



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

---

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Síntesis, resolución y estudio de la actividad  
anticonvulsionante y neurotoxicidad de fenil amidas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE  
BIOMEDICINA Y  
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

P R E S E N T A:

Q.F.B. JOSE GUILLERMO BUENDÍA PAZARÁN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. SERGIO ENRIQUE MEZA TOLEDO



MÉXICO, D.F.

JUNIO 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de     México     siendo las     8:00     horas del día     17     del mes de     junio     del     2011     se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de     la ENCB-IPN     para examinar la tesis titulada:

**Síntesis, resolución y estudio de la actividad anticonvulsionante y neurotoxicidad de fenilamidas**

Presentada por el alumno:

**Buendía**

Apellido paterno

**Pazaran**

Apellido materno

**José Guillermo**

Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	0	4	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Sergio Enrique Meza Toledo

Dr. José Luis Muñoz Sánchez

Dr. Javier Peralta Cruz

Dra. Adela Astudillo Vázquez

Dr. Ernesto Alarcón Hernández

Dr. Germán Chamorro Cevallos

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López



S.E.P.  
Escuela Nacional de  
Ciencias Biológicas  
Sección de Estudios  
de Posgrado  
e Investigación



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México el día 20 del mes Junio del año 2011, el (la) que suscribe Buendía Pazáran José Guillermo alumno (a) del Programa de maestría en ciencias con especialidad en Biomedicina y biotecnología molecular con número de registro B09104, adscrito a Escuela Nacional del Ciencias Biológicas del IPN, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Sergio Enrique Meza Toledo y cede los derechos del trabajo intitulado Síntesis, resolución y estudio de la actividad anticonvulsionante y neurotoxicidad de fenil amidas al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección semeza@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente,

Nombre y firma del alumno(a)

Buendía Pazáran J.  
Guillermo

Nombre y firma del Director de tesis

Dr. Sergio E. Meza Toledo

**ESTE TRABAJO SE REALIZO BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. SERGIO ENRIQUE MEZA TOLEDO EN EL LABORATORIO DE QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.**

**ESTE TRABAJO CONTO CON EL APOYO DE LA SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL I.P.N, PROYECTOS SIP CON CLAVE 20100520 Y 20110754.**

**SE AGRADECE A CONACYT POR EL FINANCIAMIENTO DEL PRESENTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.**

## INDICE

<b>1.0 Introducción</b>	1
1.1 Sinapsis	1
1.2 Neurotransmisores	3
1.2.1 Glutamato	3
1.2.2 Estructura y función del receptor gama amino butírico (GABA)	5
1.3 Fármacos anticonvulsionantes	8
1.3.1 Fármacos antiepilépticos desarrollados en México	11
<b>1.4 JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>1.5 OBJETIVOS</b>	17
1.5.1 Objetivo general	17
1.5.2 Objetivo específico	17
<b>2.0 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	18
2.1 QUIMICA	18
2.1.1 Determinación del punto de fusión	18
2.1.2 Espectroscopía de infrarrojo (IR)	18
2.1.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono 13 (RMN- $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ )	18
2.1.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	18
2.1.5 Rotación específica	18
2.2 Síntesis del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPB	19
2.2.1 Obtención de la DL-5-etil-5-(4'-trifluorometilfenil) butirolactona	20
2.2.2 Obtención del DL-4'- CF <sub>3</sub> -HEPB	21
2.3 Síntesis del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	21
2.3.1 Preparación del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionato de etilo	22

2.3.2 Obtención del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionamida (DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP)	22
2.4 Síntesis del DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida (DL-HEPA)	23
2.4.1 Formación de sales diastereoméricas	23
2.4.2 Síntesis del ácido DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético	24
2.4.3 Preparación del ácido (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético	24
2.4.4 Síntesis del ácido (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético	24
2.4.5 Preparación del (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetato de metilo	25
2.4.6 Síntesis de (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetato de etilo	25
2.4.7 Preparación de (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida (+)-HEPA	26
2.4.8 Síntesis de (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida (-)-HEPA	26
2.4.9 Determinación de la pureza óptica de los enantiómeros del HEPA mediante cromatografía líquida de alta resolución con fase estacionaria quiral.	26
2.5 Actividad biológica	27
2.5.1 Modelo de pentiléntetrazol (PTZ)	27
2.5.2 Determinación de las dosis efectivas 50 (DE <sub>50</sub> )	27
2.5.3 Determinación de las DE <sub>50</sub> por el método de electrochoque máximo (ECM)	28
2.5.4 Determinación de la dosis tóxica 50 (DT <sub>50</sub> ) del (±)-HEPP, y del (±)-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP en el rodillo giratorio o "rotarod"	28
2.5.5 Modulación de la actividad anticonvulsiónante del fenobarbital por el DL-HEPP	29
<b>3.0 RESULTADOS</b>	30
3.1 Caracterización del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPB	30
3.1.1 Espectro de IR del intermediario DL-5-etil-5-(4'-trifluorometilfenil) butirolactona	30

3.1.2 Espectro de IR del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPB	31
3.2 Caracterización del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	32
3.2.1 Espectro de IR del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionato de etilo	32
3.2.2 Espectro de IR del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	33
3.2.3 Espectro de RMN-H <sup>1</sup> del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	34
3.2.4 Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	35
3.3 Caracterización del DL-HEPA	37
3.3.1 Espectro de IR del DL-HEPA	37
3.3.2 Determinación de la pureza óptica de los enantiómeros del HEPA	38
3.3.3 Espectro de RMN-H <sup>1</sup> del DL-HEPA	39
3.3.4 Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del DL-HEPA	40
3.3.5 Espectro de IR del (+)-HEPA	41
3.3.6 Espectro de RMN-H <sup>1</sup> del (+)-HEPA	42
3.3.7 Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del (+)-HEPA	43
3.3.8 Correlación heteronuclear a un solo enlace (HSQC) del (+)-HEPA	44
3.3.9 Espectro de IR del (-)-HEPA	45
3.3.10 Espectro de RMN-H <sup>1</sup> del (-)-HEPA	46
3.3.11 Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del (-)-HEPA	47
3.4 Determinación preliminar de la actividad anticonvulsionante del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPB y del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP contra las convulsiones y muerte provocados por el PTZ	48
3.5 Modulación de la actividad anticonvulsionante del fenobarbital por el DL-HEPP contra las convulsiones y muerte provocadas por el PTZ	48
3.5.1 DE <sub>50</sub> del fenobarbital	48

3.5.2 Actividad anticonvulsionante del fenobarbital en presencia del DL-HEPP (15 mg/kg) en el modelo de PTZ	49
3.5.3 Actividad anticonvulsionante del fenobarbital en presencia del DL-HEPP (30 mg/kg) en el modelo de PTZ	50
3.5.4 Comparación de las DE <sub>50</sub> del fenobarbital sólo y en presencia del DL-HEPP en el modelo PTZ	50
3.6 Determinación de las DE <sub>50</sub> del fenobarbital (FB), del DL-HEPP, del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP, del DL-HEPA y del (-)-HEPA en el modelo del electrochoque máximo	51
3.6.1 DE <sub>50</sub> del FB en el modelo del electrochoque máximo	51
3.6.2 DE <sub>50</sub> del DL-HEPP en el modelo del electrochoque máximo	52
3.6.3 DE <sub>50</sub> del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP en el modelo del electrochoque máximo	53
3.6.4 DE <sub>50</sub> del DL-HEPA en el modelo del electrochoque máximo	54
3.6.5 DE <sub>50</sub> del (-)-HEPA en el modelo del electrochoque máximo	55
3.6.6 Comparación de las DE <sub>50</sub> del fenobarbital, del DL-HEPP y del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	56
3.7 Determinación de la actividad neurotóxica de los compuestos: fenobarbital, DL-HEPP y DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP, mediante la técnica del rodillo giratorio o rotarod	57
3.7.1 Neurotoxicidad del fenobarbital	57
3.7.2 Neurotoxicidad del DL-HEPP	58
3.7.3 Neurotoxicidad de DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	59
3.7.4 Comparación entre la neurotoxicidad del fenobarbital y la serie de fenil alcohol amidas.	60
<b>4.0 DISCUSION</b>	61
4.1 Síntesis del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPB	61
4.2 Síntesis y caracterización del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	61



4.3 Síntesis y caracterización del DL-HEPA y de sus enantiómeros	63
4.4 Análisis de la pureza óptica de los enantiómeros del HEPA	64
4.5 Actividad anticonvulsionante	64
4.6 Modulación de la actividad anticonvulsionante del fenobarbital por el DL-HEPP	65
4.7 Neurotoxicidad	66
<b>5.0 CONCLUSIONES</b>	67
<b>6.0 REFERENCIAS</b>	68

## CONTENIDO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sinapsis	2
<b>Figura 2.</b> Una sinapsis axodendrítica glutamaérgica	4
<b>Figura 3.</b> Receptor de GABA <sub>A</sub>	6
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del complejo receptor GABA <sub>A</sub>	7
<b>Figura 5.</b> Receptores GABA <sub>A</sub> y drogas antiepilépticas	10
<b>Figura 6.</b> Serie homóloga de amidas anticonvulsionantes	12
<b>Figura 7.</b> Obtención del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPB	19
<b>Figura 8.</b> Preparación del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionamida	21
<b>Figura 9.</b> Síntesis del DL-HEPA.	23
<b>Figura 10.</b> Resolución del DL-HEPA	23
<b>Figura 11.</b> Espectro de IR de la DL-5-etil-5-(4'-trifluorometilfenil) butirolactona	30
<b>Figura 12.</b> Espectro de IR del DL-4-hidroxi-4-etil-4-(4'-trifluorometilfenil) butiramida	31
<b>Figura 13.</b> Espectro de IR del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionato de etilo	32
<b>Figura 14.</b> Espectro de IR del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-Trifluorometilfenil) propionamida	33
<b>Figura 15.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionamida	34
<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-	

trifluorometilfenil) propionamida	35
<b>Figura 17.</b> Amplificación correspondiente a 120-128 ppm del espectro de RMN- <sup>13</sup> C del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	36
<b>Figura 18.</b> Espectro IR del DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida.	37
<b>Figura 19.</b> Determinación de la pureza óptica de los enantiómeros del DL-HEPA por HPLC	38
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del DL-HEPA	39
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del DL-HEPA	40
<b>Figura 22.</b> Espectro IR del (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida	41
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del (+)-HEPA	42
<b>Figura 24.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del (+)-HEPA	43
<b>Figura 25.</b> Estudio HSQC del (+)-HEPA	44
<b>Figura 26.</b> Espectro IR del (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida.	45
<b>Figura 27.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del (-)-HEPA	46
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del (-)-HEPA	47
<b>Figura 29.</b> Curva dosis-respuesta del fenobarbital	52
<b>Figura 30.</b> Curva dosis-respuesta del DL-HEPP	53
<b>Figura 31.</b> Curva dosis-respuesta del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	54
<b>Figura 32.</b> Curva dosis-respuesta del DL-HEPA	55
<b>Figura 33.</b> Curva dosis-respuesta del (-)-HEPA	56
<b>Figura 34.</b> Comparación de las DE <sub>50</sub> entre el fenobarbital y las fenil alcohol amidas.	56
<b>Figura 35.</b> Curva dosis-respuesta del fenobarbital en el modelo del rodillo	

giratorio.	57
<b>Figura 36.</b> Curva dosis-respuesta del DL-HEPP en el modelo del rodillo giratorio.	58
<b>Figura 37.</b> Curva dosis-respuesta del DL-4`-CF <sub>3</sub> -HEPP en el modelo del rodillo giratorio	59
<b>Figura 38.</b> Comparación entre las DT <sub>50</sub> del fenobarbital y la serie de fenil alcohol amidas.	60

## CONTENIDO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Drogas antiepilépticas	9
<b>Tabla 2.</b> Actividad anticonvulsionante del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPB y del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP	48
<b>Tabla 3.</b> Actividad anticonvulsionante del fenobarbital en el modelo.	49
<b>Tabla 4.</b> Actividad anticonvulsionante del fenobarbital (FB) en presencia del DL-HEPP (15 mg/kg) en el modelo del PTZ.	49
<b>Tabla 5.</b> Actividad anticonvulsionante del fenobarbital en presencia de DL-HEPP (30 mg/kg) en el modelo PTZ.	50
<b>Tabla 6.</b> Comparación de las DE <sub>50</sub> del fenobarbital sólo y en presencia del DL-HEPP (15 y 30 mg/kg).	50
<b>Tabla 7.</b> Actividad anticonvulsionante del FB en el modelo del electrochoque máximo	51
<b>Tabla 8.</b> Actividad anticonvulsionante del DL-HEPP en el modelo del electrochoque máximo	52
<b>Tabla 9.</b> Actividad anticonvulsionante del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP en el modelo del electrochoque máximo	53
<b>Tabla 10.</b> Actividad anticonvulsionante del DL-HEPA en el modelo del electrochoque máximo	54
<b>Tabla 11.</b> Actividad anticonvulsionante del (-)-HEPA en el modelo del electrochoque máximo	55
<b>Tabla 12.</b> Neurotoxicidad del fenobarbital en el modelo del rodillo giratorio o rotarod.	57
<b>Tabla 13.</b> Neurotoxicidad del DL-HEPP en el modelo del rodillo giratorio o rotarod.	58
<b>Tabla 14.</b> Neurotoxicidad del DL-4'-CF <sub>3</sub> -HEPP en el modelo del rodillo giratorio	59

## ABREVIATURAS

µl	Microlitros
µm	Micrometros
BZ	Benzodicepinas
Ca	Ion calcio
CCaSV	Canales de calcio sensibles a voltaje
CDCI3	Cloroformo deuterado
CF3	Trifluorometilo
Cl	Ion cloruro
cm-1	Número de onda
cm <sup>3</sup>	centimetrps cubicos
CNaSV	Canales de sodio sensibles a voltaje
DE50	Dosis efectiva 50
DL-4'-CF3-HEPB	DL-4-hidroxi-4-etil-4-(4'-trifluorometilfenil) butiramida
DL-4'-CF3-HEPP	DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionamida
DL-HEPA	DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida
DL-HEPB	DL-4-hidroxi-4-etil-4-fenil butiramida
DL-HEPP	DL-3-hidroxi-3-etil-3-fenil propionamida
DT50	Dosis tóxica 50
ECM	Electrochoque máximo
FAE	Fármacos antiepilépticos
g	Gramos
GABA	Ácido γ-amino butirico
h	Horas
H2SO4	Ácido sulfurico
HCl	Ácido clorhidrico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HSQC	Correlación heteronuclear a un solo enlace
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
IR	Infrarrojo
mA	Miliampers

mg	Miligramos
MHz	Megahertz
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercurio
Na <sup>+</sup>	Ion sodio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaH	Hidruro de sodio
ng	Nanogramos
NH <sub>3</sub> (g)	Amonio gaseoso
NH <sub>4</sub> OH	Hidroxido de amonio
NT	Neurotransmisor
°C	Grados centigrados
p.f.	Punto de fusión
ppm	partes por millon
PTZ	Pentiléntetrazol
RMN-13C	Resonancia magnetica de 1H
RMN-1H	resonancia magnetica de 13C
Zn <sup>0</sup>	Cinc activado

## RESUMEN

La epilepsia es la enfermedad neurológica más común, afecta alrededor del 1 % de la población mundial. Aproximadamente el 70 % de los pacientes con epilepsia responden al tratamiento. Sin embargo del 20 al 30% de estos son refractarios al tratamiento, de ahí la necesidad de desarrollar nuevos fármacos antiepilépticos. El compuesto DL-3-hidroxi-3-etil-3-fenil propionamida (DL-HEPP) es un anticonvulsionante de amplio espectro. La incorporación de un grupo hidrofóbico en el anillo fenilo del DL-HEPP incrementa su actividad anticonvulsionante.. Por lo tanto se introdujo un grupo hidrofobico ( $CF_3$ ) en el anillo fenilo del DL-HEPP y DL-HEPB (homólogo del HEPP) para obtener las fluorobencenamidas DL- $CF_3$ -HEPP y DL- $CF_3$ -HEPB. También realizó la resolución del anticonvulsionante DL-HEPA un homólogo del DL-HEPP. El DL- $CF_3$ -HEPP, DL-HEPA y sus enantiómeros se caracterizaron mediante  $^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -RMN y espectrofotometría de IR. Los resultados obtenidos confirmaron las estructuras propuestas. La actividad anticonvulsionante fue determinada usando pentiléntetrazol (80 mg/kg) administrado vía intraperitoneal y por el método de electrochoque máximo (MES), en ratones albino machos Swiss-Webster. Las dosis efectivas 50 ( $DE_{50}$ ) obtenidas para el DL- $CF_3$ -HEPB, DL-HEPP, DL-HEPA, (-) HEPA y el fenobarbital (PB) en la prueba de MES fueron de: 62,138, 109.5, 125 and 19 mg/kg respectivamente. En la prueba de neurotoxicidad por el método del rodillo giratorio ó rotarod, las  $DT_{50}$  obtenidas para el DL- $CF_3$ -HEPP, DL-HEPP y el PB fueron de: 66, 212 y 69 mg/kg respectivamente.

En conclusión, la introducción del grupo trifluorometilo en el anillo fenilo del DL-HEPP incremento su actividad anticonvulsionante.



## ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common neurological disorders affecting around 1 % of the worldwide population. Approximately 70% of the patients with epilepsy are successfully treated, however 20 to 30 % of epileptics are refractory to antiepileptics, hence the need to develop new antiepileptic drugs. The compound DL-3-hydroxy-3-ethyl-3-phenyl propionamide (DL-HEPP) is a broad spectrum anticonvulsant. Incorporation of hydrophobic groups in the phenyl ring of DL-HEPP increased its anticonvulsant activity.

Therefore, a hydrophobic group ( $\text{CF}_3$ ) has been introduced in the phenyl ring of DL-HEPP and DL-HEPB (a homologue of HEPP) to give the fluorobenzenamides DL- $\text{CF}_3$ -HEPP and DL- $\text{CF}_3$ -HEPB. It was also made the resolution of the anticonvulsant DL-HEPA, a homologue of DL-HEPP. DL- $\text{CF}_3$ -HEPP, DL-HEPA and its enantiomers were characterized through  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-RMN}$  and IR spectroscopy. The results confirmed the proposed structure. The anticonvulsant activity was determined using pentylentetrazole (80 mg/kg) intraperitoneally and maximal electroshock test (MES) in male Swiss Webster mice. The effective doses 50 ( $\text{ED}_{50}$ ) obtained for DL- $\text{CF}_3$ -HEPB, DL-HEPP, DL-HEPA, (-) HEPA and phenobarbital (PB) in the MES test were 62,138, 109.5, 125 and 19 mg/kg respectively. In the rotarod ataxia test the  $\text{TD}_{50}$  values obtained for DL- $\text{CF}_3$ -HEPP, DL-HEPP and PB were 66, 212 and 69 mg/kg.

In conclusion, the inclusion of the trifluoromethyl group in the phenyl ring of DL-HEPP increased its anticonvulsant activity.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Sinapsis

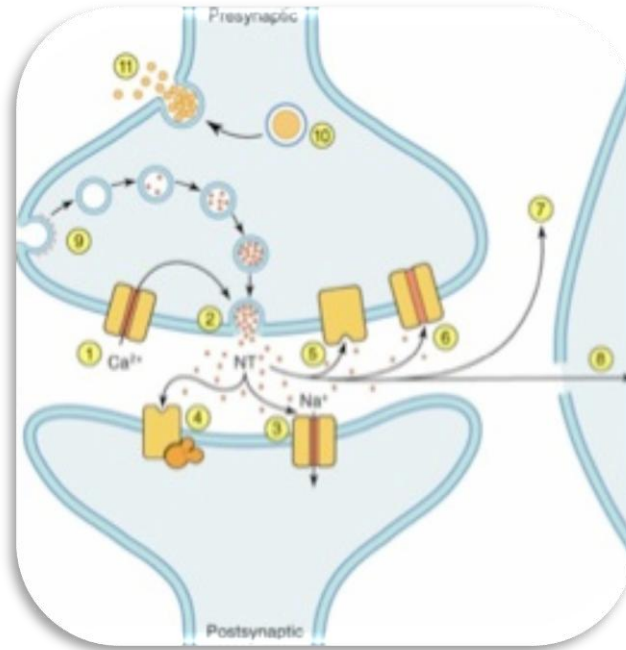
Las sinapsis son regiones de contacto especializado entre neuronas, entre estas células y órganos efectores así como entre dos fibras musculares. Se estima que el cerebro humano puede llegar a tener  $10^{14}$  sinapsis, éstas constituyen uno de los varios medios de comunicación entre las células.

En estas uniones la corriente eléctrica o algunas sustancias químicas pueden servir de vehículos para la comunicación (Brailowsky *et al.*, 1997). Dicha transmisión química entre las células involucra múltiples pasos, la transmisión química es el principal medio por el cual las células nerviosas están comunicadas con todo el sistema nervioso central. Los eventos pre-sinápticos y post-sinápticos están altamente regulados y sujetos a un uso dependiente de cambios que son la base de la plasticidad y el aprendizaje en el sistema nervioso central. Aunque las conexiones eléctricas directas pueden ocurrir, estas cuentan para la transmisión de la información entre nervios sólo en casos especializados (Ronald y Stephen, 2006).

En las sinapsis eléctricas dos células están eléctricamente acopladas de manera que el flujo electrónico de impulsos nerviosos cruza directamente de la sinapsis de la célula pre-sináptica a la post-sináptica (Figura1), (Meza, 2003).

En la neurotransmisión química se requieren los siguientes pasos:

1. Síntesis de un neurotransmisor (NT) en la terminal pre-sináptica.
2. El almacenamiento del NT en las vesículas sinápticas.
3. La liberación regulada del NT en el espacio sináptico.
4. La presencia de receptores específicos para el NT en la membrana post-sináptica.
5. Un medio para dar por terminada la liberación del NT (Ronald y Stephen, 2006).



**Figura 1.** Sinapsis. La despolarización abre los canales dependientes de calcio en la terminal pre-sináptica (1), la entrada de calcio y las altas concentraciones de este activan zonas en la terminal (2), lo cual conduce a la exocitosis de las vesículas sinápticas que almacenan el NT (3). Entonces los NT liberados se unen a sus receptores post-sinápticos (4). Los receptores de NT pre-sinápticos (5) al activarse conducen una de la exocitosis del NT, la inactivación del NT ocurre ya sea por un receptor en la terminal pre-sináptica (6) o por una proteína transportadora acoplada al gradiente de Na<sup>+</sup>, por ejemplo dopamina norepinefrina, glutamato y GABA ó por la (7) por la hidrólisis enzimática por ejemplo la acetilcolina; o por (8) la recaptura y metabolismo de la célula glial (glutamato). La vesícula sináptica membranal se recicla por (9) endocitosis. Los neuropéptidos y las proteínas se almacenan en (10) largos y densos centros granulados dentro de la terminal nerviosa, estos gránulos son liberados desde, (11) sitios distintos a las zonas de activación después de una estimulación repetitiva (Ronald y Stephen, 2006).

## 1.2 Neurotransmisores

Se define a un neurotransmisor (NT) como una sustancia producida por una célula nerviosa capaz de alterar el funcionamiento de otra célula, de manera breve o duradera, por medio de la ocupación de receptores específicos y por la activación de mecanismos ionotrópicos o metabotrópicos (Brailowsky *et al.*, 1997).

En el sistema nervioso central maduro los NT actúan como mediadores químicos en la comunicación intracelular, por la activación de receptores específicos y segundos mensajeros en las células post-sinápticas. Esta función especializada puede haber evolucionado a partir de funciones más primitivas en organismos inferiores, donde estas sustancias se utilizaban como dispositivos de señalización intra e intercelular. Esta observación se deriva de que una serie de neurotransmisores clásicos, (acetilcolina y norepinefrina) están presentes en organismos primitivos y embriones en ausencia de un sistema nervioso, y las pruebas farmacológicas de que estas sustancias regulan las actividades morfogénicas como: la proliferación, la diferenciación, la motilidad celular y la metamorfosis (Lauder, 1993).

El sistema nervioso central depende del balance exacto entre los neurotransmisores inhibidores (GABA) y excitadores (glutamato) en los vertebrados (Delgado y Schmachtenberg, 2008).

