

77  
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

"SINTESIS DE TIOCARBAMIDAS N, N'-  
DISUSTITUIDAS Y PRUEBA DE TOXICIDAD EN

*Artemia salina*"

T E S I S

Que para obtener el título de

QUIMICA FARMACEUTICO BIOLOGICA

p r e s e n t a

GABRIELA MARTINEZ ZAPIEN



MEXICO, D. F.

262223

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: Prof. Espejo González Ofelia.

Vocal: Prof. Jimenez Estrada Manuel.

Secretario: Prof. Hernández Luis Francisco.


1er. suplente: Prof. Medina Oropeza Jaime.

2do. suplente: Prof. Reyes Trejo Lino Joel.

Lugar donde se desarrolló el tema:

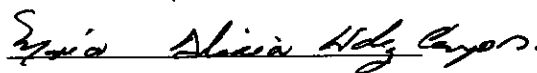
División de Bioquímica y Farmacia, Laboratorio 122 Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

M. en C. Francisco Hernández Luis.



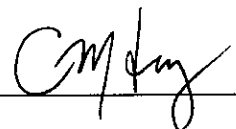
---

M. en C. Alicia Hernández Campos.



---

Gabriela Martínez Zapién.



---

## AGRADECIMIENTOS.

- √ A Dios, porque me has permitido llegar hasta donde estoy y me iluminas para seguir teniendo objetivos y metas nuevas.
- √ A mis Padres: Antonio y Josefina, que a base de constante dedicación y cuidado han sido parte fundamental de mi formación. Porque sin importar que tantos o que tan fuertes sean los problemas que les demos, siempre están allí, para darnos un consejo (o un regaño), y guiarnos por el camino que ustedes consideran es mejor para cada uno de nosotros.
- √ A mis hermanos: Elia, Eduardo y Alejandro que han estado constantemente a lado mío para resolver mis dudas o pasar un buen rato y por compartirme sus problemas, haciéndome parte de sus vidas y de sus soluciones, ayudándome a aprender de sus experiencias.
- √ A mi sobrino Axel con el cual me pelee durante todo el tiempo que tarde en hacer mi tesis por la computadora y que va a estar feliz de poder jugar todo el día desde hoy, y si lees este pedacito, quiero decirte que te quiero mucho y espero que ahora si puedas estar con nosotros siempre.
- √ A mi sobrino Anfernee, el cual quiero como hijo propio, con amor y cariño, aun cuando estés lejos.
- √ A mi hermano Armando y mis sobrinos: Martín Armando, Daniela y Michelle, con los cuales no he tenido mucha convivencia.
- √ A Jonnahtan, porque, durante el tiempo que hemos pasado juntos me has dado tu amor, tiempo, cariño, comprensión y demás, porque a pesar de los malos ratos has sido constante y me has demostrado tu amor y paciencia, porque me haces reír y soñar. He de decirte que solo Dios sabe todo lo que significas para mi.
- √ A Mónica Sánchez, porque sabes absolutamente TODO de mi, por tus consejos, tus enojos y buenos ratos, por hacerme entender que no siempre tengo la razón y que a veces hago berrinches, por escucharme, por no juzgarme, pero sobre todo por compartir tus cosas conmigo y ser mi amiga.
- √ A Raúl (mi primichi), porque te he agarrado de pañuelo en los malos ratos y me has hecho reír con tus chistes tontos, por ayudarme a tomar decisiones, por pedir mis opiniones, por ser constante, por ser amigos.

## AGRADECIMIENTOS.

---

- √ A Karen, por haber estado toda la carrera conmigo, por participar en mis locuras y dejarme ayudarte con tus travesuras, por acordarme de mil detalles y compartir otros tantos, por compartir conmigo momentos de llanto, de risas y enojos, que van haciendo de la vida la sal y la pimienta. Por recordarme cada treinta segundos a tu amigo “el de las vacas”, por alentarme, escucharme y ser una gran amiga.
  
- √ A Rafael Carrera, Rafael Corona, Luis Felipe Acevedo, Armando Tamayo, Eduardo Garza, porque indudablemente hablar de recuerdos agradables es hablar de ustedes, por apoyarme y compartir su tiempo y espacio conmigo, por estar allí cuando los necesito por eso y mas, gracias.
  
- √ A Catalina Villamil y Rada, Sandra Raso, Sandra Sosa, Sandra Zaire, Norma, Miriam, Mariana y Diana, por hacerme pasar ratos agradables, porque en poco tiempo han demostrado ser tan buenas “cuates” como amigas y porque creo, nuestra amistad trasciende mas allá del Papalote.
  
- √ Al Profesor Francisco Hernández Luis, por su dedicación hacia mi trabajo y su paciencia en todo momento, por alentarme, no desesperarse y confiar en mi.
  
- √ A la Maestra Rosalinda Velázquez Salgado, que estuvo en el momento preciso en el momento adecuado, porque tubo la confianza en nosotros y nos ayudó, porque entre usted y nosotros existe un gran secreto, el cual me ayudó a valorar mis actos y por supuesto a terminar la carrera.
  
- √ A el Dr. Rafael Castillo, M. en C. Alicia Hernández, Cecilia Juárez, Ceci, Rosita, Carlos, Lalo, Sergio, y Karla, con los cuales conviví en el Laboratorio 122 y los cuales me aceptaron como una parte mas de su equipo de investigación.
  
- √ A la Dra. Ofelia Espejo, el Dr. Manuel Jiménez Estrada, Prof. Jaime Medina Oropeza, y Prof. Lino Joel Reyes, por haber tenido la atención de tomar un poco de su tiempo para leer mi tesis y darme sus opiniones acerca de la misma.
  
- √ A todas las personas que hicieron posible la elaboración de esta tesis.

## INDICE.

1.0	Resumen.	pág. 2
2.0	Introducción.	pág. 4
3.0	Antecedentes.	pág. 6
	3.1 Tioureidos y Tiocarbamidas.	pág. 8
	3.2 Pruebas de Toxicidad.	pág. 22
4.0	Planteamiento del problema.	pág. 24
5.0	Objetivos.	pág. 24
	5.1 Objetivos Generales.	pág. 24
	5.2 Objetivos Especificos.	pág. 24
6.0	Metodologías.	pág. 28
7.0	Resultados.	pág. 35
8.0	Análisis y Discusión de Resultados.	pág. 64
	A. Parte Química.	pág. 65
	B. Parte Biológica.	pág. 73
9.0	Conclusiones.	pág. 80
10.0	Técnicas Experimentales	pág. 83
11.0	Bibliografía.	pág. 94
12.0	Apéndice	pág. 98
	Coeficientes de Reparto	pág. 99
	Gráficas de % de sobrevivientes Vs Conc.	pág. 105
	Espectros.	pág. 111

## 1.0 RESUMEN

En el presente trabajo se sintetizaron 12 compuestos: N- fenil-N'- metoxicarboniltioureido (1); N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido (2); N-(4-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido (3); N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido (4); N-fenil-N'-etoxicarboniltioureido (5); N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido (6); N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido (7); N-(3,4-diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido (8); N-feniltiurea (9); N-(3-clorofenil)tiurea (10); N-(4-clorofenil)tiurea (11); y N-(3,4- diclorofenil)tiurea (12), los cuales fueron identificados a través de los espectros de IR,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN y espectroscopia de masas, así también se les determinaron sus constantes físicas como  $R_f$ , punto de fusión y  $\lambda$  máxima de absorción en etanol.

Los compuestos fueron probados contra *Artemia salina* Leach para observar su toxicidad; esto se hizo en dos medios solución salina (SS) y medio de buffer de fosfatos (PBS) con el objetivo de verificar si existe una diferencia en la toxicidad mostrada de los organismos en frente a los compuestos en estudio ocasionada por el medio.

En este ensayo se monitoreó tanto el pH inicial de la solución, como el pH final y la concentración real en el medio, los datos fueron procesados por el programa Graffits, con lo cual se obtuvo la  $CL_{50}$  de los compuestos.

Se concluye que existe un efecto protector del medio de solución salina frente la toxicidad en todos los compuestos probados, por ejemplo para el caso del compuesto (2), se obtuvo una  $CL_{50}$  de 23.06  $\mu\text{mol/mL}$  en el medio de PBS y una  $CL_{50}$  de 304.8  $\mu\text{mol/mL}$  en el medio de SS.

De los compuestos sintetizados, el compuesto (4) es el que presenta mayor toxicidad, presentando una  $CL_{50}$  de 1.95  $\mu\text{mol/mL}$  en el medio de PBS y de 7.7  $\mu\text{mol/mL}$  en el medio de SS.

**ABSTRACT.**

In the present work were synthesized 12 compounds: N-phenyl-N'-methoxycarbonylthioureide (1); N-(3-chlorophenyl)-N'-methoxycarbonylthioureide (2); N-(4-chlorophenyl)-N'-methoxycarbonylthioureide (3); N-(3,4-dichlorophenyl)-N'-methoxycarbonylthioureide (4); N-phenyl-N'-ethoxycarbonylthioureide (5); N-(3-chlorophenyl)-N'-ethoxycarbonylthioureide (6); N-(4-chlorophenyl)-N'-ethoxycarbonylthioureide (7); N-(3,4-dichlorophenyl)-N'-ethoxycarbonylthioureide (8); N-phenylthiourea (9); N-(3-chlorophenyl)thiourea (10); N-(4-chlorophenyl)thiourea (11) and N-(3,4-dichlorophenyl)thiourea (12), which were identified through their spectra of IR,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and mass spectra, also their physical constants were determined as  $R_f$ , melting point and maximum  $\lambda$  of absorption.

The compounds were evaluated against *Artemia salina* Leach in order to observe their toxicity. This evaluation was performed in saline solution (SS) and in phosphate buffered saline (PBS) with the objective of verifying if there existed a difference in the toxicity shown by *Artemia* against the studied compounds due to the medium.

In all tests, the initial and final pH, as well as the real concentration in the media were monitored. The data were processed by the Graffits program, in that way was obtained the  $\text{LC}_{50}$  of the compounds.

It is concluded that it exists a protective effect of SS against the toxicity in all the proven compounds. For example, in the compound (2) was obtained a  $\text{LC}_{50}$  of 23.06 mmol/mL in PBS and a  $\text{LC}_{50}$  of 304.8 mmol/mL in SS.

Of the synthesized compounds, the compound (4) presents greater toxicity, presenting a  $\text{LC}_{50}$  of 1.95 mmol/mL in PBS, and  $\text{CL}_{50}$  of 7.7 mmol/mL in SS.



## 2.0 INTRODUCCIÓN.

En la actualidad ha habido un gran resurgimiento de enfermedades en las que se ha dado la resistencia de muchas cepas de microorganismos, y el surgimiento de otras enfermedades como el SIDA, como respuesta a estos hechos se han desarrollado una gran cantidad de compuestos que se pretende tengan actividad farmacológica contra éste tipo de enfermedades, aunque es bien sabido que de 10,000 compuestos sólo uno llegará a la etapa de comercialización. (2)

En nuestro país, el problema se agrava ya que muchas personas pueden morir o quedar incapacitadas a causa de un sin número de enfermedades entre las cuales podemos citar la Giardiasis (enfermedad parasitaria), leptococosis, criptococosis, etc. las cuales son enfermedades no tan comunes en otros países y por lo cual no se le ha dado una importancia debida en el campo de la investigación y desarrollo de nuevos fármacos en ellos.

En el desarrollo de fármacos, la validación de nuevos compuestos está dado por una serie de exámenes. Esto consiste en una investigación intensa que lleva a cabo tiempo y costo para proveer moléculas con la eficacia y seguridad de un nuevo medicamento. Un paso muy importante en este procedimiento, es la determinación de la toxicidad, en la cual se tiene que indicar la dosis ( o concentración) letal 50, que es la concentración de un compuesto determinado a la cual muere el 50% de los individuos a los cuales se les administró. A raíz de esto surge otro problema, y es que al hacer éste tipo de pruebas una gran cantidad de animales muere, dado a que es una prueba cuantal en la que se esta midiendo vida o muerte de animales. Para solucionar este problema se pueden hacer pruebas in vitro, las cuales tienen muchas ventajas entre las cuales podemos citar:

- Muere una menor cantidad de animales.
- Baja costos.
- Elimina espacio y la necesidad de contar con bioterios, especialistas y equipo adecuado para el manejo de animales.
- El tiempo de realización de la prueba es menor.

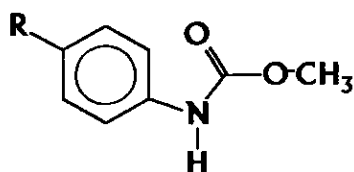
Entre las pruebas in vitro se tiene la prueba con *Artemia salina* Leach, la cual es normalmente desarrollada por incubación en un medio salino artificial durante un periodo de 24 horas, y puede también ser desarrollada en un medio de buffer salino de fosfatos a pH 7.2. De la referencia (3), podemos observar que existe un cambio en la magnitud de la toxicidad de algunos compuestos dependiendo del medio en el que se le evalúa, por lo que en este trabajo de tesis, se realizó la evaluación de los compuestos sintetizados tanto en el medio de solución salina (SS), como en el medio de solución salina con buffer de fosfatos (PBS), para observar si existe un cambio en la magnitud de la respuesta mostrada por la *Artemia salina* en cada uno de los medios.

### 3.0 ANTECEDENTES.

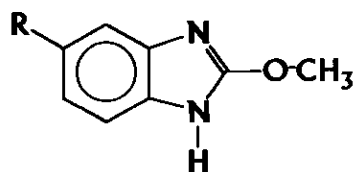
Durante varios años el interés de diversos grupos de investigación dedicados a la búsqueda de compuestos biológicamente activos contra diversos parásitos (helmintos, protozoarios y hongos) los ha llevado a encontrar sustancias tanto de origen natural como sintéticas con buenas perspectivas para ser utilizadas tanto en medicina humana como veterinaria. En la actualidad prácticamente se disponen de principios activos contra todos los parásitos conocidos. Sin embargo, la búsqueda continúa en virtud de que algunos de estos compuestos presentan, adicionalmente a su acción antiparasitaria, toxicidad para el huésped o poca eficiencia en su comportamiento farmacocinético; sin contar con el hecho de que muchos parásitos están presentando resistencia a dichos compuestos.

Nuestro grupo de investigación durante varios años ha estado explorando la posibilidad de encontrar antiparasitarios del tipo bencimidazoles. Aunque algunos de estos compuestos han mostrado ser interesantes, su escasa solubilidad acuosa ( $< 0.05$  mg/mL) en general, favorece su acción a nivel intestinal pero limita su eficiencia contra parásitos ubicados en otros órganos y tejidos. Por ello, ha surgido la necesidad de iniciar la búsqueda de otras estructuras prototipos con los mismos fines.

Como resultado de estudios conformacionales de carbamatos hechos en computadora, se ha mostrado que presentan arreglo de similitud estructural con los bencimidazoles.

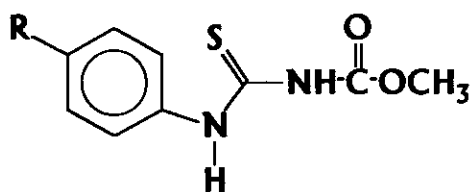


Carbamato

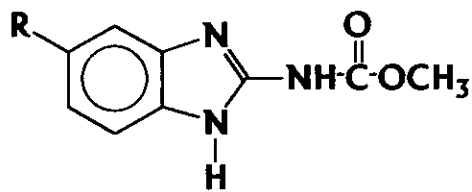


Bencimidazol

Los resultados de pruebas de evaluación biológica de estos carbamatos mostraron una modesta actividad contra *Giardia lamblia*, este protozooario nos ha motivado a iniciar el estudio de los tioureidos N,N'- disustituídos cuya conformación pudiese ser similar a un bencimidazol-2-carbamato, ejemplo de compuesto preferencialmente antiparasitaria de amplio espectro.

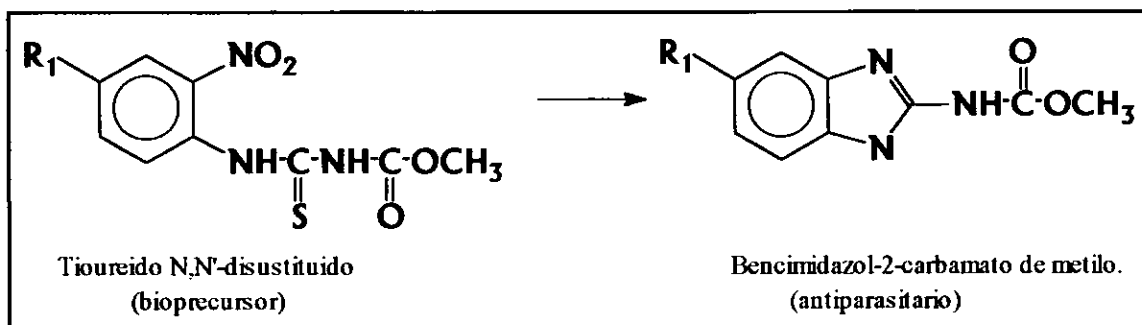


Tioureido N,N'-disustituído



Bencimidazol-2-carbamato de metilo.

En epoca reciente hemos estudiado el uso de tioureidos N,N'- disustituídos con la intención de utilizarlos como bioprecusores, los cuales después de una reducción y ciclación intramolecular dan origen al bencimidazol-2-carbamato de metilo.



Cuando estos tioureidos fueron evaluados como agentes antiparasitarios contra *Triquinella spiralis*, mostraron actividad semejante al Albendazol ( un bencimidazol-2-carbamato de metilo, antiparasitario de amplio espectro).

Aunque se asumió que la bioconversión antes mencionada, no se descarta la posibilidad que el tioureido perse tenga actividad antiparasitaria.

Por esta razón, nuestro grupo de investigación decidió iniciar la investigación de actividad biológica de tioureidos N,N disustituídos que no tengan la posibilidad de biotransformarse en bencimidazoles-2-carbamato de metilo, iniciando con su evaluación de toxicidad y en el futuro, su evaluación antiparasitaria.

En el presente apartado, continuaremos con una revisión de aspectos químicos y metabólicos de tiocarbamidas, tioureidos y finalizaremos con los aspectos relacionados con la evaluación de la actividad tóxica *in vitro* utilizando *Artemia salina*. Leach.

### 3.1 TIOCARBAMIDAS.(1)

La tiourea es la más simple de las tiocarbamidas. La estructura de tiocarbamida está presente en una variedad de compuestos alicíclicos y heterocíclicos.

La Ergotioneina, es la única tiocarbamida de origen natural conocida en la actualidad. Esta está presente en el ergot en cantidades apreciables, en células de la sangre en mamíferos y en el fluido seminal de algunas especies. Figura 1.

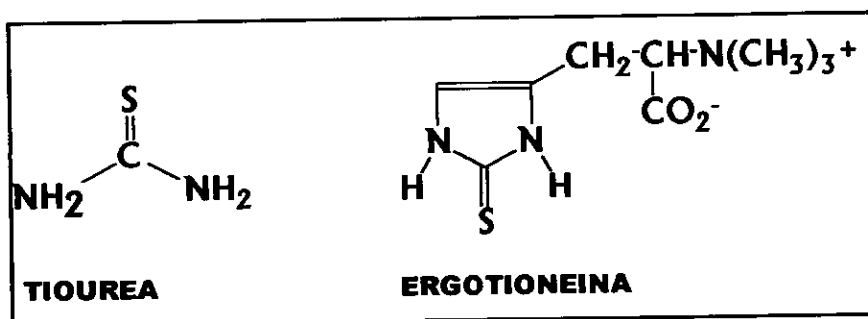


Figura 1. Estructura de los compuestos Ergtioneina y Tiourea.

---

 TIUREIDOS Y TIOCARBAMIDAS
 

---

La presencia de tiocarbamidas en el cuerpo humano se da por la ingesta de alimentos dado que no se sintetiza dentro del organismo.

Las tiocarbamidas sintéticas tienen distintos usos (ver tabla 1), entre los cuales podemos mencionar a los intermediarios en reacciones sintéticas para agentes terapéuticos; las propiedades antibacterianas de la tiourea han sido conocidas desde hace tiempo. La N-hidroximetil es un "enmascarador" de compuestos de formaldehído y es usado como agente para lavado después de cirugía abdominal.

**TABLA 1. TIOCARBAMIDAS Y ALGUNOS DE SUS USOS**

<i>COMPUESTO</i>	<i>USO</i>
Tiourea	síntesis de otras tiocarbamidas.
1-Naftiltiourea	rodenticida
N-metil-Nhidroxi metiltiourea.	bactericida tópico.
1-metil-2-tioimidazol (metimazol)	agentes antitiroideos.
2-Tiouracilos	
6-n-propil-2-tiouracil	Tratamiento de hipertiroidismo (agente antitiroideo)
5-iodo-2-tiouracil	Diagnóstico de melanoma.
2-tiobarbituratos.	

Todas las tiocarbamidas pueden emplear el metabolismo de hormonas, afectando el metabolismo tiroidal del iodo aumentándolo o disminuyéndolo. De esta observación se da el desarrollo de tiocarbamidas normalmente usadas en el tratamiento del hipertiroidismo.

Aparte de su actividad antitiroidea, el 2-tiouracilo exógeno y sus derivados son incorporados en el pigmento melanina durante su biosíntesis. Por consecuencia [<sup>125</sup>I] 5-iodo-2-tiouracilo está siendo examinado como un agente potencial para el diagnóstico de melanoma.

## PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.

Las tiocarbamidas son compuestos de clase heterogénea, que difieren en su hidrofobicidad, lipofilicidad, ionización y reactividad.

### ACIDEZ Y BASICIDAD.

En solución acuosa existen predominantemente las tiocarbamidas tautoméricas en la forma de tiona en equilibrio con un pequeño grado de tienol. Figura 2.

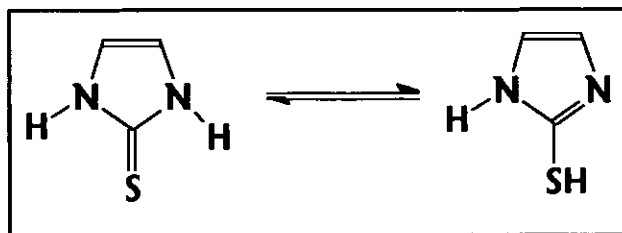
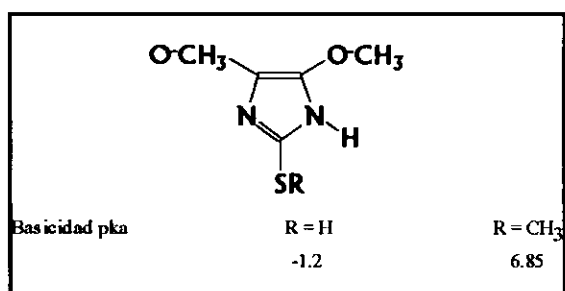


Figura 2. Formas tautoméricas tiona-tienol

La preferencia por el tautómero de tiona, el cual es aún más grande para anillos heterocíclicos de tiocarbamidas de 5 miembros que para tiocarbamidas de 6 miembros, se atribuye en parte a la estabilización de los electrones  $\pi$  en la forma tiona. Todas las tiocarbamidas son anfotéricas y en ácidos fuertes son S-protonados.

La sustitución de cualquiera de los átomos de nitrógeno o de carbono adyacentes a la estructura de tiocarbamida puede afectar el valor del pKa dependiendo del tamaño del sustituyente y sus propiedades de donador o aceptor de electrones. Figura 3.

**Figura 3. EFECTO DE LA S-SUSTITUCIÓN EN LA BASICIDAD DE LA 4,5 DIMETIL-2-TIOIMIDAZOL.**

## OXIDACIÓN.

Las tiocarbamidas son oxidadas por una gran variedad de reactivos. La naturaleza del producto de la oxidación de la tiocarbamida depende de que cualquier átomo de azufre este en la forma de tiona o si existe como tienol.

## FORMACIÓN DE DISULFURO.

La oxidación de tiocarbamidas a disulfuro en presencia de iones metálicos puede estar dado por un mecanismo de radicales libres.

Los disulfuros pueden dar la desulfuración de la tiocarbamida. Aparte de la oxidación del disulfuro en presencia de iones metálicos, soluciones de iodo o peróxido de hidrógeno diluido también está listo para oxidar las tiocarbamidas en disulfuros. La naturaleza de la reacción y las especies generadas en la formación del disulfuro dependen primariamente del agente oxidante. Tabla 2.



*TABLA 2. ALGUNOS Disulfuros TÍPICOS DE TIOCARBAMIDAS.*

Compuesto	Agente oxidante
Tiourea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -H <sup>+</sup>
Etilenotiourea	HCl-NaOH
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /CH <sub>3</sub> OH
4(5)carbetoxi-4(5)metil-2-tioimidazol	I <sub>2</sub> -
Ergotioneina	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -H <sup>+</sup>
1-Metil-2-tioimidazol	I <sub>2</sub> <sup>-</sup>
2-Tiouracilo	I <sub>2</sub> <sup>-</sup> -NaOH
6-n-Propil-2-tiouracilo	I <sub>2</sub> <sup>-</sup> -NaOH

La formación de ioduro de sulfenilo es como en el paso inicial en la oxidación de un tiol. Después, dependiendo de la estructura del tiol y de la concentración de los reactivos, da cualquier oxidación con otra molécula de tiol o reacciona con agua para formar ác. sulfénico. Figura 4.

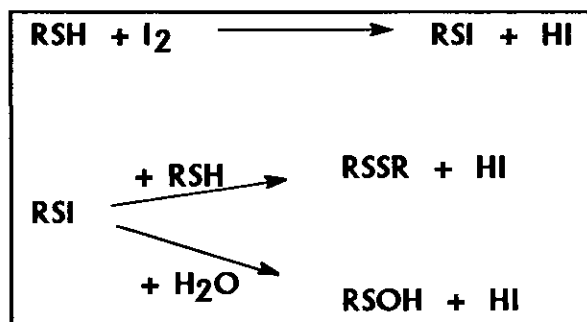


Figura 4. Formación de disulfuro y ác. sulfénico.

Podría ser razonable asumir que las tiocarbamidas son oxidadas por el I<sub>2</sub> de manera similar.

Las tiocarbamidas, compiten con el I<sub>2</sub> para desulfurar las ligaduras en la peroxidasa de la tiroides. La desulfuración de la tiocarbamida en la presencia de haluros y el sistema de la peroxidasa puede proceder via tiocarbamida con intermediario el Ioduro de sulfenilo.

El peróxido de hidrógeno es también un sustrato para la peroxidasa tiroidal. Con el peróxido de hidrógeno como agente oxidante se propone que la estructura de la tiocarbamida, tiourea y los 2-tioimidazoles actúan como nucleófilos en los agentes oxidantes electrofilicos, y que inicialmente el ácido sulfénico que se produce (Figura5) reacciona con otra molécula de tiocarbamida para producir el disulfuro (Figura 6).

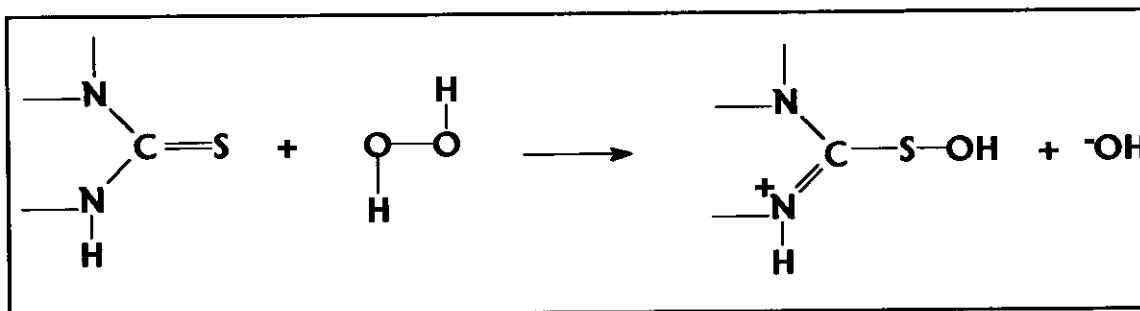


Figura 5. Formación de ácido sulfénico por oxidación con peróxido.

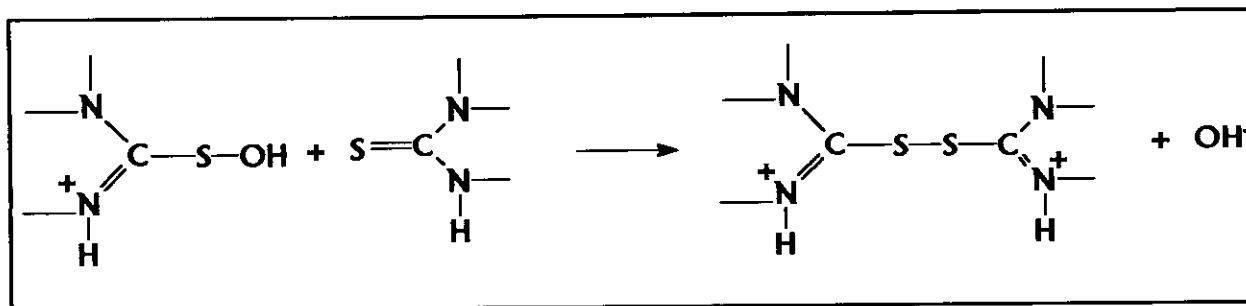


Figura 6. Producción de disulfuro.

Así la formación de un ác. sulfénico inestable se postula para ambos el iodo y la oxidación de las tiocarbamidas por peróxido.

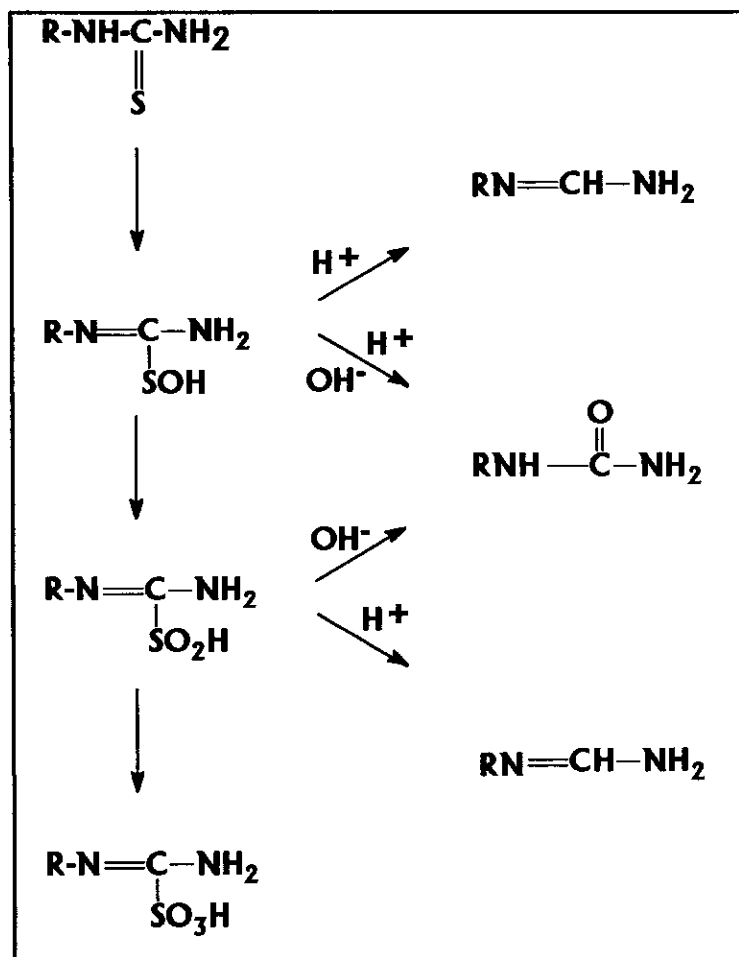


Figura 7. Oxidación secuencial de tioureas.

Los disulfuros son relativamente estables en el estado sólido pero varían en estabilidad en solución acuosa. Sin embargo, tienen estabilidad relativa en solución ácida.

### TIOCARBAMIDAS S-OXIGENADAS

La formación de ácido sulfénico ha sido implicada en la oxidación de las tiocarbamidas a disulfuros tanto con peróxido de hidrógeno como iodo, estos S-monóxidos en el esquema, los cuales son reactivos, son oxidados a sus correspondientes ácidos sulfinicos (S-dióxidos) y sulfónicos (S-trióxidos). Figura 7.

Los ácidos sulfénicos de las tiocarbamidas son extremadamente inestables. Figura 8.

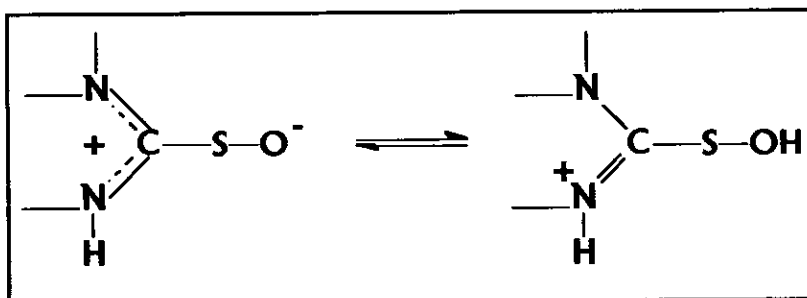
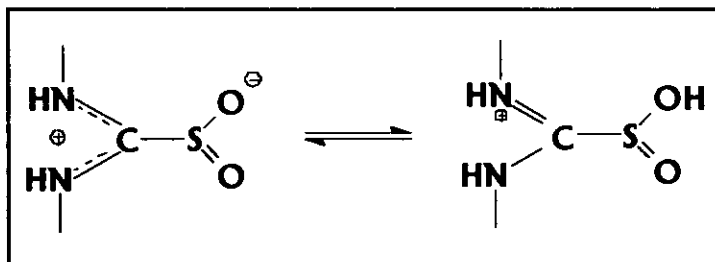


Figura 8.S-monóxidos

Las tiocarbamidas dioxigenadas (ácidos sulfinicos), varían en estabilidad, y son aislables de maneras particulares (tabla3). Son intermediarios en la S-oxidación secuencial de las tiocarbamidas a sus correspondientes ácidos sulfónicos, y son oxidadas fuertemente, moderado por agentes reductores. En condiciones básicas los ácidos sulfinicos de la tiourea se descomponen a urea, en solución ácida eliminan al dióxido de sulfuro, dando una formamidina. El ácido sulfinico de la tiourea en medio alcalino reducido con  $Cd^{2+}$  es convertido en urea.

**TABLA 3. Tiocarbamida S-dióxido (ác. sulfinico)**

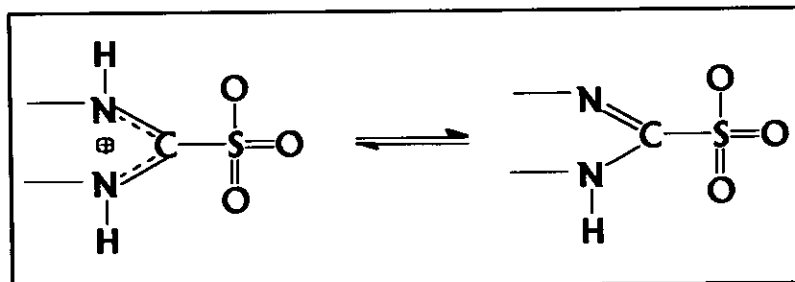


COMPUESTO	AGENTE OXIDANTE
Tiourea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
1-Metil y 1-feniltiourea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Etilenotiourea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (neutro)
4(5)-Metil-2-tioimidazol	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (neutro)
6-n-Propil-2-tiouracilo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1% NH <sub>4</sub> OH)
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 M KOH)

El ácido sulfónico derivado de las tiocarbamidas es aislable y relativamente estable. Esto podría entonces aparecer como ácidos sulfinicos reactivos que son convertidos más rápidamente en productos desulfurados que en sus correspondientes ácidos sulfónicos.

El anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) es un agente oxidante biológico el cual ha sido implicado en una variedad de deterioros y transformaciones bioquímicas. Como referencia hay sólo unos pocos reportes de oxidación de las tiocarbamidas con superóxido. Crank y Makin mostraron que estos compuestos fueron desulfurados, durante otro estudio con O<sub>2</sub><sup>-</sup>, y las tioureas, 2-tiouracilos y 2-tiobarbital fueron convertidas en sus análogos oxigenados. Tabla 4.

**TABLA 4. TIOCARBAMIDAS S-TRIÓXIDOS.**



COMPUESTO	CONDICIONES OXIDANTES.
Tioureas	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> COOH
1-Metiltiourea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> COOH
1-Feniltiourea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> COOH
Etilenotiourea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en CCl <sub>4</sub> a 0°C
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> COOH
4(5)-Metil-2-tioimidazol	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
6-n-Propil-2-tiouracilo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1% NH <sub>4</sub> OH)
	KMnO <sub>4</sub> (50 mM)

### REDUCCIÓN.

Las tiocarbamidas pueden también ser desulfuradas por agentes reductores. La reducción de las tioureas sustituidas da formamidinas. Similarmente, las 2-tiopirimidinas y los 2-tioimidazoles son reducidos a sus correspondientes pirimidinas e imidazoles. Las 2-tiohidantoinas son también desulfuradas reductivamente.

**ALQUILACIÓN Y ACILACIÓN.**

Las tiureas, tiohidantoinas, tioimidazoles, tiopirimidinas y derivados todos rápidamente forman derivados de tioeter en presencia de base y halogenuros alquílicos. Cualquier sustitución en el átomo de sulfuro o nitrógeno depende de las condiciones de reacción.

Similarmente, la acilación de las tiocarbamidas puede resultar en la producción de S- o N- acil derivados. Figura 9.

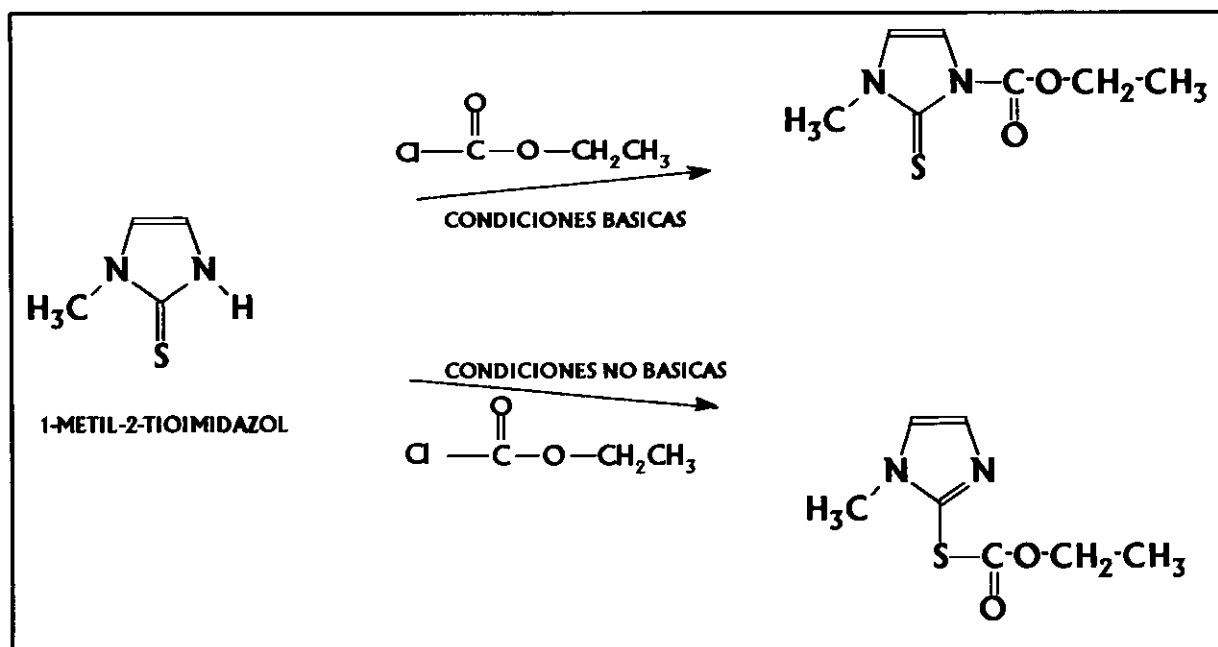


Figura 9. Producción de N- o S- acil derivados.

## METABOLISMO DE LAS TIOCARBAMIDAS.

### REACCIONES DE OXIDACIÓN.

Estudios tempranos con feniltiourea y otras tioureas N-sustituidas en rata y conejo indicaban que había correlación entre la desulfuración y la toxicidad. Sin embargo, la desulfuración reductiva da sulfuro de hidrógeno y este es el metabolito tóxico. (Figura 10)

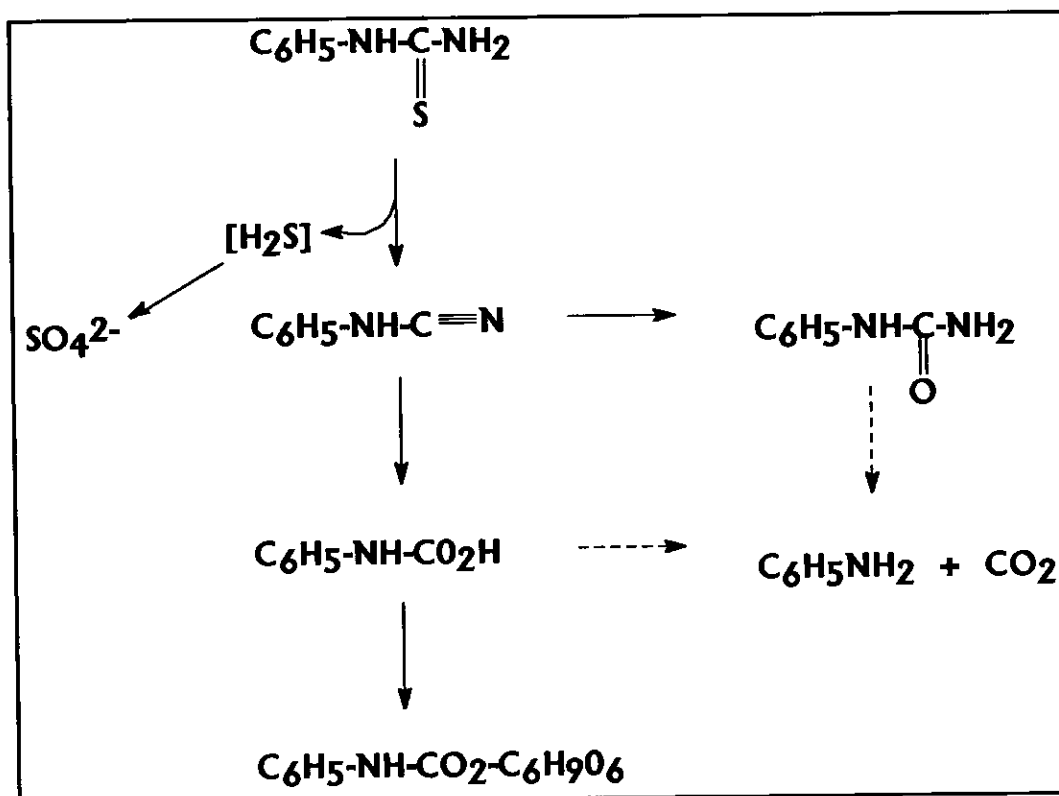


Figura 10. Biotransformación de feniltiourea.

Los ácidos sulfénicos de las tiocarbamidas, algunas de las cuales se reporta que han sido sintetizadas y aisladas, son susceptibles de catálisis a cualquier oxidación a ácidos sulfínicos más estables los cuales pueden ser hidrolizados a la urea correspondiente o su conversión en formamidina o urea, dependiendo de las condiciones de reacción.



No solo las tiocarbamidas se acumulan en la glándula de la tiroides, donde inhiben la tiroide peroxidasa y consecuentemente la biosíntesis de hormonas tiroasina ( $T_4$ ) y la Triiodotironina ( $T_3$ ), también están desulfuradas en la glándula para aumentar o disminuir su existencia con ayuda de el sulfato, el cual es un metabolito intratiroidal. Los metabolitos de el ácido sulfinico y sulfónico del propiltiouracilo son solo intermediarios intratiroidales de los productos S-oxidados de el metabolismo de la tiocarbamida, sugiriendo que el S- dióxido de propiltiouracilo es más estable que los S-dióxidos de los 2-tioimidazoles.

La desulfuración de la tiocarbamida para dar el análogo oxigenado puede ser via "ataque nucleofílico", de los S-dióxidos, dado que el grupo del dióxido de sulfuro es un buen grupo saliente. Es digno de atención que en general los derivados de las tioureas y las 2-tiopirimidinas, son capaces de ser desulfuradas a sus correspondientes análogos oxigenados y derivados de formamidina. No existe registro de que análogos no oxigenados de los 2-tioimidazoles hayan sido reportados como metabolitos.

Sin embargo, los 2-tioimidazoles no son metabolizados directamente a los análogos oxigenados, una metilhidantoina es *in vivo* un metabolito del metimazol.

## REACCIONES DE CONJUGACIÓN

### GLUCURONIDACIÓN Y RIBOSILACIÓN

La formación de glucurónidos de compuestos endógenos y exógenos involucra el ataque nucleofílico a los grupos funcionales que contienen oxígeno, nitrógeno o sulfuro en la posición C-1 de la estructura del ácido glucurónico de uridina difosfato-ácido glucurónico (UDPGA). Esta reacción está catalizada por una membrana dependiente de UDP-glucoronil transferasas. La glucuronidación esta reportada como un importante camino metabólico para los 2-tiouracilos en el hombre y en rata.

Sin embargo, no ha sido totalmente acertado que los 2-tiouracilos se conviertan en O-, N- o S-glucurónidos, hay una fuerte evidencia circunstancial basada en observaciones químicas y farmacológicas que el PTU glucurónido (Figura 11) es un S-glucurónido.

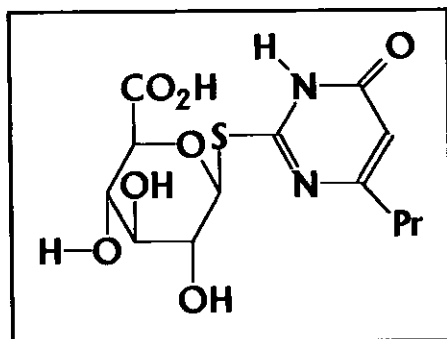


Figura 11. PTU glucurónico.

El 2-tiouracilo, el cual es estructuralmente similar al encontrado en la naturaleza como pirimidina uracilo, es incorporada al RNA en la bacteria, virus y rata. Inicialmente, los 2-tiouracilos son N-ribosilados para formar desde el nucleotido la 2-tiouridina o el nucleótido 2-tio-5'-UMP.

La 2-tiouridina o 2-tio-5'-UMP aún no es utilizada como agente efectivo antitiroidal en rata como el compuesto original 2-tiouracilo.

### METILACIÓN.

La metilación metabólica de la estructura de la tiocarbamida es en el átomo de sulfuro rico en electrones.

### 3.2 Pruebas de Toxicidad.

Ha habido un interesante incremento en años recientes en modelos *in vitro*. El potencial de usos de estos modelos incluye los estudios de compuestos solos o en combinación en una amplia variedad de organismos entre los cuales podemos mencionar las bacterias, helmintos, protozoarios, hongos, etc.<sup>(5)</sup> Estos nuevos modelos, han simplificado cuestiones de gran relevancia como las pruebas toxicológicas.<sup>(6,7)</sup>

Es deseable tratar de evaluar sistemáticamente de la manera mas económica la actividad farmacológica de los compuestos. Por supuesto, no todos los compuestos sintetizados poseen actividad biológica que sea suficientemente importante desde el punto de vista terapéutico o de interés económico. Una gran importancia de la selección (screening) experimental es que da una estimación del potencial y actividad biológica del compuesto, con un mínimo de costo, tiempo y animales. En estos ensayos se permite la evaluación de una sustancia de referencia.<sup>(6)</sup>

Los modelos *in vitro* no son una respuesta completa, debido a que ellos no tienen todas las barreras que se encuentran en el huésped, pero estas concentraciones encontradas *in vitro*, pueden dar una información valiosa para únicamente afinar la dosis en organismos superiores.<sup>(4)</sup>

Una de las ventajas de los modelos *in vitro* es que existe una relación entre la concentración del compuesto y el efecto encontrado *in vivo*.<sup>(4)</sup> Es posible no solo determinar una actividad farmacológica de tipo específico así como la potencia relativa de un nuevo compuesto comparado con compuestos estándar de referencia. Con el uso de un estándar de referencia en experimentos de selección iniciales, es posible obtener información predictiva precisa viendo el potencial terapéutico indicado de el nuevo compuesto.<sup>(6)</sup>

Otras de las ventajas entre las cuales podemos citar:

- Muere una menor cantidad de animales superiores.
- Baja costos.

## ANTECEDENTES.

---

### PRUEBAS DE CITO TOXICIDAD

- Elimina espacio y la necesidad de contar con bioterios, especialistas y equipo adecuado para el manejo de animales.
- El tiempo de realización de la prueba es menor.
- Se puede correlacionar con pruebas *in vivo*. (5)

Entre las pruebas *in vitro* se tiene la prueba con *Artemia salina* Leach, la cual es normalmente desarrollada por incubación en un medio salino artificial durante un período de 24 horas, y puede también ser desarrollada en un medio de buffer salino de fosfatos a pH 7.2.

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL $CL_{50}$ AGUDA ( $CL_{50}$ )

De manera rutinaria, es la primera determinación de un nuevo compuesto o preparación en sistemas biológicos es en ratones y/o *Artemia salina*. La toxicidad aguda debe ser hecha en animales pequeños para obtener una idea de el máximo límite para una dosis segura. Las razones para esto, son que en animales pequeños, se requiere una cantidad pequeña del nuevo compuesto, el cual en el inicio, puede ser muy difícil de obtener y muy caro. Como resultado, es posible obtener un buen estimado de su toxicidad y efectos del compuesto en estos animales, con un pequeño gasto de compuesto así como tiempo y esfuerzo del experimentador.

La estimación de la  $CL_{50}$  puede ser obtenida gráficamente por el método de probits (Finney, 1952), o por el método de Litchfield y Wilcoxon. (1949). Nosotros obtuvimos la  $CL_{50}$  por el método de probits.

Con esto es posible obtener una idea de la potencia relativa de un compuesto en investigación viendo puntos específicos de la actividad del fármaco comparado con un estándar o prototipo de esa clase de fármaco. También se usa para experimentos subsecuentes para determinar actividad en sitios de receptores específicos. (6)

#### **4.0 Planteamiento del problema.**

Por trabajos previamente realizados en nuestro grupo de investigación, tanto experimental como teóricamente, nos han llevado a considerar que moléculas del tipo tioureidos N,N-disustituidos posiblemente pudiesen presentar actividad biológica semejante a la de los bencimidazol-2-carbamatos de metilo o etilo. Con la ventaja de presentar mejores características de solubilidad acuosa que estos últimos, lo que los coloca como candidatos con mejores comportamientos dentro del organismo así como con mejores alternativas de formulación.

#### **4.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

Los tioureidos N,N- disustituidos presentarán actividad citotóxica en *Artemia salina*, semejante a la del Albendazol ( bencimidazol- 2 carbamato de metilo), aunque la solubilidad acuosa de los primeros será mayor de la del bencimidazol mencionado.

#### **5.0 OBJETIVOS.**

##### **5.1 Objetivos Generales.**

El presente trabajo de tesis se propone la síntesis de tioureidos N,N'-disustituidos y tiocarbamidas N-sustituidas, así como la evaluación de su toxicidad en *Artemia salina*. Leach.

##### **5.2 Objetivos Específicos**

- 1.- Revisión bibliográfica sobre los tioureidos y tiocarbamidas, así como de evaluación de toxicidad *in vitro*.
- 2.- Síntesis de tioureidos N,N disustituidos y tiocarbamidas N-sustituidas propuestos en el siguiente esquema:

#### **4.0 Planteamiento del problema.**

Por trabajos previamente realizados en nuestro grupo de investigación, tanto experimental como teóricamente, nos han llevado a considerar que moléculas del tipo tioureidos N,N-disustituidos posiblemente pudiesen presentar actividad biológica semejante a la de los bencimidazol-2-carbamatos de metilo o etilo. Con la ventaja de presentar mejores características de solubilidad acuosa que estos últimos, lo que los coloca como candidatos con mejores comportamientos dentro del organismo así como con mejores alternativas de formulación.

#### **4.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

Los tioureidos N,N- disustituidos presentarán actividad citotóxica en *Artemia salina*, semejante a la del Albendazol ( bencimidazol- 2 carbamato de metilo), aunque la solubilidad acuosa de los primeros será mayor de la del bencimidazol mencionado.

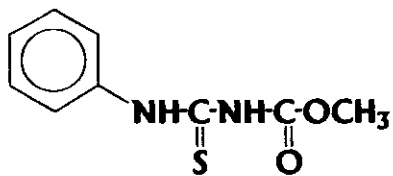
#### **5.0 OBJETIVOS.**

##### **5.1 Objetivos Generales.**

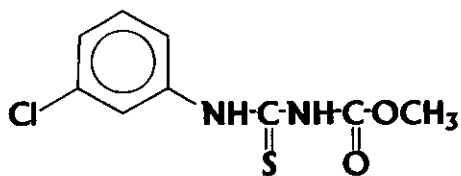
El presente trabajo de tesis se propone la síntesis de tioureidos N,N'-disustituidos y tiocarbamidas N-sustituidas, así como la evaluación de su toxicidad en *Artemia salina*. Leach.

