

INSTITUTUL POLITEHNIC "TRAIAN VUIA" TIMISOARA
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICA

SELECTAREA UNOR STRUCTURI CHIMICE CU
ACTIUNE PESTICIDA IN CLASA COMBINATIILOR ORGANOFOSFORICE
PE BAZA CORELARILOR CANTITATIVE STRUCTURA - ACTIVITATE
BIOLOGICA

L u c r a r e d e d o c t o r a t

BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"
TIMIȘOARA

CONDUCATOR STIINTIFIC,
Conf.dr.ing.RADU VILCEANU

Doctorand,
ing.Adrian Chiriac

1 9 7 7

INSTITUTUL POLITEHNIC TIMISOARA	
BIBLIOTECA	
CENTRALĂ	
Vol.	333.25
Dulap	200 Lit F

C U P R I N S

INTRODUCERE

Capitolul I.

CARACTERIZAREA GENERALA A ACTIUNII PESTICIDE A

COMBINATIILOR ORGANOFOSFORICE.....	1
1. Aspecte generale. Tipuri de acțiune.....	1
2. Mecanismul de acțiune.....	2
2.1. Reacția cu colinesteraze "in vitro".....	6
2.2. Reacția inhibitorilor organofosforici cu colinesteraze "in vivo"	12
2.2.1. Etapele inhibării colinesterazice și efectele determinate.....	12
2.2.2. Cinetica reacției inhibitorilor organofosforici cu colinesteraze.....	18
2.2.3. Aspecte ale relației dintre structura inhibitorului organofosforic și activitatea sa anticolinesterazică.....	24
2.2.4. Selectivitatea colinesterazelor în procesul de inhibare cu compuși organofosforici.....	37
2.3. Efecte și mecanisme de acțiune la mamifere.....	39
2.4. Efecte și mecanisme de acțiune la artropode.....	40
2.5. Efecte manifestate în plante.....	42
2.6. Metabolismul pesticidelor organofosforice.....	43
2.7. Toxicitatea pesticidelor organofosforice. Exprimare cantitativă.....	51
3. Pesticide organofosforice utilizate în practica combaterii dăunătorilor agricoli. Caracterizarea reprezentanților	55

Capitolul II.

DEPENDENTE CALITATIVE INTRE STRUCTURA SI ACTIVITATEA

PESTICIDA LA COMPUSII ORGANOFOSFORICI.....	56
1. Elemente structurale indispensabile manifestării activității biologice la compușii organofosforici.....	56
2. Efectele modificărilor structurale asupra tipului de acțiune și a eficacității pesticidului.....	59

2.1. Derivați ai acidului fosforos.....	59
2.2. Derivați ai acidului fosforic.....	59
2.3. Derivați ai acidului tiofosforic.....	61
2.4. Derivați ai acidului ditiofosforic.....	66
2.5. Derivați ai acidului pirofosforic.....	70
2.6. Derivați ai acidului fosfonic.....	71
2.7. Săruri de fosfoniu.....	72

Capitolul III.

RELATII CANTITATIVE STRUCTURA-ACTIVITATE BIOLOGICA LA

COMPUSII ORGANOFOSFORICI.....	73
1. Modele ale corelărilor structură-activitate biologică..	73
1.1. Modelul extratermodinamic.....	73
1.1.1. Relația liniară a energiei libere aplicată corelării activității biologice cu para- metrii fizico-chimici.....	76
1.1.2. Parametrii fizico-chimici ca mărimi care evaluează influența particularităților structurale asupra variației activității biologice.....	83
1.2. Modelul Free-Wilson.....	105
2. Corelări cantitative structură-activitate biologică la compuși organofosforici.....	107
2.1. Analiza ecuațiilor corelaționale propuse pentru descrierea relației structură-activitate biologică la serii de compuși organofosforici cu acțiune pesticidă.....	107
2.2. Aspecte particulare în alegerea parametrilor fizico-chimici pentru corelări cu activitatea biologică a pesticidelor organofosforice.....	115
2.2.1. Evaluarea efectelor electronice și a interacțiilor determinate de variația structurii într-o serie de reacție de compuși organofosforici.....	115
2.2.2. Evaluarea efectelor sterice ale substituien- ților într-o serie de reacție de compuși organofosforici.....	117

2.3. Corelări structură-activitate biologică la pesticide organofosforice din clasa derivaților acidului fosforic.....	127
2.4. Corelări structură-activitate biologică la compuși organofosforici de tip Schradar cu centru cationic în grupa eliminantă.....	152
2.5. Corelări structură-activitate biologică la combinații organofosforice de tip vinil- și enol-fosfați.....	159
2.5.1. Corelări cu parametrii cuanto-chimici.....	159
2.5.2. Corelări cu parametrii fizico-chimici.....	167
2.5.3. Corelări structură-activitate biologică în seria vinil-fosfaților prin metoda Free-Wilson.....	173
2.6. Corelări structură-activitate anticolinesterazică la compuși organofosforici din clasa S-alchil difenil tiofosfinaților.....	177
2.7. Corelări structură-activitate anticolinesterazică la compuși organofosforici din clasa O-alchil- O-(2-alchil mercaptoetil)-fenil fosfonaților.....	184
2.7.1. O-Etil-O-(2-alchil mercaptoetil) fenil fosfonați.....	184
2.7.2. O-Alchil-O-(2-metil mercaptoetil) fenil fosfonați.....	186
2.8. Corelări structură-activitate anticolinesterazică la compuși organofosforici din clasa O-alchil-S- (2-alchil mercaptoetil) metil tiofosfonaților.....	188
2.8.1. O-Etil-S-alchil tiofosfonați.....	189
2.8.2. O-Etil-S-(2-alchil mercaptoetil) metil fosfonați.....	191
2.8.3. O-Alchil-S- n-butil tiofosfonați.....	192
2.8.4. O-Alchil-S-(2-etil mercaptoetil) metil tiofosfonați.....	194

2.8.5. Metil sulfometilații de O-alchil-S-(2-alchil mercaptoetil)-metil tiofosfonații.....	194
2.9. Ipoteze privind activitatea "in vivo" a derivaților acidului tiofosfonic cu acțiune insecticidă decurgând din relația structură-activitate biologică.....	199
2.10. Corelări structură-activitate anticolinesterazică în seria O,O - dietil-N-acetil-N-fenil fosforamidelor.....	204
2.11. Corelări structură-activitate fungicidă în seria diamidelor și esteroamidelor acizilor tio- și ditiofosforici.....	208
2.12. Corelări structură-activitate biologică la derivații aziridinici fosforilați.....	217
3. Corelări cantitative structură-activitate biologică, mijloc de prevedere a structurilor optime pentru realizarea unor proprietăți pesticide date și de elucidare a mecanismului de acțiune la compuși organofosforici.....	223

Capitolul IV.

SINTEZA SI APLICATIILE DIALCHIL ESTERILOR ACIDULUI 1 - HIDROXI-2,2,2 - TRICLORETAN FOSFONIC SI A DERIVATILOR LOR DE DEHIDRO-CLORURARE. ESTERI VINILICI (VINIL FOSFATI) SI DERIVATII BROMURATI AI ACESTORA

1. Sinteza esterilor dialchilici ai acidului 1-hidroxi - 2,2,2-triclorețan fosfonic	229
1.2. Acțiune biologică	232
2. Preparate pesticide cu efect în stare gazoasă pe bază de vinil fosfați (O,O-dialchil-O-2,2 - diclorvinil fosfați)	
2.1. Sinteza	232
2.2. Acțiune biologică	234
3. 3.1. Sinteza unor O,O-dialchil-1,2-dibrom-2,2-diclor - etil fosfați	234
3.2. Acțiune biologică	235
4. Activitatea biologică cuplată	236
5. Condiționare	239
CONCLUZII	241
Literatura	249

I N T R O D U C E R E

Se apreciază că, în epoca actuală, pagubele produse de dăunători, adică de către viețuitoarele din regnul animal (insecte, rozătoare) și vegetal (bacterii, fungi) care distrug plantele de cultură, recoltele și periclitizează sănătatea animalelor și indirect sau direct și pe a omului, de bolile culturilor și de buruieni, au consecințe economice importante pe plan mondial. Astfel, ca urmare a acțiunii dăunătorilor, producția agricolă mondială suferă o pierdere îngrijorătoare: 20-30% (1) [1-4]. De asemenea trebuie menționate pagubele însemnate datorate dăunătorilor în silvicultură, zootehnie, în depozitele agroalimentare și în industrie precum și consecințele nefaste determinate de agenții transmițători de boli (malaria, tifos, boala somnului etc.) [5].

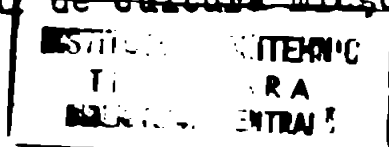
Pierderile extrem de mari pe care le pricinuiesc dăunătorii, bolile culturilor agricole și buruienile au fost calculate (tabelul 1) și s-a estimat că, la o valoare a recoltei mondiale de 140 miliarde dolari pe an, ele se ridică la suma de 75 miliarde dolari [6-7].

Tabelul 1.

C u l t u r a	Recoltă obținută mil.t/an	Pierderi din recoltă mil.t/an	% pierderi
Cereale	960-1000	500-590	34,00
Sfeclă de zahăr	211	69,0	24,64
Sfeclă furajeră	483,4	566,8	53,97
Cartofi	270,8	129,1	32,28
Struguri	50,7	26,6	34,41
Bumbac	11,06	5,69	33,97
Soia	31,98	13,07	29,01
Fructe	66,6	21,4	24,32
Legume	201,7	78,2	27,94

O familie de șobolani de câmp și urmașii rezultați, provoacă recoltelor de cereale o pagubă de 400 de ruble anual. Parazitul de piele al animalelor producătoare de lapte afectează producția de lactate din U.R.S.S., cu o jumătate de miliard ruble.

Buruienile culturilor modificând sensibil conținutul de umiditate și substanțe nutritive al terenului de cultură micșorează mult recoltele obținute.



După K. Robbins [8], din cele trei categorii de pierderi pe care suferă producția agricolă - boli, dăunători și buruieni - acestea din urmă provoacă cele mai mari daune, în timp ce Cramer [6] apreciază că pagubele produse pe plan mondial sînt datorate în proporție de 9,5% buruienilor, 11,6% bolilor, iar 13,8% dăunătorilor.

Preocuparea omului pentru combaterea dăunătorilor, bolilor și buruienilor datează din cele mai vechi timpuri dar, pînă nu demult afirmația că "mîncăm ceea ce lăsam dăunătorii" nu era cu nimic exagerată.

Eficacitatea combaterii dăunătorilor este legată indispensabil de găsirea unor metode și mijloace chimice corespunzătoare.

Denumirea de antidăunători se referă la substanțele care prin proprietățile lor toxice speciale pot fi utilizate la combaterea dăunătorilor. Ea constituie echivalentul în limba română al termenului german Schädlingsbekämpfungsmittel și pare a fi mai general decît termenul din limba engleză de pesticide [9].

Antidăunătorii, produși naturali și de sinteză, ocupă un domeniu de substanțe chimice stît de vast încît clasificarea lor, bazată pe anumite criterii, este absolut necesară.

Grupînd substanțele după natura dăunătorului asupra căruia acționează se disting:

1. substanțe utilizate pentru combaterea dăunătorilor **animali:**

- insecticide
- acaricide
- rodenticide

2. substanțe utilizate pentru combaterea bolilor plantelor (fungicide)

3. substanțe utilizate pentru combaterea buruienilor (ierbicide)

Pentru fiecare din cele trei grupe de antidăunători, astfel delimitate, sînt operante clasificări în funcție de efectul fiziologic produs și în funcție de modul de pătrundere în organism.

Astfel, combaterea insectelor poate fi realizată cu:

- insecticide = substanțe care provoacă moartea insectelor
- repelenți (insectifuge) = substanțe cu acțiune repulsivă
- atractanți = substanțe care atrag insectele pentru o distrugere masivă
- chemosterilizanți = substanțe care împiedică înmulțirea insectelor

- ovicide = substanțe cu efect specific asupra ouălelor de insecte

Acestea, după modul cum pătrund în organism pot fi:

- insecticide de ingestie
- insecticide de contact
- insecticide de respirație
- insecticide sistemice

Cercetări teoretice și sinteze de substanțe noi au adăugat noi categorii de pesticide cu destinație și efecte specifice, cum ar fi: stimulatorii și inhibitorii (regulatorii) creșterii plantelor, defoliantele, desicantele.

Eficacitatea utilizării pesticidelor la diferite culturi este remarcabilă și ea poate fi ilustrată prin datele sintetice culses de la fermierii și entomologii americani, comunicate în tabelul [2] [5] .

Tabelul 2

Cultura	% recoltă pierdută		Creșterea recoltei în urma tratării chimice (nr. de ori)
	în absența tratării chimice	la tratarea chimică	
Mazăre	66	13	2,6
Struguri	77	11	4,8
Vișine	78	8,5	4,0
Fragi	34	13,5	1,3
Cereale	13,5	12	1,1
Varză	82	12	4,9
Cartofi	72	15	3,0
Cospă	64	9	2,5
Roșii	32	15	1,7
Mere și pere	93	15	12

Eficiența utilizării pesticidelor în scopul eradicării unor boli provocate oamenilor prin intermediul unor insecte este de asemenea impresionantă, așa cum arată și următorul exemplu dat de Burnside [10] : înainte utilizării de insecticide în Sri Lanka se înregistrau anual 2.000.000 cazuri de malarie. Utilizarea sistematică a D.D.T-ului pentru stîrpierea agentului purtător -

Anopheles maculipennis - a făcut ca în 1964 numărul celor bolnavi de malarie să scadă la 13 (!!!), pentru ca la întreruperea folosirii acestuia, în anul 1968 această cifră să depășească 1.000.000.

Înalte eficacitate în combaterea dăunătorilor și implicit aportul substanțial, alături de îngrășămintele chimice, în obținerea unor producții agricole mult sporite, efectele pozitive în domeniul sănătății omului și animalelor domestice, evitarea degradării unor materii și materiale de mare interes economic, a impus

dezvoltarea continuă a sortimentului de antidăunători, atât ca gamă de produse cât și sub raportul cantităților utilizate.

Dacă în 1960 numărul de sortimente de antidăunători utilizate practic era apreciat la 80-100 [11-13], după date recente [1,2], [5], în unele țări se produc în prezent peste 100.000 de preparate comerciale condiționate pe baza a peste 900 de substanțe chimice active aparținând la cele mai diferite clase de combinații organice și anorganice.

Este interesant de urmărit dinamica producției de pesticide, precum și evoluția ponderii diferitelor clase de antidăunători în valoarea producției globale. Astfel, în tabelul 3, sînt prezentate cantitățile de pesticide produse și vîndute (precum și valoarea acestora la prețurile optime din S.U.A. în perioada 1947-1980, [14-16], iar în figura 1 distribuția pe categorii a acestei producții între 1962 și 1975 [17].

În U.R.S.S. producția de pesticide (în mii de tone) a evoluat astfel: 103,2 în 1962; 163,8 în 1970; 173 în 1972; 256,6 în 1975 și se prevede obținerea în anul 1980 a 455 mii de tone [18].

Producția mondială de pesticide a fost estimată valoric la 11 miliarde mărci vest-germane în 1972; 16 miliarde în 1975 și anticipîndu-se, la 24 miliarde mărci în 1980 [19,20].

Indice de asemenea important pentru relevarea aspectelor de conținut ale chimizării agriculturii este raportul producțiilor valorice de pesticide și îngrășăminte chimice. În anul 1969, acest indice a fost de 34% în R.F.G. și 40% în Japonia. În S.U.A., în 1975, el este de 61,5% și va ajunge la 58,9% în anul 1980 [15-16].

Producția și sortimentul de antidăunători din țara noastră sînt în continuă creștere urmărindu-se în același timp o dezvoltare cât mai echilibrată a diferitelor categorii de antidăunători.

Astfel, producția de ierbicide și cea de fungicide este în prezent preponderentă față de cea a insecticidelor.

Directivele Congresului al XI-lea al R.C.R. privind "dezvoltarea și modernizarea agriculturii pentru ridicarea ei la nivelul statelor avansate" prevăd, printre alte importante măsuri, că "producția de îngrășăminte chimice va spori în 1990 de aproape 3 ori față de 1975 și vor fi acoperite necesitățile interne de antidăunători și biostimulatori" [21].

Legat de aceste prevederi, la Congresul al XI-lea, s-a formulat ca fiind una dintre direcțiile prioritare ale activității de cercetare "dezvoltarea și diversificarea producției de pesticide în vederea satisfacerii cerințelor agriculturii" [22].

Tabelul 3.

Anul	Producție		Vânzare	
	mii tone	mil. dolari	mii tone	mil. dolari
1947	56,4	-	-	-
1952	139,6	-	-	-
1957	232,2	-	-	-
1961	317,1	-	-	-
1962	331,3	427,4	287,8	346,3
1963	346,6	456,8	295,8	369,1
1964	355,4	481,9	314,3	427,1
1965	398,4	582,9	356,8	497,0
1966	459,9	727,7	373,3	583,8
1967	476,5	914,0	407,4	787,0
1968	540,7	-	434,5	900,0
1969	501,2	-	421,8	1015
1975		2000		
1980*		2800		

* Date de prognoză

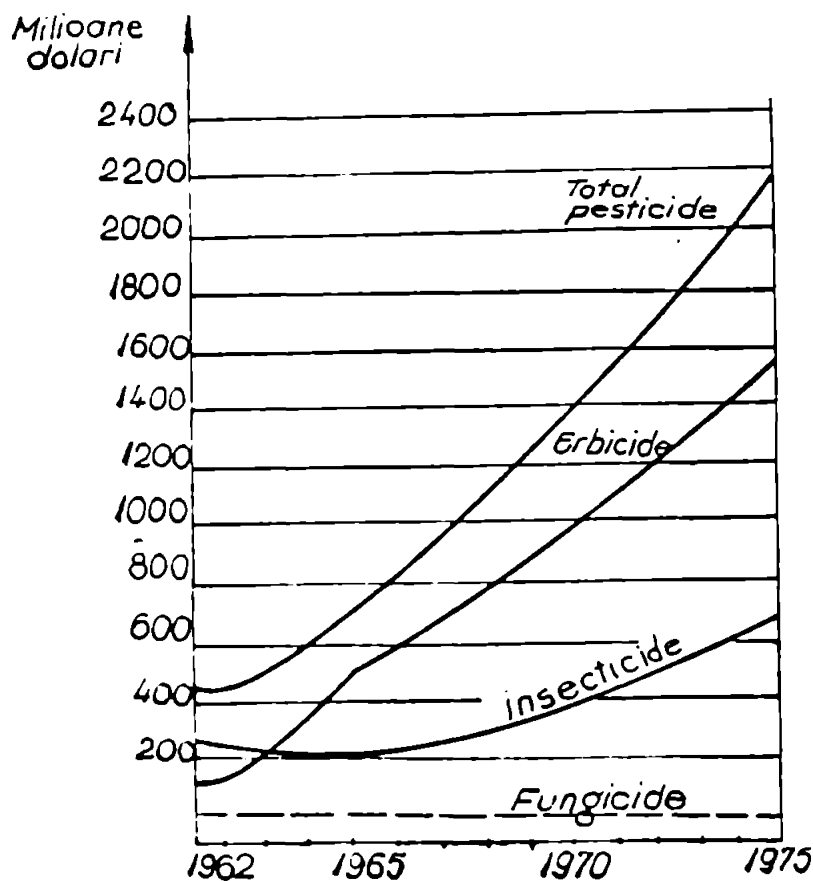


Fig.1.

Cercetările pentru obținerea unui pesticid cu acțiune dorită, producerea lui la scară industrială și administrarea în cantități corespunzătoare, trebuie să aibă la bază criteriul economic. Atingerea eficienței economice maxime, realizarea optimă a unor cerințe legate de calitățile produsului chimic și de aplicarea antidăunătorului. Prima categorie se referă la:

- toxicitatea față de dăunător
- toxicitatea față de mamifere
- toxicitatea față de plantele tratate
- rezistența dăunătorilor față de produsul chimic

iar cea de a doua la:

- modul de condiționare și efectuare a tratamentului
- costul tratamentului
- gradul de infectare al culturii
- valoarea culturii tratate
- remanența în plante și sol

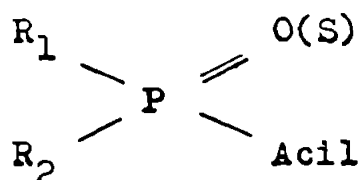
Rezolvarea optimă a tuturor acestor cerințe ar trebui să furnizeze antidăunătorul ideal care ar fi un toxic selectiv, față de dăunătorul animal sau vegetal combătut, lipsit de toxicitate față de om și viețuitoarele folositoare, inofensiv față de plantele tratate, cu acțiune rapidă. Un asemenea compus ideal nu va lăsa reziduurile toxice pe plante sau alimente, va fi stabil la depozitare și utilizare va acționa eficient în doze mici, se va fabrica ușor și va fi ieftin [5] , [9] .

Cum pînă în prezent asemenea substanță nu a fost găsită, numeroase cercetări actuale și de perspectivă își propun obținerea sau "redescoperirea" unor compuși cu caracteristici cît mai apropiate de cele ale modelului ideal. O cercetare de asemenea amploare pentru găsirea unui pesticid cu acțiune optimă reclamă utilizarea unei metodologii sau, mai degrabă, a unei strategii extrem de bine pusă la punct, prin care să fie investigată cu investiții minime și în timp scurt o imensă varietate de structuri chimice.

Astăzi este unanim acceptat că relația structură-activitate este cel mai important criteriu pentru ordonarea datelor experimentale extrem de bogate, pentru formularea unor generalizări care să țină seama de acestea și care să servească astfel pentru "prezicerea" și sinteza unor substanțe cu proprietăți prestabilite.

Relația structură-activitate biologică a fost aplicată pînă nu demult doar sub formă calitativă, operîndu-se cu ipoteze că "orice asemănare de structură implică și o activitate biologică asemănă-

toare". Astfel, în cadrul compușilor organofosforici, după lucrările lui Schrader din 1937, cercetările întreprinse pentru obținerea de pesticide s-au axat în principal pe variația în limite largi a substituenților din "formule acil" :



Urmînd această cale s-au obținut pesticide valoroase dar rezultatele multor cercetări nu au fost cele scontate din cauză că raportul real dintre numărul de reprezentanți testați și cel al compușilor activi biologic utilizabili (5000 : 1) implică în cazul unor investigații nesistematice și exhaustive o doză mare de hazard.

Lipsurile acestei ipoteze simple - "similitudine structurală = similitudine a acțiunii biologice" - sînt determinate de faptul că uneori termenul de structură chimică este luat în sensul formulei de structură clasică, pierzîndu-se din vedere aranjamentul complex al atomilor în edificiul moleculei, distribuția conținutului energetic și forțele de interacțiune care operează, distribuția densității electronice și mobilitatea sarcinilor în moleculă [23] .

Avînd în vedere numărul foarte mare de substanțe biologice active, numărul mare de factori care determină activitatea lor, abordarea relației structură-activitate biologică pe o bază cantitativă și raționalizarea cu succes a problemei găsirii structurilor cu activitate dorită, a fost posibilă numai după introducerea pe scară largă a calculatoarelor electronice.

Incepînd cu anii 1964-1975, s-au conturat două concepții de bază privind relația cantitativă între structură chimică și activitatea biologică, ambele făcînd uz de calculatoare electronice. Conform primei concepții, care se bazează pe lucrările lui Bruice, Kharasch și Winzler [24] și care a fost generalizată de Free și Wilson [25] , corelarea se face cu ajutorul unui model matematic care se bazează pe ideea unei contribuții independente și aditive a substituenților greșați pe un schelet molecular ce se menține constant la toată seria de compuși. Această idee de bază a fost aprofundată de Purcell și colaboratori [26-30] , de Kopecky și colaboratori [31-32] și respectiv de Fujita și Ban [33-34] .



Cea de a doua metodă corelează activitatea biologică cu parametri fizico-chimici definiți termodinamic și care prin relații liniare de energie liberă [35-37] de tipul ecuațiilor Hammett [38-40] și Taft [41-42], folosite în studiul cantitativ al reactivității combinațiilor organice. Acest model, elaborat de Hansch și colaboratori [43-45] pe baza unor lucrări în domeniul regulatorilor creșterii plantelor, a fost denumit extratermodinamic deoarece, deși parametri utilizați sunt definiți termodinamic ei nu sunt legați direct termodinamic de sistemul biologic.

Oportunitatea utilizării acestor metode este justificată de posibilitatea prezicerii corecte a activității pesticide a unor compuși, deși deocamdată aceasta este posibil doar pentru seriile ale căror reprezentanți se încadrează într-un mod de acțiune clar definit. În acest fel se poate restrânge considerabil numărul compușilor sintetizați și recomandați pentru testarea ca anti-dăunători, ceea ce înseamnă o reducere însemnată a unor eforturi financiare considerabile, o micșorare corespunzătoare a volumului de muncă, scurtaarea timpului necesar pentru consacrarea unui compus ca pesticid produs și utilizat pe scară largă, cu eficacitatea economică corespunzătoare.

Urișul efort depus pentru obținerea de noi pesticide absorbe investiții de sute de mii de dolari anual. Un exemplu concludent îl constituie programul Organizației Mondiale a Sănătății elaborat în anul 1960 și desfășurat în perioada 1961-1970, cu participarea a 43 de laboratoare de cercetare din universități, institute guvernamentale și departamentale ale industriei chimice, pentru obținerea și testarea unor noi insecticide subordonate unei campanii mondiale de eradicare a malariei. 1265 de compuși au fost luați în cercetare conform unei eșalonări prezentate în fig.2 și repartizați din punct de vedere al structurii chimice conform diagramei din figura 3.

După parcurgerea a șase etape ale căror obiective au fost clar definite și repartizate într-o structură organizatorică foarte bine pusă la punct, doar trei compuși au îndeplinit toate condițiile impuse (Figura 4) [46]. De reținut că numai testarea completă a unui compus pe diferite sisteme biologice este evaluată la circa 100 de dolari.

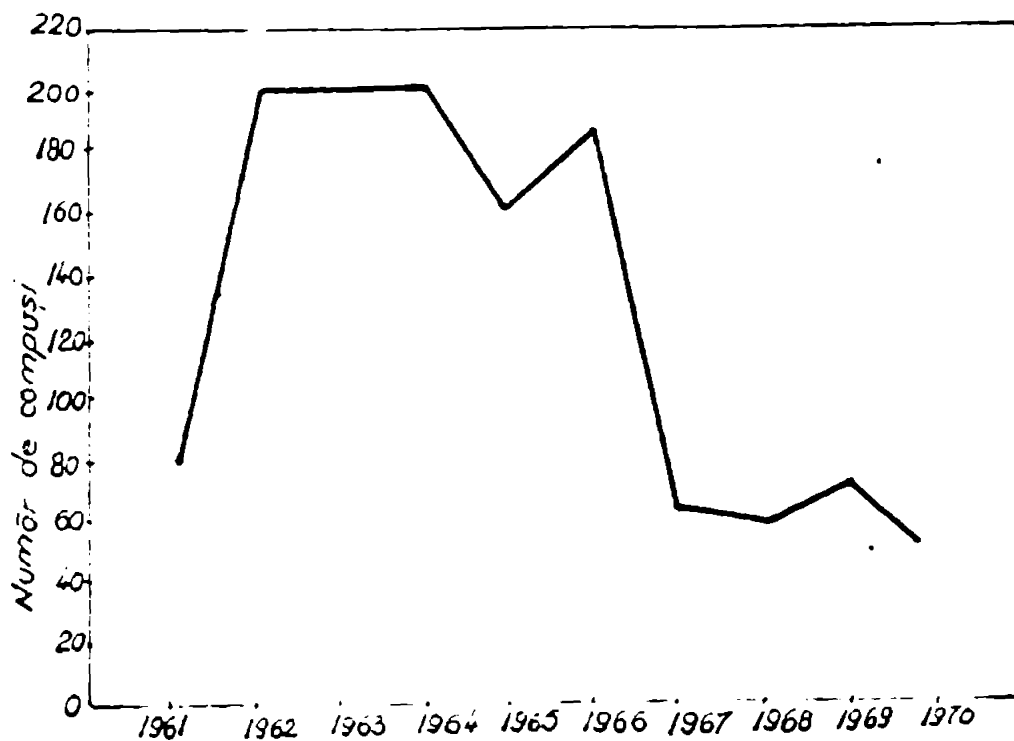
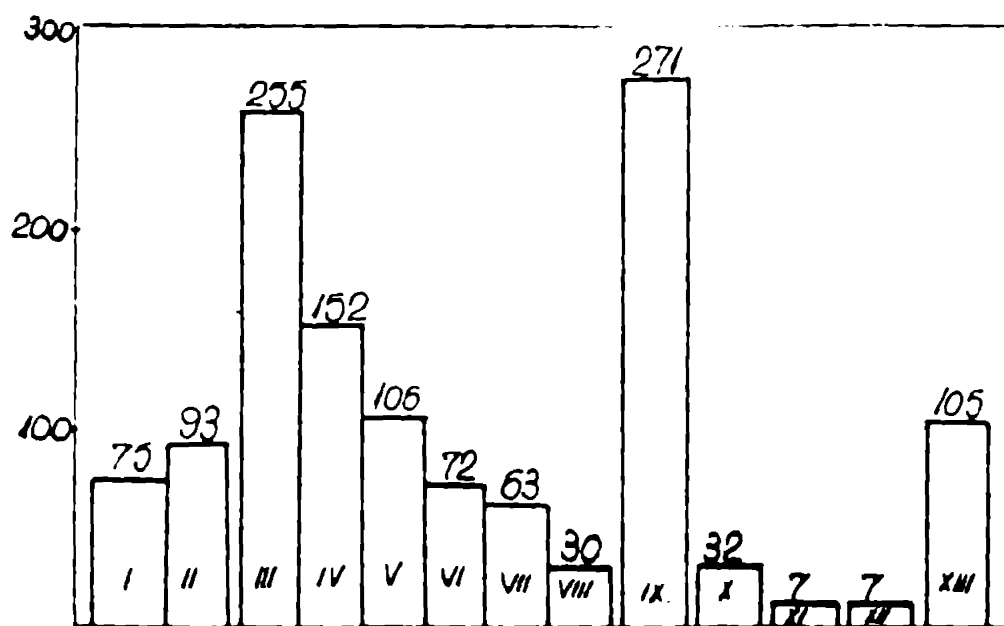
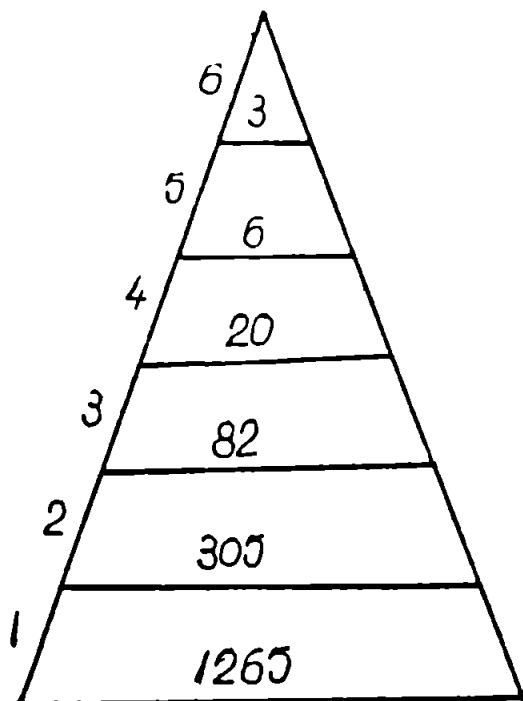


Fig.2.



- I - compuși organo-clorurați
- II - analogi D.D.T.
- III - fosforotioați
- IV - fosforamidotioați
- V - fosfonotioați
- VI - fosfați
- VII - fosfonamide
- VIII - fosfonați
- IX - carbamați
- X - organotine
- XI - imidezoli
- XII - piretoide
- XIII - amestecuri

Fig.3.



- 1 - compuși testați în etapa I
- 2 - compuși recomandați pentru etapele II și III
- 3 - compuși recomandați pentru etapa IV
- 4 - compuși recomandați pentru etapa V
- 5 - compuși recomandați pentru etapa VI
- 6 - compuși recomandați pentru utilizare

Fig.4.

În anul 1970, la Timișoara, câțiva cercetători grupați în jurul Conf.dr.R.Vîlceanu și Prof.dr.Z.Simon au abordat problema relațiilor cantitative structură-activitate biologică ca mijloc de selectare a unor structuri active, cu proprietăți biologice, în speță pesticide, prestabilite. Rezultatele încurajatoare obținute de acest colectiv, în colaborare rodnică cu alte colective din țară, au creat posibilitatea elaborării unei strategii pentru obținerea unor noi pesticide pe baza unor criterii de selecție impuse și verificate prin ecuații corelaționale ce definesc dependența efect biologic - constituție chimică;

$$\phi = f (C)$$

prin forme explicite în care intervin parametrii structurali.

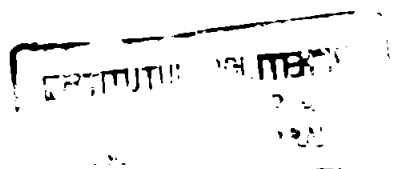
Aplicarea ei în cadrul Centrului de Cercetări Chimice din Timișoara a condus deja la obținerea unor rezultate promițătoare.

Unul dintre parametrii de corelare, diferența sterică minimă, M.S.D., a fost introdus de către colectivul menționat.

Aprecierile pozitive făcute lucrărilor publicate de R.Vîlceanu, Z.Simon și colaboratori, schimbul de informații științifice și interesul unor cercetători renumiți în domeniu ca C.Hensch, R.Aldrigo, T.R.Fukuto ș.a. au încurajat în special pe cei a căror pregătire științifică era în plină formare.

Interesul aplicativ al cercetărilor întreprinse a fost confirmat prin solicitarea rezultatelor obținute în acest colectiv de către o serie de institute experimentale de testare și aplicare a compușilor biologic activi ca și prin unele propuneri de colaborare din partea acestora.

Autoorul acestei teze de doctorat face parte din acest colectiv și contribuția sa care se referă la elaborarea unor criterii de selectare a structurilor cu acțiune pesticidă în cadrul compușilor organo-fosforici este rodul îndrumărilor primite și a muncii desfășurate alături de colegi, într-o atmosferă de fructuoase dezbateri pe teme științifice.



C a p i t o l u l I

CARACTERIZAREA GENERALA A ACTIUNII PESTICIDE A COMBINATIILOR ORGANOFOSFORICE

I. Aspecte generale. Tipuri de acțiune.

Una dintre cele mai importante clase de pesticide este aceea a combinațiilor organo-fosforice (C.O.F.) din care peste 100 sînt utilizate în mod curent în agricultură, într-un număr de peste 150 sortimente. Larga lor întrebuintare în agricultură le situează ca importanță în imediate apropiere a compușilor organoclorurați, producția mondială actuală atîngînd 150.000 tone/an.

Dezvoltarea vertiginoasă a producției de C.O.F. se explică prin o serie de proprietăți avantajoase, cele mai importante fiind:

a) o activitate pesticidă ridicată și un larg spectru de acțiune în combaterea dăunătorilor,

b) posibilitatea de a se obține combinații cu cea mai variată persistență, descompunerea acestora în cele mai diferite organisme animale conducînd la formarea de combinații practic netoxice pentru om și animale,

c) un metabolism rapid în organismul vertebratelor, absența capacității de a se depune în aceste organisme, precum și toxicitatea cronică relativ mică (uneori chiar lipsă),

d) acțiunea sistemică a unor preparate,

e) o slabă descompunere a preparatului pe unitatea de suprafață tratată și acțiunea rapidă asupra dăunătorilor culturilor și paraziților animalelor,

f) o rapidă descompunere în sol și toxicitatea medie față de pești.

Dintre dezavantajele majorității C.O.F. cea mai importantă este relativ înalta toxicitate reziduală față de vertebrate, ceea ce impune respectarea unor măsuri corespunzătoare de protecție la manipularea și întrebuintarea lor. Totuși, în ultimii ani, s-a sintetizat un număr însemnat de C.O.F. cu toxicitate medie sau scăzută pentru mamifere, care sînt utilizate în agricultură fără nici un pericol.

Din punct de vedere al tipului de dăunători asupra cărora are efect pesticid, C.O.F. pot manifesta proprietăți insecticide, acaricide, nematocide, ierbicide, defoliate, fungicide.

Ele joacă de asemenea un rol important ca mijloc de luptă împotriva ekto - și a unei părți din endo - paraziții animalelor domestice.

Din punct de vedere al modului de pătrundere în organism C.O.F pot fi:

- a) de ingestie - pătrund în organism prin cavitatea bucală și își exercită acțiunea după digerare,
- b) de contact - pătrund în organism prin tegument sau epidermă,
- c) de respirație - pătrund în organism prin căile respiratorii,
- d) sistemice - întrunind proprietăți comune tipurilor a,b,c; în mod caracteristic, pătrund în plantă prin rădăcină, tulpină sau frunze și sînt transportate prin sevă în țesuturi în concentrații suficiente pentru a provoca moartea viețuitoarelor care se hrănesc cu plante respectivă. O serie de insecticide organofosforice sistemice sînt exudate de plante și acționează apoi ca insecticide de respirație sau de contact. În acest fel insecticidele sistemice combat în mod eficace și selectiv insectele dăunătoare ce vin în contact cu plante [9] .

2. Mecanismul de acțiune

În prezent este unanim acceptat că pesticidele organo-fosforice acționează ca toxice ale sistemului nervos la nivelul sinapselor, prin inhibarea colinesterazei [7] , [47-61] . Pentru a înțelege mecanismul de acțiune al C.O.F. ca inhibitor colinesterazici a fost necesar să facă apel la rezultatele cercetărilor privind mecanismul transmiterii colinergice a excitației nervoase.

Celula nervoasă, neuronul, este componenta fundamentală a sistemului nervos, iar impulsul nervos este primit prin dendrite și transmis prin axon (transmisie axonică). La nivelul joncțiunii dintre doi neuroni transmisie are loc în sinapsă (transmisie sinaptică).

Sinapsa este formată dintr-o membrană presinaptică și una postsinaptică distanțate între ele la 100-200 Å .

Transmisie axonică este de natură electrică și se stinge în contact cu o sinapsă. Transmisie sinaptică are loc prin intermediul unui mediator chimic, un neurohormon care se eliberează în vecinătatea membranei presinaptice. Mediatorul chimic trece prin sinapsă și determină:

- un nou potențial de acțiune dacă sinapsa este între doi neuroni,

- o acțiune dacă sinapsa este între neuron și efector.

După natura mediatorului chimic sinapsele pot fi adrenergice (mediator = adrenalină și noradrenalină) sau colinergice (mediator = acetilcolina).

Distribuția și tipul sinapselor în sistemul nervos al vertebratelor rezultă din schema acestuia, prezentată în figura 5. (la insecte corespondentul sistemului nervos central este șirul de ganglioni ventrali) [7], [9], [56], [60].

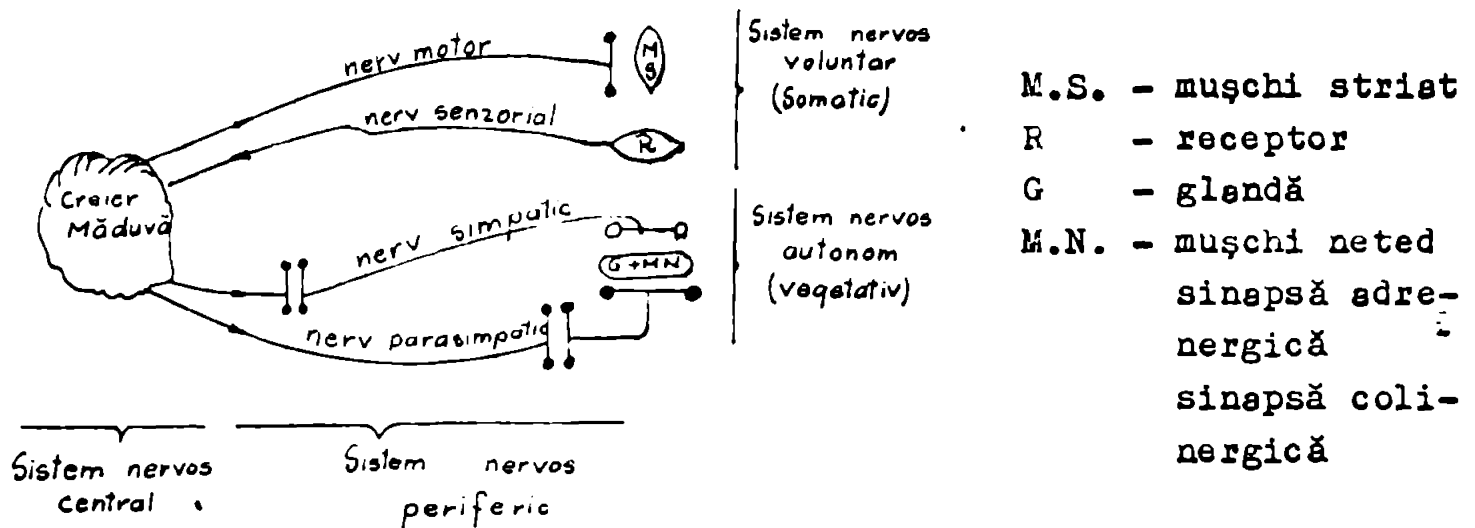


Fig.5.

Joncțiunile colinergice depind de natura membranei postsinaptice și sînt de două tipuri, după cum sînt stimulate de nicotină sau muscarină.

Acetilcolina, ca mediator chimic de pe partea presinaptică, are rolul de a stimula receptorul (plăca postsinaptică) producînd depolarizarea acestuia. Pentru a reface sensibilitatea membranei sinaptice, trebuie eliminat mediatorul chimic transmițător. În transmisia colinergică această eliminare este realizată de o enzimă: colinesteraza.

Ca enzimă proteică, colinesteraze prezintă o ordine determinată de aranjare a aminoacizilor constituenți: ... glicil-aspartil (sau glutamil) - seril - glicil (sau alanil) - ... Pe această structură se disting două centre active: unul anionic și altul esteric. Centrul anionic conține grupe $-COO^-$, probabil dintr-un rest de acid glutamic sau aspartic, alături de o grupă bazică (rest imidazolic din histidină) și are rolul de a fixe porțiunea cationică a acetilcolinei. Centrul esteric conține o grupare de

alcool primar serinic alături de o grupare acidă și de un rest bazic (probabil din histidină) și are rolul de a elimina gruparea acetil din acetilcolină. De asemenea se pare că în imediata vecinătate a centrelor active de lângă ciclul imidazolic al histidinei se află și hidroxilul fenolic al tiroșinei [56-58].

Schema centrelor active din colinesteraze este redată în figura 6.

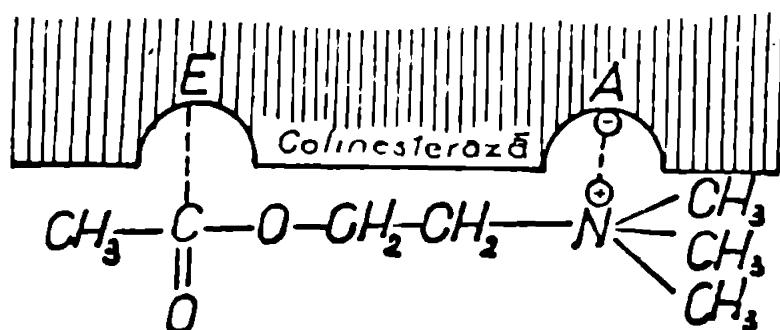
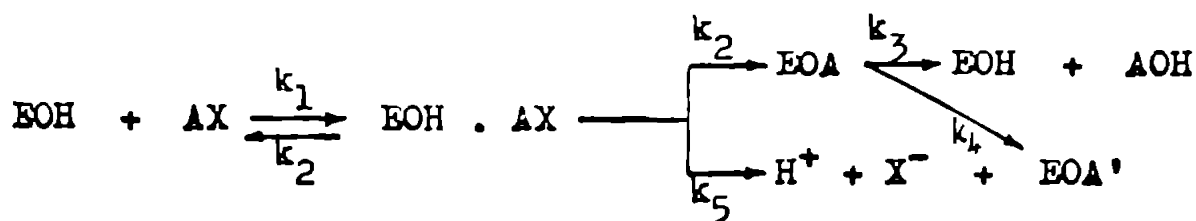


Fig.6.

Pentru modul de acțiune al colinesterazei există mai multe interpretări dar în prezent este unanim admisă valabilitatea următoarei scheme generale, în care aceasta intervine ca hidrolază a acetilcolinei:



în care EOH reprezintă colinesteraza, iar AX substratul -acetilcolina.

În prima etapă are loc fixarea substratului pe enzimă cu formarea complexului EOH · AX, iar în a doua etapă reacția dintre enzimă și substrat în care se formează acetilcolinesteraza și se pune în libertate colina, care va participa la un nou proces.

Sorbția acetilcolinei pe centrul anionic fixează mediatorul chimic pe suprafața fermentului și astfel reacția este mult facilitată. Procesul de transesterificare între AcCol și colines-

terază al grupării acetil, decurge, după cum se pare, [48] , [62-63] , după mecanismul " cheie în lacăt" prezentat schematic în fig.7.

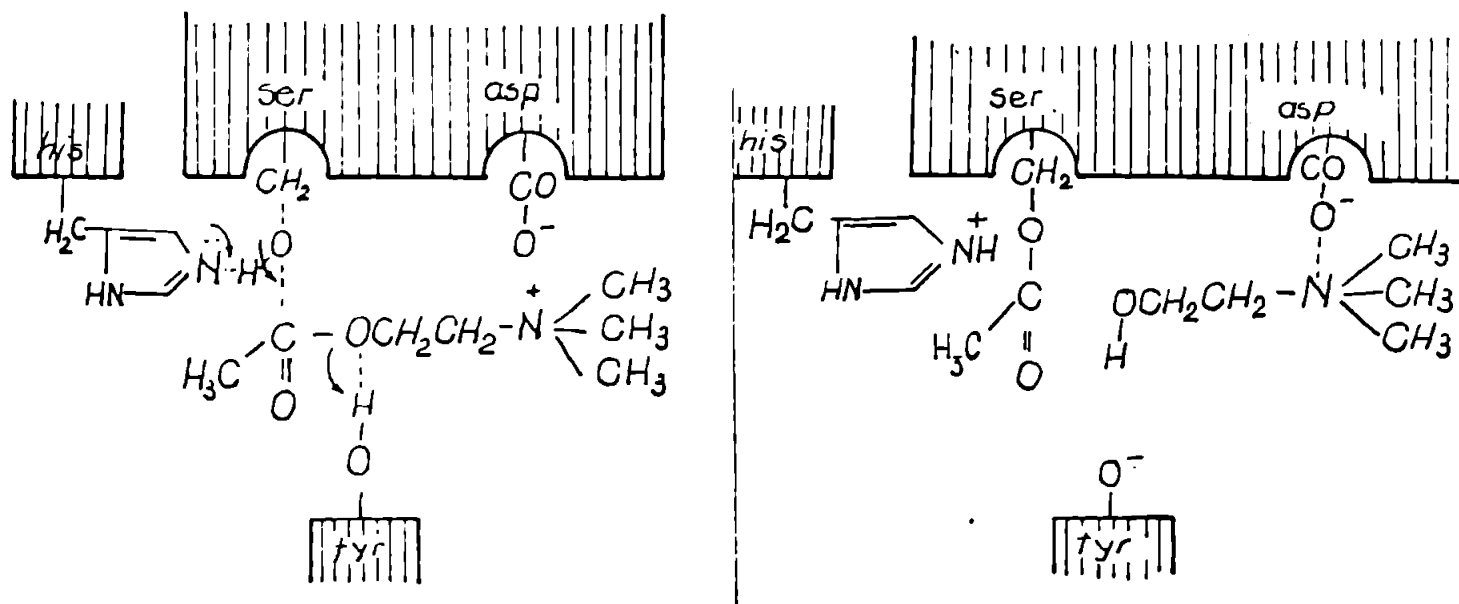


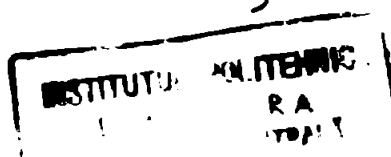
Fig.7.

Partea cationică a substratului este fixată prin forțe coulombiene la centrul anionic, iar carbonul grupării esterice (care este electrophil) este legat de asemenea coulombian la grupa bazică (nucleofilă) a centrului esteric cu care va forma astfel o legătură covalentă. Această etapă a reacției este o deplasare electro-meră care implică tranziția cooperatională a protonului de la tirozină la histidină și este determinată de viteză. În etapa următoare, de sorbție a colinei și hidroliza în prezența apei a fermentului acetilat, decurge ca o deplasare electromeră reversibilă și ca o tranziție cooperatională reversibilă (fig.8). Regenerarea fermentului încheie ciclul transformărilor.

O corespondență strictă din punct de vedere esteric și al polarității între mediator și ferment reprezintă o cerință fundamentală impusă de desfășurarea reacției și explică caracterul selectiv al acesteia. Cerința sterică impusă centrului anionic constă în adaptarea sa în mod corespunzător la gruparea $-N^+(CH_3)_3$ a acetilcolinei.

O serie de lucrări ale lui Friess și colaboratorii [64-66] confirmă în esență teoria celor două situsuri active însă sugerează că centrul esteric se leagă mai degrabă la o grupare negativă a esterului decât la carbonul pozitiv al grupării carbonilic.

În cazul reacției cu acetilcolinesteraza etapa a 3-a este caracterizată printr-o valoare mare a constantei k_3 .



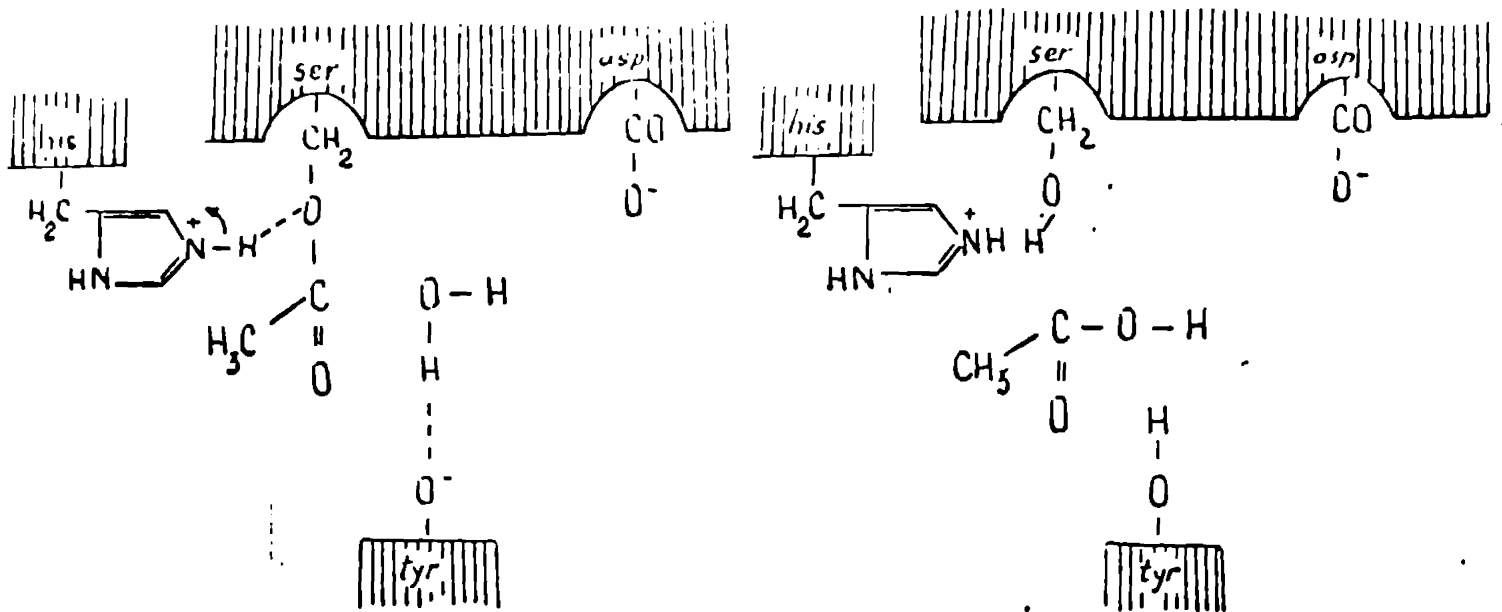


Fig.8.

C.O.F. determină o desfășurare foarte lentă a acestei etape, enzima este blocată și rămâne inactivă. Ca urmare în organism se acumulează acetilcolină, provocând tulburări în funcționarea sistemului nervos și în final moartea.

2.1. Reacții cu colinesteraze " in VITRO "

S-a demonstrat că inactivarea colinesterazei prin C.O.F. este rezultatul unei reacții chimice efective între enzimă și acestia. [50, 52, 53]. Procesul global de inhibare care conduce în cele din urmă la formarea unei legături covalente în enzima fosforilată poate fi descrisă după Krupka [66] prin ecuațiile din figura 9.

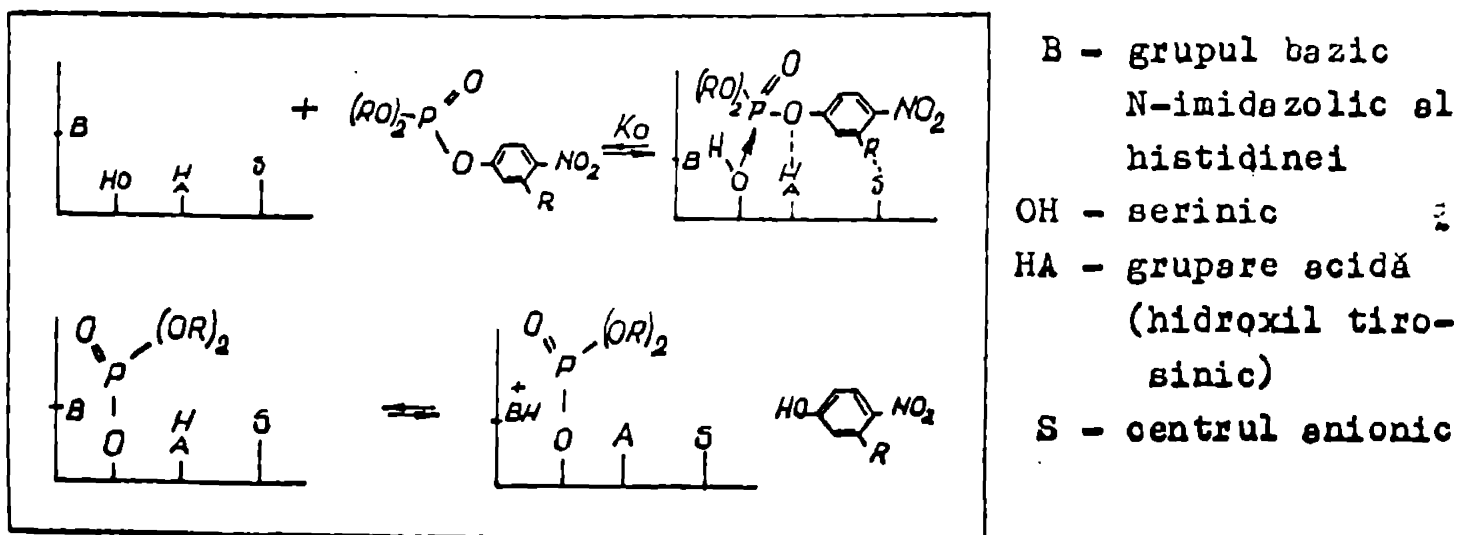


Fig.9.

Demonstrarea faptului că efectele toxice ale pesticidelor organelor fosforice sînt datorate în cea mai mare măsură inhibării colinesterazice a necesitat studiul smănușit al reacției C.O.F. cu colinesterază. Pentru simplificare, această reacție a fost urmărită "in vitro" în condiții în care a fost evitată acțiunea interferentă a altor enzime. În condițiile acestora, ea decurge după trei căi principale:

A) Reacția de fosforilare. Viteza acesteia depinde de "potrivirea" inhibitorului pe suprafața enzimei și de capacitatea fosforilării serinei din zona esterică a situsului activ, adică de mărirea sarcinii efective la atomul de fosfor. Un rol de asemenea important îl vor juca interacțiunile ionice și ion-dipol care contribuie la fixarea compusului organofosforic pe centrul anionic.

Natura radicalului scil influențează în mod hotărîtor, în timp ce modificarea grupărilor alcoxi are un efect limitat. Reacția între inhibitor și enzimă decurge după o cinetică simplă de proces bimolecular în care prima componentă este în mare exces. În consecință, evoluția reacției, pentru o concentrație de inhibitori dată, poate fi descrisă prin ecuația corespunzînd unei cinetici de ordinul unu [52], [67]:

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x} \quad (1)$$

în care k_1 - constanta de viteză, a - activitatea inițială a enzimei, x - activitatea enzimei după timpul t de menținere în contact cu inhibitorul de concentrație dată. Cum viteza este direct proporțională cu concentrația inhibitorului, I ,

$$k_1 = k_2 \cdot I \quad (2)$$

k_2 fiind constanta de viteză bimoleculară.

Deci

$$k_2 = \frac{k_1}{I} = \frac{2,303}{t \cdot I} \log \frac{a}{a-x} \quad (3)$$

sau

$$k_2 = \frac{2,303}{t \cdot I} \log \left(\frac{100}{P} \right) \quad (4)$$

în cazul în care prin P se exprimă procentul activității enzimei la timpul t .

Această cinetică a fost confirmată în cazul reacției majorității inhibitorilor cu colinesteraze [67-71]. S-a constatat că reacția de fosforilare are un caracter progresiv, prelungirea contactului inhibitor - enzimă ducînd la creșterea gradului de inhibare [72-73].

Deoarece o inhibare 100% este realizabilă doar într-un timp foarte lung, activitatea inhibitorului se exprimă prin concentrația sa molară necesară pentru inhibarea a 50% din enzimă. Această mărime, notată I_{50} sau $pI_{50} = -\log I_{50}$ depinde de timp și prin urmare trebuie precizată durata pentru determinare (de obicei 15 minute).

Parametrul cel mai corect utilizat în evaluarea "tăriei" unui inhibitor, adică afinității acestuia pentru centrele active ale colinesterazei, este constanta de viteză bimoleculară k_2 , la temperatură și pH date. Cele două mărimi I_{50} și k_2 , sînt interconvertibile:

$$k_2 = \frac{2,303}{t} \log\left(\frac{100}{P}\right) = 0,695/I_{50} \cdot t \quad (5)$$

Energie de activare a reacției de fosforilare este de 10-15 kcal/mol [69-71].

Intr-o serie de cazuri se constată că reacția dintre C.O.F și colinesteraze nu decurge după o cinetică de ordinul unu, ceea ce s-a explicat prin următoarele cauze posibile [52]:

a) compusul inhibitor poate conține una sau mai multe impurități anticolinesterazice [69],

b) enzima este "impusă" conținînd și alte enzime reactive sau componente competitive, cu centre active,

c) dacă inhibitorul este foarte activ, în condițiile experimentale poate să nu fie în mare exces față de centrele active ale colinesterazei,

d) C.O.F. (cazul fosforotionașilor) este foarte slab anticolinesterazic, formă activă constituind-o unul dintre produșii săi de metabolizare. În acest caz, slaba afinitate pentru centrele active mărește ponderea fosforilării nespecifice a altor resturi de aminoacizi ai enzimei proteice,

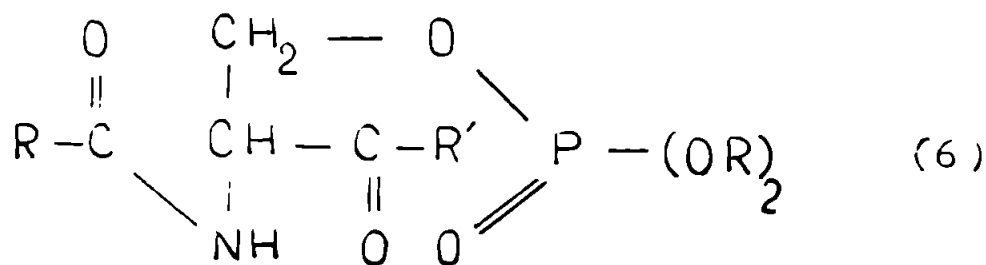
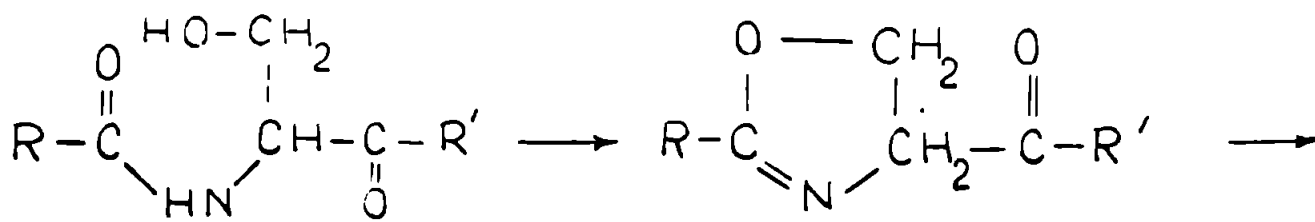
e) colinesteraza fosforilată poate fi reactivată printr-un proces spontan,

f) inhibitorul poate fi instabil sau hidrolizat de enzime. Inhibarea colinesterazică cu C.O.F. implică o fosforilare astfel încît se cere stabilit centrul din enzimă la care aceasta are loc. După unii autori [74] fosforilarea ar implica participarea restului histidinic, eventual, urmată de o transfosforilare a grupării OH - serinice [74]. Pentru aceasta pledează proprietățile intermediarului rezultat în reacția C.O.F. cu histidină, analogia de structură și comportare dintre situsurile esterice

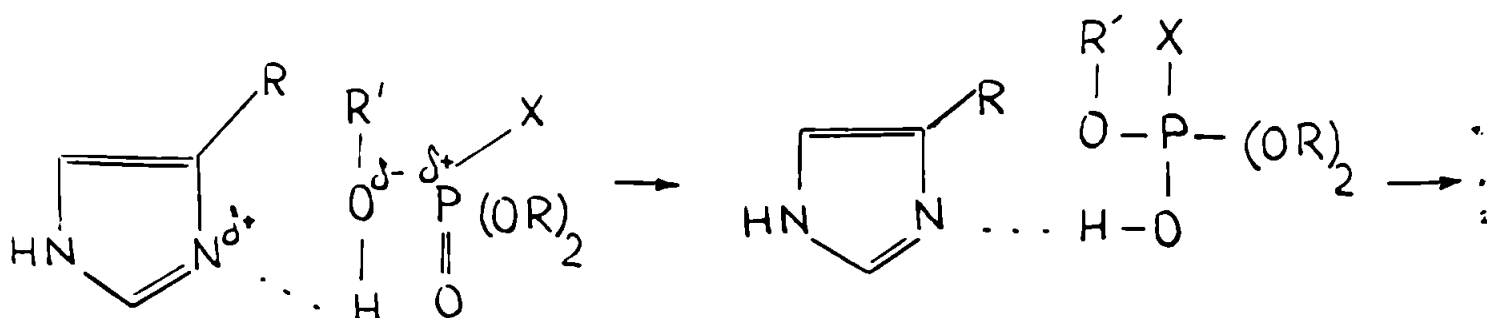
ele colinesterazei și chimotripsinei [75] ; $pK_g = 6,5$ [75-76] al grupării bazice din acest situs corespunde ciclului imidazolic din histidină.

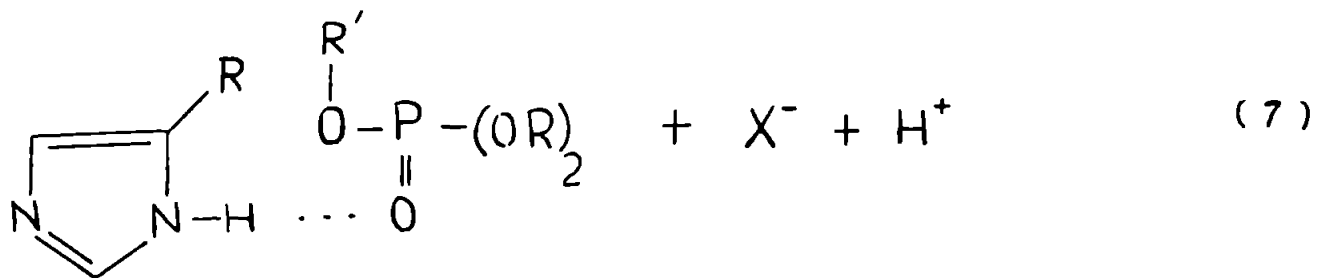
Un alt punct de vedere a fost formulat de Potter și colaboratori [77] care emit ipoteza că în fosforilare este implicat restul serinic. Acesta în cadrul centrului activ, poate trece într-o

Δ - oxazolină (6) care va fi atacată de compusul organofosforic.



Cunnigham [78] este de acord cu presupunerea că în fosforilare este implicată o "serină modificată" dar este de părere că "modificarea" serinei este datorată unui ciclu imidazolic vecin (probabil histidinic) care realizează o legătură de hidrogen cu OH - serinic. În acest fel oxigenul acestei grupări (δ^-) devine mai sensibil la atacul stomului de fosfor (δ^+) al C.O.F. (reacție 7).





Această ultimă ipoteză pare a fi cea care explică cel mai bine comportarea enzimei în reacția de fosforilare și a fost acceptată ca punct de plecare în aprofundarea mecanismului de acțiune al C.O.F. ca pesticide.

B. Reacția de reactivare a enzimei

Până nu demult s-a crezut că C.O.F. inhibă colinesterazele în mod ireversibil. S-a observat însă că, dacă enzimele inhibate sînt păstrate în timp, ele își recapătă încet activitatea. Viteza reacției de reactivare depinde nu atît de inhibitor cît de tipul de enzimă și de substituienții alchil, R, din compuși $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{X}$ [79-81]. Ea crește în ordinea: metil > etil > i-propil [82]. Reactivarea enzimei depinde de temperatură iar energia de activare este de circa 11-15 kcal/mol.

Reactivarea se poate realiza spontan sau sub influența unor agenți nucleofili puternici (indus) [83]. Derivații hidroxilaminei care induc reactivarea enzimei inhibate ating o eficacitate maximă în structurile în care gruparea reactivatoare este situată la o aceeași distanță de restul $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ca și aceea dintre centrul anionic și cel esteric din colinesterază.

Reactivarea indusă este influențată sensibil de temperatură și pH.

C. Reacția de "îmbătrînire" (inactivare ireversibilă)

S-a observat că reactivarea enzimei inhibate depinde de timpul cît enzima și inhibitorul au fost menținute în contact [88]. Cu cît acesta a fost mai mare, cu atît fracțiunea de enzimă inhibată care poate fi reactivată este mai mică. Explicația, după Hobbiger [88], ar consta în faptul că fosforilarea enzimei con-

duce inițial la o enzimă fosforilată "de tip I" care treptat trece în "tip II", printr-o transfosforilare. Tipul I de enzimă fosforilată poate fi ușor defosforilat cu ajutorul unor agenți nucleofili, în timp ce tipul II este ireversibil inactiv. El denumește acest proces "îmbătrânire".

După alți autori [89-91], tipul I constă din histidină fosforilată, iar tipul II din serină fosforilată obținută prin transfosforilare.

După Oosterbaan și colaboratorii [92] "îmbătrânirea" este rezultatul unui proces de desalchilare a enzimei fosforilate, adică a pierderii unei grupe alchil dintr-o grupare alcoxi atașată fosforului.

Viteza de "îmbătrânire" depinde de natura substituenților alcoxi [93-97] (crește în seria metil > etil > i-propil [81]), de temperatură și de pH (valori mari la pH - uri mici) [94].

Cunoașterea comportării sistemelor compuși organofosforici-colinesteraze "in vitro" reprezintă o etapă indispensabilă în descifrarea procesului complex dintre inhibitor și sistemul enzimatic al organismului. În acest sens, alături de reacțiile A, B și C menționate anterior, au fost studiate amănunțit degradarea enzimatică și activarea "in vitro" a compușilor organofosforici.

Degradarea enzimatică în organisme vii este o reacție posibilă pentru toți C.O.F.; în unele cazuri ea decurge foarte rapid. Studiul degradării "in vitro" oferă avantajul utilizării unor concentrații de inhibitor peste doza letală și posibilitatea analizei produșilor astfel rezultați, evitarea acțiunii simultane a mai multor enzime [52]. Degradarea se produce sub acțiunea fosfatezilor, o clasă de enzime care cuprinde diferite tipuri de hidrolaze, și ea constă în fapt într-o hidroliză a cărui produși, de tip anionic, sînt anticolinesterazici inactivi datorită efectului nucleofilic conferit de prezența sarcinii negative.

Fac excepție de la regula potrivit căreia hidroliza înseamnă degradare (detoxificarea compusului) acei C.O.F. care conțin o legătură esterică în cadrul grupării acil (ex. acetil dipterex), în care caz prin hidroliză activitatea anticolinesterazică a produșilor rezultați este mărită.

Din cercetarea unui număr mare de C.O.F. s-a constatat că marea lor majoritate nu sînt inhibitori direcți ai colinesterazei "in vitro". Ei devin însă acțivi "in vivo", această activare fiind datorată unor modificări structurale a "inhibitorilor latenți".

Astfel, activarea cea mai frecventă la tiocarbamizi este desulfurarea cu transformare în fosfații corespunzători, mult mai toxici (ex. paration). Alte posibilități de transformare în C.O.F. biologic activi prin "activare" sînt oxidarea sulfurului din tioeter la sulfoxizi (ex. sistox) sau a grupelor CH_3 în CH_2OH (ex. schradan).

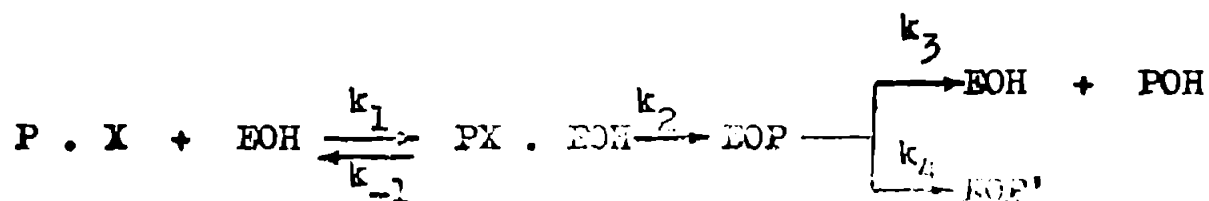
Activarea, extrem de dificil de studiat din cauza complexității procesului, poate fi realizată:

- a) "in vivo" în insecte și mamifere
- b) "in vitro" cu felii de ficat sau preparate din țesuturi întregi de insecte
- c) "in vitro" cu extracte de ficat special tratate.

2.2. Reacția inhibitorilor organofosforici cu colinesteraze "in vivo"

2.2.1. Etapile inhibării colinesterazice și efectele determinate.

Cercetări numeroase au fost consacrate elucidării condițiilor în care au loc etapele inhibării colinesterazice și efectelor astfel determinate [57] [100-113]. Ele au stabilit că toți inhibitorii colinesterazici organofosforici conțin un element structural similar părții esterice a mediatorului natural, acetilcolina, iar mecanismul complex de blocare a colinesterazei prin C.O.F. a fost reprezentat prin următoarea schemă de reacție [47], [49], [52], [54], [56], [58-60], [114], [115]:



PX reprezintă compusul organofosforic, EOH enzima, EOP enzima fosforizată.

Potrivit acestui mecanism, în prima etapă are loc o fixare a C.O.F. prin forțe de natură electrostatică pe enzimă cu formarea unui complex PX.EOH; în etapa următoare are loc reacția chimică de fosforilare prin care C.O.F. se leagă covalent de enzimă formând enzima fosforilată EOP. Regenerarea enzimei prin eliminarea restului fosfat din EOP decurge lent sau chiar nu are loc ceea ce are drept consecință blocarea enzimei și acumularea acetilcolinei în țesuturi, cauză esențială a fenomenului de intoxicare la insecte și vertebrate.

Modul cum interacționează centrele active ale colinesterazelor cu inhibitori organofosforici este indicat în figura 10.

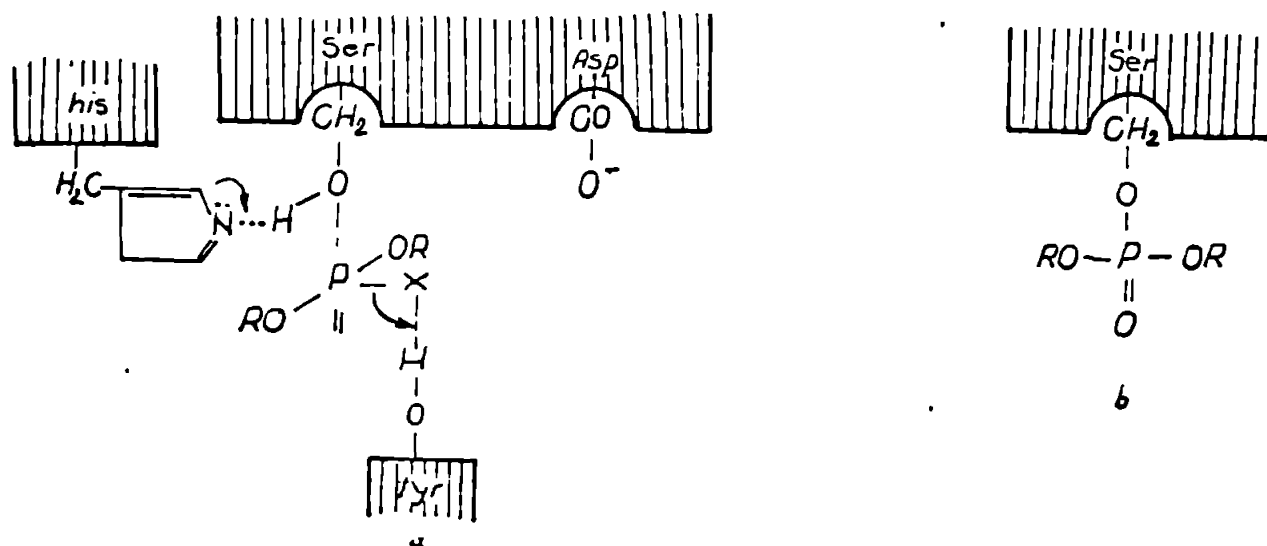


Fig.10

Activitatea inhibitorului depinde în primul rând de capacitatea sa de fosforilare, adică de mărimea sarcinii pozitive efective la atomul de fosfor. De asemenea, un rol important îl joacă și interacțiunile ion-ion și ion-dipol dar evaluarea exactă a contribuției fiecărui tip de interacțiune este extrem de dificilă [108], [109], [116].

S-a constatat [107-109], [117], că activitatea anticolinesterezică a C.O.F. crește mult (de sute sau chiar mii de ori) prin introducerea în grupa eliminantă a unui centru cationic. Creșterea este maximă atunci când atomul centrului cationic se află la aceeași distanță de atomul de fosfor ca și azotul cuaternar față de gruparea carbonilică în acetilcolină [108]. De asemenea, gruparea $C(CH_3)_3$, similară din punct de vedere steric celei $N^+(CH_3)_3$, situată la o distanță de atomul de fosfor corespunzând celei dintre centrele active ale substratului acetilcolinic, mărește sensibil activitatea inhibitorului [118]-[121]. Efectele menționate pot fi explicate prin aceea că inhibitorii organofosforici cu centru cationic reacționează nu numai cu situsul esteric al enzimei; analog acetilcolinei, ei sînt în prealabil sorbiți pe situsul anionic ceea ce determină o creștere bruscă a vitezei reacției de inhibare. În această interacțiune sînt implicate nu numai forțe de natură coulombiană. Existența în jurul centrelor active, anionic și esteric

ale colinesterazelor a unor zone hidrofobe joacă un rol important deoarece prin interacțiunea lor cu radicalii alchilici și inhibitorilor participă direct la reacțiile ce au loc pe suprafața enzimei [67] , [122-128] .

Ipoteze "interacțiunii hidrofobe" este în prezent larg răspândită în enzimologie pe baza constatărilor experimentale că în cazul fermentilor pepsina, chimotripsina, tripsina [129-133] ca și în cel al colinesterazelor [118- 119] viteza de hidroliză fermentativă a substraturilor depinde de mărimea radicalilor hidrocarbo-nați pe care îi conțin, radicali capabili de sorbție pe zonele hidrofobe ale centrelor active din enzime.

Clarificarea rolului interacțiunilor hidrofobe în inhibarea colinesterazică produsă de C.O.F. a necesitat un studiu sistematic al "topografiei" zonelor hidrofobe pe suprafața activă a enzimei cu ajutorul unor serii de compuși variați în limite largi din punct de vedere structural. [110] , [113] , [134-150] . Structura și dispunerea acestor zone hidrofobe la acetil- și butil-colinesterază este reprezentată schematic în figure 11 [110] , [151] .

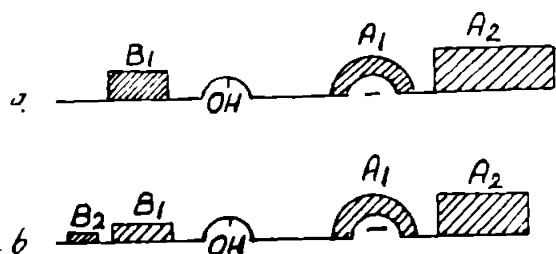


Fig.11.

a - acetilcolinesterază

b - butilcolinesterază

A_2 , compusă din 6-8 atomi de carbon, este astfel încât se manifestă complementar față de radicalii care conțin grupări $C(CH_3)_3$.

În jurul centrului esteric, în butilcolinesterază, se află două zone hidrofobe, B_1 și B_2 și diferite grupări hidrofobe. Ele acoperă un domeniu ce corespunde unui lanț de 7 atomi de carbon și în general sînt complementare radicalilor cu structură normală.

În jurul centrului anionic există două zone hidrofobe:

A_1 - cea care înconjoară nemijlocit centrul anionic și

A_2 - situată la o anumită distanță de primă.

După cum arată Augustinsson [152] la interacțiunea inhibitorilor cu centrul anionic, în cazul butilcolinesterazei, alături de forțele coulombiene un rol important îl joacă forțele van der Waals, pe cînd la acetilcolinesterază predomină interacțiunile de primul tip.

Configurația spațială a zonei

Zona B₁, nedelimitată strict, poate sorbi totuși și radicali ramificați. La acetilcolinesterază a fost pusă în evidență doar o zonă B₁, strict complementară radicalului i-hexilic.

Ca o importanță particularitate a configurației zonei B₁ este menționat faptul că nu admite sorbția radicalilor ce conțin gruparea terț-butil.

Funcția biologică a zonelor hidrofobe este de a micșora sorbțiile "parazite" și de a mări probabilitatea de sorbție a acetilcolinei pe centrele active, ceea ce corespunde unei creșteri substanțiale a vitezei reacției fermentative. Ea se exercită și în cazul fosforilării colinesterazelor cu C.O.F. (în special la cele cu radicali alchil voluminoși) determinând o sorbție orientată a moleculei inhibitorului pe centrele active și astfel, o mărire a vitezei de formare a complexului ferment-inhibitor.

Având în vedere valoarea relativ mare a lui k₂ la concentrații mari de inhibitor, pentru studiul primelor două etape a procesului de inhibare, Main și colaboratori [153-154], au propus următoarele ecuații de control:

$$\frac{[PX]}{k} = \frac{[PX]}{k_2} = \frac{K_s}{k_2}$$

în care k este constanta de viteză a reacției de fosforilare pentru o concentrație dată a inhibitorului, K_s - o constantă analogă constantei Michaelis, K_m pentru hidroliza enzimatică a substratului și reprezintă concentrația inhibitorului la care viteza de fosforilare a enzimei este jumătate din viteza maximă.

Tabelul 4

Compusul	Temp °C	K _s (M)	k ₂ (min ⁻¹)
(EtO) ₂ P(O) - C ₆ H ₅ -N ⁺ (Me) ₃ - meta	25	1,2 · 10 ⁻⁴	5,2
(1-PrO) ₂ P(O) - F	5	1,6 · 10 ⁻³	11,9
(EtO) ₂ P(O)CH ₂ CH ₂ N(Me) ₂	5	1,8 · 10 ⁻⁴	126
(EtO) ₂ P(O) - C ₆ H ₅ - NO ₂	5	3,6 · 10 ⁻⁴	42,7
CH ₂ COOEt	5	2,4 · 10 ⁻³	67,0
(MeO) ₂ P(O) - CHCOOEt			

BUPT

Datele din tabelul 4 [154-157] ilustrează faptul că K_s constituie o măsură a afinității inhibitorului pentru enzimă. Efectul temperaturii asupra celor două constante arată că mărimea K_s exprimă desfășurarea reacției de asociere-disociere dintre colinesterază și inhibitor.

Spre deosebire de enzimă acetilată, enzima fosforilată hidrolizează foarte încet ca urmare a rezistenței superioare la hidroliză a esterilor fosforici față de cei acetici și a slabei capacități a enzimei de scindare hidrolitică a legăturii O-CH₂ (fig.10.b) Viteza maximă de desacilare a colinesterazei în reacția cu acetilcolina este de 10⁵ - 10⁶ ori mai mare decât cea de defosforilare. Față de această comportare a produsului EOP, pînă nu demult inhibarea colinesterazică a fost considerată ireversibilă. Datele obținute asupra vitezelor de hidroliză a unor acetilcolinesteraze fosforilate (tabelul 5) justifică introducerea în schema generală a mecanismului de inhibare a unei etape corespunzătoare descrisă prin k_3 .

Tabelul 5 [67] , [158-159]

Natura acetilcolinesterazei	Gruperea atașată la - P(O)	10 ³ · k ₃ (min ⁻¹)
iepure	(CH ₃ O) ₂	8,5
umană	(C ₂ H ₅ O) ₂	0,2
oaie	(CH ₂ ClCH ₂ O) ₂	29,5
vacă		38
șobolan		33
cobai		28,5
bovină	(CH ₃ CHClCH ₂ O) ₂	37
bovină	(CH ₂ ClCH ₂ CH ₂ O) ₂	19

Hidroliza enzimei fosforilate este influențată de pH și temperatură.

Numeroasele studii întreprinse au condus la concluzia [59] că analogiile între reacția colinesterazei cu C.O.F. și cea cu substratul natural sînt stît de numeroase încît procesul de inhibare poate fi asimilat în multe privințe cu reacția acetilcolinei. Avînd acest punct de plecare, faptul că unui C.O.F. prin reacție cu colinesteraze formează pe lîngă enzime fosforilate un

complex ireversibil, catalitic inactiv, a fost explicat prin interacțiunea inhibitorului cu același situs la care se fixează acetilcolina atunci când provoacă "inhibarea prin exces de substrat" [115], [16c].

Există totuși, în reacția colinesterazei cu C.O.F. o transformare a enzimei fosforilate pentru care nu există analogie în reacțiile enzimă-substrat, transformare prin care reactivarea EOP după un anumit timp de acumulare, în prezență de reactanți nucleofili nu mai este posibilă [84] [161-162]. Fenomenul acesta numit "îmbătrânire" [89] este datorat pierderii unei grupe alchil din gruparea alcoxi [88], [92], [163], [164] și decurge cu o viteză care depinde de natura radicalului și de tipul enzimei [93 - 97]. În schema generală de mecanism el este reprezentat printr-o etapă distinctă, caracterizată prin k_4 , dar trebuie menționat că numai enzimele fosforilate care conțin o legătură P-O-C pot reacționa în acest mod.

Discutarea reacției inhibitorilor organofosforici cu colinesterazele din organisme impune ca pe lângă analiza etapelor propriuzise ale procesului de inhibare, să se ia în considerare o serie de factori și transformări care pot modifica sensibil activitatea anticolinesterazică și chiar însăși natura acestuia. Astfel, colinesterazele, deși probabil cu aceeași funcție biologică, diferă prin "topografia" constelației catalitice și proprietăți, în funcție de specia căreia aparține organismul. Această diferență se resimte în vitezele diferite de fosforilare și în stabilitatea enzimelor fosforilate.

De asemenea, degradarea "in vivo" a inhibitorului prin hidroliză sau oxidare poate influența considerabil. Deși această reacție are un efect inferior față de inhibarea inițială acută, care decurge cu viteză superioară degradării, în practică administrarea inhibitorului se face lent, prin expunere sau contact și doar foarte rar prin injectare. Ca urmare, viteza de degradare a inhibitorului poate dobândi o importanță deosebită. La un C.O.F. administrat extern această viteză de degradare va putea fi suficient de mare pentru a împiedeca o inhibare a colinesterazei cu consecințe letale. Nu trebuie omisă posibilitatea ca, în afara colinesterazei și alte enzime să reacționeze cu inhibitorul reducând substanțial concentrația acestuia. De aceea, este recomandabilă utilizarea unor C.O.F. cu acțiune specific anticolinesterazică.

Un alt factor dificil de evoluție este influența concentrației enzimei. Dacă în majoritatea studiilor "in vitro" concentrația

locala
333225
Dulaj

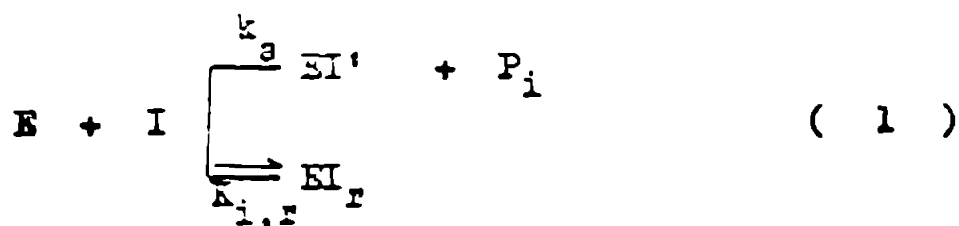
pot fi mult mai inalte; aceasta va influența viteza de îndepărtare a inhibitorului.

O problemă incomplet elucidată este evaluarea consecințelor unei administrări repetate a compusului organofosforic cu acțiune anticolinesterazică. Există indicații [59] că în acest fel se va diminua valoarea dozei letale față de inhibitorul respectiv sau față de un altul.

Cu toate semnele de întrebare care mai persistă în ceea ce privește mecanismul de acțiune extrem de complex al pesticidelor organofosforice, se poate aprecia că în prezent există suficiente informații și un cadru teoretic corespunzător pentru examinarea rațională a majorității problemelor legate de selectarea unor inhibitori colinesterazici cu acțiune optimă.

2.2.2. Cinetica reacției inhibitorilor organofosforici cu colinesteraze

După Aldrige și Reiner [115] în studiul cinetic al inhibării colinesterazice, trebuie să avem în vedere două procese: unul ireversibil, progresiv, care determină fosforilarea centrului activ al enzimei și celălalt, reversibil, neprogresiv, determinat de interacțiunea C.O.F.-ului cu situsul activ responsabil de "inhibare prin exces de substrat", conform schemei:



în care E reprezintă enzima, I - inhibitorul organofosforic, EI - enzima fosforilată, iar EI_r - complexul enzimă-inhibitor-reversibil. Pe baza acestei scheme de reacții s-a stabilit următoarea ecuație cinetică:

$$k = \frac{k_a}{1 + [I]/K_{i,r}} = \frac{1}{[I]t} \ln \frac{[E]_0}{[E]} \quad (2)$$

unde k este constanta bimoleculară de viteză pentru o concentrație dată de inhibitor, [I], care depășește de multe ori concentrația inițială a enzimei [E]₀; [E] - concentrația enzimei în amestecul de reacție după un timp t (mărimile [E]₀ și [E] se compun din concentrațiile enzimei libere și enzimei legate în complexul EI_r); k_a - constanta bimoleculară de viteză a fosfo-

rilării ireversibile; $K_{i,r}$ - constantă de disociere a complexului [146], [165].

Caracteristic pentru acest mecanism "combinat" de inhibare este scăderea sensibilă a $k_{I,r}$ - constantă bimoleculară a vitezei determinată experimental odată cu creșterea lui [I].

$$k_{I,r} = \frac{1}{t_r [I]} \ln \frac{V_0}{V_t} \quad (3)$$

V_0 - fiind viteza hidrolizei fermentative a substratului S în absența inhibitorului, iar V_t - viteza după timpul t de menținere în amestec de reacție a enzimei și inhibitorului.

Deoarece inhibarea reversibilă se manifestă nu numai în reacție de fosforilare ci și în reacția de hidroliză fermentativă a substratului, caz în care se estimează prin constanta de inhibare $K_{i,s}$, activitatea inițială a fermentului $V_{0,i}$ este de fapt inferioară activității înregistrată în absența inhibitorului. Ca urmare, dacă inhibarea reversibilă este tratată ca proces de reacții concurente, atunci în prezența inhibitorului

$$V_{0,i} = \frac{a_c \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_M (1 + [I] / K_{i,s}) + [S]} \quad (4)$$

$$\text{și } V_t = \frac{a_c [E]_t \cdot [S]}{K_M (1 + [I] / K_{i,s}) + [S]} \quad (5)$$

iar în absența inhibitorului:

$$V_0 = a_c [E]_0 [S] / (K_M + [S]) \quad (6)$$

Rezultă că la aceeași concentrație a substratului S și în aceleași condiții de temperatură pH și compoziție a amestecului rezultat, ceea ce asigură constanța mărimii K_M și a activității centruului catalitic a_c ,

$$\frac{V_0}{V_t} = \frac{[E]_0}{[E]_t} \left\{ 1 + \frac{K_M [I]}{K_{i,s} (K_M + [S])} \right\} = \frac{[E]_0}{[E]_t} \cdot n \quad (7)$$

$$\text{unde } n = 1 + \frac{K_M \cdot [I]}{K_{i,S}(K_M + [S])}$$

Aşa dar, în cazul inhibării "combinate" constanta k_{II} calculată cu ec.3, nu estimează corect viteza de inhibare ireversibilă a enzimei.

Din ec.3 și 7 se obține că:

$$k_{II} = \frac{1}{[I] \cdot t} \ln \frac{[E]_0}{[E]_t} + \frac{1}{[I] \cdot t} \ln n \quad (8)$$

și ținând cont de ec.1.

$$k_{II} = k + \frac{1}{[I] \cdot t} \ln n \quad (9)$$

Ec.9, arată că mărimea $k_{II} > k$ la o concentrație dată a inhibitorului. Reprezentarea grafică a ecuației:

$$\lg V_0/V_t = [I] \cdot kt/2,3 + \lg n \quad (10)$$

obținută din ec.7,8 și 9, dă o dreaptă a cărei $\text{tg } \alpha = \frac{[I] \cdot k}{2,3}$

permite calculul valorii k pentru $[I]$ dat, iar ordonata la origine $\lg n$ calculul mărimii $K_{i,S}$ deoarece

$$(V_0/V_t)_{t=0} = n = 1 + \frac{K_M \cdot [I]}{K_{i,S}(K_M + [S])} \quad (11)$$

de unde

$$K_{i,S} = \frac{K_M \cdot [I]}{(K_M + [S])(n-1)} \quad (12)$$

Determinând k la diferite valori ale lui, $[I]$ se poate calcula constanta biomoleculară k_g și constanta de inhibare $K_{i,r}$ reprezentând grafic ec.1 modificată

$$1/k = 1/k_g + [I]/k_g K_{i,r} \quad (13)$$

Cercetările experimentale întreprinse utilizând ecuațiile cinetice prezentate mai sus, care decurg din considerarea inhibării

după schema "combinată" [110], [117], [138], [165-167], arată că acest tip de mecanism este foarte frecvent în reacțiile colinesterazelor cu C.O.F. dar nu întotdeauna poate fi pus în evidență experimental. Dacă inhibarea ireversibilă este slabă

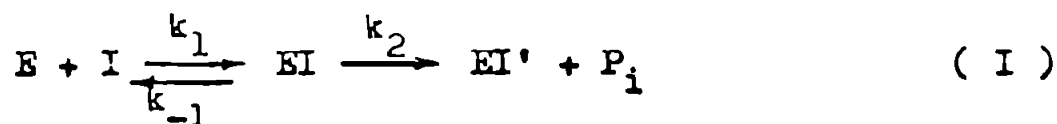
$K_{i,s}$ și $K_{i,r} \approx 10^{-3} - 10^{-2}$ M) la valori [I] mici (cazul C.O.F. active, termenii

$$1 + [I]/K_{i,r} \text{ din ec.2} \quad \text{și} \quad 1 + \frac{K_M \cdot [I]}{K_{i,s}(K_M + [S])} \text{ din ec.4}$$

sînt apropiați de unitate.

După Brestkin și colaboratori [165] fosforilarea reversibilă este explicată prin cerințele sterice impuse de formarea complexului Michaelis, ferment-inhibitor. În cazul unei orientări necorespunzătoare a inhibitorilor pe suprafața activă a enzimei, fosforilarea ireversibilă nu poate avea loc și în locul complexului Michaelis se formează complexul EI_r analog complexului rezultat în reacțiile cu inhibitorii reversibili (de ex. ioni de tetraalchilamoniu).

În prezent, schema cinetică cea mai frecvent folosită pentru procesul de inhibare colinesterazică este:



Ea poate fi tratată ca sistem de reacții consecutive [168]

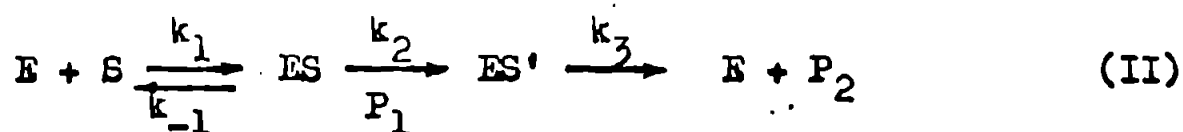
$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[E]}{dt} = -k_1 \cdot [E] + k_{-1} \cdot [EI] \quad (14.a) \\ \frac{d[EI]}{dt} = k_1 \cdot [E] + (k_{-1} + k_2) \cdot [EI] \quad (14.b) \\ \frac{d[EI']}{dt} = k_2 \cdot [EI] \quad (14.c) \\ k_1 = k_{-1} \cdot [I] \quad (14.d) \end{array} \right.$$

Rezolvarea acestui sistem permite determinarea relațiilor de calcul a mărimilor [E], [EI], [EI']. Variația concentrației enzimei din amestecul de reacție în timp, se urmărește prin scăderea activității sale catalitice, adică prin scăderea vitezei de hidroliză fermentativă a acetilcolinei în condiții standard [169]

deci, trebuie avut în vedere că după adăugarea soluției de acetilcolină la amestecul de reacție descompunerea complexului EI în E și I precum și în EI' și P₁ va continua, în timp ce formarea sa se va întrerupe din două cauze:

- micșorarea concentrației componentelor din sistemul reactant prin diluare;

- concentrația fermentului liber, E, devine nulă deoarece colinesteraza este fixată aproape în totalitate de către acetilcolina sub formă de complex Michaelis, EI, și acetilată, ES', conform schemei:



în care P₁ este colina iar P₂ acidul acetic.

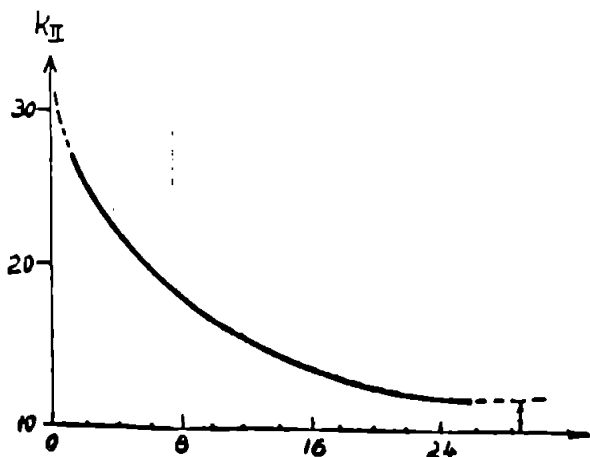
Deci, este de reținut că la determinarea activității catalitice, A_t, în hidroliza enzimatică a acetilcolinei ia parte nu numai enzima liberă ci și o parte din enzima din complexul EI.

Constantele de viteză ale reacției de inhibare colinesterazică cu C.O.F. variază în funcție de timpul de menținere în contact a enzimei și inhibitorului (Fig.12).

Studiul cinetic al inhibării colinesterazice cu o serie de derivați organofosforici [168] arată că diferențele de activitate ale acestora se resimt prin valorile k₁, în timp ce k₋₁ și k₂ sînt aproximativ de același ordin de mărime.

