



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
VENEZUELA

Facultad de Ciencias
Laboratorio de Organometálicos
Laboratorio de Control Genético de Roedores del BIOTERIO

Estudio de la actividad anticonvulsionante de proligandos derivados del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico en ratones *BIOU:NMRI*

Br. Tiffany C. Ledesma González

Tutor:

Dr. Ricardo R. Contreras

Co-Tutora:

Dr.^a Rosa de Jesús

Mérida - 2015 - Venezuela

Agradecimientos.

A la Universidad de Los Andes, institución responsable de mi formación científica.

A mi tutor el Dr. Ricardo R. Contreras, por su constante apoyo en el desarrollo del proyecto de Tesis y por todas sus enseñanzas y paciencia.

A mi cotutora Dra. Rosa De Jesús, por su ayuda en este proyecto.

Al Laboratorio de Organometálicos de la Universidad de Los Andes, a sus profesores: Eduardo Cardozo, Joel Vielma y Fernando Bellandi por su valiosa colaboración.

Al Prof. Gerzon Delgado, Departamento de Química ULA, por el apoyo a este proyecto suministrando las hidantoínas que fueron sujeto de este estudio.

Al Prof. José Nelson Aranguren, Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA, por su apoyo a la revisión de este trabajo especial de grado.

Al Bioterio de la Universidad de Los Andes, por formarme en el área de manipulación de animales de laboratorio.

Al Laboratorio de Docencia de Química Inorgánica y al Laboratorio de Cinética y Catálisis por su ayuda en la caracterización de los compuestos evaluados.

Al CDCHTA de la Universidad de Los Andes por la subvención recibida a través de la subvención proyecto **C-1945-15-08-B**.

Resumen.

El presente trabajo de investigación desarrolla la síntesis y caracterización química de un grupo de dos compuestos pertenecientes a una familia de ligandos nitrógeno-sulfurados (ácido 2-(bencilamino)ciclopent-1-enoditiocarboxílico y ácido 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxílico, cuya síntesis y caracterización ha sido previamente reportada. Estos compuestos se caracterizaron mediante espectroscopia vibracional infrarroja (IR-FT) y espectroscopia de absorción electrónica. También se estudiaron tres compuestos pertenecientes a la familia de las hidantoínas (5,5-difenilhidantoina (HTA1), 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina (HTA2), 5,5-difenil-2-tiohidantoina (HTA3). Así mismo, se desarrollaron una serie de bioensayos en ratones *BIO:NMRI* pertenecientes al bioterio de la Universidad de Los Andes a fin de verificar la actividad anticonvulsionante de los compuestos anteriormente mencionados, las convulsiones en los roedores fueron inducidas químicamente con pilocarpina, en este ensayo biológico se estudió el tiempo, duración y manifestación de dichas convulsiones, siendo los compuestos 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina (HTA2), 5,5-difenil-2-tiohidantoina (HTA3) y el ácido 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxílico favorables contra los ataques convulsivos, ya que reducen las convulsiones e intensidad de las mismas. Los ensayos biológicos se realizaron siguiendo los protocolos establecidos para la investigación en animales de laboratorio y los criterios bioéticos establecidos.

Palabras clave: Ligandos nitrógeno-sulfurados, hidantoínas, bioensayos, roedores *BIO:NMRI*, anticonvulsionante.

Abstract.

Synthesis and characterization of two compounds that belong to a nitrogen-sulfur ligands were developed 2-(benzylamino)cyclopent-1-enecarbodithioic acid y 2-(3,4-dimethoxyphenethyl)amino)cyclopent-1-enecarbodithioic acid based on a previously reported method. Both compounds were successfully characterized by FT-IR and absorption spectroscopy UV-Vis. Anticonvulsant activity for these compounds were compared to another three of an a hidantoinic series (5,5-difenilhidantoina (HTA1), 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina (HTA2), 5,5-difenil-2-tiohidantoina) (HTA3) using mice BIOU:NMRI from Universidad de Los Andes Bioterio for the bioassays. Convulsions were chemically induced to the mice using pilocarpine. Initial time, time lapse and physical manifestation were evaluated showing optimum results for 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina (HTA2), 5,5-difenil-2-tiohidantoina (HTA3) y el ácido 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxilico against the induced convulsive attacks. All bioassays were performed taking into account updated protocols and bioethics related to the research and manipulation of laboratory animals.

Keywords: Nitrogen-sulfur ligands, hidantoinis, bioassays, rodents, BIOU:NMRI, anticonvulsant.

Índice general.

Resumen.	3
Abstract.	4
Índice de tablas.	9
1. Introducción.	11
2. Marco teórico.	12
i) Los proligandos y otras moléculas de interés en química de coordinación.	12
ii) Proligandos nitrógeno-sulfurados.	14
iii) Las hidantoínas.	18
iv) Enfermedades o trastornos neurológicos.	20
a) La epilepsia. Generalidades.	20
b) Fisiopatología de las convulsiones.	21
c) Estatus epiléptico.	22
d) Frecuencia de las convulsiones.	22
e) Tratamiento de la epilepsia.	22
f) Mecanismos de las convulsiones mediadas por neurotransmisores.	25
g) Consecuencias sociales.	26
v) Bioensayos de medicamentos o fármacos.	26
a) Ensayos de toxicidad aguda.	27
b) Ensayos de toxicidad crónica.	27
c) Ensayos multi-especies.	28
vi) Evaluación biológica.	28
a) Desarrollo de modelos anticonvulsivos en animales.	29
b) Relación cuantitativa estructura-actividad.	31
vii) Bioética.	32
Ética de la experimentación animal.	33
3. Antecedentes.	35
4. Justificación.	35
5. Hipótesis.	36
6. Objetivos.	36
Objetivo general.	36
Objetivos específicos.	36
7. Metodología.	37
a) Reactivos, materiales y equipos.	37

b) Síntesis del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico (acda)	37
c) Síntesis de los ligandos (acdabz y acda4bz).....	37
d) Bioensayos en ratones <i>BIO:NMRI</i>	38
e) Cálculos computacionales.	38
8. Resultados.	38
9. Caracterización.....	39
9.1 Espectroscopia vibracional infrarroja (IR-FT).	39
9.2 Espectroscopia de absorción electrónica (UV- Vis).....	47
9.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C	53
10. Cálculo computacional.	58
10.1 Relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR).	69
11. Ensayos biológicos.	70
12. Conclusiones.	92
13. Recomendaciones.	93
14. Bibliografía.....	94

Índice de figuras.

Figura 1. Elementos representativos que se encuentran como ligandos más comunes.....	12
Figura 2. Formas de coordinación del ligando ambidentado NO_2^- : a) forma nitrito y b) forma nitro. ..	13
Figura 3. Estructura de agentes quelantes más comunes.	13
Figura 4. Esquema de los procedimientos de síntesis utilizados por Takeshima et ál. Para obtener una serie homóloga a partir de ciclopentanona.	14
Figura 5. Compuestos sintetizados por Bordás <i>et ál.</i> , los grupos R_1 y R_2 cambian desde metilos hasta butilos.	15
Figura 6. Ligandos sintetizados por Contreras <i>et ál</i> [6,7,8,9,10,11].	16
Figura 7. Ligando con propiedades anti-fúngicas y anti-cancerígenas sintetizado por Tofazzal <i>et ál.</i> ..	17
Figura 8. Estructura molecular de la fenitoína.	18
Figura 9. Izquierda: electroencefalograma de una mujer de 35 años normal, con dolores crónicos de cabeza. Derecha: electroencefalograma de un niño de 8 años, durante una convulsión, la misma implica una abducción tónica y una extensión de ambos brazos [18].	21
Figura 10. Inactivación del canal de sodio inducido por el anticonvulsivo, cuya función es reducir la capacidad de las neuronas para efectuar activación a altas frecuencias. A: compuerta de activación....	24
Figura 11. Reducción de la corriente por los canales de calcio del tipo T inducida por los anticonvulsivos.	24
Figura 12. Transmisión sináptica incrementada del <i>GABA</i> . En presencia del <i>GABA</i> el receptor <i>GABA-A</i> (estructura del lado izquierdo) se abre, lo cual permite la entrada de Cl^- . Algunos fármacos antiepilépticos actúan mediante la reducción del metabolismo del <i>GABA</i> , otros a nivel del receptor <i>GABA-A</i> . <i>GABA-T</i> : <i>GABA</i> -transaminasa, <i>GAT-1</i> : transportador de <i>GABA</i> , <i>DSS</i> : deshidrogenasa succínica de semialdehído.	26
Figura 13. Estatua de Alison Lapper (embarazada de ocho meses) ubicada en Trafalgar Square (Londres, UK.), obra del escultor Marc Quinn, 2004. Esta estatua simboliza las consecuencias de la talidomida en el desarrollo de las extremidades superiores e inferiores y el coraje de los pacientes afectado como la joven madre británica Alison Lapper.	29
Figura 14. Estructura de la fenilacetanilida monosustituída.	32
Figura 15. Reacción de síntesis del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico.	37
Figura 16. Esquema de síntesis de los ligandos nitrógeno-sulfurados. R = bencilamina para acdabz y 2-(3,4-dimetoxifenil)etanol para acda4bz.	37
Figura 17. Puente de hidrógeno intramolecular del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico.	39
Figura 18. Espectro experimental IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) del proligando acdabz.	40
Figura 19. Espectro IR-FT ($4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) calculado a través de Spartan 14' del proligando acdabz.	40
Figura 20. Espectro IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) calculado a través de MOPAC del proligando acdabz.	41
Figura 21. Espectro IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) del proligando acda4bz.	41
Figura 22. Espectro IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) calculado a través de Spartan 14' del proligando acda4bz.	42
Figura 23. Espectro IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) calculado a través de MOPAC del proligando acda4bz. ..	42
Figura 24. Espectro IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) del fármaco 5,5- difenilhidantoína.	43
Figura 25. Espectro IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) calculado a través de Spartan 14' del fármaco 5,5- difenilhidantoína.	43
Figura 26. Espectro IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) calculado a través de MOPAC del fármaco 5,5- difenilhidantoína.	43
Figura 27. Espectro IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.	44
Figura 28. Espectro IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) calculado a través de Spartan 14' del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.	44

Figura 29. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de MOPAC del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.	45
Figura 30. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.	45
Figura 31. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de Spartan 14' del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.	46
Figura 32. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de MOPAC del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.	46
Figura 33. Izquierda: conformación transoide del 1,3-butadieno. Derecha: conformación cisoide del 1,3-butadieno.	47
Figura 34. Espectro de absorción electrónica del proligando acdabz.	48
Figura 35. Espectro de absorción electrónica calculado del proligando acdabz.	48
Figura 36. Espectro de absorción electrónica del proligando acda4bz.	49
Figura 37. Espectro de absorción electrónica calculado del proligando acda4bz.	49
Figura 38. Espectro de absorción electrónica del fármaco 5,5-difenilhidantoína.	50
Figura 39. Espectro de absorción electrónica calculado del fármaco 5,5-difenilhidantoína.	50
Figura 40. Espectro de absorción electrónica del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.	51
Figura 41. Espectro de absorción electrónica calculado del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.	51
Figura 42. Espectro de absorción electrónica del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.	52
Figura 43. Espectro de absorción electrónica calculado del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.	52
Figura 44. Espectro de RMN ^1H del proligando acdabz.	54
Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C del proligando acdabz.	55
Figura 46. Espectro de RMN ^1H del proligando acda4bz.	55
Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C del proligando acda4bz.	56
Figura 48. Orbitales moleculares de frontera del benceno descrito según el método de Hückel.	59
Figura 49. Orbitales de frontera de los compuestos en estudio, calculados a través de MOPAC.	61
Figura 50. Orbitales de frontera de los compuestos en estudio, calculados a través de Spartan 14'.	62
Figura 51. Orbitales de frontera del compuesto 5,5-difenilhidantoína.	63
Figura 52. Operaciones de simetría, eje de rotación C_2 , sobre los orbitales de frontera del compuestos 5,5-difenilhidantoína.	63
Figura 53. Operaciones de simetría, plano vertical (σ_v), sobre los orbitales de frontera del compuestos 5,5-difenilhidantoína.	64
Figura 54. Operaciones de simetría, centro de inversión (i) (rotación seguida de una reflexión), sobre los orbitales de frontera del compuesto 5,5-difenilhidantoína.	64
Figura 55. Diagrama de niveles de energía calculado para la estructura HOMO-LUMO en el compuesto acda4bz.	66
Figura 56. Diagrama de niveles de energía calculado para la estructura HOMO-LUMO en el compuesto HTA2.	67
Figura 57. Diagrama de reproducción de una línea de roedores no consanguíneos.	71
Figura 58. Roedores <i>BIOU:NMRI</i>	71
Figura 59. Dosificación vía entrapéritoneal de un roedor <i>BIOU:NMRI</i>	72
Figura 60. a) Estado físico “muy bueno” en los roedores con los diferentes compuestos. b) Estado físico “malo” en los roedores con los diferentes compuestos.	89
Figura 61. Roedores <i>BIOU:NMRI</i> control-control. (a): roedor control 1. (b): roedor control 2. (c): roedor control 3.	90
Figura 62. Necropsias de los roedores <i>BIOU:NMRI</i> . (a): Roedor dosificado con HTA1. (b): roedor dosificado con HTA2. (c): roedor dosificado con HTA3. (d): roedor dosificado con acdabz. (e): roedor dosificado con acda4bz.	91

Índice de tablas.

Tabla 1. Algunos ácidos y bases duras, intermedias y blandas.....	14
Tabla 2. Ligandos nitrógeno-sulfurados en estudio.....	17
Tabla 3. Hidantoínas y Tiohidantoínas en estudio.....	19
Tabla 4. Antecedentes en la síntesis del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico.....	35
Tabla 5. Propiedades y características físicas de los compuestos sintetizados.....	38
Tabla 6. Solubilidad de los compuestos sintetizados.....	39
Tabla 7. Asignación de las bandas en espectroscopia infrarroja del proligando acdabz.....	41
Tabla 8. Asignación de las bandas en espectroscopia infrarroja del proligando acda4bz.....	42
Tabla 9. Asignación de las bandas en espectroscopia infrarroja del fármaco 5,5- difenilhidantoína.....	44
Tabla 10. Asignación de las bandas en espectroscopia infrarroja del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.....	45
Tabla 11. Asignación de las bandas en espectroscopia infrarroja del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.....	46
Tabla 12. Transiciones electrónicas del proligando acdabz.....	48
Tabla 13. Transiciones electrónicas del proligando acda4bz.....	49
Tabla 14. Transiciones electrónicas del fármaco 5,5-difenilhidantoína.....	50
Tabla 15. Transiciones electrónicas del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.....	51
Tabla 16. Transiciones electrónicas del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.....	52
Tabla 17. Desplazamientos químicos RMN ¹ H para los proligandos nitrógeno-sulfurados.....	57
Tabla 18. Desplazamientos químicos RMN ¹³ C para los proligandos nitrógeno-sulfurados.....	58
Tabla 19. Propiedades calculadas para los compuestos en estudio con el método semi-empírico PM6 y PM7.....	59
Tabla 20. Energía de formación calculada para los compuestos en estudio con el método semi-empírico PM6 y PM7.....	59
Tabla 21. Transiciones y orbitales involucrados en la transferencia de carga de los distintos compuestos en estudio.....	64
Tabla 22. Electronegatividad absoluta (χ_{abs}), dureza absoluta (η) de los compuestos en estudio.....	68
Tabla 23. Índice de electrofilicidad (ω) y suavidad global (S) de los compuestos en estudio.....	69
Tabla 24. Propiedades calculadas: Volumen (Å^3) y Log P.....	70
Tabla 25. Condiciones ambientales de los roedores en estudio.....	72
Tabla 26. Manifestaciones de la convulsión utilizando pilocarpina en roedores <i>BIOU:NMRI</i>	72
Tabla 27. Periodo interictal utilizando pilocarpina en roedores <i>BIOU:NMRI</i>	73
Tabla 28. Escala cuantitativa de las condiciones físicas de los roedores <i>BIOU:NMRI</i>	73
Tabla 29. Manifestaciones de la convulsión utilizando HTA1 como fármaco protector en roedores <i>BIOU:NMRI</i>	74
Tabla 30. Periodo interictal utilizando HTA1 como fármaco protector en roedores <i>BIOU:NMRI</i>	74
Tabla 31. Condición de los roedores durante los ocho (8) días de observación con el HTA1.....	74
Tabla 32. Estudio estadístico para el roedor 1 utilizando como fármaco HTA1.....	75
Tabla 33. Estudio estadístico para el roedor 2 utilizando como fármaco HTA1.....	75
Tabla 34. Estudio estadístico para el roedor 3 utilizando como fármaco HTA1.....	75
Tabla 35. Estudio estadístico para el roedor 4 utilizando como fármaco HTA1.....	76
Tabla 36. Estudio estadístico para el roedor 5 utilizando como fármaco HTA1.....	76
Tabla 37. Manifestaciones de la convulsión utilizando HTA2 como fármaco protector en roedores <i>BIOU:NMRI</i>	77
Tabla 38. Periodo interictal utilizando HTA 2 como fármaco protector en roedores <i>BIOU:NMRI</i>	77
Tabla 39. Condición de los roedores durante los ocho (8) días de observación con el HTA2.....	77
Tabla 40. Estudio estadístico para el roedor 1 utilizando como fármaco HTA2.....	77
Tabla 41. Estudio estadístico para el roedor 2 utilizando como fármaco HTA2.....	78

Tabla 42. Estudio estadístico para el roedor 3 utilizando como fármaco HTA2.	78
Tabla 43. Estudio estadístico para el roedor 4 utilizando como fármaco HTA2.	78
Tabla 44. Estudio estadístico para el roedor 5 utilizando como fármaco HTA2.	79
Tabla 45. Manifestaciones de la convulsión utilizando HTA3 como fármaco protector en roedores <i>BIOU:NMRI</i>	79
Tabla 46. Periodo interictal utilizando HTA 3 como fármaco protector en roedores <i>BIOU:NMRI</i>	79
Tabla 47. Condición de los roedores durante los ocho (8) días de observación con el HTA3.	80
Tabla 48. Estudio estadístico para el roedor 1 utilizando como fármaco HTA3.	80
Tabla 49. Estudio estadístico para el roedor 2 utilizando como fármaco HTA3.	80
Tabla 50. Estudio estadístico para el roedor 3 utilizando como fármaco HTA3.	81
Tabla 51. Estudio estadístico para el roedor 4 utilizando como fármaco HTA3.	81
Tabla 52. Estudio estadístico para el roedor 5 utilizando como fármaco HTA3.	81
Tabla 53. Manifestaciones de la convulsión utilizando el proligando acdabz como fármaco protector en roedores <i>BIOU:NMRI</i>	82
Tabla 54. Periodo interictal utilizando acdabz como fármaco protector en roedores <i>BIOU: NMRI</i>	83
Tabla 55. Condición de los roedores durante los ocho (8) días de observación con el acdabz.	83
Tabla 56. Estudio estadístico para el roedor 1 utilizando como fármaco acdabz.	84
Tabla 57. Estudio estadístico para el roedor 2 utilizando como fármaco acdabz.	84
Tabla 58. Estudio estadístico para el roedor 3 utilizando como fármaco acdabz.	84
Tabla 59. Estudio estadístico para el roedor 4 utilizando como fármaco acdabz.	85
Tabla 60. Estudio estadístico para el roedor 5 utilizando como fármaco acdabz.	85
Tabla 61. Manifestaciones de la convulsión utilizando el proligando acda4bz como fármaco protector en ratones <i>BIOU:NMRI</i>	86
Tabla 62. Periodo interictal utilizando acda4bz como fármaco protector en roedores <i>BIOU:NMRI</i>	86
Tabla 63. Condición de los roedores durante los ocho (8) días de observación con el acda4bz.	86
Tabla 64. Estudio estadístico para el roedor 1 utilizando como fármaco acda4bz.	87
Tabla 65. Estudio estadístico para el roedor 2 utilizando como fármaco acda4bz.	87
Tabla 66. Estudio estadístico para el roedor 3 utilizando como fármaco acda4bz.	87
Tabla 67. Estudio estadístico para el roedor 4 utilizando como fármaco acda4bz.	88
Tabla 68. Estudio estadístico para el roedor 5 utilizando como fármaco acda4bz.	88
Tabla 69. Frecuencia de las convulsiones en roedores <i>BIOU:NMRI</i> con los distintos fármacos.	89

1. Introducción.

Desde la antigüedad el hombre ha acudido a la naturaleza para obtener sustancias químicas con aplicaciones de diversa índole – paliativas del dolor y síntomas de sus enfermedades, obtención del alimento, relaciones sociales y espirituales (estimulantes y alucinógenos) - entre muchos otros. Este hecho ha permitido disponer a través del tiempo de una amplia información, que sometida a la observación y al método científico, ha dado lugar al planteamiento de ideas que han llevado a la obtención de medicamentos. En este orden, es importante resaltar que en la actualidad aproximadamente la mitad de los productos que se disponen en la farmacopea son de origen natural, y otros que han servido de modelos, sufren diferentes modificaciones en el laboratorio, encaminadas a obtener compuestos más efectivos y con menos efectos adversos que las originales.

En tal sentido, se ha planteado estudiar una familia de compuestos derivados de ácido 2-amino-1-ciclopetenditiocarboxílico, con el objetivo de evaluar su posible actividad como fármacos antiepilépticos. Estos compuestos se han sintetizado en el Laboratorio de Organometálicos del Departamento de Química – ULA, para aprovecharlos como proligandos nitrógeno-sulfurados con modos coordinativos tipo $[\text{NS}]^1$, $[\text{N}_2\text{S}_2]^2$, $[\text{SS}]^1$, frente a metales de la primera y segunda serie de transición de la Tabla Periódica, sintetizando compuestos complejos del tipo $[\text{M}(\text{II})(\text{NS})]$ y $[\text{M}(\text{II})\text{N}_2\text{S}_2]$, donde $\text{M} = \text{Cr}, \text{Fe}, \text{Co}, \text{Ni}, \text{Cu}, \text{Zn}, \text{Mo}, \text{Pd}$ [1]. Adicionalmente, es importante señalar que se escogió esta familia de compuestos en virtud de que tiene estructuralmente gran similitud con medicamentos anticonvulsionantes como la fenitoína o, en general, la familia de las hidantoínas, razón por la cual es posible proponer una interacción similar con el neuroreceptor *GABA*, involucrado en el proceso de excitabilidad neuronal.

La epilepsia – uno de los desórdenes neurológicos más frecuentes –, tiene una prevalencia mundial del 1 % (más de 60 millones de personas afectadas), y a su vez del total de personas afectadas, más del 80 % de se da en los países subdesarrollados. Se estima que entre un 25 % a 30 % de pacientes con dicha patología son farmacorresistentes, es decir, la terapia de fármacos no es efectiva en ellos. Ante esta situación, claramente surge la necesidad de desarrollar fármacos más eficaces que no afecten la calidad de vida de los pacientes [2].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Liga Internacional contra la Epilepsia (ILAE por sus siglas en inglés) definen esta enfermedad como: “una afección neurológica crónica, recurrente y repetitiva, de fenómenos paroxísticos ocasionados por descargas de neuronas cerebrales de forma desordenada y excesiva” y en general se puede decir que la epilepsia es un síndrome de desórdenes cerebrales del sistema nervioso central. La epilepsia afecta a personas de todas las edades, su incidencia es mayor durante los primeros años de vida y en personas de la tercera edad, pero inicia antes de los veinte años y en las tres cuartas partes de los casos, su inadecuado control puede conducir a un daño cerebral permanente o a trastornos del aprendizaje.

Los estudios preclínicos en animales tienen por objeto demostrar la eficacia y seguridad de un posible fármaco, antes de su introducción en voluntarios humanos. El éxito o fracaso de todo proyecto de desarrollo de fármacos, depende de la validez del modelo biológico elegido para su evaluación.

En los últimos años se ha desencadenado una corriente de opinión pública contraria al uso de los animales en estudios experimentales. Sin embargo, aunque se han buscado, y en muchos casos encontrado, alternativas a la experimentación *in vivo*, hoy en día continúa siendo absolutamente imprescindible la obtención de datos a partir de los modelos animales. En general se recomienda que el diseño de los experimentos se haga de tal manera que se consiga obtener el máximo de información empleando el menor número de animales posibles. Además todo este tipo de estudios debe realizarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio en lo que a condiciones de establecimiento y manejo de animales se refiere [1] y siempre respetando los criterios de la bioética. En el presente estudio se utilizarán ratones de la línea *NMRI* criados en las instalaciones del Bioterio de la Universidad de Los Andes, lugar donde se desarrollarán todas las pruebas *in vivo* de las hidantoínas y los compuestos derivados del ácido 2-amino-1-ciclopetenditiocarboxílico como posibles agentes anticonvulsionantes.

2. Marco teórico.

i) Los proligandos y otras moléculas de interés en química de coordinación.

Se le denomina Proligando a todas aquellas moléculas (generalmente de naturaleza orgánica) que poseen en su estructura molecular átomos donadores que son preferentemente aquellos pertenecientes a elementos representativos (bloque *p* de la Tabla Periódica) de entre los cuales destacan: el oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo, seguidos por el carbono, cloro, flúor, entre otros (Fig. 1).

Desde la perspectiva de Lewis los proligandos actúan como bases, donando pares de electrones a otras especies como por ejemplo metales de transición, los cuales a su vez funcionan como ácidos, aceptando dichos electrones en orbitales vacíos formando los denominados aductos de Lewis. A partir de esta interacción se forma lo que conoce como el enlace covalente coordinado.

14	15	16	17
6 C Carbono	7 N Nitrógeno	8 O Oxígeno	9 F Flúor
	15 P Fósforo	16 S Azufre	17 Cl Cloro
	33 As Arsénico	34 Se Selenio	35 Br Bromo
		52 Te Teluro	53 I Iodo

Figura 1. Elementos representativos que se encuentran como ligandos más comunes.

Algunos proligantes tienen un único átomo donador por lo que sólo le es posible aportar un par electrónico (ubicado en orbitales de enlace o de no-enlace), por tanto solo es posible observar un punto coordinante. Tales proligantes se clasifican como monodentados (*de un diente*, en latín). Algunos de los ligandos monodentados más comunes son: proligandos aniónicos del grupo 17 de la Tabla Periódica (F^- , Cl^- , Br^- , I^-), proligandos nitrogenados RCN^- , ligandos oxigenados RO^- , proligandos sulfurados, SCN^- y ligandos neutros como el NH_3 , el H_2O , o el CO . A los proligandos que tienen dos puntos de enlace se le clasifica como Bidentados y a los que tienen más de dos, se les llama de forma general Polidentados.

Los proligandos Ambidentados tienen más de un átomo donador pero solo enlazan por alguno de ellos y nunca por ambos por lo que pertenecen al grupo de los Monodentados. Un ejemplo es el ion tiocianato (NCS^-), que puede unirse a un átomo metálico por medio del átomo de nitrógeno para producir complejos de isotiocianato, o por medio del átomo de azufre, para generar el tiocianato. Otro ejemplo de proligando ambidentado es el ion nitrito NO_2^- , donde el proligante es nitro cuando enlaza por el nitrógeno: $M-NO_2$ y nitrito si enlaza por el oxígeno: $M-ONO^-$. En la Fig. 2 se ilustra un ejemplo de ligando ambidentado ion nitrito.

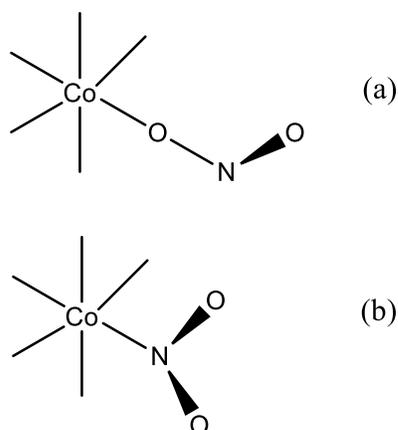


Figura 2. Formas de coordinación del ligando ambidentado NO_2^- : a) forma nitrito y b) forma nitro.

Los proligandos polidentados pueden formar quelatos (del griego “*garra*”), un complejo en el cual un ligando una vez enlazado forma un anillo que incluye al átomo metálico. Un ejemplo de este tipo de proligando quelato es la etilendiamina (en, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), que forma un anillo de cinco (5) miembros cuando los dos (2) átomos nitrógeno se enlazan al mismo tiempo al átomo metálico. En la Fig. 3 se pueden apreciar algunos de los quelatos más conocidos.

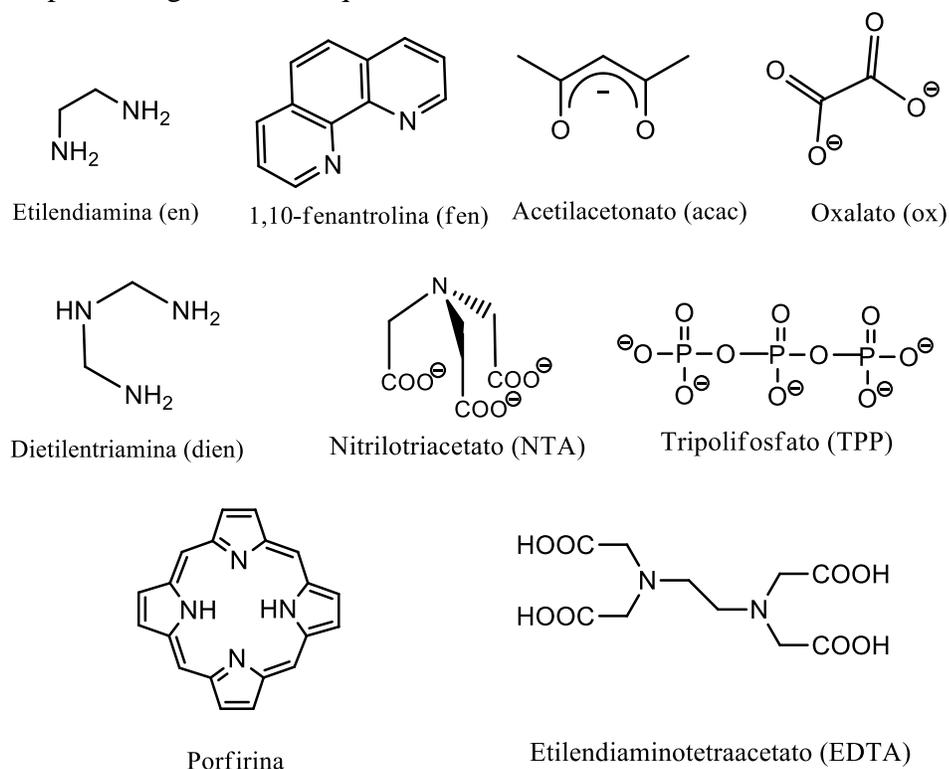


Figura 3. Estructura de agentes quelantes más comunes.

Una teoría cualitativa que nos permite determinar la acción de un proligando sobre un metal es la teoría de ácidos y bases duros y blandas (ABDB) introducida por Ralph Pearson a principios de la década de 1960. En ella definió a las especies duras como aquellas de bajo radio atómico o molecular poco polarizables, y las especies blandas como aquellas de gran volumen molecular y altamente polarizables. Según estas definiciones los cationes Al^{3+} y Cr^{3+} son ácidos duros, mientras que ligandos como F^- , NH_3 y H_2O son bases duras. Por el contrario, cationes metálicos como Hg^{2+} , Ag^+ y Au^+ y ligandos que

contienen fósforo, azufre y enlaces- π (por ejemplo CN^- y CO) son blandos. En la Tabla 1 se muestra un listado de algunos ácidos y bases duras y blandas.

Tabla 1. Algunos ácidos y bases duras, intermedias y blandas.

Tipo	Ácidos	Bases
Duros	H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Be^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cr^{2+} , Cr^{3+} , Al^{3+} , SO_3 , BF_3	F^- , OH^- , H_2O , NH_3 , CO_3^{2-} , NO_3^- , O^{2-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , ClO_4^-
Intermedios	Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , SO_2 , BBr_3	NO_2^- , SO_3^{2-} , Br^- , N_3^- , N_2 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$, SCN^-
Blandos	Cu^+ , Au^+ , Ag^+ , Tl^+ , Hg^+	H^- , R^- , CN^- , CO , I^- , SCN^- , R_3P , C_6H_5 , R_3S

El resultado de esta teoría es la predicción preferencial de un tipo de enlace en un prolígando: “los ácidos blandos se unen, preferentemente, a las bases blandas y los ácidos duros a las bases duras”.

Esta regla, basada en numerosas observaciones experimentales y en las definiciones fisicoquímica, es de gran utilidad para estimar la estabilidad relativa de los complejos de metales de transición, así como el modo coordinativo de dicha especie – para casos ambidentados o polidentados – o en general entre un conjunto de posibles ligandos [3].

ii) Proligandos nitrógeno-sulfurados.