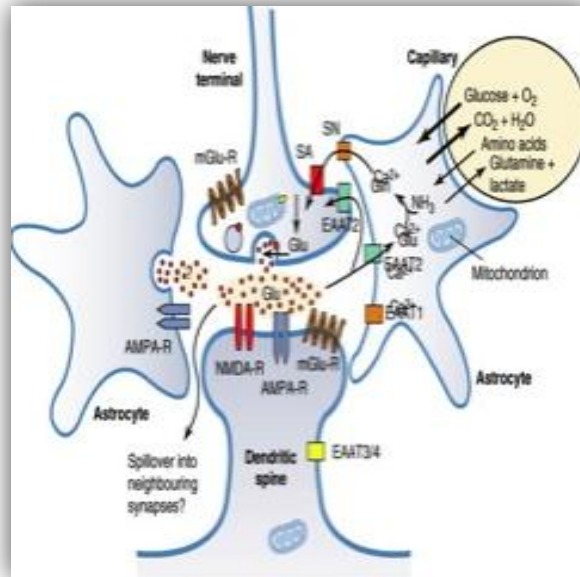
### 1.2.1 Glutamato

El glutamato es un NT en el cerebro de los mamíferos, está distribuido a lo largo y ancho del tejido celular, se encuentra en altas concentraciones respecto a los demás aminoácidos (Berl *et al.*, 1961). Este neurotransmisor es el principal regulador de la mayoría de las sinapsis excitatorias en el cerebro de los mamíferos (Figura 2). Sus efectos se presentan en dos clases de receptores:

- Los ionotrópicos que están asociados a los canales iónicos. Contienen canales permeables a cationes y se clasifican de acuerdo con sus agonistas selectivos

afines a los compuestos N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA) o kainato.

- Los metabotrópicos asociados a proteínas G acopladas a segundos mensajeros.



**Figura 2.** Una sinapsis axodendrítica glutamérgica consiste de una terminal pre-sináptica y una espinilla dendrítica post-sináptica. Las terminales pre-sinápticas contienen vesículas con transportadores de glutamato (punto rojo), mitocondrias (azul), receptores de glutamato metabotrópicos y los transportadores de glutamato (EAAT2) y glutamina (SA). La espinilla dendrítica post-sináptica contiene receptores para glutamato ionotrópicos (AMPA y NMDA) y metabotrópicos, y transportadores de glutamato (EAAT3, EAAT4 este último en las células Purkinje en el cerebelo). Alrededor de la sinapsis están presentes los transportadores astrocíticos para el glutamato (EAAT1 y EAAT2) y los transportadores de glutamina. Los rectángulos verdes en la membrana plasmática del axón terminal representan los transportadores EAAT1 y EAAT2. El glutamato que escapa fuera de la sinapsis sin ser recapturado por los transportadores podría alcanzarse sobre las sinapsis vecinas (Ronald y Stephen, 2006).

El glutamato liberado en la terminal pre-sináptica puede enlazarse tanto a los receptores NMDA (R-NMDA) como a los no NMDA. El complejo del receptor NMDA es un polirreceptor que está asociado con un canal de  $Ca^{++}$  y presenta varios sitios moduladores, por ejemplo uno para la glicina, el cual es insensible a la estricnina y un sitio de unión a poliaminas. Para facilitar la apertura del canal de calcio cuando el glutamato se une a su receptor se requiere la unión de la glicina al polirreceptor.

En el caso del R-NMDA, la hiperexcitabilidad se produce por la entrada de calcio y la activación del receptor afín al kainato lo cual despolariza la membrana al permitir la entrada de iones  $\text{Na}^+$ . Esta despolarización causa la abertura de los canales de calcio sensibles a voltaje (CCaSV) lo cual incrementa aun más la excitabilidad.

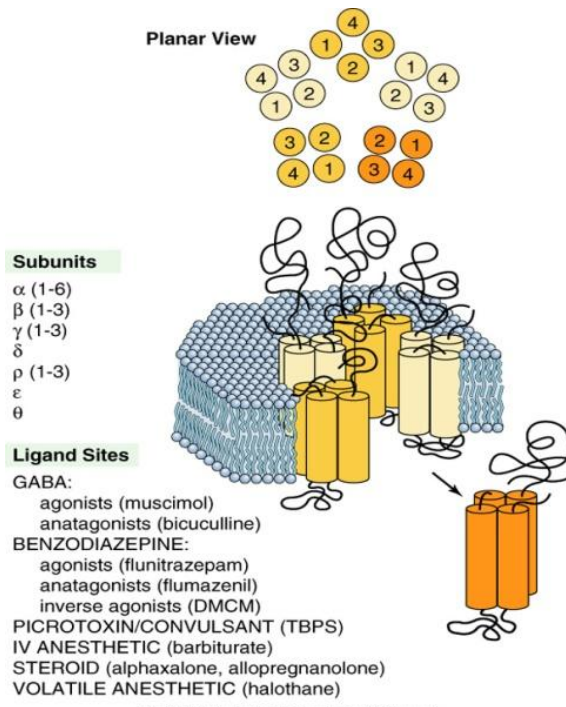
La inhibición de la entrada de iones  $\text{Na}^+$  a través de los canales de sodio sensibles a voltaje (CNaSV) (presentes en las neuronas presinápticas glutamérgicas), impiden la despolarización que se requiere para que se abran los CCaSV, lo que reduce la liberación de glutamato vesicular. Así mismo la estabilización de las membranas neurales presinápticas envía un bloqueo de los CNaSV que previene la liberación de glutamato (Martínez y Meza, 2003).

### **1.2.2 Estructura y función del receptor Gama Amino Butírico (GABA)**

El GABA se sintetiza en el cerebro por la descarboxilación del L-glutamato catalizada por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), esta reacción requiere como cofactor el fosfato de piridoxal. Posteriormente el GABA sintetizado se almacena en vesículas previo a su liberación al espacio sináptico.

El principal receptor para el neurotransmisor GABA en el cerebro de los mamíferos, es un conjunto de subunidades proteicas asociadas a un ion cloruro es conocido como receptor  $\text{GABA}_A$  (R- $\text{GABA}_A$ ) y es sensible al muscimol y a la bicuculina. La función del receptor  $\text{GABA}_A$  puede ser modulada por una amplia variedad de fármacos, como las benzodiazepinas (BZ) o los barbitúricos (Schofield *et al*; 1987).

El R- $\text{GABA}_A$  es un complejo macromolecular que consiste de cinco subunidades las cuales contienen sitios de unión a GABA, BZ, barbitúricos, picrotoxina, y anestésicos esteroideos. Este receptor pentamérico se ensambla mediante una combinación de 16 subunidades ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\theta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) y 3 subunidades  $\rho$  que contribuyen a lo que algunas veces se ha llamado el receptor  $\text{GABA}_C$  (Figura 3).



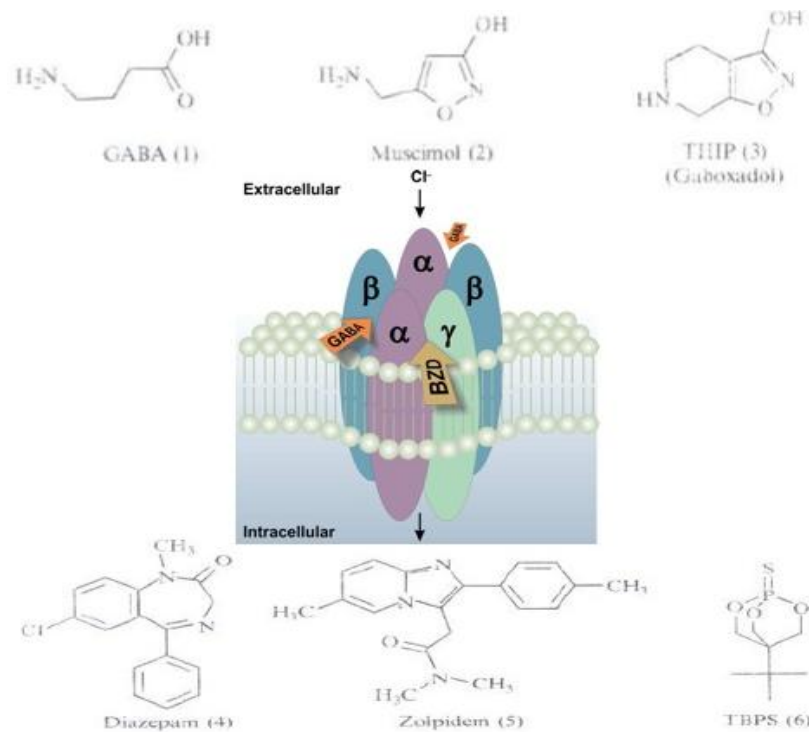
**Figura 3.** Receptor GABA<sub>A</sub> (panel inferior), la proteína se muestra como una membrana pseudosimétrica que abarca un canal de iones constituido por 5 subunidades homólogas cada una de ellas con 4 regiones de membrana que abarcan (MSRs numeradas del 1-4) como muestra una de las subunidades que está por fuera. (Panel superior) vista de la parte exterior de la célula. (Vista plana) muestra el arreglo de las 5 subunidades las cuales con 4 MSRs alrededor del canal del ion cloruro. También se enlistan las familias de subunidades que pueden ser utilizadas en la composición de dicho receptor y los ligandos que tienen sitios de unión con el receptor (Ronald y Stephen, 2006).

Los análogos del GABA como el muscimol actúan como agonistas uniéndose al sitio de GABA y abriendo los canales de Cl<sup>-</sup>. La activación del canal de iones es compleja e involucra la apertura y cierre del canal en una escala de milisegundos. El R-GABA<sub>A</sub> se desensibiliza por la continua presencia del GABA.

Los R-GABA<sub>A</sub> son parte de la superfamilia de receptores acoplados a canales iónicos regulados por ligandos que incluyen a los receptores; nicotínicos de acetilcolina (R-nACh), de glicina (R-Gly), ionotrópicos de 5-HT (R-5HT<sub>3</sub>) y canales iónicos activados por Zn<sup>2+</sup>. Difieren en estructura de los receptores tetraméricos de glutamato y los receptores triméricos de purinas. Mientras que los R-nAChR, los R-5-HT<sub>3</sub> y los canales activados por Zn<sup>2+</sup> son canales catiónicos selectivos, difieren las familias de R-GABA<sub>A</sub> y R-Gly que estos últimos son canales aniónicos selectivos.

Todos los miembros de la superfamilia de receptores acoplados a canales iónicos muestran una homología en su secuencia del 30% de identidad, pero muestran una mayor similitud al nivel de estructuras secundarias y terciarias. Tales receptores están organizados como proteínas pentaméricas a través de la membrana rodeando un poro central que forma el canal iónico a través de la membrana. Todos usan secuencias similares y dominios funcionales para establecer la estructura del canal iónico, los sitios de unión de agonistas e incluso sitios de unión para diversos ligandos alostéricos (Olsen y Sieghart, 2008).

Sitios de unión en el receptor GABA<sub>A</sub>. En la figura 4 los compuestos 1-3 son agonistas en el sitio de GABA. Los compuestos 4 y 5 son agonistas en el sitio de las BZ y en compuesto 6 es un antagonista que inhibe la acción de GABA mediante alosterismo probablemente dentro del canal de iones (Sieghart W., 2006).



**Figura 4.** Representación esquemática del complejo receptor GABA<sub>A</sub> compuesto de 2 subunidades α, 2 subunidades β, y 1 subunidad γ. La unión de los agonistas ocurre en la interfase entre las subunidades α y β y comienza con la apertura del canal permitiendo un flujo rápido de iones Cl<sup>-</sup> dentro de la célula lo que resulta en una hiperpolarización neuronal. La unión de las BZ sucede en la interfase de las subunidades α y γ que modulan alostericamente al receptor GABA<sub>A</sub>



incrementando la frecuencia de apertura del canal  $Ca^{2+}$  y potenciando al GABA (Nutt, 2006; Jacob *et al.*, 2008).

### 1.3 Fármacos anticonvulsivos

Desde 1912 en que se inició el uso del fenobarbital para el tratamiento de las crisis epilépticas, la perspectiva de tratamiento para estos procesos ha cambiado enormemente. En los siguientes años se desarrollaron moléculas bastantes similares a este, como son, la fenitoina, la carbamacepina, la primidona y las benzodiazepinas, que representaron, hasta 1970 un sostén terapéutico que no llegó a cumplir con las expectativas deseadas del fármaco ideal.

En los últimos 20 años, con la introducción del valproato, y el clonacepan se alentó la esperanza de muchos enfermos que no habían conseguido un control adecuado de sus crisis, siendo desde entonces los fármacos más utilizados, si bien tampoco estos han conseguido que la epilepsia fuera un problema resuelto. Son numerosos los pacientes que no están libres de crisis, han de ser tratados con varios fármacos y sufren efectos secundarios del tratamiento. Las características del fármaco ideal son múltiples.

Es importante contar con un fármaco que supere la relación eficacia-toxicidad de los antiepilépticos clásicos, que ofrezca amplios espectros de acción, una eficacia probada en su administración por vía oral, una vida media larga, y escasas posibilidades de metabolizarse sin unirse a las proteínas plasmáticas (por lo tanto con pocas posibilidades de interacción con otros fármacos) y que en lo posible se pueda determinar sus niveles plasmáticos y, que además su costo sea razonable.

Por otra parte, los enfoques de la investigación de nuevos antiepilépticos son variados e involucran a los neurotransmisores inhibitorios (GABA) o excitatorios (Glutamato), para modificar la balanza excitación/inhibición, o bien obtener fármacos que bloqueen los canales de calcio o de sodio (Tabla 1), (Herrero *et al.*, 2000).

**Tabla 1.** Drogas antiepilépticas

Mecanismo	Bloqueo de canales de Na <sup>+</sup>	Potenciación del GABA	Antagonismo del Glutamato	Bloqueo de canales de Ca <sup>++</sup>
Ác. Valproico	+++	++		+
Carbamacepina	++			
Felbamato	+++	++	+	
Fenotoina	+++			
Gabapentina	+++	++		
Lamotrigina	+++			
Tiagabina		++		
Topiramato	+++	+++	+++	++
Vigabatrina		+++		

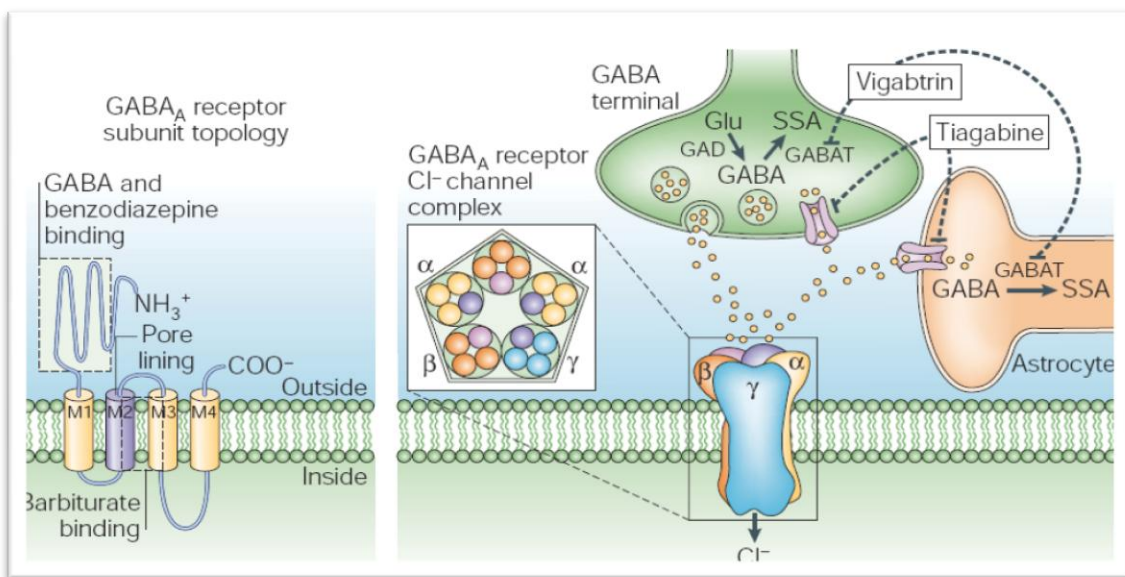
Los fármacos antiepilépticos (FAE) establecidos reducen la excitabilidad neuronal promoviendo la inactivación de canales de sodio, inhibiendo los canales de calcio tipo T, o potenciando la inhibición mediada por el receptor GABA<sub>A</sub> (Macdonald y Greenfield, 1997).

Los FAE que promueven la inactivación de canales de sodio ejercen su mecanismo de acción a través de la disminución de los disparos de alta frecuencia. La carbamacepina, la lamotrigina, la fenitoína y el ácido valproico modulan el disparo de alta frecuencia a concentraciones que son efectivas en la limitación de convulsiones en humanos. Los análisis electrofisiológicos de neuronas individuales durante crisis parciales demuestran que las neuronas se despolarizan y disparan potenciales de acción a altas frecuencias. Este patrón de disparo neural es la característica distintiva de una crisis y su ocurrencia es rara durante la actividad fisiológica. Por lo tanto, se esperaría que la inhibición selectiva de este patrón de disparo de alta frecuencia redujera las crisis. El mecanismo por el cual las drogas que limitan el disparo de alta frecuencia, involucran la disminución de la velocidad de recuperación de la inactivación por parte de los canales de sodio dependientes del voltaje.

Por otro lado, los FAE que potencian la inhibición sináptica mediada por el GABA reducen la excitabilidad neuronal y por lo tanto aumentan el umbral convulsivo. El receptor principal postsináptico del GABA liberado en la sinapsis es el R-GABA<sub>A</sub> (Figura 5). La

activación del R-GABA<sub>A</sub> lleva a cabo una inhibición de la célula postsináptica, incrementando el flujo de iones Cl<sup>-</sup> hacia la célula lo que hiperpolariza la neurona. Concentraciones clínicamente relevantes de benzodiazepinas y barbitúricos potencian la inhibición mediada por el receptor GABA<sub>A</sub>.

Los FAR que inhiben los canales de calcio tipo T, como la etosuccinamida, se involucran en el control de las crisis de ausencias. Al contrario de las crisis parciales, las crisis de ausencias generalizadas surgen de disparos recíprocos del tálamo y de la corteza cerebral. El electroencefalograma distintivo de una crisis de ausencia generalmente son descargas de punta y onda a una frecuencia de 3 Hz. Estas descargas bilaterales sincrónicas de punta y onda representan oscilaciones entre el tálamo y la corteza. Estos ritmos reverberantes de baja frecuencia son posibles debido a una combinación de factores que incluye conexiones recíprocas sinápticas excitatorias entre la corteza y el tálamo así como propiedades intrínsecas de las neuronas en el tálamo, de la cual la más importantes es la corriente de calcio de bajo umbral o I<sub>T</sub>. La expresión de I<sub>T</sub> en las neuronas talámicas es crítica para la generación de la punta onda de 3 Hz. El principal mecanismo por el cual los fármacos antiausencias actúan, es por la inhibición de la I<sub>T</sub> reduciendo el flujo de calcio a través de canales de calcio tipo T. La etosuccimida es un fármaco efectivo contra las crisis de ausencias ya que bloquea los canales de calcio tipo T (McNamara y Gibbs, 2006).



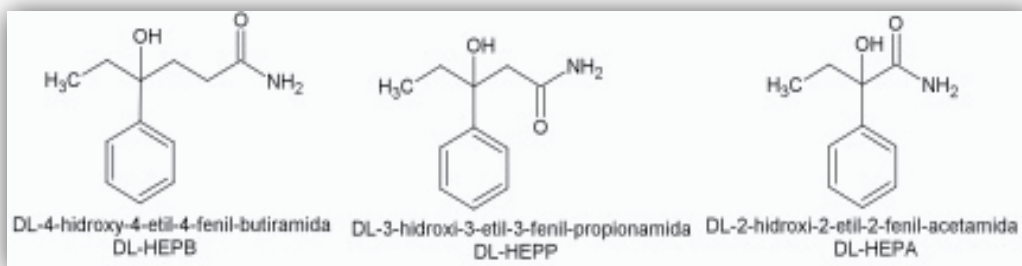
**Figura 5.** Receptor GABA<sub>A</sub> y FAE: del lado izquierdo se muestra la topología de membrana de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>. Los residuos identificados como esenciales para la unión de

agonistas (GABA) y de benzodiazepinas se encuentran en el extremo amino terminal. Los barbitúricos se unen a los segmentos M2 y M3. Del lado derecho se muestra una sinapsis inhibitoria gabaérgica ilustrando la síntesis del GABA en la terminal presináptica, a partir del ácido glutámico por la glutamato descarboxilasa (GAD). En las neuronas y los astrocitos el GABA es degradado por la transaminasa del GABA (GABAT) a semialdehído succinato (SSA); la vigabatrina es un inhibidor irreversible de la GABAT. Los cilindros representan transportadores de captura del GABA inhibidos por la tiagabina. También se representa la estructura pentamérica de los receptores GABAA. Los pequeños círculos indican los segmentos en forma de hélice que corresponden a los mostrados a la derecha. Los segmentos M2 forman el canal de Cl<sup>-</sup> (Rogawski y Loscher, 2004).

### **1.3.1 Fármacos antiepilépticos desarrollados en México**

En 1964 se publicó el trabajo de Carvajal y colaboradores en el que se presentaron los primeros resultados sobre tres compuestos planeados como inhibidores de la transaminasa del GABA. Estos tres compuestos fueron derivados 5,5-disustituídos de la 2-pirrolidinona. Uno de los resultados de este estudio fue que la 5-etil-5-fenil-2-pirrolidinona (EPP) demostró tener un buen efecto contra las convulsiones y muerte producidas por el pentilenotetrazol, así como contra las convulsiones producidas por electrochoque (Carvajal *et al.*, 1964). Estudios posteriores mediante resonancia magnética nuclear y difracción de rayos X demostraron que la estructura del EPP correspondía a la del DL-4-hidroxi-4-etil-4-fenil butiramida, DL-HEPB (Nathan *et al.*, 1978; Castellano *et al.*, 1981). También se demostró un excelente efecto antiepiléptico en mujeres epilépticas, en donde la administración durante 8 a 10 meses de 600 a 800 mg de DL-HEPB produjo una marcada disminución en la frecuencia de los episodios convulsivos (Carvajal, 1996).

Basándose en la estructura del DL-HEPB, se planeó sintetizar y probar una serie homóloga, obteniéndose los racematos de los homólogos inferiores: DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil-acetamida (DL-HEPA) y la DL-3-hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida (DL-HEPP) (Meza *et al.*, 1990).



**Figura 6.** Serie homóloga de amidas anticonvulsiantes

Estos compuestos presentan un amplio perfil anticonvulsiante en el caso de convulsiones provocadas por drogas como: el pentiléntetrazol (PTZ), la bicuculina, la tiosemicarbazida, así como en el electrochoque máximo. También protegieron a ratas y gatos contra el *kindling* hipocampal (Solis *et al.*, 1979). El DL-HEPP protegió a las ratas contra el síndrome de abstinencia del GABA, un modelo de epilepsia focal que muestra una resistencia extraordinaria a los antiepilépticos clásicos. El DL-HEPP también produjo una disminución significativa de la actividad focal de puntas y espigas en la epilepsia congénita tipo ausencias de ratas de Estrasburgo (GAERS) (Brailowsky *et al.*, 1992). El amplio espectro de actividad anticonvulsiante que exhiben el DL-HEPA, el DL-HEPP y el DL-HEPB es similar al del fenobarbital y del valproato. Sus dosis efectivas medias son superiores a las del valproato y de la etosuccimida e inferiores a las de la difenilhidantoína y benzodiazepinas, teniendo en relación con éstos la ventaja de su amplitud de espectro antiepiléptico. Los resultados obtenidos con estos compuestos los hacen candidatos a antiepilépticos mayores (Meza y Carvajal, 2007). Cabe destacar que el DL-HEPP mostró la menor toxicidad frente a la prueba del rotarod y al evaluar su dosis letal 50 (Meza *et al.*, 1990). En la serie homóloga de fenil alcohol amidas (Chamorro *et al.*). La longitud de la cadena principal de carbonos en los compuestos afectó ligeramente su actividad anticonvulsiante (Meza y Carvajal, 2007).

Cabe mencionar que desde su creación, el DL-HEPB ha sido extensamente estudiado, desde sus efectos en la memoria (Oynick, 1968), hasta sus efectos en la síntesis de proteínas y aprendizaje en ratas (Martínez de Muñoz y Ocos, 1977). Se sugirió su posible acción a nivel de fármaco antiepiléptico por Carvajal-Sandoval en 1986 como GABA mimético, de acuerdo a la definición de Krosgaard-Larsen (Krosgaard, 1979),

tomando en cuenta la protección del mismo contra las convulsiones provocadas por la bicuculina (Carvajal y Sandoval, 1986; Pérez de la Mora y Tapia, 1973).

