

17
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA



**EXÁMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA**

**"SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL TOLNAFTATO
CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
LAURA ISABEL CEDILLO CAMARILLO**



MEXICO, D.F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROF. MA. ANTONIETA SAENZ PASCASIO
VOCAL: PROF. GUADALUPE MERCADO RAMIREZ
SECRETARIO: PROF. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA
1er. SUPLENTE: PROF. LINO JOEL REYES TREJO
2do. SUPLENTE: PROF. MARCO ANTONIO TAFOYA RODRIGUEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 122, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EDIFICIO E Y
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL, EDIFICIO A,
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

ASESOR:

DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA

Rafael B.

SUPERVISOR TECNICO:

M. en C. ALICIA HERNANDEZ

Alicia Hernandez

SUSTENTANTE:

LAURA ISABEL CEDILLO CAMARILLO

Laura Isabel Cedillo Camarillo

AGRADECIMIENTOS.

Al Doctor Rafael Castillo Bocanegra, por la dirección del presente trabajo, por todo su apoyo y confianza.

A la M. en C. Rosa María Gama y a la Q.F.B. Beatriz Luna Millán, por la asesoría proporcionada en la realización de las pruebas biológicas.

A la M. en C. Alicia Hernández y al M. en C. Francisco Hernández Luis por su aportación y colaboración en la realización de este trabajo.

A la Bióloga Cecilia Juárez por su colaboración y tiempo.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio 122 Cecilia, Mayra, Hugo, Sergio, Ricardo, Reme, Carlos, y todos con quienes compartí mi estancia en el laboratorio

A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Microbiología Experimental, a la maestra Lupita, a Rosalba, Carmen, Odette, Tere, Lizette, Fabiola, Tonatzin, Marco Aurelio, Valentín, y a los laboratoristas, por su ayuda y compañía.

Y a todas aquellas personas que contribuyeron a la realización del presente trabajo. . .

GRACIAS !!!

**"AQUEL QUE ES LA PALABRA
SE HIZO HOMBRE
Y VIVIO ENTRE NOSOTROS,
LLENO DE
AMOR Y
VERDAD."**

(Jn 1, 14)

DEDICATORIAS

*A ti Señor, por todo el amor que me has dado,
por ser la fuente de mi vida
y porque de ti proviene todo.*

*A ti mamá por todo tu esfuerzo, entrega y confianza
nacidos de tu amor.*

*A ti papá, por tu presencia, esfuerzo,
y apoyo.*

A toda mi familia que siempre me ha acompañado.

*A todos mis profesores, que con sus enseñanzas
contribuyeron en cada paso que he dado.*

*A todos mis amigos, que han dejado una huella
en mi persona y sobre todo en mi corazón.*

*A ti, que compartes mis sueños, mis alegrías
y tristezas con todo amor.*

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	4
II. ANTECEDENTES	5
III. PARTE EXPERIMENTAL	20
A. DISEÑO EXPERIMENTAL	20
1. SÍNTESIS ORGÁNICA	20
2. PRUEBAS BIOLÓGICAS	25
B. METODOLOGÍA	28
1. SÍNTESIS ORGÁNICA	26
1.1. SÍNTESIS DE N-METIL-M-TOLUIDINA	26
a) Formilación	26
b) Metilación	26
c) Hidrólisis	27
1.2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL TOLNAFTATO	28
1.2.1. Síntesis de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo	28
a) Preparación de 3,4-Diclorofenolato de sodio	28
b) Preparación de Clorotionoformiato de 3,4-diclorofenilo	28

c) Condensación con N-Metil-m-toluidina	29
1.2.2. Síntesis de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo	29
a) Preparación de 2,3-Diclorofenolato de sodio	29
b) Preparación de Clorotionoformiato de 2,3-diclorofenilo	30
c) Condensación con N-Metil-m-toluidina	30
1.2.3. Síntesis de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo	31
a) Preparación de 2,6-Diclorofenolato de sodio	31
b) Preparación de Clorotionoformiato de 2,6-diclorofenilo	31
c) Condensación con N-Metil-m-toluidina	32
2. PRUEBAS BIOLÓGICAS	33
2.1. Operaciones preliminares a la realización de las pruebas biológicas	33
a) Microorganismos prueba y medio de cultivo	33
b) Caracterización de los microorganismos prueba	33
2.2. Determinación de la actividad antifúngica	34
a) Preparación de los discos de papel filtro	34
b) Activación de los microorganismos prueba	34
c) Preparación del inóculo	35
d) Preparación de las placas de agar	35
e) Ensayo	36

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
A) RESULTADOS	37
1. SINTESIS ORGANICA	37
1. 1. N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo	37
1.2. N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo	37
1.3. N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo	38
2. PRUEBAS BIOLÓGICAS	41
B) DISCUSIÓN	46
V. CONCLUSIONES	48
VI. BIBLIOGRAFÍA	58

INDICE DE CUADROS

	Página
CUADRO 1. Nombre común y científico de los diferentes tipos de tifa	7
CUADRO 2. Frecuencia con la que se presentan algunos tipos de tifa en México	11
CUADRO 3. Concentraciones empleadas para la determinación de la actividad antifúngica	34
CUADRO 4. Rendimiento y características de los compuestos sintetizados	41
CUADRO 5. Diámetro de halo de inhibición del desarrollo de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> por análogos del tolnaftato	42
CUADRO 6. Diámetro promedio de halo de inhibición del desarrollo de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	43
CUADRO 7. Diámetro de halo de inhibición del desarrollo de <i>Trichophyton rubrum</i> por análogos del tolnaftato	44
CUADRO 8. Diámetro promedio de halo de inhibición en centímetros, del desarrollo de <i>Trichophyton rubrum</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS

	Página
Figura 1. Estructura química del tolnaftato	13
Figura 2. Estructura química de tolindato y tolciclato	17
Figura 3. Grupo tiocarbamato	18
Figura 4. Grupo 2-Naftilo con posibilidad de modificaciones estructurales	18
Figura 5. Estructura química de los compuestos análogos al tolnaftato	21
Esquema No. 1 Síntesis del tolnaftato a partir de Clorotioformiato de 2-naftilo	19
Esquema No. 2 Síntesis del tolnaftato a partir de Cloruro de N-metil-N-(m-tolil) tiocarbamato	19
Esquema No.3 Síntesis de análogos del tolnaftato	22
Esquema No. 4 Síntesis de N-Metil-m-toluidina	23

INDICE DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1. Espectro de infrarrojo de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo	49
Espectro 2. Espectro de infrarrojo de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo	50
Espectro 3. Espectro de infrarrojo de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo	51
Espectro 4. Espectro de RMN de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo	52
Espectro 5. Espectro de RMN de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo	53
Espectro 6. Espectro de RMN de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo	54
Espectro 7. Espectro de masas de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo	55
Espectro 8. Espectro de masas de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo	56
Espectro 9. Espectro de masas de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo	57

I. INTRODUCCIÓN

1. PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN

Durante mucho tiempo las infecciones producidas por hongos en el ser humano, animales y plantas, han sido objeto de estudio debido al gran daño que representan. Para ello se han estudiado las características propias de las enfermedades y los medios para combatirlas, lo cual ha llevado al descubrimiento de un gran número de fármacos que permiten el tratamiento de estos padecimientos; desde yodo, compuestos de mercurio y cobre, azufre, ácidos orgánicos e inorgánicos, colorantes, hasta compuestos sintéticos como tolnaftato, clotrimazol y ketoconazol. Sin embargo, por las características propias de los microorganismos, estos padecimientos son difíciles de tratar y erradicar.

En nuestro país las infecciones provocadas por hongos parásitos de la queratina, conocidas como tiñas, se encuentran dentro de las diez infecciones de la piel (producidas por hongos) más frecuentes.

De todo lo anterior surgió el interés por el estudio de compuestos que tengan la posibilidad de combatir infecciones de este tipo.

En el presente escrito, se hace una descripción del trabajo realizado, en el cual se ha retomado el estudio de la estructura de compuestos análogos al tolnaftato (antimicótico empleado en el tratamiento tópico de algunos tipos de tiña) y la relación con su actividad biológica.

El interés principal es la investigación de compuestos, los cuales conserven una parte de la estructura química del tolnaftato y presenten alguna modificación estructural, pero que tengan potencial actividad antifúngica.

De manera general el trabajo que se realizó estuvo constituido por dos partes; la primera integrada por la síntesis de los compuestos propuestos en nuestros objetivos y la segunda constituida por las pruebas biológicas realizadas para evaluar la actividad antifúngica de los compuestos sintetizados.

Para abordar el tema, se plantean primeramente los objetivos y la hipótesis de trabajo; a continuación se presenta información general para proporcionar un panorama de la situación de las infecciones micóticas en nuestro país, así como del papel que el tolnaftato juega en el tratamiento de las mismas, posteriormente se presentan el diseño experimental y la metodología, mediante los cuales se alcanzaron los objetivos planteados. Finalmente se presentan los resultados obtenidos, la discusión y conclusiones a las que éstos condujeron.

2. OBJETIVOS

- Llevar a cabo síntesis de tres análogos del tolnaftato con actividad antifúngica potencial, cuya estructura química ha sido diseñada tomando como estructura base la del tolnaftato y sustituyendo el anillo 2-naftol por grupos aromáticos diclorados. Los nombres de éstos compuestos son N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo, N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo y N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6- diclorofenilo.
- Sintetizar N-Metil-m-toluidina, materia prima necesaria para la obtención de los compuestos propuestos.
- Llevar a cabo la purificación y caracterización de los compuestos análogos del tolnaftato, esto último mediante espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear, y espectrometría de masas.
- Realizar las pruebas biológicas con los compuestos análogos del tolnaftato, las cuales permitan evaluar la actividad antifúngica de los mismos, teniendo como referencia la actividad antifúngica del tolnaftato.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se obtendrán los compuestos N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo, N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4 diclorofenilo y N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6 diclorofenilo, siguiendo la ruta sintética propuesta, que consiste en partir del fenolato diclorosustituido y hacerlo reaccionar con tiofosgeno, formando un intermediario clorotionoformiato de diclorofenilo, que finalmente se condensará con N-Metil-m-toluidina en medio básico.