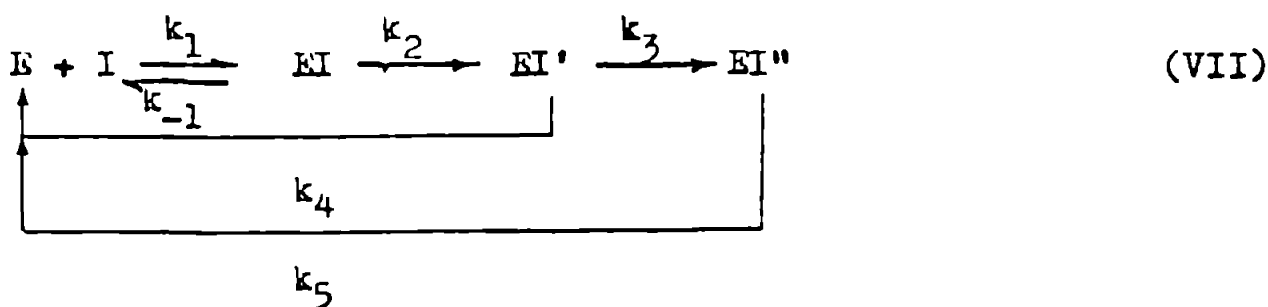
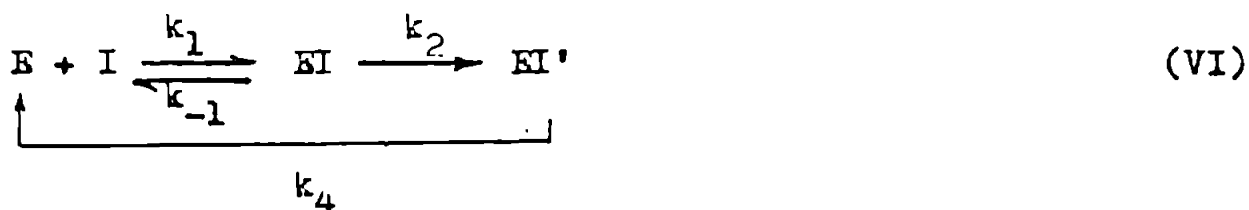
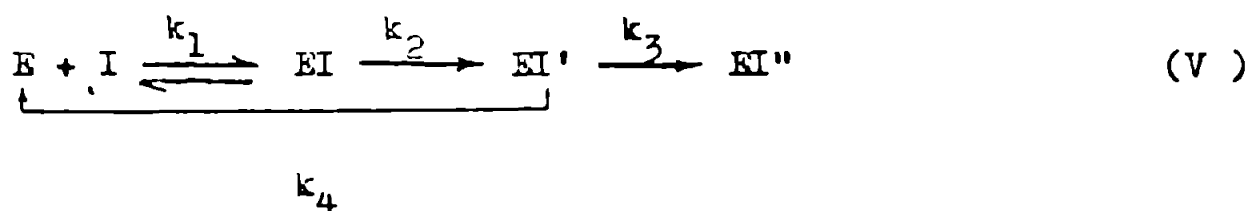
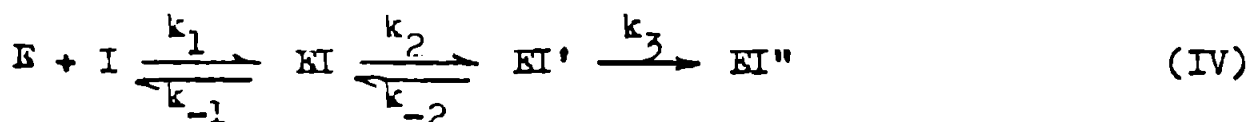
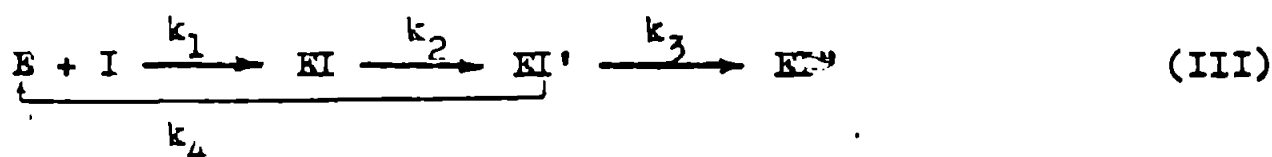
O valoare mare a constantei k₁ indică o concentrație relativ înaltă a complexului EI ceea ce corespunde unei fosforilări rapide a enzimei.

Valorile constantei k₂, aproape aceleași pentru C.O.F. de structuri diferite, sugerează ipoteza că în reacția de fosforilare nu ruperea legăturilor P - SR sau P - OR este determinantă cinetic. Este posibil ca etapa determinantă de viteză a acestei reacții să fie ruperea legăturii H - O a hidroxilului serinic din complexul ferment-inhibitor.



Determinările cinetice pentru reacția dintre colinesteraze și C.O.F. conduse după metodicile expuse anterior nu duc întotdeauna la rezultate concordante. Cauzele neconcordanțelor pot fi: date experimentale asupra activității enzimei insuficient de exacte, nerigurozitatea metodei de calcul dar și o desfășurare a procesului, în unele cazuri, după o schemă cinetică diferită de cele considerate pînă în prezent.

Knunianț și colaboratori [170] au studiat mecanismul inhibării cu C.O.F. presupunînd posibile următoarele scheme de reacție:



Schemele (III), (V) și (VII), prin k_4 , țin seama de ipoteza lui Aldrige și O'Brien [56,59] că într-un stadiu "anumit" al inhibării enzimei este posibilă reactivarea acesteia. Schema (IV) este în acord cu presupunerile lui Moon și Stuterant [171] privind posibilitatea existenței a doi complexi reversibili enzimă-inhibitori, iar a (VI) consideră că interacțiunea enzimă-inhibitor

decurge după un mecanism în care inhibitorul se comportă ca un substrat "rău".

Compararea datelor experimentale cu cele calculate potrivit schemelor (III), (V-VII) conduce la concluzia că este puțin probabil ca inhibarea colinesterazică să decurgă după unul din aceste mecanisme.

Variația constantelor de viteză cu concentrația inhibitorului indică faptul că mecanismul inhibării colinesterazice în absența substratului se încadrează cel mai bine în schema (IV) deoarece în acest caz constantele k_2 , k_3 , k_{-1} și k_{-2} nu depind de $[I]$.

Dependența lui k_1 , în toate cazurile, de concentrația inhibitorului arată că această constantă nu reprezintă constanta "reală" de viteză ci corespunde unui proces complex care implică sorbția și interacțiunea chimică a C.O.F. în zona centrului activ al enzimei.

Analiza critică a studiilor cinetice publicate referitor la reacția dintre C.O.F. și colinesteraze conduce la concluzia că deși schema (II) este operantă și în mod îndreptățit cel mai frecvent folosită, atunci când se întreprinde cercetarea cinetice de inhibare printr-un anumit compus organofosforic (eventual nou sintetizat), ea nu trebuie acceptată fără discernământ, a priori. În funcție de complexul de condiții concrete în care decurge reacția etapele ce intervin și relațiile cinetice dintre acestea pot fi "în afara unei scheme" recomandate ca general valabile.

2.2.3. Aspecte ale relației dintre structura inhibitorului organofosforic și activitatea sa anticolinesterazică

Activitatea anticolinesterazică a C.O.F. este determinată de afinitatea pentru situsul activ, capacitatea de fosforilare, posibilitatea de reactivare a enzimei fosforilate, stabilitatea chimică în condițiile de administrare și în raport cu tipul de acțiune, capacitatea de "activare" prin metabolizare, de "topografia" colinesterazei din organismul donatorului combătut.

Toți acești factori se manifestă în funcție de structura chimică a inhibitorului ceea ce înseamnă că relație dintre structură și activitatea anticolinesterazică oferă, alături de cunoștințele despre mecanismul de acțiune, posibilitatea de a stabili rațional cerințele de natură structurală pe care trebuie să le satisfacă un compus organofosforic pentru a realiza o acțiune pesticidă optimă.

În cele ce urmează se va motiva influența modificărilor structurale asupra proprietăților anticolinesterazice și se vor prezenta variațiile structurale posibile, urmînd ca în capitolul II.2 să fie sistematizate efectele modificărilor structurale asupra tipului de acțiune și a eficacității inhibitorului pe clase de compuși, iar în capitolul III.2.1. să se facă o analiză a relațiilor cantitative propuse pentru descrierea relației structură-activitate biologică la C.O.F.

Plecînd de la constatarea că inhibarea colinesterazei cu C.O.F se realizează prin atac electrolil [52], [56], se poate deduce că, în anumite limite, toți substituienții legați de atomul de fosfor care determină creșterea vitezei de hidroliză bazică măresc viteza acesteia. Cu cît substituienții sînt mai electrolili cu atît activitatea anticolinesterazică este mai mare. În figure 13, structura (a) corespunde unui compus cu activitate anticolinesterazică potențială superioară iar structura (b) unui slab anticolinesterazică.

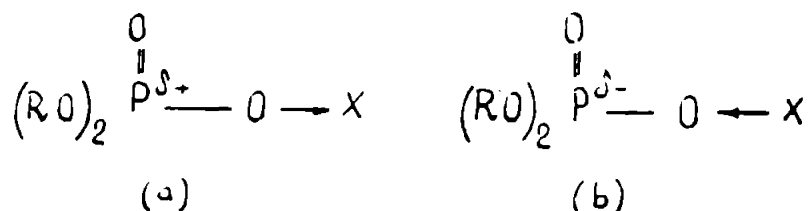


Fig.13.

Astfel, la compușii de tip $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{OX}$ ar trebui să se constate următoarele:

a) scăderea activității anticolinesterazice odată cu schimbarea lui R în ordinea metil > etil > propil > butil. Datele din tabelul 6 însă, infirmă această previziune. În două din clasele de combinații organofosforice indicate activitatea maximă corespunde compușilor cu R = i-propil iar la derivații $\text{O}[\text{P}(\text{O})(\text{OR})_2]_2$ compusului cu R = etil. Această abatere de la corespondența prevăzută dintre efectele electronice determinate de substituienți și

capacitatea de inhibare colinesterazică a fost explicată prin relativa ușurință cu care enzima dimetil fosforilată se reactivază după inhibare în timp ce enzima diizopropil fosforilată nu poate fi reactivată. Explicația nu este însă convingătoare;

b) micșorarea activității anticolinesterazice la înlocuirea grupării RO prin R . Datele existente pînă în prezent asupra activității compușilor corespunzători variației de structură $(RO)_2P(O)OX \rightarrow (RO)RP(O)OX \rightarrow R_2P(O)OX$ nu sînt suficiente pentru a confirma valabilitatea principiului. În orice caz, au fost remarcate excepții (PI_{50} pentru dietil p-nitrofenil fosfat/etil p-nitrofenil etil fosfonat este 7,6/7,9) fără ca acestea să poată fi explicate.

Tabelul 6 [72] , [172-173]

R	PI_{50}			
	$(RO)_2POF$	$(RO)_2POP(OR)_2$	$(CH_3)_2N \begin{array}{l} \diagup \\ P \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{l} O \\ CN \end{array}$	$(RO)_2PO-C_6H_5-NO_2-p$
CH ₃	7,6	5,7	7,8	6,8
C ₂ H ₅	8,1	9,1	8,4	7,3
n-C ₃ H ₇	8,25	7,6	-	7,6
i-C ₃ H ₇	8,9	-	8,9	6,0
n-C ₄ H ₉	-	8,9	-	7,8
s-C ₄ H ₉	8,7	-	-	6,3
i-C ₄ H ₉	8,7	-	-	-
Enzima	Ser uman	Ser uman	Eritrocite umane	Preparat colinesterazice
Timp de incubație(min)	15	Nelimitat	25	30
Temperatura de incubație(°C)	20	25	25	25

c) creșterea simbtică a activității anticolinesterazice odată cu caracterul electrofil al substituentului X . Se pare că această regulă are o valabilitate mult mai generală decît celelalte. Criteriile folosite pentru evaluarea naturii electrofile

a lui X sînt: t aria acidului R-OX; constanta de hidroliză bazică a lui $(RO)_2P(O)OX$; constanta de substituent σ c nd X este o grupă fenil-substituită; absorb ia în I.R. a legăturii P-O-X .

Ketelaar [175] pune în eviden a o dependența de natură calitativă între pK_a a acidului X-OH  i activitatea anticolinesterazică  i conchide că la un X-OH acid puternic corespunde un $(RO)_2P(O)OX$ inhibitor puternic.

Aldrige  i Davison [69,70] au stabilit o corelație liniară între logaritmul constantei de viteză a inhibării colinesterazice  i logaritmul constantei de viteză pentru hidroliză confirm nd astfel că o stabilitate mare la hidroliză implică o slabă activitate anticolinesterazică [176] . Grupările electrophile Cl  i NO_2 determină o creștere a sarcinii pozitive efective la atomul de fosfor f c ndu-l mai sensibil la atacul OH^- dar  i la atacul centrului activ din colinesterază.

Efectul electronic al substituenților, estimat prin constantele ρ - Hammett [38] a fost de asemenea corelat cu activitatea anticolinesterazică [174] , [176] ob in ndu-se o bună dependența liniară; exce tiile pot fi justificate prin factorii sterici care intervin. Pentru substituenții alifatici ca  i pentru grupările fenil-orto-substituite au fost folosite constantele σ^+ - Taft dar corelarea acestora cu toxicitatea compu ilor respectivi nu a dat rezultate bune [177,178] .

Fukuto  i Metcalf [174] au găsit în cazul dietil fenil fosfaților o dependența liniară între $\log I_{50}$  i frecven a legăturii P-O-X dar nu s-a putut explica de ce în acest caz relația dintre caracterul electrophil al substituenților  i variația frecven ei de alungire este inversă celeia pusă în eviden a pentru frecven a ν_{H-O} din fenolii substitui i.

d) modificarea importanța (de regulă o creștere) a activit ii anticolinesterazice prin izomerizare chimică sau oxidare enzimatică a compu ilor $(RO)_2P(S)OX$ la compuși $(RO)_2P(O)SX$ sau respectiv $(RO)_2P(O)OX$.

Efectul transformării legăturii P=S  n P=O asupra activit ii inhibitorului anticolinesterazic este ilustrat prin tabelul [179 - 183] . Trebuie observat că dacă compusul P=S a fost deja un inhibitor poten ial produ ii de oxidare sau izomerizare sînt doar cu pu in mai buni anticolinesterazici.  n cazul oxidării enzimatice sau chimice a sulfurii mercapto în compuși de tipul Systoxului (O,O-dietil S - (2-etil tioetil) fosforotiolat) la sulfoxid $[-S(O)R]$ sau sulfonă $[-S(O)(O)R]$, se constata că, f a de o creștere progre-

șiva a activității anticolinesterezice în cazul oxidației de grupări tionici și tiolici, oxidarea mercapto a unui izomer tionici deja oxidat duce la micșorarea acesteia.

Tabelul 7

Compusul P = S			Izomerul P = O		Produsul oxidat P = O
(RO) ₂ P(S)OR'			Forma izomeră	pI ₅₀	pI ₅₀
R	R'	pI ₅₀			
CH ₃	C ₆ H ₄ NO ₂ -p	2	(RO) ₂ P(O)SR'	6,5	6,0
C ₂ H ₅	C ₆ H ₄ NO ₂ -p	4	(RO)(RS)P(O)OR'	6	8,18
			(RO) ₂ P(O)SR'	8,55	
C ₂ H ₅	(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	4,4	(RO) ₂ P(O)SR	8,12	5,5
C ₂ H ₅	(CH ₂) ₂ S(C ₂ H ₅)	3,7	(RO) ₂ P(O)SR'	5,5	7,6
C ₂ H ₅	(CH ₂) ₂ S(O)C ₂ H ₅	5,5	(RO) ₂ P(O)SR'	5,8	6,0
C ₂ H ₅	(CH ₂) ₂ S(O)OC ₂ H ₅	6,1	(RO) ₂ P(O)SR'	6,2	6,9
CH ₃	CH ₂ -COOC ₂ H ₅	2,01	(RO)(RS)P(O)SR'	4,5	6,35
	CH ₂ -COOC ₂ H ₅				

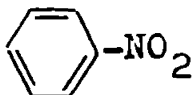
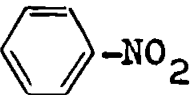
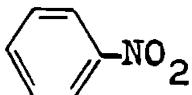

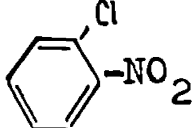
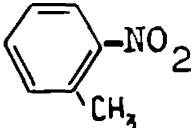
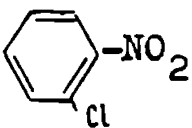
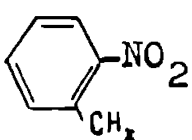
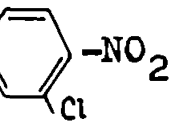
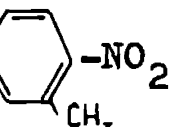
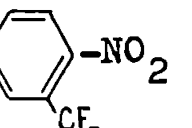
O altă constatare care trebuie reținută este aceea că dacă un slab anticolinesterezic este substituit progresiv cu grupe electrofile, viteza de hidroliză va crește continuu în timp ce activitatea de inhibare va tinde spre o viteză optimă după care va descrește. Explicația furnizată pentru această comportare a fost instabilitatea foarte mare a compusului multisubstituit [184]. O foarte bună ilustrare a efectelor variațiilor structurale asupra activității biologice a C.O.F. o constituie seria de compuși derivând din structura de bază a parationului (Tabelul 8 [185-186]).

Asemenea studii comparative sistematice au fost îndeplinite și pentru alte serii de compuși organofosforici cum ar fi derivații cu radicalul X 2,4,5 - triclorfenolic [187-190] sau metil tiofenolic [186,191] pentru compușii din seria demetonului [192] sau amitonului [193-195].

Deoarece, o grupare acil X nucleofilă determină o scădere a activității anticolinesterezice, orice hidroliză prin care la atomul de fosfor apare o grupare anionică - extrem de puternic nucleofilă-

Tabelul 8

Nr. crt	Denumirea compusului în structura de bază	Formula	Toxicitate DL ₅₀ șobolan oral (mg/kg)	Doraliș fabae conc. % mortalit. %	
1.	metil-paration	$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	14	0,0008	100
2.		$\text{CH}_3\text{S} \diagup \text{P}(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ $\text{CH}_3\text{O} \diagdown$	50	0,0008	30
3.	metil-paraoxon	$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	2,5	0,005	100
4.		$\text{CH}_3\text{O} \diagup \text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ $\text{CH}_3 \diagdown$	1	0,001	100
5.		$(\text{CH}_3)_2\text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	100	0,1	98
6.		$(\text{CH}_3)_2\text{N} \diagup \text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ $\text{CH}_3\text{OH}_3\text{O} \diagdown$	250	0,01	90
7.		$(\text{CH}_3)_2\text{N} \diagup \text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ $\text{CH}_3 \diagdown$	500	0,1	0
8.		$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{P}(\text{S})\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	1000	0,1	80
9.		$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	6,8	0,00016	20
10.		$\text{C}_2\text{H}_5\text{S} \diagup \text{P}(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{O} \diagdown$	50	0,01	100
11.		$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	2,5	0,00016	10
12.		$\text{C}_2\text{H}_5\text{O} \diagup \text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ $\text{C}_2\text{H}_5 \diagdown$	2,5	0,001	100
13.		$\text{C}_2\text{H}_5\text{O} \diagup \text{P}(\text{O})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ $\text{C}_2\text{H}_5 \diagdown$		0,001	100
14.		$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	5	0,01	100
15.		$(\text{CH}_3)_2\text{N} \diagup \text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{O} \diagdown$	50	0,001	90
16.		$(\text{CH}_3)_2\text{N} \diagup \text{P}(\text{S})\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$ $\text{C}_2\text{H}_5 \diagdown$	250	0,01 0,1	0 100
17.		$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{S})\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	10	0,1	90

18.		$(C_2H_5O)_2P(O)S-$ 	2,5	0,1	100
19.	metil- i-propil paration	$(CH_3)_2CHO$ CH_3O \setminus $P(S)O-$ 	5	0,000016	100
20.		$(CH_3)_2CHO$ CH_3O \setminus $P(S)O-$ 	5	0,001	90
21.		$(CH_3)_2CHO$ CH_2O \setminus $P(S)O-$ 	37,5	0,001	40
22.		$(C_2H_5O)_2P(S)O-$ 	50	0,001	100
23.		$(C_2H_5O)_2P(S)O-$ 	10	0,02	100
24.		$(CH_3)_2CHO$ CH_3O \setminus $P(S)O-$ 	50	0,004	100
25.		$(CH_3)_2CHO$ CH_3O \setminus $P(S)O-$ 	25	0,0008	40
26.	Clorotion	$(CH_3O)_2P(S)O-$ 	625	0,001	100
27.	Fenitrotion	$(CH_3O)_2P(S)O-$ 	250	0,004	100
28.	Fluortion	$(CH_3O)_2P(S)O-$ 	250	0,02	100

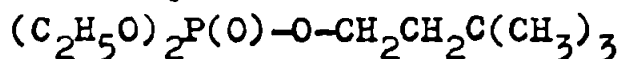
conduce la inactivarea compusului.

O influență deloc neglijabilă în realizarea inhibării colinesterazice o au factorii de natură electrostatică și sterică. Prevederea anumitor regularități în modul cum se manifestă aceștia nu este simplă și sînt de așteptat abateri de la ele. Plecînd de la structura colinesterazei pot fi făcute următoarele presupuneri:

- a) existența într-o poziție "convenabilă" a unui centru cationic în gruparea eliminantă a C.O.F. va favoriza legarea acestuia la centrul anionic al enzimei și va mări activitatea anticolinesterazică;
- b) prezența în apropierea atomului de fosfor a unor grupări voluminoase va îngreuna fixarea C.O.F. pe situsul activ, datorită dificultăților de orientare și va micșora activitatea inhibitorului.

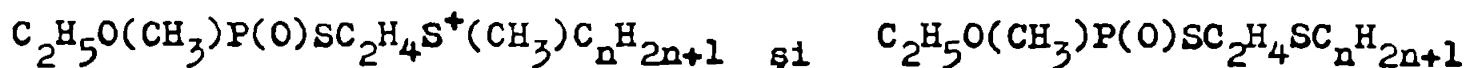
Deoarece substratul optim pentru colinesteraze este acetilcolina este normal de presupus că o distanță de 4,2 - 6,5 Å (funcție de "tiparul" enzimei) între atomul de fosfor și centrul cationic al grupării eliminante va determina un efect optim. Această ipoteză s-a verificat experimental în cadrul unor serii de compuși organofosforici [108], [110].

Fukuto și Metcalf [176] în studiile lor asupra relației dintre caracterul electrofil și activitatea anticolinesterazică la o serie de 17 fenil fosfați, fenil-substituiți, au constatat că pentru doi dintre aceștia valorile I_{50} au fost de circa 1000 de ori mai mici decât ar fi fost de așteptat. Compușii respectivi erau fenil fosfații cu substituenții fenilici meta-dimetil amino- și meta-terț-butil. Autorii au presupus că aceste două grupe determină o orientare prealabilă a inhibitorului pe enzimă în procesul fixării lui pe centrul anionic. O confirmare a acestei constatări a fost găsită [196] prin compusul



un neașteptat de bun anticolinesterazic ($I_{50} = 3 \cdot 10^7$), în pofida faptului că gruparea hexilică este nucleofilă. Legarea grupării terț-butil la situsul activ anionic al enzimei este relativ surprinzătoare ținând cont că deși $-C(CH_3)_3$ și $-^+N(CH_3)_3$ sînt similare din punct de vedere steric, proprietățile electronice ale C și ^+N diferă mult.

Studii amănunțite referitoare la relația dintre structură și activitatea anticolinesterazică în seriile de compuși organofosforici care conțin un centru cationic sau o grupare $-C(CH_3)_3$ în grupa eliminantă au fost întreprinse de colective largi de cercetători sovietici sub conducerea lui M.I. Kabachnic [110], și A.P. Brestkin [113]. Cercetînd dependența dintre logaritmul constantei de viteză a reacției de inhibare și lungimea lanțului alchil exprimată prin n - numărul de grupe metilenice în structurile de bază $C_2H_5O(CH_3)P(O)SC_nH_{2n+1}$, $C_2H_5O(CH_3)P(O)S(CH_2)_n C(CH_3)_3$,



ei obțin curbele din figurile 14, 15 și 16 (a și b). S-a folosit ca enzimă atât acetilcolinesteraza cât și butilcolinesteraza (— respectiv - - - - -)

Rezultatele obținute sînt interpretate în strînsă legătură cu "topografia" zonelor hidrofobe din jurul centrelor active ale enzimei, arătîndu-se că în inhibarea colinesterazică pe lîngă

reactivitatea electrofilă a inhibitorului, pe lângă forțele de natură coulombiană implicate în fixarea pe situsii activi, un rol important, specific, în funcție de "tiparul" colinesterazei, îl joacă interacțiunile hidrofobe.

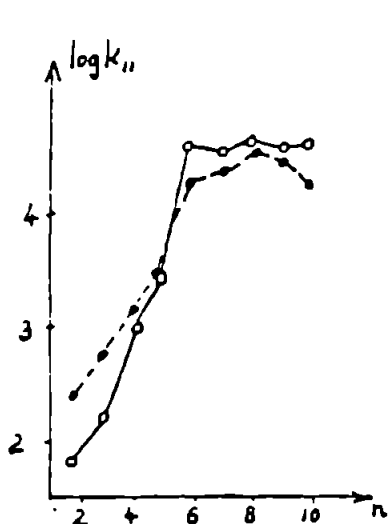


Fig.14

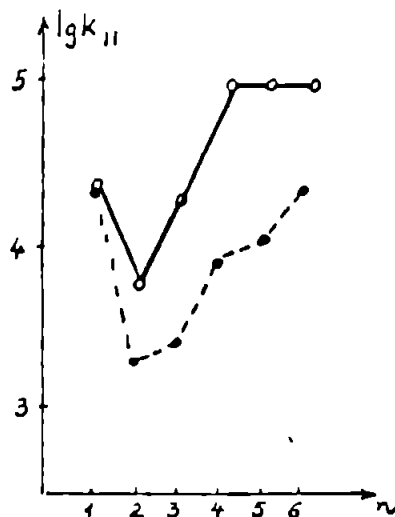


Fig.15

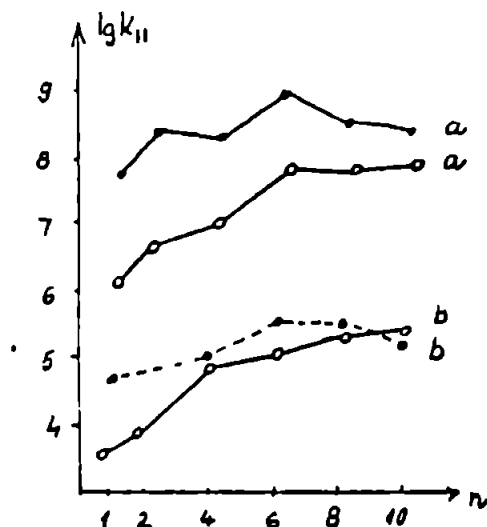


Fig.16

Decă în cazul acetilcolinesterazei rolul determinant în sorbția inhibitorului îl joacă centrul anionic adică forțele coulombiene, în cazul butilcolinesterazei zona hidrofobă din jurul acestui centru, adică forțele von der Waals, dobîndește însemnătate preponderentă. Zonele hidrofobe din vecinătatea centrului anionic (Fig.11. Cap.1.- 2,2.1) se dovedesc a fi complementare radicalilor alchilici cu 6-8 atomi de carbon și conținînd gruparea $-C(CH_3)_3$.

Dependențele $\log k_{II}$ la acetilcolinesterază și butilcolinesterază, de lungimea radicalului alchidic din grupările alcoxi la compuşii $C_nH_{2n+1}O(CH_3)P(O)SR$ (fig.16 = a) $R = C_2H_4S(CH_3) \cdot C_2H_5$; b), $R = C_2H_4SC_2H_5$; c) $R = C_4H_9$; $C_2H_5(CH_2)_nO(CH_3)P(O)SC_4H_9$ (fig.18) și $(CH_3)_2CH(CH_2)_nO(CH_3)P(O)SC_4H_9$ (Fig.19) au furnizat informații importante despre relația dintre structura chimică a inhibitorului, structura zonelor hidrofobe din jurul centrului esterazic și activitatea anticolinesterazică.

Zonele hidrofobe din jurul centrului esterazic sînt complementare radicalilor alchilici cu structură normală și formați din 7 atomi de carbon; în imediată vecinătate a centrului esterazic, configurația spațială a zonei hidrofobe împiedecă accesul prin sorbția a radicalilor conținînd grupa $-C(CH_3)_3$.

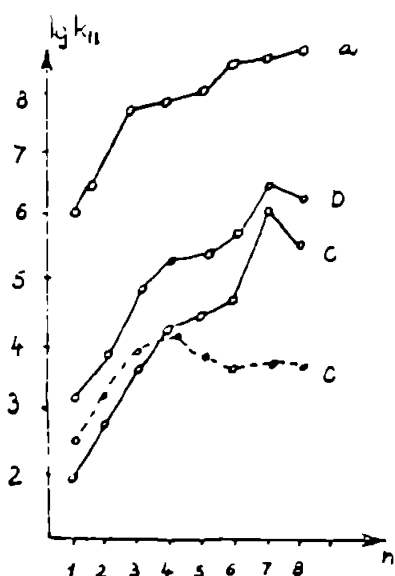


Fig.17

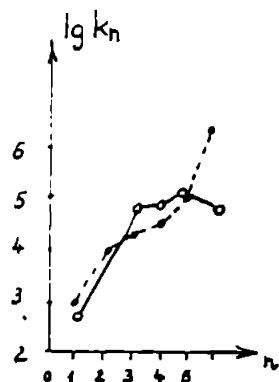


Fig.18

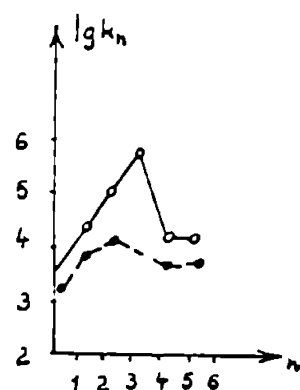
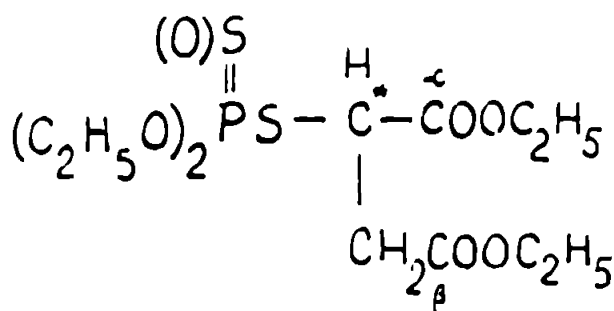
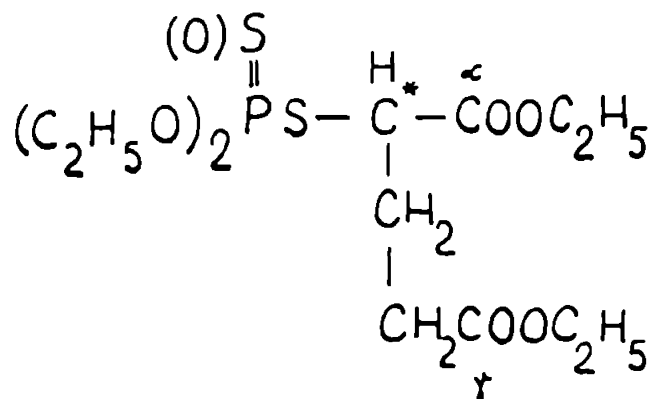


Fig.19

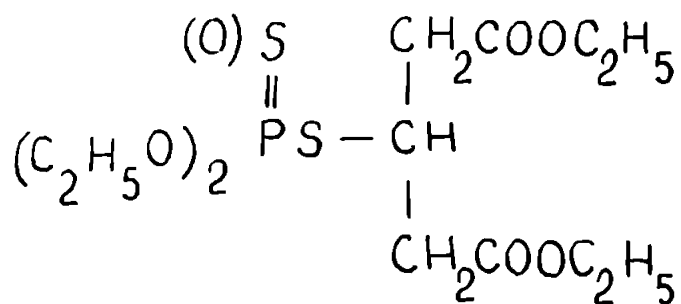
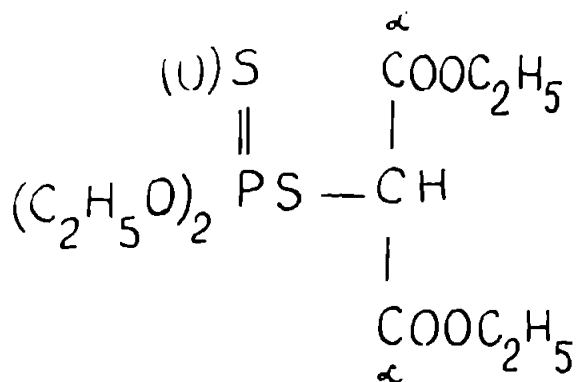
O serie de cercetări au urmărit corelarea activității inhibitorii cu structura izomerilor unui compus organofosforic potențial activ biologic. Deutermann și colaboratori [196,197] studiind izomerii malationului au găsit că d-malationul prezintă o toxicitate față de șoarece și musca domestică, ce și o activitate anticolinesterazică și anticarboxiesterazică superioară izomerului l. Un rol însemnat pentru capacitatea inhibitorie a izomerilor malationului îl are distanța dintre atomul de fosfor și gruparea α -carboxi. Derivatul α -glutaric are o toxicitate superioară față de analogul β -glutaric. În seria tionică malationul propriu-zis este cel mai activ față de musca domestică în timp ce în seria oxonice, malonat maloxonul și α -glutarat maleoxonul sînt compușii mai activi.



Succinat malationul
(maleoxonul)



α -Glutarat malationul
(maleoxonul)

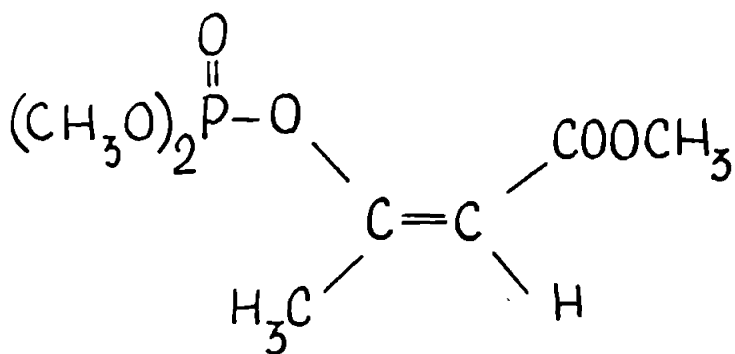
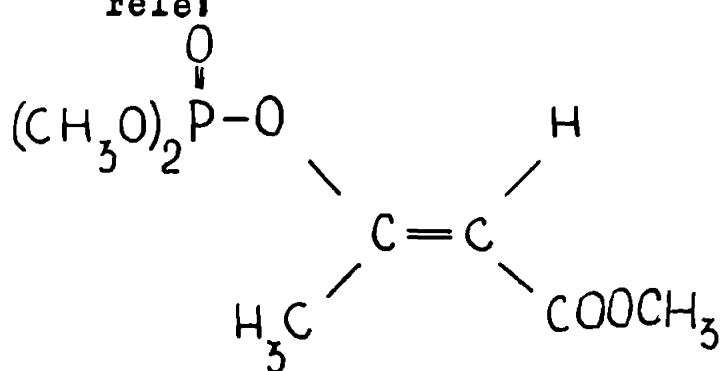


Malonat malationul
(maloxonul)

β -glutarat malationul
(maloxonul)

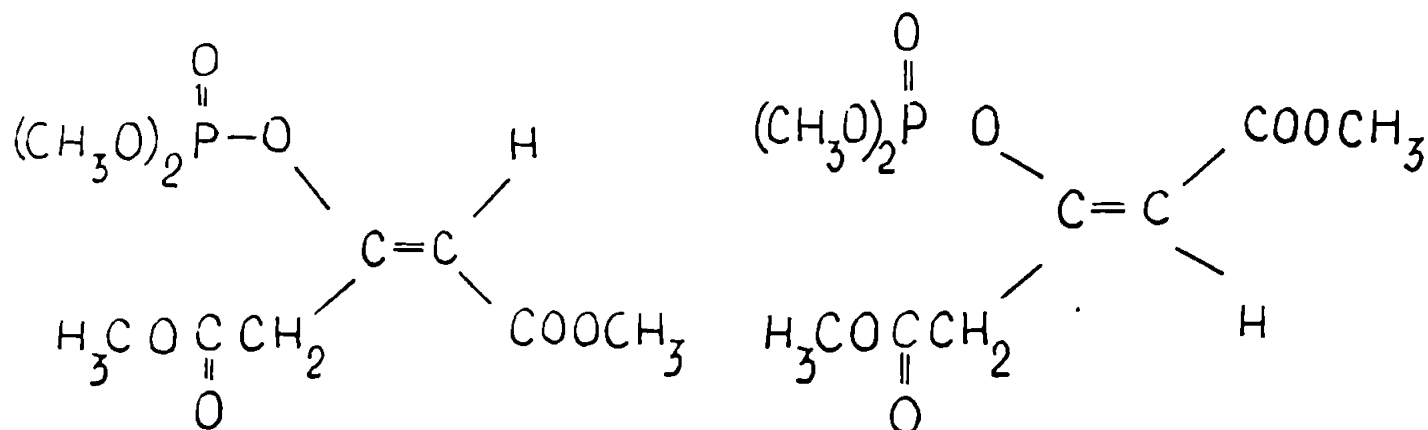
Diferența proprietăților toxice a cis - și trans -mevinfosului și a cis - și trans -bomilului sînt de asemenea explicate pe baza diferențelor de potrivire a moleculelor față de situații anionice și esterice ale colinesterazei, în spiritul mecanismului "cheie în lacăt" [198], cis - Mevinfosul este de 50 de ori mai toxic pentru mușca domestică și de 20 de ori pentru șoarece ca trans-mevinfosul.

De asemenea, compusul cis este un inhibitor colinesterazic ceva mai eficient și se degradează mai lent decît trans-mevinfosul. Comparînd distanța de 4,5 - 5,9 Å dintre centrul anionic și cel esterice al colinesterazei din insecte cu distanța P-C_{carbonil} din izomerii mevinfosului și bomilului [199] se constată următoarele:



cis-mevinfos: P-C_{carbonil} =
4,3-5,2 Å
(potrivire sterică bună)

trans-mevinfos P-C_{carbonil} =
2,2 - 4,4 Å
(potrivire sterică slabă)



cis-bomil P-C_{carbonil} =

4,4 - 5,2 Å

(potrivire sterică bună)

trans-bomil P-C_{carbonil} =

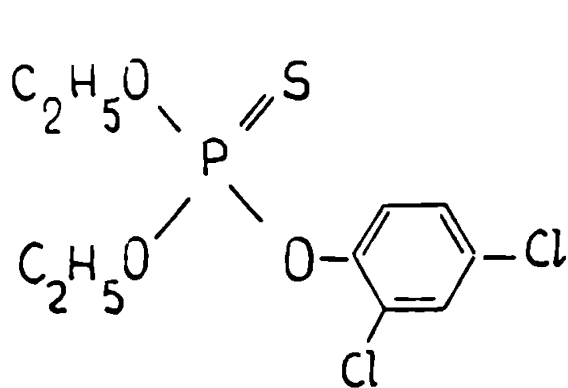
4,4 - 5,2 Å

(potrivire sterică bună)

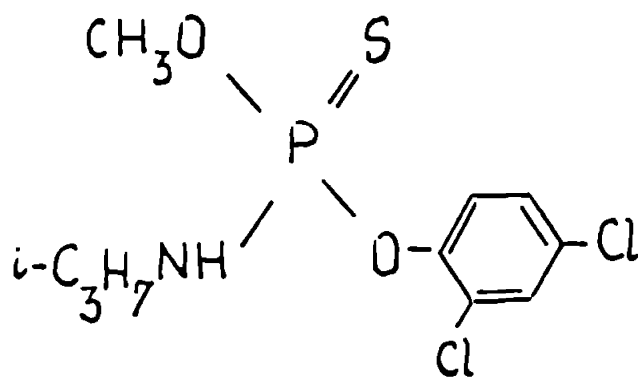
Ambii izomeri ai bomilului sînt mai toxici decît ar fi de așteptat comparativ cu cis-mevinfosul [200] .

Concluzii interesante referitor la stereoselectivitatea în inhibarea colinesterazică, toxicitatea și activitatea sistemică a unor izomeri optici organofosforici au fost formulate în studiile lui Beckett [201] , Ooms și Boter [202, 203] , De Jong și van Dijk [204] , Wustner și Fukuto [205] .

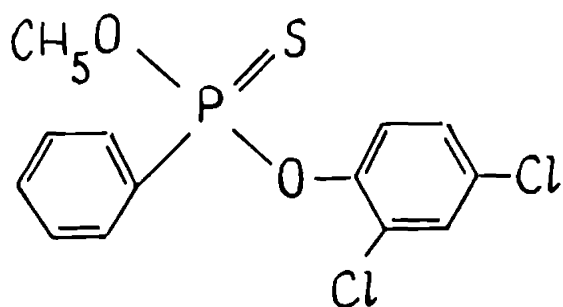
Trebuie făcută observația că studiul relației dintr-o structură și activitate biologică prin variații sistematice ale elementelor structurale pe un schelet de bază nu trebuie să piardă din vedere posibilitatea unor schimbări fundamentale în tipul de acțiune. Aceasta complică enorm depistarea legităților calitative și cantitative ale relației structură activitate pesticidă. Un exemplu elocvent în acest sens îl reprezintă unii esteri fosforici ai 2,4 - diclor - și 2,4,5 - triclorfenolului:



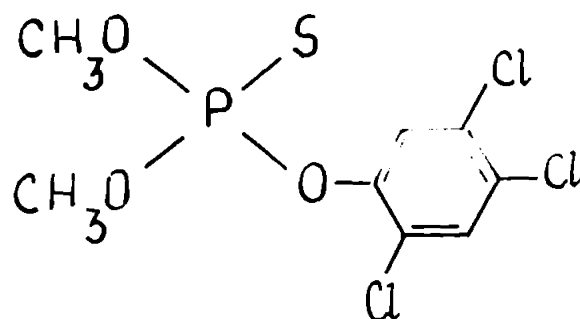
Diclorfention
(nematocid)



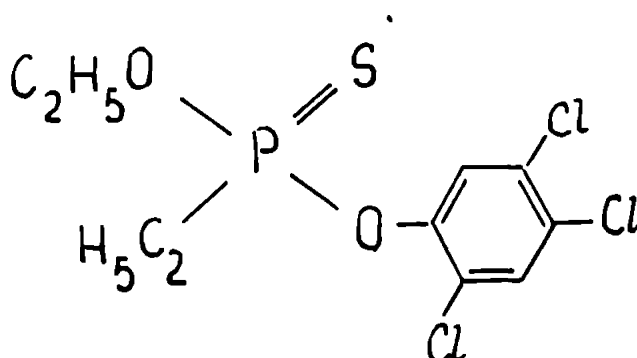
D.M.P.A
(ierbucid)



S- Seven
(acaricid)



Fenclorfos
(desinfectant)



Tricloronat
(insecticid)

Rezultate interesante asupra relației structură-activi pesticidă au fost publicate și în lucrările lui Pianka [206,207] privind efectul substituenților asupra activității insecticide sistemice și în cea a lui Crisp [208] privind condițiile structurale cerute de o activitate insecticidă sistemică. De asemenea, sînt de menționat relațiile structură - activitate anticolinesterazică stabilite pentru esterii fosforici ai saligeninei [209], în serie fosfaților și fosfonaților azonaftolilor [210] și în serie vinil tiofosfonaților [211].

În utilizarea relației structură-activitate biologică pentru sinteza unor pesticide organofosforice cu proprietăți optime, realizarea capacității de fosforilare și a cerințelor structurale de detaliu nu reprezintă decît două din condițiile necesare. Termenul de "activitate" are însă o semnificație complexă și implicații multiple. Se cer realizate optim și proprietățile de stabilitate chimică în condițiile climatice concrete, de resorbție, penetrație, partiție, stabilitate la hidroliză, oxidare, reducere etc.

2.2.4. Selectivitatea colinesterazelor în procesul de inhibare cu compuși organofosforici

Deși mulți C.O.F. inhibă acetil- și pseudocolinesterazele într-o măsură comparabilă, există totuși numeroase excepții în care se constată diferențe considerabile în activitatea anticolinesterazică (tabelul 9) în funcție de proveniența enzimei [69,71]. Aldrige pune în evidență variația raportului I_{50} acetilcolinesterază/ I_{50} pseudocolinesterază la diferite mamifere [69] (tabelul 10)

Casida [212], studiind inhibarea acetilcolinesterazică pe enzime provenind de la 10 specii de insecte, constată că gradul de inhibare variază în limitele 1 - 93%. Cauza acestei selectivități manifestate de colinesteraze în reacție de inhibare cu C.O.F. a fost atribuită distanțelor diferite dintre centrele active, centrul ionic și centrul esteric.

Tabelul 9.

Inhibitor	PI ₅₀ AcCol	PI ₅₀ pseudo- Col	I ₅₀ AcCol	PI ₅₀ AcCol	PI ₅₀ pseudo Col	I ₅₀ AcCol
			I ₅₀ pseudo- Col			I ₅₀ pseudo Col
Dimetil p-nitrofenil fosfat	6,27	6,10	0,67	7,40	5,19	0,006
Dietyl p-nitrofenil fosfat (paraoxon)	6,38	6,85	2,9	7,80	7,58	0,6
Diisopropil p-nitrofenil fosfat	5,50	6,50	10	6,49	7,15	4,5
Tetrametil fosforodiamido fluorura	1,96	3,31	22	-	-	-
N,N' -diisopropil fosforodiamido fluorura	3,82	7,42	3950	4,53	6,74	254
Diisopropil fosforofluorura (D.F.P.)	5,75	8,18	270	6,14	7,8	45
Dipropil fosforofluorura	-	-	-	7,26	8	5,5
Dietyl fosforanhidrida (T.E.P.P.)	6,52	8,39	73	7,85	7,92	1,2
N,N' diisopropil fosforodiamido fluorura (iso OMPA)	2,51	6,48	9400	3,57	6,34	590
Diisopropil fosforanhidrida	5,96	8,68	520	-	-	-

[69] - AcCol din eritrocite de cal, pseudo Col din ser

[71] - AcCol din creier de șobolan, pseudo Col din inimă

Tabelul 10.

Proveniența enzimelor	Iso-OMPA			Mipsfox		
	PI ₅₀ AcCol	PI ₅₀ pseudo Col	I ₅₀ AcCol I ₅₀ pseudo Col	PI ₅₀ AcCol	PI ₅₀ pseudo Col	I ₅₀ AcCol I ₅₀ pseudo Col
Cal	2,47	6,52	11300	3,80	7,42	4200
Umană	3,52	5,27	56 56	4,66	6,41	56
Cobai	2,34	5,89	3600	4,21	6,51	200
Cîine	2,42	6,54	13200	4,06	7,29	1700
Sobolan	3,60	6,32	5300	4,22	6,75	340
Oaie	3,20	-	-	4,41	-	-

Astfel, la colinesteraza din creierul de muscă această distanță este de 5,2 - 5,5 Å , iar la colinesteraza bovinelor de numai 4,3 - 4,7 Å . În consecință o moleculă care se încadrează primului "tipar" va fi ineficace la al doilea și invers, fapt important pentru raportul între toxicitatea față de insecte și cea față de mamifere. La esteri de tipul acizilor p-nitrofenil tiofosforici de tipul Parationului, prin substituirea inelului benzenic în meta față de restul fosforic cu grupe CH₃ sau Cl (distanța 5,2 - 6,5 Å) s-au obținut compuși toxici pentru insecte (distanța necesară 5,2 - 5,5 Å) și netoxici pentru mamifere (distanța necesară 4,2 - 4,7 Å) [60] .

Acetil - și butilcolinesterazele diferă între ele, așa cum s-a arătat anterior (2.2.1. și 2.2.3) prin natura zonelor hidrofobe din jurul centrelor active [110,112] ceea ce determină valori diferite ale activității de inhibare la unul și același C.O.F. în raport cu cele două colinesteraze.

Răspunsul selectiv al colinesterazelor din diferite organisme este legat de structura lor specifică dar și de distribuția specifică în insecte [213] și mamifere [214] .

Mulți cercetători condiționează succesul în obținerea unor pesticide organofosforice eficiente și selective de o mai bună cunoaștere a structurii colinesterazelor, de o purificare avansată și de o standardizare a preparatelor colinesterazice utilizate în testări [215] . Pentru a sublinia importanța purității în relevarea selectivității colinesterazelor, Metcalf [215] arată că studiind reacția dintre o serie de C.O.F. cu enzime provenind de la musca domestica, alina de miere și greierele de casă, acestea au fost purificate de peste 100 de ori. În aceste condiții, deși

valorile globale I_{50} au fost comparabile pentru cele 3 acetilcolinesteraze, valorile constantei vitezei de fosforilare, k_2 , au prezentat uneori variații de 10 - 20 ori pentru același inhibitor. Aceasta sugerează că fiecare specie de insecte poate avea o acetilcolinesterază distinctă din punct de vedere structural.

Aldrige și alții sînt totuși optimiști în privința posibilității de a utiliza preparate colinesterazice "crude", impure în testarea și selectarea pesticidelor cu acțiune optimă [216].

2.3. Efecte și mecanism de acțiune la mamifere

Mecanismul de acțiune al C.O.F. la mamifere a fost deja discutat în partea introductivă a paragrafului 2 și în 2.2.1. Plecînd de la structură și funcționarea sistemului nervos, de la rolul colinesterazelor în transmisiile sinaptice de tip colinergic s-a arătat că pesticidele organofosforice sînt toxice ale sistemului nervos care acționează la nivelul sinapselor prin inhibarea activității colinesterazelor.

Efectele produse de C.O.F. anticolinesterazice asupra mamiferelor pot fi înțelese prin descrierea simptomelor provocate, a cauzelor intoxicației letale precum și a comportării colinesterazei și acetilcolinei în timpul inhibării și după realizarea acesteia.

La administrarea unor doze corespunzătoare de anticolinesterazic organofosforic, simptomele obișnuit observate în reacția organismului mamiferelor sînt: defecație, lăcrimare, contracție și fibrilație musculară, slăbirea tonusului muscular urmată de o stare de deprimare. Moartea este precedată de convulsii.

Apariția simptomelor este rapidă în cazul C.O.F. care nu necesită activare și latentă în cazul unor doze normale de fosforotio-nați și fosforemide care necesită activare pentru a deveni inhibitori. Tabloul detaliat al simptomelor în cazul intoxicației mamiferelor cu C.O.F. a constituit obiectul a numeroase cercetări [217-223].

În general, se acceptă că asfixia este ultima cauză a morții mamiferelor [224-225]. Asfixia poate fi datorată: a) bronhoconstricției; b) unei extrem de scăzute presiuni sanguine; c) blocării neuromusculare a mușchilor respiratori; d) inhibării centrului respirator din creier. Așadar moartea mamiferului este rezultatul unor efecte înlănțuite determinate de C.O.F. în organism: a) inhibarea colinesterazei; b) acumularea de acetilcolină; c) întreruperea funcțiilor nervoase, centrale și periferice; d) pauze respiratorii; e) asfixia.

După intoxicare:

a) nivelul colinesterazei va scădea foarte rapid la tratarea cu fosfați și mai lent în cazul fosforamidelor și fosforotio-
sților,

b) faza ulterioară de refacere a enzimei va dura ore pentru fosfații dimetilsubstituiți, zile pentru fosfații dietilsubstituiți și va fi cu greu realizabilă la fosfații diisopropil substituiți,

c) în toate cazurile proporția în care enzima va fi reactivată va depinde de durata fenomenului de îmbătrânire la care a fost supusă enzima fosforilată.

În ceea ce privește acetilcolina, inhibarea colinesterazei determină o creștere a cantității prezente în organism, nivelul creșterii depinzând de tipul de colinesterază și de natura C.O.F.

2.4. Efecte și mecanism de acțiune la artropode.

Cunoașterea sistemului nervos al insectelor, a funcțiilor lui chimice și a efectelor biochimice cauzate de insecticide nu este atât de profundă pe cât ar fi de așteptat dat fiind importanțele consecințe economice a daunelor provocate de către insecte. Totuși, gândacii și lăcustele au fost bine studiate.

Sistemul nervos al gândacilor constă dintr-o serie de ganglioni care sînt comparabili nu cu ganglionii periferici ai mamiferelor ci cu creierul și coloana vertebrală sau, după unele lucrări, cu sistemul central. Ganglionii insectei constituie centrul de coordonare. Protecția acestora față de substanțele exogene este asigurată de o membrană continuă protectoare. Spre deosebire de mamifere teaca melinică lipsește în sistemul nervos al insectelor. Mușchii insectelor sînt inervați doar prin cîțiva axoni, fiecare fibră musculară avînd mai multe terminații subțiri separate, în toate direcțiile [226, 227] .

Sistemul autonom al artropodelor este constituit doar din sistemul simpatic. Acest sistem, în insecte nu are sinapse periferice și în consecință nu are ganglioni periferici, ca în mamifere, sensibili la acțiunea C.O.F. [60, 226, 228-229] .

Transmisia axonică la insecte este în multe privințe ca și la vertebrate, depinzînd de raportul ionic Na^+/K^+ . În legătură cu acest raport, s-a constatat [230-231] că la insectele ierbivore concentrația de K^+ este înaltă, iar cea de Na^+ scăzută pe cînd la insectele carnivore există o valoare mare a raportului Na^+/K^+ .

Din punct de vedere chimic, mecanismul neuromuscular al transmiterii impulsului în insecte este relativ necunoscut; sistemul colinergic al funcțiunii neuromusculare din vertebrate lipsește complet la gândaci. Aceasta explică ineficacitatea administrării de acetilcolină sau atropină asupra transmiterii impulsului.

Faptul că unii C.O.F. exercită o influență asupra funcțiilor nervoase centrale, însă nu asupra activității musculare a gândacilor, poate fi de asemenea explicată prin absența controlului colinergic asupra terminațiilor senzitive.

Există dovezi că transmiterea chimică la joncțiunea neuromusculară a insectelor este non-colinergică și că mediatorul chimic al transmiterii sinapselor excitatorii este acidul L-glutamic [232].

O altă problemă care reține atenția este transportul insecticidelor la sistemul nervos al artropodelor. Se pare că există trei etape de transport în accesul insecticidului la situsul activ: a) pătrunderea prin cuticulă ; b) răspîndirea prin țesuturi pînă la sistemul nervos și c) pătrunderea în sistemul nervos.

Acetilcolina și acetilcolinesteraza au fost găsite în multe specii de artropode dar este de remarcă că acetilcolina nu este toxică față de insecte și este ineficace față de transmisiile sinaptice din insecte [52,233]. Aceasta se explică prin faptul că sistemul nervos al insectelor este protejat printr-o membrană care funcționează ca barieră ionică față de acetilcolina [234].

În prezent, se consideră că insecticidele acționează de asemenea printr-un mecanism "anticolinesterazic" deși există unele rezerve că acesta ar fi singurul. Există dovezi că etapele biochimice ale intoxicației artropodelor cu C.O.F. sînt: inhibarea colinesterazei, producerea unui exces de acetilcolină, întreruperea funcționării sistemului nervos și moartea.

Principalele obiecții aduse "ipotezei anticolinesterazice" sînt:

a) observația că lăcustele supraviețuiesc chiar unei puternice inhibări colinesterazice,

b) faptul că colinesteraza nu este în mod substanțial inhibată în momentul morții insectei.

Atîta timp însă cît nu s-a putut face dovada existenței unui alt sistem enzimatic în afara celui colinesterază/acetilcolină care să aibă importanță primordială în funcționarea sistemului nervos al artropodelor, mecanismul anticolinesterazic rămîne cea mai bună explicație a modului de acțiune al insecticidelor.

Simptomele obișnuite manifestate de insecte la acțiunea C.O.F. cu activitate anticolinesterazică sînt următoarele: creșterea iritabilității, hiperexcitabilitate, convulsii ale întregului corp, paralizia și în final moartea. Tabloul simptomelor în cursul intoxicației depinde de natura insecticidului și de doză, de calea de administrare.

În unele cazuri s-a putut pune în evidență o corelație între simptome și % de inhibare colinesterazică. În general, o inhibare în proporție de 50% conduce la hiperexcitabilitate, 65% la K.D., 90% la amorteală și 98% la moarte [235]. Totuși aceste valori pot varia în limite largi cu natura C.O.F. Astfel, nivelul inhibării colinesterazei din mușca domestică necesar pentru K.D. într-o serie de 6 insecticide organofosforice variază între 31,1-86,7% [235].

Brady și Sternburg [236] au stabilit de asemenea corelații între nivelul inhibării colinesterazice la K.D. și reactivitatea C.O.F. respectiv, estimată prin stabilitatea față de hidroliză în apă și prin constanta de viteză a reacției cu colinesterază. Ei ajung la concluzia că nivelul inhibării de K.D. variază invers proporțional cu reactivitatea C.O.F. și explică aceasta cu ajutorul următoarelor ipoteze:

1. Inhibitorii cu reactivitate mare determină o acumulare rapidă de acetilcolină în sinapsă. Concentrația înaltă de acetilcolină, pe de o parte, protejează colinesteraza față de o inhibare ulterioară, iar pe de altă parte mărește activitatea nervoasă și K.D.-ul,,

2. C.O.F. reacționează nu numai cu acetilcolinesteraza ci și cu situsul receptor ceea ce poate influența nivelul inhibării colinesterazice corespunzător K.D.-ului,

3. C.O.F. provoacă eliberarea de substanțe androgene care stimulează activitatea electrică și produce un exces de acetilcolină și în consecință K.D.-ul.

2.5. Efecte manifestate în plante

Se definește ca activitate sistemică a unui pesticid capacitatea de a fi transportat în interiorul plantei. Așadar, pesticidele sistemice se caracterizează prin faptul că pătrund în plantă prin rădăcină, tulpină sau frunze și sînt transportate prin sevă în țesuturi, în concentrații suficiente pentru a provoca moartea dăunătorilor care se hrănesc cu planta respectivă. Unele pesticide sistemice sînt exudate de plantă acționînd ulterior ca pesticide

de contact sau respirație ceea ce va duce la distrugerea și a dăunătorilor care nu se hrănesc cu planta. În acest fel, o activitate sistemică permite combaterea eficace și selectivă a tuturor dăunătorilor care vin în contact într-o formă sau alta cu planta.

Sînt numeroase cazuri în care pesticidul poate fi transportat numai pe o distanță extrem de limitată, ca de exemplu, de la o suprafață la alta a frunzei. În aceste cazuri de transport limitat nu se vorbește de activitate sistemică ci de "acțiune în profunzime" [237,238] .

Pesticidele cu activitate sistemică au fost clasificate [238] în:

- a) stabile - cele care nu sînt metabolizate în plantă,
- b) endolitice - cele care sînt degradate și inactivate astfel încît toxicitatea inițială este anihilată total sau în proporție de 98%,
- c) endometatotoxice - cele care sînt activate printr-o degradare realizată în plantă, iar compusul activ rezultat este prezent în plantă.

O serie de cercetări au relevat importanța unor proprietăți fizice în determinarea acțiunii sistemice, cum ar fi: a) liposolubilitatea absolută pentru tulpine și frunze și solubilitatea absolută pentru rădăcini, b) raportul dintre liposolubilitate și solubilitate în apă, c) coeficientul de partiție ulei/apă [239] .

Conținutul de fosfor disponibil pentru plante în mediul de nutriție poate influența comportarea sistemică în plantă a C.O.F. [240] .

În ceea ce privește metabolismul C.O.F., în plante se constată că acesta decurge în multe privințe ca și în insecte și mamifere.

2.6. Metabolismul pesticidelor organofosforice

În studiul mecanismului de acțiune a pesticidelor un loc deosebit de important îl ocupă studiul evoluției lor în organisme. În această evoluție intervine un ansamblu foarte complex de procese fizice, fizico-chimice, chimice și biochimice în care sînt implicate toxicele ajunse în organism și anume: viteza de absorbție a toxicului la locul de introducere, caracterul distribuției și durata de menținere în diferite organe, transformările metabolice, căile de eliminare, etc. Fiecare din acești factori menționați pot dobîndi o influență hotărîtoare asupra efectului toxic al pesticidului.

Problema transformărilor metabolice ale C.O.F. are un interes practic deoarece determină în mod frecvent toxicitatea lor selectivă și contribuie la o cunoaștere mai completă a reacțiilor acestora în organism, aspecte esențiale care se cer clarificate în programul unor sinteze dirijate de noi pesticide, cu proprietăți prestabilite.

Înalta reactivitate a C.O.F. determină ușurința cu care ele sînt implicate în transformările metabolice iar structura lor foarte variată explică complexitatea acestora. [241-245].

Deși sînt cunoscute zeci de mii de C.O.F., se cunoaște metabolismul doar pentru un număr foarte limitat dintre ele.

Rozengart [244] dă următoarea schemă de clasificare a căilor de transformare fermentativă a pesticidelor organofosforice:

O. Fosforilare

I. Hidroliză

1. Acțiunea fosfatazei

a) ruperea legăturii P - X

b) ruperea legăturii P - O Alchil

2. Acțiunea carboxiesterazei (- CO - OR)

3. Acțiunea amidazei (- CO - NR₂)

4. N - Desalchilare (>N - Alchil)

II. Oxidare

1. P = S → P = O

2. Sulfit → sulfoxid → sulfonă

3. N- Alchil → N - oxialchil

4. Aril-alchil → Aril-oxialchil

III. Reducere

IV. Dehidroclorurare

V. Transalchilare

O reprezentare posibilă a reacțiilor chimice implicată în organism pe parcursul formă activă (inactivă) → situs receptor (prin activare sau degradare) este arătată în figura 20. [60].

În schema prezentată, în primul rînd, figurează reacția de fosforilare ca etapă obligatorie a transformărilor suferite de toate combinațiile organofosforice care manifestă acțiune anticolinesterazică.

În ceea ce privește efectul exterior al transformărilor metabolice asupra toxicității și activității anticolinesterazice a C.O.F. trebuie reamintit că în unele cazuri ele conduc la pierderea acțiunii biochimice și anticolinesterazice (dezactivare) sau la creșterea bruscă a capacității inhibitorii (activare). Căile de

metabolizare a principalelor pesticide organofosforice sînt prezentate în anexa 2.

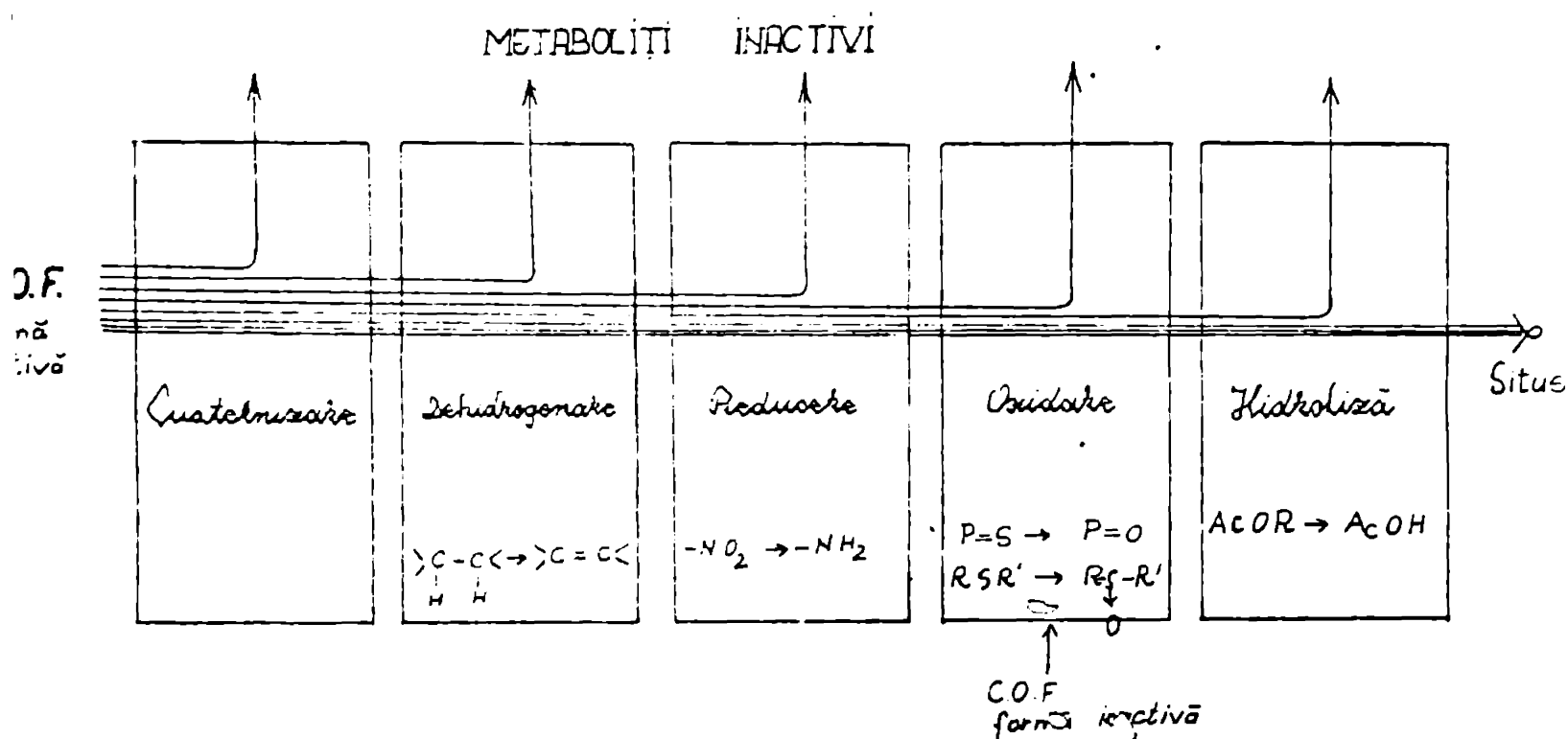


Fig.20.

2.6.1. Hidrolize

Descompunerea hidrolitică reprezintă calea cea mai frecvent întâlnită în transformarea fermentativă a C.O.F., accesibilă tuturor anticolinesterazelor organofosforice. În funcție de structura acestora, legătura scindată hidrolitic poate fi diferită. Hidroliza poate fi realizată prin:

A. Acțiunea fosfotazei. Aceasta poate scinda hidrolitic:

a) legătura P - X, în care X reprezintă o grupă electronegativă. Este un tip de transformare metabolică foarte răspîndit (D.F.F. tebutinul, sarinul, fosfacolul, tetraetil pirofosfatul - anexa 2) în urma căreia proprietățile toxice și anticolinesterazice ale C.O.F. se pierd întotdeauna.

b) legătura P - OAlchil. Legătura afectată este mult mai rezistentă. Ruperea ei hidrolitică se întâlnește mult mai rar ca (a), putînd avea loc anterior sau ulterior unui proces de tip (a) (ronnelul, endationul, melationul - anexa 2). Dimetil fosfații intervin mult mai ușor ca dietil fosfații în o asemenea transformare. În toate cazurile, eliminarea grupii alcoxi-fosfor-legată conduce la micșorarea bruscă a toxicității C.O.F. deoarece OH-ul ce apa-

re în locul ei micșorează sensibil deficitul de electroni al atomului de fosfor.

B. Acțiunea carboxiesterazei

Acest tip de reacție este propriu tuturor C.O.F. care conțin grupe esterice. Scindarea grupării carbetoxi se face anterior celei a legăturii P - X (malationul, fosdrinul, acetionul - anexa 2) și determină anihilarea acțiunii toxice a C.O.F., dacă produșii care se formează au o natură ionică. Efectul nucleofil al sarcinei anionului împiedecă interacțiunea acestora cu colinesteraze.

Se cunosc însă și cazuri când hidroliza carboxiesterazică produce activarea C.O.F. (acetil dipterex → dipterex ; anexa 2).

C. Acțiunea amidazică

Are loc la C.O.F. cu grupări carbamidice putînd constitui chiar prima etapă a transformărilor metabolice (fosfamida - anexa 2).

D. N - Desalchilarea

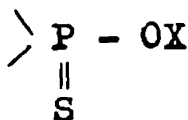
Uneori, la C.O.F. cu grupări - CO - N(Alchil)₂ nu se elimină grupele alchil-amidice în întregime ci doar grupele alchil legate de azot (fosfamidonul). În cazul dielchil amidelor, N-desalchilarea reprezintă un proces de activare deoarece monoalchil amidele sînt cu mult mai toxice decît produsul inițial.

2.6.2. Oxidarea [241]

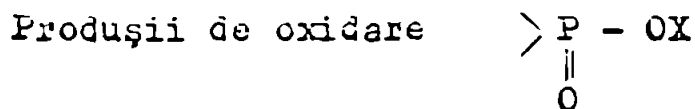
Transformările metabolice pe cale oxidativă sînt frecvent întîlnite. Ele se pot desfășura în mod diferit, funcție de structura C.O.F. Oxidarea C.O.F. conduce de regulă la creșterea activității anticolinesterazice și a toxicității acestora.

A. Oxidarea tiofosfaților în fosfați

Practic toți tiofosfații sînt ușor oxidați de sistemul fermentativ al organismelor la fosfații corespunzători (tiofos → fosfacol ; anexa 2). Ca urmare, are loc o trecere bruscă a activității anticolinesterazice și a toxicității combinațiilor. S-a emis ipoteza că slabul caracter anticolinesterazic al compușilor



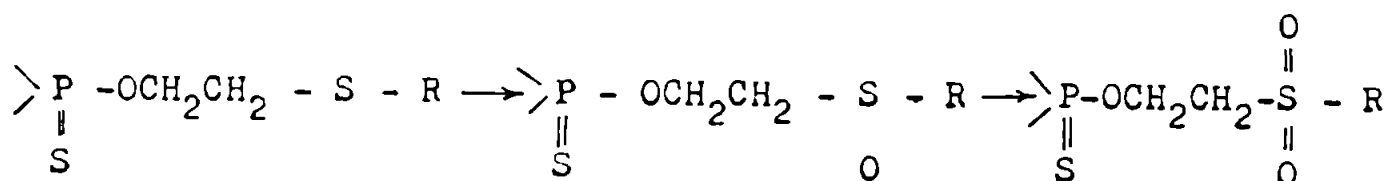
ar fi datorat unor impurități- izomeri sau analogi P = O care nu pot fi evitate în cursul purificării substanțelor.



sînt metaboliții activi ai tuturor pesticidelor cu structură de tiofosfați.

B. Oxidarea sulfului tioesteric

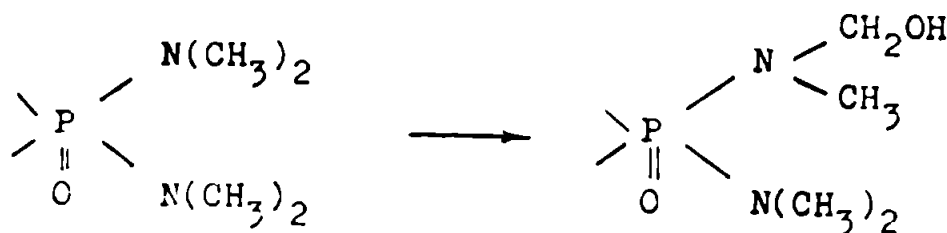
C.O.F. care conțin sulf tioesteric trec prin oxidare în sulfonizii și apoi în sulfonele corespunzătoare (mercaptofosul).



O asemenea transformare conduce la mărirea eficacității anticolinesterazice dar trebuie avut în vedere că în paralel are loc și oxidarea sulfului tionic, proces determinant de viteză în modificarea toxicității (mercaptofosul-enexa 2). Oxidarea unui analog al mercaptofosului, disistona, nu determină schimbarea toxicității,

C. Oxidarea grupei amido-alchilice

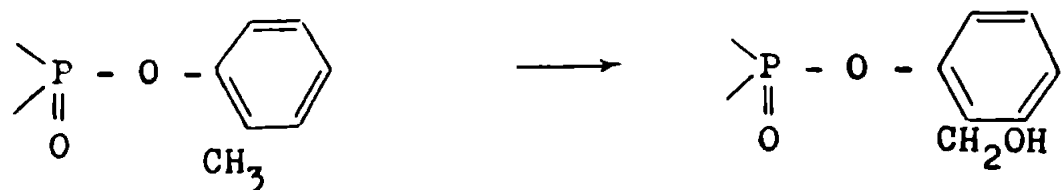
Pentru mulți derivați organofosforici care conțin grupe N-alchilice, transformarea metabolică caracteristică este oxidarea acestei grupe cu o creștere sensibilă a acțiunii toxice și anticolinesterazice (schradan, dimefos)



În cazul în care grupele dimetilamino sînt înlocuite cu dietilamino, capacitatea de activare prin oxidare a grupării amido-alchilice scade mult.

D. Oxidarea grupei de aril-alkil

În cazul în care gruparea aril din C.O.F. este constituită din grupe fenilice alchil-substituite este posibilă o metabolizare a compusului care să aibă ca efect oxidarea alchilului (tri-orto-crezol fosfat)



urmată eventual de o ciclizare spontană nefermentativă.

2.6.3. Reducerea [244]

Transformarea metabolică reductivă este proprie C.O.F. ce conțin ca grupare acidă substituenți de tip $-\text{C}_6\text{H}_5 - \text{NO}_2$ și conduce la $-\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ (paration, fosfocol).



Apariția grupei NH_2 , substituent puternic electrodonor, micșorează capacitatea electrofilă a atomului de fosfor și determină detoxificarea compusului inițial.

2.6.4. Dehidroclorurarea [244]

Unele pesticide organofosforice pot suferi în organism o transformare caracteristică: eliminare de HCl urmată de transpoziție (clorofos \longrightarrow dimetil diclorvinil fosfat). Procesul decurge ușor în soluție apoasă dar și în organismul insectelor. Produsul dehidroclorurat are toxicitate și activitate anticolinesterazică superioară compusului inițial.

2.6.5. Transalchilarea

S-a constatat că unele C.O.F., în soluție apoasă, pot suferi o reacție de transpoziție intermoleculară prin care o moleculă de substanță se alchilează pe seama celeilalte (metasistox). Această cale de transformare metabolică nu a fost deocamdată pusă direct în evidență dar trebuie luate în considerare ca o posibilă modalitate de activare în organism a unor C.O.F.

Trecînd în revistă principalele căi de transformare metabolică a C.O.F. trebuie subliniat că una și aceeași substanță poate fi implicată în mai multe reacții ceea ce duce la o mare varietate de produși de metabolizare. Unele dintre aceste reacții determină o însemnată activare a pesticidului pe cînd altele, dimpotrivă, conduc la compuși anticolinesterazici inactivi și netoxici. Raportul vitezelor reacțiilor posibile pentru un C.O.F. diferă de la un organism la altul ceea ce își găsește exprimarea într-o toxicitate selectivă. Așa de exemplu, acetionul, foarte toxic pentru muște dar slab toxic pentru gîndaci și mamifere, își datorește această selectivitate faptului că în organismul muștelor transformarea metabolică predominantă este oxidarea sulfului tionic care duce la o activare în timp ce în organismul mamiferelor acetionul suferă o hidroliză a cărui efect este inactivarea și detoxifierea.

În prezent, fermenții care metabolizează C.O.F. sînt în general cunoscuți. Ei sînt concentrați în principal în celulele microsomatice ale ficatului. Un interes practic deosebit îl prezintă studiul posibilităților de a influența activitatea fermenților care metabolizează C.O.F. în sensul atenuării sau intensificării acțiunii lor. S-a constatat că eldrinul, activînd numeroase esteraze și ceci și hidroliza C.O.F., va proteja organismele cărora le-a fost administrat de acțiunea toxică a acestora. Introducerea simultană în organism a malationului cu alte C.O.F. are ca efect o toxicitate mult superioară unei simple însumări a efectelor, ca urmare a faptului că combinația parteneră reduce activitatea esterazei care hidrolizează malationul la legătura esterică. Din aceste cercetări experimentale rezultă necesitatea unei permanente dezvoltări a studiului activatorilor și inhibitorilor fermenților care realizează metabolismul C.O.F., pentru creerea unor metode raționale de profilaxie și terapie față de efectele toxice precum și pentru obținerea toxicității selective.

În spiritul teoriei lui Bodie privind finalitatea transformărilor fermentative a substanțelor biologic active, toate căile de metabolizare a C.O.F. conduc la formarea unor substanțe mai polare și mai puțin liposolubile, ușor de eliminat de organism. Jarezyk [246] stabilește o relație între oxidarea enzimatică (activare), hidroliza enzimatică (detoxicare) și toxicitatea unui compus organofosforic:

$$\text{Toxicitate} = \frac{\text{Oxidare enzimatică (activare)}}{\text{Oxidare hidrolitică (detoxicare)}}$$

verificându-o cu rezultate bune în cazul unor derivați ai parationului.

Sim [247] propune o relație cantitativă între toxicitatea la insecte și vitezele de penetrație, activare și detoxificare a C.O.F. Prin "penetrație" se înțelege efectul unor factori fizici ca permeabilitatea, absorbția, partiția, excreția și transportul; prin "detoxificare" - factori chimici și enzimatici ca descompunerea, metabolismul și conjugarea, iar prin "activare" - oxidarea sau un alt proces în care activitatea anticolinesterazică este mărită considerabil.

După aplicarea insecticidului, aceste trei procese decurg simultan însă cu viteze diferite, iar raportul dintre aceste viteze determină toxicitatea aparentă a substanței.

Relația dintre viteza de penetrație P și viteza de detoxicare D determină acumularea în produși finali, factori foarte importanți în determinarea acțiunii toxice.

Pentru tiofosfonați, viteza de activare A devine de asemenea un factor însemnat.

Presupunând că cele trei procese decurg după mecanisme cu cinetică de ordinul unu, penetrația, activarea și detoxicarea, în intervalul de timp $0 - t$, vor fi date de ecuațiile :

$$\text{Penetrație} = \int_0^t P \cdot dt$$

$$\text{Activare} = \int_0^t A \cdot dt$$

$$\text{Detoxificare} = \int_0^t D \cdot dt$$

a căror reprezentare grafică este prezentată în figura 21.

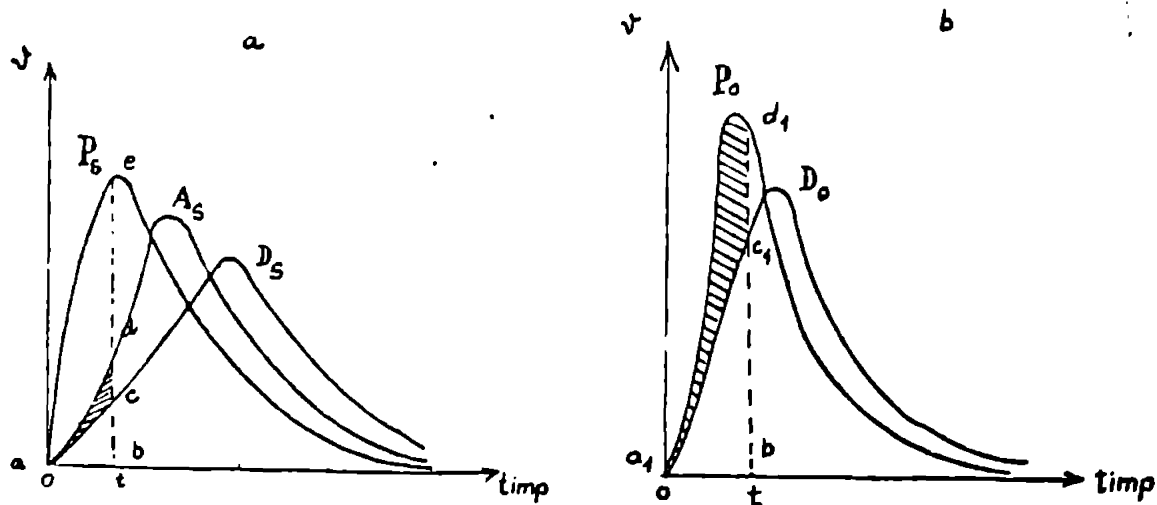


Fig.21. a) Compuși $P = S$; b) Compuși $P = 0$

În figura 21.a., aria abe corespunde penetrației, aria abd activării, iar abc detoxificării produse în intervalul de timp $0 - t$. Aria hașurată acd corespunde acumulării în produs activ ($P = 0$) și ea va crește în timp.

Figura 21.b. pentru compuși $P = 0$ se interpretează analog. Se observă că acumulările celor două tipuri de compuși sînt în relația:

$$(a_1 c_1 d_1)_{P=0} \gg (acd)_{P=S}$$

2.7. Toxicitatea pesticidelor organofosforice. Exprimare cantitativă

Problema stabilirii unor dependențe cantitative între structura chimică a C.O.F. și activitatea lor biologică se extinde și asupra toxicității. În toxicologie însă, rezolvarea unor probleme de acest tip este extrem de complicată deoarece acțiunea substanțelor depinde esențial de viteza de absorbție, de caracterul repartiției și acumulării lor în organism, de viteza și caracteristica reacțiilor de metabolism.

Cel mai utilizat indice prin care se exprimă toxicitatea față de dăunători este doza letală minimă, DL_{50} . Aceasta reprezintă cantitatea de substanță toxică (exprimată în mg., g. sau mmoli) raportată la o unitate de greutate corporală (de obicei, kg.) necesară pentru a provoca o mortalitate de 50%. Mai rar se utilizează DL_{100} . La plante se utilizează DL_{95} [248, 249, 250].

S-a constatat că doza letală depinde de temperatură. La majoritatea pesticidelor DL_{50} crește cu ridicarea temperaturii dar la C.O.F. această mărime scade cu ridicarea temperaturii (coeficient de temperatură pozitiv).

Prin natura lor pesticidă C.O.F. sînt în majoritate toxice și față de om și animalele cu sînge cald. Toxicitatea față de om se măsoară indirect prin teste pe șoareci, sobolani, iepuri, cobai prin determinarea, cantității de substanță (în mg/kg-corp) necesară pentru a omorî jumătate dintr-un număr mare de animale testate. Valorile DL_{50} se exprimă cu specificarea modului de administrare a preparatului (oral, subcutanat, pensulare).

Toxicitatea față de om se poate manifesta acut sau cronic. Intoxicațiile acute pot fi evitate respectînd normele de protecție reglementate pentru C.O.F. respectiv în timp ce intoxicațiile cronice, datorate acumulării de reziduuri toxice în organism, cer stabilirea și respectarea unei "toleranțe limită" extrem de severă

Utilizarea mării DL_{50} ca unic criteriu de exprimare a toxicității unui C.O.F. este insuficientă și poate conduce la unele concluzii greșite deoarece ea caracterizează doar limita superioară a toxicității la nivelul efectului mortal. De aceea se cere urmărirea dependența "doză-efect" la modul de "sus în jos" (de la doze și concentrații letale la doze și concentrații inefectve) și stabilirea "graniței inferioare" a toxicității. Pentru majoritatea C.O.F. această graniță este reprezentată de mătirea I_{50} - concentrația molară de substanță care determină o inhibare de 50% a colinesterazei din organism. Raportul mărimilor ce stabilesc limitele superioare și inferioare ale toxicității, DL_{50} / I_{50} , caracterizează zona acțiunii toxice.

S-a constatat existența unei dependențe între mărimea zonei de toxicitate și structura unor C.O.F. Efectuarea unor mici modificări în structura acestora determină nu numai schimbarea toxicității ci și variația extinderii zonei acțiunii toxice.

Zona de acțiune toxică se caracterizează prin panta dreptei care exprimă dependența "doză-efect" ($tg \alpha$) (figure 22).

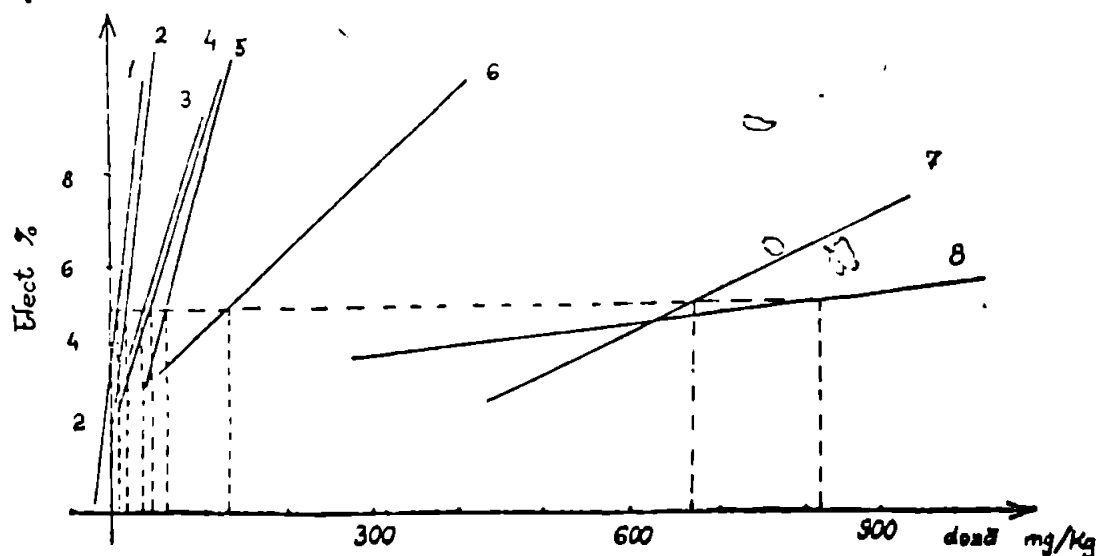


Figure 22.

1 - M - 74; 2 - mercaptofos; 3 - metafos; 4 - M-81; 5 - metil-mercaptofos; 6 - fosfamid; 7 - metil nitrofos; 8 - clorofos.

Prezintă de asemenea interes calculul indicilor care estimează simultan toxicitatea și zona de acțiune toxică. Mărimea

$$tg \alpha / DL_{50}$$

reprezintă coeficientul integral al toxicității și exprimă mai complet diferențele în proprietăți toxice ale C.O.F. decât DL_{50} .

Caracterizarea gradului de pericolozitate a pătrunderii

substanței toxice în organism prin căile respiratorii se face prin așa-numita toxicitate efectivă care reprezintă produsul toxicității cu volatilitatea. [249]. În cazul multor C.O.F. această mărime exprimă mai net diferențele de toxicitate decât compararea valorilor DL_{50} .

Periculozitatea pătrunderii C.O.F. prin piele se caracterizează prin raportul $DL_{50}(\text{cutanat})/DL_{50}(\text{intravenos})$.

Un alt criteriu indispensabil pentru evaluarea periculozității pesticidelor pentru om și mamifere este gradul de manifestare a efectelor lor exprimat prin coeficientul de efect cumulativ ca raport al dozei letale a substanței administrate zilnic în experimentul cronic și DL_{50} acută. Efectul cumulativ al C.O.F. se pune în evidență de obicei prin introducerea zilnică a $0,2 - 0,1$ din DL_{100} sau DL_{50} .

Dependența proprietăților cumulative a unor C.O.F. insecticide de mărimea dozelor administrate zilnic unui organism de testare (figura 23) arată că, spre deosebire de pesticidele din clasa compușilor organoclorurați, în cazul C.O.F. există o doză critică a cărei depășire conduce la un efect cumulativ.

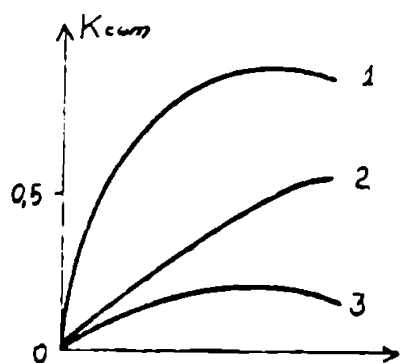


Fig. 23.

- 1- metilnitrofos
- 2- clorofos
- 3- fosfamid

Toxicitatea selectivă a C.O.F. poate fi caracterizată cantitativ prin coeficientul de selectivitate, definit prin raportul

$$K = \frac{DL_{50} (\text{șoarece})}{DL_{50} (\text{musca domestica})}$$

Datele experimentale [250] arată că acest coeficient K poate varia între 10 și 30 dar în multe cazuri poate depăși chiar 100, ceea ce arată o toxicitate de stîtes ori mai mare la insecte față de animalele cu sînge cald.

Elucidarea cauzelor și mecanismului selectivității C.O.F. constituie o problemă centrală a biochimiei și toxicologiei acestui

grup de substanțe, de a cărei rezolvare depinde în mare măsură fundamentarea unor principii teoretice de sinteză dirijată a unor pesticide cu acțiune optimă. Foarte interesante din acest punct de vedere sînt C.O.F. care prin mici variații ale structurii își modifică foarte mult coeficientul de selectivitate menținîndu-și DL_{50} (insecticid) dar micșorîndu-și foarte mult DL_{50} (mamifere). Astfel, în seria metil-, etil-, metil etil nitrofos [249], [251-253] DL_{50} (șoarece) variază de la 470 la 21 și respectiv 18 mg/kg corp, iar în seria acetofos, metil acetofos K crește de la 38 la 85 (raporturile DL_{50} (șoarece) / DL_{50} (musca domestică) fiind realizate ca 250 : 6 și 1020 : 12) [249, 254].

În ceea ce privește relația dintre toxicitate și transformările metabolice cu efect de activare sau dezactivare aceasta fost deja discutată în paragraful anterior 2.6.

Prin rezistența dăunătorilor se definește în mod comparativ insensibilitatea dobîndită de unele specii de viețuitoare față de o anumită substanță toxică, la doze care sînt letale la indivizi ale căror generații anterioare nu au fost încă în contact cu substanța respectivă [9], [230].

Se admite că rezistența față de un toxic apare în urma unei selecții artificiale a indivizilor rezistenți. Viteza creșterii rezistenței se mărește proporțional cu intensitatea selecției și cu numărul de generații de insecte ce apar într-un an. Fenomenul de rezistență devine sesizabil după 10-20 generații.

Fenomenele de rezistență sînt destul de frecvent întîlnite la artropode dar mecanismul prin care ele se instalează în organism nu a fost încă deplin elucidat. Cel mai important mecanism de rezistență față de C.O.F. insecticide pare a fi un control genetic potențial al hidrolizei enzimatică în organismul insectei (rezistență fiziologică). Ca măsură a rezistenței față de C.O.F. din seria parationului avînd în vedere relațiile puse în evidență între activarea (oxidarea), degradarea (hidroliza) și toxicitatea acestora, s-a propus [256]

$$R = \frac{1}{T} = \frac{\text{Hidroliza enzimatică (detoxificare)}}{\text{Oxidarea enzimatică (activare)}}$$

Deci rezistența față de insecticidele organofosforice ar fi urmasul modificării raportului dintre oxidarea și hidroliza enzimatică în detrimentul primului proces.

3. Pesticide organofosforice utilizate în practica combaterii dăunătorilor. Caracterizarea reprezentanților

Avînd în vedere că în cursul lucrării s-au făcut și se vor face repetate referiri la structurile compușilor organofosforici care au dobîndit o utilizare curentă în practica combaterii dăunătorilor s-a considerat oportună prezentarea sub formă de anexă (anexa 1) a tuturor pesticidelor organofosforice menționate în literatura de specialitate ca fiind produse la scară industrială.

Compușii organofosforici din anexa 1, sînt grupați din punct de vedere al structurii chimice în următoarele clase:

1. Derivați ai acidului fosforos
2. Derivați ai acidului fosforic
3. Derivați ai acidului tiofosforic
4. Derivați ai acidului diti fosforic
5. Derivați ai acidului pirofosforic
6. Derivați ai acidului fosfonic
7. Săruri de fosfoniu

Ei sînt caracterizați prin proprietățile lor fizice și chimice, prin acțiune biologică și toxicitate, mod de administrare și specificarea dăunătorilor combătuți.

Anexa 1 este astfel concepută încît poate fi corelată cu anexele 2 - transformările metabolice ale pesticidelor organofosforice și 3 - nomenclatura bolilor, agenților fitopatogeni și a dăunătorilor animalii combătuți cu compușii fosforului.

Capitolul II

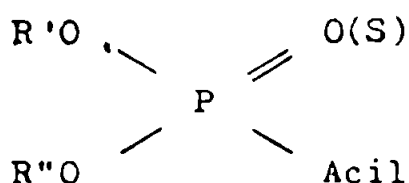
DEPENDENTE CALITATIVE INTRE STRUCTURA SI ACTIVITATE PESTICIDA LA COMPUSII ORGANOFOSFORICI

1. Elemente structurale indispensabile manifestării activității biologice la compușii organofosforici

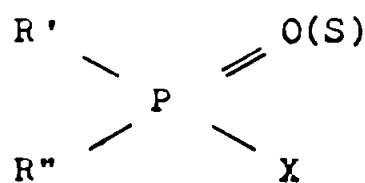
În 1938 Schrader [257] formulează o regulă empirică prin care prevede activitate biologică la acei compuși ai fosforului care corespund formulei:



El generalizează ulterior [47, 258, 259] această structură în formulele



(2)



(3)

În formula generală (3), R' și R'' sînt grupe alcoxi, alchil sau amino, iar gruparea X, inițial numită într-un sens larg "acil" este un rest de acid anorganic (Cl, CN) sau un rest organic, de obicei al unei funcțiuni acide (enol, fenol, mercepto) [47, 258].

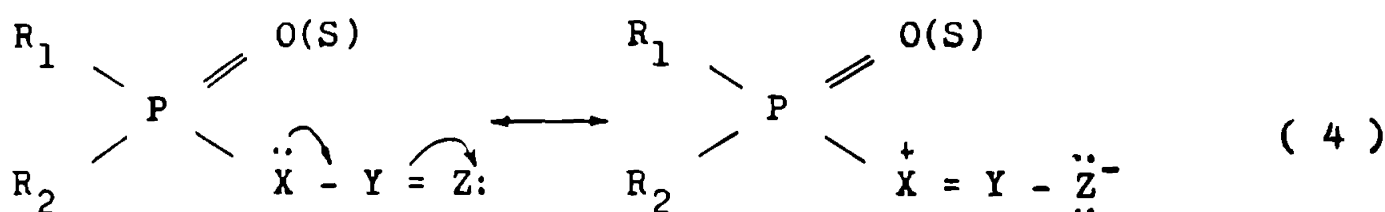
Condiția existenței unei grupe acil în C.O.F. ca grupă eliminantă nu este însă suficientă pentru a explica în toate cazurile acțiunea pesticidă.

După circa 25 de ani de la formularea sa, regula empirică a lui Schrader, a fost corelată teoretic [260] cu capacitatea de fosforilare a C.O.F. pentru formarea enzimei fosforilate.

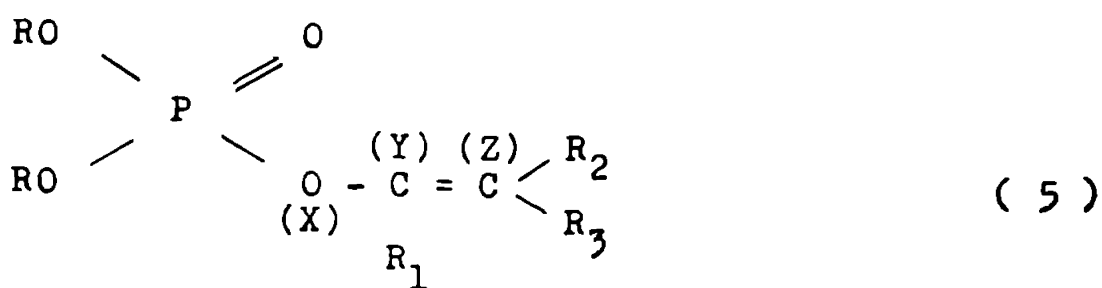
Clark, Nutkinson, Kirby și Warren [260] descriu compusul care fosforilează enzima ca un sistem P - XYZ în care electronii legăturii P - X pot fi acceptați de Z, X, Y Z sînt de obicei

H, C, N, O, S sau halogen. Capacitatea de fosforilare este mărită
 - când legătura P - X este slăbită în mod natural adică
 atunci când este absentă conjugarea $p\pi - d\pi$ între electronii
 neparticipenți ai atomului X (N, O, S) și fosfor
 - când grupa X va fi cât mai electronegativă posibil sau fi
 făcută electronegativă prin agenți electrofilii sau substanțe oxi-
 dante,
 - când bazicitatea atomului X este redusă prin introducerea
 unui atom Y sp^2 - hibridizat.