Considerando la similitud estructural entre el DL-2-hidroxisaclofén y el baclofén y los estudios de relación estructura-actividad, se prepararon una serie de análogos halogenados en la posición 4' del grupo fenilo del HEPA, del HEPP y del HEPB con la idea de aumentar la afinidad del receptor hacia los mismos e incrementar su actividad anticonvulsionante (Meza y Carvajal, 2007). La incorporación de halógenos al anillo aromático del DL-HEPP, DL-HEPA y DL-HEPB incrementó su actividad anticonvulsionante (Meza *et al.*, 2008; Carvajal *et al.*, 1998). Lo anterior sugirió la presencia de un sitio hidrofóbico en el receptor. De acuerdo a lo propuesto es probable que la incorporación del grupo trifluorometilo (grupo hidrofóbico) en el anillo fenilo del DL-HEPP, DL-HEPA y DL-HEPB pueda incrementar su afinidad hacia el receptor, lo que conllevaría a un aumento en su actividad anticonvulsionante. Por tal motivo en el presente trabajo se planeó incorporar en el anillo aromático del DL-HEPP y del DL-HEPB el grupo trifluorometilo (grupo hidrofóbico) planteándose la síntesis de los compuestos DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP y DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB.

Meza y Bowery estudiaron en 2008 la acción de las fenil alcohol amidas para desplazar el [<sup>3</sup>H] GABA de los sitios de unión del receptor GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>. Se obtuvo como resultado que las fenil alcohol amidas no desplazaron el [<sup>3</sup>H] GABA de los receptores GABA<sub>A</sub> y produjeron únicamente un bajo nivel de inhibición en el receptor GABA<sub>B</sub> con una inhibición máxima del 20-30% para el DL-HEPB, el DL-F-HEPB y el DL-CI-HEPB. Se destacó el efecto que tiene el DL-HEPB en la inhibición de la propagación de las post-descargas producida por la estimulación eléctrica hipocampal, ya que disminuyó la duración de las postdescargas y en algunos gatos bloqueó su propagación hacia la sustancia nigra y la amígdala (Tapia *et al.*, 1979). Los autores destacaron que se desconoce si este efecto del DL-HEPB está relacionado con la liberación del GABA en la sustancia nigra, tomando en cuenta que se ha sugerido que la sustancia nigra es el sitio del cerebro medio para la actividad anticonvulsionante mediada por el GABA (Iadarola y Gale, 1982). El HEPP revirtió la inhibición de la liberación evocada eléctricamente de [<sup>3</sup>H]-GABA producida por el GABA y por los antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, bicuculina y picrotoxina, proponiendo una posible acción del DL-HEPP como modulador alostérico del complejo del receptor GABA<sub>A</sub> (Meza y Bowery, 2008). Además, el compuesto DL-HEPP protege contra las convulsiones y muerte provocadas por la bicuculina y la picrotoxina en ratones. Sin

embargo, es necesario obtener mayor evidencia neuroquímica y farmacológica para apoyar el mecanismo propuesto. Por lo anterior se plantea en el presente trabajo estudiar la modulación de la actividad anticonvulsionante del fenobarbital, un modulador alostérico del receptor GABA<sub>A</sub> por el DL-HEPP.

En las evaluaciones farmacológicas, toxicológicas y neurofisiológicas que se han realizado con el DL-HEPA, el DL-HEPP y el DL-HEPB, se han utilizado sus mezclas racémicas. Para algunos compuestos que actúan sobre el sistema nervioso central y que se han evaluado como mezclas racémicas, al separar estereoisómeros se han encontrado diferencias en la actividad biológica, esto es debido a que las proteínas con las cuales interaccionan (receptores de membranas, enzimas, proteínas acarreadoras, etc.) en muchos casos muestran estereoselectividad, debido a sus centros activos quirales. La interacción de un fármaco quiral con macromoléculas quirales puede dar lugar a la formación de complejos diastereoméricos transitorios, los cuales pueden conducir a diferencias farmacocinéticas y farmacodinámicas, que producen cambios en la potencia farmacológica y en la toxicidad entre los enantiómeros. En un racemato el isómero inactivo o sus metabolitos pueden actuar como agonistas o antagonistas de las acciones farmacológicas y toxicológicas del enantiómero activo (Gross, 1989), de tal forma que la actividad y disposición de un fármaco racémico, puede ser más complejo que la suma de sus partes. Un ejemplo de cómo la distribución espacial de los grupos en una molécula podrían influir tanto en su actividad como en su naturaleza química, es el caso de la talidomida.

En ella el enantiómero dextrorrotatorio es una tranquilizante, y la versión levorrotatoria, es un poderoso agente teratogénico en ratones (Blaschke *et al.*, 1979; Brown y Davies, 1989), lo anterior condujo a la especulación de que la presencia del enantiómero levorrotatorio de la talidomida racémica suministrada a pacientes a inicios de 1960 produjo consecuencia catastróficas. Otro ejemplo que pone de manifiesto de la importancia estereoquímica es el caso de la DL-DOPA. En 1960 Blaschko y Chúsciel encontraron que el efecto del despertar que produce la dopa en animales tratados con reserpina, era debido principalmente al enantiómero L. hay que tener presente que la L-DOPA es sintetizada a partir del aminoácido L-tirosina. Una aplicación clínica de estos descubrimientos involucró el uso de la L-DOPA, para tratar pacientes con el mal de Parkinson. Estudios clínicos posteriores realizados por Cotzias *et al.*, 1967, mostraron que la L-DOPA producía efectos secundarios adversos, mientras que la L-DOPA tenía efectos

benéficos sobre los síntomas del mal del Parkinson, con unas cuantas reacciones adversas (Cotzias *et al.*, 1967), desde entonces a aumentado el interés de los efectos de los estereoisómeros sobre los mecanismos dopaminérgicos (Carvajal y Meza, 1993). Por lo anterior se plantea en el presente trabajo realizar la resolución del DL-HEPA.



## 1.4 JUSTIFICACIÓN

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más prevalentes en el mundo, afectando al 1% de la población mundial. Los pacientes epilépticos utilizan fármacos antiepilépticos convencionales y algunos de ellos presentan efectos secundarios indeseables. Además entre el 20 y 30% de los pacientes epilépticos son refractarios al tratamiento convencional. Por ello existe la necesidad de desarrollar nuevos fármacos con mayor actividad anticonvulsionante. Estudios previos han documentado la actividad anticonvulsionante del DL-HEPA. Sin embargo no se conoce si hay diferencias en la actividad anticonvulsionante de sus enantiómeros en modelos como electrochoque, por lo que en este trabajo se planteó su resolución. Se ha encontrado que la adición de un grupo halogenado al anillo fenilico de las fenil alcohol amidas potencia su actividad anticonvulsionante. Lo que sugiere que el receptor hacia estos compuestos debería presentar un sitio hidrofóbico. Por lo anterior es probable que la introducción de un grupo trifluorometilo (grupo hidrofóbico) en el anillo aromático del DL-HEPP y del DL-HEPB potencie su actividad anticonvulsionante, por lo que en este trabajo se estudió el efecto anticonvulsionante y neurotóxico de DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 OBJETIVO GENERAL

Resolver y estudiar la actividad biológica de los enantiómeros del HEPA, así como sintetizar los compuestos DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionamida (DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP) y DL-4-hidroxi-4-etil-4-(4'-trifluorometilfenil) butiramida (DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB) y estudiar su actividad anticonvulsionante.

### 1.5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar los compuestos DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil)propionamida (DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP) y el DL-4-hidroxi-4-etil-4-(4'-trifluorometilfenil) butiramida (DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB).
- b) Caracterizar el compuesto DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP mediante espectrofotometría infrarroja (IR) y resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono 13.
- c) Evaluar la actividad anticonvulsionante del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP en ratones y compararla con la del fenobarbital, contra las convulsiones y muerte provocadas por el metrazol.
- d) Resolver la mezcla racémica del (±)-HEPA mediante el método de sales diastereoméricas de quinina y (+)-1-fenil-etil amina.
- e) Determinar la pureza óptica de los enantiómeros (+)-HEPA y (-)-HEPA, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con fase estacionaria quiral.
- f) Comparar las dosis efectivas 50 (DE<sub>50</sub>) del (±)-HEPA, del (-)-HEPA y del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP contra las convulsiones inducidas por el electrochoque máximo (ECM) en ratones.
- g) Comparar las dosis neurotóxicas 50 (DT<sub>50</sub>) del DL-HEPP y del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP en el modelo del rodillo giratorio o rotarod en ratones.
- h) Estudiar la modulación anticonvulsionante del fenobarbital en presencia del DL-HEPP contra las convulsiones y muerte provocadas por el pentiléntetrazol.

## **2.0 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 QUIMICA**

#### **2.1.1 Determinación del punto de fusión**

La determinación del punto de fusión se realizó en un equipo Mettler Toledo modelo FP-62

#### **2.1.2 Espectroscopía de infrarrojo (IR)**

El análisis espectroscópico infrarrojo se realizó en un espectrofotómetro de infrarrojo Perkin-Elmer FT-IR modelo spectrum GX 2000 con accesorio de reflectancia total atenuada (ATR)

#### **2.1.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono 13 (RMN- $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ )**

Los compuestos se disolvieron en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y los espectros de RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz) y de RMN- $^{13}\text{C}$  (125 MHz) se obtuvieron con un espectroscopio Varian 500 usando tetrametilsilano como referencia interna.

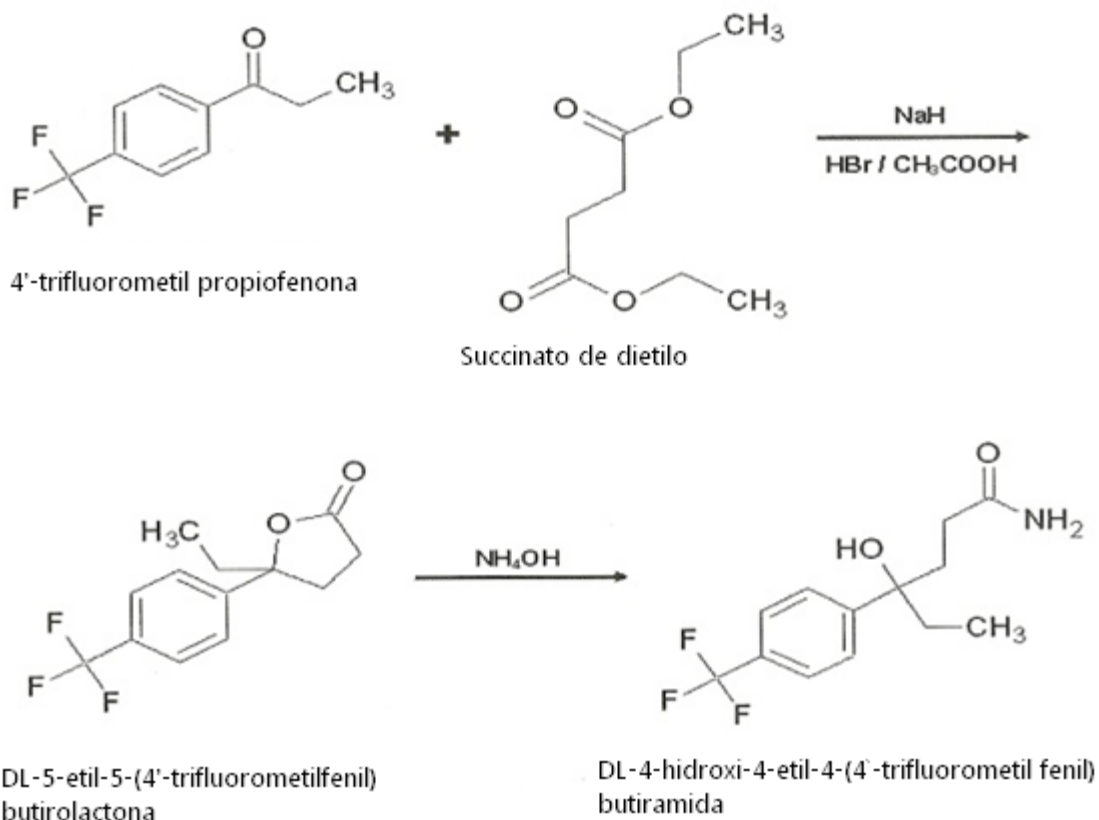
#### **2.1.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)**

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se realizó en un cromatógrafo Beckman System Gold, equipado con un detector UV-visible 166 y un módulo de bombas Beckman 128.

#### **2.1.5 Rotación específica**

Las rotaciones específicas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer modelo 341.

## 2.2 Síntesis del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB



**Figura 7.** Obtención del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB.

La síntesis del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB se llevó a cabo mediante una condensación de Stobbe, seguida de un reflujo en medio ácido y una posterior amoniolisis (Figura 7). La condensación entre aldehídos y cetonas con ésteres succínicos se conoce como condensación de Stobbe (Daub y Johnson, 1950). Si el producto de la condensación de Stobbe se refluja con ácido bromhídrico al 48 % y ácido acético, se hidroliza y se descarboxila para producir una mezcla de  $\gamma$ -lactona y del ácido isomérico insaturado (Vogel, 1961).

### 2.2.1 Obtención de la DL-5-etil-5-(4'-trifluorometilfenil) butirolactona

La reacción se llevó a cabo en un matraz de fondo redondo de tres bocas provisto con un agitador mecánico Hershberg, y un refrigerante de rosario, en el cual se colocaron 30 g (0.148 mol) de 4'-trifluorometil propiofenona, 17.2 g (0.298 mol) de succinato de dietilo, 35 mL de benceno anhidro y 7.11 g (0.296 mol) de NaH. Para iniciar la reacción se añadieron inicialmente 0.5 mL de etanol absoluto bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se dejó reaccionar durante tres horas con agitación, posteriormente se enfrió y se le añadieron 22.2 mL de ácido acético glacial y 20 mL de agua fría. El producto obtenido se extrajo con éter etílico y la fase orgánica se lavó con 250 mL de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5 %. La fase alcalina se acidificó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98 %, generando una fase orgánica que se extrajo con éter dietílico. Los extractos etéreos reunidos se lavaron con una solución saturada de NaCl y se dejaron secar sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro para posteriormente filtrarse y concentrarse, obteniéndose así 27 g de hemiésteres correspondientes.

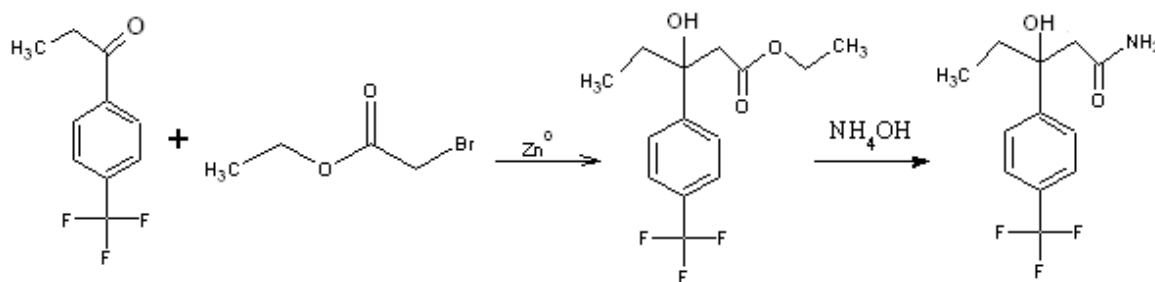
Los hemiésteres se sometieron a 6 reflujos de 24 h adicionándose 33 mL de ácido bromhídrico al 48 %, 66 mL de ácido acético glacial y 11 mL de agua. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con cuatro porciones de 50 mL de éter dietílico, después las fases etéreas reunidas se lavaron con una solución saturada fría de  $\text{NaHCO}_3$ . Las fases alcalinas se neutralizaron con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98 % para regenerar los hemiésteres que no reaccionaron, los cuales se extrajeron con cuatro porciones de 50 mL de éter dietílico, se concentraron y se reflujaron nuevamente, en presencia de ácido bromhídrico como se indicó previamente. Las fases etéreas reunidas se lavaron con una solución saturada de NaCl y se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtraron y se concentraron obteniéndose 4 g de DL-5-etil-5-(4'-trifluorometilfenil) butirolactona.

## 2.2.2 Obtención del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB

En un matraz de fondo redondo de 500 mL se colocaron 4g (0.015 mol) del DL-5-etil-5-(4'-trifluorometilfenil) butirolactona, 15 mL de etanol y 15 mL de hidróxido de amonio al 28%. La mezcla de reacción se enfrió y se saturó con amoníaco gaseoso. Posteriormente se colocó un tapón de hule en la boca el matraz y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 semanas. Posteriormente, la mezcla de reacción se enfrió y se extrajo con 3 porciones de 100 mL de éter dietílico cada una. Los extractos etéreos reunidos se secaron y se concentraron en el evaporador rotatorio al vacío y el DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB (2.3 g). Se recristalizó con agua obteniéndose 80 mg p.f. 29°C

## 2.3 Síntesis del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP

Si un éster  $\alpha$ -bromado se trata con cinc metálico, en presencia de un aldehído o una cetona, se obtiene un  $\beta$ -hidroxiéster. Esta reacción, es conocida como la reacción de Reformatsky, es la forma más importante de preparar  $\beta$ -hidroxi-ácidos y sus derivados. La reacción de Reformatsky soló se realiza con ésteres que tienen bromo en la posición *alfa*, por lo que necesariamente genera *beta*-hidroxiésteres (Morrison y Boyd, 1998).



**Figura 8.** Preparación del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionamida

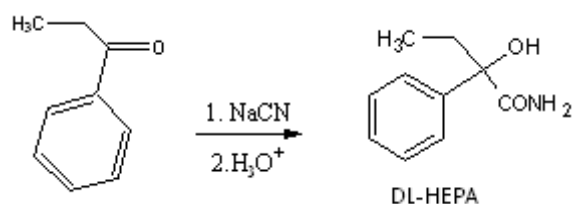
### **2.3.1 Preparación del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionato de etilo**

La síntesis del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP se llevó a cabo mediante una condensación entre una cetona con bromoacetato de etilo en presencia de zinc, para formar los hidroxiésteres correspondientes, los cuales al tratarse con amoníaco produjeron la amida esperada (Figura 8). La síntesis se realizó de la siguiente manera; en un matraz de fondo redondo de tres bocas provisto de un agitador mecánico Hershberg, un refrigerante de rosario y un embudo de adición, se mezclaron 25 ml de benceno anhidro, 20.5 g (0.123 mol) de bromoacetato de etilo, 7.5 ml de éter dietílico anhidro, 10 g (0.074 mol) de 4'-trifluorometil propiofenona, y 10.11 g (0.54 mol) de Zn<sup>o</sup> activado. La reacción se agitó por un período de 2 a 3 h, teniendo cuidado de dejar salir cada 15 min el hidrógeno desprendido y manteniendo la atmósfera de nitrógeno. Posteriormente el matraz de reacción se enfrió en un baño de hielo por 10 min y enseguida se adicionó cuidadosamente por la parte superior del refrigerante 92 ml de ácido sulfúrico al 10 %, esto se realizó para hidrolizar la mezcla. La fase bencénica se separó y se lavó con dos porciones de 36 ml de ácido sulfúrico al 5 %, 13 ml de carbonato de sodio al 10 %, y dos porciones de 25 ml de agua fría. Después las soluciones ácidas combinadas se extrajeron con dos porciones de 50 ml de éter dietílico cada una. Posteriormente las fases etéreas y bencénicas reunidas se secaron sobre sulfato de sodio anhidro durante toda la noche, se filtraron y se concentraron en el evaporador rotatorio para eliminar el éter; obteniéndose 6 g (60 %) del hidroxiéster.

### **2.3.2 Obtención del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionamida (DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP)**

En un matraz de fondo redondo de 500 ml se colocaron 6 g (0.020 mol) del hidroxiéster, 25 ml de hidróxido de amonio al 28 % y 25 ml de etanol. La mezcla de reacción se enfrió y se saturó con amoníaco gaseoso. Posteriormente se colocó un tapón de hule en la boca del matraz y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 días. Este paso se repitió nuevamente y se dejó reposar durante 15 días más. Después la mezcla de reacción se enfrió, se retiró el tapón de hule de la boca del matraz y se extrajo con 5 porciones de 50 mL de éter dietílico cada una. Los extractos etéreos reunidos se secaron y se concentraron en el evaporador rotatorio al vacío, obteniéndose 4 g (0.015 mol) (66%) de DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP. El compuesto se recristalizó con agua.

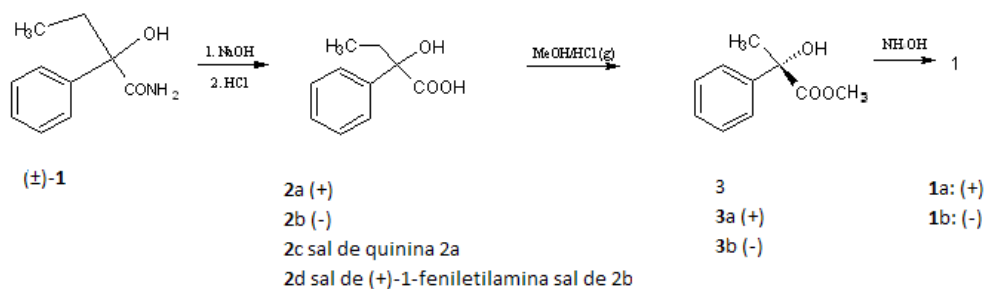
## 2.4 Síntesis del DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida (DL-HEPA)



**Figura 9.** Síntesis del DL-HEPA.

La síntesis de DL-HEPA se realizó utilizando una mezcla de 30 g (0.223 mol) de propiofenona, 27 g (0.549 mol) de cianuro de sodio, 26.5 ml de éter dietílico anhidro y 33.33 ml de agua. Entonces se añadieron lentamente 46.5 ml de ácido clorhídrico al 37 %, manteniendo la temperatura entre 2-5°C. Después la mezcla de reacción se agitó 5 h a una temperatura entre 10-15°C. La fase etérea se separó y se lavó con 100 ml de agua para disolver las sales. Posteriormente la solución acuosa se extrajo con 4 porciones de 100 ml de éter dietílico cada una y los extractos etéreos combinados se concentraron. Al producto obtenido se le adicionó 53 ml de ácido clorhídrico al 37 %, y se saturó con cloruro de hidrógeno gaseoso manteniéndolo a temperatura entre 0-5°C. Posteriormente la mezcla de reacción se dejó reaccionar durante 18 h a temperatura ambiente, tiempo en el cual apareció un precipitado. El precipitado se filtró, se recrystalizó con benceno obteniéndose 25.23 g (84%) de DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida, p.f. 91-92°C (Figura 9).

### 2.4.1 Formación de sales diastereoméricas



**Figura 10.** Resolución del DL-HEPA.



#### 2.4.2 Síntesis del ácido DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético

Una mezcla conteniendo 25.23 g (0.139 mol) de DL-HEPA, 7.56 g (0.186 ml) de hidróxido de sodio y 216 ml de agua se reflujo durante 8 h. Posteriormente la mezcla de reacción se concentró en el evaporador rotatorio hasta alcanzar un volumen de 66 ml. Después la solución se llevó a un pH 1 adicionando ácido clorhídrico al 37 %, obteniéndose un precipitado el cual se filtró y el sólido resultante se recristalizó con benceno, obteniéndose 22.4 g (88.7 %) del ácido DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético. p.f. 130-131°C.

#### 2.4.3 Preparación del ácido (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético

A una solución conteniendo 22.4 g (0.123) del ácido DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético disuelto en 300 ml de etanol, se le adicionó 43.5 g (0.133 mol) de (-)-quinina a 60 °C. La mezcla de reacción se reflujo durante 10 min y se enfrió a -3 °C, formándose unos cristales los cuales se separaron por filtración. El filtrado se utilizó para obtener el ácido (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético. Los cristales de sal de (-)-quinina-(+)-ácido se calentaron con etanol (200 mL) cinco veces, se enfrió y se filtró para obtener 25.8 g de una sal de quinina del ácido (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético. A ésta sal se le agregó ácido sulfúrico al 3.5 % y el ácido (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético, se extrajo varias veces con acetona. Los extractos de acetona reunidos se concentraron para obtener un sólido incoloro correspondiente al ácido (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético, el cual se recristalizó con benceno, para obtener 8.2 g de producto final (36%). p.f. 122-123°C,  $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = + 32.9^\circ$  (c= 0.67, H<sub>2</sub>O).

#### 2.4.4 Síntesis del ácido (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético

El filtrado de la solución madre de la sal de quinina del ácido (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético se evaporó y se secó. El residuo (40 g) se mezcló con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 3.5% en presencia de acetona y el ácido (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético, se extrajo varias veces con acetona. Los extractos de acetona reunidos se concentraron y el sólido obtenido se recristalizó con benceno para dar 10.9 g (0.061 mol) del ácido (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético parcialmente resuelto  $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = -24.01^\circ$  (c= 1.097 H<sub>2</sub>O).