Si la posición de los sustituyentes en el anillo aromático es determinante para la presencia de actividad antifúngica, entonces al realizar las pruebas biológicas, el compuesto de mayor actividad será N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4-iclorofenilo, seguido por N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3- diclorofenilo y finalmente N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo; ésto debido a la analogía de la posición de los átomos de cloro en el anillo aromático de los compuestos planteados, en relación con el grupo 2-naftilo del tolnaftato.

II. ANTECEDENTES

Entre la población de nuestro país existen padecimientos de la piel que son muy frecuentes, y su tratamiento es especial debido a las características propias de los microorganismos que causan estas enfermedades, conocidas comúnmente como tiñas.

Las enfermedades a las que nos referimos son causadas por hongos, los cuales son organismos eucariotes, cuyas células están constituidas por organelos, tales como mitocondrias y sistema endomembranoso (retículo endoplásmico y aparato de Golgi), su membrana celular contiene una gran cantidad de esteroides, en tanto que su pared celular está compuesta por quitina (N-acetil glucosamina), celulosa, glucanas y mananas; carecen de cloroplastos por lo cual no pueden realizar actividad fotosintética alguna; por lo tanto para poder obtener sus nutrientes llevan a cabo la absorción de sustancias orgánicas simples o elaboradas, esto lo pueden realizar mediante dos formas:

- 1) A partir de materia orgánica en estado de descomposición.
- 2) A partir de materia orgánica proveniente de seres vivos.

De acuerdo a la forma en la cual los hongos obtienen sus nutrientes, se han clasificado en saprófitos (para el primer caso) y parásitos (para el segundo); para poder realizar esto, cuentan con una gran capacidad de adaptación para

desarrollarse en diversos sustratos y en amplios rangos de temperatura y humedad; su supervivencia se ve determinada por la interacción de los factores antes mencionados, así como por el pH del medio y la flora microbiana asociada¹⁷. Es importante mencionar que existen hongos microscópicos así como macroscópicos, siendo únicamente los primeros de interés en el presente trabajo.

De manera particular los hongos microscópicos que obtienen sus nutrientes a partir de materia orgánica viva son de gran importancia en el área de la salud, debido a que son capaces de infectar a diversos seres vivos (plantas, animales y al hombre) causándoles una gran variedad de enfermedades llamadas micosis, las cuales son difíciles de curar de manera definitiva; en el caso del hombre el tratamiento contra las infecciones producidas por estos microorganismos es un poco largo y además con la posibilidad de que la infección vuelva a presentarse debido a una gran dificultad para romper la relación parásito-hospedero, como resultado de la gran capacidad de adaptación de estos microorganismos.

En general las micosis se dividen en tres grupos:

- a) Micosis sistémicas: se trata de infecciones profundas las cuales pueden llegar a afectar diversas partes del cuerpo, desde músculos, huesos, hasta el cerebro y los pulmones.
- b) Micosis subcutáneas: este tipo de infecciones daña las estructuras internas de la piel.

c) Micosis superficiales: con este término se denominan todas aquellas infecciones que dañan la piel y sus anexos(pelo y uñas).

Un tipo particular de micosis son aquellas llamadas oportunista, las cuales son producidas por hongos, que en condiciones normales no causan enfermedades al hombre ni a los animales, pero que bajo condiciones específicas son capaces de generar infecciones.

Dentro de las micosis superficiales, se encuentran diferentes tipos de tiña, que de manera estricta se denominan dermatofitosis, ya que son producidas por hongos que integran el grupo de los dermatofitos, los cuales tienen afinidad por desarrollarse sobre la queratina y producen enzimas que les permiten metabolizarla (parásitos de la queratina). Los géneros que integran este grupo son: *Microsporum*, *Trichopyton* , y *Epidemophyton*.

Las tiñas reciben un nombre específico dependiendo de la región anatómica del cuerpo en la cual se encuentre la infección, dichos nombres se presentan en el cuadro 1.

CUADRO 1. Nombre común y científico de los diferentes tipos de tiña

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO
Tiña de los pies	Tinea pedis
Tiña de la ingle	Tinea cruris
Tiña del cuerpo	Tinea corporis
Tiña de las manos	Tinea manuum
Tiña de la cabeza	Tinea capitis
Tiña de las uñas	Tinea unguinum

Cabe mencionar que pueden presentarse casos de dermatofitosis profundas, en los cuales extraordinariamente el hongo ha invadido tejidos profundos.

Las formas en la cual estos hongos llegan al hombre, son diversas; a través del contacto con personas o animales, los cuales han sido infectados con anterioridad, o bien por la presencia de esporas en el medio ambiente ya que con el solo contacto de la piel con éstas, se puede generar la infección ².

A partir de los diferentes tipos de hábitats de los dermatofitos, éstos se han clasificado en 3 tipos:

- 1) Geofílicos.- Aquellos que regularmente viven en la tierra y raramente atacan a los animales y al hombre.
- 2) Zoofílicos.- Dermatofitos que de manera regular atacan a los animales y por contacto de éstos con el hombre pueden infectarlo.
- 3) Antropofílicos.- Regularmente atacan al hombre y pocas veces a los animales, comprende tres subgrupos:
 - A) Cosmopolitas que se encuentran distribuidos en casi todo el mundo.
 - B) De distribución regional o restringida
 - C) Estrictos, que se encuentran escasamente distribuidos.

Sin embargo existen algunos cambios de distribución debido a fenómenos de migración, cambios en la ecología, así como en los hábitos de higiene.

Diferentes géneros de dermatofitos han sido encontrados en una diversidad de lugares, suelos, animales y en el hombre, aun en piel sana, lo cual tiene implicaciones epidemiológicas, ya que no sólo las lesiones activas de tiña son foco de infección sino también el hombre sano. Al respecto en un estudio que se realizó en la Ciudad de México, en el año de 1984, el dermatofito aislado con más frecuencia a partir de suelo fue *Trichophyton mentagrophytes* en 14 casos de un total de 29 (un 48.3 % de muestras tomadas a partir de suelos sobre los que las personas suelen caminar descalzas, como son zapaterías, balnearios, recámaras alfombradas y probadores de ropa); en los animales (gatos y perros) se encontró únicamente *Mycrosporum canis* en zonas urbanas y *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* y *M. persicolor* en zonas rurales; también se demostró que la falta de hábito de higiene favorece la presencia de estos microorganismos, pues se encontró con mayor frecuencia la presencia de dermatofitos en piel sucia que en limpia, los cuales pueden causar desde lesiones leves, hasta severas y crónicas¹⁷.

En cuanto a los factores que predisponen a la presencia de este tipo de micosis se encuentran:

- **Sexo y edad.** Las dermatofitosis se pueden encontrar en todas las edades y sexos, sin embargo, algunos tipos específicos de tiña pueden ser más frecuentes en ciertas edades, por ejemplo la tiña de la cabeza es más frecuente en los niños, y la tiña de los pies (conocida comúnmente como pie de atleta) se presenta con mayor frecuencia en las personas adultas.
- **Ocupación.** Ciertas actividades favorecen un tipo específico de tiña, por ejemplo la tiña de la ingle es más frecuente en personas que permanecen mucho tiempo sentadas como los choferes, en cambio aquellas personas que presentan continuamente húmedos los pies, como son nadadores y deportistas, padecen con más frecuencia tiña de los pies.
- **Factores predisponentes** tales como cierta susceptibilidad genética e inmunológica pueden presentarse en algunos casos, así como padecimientos crónicos.

Son sobre todo la humedad y los malos hábitos de higiene los factores que favorecen la presencia de dermatofitos en la piel. En nuestro país los tres géneros de dermatofitos son causantes de dermatofitosis.

Es muy importante poner atención a este tipo de enfermedades, ya que se encuentran dentro de las diez infecciones superficiales (micosis) más frecuentes en nuestro país y en áreas tropicales pueden estar dentro de los tres primeros lugares constituyendo un importante foco de diseminación ³.

De acuerdo con datos recabados en el año de 1991³ en nuestro país, la tiña más frecuente es la de los pies, seguida por la tiña de las uñas. Esta información se presenta en el cuadro 2.

CUADRO 2. Frecuencia con la que se presentan algunos tipos de tiña en México

NOMBRE DE LA TIÑA	FRECUENCIA (%)
Tiña de la cabeza	2.6
Tiña del cuerpo	16.4
Tiña de los pies	51.3
Tiña de la ingle	6.4
Tiña de las uñas	23.1

En un estudio realizado en el periodo de 1986 a 1992 en la ciudad de México ¹⁸, se observó la disminución de la tiña del cuerpo y el aumento de la tiña de las uñas a lo largo de ese periodo; las tiñas más frecuentes resultaron ser la tiña de los pies (25.6 %) y la tiña de las uñas (60 %), siendo los agentes etiológicos más frecuentes *T. rubrum* (80.8 %) y *T. mentagrophytes* (9.0 %).

Para el tratamiento de estas enfermedades se emplean antifúngicos, que son fármacos los cuales combaten a los hongos; éstos pueden ser fungistáticos o fungicidas; los primeros combaten a los hongos inhibiendo su desarrollo pero no causan su muerte; en tanto que los segundos, si causan la muerte de las células fúngicas. Los antifúngicos tienen un amplio campo de aplicación tanto en medicina humana como veterinaria, se emplean también en el tratamiento de plantas, semillas y suelos para proteger a los cultivos de enfermedades causadas por hongos.

El tratamiento de estos padecimientos en el hombre se realiza mediante dos tipos de terapias: sistémica y tópica. La primera se emplea en casos en los cuales las micosis se convierten en profundas, en tanto que la segunda se utiliza en caso de micosis superficiales.

Dentro de los fungistáticos que se emplean en el tratamiento de las micosis superficiales, se encuentra el tolnaftato, primer compuesto fungicida sintetizado en 1960 ³ (Figura 1), el cual es actualmente un antifúngico tópico útil ^{1,10}. In vitro el tolnaftato actúa como fungistático o fungicida para diversas especies de hongos de los géneros *Microsporum*, *Trichopyton*, y *Epidemophyton* ^{5a,5b}. Contra *T. mentagrophytes* actúa como fungistático a una concentración de 0.008 mg/ml y como fungicida a una concentración de 0.08 mg/ml, empleando el método turbidimétrico ^{5k}.