Desde principio de la década de 1970 se han sintetizado una serie de ligandos que contienen nitrógeno y azufre como átomos donadores de electrones para formar compuestos complejos mediante enlaces covalentes coordinados. En 1968, Takeshima *et al* estudiaron reacciones de compuestos de metileno activos con disulfuro de carbono en presencia de hidróxido de amonio además de sus reacciones con ciclopentanona y cicloheptanona para la cual encontraron un intermediario de reacción estable y aislable antes de producirse la tiazina esperada. Este intermediario es el ácido 2-amino-ciclopenten-1-ditiocarboxílico (*acda*) [4]. Una serie de tiazinas fueron preparadas a partir del ácido *acda* en presencia de morfolina (Fig. 4)

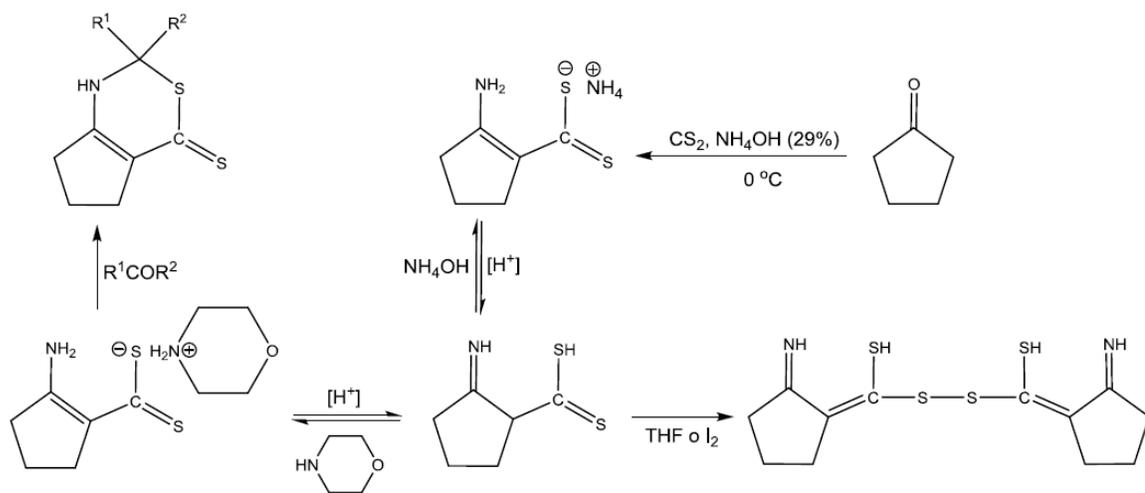


Figura 4. Esquema de los procedimientos de síntesis utilizados por Takeshima *et al*. Para obtener una serie homóloga a partir de ciclopentanona.

En 1971, Bordás *et ál.*, sintetizaron una familia de este tipo de compuestos (Fig. 5); en el que hacen reaccionar la ciclopentanona con disulfuro de carbono en presencia de alquilaminas, para obtener derivados del ácido 1-ciclopenteno-2-alkilamino-1-ditiocarboxílico. En este caso se estudiaron las formas tautoméricas de aquellos compuestos obtenidos así como también sus propiedades antifúngicas [5].

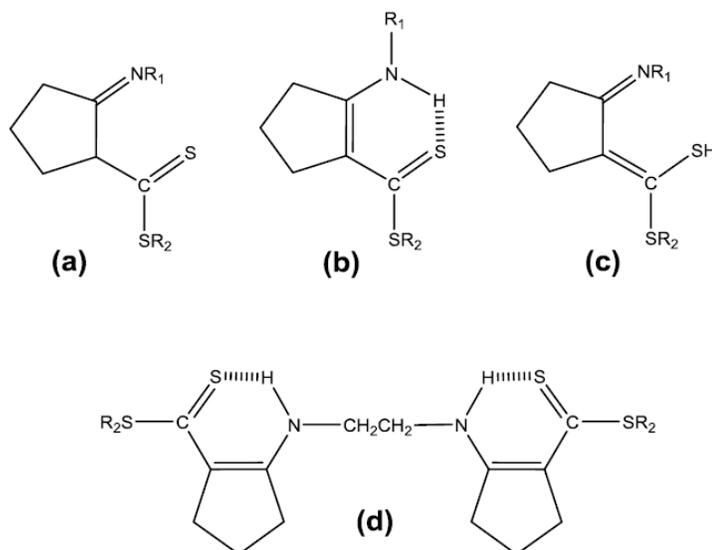


Figura 5. Compuestos sintetizados por Bordás *et ál.*, los grupos R₁ y R₂ cambian desde metilos hasta butilos.

Desde 1999, Contreras *et ál.* [6,7,8,9,10,11], en el Laboratorio de Organometálicos de La Universidad de los Andes se han diseñado, sintetizado y caracterizado una familia de proligandos derivados del ácido 2-amino-ciclopenten-1-ditiocarboxílico (acdaH), tanto bidentados como tetradentados del tipo [NS]⁻¹, [SS]⁻¹, [N₂S₂]⁻² y sus respectivos complejos con metales de la primera y segunda serie de transición. Esta investigación condujo a la obtención de una serie de ligandos tipo *N*- y *N,N'*-alquil(2-amino-1-ciclopentencarboxidato de metilo, etilo, propilo, butilo, alilo y bencilo) (Fig. 6). Misal [12] y Torres [13] han reportado también, la síntesis vía microondas de este tipo de proligandos.

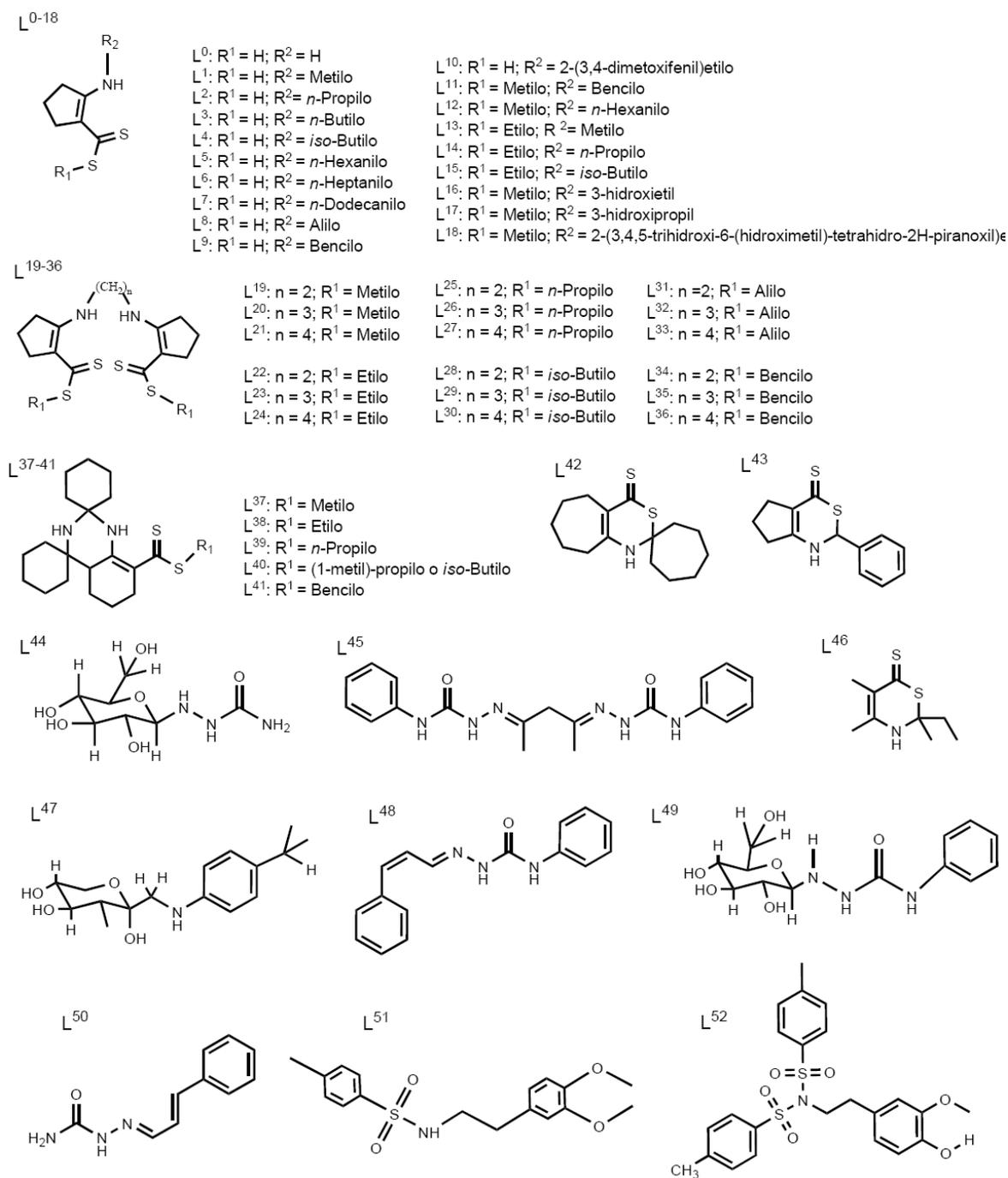


Figura 6. Ligandos sintetizados por Contreras et ál [6,7,8,9,10,11].

En el 2000, Tofazzal et ál [14] estudiaron las propiedades del ligando nitrógeno-sulfurado *S*-bencilditiocarbazato (Fig. 7), mostrando actividad antibacteriana y anti-cancerígena, especialmente contra el melanoma (cáncer de piel).

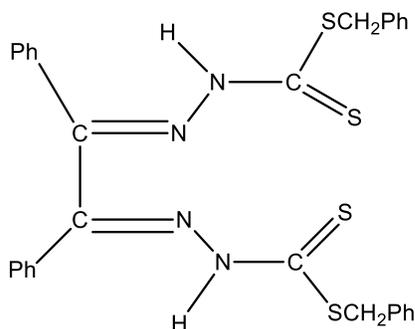


Figura 7. Ligando con propiedades anti-fúngicas y anti-cancerígenas sintetizado por Tofazzal et *ál.*

En la tabla 2 se muestran las representaciones graficas de los proligandos nitrógeno-sulfurados los cuales serán objeto de estudio en el presente trabajo.

Tabla 2. Ligandos nitrógeno-sulfurados en estudio.

Fármaco	Fórmula general	Fórmula en 3D
<p>acdabz Ácido 2-(bencilamino)ciclopent-1-enoditiocarboxílico</p>	<p>2-(benzylamino)cyclopent-1-enecarbothioic acid</p>	
<p>acda4bz Ácido 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxílico</p>		

iii) Las hidantoínas.

Las hidantoínas (imidazolidin-2,4-dionas) son compuestos derivados de los α -aminoácidos y presentan interesantes aplicaciones biológicas. Las hidantoínas muestran un gran potencial farmacológico para el tratamiento de enfermedades neurológicas crónicas tales como la epilepsia [15], una enfermedad crónica originada en la sustancia gris cerebral que afecta del 0,5 % al 2 % de la población (cerca de 40.000 personas en EE.UU.), esta enfermedad es más común en niños y aún no existe una droga ideal para el tratamiento de la misma, es por ello que existe una necesidad de abordar investigaciones en este campo dirigidas al desarrollo de otras que permitan disminuir los síntomas de esta enfermedad.

Desde un punto de vista farmacológico, las hidantoínas son fármacos estabilizadores de membrana, esto es, cambian la permeabilidad a los iones, en especial al sodio y al calcio, alterando la ATPasa de membrana sodio/potasio dependiente, disminuyen el consumo de oxígeno cerebral inhibiendo la potenciación postetánica. Se entiende por potenciación postetánica un incremento temporal de la transmisión en sinapsis del sistema nervioso central, después de una estimulación rápida y repetida. Las hidantoínas elevan el umbral de excitación sináptica y prolongan el periodo refractario. El efecto estabilizador de membrana aparece en el sistema nervioso central y en el corazón. Las hidantoínas inhiben la liberación de neurotransmisores excitatorios (ácido glutámico) y facilitan la acción de los neurotransmisores inhibitorios, presentando un efecto similar (mimético) al neuroreceptor *GABA*.

Las hidantoínas, en su calidad de fármacos, se absorben por vía oral y se unen intensamente a las proteínas plasmáticas (70 % - 95 %), difundiéndose ampliamente por el organismo y atravesando la barrera hematoencefálica.

La fenitoína o difenilhidantoína (Epanutin®) (Fig. 8) es probablemente uno de los fármacos más eficaces para tratar este tipo de enfermedades neurológicas, esta no afecta el umbral del estímulo (no inhibe el comienzo de las descargas epilépticas), pero limita la propagación de la actividad convulsiva. Este fármaco es capaz de bloquear la potenciación postetánica del foco (PPT) del mismo modo que la carbamacepina (Tegretol®).

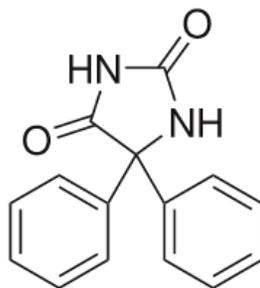


Figura 8. Estructura molecular de la fenitoína.

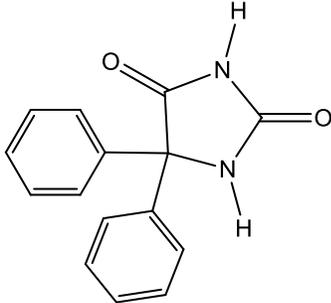
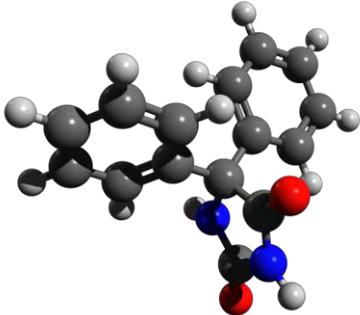
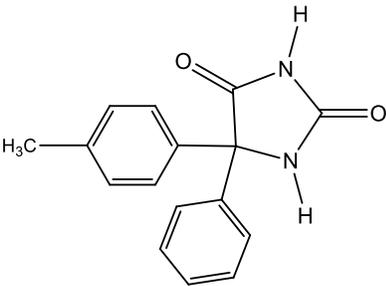
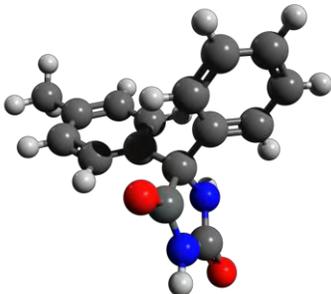
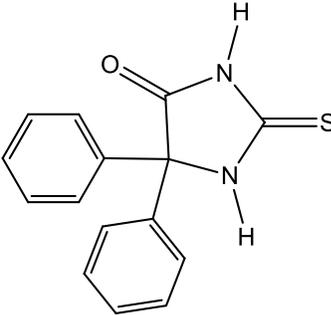
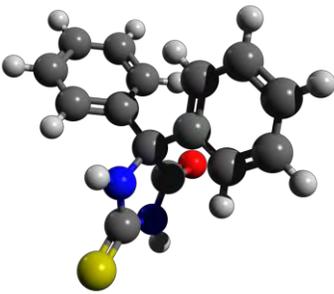
Se piensa que la acción anticonvulsiva de la fenitoína está mediada principalmente por el bloqueo de canales de sodio operados por voltaje. La fenitoína produce una inhibición del canal de sodio dependiente del voltaje (mejor en células despolarizadas) y también inhibe mejor los canales que se abren y cierran continuamente. Por ello la fenitoína es selectiva a neuronas hiperexcitadas y en concentraciones farmacológicas adecuadas no modifica la excitabilidad celular normal (solo la modifica en concentraciones tóxicas).

Aunque la fenitoína se une poco a canales de sodio en estado de reposo (cerrados), también tiene baja afinidad por el estado abierto del canal y bloquea principalmente los canales cuando están inactivos. No se sabe la manera exacta por la cual la fenitoína bloquea canales de sodio inactivos, probablemente evita que el canal pase al estado de reposo para que pueda volver a abrirse.

Este fármaco ayuda a aliviar los síntomas de la epilepsia pero posee efectos adversos en mujeres embarazadas; ensayos clínicos en humanos han demostrado que la exposición *in útero* a la hidantoína puede inducir actividad teratogénica, es decir, puede llegar a inducir malformaciones congénitas [15].

En la tabla 3 se muestran las representaciones graficas de las hidantoínas y tiohidantoínas las cuales serán objeto de estudio en el presente trabajo.

Tabla 3. Hidantoínas y Tiohidantoínas en estudio.

Fármaco	Fórmula general	Fórmula en 3D
HTA 1 (5,5-difenilhidantoína)		
HTA 2 (5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína)		
HTA 3 (5,5-difenil-2-tiohidantoína)		

iv) Enfermedades o trastornos neurológicos.

Los trastornos o enfermedades neurológicas son enfermedades del sistema nervioso central y periférico, esto es, del cerebro, la médula espinal, los nervios craneales y periféricos, las raíces nerviosas, el sistema nervioso autónomo, la placa neuromuscular, y los músculos. Entre esos trastornos se cuentan la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer y otras demencias, enfermedades cerebrovasculares (accidentes cerebrovasculares), la migraña y otras cefalalgias, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, las infecciones neurológicas, los tumores cerebrales, las afecciones traumáticas del sistema nervioso tales como los traumatismos craneoencefálicos, y los trastornos neurológicos causado por la desnutrición.

Los trastornos mentales, en cambio, son “enfermedades psiquiátricas”, es decir, enfermedades que se manifiestan principalmente como trastornos del pensamiento, las emociones o el comportamiento, y que causan malestar o una deficiencia funcional.

En la actualidad, cientos de millones de personas en todo el mundo sufren trastornos neurológicos. Según datos de la Organización Mundial de la Salud [16], aproximadamente 6,2 millones de personas mueren cada año por accidentes cerebrovasculares, y más del 80 % de estas muertes se producen en países de ingresos bajos o medianos. Más de 50 millones de personas en todo el mundo tienen epilepsia. Según los cálculos, unos 36 millones de personas en todo el mundo padecen demencia, y se diagnostican 7,7 millones de casos nuevos cada año (la enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia y puede contribuir con entre 60 % y 70 % de los casos).

a) La epilepsia. Generalidades.

Los términos: *ataques*, *convulsiones*, *ictus*, *epilepsia*, son sinónimos que se utilizan para describir las manifestaciones clínicas de una excesiva o hipsincrónica actividad eléctrica de la corteza cerebral [16].

La epilepsia es la tendencia del cerebro a presentar descargas eléctricas en forma desordenada, interrumpiendo otras funciones. Presentar una convulsión no significa necesariamente que una persona sufra epilepsia. La epilepsia es la tendencia constante a presentar convulsiones recurrentes debido a una lesión permanente o a la inestabilidad intermitente de las vías eléctricas del cerebro.

El *estado epiléptico (EE)* se define como un estado convulsivo de duración superior a los 30 minutos, o como una secuencia de crisis sin recuperación total de la conciencia durante el periodo interictal¹ [17].

Las convulsiones repetidas *en rachas* se definen como dos o más convulsiones que ocurren en un periodo limitado de tiempo (minutos y horas), con recuperación de conciencia entre los ataques. Con el término epilepsia se indica un desorden cerebral crónico caracterizado por convulsiones recurrentes. Las convulsiones de tipo epiléptico suelen ir acompañadas por característicos cambios electroencefalográficos [18] (Fig. 9).

¹ Tiempo que transcurre entre una crisis y la siguiente.
Laboratorio de Organometálicos

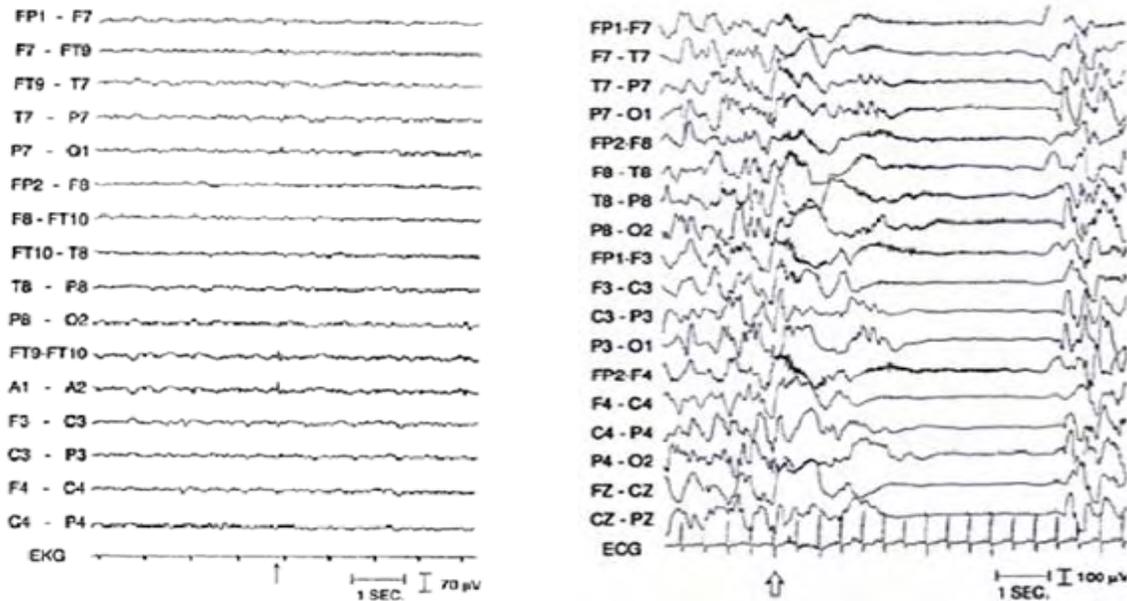


Figura 9. Izquierda: electroencefalograma de una mujer de 35 años normal, con dolores crónicos de cabeza. Derecha: electroencefalograma de un niño de 8 años, durante una convulsión, la misma implica una abducción tónica y una extensión de ambos brazos [18].

Se puede decir que epilepsia es un conjunto de trastornos neurológicos crónicos que tienen en común la existencia de episodios repentinos y transitorios de descargas anormales y sincrónicas de un punto del sistema nervioso central con o sin pérdida de la conciencia. Estos fenómenos se conocen con el nombre de crisis o comicios y pueden ser de origen motor (convulsiones o mioclonos), sensitivos, autonómicos o psíquicos (ilusiones, alucinaciones). Las convulsiones vendrían a ser episodios breves de contracciones musculares que pueden afectar a una parte del cuerpo (convulsiones parciales) o a su totalidad (convulsiones generalizadas). A veces se acompaña de pérdida de la conciencia y de control de los esfínteres [19].

b) Fisiopatología de las convulsiones.

Desde el punto de vista fisiopatológico, las convulsiones se definen como una alteración repentina de la función del sistema nervioso central, a causa de una descarga eléctrica paroxística de alto voltaje de frecuencia elevada o de frecuencia baja sincrónica, causada por un defecto en el balance entre mecanismos excitatorios e inhibidores del cerebro. La mayoría de estas descargas ocurren en el lóbulo temporal misial, aunque también la epilepsia puede generarse debido a la agenesia² del cuerpo calloso [19]. Para que las descargas eléctricas se generen y se propaguen, es necesario que aparezcan dos mecanismos esenciales que provocan la crisis:

- Excitabilidad neuronal aumentada.
- Sincronización de una determinada población neuronal.

De los mecanismos citados, la excitabilidad neuronal parece tener mayor importancia. En tal sentido, es importante señalar que la función neuronal normal implica el mantenimiento de una diferencia de potencial transmembrana de entre 60 - 80 mV, con negatividad intracelular, causada por las concentraciones relativas de diferentes iones en los espacios intracelular y extracelular. La influencia

² Malformación o irregularidades en la región cerebral llamada cuerpo calloso, probablemente como resultado de una alteración en el desarrollo embrionario (teratogénica), que ocasiona la falta parcial o total del haz de fibras interhemisféricas cerebrales.

que recibe una neurona específica puede provocar una despolarización de una membrana neuronal, que provoca a su vez un cambio en su permeabilidad con una apertura selectiva de los canales iónicos [20]. Si esta alteración del ambiente celular implica solo un pequeño grupo de neuronas y no difunde en otras áreas cerebrales, el disparo de las neuronas origina una serie de descargas periódicas, con incremento progresivo de su amplitud y frecuencia, que se pueden visualizar muy bien en el trazado electroencefalográfico.

c) Estatus epiléptico.

La Organización Mundial de la Salud denomina “estatus epiléptico” a una crisis epiléptica que se repite en un intervalo corto de tiempo o que son lo suficiente prolongadas como para condicionar un estado epiléptico fijo y duradero. En la práctica se valora como estatus epiléptico (EE) a las crisis epilépticas que se prolongan durante más de 30 minutos o que se suceden sin recuperación de la conciencia o del estado neurológico previo [21, 22].

Todavía faltan muchos aspectos por comprender de la fisiopatología del estatus epiléptico y se estima que es poco probable que tenga un único mecanismo. A pesar de encontrar una extensa cantidad de publicaciones acerca de los mecanismos fisiopatológicos a partir de una crisis única, no hay clara evidencia que explique la secuencia de eventos que lo producen. Los elementos claves del desarrollo del estatus epiléptico incluyen un desequilibrio entre la excitabilidad e inhibición neuronal con alteración de la comunicación que da lugar a hipersincronía de poblaciones neuronales. Sin embargo, estudios recientes han demostrado a través de pequeñas descargas eléctricas y exposición a la luz en diferentes zonas del cerebro con pacientes que padecen epilepsia, que los lóbulos parietales parecen desempeñar un papel importante en los ataques convulsivos generalizados [23, 24].

d) Frecuencia de las convulsiones.

En los casos más severos, los ataques ocurren con alta frecuencia; sin embargo, en la mayoría de los casos las convulsiones son menos frecuentes y fácilmente controlables. Pero, en algunos pacientes es posible que las convulsiones puedan reaparecer después de que se les ha controlado a través del tiempo, inclusive, pueden aparecer luego de varios años libres de episodios. En muchos pacientes la frecuencia y la severidad de las convulsiones son variables y no es raro encontrar un aumento de la frecuencia de convulsiones sin ningún deterioro de la condición fundamental del paciente. Muchos factores influyen en la frecuencia de las convulsiones incluyendo entre otros, la toma irregular del medicamento antiepiléptico, el consumo de alcohol, de sicotrópicos o sustancias estupefacientes, la privación de sueño, e inclusive puede aparecer como efectos secundario de ciertos medicamentos. La fotosensibilidad que manifiestan algunas personas, al exponerse a las luces centellantes o a patrones visuales repetitivos, puede ser también una causa de la aparición de convulsiones. Algunas veces pueden ocurrir cambios en las condiciones normales del cerebro, lo que sería la causa del aumento de las frecuencias de las convulsiones. El embarazo puede tener efectos en la severidad y frecuencia de las convulsiones.

e) Tratamiento de la epilepsia.

Actualmente, existen muchos tratamientos disponibles para tratar este problema de salud, razón por la cual alrededor del 70 % de las personas afectadas pueden dominar sus ataques con el uso de medicamentos o inclusive mediante la práctica de cierto tipo de neurocirugías. El primer tratamiento a considerar implica el uso de medicamentos. Éstos no curan la epilepsia pero en muchas personas evitan o reducen las convulsiones [25]. Después de una sola crisis, existen cerca del 30 % de posibilidades de una segunda crisis. Por otro lado, existe un 70 % de posibilidades de que un paciente quede libre de ataques por el resto de su vida. Por esta razón la mayoría de los neurólogos no inician con medicación después de una sola crisis excepto en circunstancias especiales. Cuando ocurre una segunda crisis,

existe un 70% de probabilidad de que ocurra una tercera. A menos que las dos crisis estén muy separadas de tiempo, los neurólogos comúnmente inician medicación después de la segunda para tratar de prevenir futuras crisis. Después de la segunda crisis (el cual resulta en el diagnóstico de la condición epiléptica) cerca de dos tercios de los pacientes tienen sus crisis controladas con la primera medicación usada, generalmente sin mayores efectos adversos. Si estos últimos ocurren o los ataques no son controlados se prueba otro anticonvulsivante. Un 20 o 25 % de los pacientes que no respondieron a la primera medicación pueden responder a la segunda o a la tercera. Lamentablemente, del 30 al 40 % de los pacientes con epilepsia parecen no responder a ninguna medicación.

f) Mecanismos de las convulsiones mediadas por canales iónicos.

Actualmente no existen fármacos que actúen de manera preventiva en la formación de focos convulsivos, sino que los compuestos disponibles parecen actuar principalmente suprimiendo o evitando la propagación de una crisis epiléptica. Esto puede suceder a partir de diversos procesos, a veces simultáneos. Los mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos (FAEs) no son completamente conocidos. Algunos estudios relativamente recientes de neurotransmisores y receptores específicos sirvieron para definir los principales modos de acción farmacológica de estos compuestos. Los mecanismos propuestos involucran la habilidad de un fármaco de modelar la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria. Esto puede suceder mediante un efecto sobre los canales iónicos, o sobre los receptores y metabolismo de los neurotransmisores [26].

- **Canales Iónicos.**

Los canales iónicos son enzimas que atraviesan la membrana plasmática y catalizan la difusión selectiva/pasiva de iones. Estas proteínas forman poros que sufren cambios conformacionales rápidos entre estados cerrados no permeables y abiertos. En esta última conformación es que seleccionan y dejan pasar iones antes de volver a cerrarse. El funcionamiento anómalo de canales da lugar a patologías del sistema nervioso central entre las que se encuentra la epilepsia. Como consecuencia, uno de los objetivos en el desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos, es encontrar compuestos que modulen selectivamente la regulación iónica de la excitabilidad neuronal [27]. Los canales catiónicos dependientes del voltaje son una familia de este tipo de proteínas de membrana excitables. Existe evidencia de que algunos agentes anticonvulsivos interactúan con los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} mediante su unión a sitios receptores ubicados en sus subunidades.

- **Canales de sodio.**

Los canales de sodio son responsables de la propagación de los potenciales de acción en las fibras mielinizadas y no mielinizadas. Los tres estados conformacionales de estos canales se denominan activos, de reposo e inactivos. Cada uno de ellos es capaz de conducir una corriente eléctrica y de permitir una permeabilidad diferente (o ninguna) de los iones Na^+ .

En general, luego de que una membrana se despolariza, aumenta la permeabilidad a los iones Na^+ y estos entran a la célula, que luego retorna a su estado normal o inicial [28].

Los análisis electrofisiológicos de neuronas individuales durante una crisis convulsiva parcial muestran que las neuronas presentan despolarización y potenciales de acción de activación a altas frecuencias. Este comportamiento es característico de las convulsiones y es poco frecuente durante la actividad neuronal fisiológica; por tanto, es de esperar que una inhibición selectiva de este modelo de activación redujera las convulsiones. Se estima que esto se produce mediante una disminución de la capacidad de los canales de sodio de recuperarse de dicha activación, en otras palabras, se requiere la apertura desencadenada por la despolarización de los canales de sodio en la membrana axoniana de una neurona para que se origine un potencial de acción. Después de esa apertura, los canales se cierran de modo

espontaneo (inactivación). Se piensa que esta inactivación da origen a un periodo refractario durante el cual es imposible inducir otro potencial. Luego de este lapso los canales de sodio quedan de nuevo preparados para participar en otro potencial de acción. La disminución de la velocidad de recuperación limitaría la capacidad de una neurona para activarse a frecuencias altas, efecto que tal vez sea la base de la acción de fármacos tales como carbamazepina, lamotrigina, fenitoína, topiramato, ácido valproico y zonisamida (Fig. 10) [29]. En cuanto al sitio de acción de este tipo de anticonvulsivos, se postula que se encuentra en el lado intracelular del canal.

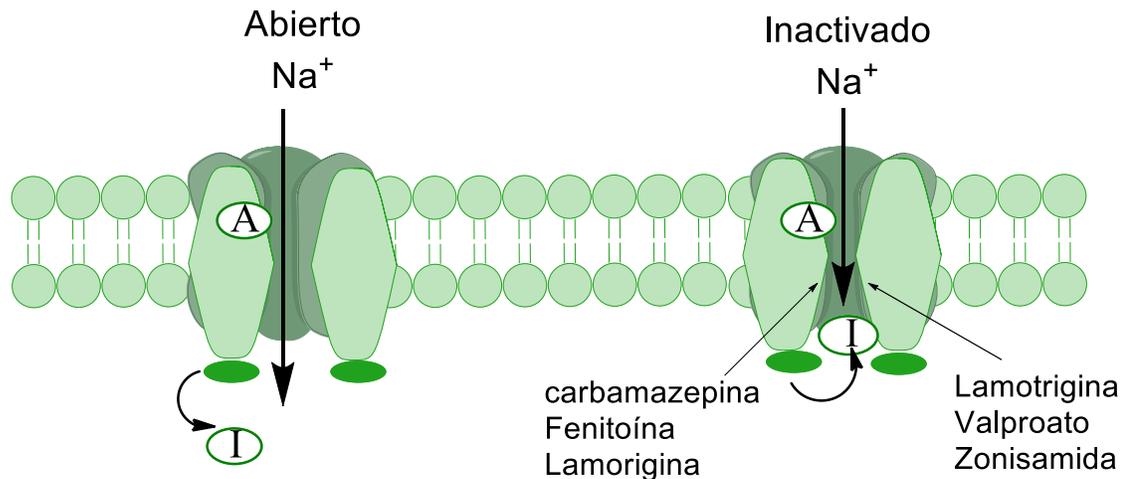


Figura 10. Inactivación del canal de sodio inducido por el anticonvulsivo, cuya función es reducir la capacidad de las neuronas para efectuar activación a altas frecuencias. A: compuerta de activación.

I: compuerta de inactivación.

• Canales de calcio.

Una propiedad intrínseca de las neuronas talámicas es una forma particular de corriente de Ca^{2+} regulada por voltaje, conocida como corriente de umbral bajo (corriente-T). El mecanismo principal por medio del cual parece actuar la mayor parte de los fármacos usados en la crisis de ausencias (etosuximida, ácido valproico, trimetadiona) es la inhibición de esta corriente-T (Fig. 11) [29].