##### **5.2 Objetivos Específicos**

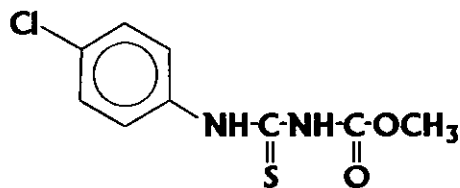
- 1.- Revisión bibliográfica sobre los tioureidos y tiocarbamidas, así como de evaluación de toxicidad *in vitro*.
- 2.- Síntesis de tioureidos N,N disustituidos y tiocarbamidas N-sustituidas propuestos en el siguiente esquema:



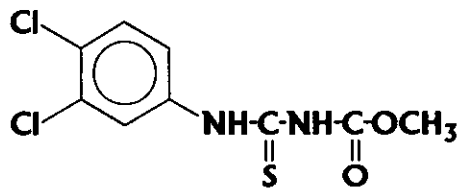
N-fenil-N'-metoxicarboniltiureido  
COMPUESTO 1



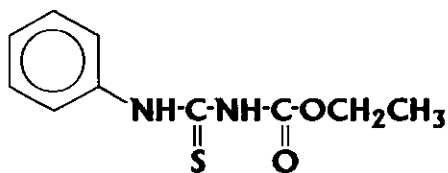
N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido  
COMPUESTO 2



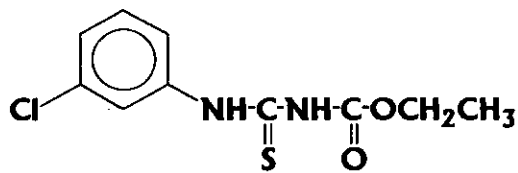
N-(4-clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido  
COMPUESTO 3



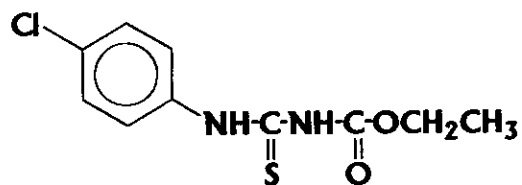
N-(3,4 -diclorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido  
COMPUESTO 4



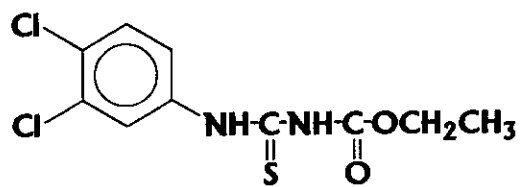
N-fenil-N'-etoxicarboniltiureido  
COMPUESTO 5



N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltiureido  
COMPUESTO 6



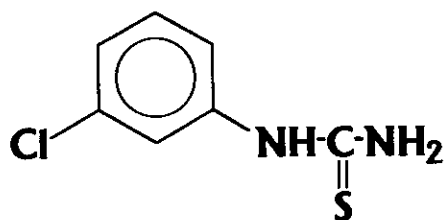
N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido  
COMPUESTO 7



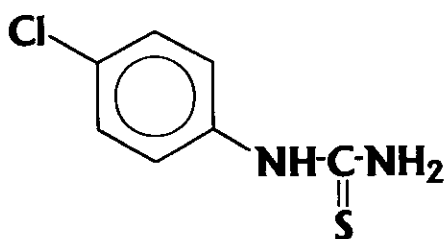
N-(3,4 -diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido  
COMPUESTO 8



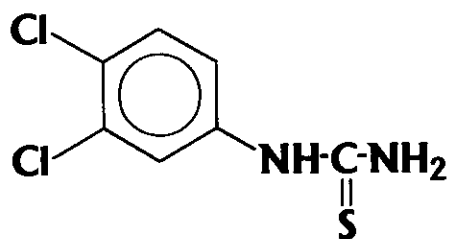
N-feniltiourea  
COMPUESTO 9



N-(3-clorofenil)tiourea  
COMPUESTO 10



N-(4-clorofenil)tiourea  
COMPUESTO 11



N-(3,4 -diclorofenil)tiourea  
COMPUESTO 12

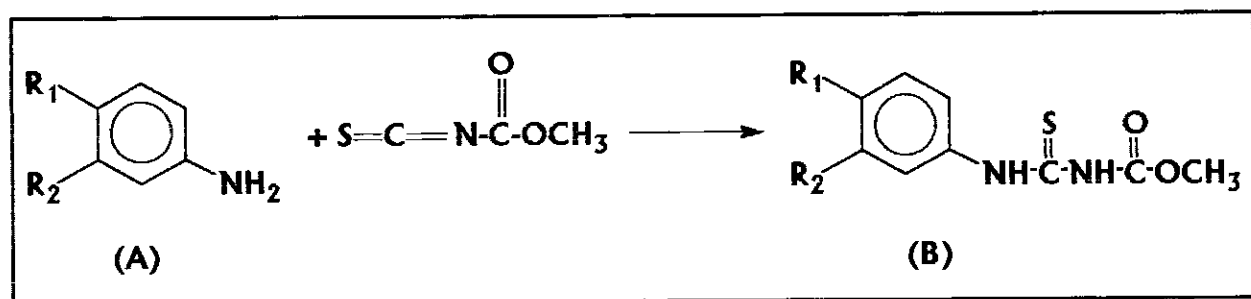
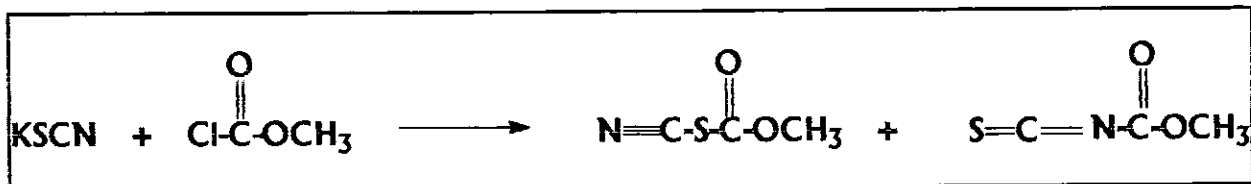


- 3.- Identificación de los compuestos sintetizados a través de sus espectros de IR,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, y espectrometría de masas.
- 4.- Ensayo de toxicidad en *Artemia salina*. Leach.
- 5.- Cuantificación espectrofotométrica de las concentraciones reales en las muestras evaluadas en la prueba de *Artemia salina*. Leach.
- 6.- Determinación de  $\text{CL}_{50}$ .

## **6.0 METODOLOGIAS**

**A. PARTE QUÍMICA.** Para la preparación de los compuestos a evaluar, se siguieron las siguientes reacciones.

**SÍNTESIS DE LOS TIOUREIDOS CON METIL CLOROFORMIATO.**



En la estructura (A) es:

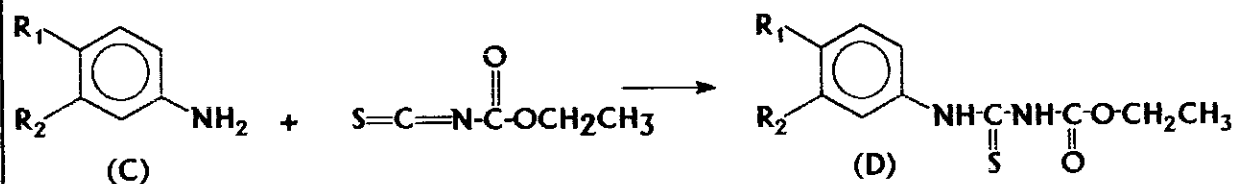
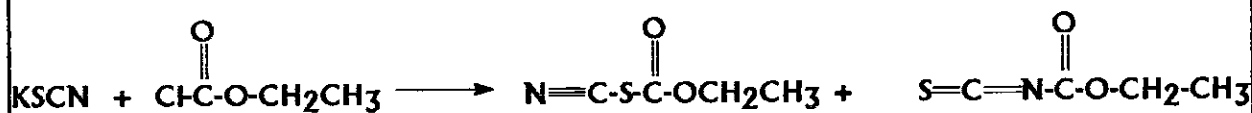
Anilina	Si $R_1 = \text{H}$	y $R_2 = \text{H}$
3-cloroanilina	Si $R_1 = \text{H}$	y $R_2 = \text{Cl}$
4-cloroanilina	Si $R_1 = \text{Cl}$	y $R_2 = \text{H}$
3,4-dicloroanilina	Si $R_1 = \text{Cl}$	y $R_2 = \text{Cl}$

En la estructura (B) es:

N- Fenil-N' - metoxicarboniltioureido	Si $R_1 = \text{H}$	y $R_2 = \text{H}$
N-(3-clorofenil) -N' - metoxicarboniltioureido	Si $R_1 = \text{H}$	y $R_2 = \text{Cl}$
N-(4-clorofenil) -N' - metoxicarboniltioureido	Si $R_1 = \text{Cl}$	y $R_2 = \text{H}$
N-(3,4 -diclorofenil) -N' - metoxicarboniltioureido	Si $R_1 = \text{Cl}$	y $R_2 = \text{Cl}$

Se hizo reaccionar tiocianato de potasio con cloroformiato de metilo, con lo cual se obtuvieron dos productos metoxicarboniltiociano y metoxicarbonilisotiociano. Se hizo reaccionar *in situ* el compuesto de anilina correspondiente (estructura A) con el metoxicarbonilisotiociano sintetizado, para obtener el tioureido del mismo (estructura B).

## SINTESIS DE LOS TIUREIDOS CON ETIL CLOROFORMIATO.



En la estructura (C) es:

Anilina	Si $\text{R}_1 = \text{H}$	y $\text{R}_2 = \text{H}$
3-cloroanilina	Si $\text{R}_1 = \text{H}$	y $\text{R}_2 = \text{Cl}$
4-cloroanilina	Si $\text{R}_1 = \text{Cl}$	y $\text{R}_2 = \text{H}$
3,4-dicloroanilina	Si $\text{R}_1 = \text{Cl}$	y $\text{R}_2 = \text{Cl}$

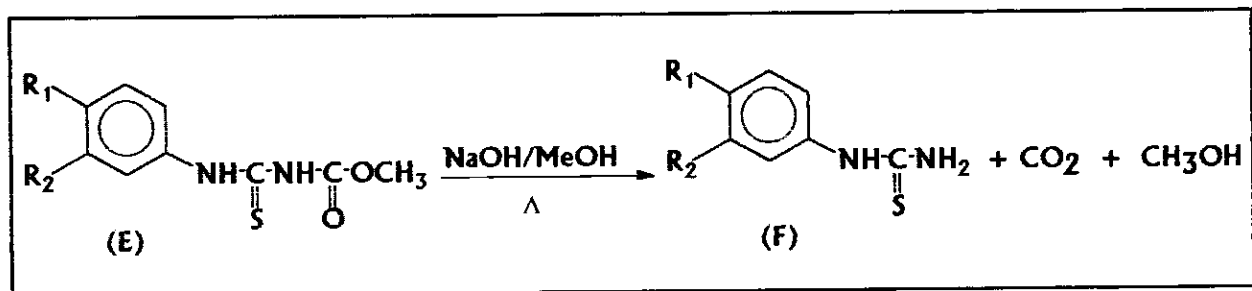
En la estructura (D) es:

N- fenil-N' - etoxicarboniltioureido	Si $\text{R}_1 = \text{H}$	y $\text{R}_2 = \text{H}$
N-(3-clorofenil) -N' - etoxicarboniltioureido	Si $\text{R}_1 = \text{H}$	y $\text{R}_2 = \text{Cl}$
N-(4-clorofenil) -N' - etoxicarboniltioureido	Si $\text{R}_1 = \text{Cl}$	y $\text{R}_2 = \text{H}$
N-(3,4 -diclorofenil) -N' - etoxicarboniltioureido	Si $\text{R}_1 = \text{Cl}$	y $\text{R}_2 = \text{Cl}$

Se hizo reaccionar tiocianato de potasio con cloroformiato de etilo, con lo cual se obtuvieron dos productos etoxicarboniltiociano y etoxicarbonilisotiociano. Se hizo reaccionar *in situ* el compuesto de anilina correspondiente (estructura C) con el etoxicarbonilisotiociano sintetizado, para obtener el tioureido del mismo (estructura D).

## HIDROLISIS DE TIOUREIDOS.

### TIOUREIDO METOXILADO.



En la estructura (E) es:

- N- fenil-N' - metoxicarboniltioureido
- N-(3-clorofenil) -N' - metoxicarboniltioureido
- N-(4-clorofenil) -N' - metoxicarboniltioureido
- N-(3,4 -diclorofenil) -N' - metoxicarboniltioureido

- |                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| Si $R_1 = \text{H}$  | y $R_2 = \text{H}$  |
| Si $R_1 = \text{H}$  | y $R_2 = \text{Cl}$ |
| Si $R_1 = \text{Cl}$ | y $R_2 = \text{H}$  |
| Si $R_1 = \text{Cl}$ | y $R_2 = \text{Cl}$ |

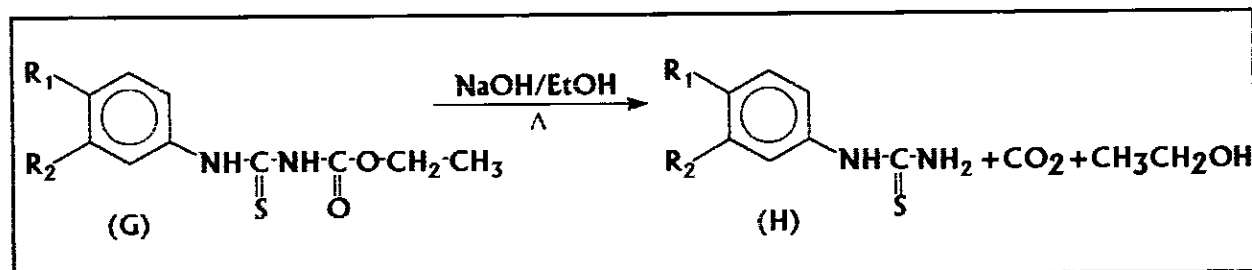
En la estructura (F) es:

- N-feniltiourea
- N-(3-clorofenil)tourea
- N-(4-clorofenil)tourea
- N-(3,4 -diclorofenil)tourea

- |                      |                     |
|----------------------|---------------------|
| Si $R_1 = \text{H}$  | y $R_2 = \text{H}$  |
| Si $R_1 = \text{H}$  | y $R_2 = \text{Cl}$ |
| Si $R_1 = \text{Cl}$ | y $R_2 = \text{H}$  |
| Si $R_1 = \text{Cl}$ | y $R_2 = \text{Cl}$ |

Se hidrolizó el tioureido metoxilado (estructura E) al hacerlo reaccionar con una solución de hidróxido de sodio en metanol y calentando en baño María, con lo cual se obtuvo la tiocarbamida correspondiente (estructura F), metanol y bióxido de carbono.

TIUREIDO ETOXILADO.



En la estructura (G) es:

N- fenil-N' - etoxicarboniltiureido

Si  $R_1 = H$  y  $R_2 = H$

N-(3-clorofenil) -N' - etoxicarboniltiureido

Si  $R_1 = H$  y  $R_2 = Cl$

N-(4-clorofenil) -N' - etoxicarboniltiureido

Si  $R_1 = Cl$  y  $R_2 = H$

N-(3,4 -diclorofenil) -N' - etoxicarboniltiureido

Si  $R_1 = Cl$  y  $R_2 = Cl$

En la estructura (H) es:

N-feniltiurea

Si  $R_1 = H$  y  $R_2 = H$

N-(3-clorofenil)tiurea

Si  $R_1 = H$  y  $R_2 = Cl$

N-(4-clorofenil)tiurea

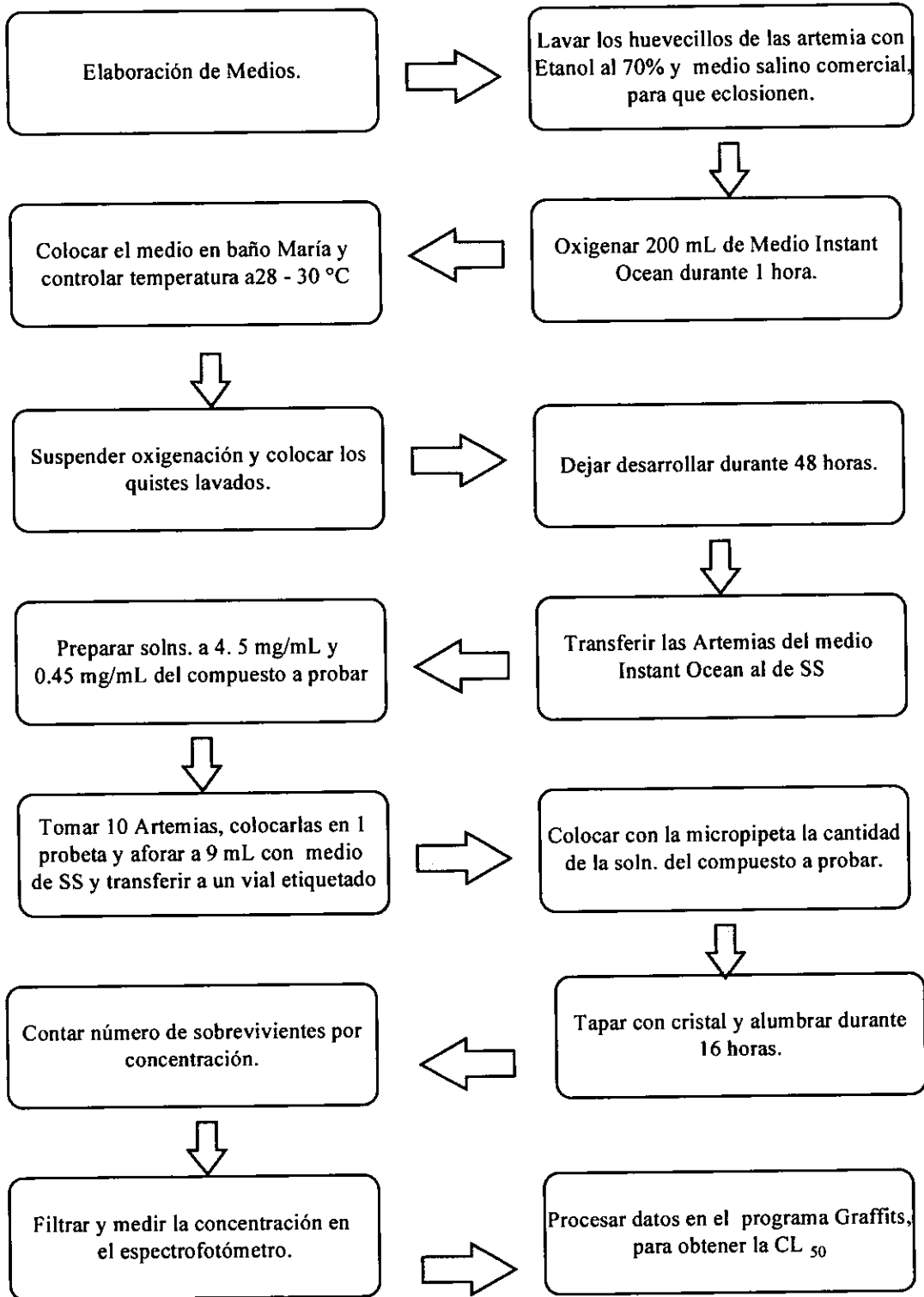
Si  $R_1 = Cl$  y  $R_2 = H$

N-(3,4 -diclorofenil)tiurea

Si  $R_1 = Cl$  y  $R_2 = Cl$

Se hidrolizó el tiureido etoxilado (estructura G) al hacerlo reaccionar con una solución de hidróxido de sodio en etanol y calentando en baño María, con lo cual se obtuvo la tiocarbamida correspondiente (estructura H), etanol y bióxido de carbono.

B.Parte Biológica. Ensayo con *Artemia salina*.



### **C. CONCENTRACION DE LOS COMPUESTOS EN EL MEDIO DE *Artemia salina* Y COEFICIENTE DE PARTICION.**

La determinación de la solubilidad de los diferentes compuestos se llevó a cabo espectrofotométricamente, en donde, previamente se hizo un corrimiento de 200 a 400 nm de longitud de onda ( $\lambda$ ), para obtener la  $\lambda$  máxima de absorción del compuesto probado y así poder medir la concentración de los compuestos.

Como blanco se emplearon, los blancos elaborados en el ensayo con *Artemia salina* en los medios de SS o de PBS. Según el medio en el cual se tenía el compuesto, la concentración se calculó por interpolación en una curva patrón previamente elaborada.

Por lo que respecta al coeficiente de partición, este se calculó tomando en cuenta tres series de valores reportados. El cálculo se realizó como se describe en la literatura (<sup>14</sup>).



## 7.0 RESULTADOS

### TABLA DE RESULTADOS.

Compuesto	Peso Mol	p.f. (°C)	$R_f$	Rendimiento en bruto %	Rendimiento de cristalización %
1	209	157-158	0.4081*	79.43	92.30
2	244	138-139	0.3877*	99.44	89.47
3	244	152	0.3673*	94.21	94.44
4	278	159	0.3469*	64.93	75.00
5	224	125-127	0.5102*	74.45	84.61
6	258	122	0.4693*	84.10	82.35
7	258	118-120	0.4591*	89.04	88.88
8	292	135	0.4489*	82.81	89.47
9	152	168-169	0.4146**	73.84	70.00
10	186	130-132	0.3658**	97.25	57.14
11	186	180-182	0.3414**	97.25	71.43
12	220	195-196	0.3170**	79.62	66.66

Comp. 1 N-fenil-N'-metoxicarboniltioureido

Comp. 2 N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido

Comp. 3 N-(4-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido

Comp. 4 N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido

Comp. 5 N-fenil-N'-etoxicarboniltioureido

Comp. 6 N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido

Comp. 7 N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido

Comp. 8 N-(3,4-diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido

Comp. 9 N-feniltiurea

Comp. 10 N-(3-clorofenil)tiurea

Comp. 11 N-(4-clorofenil)tiurea

Comp. 12 N-(3,4-diclorofenil)tiurea

\* Fase Móvil Hexano : Cloroformo : Acetato de Etilo 50:35:15

\*\* Fase Móvil Cloroformo : Metanol 98:2

**PRUEBAS DE SOLUBILIDAD EN DISOLVENTES ORGANICOS.**

	Comp.1	Comp.2	Comp.3	Comp.4	Comp.5	Comp.6	Comp.7	Comp.8	Comp.9	Comp.10	Comp.11	Comp.12
Hexano <sub>1</sub>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Hexano <sub>2</sub>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Acetona <sub>1</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Acetona <sub>2</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MeOH <sub>1</sub>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
MeOH <sub>2</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
EtOH <sub>1</sub>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
EtOH <sub>2</sub>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

No soluble (---)

Parcialmente soluble (++) en 0.1 gramo en 1 mL del disolvente se presenta una suspensión)

Muy soluble (++++) 0.1 gramo en 1 mL del disolvente)

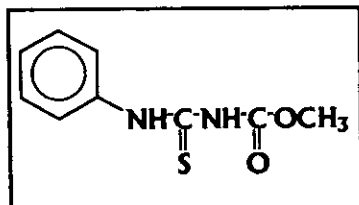
\* Solvente ideal.

f Frio.

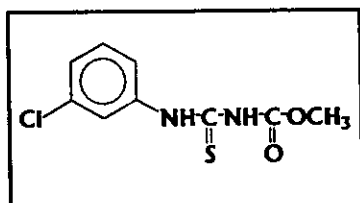
c Caliente.

- Comp. 1 N-fenil-N'-metoxicarbonilourea      Comp. 7 N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarbonilourea  
 Comp. 2 N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarbonilourea      Comp. 8 N-(3,4 diclorofenil)-N'-etoxicarbonilourea  
 Comp. 3 N-(4-clorofenil)-N'-metoxicarbonilourea      Comp. 9 N-fenilourea  
 Comp. 4 N-(3,4 diclorofenil)-N'-metoxicarbonilourea      Comp. 10 N-(3-clorofenil)ourea  
 Comp. 5 N-fenil-N'-etoxicarbonilourea      Comp. 11 N-(4-clorofenil)ourea  
 Comp. 6 N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarbonilourea      Comp. 12 N-(3,4-diclorofenil)ourea

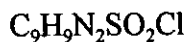
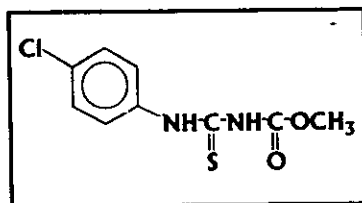
Compuesto 1



Compuesto 2



Compuesto 3



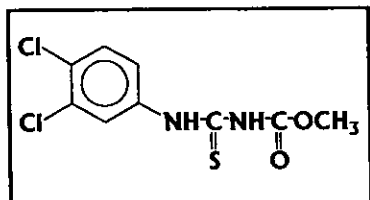
IR (KBr)  $\gamma$ : 3220, 3162, 1726, 1552, 1242, 1040  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (TMS)  $\delta$ : 3.82 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 7.27 (dd, 1H arom), 7.40 (t, 2H arom) 7.61 (d, 2H arom), 8.57 (s, 1H,  $NH$ ), 11.43 (s, 1H,  $NH$ ) ppm.  $^{13}C$  RMN (TMS)  $\delta$ : 53.47, 124.43, 126.86, 128.52, 137.45, 153.26, 177.90 ppm. EM (I.E.) 210 m/z; 209 ( $M^+$ , 100%).

IR (KBr)  $\gamma$ : 3182, 3090, 1722, 1610, 1534, 1478, 1356, 1234, 1174  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (TMS)  $\delta$ : 3.83 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 7.243 (ddd, 1H arom), 7.32 (t, 1H arom) 7.499 (ddd, 1H arom), 7.74 (ddd, 1H arom), 8.50 (s, 1H,  $NH$ ), 11.50 (s, 1H,  $NH$ ) ppm.  $^{13}C$  RMN (TMS)  $\delta$ : 53.55, 122.34, 124.30, 126.82, 129.74, 134.36, 138.62, 153.24, 177.84 ppm. EM (I.E.) 244 m/z; ( $M^+$ , 70%), 246 ( $M^+ + 2$ ), 169 (100%).

IR (KBr)  $\gamma$ : 3170, 3080, 1712, 1610, 1562, 1536, 1490  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (TMS)  $\delta$ : 4.50 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 7.40 (d, 2H arom), 7.66 (d, 2H arom), 8.6 (s, 1H,  $NH$ ), 11.5 (s, 1H,  $NH$ ) ppm.  $^{13}C$  RMN (TMS)  $\delta$ : 53.56, 125.56, 128.96, 132.18, 136.02, 153.27, 177.95 ppm. EM (I.E.) 244 m/z ; ( $M^+$ , 60%), 246 ( $M^+ + 2$ ), 169 (100%).

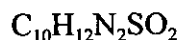
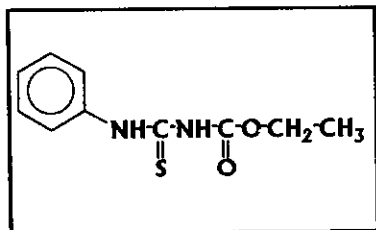
RESULTADOS

Compuesto 4



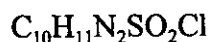
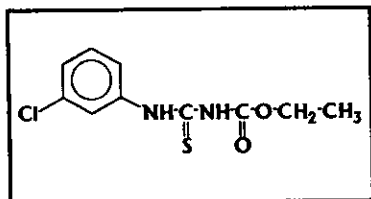
IR (KBr)  $\gamma$ : 3158, 3014, 1730, 1582, 1526, 1248, 1176, 1034  $cm^{-1}$   
 $^1H$  RMN (TMS)  $\delta$ : 3.901 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 7.490 (dd, 1arom), 7.535(dd, 1H arom), 7.91 (d, 1H arom), 8.45 (s, 1H, NH), 11.45 (s, 1H, NH) ppm.  $^{13}C$  RMN (TMS)  $\delta$ : 53.66, 123.49, 125.88, 130.37, 132.675, 136.91, 153.26, 177.88 ppm. EM (I.E.) 278 m/z; ( $M^+$ , 70%), 280 ( $M^+ + 2$ ), 203 (100%).

Compuesto 5



IR (KBr)  $\gamma$ : 3160, 1712, 1534, 1184, 1048  $cm^{-1}$   
 $^1H$  RMN (TMS)  $\delta$ : 1.26 (t, 3H,  $-OCH_2CH_3$ ), 4.19 (q, 2H,  $-OCH_2CH_3$ ), 7.1-7.6 (5H, arom), 10.74 (s, 1H, intercambiable con  $D_2O$ , NH), 11.59 (s, 1H, intercambiable con  $D_2O$ , NH) ppm.  
 $^{13}C$  RMN (TMS)  $\delta$ : 13.87, 61.93, 124.04, 125.85, 128.17, 137.57, 153.50, 178.46 ppm. E.M. (IE) 224 m/z; (223 M, 100%)

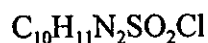
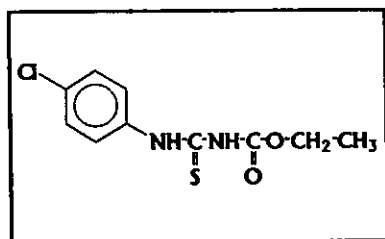
Compuesto 6



IR (KBr)  $\gamma$ : 3170, 3084, 1718, 1614, 1594, 1564, 1530  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (TMS)  $\delta$ : 1.24 (t, 3H,  $-OCH_2CH_3$ ), 4.20 (q, 2H,  $-OCH_2CH_3$ ), 7.29 (ddd,  $J=2H_z$ ,  $J=2H_z$ ,  $J=10H_z$ , 1H, H-6), 7.39 (t, 1H, H-5), 7.47 (ddd,  $J=2H_z$ ,  $J=2H_z$ ,  $J=10H_z$ , 1H, H-4), 7.83 (t, 1H, H-2), 11.35 (s, 1H, intercambiable con  $D_2O$ , -NH-), 11.58 (s, 1H, intercambiable con  $D_2O$ ) ppm.  $^{13}C$  RMN (TMS)  $\delta$ : 14.06, 62.05, 123.17, 124.13, 125.86, 130.08, 132.54, 139.48, 153.38, 178.83 ppm. E.M. (I.E.) 258 m/z; ( $M^+$ , 100%).

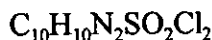
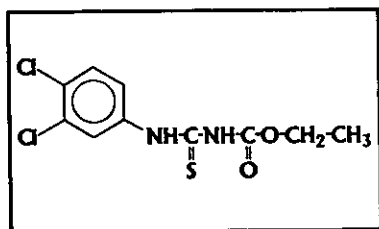
RESULTADOS

Compuesto 7



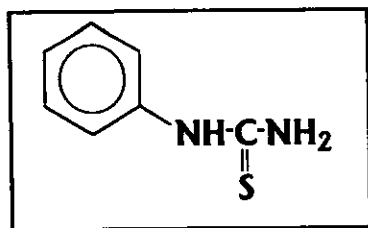
IR (KBr)  $\gamma$ : 3160, 3020, 1726, 1592, 1530, 1248, 1174  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (TMS)  $\delta$ : 1.32 (t, 3H,  $-OCH_2CH_3$ ), 4.27 (q, 2H,  $-OCH_2CH_3$ ), 7.50 (d,  $J=10$  Hz, 2H, H-2, H6), 7.68 (d,  $H=10$  Hz, 2H, H-3, H-5), 11.38 (s, intercambiable con  $D_2O$ ,  $-NH-$ ), 11.58 (s, 1H, intercambiable con  $D_2O$ ,  $-NH-$ ) ppm.  $^{13}C$  RMN (TMS)  $\delta$ : 14.14, 62.09, 126.43, 128.47, 130.14, 137.0, 153.48, 178.88 ppm. E.M. (I.E.) 258 m/z. ( $m^+$ , 100%).

Compuesto 8



IR (KBr)  $\gamma$ : 3168, 1724, 1582, 1528, 1248, 1176, 1034  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN (TMS)  $\delta$ : 1.35 (T, 3H,  $OCH_2CH_3$ ), 4.28 (q, 2H,  $-OCH_2CH_3$ ), 7.47 (D, 2H, arom), 7.96 (dd, 1H, arom), 10.91 (s, 1H, intercambiable con  $D_2O$ ,  $-NH-$ ) ppm.  $^{13}C$  RMN (TMS)  $\delta$ : 1379, 62.15, 123.52, 125.53, 128.76, 129.70, 131.35, 137.13, 153.48, 178.67 ppm. E.M. (IE) 292 m/z. ( $M^+$ , 100%); 294 ( $M^+ + 2$ ).

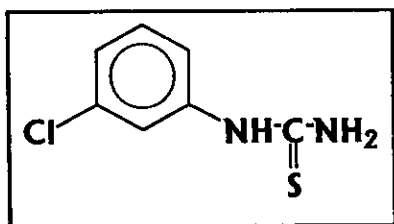
Compuesto 9



IR (KBr)  $\gamma$ : 3424, 3182, 1449  $cm^{-1}$ .  $^1H$  RMN  $\delta$ : 7.0- 7.7 ( compleja, 5H, arom.); 10.15 (1H NH) ppm.  $^{13}C$  RMN (TMS)  $\delta$ : 122.869, 124.070, 128.522, 139.493, 181.074 ppm. E.M. (IE) 152 m/z. ( $M^+$  100%)

RESULTADOS

Compuesto 10

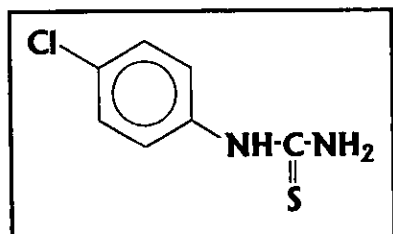


IR (KBr)  $\gamma$ : 3414, 3160, 1626, 1520, 1294  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup>H RMN (TMS)  $\delta$ : 7.12 - 7.69 (compleja, 4H, arom); 9.80 (1H, NH) ppm. <sup>13</sup>C RMN (TMS)  $\delta$ : 121, 122, 123, 130, 132, 140.8, 181.2 ppm. E.M. (I.E.) 186 m/z. (m+, 100%).



Compuesto 11

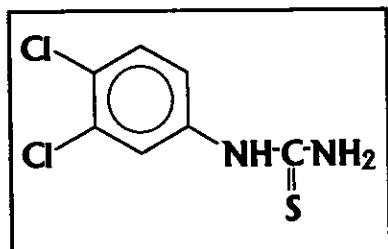


IR (KBr)  $\gamma$ : 3416, 3268, 3188, 1620, 1508  $\text{cm}^{-1}$

<sup>1</sup>H RMN (TMS)  $\delta$ : 7.30-7.48 (4H, arom); 9.80 (1H, NH) ppm. <sup>13</sup>C RMN (TMS)  $\delta$ : 124.538, 128.054, 128.449, 138.233, 181.162 ppm. E.M. (IE) 186 m/z. (M, 40%); 188 (M+ +2); 79 (100%)



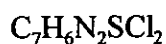
Compuesto 12



IR (KBr)  $\gamma$ : 3472, 1702, 1460  $\text{cm}^{-1}$

<sup>13</sup>C RMN (TMS)  $\delta$ : 121.023, 122.092, 123.747, 130.133, 132.667, 140.825, 181.206 ppm.

E.M. (IE) 220 m/z. (M<sup>+</sup>, 29%); 118 (100%)



**DATOS ESTADISTICOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE *Artemia salina*. Leach**

COMPUESTO		CHI <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (μMOL)	G	LSC	LIC
ALBENDAZOL	PBS	1.6393	86.16	0.2102	62.4361	11.9991
	SS	0.9514	13720	1.1804	0	166.1384
1	PBS	24220	2625	1012	84327	37727
	SS	15769	1042	1419	278757	175230
2	PBS	11.3585	23.06	0.1239	8.1318	4.0986
	SS	2.0366	304.8	0.5784	2068851.0	16.1384
3	PBS	0.3364	12.83	0.1012	8.4327	3.7727
	SS	0.1843	33.64	0.1419	27.8757	17.5230
4	PBS	0.0053	1.958	0.2625	1.0383	0.1265
	SS	6.9314	7.73	0.0900	3.0740	1.5017
5	PBS	14854	232	1412	92860	32269
	SS	7035	328	1009	106384	53246
6	PBS	7.2146	22.83	0.0895	7.8146	4.3760
	SS	15.6775	42.0	0.1546	16.6939	7.9868
7	PBS	1.4020	20.9	0.1087	8.5601	3.6211
	SS	5.5944	30.5	0.1029	11.9631	5.6149
8	PBS	3.7042	4.081	0.1935	2.1501	0.4363
	SS	0.1155	13.15	0.4784	15.4637	1.2302
9	PBS	1108	--	222422	13136	341703
10	PBS	0.0026	128.22	0.6233	513.9532	15.2445
11	PBS	0.0038	165.96	0.8465	4393805	17.7478
12	PBS	0.7681	440.8	0.8197	7,321e+12	24.7761

Comp. 1 N-fenil-N'etoxicarboniltioureido

Comp. 2 N-(3-clorofenil)-N'etoxicarboniltioureido

Comp. 3 N-(4-clorofenil)-N'etoxicarboniltioureido

Comp. 4 N-(3,4 diclorofenil)-N'etoxicarboniltioureido

Comp. 5 N-fenil-N'etoxicarboniltioureido

Comp. 6 N-(3-clorofenil)-N'etoxicarboniltioureido

Comp. 7 N-(4-clorofenil)-N'etoxicarboniltioureido

Comp. 8 N-(3,4diclorofenil)-N'etoxicarbonil tioureido

Comp. 9 N-fenil tiourea.

Comp. 10 N-(3clorofenil)tiourea

Comp. 11 N-(4 clorofenil)tiourea

Comp. 12 N-(3,4 diclorofenil)tiourea

LIC Limite inferior confiable

LSC Limite superior confiable

CHI<sup>2</sup> Valor de Chi<sup>2</sup> obtenido en la prueba biológica por compuesto

G Desviación estándar



**TABLA RESULTADOS EXPERIMENTALES.**

COMPUESTO	MEDIO	CL50 ( $\mu\text{mol/mL}$ )	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	SOLUBILIDAD ( $\mu\text{mol/mL}$ )	COEF. PARTICION
1	PBS	2625	7.2	7.1	14116	-154
	SS	1042	9.0	7.1	13955	-154
2	PBS	23.06	7.2	7.2	14.55	-0.83
	SS	304.8	9.0	8.3	13.91	-0.83
3	PBS	12.83	7.2	7.1	22.5	-0.83
	SS	33.64	9.0	7.1	21.75	-0.83
4	PBS	1.958	7.2	7.1	73.93	0.11
	SS	7.73	9.0	6.9	24.92	0.11
5	PBS	232	7.2	7.1	2750	-65
	SS	328	9.0	7.1	2497	-65
6	PBS	22.83	7.2	7.1	10.34	0.06
	SS	42.0	9.0	7.1	3.376	0.06
7	PBS	20.9	7.2	7.1	17.11	0.06
	SS	30.5	9.0	7.1	16.93	0.06
8	PBS	4.08	7.2	7.1	19.11	0.77
	SS	13.15	9.0	7.1	18.55	0.77
9	PBS	N.D.	7.2	7.2	5924	-90
10	PBS	128.22	7.2	7.2	69.27	-0.19
11	PBS	165.96	7.2	7.2	24.67	-0.19
12	PBS	440.80	7.2	7.2	53.84	0.52

- Comp. 1 N-fenil-N'-metoxicarboniltioureido      Comp. 7 N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido  
 Comp. 2 N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido      Comp. 8 N-(3,4-diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido  
 Comp. 3 N-(4-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido      Comp. 9 N-feniltioureia.  
 Comp. 4 N-(3,4- diclorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido      Comp. 10 N-(3-clorofenil)tioureia  
 Comp. 5 N-fenil-N'-etoxicarboniltioureido      Comp. 11 N-(4-clorofenil)tioureia  
 Comp. 6 N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido      Comp. 12 N-(3,4- diclorofenil)tioureia

SS: Solución Salina  
 pH<sub>1</sub>: antes de agregar el compuesto

PBS: Solución salina con buffer de fosfatos  
 pH<sub>2</sub>: después de agregar el compuesto.

RESULTADOS

Metronidazol.											
SOLUCION PBS						SOLUCION SALINA					
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	pH1	pH2	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	pH1	pH2
1(5.8)	10	10	10	7.2	6.9	1(5.8)	10	10	10	9	8.3
5(22)	10	10	10	7.2	6.9	5(22)	10	10	10	9	8.3
10(58)	10	10	10	7.2	7.0	10(58)	10	10	10	9	8.4
25(146)	10	10	10	7.2	7.0	25(146)	10	10	10	9	8.5
50(292)	10	10	9	7.2	7.0	50(292)	10	10	9	9	8.6
100(580)	10	9	10	7.2	7.0	100(580)	10	10	10	9	8.6
1000(5800)	0	0	0	7.2	7.0	1000(5800)	10	9	9	9	8.6
BLANCO	10	10	10	7.2	6.9	BLANCO	10	10	10	9	8.3

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*

E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*

E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
pH<sub>2</sub> después de 24 horas

Albendazol.													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2
1(3.7)	9	8	9	86.16	7.2	6.9	1(3.7)	9	8	7	13720	9	8.4
5(18.8)	7	9	7	86.16	7.2	6.9	5(18.8)	8	10	8	13720	9	8.4
25(94.3)	3	4	5	86.16	7.2	6.9	25(94.3)	8	9	9	13720	9	8.4
50(188.6)	4	5	4	86.16	7.2	6.9	50(188.6)	6	8	8	13720	9	8.4
BLANCO	10	10	10	—	7.2	6.9	BLANCO	10	10	10	—	9	8.3

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*

E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*

E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N-fenil - N'-metoxicarboniltioureido.													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>
0.5(2.3)	9	9	10	2625	7.2	7.1	0.5(2.3)	10	10	10	1042	9	6.6
1(4.7)	8	9	8	2625	7.2	7.1	1(4.7)	10	10	10	1042	9	6.7
5(23)	5	6	4	2625	7.2	7.1	5(23)	10	9	9	1042	9	6.9
10(47)	5	5	4	2625	7.2	7.1	10(47)	8	7	9	1042	9	6.9
15(71)	3	2	1	2625	7.2	7.1	15(71)	7	7	5	1042	9	7.0
25(119)	3	3	3	2625	7.2	7.1	25(119)	6	7	3	1042	9	7.1
50(238)	1	0	2	2625	7.2	7.1	50(238)	1	1	2	1042	9	7.1
BLANCO	10	10	10	--	7.2	7.1	BLANCO	10	10	10	--	9	7.1

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido.													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>
0.5(2.04)	10	10	9	23.06	7.2	7.2	0.5(2.04)	9	8	7	304.8	9	8.2
1(4.09)	10	9	9	23.06	7.2	7.2	1(4.09)	10	10	6	304.8	9	8.2
5(20.5 )	7	7	9	23.06	7.2	7.2	5(20.5 )	7	9	8	304.8	9	8.3
10(40.9)	1	2	1	23.06	7.2	7.2	10(40.9)	4	3	4	304.8	9	8.3
100(409)	0	0	0	23.06	7.2	7.2	100(409.3)	1	0	0	304.8	9	8.3
1000(4098)	0	0	0	23.06	7.2	7.2	1000(4098)	0	0	0	304.8	9	8.3
BLANCO	10	10	10	--	7.2	6.9	BLANCO	10	10	10	--	9	8.3

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N-(4-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido													
SOLUCIÓN PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2
0.5(2.04)	9	8	8	12.83	7.2	7.1	0.5(2.04)	9	10	10	33.64	9	6.9
1(4.09)	7	9	6	12.83	7.2	7.1	1(4.09)	9	9	10	33.64	9	7.0
5(20.5)	4	3	5	12.83	7.2	7.1	5(20.5)	7	9	9	33.64	9	7.0
10(40.9)	0	0	1	12.83	7.2	7.1	10(40.9)	6	4	2	33.64	9	7.1
15(61.4)	0	0	0	12.83	7.2	7.1	15(61.4)	3	2	2	33.64	9	7.1
BLANCO	10	10	10	—	7.2	7.1	BLANCO	10	10	10	—	9	8.3

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido.													
SOLUCIÓN PBS							SOLUCION SALINA						
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2
0.5(1.7)	9	3	4	1.958	7.2	7.2	0.5(1.7)	10	7	9	7.73	9	6.9
1(3.5)	4	3	4	1.958	7.2	7.2	1(3.5)	7	7	8	7.73	9	6.9
5(17.9)	1	2	3	1.958	7.2	7.1	5(17.9)	2	4	3	7.73	9	6.9
10(35)	1	2	1	1.958	7.2	7.1	10(35)	2	2	3	7.73	9	6.9
100(359)	0	0	0	1.958	7.2	7.1	100(359)	2	0	1	7.73	9	6.9
1000(3590)	0	0	0	1.958	7.2	7.0	1000(3590)	0	0	0	7.73	9	6.9
BLANCO	10	10	10	—	7.2	7.2	BLANCO	10	10	10	—	9	6.9

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N-Fenil-N'-etoxicarboniltioureido.													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>
0.5(2.23)	9	9	9	232	7.2	7.1	0.5(2.23)	10	10	10	328	9	7.1
1(4.46)	7	7	7	232	7.2	7.1	1(4.46)	9	9	10	328	9	7.1
5(22.3)	5	6	5	232	7.2	7.1	5(22.3)	6	6	5	328	9	7.1
10(44.6)	4	4	4	232	7.2	7.1	10(44.6)	4	4	4	328	9	7.1
15(66.9)	3	3	3	232	7.2	7.1	15(66.9)	4	3	3	328	9	7.1
BLANCO.	10	10	10	—	7.2	7.1	BLANCO.	10	10	10	—	9	7.1

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido.													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>
0.5(1.9)	10	9	10	22.83	7.2	7.0	0.5(1.9)	10	10	10	42	9	6.9
1(3.87)	9	9	10	22.83	7.2	7.1	1(3.87)	10	9	9	42	9	7.0
5(19.2)	7	7	7	22.83	7.2	7.1	5(19.2)	9	9	8	42	9	7.1
10(38.7)	4	3	4	22.83	7.2	7.1	10(38.7)	7	7	7	42	9	7.1
15(58.1)	1	0	0	22.83	7.2	7.1	15(58.1)	2	1	2	42	9	7.1
BLANCO	10	10	10	—	7.2	7.1	BLANCO	10	10	10	—	9	7.1

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido.													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>
0.5(1.9)	9	9	9	20.9	7.2	7.1	0.5(1.9)	10	10	10	30.5	9	6.9
1(3.87)	8	9	9	20.9	7.2	7.1	1(3.87)	9	9	8	30.5	9	7.1
5(19.2)	4	4	5	20.9	7.2	7.1	5(19.2)	8	8	7	30.5	9	7.1
10(38.7)	4	4	4	20.9	7.2	7.1	10(38.7)	4	3	3	30.5	9	7.1
15(58.1)	4	2	3	20.9	7.2	7.1	15(58.1)	3	3	4	30.5	9	7.1
BLANCO	10	10	10	—	7.2	7.1	BLANCO	10	10	10	—	9	7.1

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N-(3,4-diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido.													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>
0.5(1.7)	7	8	7	4.08	7.2	7.1	0.5(1.71)	7	7	9	13.15	9	7.1
1(3.42)	4	4	4	4.08	7.2	7.1	1(3.423)	5	5	5	13.15	9	7.1
5(17.1)	3	2	3	4.08	7.2	7.1	5(17.1)	5	4	5	13.15	9	7.1
10(34.2)	3	2	2	4.08	7.2	7.1	10(34.2)	4	3	4	13.15	9	7.1
15(51.3)	2	2	2	4.08	7.2	7.1	15(51.3)	4	3	3	13.15	9	7.1
BLANCO	10	10	10	—	7.2	7.1	BLANCO	10	10	10	—	9	7.1

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N-Feniltiourea.													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2
0.5(3.28)	10	10	10	nd	7.2	7.2	0.5(3.28)	10	10	10	nd	9	7.2
1(6.57)	10	10	10	nd	7.2	7.2	1(6.57)	10	10	10	nd	9	7.2
5(32.8)	9	10	10	nd	7.2	7.2	5(32.8)	10	10	10	nd	9	7.2
10(65.7)	10	10	8	nd	7.2	7.2	10(65.7)	10	10	10	nd	9	7.2
15(98.6)	8	10	9	nd	7.2	7.2	15(98.6)	10	9	9	nd	9	7.2
BLANCO	10	10	10	--	7.2	7.2	BLANCO	10	10	10	--	9	7.2

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N-(3-clorofenil)tiourea.													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2
0.5 (2.68)	10	10	10	128.22	7.2	7.2	0.5 (2.68)	10	10	10	nd	9	7.2
1(5.37)	10	10	10	128.22	7.2	7.2	1(5.37)	10	10	10	nd	9	7.2
5(26.8)	10	8	10	128.22	7.2	7.2	5(26.8)	10	10	10	nd	9	7.2
10(53.7)	8	8	8	128.22	7.2	7.2	10(53.7)	10	10	10	nd	9	7.2
15(80.6)	6	7	7	128.22	7.2	7.2	15(80.6)	9	10	10	nd	9	7.2
BLANCO.	10	10	10	--	7.2	7.2	BLANCO.	10	10	10	--	9	7.2

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

RESULTADOS

N-(4-clorofenil)tiourea.													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2
0.5(2.68)	10	10	10	165.9	7.2	7.2	0.5(2.68)	10	10	10	nd	9	7.2
1(5.37)	10	10	10	165.9	7.2	7.2	1(5.37)	10	10	10	nd	9	7.2
5(26.8)	9	10	10	165.9	7.2	7.2	5(26.8)	10	10	10	nd	9	7.2
10(53.7)	8	9	9	165.9	7.2	7.2	10(53.7)	10	10	10	nd	9	7.2
15(80.6)	8	8	7	165.9	7.2	7.2	15(80.6)	9	10	10	nd	9	7.2
BLANCO	10	10	10	–	7.2	7.2	BLANCO	10	10	10	–	9	7.2

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas

N - (3,4 -diclorofenil)tiourea													
SOLUCION PBS							SOLUCION SALINA						
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2	ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	E1	E2	E3	CL <sub>50</sub> $\mu\text{mol/mL}$	pH1	pH2
0.5(2.27)	10	10	10	440.8	7.2	7.2	0.5(2.27)	10	10	10	nd	9	7.2
1(4.54)	9	10	9	440.8	7.2	7.2	1(4.54)	10	10	10	nd	9	7.2
5(22.7)	9	9	9	440.8	7.2	7.2	5(22.7)	10	10	10	nd	9	7.2
10(45.4)	8	8	7	440.8	7.2	7.2	10(45.4)	9	10	10	nd	9	7.2
15(68.1)	7	7	8	440.8	7.2	7.2	15(68.1)	9	9	9	nd	9	7.2
BLANCO	10	10	10	–	7.2	7.2	BLANCO	10	10	10	–	9	7.2

E1.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 1 con *Artemia salina*  
 E2.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 2 con *Artemia salina*  
 E3.Artemias vivas después de 24 horas.Repetición 3 con *Artemia salina*

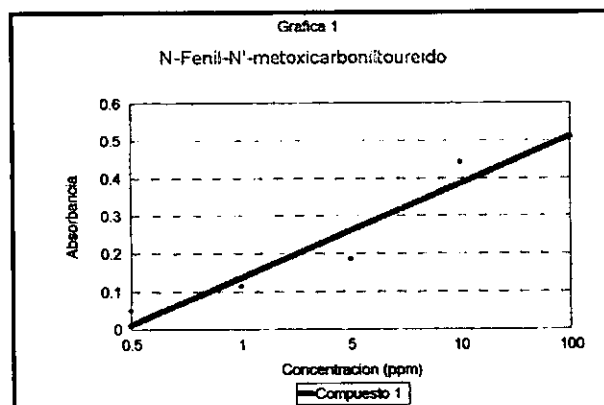
pH<sub>1</sub> antes de agregar el compuesto  
 pH<sub>2</sub> después de 24 horas



## CURVAS PATRON

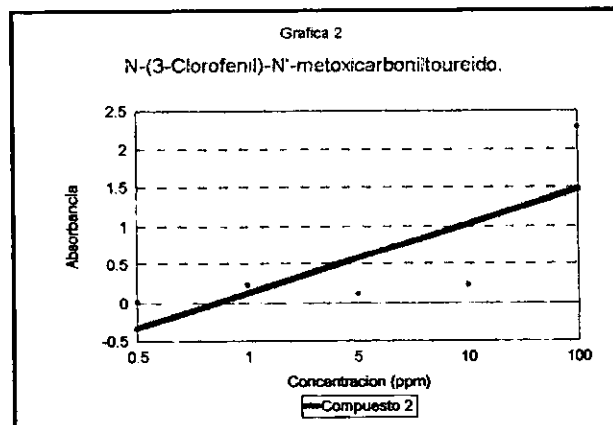
N-Fenil -N'-metoxicarboniltiureido $\lambda=290.5 \text{ nm}$	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.*
0.5(2.38)	0.0487
1(4.76)	0.1133
5(23.8)	0.1855
10(47.6)	0.4419
100(476.19)	2.2455
	$r=0.996099$
	$m=4.56904$
	$b=8.33 \times 10^{-2}$

\*Abs. Absorbancia.



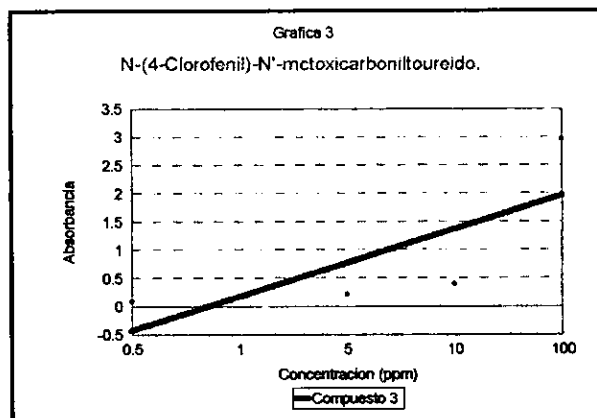
N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido $\lambda=295 \text{ nm}$	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.*
0.5(2.04)	0.0105
1(4.09)	0.0230
5(20.5)	0.1147
10(40.9)	0.2301
100(409.83)	2.2802
	$r=0.999999$
	$m=5.5628$
	$b=5.957 \times 10^{-4}$

\*Abs. Absorbancia.