Aceste cerințe electronice care contribuie la slăbirea legă-
 turii P - X se pot deduce din reprezentarea schematizată, ce
 formule mezomere, a structurii (3)

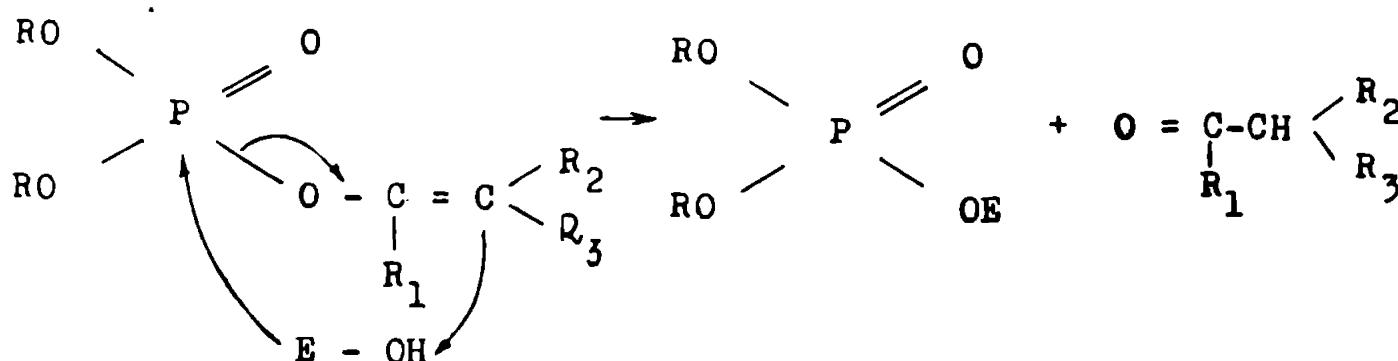


Un exemplu tipic de structură care realizând cerințele elec-
 tronice menționate manifestă acțiune pesticidă este aceea a enol
 fosfaților

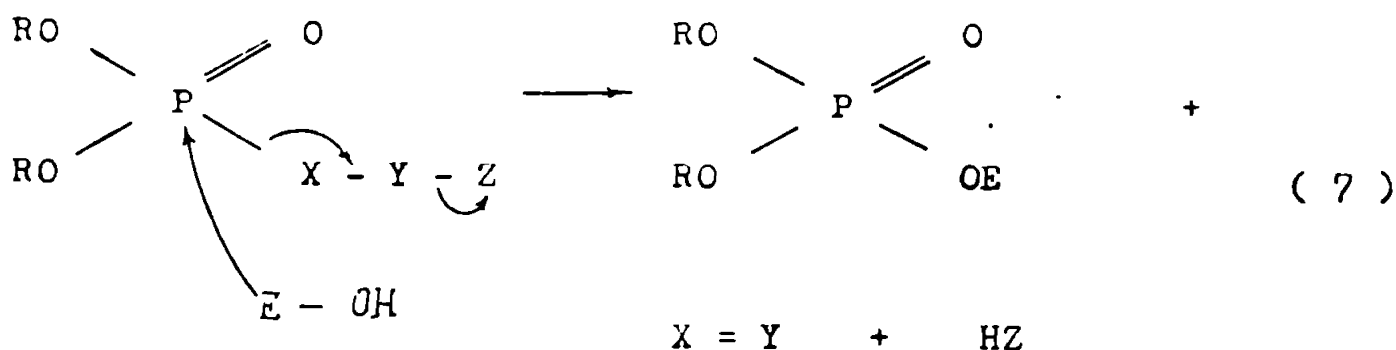


în care R_2 și R_3 sînt grupări atrăgătoare de electroni
 (ex. D.D.V.P.).

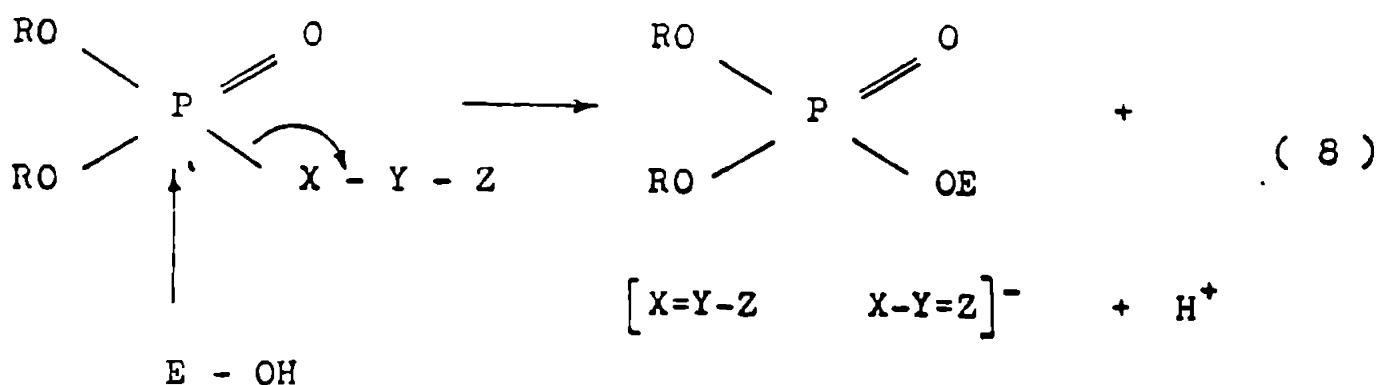
Reacția de fosforilare a enzimei decurge în acest caz după
 schema:



O legătură simplă între Y și Z poate conduce la o fragmentare a moleculei (ex. azinfosul) :



Dacă X, Y și Z pot constitui ca grupă eliminantă un anion stabilizat prin rezonanță, fosforilarea poate fi descrisă prin ecuația (8) :



Regula empirică a lui Schrader completată cu argumentele teoretice ale lui Clark și colaboratorii [260] privind condițiile structurale indispensabile unui C.O.F. pentru a manifesta activitate biologică, rămâne un principiu extrem de important și util în sinteza de noi pesticide organofosforice. De fapt, H.Hoffmann [261] afirmă că "dacă regula lui Schrader este interpretată în modul cel mai general, nu ne putem aștepta la excepții. Activitatea pesticidă a oricărui C.O.F. este legată de capacitatea de fosforilare adică, în orice caz trebuie să existe o grupă legată la fosfor care să determine scilarea unui situs corespunzător al enzimei".

Totuși, dacă structura "de tip Schrader" indică cu înaltă probabilitate clase de compuși susceptibile de activitate biologică nu înseamnă nici pe departe că toți compușii care se încadrează în formule (3) sînt pesticide utile.

Din peste 10.000 de compuși testați numai unul devine produs comercial. În cazul derivaților acidului fosforic această șansă poate spori pînă la 1 : 2.000 .

Rămîne ca prin corelări cantitative în care parametrii corelați să reflecte cît mai fidel și complet cerințele structurale corespunzătoare unei activități biologice optime, numărul compușilor organofosforici luați în considerare pentru testare să fie reduși substanțial ceea ce va însemna economii de multe milioane în domeniul cercetării aplicative.

2. Efectele modificărilor structurale asupra tipului de acțiune și a eficacității pesticidului

1. Derivați ai acidului fosforos

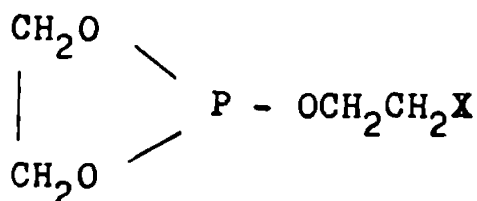
Majoritatea derivaților acidului fosforos manifestă o slabă activitate insecticidă și acaricidă. Unii dintre fosfiți și tiofosfiți sînt totuși ierbicide foarte active.

Activitatea ierbicidă a esterilor acidului fosforos se mărește odată cu creșterea numărului atomilor de carbon în radicalul alifatic al grupării esterice. Cea mai înaltă activitate o au esterii acidului fosforos cu halogen aril oxietanoli (façonul - anexa 1).

Tributil tritiofosfitul (merfosul) [262, 263], dibutil ditiochlor fosfitul [264] și triaril fosfiții [265] sînt defolienți.

Clor-fosfiții ciclici ai pirocatehinei [266] și dielil fosfiții [267] au acțiune fungicidă.

Fosfații ciclici



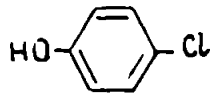
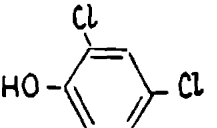
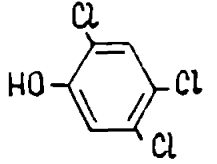
în care X = Cl, Br, F, I, au proprietăți sterilizante (dezinsectizante) [268] .

2. Derivați ai acidului fosforic

Prin trecere de la fosfiți la fosfați activitatea insecticidă și acaricidă a C.O.F. crește. Variațiile structurale ale radicalilor din derivații acidului fosforic au următoarele efecte asupra activității lor pesticide:

a) Deosebit de activi sînt esterii micști ai acidului fosforic la care radicalul esteric are un caracter acid. Astfel, în seria de compuși $(C_2H_5O)_2P(O)OR$, toxicitatea crește cu $K_{disociere}$ a fenolului substituit $R-OH$ (tabelul 11).

Tabelul 11

R - OH	K_{dis}
	$4,1 \cdot 10^{-10}$
	$3,1 \cdot 10^{-8}$
	$4,3 \cdot 10^{-8}$

b) o puternică toxicitate manifestă dialchil fluorofosfații și amidele acidului fluorfosforic

c) la mărirea lungimii radicalilor alchilici din esterii și amidele acidului fosforic, toxicitatea față de animale scade.

De regulă, toxicitatea maximă ce atinge la dietil derivat; dimetil fosfații sînt mult mai puțin toxici ceea ce se datorește, după cît se pare, capacității lor alchilente față de diferite combinații cu N și S, prezente în substratul biologic, vitezei mari de hidroliză dar și unor cauze de natură sterică [269]

d) o mare influență asupra toxicității față de insecte la derivații acidului fosforic cu radical aromatic substituit în grupe esterică o are nu numai natura substituentului ci și poziția acestuia. Proprietățile insecticide sînt accentuate mult prin introducerea în radicalul aromatic a grupărilor $-NO_2$ și $-SCH_3$. În general activitatea aril fosfaților substituiți în poziția 4 este superioară față de cei 2 și 3 substituenți.

Studiul sistematic al activității biologice în seria esterilor micști, alifatic - aromatici ai acidului fosforic a relevat utilitatea lor ca insecticide [270 - 272], fungicide [273] și ierbicide [274, 275].

e) o înaltă activitate biologică manifestă unii fosfați obținuți din oximele derivaților benzaldehidei și a acetofenonei [276] care conțin diferiți substituenți în nucleul aromatic.

f) o bună activitate insectidică și acaricidă manifestă esterii micști și estero-amidele acidului fosforic cu diferiți radicali heterociclici [277 - 284]; derivații cu radical benzofuranic dobîndesc acțiune nemstocidă [285].

Dialchil halogen piridil fosfații sînt insecticide eficiente, cu toxicitate medie față de mamifere.

g) derivații acidului fosforic care prin proprietățile lor au dobândit cea mai largă întrebuințare ca insecticide sînt vinil fosfații; grupe esterică vinil poate avea substituenți extrem de variși (anexa 1) [286].

h) o serie de amide ale acidului fosforic, mai ales derivați ai etileniminei (aziridinei), manifestă proprietăți chemosterilizante (TEFA, METEFA, TIOTEPA, MIOTEPA, H.M.P.A) Majoritatea sînt însă foarte toxice față de mamifere și de om.

3. Derivați ai acidului tiofosforic

Trecînd de la derivații acidului fosforic la cei ai acidului tiofosforic se constată o însemnată micșorare a toxicității combinațiilor față de mamifere fără o modificare esențială a activității insecticide și acaricide (deși există și excepții de la această regulă).

Derivații acidului tiofosforic pot avea structura

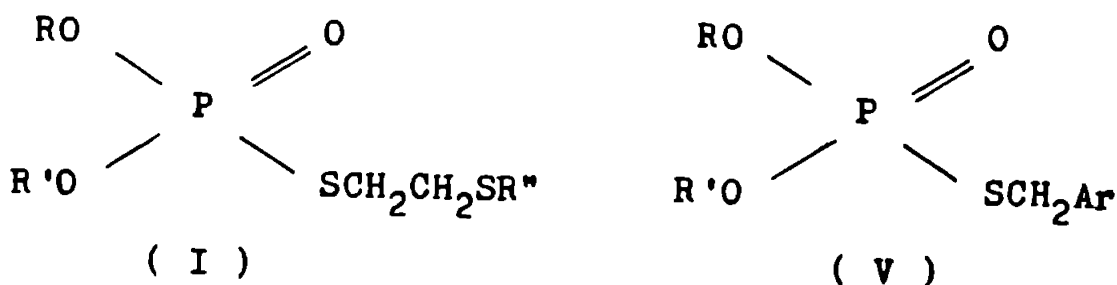
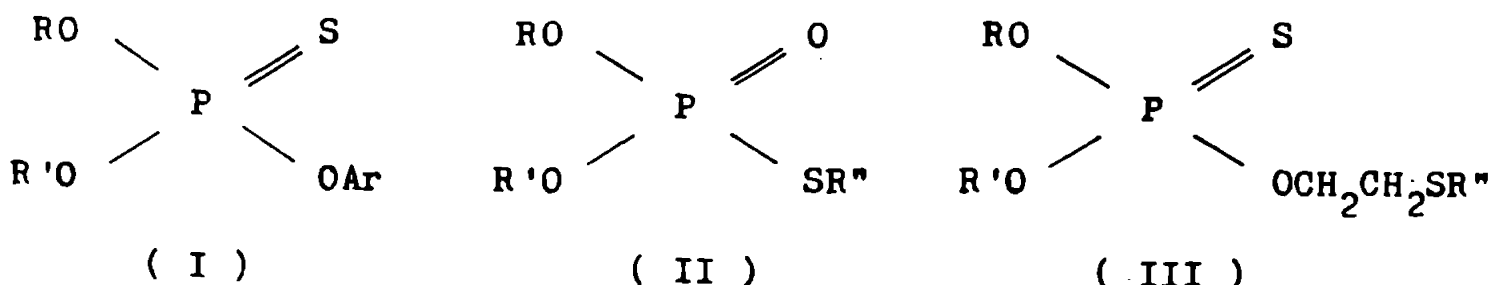


tionică

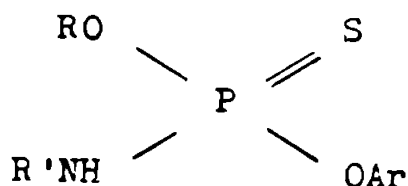
tiolică

Derivații de tip tiolic sînt mai toxici față de mamifere.

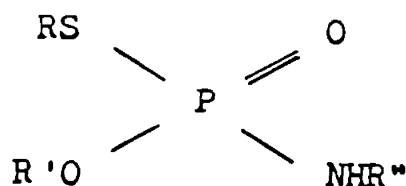
În calitate de pesticide se utilizează mai ales esterii micști ai acidului tiofosforic cu formulele generale (I) - (V)



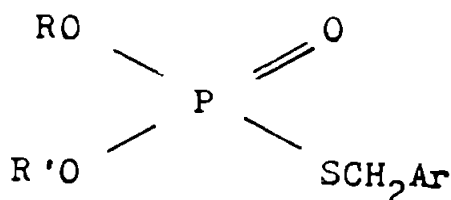
precum și estero-amidele mixte ale acidului tiofosforic (VI-VII)



(VI)



(VII)



(VIII)

Esterii micști ai acidului tiofosforic cu formula (VIII) au dobândit întrebuințări în combaterea bolilor culturilor.

Un mare număr de derivați ai acidului tiofosforic corespund formulei (I); radicalul aromatic poate fi substituit cu:

- un atom de halogen în pozițiile orto, meta sau para;
- doi atomi de halogen în diferite poziții;
- trei atomi de halogen [287 - 292];
- grupă nitro [293 - 299];
- grupă cian [300, 301];
- grupă acil [302 - 306];
- dialchil aminometil [307];
- carbalcoxil [308];
- tiocarbamoil [309];
- carbamoil amido [310];
- trifluor metil [311];
- alchil sulfid [312 - 315];
- sulfamidică [316 - 319];
- sulfonică [320 - 322];

Sînt descriși de asemenea esteri micști ai acidului tiofosforic cu bisfenoli care conțin grupe sulfidică și disulfidică [323 - 327].

Cercetarea relației dintre structură și activitatea biologică la pesticidele din clase derivaților acidului tiofosforic a condus la următoarele constatări:

a) Cele mai puternice insecticide și acaricide sînt esterii micști în care R și R' reprezintă radicali alifatici cu număr inferior de atomi de C, astfel încît suma atomilor de carbon să nu fie mai mare ca 4 (deci derivații cu două grupe etil sau

cu o grupă etil și una metil).

b) esterii micști alchil-aromatici ai acidului tiofosforic care nu conțin grupe funcționale în radicalul aromatic manifestă o activitate insecticidă scăzută.

c) esterii O, O - dialchil - O - aril substituiți au activitate insecticidă maximă când nucleul aromatic conține o grupă NO₂ în poziția 4. Destul de activi sînt și compușii la care substituienții din poziția 4 sînt grupele cian, sulfhidrică, sulfoxidică sau sulfonică. Derivații 2 - și 3 - substituiți manifestă o acțiune insecticidă mai slabă. Toți compușii sînt extrem de toxici față de mamifere.

d) introducerea unui al doilea substituent în radicalul aromatic scade într-o oarecare măsură toxicitatea combinației față de mamifere fără micșorarea esențială a activității insecticide. O mare influență o are poziția substituentului. Astfel, introducerea unei grupări alchil [328] sau halogen în poziția 3 față de 4-nitro- sau 4-metil tiofenol scade toxicitatea față de mamifere și nu micșorează activitatea insecticidă a combinației în timp ce introducerea celui de al doilea substituent în poziția 2 micșorează activitatea biologică.

Compușii 2,4,5 - trisubstituiți au o activitate insecticidă satisfăcătoare în timp ce toxicitatea lor devine neînsemnată.

e) existența în radicalul aromatic a mai mult decît 3 substituenți scade activitatea insecticidă a combinațiilor iar uneori schimbă chiar caracterul acțiunii (O, O - dialchil - O -(2,3,4,5,6-pentaclor fenil)tiofosfații au o slabă acțiune fungicidă).

f) prin trecere de la combinațiile cu formula generală I la cele de tipul VI, în multe cazuri, activitatea insecticidă se păstrează [329- 332] dar fitotoxicitatea acestei grupe de combinații este cu mult mai ridicată. Unele alchil amino-O-alchil- (2-nitro aril) tiofosfații sînt utilizați ca ierbicide [333 - 334].

g) O, O - dialchil - S - aril tiofosfații manifestă stît acțiune insecticidă cît și fungicidă [335 - 337] . Toxicitatea lor pentru mamifere este superioară celei a tionfosfaților.

h) O activitate insecticidă înaltă manifestă O, O - dialchil aril cian oximtiofosfații [338 - 340] . Unele combinații analoage au acțiune fungicidă [340] iar N- metil - O - aril carbamații N - fosforilați au o toxicitate selectivă [341] .

i) O, O - dialchil - S - benzil tiofosfații simpli și cei cu substituenți în radicalul aromatic [342-353] au o înaltă activitate fungicidă. Proprietăți analoage are și O-alchil alchil - amido - S - benzil tiofosfații [344 - 345] și O, O - dialchil - S -

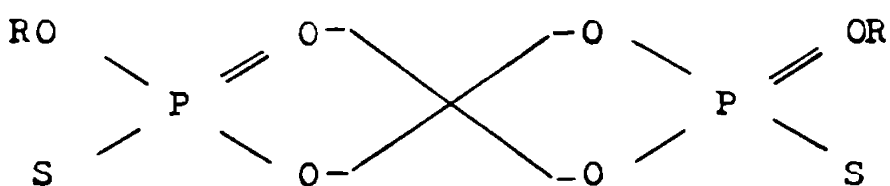
- aril tioalchil tiofosfații [353] .

j) O activitate fungică însemnată manifestă și O - alchil, O-aril - N - alchil amido tiofosfații [354,355] .

k) activitatea pesticidă a diaril - O - alchil tiofosfaților și triaril tiofosfaților este esențial mai scăzută decât cea a O,O - dialchil, O - aril tiofosfaților.

l) esterii ciclici ai acidului tiofosforic obținuți din saligenină [356 - 360] și derivații pirocatehinei [361] sînt insecticide active.

m) combinațiile corespunzînd formulei generale



manifestă acțiune nematocidă [362] .

n) O - alchil - S - alchil - O - aril tiofosfații dovedesc o intensă acțiune insectică și în același timp o toxicitate destul de mare față de mamifere [363 - 364] .

o) înlocuirea radicalului aromatic cu unul heterociclic conduce la obținerea unor insecticide active (anexa 1). În literatură sînt menționate pesticide tiofosforice în care radicalul heterociclic este: tiofenul [365] , piridina [366-372] , chinolina [373,374] , imidazolul [375,] , benzimidazolul [376,377] , tiazolul [378-380] , piridanonă [381,382] , oxicumarina [383- 384] , triazolul [385-389] , pirimidina [390-398] , benzoxazina [399-404] , beztriazina [405-406] , benzofuranul [407,408] , 1,3,4- tiadiazolul [409] , benztiadiazolul [410,] , ditianul [411-412] , chinoxalina [413-416] , ftalimida [417] , oxadiazolul [418] , piridazinil [419] , și alții.

Majoritatea combinațiilor heterociclicilor azotați manifestă nu numai acțiune fungică ci și insectică.

p) dintre omologii O,O-dialchil-O-aril tiofosfaților cea mai mică toxicitate pentru mamifere o au esterii metilici, probabil datorită capacității lor alchilante înalte.

În seria combinațiilor corespunzând formulelor generale (III) și (IV) se constată următoarele regularități privind relația structură-activitate biologică :

e) la un număr total de atomi de carbon din R și $R' > 4$ activitatea insecticidă a combinațiilor se micșorează.

b) la un număr mai mare ca 4 de grupări metilenice între atomii de fosfor și sulf activitatea combinației scade brusc. Activitatea maximă corespunde combinațiilor cu una sau două grupe metilenice.

c) oxidarea sulfurii care intră în radicalul hidrocarbonat în sulfoxid sau formarea sulfonei, mărește toxicitatea în mod sensibil.

d) introducerea de diferiți substituenți în radicalul R" conduce de asemenea la combinații active biologic [420,421].

e) aproape toate combinațiile cu structura (III) și (IV) manifestă o acțiune sistemică; acțiunea de contact la izomerii tio-nici este ceva mai slabă decât a celor tiolici.

f) înlocuirea lui S prin N conduce la combinații toxice atât pentru insecte cât și pentru mamifere.

g) mărirea numărului atomilor de carbon în R" peste 3 scade activitatea insecticidă a combinațiilor.

h) combinațiile care conțin ca R" radicali aromatici prezintă o activitate insecticidă mai scăzută ca a combinațiilor din seria alifatică.

i) introducerea de grupări hidrocarbonate în radicalul etilenic duce de asemenea la combinații active [422].

j) înlocuirea sulfurii sulfurhidric prin oxigen, de regulă, conduce la mărirea fitotoxicității combinației în special dacă de oxigen e legat un rest aromatic [423-425].

k) o înaltă activitate insecticidă dar și o destul de ridicată toxicitate față de mamifere manifestă O,S-dialchil amido-tiofosfații [426-430].

Acilarea grupării amidice determină scăderea esențială a toxicității [430].

l) amido-alchil tiofosfații, triamido tiofosfații și alchil diamido-tiofosfații micști au un larg spectru de acțiune pesticidă, în cadrul acestei grupe de combinații figurând fungicide [354], nematocide [431], chemosterilizanți [432] și ierbicide [433].

O,O-dialchil-S-tioceano metil tiofosfații sînt de asemenea pesticide active [434].

m) Insecticide active sînt și O,O - dialchil-O-vinil tiofosfații și O,O-dialchil-S-vinil tiofosfații cu diferiți substituenți

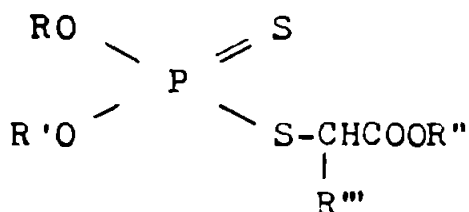
în radicalul vinil [435 - 440].

n) o ridicată activitate insecticidă manifestă esterii micști ai acidului tiofosforic care conțin grupe carbamoil în unul dintre radicalii hidrocarbonați [441, 442 și 443].

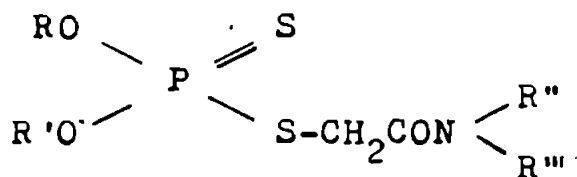
Toxicitatea combinațiilor de acest tip este superioară celei corespunzătoare ditionosfaților.

4. Derivați ai acidului ditionosforic

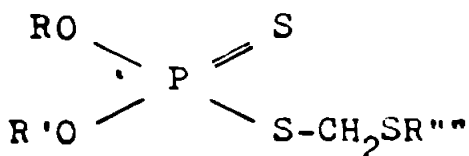
Derivații acidului ditionosforic folosiți pentru combaterea dăunătorilor culturilor, ca fungicide și ierbicide, pot fi reprezentați prin următoarele formule generale (I-VIII):



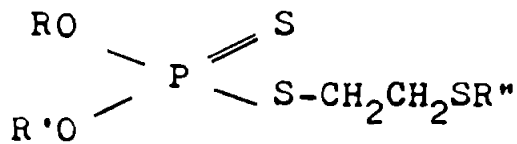
(I)



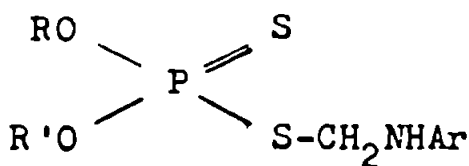
(II)



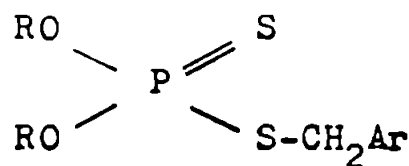
(III)



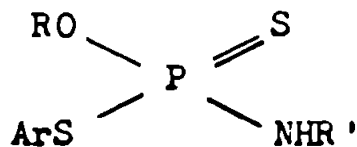
(IV)



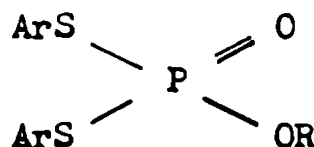
(V)



(VI)



(VII)



(VIII)

în care R, R', R'' sînt radicalii aromatici cei mai mici, R''' - hidrogen sau un radical oarecare, R'''' - radical alifatic sau aromatic, Ar - radical aromatic sau heterociclic.

Prin trecerea de la derivații acidului tiofosforic la derivații corespunzători ai acidului ditionfosforic, în majoritatea cazurilor toxicitatea combinației se micșorează iar stabilitatea chimică crește. Dar, pe lîngă un timp de acțiune prelungit, se schimbă și domeniul de acțiune.

În seria combinațiilor cu formula generală (I) pot fi menționate următoarele regularități ale relației structură-activitate biologică:

a) toți derivații acidului ditionfosforic cu structura (I) sînt mai puțin toxici față de mamifere decît derivații corespunzători ai acizilor tiofosforic și fosforic.

b) cea mai mică toxicitate pentru vertebrate manifestă esterii micști la care R și R' sînt radicali metil. Mărirea numărului atomilor de carbon în acești radicali ridică toxicitatea față de mamifere fără ca și activitatea insecticidă să crească.

c) modificarea lui R'''' influențează mai puțin esențial asupra toxicității ditionfosfaților micști pentru vertebrate dar afectează în foarte mare măsură proprietățile acaricide și insecticide.

Introducerea în R'''' a grupei carbalcoxi scade puternic toxicitatea combinației față de vertebrate dar nu se resimte asupra proprietăților insecticide și acaricide. Această comportare este valabilă numai la derivații alifatici nu și la cei aromatici.

Marea diferență de toxicitate în cadrul acestei grupe de esterii micști ai acidului ditionfosforic față de insecte și față de vertebrate se explică prin căile distincte de metabolizare a combinațiilor în organismele animale.

Combinațiile cu formula generală (II) manifestă de obicei acțiune de contact și sistemică:

a) reprezentanții în care $R = R' = CH_3$ prezintă o ridicată activitate insecticidă și o toxicitate medie față de mamifere. Înlocuirea chiar a unei singure grupe metil prin grupă etil sau altă grupă cu număr superior de atomi de carbon duce la creșterea bruscă a toxicității combinațiilor față de mamifere, fără schimbarea esențială a activității insecticide.

b) înlocuirea radicalului metil din grupe amidică prin cea etil nu modifică esențial toxicitatea combinației față de mamifere dar mărirea numărului de atomi de carbon în radicalul hidrocarbonat micșorează activitatea insecticidă.

c) înlocuirea celui de al doilea atom de hidrogen de la azot printr-un radical hidrocarbonat conduce de asemenea la scăderea activității insecticide a combinației. Când grupa înlocuitoare este un rest carbalcoxi sau formil activitatea insecticidă nu se micșorează dar toxicitatea față de mamifere crește sensibil (excepții [444,445]).

d) prin introducerea în radicalul hidrocarbonat de la azot a grupărilor carboxil sau carbamoil se obțin acaricide și insecticide cu înaltă selectivitate și toxicitate medie față de animalele cu sânge cald [446 - 448] .

e) combinațiile obținute prin reacția cu acidul dialchil ditiiofosforic cu esterii cisteinei [449] și cu aminoacizii acilați au de asemenea efecte pesticide.

f) introducerea în restul hidrocarbonat de la azot a atomilor de halogen [450] , a grupelor alchil, acil și amino [451] , ciano [452-453] ca și a grupelor fenil și carbalcoxi [454] menține proprietățile insecticide în combinațiile rezultate.

g) Substituirea hidrogenului de la azot prin grupe alchil sulfonyl - și aril sulfonyl - [455] , sulfonyl-amido și acil amido- [456] alchil amino - și dialchil amino- [457,458] , alchil- și alcoxi- [459,460] conduce la obținerea unor substanțe cu activitate insecticidă și acaricidă înaltă (cu creșterea în paralel a fitotoxicității).

h) o creștere puternică a fitotoxicității rezultă prin înlocuirea unei grupări alcoxi legată de fosfor printr-un rest oxiazolic [461] .

i) la substituirea grupei amido printr-un rest heterociclic azotat se formează compuși cu acțiune ierbicidă [462-463] .

j) esterii micști și etilen glicolului manifestă de asemenea acțiune insecticidă [464] .

k) O-alchil-N-aril (dialchil) amido -S,N - metil carbamoil ditiiofosfații prezintă nu numai acțiune insecticidă și acaricidă ci și proprietăți fungicide [465,466] .

Combinațiile cu formula generală (III) și (IV) manifestă o puternică acțiune sistemică ca acaricide și insecticide. Unele aspecte generale ale dependenței activității pesticide pe structura lor chimică pot fi formulate în felul următor:

a) la combinațiile de tip (III) mărirea numărului atomilor de carbon peste doi în toți radicalii hidrocarbonați determină scăderea toxicității. Cele mai toxice combinații sînt esterii în care $R = R' = R'' = C_2H_5$. Înlocuirea lui R''' cu un radical aromatic conduce la o anumită scădere a toxicității pentru mamifere

cu menținerea proprietăților acaricide și insecticide.

b) dintre combinațiile de tip (IV) cea mai mică toxicitate față de mamifere o arată combinațiile cu $R = R' = CH_3$. Înlocuirea unei grupe metil prin o grupă etil sau un alt rest hidrocarbonat cu număr superior de atomi de carbon conduce la o bruscă creștere a toxicității și, în paralel, la o anumită accentuare a proprietăților insecticide. La mărirea numărului total al atomilor de carbon în R și R' peste 4 se formează combinații cu o activitate insecticidă relativ mică.

c) prin introducerea în R'' a diferitelor grupe funcționale rezultă combinații cu înaltă activitate acaricidă și insecticidă [467 - 470, 471].

Cea mai înaltă activitate o manifestă esterii micști ai acidului ditio fosforic care conțin în puntea metilenică grupări carbalcoxi sau carbamidice [467 - 470].

d) o înaltă activitate insecticidă și acaricidă manifestă sulfoxizii și sulfonele corespunzătoare [472 - 473].

e) combinațiile în care R'' reprezintă un rest al acidului dialchil ditioposforic prezintă proprietăți acaricide și insecticide [474- 476].

f) înlocuirea sulfului sulfhidric prin oxigen legat de o grupă aril, conduce în majoritatea cazurilor la creșterea fitotoxicității combinațiilor [477 - 478] care devin astfel utilizabile ca ierbicide.

g) prin trecere de la derivații acidului ditioposforic la derivații acizilor tri - și tetra - tioposforici proprietățile insecticide și acaricide se atenuează, iar cele de fungi- și fitotoxicitate se accentuează [479 - 480].

h) la înlocuirea restului hidrocarbonat de la sulful sulfhidric printr-un rest tiocarbamic sau dialchil ditiocarbamic se formează substanțe cu proprietăți fungicide [481].

i) prin înlocuirea sulfului sulfhidric cu grupe acil amino - sau alchil amino - se obțin substanțe cu diferite proprietăți pesticide [482 - 494].

În cazul existenței la azot a resturilor de acizi carbonici, combinațiile manifestă proprietăți insecticide și acaricide.

j) dacă restul acil este un rest de acid sulfoxi - alifatic [487 - 489] se formează substanțe insecto-acaricide. La introducerea unui rest de sulfoacid aromatic fitotoxicitatea crește brusc și produsele au și o acțiune ierbicidă.

k) esterii micști ai acidului ditioposforic care conțin

în unul din radicalii alifatici stomi de halogen [495 - 502] sînt insecticide active. Insecticide și fungicide active sînt și O,O-dialchil-S-alchenil-ditiofosfații [498] .

l) o serie de aminoesteri ai acidului ditiofosforic au proprietăți fungicide [503] ; O,O dialchil-S-benzil ditiofosfații [504- 513] și diamino-S-benzil ditiofosfații [514] sînt fungicide cu înaltă selectivitate.

m) dacă O-alchil-S,S-diaril ditiofosfații [515-516] și [517-519] au acțiune fungicidă, O-alchil-S,S-dialchil ditiofosfații [520] sînt nematocite destul de active.

Există descrise în literatura de patente un număr foarte mare de derivați ai acidului ditiofosforic cu substituenți heterociclici, pentru care nu s-au stabilit nici un fel de legități relativ la dependența structură-activitate pesticidă.

5. Derivați ai acidului pirofosforic

În această clasă de C.O.F. s-au stabilit de asemenea o serie de dependențe de natură calitativă între structura chimică și activitatea pesticidă:

a) activitatea insecticidă a tetraalchil pirofosfaților se micșorează odată cu creșterea radicalului esteric. Cea mai activă combinație este tetraetil pirofosfatul; analogul metilic este mai puțin activ.

b) tetraalchil monotiofosfații manifestă o acțiune insecticidă dar și o toxicitate superioară față de tetraalchil pirofosfatul .

c) introducerea unui al doilea atom de sulf adiacent fosforului scade toxicitatea față de mamifere fără o micșorare însemnată a activității insecticide. Introducerea celui de al treilea atom de sulf legat la fosfor scade activitatea insecticidă a combinației.

d) tetraalchil ditio pirofosfații cu diferiți radicali hidrocarbonați au aproape aceeași activitate insecticidă ca și tetraalchil ditio pirofosfații corespunzători cu aceeași greutate moleculară.

e) toți pirofosfații manifestă o puternică acțiune insecticidă de contact dar nu și una sistemică datorită unei stabilități mici față de hidroliză. Descompunerea lor duce la produși netoxici. Trecînd de la esterii acidului pirofosforic la amidele acestuia apare acțiunea sistemică iar cea de contact se micșorează (ex. octametil tetraamida acidului pirofosforic este un insec-

tucid sistemic, fără acțiune de contact).

6. Derivați ai acidului fosfonic

a) toxicitatea esterilor micști ai acizilor metil- și etil tiofosfonici față de mamifere este în majoritatea cazurilor superioară celei manifestate de esterii micști analogi ai acidului fosforic. Toxicitatea se micșorează odată cu creșterea radicalului hidrocarbonat legat de fosfor. În general, în cazul acizilor alchil fosfonici toxicitatea este relativ mică și depinde în mare măsură de radicalii atașați fosforului [521]. Derivații corespunzători ai acizilor tio- și ditiofosfonici prezintă o toxicitate foarte variată față de mamifere care în majoritatea cazurilor depinde de structura radicalului esteric [522-524].

b) esterii micști ai acizilor tio- și ditio-alchil fosfonici au proprietăți insecticide și acaricide [525-538]. Aceste proprietăți sînt manifestate și de amido esterii acizilor alchil fosfonici și tiofosfonici [539 - 541]. Derivații acidului epoxipropil fosfonic prezintă acțiune bactericidă [542]. Prin înlocuirea unui din radicalii esterici cu grupa benzil [543] rezultă o creștere a proprietăților fungicide a alchil tio- și alchil ditiofosfonații, proprietăți pe care le au și benzil tiofosfonații [544-545].

c) majoritatea esterilor micști ai acizilor alchil tio- și ditiofosfonici care conțin diferite grupe funcționale, atît în radicalul esteric cît și în radicalul legat de fosfor [546-552] manifestă acțiune pesticidă.

d) substituirea cu halogen a hidrogenului din radicalul alchil legat la fosfor al derivaților acizilor alchil fosfonici conduce la scăderea toxicității față de vertebrate. Într-adevăr, esterii micști și esteroamidele acizilor clor metil-, clor metil-tio- și clor metil ditiofosfonici prezintă o toxicitate mai mică decît a derivaților corespunzători ai acizilor metil-, metil tio- și metil ditiofosfonici [553-554].

e) esteroamidele acidului clor metil tiofosfonic au acțiune ierbicidă. Este de menționat că acumularea de atomi de halogen în grupe metil conduce la scăderea activității ierbicide a combinațiilor. Mai puțin active sînt amidele acidului clor metil tiofosfonic, iar derivații corespunzători ai acidului clor metil fosfonic încă mai puțin activi [553-554].

f) acidul 2-clor etil fosfonic își datorează acțiunea de regulator de creștere posibilității sale de descompunere cu dega-

jare de etilenă [555-558] .

g) esterii acidului alil ditiofosfonic manifestă acțiune nematocidă [559-560] . Aceeași acțiune o au esterii acidului alcoxivinil ditiofosfonic [561] și a acidului dialcoxitiofosfonic [562] . Esterii acizilor alcoxivinil-alchil, sulfonil-și alchil sulfinil ditiofosfonici manifestă o acțiune ierbicidă [563-568] .

h) introducerea grupării OH în locul hidrogenului legat la fosfor scade toxicitatea esterilor și a altor derivați ai acidului alchil fosfonic față de mamifere (unele excepții există totuși) .

i) mărirea radicalului alchilic legat de fosfor micșorează toxicitatea și activitatea insecticidă. Astfel, în seria O-etil-O- (4-nitrofenil) alchil tiofosfonați valorile DL_{50} (mg/kgcorp șobolan) cresc în seria metil, isopropil, n-hexil: 2,5 , 25 și respectiv 250 .

Toxicitatea față de mamifere variază în funcție de structura radicalului esteric [569] în același mod ca la esterii acizilor fosforic și tiofosforic.

j) trecînd de la acizii alchil fosfonici, alchil tiofosfonici și alchil ditiofosfonici la derivații aril fosfonici, aril tiofosfonici și aril ditiofosfonici, toxicitatea față de vertebrate se micșorează substanțial în timp ce proprietățile insecticide, în majoritatea cazurilor, se mențin.

k) mulți derivați ai acizilor fosfonici și tiofosfonici care conțin resturi tiofenice [570-571] , furanice [572] piperidinice [573] și a altor heterocicli sînt insecticide, acaricide și bactericide active.

Ca observație generală, utilizarea derivaților acidului fosfonic în practica combaterii dăunătorilor rămîne deocamdată foarte limitată din cauza toxicității lor mari.

7. Săruri de fosfoniu

Sărurile de tetraalchil fosfoniu manifestă aproape aceeași acțiune bactericidă și fungicidă ca și sărurile de amoniu cu un singur radical hidrocarbonat [574] . Studiul sistematic al activității biologice a sărurilor de fosfoniu arată că ea depinde nu numai de structura cationului ci și de structura anionului.

Unele săruri de fosfoniu au și proprietăți ierbicide fără însă a avea deocamdată întrebuințări practice.

RELATII CANTITATIVE STRUCTURA-ACTIVITATE BIOLOGICA
LA COMPUSII ORGANOFOSFORICI

1. Modele ale corelărilor structură-activitate biologică

Relațiile structură-activitate biologică, au ca scop stabilirea efectului produs de o schimbare în structura combinației respective asupra răspunsului biologic pe care îl determină. Ele pot aduce un ajutor însemnat în sinteza unor noi compuși biologic activi pe baza indicațiilor pe care le furnizează asupra caracteristicilor structurale pe care aceștia trebuie să le realizeze pentru a manifesta un spectru de acțiune și eficacitate optime.

Interpretarea și utilizarea relațiilor structură-activitate biologică (R.S.A.B.) au la bază următoarele ipoteze:

a) tipul structural al unei molecule influențează răspunsul biologic într-un mod corespunzător chiar când este încorporat într-o altă moleculă.

Intr-un sistem statistic aditiv, valorile parametrilor substituenților sînt determinate ca "cele mai bune numere" corespunzînd substituentului respectiv într-un compus ce-l conține, astfel încît suma acestor "cele mai bune numere" pentru diferiții substituenți din molecula compusului să permită obținerea unei activități biologice calculată cît mai apropiată de aceea determinată într-un sistem specific de testare biologică.

Considerînd un set de N compuși cu structură similară pentru care cele p poziții de substituție ale structurii inițiale pot avea s variații de substituent, răspunsul biologic observat pentru fiecare compus testat într-un sistem biologic obișnuit, poate fi reprezentată printr-un model activ, descris prin ecuația [36]:

$$A_i = \sum_k \sum_s a_{i,ps} + \mu \quad ; \quad (i = 1, 2, \dots, N) \quad (1)$$

în care μ reprezintă contribuția dată de un fragment invariant, comun celor N compuși, în răspunsul biologic al fiecărui dintre acestea sau activitatea biologică, a unui compus de referință. În prim caz, valoarea lui μ se ia ca o medie a activităților biologice determinate experimental:

$$\mu = \frac{\sum_i A_{i,exp}}{N} \quad (2)$$

Valorile a_{ps} pentru fiecare compus estimează influența fiecărui substituent s din poziția p asupra activității biologice înregistrate.

Același substituent în poziții diferite ale moleculei poate avea valori a distincte

$$a_{i,jk} \neq a_{i,lt} \quad (3)$$

dar pentru toate moleculele seriei contribuția unui substituent dat în aceeași poziție este reprezentată prin o aceeași valoare a

$$a_{i,jk} = a_{1,jk} \quad (4)$$

Din ecuația (1) se poate obține o relație liniară multiparametrică dacă se presupune că influența asupra activității biologice atribuită fiecărui substituent poate fi reprezentată ca o combinație liniară a proprietăților X ale acestuia:

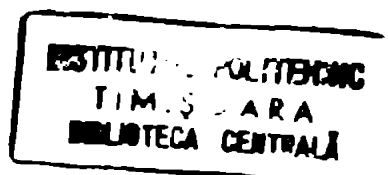
$$a_{i,jk} = \sum_w b_{jk,w} \cdot X_{jk,w} \quad (5)$$

Indicele w desemnează un anumit parametru al substituentului. Ținând cont de expunerea lui $a_{i,jk}$ din ec.(5), ec.(1) se transformă în:

$$A_i = \sum_w \sum_t \sum_s b_{ps,w} \cdot X_{ps,w} + \mu \quad ; \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (6)$$

ec.(6) conține atât de mulți coeficienți independenți, b , încât este imposibil să utilizeze pentru calculul lor procedeul celor mai mici pătrate. De aceea se admite că pentru toate substituțiile făcute în poziția j a moleculei, coeficientul care corespunde unei proprietăți anumite a substituentului este același:

$$b_{jk,u} = b_{jw,u} \quad (7)$$



Tinând cont de condiția (7) , ecuația (6) devine o relație liniară a energiei libere pentru corelarea activității biologice unor compuși cu substituenți multipli, în care fiecare poziție a acestora pe scheletul molecular apare sub forma unei contribuții distincte din fiecare proprietate - parametru a substituentului.

Atunci când se poate demonstra cu ajutorul unor relații suplimentare că, coeficienții care estimează o proprietate determinată a substituentului în două sau mai multe poziții sînt identici, adică:

$$b_{jk,u} = b_{rw,u} \quad (8)$$

atunci,

$$A_i = \sum_w (b_w \sum_t \sum_s X_{ps,w}) + \mu \quad ; \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (9)$$

Sistemul de ecuații multilinare (9) exprimă natura aditivă a proprietăților substituentului în condițiile stabilite cu activitățile biologice. Trebuie însă menționat că este puțin probabil ca această condiție (8) să fie satisfăcută în cazul corelării unor date biologice, deoarece substituția unei anumite poziții din molecula compusului activ poate determina o evoluție biologică specifică, diferită de aceea ce ar corespunde prezenței aceluiași substituent în altă poziție.

O formă limită a modelelor statistice, aditiv sau multilinear, se obține considerînd că efectul biologic este dat de variația substituentului dintr-o poziție a moleculei compusului. Modelul statistic rezultat este similar celui care furnizează binecunoscute relație Hammett. Astfel, Zakhrednik [575] în afara utilizării ecuației Hammett pentru corelarea structură-activitate biologică la compuși cu substituenți alifatici, a definit o constantă de substituent pentru efect biologic, β .

Kopecky și Bocek [31-2;576] au introdus un model statistic cu interacții în evaluarea toxicității unor compuși aromatici prin care aceasta apare ca sumă a toxicităților moleculelor mono-substituite succesiv în toate pozițiile ocupate de substituenții respectivi în compusul studiat și a produsului unor termeni ce corespund influențelor reciproce a substituenților în generarea răspunsului biologic.

În prezent s-au conturat două concepții de bază privind relație cantitativă între structură chimică și activitate biologică.

Conform primei concepții, de cea mai mare circulație, activitatea biologică este corelată cu parametri fizico-chimici definiți termodinamic, în cadrul unor relații lineare de energie liberă. Deoarece parametri nu sînt legați direct termodinamic de sistemul biologic modelul se numește EXTRATERMODINAMIC.

A doua metodă realizează corelarea cu ajutorul unui model matematic bazat pe principiul unei contribuții independente și aditive a substituenților grupați pe un schelet molecular care se menține constant în cadrul unei serii de reacție.

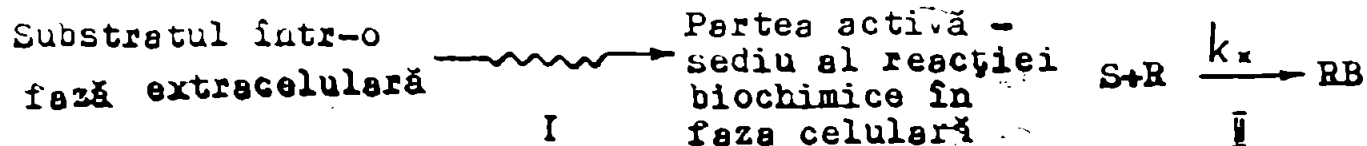
1.1. Modelul extratermodinamic

1.1.1. Relația liniară a energiei libere aplicată corelării activității biologice cu parametri fizico-chimici

Principiul relațiilor liniare de energie liberă este bazat pe cunoașterea existenței unei dependențe lineare între variațiile de energie liberă ΔG^0 sau ΔG^\ddagger și diferența mărimilor care caracterizează echilibrul sau viteza unor procese independente dar similare, în corespondență cu diferențele structurale ale compușilor seriei de reacție.

Indicii extratermodinamici ai substituentului [35], cum ar fi constantele Hammett (σ , σ^- , σ^+) [35,39,577], constantele Taft (E_s , σ) [578-580], și coeficienții de partiție Hansch, π [581-583], oferă un mijloc potrivit pentru măsurarea comparativă a variațiilor de energie liberă într-un mod consecvent reproductibil. În corelațiile dintre efectele biologice și combinații determinate ale indicilor substituentului, se pare că efectele biologice reflectă anumite tipuri de variații ale energiei libere care limitează mărimea răspunsului biologic înregistrat. Variațiile finite de energie liberă pot fi asociate cu un proces sau cu un set de procese care conduc la răspunsul biologic, cum ar fi transportul, penetrația, metabolismul sau acumularea. În toate corelările activităților biologice se face presupunerea că o măsură a acestora este o variație finită de energie liberă cu care se află în relație de dependență liniară.

Conform modelului lui Ariens [584], dezvoltat ulterior de Hansch [581,585] etapele activității biologice ale unui compus (substrat) sînt:



S - substrat, R - receptor, RB - răspuns biologic, k_x - constanta de viteză a reacției critice.

Așadar manifestarea acțiunii biologice comportă două etape principale:

a) deplasarea substanței de la locul aplicării pînă la locul acțiunii,

b) un proces fizic sau chimic determinant de viteză.

Aceste etape sînt separate în timp și spațiu de răspunsul biologic.

Studierea independentă a etapelor principale nu poate fi realizată chiar și în cazul unor sisteme biologice simple. Procesul fizic sau chimic prin care molecula biologic activă se fixează pe situsul activ al enzimei implică numeroase ciocniri ineficace ale moleculei cu părțile hidrofobe ale enzimei determinate de accesul și selectarea centrelor active prin care se stabilește legătura cu receptorul. Acest proces este dependent de timp astfel încît, răspunsul biologic trebuie conceput în termeni probabilistici.

Dacă C este concentrația molară a compusului activ biologic la locul de aplicare, după un interval de timp Δt , concentrația la partea reactivă a receptorului va fi $A.C$, A reprezentînd probabilitatea ca substanța respectivă să ajungă la centrul activ și să determine răspunsul biologic. În acest fel, cinetica procesului poate fi descrisă prin ecuația:

$$\frac{d \text{ RB}}{dt} = A \cdot k_x \cdot C \quad (10)$$

Mărimile utilizate curent pentru evaluarea activității biologice sînt de trei tipuri:

a) un RB standard pentru doze variate; C.M.I.C. (concentrația minimă de inhibare a creșterii), DL_{50} , ED_{50} (doza de substanță antagonistă necesară reducerii cu 50% a răspunsului față de o doză standard), I_{50}

b) RB distincte pentru o doză fixă: % creștere, % metabolizare sau % populație celulară viabilă după un interval de timp determinat

c) constante cinetice sau de pseudoechilibru derivînd din legile de viteză după care decurge cinetica enzimatică [584] sau din modele cinetice [586-587].

Aprecierea oportunității utilizării acestor măsuri pentru răspunsul biologic din relațiile de energie liberă indicate este făcută pe baza analizei curbelor doză-răspuns. Graficul dependenței mărimii RB înregistrat pentru diferite concentrații ale compusului activ, prezintă multe din caracteristicile proprii reacțiilor enzimatiche. El redă de obicei % RB ca funcție de logaritmul dozei, iar curbele obținute sînt de formă sigmoidă. Substanțele biologic active care produc același efect prin același mecanism însă diferă ca eficacitate, dau curbe doză - RB similare translatate de-a lungul axei log.(doză) figura 24.

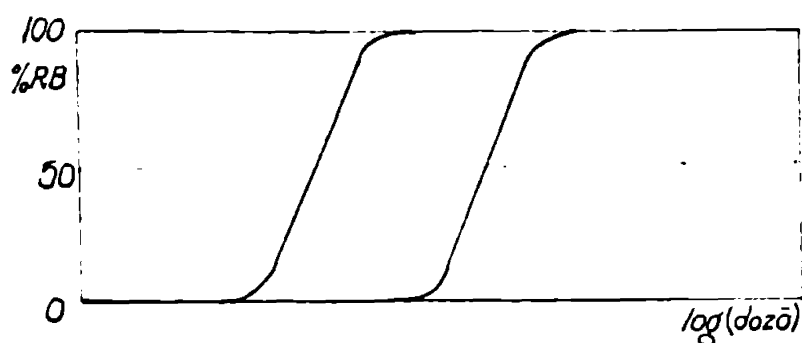


Fig.24.

Curbe de aceeași alură s-au obținut pentru reacțiile enzimă -substrat și enzimă-inhibitor [588]. Curbele doză - RB sînt interpretate adesea ușor cu ajutorul legii acțiunii maselor [588], dar eforturi considerabile au fost consacrate pentru a le explica prin considerații cît mai ample.

Activitățile biologice determinate prin metode dozei fixe pot servi pentru analiza corelațională bazată pe principiul liniarității energiei libere și se expune ca:

$$A = \log (\text{eficacitate}) = \log RB$$

Hansch și colaboratorii [589-591] au găsit că literatura de specialitate oferă numeroase exemple în care se constată că după o creștere paralelă a activității biologice cu cea a coeficientului de partiție, urmează o scădere a activității cu creșterea în continuare a caracterului liofil. Pe această bază au contestat existența unei relații liniare între mișcarea moleculelor organice prin țesuturi și coeficienții lor de partiție oferind următoarea explicație. Dacă o substanță dintr-o serie de compuși similari are coeficientul de partiție ulei/apă apropiat de zero, aceasta înseamnă că este stît de solubilă în apă încît nu poate traversa o membrană lipofilă. Reprezentanții seriei care au coeficient de partiție ce tinde spre ∞ nu vor trece de o barieră aposă. În consecință, între valorile limită a coeficientului de partiție $P = 0$ și $P = \infty$, trebuie să existe un coeficient de partiție inițial P_0 .

Plecînd de la ipoteza lui P_0 , Hansch admite cã RB are o distribuție normală gaussiană, față de coeficientul de partiție. Atunci factorul de probabilitate A se poate exprima ca:

$$A = a \cdot e^{-\frac{(\log P - \log P_0)^2}{b}} \quad (11)$$

și ecuația (10) devine:

$$\frac{d_{RB}}{dt} = K = a \cdot e^{-\frac{(\log P - \log P_0)^2}{b}} k_x C \quad (12)$$

a, b sînt constante, iar $\log P_0$, exprimă din punct de vedere termodinamic valoarea pentru care ΔF este minimă cînd substanța trece din apã în lichid, într-o stare de neechilibru.

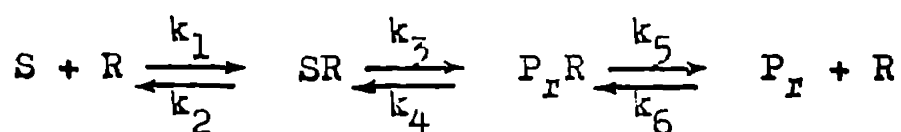
K - constanta ce corespunde rãspunsului biologic, se exprimă de obicei sub formă logaritmului inversului concentrației molare ($\log 1/C$) cauzează un rãspuns biologic standard (DE_{50}, DL_{50}, I_{50})

Logaritmind relația (12) se obține:

$$\log 1/C = -k_1(\log P)^2 + k_2 \log P + \log k_x + k_3 \quad (13)$$

Primii doi termeni arată probabilitatea ca un compus biologic activ să ajungă în intervalul de timp Δt la receptor. Termenul $\log k_x$ se poate explicita cu ajutorul unei relații liniare de energie liberă.

Acceptînd cã mecanismul interacțiunii substrat-receptor este de tip Michaelis-Menton, Hansch a propus pentru aceste următoarea schemă [592].



în care S, R reprezintă substrat absorbit de receptor, iar $P_R R$ substrat modificat.

Dacă k_3 este determinantă de viteză (adică k_x) procesul global de modificare a substratului se descrie prin ecuația 14.

$$V = k_3 [SR] \quad (14)$$

Dar

$$[SR] = \frac{[S][R]k_1}{k_2} \quad (15)$$

și ca urmare transformând corespunzător ec.(14),

$$\log v = \log k_3 + \log k_1/k_2 + \log [S] + \log [R] \quad (16)$$

În condiții experimentale, procesul poate fi considerat de ordinul 1,

și deci, $[R]$ și $[S]$ sînt constante.

Deoarece $k_3 \ll k_2$, etapa determinantă de viteză este aceea a transformării substratului. Așadar cum k_m (constanta Michaelis)

$$k_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (17)$$

$$k_1/k_2 \simeq 1/k_m$$

Compusul biologic activ poate interveni în reacția critică determinată de viteză: competitiv, necompetitiv, acompetitiv sau mixt.

Afinitatea reacției determinante de viteză depinde de energia liberă molară de formare la care își aduc contribuția componente de interacțiune: electronice, de desolvatare a complexului $P_{Pr}R$, sterice și conformaționale.

Neglijînd termenii ce exprimă interferența acestor efecte:

$$\Delta G_{Pr.R} = \Delta G^e + \Delta G^d + \Delta G^s + \Delta G^c + k \quad (18)$$

Variația afinității reacției determinante de viteză și, implicit, a răspunsului biologic, produsă de variația substituenților într-o serie de compuși biologic activi poate fi exprimată ca:

$$\int (\Delta G_{Pr.R}) = \int (\Delta G_n^e) + \int (\Delta G_n^d) + \int (\Delta G_n^s) + \int (\Delta G_n^c) \quad (19)$$

n - fiind numărul de reprezentanți din seria studiată.

Considerînd că în interiorul seriei $\int (\Delta G_n^c) \simeq$ constant; ecuația (19) se poate exprima sub formă unei relații de energie liberă, dedusă de Hansch [585-592]:

$$\log k_x = a \cdot \hat{\sigma} + b \cdot \hat{\pi} + c E_s + k \quad (20)$$

$\hat{\sigma}$ - reprezintă constanta de substituent Hammett [38,39] și reflectă influența efectelor electronice inductive și de conjugare ale substituenților; $\hat{\pi}$ - constanta de hidrofobicitate a substituentului definită prin relația:

$$\tilde{\pi} = \log P_x - \log P \quad (21)$$

$\log P_x$ este logaritmul constantei de partiție solvent - apă a unui compus substituit, iar $\log P$ cel al compusului nesubstituit; deci $\tilde{\pi}$ reflectă contribuția substituentului în formarea legăturii hidrofobe Pr - R; E_S este constanta sterică Taft și indică variația efectelor sterice determinate de substituent.

Introducând (20) în (13) rezultă:

$$\log 1/C = -k_1 \cdot \tilde{\pi}^2 + k_2 \cdot \tilde{\pi} + k_3 \cdot \tilde{\sigma} + k_4 E_S + k_5 \quad (22)$$

k_2 din această ecuație include pe k_2 din (13) și b din (20). Ecuația (22) constituie forma cea mai generală a relației de energie liberă care corelează activitatea biologică cu parametrii fizico-chimici. Ea nu este dedusă perfect riguroasă din punct de vedere teoretic; are un caracter semicantitativ, semiempiric.

Hansch a demonstrat [44] că între constantele $\tilde{\pi}$ și $\tilde{\sigma}$ nu există practic o relație de dependență lineară așa că separarea efectelor pe care le estimează aceste constante este posibilă. E_S și $\tilde{\pi}$ au tendința de covarianță ceea ce face problematică separarea efectului steric intramolecular de cel hidrofobic asupra răspunsului biologic și impune selectarea atentă a seriilor de compuși.

Dacă se încearcă corelarea activităților biologice a n compuși cu m proprietăți fizico-chimice ale acestora, măsura statistică a "bunei concordanțe" a modelului teoretic cu datele corelate este relația $n > m + 1$. Un mare exces de RB experimentale față de numărul de parametrii fizico-chimici este capabil să determine o asemenea "bună concordanță".

În general însă, există mai multe modalități statistice aplicabile analizei cantitative structură-activitate; fiecare abordând într-un mod oarecum diferit "bună concordanță" [593,594].

Ecuațiile de regresie multiliniară prin care sînt evaluate activitățile biologice A_i^{calc} ale fiecărui compus i din seria de n compuși sînt de forma

$$A_i^{calc} = \sum_{j=1}^m a_j x_{ij} + c, \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (23)$$

x_{ij} reprezintă valoarea parametrului particular j , pentru compusul i , a_j - coeficientul de contribuție al parametrului j , c - o constantă, iar m - numărul de parametrii fizico-chimici considerați în analiza corelațională.

Valorile lui a_j și c sînt determinate prin minimalizarea sumei patratelor abaterilor valorilor experimentale, A_i^{exp} față de valorile calculate A_i^{calc} ale activităților biologice

$$\sum_{i=1}^m (A_i^{\text{exp}} - A_i^{\text{calc}})^2 \quad (24)$$

Abateres standard pentru ecuația (23) se calculează prin relația:

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_i^{\text{exp}} - A_i^{\text{calc}})^2}{(n-1)}} \quad (25)$$

Un criteriu statistic utilizat frecvent pentru a stabili gradul de semnificație a corelării efectuate este coeficientul de corelație (multi) liniară, r , calculat cu ecuația [595-598] :

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (A_i^{\text{calc}} - \bar{A})^2}{\sum_{i=1}^n (A_i^{\text{exp}} - \bar{A})^2} \quad (26)$$

în care

$$\bar{A} = \frac{\sum_{i=1}^n A_i^{\text{exp}}}{n} \quad (27)$$

reprezintă valoarea medie a lui A

r^2 este fracțiunea din suma patratelor abaterilor activităților A de la valoarea lor medie care trebuie atribuită ecuației regresionale stabilite. În cazul unei perfecte concordanțe, adică pentru $A_i^{\text{exp}} = A_i^{\text{calc}}$, oricare ar fi i , $r^2 = 1$. Cu cît concordanța este mai slabă cu atît coeficientul de corelare este mai apropiat de zero.

Cercetarea gradului de semnificație a ecuației corelaționale obținute poate fi făcută și prin utilizarea testului statistic F care stabilește probabilitatea ca toți coeficienții relației de dependență liniară, a_j din ecuația (23) să fie nuli ("ipoteza de nul").

Testul F este definit prin relația:

$$F = \frac{(n-k-1)r^2}{k(1-r^2)} \quad (28.e)$$

sau

$$F = \frac{(A_i^{\text{calc}} - \bar{A})^2 / (k-1)}{(A_i^{\text{exp}} - A_i^{\text{calc}})^2 / (n-k)} \quad (28.b.)$$

cu $(n-k)$ și $(k-1)$ grade de libertate; $k = m + 1$
Valorile calculate pentru F pot fi utilizate pentru obținerea nivelului corespunzător de semnificație statistică din tabele de distribuție alcătuite pentru F .

Calculul lui r^2 nu stabilește care dintre parametrii considerați este responsabil de variația răspunsului biologic. Cu cât numărul de parametri considerați m este mai mare, valoarea obținută pentru r^2 este mai favorabilă fără a fi obligatoriu ca toți aceștia să aibă o influență semnificativă asupra valorilor A_i^{calc}

Testul statistic E.V. calculat prin relația

$$E.V. = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (A_i^{\text{calc}} - A_i^{\text{exp}})^2 / (n-k)}{\sum_{i=1}^n (A_i^{\text{exp}} - \bar{A})^2 / (n-1)} \quad (29)$$

estimează tocmai fracțiunea de varianță care este "justificată" de variabilele x și reflectă numărul de grade de libertate din analiza corelațională respectivă. Prin trecerea de la o ecuație cu m parametri la una cu $m+1$, E.V. va scădea dacă introducerea noului parametru nu se resimte în scăderea diferenței

$A_i^{\text{calc}} - A_i^{\text{exp}}$, adică nu determină o îmbunătățire a concordanței.

Când concordanța este perfectă

$$A_i^{\text{calc}} = A_i^{\text{exp}}, \text{ oricare ar fi } i \Rightarrow E.V. = 1$$

Spre deosebire de r^2 sînt posibile și valori $E.V. < 0$; semnificația individuală a coeficientului a_j poate fi stabilită utilizînd testul Student.

1.1.2. Parametrii fizico-chimici ca mărimi care evaluează influența particularităților structurale asupra variației activității biologice

A. Parametrii care indică influența electronică asupra activității biologice

Încă din 1953 Jaffe [39] menționează o serie de substanțe biologice active ai căror parametri electronici au fost corelați

satisfăcător cu activitățile biologice. Ulterior numărul corelărilor de acest tip a crescut simțitor [599-601] , [602] .

În tabelul 12 sînt indicați parametrii electronici utilizați în relațiile liniare de energie liberă pentru corelări cu activitatea biologică, iar în tabelul 13 sînt prezentate o serie de ecuații corelaționale obținute pentru diferite serii de compuși biologic-activi,

Tabelul 12,

Simbol	Parametrul	Literatura
ρ ρ^2	Constantă Hammett	35-40, 44, 592, 601, 603, 604, 585, 605-609, 610-655
ρ^-	Efectul electronic al substituentului în orto	656
ρ_m	Efectul electronic al substituentului în poziția meta	610, 616, 657, 630, 658
ρ_p	Efectul electronic al substituentului în poziția para	591, 634, 658-659
ρ_I	Constantă inductivă în serie alifatică, Taft	580, 613-614, 623-624, 627-628, 643, 659-661
ρ_R	Constantă de rezonanță în serie alifatică, Taft	623, 627-628
ρ^*	Constantă de substituent polară, Taft	35, 37, 580, 610, 613, 632, 661-665
ρ'	Constantă de tip Hammett-Yoshikawa	630, 666
ρ^+	Constantă Hammett modificată pentru grupe atrăgătoare de electroni	608, 614, 658-659
ρ^-	Constantă Hammett modificată pentru grupe donoare de electroni	44, 580, 592, 609, 641

Tabela 12-continuare-

Simbol	Parametrul	Literatură
σ_{sc}	Efectul electronic direct asupra catenei laterale	668
ρ°	Constantă pentru reacții radicalice	659
ρ^{ϕ}	Constantă Kabachnik pentru substituenți legați la atomul de P	669-674
pK_a	Logaritmul constantei de ionizare luat cu semnul minus	580,600,621,630,640,641,667,675-679
ΔpK_a	Variația valorilor pK_a între compusul substituit și cel nesubstituit	615,635,664,667
I	Potențial de ionizare	680,681
P_E	Polarizabilitate electronică molară	591,613,623,627-628,660,682
∞	Polarizabilitatea electronică	680,681,683
F	Constanta molară de atracție	684
f_p	Constante molare fracționare de atracție	685
log K	Logaritmul constantei de echilibru (viteză)	686,687
μ	Moment dipol electric	683,688-691
m, m^2	Moment dipol de grup	683,688
γ Δppm	Deplasare chimică spectroscopică	635,641
$t_{1/2}$	Timp de înjumătățire	686-687
Δk	Parametrul pentru legături de hidrogen	682
E_R	Constantă homolitică	591,614,623,624,642,658,692
\mathcal{F}	Constantă inductivă de câmp	604,633,643,658,663,680,693

Tabelul 12-continuare-

Simbol	Parametrul	Literatura
R'	Constantă de rezonanță	613,633,663,680,693
β	Asociații albuminice	635
Q	Constanta de copolimerizare	591
α_1 α_2	Parametrii Yukawa-Tsuno pentru distribuția densității de sarcină a electronilor pi	637,694-696

Tabelul 13

Sistemul biologic și seria de reacție în care s-a întreprins analiza corelațională	Ecuatie corelațională	N	r	s	Lit.
Acilarea α - chymotrypsinei cu eniline substituite ale N - acetil - L -tyrosină	$\log k_2 = - 1,94 \cdot \sigma^- - 1,27$	5	0,97	0,15	697
Hidrolize fenil sulfatilor para-substituiți cu aril sulfatază	$\log v_{max} = 2,40 \cdot \sigma^- + 0,08$	6	0,96	0,12	698
Hidrolize fenil glucozidelor meta-substituite cu emulsină	$\log(1/k_m) = 0,95 \cdot \sigma^- + 1,63$	6	0,95	0,12	592
Hidrolize fenil acetatilor meta- și para-substituiți cu α - chymotrypsină	$\log k = 1,95 \cdot \sigma^- + 0,18$	5	0,97	0,22	581
Hidrolize fenil sulfatilor orto- substituiți cu aril sulfatază	$\log 1/I_{50} = 1,36 \cdot \sigma_R^- + 4,33$	4	0,96	0,17	698
Reducerea acetofenonelor para- substituite cu TPMH carbonil reductază	$\log k_o = 3,72 \cdot \sigma_R^- + 1,99$	6	0,97	0,29	699
Activitatea bacteriostatică a N- fenil sulfanil amidelor față de E.coli	$\log(1/MIC) = 1,05 \cdot \sigma^- - 1,28$	17	0,97	0,26	601
Inhibarea colinesterazei din mușca domestică cu O-(metil carbamoil) oxime	$\log(1/I_{50}) = 1,36 \cdot \sigma_1^- + 4,33$	4	0,96	0,17	663
Toxicitatea bis - (1-aziridinil) fosfinil carbamaților	$\log(1/ED_{50}) = 2,739 \cdot \sigma^- + 3,344$	10	0,945	0,259	639

Tabelul 15.

Sistemul biologic și seria de reacție în care s-a întreprins analiza corelațională.	Ecuția corelațională	N	r	s	Lit.
Hidrolize p-nitrofenil alcanostililor cu esteraze din plasmă umană	$\log(\%Hyd) = 2,99 \cdot E_S + 2,59$	6	0,95	0,63	592
Inhibarea colinesterazei din mușca domestică cu p-nitrofenil alchil fosfonați	$\log K_i = 2,57 \cdot F_S^C + 7,94$	6	0,93	0,65	714
Inhibarea colinesterazei cu 2,4,5 - triclofenil metil N-alchil fosforeamide	$\log K_i = 2,36 \cdot F_S - 3,91 \cdot \sigma^* + 4,95$	8	0,94	0,44	616
Inhibarea colinesterazei cu fenil fosfații disubstituiți	$\log(1/T_{50}) = -0,55 \cdot F_S + 2,45 \cdot \sigma^* + 4,92$	13	0,96	0,41	609
Efectul anti-noradrenalinic al N-mono- și N,N-dialchil-2-brom-2-fenil etil aminelor asupra presiunii sanguine la pisică	$\log(1/ED_{50}) = 1,12 \cdot F_S^C + 3,84 \cdot \sigma^* - 4,48 \cdot n_H + 11,86$	10	0,95	0,45	640
Efectul anti-adrenalinic al N-mono- și N,N-dialchil-2-brom-2-fenil etil aminelor asupra presiunii sanguine la pisică	$\log(1/ED_{50}) = 1,11 \cdot F_S^C + 3,56 \cdot \sigma^* - 4,43 \cdot n_H + 11,91$	10	0,98	0,23	640
Efectul blocării adrenergice cu 2-brom-2-fenil-N,N-dialchil amide în pisică	$\log 1/C = 1,11 \cdot E_S^C + 3,57 \cdot \sigma^* - 4,43 \cdot n_H + 11,91$	10	0,99	0,24	600
Inhibarea carboxipeptidazei cu derivații β - indolil și β -nertil substituiți	$\log(1/K_I) = 4,15 - 0,4 \cdot (MSD)_i$	13	0,846	0,40	711

B. Parametrii care indică influențele sterice asupra activității biologice

Un studiu despre efectele sterice posibile în sistemele biologice este foarte dificil de realizat datorită posibilității ca între substanțele biologic active și receptor să se manifeste simultan interactiv intra-și inter-moleculare. Pe lângă constantele E_S - Taft utilizate inițial la evaluarea influențelor sterice asupra reacțiilor chimice în ultimii ani au fost introduși noi parametri sterici (tabelul 14) folosiți și în corelări structură-activitate biologică de tipul relațiilor liniare de energie liberă (tabelul 1

Tabelul 14.

Simbol	Parametrul	Literatură
E_S	Parametrul steric Taft	601,602,608,609,610-616,622,636-637,661,660,663,699-700
$E_{S^{o,m}}$	Parametrul steric Taft modificat pentru substituienții orto- și meta-	619-620
E_{S^p}	Parametrul steric Taft modificat pentru substituienții para-	619-620
E_S^c	Parametrul steric corectat Hancock	601,608,640
V_M	Volumul molar	701
R_M	Refracția molară	701
E_V	Raze van der Waals	619-620,627-628,702-703
r	Distanțe inter atomice	660,703
γ	Parametrul steric definit arbitrar de Herman	625
B,L	Parametrii Verloop-Hoogenstraaten	704
$\frac{1}{1+\Delta}$	Parametrul Amooore	705-706
M.S.D.	Diferențe sterice minime	707-713

C. Parametrii care indică influențele hidrofobice și liofile asupra activității biologice

Hansch și colaboratorii [581,585] au exprimat variația de energie liberă datorată desolvatării prin constanta de substituent π , definită

$$\pi = \log P_X - \log P$$

P_X reprezintă constanta de partiție solvent/apă a compusului substituit, iar P constanta de partiție a compusului nesubstituit.

Constanta de substituent π a fost utilizată în multe analize corelaționale, conducând la relații liniare sau multiliniare (alături de alți parametri fizico-chimici) satisfăcătoare (tabelul 16). Alături de parametrul π , coeficientul de partiție P s-a dovedit a fi un parametru foarte util pentru descrierea deplasării compusului biologic activ pînă la locul acțiunii, prin membranele țesuturilor.

Hansch [582] a stabilit existența unei relații liniare între π (sau $\log P$) și R_n , o mărime care redă efectul substituentului asupra R_f - ului moleculei nesubstituie în cromatografia pe hîrtie sau în strat subțire. S-a pus în evidență o relație parabolică între activitatea biologică și R_m într-u totul asemănătoare celeia dintre aceeași activitate și $\log P$ [715].

Sistemul cel mai frecvent utilizat pentru determinarea lui P este 1-octanol/apă, iar constantele π au fost calculate plecînd de la molecule de referință ca: acidul fenoxiacetic, acidul benzoic, fenol, alcool benzilic. Valorile π pentru un număr însemnat de substituenți sînt comunicate în lucrarea lui Leo, Hansch și Elkins [716]. O proprietate importantă a lui $\log P$, respectiv π , care permite calculul valorilor pentru multe grupări chimice este caracterul lor aditiv-constitutiv [581,595,717].

Parametrii hidrofobici utilizați pentru corelări structură-activitate biologică și o serie de ecuații corelaționale obținute pentru diferite sisteme compus biologic activ/receptor sînt indicate în tabelele 16 și respectiv 17.

Corelările structură-activitate biologică trebuie să țină cont de influența tuturor factorilor structurali care au contribuție semnificativă în variația energiei libere și se înregistrează prin variația răspunsului biologic.

Tabelul 10.

Simbol	Parametrul	Literatura
π π^2	Constante hidrofobice de substituent Hansch-Fujita	44,585,591,592,600,601,604-608,610-611,613,615,616,617,618,619-622,625-626,630-636,627-628,637-638,639,643,644,640,650,660,663,675,676,677,683,686,688,718-719,720-723,724-729,730-735.
$\log P$ $(\log P)^2$	Logaritmul coeficientului de partiție	44,575,573,601,610,613,612,615,618,621,636,639,664,676,678,689,691,690,718-719,721,724,717,736-746,728.
R_M	Parametrul cromatografic	689,747-753
ΔR_M	Parametrul de substituent cromatografic	719
$\delta, \log \delta$	Parametrul de solubilitate	677,754-755
$\log S_W$	Logaritmul solubilității în apă	677
$\log S_C$	Logaritmul solubilității în cloroform	677
P	Paracorul	680,756-759
P	Paracor corectat	680,760

Așadar expresia generală a relației de energie liberă, dedusă de Hansch pentru corelarea activității biologice cu parametri fizico-chimici

$$\log 1/C = -k_1 \cdot \pi^2 + k_2 \cdot \pi + k_3 \cdot \delta + k_4 \cdot E_S + k_5 \quad (2)$$

poate fi regăsită în practică conținând unul sau mai mulți parametri variabili.

a) În cazul în care substanțele au o toxicitate nespecifică adică nu se fixează de receptor într-un loc bine determinat:

$$\log 1/C = k_2 \cdot \pi + k_5 \quad (3)$$

Fiind vorba de stabilirea unui echilibru rapid al compusului între mediul extracelular și cel intracelular și deoarece faza celulară este mai lipofilă, concentrația la partea activă va crește cu

Tabloul 17.

	Ecuația corelațională	N	r	s	Lit.
Sistemul biologic și seria de compuși în care s-a întreprins analiza corelațională					
Fixarea barbituricelor la serul albuminic de bovină	$105(1/C) = 0,58 \cdot \log P + 2,39$	4	0,96	0,13	718
Fixarea compușilor erometrici la hemoglobina din bovine	$105(1/C) = 0,71 \cdot \log P + 1,51$	17	0,95	0,16	718
Inhibarea α -chymotripsinei prin fenoli substituiți	$105(1/K_i) = 0,95 \cdot \log P - 1,88$	10	0,99	0,09	613
Inhibarea α -chymotripsinei cu compuși "miscellaneous"	$105(1/K_i) = 0,99 \cdot \log P - 2,59$	8	0,99	0,14	613
Inhibarea mobilității de transport intercelulare cu n-alcanoli	$105(1/I_{50}) = 0,95 \cdot \log P + 0,33$	8	0,99	0,08	665
Inhibarea luminiscenței bacteriene cu n-alcanoli	$105(1/C) = 1,17 \cdot \log P + 0,22$	8	0,99	0,10	665
Activitatea antibacteriană a erilor metacrilatilor	$105(1/MIC) = 0,61 \cdot \log P + 1,53$	10	0,97	0,20	621
Activitatea antibacteriană a alchil bromfenolilor	$105(C/C_0) = 0,76 \cdot \log P - 0,99$	8	0,95	0,26	621
Inhibarea consumului de oxigen în plămâni cobiului cu n-alcanoli	$105(1/I_{50}) = 0,90 \cdot \log P + 0,16$	7	0,99	0,10	665
Inhibarea acțiunii potențiale a nervului postsinaptic din ganglionul cervical superior prin compuși alifatici	$105(1/I_{50}) = 1,19 \cdot \log P + 0,82$	7	0,98	0,30	657

Tabelul 17 - continuare -

Sistemul biologic și seria de compuși în care s-a întreprins analiza corelațională	Ecuatia corelațională	N	r	s	Lit
Acțiunea narcotică a compușilor alifatici asupra mormolocilor	$\log(1/C) = 1,17. \log P + 0,68$	17	0,98	0,20	665
Acțiunea narcotică a alchil carbemașilor asupra mormolocilor	$\log(1/C) = 1,34. \log P + 0,61$	5	0,98	0,19	665
Fixarea fenolilor substituiți la serul albumine de bovină	$\log(1/C) = 0,68. \pi + 3,48$	19	0,96	0,13	675
Fixarea penicilinelor la serul uman	$\log(B/F) = 0,48. \pi - 0,63$	17	0,92	0,13	765
Inhibarea κ - chimotripsinei cu O-alchil S-2-etil tioetil metil tiolofosonați	$\log K_i = 1,13. \pi - 1,15$	7	0,98	0,24	613
Inhibarea creșterii <i>Staphylococcus aureus</i> cu l-aril-2-nitropropene	$\log(1/I_{50}) = 0,74. \pi + 1,38$	12	0,97	0,11	621
Toxicitatea fenolilor substituiți față de <i>M. pyogenes var. aureus</i>	$\log(1/C) = 0,95. \pi + 0,14$	35	0,97	0,22	585
Inhibarea creșterii celulelor <i>Avena</i> cu acizi fenil acetici substituiți	$\log(1/C) = 0,73. \pi + 3,01$	18	0,97	0,11	585
Toxicitatea acizilor benzoici substituiți față de larve de țânțari	$\log(1/DL_{50}) = 0,52. \pi + 1,54$	14	0,97	0,13	585
Activitatea antibacteriană a monoeterilor rezorcinei	$\log(1/C) = 1,77. \log P - 0,2. (\log P)^2 - 1,77$	11	0,98	0,18	621
Desaminarea oxidativă a aminelor primare cu extras de ficat de pisică	$\log(MR) = 0,64. \log P - 0,18. (\log P)^2 + 1,48$	13	0,97	0,06	676

Sistemul biologic și seria de compuși în care s-a întreprins analiza corelațională	Ecuația corelațională	N	r	s	Lit.
Toxicitatea n-alcanelilor față de larvele de muscă	$\log(BR) = 1,41 \cdot \bar{r} - 0,23 \cdot (\bar{r})^2 - 0,83$	8	0,957	0,19	618
Activitatea hipnotică a barbiturilor în iepuri după injectarea subcutanată	$\log(1/C) = 2,09 \cdot \log P - 0,63 \cdot (\log P)^2 + 1,92$	11	0,98	0,14	665
Activitatea antifugală a compușilor N-SCCl ₃ față de Stephyllum sarcinaeforme	$\log(1/ED_{50}) = -0,608(\log P)^2 + 5,495 \cdot \log P - 7,745$	4	0,998	0,128	742
Activitatea antimelerică a 1,4-naftochinolilor	$\log(1/C) = 1,63 \cdot \log P + 0,13 \cdot (\log P)^2 - 4,02$	10	0,920	-	762
Activitatea unor substanțe cu acțiune depresivă asupra sistemului nervos central (depresie cu 50%)	$\log(1/C) = 1,17 \cdot \log P + 1,22$	6	0,982	0,295	763
Toxicitatea fenolilor asupra bacteriilor grampozitive	$\log(1/C) = 0,951 \cdot \bar{r} + 0,144$	8	0,977	-	585
Inhibarea adenisin-deaminazei de către 9-benzil adenine	$\log(1/I_{50}) = 0,453 \cdot \bar{r} - 0,194$	8	0,992	-	764
Activitatea antitumorală a unor baze Schiff	$\log(1/C) = 0,331 \cdot (\log P) + 2,552$	6	0,92	-	765
Inhibarea reacției Hill cu:					
- N-fenil-etil-carbamați	$\log(1/C) = 0,967 \cdot \bar{r} + 3,318$	7	0,985	-	
- fenil-dimetil-uree	$\log(1/C) = 1,483 \cdot \bar{r} + 4,222$	12	0,924	-	610
- enilidele acidului butiric	$\log(1/C) = 1,779 \cdot \bar{r} + 3,578$	11	0,969	-	

Tabelul 17 - continuare --

Sistem biologic și serie de compuși în care s-a întreprins analiza corelațională	Ecuația corelațională	N	r	S	Lit.
Acțiunea narcotică asupra mușchiului de broască - compuși alifatici - compuși aromatici	$\log(1/C) = 0,933 \cdot \log P + 0,108$ $\log(1/C) = 0,903 \cdot \log P + 0,622$	28 23	0,975 0,972		664
Toxicitatea fenolilor asupra bacilului S - tifosa	$\log(1/C) = 1,312 \cdot \pi - 0,288 \cdot \pi + 0,319$	8	0,919		582

creșterea lui \tilde{r} .

O explicație mai plauzibilă pentru o asemenea relație liniară ar fi că reacția determinantă de viteză are loc pe sau în peretele celular, ceea ce corespunde unei singure partiții fază hidrofilă/fază lipofilă.

Valori apropiate de unu ale constantei k_2 în relația (3) semnifică faptul că efectul substituenților asupra energiei libere de transfer din faza apoasă la locul inhibiției este simbatîc cu transferul în modelul apă/1-octanol, adică inhibitorul acționează într-un mediu foarte lipofil sau cu enzimă foarte lipofilă.

Valori mult diferite ale lui k_2 de unu în relații de tip (3) sau în două relații de acest tip, este o indicație că ele corespund la mecanisme diferite de acțiune.

Relații liniare în \tilde{r} , $\log P$ au fost prezentate în tabelul 17 iar relații liniare în σ , mult mai rare, în tabelul 15.

b) un caz destul de frecvent întîlnit în practica corelărilor structură-activitate biologică este cel al dependenței parabolice a activității biologice de parametrul \tilde{r} (sau $\log P$) (tabelul 17):

$$\log 1/C = - k_1 \cdot \tilde{r}^2 + k_2 \cdot \tilde{r} + k_5 \quad (4)$$

În cazul explorării unei porțiuni limitate a acestei dependențe parabolice se regăsește relația de tip (3).

c) de cele mai multe ori, nu se poate stabili o relație satisfăcătoare între activitatea biologică și parametri termodinamici decît aplicînd relația Hansch în formă multiliniară, corespunzător influenței simultane a mai multor factori structurali. În tabelul 18 sînt prezentate cîteva relații multiliniare stabilite în cazuri concrete.

Tabelul 18.

Sistemul biologic și serie compușilor în care s-a realizat analiza corela- țională	Ecuatia corelațională	N	r	B	Lit.
Acțiunea anestezică a dietilbenzozililor	$\log I/C = 0,57 \cdot \bar{r} - 1,262 \bar{r} + 0,961$	9	0,933		714
Inhibarea colinesterazei cu fenil carbameții para-substituiți	$\log I/C = 4,24 \cdot \bar{r} + 3,845 E_S + 2,799 \cdot \bar{r} + 2,542$ $\log I/I_{50} = 4,20 - 0,768 \cdot \bar{r} + 0,058 R_M + 0,44H_B +$ $1,082 E_C + 0,320 \cdot C_T$	7	0,962		616
Inhibarea colinesterazei cu fenil metil carbameții para- substituiți	$\log I/I_{50} = 5,16 - 0,54 \cdot \bar{r} + 0,0567 \cdot R_M + 0,638 \cdot EC +$ $+ 0,476 \cdot HB + 0,058 - 0,160 \cdot MSD$	100	0,809	0,764	766
Inhibarea colinesterazei cu fenil metil carbameții para- substituiți	$\log I/I_{50} = 0,714 \cdot \bar{r} - 0,868 \bar{r} + 3,486$	97	0,839		767
Inhibarea colinesterazei cu fenil metil carbameții meta substituiți	$\log I/I_{50} = 0,457 \cdot \bar{r} - 1,180 \cdot R - 0,853 \cdot F + 3,784$	23	0,91		767
Inhibarea colinesterazei cu fenil metil carbameții meta substituiți	$\log I/I_{50} = 1,031 \cdot \bar{r} - 1,015 \cdot F + 4,394$	15	0,855		767
Inhibarea colinesterazei cu acetofenon O-(metil carbamoil) oxime para-substituite	$\log I/I_{50} = 4,189 + 0,65 \cdot F + 1,06 \cdot R$	6	0,993		663
Inhibarea colinesterazei cu acetofenon O-(metil carbamoil) oxime meta-substituite	$\log I/I_{50} = 0,952 \cdot F + 4,33$	4	0,952		663
Inhibarea colinesterazei cu dietil fenil fosfații para-substituiți	$\log I/C = 0,251 \cdot \bar{r} + 3,858 \cdot \bar{r} + 4,214$	6	0,957		516

	Ecuația corelațională	N	r	s	Lit.
Sistemul fiziologic și seria de compuși în care s-a realizat analiza corelațională					
Activitatea sinergică a unor 1,β-benzodionoli	$\log SR_y = 0,633 \cdot \pi - 0,123 \cdot \pi^2 - 1,823 \cdot \sigma^2 + 3,126 \cdot \sigma - 0,796 \cdot (\pi \cdot \sigma) + 0,039 \cdot E_S + 1,45$	12	0,991		659
Activitatea antebionistă față de acetilcolină a unor clorhidrați de aminoceterei	$\log L/C = 2,856 \cdot \pi - 0,317 \cdot \pi^2 + 0,646 \cdot \sigma - 0,196$	7	0,835		660
Inhiberea marelui dehidrogenazei cu fenoli	$-\log I = 0,73 \cdot \sigma^2 - 0,77 \cdot \pi - 0,65 \cdot \sigma + 2,44 \cdot \pi + 3,47$	6	0,952		768
Activitatea bacteriostatică a tetraciclinelor	$\log k_i = 1,33 \cdot \sigma^2 - 0,57 \cdot r_D + 2,51$	7	0,93	0,21	624
Inhiberea monoaminoxidazei din preparatele mitocondrice ale ficatului de cîine cu compuși de tipul	$\log L/C = 2,26 \cdot \sigma - 1,57 \cdot r_V + 6,85$	9	0,90	0,16	769
$X-C_6H_4-O(CH_2)_2-NH-CO-CH_2-CH_2$ monoc și respectiv poli-substituiți	$\log L/C = 1,57 \cdot \sigma + 0,76 \cdot E_S + 0,18 \cdot \pi + 3,99$	15	0,97	0,20	620
Efectul antibacterian al erilor isotiocianeyilor față de E. coli	$\log(L/I_{50}) = 0,77 \cdot \sigma + 0,53 \cdot \log P - 1,04 \cdot (\log P)^2 - 12,63$	9	0,96	0,14	621

Tabelul 18 - continuare -

Sistemul biologic și serie de compuși în care s-a realizat analize corelaționale	Ecuație corelațională	N	r	s	Lit.
Activitatea biologică a derivaților oxitocinici	$A=0,993+0,484 \cdot \bar{x} + 0,646 \cdot AR + 0,761 \cdot CT - 0,685 \cdot EC + 0,182 \cdot HB + 0,958 \cdot \sqrt{r} + 0,067 \cdot MSD$	42	0,745	1,185	770
Hidrolize esterilor nitrofenolici catalizată de α -chymotripsină	$\log v = 1,203 + 2,485 \cdot \bar{x} + 0,31 \cdot r - 0,294 \cdot MSD$	42	0,850	0,623	709 712
Activitatea antibacteriană a derivaților din serie cloramfenicolului	$\log k = -0,94 \cdot (\log P)^2 + 1,757 \cdot \log P + 0,623 \cdot \bar{x} - 0,049 \cdot P_E + 5,348$	19	0,925	0,369	771
Inhibitorii dihidrocolat reductazei cu derivații triazinici	$\log(1/C) = 0,68 \cdot \bar{x}_3 - 0,118 \cdot (\bar{x}_3)^2 + 0,23 \cdot MR_4 - 0,0243 \cdot MR_4^2 + 0,238 \cdot I_1 - 2,53 \cdot I_2 - 1,991 \cdot I_3 + 0,877 \cdot I_4 + 0,686 \cdot I_5 + 0,704 \cdot I_6 + 6,849$	244	0,923	0,377	772
Toxicitatea enelogilor DDT-ului față de mușca domestică	$\log LD_{50} = 14,14 + 9,36 \cdot E_S + 1,12 \cdot \sum E_S^2 + 4,31 \cdot \sum \bar{x}^*$	9	0,856	0,31	772.8
Toxicitatea enelogilor DDT-ului față de larvele de înșeri	$\log LC_{50} = 5,29 + 4,90 \cdot \sum E_S + 0,76 \cdot \sum E_S^2 + 1,76 \cdot \sum \bar{x}^*$ $\log LC_{50} = 7,27 + 6,03 \cdot \sum E_S + 0,76 \cdot \sum E_S^2 + 2,27 \cdot \sum \bar{x}^* + 0,37 \cdot \sum \bar{x}^2$	14	0,881	0,29	754.
		14	0,170	0,16	754

D. Parametrii cuanto-chimici utilizați în corelările
structură-activitate biologică

Reușita corelărilor structură-activitate biologică cu ajutorul relațiilor liniare de energie liberă a stimulat cercetările teoretice prin care se urmărește atât explicitarea parametrilor fizico-chimici în funcție de indicii de orbitale moleculare ρ și corelarea directă a activității biologice cu acești indici, [624], [628], [722], [773], [774 - 779],

În interpretarea teoretică a formei generale a ecuației lui Hansch o importanță deosebită este atribuită complexului activat format între compusul biologic activ și receptor. În funcție de natura acestui complex se face explicitarea termenilor din relația Hansch.

În cazul în care complexul activat menționat se formează prin transfer de sarcină se atribuie semnificație doar termenului k_3 , care poate fi exprimat în funcție de suma densităților electronice ale compușilor biologic activi.

$$k_3 \cdot \rho = k_3 \cdot \sum_r q_r \quad (1)$$

Nu s-a reușit însă o corelare cantitativă între activitatea biologică și densitatea electronică [780].

Se consideră că, în multe cazuri, complexul activat este format între orbitalele ψ cele mai bogate în energie ale compusului biologic activ și receptorului, numite "orbitale de frontieră". Orbitalele de frontieră pot fi caracterizate prin densitatea electronică a orbitei respective (f_r) sau prin indicele de superdelocalizare (S_r) care reprezintă raportul dintre f_r și nivelul de energie corespunzător [781-784].

Între indicii de orbitale moleculare "de frontieră" și coeficientul de partiție s-a stabilit următoarea relație, aplicată cu bune rezultate:

$$\log P = a \cdot \sum S_r - b \cdot \sum |q_r| + \text{const.} \quad (2)$$

Aceasta arată că atunci când coeficientul de partiție se poate explicita atât în funcție de valoarea absolută a densității electronice cât și în funcție de superdelocalizare, corelarea se realizează cu un coeficient r bun.

Conform concepției lui Cammarata [773] termenul $-\sum |q_r|$ ar reprezenta hidrofilitatea compusului, iar $\sum S_r$, cu ponderea statistică majoră, lipofilitatea acestuia. $\log P$ arată mărirea relativă a tipului de contribuție.

$\sum q_r$ reflecta solubilitatea în apă a compusului aromatic realizată printr-un mecanism sarcină-dipol, iar $\sum S_r$ reflectă polarizabilitatea compusului, adică solubilitatea în 1-octanol datorată forțelor van der Waals.

Camărată exprimă dependența constantei π de cele două posibilități de formare a complexului activat substanță biologic activă-receptor, prin relația:

$$\pi = p.\alpha + m.\sigma + m'.\sigma^2 \quad (3)$$

reprezentînd polarizabilitatea.

Principali indici cuanto-chimici utilizați în corelări cu activitatea biologică precum și unele ecuații corelaționale stabilite pentru anumite serii de compuși chimici sînt prezentate în tabelele 19 și respectiv 20.

Tabelul 19.

Simbol	Parametrul	Literatura
E_{LEMO}	Energia nivelului cel mai jos neocupat = măsură a capacității electrono-acceptoare	626,632,784
E_{HOMO}	Energia nivelului cel mai înalt ocupat = măsură a capacității electrono-donoare	600;784
θ	Energia totală de interacțiune	625
E_{π}	Energia totală a sistemului electronic	23,777,778
E_D	Energia de delocalizare = stabilitatea sistemului de electroni	23,778
$F[A]$	Energia de interacțiune intermoleculară coulombiană	784
$E[A]$	Cîmpul electric creat în punctul A de un set de sarcini asupra unei molecule	784
L_F^+ sau L_F^-	Energia de localizare corespunzătoare localizării la un atom a densității de electroni cerută de partener	23, 777 - 778

Tabelul 19 - continuare -

Simbol	Parametrul	Literatura
ϵ	Densitatea de sarcină electronică pe atom	592,632,726
q, Q^T, Q	Sarcină netă pe atom, sarcină netă totală, valoarea absolută netă a sarcinii	722,737,773,774
q^{\sim}, Q^{\sim}	Sarcină electronică \sim netă	737,784
$q^{\hat{r}}, Q^{\hat{r}}$	Sarcină electronică \hat{r} netă	737,784,626
S_r^E	Superdelocalizabilitate electrofilă = densitate electronică corectată pentru toate nivelele ocupate	628,695 - 696, 737,774,784
S_r^N	Superdelocalizabilitate nucleofilă = densitate electronică corectată pentru toate nivelele neocupate	628,695-696, 737,611
S_r^R	Superdelocalizabilitatea radicalului liber	695 - 696
f	Densitate electronică de "frontieră" = sarcină electronică cu nivelul de energie cel mai înalt ocupat	722
F_r	Valență liberă = tăria legăturii	695 - 696
f_r	Constantă de forță de valență	635,641
c	Coeficient atomic orbital	628,722,773
δ_c	Număr de ocupare	632
ΔE	Diferențe în valori energetice	632
δ_E	Diferențe de sarcină relativ la starea de tranziție incipientă	632
$\tilde{\tau}'_{N,N}$	Polarizabilitatea de frontieră a atomului	784
$\tilde{\tau}'_{N,N+1}$	"Polarizabilitatea" de frontieră atom-atom	784
P_{rs}	Ordin de legătură = energia legăturii între atomii r și s	23,777-778

Tabelul 20.

Sistemul biologic și seria de compuși în care s-a efectuat analize corelaționale	Ecuația corelațională	N	r	s	Lit.
Aciunea sulfamidelor asupra E. coli	$pC = 8,86 \cdot f_N + 237,92 \cdot q_N - 1671,07 \cdot q_N^2 + 6,54$	9	0,973		23
Inhiberea colinesterazei prin carbamoil-piperidine	$pI_{50} = m_0,623 \cdot \bar{r} + 1,63 \cdot q_N + 4,47$	7	0,997		780
Inhiberea acetil colinesterazei cu stiril piperidine	$\log 1/I_{50} = 0,316 \sum S_{Ar} - 4,091 \cdot \sum q_r + 4,016$	7	0,995		628
Activitate bacteriostatică a unor aniline substituite	$\log 1/C = 1,7 \cdot f_N^E + 119,5 \cdot q_N - 427,65 \cdot q_N^2 - 294$	6	0,985		773
Toxicitatea acizilor benzoici asupra larvelor de țânțeri	$\log 1/C = -0,820 \cdot \sum q_r^T + 2,069$	7	0,927		585
Inhibiția reacției Hill cu 3-N-fenil-carbamați	$\log 1/C = 0,315 \cdot \sum S_r^E - 1,176 \cdot \sum q_r^T + 2,574$	6	0,985		610
Toxicitatea fenolilor asupra bacililor gram-pozitivi	$\log 1/C = 0,154 \cdot \sum S_r^E - 1,539 \cdot \sum q_r^T + 0,515$	7	0,984		585
Activitatea antihipertensivă a unor benzotiadiazine	$pA_2 = -1,96 \cdot E_{HOMO} - 52,996 \cdot S_5^B + 48,38 \cdot S_5^N - 56,07 \cdot S_4^E + 98,57 \cdot S_6^N + 28,34$	16	0,990		784
	$pA_2 = -2,09 \cdot E_{HOMO} + 12,78 \cdot S_5^N + 11,03 \cdot E[A] - 0,04 \cdot \bar{r}_{6,7} + 0,04 \cdot \bar{r}_{9,8}$	16	0,990		784
	$pA_2 = -5,16 \cdot E_{HOMO} + 55,09 \cdot S_5^N + 115,78 \cdot S_6^N + 5,16 \cdot q(3R) \cdot \bar{r} + 64,12$	26	0,980		784

Tabelul 20 - continuare -

Sistemul biologic și seria de compuși în care s-a efectuat analiza corelațională	Ecuația corelațională	N	r	s	Lit.
Activitatea antihipertensivă a unor benzotiadiazine	$pA_2 = 8,63 \cdot S_1^N - 135,08 \cdot S_4^E + 78,14 \cdot E[D] + 54,52 \cdot S_3^N + 61,60 \cdot F[E] + 1,49 \cdot q(3R) \cdot \sigma + 1,95$	25	0,990		784
Inhiberea acetilcolinesterazelor cu derivați de 3-fidroxifenil trimetilamoniu	$pk_I = -2571 \cdot Q_0^T - 283 \cdot S_0^E - 645$	6	0,98		773

1.2. Modelul Free-Wilson

Modelul matematic Free-Wilson are la bază ipoteza potrivit căreia activitatea biologică poate fi considerată ca rezultată a contribuțiilor unor "segmente moleculare" [24-34]. La fiecare segment molecular apare un număr diferit de substituenți. Deci;

R.B. = \sum contribuția segmentului i + contribuția scheletului molecular,

sau matematic exprimat

$$R.B. = \sum_i a_i \cdot x_i + \mu \quad (1)$$

În această relație a_i reprezintă contribuția substituentului i , μ - contribuția scheletului molecular; $x_i = 1$ sau 0 după cum substituentul i este prezent sau absent în segmentul respectiv. Contribuția scheletului molecular, μ , se ia constantă, ca medie a activităților biologice a compușilor considerați.