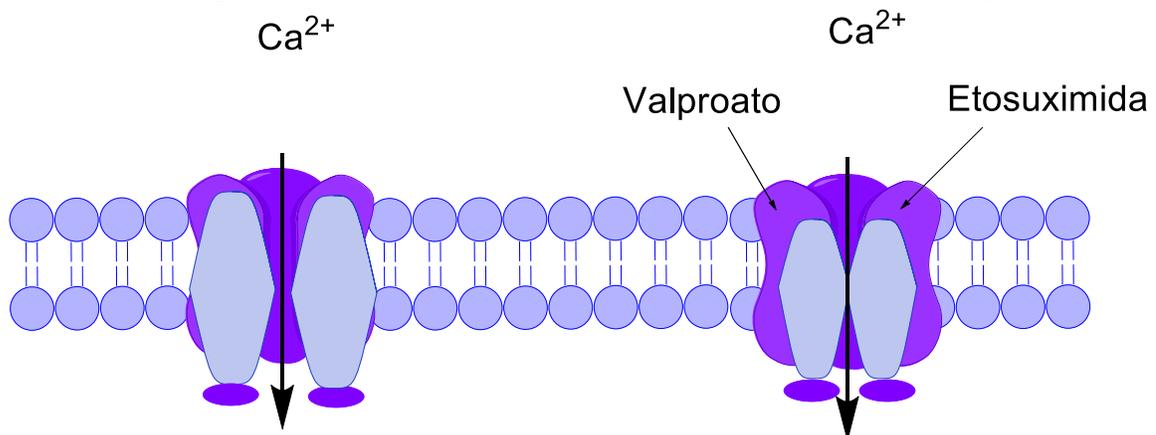


Figura 11. Reducción de la corriente por los canales de calcio del tipo T inducida por los anticonvulsivos.

• Canales de potasio.

Se cree que la activación de los canales de K^+ hiperpolarizan las neuronas y por lo tanto las inhiben. Se han desarrollado fármacos selectivos para este tipo de canales, pero no fueron exitosos debido a su incapacidad de atravesar la barrera hematoencefálica [30].

f) Mecanismos de las convulsiones mediadas por neurotransmisores.

• Neurotransmisores excitatorios.

Los aminoácidos glutamato y aspartato son considerados los principales neurotransmisores excitatorios presentes en el sistema nervioso central de los mamíferos. Los receptores de los aminoácidos excitatorios se clasifican, normalmente, en base a los agonistas³ selectivos para cada uno. De este modo se identificaron cinco subtipos de receptores, donde los tres más importantes se clasifican como receptores del *N*-metil-D-aspartato (NMDA), del ácido Q-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA) y kainato [31]. Cada uno de estos tres subtipos son canales iónicos regulados por ligando y probablemente están acoplados a un canal catiónico que se abre en respuesta a la unión de agonistas, lo cual despolariza a la célula. Sin embargo, el complejo receptor-canal NMDA posee un conjunto de características únicas que lo distinguen de los otros subtipos. Este receptor consta de un sitio de unión de glutamato y uno para el co-agonista glicina, debiendo estar ambos sitios ocupados para que se produzca la apertura del canal. De este modo se permite el pasaje de Ca^{2+} y Na^+ hacia el interior de la célula y de K^+ hacia el exterior. Los antagonistas⁴ del receptor NMDA, tanto el competitivo como el no-competitivo, han demostrado ser efectivos como anticonvulsionantes en varias pruebas con animales. Los fármacos antiepilépticos como la fenitoína, la carbamazepina y el ácido valproico bloquean en cierta medida las respuestas mediadas por el NMDA [32]. En la práctica, se han desarrollado antagonistas de este receptor con el objetivo de encontrar nuevos fármacos antiepilépticos, los cuales no ha resultado tan exitosos como se esperaba, debido a los efectos secundarios que presentan sobre los pacientes.

• Procesos de inhibición sináptica.

El ácido *gamma*-aminobutírico (*GABA* por las siglas en inglés de *gamma-amino-butiric acid*) es el principal neurotransmisor inhibitorio, el cual se forma en el cerebro por descarboxilación del glutamato. El incremento de la inhibición sináptica mediada por el *GABA* reduce la excitabilidad neuronal y eleva el umbral convulsivo [33]. Se supone entonces que los diversos fármacos bloquean las convulsiones al regular la inhibición sináptica mediada por *GABA* a través de una actividad en distintos sitios de la sinapsis. Compuestos como barbitúricos, benzodiazepinas y el ácido valproico parecen mostrar este mecanismo de acción [34].

El *GABA* actúa mediante sitios en receptores postsinápticos, los cuales regulan los canales cloruro de membrana. El principal receptor denominado *GABA-A* inhibe a la célula postsináptica mediante un incremento en el flujo de iones Cl^- hacia el interior de la célula.

Las benzodiazepinas y los barbitúricos pueden intensificar esta inhibición [29]. Ese mecanismo tal vez sea la base de la eficacia de estos compuestos contra convulsiones parciales y tónico-clónicas (Fig. 12).

³ Nos referimos con el término agonista a una sustancia que es capaz de unirse a un receptor celular y provocar una acción determinada en una célula, dicha acción es generalmente similar a la producida por una sustancia fisiológica.

⁴ Un antagonista de receptor es un tipo de sustancia llamada ligando de receptor o, en otras palabras un fármaco que bloquea o detiene respuestas mediadas por agonistas en lugar de provocar una respuesta biológica en sí, tras su unión a un receptor celular.

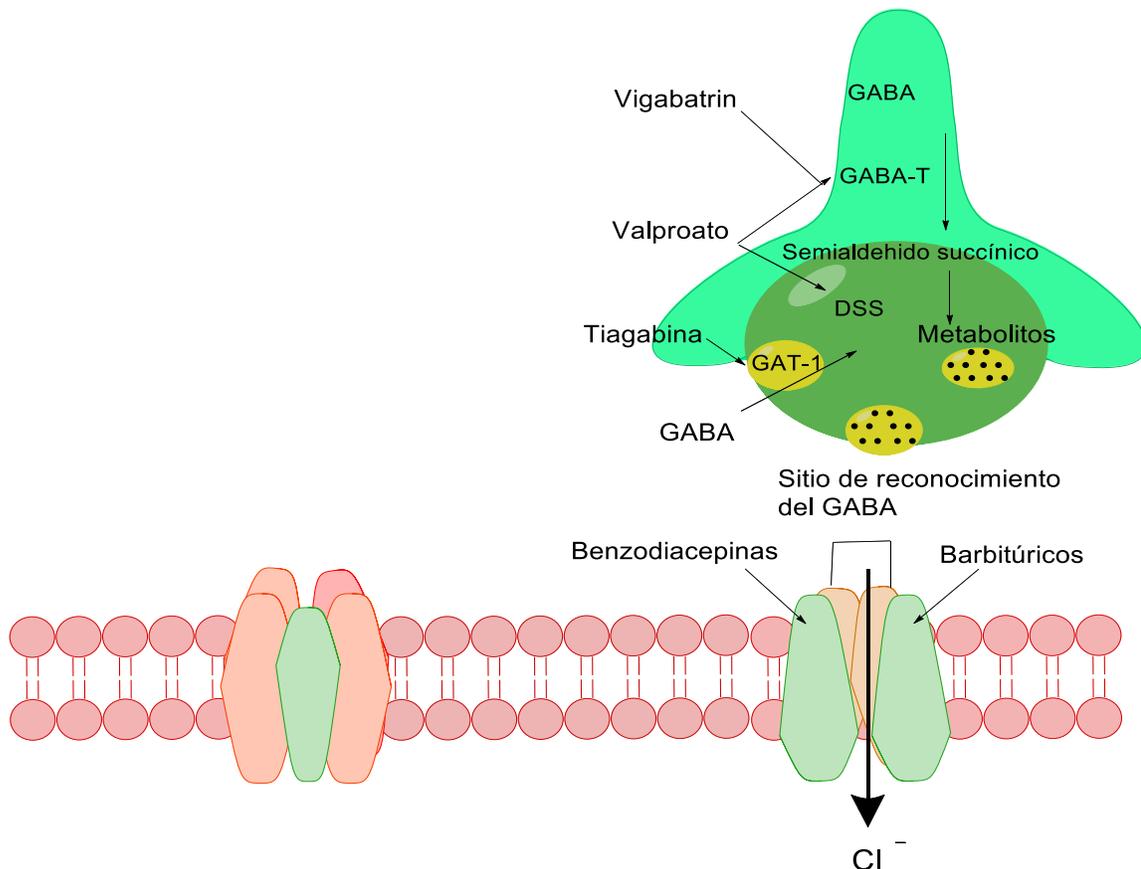


Figura 12. Transmisión sináptica incrementada del GABA. En presencia del GABA el receptor GABA-A (estructura del lado izquierdo) se abre, lo cual permite la entrada de Cl^- . Algunos fármacos antiepilépticos actúan mediante la reducción del metabolismo del GABA, otros a nivel del receptor GABA-A. GABA-T: GABA-transaminasa, GAT-1: transportador de GABA, DSS: deshidrogenasa succínica de semialdehído.

g) Consecuencias sociales.

Conseguir un trabajo estable es uno de los mayores problemas para las personas con epilepsia, pues experimentan restricciones como las relacionadas con manejar o trabajar con maquinaria y equipos en situaciones donde puedan ser responsables de daños a ellos mismos o a terceras personas. Adicionalmente, a menudo las personas con epilepsia son víctimas de la ignorancia y estigmatización, especialmente en países donde esta enfermedad tiene una connotación cultural negativa [35]. El riesgo de muerte de una persona con epilepsia es mayor comparado con el riesgo para la población general. Esto genera una preocupación muy grande de los pacientes y médicos, y es deseable una temprana identificación de pacientes con este riesgo, para poder llevar a cabo estrategias preventivas. La epilepsia no es una condición uniforme, y la probabilidad de mortalidad depende muchas veces de la etiología. La mortalidad puede dividirse en: muertes atribuibles propiamente a la enfermedad, muertes debido a la patología responsable de la epilepsia (incluyendo neoplasia, enfermedades cerebrovascular, neumonía) y muertes sin condición relacionada [33].

v) Bioensayos de medicamentos o fármacos.

Los ensayos biológicos se han desarrollado a lo largo de la historia con el propósito de estudiar aquellas sustancias de origen animal, vegetal o sintético, que pueden ser utilizadas con el fin de mejorar la salud. Adicionalmente, son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes fisicoquímicos sobre el “organismos de prueba” y bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos se pueden evaluar por la reacción de los organismos, tales como muerte,

crecimiento, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos y pueden manifestarse a diferentes niveles, por lo tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo o sobre una comunidad biótica y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo.

El “potencial nocivo” de una sustancia tóxica puede ser contrarrestado por el sistema biológico a través de diferentes estrategias, tales como reacciones metabólicas de detoxificación o excreción, entre otros, por lo tanto, la “toxicidad aparente”, evaluada en un ensayo biológico, es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico. Además, se debe considerar que el efecto tóxico sobre los sistemas biológicos es ejercido por la acción combinada de todas las sustancias nocivas presentes en el medio, incluso aquellas que no son tóxicas en sí, pero que afectan las propiedades fisicoquímicas del sistema y, consecuentemente, las condiciones de vida de los organismos.

Se han creado modelos específicos y efectivos de bioensayos los cuales han permitido que se desarrollen diversos compuestos con fines muy bien definidos, tal es el caso de las vacunas contra diversas enfermedades, desarrollo de compuestos con fines agrícolas tales como insecticidas, herbicidas, garrapaticidas, entre otros.

La implementación de ensayos biológicos es importante, no solo para probar la efectividad o deficiencia de algún compuesto de interés, sino también los posibles efectos secundarios que podrían ocasionar consecuencias irremediables al individuo o al grupo de individuos a los cuales se les está suministrando.

Se puede decir que los ensayos biológicos son herramientas de determinación y análisis de la toxicidad de un agente químico, capacidad que es medida a través de las respuestas generadas en los organismos o sistemas vivos, obteniendo una relación dosis/respuesta. El efecto se puede evaluar a diferentes niveles: subcelular, enzimático, morfológico, fisiológico, histológico, poblacional o de la comunidad, y puede clasificarse en: cuantal (cantidad de organismos afectados) o gradual (grado de alteración) [36].

Aunque las condiciones bajo las que se realizan los bioensayos son específicas y controladas, dada la complejidad del medio ambiente, no se puede reproducir con exactitud la variedad de factores que intervienen en la toxicidad de un agente liberado al ambiente, además, las especies utilizadas para los ensayos son modelos de estudio que representan ciertas funciones dentro del ecosistema, más no a la biocenosis en conjunto, por tanto los bioensayos se pueden solamente considerar como una referencia [37].

a) Ensayos de toxicidad aguda.

Los ensayos de toxicidad aguda son pruebas que se realizan en un periodo corto de entre 24 horas y 48 horas, sin embargo, este periodo puede variar dependiendo de la especie evaluada, ya que para un vertebrado 72 horas de evaluación es un tiempo mucho menor que el de su ciclo de vida normal, a diferencia de organismos como bacterias o protozoarios, quienes pueden completar su ciclo de vida o reproducirse en menos de 24 horas [37].

b) Ensayos de toxicidad crónica.

Los ensayos de toxicidad crónica son pruebas que se realizan durante un periodo largo en animales de entre 6 meses y 12 meses, cuando la exposición es considerada continua o repetida. Este tipo de bioensayo se lleva a cabo principalmente para determinar la dosis máxima, que no presenta efectos tóxicos fuertes a exposiciones constantes y permite conocer los mecanismos de toxicidad acumulativos mejorando, los ensayos de toxicidad aguda estudiados.

Generalmente estos bioensayos abarcan los periodos de gestación para hembras y de espermatogénesis para machos, así como tiempos pertinentes para evaluar el crecimiento individual o el aumento en biomasa de las poblaciones de organismos.

c) Ensayos multi-especies.

Son pruebas que incluyen más de una especie, se realizan con el fin de evaluar las alteraciones producidas por interacciones entre organismos y por la influencia del medioambiente. Acorde a la cantidad de variables incluidas dentro del ensayo, estos se pueden clasificar en:

- Microcosmos: incluye un número reducido de especies, y usualmente mide interacciones predador/presa o de competencia, y se instala en condiciones de laboratorio.
- Mesocosmos: evalúa una mayor cantidad de especies y por ende interacciones más complejas, como cadenas tróficas, por lo general se instala en condiciones externas, es decir, incluye variaciones climáticas.
- Estudios en campo: pueden ser experimentales u observacionales, incluye todos los niveles de organización biológica y la totalidad de variables temporales, climáticas y espaciales que conforman los ecosistemas, características que hacen que este nivel de estudio sea difícil, costoso y controversial si se hace a nivel experimental, pero que al mismo tiempo lo constituye en la evaluación más exacta de los efectos generados por un agente en el ambiente.

vi) Evaluación biológica.

A lo largo de la historia, se han presentado diversos casos en los cuales proyectos de nuevos fármacos presentaron fallas en las pruebas con humanos, que pueden llevar a retirar dicho medicamento del mercado, a pesar de haber sido aprobado por los órganos de control para su comercialización. Los estudios preclínicos en animales tienen por objeto demostrar la eficacia y seguridad de un posible fármaco, antes de su introducción en voluntarios humanos. Un caso emblemático sería el de talidomida que fue retirado del mercado al comprobar su actividad teratogénica.

Después de varios años de experimentación en monos, ratas, conejas y perras embarazadas, la compañía aseguró que el medicamento era inocuo y sin efectos secundarios, y el 1 de octubre de 1957 la compañía alemana *Chemie Grunenthal* lo comercializó como una nueva píldora para dormir con el nombre de Contergan®. Este efecto sedante se recomendó para combatir la ansiedad, náuseas y vómitos de la mujer embarazada, todo bajo el eslogan de que era “tan inocuo como un caramelo”, por este motivo se vendía sin receta y su uso se extendió rápidamente por Europa, África, América, Australia y Canadá. La talidomida se distribuyó en 50 países con 80 nombres comerciales y a finales de la década de 1950 era el tercer fármaco más vendido del mundo.



Figura 13. Estatua de Alison Lapper (embarazada de ocho meses) ubicada en Trafalgar Square (Londres, UK.), obra del escultor Marc Quinn, 2004. Esta estatua simboliza las consecuencias de la talidomida en el desarrollo de las extremidades superiores e inferiores y el coraje de los pacientes afectado como la joven madre británica Alison Lapper.

No fue sino hasta el 26 de noviembre de 1961 que la compañía retiró oficialmente el fármaco del mercado alemán, en Inglaterra se hizo en diciembre del mismo año, en Canadá en marzo de 1962 y en España en enero de 1963, luego de que se contabilizaran multitud de casos de niños afectados. El problema de la talidomida cambió los paradigmas en la investigación y desarrollo de bioensayos, especialmente sobre la evaluación biológica de medicamentos

En la evaluación biológica los modelos evalúan la actividad y toxicidad de nuevos candidatos, lo que permite descartarlos rápidamente si no manifiestan los efectos deseados. Además, proveen información inicial sobre la farmacocinética del compuesto y el posible mecanismo por el cual actúan. Inevitablemente, cualquier compuesto exitosamente identificado en la etapa preclínica debe ser sometido a la evaluación en humanos. Es por ello que se espera que los experimentos en animales tengan una gran capacidad predictiva respecto a la eficacia y seguridad del fármaco en la etapa clínica. Todo proyecto de diseño de fármaco, para ser efectivo en sus resultados debe tener un modelo o test de evaluación farmacológica que cumpla con las siguientes características:

- Tiempo de realización de la evaluación número de compuestos testeado: debe poder evaluar el mayor número de compuestos en el menor tiempo posible.
- Capacidad de diferenciar los compuestos activos de aquellos que no lo son: debe diferenciar sin duda cuales compuestos deben seguir en las etapas posteriores de evaluación, de aquellos que deben ser descartados.
- Correlación no correspondencia entre las evaluaciones en animales y humanos: el modelo, si bien debe ser simple, en su evaluación debe tratar de aproximarse lo más posible a la patología en estudio.

a) Desarrollo de modelos anticonvulsivos en animales.

La generación de convulsiones en animales para estudiar la actividad anticonvulsiva y la potencia de compuestos antiepilépticos fue reportada por primera vez en 1882. El experimento utilizaba un estímulo farádico administrado de forma directa en el colmillo de un perro hasta que llegaba a la corteza cerebral y fue utilizado para estudiar los efectos protectores del bromuro de potasio, de la atropina y la planta de Cinchona. Las técnicas experimentales apenas fueron utilizadas en investigaciones en gran escala a partir de los trabajos de Merritt y Putnam [38] hacia finales de la década de 1930. El modelo experimental de inducir convulsiones fue propuesto inicialmente por Merritt y Putnam consistía en producir descargas eléctricas, en gatos. El éxito de esta técnica creó interés en

desarrollar modelos animales más simples y menos costosos que requieran menor cantidad del compuesto a evaluar.

En el año 1945 se reportaron una variedad de ensayos en ratones orientados a determinar el umbral convulsivo por electroshock. Durante el desarrollo de estos ensayos fueron identificados un número de factores filogenéticos y ontogenéticos que están implicados en la producción de la convulsión y en la protección. Las comparaciones de la respuesta entre la rata y el ratón a los compuestos antiepilépticos no mostraron diferencias cualitativas, aunque se conoce que entre diversas especies de ratones ocurren diferencias cuantitativas e incluso cualitativas. Una de estas causas se encontró durante los distintos estados de maduración del animal, donde se producen llamativos cambios en la susceptibilidad a la convulsión y la respuesta a los fármacos. Por lo tanto la elección del animal y su etapa de desarrollo son importantes en los ensayos a realizar. El pentilentetrazol (PTZ) fue introducido para los ensayos de evaluación de anticonvulsivos en 1944 por Richards y Everett [39], cuando demostraron la capacidad de la trimetadiona de prevenir las convulsiones provocadas por este convulsivante químico. Una variedad de otros compuestos químicos (picrotoxina, metionina, entre otros) fueron empleados, pero ninguno de ellos fue extensamente utilizado o fue tan efectivo como el PTZ.

Otra modificación del ensayo de umbral anticonvulsivo por electroshock, fue el ensayo de baja frecuencia o “psicomotor”. La semejanza de la reacción producida con las convulsiones parciales complejas y la inhibición de esta por la fenacemida, un fármaco particularmente eficaz contra este tipo de convulsión, apoyaron inicialmente su reputación como un modelo selectivo de investigación. Pero en 1953, Brown *et al.* [40] investigaron la diferencia entre el ensayo psicomotor y el ensayo del umbral mínimo de electroshock utilizando ocho fármacos de uso clínico, encontrando que las medidas de los dos ensayos eran cualitativamente equivalentes y las clasificaciones de los fármacos eran similares. No pudieron encontrar ninguna correlación entre los resultados del ensayo psicomotor y la eficacia en convulsiones psicomotoras y se concluyó que no había fundamentos para el uso de este ensayo como prueba específica. Así se ponía de manifiesto que ninguno de los ensayos disponibles era capaz de la identificación de todos los fármacos conocidos clínicamente efectivos. Los investigadores comenzaron a construir perfiles de acción de los compuestos basados en grupos de modelos de convulsiones. Estos modelos incluyeron generalmente el ensayo de electroshock máximo, el ensayo de pentilentetrazol, y al menos uno de los siguientes ensayos: el umbral de electroshock de 60 Hz o el ensayo de convulsión por electroshock de baja frecuencia. La composición de este grupo de ensayos, muestra el conocimiento que se dispone para conocer que la modificación en el patrón de convulsiones máximas y la elevación del umbral convulsivo representaban dos mecanismos fisiológicos diferentes.

Jenney *et al.* [41], a través de un estudio de los ensayos MES (*maximal electroshock seizure test*) y PTZ demostraron que la actividad antipentilentetrazol correlacionaba bien con la eficacia clínica de las crisis de ausencia y la actividad anti-MES correlaciona con la eficacia clínica en las convulsiones generalizadas y parciales. Everett y Richards [42] demostraron que las convulsiones inducidas por PTZ pueden ser bloqueadas con trimetadiona (TMO) y fenobarbital (PB) pero no por fenitoína. Posteriormente Lennox demostró que TMO fue efectivo en disminuir o prevenir las crisis de ausencia pero fue inefectivo o empeoró las convulsiones generalizadas tónico-clónicas. El éxito del TMO en clínica y su habilidad para bloquear el umbral de las convulsiones inducidas por PTZ suministraron la correlación necesaria para establecer el ensayo PTZ como un modelo de crisis de ausencia.

En los modelos de epilepsia crónica se promueve que los animales manifiesten los ataques epilépticos en forma espontánea, o que sean más susceptibles al mismo. Los modelos genéticos, junto con los experimentos de encendido de amígdala, son los más precisos a la hora de definir un perfil preclínico. El mérito del trabajo con modelos de epilepsia crónica para la identificación de nuevos compuestos se ilustra usualmente con el descubrimiento del levetiracetam, fármaco recientemente incorporado al mercado. Este compuesto es inactivo en MES y PTZ pero es muy activo cuando se testea frente a modelos genéticos o de encendido de amígdala. La eficacia de este compuesto parece deberse a que

actúa por un nuevo mecanismo de acción, dado que muestra un comportamiento electrofisiológico atípico relativo a los otros fármacos conocidos.

El proceso de “evaluación en masa”, desarrollado por Goodman et al. [43], quienes emprendieron extensivos estudios sobre la “terapia y fisiología de desórdenes convulsivos experimentales” permitieron que los modelos de convulsiones inducidas por MES y PTZ, fueran considerados en la década de 1970 como los únicos modelos necesarios para la evaluación de fármacos anticonvulsivos, ya que sus efectos se correlacionaban con todos los aspectos de la epilepsia clínica, y miles de compuestos fueron evaluados utilizando estos modelos. El programa de búsqueda de fármacos antiepilépticos del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH por sus siglas en inglés) fue la culminación de este desarrollo. Entre 1975 y 1995 el programa del NIH evaluó 16.000 compuestos utilizando el ensayo MES y también el ensayo PTZ. De estos 16.000 compuestos, 2.700 mostraron tener acción anticonvulsiva, 130 fueron evaluados en estudios más avanzados, 11 entraron en pruebas clínicas, 6 han sido presentados para su aprobación y solo uno ha sido lanzado al mercado: el felbamato®. Se estima que para estas evaluaciones se llevaron a cabo más de 5 millones de experimentos en animales.

Los modelos MES, PTZ y de encendido, desempeñaron un importante papel en el desarrollo de la segunda generación de fármacos antiepilépticos introducidos desde 1993 y como tales han contribuido a mejorar el control de las crisis de los pacientes epilépticos. No obstante, ninguno de estos modelos de convulsiones reflejan necesariamente el modelo “ideal” de la epilepsia, este modelo debe reflejar una fenomenología y patofisiología similar a la epilepsia humana. Desde una perspectiva del descubrimiento de fármacos, el modelo ideal deberá proporcionar una oportunidad de determinar la eficacia contra un fenotipo de convulsiones fármacorresistentes y permitir la evaluación temprana de la habilidad de un fármaco para modificar el curso de la epilepsia que sigue a un daño epileptogénico. Desafortunadamente, es altamente improbable que cualquier modelo animal pueda predecir el potencial terapéutico completo de un fármaco antiepiléptico en desarrollo, debido a que la epilepsia humana es un desorden neurológico heterogéneo que abarca muchos fenotipos y síndromes de la convulsión. Esto hace necesaria la evaluación de los fármacos en desarrollo en varios modelos de sistemas síndrome específicos.

b) Relación cuantitativa estructura-actividad.

La química computacional es un área de la química teórica que implica el modelaje de estructuras químicas a través de computadores. Posee diversas funciones y tiene una gran importancia en la ciencias tales como: química inorgánica y orgánica, espectroscopía, bioquímica, física, ciencia de los materiales, cinética química, biología, medicina, farmacia, catálisis e ingeniería ambiental.

En los últimos años la química computacional se ha visto involucrada en algunas áreas de la ciencia, porque ha sido de gran utilidad para entender el comportamiento molecular para diferentes sistemas químicos. Un área de interés y gran importancia es el ámbito de generar nuevos fármacos más efectivos, económicos y al alcance del consumidor. En los últimos años se ha investigado arduamente la aplicación de las medidas de semejanzas cuánticas para establecer relaciones tridimensionales entre la estructura y la actividad de determinados conjuntos de moléculas, por lo tanto estudios QSAR-2D o QSAR-3D los cuales son parte de la química computacional.

El análisis REAC, también conocido en sus siglas en inglés, QSAR (Relaciones Estructura-Actividad Cuantitativas) como todo análisis QSAR es retrospectivo (conocemos el conjunto de moléculas y sus actividades) y nos da una idea cuantitativa de la variación de actividad asociada a una modificación dada. El análisis QSAR es una aproximación “in-silico” (mediante cálculos computacionales) basada en un tratamiento estadístico que relaciona, mediante algoritmos matemáticos, la actividad biológica con descriptores estructurales y/o fisicoquímicos de los ligandos. De acuerdo a los resultados de este estudio pueden deducirse aquellas propiedades o características que resultan importantes para la actividad, la información obtenida puede ser utilizada para proponer con una cierta base racional cuales

cambios estructurales pueden conducir a nuevos compuestos en donde sea posible observar un incremento de la actividad. La metodología QSAR da como resultado una ecuación matemática que relaciona cuantitativamente parámetros estructurales con la actividad biológica, asignada a la molécula como un todo.

En el 2000 Ernesto Estrada y Alfredo Peña [44] estudiaron “*in silico*” la relación cuantitativa estructura-actividad de diversos compuestos anticonvulsivantes ya conocidos, estos fueron utilizados para el diseño de nuevos fármacos anticonvulsivos que sintetizaron y caracterizaron posteriormente.

En el 2001 Laszlo Tarko y Ovidiu Ivanciuc [45], modelando diversas moléculas de fenilacetanilida mono-sustituidas (Fig. 14) estudiaron la actividad anticonvulsivante de dichos compuestos mediante la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR)

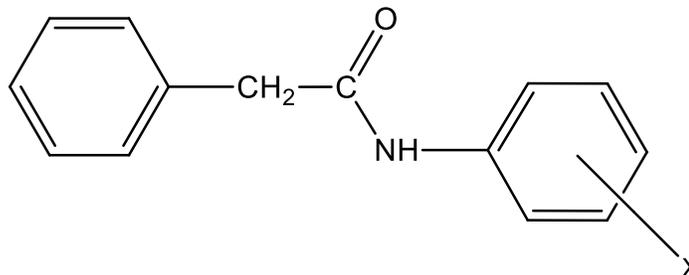


Figura 14. Estructura de la fenilacetanilida monosustituida.

En el 2003 Jeffrey J. Sutherland y Donald F. Weaver [46] estudiaron 287 compuestos análogos a las hidantoínas con actividad anticonvulsivante mediante el análisis QSAR, desarrollando modelos simples que podrían ser utilizados para estimar la actividad de los compuestos de manera rápida y fiable.

En el año 2007 Luciana Gavernet *et ál*, [47] diseñaron a través del análisis por QSAR nuevos compuestos sulfamidados con actividad anticonvulsivante.

vii) Bioética.

El término bioética fue introducido en 1970 por Van Rensselaer Potter, apuntando a los problemas que el nuevo desarrollo de la tecnología plantea a un mundo en plena crisis de valores, necesitando superar la actual ruptura entre la ciencia y la tecnología por una parte y las humanidades de otra. Ésta ruptura hunde sus raíces en la asimetría existente entre el enorme desarrollo tecnológico actual, que otorga al hombre el poder de manipular la intimidad del ser humano y alterar el medio, y la ausencia de un aumento correlativo en su sentido de responsabilidad por el que habría de obligarse a sí mismo a orientar este nuevo poder en beneficio del propio hombre y de su entorno natural.

La bioética surge por tanto como un intento de establecer un puente entre ciencia experimental y humanidades [48]. De ella se espera una formulación de principios que permita afrontar con responsabilidad las posibilidades enormes, impensables hace solo unos años, que hoy nos ofrece la tecnología. En tal sentido, podemos distinguir tres etapas: la bioética clínica, la bioética global y la bioética profunda. Todas ellas importantes y relacionadas entre sí.

La bioética que imaginaba Potter tiene una visión globalizadora de los problemas de la vida, que involucra la ecología y todo lo referente al medio ambiente, Potter llegó a la convicción de que la biología podría ser la clave para acercarnos a las ciencias humanas y, a partir de ella, construir una relación necesaria para asegurar la supervivencia y la calidad de vida en el futuro. La bioética surge como una nueva sabiduría necesaria para aprender a utilizar el pensamiento humano [49].

Se han dado muchas definiciones para la Bioética: por ejemplo, la *Encyclopedia of Bioethics* [50] la define como “el estudio sistemático de la conducta humana en el ámbito de las ciencias de la vida y del cuidado de la salud, en cuanto que esta conducta es examinada a la luz de los valores y principios morales”. Por su parte, Abel (2001) definía la Bioética como “el estudio interdisciplinar (transdisciplinar) orientado a la toma de decisiones éticas de los problemas planteados a los diferentes sistemas éticos por los progresos médicos y biológicos, en el ámbito micro-social y macro-social, micro y macroeconómico, y su repercusión en la sociedad y su sistema de valores, tanto en el momento presente como en el futuro”.

Ética de la experimentación animal.

Actualmente, las consideraciones éticas respecto a los animales se sostienen en diferentes principios morales:

i) Principios éticos basados en el agente de la acción, los cuales rechazan la consideración moral de los animales y que proceden de fuentes distintas, pero muy influyentes en nuestra cultura: desde la moral judeo-cristiana y parte del pensamiento filosófico occidental hasta determinadas corrientes científicas.

La ética contractualista considera a los seres humanos como sujetos de consideración moral. Desde este punto de vista, sólo necesitamos tratar a los animales lo suficientemente bien como para que sirvan a nuestros propósitos lo mejor posible, aunque estos propósitos puedan ser altruistas y loables. En contra de lo que mucha gente cree, la postura ecologista, que defiende el respeto a la biodiversidad y a la naturaleza viva, se enmarca dentro de estos principios éticos.

ii) Principios éticos basados en la consideración moral de los animales. Para la ética utilitarista, la moralidad nos obliga a limitar la consecución de nuestros intereses al respeto a los intereses de los demás, obligándonos a no infligir daño o sufrimiento. Si este principio moral se acepta, no hay ningún argumento para postular el respeto moral (la consideración moral) a todos los seres humanos que no se aplique también a aquellos animales capaces de sufrir. Las tendencias actuales en la ética, basadas en la no discriminación por razones de pertenencia a un grupo, obligan a que la consideración moral del sufrimiento (el deber moral de no infligir sufrimiento) se aplique por igual a todos los seres vivos capaces de sufrir, basándose únicamente en esta capacidad y no en criterios de pertenencia a un grupo étnico, sexo o especie.

Ahora bien, si se demuestra que algunos animales pueden sufrir (en un sentido similar al nuestro, es decir, siendo de algún modo conscientes de ese sufrimiento), se nos plantea un auténtico conflicto de intereses que no se puede eludir. Desde el punto de vista ético, deberíamos dar respuesta a las diferentes preguntas que surgen de dicho conflicto:

- ¿Qué especies o individuos deben tener mayor consideración y por qué?
- ¿Qué tipo de sufrimiento deberíamos permitir, hasta qué punto y bajo qué circunstancias?