Respecto al mecanismo de acción del tolnaftato, éste no se conoce con certeza, sin embargo algunos consideran que es muy probable que interaccione con los grupos tiol de algunas enzimas del hongo inhibiendo así su metabolismo¹³; también es posible que al penetrar dentro de las esporas del hongo, este tipo de compuestos sufra una desesterificación dando lugar a un ácido el cual lleve a la formación posterior de una amina responsable de la toxicidad^{5a}.

De cualquiera de las dos formas, el grupo tiocarbamato del tolnaftato juega un papel muy importante en la actividad antifúngica de esta molécula.

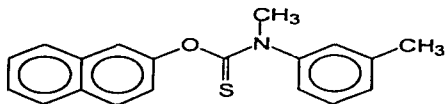


Figura 1. Estructura química del Tolnaftato

El tolnaftato se emplea en el tratamiento de tiña de los pies, en el cual el porcentaje de curación es del 80 %, tiña de la ingle, tiña del cuerpo y tiña de las manos; en algunos otros casos como tiña de la cabeza y tiña de las uñas es efectivo sólo cuando la infección es estrictamente superficial.

El tolnaftato se puede administrar conjuntamente con agentes antifúngicos sistémicos como griseofulvina, para el tratamiento de infecciones profundas y con agentes queratolíticos, en el tratamiento de lesiones en la palma de la mano o en la planta del pie y callos ¹. Cuando se trata de infecciones producidas simultáneamente por bacterias o protozoarios se recurre a una terapia suplementaria.

Las formas farmacéuticas en las que se encuentra disponible el tolnaftato para su uso son en crema, solución o polvo al 1%. El régimen de administración consiste en dos administraciones diarias sobre el área infectada previamente lavada y seca, el prurito suele aliviarse dentro del periodo de 24-72 horas después de su administración; el tiempo que debe durar el tratamiento es de 2 a 3 semanas, alargándose de 4 a 6 semanas en casos de engrosamiento de la piel; para evitar casos de recurrencia debe de continuarse con la administración durante dos semanas después de la desaparición de los síntomas ⁶.

El tolnaftato tiene un bajo grado de toxicidad así como bajo grado sensibilizante ⁵, si se presentan casos, en su mayoría se deben a algún componente de la formulación; en los casos en los cuales se aplica sobre piel escoriada puede presentarse una ligera irritación local ¹.

Cabe mencionar que para el tratamiento de estos padecimientos se emplean otros fármacos tales como la griseofulvina, imidazoles (como el ketoconazol) y triazoles (como el itraconazol y fluconazol) en la terapia sistémica.

y carbanilatos (como el tolciclato) e imidazoles (como el miconazol, clotrimazol) en terapia tópica ³.

El tolnaftato (I) es el éster O-2-naftalenil del ácido metil(3-metilfenil) carbamotióico, éster O-2-naftil del ácido m,N-dimetiltiocarbamílico, ó N-metil-N-(3-tolil)tiocarbamato de 2-naftilo, cuyo nombre empleado en el presente trabajo es N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2-naftilo. Es un compuesto cuyos cristales son blancos con p.f. 110.5-111.5 °C; insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y metanol, en cloroformo es soluble en una proporción de 1:1.5 ¹⁹.

El tolnaftato fue sintetizado por primera vez por los investigadores japoneses Yokinobu Miyazaki, Koichi Hashimoto y Teruhisa Noguchi y patentado en 1963 por Japan Soda Co. Fue el primer compuesto fungicida en lugar de fungistático eficaz en el tratamiento por vía tópica.

En dicha patente ²⁰ son descritos dos procedimientos que emplean derivados del tiosfogeno para la síntesis del tolnaftato. En el primero (Esquema No. 1) el clorotioformiato de 2-naftilo (II) se hace reaccionar en caliente con N-Metil-m-toluidina (IIIb) en acetona con bicarbonato de sodio; después de llevar a reflujo durante 30 minutos, la mezcla fría se trata con agua dando un rendimiento del 90 %.

El segundo procedimiento consiste en hacer reaccionar el cloruro de N-metil-N-(m-tolil)tiocarbamato (IV) con 2-Naftol en las mismas condiciones que el anterior (Esquema No. 2).

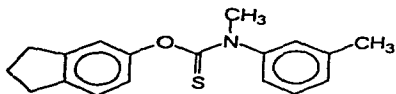
Uno de los compuestos que precedieron al descubrimiento del tolnaftato, fue el tolindato, el cual también presentó actividad antifúngica, éste se convirtió en base para el diseño de otras moléculas de las cuales surgió el tolnaftato¹⁵. Lo importante de este hecho es que el tolnaftato tiene una estructura química, en la cual se conserva gran parte de la estructura del tolindato con la diferencia en la sustitución de un anillo naftalénico por un anillo indanilo.

Otro fármaco empleado actualmente en el tratamiento de las tiñas es el tolciolato (Figura 2), cuya diferencia con la estructura del tolindato, consiste en la presencia de un biciclo en el anillo indanilo.

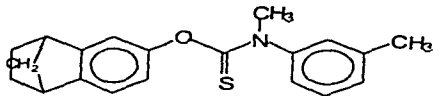
Esto confirma que la presencia de sustituyentes voluminosos sobre las posiciones 3 y 4 (correspondientes al anillo aromático), es importante para que se presente la actividad biológica. Lo anterior llevó a suponer que el grupo farmacofórico necesario para la actividad biológica radica en el grupo tiocarbamato (Figura 3); este hecho permite el diseño de moléculas que conserven el grupo farmacofórico con la posibilidad de realizar modificaciones en el grupo 2-naftilo (Figura 4).

En base a toda la información reunida, surgió el interés de estudiar compuestos diseñados tomando como base la estructura química del tolnaftato, los cuales presenten alguna modificación estructural que les permita conservar la actividad biológica; lo que conduzca a encontrar compuestos que mejoren la actividad de los fármacos empleados actualmente para el tratamiento de la tiña,

conociendo mejor la relación estructura química-actividad biológica de la molécula.



Tolindato



Tolciclato

Figura 2. Estructura química de Tolindato y Tolciclato

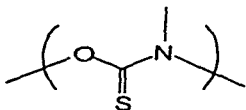
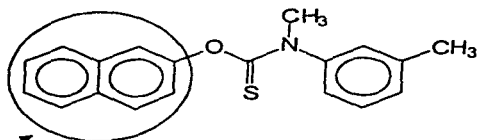
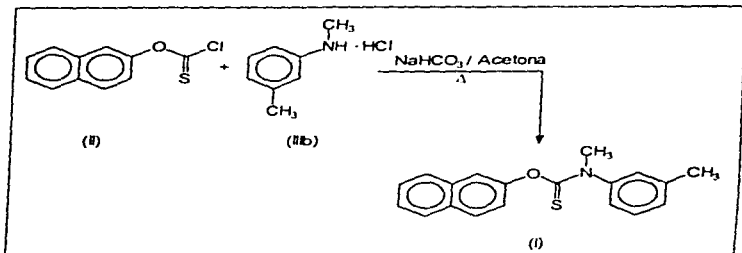


Figura 3. Grupo tiocarbamato

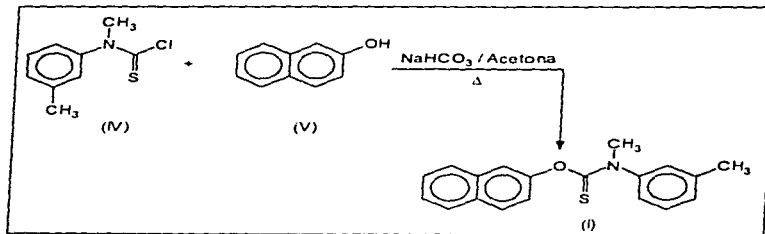


Sustituyente 2-naftilo

Figura 4. Grupo 2-Naftilo con posibilidad de modificaciones estructurales



Esquema No. 1 Síntesis de tolnaftato a partir de clorotioformiato de 2-naftilo



Esquema No. 2 Síntesis de tolnaftato a partir de cloruro de N-metil-N-(m-tolil) tiocarbamato

III. PARTE EXPERIMENTAL

A. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. SÍNTESIS ORGÁNICA

En el presente trabajo la modificación estructural consistió en la sustitución de los átomos de carbono 5, 6, 7 y 8 del grupo 2-naftilo, por dos átomos de cloro, los cuales al ser voluminosos se espera que contribuyan a que el grupo diclorofenilo presente un efecto estérico semejante al grupo 2-naftilo; lo anterior permite usar el término de isómeros.

Son tres los compuestos que se plantearon sintetizar, de los cuales es posible predecir cierto grado de actividad comparativa entre ellos, de acuerdo con la posición que los átomos de cloro tienen en la estructura de cada uno ellos (Figura 5).

El compuesto, cuyo nombre es N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4 diclorofenilo (VIIb), al presentar los átomos de cloro sustituidos sobre los átomos de carbono que eran puente en el grupo 2-naftilo, tienen la probabilidad de presentar la mayor actividad biológica de los tres compuestos sintetizados.

En el compuesto, N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo (VIb), también encontramos los átomos de cloro en posiciones vecinas, sin embargo se encuentran una posición más cerca del grupo tiocarbamato, y si consideramos este grupo como el responsable de la actividad biológica, la cercanía de los

átomos de cloro podría dificultar por factores estéricos, el acceso a este grupo funcional para que se presente la actividad biológica, de lo cual podemos pensar que presentaría una menor actividad biológica en comparación al primer compuesto.

En el caso del compuesto N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo (VIIIb), los átomos de cloro no se encuentran en posiciones vecinas de forma tal que no tienen la posibilidad de asemejar el volumen y acomodo en el espacio del sustituyente 2-naftilo en la molécula del tolnaftato, lo cual hace suponer que no presente actividad antifúngica o bien que ésta sea mínima. De ser cierto lo anterior, los compuestos sintetizados no sólo serían isómeros, sino también bioisómeros.