O condiție esențială a metodei este aceea că suma contribuțiilor dintr-un segment pentru întreaga serie de compuși este egală cu zero. În cazul când seria admite 4 segmente moleculare A, B, C și D, această condiție se formulează:

$$\sum_i^n (a_i \cdot A + b_i \cdot B + c_i \cdot C + d_i \cdot D) = 0 \quad (2)$$

Ca urmare contribuția de substituent dintr-un segment nu este liniar independentă și poate fi exprimată ca o combinație liniară a celorlalte contribuții:

$$-D = \sum_i^n \left(\frac{a_i}{d_i} A + \frac{b_i}{d_i} B + \frac{c_i}{d_i} C \right) \quad (3)$$

Pentru o serie de n compuși cu k segmente și m substituenți se va scrie un sistem de n ecuații cu $m-k$ necunoscute independente (m - necunoscute și k - ecuații de restricție) care este rezolvabil dacă

$$n \geq m - k \quad (4)$$

Soluția sistemului dă contribuția celor $m-k$ substituenți în raport cu care s-a făcut explicitarea sistemului iar din cele k ecuații de restricție se determină și contribuțiile celorlalți substituenți.

Purcell [26] precizează că metoda Free-Wilson este aplicabilă atunci când:

- în seria de compuși au loc variații structurale sistematice,

- valorile activităților biologice corelate sînt precis determinate, iar în final, oportunitatea ei este hotărîită de valorile testului F și al coeficientului r .

Ban și Fujita [33] au dezvoltat metoda Free-Wilson operînd cu activități biologice relative ale derivaților substituți față de cel nesubstituit și admițînd contribuții ale interacțiilor dintre substituenți.

Singler și Purcell [28] au demonstrat că în cazul unor relații $A = f(r)$ de tip parabolic este recomandabilă utilizarea unui model care să țină cont de interacțiile substituenților [32], în timp ce pentru relațiile $A = f(r)$ de tip liniar, modelul Free-Wilson pur, pare mai potrivit.

A.Chiriac, a propus utilizarea metodei Free-Wilson pentru determinarea standardului optim ipotetic al unei serii pentru referința în calculul diferențelor sterice minime. [706,712].

Cîteva din sistemele biocimice și seriile de reacție în care corelarea structură-activitate s-a făcut cu metoda Free-Wilson sînt indicate în tabelul 21.

Tabelul 21.

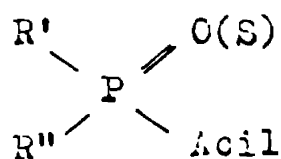
Acțiunea biologică și serie de compuși în care s-a efectuat analiza corelațională	Nr. de compuși	Nr. de necunoscute	r	Lit.
Acțiunea depresivă a unor derivați ai tiazolului și oxazolului	20	14	0,915	23
Activitatea anti-Plasmodium gallinaceum a unor clor-chinoline	14	10	0,970	30
Activitatea antitumorală a unor acetilen-carbamați	65	36	0,936	29
Inhiberea colinesterazei cu β -carbamoil piperidine alchil-substituite	36	13	0,95	26
Activitatea meditoare și stimulatorie a β -fenil etil-aminelor asupra sistemului nervos	15	*	0,95	786
Inhiberea in vitro la Staphilococcus aureus cu 6-deoxitetraciclină	10	5	0,95	787
Activitatea hipoglicemică a unor piperidine sulfamid-semicarbazide	10	5	0,94	788

* s-au corelat parametrii cuantochimici.

2. Corelări cantitative structură-activitate biologică la compuşii organofosforici

2.1. Analize ecuațiilor corelaționale propuse pentru descrierea relației structură-activitate biologică la serii de compuşii organofosforici cu acțiune pesticidă

Relația dintre structura chimică a C.O.F. pesticide și capacitățile lor de inhibare colinesterazică a fost studiată pe larg. La început această relație a fost studiată sub aspect calitativ și a condus la formularea bine-cunoscutei reguli a lui Schrader prin care se postula că toate C.O.F. active ca pesticide trebuie să aibă o structură de tip



Această regulă empirică și-a primit fundamentarea teoretică prin lucrările lui Clark, Hutchinson, Kirby și Warren [260].

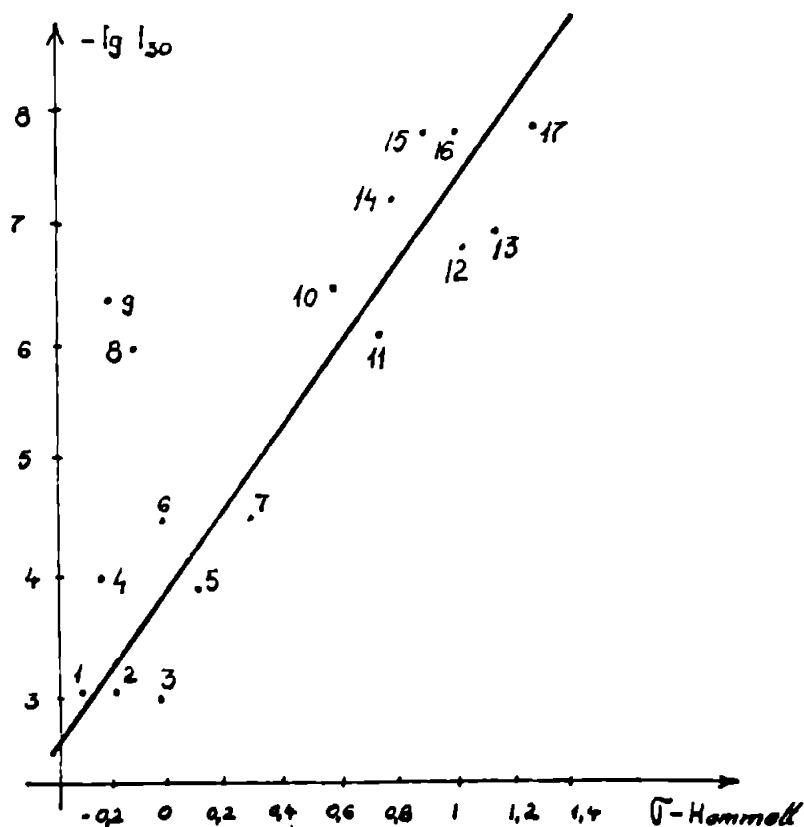
Implicațiile dependenței calitative între structura și activitatea pesticidă a C.O.F. au fost prezentate pe larg în capitolul nr.1.

Abordarea pe baze cantitative a dependenței menționate este legată de lucrările lui Aldrige și colaboratori [67-70], O'Brien [52,56], Fukuto și Metcalf [50,58,176], Vîlceanu și colaboratori [788-792].

În studiile de început ale lui Aldrige [70] privind inhibarea acetil colinesterazei cu dietil fenil fosfați, fenil substituiți s-a pus în evidență o relație de dependență liniară între constanta de inhibare k_e și viteza și viteza de solvoliză a acestor esteri. Ulterior Fukuto și Metcalf [176] pentru o serie lărgită a acestor C.O.F. au stabilit că activitatea de inhibare a acetil colinesterazei este dependentă de efectul imprimat de substituent asupra labilității legăturii $-p-O-\text{C}_6\text{H}_4-X$ estimat prin

constante σ - Hammett (figura 24) de variația frecvenței de alungire pentru această legătură și de viteza de hidroliză.

Fig.24. bis



1. p-OCH₃; 2. p-CH₃; 3. H;
4. p-terț-C₄H₉; 5. m-OCH₃;
6. p-SCH₃; 7. p-Cl;
8. m-terț-C₄H₉; 9. m-N(CH₃)₂;
10. pSOCH₃; 11. p-COOH;
12. p-CN; 13. p-CHO; 14. m-NO₂;
15. N(CH₃)₃⁺; 16. p-SO₂CH₃;
17. p-NO₂.

Deși în corelarea stabilită (fig.24b) factorul determinant în activitatea anticolinesterazică este reactivitatea compușilor, proprietățile sterice ale moleculei, pot adesea influența semnificativ viteza de inhibare (așa se explică activi-

tatea neobișnuit de mare a m-dietil amine și m-terț-butil fenil dietil fosfaților, - 8,9 - de circa 1000 ori mai mare decât cele corespunzând valorilor σ).

Hansch [609], a corelat valorile $\log I_{50}$ cu diferiți parametrii structurali la o serie de 13-dietil fenil fosfați (meta-fenil substituiți și para-fenil substituiți) obținând ecuațiile (1a-c) (tabelul 22) pentru derivații meta-substituiți, ecuația (2) pentru derivații para-substituiți și ecuațiile (3a-b) pentru întreaga serie. Examinând aceste ecuații se constată aportul consistent al parametrilor σ și E_s în corelările liniare corespunzând dietil fenil fosfaților meta-substituiți și oportunitatea utilizării parametrului σ (în loc de σ) în corelările cu dietil fenil fosfații para-substituiți. Parametrul X din ecuația (3b) evidențiază diferențele de natură stereoelectronică în mecanismul de inhibare între compușii meta (X = 0) și cei para-substituiți (X = 1). Utilizarea suplimentară a constantei π nu aduce îmbunătățirea corelațiilor menționate ceea ce sugerează că dietil fenil fosfații nu se vor fixa hidrofobic de enzime.

Intr-o altă serie de 8 dietil fenil fosfați a căror toxicitate a fost determinată de către Fukuto și Metcalf [176], Hansch și Fujita [585] au stabilit ecuațiile corelaționale (4a-b) (tabelul 22).

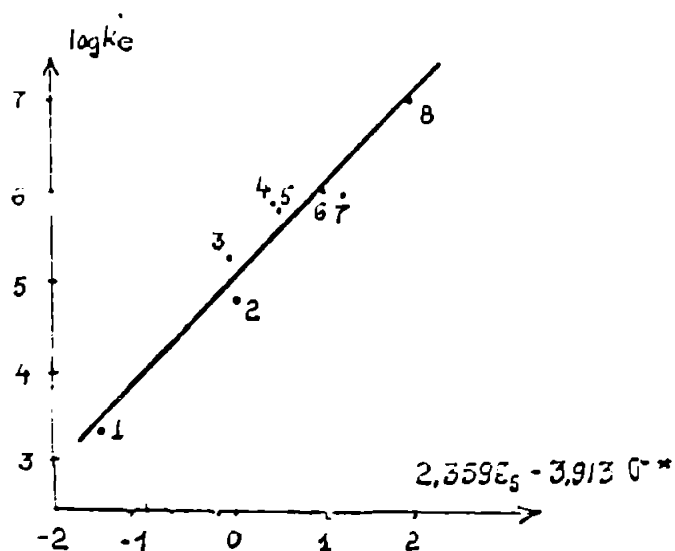
Fukuto și colaboratorii [732] au calculat indicii de superdelocalizare și densitatea electronică a atomului de fosfor la un număr de 15 fenil dietil fosfați și au găsit că S_P^N se poate corela cu viteza de hidroliză pozitivă a acestora. În schimb, între S_P^N și concentrația molară medie de inhibare a colinesterazei nu s-a putut stabili decât o corelație cu un slab coeficient r . Ca urmare a acestor rezultate, autorii emit ipoteza că mecanismul inhibiției constă dintr-un atac nucleofil la atomul de fosfor urmat de o fosforilare a enzimei.

Rolul important al efectelor sterice este relevat și în seria p-nitro fenil alchil fosfonaților. Deși în general k_e (constanta bimoleculară a procesului de inhibare) crește odată cu creșterea lui $k_{hidr.}$ (constanta de hidroliză), nu s-a putut stabili o dependență $\log k_e = f(\log k_{hidr.})$ liniară. Ca urmare a îngreunării accesului grupării fosfonil la centrul esteric al enzimei, atunci când grupa alchil crește de la etil la n-amil, k_e scade de circa 20 de ori în timp ce $k_{hidr.}$ rămâne aproximativ constantă [174].

Buna corelație obținută între $\log k_e$ și constanta sterică de substituient E_S (ecuația 5, tabelul 22) arată că variația activității anticolinesterazice trebuie atribuită în cazul acestei serii efectelor sterice. Corelarea cu constantele sterice de substituient Hancock conduce la obținerea unui r îmbunătățit (ecuația 6).

Aceeași contribuție importantă a efectelor sterice în inhibarea colinesterazică a C.O.F. se întâlnește la serie metil-2,4,5-triclor fenil N-alchil fosforamidelor. Utilizarea suplimentară a constantei E_S îmbunătățește sensibil corelația liniară $\log k_e = f(\tilde{r}^*)$ (relația C.O.F. tabelul 22) (fig.25).

Fig.25.



1-NH-t-C₄H₉; 2-NH-i-C₃H₇;
 3-N(CH₃)₂; 4-NH-C₃H₇; 5-NH-C₄H₉;
 6-NH-CH₃; 7-NH-C₂H₅; 8-NH₂;

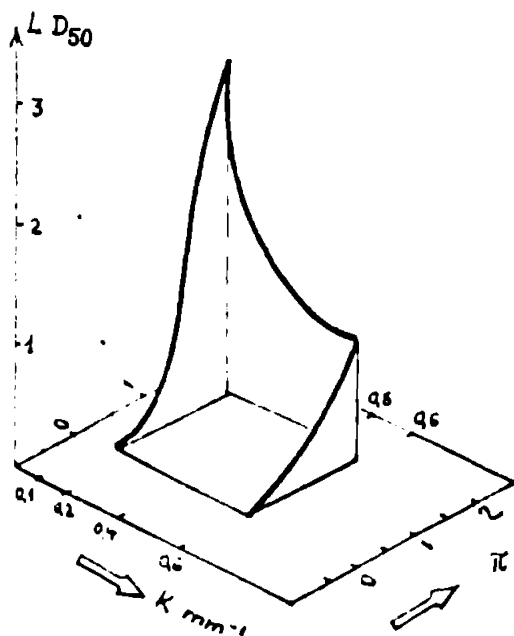
Ecuațiile 7a-b-c sînt obținute prin corelarea multiparametrică a lui $\log k_e$ cu seturi de parametri fizico-chimici la aceeași serie de etil p-nitro fenil fosfonați. Ele arată că introducerea suplimentară a parametrului \tilde{r}^* nu îmbunătățește corelările,

$\log k_e = f(E_S^C)$ și $\log k_e = f(E_S^C, \delta^*)$, adică substituentul R nu ajunge în contact direct. Autorul [714], pe baza analizei statistice a relațiilor (6) și (7) precizează că simpla creștere a coeficientului de corelare nu poate fi unicul criteriu de apreciere asupra ameliorării corelațiilor întreprinse. Astfel, pe baza valorilor lui s și a testului F rezultă că relația 6 constituie o mai bună corelare decât cea reușită de ecuația (7a) iar (7b) una mai bună ca (7c).

Analiza de regresie multiliniară a valorilor I_{50} cu diferiți parametri de energie liberă pentru acetofenon O-(dietil fosforil) oxime para-substituite [663] a condus la ecuația corelațională (9) în care R și F reprezintă constantele de câmp și respectiv de rezonanță ale lui Swain și Lupton [793]. Relația obținută indică dependența activității anticolinesterazice în mod direct de tendința electronodonoare a substituentului din ciclul fenilic (adică invers decât la dietil fenil fosfații fenil-substituiți).

Pentru O,O-dietil p-metil sulfonil fosfații corelarea toxicității "in vivo" față de Musca domestica cu parametrii structurați a condus la ecuațiile corelaționale 10a-b [794] în care se observă că parametrul π asigură principale contribuție în variația activității biologice. Este de presupus că la acești compuși valorile optime π corespund unei creșteri a sensibilității la atac nucleofil (figura 26).

Fig. 26.



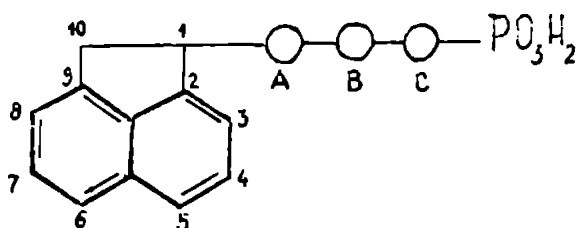
Suprafața structură - activitate generată de ecuația corelațională:
 $\log LD_{50} = 0,84 \cdot \pi - 0,194 \pi -$
 $- 0,626 \cdot \log k - 1,76$

Aceste constatări nu concordă cu rezultatele obținute de către Hansch [616] la fosforamide (corelări ale toxicității exclusiv cu parametrii electronici, independente de π) dar nu trebuie omis că el a utilizat activități "in vitro".

În seria O,O- dietil p-metil tiofenil tiofosfaților, în schimb, valorile $\log LD_{50}$ sînt funcții liniare de $\log k$, k fiind constanta de viteză a reacției de hidroliză, și nu depind de T și T^2 . Ecuația 11 (tabelul 22) este relativ surprinzătoare avînd în vedere că prevede, contrar constatărilor experimentale obișnuite, că substanțele stabile față de hidroliză au activitate biologică superioară [794].

Rezultatele acestui studiu confirmă odată în plus că este foarte dificil să face previziuni asupra activității biologice a unei clase de compuși exclusiv pe baza sistemelor model.

Vîlceanu și colaboratorii [789] în corelarea structură-activitate anticolinesterazică pentru compușii organofosforici de tipul



utilizează ca parametri structurali prezența sau absența grupelor NO_2 în poziția 5, a simultan două grupe NO_2 în pozițiile 5 și 6, a grupei esterice în R' , ca și succesiunea $CO-CH_2$ în fragmentul molecular situat între acenaften și atomul de fosfor; acești parametri

pot lua valorile discrete 1 sau 0. Ecuația corelațională obținută (12, tabelul 22) are un foarte bun coeficient de corelare.

Marea majoritate a analizelor corelaționale structură-activitate biologică întreprinse la C.O.F. cu acțiune pesticidă operează cu serii relativ restrînse de compuși. Pe baza ecuațiilor corelaționale obținute, se încearcă estimarea aportului diferiților factori structurali în variația activității biologice și cunoașterea mai profundă a mecanismului de acțiune a C.O.F. ca inhibitori colinesterazici.

Un număr relativ restrîns de studii au folosit corelările obținute ca punct de plecare în selectarea de structuri biologic active și optimizarea activității pesticide prin variații structurale, în acord cu indicațiile oferite de acestea privitor la relația structură - răspuns biologic. Această rezervă este motivată prin numărul mic al datelor experimentale de activitate biologică în raport cu multitudinea structurilor posibile într-o serie de reacții ca și prin nesiguranța acestora ca urmare a influenței deosebit de mari pe care o are sursa și puritatea enzimelor utilizate în testări.

Deși după opinia unor cercetători, pentru obținerea unor noi pesticide organofosforice selective, eficiente și lipsite de toxicitate reziduală față de mamifere este necesar să se investigheze

Nr.	Acțiunea biologică și serie de compuși organofosforici în care s-a întreprins corelarea	Ecuația corelațională	Semnificație statistică	Lit.
1.a	Inhiberea colinesterazei cu dietil fenil fosfați metasubstituiți N = 5	$-\log I_{50} = 2,685 \cdot \sigma + 5,184$	r=0,743 s=1,159	609
1.b		$-\log I_{50} = -1,366 \cdot E_S + 4,900$	r=0,911 s=0,614	609
1.c		$-\log I_{50} = -1,090 \cdot E_S + 1,576 \cdot \sigma + 4,449$	r=0,993 s=0,248	609
2.	Inhiberea colinesterazei cu dietil fenil fosfați para-substituiți N = 8	$-\log I_{50} = 2,490 \cdot \sigma + 4,184$	r=0,985 s=0,254	609
3.a	Inhiberea colinesterazei cu dietil fenil fosfați N = 13	$-\log I_{50} = -0,556 \cdot E_S + 2,452 \cdot \sigma + 4,818$	r=0,962 s=0,408	609
3.b		$-\log I_{50} = -0,966 \cdot E_S + 2,287 \cdot \sigma - 1,201 \cdot X + 5,519$	r=0,980 s=0,313	609
4.a	Toxicitatea față de Musca domestica a unor dietil fenil fosfați N = 8	$-\log LD_{50} = 2,282 \cdot \sigma - 0,348$	r=0,976 s=0,286	585
4.b		$-\log LD_{50} = 2,420 \cdot \sigma + 0,256 \cdot \mu - 0,600$	r=0,987 s=0,228	585

Tabelul 22 - continuare -

Nr.	Acțiunea biologică și seria de compuși organofosforici în care s-a întreprins corelarea	Ecuația corelațională	Semnificația statistică	Lit.
5.	Inhibarea acetilcolinesterazei din Musca domestica cu p-nitrofenil alchil fosfonați N = 14	$\log k_e = 3,738.E_S + 7,539$	$r=0,901$	616
6.	Inhibarea colinesterazei din Musca domestica cu p-nitro fenil fosfonați N= 13	$\log k_e = 2,58.E_S^C + 7,94$	$r=0,927$ $s=0,684$	714
7.a	Inhibarea colinesterazei din Musca domestica cu p-nitro-fenil fosfonați N = 13	$\log k = 2,59.E_S^C + 0,09.\pi + 7,78$	$r=0,928$ $s=0,676$	714
7.b		$\log k = 2,89.E_S^C - 2,72.\sigma^* + 7,92$	$r=0,940$ $s=0,696$	714
7.c		$\log k = 2,96.E_S^C + 0,18.\pi - 3,05. + 7,59$	$r=0,944$ $s=0,631$	714
8.	Inhibarea acetilcolinesterazei din Musca domestica cu metil-2,3,4-triclor fenil N-alchil fosforamide N= 8	$\log k_e = 2,359.E_S - 3,913.\sigma^* + 4,948$	$r=0,939$	663
9.	Inhibarea colinesterazei determinată de acetofenon O-(dietil fosforil) oxime	$\log 1/I_{50} = -2,47.R - 2,37.F + 7,19$	$r=0,89$	663

Tabloul 22 - continuare -

Nr.	Acțiunea biologică și serie de compuși organofosforici în care s-a întreprins corelarea	Ecuația corelațională	Semnificația statistică	Lit.
10.a.	Toxicitatea O,O-dietil p-metil sulfonil fosfaților față de Musce domestice N = 5	$\log LD_{50} = 0,528 \cdot \bar{x} - 1,399$	r = 0,857 s = 0,152	794
10.b		$\log LD_{50} = 0,84 \cdot \bar{x}^2 - 0,194 \cdot \bar{x} - 0,626 \cdot \log k - 1,76$	r = 0,989 s = 0,011	794
11	Toxicitatea O,O-dietil p-metil tiofosfaților față de Musce domestice N = 6	$\log LD_{50} = 0,524 \cdot \log k + 0,045$	r = 0,911 s = 0,08	794
12	Inhibarea colinesterazei cu derivai organofosforici ai aceneftenului N = 10	$PI_{50} = 3,20 + 0,10 \cdot \delta(NO_2) + 0,25 \cdot \delta(NO_2)_2 + 1,00 \cdot \delta(ester) + 0,62 \cdot \delta(A-CH_2; B-CO) - 0,08 \cdot \delta(B-CO; C-CH_2)$	r = 0,991 s = 0,826	789

investigațiile să fie orientate înspre cunoașterea cât mai exactă a naturii și dispunerii centrelor active în colinesteraze, se înregistrează o preocupare din ce în ce mai susținută pentru folosirea rezultatelor analizei corelaționale structură-activitate anticolinesterazică în sinteza de noi compuși [795-797].

2.2. Aspecte particulare în evaluarea parametrilor fizico-chimici pentru corelări cu activitatea biologică a pesticidelor organofosforice

2.2.1. Evaluarea efectelor electronice și a interacțiilor determinate de variația într-o serie de reacție de compuși organofosforici

Efectele electronice ca și influențele hidrofobe sau liofile manifestate de către substituienții variabili ai unei serii de reacție asupra activității biologice a C.O.F. se exprimă cu ajutorul unor parametri fizico-chimici. Majoritatea parametrilor de acest tip, utilizabili și în corelările structură-activitate biologică pentru pesticidele organofosforice au fost deja prezentate în capitolul III, tabelele 12 și 16. Trebuie totuși remarcat că pentru evaluarea efectului substituentului asupra entalpiei libere de reacție a procesului studiat, se utilizează constantele substituent exprimate în scări diferite (σ , σ^* , σ_I , σ^* , σ^+). Alegerea tipului de constantă de substituent pentru corelare trebuie să țină seama de caracterul electronic al substituentului ($\pm E$), de natura interacțiilor substituent-centru de reacție (efect inductiv sau de conjugare) și de structura complexului activat compus biologic activ-receptor.

Deși, deocamdată, folosite mult mai puțin, constantele s-au dovedit aplicabile în toate acele cazuri în care reacția nu afectează direct atomul de fosfor ca centru de reacție, adică atunci când nu se rup și nu se formează legături σ noi la fosfor [669-674], [790], [798-801]. În reacțiile în care atomul de fosfor participă direct, în corelarea proprietăților fizice ale C.O.F. se recomandă utilizarea ca măsură a efectelor electronice ale substituenților valorile

$$\sum (\sigma_I^\phi + \alpha \cdot \sigma_R^\phi)$$

în care σ_I^ϕ , σ_R^ϕ reprezintă componenta inductivă și respectiv de rezonanță a lui σ^ϕ ; α - un coeficient cu valori între 0,5-2 și cu valoare optimală specifică seriei de reacție, reflectă ponderea efectelor de rezonanță în efectul electronic global [670]

Determinarea constantelor σ^ϕ s-a făcut fie pe baza constantelor de disociere ale acizilor fosforului constituiți în serii de reacție cu variații largi ale substituenților [670-671], [673-674], [802-807], fie cu ajutorul unor reguli de aditivitate aplicate unor substituenți cu structură chimică complexă [673-674]

[790], [801], [808] și a unor relații de convertire a diferitelor scări în care se exprimă constantele de substituenți [670], [673-674], [809] .

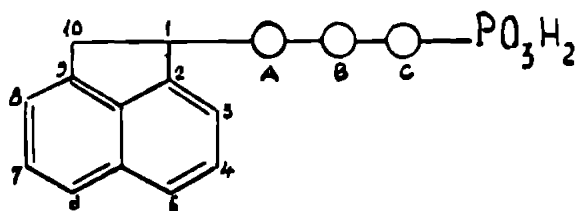
Constantele de hidrofobicitate Hansch [585], [592], [607], [710] pentru diferiți substituenți sînt determinate și tabelate în lucrările menționate ca și în literatura citată în tabele 12 și 16. Pentru substituenții cu structură complexă ale căror constante π nu sînt date în literatură, aceste mărimi se calculează pe baza proprietății lor de aditivitate, cu relațiile:

$$\log P = \sum_i \log P_i \quad (1)$$

$$\pi_X = \log P_{RX} - \log P_{RH} + \sum \Delta \pi_i \quad (2)$$

în care P_i sînt constantele de partiție ale unor fragmente structurale din care este constituit substituentul, iar $\Delta \pi_i$ corecțiile datorate efectelor de conjugare, naturii alifatică sau aromatică a radicalului R sau efectului de pliere al catenei.

Pe lîngă parametrii folosiți în mod frecvent în corelările structură-activitate biologică prezentați în tabelele 12 și 14, o serie de autori au introdus noi parametri pentru a marca particularitățile structurale ale substituenților și efectele determinate de acestea. Dintre acești noi parametri vom consemna pe cei utilizați de către Vîlceanu, Simon și colaboratorii în analizele corelaționale structură-activitate anticolinesterazică la C.O.F. Astfel, pentru compușii de tipul



parametrii structurali cu care s-a realizat corelația liniară

$$PI_{50} = \alpha + \sum_j \beta_j \cdot \delta_{ij} \quad (3)$$

au fost: $\delta_{i1} = 1(0)$ pentru prezența (absența) grupei NO_2 în poziția 5; $\delta_{i2} = 1(0)$ pentru prezența (absența) simultană a două grupe NO_2 în pozițiile 5 și 6; $\delta_{i3} = 1(0)$ după cum compusul este ester sau acid; $\delta_{i4} = 1(0)$ pentru prezența (absența) grupei $-CH_2$ în A și $-CO$ în B; $\delta_{i5} = 1(0)$ pentru prezența (absența) grupei $-CH_2$ în C și $-CO$ în B [789]

Z. Simon și A. Chiriac [80] , printre parametrii cu care corelează toxicitatea unor esteri organofosforici introduc numărul de atomi cu caracter acceptor de protoni disponibili pentru legături de hidrogen, numărul de cicluri benzenice ca măsură a caracterului aromatic, numărul de grupe NO_2 sau CN ca măsură a caracterului acceptor de electroni în complecși cu transfer de sarcină.

În cazul unor inhibitori colinesterazici organofosforici cu centru cationic în grupa eliminantă A. Chiriac și colaboratorii [79] adoptă ca parametrii structurali constantele de substituient ρ^+ și π , sarcină electrică netă, MC , caracterul acceptor de electroni în complecși cu transfer de sarcină, CD , și diferențele sterice minime.

Pentru C.O.F. în care variațiile structurale implică pe lângă schimbarea naturii chimice a substituentului și schimbarea poziției acestuia într-o catenă sau ciclu, se pot utiliza constantele de substituent care pentru una și aceeași grupare chimică se corectează prin coeficienți de contribuție în funcție de poziția ocupată; se propun de asemenea combinații liniare de coeficienți ponderați ai unor valori discrete care marchează prezența sau absența substituentului în pozițiile ocupate succesiv sau simultan de o grupare anumită în cadrul seriei de reacție [81] .

2.2.2. Evaluarea efectelor sterice a substituenților într-o serie de reacție de compuși organofosforici

Spre deosebire de parametrii utilizați pentru proprietățile electronice și hidrofobe ale substituenților care au fost cercetați amănunțit și au primit o fundamentare teoretică, constantele sterice de substituent se află încă în faza incipientă a definirii și folosirii în analizele corelaționale. Această situație poate fi considerată ca unul din punctele nevralgice ale stadiului actual de dezvoltare a corelării cantitative structură-activitate biologică deoarece deși este recunoscut rolul extrem de important al cerințelor sterice în interacțiunile substrat-receptor, în metabolismul compușilor biologic activi [81] până în prezent nu pare să existe un sistem, nu prea complicat, pentru caracterizarea cantitativă a configurației sterice pe care o au moleculele biologic active.

Constantele sterice de substituent se definesc în raport cu compusul nesubstituit [41-42] , [699] sau cu structură corespunzând valorii optime a activității biologice [812] precum și

prin referire directă (r , r_V , V_M) sau indirectă (R_M) la caracteristicile geometrice ale substituentului. Valorile constantelor sterice de substituent exprimă "grosimea" substituentului (E_S^O , E_S^C , r_V^{\min} , r_V^{mediu}), lungimea (B, L), volumul (R_M), dimensiunile în patru direcții perpendiculare (B_1, B_2, B_3, B_4) sau într-o serie de direcții alese în funcție de "siluetele" moleculare optime:

$$1/(1 + \bar{\Delta})$$

Refracțiile molare sînt determinate și tabelate în lucrările [813-815] iar pentru substituenții cu structură completă se calculează pe baza proprietății lor de constitutivitate, aditivitate:

$$R_M = \sum R_i + \sum I_i$$

în care R_i sînt refracțiile atomice, iar I_i incrementele introduse ca urmare a unor particularități structurale ale substituentului (duble legături, duble legături conjugate, ciclu benzenic).

În cazul în care în cadrul unei serii de reacție variația structurală a compușilor seriei este datorată atât schimbării naturii chimice cît și poziției substituenților se pot face corelări cu combinații liniare de coeficienți optimizați ale parametrilor sterici corespunzînd pozițiilor ocupabile [619], [810].

În corelările structură-activitate biologică la C.O.F. s-au folosit ca parametri sterici, de regulă, constantele E_S [609], [616], [816], [817], E_S^C [714] și R_M [790], [801], [816-817].

Simon și colaboratorii [707-718] au introdus un nou parametru steric: diferența sterică minimă - M.S.D. care a fost utilizat în analizele corelaționale întreprinse la serii variate de compuși.

Vîlceanu, Simon și A.Chiriac [708], [790-791], [816-817] au adaptat strategia determinării parametrului M.S.D. la serii de C.O.F. cu acțiune anticolinesterazică și au obținut rezultate semnificative în corelările activității biologice cu seturi de parametri care au inclus M.S.D.-ul.

2.2.2.A. Introducerea conceptului de standard steric și a parametrului diferență sterică minimă -M.S.D.

Configurația sterică a situsilor responsabili de activitate biologică se reprezintă pe baza binecunoscuței ipoteze a "cheii în lăcat", în corespondență cu configurația moleculei substratului

natural cu valoare maximă a activității biologice respective.

Simon și colaboratorii [707] , [711-712] , propun ca parametru steric diferența sterică minimă a moleculei biologice active în raport cu aceea a unei molecule standard. Diferența sterică minimă va fi suma volumelor fragmentelor moleculare ale compusului care în condițiile unei acoperiri spațiale maxime a standardului nu se suprapun peste părți ale acestuia. Pentru simplificarea calculelor se atribuie valoarea 1 pentru volumul grupelor $-XH_n$ ($n = 0, 1, 2, \dots$) neacoperite, dacă atomul X face parte din perioada a doua a sistemului periodic, 1,5 dacă X face parte din perioada a treia și 2 pentru celelalte perioade. Se neglijează diferențele sub $0,3 \text{ \AA}$ între lungimile de legătură și sub 20° între unghiurile de valență.

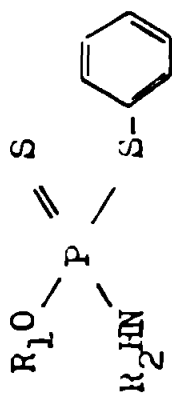
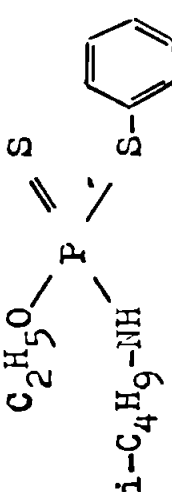
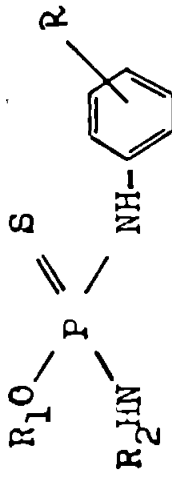
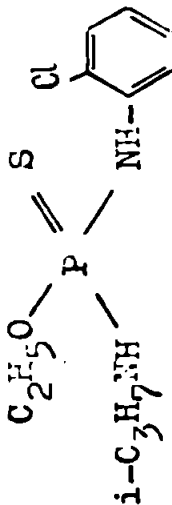
Utilizînd parametrul M.S.D. determinat după procedeul descris mai sus, Vîlceanu, Simon și A. Chiriac, au efectuat corelări structură-activitate anticolinesterazică la serii de pesticide organofosforice și au pus în evidență ecuații corelaționale în care aportul M.S.D.-ului este semnificativ.

În tabelul 23 sînt prezentate seriile de C.O.F. la care s-au făcut analize corelaționale, standardele față de care s-au calculat valorile M.S.D. în cadrul seriei, seturile de parametri folosite în corelări care includ M.S.D-ul și coeficientul de corelare r corespunzător.

Nr. crt.	Seriã de compuși	Standãrdul ales	Seturile de parametri corelați cu activitatea biologicã	Lit.
1.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}_1 \text{---} \text{P} \text{---} \text{R}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R}_2 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---N}^+\text{---CH}_2\text{---} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$(\bar{\nu}, \bar{\nu}^{\oplus}, \text{MSD, EC, CT})$ $N = 60; r = 0,880;$ $s = 0,905$	790
2.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \text{---} \text{P} \text{---} \text{S} \text{---} (\text{CH}_2)_n \text{---} \text{R} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{---CH}_2\text{---C---CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$*(R, R^2); r=0,920$ $:(R, \text{MSD}); r=0,852$ $N=24$	817
3.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \text{---} \text{P} \text{---} \text{S} \text{---} \text{CH}_2\text{---CH}_2\text{---S} \text{---} \text{R} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \text{---} \text{P} \text{---} \text{S} \text{---} \text{CH}_2\text{---CH}_2\text{---S} \text{---} \text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array}$	$*(R_S, \text{MSD}); r=0,999$ $:(\tau, \text{MSD}); r=0,932$ $N=6$	817
/ 4.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \text{---} \text{P} \text{---} \text{S} \text{---} \text{C}_4\text{H}_9 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{RO} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \text{---} \text{P} \text{---} \text{S} \text{---} \text{C}_7\text{H}_{15} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_4\text{H}_9\text{O} \end{array}$	$*(\tau, \text{MSD}); r=0,981$ $N=10$	817
5.	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \text{---} \text{P} \text{---} \text{S} \text{---} \text{CH}_2\text{---CH}_2\text{---S} \text{---} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{RO} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 \text{---} \text{P} \text{---} \text{S} \text{---} \text{CH}_2\text{---CH}_2\text{---S} \text{---} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_6\text{H}_9\text{O} \end{array}$	$*(\tau, \text{MSD}); r=0,960$ $N=13$	817

Tabelul 23 - continuare -

Nr. crt	Serie de compuși	Standardul ales	Seturile de parametrii corelației cu activitatea biologică	Lit.
6.	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{P} \\ \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-R;} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} + \text{SO}_4^-\text{CH}_3$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{P} \\ \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-C}_{10}\text{H}_{21}; \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} + \text{SO}_4^-\text{CH}_3$	$(r, \text{MSD}); r=0,985^*$ $(\tilde{r}, \text{MSD}); r=0,994^*$ $(\bar{r}, \text{MSD}); r=0,979^{**}$ N=6	817
7.	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{P} \\ \diagup \\ \text{RO} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-C}_2\text{H}_5; \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} + \text{SO}_4^-\text{CH}_3$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{P} \\ \diagup \\ \text{C}_8\text{H}_{17}\text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-C}_2\text{H}_5; \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} + \text{SO}_4^-\text{CH}_3$	$(R, \text{MSD}); r=0,945$ $(\bar{r}, \text{MSD}); r=0,975$ $(E_S, \text{MSD}); r=0,992$ N=8	817
8.	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \\ \text{P} \\ \diagup \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S-R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \\ \text{P} \\ \diagup \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S-C}_6\text{H}_{13} \end{array}$	$(\bar{r}, \text{MSD}); r=0,992^{**}$ $(E_S, \text{MSD}); r=0,989^{**}$ N=9	818
9.	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \\ \text{P} \\ \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \\ \text{P} \\ \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3 \end{array}$	$(R, \text{MSD}); r=0,983^{**}$ $(\bar{r}, \text{MSD}); r=0,896^*$ N=6	816
10.	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{P} \\ \diagup \\ (\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH-} \end{array} \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{P} \\ \diagup \\ (\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{N} \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH-} \end{array} \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{NO}_2 \end{array}$	$(\bar{r}, \text{MSD}); r=0,782$ N=10	819

Nr. crt.	Serie de compuși	Standardul ales	Seturile de parametrii corelați cu activitatea biologică	Lit.
11.			(E _S , MSD); r=0,843 N=12	819
12.			(π, R); r=0,910 (MSD, R); r=0,662	819

* - Butilcolinesteraze

** - Acetilcolinesteraze

2.2.2.b.- Strategia determinării structurii standard optime și a diferențelor sterice minime

Așa după cum s-a arătat deja în paragraful anterior, ca o măsură a potrivirii sterice a moleculelor M_i ale unei serii de reacții cu o cavitate a receptorului, Simon și colaboratorii [707], [711], [820], cu considerat suma volumelor neacoperite la o suprapunere maximă a moleculelor cu cavitatea sau cu o structură standard care reprezintă "cheia perfectă" a cavității - "lacăt". Ei presupun că afinitatea dintre M_i și receptor scade liniar cu creșterea volumelor neacoperite.

Modalitatea de calcul a M.S.D.-ului a fost prezentată anterior. Ea operează cu reguli simple dar cere alegerea unui standard optim ceea ce implică de fapt, tocmai găsirea acelei configurații care redă cel mai fidel forma situsului receptor. În principiu, forma cavității receptorului va corespunde moleculei cu activitatea biologică maximă, dar trebuie acceptat că seria de compuși cunoscuți (cu activitățile determinate experimental) nu o include în mod obligatoriu pe aceasta, așa încât tehnica de calcul a parametrului M.S.D. trebuie să plece de la găsirea formei standardului optim, S_{opt} .

Acest S_{opt} poate fi determinat pe baza a N molecule din serie de compuși M_i ($i=1,2,\dots,N$) cu activitatea biologică cunoscută și trebuie să conducă la cea mai bună corelare a lui A_i^{exp} cu M.S.D.-ul sau cu un set de parametri care-l conține.

Intr-o primă etapă "se construiește o hipermoleculă \mathcal{K} " prin suprapunerea celor N molecule M_i atomi peste atomi. Se obține o rețea din M noduri [712], [821] (noduri indexate- $j=1,2,\dots,M$) în cadrul căreia atomii implicați direct în reacție vor ocupa întotdeauna aceleași noduri j ca și atomii care se presupun a stabili legături intermoleculare puternice.

Moleculele M_i sînt caracterizate printr-o matrice $\|x_{ij}\|$ de dimensiune $N \times M$ în care:

$$x_{ij} = \begin{cases} 0 & \text{dacă nodul } j \text{ din } \mathcal{K} \text{ este neocupat în } M_i \\ 1 & \text{dacă nodul } j \text{ din } \mathcal{K} \text{ este ocupat în } M_i \text{ cu atomi din} \\ & \text{perioada II} \\ 1,5 & \text{dacă nodul } j \text{ din } \mathcal{K} \text{ este ocupat în } M_i \text{ cu atomi din} \\ & \text{perioada III} \\ 2 & \text{dacă nodul } j \text{ din } \mathcal{K} \text{ este ocupat în } M_i \text{ cu atomi din} \\ & \text{perioada III} \end{cases}$$

Standardul S (experimental = molecula cea mai activă, sau S optimal ("hibridul" = rezultat din suprapunerea celor N-molecule) ca și regiunile spațiale relevante sau irelevante pentru cerințele sterice și caracterizarea prin doi parametri [711], [821]

δ_j și γ_j .

$$\gamma_j = \begin{cases} 1 & \text{nodul } j \text{ este conținut în standard} \\ 0 & \text{nodul } j \text{ nu este conținut în standard} \end{cases}$$

$$\delta_j = \begin{cases} 1 & \text{nodul } j \text{ este relevant din punct de vedere al} \\ & \text{cerințelor sterice} \\ 0 & \text{nodul } j \text{ nu este relevant din punct de vedere al} \\ & \text{cerințelor sterice} \end{cases}$$

(exterior cavității receptorului)

Cu ajutorul acestor parametri, M.S.D-ul poate fi exprimat prin relația:

$$\text{MSD}_i = \sum_{j=1}^M \delta_j |x_{ij} - \gamma_j| \quad (1)$$

Pe baza premizelor teoretice expuse mai sus, procedeul optimizării standardului se realizează în modul următor:

Începând de la N molecule caracterizate prin parametrul MSD_i , determinat în raport cu un standard ales inițial, S_0 , și prin parametrii γ_{ki} se obține sistemul de ecuații:

$$A_i^{\text{calc}} = d_0 + \sum_k d_k \cdot \gamma_k - \beta \cdot \text{MSD}_i, \quad i = 1, 2, \dots, N \quad (2)$$

Ecuațiile corelaționale ale sistemului se determină prin minimalizarea abaterii standard medii

$$Y = \sum_{i=1}^N (A_i^{\text{exp}} - A_i^{\text{calc}})^2 \quad (3)$$

în raport cu d_0 , d_k , și β . Cum Y este funcție de mărimile δ_j^0 și γ_j^0 care caracterizează standardul S_0 , standardul optim, S_{opt} , poate fi găsit prin minimalizarea lui Y în raport cu δ_j și γ_j [712], [820].

Dacă S_{opt} este caracterizat prin parametrii δ_j^S , γ_j^S , substituirea acestora prin oricare set (δ_t, γ_t) nu va micșora suplimentar pe Y.

Variabilele ΔY determinate într-un nod \underline{t} de înlocuirea (δ_t^s, γ_t^s) prin (δ_t, γ_t)

$$\Delta Y = Y(\delta_t, \gamma_t) - Y(\delta_t^o, \gamma_t^o) = 2 \cdot \beta \left[\sum_i^N v_{ti} \cdot (A_i^{\text{exp}} - A_i^{\text{calc}}) + \frac{\beta}{2} \sum_i^N v_{ti}^2 \right] \quad (4)$$

în care

$$v_{ti} = \delta_t \cdot x_{ij} - \gamma_t \mid - \delta_t^o \cdot \mid x_{it} - \delta_t^o - \\ - \frac{1}{N} \sum \left(\delta_t \cdot \mid x_{it} - \gamma_t \mid - \delta_t^o \cdot \mid x_{it} - \gamma_t^o \mid \right) \quad (5)$$

pot fi calculate pentru toate M nodurile atomice și pentru toate combinațiile δ_t, γ_t posibile $(1,1);(1,0);(0,0)$.

Se poate considera că prin efectuarea unei asemenea înlocuiri succesive a setului (δ_t^s, γ_t^s) prin (δ_t, γ_t) se modifică, prin intermediul valorii medii MSD, termenul \mathcal{L}_0 .

Dacă toate diferențele ΔY sînt nenegative, S_0 este chiar S_{opt} . În caz contrar cel mai bun standard se obține prin substituția $(\delta_t, \gamma_t) \rightarrow (\delta_t^o, \gamma_t^o)$ care corespunde diferenței negative cu valoare absolută maximă. Această procedură se repetă pînă cînd toate diferențele ΔY devin nenegative.

Există riscul ca procedînd în modul arătat, minimalizarea să conducă la obținerea unui standard care să corespundă unui minim local. Dacă însă se face o selecție judicioasă a standardului inițial S_0 prin raportarea formei acestuia la configurația celor mai active molecule se poate atinge minimul absolut și astfel determina standardul optim corespunzător.

Moleculele considerate inactive pot fi utilizate pentru cercetarea unei regiuni spațiale extinse \mathcal{X} , examinînd seturi (δ_j, γ_j) ce corespund nodurilor prezente sau absente în toate moleculele. Pentru nodurile "necercetate" în \mathcal{X} ,

$$(\delta, \gamma) = \begin{cases} (0,0) & \text{dacă se află în vecinătatea unui nod steric} \\ & \text{irelevant } (\delta_j = 0) \\ (1,0) & \text{dacă se află în vecinătatea unui nod de tip} \\ & (1,0) \end{cases}$$

Procedeuul descris pentru determinarea celui mai bun standard în vederea calculării valorilor MSD_i corespunzătoare moleculelor caracterizare din punct de vedere al activității biologice prin A_i^{exp} ridică problema semnificației statistice a celor 2.M parametrii (δ_j, γ_j). Ei pot depăși numărul de molecule, N . Pentru nodurile conținând doar câteva molecule semnificația statistică este desigur scăzută.

Cea mai bună testare a lui S_{opt} este utilizarea lui în corelări $A_i^{exp} = F(\tilde{\nu}_{ki}, MSD)$ pentru alte serii de compuși în interacție cu același receptor.

Procedeuul de optimizare a standardului propus de Simon și colaboratori, expus în acest paragraf, a fost utilizat în corelarea activității biologice cu seturi de parametrii structurale care conțin și parametrul MSD la 15 serii de compuși aparținând unor clase diferite de substanțe și implicând receptori diferiți. Rezultatele acestor corelări sînt prezentate sintetic de autori în lucrarea [711].

Plecînd de la constatarea că acest procedeu operează doar cu structurile a căror activitate biologică sînt cunoscute, ceea ce face ca molecula cea mai activă să constituie un punct de referință relativ în mulțimea configurațiilor sterice active ale seriei față de receptorul respectiv, A.Chiriac [713], [822] a propus o nouă strategie în determinarea standardului optim.

Cele N molecule M_i cu activitățile biologice A_i^{exp} sînt corelate cu setul optim de parametrii ($\tilde{\nu}_{ki}, MSD$) - MSD fiind calculat în raport cu configurația celui mai activ compus cu metoda Free-Wilson. Se determină astfel contribuțiile fiecărui substituent din fiecare fragment molecular. Cu ajutorul acestora, se poate stabili natura chimică și poziția substituentului pentru care se realizează activitatea biologică maximă:

$$A_{max}^{calc} \geq A_{max}^{exp}$$

Dacă structura careia îi corespunde A_{max}^{calc} nu aparține seriei celor N compuși, valorile MSD_i pentru moleculele M_i se recalculază în raport cu aceasta și se efectuează corelarea $A = F(\tilde{\nu}, MSD_i)$.

2.3. Corelări structură-activitate biologică la pesticide organofosforice din clasa derivaților acidului fosforic

Derivații acidului fosforic



În care gruparea OR_3 joacă rolul grupării acil din "formula Schrader", reprezintă o clasă de compuși cuprinzând multe pesticide utilizate pe scară largă (anexa 1). Acțiunea pesticidă a C.O.F. deci și a acestor compuși, așa cum s-a arătat în capitolul 1, se bazează pe activitatea anticolinesterazică care realizează fosforilarea enzimei. Regenerarea enzimei decurgând lent sau deloc, acumularea colinesterazei provoacă fenomene de intoxicație, atât la insecte cât și la vertebrate. Deși există un mare număr de lucrări și ipoteze privind mecanismul de acțiune al compușilor I relația structură-activitate biologică este încă departe de a fi clarificată [9], [47], [49-52], [56], [60].

Ne-am propus să stabilim importanța diferiților factori structurali în determinarea activității biologice a derivaților acidului fosforic prin corelarea toxicității acestora cu parametrii fizico-chimici care-i caracterizează structural [708], [801]. În acest scop a fost folosită metoda corelării multiple.

Se consideră "un corp molecular" invariant cu n poziții afectate de schimbări structurale (variația naturii și poziției substituenților) caracterizate prin parametrii structurali, \hat{v}_{ji} ; indicii j se referă la poziție ($j = 1, 2, \dots, m$) iar i desemnează substanța cu activitatea A_i^{exp} ($i = 1, 2, \dots, N$).

Activitatea, A_i^{exp} , se definește ca

$$A_i^{\text{exp}} = -\log \text{DL}_{50} \quad (1)$$

și din considerente de echilibru ea trebuie să fie proporțională cu entalpia liberă de interacțiune, G_i

$$G_i \left(\frac{\text{kcal}}{\text{mol}} \right) = -1,4 \cdot A_i^{\text{exp}} \quad (\text{la } 300^\circ\text{K}) \quad (2)$$

Forma generală a funcției $A_i^{\text{exp}} = f(\hat{v}_{ji})$, în cazul unei corelații liniare este

$$A_i^{\text{calc}} = \alpha + \sum_j \beta_j \cdot \sigma_{ji} \quad (3)$$

iar în cazul corelației de tip pătratic

$$A_i^{\text{calc}} = \alpha + \sum_j \beta_j \cdot \sigma_{ji} + \sum_j \gamma_j \cdot \sigma_{ji}^2 \quad (4)$$

Coeficientul α reprezintă cea mai bună valoare A_i^{calc} pentru substanța cu valori "standard" ale constantelor structurale ($\sigma_{ji} = 0$); coeficienții β_j arată sensibilitatea seriei de compuși în reacția cu receptorul la modificările structurale estimate prin parametrul σ_{ji} ; coeficienții γ_j se introduc pentru "optimizarea" constantelor structurale.

O corespondență cât mai bună între A_i^{exp} și A_i^{calc} se obține prin minimizarea sumei Y a abaterilor pătratice

$$Y = \sum_i^N (A_i^{\text{exp}} - A_i^{\text{calc}})^2 \quad (5)$$

în raport cu coeficienții α și β_j , respectiv α , β_j și γ_j :

$$\frac{\delta Y}{\delta \alpha} = 0; \quad \frac{\delta Y}{\delta \beta_j} = 0; \quad j = 1, 2, \dots, m \quad (6.a)$$

respectiv

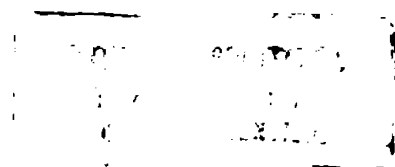
$$\frac{\delta Y}{\delta \alpha} = 0; \quad \frac{\delta Y}{\delta \beta_j} = 0; \quad \frac{\delta Y}{\delta \gamma_j} = 0; \quad j = 1, 2, \dots, m \quad (6.b)$$

Condițiile de minim (6.a) conduc la un sistem de $m + 1$ ecuații liniare în α și β_j

$$N \cdot \alpha + \sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^N \sigma_{ji} \cdot \beta_j = \sum_{i=1}^N A_i^{\text{exp}} \quad (7.a)$$

$$\sum_{i=1}^N \sigma_{li} \cdot \alpha + \sum_{j=1}^m \left(\sum_{i=1}^N \sigma_{ji} \cdot \sigma_{li} \right) \cdot \beta_j = \sum_{i=1}^N \sigma_{li} \cdot A_i^{\text{exp}} \quad (7.a)$$

În timp ce condițiile (6.b), corespunzând corelării pătratice dau un sistem de $2 \cdot m + 1$ ecuații:



$$N \cdot \alpha + \sum_{j=1}^m \left(\sum_{i=1}^N \sigma_{ji} \right) \cdot \beta_j + \sum_{j=1}^m \left(\sum_{i=1}^N \sigma_{ji}^2 \right) \cdot \gamma_j = \sum_{i=1}^N A_i^{\text{exp}}$$

$$\left. \begin{aligned} \sum_{i=1}^N \tilde{\sigma}_{li} \cdot \alpha + \sum_{j=1}^m \left(\sum_{i=1}^N \sigma_{ji} \cdot \tilde{\sigma}_{li} \right) \cdot \beta_j + \sum_{j=1}^m \left(\sum_{i=1}^N \sigma_{ji}^2 \cdot \tilde{\sigma}_{li} \right) \cdot \gamma_j = \\ = \sum_{i=1}^N \tilde{\sigma}_{li} \cdot A_i^{\text{exp}} \end{aligned} \right\}$$

$$\left. \begin{aligned} \sum_{i=1}^N \sigma_{pi}^2 \cdot \alpha + \sum_{j=1}^m \left(\sum_{i=1}^N \sigma_{ji} \cdot \sigma_{pi}^2 \right) \cdot \beta_j + \sum_{j=1}^m \left(\sum_{i=1}^N \sigma_{ji}^2 \cdot \sigma_{pi}^2 \right) \cdot \gamma_j = \\ = \sum_{i=1}^N \sigma_{pi}^2 \cdot A_i^{\text{exp}} \end{aligned} \right\}$$

(7.b)

$$l = 1, 2, \dots, m ; p = 1, 2, \dots, m$$

Rezolvarea acestor sisteme de ecuații furnizează coeficienții de regresie a ecuațiilor (3) și respectiv (4).

Ca măsură a concordanței între A_i^{exp} și valorile A_i^{calc} furnizate de către ecuațiile de regresie, coeficientul de corelație liniară, r se calculează cu relația:

$$r = \frac{\sum_i (A_{\text{calc}}^i - \bar{A}_{\text{calc}}) (A_{\text{exp}}^i - \bar{A}_{\text{exp}})}{\sqrt{\sum_i (A_{\text{calc}}^i - \bar{A}_{\text{calc}})^2 \sum_i (A_{\text{exp}}^i - \bar{A}_{\text{exp}})^2}} \quad (8)$$

unde \bar{A}_{calc} și \bar{A}_{exp} sînt mediile aritmetice ale valorilor A_{calc}^i și A_{exp}^i .

$\tilde{\sigma}_i$ pentru care A_{calc}^i prezintă un extrem rezultă prin derivare

$$\frac{\partial A_{\text{calc}}}{\partial \tilde{\sigma}} = \beta_j + 2 \cdot \gamma_j \cdot \tilde{\sigma}_j = 0 ; \quad \tilde{\sigma}_j^0 = - \frac{\beta_j}{2 \cdot \gamma_j} \quad (9)$$

După semnul derivatei a doua

$$\frac{\delta A^{\text{calc}}}{\delta \rho_j^2} = 2 \cdot \gamma_j \quad (10)$$

ne putem da seama dacă valoarea A^{calc} pentru ρ_j reprezintă un minim sau un maxim. Cu aceste valori extreme, valoarea calculată ca extremă $A_{\text{extr}}^{\text{calc}}$ va fi:

$$A_{\text{extr}} = \alpha + \frac{1}{4} \sum_j \frac{\beta_j}{\gamma_j} \quad (11)$$

Pentru corelare s-au ales următorii parametri:

- ρ_{1i} - suma constantelor ρ^ϕ - Hammett pentru substituenții R_1+R_2
- ρ_{2i} - numărul de stomi - Y; cu perechi de electroni neparticipanți, acceptori de protoni în punți de hidrogen, din substituenții R_1+R_2
- ρ_{3i} - suma refracțiilor molare (cc) pentru substituenții R_1+R_2 , ca măsură a caracterului hidrofob al acestora
- ρ_{4i} - constanta ρ^ϕ - Hammett pentru substituentul R_3
- ρ_{5i} - numărul de atomi, acceptori de protoni în punți de hidrogen, din substituentul R_3
- ρ_{6i} - numărul de cicluri benzenice (caracterul aromatic) din substituentul R_3
- ρ_{7i} - numărul grupelor nitro și nitril (și jumătate din numărul atomilor de clor) substituiți în grupe aromatice din substituentul R_3 ca măsură a caracterului acceptor de electroni în complecși cu transfer de sarcină
- ρ_{8i} - refracția molară (caracterul hidrofob) al substituentului R_3

Toate constantele ρ care estimează efectele electronice ale substituenților au fost date în scara ρ^ϕ . Pentru substituenții R_1 , R_2 și o parte din R_3 valorile ρ^ϕ folosite sînt cele comunicate de către Kabachnik și Mostrynkora [670-671]. Pentru substituenții la care au fost cunoscute valorile ρ^* sau ρ trecerea în scara ρ^ϕ s-a făcut folosind relațiile [670]

$$\rho^\phi = -0,965 + 1,97 \rho \quad (12)$$

respectiv

$$\rho^\phi = -0,415 + 0,634 \rho \quad (13)$$

O discuție a valorilor ρ^ϕ calculată după [670-671]; [808], [672-674; 823-824] este dată în notele explicative din lucrarea [708].

Tabelul 24 - continuare -

Com- pusul nr.	R ₁	R ₂	R ₃
30	-OCH ₃	-OCH ₃	-P(O)(OC ₂ H ₅) ₂
31	-OCH ₃	-OCH ₃	-P(O)(OC ₃ H ₇ -i) ₂
32	i-C ₃ H ₇ O-	i-C ₃ H ₇ O-	-P(O)(OC ₃ H ₇ -i) ₂
33	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	2,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -
34	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	3,4,6-Cl ₃ C ₆ H ₂ -
35	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
36	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	3,4-O ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₃ -
37	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	2,3-Cl ₂ C ₆ H ₃ -
38	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OC ₂ H ₅	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
39	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-O(CH ₂) ₂ CH ₃	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
40	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH(CH ₃) ₂	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
41	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OC ₄ H ₉	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
42	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OC ₆ H ₁₃	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
43	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OC ₂ H ₅	3,4-O ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₃ -
44	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₂ CH ₂ CH ₃	3,4-O ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₃ -
45	-OCH ₃	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅
46	-OCH ₃	-CH ₃	2-ClC ₂ H ₄ CH ₂ -
47	-OCH ₃	-CH ₃	3-O ₂ N-C ₆ H ₄ CH ₂ -
48	-OCH ₃	-CCH ₃	-COC ₆ H ₄ NO ₂
49	-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₂ COC ₆ H ₅

Calculul coeficienților de regresie, coeficientul de corelație multiplă și ceilalți parametri și corelării au fost obținuți cu ajutorul unui program pentru corelații multiple elaborat în FORTRAN de către dr.R.Popa, pe un calculator IRIS de la Centrul teritorial de calcul Timișoara.

S-au efectuat trei serii de corelații atât de tip liniar cât și de tip patratice:

- A_i^{exp} corespunde unei exprimări a lui DL_{50} în mg/kcorp
- A_i^{exp} corespunde unei exprimări a lui DL_{50} în mol/kcorp
- A_i^{exp} pentru o exprimare a lui DL_{50} în mol/kcorp se

corelează cu parametrii r_{ji} însumați pentru toți cei trei substituenți $\sum r_{ji}$, corespunzător efectelor estimate:

$$r_{1i} + r_{4i}, r_{2i} + r_{5i}, r_{3i} + r_{8i}, r_{5i} + r_{6i}$$

Tabelul 25.

Com- pus nr.	exp $= -$ $\log \frac{DL_{50}}{M}$	$R_1 + R_2$			R_3				
		r_1	r_2	r_3	r_4	r_5	r_6	r_7	r_8
1	1.56845	-0.24	2	14.58	0.574	1	0	0	25.36
2	1.58574	-0.42	3	23.88	3.566	1	0	0	34.88
3	1.18523	-0.42	3	23.88	2.884	1	0	0	40.37
4	1.65717	-0.24	2	14.58	3.566	1	0	0	34.88
5	0.99183	-0.24	2	14.58	1.980	1	1	0	54.27
6	0.41365	-0.24	2	14.58	2.160	1	0	0	45.41
7	1.40892	-0.24	2	14.58	1.490	1	1	0	49.72
8	-0.59176	-0.42	2	23.88	0.808	0	2	0	34.32
9	-0.51713	-0.24	2	14.58	0.335	0	1	0,5	58.58
10	-0.01565	-0.24	2	14.58	1.245	0	1	0,5	39.19
11	0.32325	-0.42	2	23.88	1.245	0	1	0,5	39.19
12	0.93909	-0.24	2	14.58	1.555	2	2	0	65.83
13	1.37429	-0.42	2	23.88	1.555	2	2	0	65.83
14	1.30052	-0.24	2	14.58	3.270	2	2	0,5	70,70
15	0.57766	-0.24	2	14.58	0.729	1	0	0,5	23.76
16	0.99271	-0.42	2	23.88	0.729	1	0	0,5	23.76
17	0.48448	-0.42	2	23.88	1.429	1	1	0	49.72
18	1.55990	-0.24	2	14.58	4.068	1	1	0	54.59
19	1.35521	-0.42	2	23.88	4.068	1	1	0	54.59
20	-0.17559	-0.24	2	14.58	3.085	1	1	0	43.23
21	0.12742	-0.42	2	23.88	3.085	1	1	0	43.23
22	0.45483	-0.42	2	23.88	1.980	1	1	0	54.27
23	3.19829	-0.24	2	14.58	0.842	0	0	1	19.80
24	3.19210	-0.42	2	23.88	0.842	0	0	1	19.80
25	2.91098	-0.64	2	33.22	0.842	0	0	1	19,80
26	2.55598	-0.60	2	33.22	0.842	0	0	1	19.80
27	2.71340	-0.62	2	42.44	0.842	0	0	1	19.80
28	2.13882	-0.24	2	14.58	-0.079	3	0	0	20.30
29	2.75450	-0.42	2	23.88	-0.085	3	0	0	29.60
30	2.28950	-0.24	2	14.58	-0.085	3	0	0	29.60
31	2.28460	-0.24	2	14.58	-0.098	3	0	0	38.95
32	1.39458	-0.60	2	33.22	-0.098	3	0	0	38.95
33	-0.19988	-0.09	2	24.34	-0.730	0	1	1	35.10
34	0.22431	-0.09	2	23.34	0.125	0	1	1.5	39.97
35	1.99346	-0.09	2	24.34	0.130	2	1	1	30.97
36	1.61566	-0.09	2	24.34	0.090	2	1	0	35.63

Tabelul 25 - continuare -

Com- pus nr.	$A_i^{exp} = -$ $\log \frac{DL_{50}}{L_i}$	$K_1 + K_2$			K_3				
		r_1	r_2	r_3	r_4	r_5	r_6	r_7	r_8
37	0.02737	-0.09	2	24.34	0.054	0	1	1	35.10
38	1.08856	-0.18	2	28.79	0.130	2	1	1	30.97
39	1.33377	-0.29	2	33.47	0.130	2	1	1	30.97
40	1.20887	-0.27	2	33.47	0.130	2	1	1	30.97
41	1.15037	-0.38	2	30.07	0.130	2	1	1	30.97
42	0.80782	-0.35	2	47.34	0.130	2	1	1	30.97
43	1.85667	-0.18	2	28.79	0.090	2	1	1	35.62
44	0.92617	-0.29	2	33.47	0.090	2	1	1	35.62
45	0.30103	-1.09	1	12.94	-0.190	0	1	0	30.01
46	0.06914	-1.09	1	12.94	-0.115	0	1	0	34.88
47	-0.40593	-1.09	1	12.94	0.040	2	1	0.5	35.61
48	-0.10177	-0.24	2	14.58	-0.220	3	1	2	35.57
49	-0.06741	-0.24	2	14.58	-0.208	1	1	0.5	34.61

Pentru prima serie de corelații (DL_{50} în mg/kg), corelația liniară a dat următoarea ecuație optimă pentru calculul activității biologice:

$$A_i^{calc} = -4,723 - 1,536 \cdot r_1 + 1,939 \cdot r_2 - 0,007 \cdot r_3 + 0,154 \cdot r_4 + 0,278 \cdot r_5 - 0,324 \cdot r_6 + 0,107 \cdot r_7 - 0,029 \cdot r_8 \quad (14.a)$$

coeficientul de corelație liniară fiind $r = 0,656$. Corelația patrată pentru această serie duce la ecuația de regresie:

$$A_i^{calc} = 26,350 + 3,078 \cdot r_1 - 33,024 \cdot r_2 + 0,109 \cdot r_3 + 0,225 \cdot r_4 - 0,291 \cdot r_5 + 0,032 \cdot r_6 + 0,075 \cdot r_7 - 0,321 \cdot r_8 + 2,084 \cdot (r_1)^2 + 10,919 \cdot (r_2)^2 - 0,0014 \cdot (r_3)^2 - 0,036 \cdot (r_4)^2 + 0,213 \cdot (r_5)^2 - 0,701 \cdot (r_6)^2 - 0,228 \cdot (r_7)^2 + 0,0039 \cdot (r_8)^2 \quad (15.a)$$

careia îi corespunde un coeficient de corelație $r = 0,852$.

Pentru seria a II-a de corelație (DL_{50} în mmol/kg) cele două ecuații sînt:

$$A_i^{calc} = -3,881 + 1,405 \cdot r_1 + 1,901 \cdot r_2 - 0,0072 \cdot r_3 + 0,066 \cdot r_4 + 0,239 \cdot r_5 - 0,458 \cdot r_6 + 0,036 \cdot r_7 - 0,027 \cdot r_8$$

$$r = 0,666 \quad (14.b)$$

și respectiv

$$A_i^{calc} = 4,999 + 3,673 \cdot \rho_1 - 0,104 \cdot \rho_2 + 0,151 \cdot \rho_3 + 0,579 \cdot \rho_4 -$$

$$- 0,351 \cdot \rho_5 + 0,453 \cdot \rho_6 - 0,407 \cdot \rho_7 - 0,333 \cdot \rho_8 +$$

$$+ 2,664 \cdot (\rho_1)^2 + 0,017 \cdot (\rho_2)^2 - 0,0022 \cdot (\rho_3)^2 - 0,094 \cdot (\rho_4)^2 +$$

$$+ 0,259 \cdot (\rho_5)^2 - 0,620 \cdot (\rho_6)^2 - 0,0030 \cdot (\rho_7)^2 + 0,0036 \cdot (\rho_8)^2$$

$$r = 0,860 \quad (15.b)$$

Pentru seria a III-a de corelații (DL₅₀ în mmol/kg și doar cinci parametri structurali):

$$A_i^{calc} = -0,813 + 0,054 \cdot \rho_1 + 0,212 \cdot \rho_2 - 0,913 \cdot \rho_3 + 0,234 \cdot \rho_4 -$$

$$- 0,0023 \cdot \rho_5$$

$$r = 0,615 \quad (14.c)$$

și respectiv

$$A_i^{calc} = 3,500 + 0,413 \cdot \rho_1 - 1,515 \cdot \rho_2 - 1,349 \cdot \rho_3 + 1,964 \cdot \rho_4 -$$

$$- 0,080 \cdot \rho_5 - 0,062 \cdot (\rho_1)^2 + 0,280 \cdot (\rho_2)^2 + 0,318 \cdot (\rho_3)^2 -$$

$$- 1,123 \cdot (\rho_4)^2 + 0,00062 \cdot (\rho_5)^2$$

$$r = 0,740 \quad (15.c)$$

În tabelul 26 sînt redate valorile de extrem ρ_j^0 și se specifică caracterul lor de maximizare sau minimalizare a toxicității

Tabelul 26.

Semnificația parametrului	Seria I	Seria II	Seria III
ρ_1^0 : Constantă Kabachnik pentru $R_1 + R_2$	-0,368(min)	-0,687(min)	-
ρ_2^0 : Număr de atomi - Y: în $R_1 + R_2$	+0,756(min)	+5,40(min)	-
ρ_3^0 : Hidrofobicitate (refracție molară, cc) în $R_1 + R_2$	+19,5(max)	+34,4(max)	-
ρ_4^0 : Constantă Kabachnik pentru R_3 ; $(\rho_1^0)^{R_3}$	+1,56(max)	+3,08(max)	+3,32(max)

Tabelul 26-continuare -

Semnificația parametru- lui	Seria I	Seria II	Seria III
\hat{r}_5^0 : număr de atomi - Y: în R_3 ; (\hat{r}_2^0) [*]	+0,34(min)	+0,38(max)	+2,70(min)
\hat{r}_6^0 : număr de cicluri benzenice în R_3 ; (\hat{r}_3^0) [*]	+0,114(max)	+0,365(max)	+1,15(min)
\hat{r}_7^0 : număr de grupe NO ₂ în R_3 ; (\hat{r}_4^0) [*]	+0,082(min)	-81,4(max)	+0,87(max)
\hat{r}_8^0 : hidrofobicitate (refracție mola- ră, cc) în R_3 ; (\hat{r}_5^0) [*]	+20,6(min)	+46,4(min)	+64,5(min)

* se referă la seria III, constantele corespunzând însumării pentru $R_1 + R_2 + R_3$

Pentru seriile II și III ($A_i^{\text{exp}} = -\log DL_{50}$; DL_{50} în mol/kcorp) s-a făcut un calcul al variației afinității compușilor față de situsul receptor. Variația afinității în raport cu parametrul \hat{r}_j este legată, în cazul corelației liniare, de valoarea medie a derivatei

$$\frac{\partial A_{\text{calc}}}{\partial \hat{r}_j} = \beta_j$$

Rezultatele calculelor lui

$$\Delta G_j \cong -1,4 \cdot \left(\frac{\partial A}{\partial \hat{r}_j} \right) = -1,4 \cdot \beta_j \text{ kcal/mol/unitate } \hat{r}_j \quad (16)$$

sînt date în tabelul 27.

Examinarea corelațiilor întreprinse conduce la o serie de constatări importante. Dat fiind faptul că la cei 49 de compuși și serici rutățile moleculare nu diferă mult, coeficienții de corelație r nu diferă mult prin trecerea de la seria I la seria II; în schimb o bună parte din coeficienții β_j și δ_j și corelații pătratice diferă mult la cele două serii menționate.

Deși numărul de parametri structurali, în cazul seriei III, scade de la 8 la 5, coeficientul de regresie r nu scade prea mult.

Tabloul 17.

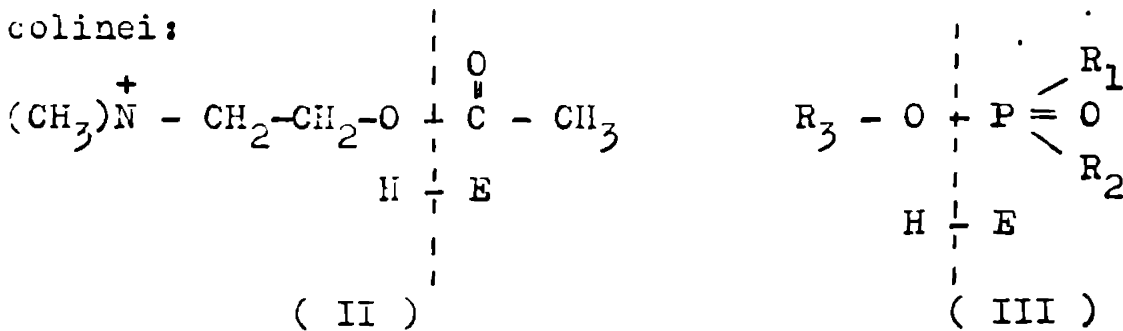
Parametrul	Seria II	Seria III	Unități pentru G_j
ΔG_1	+2,0	-	kcal/mol/ unitate \checkmark în $R_1 + R_2$
ΔG_2	-2,7	-	kcal/mol/atom - Y: în $R_1 + R_2$
ΔG_3	+0,01	-	kcal/mol/increment de hidrofobicitate în $R_1 + R_2$
ΔG_4 (ΔG_1)	-0,093	-0,075	kcal/unitate \checkmark în R_3
ΔG_5 (ΔG_2)	-0,33	-0,30	kcal/mol/atom - Y: în R_3
ΔG_6 (ΔG_3)	+0,64	+1,28	kcal/mol/nucleu benzenic în R_3
ΔG_7 (ΔG_4)	-0,05	-0,33	kcal/mol/ grupă NO_2 în R_3
ΔG_8 (ΔG_5)	+0,04	+0,003	kcal/mol/increment de hidrofobicitate în R_3

În ceea ce privește valorile \checkmark_i optimele, un caracter slab donator de electroni ai grupelor $R_1 + R_2$, $\checkmark_1^0 = \checkmark^{\phi} \cong 0,7$ (de exemplu $R_1 + R_2 = OC_3H_7$) minimizează toxicitatea, în timp ce un caracter atrăgător de electroni ai grupei R_3 , $\checkmark_4^0 = \checkmark^{\phi} = +3$ (de exemplu $C(CH_3) = C(C_6H_5)CN$) o maximizează. Prezența unor cicluri benzenice în R_3 trebuie să micșoreze destul de mult toxicitatea:

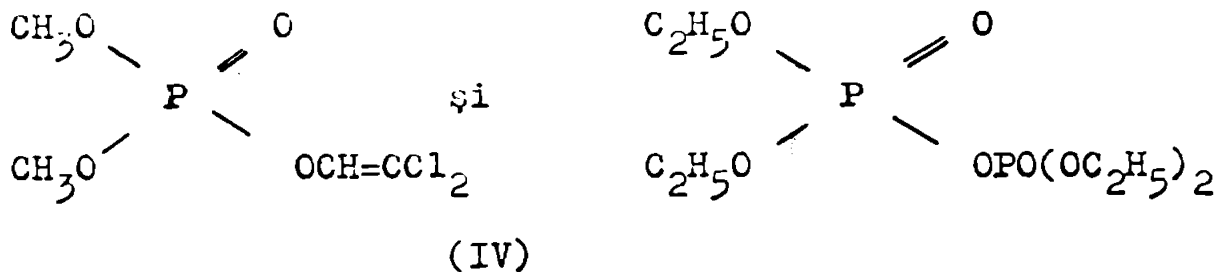
$\Delta G_4 = +1$ kcal/mol (scădere puternică a afinității) toxicitate fie maximă pentru $\checkmark_6^0 = 0$, fie minimă pentru $\checkmark_6^0 = 2$ cicluri. Hidrofobicitatea conform corelației liniare ar trebui să influențeze puțin toxicitatea (ΔG_3 , $\Delta G_6 \cong 0$); conform corelației patratice, toxicitatea ar fi maximalizată pentru o refracție molară a grupelor $R_1 + R_2$, $\checkmark_3^0 = 25$ cc ($R_1, R_2 = OCH_3$) și este minimalizată pentru $\checkmark_8^0 = 30$ cc în cazul grupei R_3 . În ceea ce privește numărul atomilor - Y: , cu perechi de electroni neparticipanți, conform corelației liniare, prezența lor, în special în $R_1 + R_2$, trebuie să favorizeze toxicitatea (ΔG_2 , $\Delta G_5 < 0$). La fel în ceea ce privește caracterul acceptor de electroni al lui R_3 în complecși cu transfer de sarcină, cele trei serii de corelații patratice dau valori complet deosebite; corelația liniară ar indica o slabă creștere a toxicității ($\Delta G_7 < 0$) la substituții de grupări atrăgătoare de electroni în R_3 . Conform valorilor absolute ale lui ΔG_j ,

cele mai mari efecte asupra toxicității ar trebui să le aibă variațiile în σ^p și în numărul de atomi - Y: în $R_1 + R_2$ și în numărul de cicluri aromatice în R_3 .

În ceea ce privește mecanismul de acțiune al acestor compuși asupra acetilcolinesterazei, comparând formula lor cu cea a acetilcolinei:

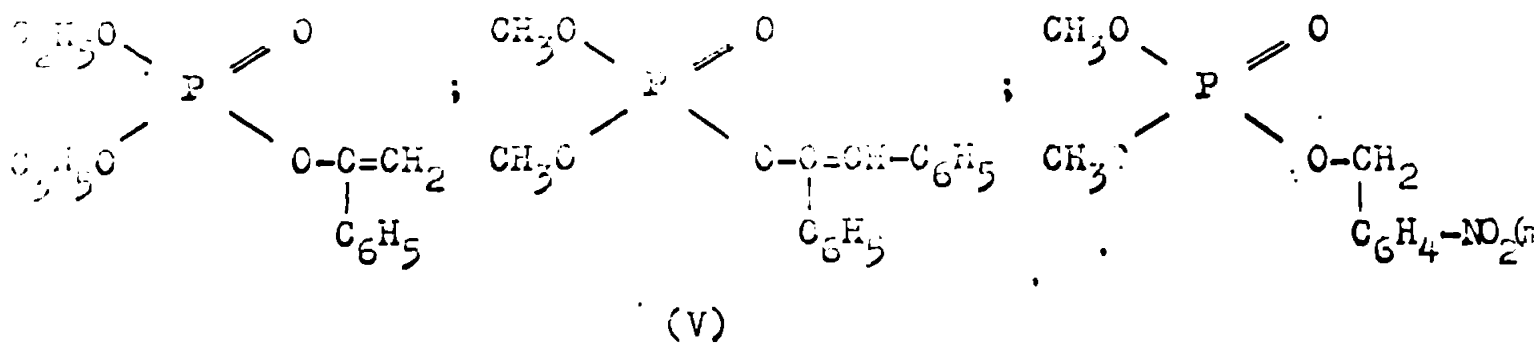


restul $R_3 - O -$ ar trebui să joace rolul restului colinic. Faptul că derivații vinilici cu grupa R_3 dau de regulă naștere la compuși foarte toxici s-ar putea explica printr-o asemănare a dimensiunilor grupei $-\text{CH}=\text{CH}-$ cu grupa $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ din restul colinic. Prezența dublei legături din restul vinilic ar fi necesară pentru buna transmitere a efectului atrăgător de electroni a grupelor atașate. Prezența în R_3 a unui ciclu benzenoid, rigid și cu volumul relativ mare, ar putea îngreuna steric atașarea compusului organofosforic la centrul activ al enzimei. Pentru comparație, cei mai toxici compuși sînt:



Pentru toți compușii analizați σ^p ale grupelor $R_1 + R_2$ au valori negative (-0,24 pentru $R=\text{CH}_3$, -0,42 pentru $R=\text{C}_2\text{H}_5$) ceea ce trebuie să favorizeze toxicitatea. Pentru R_3 , σ^p este de +0,842, respectiv -0,005, față de valoarea optimă $\sigma_4^0 \approx +2,0$; $\Delta G_4 = -0,1$ kcal/mol este însă mic. Acești compuși nu conțin nuclee benzenice; refracțiile molare ale grupelor CH_3O și $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ (15 cc și respectiv 24 cc) sînt destul de apropiate de optimul $\sigma_3^0 = 25$ cc, iar cele ale grupelor $-\text{CH}=\text{CCl}_2$ și $-\text{PO}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$ (20 cc și respectiv 30 cc) destul de aproape de valoarea minimizantă $\sigma_8^0 = 30$ cc; și aici însă $\Delta G_8 \approx 0$. Compușii au 2 atomi tip -Y: în $R_1 + R_2$.

Cei mai puțin toxici compuși sînt:



toți se caracterizează prin prezența unuia sau a câtorva cicluri benzenice în R_3 și valori (R_3) de +0,808; +0,335; +0,04, mici față de valoarea optimală $R_3^0 = +2$

Este evident că în determinarea toxicității intervin mai mulți factori, iar metoda de corelație folosită are desigur scăderile ei, cea mai importantă fiind o neglijașe aproape totală a factorilor sterici. Imaginea globală a concordanței între valorile calculate și cele observate pentru toxicitate este dată în figura (27), valorile calculate A_{calc} fiind cele obținute pentru seria II-a, conform ecuației de regresie patratică pentru seria a II-a, la care s-a obținut cea mai mare valoare pentru coeficientul r ($r=0,860$).

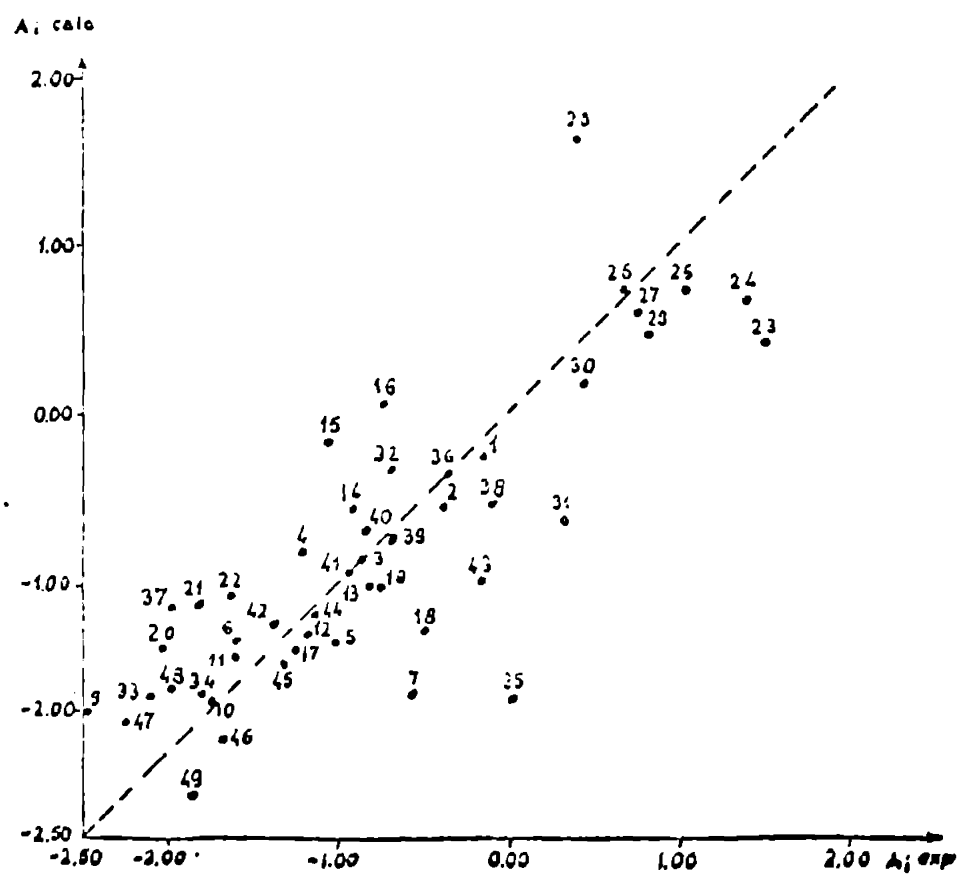
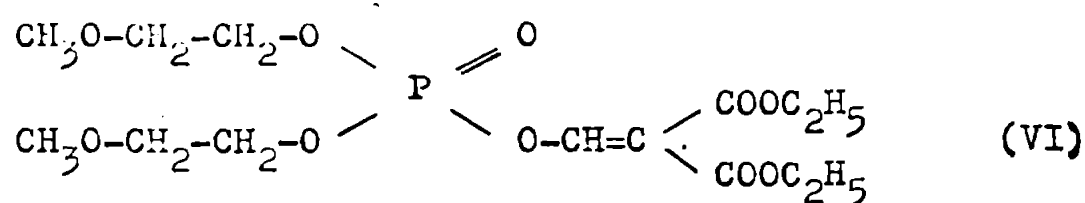


Fig.27.

Compusul cel mai toxic, conform ecuațiilor de corelație, nu pare să se fi sintetizat. Conform prezicerilor ecuației de corelație liniară ale seriei II, caracteristicile sale ar fi următoarele: cât mai mulți atomi tip -Y: în $R_1 + R_2$, un atom donor de electroni (ρ^+ -Hammett cât mai negativ) pentru aceste grupe; lipsă de cicluri aromatice în R_3 și cât mai mulți atomi -Y: în aceste grupe. Corelația patrată ar indica pentru compusul cel mai toxic, un număr sub 5 atomi -Y: în $R_2 + R_2$, o refracție molară de 34 cc pentru aceste grupe și un ρ^+ -Hammett de aproximativ +5 pentru R_3 . Un compus care ar satisface aproximativ aceste cerințe ar fi:



Corelările structură-activitate biologică la cei 49 de compuși derivați ai acidului fosforic cu o structură a substituenților variiind în limite destul de largi au furnizat anumite indicații privind compușii ipotetici cu activitate maximă.

Fără îndoială coeficienții de corelare obținuți sînt modești dar trebuie ținut cont că valoarea lor intrinsecă este alta decît în corelările structură-activitate chimică. Principala lacună a acestei prime corelări la C.O.F. pe care colectivul nostru a realizat-o a fost absența dintre parametrii structurați a unuia care să evalueze cerințele sterice impuse de recetor moleculelor biologic-actieve considerate.

De asemenea relațiile de corelare obținute conțin o serie de parametrii structurați care au variat foarte puțin în serie considerată, motiv pentru coeficienții β_j corespunzători au o fiabilitate scăzută.

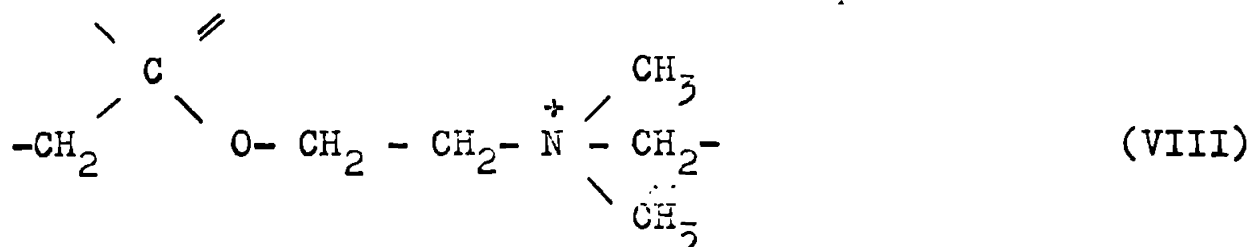
Avînd în vedere insuficiențele menționate pentru corelările întreprinse la seria celor 49 de fosfați cu acțiune pesticidă, metoda corelării multiple structură-activitate pesticidă a fost aplicată unei serii extinse de 71 C.O.F. de tipul:



dar între parametrii de corelare a fost introdus unul pentru evaluarea cerințelor sterice impuse compuşilor de reacția lor cu sițuși activi ai colinesterazelor [792].

Cei 9 parametrii utilizați în noua corelare sînt următorii:

σ_1 - suma constantelor σ^+ pentru $R_1 + R_2$, σ_2 - numărul de atomi Y; acceptori de protoni în punți de hidrogen tari) pentru $R_1 + R_2$, σ_3 - indicele de hidrofobicitate a grupelor $R_1 + R_2$ (exprimat prin suma refracțiilor molare), σ_4 - constanta σ^+ pentru R_3 , σ_5 - numărul de atomi Y; acceptori de protoni în punți de hidrogen, din substituentul R_3 , σ_6 - numărul ciclurilor benzenice din substituentul R_3 , σ_7 - numărul grupelor nitro și nitril substituite în grupe aromatice din substituentul R_3 ca măsură a caracterului acceptor de electroni în complecși cu transfer de sarcină, σ_8 - indicele de hidrofobicitate (refracție molară) al substituentului R_3 , σ_9 - diferența sterică minimă, MSD-ul, care măsoară numărul minim de atomi ai compusului care nu se pot suprapune peste structura standard, analogă acetilcolinei (VIII).



În tabelul 28 se dă lista celor 71 de compuși organofosforici luați în studiu, iar în tabelul 29 valorile parametrilor structurali și activitățile experimentale, luate în corelație.

Tabelul 28.

Compu- sul	R_1	R_2	R_3
1	-OCH ₃	-CCH ₃	-C(CH ₃)=CHCOOCH ₃
2	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(CH ₃)=CClCOOC ₂ H ₅
3	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-(Cl)C(CH ₃)CHClCOOC ₂ H ₅
4	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(CH ₃)CHClCOOC ₂ H ₅
5	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(CH ₃)=C(C ₆ H ₅)COOC ₂ H ₅
6	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(CH ₃)=CCOOC ₂ H ₅ CH ₂ COOC ₂ H ₅
7	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅)=CHCOOC ₂ H ₅
8	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(C ₆ H ₅)=CH ₂
9	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅)=CHC ₆ H ₅
10	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅)=CHCl
11	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(C ₆ H ₅)=CHCl

Tabelul 28 - continuare -

Compu- sul	R ₁	R ₂	R ₃
12	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅)=CHOC ₆ H ₄ NO ₂
13	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(C ₆ H ₅)=CHOC ₆ H ₄ NO ₂
14	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅)=CClOC ₆ H ₄ NO ₂
15	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(CH ₃)=CHCOCH ₃
16	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(CH ₃)=CHCOCH ₃
17	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(C ₆ H ₅)=CHCOCC ₂ H ₅
18	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅)=CClCOCC ₂ H ₅
19	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(C ₆ H ₅)=CClCOCC ₂ H ₅
20	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(CH ₃)=C(C ₆ H ₅)CN
21	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(CH ₃)=C(C ₆ H ₅)CN
22	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(CH ₃)=C(C ₆ H ₅)COCC ₂ H ₅
23	-OCH ₃	-OCH ₃	-CH=CCl ₂
24	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-CH=CCl ₂
25	-OC ₃ H ₇ -n	-OC ₃ H ₇ -n	-CH=CCl ₂
26	-OC ₃ H ₇ -i	-OC ₃ H ₇ -i	-CH=CCl ₂
27	-OC ₄ H ₉ -n	-OC ₄ H ₉ -n	-CH=CCl ₂
28	-OCH ₃	-OCH ₃	-P(O)(OCH ₃) ₂
29	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-P(O)(OC ₂ H ₅) ₂
30	-OCH ₃	-OCH ₃	-P(O)(OC ₂ H ₅) ₂
31	-OCH ₃	-OCH ₃	-P(O)(OC ₃ H ₇ -i) ₂
32	-OC ₃ H ₇ -i	-OC ₃ H ₇ -i	-P(O)(OC ₃ H ₇ -i) ₂
33	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	2,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -
34	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	3,4,6-Cl ₃ C ₆ H ₂ -
35	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
36	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	3,4-O ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₃ -
37	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₃	2,2-Cl ₂ C ₆ H ₃ -
38	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OC ₂ H ₅	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
39	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-O(CH ₂) ₂ CH	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -

Com- pusul nr.	Seria I	Seria II	Seria III
40	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH(CH ₃) ₂	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
41	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OC ₄ H ₉	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
42	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OC ₆ H ₁₃	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
43	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OC ₂ H ₅	3,4-O ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₃ -
44	-OCH ₂ CH ₂ Cl	-OCH ₂ CH ₂ CH ₃	3,4-O ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₃ -
45	-OCH ₃	-CH ₃	-CH ₂ C ₆ H ₅
46	-OCH ₃	-CH ₃	2-ClC ₆ H ₄ CH ₂ -
47	-OCH ₃	-CH ₃	3-O ₂ N-C ₆ H ₄ CH ₂ -
48	-OCH ₃	-OCH ₃	-COC ₆ H ₄ NO ₂
49	-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₂ COC ₆ H ₅
50	-OCH ₃	-OCH ₃	-CH ₂ -C(Cl)=CH ₂
51	-OC ₃ H ₇ -n	-OC ₃ H ₇ -n	-CH ₂ -C(Cl)=CH ₂
52	-OC ₄ H ₉ -n	-OC ₄ H ₉ -n	-CH ₂ -C(Cl)=CH ₂
53	-OC ₄ H ₉ -i	-OC ₄ H ₉ -i	-CH ₂ -C(Cl)=CH ₂
54	-OC ₅ H ₁₁ -n	-OC ₅ H ₁₁ -n	-CH ₂ -C(Cl)=CH ₂
55	-OC ₆ H ₁₃ -n	-OC ₆ H ₁₃ -n	-CH ₂ -C(Cl)=CH ₂
56	-OC ₇ H ₁₅ -n	-OC ₇ H ₁₅ -n	-CH ₂ -C(Cl)=CH ₂
57	-OC ₈ H ₁₇ -n	-OC ₈ H ₁₇ -n	-CH ₂ -C(Cl)=CH ₂
58	-OC ₄ H ₉ -i	-OC ₄ H ₉ -i	-CH ₂ -CH=CH ₂
59	-OC ₄ H ₉ -i	-OC ₄ H ₉ -i	-CH ₂ C=CH
60	-SCH ₃	-OC ₂ H ₅	2,4-Cl ₂ C ₆ H ₃ -
61	-SCH ₃	-OCH ₃	p-O ₂ N-C ₆ H ₄ -
62	-SCH ₃	-OCH ₃	3,4-O ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₃ -
63	-SCH ₃	-OCH ₃	-P(O)(OC ₂ H ₅) ₂
64	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-(CH ₂) ₄ CCl ₃
65	-OC ₄ H ₉	-OC ₄ H ₉	-(CH ₂) ₂ CCl ₃
66-	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-CH ₂ CCl ₃
67	-OC ₄ H ₉	-OC ₄ H ₉	-CH ₂ CCl ₃

Com- pusul nr.	Seria I	Seria II	Seria III
68	-CH ₃	-OC ₂ H ₅	-CH ₂ CCl ₃
69	-CH ₃	-OC ₂ H ₅	-(CH ₂) ₄ CCl ₃
70	-CH ₃	-C(CH ₂) ₄ CCl ₃	-(CH ₂) ₄ CCl ₃
71	-CCl ₃	-OC ₂ H ₅	-C ₂ H ₅

Tabelul 29.

