencia en la generación del impacto en la salud que se verificaba en el barrio. Esto es importante considerarlo porque deja en evidencia que el problema era la mala utilización de los plaguicidas. En ese proceso, con marchas y contramarchas, se pudo cambiar la fuente de agua potable, inicialmente de pozo y con alta concentración de arsénico, por agua corriente de la red de la ciudad. Se evaluó la posibilidad de la enfermedad hidroarsenicismo regional endémico HACRE es una enfermedad crónica producida por el consumo por varios años de agua arsenicales. Esto provoca alteraciones cardíacas, vasculares y neurológicas, repercusiones en el aparato respiratorio y lesiones hepáticas, renales e hiperqueratosis cutánea que avanzan progresivamente hasta las neoplasias o cáncer. Estos efectos que pueden también traducirse en cáncer no son agudos sino crónicos y no producirían la enfermedad como se observan en esta zona de Córdoba, en algunos puntos del lugar, sino en toda la zona afectada. Además se retiraron los transformadores de energía que contenían policloruro de bifenilo (**PCB**). Este compuesto químico está considerado -según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA)- como uno de los doce contaminantes más nocivos. Produce cáncer, debido a su gran estabilidad térmica biológica y química, así como por su elevada constante dieléctrica, los PCB's se usaron masivamente hasta mediados de 1970 como aislantes para equipos eléctricos como transformadores, interruptores, capacitores y termostatos. Su uso actualmente está prohibido en casi todo el mundo. En la Argentina, la Ley 25.670 de protección ambiental para la gestión y eliminación de PCB define que el nivel mínimo que debe contener una mezcla para considerarse contaminada por PCB es de 50 partes por millón y establece el año 2010 como último plazo para su eliminación total. No obstante, en la Ciudad de Buenos Aires la ley 760 es más estricta y determina que aquellos transformadores de energía que contengan PCB en una concentración superior a las 500 partes por millón debían ser eliminados antes de 2005[96].

Además se pavimentó todo el barrio de Ituzaingó, para disminuir el polvo en suspensión; se limpiaron todos los tanques domiciliarios de agua y se colocaron tapas en todos ellos (los barro de los tanques contenían residuos de plaguicidas); se construyó una Unidad Primaria de Atención de la Salud (UPAS 28). Todas estas acciones se llevaron adelante bajo

la presión de la comunidad movilizada en defensa de sus derechos a la salud y en reclamos de que se garantice su seguridad ambiental y sanitaria. (Incluso, surgió la necesidad de que la provincia cuente con un centro público de asistencia a pacientes oncológicos, el Hospital Oncológico de Córdoba. Además, se creó el Registro Provincial de Tumores). Se dictaron ordenanzas municipales que establecieron la “emergencia sanitaria y ambiental” y se prohibieron fumigaciones alrededor del barrio (ordenanzas N° 10505, 10589, 10590), que derivaron finalmente en la prohibición de las fumigaciones en toda la ciudad.

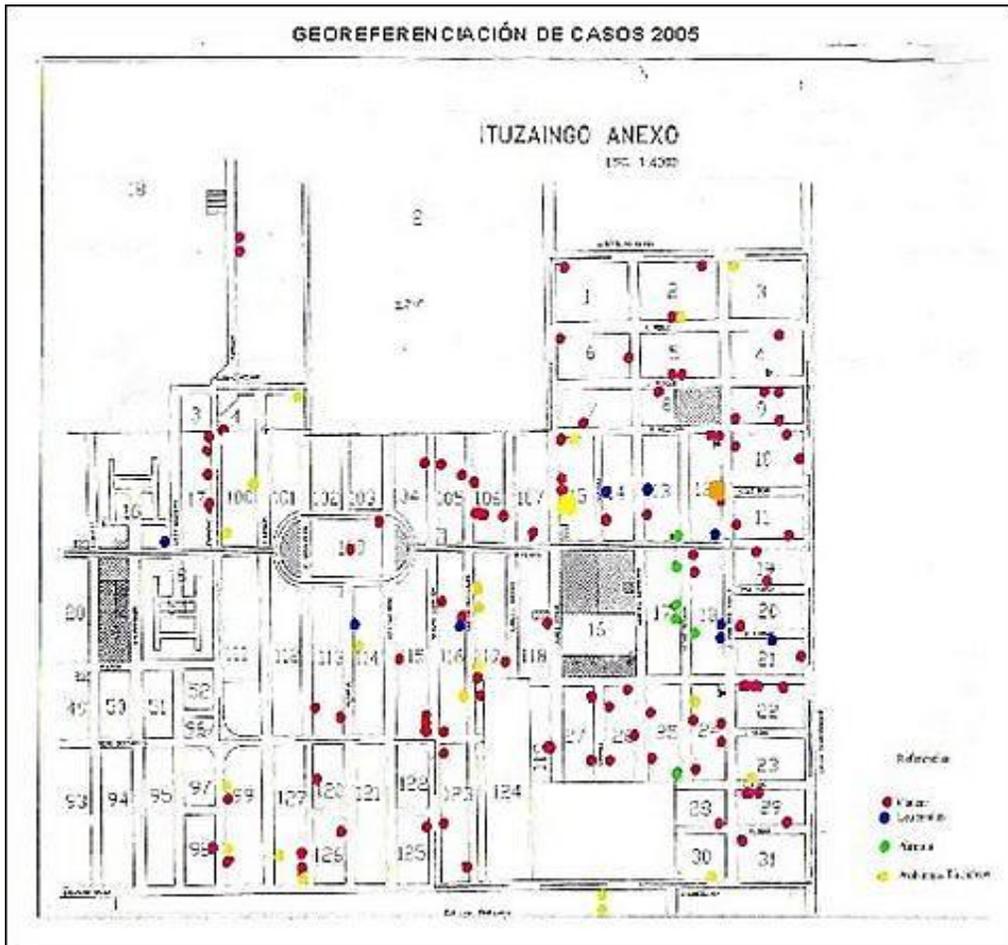
En junio de 2002 la Municipalidad solicitó a la Agricultura Provincial la vigilancia de las aplicaciones de agroquímicos instándoles a controlar la prohibición de aeroaplicaciones. Sin embargo, estas normas fueron acatadas sólo parcialmente por los productores, no respetándose la distancia recomendada, y esporádicamente realizándose fumigaciones aéreas clandestinas. Dichas fumigaciones terrestres y aéreas, siguieron siendo una fuente de agresión tóxica para la población que no tuvo solución.

En el año 2004, Sofia Gatica denuncia ante la Unidad Fiscal del lugar que en el “campo de Parra” -al este del barrio- aplicaban agrotóxicos con un equipo terrestre (mosquito). Se identificaron restos de los venenos utilizados y los dosajes de la tierra del lugar detectaron compuestos organoclorados y fosforados, 2.4D, diendrin y clorpirifós (pesticida clorado muy usado en la Argentina).

Más de seis años después de las investigaciones, en el 2011 se llega a un juicio contra los empresarios sojeros Francisco Parra y Jorge A. Gabrielli; y él fumigador Sr. Edgardo J. Pancello y por violación a la Ley de Residuos Peligrosos (24.051). La fiscalía y la querrela presentaron como testigos a numerosos afectados por las fumigaciones en el barrio, y también a expertos en agricultura, en deriva de aplicación de agroquímicos, científicos que han desentrañado los mecanismos íntimos por los que glifosato genera mecanismos que devienen en cáncer y malformaciones congénitas, profesores universitarios y médicos. Entre ellos estaba prevista la declaración del investigador Dr. Andrés Carrasco, el cual está investigando el efecto del glifosato en el desarrollo de embriones de anfibios de la especie *Xenopus laevis* en el *Laboratorio Embriología Molecular* Conicet UBA. Facultad de Medicina. Los imputados por el delito de “contaminación dolosa” –cuya pena prevista es de tres a diez años de cárcel– son dos productores, Francisco Parra y Jorge Alberto Gabrielli, y el propietario y piloto del avión fumigador, Edgardo Jorge Pancello. En caso de comprobarse

la vinculación entre fumigaciones y muerte, la figura por la que se los acusa, podría ser agravada con penas de 10 a 25 años de prisión. El fallo fue inédito para nuestro país, el tribunal cordobés condeno a tres años de prisión en suspenso a dos de los acusados, el productor rural y al piloto aeroplacador. Si bien la sentencia no fue aplicada con el rigor que debería fue el primer fallo de ese tenor en nuestro país y establece un antecedente. La causa de la condena es por afectar la salud del barrio por realizar fumigaciones ilegales con endosulfán(6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3benzodioxatiepina-3-oxido)y glifosato(N- fosfometilglicina).

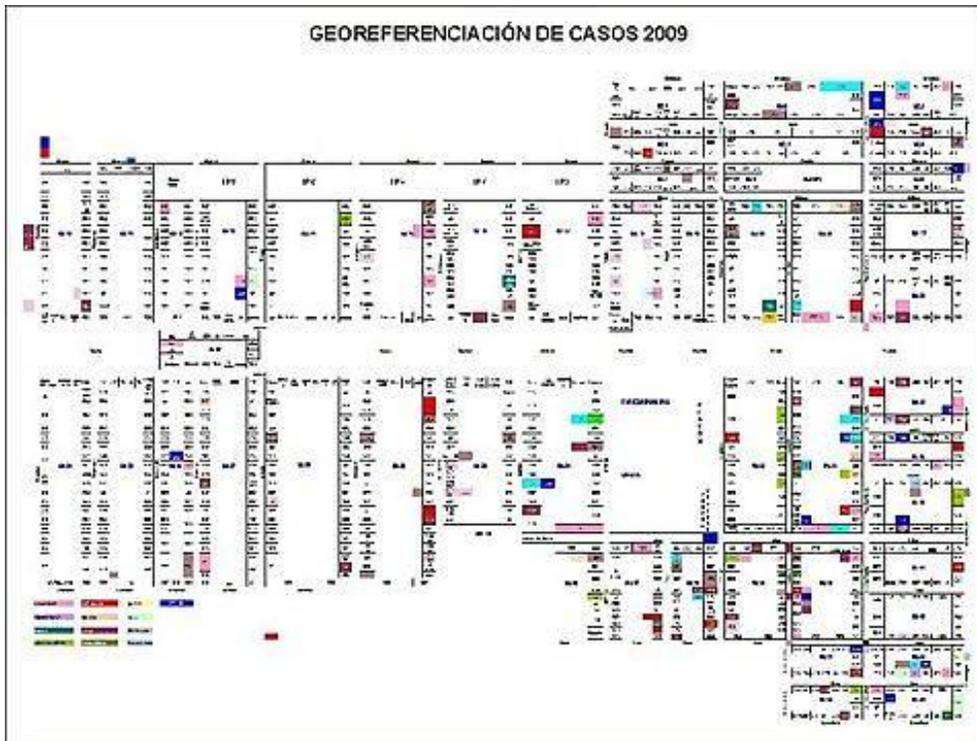
Los efectos de la contaminación producida por la agricultura tóxica en B° Ituzaingó Anexo queda evidenciada cuando se observa la distribución de las enfermedades en el plano del barrio.



El vínculo espacial es evidente. A medida que nos acercamos al límite del barrio donde se siembra y fumigan las parcelas de soja, aumenta la densidad de vecinos con cáncer, trastornos endocrinos y hematológicos. Los enfermos no se distribuyen alrededor de los

transformadores con PCB, ni su dispersión es uniforme porque todos consumían el agua con arsénico del pozo del barrio.

Por otro lado, los estudios de biomarcadores realizados en niños del lugar, registran presencia de plaguicidas y sus metabolitos en cantidades superiores a las de la población normal y la ausencia o muy bajos niveles de otros contaminantes como metales pesados o PCB.



En esta zona de la ciudad actuaron varios contaminantes que, en conjunto, explican el impacto sobre la salud ambiental de la población. Sin embargo, la contaminación con agrotóxicos es sin duda la predominante y la que además de tener un vínculo espacial, también expresa un vínculo temporal: después que comienzan las fumigaciones intensivas (desde 1997 en adelante) comienzan a aparecer los casos de enfermedades severas. [99]

“Desde entonces hasta 2010 encontramos 193 casos de cáncer entre los vecinos, además de otras malformaciones como púrpura o labio leporino”. Las madres denunciaron casos de alergias respiratorias y en la piel, enfermedades neurológicas, casos de malformaciones y cánceres. “En el 2003 lograron una ordenanza que estableció la distancia mínima de fumigación de 200 metros, pero los sojeros preferían pagar las multas, y lo hacían de noche o en feriados. [100,101]

Con el aumento de la producción agrícola aumento el uso de estas sustancias en los últimos años, existen antecedentes sobre varios estudios realizados en la Argentina, desde la detección de plaguicidas en el río Reconquista [105], influencia de plaguicidas sobre la fertilidad [102] hasta contaminaciones por plaguicidas en otras provincias como por ejemplo Tucumán [103], y también se empezó a trabajar en la prevención. [104].

El mal uso de estos compuestos utilizados sin tomar los recaudos necesarios produce problemas de salud en los niños y en toda la población. La fumigación debe realizarse lejos de las zonas urbanas considerando todas las medidas de seguridad para la población y para el que la transporta. Evitar el contacto del plaguicida con el agua porque en general se lentifica su ciclo de degradación, hay que conocer las propiedades químicas de estos compuestos y considerar su cinética de degradación, informarse cuál es su vida media para evitar la acumulación en los suelos y en los recursos hídricos.

Tabla N°2 Estabilidad de compuestos organofosforados en agua a 17-31°C. Las concentraciones iniciales son de 0.1mg/mL [111].

Producto	Vida media (t <sup>1/2</sup> )			Persistencia (días)		
	pH ácido	pH neutro	pH básico	pH ácido	pH neutro	pH básico(*)
Diazirón	1.31	8.57	8.19	56	84	84
Dimetoato	28.13	12.84	15.00	140	70	112
Etilparatión	17.46	15.57	14.85	196	112	112
Malatión	26.42	13.99	5.05	196	140	14
Metilparatión	60.48	62.72	38.64	448	448	392
Triclorfón	21.88	5.89	3.68	308	196	168

Los controles para determinar las posibles contaminaciones deberían ser preventivas, es decir antes de evidenciarse enfermedades, evidentemente todavía nos queda mucho para hacer, en esta área en nuestro país.

La Agencia Estadounidense de Protección Ambiental (**EPA**) de EE.UU. ha impuesto regulaciones estrictas sobre las concentraciones de muchos contaminantes ambientales en el aire y el agua [97]. Sin embargo, los actuales métodos de control de la mayoría de los contaminantes orgánicos son costosos y requieren mucho tiempo, y existen limitaciones en



Estructuralmente, ambos oxon y tión muestran una gran variedad dependiendo de los grupos  $R_1$ ,  $R_2$  y  $X$ , adjunto al átomo de fósforo pentavalente central. Sin embargo,  $R_1$  y  $R_2$  en general tienden a ser alcoxi, ariloxi y grupos tioalcoxi, mientras que  $X$  es un grupo lábil saliente. TEPP, es el pesticida oxon más potente en fosfato. El pesticida tión más potente, es el paratión, tiene un p-nitrofenoxi ( $X$ ) sustituyente, que es un muy buen grupo saliente en reacciones de sustitución nucleófila que implica el átomo de fósforo central.

La mayoría de los pesticidas organofosforados (PO) son sólo ligeramente solubles en agua y tienen un alto coeficiente de partición aceite-agua y baja presión de vapor. Los datos físicos y químicos no se presentan aquí, pero se puede obtener de otras fuentes, incluyendo Organización Mundial de la Salud (OMS), las publicaciones, y los perfiles y los manuales incluidos en la lista de referencias del Registro Internacional de Productos Químicos Potencialmente Tóxicos (RIPQPT). Una fuente principal de los métodos analíticos es proporcionada por la Comisión del Codex Alimentarius del Programa Conjunto FAO / OMS sobre Normas Alimentarias (Programa Internacional sobre Seguridad Química, IPCS, 1986). En general, y como ya mencionamos la estructura de los OP consta de fósforo unido por un doble enlace a un oxígeno o azufre (tal como Diazinon) y tres enlaces simples a tres diferentes tipos de radicales, que pueden ser alquilo, arilo, aromático alifático, o heterocíclicos.

Cuando un compuesto OP tiene su original grupo  $P = S$  sustituido con  $P = O$ , es decir, azufre sustituido con oxígeno, el nuevo compuesto se nombra como el oxon. Así, por ejemplo, Diazinon-un compuesto fosfortioico-(nombre IUPAC: O, O-dietil O-[4-metil-6-(propan-2-il) pirimidin-2-il] fosfortioato), se convierte en Diazoxon (IPCS, 1986).

Según su estructura química, el OP se puede clasificar en diez grupos diferentes, que se describen en el anexo 1 (CCE, 1986, Anexo 1). Sin embargo, la OMS clasifica a los pesticidas en cuatro grupos en función de su peligro, que depende de los valores de la dosis letal cincuenta (DL50) que se determinó en ratas adultas (IPCS, 2005, Anexo 2

Tabla N°3 DL-50 de Algunos Plaguicidas Organofosforados [111].

DL-50 ORAL, en rata			
Forma Tiono	mg/kg	Forma Oxo	mg/kg
Paratión	5,0	Paraoxon	3,5
Pyrazotion	36,0	Pyrazoxon	4,0
Acetotion	1.280,0	Acetoxon	214,0
Akton	146,0	Clorfevinfos	10-39
Fenitrotion	1.250	Sumioxon	120
Protion	2.600	Propoxon	435
Sulfotepp	5	Tepp	2
Cyolan	30	Oxocyolan	12
Famphur	27	Famoxon	18
Tiono Mipafox	58	Mipafox	15,5

Tabla N°4 Se adjuntan al final tablas de plaguicidas.

### 3-1-4 Los compuestos OP y su toxicidad

Los pesticidas se describen como productos químicos que matan o hacen más lento el crecimiento de organismos no deseados. Los pesticidas incluyen herbicidas, insecticidas, fungicidas y nematocidas. Hoy en día, se cree que la aplicación de pesticidas sintéticos es uno de los métodos más eficaces para controlar los insectos que afectan el crecimiento del cultivo [110]. Plaguicidas organofosforados constituyen los insecticidas más utilizados en la actualidad. Esta clase de compuestos ha logrado un éxito comercial enorme como un componente clave en el arsenal de agroquímicos, y es actualmente un elemento integral de la agricultura moderna en todo el mundo. Conforme con la EPA, alrededor del 70% de los insecticidas de uso corriente en los EE.UU. son plaguicidas organofosforados [97]. Fueron desarrollados para reemplazar los pesticidas organohaluro a finales de los años 1950 debido a los pesticidas organofosforados son relativamente más fáciles de degradar por medio de procesos microbianos o ambiental. A diferencia de los plaguicidas organohaluro, el OP no se bioacumula tanto debido a su rápida degradación en el medio ambiente y son por lo tanto preferidos sobre organohaluros como uso pesticidas.

Aunque los compuestos OP se consideran más seguros que los organohaluros, los cuales son altamente neurotóxicos y en algunos casos sus productos de degradación pueden ser

potencialmente más tóxicos en una exposición crónica en seres humanos. Los compuestos OP se absorben por inhalación, ingestión y penetración en la piel. Son inhibidores potentes de las enzimas colinesterasa incluyendo acetilcolinesterasa, butilcolinesterasa, y pseudocolinesterasa, que funcionan como reguladores de la neurotransmisión producida por acetilcolina. Estas enzimas son inhibidas por la unión al compuesto OP. Tras la unión, el compuesto OP se somete a una hidrólisis que conduce a una enzima fosforilada estable que es poco reactiva. De esta inhibición resulta la acumulación de acetilcolina en la neurona, entre neurona y neurona, y en las uniones musculares o sinapsis.

Cada año se producen miles de envenenamientos en seres humanos en todo el mundo por OP. De hecho, en 1994, se estima que 74.000 de los niños están involucrados en el envenenamiento por pesticidas hogareños comúnmente relacionada a exposiciones diarias en los Estados Unidos [97]. En un estudio más reciente, se encontró que los niños expuestos a pesticidas OP eran más propensos a ser diagnosticados con trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) [112]. La exposición ha sido atribuida a frecuentar el uso de los programas operativos en las tierras agrícolas y su presencia como residuos en frutas, verduras, ganado, productos avícolas y acuíferos municipales [113]. Por ejemplo, las concentraciones de plaguicidas típicos que desembocan en serie residuos acuosos de 10.000 a 1 ppm [106,114].

Los plaguicidas son influenciados por un número de procesos biológicos, químicos y físicos, una vez que entran en el medio ambiente. Existen posibles vías de exposición ambiental de los plaguicidas organofosforados a los seres humanos y la vida silvestre [115]. Mientras que muchos pesticidas OP se puede degradar a través procesos microbianos o ambientales, algunos de estos pesticidas son consumidos por organismos, o se podría filtrar en las aguas subterráneas. Una vez que el pesticida entra en el agua subterránea puede permanecer allí durante largos períodos de tiempo. En el agua baja, hay poca exposición al sol, lo que hace más lenta la degradación de los plaguicidas organofosforados y aumenta sus riesgos potenciales para el medio ambiente y la salud humana.

La primera indicación de la actividad insecticida de los compuestos OP se encontró en 1930, sin embargo, el primer compuesto de este tipo, tetrafosfato hexaetilo (HETP) [una mezcla impura que contiene tetraetilpirofosfato (TEPP) como el ingrediente activo] no fue utilizado como insecticida agrícola hasta 1942 [116]. Desde la introducción primero de

HETP, el número de pesticidas OP se ha elevado a cientos, y los más comunes se muestran en tablas, junto con su información de toxicidad. Evaluando sus valores de dosis letal 50 LD50, existen algunas diferencias significativas entre la bioactividad de los grupos oxons y tions. En general, en comparación con los pesticidas Tion, los oxons son más potentes con menor LD50. Uno de los pesticidas oxon más potentes es TEPP con una DL50 oral de 0,5 mg / kg, mientras que uno de los plaguicidas más activos Tion es el paratión con una DL50 oral de 1 mg / kg. En general, se indica que la toxicidad oral para un OP individual es mucho mayor que su toxicidad dérmica.

Los avances significativos en la detección de compuestos OP hacia el desarrollo de métodos de detección de compuestos OP han sido reportados en la literatura [117-123]. Los análisis de los plaguicidas OPs en muestras ambientales y biológicas son rutinarios y se lleva a cabo utilizando diversas técnicas analíticas, incluyendo resonancia magnética nuclear (RMN) espectroscopia [124], cromatografía de capa fina, y la espectrometría de masa [123]. Una gran variedad de enfoques han sido investigados por medio de sensores, incluyendo ensayos enzimáticos [121], impresión molecular junto con luminiscencia (utilizando lantánidos) [117-120], métodos colorimétricos [125-127] y otros [128,126], usando moléculas orgánicas fluorescentes [130-132], y la interferometría [122]. La técnica más común para detectar pesticidas OP son métodos cromatográficos acoplados con diferentes detectores y diferentes tipos de biosensores de espectroscopía, los inmunoensayos, y los métodos enzimáticos basados en la inhibición de la actividad de la enzima colinesterasa [133-131].

Una alternativa a los métodos clásicos para la detección de pesticidas OP es el diseño de sensores ópticos, sensores químicos, es decir, colorimétricos o fluorimétricos o reactivos. Uno del más sencillo y cómodo medio de detección química, es la generación de una señal óptica, por ejemplo, se producen cambios en la absorción y en la emisión de las bandas del sensor químico en presencia de un analito diana.

Han sido utilizados ampliamente en los últimos años en el reconocimiento y la detección basada en los conceptos supramoleculares, usando métodos ópticos [136], para el desarrollo de sensores químicos para un grupo de iones o especies neutras,

Desafortunadamente, a pesar de que la utilidad de la detección óptica se está convirtiendo en un tipo de análisis valioso desde el punto de vista cualitativo como también cuantitativo, el número de sensores ópticos disponibles en la actualidad para la detección de compuesto OP es bastante limitada.

Basados en la fluorescencia, ambos sensores químicos y biosensores ofrecen ventajas significativas sobre los otros métodos convencionales para la detección de compuestos OP. Las principales ventajas de la fluorescencia son su alta sensibilidad para una sola molécula y en algunos casos la respuesta es casi instantánea.

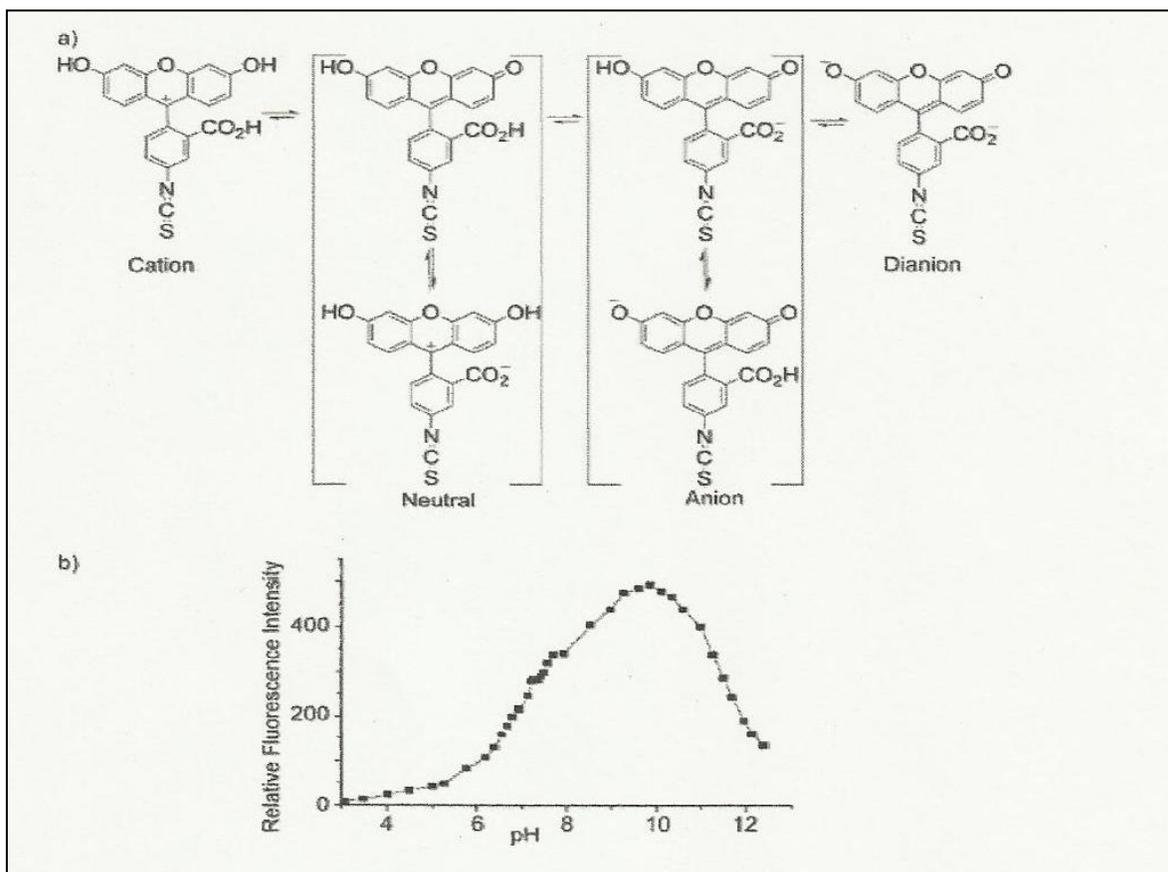
Los métodos de fluorescencia son capaces de medir las concentraciones de analitos 10<sup>6</sup> veces más pequeña que las técnicas donde se mide la absorbancia [136]. Por lo tanto, las técnicas de fluorescencia han sido ampliamente utilizadas en biología molecular y la química analítica, pero no de forma extensa en la detección de pesticidas OP.

### **3-1-5 Métodos basados en Biosensores con fluorescencia para compuestos OP**

Hasta la fecha, se han utilizado para la detección de compuesto OP [121, 133, 137-144] una serie de biosensores sensibles basados en la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) o butirilcolinesterasa (BChE) En general, estos sensores para la detección de compuestos OP pueden ser clasificados en dos principales tipos basadas en la enzima empleada (1) AChE o (2) la enzima hidrolasa (OPH).

La hidrólisis de la acetilcolina por AChE produce un protón por molécula de sustrato que produce un aumento de la acidez de la solución. Esto forma la base para el proceso de los sensores basados en la AChE. Rogers et al. [144] utiliza un pH sensible al colorante fluorescente, que consta de AChE unida a un compuesto sensible al pH, isotiocianato de fluoresceína (FITC). El aducto enzima-colorante se inmoviliza sobre una fibra de cuarzo que fue unido a un espectrofotómetro de fluorescencia. En ausencia de un compuesto OP, la AChE es capaz de hidrolizar a la acetilcolina y conduce a una disminución en el pH que produce la reducción de la intensidad de fluorescencia debido a la interrupción de la conjugación de fluoróforo en protonación. Sin embargo, en presencia posteriormente a la acetilcolina de diisopropilfluorofosfato (DFP), se observó que el 90% de la actividad de la enzima se había perdido, y era cuantificada por una reducción menos pronunciada en la

intensidad de la fluorescencia. Este biosensor es muy sensible (capaz de detectar nanomolares (nM) concentraciones de paraoxón cuando se expone a la solución que contiene el analito durante diez minutos), y se demostró cierta selectividad hacia diferentes compuestos OP.



**Figura N° 7** (a) Estructura del isotiocianato de fluoresceína (FITC) a diferentes pH, (b) Intensidad de fluorescencia relativa en diferentes pH. Extraído de la referencia [147], publicado por Elsevier, 2004.

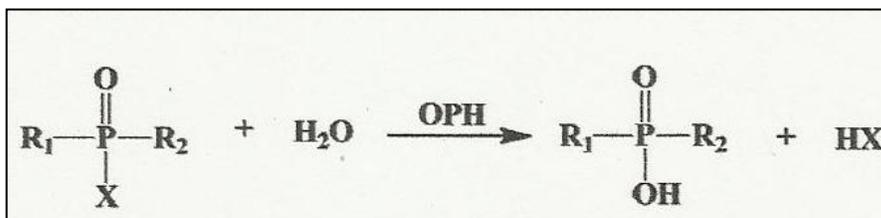
La segunda familia de biosensores utiliza OPH como el sensor enzimático para la detección de OP compuestos. El modo de acción de OPH es diferente de la AChE, catalíticamente hidroliza el OP compuesto, en lugar de unirse covalentemente a la misma. Así, en lugar de medir la inhibición de la enzima, los métodos de detección que implican OPH permiten una medición más directa de la OP compuestos. Hoy en día, OPH se utiliza ampliamente

como un biosensor debido a su capacidad para hidrolizar una gran variedad de compuestos que contienen uniones P-O, P-F, P-S, o P-CN [143,145]. La hidrólisis de compuestos OP condujo a la producción estequiométrica de dos protones que pueden ser controlados y directamente correlacionada con la cantidad de sustrato OP [143]. Por ejemplo, Cao y otros [141] utiliza OPH marcado con FITC, deposita el material resultante sobre portaobjetos de cuarzo silanizado en forma de films Langmuir-Blodgett creando así monocapas organizados de los sensores basados en enzimas. Se demostró que este sensor OPH enzimático tienen una mayor sensibilidad y podría detectar el analito en concentraciones nM.

Un gran número de los biosensores se han desarrollado sobre la base de los inmunoensayos por detección de polarizada (FPIA) [148-151]. Un ejemplo informado por Kolosova y otros, fue el que utiliza un anticuerpo monoclonal para la detección del metil paratión usando FPIA [148]. La unidad de detección comprende un derivado de metil paratión relacionado con fluoresceína. La unión al metil paratión y otros compuestos estrechamente relacionados se confirma mediante la medición de la intensidad de la luz emitida polarizada lo que indica la unión al anticuerpo. A pesar de la susceptibilidad de interferencia con diferentes componentes que existen en algunas matrices y el determinante de amplio rango, el método FPIA es altamente específico y reproducible y sin complicaciones en las posibles contaminaciones, el método cumple con los criterios de desempeño para la detección de metil paratión.

En resumen, los sensores basados en enzimas son muy sensibles y selectivos en su enfoque para detectar compuestos OP. Además, los sensores enzimáticos basados en OPH ofrecen distintas ventajas sobre los basados en sistemas con AChE. Si bien estos enfoques para la detección de OP han sido significativos, la inhibición basada en biosensores sufre de tres desventajas: (1) las enzimas pierden fácilmente la actividad en caso de factores ambientales o de manipulación, por lo tanto, estas enzimas pueden proporcionar señales de falsos positivos, (2) los sensores requieren pruebas de línea de base, antes de muestrear los tiempos de aplicación y los prolongados tiempos de incubación para permiten la interacción analito enzima y (3) debido a la naturaleza irreversible de la inhibición de la

enzima colinesterasa, basados en la inhibición de sensores, no pueden ser reutilizado sin regeneración de la actividad enzimática. Además, el tiempo de vida de estos sensores está limitado por la degradación enzimática.



**Figura N° 8** Mecanismo de hidrólisis de los compuestos OP con la enzima hidrolasa OPH

### 3-1-6 Métodos de detección basados en un sensor químico de fluorescencia

Recientemente, un gran número de métodos innovadores para la detección de compuestos OP utilizan sensores ópticos químicos. El primer sensor químico fluorescente para la detección de compuestos OP fue reportado por Van Houten y otros [132] en la que se usa una serie de complejos de Eneditiolato 1,2 de platino con un alcohol adjunto primario no emisivo. Tras la adición del analito electrófilo OP para este compuesto y un agente de activación (triazol) en diclorometano, el alcohol se convierte en un éster fosfato, que reacciona intramolecularmente para formar un producto cíclico fluorescente. El método se encontró que era muy eficaz en la detección de una gran variedad de agentes de guerra que actúan a nivel nervioso. El análisis se llevó a cabo evitando la presencia de oxígeno ya que este disminuye la fluorescencia.

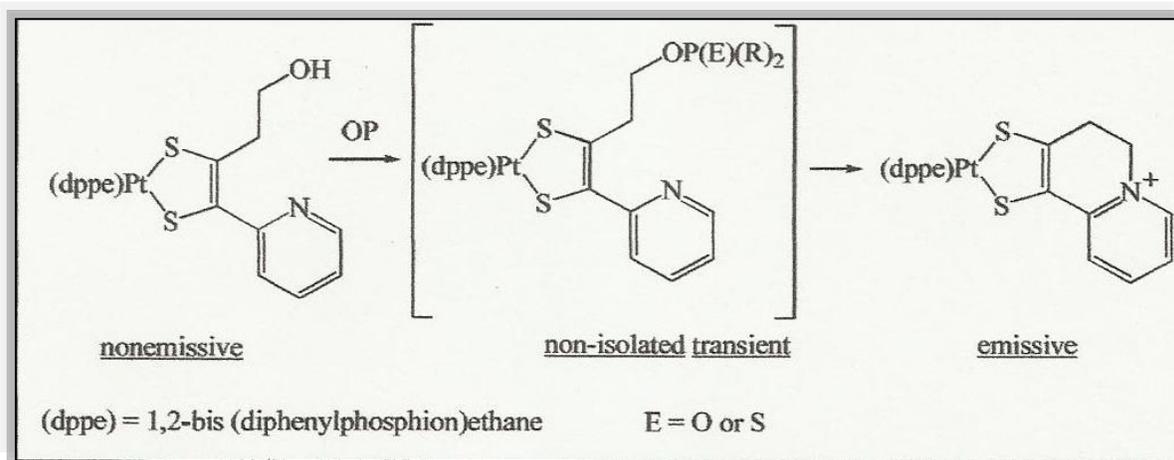


Figura N°9 Mecanismo del desarrollo del sensor químico reactivo por Van Houten y otros. Extraído de la referencia [132], publicado por American Chemical Society 1998.

Zhang y Swager [152] desarrollaron una serie de sistemas con el compuesto tienilpiridil fenilpiridilo que producen reacciones de ciclación intramoleculares tras la exposición del sistema a compuestos OP. Esto origina cambios en la absorción y en la fluorescencia de estos sensores químicos. Se utilizó una lámpara UV bajo una atmósfera ambiente y se observaron notables cambios de fluorescencia. Se encontró que este sistema es sensible y selectivo a compuestos OP y que muestran una respuesta completa hasta de 10 ppm DFP (diisopropilfluorofosfato) en forma de vapor dentro de los cinco minutos.

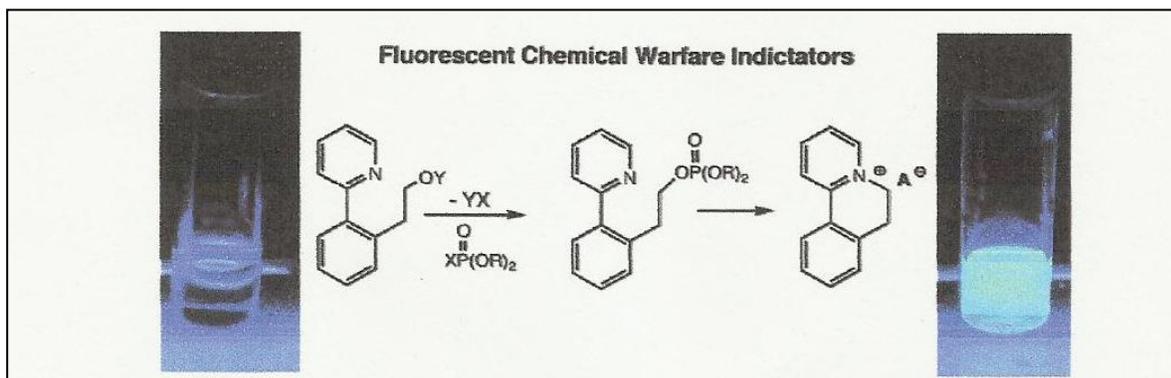


Figura N°10 El sensor químico reactivo informado por el grupo Rebek Extraído de la referencia [153], publicado por American Chemical Society 2006.

El grupo de Rebek [153] llevó a cabo un trabajo similar para desarrollar sensores de compuestos OP donde una serie de compuestos derivados de pireno, se examinaron como posibles receptores fluorescentes. El diseño de los sensores químicos fueron similares a la mostrada por Van Houten y otros, y Zhang y Swager, y sin embargo el mecanismo de la reacción de unión se basa en la supresión de una transferencia de electrones fotoinducida (PET) proceso que sirve para activar una señal de fluorescencia. Las cadenas alifáticas saturadas que oscilan desde uno hasta cuatro unidades de metileno, fueron empleadas como el espaciador que une el fluoróforo y es afectada la amina por la eficiencia de los

sensores. El Pireno se utilizó como el fluoróforo ya que puede aceptar electrones a partir de aminas terciarias en los procesos de PET. Tras la unión a clorofosfato de dietilo (DCP), los sensores resultaron en un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia y los cambios eran visibles a simple vista, las muestras se observaron visualmente usando una lámpara UV de mano. El sensor muestra una instantánea (dentro de 5 segundos) de fluorescencia tras la exposición a solo 10 ppm.

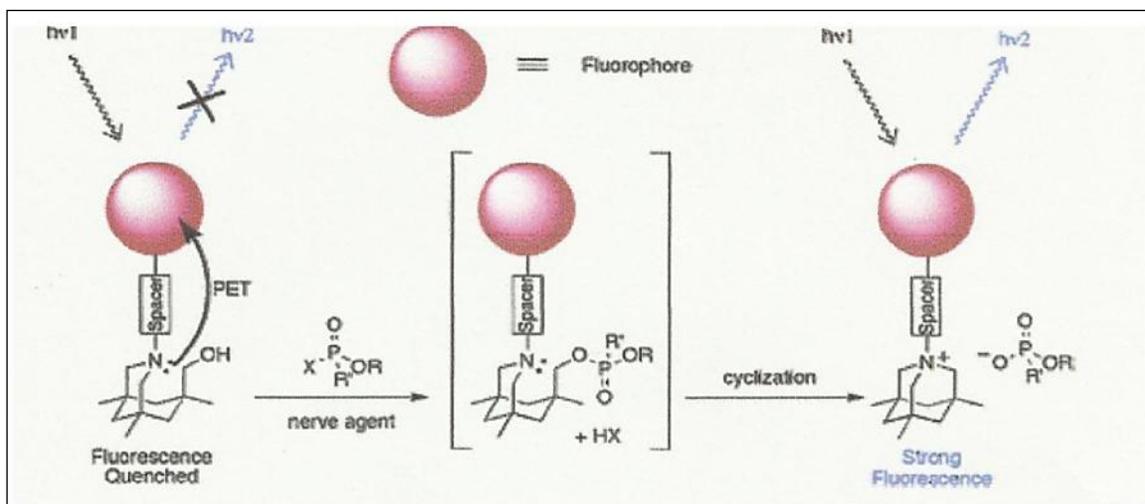


Figura N°11 El sensor reactivo químico informado por el grupo Rebek. Extraído de la referencia [153], publicado por American Chemical Society 2006.

En 2007, el grupo de Simonian [154] informó un sensor de fluorescencia para plaguicidas organofosforados sobre la base de Cumarina 1. La Cumarina 1 en presencia de p-nitrofenol sustituido con compuesto OP conduce a la extinción de la fluorescencia debido a la transferencia de energía resonancia fluorescente (FRET). El sensor es muy eficaz en la detección de plaguicidas nitrofenilo sustituidos como son el metil paratión y el fenitrotión.

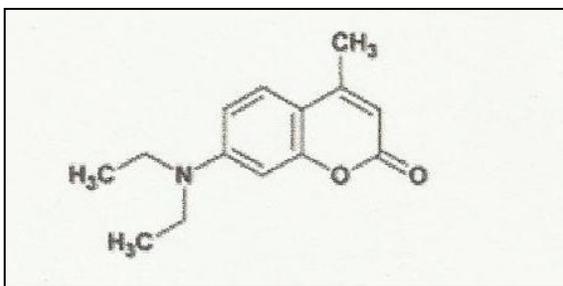


Figura N°12 Cumarina 1, Compuestos fluorescentes e inhibidor informado por el grupo Simonian. Extraído de la referencia [154], publicado por Elsevier, 2007.

Delattre y colaboradores [155] informaron que una ciclodextrina (CD) se usa como sensor fluorescente basado para la detección de plaguicidas en el agua. La D-glucopiranososa en la CDs con una cavidad hidrofóbica, lo que puede inducir a los fenómenos de inclusión de un huésped. El sistema macromolecular dipolar varía con la entrada de una molécula huésped. Una modificación  $\beta$ -ciclodextrina, la piridinoindolizina- $\beta$ -ciclodextrina, se utilizó para detectar pesticidas y herbicidas (lindane, el paratión, el malatión, imidacloprid, atrazina, simazina) a través de un complejo de inclusión entre el pesticida o herbicida y la cavidad hidrofoba del macrociclo. Esta interacción conduce a la extinción de la fluorescencia del fluoróforo. Una ventaja de este sensor de fluorescencia es la capacidad de cuantificar los datos de concentración a través de la intensidad de fluorescencia.

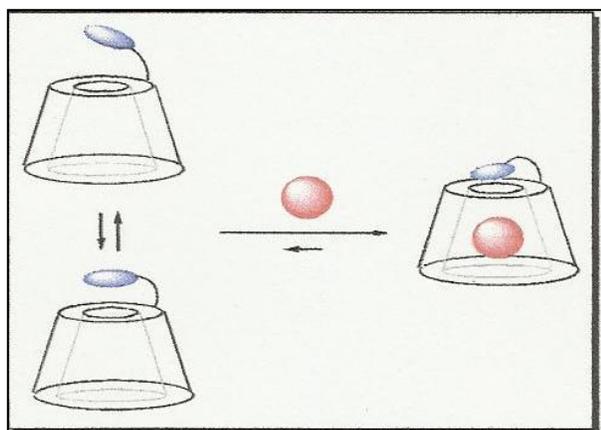


Figura N°13 Complejos de inclusión de un huésped en las moléculas de CDs. Extraído de la referencia [155], publicado por Bentham Science, 2009.

Otro tipo de sensores es el Auto-ensamblado de múltiples capas (SAM), que consiste en amino-cuarzo silanizado funcionalizadas con nanopartículas de oro recubiertas con indol y mediante un enlace de L-cisteína fue fabricado como se muestra en [156]. Cuando el sensor de SAM fue expuesto al pesticida, el grupo indol del sensor en la película modificada, se oxida a un grupo indoxilo fluorescente.

El proceso de oxidación depende de la concentración de pesticidas y se refleja en cambios en la intensidad. El sensor fue capaz de detectar el metilparatión y monocrotófos en el rango de ppm y ppb, respectivamente. Una ventaja del sensor de indol basada en SAM es que podría detectar pesticidas OP en especies iónicas medioambientales y de otro tipo, pero está sujeto a la interferencia en 20 equivalentes de iones  $\text{Fe}^{3+}$ .

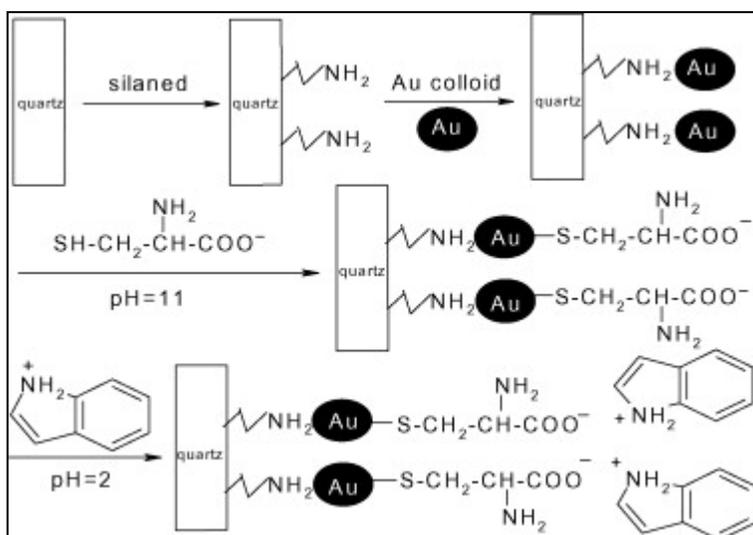


Figura 14. Representación esquemática de la formación del indol sensor basado en SAM.

Extraído de la referencia [156], publicado por Elsevier, 2008,

### 3-1-7 Los sensores con múltiples modos de Transducción de Señales

Hay una creciente toma de conciencia y una tendencia hacia el desarrollo de sistemas multimodales que recuerda el de los organismos vivos y que utilizan múltiples sentidos para responder inteligentemente a los estímulos múltiples en el mundo real ambiental. Una ventaja importante de estos sensores multimodal es la minimización de falsos positivos. En este sentido, recientemente se han desarrollado y reportado nuevos sensores químicos con sensor multimodal con capacidades para analitos tales como sacáridos [157] y los compuestos OP tóxicos [158].

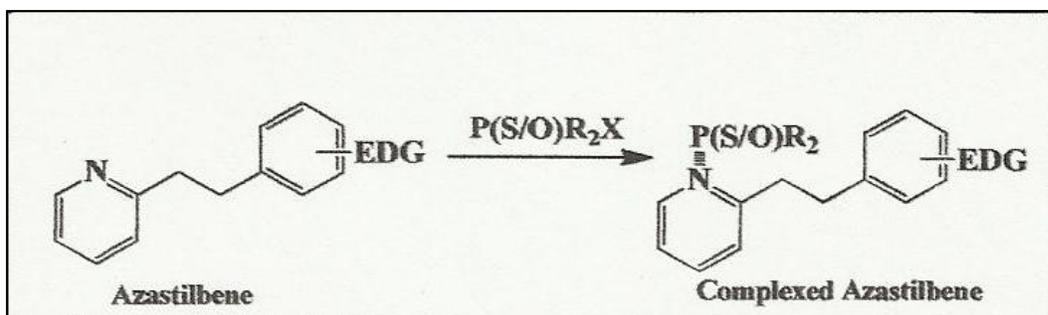


Figura N°15. Representación esquemática de complejo (izquierda) y complejos (derecha) Azastilbene [158]. (EDG = grupo dador de electrones).