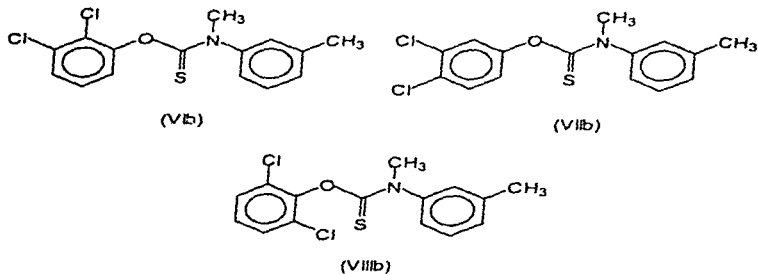
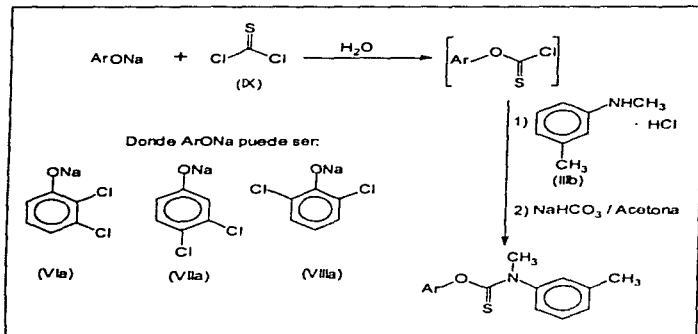


Figura 5. Estructura química de los compuestos análogos del tolnaftato

La síntesis de compuestos planteados, se basó en la patente para la síntesis del toinaftato y en un estudio realizado con anterioridad para la síntesis de este tipo de compuestos ¹⁰.

La ruta sintética se describe en el esquema No. 3.

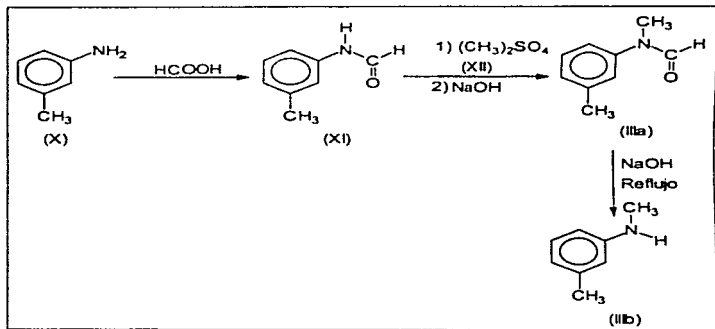


Esquema No. 3 Síntesis de análogos del toinaftato

Primeramente se forma el fenolato sódico correspondiente para cada compuesto y se hace reaccionar con tiofosgeno (IX) para dar un intermediario inestable y tóxico, el clorotioformiato, el cual, sin ser aislado, en una posterior

reacción, se condensa con N-Metil-m-toluidina (IIlb) para dar finalmente los análogos del tolnaftato planteados.

Para la síntesis de los compuestos planteados se requirió de la preparación de una materia prima mencionada inicialmente, ésta es N-Metil-m-toluidina (IIlb), cuya síntesis se resumen en el esquema No. 4.



Esquema No. 4. Síntesis de N-Metil-m-toluidina

La anterior reacción consiste en tres pasos; primero la formilación, en la cual se protege el grupo amino, con el fin de que no se presente una dimetilación

del átomo de nitrógeno; una vez obtenida la amida, se lleva a cabo la reacción de metilación y finalmente la hidrólisis para eliminar el grupo formilo.

2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

La actividad antifúngica de los compuestos sintetizados se determinó mediante el método de difusión en placa, empleando discos de papel filtro como reservorio de los compuestos en estudio.

Para realizar el estudio se utilizaron cepas (proporcionadas por el ceparo de la Facultad de Química) de los hongos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* y los compuestos probados fueron N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3 diclorofenilo, N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4 diclorofenilo y N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6 diclorofenilo y tolnaftato como referencia; simultáneamente se evaluó la influencia del disolvente empleado, en el desarrollo de los microorganismos. Para cada prueba se contó con una caja de control de desarrollo y una de control de esterilidad.

Las concentraciones probadas para cada compuesto fueron 100, 50, 10 y 1 mcg/ml, cada una por triplicado, los resultados obtenidos correspondieron a diámetro del halo de inhibición en centímetros, de los tres resultados obtenidos se obtuvo el promedio, los cuales fueron comparados con los resultados del tolnaftato.

B. METODOLOGÍA

1. SÍNTESIS ORGÁNICA

1.1. Síntesis de N-Metil-m-toluidina

a) Formilación

Este primer paso se realizó colocando 20.0 g (0.1866 mol, 21.6 ml) de m-Toluidina (X) en un matraz de 250 ml adaptado con termómetro y embudo de adición, a continuación se adicionaron gota a gota y bajo agitación constante 10 ml (0.1912 mol, 1.02 eq.) de ácido fórmico. Una vez terminada la adición se procedió a calentar la mezcla de reacción en baño de aceite y se llevó a reflujo durante 3 hrs después de las cuales se adicionó un exceso de ácido fórmico (3 ml, 0.0573 mol, 0.31 eq.) y se continuó el calentamiento durante 1 hr más para completar la reacción. A continuación se procedió a destilar el exceso de ácido fórmico.

b) Metilación

En el mismo matraz que contenía la anterior mezcla de reacción se continuó con la metilación, para lo cual previamente se neutralizó con una solución de hidróxido de sodio al 10 %; a continuación se adicionaron 50 ml (0.5284 mol, 66.65 g, 2.83 eq.) de sulfato de dimetilo (XII) y cuidando que la mezcla se mantuviera a una temperatura de 30-35 °C en baño de agua y con agitación constante, se goteó una solución de hidróxido de sodio, preparada con 21.14 g de NaOH (0.5285 mol, 2.83 eq.) y 45 ml de agua.

Terminada la adición, la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 25 minutos, después de los cuales se separaron las dos fases que formaban la mezcla. La fase orgánica fue sometida posteriormente a una reacción de hidrólisis.

c) Hidrólisis

En un matraz de 250 ml adaptado con termómetro y embudo de adición, se colocó la fase orgánica del paso anterior y con agitación constante, manteniendo el sistema en baño de agua, se adicionó gota a gota, una solución de hidróxido de sodio preparada con 24 g (0.6 mol, 3.22 eq.) de NaOH disueltos en 16 ml de agua; terminada la adición se procedió a calentar en un rango de temperatura de 50-55 °C durante 30 minutos y posteriormente a reflujo durante 2 hrs con pequeñas adiciones de etanol como cosolvente. La mezcla de reacción final se dejó enfriar y se procedió a separar las dos fases formadas, la fase acuosa se extrajo con 50 ml de acetato de etilo; los extractos y la fase orgánica se reunieron, se lavaron con agua y se secaron con sulfato de magnesio anhidro.

Cada una de las reacciones fueron monitoreadas mediante ccf, empleando como sistema de elución una mezcla de disolventes constituida por hexano, cloroformo y acetato de etilo en proporción 50:35:15.

Finalmente el aislamiento del compuesto obtenido se llevó a cabo mediante destilación a presión reducida a 8 mm Hg, en un intervalo de temperatura de 90-

95 °C, para lo cual primero se destiló el acetato de etilo a presión atmosférica. El rendimiento de esta reacción fue de 61.0 %.

1.2. Síntesis de análogos del tolnaftato

1.2.1. Síntesis de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo (VIIb)

a) Preparación de 3,4-Diclorofenolato de sodio (VIIa)

Se preparó la solución del fenolato disolviendo 3 g (0.0184 mol, 1 eq) de 3,4-Diclorofenol en una solución de 0.74 g (0.0185 mol, 1 eq) de hidróxido de sodio disuelto previamente en 10 ml de agua.

b) Preparación de Clorotioformiato de 3,4-Diclorofenilo

En un matraz de 250 ml de 3 bocas adaptado con termómetro y embudo de adición se colocaron 1.4 ml (0.9284 g, 0.0184 mol, 1 eq) de tiosfogeno y 2 ml de agua helada, el sistema se colocó en baño de hielo; una vez que el sistema alcanzó una temperatura entre 0-10 °C se le adicionó, gota a gota, la solución de 3,4-Diclorofenolato de sodio con agitación constante; a lo largo de la adición se mantuvo la temperatura en el intervalo señalado. Una vez que se terminó la adición se retiró el baño de hielo y se mantuvo la agitación durante 30 minutos; a continuación se separaron las fases formadas, la fase acuosa se extrajo con 3 porciones de 25 ml de acetato de etilo, los extractos se reunieron con la fase orgánica y se lavaron y secaron con sulfato de magnesio anhidro, para

al final destilar el exceso de disolvente; el residuo en el matraz se utilizó inmediatamente en la siguiente reacción.

c) Condensación con N-Metil-m-toluidina

El residuo obtenido en la reacción anterior se colocó en un matraz de 250 ml de 2 bocas adaptado con termómetro, y se mantuvo en baño de hielo-agua a una temperatura de 0-10 °C, se adicionaron 2.9 g (0.0184 mol, 1 eq) de clorhidrato de N-metil-m-toluidina (IIIb) disueltos en 10 ml de acetona y 1.6 g (0.0190 mol, 1 eq) de bicarbonato de sodio. Terminada la adición se inició el calentamiento a reflujo durante 1 hora.

Al finalizar el reflujo, la mezcla de reacción se vertió en baño de agua-hielo, el sólido obtenido se purificó tratándolo con carbón activado en etanol caliente y se recristalizó en el mismo disolvente.

1.2.2. Síntesis de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo (VIb)

a) Preparación de 2,3-Diclorofenolato de sodio (VIa)

Se preparó una solución con 1.23 g (0.0307 mol, 1 eq) de hidróxido de sodio disueltos en 20 ml de agua, en esta solución se disolvieron 5 g (0.0306 mol, 1 eq) de 2,3-Diclorofenol.

b) Preparación de Clorotionoformiato de 2,3-Diclorofenilo

En un matraz de 250 ml adaptado con termómetro y embudo de adición, se colocaron 2.4 ml (0.0315 mol, 1.02 eq) de tiosfgeno y 5 ml de agua helada; el sistema se colocó en baño de hielo, una vez que se alcanzó una temperatura de 5 °C se adicionó, gota a gota, la solución del fenolato, bajo agitación constante y manteniendo la temperatura en un rango de 0 - 10 °C. Una vez que terminó la adición se mantuvo en agitación durante 60 minutos hasta que la reacción finalizó. La mezcla de reacción se extrajo con 3 porciones de 40 ml de acetato de etilo, los extractos se reunieron y se secaron con sulfato de magnesio anhidro; a continuación se procedió a evaporar en rotavapor el disolvente, el residuo obtenido se utilizó inmediatamente en la reacción siguiente.

c) Condensación con N-Metil-m-toluidina

El residuo obtenido en la reacción anterior, se colocó en un matraz de 250 ml de dos bocas, adaptado con termómetro, el sistema se mantuvo en baño de hielo-agua y se le adicionaron 4.9 g (0.0311 mol, 1 eq) de Clorhidrato de N-metil-m-toluidina (IIIb) disueltos en 15 ml de acetona y 6.44 g de bicarbonato de sodio. Terminada la adición, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 hora con agitación constante.