Com- pus nr.	A ₁ ^{exp} [261,795, 826]	R ₁ + R ₂			R ₃					
		r ₁	r ₂	r ₃	r ₄	r ₅	r ₆	r ₇	r ₈	r ₉
1	1,568	-0,24	2	14,58	0,574	1	0	0	25,36	2
2	1,566	-0,42	2	23,88	3,566	1	0	0	34,88	3,5
3	1,185	-0,42	2	23,88	2,884	1	0	0	40,37	5
4	1,657	-0,24	2	14,58	3,566	1	0	0	34,88	3,5
5	0,992	-0,24	2	14,58	1,980	1	1	0	54,27	8
6	0,414	-0,24	2	14,58	2,160	1	0	0	45,41	8
7	1,403	-0,24	2	14,58	1,490	1	1	0	49,72	7
8	-0,592	-0,42	2	23,88	0,808	0	2	0	34,32	10
9	-0,517	-0,24	2	14,58	0,335	0	1	0,5	58,58	10
10	-0,016	-0,24	2	14,58	1,245	0	1	0,5	39,19	4,5
11	0,323	-0,42	2	23,88	1,245	0	1	0,5	39,19	4,5
12	0,939	-0,24	2	14,58	1,555	2	2	0	65,83	8
13	1,374	-0,42	2	23,88	1,555	2	2	0	65,83	8
14	1,301	-0,24	2	14,58	3,270	2	2	0,5	70,70	9,5
15	0,578	-0,24	2	14,58	0,729	1	0	0,5	23,76	2
16	0,993	-0,42	2	23,88	0,729	1	0	0,5	23,76	2
17	0,484	-0,42	2	23,88	1,429	1	1	0	49,72	6
18	1,560	-0,24	2	14,58	4,058	1	1	0	54,59	8,5
19	1,355	-0,42	2	23,88	4,068	1	1	0	54,59	8,5
20	-0,176	-0,24	2	14,58	4,085	1	1	0	43,23	9
21	0,127	-0,42	2	23,88	3,085	1	1	0	43,23	9
22	0,455	-0,42	2	23,88	1,980	1	1	0	54,27	8
23	3,198	-0,24	2	14,58	0,842	0	0	1	19,80	4
24	3,192	-0,42	2	23,88	0,842	0	0	1	19,80	4
25	2,911	-0,64	2	33,22	0,842	0	0	1	19,80	4
26	2,556	-0,60	2	33,22	0,842	0	0	1	19,80	4
27	2,713	-0,82	2	42,44	0,842	0	0	1	19,80	2

COL BUS nr.	Δ_i exp [261,795 826]	$R_1 + R_2$			R_3					
		r_1	r_2	r_3	r_4	r_5	r_6	r_7	r_8	r_9
28	2,139	-0,24	2	24,58	-0,079	3	0	0	20,30	6,5
29	2,754	-0,42	2	23,88	-0,085	3	0	0	29,60	6,5
30	2,290	-0,24	2	14,58	-0,085	3	0	0	29,60	6,5
31	1,395	-0,60	2	33,22	-0,098	3	0	0	38,95	6,5
32	2,285	-0,24	2	14,58	-0,098	3	0	0	38,95	6,5
33	-0,200	-0,09	2	24,34	-0,730	0	1	1	35,10	5,5
34	0,224	-0,09	2	24,34	-0,125	0	1	1,5	39,97	7
35	1,993	-0,09	2	24,34	0,130	2	1	1	30,97	
36	1,616	-0,09	2	24,34	0,090	2	1	0	35,63	5
37	0,027	-0,09	2	24,34	0,054	0	1	1	35,10	5,5
38	1,889	-0,18	2	28,79	0,130	2	1	1	30,97	4
39	1,334	-0,29	2	33,47	0,130	2	1	1	30,97	4
40	1,209	-0,27	2	33,47	0,130	2	1	1	30,97	4
41	1,130	-0,38	2	38,07	0,130	2	1	1	30,97	4
42	0,808	-0,35	2	47,37	0,130	2	1	1	30,97	4
43	1,857	-0,18	2	38,79	0,090	2	1	1	35,62	5
44	0,926	-0,29	2	33,47	0,090	2	1	1	35,62	5
45	0,301	-1,09	1	12,94	-1,190	0	1	0	30,01	5
46	0,069	-1,09	1	12,94	-0,115	0	1	0	34,88	4,5
47	-0,486	-1,09	1	12,94	0,040	2	1	0,5	35,61	5
48	-0,102	-0,24	2	14,58	-0,220	3	1	2	35,67	9
49	-0,067	-0,24	2	14,58	0,028	1	1	0,5	34,61	5
50	0,458	-0,24	2	14,58	-0,78	0	0	0	20,30	3,5
51	-0,031	-0,64	2	33,22	-0,78	0	0	0	20,30	3,5
52	-0,360	-0,82	2	42,44	-0,78	0	0	0	20,30	3,5
53	-0,473	-0,60	2	42,35	-0,78	0	0	0	20,30	3,5
54	-0,469	-0,78	2	47,71	-0,78	0	0	0	20,30	3,5
55	-0,583	-0,80	2	60,92	-0,78	0	0	0	20,30	3,5
56	-0,511	-0,68	2	70,31	-0,78	0	0	0	20,30	3,5
57	-0,511	-0,64	2	79,48	-0,78	0	0	0	20,30	3,5
58	-0,570	-0,60	2	42,55	-0,83	0	0	0	14,49	3
59	-0,633	-0,60	2	42,55	-0,09	0	0	0	12,83	3
60	0,001	-0,06	1	20,85	-0,73	0	1	0	35,10	5,5
61	0,378	0,03	1	16,21	0,13	2	1	0	30,97	4
62	0,135	0,03	1	16,21	0,09	2	1	0	35,63	5
63	1,932	0,03	1	16,21	-0,085	3	0	0	29,60	6,5
64	0,233	-0,42	2	23,88	0,077	0	0	0	38,12	2

Compuș nr.	A_i^{exp} [261,795 826]	$R_1 + R_2$			R_3					
		\bar{r}_1	\bar{r}_2	\bar{r}_3	\bar{r}_4	\bar{r}_5	\bar{r}_6	\bar{r}_7	\bar{r}_8	\bar{r}_9
65	-0,044	-0,82	2	42,44	0,077	0	0	0	38,12	1,5
66	-0,284	-0,42	2	23,88	0,12	0	0	0	24,18	5,5
67	-0,572	-0,82	2	42,44	0,12	0	0	0	24,18	5,5
68	-0,026	-1,17	1	16,97	0,12	0	0	0	24,18	5,5
69	-0,516	-1,17	1	16,97	0,077	0	0	0	38,12	2
70	-0,374	-0,92	1	44,69	0,077	0	0	0	38,12	2
71	-0,043	0,09	1	31,47	-0,10	0	0	0	10,06	4

Pentru compușii nr.1-48 și 59-63 activitățile A_i^{exp} după [261], [795], [826];

Pentru compușii nr.49-58 activitățile A_i^{exp} după [828];

Pentru compușii nr.64-71 activitățile A_i^{exp} după [829].

În afara corelației multiliniare cu 9 parametri s-au efectuat și corelări cu un număr restrâns de parametri, plecând de la constatarea că în cazul ecuațiilor obținute pentru numărul maxim de parametri unii dintre aceștia intervin cu pondere mică. Dintre corelările cu număr restrâns de parametri am reținut ca semnificativă corelarea cu 6 parametri, în care \bar{r}_1 - reprezintă numărul de atomi Y; cu perechi de electroni neparticipanți din grupele R_1 , R_2 și R_3 , \bar{r}_2 - suma refracțiilor molare ale grupelor R_1 , R_2 și R_3 , \bar{r}_3 - constanta σ^p pentru grupa R_3 , \bar{r}_4 - numărul ciclurilor benzenice din R_3 , \bar{r}_5 - număr de grupe nitro și nitril substituente în ciclurile aromatice din R_3 , \bar{r}_6 - diferența sterică minimă.

Această corelare s-a efectuat atât pentru întreaga serie de compuși de 71 C.O.F. cât și pentru o restricție a seriei la 51 de compuși. Selecția celor 51 de reprezentanți ai seriei a fost făcută prin excluderea combinațiilor care nu prezentau grupări cu caracter acid marcant. Ei sînt indexați în tabelul 28 sub numărul 1-48 și 60-62.

Coeficienții de regresie, coeficientul de corelare multiplă ca și ceilalți parametri ai corelării au fost obținuți pe un calculator IRIS de la Centrul Teritorial de Calcul Timișoara, cu ajutorul unor programe elaborate de dr.Popa R. și colectivul S.Holben, D.Ciubotaru, I.Moșoc și K.Mracec.

Corelațiile liniare pentru seria de 91 de compuși ale A_i^{EXP} cu setul de 6 și respectiv 9 parametrii structurali exprimate prin ecuațiile 17 și corespunzător 18:

$$A_i^{calc} = 0,620 + 0,302 \cdot \bar{r}_1 + 0,007 \cdot \bar{r}_2 + 0,137 \cdot \bar{r}_3 - 0,862 \cdot \bar{r}_4 + \\ + 0,270 \cdot \bar{r}_5 - 0,09 \cdot \bar{r}_6$$

$$r=0,658 \quad (17)$$

$$A_i^{calc} = 0,448 + 0,613 \cdot \tilde{r}_1 + 0,015 \cdot \tilde{r}_2 + 0,045 \cdot \tilde{r}_3 + 0,298 \cdot \tilde{r}_4 + \\ - 0,017 \cdot \tilde{r}_5 + 0,158 \cdot \tilde{r}_6 - 0,548 \cdot \tilde{r}_7 - 0,012 \cdot \tilde{r}_8 - \\ - 0,046 \cdot \tilde{r}_9$$

$$r=0,716 \quad (18)$$

Pentru seria completă de 71 compuși ecuațiile (19), (20) și (21) reprezintă corelarea liniară cu 6 parametrii, corelarea liniară cu 9 parametrii și respectiv corelarea patratică.

$$A_i^{calc} = 0,555 + 0,476 \cdot \bar{r}_1 - 0,017 \cdot \bar{r}_2 + 0,343 \cdot \bar{r}_3 - 0,402 \cdot \bar{r}_4 + \\ + 0,611 \cdot \bar{r}_5 - 0,063 \cdot \bar{r}_6$$

$$r=0,716 \quad (19)$$

$$A_i^{calc} = 0,796 + 0,358 \cdot \tilde{r}_1 - 0,015 \cdot \tilde{r}_2 + 0,117 \cdot \tilde{r}_3 + 0,487 \cdot \tilde{r}_4 + \\ + 0,017 \cdot \tilde{r}_5 + 0,351 \cdot \tilde{r}_6 - 0,380 \cdot \tilde{r}_7 + 0,601 \cdot \tilde{r}_8 - \\ - 0,066 \cdot \tilde{r}_9$$

$$r=0,713 \quad (20)$$

$$A_i^{calc} = 3,50 - 1,76 \cdot \tilde{r}_1 + 0,008 \cdot \tilde{r}_2 + 0,34 \cdot \tilde{r}_3 - 0,38 \cdot \tilde{r}_4 - \\ - 0,039 \cdot \tilde{r}_5 + 0,75 \cdot \tilde{r}_6 + 0,45 \cdot \tilde{r}_7 + 1,97 \cdot \tilde{r}_8 - \\ - 0,19 \cdot \tilde{r}_9 + 0,67 \cdot (\tilde{r}_1)^2 - 0,06 \cdot (\tilde{r}_2)^2 + 0,13 \cdot (\tilde{r}_3)^2 + \\ + 0,33 \cdot (\tilde{r}_4)^2 + 0,001 \cdot (\tilde{r}_5)^2 - 0,09 \cdot (\tilde{r}_6)^2 + 0,005 \cdot (\tilde{r}_7)^2 - \\ - 1,12 \cdot (\tilde{r}_8)^2 + 0,03 \cdot (\tilde{r}_9)^2$$

$$r=0,801 \quad (21)$$

Tabelul 30 conține parametrii statistici care caracterizează

ecuațiile (17-21) : coeficientul de corelație liniară, r , abaterea patrată standard, s , numărul de compuși corelați, N , numărul de parametri structurali, k , și valorile pentru testul F , F_{nk} .

Tabelul 30.

Ecuația	r	s	N	k	F_{nk}
17	0,658	0,758	51	6	4,7
18	0,663	0,754	51	9	3,3
19	0,716	0,746	71	6	13,8
20	0,713	0,749	71	9	7,8
21	0,801	-	71	17	4,7

Coeficienții parțiali de corelație și coeficienții de inter-corelație ($n = 71$; $j = 1,2,3,4,5,6$) sînt dați în tabelul 31.

Tabelul 31.

	A_i^{exp}	\bar{r}_1	\bar{r}_2	\bar{r}_3	\bar{r}_4	\bar{r}_5	\bar{r}_6
1	0,508	1,000	0,059	0,167	0,236	0,193	0,350
2	-0,240		1,000	0,173	0,320	-0,078	0,198
3	0,289			1,000	0,281	-0,132	0,451
4	-0,078				1,000	0,229	0,588
5	0,285					1,000	-0,015
6	0,048						1,000

Așa cum rezultă din tabelul 30 ecuația corelațională (19) corespunde cel mai bine din punct de vedere statistic; parametrizarea separată a grupelor $R_1 + R_2$ și R_3 nu îmbunătățește semnificativ corelarea.

Din ecuația 19 și valorile coeficienților parțiali de corelație rezultă că atomii de tip: Y : cu perechi de electroni neparticipanți, constante σ^p mari pentru grupa acil R_3 și un caracter acceptor de electroni în complecși cu transfer de sarcină mărește toxicitatea compușilor (VII) în timp ce o refracție molară mare o micșorează.

Corelarea toxicității doar cu $\bar{r}_1, \bar{r}_4, \bar{r}_5$ determină o scădere sensibilă a coeficientului de corelație, r ($r=0,59$)

Coeficienții de intercorelație sînt relativ scăzuți, excepție făcînd cei relativ la caracterul aromatic și la diferențele sterice minime.

Descrerea lui r prin trecerea de la seria de 71 compuși la cea de 51 compuși s-ar putea datora faptului că valorile A_j^{exp} au fost determinate de autori diferiți, iar eliminarea a 21 de reprezentanți din serie poate mări ponderea datelor obținute prin testarea prin colinesteraze de surse și puritate diferită.

Valorile optimizate, \hat{r}_j^0 , obținute din ecuația (21) cu relația (9) sînt date în tabelul 32.

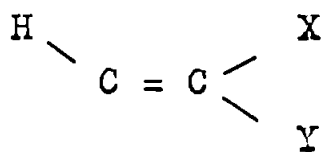
Tabelul 32

Semnificația parametrilor	\hat{r}_j^0 valori optime
\hat{r}_1 - constante \hat{r}^0 pentru $R_1 + R_2$	-1,3 (min)
\hat{r}_2 - număr de atomi Y: în $R_1 + R_2$	+13,0 (min)
\hat{r}_3 - constantă \hat{r}^0 pentru R_3	+4,0 (max)
\hat{r}_4 - număr de atomi Y: în R_2	+6,0 (min)
\hat{r}_5 - număr de grupe NO_2	+1,0 (max)

Ele nu au o semnificație statistică suficient de înaltă ($F_{nk} = 4,7$ doar pentru ecuația 21).

Coeficienții β_j ai ecuației (19) pot fi comparați cu cei corespunzînd interacțiilor oligopeptidelor cu un situs de natură probabil, proteică [830]. Se constată că valorile coeficienților β_j pentru parametrii de refracție molară, de aromaticitate și pentru caracterul acceptor de protoni în punți de hidrogen sînt apropiate.

În ceea ce privește cerințele sterice corelațiile (17-21) nu reușesc să le exprime în mod relevant. Coeficienții parțiali de corelare mici ca și valorile β_{MSD} scăzute în toate ecuațiile (17-21) arată că structura acetilcolinică (VIII) nu reprezintă un bun standard, cu toate că cei mai activi compuși ai seriei (nr. 23-27) au în R_3 configurația



(IX)

similară întrucâtva cu aceea a grupării $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ din acetil colină.

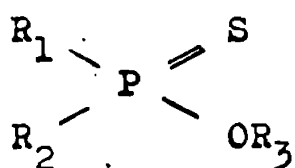
La prima vedere, această pondere scăzută a parametrului steric în corelările întreprinse s-ar putea explica prin interacția compusului organofosforic cu un situs "de suprafață" al acetilcolinesterazei și nu cu unul situat într-o cavitate a enzimei, cavitate care să impună o potrivire sterică strictă. Această ipoteză nu este convingătoare dacă se ține cont de cercetările făcute asupra topografiei zonelor din vecinătatea centrelor active ale colinesterazelor [110].

Structura acestor zone determină interacții hidrofobe a căror valoare depinde de natura grupărilor alcoxi R_1 și R_2 (în structura VII) și este optimă pentru grupa alchil $-\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ de mărime și structură (catenă normală sau ramificată) anumite. Interacțiile hidrofobe au un rol însemnat în orientarea substratului și alături de interacțiile de natură coulombiană sînt determinate în forma complexului PX.EOH și a enzimei fosforilate EOP ; astfel încît trebuie apreciat că pentru o evaluare relevantă a cerințelor sterice, standardul ales trebuie să redea particularitățile de conformație atât a grupei R_3 cît și a celor R_1 și R_2 .

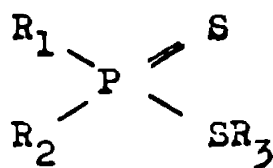
Asupra rolului structurii grupelor R_1 și R_2 în mecanismul acțiunii anticolinesterazice vom reveni în acest capitol (§ 29)

Pe baza corelărilor (17-21) s-au făcut încercări de a le extinde și la alte clase de compuși organofosforici.

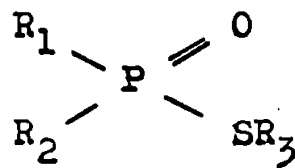
Astfel ecuația (20) a fost testată pe trei serii de cîte 9,4 și respectiv 25 compuși din clasele



(X)



(XI)



(XII)

În tabelul 33 sînt prezentate grupele R_1 , R_2 și R_3 , valorile A_i^{exp} și cele calculate A_i^{calc} conform ecuației (20), pentru cei 9 compuși de tip (X).

Coeficientul de corelație obținut $r=0,69$ este foarte apropiat de cel obținut pentru seria de 71 de compuși (VII) de tip Schrader.

Aplicarea ecuației (20) la seriile de compuși (XI) și (XII) conduce la coeficienți $r=0$ ceea ce era de așteptat avînd în vedere că mecanismul de acțiune toxică a compușilor (XI) și (XII)

Tabelul 9.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A _i ^{exp}	A _i ^{calc}
1	-OCH ₃	-OCH ₃	-P(O)(OCH ₃) ₂	1,678	1,493
2	-OCH ₃	-OCH ₃	-P(O)(OC ₂ H ₅) ₂	2,143	1,343
3	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C ₄ H ₉	-0,424	-0,400
4	-CH ₃	-OC ₂ H ₅	-(CH ₂) ₄ CCl ₃	-0,451	-0,574
5	-OCH ₃	-OCH ₃	-C ₆ H ₃ (CH ₃)NO ₂	-0,229	0,324
6	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C ₆ H ₃ (CH ₃)NO ₂	1,162	0,189
7	-OCH ₃	-OC ₂ H ₅	-C ₆ H ₃ (CH ₃)NO ₂	1,209	0,257
8	-OCH ₃	-OCH ₃	-C ₆ H ₄ NO ₂	p,876	1,072
9	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C ₆ H ₄ NO ₂	-0,189	0,936

(spre deosebire de cei (VII) și (X) include ca etapă suplimentară, activarea prin oxidare a grupării P = S la P = O). În plus, aproape toți cei 29 de compuși (XI) și (XII) au ca grupe R₃, radicalii alifatici (substituiți cu grupe atrăgătoare de electroni, sau nesubstituiți) cu un foarte slab caracter acid (atrăgător de electroni).

Ecuatiile corelaționale (19) și (21) au coeficienții de corelație r prea scăzuți ($r = 0,71$ respectiv $0,80$) pentru a putea fi utilizate în prezicerea toxicității. Dacă se ține seama însă că seria celor 71 de compuși cuprinde molecule mult mai variate din punct de vedere steric și chimic decât cele din seriile utilizate de obicei pentru corelări structură-activitate biologică [36], [831], valorile intrinsece ale coeficienților de corelație au un plus de semnificație.

Creдем că ecuațiile de corelare obținute pot da unele sugestii pentru încercări de sinteze în clase compușilor de tipul (VII). Valorile optime ale parametrilor, așa cum rezultă din ecuația (21) (tabelul 32) arată că un substituent R₃ cu constanta $\sigma^{\phi} = 4$ și prezența unei grupări NO₂ sau CN în R₃ determină o maximizare a toxicității în timp ce substituenții R₁ și R₂ cu $\sum \sigma^{\phi} = -1,3$, cu un număr de 13 atomi Y: împreună cu 6 atomi Y: în R₃ imprimă o toxicitate minimă.

2.4. Corelări structură-activitate biologică la compuși organofosforici de tip Schrader cu centru cationic în grupa eliminantă

Activitatea anticolinesterazică a compușilor organofosforici cu structură Schrader (I) crește mult prin introducerea unui centru cationic în grupa eliminantă.



Creșterea este maximă atunci când atomul centrului cationic se află la aceeași distanță pe atomul de fosfor ca și azotul cuaternar față de gruparea carbonilică din acetilcolină [108]. Prin introducerea centrului cationic în molecula C.O.F. apare nu numai posibilitatea unor interacțiuni ionice ci, datorită efectului inductiv, crește sensibil capacitatea de fosforilare a combinației. Din aceste motive, ca și pentru clarificarea naturii interacțiilor hidrofobe substrat-enzimă, prezintă interes corelarea activității biologice a unor asemenea tipuri de C.O.F. cu parametrii structurali.

Am selectat [790] în acest scop, 60 de C.O.F. în care structura substituenților variază sistematic (tabelul 34) în limite largi. Este de remarcat că în grupa acil R_3 atomul care se află la aceeași distanță de fosfor ca și grupa $-N^+(CH_3)_3$ de cea $-CO-$ din acetilcolină



variază atât ca natură (O,N,S) cât și ca încărcare electrică (S^+ , S^+ ; N^+ , N^+), iar R este radical alifatic sau aromatic substituit.

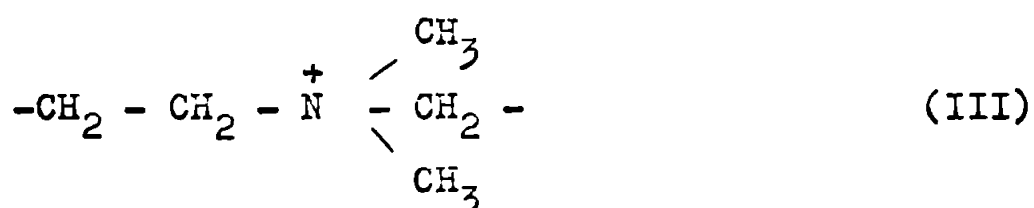
Intre cei 60 de compuși ai seriei au fost introduși 11 (nr.9 și 24-33) care au substituenții R_1 și R_2 identici cu alți reprezentanți dar nu realizează structure (II) în R_3 .

Ca măsură a activității biologice a celor 60 de compuși s-a utilizat logaritmul constantei de viteză a reacției de fosforilare a acetilcolinesterazei, determinată în condiții experimentale similare (colinesterază din eritrocitele de cal; $25^\circ C$, $pH=7,5$) [138], [139], [140], [141], [112], [832-834].

INSTITUTUL POLITEHNIC
 TIMIȘOARA
 BIBLIOTECA CENTRALĂ

Tabelul 34 conține pe lângă radicalii R_1 , R_2 și R_3 corespunzătorii compusului îndemst, valorile $\log k$ și parametrii de corelare: $\tilde{\pi}$ - constanta de hidrofobicitate Hansch; σ^ϕ - constanta de substituent Kabachnik, SE - sarcina electrostatică, MSD - diferență sterică minimă; CT - caracterul acceptor de electroni în complecși cu transfer de sarcină. Hidrofobicitățile $\tilde{\pi}$ au fost calculate după reguli aditive date de Leo, Hansch și Elkins [716]. Constantele σ^ϕ au fost preluate sau calculate pe baza relațiilor de convertire a constantelor σ date în alte scări (vezi indicațiile bibliografice din tabelul 12, cap. 3, § 1.1.2). Sarcina electrică este cea la $\text{pH} = 7$. Diferența sterică minimă s-a stabilit prin referire la structura standard (III), după regulile spuse în cap. 3, § 2.2

Standardul ales este molecula acetilcolinei dar se presupune că doar gruparea



interacționează cu un situs de structură spațială rigidă din enzimă.

Caracterul de transfer de sarcină se consideră a fi +1 / grupă NO_2 în ciclul fenilic, 0,5 / atomi de clor, -1 / grupare NH_2 și -0,5 pentru grupările CH_3 și OH (valori pozitive semnifică tendința acceptoare de electroni, valori negative - donoare).

Calcululele de corelare au fost efectuate pe calculatorul IRIS al Centrului Teritorial de Calcul Timișoara după programul "COLIN" scris de S. Holban, D. Ciubotaru și I. Moțoc.

Ecuația corelațională obținută pentru seria de 60 de compuși și cei 5 parametrii structurali este:

$$A_i^{\text{calc}} = 2,941 + 0,136 \cdot \tilde{\pi} - 0,060 \cdot \sigma^\phi - 0,272 \cdot \text{MSD} + 3,003 \cdot \text{SE} - 0,028 \cdot \text{CT} \quad (\text{I})$$

$$N = 60 ; \quad s = 0,906 ; \quad r = 0,880$$

Coeficienții parțiali de corelație și coeficienții de intercorelație sînt dați în tabelul 35.

Tabelul 34

Nr. crt	C O M P U S U L			$-\log k$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	π	ρ	MSD	SB	CT	Lit.
	R ₁	R ₂	R ₃							
0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
1.	(CH ₃) ₂ CHO	CH ₃	SCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	1,08	3,12	0,61	1,5	0	0	834
2.	CH ₃	(CH ₃) ₂ CHO	SCH ₂ CH ₂ SCH ₃	2,40	2,32	0,61	2,0	0	0	834
3.	CH ₃	(CH ₃) ₂ CHO	SCH ₂ CH ₂ SC ₂ H ₅	2,55	2,82	0,60	2,0	0	0	834
4.	CH ₃	(CH ₃) ₂ CHO	SC ₂ H ₅	0,97	1,82	1,90	4,5	0	0	834
5.	CH ₃	(CH ₃) ₂ CHO	SCH ₂ CH ₂ F	2,08	1,65	1,20	3,5	0	0	834
6.	CH ₃	(CH ₃) ₂ CHO	SCH ₂ CH ₂ S ⁺ (CH ₃) ₂	5,80	2,62	3,96	1,0	1	0	834
7.	CH ₃	(CH ₃) ₂ CHO	SCH ₂ CH ₂ NH ⁺ (CH ₃) ₂	5,23	1,46	4,00	1,5	1	0	834
8.	CH ₃	(CH ₃) ₂ CHO	SCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	5,95	1,96	4,36	0,5	1	0	834
9.	CH ₃	(CH ₃) ₂ CHO	F	5,36	0,65	0,56	6,0	0	0	834
10.	CH ₃	(CH ₃) ₂ CHO	O-C ₆ H ₄ -NO ₂ -p	4,25	2,72	0,35	4,0	0	0	834
11.	CH ₃	(CH ₃) ₂ CHO	O-C ₆ H ₄ -N(CH ₃) ₂ -m	1,83	1,66	-0,09	4,0	0	-2	834
12.	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ SCH ₃	2,83	1,98	0,61	2,0	0	0	138
13.	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ SC ₂ H ₅	3,00	2,48	0,60	2,0	0	0	138
14.	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ SC ₄ H ₉ -n	3,17	3,48	0,59	2,0	0	0	138
15.	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ SC ₆ H ₁₃ -n	3,83	4,48	0,58	2,0	0	0	138
16.	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ SC ₈ H ₁₇ -n	3,74	5,48	0,57	2,0	0	0	138

Tabellul 34 -continuar

0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
17	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ SC ₁₀ H ₂₁ -n	3,52	6,48	0,56	2,0	0	0	138
18	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ S ⁺ (CH ₃)CH ₃	5,99	2,48	3,96	0,5	1	0	138
19	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ S ⁺ (CH ₃)C ₂ H ₅	6,63	2,98	3,94	0,5	1	0	138
20	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ S ⁺ (CH ₃)C ₄ H ₉ -n	6,57	3,98	3,92	0,5	1	0	138
21	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ S ⁺ (CH ₃)C ₆ H ₁₃ -n	7,28	4,98	3,90	0,5	1	0	138
22	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ S ⁺ (CH ₃)C ₈ H ₁₇ -n	6,86	5,98	3,86	0,5	1	0	138
23	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ S ⁺ (CH ₃)C ₁₀ H ₂₁ -n	6,83	6,98	3,85	0,5	0	0	138
24	CH ₃	CH ₃ O	SCH ₃	0,63	0,51	1,96	5,5		0	141
25	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₃	1,30	1,00	1,96	5,5	0	0	141
26	CH ₃	n-C ₃ H ₇ O	SCH ₃	1,97	1,50	1,96		0	0	141
27	CH ₃	n-C ₄ H ₉ O	SCH ₃	1,36	2,00	1,96		0	0	141
28	CH ₃	n-C ₅ H ₁₁ O	SCH ₃	1,04	2,50	1,96	5,5	0	0	141
29	CH ₃	n-C ₆ H ₁₃ O	SCH ₃	0,85	3,00	1,96	5,5	0	0	141
30	CH ₃	n-C ₇ H ₁₅ O	SCH ₃	0,87	3,50	1,96	5,5	0	0	141
31	CH ₃	n-C ₈ H ₁₇ O	SCH ₃	0,84	4,00	1,96	5,5	0	0	141
32	CH ₃	n-C ₉ H ₁₉ O	SCH ₃	1,00	4,50	1,96	5,5	0	0	141
33	CH ₃	n-C ₁₀ H ₂₁ O	SCH ₃	0,68	5,00	1,96	5,5	0	0	141
34	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R ; R: H	2,62	2,11	0,38	2,5	0	-1	140

Tabelul 34 - continuare -

0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
35	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R ⁺ ; R: CH ₃ -m	2,52	2,62	-0,41	2,5	0	-1	140
36	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: CH ₃ -p	2,45	2,63	-0,41	2,5	0	-1	140
37	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: OCH ₃ -m	2,83	2,22	-0,16	2,5	0	-2	140
38	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: OCH ₃ -p	2,68	2,22	-0,47	2,5	0	-2	140
39	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: Cl-m	3,15	2,87	-0,31	2,5	0	-0,5	140
40	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: Cl-p	3,11	2,81	-0,34	2,5	0	-0,5	140
41	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: Br-p	3,05	3,13	-0,33	2,5	0	-0,5	140
42	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: C(CH ₃) ₃ -p	2,43	3,91	-0,40	2,5	0	-1	140
43	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: NO ₂ -m	3,95	2,22	-0,23	2,5	0	0	140
44	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: NO ₂ -p	4,04	2,35	-0,22	2,5	0	0	140
45	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: OH-m	3,23	1,60	0-0,60	2,5	0	-2	140
46	CH ₃	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ OC ₆ H ₄ R; R: OH-p	3,96	1,50	-0,67	2,5	0	-2	112
47	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₄ R; R: OCH ₃ -p	2,92	1,26	0-0,48	1,5	0	-2	112
48	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₄ R; R: CH ₃ -p	2,49	1,57	-0,48	1,5	0	-1	112
49	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₄ R; R: CH ₃ -m	2,20	1,56	-0,46	1,5	0	-1	112
50	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₄ R; R: H	2,04	1,15	-0,44	1,5	0	-1	112
51	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₄ R; R: OCH ₃ -m	2,20	1,26	-0,39	1,5	0	-2	112
52	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₄ R; R: Cl-p	2,04	1,91	-0,19	1,5	0	-0,5	112

Tabelul 34-continuare -

0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
53	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N(CH ₃)C ₆ H ₄ R; R: Cl-m	1,52	1,85	-0,21	1,5	0	-0,5	112
54	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ R; R:OCH ₃ -p	5,68	1,76	-0,34	0,5	1	-1	112
55	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ R; R:CH ₃ -p	5,60	2,07	-0,34	0,5	1	0	112
56	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ R; R:CH ₃ -m	5,72	2,07	-0,32	0,5	1	0	112
57	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ R; R: H	5,62	1,65	-0,31	0,5	1	0	112
58	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ R; R:OCH ₃ -m	5,85	1,76	-0,25	0,5	1	-1	112
59	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ R; R: Cl-p	5,57	2,35	-0,23	0,5	1	0,5	112
60	C ₂ H ₅ O	C ₂ H ₅ O	SCH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₂ C ₆ H ₄ R; R: Cl-m	5,81	2,41	-0,25	0,5	1	0,5	112

Tabelul 35

	log k	P	\bar{r}	\bar{r}^{ϕ}	MSD	SE	CT
\bar{r}	0,205	0,9	1,000	0,361	-0,113	0,141	0,325
\bar{r}^{ϕ}	0,296	0,93		1,000	0,045	0,465	0,503
MSD	-0,717	0,999			1,000	-0,645	0,080
SE	0,852	0,999				1,000	0,301
CT	0,189	0,9					1,000

Coeficienții de intercorelare nu sînt excesiv de mari, cu excepția lui $r(\text{MSD}, \text{SE})$ ceea ce se explică prin faptul că mulți din reprezentanții seriei cu sarcină pozitivă la $\text{pH} = 7$ prezintă gruparea trimetil amoniu. Cel mai mare coeficient de corelare, $r(\text{SE}) = 0,852$, subliniază ponderea deosebită a sarcinii pozitive, după cum atestă și coeficientul ridicat al acesteia în ecuația corelațională (1). De aici rezultă, pentru interacțiunea enzimei cu gruparea trimetil amoniu, o valoare $\Delta G \approx 4 \text{ kcal/mol}$.

Coeficienții parțiali de corelare cît și coeficienții din ecuația (1) pentru π , σ^+ , CT sînt destul de mici (de altfel nu trebuie uitat că σ^+ se referă de regulă la substituenți față de care atomul de fosfor nu este centru de reacție).

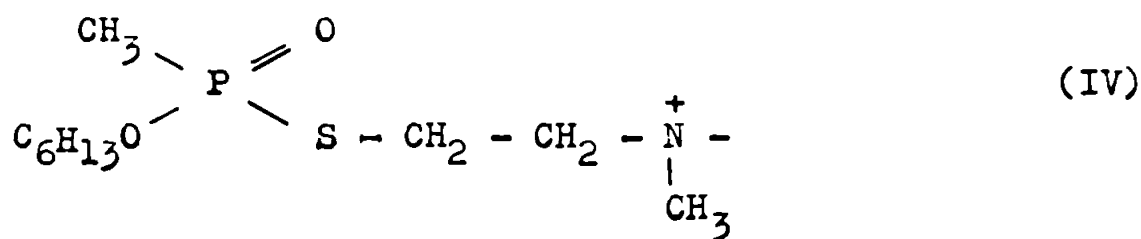
Coeficientul total de corelație ($r=0,88$) este sensibil mai bun decît cei rezultați în corelările structură-toxicitate pentru C.O.F. pe care le-am efectuat și descris anterior (§ 2.3).

Compararea coeficienților ecuațiilor corelaționale pentru parametri similari subliniază în cazul seriei de C.O.F. cu centru cationic în grupe eliminantă o importanță mult diminuată a caracterului donor de electroni în complecși cu transfer de sarcină față de seriile precedente; coeficientul parametrului de hidrofobicitate intervine cu semn contrar.

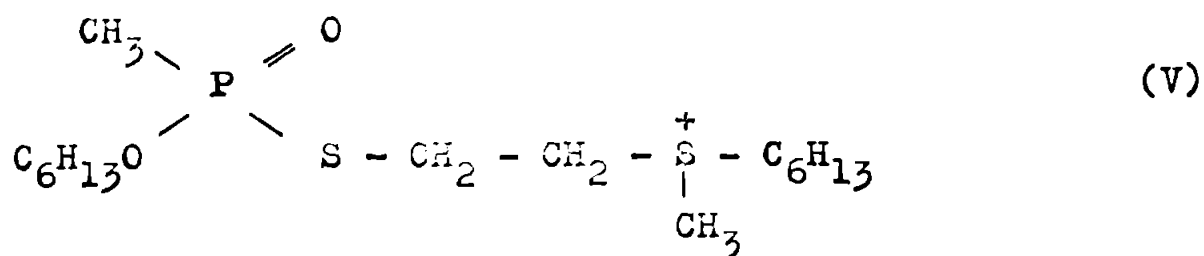
Este probabil că toxicitatea este determinată în bună măsură și de penetrația C.O.F. în celule, factor care nu intervine în cazul abordării exclusiv a etapei de fosforilare.

Coeficientul de corelație obținut, $r=0,88$ ne permite să sperăm că, pentru serii de compuși cu mecanism de acțiune bine definit, setul de parametri utilizați în mod curent, π și σ , pot fi completați cu bune rezultate cu parametri de tipul EC, MSD, etc. care iau în considerație mai amănunțit tipurile de forțe intermoleculare și structura sterică.

Pe baza coeficienților de corelare ai ecuației (1), structurile ipotetice cu activitate maximă (caracterizate prin viteză maximă de fosforilare) ale seriei de compuși de tip I sînt:



și



Activitatea anticolinesterazică înaltă a acestor structuri se explică prin prezența sarcinii pozitive la heteroatomul din poziția β a radicalului tioetilic (IV), poziție similară celei a centrului cationic din substratul natural, care realizează o bună potrivire cu "tiparul" acetil colinesterazei.

Radicalii aril sau gruparea alchil $-\text{C}_6\text{H}_{13}$ contribuie la orientarea sorbției C.O.F. pe suprafața enzimei, fiind complementarii optimi ai zonelor hidrofobe.

Substituenții ciclului fenilic în compușii organofosforici de tip (IV) manifestă o slabă influență prin efecte polare și sterice asupra activității lor anticolinesterazice.

2.5. Corelări structură-activitate biologică la combinații organofosforice de tip vinil- și enol-fosfați

2.5.1. Corelări cu parametrii cuantochimici

Acțiunea pesticidă a vinil- și enolfosfaților depinde de caracteristicile structurale de natură electronică, de interacțiile hidrofobe și de configurație sterică a compușilor. Cu scopul de a găsi acei parametri electronici care determină acțiunea pesticidă s-au efectuat calcule de orbitale moleculare pentru o serie de 15 enolfosfați [835]. Am utilizat metoda HMO potrivit căreia reactivitatea este determinată de sistemul de electroni π (mai mobil) al moleculei. Dimensiunile moleculelor sînt relativ mari pentru utilizarea unor metode mai avansate.

O serie de autori au realizat calculele de orbitale moleculare pentru sisteme electronice π ale C.O.F. utilizînd metode avansate dar numai pentru molecule mici [836-838] sau de dimensiuni medii însă pentru serii mici [839-840].

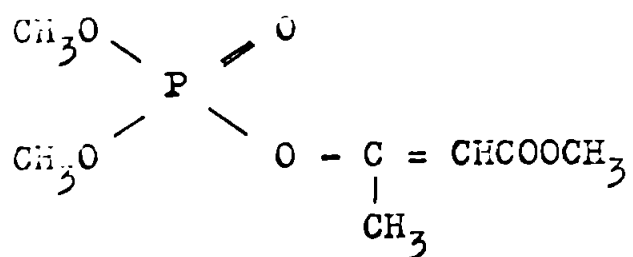
Participarea orbitalelor $3d - P$ la sistemul de electroni π ridică o serie de probleme motiv pentru care în parametrizare am considerat atomul de P cu un orbital $3d - \pi$ și un electron π ca și în unele lucrări anterioare [841-842]. Parametrii α și β utilizați sînt dați în tabelul 36.

Tabelul 36.

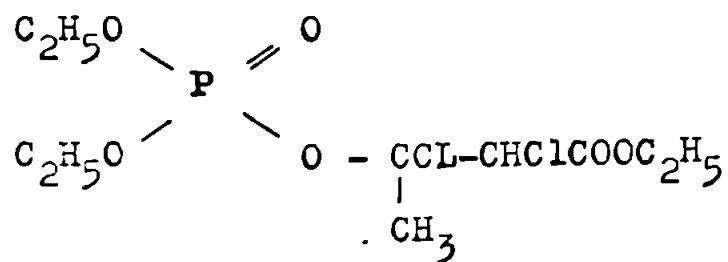
Legătura	α	β
P → O	$\alpha_P = \alpha - 0,6 \cdot \beta$	$\beta_{P \rightarrow O} = 0,9$
P — OCH ₃	$\alpha_{\ddot{O}CH_3} = \alpha + 2 \cdot \beta$	$\beta_{P-OCH_3} = 0,8 \cdot \beta$
P — O	$\alpha_{\ddot{O}} = \alpha + 2 \cdot \beta$	$\beta_{P-O} = 0,8 \cdot \beta$
C — OCH ₃	$\alpha_{\ddot{O}CH_3} = \alpha + 2 \cdot \beta$	$\beta_{C-CH_3} = 0,8 \cdot \beta$
C — Cl	$\alpha_{\ddot{C}l} = \alpha + 2 \cdot \beta$	$\beta_{C-Cl} = 0,4 \cdot \beta$
C — CH ₂	$\alpha_{CH_2} = \alpha + 2 \cdot \beta$	$\beta_{C-CH_2} = 0,6 \cdot \beta$
C — NO ₂	$\alpha_N = \alpha + \beta$	$\beta_{C-NO_2} = \beta$
	$\alpha_O = \alpha + 1,5 \cdot \beta$	$\beta_{N-O} = \beta$
	$\alpha_{C(-NO_2)} = \alpha + 0,2 \cdot \beta$	
C ≡ N	$\alpha_{C(N)} = \alpha + 0,1 \cdot \beta$	$\beta_{C \equiv N} = 1,5 \cdot \beta$
	$\alpha_{N(C)} = \alpha + 0,3 \cdot \beta$	
C — CH ₃	$\alpha_{CH_3} = \alpha + 2 \cdot \beta$	$\beta_{C-CH_3} = 0,6 \cdot \beta$

Calcululele de orbitale moleculare pentru compușii 1-15 din figura (27) au fost realizate pe un calculator FELIX C-256 al Centrului Teritorial de Calcul Timișoara, iar corelările pe un calculator HEWLETT PACKARD.

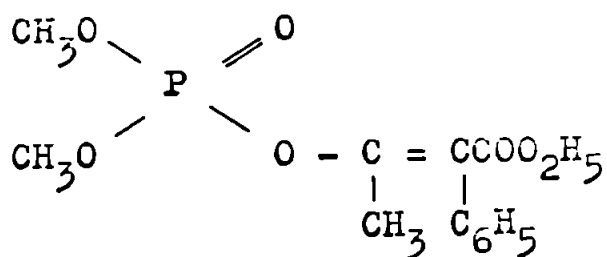
În tabelul 37 (a și b) sînt indicate valorile $A_i^{\text{exp}} = -\log DL_{50}$ cu și parametrii electronici calculați: lungimile de undă pentru prima tranziție (în nm.) λ_1 și λ_2 , energiile orbitale cel mai înalt ocupat, ϵ_{HOMO} , și a celui mai jos neocupat, ϵ_{LEMO} , energia totală a electronilor \tilde{T} , energia de delocalizare $\Delta\tilde{T}$, sarcina efectivă (\tilde{T} electronică) la stumul de P, δ_P , și la cel de oxigen, δ_O , al legăturii P — O (enolică), implicată în fosforilarea colinesterazei.



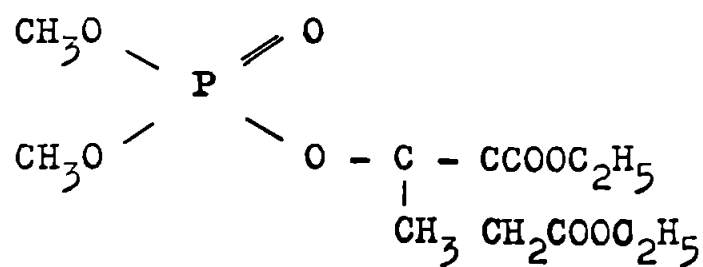
(1)



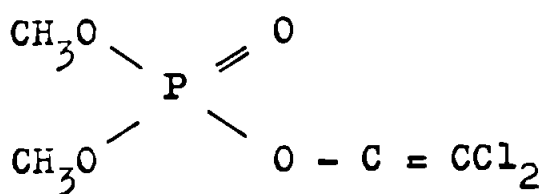
(2)



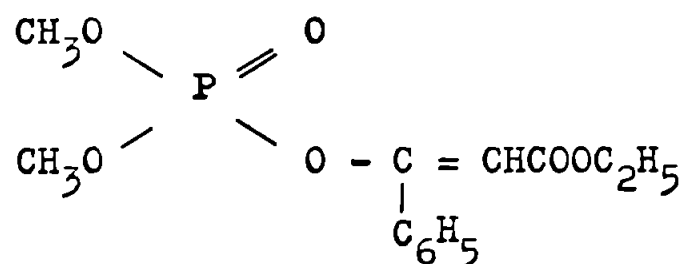
(3)



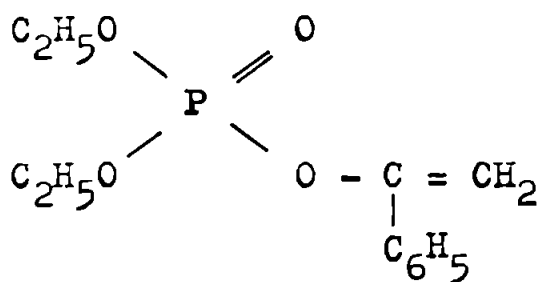
(4)



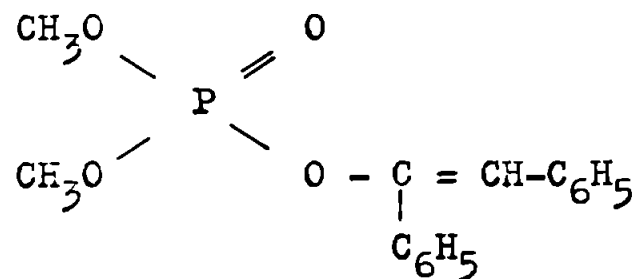
(5)



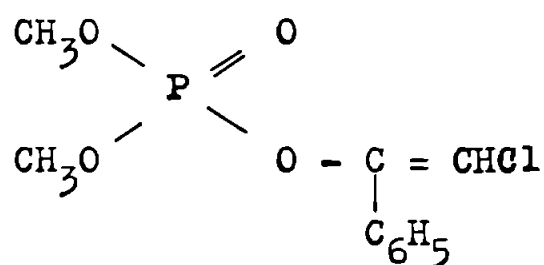
(6)



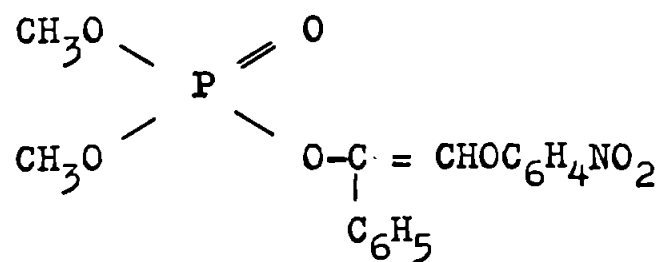
(7)



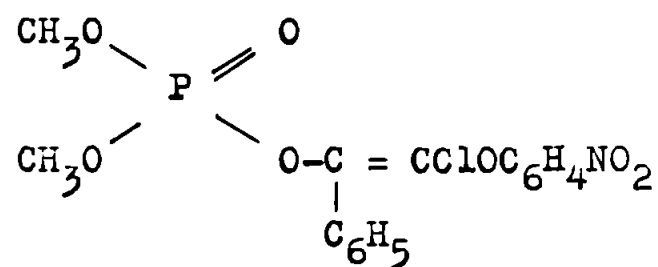
(8)



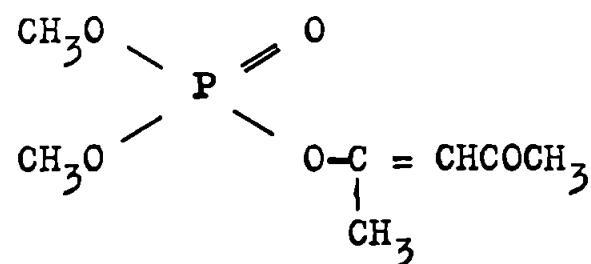
(9)



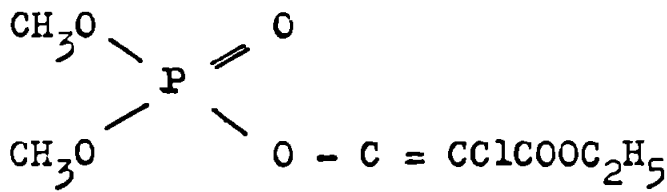
(10)



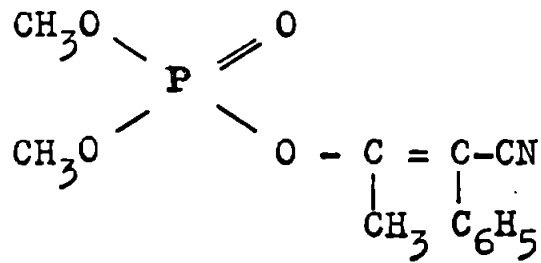
(11)



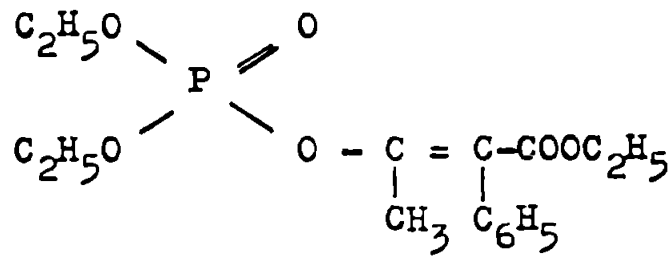
(12)



(13)



(14)



(15)

Tabelul 37.a.

Compus nr.	A_i^{exp}	λ_1	λ_2	ϵ_{HOMO}	ϵ_{LEMO}
1	1,56845	360	277	+ 0,7939.	-0,5867.
2	1,18523	375	277	+ 0,7401.	-0,5834.
3	0,99183	439	331	+ 0,5551.	-0,5705.
4	0,41365	390	317	+ 0,6855.	-0,5892.
5	3,19210	280	228	+ 0,6671.	-1,1111.
6	1,40892	460	293	+ 0,6966.	-0,3835.
7	-0,59176	386	311	+ 0,5961.	-0,6904.
8	-0,51713	508	377	+ 0,4366.	-0,5437.
9	-0,01505	396	322	+ 0,5488.	-0,7085.
10	1,37429	696	428	+ 0,5539.	-0,1599.
11	1,30052	895	431	+ 0,3980.	-0,1588.
12	0,57766	368	282	+ 0,7965.	-0,5516.
13	1,55990	477	359	+ 0,6541.	-0,3881.
14	-0,17559	424	342	+ 0,4545.	-0,7515.
15	-0,45483	441	332	+ 0,5551.	-0,5705.

R.Friedemann și W.Gründler [843] au discutat doar din punct de vedere calitativ corelația dintre sarcină electrică la P și viteza de hidroliză sau constante de inhibere colinesterazică la câțiva esteri ai acizilor fosfonic și fosforic.

Tabelu 7.b.

Compus nr.	ϵ_r	$\Delta \tilde{\pi}$	δ_P	$\delta_O(P-OR)$
1	30,2488. β	8,8488. β	0,4506	1,8334
2	34,2865. β	8,8865. β	0,4509	1,8347
3	38,6415. β	11,2415. β	0,4508	1,8294
4	42,0957. β	11,6957. β	0,4512	1,8358
5	26,0605. β	7,6605. β	0,4546	1,8617
6	34,5276. β	9,1277. β	0,4510	1,8413
7	26,3763. β	7,9763. β	0,4531	1,8644
8	34,8387. β	10,4387. β	0,4534	1,8587
9	30,4261. β	8,0261. β	0,4536	1,8665
10	39,4646. β	10,8646. β	0,4555	1,8635
11	51,9442. β	13,3442. β	0,4553	1,8718
12	30,1276. β	8,7276. β	0,4505	1,8317
13	38,5694. β	11,1694. β	0,4513	1,8428
14	34,3299. β	9,5299. β	0,4527	1,8429
15	38,6415. β	11,2415. β	0,4508	1,8292

Incercînd corelări cantitative ale A_i^{exp} cu parametrii electronici ai celor 15 compuși ecuația multiparametrică obținută pentru întreaga serie cu cei 6 parametri este următoarea:

$$A_i^{calc} = -377,675 + 8,506 \cdot \epsilon_{HOMO} - 1,324 \cdot \epsilon_{LEMO} + 0,076 \cdot \epsilon_r - 0,052 \cdot \Delta \tilde{\pi} + 1216,727 \cdot \delta_P + 94,445 \cdot \delta_O$$

$$r = 0,683$$

(1)

Coeficienții parțiali de corelare sînt:

$$r(\epsilon_{HOMO}) = 0,405; \quad r(\epsilon_{LEMO}) = -0,119; \quad r(\epsilon_r) = 0,004;$$

$$r(\Delta \tilde{\pi}) = -0,045; \quad r(\delta_P) = 0,046; \quad r(\delta_O) = -0,61$$

se constată astfel că parametrii semnificativi ai corelării sînt ϵ_{HOMO} și ϵ_{LEMO} .

Coeficientul de corelare $r=0,683$ este desigur scăzut, o cauză putînd fi diferențele sterice relativ mari între compuși constituiți cu grupe metil și cei conținînd grupe fenil în poziția α față de fosfor. În această idee, am despărțit cei 15 compuși în două serii:

a. 7 compuși metil-substituiți $(CH_3O)_2OPOC(CH_3) = CR_1COOR$
(compuși nr.1,2,3,4,12,14,15)

b. 8 compuși fenil-substituiți $(CH_3O)_2OPCC(C_6H_5) = CR_1COOR$
(compuși nr.5,6,7,8,10,11,9,13)

Corelațiile uniparametrice de tipul:

$$A_1^{calc} = (a \pm \Delta a) + (b \pm \Delta b) \cdot X_1 \quad (2)$$

cu parametrii ϵ_{HOMO} , ϵ_{LEMO} , δ_P au condus la obținerea ecuațiilor corelaționale din tabelul 38.

Tabelul 38.

X	S e r i a		r
	a ± Δa	b ± Δb	
ϵ_{HOMO}	- 1,285 ± 1,654	3,45 ± 2,43	0,393
ϵ_{LEMO}	- 1,623 ± 0,815	-3,91 ± 1,16	0,713
δ_P	- 188,10 ± 81,91	418,79 ± 181,38	0,570
S e r i a b			
ϵ_{HOMO}	- 0,834 ± 1,23	2,643 ± 2,19	0,303
ϵ_{LEMO}	1,907 ± 0,35	2,831 ± 0,696	0,696
δ_P	49,530 ± 54,49	-107,94 ± 120,29	0,227

Corelările biparametrice de tipul

$$A_1^{calc} = a \cdot X_1 + b \cdot Y_1 + c \quad (3)$$

au condus în cazul celor două serii la obținerea unor coeficienți de corelare mult îmbunătățiți: $r = 0,961$ pentru setul $(\epsilon_{LEMO}, \delta_P)$ în serie (a), $r = 0,911$ pentru $(\epsilon_{LEMO}, \delta_P)$ și $r = 0,990$ pentru $(\epsilon_{HOMO}, \epsilon_{\pi})$ în seria (b) corespunzător ecuațiilor (4-5-6).

$$A_1^{calc} = -21,308 \cdot \epsilon_{LEMO} - 2,376 \cdot \delta_P + 1,060 \quad (4)$$

$$A_1^{calc} = 3,981 \cdot \epsilon_{LEMO} - 309,573 \cdot \delta_P + 142,662 \quad (5)$$

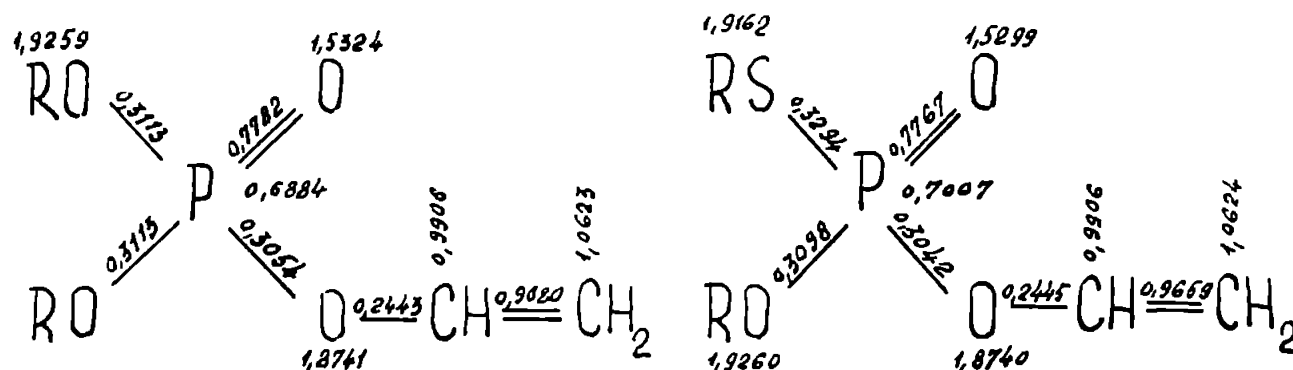
$$A_1^{calc} = 7,467 \cdot \epsilon_{HOMO} + 0,126 \cdot \epsilon_{\pi} - 8,166 \quad (6)$$

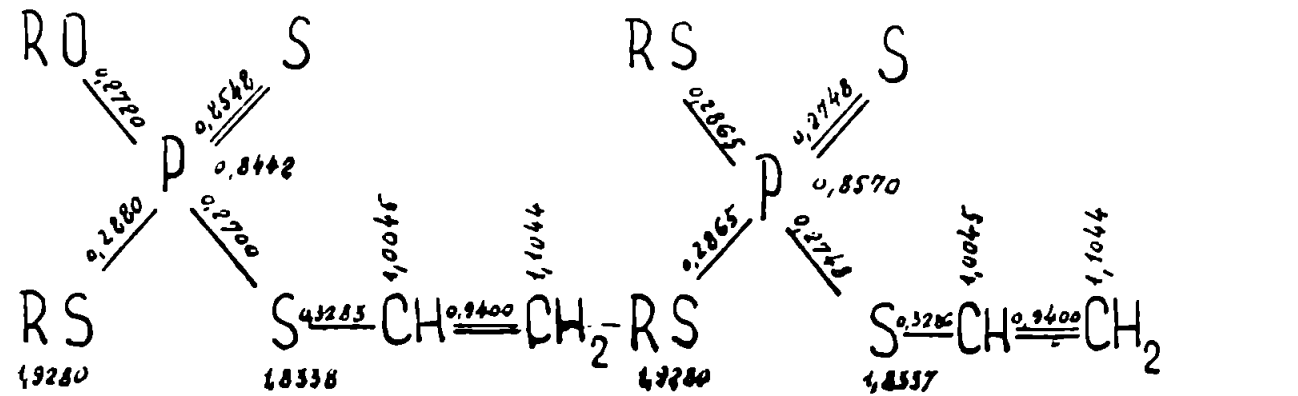
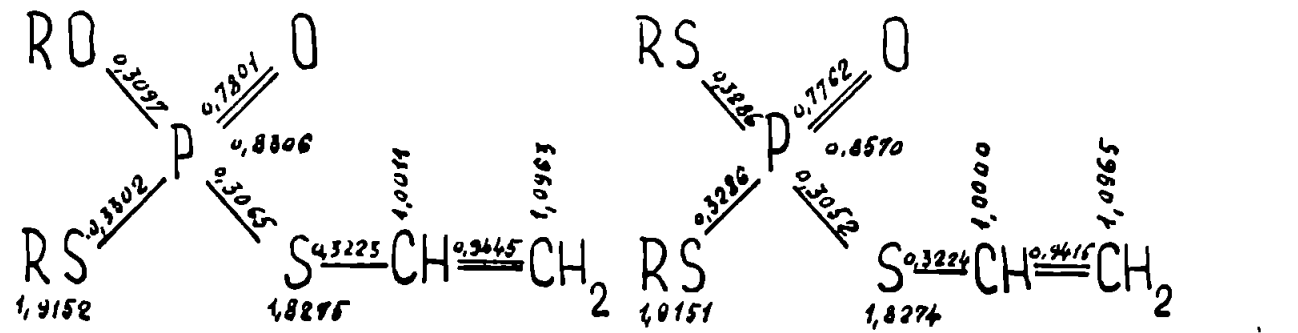
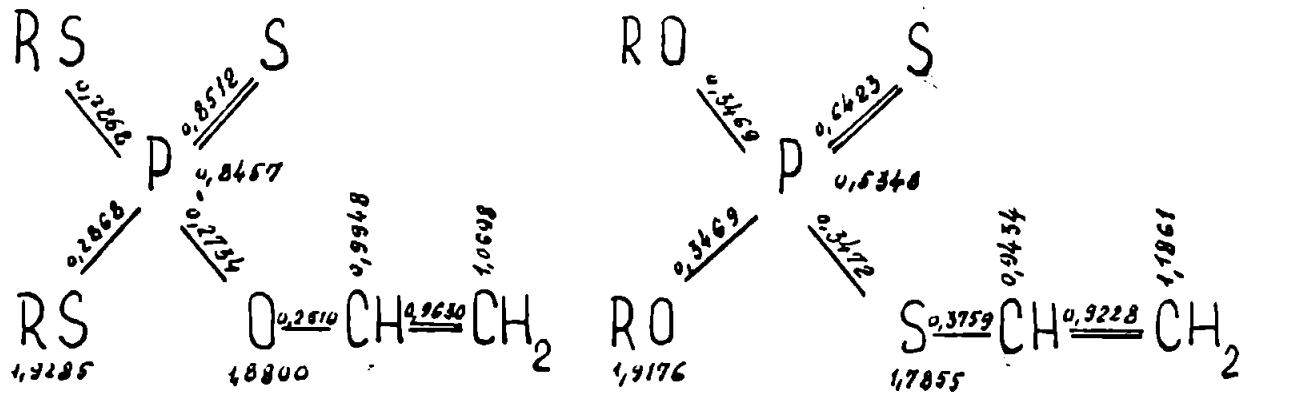
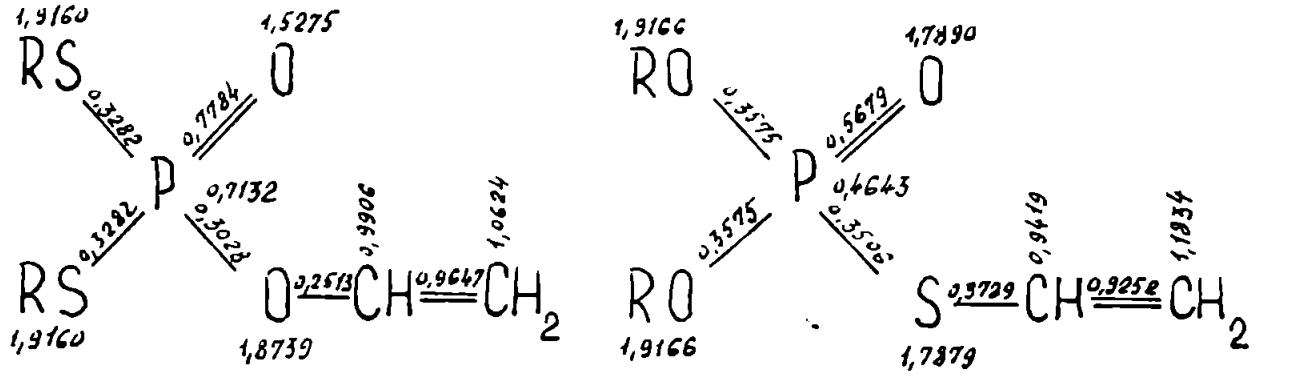
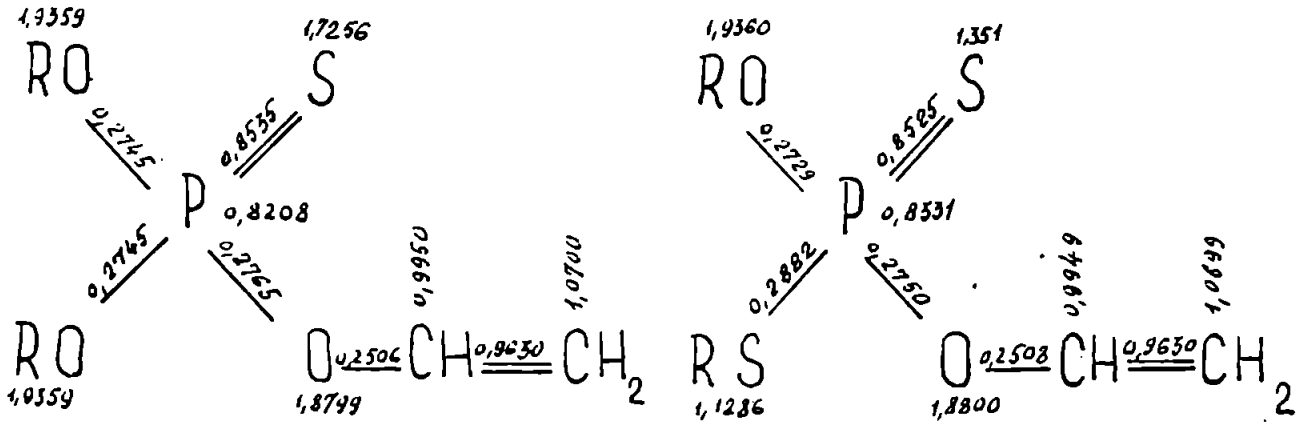
Separarea enol-fosfaților în cele două grupe similare din punct de vedere steric oferă astfel posibilitatea obținerii unor corelări biparametrice semnificative dacă sînt utilizate seturile de parametri cu contribuție majoră în determinarea activității biologice a compușilor. Energiile orbitalelor de frontieră ϵ_{HOMO} și ϵ_{LEMO} contribuie în cea mai mare măsură la realizarea unor bune corelări atît pentru seria întregă cît și pentru subseriile (a) și (b) de compuși. Aceasta sugerează apariția unui transfer de sarcină în complexul enzimă-inhibitor care se formează în cursul fosforilării colinesterazei (analogul inhibării acetilcolinesterazei cu metil carbamații [844]). Utilizarea în setul parametrilor de corelare a parametrului δ_{P} alături de ϵ_{HOMO} sau ϵ_{LEMO} îmbunătățește sensibil corelarea, ceea ce este în acord cu teoriile emise privind dependența capacității de fosforilare de sarcina pozitivă de la atomul de fosfor.

Deși în mai mică măsură decît parametri fizico-chimici parametri de orbitale moleculare corelabili cu activitatea biologică pot scoate în evidență factorii electronici determinanți în inhibarea colinesterazei:

- a) interacțiunea prin transfer de sarcină sau electrostatică cu centrul anionic,
- b) caracterul electrofil al atomului de fosfor,
- c) tăria legăturii implicate în fosforilare

Diagramele moleculare calculate de noi [842] pentru 12 vinil-fosfați și vinil-tiofosfați cu metoda HMO și cu varianta ω a acestei metode reprezintă argumente în sprijinul teoriei legăturii "bipozitive" a lui Pullman [840] prin care activitatea de inhibitor colinesterazici ai acestora este explicată prin deficitul de electron al legăturii care suferă hidroliza. (Figure 28).





2.5.2. Corelări cu parametri fizico-chimici

Vinil- și enol-fosfații cu structurile 1-15 (fig.27) a căror toxicitate a fost corelată cu parametrii de orbitale moleculare (paragraful anterior 2.5.1) pot fi caracterizați structural și prin parametri fizico-chimici: σ_1 - suma constantelor de substituent σ^{ϕ} pentru grupele alcoxi, σ_2 - număr de atomi cu perechi de electroni - Y; acceptori de protoni în punți de hidrogen, din grupele alcoxi, σ_3 - suma refracțiilor grupelor alcoxi, σ_4 - constanta Kabachnik, σ_5 - numărul de atomi Y; σ_6 - numărul de cicluri benzenice σ_7 - număr de grupe nitro și nitril în ciclul benzenic pentru caracterul aromatic (măsură a caracterului acceptor de electroni în complecși cu transfer de sarcină), σ_8 - refracție molară, σ_9 - diferența sterică minimă. Așadar, grupele alcoxi sînt caracterizate prin parametrii σ_{1-3} , iar grupa scil prin cei $\sigma_4 - \sigma_8$, parametrul σ_9 caracterizează steric compusul în ansamblu.

Parametrizarea celor 15 compuși conduce la valorile parametrilor din tabelul 39.

Tabelul 39.

Compus nr.	A_i^{exp}	$R_1 + R_2$			R_3					
		σ_1	σ_2	σ_3	σ_4	σ_5	σ_6	σ_7	σ_8	σ_9
1	1,56845	-0,24	2	14,58	0,574	1	0	0	25,36	6
2	1,18523	-0,42	3	23,88	2,884	1	0	0	40,37	5,5
3	0,99183	-0,24	2	14,58	1,980	1	1	0	54,27	11
4	0,41365	-0,24	2	14,58	2,160	1	0	0	45,41	10
5	1,40892	-0,24	2	14,58	1,490	1	1	0	49,72	12
6	-0,59176	-0,42	2	23,88	0,808	0	2	0	34,32	8
7	-0,51713	-0,24	2	14,58	0,335	0	1	0,5	58,58	14
8	0,01565	-0,24	2	14,58	1,245	0	1	0,5	39,19	9
9	0,93909	-0,24	2	14,58	1,555	2	2	0	65,83	10
10	1,30052	-0,24	2	14,58	3,270	2	2	0,5	70,70	7
11	0,57766	-0,24	2	14,58	0,729	1	0	0,5	23,76	5
12	1,55990	-0,24	2	14,58	4,068	1	1	0	54,59	11
13	-0,17559	-0,24	2	14,58	3,085	1	1	0	43,23	9
14	0,45483	-0,42	2	23,88	1,980	1	1	0	54,27	8
15	3,19829	-0,24	2	14,58	0,842	0	0	1	19,80	2

Aşa cum rezultă din tabelul 39 , corelări semnificative sînt de aşteptat în cazul utilizării parametrilor r_4 , r_8 şi r_9 .

Cu toate acestea, corelările uniparametrice

$$A_i^{calc} = F(r_i), \text{ unde } i = 4, 8, 9$$

pentru întreaga serie de 15 compuşi conduc la obţinerea unor ecuaţii corelaţionale cu valori slabe ale coeficienţilor de corelare, iar corelările multiparametrice sînt de asemenea nesemnificative.

Separarea celor 15 compuşi în două grupe:

a) 7 compuşi metil-substituiţi $(C_n H_{2n+1} O)_2 OP(O) C(CH_3) = CR_1 COOR$

(compuşii nr.1, 2, 4, 11, 13, 14, 15)

b) 8 compuşi fenil-substituiţi $(C_n H_{2n+1} O)_2 OP(O) C(C_6H_5) = CR_1 COOR$

(compuşii nr.3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12)

în care $n = 1, 2$, la fel ca în paragraful 2.5.1, a permis obţinerea unor corelări sensibil îmbunătăţite.

Cea mai bună corelare uniparametrică din seria (a) este $A_i^{calc} = F(r_9)$ în care $r = 0,857$:

$$A_i^{calc} = (-0,349 \pm 0,06).MSD + (3,301 \pm 0,399) \quad (1)$$

Considerarea suplimentară a altor parametri alături de r_9 , în corelări multiparametrice, nu are efect.

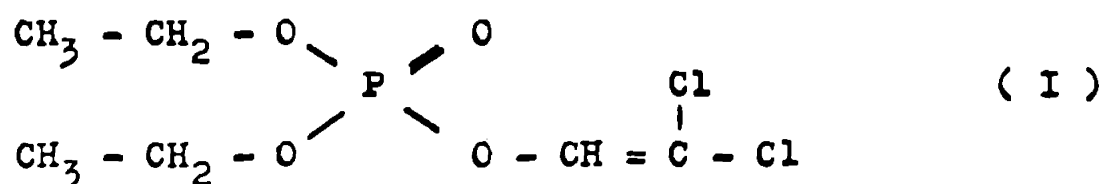
În seria (b) corelarea uniparametrică "cea mai bună" nu depăşeşte un $r = 0,795$ (pentru r_4) iar ecuaţia corelaţională biparametrică admite ca set optim de parametri pe cel (r_4 , r_8):

$$A_i^{calc} = (0,558 \pm 0,11) . r_4 - (0,394 \pm 0,24) \quad (2)$$

$$A_i^{calc} = 0,017 . r_8 + 0,485 . r_4 - 1,185 \quad (3)$$

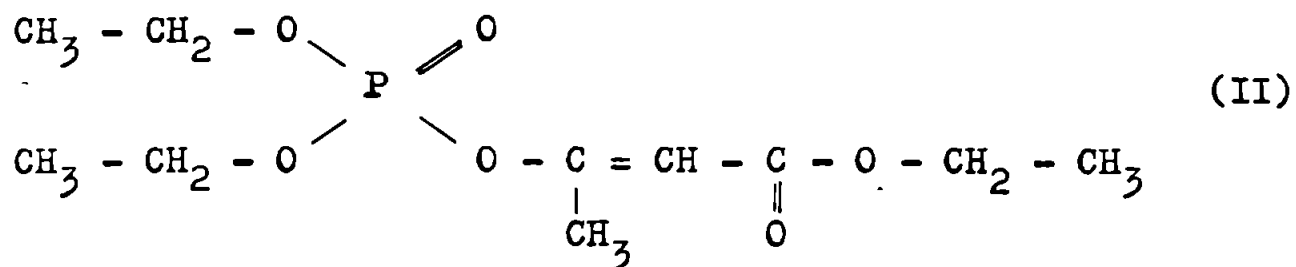
$$r = 0,825; \quad s = 0,394; \quad F = 5,68$$

Utilizarea ca standard în calculul diferenţelor sterice minime a compusului

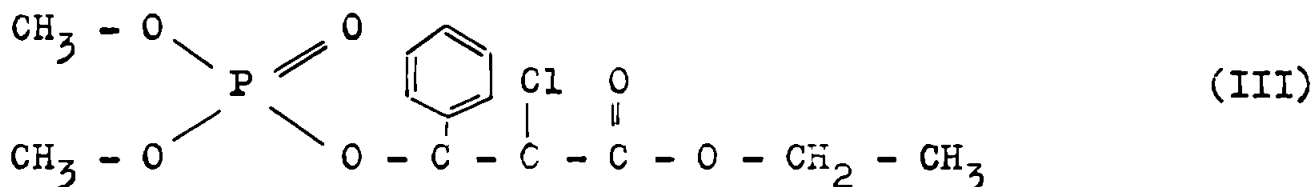


cu toxicitatea cea mai înaltă dintre toţi cei 15 compuşi nu a permis obţinerea unei corelări $A_i^{calc} = F(MSD)$, admisibilă decât pentru grupe (a) .

Plecînd de la ipoteza că pentru fiecare dintre cele două grupe de compuși trebuie considerat un standard distinct (ipoteză sugerată de faptul că atît în corelările cu parametrii de orbitale moleculare cît și în cele cu parametrii fizico-chimici grupele (a) și (b) se comportă diferit) am recalculat diferențele sterice minime pentru enol (vinil)- fosfații α -metil substituiți și respectiv enol(vinil)- fosfații α -fenil substituiți. Reprezentanții celor două serii de compuși, activitățile ca și parametrii noilor corelări sînt dați în tabelul 4o, iar standardele fixate sînt



și corespunzător



Corelările uniparametrice $A_i^{\text{calc}} = F(\text{MSD})$, care se obțin în foarte bune atît în cazul grupei de compuși α -metil substituiți cît și în cel al compușilor α -fenil substituiți:

$$A_i^{\text{calc}} = (-0,167 \pm 0,009) \cdot \text{MSD} + (1,472 \pm 0,05) \quad (4)$$

r = 0,064

$$A_i^{\text{calc}} = (-0,271 \pm 0,012) \cdot \text{MSD} + (1,766 \pm 0,05) \quad (5)$$

r = 0,974

Graficele acestor dependențe liniare sînt reprezentate în figurile 29 și 30.

Corelările biparametrice cu seturile (\hat{r}_4, \hat{r}_9) și ($\hat{r}_{3;8}, \hat{r}_9$) determină coeficienți de corelare superiori doar pentru seria (a) de compuși:

$$A_i^{\text{calc}} = 0,116 \cdot \hat{r}_4 - 0,175 \cdot \hat{r}_9 + 1,244 \quad (6)$$

$$r = 0,987 ; s = 0,091 ; F = 50,28$$

Tabelul 40.

Com- pus nr.	R ₁	R ₂	R ₃	A ₁ ^{exp}	σ_4	σ_{3+8}	σ_9
0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
1	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅) = CC1COOC ₂ H ₅	1,55990	4,068	69,16	0
2	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅) = CHCOOC ₂ H ₅	1,40892	1,490	54,30	1,5
3	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(C ₆ H ₅) = CHOC ₆ H ₄ NO ₂	1,37429	1,555	89,71	2
4	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(C ₆ H ₅) = CC1COOC ₂ H ₅	1,35521	4,068	78,47	2
5	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅) = CC1OC ₆ H ₄ NO ₂	1,30052	3,270	85,28	2
6	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅) = CHOC ₆ H ₄ NO ₂	0,93909	1,555	80,41	3
7	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(C ₆ H ₅) = CHCOOC ₂ H ₅	0,48448	1,429	73,60	4
8	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(C ₆ H ₅) = CHCl	0,93909	1,245	63,07	6
9	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(C ₆ H ₅) = CHC ₆ H ₅	-0,51713	0,335	73,16	9
10	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(C ₆ H ₅) = CH ₂	-0,59176	0,808	58,20	7,5
1	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(CH ₃) = C(C ₆ H ₅) CN	-0,17559	3,085	57,81	10,0
2	-OC ₂ H ₅	-OC ₂ H ₅	-C(CH ₃) = C(C ₆ H ₅) CN	0,12742	3,085	67,11	8
3	-OCH ₃	-OCH ₃	-C(CH ₃) = C - COOC ₂ H ₅ CH ₂ COOC ₂ H ₅	0,41365	2,16	59,11	7

Tabelul 40.

0.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
4	$-\text{OC}_2\text{H}_5$	$-\text{OC}_2\text{H}_5$	$-\text{C}(\text{CH}_3) = \text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)\text{COOC}_2\text{H}_5$	0,45483	1,980	78,15	6
5	$-\text{OCH}_3$	$-\text{OCH}_3$	$-\text{C}(\text{CH}_3) = \text{CHCOCH}_3$	0,577660	0,719	38,34	4
6	$-\text{OC}_2\text{H}_5$	$-\text{C}(\text{CH}_3)$	$-\text{C}(\text{CH}_3) = \text{CHCOCH}_3$	0,99271	0,729	47,64	2
7	$-\text{OC}_2\text{H}_5$	$-\text{OC}_2\text{H}_5$	$-(\text{Cl})\text{C}(\text{CH}_3)\text{CHClCOOC}_2\text{H}_5$	1,18523	2,884	64,25	1,5
8	$-\text{OC}_2\text{H}_5$	$-\text{OC}_2\text{H}_5$	$-\text{C}(\text{CH}_3) = \text{CClCOOC}_2\text{H}_5$	1,58574	3,566	58,76	1,0

$$A_i^{calc} = 0,006 \cdot \tilde{v}_{3;8} - 0,173 \cdot \tilde{v}_9 + 1,137 \quad (7)$$

$$r = 0,971; s = 0,136; F = 21,99$$

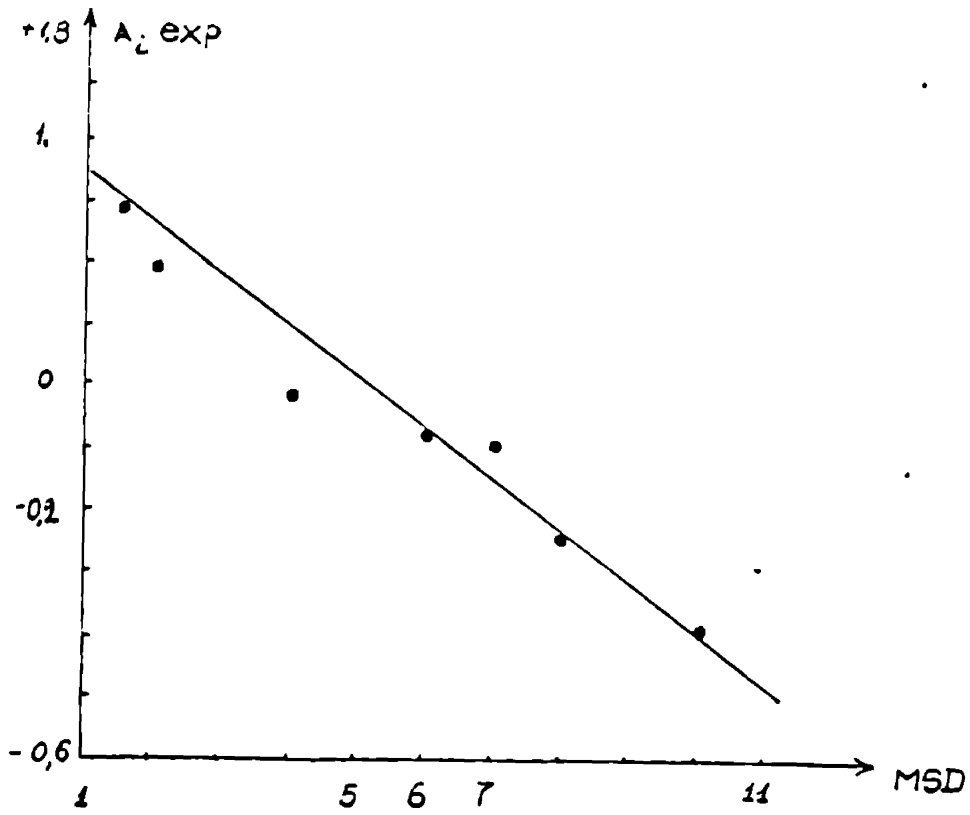


Fig.29

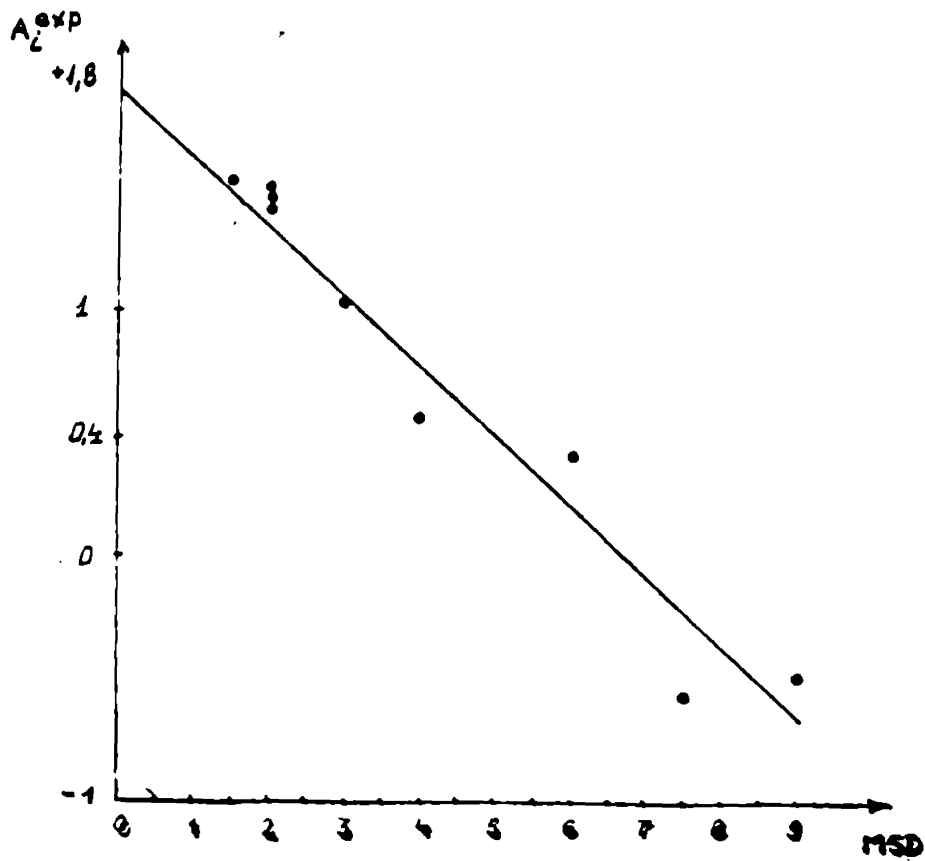


Fig.30

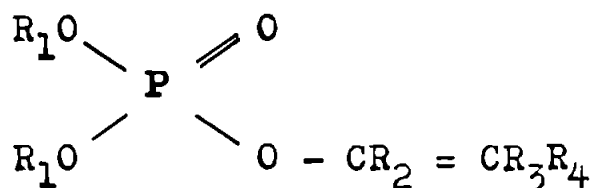
Corelările reușite prin separarea enol (vinil) fosfaților în grupe distincte a compușilor α metil- de cei α -fenil substituiți și prin considerarea standardelor (II) și (III) ne determină să avansăm ipoteza că la vinil(enol) fosfați, modul în care are loc "recunoașterea" acestora de către situsul activ este condiționat steric diferit, după cum în grupa acil - $OCR_1 = CR_2R_3$

substituentul R_1 este CH_3 sau C_6H_5

Diferența reperelor sterice optimale este cauzată probabil, de particularitățile de realizare a complexității grupei acil față de zonele hidrofobe din vecinătate centrului esteric.

2.5.3. Corelări structură-activitate biologică în seria vinil-fosfaților prin metoda Free-Wilson

Pentru o serie de 16 compuși organofosforici, pesticide din clasa vinil fosfaților, cu formula generală



s-a încercat corelarea toxicității ($-\log DL_{50}$) reprezentanților cu structura lor chimică prin metoda Free-Wilson. În acest scop s-au fixat patru segmente în care are loc variația de substituent. Numărul substituenților a căror contribuție în determinarea valorii activității biologice, alături de aceea a scheletului molecular, trebuie determinată: 14.

Alternanța substituenților în cele patru poziții, în cadrul seriei considerate este redată în tabelul 41.

Sistemul de ecuații construit în considerarea contribuției aditive a segmentelor moleculare și a scheletului molecular este următorul:

$$\left\{ \begin{array}{ll} 1,568 = 2.A + D + F + L + \mu & (1.a) \\ 1,586 = 2.B + D + G + M + \mu & (1.b) \\ 0,992 = 2.A + D + H + M + \mu & (1.c) \\ 1,408 = 2.A + E + F + M + \mu & (1.d) \\ -0,016 = 2.A + E + F + I + \mu & (1.e) \\ 0,323 = 2.B + E + F + I + \mu & (1.f) \\ 0,578 = 2.A + D + F + K + \mu & (1.g) \\ 0,992 = 2.B + D + F + K + \mu & (1.h) \end{array} \right.$$

$$\begin{cases}
 0,484 = 2.B + E + F + M + \mu & (1.i) \\
 1,560 = 2.A + E + G + M + \mu & (1.j) \\
 1,355 = 2.B + E + G + M + \mu & (1.k) \\
 -0,176 = 2.A + D + H + J + \mu & (1.l) \\
 0,127 = 2.B + D + H + J + \mu & (1.m) \\
 0,455 = 2.B + D + H + M + \mu & (1.n) \\
 1,374 = 2.B + H + F + N + \mu & (1.o) \\
 1,301 = 2.A + E + G + N + \mu & (1.p)
 \end{cases}$$

iar ecuațiile de restricție:

$$\begin{cases}
 8.A + 8.B = 0 & (2.a) \\
 8.D + 8.E = 0 & (2.b) \\
 9.F + 3.I + 4.H = 0 & (2.c) \\
 2.I + 2.J + L + 7.M + 2.K + 2.N = 0 & (2.d)
 \end{cases}$$

Tabelul 41

1		2		3				4				
CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₆ H ₅	H	Cl	C ₆ H ₅	Cl	CN	COCH ₃	COOCH ₃	COOC ₂ H ₅	OC ₆ H ₄ NO ₂
*		*		*						*		
	*	*			*						*	
*		*				*					*	
*			*	*				*				
	*		*	*				*				
*		*		*					*			
	*	*		*					*			
	*		*	*							*	
*			*		*						*	
	*		*		*						*	
*		*				*		*				
	*	*				*		*				
	*	*				*						
	*		*	*		*						*
*			*		*							*
A	B	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N

Sistemul de 16 ecuații cu 16 necunoscute care rezultă din considerarea sistemelor 1 și 2 este următorul:

$$\begin{cases}
 1,568 = - 2.B - E + F + L + \mu & (3.a) \\
 1,586 = 2.B - E + I + M + \mu & (3.b) \\
 0,992 = - 2.B - E - 0,75.G - 2,25.F + M + \mu & (3.c) \\
 1,408 = - 2.B + E + F + M + \mu & (3.d) \\
 -0,016 = - 2.B + E + F + I + \mu & (3.e) \\
 0,323 = 2.B + E + F + I + \mu & (3.f) \\
 0,578 = - 2.B + E + F + L + \mu & (3.g) \\
 0,992 = 2.B - E + F + L + \mu & (3.h) \\
 0,484 = 2.B + E + F + M + \mu & (3.i) \\
 1,560 = - 2.B + E + I + M + \mu & (3.j) \\
 1,355 = 2.B + E + I + M + \mu & (3.k) \\
 -0,176 = - 2.B - E - 0,75.G - 2,25.F + J + \mu & (3.l) \\
 0,127 = 2.B - E - 0,75.G - 2,25.F + J + \mu & (3.m) \\
 0,455 = 2.B - E - 0,75.G - 2,25.F + M + \mu & (3.n) \\
 1,374 = 2.B + E + F - I - J - 1,5.L - 3,5.M + \mu & (3.o) \\
 1,301 = - 2.B + E + G - I - J - 1,5.L - 3,5.M + \mu & (3.p)
 \end{cases}$$

Acest sistem a fost rezolvat cu un program scris și adaptat pentru calculatorul FELIX C-256 cu ajutorul lui R.D.Pop de la I.M.F. Cluj.

Contribuțiile de grup calculate sînt date în tabelul 42.

Tabelul 42.

A	B	D	E	F	G	H
-0,051	0,051	0,214	-0,214	-0,159	0,490	0,090
I	J	K	L	M	N	μ
-0,642	-1,585	-0,570	0,410	-0,420	0,463	1,204

În tabelul 43 sînt prezentate valorile: A_i^{exp} , A_i^{calc} și $A_i^{exp} - A_i^{calc}$ determinate cu contribuțiile de grup rezultate din rezolvarea sistemului.

Analiza statistică a corelării efectuate a furnizat un coeficient de corelare $r = 0,962$, valoarea 24,23 pentru testul F și 0,914 pentru testul E. V.

Pentru 4 din cei 16 compuși, valorile calculate ale activității biologice diferă mult de valorile experimentale.

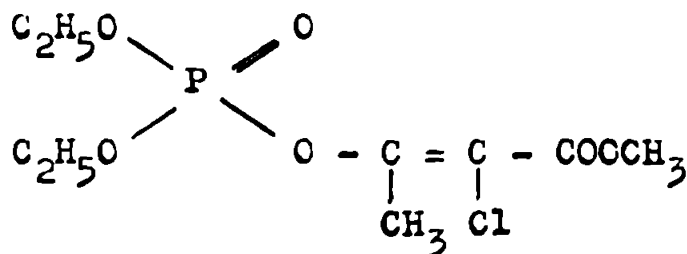
Luînd în considerare doar ceilalți 12 compuși se obține un coeficient de corelare $r = 0,993$ iar $F = 468,21$ și $E.V. = 0,997$

Tabelul 43.

Nr.	A_i^{exp}	A_i^{calc}	$A_i^{exp} - A_i^{calc}$
1	1,567	1,568	0,001
2	1,586	1,590	-0,004
3	0,992	0,986	0,004
4	1,408	0,784	0,624
5	-0,016	-0,011	-0,005
6	0,323	0,197	0,126
7	0,578	0,587	-0,009
8	0,992	0,791	0,201
9	0,484	0,507	-0,023
10	1,560	0,938	0,622
11	1,355	1,070	0,285
12	-0,176	-0,179	0,003
13	0,127	0,025	0,102
14	0,455	1,190	-0,735
15	1,374	1,376	-0,002
16	1,301	1,841	-0,540

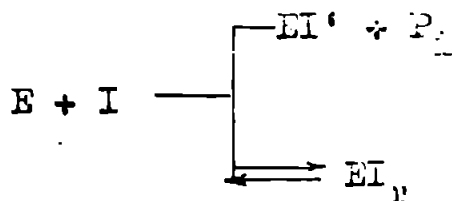
După cum relevă datele tabelului 43, principalele contribuții în stabilirea valorii activității biologice le oferă, corespunzător celor 4 fragmente moleculare, substituenții C_2H_5 , CH_3 , Cl și respectiv CN .

Pe baza contribuțiilor de grup cu valoare maximă din fiecare segment, deduse prin metoda Free-Wilson, compusul cu toxicitate maximă poate fi identificat cu structura



2.6. Corelări structură-activitate anticolinesterazică
la compuşii organofosforici din clasa
S - alchil difenil tiofosfinaţi

Brestkin și colaboratorii [146-147] au arătat că S-alchil difenil tiofosfinații realizează o acțiune de inhibare colinesterazică atât cu caracter reversibil cât și ireversibil. Inhibarea reversibilă decurge rapid și nu se modifică în timp, putând fi caracterizată prin constanta de disociere a complexului ferment-inhibitor, K_i , și prin constanta de viteză a procesului de inhibare, k_2 . Inhibarea ireversibilă decurge progresiv și poate fi descrisă prin constanta de viteză a reacției bimoleculare. Această modalitate complexă de inhibare a colinesterazei corespunde schemei de mecanism propusă de Aldridge și Reiner [845]



în care E este enzima, I - inhibitorul organofosforic, EI' - enzima fosforilată, iar EI_r complexul enzimă-inhibitor format prin procesul reversibil.

Sintetizînd o serie de derivați din seria S-alchil difenil tiofosfinaților



Agobekyan și colaboratorii [149] au confirmat acest mecanism al acțiunii anticolinesterazice și au evidențiat dependența capacității de inhibare de lungimea și gradul de ramificare a radicalului alchilic din gruparea alchilică. Influența acestor factori este legată de mecanismul intim al activității biologice care are în vedere sorbția hidrofobă pe suprafața activă a fermentului și de capacitatea de fosforilare a inhibitorului. Autorii menționați au stabilit dependențe de natură calitativă între mărimile ce caracterizează termodinamic și cinetic etapele

procesului de fosforilare ale enzimei și numărul de atomi de C din radicalul alctiolic, subliniind comportări diferite în cazul radicalilor cu catenă normală față de cei cu catenă ramificată.

Plecînd de la aceste rezultate ne-am propus [813] evaluarea cantitativă a influențelor diferiților parametrii structurali asupra acțiunii anticolinesterazice a unor S-alchil difenil tiofosfinași (1) pentru a aduce precizări legate de activitatea biologică a acestui tip de C.O.F.

Evoluția procesului de inhibare a colinesterazelor este urmărită prin valorile constantelor de echilibru ale procesului ireversibil K_1 și respectiv reversibil K_2 de inhibare și prin valorile constantelor de viteză k . Logaritmul acestor mărimi (tabelul 44) este corelat cu constanta ρ - Hammett [643] parametrului de hidrofobicitate Hansch, π , π^2 , [716] refracției molare [813], constante sterice Taft [699] și diferențe sterice minime, MSD [707].

S-a avut în vedere atât acțiunea antiacetilcolinesterazică cât și cea antibutilcolinesterazică.

Parametrii MSD au fost determinați față de standarde diferite, corespunzînd celor două colinesteraze (compusul 5 și respectiv 9).

Valorile parametrilor utilizați în corelare sînt redete în tabelul 45.

Tabelul 44.

Nr.	R	Acetilcolinesteraze			Butilcolinesteraze		
		log k	log K_1	log K_2	log k	log K_1	log K_2
1	CH ₃	2,3424	-3,4437	-4,1135	2,0792	-4,5850	-4,3665
2	C ₂ H ₅	2,6902	-3,7212	-4,3372	2,1761	-4,8539	-4,4559
3	C ₃ H ₇	3,0792	-4,4948	-4,7212	2,2787	-5,1192	-4,4314
4	C ₄ H ₉	3,3979	-4,8861	-5,2076	2,3424	-5,3010	-4,7447
5	C ₅ H ₁₁	3,6628	-5,1425	-5,3665	2,3802	-5,3665	-4,7695
6	C ₆ H ₁₃	3,7634	-5,1938	-5,5376	2,3979	-5,5528	-4,8539
7	i-C ₃ H ₇	1,4771	-3,3010	-3,6990	2,4624	-4,7959	-4,3468
8	i-C ₄ H ₉	1,6990	-3,8539	-3,7447	2,9294	-5,2148	-4,4318
9	i-C ₅ H ₁₁	1,8451	-4,0062	-3,9208	3,4314	-5,4948	-4,6576

Tabelul 45.