Una nueva estrategia de diseño, utiliza y acopla la reactividad electrófila del átomo de fósforo pentavalente de los grupos fosforilo y tiofosforilo de los OPs tóxicos, a un fluoróforo nucleófilo capaz de reconocer e informar de las interacciones del sensor analito. En la señal la transducción se prevé que se produzca a través del sistema electrónico  $\pi$  del sistema aceptor donante (azastilbene) en la complejación del fósforo electrófilo con el sitio de unión nucleófilo que muestra el sensor químico óptico.

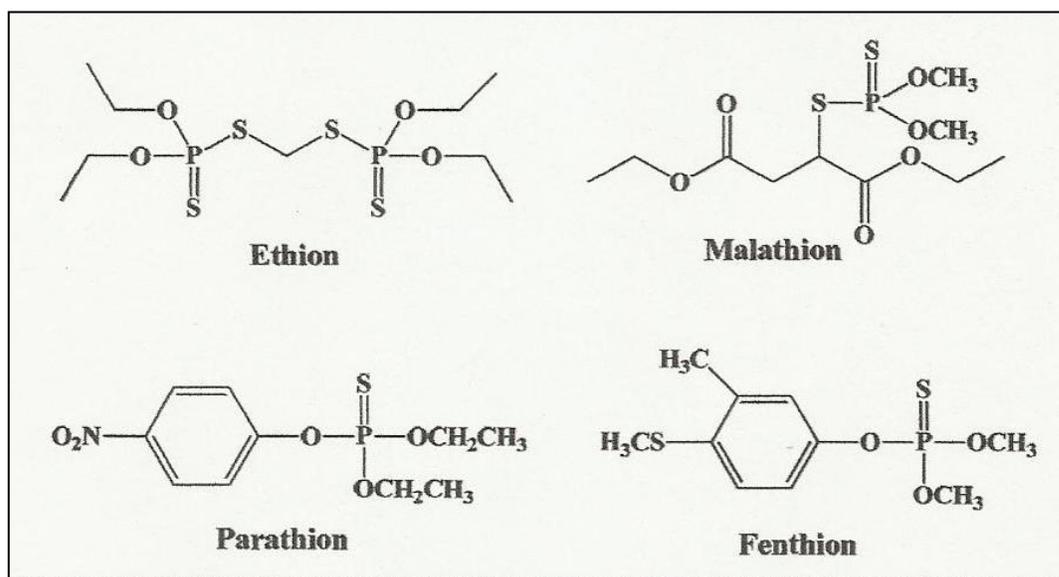


Figura N°16 Las estructuras químicas de los pesticidas analizados.

Las estructuras químicas del etión, malatión, paratión y fentión, son las estructuras de los pesticidas OP por medio de los cuales se evalúa la eficacia de los sistemas aceptor donante

azastilbenes, usado como sensores. Se ha demostrado que la azastilbene, dimetil-[4 - (2-quinolin-2- il-vinil)-fenil]-amina (DQA), reconoce, reacciona y responde a los plaguicidas: etión, malatión, paratión y fentión. Los productos de la unión de los pesticidas anteriormente mencionados con DQA, se leen por medio de un espectroscopio de absorción obteniéndose las absorbancias en las diferentes longitudes de onda de un espectro visible y además la determinación del número de puntos isobéptico en cada caso. Se observa que el paratión y el fentión no muestran puntos isobéptico mientras que el etión y el malatión tienen dos cada uno.

Se puede usar esta técnica como una herramienta fiable de diagnóstico cualitativo y cuantitativo en la detección y en el análisis de los programas operativos.

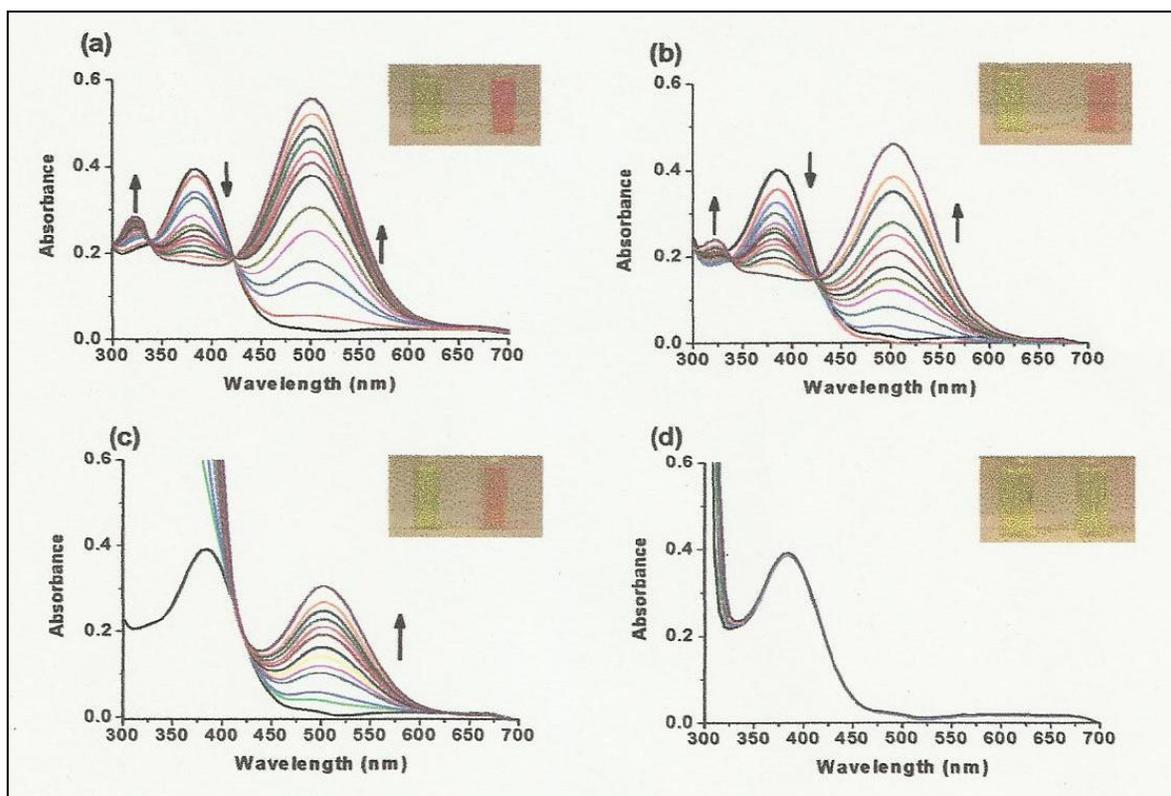


Figura N°17 Cambios en la absorbancia de la unión de DQA con los pesticidas OP.

a) titulación con el etión b) titulación con malatión c) titulación con paratión y d) titulación con fentión, En cada caso la dirección de la flecha indica la concentración de 0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24  $\mu\text{M}$ .

La interacción de estos plaguicidas con el DQA fue estudiada con los siguientes métodos:

Espectroscopía de absorción UV- visible, Espectroscopía fluorescente, y voltametría cíclica.

En los espectros de emisión de DQA obtenido en disolvente acetonitrilo se observa un pico centrado en 530 nm. Los cambios en los espectros de fluorescencia de DQA se midieron con los diferentes OP.

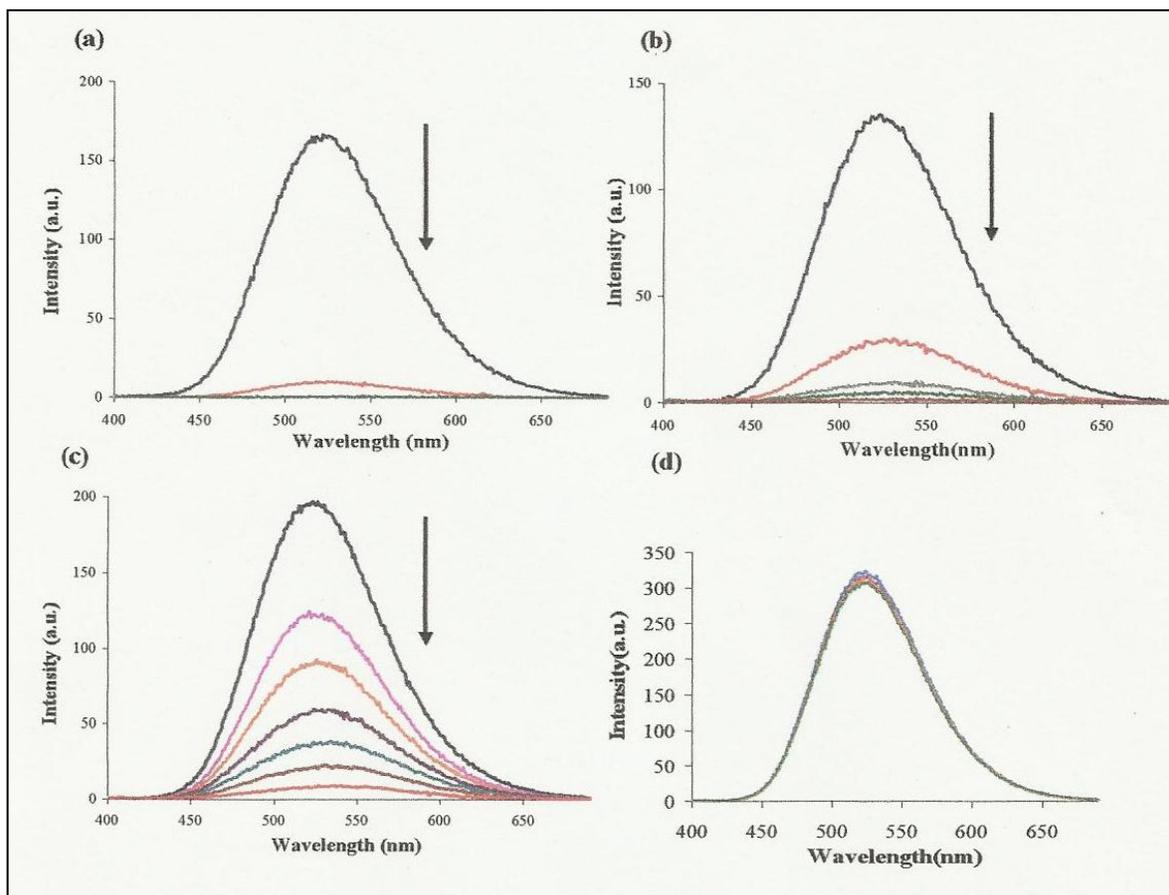


Figura N°18 Cambios en el espectro de emisión de la fluorescencia del DQA unido a los OPs (a) Titulación con etión con las concentraciones 0,2,4,6  $\mu\text{M}$  (b) Titulación con malatión con las concentraciones desde 0,2,4,6,8  $\mu\text{M}$  (c) Titulación con paratión con las concentraciones 0,2,4,6,8,10,12  $\mu\text{M}$  (d) En el caso del fentión en una concentración con más de 24 $\mu\text{M}$  no se observa ningún cambio.

Las flechas indican la dirección en la cual se produce el cambio de la intensidad de la fluorescencia. Según los resultados expuestos en este artículo, con la valoración del etión se observa una fluorescencia completa de extinción de DQA. Del mismo modo, el resultado de la extinción de la fluorescencia en la titulación de DQA tanto con el malatión y con el paratión. En el caso de fentión, conlleva a un comportamiento similar en los resultados

obtenidos con los estudios de absorbancia UV-visible, es decir, la valoración de DQA con fentión no dio lugar a cambios significativos en los picos de emisión. En el caso del etión, el malatión y el paratión, la intensidad de fluorescencia de DQA disminuye pero la sensibilidad es del orden de etión > malatión > paratión.

Las reacciones DQA-OP pueden ser explicadas por un sistema ácido - base de Lewis o por medio de interacciones nucleófilo-electrófilo entre el átomo de nitrógeno quinolinilo y los átomos de fósforo del OP. Las reacciones de electrófilos (por ejemplo, protones, cationes metálicos, y carbono) con los compuestos 4-dimetilamino stiril aza aromáticos ocurren exclusivamente en el anillo nitrogenado (piridilo, quinolinilo) [164]. Esto generalmente resulta en la formación de las correspondientes sales de amonio cuaternario (piridinio quinolinum). Por lo tanto, es razonable asumir que los reactivos electrófilos (fósforo) también reaccionan preferentemente con el anillo aza aromático nitrogenado. Por otra parte, cálculos computacionales realizados con el programa Gaussian 03 [165] revela que el potencial electrostático en el nitrógeno de la quinolina es mayor en relación con el nitrógeno dimetilamino.

Una vía común mecanicista de las reacciones de transferencia del fosforilo es a través de procesos de SN2 concertada (P) en los que un ataque nucleófilo sobre el fósforo conduce a la expulsión del grupo saliente. En estos escenarios SN2, la velocidad de reacción para la transferencia de tiosforilo se espera que sea altamente dependiente del grupo saliente. Esto a su vez afectará a la constante de unión del nucleófilo entrante. Esta interpretación es consistente con nuestros resultados, ya que por ejemplo, se sabe que el anión p-nitrofenolato del paratión es mucho mejor grupo saliente, más estable que el anión fenolato del fentión. Por lo tanto, el paratión tiene una constante de unión más fuerte que el fentión a DQA. La interacción de DQA con cada pesticida OP depende de la estabilidad del grupo saliente (el más estable es el grupo saliente del OP), es más probable que se disocie tras la interacción con el nitrógeno nucleófilo quinolinilo DQA.

Los cambios ópticos y electroquímicos del DQA azastilbene cuando se exponen al etión, malatión, paratión y el fentión muestran el potencial de azastilbenes como viables por motivos estructurales para el desarrollo de sensores químicos multimodales. Los Azastilbenes han demostrado la capacidad de distinguir entre los diversos plaguicidas, lo

cual es importante tanto para el medio ambiente, así como en la seguridad de las aplicaciones. Los posibles trabajos que se pueden desarrollar en un futuro cercano es la obtención de aún más muestras de azastilbene basadas en sensores químicos multimodal para organofosforados tóxicos y otros analitos tóxicos.

### **3-1-8. Perspectivas para el futuro de los métodos de detección de OP**

Un progreso significativo se ha logrado para el desarrollo de sensores químicos fluorescentes para pesticidas tóxicos organofosforados y agentes de guerra química.

Estos sensores químicos han demostrado ser eficaces en el tiempo y más robustos que los biosensores. Es evidente que las mejoras futuras en esta área requerirá el diseño de nuevos sensores químicos fluorescentes con modos adicionales para la señal de transducción.

Tales sensores jugarán un papel importante en la minimización o eliminación de falsos positivos.

Debido a la similitud estructural de compuestos OP, también es de suma importancia que el Sensor diseñado debe ser fabricado de manera tal que sean muy selectivos hacia compuestos OP específicos.

Según estos autores la segunda generación de sensores OP azastilbene deberá:

- (a) Aumentar la multimodalidad del sensor.
- (b) Mejorar la selectividad del sensor entre oxons y tions.
- (c) Desarrollar sensores robustos con capacidad trabajar en matrices complejas, incluyendo sistemas acuosos.

### **3-2-1 Aporte de los estudios teóricos al conocimiento de las propiedades de los pesticidas.**

Con el fin de evaluar la capacidad de las  $\beta$ -CD para discriminar entre diferentes enantiómeros de pesticidas, Manunza y otros [167] llevaron a cabo un cálculo de dinámica molecular (MD) para investigar el mecanismo de la unión selectiva de  $\beta$ -CD con los enantiómeros R y S del herbicida organoclorado de diclorprop, de su derivado el ácido 2 - fenoxipropiónico y el insecticida organofosforado dioxabenzofos.

Las moléculas del diclorprop y del ácido 2-fenoxipropiónico son similares ya que ambas tienen un anillo fenilo con un sustituyente con una función carboxílica. Se construyeron en este artículo, las estructuras moleculares de los seis complejos de inclusión 1:1, es decir un complejo para cada enantiómeros, después de un proceso de acoplamiento en la cavidad de la  $\beta$ -CD. Estos aductos fueron estructuras modeladas a partir de cálculos con MD. Las corridas MD se realizaron empleando el programa DLPOLY2 [168], el método AMBER [278], [194], además del GLYCAM [282], se utilizó un campo de fuerzas con las adaptaciones necesarias, mientras que las cargas parciales atómicas de la  $\beta$ -CD se calcularon por el método Gasteiger [180].

La  $\beta$ -CD para la simulación de la estructura fue tomada de la "BCDEX04" base de datos Cristalográficos Cambridge.

Todas las simulaciones MD se realizaron en el conjunto NVT (número constante de partículas, volumen y temperatura) y en el interior de una celda cúbica de 35 Å a una temperatura de 298 K. El sistema se dejó equilibrar durante 200 ps y se determinó la trayectoria en más de 1000 ps.

Los resultados explican que la formación de los aductos con el diclorprop y las moléculas de ácido 2-fenoxipropiónico son estables a temperatura ambiente, mientras que ninguno de los enantiómeros dioxabenzofos entró en la cavidad  $\beta$ -CD completamente.

Los resultados computacionales están de acuerdo con la evidencia experimental de que la  $\beta$ -CD forma complejos estables con ambos, el diclorprop y ácido 2-fenoxipropiónico después de 7 horas a 70 ° C y después de 24 horas a temperatura ambiente, mientras que no se observó evidencia experimental para la complejación del dioxabenzofos. Los datos energéticos indicaron que la molécula de  $\beta$ -CD muestra preferencia por los enantiómeros S. Los gráficos de la función de distribución radial mostraron que los enantiómeros R forman enlaces de hidrógeno principalmente con los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilos secundarios en la  $\beta$ -CD, mientras que los enantiómeros S forman puente de hidrógeno incluso con los oxígenos de los grupos hidroxilos primarios del ciclo. Los datos de energía revelaron que los complejos con los enantiómeros R del diclorprop y del ácido 2-fenoxipropiónico, presentan un ventajoso puente de hidrógeno, en cambio esto no se observa en los aductos con la forma enantiomérica S, por la liberación de energía de deformación principalmente por la molécula de  $\beta$ -CD.

La aplicación de las ciclodextrinas para la formulación de pesticidas era, hasta hace algunos años, algo difícil [169], pero la situación ha cambiado de manera significativa ya que el costo técnico de las  $\beta$ -CD de buena calidad, es totalmente aceptable para la industria de la formulación de pesticidas. Tal uso potencial de la  $\beta$ -CD puede ser de gran interés para aumentar la actividad biológica de estos productos químicos [249].

La hidrólisis alcalina de tres pesticidas organofosforados, como son, fenitrotión, paratión y metilparatión, parece ser inhibida por  $\beta$ -CD [375]. Este comportamiento, se atribuye a una inclusión más superficial del huésped en la cavidad, es menor en el caso de fenitrotión [332].

El análisis realizado por medio de dicroísmo circular reveló que la inclusión de los pesticidas se produce por el extremo del grupo nitro y lo mismo ocurre con los análogos ésteres de ácidos carboxílicos, cuya hidrólisis es, por el contrario, catalizada por la  $\beta$ -CD Osa y Suzuki [251] y Coscarello y otros [195] analizaron el proceso de formación de los complejos de ambos pesticidas y sus análogos de éster carboxílico por  $\beta$ -CD. a) Se aplicaron cálculos de mecánica molecular MM+ [271,272]. b) métodos semiempíricos PM3 contenidos en el programa HyperChem-7 (2002) [226]. La formación de complejos de fenitrotión se exploró más allá, ya que los experimentos demostraron que su hidrólisis es relativamente menos inhibida y avanza principalmente a través de una vía diferente. Los resultados mostraron que las estructuras complejas que implican los ésteres carboxílicos permiten interacciones eficaces entre el carbonilo huésped y el borde de la  $\beta$ -CD. El metilparatión y el paratión, sin embargo, se observaron incluidos profundamente en la cavidad de  $\beta$ -CD, en estas condiciones un ataque nucleofílico por la  $\beta$ -CD, no se vería favorecido. Para el fenitrotión se obtuvo un complejo de geometría tal que, al parecer, un ataque de un grupo OH de la  $\beta$ -CD no sería posible, pero sí, en cambio, el de un grupo OH externo, en acuerdo con los datos experimentales. Este trabajo será desarrollado en el próximo capítulo.

Los óxidos metálicos inorgánicos se usan en la industria química como adsorbentes, sensores, catalizadores, etc. Debido a sus características únicas morfológicas y de alta área superficial, los nanocristales de óxidos metálicos se han utilizado como adsorbentes para la descomposición o la detección de variedad de contaminantes y sustancias nocivas, incluidos los compuestos organofosforados [260]. Recientemente, nanopartículas de óxido

de cinc (ZnO) han recibido mucha atención, debido a las aplicaciones tales como la descomposición, desodorización, la absorción ultravioleta, y el tratamiento antibacteriano. Es un catalizador bien conocido, adsorbente de gases, sensor tóxico, etc. [283]. Entre las propiedades químicas y únicas del ZnO es que se encuentra en el límite entre los sólidos iónicos y los covalentes [206]. Leszczynski y otros [253] estudiaron la adsorción de Tabun (TB) que es un agente tóxico de guerra que actúa a nivel del sistema nervioso y el dimetilo metilfosfonato (DMMP) un organofosforado que se simuló en las superficies de ZnO polares y no polares, utilizando el enfoque del modelo de clúster. Fueron considerados diferentes tamaños de racimos y de los sitios de adsorción de ZnO, y fue investigada la influencia de los diferentes métodos de cálculo, en la naturaleza de las interacciones de estas moléculas con la superficie del cristal de ZnO. Se consideraron para el ZnO dos tipos de superficies, polares y no polares, siendo este último caso el más estable para el sólido. Estas superficies de ZnO se han estudiado experimentalmente [206 y 207]. Los cálculos de adsorción de DMMP y TB que se produce en las superficies de los modelos de ZnO fueron realizados en varios niveles del cálculo teórico, por ejemplo uno de los niveles fue el ab initio, y el método que se utilizó fue el ONIOM implementado en el paquete Gaussian programa 03/Rev.C02 (Frisch et al., 2004), con el fin de probar la influencia del método en las interacciones intermoleculares. La geometría de las moléculas diana se optimizaron completamente mientras que el fragmento ZnO se mantuvo congelado.

DMMP contiene tres grupos diferentes que pueden estar involucrados en las interacciones intermoleculares con los sitios activos de la superficie de ZnO, ellos son el P = O, O-CH<sub>3</sub>, y CH<sub>3</sub>. Por lo tanto, se ensayaron varias orientaciones iniciales diferentes de DMMP hacia el grupo óxido.

Para probar el efecto de los átomos circundantes de Zn y O y las capas adicionales sobre la adsorción de la molécula diana, los autores realizaron los cálculos ONIOM: el sistema molecular se dividió en dos capas, que fueron tratadas en los diferentes niveles, el más estricto el DFT, y el otro por medio del método PM3.

Desde los resultados, los autores concluyeron que en ambas superficies de ZnO, la adsorción molecular se produce como quimisorción a través de la formación de un enlace químico Zn ••• O en el caso complejo de adsorción con DMMP, y un enlace covalente P ••• O ó uno Zn ••• N para los complejos de adsorción con TB. El tipo de superficie

afectada en gran medida la fuerza de las interacciones intermoleculares y las energías de interacción.

Los resultados indican que la adsorción de DMMP y TB es energéticamente más favorable en la superficie no polar del ZnO. Se determinó que TB se halla más firmemente unido a la superficie de ZnO que la DMMP, pero las energías de adsorción eran aproximadamente la mitad de los valores revelados para la adsorción de la TB y la DMMP sobre una superficie de CaO, como informaron los mismos autores [247 y 252]. Por lo tanto, la conclusión fue que la descomposición de estos compuestos procedería más fácil sobre CaO, mientras que ZnO sería un sensor eficaz para su detección.

Las entalpías de formación experimentales ( $\Delta_f H^\circ(298)$ ) para muchos importantes compuestos organofosforados son a menudo desconocidos o son conocidos pero con gran incertidumbre, debido a la combustión incompleta y a la formación de una mezcla de los diversos oxoácidos de fósforo que dificultan la definición precisa del sistema final [256]. Debido a la falta de datos termoquímicos precisos, existen enfoques alternativos, tales como cálculos cuánticos químicos que pueden ser usados para predecir los valores del  $\Delta_f H^\circ(298)$  de compuestos organofosforados. Para predecir con precisión las propiedades termoquímicas de moléculas más grandes con un costo computacional relativamente bajo, se desarrollaron los métodos Gaussian-n [G2, G3, G3 (MP2), G3X, G3X (MP2), etc.] [197, 198, 199 y 174].

En estos métodos, cálculos de diferentes niveles de teoría se combinan para producir diferencias de energía con precisión de aproximadamente 1 kcal / mol, en comparación a los resultados experimentales. Estos métodos han sido calibrados respecto a un conjunto de propiedades atómicas y moleculares (energías de atomización, potenciales de ionización, afinidad electrónica y protónica, etc.) El principio general es realizar un cálculo en un alto nivel de teoría y luego corregir este valor por deficiencias utilizando cálculos menos costosos, de nivel teórico inferior.

La modificación de la teoría G3, en particular, llamado Gaussian-3X (G3X), fue diseñada para mejorar la relación entre el valor  $\Delta_f H^\circ(298)$  teórico y el experimental para moléculas que contienen átomos del segundo período (Na-Ar). Este método proporciona buenos datos, comparados con los experimentales, para compuestos inorgánicos de fósforo.

Dorofeeva y Moiseeva [205] calcularon el  $\Delta_f H^\circ(298)$  de compuestos orgánicos que contienen fósforo. Su propósito era: a) evaluar datos experimentales aceptados sobre compuestos organofosforados (III) utilizando el método G3X, b) recomendar un conjunto coherente de valores de  $\Delta_f H^\circ(298)$  basados en valores experimentales mejores y en la mejor calidad de los resultados G3X, c) para calcular valores de  $\Delta_f H^\circ(298)$  precisos de los compuestos organofosforados (III) desprovistos de datos experimentales termoquímicos, d) obtener un conjunto coherente y preciso de valores de actividad de grupo ( $G_{avs}$ ) necesarios para estimar la  $\Delta_f H^\circ(298)$  para moléculas de organofósforo (III) más grandes, tomando en cuenta que con el método empírico de aditividad de grupo de Benson [178 y 192] se pueden predecir propiedades termoquímicas de compuestos orgánicos con precisión química, es decir, dentro de 4 kJ / mol. Así el  $\Delta_f H^\circ(298)$  de 55 compuestos de organofósforo (III) se calcularon por medio de G3X, G3X (MP2), y DFT, por medio del procedimiento de la energía de atomización y del método de reacciones isodésmicas.

Este método se basa en el principio de que, para una determinada reacción, es necesario, se puede esperar que un enfoque computacional particular tenga deficiencias similares tanto para reactivos como para productos que son químicamente similares; por esto se espera que las deficiencias se cancelen entre sí, cuando se calcule la entalpía de la reacción. Dorofeeva y Moiseeva calcularon también los valores de  $\Delta_f H^\circ(298)$  para 50 moléculas de tamaño moderado con 2 a 10 átomos distintos del hidrógeno, directamente a partir de las energías de atomización G3X.

Ejemplos de tal grupo son  $P(CH_3)_3$ ,  $P(C_2H_5)_3$ ,  $P(OCH_3)_3$ ,  $n-C_4H_9OPCl_2$ ,  $[(CH_3)_2N]_2PCl$ ,  $(C_2H_5)_2NPCL_2$ , y  $[(CH_3)_2N]_2PCN$ .

Mediante la comparación de los datos experimentales con los resultados G3X, se encontró que el método G3X reproduce exitosamente valores bien establecidos de  $\Delta_f H^\circ(298)$ , con una precisión de  $\pm 10$  kJ / mol.

Se obtuvo una buena concordancia entre los valores experimentales conocidos y los resultantes de G3X para 14 compuestos; esto prestó apoyo a las predicciones para otras especies con  $\Delta_f H^\circ(298)$  desconocidos experimentalmente u obtenidos con grandes incertidumbres.

Los valores de  $\Delta_f H^\circ(298)$  obtenidos en este trabajo proporcionan un conjunto coherente de estimaciones fiables para el modelado termodinámico de procesos involucrando especies

que contienen fósforo (III). Los valores recomendados de  $\Delta_f H^\circ(298)$  fueron utilizados para obtener los Gavs para 45 grupos implicando el átomo de fósforo (III), extendiendo así la aplicabilidad del método de Benson de aditividad de grupo para estimar el  $\Delta_f H^\circ(298)$  para compuestos tipo organofósforo (III) más grandes (para los cuales cálculos cuánticos de alto nivel podrían aparecer como impracticables).

Hemseloet y otros [223] realizaron un amplio estudio ab initio de especies que contienen fósforo con tres objetivos principales:

- a) Evaluar una amplia gama de métodos de cálculo, a los fines de poder determinar un nivel de teoría apropiado para el cálculo de propiedades de disociación en los compuestos de fósforo,
- b) Para proporcionar datos termoquímicos como la entalpía de formación, la capacidad calorífica y la entropía para un conjunto de especies que contienen fósforo y que representan aditivos inhibidores de coke industrialmente importantes,
- c) Para calcular entalpías de disociación de enlace (BDE, por sus siglas en inglés) de estos compuestos para establecer la estabilidad de los radicales formados y sus tendencias de reactividad.

Realizaron cálculos estándar ab initio y de funcional de la densidad (DFT) mediante los programas Gaussian03/Rev. D.01 [212], Molpro 2002,6 [280], y NWChem5 [188].

Las geometrías fueron optimizadas en DFT.

Las frecuencias de vibración armónicas se calcularon en el mismo nivel de teoría y con ellas se obtuvieron las energías de punto cero y para confirmar la naturaleza de los puntos estacionarios.

Se realizaron subsiguientes cálculos de energía de un solo punto (*single point*), utilizando varios niveles de teoría y se evaluaron diversos métodos en cuanto a su rendimiento. Se demostró que la combinación G3(MP2)-RAD [224] genera valores de calores de formación para moléculas pequeñas conteniendo fósforo, que están de acuerdo con los datos experimentales.

Hodgson y Coote [224] investigaron las estabildades relativas de radicales fosforanilos  $\bullet P(CH_3)_3X$  e introdujeron una nueva medida de la estabilidad, esto es la  $\alpha$ -RSE ( *$\alpha$ -radical stabilization energy*). A diferencia de la RSE estándar, la  $\alpha$ -RSE mide la estabilidad del radical con respecto a  $P(CH_3)_2X$  en lugar de  $H-P(CH_3)_3X$ .

Esto significa que se evalúa la estabilidad del radical sobre la base de su susceptibilidad a la escisión  $\alpha$ - del radical metilo en lugar de la abstracción del hidrógeno.

El estudio proporciona un amplio conjunto de datos de alto nivel de cálculo, que Hemelsoet y otros, [223] tomaron como valores de referencia. Se calcularon las energías de disociación de enlace  $D(\bullet\text{P-C})$  y  $D(\bullet\text{P-X})$  de los radicales fosforanilos  $\bullet\text{P}(\text{CH}_3)_3\text{X}$ . Los valores de referencia de la categoría  $D(\bullet\text{P-C})$  pudieron ser reproducido utilizando diversos métodos DFT de bajo costo, mientras que esto resultó mucho más difícil para los valores de  $D(\bullet\text{P-X})$ . En el caso de  $D(\bullet\text{P-C})$ , los métodos ROB2PLYP [217] y ROMPW2PLYP [265] resultaron mejores.

Los valores  $D(\bullet\text{P-X})$ , por otro lado, fueron en general mejor reproducidos utilizando los métodos SOS- [231] y SCS-ROMP2 [217]. El prefijo RO indica que los cálculos de radicales se llevaron a cabo con una función de onda de referencia de capa abierta restringida, en oposición a los cálculos de capa abierta sin restricciones. Las entalpías de disociación de uniones BDE se calcularon utilizando los niveles de teoría BMK [182], M05-2X [193] y SCS ROMP2.

Los tres métodos dan la misma tendencia en la estabilidad. No hay correlación observada entre BDE y parámetros geométricos o cargas atómicas (spin). Las BDE de moléculas de fósforo (III) se han encontrado más bajas que las de sus homólogas con fósforo (V). En general, los autores informan el siguiente orden hallado:  $\text{BDE}(\text{P-OPh}) < \text{BDE}(\text{P-CH}_3) < \text{BDE}(\text{P-Ph}) < \text{BDE}(\text{P-OCH}_3)$ .

Además, las entalpías estándar de formación, las entropías y capacidades caloríficas de un conjunto de diez especies organofosforadas, que representan aditivos inhibidores de coke, se calcularon utilizando el funcional BMK, de bajo costo.

Los resultados fueron consistentes con los datos experimentales disponibles y podrían ser utilizados como entrada en modelos cinéticos.

### **3-2-2 Introduciéndonos en la actividad enzimática**

Entre las clases de productos químicos que han sido desarrollados como pesticidas, los compuestos organofosforados (junto con los carbamatos), representan una parte muy

importante del mercado mundial de pesticidas [191]. Ambas clases deben su toxicidad aguda a la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), la enzima que regula la concentración del neurotransmisor acetilcolina (ACh). El papel principal de la AChE en el sistema nervioso consiste en terminar la transmisión del impulso en la sinapsis colinérgica por medio de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina [266].

La enzima fosfotriesterasa (PTE) tiene la capacidad de hidrolizar una amplia gama de compuestos organofosforados triéster incluidos pesticidas e insecticidas, así como agentes de guerra química, y tiene un gran potencial para su uso en la biorremediación de estos contaminantes ambientales. Koča y otros [236] examinaron teóricamente la geometría y la movilidad de varios complejos sustrato/sitio-activo-PTE, utilizando como sustratos el paraoxón y el sarín. Sus observaciones indicaron que el posicionamiento del sustrato en el sitio activo de la enzima, así como la flexibilidad del sitio activo, desempeñan un papel importante en el proceso enzimático. Como la reacción enzimática es muy rápida, la obtención de los datos experimentales directos sobre el complejo enzima - sustrato es muy difícil, por lo que los autores recurrieron a las simulaciones de dinámica molecular (DM) de los complejos solvatados sustrato-PTE, así como cálculos de mecánica cuántica en un modelo simplificado del sitio activo complejo con los sustratos, con el fin de abordar cuestiones sobre el comportamiento de la proteína antes y durante la interacción con el sustrato. Se llevaron a cabo en la subunidad del dímero de PTE, simulaciones de DM utilizando AMBER 5.0 [190] con el campo de fuerza informado por Cornell y otros [194]. En este trabajo, fueron producidas siete simulaciones en 500 picosegundos, cinco sobre la proteína completamente solvatada y dos de cada sustrato, paraoxón y sarín, en fase gaseosa. Se determinaron las cargas atómicas parciales para paraoxón, sarín, y la Lys-169 carbamilada del sitio activo utilizando el procedimiento del potencial electrostático restringido (RESP) descrito en Cornell y otros [194]. Los cálculos químicos cuánticos se llevaron a cabo mediante los programas Gaussian94 [210] y Gaussian98 [211].

Las geometrías de los complejos PTE-sustrato se optimizaron empleando la teoría funcional de la densidad (DFT), con el funcional B3LYP [193] [177 y 238].

Las correspondientes frecuencias vibracionales fueron evaluadas en las geometrías optimizadas para verificar su verdadera estabilidad. Los resultados obtenidos a partir de las simulaciones de dinámica molecular (DM) mostraron múltiples orientaciones posibles del

paraoxón y del sarín en el sitio activo de la PTE-cinc-sustituida. El oxígeno del fosforilo está fuertemente coordinado con el catión cinc menos profundo, presente en el sitio activo de la enzima (los hay dos); esto permite una fuerte polarización en el centro de reacción del sustrato. Estos resultados indican que la hidrólisis enzimática se produce como un proceso de múltiples etapas, en el que la formación del complejo sustrato-proteína es el primer paso. Hay cambios conformacionales que se producen a lo largo de la región del sitio activo de la PTE, cuando la enzima se halla sumergida en un supuesto baño de agua y se somete a DM. El cambio más notable es la apertura de un paso, específicamente en un hueco donde se espera que se ubique el grupo saliente. La apertura del paso en la enzima ocurre con y sin la presencia de sustrato en el sitio activo. El tamaño de la abertura depende del sustrato y puede variar de 11 a 18 Å. Se observaron diferentes comportamientos conformacionales para los mismos sustratos dentro de diferentes huecos, para diferentes simulaciones, al igual que para la fase gaseosa. Esto demuestra que los huecos del sitio activo generalmente contribuyen a la unión con el sustrato. El análisis detallado de todas las trayectorias reveló que no es en base a los enlaces de hidrógeno esta contribución. Los sustituyentes de los sustratos se localizan en los huecos, y éstos presentan diferente flexibilidad e interactúan con el sustrato con ajustes conformacionales coordinados.

Wong & Gao [281] también llevaron a cabo la hidrólisis PTE del paraoxón para determinar el potencial de fuerza media (PMF), recurriendo al cálculo combinado QM / MM. La energía intrínseca (fase gaseosa) del sitio activo en la región QM se determinaron mediante el uso de DFT (B3LYP) y la teoría de perturbaciones de segundo grado Møller-Plesset (MP2) [222]. Las simulaciones de dinámica molecular de energía libre se realizaron por métodos de interacciones QM / MM, más precisamente, la combinación AM1: CHARMM [202,203 y 204] y [242, 243, 244].

Como ya se ha mencionado, una característica clave del sitio activo del PTE es el centro cinc binuclear, en el que se coordina cada ion cinc a cinco ligandos en una estructura bipiramidal trigonal distorsionada. Los resultados de la simulación sugieren que el perfil de energía libre de la reacción se refleja en los movimientos estructurales de centro metálico binuclear en el sitio activo. El carbamato de la Lys169 y el ion OH<sup>-</sup> nucleófilo, ambos se coordinan con los iones cinc en una conformación compacta con un promedio de distancia cinc-cinc de  $3,5 \pm 0,1$  Å. El enlace P=O del sustrato paraoxón es activado por la adopción

de una coordinación estrecha a la carga más expuesta del ion  $Zn\beta^{2+}$ , la liberación de la coordinación con el ion hidróxilo (lo cual aumenta su nucleofilia). El resultado es una conformación floja binuclear, que se caracteriza por una distancia cinc-cinc promedio de  $5,3 \pm 0,3 \text{ \AA}$  en el estado de transición.

Se encontró también que una molécula de agua ingresa en el hueco del centro binuclear, originalmente ocupado por el ion hidróxilo nucleófilo. Se sugirió que el protón de esta molécula de agua es absorbido por residuo His254 de la PTE a pH bajo o liberado en el disolvente a pH alto, resultando en un ion hidróxido que acerca el  $Zn\beta^{2+}$  para formar una configuración compacta y restituye el estado de reposo de la enzima.

Teniendo en cuenta que la transformación a un estado no-perjudicial de los productos químicos peligrosos, tales como los compuestos organofosforados, se podría también conseguir a través de la biodegradación enzimática [259], Leszczynski y otros [208] se centraron en un estudio ab initio exhaustivo de los posibles mecanismos en fase de gaseosa de la hidrólisis alcalina sustratos PTE bacteriales, referidos a uniones, tales como:

- a) P — O, fósforo-oxígeno (por ejemplo, O, O-dietil p-nitrofenil fosfato (paraoxón), O, O-dietil p-nitrofenil tiofosfato (paratión))
- b) P — F, fósforo y flúor (por ejemplo, O, O-di-isopropilofosforofluoridato (DFP), O-metil isopropil fosfonofluoridato (sarín, SA))
- c) P — S, fósforo-azufre (por ejemplo, ácido acetil fosforamidotioico O, S dimetil éster u O, S-dimetil N-acetil fosforamidotioato (acefato), O, O-dietil S-2-etiltioetilo fosforotioato (demetón-S)),
- d) P — CN, fósforo-cianuro (por ejemplo, O-etil-N, N-dimetil fosforamido cianadato por (Tabun, TB)).

Dada la diversidad química de los sustratos PTE, los autores consideraron esencial dilucidar ciertas características comunes de estos compuestos, en el proceso de hidrólisis que es lo que permite que todos estos sustratos sean alojados en el sitio activo de la PTE y posteriormente a ser sometidos a la catálisis.

La hidrólisis de un enlace P — O puede ser interpretado como un mecanismo  $S_N2$  asociativo concertado, el cual junto con la implicación aparente de un hidróxilo como nucleófilo, se usó para racionalizar el enfoque de los autores al utilizar los resultados en fase gaseosa para

la hidrólisis alcalina como un punto de partida razonable para el estudio de la reacción que se produce en el sitio activo de la PTE.

En cuanto al análisis de la ruptura del enlace P — F, aunque se seleccionaron DFP y SA, el compuesto O, O-dimetil fosforofluoridato fue elegido como un compuesto modelo para el estudio preliminar de los mecanismos de reacción.

El modelo de demetón-S también se simplificó mediante el truncamiento del último grupo metil perteneciente al fragmento S-2-etiltioetilo.

Finalmente, se examinó la influencia del disolvente sobre la estabilidad relativa de las estructuras que se producen a lo largo de coordenadas de reacción particulares.

Los perfiles de la fase gaseosa de la reacción fueron estudiados a nivel ab initio. Para todos los puntos de ensilladura de primer orden, se realizaron cálculos de la coordenada de reacción intrínseca (IRC), revelándose las geometrías de los mínimos locales asociados con un estado de transición dado. Las propiedades termodinámicas (entalpías y energías libres de Gibbs) se determinaron a partir de las frecuencias de vibración calculadas en las estructuras optimizadas de puntos estacionarios a lo largo de una coordenada de reacción. Para dar cuenta de la influencia de la solvatación acuosa, se aplicó el modelo de continuo polarizable (PCM) [245]. Todos los cálculos se realizaron utilizando el programa Gaussian 03/Rev. C02. [212].

Las conclusiones fueron:

- 1) Si bien todas las reacciones de hidrólisis catalizadas por bases que se estudiaron parecen seguir un mecanismo asociativo, la escisión de los enlaces P — O y P — S (excepto la molécula de acefato) se produce de acuerdo con un paso directo de desplazamiento, mecanismo que implica la presencia de un único estado de transición del tipo  $S_N2$ . La hidrólisis de las uniones P — F y P — NC, sin embargo, es consistente con un esquema de adición-eliminación empleando varios productos intermedios de estructura bipirámide trigonal.
- 2) Excepto para el acefato (acephate), son posibles dos vías de reacción alternativas para cada uno de estos mecanismos que difieren en la posición del hidróxido al atacar al átomo de oxígeno del fosforilo. Al parecer, la coordenada de reacción más

favorable energéticamente implica al protón del hidróxido estabilizado por un oxígeno de fosforilo. Cuál mecanismo se produce en el interior del sitio activo de la PTE sigue siendo, según los autores, una respuesta no revelada.

- 3) En el caso de mecanismos de múltiples etapas de adición-eliminación, barreras de energía relativamente importantes se relacionan con un ataque nucleófilo de un hidróxido (es decir, la formación del primer intermediario) y la salida de un grupo saliente (es decir, la descomposición del intermediario final). A juzgar por los resultados de O, O-dimetil hidrólisis fosforofluoridato, las barreras de energía para las transiciones conformacionales son de menor importancia con respecto a los pasos químicos que abarca la formación o rotura de un enlace químico.
- 4) El paso limitante de mecanismos de pasos múltiples parece estar asociado con la formación de un intermediario.
- 5) Dado que todos los caminos de reacción considerados constituyen variantes de un mecanismo asociativo de hidrólisis, presumiblemente podrían acomodarse en un sitio activo común de la PTE.

La tecnología de sensores ha permitido el desarrollo de biosensores enzimáticos reciclables, mediante el confinamiento de enzimas dentro de nanomateriales [239 y 240].

La enzima bacteriana organofosforados hidrolasa (OPH), otro nombre de la PTE, es una candidata a ser inmovilizada porque desactiva catalíticamente la toxicidad de compuestos organofosforados. La OPH posee un sitio activo con dos iones metálicos divalentes unidos por una molécula de agua y un residuo de Lys169 carbamilada.

El cinc  $Zn^{2+}$  es el metal nativo, pero la actividad se consigue también a través de la sustitución por  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  [250 y 261] OPH cataliza la escisión de los enlaces P — O, P — F y P — S de una gran variedad de compuestos de organofosfato triésteres y fosfonatos.

La inmovilización de OPH en sílice mesoporosa funcionalizada (FMS) ha demostrado mejorar la estabilidad y aumentar la actividad catalítica de la enzima en un 200% en comparación con OPH libre en solución [239], pero el efecto del confinamiento sobre la actividad catalítica de las enzimas no se entiende claramente. Gomes y otros [215] desarrollaron modelos de confinamiento y llevaron a cabo simulaciones MD de OPH libre

en solución ( $\text{OPH}_{\text{free}}$ ), OPH confinada mediante restricciones posicionales de los átomos ( $\text{OPH}_{\text{fix}}$ ), y a través de la representación de grano grueso del poro FMS ( $\text{OPH}_{\text{fms}}$ ). El modelo molecular de la OPH fue construido a partir de las coordenadas cristalográficas. Los átomos se representaron por el modelo atómico de van der Waals que contiene cargas puntuales centradas en los átomos. Se usó el campo de fuerza AMBER [194] para tratar las interacciones de partículas unidas y no unidas (*bonded*; *non-bonded*). Los iones de cinc en el sitio activo fueron tratados usando un modelo *non-bonded*, mientras que las cargas atómicas parciales y los parámetros para la Lys169 carbamilada se calcularon como se describe por Soares y otros [267]. Las interacciones entre el FMS y OPH tienen componentes estéricos y electrostáticos. Las interacciones estéricas, debido a la naturaleza inerte del material de sílice, se aproximaron por un modelo no atómico, en el que las posiciones de los átomos de N de los residuos de lisina fueron armónicamente restringidos (excepto Lys169). Las cadenas laterales de lisina son los sitios de unión en los complejos covalentemente unidos OPH-FMS [240]. Las interacciones electrostáticas, debido a la funcionalización de los mesoporos, se modeló como una matriz cilíndrica, uniforme de átomos, con cada átomo correspondiendo a un determinado grupo funcional. En cuanto al grupo  $\text{COO}-(\text{CH}_2)_n$ , experimentalmente usados para funcionalizar la sílice mesoporosa, la superficie porosa fue representada por partículas puntuales de carga -1 y los parámetros de van der Waals correspondientes a un anión carboxilato derivados mediante campo de fuerza AMBER. La estructura OPH se acopló a la pared del poro FMS en base a la complementariedad de sus superficies de potencial electrostático calculadas con el programa APBS [175]. Dentro de tiempos de simulación de 5 nanosegundos, varias propiedades estructurales alcanzaron convergencia. Todas las simulaciones se realizaron con el programa NWChem [186], y los análisis de las trayectorias moleculares se llevaron a cabo con el programa GROMACS [241]. La simulación  $\text{OPH}_{\text{fix}}$  parecía describir mejor las configuraciones alrededor de la estructura de rayos-X. Sin embargo, este modelo de restricción posicional suprimió la flexibilidad de la región del bucle situado en la entrada del sitio activo de la enzima con la Lys169 carbamilada que coordina a los cationes  $\text{Zn}^{2+}$  necesarios en la OPH para la actividad catalítica completa y también suprimió las fluctuaciones conformacionales de la enzima completa, de una manera no selectiva, lo que se traduciría en un descenso de eficiencia catalítica [182]. La interacción entre el modelo

FMS de grano grueso y la enzima, parecía no afectar los movimientos de estado nativo de la enzima OPH libre. Una representación de grano grueso de los grupos funcionales daría una descripción más homogénea de la distribución de carga a lo largo del material mesoporoso de sílice, pero el potencial promedio resultante de la fuerza media, debería ser equivalente al de un modelo atomista. Según los autores, una representación física del material mesoporoso, en lugar del enfoque de restricción posicional, será crucial para determinar los coeficientes de difusión o las tasas de colisión en el ambiente confinado. Así que la aproximación en multiescala aparece como un modelo viable para simulaciones más tangibles de proteínas confinadas. Tal enfoque permite que fenómenos biológicos complejos se modelen en diferentes escalas, alcanzando simultáneamente precisión y economía. Estos van desde las escalas subatómicas de mecánica cuántica, hasta el nivel atómico de la mecánica molecular, los métodos de dinámica molecular y Monte Carlo y aún modelos de mesoescala.