Se ha respaldado como principio ético básico, que se podría establecer preferencias en la consideración de los intereses encontrados entre grupos o especies distintas, siempre que la preferencia se base en criterios justos de evaluación del sufrimiento, siendo la capacidad de sufrir de los individuos, la base sobre la que se establezca nuestro rango de consideración moral y/o la preferencia por un individuo, grupo o especie. Para responder al segundo punto, hay que tener en cuenta el tipo de interacción hombre-animal causante de sufrimiento: la investigación, educación y conservación (zoológicos, centros de recuperación y animales de experimentación), la alimentación y el vestido (ganadería y caza), el ocio (caza deportiva y fiestas tradicionales con uso de animales), el comercio de mascotas y el control de plagas. Los problemas éticos que se plantean en cada uno de estos casos son distintos, pero todos ellos tienen que ver con el mantenimiento en cautividad, el sacrificio de animales sanos y el dolor o sufrimiento deliberadamente provocado.

Hay que distinguir entre la ganadería y el mantenimiento en cautividad de animales de vida libre. Los animales domésticos, tras miles de años de selección artificial, se habían adaptado a las condiciones de vida impuestas por el hombre. Si en estas condiciones, se garantiza que los animales serán tratados y atendidos debidamente, su mantenimiento en cautividad no supone un problema de carácter ético. Sin embargo, la aparición de la ganadería, con el mantenimiento de los animales en unas condiciones de sobre-explotación para el que no están adaptados, y una fuente constante de situaciones dolorosas, está siendo objeto de un intenso debate social de carácter ético.

En cuanto a los animales no adaptados a la cautividad y al manejo humano, el problema deriva del hecho de no tener en cuenta que los animales pueden percibir las condiciones artificiales impuestas por el hombre como dañinas para su supervivencia. El sacrificio de animales sanos. Desde el punto de vista moral, es posible distinguir entre la muerte física de los animales y el sufrimiento infligido mientras están vivos, entre la ética del dolor y la ética de la muerte. Así, mientras provocar dolor es siempre un mal moral, el provocar la muerte puede llegar incluso a ser un acto de piedad. Esta argumentación se basa en mantener la compasión ante el sufrimiento ajeno como base de la moral. Lo importante es conservar a los animales en unas condiciones que garanticen su bienestar, no infringirles sufrimientos innecesarios y asegurar un sacrificio indoloro. El dilema moral que se plantea a este respecto es el origen entre el daño deliberado causado a animales sensibles, como mal moral y el beneficio obtenido de ese daño, como bien moral: ya sea el aumento del conocimiento y las aplicaciones prácticas de la investigación, dirigidas en muchos casos a evitar el dolor y el sufrimiento al hombre y otros animales, o los recursos obtenidos con su explotación. El debate ético no ha concluido, y podemos encontrar en la actualidad diferentes posturas, desde las claramente abolicionistas, hasta los que consideran válido cualquier uso de animales en beneficio humano.

La ciencia de animales de laboratorio fue creada para ayudar a la comunidad científica a mejorar todos los aspectos concernientes a la experimentación animal. En el año 1959, los científicos ingleses WM Russell y RL Burch establecieron que la excelencia científica y el uso humanitario de los animales de laboratorio estaban fuertemente ligadas [51], y describieron por primera vez el lema de las tres erres (**3 R's**) en el uso de animales de experimentación: reducción, refinamiento y remplazo. El refinamiento involucra la normalización según parámetros internacionales, la definición genética (animales definidos) y la calidad del ambiente donde son criados antes y durante la experimentación, los progresos en el refinamiento de los experimentos llevaran a cabo, por si solos, a la reducción del número de animales utilizados. La búsqueda de métodos alternativos que reemplacen los animales en la experimentación es una responsabilidad y debería ser una inquietud de todos los investigadores. Existen diversos estudios que pueden remplazar el uso del animal de laboratorio tales como: estudios epistemológicos, estadísticos, cultivos celulares y modelos de computación (programas de simulación). Sin embargo, el uso de los animales de experimentación, actualmente es imprescindible en la investigación de nuevos medicamentos y técnicas terapéuticas antes de su aplicación tanto en la vida humana como veterinaria. Muchos efectos farmacodinámicos son análogos en el animal y en el hombre, por ello, los estudios en animales ofrecen una utilidad relativamente grande como medio de predicción de estos efectos.

3. Antecedentes.

Sobre la base de la estructura de la familia de los compuestos de la familia de las hidantoínas, se encontró una similitud con la estructura de compuestos derivados del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico, sintetizado por primera vez por Bordas et *ál.* [5] en 1968. Estos compuestos han servido de punto de partida para algunos grupos de investigación que han sintetizado familias de compuestos a partir de la reacción de la ciclopentanona con disulfuro de carbono en medio de hidróxido de amonio concentrado (29 %). En tal sentido, se han sintetizado compuestos por medio de reacciones de *N*-alquilación y de tioesterificación, muchas de las cuales han sido reportadas por Contreras et al. [6,7,8,9,10,11]. Por otro lado, se han tomado en cuenta para este proyecto de investigación los diversos modelos de bioensayos desarrollados en ratones a fin de estudiar el estatus epiléptico en la prueba de nuevos profármacos. En la Tabla 4 se pueden apreciar algunos de los estudios más resaltantes a tomar en cuenta como antecedentes de esta investigación.

Tabla 4. Antecedentes en la síntesis del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico.

Autor	Título del trabajo	Referencia
Bordás et <i>ál.</i>	Synthesis and Antifungal Properties of Dithiocarboxylic Acid Derivatives. Novel Preparation of 2-Alkylamino-1-cyclopentene-1-dithiocarboxylic Acids and Some of Their Derivatives	[5]
Contreras et <i>al.</i>	Synthesis of benzyl-N,N'-alkylbis-(2-amino-1-ciclopentencarbodithioate) derived from cyclopentanone.	[10]
Contreras et <i>al.</i>	Una nueva generación de fármacos a base de compuestos organometálicos.	[52]
López-Meraz et <i>ál.</i>	Inducción de status epilépticos durante las fases de luz/oscuridad del día y efecto sobre la muerte neuronal en el hipocampo en la rata en desarrollo	[57]
Medel-Matus et <i>ál.</i>	El status epilépticos no modifica la memoria de trabajo en ratas de 21 días de edad: un estudio preliminar	[22]
Zavala-Tecuapetla et <i>ál.</i>	Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo	[58]
Torres et <i>ál.</i>	Fisiología del estatus epiléptico	[59]

4. Justificación.

El estudio de nuevos fármacos constituye una importante línea de investigación en el campo de la síntesis orgánica e inorgánica. Laboratorios de instituciones públicas y privadas invierten cantidad importantes de recursos en la formación de personal, y la adquisición de equipos dirigidos a desarrollar nuevas rutas de síntesis [53], de compuestos que tenga actividad farmacológica. En tal sentido, vemos con mucho el adelanto de investigación en química farmacéutica [54], como una alternativa para no solo desarrollar nuevas sustancias químicas con propiedades farmacéuticas, sino que permita comprender mejor la forma como actúan frente a las “dianas” u objetivos de acción para cumplir con su acción medicamentosa.

Los proligandos nitrógeno-sulfurados han sido objeto de diversos tipos de estudios, desde la década de 1970 y se ha venido desarrollando una línea de investigación asociada a este tipo de compuestos, los cuales han mostrado una gran actividad biológica, presentando propiedades antifúngicas y anticancerígenas [5, 14].

El propósito de esta investigación es aprovechar la variedad de proligandos que han venido siendo desarrollados en el Laboratorio de Organometálicos del Departamento de Química, Facultad de

Ciencias de la Universidad de Los Andes, y su experiencia en el diseño y síntesis de prolifandos nitrógeno-sulfurados, a fin de plantear un esquema de estudio con miras a determinar su actividad anticonvulsivante en roedores *BIO: NMRI*, tomando en cuenta que la epilepsia es una enfermedad que según la Organización Mundial de la Salud, en la actualidad, afecta a unos 50 millones de personas de todo el mundo, con una proporción estimada de la población general con epilepsia activa (es decir, ataques continuos o necesidad de tratamiento) en algún momento dado oscila entre 4 y 10 por 1000 personas [16]. Adicionalmente, algunos estudios realizados en países de ingresos bajos y medianos sugieren una proporción mucho mayor, entre 7 y 14 por 1000 personas. Según estimaciones, se diagnostican anualmente unos 2,4 millones de casos de epilepsia y en los países de altos ingresos, los nuevos casos registrados cada año entre la población general oscilan entre 30 y 50 por 100 000 personas. En los países de ingresos bajos y medios esa cifra puede ser hasta dos veces más alta. Esto se debe probablemente al mayor riesgo de enfermedades endémicas tales como el paludismo o la neurocisticercosis; la mayor incidencia de traumatismos relacionados con accidentes de tránsito; traumatismos derivados del parto; y variaciones en la infraestructura médica, la disponibilidad de programas de salud preventiva y la atención accesible. Casi el 80 % de las personas epilépticas viven en países de ingresos bajos y medios.

5. Hipótesis.

Es posible que los prolifandos nitrógeno-sulfurados derivados del ácido 2-(bencilamino)ciclopent-1-enoditiocarboxílico y ácido el 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxílico, presenten actividad anticonvulsionante, debido a que poseen en su estructura química grupos funcionales similares a los encontrados en la familia de las hidantoínas, por lo que es de esperar que exista una interacción fármaco/neurorreceptor similar a las que tienen las hidantoínas en ensayos biológicos con ratones *BIO:NMRI*.

6. Objetivos.

Objetivo general.

Sintetizar y caracterizar dos profármacos pertenecientes a una familia de prolifandos nitrógeno-sulfurados, y comparar su acción y su efecto anticonvulsivante con un grupo de hidantoínas, las cuales son utilizadas para el tratamiento de trastornos neurológicos que deja una predisposición al cerebro para generar convulsiones recurrentes. Dicha actividad será determinada mediante bioensayos en ratones de laboratorio *BIO:NMRI*.

Objetivos específicos.

- Sintetizar los prolifandos ácido 2-(bencilamino)ciclopent-1-enoditiocarboxílico y ácido 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxílico.
- Caracterizar los prolifandos ácido 2-(bencilamino)ciclopent-1-enoditiocarboxílico y ácido 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxílico por medio de técnicas espectroscópicas (IR, UV-Vis y RMN ^1H y ^{13}C).
- Realizar bioensayos en ratones de laboratorio para determinar la eficiencia de estos compuestos y de los hidantoínas de referencia: 5,5-difenilhidantoina, 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina y, 5,5-difenil-2-tiohidantoina, en referencia a una posible actividad anticonvulsionante, midiendo diferentes factores tales como tiempo de respuesta a la dosis aplicada, disminución del tiempo de la convulsión, intensidad de la convulsión, entre otros, mediante bioensayos en ratones de laboratorio *BIO:NMRI*.

7. Metodología.

a) Reactivos, materiales y equipos.

Todos los reactivos y solventes fueron obtenidos de las casas comerciales *Aldrich*, *Merck*, *Riedel de Haën* y fueron utilizados sin purificación previa.

La síntesis de los ligandos se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Organometálicos del Departamento de Química el cual cuenta con los recursos, instalaciones y material necesario.

La caracterización de los productos se realizó en colaboración con el Laboratorio de Cinética y Catálisis (Msc. Marlín Villarroel) y Laboratorio de Química Inorgánica Docencia-ULA (TSU. Ivetty Zavala).

Los espectros vibracionales infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro con transformada de Fourier *Spectrum-RX1 Perkin Elmer* (en un intervalo de trabajo de 4000 cm^{-1} a 450 cm^{-1} , en pastillas de KBr) perteneciente al Laboratorio de Cinética y Catálisis. Los espectros de absorción electrónica se efectuaron en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-mini 1240* en la región ultravioleta/visible (200 nm – 500 nm,) del Laboratorio de Inorgánica de Docencia-ULA.

b) Síntesis del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico (acda)

Se mezclaron 25 mL de ciclopentanona disueltos en 100 mL de hidróxido de amonio (29 % v/v) con 28 mL de disulfuro de carbono. Luego de 15 h de reacción, en un baño de alcohol isopropílico a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y agitación constante, se obtuvo un precipitado anaranjado correspondiente a la sal de amonio del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico, que se filtró por succión y se lavó con etanol frío. Posteriormente se disolvió en agua y la solución resultante se acidificó hasta $\text{pH} = 4$, utilizando una solución de HCl 2N, y se obtuvo el respectivo ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico, como un sólido de color amarillo, se filtró y secó por succión, se lavó con agua y etanol frío.

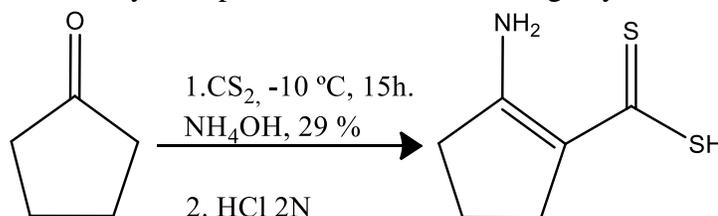


Figura 15. Reacción de síntesis del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico.

c) Síntesis de los ligandos (acda4bz y acda4bz).

La estrategia de síntesis de los ligandos parte del método de Bordas *et al.* [3] con las modificaciones desarrolladas en el Laboratorio de Organometálicos [4, 5]: Se disolvió 1,0 g del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico en 7 mL de etanol con la amina correspondiente (bencilamina para acda4bz y 2-(3,4-dimetoxifenil)etanol para acda4bz), en una relación estequiométrica 1:1 con agitación constante por 72 h a temperatura ambiente, se filtró y secó al vacío.

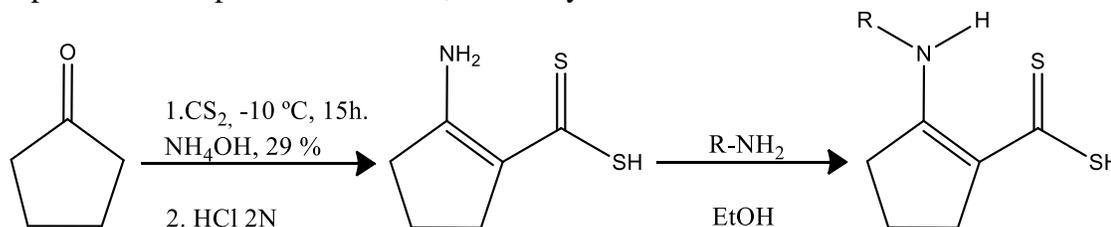


Figura 16. Esquema de síntesis de los ligandos nitrógeno-sulfurados. R = bencilamina para acda4bz y 2-(3,4-dimetoxifenil)etanol para acda4bz.

d) Bioensayos en ratones *BIO:NMRI*.

En el presente trabajo de investigación, se persigue estudiar el efecto protector en los estudios contra la epilepsia, de los distintos compuestos (acdabz, acda4bz, HTA2 Y HTA3) siendo estos comparados con uno de los fármacos comerciales más utilizados contra dicha enfermedad, como lo es la 5,5-difenilhidantoína (HTA1), mayormente conocida como fenitoína.

El ensayo biológico consistió en tomar 5 roedores de la línea *BIOU: NMRI* para cada uno de los compuestos a evaluar, a los cuales se les administró una dosis de 20 mg/Kg de cada compuesto en estudio, pasado quince (15) minutos se les aplicó una dosis única de pilocarpina, para producir la convulsión. Las observaciones experimentales se realizan a partir de estos quince (15) minutos, por espacio de 90 minutos.

El modelo experimental utilizado para inducir las convulsiones en los roedores *BIOU: NMRI* consistió en la aplicación de una sola dosis de pilocarpina previamente establecida 225 mg/Kg [56], produciendo una fase del estado epiléptico (EE), el cual es caracterizado por crisis tónico-clónicas. En este modelo experimental también se verificaron los tiempos de aparición, el tiempo de duración y las características de las convulsiones en tres ratones.

Una vez colectados los datos necesarios, los animales fueron sacrificados usando dislocación cervical, luego de pasada una semana después de la administración de los ligandos.

Es importante resaltar que el estudio de los ensayos biológicos, fue previamente analizado y aprobado por el comité de bioética del bioterio perteneciente a la Universidad de Los Andes.

e) Cálculos computacionales.

Los cálculos computacionales fueron realizados mediante el software *Wavefunction Spartan 14'* para *Microsoft Windows* y las interfaces de cálculo *MOPAC2012* y *ORCA* bajo ambiente *Linux*. Las geometrías moleculares de mínima energía fueron obtenidas para todos los casos partiendo de estructuras previamente optimizadas mediante mecánica molecular. Posteriormente fueron calculadas las propiedades espectroscópicas de interés: espectros vibracionales (mediante *Spartan 14'* y *MOPAC2012*) y espectros de absorción electrónica (*ORCA*).

Los métodos de cálculo seleccionados fueron de tipo semiempíricos: PM6 (en *Spartan 14'*), PM7 (en *MOPAC2012*) y ZINDO/S (en *ORCA*).

8. Resultados.

Tabla 5. Propiedades y características físicas de los compuestos sintetizados.

Compuesto	Color	Punto de fusión (°C)	Rendimiento (%)	Tiempo de reacción
acda	Amarillo	98-99	65	15 h
acdabz	Amarillo	130*	37	72 h
acda4bz	Amarillo	190*	68	72 h

* Descompone

Tabla 6. Solubilidad de los compuestos sintetizados.

Solvente	acdabz	acda4bz	HTA1	HTA2	HTA3
metanol	+/-	+/-	-	+	+
etanol	+/-	+/-	-	+	+
isopropanol	-	-	+	-	+/-
agua	-	-	+	-	-
diclorometano	+	+	-	-	+
cloroformo	+/-	+/-	-	-	+
acetona	+/-	+/-	-	+	+
acetato de etilo	+/-	+/-	-	+	+
éter etílico	+/-	+/-	-	+/-	+
acetonitrilo	+/-	+/-	-	-	+
<i>n</i> -hexano	+/-	+/-	-	-	-
DMSO	+/-	+	+	+	+

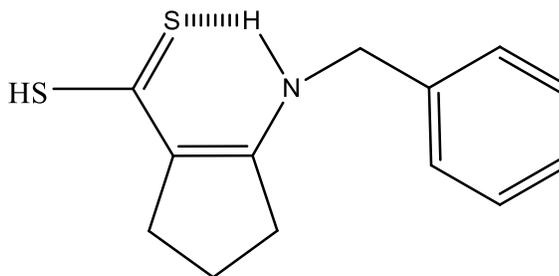
Soluble: +; parcialmente soluble: +/-; insoluble: -.

9. Caracterización.

9.1 Espectroscopia vibracional infrarroja (IR-FT).

La espectroscopia vibracional infrarroja es una técnica que permite estudiar los fenómenos de vibración en enlaces químicos, por absorción de un cuanto de radiación infrarroja, según la naturaleza molecular del analito en estudio. Por esta razón, esta técnica es utilizada para identificar la presencia de grupos funcionales y cambios de simetría tanto en moléculas orgánicas como en compuestos de coordinación e inorgánicos [60, 61].

En todos los compuestos estudiados se observaron los modos vibracionales de los grupos funcionales característicos, tales como: aminas, mercaptanos, hidrocarburos aromáticos y cetonas. En la tabla 7 se resumen los modos vibracionales característicos para la molécula de acdabz, y se establecen, de forma comparativa, cada una de las diferencias entre vibraciones experimentales y teóricas. La Fig. 18 muestra un espectro típico para el compuesto acdabz, en donde es posible identificar los estiramientos $\nu_{\text{N-H}}$ (3490 cm^{-1}), $\nu_{\text{C-H}}$ y $\nu_{\text{asC-H}}$ (3278 cm^{-1} , 3239 cm^{-1}), $\nu_{\text{S-H}}$ (2840 cm^{-1}), $\nu_{\text{C=C}}$ (1457 cm^{-1}) de los anillos aromáticos y $\nu_{\text{C=S}}$ (903 cm^{-1}), confirmándose cada uno de los grupos funcionales esperados. En los espectros de los proligandos nitrógeno sulfurados observamos bandas similares, entre las que destacan una banda alrededor de 1600 cm^{-1} perteneciente a la suma de las vibraciones de tensión C=C y C=N asociado al sistema deslocalizado del anillo ciclopentenílico (Fig. 17) reportado en la literatura [62].

**Figura 17.** Puente de hidrógeno intramolecular del ácido 2-amino-1-ciclopentenditiocarboxílico.

A partir de los espectros de infrarrojo obtenidos del cálculo computacional, se puede inferir que existen corrimientos notorios de hasta un máximo de 708 cm^{-1} en los desplazamientos al rojo, y 119 cm^{-1} en los desplazamientos al azul, respecto de las frecuencias experimentales, efecto que se atribuye a lo que se denominará a partir de este momento como “condiciones ideales” (CI). Esta condición implica que dentro del cálculo, el software supone moléculas aisladas en el vacío sin ningún tipo de interacción [63, 64]. Existen efectos de relajación en las reglas de selección del infrarrojo, así como también absorción de cuantos de radiación debidos a efectos rotacionales, y distorsiones de simetría, que repercuten directamente en la cantidad de bandas observadas, la amplitud y la intensidad. Sin embargo, existe una buena correlación entre ambos espectros calculados (Fig. 19 y Fig. 20) y la estructura fina de los tres espectros (al menos en la zona comprendida entre los 2800 cm^{-1} y 900 cm^{-1}) parece coincidir.

Un análisis similar se realizó para los otros compuestos sintetizados (acda4bz, HTA1, HTA2 y HTA3), que se reflejan en las tablas 9 a 12 y Fig. 21 a 32. En cada caso se consigue la identificación de los grupos funcionales de interés, especialmente las aminas secundarias. Estos grupos permitieron diferenciar entre cada uno de los compuestos en estudio. También fue posible observar en este grupo de compuestos, una coincidencia en la estructura fina de los espectros experimentales y los calculados, así como una tendencia del cálculo a desplazar hipsocrómicamente bandas alrededor de los 1000 cm^{-1} y batocrómicamente aquellas cercanas a los 2800 cm^{-1} . En general, y de manera cualitativa, se observó una correlación óptima en la ventana comprendida entre 1800 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} .

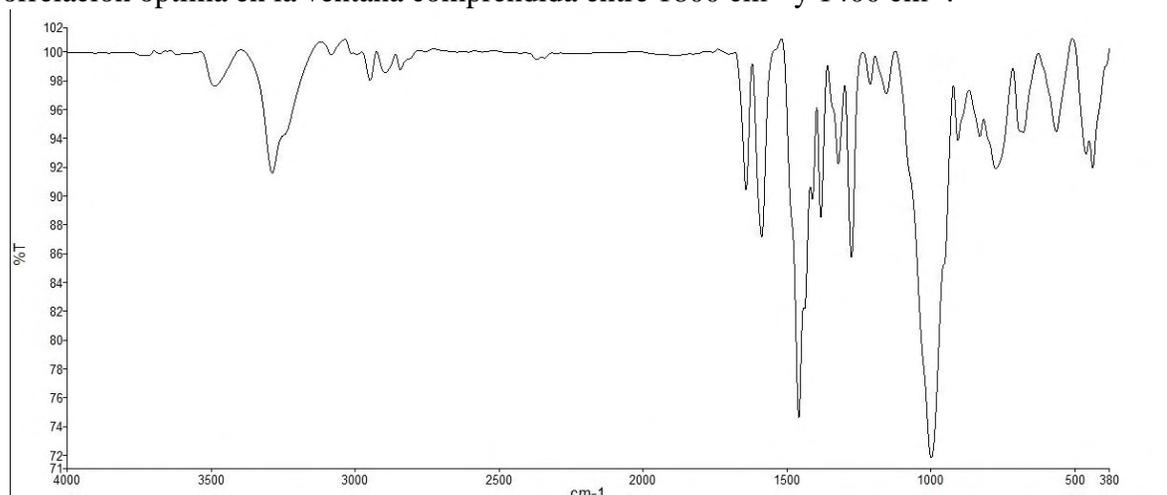


Figura 18. Espectro experimental IR-FT ($4000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$) del prolígando acdabz.

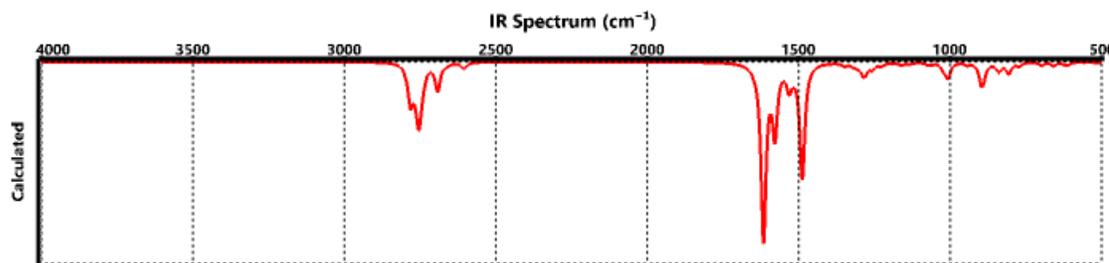


Figura 19. Espectro IR-FT ($4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) calculado a través de Spartan 14' del prolígando acdabz.

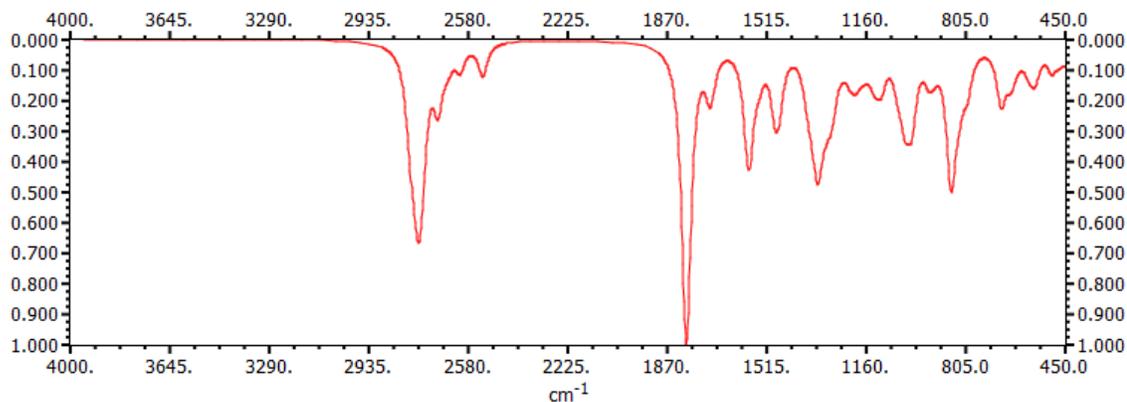


Figura 20. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de MOPAC del proligando acdabz.

Tabla 7. Asignación de las bandas en espectroscopia infrarroja del proligando acdabz.

Asignación *	Frecuencia (cm^{-1})				
	Experimental	Teórica Spartan (PM6)	$\Delta\nu$	Teórica MOPAC (PM7)	$\Delta\nu$
$\nu\text{N-H}$	3490 (<i>v</i>)	2782	708	2790	700
$\nu_s\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	3278 (<i>v</i>)	2766	512	2774	504
$\nu_{as}\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	3239 (<i>v</i>)	2745	494	2761	478
$\nu\text{S-H}$	2840 (<i>d</i>)	2691	149	2530	310
$\nu\text{C=N}+\nu\text{C=C}$	1639 (<i>d-m</i>)	1616	23	1488	151
$\nu\text{C=C}$	1589 (<i>d</i>)	1579	10	1586	3
$\omega\text{C-H}$ fuera del plano (anillo aromático)	1210 (<i>m</i>)	1285	-75	1280	-70
$\nu\text{C=S}$	995 (<i>f</i>)	1008	-13	1022	-27
$\nu\text{C-S}$	830 (<i>f</i>)	897	-67	861	-31

*Intensidad de las señales: *f*= fuerte; *m*= medio; *d*= débil; *v*= variable

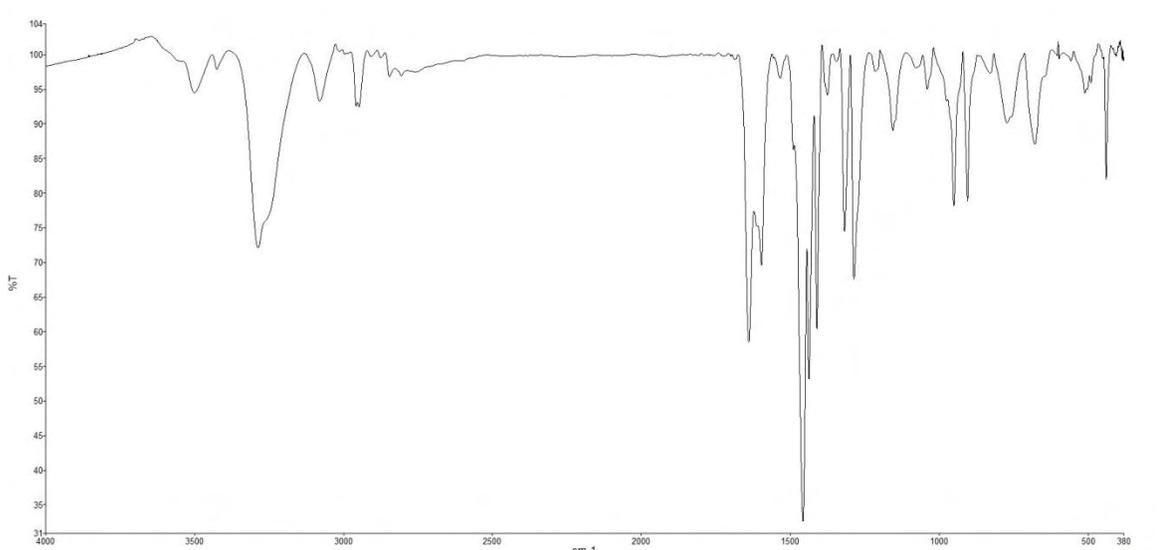


Figura 21. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) del proligando acda4bz.

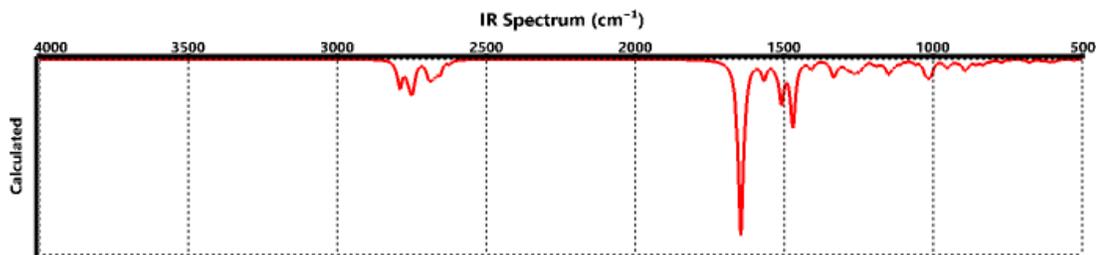


Figura 22. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de Spartan 14' del proligando acda4bz.

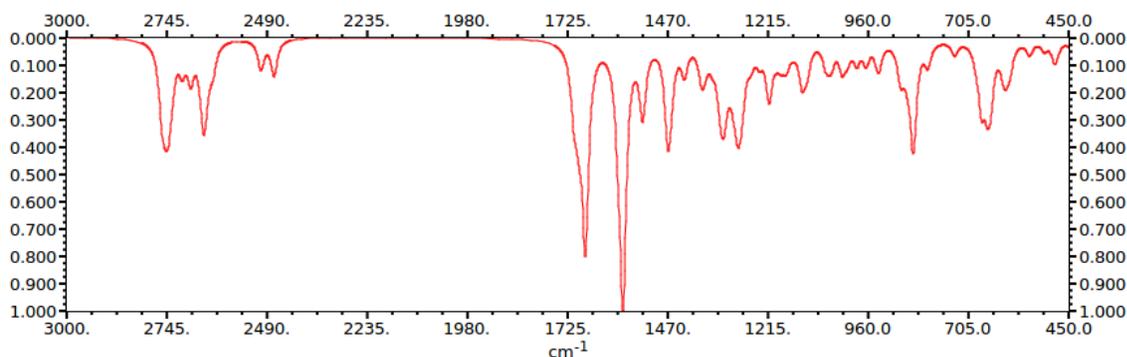


Figura 23. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de MOPAC del proligando acda4bz.

Tabla 8. Asignación de las bandas en espectroscopia infrarroja del proligando acda4bz.