. Este se disolvió en 23 ml de agua y se hizo reaccionar con 7.3 g (0.061 mol) de (+)-1-fenil-etil amina calentando a 70°C durante 5 min. La mezcla de reacción se concentró y el

sólido obtenido se recristalizó 5 veces con agua, para obtener un precipitado blanco (13.7 g) de la sal de (+)-1-fenil-etil amina del ácido (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético. La sal obtenida se mezcló con hidróxido de sodio al 40% y benceno. Entonces el extracto acuoso se lavó con benceno frío, y la solución se ajustó a pH 1 con HCl al 37%. El sólido obtenido se recristalizó con benceno para dar 5.06 g (36.9%) del ácido (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético. p.f. 122-123°C,  $[\alpha]_D^{20^\circ} = -33^\circ$  (c= 0.62, H<sub>2</sub>O).

#### **2.4.5 Preparación del (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetato de metilo**

Una solución conteniendo 8.13 g (0.044 mol) del ácido (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético y 10.8 g (0.339 mol) de metanol absoluto, se saturó con cloruro de hidrogeno y se reflujo durante 8 horas. Posteriormente la mezcla de reacción se concentró, se enfrió y se le adicionaron 45 mL de agua fría. La solución se neutralizó con bicarbonato de sodio sólido y se extrajo con 4 porciones de 50 mL de éter dietílico cada una. Los extractos etéreos reunidos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, para obtener 5.13 g (63 %) de (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetato de metilo. p.f. 121-122°C/6 mmHg,  $[\alpha]_D^{+20^\circ} = +24.01^\circ$  (c= 109.7),  $d_{20^\circ} = 1.098 \text{ g/cm}^3$

#### **2.4.6 Síntesis de (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetato de etilo**

Una solución conteniendo 5 g (0.027 mol) del ácido (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acético y 10.8 g (0.339 mol) de metanol absoluto, se saturó con cloruro de hidrogeno y se reflujo durante 8 horas. Posteriormente la mezcla de reacción se concentró, se enfrió y se le adicionaron 45 mL de agua fría. La solución se neutralizó con bicarbonato de sodio sólido y se extrajo con 4 porciones de 50 mL de éter dietílico cada una. Los extractos etéreos reunidos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, para obtener 2.9 g (58 %) de (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetato de metilo. p.e. 121-122°C/7 mm Hg,  $[\alpha]_D^{20^\circ} = -24^\circ$  (c= 109.7)  $d_{20^\circ} = 1.098 \text{ g/cm}^3$ .

#### 2.4.7 Preparación de (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida (+)-HEPA

Una mezcla conteniendo 2.7 g (0.014 mol) de (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetato de metilo y 10 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28% se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y se saturó con  $\text{NH}_3(\text{g})$ . El matraz se tapó con un tapón de hule y se mantuvo a temperatura ambiente durante 7 días, saturándolo semanalmente con  $\text{NH}_3(\text{g})$ . La mezcla de reacción se enfrió, se retiró el tapón de hule y se extrajo con 4 porciones de 50 mL de éter dietílico. Los extractos etéreos reunidos se concentraron y se les añadió 10 mL de benceno formándose un precipitado, el cual se filtró y el sólido formado se recrystalizó con benceno obteniéndose 1.56 g (53.7 %) de (+)-HEPA. p.f.  $91-92^\circ\text{C}$   $[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}} = + 13.7^\circ$  (c= 1.028, acetona).

#### 2.4.8 Síntesis de (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida (-)-HEPA

Una mezcla conteniendo 5 g (0.014 mol) de (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetato de metilo y 10 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28% se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y se saturó con  $\text{NH}_3(\text{g})$ . El matraz se tapó con un tapón de hule y se mantuvo a temperatura ambiente durante 7 días, saturándolos semanalmente (durante semanas) con  $\text{NH}_3(\text{g})$ . La mezcla de reacción se enfrió, se retiró el tapón de hule y se extrajo con 4 porciones de 50 mL de éter dietílico cada una. Los extractos etéreos reunidos se concentraron y se les añadió 10 mL de benceno formándose un precipitado, el cual se filtró y el sólido formado se recrystalizó con benceno obteniéndose 2.66 g (53 %) de (-)-HEPA, p.f.  $91-92^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20^\circ\text{C}} = - 14^\circ$  (c= 1.04, acetona).

#### 2.4.9 Determinación de la pureza óptica de los enantiómeros del HEPA mediante cromatografía líquida de alta resolución con fase estacionaria quiral.

Para determinar la pureza de los enantiómeros del HEPA por cromatografía de líquidos de alta resolución, se utilizó una columna analítica CHIRACEL OJ ( $10\ \mu\text{m}$ ,  $4.6 \times 250\ \text{mm}$ ) con una fase estacionaria de sílice unido a un éster de celulosa tris-(4-metilbenzoato) como agente quiral. Como fase móvil se utilizó una mezcla de hexano:2-propanol (85:15) con un flujo de  $0.9\ \text{mL/min}$  y una longitud de onda de detección de  $221\ \text{nm}$ .

Para separar la mezcla de enantiómeros presentes en el DL-HEPA, se inyectaron a la columna quiral  $20\ \mu\text{l}$  disueltos en una mezcla de hexano: 2-propanol (85:15) a una concentración de  $500\ \text{ng/mL}$ . Se inyectó también por separado cada uno de los enantiómeros y se determinaron los tiempos de retención de cada uno.

## **2.5 Actividad biológica**

Ratones albino macho de la cepa Swiss-Webster de 20 a 30 g de peso se dividieron en grupos de 10 y se mantuvieron a temperatura ambiente con agua y comida *ad libitum* con ciclos de luz oscuridad de 12 h. Los compuestos, DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP y DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB se disolvieron en una solución de polietilenglicol-400 al 30 %, mientras que sus homólogos DL-HEPA, (-)-HEPA DL-HEPP se disolvieron en una solución de polietilenglicol al 10 % y el pentilentetrazol se disolvió en agua. El fenobarbital, se diluyó con una solución de NaOH 0.01 N. Todos los compuestos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.).

### **2.5.1 Modelo de pentiléntetrazol (PTZ)**

El PTZ que se empleó como agente convulsionante, se inyectó a una dosis de 80 mg/kg de peso, la cual produce convulsiones y muerte en el 100 % de los ratones.

Los compuestos anticonvulsiantes se administraron via i.p, a diferentes dosis, 30 minutos antes de la administración del PTZ (80 mg/kg). Se incluyó el fenobarbital como control positivo, el cual se administró vía i.p. a diferentes dosis, y 60 minutos después se administró el PTZ.

### **2.5.2 Determinación de las dosis efectivas 50 (DE<sub>50</sub>)**

Los compuestos a estudiar se administraron a diferentes dosis media hora antes de la inyección del PTZ. La supresión de las convulsiones y de la muerte se consideró como punto final en la evaluación. Las DE<sub>50</sub> de los compuestos y los intervalos de confianza al 95 % se determinaron por el método de Litchfield y Wilcoxon, usando un análisis probit con una t de student al 95 % para calcular los intervalos de confianza (Litchfield y Wilcoxon, 1949).

### **2.5.3 Determinación de las DE<sub>50</sub> por el método de electrochoque máximo (ECM)**

Los compuestos anticonvulsivos se administraron vía i.p. 30 minutos antes de la inducción de las convulsiones. Para las cuales se empleó el equipo generador de pulsos rectangulares ECT-unit 7801 de Ugo Basile, provisto de electrodos auriculares cubiertos de un gel de conductividad. Los electrodos se colocaron en las orejas de los ratones a los cuales se les aplicó una corriente de 100 Hz, 20 mA, por 0.2 segundos con una amplitud de pulso de 0.5 segundos. Se incluyó el fenobarbital como control positivo el cual se administró vía i.p. a diferentes dosis, 45 minutos antes de la inducción de las convulsiones. Se tomó como ratón no protegido aquel que presentó una extensión de los miembros posteriores en 180° con respecto al cuerpo, con una duración mayor a 3 segundos, correspondiendo ésta a la convulsión tónica generalizada.

Las DE<sub>50</sub> de cada uno de los compuestos y los intervalos de confianza al 95 % se calcularon por el método de Litchfield y Wilcoxon usando un análisis probit, con una t de student del 95% para calcular los intervalos de confianza (Litchfield y Wilcoxon, 1949).

### **2.5.4 Determinación de la dosis tóxica 50 (DT<sub>50</sub>) del (±)-HEPP, y del (±)-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP en el rodillo giratorio o "rotarod"**

Los ratones utilizados, se entrenaron por 5 días en un rotarod marca Rotamex provisto de un rodillo de 29.4 mm de diámetro girando a 120 rpm durante 120 segundos. Los ratones entrenados se dividieron en grupos de 8 y se evaluó el grado de ataxia inducido por los compuestos. Se consideró como ratón atáxico aquel que no permaneció los 120 segundos en el rodillo. Se incluyó al fenobarbital como control positivo. Se evaluó el grado de ataxia a la media hora de la administración de los compuestos.

La DT<sub>50</sub> de los compuestos y los intervalos de confianza al 95% se calcularon por el método de Litchfield y Wilcoxon usando un análisis probit, con una t de student del 95% para calcular los intervalos de confianza (Litchfield y Wilcoxon, 1949).

### **2.5.5 Modulación de la actividad anticonvulsionante del fenobarbital por el DL-HEPP**

Se determinaron las  $DE_{50}$  tanto del fenobarbital sólo, como en presencia del DL-HEPP. Los ratones utilizados se separaron en grupos de 10 y se les administró fenobarbital a dosis de 3, 5, 8, 10 y 15 (mg/kg), 45 minutos antes de la inyección del PTZ (80 mg/kg). A otro grupo de ratones a los que previamente se les administró el fenobarbital, 45 min antes de la inyección de PTZ, se les administró el DL-HEPP ya sea a una dosis de 15 mg/kg o de 30 mg/kg de peso, treinta minutos antes de la inyección del PTZ. La supresión de las convulsiones y de la muerte se consideró como el punto final de la prueba. Las  $DE_{50}$  del fenobarbital sólo y en presencia del DL-HEPP, y los intervalos de confianza al 95 % se calcularon por el método de Litchfield y Wilcoxon usando un análisis probit con una *t* de student al 95 % de intervalos de confianza (Litchfield y Wilcoxon, 1949).

### 3.0 RESULTADOS

#### 3.1 Caracterización del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB

##### 3.1.1 Espectro de IR del intermediario DL-5-etil-5-(4'-trifluorometilfenil) butirolactona

La figura 11 muestra el espectro de infrarrojo de la DL-5-etil-5-(4'-trifluorometilfenil) butirolactona (compuesto intermediario en la síntesis del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB). Se observó el pico de absorción que corresponde a la presencia del grupo carbonilo en 1775 cm<sup>-1</sup> (número de onda 1750 a 1600 cm<sup>-1</sup>). El enlace carbono-flúor del grupo trifluorometilo (-CF<sub>3</sub>) se ubicó en 1323 cm<sup>-1</sup>.

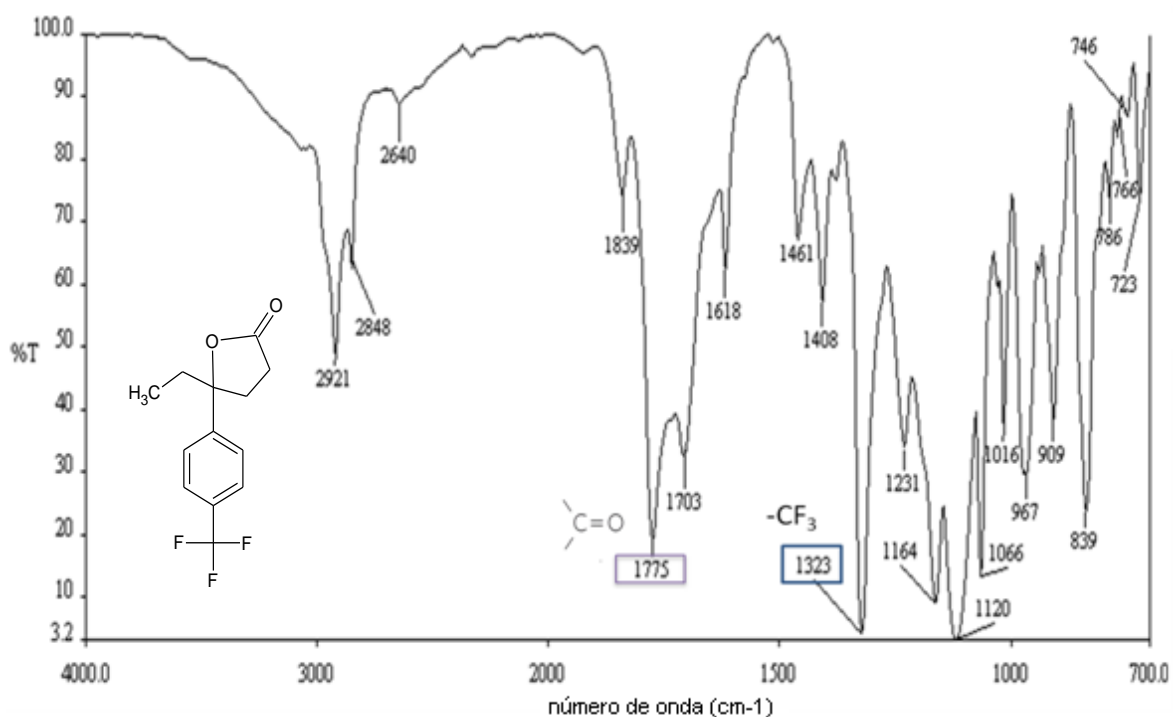
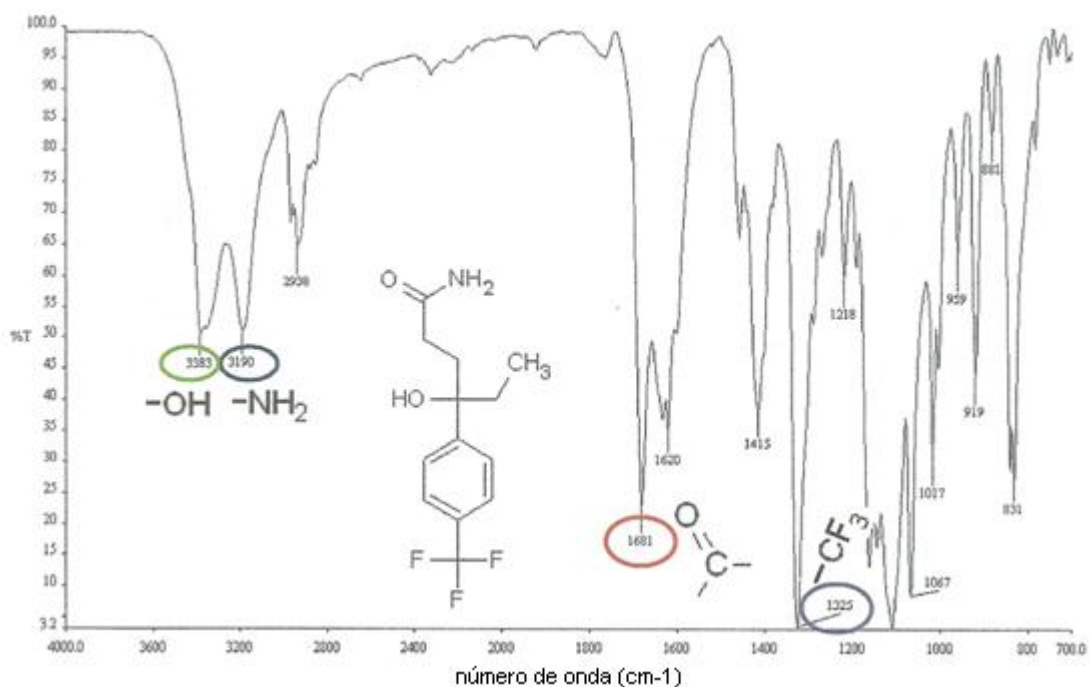


Figura 11. Espectro de IR de la DL-5-etil-5-(4'-trifluorometilfenil) butirolactona

### 3.1.2 Espectro de IR del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB

En la figura 12 se observa el espectro de IR correspondiente al DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB. Se tiene la señal correspondiente al grupo hidroxilo en 3383 cm<sup>-1</sup> (número de onda 3300 cm<sup>-1</sup>); el grupo amino de la amida (-NH<sub>2</sub>) apareció en 3190 cm<sup>-1</sup> (número de onda 3100 cm<sup>-1</sup>); y el grupo carbonilo de la butiramida (-C=O) se observó en 1681 cm<sup>-1</sup> (número de onda 1600-1700 cm<sup>-1</sup>). El enlace carbono-flúor del grupo trifluorometilo (-CF<sub>3</sub>) se ubicó en 1325 cm<sup>-1</sup>.



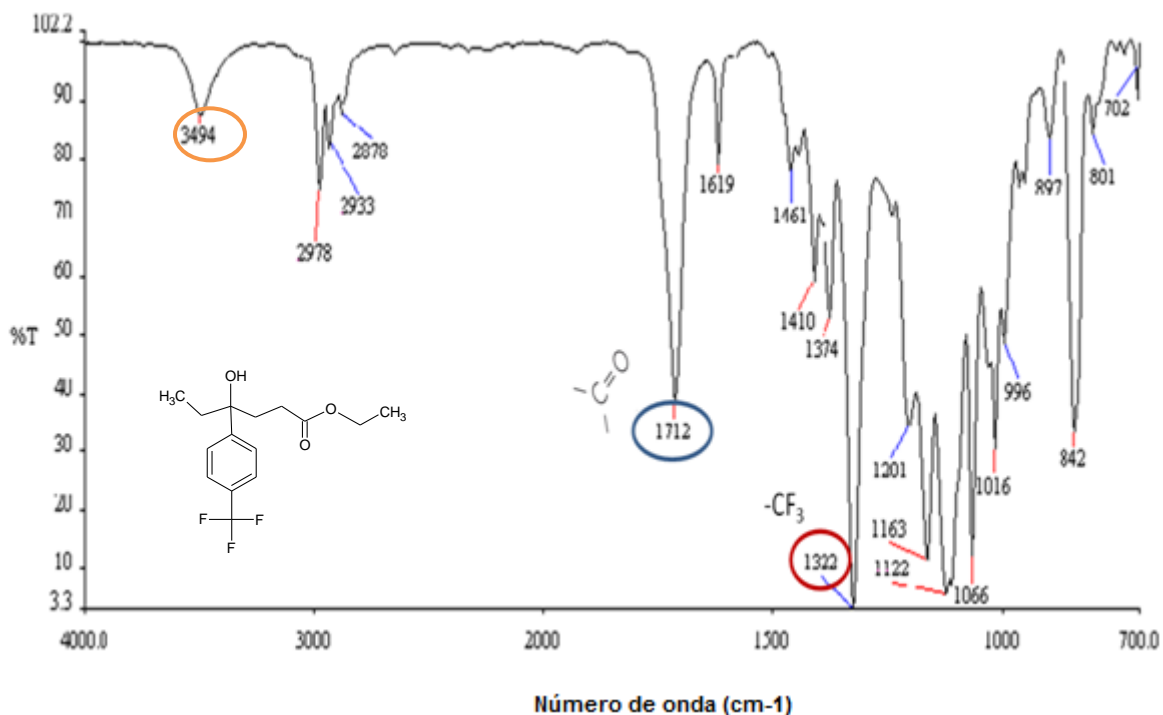
**Figura 12.** Espectro de IR del DL-4-hidroxi-4-etil-4-(4'-trifluorometilfenil) butiramida



## 3.2 Caracterización del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP

### 3.2.1 Espectro de IR del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionato de etilo

El espectro de infrarrojo del hidroxíéster intermediario de la síntesis del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP (Figura 13) mostró una señal correspondiente al grupo hidroxilo en 3494 cm<sup>-1</sup>, el grupo carbonilo del éster apareció en 1712 cm<sup>-1</sup>. El enlace carbono-flúor del grupo trifluorometilo (-CF<sub>3</sub>) presentó una señal en 1327 cm<sup>-1</sup>(Figura 13).



**Figura 13.** Espectro de IR del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionato de etilo

### 3.2.2 Espectro de IR del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP

El espectro de infrarrojo del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP (Figura 14) presentó una señal a 3380 cm<sup>-1</sup> correspondiente al grupo hidroxilo (-OH). El grupo amino de la amida, apareció en 3177 cm<sup>-1</sup>. El grupo carbonilo de la butiramida se observó en 1669 cm<sup>-1</sup> y el enlace carbono-flúor del grupo trifluorometilo presentó una señal en 1327 cm<sup>-1</sup>.

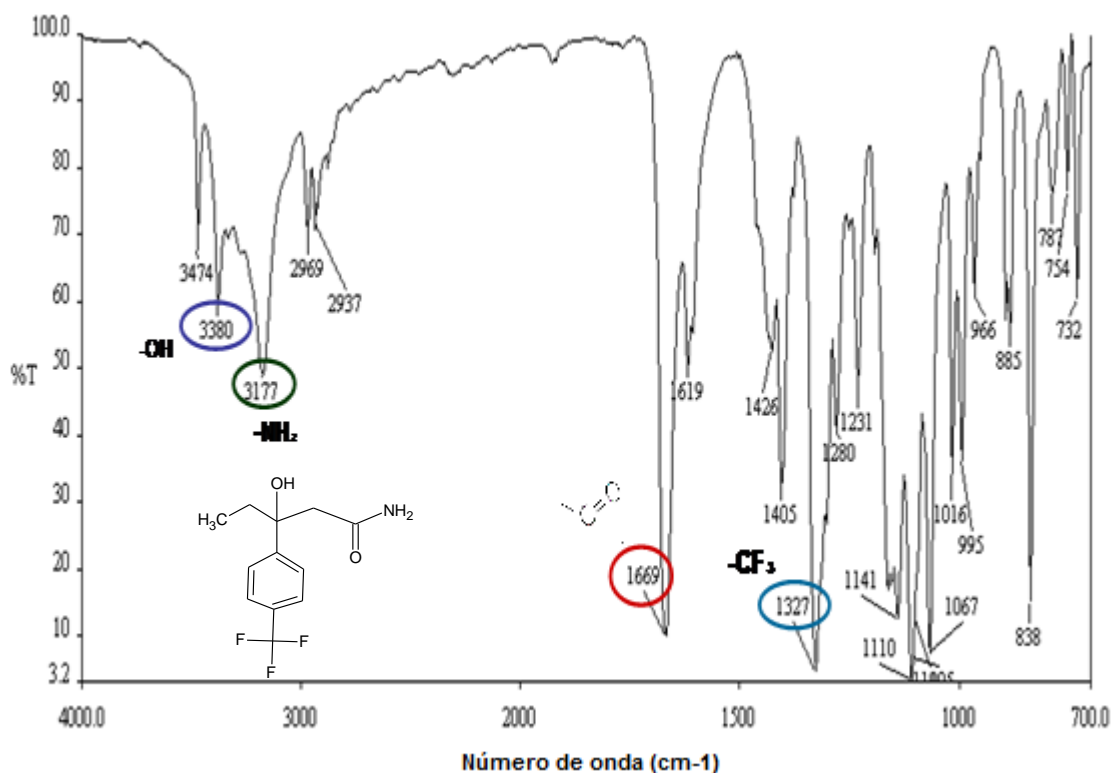


Figura 14. Espectro de IR del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-Trifluorometilfenil) propionamida

### 3.2.3 Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón para el compuesto DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP (Figura15), mostró los siguientes desplazamientos químicos en partes por millón (ppm).