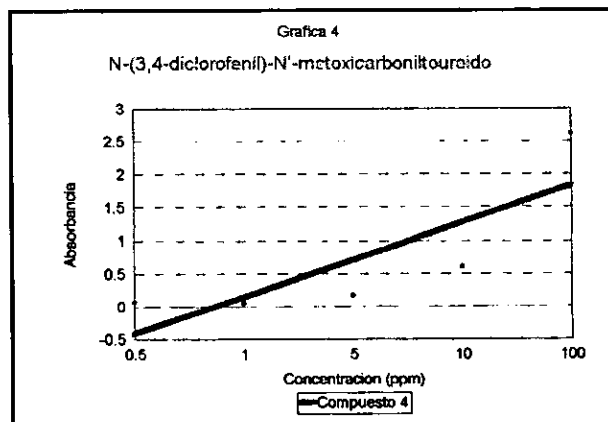
N-(4-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido $\lambda=295\text{nm}$	
ppm (mmol/mL)	Abs. *
0.5(2.04)	0.0850
1(4.09)	0.1702
5(20.5)	0.2062
10(40.9)	0.3912
100(409.83)	2.9641
	$r=0.99917$
	$m=7.0568$
	$b=7.4793 \times 10^{-2}$

\*Abs. Absorbancia.



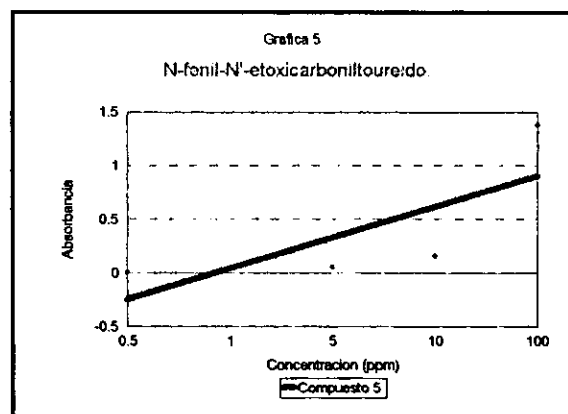
N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido $\lambda = 290 \text{ nm}$	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.*
0.5(1.79)	0.0068
1(3.59)	0.0507
5(17.9)	0.1724
10(35.9)	0.6005
100(359.71)	2.6128
	$r=0.99673$
	$m=7.19705$
	$b=4.7653 \times 10^{-2}$

\*Abs. Absorbancia.



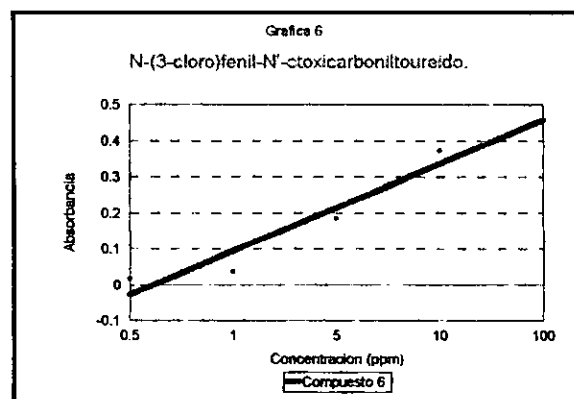
N- Fenil - N'-etoxicarboniltioureido $\lambda=312$ nm	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.*
0.5(2.23)	0.0060
1(4.46)	0.0063
5(22.3)	0.0544
10(44.6)	0.1583
100(446.42)	1.3822
	$r=0.99977$
	$m=3.1012$
	$b=-9.09 \times 10^{-4}$

\*Abs. Absorbancia.



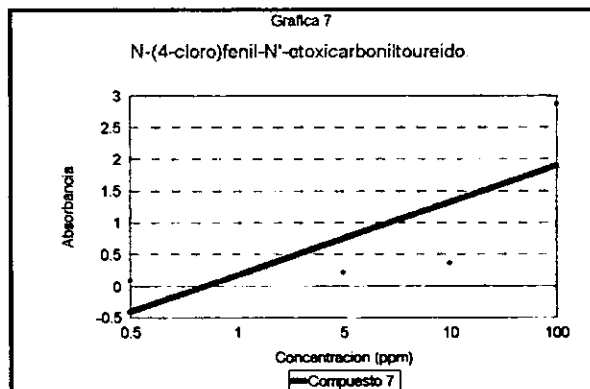
N -(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido $\lambda=355.5$ nm	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.*
0.5(1.93)	0.0186
1(3.87)	0.0374
5(19.3)	0.1859
10(38.7)	0.3724
100(387.59)	2.9015
	$r=0.9996$
	$m=7.4331$
	$b=2.675 \times 10^{-2}$

\*Abs. Absorbancia.



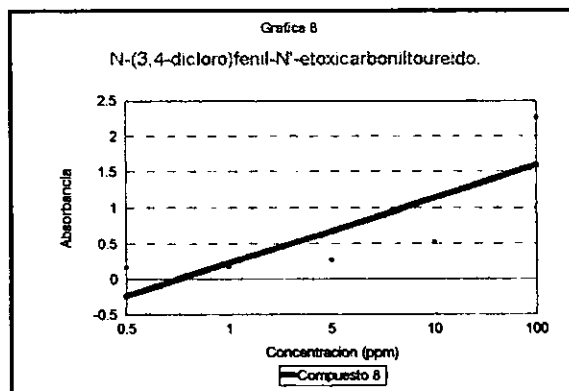
N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido $\lambda=355\text{ nm}$	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.*
0.5(1.93)	0.0911
1(3.87)	0.1771
5(19.3)	0.2169
10(38.7)	0.3631
100(387.59)	2.8706
	R=0.99909
	m=7.2103
	b=7.73X10-2

\*Abs. Absorbancia.



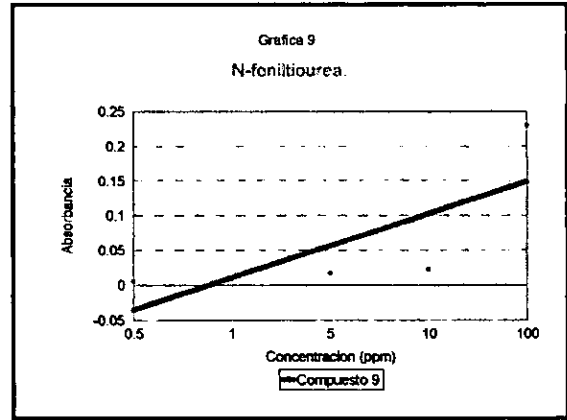
N-(3,4-diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido. $\lambda=312\text{ nm}$	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.*
0.5(1.71)	0.1555
1(3.42)	0.1662
5(17.1)	0.2514
10(34.2)	0.5189
100(342.46)	2.2601
	r=0.99346
	m=6.0903
	b=0.18454

\*Abs. Absorbancia.



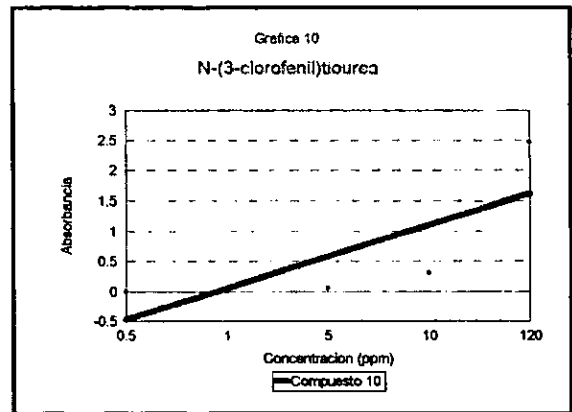
N-Feniltiourea $\lambda=311\text{ nm}$	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.*
0.5(3.28)	0.0050
1(6.57)	0.0084
5(32.8)	0.0167
10(65.7)	0.0222
100(657.89)	0.2292
	$r=0.99954$
	$m=0.3434$
	$b=3.04 \times 10^{-3}$

\*Abs. Absorbancia.



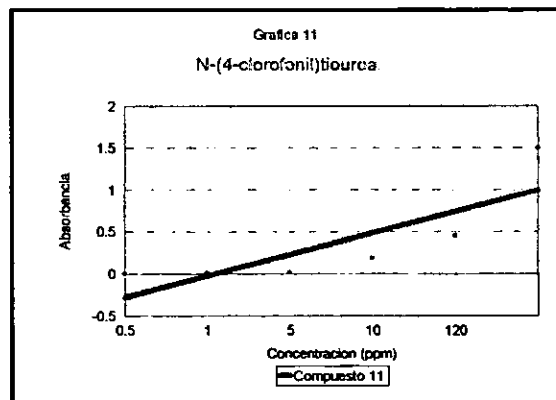
N - (3-clorofenil)tiourea $\lambda=289\text{ nm}$	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.*
0.5(2.68)	0.0023
1(5.37)	0.0103
5(26.8)	0.0590
10(53.7)	0.3060
120(645.1)	2.4698
	$r=0.9988$
	$m=3.8234$
	$b=9.153 \times 10^{-3}$

\*Abs. Absorbancia.



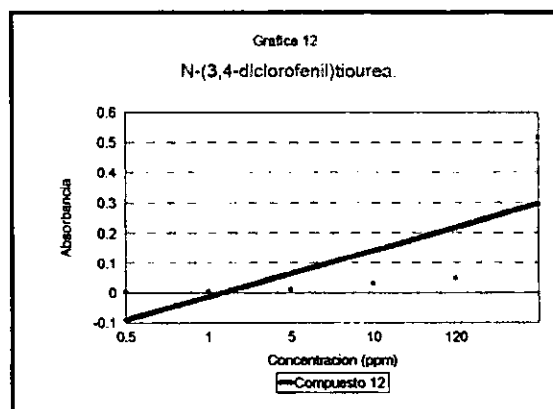
N-(4-clorofenil)tiourea $\lambda=289\text{nm}$	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.
0.5(2.68)	0.0068
1(5.37)	0.0135
5(26.8)	0.1855
10(53.7)	0.4497
120(645.1)	1.4952
	$r=0.9751$
	$m=2.2139$
	$b=8.774 \times 10^{-2}$

Abs. Absorbancia.



N-(3,4-diclorofenil)tiourea $\lambda=311.5\text{ nm}$	
ppm ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.*
0.5(2.27)	0.0043
1(4.54)	0.0107
5(22.7)	0.0302
10(45.4)	0.0477
100(454.54)	0.5153
	$r=0.99986$
	$m=1.1290$
	$b=1.71 \times 10^{-3}$

\*Abs. Absorbancia.



**TABLAS DE CONCENTRACION ENCONTRADA DESPUES DE 24 HORAS DE EXPOSICION DE LOS COMPUESTOS EN *Artemia salina*.Leach.**

N-Fenil-N'-metoxicarboniltiureido					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5(2.38)	0.0210	4.59	0.5(2.38)	0.0205	4.48
1 (4.76)	0.0450	9.84	1 (4.76)	0.0431	9.43
5 (23.8)	0.0980	21.4	5 (23.8)	0.0931	20.37
10 (47.6)	0.1134	24.8	10 (47.6)	0.1049	22.95
15 (71)	0.2130	46.6	15 (71)	0.2092	45.78
25 (119)	0.3310	72.44	25 (119)	0.3251	71.15
50 (238)	0.6402	141.16	50 (238)	0.6376	139.55

N-(3-Clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido.					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5 (2.04)	0	0	0.5 (2.04)	0	0
1 (4.09)	0.0009	0.1275	1 (4.09)	0	0
5 (20.4)	0.0148	2.097	5 (20.4)	0.0097	1.374
10 (40.9)	0.0642	9.097	10 (40.9)	0.0523	7.411
100 (409.83)	0.1027	14.55	100 (409.83)	0.0982	13.91

N-(4-Clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5 (2.04)	0	0	0.5 (2.04)	0	0
1 (4.09)	0.0171	2.963	1 (4.09)	0.0153	2.639
5 (20.4)	0.0320	5.641	5 (20.4)	0.0856	15.28
10 (40.9)	0.1715	30.72	10 (40.9)	0.1017	18.17
100 (409.83)	0.1866	33.43	100 (409.83)	0.1417	25.36
1000 (4098.3)	0.1260	22.54	1000 (4098.3)	0.1216	21.75

N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido.					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5(1.79)	0.0262	3.640	0.5(1.79)	0	0
1 (3.59)	0.0458	6.363	1 (3.59)	0.0436	6.058
5 (17.9)	0.0898	12.47	5 (17.9)	0.0866	12.03
10 (35.9)	0.1270	17.64	10 (35.9)	0.1115	15.49
100 (359)	0.2893	40.19	100 (359)	0.1544	21.45
1000 (3590)	0.5321	73.93	1000 (3590)	0.1794	24.92



N-Fenil-N'-etoxicarboniltiureido					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5 (2.23)	0	0	0.5 (2.23)	0	0
1 (4.46)	0	0	1 (4.46)	0	0
5 (22.3)	0	0	5 (22.3)	0	0
10 (44.6)	104	3353	10 (44.6)	112	3611
15 (66.9)	853	2750	15 (66.9)	763	2497

N-(3-Clorofenil)-N'-etoxicarboniltiureido					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5 (1.9)	0.0171	2.300	0.5 (1.9)	0	0
1 (3.8)	0.0250	3.363	1 (3.8)	0	0
5 (19)	0.0251	3.376	5 (19)	0	0
10 (38)	0.0355	4.776	10 (38)	0	0
15 (58)	0.0769	10.34	15 (58)	0.0251	3.376

N-(4-Clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5 (1.9)	0.0052	0.7211	0.5 (1.9)	0.0031	0.4299
1 (3.8)	0.0177	2.454	1 (3.8)	0.0170	2.357
5 (19)	0.0240	3.328	5 (19)	0.0217	3.009
10 (38)	0.0544	7.544	10 (38)	0.0502	6.962
15 (58)	0.1234	17.11	15 (58)	0.1221	16.93

N-(3,4- diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido.					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5 (1.71)	0	0	0.5 (1.71)	0	0
1 (3.42)	0	0	1 (3.42)	0	0
5 (17.1)	0	0	5 (17.1)	0	0
10 (34.2)	0.0386	3.337	10 (34.2)	0.0276	4.531
15 (51.3)	0.1164	19.11	15 (51.3)	0.1130	18.55

N-Feniltiurea.					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5 (3.28)	0.0010	2.911	0.5 (3.28)	0	0
1 (6.57)	0.0015	4.367	1 (6.57)	0	0
5 (32.8)	0.0038	2.169	5 (32.8)	0	0
10 (65.7)	0.0115	24.59	10 (65.7)	0.0098	19.63
15 (98.6)	0.0234	59.24	15 (98.6)	0.0110	23.13

N - (3-clorofenil)tiurea.					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5 (2..68)	0.0006	0.2710	0.5 (2..68)	0.0020	0.9033
1 (5.37)	0.0043	1.942	1 (5.37)	0.0096	4.336
5 (26.8)	0.0458	20.68	5 (26.8)	0.0542	6.474
10 (53.7)	0.1876	44.20	10 (53.7)	0.1193	14.25
15 (80.6)	0.2411	69.27	15 (80.6)	0.1910	46.64

RESULTADOS

N - (4-clorofenil)tiourea.					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5 (2.68)	0.0004	0.1046	0.5 (2.68)	0.0281	4.955
1 (5.37)	0.0067	1.752	1 (5.37)	0.0300	5.452
5 (26.8)	0.0184	2.418	5 (26.8)	0.0586	12.93
10 (53.7)	0.0985	23.3	10 (53.7)	0.1425	34.87
15 (80.6)	0.1035	24.67	15 (80.6)	0.1946	48.50

N-(3,4-diclorofenil)tiourea.					
Solución PBS			Solución Salina		
ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )	ppm( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs.	Concentración encontrada ( $\mu\text{mol/mL}$ )
0.5 (2.27)	0.0004	0.3541	0.5 (2.27)	0.0003	0.2657
1 (4.54)	0.0006	0.5314	1 (4.54)	0.0004	0.3541
5 (22.7)	0.0036	3.188	5 (22.7)	0.0045	3.985
10 (45.4)	0.0298	26.39	10 (45.4)	0.0088	7793
15 (68.1)	0.0608	53.84	15 (68.1)	0.0156	13.81

## INSTRUMENTACION.

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

Los espectros de resonancia magnética protónica ( $^1\text{H}$  RMN) y de resonancia de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$  RMN) se determinaron en un equipo Varian EM-390 usando Dimetil sulfóxido o Cloroformo deuterados como disolventes y Tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos ( $\gamma$ ) se dan en ppm.

Los espectros de masas se registraron en un equipo QCQ Finnigan mat, utilizando impacto electrónico e introducción directa de la muestra y los equipos acoplados Cromatografo de gases Hewlett Packard 5890 Series II y Espectrometro de masas JMSSX102A, utilizando impacto electrónico con acomplamiento de masas. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Buchi Mod. 530 utilizando capilares de vidrio.

Para concentrar se empleó un rotaevaporador marca Buchi REIII, con vacío generado por una bomba Felisa Mos. 1600 ajustada a 55 mm de Hg y condensador de hielo seco.

Los espectros de absorbancia y la cuantificación de la misma se llevó a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu 1600, utilizando celdas de metracrilato (Aldrich) de 1 cm de longitud y de 1.5 mL de capacidad.

Para las cromatografías en capa fina se utilizaron placas de vidrio recubiertas con gel de sílice  $\text{GF}_{254}$  (Merck) con indicador fluorescente.

## **8.0 DISCUSION DE RESULTADOS**

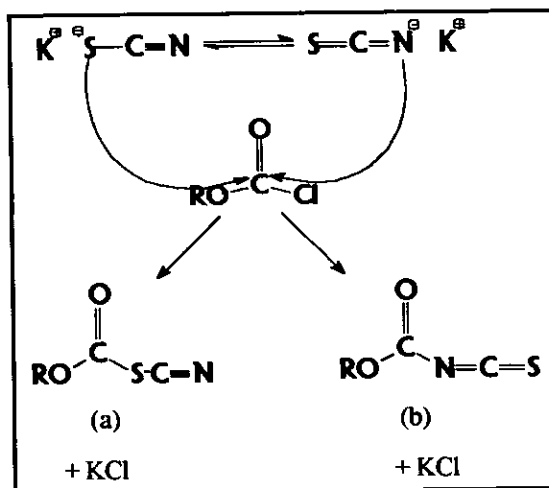
## DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### A. PARTE QUÍMICA.

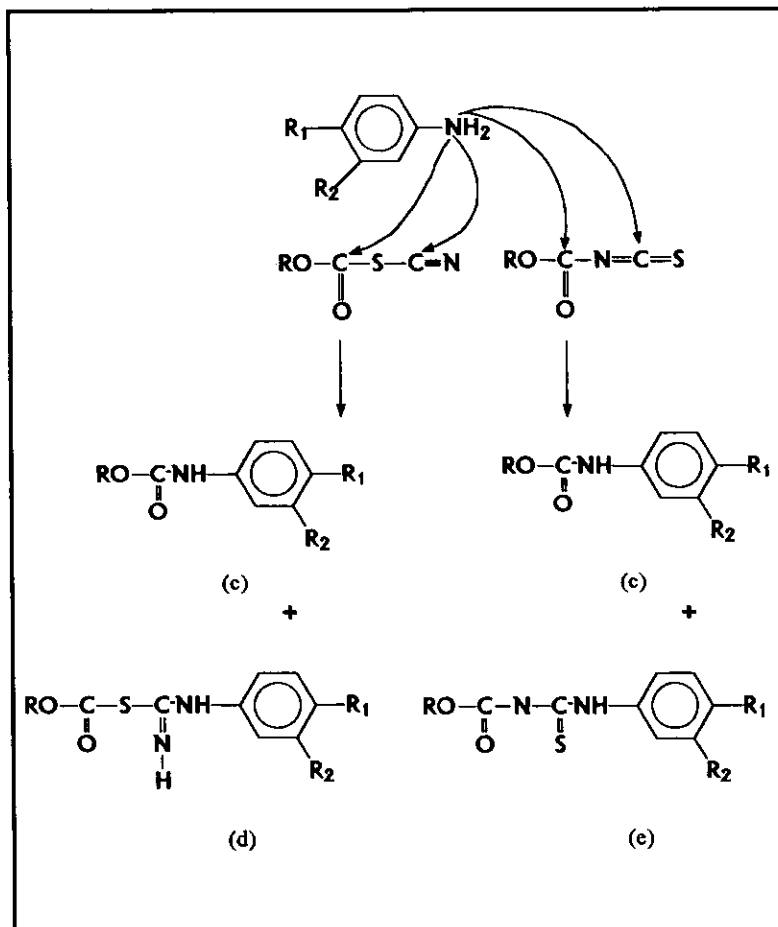
#### ELABORACIÓN DE TIUREIDOS.

Con la intención de encontrar moléculas cuya síntesis no implicara la realización de muchos pasos, con materias primas de bajo costo, y que en el futuro pudiesen presentar alguna actividad biológica de interés antiparasitario, se han preparado compuestos del tipo tioureido N,N'-disustituidos y tioureas N-sustituidas en el presente proyecto de tesis.

Para la preparación de los compuestos: N-fenil-N'-metoxicarboniltioureido(1), N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido(2), N-(4-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido (3), N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido (4), N-fenil-N'-etoxicarboniltioureido (5), N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido (6), N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido (7), N-(3,4-diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido (8), N-feniltiourea (9), N-(3-clorofenil)tiourea (10), N-(4-clorofenil)tiourea (11), N-(3,4-diclorofenil)tiourea (12), se prosiguió un procedimiento general de trabajo descrito por Walchshofer. <sup>(18)</sup> En primer lugar, el tiocianato de potasio se hizo reaccionar mediante una sustitución nucleofílica a grupo carbonilo, con el cloroformiato correspondiente. En este caso, el nucleófilo fue el tiocianato y el electrófilo el carbonilo del cloroformiato. Por la naturaleza bidentada del tiocianato cabría esperar una mezcla de dos productos, el metoxicarboniltiociano (a) y el metoxicarbonilisotiociano (b).



Tanto en los trabajos previamente publicados, como en el nuestro, no se procedió a separar esta mezcla de compuestos ( a y b ), para proseguir con el siguiente paso de reacción, el cual consiste en adicionar la anilina correspondiente a la mezcla anterior. En este segundo paso, el grupo amino se adicionó nucleofílicamente a la especie electrofílica. Por las características mencionadas en el primer paso, se esperaba obtener la siguiente mezcla de productos:



En una publicación de nuestro grupo (<sup>15</sup>), donde se utilizó acetona anhidra como disolvente de la reacción, se obtenía la mezcla de productos anteriormente citado ( c, d y e), lo cual mermaba el rendimiento del producto principal, el tioureido N, N'-disustituido (e). En el presente trabajo de tesis, se decidió cambiar el disolvente acetona (constante dieléctrica 20.7) por acetonitrilo (constante dieléctrica 3.88). Con este cambio, cuando la reacción se llevó a cabo, el seguimiento en la



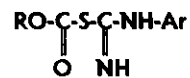
cromatoplaça, solo mostraba, para todos los casos, un solo producto de reacción. La suspensión fue separada por filtración. El filtrado, se concentró evaporando todo el disolvente con la ayuda del rotaevaporador, obteniéndose así un sólido de color amarillo. Al hacer esto se percibía un olor muy picante, el cual se eliminaba al lavar con una solución al 3% de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). El sólido se lavó después con agua destilada hasta pH neutro. Se dejó secar el sólido durante una noche. Se hicieron pruebas de solubilidad hasta encontrar el disolvente ideal, en el cual se recrystalizó la totalidad del sólido obtenido.

La solución de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) con la cual se hicieron los lavados se veía amarilla, por lo que se hicieron 3 extracciones con acetato de etilo, para reobtener el producto que se hubiera disuelto en la solución de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Se juntó la fase orgánica (acetato de etilo) después de cada una de las extracciones y se secó con sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro). Se filtró y posteriormente concentró en el rotaevaporador con lo cual se obtuvo un sólido amarillo el cual se recrystalizó del disolvente correspondiente. Se hizo cromatografía en capa fina comparando la materia prima, el sólido obtenido de la extracción con acetato de etilo y el sólido obtenido al lavar con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, obteniendo el mismo R<sub>f</sub> para los sólidos probados y diferente R<sub>f</sub> para la materia prima.

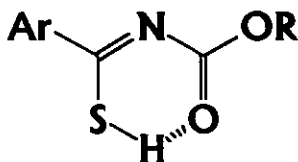
Los sólidos obtenidos como tioureidos N,N'-disustituídos presentaron bandas en el espectro de infrarrojo que los identificaron como tales (<sup>16</sup>).

Compuestos	Tioureido	Uretano
1-8	$\begin{array}{c} \text{S} \\    \\ -\text{C}-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{RO}-\text{C}-\text{NH}-\text{R} \end{array}$
	3150-3182 cm <sup>-1</sup>	1710-1730 cm <sup>-1</sup>
	1550-1582 cm <sup>-1</sup> (banda amida II)	1520-1553 cm <sup>-1</sup> (banda amida II)
	1240-1255 cm <sup>-1</sup> (C=S)	1030-1040 cm <sup>-1</sup> (C-O)

Los datos de IR no dan señales que pudiesen presentar compuestos del tipo: tales como  $1690\text{ cm}^{-1}$  para  $\text{RCOSR}$ , ó  $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$  para  $\text{C}=\text{NH}$ .



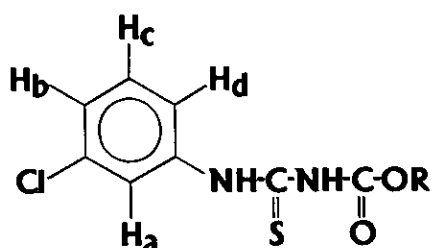
Asimismo, los datos obtenidos muestran que el tioureido  $\text{N},\text{N}'$ -disustituido no se encuentra como mezcla tautomérica tioceto-tioenol por la ausencia de la banda a  $2415\text{ cm}^{-1}$  (amplia) en todos los casos,<sup>(17)</sup>.



En relación al espectro de  $^1\text{H}$  RMN, todos los tioureidos  $\text{N},\text{N}'$ -disustituidos mostraron dos singuletes a campos bajos ( $> 8\text{ ppm}$ ) que desaparecen con  $\text{D}_2\text{O}$  y que se asignaron a los protones unidos a nitrógenos. los compuestos no halogenados (1 y 5) mostraron señales en los patrones aromáticos en forma compleja como era de esperarse en anillos monosustituidos con grupo protector-desprotector de protones aromáticos. Los desplazamientos fueron asignados para protones  $p>o,m$ , de campos bajos a campos altos.

En cuanto a los tioureidos monoclorados con sustitución en relación 1-4 (compuestos 3 y 7), los protones aromáticos presentaron el sistema  $\text{A}_2\text{X}_2$ , donde el átomo de cloro desprotege a los protones que están en posición orto con respecto a él, desplazando sus señales a campos menores; en tanto que el átomo de nitrógeno ejerce el efecto contrario.

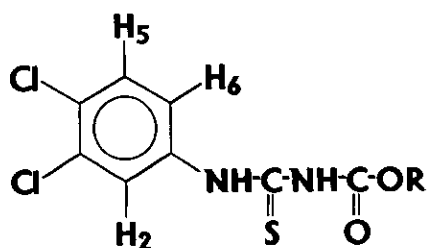
Cuando la disustitución fué 1-3 (compuestos 2 y 6), en ambos casos se presentó el sistema ABCD en los protones del anillo aromático y fueron asignados de la siguiente forma:

Compuesto 2 si R = CH<sub>3</sub>Compuesto 6 si R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

Compuesto	H <sub>a</sub>	H <sub>b</sub>	H <sub>c</sub>	H <sub>d</sub>	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
2	7.74	7.50	7.32	7.24	--	3.92
6	7.83	7.47	7.39	7.29	4.20	1.24

Los valores medios aquí presentados se asignaron en base a los patrones de acoplamiento que presentan los diferentes protones en el compuesto.

Los compuestos diclorados (compuestos 4 y 8) mostraron las señales de las porciones alquílicas como se esperaba. No obstante en la región de los anillos aromáticos, el sistema ABX esperado no se mostró con claridad. Para los compuestos 4 y 8 se presentó un doblete a 7.95 ppm que integra para un protón a H-5

Compuesto 4 si R = CH<sub>3</sub>Compuesto 8 si R = CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

Las señales para H-2 y H-6 se presentaron prácticamente juntas en 7.51 ppm, en una señal que integra para dos protones.

Los datos de  $^{13}\text{C}$  RMN para los compuestos concuerdan con lo esperado. El grupo carbonilo en todos los casos se presentó en 152-153 ppm; el grupo tiocarbonilo entre 177-178 ppm. Los carbonos  $\text{sp}^3$  correspondieron a la porción alquímica de los tioureidos N,N'-disustituídos. Los carbonos  $\text{sp}^2$  de los anillos aromáticos se asignaron en base a sus desplazamientos y a experimentos HETCOR.

Los espectros de masas por impacto electrónico presentaron en todos los casos el ion molecular ( $\text{M}^+$ ) acorde a lo esperado.

#### HIDRÓLISIS DE TIOUREIDOS

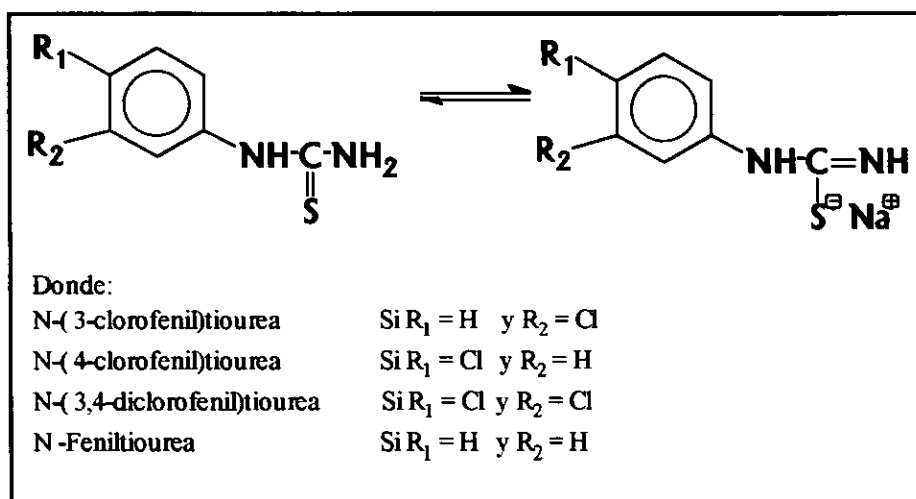
Se elaboró una solución de NaOH al 4% en metanol ( si el tioureido a hidrolizar era metoxilado) o etanol ( si el tioureido a hidrolizar era etoxilado).

Se colocó el tioureido a hidrolizar en un matraz al cual se le agregó acetona y se calentó en baño María hasta disolución. Una vez disuelto se agregó la solución de NaOH preparada, agitando y en baño María con esto se observa la formación de un precipitado blanco que aumentó con respecto al tiempo. Se hizo cromatografía en capa fina para observar que ya no hubiera materia prima, y posteriormente se filtró el contenido del matraz. A el filtrado se le colocó en un vaso de precipitados y se dejó cristalizar.

A el sólido obtenido se le adicionó agua y HCl hasta pH 3, obteniéndose así una solución la cual se le hicieron extracciones con acetato de etilo, para recuperar la tiocarbamida que hubiera podido estar atrapada en el sólido original. A la fase orgánica (acetato de etilo) se le adicionó sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua y se filtró para que quedara libre del sólido (sulfato de sodio). El filtrado se concentró en el rotaevaporador hasta sequedad. Se obtuvo un líquido viscoso el cual se dejó para que cristalizara.

Se hizo una cromatografía en capa fina con los cristales obtenidos del filtrado de la hidrólisis del tioureido y de los cristales del sólido obtenido de la extracción del sólido de la hidrólisis, obteniéndose el mismo  $R_f$  y el mismo punto de fusión, por lo cual, podemos asumir que era el mismo compuesto.

Las tioureas se obtuvieron con la hidrólisis de los tioureidos etoxilados debido a que al hidrolizar los tioureidos metoxilados se obtuvo una sal (La cual puede ser NaOH o  $\text{NaHCO}_3$  o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , la que tenía un p.f. mayor a  $250^\circ\text{C}$ ), la cual no podía separarse porque al tratarla con agua se disolvía también la Tiourea porque puede haber estado también en forma de sal (ver esquema) y los rendimientos de estas fué imposible determinarlo porque se estaba pesando las tioureas con la sal.



Al observar

la solubilidad de las tioureas podemos percatarnos que es insoluble en metanol frío y parcialmente soluble en metanol caliente, y el metanol era el disolvente en la primera hidrólisis, ya que el tioureido a hidrolizar era metoxilado, haciendo que al formarse la tiourea como producto se precipitara junto con las sales haciendo muy difícil su separación. Por el contrario, estos compuestos en etanol si son parcialmente solubles en etanol frío y solubles en etanol caliente haciendo que se pudiera recuperar más fácilmente la tiourea obtenida.

Al comparar los  $R_f$  obtenidos, se puede observar que el compuesto menos polar de los tioureidos es el N-Fenil-N'-etoxicarboniltioureido (comparado con sus tioureidos homólogos), y esto puede ser debido a que tiene en su cadena lateral 2 átomos de Carbono y no tiene Cloro en el anillo aromático que pueda contribuir a su polaridad. En cuanto al más polar es el N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido y esto puede estar debido a que en su cadena lateral es de 1 átomo de Carbono y tiene 2 Cloros en el anillo aromático que contribuyen a su polaridad. Cabe mencionar que estos  $R_f$  están tomados todos con la misma fase móvil (Hexano: Cloroformo: Acetato de Etilo 50:35:15).

En los compuestos con monosustitución con Cloro en el anillo aromático, tanto para los Tioureidos Metoxilados, para los Tioureidos Etoxilados y las Tioureas se observa que es más polar el compuesto con el Cloro en posición 4 (para) que en posición 3 (meta) y esto puede estar dado porque el momento dipolo en el compuesto con el Cloro en posición 4 es mayor al momento dipolo en el compuesto con el Cloro en posición 3.

En cuanto a las tioureas se observa que la menos polar es la N-Feniltiourea y la más polar la N-(3,4 diclorofenil)tiourea, siendo de las tioureas monocloradas en las posiciones 3 y 4 más polar la Tiourea con el Cloro en posición 4 probablemente por lo citado anteriormente.

Los rendimientos obtenidos son aceptables ya que están por arriba del 50 % viendo que los compuestos con mejor rendimiento en bruto fué el del N-(3 Clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido y el N-(4 clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido con un 99.4% y 94.21% respectivamente, así como para las tioureas N-(3 clorofenil)tiourea y N-(4 clorofenil)tiourea con 97.25% cada una.

Los compuestos con rendimiento más bajo fueron la N-(3,4 diclorofenil)tiourea y la N-Feniltiourea con 64.93% y 73.84% respectivamente.

Todos los compuestos son insolubles en Hexano en frío y en caliente. Muy solubles en Acetona en frío y en caliente y parcialmente solubles en Metanol y Etanol en frío y Muy solubles en estos disolventes en caliente. Al llevar a cabo la recristalización, se eligió uno de los disolventes Etanol o Metanol dependiendo de en cual quedaba un mejor cristal.

**B. PARTE BIOLÓGICA.****TIEMPO DE INCUBACIÓN Y MEDIOS EMPLEADOS.**

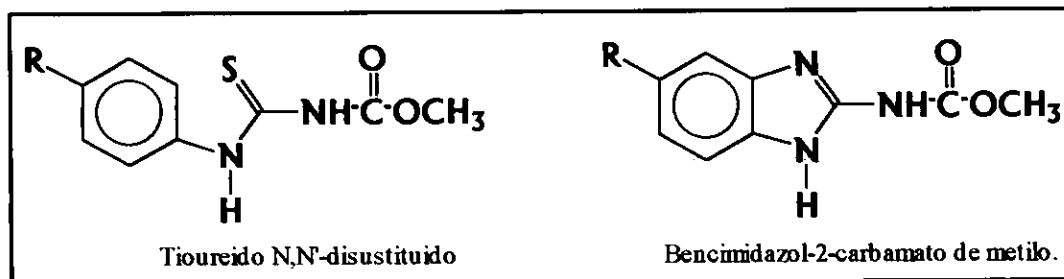
Al hacer nuestros ensayos con *Artemia salina*, no empleamos el medio salino comercial Instant Ocean<sup>R</sup>, sino dos medios salinos, los cuales son Solución Salina (SS) y Solución Salina con buffer de Fosfatos (PBS), con lo cual se quería ver el efecto de los mismos en los resultados del ensayo; estos medios fueron tomados de la referencia (3). Aunque en ambos medios, SS y PBS se observan las mismas tendencias, podemos observar, como se había propuesto, que un medio de cultivo puede proteger a los organismos de estudio (*Artemia salina*. Leach) de la actividad tóxica de un compuesto (3), este es el caso de la solución salina, medio en el cual, se obtuvieron unas CL<sub>50</sub> mayores a las CL<sub>50</sub> obtenidas en el medio de PBS para el mismo compuesto, por ejemplo para el caso del compuesto comercial Albendazol, la CL<sub>50</sub> obtenida en el medio de PBS fué de 86.16 µmol/mL y la CL<sub>50</sub> obtenida en el medio de SS fué de 13720 µmol/mL. Al graficar el porciento de organismos sobrevivientes contra la concentración para cada uno de los compuestos en ambos medios, podemos observar que para todos los compuestos se presenta un efecto protector del medio de solución salina, en el cual, a una misma concentración hay una menor mortalidad en este medio que en el de PBS (Ver gráficas 13-24 en el apéndice.). Esto, por un lado lo podemos explicar, debido a que en el medio de SS tenemos una concentración de sales mayor que en el medio de PBS, y debido a esto, los compuestos probados en este medio tenían una solubilidad menor que en el medio de PBS, así las artemias estaban expuestas a concentraciones reales menores de dichos compuestos que en el medio de PBS, por otro lado, tenemos que en el medio de SS, se tiene también una fuerza iónica de 0.5883 mol/L mayor a la fuerza iónica en el medio de PBS la cual es de 0.167766 mol/L.

En la referencia (3), se propone una reducción del tiempo de incubación, sin embargo observamos que la sobrevivencia de *Artemia salina* en los medios fué muy buena, tanto para SS como para PBS, ya que en los blancos empleados tuvimos a todos los organismos en estudio con vida hasta 48 horas después de haber concluido el ensayo.

En estos ensayos se monitoreó el pH inicial (antes de agregar el compuesto) y el pH final (después de agregar el compuesto), con lo cual observamos que este varía debido al cosolvente empleado para la disolución del compuesto a probar (cosolvente: DMSO), ya que esta variación también se presenta en el blanco empleado el cual carece de compuesto de prueba, sin embargo esta variación de pH no afecta nuestro ensayo, y esto lo podemos comprobar debido a que también se presenta en los blancos, en los cuales tenemos una sobrevivencia del 100% de los animales en estudio hasta 48 horas después de haberlo concluido.

### ALBENDAZOL Vs COMPUESTOS SINTETIZADOS.

Al comparar la  $CL_{50}$  del Albendazol en el medio de PBS con las  $CL_{50}$  de los compuestos sintetizados en este mismo medio, notamos que hay un aumento en la toxicidad de los compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 (tioureidos sintetizados) con respecto al Albendazol, con lo cual se tiene que el compuesto más tóxico es el 4 presentando una  $CL_{50}$  de  $1.95 \mu\text{mol/mL}$  en este medio, pero en el caso de los compuestos 9, 10, 11 y 12 (tioureas sintetizadas) hay un decremento en la toxicidad con respecto al Albendazol, en los cuales sus  $CL_{50}$  oscilan entre 128 y  $441 \mu\text{mol/mL}$ , esto está dado porque, para que se presente la toxicidad de manera contundente, debe estar presente una similitud con los bencimidazoles 2-carbamato de metilo, el cual muestra una actividad preferencialmente antiparasitaria de amplio espectro.





En el caso de comparar la  $CL_{50}$  del Albendazol en el medio de SS con las  $CL_{50}$  de los compuestos sintetizados en este mismo medio, podemos observar que todos los compuestos (tioureidos y tiocarbamidas) presentan una toxicidad mayor al compuesto de referencia, sin embargo menores con respecto a si mismos pero en el medio de PBS. Esto, como ya lo habíamos visto en el efecto del medio, se debe a que el Albendazol es muy insoluble en el medio de SS, con lo cual su  $CL_{50}$  se incrementa de manera significativa, haciendo que todos los compuestos sintetizados (que si son solubles en este medio, aunque en menor grado que en el medio de PBS) tengan una  $CL_{50}$  menor que el Albendazol. Por lo anteriormente citado, lógicamente la  $CL_{50}$  de los compuestos sintetizados en el medio de PBS es menor que la  $CL_{50}$  obtenida en el medio de SS. En este medio, el compuesto con mayor toxicidad es también el 4 con una  $CL_{50}$  de  $7.73 \mu\text{mol/mL}$ .

En este ensayo también se probó el compuesto comercial Metronidazol, del cual no se obtuvo su  $CL_{50}$  por no presentarse muerte de las artemias, debido a que su mecanismo de acción está dado por su grupo nitro, el cual actúa como aceptor de electrones, llevándose a cabo la reducción del mismo, desviando de esta manera los electrones de su vía normal productora de energía, y la *Artemia salina* no lleva a cabo la nitroreducción, motivo por el cual no resiente la toxicidad del compuesto y no muere. Este compuesto se empleó a manera de control negativo. Al poner el Metronidazol en los medios de ensayo este compuesto se precipita casi por completo por su insolubilidad en los medios.

## INTRODUCCIÓN DE CLORO.

Al comparar la molécula original sin cloro (compuestos 1, 5 y 9) y compararlos con los compuestos clorados análogos, podemos observar que el cloro tiene un efecto electrónico con propiedades de electrón atrayente. Este efecto electrónico tiene una marcada influencia en la toxicidad, haciendo que las moléculas cloradas tengan, en general, mayor toxicidad que sin sustitución por cloro.

### **POSICIÓN DEL CLORO.**

De los resultados obtenidos podemos observar que los compuestos 1,5 y 9 (tioureidos y tiocarbamidas sin sustitución por cloro), fueron los que presentaron menor toxicidad para el medio de PBS, al observar su solubilidad, estos compuestos muestran la máxima solubilidad en comparación de los compuestos clorados de su misma serie, sin embargo su bajo efecto puede estar relacionado con la densidad electrónica, ya que, al ir introduciendo cloros (el cual tiene un efecto inductivo de electrón atrayente, al igual que la tiourea), se incrementa la toxicidad del compuesto.

Al tomar como referencia a los compuestos 1, 5 y 9 podemos observar que en el caso de los tioureidos metoxilados y etoxilados, al introducir un cloro al anillo aromático, se incrementa la toxicidad, y tiene un efecto mayor en la misma la monosustitución por cloro en el compuesto en posición 4 que el compuesto que tiene el cloro en posición 3, esto se puede explicar debido a que la solubilidad para los compuestos con el cloro en posición 4 es mayor en ambos medios que para el caso de los compuestos con el cloro en posición 3, ya que el coeficiente de reparto en ambos casos es el mismo.

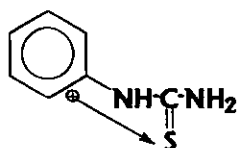
En el caso de las tioureas vemos que el resultado es al revés, teniendo una mayor toxicidad el compuesto 10 que el 11, y al observar sus respectivas solubilidades observamos que la solubilidad para el compuesto 10 ( en ambos medios) es por mucho mayor que la solubilidad registrada en el caso del compuesto 11, ya que también en este caso ambas tioureas tienen el mismo coeficiente de reparto.

Al comparar el efecto de la doble sustitución por cloro en el caso de el compuesto 8, con respecto a los compuestos 6 y 7, vemos que hay un aumento real en la toxicidad al aumentar la sustitución por cloro, en ambos medios (SS y PBS), podemos apreciar que el compuesto con la mayor toxicidad es el 8, y esto se puede explicar ya que, con respecto a la solubilidad el compuesto 8, presenta una concentración mayor en ambos medios que para el caso de los compuestos con monosustitución por cloro 6 y 7, a demás de que hay un mayor efecto inductivo en el anillo aromático, ocasionado por la doble sustitución por cloro y la tiourea sustituida unida también al anillo aromático.

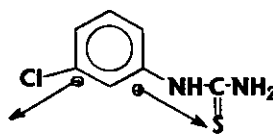
En el caso de los tioureidos metoxilados, la toxicidad con la introducción del segundo cloro también varía de manera considerable como en el caso de los tioureidos etoxilados, ya que observamos que el compuesto con la mayor toxicidad sigue siendo el compuesto diclorado 4, observándose esto tanto para el medio de SS como para el de PBS.

Con las tioureas podemos percatarnos de que el efecto de la sustitución por cloro es diferente, es decir, con respecto al compuesto 9, el hecho de no tener la estructura del metoxi o etoxicarbonilo, lo hace menos activo que los tioureidos disustituídos, sin embargo, al introducir un cloro como en el caso de los compuestos 10 y 11, vemos que el compuesto más tóxico de estos dos es el 10, y como ya lo habíamos explicado antes, esto, es debido a la solubilidad, ya que encontramos una concentración mayor en el medio en el caso del compuesto 10 que en el compuesto 11.

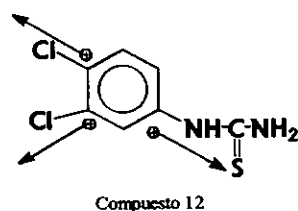
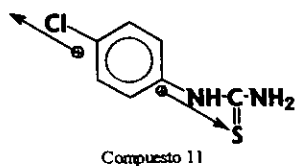
Al comparar el compuesto 12 con los compuestos 10 y 11, vemos que la toxicidad es menor, y esto no es debido a la solubilidad, ya que aún cuando es mas soluble que el compuesto 11, aún así su  $CL_{50}$  es menor, al comparar el efecto inductivo de los compuestos 10, 11 y 12, podemos observar que el efecto inductivo del compuesto 12 es mayor por tener doble sustitución por cloro que en el caso de los otros dos compuestos, con lo cual observamos que es necesario que exista una cierta densidad electrónica en el anillo aromático, la cual es desfavorable desde la monoclорación de la feniltiourea en posiciones 3 ó 4, que muestra baja toxicidad y que al introducir un segundo cloro para hacer la dicloración en posiciones 3 y 4, se modifica aún mas esta densidad electrónica haciéndola mas desfavorable, decrementando así mas su toxicidad.



Compuesto 9



Compuesto 10



Debido a lo anterior, podemos observar que, es necesario que la tiourea tenga una cierta densidad electrónica, lograda con la monosustitución por cloro en las tioureas, y al tener un grupo metoxi o etoxi carbonilos ( los cuales también son electro atractores), se asegura en buena manera que la molécula tenga cierta toxicidad en estos compuestos.

Para las tioureas, en el medio de solución salina y para el caso de la N-feniltiourea en el medio de PBS no se registra la concentración letal 50 debido a que a las concentraciones probadas no se registró muerte de la Artemias salina en estos medios, y no se afinó la concentración elevando la misma, debido a que se estaba buscando a los compuestos con toxicidad a las concentraciones de prueba y los compuestos de la serie con mayor toxicidad y con este simple ensayo se observó que estos compuestos tienen una toxicidad menor que cualquiera de los compuestos probados de la misma serie.

#### CADENA LATERAL.

Podemos observar que los compuestos con menor toxicidad son las tioureas, esto se presenta en ambos medios, y esto puede estar dado porque, la tiourea debe estar disustituida, y una de las sustituciones debe ser con un metoxi o etoxi carbonilo, para formar la estructura del tioureido disustituido que es similar a la estructura del carbamato de alquilo, y así ser tóxica.

Al comparar la introducción del etoxi carbonilo con la introducción del metoxi carbonilo en la tiourea, no se tiene una tendencia establecida, ya que para los compuestos sin sustitución por cloro y los compuestos con el cloro en posición 3, podemos advertir que es mejor la introducción del etoxi carbonilo en la tiourea ya que se presenta una mayor toxicidad que en el caso de la introducción del metoxi carbonilo. Esto se presenta en ambos medios.

En el caso de los compuestos con cloro en las posiciones 3 y 4, nos damos cuenta de que es la introducción del metoxicarbonilo al presentarse una mayor toxicidad que en el caso de la introducción del etoxicarbonilo, esto también en ambos medios.

Sin embargo en el caso del compuesto con el cloro en posición 4, en el medio de solución salina es mejor la introducción del etoxicarbonilo que la introducción del metoxicarbonilo, pero en el medio de PBS, es mejor la introducción del metoxicarbonilo que el del etoxicarbonilo.

Con lo anterior, podemos observar que es necesario que exista un grupo similar al carbamato, como es el tioureido disustituido, para tener una adecuada toxicidad, sin embargo, la diferencia que da el grupo metilo o etilo, sólo es en la lipofilia de la molécula, ya que la contribución que hace a la toxicidad es al azar.

Se recomienda la halogenación (Cloración) de anillos aromáticos en sustancias activas en donde se espera que su acción biológica sea prolongada. ( $\geq 12$  H).

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES.

En los objetivos de trabajo se había planteado la síntesis de doce compuestos, así como la determinación de sus constantes físicas, que fué motivo de esta tesis y con lo cual llegamos a lo siguiente:

-Se logró sintetizar doce compuestos, ocho tioureidos y cuatro tiocarbamidas, los cuales fueron identificados con sus espectros de IR,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN , y espectrometría de masas.

-Se determinó  $R_f$  , punto de fusión, así como solubilidad en distintos disolventes orgánicos a cada uno de los compuestos sintetizados.

En la hipótesis de trabajo se había planteado que los tioureidos que N,N- disustituidos podían presentar actividad tóxica en *Artemia salina*, semejante a la del Albendazol, y que la solubilidad de estos compuestos sería mayor a la del Albendazol, con este trabajo de tesis, observamos que la hipótesis de trabajo es correcta, lograndose a demás los siguientes puntos:

-El medio empleado en las pruebas de toxicidad influye en la respuesta de los organismos en estudio, viéndose una menor mortalidad en el medio de SS que en el medio de PBS, debida a la solubilidad de los compuestos en estos medios.

-Con respecto al Albendazol, los compuestos sintetizados tienen mayor toxicidad.

-Con respecto a los compuestos 1 y 5, (tioureidos no clorados), observamos que al ir introduciendo cloros, se aumenta la toxicidad para estos compuestos, teniendo una mayor toxicidad con la monocloración en posición 4 que en posición 3, y lográndose una toxicidad aún mayor con el compuesto diclorado en posiciones 3 y 4.

---

## CONCLUSIONES

-Con respecto a el compuesto 9 (tiourea no clorada), al ir introduciendo cloros, aumenta la toxicidad, pero ésta cae bruscamente al introducir un segundo cloro en la molécula.

-Se observa que es necesario que exista un grupo similar al carbamato, como es el tioureido disustituido, para tener una adecuada toxicidad, sin embargo, la diferencia en la cadena lateral sólo es en la lipofilia de la molécula.

-Se recomienda la halogenación (Cloración) de anillos aromáticos en sustancias activas en donde se espera que su actividad biológica sea prolongada. (>ó= 12 H).



## **10.0 TECNICAS EXPERIMENTALES**

## **TÉCNICAMENTAL PARA LA ELABORACIÓN DE TIOUREIDOS.**

### **A. PARTE QUIMICA.**

- 1.- Se colocó en un matraz 50 mL (24/40), adaptado con un agitador magnético, la cantidad indicada en la tabla 7 de tiocianato de potasio (KSCN), el acetonitrilo y una trampa anhidra. Se dejó en agitación durante 30 minutos.
  
- 2.- Al pasar el tiempo de agitación, se agregó a temperatura ambiente y gota a gota con la ayuda de un embudo de adición de presiones igualadas, la cantidad indicada en la tabla 7 del cloroformiato de metilo previamente diluido 1:1 con acetonitrilo. Se dejó en agitación la mezcla durante un periodo de dos horas.
  
- 3.- Después de ese tiempo se agregó poco a poco el compuesto de anilina (CDA), correspondiente al ureido a elaborar, en la cantidad indicada en la tabla 6, previamente disuelto (o diluido) 1:1 y se dejó en agitación durante 20 horas.
  
- 4.- Una vez transcurrido el tiempo de agitación, se observó una suspensión de un sólido amarillo claro en un líquido amarillo oscuro. Se tomó muestra para hacer cromatografía en capa fina.
  
- 5.- Cuando ya no se observó materia prima en la cromatoplaça, se quitó la trampa de humedad. Se filtró al vacío con ayuda de un matraz Kitassato de 250 mL y un embudo Buchner con alargadera.
  
- 6.- El sólido obtenido se colocó en un vaso de precipitados de 50 mL y se le adicionaron 30 mL de acetonitrilo. Se agitó con agitador de vidrio y se filtró al vacío con ayuda de un matraz Kitassato de 100 mL y un embudo Buchner con alargadera. El sólido obtenido se desechó y el filtrado resultante se juntó con el obtenido en el paso 5.

TABLA 6. COMPUESTOS DE ANILINA (CDA)

COMPUESTO DE ANILINA (CDA)	CANTIDAD EN MOL	PESO MOL	CANTIDAD EN GRAMOS.
anilina	0.00783	93.00	0.73
3-cloroanilina	0.00783	127.57	1.00
4-cloroanilina	0.00783	127.57	1.00
3,4-dicloroanilina	0.00783	162.02	1.27

TABLA 7.

COMPUESTO	CANTIDAD EN MOL	PESO MOL	CANTIDAD EN GRAMOS.
tiocianato de potasio	0.062	97	3.041
acetonitrilo	--	--	50 mL
cloroformiato de metilo	0.062	94	2.947
CDA	0.00783	Tabla 6	Tabla 6

7.- El filtrado obtenido se colocó en un matraz de bola de 250 mL (24/40) y se evaporó todo el disolvente con la ayuda del rotaevaporador.

8.- Se elaboraron 100 ml de una solución al 3% de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

9.- Al eliminar totalmente el disolvente, se percibió un olor muy picante por lo que se le agregan 30 mL de la solución al 3% de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).