Recientemente Kwasnieski y otros [237] analizaron directamente la interacción del Tabun con AChE. Como fue mencionado anteriormente, AChE cataliza la hidrólisis de la acetilcolina en colina y ácido acético y se regenera así la neurona colinérgica. El sitio catalítico está dentro de un pasaje estrecho de unos 20 Å, el ciclo catalítico implica una tríada catalítica compuesta de tres residuos Ser203, His447, y Glu334 en la AChE de ratón. El hueco del oxianión compuesto por Ala204, Glu121 y Glu122 es muy importante ya que activa el sustrato a través de enlaces de hidrógeno [277 y 213]. Las disfunciones de AChE debido a los compuestos organofosforados son una importante amenaza, ya que inhiben la AChE en forma irreversible y conducen a convulsiones y posiblemente a la muerte por asfixia. Se forma un enlace covalente entre el oxígeno de Ser203 y el fósforo del compuesto organofosforado. Se acepta comúnmente que el grupo saliente es *anti* al oxígeno de la Ser203. La reactividad del Tabun es particularmente interesante, puesto que la AChE inhibida por Tabun es uno de los complejos más difíciles para reactivar. También, el Tabun se produce como una mezcla de dos enantiómeros, y uno de ellos es 6,3 veces más potente. Para entender si la cinética difiere para cada enantiómero o si el mecanismo de unión es diferente, los autores estudiaron en forma teórica la inhibición de la AChE por medio del Tabun, mediante el examen de cuatro posibilidades para los modos de fijación de éste:

1- Fijación del enantiómero (S) Tabun, con el grupo ciano *anti* o *sin* al átomo de oxígeno de la Ser203 (S-Sin y S-Anti),

2- Fijación del enantiómero (R) Tabun, con el grupo ciano *anti* o *sin* al átomo de oxígeno de la Ser203 (R-Sin y R-anti).

Los autores utilizaron una metodología híbrida QM / MM. Los cálculos se realizaron con el funcional BP86 [177]. Los puntos aislados también se trataron con los funcionales B3LYP y PBE0 [170]. Se estudiaron los cuatro posibles ataques del Tabun al oxígeno de Ser203 utilizando dos estructuras cristalográficas (PDB códigos 2C0P y 3DL7): Tabun(S) con el grupo ciano *Sin* al oxígeno de Ser203, y Tabun(R) con el grupo ciano *Anti* al oxígeno, correspondiente a la estructura experimental de rayos X; el Tabun(S) con el grupo ciano *Anti* al oxígeno de Ser203, y Tabun(R) con el grupo ciano *Sin*, que condujo a un isómero diferente que el observado experimentalmente.

Las dos estructuras de rayos X (PDB-2C0P y -3DL7) dieron resultados análogos para los cálculos previamente descritos. Al usar la PDB-2C0P, la fijación de los dos enantiómeros condujo a la estructura experimental de rayos X, a saber, S-*Sin* y R-*Anti* con un mecanismo que atraviesa una vía de adición-eliminación. El paso cinético determinante parece ser la salida del grupo ciano, puesto que la fijación del Tabun en la salida de Ser203 prácticamente no presenta barrera. En cuanto a la estructura PDB-3DL7, se consideran cuatro posibles ataques del Tabun al oxígeno de Ser203: S-*Sin* y R-*Anti*, que condujo a la estructura experimental de rayos X, y S-*Anti* y R-*Sin*, lo que condujo al isómero que tiene posiciones relativas opuestas del grupo N-dimetilo y el grupo etoxi en el sitio activo en comparación con la estructura experimental. Parece que el enantiómero más activo es S-*Sin*.

Así, parece que el grupo ciano se desprende *anti* al oxígeno de la Ser203, como se esperaba, debido a interacciones polares repulsivas entre el cianuro y los residuos aromáticos en el sitio activo, en particular los residuos Phe295, Phe297 y Phe338.

### **3-2-3- Profundizando el mecanismo enzimático y tóxico de los OP**

A pesar de las preocupaciones ecológicas, los pesticidas sintéticos permanecen como las principales herramientas para implementar el control de plagas de insectos, hierbas

indeseables etc. Como ya dijimos, algunos de ellos deben su toxicidad aguda a la inhibición de una enzima específica, como por ejemplo la acetilcolinesterasa (AChE) que regula la concentración del neurotransmisor acetilcolina (ACh). Por otro lado, también la butirilcolinesterasa (BuChE) ha sido inhibida por medio de pesticidas organofosforados y agentes de guerra química. Por lo tanto, es de primordial importancia comprender el mecanismo de la inhibición o activación de enzimas por medio de estos compuestos, con el fin de desarrollar tecnologías de biorremediación para facilitar la degradación de tales contaminantes, e incluyendo el conocimiento de armas químicas, y de esta forma diseñar de manera más rigurosa los agentes de reactivación. Varios autores han modelado, con diferentes grados de precisión teórica, los mecanismos enzimáticos.

Desde un punto de vista biológico, los OPs son inhibidores irreversibles de la enzima AChE, debido a su capacidad de fosforilar el grupo hidroxilo de la serina situado en el sitio activo de la enzima. La fosforilación se produce por la pérdida de uno de los grupos radicales OP y la unión covalente de la estructura OP restante a la AChE [286]. La enzima AChE es responsable de degradar ACh en colina y acetato, inhibiendo con ello las sinapsis colinérgicas. Cuando esta enzima es inhibida, ACh se acumula en el espacio pre-sináptico y se une a prolongados receptores nicotínicos y muscarínicos, tanto en el cerebro, en los nervios periféricos y en las uniones neuromusculares, en todos los componentes del sistema nervioso central, como también en los receptores muscarínicos y nicotínicos en la sistema nervioso periférico [290], y en otros tipos de células donde hay una ACh no neuronal, tales como el ovario y la placenta [287 y 291]. Los receptores nicotínicos son canales iónicos bloqueados por un ligando, y su activación por lo general hace que se produzca el flujo de iones cargados positivamente, lo que resulta en la despolarización de la membrana. Estos receptores nicotínicos constan de cinco subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\delta$ ), homólogos o idénticos, dispuestos de manera que permiten la formación de un canal iónico central. ACh se une a dos subunidades  $\alpha$ , resultando en la apertura del canal iónico y por lo tanto permite la entrada de sodio en la célula. La conformación de los isotipos de los receptores varía de acuerdo con el tipo de célula en el que se encuentran.

Los receptores muscarínicos pertenecen a la gran familia de receptores acoplados a proteínas G localizados en la membrana celular. Cinco subtipos de receptores han sido identificados (de M1 a M5), con diferentes lugares para cada tipo de célula. Las proteínas G

se compone de tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y regulan las reacciones de los receptores muscarínicos acoplados a sus efectores celulares o moduladores del sistema.

La activación del receptor provocada por la unión de ACh, resulta en la disociación de las subunidades de proteínas G heterotriméricas en  $\alpha$  y  $\beta / \gamma$ , que participan en la transducción de la señal muscarínica. El tipo de señal depende del tipo de receptor que se activa. Por ejemplo, si se une ACh a M1 produce una despolarización de la membrana postsináptica, mientras que la unión de ACh a M2 produce una hiperpolarización de la membrana [292]. El efecto de los OPs a nivel del sistema nervioso central se hace evidente por los siguientes síntomas: irritabilidad, temblores, problemas del habla, ataxia, debilidad generalizada y delirio. Los efectos en los receptores muscarínicos periféricos incluyen salivación, lagrimeo, micción involuntaria, diarrea y vómitos, mientras que los efectos en los receptores nicotínicos incluyen calambres, debilidad muscular, parálisis y falla respiratoria [293]. Se sabe que el OP puede inducir aberraciones cromosómicas (tanto numéricas y estructurales), el aumento de intercambio de cromátidas hermanas, e inducir anormalidades en los espermatozoides [379].

Por otra parte, los OP también pueden aumentar la frecuencia de micronúcleos en la médula ósea [294] y se origina en espermatozoides con aneuploidías [295]. Se evaluó la toxicidad producida por el OP pesticida Diazinon a través de la observación y del análisis de la preimplantación de embriones de ratón, se recuperaron de forma independiente ratones machos y hembras expuestos a estos compuestos. La conclusión fue que el Diazinon un compuesto fosforotioico (nombre IUPAC: O, O-dietil O-[4-metil-6-(propan-2-il) pirimidin-2-il] fosforotioato), se convierte en Diazoxon (IPCS, 1986) afecta a la calidad de los gametos masculino y femenino, siendo este efecto hereditario y evidente durante el desarrollo del embrión preimplantatorio en el ratón [296].

Los carbamatos (CM) son derivados de éster de N-metilo de ácido carbámico que actúa por inhibición de la AChE en forma reversible. Su acción es relativamente más corta que la de los OP y su toxicidad es menor [297,298 y299]. La difusión en el sistema nervioso central no es tan eficiente porque su traspaso de la barrera hematoencefálica es más débil [301]. Sin embargo, el envenenamiento por ditio-carbamato puede ser grave al afectar al sistema nervioso central y periférico y también por su acción directa mediante la producción de la insuficiencia renal aguda [302 y 303].

Los estudios teóricos sobre los mecanismos enzimáticos que implican los pesticidas ayudan a comprender y evaluar las diferentes tendencias de los datos biológicos a que se refiere el metabolismo de los pesticidas y su degradación. Tales estudios se espera que proporcionen una herramienta para prever y para modular la toxicidad de los residuos, así como para conducir hacia el desarrollo de diversas estrategias que implican el uso de enzimas para descontaminar el medio ambiente.

Mascini y otros [304] seleccionaron tres diferentes péptidos (His-Glu-Pro-Ser, His-Gly-Ser-Ala y Glu-Pro-Ser Ala-) y los probaron como receptores de afinidad de unión en OP y CM. Los péptidos fueron diseñados racionalmente imitando el sitio activo de la AChE. La energía de la unión simulada de los tres tetrapéptidos frente a un modelo de compuesto organofosfato (paraoxón) y un modelo de carbamato (carbaril) se calculó y se obtuvo una buena correlación entre la forma diseñada y los registros de unión. Las propiedades de la interacción péptido-pesticida se estudiaron en la variación de los espectros UV-visible en diferentes disolventes a 298K.

Las constantes de unión de estos productos en agua que se correlacionaron con los datos computacionales, variaron de  $506 (\pm 115)$  a  $36 (\pm 2) \text{ M}^{-1}$ .

Todos los péptidos tuvieron una disminución de 5 veces en la unión, mediante el cambio de disolvente, pasando de agua a etanol que es menos polar. La afinidad observada sugirió el uso de estos ligandos como una herramienta preanalítica, introduciéndolos en los cartuchos usados en la extracción en fase sólida de los pesticidas.

La eficiencia de estos tetrapéptidos se comprobó de la siguiente manera: se unieron los péptidos a dos soportes diferentes. Los cartuchos preparados utilizando la secuencia His-Glu-Pro-Ser eran, como se predijo, capaces de unir al paraoxón y al carbaril con valores de recuperación en un rango del 72-88% a pH 4,5. En los análisis realizados entre columnas y entre días, la desviación estándar relativa (RSD) estaba en el intervalo de 4-7%. Las columnas se utilizaron en 80 ciclos antes de perder su capacidad de retención.

La estructura de la enzima AChE metilfosfonilada fue descargada desde el sitio Web Protein Data Bank (PDB ID, 1VXO). La disposición tridimensional del sitio de unión se analizó a través del programa VIDA (Software Científico, 1997-2011) [305].

Se usó el software de Sybyl [306], para dibujar los tetrapéptidos virtuales en modo zwitterion, adicionando hidrógeno y cargas por medio del método computacional Gasteiger-Hückel [307, 308 y 309].

La minimización se ejecutó con el método de mecánica molecular Powell [310, 311 y 312] con campos de fuerza Tripos [313].

Se utilizaron parámetros como función dieléctrica y constante dieléctrica, que corresponden a condiciones de vacío como condiciones predeterminadas en el software Sybyl. El criterio de convergencia empleado fue cuando la diferencia de energía entre un paso y el otro era inferior a  $4,84 \text{ J (mol \AA)}^{-1}$ , en un máximo de 2000 iteraciones.

El mismo procedimiento se aplicó para diseñar los pesticidas paraoxón y carbarilo que fueron usados como modelos para la etapa computacional subsiguiente, donde el algoritmo Leapfrog [314] se utilizó para la interacción péptido-pesticida.

Este último programa se aplicó en el modo DREAM [315] de 80 000 iteraciones. En este trabajo, la mayoría de las categorías se dejaron en condiciones predeterminadas del programa (con excepción de la energía del inicio), y se incluyó la energía de enlaces de hidrógeno, inactiva en esas condiciones.

Para el diseño racional de los receptores biomiméticos, los autores partieron de la estructura biológica de la AChE metilfosfonilada (código PDB 1VXO) analizada en el complejo con O-etil-s-[2-[bis (1-metiletil) amino] etil] metilfosfonotioato, y trataron de reproducir el entorno para la interacción.

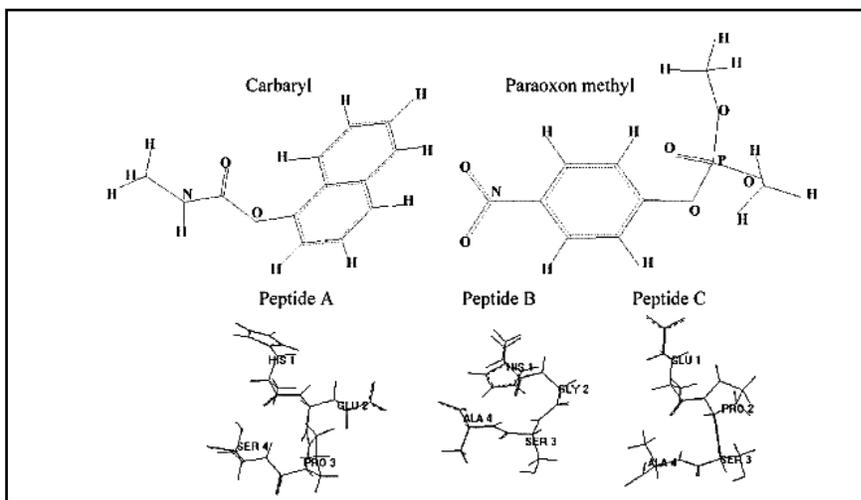


Figura N°19: La forma tridimensional de los tres tetrapéptidos y de los pesticidas estudiados.

Se utilizan los aminoácidos clave en el sitio activo de la enzima. Los aminoácidos implicados en la unión de pesticidas con AChE son (ref. De Millard y otros) Ser 200, His 440, Glu 327 y se llama "tríada catalítica". Los péptidos se construyeron teniendo en cuenta la configuración de estos tres aminoácidos, pero con reducción del tamaño del ligando al mínimo, con el fin de controlar la forma posible de la estructura secundaria del receptor durante la simulación computacional. Según los autores, mantener el tamaño del receptor al mínimo podría minimizar divergencias inesperadas entre el péptido sintetizado y la forma original pronosticada por el modelo molecular.

Los tres péptidos fueron seleccionados de una biblioteca propuesta en un trabajo anterior [316 y 317], construida al estudiar la interacción de 24 tetrapéptidos con 26 diferentes OPs y CM.

Los datos computacionales demostraron que:

- (a) El uso de cuatro unidades de aminoácidos representó una buena solución de compromiso para tener un cierto grado de similitud espacial con la región de unión del sitio activo de la enzima.
- (b) Los péptidos que llevan residuos de la tríada mostraron tener energías de enlace calculadas importantes.

Con el fin de demostrar que un enfoque computacional se puede utilizar para reducir el trabajo experimental cuando se investigan estos receptores, los autores seleccionaron para los experimentos de unión los tres tetrapéptidos presentados en la figura 19. Los péptidos se eligieron de acuerdo con los siguientes criterios: la tríada catalítica inicial del sitio activo de la AChE se mantuvo en un péptido A, utilizando Pro entre los residuos de Glu y Ser. En los péptidos B y C, la tríada fue reemplazada parcialmente, sustituyendo Glu (péptido B) y His (péptido C) con Ala. Los aminoácidos Gly o Pro se usaron para obtener la distancia adecuada entre los residuos en una estructura lineal o curvada.

Los péptidos se ensayaron con dos pesticidas modelo, el organofosforado metil paraoxón y el carbamato carbarilo (Figura 19). La energía de enlace del complejo pesticida-péptido se estudió utilizando el algoritmo Leapfrog y el ligando que mostró el valor más alto se aceptó como el que tiene la mayor capacidad de formar el complejo más fuerte. Resultó que la estructura del péptido A, mostró la mejor interacción con ambos CM y OP, con los tres aminoácidos implicados en la unión con los pesticidas..

Se comparó la geometría de los aminoácidos implicados en la unión a los pesticidas de la AChE (la tríada catalítica Ser 200, His 440, Glu 327) y los péptidos diseñados, utilizando como parámetros los ángulos y las distancias del carbono  $\alpha$  de cada aminoácido.

Se pudo observar que sólo el péptido A se ajustaba en parte con la geometría de la tríada catalítica, mostrando una diferencia sólo en el ángulo formado a partir de la tríada His-Ser-Glu. Los ángulos de péptido B fueron considerablemente diferentes de la posición espacial original en la enzima AChE.

A pesar de las diferencias con la forma y la estructura de los péptidos de la enzima AChE, los péptidos A y B tenían valores de unión relativamente elevada. Conviene tener en cuenta que los receptores potenciales de pesticidas diseñados poseen residuos que son capaces de interactuar con los sustratos predominantemente a través de interacciones electrostáticas, de van der Waals y enlaces de hidrógeno. Así que la unión se puede explicar cómo una cooperación sinérgica del grupo residuo en cada aminoácido, que tiene libertad para moverse alrededor de la columna vertebral de los carbonos, manteniendo la probabilidad de interactuar a través de interacciones electrostáticas con los átomos diana de los pesticidas implicados en la unión. Mascini y otros, concluyeron que usar receptores imitando la naturaleza es posible. El uso de nuevos ligandos de afinidad, tales como los oligopéptidos

diseñados computacionalmente es particularmente adecuado para la síntesis a gran escala y supera las desventajas de los anticuerpos o enzimas, que son a menudo inestables y caros. Uno de los péptidos biomiméticos mostró un comportamiento muy bueno como sorbente para la extracción en fase sólida y, además, los datos computacionales de la afinidad relativa de los tetrapéptidos seleccionados hacia los pesticidas OP y CM se confirmaron parcialmente. Sólo el péptido que coincide con el carácter de la estructura biológica mimética y que mostró el mejor valor de unión dio una tasa de retención estadísticamente inequívoca frente a los pesticidas ensayados, poniendo de relieve la necesidad de un diseño racional en la estructura del receptor. Los datos obtenidos para el péptido B o C demostraron que la simulación de modelado molecular realizada en el trabajo es útil, pero no es totalmente predictiva para la interacción sólido-líquido, por lo que es necesario el examen de un cierto número de secuencias similares para obtener información analítica valiosa.

Aproximadamente dos tercios de los insecticidas, aplicados contra insectos, ácaros y nematodos son POs y CM [318], son en consecuencia los pesticidas más comunes relacionados con la intoxicación alimentaria. [319], Alrededor de 800 000 casos de intoxicación y 3000 muertes se reportan cada año [320 y 321].

Es especialmente preocupante la exposición de los lactantes y de los niños a contaminantes de los alimentos debido a su mayor susceptibilidad a los efectos adversos. [322 y 323]

. La Unión Europea ha establecido un límite muy bajo de pesticidas en los alimentos para lactantes y, por tanto, las fórmulas infantiles no deben contener residuos de pesticidas en niveles superiores a 10 µg / kg. [324 y 325]. Este umbral es cercano al valor que se puede determinar con los métodos tradicionales de análisis, es decir, la cromatografía gaseosa o la cromatografía líquida de alta performance (HPLC) acoplada a detectores selectivos de masa [326,327 y 328].

Por lo general, el tiempo de procesamiento medio de una muestra en un laboratorio de análisis es de 7 días y los resultados se obtienen normalmente después que la comida ya se ha vendido e ingerido por el consumidor. Además, los métodos están restringidos a un número limitado de pesticidas que pueden ser analizados con una combinación de varios métodos multiresiduos. Como ya se expuso en la introducción los ensayos bioquímicos

basados en la inhibición de AChE puede ser un agregado conveniente a los métodos estándar, ya que son rápidos y permiten el análisis in situ. Además, el riesgo de falsos negativos se reduce porque las pruebas de inhibición de AChE cubren todas los OPs y CMs.

Los biosensores AChE han demostrado ser funcionales [329 y 330], y diversos biosensores utilizan la colinesterasa como el elemento de bioanálisis [331 y 332].

La mayoría de estos biosensores emplean AChE comercialmente disponible, pero un estudio previo en un biosensor que emplea AChE humana demostró que la sensibilidad del biosensor no es suficiente para todos los OPs y CMs. en el intervalo del límite máximo de residuos de alimentos infantiles, aunque el límite de detección del paraoxón en el biosensor AChE fue de  $1 \mu\text{g} / \text{L}$  [330].

La constante de velocidad bimolecular ( $k_i$ ), que representa la sensibilidad de una combinación enzima-inhibidor [334], y se determinó como  $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  para la combinación de paraoxón y el biosensor de AChE [335].

Schulze y otros [330], trabajaron con el fin de aumentar las constantes de velocidad bimolecular de todos los OP y CM a un valor mayor que  $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Para este propósito, aplicaron la ingeniería de proteínas por medio de *Nippostrongylus brasiliensis* AChE B, que es un parásito gastrointestinal de ratas que secreta tres , AChEs monómeros hidrófilo [336], *N. brasiliensis* AChE B es una enzima adecuada para aplicaciones de biosensores.

La posibilidad de expresión heteróloga con alto rendimiento en *Pichia pastoris* y su extraordinaria estabilidad a temperatura ambiente hace que esta enzima resulte superior a AChEs de anguilas eléctricas de *Drosophila melanogaster*, que actualmente están considerados como el estándar de alto valor para las aplicaciones en biosensores.

Los autores crearon y caracterizaron 10 mutantes individuales y 4 dobles de *N. brasiliensis* AChE B y combinaron los mutantes más sensibles en un arreglo multienzimático biosensor. Todas las enzimas se expresaron en una cepa de *P. pastoris* X33, transformada con un vector pPICZRB portando el gen *N. brasiliensis* AChE B. La mutagénesis se realizó mediante extensión del primer cebador usando un kit. La secuencia fue verificada por secuenciación del ADN. Para la expresión de AChE B, la *P. pastoris* X33 se cultivó en un medio complejo, conteniendo peptona, extracto de levadura, glicerol y tampón fosfato

potásico pH 7,5. Después de 24h de incubación a 30 ° C, este medio se cambió por un medio sin glicerol. La inducción de la expresión de AChE B se inició mediante la adición diaria de 0,5% (v / v) de metanol durante 9 días. Los cultivos de la expresión de proteína se centrifugaron y el sobrenadante se usó como la fuente de la enzima.

La estructura del sitio activo de AChEs es bien conocido y están disponibles varias estructuras cristalinas, incluyendo el de Torpedo californica, [337]. La estructura de la N. brasiliensis AChE B aún no ha sido resuelto, pero dado que N. brasiliensis AChE B muestra una identidad de aminoácidos de 35% hacia T. californica AChE. Schumacher M. otros [338], los autores crearon un modelo de homología de N. brasiliensis AChE B, teniendo la estructura de T. californica AChE, como modelo en una resolución de 1.8-Å (AP 1EA5), [339]. Basado en el modelo de homología, la mutagénesis dirigida al sitio del gen de N. brasiliensis AChE B se efectuó mediante la extensión de primer cebador con el fin de investigar el efecto de mutaciones en distintas regiones de la enzima sobre la sensibilidad hacia OPs y CM<sub>5</sub>. Distintos alineamientos de secuencias de proteínas se realizaron utilizando Clustal X 1,81 [340]. El modelo de N. brasiliensis AChE B se obtuvo con el 3Djigsaw programa de modelado [341] y Swiss-Model[342] utilizando la secuencia de aminoácidos de N. brasiliensis AChE B y las coordenadas de inicio de la estructura de T. californica AChE. La alineación de las dos secuencias de AChE, obtenidas desde el 3Djigsaw, se ha mejorado de acuerdo con la alineación Clustal X. El modelo de la estructura obtenido era fragmentario, y las interrupciones estructurales fueron modeladas siguiendo la estructura T. californica AChE utilizando el visor de Swiss-PDB y el Swiss Model de software.

Las mutaciones se introdujeron en la abertura de acceso del sustrato (W79 (84) y Y349 (334)) y en dos partes opuestas del sitio activo, el hueco acilo (M301-(288) y W303 (290)) y el sitio de unión a colina (F345 (330)), la numeración de T. californica AChE se añade en paréntesis. La expresión de los mutantes de N. brasiliensis AChE B dieron valores entre 58 y 3019 unidades / mL. La mayoría de los mutantes mostraron tasas mayores de expresión que la enzima del tipo salvaje (WT). Las posiciones exactas y las introducidas de los aminoácidos se seleccionaron según los resultados de estudios similares en humanos, [343] del cerebro de rata [344] y D. melanogaster AChEs. [345 y 346]. Como mutaciones en el sitio aniónico periférico de D. melanogaster (Glu107 (70) Tyr) [345] produjo una variante

de mayor sensibilidad hacia muchos OPs y CMs, treonina-65 (70) fue sustituido por tirosina. Los estudios anteriores demostraron que la sustitución de los residuos de los huecos acilo 288 y 290 por los alifáticos pequeños provocó un aumento de la sensibilidad hacia varios inhibidores. [343 y 346]. En el caso de *N. brasiliensis* AChE, hay una metionina en la posición 288. Este fue reemplazado en analogía a los estudios mencionados por alanina y por el residuo aromático triptófano. Villatte y otros [345] crearon mutantes sensibles sustituyendo tirosina por fenilalanina en la posición 408 (330) en el sitio de unión de la colina del *D. melanogaster* AChE. [347]. En la AChE *N. brasiliensis*, ya hay una fenilalanina en la 335 posición - (330). Por lo tanto, se investigó el efecto de la sustitución por alanina y tirosina. El intercambio de la tirosina-349 (334) por glicina y leucina como residuos alifáticos pequeños también siguió el ejemplo de *D. melanogaster* AChE (Y412 (334) A) [345].

La enzima WT se expresó a tasas de entre 132 y 157 unidades / mL, que es aproximadamente el doble del valor obtenido en un trabajo anterior [348].

El mutante *N. brasiliensis* AChE B se calculó el rendimiento como 67 mg / L cuando se utiliza una actividad específica de 2080 unidades / mg informados en Hussein, A. y otros [348]. La determinación de las constantes de velocidad bimolecular ( $k_i$ ), como una medida de la sensibilidad, se realizó de acuerdo a Aldridge. [334]. La constante de velocidad bimolecular se determinó por medio de *N. brasiliensis* AChE B WT y mutantes simples o dobles hacia los 14 OP más relevantes y CMs. Fue alcanzado el objetivo de un valor de  $K_i$  de  $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  por todos los OP, excepto el plaguicida ometoato.

La mayoría de las mutaciones reducen la sensibilidad hacia los CM en comparación con el WT. Pero en el caso de carbaril y pirimicarb, un valor de  $K_i$  de  $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  se alcanzó mediante la introducción de mutaciones en el sitio de unión a colina o el hueco acilo, respectivamente. Así que en algunos insecticidas, la sensibilidad de *N. brasiliensis* B AChE podría ser exitosamente mejorada hasta en 2 órdenes de magnitud a través de mutagénesis dirigida al sitio.

Para pirimifos metil, el límite de detección se reduce en hasta 4 órdenes de magnitud, desde  $10 \mu\text{g} / \text{L}$  a un valor tan bajo como  $1 \text{ ng} / \text{L}$  ( $3,5 \times 10^{-12} \text{ mol} / \text{L}$ ).

Los biosensores de AChE se produjeron como se ha descrito anteriormente [349], por impresión en placa (serigrafía). Se componen de un electrodo de referencia de Ag / AgCl y un electrodo de trabajo 7,7, 8,8 tetra ciano quino dimetan grafito. WT o mutante de *N. brasiliensis* AChE B se inmovilizó en la parte superior de los electrodos de trabajo por medio de la reticulación del polímero glutaraldehído, en vapor durante 15 min. La actividad enzimática se determinó mediante el control de la cantidad de tiocolina formado por hidrólisis enzimática de cloruro de ACh.

Un biosensor de formación multienzimática permitió la detección altamente sensible de todos los OP y la CMS, excepto del ometoato, aldicarb, y etiofencarb. Para estos tres insecticidas, la sensibilidad del biosensor aún necesita ser mejorado y aún más, los autores sugieren que los estudios de modelización molecular podrían ayudar a predecir las mutaciones adecuadas para este propósito. Los biosensores recién creados mostraron una estabilidad extraordinaria de alto almacenamiento. No hubo pérdida de la sensibilidad de la *N. brasiliensis* AChE B, inmovilizado en serigrafías o en placas impresas, electrodos desechables, incluso después de 17 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

El patrón de sensibilidad de los mutantes creados confirmó los resultados previos con humanos. *D. melanogaster* de cerebro de rata, y las mutaciones introducidas, con el fin de mejorar la sensibilidad, no se limita a un área particular del sitio activo de las enzimas sino que están distribuidas en varias regiones. En combinación con un reciente desarrollo de la actividad enzimática de fosforotioatos, [350], este sistema bioanalítico ahora se puede utilizar para aplicaciones de la vida real, especialmente en el control de la alimentación, que es consumido por los grupos vulnerables, en particular, la alimentación infantil que debe estar libre de insecticidas neurotóxicos[351].

Suarez y otros [368] investigaron el mecanismo de la reacción de desacilación en el sitio activo de la enzima BuChE humana, también llamado suero de la colinesterasa ampliamente distribuido en tejidos y plasma. La enzima BuChE es de interés para anesthesiólogos y genetistas debido a que es la responsable de la ruptura de la succinildicolina, relajante muscular a corto plazo y porque numerosas variantes genéticas de BuChE que pueden existir con menor afinidad por la succinildicolina [352].

La BuChE es también una importante enzima desintoxicante porque hidroliza drogas como la cocaína [353] o OPs peligrosos y agentes de guerra química [354].

Además, se ha informado de que BuChE cataliza la hidrólisis de ACh en el sistema nervioso y por lo tanto podría servir como un corregulador de la transmisión colinérgica [355 y 356].

La arquitectura general de las enzimas AChE y BuChE es bastante similar [337 y 357]. Sin embargo en BuChE el sitio activo se encuentra en la parte inferior de una cavidad profunda llamada la "garganta aromática", porque su superficie está revestida por 8 anillos aromáticos y por 14 anillos aromáticos en el AChE. El canal que conduce desde la superficie de la cavidad catalítica de la AChE es estrecho, mientras que el canal y la cavidad garganta en la estructura BuChE es menos estrecha [357 y 358].

Los autores llevaron a cabo cálculos de mecánica cuántica (QM) en modelos de clúster del sitio activo de la enzima construida a partir de una estructura cristalográfica. Los modelos estaban formados del resto de butirato del sustrato, la tríada catalítica de residuos (Ser198, Glu325, y His438), que se asemeja mucho a la de las serino-proteasas [359], el "agujero oxi-aniones" (Gly116, Gly117, y Ala199) que estabiliza la carga negativa desarrollada en el átomo de O carbonílico del sustrato en un proceso de acilación -desacilación, la cadena lateral de Glu197, cuatro moléculas de agua, la cadena lateral de Ser225, y el enlace peptídico entre Val321 y Asn322.

Los estudios previos de la simulación de las vías de acilación y desacilación se realizaron en la AChE [360 y 361].

Estos cálculos mostraron que la enzima AChE disminuye las barreras de energía de activación para las etapas de acilación - desacilación en relación 10-15/11-12 kcal / mol con referencia a reacciones en el agua. Tales efectos catalíticos fueron principalmente originados por las fuerzas electrostáticas ejercidas por la tríada catalítica y los residuos adyacentes (el agujero "oxi-aniones" y el residuo ácido Glu197 en BuChE). Para la reacción de acilación, el ataque del grupo nucleófilo hidroxilo de Ser198 apareció concomitante con una transferencia de único protón (Ser-OH  $\leftarrow$ : N $\epsilon$ -His), mientras que el residuo Glu en la tríada catalítica y el agujero de los "oxi-aniones" resultó esencial en la

estabilización de la estructura de transición y en el intermedio tetraédrico a lo largo de la vía de reacción por medio de interacciones electrostáticas.

Suarez y otros [364], observaron que la inclusión de la cadena lateral de péptido Ser225 y el enlace Val321-Asn322 en el modelo de clúster resultó ser esencial para las simulaciones con el fin de preservar la orientación de la tríada catalítica cerca a la observada en la estructura de rayos X de BuChE humana. Los análisis de las geometrías de equilibrio, las propiedades electrónicas, y las energías de los modelos de QM originaron ideas sobre el mecanismo catalítico. Además, los cálculos de QM proporcionaron los datos necesarios para construir una representación por mecánica molecular (MM) de la región reactiva de la BuChE que se empleó en simulaciones de dinámica molecular, seguida de cálculos de mecánica molecular-Poisson-Boltzmann (MM-PB). Los autores combinaron las energías QM con las energías MM-PB medias para estimar la energía libre de las estructuras reactivas en la enzima, y la etapa determinante de la velocidad dio como resultado la formación de un intermedio tetraédrico con una barrera de energía de  $\sim 14.0$  kcal/mol. No implica ningún efecto alostérico significativo, la modulación de la actividad de BuChE, ejercida por cualquiera de las moléculas neutras (glicerol, GOL) o una segunda molécula butirilcolina (CHO) unida al sitio catión- $\pi$ , pero se estabilizó un complejo formado entre una molécula ácido butírico y BuChE.

Así que los resultados más interesantes y las conclusiones obtenidas a partir de estos cálculos en los modelos de clúster fueron:

(A) El camino de reacción QM para la desacilación del complejo inicial acil-enzima implica una transferencia del protón individual a lo largo del enlace de hidrógeno His438 Ne-H... O $\gamma$  Ser198, mientras que no hay transferencia de protones entre His438 y Glu325. Los cálculos QM también destacaron el papel catalítico esencial del agujero "oxi-aniones" en los estados de transición y tetraédricos intermedios, estableciendo tres contactos NH... con átomos pesados a distancias de 2.7-3.1 Å.

(B) Sobre la base de las propiedades electrónicas y de la geometría de equilibrio del modelo de clúster considerado, el "enlace BTY C1... O $\gamma$  Ser198" detectado experimentalmente se puede asignar a de interacción donante no covalente-aceptor entre el átomo de C carbonílico de la molécula del ácido butírico y el átomo de O hidroxílico de Ser198.

(C) En la fase gaseosa, deben ser especies de vida corta, tanto el intermedio tetraédrico como el complejo producto (ProdA). La hidrólisis inicial de la estructura acil-enzima procedería a través de un mecanismo de un solo paso que conduce a un segundo complejo (prodB), en el que se protona el grupo carboxilato Glu197.

Los modelos de clúster QM proporcionaron geometrías de referencia y distribuciones atómicas de carga que se emplearon para la construcción de las representaciones MM de la región reactiva del complejo de BuChE-butirato en diferentes etapas de la ruta de reacción para el proceso de desacilación. Estos "modelos reactivos MM" permitieron a los autores emplear MD-LES complementarias (es decir, dinámica molecular con técnica de muestreo localmente reforzada) [362 y 363], y metodologías MM -PB para estimar los efectos energéticos en diferentes configuraciones enzimáticas.

Los resultados más importantes obtenidos a partir de los cálculos del MM-PB fueron (d) cuando las correcciones de energía libre, que tienen en cuenta los efectos de la proteína y el solvente en el medio ambiente fluxional interactuando con los "modelos MM reactivos", se añaden a las energías QM de los correspondientes modelos pequeños QM, el paso determinante de la velocidad es la formación del intermedio tetraédrico, que se convierte en una estructura energéticamente estable, a pesar que no se acumulan durante el proceso de reacción. La magnitud de la barrera de energía oscila desde 13 hasta 16 kcal / mol, dependiendo de la configuración enzimática exacta.

(e) Cuando se llevaron a cabo simulaciones MD-LES en presencia de un ion  $\text{Na}^+$  o una molécula neutra GOL unido al sitio de catión- $\pi$ , los autores encontraron que tanto el  $\text{Na}^+$  catión y la molécula GOL estabilizan la red de enlaces de hidrógeno entre los grupos reactivos y afectan el perfil de energía para el proceso de desacilación al disminuir la barrera de energía por  $\sim 2$  kcal / mol.

(f) El glicerol estabiliza preferentemente el complejo producto formado entre una molécula de ácido (neutro) butírico y la enzima BuChE en lugar del complejo producto entre un butirato (cargado negativamente) y BuChE con Glu197 protonado. Esto está de acuerdo con la estructura cristalográfica de la enzima BuChE, en el que el catalizador Ser198 interactúa con un fragmento butírico, mientras que el sitio de catión-  $\pi$  está ocupado por una molécula de GOL.

(g) Los resultados de la simulación BuChE-butirato-CHO dio apoyo a la propuesta anterior [364] que el proceso de desacilación puede ocurrir con la unión simultánea de una segunda molécula de reactivo a CHO a el sitio catión- $\pi$ . Los cálculos PB-MM de energía muestran que la presencia de CHO resulta en la disminución de la barrera de energía por  $\sim 3$  kcal / mol con respecto a la configuración BuChE-butirato ( $\sim 1$  kcal / mol con respecto a BuChE-butirato-Na).

Estas observaciones computacionales son consistentes con la hipótesis de que la activación del sustrato exhibida por BuChE, surge de la aceleración del proceso de desacilación.

(h) La modulación de la actividad de BuChE, ejercida por cualquiera de GOL o CHO unido al sitio de catión- $\pi$ , no implica ningún cambio significativo de conformación de los residuos de la garganta. Estos resultados indican que las moléculas no reactivas (GOL o CHO) pertenecen a la primera "capa de solvatación" que rodea a los fragmentos reactivos del complejo BuChE-butirato y puede favorecer al proceso de reacción con tan solo modificar la estructura media y energética de esta capa.

Doorn y otros llevaron a cabo el sondeo de esterasa BuChE y colesterol-esterasa (CholE) con isomalatión. Ambas enzimas pertenecen a una gran familia de proteínas  $\alpha / \beta$  hidrolasas, que incluye otras esterasas tales como AChE. Trabajos previos demostraron que la AChE es inhibida estereoselectivamente por los cuatro estereoisómeros de isomalatión en el siguiente orden: (1R, 3R) > (1R, 3S) > (1S, 3R) > (1S, 3S) [369 y 370].

Datos cinéticos [371 y 372] y de espectros de masas demostraron que existe una diferencia en el mecanismo de inactivación para AChE que se trató con el estereoisómeros (1R) - versus (1S, 3S). Mientras la enzima inhibida con (1R)-isomalatión se reactiva fácilmente tanto de forma espontánea y en presencia de piridina-2-aldoxima metiodida (2-PAM), para la AChE inactivada con el (1S)-isómero la reactivación no resulta detectable la [371 y 372].

Doorn y otros intentaron determinar si otras hidrolasas  $\alpha / \beta$  son estereoselectivamente inhibidas por isomalatión y si la diferencia en el mecanismo de inactivación entre AChE y los isómeros (1R) - y (1S, 3S) se conserva para esas otras  $\alpha / \beta$ -hidrolasas. Las constantes bimoleculares de velocidad de inhibición ( $k_i$ ) se midieron para butirilcolinesterasa humana y equina (HBuChE y EBuChE, respectivamente) y la esterasa colesterol bovina (BCholE)

con los cuatro isómeros. EBUChE, HBUChE, y BCholE fueron inactivados por los estereoisómeros con el orden de potencia visto anteriormente para AChE de mamífero, pero con menos preferencia por los (1R, 3R) - versus (1R, 3S)-diastereómeros.

Las relaciones de los valores de  $k_i$  desde el isómero más potente hasta el menos potente fueron 10,5 (HBUChE), 11,9 (EBUChE), y 68,6 (BCholE). Las constantes de velocidad de reactivación ( $k_3$ ) se midieron para la enzima inhibida por isómeros del isomalatión. HBUChE, EBUChE, y BCholE inactivadas por el (1R)-isómeros se reactivaron fácilmente. Sin embargo, las enzimas modificadas por (1S)-isomalatión fueron refractarias para la reactivación, y los valores de  $k_3$  no fueron significativamente diferentes de cero para HBUChE y BCholE tratadas con el (1S, 3S)-isómero.

Por primera vez, se demostró que CholE tiene una preferencia estereoquímica por un inhibidor OP, y que la quiralidad en los átomos de fósforo y de carbono influyen los valores de  $K_i$ .

El modelado molecular se utilizó para determinar la orientación de los (1R, 3R) - y (1S, 3S)-enantiómeros en el sitio activo de BCholE y predecir el grupo saliente para la reacción inhibitoria. Estructuras calculadas predijeron que el grupo principal saliente para la reacción inhibitoria de BCholE con (1R, 3R)-isomalatión es el dietil tiosuccinato, pero para la reacción de la enzima con el (1S, 3S)-enantiómero, es el tiometilo.

Todos los experimentos de modelización molecular se realizaron en un equipo SGI Octane (Mountain View, CA) utilizando software Insight II 2000 con los módulos Affinity, Biopolymer, y Discover (Molecular Simulations, Inc., San Diego, CA) [374].

La estructura cristalina de BCholE [373]; 1AKN.pdb) ha sido descargada del Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank. Los átomos de hidrógeno se han añadido (pH 7,0) utilizando el módulo Biopolymer.

Las estructuras (1R, 3R) - y (1S, 3S)- isomalatión se ubicaron inicialmente en el sitio activo de BCholE. El inhibidor y un subconjunto de átomos de BCholE situados dentro de un radio de 10 Å del inhibidor fueron designados como flexibles, mientras que el resto de la enzima se mantuvo rígido. Se aplicó la técnica tethering a partir del oxígeno del fosforilo del inhibidor al presunto hueco oxianión de modo que se mantuvieran dentro de una distancia de enlaces de hidrógeno [343]. El ligando se limitó a un radio de 2 Å para evitar

que se derive lejos del sitio activo durante la minimización inicial que se realiza en vacío. El acoplamiento se realizó utilizando un proceso de minimización que implica dos fases, seguidas de una simulación de dinámica molecular [374].

La primera ronda de minimización (100 pasos) implicó un enfoque Monte Carlo que tomó en consideración, únicamente, interacciones de van der Waals. Los términos coulómicos no se consideraron, y los factores de restricción se establecieron en un valor mínimo. Durante la segunda ronda de minimización (100 pasos), los términos de Coulomb se incluyeron (la constante dieléctrica  $\epsilon = 78,0$  dependiente de la distancia) y los factores de restricción retomaron sus valores plenos. El recalentamiento se realizó con un total de 50 etapas dinámicas de duración 100 fs cada una. Las temperaturas de inicio y final se fijaron en 500 y 300 K, respectivamente.

Las estructuras generadas a partir de este procedimiento se sometieron a continuación a una ronda final de minimización (1000 pasos) similar a la segunda fase utilizada inicialmente.

Los resultados de los experimentos de modelización molecular mostraron que (1R, 3R) - isomalatión se orienta en el sitio activo de BCholE con el grupo dietiltiosuccinato apuntando hacia la abertura de tipo garganta y posicionado apicalmente al grupo hidroxilo del sitio activo Ser 194. En contraste, la configuración calculada del (1S, 3S) - enantiómero fue con el grupo tiometilo apuntando hacia la abertura tipo garganta y orientado apicalmente al sitio activo Ser 194.

En ambos casos, el ligando metoxi era proximal a Trp 227, Phe 324 y Phe 393, y el oxígeno del fosforilo estaba en la proximidad cercana al hueco oxianión generador: Gly 107, Ala 108, y Ala 195 (Wang, X et al, 1997). El grupo principal saliente ha demostrado ser el tiometilo para la reacción de AChE con (1S, 3S)-isomalatión de acuerdo con los resultados descritos en el informe de estos autores. [371,372, 375 y 376].

### 3-3-4 Conclusiones

John E. Casida afirma [377] que “Comprender y optimizar la actividad pesticida requiere del conocimiento de las relaciones estructura-actividad en el sitio diana primario y la relaciones estructura-biodegradabilidad a nivel del organismo.” Los sustituyentes se introducen o son reemplazados para mejorar la llegada del pesticida y para cumplir su función y además para mejorar las tasas de control de bioactivación o desintoxicación. Como resultado de esto, los pesticidas son cada vez más potentes y selectivos y generalmente más complejos en su estructura.

Hay tres enfoques que se utilizan en diferentes estudios desde el punto de vista de la acción del pesticida y con respecto al metabolismo de este agente activo.

El primer enfoque o tradicional es definir por separado la química y la biología por reconocimiento metabólico, el aislamiento, la identificación y la síntesis. Sus propiedades biológicas se predicen a partir de compuestos relacionados. Se bioensaya el auténtico compuesto en sistemas apropiados.

El segundo enfoque consiste en incubar el metabolito y generar los sistemas de ensayo. El sistema de generación podría ser una célula, una fracción de células, o una enzima tal como la fracción S9 o CYP450 con o sin NADPH. El sistema de ensayo puede implicar AChE (colinérgico) o receptores de membrana con [35S] TBPS (GABAérgicas) o *Salmonella typhimurium* (mutagénesis). La información útil proviene de modelos computacionales.

Un tercer enfoque y muy informativo implica la comparación de las relaciones estructura-actividad in vitro contra un objetivo primario y el efecto que se produce en el organismo.

De los informes anteriores, dos aspectos son notables acerca de los estudios teóricos de los mecanismos enzimáticos implicados en el metabolismo y la degradación de los pesticidas: contribuyen tanto para prever y modular la toxicidad de los residuos, como para promover el uso de diferentes estrategias con respecto al uso de enzimas en la descontaminación del medio ambiente.

La curiosidad es la clave.

Los avances científicos dependen de hacerse las preguntas correctas en el momento adecuado y con los ambientes intelectuales e institucionales para buscar estas respuestas.

Interesantes descubrimientos necesitan de la libertad de explorar la acción pesticida en la dirección que la casualidad y nuestra curiosidad nos permita llegar. Sólo así podremos seguir formulando y utilizando pesticidas seguros y efectivos y de esa forma mantener los recursos alimentarios y una población humana saludable.

Hemos analizado algunos ejemplos de curiosidad apropiados para la química teórica.

## Capítulo IV

**El universo comienza a parecerse más a un gran pensamiento que a una gran máquina**  
Sir James Jeans

### **4-1-1- Análisis comparativo de la complejación por $\beta$ -ciclodextrina de los plaguicidas (fenitrotión, metil paratión, paratión) y sus análogos de ésteres carboxílicos.**

#### **4-1-2-Introducción**

La formación de complejos de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) con tres pesticidas organofosforados, fenitrotión, paratión y metil paratión, y sus análogos del éster carboxílico se analizaron a través de una metodología híbrida. Con una primera optimización por medio de métodos de mecánica molecular MM+ y luego utilizando QM un método semiempírico PM3.

El objetivo era interpretar las características estructurales y el intercambio de energía en la formación de complejos y dilucidar cómo estas propiedades podrían afectar el proceso de hidrólisis.

En el caso de los ésteres carboxílicos la hidrólisis resulta catalizada por las  $\beta$ -CD y en cambio en el caso del plaguicida en medio alcalino es inhibida. La complejación del fenitrotión fue explorada con mayor intensidad, ya que en el desarrollo experimental resultó ser una esterólisis relativamente menos inhibida y además la reacción parece progresar a través de un camino diferente al de los anteriores.

Los resultados de este estudio, muestran estructuras de complejos que implican que los ésteres facilitan una eficaz interacción entre el carbonilo del huésped y el borde de la  $\beta$ -CD, sin embargo el paratión y el metil paratión, están muy incluidos en la profundidad de la cavidad de la  $\beta$ -CD. Así que para un ataque nucleofílico de parte de la  $\beta$ -CD son favorables las estructuras de los complejos de los ésteres de ácidos carboxílicos, pero no las estructuras de los complejos de los dos pesticidas.