Los hidrógenos del grupo metilo C<sub>5</sub> se presentaron en 0.74 ppm (t, 3H, -CH<sub>3</sub>); los hidrógenos del metileno C<sub>4</sub> aparecieron entre 1.78 y 1.8 ppm (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); para el caso del grupo metileno C<sub>2</sub> los hidrógenos se presentaron entre 2.8 - 2.83 ppm (d,d, 2H, -CH<sub>2</sub>-). El hidrógeno del grupo hidroxilo apareció en 5.94 ppm (s, 1H, -OH); en el caso de los hidrógenos de la amina de la propionamida, se presentaron a 6.4 y 7.28 ppm (sa, 2H, -CONH<sub>2</sub>-). En el anillo aromático los hidrógenos del C<sub>2',3',5',6'</sub> aparecieron en el intervalo 7.53 y 7.65 ppm (m, 4H, -CH=). Tipos de señales:

s = señal simple

d = señal doble

t = señal triple

m = señal múltiple

sa = señal ancha

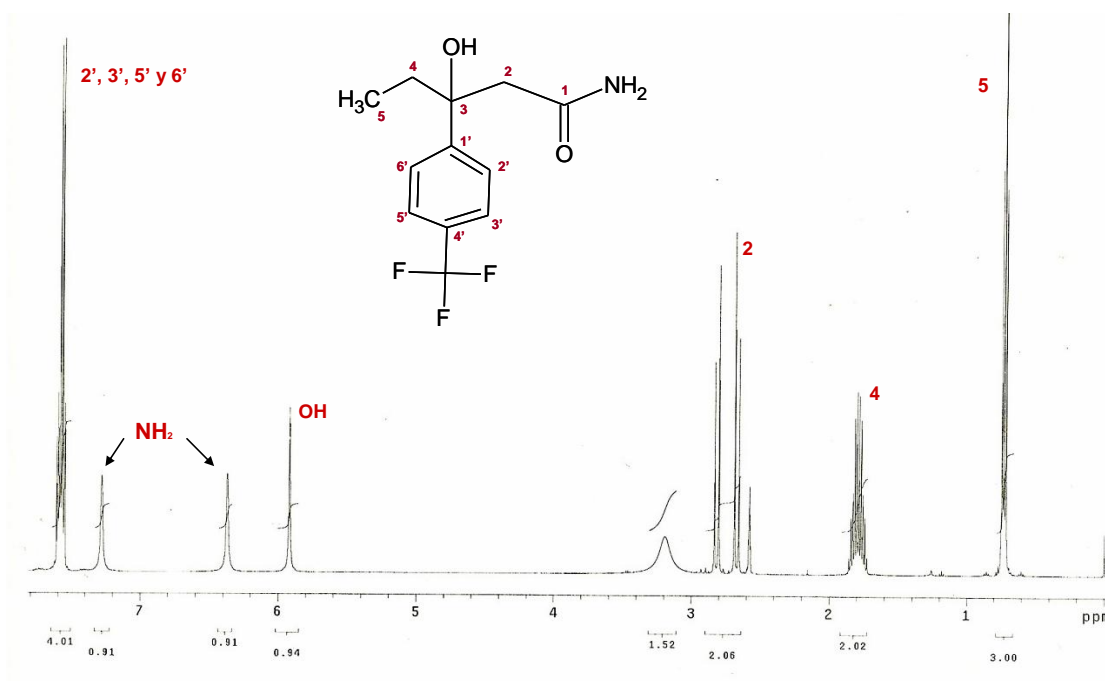


Figura 15. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionamida

### 3.2.4 Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP

El espectro de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C para el compuesto DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP (Figura 16), mostró los siguientes desplazamientos químicos (σ) en partes por millón (ppm).

La señal para el C<sub>5</sub> se presentó en 6.85 ppm, el C<sub>4</sub> dió una señal en 35.03 ppm, mientras que el C<sub>2</sub> presentó la señal en 44.06 ppm y el C<sub>3</sub> apareció en 74.43 ppm. Para el caso del C<sub>1</sub> de la propionamida se presentó en 173.93 ppm y el carbono correspondiente al grupo CF<sub>3</sub> dio una señal en 127.5 ppm ( $J^2_{C-F} = 272$  Hz). En tanto los C<sub>3'</sub> y C<sub>5'</sub> del anillo fenílico aparecieron a 123.87 ppm, los C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub> se presentaron a 125.17 ppm, el C<sub>4'</sub> mostró una señal en 127.4 ppm ( $J^2_{C-F} = 32$  Hz). Y el C<sub>1'</sub> apareció en 149.6 ppm.

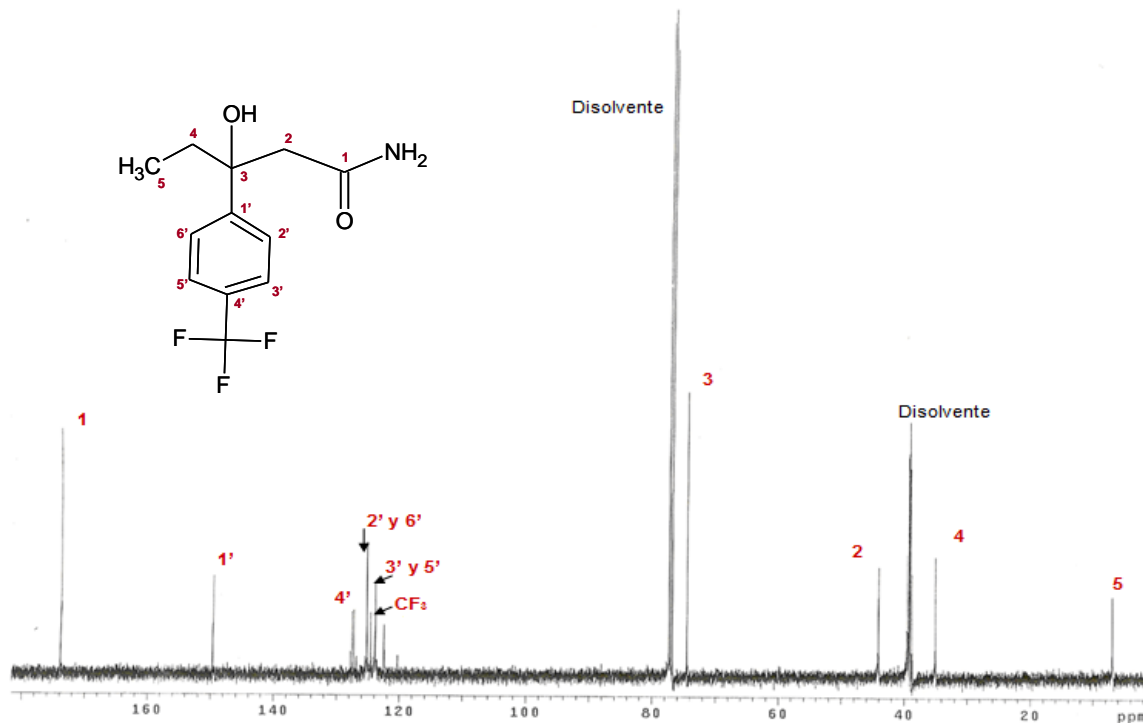
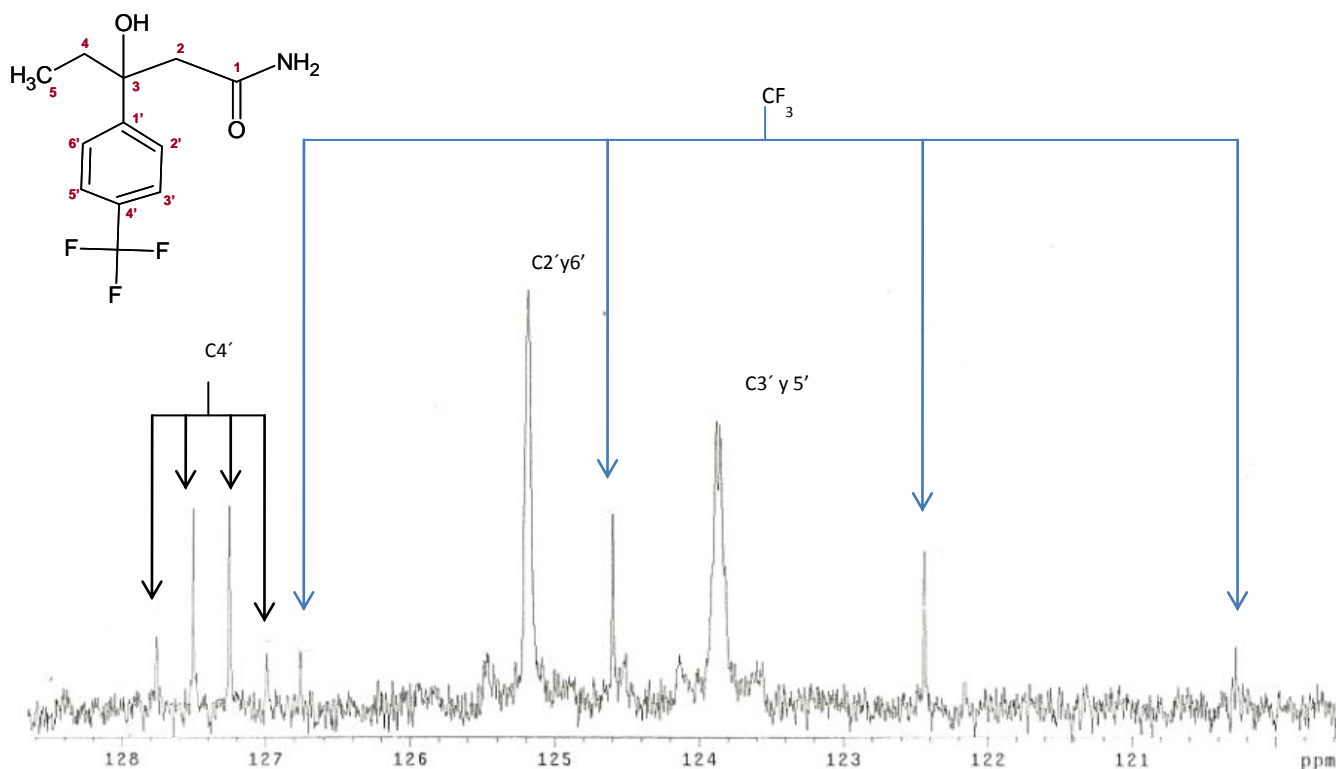


Figura 16. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del DL-3-hidroxi-3-etil-3-(4'-trifluorometilfenil) propionamida

La asignación de los carbonos correspondientes al anillo fenilo es posible realizando una amplificación entre las 120 ppm y las 128 ppm del espectro de RMN-<sup>13</sup>C del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP. La figura 17 muestra dicha amplificación así como la asignación de cada carbono.



**Figura 17.** Amplificación correspondiente a 120-128 ppm del espectro de RMN-<sup>13</sup>C del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP

### 3.3 Caracterización del DL-HEPA

#### 3.3.1 Espectro de IR del DL-HEPA

La figura 18 muestra el espectro de infrarrojo del DL-HEPA el cual presentó una señal a  $3369\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo hidroxilo (-OH). El grupo amino de la amida, presentó una señal a  $3191\text{ cm}^{-1}$ . El grupo carbonilo de la butiramida se observó en  $1662\text{ cm}^{-1}$ .

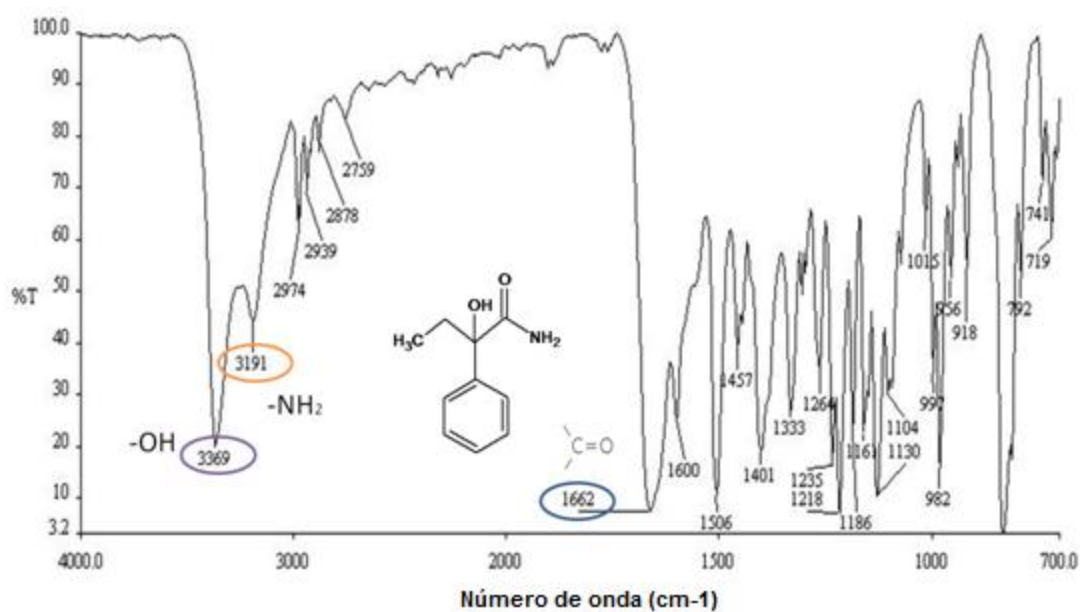
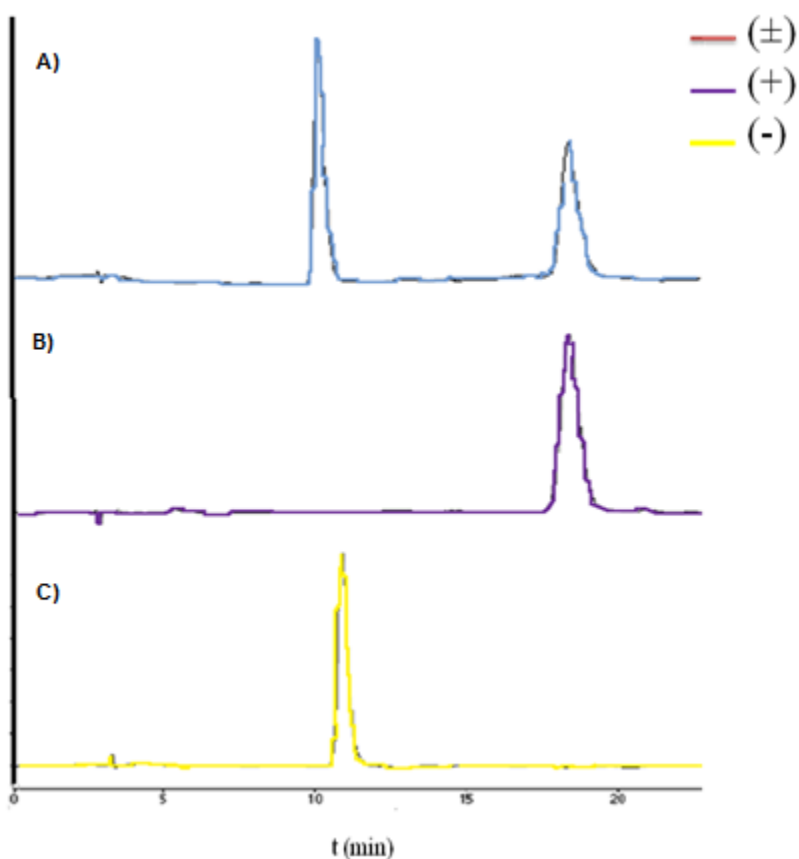


Figura 18. Espectro IR del DL-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida.

### 3.3.2 Determinación de la pureza óptica de los enantiómeros del HEPA

En la figura 19 se muestra la resolución de la mezcla racémica del DL-HEPA por HPLC. En el cromatograma superior se observa la mezcla racémica del ( $\pm$ )-HEPA que presentó dos tiempos de retención: 11.06 y 19.93 min. En el cromatograma intermedio se muestra el (+)-HEPA que presentó un tiempo de retención a los 19.23 min y el cromatograma de la parte inferior corresponde al (-)-HEPA con un tiempo de retención de 11.00 min.



**Figura 19.** Determinación de la pureza óptica de los enantiómeros del DL-HEPA por HPLC. En A) se muestra el DL-HEPA, que presentó tiempos de retención de 11.06 y 19.93 min. En B) se muestra el (+)-HEPA con un tiempo de retención de 19.23 min y en C) se muestra el (-)-HEPA, tiempo de retención de 11.00 min.

### 3.3.3 Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del DL-HEPA

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón para el compuesto DL-HEPA, mostró los siguientes desplazamientos químicos en partes por millón (ppm).

Los hidrógenos del grupo metilo  $\text{C}_4$  se presentaron en 0.9 ppm (t, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); los hidrógenos del metileno  $\text{C}_3$  aparecieron entre 1.8 y 2.2 ppm (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ). El hidrógeno del grupo hidroxilo se presentó en 5.4 ppm (s, 1H,  $-\text{OH}$ ). En el caso de los hidrógenos de la amina del grupo amida, se presentaron entre 6.8 y 7.0 ppm (bs, 2H,  $-\text{CONH}_2$ ). En el anillo aromático los hidrógenos del  $\text{C}_{2,6'}$  aparecieron a 7.6 ppm (d, 4H,  $-\text{CH}=\text{}$ ), los hidrógenos del  $\text{C}_{3',5'}$  se asignaron en 7.3 ppm (d, 4H,  $-\text{CH}=\text{}$ ) y el protón de  $\text{C}_{4'}$  apareció en 7.2 ppm (d, 4H,  $-\text{CH}=\text{}$ ) Tipos de señales:

s = señal simple

d = señal doble

t = señal triple

m = señal múltiple

bs = banda ancha

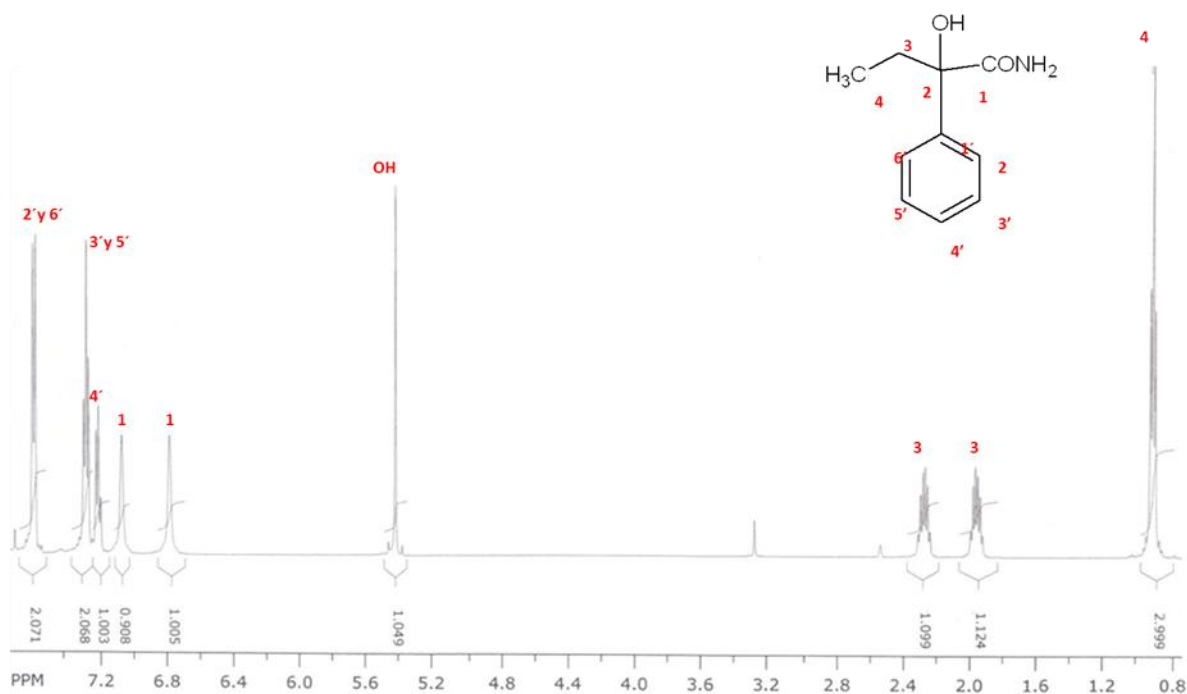


Figura 20. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del DL-HEPA



### 3.3.4 Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del DL-HEPA

El espectro de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C para el compuesto DL-HEPA, mostró los siguientes desplazamientos químicos ( $\sigma$ ) en partes por millón (ppm).

La señal para el C<sub>4</sub> se presentó en 7 ppm, el C<sub>3</sub> dió una señal en 30.5 ppm, mientras que el C<sub>2</sub> presentó la señal en 78 ppm. Para el caso del C<sub>1</sub> de la amida se asignó en 175.93 ppm. El C<sub>1'</sub> presentó una señal en 142 ppm. En tanto los C<sub>3'</sub> y C<sub>5'</sub> aparecieron a 125 ppm y los C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub> se presentaron a 127 ppm. Por último el C<sub>4'</sub> se encuentra en 126 ppm.

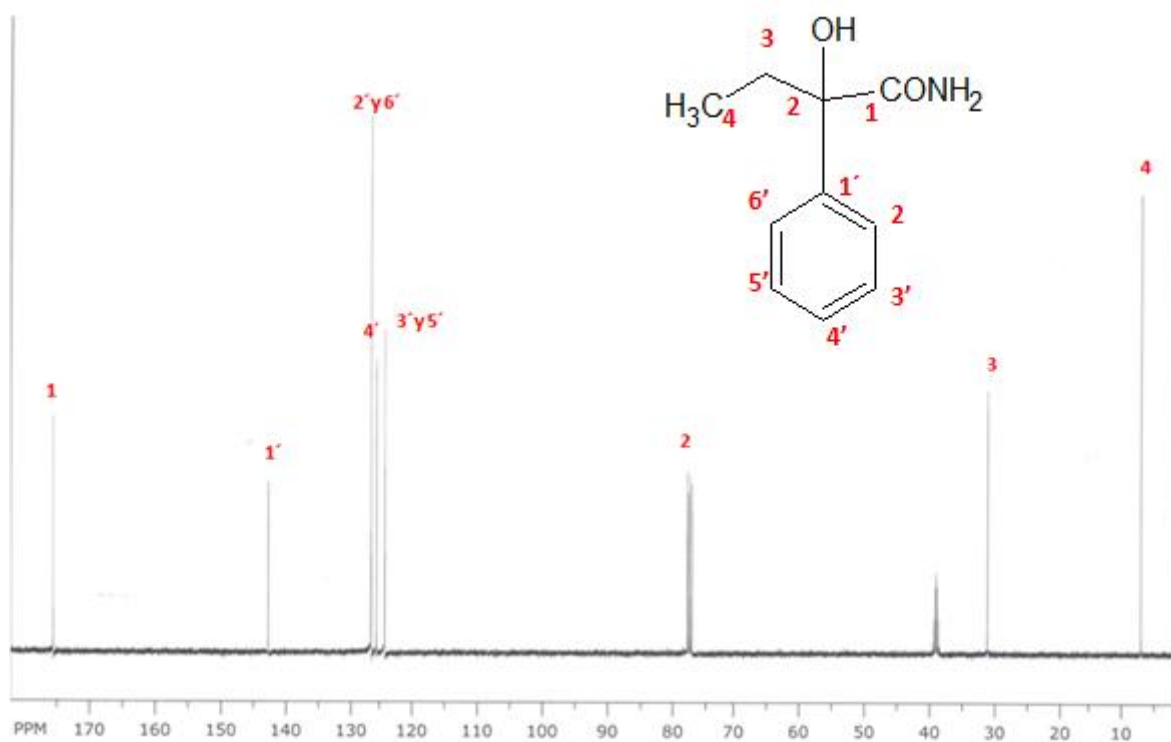
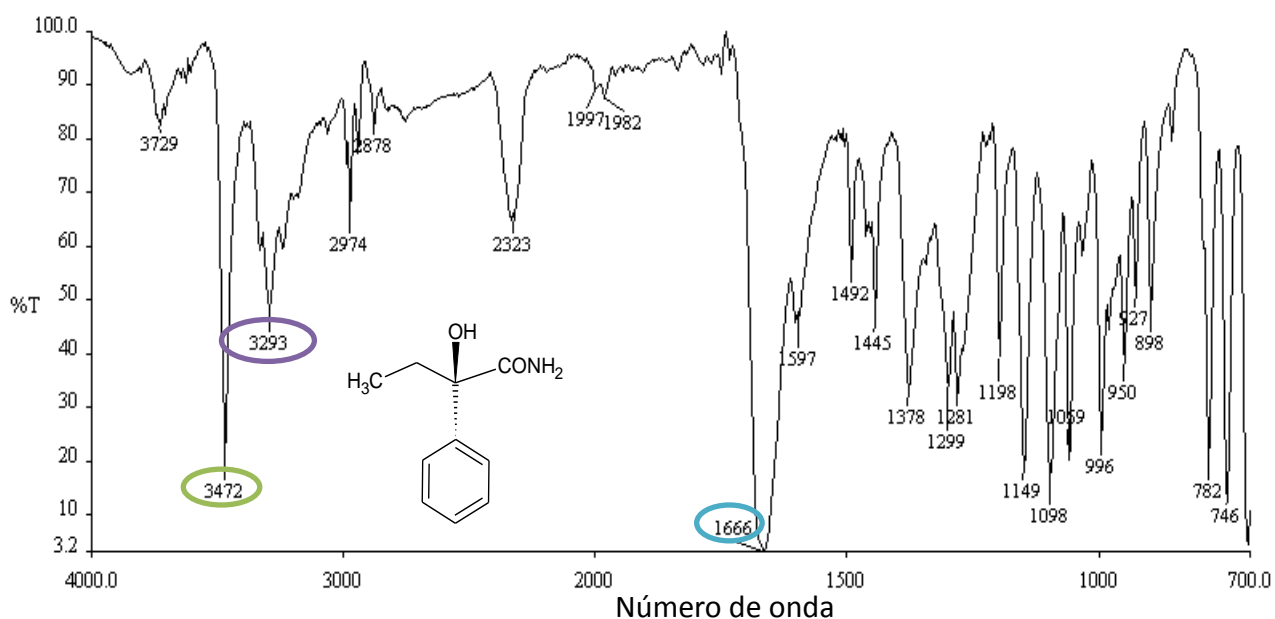


Figura 21. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del DL-HEPA

### 3.3.5 Espectro de IR del (+)-HEPA

La figura 22 muestra el espectro de infrarrojo del (+)-HEPA el cual presentó una señal a  $3472\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo hidroxilo (-OH). El grupo amino de la amida, presentó una señal a  $3293\text{ cm}^{-1}$ . El grupo carbonilo de la butiramida se observó en  $1666\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 22.** Espectro IR del (+)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida.