Asignación	Frecuencia (cm^{-1})				
	Experimental	Teórica Spartan (PM6)	$\Delta\nu$	Teórica MOPAC (PM7)	$\Delta\nu$
$\nu\text{N-H}$	3507 (<i>v</i>)	2790	717	2467	1040
$\nu_s\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$	3288 (<i>v</i>)	2753	535	2745	543
$\nu_{\text{as}}\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$	3249 (<i>v</i>)	NA	NA	2744	505
$\nu\text{S-H}$	2945 (<i>d</i>)	2656	289	2531	414
$\nu_{\text{as}}\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	2843 (<i>v</i>)	2751	92	2755	88
$\nu_s\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$	2803 (<i>v</i>)	2763	40	2760	43
$\nu\text{C=C} + \nu\text{C-N}$	1596 (<i>m</i>)	1334	262	1375	221
$\nu\text{C=C}$	1460 (<i>f</i>)	1647	-187	1607	-147
$\rho\text{N-H}$	1437 (<i>d</i>)	1471	-34	1475	-38
$\omega\text{C-H}$ fuera del plano (anillo aromático)	1375 (<i>m</i>)	1229	146	1266	109
$\omega\text{C-H}$ fuera del plano (metilo)	1315 (<i>m</i>)	1267	48	1260	55
$\nu\text{C-S}$	1148 (<i>f</i>)	895	253	935	213
$\nu\text{C=S}$	1045 (<i>f</i>)	1017	28	1052	-7
$\nu\text{C-O-C}$	949 (<i>f</i>)	1151	-202	1184	-235
$\nu\text{C-O-C}$	903 (<i>f</i>)	1134	-231	1172	-269

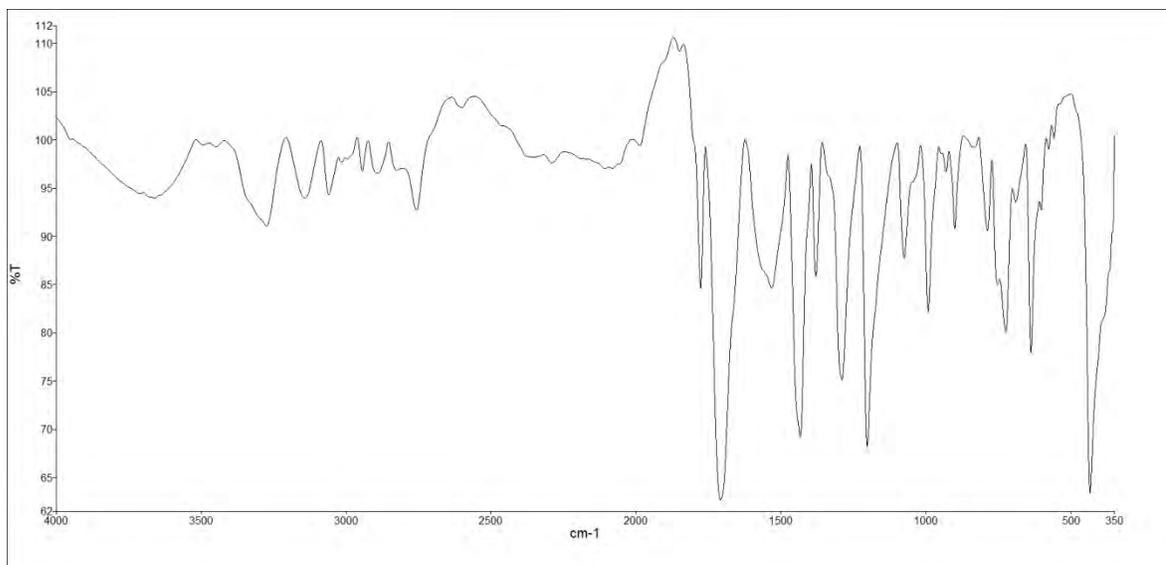


Figura 24. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) del fármaco 5,5- difenilhidantoína.

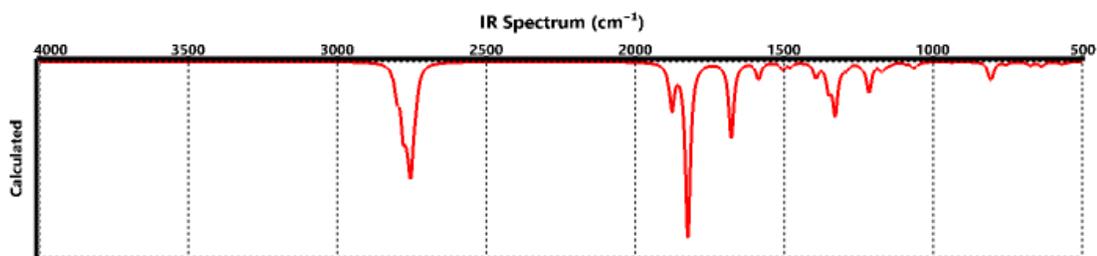


Figura 25. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de Spartan 14' del fármaco 5,5- difenilhidantoína.

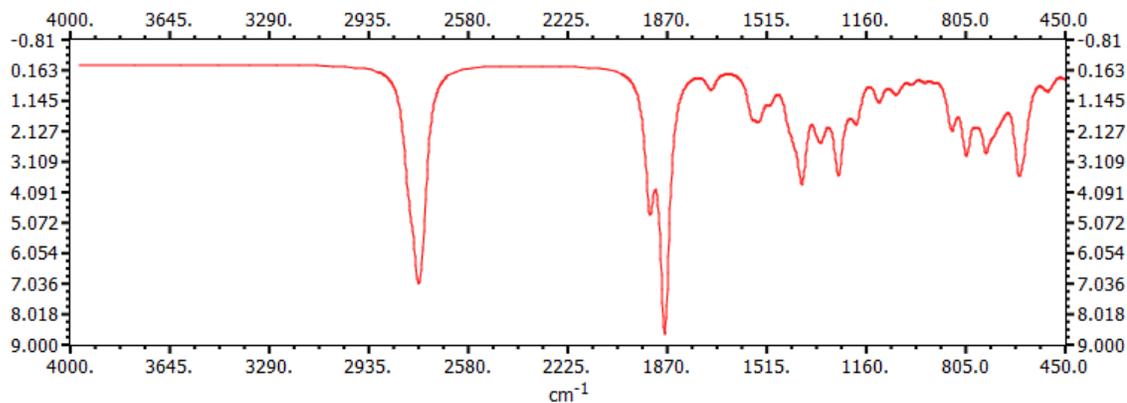
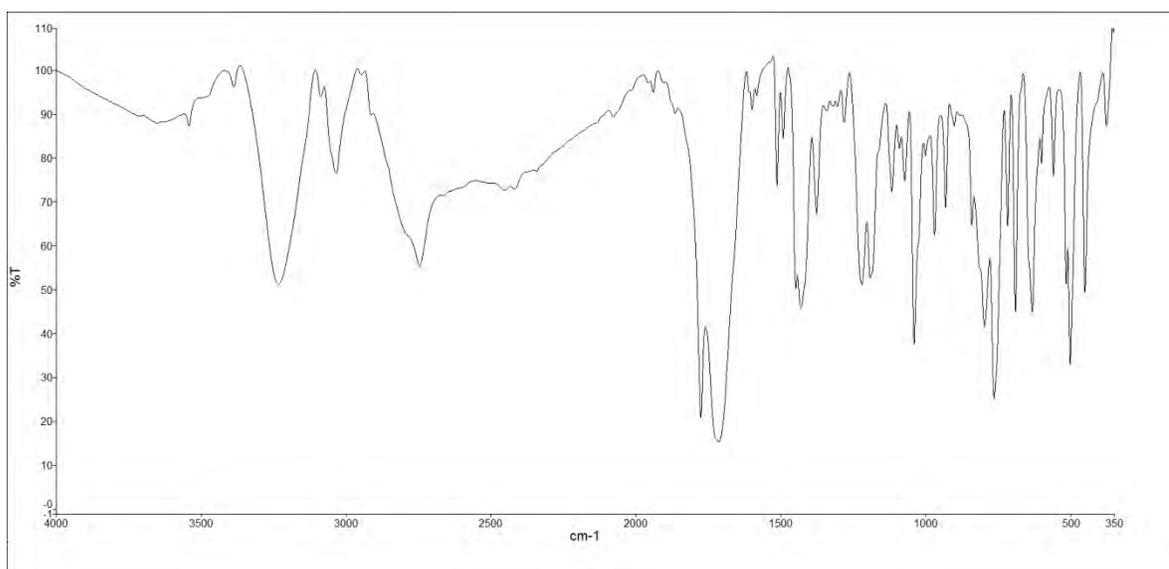
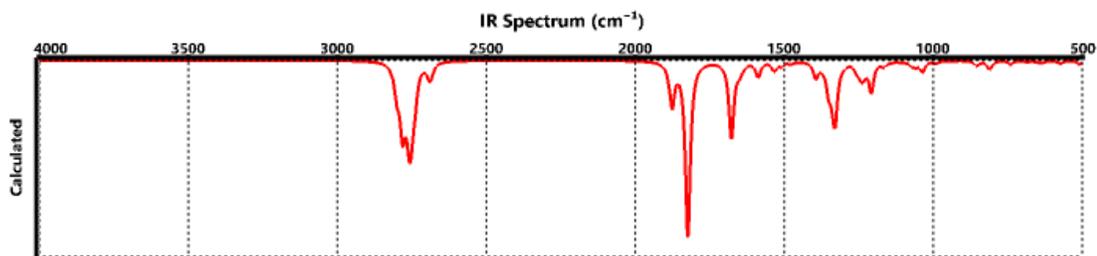


Figura 26. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de MOPAC del fármaco 5,5- difenilhidantoína.

Tabla 9. Asignación de las bandas en espectroscopia infrarroja del fármaco 5,5- difenilhidantoína.

Asignación	Frecuencia (cm ⁻¹)				
	Experimental	Teórica Spartan (PM6)	$\Delta\nu$	Teórica MOPAC (PM7)	$\Delta\nu$
ν N-H	3492; 3449 (ν)	2799; 2779	693; 670	2802; 2790	690; 659
ν_s C _{sp} ² -H	3146 (ν)	2765	381	2769	377
ν_{as} C _{sp} ² -H	3063 (ν)	2754	309	2760	303
ν C=O	1709 (f)	1823	-114	1881	-172
ν C=C	1562 (ν)	1504	58	1503	59
ρ N-H	1444; 1433 (d)	1351; 1329	93; 104	1441; 1420	3; 13

**Figura 27.** Espectro IR-FT (4000-450 cm⁻¹) del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.**Figura 28.** Espectro IR-FT (4000-450 cm⁻¹) calculado a través de Spartan 14' del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.

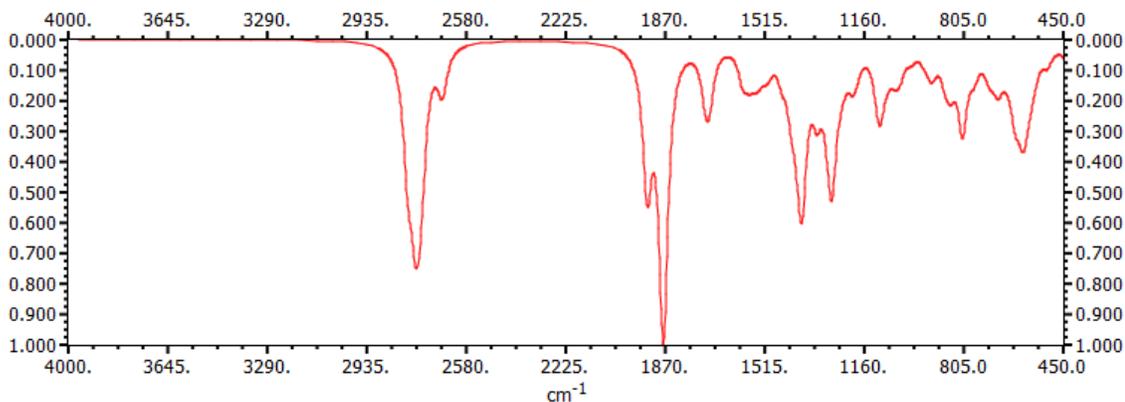


Figura 29. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de MOPAC del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.

Tabla 10. Asignación de las bandas en espectroscopia infrarroja del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.

Asignación	Frecuencia (cm^{-1})				
	Experimental	Teórica Spartan (PM6)	$\Delta\nu$	Teórica MOPAC (PM7)	$\Delta\nu$
ν N-H secundaria	3227 (<i>v</i>)	2800; 2780	427; 447	2795; 2791	432; 436
ν_{as} C $_{sp^2}$ -H	3093 (<i>v</i>)	2758	335	2759	334
ν_s C $_{sp^2}$ -H	3039 (<i>v</i>)	2763	276	2769	270
ν C=O	1714 (<i>f</i>)	1824	-110	1879	-165
ν C=C	1515 (<i>v</i>)	1509	6	1505	10
ω C-H fuera del plano (metilo)	1512 (<i>m</i>)	NA	NA	NA	NA
ρ C-H en el plano (metilo)	1493 (<i>m</i>)	1337	156	1392	101
ρ N-H secundaria	1429; 1449 (<i>d</i>)	1329; 1351	100; 98	1384; 1379	45; 70

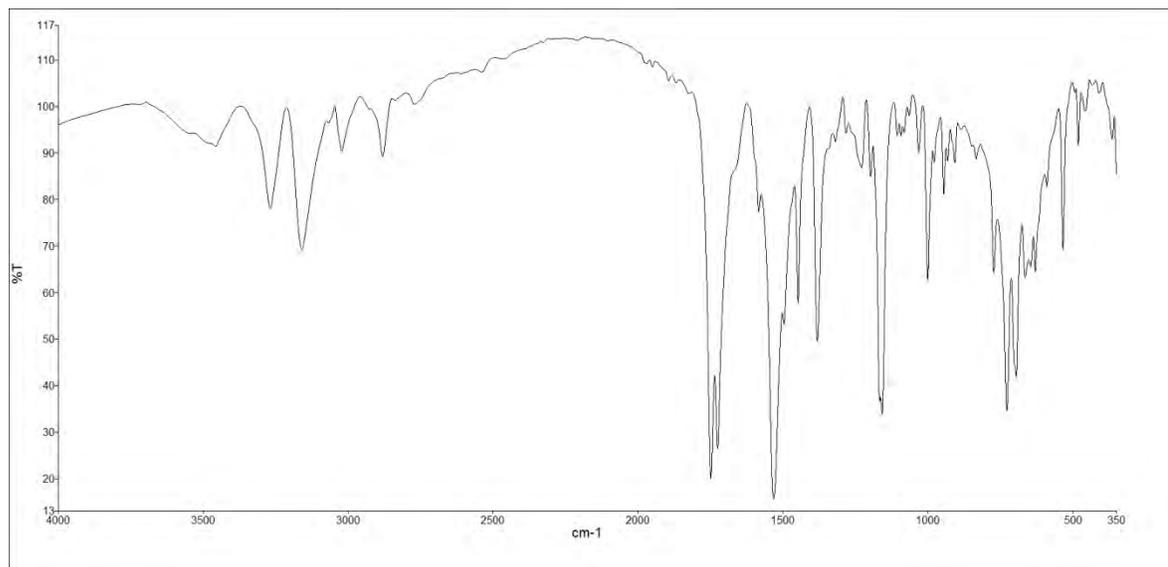


Figura 30. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.

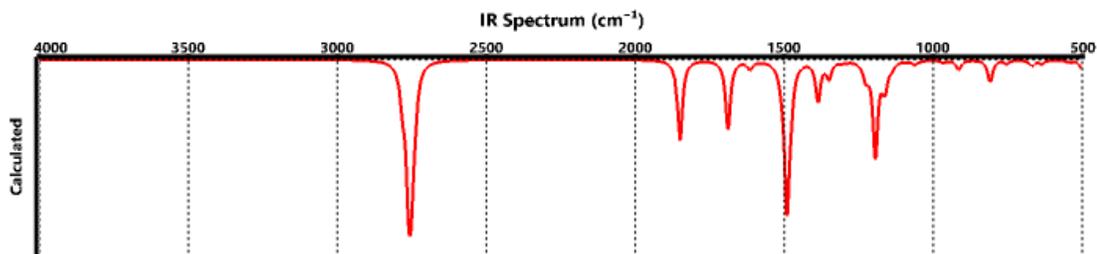


Figura 31. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de Spartan 14' del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.

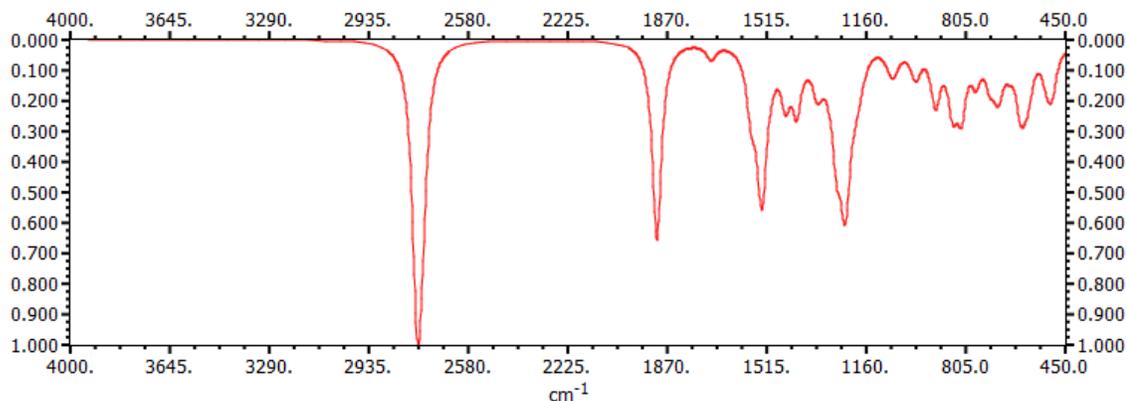


Figura 32. Espectro IR-FT (4000-450 cm^{-1}) calculado a través de MOPAC del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.

Tabla 11. Asignación de las bandas en espectroscopia infrarroja del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.

Asignación	Frecuencia (cm^{-1})				
	Experimental	Teórica Spartan (PM6)	$\Delta\nu$	Teórica MOPAC (PM7)	$\Delta\nu$
$\nu_{\text{N-H}}$	3265; 3161 (ν)	2781	484; 380	2769; 2765	496; 396
$\nu_{\text{sC}_{\text{sp}^2}\text{-H}}$	3064 (ν)	2764	300	2770	294
$\nu_{\text{asC}_{\text{sp}^2}\text{-H}}$	2880 (ν)	2738	142	2760	120
$\nu_{\text{C=O}}$	1752 (f)	1850	-98	1909	-157
$\nu_{\text{C=C}}$	1531 (ν)	1504	27	1513	18
$\rho_{\text{N-H}}$	1449 (d)	1491	-42	1411	38
$\nu_{\text{C=S}}$	1169 (f)	1224	-55	1060	109

9.2 Espectroscopia de absorción electrónica (UV- Vis).

La espectroscopia de absorción electrónica estudia las distintas transiciones que pueden experimentar los electrones, desde orbitales atómicos o moleculares ocupados (HOMO por sus siglas en inglés), a orbitales atómicos o moleculares desocupados (LUMO por sus siglas en inglés) de los grupos cromóforos presentes en la estructura de la molécula. Los compuestos orgánicos presentan una serie de transiciones típicas tales como: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\sigma \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$, donde la transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$ corresponde a la de mayor energía y la $n \rightarrow \pi^*$ es la de menor energía [65]. La absorción de un fotón se produce cuando se suministrar un cuanto de energía que es igual a la diferencia de energía entre los orbitales involucrados; adicionalmente, se deben respetar las reglas de selección de simetría-orbital, es decir, se debe producir un cambio de paridad entre los orbitales (Regla de Laporté) y se debe conservar el espín (Regla de espín: $\Delta S = 0$). También existe otro parámetro adicional de interés que se suma a las reglas de selección definidas anteriormente, y depende del volumen de la superficie del orbital HOMO, es decir, mientras más volumen posee dicho orbital, más probable es dicha transición y por tanto podría esperarse un efecto hipercrómico [66].

Para un compuesto como el 1,3-butadieno es posible tener dos conformaciones diferentes: cisoide y transoide. En la espectroscopia de absorción electrónica es posible –al igual que en infrarrojo– observar las diferencias estructurales debido a distorsión en la simetría, que se traducen en desdoblamiento y corrimientos de bandas. En la Fig. 33 se observan las dos conformaciones para este sistema y la cantidad de bandas e intensidades relativas para cada uno.

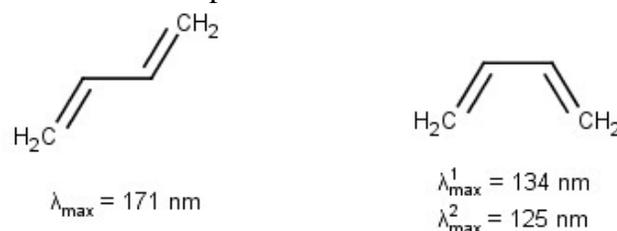


Figura 33. Izquierda: conformación transoide del 1,3-butadieno. Derecha: conformación cisoide del 1,3-butadieno.

A través de esta técnica espectroscópica se analizaron las diferentes transiciones electrónicas que pueden experimentar los electrones entre los diferentes orbitales moleculares en todos los compuestos en estudio y, en todos los casos, fue posible observar transiciones del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$. La banda $n \rightarrow \pi^*$ está presentes en aquellos compuestos que poseen en su estructura grupos $>C=S$, $-C-S$ y $H-N\langle R_2$, mientras que la banda $\pi \rightarrow \pi^*$ proviene de las insaturaciones. Particularmente, los grupos tiolato generan bandas anchas debido a la gran cantidad de electrones de no-enlace (“n”) disponibles.

En la Fig. 34 se muestra el espectro de absorción electrónica del acdabz, en el que se tiene una banda a 305 nm de baja intensidad, y otra a 394 nm de mayor intensidad y por tanto de mayor probabilidad. En el espectro calculado (Fig. 35) dichas bandas se desplazan a menores energías (desplazamiento hacia el rojo), en la tabla 12 se observan los valores de λ_{\max} para las distintas bandas. En los compuestos acdabz y HTA1 (Fig. 34 y Fig. 38) se observó un comportamiento similar, poniéndose de manifiesto en los espectros calculados un efecto batocrómico respecto a las bandas del espectro experimental (Fig. 35 y 39). Por el contrario, para los compuestos acda4bz, HTA2 Y HTA3 (Fig. 36, 40 y 42), se observó un efecto hipsocrómico en los espectros calculados (Fig. 37, 41 y 43) con respecto al espectro experimental. En los compuestos acdabz, acda4bz, HTA2 y HTA3 el solvente utilizado fue acetato de etilo, mientras que para el HTA1 se utilizó agua. El efecto del solvente en el primer caso produce desplazamientos hipsocrómicos en aquellas moléculas cuya polaridad es elevada (acda4bz, HTA2 y HTA3) [67, 68]. El mecanismo más ampliamente conocido en este tipo de fenómenos es el de la interacción de pares electrónicos de no-enlace del solvente con orbitales moleculares del analito, haciendo más elevado el costo energético de dicha transición. Pese a que el agua posee una mayor polaridad que el acetato de etilo, la disponibilidad de sus pares de no-enlace es relativamente menor,

puesto que no existe un efecto neto inductivo, por lo que podría esperarse muy poco o ningún desplazamiento hacia el rojo (acdabz y HTA1)

En las tablas 12 a 16 se aprecian los valores absorción máxima para cada uno de los compuestos y se comparan con la absorción de los espectros calculados.

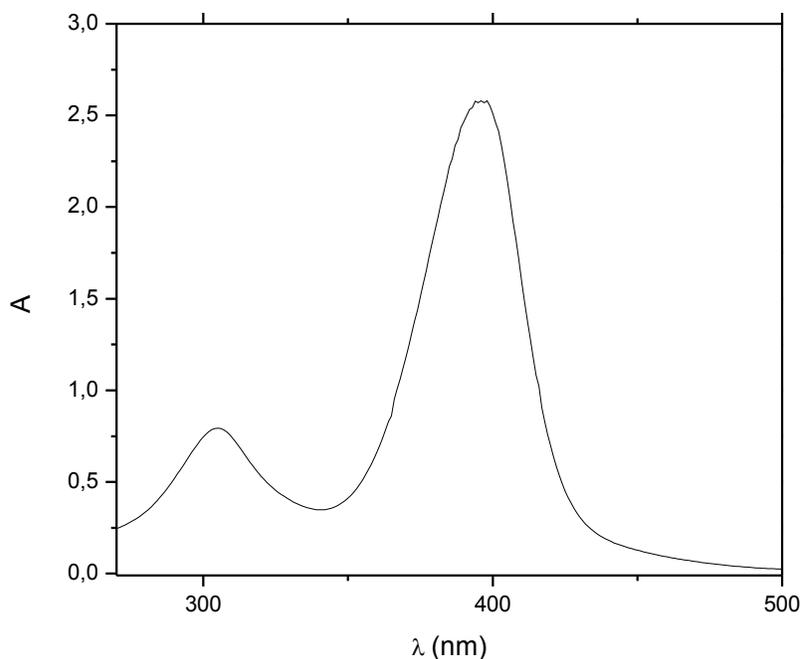


Figura 34. Espectro de absorción electrónica del proligando acdabz.

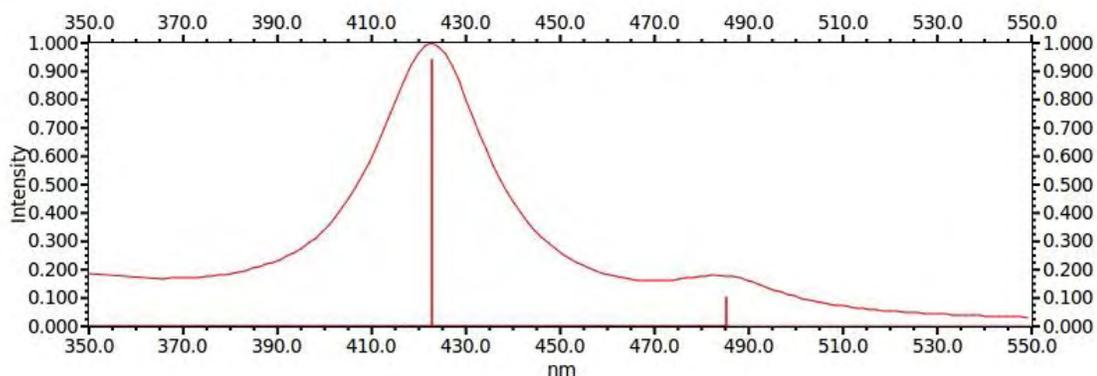


Figura 35. Espectro de absorción electrónica calculado del proligando acdabz.

Tabla 12. Transiciones electrónicas del proligando acdabz.

Banda	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)		ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Asignación
	Experimental	Teórica*		
1	394	483	8.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
2	305	420	3.000	$n \rightarrow \pi^*$

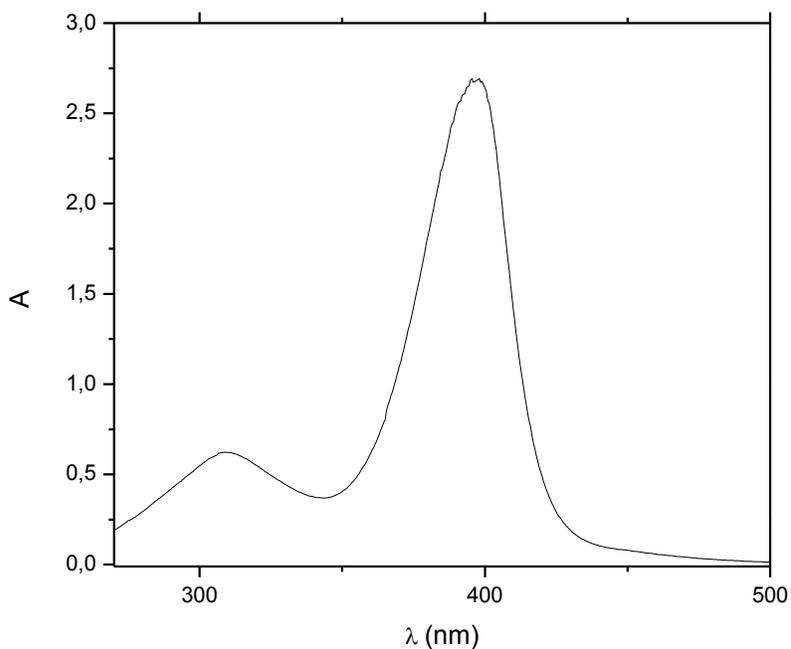


Figura 36. Espectro de absorción electrónica del proligando acda4bz.

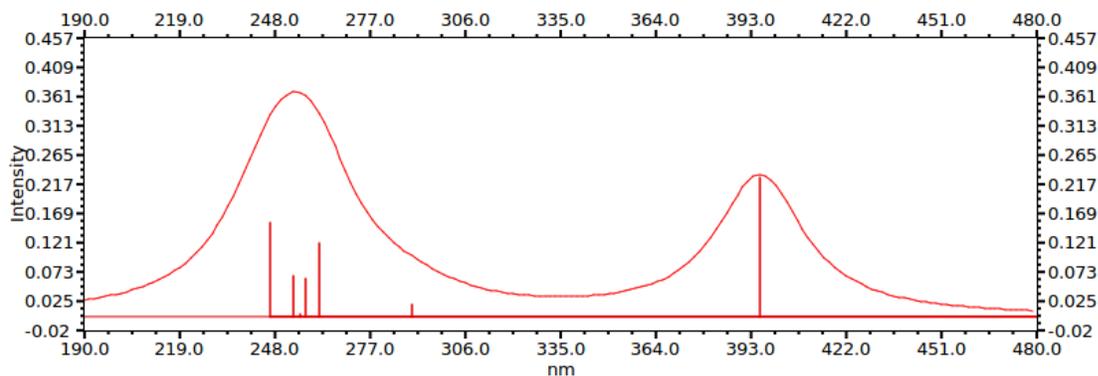


Figura 37. Espectro de absorción electrónica calculado del proligando acda4bz.

Tabla 13. Transiciones electrónicas del proligando acda4bz.

Banda	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)		ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Asignación
	Experimental	Teórica*		
1	398	393	8.000	$\pi \rightarrow \pi^*$
2	309	236	3.000	$n \rightarrow \pi^*$

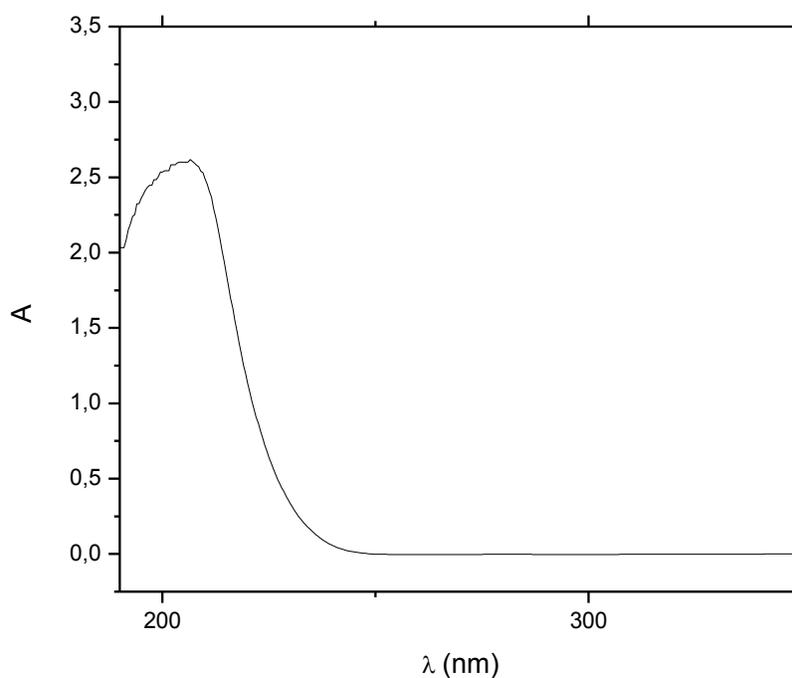


Figura 38. Espectro de absorción electrónica del fármaco 5,5-difenilhidantoína.

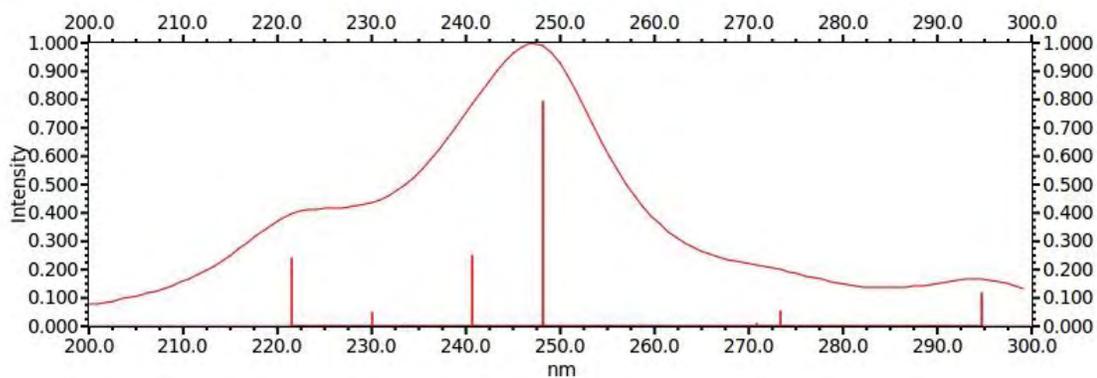


Figura 39. Espectro de absorción electrónica calculado del fármaco 5,5-difenilhidantoína.

Tabla 14. Transiciones electrónicas del fármaco 5,5-difenilhidantoína.