10.- Se agitó el contenido del matraz y se filtró al vacío con ayuda de un matraz Kitassato de 150 mL y un embudo Kirsch con alargadera. Se lavó con porciones de 20 mL de la solución al 3% de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) hasta completar los 100 mL preparados. Se juntaron los filtrados.

11.- Después de evaporar el disolvente, se obtuvo un sólido el cual se lavó con agua hasta pH neutro.

12.- Se dejó secar el sólido durante una noche y se anotó el peso obtenido.

13.- Se hicieron pruebas de solubilidad hasta encontrar el disolvente ideal para la recristalización .

14.- Se recristalizó la totalidad del sólido obtenido en el punto 12.

15.- El filtrado obtenido en el punto 10 se extrajo 3 veces con porciones de 30 mL de acetato de etilo, en el cual se juntaron las fases orgánicas.

16.- A la fase orgánica obtenida se agregó sulfato de sodio anhidro y se filtró con ayuda de un matraz Kitassato de 50 mL y un embudo Kirsch con alargadera.

17.- El filtrado obtenido en el punto 16 se colocó en un matraz de bola (24/40) y se concentró con ayuda del rotaevaporador hasta sequedad. Se obtuvo un sólido amarillo.

18.- Se colocó el sólido obtenido en el punto 17 en un vaso de precipitados de 50 ml y se recristalizó en el disolvente ideal encontrado en el punto 13.

19.- Se anotó el peso de los cristales obtenidos y se sacó rendimiento.

## TÉCNICA EXPERIMENTAL PARA LA ELABORACIÓN DE TIOCARBAMIDAS.

- 1.- Se elaboraron 100 mL de NaOH al 4% en metanol ( si el tioureido a hidrolizar era metoxilado) o etanol ( si el tioureido a hidrolizar era etoxilado).
- 2.- Se colocó 0.5 gramos del tioureido a hidrolizar en un matraz Erlenmeyer de 50 mL .Se agregó 5 mL de acetona y se dejó calentar en baño María hasta disolución.
- 3.-Se agregó 5 mL de la solución preparada en el punto número 1.Se continuó el calentamiento y la agitación. Se observó la formación de un precipitado blanco que aumentó con respecto al tiempo.
- 4.- Se tomó una muestra para elaborar una cromatografía en capa fina.
- 5.- Cuando ya no se observó materia prima en la cromatoplaça, se filtró el contenido del matraz con la ayuda de un matraz Kitassato de 50 mL y un Kirsch con alargadera.
- 6.-El filtrado se colocó en un vaso de precipitados de 50 mL, se tapó con parafilm y se dejó cristalizar.
- 7.- El sólido obtenido se colocó en un vaso de precipitados de 100 mL, y se le adicionaron 2 mL de agua, se agregó HCl al 0.1 N hasta pH 3.
- 8.- A la solución anterior se le hicieron extracciones con 3 porciones de 30 mL de acetato de etilo. Se juntaron las fases orgánicas.
- 9.- A la fase orgánica obtenida en el punto 8 se le adicionó sulfato de sodio anhidro y se filtró con ayuda de un matr az Kitassato de 100 mL y un embudo Kirsch con alargadera.

10.- El filtrado se colocó en un matraz de bola de 100 ml (24/40) y se concentró con la ayuda de un rotaevaporador hasta obtener aproximadamente 3 mL.

11.- Se colocó el líquido obtenido en el punto 10 en un vaso de precipitados de 50 ml. Se tapó con parafilm y se dejó cristalizar.

12.- Se hizo una cromatografía en capa fina con el sólido recristalizado en el punto 6, el sólido obtenido en 11 y la materia prima.

## TÉCNICA EXPERIMENTAL PARA LA ELABORACIÓN DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA PARA TIOUREIDOS.

- 1.- En un frasco vial se colocó 0.1 gramo del compuesto de anilina correspondiente (CDA) y se agregó 1 mL de acetonitrilo y 5 mL de etanol. Esta mezcla se tomó como materia prima de referencia (MR).
  - 2.- Se eliminó la agitación y esperé unos 3 minutos hasta ver la separación de las fases sólida y líquida.
  - 3.- Se marcó con un lápiz de manera tenue aproximadamente a 1 cm. del borde de la placa una línea y se pintó los puntos de aplicación M (muestra del sobrenadante), MR (compuesto de anilina correspondiente) y 1:1, que corresponde a un punto medio y se colocó un toque de M y otro de MR.
  - 4.- Se tomó la muestra con un aplicador del sobrenadante o fase líquida de la reacción.
  - 5.- Se colocó la muestra en los puntos M y 1:1.
  - 6.- Se tomo con un aplicador limpio muestra de referencia y se colocó en los puntos MR y 1:1
  - 7.- Se colocó la placa en la estufa durante 5 minutos.
  - 8.- Se preparó la cámara de elución colocando un rectángulo de papel filtro en el interior y la fase móvil. Se tapó y se dejó saturar.
  - 9.- Se colocó la placa en el interior de la cámara de elución y se dejó eluir totalmente.
  - 10.- Se observó en la lámpara U.V. y se marcó con un lápiz las manchas observadas.
  - 11.- Se calculó el  $R_f$ .
- Fase móvil empleada: hexano:cloroformo:acetato de etilo 50:35:15. (Sistema I).

## **TÉCNICA EXPERIMENTAL PARA LA ELABORACIÓN DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA PARA TIOCARBAMIDAS.**

- 1.- En un frasco vial se colocó 0.1 gramo del compuesto del ureido correspondiente y se agregó 5 mL de acetona 5 mL de metanol ( si el tioureido era metoxilado) o etanol ( si el tioureido era etoxilado). Esta mezcla se tomó como materia prima de referencia (MR).
- 2.- Se marcó con un lápiz de manera tenue aproximadamente a 1 cm. del borde de la placa una línea y se pintó los puntos de aplicación M (muestra del sobrenadante), MR (compuesto de anilina correspondiente) y 1:1, que corresponde a un punto medio y se colocó un toque de M y otro de MR.
- 3.- Se tomó con un aplicador limpio una muestra de la mezcla de reacción agitando la misma.
- 4.- Se colocó la muestra en los puntos M y 1:1.
- 5.- Se tomo con un aplicador limpio muestra de referencia y se colocó en los puntos MR y 1:1.
- 6.- Se preparó la cámara de elución colocando un rectángulo de papel filtro en el interior y la fase móvil. Se tapó y se dejó saturar.
- 7.- Se colocó la placa en el interior de la cámara de elución y se dejó eluir totalmente.
- 8.- Se observó en la lámpara U.V. y se marcó con un lápiz las manchas observadas.
- 9.- Se calculó el  $R_f$ .

Fase móvil empleada: cloroformo : metanol 98:2 (Sistema V).



## B. PARTE BIOLÓGICA.

### TÉCNICA EXPERIMENTAL PARA LA ELABORACIÓN DE LA PRUEBA CON *Artemia salina*. Leach.

1.- Se elaboró un litro de medio salino comercial Instant Ocean<sup>®</sup>, Aquarium Systems, en una proporción de 37.7 gramos por cada litro de agua destilada.

2.- Se elaboró un medio salino que contenía:

23.0	gramos de NaCl
11.0	gramos de MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
4.0	gramos de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1.3	gramos de CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
0.7	gramos de KCl

Se disolvió en el orden indicado en la lista anterior y se aforó en un litro de agua destilada ajustando el pH a 9.0 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se etiquetó perfectamente el medio.

3.- Se elaboró un medio salino con buffer de fosfatos que contenía:

8.0	gramos de NaCl
0.2	gramos de KCl
2.9	gramos de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O
0.2	gramos de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.7	gramos de KCl

Se disolvió en el orden indicado en la lista anterior y se aforó en un litro de agua destilada ajustando el pH a 7.2 con HCl. Se etiquetó perfectamente el medio.

4.- Los huevecillos de artemias fueron colocados en un vaso de precipitados de 50 mL, y se le adicionaron 30 mL de etanol al 70%. Se agitó durante dos minutos y después se filtró con ayuda de un embudo de filtración rápida. Se enjuagaron con 100 mL. de medio salino comercial preparado en el punto número 1.

- 5.- Todo el material usado para este ensayo fué lavado con alcohol al 70%.
- 6.- En un frasco se colocaron 200 mL de medio salino comercial y se oxigenaron durante una hora con la ayuda de un oxigenador para pecera.
- 7.- Se colocó un baño María con temperatura controlada entre 28-30 °C.
- 8.- Transcurrida la hora de oxigenación del medio, se suspendió y se colocó el frasco dentro del baño María para que llegara a la temperatura de 28-30 °C.
- 9.- Una vez que se llegó a la temperatura de 28-30 °C, se colocaron en el frasco los huevecillos ya lavados en un medio salino comercial en una proporción de 0.1 gramos por cada 200 mL de medio.
- 10.- Se dejaron desarrollar durante 48 horas a la temperatura mencionada.
- 11.- Se pesó en balanza analítica 0.045 gramos del compuesto a probar.
- 12.- Se colocó el sólido en un matríz aforado limpio de 10 mL y se aforó con dimetilsulfóxido (DMSO), con lo cual se tiene una solución con concentración de 4.5 mg/mL.
- 13.- De la solución anterior se tomó 1 mL y se colocó en un otro matríz aforado de 10 mL. Se aforó con dimetilsulfóxido (DMSO), con lo cual se tiene una solución con concentración de 0.45 mg/mL.
- 14.- Las concentraciones a probar se consiguieron de la siguiente manera:
  - Para una conc. de 0.5 ppm tomar 10 µL de la solución con conc. 0.045 mg/ml+9 mL de medio
  - Para una conc. de 1.0 ppm tomar 20 µL de la solución con conc. 0.045 mg/ml+9 mL de medio
  - Para una conc. de 5.0 ppm tomar 100 µL de la solución con conc. 0.045 mg/ml+9 mL de medio
  - Para una conc. de 10.0 ppm tomar 20 µL de la solución con conc. 4.5 mg/ml+9 mL de medio
  - Para una conc. de 15.0 ppm tomar 30 µL de la solución con conc. 4.5 mg/ml+9 mL de medio
  - Para una conc. de 20.0 ppm tomar 40 µL de la solución con conc. 4.5 mg/ml+9 mL de medio
  - Para una conc. de 25.0 ppm tomar 50 µL de la solución con conc. 4.5 mg/ml+9 mL de medio
  - Para una conc. de 50.0 ppm tomar 100 µL de la solución con conc. 4.5 mg/ml+9 mL de medio
- 15.- Se etiquetó perfectamente los frascos viales utilizados.
- 16.- En una caja Petri se colocó medio salino (preparado en el punto 2), y se transfirieron las artemias desarrolladas en el medio salino comercial.

- 17.- En una probeta de 10 mL se colocaron 10 animales y se agregaron 9 mL de medio salino (preparado en el punto 2). Se trasvasaron a uno de los viales. Se colocó la concentración adecuada del compuesto a probar con una micropipeta. Esto se hizo por triplicado.
- 18.- Se hizo un blanco colocando 10 animales más 9 mL de medio salino (preparado en el punto 2) y 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Esto se hizo por triplicado.
- 19.- Se midió y registró el pH de cada una de las soluciones a diferente concentración.
- 20.- Se colocó un cristal encima de los frascos viales y se alumbró con una lámpara directo al cristal.
- 21.- Se dejó así durante 12-17 horas y se leyó el número de sobrevivientes terminado el lapso de exposición.
- 22.- Una vez registrado el número de sobrevivientes, se filtraron las soluciones resultantes juntando cada uno de los filtrados de la misma concentración en un mismo frasco.
- 23.- Se midió el pH final de estas soluciones y se registraron.
- 24.- Con la solución inicial de 0.45 mg/mL se hizo un barrido en el espectrofotómetro entre 200 y 400 nm. Registrar la  $\lambda_{max}$ .
- 25.- Se hizo una curva patrón del compuesto a las concentraciones 0.5, 1, 5, 10 y 25 ppm haciendo las diluciones con etanol absoluto. Se leyó a la  $\lambda_{max}$  registrada en el punto 24 y se anotaron las absorbancias.
- 26.- Se leyó a la  $\lambda_{max}$  registrada en el punto 24 de las soluciones a las diferentes concentraciones de el ensayo con *Artemia salina* utilizando como blanco, el blanco hecho en este mismo ensayo con el medio salino y el dimetilsulfóxido.
- 27.- Se calculó la concentración real que tienen cada una de las diferentes soluciones medidas.
- 28.- Se repitió de los pasos 16 al 27 pero con medio salino con buffer de fosfatos.

## **BIBLIOGRAFIA.**

- (<sup>1</sup>) Damani, L. A.; 1989. Sulphur containing drugs and related Organic compounds. *Chemistry, Biochemistry and Toxicology*. Vol. 1-B Ed. John Wiley and sons. ,Printed Great Britain. pp. 49 - 89.
- (<sup>2</sup>) Korolkovas, A.; Burckhalter, J.1979. Compendio Esencial de Química Farmacéutica. Ed. Reverté. S. A. España. pp. 16 - 51.
- (<sup>3</sup>) Lewan, L.; Andersson, M; Morales-Gomez, P. 1992. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. *ATLA*. 20:297-301.
- (<sup>4</sup>) Schentag, J.; Swanson, D.; Smith, I. 1985. Dual individualization: Antibiotic dosage calculation from the integration of in vitro pharmacodynamics and in vivo pharmacokinetics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Suppl. A. 15: 47-57.
- (<sup>5</sup>) Grasso, S. 1985. Historical Review of in vitro models. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Suppl. A, 15: 99-102
- (<sup>6</sup>) Domer; Floyd. 1971. Animal Experiments in Pharmacological Analysis. Chap. 2 and 3. Charles C. Thomas Publisher. U.S.A. pp. 56 - 97

- (7) Plein, J. ; Plein, E. 1974. Fundamentals of medications 2 nd Edition. Chap. 2. Drug Intelligence Publications Inc., U.S.A. pp. 9 - 14
- (8) Meyer, B.; Ferrigni, R.; Potnam, J.E.; Jacobsen, L.; Nichols, D.; and Mc Laughlin, J.L.; 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant Research Medica* 45: 31-34.
- (9) Purcell, W.; Bass, G.; y Clayton, M.; 1973 Strategy of drugs *design: A molecular guide to biological activity*, Wiley Interscience, New York, 1973.
- (10) Brandborg, L.L. 1967. Histological demonstration of mucosal invasion by *Giardia lamblia* in man. *Gastroenterology* 52:143-150
- (11) Morecki, R., Ruppenauer, and C.W. Schwabe. 1967. Ultrastructural studies of the human *Giardia lamblia* and subjacent jejunal mucosa in a subject with steatorrhea. *Gastroenterology* 52:151-164.
- (12) Freeman B.A. 1985. Microbiología de Burrows . Editorial Interamericana-Mc. Graw Hill, 22º edición. México D.F. pp. 356-357
- (13) Ramette, R.; 1981. Chemical Equilibrium and Analysis. Addison-Wesley Publishing Co. Philippines. pp. 210-212

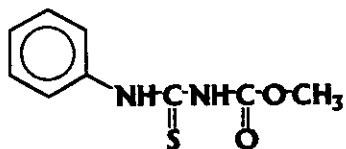
- (<sup>14</sup>) Yalkowsky, S.; Morozwicz. 1980. Drug Desing. Vol. IX. Academic Press. U.S.A. pp. 138-141
- (<sup>15</sup>) Hernández-Luis F.; Castillo R.; Yepéz-Mulia L.; Cedillo-Rivera R.; Hernández-Campos A. 1996. Preparation of N-methoxycarbonyl-N-[2-nitro-4(5)-propylthiophenyl]thiourea as prodrugs of albendazole. *Biorg. Med. Chem.* **6(18)**:2231-2236.
- (<sup>16</sup>) Nakanishi K. 1969. Infrared absorption spectroscopy. Holden-Day, Inc., San Francisco. Quinta Edición, Japón. Pág. 54
- (<sup>17</sup>) Silverstein R.M., Clayton Bassler G., Morrill T.C. 1991. Spectroscopic identification of organic compounds. John Wiley and sons, Inc. Fifth edition. Singapore. Pág. 129.
- (<sup>18</sup>) Walchshofer, N.; Delabre-Defayolle I., Paaris J., Petavy A.F. 1990. In vivo Morphological Damage Induced by a New Benzimidazole Prodrug in *Echinococcus multilocularis* Metacestoides. *J. Pharm. Sci.* **79**:606-608.

•

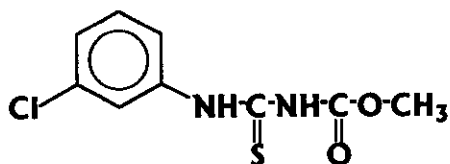
## **APENDICE**



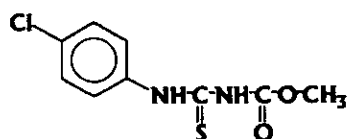
COEFICIENTES DE REPARTO (14)



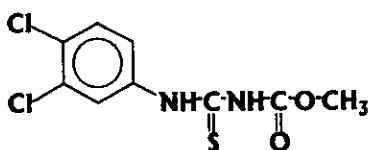
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2.15	1.9	1.9
CONH <sub>2</sub> aromático	-1.49	-1.26	-1.26
CONH <sub>2</sub> alifático	-1.71	-1.99	-2.18
OCH <sub>3</sub>	-0.47	-0.83	-
TOTAL	-1.52	-2.18	-1.54



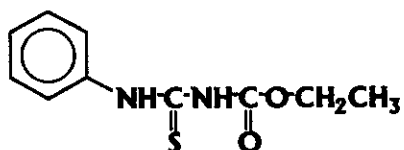
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2.13	1.73	1.67
CONH <sub>2</sub> aromático	-1.49	-1.26	-1.26
CONH <sub>2</sub> alifático	-1.71	-1.99	-2.18
OCH <sub>3</sub>	-0.47	-0.83	-
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
TOTAL	-0.78	-1.42	-0.83



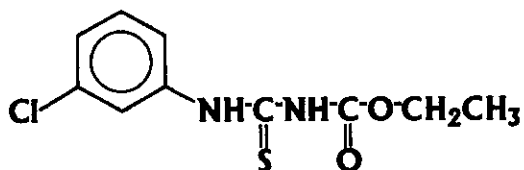
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2.13	1.73	1.67
CONH <sub>2</sub> aromático	-1.49	-1.26	-1.26
CONH <sub>2</sub> alifático	-1.71	-1.99	-2.18
OCH <sub>3</sub>	-0.47	-0.83	-
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
TOTAL	-0.78	-1.42	-0.83



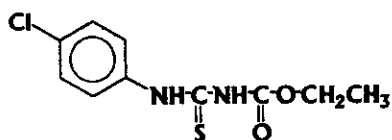
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2.13	1.48	1.67
CONH <sub>2</sub> aromático	-1.49	-1.26	-2.18
CONH <sub>2</sub> alifático	-1.71	-1.99	-1.26
OCH <sub>3</sub>	-0.47	-0.83	0
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
TOTAL	-0.02	-0.74	0.11



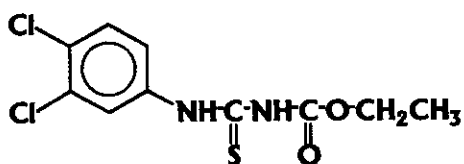
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2.15	1.90	1.90
CONH <sub>2</sub> aromático	-1.49	-1.26	-2.18
CONH <sub>2</sub> alifático	-1.71	-1.99	-1.26
OCH <sub>2</sub>	-0.47	-0.83	0
CH <sub>3</sub>	0.5	0.70	0.89
TOTAL	-1.02	-1.48	-0.65



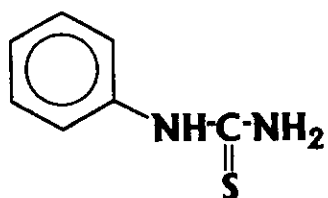
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2.13	1.73	1.67
CONH <sub>2</sub> aromático	-1.49	-1.26	-2.18
CONH <sub>2</sub> alifático	-1.71	-1.99	-1.26
OCH <sub>2</sub>	-0.47	-0.83	0
CH <sub>3</sub>	0.5	0.70	0.89
Cl aromático	0.46	0.93	0.94
TOTAL	-0.28	-0.72	0.06



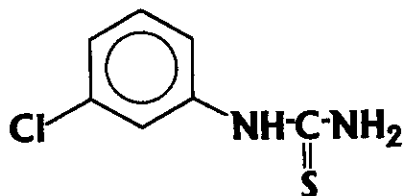
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2.13	1.73	1.67
CONH <sub>2</sub> aromático	-1.49	-1.26	-1.26
CONH <sub>2</sub> alifático	-1.71	-1.99	-2.18
OCH <sub>2</sub>	-0.47	-0.83	0
CH <sub>3</sub>	0.05	0.70	0.89
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
TOTAL	-0.28	-0.72	0.06



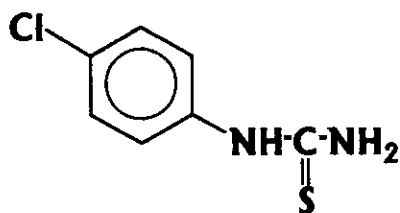
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2.13	1.48	1.44
CONH <sub>2</sub> aromático	-1.49	-1.26	-1.26
CONH <sub>2</sub> alifático	-1.71	-1.99	-2.18
OCH <sub>2</sub>	-0.47	-0.83	0
CH <sub>3</sub>	0.05	0.70	0.89
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
TOTAL	0.48	-0.4	0.77



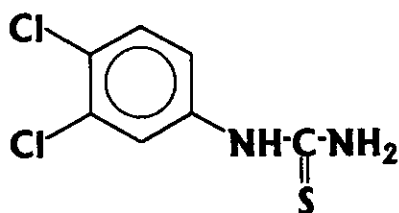
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	2.15	1.90	1.90
CONH <sub>2</sub> aromático	-1.49	-1.26	-1.26
NH <sub>2</sub> alifático	-1.19	-1.38	-1.54
TOTAL	-0.53	-0.74	-0.90



	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2.13	1.73	1.67
CONH <sub>2</sub> aromático	-1.49	-1.26	-1.26
NH <sub>2</sub> alifático	-1.19	-1.38	-1.54
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
TOTAL	-0.21	0.02	-0.19

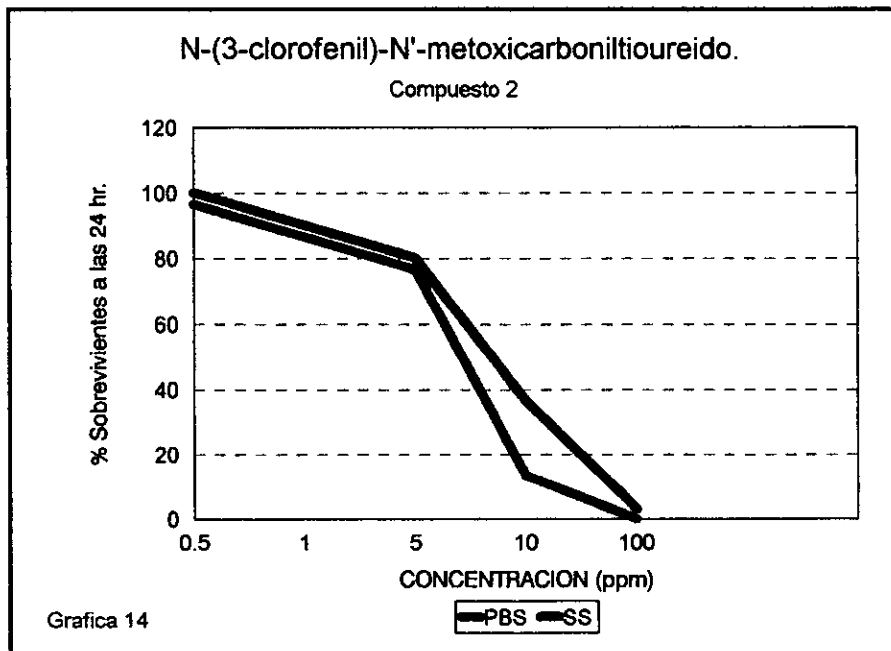
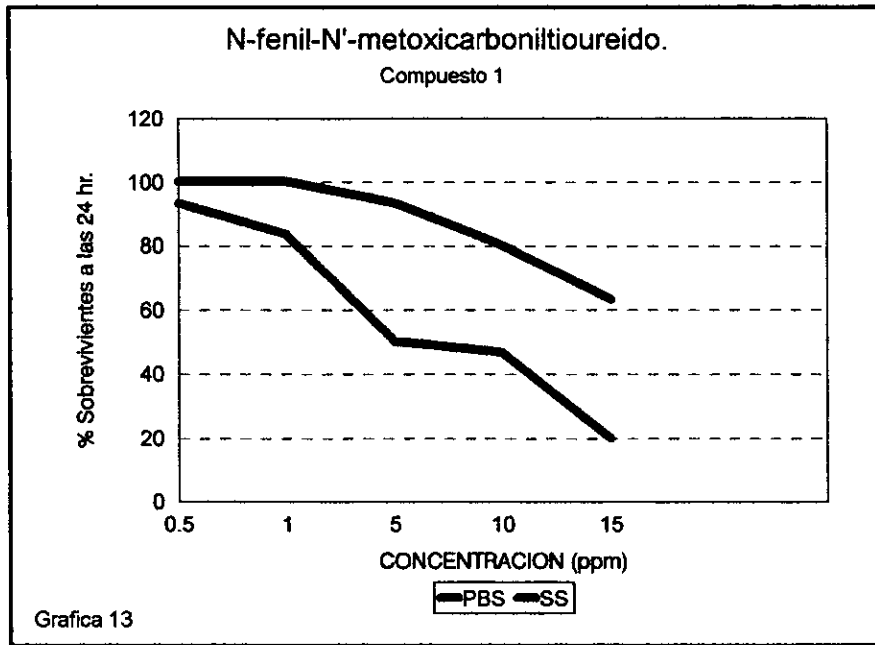


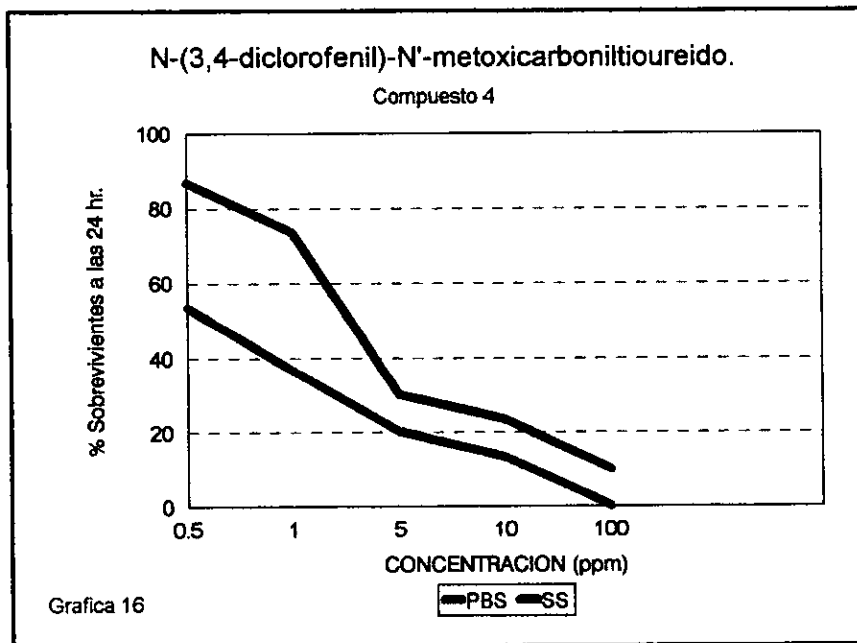
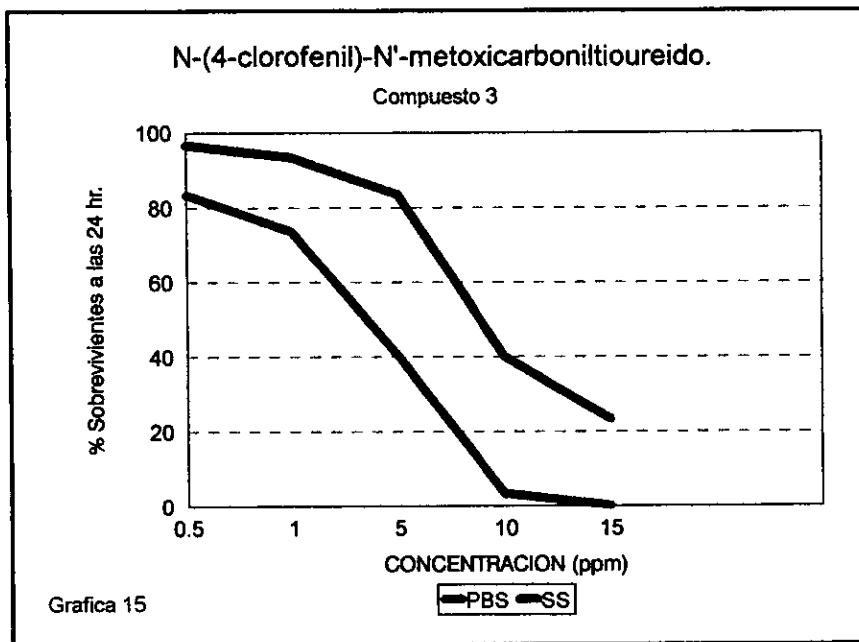
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
$C_6H_4$	2.13	1.73	1.67
$CONH_2$ aromático	-1.49	-1.26	-1.26
$NH_2$ alifático	-1.19	-1.38	-1.54
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
TOTAL	-0.21	0.02	-0.19



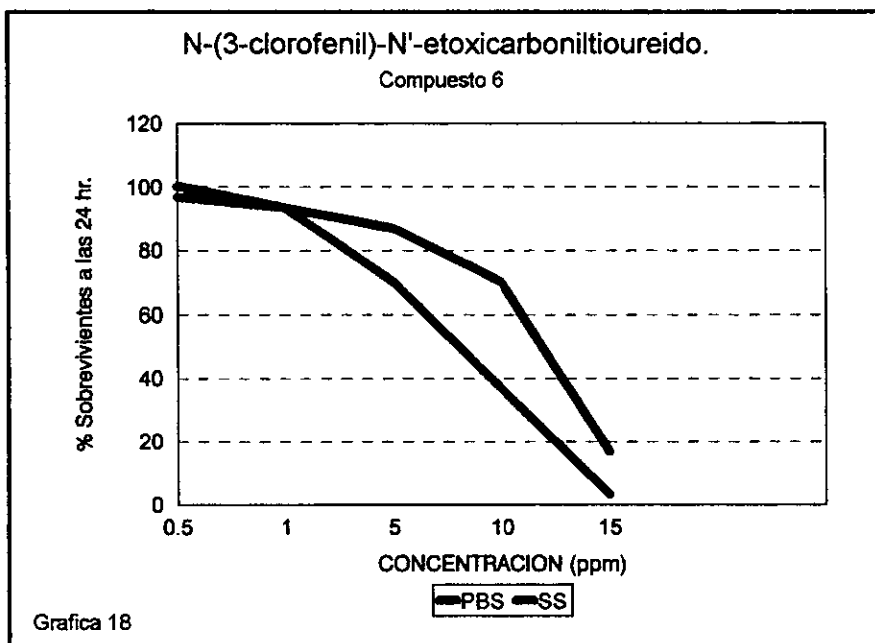
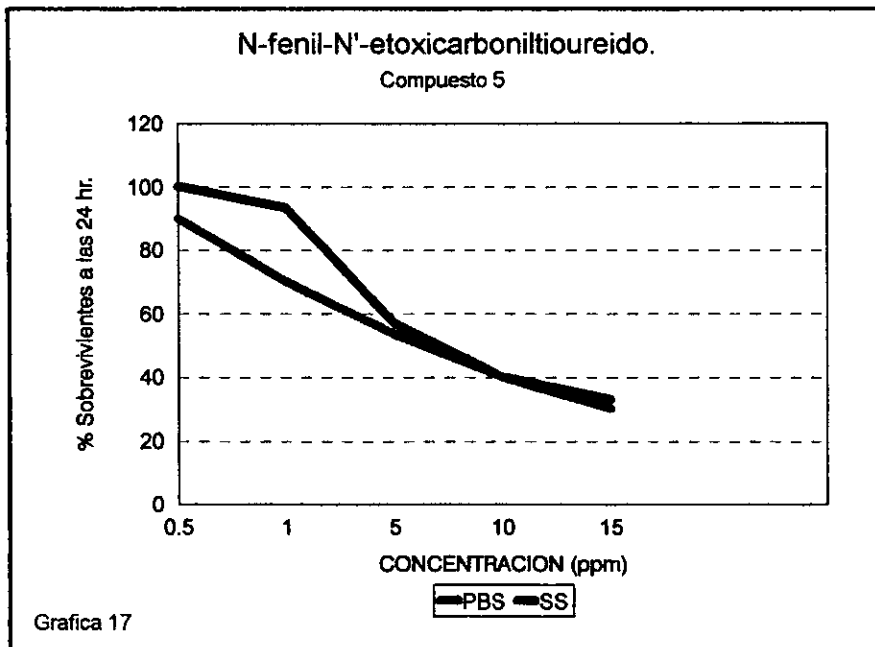
	HANSCH (OCTANOL/AGUA)	NYS	LEO
$C_6H_4$	2.13	1.48	1.44
$CONH_2$ aromático	-1.49	-1.26	-1.26
$NH_2$ alifático	-1.19	-1.38	-1.54
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
Cl aromático	0.76	0.93	0.94
TOTAL	0.97	0.70	0.52

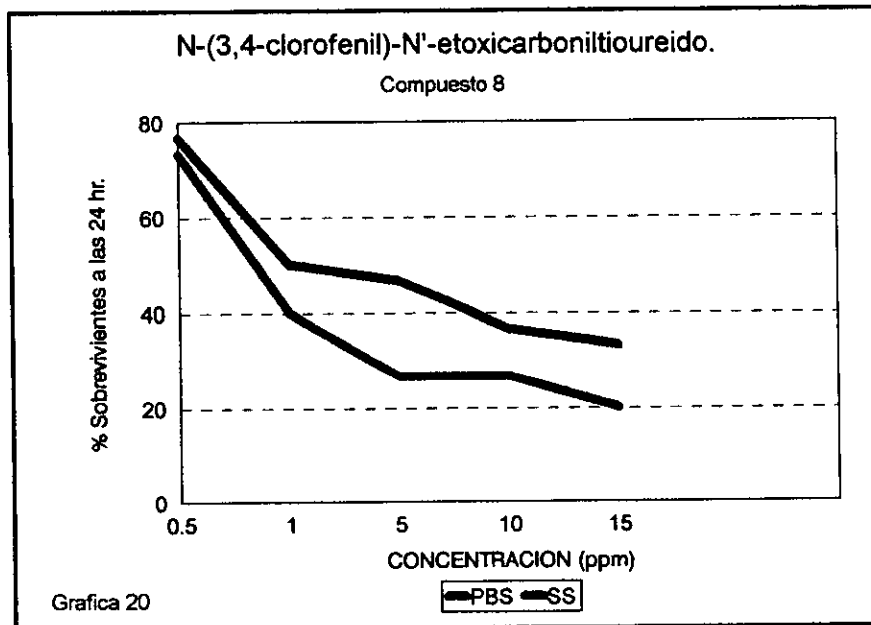
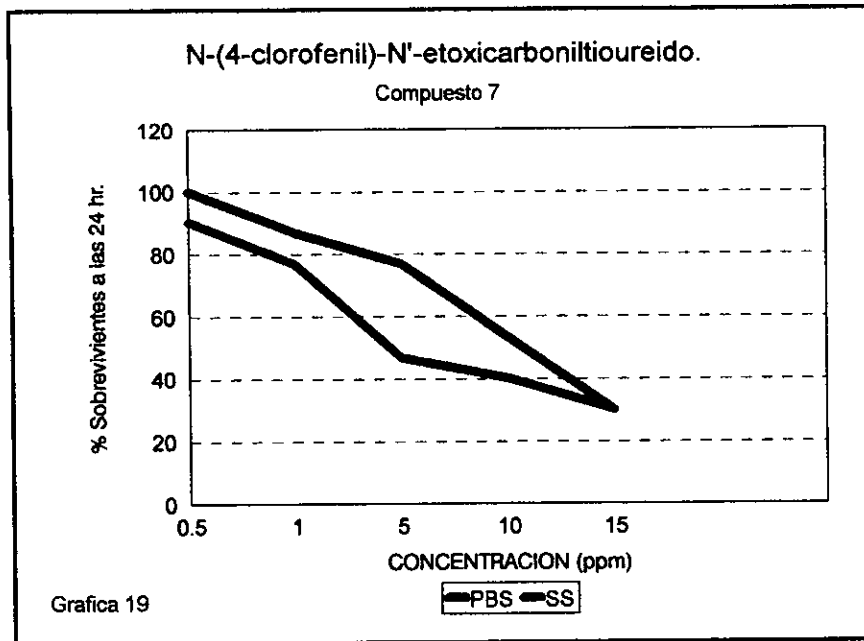
### GRAFICAS DE % DE SOBREVIVIENTES Vs. CONCENTRACIÓN.

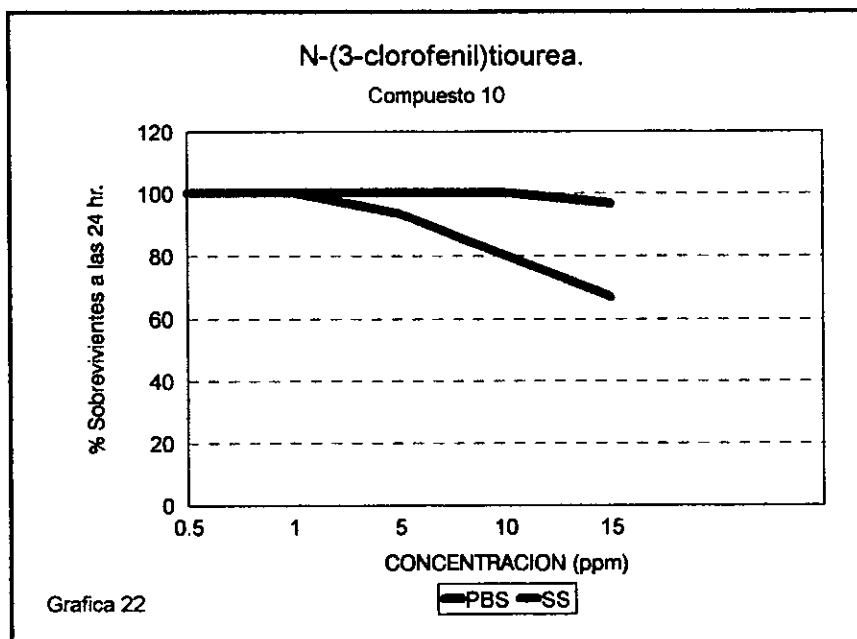
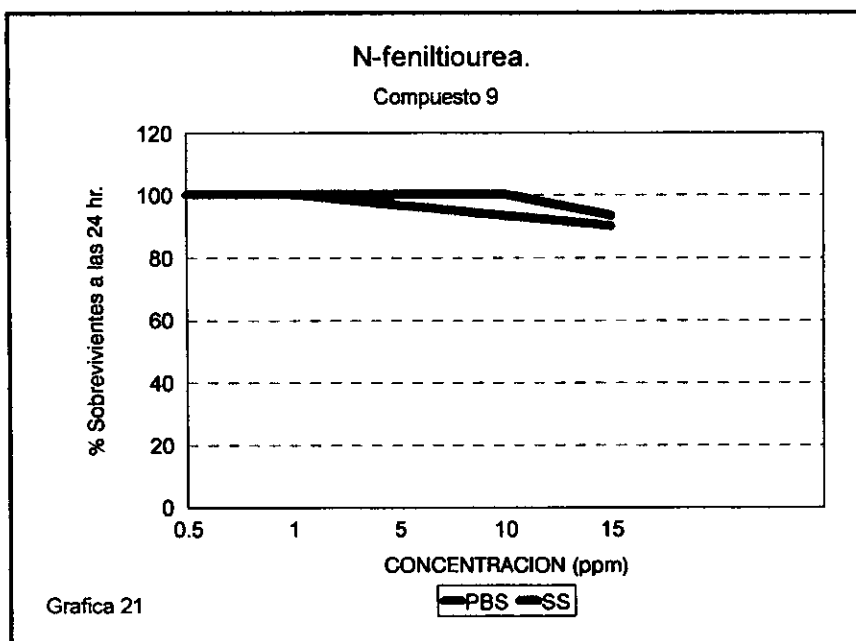


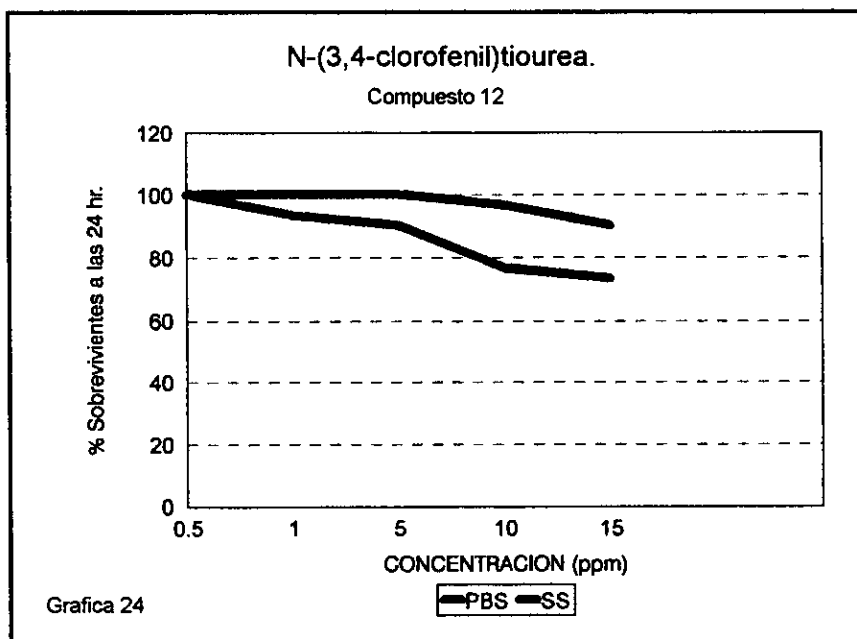
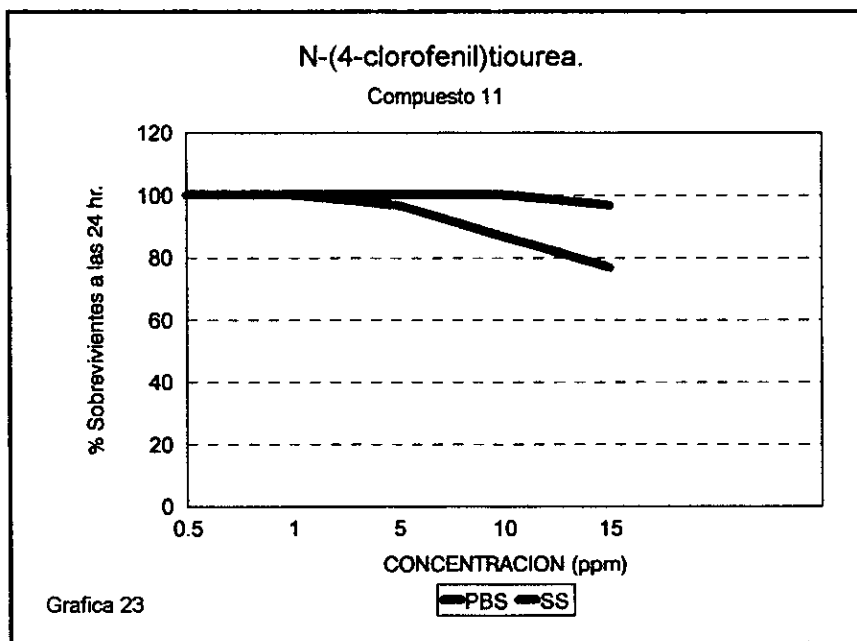




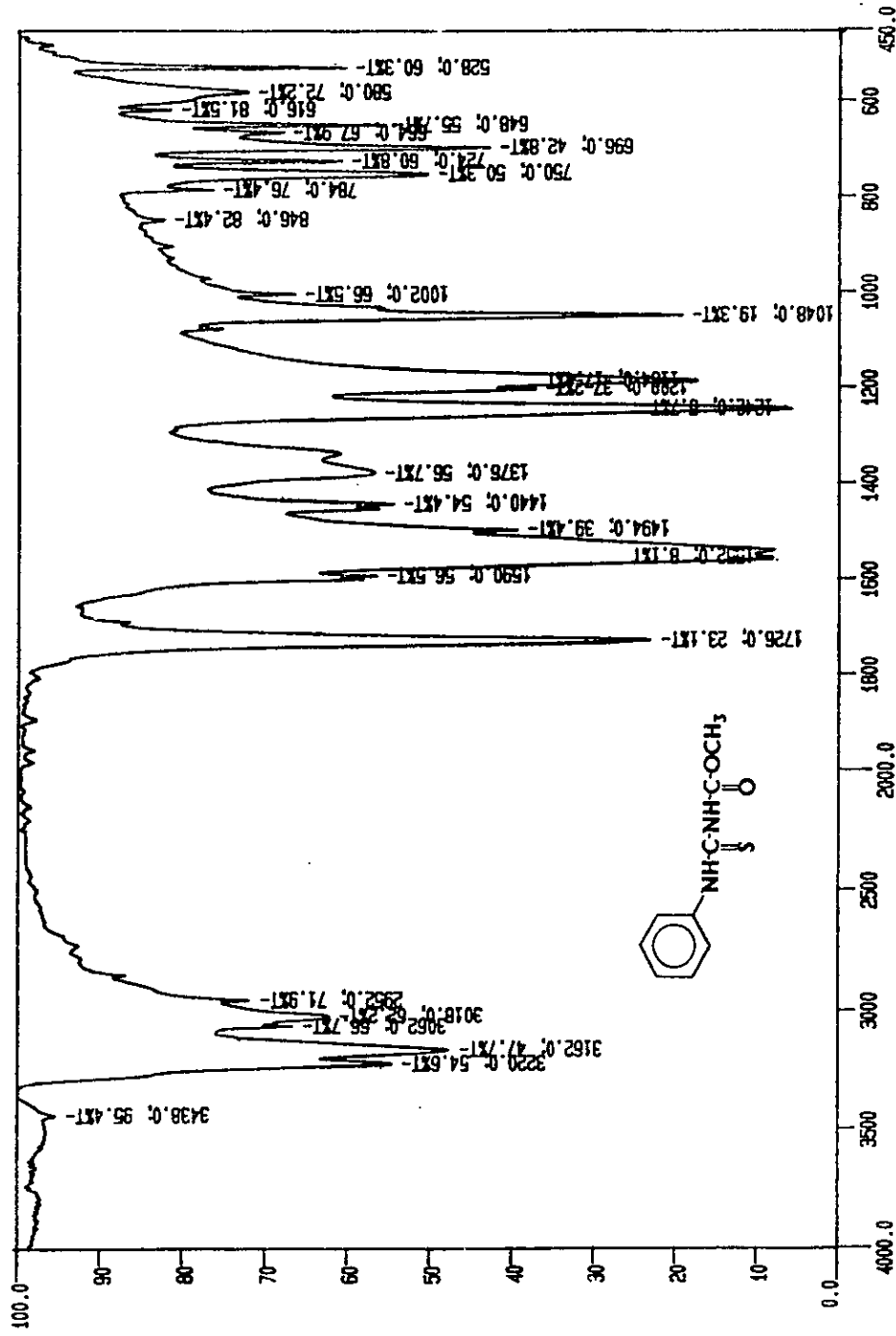








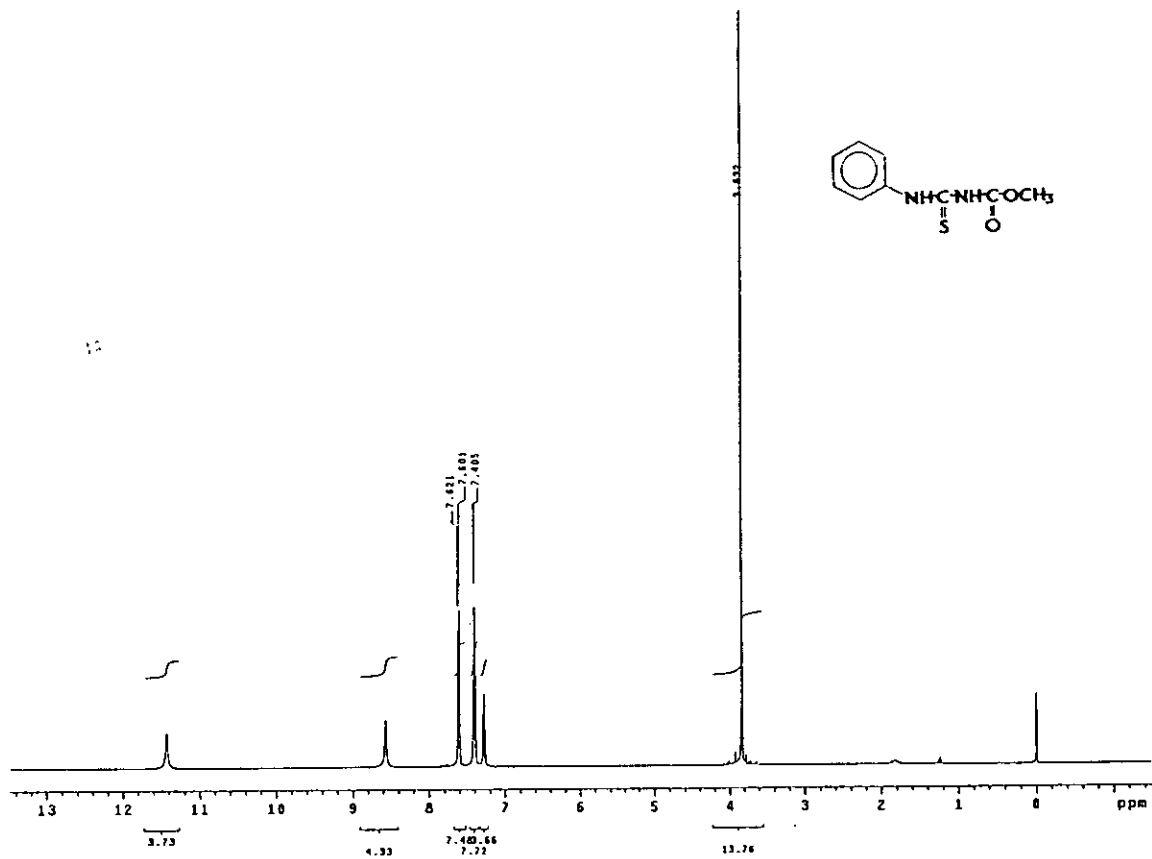
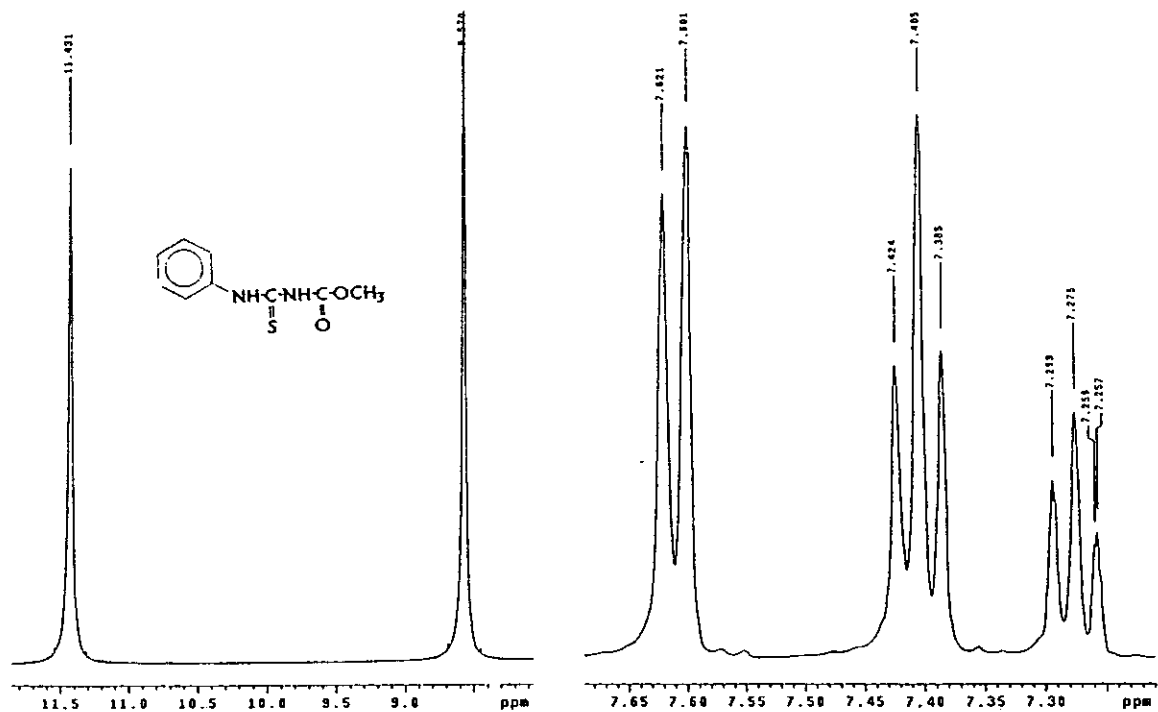
**ESPECTROS**

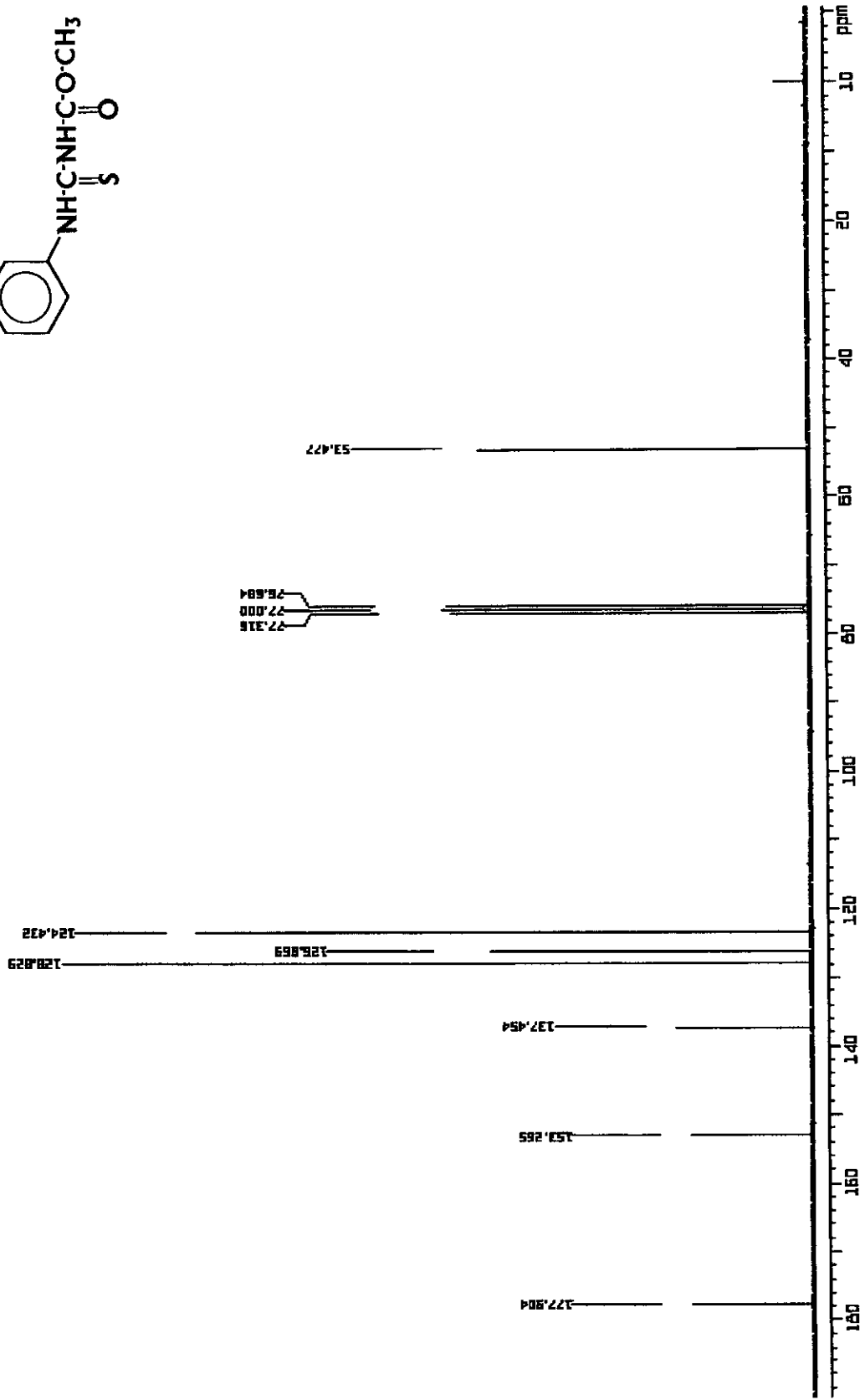
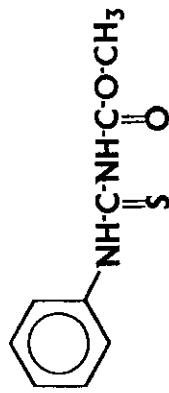


15

DK-1

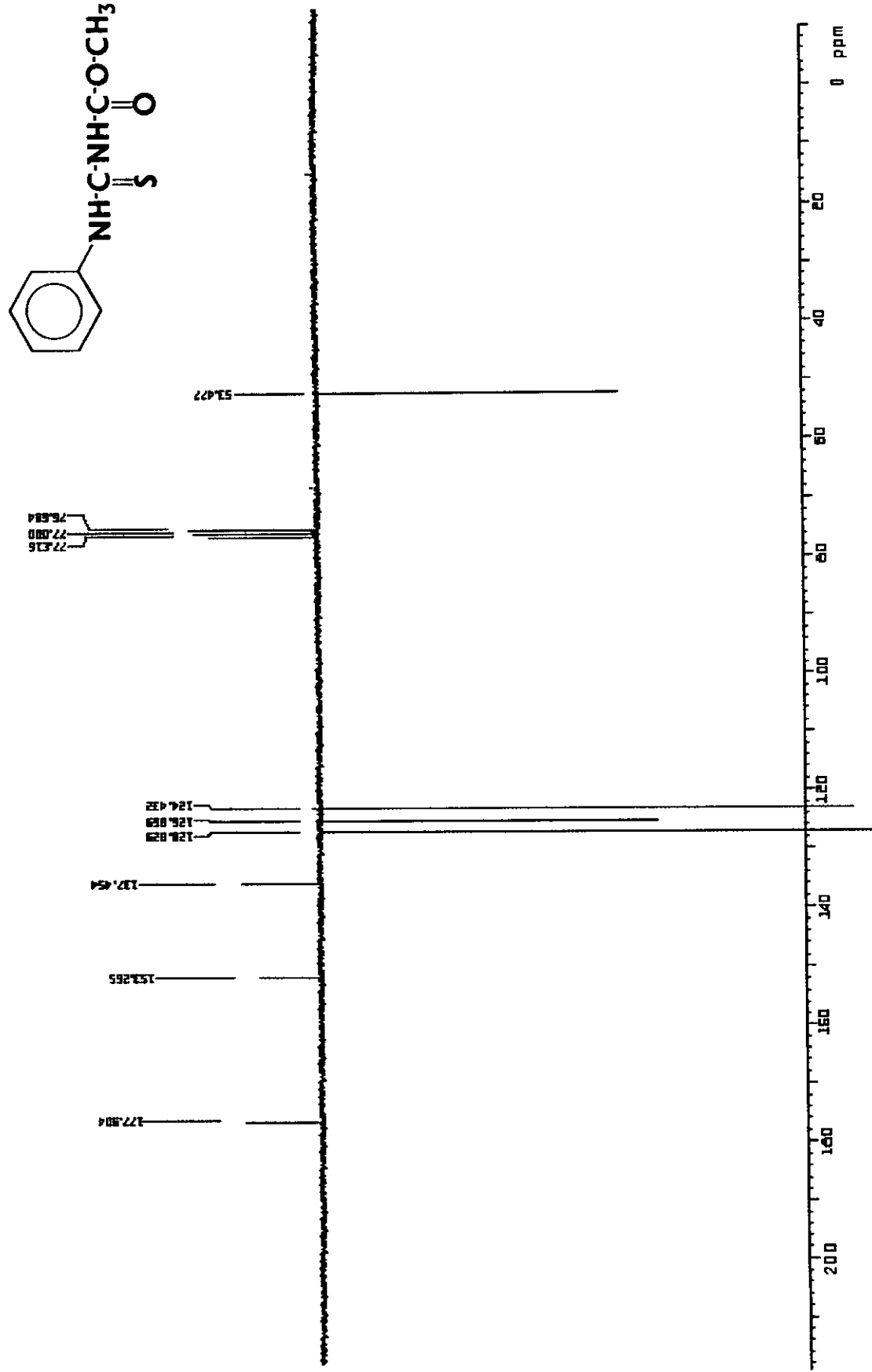
# Espectro de IR del compuesto N-fenil-N'-metoxycarbonitoureido

Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto N-fenil-N'-metoxicarboniltiureido.Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto N-fenil-N'-metoxicarboniltiureido.