En el caso del fenitrotión dependiendo del modo de inclusión en la cavidad, se obtienen complejos de geometrías diferentes, al parecer ninguna de estas estructuras favorece la aproximación de los grupos hidroxilo de la  $\beta$ -CD, pero sí de alguno externo, en acuerdo con lo observado en los ensayos experimentales.

Como ya dijimos las ciclodextrinas son moléculas cíclicas, construidas por unidades de glucopiranosas, y tienen la propiedad de originar complejos de inclusión de la forma anfitrión-huésped [381, 382, 383 y 384]. La más utilizada es la  $\beta$ -ciclodextrina que está formada por siete unidades de glucopiranosas y adopta la forma de un cono truncado, al igual que los otros miembros de la familia.

En la  $\beta$ -CD los hidroxilos secundarios de la glucopiranosas están situados en el borde del cono más ancho y los hidroxilos primarios en el borde más estrecho. El interior de la cavidad está cubierto por dos filas de grupos CH (es decir, el C-3 y C-5 grupos) y en el medio, por una hilera de átomos de oxígeno glicosídicos [Malthus]

El exterior de la CD es bastante polar, el interior de la cavidad es relativamente no polar y esto convierte estas moléculas atractivas para que diversas sustancias ingresen en la cavidad para formar complejos de inclusión, o queden tapando la abertura y se obtienen de esta manera los complejos de oclusión.

La complejación de la CD protege la molécula huésped frente a la oxidación atmosférica en el caso de sustancias que son oxidables con facilidad, mejora la solubilidad de las sustancias poco solubles, y reduce la pérdida de aquellas que son altamente volátiles.

Además, los pesticidas sintéticos que pueden ser complejados con CD, frecuentemente muestran cambios de propiedades [385], tales como: una mayor biodisponibilidad, toxicidad selectiva con respecto a los insectos; menor fitotoxicidad y efectos de larga duración en el suelo debido a las propiedades de liberación controlada.

La dosis de contaminantes ambientales agroquímicos sintéticos podría reducirse significativamente y su eficacia se podría mejorar, si las CDs pudiesen ser utilizadas en las formulaciones de soluciones de pesticidas. [Malthus]

La aplicación de formulaciones de pesticidas con CDs era, hasta los últimos años, modesta [386], como ya se comentó, la situación ha cambiado mucho, ya que el costo de una  $\beta$ -CD de calidad técnica, totalmente aceptable para la formulación de pesticidas, ha disminuido mucho y permite que sea utilizada en la industria.

Así el uso potencial de  $\beta$ -CD puede ser de gran interés para mejorar la actividad biológica de estos productos químicos. Los tres pesticidas organofosforados fenitrotión, paratión y metil paratión respectivamente (Fig. N°20) han sido y en algunos casos son ampliamente utilizados todavía, por lo tanto, su comportamiento químico es de gran interés. Su hidrólisis alcalina, aparece inhibida por  $\beta$ -CD [387], pero no suele ser tan intenso el efecto en el caso del fenitrotión [388]. Esto se atribuye a una inclusión más superficial del huésped en la cavidad. El análisis realizado por dicroísmo circular [389], reveló que la inclusión de los pesticidas aromáticos ocurre introduciendo en primer lugar el grupo nitro en la cavidad. Lo mismo ocurre con la hidrólisis del éster carboxílico análogo de cada uno de los pesticidas; pero para éstos, por el contrario, la hidrólisis es catalizada por la  $\beta$ -CD [381 y390].

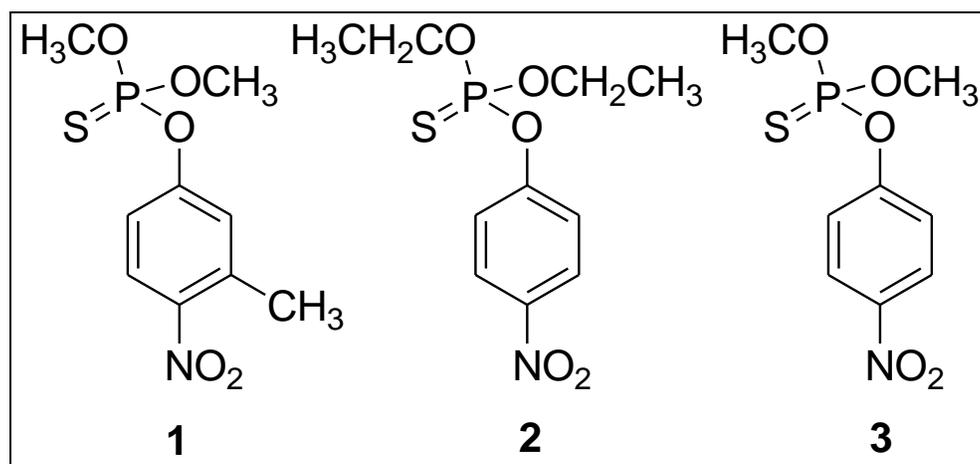


Figura N° 20

Los efectos de las CDs en las reacciones orgánicas se clasifican en dos grupos principales, dependiendo de si se trata de enlaces covalentes o no [391].

La CD se une al reactivo y se forma un intermediario de reacción que involucra un enlace covalente y que conduce luego al producto.

b) La cavidad hidrófoba de la CD proporciona al reactivo un entorno de reacción nuevo con cambio de reactividad, es decir, varía la selectividad y/ o la velocidad de la reacción.

Las reacciones de esterólisis alcalina mediadas por la CD proceden en general de acuerdo con el primer modelo: un ión alcóxido secundario de la CD realiza un ataque nucleófilo sobre el reactivo incluido, formando un intermedio tetraédrico por medio de un enlace covalente; entonces se lleva a cabo la transferencia del acilo a la CD [392], y finalmente, se liberan los productos de hidrólisis.

Tee y otros, han analizado ampliamente la escisión de los ésteres en medio básico y en presencia de CDs [399 y 340]. Se exploraron varios modos posibles de unión en el estado inicial y en los estados de transición durante este proceso. Según sus resultados, la escisión en el fenilacetato meta- sustituido parece ser más eficiente que en los para- isómeros. La explicación sería que la inserción del primero en la cavidad conduce a una geometría que es más favorable para un ataque nucleófilo por parte de la CD. Por otra parte, el fenilo para-sustituido se vería obligado a salir parcial o completamente de la cavidad durante la transferencia del acilo [393].

El propósito de nuestro trabajo fue comparar desde el punto de vista teórico la complejación y la hidrólisis posiblemente mediada por CD de los tres pesticidas mencionados anteriormente, con los análogos correspondientes de ésteres carboxílicos. Esta colección de moléculas consta de:

a) Dos pesticidas para-sustituidos y sus análogos de éster carboxílico;

b) Fenitrotión y su análogo el éster carboxílico. Ambos son tanto meta y para sustituidos, al mismo tiempo, características que ejercen tendencias opuestas en los restos incluidos durante el proceso de hidrólisis, como se mencionó anteriormente.

Así que resulta interesante dilucidar cómo estas dos tendencias terminan en una situación de compromiso. Por otra parte, para el fenitrotión se ha informado [394] que la principal vía para la hidrólisis básica sería el ataque del sustrato-complejado con la  $\beta$ -CD ionizada

por parte de un grupo  $\text{HO}^-$  externo, sin mayor intervención de iones alcóxidos pertenecientes a la  $\beta$ -CD misma, siendo la constante de velocidad del proceso cuatro veces menor que la correspondiente constante de hidrólisis del sustrato en estado libre. Por lo tanto, algunas maneras alternativas de formación de los complejos con este compuesto en particular fueron analizadas y los resultados se describen en este capítulo.

#### **4-1-3-Metodología y Resultados**

El modo aceptado de la complejación de los tres pesticidas de tipo organofosforotioato [387], fenitrotión, metilparatión y paratión (Fig.Nº20) se estudió teóricamente con sus correspondientes análogos de éster carboxílico. Los análogos del éster carboxílico son aquellas estructuras obtenidas mediante la sustitución de los residuos a base de tiofosfato por acetato (para el fenitrotión y metilparatión) o propanoato de etilo (para el paratión), de manera correspondiente. Se tuvo en cuenta el propanoato para detectar posibles diferencias que pudiera generar, con respecto al acetato, si, como resultado del proceso de complejación, terminaba localizado dentro de la cavidad del macrociclo. Sin embargo, al final se observó que las configuraciones de energía más bajas se relacionan con estos sustituyentes ubicados fuera de la cavidad de la CD.

Se observará que los análogos del éster carboxílico aparecen identificados aludiendo al pesticida con el que cada uno de ellos se correlaciona: FNth-éster con fenitrotión; MPth-éster con metilparatión; Pth-éster con paratión.

Todas las estructuras moleculares fueron optimizadas en primer lugar por el método de mecánica molecular MM + contenido en el programa HyperChem-7 y luego por el método semiempírico PM3 contenido en el mismo paquete [395]. Se utilizó como punto de partida la estructura de la  $\beta$ -CD descargada de: <http://www.lists.ic.ac.uk/hypermil/chemweb>, como archivo extraído de 1DMB.pdb disponible en <http://www.rcsb.org/pdb>.

Se trata de la misma estructura empleada en trabajos anteriores [396 y 397] con cinco puentes de hidrógeno interglucosídico (unión-H) que afectan a los grupos secundarios hidroxilo (OH) del ciclo.

La complejación se simuló en el vacío mediante la ubicación inicial de cada molécula de sustrato a una distancia de  $\sim 3\text{\AA}$  desde el centro del círculo determinado por el borde secundario de la  $\beta$ -CD. Sobre la base de los datos experimentales [389], el sustrato o huésped se orientó de modo que su inserción vertical en la cavidad tendría lugar con el grupo nitro en primer lugar. Se tomaron once diferentes orientaciones, cada una resultante de la rotación que se realiza alrededor del eje longitudinal del huésped, esas estructuras fueron guardadas y analizadas una por una. Tal procedimiento fue debido a la simetría C1 de la  $\beta$ -CD que se empleó, que es la simetría más frecuente y probable en el medio de reacción, antes que la estructura de simetría C7 [398].

La secuencia que se siguió fue la siguiente: i) sometimiento del sistema a un proceso MM + hasta convergencia, lo que llevó al huésped a introducirse en la molécula de  $\beta$ -CD, y ii) optimización del sistema por medio de cálculos PM3. Los criterios de convergencia fueron  $\text{rms grad.} = 0,005 \text{ kcal.}\text{\AA}^{-1}.\text{mol}^{-1}$  para cálculos MM + (a excepción de la  $\beta$ -CD cuya estructura se volvía muy distorsionada, por lo que se adoptó  $\sim 0,05$ ) y  $0,05 \text{ kcal.}\text{\AA}^{-1}.\text{mol}^{-1}$  para PM3.

Se seleccionaron luego los complejos más estables según las energías obtenidas, aunque se consideraron también algunas estructuras menos estables que, estando bastante cerca de esa energía, presentaban alguna característica de interés. Los modos de inserción adicionales explorados para el fenitrotión se realizaron según la metodología que acabamos de describir, y los resultados se comentan aparte.

La Tabla N°5 muestra los valores de energía obtenidos a través de ambos métodos, MM + y PM3, para los sustratos libres. Esta tabla también incluye las cargas netas de los átomos descriptos e identificados de la siguiente manera:

- a) El enlace del oxígeno puente y simbolizado por -O-, que en el caso del pesticida une el residuo tiofosfato y el anillo aromático, y en la estructura del éster análogo, un fragmento de acetato o propanoato y el anillo aromático,
- b) Según el caso, el átomo de P o el átomo de C que pertenece a los fragmentos mencionados y que se hallan unidos a -O-.

Dos aspectos que se observan en la Tabla N° 5 son:

i) La carga es más grande en el -O- de los restos tiofosfato en comparación con los ésteres carboxílicos (y también, correspondientemente, sus contrapartes positivas, P y C).

ii) la diferencia entre los órdenes de enlace de CA-O y O-P, en comparación con los valores mutuamente similares de las uniones CA-O y O-C

Los órdenes de enlace se refieren al C<sub>aromático</sub> -O-(símbolo CA-O), y a las uniones el -O-P u -O-C, según sea el caso considerado.

**Tabla N°5:** Energías obtenidas por medio de los cálculos MM y PM3 (kcal.mol<sup>-1</sup>) de las moléculas en estado libre y cargas atómicas y ordenes de enlace en los átomos seleccionados de los sustratos.

Molécula	E <sub>libre</sub> (MM)	E <sub>libre</sub> (PM3)	Carga Atómica		Orden de enlace	
			q(-O- <sup>a</sup> )	q(P/C <sup>b</sup> )	P(C <sub>A</sub> -O- <sup>c</sup> )	P(-O-P/C)
<b>Fenitrotión</b>	<b>31,74</b>	<b>-2863</b>	<b>-0,563</b>	<b>1,835</b>	<b>1,033</b>	<b>0,630</b>
<b>Metilparatión</b>	<b>30,26</b>	<b>-2580</b>	<b>-0,535</b>	<b>1,840</b>	<b>1,029</b>	<b>0,671</b>
<b>Paratión</b>	<b>30,67</b>	<b>-3140</b>	<b>-0,535</b>	<b>1,849</b>	<b>1,030</b>	<b>0,669</b>
<b>FNth-ester</b>	<b>5,60</b>	<b>-2431</b>	<b>-0,231</b>	<b>0,379</b>	<b>0,992</b>	<b>0,967</b>
<b>MPth-ester</b>	<b>3,45</b>	<b>-2150</b>	<b>-0,231</b>	<b>0,380</b>	<b>0,994</b>	<b>0,964</b>
<b>Pth-ester</b>	<b>4,71</b>	<b>-2429</b>	<b>-0,234</b>	<b>0,377</b>	<b>0,995</b>	<b>0,961</b>
<b>Ciclodextrina</b>	<b>80,73</b>	<b>-14362</b>				

<sup>a</sup> oxígeno unido al fragmento aromático y al tiofosfato, en el caso de los pesticidas, o a los alcanosatos en el caso de los ésteres carboxílicos.

<sup>b</sup> átomo unido al -O-, esto es P en pesticidas, o C en los esterres.

<sup>c</sup> unión entre el carbono aromático y el -O-

Estas propiedades revelan una mayor polarización en el enlace O - P en los pesticidas que en el enlace O - C en los ésteres carboxílicos. También se observó que, en las estructuras de los pesticidas, los dos átomos de oxígeno restantes en el residuo de tiofosfato presentan cargas netas que van desde -0,540 a -0,600.

#### **4-1-4 Resultados de los complejos producidos por el método PM3.**

En la Tabla N° 6 se muestran los resultados obtenidos con los cálculos PM3. Por lo menos dos de los complejos obtenidos, se informan para cada huésped.

Los etiquetados **1** corresponden a la estructura de energía más baja.

Se consideraron uno o dos complejos menos estables adicionales cuando difieren en una energía inferior al 0,1% con respecto a la más baja, o si presentan alguna característica interesante, como por ejemplo enlaces de H que implican ya sea el átomo de S o el O del carbonilo y / o el átomo -O- de los sustratos.

Tales características se especifican en la segunda columna de la tabla, mientras que las energías de enlace PM3 aparecen en la tercera columna.

**Tabla N° 6:**

Uniones de H intermoleculares; energías PM3 de unión y de formación(Kcal.mol<sup>-1</sup>) de los complejos; cargas atómicas y órdenes de unión seleccionados de los sustratos y sus respectivas variaciones respecto al estado libre.

Sustrato	Uniones intermolecular de H de la β-CD con ...	E <sub>cmplx</sub>	E <sub>r</sub>	Carga Atómica		%variación		Orden de enlace		%variación	
				q(-O <sup>-</sup> )	q(P/C <sup>+</sup> )	Δq(O-)	Δq(P/C)	P(C <sub>A</sub> -O <sup>-</sup> )	P(O-P/C)	ΔP(C <sub>A</sub> -O)	ΔP(O-P/C)
Fenitrotión 1	S, -O-	-17241	-16	0,571	1,868	1	2	1,029	0,631	0	0
Fenitrotión 2	S,	-17236	-11	-0,555	1,867	-1	2	1,039	0,641	1	2
Metilparatión1	---	-16954	-12	-0,534	1,849	0	1	1,027	0,691	0	3
Metilparatión2	S	-16953	-11	-0,567	1,848	6	0	1,041	0,630	1	-6
Paratión1	S	-17515	-13	-0,566	1,864	6	1	1,032	0,636	0	-5
Paratión2	---	-17511	-9	-0,542	1,866	1	1	1,042	0,661	1	-1
FNth-ester1	---	-16804	-11	-0,226	0,385	-2	2	0,991	0,973	0	1
FNth-ester2	Carbonil O	-16802	-9	-0,226	0,391	-2,	3	0,989	0,975	0	1
FNth-ester3	-O-	-16801	-8	-0,235	0,386	2	2	0,999	0,961	1	-1
MPth-ester1	---	-16525	-13	-0,223	0,385	-4	1	1,006	0,961	1	0
MPth-ester2	Carbonil O	-16520	-8	-0,222	0,393	-4	3	0,995	0,976	0	1
Pth-ester1	---	-16804	-13	-0,227	0,376	-3	0	0,994	0,964	0	0
Pth-ester2	Carbonil O	-16799	-8	-0,229	0,390	-2	4	0,988	0,972	-1	1

Véanse las notas al pie de la Tabla 5

Las figuras 21 a 23 muestran pares de los complejos elegidos, que implican un pesticida y el éster correspondiente.

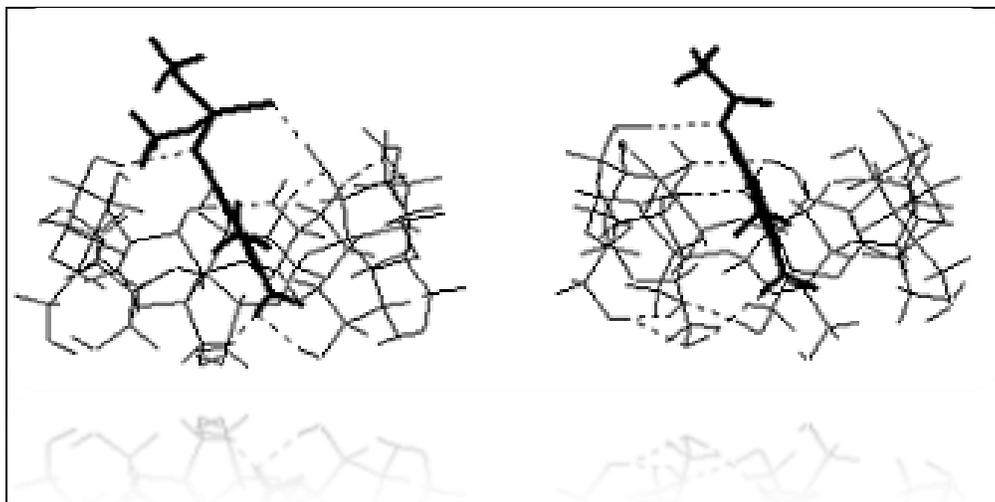


Fig. N° 21. Complejo de Fenitrotión 1 (izquierda) y el éster FNth 3 (derecha) con  $\beta$ -ciclodextrina y las uniones intermoleculares de hidrógeno con el hidróxilo secundario de la  $\beta$ -CD: Izquierda(S...HO, 2.51 Å; —O—...HO, 2.62 Å; (derecha) —O—...HO, 2.52 Å

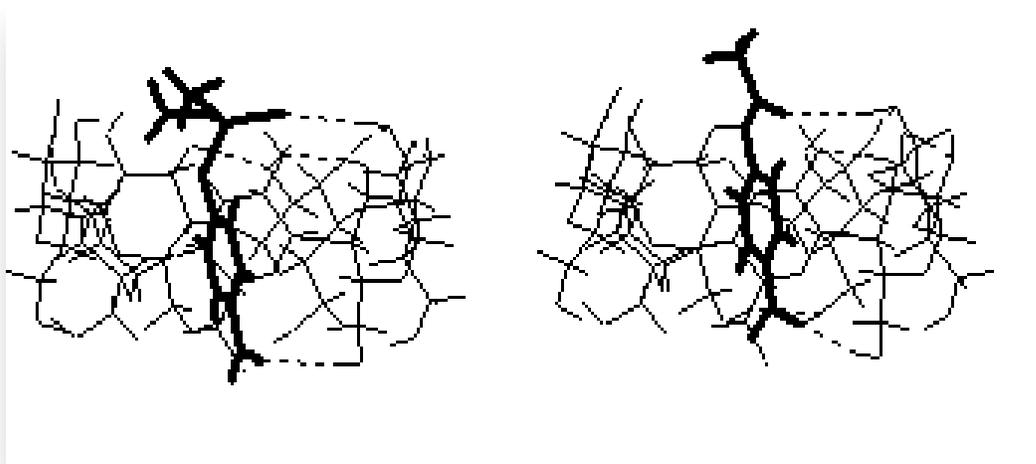


Fig. N° 22. Complejo del metil paratión 2(izquierda) y el éster MPth2 (derecha) con  $\beta$ -ciclodextrina y las uniones intermoleculares de hidrógeno con el hidróxilo secundario de la  $\beta$ -CD (izquierda) S....HO, 3.07 Å; (derecha) Carbonil -O....HO 2.70Å

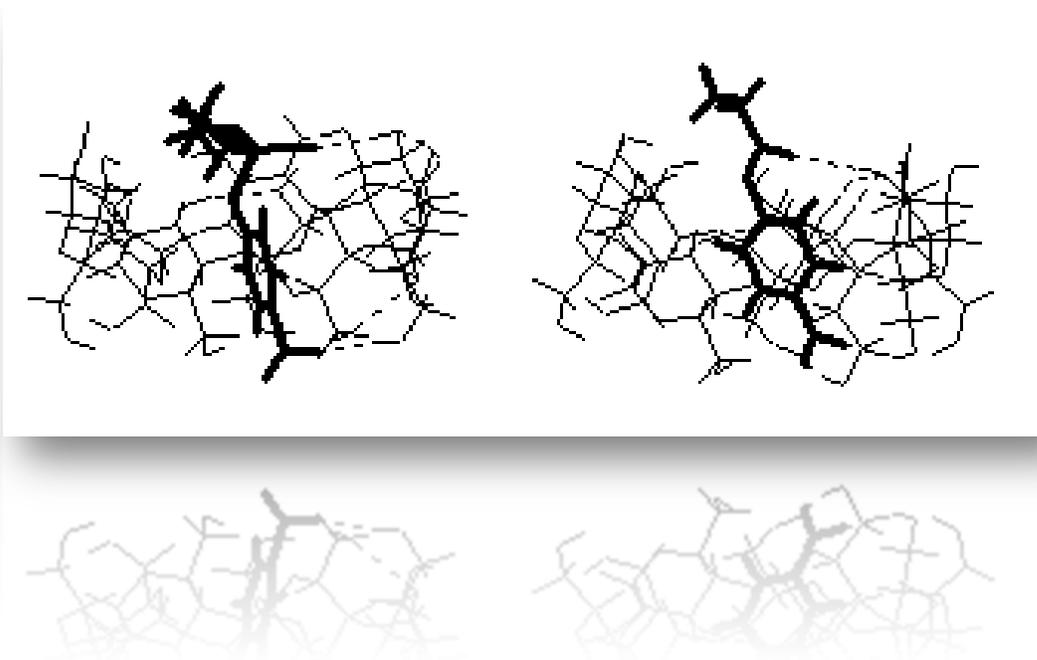


Fig. N° 23 Complejo del paratión1 (izquierda) y el éster Pth2 (derecha) con  $\beta$ -ciclodextrina y las uniones intermoleculares de hidrógeno con el hidróxilo secundario de la  $\beta$ -CD (izquierda) S...HO, 2.61 Å; (derecha) Carbonil -O...HO 2.58Å

Vale la pena mencionar que en todos los complejos, el grupo nitro del huésped aparece unido mediante una unión H a un -OH primario del macrociclo.

La Tabla N° 6 también muestra las energías de formación obtenidas a través de la Ec. (2), en la que los dos últimos términos corresponden a las especies libres

$$E_{\text{formación}} = E_{\text{complex}} - E_{\text{substr}} - E_{\text{CD}} \quad (2)$$

Las cargas atómicas netas sobre el -O- y el P ó el C después de la complejación se informan también, así como el porcentaje de variación con respecto a los valores correspondientes en los sustratos libres, Ec. (3). Un procedimiento análogo, Ec. (4), se llevó a cabo con los órdenes de enlace de las uniones CA-O y -O-P/C.

$$\Delta q_i = \frac{q_i \text{ (en el compl.)} - q_i \text{ (libre)}}{q_i \text{ (libre)}} \times 100 \quad (3)$$

$$\Delta P_{ij} = \frac{P_{ij} \text{ (en el compl.)} - P_{ij} \text{ (libre)}}{P_{ij} \text{ (libre)}} \times 100 \quad (4)$$

#### 4-1-5 Cálculos de mecánica molecular

Aunque estos resultados son anteriores a los cálculos PM3, los presentamos en la Tabla 7 como un aspecto complementario de este análisis.

La estabilización de las energías se calcula mediante la aplicación de Ec. (2) a los valores de energía de tensión generados por cálculos MM+, de manera que la E de formación en la Ec. (2) se reemplaza por la E de estabilización.

La energía de interacción se obtiene de la siguiente expresión

$$E_{\text{interacción}} = E_{\text{complejo}} - E_{\text{huesped en complejo}} - E_{\beta\text{-CD en complejo}} \quad (5)$$

También se verifica que

$$E_{\text{estabilización}} = \Delta E_{\text{tensión del ciclo}} + \Delta E_{\text{tensión sust.}} + E_{\text{interacción CD/huésped}} \quad (6)$$

En la **Ec. (6)**, los cambios en la energía de deformación se refieren al ciclo y al huésped, cuando se comparan sus conformaciones respectivas en el complejo y en el estado libre.

**Tabla N°7:** Energías de tensión obtenidas por MM (kcal.mol<sup>-1</sup>) de los complejos y de sus miembros, su cambio de tensión en relación con el estado libre, sus interacciones, así como la estabilización de la estructura compleja.

<b>Molécula</b>	<b>E<sub>cmplx</sub></b>	<b>E<sub>estabiliz</sub></b>	<b>E<sub>gst en cmplx</sub></b>	<b>E<sub>β-CD in cmplx</sub></b>	<b>E<sub>interac</sub></b>	<b>ΔE<sub>β-CD tensión</sub></b>	<b>ΔE<sub>gst tensión</sub></b>
<b>Fenitrotión</b>	<b>91,90</b>	<b>-20,57</b>	<b>31,88</b>	<b>85,16</b>	<b>-25,14</b>	<b>4,43</b>	<b>0,14</b>
<b>Metilparatión</b>	<b>84,15</b>	<b>-26,84</b>	<b>30,47</b>	<b>79,80</b>	<b>-26,12</b>	<b>-0,93</b>	<b>0,21</b>
<b>Paratión</b>	<b>82,61</b>	<b>-28,79</b>	<b>32,19</b>	<b>78,16</b>	<b>-27,74</b>	<b>-2,57</b>	<b>1,52</b>
<b>FNth-ester</b>	<b>63,52</b>	<b>-22,81</b>	<b>6,04</b>	<b>76,86</b>	<b>-19,38</b>	<b>-3,87</b>	<b>0,44</b>
<b>MPth-ester</b>	<b>61,70</b>	<b>-22,48</b>	<b>3,55</b>	<b>78,12</b>	<b>-19,97</b>	<b>-2,61</b>	<b>0,10</b>
<b>Pth-ester</b>	<b>62,98</b>	<b>-22,46</b>	<b>5,08</b>	<b>78,80</b>	<b>-20,90</b>	<b>-1,93</b>	<b>0,37</b>

De los resultados presentados en la Tabla 7, se puede deducir que todos los complejos son estables, ya que las energías de estabilización son negativas. Para el fenitrotión, la energía de estabilización es algo inferior a la de los otros dos pesticidas, debido a que la β CD aumenta su tensión, si se compara con el estado libre, al formar el complejo con este huésped (ver la columna siete de la tabla). En los restantes casos, hay liberación de la tensión del ciclo en varios grados.

Para los ésteres carboxílicos, los valores de estabilidad, por un lado, y las interacciones por el otro, son aproximadamente equivalentes. Los dos grupos etilos presentes en el éster carboxílico análogo del paratión, permiten interacciones intermoleculares ligeramente mejores, tal como lo hacen también en el paratión.

El fenitrotión y el éster carboxílico correspondiente, cada uno considerado en el subgrupo de su tipo, presenta una inclusión más superficial en la cavidad comparado con los otros huéspedes, por lo que muestran las menores interacciones intermoleculares.

#### 4-1-6 El tratamiento adicional de Fenitrotión

Dado que la hidrólisis de este compuesto resulta ser menos inhibida por la  $\beta$ -CD que la hidrólisis de los otros dos pesticidas [388], y que la vía de reacción habitual para la catálisis de la hidrólisis del éster carboxílico no parece ocurrir apreciablemente con este éster fosfato [395], se sugirió la idea de un grupo tiofosfato protegido de alguna manera diferente. Por lo tanto, se consideraron también otras formas de aproximación al ciclo en el caso del fenitrotión. Así que el huésped fue orientado para su entrada por a) el grupo del tiofosfato a través del borde secundario de  $\beta$ -CD y b) el grupo arilo y el grupo tiofosfato, sucesivamente, a través del borde primario.

En cuanto al caso a), la fig. 24 muestra dos complejos con la misma energía mínima obtenida ( $-17.234 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ): uno con el átomo de S apuntando hacia el centro de la cavidad y el otro con el S orientado hacia el borde secundario de la  $\beta$ -CD e interactuando con él.

Respecto al caso b), consistente en la inserción a través de la abertura estrecha de la  $\beta$ -CD, la interacción de cualquiera de los dos grupos, el  $-\text{NO}_2$  o el tiofosfato, con los OH primarios del ciclo, dificultaron la entrada del huésped en la cavidad durante el proceso de acoplamiento. Teniendo en cuenta los casos en que la entrada se produjo efectivamente, los complejos más estables se muestran en la figura. 25, cuyas energías son  $-17.238 \text{ kcal.mol}^{-1}$  para el complejo con el huésped introducido por el grupo- $\text{NO}_2$ ; y  $-17.237 \text{ kcal.mol}^{-1}$  con respecto al complejo con el huésped insertado por el resto tiofosfato.

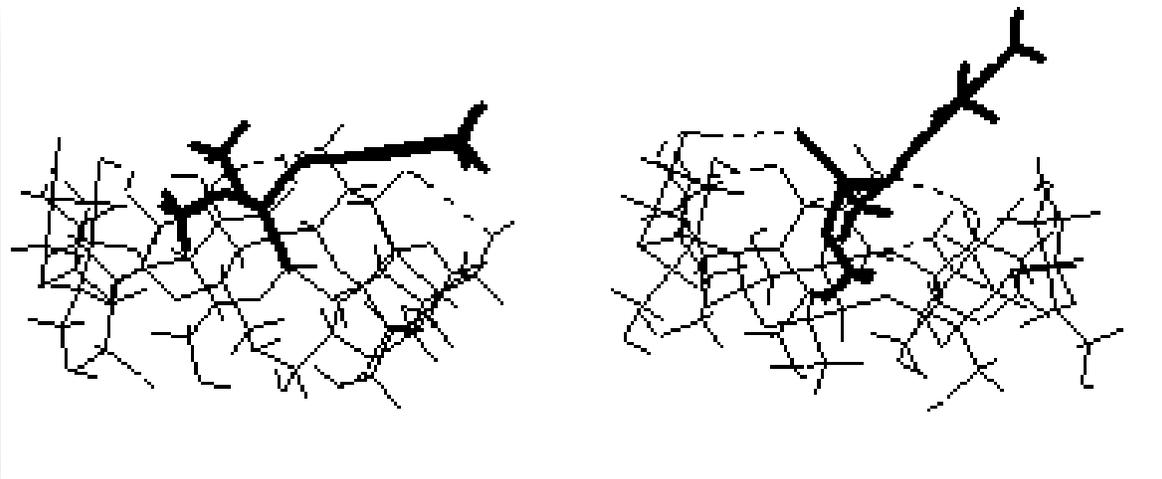


Fig. 24. El fenitrotión introducido por el resto tiofosfato en la  $\beta$ -CD a través del anillo ancho (Izquierda) el átomo de azufre está centrado en la cavidad (derecha) el átomo de azufre interactúa con el hidroxilo del anillo (S...HO, 2.70 Å)

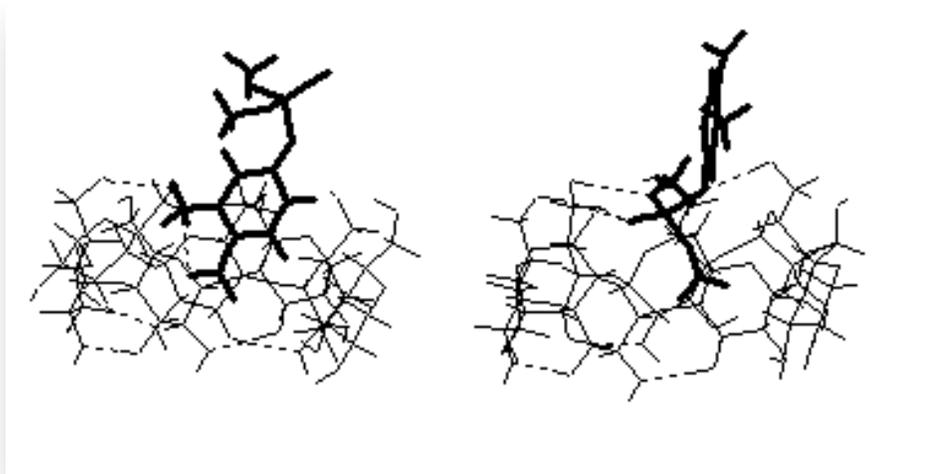


Fig. 25. El fenitrotión introducido por el resto - NO<sub>2</sub> (izquierda) ó por el resto tiofosfato (derecha) a través del anillo estrecho primario de la  $\beta$ -CD ( (S...HO, 2.70 Å) y las uniones intermoleculares de hidrógeno con el hidróxilo primario de la  $\beta$ -CD (izquierda) (N)O..2.83 Å; (derecha) S...HO 2.64 Å, P(O)...HO 2.65 Å, (P) O...HO, 2.73Å

#### 4-2-1 Discusión

Debe tenerse en cuenta que las condiciones experimentales se encontraban en medio básico, por lo que en realidad algún  $O^-$  perteneciente a la  $\beta$ -CD sería el responsable del ataque nucleofílico con que se especula aquí.

La Tabla 6 muestra que fuerza impulsora hacia la formación de complejos ( $E_{\text{formación}}$ ) es apenas más grande en promedio para pesticidas, que para los ésteres carboxílicos. Es interesante notar que el fenitrotión introducido por el grupo  $-NO_2$  a través del borde secundario de la  $\beta$ -CD, a pesar de ser el sustrato que aparece, al menos comparativamente, menos incluido dentro de la cavidad, presenta la mayor energía de formación del complejo. Dos enlaces de H intermoleculares con S y  $-O-$ , respectivamente, contribuyen a la estabilidad del complejo de energía más baja.

En cuanto a la reorganización de las cargas después de la formación de los complejos, en ésteres de ácidos carboxílicos en general aumenta la carga positiva en C y disminuye la carga negativa de  $-O-$  en las uniones  $-O-C$ , mejorando así las condiciones para un ataque nucleófilo sobre el C. Un comportamiento diferente se muestra en FNth -ester3, cuya carga negativa sobre el  $-O-$  aumenta, y lo mismo sucede con el Fenitrotion1.

En ambos casos, los respectivos átomos  $-O-$  aparecen implicados en enlaces de H intermoleculares. Estas interacciones se ven facilitadas por la inserción superficial de estos sustratos en la cavidad, dejando el  $-O-$  puente en el nivel de los OHs secundarios', y por lo tanto accesible. El otro complejo de fenitrotión en la Tabla 6 (Fenitrothion2) reorganiza las cargas sobre el  $-O-$  y el P, en la forma en que generalmente ocurre con los ésteres carboxílicos, esto es favoreciendo, en este sentido al menos, las condiciones para un ataque nucleófilo sobre P.

Los dos pesticidas restantes aparecen bien incluidos en la cavidad y, en los dos casos en que se muestran enlaces de H intermoleculares entre S y algún OH secundario, resulta que el  $-O-$  aumenta su carga en  $\sim 6\%$  y el orden de enlace  $-O-P$  se debilita en  $\sim 5\%$ , al mismo tiempo. En ambos casos, en realidad, los tres átomos de oxígeno del tiofosfato reorganizan sus cargas de manera uniforme a  $\sim -0.565$ , mientras que en los complejos de los otros

pesticidas, las cargas de oxígeno no se diferencian mucho de los valores inicialmente adquiridos en estado libre, y cuyo rango se ha mencionado en el párrafo anterior.

La Tabla 6 también muestra que los complejos más estables de ésteres carboxílicos no presentan enlaces de H intermoleculares que impliquen el O del carbonilo. Otra característica común en ellos es que los huéspedes aparecen particularmente apoyados hacia el borde secundario (ejemplo en la fig. 26, izquierda), con el carbonilo próximo al mismo -tendencia geométrica previamente inferida [393 y 394] para alcanos del p-nitrofenilo durante la transferencia de acilo. Por otra parte, la interacción del O carbonilo con el borde de la CD a través de los enlaces de H (Fig. 26, derecha) conduce a complejos de éster carboxílico ligeramente menos estables (2 a 5 kcal.mol<sup>-1</sup>).

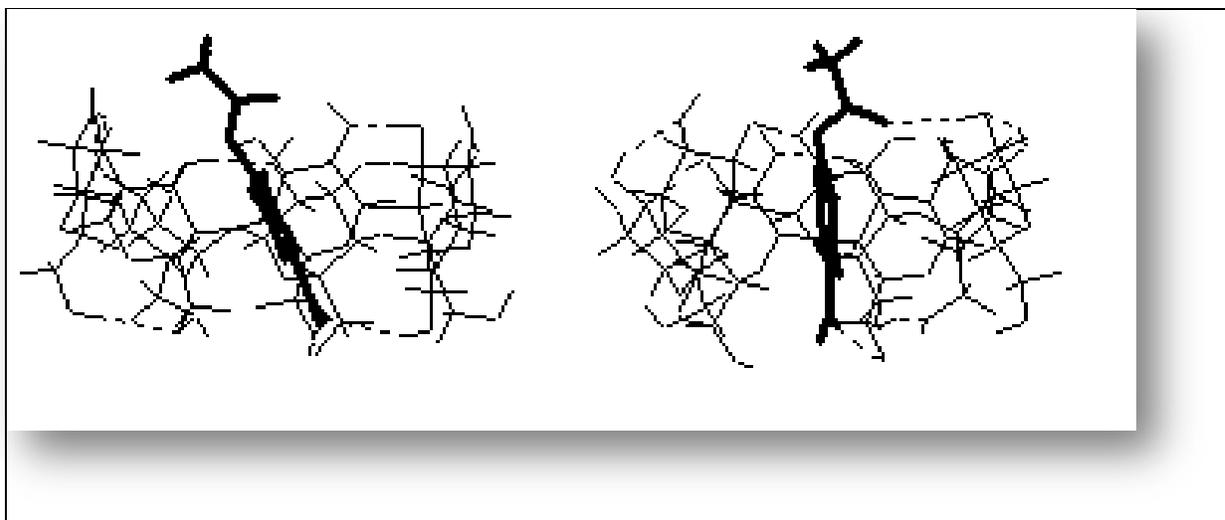


Fig. N° 26 Complejos con éster-MPth1 y con éster-MPth2 con  $\beta$ -CD mostrando diferentes formas de introducción del sustrato a la macromolécula. Distancias intermoleculares (izquierda) -O- más cerca del anillo -C, 3.89Å, (derecha) -O- ... más cerca del anillo -C4.13 Å.

La observación de la figura. 21, esto es del fenitrotión y su éster carboxílico correspondiente, revela que como resultado de su inclusión relativamente poco profunda en la cavidad, los sustituyentes, tiofosfato y acetato aparecen bastantes expuestos. La existencia del grupo metilo en posición meta parece restringir una penetración más

profunda del sustrato dentro del macrociclo -a pesar de la presencia del grupo  $-\text{NO}_2$ , de otro modo interactivo con los OH primarios del ciclo- e induce a la  $\beta$ -CD a adoptar una forma casi oblonga. En ambos complejos hay enlaces de H generados entre OH secundarios y el huésped respectivo, que implican o bien S o el O carbonilo, según el caso considerado, pero a veces también implica al -O-. (Como se muestra en la figura). En esta última situación, tanto el pesticida como el éster carboxílico adoptan una posición inclinada hacia el borde secundario, con la diferencia de que el C carbonilo del éster carboxílico aparece desprotegido, mientras que la presencia de los dos metilos en el residuo tiofosfato (cuyas orientaciones se influyen mutuamente), provocan que la aproximación a P sea más difícil.

El metilparatión y su éster carboxílico correspondiente, a la fig. 22, penetraron más profundamente en la cavidad de CD, debido a la ausencia del grupo metilo meta en el anillo aromático. Aquí el grupo tiofosfato permanece a nivel del borde más ancho, pero en el centro de la CD, forzado por los dos metilos que dificultan su aproximación a la pared de la cavidad. Por el contrario, el éster carboxílico muestra su metilo orientado hacia el exterior de la cavidad, y se inclina lo suficiente hacia el borde, de modo que el oxígeno del carbonilo interactúa con los OH secundarios.

El paratión en la fig. 23 aparece más profundamente introducido que el éster carboxílico correspondiente, aunque ambos muestran sus etilos que salen de la cavidad. En el éster carboxílico, aparece así facilitado el acceso a C, lo que permite un ataque nucleófilo, en medio básico. Además, en el complejo dado, hay dos OH secundarios del ciclo que aparecen más cerca del grupo carbonilo del huésped que los otros OH secundarios y se encuentran en el ángulo correcto para el ataque nucleofílico, lo que sugiere que, en medio básico, la conformación necesaria para la reacción intramolecular sería alcanzable.

En las figuras 24 y 25 se muestran complejos entre  $\beta$ -CD y el fenitrotión cuyas energías difieren menos de 0,1% en relación con el valor del complejo más estable obtenida para este compuesto en la Tabla 6. Siempre que el huésped sea introducido por el grupo arilo, el mismo aparece más bien sobresalido, de manera que un ataque nucleófilo por parte de la  $\beta$ -CD parece difícil de lograr. Este no sería el caso para el ataque por parte de un HO-

externo, como se infirió experimentalmente [395], excepto por la barrera electrostática que se opone al borde cargado.

Si el huésped aparece insertado por el grupo tiofosfato, el resto se queda nivelado con el borde de la  $\beta$ -CD, pero los metilos impiden un ataque nucleofílico por algún grupo alcoxi del borde, excepto si el ciclo sufrió una distorsión considerable. En cuanto a la acción de un grupo externo HO-, la conformación más favorable es la que tiene el átomo de S que apunta al centro de la cavidad, haciendo caso omiso del hecho de que en este tipo de complejo de oclusión, el átomo de P, aunque al descubierto, está profundamente introducido en la cavidad de la  $\beta$ -CD.

#### **4-2-2 Conclusión**

Los complejos que implican sustratos MPth-éster y Pth-éster, muestran los sustratos incluidos algo menos profundamente que los pesticidas correspondientes, lo cual es consistente con las interacciones más fuertes del átomo de carbonilo-O con el borde secundario de  $\beta$ -CD, que las del átomo fosforil-S. Estos ésteres adoptan orientaciones inclinadas y sufren cambios de carga neta tales que favorecen un ataque nucleófilo sobre el carbonilo C, por parte de un O<sup>-</sup> de la  $\beta$ -CD. En los complejos de sustratos metilparatión y paratión, los sustratos permanecen insertados profundamente en la cavidad, ya que las interacciones más débiles de S con el borde secundario de la CD se unen con el efecto de arrastre hacia abajo del grupo -NO<sub>2</sub>, interactivo con el borde primario de la  $\beta$ -CD. Un ataque nucleófilo parece estéricamente impedido, pues el P está situado en el centro del borde secundario, y la accesibilidad al átomo está obstruida por los componentes metilo o etilo de cada sustituyente. Otro obstáculo a tener en cuenta son los tres oxígenos del tiofosfato que están presentes en los sustratos con movilidad y conformación restringidas dentro de la cavidad. Ellos determinan, en conjunto, una barrera de potencial que no sería favorable, por lo menos, al ataque nucleófilo en estas condiciones.

El complejo FNth-éster muestra una tendencia comparable a los otros ésteres carboxílicos, salvo que su sustrato aparece como el menos incluido, debido a las características estéricas de su fragmento ariloxi. En cuanto al fenitrotión después de la formación de complejos, cuando el sustrato se introduce por el grupo  $-\text{NO}_2$ , el residuo tiofosfato o bien emerge de la cavidad y el acceso al P es difícil debido a su distancia a los alcóxidos del borde de la CD, o bien aparece inclinado hacia el borde del ciclo, pero en un grado limitado debido a sus metilos.

Cuando el sustrato se aproxima a la CD por el grupo tiofosfato, las interacciones atractivas entre el grupo y el borde del ciclo impiden una entrada significativa del sustrato en la cavidad y el átomo de P se mantiene en el centro del círculo del borde. Un ataque alcóxido requeriría un importante esfuerzo tensionante de parte del ciclo, debido al impedimento estérico de los metilos del tiofosfato.

Entonces, las características estereoquímicas de los complejos de fenitrotión no darían vía fácil para que se produzca la hidrólisis mediada por un grupo alcoxi del borde de la  $\beta$ -CD. En su lugar, las geometrías más bien parecen favorecer la aproximación de un grupo  $\text{HO}^-$  externo, que todavía tendría que superar la barrera de repulsión ejercida por el borde cargado. Esto podría explicar por qué, aunque menos inhibida que para los otros dos pesticidas, la hidrólisis mediada de fenitrotión es más lenta que la del sustrato libre.

## **Capítulo V**

**No puedes zarandear una flor, sin perturbar una estrella**

**Francis Thompson**

### **5-1-1 Una alternativa desde la naturaleza para el control de plagas.**

El cultivo de la tierra está unido a la naturaleza y no debería existir ningún cultivo que alterara la naturaleza al extremo de destruirla totalmente.

La modificación de la naturaleza por el uso de agrotóxicos y fertilizantes químicos ha generado desequilibrios ecológicos, alterándola a tal punto que las plagas y enfermedades que afectan a los cultivos se incrementan y son cada vez más difíciles de combatir.

El objetivo ha sido el de eliminar y no el de controlar. Cultivando con la naturaleza, el control de insectos, hongos, ácaros y otras enfermedades que afectan a las plantas se ha realizado desde que el hombre empezó a cultivar para alimentarse. Los pueblos indígenas, campesinos y agricultores por siglos realizaron –y muchos de ellos aún lo realizan- sus cultivos sin hacer uso de agrotóxicos ni de fertilizantes químicos. El control de las “plagas” y enfermedades era y es realizado con elementos provistos por la propia naturaleza.

Una forma de control se ha basado en el control biológico: insectos controlados por los pájaros; pulgones controlados por insectos y así sucesivamente. Es decir, un control basado en el equilibrio de la cadena alimenticia o cadena trófica (del griego *throphe*, alimentación) y en la importancia de cada uno de sus eslabones. Esta cadena describe el proceso de transferencia de sustancias nutritivas a través de las diferentes especies de una comunidad biológica, en el que cada uno se alimenta del precedente y es alimento del siguiente. También conocida como cadena alimentaria, es la corriente de energía y nutrientes que se establece entre las distintas especies de un ecosistema en relación con su nutrición.

Otro sistema ha sido a través de plantas insecticidas, ya sea utilizándolas en combinación con los cultivos o en preparados para combatir las plagas. La agricultura agroecológica apunta a evitar las plagas para no tener que combatir las y no dominar la naturaleza sino vivir en armonía con ella. Un elemento importante para evitar enfermedades ha sido tener en cuenta la preparación física del suelo, la nutrición y una buena planificación de los cultivos. La naturaleza tiene y proporciona todo, siempre y cuando se trabaje y se maneje la tierra adecuadamente.