Finalizada la reacción, se procedió a separar las fases, la fase acuosa se extrajo con tres porciones de 30 ml de acetato de etilo; los extractos y la fase orgánica se reunieron y secaron con sulfato de magnesio anhidro, el disolvente se

evaporó en rotavapor; el residuo se trató con carbón activado y se recristalizó en etanol.

1.2.3. Síntesis de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo (VIIIb)

a) Preparación de 2,6-Diclorofenolato de sodio (VIIIa)

La solución se preparó con 10 g (0.0613 mol) de 2,6-Diclorofenol (VIIIa) y una solución de hidróxido de sodio preparada con 2.45 g de NaOH (0.612 mol, 1 eq.) disueltos en 30 ml de agua.

b) Preparación de Clorotionoformiato de 2,6-diclorofenilo

En matraz bola de 250 ml adaptado con termómetro y embudo de adición, se colocaron 4.7 ml (0.0616 mol, 1 eq.) de tiofosgeno (IX) y 5 ml de agua, a continuación el matraz se colocó en un baño de hielo; una vez que se alcanzó una temperatura entre 0 y 10 °C, se inició la adición de la solución del fenolato, gota a gota, procurando mantener la agitación constante y la temperatura en el intervalo señalado anteriormente.

Terminada la adición se retiró el baño de hielo y se mantuvo la mezcla de reacción bajo agitación a temperatura ambiente durante 90 minutos aproximadamente, después de esto se observó en el matraz la presencia de un sólido rosado. A continuación se procedió a tratar la mezcla de reacción adicionándole acetato de etilo (80 ml aproximadamente) hasta completa disolución del sólido. Las dos fases fueron separadas, y la fase orgánica se lavó

con agua 3 veces y se secó con sulfato de sodio anhidro, una vez hecho esto, se procedió a concentrar la fase orgánica, para eliminar el disolvente. El residuo obtenido, se empleó como tal para la reacción siguiente.

c) Condensación con N-Metil-m-toluidina

El residuo de la reacción anterior se colocó en un matraz de 250 ml de dos bocas adaptado con termómetro, el sistema de reacción se colocó en baño de hielo y a una temperatura entre 5-10 °C, se le adicionó una solución preparada con 9.92 g (0.0630 mol, 1eq.) de Clorhidrato de N-metil-m-toluidina (IIIb) disueltos en 30 ml de acetona y 10.30 g (0.1226 mol, 2 eq) de bicarbonato de sodio; terminada la adición se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 90 minutos. La mezcla de reacción se vertió en agua con hielo, se observó la formación de un sólido el cual se separó por filtración al vacío y se recrystalizó en etanol.

2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

2.1. Operaciones preliminares a la realización de las pruebas biológicas

a) Microorganismos prueba y medio de cultivo

Los microorganismos de prueba empleados fueron *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*. Las cepas fueron proporcionadas por el Cepario de la Facultad de Química. Las cepas sembradas en tubos con medio de cultivo inclinado, se conservaron en refrigeración.

El medio de cultivo que se utilizó para el mantenimiento de las cepas y determinación de la actividad antifúngica de los compuestos en estudio fue Sabouraud modificado por Emmons, su preparación consistió en rehidratar agar dextrosa Sabouraud de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial y ajustar el pH del medio en un rango de 6.8 a 7.0 antes de esterilizarlo. El método de esterilización fue en autoclave a 121 °C y 15 lb/cm², durante 15 minutos.

b) Caracterización de los microorganismos prueba

La caracterización de los hongos empleados, se realizó por observación de sus características macroscópicas y microscópicas, éste último se realizó mediante tinción simple con azul de lactofenol.

2.2. Determinación de la actividad antifúngica

a) Preparación de los discos de papel filtro.

Los discos de papel filtro fueron esterilizados en autoclave. Se preparó una solución stock de cada compuestos en estudio y a partir de ésta se hicieron diluciones para obtener las concentraciones deseadas, el disolvente empleado fue una mezcla de acetona-agua en una proporción 80:20. De cada solución, se tomó una alícuota de 20 μ l con los cuales se impregnó un disco de papel filtro de 13 mm de diámetro. Los discos una vez impregnados, se dejaron secar a temperatura ambiente. La concentración de las diferentes soluciones preparadas y la concentración final en cada uno de los discos se presenta en el cuadro 3.

CUADRO 3. Concentraciones empleadas para la determinación de la actividad antifúngica

Concentración de la solución (mcg/ml)	Concentración en el disco (mcg)
100	2
50	1
10	0.2
1	0.02

b) Activación de los microorganismos prueba

A partir de la cepa conservada en refrigeración, se resembró en un tubo con medio inclinado y se incubó a 28 °C durante 7 días.

c) Preparación del inóculo

El desarrollo del tubo utilizado para activar al hongo se cosechó con 3 ml de SSI (Solución Salina Isotónica) estéril y se raspó con asa microbiológica sobre la superficie del cultivo, de esta suspensión se tomaron 0.5 ml y se colocaron en un matraz de 250 ml con 50 ml de agar Sabouraud modificado por Emmons; se procedió a agitar el matraz para dispersar la suspensión sobre la totalidad de la superficie del medio, el tiempo de incubación fue de 4 días.

Este cultivo se cosechó adicionando 30 ml de SSIT (una solución preparada con 100 ml de SSI y 0.4 ml de Tween) estéril al matraz con el desarrollo y se raspó sobre la superficie del cultivo hasta obtener una suspensión turbia y lo más homogénea posible; de la cual se tomaron 10 ml y se colocaron en un matraz Nefelométrico estéril de 250 ml, se tomó la lectura de densidad óptica en un nefelómetro y se ajustó la concentración hasta obtener una lectura de 50 UK; el diluyente empleado fue SSIT. Esta suspensión corresponde al inóculo.

d) Preparación de las placas de agar

Las placas con doble capa de agar, se prepararon colocando la capa de siembra (8 ml de medio de cultivo inoculado a 45 °C en una proporción de 0.5 ml de inóculo por cada 40 ml de medio de cultivo) sobre una capa de agar sólido preparada con 10 ml de medio sin inocular.

e) Ensayo

Una vez que el medio de las placas solidificó, se colocaron los discos de papel filtro (impregnados previamente) sobre la superficie del agar, en los cuatro cuadrantes de la superficie, en cada uno una concentración diferente. El ensayo se realizó por triplicado. Las cajas Petri se incubaron a 28 °C durante cuatro días. Después de los cuales se midió el diámetro del halo de inhibición de cada uno, los resultados se presentan en los cuadro 5 y 6 .

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A) RESULTADOS

1. SÍNTESIS ORGÁNICA

1.1. N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo (VIIb)

El compuesto se obtuvo en un rendimiento del 54.50 %. En el espectro de IR (espectro 1) se observa señal en 2926, 1462 y 1386 cm^{-1} , correspondiente a grupo metilo; señal en 3054 cm^{-1} (vibración =C-H), señales en 1588, 1490 cm^{-1} (vibración C=C de anillo aromático), varias señales de 1900 a 1700 cm^{-1} (sobretonos de aromático), correspondientes a la presencia de anillo aromático; señal en 1304 cm^{-1} (vibración C-N de tioamida) y señal en 1118 cm^{-1} (vibración C=S de tioamida), que indican la presencia del grupo tiocarbamato.

En el espectro de RMN (espectro 4) se observa: s, 2.4, 3H (metilo unido a anillo aromático); s, 3.7, 3H (N-CH₃); m, 6.8-7.5, 7H (átomos de hidrógeno unidos a anillos aromáticos).

En el espectro de masas (espectro 7) se observó el ion molecular m/z 325 y el pico base con m/z 148.

1.2. N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo (VIb)

El compuesto se obtuvo en un rendimiento del 64.99 %, en el espectro de IR (espectro 2) se observa señal en 2926, 1484 y 1386 cm^{-1} , correspondientes a

grupos metilo; señal en 3054 cm^{-1} (vibración =C-H), señales en $1588, 1490\text{ cm}^{-1}$ (vibración C=C de anillo aromático), varias señales de $1900\text{ a }1700\text{ cm}^{-1}$ (sobretonos de aromático), que indican la presencia de anillo aromático; señal en 1304 cm^{-1} (vibración C-N de tioamida) y señal en 1118 cm^{-1} (vibración C=S de tioamida), que indican la presencia del grupo tiocarbamato.

En el espectro de RMN (espectro 5) se observa: s, 2.4, 3H (metilo unido a anillo aromático); s, 3.7, 3H (metilo unido a nitrógeno); m, 6.8-7.5, 7H (átomos de hidrógeno unidos a anillos aromáticos).

En el espectro de masas (espectro 8) se observó el ion molecular m/z 325 y el pico base con m/z 148.

1.3. N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo (VIIIb)

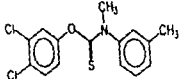
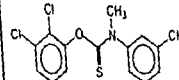
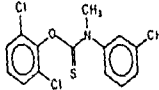
El compuesto se obtuvo en un rendimiento del 53.50 %. En el espectro de IR (espectro 3) se observa señal en $2926, 1484$ y 1386 cm^{-1} , correspondiente a grupo metilo; señal cercana a 3100 cm^{-1} (vibración =C-H), señales en $1576, 1492\text{ cm}^{-1}$ (vibración C=C de aromático), varias señales de $1928\text{ a }1736\text{ cm}^{-1}$ (sobretonos de aromático), que indican la presencia de anillo aromático; señal en 1288 cm^{-1} (vibración C-N de tioamida) y señal en 1122 cm^{-1} (vibración C=S de tioamida) las cuales indican la presencia del grupo tiocarbamato.