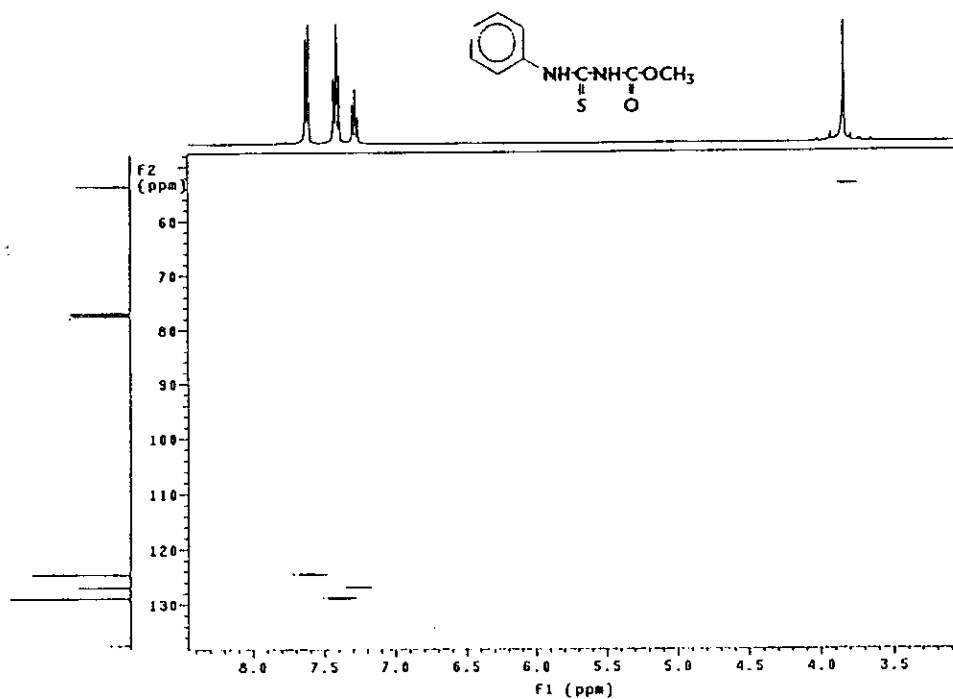


Espectro <sup>13</sup>C RMN del compuesto N-fenil -N' -metoxicarboniltioureido.

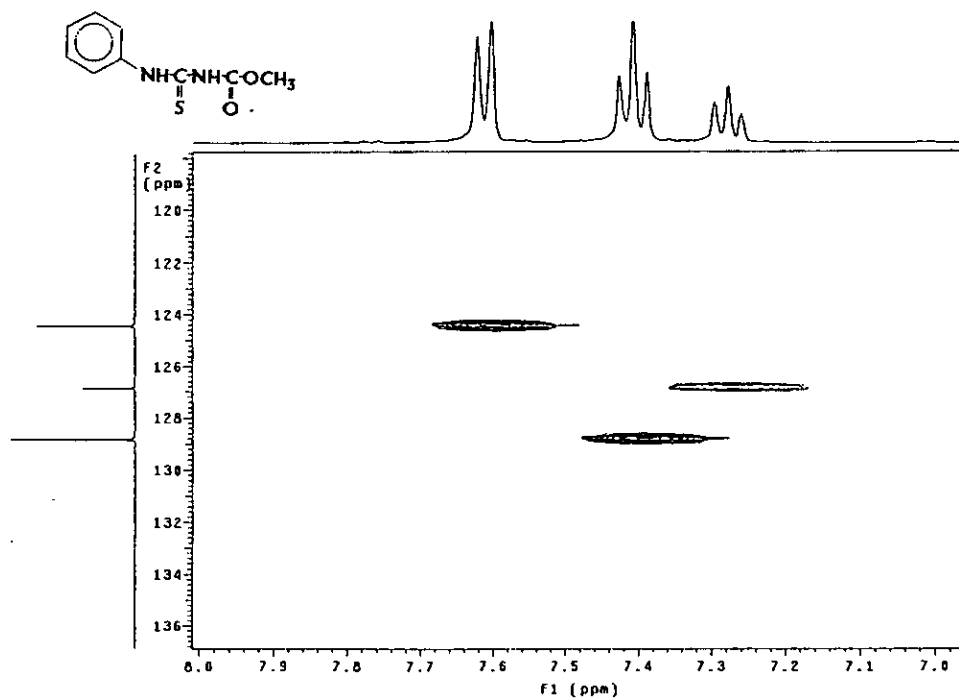




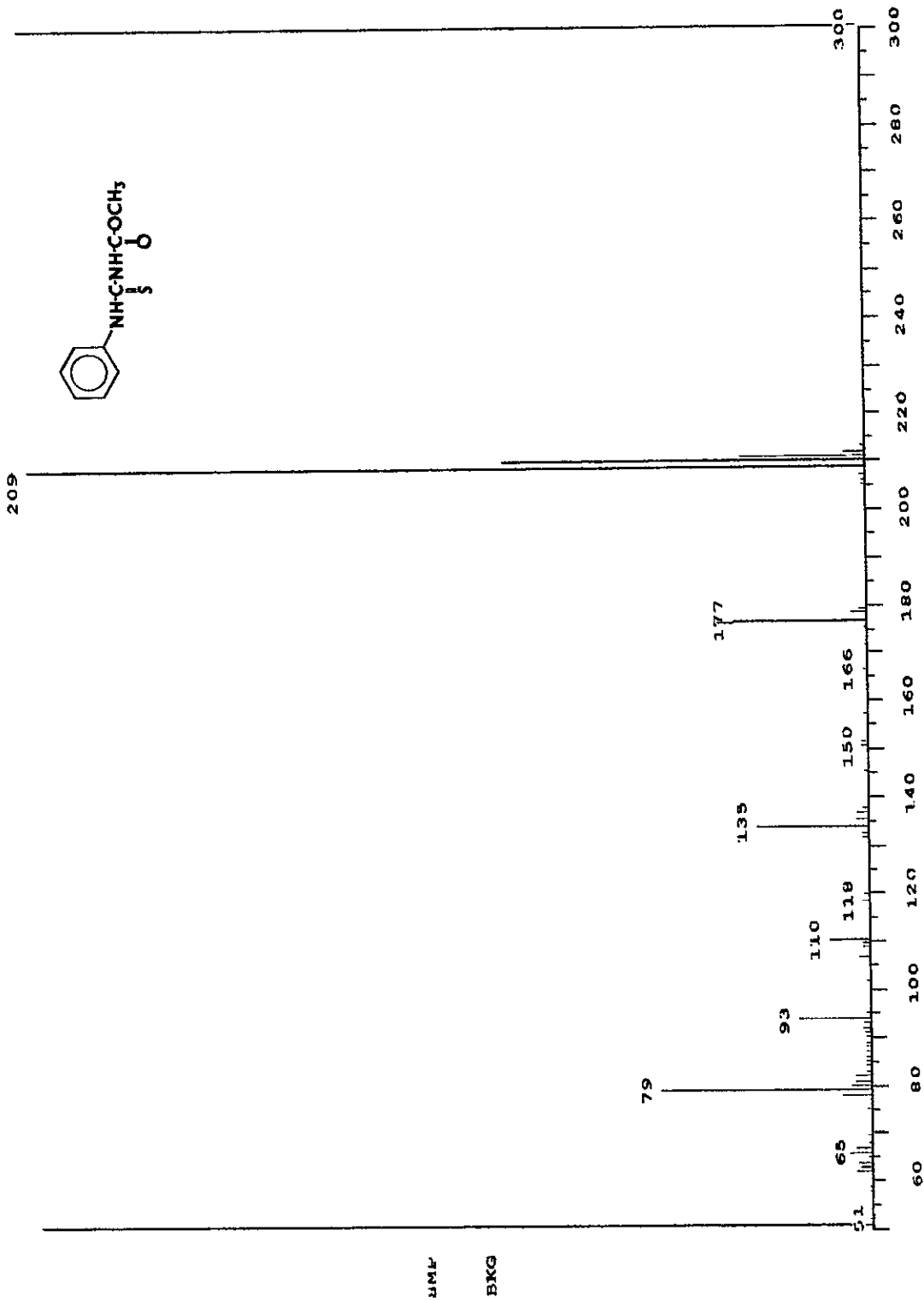
Espectro APT del compuesto N-fenil-N'-metoxicarboniltioureido.



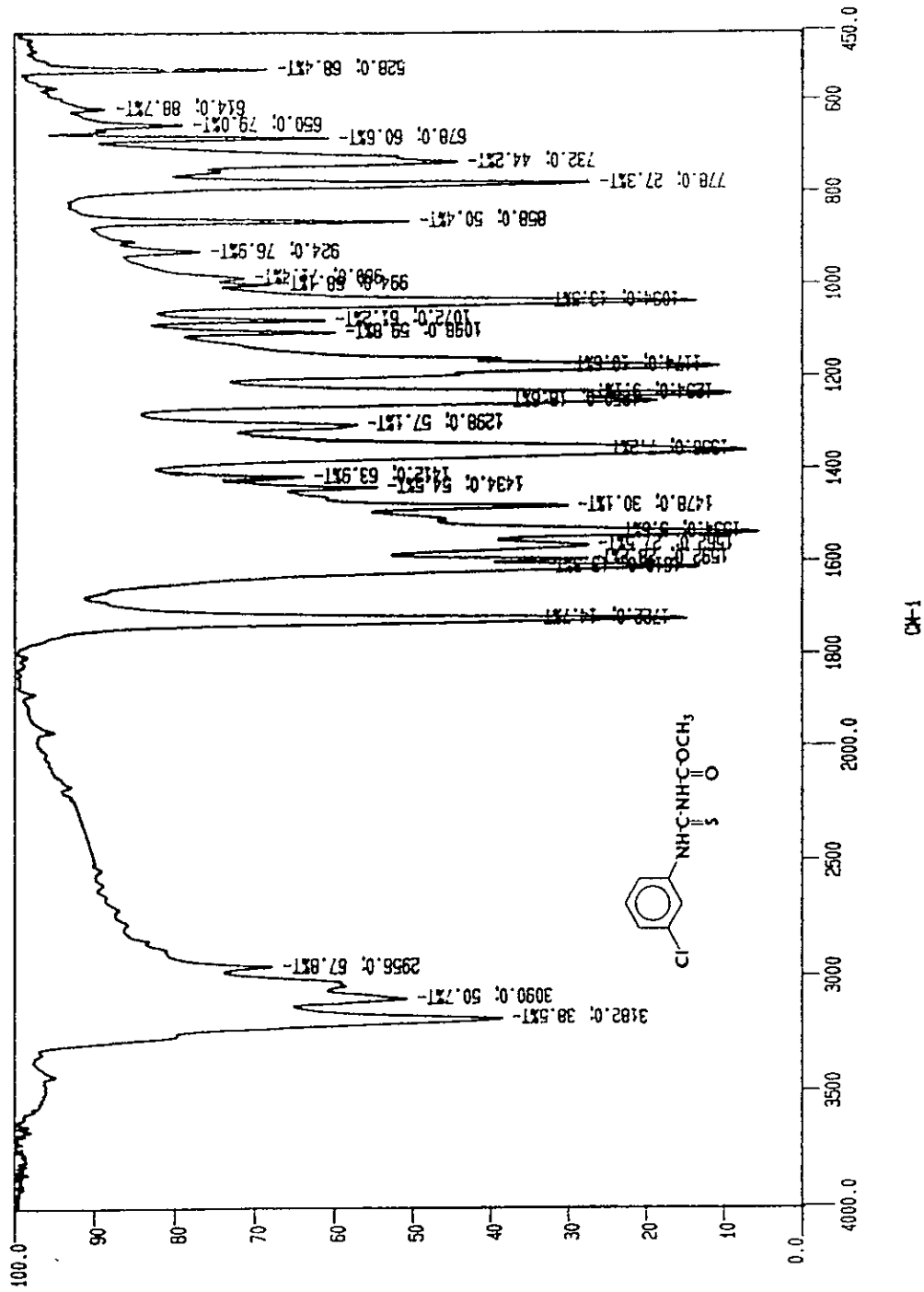
Espectro HETCOR del compuesto N-fenil-N'metoxicarboniltioureido.



Espectro HETCOR del compuesto N-fenil-N'metoxicarboniltioureido.

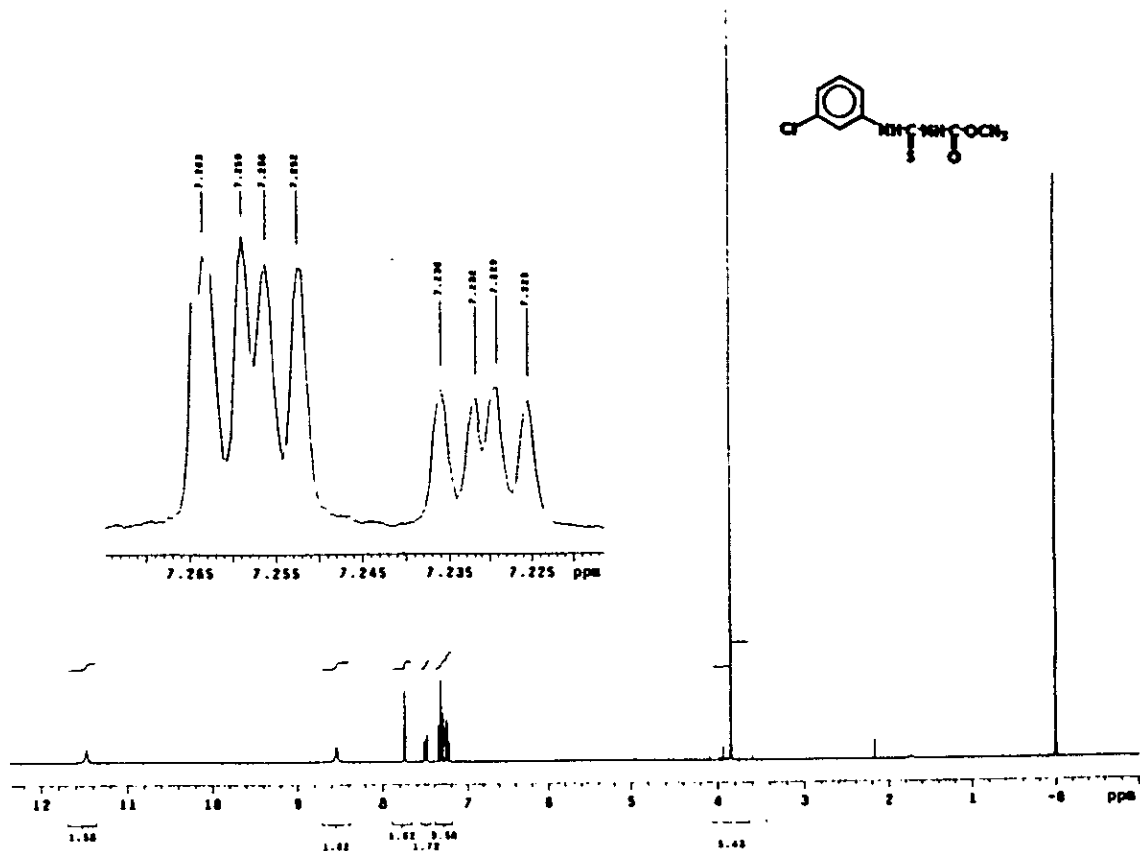


Espectro de Masas del Compuesto N-fenil-N'-metoxicarbonilureido.

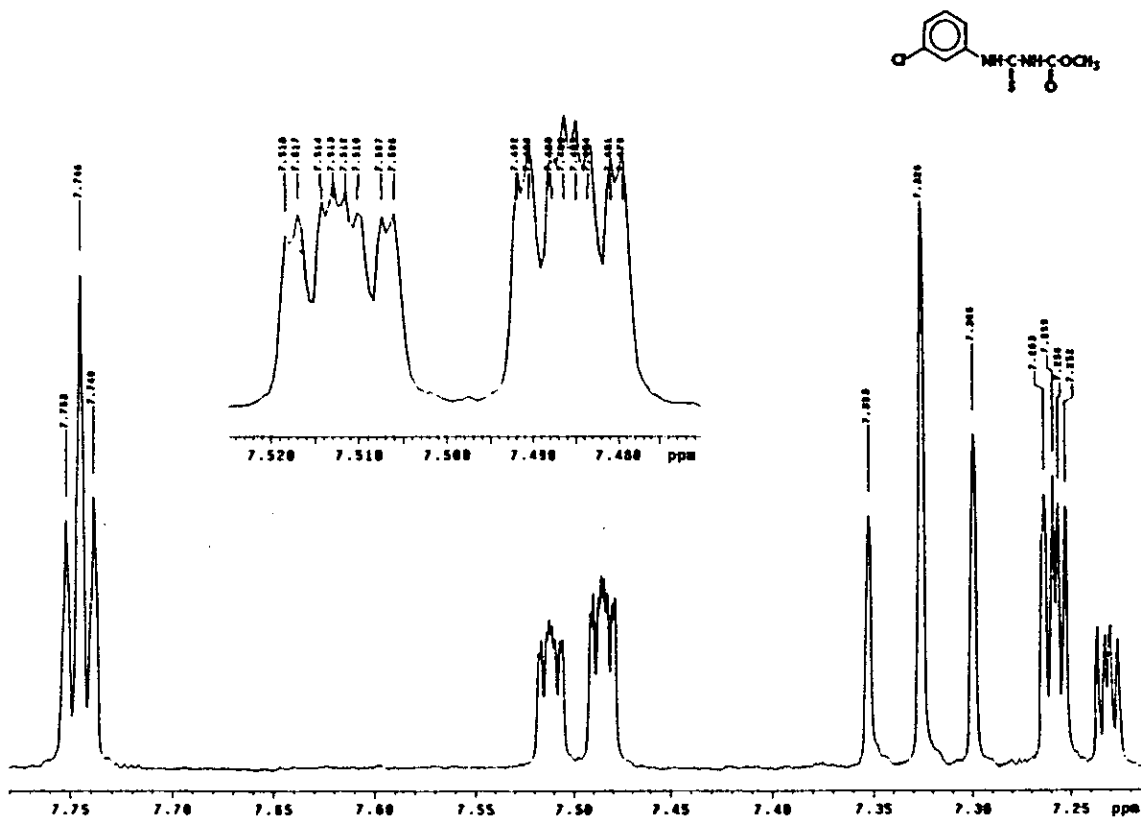


IX

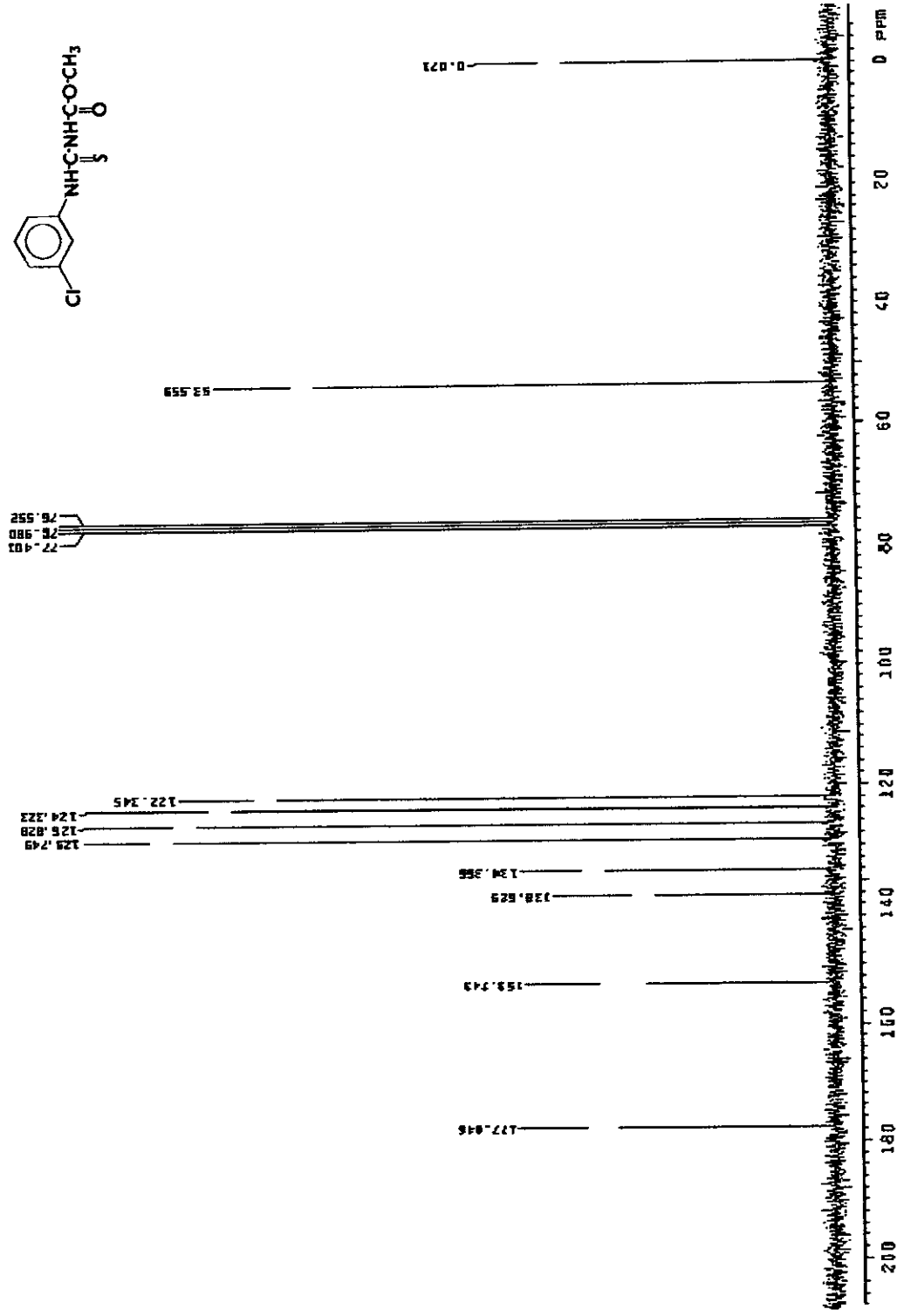
Espectro de IR del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltoureido



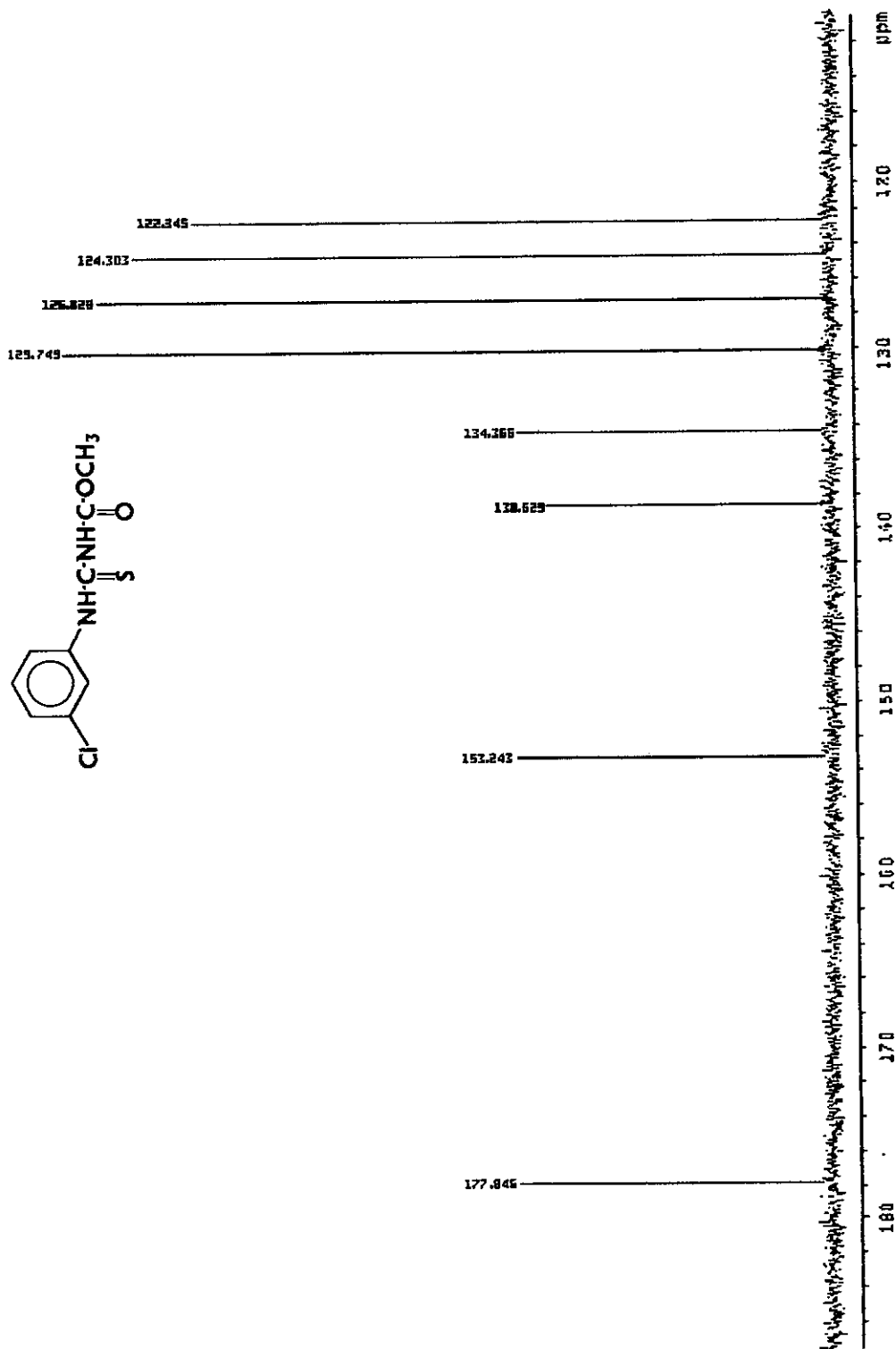
Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarbonilureido.

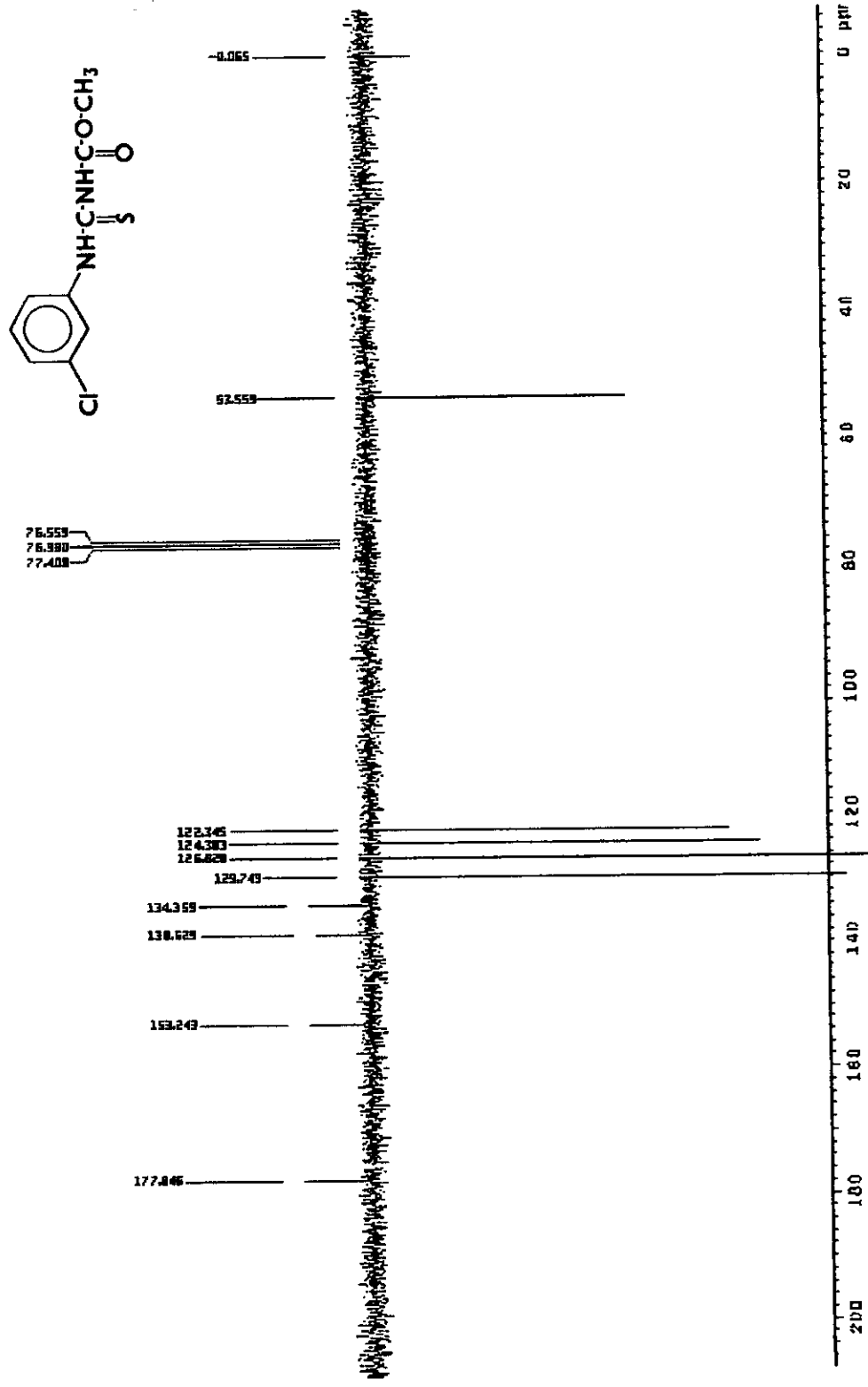


Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarbonilureido.



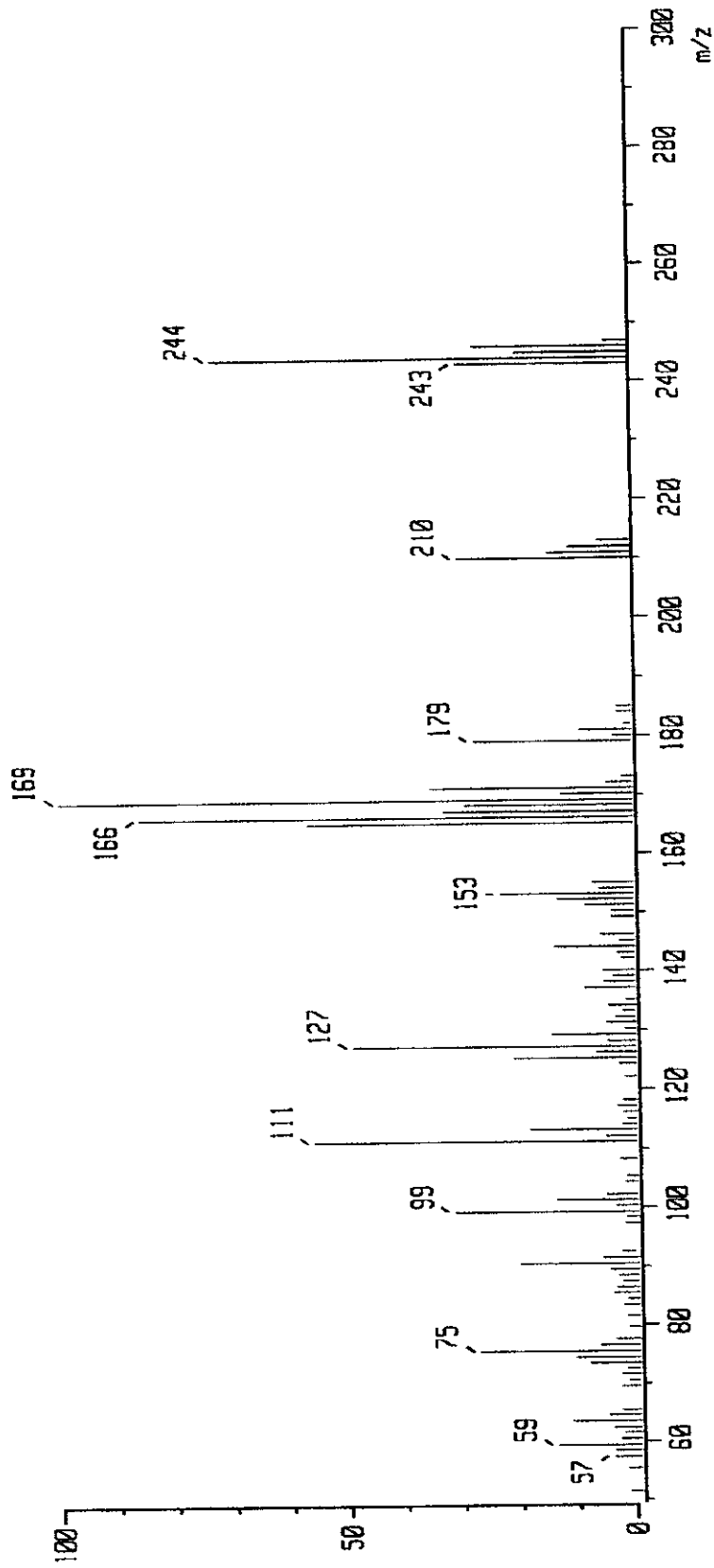
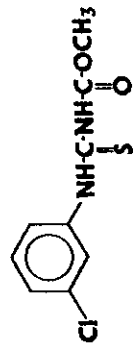
Espectro de <sup>13</sup>C RMN del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido

Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarbonilureido.

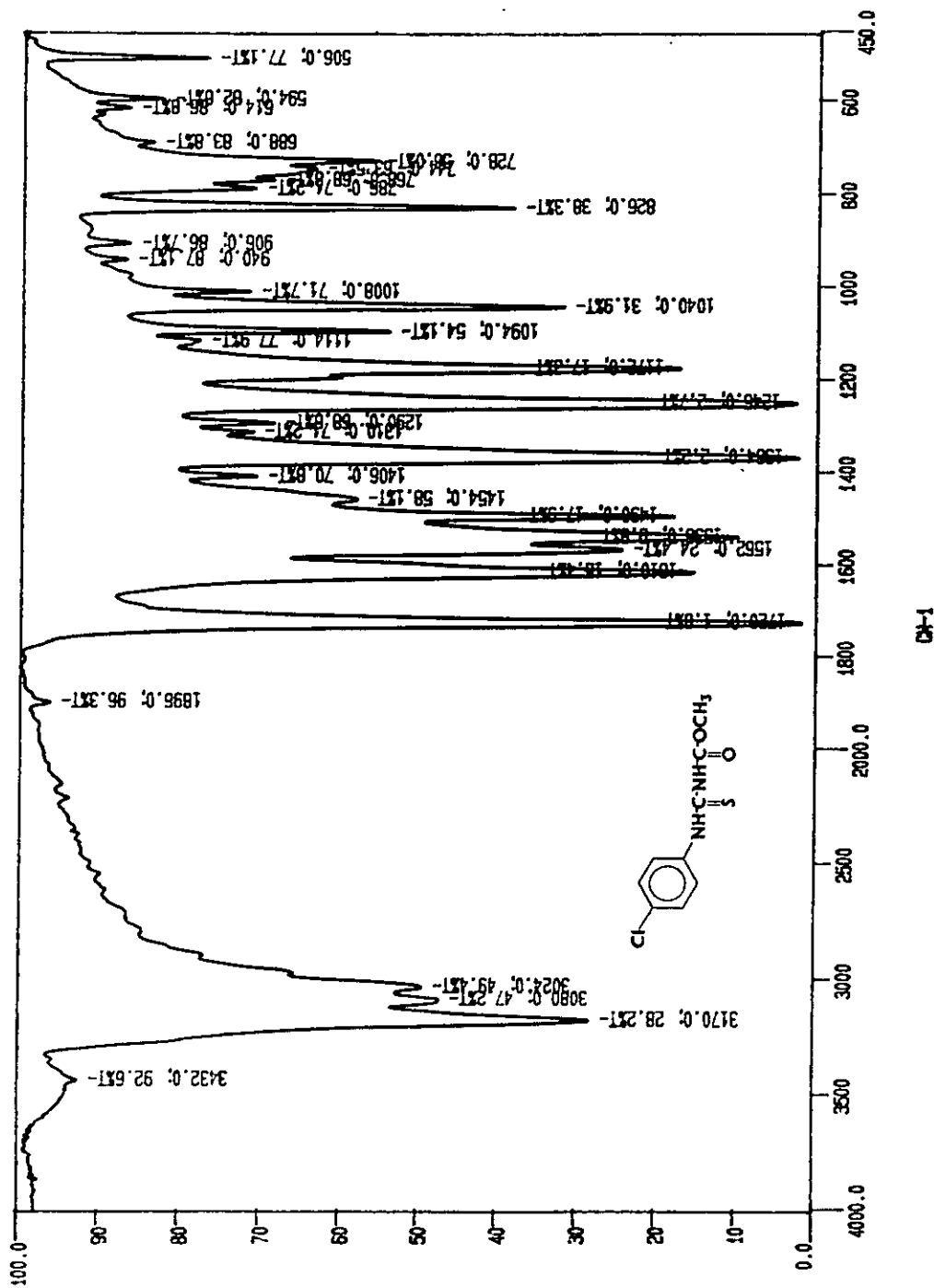


Espectro de APT del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido.

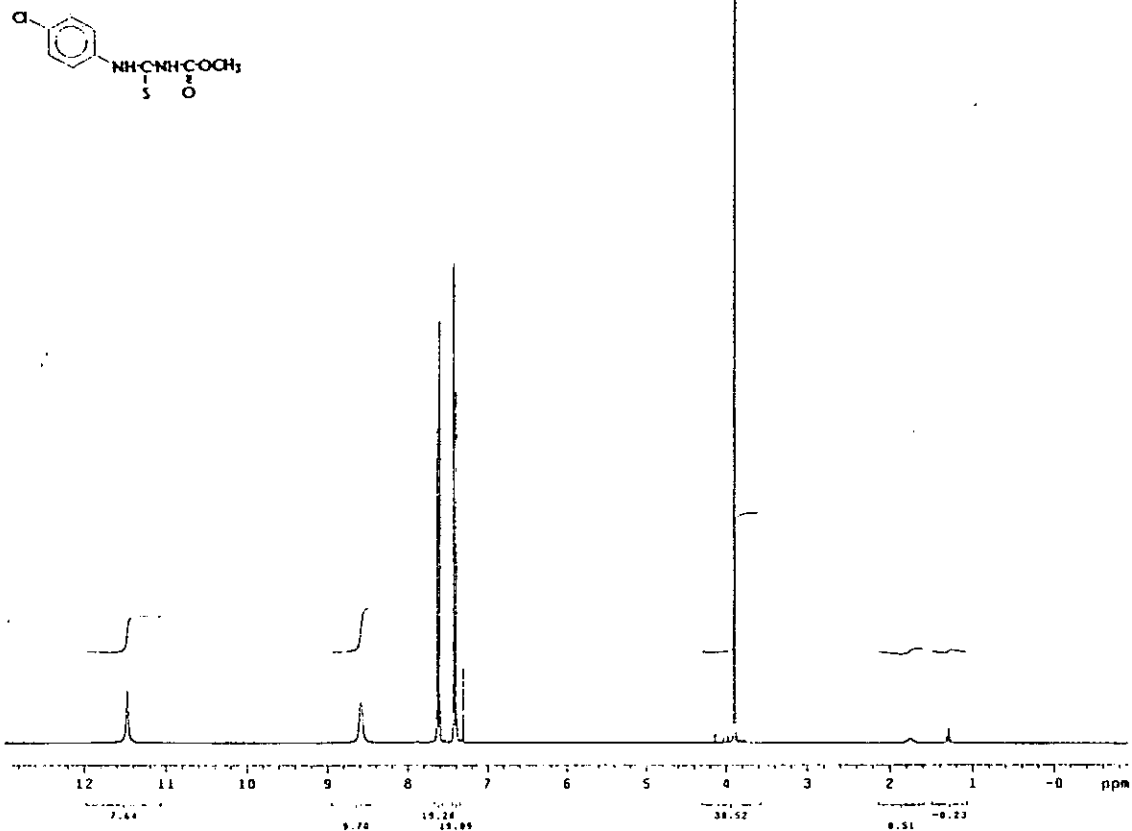




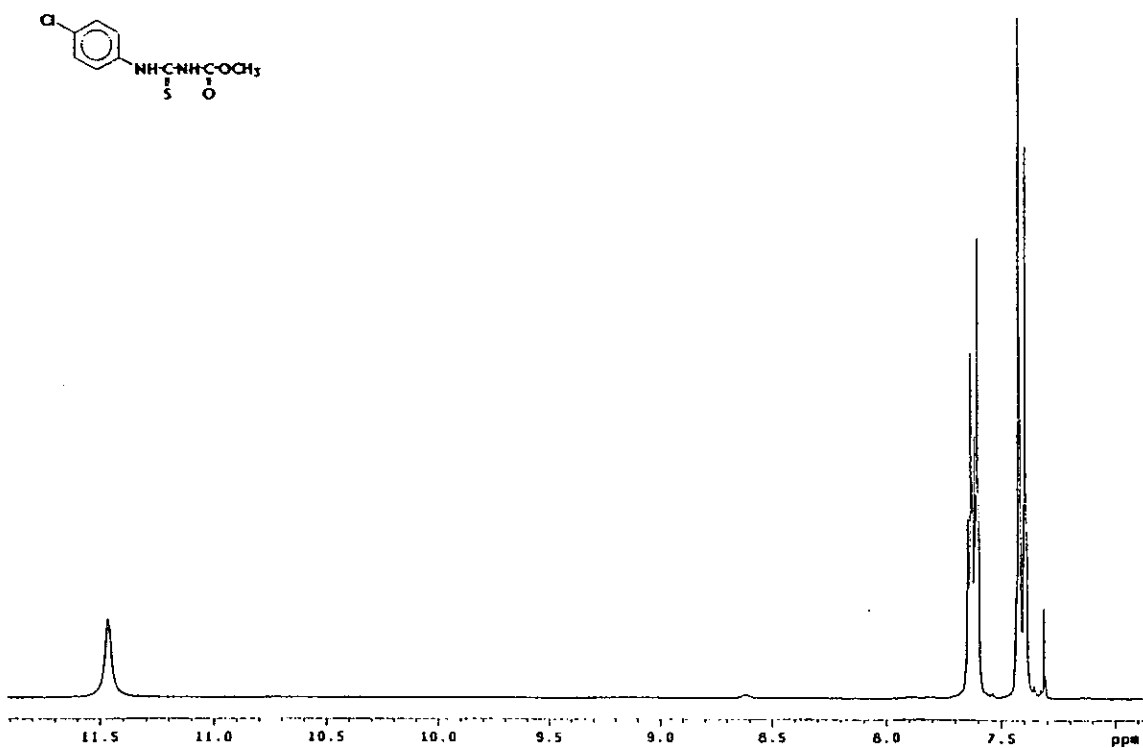
Espectro de Masas del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido.



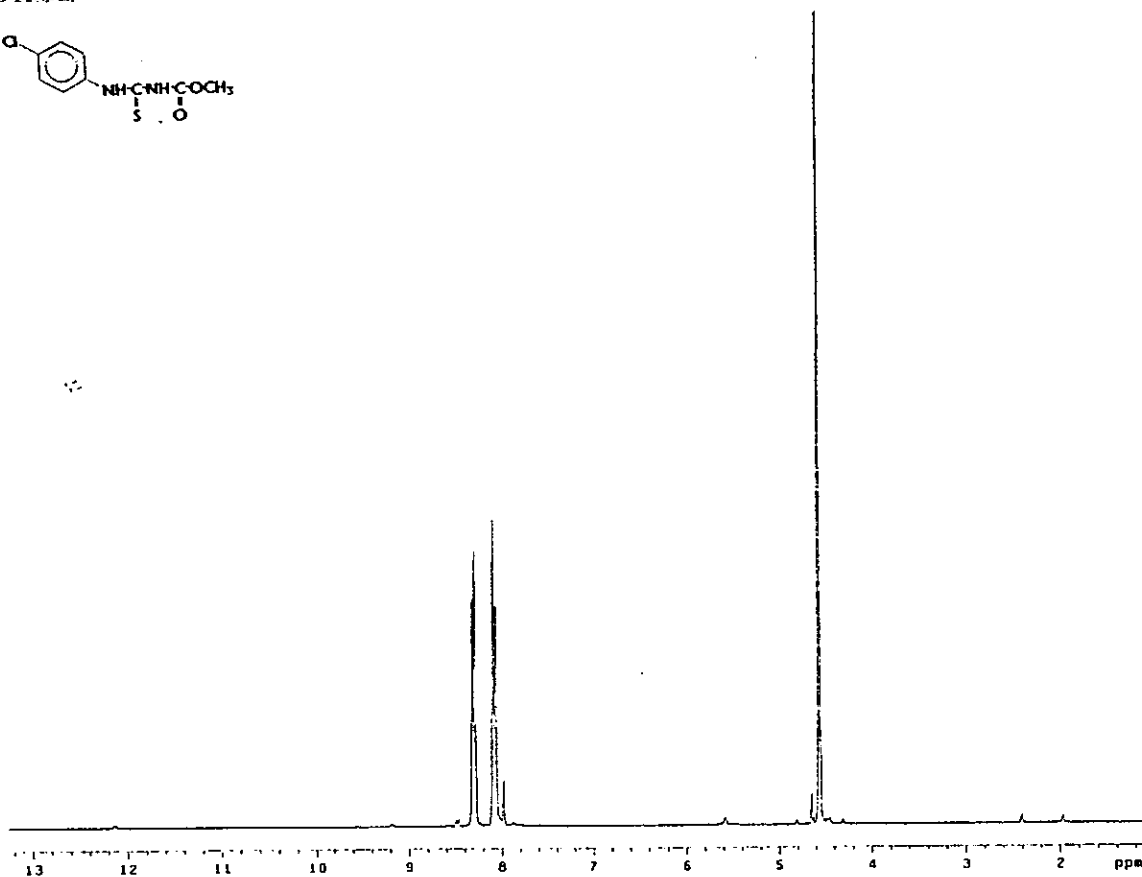
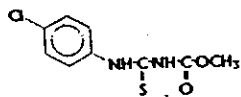
Espectro de IR del compuesto N-(4 -clorofenil)-N'-metoxicarboniloureido



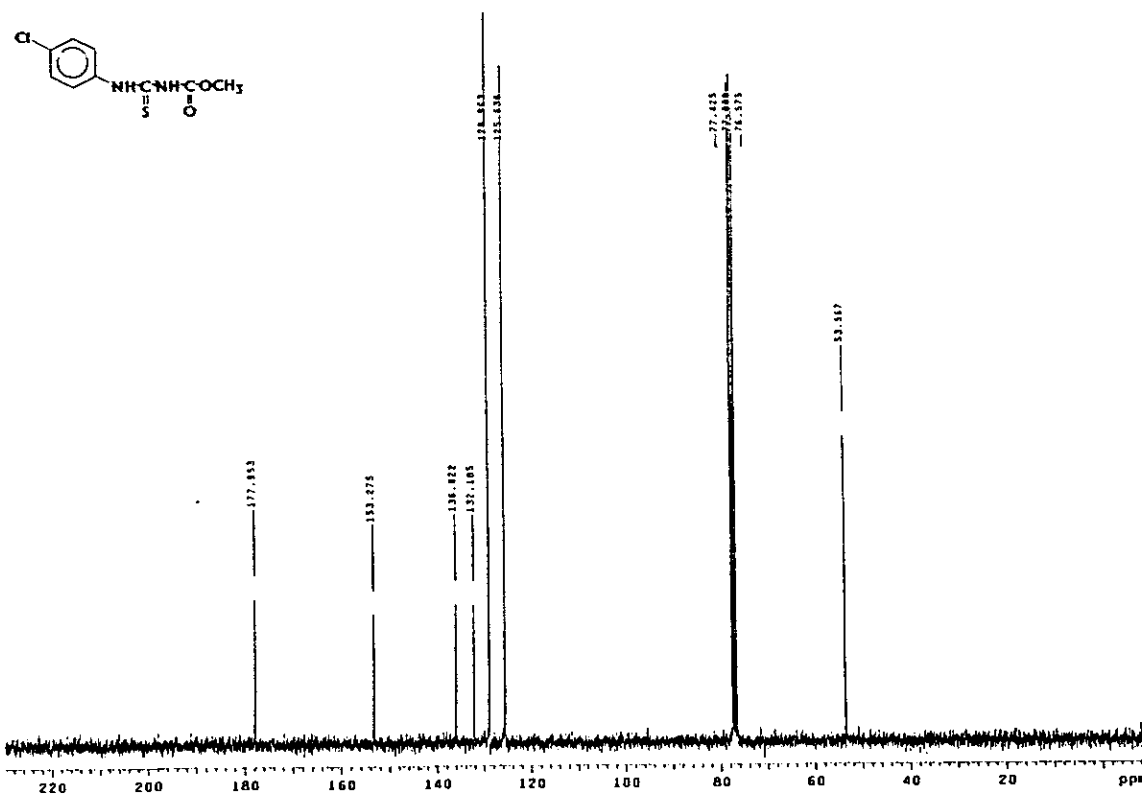
Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(4 -clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido.