### 3.3.6 Espectro de RMN- $H^1$ del (+)-HEPA

Los hidrógenos del grupo metilo  $C_4$  se presentaron en 0.9 ppm (t, 3H,  $-CH_3$ ); los hidrógenos del metileno  $C_3$  aparecieron entre 1.9 y 2.3 ppm (m, 2H,  $-CH_2-$ ). El hidrógeno del grupo hidroxilo se presentó en 5.5 ppm (s, 1H,  $-OH$ ). En el caso de los hidrógenos de la amina del grupo amida, se presentaron entre 6.8 y 7.1 ppm (bs, 2H,  $-CONH_2$ ). En el anillo aromático los hidrógenos del  $C_{2,6'}$  aparecieron a 8.0 ppm (d, 4H,  $-CH=$ ), los hidrógenos del  $C_{3,5'}$  se asignaron en 7.1 ppm (d, 4H,  $-CH=$ ) y el protón de  $C_4'$  apareció en 7.2 ppm (d, 4H,  $-CH=$ ).

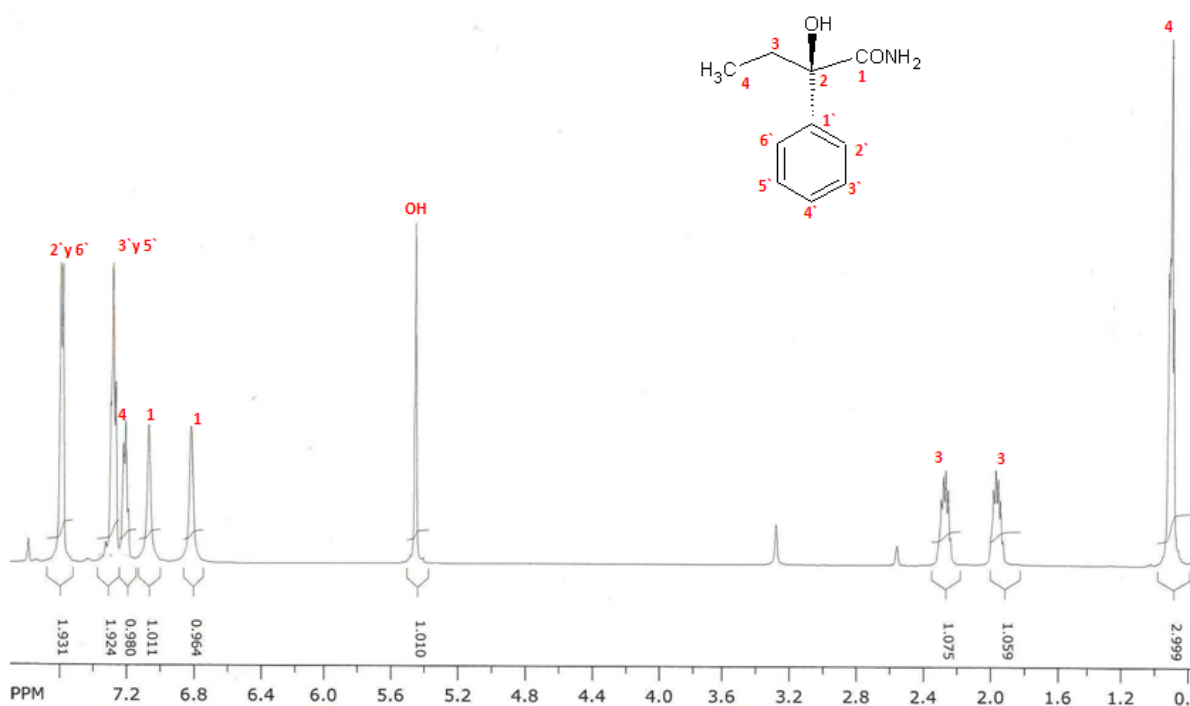


Figura 23. Espectro de RMN- $H^1$  del (+)-HEPA

### 3.3.7 Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del (+)-HEPA

El espectro de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C para el compuesto (+)-HEPA, mostró los siguientes desplazamientos químicos ( $\sigma$ ) en partes por millón (ppm).

La señal para el C<sub>4</sub> se presentó en 6.8 ppm, el C<sub>3</sub> dió una señal en 30.5 ppm, mientras que el C<sub>2</sub> presentó la señal en 76.6 ppm. Para el caso del C<sub>1</sub> de la amida se asignó en 175.8 ppm. El C<sub>1'</sub> presentó una señal en 142.7 ppm. En tanto los C<sub>3'</sub> y C<sub>5'</sub> aparecieron a 124.4 ppm y los C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub> se presentaron a 126.4 ppm. Por último el C<sub>4'</sub> se encuentra en 125.6 ppm.

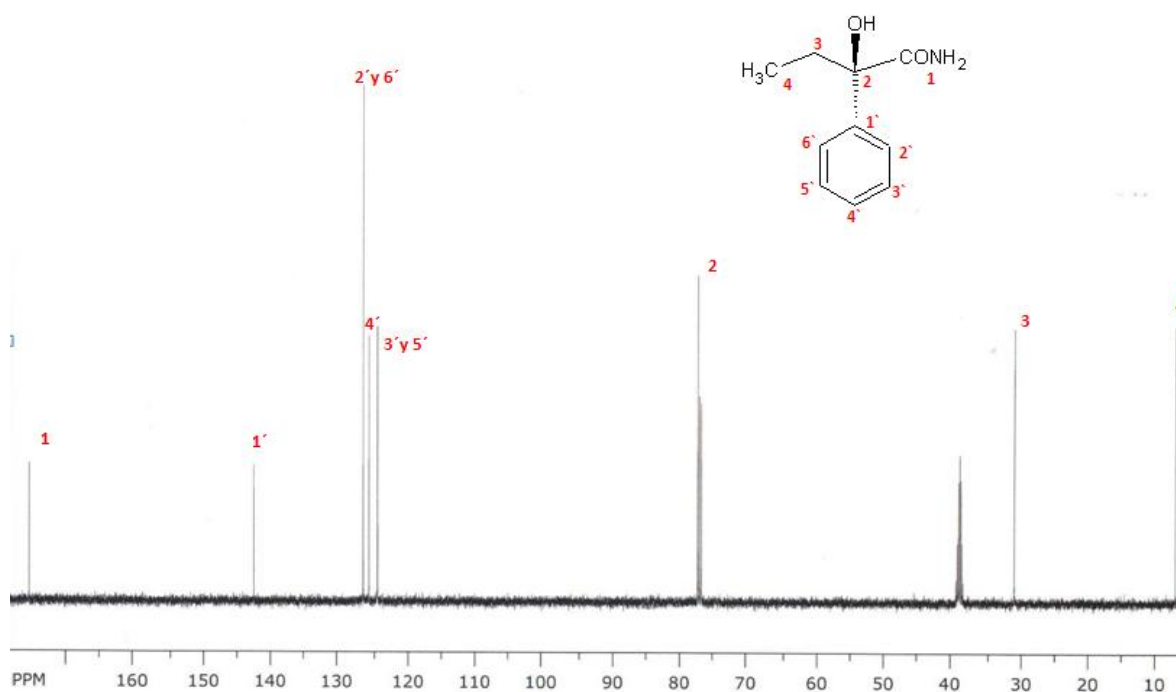
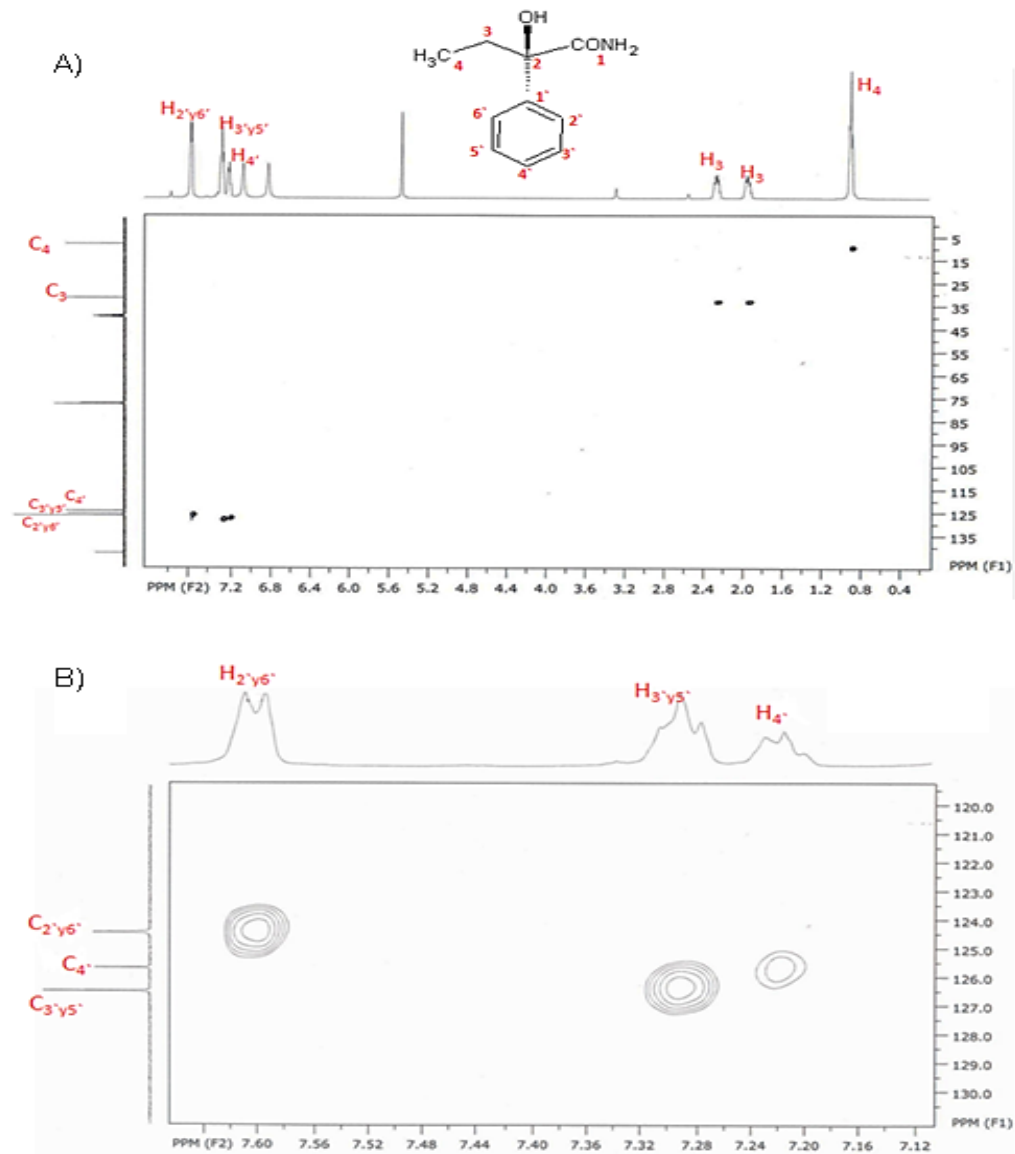


Figura 24. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del (+)-HEPA

### 3.3.8 Correlación heteronuclear a un solo enlace (HSQC) del (+)-HEPA



**Figura 25.** Estudio HSQC del (+)-HEPA. A) HSQC que muestra la correlación a un enlace entre los átomos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , para el (+)-HEPA; B) HSQC correspondiente a la región aromática de (+)-HEPA.

### 3.3.9 Espectro de IR del (-)-HEPA

La figura 26 muestra el espectro de infrarrojo del (+)-HEPA el cual presentó una señal a  $3472\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo hidroxilo (-OH). El grupo amino de la amida, presentó una señal a  $3293\text{ cm}^{-1}$ . El grupo carbonilo de la butiramida se observó en  $1666\text{ cm}^{-1}$ .

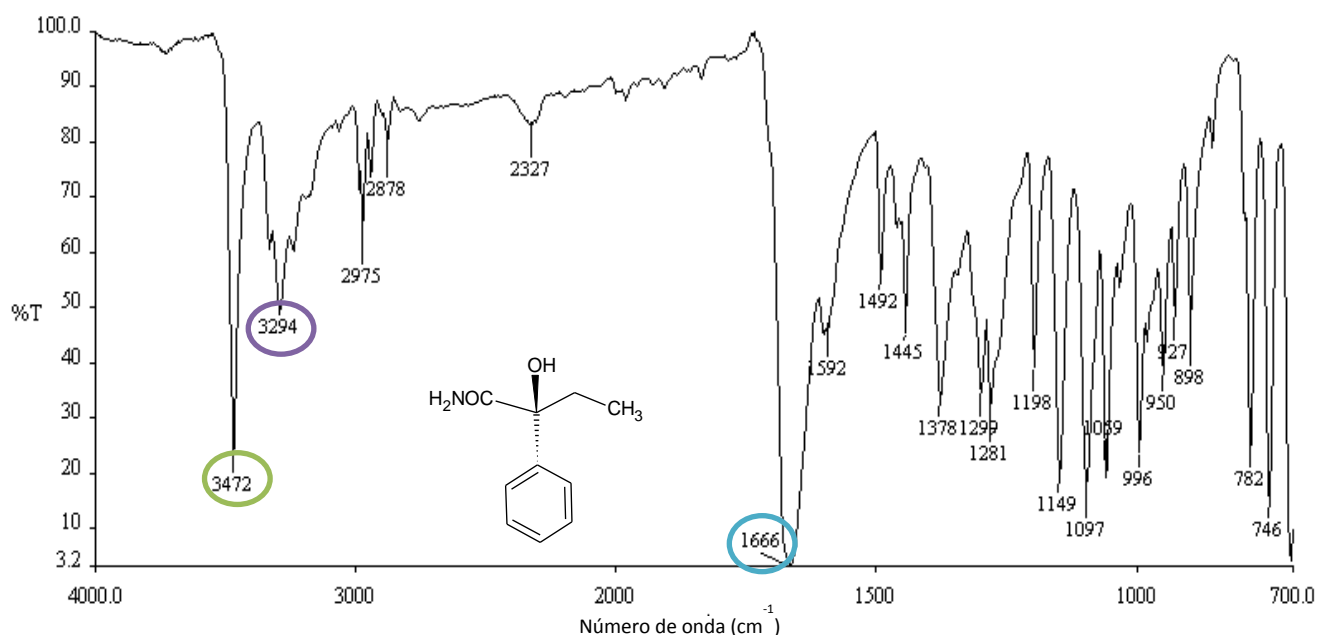


Figura 26. Espectro IR del (-)-2-hidroxi-2-etil-2-fenil acetamida.

### 3.3.10 Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del (-)-HEPA

Los hidrógenos del grupo metilo  $\text{C}_4$  se presentaron en 0.87 ppm (t, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); los hidrógenos del metileno  $\text{C}_3$  aparecieron entre 1.9 y 2.2 ppm (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ). El hidrógeno del grupo hidroxilo se presentó en 5.5 ppm (s, 1H,  $-\text{OH}$ ). En el caso de los hidrógenos de la amina del grupo amida, se presentaron entre 7.0 y 7.1 ppm (bs, 2H,  $-\text{CONH}_2$ ). En el anillo aromático los hidrógenos del  $\text{C}_{2',6'}$  aparecieron a 7.6 ppm (d, 4H,  $-\text{CH}=\text{}$ ), los hidrógenos del  $\text{C}_{3',5'}$  se asignaron en 7.3 ppm (d, 4H,  $-\text{CH}=\text{}$ ) y el protón de  $\text{C}_4'$  apareció en 7.2 ppm (d, 4H,  $-\text{CH}=\text{}$ ).

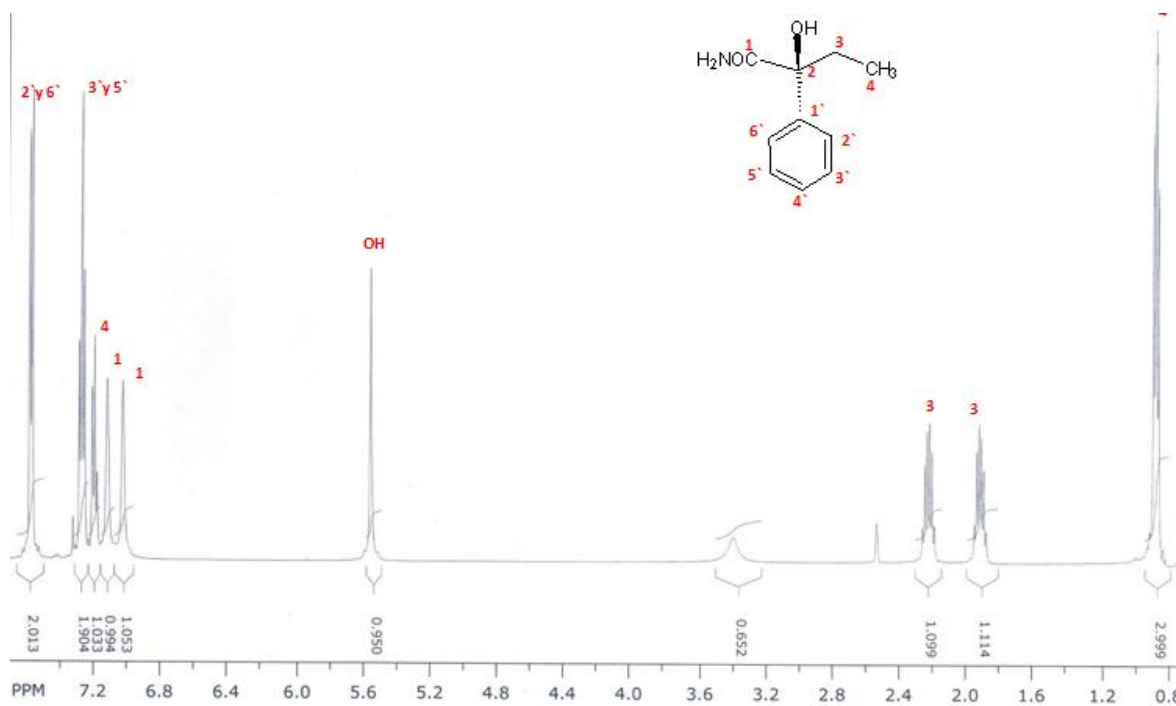


Figura 27. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del (-)-HEPA

### 3.3.11 Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del (-)-HEPA

El espectro de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C para el compuesto (+)-HEPA, mostró los siguientes desplazamientos químicos ( $\sigma$ ) en partes por millón (ppm).

La señal para el C<sub>4</sub> se presentó en 6.4 ppm, el C<sub>3</sub> dió una señal en 30.0 ppm, mientras que el C<sub>2</sub> presentó la señal en 76.6 ppm. Para el caso del C<sub>1</sub> de la amida se asignó en 175.0 ppm. El C<sub>1'</sub> presentó una señal en 142.45 ppm. En tanto los C<sub>3'</sub> y C<sub>5'</sub> aparecieron a 123.9 ppm y los C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub> se presentaron a 125.8 ppm. Por último el C<sub>4'</sub> se encuentra en 125 ppm.

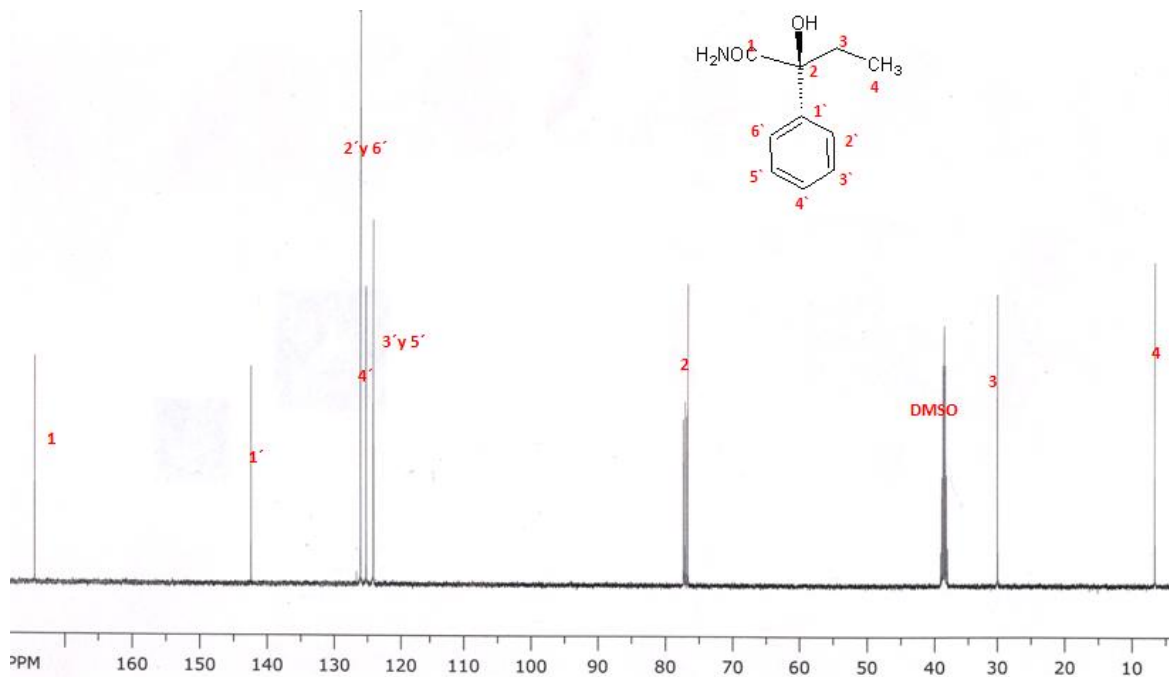


Figura 28. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del (-)-HEPA



### 3.4 Determinación preliminar de la actividad anticonvulsionante del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB y del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP contra las convulsiones y muerte provocados por el PTZ

Se realizó la determinación preliminar de la actividad anticonvulsionante de los compuestos DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB y DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP administrados vía i.p., contra las convulsiones y muerte provocadas por el PTZ 180 mg/Kg vía i.p. obteniéndose los resultados mostrados la tabla 2.

**Tabla 2.** Actividad anticonvulsionante del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB y del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP

Compuesto	Dosis (mg/kg)	% Protección
<b>DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB</b>	15	80
<b>DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP</b>	15	50
<b>DL-HEPB</b>	15	0
<b>DL-HEPP</b>	15	0
<b>Fenobarbital</b>	15	83
<b>Pentiléntetrazol</b>	100	0

### 3.5 Modulación de la actividad anticonvulsionante del fenobarbital por el DL-HEPP contra las convulsiones y muerte provocadas por el PTZ

#### 3.5.1 DE<sub>50</sub> del fenobarbital

Se determinó inicialmente la dosis efectiva 50 del fenobarbital. Los resultados se aprecian en la tabla 3.

**Tabla 3.** Actividad anticonvulsionante del fenobarbital en el modelo.

Dosis (mg/kg)	Log <sub>10</sub> dosis	% Protección	Probit
3	0.4771	10	3.7184
5	0.6989	15	3.9636
8	0.903	50	5.0000
10	1	76.6	5.7225
15	1.176	83.3	5.9542

DE<sub>50</sub> de 7.60 mg/kg con intervalos de confianza al 95 % : p(6.3118 < 7.68 < 9.4046)

### 3.5.2 Actividad anticonvulsionante del fenobarbital en presencia del DL-HEPP (15 mg/kg) en el modelo de PTZ

**Tabla 4.** Actividad anticonvulsionante del fenobarbital (FB) en presencia del DL-HEPP (15 mg/kg) en el modelo del PTZ.