En el espectro de RMN (espectro 6) se observa: s, 2.3, 3H (metilo unido a anillo aromático); s, 3.7, 3H (metilo unido a nitrógeno); m, 6.8-7.3, 7H (átomos de hidrógeno unidos a anillos aromáticos).

En el espectro de masas (espectro 9) se observó el ion molecular m/z 325 y el pico base con m/z 290.

En el cuadro 4 se presentan de Rf y p.f para cada compuesto, así como el rendimiento de cada reacción.

CUADRO 4: Rendimiento y características de los compuestos sintetizados

ESTRUCTURA QUÍMICA	NOMBRE QUÍMICO	RENDIMIENTO (%)	R ^F	PUNTO DE FUSIÓN (°C)
	N-Metil-N-(m-tolil) tocobamato de 3,4-diclorofenilo	54.50	0.6724	127-128.5
	N-Metil-N-(m-tolil) tocobamato de 2,3-diclorofenilo	64.99	0.6724	127-128
	N-Metil-N-(m-tolil) tocobamato de 2,6-diclorofenilo	53.50	0.6724	133-134.5

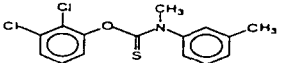
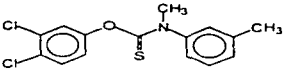
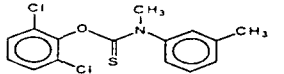
40

* Fase móvil: Hexano-Acetato de etilo (95/5)

RESULTADOS

2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

Los resultados de las pruebas se muestran en los cuadros 5 al 8. Para fines prácticos, se asignó una clave a cada uno de los compuestos probados, la cual se presenta a continuación:

NOMBRE DEL COMPUESTO	ESTRUCTURA QUÍMICA	CLAVE
N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo		2,3-DC
N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo		3,4-DC
N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo		2,6-DC

CUADRO 5. Diámetro de halo de inhibición del desarrollo de *Trichophyton mentagrophytes* por análogos del tolnaftato

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN mcg/ml			
	100	50	10	1
Tolnaftato	4.7	4.5	3.5	1.6
	4.5	4.5	3.4	1.6
	4.8	4.2	3.5	1.6
2,3-DC	3	2.7	1.8	---
	3	2.7	1.8	---
	2.7	2.6	1.6	---
3,4-DC	2.6	2.3	inhibición	---
	2.7	2.1	no	---
	2.7	2.1	cuantificable	---
2,6-DC	---	---	---	---
	---	---	---	---
	---	---	---	---
CONTROL DE DISOLVENTE	Desarrollo normal del microorganismo			
CONTROL DE CRECIMIENTO	Desarrollo normal del microorganismo			
CONTROL DE ESTERILIDAD	Ausencia de desarrollo			

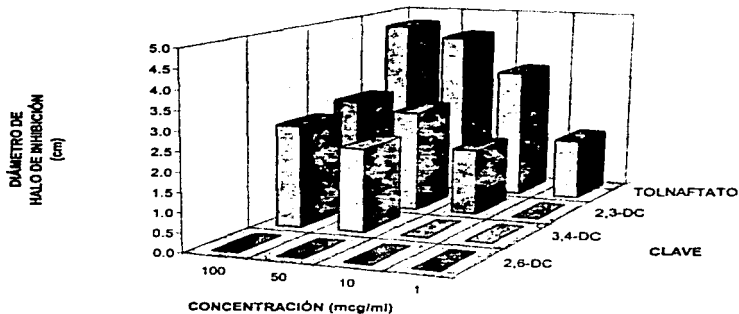
--- Ausencia de inhibición

CUADRO 6. Diámetro promedio de halo de inhibición del desarrollo de *Trichophyton mentagrophytes*

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN mcg/ml			
	100	50	10	1
TOLNAFTATO	4.7	4.4	3.5	1.6
2,3-DC	2.9	2.7	1.7	—
3,4-DC	2.7	2.2	INH.N.C.	—
2,6-DC	—	—	—	—

INH.N.C.= Inhibición no cuantificable

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ANÁLOGOS DEL TOLNAFTATO
(ENSAJO CON *Trichophyton mentagrophytes*)



Gráfica No. 1

CUADRO 7. Diámetro de halo de inhibición del desarrollo de *Trichophyton rubrum* por análogos del tolnaftato

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN mcg/ml			
	100	50	10	1
Tolnaftato	4.1	3.8	3	1.5
	4.1	3.8	3	1.4
	4.2	3.8	3	1.5
2,3-DC	2.7	2.5	1.6	—
	2.7	2.4	1.5	—
	2.7	2.4	1.6	—
3,4-DC	2.5	2.0	Inhibición no cuantificable	—
	2.5	2.0		—
	2.4	2.0		—
2,6-DC	—	—	—	—
	—	—	—	—
	—	—	—	—
CONTROL DE DISOLVENTE	Desarrollo normal del microorganismo			
CONTROL DE CRECIMIENTO	Desarrollo normal del microorganismo			
CONTROL DE ESTERILIDAD	Ausencia de desarrollo			

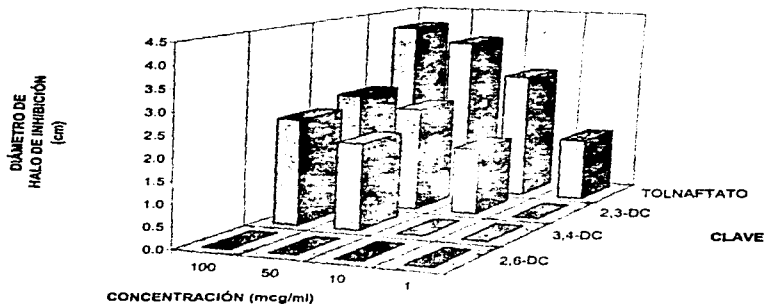
— Ausencia de inhibición

CUADRO 8. Diámetro promedio de halo de inhibición en centímetros, del desarrollo de *Trichophyton rubrum*

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN mcg/ml			
	100	50	10	1
TOLNAFTATO	4.1	3.8	3.0	1.5
2,3-DC	2.7	2.4	1.6	---
3,4-DC	2.5	2.0	INH. N. C.	---
2,6-DC	---	---	---	---

INH. N. C. = Inhibición no cuantificable

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ANÁLOGOS DEL TOLNAFTATO
(ENSAYO CON *Trichophyton rubrum*)



Gráfica No. 2

B) DISCUSIÓN

En base a los resultados de las pruebas biológicas realizadas, el compuesto más activo fue N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo (2,3-DC), seguido por N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo (3,4-DC) y finalmente N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,6-diclorofenilo (2,6-DC) el cual no presentó actividad antifúngica.

De estos resultados es posible analizar tres puntos. Primeramente se esperaba que los compuestos sintetizados tuvieran actividad antifúngica, con la posibilidad que el análogo sustituido en las posiciones 2,6 tuviera una actividad mínima o careciera de ésta; dicho planteamiento se realizó con base en el carácter voluminoso del grupo 2-naftilo de la molécula del tolnaftato, considerando el factor estérico; con los resultados obtenidos, fue posible confirmar que este factor contribuye de manera importante en la actividad biológica de la molécula y que los compuestos N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo y N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo son bioisómeros del tolnaftato.

En segundo lugar, no es el único factor de esta parte de la molécula que contribuye con la actividad biológica, pues de haber sido así la actividad de los compuestos activos hubiera sido muy semejante a la del tolnaftato, lo cual no ocurrió; la explicación ante este comportamiento es que posiblemente intervenga otro factor, además del estérico, en la actividad biológica, posiblemente el

sustituyente 2-naftilo de la molécula de tolnaftato confiere a la molécula un grado de liposolubilidad tal que le permite, penetrar a la célula del hongo.

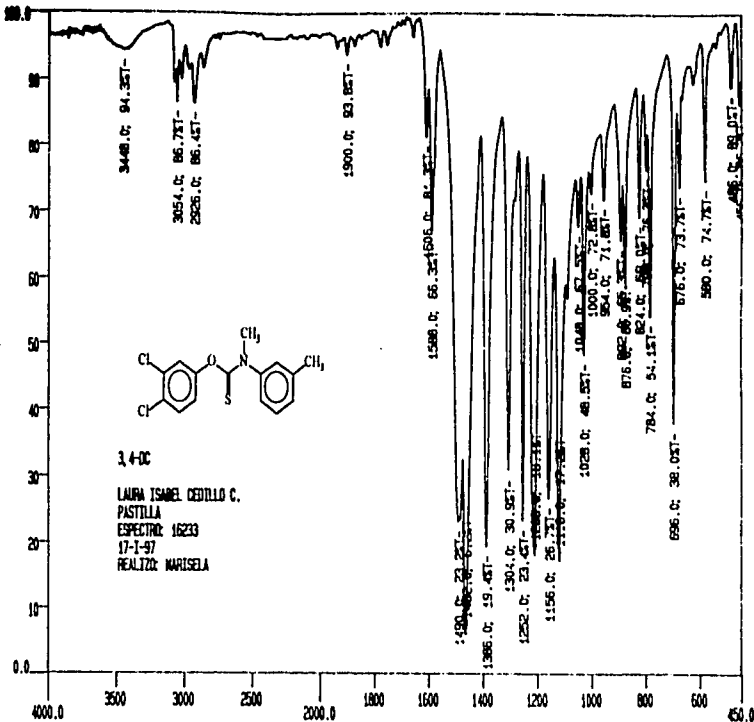
Finalmente, comparando el promedio del diámetro de inhibición debido a N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo, con el obtenido en el caso de N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo; se distingue que el primero de éstos compuestos es ligeramente más activo aunque los resultados no presentan una diferencia radical entre ellos; sin embargo a una concentración de 10 mcg/ml se distingue una diferencia evidente, la cual nos lleva a considerar a N-Metil-N-(m-tolil)tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo el análogo más activo.

Tal resultado es contrario a lo que se planteó inicialmente, pues se esperaba que el compuesto más activo fuera N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo, pero recordando que muy posiblemente sea el grupo tiocarbamato el responsable inicial de la actividad antifúngica, es factible que los átomos de cloro, dado su carácter electronegativo, modifiquen la reactividad del grupo tiocarbamato. Los átomo de cloro sustituido en las posiciones 2,3 pueden contribuir a una mayor reactividad del grupo tiocarbamato, pues se encuentran mas cercanos, ejerciendo así una mayor atracción electrónica y desprotegiendo al átomo de carbono de dicho grupo (efecto inductivo).