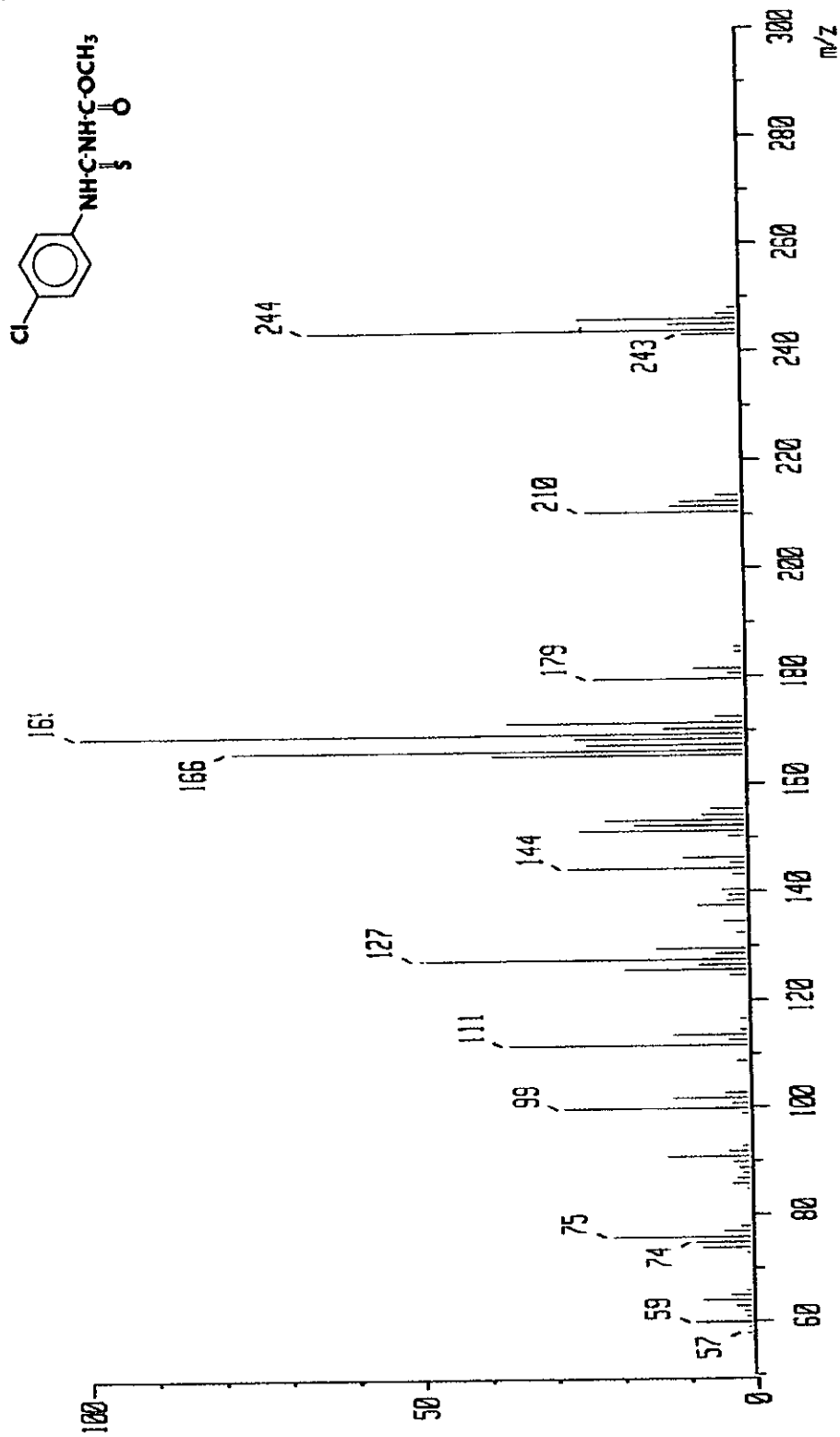
Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(4 -clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido.



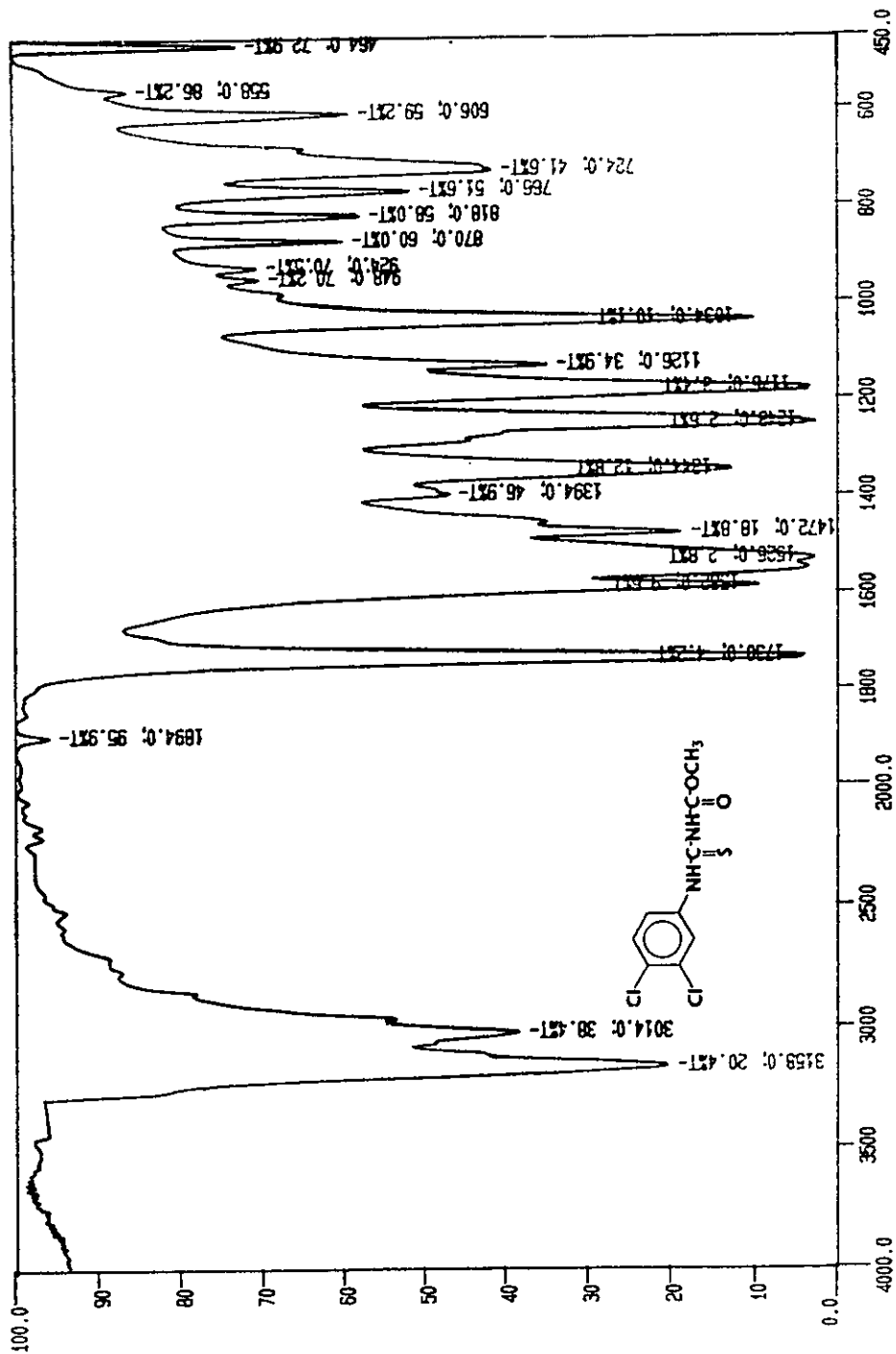
Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(4-clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido.



Espectro de <sup>13</sup>C RMN del compuesto N-(4-clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido.

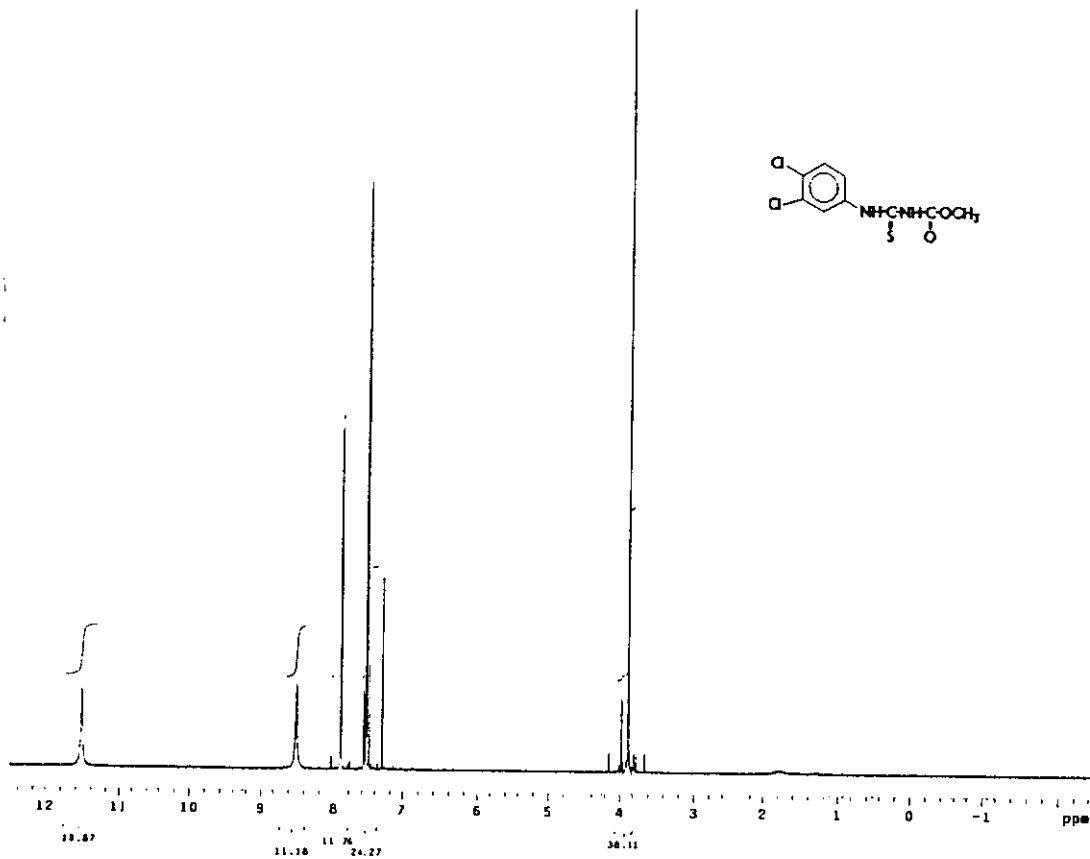


Espectro de Masas del Compuesto N-(4 -clorofenil)-N'-metoxicarboniltiureido.

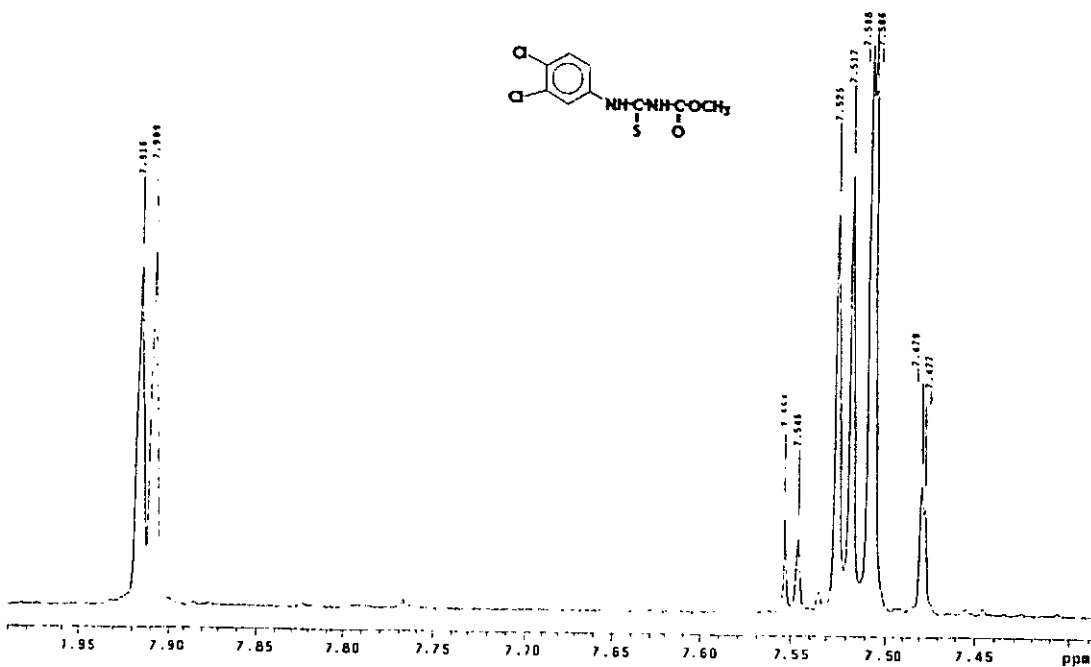


13

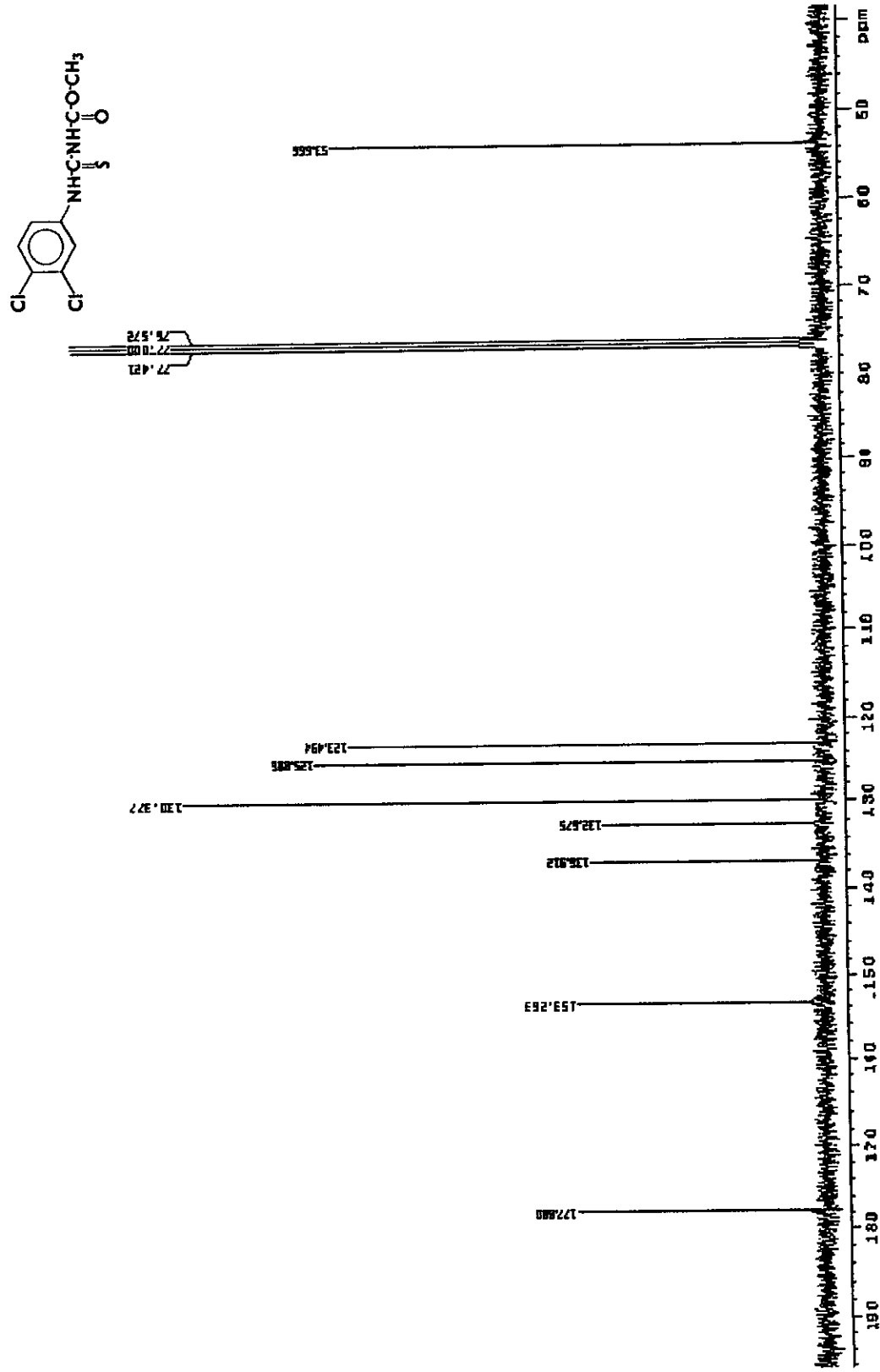
Espectro de IR del compuesto N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido.



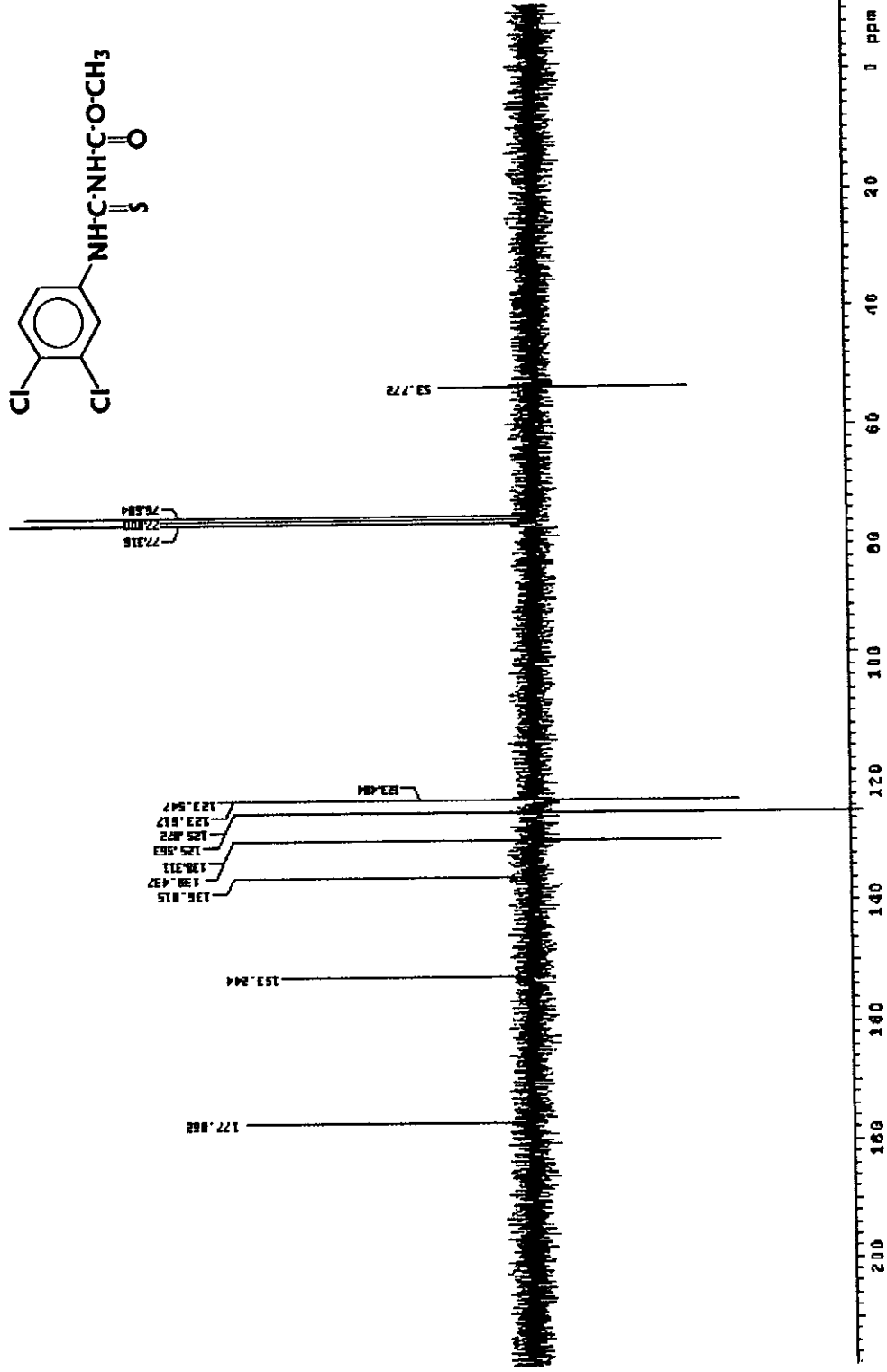
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto N-(3,4 -diclorofenil)-N' metoxicarboniltioureido.



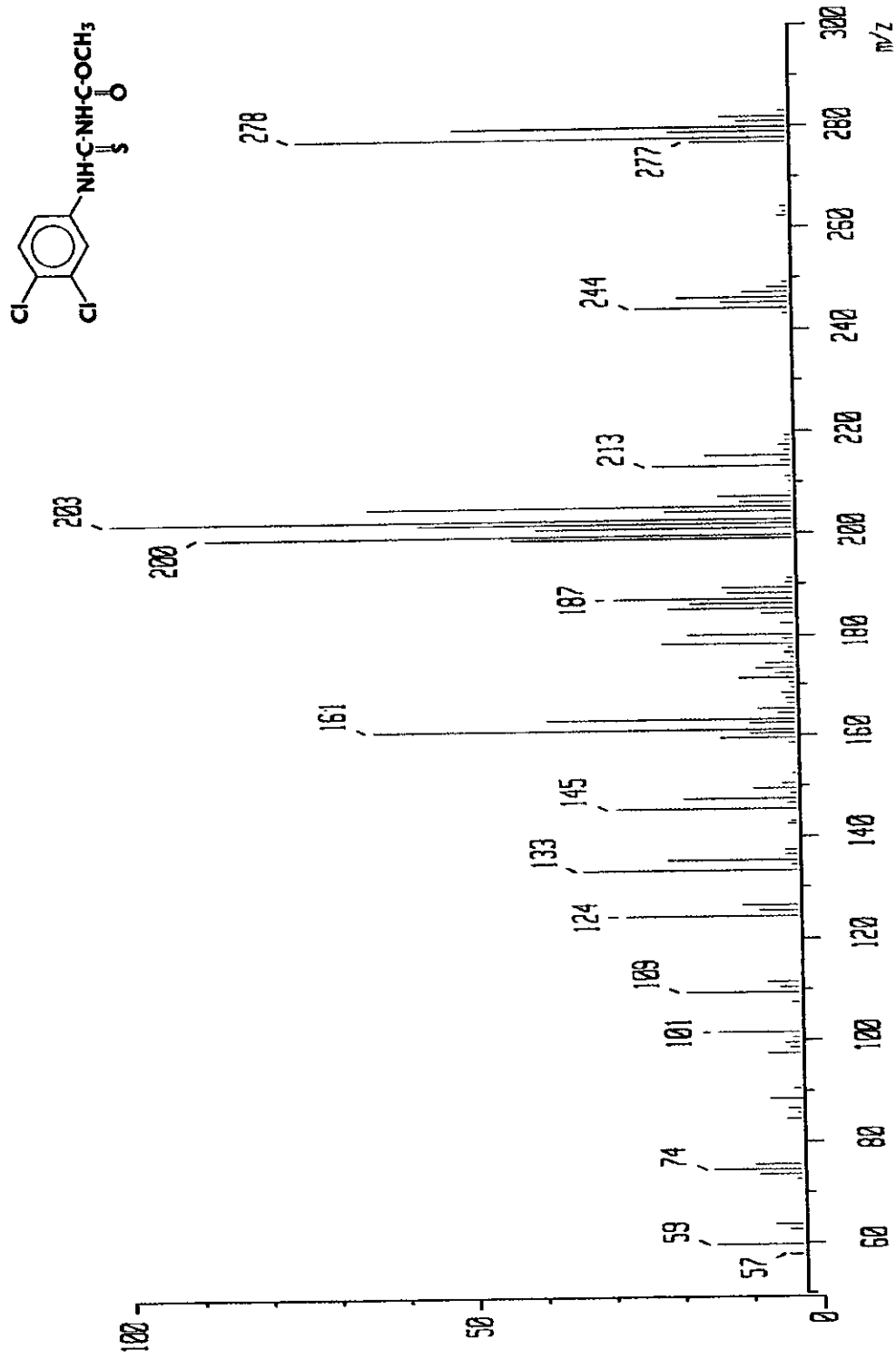
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto N-(3,4 -diclorofenil)-N' metoxicarboniltioureido.

Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido.

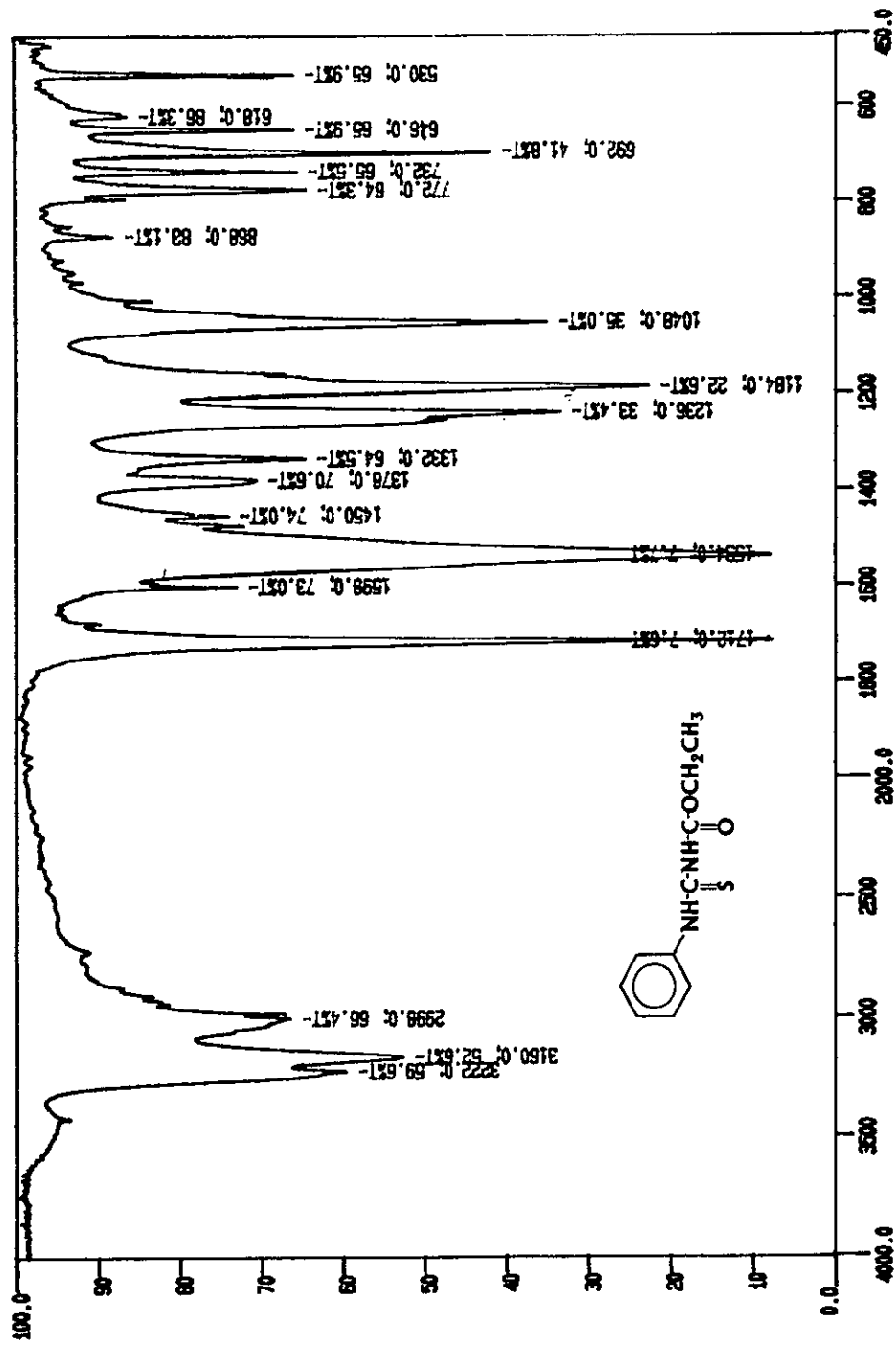




Espectro APT del compuesto N-(3,4-diclorofenil)-N'-metoxicarboniltioureido.



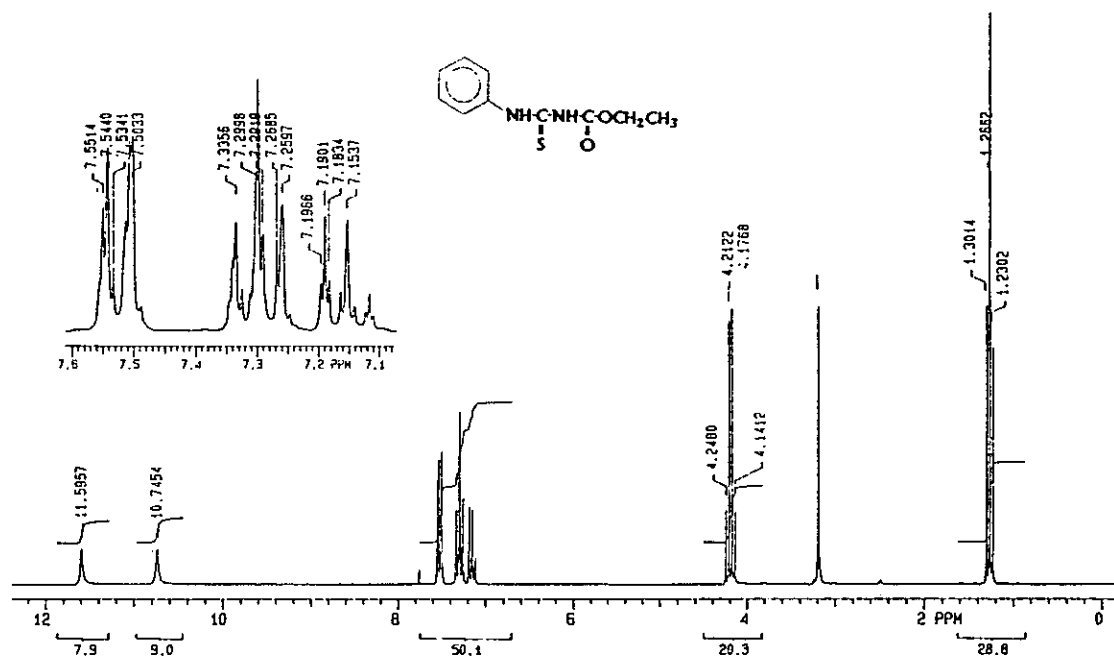
Espectro de Masas del Compuesto N-(3,4 -dichlorofenil)-N'-metoxicarbonilureido



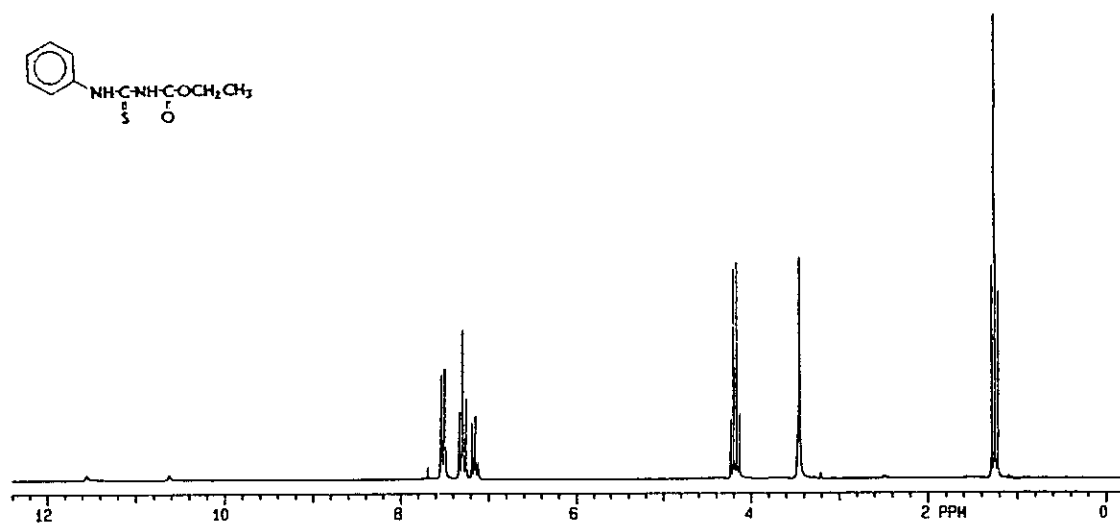
11

cm-1

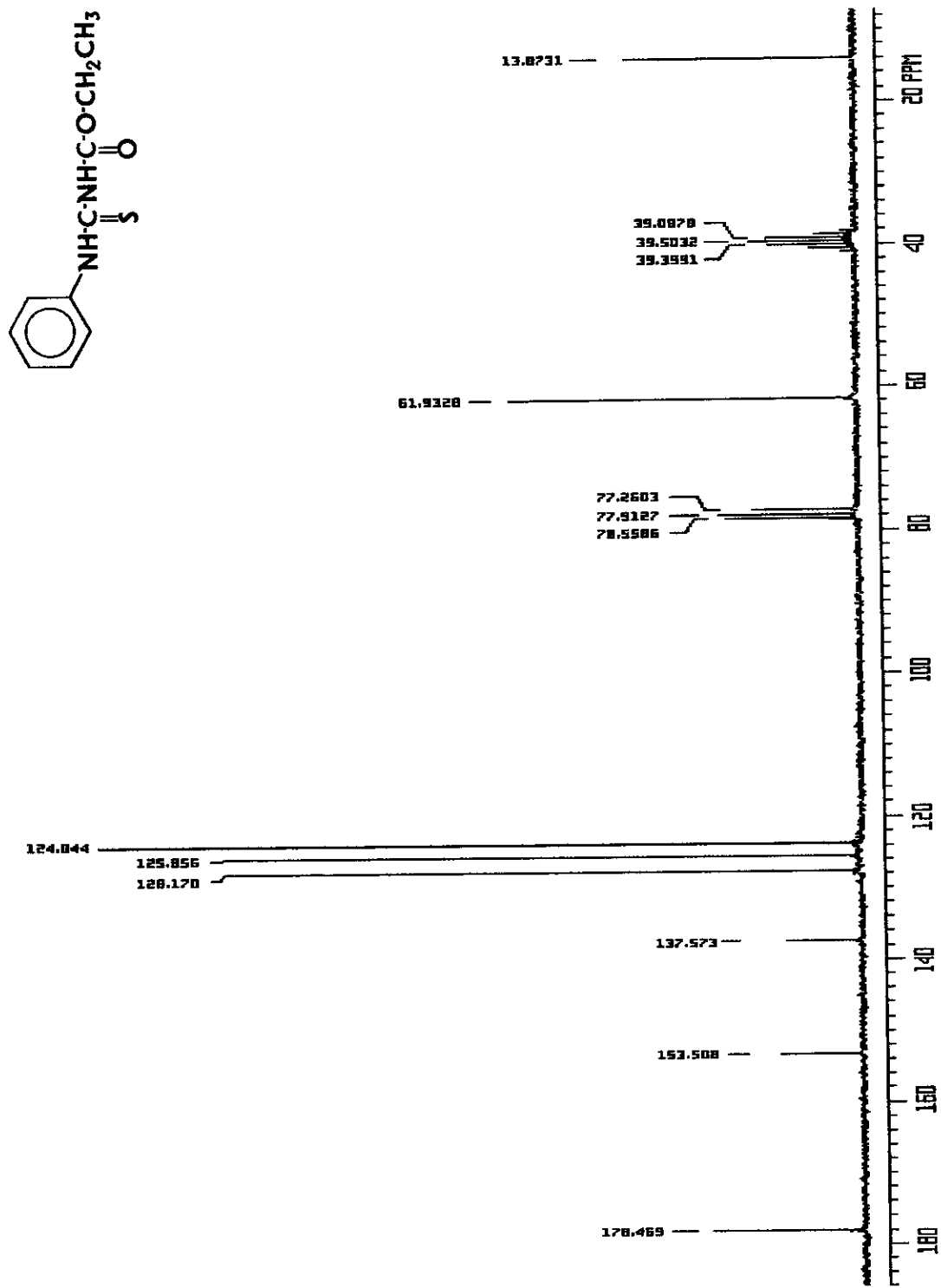
N-fenil-N'-etoxicarboniltioureido.

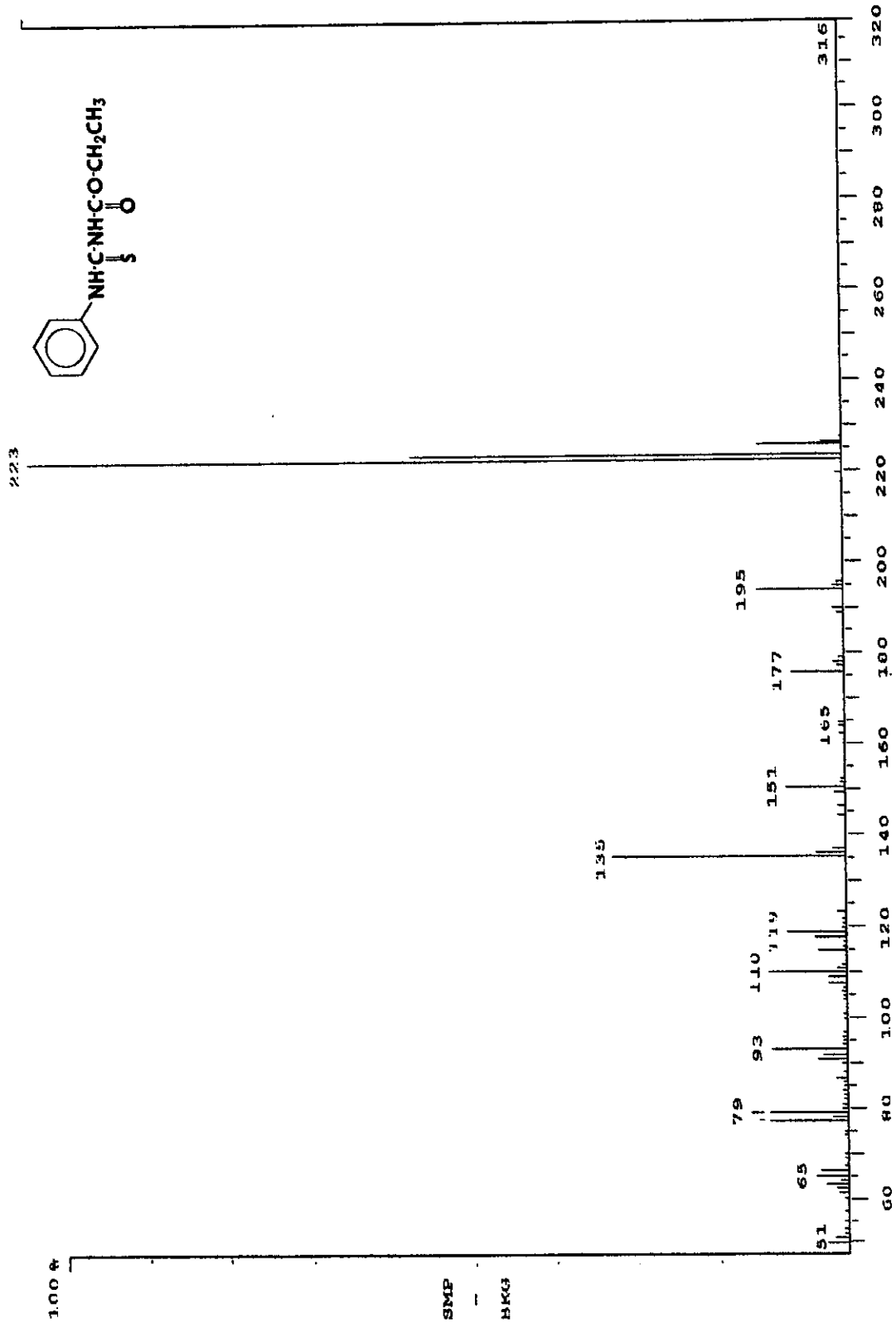


Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto N-fenil-N'-etoxicarboniltioureido.

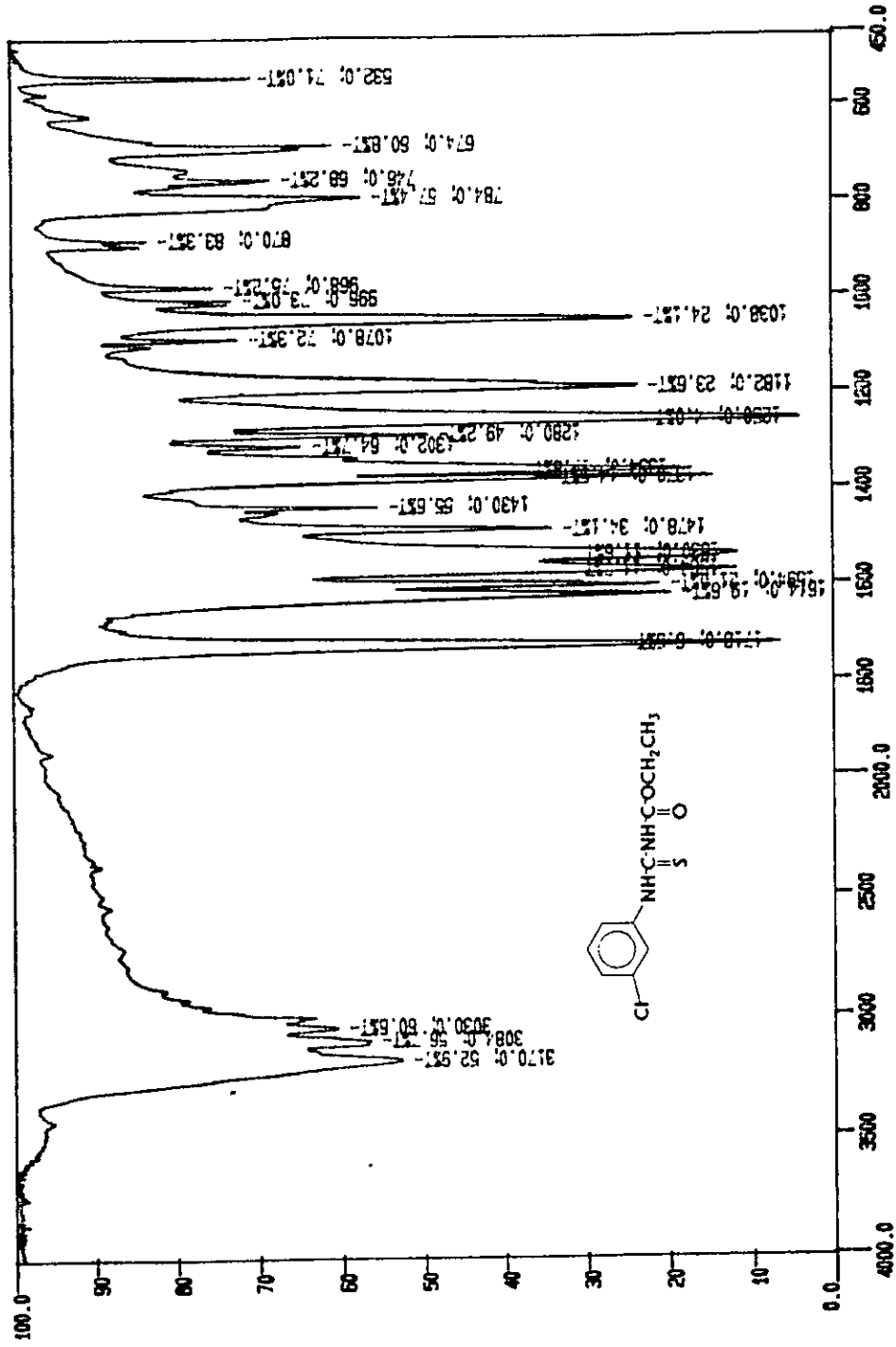


Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto N-fenil-N'-etoxicarboniltioureido +  $\text{D}_2\text{O}$ .

Espectro de  $^{13}\text{C}$  del Compuesto N-fenil-N'-etoxicarboniltiureido.

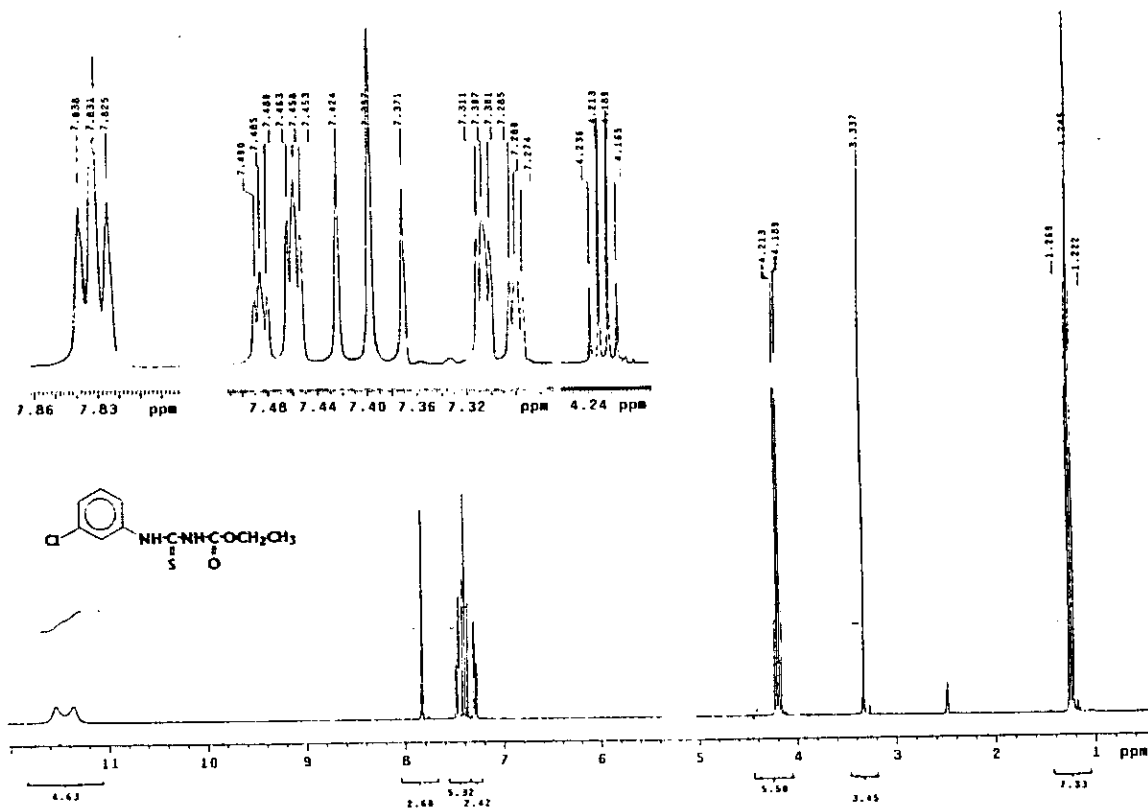


Espectro de Masas del compuesto N-fenil-N'-etoxicarboniltioureido.

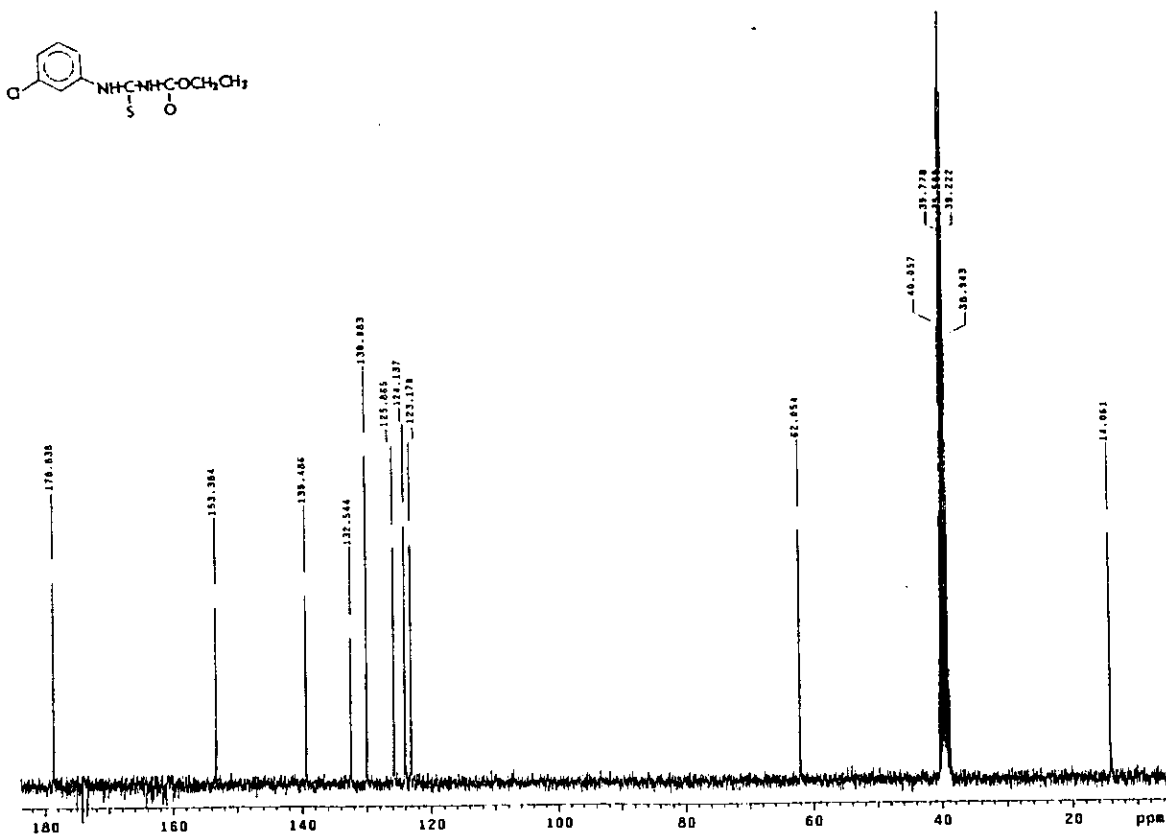


11

<sup>13</sup>C-NMR  
N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido.