Nr.	ρ	$\hat{\rho}$	$\hat{\rho}^2$	MR	(MR) ²	E_S	MSD ₁	MSD ₂
1	0	0,5	0,25	5,65	31,96	0	5	4
2	-0,10	1,0	1,00	10,30	106,09	-0,07	4	3
3	-0,115	1,5	2,25	14,96	223,95	-0,36	3	2
4	-0,130	2,0	4,00	19,58	383,57	-0,39	2	3
5	-0,162	1,9	3,61	24,25	588,06	-0,40	1	4
6	-0,162	2,4	5,76	28,85	832,60	-0,40	0	5
7	-0,190	1,3	1,69	14,96	223,95	-0,47	7	6
8	-0,125	1,8	3,24	19,62	384,94	-0,93	6	5
9	-0,162	2,1	4,75	24,28	589,52	-1,35	5	0

S-au efectuat corelări uniparametrice

$$\left. \begin{array}{l} \log K_1 \\ \log K_2 \\ \log k \end{array} \right\} = A_i^{\text{calc}} = a \cdot X_i + b \quad (1)$$

sau biparametrice

$$A_i^{\text{calc}} = a \cdot X_i + b \cdot Y_i + c \quad (2)$$

utilizînd biblioteca de programe a unui calculator HEWLETT - PACKARD

Corelările uniparametrice cu cei mai înalți coeficienți de corelare se obțin utilizînd parametrul MSD, pentru acetil colinesterază (ecuațiile 3-5 și figurile 31-33) și parametrii $\hat{\rho}$ și E_S , pentru butilcolinesterază (ecuațiile 6-8 și figurile 34-36).

$$\log k_i = (0,287 \pm 0,027) \cdot \text{MSD}_i - (5,288 \pm 0,115) ;$$

$$r = 0,923 \quad (3)$$

$$\log K_{1i} = (0,287 \pm 0,027) \cdot \text{MSD}_i - (5,288 \pm 0,095) ;$$

$$r = 0,932 \quad (4)$$

$$\log K_{2i} = (0,299 \pm 0,011) \cdot \text{MSD}_i - (5,614 \pm 0,049) ;$$

$$r = 0,984 \quad (5)$$

$$\log k_i = (-1,003 \pm 0,036) \cdot E_S + (2,010 \pm 0,024) ;$$

$$r = 0,989 \quad (6)$$

$$\log K_{1i} = (-0,535 \pm 0,031) \cdot \hat{\rho} - (4,275 \pm 0,054) ;$$

$$r = 0,973 \quad (7)$$

$$\log K_{2i} = (-0,257 \pm 0,048) \cdot \hat{\rho} - (4,145 \pm 0,082) ;$$

$$r = 0,803 \quad (8)$$

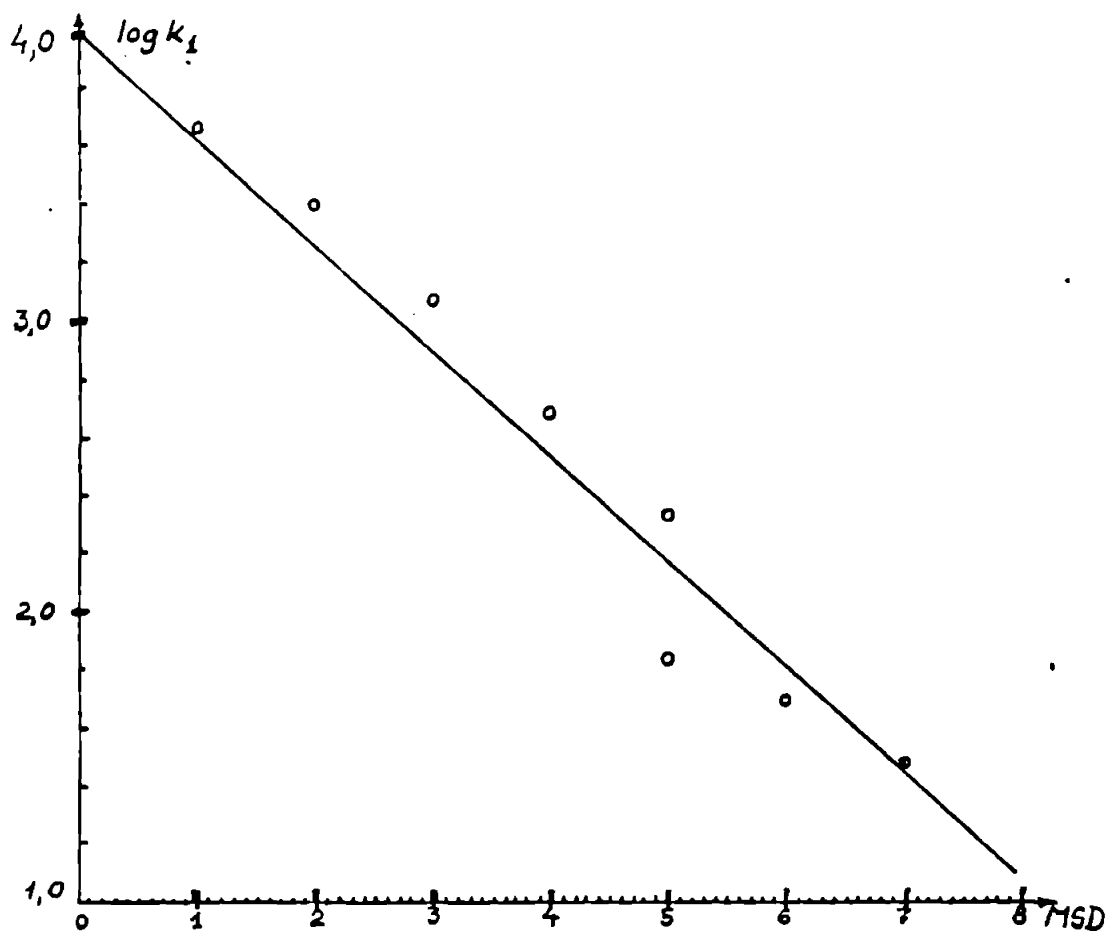


Fig.31

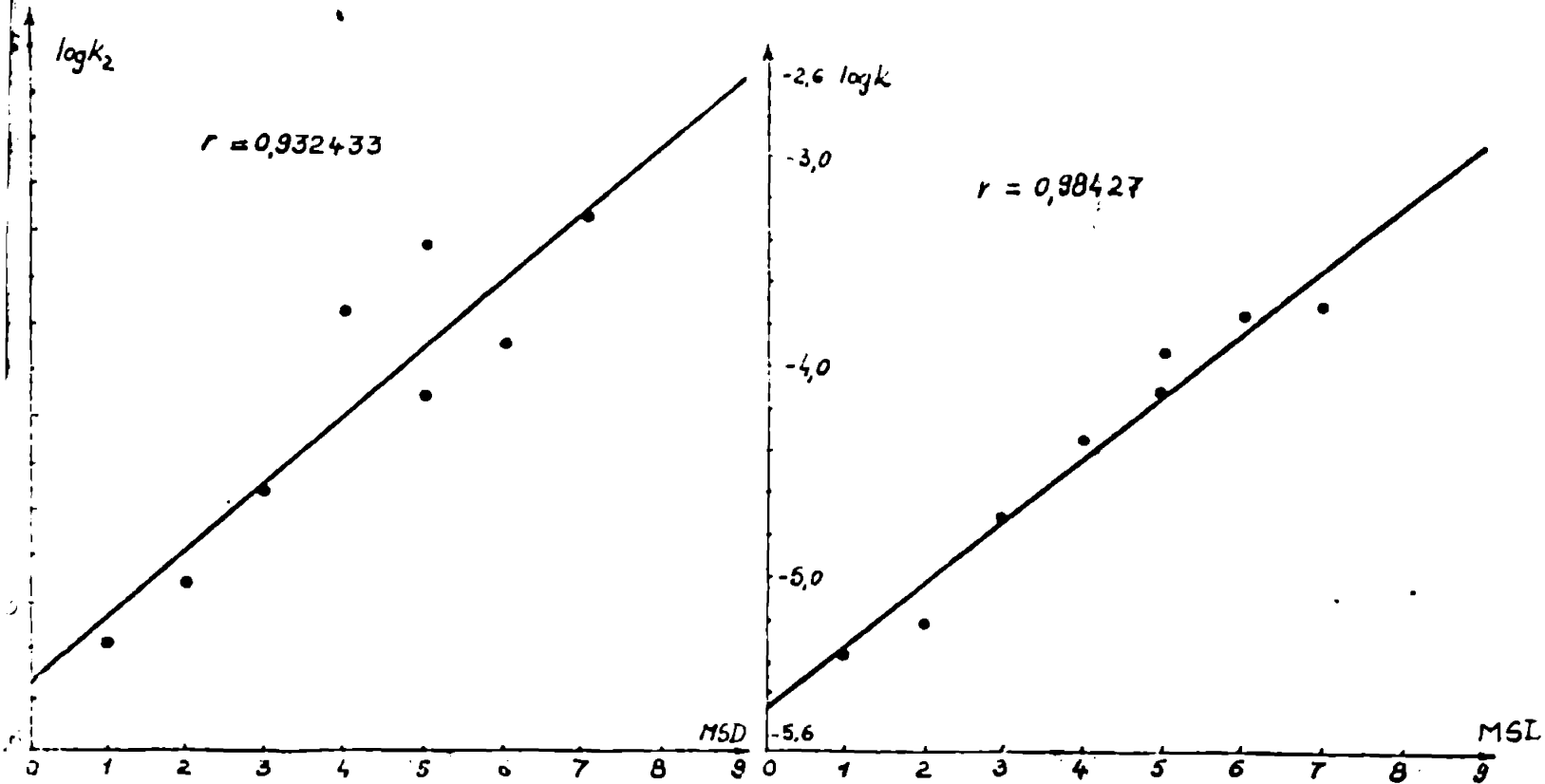


Fig.32.

Fig.33.

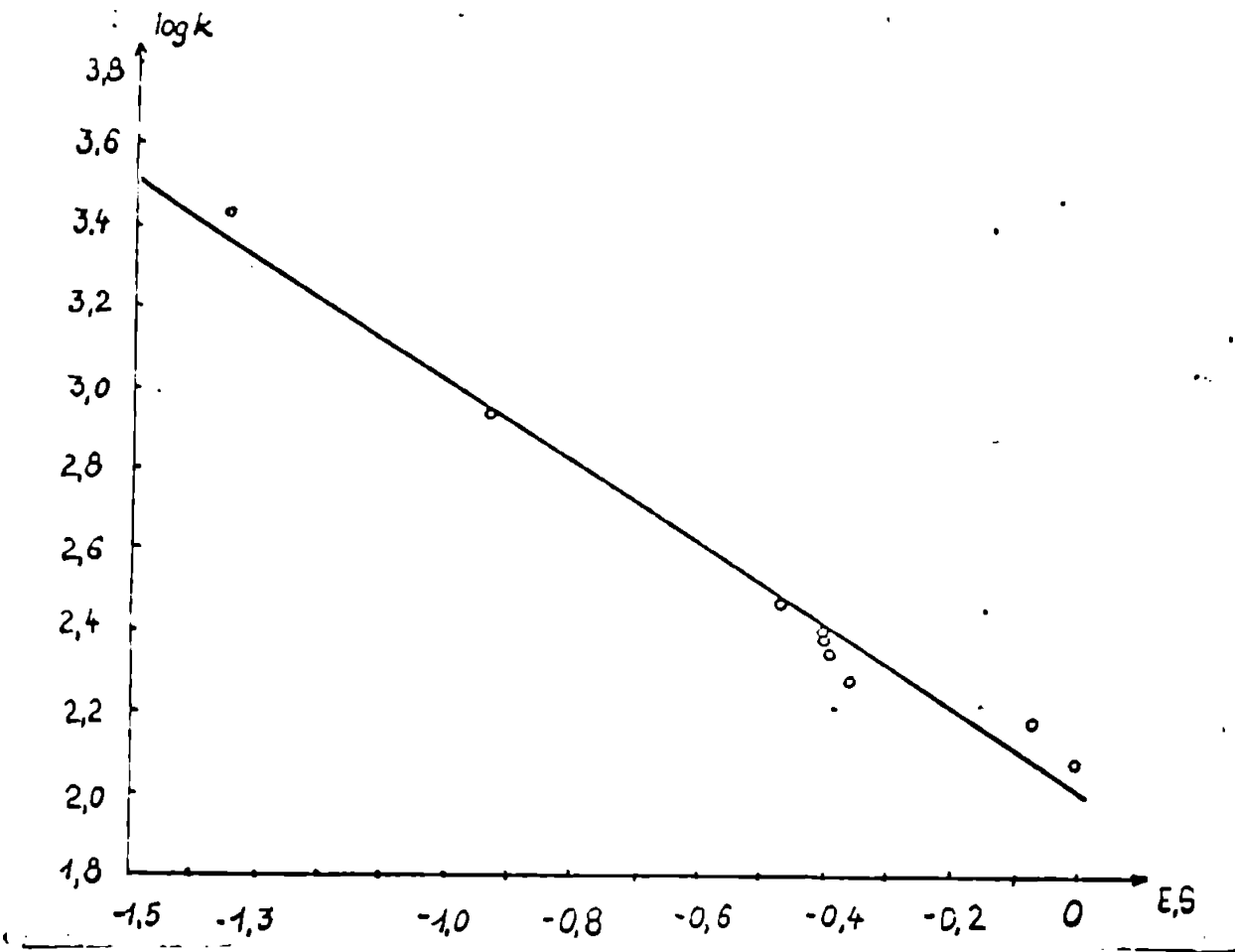


Fig. 34.

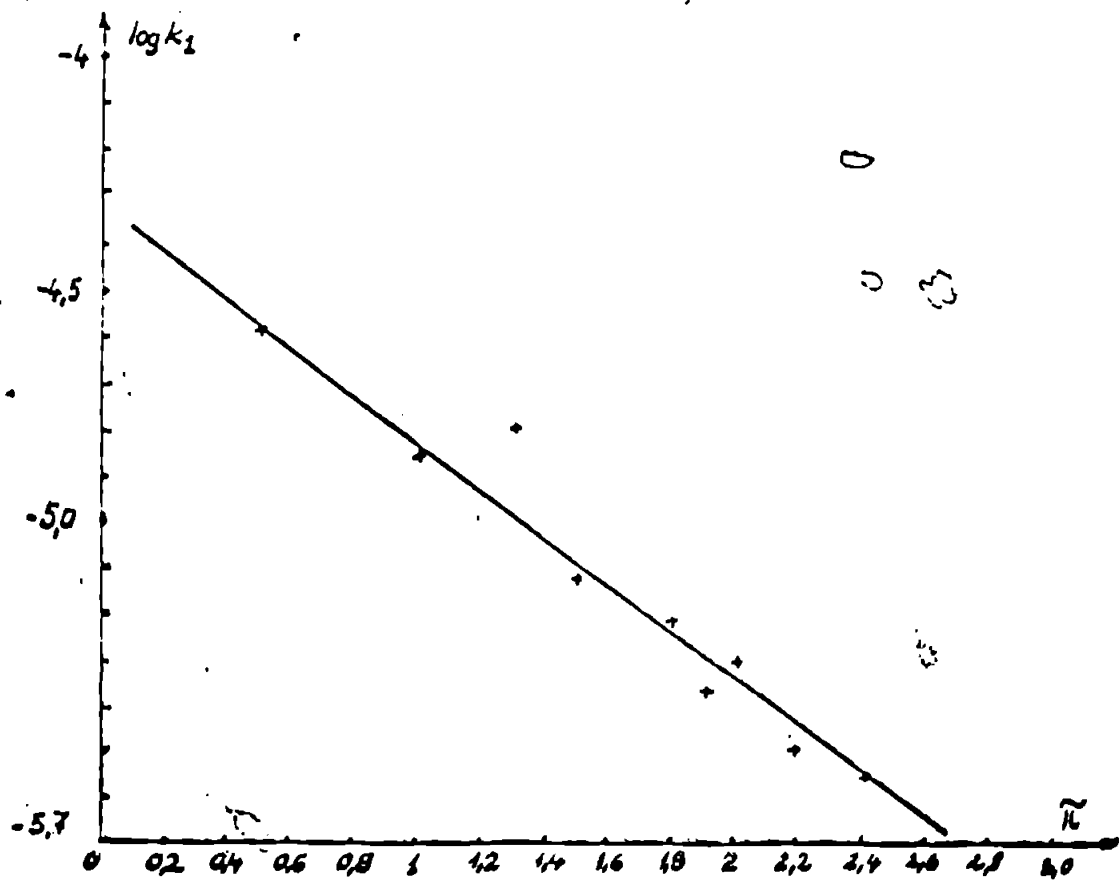


Fig. 35

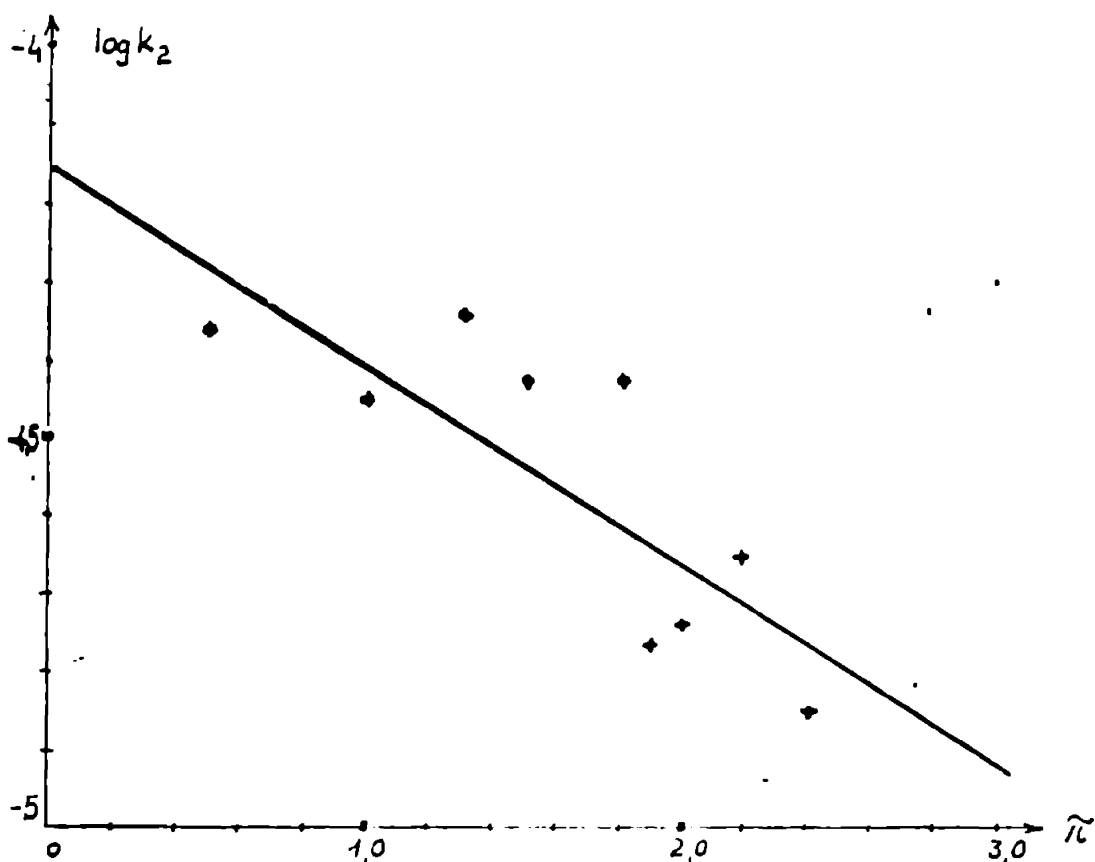


Fig. 36.

Tabelul 46.

A_i^{calc}	a	X_i	b	Y_i	C	r	s	F
log k	-0,026	R	-0,406	MSD	4,623	0,994	0,089	137,63
AcCol	0,389	\tilde{r}	-0,343	MSD	4,108	0,993	0,234	117,79
	-0,287	\tilde{F}	-0,399	MSD	4,591	0,992	0,113	102,91
log K_2	0,269	\tilde{r}	0,299	MSD	-5,577	0,984	0,125	50,83
AcCol.	0,048	$\tilde{\pi}$	0,306	MSD	-5,716	0,985	0,124	54,30
	0,005	R	0,308	MSD	-5,737	0,985	0,122	54,30
	-0,144	E_S	0,293	MSD	-5,659	0,988	0,112	68,19
log K_1	-0,043	R	0,044	MSD	-4,533	0,983	0,060	47,77
BuCol	-0,523	$\tilde{\pi}$	0,026	MSD	-4,390	0,983	0,059	47,77
	-1,234	\tilde{r}	-0,619		-4,298	0,983	0,068	47,77
log K_2	-1,471	\tilde{r}	-0,030	R	-4,205	0,873	0,094	6,79
BuCol	-0,358	\tilde{F}	-0,235	E_S	-4,096	0,896	0,094	6,79
	-0,028	R	-0,200	E_S	-4,147	0,899	0,085	7,02

Considerarea suplimentară a celorlalți parametri \tilde{r} , $\tilde{\pi}$, R, E_S , alături de MSD în corclări biparametrice cu A_i^{calc} conduce la coeficienți de corelare superiori celor corespunzând ecuațiilor (3-8), pentru seturile de parametrii indicate în tabelul 46.

Analiza corelațiilor uniparametrice ca și a celor 72 de ecuații biparametrice determinate pentru diferitele seturi de parametrii [818] ne-a condus la o serie de concluzii.

În inhibarea acetil- și butilcolinesterazei cu S-alchil difenil tiofosfinați, un rol însemnat îl joacă atât prezența grupelor fenil cât și lungimea și așezarea sterică a radicalilor alchilici. Avînd în vedere că în corelările realizate parametrii MSD, $\tilde{\tau}$, R și E_S , au contribuții importante, se confirmă ipoteza că în cazul acestor compuși organofosforici sorbția hidrofobă joacă un rol decisiv. Este de presupus că situsul receptor se prezintă ca o cavitate elastică, care se adaptează în anumite limite naturii inhibitorului; forma optimă a acesteia se realizează în funcție de posibilitățile de orientare și suprapunere pe suprafața enzimei în cadrul sorbției hidrofobe a radicalilor fenil și alchil. Suprapunerea cu sorbție hidrofobă intensă este determinată atât de volumul radicalilor și de caracterul lor hidrofob cât și de disponibilitățile sterice care fac posibilă adoptarea conformației cerute de dispunerea centrelor active ale enzimei. O asemenea structură a situsului explică modificările sensibile ale activității anticolinesterazice prin trecere de la radicalii alchilici cu catenă normală la cei ramificați precum și în funcție de lungimea lanțului.

Faptul că în cazul acetilcolinesterazei corelările cu parametrul MSD dau rezultate bune pledează pentru o relativă rigiditate a situsului receptor al acestei enzime, spre deosebire de butilcolinesterază, la care dependența pregnantă a constantei de viteză de constanta sterică Taft, E_S indică o rigiditate mare a constelației catalitice a enzimei.

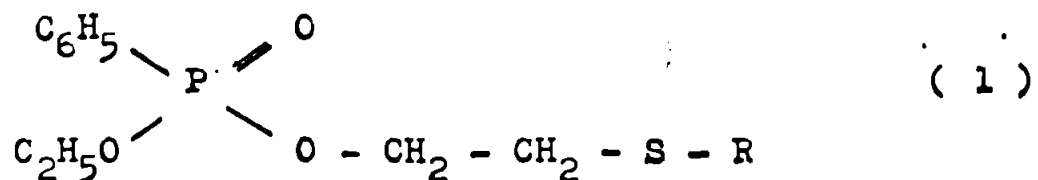
2.7. Corelări structură - activitate anticolinesterazică
la compuși organofosforici din clasa
O-Alchil-O-(2- alchil mercaptoetil) fenil fosfonați

2.7.1. O-etil-O-(2-alchil mercaptoetil) fenil fosfonați

În cazul S-alchil difenil tiofosfonaților s-a evidențiat [149] faptul că în inhibarea colinesterazică sorbția hidrofobă pe suprafața fermentului conduce la formarea unui complex ferment-inhibitor netransformabil sau în foarte mică măsură transformabil în ferment fosforilat, ceea ce determină caracterul reversibil al inhibării. Un rol însemnat în stabilirea căii reversibile de acțiune a inhibitorului îl are în acest caz și capacitatea scăzută de fosforilare electrofilă.

Pentru precizarea modalității de răspuns a situsului receptor față de naturi diferite ale substratului inhibitor și pentru stabilirea limitelor în care se păstrează caracterul reversibil al inhibării s-a studiat efectul înlocuirii grupelor fenil. Astfel, Kabachnic și colaboratorii [110] au studiat activitatea anticolinesterazică a O-etil metil tiofosfonaților precum și pe aceea a O-etil-O-(2-alchil mercaptoetil) și a O-alchil-O-(2-metil mercaptoetil) - fenil fosfonaților [150]. Autorii au arătat că activitatea anticolinesterazică a acestor compuși este dependentă de capacitatea de sorbție a radicalilor alchilici hidrofobi atât S- cât O- legați și că lungimea lanțului alchilic influențează preponderent sorbția pe zone hidrofobe ale centrului anionic al enzimei.

Corelările cantitative structură-acțiune anticolinesterazică pe care le-am efectuat [816] pentru O-etil-O-(2-alchil mercaptoetil)-fenil fosfonați (I)



și propun stabilirea setului optim de parametri structurali în măsură să descrie cât mai fidel forma situsului receptor și răspunsul specific determinat de un anumit tip de inhibitor. Seturile de parametri optimi au fost selectate pe baza ecuațiilor corelaționale cu cei mai înalți indici de corelare. Parametrii de corelare utilizați, constante ρ - Hammett [643], constante de hidrofobicitate π , τ , [716], refracții molare, R, [813],

constante sterice, E_S , [599], și diferențele sterice minime MSD [707], sînt redați în tabelul 47.

Tabelul 47.

R	log K		σ	π	π^2	R	R^2	E_S	MSD
	BuCol	AcCol							
CH ₃	-3,9208	-3,0605	0	0,5	0,25	5,65	31,16	0	0
C ₂ H ₅	-4,0458	-3,5850	-0,10	1,0	1,00	10,30	106,09	-0,07	1
C ₃ H ₇	-4,4145	-3,8239	-0,12	1,5	2,25	14,96	223,95	-0,36	2
C ₄ H ₉	-4,7212	-4,8239	-0,13	2,0	4,00	19,58	383,57	-0,39	3
C ₅ H ₁₁	-4,9788	-4,8182	-0,16	1,9	3,61	24,25	588,16	-0,40	4
C ₆ H ₁₃	-5,9586	-4,8386	-0,16	2,4	5,76	28,85	832,60	-0,40	5

Corelarea uniparametrică a activității antiacetilcolinesterazică cu parametrul R conduce la acușia corelațională

$$\log K = (-0,084 \pm 0,009) \cdot R - (2,714 \pm 0,17)$$

$$r = 0,940$$

(1)

reprezentată în figura 37.

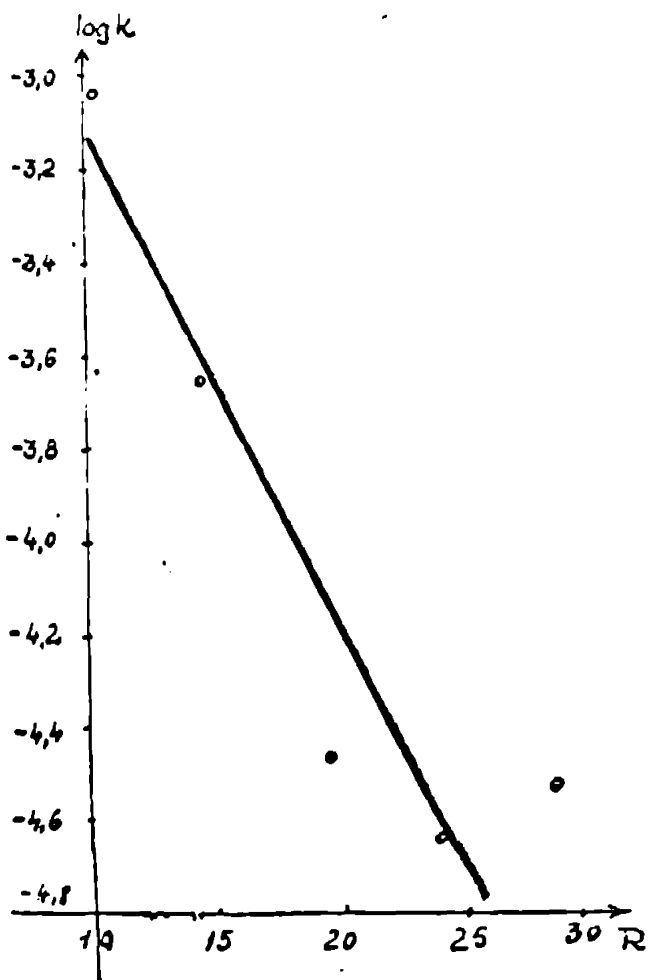


Fig. 37.

Examinînd rezultatele obținute se constată că pentru corelările cu activitățile de inhibare ale acetilcolinesterazei se obțin coeficienți de corelare net superiori față de cele cu activitățile antibutilcolinesterazice.

Seturile de parametrii structurali cu care se stabilesc corelări biparametrice semnificative, la inhibarea acetilcolinesterazei, conțin pe σ , R și MSD așa după cum arată și ecuațiile corelaționale (2-4):

$$\log K = -6,046.\tilde{\nu} - 0,119.R - 3,285 \quad (2)$$

$$r = 0,977; s = 0,656; F = 13,99$$

$$\log K = -6,021.\tilde{\nu} - 0,553.MSD - 3,960 \quad (3)$$

$$r = 0,977; s = 0,661; F = 13,99$$

$$\log K = 0,029.R - 0,003.R^2 - 4,009 \quad (4)$$

$$r = 0,986; s = 0,638; F = 23,31$$

In cazul inhibării butil colinesterazei seturile de parametri ce stabilesc cele mai bune corelări sînt ($\tilde{\nu}$, R) și ($\tilde{\nu}$, MSD) (ecuațiile 5 și 6):

$$\log K = -6,512.\tilde{\nu} - 0,453.MSD - 3,453 \quad (5)$$

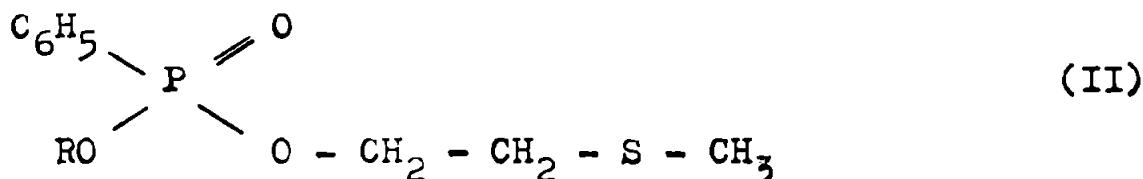
$$r = 0,896; s = 0,930; F = 2,71$$

$$\log K = -6,546.\tilde{\nu} - 0,098.R - 3,341 \quad (6)$$

$$r = 0,896; s = 0,474; F = 2,71$$

2.7.2. O-alkil - O-(2-metil mercaptoetil)- fenil fosfonați

In cazul O-alkil-O-(2-metil mercaptoetil)-fenil fosfonaților (II) :



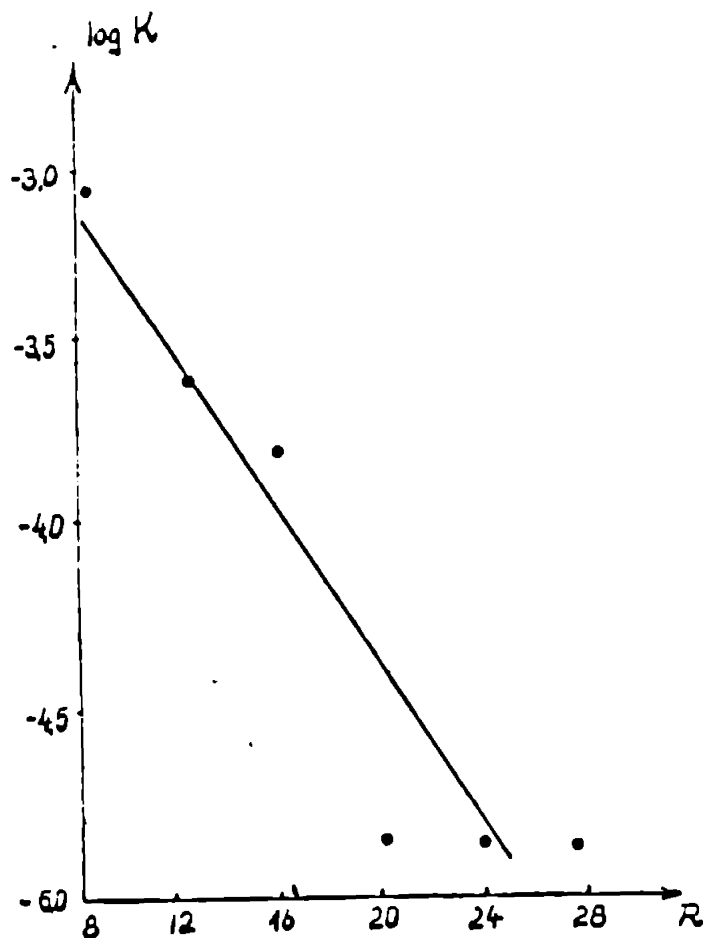
valorile mărimii corelate (log K) și ale parametrilor de corelare sînt date în tabelul 48.

Tabelul 48.

R	log K		$\tilde{\nu}$	$\tilde{\pi}$	$\tilde{\pi}^2$	R	R ²	E _S	MSD
	BuCol	AcCol							
C ₂ H ₅	-3,9208	-3,0605	-0,10	1,0	1,00	10,30	106,09	-0,07	0
C ₃ H ₇	-4,6478	-3,6478	-0,12	1,5	2,25	14,96	223,95	-0,36	1
C ₄ H ₉	-5,8539	-4,4437	-0,13	2,0	4,00	19,58	383,57	-0,39	2
C ₅ H ₁₁	-4,4202	-4,6383	-0,16	1,9	3,61	24,25	588,06	-0,40	3
C ₆ H ₁₃	-4,5229	-4,4948	-0,16	2,4	5,76	28,85	832,60	-0,40	4

Corelarea uniparametrică $\log K = f(R)$ stabilește ecuația corelațională (7) (figura 38).

Figura 38.



$$\log K = (-0,083 \pm 0,013) \cdot R - (2,427 \pm 0,26) \quad (7)$$

$$r = 0,900 \quad (7)$$

În cazul inhibării acetilcolinesterazei, corelările biparametrice cu seturile (\tilde{V}, E_S) , (R, E_S) și (MSD, E_S) dau cei mai înalți coeficienți de corelare:

$$\log K = 13,838 \cdot \tilde{V} + 2,115 \cdot E_S - 1,507 \quad (8)$$

$$r = 0,957; s = 0,216; F = 3,616$$

$$\log K = -0,05 \cdot R + 2,171 \cdot E_S - 2,365 \quad (9)$$

$$r = 0,945; s = 0,221; F = 2,783$$

$$\log K = 2,177 \cdot E_S - 0,236 \cdot MSD - 2,885 \quad (10)$$

$$r = 0,945; s = 0,221; F = 2,78$$

În timp ce ecuațiile corelaționale optime pentru activitatea anticolinesterazică sînt:

$$\log K = -3,490 \cdot \tilde{V} + 0,216 \cdot R - 2,802 \quad (11)$$

$$r = 0,854; s = 0,281;$$

$$\log K = -3,504 \cdot \tilde{V} + 1,007 \cdot MSD - 0,559 \quad (12)$$

$$r = 0,856; s = 0,278$$

Inhibitorii organofosforici de tip (I) și (II) își realizează activitatea anticolinesterazică ca urmare a unor efecte simultane determinate de structura chimică de bază și de către substituenții: substituenții, prin volumul lor, proprietăți hidrofobe, configurație sterică și deplasări electronice care modifică sarcina la atomul de fosfor, hotărîsc rolul și contribuțiile efective ale sorbției și ale efectului alchilant în procesul de inhibare.

Contribuția constant inhibantă a refracției molare în corelări arată că situsul receptor este în primul rînd sensibil la realizarea unei "potriviri" care să realizeze recunoașterea cît mai completă a naturii chimice a inițiatorului în vederea răspunsului "specific". Această potrivire este determinată de dimensiunile gru-

pelor hidrofobe care au acces în cavitatea care conține zonele active ale centrelor amonic și esteric, în primul rând, dar și de hidrofobicitatea însăși a radicalilor și de efectele electronice imprimare. Corelarea cu R indică în general un situs puțin rigid care se poate adapta unor grupări de forme diferite ale moleculei efectoare.

Contribuția semnificativă a parametrilor E_S și MSD în cele mai bune corelări indică faptul că dispoziția sterică a substituenților intervine de asemenea în mod determinant.

Se impune concluzia că numai o corelare multiparametrică poate descrie dependența activității anticolinesterazice de multitudinea factorilor structurali care trebuiesc considerați în analiza situsului receptor.

2.8. Corelări structură-activitate anticolinesterazică la compușii organofosforici din clasa O-alkil-S-(2-alkil mercaptoetil)-metil tiofosfonatilor

Așa cum s-a arătat deja, activitatea anticolinesterazică a C.O.F. depinde în primul rând de capacitatea lor de fosforilare, dar un rol de asemenea important îl joacă interacțiunile ionice și ion-dipol dintre substrat și enzimă. La acestea se adaugă rolul important al sorbției hidrofobe în procesul inhibării în funcție de particularitățile topografice ale zonelor active de pe suprafața colinesterazei. Pentru a pune în evidență ponderea acestor factori în determinarea activității biologice, ne-am propus corelarea parametrilor structurali cu activitatea anticolinesterazică în seria derivaților acidului metil tiofosforic în care substituenții alchilici, cu catenă normală sau ramificată, variază ca lungime atât în grupe eliminantă cât și la grupele alcoxi, sau a celor cu centru cationic în grupa eliminantă [817]. Activitatea anticolinesterazică este exprimată prin $\log k$, unde k reprezintă constanta de viteză a procesului de interacțiune a combinației organofosforice cu acetil- sau butilcolinesteraza, precum și prin raportul constantelor de viteză ale inhibării celor două colinesteraze. Parametrii structurali care au fost luși în considerare ca fiind responsabili de activitatea inhibitorie manifestată sînt: constantele ρ - Hammett [643], parametrii de hidrofobicitate Mensch π , π^+ [716], refracția molară R , R^2 [813], constantele sterice Taft, E_S [699] și diferențele sterice minime, MSD [707].

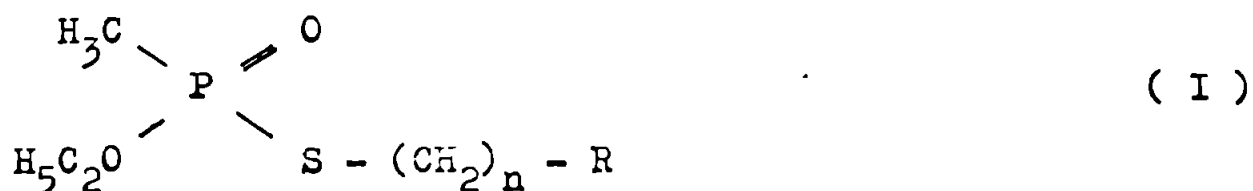
S-au efectuat corelări biparametrice de tipul

$$A_i^{calc} = a.X_i + b.Y_i + c \quad (1)$$

cu ajutorul unui calculator HEWLETT - PACKARD, stabilindu-se seturile de parametrii care conduc la cei mai buni coeficienți de corelare.

2.8.1. O-etil-S-alkil tiofosfonați

În tabelul 49 sînt date activitățile anticolinesterazice și parametrii structurali utilizați în corelare pentru serie O-etil-S-alkil metil tiofosfonaților (I):



Examinarea ecuațiilor corelaționale obținute (redate în tabelul 50) arată că cei mai înalți coeficienți de corelare se obțin cu ajutorul următoarelor seturi de parametrii: (R, R²) - r=0,920 în cazul butilcolinesterazei; (R, MSD) - r = 0,852 și (R, R²) - r=0,828 pentru acetilcolinesterază.

Corelarea mărimii log(k_{BuCol}/k_{AcCol}) scade mult valoarea coeficienților de corelare dar și în acest caz cel mai bun r (r=0,799) se realizează pentru setul (R, R²).

Că standard pentru stabilirea valorilor MSD a fost ales compusul I.10.

Tabelul 49.

R	n	log k		log k ₁ /k ₂	π	π ²	R	R ²	MSD
		BuCol	AcCol						
o.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
CH ₃	1	1,8062	2,2324	-0,5362	1,00	1,00	10,30	106,09	3
CH ₃	2	2,1461	2,7160	-0,5699	1,50	2,25	14,96	223,95	2
CH ₃	3	2,9138	3,0792	-0,1654	2,00	4,00	19,58	283,77	3
CH ₃	4	3,4150	3,4150	0,0000	2,50	6,25	24,25	588,06	4
CH ₃	5	4,5798	4,2041	0,3755	2,40	5,76	28,85	832,61	5
CH ₃	6	4,5185	4,3222	0,1963	2,90	8,41	35,55	1123,60	6

Tabel 49 - continuare -

o.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
CH ₃	7	4,6128	4,5563	0,0565	3,40	11,56	38,13	1454,28	7
CH ₃	8	4,5315	4,5914	0,0401	3,90	15,21	42,78	1830,13	8
CH ₃	9	4,5798	4,2041	0,3757	4,40	17,16	47,42	2249,13	9
t-C ₄ H ₉	1	4,3222	4,3010	0,0212	2,18	6,75	24,07	579,22	0
t-C ₄ H ₉	2	3,6721	3,2041	0,4680	2,68	7,18	28,51	812,93	5
t-C ₄ H ₉	3	4,2553	3,3424	0,9128	3,18	10,11	32,96	1086,16	6
t-C ₄ H ₉	4	4,9590	3,0573	1,1027	3,68	13,54	37,40	1388,91	7
t-C ₄ H ₉	5	4,9542	4,0414	0,9028	3,08	9,50	41,85	1751,17	8
t-C ₄ H ₉	6	4,9956	4,2787	0,7269	3,58	13,11	46,29	2142,95	9
i-C ₃ H ₇	1	2,8261	3,2041	0,3380	1,80	3,24	19,62	385,02	1
i-C ₃ H ₇	2	3,2617	3,1139	0,2478	2,30	5,29	24,27	588,98	4
i-C ₃ H ₇	3	3,3979	2,9191	0,4789	2,80	7,84	28,92	836,13	5
i-C ₃ H ₇	4	4,7708	3,9542	0,8166	2,30	10,89	33,56	1127,47	6
i-C ₃ H ₇	6	4,9685	4,3424	0,6261	2,70	7,29	38,21	1460,00	8
C ₆ H ₅	1	5,0792	-	-	2,63	7,20	29,29	857,67	4
C ₆ H ₅	2	4,1461	4,0792	0,0669	2,39	5,71	34,29	1176,01	7
C ₆ H ₅	3	4,9294	4,2552	0,6741	2,63	12,38	38,76	1502,34	8
C ₆ H ₅	4	5,0414	4,5315	0,5099	4,13	17,06	43,23	1868,57	9

Tabelul 50.

A ^{oslo}	B	X	b	Y	c	r	S	F
log k	1,901	\bar{x}	-0,190	\bar{y}^2	0,385	0,806	0,539	12,36
buCol	-0,097	\bar{x}	0,091	R	1,494	0,065	0,491	19,81
	0,254	R	-0,003	R ²	-0,824	0,920	0,433	36,73
	0,775	\bar{x}	0,050	MSD	1,639	0,794	0,572	11,37
	0,125	R	-0,177	MSD	1,122	0,888	0,433	24,86
log k	0,479	\bar{x}	0,013	\bar{y}^2	2,294	0,713	0,461	6,55
AcCol	-0,239	\bar{x}	0,072	R	2,166	0,821	0,367	13,09
	0,470	\bar{x}	0,030	MSD	2,216	0,716	0,457	6,66
	0,110	R	-0,001	R ²	1,321	0,828	0,364	13,61
	-0,153	MSD	0,089	R	1,813	0,852	0,332	16,77

Tabelul 50 - continuare -

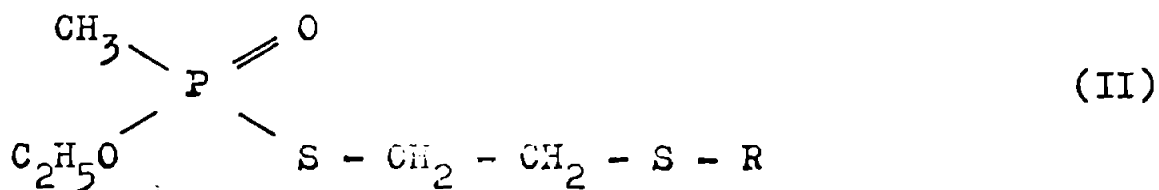
A ^{calc}	a	X	b	Y	c	r	S	F
log(k ₁ /k ₂)	1,260	$\bar{\pi}$	-0,171	$\hat{\pi}^2$	-1,786	0,748	0,302	10,10
	0,137	$\bar{\pi}$	0,021	$\bar{\pi}$	-0,758	0,706	0,326	6,29
	0,119	R	-0,001	R ²	-1,876	0,779	0,662	9,77
	0,251	$\bar{\pi}$	0,046	MSD	-0,672	0,701	0,327	6,12
	0,028	R	0,015	MSD	-0,684	0,701	0,329	6,12

Corelările stabilite pentru compușii (I) arată rolul important pe care îl au parametrii R și MSD, adică volumul și dispunerea sterică a substituenților în acțiunea de inhibare colinesterazică a acestora.

Corelarea cu R indică în general un situs puțin rigid care se poate adapta unor grupări de forme diferite ale moleculei efectora.

2.8.2. O-etil-S-(2-alkil mercaptoetil) metil fosfonați

Pentru O-etil-S-(2-alkil mercaptoetil;metil fosfonați (II)



cu valorile activităților colinesterazice și ale parametrilor structurali date în tabelul 51 au stabilit ecuații corelaționale cu coeficienții de corelare $r \geq 0,948$

Tabelul 51

Nr.	R	log k		log(k ₁ /k ₂)
		BuCol	AcCol	
1	CH ₃	3,5051	4,6021	1,0969
2	C ₂ H ₅	3,8325	4,7781	0,0555
3	n-C ₄ H ₉	4,8921	4,9542	0,9208
4	n-C ₆ H ₁₃	5,1111	5,6011	0,4914
5	n-C ₈ H ₁₇	5,4771	5,5185	0,0414
6	n-C ₁₀ H ₂₁	5,6021	5,3010	-0,3010

Tabelul 51 - continuare -

Nr.	\tilde{r}^*	\tilde{r}	\tilde{r}^2	R	R ²	E _S	MSD
1	0,000	0,5	0,25	5,65	31,96	0,00	9
2	-0,100	1,0	1,00	10,30	106,90	-0,07	8
3	-0,130	2,0	4,00	19,58	383,57	-0,39	6
4	-0,162	2,4	5,76	28,85	832,60	-0,40	4
5	-0,080	3,5	11,56	38,13	1454,28	-0,40	2
6	-0,115	4,4	19,36	47,41	2247,70	-0,40	0

Coeficienții de corelare cei mai înalți sînt realizați prin seturile de parametri (E_S, MSD) - r = 0,999; (E_S, R) - r = 0,999 și (E_S, \tilde{r}) - r = 0,998 pentru butil colinesterază

$$\log k = 0,026.R - 2,593.E_S + 3,369 \quad (2)$$

$$r=0,999; s=0,044; F=332,8$$

$$\log k = 0,285.\tilde{r} - 2,618.E_S + 3,363 \quad (3)$$

$$r=0,998; s=0,059; F=166,17$$

și prin (R, \tilde{r}), (R, R²) pentru anticolinesteraze

$$\log k = -1,219.\tilde{r} + 0,130.R + 4,660 \quad (4)$$

$$r=0,932; s=0,151; F=4,41$$

$$\log k = 0,073.R - 0,001.R^2 + 4,148 \quad (5)$$

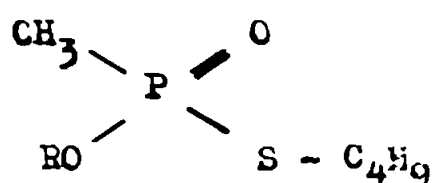
$$r=0,938; s=0,142; F=4,88$$

Mărimea $\log(k_{\text{BuCol}}/k_{\text{AcCol}})$ dă corelări mult mai slabe (cel mai bun r atinge doar 0,819) pentru seturile (E_S, MSD) și (E_S, MSD)

Aceste rezultate demonstrează în cazul C.O.F.(II) acțiunea de inhibare depinde hotărîtor de parametrii structurali care caracterizează dimensiunea și particularitățile stereice ale substratului.

2.8.3. O-alkil-S-n-butil tiofosfonați

O-n-alkil-S-butil metil tiofosfonații (III)



(III)

cu valorile $\log k_{\text{BuCol}}$, $\log k_{\text{AcCol}}$ și $\log(k_{\text{BuCol}}/k_{\text{AcCol}})$ și parametrii structurali din tabelul 52 conduc la ecuații corelaționale care, spre deosebire de compușii (II), au coeficienți de corelare cu valori mult mai dispersate.

Dintre seturile de parametrii utilizate în corelare, cele cu ($\bar{\pi}$, MSD) - $r=0,981$ și (R, MSD) - $r=0,970$ stabilesc corelări net superioare pentru inhibarea butilcolinesterazei

Tabelul 52.

Nr.	R	log k		log(k ₁ /k ₂)	r*
		BuCol	AcCol		
1.	CH ₃	1,7634	2,4150	-0,651	0,000
2.	C ₂ H ₅	2,7160	3,0792	-0,363	-0,100
3.	C ₃ H ₇	3,6532	3,7482	-0,096	-0,115
4.	C ₄ H ₉	4,0792	4,1461	0,068	-0,130
5.	C ₅ H ₁₁	4,2041	3,8325	0,372	-0,162
6.	C ₆ H ₁₃	4,6989	3,6232	1,075	-0,130
7.	C ₇ H ₁₅	6,0414	3,6532	2,388	-0,130
8.	C ₈ H ₁₇	5,5563	3,6128	1,944	-0,130
9.	C ₉ H ₁₉	5,8451	3,7924	2,073	-0,130
10.	C ₁₀ H ₂₁	4,7924	3,6721	1,120	-0,130

Nr.	E _S	$\bar{\pi}$	$\bar{\pi}^2$	R	R ²	MSD	
						BuCol	AcCol
1.	0,00	0,50	0,25	5,65	31,96	6	1
2.	-0,10	1,00	1,00	10,30	106,09	5	2
3.	-0,36	1,50	2,25	14,96	223,95	4	3
4.	-0,47	2,00	4,00	19,58	383,77	3	0
5.	-0,40	1,40	1,96	24,25	588,06	2	1
6.	-0,40	1,90	3,61	28,85	832,61	1	2
7.	-0,40	2,40	5,76	33,55	1125,60	0	3
8.	-0,40	2,90	8,41	38,13	1454,28	1	4
9.	-0,40	3,40	11,56	42,78	1830,56	2	5
10.	-0,40	3,90	15,21	47,33	2240,13	3	6

$$\log k = 0,538 \cdot \bar{\pi} - 0,490 \cdot \text{MSD} + 4,535 \quad (6)$$

$$r=0,981; s=0,267; F=51,93$$

$$\log k = 0,044 \cdot R - 0,432 \cdot \text{MSD} + 4,338 \quad (7)$$

$$r=0,970; s=0,314; F=31,84$$

In cazul inhibării acetilcolinesterazei, ecuațiile corelaționale optimele sînt:

$$\log k = -3,470 \cdot E_S - 0,008 \cdot R + 2,603 \quad (8)$$

$$r=0,970; s=0,013; F=31,84$$

$$\log k = -3,085 \cdot E_S - 0,027 \cdot MSD + 2,604 \quad (9)$$

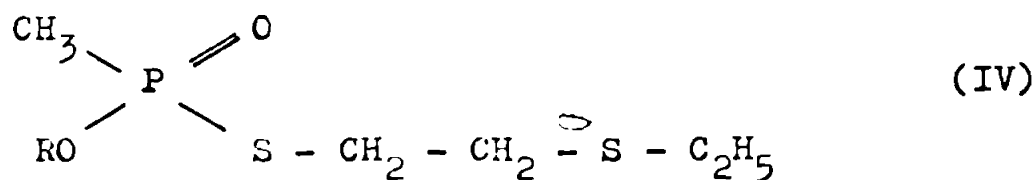
$$r=0,962; s=0,015; F=24,82$$

Seturile de parametrii (R, MSD) și ($\bar{\pi}$, MSD) stabilesc corelări semnificative cu $\log(k_{BuCol}/k_{AcCol})$ ($r=0,935$).

Ecuațiile (6-9) relevă faptul că parametrul MSD contribuie esențial, în toate cazurile la stabilirea unor bune corelări. Diferențele sterice minime s-au calculat față de standardele: (III.7) pentru activitatea antibutilcolinesterazică și respectiv față de (III.4) pentru activitatea antiacetilcolinesterazică.

2.8.4. O-alkil-S-(2-etil mercaptoetil)-metil tiofosfonaților

Pentru seria O-alkil-S-(2-etil mercaptoetil)-metil tiofosfonaților (IV)



s-au corelat valorile $\log k_{BuCol}$ cu parametrii structurali specificați în tabelul 53.

Tabelul 53.

R	log k	r^{ϕ}	$\bar{\pi}$	$\bar{\pi}^2$	E_S	R	R^2	MSD
CH ₃	2,9828	-0,96	0,5	0,25	0,00	5,65	31,85	5
C ₂ H ₅	3,6434	-0,10	1,0	1,00	-0,07	10,30	106,09	4
C ₃ H ₇	4,7634	-1,18	1,5	2,25	-0,36	14,96	223,95	3
C ₄ H ₉	5,2041	-1,22	2,0	4,00	-0,39	19,58	383,57	2
C ₅ H ₁₁	5,2304	-1,21	1,9	3,61	-0,40	24,25	588,06	1
C ₆ H ₁₃	5,5682	-1,19	2,4	5,76	-0,40	28,85	832,50	0
C ₇ H ₁₅	5,4472	-1,16	2,9	8,41	-0,40	33,55	1125,60	1
C ₈ H ₁₇	5,0414	-1,11	2,4	11,56	-0,40	38,13	1453,48	2

Cele mai bune corelări se stabilesc cu parametrii ($\bar{\pi}$, $\bar{\pi}^2$) și (R, R^2), (ecuațiile 10 și 11).

$$\log k = 3,104. \tilde{N} - 0,594. \tilde{N}^2 + 1,417 \quad (10)$$

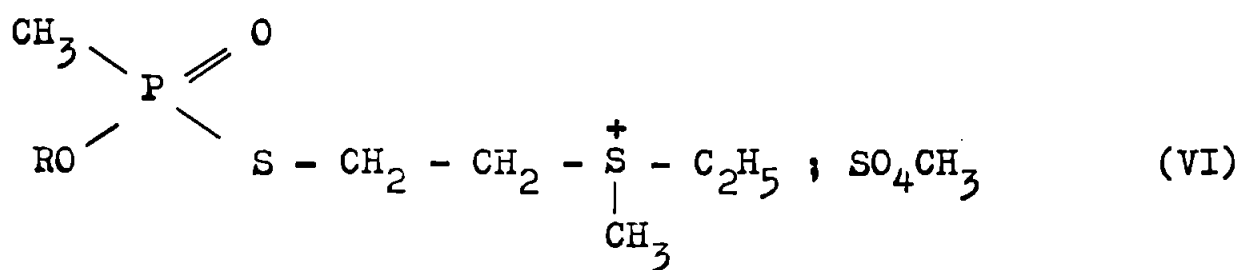
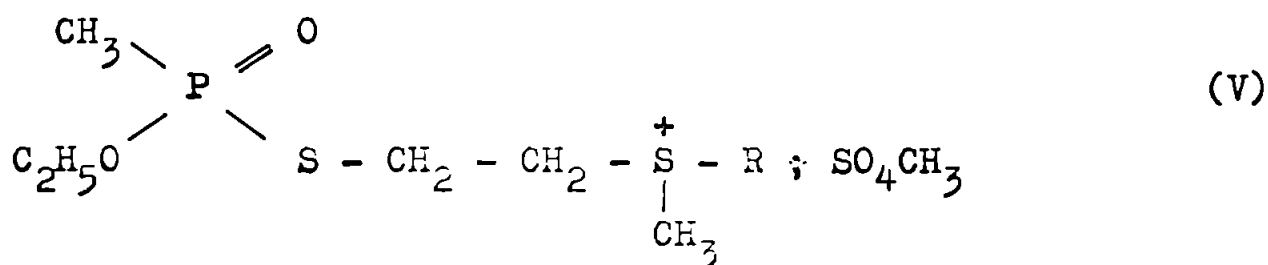
$$r=0,989; s=0,137; F=89,41$$

$$\log k = 0,283.R - 0,005.R^2 + 1,467 \quad (11)$$

$$r=0,989; s=0,144; F=89,41$$

2.8.5. Metil sulfometilații de O-alchil-S-(2-alchil mercaptoetil) metil fosfonați

Alte două serii de compuși O.F. pentru care s-au efectuat corelări cu parametrii structurali sînt seriile metil sulfometilațiilor de O-etil-S-(2-alchil mercaptoetil)-metil fosfonaților (V) și respectiv metil sulfometilațiilor de O-alchil S-butil metil tiofosfonaților (VI) în care în grupa eliminantă este prezent un centru cationic într-o poziție similară față de atomul de fosfor cu aceeași grupele cuaternare de amoniu din acetil colină.



Valorile mărimilor corelate pentru acești compuși sînt date în tabelul 54 și 55. Standardele folosite pentru calculul MSD-urilor au fost compusul (V.6) și respectiv (VI.8).

Ecuatiile corelaționale cu cei mai buni coeficienți de corelare se obțin cu (\tilde{N} , MSD), atît în cazul butilcolinesterazei cît și în cel al acetilcolinesterazei:

$$\log k = -1,083. \tilde{N} - 1,310. \text{MSD} + 13,051 \quad (12)$$

$$r=0,994; s=0,102; F=55,05$$

$$\log k = -1,626. \tilde{N} - 1,425. \text{MSD} + 15,740 \quad (13)$$

$$r=0,979; s=0,088; F=15,37$$

Corelări surprinzător de bune se obțin și pentru $\log(k_{\text{BuCol}}/k_{\text{AcCol}})$.

Tabelul 54.

Er.	R	log k		log(k ₁ /k ₂)	ρ*
		BuCol	AcCol		
1	CH ₃	6,0000	7,7404	1,7404	0,000
2	C ₂ H ₅	6,5682	8,3979	1,8293	-0,100
3	n-C ₄ H ₉	7,0414	8,3424	1,3010	-0,120
4	n-C ₆ H ₁₃	7,9494	9,0414	1,0934	-0,162
5	n-C ₈ H ₁₇	8,0000	8,6628	0,6628	-0,080
6	n-C ₁₀ H ₂₁	8,2553	8,6021	0,3424	-0,115

Nr.	π	π ²	R	R ²	E _S	MSD
1	0,5	0,25	5,65	31,96	0,00	5
2	1,0	1,00	10,30	106,09	-0,07	4
3	2,0	4,00	19,58	383,57	-0,39	3
4	2,4	5,76	28,85	832,60	-0,40	2
5	3,4	11,56	38,13	1454,28	-0,40	1
6	4,4	19,36	47,41	2247,70	-0,40	0

Tabelul 55.

R	log k BuCol	ρ*	π	π ²	R	R ²	E _S	MSD
CH ₃	5,8865	0,000	0,5	0,25	5,65	31,96	0,00	7
C ₂ H ₅	6,5798	-0,100	1,0	1,00	10,30	106,09	-0,07	6
C ₃ H ₇	7,5798	-0,115	1,5	2,25	14,96	223,95	-0,36	5
C ₄ H ₉	7,6012	-0,130	2,0	4,00	19,58	383,57	-0,39	4
C ₅ H ₁₁	7,8751	-0,162	1,9	3,61	24,25	588,06	-0,40	3
C ₆ H ₁₃	8,2553	-0,162	2,4	5,76	28,85	832,60	-0,40	2
C ₇ H ₁₅	8,3979	-0,091	2,9	8,41	33,55	1125,58	-0,40	1
C ₈ H ₁₇	8,4472	-0,080	3,4	11,56	38,13	1454,28	-0,40	0

La compușii (VI) seturile de parametri optime pentru corelare sînt (E_S,MSD), (E_S,R) și (E_S,π):

$$\log k = -3,093 \cdot E_S - 0,179 \cdot \text{MSD} + 7,280 \quad (14)$$

$$r=0,992; s=0,119; F=41,16$$

$$\log k = -3,090 \cdot E_S + 0,039 \cdot R + 5,806 \quad (15)$$

$$r=0,992; s=0,919; F=41,16$$

$$\log k = -3,046.E_S + 0,461.\bar{V} + 5,767 \quad (16)$$

$$r=0,990; s=0,127; F=32,83$$

Natura parametrilor care intervin în cele mai bune corelări stabilite pentru O-alkil-S-(2-alkil mercaptoetil)-metil tiofosfonați (I-VI) confirmă ipoteza făcută de Kabachnic și colaboratorii [110] și O'Brien [56] privind importanța sorbției hidrofobe în realizarea acțiunii anticolinesterazice.

Examinînd seturile de parametrii structurali care determină corelări semnificative se constată că cele două enzime la care se raportează activitatea inhibitorie a C.O.F. se comportă diferit. Parametrii de hidrofobicitate joacă un rol mai important în cazul interacției dintre inhibitorii organofosforici cu butilcolinesteraza. Aceasta se poate explica prin dispunerea diferită a zonelor hidrofobe pe părțile active ale celor două colinesteraze. De asemenea, corelările date de compușii (V) cu $\log k_{AcCol}$ subliniază faptul că sorbția inhibitorului pe acetilcolinesterază este determinată în primul rînd de centrul anionic al fermentului.

La toate seriile pentru care s-au făcut corelări, refracția molară reprezintă un parametru care îmbunătățește coeficientul de corelare, ceea ce arată că volumul substituenților exercită o mare influență asupra inhibării.

Dimensiunea optimă pentru substituent trebuie însă coroborată și cu dispoziție sterică. Importanța factorului steric este relevată de prezența parametrilor E_S și mai ales MSD în corelările ce realizează cei mai buni coeficienți de corelare.

Standardele alese pentru stabilirea valorilor MSD pentru corelările făcute în cadrul celor 6 serii s-au identificat cu compușii de cea mai înaltă activitate anticolinesterazică. Este de presupus că structura chimică optimă a inhibitorilor organofosforici de tip

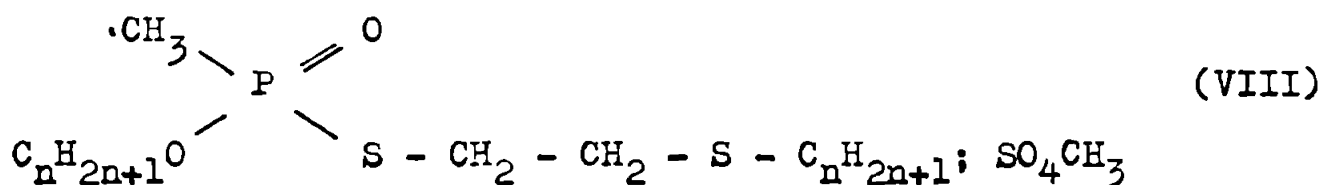


care înglobează seriile de compuși (I-VI) este dată de un standard optim care conține elemente structurale comune unei varietăți suficient de mari de reprezentanți.

În cazul compușilor în care grupa eliminantă conține fragmentul mercaptoetil, corelările obținute sînt sensibil mai bune. Aceasta arată că structura acetilcolinei ar putea fi considerată ca un standard posibil pentru evaluarea potrivirii sterice optime.

Variația coeficienților de corelare în cazul corelărilor cu $\log(k_{\text{BuCol}}/k_{\text{AcCol}})$ arată că specificitatea compușilor din seriile (I-VI) față de cele două enzime scade în cazul compușilor organofosforici cu centrul cationic în grupa eliminantă, ca urmare a creșterii ponderii interacțiunilor de natură electrostatică în formarea complexului enzimă-inhibitor. Se poate emite ipoteza că sorbția hidrofobă este în mare măsură dependentă de realizarea unei foarte bune potriviri sterice între substrat și receptor fără însă ca această etapă a procesului de inhibare să poată fi considerată separat de capacitatea de fosforilare a compusului organofosforic.

Rezultatele corelărilor întreprinse la derivații acidului O-alkil-S-(2-alkil mercaptoetil)-metil tiofosfonic recomandă ca structură optimă în realizarea unei activități anticolinesterazice eficace, compusul de forma:

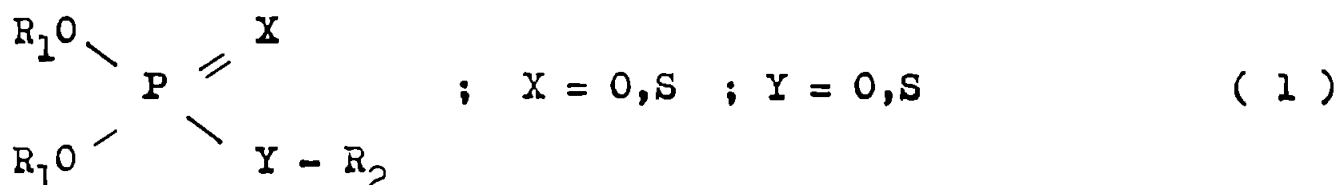


în care $n = 6-8$

2.9. Ipoteze privind activarea "in vivo" a derivaților acidului tiofosforic cu acțiune insecticidă decurgând din relația structură-activitate biologică.

Studiile privind mecanismul de acțiune al pesticidelor din clasa derivaților acidului tiofosforic arată că acești C.O.F. nu sînt inhibitori direcți ai colinesterazei "in vitro". Activarea lor "in vivo" este realizată prin reacția de oxidare care îi transformă în fosfații corespunzători. În cazul prezenței atomului de S sulfhidric în grupa eliminantă acesta este oxidat, la sulfoxid și apoi sulfonă determinînd de asemenea creșterea sensibilă a activității colinesterazice. Oxidarea sulfurii tioeteric are loc anterior oxidării grupei P = S la P = O. [123]

Este de asemenea de remarcă că în majoritatea cazurilor pentru compușii de tipul



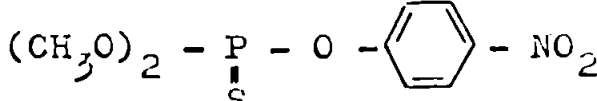
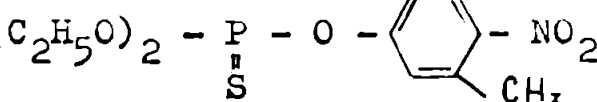
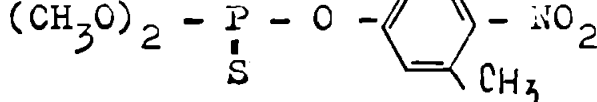
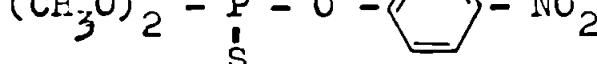
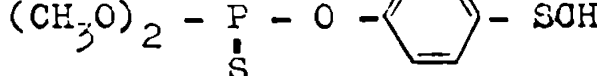
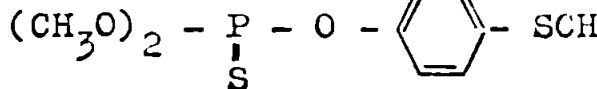
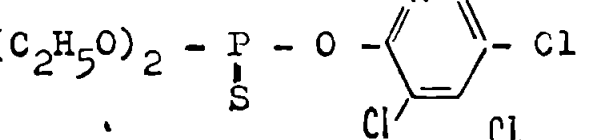
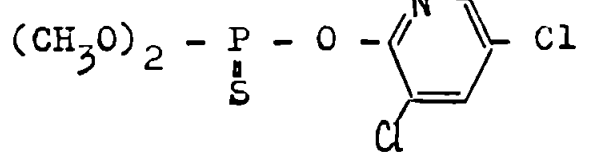
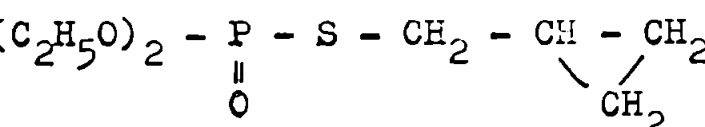
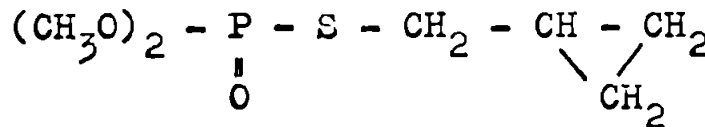
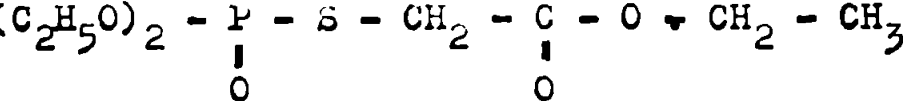
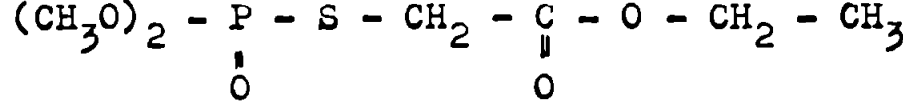
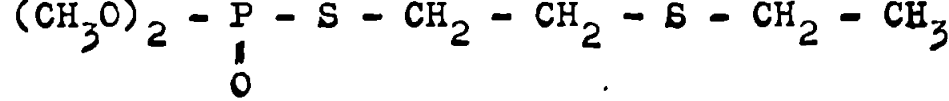
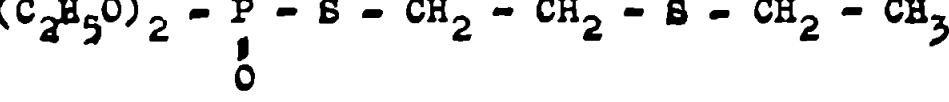
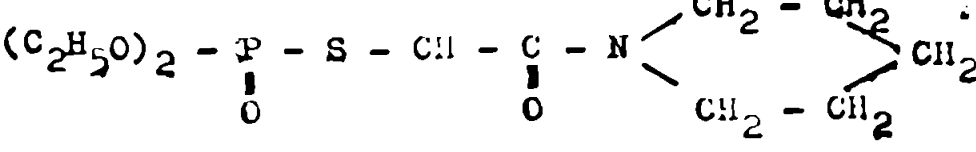
derivații metiloxi- $(R_1 = CH_3)$ au o toxicitate față de mamifere mai scăzută ca a derivaților etiloxi- $(R_2 = C_2H_5)$, diferența fiind în unele cazuri de aproape un ordin de mărime. (Tabelul 56).

Vom încerca să explicăm aceste diferențe de toxicitate pe baza unei structuri geometrice ipotetice a situsului activ al enzimei și a relației dintre concentrațiile intra- și extracelulare a C.O.F. [269].

Tabelul 56.

Nr.	Compușul	$-\log DL_{50}$	MSD
1.1	$(CH_3O)_2 - \overset{\overset{O}{\parallel}}{P} - O - \text{C}_6\text{H}_4 - NO_2$	-0,40	2
2	$(C_2H_5O)_2 - \overset{\overset{O}{\parallel}}{P} - O - \text{C}_6\text{H}_4 - NO_2$	-0,40	0
3	$(C_2H_5O)_2 - \overset{\overset{O}{\parallel}}{P} - O - \text{C}_6\text{H}_4 - NO_2$	-0,85	1
4	$(CH_3O)_2 - \overset{\overset{O}{\parallel}}{P} - O - \text{C}_6\text{H}_4 - NO_2$	-1,15	3
5	$(C_2H_5O)_2 - \overset{\overset{S}{\parallel}}{P} - O - \text{C}_6\text{H}_4 - NO_2$	-0,85	0

Tabelul 56-continuare -

Nr.	Compusul	-log DL ₅₀	MSD
6	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \text{P} - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NO}_2$ 	-1,15	2
7	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2 - \text{P} - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3) - \text{NO}_2$ 	-1,00	1
8	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \text{P} - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3) - \text{NO}_2$ 	-2,46	3
II.9	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \text{P} - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NO}_2$ 	-2,40	3,5
10	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \text{P} - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{SOCH}_3$ 	-1,00	2
11	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \text{P} - \text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{SCH}_3$ 	- 2,40	3
12	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2 - \text{P} - \text{O} - \text{C}_5\text{H}_3\text{N}(\text{Cl})_2 - \text{Cl}$ 	-2,13	3
13	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \text{P} - \text{O} - \text{C}_5\text{H}_3\text{N}(\text{Cl})_3$ 	-3,00	5
III,14	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2 - \text{P} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2$ 	-1,63	2-3
15	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \text{P} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2$ 	-2,06	4-5
16	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2 - \text{P} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$ 	-2,40	3
17	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \text{P} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$ 	-3,01	5
18	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \text{P} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$ 	-0,68	3,5
19	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2 - \text{P} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$ 	-0,86	1,5
20	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2 - \text{P} - \text{S} - \text{CH} - \text{C} - \text{N} \begin{matrix} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \end{matrix}$ 	-0,90	4-6

Tabelul 56 - continuare -

Nr.	Compusul	-log DL ₅₀	MSD
21	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{P}}} - \text{S} - \text{CH}_2 - \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} - \text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \end{array}$	-1,60	6-8
IV.22	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2 - \underset{\text{S}}{\underset{\parallel}{\text{P}}} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$	-0,76	1,5
23	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \underset{\text{S}}{\underset{\parallel}{\text{P}}} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$	-1,59	3,5
24	$(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2 - \underset{\text{S}}{\underset{\parallel}{\text{P}}} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{Cl}$	-1,72	4,5-7
25	$(\text{CH}_3\text{O})_2 - \underset{\text{S}}{\underset{\parallel}{\text{P}}} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{Cl}$	-2,28	6,5-7

Ipotezele avansate pentru mecanismul de acțiune al compuşilor (I) sînt următoarele:

1. Pentru derivații tionici, etapa determinantă de viteză este oxidarea la derivați ai acidului fosforic, concomitent avînd loc unele procese de degradare destructivă.

2. Enzima care realizează această oxidare, are atît două situsuri rigide pentru grupele $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ cît și un situs pentru grupe fenil, nesubstituite în pozițiile 2,3,5,6 (fig.39).

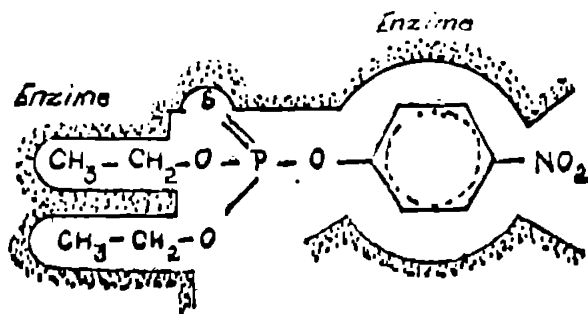


Fig.39.

3. Afinitatea enzimei pentru grupele C_2H_5O și, separat, cea enzimă-grupă fenil substituită, fiecare în parte, sînt suficiente pentru a asigura o saturare de circa 50% a enzimei la o concentrație intracelulară C_i .

4. Dependența dintre concentrațiile intra- C_i , și extracelulară, C_e , ale acestor compuși, la o concentrație C_e determinată de DL_{50} se prezintă așa cum este ea dată de valorile C_i care satisfac condiția (3) (Fig.40).

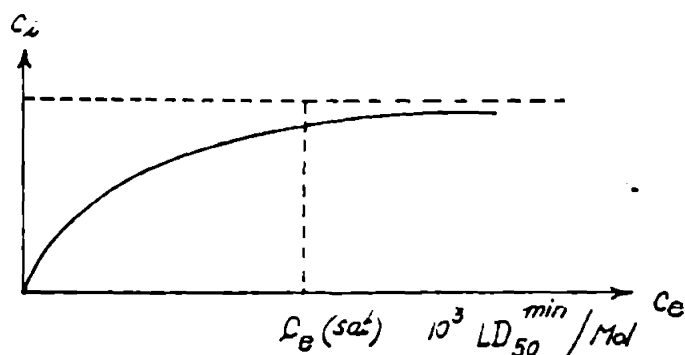
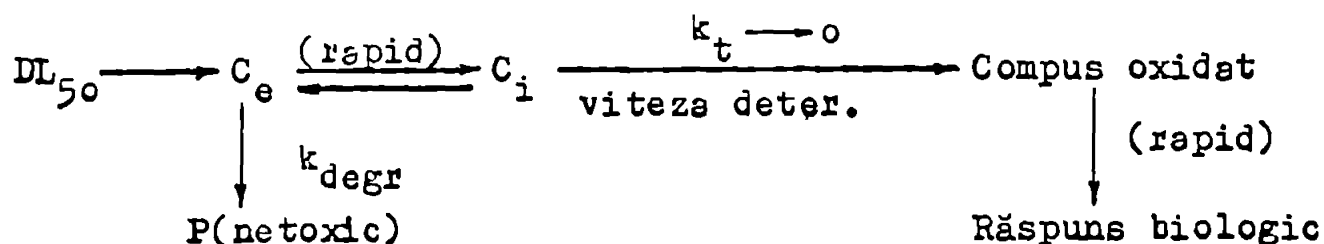


Fig.40.

$(DL_{50})^{min}$ reprezintă valoarea DL_{50} minimă pentru seria de compuși discutată.

Mecanismul de acțiune poate fi rezumat în modul următor:



Ca urmare, dacă M este greutatea moleculară a compusului DL_{50} doza lui semiletală în mg/kgcorp, se obține:

$$C_e = \frac{DL_{50}}{1000 M} \quad (1)$$

Presupunând o cinetică de tip Michaelis-Menten pentru oxidarea $tion \rightarrow oxo$ a derivaților acidului tionfosforic viteze corespunzătoare a acestui proces, $k_t \longrightarrow o$ va fi:

$$k_{t \rightarrow o} = k_{t \rightarrow o}^0 \cdot \frac{C_i}{C_i + K} \quad (2)$$

Conform ipotezelor (3) și (4) dacă compusul este un derivat parăsubstituit sau un compus cu grupa alcoxi R_1 , etil, $C_i \gg K$ și $k_{t \rightarrow o} \approx k_{t \rightarrow o}^0$; aceasta explică de ce compușii 5,6,7 și 10 din tabelul 56, au valori DL_{50} scăzute ($-\log DL_{50} = -1,0$)

Cantitatea de derivat toxifosforic care produce acțiunea semiletală poate fi calculată:

$$G_{\text{deriv.oxidat}} = DL_{50} \cdot \text{greutate corp} \cdot \frac{k_{t \rightarrow o}}{k_{\text{degrad}}} \quad (3)$$

Dozele semiletale pentru 25 de compuși (mg/kg) sînt date în tabelul 56 [47,795,827,846], ca și diferențele sterice minime calculate față de compusul dat în figura (39) ca standard.

Grupa para-nitro nu este considerată în standard; regiunile presupuse a fi constrînse steric de către enzimă sînt de asemenea reprezentate în figura 39.

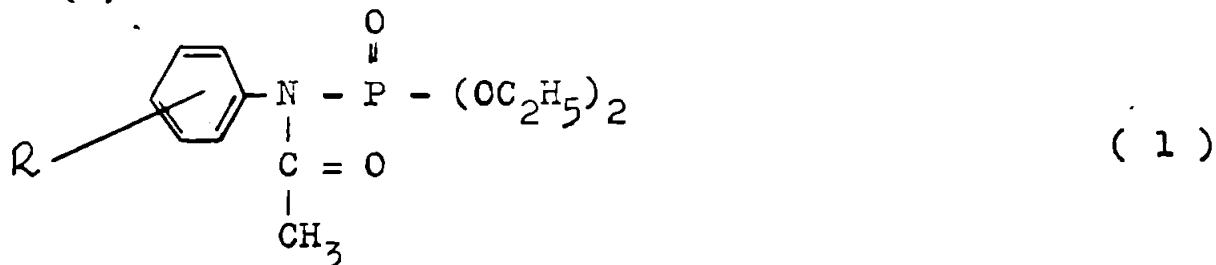
În mod corespunzător mecanismului lor ipotetic de acțiune, se poate observa o bună corelație a mărimilor $-\log DL_{50}$ cu parametru MSD pentru derivații acizilor tionfosforic și tion-tiofosforic însă nu și pentru derivații acizilor fosforic și tiofosforic. Astfel pentru cei 9 derivați tionfosforici (tabelul 56) (compușii nr.5-13) se obține un coeficient de corelare $r = -0,92$, pentru cei 4 derivați tion-tiofosforici (tabelul 56) (compușii nr.22-25), $r = -0,99$ în timp ce seriilor de 4 fosfați (tabelul 56) (compușii nr.1-4) și cele de 8 tiofosfați (tabelul 56) (compușii nr.14-21), $r = -0,64$ și respectiv $r = -0,31$.

Valorile relativ mari ale lui $-\log DL_{50}$ pentru compușii 6,7 și 10 pot fi explicate pe baza ipotezelor (3) și (4) făcute asupra mecanismului lor de acțiune.

Substituirea grupei CH_3CH_2O prin CH_3O permite ocuparea unei cavități hidrofobice libere de circa 10 \AA^2 din situsul activ al enzimei. La o tensiune superficială de 3 dyne/cm corespunde o scădere de energie de circa 0,5 kcal/mol, astfel încît pentru 2 substituenți rezultă o micșorare a toxicității cu circa 0,7 unități logaritmice, căci este în bună concordanță cu mărimile prezentate pentru perechile de compuși (12-13; 22-23 și 24-25) din tabelul 56.

2.10. Corelări structură -activitate anticolinesterazică în seria O'-O-dietil N-acetil-N-fenil fosforamidelor

Cercetînd activitatea biologică a fosforamidelor, Fukuto și colaboratori [846,847] au arătat că N-acetil-N-fenil fosforamidele (1):



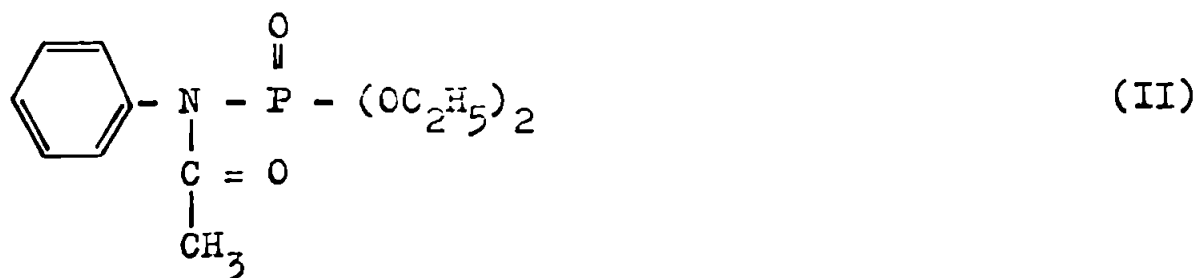
prezintă un interes deosebit datorită modului cum își realizează activitatea lor anticolinesterazică și toxicitatea față de insecte. Acești compuși sînt neobișnuiți prin aceea că legătura care, cu cea mai mare probabilitate se rupe în procesul fosforilării este legătura P-N astfel încît anionul acetanilidic apare ca grupă eliminantă.

Pentru a pune în evidență elementele structurale care definesc activitatea colinesterazică a compușilor (1) și a obține informații asupra relației dintre structura situsului receptor și cea a structurii cu activitate insecticidă optimă, ne-am propus [847] să corelăm datele de activitate biologică cu parametrii structurali.

Activitățile biologice ale celor 11 reprezentanți ai seriei N-acetil-N-fenil fosforamidelor [846] exprimate prin valori I_{50} , DL_{50} și k_i (constanta de viteză a procesului de inhibare) s-au luat în corelări ca:

$$A = \begin{cases} - \log I_{50} \\ - \log DL_{50} \\ - \log k_i \end{cases}$$

Aceste mărimi exprimă activitatea insecticidă și anticolinesterazică față de *Musca domestica*. Corelările efectuate au stabilit dependența mărimilor A de următorii parametrii structurali: constanta de substituent σ - Hammett [59], constanta de hidrofobicitate π - Hansch [716], refracții molare [813], constanta sterică E_s , Taft [699], diferența sterică minimă, KSD, [707]. Diferențele sterice minime s-au calculat în raport cu un standard care corespunde compusului nesubstituit al seriei (II):



Valorile mărimilor corelate și ale parametrilor de corelare sînt prezentate în tabelul 57.

Utilizînd un program de corelare biparametrică de tip

$$A_i^{\text{calc}} = a \cdot X_i + b \cdot Y_i + c \quad (1)$$

datele din tabelul 57 prelucrate pe un calculator HEWLETT-PACKARD, au condus la obținerea ecuațiilor corelaționale și a coeficienților de corelare corespunzători din tabelul 58.

În cazul în care mărimea corelată A corespunde la $-\log I_{50}$ sau $\log k_i$ pentru toate seturile de parametri încercate, ecuațiile corelaționale obținute nu sînt semnificative, dat fiind indicii lor de corelare scăzuți.

Pentru $A = -\log DL_{50}$ seturile de parametri (E_S, MSD), (π, MSD), (R, MSD) și (\tilde{r}, MSD) conduc la corelări cu valori ale lui r sensibil îmbunătățite: 0,801, 0,800, 0,804 și respectiv 0,851. Aceasta este urmarea utilizării parametrului MSD care ține cont de particularitățile dispunerii spațiale a substituentului ca factor determinant în stabilirea acțiunii biologice optime.

Importanța efectelor sterice exprimate prin parametrul MSD este relevată de corelația uniparametrică ($-\log DL_{50}, \text{MSD}$) care conduce la ecuația corelațională:

$$\begin{aligned}
 A_i^{\text{calc}} &= (-0,302 \pm 0,05) \cdot \text{MSD} - (1,829 \pm 0,09) \quad (2) \\
 r &= 0,800
 \end{aligned}$$

Între mărimile corelate care exprimă activitatea anticolinesterazică ($\log I_{50}$, $\log k$) și toxicitatea față de Musca domestică există următoarea relație:

$$\begin{aligned}
 -\log I_{50} &= 0,566 \cdot (-\log DL_{50}) + 1,779 \cdot \log k_i - 0,673 \quad (3) \\
 r &= 0,942
 \end{aligned}$$

Teabelul 57.

Nr.	R	-log I ₅₀	log k _i	-log DL ₅₀	σ	π	π ²	R	R ²	E _S	M S D		
											para-subst.	nesubstituit	para-inactiv
1	H	6,6198	4,7076	-1,7818	0	0,00	0,60	1,028	1,057	1,28	1	0	0
2	p-CH ₃ S	6,4685	4,6813	-2,6284	-0,047	0,61	0,37	13,576	184,307	1,24	1,5	2,5	0
3	p-CH ₃	5,6339	4,5052	-2,0000	-0,17	0,60	0,36	5,653	31,956	-0,14	0	1	0
4	p-CH ₃ O	6,1265	4,3979	-2,1462	-0,27	-0,04	0,002	7,417	55,011	0,69	1	2	0
5	o-CH ₃ O	5,9208	4,5798	-2,6233	0,12	-0,34	0,116	7,417	55,011	0,69	3	2	2
6	p-Cl	5,6795	4,4624	-2,2553	0,23	0,70	0,490	5,844	34,152	0,27	0,5	1,5	0
7	o-Cl	4,1427	3,5186	-2,6991	0,23	0,76	0,578	5,844	34,152	0,27	1,5	1,5	1,5
8	m-Cl	5,9393	4,2788	-2,2553	0,37	0,76	0,578	5,844	34,152	0,27	1,5	1,5	1,5
9	p-Br	5,6904	4,1761	-2,3011	0,23	1,19	1,416	8,740	76,405	0,08	1	2	0
10	p-F	5,7959	4,1461	-2,1614	0,06	0,15	0,022	0,81	0,656	0,78	0	1	0
11	o-1-C ₂ H ₅	4,5565	3,9091	-2,6991	-0,19	1,3	1,690	14,965	223,951	-0,4	4	3	3

Tabelul 58.

Nr.	A_i^{calc}	X_i	a	Y_i	b	c	r
1	-log I_{50}	$\hat{\tau}$	0,0964	$\hat{\tau}$	-0,828	6,132	0,548
2		$\hat{\tau}$	-0,064	R	-0,685	6,192	0,353
3		$\hat{\tau}$	-0,225	E_S	0,989	5,268	0,684
4		$\hat{\tau}$	-0,592	MSD	-0,419	6,396	0,419
5		$\hat{\tau}^2$	-0,072	$\hat{\tau}^2$	-0,772	6,140	0,604
6		$\hat{\tau}$	-0,801	R	-0,004	6,154	0,548
7		$\hat{\tau}$	-0,224	E_S	0,841	5,439	0,690
8		$\hat{\tau}$	-0,699	MSD	-0,180	6,364	0,573
9		R	-0,055	R^2	-0,001	6,092	0,307
10		R	-0,017	E_S	0,946	5,393	0,687
11		R	+0,063	MSD	-0,685	6,390	0,413
12		E_S	0,904	MSD	-0,158	5,554	0,791
1	log k_i	$\hat{\tau}$	-0,230	$\hat{\tau}$	-0,335	4,491	0,529
2		$\hat{\tau}$	-0,480	R	-0,015	4,436	0,286
3		$\hat{\tau}$	-0,362	E_S	0,363	4,159	0,589
4		$\hat{\tau}$	-0,485	MSD	-0,132	4,547	0,371
5		$\hat{\tau}^2$	-0,231	$\hat{\tau}^2$	-0,124	4,490	0,520
6		$\hat{\tau}$	-0,435	R	0,019	4,400	0,549
7		$\hat{\tau}$	-0,174	E_S	0,250	4,282	0,580
8		$\hat{\tau}$	-0,342	MSD	-0,013	4,506	0,513
9		R	-0,014	R^2	0,004	4,382	0,106
10		R	-0,007	E_S	0,385	4,081	0,556
11		R	0,091	MSD	-0,178	4,356	0,500
12		E_S	0,353	MSD	-0,024	4,185	0,553
1	-log DL_{50}	$\hat{\tau}$	-0,108	$\hat{\tau}$	-0,187	-2,220	0,339
2		$\hat{\tau}$	-0,546	R	-0,057	-1,895	0,791
3		$\hat{\tau}$	-0,188	E_S	0,137	-2,376	0,275
4		$\hat{\tau}$	-0,436	MSD	-0,323	-1,772	0,851
5		$\hat{\tau}^2$	0,206	$\hat{\tau}^2$	-0,413	-2,218	0,480
6		$\hat{\tau}$	0,034	R	-0,052	-1,978	0,709
7		$\hat{\tau}$	-0,184	E_S	0,016	-2,235	0,332
8		$\hat{\tau}$	0,011	MSD	-0,305	-1,830	0,800
9		R	-0,067	R^2	0,001	-1,926	0,712
10		R	-0,049	E_S	0,007	-1,981	0,707
11		R	0,014	MSD	-0,372	-1,813	0,804
12		E_S	-0,030	MSD	-0,309	-1,804	0,801

Rezultatele obținute de noi sînt în acord cu observațiile făcute de către Bellet și Fukuto [846] care au semnalat absența unei corelații semnificative între acțiunea de inhibare colinesterazică sau toxicitate și parametrii de reactivitate. În schimb, utilizarea parametrului MSD conduce la corelare imparmetrică sau biparametrică îmbunătățită, care în pofida unor valori modeste ale lui r (0,800-0,851), relevă importanța deosebită pe care o are configurația spațială a inhibitorului. Aceasta determină specificitatea destul de mare în acțiune și explică valorile distincte ale activităților biologice considerate, în intervalul de valori acoperit de mărimile A_i^{exp} .

Faptul că mărimile $-\log I_{50}$ și $\log k_i$ care estimează capacitatea inhibitorie a compușilor seriei (I) nu sînt corelabile cu parametrii de reactivitate și nici cu MSD poate fi interpretat prin formarea unui complex Michaelis E-I mai stabil, ceea ce implică o manifestare distinctă a primei etape, reversibile a procesului de inhibere.

Ne mai avînd loc o fosforilare directă a centrului esterazic al enzimei, măsurile amintite evoluează un efect global și reflectă în mai mică măsură efectul specific al structurii compusului.

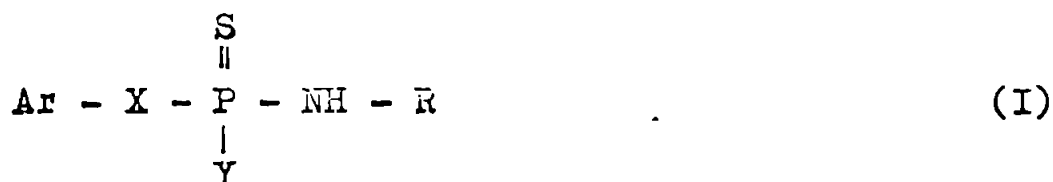
Se poate presupune că prin găsirea unui standard mai potrivit, care să ia în considerare și structurile ipotetice active, netestate biologic deocamdată și vor determina valori MSD care vor îmbunătăți sensibil corelările. O cale posibilă pentru determinarea unui standard optim ar consta în utilizarea metodei Free-Wilson.

2.11. Corelări structură activitate fungică în serie diamidelor și ester-amidelor acizilor tio- și ditio-fosforici

Dacă mecanismul de acțiune al insecticidelor O.F. este în linii mari elucidat acțiunea fungică a derivaților organofosforici a fost mai puțin studiată și clarificată. Melnikov și colaboratorii [849] au sintetizat o largă varietate de derivați ai amidelor acizilor fosforic, tio- și ditiofosforic, pe care le-au caracterizat sub aspectul activității fungicide prin procentul de încetinire a creșterii sau prin toxicitatea relativă exercitată asupra unor specii de ciuperci (micelii sau spori). Ei au făcut și unele observații de ordin calitativ asupra structurilor chimice active și a influenței substituenților asupra mărimii activității fungicide.

În scopul clarificării mecanismului de acțiune, am efectuat corelări cantitative ale activității fungicide cu parametrii structurali: constanta σ -Hammett [39], constanta de hidrofobicitate π -Hansch [716], refracției molare, R , [813], constanta sterică E_S , Taft [699], și diferența sterică minimă, MSD [707]. Ca activitate fungică s-a luat logaritmul cu semn schimbat al mărimii care exprimă (în procente față de etalon) inhibarea creșterii unor micelii și spori de ciuperci (*botrytis cinerea*, *venturia inaequalis*, *fusarium oxysporum*, *fusicladium dendriticum*, *rhizoctonia*) după Melnikov și colaboratori [849].

Corelările s-au făcut pentru serii de compuși O.F. cu structuri chimice încadrate în formula generală

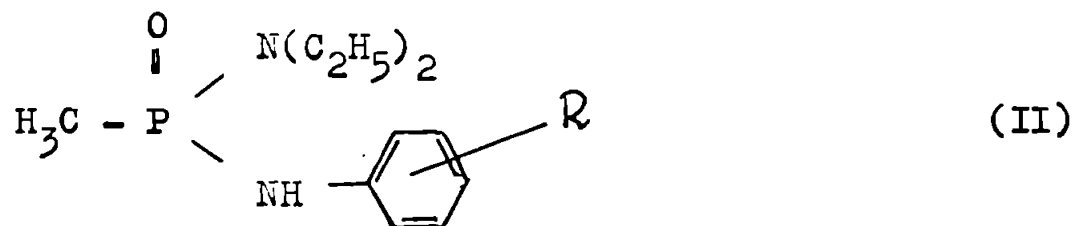


Ecuatiile corelaționale de forma

$$A_i^{\text{calc}} = a \cdot X_i + b \cdot Y_i + c \quad (1)$$

au fost stabilite cu ajutorul unui calculator HELLWETT-PACKARD.

În tabelul 59 sînt prezentate activitățile fungicide ale unor N,N-dietil, N-aril metil fosfonat-diamide.



(față de micelii de ciuperci la concentrația de 0,05% inhibitor în probă) și parametrii de corelare utilizați.

Ecuatiile corelaționale obținute, împreună cu coeficienții de corelare sînt redată în tabelul 60.

Corelări semnificative se obțin în cazul inhibării micelilor de *fusarium oxysporum*, pentru seturile de parametrii (σ, π) și (σ, E_S) : $r=0,810$ și respectiv $r=0,718$. Pentru miceliile de *rizortonia*, cea mai bună corelare se stabilește cu ajutorul setului (σ, E_S) : $r=0,796$.

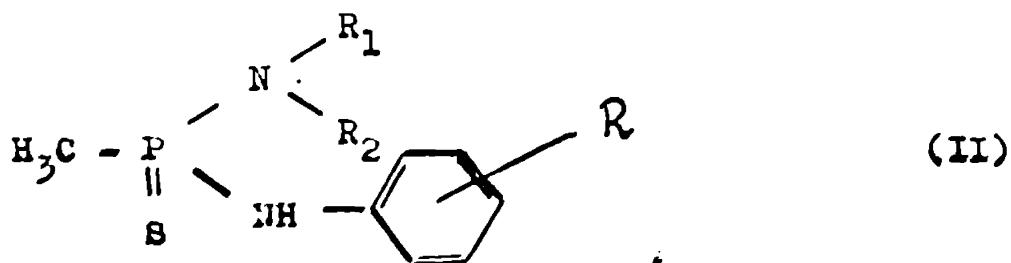
Tabelul 59.

R	log 1/c		ρ	π	π^2	E_S	MSD
	Fusarium oxysporum	Rhizoctonia					
m-Cl	-1,7860	-1,8195	0,37	0,76	0,58	0,27	4,5
H	-	-1,3674	0	0	0	1,28	3
p-Cl	-1,5798	-1,8235	0,23	0,70	0,49	0,27	2
o-Cl	-1,6474	-1,8235	0,23	0,76	0,58	0,27	4,5
m-CH ₃	-1,2201	-1,8651	-0,07	0,54	0,29	-0,14	4
p-CH ₃	-1,6474	-1,9375	-0,17	0,60	0,36	-0,14	2
o-CH ₃	-1,6434	-1,8451	-0,17	0,68	0,46	-0,14	3
p-NO ₂	-2,0000	-2,0000	0,78	0,24	0,06	-1,28	0
p-OCH ₃	-1,2201	-1,9375	-0,27	0,04	0,002	0,69	1
p-OC ₂ H ₅	-1,4425	-1,7267	-0,24	0,46	0,21		2

Tabelul 60.

A ^{calc}	a	X	b	Y	c	r	s	F
log 1/c	-0,541	ρ	-0,205	π	-1,427	0,810	0,226	3,18
(Fusarium oxysporum)	-0,465	ρ	0,113	E_S	-1,536	0,798	0,153	2,12
	-0,556	ρ	0,008	MSD	-1,555	0,782	0,149	2,63
	-0,335	π	0,300	E_S	-1,408	0,723	0,233	1,46
	-0,864	π	0,132	MSD	-1,462	0,628	0,182	1,08
log 1/c	-0,090	ρ	0,037	MSD	-1,903	0,372	0,162	0,32
(Rhizoctonia)	-0,654	π	0,660	π^2	-1,709	0,371	0,231	0,32
	-0,053	π	0,107	E_S	-1,822	0,747	0,244	2,10
	-0,409	ρ	0,086	MSD	-1,846	0,668	0,124	1,61
	0,189	ρ	0,244	E_S	-1,873	0,796	0,106	2,88

O altă serie de compuși în care s-a corelat activitatea fungicidă (inhibarea creșterii miceliilor de venturia inequalis la concentrația de 0,003% substanță) cu parametrii structurali conform datelor din tabelul 61 este aceea a N,N-dialchil,N' aril metil tiofosfonat-diamidelor.



Tabelul 61.