Se deben prever los posibles ataques, cultivando en forma de policultivos, utilizando barreras biológicas y plantas atractivas de enemigos naturales, dejando una cierta cantidad de plantas y malezas que sirvan de alimento a las plagas y enfermedades.

El objetivo de la protección de los cultivos desde el punto de vista agroecológico no es asegurar el máximo de la producción sino el dejar que otros seres vivos puedan convivir con los cultivos, dejando espacios y recursos para ellos.

Existen plantas que no son atacadas por enfermedades ni plagas y muchas de ellas pueden ser utilizadas como repelentes o realizar aplicaciones de sus macerados.

Se pueden utilizar estas plantas para producir una alteración poblacional que permite mantener la plaga a niveles aceptables, sin producir un desequilibrio ecológico.

Los preparados que se presentan requieren una observación del suelo y del comportamiento de las plagas. Cada terreno es diferente y los elementos como la humedad, temperatura e incluso textura del suelo influyen en el manejo de las plagas, por lo que los resultados deben ser cuidadosamente observados.

Esto dependerá de cómo se apliquen estas plantas y si se toma en cuenta la observación e información específica de cada predio. Es importante saber también que algunas de las plantas no son fáciles de obtener, pero que todo predio agroecológico debe apuntar a incorporarlas.

En los tiempos actuales son crecientes las preocupaciones en torno a una serie de problemas vinculados a diferentes tipos de sustancias químicas que implican graves riesgos para la salud humana y para el medio ambiente, a las que estamos expuestos habitualmente.

Partimos de la premisa que si bien se pueden controlar mejor, no todo lo natural es bueno para la salud, es necesario conocer los tipos de sustancias que contienen cada una de estas plantas para poder trabajar con seguridad con ellas.

En los distintos ámbitos de nuestra vida cotidiana consumimos productos cuya peligrosidad muchas veces ignoramos, alejándonos así cada vez más, de la posibilidad de optar y tomar las precauciones pertinentes.

Dentro de estos productos se encuentran los denominados plaguicidas que constituyen una alarmante causa de enfermedades y de diversos daños ambientales, utilizados a nivel doméstico, laboral, agrícola y forestal, para combatir organismos que de una manera u otra nos resultan perjudiciales.

Entre los plaguicidas de uso más frecuente, además de herbicidas, fungicidas e insecticidas de uso agrícola, encontramos aquellos empleados cotidianamente para eliminar piojos, garrapatas, pulgas, polillas, moscas, mosquitos, cucarachas, hormigas y ratones, entre otros.

Aunque muchos de sus efectos nocivos ya han sido ampliamente reconocidos y estudiados, en nuestro país se comercializan libremente sustancias de uso estrictamente restringido o directamente prohibido en otras partes del mundo por su toxicidad. A esto se agrega la falta de controles en el cumplimiento de la normativa vigente y de asesoramiento a los usuarios agrícolas, los vacíos de información y difusión, y la débil o ausente participación de la ciudadanía en este tema, todo lo cual, torna más compleja y dificultosa la búsqueda de soluciones y alternativas.

Sin embargo, pareciera que poco a poco una nueva conciencia se está despertando, y es quizá en parte, redescubriendo y renovando aquellas prácticas y saberes que han quedado olvidados y silenciados por un sistema dominante que impone reglas universales, que podamos transitar hacia la reversión de esta situación.

La necesidad de aplicación de plaguicidas responde en muchos casos a un enfoque sintomático del problema en lugar de atender sus causas mediante una actitud preventiva. “Más vale prevenir que curar”. Esto significa que muchas de las molestias y perjuicios que nos ocasionan las llamadas plagas podrían evitarse tomando ciertas medidas y acciones tendientes a reducir su proliferación en aquellos ambientes en los que se presentan.

A continuación se detallan algunas medidas prácticas que podemos adoptar en nuestras viviendas y lugares de trabajo con fines preventivos.

Realizar una adecuada eliminación de la basura evitando su acumulación y colocándola en bolsas plásticas y tachos herméticos (ya que constituye un foco de atracción para moscas, cucarachas, hormigas, roedores). Utilizar lo más que se pueda el reciclado de los residuos.

No dejar alimentos al descubierto o restos de ellos desperdigados, teniendo un especial cuidado con los comestibles dulces a los que resulta conveniente además, almacenar en recipientes herméticos. Con esto se evitará atraer hormigas, moscas, roedores y cucarachas. Eliminar aguas servidas y asegurar la limpieza de los lugares en donde se acumula cualquier tipo de materia orgánica en descomposición (estiércol, residuos de comida, etc.), contribuirá al control de moscas. Verificar que no queden en los alrededores envases, neumáticos y cualquier tipo de objeto que pueda contener agua estancada, ayudará a que no se desarrollen larvas de mosquitos. En nuestro país tenemos un insecto que prolifera en

aguas estancadas y propicia la enfermedad del dengue hemorrágico. Para impedir el ingreso de roedores a las edificaciones, deben arreglarse cimientos, paredes y techos, colocar rejillas de acero en entradas de tuberías y aberturas para la ventilación y sellar los huecos por donde éstos penetran. En el caso de las cucarachas deben mantenerse cerrados los desagües y para evitar el ingreso de moscas y mosquitos pueden colocarse mallas en puertas y ventanas. Para el control de pulgas deben asearse periódicamente las habitaciones en general y los sitios en donde habitualmente permanecen los animales domésticos, poniendo mayor énfasis en aspirar el polvo o la tierra del piso, las alfombras y los rincones que normalmente se encuentran obstaculizados.

En el terreno de la agricultura, encontramos que el tema adquiere un carácter mucho más vasto y complejo. El actual modelo agrícola dominante (agricultura convencional) contiene una serie de características que hacen que en ese contexto el concepto de plaga adopte su mayor significado.

Si tomamos en cuenta que una población de organismos se vuelve plaga cuando su número se dispara a niveles que nos resultan perjudiciales, encontramos que dentro de este modelo las condiciones están dadas para que esto ocurra de esa manera.

Las grandes extensiones de tierra cultivadas con una única variedad vegetal (monocultivos) que impone la agricultura convencional, potencian la reproducción de unos pocos organismos e impiden el desarrollo de otros, provocando así un importante desequilibrio en las interacciones ecológicas y una considerable disminución en la diversidad biológica, que promueven el surgimiento de plagas.

Es así que, como consecuencia de esto, se recurre al uso intensivo de plaguicidas sintéticos que eliminan no sólo organismos perjudiciales sino también a aquellos que intervienen en su control, acentuando aún más estos desequilibrios e induciendo resistencia en las plagas. La sustitución de los ecosistemas naturales por inmensos monocultivos y el uso paralelo de agrotóxicos, conducen además, a una enorme pérdida de especies animales y vegetales nativas.

Otro efecto del conjunto de medidas incluidas en este sistema así como también de la utilización del paquete tecnológico predeterminado, es la obtención de suelos

contaminados, erosionados, nutricionalmente desbalanceados y desgastados, en los que las plantas crecen con una mayor susceptibilidad a contraer enfermedades y a ser atacadas por las plagas.

Pareciera entonces muy difícil, si no imposible, intentar realizar manejos preventivos eficaces contra la aparición de plagas cuando el propio modelo es intrínsecamente generador de esta problemática. Estos son apenas algunos rasgos de la agricultura convencional cuyos costos y repercusiones no se limitan exclusivamente a aspectos ambientales y de la salud, sino que alcanzan además a otras cuestiones sociales, económicas y políticas a las que está indisolublemente ligada.

Es frente a esta insustentabilidad planteada por la agricultura convencional, que resurge la necesidad de un cambio en la concepción de la forma de producir y en donde el enfoque agroecológico ofrece nuevas perspectivas.

Este enfoque propone una serie de principios que hacen que los sistemas agrícolas traigan incorporados en su propio diseño las estrategias para una producción que, entre otras cosas, evite la proliferación excesiva de organismos que pudieran resultar dañinos.

Esto se lograría respetando y fortaleciendo los procesos naturales y las interacciones biológicas mediante: la diversificación, asociación y rotación de cultivos, la incorporación al suelo de materia orgánica y abonos verdes, la presencia de cultivos de cobertura y de vegetación extra al cultivo, un adecuado manejo en general relacionado a factores como el agua, el aire y la estructura del suelo, la época de siembra, entre otras medidas.

La acción combinada de todos estos elementos asegura el mantenimiento de un sistema equilibrado y saludable en el cual las funciones naturales se hallan favorecidas (reciclaje de nutrientes y fertilidad del suelo, regulación de procesos hidrológicos, control del microclima local y control biológico, inactivación y descomposición de sustancias químicas tóxicas).

De esta manera, ningún organismo se desarrollará en forma descontrolada y las plantas crecerán con una nutrición balanceada y rica en nutrientes que las volverá resistentes frente a eventuales plagas y enfermedades. Podremos contribuir entonces a una menor incidencia

de plagas en nuestras huertas y jardines, dejando recursos disponibles para la fauna silvestre (tanto dentro de la huerta como del paisaje natural circundante) y procurando una gran diversidad de plantas que sirvan de refugio y alimento a organismos benéficos.

Cuando las medidas de prevención se vuelven insuficientes y nos vemos en la necesidad de seguir otro tipo de procedimiento para el control de plagas, podemos recurrir al empleo de plantas con este fin.

Las distintas propiedades de las plantas y sus diferentes formas de utilización, nos ofrecen un amplio espectro de posibilidades para el control de numerosos organismos. Estos métodos implican una serie de ventajas frente al uso de plaguicidas sintéticos.

En primer lugar, al estar basados en la utilización de los recursos renovables localmente disponibles, constituyen una alternativa más económica; y en la medida en que se requiere una mínima o nula cantidad de energía a base de combustible fósil para su producción, resultan, desde este punto de vista, más eficientes. A su vez, la utilización de plantas y sus extractos implica una menor contaminación dado que son sustancias biodegradables que persisten, por lo general, poco tiempo en el ambiente. Debido a ello es que se ve disminuido además, el riesgo de la presencia de residuos en los alimentos, pudiendo en varios casos, ser aplicados incluso hasta poco tiempo antes de la cosecha.

Por otra parte, los extractos vegetales están constituidos por un conjunto de principios activos, químicamente distintos entre sí, cuyas proporciones son variables. Esto hace que la presión de selección sobre los organismos a controlar no sea siempre la misma, disminuyendo así, las probabilidades de desarrollar resistencia.

Por último, aunque en el reino vegetal se encuentran sustancias de alta toxicidad tanto para las personas como para los distintos grupos animales, las plantas no deberían representar riesgos para la salud, si son utilizadas correctamente.

Muchas de las plantas cuentan con registros clínicos o bibliográficos de toxicidad tanto en nuestro país como en otras partes del mundo. Estos casos de intoxicación se producen principalmente debido a la ingesta de las plantas, tanto accidental como intencional, y en menor medida a la inhalación y al contacto directo con la piel.

Es conveniente destacar, que los efectos nocivos no dependen solamente de la especie vegetal implicada sino que además se vinculan con otros aspectos tales como factores ambientales, dosis y parte de la planta ingerida y características de la persona que la consume (edad, peso, gravidez, estado de salud, susceptibilidad individual, etc.). La dosis ingerida es de especial importancia ya que en ella radica muchas veces, la diferencia entre un efecto terapéutico y uno perjudicial.

Las plantas que pueden ocasionar reacciones adversas de diversa índole y gravedad (incluso letales en muchos casos) se encuentran: el floripón, la lantana, el paraíso, el perejil, la yerba del bicho, el paico, la acacia blanca, la anacahuita, el ajeno, la manzanilla, el diente de león, el hinojo, el duraznillo negro, el palán palán, la ruda y el ricino.

Es debido a estos riesgos potenciales que se vuelve imprescindible tomar determinadas precauciones y seguir una serie de indicaciones a la hora de trabajar en la elaboración de las sustancias, ya que de esta manera estaremos además, asegurando la calidad de los preparados y evitando problemas ambientales.

En el presente explorando las alternativas que puedan surgir del empleo de plantas como sustitutas ecológicas de los plaguicidas sintéticos, se planifica no como soluciones aisladas, sino enmarcadas dentro de un enfoque integrador que tome en cuenta los distintos aspectos de esta problemática.

Actualmente en nuestro país, se utilizan como herramienta para el trabajo a pequeña escala y con un fin ecológico y social, en las huertas orgánicas periurbanas [419] las cuales también están siendo evaluadas en cuanto a la inocuidad de los productos que se obtienen de ellas.

Sin embargo no podemos desconocer el aspecto económico que también forma parte de nuestro equilibrio.

Si dado el aumento en la intensidad de la producción no es factible el uso de plantas para evitar plagas. Otra alternativa para mejorar la situación actual en nuestro país es utilizar una agricultura con conciencia. Consiste en usar estos plaguicidas con las medidas de seguridad

que corresponden tanto para las personas que lo manipulan como para la población que circunda la zona rural.

Una herramienta muy beneficiosa, es trabajar con el asesoramiento y la capacitación, lo cual es una forma barata de prevención, desde los que trabajan con estas sustancias, hasta todos los que deciden el uso de estos compuestos.

Una capacitación que implique fundamentalmente la toma de conciencia de las personas sobre las consecuencias del mal uso de estas sustancias, ya desarrolladas en el capítulo III. Donde las personas que intervienen en este proceso conozcan el tipo de plaguicida, su toxicidad, su correcto aislamiento y almacenamiento, como debe utilizarlo, los equipos y las herramientas disponibles actualmente que se usan para fumigar, cual es la vestimenta que les permite cubrirse del plaguicida a los manipuladores.

Conocer cuáles son las practicas que garantizan su uso sin perjuicio de la salud, analizar la cinética de degradación de la sustancia con el fin de elegir la más conveniente en cada caso.

Evitar el contacto de estos productos, con las reservas de agua para evitar la contaminación no solo en los humanos sino la contaminación de los recursos, fundamentalmente debido a la falta de conocimiento de la vida media de estos compuestos y a la posibilidad de acumulación de los mismos.

Además existen otras metodologías que ayudan a evitar el uso indiscriminado de plaguicidas, una de ellas es utilizando una buena rotación de los cultivos y disminuyendo el uso no indiscriminado de estas sustancias y como consecuencia la incidencia desfavorable debido a su toxicidad.

Enfocándonos en nuestro país, disminuir el monocultivo que, como dijimos antes, es perjudicial; por ejemplo, el de soja. Una solución sería buscar otro cultivo que tenga otras propiedades beneficiosas como la soja y que comience a ser valorado como ella. Es decir buscar una solución desde el conocimiento y la creatividad. No hay que desconocer el aspecto comercial, pero también es cierto que este tipo de producción de monocultivo es beneficiosa en el corto plazo pero a través de los años será cada vez más perjudicial para el suelo.

Una posibilidad es encontrar diversos alimentos que contengan beneficios puntuales como puede ser un alimento funcional es decir un alimento que además de nutrir mejore la salud de la población. Empezar por el alimento que contenga un cereal determinado, y de esa forma aumentar la necesidad de producción de ese cereal, y como consecuencia aumentar las zonas cultivadas, que aumente la rentabilidad de los campos pero a su vez que permita mejorar la calidad del suelo, propiciando la rotación de cultivos.

Un ejemplo podría ser el centeno que es un cereal no tan desarrollado, que se puede sembrar en suelos pobres y no requiere tantos cuidados y puede transformarse en un alimento funcional. En general se utiliza en los panificados y en la producción de bebidas, como harina sin ningún tratamiento previo, sin agregar sabores y otras características expresadas durante el malteado. El malteado es un proceso aplicado a los cereales en el cual los granos se hacen germinar para que se expresen enzimas (ej. aminolíticas, proteolíticas, fitasas, glucanasas, etc.), las cuales originan fibras solubles oligosacáridos que se utilizan como prebióticos. Estas sustancias son el alimento de microorganismos como las bacterias lácticas (probióticos), las cuales se desarrollan en el intestino. Estas bacterias toman distintos hidratos de carbono y los transforman en ácido láctico bajando el pH y disminuyendo la posibilidad de que aumente la proliferación de microorganismos patógenos. Según la bibliografía, y se sigue investigando al respecto, si luego del malteado secamos y molem estas semillas obtendríamos una harina funcional; todo alimento funcional es aquel que conlleva a otra función más, además de la de nutrir, como es la de aumentar las defensas del organismo.[408,407 y 406]. Otro aspecto que se está estudiando e investigando de este cereal es que puede también puede ser un control natural de malezas y sus raíces capturan nutrientes y reducen la erosión y el escurrimiento del suelo[405].

Pero por sobre todo esta realidad es una invitación a volver la mirada hacia nosotros, mismos y desde ese lugar de responsabilidad que tenemos, prestar atención a nuestras elecciones cotidianas y ver de qué manera podemos, a través de la información, la reflexión, la conciencia y la acción, contribuir a la construcción colectiva de una nueva forma de estar en el mundo, en este camino de la sustentabilidad que necesita del compromiso de todos nosotros.

### **5-2-1 Una planta aromática que, dentro de sus usos, es también control de plagas:**

**La menta.** Mentas (*Mentha* sp.) Familia: Lamiaceae

#### **5-2-2 Generalidades:**

Existen en el mundo más de 600 variedades de mentas, tanto silvestres como de cultivo. Poseen aromas y sabores con notas muy diversas entre sí, pero todas ellas contienen principios activos similares que les otorgan propiedades en común. Se trata de plantas herbáceas perennes, erguidas y de tallos cuadrangulares, ramificados y de altura variable; de flores pequeñas dispuestas de diferentes maneras según la variedad.

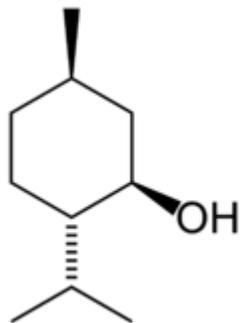
Son originarias de las zonas templadas del hemisferio norte y han sido utilizadas con fines medicinales y culinarios tanto por las grandes civilizaciones de la antigüedad como en el presente.

Propiedades y aplicaciones: Contienen propiedades repelentes e insecticidas. Actúan en el control de hormigas, polillas, gorgojos, pulgones, moscas de la fruta, mariposas de la col y garrapatas en animales domésticos.

Formas caseras de utilización en el control de plagas:

- ✓ El extracto alcohólico controla hormigas, larvas en el repollo, moscas de la fruta.
- ✓ Las plantas de menta en siembras asociadas (por ejemplo, con tomate y repollo) repelen pulgones y a la mariposa de la col.
- ✓ Las hojas frescas frotadas sobre la piel sirven para proteger de las picaduras de insectos.
- ✓ Para el control de garrapatas en animales domésticos, se espolvorea la piel del animal y las zonas en donde éste descansa con hojas secas trituradas. Otra forma de utilización para este fin, es realizar una infusión concentrada de la planta y emplear el agua para bañarlos.
- ✓ Para el control de polillas se colocan bolsas de tela con hojas secas de menta dentro de los armarios y entre la ropa. [404]

### 5-3-2; Cuáles son los componentes de la menta? El Mentol



**Mentol**

**Figura N°27**

El mentol es un alcohol secundario saturado, que se encuentra en los aceites de menta (*Menta arvensis*); es un sólido cristalino que funde alrededor de los 40 °C (104 °F). [403 y 402]

Se encuentran artículos donde se demuestra su acción plaguicida, en este caso fungicida.

Se estudió la actividad antifúngica de dos componentes de aceite esencial (citral y mentol) en cultivos de *Aspergillus niger* y *Rhizopus stolonifer*. La actividad fue alta con baja densidad del inóculo (medida en términos de número de esporas por mL), y disminuyó a medida que aumentó la densidad del inóculo.

El citral a 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  y el mentol a 400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  eran letales para las esporas de *A. niger* y *R. stolonifer*, respectivamente, después de un tratamiento de 48 horas. A concentraciones más bajas estos compuestos eran sólo fungistáticos: el crecimiento de los hongos se reanuda después de un retraso inicial o después de la transferencia a un medio fresco. Determinaciones periódicas de los componentes esenciales por cromatografía HPLC mostraron una disminución continua de sus concentraciones en el medio de cultivo, lo que indicó su eliminación tendiendo a la desintoxicación. La diferencia en la actividad de los dos compuestos se relacionó con la capacidad de disminuir su concentración y contrarrestar los efectos indeseables de los hongos. [409] También se evaluó en otro trabajo su acción acaricida [410].

### **5-3-3 Usos del mentol**

Se emplea en la industria farmacéutica como saborizante, carminativo, anestésico y antiséptico [402] y en algunos cigarrillos, porque posee un efecto refrescante sobre las mucosas. Tiene también propiedades anti pruriginosas y antisépticas. Es insoluble en agua y soluble en alcohol y éter. Se utiliza como ingrediente en los siguientes tipos de productos: la inmensa mayoría de las pastas dentífricas; chicles y caramelos con sabor a menta; aceite de menta; medicamentos para el herpes labial (boqueras o fuegos); ungüentos para tratar dolores (Ben-Gay, Therapeutic Mineral Ice); inhaladores, pastillas o ungüentos para tratar la congestión nasal; cremas y lociones para aliviar la picazón; medicamentos para tratar las encías, boca, garganta irritadas; enjuagues bucales y crema para infección vaginal.

El uso de mentol está desaconsejado en los productos cosméticos destinados a niños menores de tres años. El mentol produce toxicidad por Sobredosis

#### **Se pueden presentar los siguientes síntomas:**

- Vejiga y riñones
  - ✓ sangre en la orina
  - ✓ ausencia del gasto urinario
- Pulmones
  - ✓ respiración rápida
  - ✓ respiración superficial
- Gastrointestinales
  - ✓ dolor abdominal
  - ✓ diarrea
  - ✓ náuseas
  - ✓ vómitos
- Corazón y sangre
  - ✓ latidos cardíacos rápidos
- Sistema nervioso
  - ✓ convulsiones
  - ✓ mareo
  - ✓ temblor
  - ✓ pérdida del conocimiento
  - ✓ marcha inestable

Si el mentol está bajo la forma de crema o ungüento, se debe limpiar cualquier residuo que permanezca sobre la piel y contactar al Centro de Control de Envenenamientos para más indicaciones. Inmediatamente se debe buscar asistencia médica de emergencia [420 y 421]

**Algunos trabajos como ejemplos, donde se verifica su acción farmacológica.**

Se estudiaron los efectos de la administración oral de una pastilla/comprimido conteniendo 11 mg de (-) mentol sobre la resistencia al flujo de aire (NAR, por sus siglas en inglés) y sobre la sensación de flujo de aire en 62 sujetos afectados de congestión nasal asociada con la infección del resfrío común, contraída naturalmente. NAR se midió mediante una rinomanometría posterior, y la sensación nasal de flujo de aire por medio de una escala visual analógica (VAS, en inglés). Los efectos del comprimido se compararon con un placebo. NAR mostró un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) en ambos grupos (mentol y placebo) durante las 2 horas del experimento, sin que en ningún momento se registraran diferencias entre los dos grupos. Los registros VAS mostraron cambios significativos de mejora subjetiva en la sensación nasal de flujo de aire ( $P < 0.001$ ) en el grupo tratado con mentol, a 10 minutos de la administración de la dosis, mientras que el grupo placebo no mostró cambios. Se concluye que la administración de 11 mg de mentol en sujetos con resfrío común no tiene efectos sobre NAR, de acuerdo con la rinomanometría posterior, pero causa un cambio notorio en la sensación nasal de flujo de aire con una sensación subjetiva de descongestión nasal. [412] Además se realizó un estudio comparativo de la eficacia de la bencidamina, mentol y salicilato de metilo vs el clorhidrato de bencidamina para el tratamiento de los traumatismos del sistema musculo esquelético. En este trabajo se presentan los resultados de un estudio clínico fase III, prospectivo, longitudinal y experimental. Se comparó la eficacia y la seguridad de dos medicamentos para el tratamiento de los síntomas y signos posteriores al traumatismo musculo esquelético. Dicho estudio se realizó en dos grupos paralelos de 25 deportistas escogidos al azar. Los resultados muestran que el medicamento combinado de bencidamina más mentol y salicilato de metilo, disminuyó significativamente la presencia e intensidad del dolor, calor, rubor y edema en el sitio del traumatismo y recuperación más rápida de la capacidad funcional en la región afectada por el traumatismo. Se observaron también menos efectos adversos con el uso del medicamento combinado en comparación con el medicamento constituido por bencidamina sola. De esta manera se puede concluir que la inclusión de

mentol y salicilato de metilo en la crema para el tratamiento t3pico de los traumatismos ofrece un tratamiento m3s eficiente y seguro que la bencidamina sola (AU).

En el pr3ximo cap3tulo se trabajara con complejos de inclusi3n del (+)-mentol y el (-)-mentol con  $\beta$ -ciclodextrina modificada con L-tript3fano, desde el punto de vista te3rico.

## Cap3tulo VI

Sabes que algo est3 pasando, pero no sabes lo que es

Bob Dylan

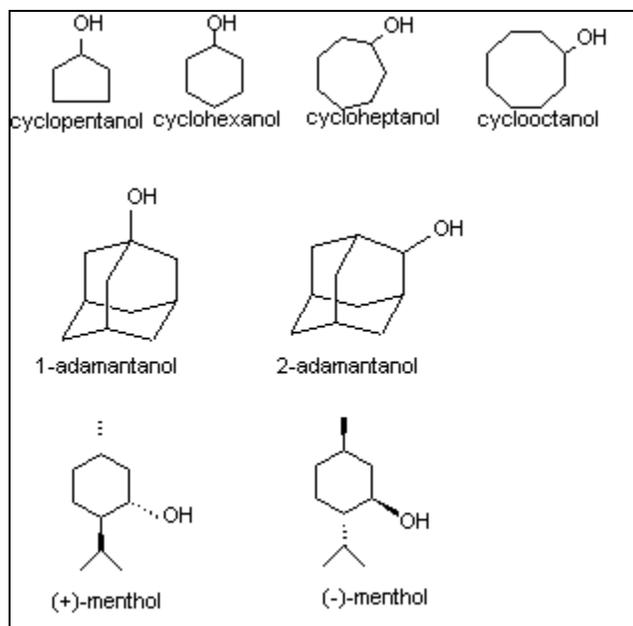
Toda interpretaci3n de la mec3nica cu3ntica involucra la conciencia

Euan Squires

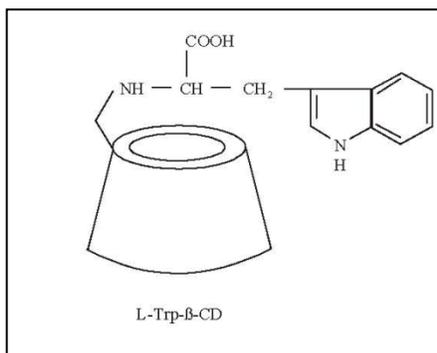
### 5-1-1- $\beta$ -Ciclodextrina modificada con L-tript3fano actuando como Selector Molecular y Enantiom3rico verificado por medio de C3lculos Semiemp3ricos

#### 5-1-2 Introducci3n

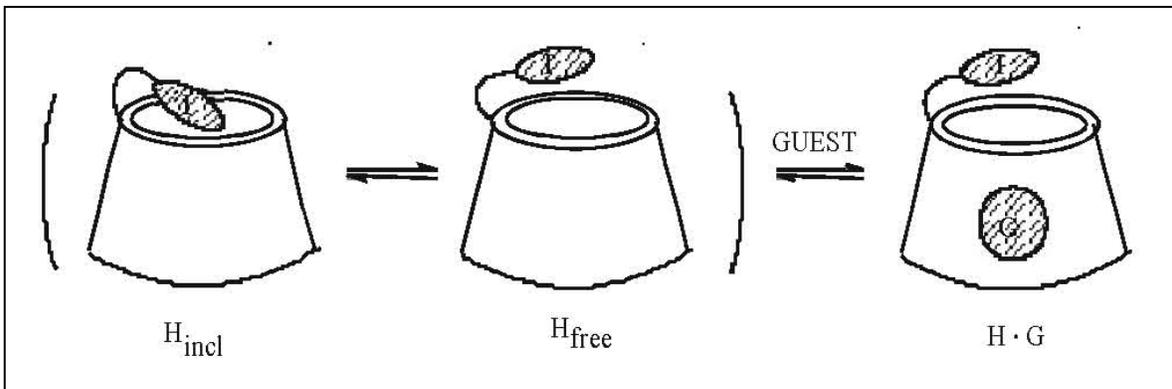
El estudio de los complejos formados con  $\beta$ -ciclodextrina modificada con L-tript3fano y con los sustratos: alcoholes c3clicos de pentanol a octanol, el (+)-mentol y el (-)-mentol y el 1- y el 2-adamantanol, se llev3 a cabo mediante c3lculos de mec3nica molecular y semiemp3ricos PM3.



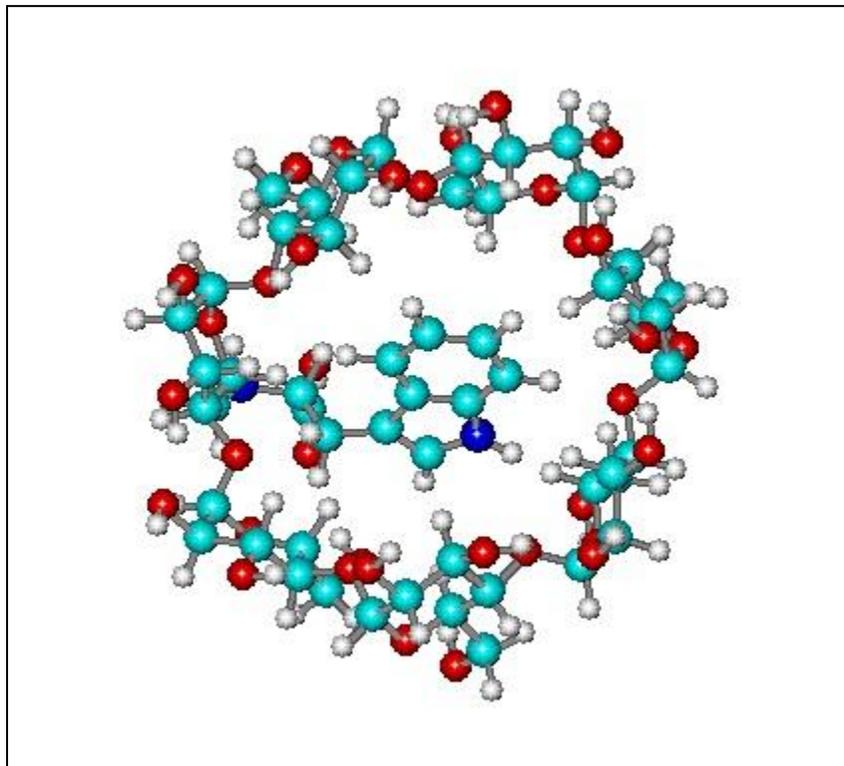
**Figura N° 28: Los alcoholes cíclicos que actúan como huéspedes en la formación de complejos con la  $\beta$ -Ciclodextrina modificada con L-triptófano**



**Figura N°29:  $\beta$ -CD modificada con L- triptófano**



**Figura N°30: Equilibrio en el proceso de complejación de la  $\beta$ -Ciclodextrina modificada**



**Figura N°31:  $\beta$ -CD modificada con L- triptófano**

El objetivo ha sido racionalizar a través de las energías y de las estructuras, la probada capacidad de la ciclodextrina sustituida para el reconocimiento molecular y la selectividad. El reconocimiento molecular de los cicloalcoholes apareció guiado por su forma, tamaño, y rigidez. La interacción intermolecular fue estudiada a partir de enlaces intermoleculares de hidrógeno, su viabilidad, y de la fuerza impulsora hacia la formación de los complejos y el aumento de las energías de estabilización con el tamaño molecular. La complejación más efectiva fue la del (-)-mentol, en comparación con el (+)-mentol. Esto fue observado para dos diferentes conformeros del anfitrión o receptor (host) y la inserción del huésped (guest) por el extremo metilo, se mostró más eficiente. Los resultados no apoyan la evidencia experimental que el 2-adamantanol forma complejos más estables que el 1-adamantanol, por lo que posteriormente se realizaron estudios de estos dos tipos de complejos, mediante cálculos teóricos a un nivel más profundo. En el caso de la  $\beta$ -Ciclodextrina modificada con L-triptófano los resultados teóricos apoyan la evidencia experimental de que el resto indólico del triptófano, tiende a situarse dentro de la cavidad de la Ciclodextrina.

La química supramolecular permite el proceso de reconocimiento de especies químicas por medio de un receptor molecular. Como ya dijimos las CDs naturales, son oligosacáridos cíclicos; las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , están compuestas respectivamente por 6, 7 y 8 unidades de D-(+)-glucopiranosas unidas en forma  $\alpha$ -1,4. Esta forma permite utilizar estas estructuras para estudiar la formación de complejos [425]. Las CDs son descritas por medio de una geometría de tipo toro, y presentan usualmente la estructura de un cono truncado, en donde el borde correspondiente a los HO<sup>-</sup> primarios del anillo muestra un diámetro más reducido, comparándolo con el de los HO<sup>-</sup> secundarios, más ancho. Además, en algunos casos, la estructura geométrica puede apartarse bastante de la simetría toroide casi perfecta.

Las CDs presentan la habilidad de formar complejos de inclusión. Su cavidad central formada por los átomos de carbono de las unidades de glucosa es relativamente apolar y por esta propiedad permite la inclusión de una variedad de moléculas orgánicas en solución acuosa [[425-427].

El proceso de complejación de las CDs está gobernado por diversas fuerzas intermoleculares entre el anfitrión o receptor y el sustrato o *guest*, tales como dipolo-dipolo,

hidrofóbicas, electrostáticas, de van der Waals y uniones de hidrógeno [428]. Este proceso de reconocimiento es generalmente acompañado de cambios conformacionales y de distensión del anillo, así como de la transferencia al seno de la solución de moléculas de agua que se encuentran inicialmente incluidas en la cavidad.

La espectroscopia UV y la espectroscopia de fluorescencia han sido ampliamente usadas para estudiar este tipo de complejos. Más aún, siendo la cavidad quiral, se induce dicroísmo circular cuando el huésped es no quiral: una manera de probar que la inclusión se produjo y de obtener información sobre la orientación del huésped en el ciclo [429, 430].

Por otra parte la fluorescencia es sensible a los cambios en la polaridad del microambiente y esto puede provocar un corrimiento de la fluorescencia de especies activas hacia mayores o menores longitudes de onda, según sea el medio más o menos polar, o cambios en el rendimiento cuántico.

La sustitución de un grupo hidróxilo del macrociclo CD provoca cambios sustanciales, y por tanto, dará lugar a interacciones adicionales, más específicas, entre el huésped y el receptor. Esto fue usado como recurso para modificar la transparencia espectroscópica de las CDs: al unir covalentemente un sustituyente espectroscópicamente activo, la complejación puede causar cambios en los espectros de absorción UV o emisión por fluorescencia de la CD modificada [432,434]. Si el sustituyente agregado tiende a auto-incluirse dentro del ciclo de acuerdo con la **Figura N°30** (estructuras del lado izquierdo), los cambios inducidos por la inclusión de un huésped externo (**Figura N°30** estructura del lado derecho), permitirán la detección óptica de huéspedes espectroscópicamente inactivos. De esta manera, la CD modificada se transforma en un sensor químico.

Se estudió la capacidad de reconocimiento molecular que muestran derivados de la  $\beta$ -CD poseedores de una sonda espectroscópica y se investigó su comportamiento con relación a los procesos de complejación [436,438]. Así fue que se demostró que la  $\beta$ -CD modificada con L-triptófano (Figura N°31), que lleva al resto L triptófano como una sonda, reconoce mínimas diferencias estructurales en un conjunto de huéspedes alcoholes examinados sobre la base de su tamaño, forma, rigidez e hidrofobicidad [439]. El comportamiento de la auto

inclusión de la sonda y la inclusión del huésped fue monitoreado por fluorescencia, y dicroísmo circular y la medición del tiempo de vida de la fluorescencia.

Los experimentos revelaron que en la formación de los complejos 1:1 (Ecuación 7), parte de la sonda del L-triptófano se halla al principio autoincluida en la CD, pero resulta luego impulsada fuera de la cavidad, al proceder la inserción del huésped. También se estableció que la  $\beta$ -CD modificada con L-triptófano ( **$\beta$ -CD L-Trp**) no solo reconoce el tamaño e hidrofobicidad de los huéspedes, sino que también discrimina los enantiómeros y los isómeros geométricos.



Un conjunto grande de alcoholes que forman complejos con  $\beta$ -CD modificada con L-triptófano fue estudiado experimentalmente y analizado en el trabajo de Lie y otros [439].

De ese amplio conjunto, nosotros estudiamos, por medio de cálculos teóricos, los alcoholes cíclicos desde el pentanol al octanol (1S, 2R, 5S)- (+)-mentol y (1R, 2S, 5R)- (-)-mentol y 1- y 2-adamantanol (Fig. 28). Se trata en este capítulo de describir el reconocimiento molecular y la selectividad de la CD modificada por L triptófano, por medio de lo que reflejan la energía y las estructuras, aplicando métodos híbridos compuestos de un método de mecánica molecular y luego PM3.

Los cálculos se llevaron a cabo y los resultados relativos fueron coherentes con los valores experimentales de los alcoholes cíclicos y de los mentoles, no fue así con el 1 y 2 adamantanol. Por lo tanto se decidió trabajar con cálculos ab initio, esto se amplió en otro trabajo realizado después en colaboración con un grupo de investigación de Brasil [423]. Primero evaluamos los resultados de cálculos de mecánica molecular y métodos semiempíricos.

### 5-1-2-Materiales y Métodos

Los cálculos se llevaron a cabo en el vacío mediante la aplicación de los métodos MM + y PM3 contenidos en el programa HyperChem [442-445]. Pro 6 para Windows [441] Como estructura de partida de L-Trp- $\beta$ -CD, se utilizó la  $\beta$ -CD descargada de

<http://www.lists.ic.ac/> hypermail /chemweb como un archivo extraído de 1DMB.pdb disponible en <http://www.rcsb.org/pdb>. El resto L-Trp fue agregado a mano, previamente optimizado. Fueron realizadas distintas estructuras con orientaciones diferentes del sustituyente L-Trp y optimizadas en concordancia con el Esquema N °1, esto es con el grupo indólico o bien autoincluido o como si fuese un sombrero sobre el anillo primario de la  $\beta$ -CD. Se obtuvieron distintos conformeros, se seleccionaron los de menor energía, y el correspondiente al grupo indolil situado por encima del anillo primario, se eligió para la simulación de los procesos de complejación.

Los procesos de complejación fueron iniciados con cálculos de mecánica molecular. Se ubicó a cada huésped (optimizado) apuntando directamente hacia la cavidad, pero con el grupo alcohólico HO<sup>-</sup> apuntando en sentido contrario al ingreso en la misma y a una distancia  $\approx 2.5\text{\AA}$  desde el centro del borde secundario de la  $\beta$ -CD-L -Trp. Al relajar el sistema, éste evoluciona en una trayectoria de acoplamiento hacia una estructura optimizada de los complejos y hacia la convergencia de energía. Las estructuras así obtenidas se sometieron luego a la optimización en un cálculo PM3; fue elegido este método porque se modeliza mejor las uniones hidrógenos [442-445].

Debido a la simetría C1 de la CD usada, cada huésped fue rotado alrededor de su eje molecular longitudinal, previo al tratamiento por mecánica molecular, con lo cual se simularon unos 10 á 12 procesos de acoplamiento para cada huésped. En el caso del mentol no solamente se simuló la inclusión de modo que el grupo metil entre en primera instancia en la cavidad, sino también se trató de obtener estructuras donde el grupo isopropil se introdujera primero en la cavidad. Por otro lado los mentoles también fueron optimizados con la CD en conformación con casco o sombrero; esto se detallará más, en breve.

### 5-1-3-Resultados y Discusiones

Las estructuras que se muestran en las fig.32 y fig. 33 son los dos conformeros de menor energía de la CD sustituida libre; uno corresponde al sustituyente autoincluido y el otro al sustituyente ubicado como sombrero.

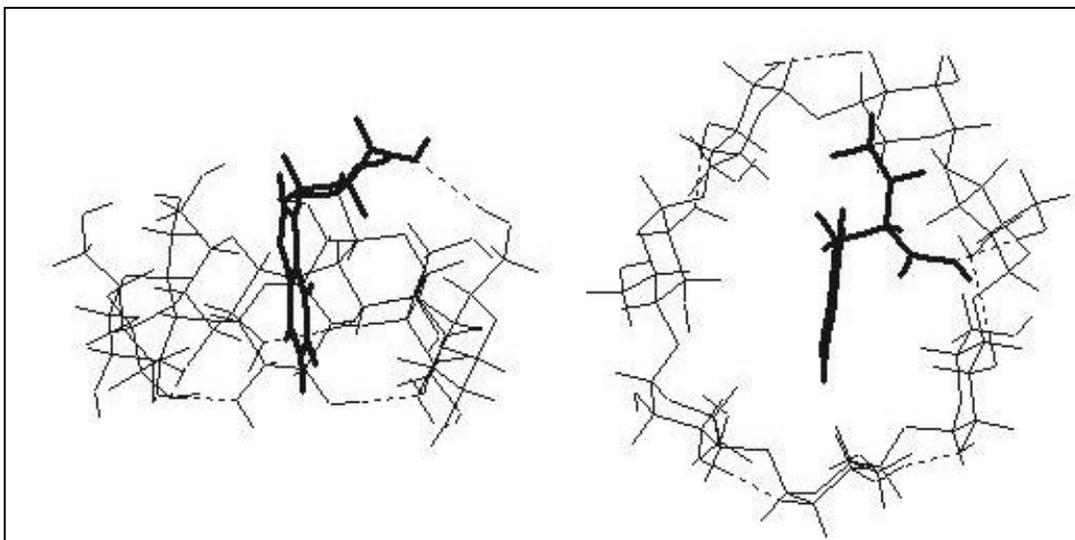


Fig. 32 Vistas laterales de la estructura auto-incluida de la  $\beta$ -CD L-Trp.

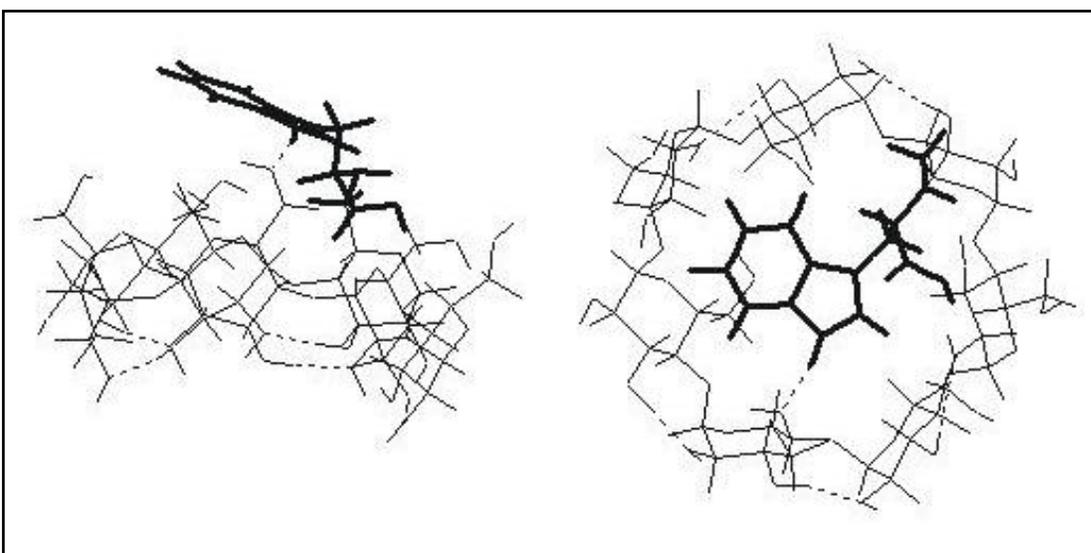


Fig. 33 Vistas de la estructura o conformeros más estable de la  $\beta$ -CD L-Trp.con sombrero

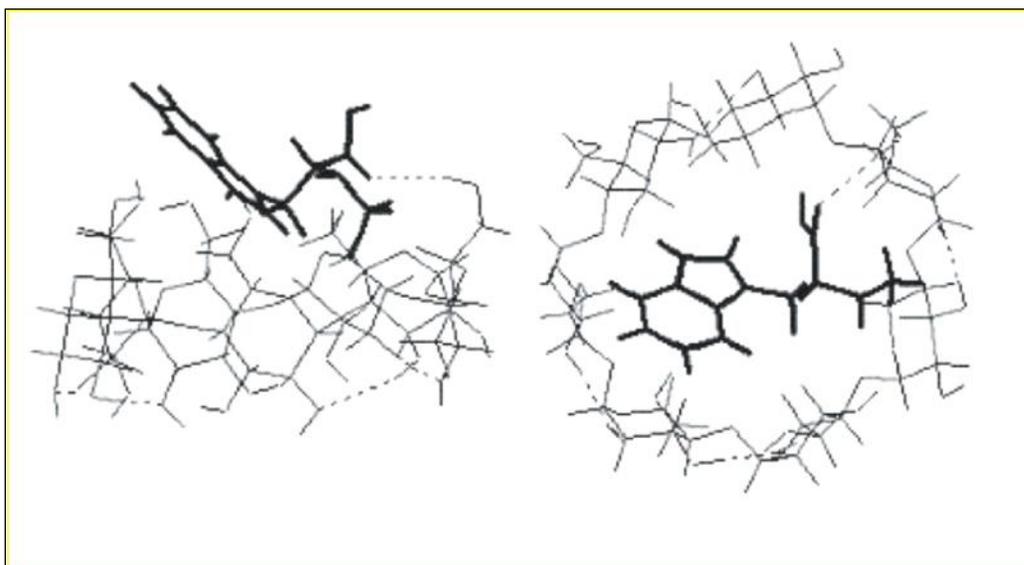


Fig.34 Vistas de la segunda estructura más estable de la  $\beta$ -CD L-Trp.con sombrero ( $\beta$ -CD L-Trp.Capped ) usada para la complejación del mentol.

Tabla N ° 8 Energías de conversión en Kcal. mol<sup>-1</sup> de las estructuras de dos la  $\beta$ -CD L-Trp.con sombrero (  $\beta$ -CD L-Trp.Capped) usadas en este trabajo y la estructura incluida(  $\beta$ -CD L-Trp.incl)de la  $\beta$ -CD L-Trp. Mostradas su vistas en las figuras 3,4 y 5.

Method	CD <sub>incl</sub>	CD <sub>capped</sub>	CD' <sub>capped</sub>
MM	73.7	81.3	80.1
PM3	-17061.0	-17053.0	-17051.0

La  $\beta$ -CD L-Trp auto incluida presenta seis uniones de hidrógenos, de las cuales cinco son entre HO- secundarios y la sexta entre el grupo carbonilo del L-triptófano y un HO-primario, con la distancia O-H (CD).... (L-Trp) = 2.627Å.

Comparando el conformero de la  $\beta$ -CD L-Trp.<sub>Capped</sub> con el anterior, la unión de hidrógeno con el carboxilo fue reemplazada por otra entre el residuo indólico y otro HO<sup>-</sup> primario del ciclo con la distancia  $\text{NH}\dots\text{O} = 1.850\text{\AA}$ . El carbonilo apunta en este conformero al centro de la cavidad.

Los resultados referidos a los mentoles no fueron del todo claros inicialmente. Por tanto, se ensayó la complejación de estas moléculas con otro conformero, identificado como la  $\beta$ -CD L-Trp.<sub>Capped'</sub>.

A pesar de no ser el más estable sino es el segundo en orden creciente de energía, se asumió alcanzable en función de cierto dinamismo en el equilibrio descrito en el Esquema N° 1.

En este nuevo conformero se observaron cinco uniones de hidrógeno una involucrando el carbonilo del L-triptófano y un HO- primario con una distancia de  $\text{HO (CD)}\dots\text{O} = \text{C(L-Trp)} = 2.411\text{\AA}$ . Las restantes uniones hidrógeno son interglucosídicas y el carboxilo apunta hacia el borde primario de la CD (fig.5), dejando más libre la cavidad de sus influencias polares.

La distorsión de cada anillo fue interpretada como el resultado de la interacción entre el sustituyente y la cavidad y como una condición realista en el medio de reacción [446].