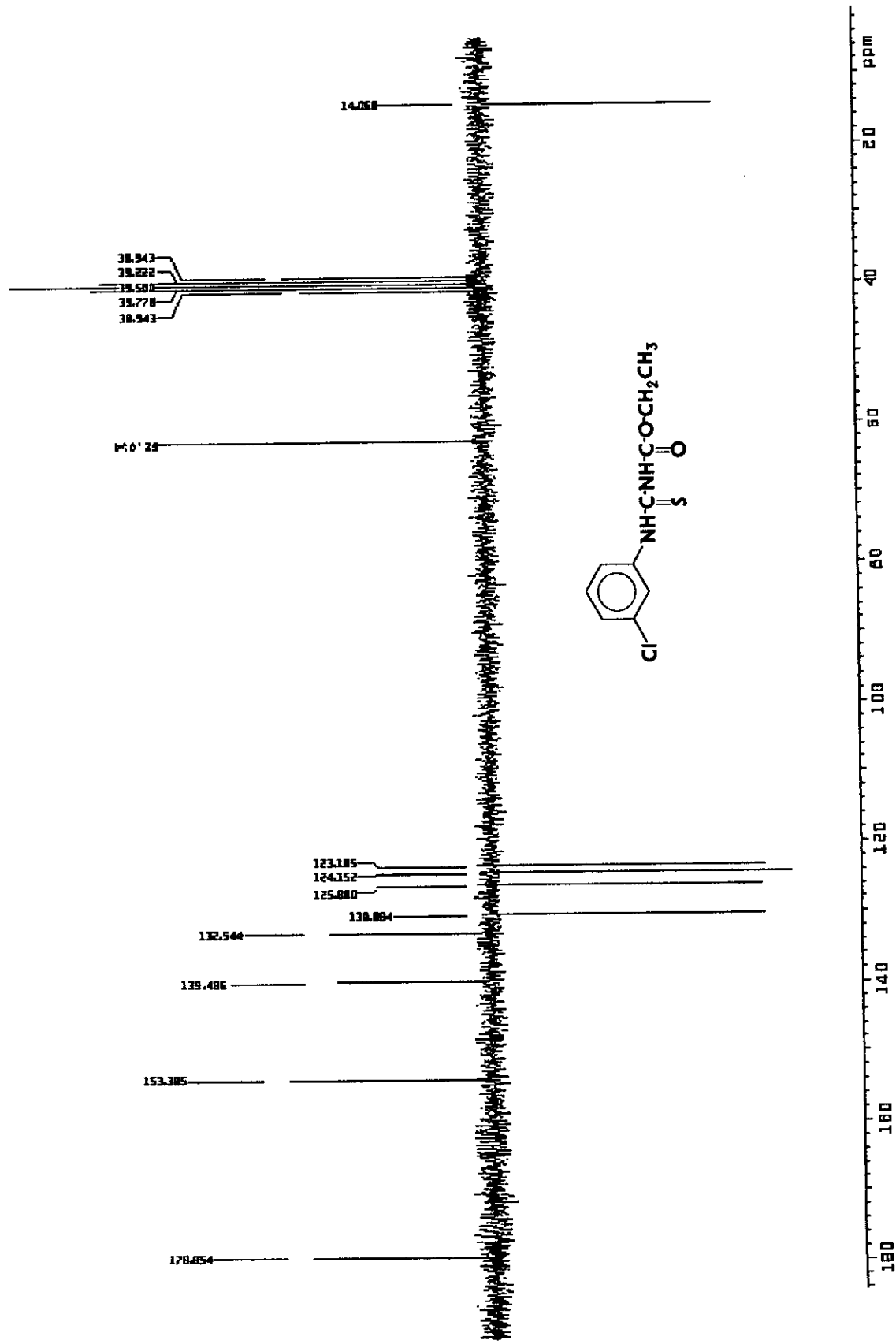


Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltiureido.

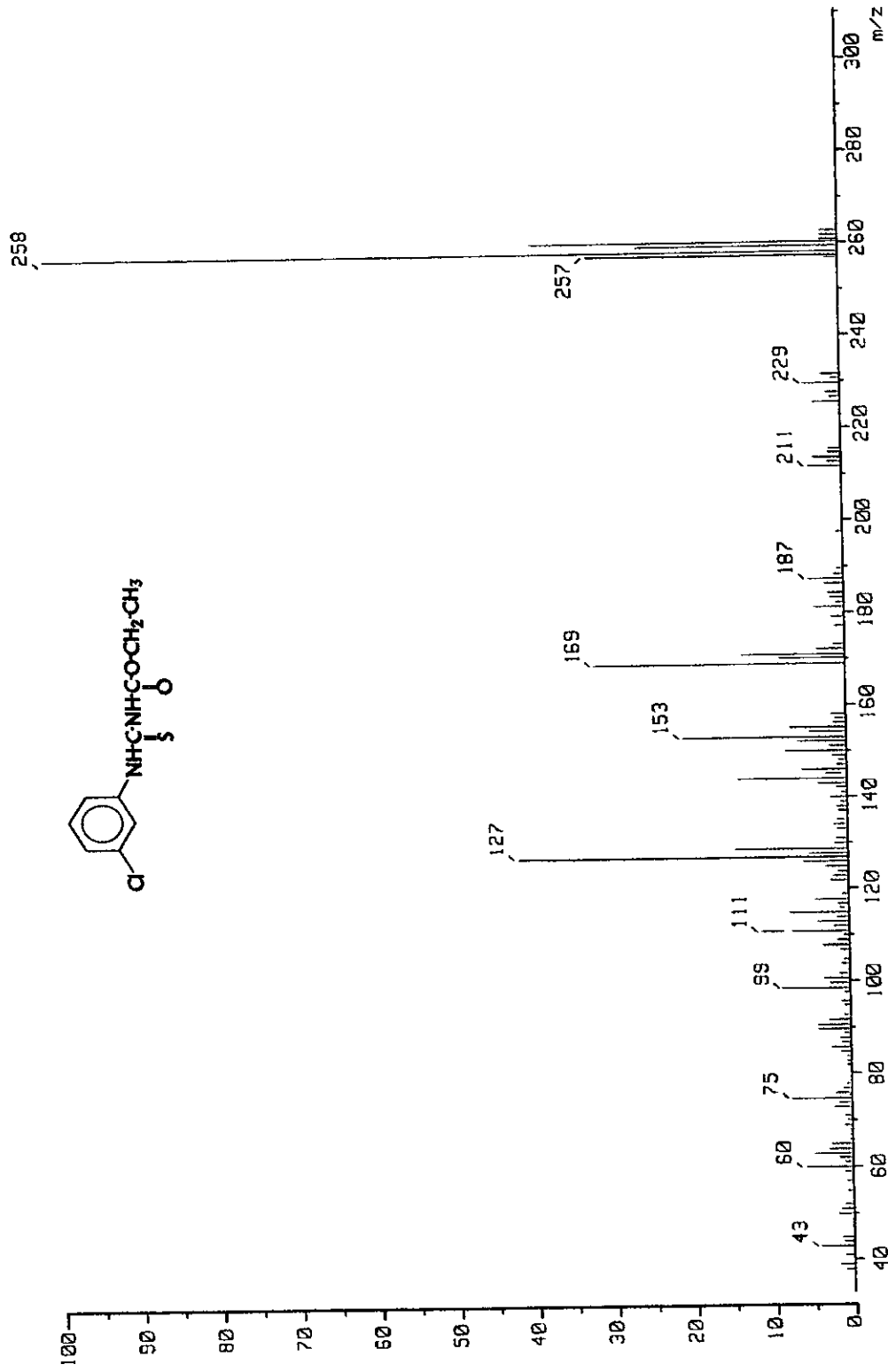


Espectro de <sup>13</sup>C RMN del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltiureido.

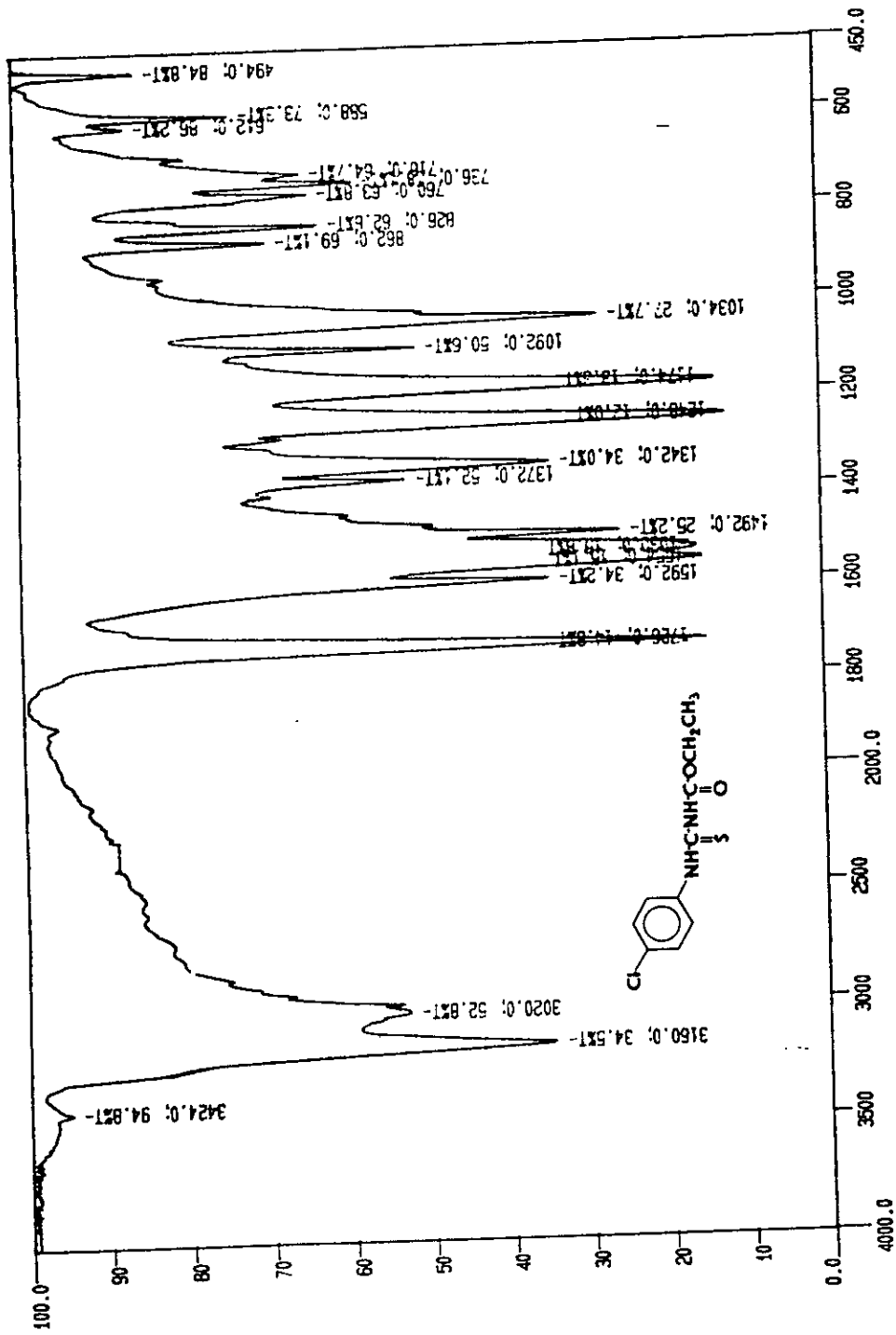




Espectro APT del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido.

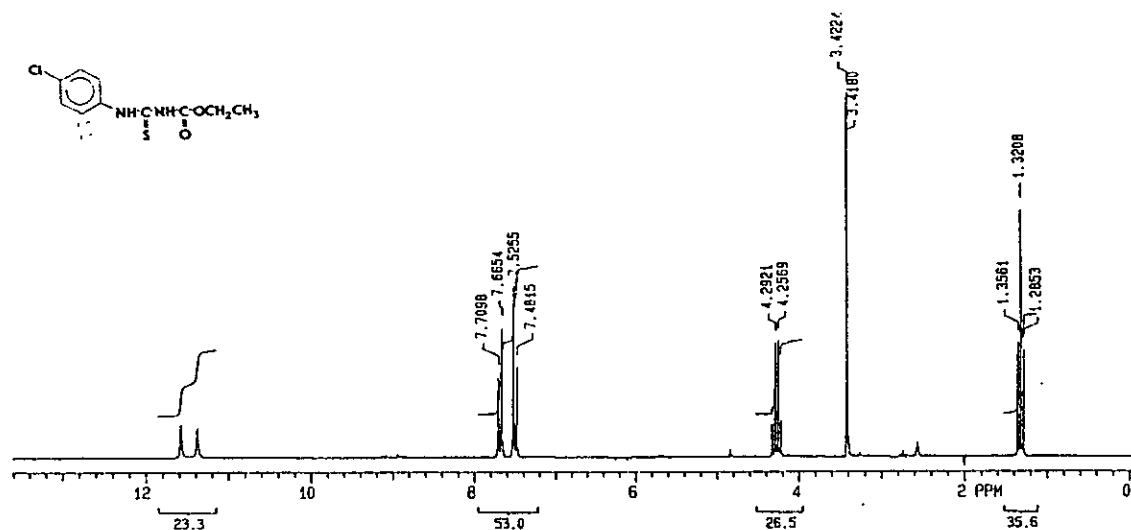


Espectro de Masas del compuesto N-(3-clorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido

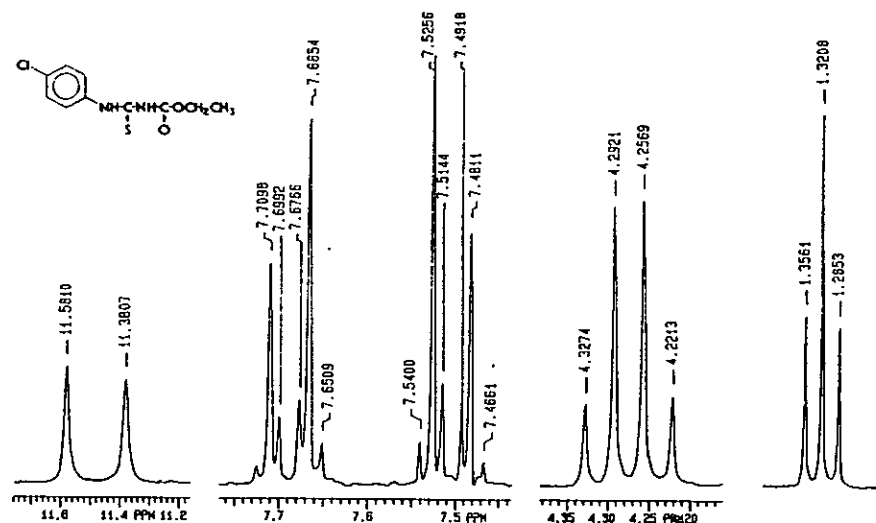


CH-1

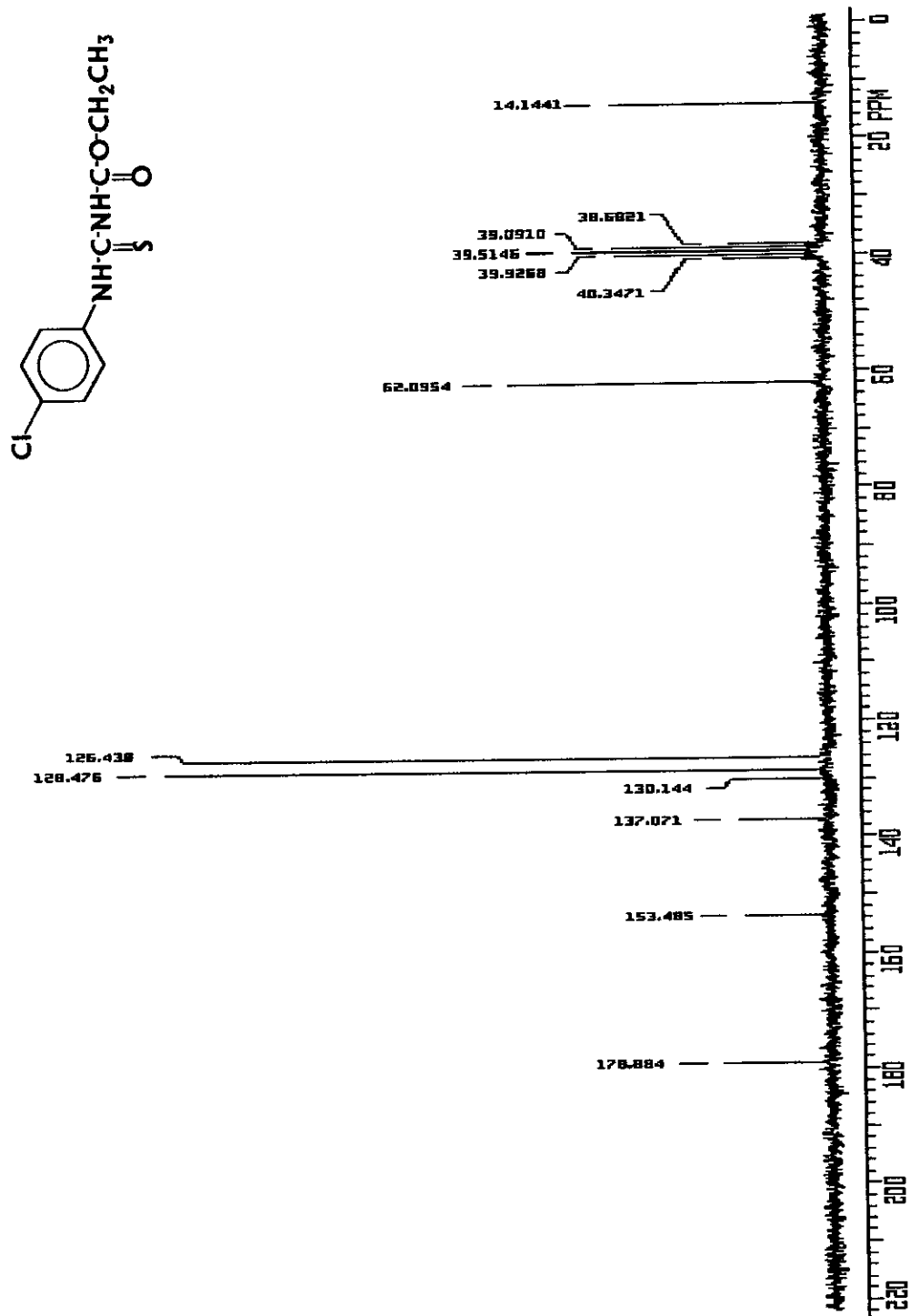
Espectro de IR del compuesto N-(4-clorofenil)-N' - etoxicarboniltioureido.



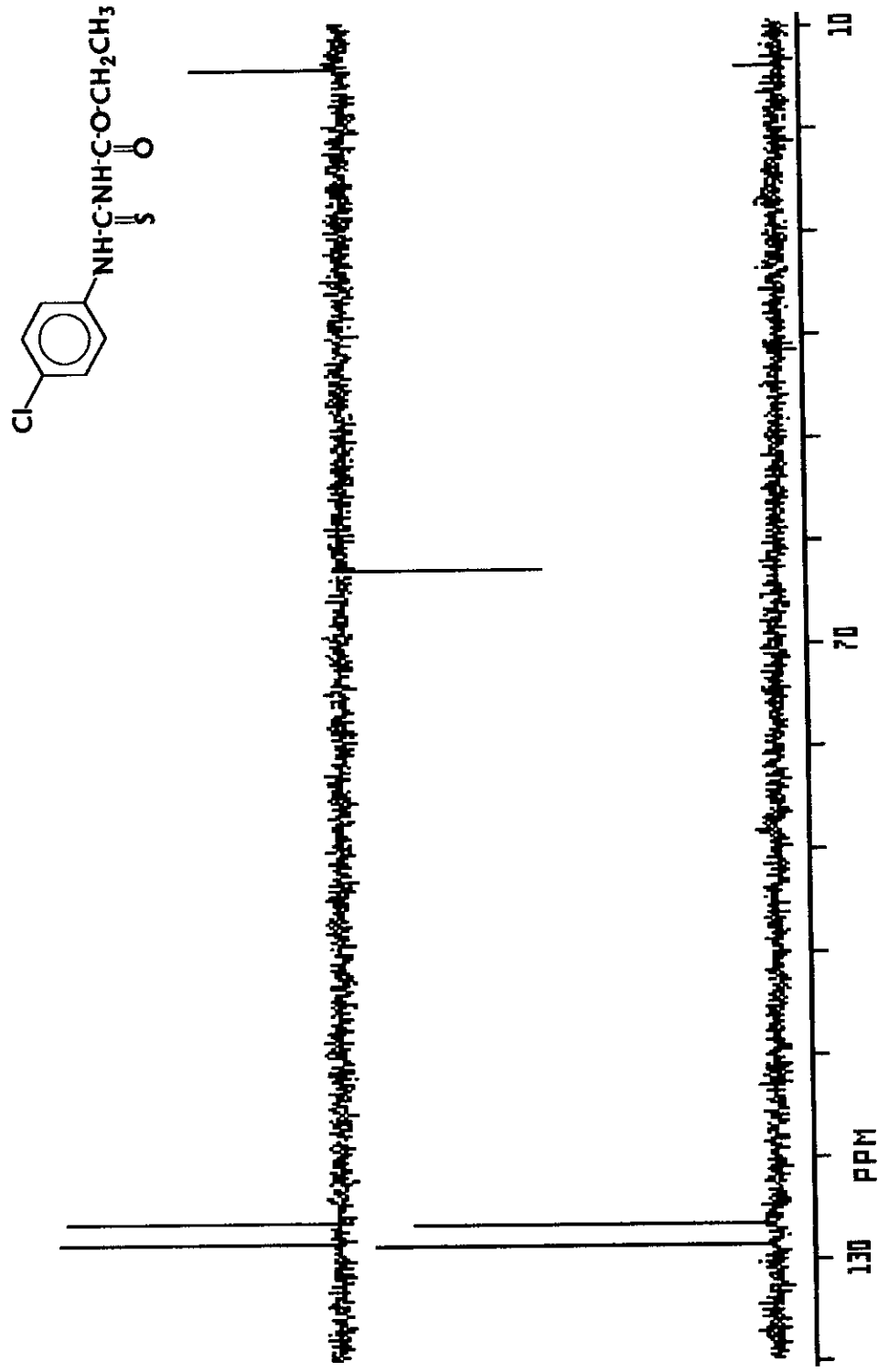
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarboniltiureido.



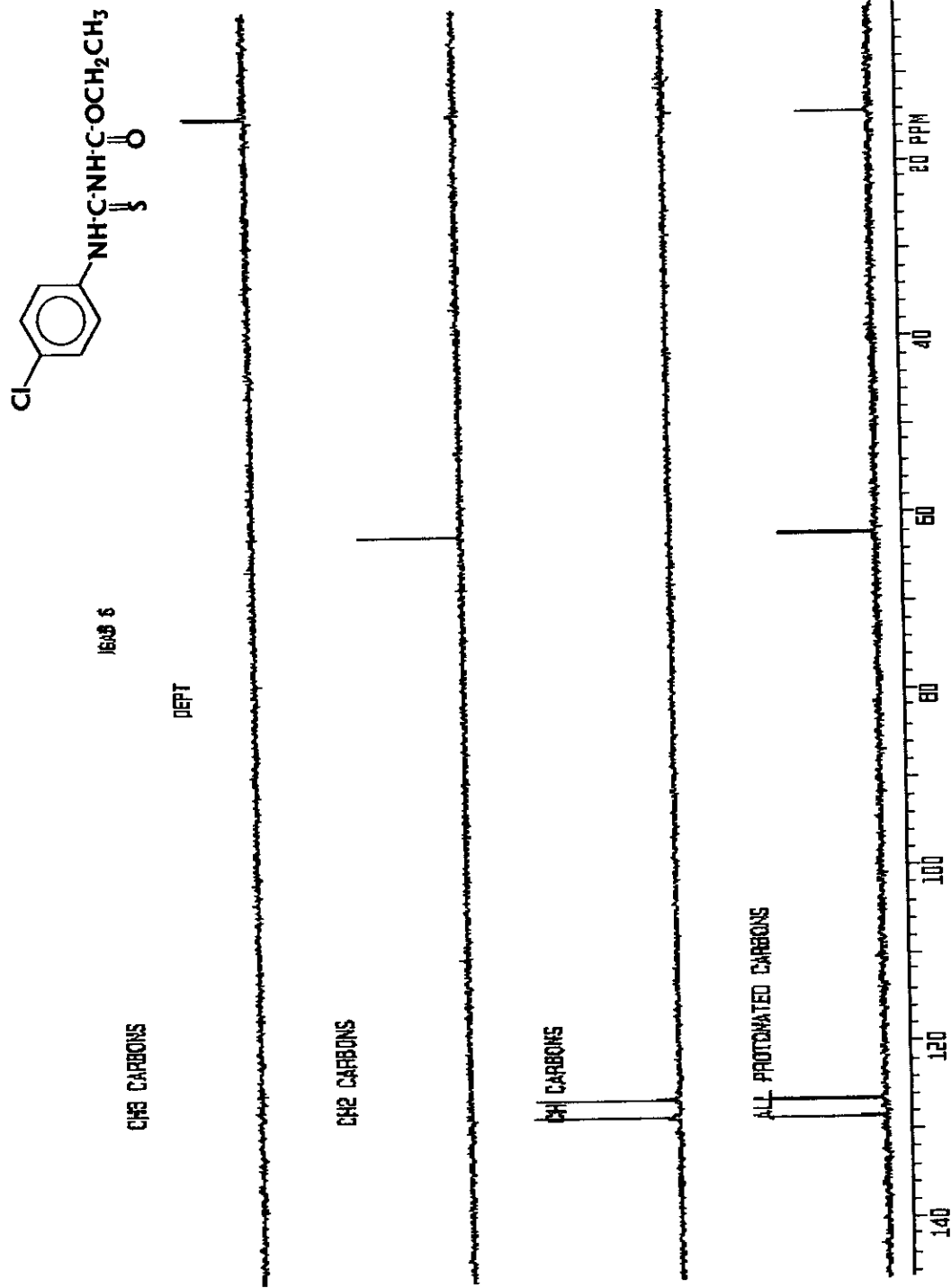
Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del compuesto N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarboniltiureido.



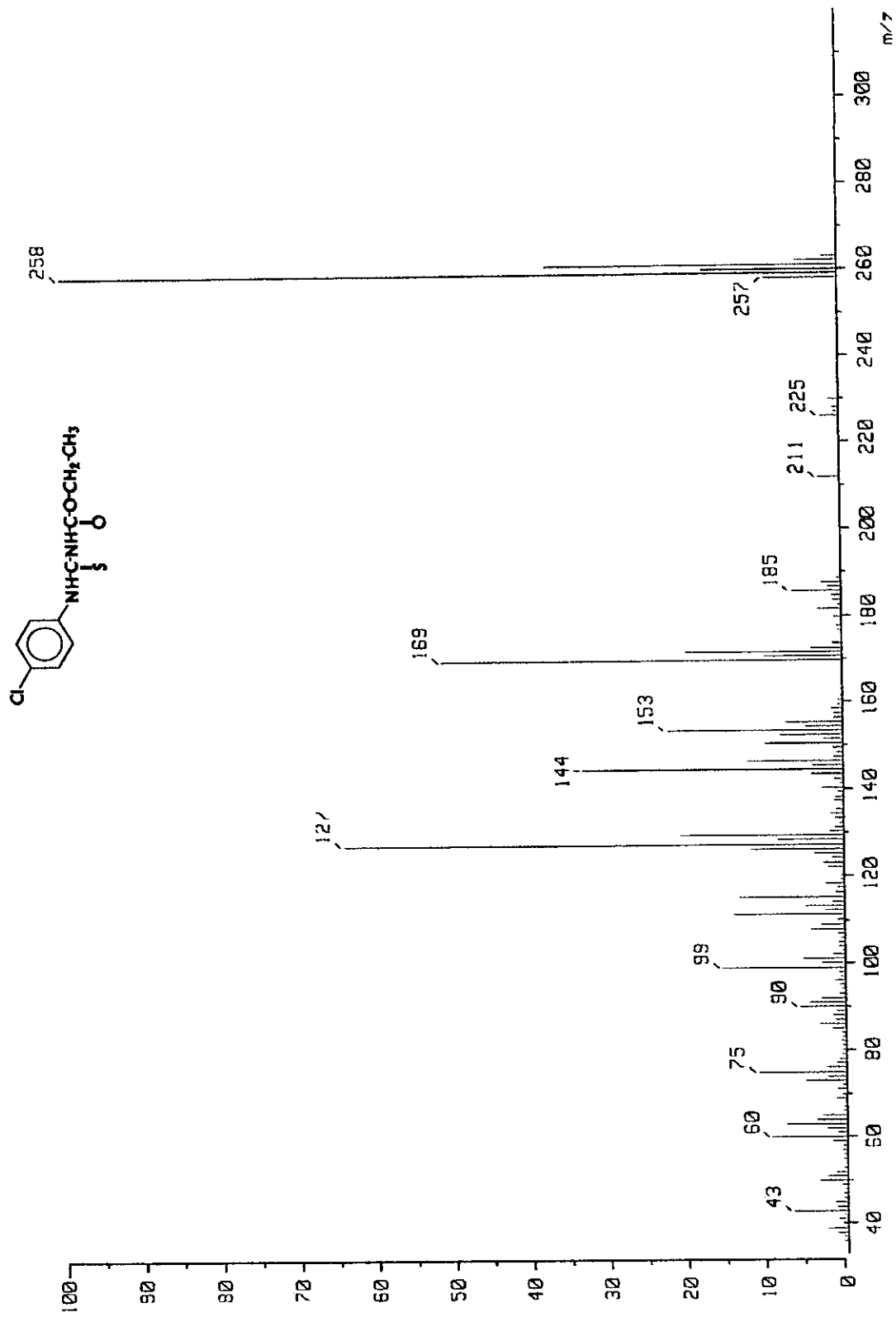
Espectro de <sup>13</sup>C RMN del compuesto N-(4 clorofenil)- N'-etoxicarboniltiureido.



Espectro DEPT del compuesto N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarbonilureido.

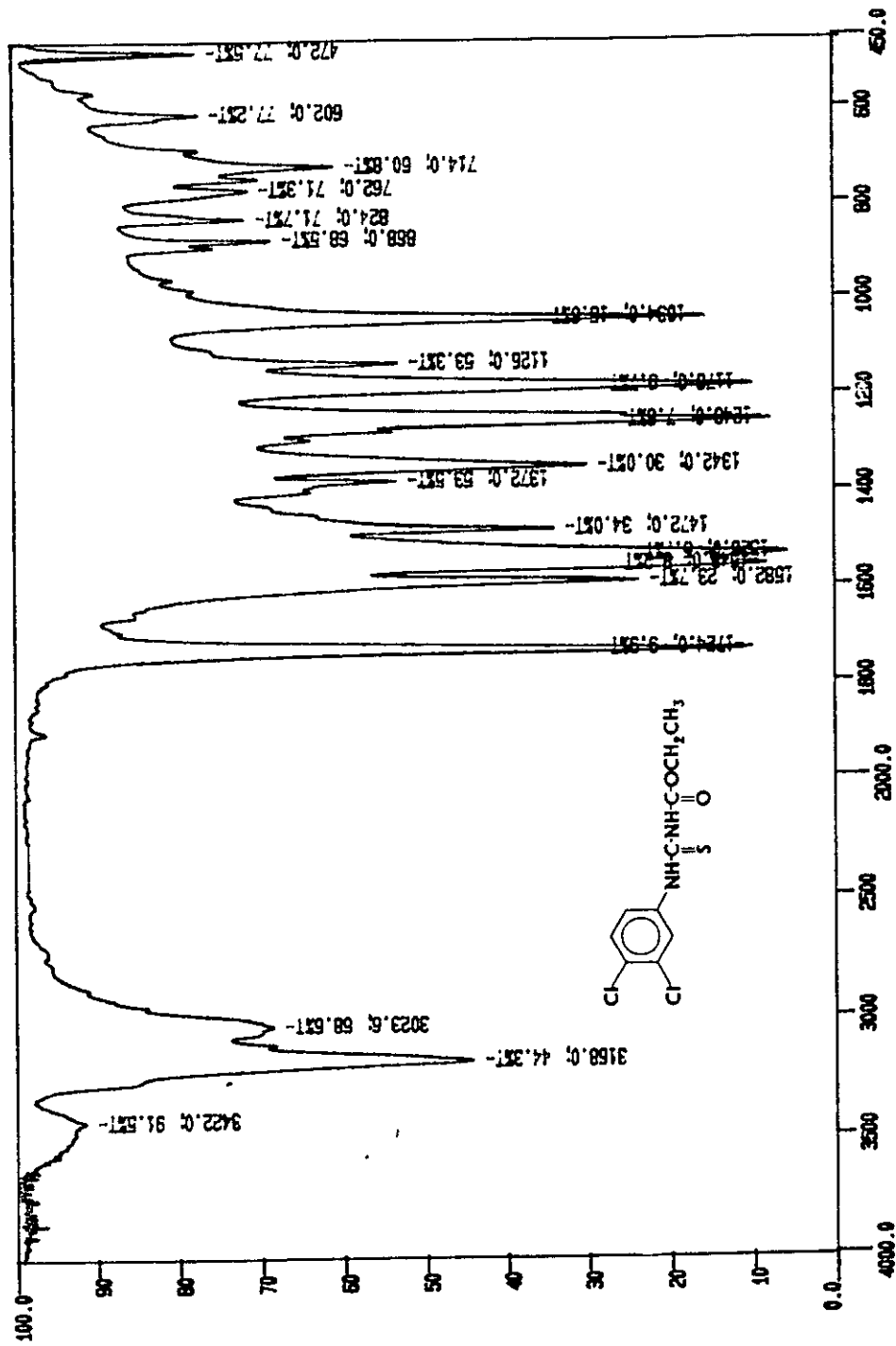


Espectro DEPT del compuesto N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarboniltiureido.



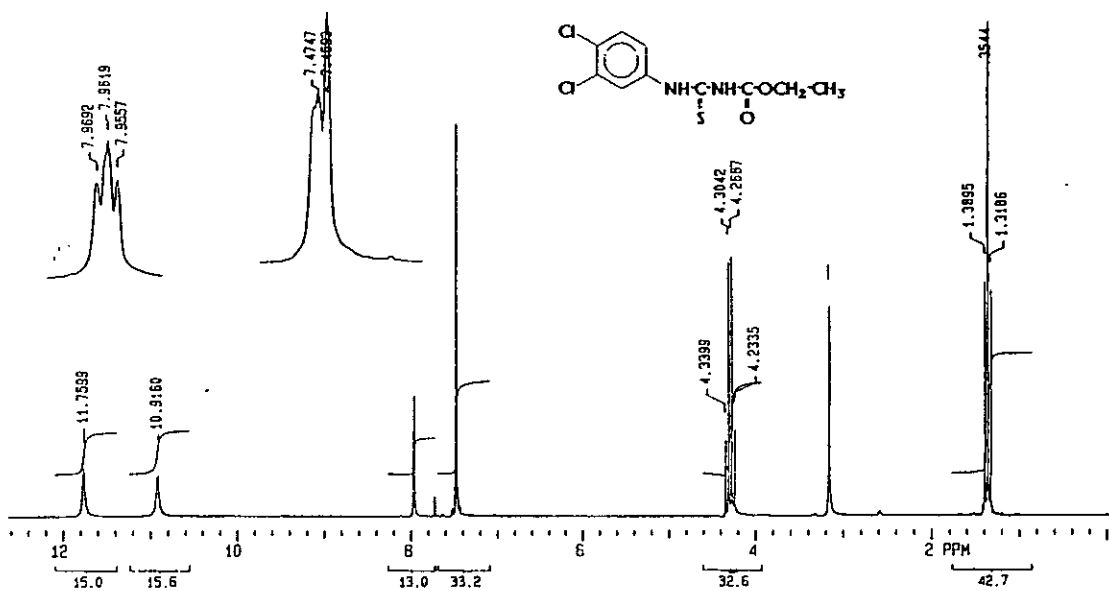
Espectro de Masas del compuesto N-(4-clorofenil)-N'-etoxicarbonilureido.



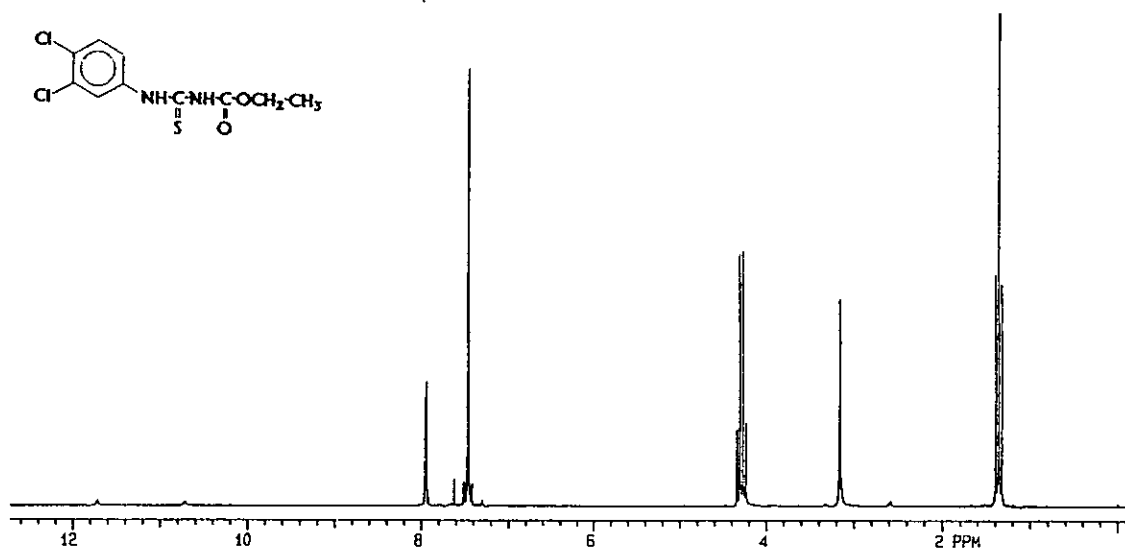


51

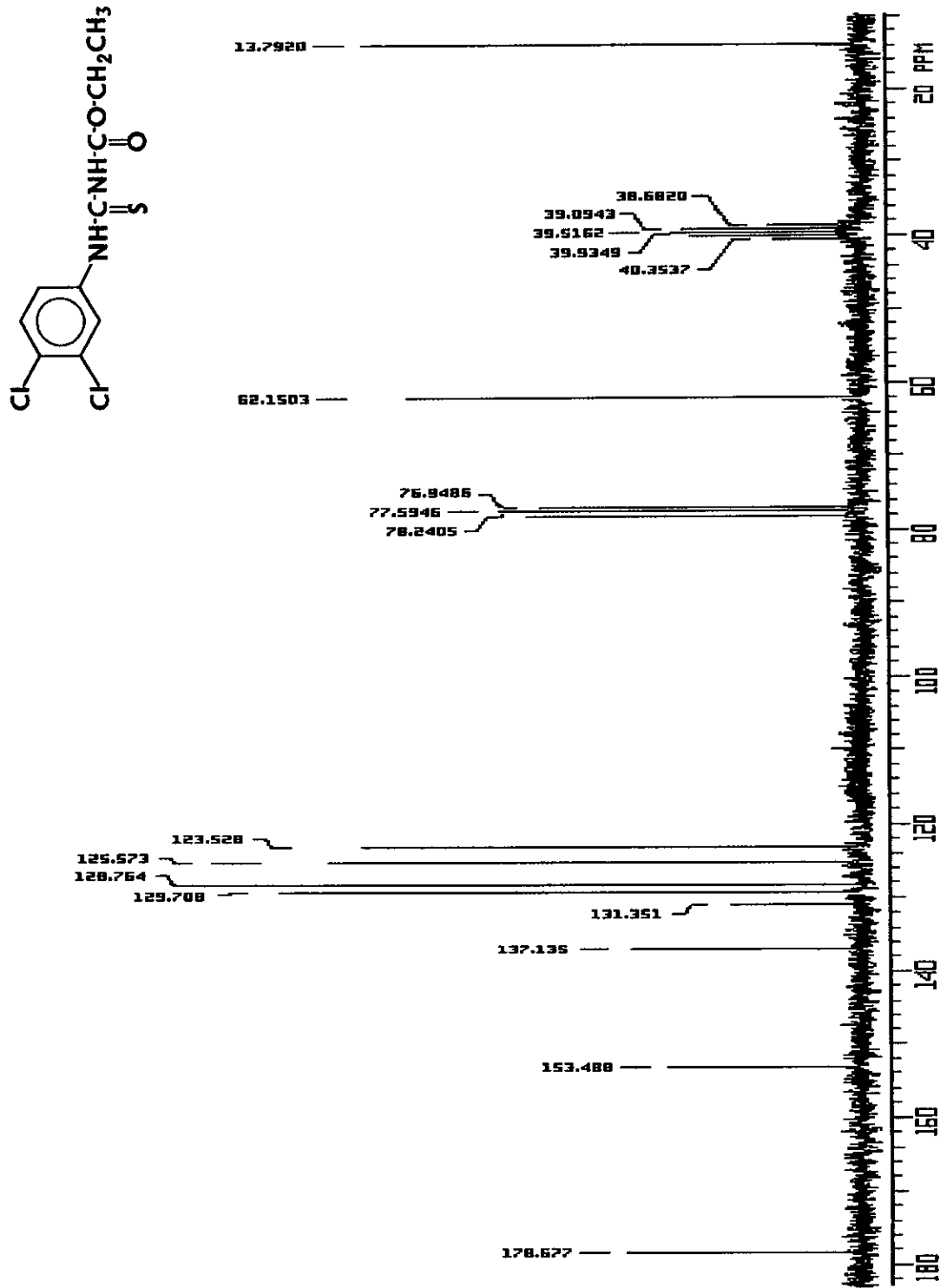
N-(3,4-diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido.



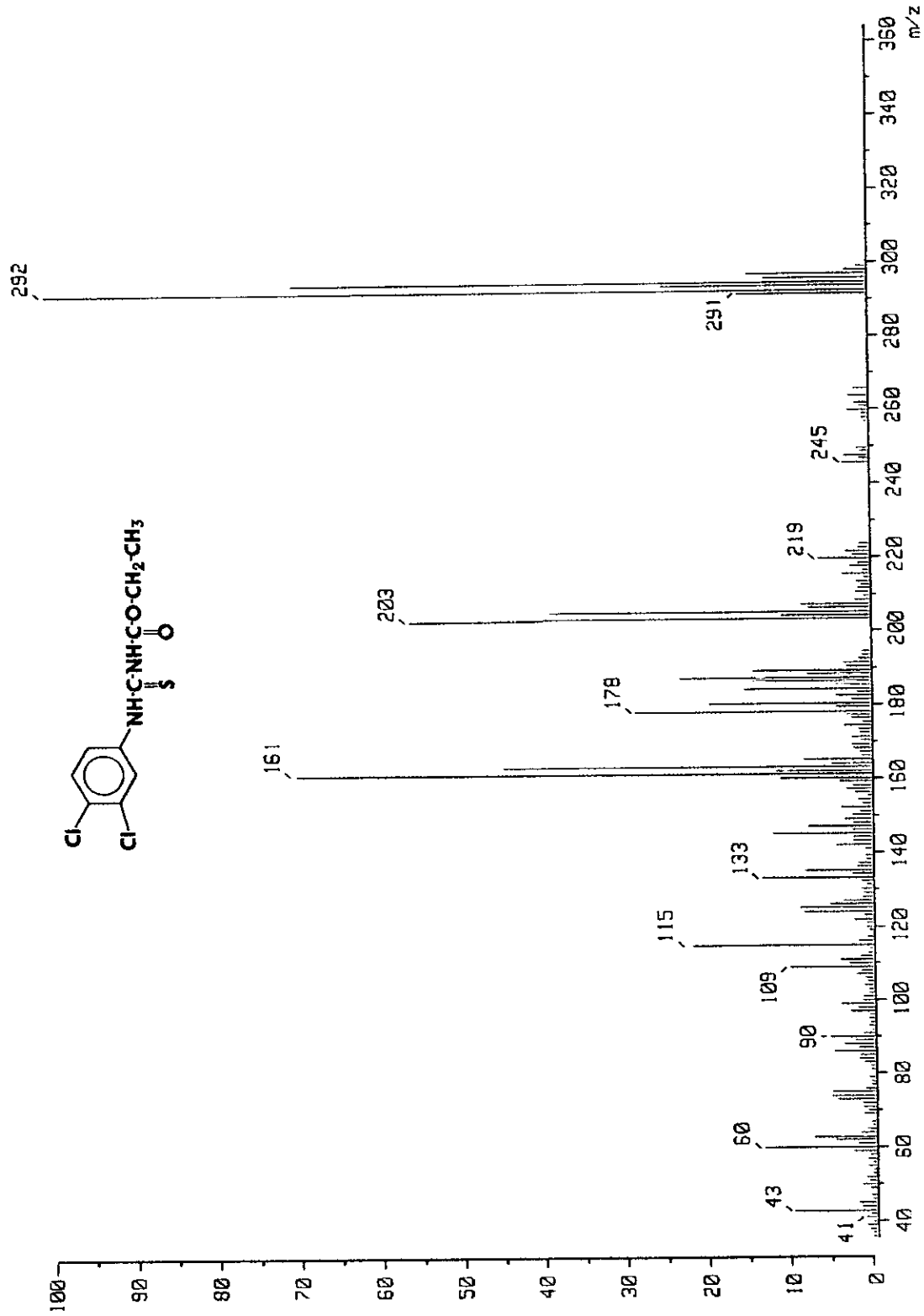
Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(3,4 -diclorofenil)-N'-etoxicarboniltiureido.



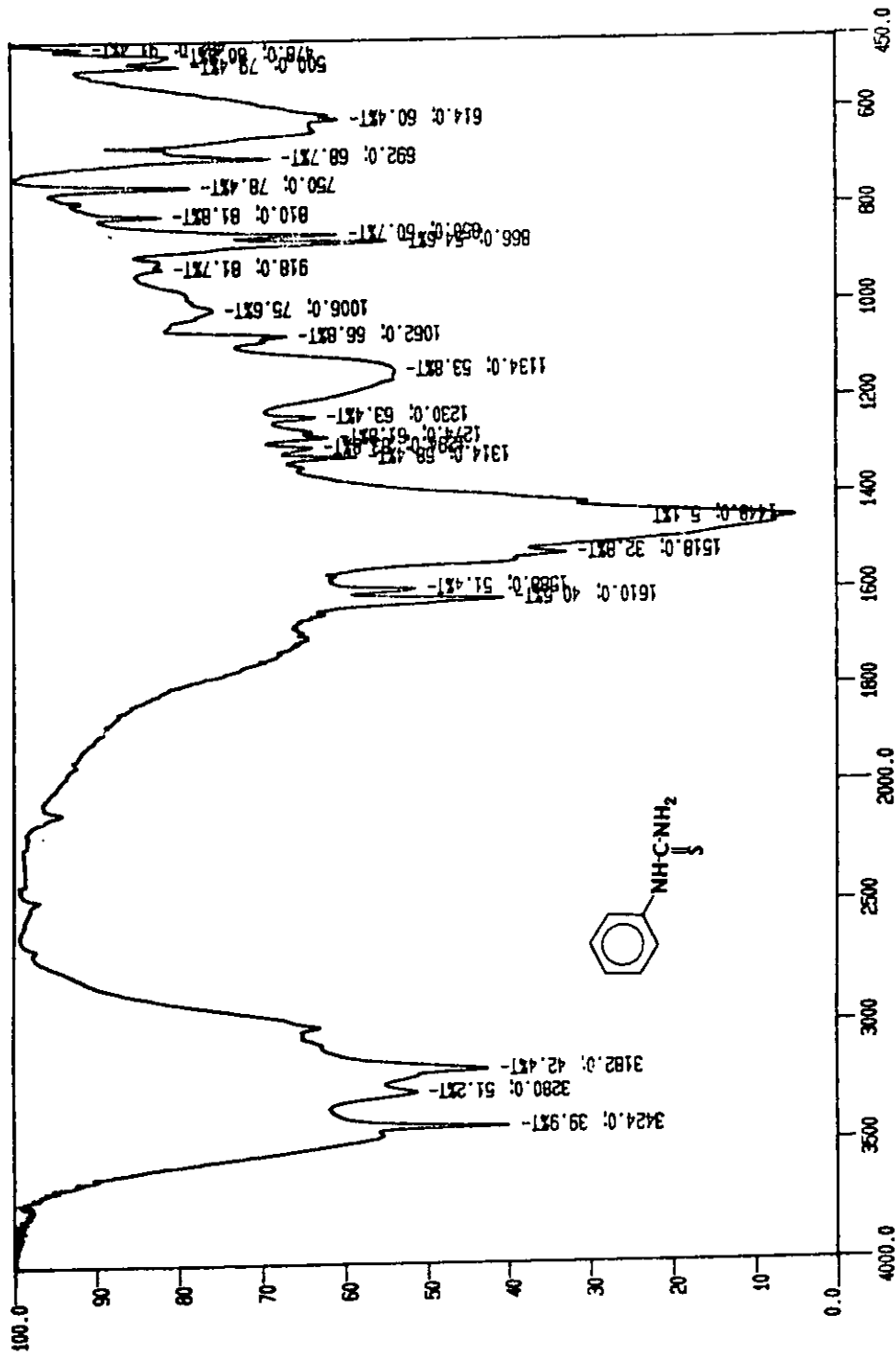
Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(3,4 -diclorofenil)-N'-etoxicarboniltiureido + D<sub>2</sub>O.



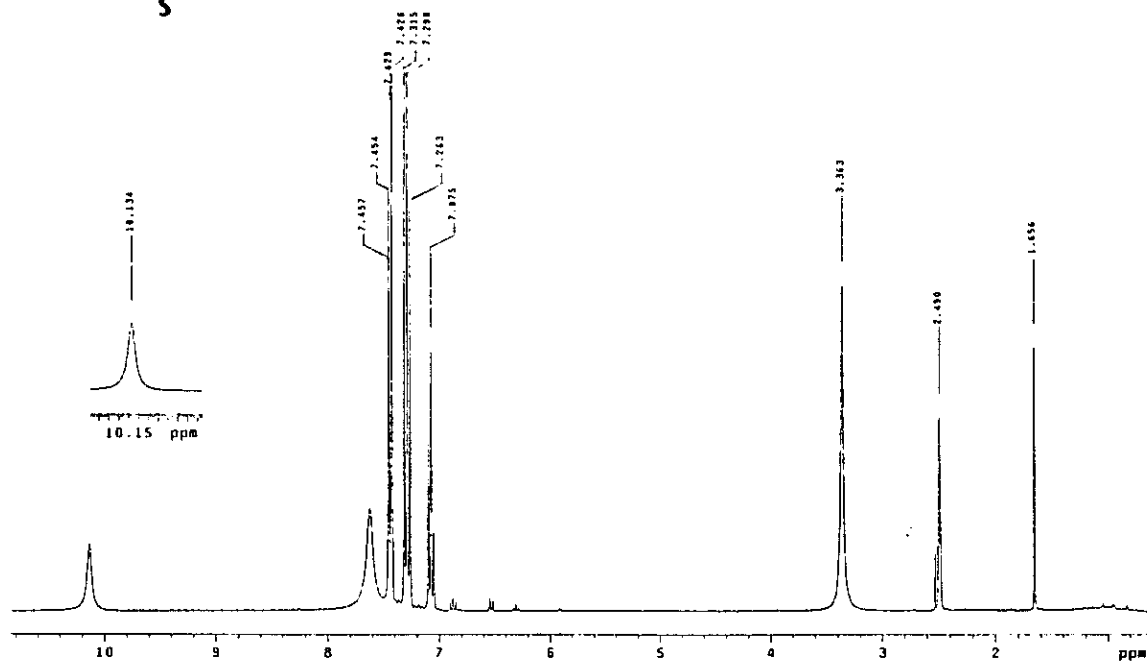
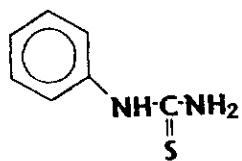
Espectro de  $^{13}\text{C}$  del compuesto N-(3,4-diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido.



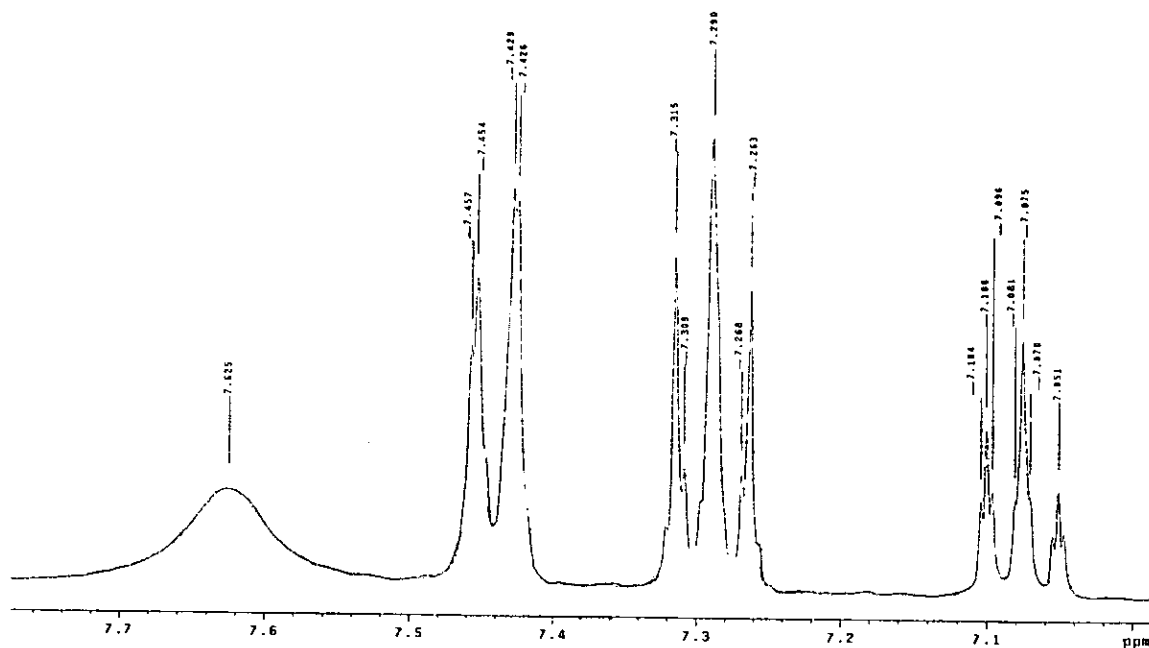
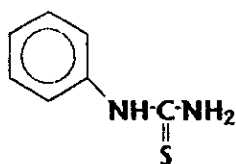
Espectro de Masas del compuesto N-(3,4-diclorofenil)-N'-etoxicarboniltioureido.