Dosis FB (mg/kg)	% Protección en presencia de FB + DL-HEPP (15 mg/kg)
0	0
3	40
5	90
8	80

DE<sub>50</sub> = 2.85 mg/kg

IC<sub>95%</sub>: p(0.2402 < 2.85 < 3.72) = 95%

### 3.5.3 Actividad anticonvulsionante del fenobarbital en presencia del DL-HEPP (30 mg/kg) en el modelo de PTZ

**Tabla 5.** Actividad anticonvulsionante del fenobarbital en presencia de DL-HEPP (30 mg/kg) en el modelo PTZ.

Dosis FB (mg/kg)	% Protección en presencia de FB + DL-HEPP (30 mg/kg)
------------------	---

0	0
1	40
3	80
5	80
8	90

DE<sub>50</sub> = 1.27

mg/kg

IC<sub>95%</sub>:

p(0.6894 < 1.27 < 2.3565) = 95%

### 3.5.4 Comparación de las DE<sub>50</sub> del fenobarbital sólo y en presencia del DL-HEPP en el modelo PTZ

**Tabla 6.** Comparación de las DE<sub>50</sub> del fenobarbital sólo y en presencia del DL-HEPP (15 y 30 mg/kg).

Compuesto	DE <sub>50</sub> (mg/kg)
<b>FB</b>	7.60
<b>FB +DL-HEPP (15 mg/kg)</b>	2.85
<b>FB +DL-HEPP (30 mg/kg)</b>	1.27

Como se puede observar en los resultados anteriores se nota como disminuye la DE<sub>50</sub> del fenobarbital y en presencia del DL-HEPP a diferentes dosis (15 y 30 mg/kg).

### 3.6 Determinación de las DE<sub>50</sub> del fenobarbital (FB), del DL-HEPP, del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP, del DL-HEPA y del (-)-HEPA en el modelo del electrochoque máximo

Se determinaron las DE<sub>50</sub> de los compuestos: fenobarbital, de (-)-HEPA en el modelo de electrochoque máximo. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 7, 8, 9, 10 y en las figuras 29, 30, 31, 32 y 33.

#### 3.6.1 DE<sub>50</sub> del FB en el modelo del electrochoque máximo

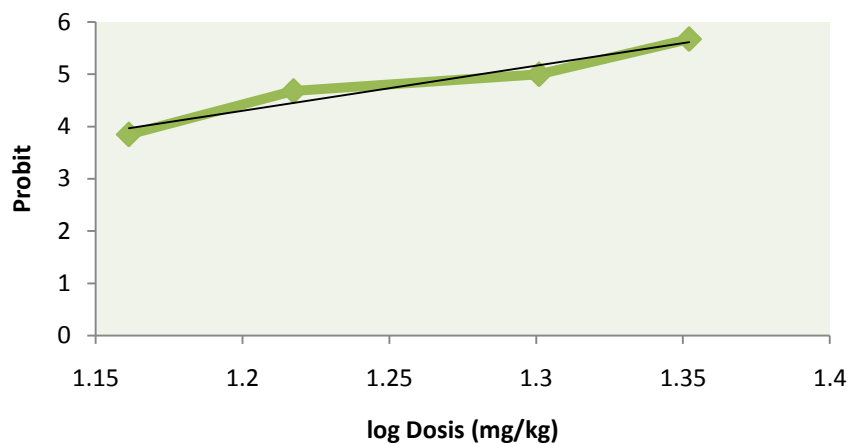
Dosis (mg/kg)	Log Dosis	% Protección	Probit
14.5	1.1613	12.5	3.8493
16.5	1.2174	37.5	4.6813
20	1.301	50	5

<b>Tabla 7.</b>	22.5	1.3521	75	5.6745
-----------------	------	--------	----	--------

Actividad anticonvulsionante del FB en el modelo del electrochoque máximo

DE<sub>50</sub>: 19 mg/kg de peso

IC<sub>95%</sub>: P(20.8522<19<17.4842) 95 %



**Figura 29.** Curva dosis-respuesta del fenobarbital

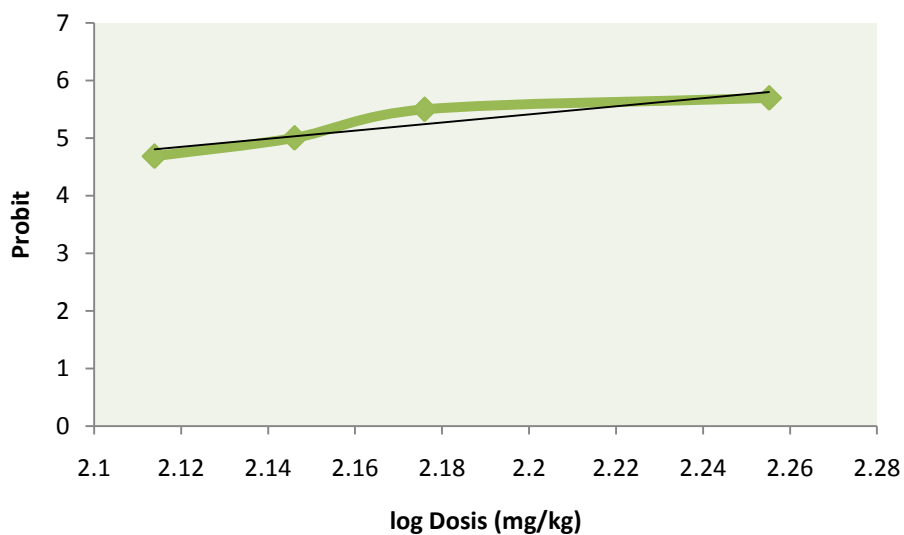
### 3.6.2 DE<sub>50</sub> del DL-HEPP en el modelo del electrochoque máximo

**Tabla 8.** Actividad anticonvulsionante del DL-HEPP en el modelo del electrochoque máximo

Dosis (mg/kg)	Log Dosis	% Protección	Probit
130	2.1139	37.5	4.6813
140	2.1461	50	5
150	2.176	68.75	5.4959
180	2.2552	75	5.6945

DE<sub>50</sub>: 138 mg/kg de peso

IC<sub>95%</sub>: P(124.4480<138<154.5297)) 95%



**Figura 30.** Curva dosis-respuesta del DL-HEPP

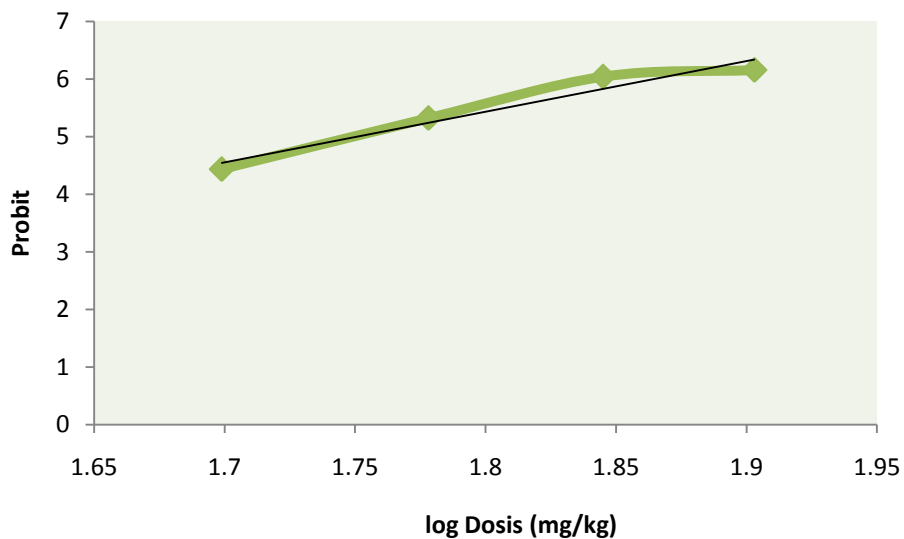
### 3.6.3 DE<sub>50</sub> del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP en el modelo del electrochoque máximo

**Tabla 9.** Actividad anticonvulsionante del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP en el modelo del electrochoque máximo.

Dosis (mg/kg)	Log Dosis	% Protección	Probit
50	1.6989	28.5	4.435
60	1.7781	62.5	5.32
70	1.8450	75	6.04
80	1.9030	87.5	6.155

DE<sub>50</sub>: 53 mg/kg de peso

IC<sub>95%</sub>: P(50.11<53<57.04) 95%



**Figura 31.** Curva dosis-respuesta del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP

### 3.6.4 DE<sub>50</sub> del DL-HEPA en el modelo del electrochoque máximo

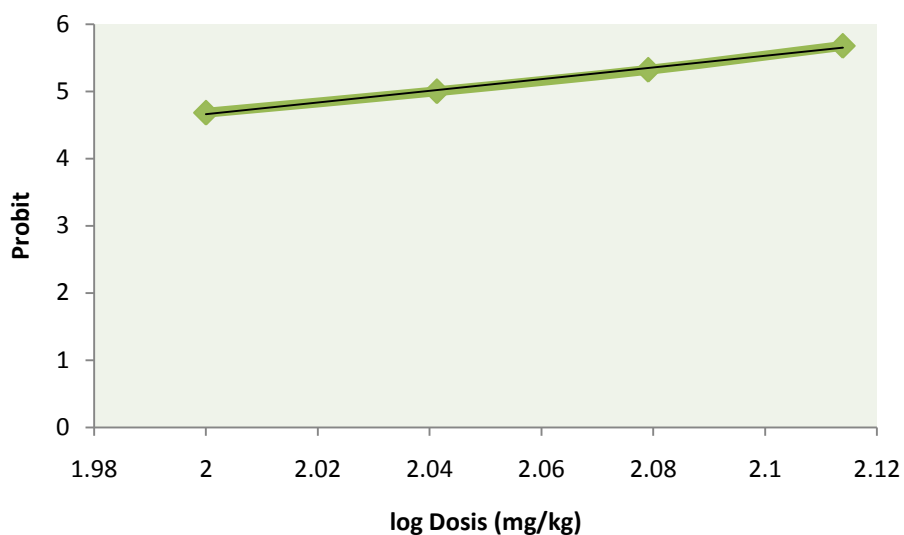
Dosis	Log Dosis	% Protección	Probit
100	2	37.5	4.6813
110	2.0413	50	5

120	2.0791	62.5	5.3187
130	2.1139	75	5.6745

**Tabla 10.** Actividad anticonvulsionante del DL-HEPA en el modelo del electrochoque máximo.

DE<sub>50</sub>: 109.5 mg/kg de peso

IC<sub>95%</sub>: P(109.4370<109.5<115.5997) 95%



**Figura 32.** Curva dosis-respuesta del DL-HEPA

### 3.6.5 DE<sub>50</sub> del (-)-HEPA en el modelo del electrochoque máximo

Dosis	Log Dosis	% Protección	Probit
100	2	12.5	3.8493
110	2.0413	32.5	4.6313

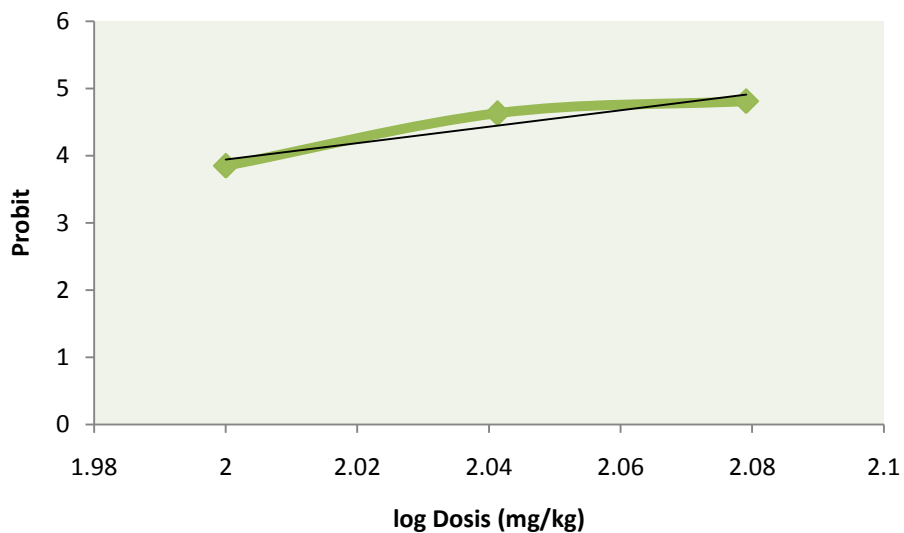


120	2.0791	42.5	4.81
-----	--------	------	------

**Tabla 11.** Actividad anticonvulsinante del (-)-HEPA en el modelo del electrochoque máximo.

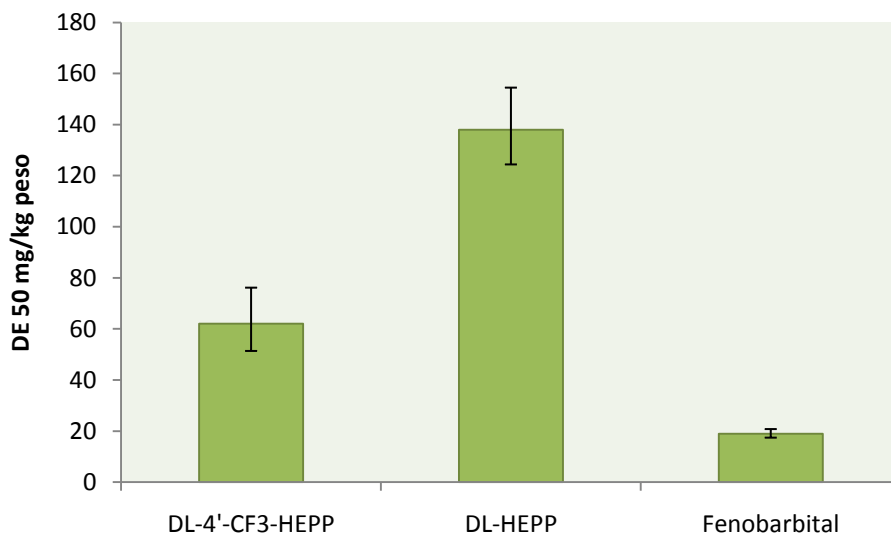
DE<sub>50</sub>: 125 mg/kg de peso

IC<sub>95%</sub>: P(122<125<130) 95%



**Figura 33.** Curva dosis-respuesta del (-)-HEPA

### 3.6.6 Comparación de las DE<sub>50</sub> del fenobarbital, del DL-HEPP y del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP



**Figura 34.** Comparación de las DE<sub>50</sub> entre el fenobarbital y las fenil alcohol amidas.

### 3.7 Determinación de la actividad neurotóxica de los compuestos: fenobarbital, DL-HEPP y DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP, mediante la técnica del rodillo giratorio o rotarod

#### 3.7.1 Neurotoxicidad del fenobarbital

**Tabla 12.** Neurotoxicidad del fenobarbital en el modelo del rodillo giratorio o rotarod.

Dosis (mg/kg)	Log Dosis	% ratones atáxicos	Probit
<b>60</b>	1.7781	37.5	4.68
<b>70</b>	1.845	50	5
<b>75</b>	1.875	62.5	5.32
<b>80</b>	1.903	85.71	6.08

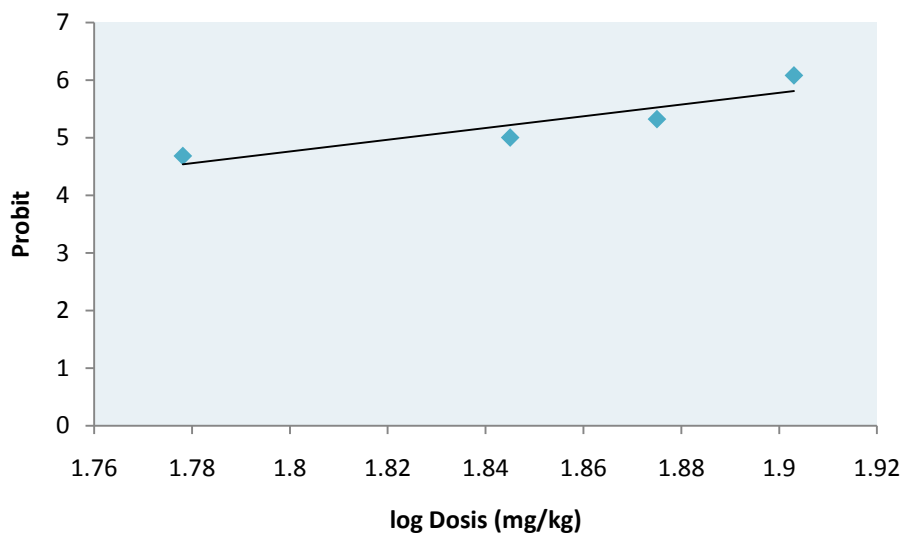
DT<sub>50</sub>:

mg/kg de peso

66

IC<sub>95%</sub>: P(60.1611<66.6479<73.8046) 95 %

57



**Figura 35.** Curva dosis-respuesta del fenobarbital en el modelo del rodillo giratorio.

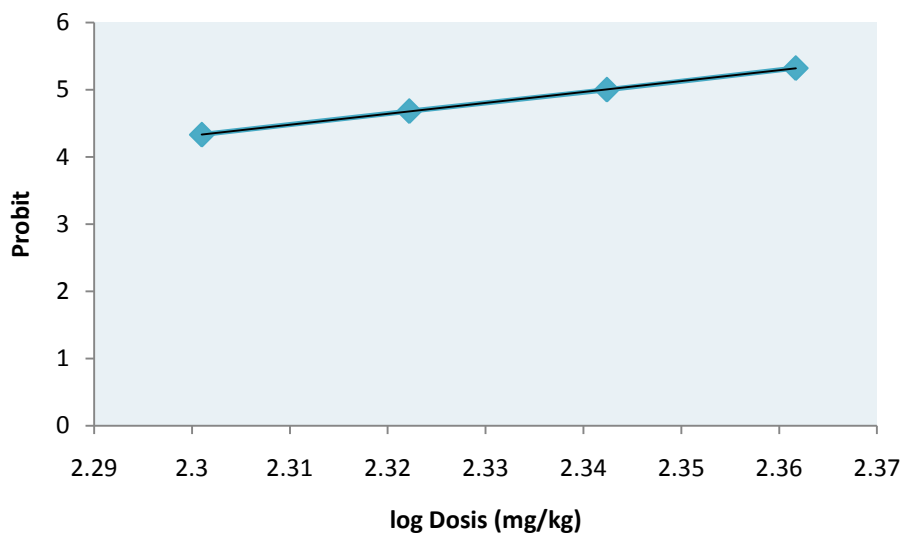
### 3.7.2 Neurotoxicidad del DL-HEPP

**Tabla 13.** Neurotoxicidad del DL-HEPP en el modelo del rodillo giratorio o rotarod.

DOSIS (mg/kg)	Log Dosis	% ratones atáxicos	Probit
<b>200</b>	2.301	25	4.33
<b>210</b>	2.3222	37.5	4.68
<b>220</b>	2.3424	50	5
<b>230</b>	2.3617	62.5	5.32

DT<sub>50</sub>: 212 mg/kg de peso

IC<sub>95%</sub>: P(208.7757<212<215.6353) 95 %



**Figura 36.** Curva dosis-respuesta del DL-HEPP en el modelo del rodillo giratorio.

### 3.7.3 Neurotoxicidad de DL--4'-CF<sub>3</sub>-HEPP

**Tabla 14.** Neurotoxicidad del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP en el modelo del rodillo giratorio

<b>Dosis (mg/kg)</b>	<b>Log Dosis</b>	<b>% ratones atáxicos</b>	<b>Probit</b>
<b>60</b>	1.7781	37.5	4.68
<b>70</b>	1.8450	50	5
<b>80</b>	1.9030	62.5	5.32

90

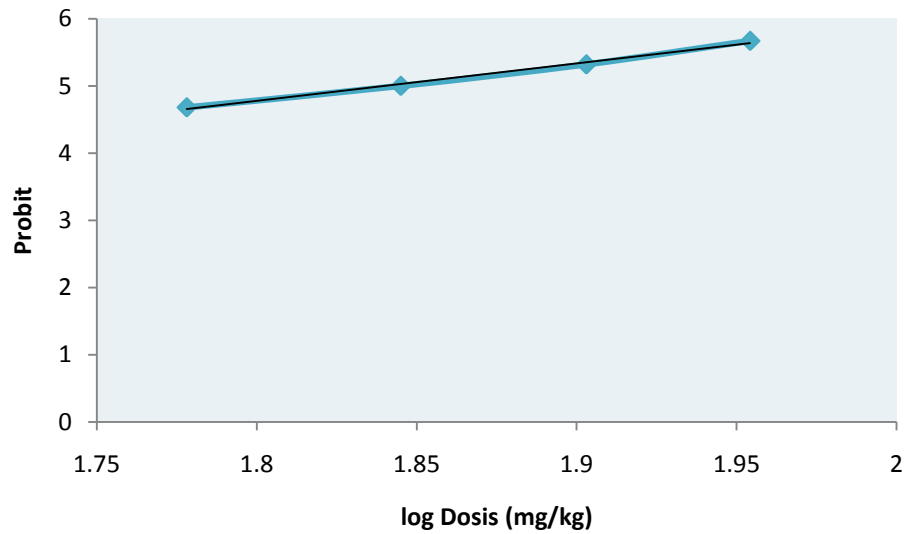
1.9542

75

5.67

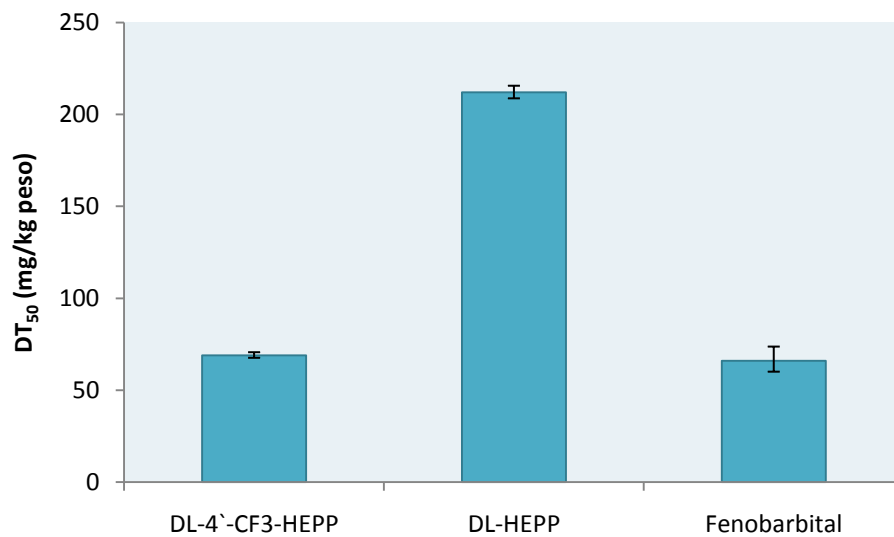
DT<sub>50</sub>: 69 mg/kg de peso

IC<sub>95%</sub>: P(67.6937<69<70.7388) 95 %



**Figura 37.** Curva dosis-respuesta del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP en el modelo del rodillo giratorio.

### 3.7.4 Comparación entre la neurotoxicidad del fenobarbital y la serie de fenil alcohol amidas.



**Figura 38.** Comparación entre las  $DT_{50}$  del fenobarbital y la serie de fenil alcohol amidas.

## 4.0 DISCUSION

### 4.1 Síntesis del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB

La síntesis del compuesto DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB se realizó mediante una condensación de Stobbe seguida de la formación de una lactona y posteriormente una amoniolisis. Para obtener evidencias de la estructura propuesta se realizó el análisis por espectrofotometría infrarroja (IR) encontrándose los grupos funcionales esperados para la butirolactona y la hidroxiamida correspondiente como se observa en las figuras 11 y 12. Para la butirolactona (Figura 11) los picos de absorción correspondientes al grupo -CF<sub>3</sub> y -COO<sup>-</sup> se ubicaron en 1323 y 1775 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. Mientras que el grupo carbonilo de la valerolactona aparece en 1735cm<sup>-1</sup> el de las butirolactonas se presenta en 1770 cm<sup>-1</sup> (Pretsch. *et al* 1998), lo cual corresponde a lo obtenido. Por otra parte para el DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB los picos de absorción para los grupos -OH, -NH<sub>2</sub>, -CONH<sub>2</sub> y CF<sub>3</sub> aparecieron en 3383, 3190, 1681 y 1325 cm<sup>-1</sup> respectivamente lo cual concuerda con lo esperado (Figura 12). Los picos observados para los grupos funcionales del DL -4'-CF<sub>3</sub>-HEPB corresponden a lo esperado y publicado en la literatura (Pretsch. E. *et al* 1998).