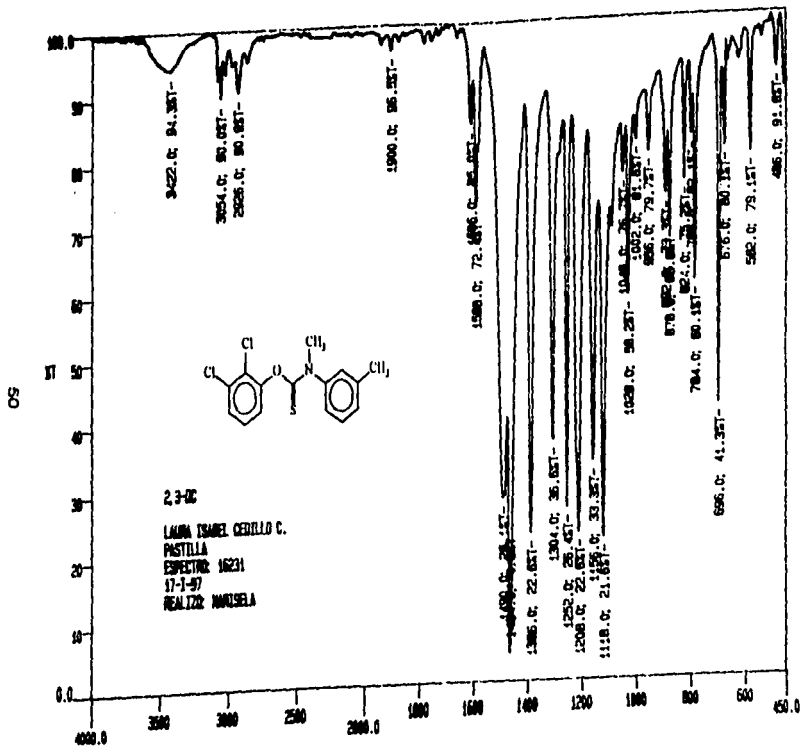
V. CONCLUSIONES

Se sintetizaron los compuesto planteados, siguiendo la ruta sintética propuesta; una vez obtenidos fueron purificados y caracterizados mediante espectroscopia de IR y RMN así como espectrometría de masas. De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas antifúngicas encontramos que los compuestos N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo y N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo son bioisómeros del tolnaftato, de los dos el compuesto más activo fue N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 2,3-diclorofenilo seguido por N-Metil-N-(m-tolil) tiocarbamato de 3,4-diclorofenilo; ésto permite afirmar que en la actividad biológica de estas moléculas interviene no sólo el factor estérico, sino también la liposolubilidad de la molécula y efectos de inducción por la presencia de los átomos de cloro (característicamente electronegativos), sustituidos sobre el anillo aromático.

Por otra parte, este tipo de estudio permitió, conocer más sobre la relación entre la estructura química y la actividad biológica del tolnaftato, con el fin de desarrollar con estas herramientas compuestos que permitan mejorar las actividad biológica del tolnaftato. Todo ésto tiene como fin último, contribuir a mejorar el tratamiento de las infecciones producidas por dermatofitos, comúnmente llamadas tiñas, atendiendo de esta manera a un problema importante de salud pública en nuestro país.

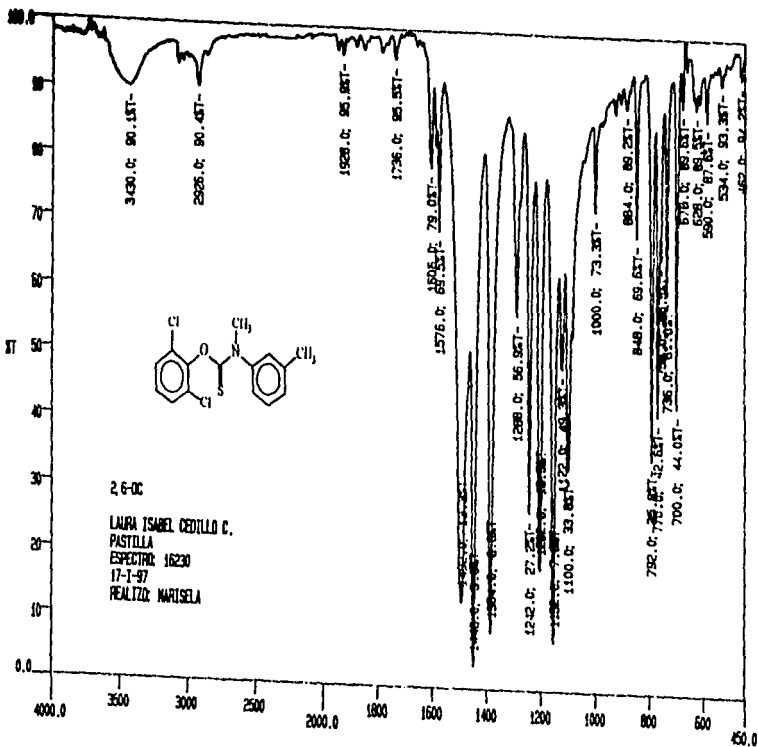


Espectro 1



Espectro 2

S1



Espectro 3

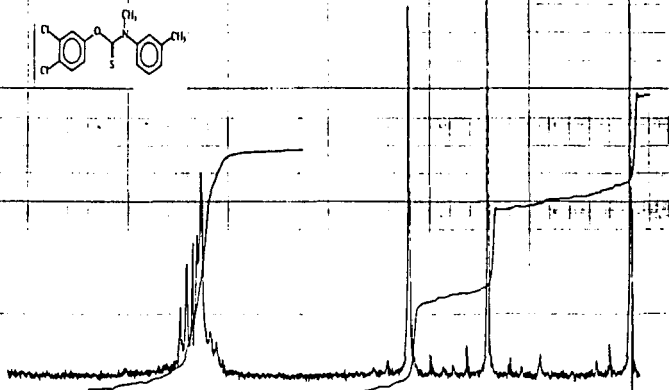
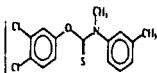
ESPECTROS

START OF SWEEP

→

END OF SWEEP

10ppm	900Hz	750	600	450	300	150
5ppm	450	375	300	225	150	75
2ppm	180	150	120	90	60	30



EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

Espectro 4

LOCK POC: ppm SPECTRUM AMPL: _____ FREQ: _____ MHz NUCLEUS: _____ SAMPLE TEMP: _____ OPERATOR: _____
 LOCK POWER: mW FILTER: _____ SEC SWEEP: _____ cm ZERO REF: _____ DATE: 10-2-92
 DECOUPLE POC: ppm RF POWER: _____ mW END OF SWEEP: _____ ppm SAMPLE TEMP: _____ C SOLVENT: (CD₃)₂S SPECTRUM NO. 2222

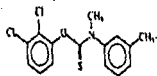
S2

ESPECTROS

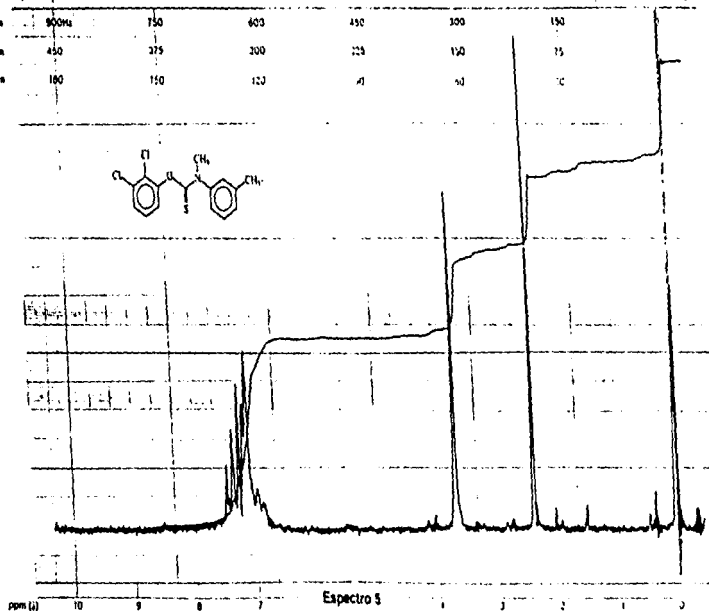
START OF SWEEP

END OF SWEEP

10ppm	800Hz	150	603	450	300	150
5ppm	450	375	300	225	150	75
2ppm	180	150	123	91	60	30



S3



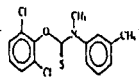
EM-300 MHz NMR 15 LCTK0111111

ESPECTROS

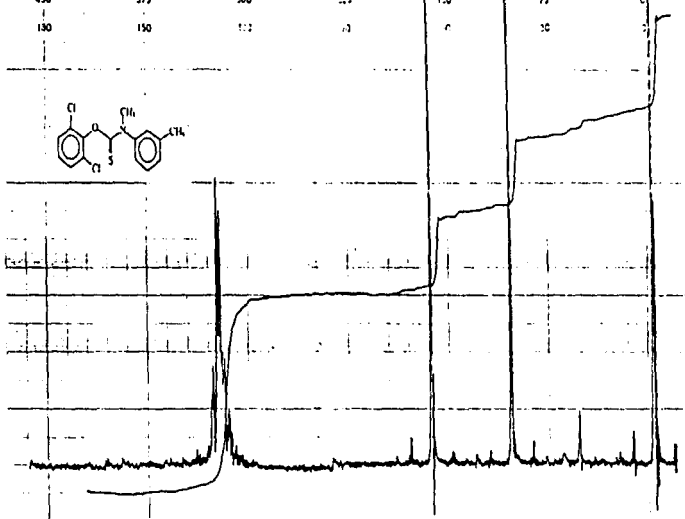
LOCK POS _____ ppm SPECTRUM AMPL. _____ SWEEP TIME _____ min NUCLEUS _____ SAMPLE _____ OPERATOR _____
 LOCK POWER _____ mW FILTER _____ sec SWEEP WIDTH _____ ppm ZERO REF _____ DATE _____
 DECOUPLE POS _____ ppm DECOUPLING POWER _____ mW RF POWER _____ mW END OF SWEEP _____ C SAMPLE TEMP. _____ C SOLVENT _____ SPECTRUM NO. _____