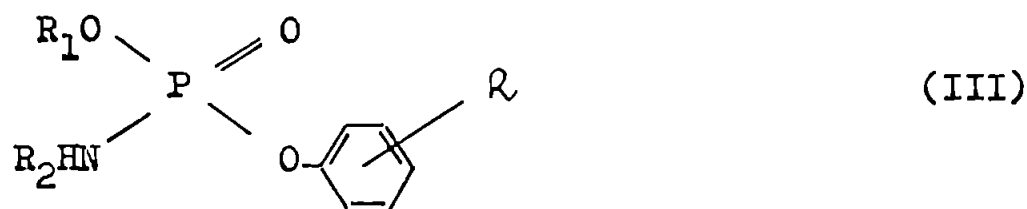
R ₁	R ₂	R ₃	log 1/C	ρ	$\tilde{\pi}$	$\tilde{\pi}^2$	E _S	MSD
H	CH ₃	m-Cl	-0,8573	0,20	1,32	1,74	0,27	5,0
H	CH ₃	o-Cl	-1,5172	0,06	1,32	1,74	0,27	5,0
CH ₃	CH ₃	H	-1,3385	-0,34	1,12	1,25	0,00	4,5
CH ₃	CH ₃	p-Cl	-1,5378	-0,11	1,82	3,31	0,27	3,5
CH ₃	CH ₃	p-CH ₃	-1,6243	-0,51	1,72	2,96	0,00	3,5
H	C ₂ H ₅	H	-1,7917	-0,15	1,00	1,00	-0,07	2,5
H	C ₂ H ₅	m-Cl	-1,8055	0,22	1,76	3,10	0,20	4,0
H	C ₂ H ₅	p-Cl	-0,9731	0,08	1,70	2,89	0,20	1,0
H	C ₂ H ₅	2,4-Cl ₂	-1,8041	0,31	2,52	6,35	0,47	2,5
H	i-C ₃ H ₇	H	-1,4440	-0,15	1,30	1,69	-0,47	1,0
H	i-C ₃ H ₇	p-Cl	-1,8395	0,08	2,00	4,00	-0,20	0,0
H	n-C ₄ H ₉	p-Cl	-1,0969	0,07	2,70	7,29	-0,12	2,0

În acest caz singura ecuație corelațională care corespunde unui coeficient de corelare acceptabil este aceea obținută folosind ca parametrii structurali $\tilde{\pi}$ și E_S (ecuația 2): r=0,870

$$\log 1/C = 0,083 \cdot E_S - 0,047 \cdot \tilde{\pi} - 1,395 \quad (2)$$

$$s=0,339; F=8,30$$

Pentru seria compușilor alchil-, aril fosfonat amidelor N-alchilate (III):



activitățile fungicide față de miceliile de botrytis cinerea (concentrația inhibitorului 0,003%) și parametrii structurali cu care acestea se corelează sînt date în tabelul 62.

Tabelul 62.

R ₁	R ₂	R ₃	log 1/C	ρ	$\tilde{\pi}$	$\tilde{\pi}^2$	E _S	MSD
CH ₃	CH ₃	o-NO ₂	0,1805	0,42	0,67	0,45	-1,28	2
CH ₃	C ₄ H ₉	p-NO ₂	0,2676	0,47	2,74	7,51	0,85	9
CH ₃	C ₄ H ₉	o-NO ₂	0,2366	0,45	2,27	5,15	-1,67	5
C ₂ H ₅	CH ₃	p-NO ₂	0,1549	0,46	1,74	3,03	1,17	4
C ₂ H ₅	CH ₃	o-NO ₂	0,1427	0,44	1,27	1,61	-1,35	1

Tabelul 62-continuare-

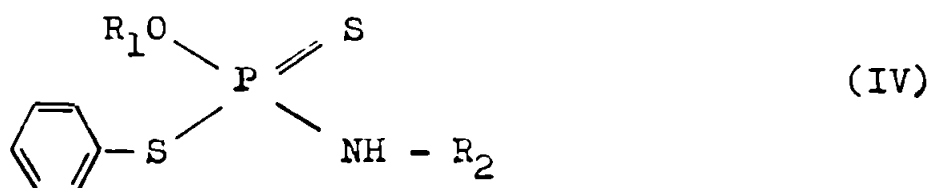
R ₁	R ₂	R ₃	log 1/C	ρ	π	τ^2	E _S	MSD
C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	p-NO ₂	0,2676	0,48	2,24	5,02	1,10	6
C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	o-NO ₂	0,1308	0,46	1,67	2,79	-1,42	0
C ₂ H ₅	i-C ₃ H ₇	p-NO ₂	0,1805	0,48	2,54	6,45	0,70	4
C ₂ H ₅	i-C ₃ H ₇	o-NO ₂	0,1805	0,46	2,07	4,28	-1,82	1
C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	p-NO ₂	0,3372	0,45	3,24	10,48	0,78	10

Utilizarea seturilor de parametrii (ρ, π), (τ, τ^2), (π, MSD) conduce la corelări interpretabile; coeficienții de corelare realizare $r=0,820$, $r=0,821$ și respectiv $r=0,869$ (Tabelul 63).

Tabelul 63.

a	X	b	Y	c	r	s
-1,709	ρ	0,093	π	0,797	0,831	0,037
-0,113	τ	0,046	τ^2	0,223	0,869	0,033
-0,471	ρ	0,028	E _S	0,431	0,489	0,050
0,062	π	0,005	E _S	0,083	0,753	0,043
-0,633	τ	0,020	MSD	0,424	0,754	0,029
0,042	π	0,011	MSD	0,083	0,820	0,036

Compuși de tipul O-alkil S-aryl amido N-alkil diti fosfonat



s-au corelat de asemenea activitățile fungicide față de micelii de botrytis cinerea (la 0,003% concentrație subst.) cu parametrii structurași corespunzători (tabelul 64).

Tabelul 64.

Nr.	R ₁	R ₂	log 1/C	ρ	π	τ^2	E _S	MSD
1	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	0,0000	-0,31	3,00	9,00	-0,46	2
2	C ₂ H ₅	i-C ₄ H ₉	-0,0823	-0,35	2,80	7,84	-1,00	0
3	i-C ₃ H ₇	CH ₃	0,1367	-0,32	1,80	3,24	-0,47	4
4	i-C ₃ H ₇	C ₂ H ₅	0,1549	-0,30	2,30	5,29	-0,54	3
5	i-C ₃ H ₇	i-C ₃ H ₇	0,2441	-0,30	2,60	6,76	-0,94	4
6	i-C ₃ H ₇	C ₄ H ₉	0,1192	-0,31	3,30	10,89	-0,46	3
7	i-C ₃ H ₇	i-C ₄ H ₉	0,1549	-0,35	3,60	12,96	-1,40	1

Tabelul 64.

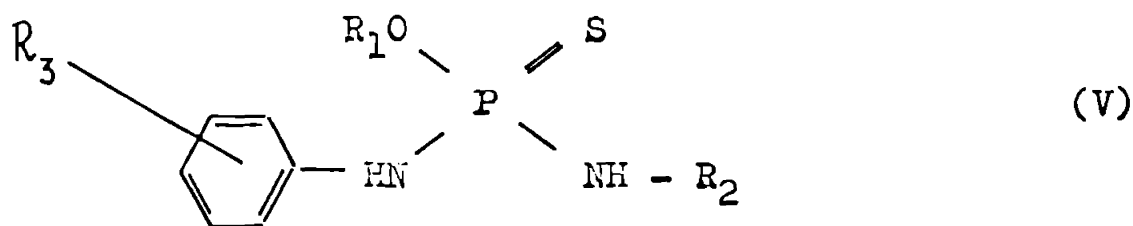
Nr.	R ₁	R ₂	log I/C	ρ	π	π^2	E _S	MSD
8.	C ₄ H ₉	CH ₃	0,2840	-0,33	2,50	6,25	-0,39	5
9.	C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	0,1675	-0,31	3,00	9,00	-0,46	4
10.	C ₄ H ₉	i-C ₃ H ₇	0,2076	-0,31	3,30	10,89	-0,86	3
11.	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	0,1675	-0,32	4,00	16,00	-0,78	4
12.	C ₄ H ₉	i-C ₄ H ₉	0,3767	-0,36	3,80	14,44	-1,32	2

Si în acest caz, dintre ecuațiile corelaționale, una se impune printr-un coeficient de corelare net superior față de celelalte (tabelul 65) și ea corespunde parametrilor (E_S, MSD) (r=0,843)

Tabelul 65.

a	X	b	Y	c	r	s
-0,087	ρ	0,035	π	0,028	0,193	0,117
0,323	ρ	-0,078	E _S	0,203	0,190	0,099
-0,416	ρ	0,072	MSD	-1,150	0,711	0,084
-0,390	π	0,072	π^2	0,653	0,330	0,113
0,023	π	-0,038	E _S	0,060	0,211	0,117
0,071	π	0,053	MSD	-0,207	0,641	0,092
-0,296	E _S	0,087	MSD	-0,328	0,843	0,064

Incercînd corelări în seria compușilor O-alchil, N-aril, N-alchil tiofosfonat diaminelor (V)



alcătuită din 25 de compuși (tabelul 66) nu s-au obținut coeficienți de corelare semnificativi.

Subdivizînd această serie în grupe corespunzînd derivaților orto-meta și respectiv para-substituiți și efectuînd corelări cu parametrii structurali indicați în tabelul 66 se pot pune în evidență dependențe ale activității fungicide de unii factori structurali:

Tabelul 66.

R ₃	R ₂	R ₁	log I/C	r	π	π ²	R	R ²	E _B	MSD
O-Cl	CH ₃	C ₂ H ₅	-1,9345	-0,09	2,34	5,48	21,80	475,24	0,20	2
O-CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	-1,9085	-0,49	2,26	5,11	21,61	466,99	-0,21	2,5
O-Cl	i-C ₃ H ₇	C ₂ H ₅	-1,9542	-0,07	3,08	9,48	31,13	969,08	-0,27	0
O-Cl	C ₄ H ₉	i-C ₃ H ₇	-1,7404	-0,08	4,06	16,48	40,41	1632,97	-0,59	4
O-CH ₃	C ₄ H ₉	i-C ₃ H ₇	-1,9031	-0,48	3,98	15,84	40,22	1617,65	-1,00	4,5
O-CH ₃	C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	-1,7201	-0,48	3,70	13,69	35,54	1263,04	-0,19	3,5
m-Cl	CH ₃	C ₂ H ₅	-1,9494	0,05	2,28	5,20	21,80	475,24	0,20	
m-CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	-1,9345	-0,39	2,12	4,49	21,61	466,99	-0,21	
m-Cl	i-C ₃ H ₇	C ₂ H ₅	-1,9243	0,07	3,08	9,48	31,13	969,08	-0,27	
m-CH ₃	i-C ₃ H ₇	C ₂ H ₅	-1,9005	-0,37	2,86	8,16	30,94	957,28	-0,68	
m-Cl	C ₄ H ₉	i-C ₃ H ₇	-1,9294	0,06	4,06	16,48	40,41	1632,97	-0,59	
m-Cl	C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	-1,9557	0,06	3,78	14,29	35,54	1263,09	-0,19	
m-CH ₃	C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	-1,9628	-0,38	3,56	12,67	35,36	1250,53	-0,60	
p-Cl	CH ₃	C ₂ H ₅	-1,8751	-0,09	2,28	5,20	21,80	475,24	0,20	
p-Cl	i-C ₃ H ₇	C ₂ H ₅	-1,92432	-0,07	3,02	9,12	31,13	969,08	-0,27	
p-CH ₃	i-C ₃ H ₇	C ₂ H ₅	-1,9494	0,07	2,92	8,53	30,94	957,28	-0,68	
p-Cl	C ₄ H ₉	i-C ₃ H ₇	-1,8809	-0,07	4,00	16,00	40,41	1632,97	-0,59	
p-CH ₃	C ₄ H ₉	i-C ₃ H ₇	-1,8921	-0,48	3,90	15,21	40,22	1617,65	-1,00	
p-CH ₃	C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	-1,9661	-0,08	3,72	13,84	35,54	1263,09	-0,19	

pentru derivații orto-substituiți (tabelul 67) corelarea cea mai bună se obține cu parametrii (\tilde{r}, R): $r=0,910$. Celelalte grupe de compuși, meta- și para-substituiți dau corelări sensibil mai slabe: $r=0,810$ pentru setul (\tilde{r}, R) și respectiv $r=0,889$ pentru (R, R^2).

Tabelul 67.

A^{calc}	a	X	b	Y	c	r	s
log 1/C ORTO	-0,054	\tilde{r}	0,079	\tilde{r}	-2,132	0,643	0,078
	-0,062	\tilde{r}	0,007	R	-2,092	0,586	0,083
	-0,061	\tilde{r}	-0,030	E_S	-1,888	0,203	0,193
	0,086	\tilde{r}	0,044	MSD	-1,956	0,625	0,800
	-0,241	\tilde{r}^2	0,051	\tilde{r}^2	-1,644	0,653	0,077
	1,008	\tilde{r}	-0,088	R	-2,333	0,910	0,043
	0,155	\tilde{r}	0,191	E_S	-2,295	0,802	0,061
	0,053	\tilde{r}	0,022	MSD	-2,093	0,689	0,074
	0,003	R	0,001	R^2	-2,017	0,571	0,085
	0,015	R	0,206	E_S	-2,258	0,753	0,067
	0,004	R	0,026	MSD	-2,058	0,662	0,076
	0,077	E_S	0,049	MSD	-1,969	0,652	0,077
log 1/C META	-0,003	\tilde{r}	-0,005	\tilde{r}	-1,924	0,200	0,019
	-0,008	\tilde{r}	-0,001	R	-1,937	0,106	0,038
	0,007	\tilde{r}	-0,025	E_S	-1,945	0,374	0,018
	0,061	\tilde{r}^2	-0,011	\tilde{r}^2	-2,018	0,295	0,018
	-0,111	\tilde{r}	0,011	R	-1,942	0,810	0,018
	-0,045	E_S	-0,001	R	-1,908	0,541	0,322
	-0,014	\tilde{r}	-0,041	E_S	-1,907	0,193	0,015
	0,005	R	-0,001	R^2	-2,012	0,595	1,069
log 1/C PARA	-0,112	\tilde{r}	-0,018	\tilde{r}	-1,870	0,495	0,063
	-0,111	\tilde{r}	-0,002	R	-1,874	0,488	0,032
	-0,109	\tilde{r}	0,024	E_S	-1,917	0,474	0,033
	-0,094	\tilde{r}^2	-0,605	\tilde{r}	-0,982	0,804	0,017
	-0,026	\tilde{r}	0,002	R	-1,901	0,104	0,038
	-0,006	\tilde{r}	-0,004	E_S	-1,898	0,079	0,038
	-0,049	R	0,001	R^2	-1,666	0,889	0,272
	-0,001	R	-0,005	E_S	-1,899	0,065	0,041

Cele mai bune corelări ale activității fungicide cu parametrii structurali relevă faptul că în cazul compușilor de tipul (I) și (III) o contribuție hotărâtoare o au parametrii care descriu efectele electronice ale substituenților și cei care evaluează proprietățile de hidro-fobicitate.

În cazul compușilor (II) și (IV) parametrul E_S stabilește corelări semnificative, alături de τ și MSD ceea ce evidențiază rolul deosebit al particularităților sterice în regularitatea variației activității fungicide.

La compușii (V) hidrofobicitatea și volumul substituenților definesc în mare măsură activitatea fungică dar numai în măsura în care se referă la o aceeași poziție în nucleul benzenic.

Se poate admite că într-adevăr manifestarea activității fungicide presupune interacțiunea compusului respectiv cu sistemul redox al ciupercii [849] dar alături de perturbarea proceselor oxido-reducătoare, compușii discutați exercită și o acțiune efectivă de inhibare a activității unor fermenți. Realizarea inhibării fermenților poate avea loc prin formarea ireversibilă a unor compuși substrat-ferment ca și a unor complecși chelați între compușii studiați și ioni unor metale cu rol decisiv în cataliza biologică reprezintă de asemenea modalități de realizare a acțiunii fungicide.

Aceste procese sînt condiționate de capacitatea C.O.F. de a pătrunde prin membranele ciupercii, ceea ce impune satisfacerea anumitor cerințe sterice. Condițiile sterice sînt impuse de similitudinea substrat albuminic- molecule de fungicid.

Natura, poziția și volumul substituenților joacă un rol însemnat stît în formarea complecșilor cît și în exercitarea efectului electronic perturbator asupra sistemului redox din ciuperci.

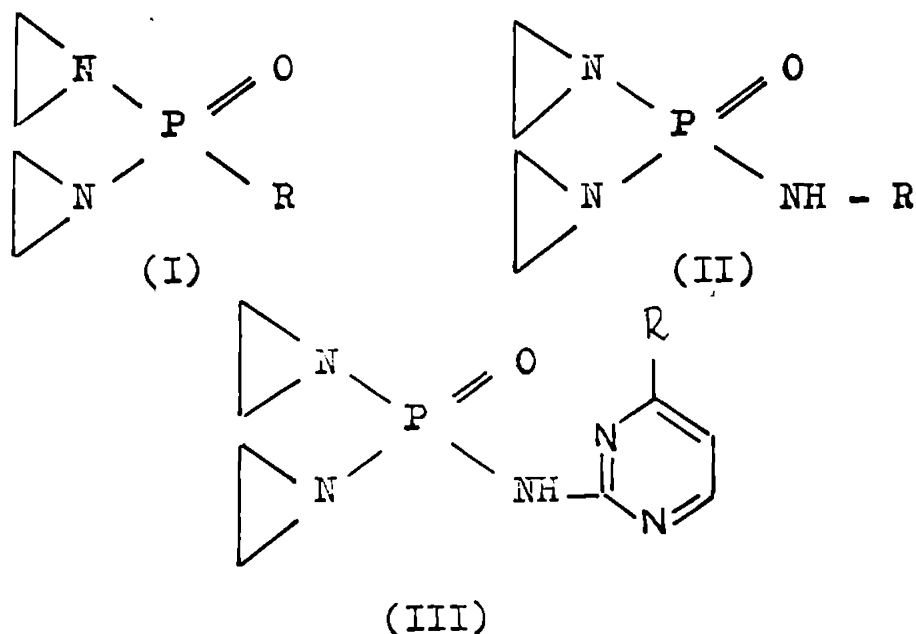
Este de presupus că structura chimică, privită în sens complex, determină ceea ce prin care se realizează efectul fungicid și este de așteptat că acesta se manifestă cu un înalt grad de specificitate.

2.12. Corelări structură-activitate biologică la derivații aziridinici fosforilați

Derivații aziridinici, între care și cei fosforilați, manifestă o acțiune biologică cu efecte multiple: antimicrobian, insecticid și chemosterilizant [850]. Deși derivații aziridinici manifestă un oarecare efect specific, cauza obișnuită a efectelor înregistrate este o acțiune tipică de agent alchilant puternic [851-854] prin care se produce alchilarea unei anumite părți sau mai multor părți ale structurii de acid nucleic implicată în diviziunea celulară, eventual și a altor componente celulare. Efectul biologic al acestei acțiuni constă în perturbări importante ale mitozei și în modificarea profundă a materialului genetic al celulei.

La nivel celular în funcție de intensitatea de acțiune a agenților alchilanți aziridinici și pe măsura creșterii dozei administrate se disting trei categorii de efecte [850]: împiedecarea diviziunii celulare (efect citostatic), formarea de celule cu proprietăți genetice alterate (efect mutagenetic) și moartea celulei (efect citotoxic).

Pentru a determina influența variațiilor structurale asupra acțiunii biologice, ne-am propus [855] corelarea toxicității unor serii de derivați aziridinici fosforilați exprimată prin $-\log DL_{50}$ cu parametrii structurali. Seriele de compuși examinate corespund formulelor generale:



Parametrii structurali utilizați în corelări au fost: constantele de substituent σ^p , σ^1 și respectiv f^* [39,670]; constantele de hidrofobicitate Hansch, π , π^2 , [716], refracțiile molare, R , [813] și diferențele sterice minime, MSD, [707].

Valorile mărimilor corelate pentru seriile (I),(II),(III) sînt date în tabelele 68,69 și respectiv 70.

Tabelul 68.

Nr.	R ₁	-log DL ₅₀	σ^{\dagger}	π	π^2	R	R ²	MSD	Lit.
1	-NHCH ₃	-0,9445	-0,606	-0,47	0,221	9,263	85,803	0	856
2	-NHC ₂ H ₅	-1,2648	-0,511	0,08	0,006	13,910	193,488	1	856
3	-NHC ₃ H ₇	-1,0171	-0,590	0,76	0,578	18,263	333,537	2	856
4	-N(C ₂ H ₅) ₂	-2,5663	0,390	-0,53	0,281	23,344	544,942	3	857
5	-C ₂ H ₅	-1,3655	-0,100	1,02	1,040	10,300	106,090	0	856
6	-CH ₃	-1,3802	0,000	0,56	0,314	5,653	31,956	1	856
7	-C ₃ H ₇	-1,3181	-0,115	1,55	2,40	14,965	223,395	1	856
8	-C ₄ H ₉	-1,6513	-0,130	2,00	4,00	19,585	383,57	2	856

Tabelul 69.

Nr.	R	-log DL ₅₀	σ_1	π	π^2	R	R ²	MSD	Lit.
1	=C(C ₆ H ₅)OC ₂ H ₅	-1,6021	0,24	0,45	0,202	25,20	408,04	6	856
2	-COOCH ₃	-1,5050	0,34	0,27	0,073	11,85	140,42	5	858
3	-COOC ₂ H ₅	-1,4773	0,34	0,51	0,26	16,50	272,25	3	858
4	-COOCH ₂ C ₆ H ₅	-1,4472	0,30	1,06	1,12	36,01	1311,16	0	858
5	-CH ₂ C ₆ H ₅	-2,1762	0,04	2,01	4,04	30,01	960,60	12	859
6	-COC ₆ H ₄ F-P	-1,9295	0,20	0,58	0,34	30,95	957,90	8	859
7	-CONHC ₆ H ₅	-2,0414	0,25	0,72	0,52	34,68	1202,70	10	859
8	-CONHC ₁₀ H ₇	-2,4773	0,29	1,33	1,71	51,06	2607,12	13	860

Tabelul 70.

Nr.	R	$-\log DL_{50}$	σ	\bar{x}	π^2	R	R^2	MSD	Lit.
1	H	-2,6583	0,98	0	0	2,052	4,211	3	861
2	Cl	-2,9804	3,17	0,70	0,49	6,847	46,811	2	861
3	CH ₃	-2,2254	0,49	0,52	0,27	6,662	44,382	2	861
4	OCH ₃	-2,1336	2,22	-0,04	0,0016	8,415	70,812	1	861
5	N(CH ₃) ₂	-0,7785	1,11	0,14	0,0196	13,970	195,161	0	861
6	N(CH ₃)(CH ₂ C ₆ H ₅)	-2,3655	1,86	2,10	4,41	38,094	1451,15	1	861
7	CH ₃	-3,0171	2,68	1,22	1,488	11,457	131,26	1	861

Diferențele sterice minime s-au calculat în raport cu stenderdele alese, care în cazul fiecăreia dintre cele trei serii de compuși s-au considerat a fi compuși cu toxicitate maximă.

Utilizând un program de corelare biparametrică de tip:

$$-\log DL_{50} = a.X_i + b.Y_i + c$$

s-au obținut ecuații corelaționale care,corespunzător seriilor (I), (II) și (III),sînt prezentate în tabelele 71,72 și respectiv 73.

Tabelul 71.

A_i^{calc}	a	X_i	b	Y_i	c	r	s	F
-log DL ₅₀	0,125	π	-0,055	R	-0,726	0,659	0,381	1,02
	0,093	π	-0,347	MSD	-1,062	0,732	0,345	1,5
	-0,005	R	-0,325	MSD	-0,962	0,713	0,354	
	0,237	R	-0,010	R ²	-2,468	0,878	0,242	4,4
	-1,312	r	0,117	π	-1,784	0,905	0,215	6,9
	-1,127	r	-0,034	R	-1,188	0,956	0,148	14,15
	-1,034	r	-0,186	MSD	-1,421	0,942	0,169	10,5
	0,555	π	-0,343	π^2	-1,404	0,508	0,436	0,46

Tabelul 72.

A_i^{calc}	a	X_i	b	Y_i	c	r	s	F
-log DL ₅₀	0,362	r	-0,321	π	-1,666	0,639	0,293	1,49
	1,405	r	-0,021	R	-1,565	0,893	0,217	2,71
	-0,222	r	-0,083	MSD	-1,184	0,942	0,125	10,50
	-0,352	π	-0,003	π^2	-1,547	0,636	0,294	0,97
	-0,153	π	-0,017	R	-1,186	0,749	0,244	1,92
	-0,124	π	-0,071	MSD	-1,227	0,962	0,103	16,56
	-0,004	R	-0,001	R ²	-1,415	0,758	0,248	1,80
	-0,011	R	-0,065	MSD	-1,049	0,991	0,051	72,13

Tabelul 73.

A_i^{calc}	a	X_i	b	Y_i	c	r	s	F
-log DL ₅₀	-1,438	π	0,087	R	-2,441	0,834	0,340	2,28
	-0,478	π	-0,570	MSD	-1,178	0,794	0,462	1,70
	-0,150	R	-0,003	R ²	-3,274	0,486	0,685	0,31
	-0,014	R	-0,575	MSD	-1,316	0,661	0,570	0,77
	-0,367	r	-0,189	π	-1,527	0,562	0,628	0,46
	-0,429	r	0,012	R	-1,698	0,566	0,626	0,47
	-0,500	r	-0,568	MSD	-0,604	0,896	0,337	4,08
	-1,414	r	0,545	π^2	-1,893	0,493	0,661	0,32

Examinarea corelărilor structură-toxicitate efectuate pentru seria N-alkil diaziridinil-(1)-fosfinamidelor(I) arată că cei mai buni coeficienți de corelare se obțin în utilizarea seturilor de parametri (\tilde{r}, R) , (\tilde{r}, MSD) și (\tilde{r}, \tilde{r}) ($r=0,956$, $0,942$ și respectiv $0,902$) în care contribuția principală revine lui \tilde{r} . Corelarea uniparametrică $-\log DL_{50} = F(\tilde{r})$ a condus la ecuația corelațională:

$$-\log DL_{50} = (-1,300 \pm 0,19) \cdot \text{MSD} + (1,709 \pm 0,07) \quad (1)$$

$$r = 0,881$$

reprezentată în figura 41.

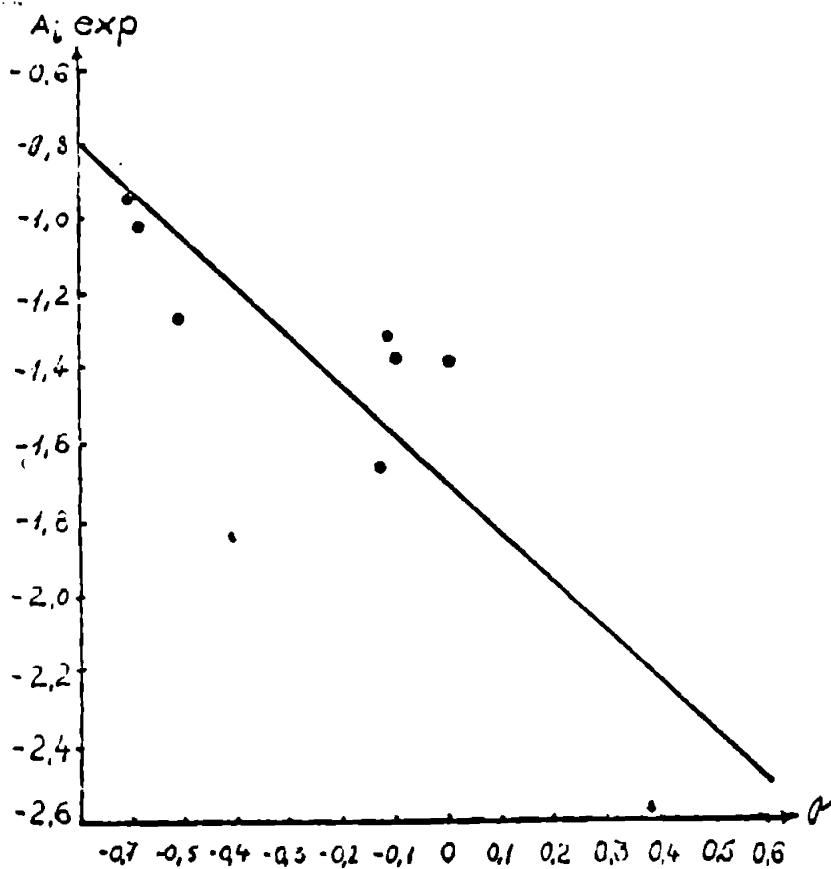


Figure 41.

În cazul diaziridinil-(1)-fosfinamidelor N-substituite cele mai bune corelări biparametrice sînt realizate prin seturile de parametri care conțin MSD-ul (ecuațiile 3, 6 și 8 din tabelul 72), în timp ce singura corelare uniparametrică semnificativă este

$$-\log DL_{50} = F(\text{MSD}) :$$

$$-\log DL_{50} = (-0,080 \pm 0,006) \cdot \text{MSD} - (1,259 \pm 0,05) \quad (2)$$

a cărei reprezentare este dată în figura 42.

Spre deosebire de primele două serii de compuși, la 2-(diaziridinil-1-fosfinamido)-pirimidine-4,6-disubstituite corelările $-\log DL_{50} = F(\tilde{r})$ și respectiv $-\log DL_{50} = F(\text{MSD})$

$$-\log DL_{50} = (-0,415 \pm 0,19) \cdot \tilde{r} - (1,568 \pm 0,532) \quad (3)$$

$$r = 0,532$$

$$-\log DL_{50} = (-0,494 \pm 0,14) \cdot MSD - (1,604 \pm 0,23) \quad (4)$$

$$r=0,634$$

au coeficienți de corelare slabi. Utilizarea setului de parametrii (r , MSD) îmbunătățește sensibil corelarea (ecuația 7, tabelul 73).

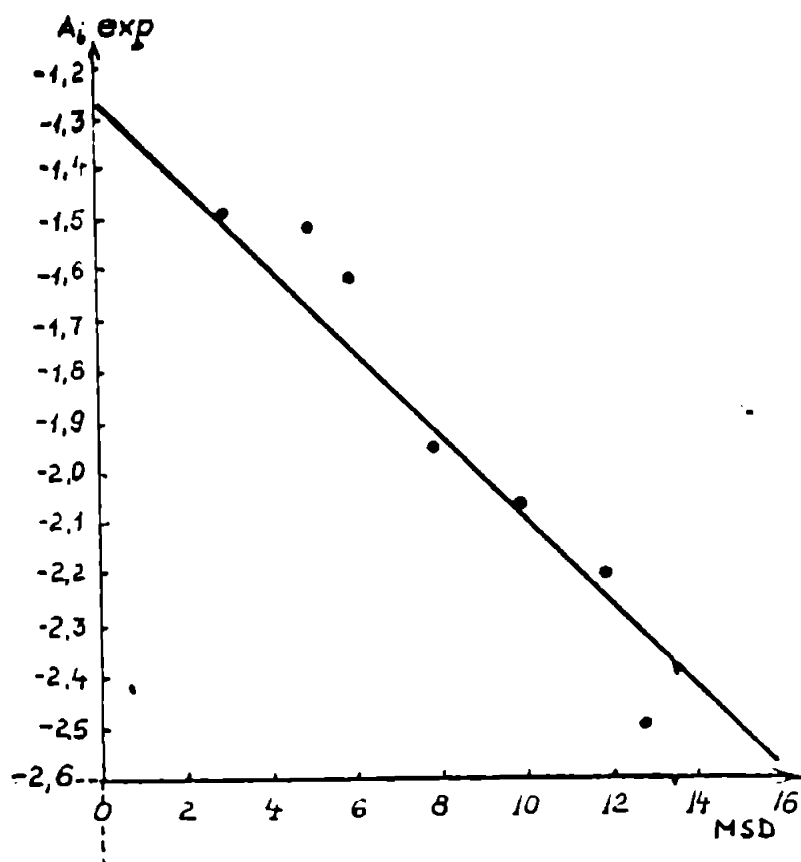


Figure 42.

Rezultatele obținute ne-au permis să tragem concluzia că dacă în cazul compușilor seriei (I) efectele electronice ale substituenților determină în primul rând toxicitatea, la diaziridinil - l-fosfinamidele N-substituite (II) aceasta este condiționată în principal de particularitățile sterice ale substituenților raportate la cerințele sterice optimele (ale standardului). Toxicitatea compușilor (III) este dependentă atât de efectele electronice cât și de cele sterice exercitate în mod specific în funcție de natură substituentului.

3. Corelări cantitative structură-activitate biologică, mijloc de prevedere a structurilor optime pentru realizarea unor proprietăți pesticide date și de elucidare a mecanismului de acțiune la compuși organofosforici

Corelările cantitative structură-activitate biologică pot dobîndi o mare însemnătate ca modalitate de selectare a structurilor chimice cu acțiune pesticidă prestabilită, la parametri optimi de eficacitate, spectrul de acțiune, toxicitate selectivă, stabilitate [862-864]. Succesul corelărilor întreprinse în acest scop depinde de o parametrizare cît mai completă și mai fidelă a proprietăților care determină activitatea biologică a compușilor studiați. Dacă influența efectelor electronice și a interacțiilor hidrofobe sau liofile asupra mărimii care exprimă răspunsul biologic, la variația substituenților în serii de compuși activi, a putut fi descrisă printr-o gamă largă de parametri, particularitățile sterice nu au fost încă estimate la nivelul cerințelor dictate de structura complexă, insuficient elucidată, a situsilor receptori.

Corelările multiparametrice în care variațiile structurale sînt exprimate printr-o variație continuă a parametrilor, mai degrabă decît prin valori discrete ale acestora, (0,1), ni se par cele mai indicate pentru a releva particularitățile structurale ale substituenților (fragmentelor moleculare) care determină acțiunea biologică optimă.

Aplicînd aceste principii în corelări structură-activitate biologică la compuși organofosforici, așa cum s-a arătat pe larg în capitolul 3, paragrafele 2 din această lucrare, s-au obținut ecuații corelaționale a căror finalitate o reprezintă desemnarea structurilor care se recomandă a fi cele mai active.

În tabelul 74 sînt date structurile ipotetice care se presupun a corespunde celor mai activi compuși din clasele de combinații organofosforice studiate.

Tabelul 74.

Nr.	Clasa de compuși organofosforici	Structura compusului cu eficacitate pesticidă maximă
1.	Derivați ai acidului fosforic de tip Schrader $ \begin{array}{c} R_1O \\ \diagdown \\ P \\ \diagup \\ R_2O \end{array} \begin{array}{l} = O \\ \\ \diagdown \\ OR_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} CH_3O-CH_2-CH_2O \\ \diagdown \\ P \\ \diagup \\ CH_3O-CH_2-CH_2O \end{array} \begin{array}{l} = O \\ \\ \diagdown \\ O-CH=C \begin{array}{l} \diagup COOC_2H_5 \\ \diagdown COOC_2H_5 \end{array} \end{array} $

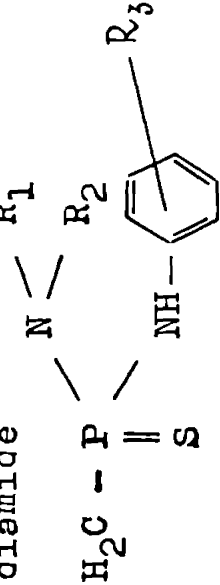
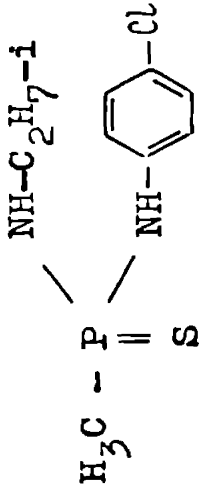
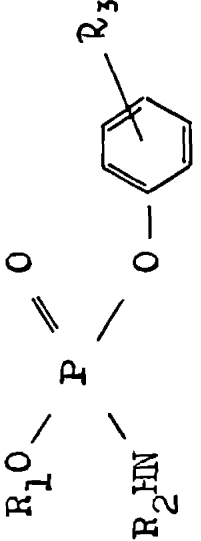
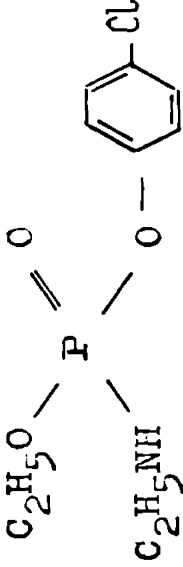
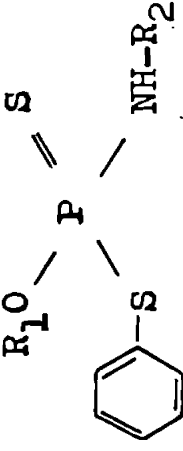
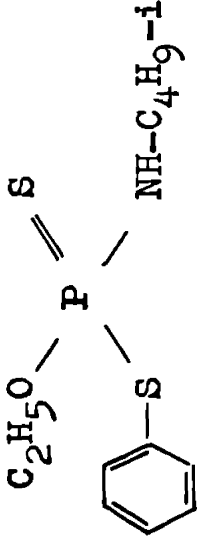
Nr.	Clasa de compuși organofosforici	Structura compusului cu eficacitate pesticidă maximă
2.	<p>Derivați ai acidului tiofosonic de tip Schrader cu centru cationic în grupe eliminantă</p> $ \begin{array}{c} R_1 \quad O \\ \diagdown \quad // \\ P \\ \diagup \quad \diagdown \\ R_2 \quad S-CH_2-CH_2-X-R \end{array} $	$ \begin{array}{c} CH_3 \quad O \\ \diagdown \quad // \\ P \\ \diagup \quad \diagdown \\ C_6H_{13}O \quad S-CH_2-CH_2-N^+(C_6H_5)CH_3 \end{array} $
3.	<p>Vinil fosfeți</p> $ \begin{array}{c} R_1O \quad O \\ \diagdown \quad // \\ P \\ \diagup \quad \diagdown \\ R_1O \quad O-CR_2=CR_3COOR_4 \end{array} $	$ \begin{array}{c} CH_3 \quad O \\ \diagdown \quad // \\ P \\ \diagup \quad \diagdown \\ C_2H_5O \quad O-C=CHCOOC_2H_5 \\ C_2H_5O \quad \\ \quad \quad CH_3 \end{array} $
		$ \begin{array}{c} CH_3 \quad O \\ \diagdown \quad // \\ P \\ \diagup \quad \diagdown \\ CH_3O \quad O-C(=C-COOCH_2CH_3)C_6H_5 \\ \quad \quad \\ \quad \quad Cl \end{array} $

Tablul 74-continuere-

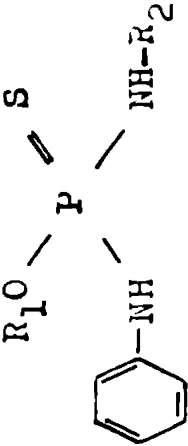
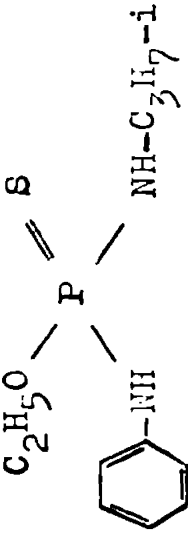
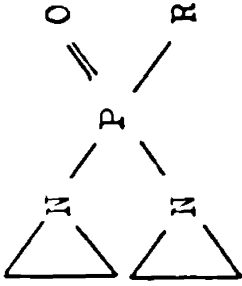
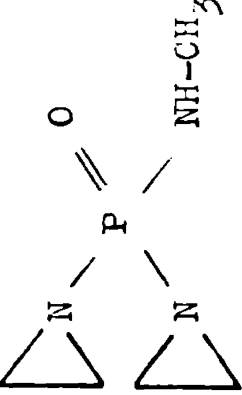
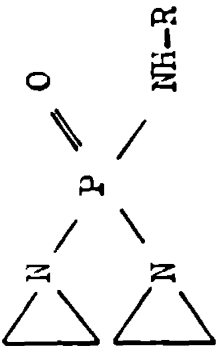
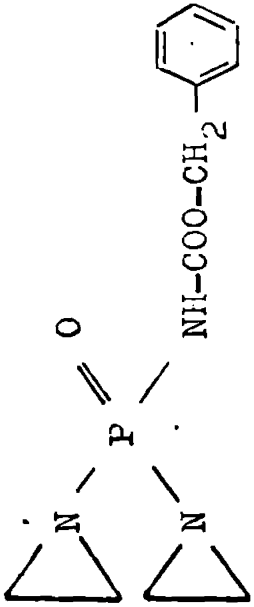
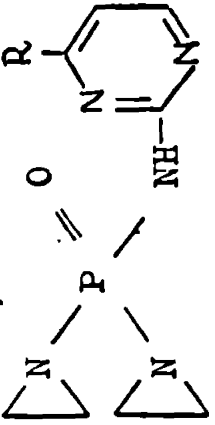
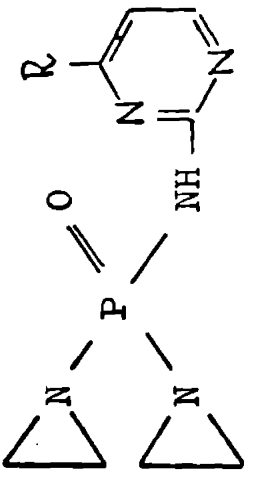
Nr.	Clasa de compuși organofosforici	Structura compusului cu eficacitate pesticidă maximă
		$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} - \text{P} - \text{Cl} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{OC} - \text{C} - \text{COOCH}_3 \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3 \end{array} $
4.	S-alchil difenil fosfați	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_6\text{H}_5 - \text{P} - \text{S} - \text{C}_6\text{H}_{13} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_6\text{H}_5 \quad \text{S} - \text{C}_6\text{H}_{13} \end{array} $
5.	O-etil-O-(2-alchil mercaptoetil) fenil fosfați	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_6\text{H}_5 - \text{P} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{R} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_3 \end{array} $
6.	O-alchil-O-(2-metil mercaptoetil) fenil fosfați	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}_6\text{H}_5 - \text{P} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_3 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_2\text{H}_5\text{O} \quad \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_3 \end{array} $

Nr.	Clasa de compuși organofosforici	Structura compusului cu eficacitate pesticidă maximă
7.	<p>O-alkil-S-(2-alkil mercaptoetil) metil tiofosfonații</p> $ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{O} \\ \diagdown \quad // \\ \text{P} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R}_1 \quad \text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-R}_2 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{O} \\ \diagdown \quad // \\ \text{P} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_n\text{H}_{2n+1} \quad \text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-C}_n\text{H}_{2n+1}\text{-SO}_4\text{CH}_3 \end{array} $
8.	<p>O,O-dialkil N-acetil-N-fenil fosforeamide</p> $ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{N-P}-(\text{O-alkil})_2 \\ \quad \\ \text{C=O} \quad \text{CH}_3 \\ \text{R} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{N-P}-(\text{OC}_2\text{H}_5)_2 \\ \quad \\ \text{C=O} \quad \text{CH}_3 \\ \text{R} \end{array} $
9.	<p>N,N-dietil,N-eril metil fosfonat-diamine</p> $ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} - \text{P} \quad \text{NH} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{R} \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2 \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} - \text{P} \quad \text{NH} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{NO}_2 \end{array} $

Tabelul 74--continuare --

Nr.	Clasa de compuși organofosforici	Structura compusului cu eficacitate pesticidă meximă
10.	<p>N,N-dialchil,N-aril metil tiosfonat-diamide</p> 	
11.	<p>Alchil-aril fosfonat amide-N-alchilate</p> 	
12.	<p>O-alchil-S-aril amido N-alchil ditionofosoneși</p> 	

Tabelul 74 - continuare -

Nr.	Clase de compuși organofosforici	Structura compusului cu eficacitate pesticidă maximă
13.	<p>O-alkil-N-aryl,N'-alkil tiofosfonat diemide</p> 	
14.	<p>N-alkil diaziridinil -(1)-fosfinamide</p> 	
15.	<p>Diaziridinil -1-fosfinamide N-substituite</p> 	
16.	<p>2-(diaziridinil-1-fosfinamido)-pirimidine-4,6-disubstituite</p> 	

C a p i t o l u l I V

P A R T E A E X P E R I M E N T A L A

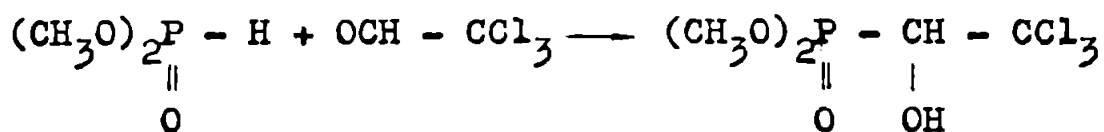
SINTEZA SI APLICATIILE DIALCHIL ESTERILOR ACIDULUI 1- HIDROXI -
2,2,2-TRICLORETAN FOSFONIC SI A DERIVATILOR LOR DE DEHIDROCLORU-
RARE. ESTERI VINILICI (VINIL FOSFATI) SI DERIVATII BROMURATI
AI ACESTORA

1. Sinteza esterilor dialchilici ai acidului 1-hidroxi-2,2,2,-
tricloretan fosfonic

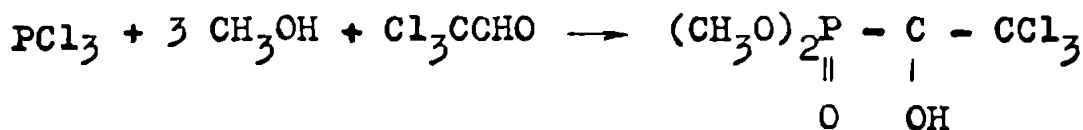
Esterii dialchilici ai acidului 1-hidroxi-2,2,2-tricloretan fosfonic (ex.0,-dimetil-(1-hidroxi-2,2,2,-tricloretil)-fosfonatul, cunoscut sub denumirea comercială de Triclorfon sau Dipterex) prezintă o acțiune pesticidă remarcabilă, în special ca insecticide de ingestie și de contact cu spectru larg de acțiune [865-866]

Metodele de preparare cunoscute în literatura indică obținerea Dipterexului prin:

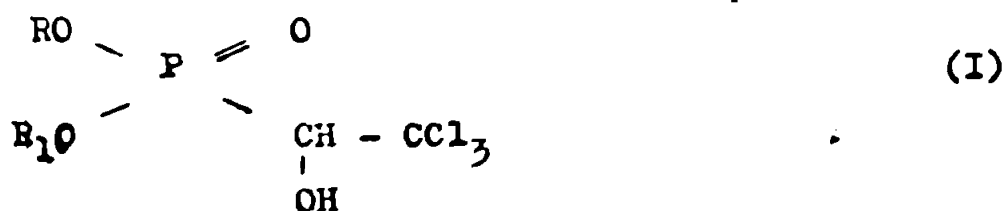
a) condensarea dimetilfosfitului cu cloral [867-868]



b) condensarea triclorurii de fosfor cu metanol și, fără a izola fosfitul, tratarea în continuare cu cloral [869] în mediu bazic



Noii esterii dialchilici ai acidului 1-hidroxi-2,2,2-triclor-
etan fosfonic, sintetizați în condiții foarte ușor accesibile din
punct de vedere industrial, corespund formulei:



în care R și R₂ sînt radicalii etilici - C₂H₅ [570]

Sinteza decurge prin adăugarea într-un solvent inert (cu punct de fierbere cît mai jos), sub agitare intensă și sub reflux a unui amestec al celor doi alcooli, ai căror radicali intră în structura fosfonatului respectiv. Solventul se evaporă sub vid, la temperatură cît mai joasă. Reziđiul din blaz, ușor mobil, se încălzește la o temperatură în jur de 50-60°C, după care se adaugă cantitatea necesară de cloral anhidru, menținînd temperatura constantă (pe un interval de 3-5°C) în tot timpul adăugării acestui reactant.

Final, se încălzește încă o oră sub agitare, la temperatura stabilită final - după adăugarea întregii cantități de cloral.

Sub vid de 10-30 mm Hg, prin încălzire timp de cîteva minute la 80-90°C, se îndepărtează excesul de cloral din amestecul de reacție.

Reziđiul, diluat cu solventul în care s-a efectuat reacția, se spală pînă la reacție neutră cu o soluție apoasă de bicarbonat de sodiu.

După uscare timp de 24 de ore pe Na₂SO₄ anhidru, se evaporă componentele mai volatile, pînă la greutate constantă, într-un evaporator pelicular.

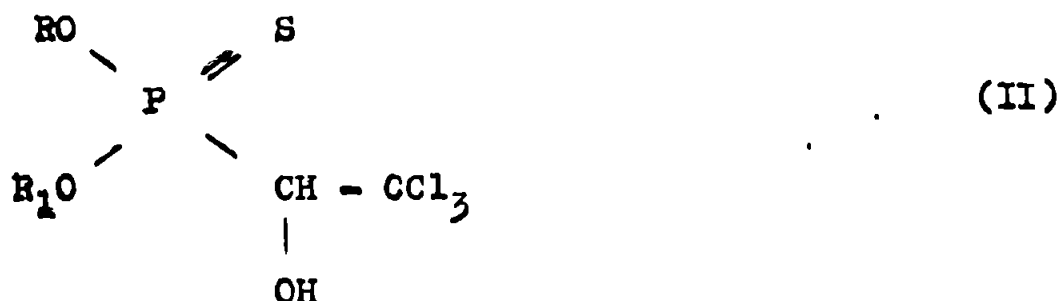
Randamentul variază între 75-85% în esterii micști de tipul menționat (I)

Analiza gaz-cromatografică a produsului acetilat în piridină a indicat în cazul produsului cu grupa metoxi și etoxi la P un raport de produse MED : DMD : DED = 2 : 1 : 1.

De o mare importanță este evitarea prezenței unor impurități acide sau bazice. Un mediu bazic determină eliminarea de HCl și transpunerea în analogi ai Diclorvosului, iar în mediu bazic se produce o desalchilare parțială.

Prin reacția unor esteri dialchilici ai acidului tionofosfonic cu cloral, în prezența unui catalizator bazic și în solvent inert,

s-au obținut de asemenea esteri cu structură analogă celor menționați anterior prin (I) (radicalii R și R₁ sînt aceiași sau diferiți:



Sinteza unor astfel de compuși (I) și (II) s-a întreprins plecînd de la ipotezele făcute pe baza relațiilor structură-activitate anticolinesterazică pe care le-am stabilit anterior [264] și care prevăd o acțiune insecticidă considerabil mai puternică și o toxicitate scăzută față de animalele cu sînge cald la acești tio-derivați, comparativ cu analogii dialchilici ai acidului l-hidroxi-2,2,2-triclorețan fosfonic.

Dintre solvenții ce pot fi folosiți se menționează: clorura de metilen, cloroform, tetraclorura de carbon, clorbenzen și xilen.

La dimetil fosfitul (tionoderivatul), diluat în solventul de reacție, conținînd și cantitatea de catalizator corespunzătoare, s-a adăugat cantitatea stoichiometrică necesară de clorol anhidru, astfel ca temperatura în vasul de reacție să nu depășească 5-10°C. Se menține amestecul sub agitare energică, timp de o oră, la această temperatură, apoi se spală masa de reacție cu apă pînă la reacție neutră a apei de spălare. Din faza organică separată, se evaporă solventul, după o uscare preliminară pe Na₂SO₄.

Randamentul în l-hidroxi-2,2,2-triclorețan fosfonatul de dime-til este peste 95%. Produsul se distilă sub vid înaintat (caracterizare: $n_D^{20} = 1,5330$). Folosirea carbonatului de potasiu a dus la rezultate similare. După o metodică analogă se obține și etil-derivatul respectiv.

Efecte bune, în calitate de catalizatori, dau unele amine heterociclice precum și hidroxizii și carbonații alcalini. Temperaturile

de reacție pot fi variabile într-un interval larg, sub 110°C.

Reacția s-a condus de regulă, la presiunea normală. Reactanții s-au luat în raporturi stoichiometrice.

După evaporarea solventului, amestecul de reacție se spală cu o soluție apoasă de bicarbonat de sodiu. Se procedează la uscarea pe Na_2SO_4 , după care se evaporă în evaporator pelicular.

Randamentele obținute sînt în jur de 80%.

1.2. Acțiune biologică

În ceea ce privește activitatea biologică a compușilor sintetizați, aceștia se manifestă ca insecticide de ingestie dar și de contact. Toxicitatea față de mamifere variază în limite largi. De la 630 mg/kg la Dipterex, ea crește de aproape 10 ori la D.E.D., în timp ce activitatea anticolinesterazică scade de cca. 15 ori. Dipterexul asimetric prezintă o activitate insectidică satisfăcătoare fără o creștere exagerată a toxicității față de mamifere. Derivații alchilici în care R și R_1 sînt radicali C_3 , C_4 sînt de asemenea activi și slab toxici. Toxicitatea scade și mai mult în cazul în care gruparea OH este acilată prin tratarea cu anhidride.

Transformările metabolice care au loc în organism sînt diferențiate în mediu apos și pH acid față de mediul bazic. Tabloul acestor transformări respectă schema prezentată în anexa II, p.12.

Dialchil tiofosfonații obținuți au în toate cazurile un caracter anticolinesterazic atenuat și acțiunea lor este urmarea transformării lor prin oxidarea de către sistemul fermentativ al organismului la metaboliții activi $(\text{RO})(\text{R}_1)\text{P}(\text{O})\text{R}_2$

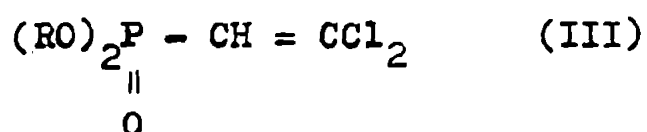
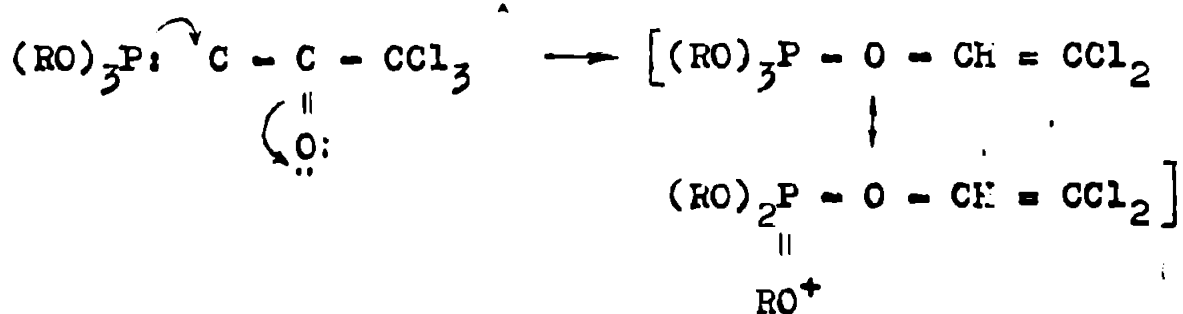
2. Preparate pesticide cu efect în stare gazoasă pe bază de vinil fosfați (O,O-dialchil-O-2,2 - diclorvinil fosfați)

2.1. Sinteza

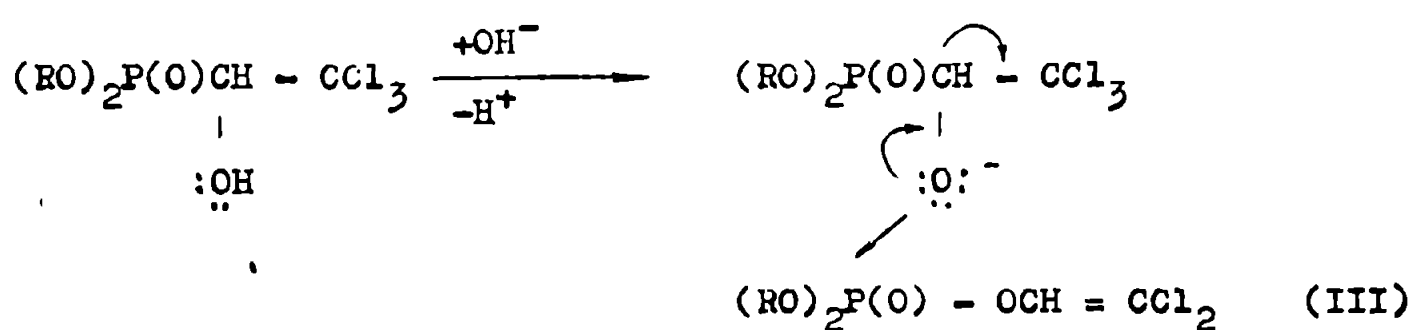
Vinil fosfații pot fi obținuți:

- prin condensarea directă a trialchil fosfiților cu cloral [871-876]

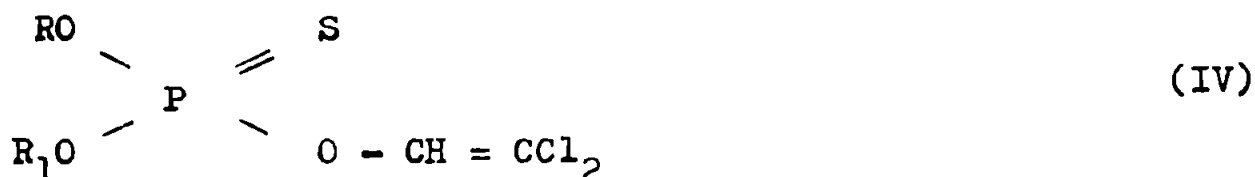
ca urmare a atacului nucleofil al fosfitului la grupa carbonil (reacție Perkow) [877] :



- prin transpoziția O,O-dialchil-1-hidroxi-2,2,2-tricloreten fosforaților la încălzirea cu baze [878-879] :

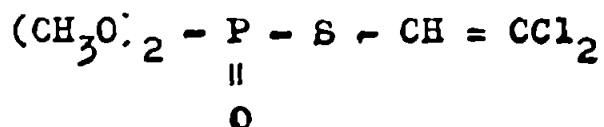


Vinil tionofosfații cu formula



se obțin pe căi similare dar cu randamente de reacție foarte mici. Astfel, esterul O,O-dimetilic al acidului O-(2,2-diclorvinil)-tionofosforic se poate prepara plecând de la diclorura esterului acidului O-(2,2-diclorvinil)-tionofosforic prin reacția cu metanol. Procedeu are o serie de dezavantaje, în sensul că diclorura respectivă se prepară cu randamente foarte mici (sub 30% față de cel teoretic) și la temperaturi foarte mari.

După unele surse din literatură compușii obținuți nu ar avea structura esterilor O,O-dialchilici ai acidului O-(2,2-diclorvinil)-tionofosforic ci s-ar obține un izomer ale acestuia:



Interesul pentru elaborarea unui procedeu care să înlăture dificultățile menționate este evident.

Produsul de reacție, O,O-dialchil esterul acidului O-(2,2-diclorvinil)-tionofosforic, se obține în condiții avantajoase când esterul O,O-dialchilic al acidului 1-hidroxi-2,2,2-tricloretan tionofosforic reacționează cu cantitatea echivalentă a unui alcoolat, hidroxid sau carbonat de metal alcalin în alcoolul corespunzător (metilic, etilic etc.)

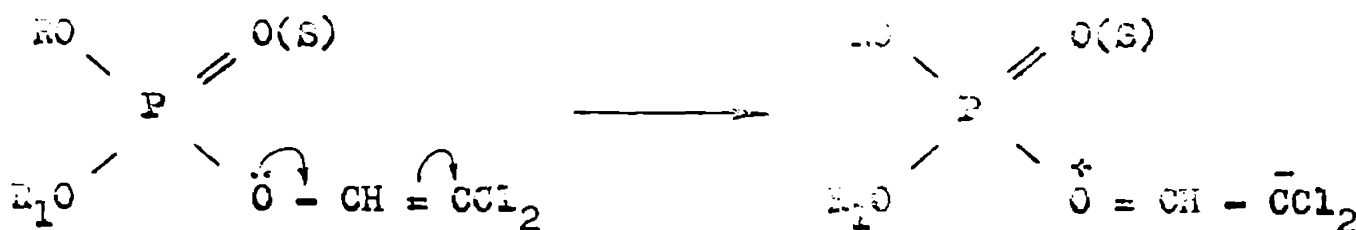
Soluția apoasă obținută la turnarea masei de reacție peste apă cu gheață, se extrage cu un solvent alifatic clorurat. Solventul se îndepărtează, după uscarea soluției respective, iar produsul brut de reacție se distilă sub vid.

2.2. Acțiune biologică

Compușii sintetizați (III-IV) se manifestă ca insecticide cu acțiune de contact și de ingestie [870], cu toxicități moderate față de mamifere. Sînt activi în concentrații de 0,01-0,5%.

Se constată de asemenea că omologii simetrici ai DWP-ului au acțiune insectică mult mai slabă decât aceasta. În schimb volatilitatea lor, sensibil mai mică, îi recomandă a fi utilizați prin inhibare pe suporturi.

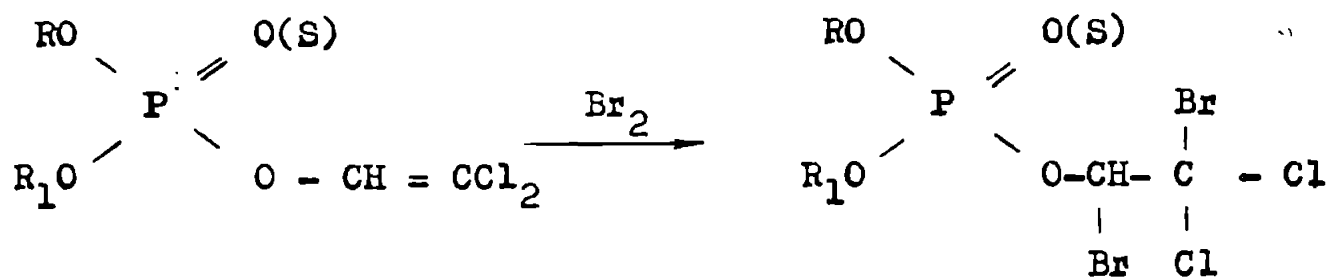
Activitatea biologică este legată de capacitatea de fosforilare a enzimei (formarea POF), adică de agunța cu care are loc hidroliza legăturii P - X. Aceasta este asigurată de prezența în structurile active a grupării acide.



Transformările metabolice pe care compușii sintetizați le suferă în organismul vertebratelor, sau în cel al insectelor, în plante, sînt probabil de tipul celor reduse în schema din anexa II, p.1.

3.1. Sinteza unor O,O-dialchil-1,2-dibrom-2,2-dicloretil fosfați

Adiția bromului la Diclorvos conduce la obținerea O,O-dialchil-1,2-dibrom-2,2-dicloretil fosfatului ("Dibrom") [880-882]. Bromurarea vinil fosfaților sintetizați în modul descris anterior a condus la obținerea unor compuși ai dibromului [870].



(V)

Modul de lucru este analog cu cel descris în literatura de specialitate pentru produsul comercializat sub denumirea de "Naled".

3.2. Acțiunea biologică

Scăderea toxicității față de mamifere prin trecerea de la vinil (tio) fosfați la derivații bromurați corespunzători a fost prevăzută pe baza studiilor noastre [883-884] privind corelația structură-toxicitate la derivații acidului fosforic din clasa enol (vinil)-fosfaților. Plecând de la constatarea că o similitudine sterică cu acetilcolina determină o toxicitate mărită la compusul respectiv, se remarcă faptul că în cazul compușilor (III-IV), dubla legătură s-ar suprapune peste gruparea etilenică a acetilcolinei. Prin bromurarea O,O-dialchil-2,2-diclorvinil fosfaților, diferența sterică minimă în raport cu acetilcolina crește cu 4 unități și este de așteptat că toxicitatea scade în mod sensibil: de la 45 mg/Kg la 400-700 mg/Kg.

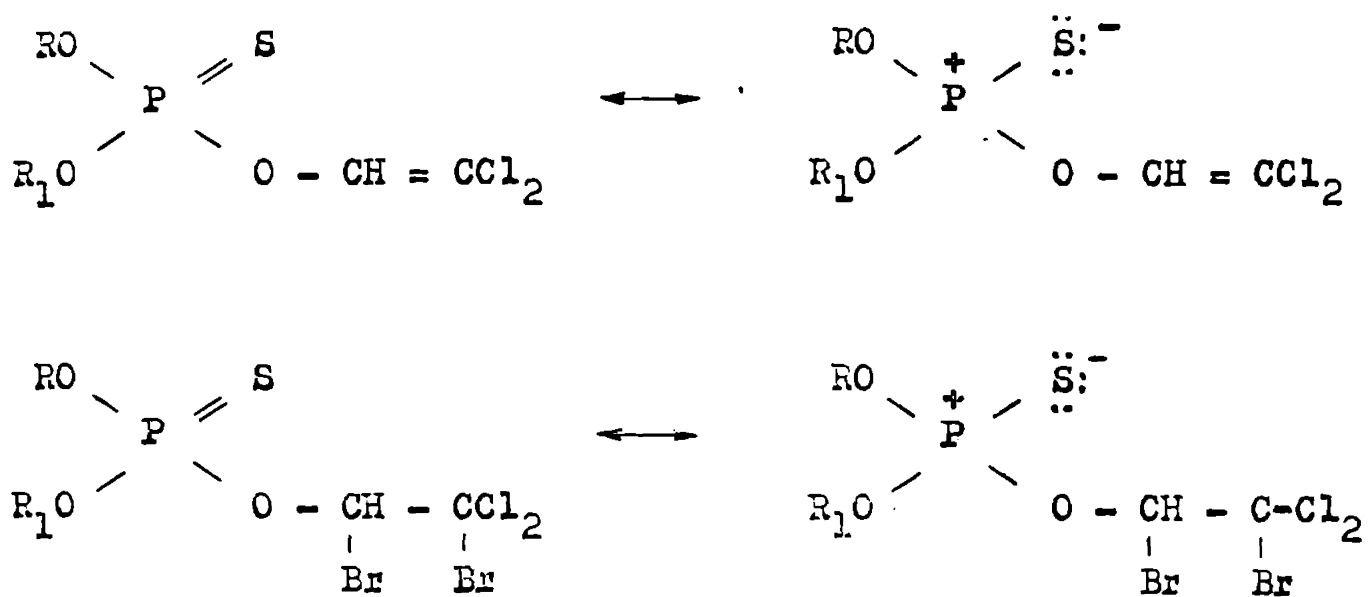
Această scădere a toxicității este estimată de ecuația (6) din cap.II, § 2.5.2, care prevede o variație ΔA_1^{calc} de |0,175.4| unități logaritmice datorită diferențelor sterice și la |0,116.(2.0,391)| datorită modificărilor electronice în substituentul grupării "acil".

Așa cum era ^{de}prevăzut, prin introducerea celor doi atomi de brom în moleculă, volatilitatea compușilor (V) scade.

Capacitatea mărită de hidroliză a O,O-dialchil - 1,2-dibrom-2,2-dicloretil fosfaților poate fi pusă pe seama creșterii bazici-

tății oxigenului grupării acil care nu mai intervine în conjugare și poate accepta un proton. Intermediarul protonat rezultat realizează condițiile unui atac nucleofil favorizat.

Ca și în cazul general, prin trecere de la O,O-dialchil-2,2-diclorvinil fosfații (III) și O,O-dialchil-1,2-dibrom-2,2-dicloretil fosfații (IV) la tion-derivații corespunzători, are loc o scădere a vitezei de hidroliză bazică dat fiind electronegativitatea sulfurii, inferioară față de oxigen:



Contribuția structurilor ionizate este defavorizată.

Datorită capacității de oxidare relativ ridicate, tion-derivații manifestă totuși o toxicitate marcantă ca urmare a oxidării enzimatice din organism care conduce la compuși oxigenați corespunzători cu acțiune anticolinesterazică superioară.

4. Activitatea biologică cuplată, în amestecuri cu acțiune insecticidă pe bază de O,O-dialchil-1-hidroxi-2,2,2-triclorețan (tio) fosfonați și de O,O-dialchil-0-2,2-diclorvinil (tio) fosfați

Amestecurile realizate din O,O-dialchil-1-hidroxi-2,2,2-triclorețan fosfonați manifestă o activitate biologică care este o consecință a acțiunii independente și similare a componentelor. Această concluzie este determinată de înregistrarea unei valori de aproximativ 100 pentru coeficientul de cotoxicitate, CTC.

CTC este definit prin relația [885-887] :

$$CTC = \frac{TI_{AB}}{TI_{AB}^+} \times 100 \quad (1)$$

în care TI_{AB} și TI_{AB}^+ sînt indici de toxicitate pentru un amestec format din două componente active ca pesticide (A și B) :

$$TI_{AB} = \frac{(LC_{50})_A}{(LC_{50})_{AB}} \times 100 \quad (2)$$

$$TI_{AB}^+ = (TI)_A \cdot C_A + (TI)_B \cdot C_B \quad (3)$$

C_A și C_B reprezentînd concentrațiile procentuale ale componentelor respective, A și B, în amestecul testat.

La derivații O,O-dietil, toxicitatea față de mamifere ($DL_{50} = 45-50$ mg/Kg, la șobolan) este de aproximativ 15 ori mai scăzută decît a analogului O,O-dimetilic. Această variație considerabilă a activității insecticide, dar inversă decît în cazul general [264] poate fi pusă pe seama influenței conjugate a următorilor factori asupra dependenței structură-activitate anticolinesterazică:

- mărimea grupării legate direct la P și prezența simultană în aceasta a grupărilor OH și halogen,
- complementaritatea structurii situsului activ în raport cu grupările alcoxi,
- mediul acid sau bazic în care se desfășoară hidroliza enzimatică.

Creșterea în continuare a radicalului alcoxi nu determină o scădere sensibilă a toxicității.

Amestecurile de O,O-dialchil-1-hidroxi-2,2,2-tricloreten fosfonați, în special pe bază de compuși cu grupări alcoxi diferite, permit obținerea de preparate insecticide eficiente la limite unui plafon optim față de dăunătorul combătut, care evită remanența

și efectele secundare.

O,O-dialchil-1-hidroxi-2,2,2-triclorețan tiofosfonații, implicați într-un ansamblu complex de transformări metabolice, manifestă o acțiune insecticidă comparabilă cu aceea a fosfonaților respectivi. O-Desalchilarea enzimatică realizată fie direct, fie prin intermediul produsului de oxidare, funcție de substrat, se realizează cel mai greu la compușii O,O-dietilici.

Variația activității anticolinesterazice ca urmare a variației naturii grupărilor alchidice este mai puțin importantă având în vedere caracterul determinant-preponderent al transformării:



Amestecurile de compuși (I) și (II) se caracterizează printr-o activitate biologică determinată de acțiunea diferită și independentă a componentelor. Ele sînt recomandate [870] ca preparate eficiente în funcție de calea metabolică preponderentă prin care are loc degradarea compusului în organismul dăunătorului.

Amestecuri de O,O-dialchil-1-hidroxi-2,2,2-triclorețan fosfonați cu malation, gusathion sau sasamex prezintă acțiune sinergetică ($CTC > 100$) ca urmare a interferenței metabolismului și a reacțiilor de detoxicare pe care le înregistrează componentele.

Amestecurile preparate pe bază de O,O-dialchil-O-2,2-diclorvinil fosfați, formate din:

- compuși de tipul (III) în proporții diferite,
- compuși de tipul (III) cu alți vinil fosfați (fosfinon, mevinfos, ciodrin, azodrin, bidrin, fosfamidon, bamil și gardona) manifestă activități anticolinesterazice determinate de caracterul independent și similar al acțiunii componentelor. Toxicitățile amestecurilor au valori care reprezintă contribuția aditivă a componentelor.

Derivatul O,O-dimetilic poate fi utilizat ca și componentă de atenuare a toxicității amestecurilor dat fiind înalte sa capacitate

alchilantă față de substraturile biologice și viteza mare de hidroliză în timp ce derivatul O,O-dietilic determină creșteri însemnate ale toxicității, în acord cu mecanismul de acțiune propus de noi [264].

Si în cazul O,O-dialchil-O-2,2-diclorvinil tiofosfaților, activitatea insecticidă maximă o are compusul O,O-dietilic iar compusul O,O-dimetilic prezintă toxicitatea minimă.

Toxicitatea amestecurilor preparate din tiovinil fosfați variază în limite nu prea largi.

În cazul amestecurilor de vinil fosfați și vinil tiofosfați (IV), valorile CTC < 100 obținute [870] indică o relație de antagonism între activitățile biologice ale componentelor care acționează în sistem cuplat.

Amestecurile obținute din vinil tiofosfați și derivați de piretri prezintă efecte sinergetice care cresc când numărul atomilor de carbon din radicalii alcoxi crește de la 1 la 4.

Comportarea compușilor sintetizați (I-IV) este în strînsă dependență de raportul metabolic dintre căile de transformare responsabile pentru activarea sau degradarea inhibitorului acetilcolinesterazic și gradul în care fiecare din aceste căi de metabolizare sînt inhibate concurent de partener.

Utilizarea compușilor (I-V) prin tehnica amestecurilor are perspective deosebite în combaterea dăunătorilor pentru cicluri la care toxicitatea, eficacitatea și persistența insecticidului se cer corelate cu etapa de dezvoltare a plantei și condițiile concrete meteo și de teren.

5. Condiționare

Substanțele active sintetizate au fost condiționate după formulările obișnuite și anume ca soluții, pulberi, pulberi de stropire, suspensii, spume, paste, aerosoli sau granulare.

Formulările respective se prepară prin amestecarea substanțelor active cu agenți de diluare (solvenți lichizi), gaze lichefiate sub presiune, respectiv cu materiale de suport solide.

Pentru emulsii se adaugă agenți tensioactivi, respectiv agenți de dispersie și de spumare.

Drept solvenți lichizi se pot lua în considerare hidrocarburi aromatice ca xilenul sau alchil - naftaline, hidrocarburi alifatiche clorurate (clorura de metilen sau clorura de etilenă), alcooli ca butanolul sau glicolul precum și unele cetone.

Dintre suporturile solide pot fi menționate taloul, creta, cuarțul, oxidul de aluminiu, bentonita etc.

Pentru vinil fosfații obținuți s-a încercat o condiționare prin microincapsulare separată a vinil derivaților respectivi, cât și a unor amestecuri în proporții variabile din aceștia.

Rezultatele urmează să fie estimate după un ciclu mai mare de experimentări.

O condiționare prin amestecarea produselor analoge ale DDVP-ului și tio-DDVP-ului a prezentat probleme dificile de utilaj și de aceea s-a recurs la forma cunoscută de condiționare pe suporturi solide (materiale naturale conținând celuloză, azbest, carton, materiale sintetice termoplastice sau elastomere). Substanțele de umplură (agenți de frînare sau accelerare a evaporării, stabilizatori, substanțe odorante) sînt cele folosite curent la asemenea condiționări ale insecticidelor cu efect în stare gazoasă.

C a p i t o l u l 4

C O N C L U Z I I

1^o. Lucrarea de față utilizează un material bibliografic exhaustiv, analizat critic și sistematizat, referitor la:

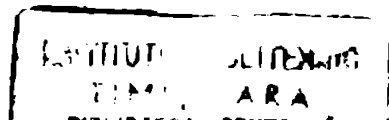
- a. mecanismul de acțiune al pesticidelor organofosforice,
- b. combinațiile organofosforice utilizate în practica combaterii dăunătorilor agriculturii,
- c. dependențele calitative între structură și activitatea pesticidă la combinațiile organofosforice,
- d. modelele corelărilor structură-activitate biologică; parametrizarea proprietăților,
- e. relațiile cantitative propuse pentru descrierea dependenței structură-activitate biologică, la compușii organofosforici.

Studiul de literatură al lucrării a fost elaborat pe baza referatelor și examenelor susținute de autor în cadrul stagiului de doctorantură pentru care au fost consultate circa 2.000 surse bibliografice, completate și în unele părți reconsiderate prin prisma ultimelor articole științifice apărute în domeniu.

2^o. În parametrizarea proprietăților fizico-chimice s-au introdus o serie de noi parametri pentru a estima efectul variațiilor structurale asupra activității biologice:

- a. număr de atomi - Y : cu perechi de electroni neparticipanți, acceptori de protoni în punți de hidrogen,
- b. număr de cicluri benzenice ca măsură a caracterului aromatic,
- c. numărul grupelor nitro, nitril sau halogen, substituenți în nucleeele aromatice din gruparea acil, ca măsură a caracterului acceptor de electroni în complecși cu transfer de sarcină,
- d. sarcina electrostatică netă a centrului cationic din grupe eliminantă,
- e. diferențe sterice minime, MSD, ca măsură a cerințelor sterice impuse de situsul receptor.

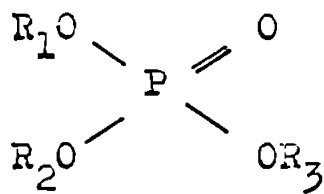
Parametrul MSD, introdus de Zeno Simon și colaboratorii, a fost utilizat pentru întâia dată de către autor la serii de compuși organofosforici, pe baza unei strategii elaborate corespunzător pentru determinarea valorilor acestuia în raport cu un standard optim,



O parte din parametrii σ^{Φ} utilizați pentru estimarea efectelor electronice ale substituenților în serii de C.O.F. au fost calculate pentru prima dată de noi pe baza principiilor de aditivitate și a constantelor de disociere determinate pentru acizi fosforici substituiți corespunzător.

3^o. S-au efectuat corelări cantitative structură-activitate biologică cu ajutorul modelului extratermodinamic și s-au obținut ecuații corelaționale semnificative, pe baza cărora s-au evaluat parametri (factorii) structurali determinanți în realizarea unei acțiuni pesticide eficace, în următoarele serii de compuși organo-fosforici:

- a. Derivați ai acidului fosforic cu structură de tip Schrader



Valorile optime ale parametrilor determinate de ecuația multi-parametrică obținută arată că un substituent R_3 cu constanta $\sigma^{\Phi} = 4$ și prezența unei grupări NO_2 sau CN în R_3 determină o maximalizare a toxicității în timp ce substituenții R_1 și R_2 cu $\sum \sigma^{\Phi} = -13$, conținând un număr de 13 atomi Y: împreună cu 6 atomi Y: în R_3 imprimă o toxicitate minimă.

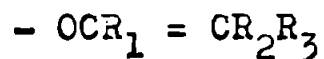
- b. Compuși organofosforici de tip Schrader cu centru cationic în grupa eliminantă

Ecuația corelațională obținută relevă ponderea deosebită a parametrului care estimează sarcina pozitivă a centrului cationic și o contribuție mult diminuată a caracterului donor de electroni în complexii cu transfer de sarcină și a efectelor electronice ale substituenților. Compușii cu acțiune optimă realizează o bună potrivire cu tiparul acetil colinesterazei în condițiile în care poziția centrului cationic față de fosfor este similară poziției centrelor active din acetilcolină, iar grupările complementare zonelor hidrofobe sînt radicali aril sau $-\text{C}_6\text{H}_{13}$.

- c. Vinil- și enol-fosfați

Corelările reușite prin separarea enol(vinil)-fosfaților în grupe distincte constituite din compuși CH_3 -metil- și respectiv $-\text{C}_6\text{H}_5$ -fenil substituiți și prin considerarea unor standarde distincte ne determină să avansăm ipoteza că la vinil (enol)-fosfați modul

în care are loc "recunoașterea" acestora de către situsul activ este condiționat steric diferit, după cum în grupa acil



substituentul R_1 este CH_3 sau C_6H_5

d. S-alkil difenil tiofosfinații

În inhibarea acetil- și butilcolinesterazei cu S-alkil difenil tiofosfinați, un rol însemnat îl joacă atât prezența grupelor fenil cât și lungimea și dispunerea sterică a radicalilor alchilici. Având în vedere contribuția importantă a parametrilor MSD, π , R și E_S în ecuațiile corelaționale obținute, se confirmă ipoteza că în cazul acestor compuși organofosforici sorbția hidrofobă joacă un rol decisiv. Este de presupus că situsul receptor se prezintă ca o cavitate elastică care se adaptează în anumite limite naturii inhibitorului. O asemenea structură a situsului explică modificările sensibile ale activității anticolinesterazice prin trecerea de la radicalii alchilici cu lanț normal la cei ramificați, precum și în funcție de lungimea lanțului. Corelările reușite cu MSD în cazul acetilcolinesterazei pledează pentru o relativă rigiditate a situsului acestei enzime.

e. O-alkil-O-(2-alkil mercaptoetil)-fenil fosfonați

Corelările activităților anticolinesterazice cu refracția molară, R, indică în general un situs puțin rigid care se poate adapta unor grupări de forme diferite ale moleculei efector. Contribuția semnificativă a parametrilor E_S și MSD în cele mai bune corelări indică faptul că dispoziția sterică a substituenților intervine de asemenea în mod determinant.

f. O - alkil -S- (2-alkil mercaptoetil)-metil tiofosfonați

Si în cazul acestor compuși analiza corelațională relevă importanța sorbției hidrofobe în realizarea acțiunii anticolinesterazice. Parametrii de hidrofobicitate joacă un rol mai important în cazul interacției inhibitorilor organofosforici cu butilcolinesteraza, în timp ce sorbția acestora pe acetilcolinesterază este determinată în primul rând de centrul anionic al fermentului. Variația coeficienților de corelare în corelările cu $\log(k_{BuCol}/k_{AcCol})$ arată că specificitatea C.O.F. față de cele două enzime scade în cazul combinațiilor cu centrul cationic în grupa eliminantă, ca urmare a creșterii ponderii interacțiunilor de natură electrostatică în formarea complexului enzimă-inhibitor.

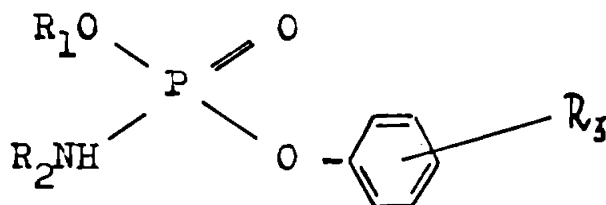
La toate seriile din această clasă de C.O.F., în corelările întreprinse refracția molară reprezintă un parametru ce îmbunătățește sensibil coeficientul de corelare. Importanța factorului steric este relevată de prezența parametrilor E_S și mai ales MSD în corelările ce realizează cei mai buni coeficienți r .

g. O,O-dietil-N-acetil-N-fenil fosforamide

Analiza corelațională efectuată confirmă absența unei relații semnificative între acțiunea de inhibare colinesterazică și parametrii de reactivitate. În schimb, utilizarea parametrului MSD conduce la obținerea unor ecuații uniparametrice sau biparametrice care evidențiază importanța deosebită pe care o are configurația spațială a inhibitorului, de unde și specificitatea mare de acțiune.

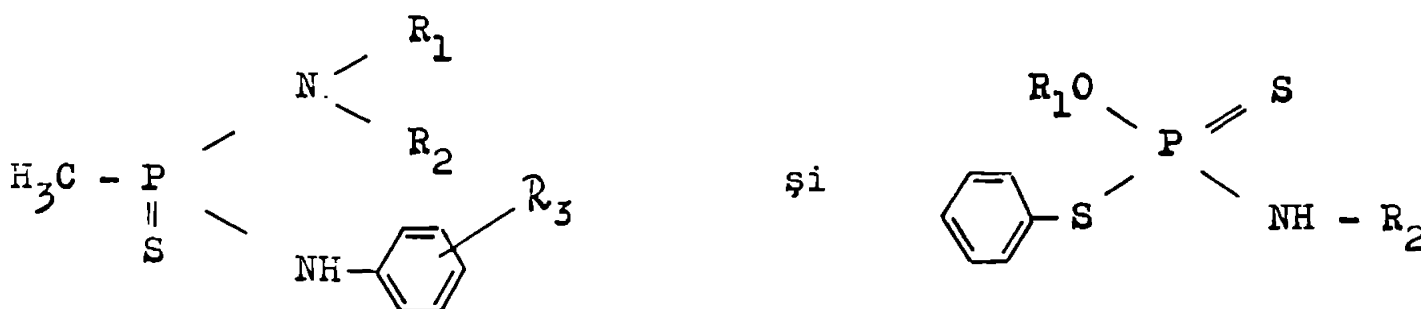
h. Diamide și esteroamide ale acizilor tio- și ditiofosforici

Cele mai bune corelări ale activității fungicide la compuși de tipul



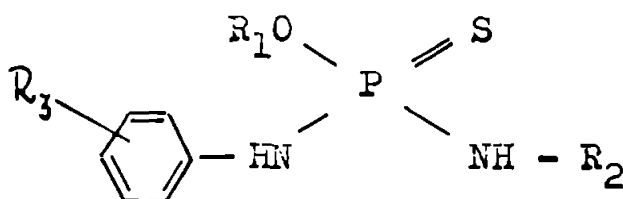
arată că o contribuție hotărâtoare o au parametrii care descriu efectele electronice ale substituenților și cei care evaluează proprietățile de hidrofobicitate.

În cazul C.O.F.



parametrul E_S stabilește corelări semnificative, alături de MSD și $\tilde{\pi}$ ceea ce indică rolul deosebit al particularităților sterice în variația activității fungicide.

La C.O.F.



hidrofobicitatea și volumul substituenților definesc în principal activitatea fungică numai în măsura în care se referă la aceeași poziție în nucleul benzenic.

S-a stabilit că natura, poziția și volumul substituenților influențează decisiv formarea complexilor chelați ai compușilor organofosforici cu ioni unor metale ce au rol catalitic, cât și exercitarea efectului electronic perturbator asupra sistemului redox din ciuperci.

i. Derivați aziridinici fosforilați

Examinarea corelărilor structură-toxicitate efectuate pentru N-alchil diaziridinil - (1) fosfinamide arată că efectele electronice ale substituenților sînt determinante. Utilizarea seturilor de parametrii (σ , R) și (σ , MSD) conduce la ecuații corelaționale cu $r = 0,956$ și respectiv $0,942$.

În cazul diaziridinil - (1) fosfinamidelor N-substituite corelarea $-\log DL_{50} = f(\text{MSD})$ are un coeficient de corelare $r = 0,943$.

La 2-(diaziridinil-1-fosfinamido)-pirimidine - 4,6 - disubstituite setul de parametri optim în corelare este (σ , MSD).

În seriile menționate (a-b-c-d-e-f-g-h-i) s-au reprezentat structurile compușilor recomandați printr-o acțiune pesticidă eficientă. S-au emis ipoteze asupra structurii situsurilor receptori și a topografiei zonelor din vecinătatea centrelor active.

4°. Utilizînd metoda HMO, s-au efectuat calcule cuantochimice pentru o serie de 15 enol-(vinil)-fosfați, determinîndu-se lungimile de undă pentru prima tranziție, energiile orbitalului cel mai înalt ocupat, ϵ_{HOMO} , și a celui mai de jos neocupat, ϵ_{LEMO} , energia totală a electronilor π , energia de delocalizare, $\Delta\pi$, sarcina efectivă la atomul de fosfor, δ_{P} , și la cel de oxigen, δ_{O} , al legăturii P - O enolică.

Parametrii de orbitale moleculare astfel obținuți, au fost corelați cu activitățile biologice ale compușilor respectivi. Ecuația corelațională multiparametrică stabilită relevă ca parametri semnificativi ai corelării pe ϵ_{HOMO} și ϵ_{LEMO} dar are un r foarte scăzut.

Separarea enol-(vinil)-fosfaților în două grupe similare din punct de vedere steric a permis obținerea unor corelări mult îmbunătățite prin folosirea seturilor de parametri (ϵ_{HOMO} , δ_{P}) ($r=0,961$) - la compușii C^* -metil substituiți-

și (ϵ_{HOMO} , ϵ) ($r=0,990$) - la compuși α -fenil substituiți.

5°. Pentru o serie de 16 C.O.F. cu acțiune pesticidă, din clasa vinil fosfaților s-a încercat o corelare a toxicității reprezentanților cu structura lor chimică prin metoda Free-Wilson. Se stabilește că principalele contribuții pentru determinarea valorii activității biologice le dau, corespunzător celor 4 fragmente moleculare, substituienții C_2H_5 , CH_3 , Cl și respectiv CN . Pe baza contribuțiilor de grup se fac ipoteze asupra structurii compusului cu toxicitate maximă.

6°. S-au făcut precizări asupra activării "in vivo" a tiofosfaților cu acțiune anticolinesterazică, pe baza relațiilor structură-activitate biologică stabilite. Ipotezele avansate pentru mecanismul de acțiune sînt următoarele:

a. pentru derivații tionici, etapă determinantă de viteză este oxidarea la derivații corespunzători ai acidului fosforic, concomitent avînd loc unele procese de degradare distructivă.

b. enzima care realizează această oxidare are stît două situsuri rigide pentru $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ cît și un situs pentru grupa fenil, nesubstituită, și pozițiile 2,3,5,6.

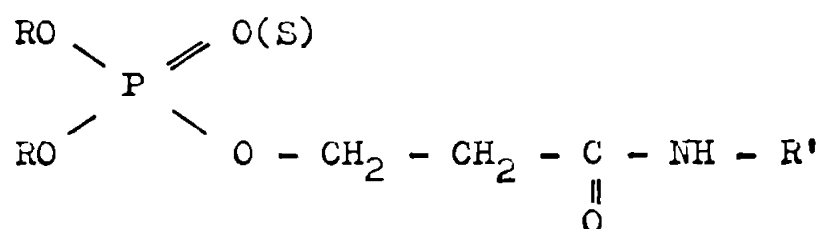
c. afinitatea enzimei pentru grupele $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ și , separat, cea enzimă -grupă fenil substituită , fiecare în parte, este suficientă pentru a asigura o saturare de circa 50% a enzimei la o concentrație intracelulară, C_i .

d. dependența dintre concentrațiile intra-, C_i , și extracelulară, C_e , ale acestor compuși, la o concentrație C_e determinată de DL_{50} este de tip exponențial.

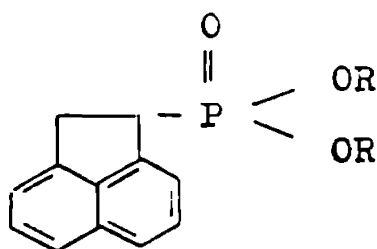
Pe baza acestor ipoteze s-a elaborat schema de mecanism, iar cantitatea de derivați oxifosforici care produce acțiunea semiletali se exprimă ca:

$$G = \text{DL}_{50} \cdot \text{greutate corp} \cdot \frac{k_{t \rightarrow o}}{k_{\text{degr.}}}$$

7°. S-a elaborat o strategie de selectare a structurilor active ca pesticide prin analiza corelațională structură-acțiune biologică care a fost aplicată și se aplică în cadrul colectivului de cercetare condus de Conf.dr.ing.Radu Vîlceanu, pentru obținerea unor noi anti-dăunători organofosforici. Astfel au fost obținute pesticide organofosforice eficiente de tipul



și



care prin proprietățile lor se recomandă spre întrebuințare în practica combaterii dăunătorilor agricoli.

8°. Pe baza concluziilor privind relațiile structură - activitate anticolinesterazică în clase de pesticide organo-fosforice; în partea experimentală a lucrării de doctorat s-a întreprins un studiu privind sinteza și aplicațiile dialcnil esterilor acidului 1-hidroxi-2,2,2-triclorețan fosfonic și derivaților lor de dehidroclorurare. În acest sens:

a) s-au sintetizat esterii O,O-dialchilici ai acidului 1-hidroxi-2,2,2-triclorețan fosfonic de tipul



în care R și R₁ sînt radicali C₁ - C₆

Metoda propusă prezintă avantajul de a putea fi realizată în condiții avantajoase pe scară industrială.

b) pentru compușii respectivi s-a pus în evidență o acțiune insecticidă de ingestie și de contact. S-a studiat toxicitatea și transformările metabolice ale acestor substanțe;

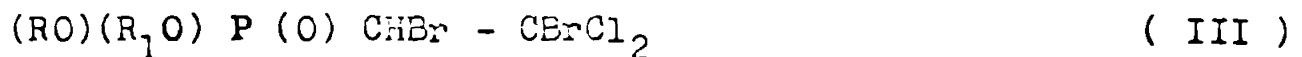
c) prin încălzirea cu baze a compușilor I s-au obținut O,O-dialchil-O-2,2-diclorvinil fosfați



care se recomandă spre utilizare ca preparate pesticide cu efect în stare gazoasă;

d) compușii sintetizați II se manifestă ca insecticide cu acțiune de contact și de ingestie, active în concentrații de 0,01 - 0,5 % și cu toxicități moderate față de mamifere;

e) bromurarea compușilor II a condus la obținerea O,O-dialchil-1,2-dibrom-2,2-diclorvinil fosfaților



f) compușii III, în acord cu previziunile furnizate de studiul nostru privind corelația structură-toxicitate la derivații acidului fosforic din clasa vinil fosfaților, prezintă o scădere a toxicității față de compușii analogi ai Diclorvosului cu pînă la un ordin de mărime;

g) studiul activității biologice cuplate în amestecuri cu acțiune insecticidă pe bază de O,O-dialchil-1-hidroxi-2,2,2-triclor-etan fosfonați și de O,O-dialchil-O-2,2-diclorvinil fosfați a evidențiat posibilități practice de obținere a unor preparate cu acțiune sinergetică sau a unor preparate cu activitate optimizată prin atenuarea sau amplificarea toxicității prin componente.

Utilizarea compușilor (I - III) prin tehnica amestecurilor are perspective deosebite în combaterea dăunătorilor.

L I T E R A T U R A

1. M.Florescu, Rev.de chimie, 22, 385 (1971).
2. M.Florescu, "Chimia și valențele ei cu agricultura", Edit.Ceres, București, 1972.
3. T.Baicu, "Probleme de protecția plantelor", M.A.I.A.A., Acad. Științe Agricole și Silvice, Buc., 1972.
4. C.Popa, Rev.de chimie, 12, 211 (1961).
5. N.N.Melnikov, "Khimia i tehnologia pestitsidov", Izd."Khimia", Moskva, 1974, p.12 .
6. H.H.Cramer, "Pflanzenschutz und Welternte", Leverkusen, Bayer, 1967, p.523 .
7. H.von R.Wegler, "Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel", E.1, Berlin-Heidelberg-New York, Springer, 1970, p.661 .
8. A.S.Krafts și W.W.Robbins, "Weed Control.A text book and manual", 3-d ed., Mc.Graw Hill Company, New York-San Francisco-Toronto, 1971.
9. M.Avram, "Antidăunători", Edit.Acad.R.S.R., București, 1974, p.15.
10. O.C.Burnside, J.D.Furrer și R.E.Roselle, Agr.Age, 7, 5 (1970).
11. R.L.Metcalf și V.F.Barthel, "Advances in Pest Control", vol.4, 1961 .
12. P.Müller, "Insektizide" in "Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie", Urban-Schwarzenberg, München-Berlin, ed.3-a, 1964, p.111-131 .
13. W.Eichler, "Handbuch der Insektizidkunde", V.E.B. Verlag, Volk und Gesundheit, Berlin, 1965.
14. N.N.Melnikov, "Sovremennie napravleniya razvitya proizvodstva primeneniya pestitsidov", VINITI, Moskva, 1970.
15. - Chem.Week, 104, 38-41, 67-68 (1969).
16. - Chem.Ind., 23, 307 (1971).
17. G.Mathys in "Erbicidele" de N.Sarpe, A.Ciorlăuș, I.Vlăduțu și L.Ghinea, Ed.Ceres, București, 1975, p.10 .
18. E.S.Savinski, "Himizatsia narodnovo hozyaistva i proportzia razvitya khimicheskoi promishlennosti", Izd."Khimia", Moskva, 1972, p.292 .
19. H.Metzger, Chem.Ind., 24, 489 (1972).
20. - Farm.Chem., 136, 15 (1972).

21. - "Directivile Congresului al XI-lea al P.C.R. cu privire la planul cincinal 1976-1980 și liniile directoare ale dezvoltării economico-sociale a României pentru perioada 1981-1990", Ed. politică, București, 1974, p.80.
22. Elena Ceaușescu, "Cuvintare. Congresul al XI-lea al P.C.R. ", Ed. politică, București, 1975, p.384.
23. I.Simiti și I.Schwartz, "Structură chimică. Activitate biologică", Ed. "Dacia", Cluj-Napoca, 1974, p.8 .
24. T.C. Bruice, N.Kharasch și W.I. Winzler, Arch. Biochem. Biophys., 62, 305 (1956).
25. S.M. Free și I.N. Wilson, J. Med. Chem., 7, 398 (1964).
26. W.P. Purcell, Biochim. Biophys. Acta, 105, 201 (1965).
27. W.R. Smithfield și W.P. Purcell, J. Pharm. Sci., 56, 577 (1967).
28. I.A. Singer și W.P. Purcell, J. Med. Chem., 10, 1000 (1967).
29. W.P. Purcell și I.D. Clayton, J. Med. Chem., 11, 199 (1968).
30. D.R. Hudson, G.E. Bass și W.P. Purcell, J. Med. Chem., 13, 1184 (1970).
31. K. Bocek, I. Kopecky, M. Krivukova și D. Valadorova, Experientia, 20, 667 (1964).
32. I. Kopecky și K. Bocek, Experientia, 23, 125 (1967).
33. T. Ban și T. Fujita, J. Med. Chem., 12, 353 (1969).
34. T. Fujita și T. Ban, J. Med. Chem., 14, 148 (1971).
35. I.E. Leffler și E. Grunwald, "Rates and Equilibria of Organic Reaction", John Wiley and Sons Inc., New York, 1963
36. - "Advances in Linear Free Energy Relationships", Edited by N.B. Chapman and J. Shorter, Plenum Press, London-New York, 1972.
37. P.R. Wells, "Linear Free Energy Relationships", Academic Press, London, 1968.
38. L.P. Hammett, "Physical Organic Chemistry", Mc Graw Hill Book Company, New York, 1970.
39. H.H. Jaffé, Chem. Rev., 53, 191 (1953).
40. C.D. Johnson, "The Hammett Equation", University Press, Cambridge, 1973.
41. R.W. Taft și I.C. Lewis, J. Amer. Chem. Soc., 80, 2436 (1958).
42. R.W. Taft, J. Phys. Chem., 64, 1805 (1960).
43. C. Hansch, P.P. Maloney, T. Fujita și R.M. Muir, Nature, 194, 178 (1962).
44. C. Hansch, M.M. Muir, T. Fujita, P.P. Maloney, C.F. Geiger și M.I. Streich, J. Amer. Chem. Soc., 85, 2817 (1963).
45. R.M. Muir și C. Hansch, Ann. Rev. Plant. Physiol., 6, 157 (1955).