Banda	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)		ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Asignación
	Experimental	Teórica*		
1	206,5	246	10.000	$n \rightarrow \pi^*$

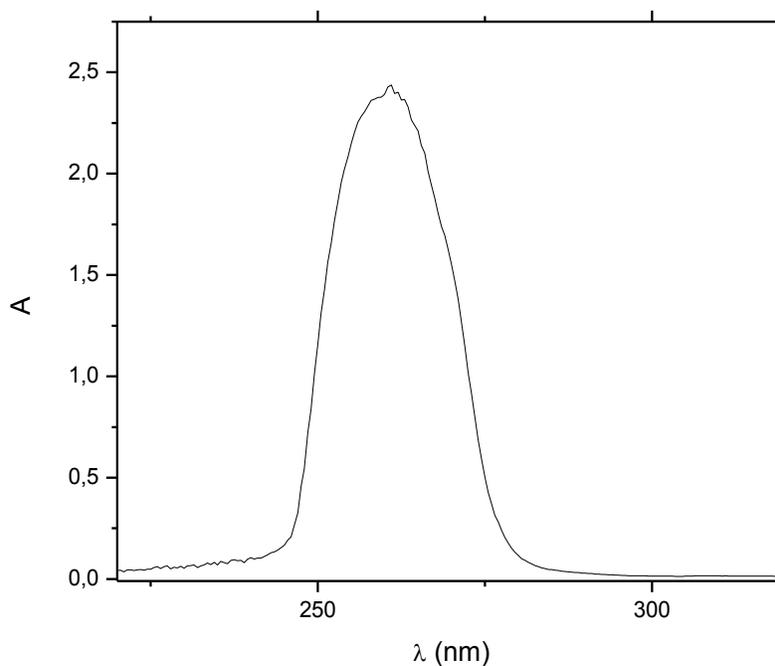


Figura 40. Espectro de absorción electrónica del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.

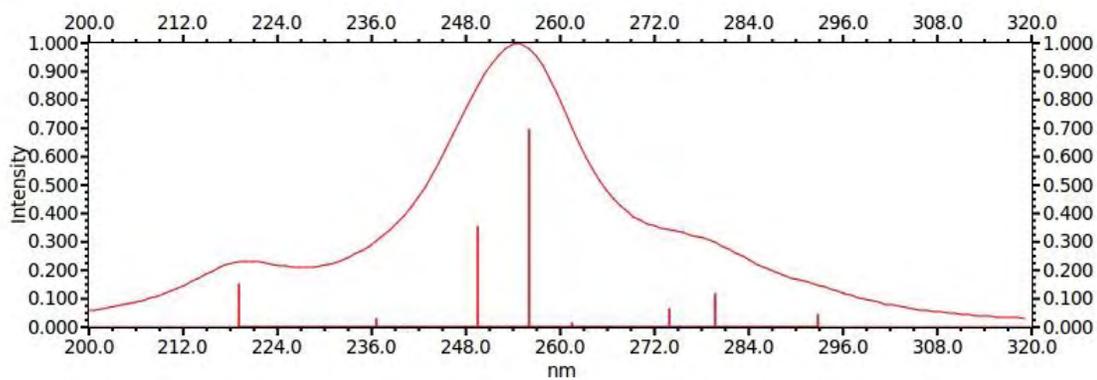


Figura 41. Espectro de absorción electrónica calculado del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.

Tabla 15. Transiciones electrónicas del fármaco 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína.

Banda	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)		ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Asignación
	Experimental	Teórica*		
1	261	253	10.000	$n \rightarrow \pi^*$

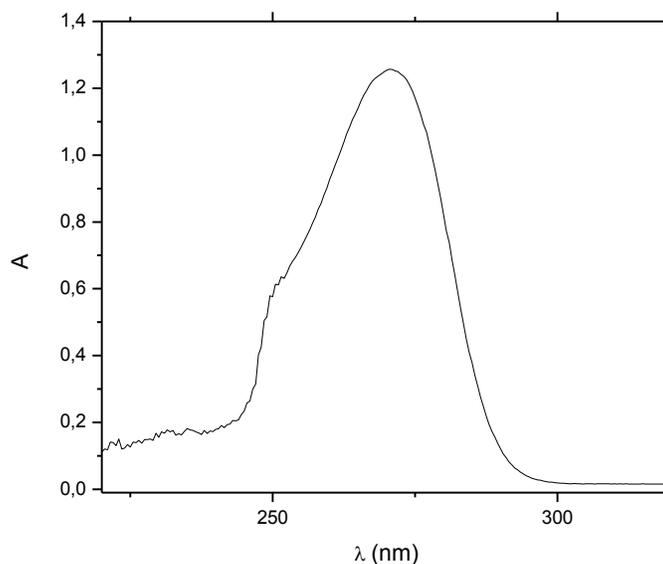


Figura 42. Espectro de absorción electrónica del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.

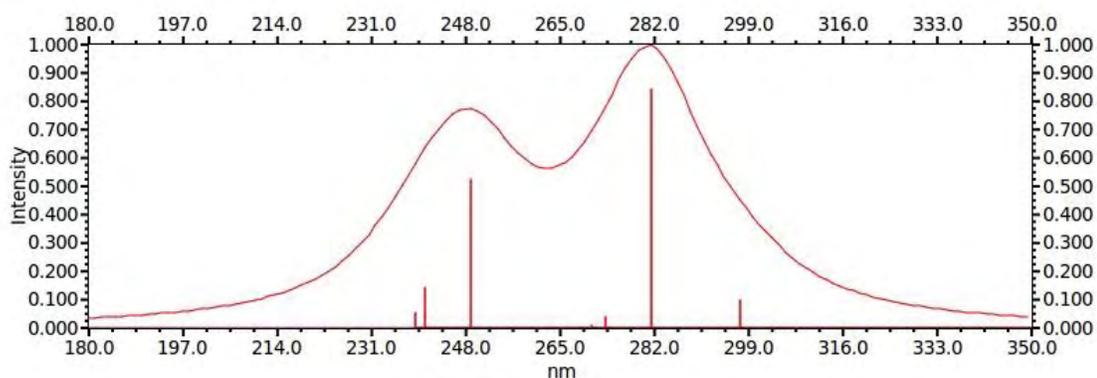


Figura 43. Espectro de absorción electrónica calculado del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.

Tabla 16. Transiciones electrónicas del fármaco 5,5- difenil-2-tiohidantoína.

Banda	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)		ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Asignación
	Experimental	Teórica*		
1	270,5	246	2.500	$n \rightarrow \pi^*$
2	309	280	4.000	$n \rightarrow \pi^*$

9.3 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

Esta técnica espectroscópica se fundamenta en la absorción de energía por un núcleo magnéticamente activo, que está orientado en el seno de un campo magnético, y que por efecto de esa energía cambia su orientación. Esta técnica permite estudiar sólo los núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos), situación que se presenta en los átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P [69, 70].

En el espectro de RMN ^1H correspondiente al proligando acdabz (Fig. 44) se puede apreciar una señal, a campo bajo y alrededor de 12 ppm, que se aparece como un singlete, correspondiente al hidrógeno de la amina secundaria 5-NH₂-. Los protones que corresponden al grupo metileno de la cadena alquílica 6-CH₂- y que integran para 2H, presentan un doblete en 4,57 ppm, mientras que la señal correspondiente a los metilenos del anillo ciclopentenílico 2-CH₂-, 3-CH₂- y 4-CH₂- aparecen desplazados a campo alto en 2,76 ppm, 1,86 ppm y 2,70 ppm, con una multiplicidad del tipo: triplete, quintete, triplete, respectivamente, e integran para 2H. Los protones aromáticos de acdabz 7-CH-; 8-CH- y 9-CH- aparecen con una señal tipo multiplete en la región comprendida entre 7,27 ppm y 7,38 ppm, que integran para 5H. Por otro lado, la señal correspondiente al grupo 1-SH, que integra para 1H, aparece en 4,89 ppm, lo cual concuerda con lo reportado según la literatura [71].

En la Fig. 46 se muestra el espectro de RMN ^1H para el proligando acda4bz, el cual aparece una señal en 12,66 ppm asignada al hidrógeno de la amina 5-NH₂-, mientras que los desplazamientos correspondientes a los grupos metilenos del anillo ciclopentenílico se encuentran entre 2,45 ppm para el 4-CH₂- y 3,06 ppm para en 2-CH₂-. Por otra parte, la señal de los protones aromáticos 8-CH-; 9-CH- y 11-CH- aparece entre 6,8 ppm y 6,7 ppm, desplazados a campo alto respecto de acdabz, debido probablemente al efecto protector que ejerce el grupo metoxilo sobre estos. En 3,86 ppm aparece un doblete, el cual se asignó a los hidrógenos del grupo metilo 10-CH₃-, tal como lo indica la literatura [72]. Las constantes de acoplamiento estimadas para el protón sobre el nitrógeno 5-NH₂- es de $J \approx 12$ Hz, mientras que para los protones 2-CH₂-, 3-CH₂- y 4-CH₂- la constante de acoplamiento se encuentra aproximadamente en 6,5 Hz, todos estos valores se acercan al valor reportado [72]. Los desplazamientos para dichos proligandos, así como las constantes de acoplamiento se encuentran en la tabla 17.

En los espectros de RMN ^{13}C para los proligandos en estudio (Fig. 45 y 47) se observó una excelente concordancia con las estructuras propuestas. Destaca la presencia de un carbono sp^2 -S-C⁽¹⁾=S perteneciente a un grupo tiocarbonilo, con un desplazamiento alrededor de 190 ppm, y unido a un carbono sp^2 -HNC=C⁽²⁾ que presenta un desplazamiento químico entorno a 118 ppm, el cual, a su vez, está enlazado a otro carbono sp^2 -HNC⁽⁶⁾=C, que presenta un desplazamiento a 170 ppm para ambos proligandos, y se encuentra unido a un carbono sp^2 -C⁽⁵⁾ a 20,1 ppm, el cual se encuentra enlazado a otro carbono sp^3 -C⁽⁴⁾-C que presenta un desplazamiento en 33,3 ppm y 32,9 ppm para el proligando acdabz y acda4bz respectivamente. Este carbono encuentra enlazado a un carbono sp^2 -C⁽³⁾, con un desplazamiento alrededor de 33 ppm. Las señales estudiadas concuerdan con lo reportado en la literatura [73] y los desplazamientos se resumen en la tabla 18.

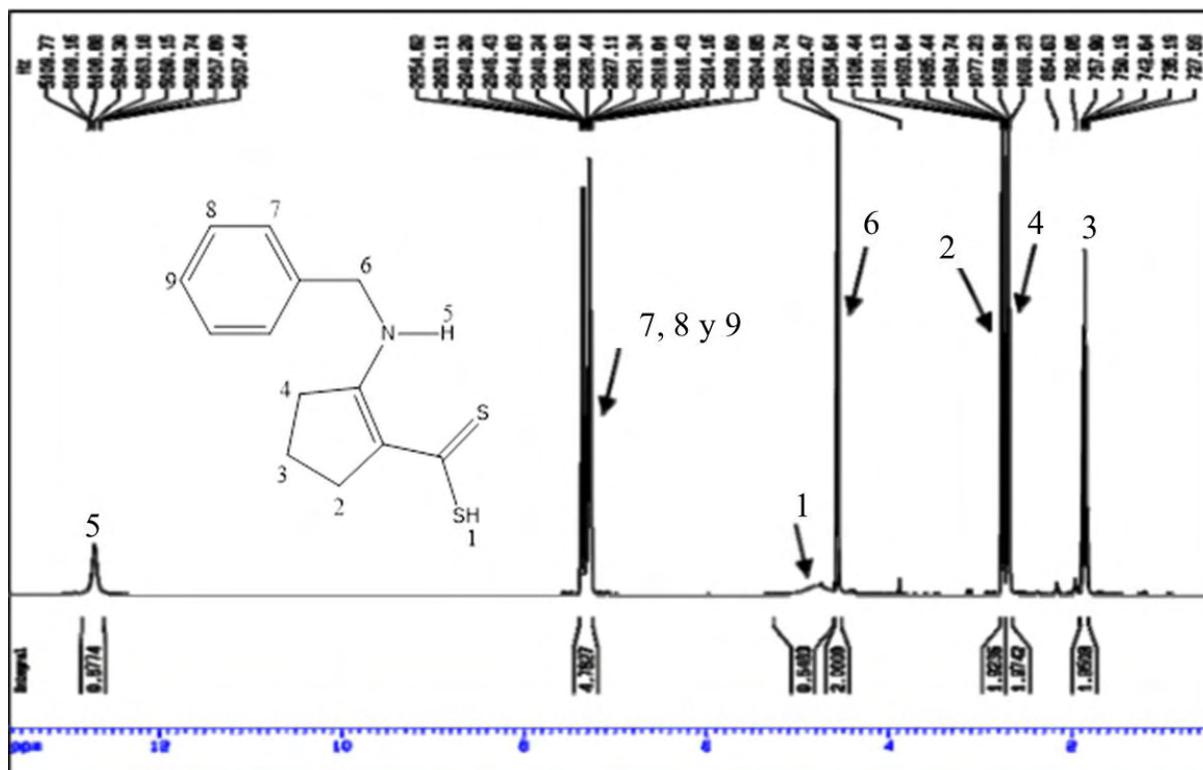


Figura 44. Espectro de RMN ^1H del proligando acdabz

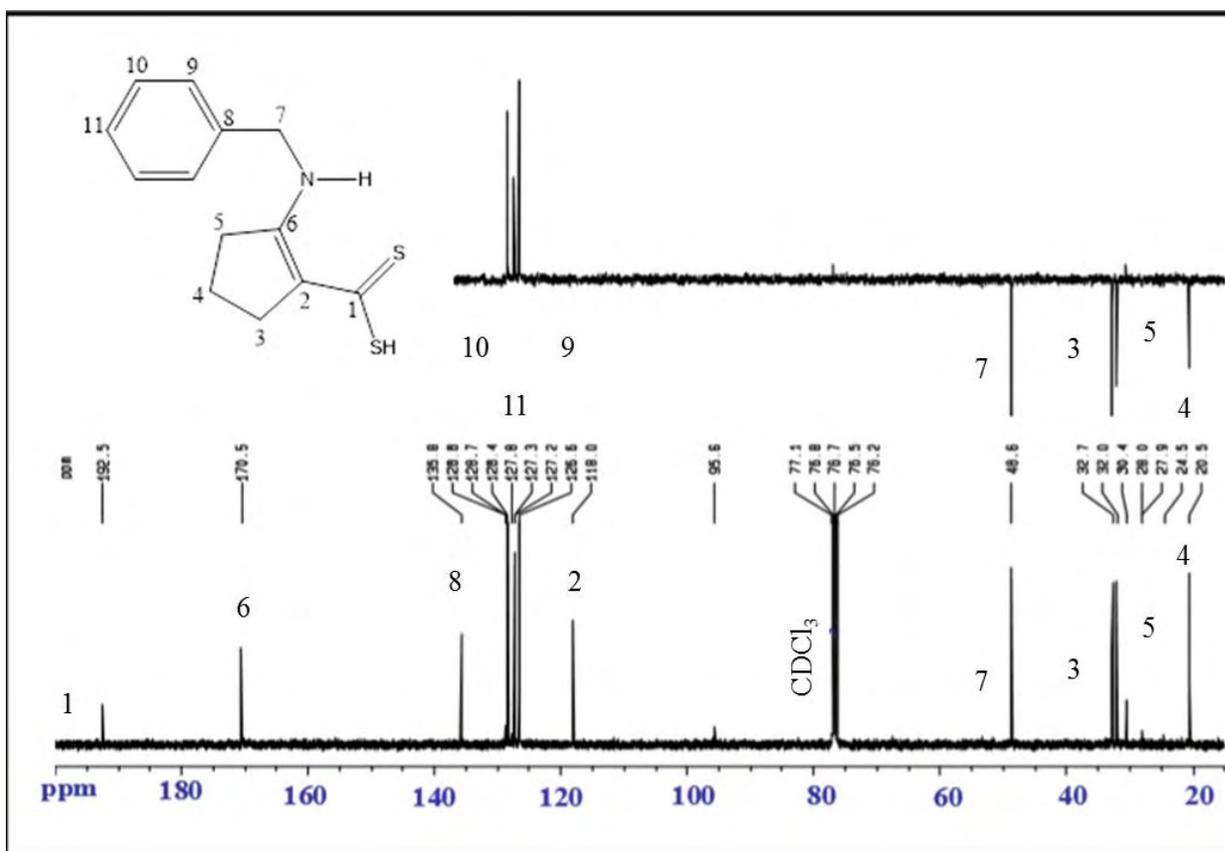


Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C del proligando acdabz.

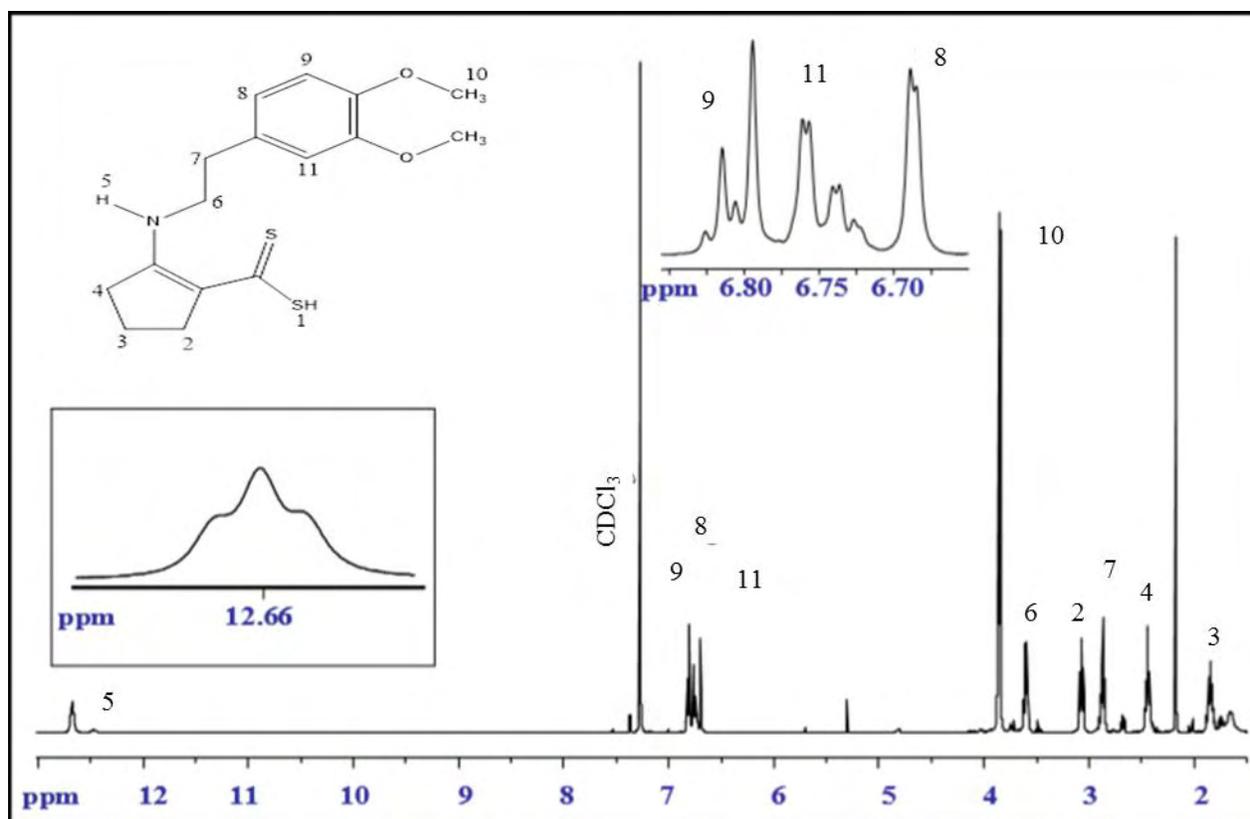


Figura 46. Espectro de RMN ^1H del proligando acda4bz.

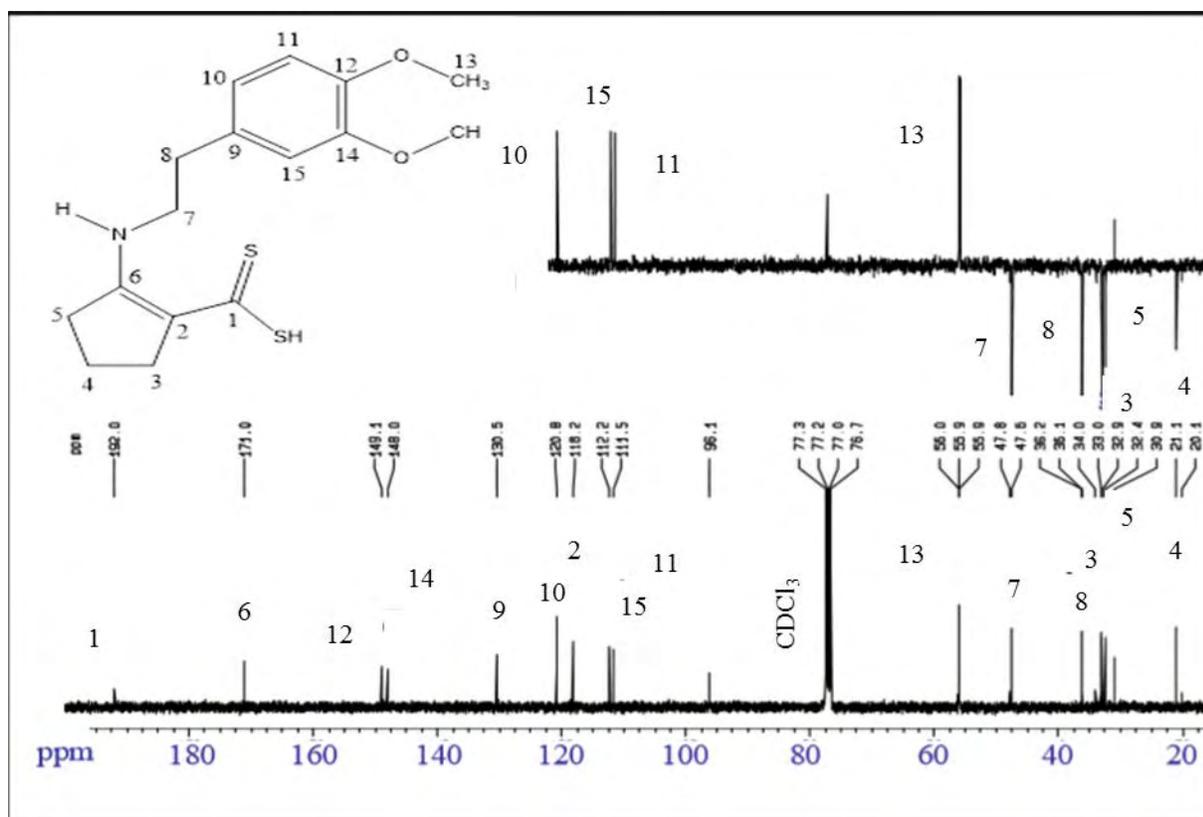
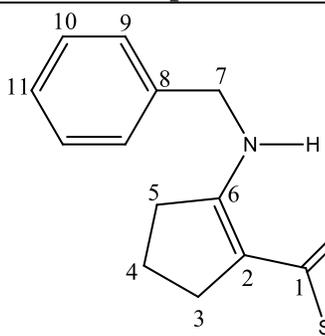
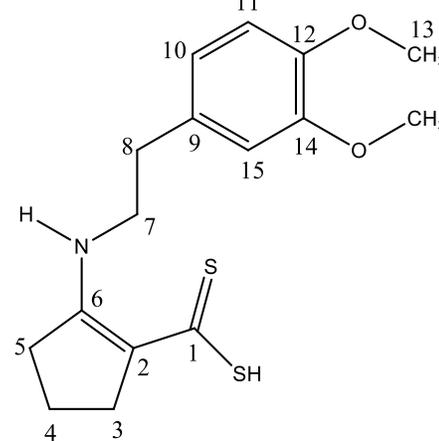


Figura 47. Espectro de RMN ¹³C del proligando acda4bz.

Tabla 17. Desplazamientos químicos RMN ^1H para los prolifandos nitrógeno-sulfurados.

Estructura	N $^{\circ}$	δ ppm (J,nH,m)	
	1	4,89 (1H, s)	
	2	2,76 (7,5 Hz, 2H, t)	
	3	1,86 (7,5 Hz, 2H, q)	
	4	2,70 (7,7 Hz, 2H, t)	
	5	12,72 (6,2 Hz, 1H, t)	
	6	4,57 (6,2 Hz, 2H, d)	
	7, 8, 9	7,27 a 7,38 (5H, m)	
	<hr/>		
		1	-
2		3,06 (7,0 Hz, 2H, t)	
3		1,85 (7,0 Hz, 2H,q)	
4		2,45 (4,0 Hz, 2H, t)	
5		12,66 (5,8 Hz, 1H, t)	
6		3,60 (7,0 Hz, 2H, c)	
7		2,86 (2H, t)	
8		6,68 (1H, d)	
9		6,80 (8,0 Hz, 1H, d)	
10		3,86 (6H, d)	
11		6,76 (8,0 Hz, 1H, s)	

Tabla 18. Desplazamientos químicos RMN ^{13}C para los prolifandos nitrógeno-sulfurados.

Compuesto	N ^o	δ (ppm)
	1	191,0
	2	119,0
	3	34,1
	4	33,3
	5	20,1
	6	171,3
	7	49,3
	8	136,0
	9	129,0
	10	127,0
	11	127,9
	1	192,0
	2	118,2
	3	33,0
	4	32,9
	5	20,1
	6	171,0
	7	47,0
	8	36,1
	9	130,5
	10	120,8
	11	111,5
	12	149,1
	13	55,9
	14	148,8
	15	112,2

10. Cálculo computacional.

La química computacional se concentra en la aplicación de los métodos de cálculo mecano-cuántico, para resolver la estructura electrónica y por tanto predecir geometrías de mínima energía o calcular propiedades moleculares de interés. La química computacional proporciona una mayor comprensión de sistemas químicos y es muy útil como herramienta de aprendizaje y de respaldo en investigaciones experimentales. [74, 75]

En la tabla 19 se muestran los valores de la energía HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) y LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) así como la energía de formación de los distintos compuestos.

Las diferencias entre cada método de cálculo (re-optimización de los parámetros atómicos y diatómicos, así como también la reducción de errores en compuestos orgánicos), tanto en entalpías de formación como en energías orbitales es considerable, y podría esperarse que los resultados con mayor aproximación sean los obtenidos mediante el método PM7, por razones inherentes al algoritmo de cálculo y al modelo que este posee y en cuanto a correlación electrónica. Sin embargo, puede deducirse que la diferencia energética entre los orbitales HOMO-LUMO son menores para los compuestos acda4bz y 5,5-difenil-2-tiohidantoina, razón por la cual presentan transiciones electrónicas a menor energía así como también una mayor polarizabilidad que en los otros casos. Puede decirse que estos compuestos son más blandos según la teoría de ácidos y bases duros y blandos propuesta por R. G. Pearson [3].

Se conoce que, en una reacción química, es posible conocer la cantidad de calor liberado o absorbido durante el proceso de formación del producto, en otras palabras, esto es, el calor o entalpía de formación ΔH_f , el cual está estrechamente relacionado con la formación y ruptura de enlaces. El calor

de formación se puede calcular termoquímicamente siguiendo un ciclo de Born-Haber, y contabilizando el cambio de energía entre los productos y los reactantes, por lo que a menores entalpías de formación (valores positivos pequeños o negativos), el proceso de ruptura de enlaces de los reactantes es favorable y la estabilidad de los productos es buena [76]. De acuerdo a esto, puede decirse que los compuestos siguen el siguiente orden de estabilidad respecto a su calor de formación: $\text{acda4bz} > \text{HTA2} > \text{HTA1} > \text{HTA3} > \text{acdabz}$.

Tabla 19. Propiedades calculadas para los compuestos en estudio con el método semi-empírico PM6 y PM7.

Compuesto	E HOMO (eV)		\bar{x}	E LUMO (eV)		\bar{x}	(E _{HOMO} - E _{LUMO}) eV		\bar{x}
	PM6	PM7		PM6	PM7		PM6	PM7	
acdabz	-8,16	-8,213	-8,187	-0,76	-1,136	-0,948	-7,4	-7,077	-7,239
acda4bz	-8,19	-8,147	-8,169	-0,83	-1,176	-1,003	-7,36	-6,971	-7,166
HTA1	-9,86	-9,911	-9,886	-0,34	-0,410	-0,375	-9,52	-9,501	-9,511
HTA2	-9,54	-9,703	-9,622	-0,29	-0,292	-0,291	-9,25	-9,411	-9,331
HTA3	-9,08	-8,841	-8,961	-0,76	-0,747	-0,754	-8,32	-8,094	-8,207

Tabla 20. Energía de formación calculada para los compuestos en estudio con el método semi-empírico PM6 y PM7.

Energía (KJmol ⁻¹)		\bar{x}
PM6	PM7	
221,40	236,931	229,166
-151,21	-145,007	-148,109
-102,26	-99,584	-100,922
-145,60	-147,364	-146,482
131,91	151,151	141,531

A continuación se muestran los orbitales moleculares de frontera del benceno, sabiendo que el orbital HOMO es el último orbital molecular que se encuentra doblemente ocupado, donde se encuentra el par de electrones que más fácilmente puede perder o ceder la molécula. Por otro lado el orbital LUMO es el orbital de menos energía que se encuentra vacío, el lugar donde más fácilmente la molécula aceptaría un par de electrones [77, 78].

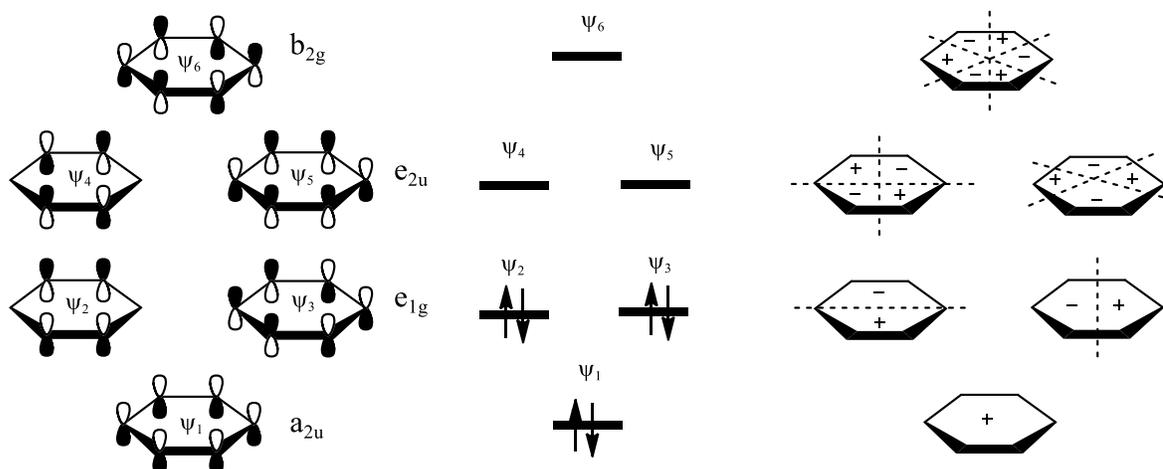


Figura 48. Orbitales moleculares de frontera del benceno descrito según el método de Hückel.

En función de la descripción de orbitales moleculares de frontera de Hückel, se muestran en la Fig. 49 y Fig. 50 los orbitales HOMO-LUMO obtenidos mediante el método semi-empírico PM7 y PM6 respectivamente, para cada compuesto en estudio. En el caso de los proligandos nitrógeno-sulfurados, el orbital HOMO se localiza en el anillo ciclopenteno, específicamente sobre el enlace- π , igualmente involucra los electrones de no enlace “ n ” de los grupos amino y tiol. Por otra parte, tenemos que los orbitales LUMO se encuentran localizados sobre el grupo tiol de las moléculas. De esta manera se puede decir que estos compuestos presentan transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$, de acuerdo a los orbitales de frontera y tal como se describió en la sección de espectroscopia de absorción electrónica.

En el compuesto HTA1, el orbital HOMO se encuentra sobre los orbitales- π de los anillos aromáticos, y el orbital LUMO sobre uno de los anillos bencénicos de la molécula, lo cual sugiere la posibilidad de una transición $\pi \rightarrow \pi^*$. En el compuesto HTA2, el orbital HOMO se encuentra en los anillos aromáticos y los electrones de no-enlace de los átomos de nitrógeno, mientras que el orbital LUMO se localiza sobre el anillo hidantoínico, lo cual apunta una $n \rightarrow \pi^*$. En el caso de HTA3, los orbitales HOMO se encuentran sobre los electrones de no enlace, pertenecientes al átomo de azufre del anillo hidantoínico y el orbital LUMO se encuentra localizados sobre la superficie del anillo de cinco miembros, mostrando transiciones de $n \rightarrow \pi^*$, y otra de menor energía $\pi \rightarrow \pi^*$.