En la tabla 8 se informan las energías de convergencia de los conformeros de la  $\beta$ -CD L-Trp, usadas en este trabajo y optimizadas según métodos de mecánica molecular y cálculos cuánticos semiempíricos.

Con respecto a los datos observados, la  $\beta$ -CD L-Trp.<sub>Capped</sub> presenta una energía más baja de convergencia obtenida con PM3 que la  $\beta$ -CD L-Trp.<sub>Capped'</sub>, pero esta última fue tentativamente considerada más apropiada para alojar los mentoles. Tanto los valores de energía de tensión (MM) como los de las energías de enlace (PM3) favorecen el conformero autoincluido respecto a los dos tipo sombrero.

En la tabla 9 se muestran las energías de convergencia obtenidas para cada huésped o sustrato en estado libre (rms grad = 0.001 kcal/Å mol), y para los complejos más estables obtenidos por PM3 y MM (rms grad 0.005(MM) y 0.05 (PM3) kcal/Å mol). También se informan las energías de tensión MM del anfitrión y del huésped correspondientes a sus respectivas conformaciones en la estructura del complejo seleccionado.

Con respecto a los mentoles, se listan los resultados referidos a ambos conformeros,  $\beta$ -CD L-Trp.Capped y  $\beta$ -CD L-Trp.Capped', señalándose si el grupo metilo del huésped se hallaba inicialmente orientado hacia la cavidad de la CD o no, para distinguir el modo de ingreso en ella.

La fuerza impulsora hacia la formación de los complejos de acuerdo a las energías obtenidas según PM3 ( $\Delta E_f$ ) y la energía de estabilización de los complejos derivadas del cálculo de MM ( $\Delta E_s$ ) fueron calculadas según la ecuación N° 2 con la  $\beta$ -CD L-Trp.Capped tomada como referencia de la CD libre.

En los cálculos para los mentoles, se eligió la  $\beta$ -CD L-Trp.Capped' y fueron consideradas las dos formas de inserción.

La energía de interacción ( $E_{int}$ ) entre el huésped y la Ciclodextrina fue calculada con los datos de MM y fue aplicada la ecuación N° 9.

Los resultados se informan en la tabla N 10 donde se presentan, como referencia, las constantes de estabilidad experimentales [439].

$$\Delta E_{f/s} = E_{\text{complejo}} - E_{\text{sustrato}} - E_{\text{CD}} \quad \text{Ec. N } ^\circ \text{ 8}$$

$$E_{\text{int}} = E_{\text{complejo}} - E_{\text{sustrato en el complejo}} - E_{\text{CD en el complejo}} \quad \text{Ec. N } ^\circ \text{ 9}$$

En la tabla N ° 10 se observa que, en el caso de los adamantanos, los resultados teóricos no concuerdan con los experimentales, pues los dos isómeros presentan igual energía de formación, y las energías de estabilización y de interacción parecen favorecer el 1-adamantanol con respecto al 2- adamantanol, contrario a lo que indican los valores de las constantes de estabilidad.

Tabla N ° 9: Energías por medio de los cálculos de MM y PM3 de los sustratos libres y sus complejos con la  $\beta$ -CD L-Trp. en kcal.mol<sup>-1</sup> y energías de tensión por medio de MM del huésped y de la CD en la estructura del complejo en letra *italica* la referencias correspondientes a los conformeros del mentol.

Substrate	Free		Complex		Incomplex	
	PM3	MM	PM3	MM	Guest	CD
1-adamantanol	-2679	18.1	-19748	81.0	18.2	83.3
2-adamantanol	-2676	18.2	-19745	82.7	19.1	83.9
cyclooctanol	-2337	20.4	-19413	81.7	20.5	81.8
cycloheptanol	-2053	17.7	-19123	80.2	17.8	81.7
cyclohexanol	-1781	7.5	-18851	71.7	7.7	82.0
cyclopentanol	-1500	11.9	-18566	77.2	11.9	81.5
(+) -menthol	<i>a</i> {		-19980	77.5	17.8	84.1
			-19983	74.0	16.7	80.6
			-19982	75.8	17.1	81.7
			-19980	74.1	16.8	81.0
(-) -menthol	<i>a</i> {		-19977	71.6	12.2	84.3
			-19985	69.6	12.4	83.0
			-19981	70.0	12.3	82.1
			-19982	70.2	12.3	80.9
(+) -menthol	<i>b</i> {		-19980	77.5	17.8	84.1
			-19983	74.0	16.7	80.6
			-19982	75.8	17.1	81.7
			-19980	74.1	16.8	81.0
(-) -menthol	<i>b</i> {		-19977	71.6	12.2	84.3
			-19985	69.6	12.4	83.0
			-19981	70.0	12.3	82.1
			-19982	70.2	12.3	80.9

*a* Inclusión desde el extreme metil de la molécula incluida como un sombrero en la CD, *b* Inclusión desde el extremo *propil* extreme de la molécula incluida como un sombrero en la CD.

Tabla N° 10: Energías de formación, de estabilidad e interacción en Kcal.mol<sup>-1</sup> de los complejos. Como referencias experimentales en la última columna la constante de estabilidad de los complejos.

Substrate	E <sub>f</sub>		E <sub>s</sub>		E <sub>int</sub>		Experimental K <sub>s</sub> (M <sup>-1</sup> )	
	PM3	MM	MM	MM	MM	MM		
1-adamantanol	-16	-18	-18	-21	-21	-21	4730.0	
2-adamantanol	-16	-17	-17	-20	-20	-20	13900.0	
cyclooctanol	-23	-20	-20	-21	-21	-21	1180.0	
cycloheptanol	-17	-19	-19	-19	-19	-19	453.0	
cyclohexanol	-17	-17	-17	-18	-18	-18	96.8	
cyclopentanol	-13	-16	-16	-16	-16	-16	60.0	
(+) -menthol	<i>a</i>	-24	-29	-20	-22	-24	-23	429.0
	<i>b</i>	-26	-26	-22	-22	-23	-24	
(-) -menthol	<i>a</i>	-25	-35	-23	-24	-25	-26	810.0
	<i>b</i>	-29	-32	-24	-23	-24	-23	

*a* Inclusión desde el extremo metil de la molécula incluida como un sombrero en la CD, *b* Inclusión desde el extremo *propil* de la molécula incluida como un sombrero en la CD.

Se observa que sólo el 1-adamantanol forma enlace de hidrógeno con el ciclo. Como se ha comentado anteriormente, estos dos complejos se sometieron posteriormente a un tratamiento más exhaustivo.

Con relación a los alcoholes cíclicos, las energías de estabilización e interacción coinciden con los datos experimentales, en el sentido de que ambos tipos de energía decrecen (en valores absolutos) con la disminución del tamaño de los huéspedes.

Las energías de formación no muestran una tendencia uniforme, pues en los complejos de los alcoholes cicloheptanol y el ciclohexanol se obtuvieron los mismos valores.

Es importante mencionar que el grupo alcoholico HO<sup>-</sup> de los alcoholes ciclohexanol y ciclopentanol formó un enlace de hidrógeno con la ciclodextrina, no observándose lo propio para los ciclos más grandes.

Tal comportamiento puede ser causado por el tamaño del huésped estudiado.

El ciclopentanol y el ciclohexanol son lo suficientemente pequeños para moverse con una mayor libertad en la cavidad y encontrar una posición eficaz de aproximación a un grupo OH de la ciclodextrina.

Los ciclos de los huéspedes más grandes pueden optimizar las interacciones de van der Waals con la cavidad, pero esto va acompañado de su traslación y movimiento conformacional más restringidos.

Esto de alguna manera se corrobora por el hecho de que mientras que ninguno de los otros complejos obtenidos con ciclo octanol mostraba uniones de hidrógeno, un complejo con ciclo heptanol sí lo hizo, siendo  $\approx 5 \text{ kcal.mol}^{-1}$  menos estables que el complejo que aquí se informa.

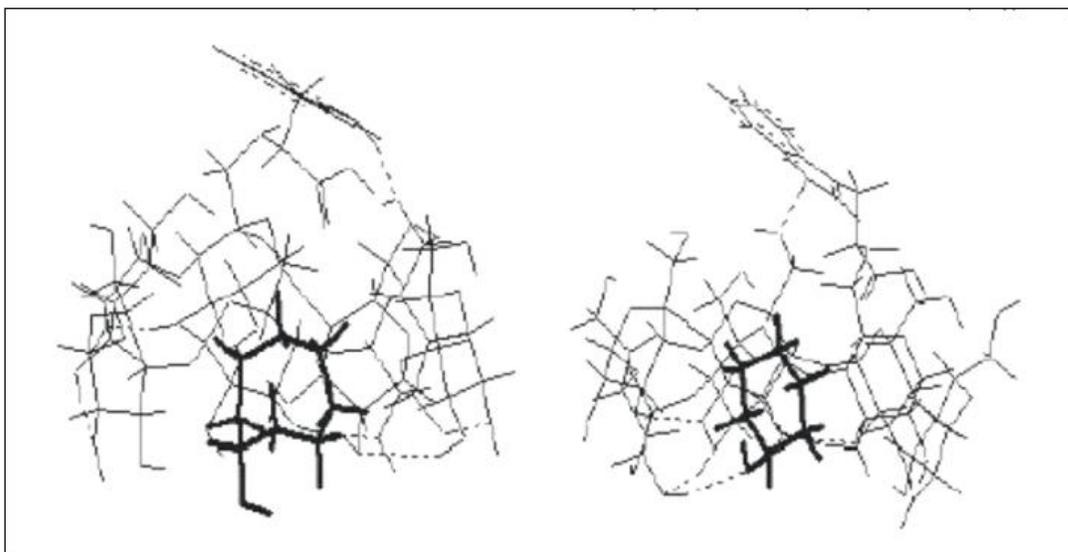


Fig. 6 Complejo del ciclo hexanol y el ciclo octanol con  $\beta$ -CD L-Trp con sombrero.

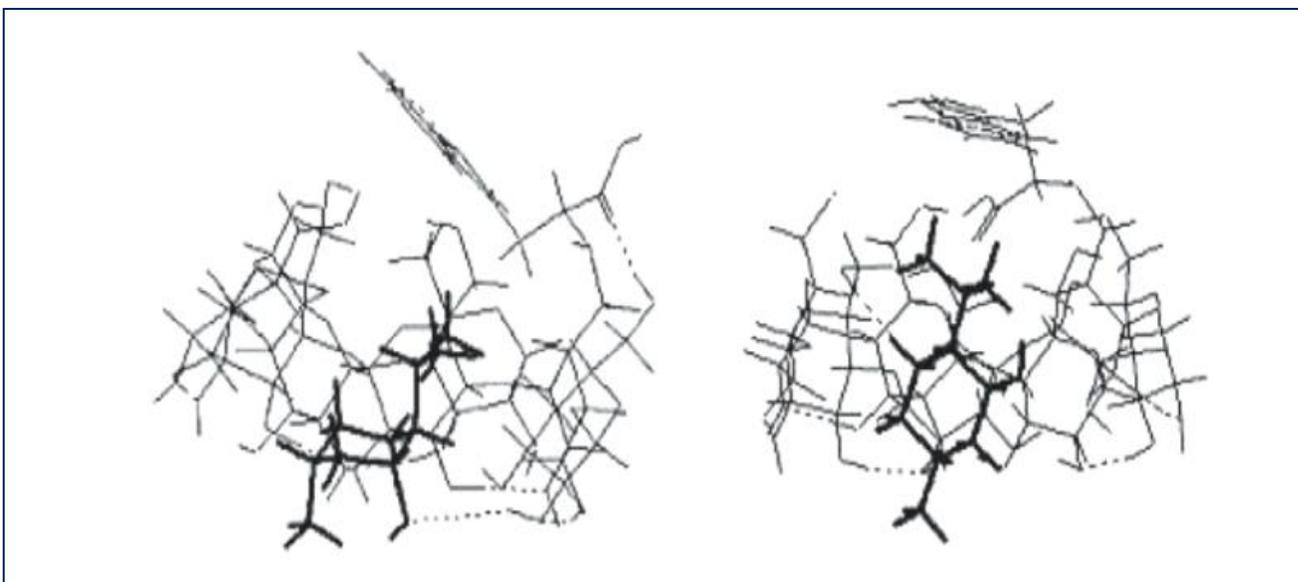


Fig. 7 Complejo del (-)- mentol insertado por el grupo propil dentro de la con  $\beta$ -CD L-Trp con sombrero (derecha) y el (+)- mentol insertado por el grupo propil dentro de la  $\beta$ -CD L-Trp con sombrero' (izquierda).

Para el hexanol y los pentanoles, se observaron respectivamente uno y dos casos análogos, con diferencias dentro de  $\approx 0.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$  respecto a los complejos aquí presentados.

La figura N°6 muestra los complejos del ciclo hexanol y el ciclo octanol con  $\beta$ -CD L-Trp con sombrero, optimizados por medio de cálculos semiempíricos.

#### **Aclaración:**

Entre los resultados obtenidos hubo dos complejos, uno con el ciclo hexanol y el otro con el ciclo pentanol, que fueron más estables (entre  $5$  y  $7 \text{ kcal.mol}^{-1}$  respectivamente) que los seleccionados para este informe. Ambos complejos mostraron el huésped profundamente insertado en la cavidad del ciclo y ninguno de los huéspedes presentaba su grupo  $\text{HO}^-$  orientado hacia el carboxilo del sustituyente de la ciclodextrina. Los dos complejos fueron descartados basándose en la suposición de que, en la solución, la interacción del grupo hidrofílico  $-\text{OH}$  con el borde de la  $\beta$ -CD L-Trp impediría al huésped ubicarse en la posición teóricamente más favorable con una estructura completamente optimizada.

Esto se dedujo previamente en el caso de otro sustituyente de la ciclodextrina, a partir de la comparación de los valores experimentales de  $K_s$  para cicloalcanos versus cicloalcoholes [447] y está avalado por el análisis de la estructura cristalina de complejos de ciclodextrina en los cuales el grupo  $\text{HO}^-$  del alcohol se encuentra normalmente ubicado cerca del borde secundario de la ciclodextrina [448,449].

Al analizar la complejación de los mentoles con el confórmero CD *capped* (izquierda en la tabla 3 sub-columna mentol) los valores de la energía de formación ( $\Delta E_f$ ) y de energía de estabilización ( $\Delta E_e$ ) parecen favorecer el (-)- mentol entrando por el extremo propilo (fig.7, izq) a la derecha; mientras tanto el (-)- mentol insertado por el grupo metilo muestra la mejor energía de interacción. En el confórmero  $\text{Cd}'$  *capped* donde el carboxilo está orientado hacia el borde del anfitrión, todos los valores en la sub columna derecha de la tabla 3, señalan el (-)- mentol introducido por el extremo metilo. Entonces esta última disposición parece uniformemente la más favorecida. Los resultados son realmente coherentes con los experimentales, como se deduce de los valores de  $K_s$ .

Solamente dos de los ocho complejos analizados con los alcoholes mentoles no presentaban enlaces hidrógenos entre el  $\text{HO}^-$  del huésped y el borde secundario del anfitrión: el (+)-mentol insertado por el metilo en la  $\text{CD}'$  *capped* y el (-)- mentol insertado por el metilo en la CD *capped*.

El primer sustrato inclinado muestra una inserción poco profunda, el segundo más bien lo contrario; está insertado bastante profunda y verticalmente en la cavidad y su  $\text{HO}^-$  se orienta hacia el carbonilo del sustituyente de su anfitrión (fig. 7)

En los otros tres complejos que involucran mentoles, éstos se muestran insertados más profundamente por el grupo metilo, y presentan un apreciable incremento de la energía de tensión de la CD, ( $\approx 2.9 \text{ kcal.mol}^{-1}$  según el cálculo MM, mientras que en los complejos restantes es menor o igual a  $1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ). Todos los complejos de (-)-mentol revelan una pequeña relajación de los huéspedes en la formación de complejos. ( $\approx -0.9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ )

Se observa que la complejación del mentol es principalmente gobernada por una interacción intermolecular más fuerte, tal como es la unión de hidrógeno con la ciclodextrina. Esta unión se forma, como en el caso de los alcoholes anteriores, entre el HO- hidrofílico del huésped, unido a uno de los tres centros asimétricos de la molécula, y el borde secundario de la ciclodextrina. En el (-)-mentol optimizado, el grupo HO<sup>-</sup> aparece en forma ecuatorial, así como los dos sustituyentes alquilo. En el (+)- mentol optimizado los tres aparecen en posiciones axiales. Así que debería ser mayor el impedimento estérico para la mejor inserción del segundo sustrato, que para el anterior (fig. 7 derecha).

Otra cuestión es por qué los complejos con (-)- mentol entrando por el grupo metilo se ven favorecidos en comparación con los que entran por el grupo isopropilo. Recordemos que la inserción por el grupo propilo en la β-CD L-Trp capped presentaba un complejo más estable pero sin el enlace de hidrógeno intermolecular entre el HO- del alcohol y el macrociclo. Entonces las mejores interacciones se obtuvieron para el complejo con el huésped insertado por el grupo metilo, que produjo una unión de hidrógeno intermolecular.

En cuanto a las dos estructuras complejas que implican la β-CD L-Trp 'capped, la que originó el (-)- mentol ingresando por el isopropilo mostró una inserción superficial del huésped y por lo tanto la asociación es más débil en este complejo que en el otro, en el que el huésped entró con orientación opuesta, produciéndose finalmente una buena inserción y con interacciones intermoleculares eficientes, incluida una unión hidrógeno.

#### **5-1-4 Uniones de hidrógeno en el ciclo anfitrión**

La unión de hidrógeno del grupo indólico que aparece originariamente en la β-CD L-Trp<sub>libre</sub>, fue preservada en los complejos con adamantanol y en los complejos de los alcoholes cíclicos, pero solamente en un complejo con mentol, esto es el (-)-mentol insertado por el grupo metilo. Para el complejo (+)-mentol que se introduce por el grupo propilo ese enlace de hidrógeno fue sustituido por otro entre el grupo carboxilo del sustituyente y un grupo HO- del anillo primario de la CD capped. No hay unión hidrógeno entre el residuo y el macrociclo, en los otros dos complejos del (-)- mentol insertado por el propilo y el (+)-mentol que se introduce por el metilo en la CD capped..

Los alcoholes mentoles tienen forma molecular alargada y empujan el residuo fuera de la CD; por lo tanto destruyen este enlace de hidrógeno, a menos que se adapten convenientemente, lo cual es posible en caso de un sustituyente pequeño como el metilo, pero no en uno más voluminoso, como el isopropilo.

El enlace de hidrógeno que implica un grupo carbonilo, mencionado en la CDcapped ' L-Trp, se mantuvo en todos los complejos con los mentoles, pues era posible preservarlo incluso cuando el resto fue moderadamente desplazado hacia afuera.

### **5-1-5 Conclusiones**

La estructura y la más baja energía del conformero  $\beta$ -CD L-Trp autoincluido, el de la izquierda del esquema 1, comparado con el conformero del cuasi sombrero que cubre la cavidad, evidencian en los cálculos que el grupo indólico tiende a introducirse en la cavidad de la CD. Esto resulta conforme a los datos experimentales.

El reconocimiento molecular de los cicloalcoholes fue deducido por el aumento de la  $K_s$  experimental con el tamaño molecular, ahora con el apoyo de la tendencia general, en la misma dirección, de la energía de estabilización, las interacciones intermoleculares y la fuerza impulsora hacia la formación de los complejos.

La complejación mejor constituida entre la  $\beta$ -CD L-Trp y el (-)-mentol, en comparación con el (+)-mentol, fue obtenida para dos diferentes conformeros del anfitrión, y con la inserción del huésped por su extremo metilo, más eficiente que por el extremo isopropilo.

Los resultados semiempíricos no apoyaron la evidencia experimental que el 2- adamantanol forma complejos más estables con la  $\beta$ -CD L-Trp que el 1- adamantanol, probablemente debido a la interferencia del residuo de la CD,, ubicado dentro de la cavidad en el conformero empleado en nuestra simulación.

Se realizó un trabajo en colaboración con un grupo de investigadores de Brasil [423]en donde se profundizó este tema obteniéndose más información. Los procesos de formación de complejos de 1 y de 2-adamantanol con la  $\beta$ -CD L-Trp se han estudiado utilizando el método ab initio Hartree-Fock y la teoría del funcional de la densidad. Para los procesos de inclusión de los adamantanoles, se encontró que el 2-adamantanol tiene una diferencia de

energía de ~2kcal/mol en su favor, en concordancia cualitativa con el resultado experimental. La forma de inserción es con grupo HO<sup>-</sup> del alcohol orientado hacia el borde secundario de la CD. Sin embargo, no se obtuvieron uniones hidrógeno, en contra de la sugerencia experimental de que el 2-adamantanol las puede formar más eficientemente que su isómero. Se propuso un mecanismo de reconocimiento molecular basado en la orientación relativa de los dipolos del anfitrión y del huésped. Para el complejo con el isómero 2-adamantanol, los dipolos paralelos favorecen la energía de interacción entre el anfitrión y el huésped. Para el 1-adamantanol, los dipolos son anti-paralelos, con lo cual el potencial dipolo-dipolo es repulsivo. Este mecanismo de reconocimiento molecular podría explicar las pequeñas diferencias de energía para los procesos que implican los isómeros del adamantanol y las ciclodextrinas modificadas [423]

## Capítulo VII

**Dios no juega a los dados en el universo.**

**Albert Einstein**

**Einstein se equivocaba diciendo que Dios no juega a los dados en el universo, considerando los agujeros negros, no sólo juega a los dados sino que también a veces los arroja donde no podemos verlos.**

**Stephen Hawking**

**Tal vez no se pueda unir todo en una sola teoría, o sea tan perfecta la solución que no somos capaces de encontrarla.**

### 7-1-1 Síntesis

En los primeros capítulos I y II se realizó una introducción al tema de los complejos de inclusión de CDs y de los métodos teóricos que se pueden utilizar para efectuar el estudio de sus propiedades desde la química computacional.

Es sabida la importancia de los pesticidas, no sólo desde la necesidad de utilizarlos -en la agricultura por ejemplo-, sino sobre todo por las consecuencias de su uso no responsable, interfiriendo entonces en la calidad de vida y en la salud de la población.

Para desarrollar el capítulo III se efectuó una búsqueda bibliográfica sobre los trabajos de pesticidas de la última década, aproximadamente, algunos totalmente teóricos y otros cuya faceta teórica se realizó, completando la base experimental desarrollada, por medio del

modelado de estas sustancias, optimizadas con el uso de métodos teóricos. Se buscaron, además, métodos analíticos para la detección de sustancias pesticidas y, en el caso de los organofosforados, se prestó atención a trabajos que analizaran y modelaran su interacción enzimática como la responsable de su toxicidad.

En muchos ejemplos de los trabajos de la bibliografía se encuentran complejos de inclusión con CDs; como consecuencia de la formación de estos complejos, se puede gobernar la hidrólisis de estos pesticidas y variar su solubilidad.

En el caso específico del capítulo IV se estudió la hidrólisis de tres pesticidas, modificada por la formación de complejos con  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD).

Los pesticidas organofosforados considerados son el fenitrotión, paratión y metil paratión, incluidos, a los efectos de una comparación, sus análogos del éster carboxílico. Se analizaron con una primera optimización por medio de métodos de mecánica molecular (programa MM+) y luego utilizando un análisis mecano cuántico, mediante el método semiempírico PM3. Se interpretaron las características estructurales y los cambios de energía en la formación de complejos y se dilucidaron cómo estas propiedades podrían afectar el proceso de hidrólisis. En el caso de los ésteres carboxílicos la hidrólisis resulta catalizada por las  $\beta$ -CD y en cambio en el caso del plaguicida, en medio alcalino, es inhibida.

La complejación del fenitrotión fue explorada con mayor intensidad, ya que en el desarrollo experimental resultó ser una hidrólisis relativamente menos inhibida y, además, la reacción parece progresar a través de un camino diferente al de los otros dos.

Los resultados muestran estructuras de complejos que implican que los ésteres facilitan una eficaz interacción entre el carbonilo del huésped y el borde de la  $\beta$ -CD. En los pesticidas paratión y metil paratión, en cambio, los sustratos están profundamente incluidos en la cavidad de la  $\beta$ -CD. Así que, para un ataque nucleofílico de parte de la  $\beta$ -CD, son favorables las estructuras de los complejos de los ésteres de ácidos carboxílicos, pero no las estructuras de los complejos de estos dos pesticidas.

En el caso del fenitrotión, dependiendo del modo de inclusión en la cavidad, se obtienen complejos de geometrías diferentes; al parecer, ninguna de estas estructuras favorece la aproximación de los grupos hidroxilo de la  $\beta$ -CD, pero sí de algún nucleófilo externo (un OH<sup>-</sup> en medio básico), en acuerdo con lo observado en los ensayos experimentales.

En el caso de los pesticidas el complejo formado tiene un anclaje que lo proporcionan las uniones de hidrógeno que se forman, salvo en el caso del fenitrotión que es diferente, que permite prever que no estamos tan alejados de la realidad aunque trabajamos en el vacío.

En el capítulo V se analizó la posibilidad de disminuir el uso de pesticidas con plantas que evitan las plagas. Específicamente se trató el tema de la menta, la cual está constituida por el mentol, sustancia que forma también complejos de inclusión con  $\beta$ -ciclodextrina modificada con L-triptófano.

En el capítulo VI se estudiaron los complejos formados por  $\beta$ -ciclodextrina modificada con L-triptófano, con los alcoholes cíclicos de pentanol a octanol, el (+)-mentol y el (-)-mentol y los isómeros 1- y 2-adamantanol. El análisis se llevó a cabo mediante cálculos de mecánica molecular y cálculos semiempíricos PM3.

La probada capacidad de la ciclodextrina sustituida para el reconocimiento molecular y la selectividad se estudió a través de las energías involucradas y las estructuras de los complejos modelados. El reconocimiento molecular de cicloalcoholes apareció guiado por su forma, tamaño, y rigidez. La interacción intermolecular fue deducida a partir de enlaces intermoleculares de hidrógeno observados, su viabilidad y el aumento de las energías de estabilización con el tamaño molecular. Esta interacción molecular conduce hacia la formación de los complejos.

Según los modelos, la complejación más favorecida es la del (-)-mentol, en comparación con el (+)-mentol. Esto fue observado mediante los dos diferentes conformeros con el anfitrión o receptor (host) y la inserción del huésped (guest) por el extremo metilo, la cual resulta como la introducción más eficiente. Los resultados de la modelación no apoyan la evidencia experimental, según la cual el 2-adamantanol forma complejos más estables que el 1-adamantanol, por lo que posteriormente se realizó un tratamiento de estos complejos con cálculos teóricos a un nivel más profundo.

En el caso de la  $\beta$ -ciclodextrina modificada con L-triptófano, los resultados teóricos apoyan la evidencia experimental de que el resto indólico del triptófano tiende a situarse dentro de la cavidad de la ciclodextrina.

### **7-1-2 Reflexión**

La química computacional utiliza los métodos teóricos como herramientas de trabajo, pero no en todos los casos podemos trabajar con métodos de primeros principios, debido a su costo computacional. Queda a criterio del químico evaluar entonces cuál es el proceso más conveniente para sus fines. Análogamente, durante el modelado de estas macromoléculas y sus complejos, cualesquiera sean los métodos que se usen, será nuevamente el criterio químico el que permitirá seleccionar como válidas, entre las diversas estructuras que emerjan de los cálculos, sobre la base de los conocimientos teóricos y experimentales comprobados, provenientes de las diferentes áreas de la química. Son estos cimientos en conjunto, los que nos permiten dilucidar algunos aspectos novedosos que se producen en el modelado molecular de estas sustancias.

### **7-1-3 Futuros proyectos**

Estos trabajos se realizaron con el software de HyperChem; las estructuras se optimizaron en forma completa con cálculos de MM+ y PM3.

Con relación a los pesticidas, se proyecta profundizar en el mecanismo de reacción de la hidrólisis del fenitrotión, con y sin presencia de la  $\beta$ -CD, utilizando el software Gaussian 09 y aplicando el método ONIOM donde definiremos como capa de alta precisión la de los átomos involucrados directamente en la hidrólisis, para tratarlos por primeros principios a nivel de Hartree Fock, por lo menos, deseablemente por DFT, y el resto por medio de un método semiempírico (capa media) y de mecánica molecular (capa baja), o sólo ésta, según resulten los costos en tiempo de cómputo en intentos preliminares.

Sería interesante seguir trabajando con la formación de complejos con  $\beta$ -CD y diferentes pesticidas, con el fin de comprender y dilucidar el comportamiento de estas sustancias, y para poder utilizarlas de la manera más conveniente evitando sus efectos desfavorables, tanto para mi desarrollo profesional como para aportar a mis tareas docentes las cuales llevo a cabo en la Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias de la Universidad de Morón.

Actualmente estamos trabajando en el Estudio teórico computacional sobre la base experimental comparada de la reactividad del bis-(2.4-dinitrofenil)-sulfuro y el éter análogo correspondiente con aniones carboxílicos y tiocarboxílicos. <sup>ii</sup>Donde el bis-(2.4-dinitrofenil)-sulfuro se utilizó antiguamente como pesticida, la conexión de este trabajo con el anterior si bien no formamos el complejo con CDs, se observa en el modelado, la diferencia entre el azufre y el oxígeno relacionada con la comparación de las estructuras observadas, lo cual puede estar modificando la reactividad de cada compuesto.

---

<sup>i</sup> S. Dapprich, I. Komáromi, K. S. Byun, K. Morokuma and M. J. Frisch, "A New ONIOM Implementation in Gaussian 98. Part 1. The Calculation of Energies, Gradients and Vibrational Frequencies and Electric Field Derivatives," *J. Mol. Struct. (Theochem)* **462** (1999) 1.),

<sup>iii</sup> Proyecto de investigación 2012. Estudio teórico computacional sobre la base experimental comparada de la reactividad del bis-(2.4-dinitrofenil)-sulfuro y el éter análogo correspondiente con aniones carboxílicos y tiocarboxílicos Director Dr. Cesar Micheli. Asesora Dra. Dora Barbiric Facultad de Ciencias Exactas. Universidad de Morón

### **Referencias del Capítulo N° I**

[1] **G. Wipff**, Ed., 1994. Computational Approaches in Supramolecular Chemistry, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands,.

[2] **J. Choe**, S. Chang, S. Nanbu, 2002. Ab Initio study of conformers of p-terbutylcalix[4]crown-6-ether complexed with alkyl ammonium cations, *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**(6) 891.

[3] **F. Jensen**, 1999. Introduction to Computational Chemistry, Wiley, New York,.

[4] **E. A. Castro**, D. J. Barbiric, 2002, Current theoretical methods applied to study cyclodextrins and their complexes.. E.A.Castro and D.A.Barbiric. *J.Arg.Chem.Soc.* **90** (4/6) 1-44 (Review).

[5] **Bender, M. L.**; Komiyama M., 1978. Cyclodextrin Chemistry, Springer-Verlag: Berlin.

- 
- [6] **Szejtli, J.** 1982. Cyclodextrins and their Inclusion Complexes, Akadémiai Kiadó: Budapest,.
- [7] **Vico R.V.**, Buján E.I., de Rossi R.H. 2002. Effect of cyclodextrin on the hydrolysis of the pesticide fenitrothion [*o,o*-dimethyl *o*-(3-methyl-4-nitrophenyl)phosphorothioate]// J. Phys. Org. Chem. 15, N 12. – P. 858 – 862.
- [8] **Kamiya, M.**; Nakamura, 1994. Studies on the susceptibility to alkaline hydrolysis of inclusion complexes of organophosphorothioate pesticides with  $\beta$ -cyclodextrins K. Pestic. Sci. 41, 305-309.
- [9] **Tee, O. S.**, Mazza, C., Du, X-X. 1990. Chain length effects in the cleavage of aryl esters by cyclodextrins. Different transition states for *m*- and *p*-nitrophenyl alkanoates. J. Org. Chem., 55, 3603-3609
- [10] **Liu, Y.**; Han, B. H.; Sun, S.X.; Wada, T.; Inoue, Y. 1999. Molecular Recognition Study on Supramolecular Systems. 20. Molecular Recognition and Enantioselectivity of Aliphatic Alcohols by L-Tryptophan-Modified  $\beta$ -Cyclodextrin J. Org. Chem., 64, 1487.
- [11] **M.Fathallah**, F.Fotiadu and C.Jaime.1994. Cyclodextrin Inclusion Complexes. MM2 Calculations Reproducing Bimodal Inclusions. J. Org. Chem, 59, 1288
- [12] **M.Kitagawa**, H.Hoshi, M.Sakurai, Y. Inone and R.Chujó, 1988. Estudio de complejos de inclusión de ciclodextrina. I. Cálculo de los momentos dipolares de los complejos de  $\alpha$ -ciclodextrina- huéspedes aromáticos, Toro. Chem. Soc. Jpn., 61, 4.225 a 4.229.
- [13] **B.Gillet**, D.J.Nicole and J.J.Delpuech. 1982. The hydroxyl group protonation rates of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -cyclodextrins in dimethyl sulphoxide. Tetrahedron Lett. 23, 65.
- [14] **D.A.Rees**, 1970. Conformational analysis of polysaccharides. Part V. The characterization of linkage conformations (chain conformations) by optical rotation at a single wavelength. Evidence for distortion of cyclohexa-amylose in aqueous solution. Optical rotation and the amylose conformation J. Chem. Soc. B, 877-884.

---

[15] **W.Saenger**, M.Noltemeyer, P.C.Manor, B.Hingerty and B.Klar, 1976. "Induced-fit"-type complex formation of the model enzyme  $\alpha$ -cyclodextrin Bioorg.Chem. Volume 5, Issue 2, 187–195.

[16] **B.Casu**, G.G.Gallo, M.Reggiani and Vigevani, 1968.Solution properties of natural polymers Special Publication Chem.Soc. London, 23.

[17] **Myrback K.**, Janenstrom R., 1949.Arkiv for Kemi I .129.

[18] **W Saenger**, Angew. 1980.Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry Chem.Int.Ed.Ingl.19 , 343.

[19]**Cramer F.**, Hettler H., 1967. Inclusion compounds of cyclodextrins. Naturwissenschaften, 54, 625-632.

[20]**K.A.Connors**,1982,Proc.Ist.Int.Symp.Cyclodextrins,J.Szejti,Ed.Reidel,Dordrecht, p.16.

[21] **R.J.Bergeron**, D.M. Pillor, G.J. Gibeily and W.P. Roberts, 1978 "Thermodynamics of Cycloamylose-Substrate Complexation." Bioorg.Chem, 7, 263-271.

[22]**I.Tabuski**.Y Kiyosure, T.Sugimoto and K.Yamamura. 1978.Approach to the aspects of driving force of inclusion by .alpha.-cyclodextrin.J.Am.Chem.Soc.100 ,916.

[23]**R.L.Van Etten**, J.F Sebastian, G.A. Clowes and A. Bender, 1967.Acceleration of phenyl ester cleavage by cycloamyloses. A model for enzymic specificity. J.Am.Chem.Soc.89 , 3242.

[24] **A.Orstan** and J.B.A.Ross, 1987. Investigation of the .beta.-cyclodextrin-indole inclusion complex by absorption and fluorescence spectroscopies J.Phys.Chem.91 ,2739.

[25]**W.Schlenk** and V.M. Sand J. 1961.The association of  $\alpha$  and  $\beta$  cyclodextrins with organics acids. Am.Chem.Soc.83, 2312.

- 
- [26] **M.Komiyama** and M.L. Bender, 1978. Thermodynamic studies of the cyclodextrin-accelerated cleavage of phenyl esters. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 2259.
- [27] **A. Hersey** and B.H. Robinson. 1984. Thermodynamic and kinetic study of the binding of azo-dyes to  $\alpha$ -cyclodextrin *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 80, 2039.
- [28] **E.A. Lewis** and L.D. Hansen. 1973. Thermodynamics of binding of guest molecules to  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins *J. Chem. Soc. Pekin Trans.* 2, 2081.
- [29] **F. Cramer**, *Angew.* 1952. Occlusion compounds of cyclodextrins. *Chem. Int. Ed. Engl.*, 64, 136.
- [30] **K Tadeo** and T. Kuge, 1972. On the Inclusion Compounds of Cyclodextrins with Diethylether *J. Agr. Biol. Chem.* 36, 2615.
- [31] **J.A. Hamilton L.K.** Steinrauf, R.L. van Etten, 1968. Interrelated space groups observed for complexes of cycloheptaamylose with small organic molecules. *The Acta Crystallogr. Sect. B* 24. B24, 1560-1562.
- [32] **K. Flohr**, R.M. Patton and E.T. Kaiser, 1975 Interactions of spin-labeled substrates with chymotrypsin and with cycloamyloses *J. Am. Chem. Soc.* 97, 1209.
- [33] **S. Dong** and D. Zhang, 1988. Study of the inclusion complexes of cyclodextrin by cyclic voltammetry *Acta Chim. Sin.* 46, 335-339.
- [34] **R. Isnin**, C. Slam and A.K. Kaifer, 1991. Bimodal cyclodextrin complexation of ferrocene derivatives containing n-alkyl chains of varying length *J. Org. Chem.* 56, 35.
- [35] **I. Tabushi**, 1982. Cyclodextrin catalysis as a model for enzyme action *Acc. Chem. Res.* 15, 66.

---

[36] **M.R.Eftink**, M.Andy.K.Bystrom, H.D.Perlmutter and D.S.Kristol, 1989. Cyclodextrin inclusion complexes: studies of the variation in the size of alicyclic guests J.Am.Chem.Soc.111, 6765.

[37] **K.Harata**. 1976. The Structure of the Cyclodextrin Complex. III. The Crystal Structure of the  $\alpha$ -Cyclodextrin-Sodium Benzenesulfonate Complex Bull.Chem.Soc.Jpn.49, 2066.

[38]. **Tomasik P**, Schilling CH. 1998. Complexes of starch with organic guests. In: Horton D, editor. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. San Diego: Academic Press, pp 345–426.

[39]. **Aoyama Y**, Otsuki J, Nagai Y, Kobayashi K, Toi H. 1992. Host-guest complexations of oligosaccharides: Interaction of maltodextrins with hydrophobic fluorescence probes in water. Tetrahedron Lett 33:3775–3778.

[40] **Kano K**, Minami K, Horiguchi K, Ishimura T, Kodera M. 1995. Ability of noncyclic oligosaccharides to form molecular complexes and its use for chiral separation by capillary zone electrophoresis. J Chromatogr A 694:307–313.

[41] **Gabelica V**, Galic N, De Pauw E. 2002. On the specificity of cyclodextrin complexes detected by electrospray mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom 13:946–953.

[42]**Gabelica V**, Galic N, Rosu F, Houssier C, De Pauw E. 2003. Influence of response factors on determining equilibrium association constants of non-covalent complexes by electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom 38:491–501.

[43] **Niu J**, Cheng G, Dong S. 1994. Study on the kinetic process of the complex reaction between bilirubin and cyclodextrins. Electrochim Acta 39:2455– 2460.

---

[44] **Vazquez ML**, Cepeda A, Prognon P, Mahuzier G, Blais J. 1991. Cyclodextrins as modifiers of the luminescence characteristics of aflatoxins. *Anal Chim Acta* 255:343–350.

[45] **Amato ME**, Lipkowitz KB, Lombardo GM, Pappalardo GC. 1996. NMR spectroscopic evidence and molecular dynamics studies on inclusion and non inclusion phenomena between  $\beta$ -cyclodextrin and new anti-Alzheimer's drugs tacrine (CI-970), velnacrine (HP-029), and suronacrine (HP-128). *J Chem Soc Perkin Trans 2*:321–325.

[46] **Correia I**, Bezzenine N, Ronzani N, Platzer N, Beloeil J-C, Doan B-T. 2002. Study of inclusion complexes of acridine with  $\beta$ - and (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin by use of solubility diagrams and NMR spectroscopy. *J Phys Org Chem* 15:647–659.

[47] **Andronati SA**, Shapiro YE, Yakubovskaya LN, Gorbatyuk VY, Andronati KS, Krasnoschekaya SP. 1996. Inclusion compounds of psychotropic agents and cyclodextrins. *J Inclusion Phenom Macro Chem* 24:175–186.

[48] **Szente L**, Szejtli J, Kis GL. 1998. Spontaneous opalescence of aqueous  $\gamma$ -cyclodextrin solutions: Complex formation or self-aggregation. *J Pharm Sci* 87:778–781.

[49] **Mele A**, Mendichi R, Selva A. 1998. Non-covalent associations of cyclo malto oligosaccharides (cyclodextrins) with trans- $\beta$ -carotene in water: Evidence for the formation of large aggregates by light scattering and NMR spectroscopy *Carbohydrate Res* 310:261–267.

[50]. **Suzuki M**, Tsutsui M, Ohmori H. 1994.  $^2\text{H}$  NMR study of the self-assembly of an azo dye-cyclomaltooctanose ( $\gamma$ -cyclodextrin) complex. *Carbohydr Res* 264:223–230.

[51]. **Gonzalez-Gaitano G**, Rodriguez P, Isasi JR, Fuentes M, Tardajos G, Sánchez M. 2002. The aggregation of cyclodextrins as studied by photon correlation spectroscopy. *J*

---

[52] **Agbaria RA**, Gill D. Inclusion Phenom Macro Chem 44:101–105. 1988. Extended 2,5-diphenyloxazole-  $\gamma$ -cyclodextrin aggregates emitting 2,5-diphenyloxazole excimer fluorescence. J Phys Chem 92:1052–1055.

[53] **Agnew KA**, McCauley TD, Agbaria RA, Warner IM. 1995. Phase transition pattern of 2, 5-diphenyloxazole/  $\gamma$ -cyclodextrin (PPO/ $\gamma$ -CD) self-assembly aggregates. J Photochem Photobiol A 91:205–210.

[54] **Polarz S**, Smarsly B, Bronstein L, Antonietti M. 2001. From cyclodextrin assemblies to porous materials by silica templating. Angew Chem Int Ed 40:4417–4421.

[55] **Loftsson**, A. Magnúsdóttir, M. Másson and J. F. Sigurjónsdóttir, 2002. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs“, J. Pharm. Sci. 91, 2307-2316.

[56] **Loftsson**, M. Másson and M. E. Brewster, 2004. Self-Association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes”, J. Pharm. Sci. 93, 1091-1099.

[57] **Loftsson T**, Jarho P., Másson M & Järvinen T .2005. Cyclodextrins in drug delivery University of Iceland, Faculty of Pharmacy, Hagi, Hofsvallagata 53, IS-107, Reykjavik, Iceland Review Expert Opin. Drug Deliv. 2(2)335-351 Ashley Publications www.ashley-pub.com ISSN 1742-5247

## **Referencias del Capítulo N°II**

[58] **Leach, A. R.** 2001. Molecular Modelling, principles and applications, 2nd Ed. 2001, Pearson Education Limited, ISBN 0-582-38210-6, England.

---

[59] **Born, M.**, Oppenheimer, R., 1927, Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annalen der Physik* , 389, 20, 457–484, 1927.

[60] **Jensen F.** Introduction to computational Chemistry Odense University.1999.John Wiley. J.Sons.

[61] **Dewar, M. J. S.**, Thiel, W., 1977. Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters *J. Am. Chem. Soc.* 99 , 4899

[62] **Dewar, M. J. S.**, Zoebisch, E. G., Healy, E. F., Stewart, J. J. P., 1985. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3902; erratum, 115 (1993) 5348.

[63] **Stewart, J. J. P.**, 1989.Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method *J. Comput. Chem.* 10 , 209.

[64] **Pople, J. A.**; D. Beveridge, 1970.Approximate Molecular Orbital Theory. McGraw-Hill,.

[65] **Ekhola, Michaela.** 2001. Thesis. University of Helsinki, 2001-12, ISBN 952-91-4072-X <http://ethesis.helsinki.fi>

[66] **Allinger, N.L.**, 1977.Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms *J. Am.Chem.Soc.* 99, 8127-8134,

[67 ] **Atkins, P. & Paula, J.d.** 2006. *Physical Chemistry*, 8th Ed., Oxford University Press, ISBN 9780198700722 ISBN 0198700725, United States.

[68] **Castro, E**, Barbiric D.J.2002. Current Theoretical methods applied to study Cyclodextrins and theirs complexes. *J.Arg.Chem.Soc.* 90 (4/6) 1-44 (Review).

[69] **Lennard- Jones, J.E.** 1931.Cohesion.Proceedings of the Physical Society, 43,461-482

[70] **Stejtli J.** 1982.Cyclodextrins and their Inclusion Complexes.Akadémiai Kiadó, Budapest,.

---

[71] **Stejtli J.** and Osa T., 1996. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Pergamon Press.Oxford.

[72] **Breslow R.**, 1989.Adjusting the Lock and Adjusting the Key in Cyclodextrin Chemistry - An Introduction *Adv.Chem.Ser.* 191, 1.

[73] **Sangwan N.K.** and Schneider H.J., 1989, The kinetic effects of water and of cyclodextrins on Diels–Alder reactions. Host–guest chemistry. Part 18 . *J.Chem.Soc.Perkin trans.2*, 1223-1227.

[74] **Lee S. H,** Berthod A., Armstrong D.W., 1992. Systematic study on the resolution of derivatized amino acids enantiomers on different cyclodextrin-bonded stationary phases *J.Chromatogr.*, 603, 83.

[75] **Menges R.A.**,Armstrong D.W, 1991 *Chiral Separations by Liquid Chromatography*, American Chemical Society, Washington, Dc, p67.

[76] **Linert W.**, Margl P. and Renz F., 1992. Solute-solvent interactions between cyclodextrin and water: a molecular mechanical study.*Chem. Phys.*, 161,327.

[77] **Jaime C.**, Redondo J., Sanchez –Ferrando F.And Virgili A., 1991.  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex with adamantane Intermolecular  $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$  NOE determinations and molecular mechanics calculations *Journal of Molecular Structure*, Vol.248, 317-329.

[78] **Alvira E.**, 1997. Physisorption in cyclodextrin cavities: an analytical model. *J.Mol.Struct.(theochem)*,267,221

[79] **Deryckel.**, Vigneron J.P., Lambin Ph, Lucas A.A. and Derouane E.G. 1991, Physisorption in confined geometry. *J.Chem.Phys.*, 94, 4620.

[80]**Bretón J.**, Gonzalez –Platas J.And Giradet C. 1993.Endohedral and exohedral adsorption in C60: An analytical model *.J.Chem, Phys.*, 99, 4036.

---

[81] Woods R., Dwek R.A., Edge C.J. and Fraser-Reid B. 1995. Molecular Mechanical and Molecular Dynamic Simulations of Glycoproteins and Oligosaccharides. 1. GLYCAM\_93 Parameter Development J.Phys.Chem., 99, 3832.

[82] Li J., Uzawa J. and Doi Y, 1998. NMR Spectroscopic Studies on Complex Formation between Dimeric (R)-3-Hydroxybutanoic Acid and  $\beta$ -Cyclodextrin. Bull. of the Chem. Society of Japan Vol. 71 No. 8 P 1953-1957 <http://dx.doi.org/10.1246/bcsj.71.1953>.

[83] Castro E.A. and Jubert A.H. 1999. Theoretical Study on Gas Phase Complex Formation Between 3-Hydroxybutanoic Acid and Cyclodextrins. Atual.Fisicoq.Org.246.

[84] Steward J.J. P., 1990. in Reviews In Computational Chemistry, Lipkowitz K.B. and Boys D.B., Eds, VCH Publishers, Berlin, , p.45.

[85] Steiner T. and Saenger. Geometry of C-H...O hydrogen bonds in carbohydrate crystal structures. Analysis of neutron diffraction data W.J.Am.Chem.Soc.1992, 114, 10146.

[86] Steiner T. and Gessler K., 1994. Aromatic molecules included into and contacting the outer surface of cyclomaltohexaose ( $\alpha$ -cyclodextrin): crystal structure of  $\alpha$ -cyclodextrin-(benzyl alcohol)2-hexahydrate Carbohydr.Res., 260, 27.

[87] Steiner T., Koellner G, Gessler K., and Saenger W. 1995. Isostructural replacement of an N-H...O by a C-H...O hydrogen bond in complex stabilisation: crystal structures of  $\beta$ -cyclodextrin complexed with diethanolamine and with pentane-1,5-diol J Chem Soc Chem Commun, 511.