#### **4.2 Síntesis y caracterización del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP**

Mediante la reacción de Reformatsky en la que un éster α-bromado se trató con zinc metálico, en presencia de una cetona, se obtuvo un β-hidroxi-éster. Posteriormente el cual mediante una reacción de amoniolisis generó la fenil alcohol amida correspondiente. La estructura del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP y del hidroxíéster intermediario se estudió mediante espectrofotometría de IR y por RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, lo que mostró que el hidroxíéster se realizó de manera exitosa.

Mediante el espectro de IR (Figura 13) se obtuvieron para el hidroxíéster intermediario en la síntesis del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP los picos de absorción a: 3494, 1712, 1322 cm<sup>-1</sup> para los grupos funcionales -OH, -C=O y CF<sub>3</sub> respectivamente lo cual corresponde con lo esperado (Pretsch. E. *et al* 1998). La formación de la amida DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP se confirmó por la presencia de: grupo carbonilo de la amida a 1669 cm<sup>-1</sup>, el grupo amino de la amida a 3177 cm<sup>-1</sup>, el grupo hidroxilo presentó una señal a 3380 cm<sup>-1</sup> y por último una señal a 1327 cm<sup>-1</sup> correspondiente al grupo CF<sub>3</sub> (Figura 14) Lo anterior corresponde a lo publicado para los grupos funcionales encontrados (Pretsch. E. *et al* 1998).

En las figuras 13 y 14 puede observarse el desplazamiento del grupo carbonilo desde 1712 cm<sup>-1</sup> en el hidroxíéster hasta 1669 cm<sup>-1</sup> en la amida DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP.

Como otro punto para la caracterización del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP se realizó la RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Los desplazamientos químicos obtenidos proporcionan información acerca del ambiente químico de los hidrógenos y de los carbonos en la muestra. En el espectro de resonancia magnética nuclear de protones puede integrarse electrónicamente el área bajo cada pico de absorción, lo que permite determinar el número relativo de hidrógenos de cada pico.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP (Figura 15) se observa la presencia de los protones correspondientes al grupo metilo C<sub>5</sub> en 0.74 ppm (t, 3H, -CH<sub>3</sub>); los hidrógenos del metileno C<sub>4</sub> aparecieron entre 1.78 y 1.8 ppm (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-); estos protones se encuentran cercanos al anillo fenilo y pueden desplazarse a un campo más alto que los protones del metileno C<sub>2</sub> que presentaron un desplazamiento entre 2.8 y 2.83 ppm (d,d, 2H, -CH<sub>2</sub>-). En este último grupo metileno sus protones se encuentran más desprotegidos debido a que están adyacentes al grupo amida. El hidrógeno del grupo hidroxilo presentó un desplazamiento en 5.94 ppm (s, 1H, -OH). En el caso de los hidrógenos del grupo amino de la amida los protones no fueron equivalentes y se presentaron entre 6.4 y 7.28 ppm (bs, 2H, -CONH<sub>2</sub>-), lo cual sugiere la probable presencia de un enlace por puente de hidrogeno entre el oxígeno del grupo hidroxilo y los protones del grupo amida. Los protones del anillo aromático aparecieron en el intervalo 7.53 y 7.65 ppm (m, 4H, -CH=). Cabe mencionar que la presencia del grupo trifluorometilo en el carbono 4' contribuyó al desplazamiento a un campo más bajo de los protones aromáticos (Figura 15).

En lo que respecta al espectro de RMN <sup>13</sup>C del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP (Figura 16), se observó la señal para el C<sub>5</sub> en 6.85 ppm, el C<sub>4</sub> dió una señal en 35.03 ppm, mientras que el C<sub>2</sub> presentó la señal en 44.06 ppm. Los desplazamientos de los carbonos de los grupos metileno en C<sub>4</sub> y C<sub>2</sub> estos pueden verse afectados por su cercanía al carbono quiral dando un desplazamiento a campo alto, debido a su mayor densidad electrónica. El C<sub>3</sub> correspondiente al carbono quiral apareció en 74.43 ppm. El carbono C<sub>1</sub> del grupo amida apareció en 173.93 ppm, lo cual concuerda con lo publicado en la literatura (Pretsch. E. *et al* 1998). La presencia del grupo trifluorometilo afectó el desplazamiento químico de los carbonos aromáticos. El carbono correspondiente al grupo CF<sub>3</sub> presentó una señal en 123.5 ppm. En tanto los C<sub>3'</sub> y C<sub>5'</sub> aparecieron a 123.87 ppm y los carbonos los C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub> se presentaron a 125.17 ppm, y por último el C<sub>4'</sub> se mostró en 127.4 ppm. En la (Figura 17) se observa la amplificación de la región 120-130 ppm del espectro de RMN-<sup>13</sup>C del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP donde puede apreciarse el acoplamiento del grupo CF<sub>3</sub> con el carbono 4' del anillo aromático con una J<sup>2</sup><sub>C-F</sub>= 32 Hz. También se observa el acoplamiento C-F con una



$J^1_{C-F} = 272$  Hz, lo que apoya la presencia del grupo trifluorometilo en la posición 4' del anillo fenilo. Los valores de las constantes de acoplamiento  $J^1_{C-F}$  y  $J^2_{C-F}$  obtenidos son muy similares a los publicados en la literatura (Pretsch. E. *et al* 1998).

### 4.3 Síntesis y caracterización del DL-HEPA y de sus enantiómeros

Para el DL-HEPA el pico correspondiente al grupo carboxilo de la amida apareció en  $1658\text{ cm}^{-1}$ , el grupo amino de la amida se encontro en  $3186\text{ cm}^{-1}$ , y el grupo hidroxilo está en  $3371\text{ cm}^{-1}$  (Figura 18): Lo anterior corresponde a lo publicado en la literatura para los grupos funcionales mencionados (Pretsch. E. *et al* 1998). Los espectros IR obtenidos para los enantiómeros del HEPA fueron similares. El grupo carboxilo de la amida se presento en  $1663\text{ cm}^{-1}$ , el grupo amino de la amida a  $3293\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo los espectros IR de los enantiómeros de DL-HEPA fueron un poco diferentes al del racemato. Lo anterior se asocia a los diferentes empaquetamientos cristalinos que se encuentran en los enantiómeros y en el racemato que conduce a diferencias en las interacciones intermoleculares (Nógrádi, 1981).

Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  para el DL-HEPA y sus enantiómeros fueron similares, ya que estos se realizaron en solución donde se reducen las interacciones intermoleculares. Los protones del grupo amida no son equivalentes, presentando desplazamientos de 6.8 y de 7 ppm. Lo anterior sugeriría un probable enlace por puente de hidrógeno entre el oxígeno del grupo hidroxilo y el hidrógeno del nitrógeno de la amida. Los desplazamientos de los protones unidos a los carbonos 2, 3, 4 y el anillo aromático concuerdan con lo publicado en la literatura (Pretsch. *et al* 1998). Y apoyan la estructura propuesta.

Los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  para el DL-HEPA y sus enantiómeros fueron similares, apareciendo el carbono de la amida en 175 ppm. El  $\text{C}_2$  del centro quiral a 77 ppm. Los desplazamientos químicos obtenidos para los carbonos 3, 4 y aromáticos corresponden a lo publicado (Pretsch. *et al* 1998). Lo cual apoya la estructura propuesta.

### 4.4 Análisis de la pureza óptica de los enantiómeros del HEPA

Para la formación de las sales diastoméricas se utilizaron los compuestos (-)-quinina y (+)-1-fenil-etil-amina, estos se hicieron reaccionar con los enantiómeros correspondientes al ácido del DL-HEPA. Las rotaciones específicas de los ácidos dextrorrotatorios y los levorrotatorios fueron similares, lo que indicó que se logró la resolución de la mezcla racémica de ácidos. Posteriormente los ácidos ópticamente activos se transformaron en los ésteres metílicos correspondientes y éstos se trataron con hidróxido de amonio para formar las amidas ópticamente activas (+)-HEPA y (-)-HEPA. Estas también presentaron rotaciones específicas similares.

La pureza óptica tanto del (+)-HEPA como del (-)-HEPA se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución con fase estacionaria quiral. En este tipo de cromatografía se utiliza una fase estacionaria quiral unida a la columna, la cual contiene un éster de celulosa tris-(4-metil benzoato). La figura 19 muestra el cromatograma del ( $\pm$ )-HEPA, el cual mostró dos picos con un tiempo de retención correspondiente a 11.06 y 19.93 min. Lo anterior nos indicó que la columna utilizada sí resolvió el racemato y podría ser utilizada para determinar la pureza óptica de los enantiómeros. El cromatograma del (+)-HEPA presentó un pico con un tiempo de retención a los 19.23 min y a los 11 minutos no apareció el otro enantiómero, lo que nos indica que el (+)-HEPA está ópticamente puro. Por otro lado, en el cromatograma obtenido para el (-)-HEPA se observó un pico con un tiempo de retención de 11 min, y el otro enantiómero no está presente lo que nos indica que el (-)-HEPA presentó una pureza óptica mayor al 99 %. No se detectaron impurezas. Los resultados anteriores confirman que se logró la resolución del DL-HEPA presentando una pureza óptica mayor al 99 %.

#### **4.5 Actividad anticonvulsionante**

Estudios previos realizados con el F-HEPP, Cl-HEPP, diCl-HEPP y Br-HEPP (Carvajal *et al* 1998, Meza *et al* 1998 y 2008) sugirieron la presencia de un sitio hidrofóbico en el receptor del DL-HEPP. Por lo anterior se esperaba que la presencia de un grupo trifluorometilo (grupo hidrofóbico) en el anillo aromático del DL-HEPP incrementaría su lipofilia e interactuaría mejor con su receptor, aumentando su actividad anticonvulsionante. De los resultados obtenidos puede apreciarse que en el modelo de electrochoque máximo el DL-HEPP presentó una  $DE_{50} = 138$  mg/kg de peso y ésta disminuyó a 62 mg/kg de peso en el modelo DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP. Lo que indica que la

incorporación del grupo trifluorometilo en el anillo fenilo del DL-HEPP incrementó su potencia anticonvulsionante. Asimismo puede observarse que al incorporación de un grupo trifluorometilo en el anillo fenilo del DL-HEPB, aumentó su actividad anticonvulsionante en el modelo del PTZ. Lo anterior apoyaría que el receptor para el HEPP y para el HEPB presentaría un sitio hidrofóbico que reconocería al grupo fenilo y a sus sustituyentes.

El fenobarbital se utilizó como compuesto de referencia y la  $DE_{50}$  obtenida (19 mg/kg) contra las convulsiones provocadas por electrochoque máximo es muy similar a la publicada previamente de 22 mg/kg (Swinyard *et al* 1987). La  $DE_{50}$  del HEPA en el modelo de electrochoque máximo o (ECM) es de 109.5 mg/kg, mientras que la del (-)-HEPA fue de 125 mg/kg de peso. La diferencia es solo marginal.

Cuando se determinaron la  $DE_{50}$  en el modelo de ECM para el DL-HEPP y sus enantiómeros, también se encontró que eran similares. Lo anterior podría sugerir que el sitio de reconocimiento tanto para el HEPA como para el HEPP no es estereoespecífico.

#### **4.6 Modulación de la actividad anticonvulsionante del fenobarbital por el DL-HEPP**

El fenobarbital es un antiepiléptico que modula alostéricamente la función del GABA en el R-GABA<sub>A</sub> incrementando el tiempo de apertura del canal de cloro. A nivel experimental también protege contra las convulsiones provocadas por el pentiléntetrazol (Swinyard *et al*, 1987). Se ha sugerido que el DL-HEPP podría actuar como un modulador alostérico del R-GABA<sub>A</sub>, por lo que es posible que el DL-HEPP module alostéricamente la unión del Fenobarbital al R-GABA<sub>A</sub> y ello alterar su actividad anticonvulsionante. Por lo anterior se estudió la actividad anticonvulsionante del fenobarbital en presencia del DL-HEPP.

La  $DE_{50}$  del fenobarbital contra las convulsiones y muerte provocadas por el PTZ es de 7.6 mg/kg. Esta  $DE_{50}$  se redujo a 2.85 mg/kg en presencia de 15 mg/kg de DL-HEPP y se redujo aún más a 1.27 mg/kg cuando se utilizó DL-HEPP a una dosis 30 mg/kg. Lo anterior sugiere que el DL-HEPP pudiera estar modulando alostéricamente la unión del fenobarbital en el R-GABA<sub>A</sub>.

#### **4.7 Neurotoxicidad**

La neurotoxicidad nos da una idea del efecto tóxico de los compuestos estudiados sobre el sistema nervioso central. De los resultados obtenidos puede apreciarse que el DL-HEPP ( $DT_{50} = 212$  mg/kg) resultó ser menos neurotóxico que el DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP ( $DT_{50} = 69$  mg/kg) y que el fenobarbital ( $DT_{50} = 66$  mg/kg) utilizando la prueba del rodillo giratorio o "rotarod".

Al comparar la neurotoxicidad del DL-HEPA y de sus enantiómeros, se encontró que el racemato presenta una  $DT_{50} = 161$  mg/kg mientras que la  $DT_{50}$  del (+)-HEPA 111 mg/kg y del (-)-HEPA fue de 242 mg/kg fueron diferentes (Meza *et al* 1995). Sin embargo cuando se resolvió la mezcla racémica del DL-HEPP, la  $DT_{50}$  del DL-HEPP y sus enantiómeros (+)-HEPP y (-)-HEPP fue similar. Se requerirán más estudios para explicar estas diferencias.

El que existan pocas diferencias en la actividad biológica entre el DL-HEPP y el DL-HEPA y sus enantiómeros sugiere que la resolución de los racematos no es necesaria para estudios preclínicos y clínicos posteriores. Lo que facilitaría la obtención del producto y reduciría el costo del tratamiento.

Es interesante considerar que la incorporación del grupo trifluorometilo en el anillo fenilo de las amidas preparadas incrementa su actividad anticonvulsionante.

## 5.0 CONCLUSIONES

- El compuesto DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP presentó espectros de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono 13 compatibles con su estructura.
- El compuesto DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPB presentó el espectro infrarrojo compatible con su estructura.
- En el modelo de electrochoque máximo la introducción del grupo trifluorometilo incrementó la actividad anticonvulsionante del DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP dando una DE<sub>50</sub>, de DE<sub>50</sub>: 62 mg/Kg de peso con respecto a la DE<sub>50</sub> del HEPP de 138 mg/kg.
- El compuesto DL-HEPA se resolvió en sus enantiómeros los cuales presentaron una pureza óptica mayor al exceso enantiomérico 99 %, comprobada mediante cromatografía líquida de alta resolución con fase estacionaria quiral.
- En el modelo de pentiléntetrazol el DL-HEPP potenció la actividad anticonvulsionante del fenobarbital.
- En el modelo del rodillo giratorio la DT<sub>50</sub> para el DL-4'-CF<sub>3</sub>-HEPP fue de 69 mg/Kg de peso, mientras que el DL-HEPP presentó una DT<sub>50</sub> de 212 mg/kg.
- **La actividad anticonvulsionante del DL-HEPA y del (-)-HEPA en el modelo de electrochoque máximo es similar, lo que indica que no es necesaria la resolución del DL-HEPA para estudios posteriores.**
- **La incorporación de un grupo trifluorometilo en el anillo fenilo del DL-HEPP incremento su actividad anticonvulsionante.**

## 6.0 REFERENCIAS

1. Berl S., Lajtha A., and Waelsch H., Amino acid and protein metabolism. VI. Cerebral compartments of glutamic acid metabolism. *J. Neurochem.* 7, 186-197 (1961).
2. Blaschke V. G., Kraft H. P., Fickentscher K. y Kohler F., Chromatographische Racemattremmung von Thalidomid und teratogene wirkung der enantiomere, *Azneim.-Forsch/Drug Res.*, 29(II) 1640-1642 (1979).
3. Brailowsky S., Hirsch E., Marescaux C., Elementos fisiopatológicos de los procesos epilépticos, en: *Epilepsia: aspectos clínicos, neurobiológicos y sociales*, Feria-Velasco A., Martínez de Muñoz D., Rubio Donnadiou F. (Eds), Trillas, México, pp. 103-108 (1997).
4. Brailowsky S., Montiel T., Hernández E., Marescaux C., Vergnes M., Effects of 3-hydroxy,3-ethyl,3-phenylpropionamide (HEPP) on rat models of generalized and focal epilepsy, *Epilepsy Res.*, II: 167-172, (1992).
5. Brown J. M., y Davies S. G., Chemical asymmetric synthesis, *Nature*, 342:631-636 (1989).
6. Carvajal Sandoval G., Juarez Carvajal E., Cruz Peinado C., Meza Toledo S., Synthesis and pharmacological evaluation of a new homologous series of (±)-p-Fluoro-phenyl Alcohol Amide anticonvulsants, *Arzneim-Forsch. /Drug Res.* 48(I): 349-352 (1998).
7. Carvajal Sandoval G., La planeación de fármacos antiepilépticos, en: *Epilepsia un enfoque multidisciplinario*, Feria-Velasco A., Martínez de Muñoz D., Rubio Donnadiou F (Eds) 2ª edición, Trillas, México, pp 193-201,203-207 (1986).
8. Carvajal-Sandoval, G., Diseño de la DL-4-hidroxi-4-etil-4-fenil butiramida y sus homólogos inferiores, *Arch. Neurocién (Mex)*, 1, 2: 108-113 (1996).
9. Castellano E. E., Zujerman S., Carvajal E., 4-hydroxy-4-phenyl hexanamide, an anticonvulsant molecule. *ActaCrysallogr B37*;284-286 (1981).
10. Chamorro G., Salazar M., Salazar S., Ulloa V., Carvajal G., Martínez D., Evaluation of the toxic and teratogenic potential of the anticonvulsant drug 4-hidroxy, 4-ethyl, 4-phenylbutyramide in mice. *Arch Med Res* 4:441-446 (1994).

11. Cotzias G. C., Van Wiert M. H., y Schiffer L. M., Aromatic aminoácidos and modification of parkinsonism, *New Engl.J. Med.*, 276:374-379 (1967).
12. Delgado Luz , Schmachtenberg Oliver, Immunohistochemical Localization of GABA, GAD and the Receptor Subunits GABAA $\alpha$ 1 and GABAB1 in the Zebrafish Cerebellum. *Cerebellum* 7(3):444-50 (2008).
13. Gross M., Significance of drug stereochemistry in modern pharmaceutical research and development, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 25:323-331 (1989).
14. Herrero M. M., Cabrera L. J. C., Toledo L., Manejo de las convulsiones febriles en nuestra comunidad BSCP *Can Ped* 24 (3) (2000).
15. Iadarola MJ, Gale K, Substantia nigra: site of anticonvulsant activity mediated by gamma-aminobutyric acid, *Science* 218: 1237-1240 (1982).
16. Jacob T.C., Moss S.J., and Jurd R., GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neuroscience* 9(5): 331-43. (2008)
17. Krogsgaard-Larsen P.,  $\gamma$ -aminobutyric acid agonists, antagonists and uptake inhibitors. Designs and therapeutic aspect, *J. Med. Chem.*, 24:1377-1383 (1979).
18. Lauder Jean M., Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends in Neurosciences* 16:233-240, (1993)
19. Litchfield J., Wilcoxon F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99-113 (1949).
20. Macdonald R. L., Greenfield L. J. Jr., Mechanisms of action of new antiepileptic drugs, *Current Opinion in Neurology.* 10(2):121-128, (1997).
21. Martinez de Muñoz D., Óscos A., Effects of cyclic analogs of GABA on protein synthesis and discriminating learnig, *Psycho. Pharmacol.*, 54: 149-152 (1977)
22. McNamara J., Gibbs J., The epilepsies: phenotype and mechanisms, En: *Basis Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects.* Siegel G., Albers R., Brady S., Price D., (Eds.), Academic Press, Canada, pp. 629-638 (2006).
23. Meza T. S., Martínez M. D., Mecanismos bioquímicos de los antiepilépticos, en *Farmacología Clínica*, Uriarte Bonilla V., Trejo Flores Caso S. (Eds.), Trillas, México, D.F., pp 799-806 (2003).
24. Meza T. S., Zenteno-García M., Juárez-Cavajal E., Martínez-Muñoz D, Carvajal-Sandoval G., A new Homologous series of anticonvulsants: phenyl alcohol amides. Synthesis and pharmacological evaluation, *Arzneim Forsch/Drug Res.* 40 (III): 1289-1291 (1990).

25. Meza-Toledo S. E., Bowery N. G., Reversal of GABA-mediated inhibition of the electrically and potassium chloride evoked [3H]-GABA release from rat substantia nigra slices by DL-3-hydroxy-3-phenyl pentanamide, *Arzneim Forsch Drug Res*, 59 (2):pp 53-61 (2008).
26. Meza-Toledo S. E., Carvajal-Sandoval G., Preparación de nuevas fenilamidas anticonvulsiantes, *Gac. Med. Méx*, 143 (1): 34-38 (2007).
27. Meza-Toledo S. E., Carvajal-Sandoval G., Preparación de nuevas fenilamidas anticonvulsiantes, *Gac. Med. Méx*, 143 (1): 34-38 (2007)
28. Meza-Toledo S. E., Lira-Zárte F., Robles-Martínez E., Peralta-Alvarez B., Cabrera-Cedillo F., Peralta-Cruz J., Cruz-Peinado C., Miñón-López H., Synthesis of DL-Fluorobenzenamides as anticonvulsants, *Arzneim Forsch Drug Res*, 58 (4): 155-159 (2008).
29. Morrison R., Boyd R., *Química orgánica*, Pearson Education, México, p 1058, (1998).
30. Nathan J. P., Massieu E., Carvajal E., Tapia R.,  $\gamma$ -hidroxy- $\gamma$ -phenyl, caproamide an anticonvulsant molecule. *Rev. Latinoamer. Quím.* 9:90-92 (1978).
31. Nógrádi M., In: *estereochemistry. Basic concepts and applications*, pp. 42-43, Pergamon press, Oxford (1981).
32. Nutt D., GABAA receptors: subtypes, regional distribution, and function. *J ClinSleep Med* 15;2(2):S7-11, (2006).
33. Olsen R., Sieghart W., International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of  $\gamma$ -aminobutyric acid A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update, *Pharmacol Rev* 60:243–260 (2008).
34. Oynik V., Estudio de la acción de nuevos anticonvulsiantes sobre la discriminación en ratas y sobre ciertas funciones intelectuales, en niños con lesión cerebral, Tesis, Facultad de Filosofía y Letras, Colegio de Psicología, UNAM, p 70, (1968).
35. Perez de la Mora M., Tapia R., Anticonvulsant effect of 5-ethy, 5-phenyl, 2-pyrrolidinone and its possible relationship to  $\gamma$ -aminobutirico acid. depend inhibitory mechanism. *Biochem Pharmacol* 22:2635 (1973).
36. Pretsch E., Seibl J., Simon W., Clerct, *Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos*. Springer, Barcelona (1998).
37. Rogawski M. A., Löscher W., The neurobiology of antiepileptic drugs, *Nat. Rev. Neurosci.*, 5: 553-564 (2004).



38. Ronald W., Stephen K., Synaptic Transmission and Cellular Signaling: An overview, Basic neurochemistry Molecular, Celular and Medical Aspects seven edition, Academic Press Pg: 167-182 (2006).
39. Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family, Nature 16-22;328(6127):221-7 (1987).
40. Sieghart W., Structure, pharmacology and function of GABA-A receptor subtypes. In: (Eds.), Advances in Pharmacology 54 (Enna SJ) Elsevier Inc: 231-263 (2006).
41. Solís H., Jurado J. L., Fernández G. A., La acción de la butiramida sobre el desarrollo del Kindling y el Kindling amigdalino ya establecido en el gato, Neurobiología, Symposium Internacional, Eds. Velasco-Suárez M. y Escubedo-Ríos F., pp 83-94, Instituto Nacional de Neurología, México (1979).
42. Swinyard E., Sofía R., Jupferberg H., Comparative anticonvulsant activity and neurotoxicity of felbamate and four prototype antiepileptic drugs in mice and rats. Epilepsia 27:27-34 (1986).
43. Tapia R., Drucker-Colín RR., Meza-Ruiz G., Durán L., Levi G., Neurophysiological and neurochemical studies on the action of the anticonvulsant  $\gamma$ -hydroxy,  $\gamma$ -ethyl,  $\gamma$ -phenyl butyramide. Epilepsia 20: 135-145 (1979).
44. Vogel A., A textbook of practical organic chemistry, Longman, EEUU, pp. 919-920 (1961).