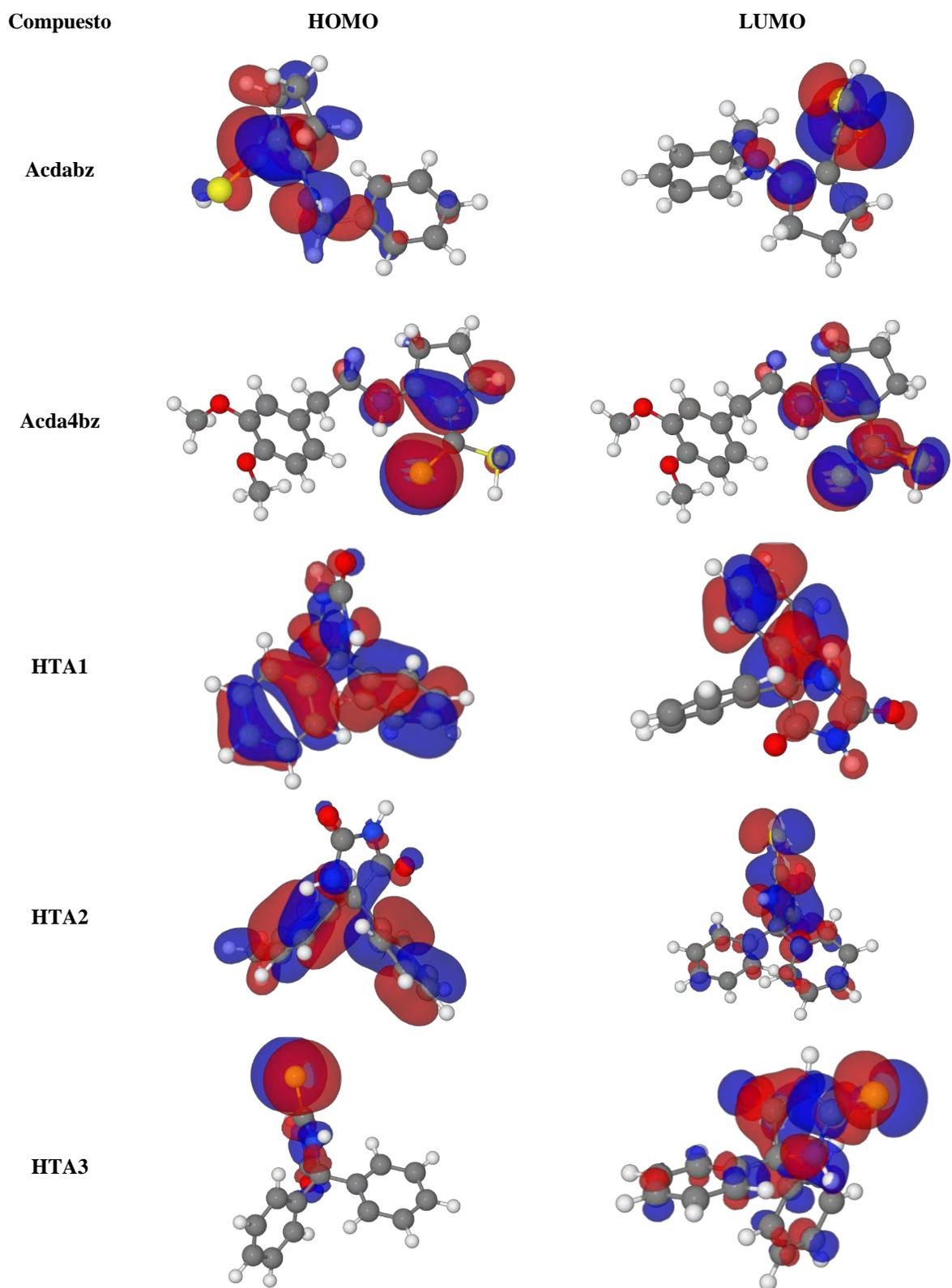


Figura 49. Orbitales de frontera de los compuestos en estudio, calculados a través de MOPAC.

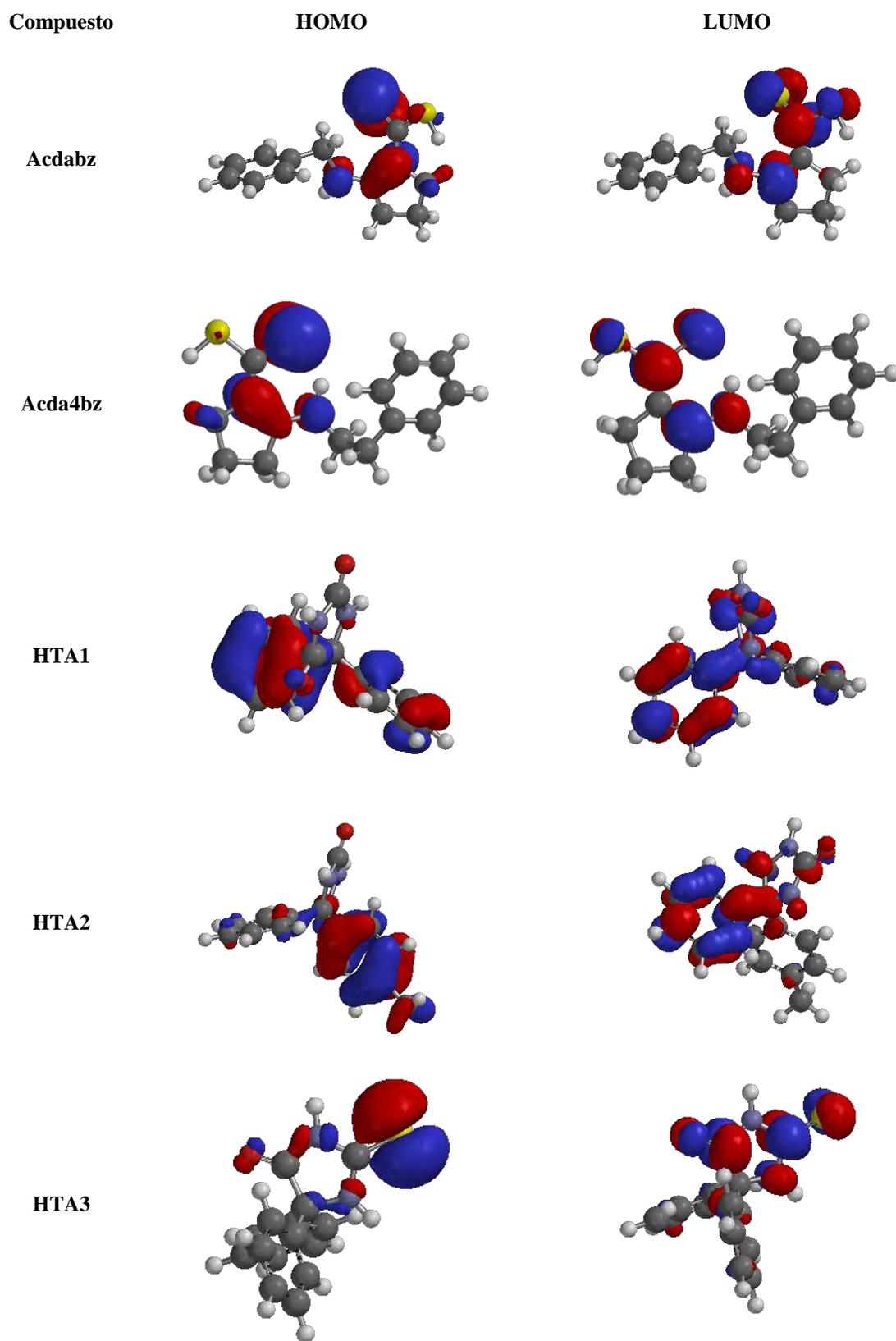


Figura 50. Orbitales de frontera de los compuestos en estudio, calculados a través de Spartan 14'.

A continuación, se realizó el estudio de la simetría local de los orbitales involucrados en las transiciones electrónicas. En la Fig. 51 observamos los orbitales de frontera HOMO y LUMO del compuesto HTA1. Podemos observar que el orbital de frontera HOMO se encuentra sobre los anillos bencénicos de la molécula, muy cercano al ψ_3 descrito según Hückel (Fig. 48), mientras que el orbital LUMO se encuentra sobre uno de los anillos bencénicos, muy cercano al ψ_5 descrito por Hückel.

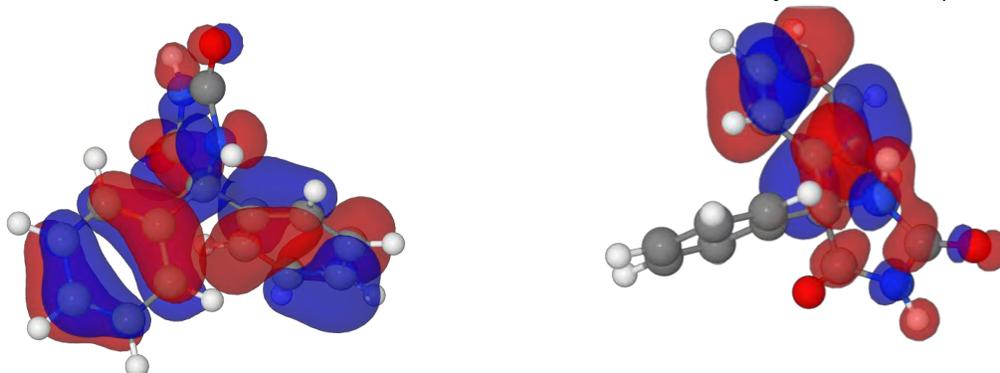


Figura 51. Orbitales de frontera del compuesto 5,5-difenilhidantoína.

Los símbolos de las especies de simetría, indican la dimensión de la representación y su comportamiento frente a las operaciones de simetría, las representaciones unidimensionales se representan con “A” o “B” (se usa mayúscula para simetría atómica y minúsculas para simetría molecular), las bidimensionales con “E” y las tridimensionales con “T”. Si hay una especie que sea simétrica con respecto al eje de rotación de mayor orden, las especies se designan con “A”, mientras que si la especie de simetría unidimensional es antisimétrica con respecto al eje de mayor orden se designa con “B”. El plano especular vertical se utiliza para asignar superíndices el número “1” significa comportamiento simétrico y “2” para un comportamiento antisimétrico respecto al plano vertical. Por último, en grupos con centro de inversión se utiliza el subíndice *g* para indicar un comportamiento simétrico (*gerade*) y el subíndice *u* para un comportamiento asimétrico (*ungerade*) respecto al centro de inversión. Para determinar la simetría de los orbitales de acuerdo con los símbolos de Mulliken [79, 80] y establecer si son simétricos “a” o antisimétricos “b”, aplicaremos un C_2 sobre el nodo de los orbitales HOMO y LUMO (Fig. 52).

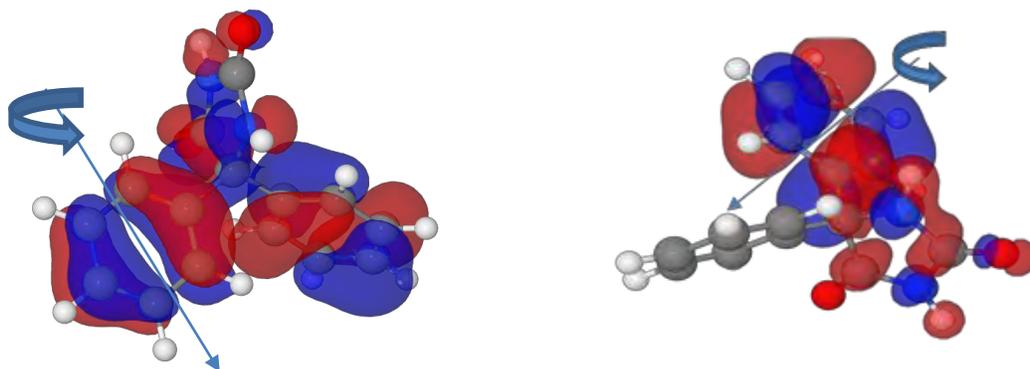


Figura 52. Operaciones de simetría, eje de rotación C_2 , sobre los orbitales de frontera del compuestos 5,5-difenilhidantoína.

Las fases de los orbitales no cambian, por lo tanto se trata de un orbital “a”, ahora en la Fig. 53 determinaremos si son simétricos, y les corresponde el subíndice “1” o antisimétricos y les corresponde el subíndice “2”, con respecto a un plano vertical (σ_v).

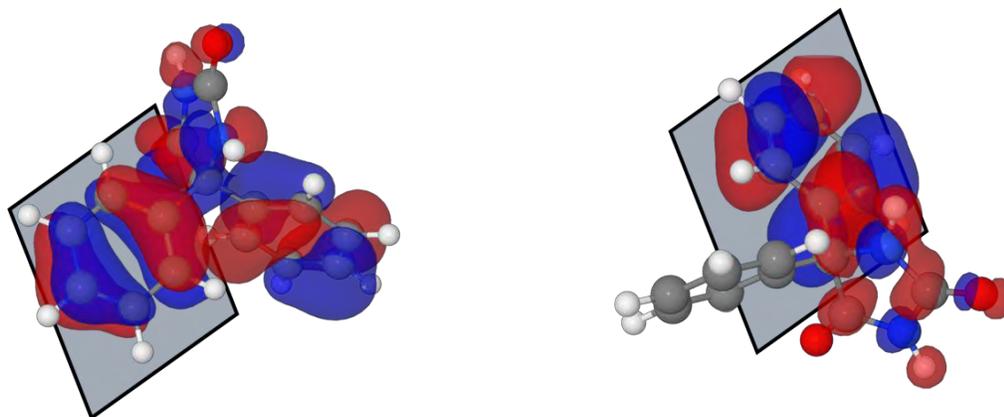


Figura 53. Operaciones de simetría, plano vertical (σ_v), sobre los orbitales de frontera del compuesto 5,5-difenilhidantoína.

Observamos que no se reflejan las mismas fases al aplicar el plano vertical, por lo tanto el subíndice es “2”, teniendo así un orbital simétrico, no degenerado a_2 . Por último, se determinará si es simétrico tipo *gerade* (g) o antisimétrico tipo *ungerade* (u) con respecto a un centro de inversión (i), tal como se muestra en la figura 54.

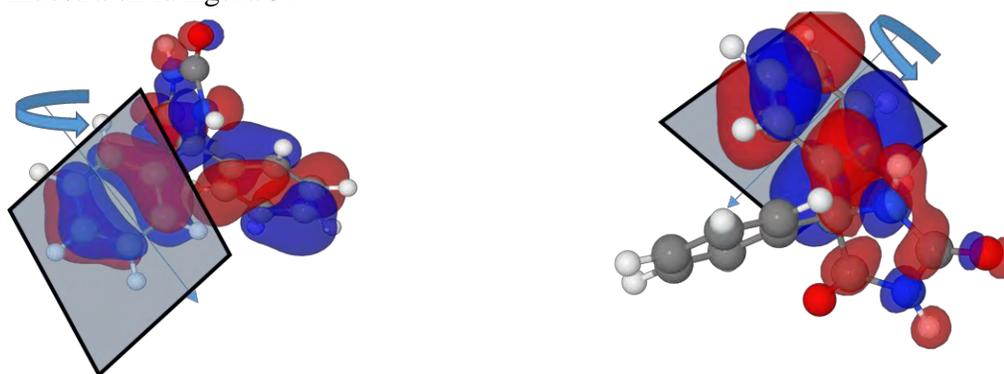


Figura 54. Operaciones de simetría, centro de inversión (i) (rotación seguida de una reflexión), sobre los orbitales de frontera del compuesto 5,5-difenilhidantoína.

Se establece el centro de inversión, y se tiene para el orbital HOMO que la fase no cambia respecto al centro de inversión, lo que significa que es simétrico *gerade* (g). En el caso del orbital LUMO, las fases cambian respecto al centro de inversión, siendo un orbital antisimétrico *ungerade* (u), con respecto a dicha operación de simetría. En conclusión, la transición electrónica de este fármaco (HTA1) ocurre desde el orbital HOMO tipo a_{2g} y un orbital LUMO tipo a_{2u} .

De la misma manera se estudiaron las simetrías de los orbitales para todos los compuestos en estudio, estableciendo así lo siguiente:

Tabla 21. Transiciones y orbitales involucrados en la transferencia de carga de los distintos compuestos en estudio.

Compuesto	Transición	Orbitales	Transición electrónica
acdabz	$b_{2g} \leftarrow b_{2u}$	$\Psi_4 \leftarrow \Psi_2$	$\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$
acda4bz	$b_{2g} \leftarrow b_{2u}$	$\Psi_4 \leftarrow \Psi_2$	$\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$
HTA1	$a_{2u} \leftarrow a_{2g}$	$\Psi_5 \leftarrow \Psi_3$	$n \rightarrow \pi^*$
HTA2	$a_{2u} \leftarrow a_{2g}$	$\Psi_5 \leftarrow \Psi_3$	$n \rightarrow \pi^*$
HTA3	$b_{2g} \leftarrow b_{2u}$	$\Psi_4 \leftarrow \Psi_2$	$n \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$

Es importante analizar con cuidado las diferencias de energía entre el segundo orbital molecular ocupado de más alta energía [HOMO-1] y de más alta energía [HOMO], el orbital molecular desocupado de más baja energía [LUMO] y el segundo desocupado de más baja energía [LUMO+1]. Esto se hizo en los compuestos *acda4bz* y el HTA2 (Fig. 55 y 56). Para el primer compuesto se tiene una diferencia de energía entre los orbitales HOMO-1 y LUMO+1 de -182,063 Kcal/mol, mientras que la diferencia entre los orbitales HOMO-LUMO es de -164,33 Kcal/mol. De la misma manera se obtuvieron estas energías para el compuesto hidantoinico HTA2, presentando un $\Delta E = -225,324$ Kcal/mol para los orbitales HOMO-1 y LUMO+1, y $\Delta E = -217,022$ Kcal/mol correspondiente a los orbitales HOMO-LUMO. A partir de estos resultados podemos deducir que cuanto menor es la diferencia de energía entre los orbitales, mayor será la facilidad con lo cual se mueven los electrones, es por esto que dichos compuestos experimentan transiciones a más baja energía.

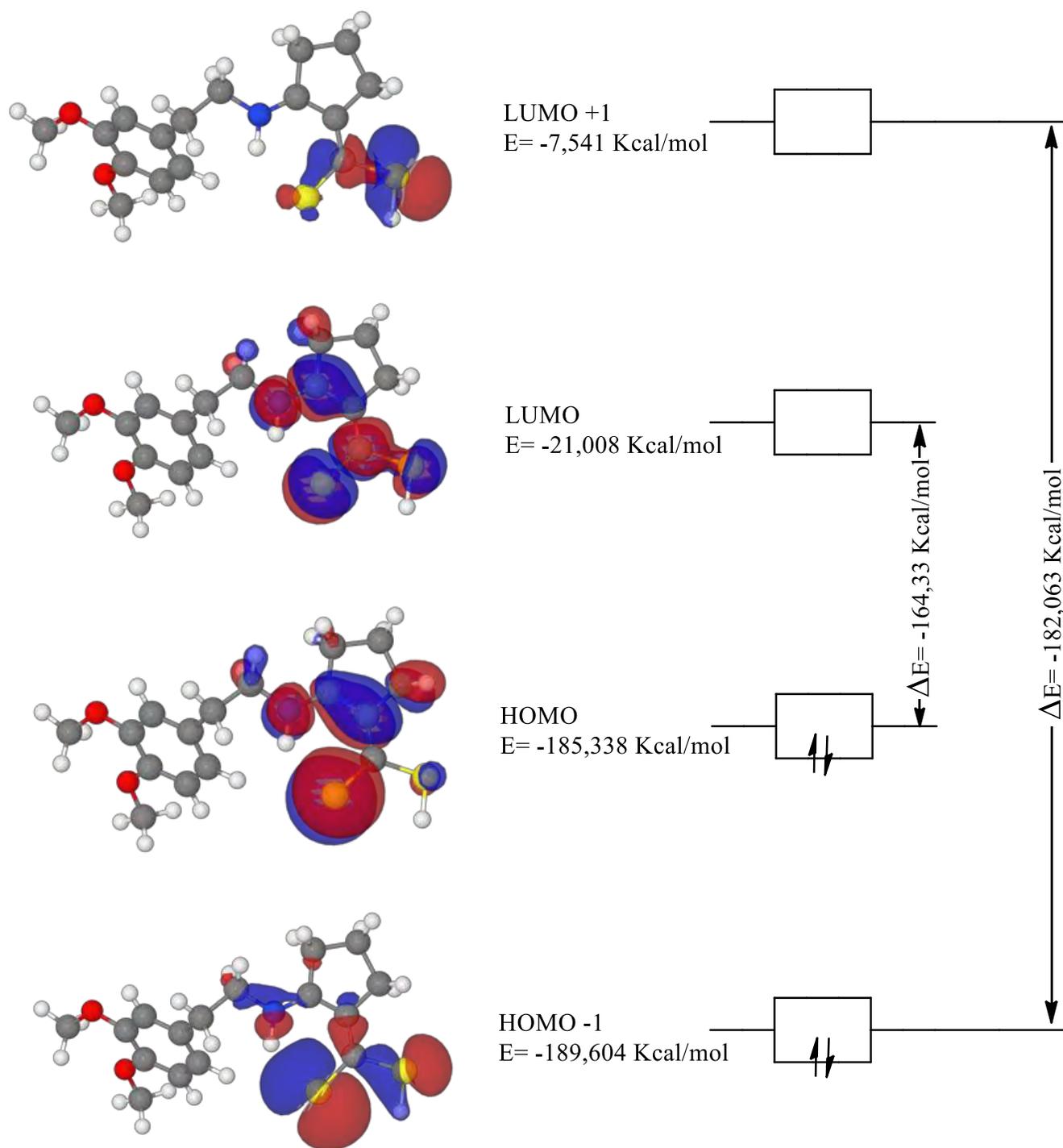


Figura 55. Diagrama de niveles de energía calculado para la estructura HOMO-LUMO en el compuesto acda4bz

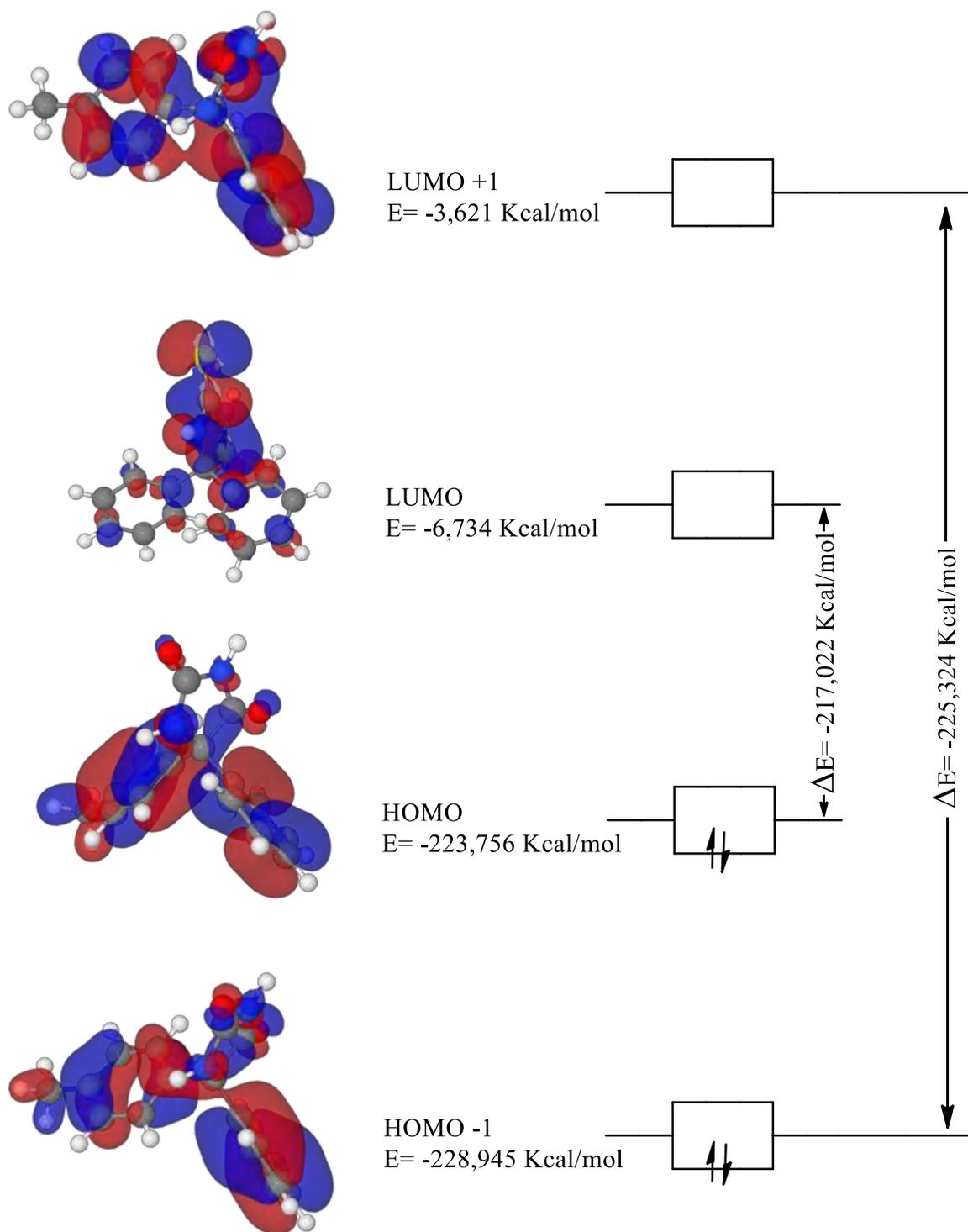


Figura 56. Diagrama de niveles de energía calculado para la estructura HOMO-LUMO en el compuesto HTA2.

A partir de la energía calculada para los orbitales moleculares de los compuestos en estudio, podemos inferir información sobre la energía de ionización (EI) y la afinidad electrónica (AE) de los compuestos en estudiado. La EI está relacionada con la energía necesaria para sustraer un electrón al sistema y la AE está relacionada con la energía desprendida al adicionar un electrón al sistema. Por tanto, la EI está relacionada con la energía del orbital HOMO y la AE con el orbital LUMO. De este modo se suelen obtener valores teóricos que reproducen muy bien los valores experimentales [81], siguiendo las siguientes relaciones:

$$EI = - E_{\text{HOMO}}$$

$$AE = - E_{\text{LUMO}}$$

Por otra parte, la electronegatividad absoluta (χ_{abs}) y la dureza absoluta (η) están relacionadas con estos términos [82] como se describe a continuación:

$$\chi_{\text{abs}} = (EI + AE) / 2 = (E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}}) / 2$$

$$\eta = (EI - AE) / 2 = (E_{\text{HOMO}} - E_{\text{LUMO}}) / 2$$

De esta manera, las moléculas duras se caracterizan por presentar una gran brecha energética HOMO-LUMO mientras que en las moléculas blandas, la brecha es pequeña [83]. Otras propiedades importantes relacionadas con el momento dipolar (μ) y la dureza son el índice de electrofilicidad (ω) y la suavidad global (S), que se muestran en las ecuaciones a continuación:

$$\omega = \mu^2 / 2\eta$$

$$S = 1 / \eta$$

Los indicadores globales (caracterizan las especies como un todo) son propiedades electrónicas intrínsecas del sistema que indican la disponibilidad que poseen para que ocurra un cambio químico. El potencial químico (μ) mide la tendencia de migración de los electrones del sistema en equilibrio, de manera que los electrones fluyen desde regiones de alto potencial químico hacia regiones de bajo potencial químico, este flujo ocurrirá hasta que μ sea constante a través de todo el sistema [84]. La dureza absoluta (η) puede ser vista como la resistencia de un sistema a la transferencia de carga, en consecuencia, permite caracterizar la estabilidad de los sistemas en estudio, el índice de electrofilicidad (ω) es una medida de la estabilización energética del sistema cuando se satura de electrones que provienen del medio externo, es decir, mide la tendencia que posee un sistema para atraer electrones. La suavidad (S), es el inverso de la dureza y constituye un concepto útil para la predicción de la “reactividad química”. Las moléculas blandas sufren cambios en su densidad electrónica más fácilmente que las moléculas duras y por ende, son más reactivas. En general, se puede decir que el incremento en la suavidad se asocia con el incremento de la reactividad química, mientras que la dureza está relacionada con la disminución de la reactividad química. Por otro lado, la electronegatividad absoluta (χ_{abs}) mide la habilidad para atraer electrones hacia sí misma. Los indicadores globales calculados para los compuestos en estudio se muestran en la tabla 22 y 23.

Tabla 22. Electronegatividad absoluta (χ_{abs}), dureza absoluta (η) de los compuestos en estudio.

Compuesto	χ_{abs}		$\bar{\chi}$	η		$\bar{\chi}$	μ (Debye)		$\bar{\chi}$
	PM6	PM7		PM6	PM7		PM6	PM7	
acdabz	-4,46	-4,675	-4,568	-3,07	-3,539	-3,619	7,43	7,991	7,711
acda4bz	-4,51	-4,662	-4,586	-3,68	-3,486	-3,583	8,65	7,444	8,047
HTA1	-5,01	-5,161	-5,131	-4,76	-4,751	-4,756	3,68	3,332	3,506
HTA2	-4,92	-4,998	-4,959	-4,63	-4,706	-4,666	4,16	4,006	4,083
HTA3	-4,92	-4,794	-4,857	-4,16	-4,047	-4,103	4,61	4,688	4,649

Tabla 23. Índice de electrofilicidad (ω) y suavidad global (S) de los compuestos en estudio.

ω		\bar{x}	S		\bar{x}
PM6	PM7		PM6	PM7	
-7,46	-7,251	-7,356	-0,27	-0,28	-0,275
-10,17	-7,949	-9,059	-0,27	-0,29	-0,28
-1,42	-1,169	-1,295	-0,21	-0,21	-0,21
-1,87	-1,705	-1,788	-0,22	-0,21	-0,215
-2,55	-2,715	-2,633	-0,24	-0,25	-0,245

Evaluando el valor absoluto en los cálculos realizados para los compuestos en estudio, se tiene que los compuestos más duros son HTA1> HTA2> HTA3> acdabz> acda4bz. De acuerdo a esto los compuestos más reactivos son: acda4bz> acdabz> HTA3> HTA2> HTA1.

10.1 Relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR).

La polarizabilidad puede discutirse de forma indirecta sobre la base de la dureza de una molécula. Es bien sabido, según la teoría de Pearson, que aquellas especies consideradas “duras” poseen poco volumen molecular, por ende, poca polarizabilidad, mientras que aquellas denominadas “blandas” tienen volúmenes moleculares considerablemente mayores y en consecuencia alta polarizabilidad. El índice de dureza (η) – definido anteriormente – indica de forma cuantitativa la polarizabilidad de una especie.

La tabla 22 presenta los índices de dureza para cada uno de los compuestos en estudio, como medida directa de su polarizabilidad, calculados mediante los métodos semi-empíricos PM6 y PM7, en esta se observa que el mayor índice de dureza se asocia al fármaco comercial 5,5-difenilhidantoina (HTA1), seguido del compuesto HTA2 y HTA3, siendo una medida para evaluar la actividad del fármaco, por lo tanto se esperaría que dichos compuestos tengan un mejor efecto que los pro-ligandos nitrógeno sulfurados.

Un fármaco depende de dos procesos:

- Farmacocinética: camino que sigue el fármaco desde su administración al organismo hasta el sitio de interés.
- Farmacodinamia: interacción del fármaco con el sitio específico de acción.

El primer proceso depende de la estructura molecular del compuesto, pues contabiliza la velocidad con la cual un compuesto llega a su sitio de acción y la interacción con las membranas celulares (medio lipofílico) y el citoplasma (medio acuoso).

Para evaluar el segundo proceso, se estudia la habilidad de un compuesto para particionarse en 1-octanol (simula la parte lipídica de la membrana) y agua. Se define como una medida de lipofilidad al coeficiente de partición P entre 1-octanol y agua, y se describe de la siguiente manera:

$$P = \frac{[\text{compuesto}]_{\text{octanol}}}{[\text{compuesto}]_{\text{agua}} (1 - \alpha)}$$

Donde α es el grado de disociación del compuesto en agua, calculado a partir de las constantes de disociación [85].

De la ecuación anterior se puede deducir que cuando un compuesto es más soluble en 1-octanol que en agua: P es mayor que 1, en consecuencia $\log P$ es positivo. De lo contrario, si un compuesto es más soluble en agua que en 1-octanol: P es menor que 1, por ende $\log P$ es negativo. En conclusión, se puede decir que a mayor valor de P mayor interacción del fármaco con la membrana lipídica, y a medida que P se acerca a 0, el compuesto permanece en la fase acuosa.

Para evaluar la relación estructura-actividad es posible aproximarse en función de dos parámetros fundamentales [86]:

- a) Polarizabilidad
- b) Lipofilicidad

En la tabla 24 se expone el volumen molecular y el logaritmo del coeficiente de partición de cada compuesto. El logaritmo del coeficiente de partición muestra valores positivos, indicando como ya se mencionó, que los compuestos estudiados son solubles en el segmento lipídico de la membrana (lipofílicos), esto quiere decir que atraviesan la membrana plasmática, el cual permite que el compuesto llegue hacia el sitio de acción. El fármaco de referencia (HTA1) posee un valor de 2,14 en base a este fármaco se comparan los demás compuestos, teniendo valores del logaritmo del coeficiente de partición por debajo del fármaco de referencia el compuesto acda4bz, indicando que su facilidad para atravesar la membrana plasmática es menor que el compuesto HTA1, por otro lado los compuestos acdabz, HTA2 y HTA3 atraviesan la membrana con mayor facilidad que el compuesto de referencia.

Tabla 24. Propiedades calculadas: Volumen (\AA^3) y Log P.

Compuesto	Volumen (\AA^3)	Log P
Acdabz	253,00	2,53
Acda4bz	267,67	1,75
HTA1	256,07	2,14
HTA2	274,18	2,63
HTA3	265,72	2,99

11. Ensayos biológicos.

Los roedores utilizados en este proyecto corresponden a la línea *NMRI* (pertenecientes al Bioterio de la Universidad de los Andes), ya que son no consanguíneos, es decir, animales de una misma especie genéticamente diferentes o genéticamente “no definidos”, a pesar de que son producidos dentro de una misma colonia cerrada durante más de cuatro generaciones, con un tamaño básico de la población que posibilita que el incremento de la consanguinidad no sea mayor del 1% por generación (Fig. 57).