[88] Steiner T. and Saenger W. 1995. Weak polar host-guest interactions stabilizing a molecular cluster in a cyclodextrin cavity: C-H...O and C-H... $\pi$  contacts in  $\beta$ -cyclodextrin-but-2-yne-1, 4-diol heptahydrate J.Am.Chem.Soc. Chem. Commun., 2087.

---

[89] **Steiner T.** 1997. Unrolling the hydrogen bond properties of C–H···O interactions Chem. Commun., 727.

[90] **Junquera E.** Martin Pastor M. and Aicart E. Molecular Encapsulation of Flurbiprophen and/or Ibuprophen by Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in Aqueous Solution. Potentiometric and Molecular Modeling Studies. J. Org. Chem. 1998,63,4349.

[91] **Guarnieri F.** and Still W.C. J., 1994. A rapidly convergent simulation method: Mixed Monte Carlo/stochastic dynamics. J. Comput. Chem, 15, 1302.

[92] **Zabel V.** Saenger W and Mason S.A. 1986. Topography of cyclodextrin inclusion complexes. Part 23. Neutron diffraction study of the hydrogen bonding in  $\beta$ -cyclodextrin undecahydrate at 120 K: from dynamic flip-flops to static homodromic chains J. Am. Chem. Soc. 108, 3664.

[93] **Steiner t.** and Saenger W, 1994 Reliability of assigning O–H ··· O hydrogen bonds to short intermolecular O ··· O separations in cyclodextrin and oligosaccharide crystal structures. Carbohydrate. Res., 259, 1

[94] **Bodor N,** Huang, M. J., John D. Watts, 1997. "Theoretical Studies of Inclusion Complexes of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cyclodextrin with Benzoic Acid and Phenol." International Journal of Quantum Chemistry-Quantum Biology Symposium. No. 24. New York, NY: Wiley, c1974-c1991.,.

[95] **Bodor N,** Huang J.M., Watta H, 2006. Theoretical studies on the structures of natural and alkylated cyclodextrins Article first published online: 17 SEP 2006 DOI: 10.1002/jps.2600840313

[96] **Guía de trabajos practicos del Curso avanzado de simulación computacional** cátedra de Química inorgánica Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales Universidad de Buenos Aires en el segundo cuatrimestre del 2011. A cargo del Dr. Darío Estrin.

[97] **Coscarello E.N.,** Hojvat R., Barbiric D.A, Castro E.A. 2011. The contribution of

---

Molecular Modelling to the knowledge of Pesticides, Capítulo N° 19. Nombre del libro: *Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure*. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-531-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/the-contribution-of-molecular-modeling-to-the-knowledge-of-pesticides>

### **Referencias del Capítulo N° III**

[94] **Ariese, F.; Ernst.** 2001. W.H.O.; Sijm, D.T.H.M. Compuestos orgánicos naturales y sintéticos en el medio ambiente Un informe del simposio. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 10, 65-80.

[95] **Karr, J. R.; Dudley, D.R.** 1981 Perspectiva ecológica en los objetivos de calidad del agua. *Environ. Administrar*, 5, 55-68.

[96] **Disponible Online:** <http://transformadores-sin-pcb.blogspot.com.ar/2009/01/transformadores-con-pcv.html> (**consultado 11-2012**).

[97] **Disponible Online:** <http://www.epa.gov/pesticides/food/pest.htm>. EE.UU. EPA. Pesticidas y alimentos: ¿Por qué los niños pueden ser especialmente sensibles a los pesticidas? (**consultado el 26 de febrero de 2010**)

[98] **Sherine O. Obare, Chandrima De, Wen Guo, Tajay L. Haywood , Tova A. Samuels , Clara P. Adams, Noah O. Masika, Desmond H. Murray, Ginger A. Anderson, Keith Campbell and Kenneth Fletcher** *Sensors* 2010,10,7018-7043; doi:10.3390/s100707018 Review Fluorescent Chemosensors for Toxic Organophosphorus Pesticides: A Review.

[99] **Disponible Online** <http://www.juicioalafumigacion.com.ar/la-causa>  
<http://www.reduas.fcm.unc.edu.ar/el-juicio-de-barrio-ituzaingo-en-cordoba-argentina/> (**consultado el 26 de febrero de 2010**)

---

[100] **Disponible Online** <http://www.reduas.fcm.unc.edu.ar/trial-against-applications-of-pesticides-on-people-ituzaingo-district-cordobaargentina>(consultado el 26 de febrero de 2010)

[101] **Disponible Online** /<http://www.pagina12.com.ar/diario/sociedad/3-201610-2012-08-22.html> consultado el 26 de febrero de 2010)

[102]Sanbour M,Coli D.,Vakil C.,Keer K.,Bassil K, Pesticides Literature Review 2004.Ontario.

[103] Villena J, Cordoba A., Terán de H. Intoxicaciones con plaguicidas en la San Miguel de Tucumán.UNT Revista de toxicología.2002. **Disponible Online** /<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd56/tucuman.pdf> consultado el 26 de febrero de 2010)

[104] **Taller Regional sobre intoxicaciones por plaguicidas** Ministerio de Salud 2004

[105] M.G Rovedatti P.M Castañé M.L Topalián,A Salibián National University of Luján, Career of Medicine, National University of Comahue, N8300-Neuquén and CONICET, Argentina. Scientific Research Commission (CIC), B1900-La Plata, Argentina [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00058-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00058-6), Monitoring of organochlorine and organophosphorus pesticides in the water of the Reconquista river (Buenos Aires, Argentina)

[106] Survey, U.S.G. Organophosphorus pesticides occurrence and distribution in surface and ground water of the United States. Available online: **Disponible Online** <http://ga.water.usgs.gov/publications/ofr00-187.pdf>. (Consultado 26 Febrero 2010).

[107] **The Pesticide Action Network (PAN)**. Pesticide Action Network (PAN) pesticide database. Disponible online: <http://www.pesticideinfo.org>. (Consultado 26 Febrero 2010).

---

[108] **International Programme on Chemical Safety (INCHEM).** International Programme on Chemical Safety INCHEM Database. Disponible online: <http://www.inchem.org> (Consultado el 26 Febrero del 2010).

[109] **Ullmann's Agrochemicals.** Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 26 March 2007; Volume1.

[110] **Celik, S.; Kunc, S.; Asan, T.** 1995.Degradation of some pesticides in the field and effect of processing. *Analyst*, 120, 1739-1743.

[111] **Leach, A. R.** 2001. *Molecular Modelling, principles and applications*, 2<sup>nd</sup> Ed. 2001, Pearson Education Limited, ISBN 0-582-38210-6, England.

[112] **Bouchard, M.F.; Bellinger, D.C.; Wright, R.O.; Weisskopf, M.G.** 2010. Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. *Pediatrics*, 125, 1216-1226.

[113] **Liu, G.L.; Lin, Y.** 1995.Electrochemical sensor for organophosphate pesticides and nerve agents using Zirconia nanoparticles as selective Sorbents. *Anal. Chem.*, 77, 5894-5901.

[114] **Gilliom, R.J.B.; Barbash, J.E.; Kolpin, D.W.; Larson, S.J.** 1999, Testing water quality for pesticide pollution. *Environ. Sci. Technol.* 33, 164A-169A.

[115] **Vermeire, T.; MacPhail, R.; Waters, M.** 2003.Integrated human and ecological risk assessment: A case study of organophosphorous pesticides in the environment. *Hum. Ecol. Risk. Assessment*, 9, 343-357.

[116] **Walker, B.J.** 1972.*Organophosphorus Chemistry.* Penguin: London, UK,.

---

[117] **Jenkins, A.L.; Uy, O.M.; Murray, G.M.** 1997. Polymer based lanthanide luminescent sensors for the detection of nerve agents. *Anal. Commun.*, 34, 221-224.

[118] **Jenkins, A.L.; Uy, O.M.; Murray, G.M.** 1999. Polymer-based lanthanide luminescent sensor for detection of the hydrolysis product of the nerve agent Soman in water. *Anal. Chem.*, 71, 373-378.

[119] **Jenkins, A.L.; Yin, R.; Jensen, J.L.** 2001. Molecularly imprinted polymer sensors for pesticide and insecticide detection in water. *Analyst*, 126, 798-802.

[120] **Rudzinski, C.M.; Young, A.M.; Nocera, D.G.** 2002. A supramolecular microfluidic optical chemosensor. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 1723-1727.

[121] **Russell, A.J.; Berberich, J.A.; Drevon, G.E.; Koepsel, R.R.** 2003. Biomaterials for mediation of chemical and biological warfare agents. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 5, 1-27.

[122] **Sohn, H.; Letant, S.; Sailor, M.J.; Trogler, W.C.** 2000 Detection of fluorophosphonate chemical warfare agents by catalytic hydrolysis with a porous silicon interferometer. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 5399-5400.

[123] **Steiner, W.E.; Klopsch, S.J.; English, W.A.; Clowers, B.H.; Hill, H.H.** 2005 Detection of a chemical warfare agent simulant in various aerosol matrixes by ion mobility time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 77, 4792-4799.

[124] **Ross, R.T.; Biros, F.J.** 1970, Correlations between <sup>31</sup>P NMR chemical shifts and structures of some organophosphorus pesticides. *Anal. Chim. Acta.* 52, 139-141.

[125] **Michel, H.O.; Gordon, E.C.; Epstein, J.** Detection and estimation of isopropyl methylphosphonofluoridate and O-ethyl S-diisopropylaminoethyl methylphosphonothioate in seawater in parts-per-trillion level. *Environ. Sci. Technol.* 1973, 7, 1045-1049.

---

[126] **Novak, T.J.; Daasch, L.W.; Epstein, J.** 1979. Decomposition at 90 degrees celcius of the cholinesterase substrate indoxyl acetate impregnated on paper supports. *Anal. Chem.*, 51, 1271-1275.

[127] **Wallace, K.J.; Morey, J.; Lynch, V.M.; Anslyn, E.V.** 2005. Colorimetric detection of chemical warfare simulants. *New J. Chem.*, 29, 1469-1474.

[128] **Ngehngwainbi, J.; Foley, P.H.; Kuan, S.S.; Guilbault, G.G.** 1986. Parathion antibodies on piezoelectric crystals. *J. Am. Chem. Soc.* 108, 5444-5447.

[129] **Nieuwenhuizen, M.S.; Harteveld, J.L.N.** 1997. Studies on a surface acoustic wave (SAW) dosimeter sensor for organophosphorous nerve agents. *Sens. Actuat. B*, 40, 167-173.

[130] **Yamaguchi, S.; Yoshimura, L.; Kohira, T.; Tamaru, S.; Hamachi, I.** 2005. Cooperation between artificial receptors and supramolecular hydrogels for sensing and discriminating phosphate derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 11835-11841.

[131] **Zhang, S.W.; Swager, T.M.** 2003. Fluorescent detection of chemical warfare agents: Functional group specific ratiometric chemosensors. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 3420-3421.

[132] **Van Houten, K.A.; Heath, D.C.; Pilato, R.S.** 1998. Rapid luminescent detection of phosphate esters in solution and the gas phase using (dppe)Pt{S2C2(2-pyridyl)(CH2CH2OH)}. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 12359-12360.

[133] **Evtugyn, G.A.; Budnikov, H.C.; Nikolskaya, E.B.** 1996. Influence of surface-active compounds on the response and sensitivity of cholinesterase biosensors for inhibitor determination. *Analyst*, 121, 1911-1915.

[134] **Sherma, J.** 1995. Pesticides. *Anal. Chem.*, 67, R1-R20.

---

[135] **Trojanowicz, M.** 2002 Determination of pesticides using electrochemical enzymatic biosensors. *Electroanalysis*, 14, 1311-1328.

[136] **Martínez-Máñez, R., Sancenón, F.** 2003. Fluorogenic and chromogenic chemosensors and reagents for anions. *Chem. Rev*, 103, 4419-4476.

[137] **Brufani, M.; Marta, M.; Pomponi, M.** 1986. Anticholinesterase activity of a new carbamate, heptylphysostigmine, in view of its use in patients with Alzheimer-type dementia. *Eur. J. Biochem.*, 157, 115-120.

[138] **Lei, Y.; Mulchandani, P.; Wang, J.; Chen, W.; Mulchandani, A.** 2005 Highly sensitive and selective amperometric microbial biosensor for direct determination of p-nitrophenyl-substituted organophosphate nerve agents. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 8853-8857.

[139] **Mionetto, N.; Marty, J.L.; Karube, I.** 1994. Acetylcholinesterase in organic-solvents for the detection of pesticides—Biosensor application. *Biosens. Bioelectr.*, 9, 463-470.

[140] **Palleschi, G.; Bernabei, M.; Cremisini, C.; Mascini, N.** 1992. Determination of organophosphorus insecticides with a choline electrochemical biosensor. *Sens. Actuat. B*, 7, 513-517.

[141] **Cao, X.; Mello, S.V.; Leblanc, R.M.; Rastogi, V.K.; Cheng, T.C.; DeFrank, J.J.** 2004. Detection of paraoxon by immobilized organophosphorus hydrolase in a langmuir-blodgett film. *Colloids Surf. A*, 250, 349-356.

[142] **Rudzinski, C.M.Y.; Young, A.M.; Nocera, D.G.** 2002 Supramolecular Microfluidic Optical Chemosensor. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 1723-1727.

---

[143] **Burnworth, M.**; Rowan, S.J.; Weder, C. 2007. Fluorescent Sensors for the detection of chemical warfare agents. *Chem. Eur. J.*, 13, 7828-7836.

[144] **Rogers, K.R.**; Cao, C.J.; Valdes, J.J.; Elderfrawi, A.T.; Eldefrai, M.E. 1991. Acetylcholinesterase fiber-optic biosensor for detection of anticholinesterases. *Appl. Toxicol.*, 16, 810-820.

[145] **Cao, H.**; Nam, J.; Harmon, H.J.; Branson, D.H. 2007. Spectrophotometric detection of organophosphate diazinon by porphyrin solution and porphyrin-dyed cotton fabric. *Dyes Pigments*, 74, 176-180.

[146] **Dave, K.I.**; Miller, C.E.; Wild, J.R. 1993 Characterization of organophosphorus hydrolases and the genetic manipulation of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Chem-Biol. Interact.*, 87, 55-68.

[147] **Ma, L.Y.**; Wang, H.Y.; Xie, H.; Xu, L.X. 2004. A long lifetime chemical sensor: study on fluorescence property of fluorescein isothiocyanate and preparation of pH chemical sensor. *Spectrochim. Acta A*, 60, 1865-1872.

[148] **Kolossova, A.Y.**; Park, J.H.; Eremin, S.A.; Kang, S.J.; Chung, D. 2003. Fluorescence polarization immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of the organophosphorus pesticide parathion-methyl. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1107-1114.

[149] **Kolossova, A.Y.**; Park, J.H.; Eremin, S.A.; Park, S.J.; Kang, S.J.; Lee, H.S.; Chung, D.H. 2004. Comparative study of three immunoassays based on monoclonal antibodies for detection of the pesticide parathion-methyl in real samples. *Anal. Chim. Acta*, 511, 323-331.

[150] **Lee, E.K.**; Kim, Y.J.; Park, W.C.; Chung, T.W.; Lee, Y.T. 2005 Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of the organophosphorus insecticide diazinon. *Anal. Chim. Acta.*, 530, 143-153.

---

[151] **Tang, S.J.;** Zhang, M.; Cheng, C.G.; Lu, Y.T. 2008 Development of fluorescence polarization immunoassay for the detection of the organophosphorus pesticides parathion and azinophos-methyl. *J. Immuno. Immunochem*, 29, 356-369.

[152] **Zhang, S.W.;** Swager, T.M. 2003. Fluorescent detection of chemical warfare agents: Functional group specific ratiometric chemosensors. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 3420-3421.

[153] **Dale, T.J.;** Rebek, J. 2006. Fluorescent sensors for organophosphorus nerve agent mimics. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 4500-4501.

[154] **Paliwal, S.;** Wales, M.; Good, T.; Grimsley, J.; Wild, J.; Simonian, A. 2007. Fluorescence-based sensing of p-nitrophenol and p-nitrophenyl substituent organophosphates. *Anal. Chim. Acta.*, 596, 9-15.

[155] **Delattre, F.;** Cazier, F.; Cazier, F.; Tine, A. 2009. Use a fluorescent molecular sensor for the detection of pesticides and herbicides in water. *Curr. Anal. Chem.*, 5, 48-52.

[156] **Sun, X.Y.;** Xia, K.H.; Liu, B. 2008. Design of fluorescent self-assembled multilayers and interfacial sensing for organophosphorus pesticides. *Talanta*, 76, 747-751.

[157] **Beaudoin, D.S.;** Obare, S.O. 2008. Dual optical and electrochemical saccharide detection based on a dipyrrodo[3,2-a:2'3'-c]phenazine (DPPZ) ligand. *Tetrahedron Lett.*, 49, 6054-6057.

[158] **De, C.;** Samuels, T.A.; Haywood, T.L.; Anderson, G.A.; Campbell, K.; Fletcher, K.; Murray, D.H.; Obare, S.O. 2010. Dual colorimetric and electrochemical sensing of organothiophosphorus pesticides by an azastilbene derivative *Tetrahedron Lett*, 51, 1754-1757.

---

[159] **Wheeler, O.H.; Batlle de Pabon, H.N.** 1965. Synthesis of stilbenes. A comparative study. *J. Org. Chem.*, 30, 1473-1477.

[160] **Becker, K.B.** 1983. Synthesis of stilbenes. *Synthesis*, 5, 341-368.

[161] **Takahashi, K.;** Okamoto, T.; Yamada, K.; Iida, H.A. 1977. Convenient synthesis of substituted stilbenes by condensation of o- or p-Tolunitrile with p-Substituted benzaldehydes. *Synthesis*, 1, 58.

[162] **Wang, S.L.;** Ho, T.I. 1997. Protonation dependent electron transfer in 2-styrylquinolines *Chem. Phys. Lett.*, 268, 434-438.

[163] **Ko, H.J.;** Park, T.H. 2006. Dual signal transduction mediated by a single type of olfactory receptor expressed in a heterologous system. *Biol. Chem.*, 387, 59-68.

[164] **Allen, K.N.;** Dunaway-Mariano, D. 2004. Phosphoryl group transfer: Evolution of a catalytic scaffold *Trends Biochem. Sci.*, 29, 495-503.

[165] **Frisch, M.J.;** Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery, J.A., Jr.; Vreven, T.V.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H.P.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R.E.; Yazyev, O.; Austin, A.J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J.W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M.C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B.B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R.L.; Fox, D.J.; Keith, T.; Al-Laham, M.A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P.M.W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M.W.; Gonzalez, C.; Pople, J.A.

---

Gaussian 03, Gaussian, Inc.: Wallingford CT, USA, 2004. © 2010 by the authors; licensee MPDI, Basel, Switzerland. This article is an Open Access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

[166] **Atkins, P. & Paula, J.d.** 2006. Physical Chemistry, 8th Ed., Oxford University Press, ISBN 9780198700722 ISBN 0198700725, United States.

[167] **Manunza, B.;** Deiana, S.; Pintore, M.; Delogu, G.; Gessa, C. 1998. A Molecular Dynamics Investigation on the Inclusion of Chiral Agrochemical Molecules in  $\beta$  - Cyclodextrin. Complexes with Dichlorprop, 2-Phenoxypropionic Acid and Dioxabenzofos. Pestic. Sci., 54, 68-74.

[168] **Smith, W. & Forester, T. R.** 1994. DLPOLY2, package of molecular simulation routines, copyright the Council for the Central Laboratory of the Research Councils, Daresbury Laboratory, Warrington U.K. (1994-6).

[169] **Szejtli, J.** 2004. Past, present, and future of cyclodextrin research. Pure Appl. Chem. 76 (10), 1825–1845.

[170] **Adamo, C. & Barone, V.** 1999. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. J. Chem. Phys., 110, 6158-6170.

[171] **Ahlner, J.; Andersson, R. G. G.; Torfgard, K.; Axelsson, K. L.** 1991. Organic Nitrate Esters- Clinical Use And Mechanisms Of Actions. Pharmacol. Rev., 43, 351-423.

[172] **Ahlsvede, B.;** Jug, K. 1999. Consistent modifications of SINDO1: I. Approximations and parameters. J. Comput. Chem., 20, 563–571.

[173] **Ahlsvede, B.;** Jug, K. 1999. Consistent modifications of SINDO1: II. Applications to first and second-row elements. J. Comput. Chem. 20, 572–578.

---

[174] **Baboul, A. G.; Curtiss, L. A.; Redfern, P. C.; Raghavachari, K. 1999.** Gaussian-3 theory using density functional geometries and zero-point energies. *J. Chem. Phys.*, 110 (16), 7650-7657.

[175] **Baker, N.A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. 2001.** Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (18), 10037–10041, August 2001, USA.

[176] **Balbi, H. J. 2004.** Chloramphenicol: A review. *Pediatr. Rev.*, 25, 284-288.

[177] **Becke, A.D. 1988,** Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *Phys. Rev. A*, 38 (6), 3098-3100.

[178] **Benson, S. W.;** Cruickshank, F. R.; Golden, D. M.; Haugen, G. R.; O'Neil, H. E.; Rodgers, A. S.; Shaw, R.; Walsh, R. 1969. Additivity Rules for the Estimation of Thermochemical Properties. *Chem. Rev.*, 69 (3), 279-324

[179] **Jensen, F. 1999.** Introduction into computational chemistry. John Wiley, ISBN 0471984256, England.

[180] **Berendsen, H. J. C.;** Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F. & Hermans, J. 1981. Interaction models for water in relation to protein hydration. In: *Intermolecular Forces*, B. Pulmann (Ed.), 331-342. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht.

[181] **Bish, D. L. 1993.** Rietveld refinement of the kaolinite structure at 1.5K. *Clays and Clay Miner.*, 41, 738-744.

[182] **Boehr, D.D.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. 2006.** An NMR Perspective on Enzyme Dynamics. *Chem. Rev.* 106, 3055–3079.

---

[183] **Boese, A. D.; Martin, J. M. L. 2004.** Development of density functionals for thermochemical kinetics. *J. Chem. Phys.*, 121, 3405-3416.

[184] **Boulet, P.; Greenwell, H. C.; Stackhouse, S. & Coveney, P.V. 2006.** Recent advances in understanding the structure and reactivity of clays using electronic structure calculations. *J. Molecular Structure: THEOCHEM*, 762, 33–48.

[185] **Bredow, T.; Geudtner, G.; Jug, K. 2001.** MSINDO parameterization for third-row transition metals. *J. Comput. Chem.*, 22, 861–887.

[186] **Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. 1983.** CHARMM-a Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comput. Chem.*, 4 (2), 187-217.

[187] **Bylaska, E. J.; Jong, W.A.d.; Kowalski, K.; Straatsma, T.P.; Valiev, M.; Wang, D.; Aprà, E.; Windus, T. L.; Hirata, S.; Hackler, M.T.; Zhao, Y.; Fan, P.-D.; Harrison, R.J.; Dupuis, M.; Smith, D. M. A.; Nieplocha, J.; Tipparaju, V.; Krishnan, M.; Auer, A. A.; Nooijen, M.; Brown, E.; Cisneros, G.; Fann, G. I.; Frücht, H.; Garza, J.; Hirao, K.; Kendall, R.; Nichols, J. A.; Tsemekhman, K.; Wolinski, K.; Anchell, J.; Bernholdt, D.; Borowski, P.; Clark, T.; Clerc, D.; Dachsel, H.; Deegan, M.; Dyall, K.; Elwood, D.; Glendening, E.; Gutowski, M.; Hess, A.; Jaffe, J.; Johnson, B.; Ju, J.; Kobayashi, R.; Kutteh, R.; Lin, Z.; Littlefield, R.; Long, X.; Meng, B.; Nakajima, T.; Niu, S.; Pollack, L.; Rosing, M.; Sandrone, G.; Stave, M.; Taylor, H.; Thomas, G.; Lenthe, J.v.; Wong, A.; Zhang, Z. (2006).** NWChem, A Computational Chemistry Package for Parallel Computers, Version 5.0. Pacific Northwest National Laboratory, Richland, Washington 99352-0999, USA (A modified version, 2006).

[188] **Bylaska, E. J.; de Jong, W. A.; Govind, N.; Kowalski, K.; Straatsma, T. P.; Valiev, M.; Wang, D.; Apra, E.; Windus, T. L.; Hammond, J.; Nichols, P.; Hirata, S.; Hackler, M. T.; Zhao, Y.; Fan, P.-D.; Harrison, R. J.; Dupuis, M.; Smith, D. M. A.; Nieplocha, J.; Tipparaju, V.; Krishnan, M.; Wu, Q.; Van Voorhis, T.; Auer, A. A.; Nooijen, M.;**

---

Brown, E.; Cisneros, G.; Fann, G. I.; Fruchtl, H.; Garza, J.; Hirao, K.; Kendall, R.; Nichols, J. A.; Tsemekhman, K.; Wolinski, K.; Anchell, J.; Bernholdt, D.; Borowski, P.; Clark, T.; Clerc, C.; Dachsel, H.; Deegan, M.; Dylla, K.; Elwood, D.; Glendening, E.; Gutowski, M.; Hess, A.; Jaffe, J.; Johnson, B.; Ju, J.; Kobayashi, R.; Kutteh, R.; Lin, Z.; Littlefield, R.; Long, X.; Meng, B.; Nakajima, T.; Niu, S.; Pollack, L.; Rosing, M.; Sandrone, S.; Stave, M.; Taylor, H.; Thomas, G.; van Lenthe, J.; Wong, A.; Zhang, Z. *NWChem, A Computational Chemistry Package for Parallel Computers*, Version 5.1; Pacific Northwest National Laboratory: Richland, WA, 2007.

[189] **Cao, L.** 2005. Immobilized Enzymes: science or art. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 217–226.

[190] **Case, D. A.**; Pearlman, D. A.; Caldwell, J. W.; T. E. Cheatham, I.; Ross, W. S.; Simmerling, C.; Darden, T.; Merz, K. M.; Stanton, R. V.; Cheng, A.; Vincent, J. J.; Crowley, M.; Ferguson, D. M.; Radmer, R.; Seibel, G. L.; Singh, U. S.; Weiner, P. K.; Kollman, P.A. 1997. *AMBER*, 5.0; University of California: San Francisco.

[191] **Casida, J. E.**; Quistad, G. B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1–16.

[192] **Cohen, N.**; Benson, S. W. 1993. Estimation of heats of formation of organic compounds by additivity methods. *Chem. Rev.*, 93 (7), 2419-2438.

[193] **Coote, M. L.**; Henry, D. J. 2005. Effect of substituents on radical stability in reversible addition fragmentation chain transfer polymerization: an ab initio study. *Macromolecules*, 38(4), 1415-1433.

[194] **Cornell, W. D.**; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M. Jr.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W. & Kollman, P.A. 1995. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids and Organic Molecules, *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5179-5197.

---

[195] **Coscarello, E. N.**; Barbiric, D. A.; Castro, E. A.; Vico, R.V.; Bujan, E. I.; de Rossi, R. H. 2009. Comparative Analysis of Complexation of Pesticides (fenitrothion, methylparathion, parathion) and their Carboxylic Ester-Analogues by  $\beta$ -Cyclodextrin. Theoretical Semiempirical Calculations. *J. Structural Chemistry*, 50 (4),705-713. ISSN: 0022-4766. Ed. Springer. J.N° 10947.

[196] **Curtiss, L. A.**; Raghavachari, K.; Redfern, P. C.; Pople, J. A. 1997. Assessment of Gaussian-2 and density functional theories for the computation of enthalpies of formation. *J. Chem. Phys.*, 106 (3), 1063-1079.

[197] **Curtiss, L. A.**; Raghavachari, K.; Redfern, P. C.; Rassolov, V.; Pople, J. A. 1998. Gaussian-3 (G3) theory for molecules containing first and second-row atoms. *J. Chem. Phys.*, 109, 7764-7776.

[198] **Curtiss, L. A.**; Raghavachari, K.; Redfern, P. C.; Pople, J. A. 2000a. Gaussian-3 theory using scaled energies. *J. Chem. Phys.*, 112 (3), 1125-1132.

[199] **Curtiss, L. A.**; Raghavachari, K.; Redfern, P. C.; Pople, J. A. 2000 b. Assessment of Gaussian-3 and density functional theories for a larger experimental test set. *J. Chem. Phys.*, 112, 7374-7383.

[200] **Curtiss, L. A.**; Redfern, P. C.; Raghavachari, K.; Pople, J. A. 2001. Gaussian-3X (G3X) theory: Use of improved geometries, zero-point energies, and Hartree-Fock basis sets. *J. Chem. Phys.*, 114, 108-117

[201] **David, R. L.**, Ed. 2007. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 87th ed.; Taylor and Francis: Boca Raton, FL; <http://www.hbcpnetbase.com>.

[202] **Dewar, M. J. S.**; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F. & Stewart, J. P. 1985. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model, *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3902-3909.

---

[203] Dewar, M. J. S. & Merz, K. M., Jr. 1988. AM1 parameters for zinc, *Organometallics* 7, 522-524.

[204] Dewar, M. J. S., and Jie, C. 1989. AM1 parameters for phosphorus, *THEOCHEM* 187, 1-13.

[205] Dorofeeva, O. V.; Moiseeva, N. F. 2006. Computational Study of the Thermochemistry of Organophosphorus(III) Compounds. *J. Phys. Chem. A* , 110, 8925-8932

[206] Duke, C. R.; Lubinsky, A. R.; Chang, S. C.; Lee, B. W.; Mark, P. 1977. Low-energy-electron diffraction analysis of the atomic geometry of ZnO (1010). *Phys. Rev. B*, 15, 4865- 4873.

[207] Duke, C. B.; Meyer, R. J.; Paton, A.; Mark, P. 1978. Calculation of low-energy-electron diffraction intensities from ZnO (1010). II. Influence of calculational procedure, model potential, and second-layer structural distortions. *Phys. Rev. B* , 18, 4225- 4240.

[208] Dyguda-Kazimierowicz E.; Sokalski, W.A. & Leszczynski, J. 2008. Gas-Phase Mechanisms of Degradation of Hazardous Organophosphorus Compounds: Do They Follow a Common Pattern of Alkaline Hydrolysis Reaction As in Phosphotriesterase? *J. Phys.Chem. B*, 112, 9982–9991.

[209] Feigenbrugel, V.; Person, Calve, A. L.; Mellouki, S. L.; A.; Munoz, A.; Wirtz, K. 2006. Atmospheric fate of dichlorvos: Photolysis and OH-initiated oxidation studies. *Environ. Sci. Technol.*, 40 (3), 850-857.

[210] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Keith, G. A.; Petersson, D. A.; Montgomery, J. A.; Al-Laham, M. A.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.;

---

Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Peng, C. Y.; Ayala, P. Y.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Replogle, E. S.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Binkley, J. S.; Defrees, G. J.; Baker, J.; Stewart, J. P.; Head-Gordon, M.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. **1995; Gaussian 94 (Revision A.1); Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA.**

[211] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G. Jr.; Montgomery, J. A.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. **1998; Gaussian 98 (Revision A.6); Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA.**

[212] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. (2004). **Gaussian 03, Revision X.0X. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.**

---

[213] **Fuxreiter, M.;** Warshel, A. 1998. Origin of the Catalytic Power of Acetylcholinesterase: Computer Simulation Studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 183-194.

[214] **Fukui, K. 1981.** The path of chemical reactions: The IRC approach. *Acc. Chem. Res.*, 14 (12),363-368.

[215] **Gomes, D. E. B.;** Lins, R. D.; Pascutti, P. G.; Straatsma, T. P.; Soares, T. A. 2008. Molecular Models to Emulate Confinement Effects on the Internal Dynamics of Organophosphorous Hydrolase. *Lecture Notes in Bioinformatics*, 5167, 68-78. A.L.C. Bazzan, M. Craven, and N.F. Martins (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

[216] **Gorb, L.;** Lutchyn, R.; Zub, Yu. Leszczynska, D.; Leszczynski, J. 2006 . The origin of the interaction of 1,3,5-trinitrobenzene with siloxane surface of clay minerals. *J. Molecular Structure: THEOCHEM*, 766, 151–157.

[217]**Grimme, S. 2003.** Improved second-order Møller–Plesset perturbation theory by separate scaling of parallel- and antiparallel-spin pair correlation energies. *J. Chem. Phys.*, 118, 9095-9102.

[218] **Grimme, S. 2006.** Semiempirical hybrid density functional with perturbative second-order correlation. *J. Chem. Phys.*, 124, 034108-034123.

[219] **Haderlein, S. B.;** Schwarzenbach, R. P. 1993. Adsorption of substituted nitrobenzenes and nitrophenols to mineral surfaces. *Environ. Sci. Technol.*, 27(2), 316-26.

[220] **Haderlein, S. B.;** Weissmahr, K. W.; Schwarzenbach, R. P. 1996. Specific adsorption of nitroaromatic explosives and pesticides to clay minerals. *Environ. Sci. Technol.*, 30 (2), 612-622.

---

[221] **Harrison, M. A. J.**; Barra, S.; Borghesi, D.; Vione, D.; Arsene, C.; Olariu, R. L. 2005. Nitrated phenols in the atmosphere: a review. *Atmos. Environ.*, 39, 231-248.

[222] **Hehre, W. J.**; Radom, L.; Schleyer, P. v. R. & Pople, J. A. 1986. *Ab initio molecular orbital theory*, Wiley, New York.

[223] **Hemelsøet, K.**; Van Durme, F.; Van Speybroeck, V.; Reyniers, M-F & Waroquier, M. 2010. Bond Dissociation Energies of Organophosphorus Compounds: an Assessment of Contemporary Ab Initio Procedures. *J. Phys. Chem. A*, 114, 2864–2873

[224] **Hodgson, J. L.**; Coote, M. L. 2005. Effects of Substituents on the Stability of Phosphoranyl Radicals. *J. Phys. Chem. A*, 109, 10013- 10021.

[225] **Hofer, W. (1981)**. Chemistry of metrifonate and dichlorvos. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 49 (Suppl. 5), 7-14.

[226] **HyperChem 7** for Windows, Hypercube Inc., 2002.

[227] **Janssen, R. H. C.**; Theodorou, D. N.; Raptis, S.; Papadopoulos, M. G. 1999. Molecular simulation of static hyper-Rayleigh scattering: A calculation of the depolarization ratio and the local fields for liquid nitrobenzene. *J. Chem. Phys.*, 111, 9711-9719.

[228] **Jorge, M.**; Gulaboski, R.; Pereira, C. M.; Cordeiro, M. 2006. Molecular dynamics study of nitrobenzene and 2-nitrophenyloctyl ether saturated with water. *Mol. Phys.*, 104, 3627-3634.

[229] **Jorgensen, W. L.**; Tirado-Rives, J. 1988. The OPLS Force Field for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 1657–1666.

---

[230] **Jorgensen, W.L.;** Maxwell, D.S.; Tirado-Rives, J. 1996. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (45), 11225–11236.

[231] **Jung, Y.;** Lochan, R. C.; Dutoi, A. D.; Head-Gordon, M. 2004. Scaled opposite-spin second order Møller–Plesset correlation energy: An economical electronic structure method. *J. Chem. Phys.*, 121 (20), 9793-9803.

[232] **Kamiya, M.;** Nakamura, K.; Sasaki, C. 1995. Inclusion effects of  $\beta$ -cyclodextrins on the hydrolysis of organophosphorus pesticides. *Chemosphere*, 30 (4), 653-660.

[233] **Klauda, J. B.;** Pastor, R. W.; Brooks, B. R. 2005. Adjacent gauche stabilization in linear alkanes: Implications for polymer models and conformational analysis. *J. Phys. Chem. B*, 109 (33), 15684–15686.

[234] **Klauda, J. B.;** Brooks, B. R.; MacKerell, A. D. Jr.; Venable, R. M.; Pastor, R. W. 2005. An Ab Initio Study on the Torsional Surface of Alkanes and its Effect on Molecular Simulations of Alkanes and a DPPC Bilayer. *J. Phys. Chem. B*, 109, 5300-5311.

[235] **Klauda, J. B. & Brooks, B. R.** 2008. CHARMM Force Field Parameters for Nitroalkanes and Nitroarenes. *J. Chem. Theory Comput.*, 4, 107-115.

[236] **Koča, J.;** Zhan, C.-G.; Rittenhouse, R.C. & Ornstein, R.L. 2001. Mobility of the Active Site Bound Paraoxon and Sarin in Zinc-Phosphotriesterase by Molecular Dynamics Simulation and Quantum Chemical Calculation. *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 817-826.

[237] **Kwasnieski, O.;** Verdier, L.; Malacria, M. & Derat, E. 2009. Fixation of the Two Tabun Isomers in Acetylcholinesterase: A QM/MM Study. *J. Phys. Chem. B*, 113, 10001–10007.

---

[238] **Lee, C.;** Yang, W.; Parr, R. G. 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 37, 785-789.

[239] **Lei, C.;** Shin, Y.; Liu, J.; Ackerman, E. J. 2002. Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 11242–11243.

[240] **Lei, C.;** Shin, Y.; Liu, J.; Ackerman, E. J. 2007. Synergetic effects of nanoporous support and urea on enzyme activity. *Nano Letters*, 7, 1050–1053.

[241] **Lindahl, E.;** Hess, B.; Spoel, D.v.d. 2001. GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Molecular Modeling*, 7, 306–317.

[242] **MacKerell, A. D., Jr.** 2001. Atomistic Models and Force Fields. In: *Computational Biochemistry and Biophysics*; Becker, O. M., MacKerell, A. D., Jr., Roux, B., Watanabe, M., Eds., p 7-38, Marcel Dekker: New York.

[243] **MacKerell, A. D. Jr.,** 2004. Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues. *J. Comput. Chem.*, 25, 1584-1604.

[244] **MacKerell, A. D. Jr.** 2005. Interatomic Potentials: Molecules. In: *Handbooks of Material Modeling*; Yip, S., Ed. p 509-525; Springer: The Netherlands.

[245] **Mennucci, B.;** Tomasi, J.; Cammi, R.; Cheeseman, J.R.; Frisch, M.J.; Devlin, F.J.; Gabriel, S.; Stephens, P.J. 2002. Polarizable Continuum Model (PCM) Calculations of Solvent Effects on Optical Rotations of Chiral Molecules, *J. Phys. Chem. A.*, 106, 6102-6113.

[246] **Michael, D.;** Benjamin, I. 1998. Molecular dynamics simulation of the water-nitrobenzene interface. *J. Electroanal. Chem.*, 450 (2), 335-345.

---

[247] **Michalkova, A.;** Paukku, Y.; Majumdar, D.; Leszczynski, J. 2007. Theoretical study of adsorption of tabun on calcium oxide clusters. *Chem. Phys. Lett.*, 438, 72-77.

[248] **Murphy, K. C.; Cooper, R. J.; Clark, J. M. 1996.** Volatile and dislodgeable residues following trichlorfon and isazofos application to turfgrass and implications for human exposure. *Crop Sci.*, 36 (6), 1446-1454.

[249] **Nair, R. K.; Kadam, M. M.; Sawant, M. R.2006.** Effect on the Solubility, Wettability, and Dispersibility of the  $\beta$ -CD-Deltamethrin Inclusion Complex in Presence of Mixed Surfactant (C14MEA/AOS) Blend. *J. Disper. Sci. Tech.* 27 (7) , 1015 – 1019. Taylor & Francis Eds. ISSN: 1532-2351.

[250] **Omburo, G. A.; Kuo, J. M.; Mullins, L. S.; Raushel, F. M. 1992.** Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. *J. Biological Chemistry*, 267, 13278– 13283.

[251] **Osa, T.; Suzuki, I. 1996.** In: *Comprehensive Supramolecular Chemistry (Vol. 3) Cyclodextrins*. Eds. J. Szejtli and T. Osa., pp 367 – 400. Pergamon, Oxford.

[252] **Paukku, Y.;** Michalkova, A. & Leszczynski, J. 2008. Adsorption of dimethyl methylphosphonate and trimethyl phosphate on calcium oxide: an ab initio study. *J. Struct. Chem.*, 19 (2), 307-320.

[253] **Paukku, Y.;** Michalkova, A. & Leszczynski, J. 2009. Quantum-Chemical Comprehensive Study of the Organophosphorus Compounds Adsorption on Zinc Oxide Surfaces. *J. Phys. Chem. C* 2009, 113, 1474–1485

[254] **Pelmenschikov, A. & Leszczynski, J. 1999.** Adsorption of 1,3,5-Trinitrobenzene on the Siloxane Sites of Clay Minerals: Ab Initio Calculations of Molecular Models. *J. Phys. Chem. B*, 103, 6886-6890.

---

[255] **Pettigrew, L. C.**; Bieber, F.; Lettiere, J.; Wermeling, D. P.; Schmitt, F. A.; Tikhterman, A. J.; Ashford, J. W.; Smith, C. D.; Wekstein, D. R.; Markesbery, W. R.; Orazem, J.; Ruzicka, B. B.; Mas, J.; Gulanski, B. (1998). Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of metrifonate in patients with Alzheimer's disease. *J. Clin. Pharmacol.*, 38 (3), 236-245.

[256] **Pilcher, G.** 1990. Thermochemistry of phosphorus(III) compounds. In: *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*; Hartley, F. R., Ed.; Vol. 1, p 127-136. J. Wiley & Sons, New York.

[257] **Price, M. L. P.**; Ostrovsky, D.; Jorgensen, W. L. 2001. Gas-phase and liquid-state properties of esters, nitriles, and nitro compounds with the OPLS-AA force field. *J. Comput. Chem.*, 22, 1340-1352.

[258] **Price, D. J.**; Brooks, C. L. 2005. Detailed considerations for a balanced and broadly applicable force field: A study of substituted benzenes modeled with OPLS-AA. *J. Comput. Chem.*, 26 (14), 1529-1541.

[259] **Raushel, F. M.** 2002. Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5, 288–295.

[260] **Richards, R.**; Li, W.; Decker, S.; Davidson, C.; Koper, O.; Zaikovski, V.; Volodin, A.; Rieker, T.; Klabunde, K. J. 2000. Consolidation of Metal Oxide Nanocrystals. Reactive Pellets with Controllable Pore Structure That Represent a New Family of Porous, Inorganic Materials. *J. Am. Chem. Soc.*, 122 (20), 4921-4925.

[261] **Rochu, D.**; Renault, F.; Viguille, N.; Crouzier, D.; Froment, M. T.; Masson, P. 2004. Contribution of the active-site metal cation to the catalytic activity and to the conformational stability of phosphotriesterase: temperature- and pH-dependence. *Biochemical Journal*, 380, 627–633.

---

[262] **Schaftenaar, G.**; Noordik, J. H. 2000. MOLDEN: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 14, 123-134.

[263] **Schmidt, M.W.**; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. J.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J.A. 1993. GAMESS Version 21 Nov. 1995, *J. Comput. Chem.* 14, 1347-1363.

[264] **Scholz, F.**; Schroder, U.; Gulaboski, R. 2005. *Electrochemistry of Immobilized Particles and Droplets*; Springer: Berlin, Heidelberg, New York. ISBN 3-540-22005-4

[265] **Schwabe, T.; Grimme, S. 2006.** Towards chemical accuracy for the thermodynamics of large molecules: new hybrid density functionals including non-local correlation effects. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8 (38), 4398-4401.

[266] **Silman, I. & Sussman, J. L.** 2005. Acetylcholinesterase: “Classical” and “non-classical” functions and pharmacology. *Curr Opin. Pharmacol.*, 5, 293-302.

[267] **Soares, T. A.**; Osman, M.; Straatsma, T. P. 2007. Molecular dynamics of organophosphorous hydrolases bound to the nerve agent soman. *J. Chemical Theory and Computation*, 3, 1569–1579.

[268] **Sokalski, W.A.**; Roszak, S.; Pecul, K. 1988. An efficient procedure for decomposition of the SCF interaction energy into components with reduced basis set dependence. *Chem. Phys. Lett.*, 153, 153-159.

[269] **Spain, J. C.** 1995. Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49, 523-555.

[270] **Staroverov, V. N.**; Scuseria, G. E.; Tao, J.- M.; Perdew, J. P. 2003. Comparative assessment of a new nonempirical density functional: Molecules and hydrogen-bonded

---

complexes. *J. Chem. Phys.*, 119 (23), 12129-12137.

[271] **Stewart, J. J. P.** 1989 . Optimization of Parameters for Semi-Empirical Methods. I-Method. *J. Comput. Chem.*, 10, 209-220.

[272] **Stewart, J. J. P.** 1989. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods. II. Applications. *J. Comput. Chem.*, 10, 221-264.

[273] **Svensson, M.**; Humbel, S.; Froese, R.D.J.; Matsubara, T.; Sieber, S. & Morokuma, K. 1996. ONIOM. A Multilayered Integrated MO + MM Method for Geometry Optimisations and Single Point Energy Predictions. A Test for Diels-Alder Reactions and Pt(P(t-Bu)<sub>3</sub>)<sub>2</sub>+H<sub>2</sub> Oxidative Addition. *J. Phys. Chem.*, 100, 19357-19363.

[274] **Tao, J. -M.**; Perdew, J. P.; Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E. 2003. Climbing the Density Functional Ladder: Nonempirical Meta- Generalized Gradient Approximation Designed for Molecules and Solids. *Phys. Rev. Lett.*, 91(14), 146401/1-4.

[275] **Vico R.V.**, Buján E.I., de Rossi R.H. 2002. Effect of cyclodextrin on the hydrolysis of the pesticide fenitrothion [O,O-dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl)phosphorothioate]. *J. Phys. Org. Chem.* 15 (12), 858– 862.

[276] **Wahab, H.S.**; Koutselos A. D. 2009. Computational modeling of the adsorption and •OH initiated photochemical and photocatalytic primary oxidation of nitrobenzene. *J. Mol. Model.*, 15, 1237–1244.

[277] **Warshel, A.**; Naray-Szabo, G.; Sussman, F.; Hwang, J. K. 1989. How do serine proteases really work?. *Biochemistry*, 28, 3629-3637.

[278] **Weiner, S. J.**; Kollman, P. A.; Case, D.A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, S. & Weiner, P. 1984. A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 765-784.

---

[279] **Weissmahr, K. W.;** Haderlein, S. B.; Schwarzenbach, R. P. 1997. In situ spectroscopic investigations of adsorption mechanisms of nitroaromatic compounds at clay minerals. *Environ. Sci. Technol.*,31(1), 240-247.

[280] **Werner, H.-J.;** Knowles, P. J.; Amos, R. D.; Bernhardsson, A.; Berning, A.; Celani, P.; Cooper, D. L.; Deegan, M. J. O.; Dobbyn, A. J.; Ecker, F.; Hampel, C.; Hetzer, G.; Knowles, P. J.; Korona, T.; Lindh, R.; Lloyd, A. W.; McNicholas, S. J.; Manby, F. R.; Meyer, W.; Mura, M. E.; Nicklass, A.; Palmieri, P.; Pitzer, R.; Rauhut, G.; Schutz, M.; Schumann, U.; Stoll, H.; Stone, A. J.; Tarroni, R.; Thorsteinsson, T. 2002. MOLPRO 2002.6; University of Birmingham: Birmingham, U.K..

[281] **Wong, K.-Y. &** Gao, J. 2007. The Reaction Mechanism of Paraoxon Hydrolysis by Phosphotriesterase from Combined QM/MM Simulations. *Biochemistry*, 46, 13352-13369

[282] **Woods, R. J.;** Dwek, R. A.; Edge, C. J. & Fraser-Reid, B. 1995. Molecular mechanical and molecular dynamical simulations of glycoproteins and oligosaccharides. 1. GLYCAM- 93 parameter development, *J. Phys. Chem.*, 99, 3832-3846.

[283] **Yun, K.-H.;** Yun, K.-Y.; Cha, G.-Y.; Lee, B.-H.; Kim, J.-C.; Lee, D.-D.; Huh, J.-S. 2005. Gas Sensing Characteristics of ZnO-doped SnO<sub>2</sub> Sensors for Simulants of the Chemical Agents. *Mater. Sci. Forum* , Vols. 486-487, pp.9-12 in *Eco-Materials Processing & Design VI*. DOI: 10.4028/www.scientific.net/MSF.486-487.9

[284] **Zhang, Q.;** Qu, X. ; Wang, W. 2007. Mechanism of OH-Initiated Atmospheric Photooxidation of Dichlorvos: A Quantum Mechanical Study. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 6109-6116.