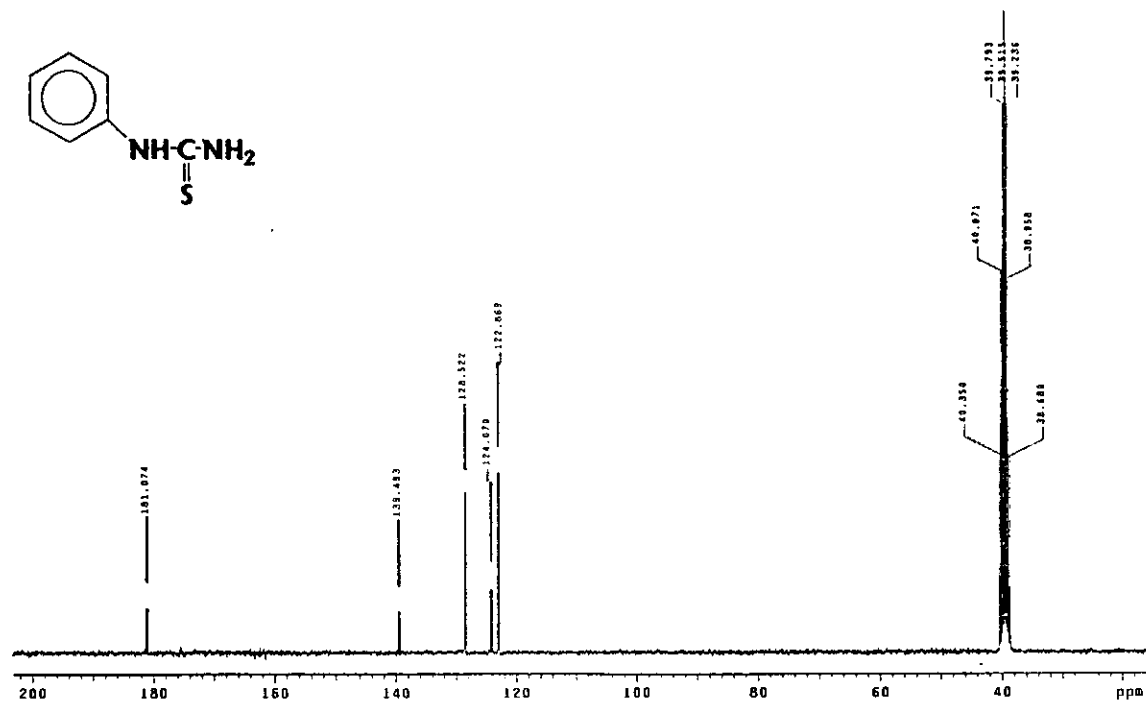
Espectro de IR del compuesto N-feniltiourea. <sup>cm-1</sup>



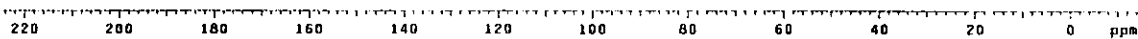
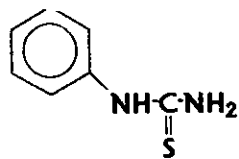
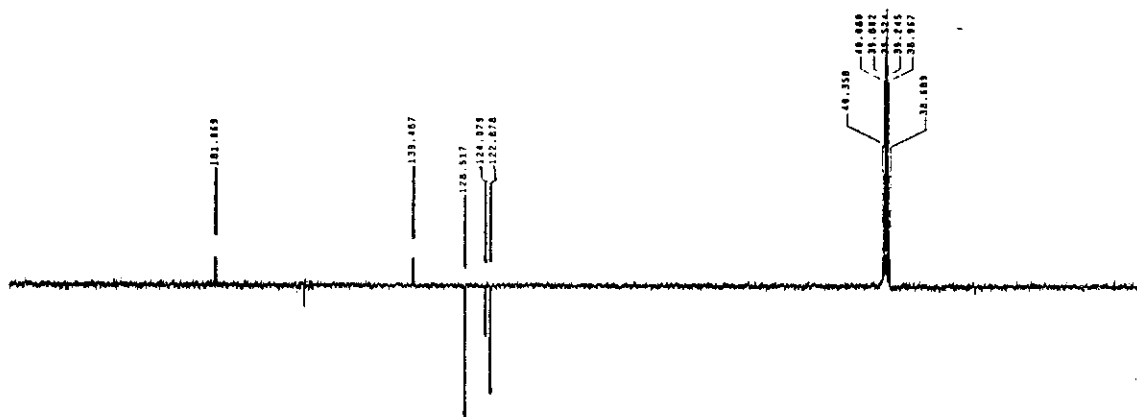
Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-feniltiourea.



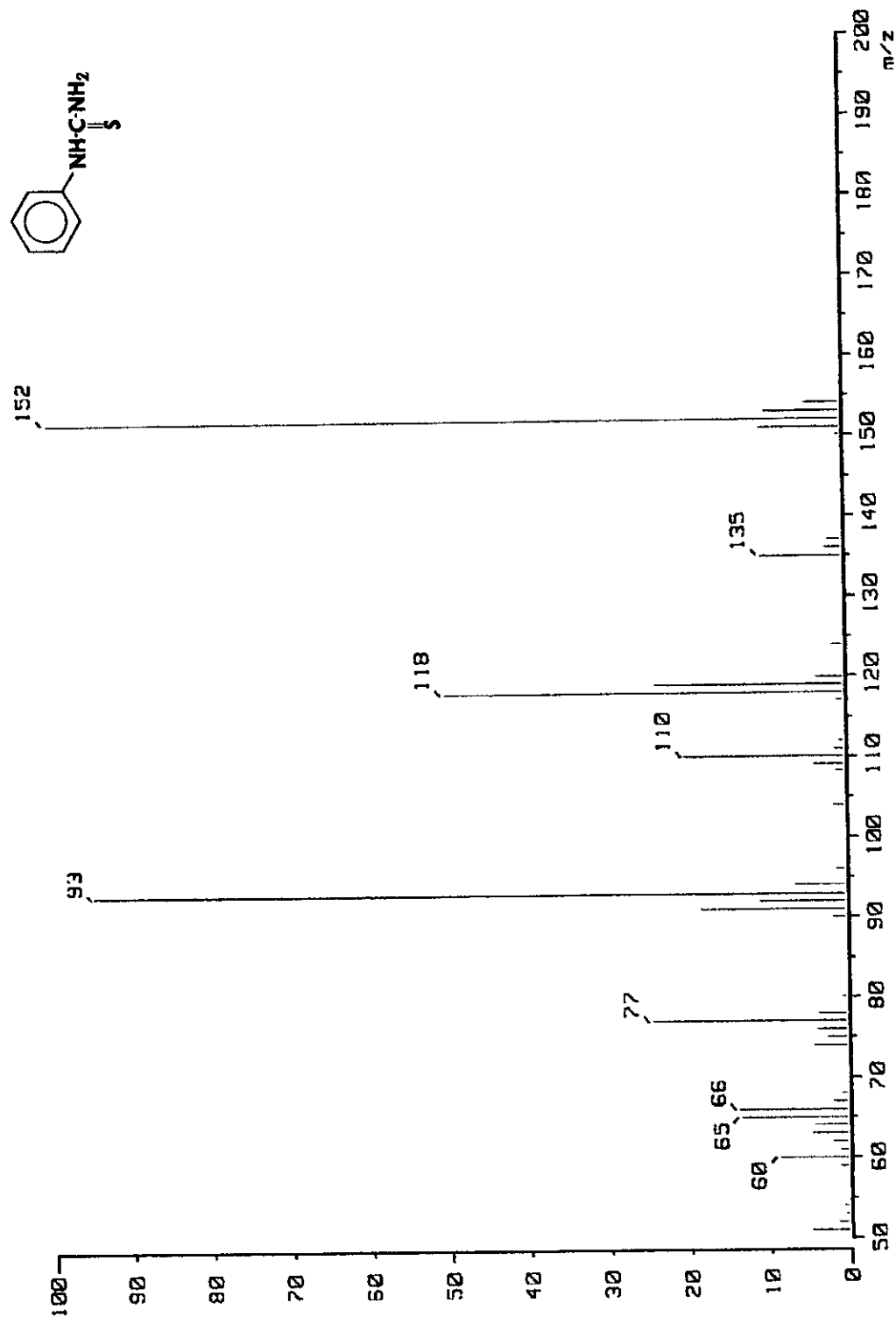
Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-feniltiourea.



Espectro de <sup>13</sup>C RMN del compuesto N-feniltiourea.

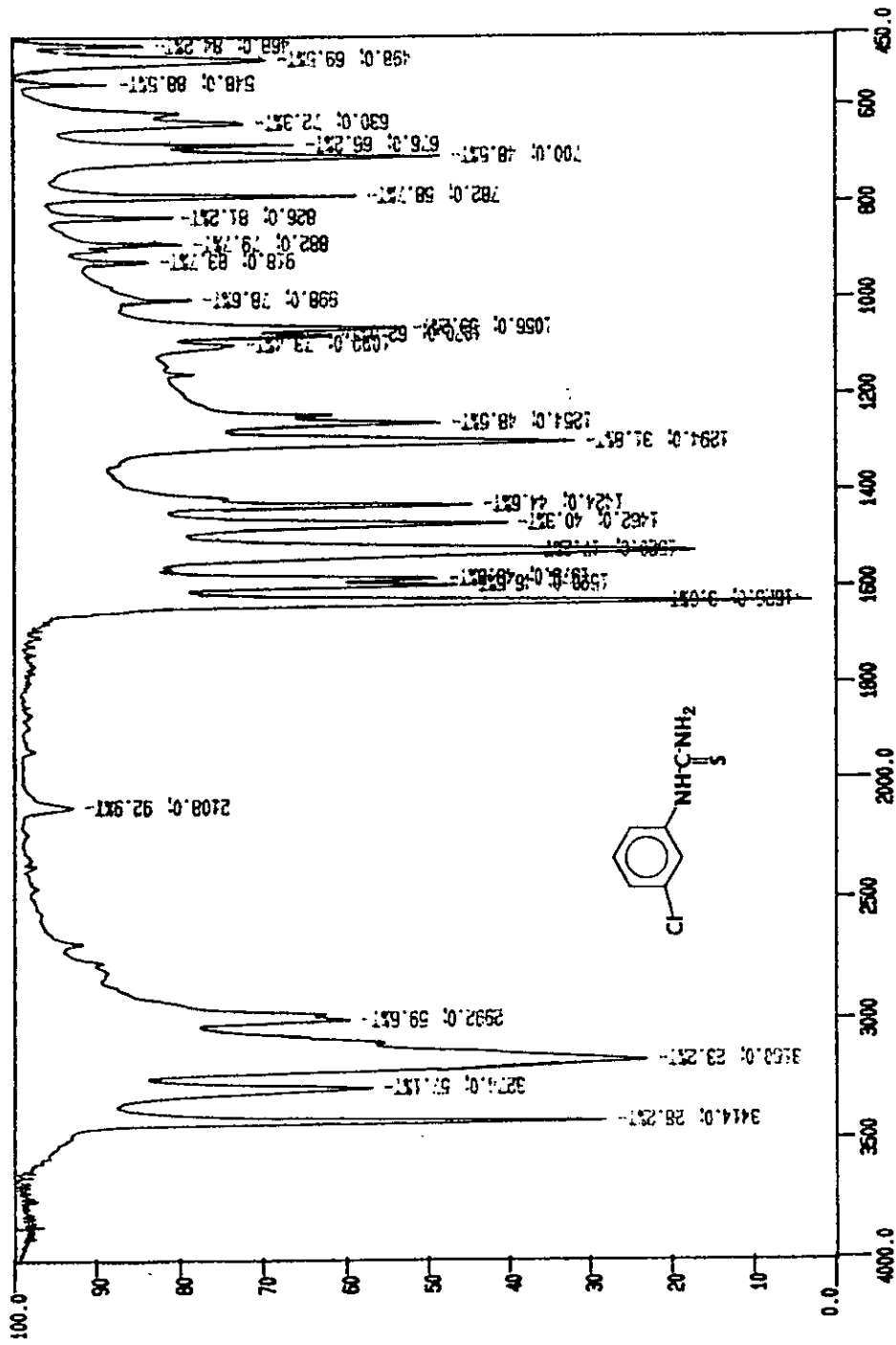


Espectro de APT del compuesto N-feniltiourea.



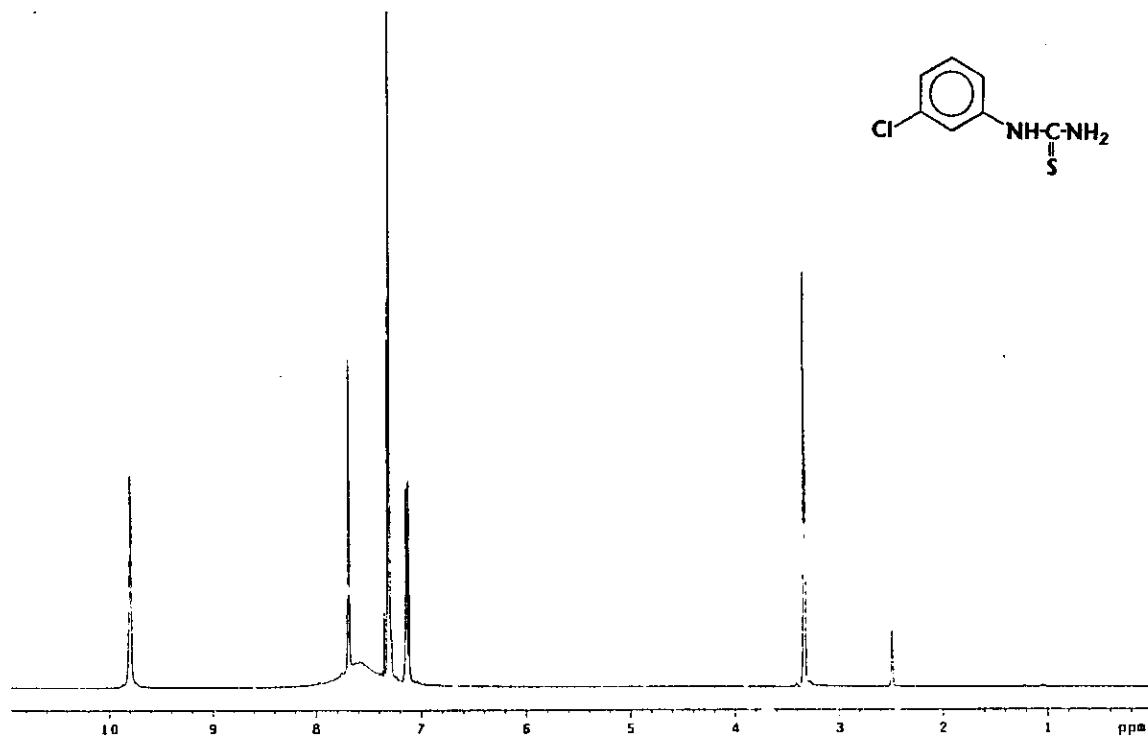
## Espectro de Masas del compuesto N-feniltiurea.



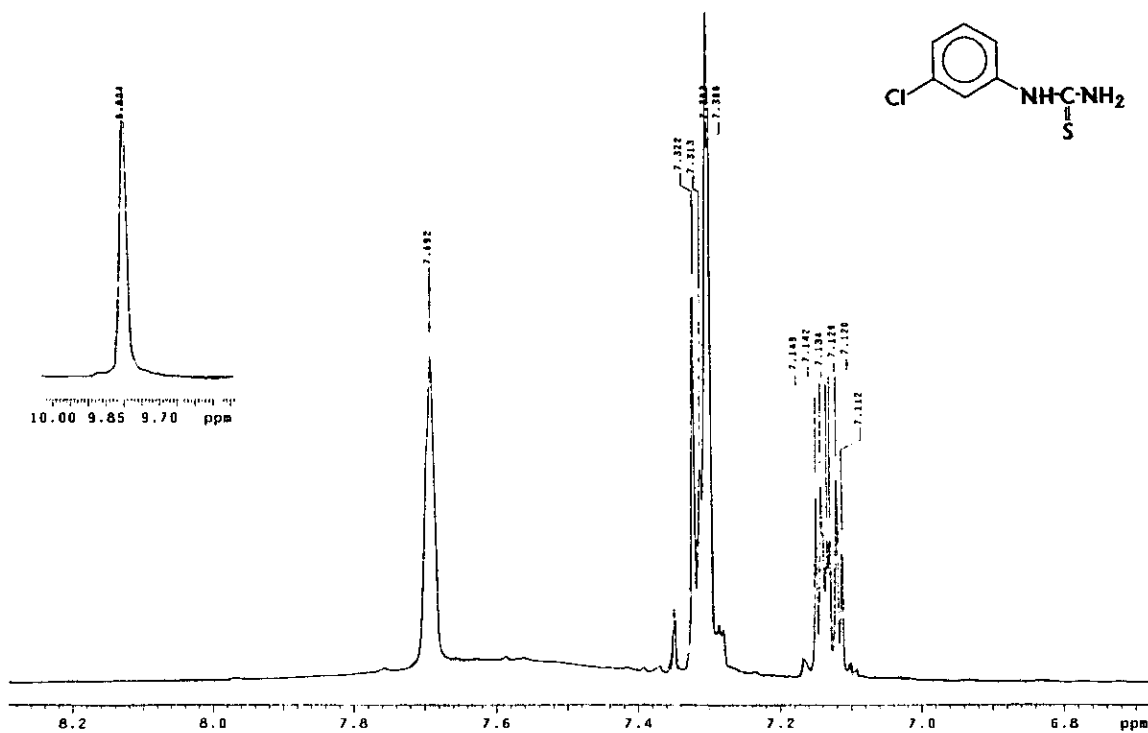


CH-1

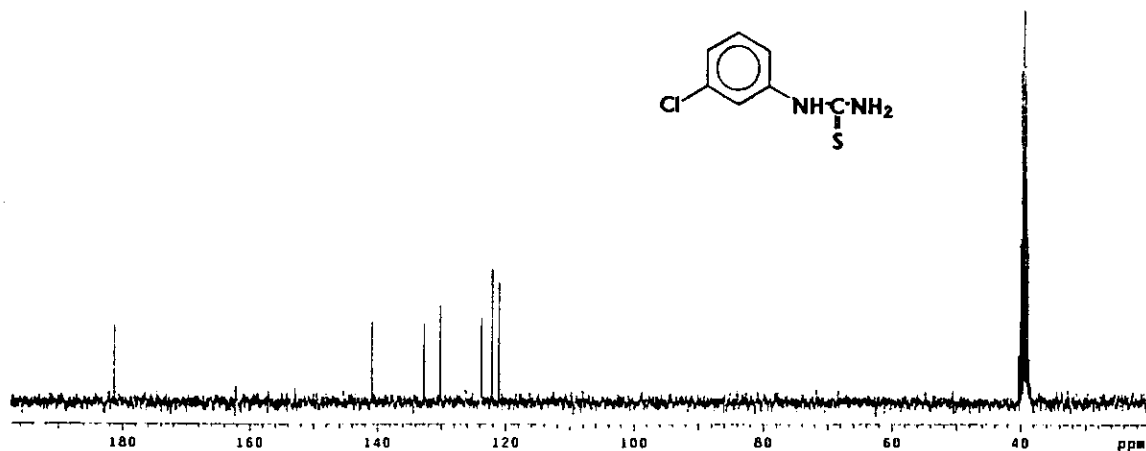
## Espectro de IR del compuesto N-(3-clorofenil)tiourea



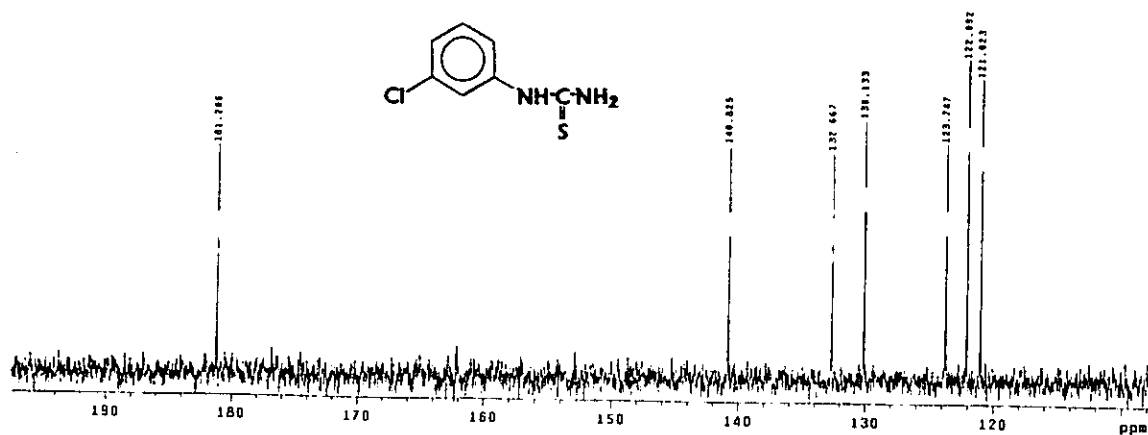
Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(3 -clorofenil)tiourea.



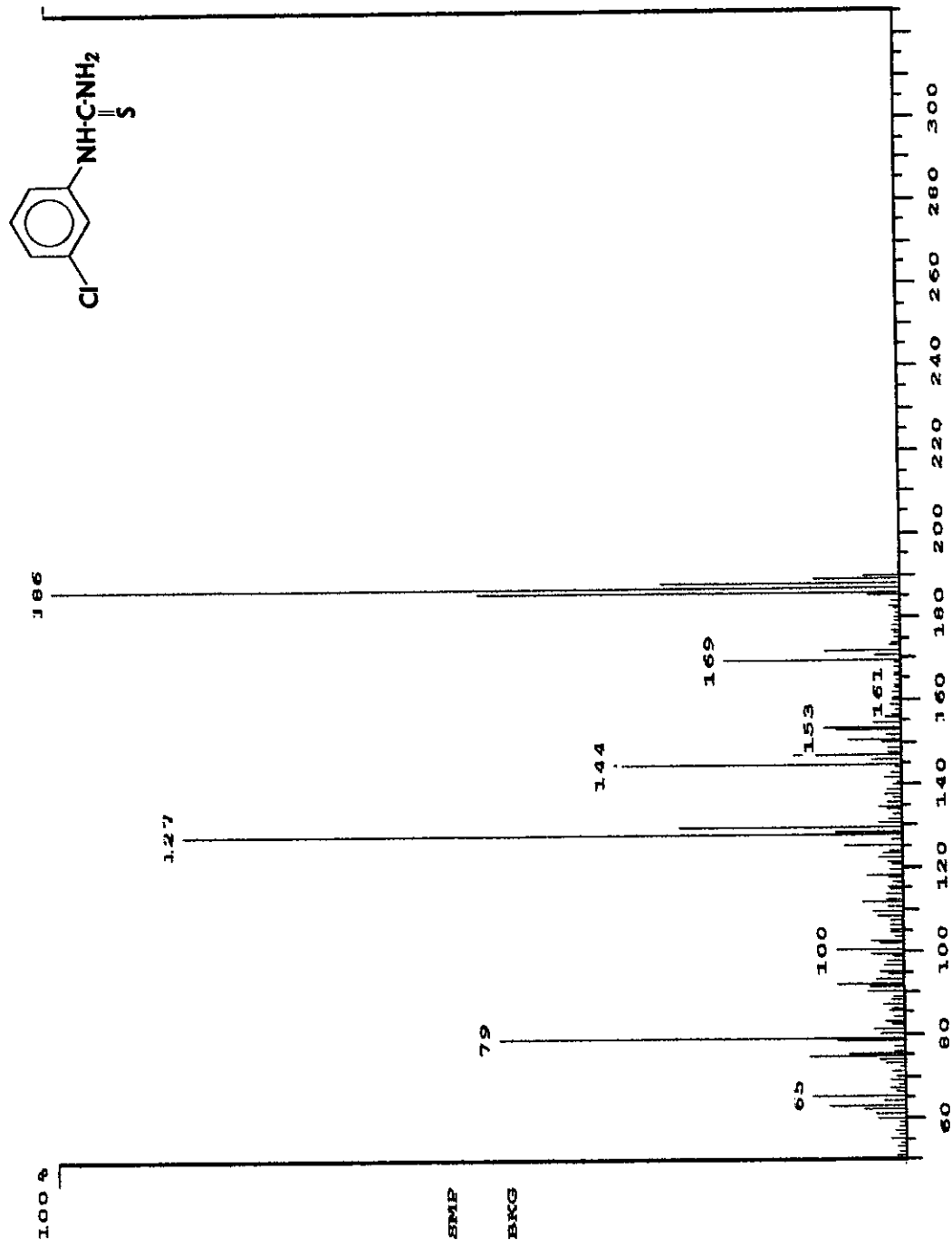
Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(3 -clorofenil)tiourea.



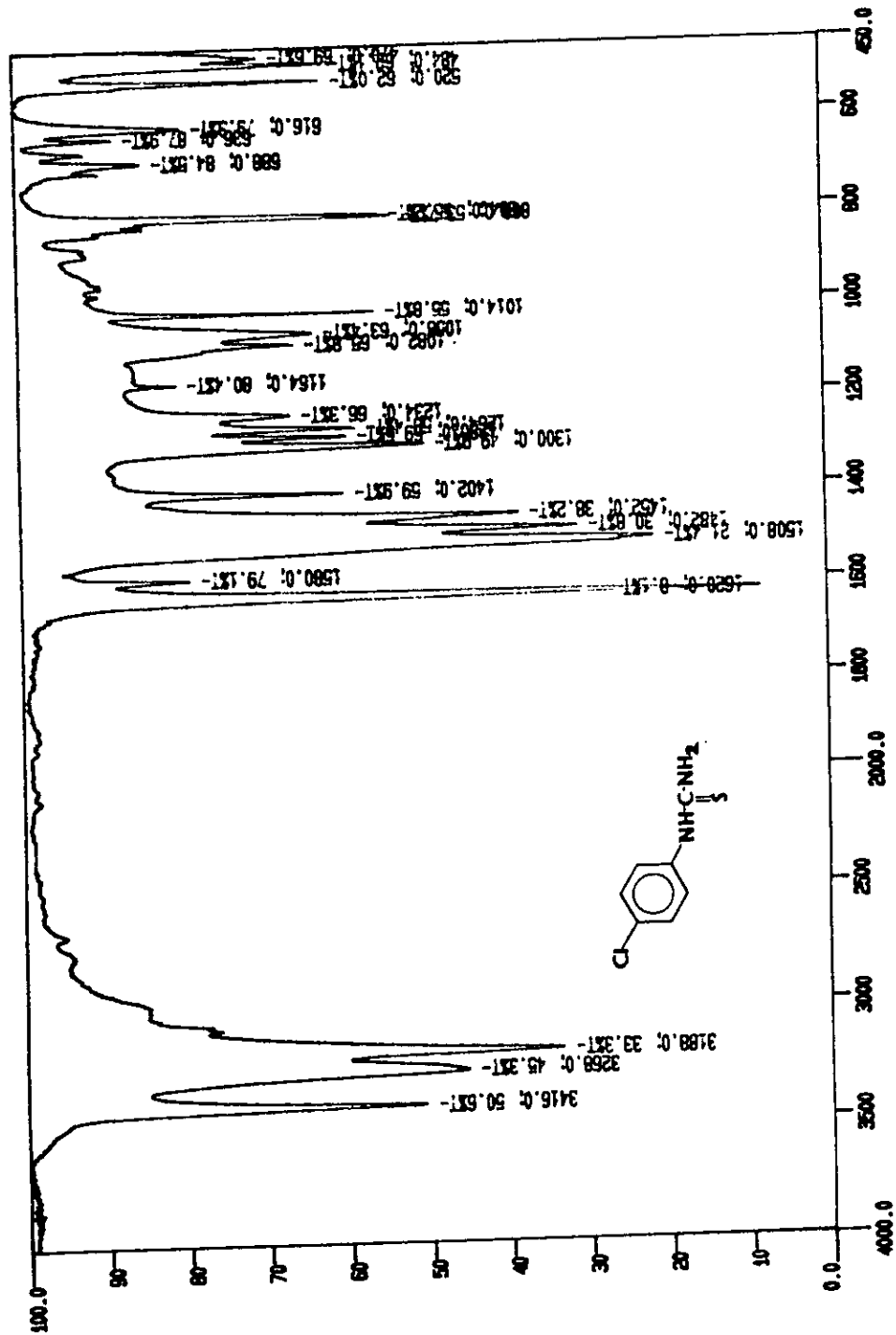
Espectro de <sup>13</sup>C RMN del compuesto N-(3-clorofenil)tiourea.



Espectro de <sup>13</sup>C RMN del compuesto N-(3-clorofenil)tiourea.



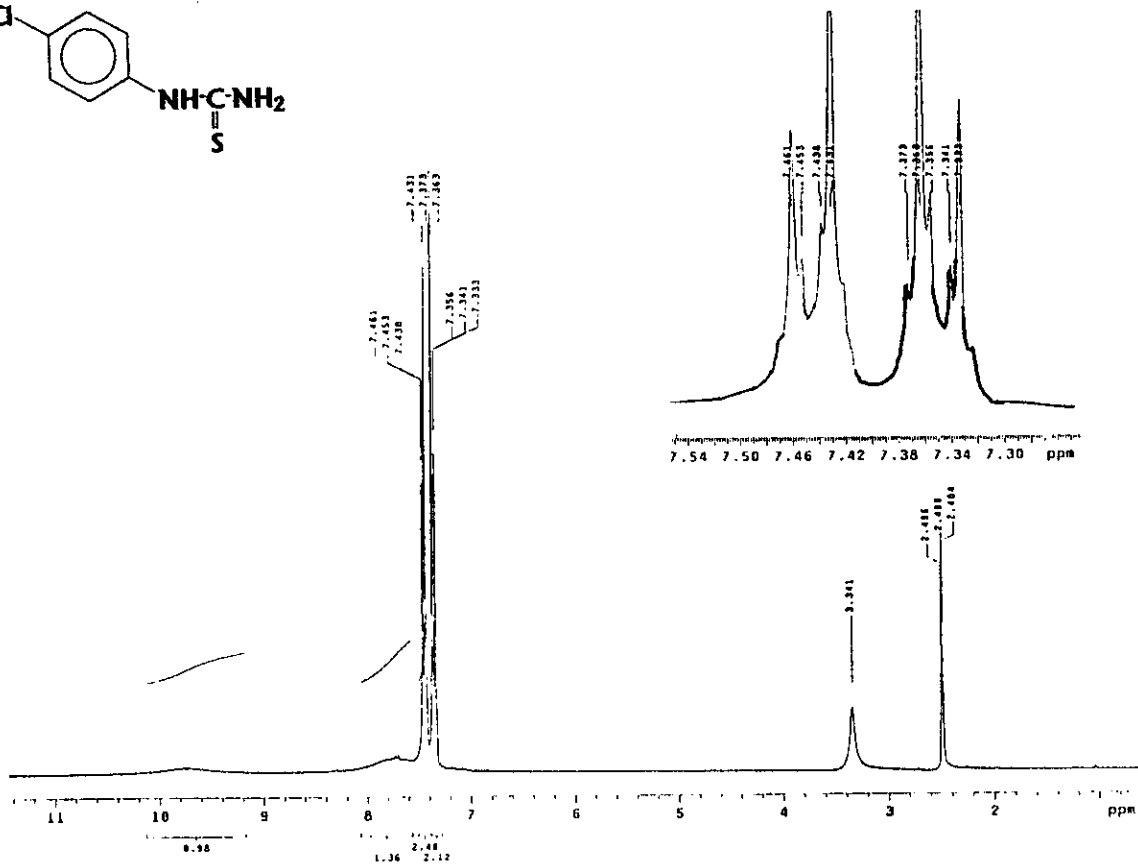
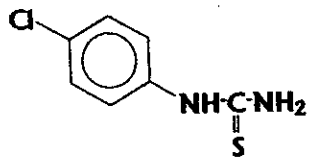
Espectro de Masas del compuesto N-(3-clorofenil)tiourea.



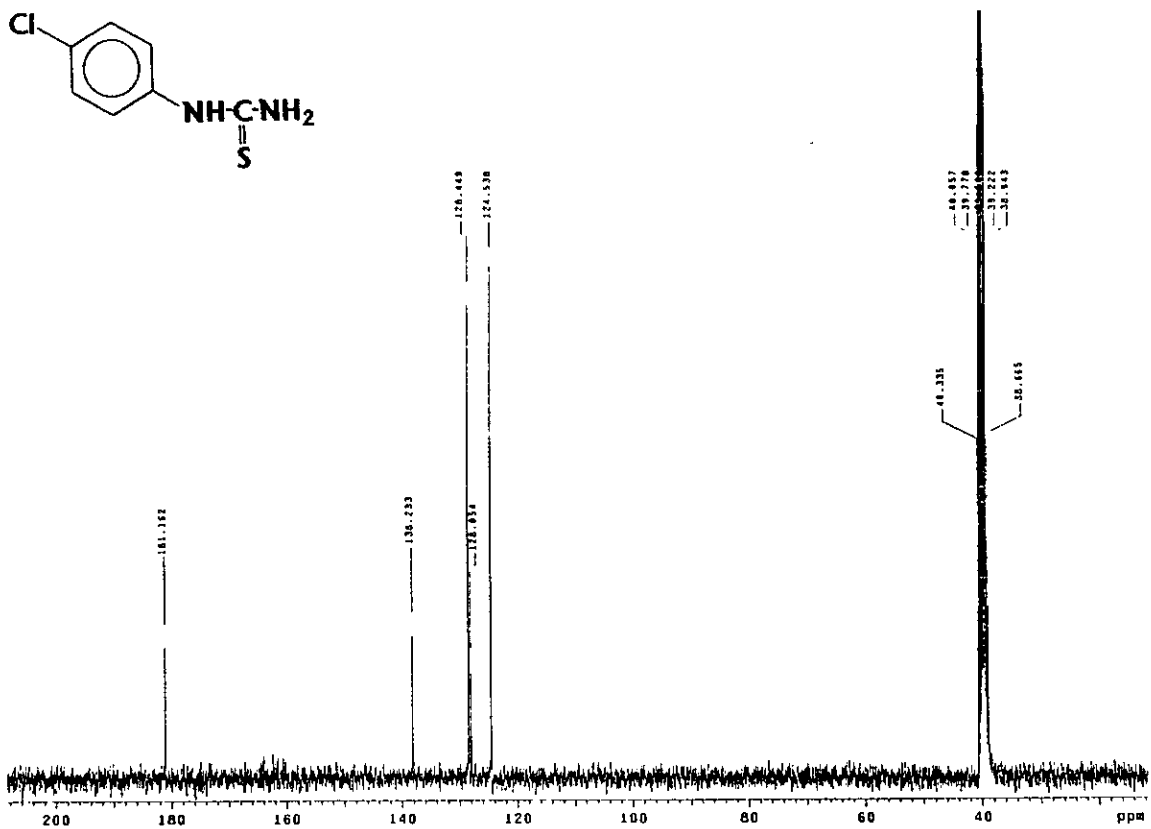
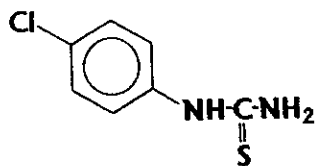
13

CH-1

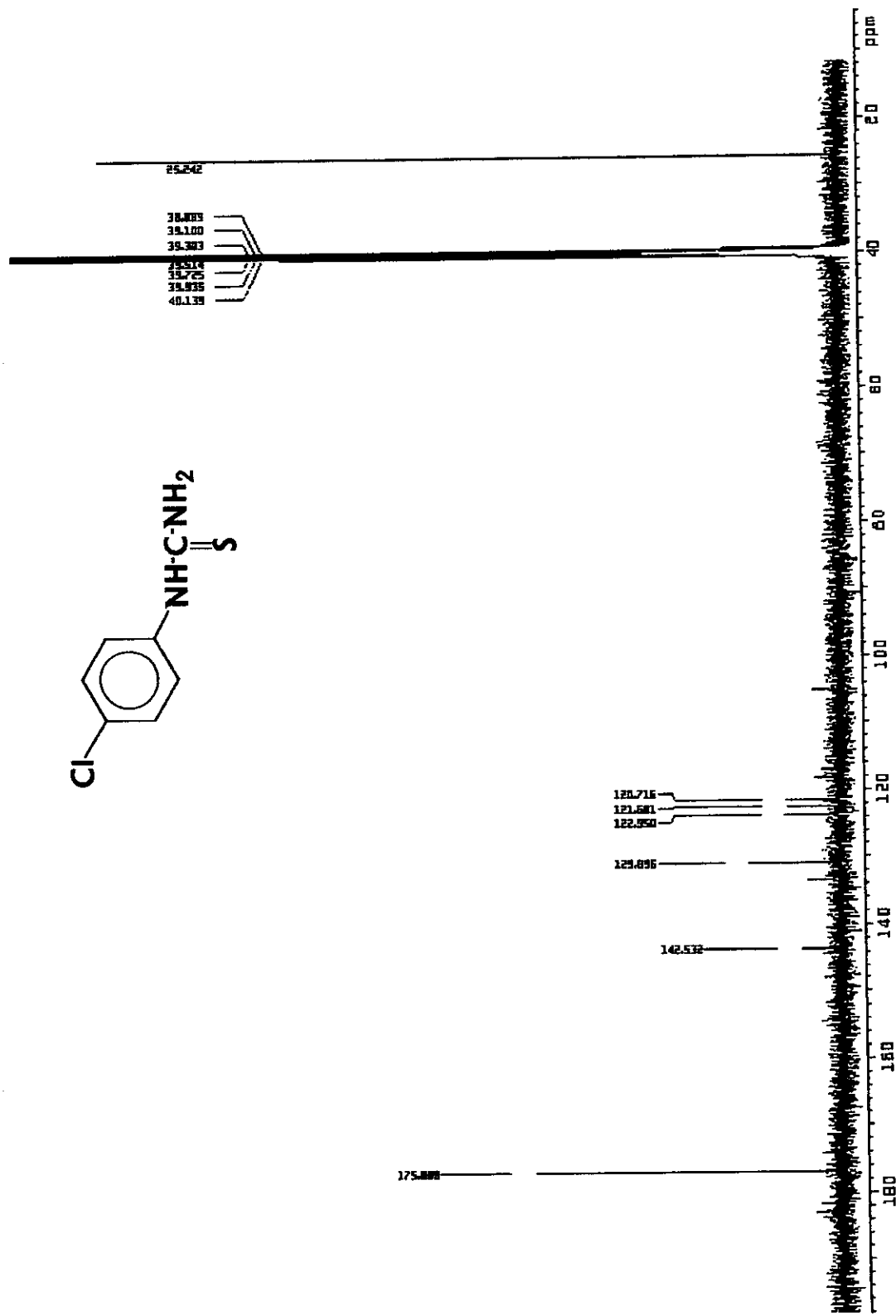
Espectro de IR del compuesto N-(4-clorofenil)tiourea.



Espectro de <sup>1</sup>H RMN del compuesto N-(4-clorofenil)tiourea.

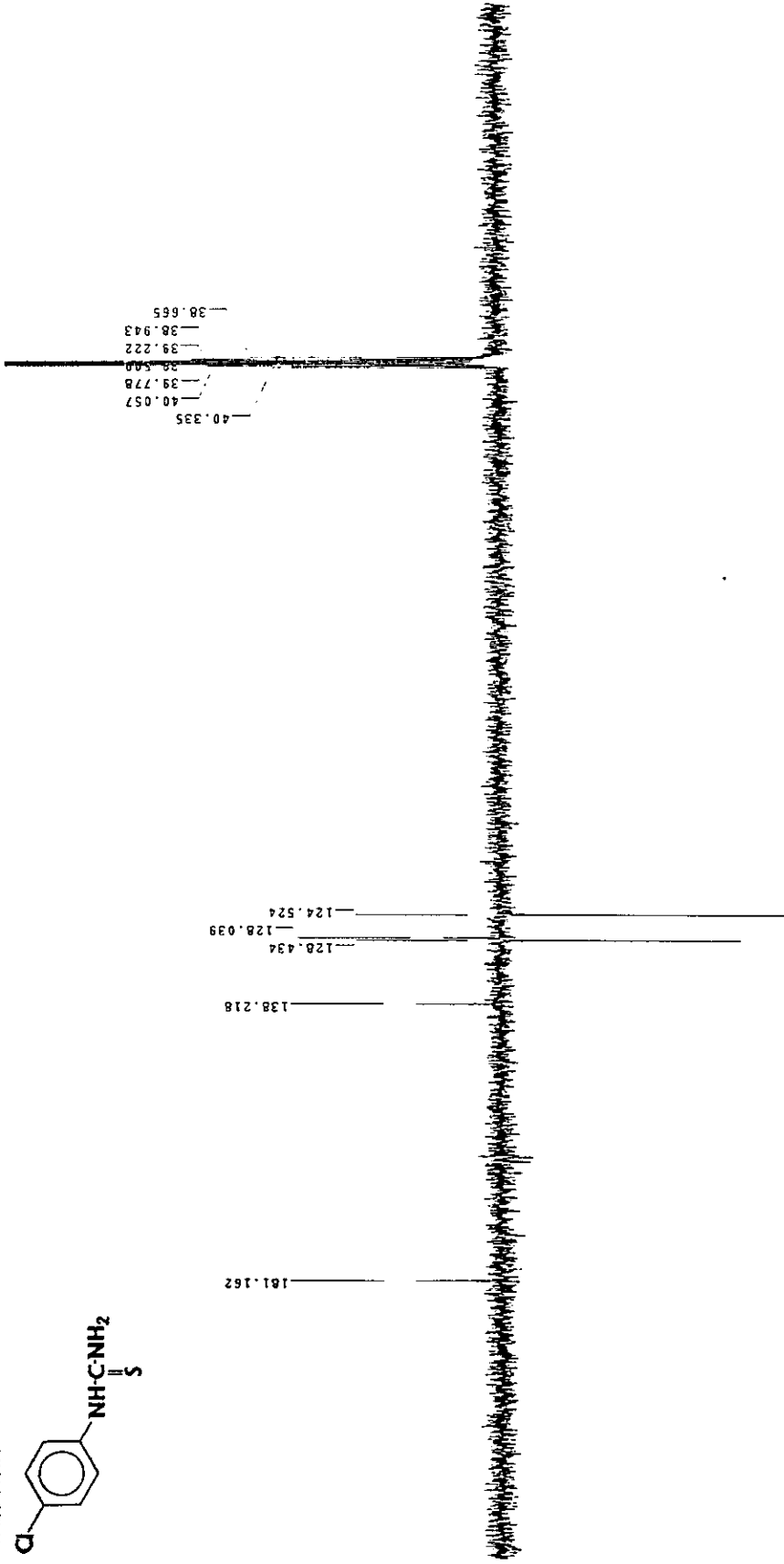
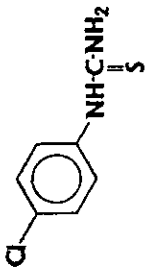


Espectro de <sup>13</sup>C RMN del compuesto N-feniltiourea.



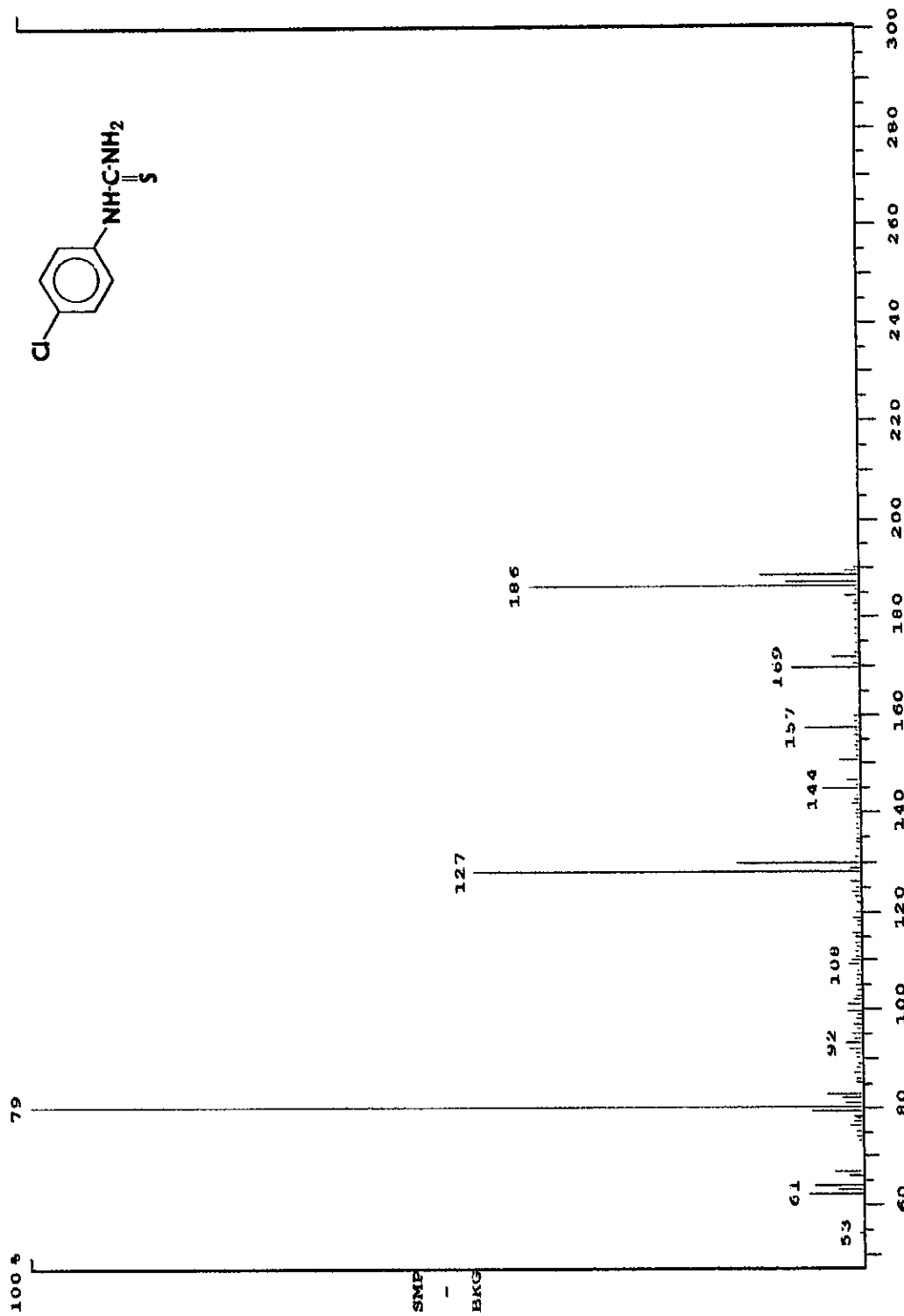
Espectro <sup>13</sup>C RMN del compuesto N-(4-clorofenil)tiourea.

ESPECTROS

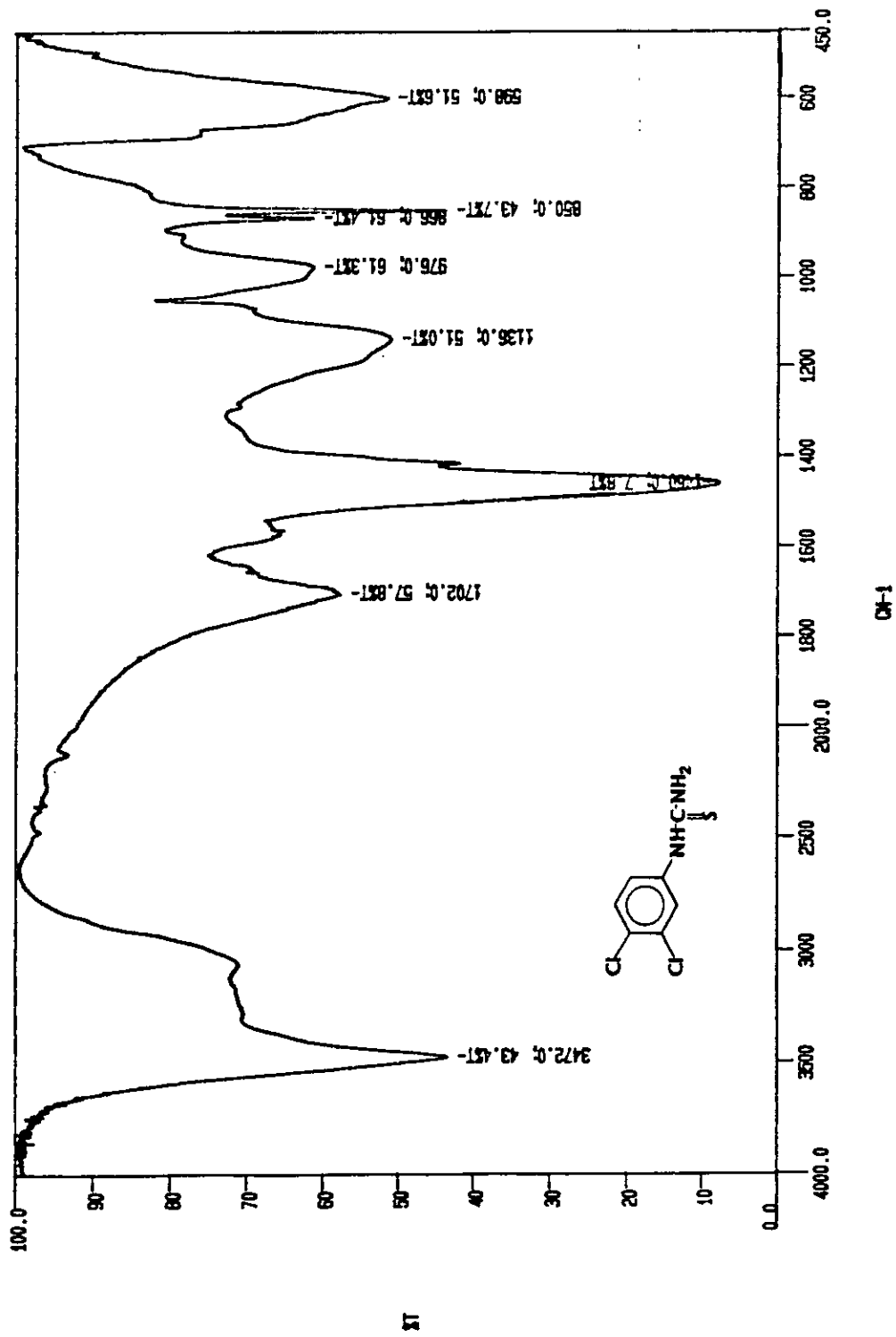


Espectro de APT del compuesto N-(4-clorofenil)tiourea.

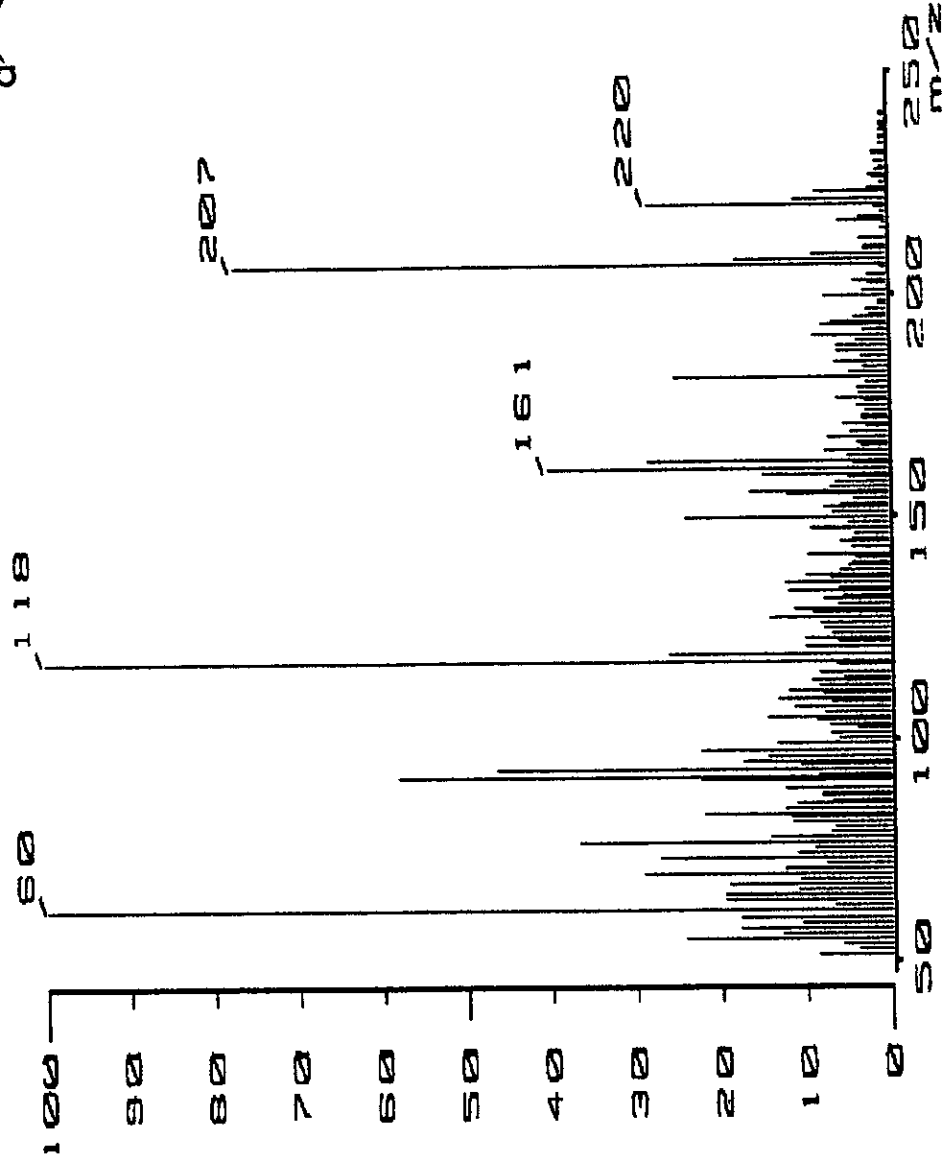
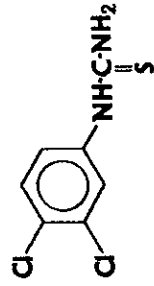




Espectro de Masas del compuesto N-(4-clorofenil)tiourea.



Espectro de IR del compuesto N-(3,4-diclorofenil)tiourea.



Espectro de Masas del compuesto N-(3,4-diclorofenil)tiourea.