START OF SWEEP -1.3 END OF SWEEP

10ppm	900Hz	750	800	150	300	150	0
5ppm	450	375	400	75	150	75	0
0ppm	150	150	100	25	0	50	0



54



Espectro 6

MILITARY/INDUSTRIAL/ACADEMIC USE

LOCK POS _____ ppm SPECTRUM AMPL 1.0 SWEEP TIME _____ min NUCLEUS _____ SAMPLE _____ OPERATOR _____

LOCK POWER _____ mW FILTER _____ sec SWEEP WIDTH _____ ppm ZERO REF _____ DATE _____

DECOUPLE POS _____ ppm DECOUPLING POWER _____ mW RF POWER 2.75 mW END OF SWEEP _____ ppm SAMPLE TEMP _____ C SOLVENT CDCl3 SPECTRUM NO 2222

ESPECTROS

File: Spectrum 1

Date: 14-04-08

Time: 15 Feb 07 11:18

Sample: 8

Lab: Dr Rafael Castillo DSM

Lab: Mycotox

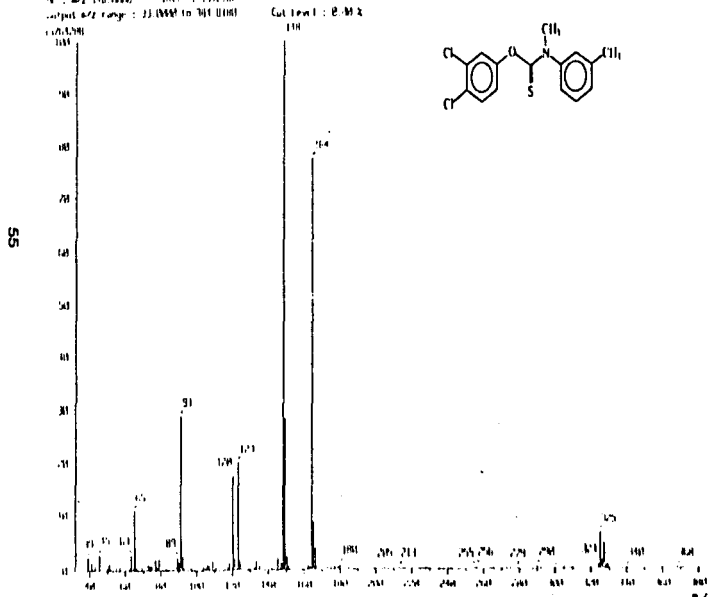
Ion Mode: [1+]

Acquisition Type: Single [0.100000]

Scan: 15, 33

Scan Range: 148.0000

Scan Range: 23.0000 to 341.0000



Espectro 7

ESPECTROS

Mass Spectrum 1

Date : 17-11

Date : 15 Feb 11:11

Sample :

Date : Dr-Rafael Castro (10/06)

Inlet : Micro

Ion Mode : ESI+

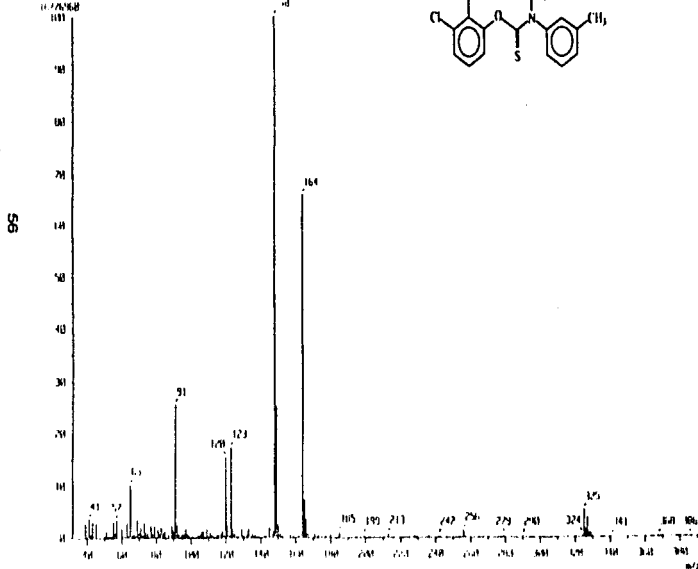
Spectrum Type : Molecular Ion Scan

MS : 0.10 min Scan : 114, 211

MS : m/z 100.0444 Int. : 1579.50

Mass m/z range : 31.0000 to 331.4000

0.000000



Espectro 8

ESPECTROS

1 Mass Spectrum 1

Date : 26 JUL

Date : 15 Feb 77 11:16

Sample :

Name : (R-Rafael) Cass-Hu 11049

Ion Mode : L1

Info : Mass

Spectrum Type : Regular MS (Linear)

SI : 0.00 min

Scan# : 111,111

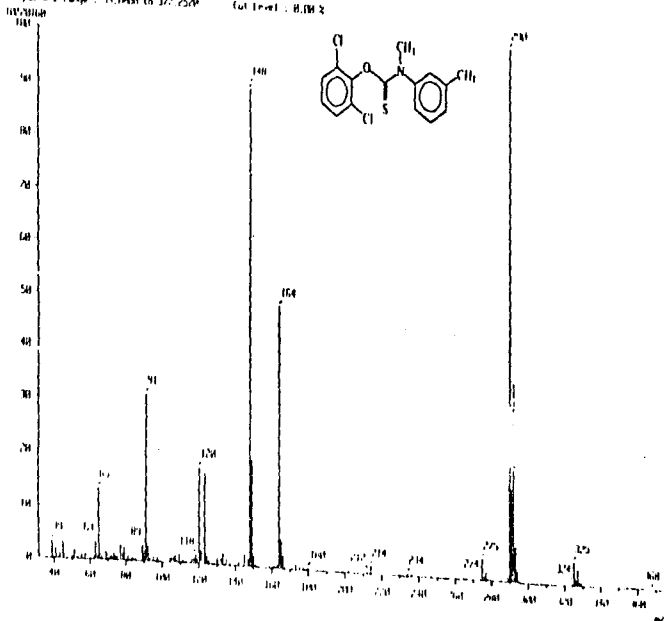
RF : 250.0000V

Int. : 574.67

Output w/z range : 11.0000 to 327.0000

Gain Level : 0.00 X

57



ESPECTROS

Espectro 9

VI. BIBLIOGRAFÍA

- 1) AMERICAN HOSPITAL FORMULARI SERVICE. 1992. Drug Information, USA, p. 2120, 2121.
- 2) AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Catalogue of Bacteria and Phages. 1989. 17 th ed., Ed. Maryland.
- 3) Bonifaz, Alexandro. 1991. MICOLOGÍA MEDICA BÁSICA. 1ª edición, Editorial Méndez Cervantes, México, p. 3-90.
- 4) Bowman, W. C.; Rand, M. J. 1984. FARMACOLOGÍA. Bases bioquímicas y patológicas con aplicación clínica. 2ª edición, Editorial Interamericana, México, p.32.22.35.1-35.10.
- 5) 5a) CA 57: 6357d (1962), b) CA 59: 15826c (1963), c) CA 60: 11230h (1964), d) CA 60: 11231a (1964), e) CA 60: 2871a (1964), f) CA 60: 2873d (1964), g) CA 60: 7969c (1964), h) CA 61: 1133g (1964), i) CA 62: 2746b (1965), j) CA 63: 3519d (1965), k) CA 63: 3496c (1965), l) CA 64: 20478h, 20479a (1966), m) CA 69: 93987q (1968).
- 6) DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACÉUTICAS. 1996. PLM, 42ª edición, México, p. 1092,1835,2024.
- 7) Dustin Jr., Pierre. 1963. NEW ASPECTS OF THE PHARMACOLOGY OF ANTIMITOTICS. *Pharmacological Reviews* 15 (3), 464-466.
- 8) Georgii, A.; Korting, H. C. 1991. ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING WHIT DERMATOPHYTES. *Mycoses* 34, 193-199.
- 9) González-Ochoa, A.; Orozco Victoria, C. 1974. FREQUENCY OF OCCURRENCE OF PRINCIPAL DERMATOPHYTOSES AND THEIR CAUSATIVA AGENTS OBSERVED IN MEXICO CITY. *International Journal of Dermatology* 13, 303-309.
- 10) González Saravia Coss, M. C. 1992. SÍNTESIS DE TOLNAFTATO Y PREPARACIÓN DE ANÁLOGOS. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
- 11) Goodman, A. G.; Rall, T. W. 1991. LAS BASES FARMACOLÓGICAS DE LA TERAPEÚTICA. 8ª edición, Editorial Médica Panamericana, México, p.1140.

- 12) Grasselli, J. C; Ritchey, W. M. 1975. ATLAS OF SPECTRAL DATA AND PHYSICAL CONSTANTS FOR ORGANIC COMPOUNDS. V. 1, 2 nd. ed., USA, p. 335-348.
- 13) Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H. 1979. COMPENDIO ESENCIAL DE QUÍMICA FARMACÉUTICA. Editorial Reverté, España, p.571-582.
- 14) Korting, H. C.; Rosenkranz, S. 1989. IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF DERMATOPHYTES FROM MUNICH TO GRISOFULVIN, MICONAZOLE AND KETOCONAZOLE. *Mycoses* **33**, 136-139.
- 15) Lednicer, D.; Mitscher, L. A. 1984. THE ORGANIC CHEMISTRY OF DRUG SYNTHESIS. V. 3, John Wiley and Sons, USA, p. 69.
- 16) Litter, M. F. 1980. FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL Y CLÍNICA. 6ª edición, Editorial El Ateneo, Argentina, p.1482-1489.
- 17) López-Martínez, R. 1986. INVESTIGACIÓN DE ALGUNAS FUENTES DE INFECCIÓN EN LAS DERMATOFITOSIS. ESTUDIO DE SUELOS, ANIMALES Y HOMBRE. *Gaceta Médica de México* **22**(5-6), 167-172.
- 18) Manzano-Gayoso, P.; et. al. 1994. DERMATOPHYTOSES IN MEXICO CITY. *Mycoses* **37**, 49-52.
- 19) MERCK INDEX. 1989. 11 th ed., p. 9445.
- 20) Miyazaki et al., US. pat 3,334,126 (1963,1967 to Japan Soda)