[285] **Coscarello E.N.,** Hojvat R., Barbiric D.A., Castro E.A. The Contribution of Molecular Modeling to the Knowledge of Pesticides, *Pesticides - The Impacts of Pesticides*

---

Exposure, (424- 446, Ed. 2011). Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-531-0, InTech, <http://www.intechopen.com/articles/show/title/the-contribution-of-molecular-modeling-to-the-knowledge-of-pesticides>

[286] **Aluigi , M.G.**, Angelini, C., Falugi, C., Fossa, R., Genever, P., Gallus, L., Layer, P.G. Prestipino , G., Rakonczay, Z. SGro, M. Thielecke, H., Trombino, S. 2005. Interaction between organophosphate compounds and cholinergic functions during development. *Chem Biol Interact.* 157-158: 305-316.

[287] **Cruz, M.E.**, Flores, A., Palafox, M.T., Meléndez, G. Rodríguez, J.O, Chavira, R, Domínguez, R. 2006. The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reprod Biol Edocrinol.* 4:43(doi:10.1186/1477-7827-4-43).

In:<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=1564398&blobtype=pdf>

[288] **International Programme on Chemical Safety (IPCS)**. 1986. Environmental Health Criteria 63 / Organophosphorus Insecticides: A General Introduction. In: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc63.htm>.

[289] **International Programme on Chemical Safety (IPCS (IPCS). 2005.** The World Health Organization (WHO) Recommended and Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2004. In: <http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class.pdf>.

[290] **Sungur, M.**, Guven, M. 2001. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit Care.* 5(4): 211–215.

[291] **Bhuiyan, M. B.**, Murad, F., Fant, M. E. 2006. The placental cholinergic system: localization to the cytotrophoblast and modulation of nitric oxide. *Cell Commun and Signal.* 4: 4 (doi: 10.1186 / 1478-811X-4-4). In: <http://www.biosignaling.com/content/pdf/1478-811X-4-4.pdf>.

---

[292] **Racké, K.**, Juergens, U. R., Matthiesen, S. 2006. Control by cholinergic mechanisms. *Europ J Pharmacol.* 533: 57–68.

[293] **Hatjian, B.A.**, Mutch, E., Williams, F.M., Blain, P.G., Edwards, J.W. 2000. Cytogenetic response without changes in peripheral cholinesterase enzymes following exposure to a sheep dip containing Diazinon in vivo and in vitro. *Mutat Res.* 472: 85-92.

[294] **Malhi, P.K.**, Grover, I. S. 1986. Genotoxic effects of some organophosphorus pesticides. Part II. In vivo chromosomal aberration bioassay in bone marrow cells in rat. *Mutat Res.* 188: 45–51.

[295] **Recio, R.**, Robbins, W. A., Ocampo-Gómez, G., Borja- Aburto, V., Morán-Martinez, J., Froines, J. R., García- Hernández, R., Cebrián, M. E. 2001. Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. *Environ Health Perspect.* 109(12): 31-34.

[296] **Díaz Saldívar P. S.** 2006. Toxicidad embrionaria en ratones pretratados con el pesticida organofosforado “Diazinon” Tesis. Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de ciencias Biológicas, Lima Perú.

[297] **Ellenhorn M.J.** 1997. Pesticides. In: *Ellenhorn’s Medical Toxicology. Diagnosis and Treatment of Human Poising* 2<sup>nd</sup> edition, USA, 1644-1663.

[298] **Nogué S.** 1995. Intoxicación por productos agrícolas. En: *Manual de Salud Laboral.* Sanz-Gallén, P, Izquierdo J, Prat A, Springer-Verlag, Ibérica, Barcelona, pág. 172-181

[299] **Ribas O.**, 1995. Alteraciones bucodentarias y hepatopatías de origen profesional. . En: *Manual de Salud Laboral.* Sanz-Gallén, P, Izquierdo J, Prat A, Springer-Verlag, Ibérica, Barcelona, pág. 265-282.

- 
- [300] **Repetto M**, Martínez D, Sanz P, 1995. Actualizaciones de la toxicología de los plaguicidas. En Toxicología avanzada, M.Repetto(ed) Díaz de Santos.Madrid.
- [301] **Ferrer Dufol A**, Martínez Chuecos J ,1993. Insecticidas. En: Marruecos. Nogué L, Nolla J. Toxicología Clínica. Springer-Verlag, Ibérica, Barcelona, pág. 233-253.
- [302] **Koizumi A**, Shiojima S, Omiga M, Nakano S., Sato N, Ikeda M, 1979, Acute renal failure and maneb. Manganous ethylenebis(dithiocarbamate) exposure. JAMA 242:2583-2585.
- [303] **Suárez Solá ML**, González –Delgado F, Rubio C, y Hardisson A, 2004, Estudio de seis suicidios consumados por ingestión de carbamatos en el partido judicial de la laguna de Tenerife durante el periodo 1998-2002.Rev. Toxicol. (2004) 21:108-112.
- [304] **Mascini M**, Monti Sergi M., Del Carlo M., Compagnone D.2008 Oligopeptides as Mimic of Acetylcholinesterase: From the Rational Design to the Application in Solid-Phase Extraction for Pesticides. Anal. Chem. 2008, 80, 9150–9156.
- [305] **VIDA**, OpenEye Scientific Software, Santa Fe, New Mexico. 1997-2011.
- [306] **SYBYL** is a registered trademark of TRIPOS, Inc. St. Louis, Missouri. USA 2006.
- [307] **Gasteiger, J.**; Marsili, M.1978. A new model for calculating atomic charges in molecules.Tetrahedron Lett. , 3181,
- [308] **Gasteiger, J.**; Marsili, M. 1980.Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges Tetrahedron, 36, 3219.
- [309] **Purcell, W. P.**; Singer, J. A. 1967.A brief review and table of semiempirical parameters used in the Huckel molecular orbital method J. Chem. Eng. Data, 12, 235.

---

[310] **Powell, M.J.D.**, 1964. An efficient method for finding the minimum of a function of several variables without calculating derivatives. *Comput. J.* 1964, 7, 155–162.

[311] **Powell, M.J.D.**, 1970 "A new algorithm for unconstrained optimization," *Nonlinear Programming* (J. B. Rosen, O. L. Mangasarian and K. Ritter, Eds.), Academic Press, New York, 1970, pp. 31-65.

[312] **Fortran 1970**, A subroutine for unconstrained minimization, requiring first derivatives of the objective function. Tech. Rep. AERE-R. 6469, Mathematics Branch, A.E.R.E. Harwell, Berkshire, England, 1970

[313] **Clark M**, Cramer RDI, van Opdenbosch N. 1989. Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. *J Comput Chem.* 1989; 10:982–1012.

[314] **Lipkowitz B.K**, Boyd D. B. 1997. *Reviews in Computation Chemistry. Volumen II.* Wiley-VCH. U.S.A.

[315] **Heritage T.W., 2003.** Molecular Docking in structure based design. Chapter 16. Tripos, Inc, in the book ; *Determination analysis and applications for drug discovery* edited by Chasman Daniel

[316] **Mascini M**, Del Carlo M., Compagnone D. 2004. Development of artificial oligopeptides as biomimetic receptors for carbamate and organophosphate pesticides. In *Sensors and Microsystems Proceedings of the 9th Conference*; World Scientific: Singapore, 44-49.\*

[317] **Mascini M**, Del Carlo M., Pepe A, Compagnone D. 2005. Biomimetic receptors for pesticides comparison of computational and experimental data. In book *Sensors and Microsystems Proceedings of the 10th Italian Conference*; Mignani A, Di Natale A, D'Amico editors World Scientific. Page 65-70.

---

[318] **Donaldson, D.**; Kiely, T.; Grube, A: 1998-1999. Pesticides Pesticide Market Estimates; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2002.

[319] **Karalliedde L**, Senanayake N: 1989 Organophosphorus insecticide poisoning.Br J Anaesth 1989; 63:736-750.citado en JIFCC 1999.

[320] **Koletzko, B.**; Aggett, P. J.; Agostoni, C.; Baerlocher, K.; Bresson, J. L.; Cooke, R. J.; Decsi, T.; Deutsch, J.; Janda, J.; Manz, F.; Moya, M.; Rigo, J.; Socha, 1999 Pesticides in dietary foods for infants and young children.J. Arch. Dis. Childhood 1999, 80, 91-92

[321] **Schilter, B.**; Huggett, A. C. 1998.The ADI as a basis to establish standards for pesticide residues in food products for infants and children. Food Addit. Contam.,15 (Suppl.), 83-9.

[322] **Padilla, S.**; Buzzard, J.; Moser, V. C. Comparison of the role of esterases in the differential age-related sensitivity to chlorpyrifos and methamidophos. Neurotoxicology 2000, 21, 49-56

[323] **Padilla, S.**; Sung, H. J.; Moser, V. C.Further assessment of an in vitro acreeam that may help identify organophosphorus pesticides that are more acutely toxic to the young J. Toxicol. Environ. Health, Part A 2004, 67, 1477-89.

[324] **European Community.** Commission Directive 1999/50/EC of 25 May 1999 amending Directive 91/321/EEC on infant formulae and follow-on formulae. (Official Journal of the European Communities, No. L 139, 2 June 1999, pp. 29-31).

[325] **European Community.** Commission Directive 1999/39/EC of 6 May 1999 amending Directive 96/5/EC on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children. (Official Journal of the European Communities, No. L 124, 18 May 1999, pp. 8-10)

---

[326] **Anastassiades, M.**; Scherbaum, E. Dtsch. Lebensm.-Rundsch. **1997**, 93, 316-27.

[327] **Anastassiades, M.**, Lehotay, S. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. J of AOAC International, Vol 86, No 2, 2003.

[328] **Pylypiw, H. M. J.** AOAC International **1993**, 76, 1369-73.

[329] **Nunes, G. S.**; Skladal, P.; Yamanaka, H.; Barcelo D, Determination of carbamate residues in crop samples by cholinesterase-based biosensors and chromatographic techniques. Anal. Chim. Acta 1998, 362, 59-68.

[330] **Schulze, H.**; Scherbaum, E.; Anastassiades, M.; Vorlova, S.; Schmid, R. D.; Bachmann, T. T. Development, validation, and application of an acetylcholinesterase-biosensor test for the direct detection of insecticide residues in infant food. Biosens. Bioelectron. **17**: 1095–105 (2002).

[331] **Kulys, J.**; D’Costa, E. J amperometric sensor based on TCNQ and cholinesterase. Biosens. Bioelectron. **1990**, 6, 109-15

[332] **Makower, A.**; Halamek, J.; Skladal, P.; Kernchen, F.; Scheller, New principle of direct real-time monitoring of the interaction of cholinesterase and its inhibitors by piezoelectric biosensorF. W. Biosens. Bioelectron. 2003, 18, 1329-37.

[333] **Schulze, H.**; Schmid, R. D.; Bachmann, T. T. Rapid detection of neurotoxic insecticides in food using disposable acetylcholinesterase biosensors and simple solvent extraction. Anal. Bioanal. Chem. **2002**, 372, 268-72. DOI: 10.1007/s00216-001-1137-2

---

[334] **Aldridge, W. N.** 1950. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. *Biochem. J.*, 46, 451-6.

[335] **Herzprung, P.**; Weil, L.; Quentin, K. Z. *Wasser-Abwasser-Forsch.* **1989**, 22, 67-72.

[336] **Hussein, A.**; Harel, M.; Selkirk, M. A distinct family of acetylcholinesterases is secreted by *Nippostrongylus brasiliensis* *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, 123.125.

[337] **Sussman, J. L.**; Harel, M.; Frolow, F.; Oeffner, C.; Goldman, A.; Toker, L Silman, I.; Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* a prototype acetylcholinesterase binding protein. *Science* **1991**, 253, 872-9.

[338] **Schumacher, M.**; Camp, S.; Maulet, Y.; Newton, M.; Macpheequigley, K.; Taylor, S. S.; Friedmann, T.; Taylor, Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence *P. Nature* **1986**, 319, 407-9.

[339] **Harel, M.**; Weik, M.; Silman, I.; Sussman, J. L. Native Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) from *Torpedo Californica* At 1.8A Resolution, PDB code 1EA5; 2000.

[340] **Thompson, J. D.**; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D.G. The CLUSTAL\_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 4876-82 doi: 10.1093/nar/25.24.4876

[341] **Bates, P. A.**; Kelley, L. A.; Mac Callum, R. M.; Sternberg, M. J. *Proteins* **2001**, (Suppl. 5), 39-46. Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM Article first published online: 28 JAN 2002 DOI: 10.1002/prot.1168

---

[342] **Guex, N.;** Peitsch, M. C. 1997.Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* , 18, 2714-23.

[343] **Ordentlich, A.;** Barak, Dov; Kronman, Chanoch; Ariel, Naomi; Segall, Yoffi; Velan, Baruch; Shafferman, Avigdor. The Architecture of Human Acetylcholinesterase Active Center Probed by Interactions with Selected Organophosphate Inhibitors *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11953-62 doi .10.1074/jbc.271.20.11953

[344] **Pleiss, J.;** Mionetto, N.; Schmid, R. D. 1999.Probing the acyl binding site of acetylcholinesterase by protein engineering1*J. Mol. Catalysis B*, 6, 287-96.

[345] **Villatte, F.;** Ziliani, P.; Marcel, V.; Menozzi, P.; Fournier, A High Number of Mutations in Insect Acetylcholinesterase May Provide Insecticide Resistance D. *Pestic. Biochem.Physiol.* **2000**, 67, 95-102.dx.doi.org/101006/pest2000.2478

[346] **Boublik, Y.;** Saint-Aguet, P.; Lougarre, A.; Arnaud, M.; Villatte, F.; Estrada-Mondaca, S.; Fournier, Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residuesD. *Protein Eng.* 2002, 15, 43-50. doi: 10.1093/protein/15.1.43

[347] **Villatte, F.;** Marcel, V.; Estrada-Mondaca, S.; Fournier, D. Engineering sensitive acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticides *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 157-64. dx.doi.org/101016/S0956-5663

[348] **Hussein, A. S.;** Chacon, M. R.; Smith, A. M.; Tosado-Acevedo, R.; Selkirk, M. E. Cloning, Expression, and Properties of a Nonneuronal Secreted Acetylcholinesterase from the Parasitic Nematode *Nippostrongylus brasiliensis* *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 9312-9. Doi: 10.1074/jbc.274.14.9312

---

[349] **Bachmann, T. T.;** Schmid, R. A disposable multielectrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paraoxon and carbofuran at high resolution D. Anal. Chim. Acta **1999**, 401, 95-103. dx.doi.org/101016/S0003-2670.

[350] **Schulze, H.;** Schmid, R. D.; Bachmann, T. T. Activation of phosphorothionate pesticides based on a cytochrome P450 BM-3 (CYP102 A1) mutant for expanded neurotoxin detection in food using acetylcholinesterase biosensors. Anal. Chem. **2004**, 76, 1720-5

[351] **Schulze H. ,** Muench S. B., Villatte F., Schmid R. D. , Bachmann T. T, 2005 Insecticide Detection through Protein Engineering of *Nippostrongylus brasiliensis* Acetylcholinesterase B ,Anal. Chem. 2005, 77, 5823-5830.

[352] **Masson, P.,** Legrand, P., Bartels, C. F., Froment, M.-T., Schopfer, L. M., and Lockridge, O. (1997) Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase, Biochemistry 36, 2266-2277.

[353] **Gorelick, D.,** Gardner, E., and Xi, Z. 2005. Agents in development for the management of cocaine abuse, Drugs 64, 1547- 1573.

[354] **Nigg, H. N.,** and Knaak, J. B. 2000. Blood cholinesterases as human biomarkers of organophosphorus pesticide exposure, ReV. EnViron. Contam. Toxicol. 163, 29-111.

[355] **Geula, C.,** and Darvesh, S. 2004. Butyrylcholinesterase, cholinergic neuro transmission and the pathology of Alzheimer's disease, Drugs Today 40, 711-721.

[356] **Darvesh, S.,** Hopkins, D. A., and Geula, C. 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase, Nat. ReV. Neurosci. 4, 131-138.

---

[357] **Nicolet, Y.**, Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J. C., and Nachon, F. 2003. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products, *J. Biol. Chem.* 278, 41141-41147.

[358] **Saxena, A.**, Redman, A. M. G., Jiang, X., Lockridge, O., and Doctor, B. P. ,1997. Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase, *Biochemistry* 36, 14642-14651.

[359] **Fersht, A. R.** ,1995. *Enzyme Structure and Mechanism*, W. H. Freeman and Co., New York.

[360] **Fuxreiter, M.**, and Warshel, A. .1998. Origin of the catalytic power of acetylcholinesterase: Computer simulation studies, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 183-194.

[361] **Vagedes, P.**, Rabenstein, B., Aqvist, J., Marelius, J., and Knapp, E.-W. 2000. The deacylation step of acetylcholinesterase: Computer simulation studies, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12254-12262

[362] **Elber, R.** ,1990. Calculation of the potential of mean force using molecular dynamics with linear constraints: An application to a conformational transition in a solvated peptide, *J. Chem. Phys.* 93, 4312-4321.

[363] **Elber, R.**, and Karplus, M. ,1990. Enhanced sampling in molecular dynamics. Use of the time dependent hartree approximation for a simulation of carbon monoxide diffusion through myoglobin, *J. Am. Chem. Soc.*, 9161-9175.

[364] **Suarez, D.**, and Field, M. J. (2005) Molecular dynamics simulations of human butyrylcholinesterase, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* 59, 104-117.

[365] **Fuxreiter, M.**, and Warshel, A. ,1998. Origin of the catalytic power of acetylcholinesterase: Computer simulation studies, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 183-194.

---

[366] **Zhan, C.-G.**, and Gao, D. (2005) Catalytic mechanism and energy barriers for butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of cocaine, *Biophys. J.* 89, 3863-3872.

[367] **Zhang, Y.**, Kua, J., and McCammon, J. A. ,2002.Role of the catalytic triad and oxyanion hole in acetylcholinesterase catalysis: An ab initio QM/MM study, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 10572-10577

[368] **Suarez D.**,Diaz N, Fontecilla – Camps J., Field M. J. 2006. A Computational Study of the Deacylation Mechanism of Human Butyrylcholinesterase, *Biochemistry* 2006, 45, 7529-7543.

[369] **Berkman, C. E.**, Quinn, D. A., and Thompson, C. M. (1993) Interaction of acetylcholinesterase with the enantiomers of malaoxon and isomalathion. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 724-730.

[370] **Jianmongkol, S.**, Berkman, C. E., Thompson, C. M., and Richardson, R. J. (1996) Relative potencies of the four stereoisomers of isomalathion for inhibition of hen brain acetylcholinesterase and neurotoxic esterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **139**, 342-348

[371] **Berkman, C. E.**, Ryu, S., Quinn, D. A., and Thompson, C. M. (1993) Kinetics of the postinhibitory reactions of acetylcholinesterase poisoned by chiral isomalathion: a surprising nonreactivation induced by the RP stereoisomers. *Chem. Res. Toxicol.* **6**,28-32.

[372] **Jianmongkol, S.**, Marable, B. R., Berkman, C. E., Talley, T. T., Thompson, C. M., and Richardson, R. J. (1999) Kinetic evidence for different mechanisms of acetylcholinesterase inhibition by (1R)- and (1S)-stereoisomers of isomalathion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **155**, 43-53.

---

[373] **Wang, X.**, Wang, C. S., Tang, J., Dyda, F., and Zhang, X. C. 1997 The crystal structure of bovine bile salt activated lipase: insights into the bile salt activation mechanism. *Structure* **5**, 1209- 1218.

[374] **Technical literature for Affinity module** (Molecular Simulations, Inc.)

[375] **Doorn, J. A.**, Gage, D. A., Schall, M., Talley, T. T., Thompson, C.M., and Richardson, R. J. 2000 Inhibition of acetylcholinesterase by isomalathion proceeds with loss of thiomethyl: kinetic and mass spectral evidence for an unexpected primary leaving group. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 1313-1320.

[376] **Doorn J. A.**, Talley T. T, Thompson C, Richardson R. J.2001.Probing the Active Sites of Butyrylcholinesterase and Cholesterol Esterase with Isomalathion: Conserved Stereoselective Inactivation of Serine Hydrolases Structurally Related to Acetylcholinesterase.*Chem.Res.Toxicol.*2001.14,807-813.

[377] **Casida J. E.**, 2011.Curious about Pesticide Action, [dx.doi.org/10.1021/jf021115](https://doi.org/10.1021/jf021115)/J.Agric.Food Chem, 2011, 59, 2762-2769. 2011 AcademyPublish.org.

[378] **Jensen, F.** 1999: Introduction into computational chemistry. John Wiley, ISBN 0471984256, England.

[379] **Bustos-Obregón, E.**, Valenzuela, M., Rojas, M. 1998. Agropesticidas and testicular damage. In: Male reproduction: A multidisciplinary overview. Churchill Communications Europe. España. ,pág. 257- 264

#### **Referencias del Capítulo IV**

[380] **Tee O.S.** Advances in Physical Organic Chemistry. NY. Academic Press Limited 1994-p.1-85.

---

[381] **Bender, M. L.**; Komiyama, M. Cyclodextrin Chemistry, Springer-Verlag: Berlin, 1978.

[382] **Szejtli, J.** Cyclodextrins and their Inclusion Complexes, Akadémiai Kiadó: Budapest, 1982.

[383] **Atwood, J. L.**; Davis, J. E.; MacNicol, D. D., Eds., Inclusion Compounds, Academic Press: London, **1984**.

[384] **Rekharsky, M. V.**; Inoue, Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins  
Y. Chem. Rev., **1998**, 98, 1875.

[385] **Szejtli J.** Starch-Stärke, **1985**, Cyclodextrins in Pesticides (pages 382–386)  
Prof. Dr. J. Szejtli 37, 382.

[386] **Szejtli J.**, **2004**, Past, present and future of cyclodextrin research. Pure Appl. Chem. 76, 1825.

[387] **Kamiya, M.**; Nakamura, K., **1994** Studies on the susceptibility to alkaline hydrolysis of inclusion complexes of organophosphorothioate pesticides with  $\beta$ -cyclodextrins. Pesticide Sci (pages 305–309), 41, 305.

[388] **Kamiya, M.**; Nakamura, K.; Sasaki, C., **1995**, Inclusion effects of  $\beta$ -cyclodextrins on the hydrolysis of organophosphorus pesticides. Chemosphere, 30, 653.

[389] **Ishiwata, S.**; Kamiya, M., **2000**, Structural study on inclusion complexes of cyclodextrins with organophosphorus pesticides by use of rotational strength analysis method. Chemosphere 41, 701.

---

[390] **Osa, T.**; Suzuki, I. **1996**. In *Cyclodextrins: Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Szejtli, J., Osa, T., Eds.; Pergamon: Oxford,; Vol.3, p 367.

[391] **Takahashi, K.** **1998**, *Organic Reactions Mediated by Cyclodextrins*, *Chem Rev.*98, 2013.

[392] **Komiyama, M.**; Bender, M.L., **1984**. *The Chemistry of Enzyme Action*; Page, M.I., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Ch. 14.

[393] **Matsui, Y.**; Nishioka, T.; Fujita, T., **1985** Quantitative structure-reactivity analysis of the inclusion mechanism by cyclodextrins. *Biomimetic and Bioorganic Chemistry* ISBN: 978-3-540-15136-4 (Print) 978-3-540-39248-4 (Online) *Top.Curr.Chem.*, 128, 61.

[394] **Vico, R.**; Buján, E.; de Rossi, R. H. *J. Phys. Org. Chem.*, **2002**, Effect of cyclodextrin on the hydrolysis of the pesticide fenitrothion [O,O-dimethyl O-(3-methyl-4-nitrophenyl)phosphorothioate 15, 858.

[395] **HyperChem 7** for Windows, Hypercube Inc., 2002.

[396] **Granados, A.M.**; de Rossi, R.H.; Barbiric, D.A.; Castro, E.A. 2002 Effect of  $\beta$ -cyclodextrin on the hydrolysis of n-phenylphtalamide and N-adamantylphtalamide.- A two-sided semiempirical approach *J.of Molec. Struct. (THEOCHEM)*, 619, 91.

[397] **Coscarello, E.N.**; Barbiric, D.A.; Castro, E.A. 2006 -L-Tryptohan-Modified- $\beta$ -Cyclodextrin as Molecular and Enantiomeric Selector: Semiempirical Calculations *Global J. Molec. Sci.*, 1.

[398] **Lipkowitz, K.** 1991. Symmetry breaking in cyclodextrins: a molecular mechanics investigation. *J. Org. Chem.*, 56, 6357

[399] **Tee O. S.**, Mazza C. , Du X. X. 1990 ,Chain length effects in the cleavage of aryl esters by cyclodextrins. Different transition states for m- and p-nitrophenyl alkanoates *J. Org. Chem.*, 1990, 55 (11), pp 3603–3609 Doi: 10.1021/jo00298a04.

---

[400] Tee, O. S. 1994. "The stabilization of transition states by cyclodextrins and other catalysts". In *Advances in physical organic chemistry*, 29 ed.; Academic Press Limited: New York ; pp 1-85.

[401] Coscarello E.N., Barbiric D. A., Castro E. A.; Vico R.V., Bujan E. I., de Rossi R. H., 2009. Comparative Analysis of Complexation of Pesticides (fenitrothion, methylparathion, parathion) and their Carboxylic Ester-Analogues by  $\beta$ -Cyclodextrin. Theoretical Semiempirical Calculations. *J. Structural Chemistry*, 50 (4), 705-713. ISSN: 0022-4766. Ed. Springer. J.N° 10947.

### Referencias del Capítulo V

[402] Gennaro A. 2003. Remington The science and the practice of pharmacy 20th. USA Philadelphia.

[403] Bravo L. 2003. Farmacognosia especial.. Ed. Elsevier España

[404] Millán C. 2008. Las plantas: una opción saludable para el control de plagas. Red de acción de plaguicidas y sus alternativas para América latina feb. 2008 ISBN 978-9974-8029-2-6

[405] O' Brian D. 2009. Comprendiendo porque el centeno funciona tan bien como cultivo de cobertura United State Department of Agriculture. Pag web Visitado el 2/2/2013 <http://www.ars.usda.gov/is/espanol/pr/2009/091016.es.htm?pf=1>

[406] Cloetens, L. DePreter, V. Sweennen, K. Broekaert, W. F. Courtin, C. M. Delcour, J. A. Rutgerts, P. Verbeke, K. 2008. Dose-response effect of arabino-xylo-oligosaccharides on gastrointestinal motility and on colonic bacterial metabolism in healthy volunteers. *Journal of the American College of Nutrition* 27(4), 512-512.

---

[407] **Lu, Z.X. Walker** ,K,Z,Muir J.G.Mascara T, ODea K, . 2000.Arabinoxylan fibre improves metabolic control in control in people with type II diabetes European journal of clinical nutrition 58,621-628.

[408] **Vicente F.**, Coscarello E., Goicochea D., 2011. Desarrollo de un metodo de malteado de centeno para obtener una material prima funcional en la elaboración de alimentos.Proyecto de investigación de cátedra Facultad de agronomía y ciencias agroalimentarias Universidad de morón.-proyecto presentado en el concurso nacional arcora a la innovación en alimentos.

[409] **Venkataramana Moleyar**, Pattisapu Narasimham. 2006.Detoxification of essential oil components (citral and menthol) by *Aspergillus niger* and *Rhizopus stolonifer* \*Article first published online: DOI: 10.1002/jsfa.2740390307Copyright © 1987 John Wiley & Sons, Ltd.

[410]**Vanessa Schmidt S.**; Miguel Neira C.; Roberto Carrillo. 2008. Evaluación comparativa de los acaricidas Bayvarol (Flumetrina) y apilife Var (Timol, Eucaliptol, Mentol y alcanfor) en el control del acaroVarroa destructor Anderson & Trueman en época primaveral. L1. Agro Sur 36 (1) 8-14 .Universidad Austral de Chile, Valdivia. Facultad de Ciencia Agrarias, Escuela de Agronomía.

[411] **Arne P. Skouby**, Zilstorff-Pedersen.2008.The Influence of Acetylcholine-like Substances, Menthol and Strychnine on Olfactory Receptors in Man. Article first published online: DOI: 10.1111/j.1748-1716.1954.tb01172.xC1954 Scandinavian Physiological Society.

[412]**Ronald E.**, Moutaz S., Jawad, Morris S. 2011.The effects of oral administration of (-)-menthol on nasal resistance to airflow and nasal sensation of airflow in subjects suffering from nasal congestion associated with the common cold Article first published online: DOI: 10.1111/j.2042-7158.1990.tb06625.x1990.Royal Pharmaceutical Society of Great Britain.

---

[413] **Caso, Antonio**; Hernández R., Sofía; Martínez Ortiz, José Luis; Segovia A, Carlos. 1999. Estudio comparativo de la eficacia de la bencidamina, mentol y salicilato de metilo vs el clorhidrato de bencidamina para el tratamiento de los traumatismos del sistema musculo esquelético / Benzydamine hydrochloride vs. methyl-salicylate in external trauma  
Fonte: Rev. Fac. Med. UNAM;42(4):158-61, jul.-ago. graf, tab.

[414] **Floch MH**, Madsen KK, Jenkins DJ, et al. 2006. Recommendations for probiotic use.  
J Clin Gastroenterol;40:275–8. PMID 16633136

[415] **Fedorak RN**, Madsen KL. 2004. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. Curr Opin Gastroenterol;20:146–55. PMID 15703637

[416] **Lenoir-Wijnkoop I**, Sanders ME, Cabana MD, et al. 2007. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. Nutr Rev;65:469–89. PMID 18038940

[417] **Sazawal SG**, Hiremath U, Dhingra P, Malik P, Deb S, Black RE. 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked randomised, placebo-controlled trials. Lancet Infect Dis;6:374–82. PMID 16728323

[418] **Guías prácticas de la OMGE Probióticos y prebióticos**. 2008. Organización Mundial de Gastroenterología Guías prácticas: Probióticos y Prebióticos. Equipo de Revisión Francisco Guarner, (Presidente, España) Aamir G. Khan (Pakistán) James Garisch (Sudáfrica) Rami Eliakim (Israel) Alfred Gangl (Austria) Alan Thomson (Canadá) Justus Krabshuis (Francia) Ton Le Mair (Países Bajos) Expertos externos invitados Pedro Kaufmann (Uruguay) Juan Andres de Paula (Argentina) Richard Fedorak (Canadá) Fergus Shanahan (Irlanda) Mary Ellen Sanders (EUA) Hania Szajewska (Polonia) © World Gastroenterology Organization.

[419] **Roberto Cittadini coordinador** 2008. cartilla La huerta organica. Programa de Pro Huerta. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA.

---

[420] **Maypole J**, Woolf AD, Donovan JW. 2007. Essential oils. In: Shannon MW, Borron SW, Burns MJ, eds. Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose. 4th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; chap 101.

[421] **University Of Maryland Medical Center** Sitio web visitado el 10/2/2013 [http://www.umm.edu/esp\\_ency/article/002673sym.htm#ixzz2KhFLVtXJ](http://www.umm.edu/esp_ency/article/002673sym.htm#ixzz2KhFLVtXJ)

## Referencias del Capítulo VI

[423] **Castro, E.A.**, Barbiric D.A.J., Nascimento C.S., De Almeida W.B., Dos Santos, H.F, Coscarello E.N., 2006. Quantum Mechanical Study of the Inclusion Processes of Adamantol Isomers by L-Tryptophan Modified- $\beta$ -Cyclodextrin". Molecular simulation. Vol 32, N°8, 623-631

[424] **Coscarello E.N.**, Barbiric D.A., Castro E.A. 2006. L-Tryptophan-Modified- $\beta$ -Cyclodextrin as Molecular and Enantiomeric Selector: Semiempirical Calculations Global Journal of Molecular Sciences, ISSN 1990-9241© IDOSI Publications

[425] **Bender, M.L.** and M. Komiyama, 1978. Cyclodextrin Chemistry, Springer-Verlag: Berlin.

[426] **Szejtli, J.**, 1982. Cyclodextrins and their Inclusion Complexes, Akadémiai Kiadó: Budapest

[427] **Atwood, J.L.**, J.E. Davis and D.D. MacNicol 1984. Eds., Inclusion Compounds, Academic Press: London.

[428] **Rekharsky, M.V.** and Y. Inoue, 1998. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. Chem. Rev. 98: 1875.

[429] **Kodaka, M.**, 1998. Application of a General Rule to Induced Circular Dichroism of Naphthalene Derivatives Complexed with Cyclodextrins. J. Phys. Chem. A, 102, 8101.

[430] **Harata, K.** and H. Uedaira, 1975. The Circular Dichroism Spectra of the  $\beta$ -Cyclodextrin Complex with Naphthalene Derivates. Bull. Chem. Soc. Jpn., 48: 375.

---

[431] **Li, S.** and W.C. Purdy, 1992. Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. *Chem. Rev.*, 92: 1457.

[432] **Ueno, A.**, 1993. Fluorescent sensors and color-change indicators for molecules. *Adv. Mater.*, 5: 132.

[433] **Hamasaki, K.**, H. Ikeda, A. Nakamura, A. Ueno, F. Toda, I. Suzuki and T. Osa, 1993. Fluorescent sensors of molecular recognition. Modified cyclodextrins capable of exhibiting guest-responsive twisted intramolecular charge transfer fluorescence *J. Am. Chem. Soc.*, 115: 5035.

[434] **Ueno, A.**, 1992. In *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*, Czarnik, A.W., Ed., ACS Symposium Series 538; American Chemical Society: Washington, DC., Ch. 6, pp: 74.

[435] **Ueno, A.**, 1996. Fluorescent cyclodextrins for molecule sensing. *Supramol. Sci.*, 3: 31.

[436] **Matsushita, A.**, T. Kuwabara, A. Nakamura, H. Ikeda and A. Ueno, 1997. Guest-induced colour changes and molecule-sensing abilities of p-nitrophenol-modified cyclodextrins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2: 1705.

[437] **Corradini, R.**, A. Dossena, G. Galaverna, R. Marchelli, A. Panagia and G. Sartor, 1997. Fluorescent Chemosensor for Organic Guests and Copper(II) Ion Based on Dansyldiethylenetriamine-Modified  $\beta$ -Cyclodextrin *J. Org. Chem.*, 62: 6283.

[438] **de Jong, M.R.**, 2001. Cyclodextrins for sensing Solution, Surface and Single Molecule Chemistry, Ph.D. Thesis, Universiteit Twente: Netherlands

[439] **Liu, Y.**, B.H. Han, S.X. Sun, T. Wada and Y. Inoue, 1999. Molecular Recognition Study on Supramolecular Systems. 20. Molecular Recognition and Enantioselectivity of Aliphatic Alcohols by l-Tryptophan-Modified  $\beta$ -Cyclodextrin. *J. Org. Chem.*, 64: 1487.

[440] **HyperChem 6 Pro**, Hypercube, Inc., Serial # 12-600-1500700081.

[441] **Li, X.S.**, T.W. Mu and Q.X. Guo, 2000. A systematic quantum chemistry study on cyclodextrins *Monats Chem.*, 131: 849.

---

[442] **Zheng**, Y.J. and K.M. Merz Jr., 1992. Study of hydrogen bonding interactions relevant to biomolecular structure and function. *J. Comp. Chem.* 13:1151-1169.

[443] **Morley**, J.O., R.M. Morley, R. Docherty and M.H. Charlton, 1997. Fundamental Studies on Brooker's Merocyanine *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 10192.

[444] **Morpurgo**, S., M. Bossa and G.O. Morpurgo, 1998. Critical test of PM3-calculated proton transfer activation energies: A comparison with ab initio and AM1 calculations. *J. Molec. Struct. (Theochem)*, 429: 71.

[445] **Lipkowitz**, K., 1991. Symmetry breaking in cyclodextrins: a molecular mechanics investigation. *J. Org. Chem.*, 56: 6357.

[446] **Inoue**, Y., K. Yamamoto, T. Wada, S. Everitt, X.M. Gao, Z.J. Hou, L.H. Tong, S.K. Jiang and H.M. Wu, 1998. Inclusion complexation of (cyclo) alkanes and (cyclo) alkanols with 6-O-modified cyclodextrins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2: 1807.

[447] **Harata**, K. and H. Uedaira, 1978. Tanaka, The Structure of the Cyclodextrin Complex. VI. The Crystal Structure of  $\alpha$ -Cyclodextrin-m-Nitrophenol (1: 2) Complex. *J. Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 51: 1627.

[448] **Harata**, K., 1980. The Structure of the Cyclodextrin Complex. IX. The Crystal Structure of  $\alpha$ -Cyclodextrin-m-Nitroaniline (1:1) Hexahydrate Complex *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 53: 2782.

[449] **Rosenblum Bruce** y Kuttner Fred. 2006. El enigma cuántico. Encuentros entre la física y la conciencia. Tusquets Editores. Barcelona.España.

### **Artículos Publicados**

-**The Contribution of Molecular Modeling to the Knowledge of Pesticides**, Capítulo N° 19. Nombre del libro: *Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure*, Ethel N. Coscarello, Ruth Hojvat, Dora A. Barbiric and Eduardo A. Castro (páginas de 424 hasta la 446, Edición 2011). Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-531-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/the-contribution-of-molecular-modeling-to->

---

the-knowledge-of-pesticides.

**-Comparative analysis of complexation of pesticides (fenitrothion, methylparathion, parathion) and their carboxylic ester analogues by  $\beta$ -cyclodextrin. Theoretical semiempirical calculations**-Journal of Structural Chemistry Vol 50 N 4 p. 671-679 4 August 2009 -0022-4766(print) 1573-8779(online) E.N.Coscarello, D.A.Barbiric, E.A.Castro, R.V.Vico, E I Bujánm and R H de Rossi.

**-Quantum mechanical study of the inclusión process of adamantanol isomers by L-tryptophan–modified– $\beta$ -cyclodextrin** –.Molecular simulation.Vol 32, N°8, 15 july 2006.623-631E.A.Castro.D.Barbiric.C.S.Nacimiento.W.B.Almeida.H.F.Santos.  
E.Coscarello

**-L-Tryptohan-Modified- $\beta$ -Cyclodextrin as Molecular and Enantiomeric Selector: Semiempirical Calculations**, Global Journal of molecular Sciences 1(1), 2006. E.N.Coscarello. D.A.Barbiric. E.A.Castro.

### **Presentación de Trabajos en Congresos y Jornadas**

**-XXVI Congreso Argentino de Química** Dr Ángel del Carmen Devia del 13 al 15 de septiembre de 2006. San Luis presentando el siguiente Estudio comparativo de los complejos entre  $\beta$ -Ciclodextrina modificada con L-triptofano y los isómeros 1- y 2-Adamantanol.- **XIV Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica** del 11al 14 de abril del 2005 presentando el siguiente trabajo Inhibición de la hidrólisis de pesticidas fosforados en presencia de  $\beta$ - CD Cálculos semiempíricos.

**-XXV Congreso Argentino de Química** Dr Eduardo Bottani del 22 al 24 septiembre del 2004 presentando el siguiente trabajo: Hidrólisis de pesticidas fosforados y ésteres análogos en presencia de  $\beta$ -CD -Cálculos semiempíricos.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### CLASIFICACION DE LOS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS SEGÚN SU ESTRUCTURA QUÍMICA

GRUPO DE ORGANOFOSFORADO	ESTRUCTURA QUÍMICA	NOMBRE COMÚN
Fosfatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ (\text{R}-\text{O})_2-\text{P}-\text{O}-\text{X} \end{array}$	Chlorfenvinphos, Crotoxyphos, Dichlorvos, Dicrotophos, Heptenphos, Mevinphos, Monocrotophos, Naled, Nosphamidon, TEPP, Tetrachlor, Vinphos, Triazophos
<i>O</i> -alquil fosforotioatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ (\text{R}-\text{O})_2-\text{P}-\text{S}-\text{X} \end{array}$	Amiton, Demeton-S-Methyl, Omethoate, Oxydemeton, Methyl, Phoxim, Vamidothion
	$\begin{array}{c} \text{S} \\    \\ (\text{R}-\text{O})_2-\text{P}-\text{O}-\text{X} \end{array}$	Azothoate, Bromophos, Bromophos-ethyl, Chlopyriphos, Chlorpyriphos-methyl, Coumaphos, <b>Diazinon</b> , Dichlofenthion, Fenchlorphos, Fenitrothion, Fenthion, Iodofenphos, Parathion, Parathion-methyl, Pyrazophos, Pyrimiphos-ethyl, Pyrimiphos-methyl, Quinalphos, Sulfotep, Temephos, Thionazin
Fosforoditioatos	$\begin{array}{c} \text{S} \\    \\ (\text{R}-\text{O})_2-\text{P}-\text{S}-\text{X} \end{array}$	Amidithion, Azinophos-ethyl, Azinophos-methyl, Dimethoate, Dioxathion, Disulfoton, Ethion, Formothion, Malathion, Mecarbam, Menazon, Methidathion, Morphothion, Henthoate,

		Phorate, Phosalone, Phosmet, Prothoate, Thiometon
S- alquil fosforotioatos	$  \begin{array}{c}  \text{R} \\  \diagdown \\  \text{S} \\  \diagup \\  \text{O} \\  \parallel \\  \text{P} - \text{O} - \text{X} \\  \diagup \\  \text{O} \\  \diagdown \\  \text{R}  \end{array}  $	Profenofos, Trifenofos
S- alquil fosforoditioatos	$  \begin{array}{c}  \text{R} - \text{S} \\  \diagdown \\  \text{S} \\  \parallel \\  \text{P} - \text{O} - \text{X} \\  \diagup \\  \text{R} - \text{O}  \end{array}  $	Prothiofos, Sulprofos
Fosforoamidatos	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  (\text{R}-\text{O})_2 - \text{P} - \text{NR}_2  \end{array}  $	Cruformate, Fenamiphos, Fosthietan
Fosfortriamidatos	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{R}_2\text{N} - \text{P} - \text{N} \\  \parallel \\  \text{NR}_2  \end{array}  $	Triamiphos
Fosfortioamidatos	$  \begin{array}{c}  \text{O} \\  \parallel \\  \text{R}-\text{O}-\text{P}-\text{NR}_2 \\    \\  \text{S-alquil}  \end{array}  $	Methamidophos
	$  \begin{array}{c}  \text{S} \\  \parallel \\  (\text{R}-\text{O})_2 - \text{P} - \text{NR}_2  \end{array}  $	Isofenphos

Fosfonatos	$\begin{array}{c} \text{RO} \quad \text{O} \\ \quad \quad \parallel \\ \text{R} \quad \text{P} \text{---} \text{O---X} \end{array}$	Butonate, Trichlorfon
Fosfonotioatos	$\begin{array}{c} \text{R-O} \quad \text{S} \\ \quad \quad \parallel \\ \text{R} \quad \text{P} \text{---} \text{O---X} \end{array}$	EPN, Trichlormat, Leptophos, Cyanofenphos

## ANEXO 2

### Clasificación de los Pesticidas Organofosforados según la WHO

#### Clase IA: Extremadamente Peligrosos

Nombre Común	Estado Físico	Uso Principal	LD <sub>50</sub> mg/kg
Cloretoxifos	Líquido	Insecticida	1.8
Clormefos	Líquido	Insecticida	7
Disulfoton	Líquido	Insecticida	2.6
EPN	Sólido	Insecticida	14
Etoprophos	Líquido	Insecticida	26
Mevinfos	Líquido	Insecticida	4
Parathion	Líquido	Insecticida	13
Parathion-metil	Líquido	Insecticida	14
Phorate	Líquido	Insecticida	2
Phosphamidon	Líquido	Insecticida	7
Sodium fluoroacetate	Sólido	Raticida	0.2
Sulfotep	Líquido	Insecticida	5
Tebupirimfos	Líquido	Insecticida	1.3
Terbufos	Líquido	Insecticida	2

**Clase IB: Altamente Peligrosos**

Nombre Común	Estado Físico	Uso Principal	LD <sub>50</sub> mg/kg
Azinphos-ethyl	Sólido	Insecticida	12
Azinphos-methyl	Sólido	Insecticida	16
Cadusafos	Líquido	Nematicida, Insecticida	37
Chlorfenvinphos	Sólido	Insecticida	31
Coumaphos	Sólido	Acaricida	7.1
Demeton-S-methyl	Líquido	Insecticida	40
Dichlorvos	Líquido	Insecticida	56
Dicrotophos	Líquido	Insecticida	22
Edifenphos	Líquido	Fungicida	150
Famphur	Sólido	Insecticida	48
Fenamiphos	Sólido	Nematicida	15
Heptenophos	Líquido	Insecticida	96
Isoxathion	Líquido	Insecticida	112
Mecarbam	Aceite	Insecticida	36
Methamidophos	Sólido	Insecticida	30
Methidathion	Líquido	Insecticida	25
Monocrotophos	Sólido	Insecticida	14
Omethoate	Líquido	Insecticida	50
Oxydemeton-methyl	Líquido	Insecticida	65
Propetamphos	Líquido	Insecticida	106
Thiometon	Aceite	Insecticida	120
Triazophos	Líquido	Insecticida	82
Vamidothion	Sólido	Raticida	10

**Clase II: Moderadamente Peligrosos**

Nombre Común	Estado Físico	Uso Principal	LD <sub>50</sub> mg/kg
Anilofos	Sólido	Herbicida	472
Butamifos	Líquido	Herbicida	630
Chlorpyrifos	Sólido	Insecticida	135
Cyanophos	Líquido	Insecticida	610
<b>Diazinon</b>	<b>Líquido</b>	<b>Insecticida</b>	<b>1000</b>
Dimethoate	Sólido	Insecticida	150
Ethion	Líquido	Insecticida	208
Fenitrothion	Líquido	Insecticida	503
Fenthion	Líquido	Insecticida, Larvicida	586
Methacrifos	Líquido	Insecticida	678
Naled	Líquido	Insecticida	430
Phenthoate	Líquido	Insecticida	400
Phosalone	Sólido	Insecticida	120
Phosmet	Sólido	Insecticida, Acaricida	113
Phoxim	Líquido	Insecticida	1975
Piperophos	Aceite	Herbicida	324
Profenofos	Líquido	Insecticida	358
Prothiofos	Líquido	Insecticida	925
Pyraclofos	Líquido	Insecticida	237
Quinalphos	Sólido	Insecticida	62
Trichlorfon	Sólido	Insecticida	250

**Clase III: Ligeramente Peligrosos**

Nombre Común	Estado Físico	Uso Principal	LD <sub>50</sub> mg/kg
Acephate	Sólido	Insecticida	945
Azamethiphos	Sólido	Insecticida	1010
Malathion	Líquido	Insecticida	2100
Pirimiphos-methyl	Líquido	Insecticida	2018
Pyridaphenthion	Sólido	Insecticida	769

## ANEXO 3

## TABLAS

CONSTANTE	VALOR
Fórmula Molecular	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS
Peso Molecular (g/mol)	304.36
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	1.11
Punto de Fusión (°C)	Líquido (N/A)
Punto de Ebullición (°C)	120
Presión de Vapor (Torr)	8.25
Solubilidad en Agua (mg/L)	40 (25 °C)
Constante de Henry, K <sub>H</sub> (atm m <sup>3</sup> /mol)	1.09 (25 °C)
Coefficiente de Partición en Agua-Octanol, Log K <sub>ow</sub>	3.81
Coefficiente de Partición de la Materia de Carbón, Log K <sub>oc</sub>	2.28
Coefficiente de Absorción, K <sub>d</sub> ((mg/kg <sub>s</sub> )/ (mg/L))	N/A
pK <sub>a</sub>	<2.5
Factor de Bioconcentración, Log BCF (especies dependientes)	1.2
Vida Media: Aire	4.1 d
Agua	43 d
Suelo	40-65 d
Biota	32 d

Tabla 1. Valores de las principales constantes químicas y físicas para Diazinon. Tomado de <http://www.ces.clemson.edu/ees/lee/organophosphates.html>