46. - Bull.of the World Health Organization, 44, 11 (1971).
47. G.Schrader, "Die Entwicklung neuer Insektizide auf Grundlage organischer Fluor und Phosphor Verbindungen", Verlag Chemie, Weinheim, ed. 2-a, 1952.
48. J.Wilson in "Symposium on the Mechanism of Enzyme Action", 1955.
49. B.C.Saunders, "Some Aspect of the Chemistry and Toxic Action of Organic Compounds containing Phosphorus and Fluorine", Cambridge Univ.Press, 1957.
50. T.R.Fukuto, "Advances in pest control research", Interscience, vol 1 (1957), p.147-191.
51. V.A.Iakovlev, "Biokhimicheskie voprosi mehanizma deistriya fosfororganicheskikh insectitzidov", Tez.dokl. I Vsesoyuz. konf. po gygyne i toksikology insekto-fungytzidov, Kiev, 1957.
52. R.D.O'Brien, "Toxic Phosphorus Ester. Chemistry, Metabolism and Biological Effects", Academic Press, New York - London, 1960.
53. D.F.Heath, "Organophosphorus poisons", Pergamon, London, 1961.
54. N.Golikov și V.I.Rozengart, "Colinesterazi i anticolinesterazi", Izd."Meditma", Moskva, 1964.
55. M.I.Kabachnik, A.P.Brestkin și M.Ya.Michelson, "O mehanizme fizi loghichescovo deystviya fosfororganicheskikh soedinei Izd."Nauka", Moskva, 1965.
56. R.D.O'Brien, "Insecticide, Action and Metabolism", Academic Pres New York - London, 1967.
57. M.I.Kabachnik, Vestnik Akad.Nauk S.S.S.R., 1968, 86 .
58. R.T.Fukuto, Bull.org.mond.Santé , 44, 31 (1971).
59. N.Aldrige, Bull.org.mond.Santé , 44, 25 (1971).
60. C.Fest și K.J.Schmidt, "The Chemistry of Organophosphorus Pesticides", Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1973.
61. E.Morifusa, "Organophosphorus pesticides:organic and biological chemistry", CRC Press, New York, 1974.
62. I.B.Wilson, F.Bergmann și D.Nachmannsonn, J.Biol.Chem., 186 , 781 (1950).
63. I.B.Wilson și M.Cohen, Biochim. et Biophys.Acta, 11, 147 (1953).
64. S.L.Friess și W.J.Mc Carville, J.Amer.Chem.Soc., 76, 1363 (1954).
65. S.L.Friess și W.J.Mc Carville, J.Amer.Chem.Soc., 76, 2260 (1954).
66. S.L.Friess și H.D.Baldrige, J.Amer.Chem.Soc., 78, 966 (1956).
67. W.N.Aldrige, Biochem.J., 46, 451 (1950).
68. W.N.Aldrige, Biochem.J., 54, 442 (1953).

69. W.N.Aldrige și A.N.Davison, *Biochem.J.*, 51, 62 (1952).
70. W.N.Aldrige și A.N.Davison, *Biochem.J.*, 55, 763 (1953).
71. A.N.Davison, *Biochem.J.*, 60, 339 (1955).
72. J.F.Mackworth și E.C.Webb, *Biochem.J.*, 42, 91 (1948).
73. D.Nachmanson, M.A.Rothenberg și E.A.Feld, *J.Biol.Chem.*, 174, 247 (1948).
74. T.Wagner-Jauregg și B.E.Hackley, *J.Amer.Chem.Soc.*, 75, 2125 (1953)
75. F.Bergmann, *Discussions Faraday Soc.*, 20, 126 (1955).
76. L.A.Mounter, H.C.Alexander, K.D.Tuck și L.T.H.Dien, *J.Biol.Chem.*, 226, 867 (1957).
77. G.R.Porter, H.N.Rydon și J.A.Schofield, *Nature*, 182, 927 (1958).
78. L.W.Cunningham, *Science*, 125, 1145 (1957).
79. A.N.Davison, *Biochem.J.*, 54, 583 (1953).
80. F.Hobbiger, *Brit.J.Pharmacol.*, 6, 21 (1951).
81. D.C.Mengle și R.D.O'Brien, *Biochem.J.*, 75, 201 (1960).
82. W.N.Aldrige, *Chem. and Ind.*, 1954, 473 .
83. I.B.Wilson, *J.Biol.Chem.*, 190, 111 (1951).
84. I.B.Wilson, S.Ginsburg și E.K.Meislich, *J.Amer.Chem.Soc.*, 77 , 4286 (1955).
85. F.Hobbiger, D.G.O'Sullivan și P.W.Sadler, *Nature*, 182, 1418 (1958)
86. E.J.Pozlomek, B.E.Hackley și G.M.Steinberg, *J.Org.Chem.*, 23, 714 (1958).
87. I.B.Wilson și E.K.Meislich, *J.Amer.Chem.Soc.*, 75, 4628 (1953).
88. F.Hobbiger, *Brit.J.Pharmacol.*, 6, 21 (1951).
89. J.A.Cohen, R.A.Oosterbaan, M.G.P.Warringe și H.B.Jansz, *Discussion Faraday Soc.*, 20, 114 (1955).
90. N.K.Schaffer, S.C.May și W.H.Summerson, *J.Biol.Chem.*, 202, 67 (1953).
91. N.K.Schaffer, S.C.May și W.H.Summerson, *J.Biol.Chem.*, 206, 201 (1954).
92. R.A.Oosterbaan, M.G.Warringe, F.B.Jansz și J.A.Cohen, *IV Proc. Intern.Congr.Biochem.*, 4 th Congr. Wien, 1958 Abstr., 4-12 (1959) p.38, citat în 52 p.107 .
93. F.Hobbiger, *Brit.J.Pharmacol.*, 12, 438 (1957).
94. I.B.Wilson, *Discussions Faraday Soc.*, 20, 119 (1955).
95. D.B.Coult, D.J.Marsh și G.Read, *Biochem.J.*, 98, 809 (1966).
96. W.R.Pickering și J.C.Malone, *Biochem.Pharmacol.*, 18, 269 (1967).
97. H.P.Benschop și J.H.Keijer, *Biochim.biophys.Acta (Amsterdam)*, 128, 586 (1966).
98. C.B.Koelle, "Handbuch der Experimentalische Pharmacologie", Bd.15, Berlin, 1963 .

99. J.R.Bocque, Ann.Roy.Soc.Med., Bruxelles, 9, 161 (1956).
100. T.R.Fukuto în "Uspekhi v oblasti borbi s vreditelyami rastenii",
Izd."Inostr.Lit.", Moskva, 1957, p.157.
101. A.P.Brestkin și E.V.Rozengard, Nature, 205, 388 (1965).
102. M.I.Kabachnik, Vestnik Akad.Nauk S.S.S.R., 1964, 60.
103. G.B.Koelle și E.C.Steiner, J.Pharmacol., 118, 420 (1956).
104. L.E.Tammelin, Acta chem.Scand., 11, 859 (1957).
105. T.R.Fukuto, R.L.Metcalf și J.Maxon, J.Econ.Entomol., 48, 347
(1955).
106. N.N.Godovikov, "Khimia i primeneniye fosfororganicheskikh soedy-
nenii", Izd.Akad.Nauk S.S.S.R., Moskva, 1957,
p.212.
107. I.V.Semenov și N.K.Fruentov în "Fiziologhicheskaya rol acetyl-
colina i iskanie lekarstvenih veschestv",
Leningrad, 1957, p.245.
108. R.I.Volkova, N.N.Godovikov, M.I.Kabachnik, L.G.Magazanik,
T.A.Masteryukova, M.Ya.Michelson, E.K.Rojkova, N.K.Fruentov și
V.A.Iakovlev, Voprosi Med.khim., 7, 250 (1961).
109. V.A.Iakovlev și R.I.Volkova, Doklady Akad.Nauk S.S.S.R., 146,
217 (1962).
110. M.I.Kabachnik, A.A.Abduvahabov, I.I.Agabekova, A.P.Brestkin,
R.I.Volkova, N.N.Godovikov, E.I.Godina, S.S.Mihailov, M.Ya.Mi-
chelson, V.I.Rozengart, E.V.Rozengart și R.V.Sitkevich,
Uspekhi Khim.; 39, 1050 (1970).
111. W.N.Aldrige și M.K.Johnson, Bull.World Health Organ., 44, 250
(1951).
112. N.N.Godovikov în "Khimia i primeneniye fosfororganicheskikh soedy-
nenii", 3-vo konf., Izd."Nauka", Moskva, 1972,
p.423.
113. A.P.Brestkin în "Khimia i primeneniye fosfororganicheskikh soedy-
nenii", 4-vo konf., Izd."Nauka", Moskva, 1972,
p.322.
114. E.L.Becker, T.R.Fukuto, R.Borne, D.Cauham și E.Buger,
Biochemistry, 2, 72 (1963).
115. W.N.Aldrige și E.Reiner, Biochem.J., 115, 147 (1969).
116. R.J.Kitz, S.Ginsburg și I.B.Wilson, Molec.Pharmacol., 3, 225
(1967).
117. A.P.Brestkin, I.L.Brik, R.I.Volkova, N.N.Godovikov, N.E.Tepov, și
M.I.Kabachnik, Doklady Akad.Nauk S.S.S.R., 163, 365 (1965).
118. D.H.Adams și V.P.Wittaker, Biochem.biophys.acta, 3, 358 (1949).
119. V.F.Wittaker, Physiol.Revs., 31, 312 (1951).
120. I.B.Wilson, J.Biol.Chem., 197, 215 (1952).

121. F.Bergman și R.Segal, Biochem.J., 50, 652 (1954).
122. M.I.Kabachnik și N.N.Godovikov, Zhur.org.Khim., 33, 1941 (1963)
123. M.I.Kabachnik, A.P.Brestkin și M.Ya.Michelson, IX-Mendeleevskii syezd, Izd."Nauka", 1965, p.231.
124. N.N.Godovikov, E.I.Godina, M.I.Kabachnik, M.Ya.Michelson, E.V.Rozengart și V.A.Iakovlev, Doklady Akad.Nauk S.S.S.R., 151, 1104 (1963).
125. A.P.Brestkin, N.N.Godovikov, E.I.Godina, M.I.Kabachnik, M.Ya.Michelson, E.V.Rozengart și V.A.Iakovlev, Doklady Akad. Nauk S.S.S.R., 158, 880 (1964).
126. A.P.Brestkin și I.L.Brik, Biokhim., 32, 1004 (1967).
127. A.A.Abduvahabov, N.N.Godovikov, M.I.Kabachnik în "Khimia organicheskikh soedyneniî fosfora", Izd. "Nauka", Leningrad, 1967, p.3 .
128. A.A.Abduvahabov, N.N.Godovikov și M.I.Kabachnik, Izvest.Akad. Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk, 1968, 583.
129. W.Kauzmann, Adv.Protein.Chem., 14, 37 (1959).
130. J.Tang, Nature, 199, 1094 (1963).
131. B.H.Hofstee, J.Biochem.biophys.acta, 32, 182 (1959).
132. B.Baker, "Design of Active-Site-Direct Irreversible Enzyme Inhibitors", New York, 1967, cap.II-III.
133. A.P.Brestkin, I.L.Brik și N.E.Teplov, Biokhim., 33, 1059 (1968).
134. M.I.Kabachnik și N.N.Godovikov, Zhur.obshchei Khim., 26, 2228 (1958).
135. E.V.Rozengart, E.I.Godina și N.N.Godovikov, Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk, 1965, 1370.
136. A.A.Abduvahabov, N.N.Godovikov, M.I.Kabachnik, S.S.Mihailov, V.I.Rozengart și R.V.Sitkevich, Doklady Akad.Nauk S.S.S.R., 171, 857 (1966).
137. A.A.Abduvahabov, N.N.Godovikov, M.I.Kabachnik, S.S.Mihailov, V.I.Rozengart și R.V.Sitkevich, Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk, 1968, 744.
138. A.P.Brestkin, R.I.Volkova, N.N.Godovikov și M.I.Kabachnik, Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk, 1968, 2028.
139. A.P.Brestkin, I.L.Brik, A.P.Ginetsinskaya, N.N.Godovikov, M.I.Kabachnik și N.E.Teplov, Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel. khim.Nauk, 1968, 2070.
140. A.P.Brestkin, I.L.Brik, A.P.Ginetsinskaya, N.N.Godovikov, M.I.Kabachnik și N.E.Teplov, Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel. khim.Nauk, 1968, 2122.

141. A.A.Abduvahabov, V.A.Andreeva, N.N.Godovikov, M.I.Kabachnik, A.B.Katznelson, S.S.Mihailov, V.I.Rozengart, R.V.Sitkevich și Ya.S.Simisin, *Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk*, 1968, 2033.
142. T.A.Masteryukova, A.E.Sipov, E.B.Gorbenko, M.P.Sabanova, K.N.Savcenko, Yu.S.Kagan și M.I.Kabachnik, *Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk*, 1968, 2042.
143. T.A.Masteryukova, A.E.Sipov, E.B.Gorbenko, M.I.Kabachnik, Yu.S.Kagan, E.A.Ershova, M.P.Shebanova și K.N.Savcenko, *Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk*, 1971, 2003.
144. B.A.Arbuzov, V.M.Zoroactrova, I.D.Neklesova, M.A.Kudrina, N.V.Egorova, și G.A.Tudryi, *Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk*, 1972, 1155.
145. M.I.Kabachnik, A.P.Brestkin, N.N.Godovikov, M.I.Michelson, E.V.Rozengart și V.I.Rozengart, *Pharm.Review*, 22, 355 (1970).
146. A.P.Brestkin, I.L.Brik, R.I.Volkova, N.N.Godovikov, H.H.Gurdatev, M.I.Kabachnik și N.A.Kardanov, *Doklady Akad.Nauk S.S.S.R.*, 200, 103 (1971).
147. A.P.Brestkin, R.I.Volkova, N.N.Godovikov, M.I.Kabachnik, N.A.Kardanov, *Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk*, 1973, 622.
148. N.N.Godovikov, M.H.Bekamov, M.H.Berhamov și M.I.Kabachnik, *Zhur.obshchei Khim.*, 44, 34 (1974).
149. R.S.Agabekyan, M.H.Berhamov, N.N.Godovikov, M.I.Kabachnik și G.G.Olhovaya, *Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk*, 1974, 407.
150. R.S.Agabekyan, M.H.Bekamov, M.H.Berhamov, N.N.Godovikov și M.I.Kabachnik, *Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.Nauk*, 1974, 874.
151. V.I.Rozengart, A.P.Brestkin, N.N.Godovikov, M.I.Kabachnik, S.S.Mihailov, M.I.Michelson, E.V.Rozengart și R.V.Sitkevich, *Abstr.VII Intern.Congr.Biochem., Tokio, 1967*, vol. IV, p.817.
152. K.B.Augustinsson, *Proc.Roy.Soc., Ser.B.*, 154, 954 (1961).
153. A.R.Main și W.C.Dauterman, *Nature*, 198, 551 (1963).
154. A.R.Main și F.Iverson, *Biochem.J.*, 100, 525 (1966).
155. E.Reiner și W.N.Aldrige, *Biochem.J.*, 105, 173 (1967).
156. Y.C.Chiu, A.R.Main și W.C.Dauterman, *Biochem.Pharmacol.*, 18, 2171 (1969).
157. Y.C.Chiu și W.C.Dauterman, *Biochem.Pharmacol.*, 19, 1856 (1970).
158. A.S.V.Burgen și F.Hobbiger, *Brit.J.Pharmacol.*, 6, 593 (1951).
159. R.M.Lee, *Biochem.Pharmacol.*, 13, 1551 (1964).

160. D.K.Myers, Arch.Biochem., 37, 469 (1952).
161. F.Hobbiger, Brit.J.Pharmacol., 10, 356 (1955).
162. D.R.Davies și A.N.Green, Biochem.J., 63, 529 (1956).
163. H.S.Janes, D.Brons și M.G.P.J.Warringa, Biochim.biophys.Acta (Amsterdam), 34, 573 (1959).
164. F.Berends, C.H.Posthumus, I.V.D.Sluye și F.A.Deierkauf, Biochim.biophys.Acta (Amsterdam), 34, 576 (1959).
165. A.P.Brestkin, I.L.Brik, R.I.Volkova, N.N.Godovikov, H.H.Gurdaliev M.I.Kabachnik și N.A.Kardanov, Doklady Akad.Nauk S.S.S.R., 167, 1381 (1966).
166. G.M.Grigorieva, Biokhim., 30, 415 (1965).
167. A.P.Brestkin, I.L.Brik, R.I.Volkova și N.N.Godovikov, "Reakț. sposobnost organicheskih soedyneni", 3, 231 (1966).
168. A.P.Brestkin, I.L.Brik, R.I.Volkova, E.V.Rozengart și A.A.Segal, în "Khimia i primeneniie fosfororganicheskih soedyneni", 3-vo konf., Izd."Nauka", Moskva, 1972, p.431
169. V.A.Iakovlev și R.I.Volkova, Doklady Akad.Nauk S.S.S.R., 128, 843 (1959).
170. I.L.Knuneantz, A.M.Polchin, S.M.Markov, N.A.Loshadkin și L.P.Bulanova, în "Khimia i primeneniie fosfororganicheskih soedyneni", 4-vo konf., Izd."Nauka", Moskva, 1972, p.333.
171. A.Moon și Stutevant, J.Biol.Chem., 240, 4204 (1965).
172. B.Holmsted, Acta Physiol.Scand., 25 Suppl., 90 (1951).
173. A.J.J.Ooms, A.Hansen, L.Ginjaar, Proc.Intern.Congr.Biochem., 4 th Congr.,Wien, 1958, Abstr. 4-6, 1959, p.37
174. T.R.Fukuto și R.L.Metcalf, J.Amer.Chem.Soc., 81, 372 (1959).
175. J.A.A.Kelelaar, Trans.9 th Intern.Congr.Entomol., Amsterdam, 1951 2, 318 (1953) în 52 p.86-87.
176. T.R.Fukuto și R.L.Metcalf, J.Agr.Food Chem., 4, 930 (1956).
177. T.R.Fukuto, R.L.Metcalf, R.B.March și M.G.Maxon, J.Amer.Chem.Soc., 77, 3670 (1955).
178. T.R.Fukuto, R.L.Metcalf și M.Y.Winton, J.Econ.Entomol., 52, 1121 (1959).
179. T.R.Fukuto, R.L.Metcalf, R.B.March și M.G.Maxon, J.Econ.Entomol., 48, 347 (1955).
180. K.B.Augustinsson și G.Jonsson, Acta Chem.Scand., 11, 275 (1957).
181. R.D.O'Brien, J.Econ.Entomol., 49, 484 (1956).
182. R.D.O'Brien, J.Econ.Entomol., 52, 812 (1959).
183. L.E.Tammelín, Acta Chem.Scand., 11, 1738 (1957).
184. E.Y.Spencer și R.D.O'Brien, J.Agr.Food Chem., 1, 11 (1953).

185. G.Schrader, World Rev.Pest.Control., 4, 140 (1965).
186. G.Schrader, Pflanzenschutz Ber., 36, 14 (1967).
187. D.G.Coe, H.Hurtig, B.J.Perry și E.S.Sherlock, J.Agr.Food Chem., 7, 251 (1959).
188. A.D.Flynn și W.G.Eden, J.Econ.Entomol., 53, 692 (1960).
189. J.J.Menn și K.Szabo, J.Econ.Entomol., 58, 734 (1965).
190. R.L.Metcalf, H.T.Reynolds, T.R.Fukuto și C.Collins, J.Econ.Entomol 57, 531 (1964).
191. J.I.Francis și J.M.Barnes, Bull.World Health Organ., 29, 205 (1963).
192. R.L.Metcalf și T.R.Fukuto, J.Econ.Entomol., 53, 127 (1960).
193. R.D.O'Brien și R.D.Hilton, J.Agr.Food Chem., 13, 366 (1965).
194. P.Bracha și R.D.O'Brien, Biochemistry, 7, 1545 (1968).
195. P.Bracha și R.D.O'Brien, Biochemistry, 7, 1555 (1968).
196. Y.C.Chiu, A.Hassan, F.E.Guthrie și W.C.Dauterman, Toxicol.Appl. Pharmacol., 12, 219 (1968).
197. A.Hassan și W.C.Dauterman, Biochem.Pharmacol., 17, 1431 (1968).
198. A.Morello, E.Y.Spencer și A.Vardanis, Biochem.Pharmacol., 16, 1703 (1967).
199. R.D.O'Brien, J.Agr.Food Chem., 11, 163 (1963).
200. P.E.Newallis, P.Lombardo, E.E.Gilbert, E.Y.Spencer și A.Morello, J.Agr.Food Chem., 15, 940 (1967).
201. A.H.Beckett, M.Michard și J.W.Clithrow, BiochemPharmacol., 17, 1601 (1968).
202. A.J.J.Ooms, Bull.World Health Organ., 44, 113 (1971).
203. A.J.J.Ooms și H.L.Boter, Biochem.Pharmacol., 14, 1839 (1965).
204. L.P.A.De Jong, C.van Dijk, Biochem.Biophys.Acta, 268, 680 (1972).
205. D.A.Wurstner și T.R.Fukuto, J.Agr.Food Chem., 21, 756 (1973).
206. M.Pianka în "Insecticides.Proceedings of the Second Intern.IUPAC Congress of Pesticide Chemistry", Ed.A.S.Tahori, Gordon and Breach Science Publishers, New York-London-Paris, vol.1, 1972, p.207.
207. Idem, p.265.
208. C.E.Crisp, Idem, p.211.
209. M.Eto, Idem, p.311.
210. K.J.Schmidt, Idem, p.365.
211. J.F.Leber, Idem, p.381.
212. J.E.Casida, Biochem.J., 60, 487 (1955).
213. G.M.Booth și A.H.Lee, Bull.World Health Organ., 44, 91 (1971).
214. B.Holmstedt, Bull.World Health Organ., 44, 99 (1971).
215. A.J.J.Coms, Bull.World Health Organ., 44, 113 (1971).

- 215a. R.L.Metcalf, Bull.World Health Organ., 44, 117 (1971).
216. W.N.Aldrige, Bull.World Health Organ., 44, 116 (1971).
217. A.J.Okinaka, J.Doull, J.M.Coon și K.P.DU Bois, J.Pharmacol.Exptl., therap., 112, 231 (1954).
218. W.B.Deichman și R.Rakoczy, A.M.A.Arch.Ind.Health, 11, 324 (1955),
in 52 p.175.
219. W.B.Deichman și K.Lampe, U.Miami School Med.Bull., 9, 7 (1955) in
52 p.175.
220. K.P.Du Bois și G.J.Cotter, A.M.A.Arch.Ind.Health, 11, 53 (1955) in
52 p.175.
221. K.P.Du Bois, D.Thursh și S.D.Murphy, J.Pharmacol.Exptl.therap.,
119, 208 (1957).
222. R.E.Bagdon și K.P.Du Bois, Arch.intern.pharmacodynamie, 103, 192
(1955).
223. C.Dayrit, C.H.Manry și M.H.Seevers, J.Pharmacol.Exptl.therap.,
92, 173 (1948) in 52 p.176.
224. J.M.Barnes, Brit.J.Pharmacol., 8, 208 (1953).
225. J.M.Barnes, Chem.and Ind.(London), 1954, 478.
226. J.B.Schmidt, Ann.Rev.Entomol., 7, 137 (1962).
227. D.S.Smith și J.E.Treherne, Advan.Insect.Physiol., vol.I, London-
New York, Acad.Press, 1964.
228. T.Narahasm, Advan.Insect.Physiol., vol.I, London-New York,
Acad.Press, 1964, p.175.
229. K.G.Davey, Idem, vol.II, p.219.
230. M.P.Osborne, J.Insect.Physiol., 12, 1503 (1966).
231. M.P.Osborne, J.Insect.Physiol., 13, 827 (1967).
232. P.N.R.Usherwood și P.Machili, J.Exptl.Biol., 49, 341 (1968).
233. H.S.Hopf, Ann.Appl.Biol., 41, 248 (1954).
234. K.A.Lord și E.Porter, J.Sci.Food Agr., 5, 490 (1954).
235. R.L.Metcalf și P.B.March, J.Econ.Entomol., 42, 721 (1949).
236. U.E.Brady și J.Sterburg, J.Insect.Physiol., 13, 369 (1967).
237. S.H.Bennett, Ann.Rev.Entomol., 2, 279 (1957).
238. W.E.Ripper, Advances in Pest Control Research, 1, 305 (1957).
239. R.L.Metcalf, E.M.Stafford, T.R.Fukuto și R.B.March, J.Econ.Entomol.
50, 205 (1957).
240. J.E.Casida, R.K.Chapman și T.C.Allen, J.Econ.Entomol., 45, 568
(1952).
241. R.G.Brodie, J.R.Gillette și B.N.La Du, Ann.Rev.Biochem., 27, 427
(1958).
242. J.N.Smith, Ann.Rev.Entomol., 7, 465 (1962).
243. L.Schuster, Ann,Rev.Biochem., 33, 571 (1964).
244. V.I.Rozengart in "Khimia i primenenie fosfororganicheskikh soedy-
nenii", 3-ve konf., Izd."Nauka", Moskva, 1972, p.89.

245. R.Singleton, J.Chem.Educ., 50, 538 (1973).
246. H.J.Jarczyk, Z.Naturforsch., 20b, 257 (1965).
247. Y.P.Sim, J.Econ.Entomol., 61, 949 (1968).
248. L.I.Medvedev și Yu.S.Kagan, "Promishlennaya toksikologhia i klinika profzabolevaniy khimicheskoi etiologhyi", Moskva, Izd."Medghiz", 1962, p. 9-25.
249. Yu.S.Kagan, "Toksikologhya fosfororganicheskikh insektitsidov i ghyghiena truda pri ih primenenii", Moskva, Izd."Medghiz", 1963.
250. Yu.S.Kagan, M.A.Klisenko și T.P.Panshina în "Khimia i primenie fosfororganicheskikh soedynenii", 3-vo konf., Izd."Nauka", 1972, p.438.
251. E.I.Spînu în "Farmakologhia i toksikologhya", Izd."Medghiz", 1957, p.49.
252. Z.Z.Golubeva și P.V.Popov, Khim.v selskom hozyaistve, 7, 29 (1964)
253. S.A.Roslavtzeva și P.V.Popov, Khim.v selskom hozyaistve, 2, 25 (1964).
254. A.S.Perry, J.Agr.Food Chem., 8, 266 (1960).
255. - Bull.World Health Organ.,Exp.Comm.Insect., 7 th Rep. World Health Organ., 1957, p.125.
256. J.M.Grayson și D.G.Cochran, World.Rev.Pest.Control, 7, 172 (1963).
257. G.Schrader și H.Kükenthal, D.B.Pat., 767 153 (1938).
258. G.Schrader, Angew.Chem., 62, 471 (1950).
259. K.H.Lohs, "Sintetische Gife", 3 rd ed., Berlin, 1967.
260. W.M.Clark, D.N.Hutkinson, A.J.Kirby și S.G.Warren, Angew.Chem., 76, 704 (1964).
261. H.Hoffmann, "Chimie Organique du Phosphore. Colloq.Intern.du C.N.R.S.", Paris 19-24 Mai 1969"; Ed.C.N.R.S., Paris, 1970, p.357.
262. A.I.Imamaliev, "Defolianty i ih fiziologhicheskoe deystvye na hlopehatnik", Izd."FAN", Toshkent, 1969.
263. S.S.S.R.Pat., 317 168 (1971); Tovar.znaky, nr.30 (1971).
264. S.S.S.R.Pat., 300 980 (1971); Tovar.znaky, nr.13 (1971).
265. U.S.A.Pat., 3 416 911 (1969); Ref.Zhur.Khim., 6 N 947 (1970).
266. D.D.R.Pat., 73 770 (1970); Ref.Zhur.Khim., 5N 718 (1971).
267. Jap.Pat., 19 079 (1970); Ref.Zhur.Khim., 14N 693 (1971).

268. U.S.A.Pat., 3 562 390 (1971); Ref.Zhur.Khim., 23N 596 (1971).
269. A.Chiriac, Z.Simon și R.Vilceanu, Preprint Univ.Timisoara, Ser.chimie, 4 (1974).
270. S.S.S.R.Pat., 236 895 (1969); Ref.Zhur.Khim., 2N 780 (1970).
271. S.S.S.R.Pat., 238 548 (1969); Tovar.znaky, nr.10 (1969).
272. S.S.S.R.Pat., 238 549 (1969); Tovar.znaky, nr.10 (1969).
273. S.S.S.R.Pat., 245 111 (1969); Tovar.znaky, nr.19 (1969).
274. S.S.S.R.Pat., 283 987 (1970); Tovar.znaky, nr.32 (1970).
275. Jap.Pat., 8998 (1971); Ref.Zhur.Khim., 20N 642 (1971).
276. S.S.S.R.Pat., 261 384 (1970); Ref.Zhur.Khim., 4N 748 (1971).
277. J.A.Klinn, C.L.Tipton, J.Agr.Food Chem., 18, 663 (1970).
278. U.S.A.Pat., 3 519 630 (1970); Chem.Abstr., 73, 76 154 (1970).
279. Brit.Pat., 1 113 634 (1968); Chem.Abstr., 69, 58 590 (1968).
280. U.S.A.Pat., 3 555 155 (1971); Ref.Zhur.Khim., 20N 646 (1971).
281. Polsk.Pat., 59 249 (1970); Ref.Zhur.Khim., 7N 750 (1971).
282. U.S.A.Pat., 3 403 209 (1961); Ref.Zhur.Khim., 3N 689 (1970).
283. Chem.Abstr., 73, 77 238 (1970).
284. S.S.S.R.Pat., 332 632 (1962); Tovar.znaky, nr.11 (1963).
285. D.D.R.Pat., 67 276 (1969); Ref.Zhur.Khim., 6N 900 (1970).
286. D.B.R.Pat., 2 204 770 (1973); Chem.Abstr., 125 837r (1973).
287. S.S.S.R.Pat., 285 662 (1970); Tovar.znaky, nr.33 (1970).
288. Swed.Pat., 490 017 (1970); Ref.Zhur.Khim., 2N 564 (1971).
289. Swed.Pat., 497 844 (1970); Ref.Zhur.Khim., 12 N 532 (1971).
290. Swed.Pat., 504 476 (1971); Ref.Zhur.Khim., 21N 653 (1971).
291. Swed.Pat., 466 635 (1969); Chem.Abstr., 71, 80 209 (1969).
292. S.S.S.R.Pat., 206 453 (1965); Tovar.znaky, nr.24 (1965).

293. V.Konevny și T.Sirota, Chem.Zvesti, 23, 696 (1969).
294. Cehoslov.Pat., 127 211 (1969); Ref.Zhur.Khim., 5N 819 (1970).
295. Cehoslov.Pat., 126 088 (1969); Ref.Zhur.Khim., 6N 867 (1970).
296. D.B.R.Pat., 1 280 256 (1969); Ref.Zhur.Khim., 15 N 664 (1970).
297. Cehoslov.Pat., 128 779 (1969); Ref.Zhur.Khim., 10N 625 (1970).
298. Swed.Pat., 478 151 (1969); Ref.Zhur.Khim., 10N 623 (1970).
299. Jap.Pat., 16 399 (1969); Ref.Zhur.Khim., 12N 1009 (1970).
300. H.B.Camp și T.R.Fukuto, J.Agr.Food Chem., 17, 243 (1969).
301. S.S.S.R.Pat., 257 501; Ref.Zhur.Khim., 1N 565 (1971).
302. D.B.R., 1 276 638 (1969); Ref.Zhur.Khim., 5N 718 (1970).
303. E.Schiewald, D.Meisner și E.Kempter în "Intern.Symposium der Pflanzenschutz- und Schadligsbekämpfungsmittel", Magdeburg, 1970.
304. S.S.S.R.Pat., 245 779 (1969); Ref.Zhur.Khim., 15N 667 (1971).
305. S.S.S.R.Pat., 314 339 (1971); Tovar.znaky, nr.27 (1971).
306. D.D.R.Pat., 77 104 (1969).
307. U.S.A.Pat., 3 758 647 (1973); Chem.Abstr., 79, 126 078f (1973).
308. U.S.A.Pat., 3 470 296 (1970); Chem.Abstr., 72, 12 347 (1970).
309. Jap.Pat., 4546 (1968); Chem.Abstr., 71, 3840 (1969).
310. U.S.A.Pat., 3 383 194 (1969); Ref.Zhur.Khim., 15N 746 (1970).
311. Cehoslov.Pat., 129 660 (1969); Chem.Abstr., 71, 91 069 (1969).
312. Shi-ichi Suzuki, J.Agr.Biol.Chem., 34, 1697 (1970).
313. D.B.R.Pat., 1 298 990 (1970); Ref.Zhur.Khim., 3N 550 (1971).
314. S.S.S.R. 3 05655 (1971); Tovar.znaky, nr.18 (1971)
Pat.,
315. D.D.R.Pat., 67 842 (1967).
316. Austral.Pat., 274 810 (1969); Ref.Zhur.Khim., 6N 682 (1970).
317. Jap.Pat., 12 920 (1969); Ref.Zhur.Khim., 10N 627 (1970).

318. U.S.A.Pat., 3 435 100 (1969); Ref.Zhur.Khim., 9N 597 (1970).
319. D.D.R.Pat., 67 617 (1967).
320. W.B.Neely si W.E.Allison, J.Agr.Food Chem., 18, 45 (1970).
321. Austral.Pat., 288 426 (1970); Ref.Zhur.Khim., 16N 641 (1970).
322. S.S.S.R.Pat., 283 093 (1970); Tovar.znaky, nr.30 (1970)
323. U.S.A.Pat., 3 459 856 (1969); Ref.Zhur.Khim., 19N 577 (1970).
324. U.S.A.Pat., 3 467 734 (1969); Ref.Zhur.Khim., 18N 628 (1970).
325. U.S.A.Pat., 3 390 209 (1969); Chem.Abstr., 69, 76 982 (1969).
326. D.B.R.Pat., 1 274 399 (1964).
327. U.S.A.Pat., 3 493 655 (1969); Ref.Zhur.Khim., 4N 706 (1971).
328. Cehoslov.Pat., 147 726 (1973); Chem.Abstr., 79, 74 963n (1973).
329. Swed.Pat., 478 529 (1969); Ref.Zhur.Khim., 12N 1003 (1970).
330. Z.IYagnugova, K.D.Svetzova si N.N.Melnikov, Zhur.org.Khim., 41, 84 (1971).
331. S.S.S.R.Pat., 232 848 (1967).
332. G.Quistad, T.R.Fukuto si R.L.Metcalf, J.Agr.Food Chem., 18, 189 (1970).
333. S.S.S.R.Pat., 317 173 (1971); Tovar.znaky, nr.30 (1971).
334. S.S.S.R.Pat., 294 279 (1971); Tovar.znaky, nr.6 (1971).
335. L.L.Murdoch si T.L.Hopkins, J.Agr.Food Chem., 16, 954 (1968).
336. Jap.Pat., 7120 (1971); Ref.Zhur.Khim., 23N 594 (1971).
337. Jap.Pat., 7959 (1971); Ref.Zhur.Khim., 24N 703 (1971).
338. S.S.S.R.Pat., 226 473 (1967).
339. S.S.S.R.Pat., 272 187 (1970); Tovar.znaky, nr.18 (1970).
340. U.S.A.Pat., 3 469 004 (1969); Ref.Zhur.Khim., 17N 620 (1970).
341. M.A.H.Fahmy si T.R.Fukuto, J.Agr.Food Chem., 18, 793 (1970).
342. U.S.A.Pat., 3 443 011 (1970); Ref.Zhur.Khim., 13N 747 (1970).
343. U.S.A.Pat., 3 553 323 (1971); Ref.Zhur.Khim., 18N 670 (1971).
344. Jap.Pat., 6318 (1969); Ref.Zhur.Khim., 20N 668 (1971).
345. Jap.Pat., 6319 (1969); Ref.Zhur.Khim., 20N 667 (1971).

346. Jap.Pat., 16 400 (1969); Ref.Zhur.Khim., 12N 1069 (1970).
347. Jap.Pat., 17 920 (1969); Ref.Zhur.Khim., 11N 949 (1970).
348. Jap.Pat., 18 543 (1969); Chem.Abstr., 70, 68 505 (1969).
349. Jap.Pat., 26 310 (1970); Ref.Zhur.Khim., 16N 674 (1971).
350. Jap.Pat., 27 355 (1969); Ref.Zhur.Khim., 1N 721 (1970).
351. Jap.Pat., 37 799 (1970); Ref.Zhur.Khim., 18N 671 (1971).
352. Jap.Pat., 305 (1969); Ref.Zhur.Khim., 1N 717 (1970).
353. Jap.Pat., 520 (1971); Ref.Zhur.Khim., 21N 685 (1971).
354. I.L.Vladimirova și A.F.Grapov în "Khimyia i primeneniie fosfor-organicheskikh soedineniyi", Moskva, Izd."Nauka", 1972, p.449.
355. D.B.R.Pat., 2 211 338 (1972); Chem.Abstr., 72, 36 490g (1973).
356. K.Kobajsi, T.Hirano și J.Bakamori în Ref.Zhur.Khim., 12N 994 (1970).
357. Jap.Pat., 28 101 (1970); Ref.Zhur.Khim., 19N 580 (1970).
358. S.S.S.R.Pat., 136 908 (1966); Товар.znaky, nr.19, (1966).
359. D.B.R.Pat., 1 904 852 (1969).
360. U.S.A.Pat., 3 478 133 (1970); Ref.Zhur.Khim., 2N 565 (1971).
361. D.D.R.Pat., 73 770 (1968).
362. U.S.A.Pat., 3 445 468 (1969); Chem.Abstr., 71, 61 430 (1969).
363. Jap.Pat., 27 097 (1970); Ref.Zhur.Khim., 12N 637 (1971).
364. Jap.Pat., 14 759 (1971); Ref.Zhur.Khim., 23N 592 (1971).
365. Jap.Pat., 8852 (1969); Ref.Zhur.Khim., 10N 629 (1970).
366. R.H.Rigternik și E.E.Kenage, J.Agr.Food Chem., 14, 394 (1966).
367. Swed.Pat., 470 416 (1969); Ref.Zhur.Khim., 12N 996 (1970)
368. U.S.A.Pat., 3 478 148 (1970); Ref.Zhur.Khim., 17N 640 (1971).
369. Austral.Pat., 288 428 (1970); Ref.Zhur.Khim., 19N 761 (1971).
370. Brit.Pat., 1 220 571 (1971); Ref.Zhur.Khim., 19N 737 (1971).
371. Brit.Pat., 1 144 003 (1969); Ref.Zhur.Khim., 4N 718 (1970).
372. U.S.A.Pat., 3 743 648 (1973); Chem.Abstr., 122 574s 79, (1973).
373. U.S.A.Pat., 3 518 279 (1970); Ref.Zhur.Khim., 12N 1071 (1970).

374. U.S.A.Pat., 734 914 (1973); Chem.Abstr., 79, 78 958u (1973).
375. M.Pinka și J.D.Edwards, J.Sci.Food Agr., 19, 399 (1968).
376. M.Pinka, J.Sci.Food Agr., 19, 403 (1968).
377. U.S.A.Pat., 3 518 279 (1970); Ref.Zhur.Khim., 8N 601 (1971).
378. U.S.A.Pat., 3 505 328 (1970); Ref.Zhur.Khim., 3N 558 (1971).
379. D.B.R.Pat., 2 121 065 (1972); Chem.Abstr., 78, 97623g (1972).
380. U.S.A.Pat., 3 749 775 (1973); Chem.Abstr., 79, 122 574 s (1973).
381. D.D.R.Pat., 76 227 (1969).
382. T.F.Kozlova și G.B.Shahova, Khim.promiglen., 1971, 429.
383. Jap.Pat., 27 973 (1970); Chem.Abstr., 72, 79 067 (1970).
384. D.B.R.Pat., 1 299 924 (1967).
385. D.D.R.Pat., 71 556 (1968).
386. S.S.S.R.Pat., 320 093 (1971); Tovar.znaky nr.33 (1971).
387. Swed.Pat., 326 598 (1970); Ref.Zhur.Khim., 10N 581 (1971).
388. D.B.R.Pat., 2 260 015 (1973); Chem.Abstr., 79, 66 575d (1973).
389. U.S.A.Pat., 3 723 450 (1973); Chem.Abstr., 79, 5328d (1973).
390. Brit.Pat., 1 204 552 (1970); Ref.Zhur.Khim., 8N 599 (1971)
391. Brit.Pat., 1 205 000 (1970); Ref.Zhur.Khim., 8N 600 (1971)
392. Swed.Pat., 320 975 (1970); Ref.Zhur.Khim., 5N 650 (1971).
393. Brit.Pat., 1 203 026 (1970); Ref.Zhur.Khim., 5N 651 (1971).
394. S.S.S.R.Pat., 232 850 (1969); Tovar.znaky, nr.33 (1969).
395. S.S.S.R.Pat., 321 974 (1971); Tovar.znaky, nr.35 (1971).
396. D.D.R.Pat., 72 424 (1968).
397. Brit.Pat., 1 129 563 (1969); Chem.Abstr., 70, 47 594 (1969).
398. D.D.R.Pat., 62 954 (1967).
399. Jap.Pat., 2837 (1969); Ref.Zhur.Khim., 8N 654 (1970).
400. Jap.Pat., 12 146 (1969); Ref.Zhur.Khim., 9N 605 (1970).
401. Jap.Pat., 11 895 (1969); Ref.Zhur.Khim., 9N 599 (1970).
402. Jap.Pat., 12 147 (1969); Ref.Zhur.Khim., 9N 604 (1970).
403. Jap.Pat., 11 894 (1969); Chem.Abstr., 71, 112 948 (1969).

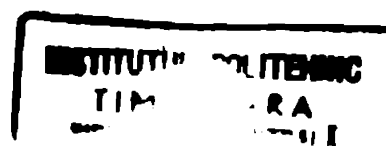
404. Jap.Pat., 11 895 (1969); Chem.Abstr., 71, 101 870 (1969).
405. K.Schmidt, Chem.Abstr., 73, 45 549 (1971).
406. S.S.S.R.Pat., 305 654 (1971); Tovar.znaky, nr.18 (1971).
407. S.S.S.R.Pat., 262 730 (1970); Tovar.znaky, nr.6 (1970).
408. Brit.Pat., 1 164 177 (1969); Ref.Zhur.Khim., 17N 596 (1970).
409. S.S.S.R.Pat., 203 578 (1967).
410. S.S.S.R.Pat., 240 567 (1967).
411. D.B.R.Pat., 1 301 928 (1969).
412. U.S.A.Pat., 3 470 207 (1970); Ref.Zhur.Khim., 22N 688 (1970).
413. U.S.A.Pat., 3 364 230 (1968); Chem.Abstr., 69, 36 104 (1968).
414. S.S.S.R.Pat., 226 500 (1967).
415. Swed.Pat., 493 200 (1970); Ref.Zhur.Khim., 7N 625 (1971).
416. Jap.Pat., 306 (1969); Ref.Zhur.Khim., 3N 658 (1970).
417. Brit.Pat., 1 316 242 (1973); Chem.Abstr., 72, 66 575d (1973).
418. D.B.R.Pat., 2 310 287 (1973); Chem.Abstr., 79, 146 504v (1973).
419. D.B.R.Pat., 2 214 059 (1973); Chem.Abstr., 146 657 (1973).
420. S.S.S.R.Pat., 195 992 (1967); Tovar.znaky, nr.10 (1967).
421. S.S.S.R.Pat., 149 360 (1960).
422. Brit.Pat., 1 198 192 (1970); Ref.Zhur.Khim., 6N 669 (1971).
423. B.A.Trofimov, Zhur.org.Khim., 5, 816 (1969).
424. Cehoslov.Pat., 132 844 (1970); Ref.Zhur.Khim., 5N 761 (1971).
425. Cehoslov.Pat., 132 843 (1970); Ref.Zhur.Khim., 5N 760 (1971).
426. France Pat., 2 001 829 (1970); Chem.Abstr., 72, 89 767 (1970).
427. S.S.S.R.Pat., 211 444 (1965).
428. Swed.Pat., 47 155 (1969); Ref.Zhur.Khim., 12N 1070 (1970).
429. D.D.R.Pat., 56 967 (1966).
430. S.S.S.R.Pat., 253 843 (1971); Ref.Zhur.Khim., 3N 553 (1971).
431. U.S.A.Pat., 3 468 964 (1970); Chem.Abstr., 72, 12 067 (1970).
432. S.S.S.R.Pat., 248 690 (1969); Ref.Zhur.Khim., 18N 621 (1970).

433. U.S.A.Pat., 3 538 220 (1970); Ref.Zhur.Khim., 13N 596 (1971).
434. S.S.S.R.Pat., 237 148 (1969); Ref.Zhur.Khim., 5N 826 (1970).
435. S.S.S.R.Pat., 259 877 (1970); Ref.Zhur.Khim., 3N 554 (1971).
436. Swed.Pat., 494 016 (1970); Ref.Zhur.Khim., 2N 563 (1971)
437. Swed.Pat., 506 563 (1971); Ref.Zhur.Khim., 23N 582 (1971).
438. U.S.A.Pat., 3 476 834 (1970); Ref.Zhur.Khim., 2N 567 (1971).
439. Brit.Pat., 1 214 534 (1971); Ref.Zhur.Khim., 13N 602 (1971).
440. U.S.A.Pat., 3 553 320 (1971); Ref.Zhur.Khim., 19N 741 (1971).
441. U.S.A.Pat., 3 742 698 (1977); Chem.Abstr., 79, 125 825k (1973).
442. U.S.A.Pat., 3 742 698 (1973); Ref.Zhur.Khim., 5N 825 (1970).
443. Swed.Pat., 497 124 (1970); Ref.Zhur.Khim., 13N 593 (1971).
444. S.S.S.R.Pat., 280 367; Tovar.znaky, nr.27 (1970).
445. France Pat., 1 592 116 (1970); Ref.Zhur.Khim., 13N 594 (1971).
446. T.A.Masteryukova si A.E.Shipov, Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel. khim.Nauk, 1968, 2042.
447. T.A.Masteryukova si A.E.Shipov, Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel. khim.Nauk, 1971, 2003.
448. D.B.R.Pat., 2 262 769 (1973); Chem.Abstr., 79, 78 143z (1973).
449. S.S.S.R.Pat., 281 465 (1970); Tovar.znaky, nr.38 (1970).
450. Jap.Pat., 29 647 (1970); Ref.zhur.Khim., 22N 649 (1970).
451. S.S.S.R.Pat., 225 109 (1966).
452. U.S.A.Pat., 3 499 077 (1970); Ref.Zhur.Khim., 7N 669 (1971).
453. U.S.A.Pat., 3 420 919 (1969); Ref.Zhur.Khim., 10N 630 (1970).
454. U.S.A.Pat., 3 517 089 (1970); Ref.Zhur.Khim., 8N 596 (1971).
455. S.S.S.R.Pat., 212 262 (1968); Ref.Zhur.Khim., 1N 653 (1970).

456. S.S.R.Pat., 228 681 (1968); Ref.Zhur.Khim., 2N 714 (1970).
457. Brit.Pat., 1 216 400 (1970); Ref.Zhur.Khim., 14N 659 (1971).
458. France Pat., 1 558 390 (1970); Chem.Abstr., 72, 90 626 (1970).
459. France Pat., 1 592 328 (1971); Ref.Zhur.Khim., 13N 595 (1971).
460. France Pat., 1 538 747 (1970); Ref.Zhur.Khim., 9N 617 (1971).
461. U.S.A.Pat., 3 385 689 (1968); Chem.Abstr., 43614 (1969).
462. U.S.A.Pat., 3 455 938 (1969); Ref.Zhur.Khim., 15N 718 (1970).
463. D.D.R.Pat., 74 670 (1968).
464. France Pat., 1 533 458 (1968); Chem.Abstr., 71, 60787 (1969).
465. Jap.Pat., 15 800 (1970); Ref.Zhur.Khim., 15N 661 (1970).
466. Ya.A.Mendelbaum și R.S.Soyfer, Khim.v selskom hozyaistve, 6, 107 (1968).
467. S.S.S.R.Pat., 250 136 (1969); Ref.Zhur.Khim., 18N 6241 (1970).
468. Jap.Pat., 16 238 (1970); Ref.Zhur.Khim., 12N 624 (1970).
469. D.B.R.Pat., 1 642 294 (1967).
470. S.S.S.R.Pat., 180 153 (1963).
471. U.S.A.Pat., 3 397 269 (1969); Ref.Zhur.Khim., 3N 672 (1970).
472. Jap.Pat., 29 879 (1970); Ref.Zhur.Khim., 22N 638 (1970).
473. U.S.A.Pat., 3 408 426 (1969); Ref.Zhur.Khim., 2N 716 (1970).
474. N.Anghelescu, Rev.Chim., 20, 361 (1969).
475. U.S.A.Pat., 3 396 213 (1969); Ref.Zhur.Khim., 1N 652 (1970).
476. S.S.S.R.Pat., 254 510 (1969); Ref.Zhur.Khim., 21N 561 (1971).
477. U.S.A.Pat., 3 567 422 (1971); Ref.Zhur.Khim., 24 N 764 (1971).
478. Austral.Pat., 403 472 (1971); Ref.Zhur.Khim., 19N 625 (1971).
479. U.S.A.Pat., 3 502 771 (1970); Ref.Zhur.Khim., 11N 618 (1971).
480. D.B.R.Pat., 1 296 633 (1966).

481. Ya.A.Mendelbaum, V.I.Lomakina gi N.N.Melnikov in
"Khimicheskie sredstva zaschiti rastenyi", Moskva,
VINIHSZR, 1970, p.104.
482. D.B.R.Pat., 1 274 849 (1963).
483. U.S.A.Pat., 3 382 300 (1969); Ref.Zhur.Khim., 1N 659
(1970).
484. U.S.A.Pat., 3 520 956 (1970); Ref.Zhur.Khim., 8N 651
(1971).
485. U.S.A.Pat., 3 442 928 (1969); Ref.Zhur.Khim., 13N 705
(1970).
486. U.S.A.Pat., 3 527 848 (1970); Ref.Zhur.Khim., 11N 579
(1971).
487. U.S.A.Pat., 3 446 896 (1969); Ref.Zhur.Khim., 12N 999
(1970).
488. U.S.A.Pat., 3 392 215 (1969); Ref.Zhur.Khim., 4N 785
(1970).
489. U.S.A.Pat., 3 415 909 (1969); Ref.Zhur.Khim., 4N 786
(1970).
490. Jap.Pat., 10 734 (1970); Ref.Zhur.Khim., 12N 530 (1970).
491. U.S.A.Pat., 3 517 088 (1970); Ref.Zhur.Khim., 8N 598
(1971).
492. S.S.S.R.Pat., 222 265 (1966).
493. S.S.S.R.Pat., 276 056 (1970); Ref.Zhur.Khim., 8N 594
(1971).
494. U.S.A.Pat., 3 476 833 (1970); Chem.Abstr., 72, 21 302
(1970).
495. U.S.A.Pat., 3 433 865 (1969); Ref.Zhur.Khim., 12N 1007
(1970).
496. D.D.R.Pat., 76 639 (1969).
497. S.S.S.R.Pat., 317 207 (1971); Tovar.znaky, nr.30 (1971).
498. U.S.A.Pat., 3 536 812 (1970); Ref.Zhur.Khim., 13N 606
(1971).
499. U.S.A.Pat., 3 431 325 (1969); Ref.Zhur.Khim., 12N 1006
(1970).
500. U.S.A.Pat., 3 439 092 (1969); Ref.Zhur.Khim., 10N 655
(1970).
501. U.S.A.Pat., 3 463 836 (1969); Ref.Zhur.Khim., 19N 586
(1970).
502. Jap.Pat., 318 (1969); Ref.Zhur.Khimn., 2N 761 (1970).
503. D.D.R.Pat., 74 669 (1969).
504. S.S.S.R.Pat., 310 330 (1971); Tovar.znaky, nr.26 (1971).

505. France Pat., 1 560 074 (1970); Chem.Abstr., 72, 90 043 (1970).
506. D.B.R.Pat., 1 301 172 (1963); Ref.Zhur.Khim., 5N 644 (1971).
507. D.B.R.Pat., 1 278 789 (1963).
508. Jap.Pat., (1969); Ref.Zhur.Khim., 1N 722 (1970).
509. Jap.Pat., 27 359 (1969); Ref.Zhur.Khim., 1N 724 (1970).
510. Cehoslov.Pat., 129 181 (1969); Ref.Zhur.Khim., 10N 657 (1970).
511. D.B.R.Pat., 1 542 919 (1969).
512. Brit.Pat., 1 223 820 (1971); Ref.Zhur.Khim., 19N 736 (1971).
513. D.B.R.Pat., 2 210 836 (1972); Chem.Abstr., 79, 146 651r (1973).
514. Jap.Pat., 4340 (1968); Chem.Abstr., 69, 76 898 (1968).
515. D.B.R.Pat., 1 300 935 (1967); Ref.Zhur.Khim., 5N 716 (1971).
516. Jap.Pat., 6818 (1969); Ref.Zhur.Khim., 3N 699 (1970).
517. D.B.R.Pat., 1 288 843 (1969); Ref.Zhur.Khim., 17N 621 (1970).
518. Jap.Pat., 3583 (1969); Ref.Zhur.Khim., 2N 763 (1970).
519. S.S.S.R.Pat., 317 163 (1971) Tovar.znaky, nr.30 (1971).
520. D.B.R.Pat., 1 238 013 (1965).
521. U.S.A.Pat., 3 760 040 (1973); Chem.Abstr., 79, 126 613b (1973).
522. C.N.Lieske și J.W.Hovamice, J.Agr.Food Chem., 17, 355 (1969).
523. K.Szabo și J.J.Menn, J.Agr.Food Chem., 17, 863 (1969).
524. J.G.Shaw, J.Econ.Entomol., 63, 1590 (1970).
525. J.J.Menn și K.Szabo, J.Econ.Entomol., 58, 734 (1965).
526. R.B.Fearing și E.M.Walsh, J.Agr.Food Chem., 17, 1261 (1969).
527. U.S.A.Pat., 3 476 836 (1970); Chem.Abstr., 72, 32 017 (1970).
528. S.S.S.R.Pat., 232 971 (1970); Ref.Zhur.Khim., 7N 689 (1970).
529. W.E.Peag, G.W.Beards și A.A.Swenson, J.Econ.Entomol., 62, 1083 (1969).
530. Jap.Pat., 10 800 (1969); Ref.Zhur.Khim., 12N 997 (1970).
531. U.S.A.Pat., 3 523 999 (1970); Ref.Zhur.Khim., 18N 627 (1971).
532. S.S.S.R.Pat., 280 368 (1970); Tovar.znaky, nr.27 (1970).
533. Swed.Pat., 497 127 (1970); Ref.Zhur.Khim., 11N 581 (1971).
534. U.S.A.Pat., 3 426 021 (1969); Ref.Zhur.Khim., 7N 685 (1970).



535. W.J.Mistis și F.D.J.Smith, J.Econ.Entomol., 62, 712 (1969).
536. U.S.A.Pat., 3 420 991 (1969); Ref.Zhur.Khim., 6N 860
(1970).
537. U.S.A.Pat., 3 351 679 (1968).
538. U.S.A.Pat., 3 401 220 (1969); Ref.Zhur.Khim., 2N 717
(1970).
539. V.I.Kondratiuc, E.I.Slyusarenko și G.I.Dercach, "Fiziologhiceski
aktivnniie veschestva", tom 2, Izd. "Naukova
dumka", Kiev, 1969, p.37.
540. S.S.S.R.Pat., 304 727 (1971).
541. J.S.Thornton și C.W.Stanly, J.Agr.Food Chem., 19, 73 (1971).
542. D.B.R.Pat., 1 924 083 (1970); Chem.Abstr., 72, 90 621
(1970).
543. D.B.R.Pat., 2 205 565 (1973); Chem.Abstr., 79, 146 659z
(1973).
544. U.S.A.Pat., 3 560 596 (1971); Ref.Zhur.Khim., 22N 590
(1971).
545. A.F.Prokofieva, N.N.Melnikov și I.L.Vladimirova, Zhur.obschei Khim.
41, 1702 (1971).
546. U.S.A.Pat., 3 499 964 (1970); Ref.Zhur.Khim., 6N 671
(1971).
547. S.S.S.R.Pat., 249 399 (1969); Ref.Zhur.Khim., 18N 621
(1970).
548. S.S.S.R.Pat., 239 946 (1909); Ref.Zhur.Khim., 21N 559
(1970).
549. Brit.Pat., 1 175 220 (1969); Ref.Zhur.Khim., 15N 349 (1970).
550. D.D.R.Pat., 77 712 (1968).
551. M.A.Englin, Zhur.obschei Khim., 38, 869 (1968).
552. S.S.S.R.Pat., 246 957 (1970); Ref.Zhur.Khim., 17N 595
(1970).
553. N.N.Melnikov și A.F.Grapov, Khim. v selskom hozyaistve, 7, 55
(1969).
554. A.F.Grapov și N.V.Lebedeva, Agrokhim., 1972, 96.
555. S.S.S.R.Pat., 298 093 (1972); Tovar.znaky, nr.10 (1972).
556. L.Ferte și J.Pecheur, Phytiatr.Phytopharm., 19, 113 (1970).
557. G.Martin, J.Amer.Soc.Hortic.Sci., 96, 434 (1971).
558. L.L.Edgerton și W.Greenhalgh, J.Amer.Soc.Hortic.Sci., 94, 11
(1969).
559. U.S.A.Pat., 3 513 233 (1970); Ref.Zhur.Khim., 6N 672 (1971).
560. U.S.A.Pat., 3 467 736 (1970); Chem.Abstr., 72, 32 027
(1970).

561. Danem.Pat., 118 858 (1971); Ref.Zhur.Khim., 24N 66o (1971).
562. France Pat., 2 o32 oo6 (1971); Ref.Zhur.Khim., 22N 562 (1971).
563. U.S.A.Pat., 3 481 731 (197o); Chem.Abstr., 32 o22 (197o).
564. Swed.Pat., 499 963 (197o); Ref.Zhur.Khim., 15N 8o8 (1971).
565. U.S.A.Pat., 3 529 o41 (197o); Ref.Zhur.Khim., 11N 653 (1971).
566. Brit.Pat., 1 183 13o (197o); Ref.Zhur.Khim., 22 N 71o (197o)
567. U.S.A.Pat., 3 416 912 (1969); Ref.Zhur.Khim., 9N 683 (197o).
568. France Pat., 1 577 278 (197o); Ref.Zhur.Khim., 16N 681 (197o).
569. A.A.Abduvahabov, V.L.Avdeeva, R.V.Babakhanyan și Ya.S.Simisin, Biol.Zhur.Arm., 26, 1o7 (1973).
570. A.A.Abduvahabov, V.L.Avdeeva, I.V.Semenov și Ya.S.Simisin, Voprosi Med.Khim., 19, 365 (1973).
571. U.S.A.Pat., 3 553 233 (1971); Ref.Zhur.Khim., 18N 626 (1971).
572. D.D.R.Pat., 71 771 (1967).
573. U.S.A.Pat., 3 462 439 (197o); Ref.Zhur.Khim., 19N 637 (197o).
574. U.S.A.Pat., 3 511 636 (197o); Ref.Zhur.Khim., 7N 725 (197o).
575. N.N.Melnikov și B.A.Haskin, Khim.farm.Zhur., 5, 8 (1968).
- 575.a. R.Zahradnik, Arch.Intern.Pharmacodynamie, 13, 93 (197o).
576. J.Kopecky, K.Bocek și D.Vlachova, Nature, 2o7, 981 (1965).
577. C.D.Ritchie și W.F.Sager, Progr.Phys.Org.Chem., 2, 323 (1964).
578. R.W.Taft in "Steric Effects in Organic Chemistry", M.S.Newman, ed.J.Wiley, New York, 1956.
579. C.K.Hancock, E.A.Meyers și B.J.Yager, J.Amer.Chem.Soc., 83, 4211 (1961).
580. M.Charton, J.Org.Chem., 29, 1222 (1964).
581. T.Fujita, J.Iwasa și C.Hansch, J.Amer.Chem.Soc., 86, 5175 (1964).
582. J.Iwasa, T.Fujita și C.Hansch, J.Med.Chem., 8, 15o (1965).
583. C.Hansch și S.M.Anderson, J.Org.Chem., 32, 2583 (1967).
584. E.I.Ariens, "Molecular Pharmacology", vol.I, Acad. Press, New York 1964.
585. C.Hansch și T.Fujita, J.Amer.Chem.Soc., 86, 1616 (1964).
586. E.R.Garrett și O.K.Wright, J.Pharm.Sci., 56, 1576 (1967).
587. E.R.Garrett, G.H.Müller și M.R.W.Brown, J.Pharm.Sci., 55, 593 (1966).
588. A.Goldstein, L.Arnou și J.M.Kalman, "Principles of Drug Action; the Basis of Pharmacology", Harper a Row, New York, 1968.

589. C.Hansch, A.R.Steward, S.M.Anderson și D.L.Bentley, J.Med.Chem., 11, 1 (1968).
590. C.Hansch, A.R.Steward și E.W.Deutsch, Mol.Pharmacol., 1, 205 (1965).
591. C.Hansch, E.Kuttér și A.Leo, J.Med.Chem., 12, 746 (1969).
592. C.Hansch, E.W.Deutsch și R.N.Smith, J.Amer.Chem.Soc., 87, 2738 (1965).
593. G.E.Bass, D.R.Hudson, J.E.Parker și W.P.Purcell, J.Med.Chem., 14, 275 (1971).
594. P.N.Craig, C.Hansch, J.W.Mc Farland, Y.C.Martin, W.C.Purcell.și R.Zahradnik, J.Med.Chem., 14, 447 (1971).
595. M.Tiron, "Teoria Erorilor de măsurare și metoda celor mai mici patrate", Ed.Tehnică, Buc., 1972.
596. A.Glück, "Metode matematice în industria chimică", Ed.Tehnică, Buc., 1971.
597. F.Klepp, "Matematici speciale pentru ingineri chimiști", Lit.I.P.1 "Traian Vuia", Timișoara, 1974.
598. I.Todoren, "Tratarea matematică a datelor experimentale", Ed.Acad. R.S.R., Buc., 1976.
599. Yu.A.Jdanov, Uspekhi sovrem.biokhim., 61, 187 (1966).
600. E.J.Lien, Amer.J.Pharm.Educ., 33, 368 (1969).
601. C.Hansch, Accts.Chem.Revs., 2, 232 (1969).
602. A.Chiriac, "Principiile analizei cantitative a relațiilor structur reactivitate chimică și activitate biologică", Referat doctorantură, 1971.
603. J.M.Clayton, O.E.Millner și W.P.Purcell, Ann.Rept.Med.Chem., 1969, 285 (1970).
604. E.Coats, W.R.Glave și C.Hansch, J.Med.Chem., 13, 305 (1970).
605. E.W.Deutsch și C.Hansch, Nature, 211, 75 (1966).
606. T.Fujita și C.Hansch, J.Med.Chem., 10, 991 (1967).
607. T.Fujita, J.Iwasa și C.Hansch, J.Amer.Chem.Soc., 86, 5175 (1964).
608. C.Hansch, J.Med.Chem., 13, 964 (1970).
609. C.Hansch, J.Org.Chem., 35, 620 (1970).
610. C.Hansch și E.W.Deutsch, Biochim.Biophys.Acta, 112, 381 (1966).
611. C.Hansch și E.W.Deutsch, J.Med.Chem., 8, 705 (1965).
612. C.Hansch și K.N. Von Kaula, Biochem.Pharmacol., 19, 2193 (1970).
613. C.Hansch și E.Coats, J.Pharm.Sci., 59, 731 (1970).
614. C.Hansch și R.Kerley, J.Med.Chem., 13, 957 (1970).
615. C.Hansch și F.Helmer, J.Polymer Sci.,Part.A-1, 6, 3295 (1968).
616. C.Hansch și E.W.Deutsch, Biochim.Biophys.Acta, 126, 117 (1966).
617. C.Hansch și A.R.Steward, J.Med.Chem., 7, 691 (1964).

618. C.Hansch, A.R.Steward și J.Iwasn, Mol.Pharmacol., 1, 87 (1965).
619. E.Kutter și C.Hansch, Arch.Biochem.Biophys., 135, 126 (1969).
620. E.Kutter și C.Hansch, J.Med.Chem., 12, 647 (1969).
621. E.J.Lien, C.Hansch și S.M.Anderson, J.Med.Chem., 11, 430 (1968).
622. E.Miller și C.Hansch, J.Pharm.Sci., 56, 92 (1967).
623. A.Cammarata, J.I.Yan, J.M.Collett și A.N.Martin, Mol.Pharmacol., 6, 61 (1970).
624. A.Cammarata și J.I.Yan, J.Med.Chem.Soc., 13, 93 (1970).
625. R.W.Fuller, M.M.Marsh și J.Mills, J.Med.Chem., 11, 397 (1968).
626. R.C.Allen, G.L.Carlson și C.J.Cavallio, J.Med.Chem., 13, 909 (1970).
627. A.Cammarata, J.Med.Chem., 10, 525 (1967).
628. A.Cammarata, J.Med.Chem., 12, 314 (1969).
629. T.Fujita, J.Med.Chem., 9, 797 (1966).
630. E.R.Garrett, O.K.Wright, G.H.Miller și K.L.Smith, J.Med.Chem., 9, 203 (1966).
631. H.C.Heinker, Biochim.Biophys.Acta, 63, 46 (1962).
632. R.B.Hermann, H.W.Culp, R.E.Mc Mahon și M.M.Marsh, J.Med.Chem., 12, 749 (1969).
633. R.L.Jones, R.L.Metcalf și T.R.Fukuto, J.Econ.Entomol., 62, 801 (1969).
634. E.C.Jorgensen și J.W.Reid, J.Med.Chem., 8, 533 (1965).
635. N.Kakeya, N.Yata, A.Kanada și M.Aoki, Chem.Pharm.Bull., 17, 2558 (1969).
636. E.J.Lien, M.Hussani și G.L.Tong, J.Pharm.Sci., 59, 865 (1970).
637. Y.Sasaki și M.Suzuki, Chem.Pharm.Bull., 17, 1569 (1969).
638. H.J.Schaeffer, R.N.Johnson, E.Odin și C.Hansch, J.Med.Chem., 13, 452 (1970).
639. E.J.Lien și G.L.Tong, Cancer Chemother.Rep., 57, 251 (1973).
640. C.Hansch și E.J.Lien, Biochem.Pharmacol., 17, 709 (1968).
641. N.Kakeya, M.Aoki, A.Kanada și N.Yata, Chem.Pharm.Bull., 17, 1010 (1969).
642. A.Cammarata, J.I.Yan, J.Polymer Sci., A-1, 8, 1303 (1970).
643. J.G.Topliss, J.Med.Chem., 15, 1006 (1972).
644. C.Hansch, A.Leo, S.H.Unger, K.Kim, D.Nikaitani și E.J.Lien, J.Med.Chem., 16, 1207 (1973).
645. M.Yoshimoto, C.Hansch, Priscilla Y.C.Jow, Chem.Pharm.Bull., 23, 437 (1975).
646. C.Silipo și C.Hansch Mol.Pharmacol., 10, 954 (1974).
647. B.T.Stoney, D.F.Williams și A.Bracey, J.L.Hosen și S.Stephenson, PERS I, 49, 338 Biochim.Zhur., 12F,13 (1975).

648. F.L.Hubert, Mol.Pharmacol., 10, 315 (1974).
649. C.Hansch, J.Schaffer și P.Kerley, J.Biol.Chem., 247, 4703 (1972).
650. T.Fujita, J.Med.Chem., 16, 923 (1973).
651. C.Hansch, K.Nakamoto, M.Gorin, P.Denisevich, E.R.Garrett și S.M.Herman, J.Med.Chem., 16, 917 (1973).
652. S.Wold, Chim.Scripta, 1974, 97 .
653. M.Sjöström și S.Wold, Chim.Scripta, 1974, 114.
654. S.Wold și M.Sjöström, Chim.Scripta, 1972, 49.
655. R.M.Sacher, G.H.Alt și W.A.Darlington, J.Agr.Food Chem., 21, 132 (1973).
656. P.N.Craig, H.C.Caldwell și W.G.Groves, J.Med.Chem., 13, 1079 (1970).
657. C.Hansch, Il Farmaco, Ed.Sci., 23, 293 (1968).
658. C.Hansch și R.Kerley, Chem.Ind., 1969, 294.
659. C.Hansch, J.Med.Chem., 11, 920 (1968).
660. K.Bowden și R.C.Young, J.Med.Chem., 13, 225 (1970).
661. J.J.Zimmerman și J.E.Goyan, J.Med.Chem., 13, 492 (1970).
662. C.Hansch și A.R.Steward, J.Med.Chem., 7, 691 (1964).
663. T.R.Fukuto, R.L.Metcalf, R.L.Jones și R.O.Myers, J.Agr.Food.Chem., 17, 923 (1969).
664. C.Hansch și S.M.Anderson, J.Med.Chem., 10, 745 (1967).
665. T.R.Fukuto, Residue Reviews, 25, 327 (1969).
666. M.Yoshioka, K.Hamamoto și T.Kubota, Bull.Chem.Soc.Jap., 35, 1723 (1962).
667. T.Fujita și C.Hansch, J.Med.Chem., 10, 991 (1967).
668. P.N.Craig, H.C.Caldwell și W.G.Groves, J.Med.Chem., 13, 1079 (1970).
669. M.I.Kabachnik, Doklady Akad.Nauk S.S.S.R., 110, 393 (1956).
670. T.A.Mastryukova și M.I.Kabachnik, Uspekhi Khim., 38, 1751 (1969).
671. T.A.Mastryukova în "Khimia i primeneniye fosfororganicheskikh soedynenii", 4-vo konf., Izd."Nauka", Moskva, 1972, p.76.
672. A.Chiriac, "Analiza corelațională structură-reactivitate la compușii organofosforici", Referat de doctorat, 1972.
673. Mariana Basarabescu, "Calculul unor constante de substituent de tip ", Comunicare la sesiunea cercurilor științifice studentești, Univ.Timișoara, aprilie 1973, îndrumător științific, A.Chiriac.
674. Mariana Basarabescu, "Constante de substituent și utilizarea lor în analiza corelațională structură-reactivitate la compușii organofosforici", Lucrare de diplomă, Univ. Timișoara, 1973 , îndrumător științific A.Chiriac.

675. C.Hansch, K.Kiehs și G.L.Lawrance, *J.Amer.Chem.Soc.*, 87, 5770 (1965).
676. C.Hansch, E.J.Lien și F.Helmer, *Arch.Biochem.Biophys.*, 128, 319 (1963).
677. M.Yamazaki, N.Kakeya, T.Morishita, A.Kamada și M.Aoki, *Chem.Pharm.Bull.*, 18, 708 (1970).
678. C.Hansch, A.R.Steward și J.Iwasa, *J.Med.Chem.*, 8, 868 (1965).
679. E.V.Brown și W.H.Kipp, *Cancer Res.*, 29, 1341 (1969).
680. A.Leo, C.Hansch și C.Church, *J.Med.Chem.*, 12, 766 (1969).
681. D.Agin, L.Hersh și D.Holtzman, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.*, 53, 952 (1965).
682. W.P.Purcell, J.G.Beasley, R.P.Quintana și J.A.Singler, *J.Med.Chem.*, 9, 297 (1966).
683. M.S.Tute, *J.Med.Chem.*, 13, 48 (1970).
684. J.A.Ostrega, *J.Med.Chem.*, 12, 349 (1969).
685. J.A.Ostrega și C.Steinmetz, *J.Pharm.Sci.*, 59, 414 (1970).
686. W.B.Neely, W.G.Allison, W.B.Crummett, K.Kauer și W.Reifschneider, *J.Agr.Food.Chem.*, 18, 45 (1970).
687. S.D.Faust și H.M.Gomaa, *Environmentat Letters*, 3, 171 (1972).
688. J.M.Clayton și W.P.Purcell, *J.Med.Chem.*, 12, 1087 (1969).
689. M.H.Hussain și E.J.Lien, *J.Med.Chem.*, 14, 138 (1971).
690. E.J.Lien, G.L.Tong, J.T.Chou și L.L.Lien, *J.Pharm.Sci.*, 62, 242 (1973).
691. E.J.Lien, *J.Med.Chem.*, 13, 1189 (1970).
692. T.Yamamoto și T.Otsu, *Chem.Ind.*, 1967, 787.
693. C.G.Swain și E.C.Lupton, *J.Amer.Chem.Soc.*, 90, 4328 (1968).
694. Y.Yukawa și Y.Tsuno, *J.Chem.Soc.Japan (Pure Chem.Section)*, 86, 873 (1965).
695. Y.Sasaki și M.Suzuki, *Chem.Pharm.Bull.*, 18, 1759 (1970).
696. Y.Sasaki și M.Suzuki, *Chem.Pharm.Bull.*, 18, 1774 (1970).
697. T.Inagami, S.S.York și A.Patehornik, *J.Amer.Chem.Soc.*, 87, 126 (1965).
698. K.S.Dodgson, B.Spencer și K.Williams, *Biochem.J.*, 64, 216 (1956).
699. R.W.Taft in "Steric Effects in Organic Chemistry", M.S.Newman, Ed. J.Wiley and Sons, Inc., New York, 1956, p.556.
700. G.H.Hamer și E.J.Lien, *Il Farmaco, Ed.Sci.*, 24, 704 (1969).
701. O.Exner, *Col.Czech.Chem.Comm.*, 32, 1 (1967).
702. A.Bondi, *J.Phys.Chem.*, 68, 441 (1964).
703. M.Charton, *J.Amer.Chem.Soc.*, 31, 615 (1969).
704. A.Verloop, W.Hoogenstraaten și J.Tipker, "Development and application of new steric substituent parameters in drug design", in "Drug Design", vol.V, cap.III, 1975.

705. J.E.Amoore, G.Palmieri și E.Wanke, Nature, 216, 1084 (1967).
706. J.E.Amoore, G.Palmieri, E.Wanke și M.S.Blum, Science, 165, 1266 (1969).
707. Z.Simon și Z.Szabaday, Studia Biophysica (Berlin), 39, 123 (1973)
708. A.Chiriac, D.Ciubotariu, Z.Szabaday, R.Vilceanu și Z.Simon, Rev.Roumaine Biochim., 12, 143 (1975).
709. Z.Simon, I.Moțoc, D.Ciubotariu, Preprint, Univ.Timișoara, Ser. Chim., nr.17 (1975).
710. Z.Simon, Preprint, Univ.Timișoara, Ser.Chim., nr.1 (1976).
711. Z.Simon, I.Bădilescu, A.Chiriac, D.Ciubotariu, S.Holban, F.Kerek, I.Moțoc, M.Mracec și Z.Szabadai, Preprint, Univ.Timișoara, Ser.Chim., nr.7 (1976).
712. Z.Simon, A.Chiriac, I.Moțoc, S.Holban, D.Ciubotariu și Z.Szabaday, Studia Biophys.(Berlin), 55, 217 (1976).
713. Z.Simon, F.Kerek, R.D.Pop, S.Holban, I.Moțoc, M.Mracec, A.Chiriac, D.Ciubotariu, Z.Szabadai și I.Schwartz, Studia Biophys.(Berlin), 59, 181 (1976).
714. C.Hansch, Il Farmaco, Ed.Sci., 23, 293 (1968).
715. C.B.C.Boyce și B.I.Milborrow, Nature, 208, 537 (1965).
716. A.Leo, C.Hansch și D.Elkins, Chem.Revs., 71, 525 (1971).
717. C.Hansch, I.E.Quinlan și G.E.Lawrance, J.Org.Chem., 33, 347 (1968)
718. F.Helmer, K.Kiehs și C.Hansch, Biochemistry, 7, 2858 (1965).
719. J.Iwasa, T.Fujita și C.Hansch, J.Med.Chem., 8, 150 (1965).
720. D.J.Curie, C.E.Longh, R.F.Silver și H.L.Holmes, Canad.J.Chem., 44, 1035 (1966).
721. E.J.Lien, M.Hussain și P.Golden, J.Med.Chem., 13, 623 (1970).
722. Y.C.Martin, J.Med.Chem., 13, 145 (1970).
723. W.B.Neely, H.C.White și A.Rudzik, J.Pharm.Sci., 57, 1176 (1968).
724. P.Pratesi, L.Villa și E.Grana, Il Farmaco,Ed.Sci., 21, 409 (1966).
725. R.F.Rekker și G.G.Nys, Molecular and Quantum Pharm., 1974, 457.
726. E.J.Lien, J.Med.Chem., 13, 1189 (1970).
727. G.G.Nys și R.F.Rekker, Chim.Terapeutique, 1973, 521.
728. G.G.Nys și R.F.Rekker, Eur.J.Med.Chem.,Chim.Terapeutica, 4, 361 (1974).
729. C.Hansch, A.Vittoria, C.Silipo și Priscilla Y.C.Jow, J.Med.Chem., 18, 539 (1975).
730. C.Hansch și S.H.Ungar, J.Med.Chem., 16, 1217 (1973).
731. P.L.Hulbert, Mol.Pharmacol., 10, 315 (1974).
732. M.Yoshimoto, C.Hansch, Priscilla Y.C.Jow, Chem.Pharm.Bull., 23, 446 (1975).
733. T. Miyagishima, Chem.Pharm.Bull., 22, 2288 (1974).

734. C.Silipo și C.Hansch, *Mol.Pharmacol.*, 10, 954 (1974).
735. I.Moriguchi, *Chem.Pharm.Bull.*, 23, 247 (1975).
736. P.Bracha și R.D.O'Brien, *J.Econ.Entomol.*, 59, 1255 (1966).
737. A.Cammarata și R.L.Stein, *J.Med.Chem.*, 11, 829 (1968).
738. E.R.Garrett, J.B.Mielck, J.K.Seydel și H.J.Kessler, *J.Med.Chem.*, 12, 740 (1969).
739. G.H.Hamor și E.J.Lien, *Il Farmaco, Ed.Sci.*, 24, 704 (1969).
740. K.Kiehs, C.Hansch și L.More, *Biochemistry*, 5, 2602 (1966).
741. E.Kutter, A.Hertz, H.J.Teschemacher și R.Hess, *J.Med.Chem.*, 13, 801 (1970).
742. E.J.Lien și Cheung-Tung Kong, *Pesticide Biochem.and Physiology*, 4, 289 (1974).
743. E.J.Lien și C.Hansch, *J.Pharm.Sci.*, 57, 1027 (1968).
744. E.J.Lien, *J.Agr.Food Chem.*, 17, 1265 (1969).
745. E.J.Lien, J.Kuwahara și R.T.Koda, *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy*, 8, 470 (1974).
746. E.J.Lien, *Proceedings of the 4 th Intern.Symposium on Medicinal Chemistry, Noordwijkerhout, The Netherlands, September 9-13, 1974.*
747. J.Green, și S.Mareinkiewicz, *J.Cromatogr.*, 10, 389 (1963).
748. L.S.Bark și R.J.T.Graham, *Talanta*, 13, 1281 (1966).
749. L.S.Bark și R.J.T.Graham, *J.Cromatograf.*, 23, 417 (1966).
750. G.L.Biagi, M.C.Guerra și A.M.Barbaro, *J.Med.Chem.*, 13, 511 (1970).
751. G.L.Biagi, M.C.Guerra și A.M.Barbaro, *Il Farmaco, Ed.Sci.*, 25, 755 (1970).
752. G.L.Biagi, A.M.Barbaro și M.C.Guerra, *Il Farmaco, Ed.Sci.*, 25, 749 (1970).
753. M.L.Bender, R.L.Van Etten, G.A.Clowes și J.F.Sebastian, *J.Amer.Chem.Soc.*, 88, 2318 (1966).
754. L.J.Mullins, *Chem.Rev.*, 54, 289 (1954).
755. J.A.Ostrenga, *J.Med.Chem.*, 12, 349 (1969).
756. J.C.Mc Gowan, *J.Appl.Chem.*, 1, 1205 (1951).
757. J.C.Mc Gowan, *J.Appl.Chem.*, 4, 41 (1954).
758. J.C.Mc Gowan, *Nature*, 200, 1317 (1963).
759. J.C.Mc Gowan, *J.Appl.Chem.*, 16, 103 (1966).
760. J.C.Mc Gowan, *Rec.Trav.Chim.Pays-Bas*, 75, 193 (1965).
761. A.E.Bird și A.C.Marshall, *Biochem.Pharmacol.*, 16, 2275 (1967).
762. Y.C.Martin, Th.M.Bustard și K.L.Lynn, *J.Med.Chem.*, 16, 1089 (1973),
763. J.L.Barker, *Nature*, 252, 5478 (1972).
764. H.I.Schaffer, R.N.Johnson, E.O.Odin, *J.Med.Chem.*, 13, 452 (1970).

765. E.M.Hodnett și W.I.Dum, J.Med.Chem., 13, 768 (1970).
766. A.Chiriac, R.Vilceanu, D.Ciubotariu, Z.Szabadai și Z.Simon, Preprint, Univ.Timisoara, Ser.Chim., nr.3 (1974).
767. R.L.Metcalf, Bull.World Health Organ., 44, 43 (1971).
768. R.T.Wedding, C.Hansch și T.R.Fukuto, Arch.Biochim.Acta, 121, 9 (1967).
769. W.F.Purcell, Biochim.Biophys.Acta, 105, 201 (1965).
770. Z.Simon, Preprint, Univ.Timisoara, Ser.Chim., nr.5 (1974).
771. C.Hansch, K.Nakamoto, M.Gorni, P.Danisevich, E.R.Garrett, S.M.Herman și C.N.Won, J.Med.Chem., 16, 917 (1973).
772. C.Silipo și C.Hansch, J.Amer.Chem.Soc., 97, 1327 (1975).
- 772.a. M.A.H.Fahmy, T.R.Fukuto, R.L.Metcalf și R.L.Hohnstead, J.Agr.Food Chem., 21, 585 (1973).
773. A.Cammarata, J.Med.Chem., J.Med.Chem., 11, 1111 (1968).
774. K.S.Rogers și A.Cammarata, J.Med.Chem., 12, 692 (1969).
775. O.Horowitz, "Calculul cuanto-chimic al constantelor de substituent
Lucrare de diplomă, Universitatea "Babeș-Bolyai" ,
Cluj-Napoca, 1963.
776. B.Pullman și A.Pullman, "Quantum Biochemistry", J.Wiley, New York, 1963.
777. L.B.Kier, "Molecular Orbital Methods in Drug Research", Acad.Press New York, 1971.
778. Z.Simon, "Biochimie cuantică și interacții specifice", Ed.Stiințifică, Buc., 1973.
779. Z.Simon, "Quantum Biochemistry and Specific Interactions", Abacus Press, Tunbridge Wells, Kent.
780. P.N.Craig, J.Med.Chem., 14, 680 (1971).
781. A.Stretweiser, "Molecular Orbital Theory for Organic Chemists", J.Wiley and Sons, New York, 1967.
782. K.Fukui, T.Yonezawa și C.Nagata, J.Chem.Phys., 27, 1247 (1957).
783. K.Fukui, T.Yonezawa și C.Nagata, J.Chem.Phys., 31, 550 (1959).
784. A.J.Wohl, Mol.Pharmacol., 6, 195 (1970).
785. K.E.Rogers și A.Cammarata, Biochim.Biophys.Acta, 123, 22 (1969).
786. I.Lukovitz, G.Biczó și I.Pataki, Studia Biophys.(Berlin), 39, 103 (1973).
787. J.L.Spencer, J.J.Hlavka, J.Petisi, H.M.Krazinski și J.H.Boethe, J.Med.Chem., 6, 405 (1963).
788. W.R.Smithfield și W.P.Purcell, J.Pharm.Sci., 56, 577 (1967).
789. R.Vilceanu, Comunicare prezentată la "Symposium on Possible Technique for Inspection of Protection of Organophosphorus Compounds", Stockholm, 21-24 Sept., 1971.

- 789.a. R.Vilceanu, Z.Szabadai, Ileana Neamțiu și Livia Pot,
Studia Biophys.(Berlin), 42, 135 (1974).
790. R.Vilceanu, Z.Simon, R.Vilceanu, Studia Biophys.(Berlin), 51,
183 (1975).
791. R.Vilceanu, A.Chiriac, Z.Szabadai și Z.Simon, Rev.Roumaine Biochim
10, 239 (1973).
792. R.Vilceanu, A.Chiriac și Z.Simon, Comunicare la a-4-a Conferință
Republicană de Chimie fizică generală și aplicată,
Buc., 2-5 Sept., 1974.
793. C.G.Swain și E.C.Lupton, J.Amer.Chem.Soc., 90, 4328 (1968).
794. W.B.Neely, W.E.Allison, W.B.Crummett, K.Kauer și W.Reifschneider,
J.Agr.Food Chem., 18, 45 (1970).
795. R.D.O'Brien, "Chimie Organique du Phosphore. Colloq.Intern.du
C.N.R.S., Paris, 19-24 mai 1969", Ed.C.N.R.S., Paris,
1970, p.353.
796. J.Metivier în "Insecticides Proceedings of the Second Intern.
IUPAC Congress of Pesticide Chemistry", Ed.A.S.Tahori,
Gordon and Breach Science Publishers, New York-London-
Paris, vol.1, 1972, p.325.
797. D.C.Twinn, Idem, p.353.
798. M.I.Kabachnik, "Khimia i primeneniye fosfororganicheskikh soedyneniy"
Izd.Akad.Nauk S.S.S.R., 1956, p.24.
799. S.M.Markov, N.A.Loshadkin, M.A.Cistova și I.L.Knuneanț în
"Mechanism i kinetika fermentativovo kataliza",
Izd."Nauka", Moskva, 1964.
800. T.A.Mastryukova, T.A.Melentieva, A.E.Sipov și M.I.Kabachnik,
Zhur.organ.khim., 29, 2178 (1959).
801. R.Vilceanu, Z.Szabadai, A.Chiriac și Z.Simon, Studia Biophys.
(Berlin), 34, 1 (1972).
802. M.I.Kabachnik, Doklady Akad.Nauk S.S.S.R., 110, 393 (1956).
803. M.I.Kabachnik, S.I.Ioffe și T.A.Mastryukova, Zhur.obschei Khim.,
30, 2763 (1960).
804. V.E.Belski, M.V.Efremova, I.M.Sermegorn și A.N.Pudovik,
Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.Khim.Nauk, 1969, 307.
805. V.E.Belski și M.V.Efremova, Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.Khim.
Nauk, 1970, 1542.
806. L.Larsson, Acta Chem.Scand., 11, 1131 (1957).
807. L.Larsson, Acta Chem.Scand., 12, 783 (1958).
808. V.A.Palm, "Osnovi kolichestvennoy teoryi organicheskikh reaktzii",
Izd."Khimia", Leningrad, 1967.
809. V.A.Palm, Uspekhi Khim., 30, 1069 (1961).

810. A.Chiriac și R.Vilceanu, sub tipar
811. E.J.Ariëns în "Drug Design" (E.J.Ariëns ed.), vol.I ,1-270,
Academic Press, New York, 1971.
812. S.B.Soloway în "Advances in Pest Control Research", Vol.6,
p.85-126, Interscience Publishers, New York, 1965.
813. B.V.Ioffe, "Refractometricheskie metodî khimii", Izd."Khimia",
Leningrad, 1974.
814. N.Bauer, K.Fajans și S.Z.Lewin, "Refractometry", A.Weissberger Ed
Physical Methods in Organic Chemistry, 3d ed., part II
p.p. 1139-1281, New York, 1960.
815. R.Ramb, "Refraktometrie. Handbuch der Lebensmittelchemie" (von
J.Schortmüller), Bd.II, 1.Teil, p.874-908, Springer Verlag
1965.
816. A.Chiriac, Veronica Chiriac, Z.Simon și R.Vilceanu, Preprint,
Univ.Timigoara, Ser.Chim., nr.3 (1976).
817. A.Chiriac, Veronica Chiriac, R.Vilceanu și Z.Simon, Preprint,
Univ.Timigoara, Ser.Chim., nr.4 (1976).
818. A.Chiriac, Veronica Chiriac, R.Vilceanu și Z.Simon, Preprint,
Univ.Timigoara, Ser.Chim., nr.2 (1976).
819. A.Chiriac, Z.Simon, Veronica Chiriac și R.Vilceanu, Preprint
Univ.Timigoara, Ser.Chim., nr.5 (1976).
820. Z.Simon, Preprint, Univ.Timigoara, Ser.Chim., nr.1 (1976).
821. Z.Simon, Studia Biophys.(Berlin), 51, 49 (1975).
822. R.Vilceanu și A.Chiriac, sub tipar.
823. E.N.Tsvetkov, D.I.Lobanova, L.I.Izosenkova și M.I.Kabachnik,
Zhur.obschei Khim., 39, 2177 (1969).
824. V.E.Belski, Zhur.obschei Khim., 40, 1374 (1970).
825. B.V.Ioffe, "Refractometrie pentru chimiști", Ed.tehnică, Buc.,
1958 ,p.199-203.
826. Z.Simon, Z.Szabadai și J.Miklos, Rev.Roumaine Biochim., 8, 79
(1971).
827. J.Cheymol în "Chimie Organique du Phosphore, Colloques Intern.
C.N.R.S. Paris 1969", Ed.C.N.R.S., Paris, 1970, p.353.
828. B.A.Arbutov, V.M.Zarostrova, I.D.Neklesova, M.A.Kudrina,
N.V.Egorova și G.A.Tudryi, Izvest.Akad.Nauk S.S.S.R., Otdel.khim.
Nauk, 1972, 1155.
829. E.E.Sepeleva, I.I.Sanin, Yu.S.Kagan, M.S.Borodach, A.P.Gelfer,
D.M.Paikyn și N.M.Gamper în "Khimia i primeneniie fosfororganiches-
kih soedynenii", Izd."Nauka", Moskva, 1972, p.484.
830. Z.Szabadai și Z.Simon, Rev.Roumaine Biochim., 9, 327 (1972).

831. A.Cammarata in "Molecular Orbital Studies in Chemical Pharmacology Symposium", Ed.by L.B.Kier, Springer, 1970, p.156-190.
832. A.J.J.Ooms și H.L.Botter, Biochem.Pharmacology, 14, 1839 (1965).
833. H.L.Botter și A.J.J.Ooms, Rec.Trav.Chim., 85, 21 (1966).
834. H.L.Botter și A.J.J.Ooms, Biochem.Pharmacology, 16, 1563 (1967).
835. A.Chiriac, Veronica Chiriac, M.Mracec, Z.Simon și R.Vilceanu, Preprint, Univ.Timișoara, Ser.Chim., nr.6 (1976).
836. M.A.Landau, O.G.Strukov și S.S.Dubov, Zhur.strukt.Khim., 10, 335 (1969)
837. M.A.Landau, V.V.Selucenko și S.S.Dubov, Doklady Akad.Nauk S.S.S.R 182, 134 (1968).
838. M.F.Guest, I.H.Hillier și V.R.Saunders, J.Chem.Soc., Faraday Trans 1972, 867.
839. R.L.Collin, Ann.New York Acad.Sci., 158, 50 (1969).
840. B.D.Pullman și C.Valdemoro, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam), 43, 548 (1960).
841. R.Vilceanu, A.Balint și Z.Simon, Nature, 217, 61 (1968).
842. A.Chiriac, I.Bădilescu, Z.Simon și R.Vilceanu, Preprint, Univ.Timișoara, Ser.Chim., 1, (1974).
843. R.Friedemann și W.Gründler, J.prakt.Chem., 316, 159 (1974).
844. B.Hetnarski și R.D.O'Brien, Biochemistry, 12, 3883 (1973).
845. W.N.Aldrige și E.Reiner, Biochem.J., 115, 147 (1969).
846. E.M.Bellet și T.R.Fukuto, J.Agr.Food Chem., 20, 931 (1972).
847. M.I.Kabachnik și V.A.Gilgarov, Bull.Acad.Sci., S.S.S.R., Div.Chem. Sci., 809 (1956).
848. A.Chiriac, Veronica Chiriac și R.Vilceanu, Preprint, Univ.Timișoara Ser.Chim., nr.13 (1976).
849. I.L.Vladimirova, A.F.Grapov, Ya.A.Mendelbaum și N.N.Melnikov, "Himia i primeneniia fosfororganicheskikh soedyneniia Trudf 3-vo konf. Izd."Nauka", Moskva, 1972.
850. O.C.Dermer și G.E.Ham, "Ethylenimine and other aziridines. Chemistry and Applications", Academic Press, New York-London, 1969, cap.6, p.394.
851. P.Alexander și J.T.Lett, Biochem.Pharmacol., 4, 34 (1960).
852. S.S.Brown, Adv.Pharmacol., 2, 243 (1963).
853. W.J.Hayness, jr., Bull.World Health Organ., 31, 721 (1964).
854. W.C.J.Ross, "Biological Alkylating Agents", Butterworth, London-Washington, D.C., 1962.
855. A.Chiriac, R.Vilceanu, Z.Simon și Veronica Chiriac, Preprint, Univ.Timișoara, Ser.Chim., nr.14 (1976).

856. V.A.Chernov, S.M.Volodarskaya și A.I.Gavrilova, Farmacol. i Toksikol., 28, 70 (1965).
857. M.P.Sykes, Cancer, 6, 142 (1953).
858. T.J.Bardos, Nature, 183, 399 (1965).
859. L.F.Larionov, "Khimiotherapia zlokachestvenych opukholej", Gos.Izd. Med.Literat., Moskva, 1962.
860. G.I.Kulik și I.M.Loseva, Farmacol. i Toksikol.S., p.109 (1964).
861. A.A.Kropacheva, N.V.Sazonov și A.V.Parshina, "Khim. i Primenenie fosfororganicheskikh Soedinenii", Akad.Nauk S.S.S.R. Kazansk.Filial, Trudy 2-oi konf. p.366 1962.
862. H.Hoffmann, "Development and application of pesticidal phosphoric acid derivatives", material nepublicat comunicat lui R.Vilceanu.
863. A.J.J.Ooms, "On the possibility to delimitate nerve gases within the field of organophosphorus compounds", in "Possible techniques for inspection of production of organophosphorus compounds", SIPRI Symposium Report, Stockholm, 1971
864. R.Vilceanu, "New developments in the chemistry of organophosphorus pesticides" in "Possible technique for inspection of production of organophosphorus compounds", SIPRI Symposium Report, Stockholm, 1971.
865. G.Unterstenhöfer, Anz.Schaedlingskunde, 30, 7 (1957) in [9] p.137.
866. W.Behrenz, M.Federman și W.R.Bolle, Vet.Med.Nachr., H.4 in [9] p.137.
867. W.F.Barthel, P.F.Ciang și S.S.Hall, J.Amer.Chem.Soc., 76, 4186 (1954).
868. G.Fricke și W.Georgi, J.prakt.Chem., 20, 250 (1963).
869. U.S.A.Pat., 2 956 073 (1963).
870. R.Vilceanu și A.Chiriac, Cerere Brevet (1977)
871. W.Perkow, K.Ullerich și F.Meyer, Naturwiss., 39, 353 (1952).
872. W.Perkow, Chem.Ber., 87, 755 (1954).
873. W.F.Barthel, B.H.Alexander, P.A.Ciang și S.S.Hall, J.Amer.Chem.Soc. 77, 2424 (1955).
874. U.S.A.Pat., 2 854 943 (1958).

875. U.S.A.Pat., 2 956 073 (1960).
876. A.E.Arbutov, K.W.Nikoronow, Zhur.obschei khim., 17, 2139 (1947).
877. F.Cramer, Angew.Chem., 72, 236 (1960).
878. W.Lorenz, A.Meuglein și G.Schrader, J.Amer.Chem.Soc., 77, 2554 (1955).
879. T.W.Lichtenhalten, Chem.Rev., 61, 607 (1961).
880. N.J.Cspensen și G.Kohn, D.B.R.Pat., 1 190 246 (1965).
881. L.Street și C.Way, Belg.Pat., 585 182 (1959).
882. C.Fest și K.J.Schmidt, U.S.A.Pat., 3 102 842 (1963).
883. A.Chiriac, R.Vilceanu și Veronica Chiriac, Analele Univ. din Timișoara (seria fizică-chimie), sub tipar.
884. A.Chiriac, R.Vilceanu și Veronica Chiriac, Analele Univ.din Timișoara (seria fizică-chimie), sub tipar.
885. Y.P.Sun și E.R.Johnson, J.Agr.Food Chem., 8, 261 (1960).
886. Y.P.Sun și E.R.Johnson, J.Econ.Entomol., 53, 887 (1960).
887. Y.P.Sun, E.R.Johnson și L.F.Ward jr., J.Econ.Entomol., 60, 828 (1967).