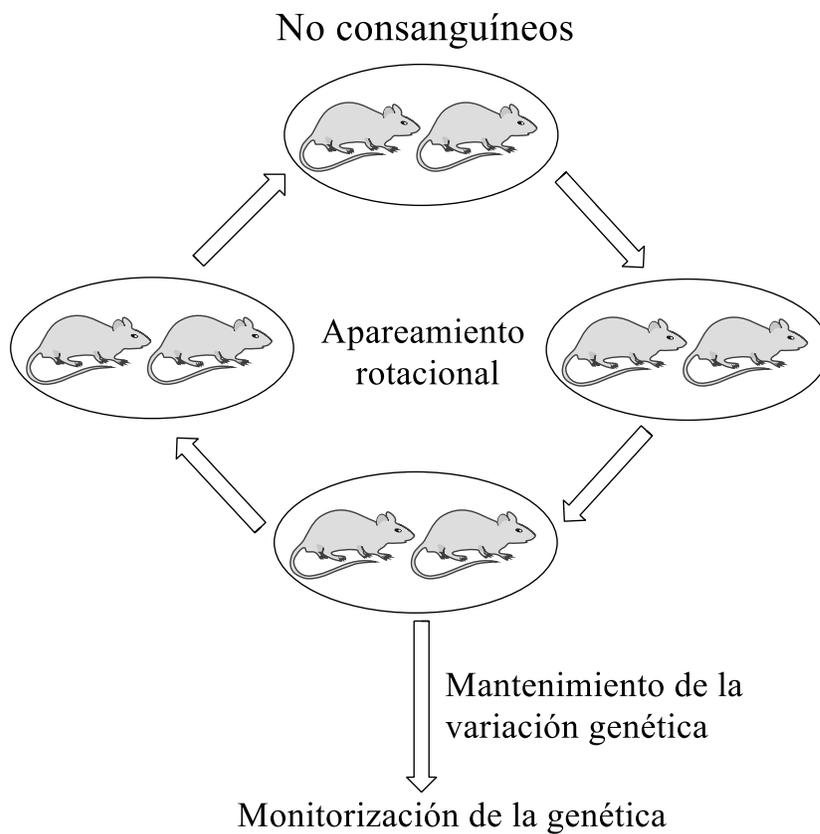


Figura 57. Diagrama de reproducción de una línea de roedores no consanguíneos.



Figura 58. Roedores *BIOU:NMRI*.

Los roedores se encuentran en condiciones controladas y específicas, las cuales se muestran en la tabla 25.

Tabla 25. Condiciones ambientales de los roedores en estudio.

Sexo	Macho
Línea	NMRI
Peso del roedor	(30 ± 2)g
Alimento (marca Protinal)	Ratarina, pasteurizada a 60 °C durante 10 minutos
Agua	Esterilizada a 120 °C durante 15 min
Encamado	Concha de arroz, esterilizada a 120 °C durante 15 minutos
Jaula	Esterilizada a 120 °C durante 15 minutos Dimensiones: L = 26 cm, A= 20 cm, h= 13 cm

En primer lugar, se procedió a estudiar el efecto de la convulsión bajo la dosificación con pilocarpina (225mg/Kg), vía intraperitoneal (Fig. 59), utilizando tres roedores para el estudio. Las convulsiones aparecían en promedio 18 min después de ser dosificados, las manifestaciones de la convulsión se encuentran especificadas en la tabla 26, en la tabla 27 también se muestra el periodo interictal para los tres roedores en estudio.

**Figura 59.** Dosificación vía intraperitoneal de un roedor *BIOU:NMRI*.**Tabla 26.** Manifestaciones de la convulsión utilizando pilocarpina en roedores *BIOU:NMRI*.

Roedor	Tiempo de aparición de la convulsión (min)	Tiempo de duración de la convulsión (min)	Manifestaciones de la convulsión
1	10	0,1	Piloerección, temblores, defecación, inmovilidad.
	21	0,6	
	24	0,3	
	25	0,7	
2	23	0,2	Piloerección, temblores, defecación, inmovilidad.
	27	0,3	
	30	0,4	
	32	0,5	
	34	0,7	
3	22	0,2	Piloerección, temblores, defecación, inmovilidad.
	25	0,2	
	31	0,4	
	33	0,6	
	34	0,7	

Tabla 27. Periodo interictal utilizando pilocarpina en roedores *BIOU:NMRI*.

Roedor	Periodo interictal (min)
1	11
	3
	1
2	4
	3
	2
	2
3	3
	6
	2
	1

Las condiciones de los roedores se clasificaran de la siguiente manera:

- **Muerto:** defunción del roedor.
- **Muy bueno:** si el roedor puede moverse normalmente.
- **Bueno:** si el roedor permanece inmóvil (tranquilo).
- **Estable:** inmovilidad del roedor, con espasmos generalizados en las extremidades (delanteras, traseras o ambas).
- **Mala:** si el roedor tiene espasmos en todo su cuerpo.
- **Muy mala:** inmovilidad y respiración lenta.

En función de lo anterior se plantea una escala cuantitativa, para la evaluación de las condiciones del roedor en función del tiempo. La escala se acotará como sigue:

Tabla 28. Escala cuantitativa de las condiciones físicas de los roedores *BIOU:NMRI*.

Escala numérica	Condición física
0	Muerto
1	Muy bueno
2	Bueno
3	Estable
4	Mala
5	Muy mala

Se dosificaron cinco (5) roedores con la 5,5-difenilhidantoína (HTA1), el cual será el compuesto de referencia, puesto que es ampliamente comercializado contra la epilepsia. Comparando el tiempo de aparición de las convulsiones con HTA1, y las inducidas por pilocarpina, observamos que dicho fármaco tiene un efecto protector favorable, ya que extiende el tiempo en el cual aparece la crisis epiléptica, en la tabla 29 se muestra que los roedores tienen en promedio 4 episodios epilépticos. El periodo interictal, que es el tiempo que transcurre entre una crisis y otra se muestra en la tabla 30.

Se estudiaron las condiciones de los roedores durante los ocho días de evaluación, y se realizaron distintos gráficos de 360, representando así el porcentaje del estado físico. Estos pueden observarse en las tablas 32 a 36.

Tabla 29. Manifestaciones de la convulsión utilizando HTA1 como fármaco protector en roedores *BIOU:NMRI*.

Roedor	Tiempo de aparición de la convulsión (min)	Tiempo de duración de la convulsión (min)	Manifestaciones de la convulsión
1	26	0,2	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad.
	43	0,2	
	45	1,2	
	47	0,1	
2	32	0,2	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad.
	35	0,2	
	36	0,3	
	38	0,2	
	39	0,6	
3	24	0,1	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad.
	32	0,2	
	34	0,3	
	35	0,3	
4	23	0,3	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad.
	29	0,2	
	30	0,2	
	31	0,4	
5	39	0,1	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad

Tabla 30. Periodo interictal utilizando HTA1 como fármaco protector en roedores *BIOU:NMRI*.

Roedor	Periodo interictal (min)
1	17
	2
	2
2	3
	1
	2
3	1
	8
	2
4	1
	6
	1
5	1
	0

Tabla 31. Condición de los roedores durante los ocho (8) días de observación con el HTA1.

Día	Roedor				
	1	2	3	4	5
1 (dosificación)	4	4	4	4	4
2	2	3	3	2	3
3	2	2	3	2	2
4	2	2	2	2	2
5	2	2	2	2	2
6	2	1	1	2	1
7	1	1	1	2	1
8 (sacrificio)	1	1	1	1	1

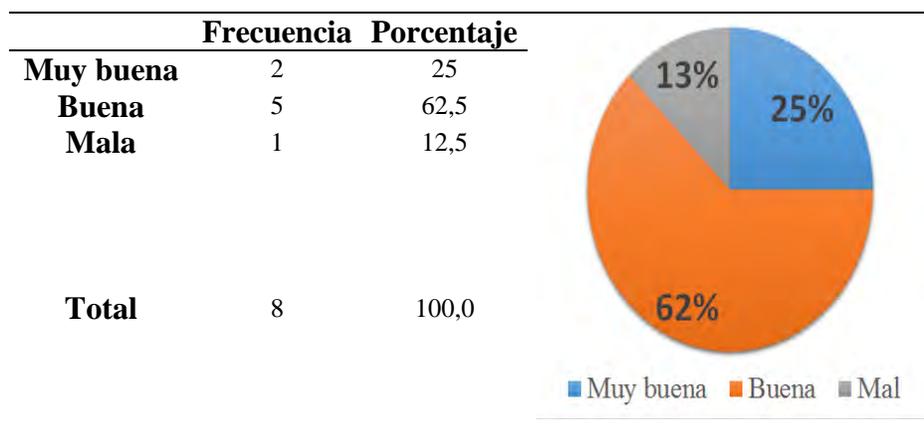
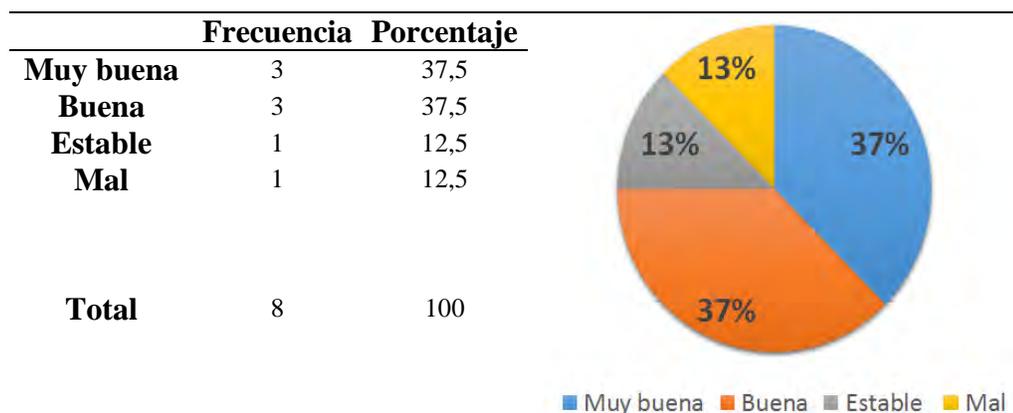
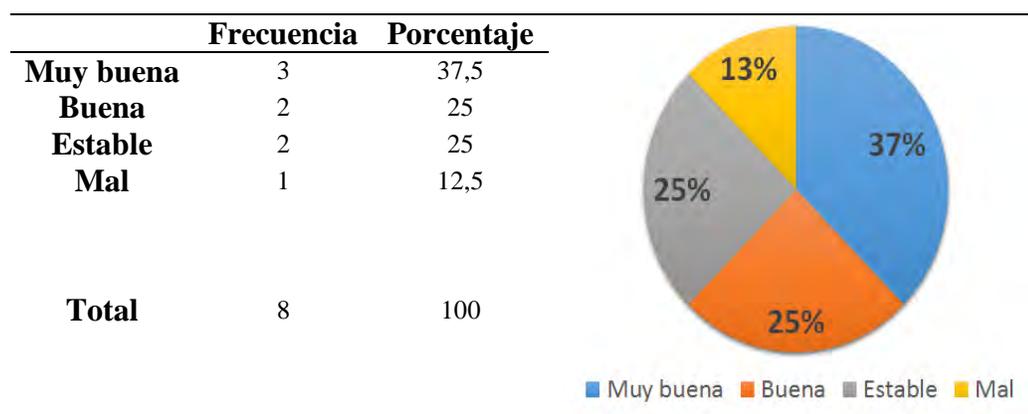
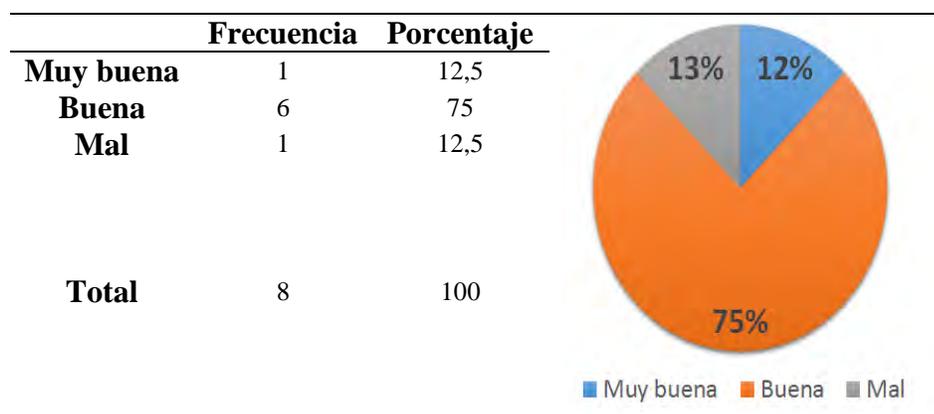
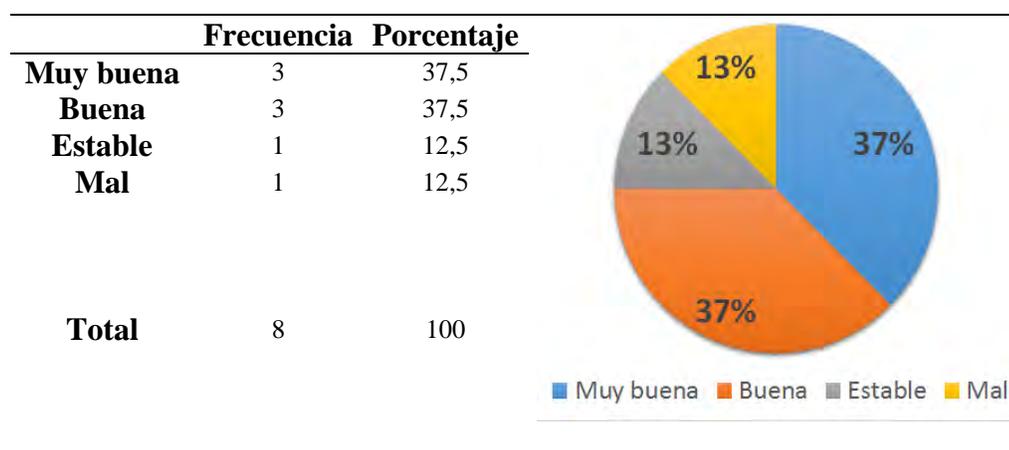
Tabla 32. Estudio estadístico para el roedor 1 utilizando como fármaco HTA1.**Tabla 33.** Estudio estadístico para el roedor 2 utilizando como fármaco HTA1.**Tabla 34.** Estudio estadístico para el roedor 3 utilizando como fármaco HTA1.

Tabla 35. Estudio estadístico para el roedor 4 utilizando como fármaco HTA1.**Tabla 36.** Estudio estadístico para el roedor 5 utilizando como fármaco HTA1.

El compuesto 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína (HTA2) tuvo un efecto protector favorable, ya que el número de episodios epilépticos es en promedio de uno (1) por roedor, presentando dicho compuesto una disminución de los episodios considerable respecto al fármaco de referencia. Los valores de aparición y duración de las convulsiones se muestran en la tabla 37. Con este fármaco el periodo interictal disminuye (tabla 38) comparado con el periodo interictal para la HTA1. En la tabla 39 se encuentran las condiciones físicas de los roedores para este fármaco, las cuales fueron muy buenas, es decir los roedores se recuperaron más fácilmente con la HTA2. En las tablas 40 a 44 se encuentra el estudio estadístico respecto a las condiciones físicas para cada roedor en específico.

El fármaco HTA2 posee una diferencia estructural respecto a la HTA1, y es un metilo en posición cuatro (4-CH₃) en uno de sus anillos bencénicos, el cual puede modificar significativamente la duración de la acción del compuesto y la potencia del mismo [82]. Es por esto que el HTA2 tuvo un mejor efecto que el fármaco de referencia (HTA1).

Tabla 37. Manifestaciones de la convulsión utilizando HTA2 como fármaco protector en roedores *BIOU:NMRI*.

Roedor	Tiempo de aparición de la convulsión (min)	Tiempo de duración de la convulsión (min)	Manifestaciones de la convulsión.
1	28	0,1	Piloerección, temblores, defecación, inmovilidad.
2	23	0,2	Defecación, inmovilidad.
	29	0,3	
3	27	0,2	Piloerección, temblores, defecación, inmovilidad.
	33	0,3	
	36	0,3	
	40	0,3	
4	NC	NC	Defecación, inmovilidad.
5	NC	NC	Defecación, inmovilidad.

NC: No convulsionó.

Tabla 38. Periodo interictal utilizando HTA 2 como fármaco protector en roedores *BIOU:NMRI*.

Roedor	Periodo interictal (min)
1	0
2	6
	6
3	3
	4
4	0
5	0

Tabla 39. Condición de los roedores durante los ocho (8) días de observación con el HTA2.

Día	Roedor				
	1	2	3	4	5
1 (dosificación)	4	3	3	4	4
2	2	3	2	3	3
3	2	2	2	2	2
4	2	2	2	2	1
5	2	2	2	2	1
6	2	1	2	1	1
7	2	1	1	1	1
8 (sacrificio)	1	1	1	1	1

Tabla 40. Estudio estadístico para el roedor 1 utilizando como fármaco HTA2.

	Frecuencia	Porcentaje
Muy buena	1	12,5
Buena	6	75
Mala	1	12,5
Total	8	100

A pie chart illustrating the distribution of conditions for roedor 1. The chart is divided into three segments: a large orange segment representing 'Buena' at 75%, a blue segment representing 'Muy buena' at 12.5%, and a grey segment representing 'Mala' at 12.5%. A legend below the chart identifies the colors: blue for 'Muy buena', orange for 'Buena', and grey for 'Mal'.

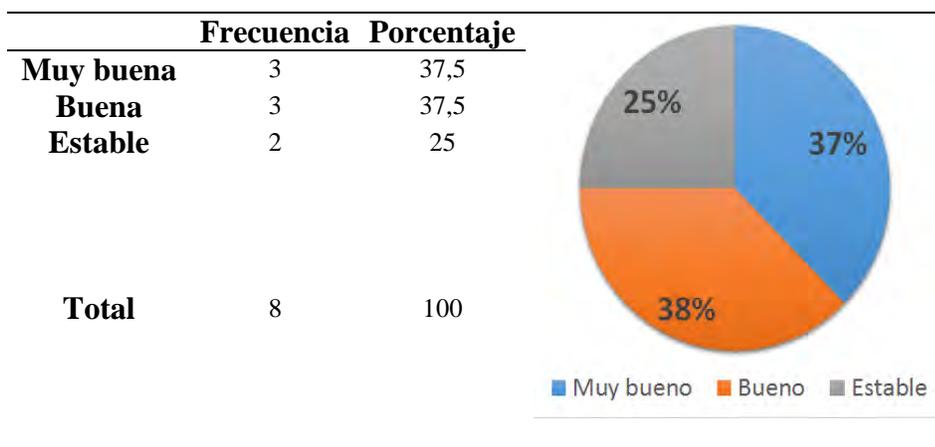
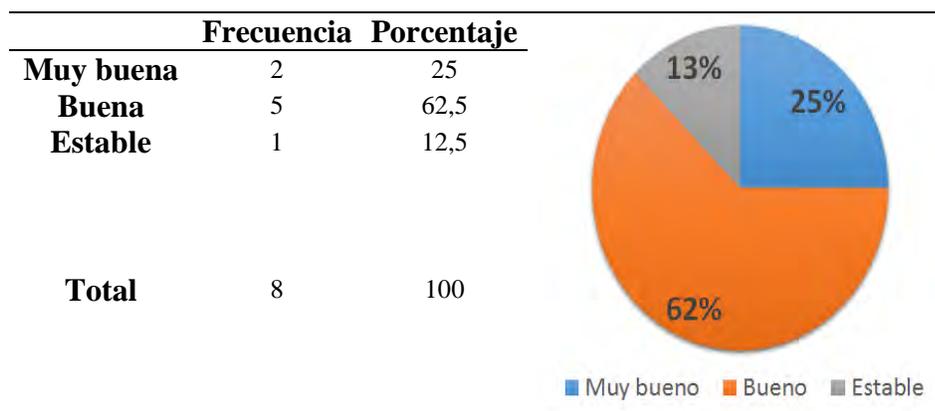
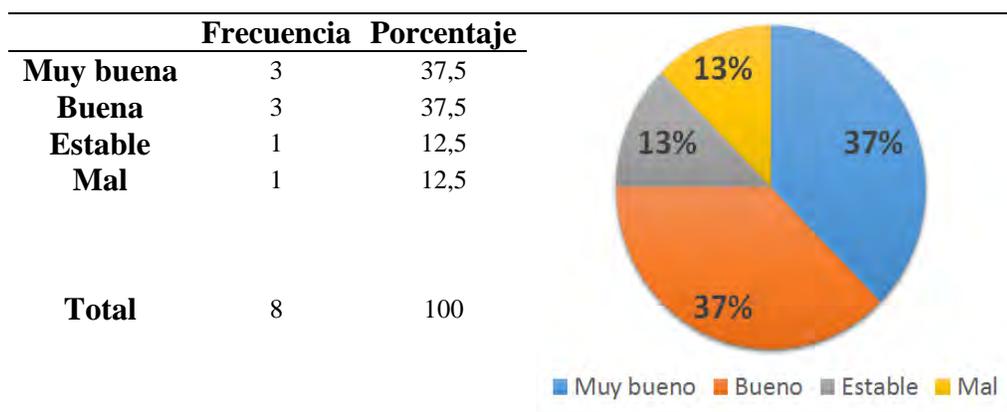
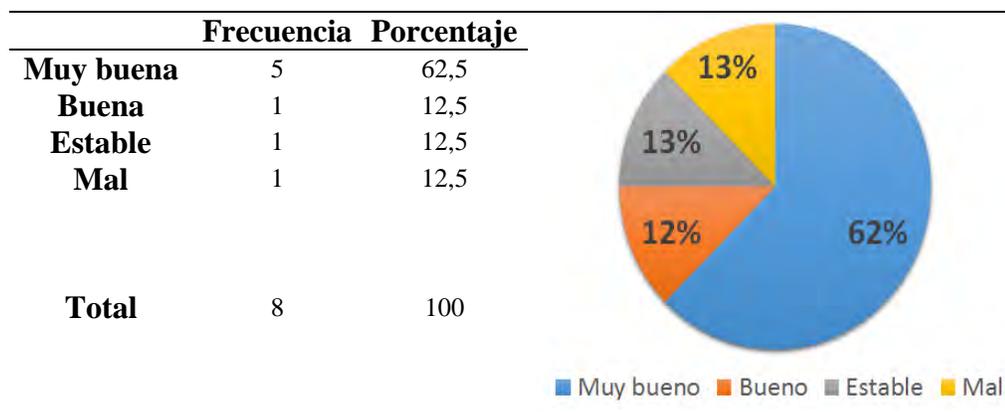
Tabla 41. Estudio estadístico para el roedor 2 utilizando como fármaco HTA2.**Tabla 42.** Estudio estadístico para el roedor 3 utilizando como fármaco HTA2.**Tabla 43.** Estudio estadístico para el roedor 4 utilizando como fármaco HTA2.

Tabla 44. Estudio estadístico para el roedor 5 utilizando como fármaco HTA2.

Para el compuesto 5,5-difenil-2-tiohidantoina (HTA3) también se obtuvo un efecto protector favorable, puesto que los roedores presentan dos (2) episodios epilépticos en promedio, adicionalmente, las crisis aparecen 10 minutos después en comparación con HTA1. En la tabla 45 se observan el tiempo de aparición y duración de las convulsiones así como también la manifestación de las mismas para cada roedor, el periodo interictal disminuye con este compuesto como puede evidenciarse en la tabla 46. Las condiciones físicas de los roedores fueron buenas, este hecho se resume en la tabla 47. Se realizó un estudio estadístico de las condiciones físicas para cada roedor las cuales se encuentran en las tablas 48-52.

Tabla 45. Manifestaciones de la convulsión utilizando HTA3 como fármaco protector en roedores *BIOU:NMRI*.

Roedor	Tiempo de aparición de la convulsión (min)	Tiempo de duración de la convulsión (min)	Manifestaciones de la convulsión.
1	32	0,2	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad.
	41	0,5	
	43	0,2	
2	NC	NC	Defecación, inmovilidad.
3	26	0,1	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad.
	30	0,3	
4	29	0,2	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad.
	31	0,2	
	33	0,2	
5	76	0,2	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad.
	81	0,4	

Tabla 46. Periodo interictal utilizando HTA 3 como fármaco protector en roedores *BIOU:NMRI*.

Roedor	Periodo interictal (min)
1	9
	2
2	0
3	4
4	2
	2
5	5

Tabla 47. Condición de los roedores durante los ocho (8) días de observación con el HTA3.

Día	Roedor				
	1	2	3	4	5
1 (dosificación)	4	4	3	4	4
2	3	3	2	3	3
3	2	3	2	3	3
4	2	2	2	3	3
5	2	2	2	3	3
6	1	2	2	2	2
7	1	1	1	2	2
8 (sacrificio)	1	1	1	1	1

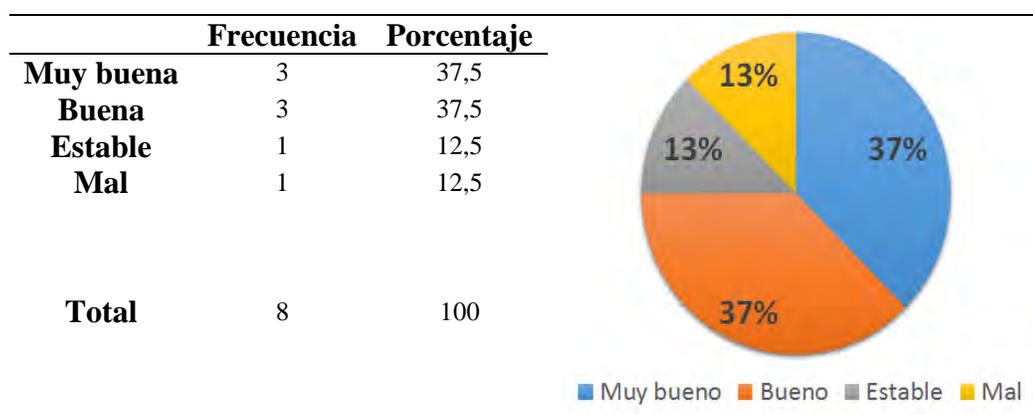
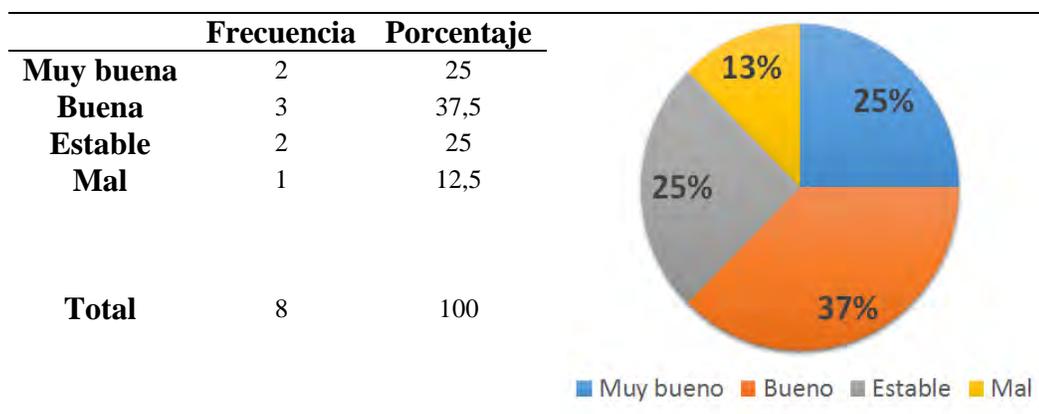
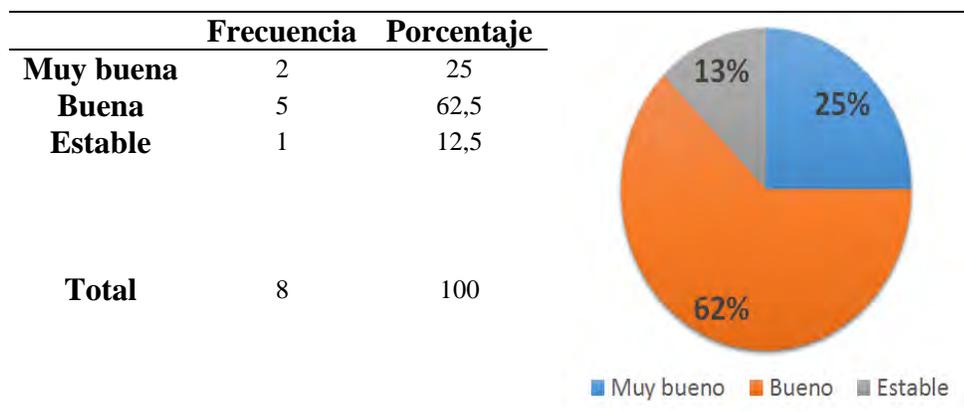
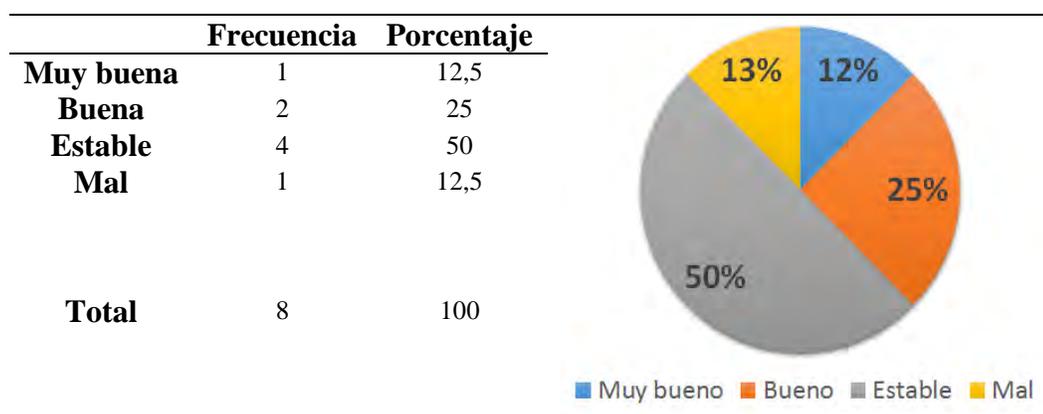
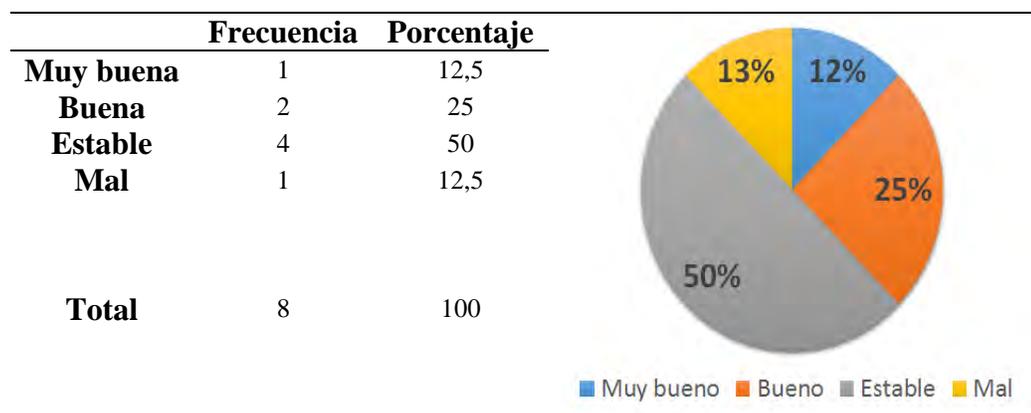
Tabla 48. Estudio estadístico para el roedor 1 utilizando como fármaco HTA3.**Tabla 49.** Estudio estadístico para el roedor 2 utilizando como fármaco HTA3.

Tabla 50. Estudio estadístico para el roedor 3 utilizando como fármaco HTA3.**Tabla 51.** Estudio estadístico para el roedor 4 utilizando como fármaco HTA3.**Tabla 52.** Estudio estadístico para el roedor 5 utilizando como fármaco HTA3.

El compuesto ácido 2-(bencilamino)ciclopent-1-enoditiocarboxílico (acdabz) no tuvo un efecto favorable ya que los roedores experimentan un mayor número de convulsiones en comparación con el fármaco de referencia HTA 1 (tabla 53), aumentando de esta manera el periodo interictal (tabla 54). Los roedores experimentaron condiciones físicas definidas como muy malas, es decir inmóviles y con respiración lenta. Con dicho compuesto ningún roedor tuvo una condición física de muy buena, es decir, no llegaron a moverse normalmente (tabla 55). El estudio estadístico para los distintos roedores con el proligando acdabz se encuentran en las tablas 56-60.

Tabla 53. Manifestaciones de la convulsión utilizando el proligando acdabz como fármaco protector en roedores *BIOU:NMRI*.

Roedor	Tiempo de aparición de la convulsión (min)	Tiempo de duración de la convulsión (min)	Manifestaciones de la convulsión.
1	39	0,3	Piloerección, temblores, defecación, inmovilidad.
	41	0,2	
	43	0,3	
	45	0,3	
	54	0,2	
2	38	0,2	Defecación, inmovilidad.
	71	0,1	
	75	0,1	
	78	0,3	
	81	0,1	
	83	0,2	
	84	0,4	
	87	0,2	
	88	0,8	
90	0,6		
3	25	0,2	Piloerección, temblores, defecación, inmovilidad.
	32	0,5	
	35	0,8	
	36	0,6	
4	26	0,4	Defecación, inmovilidad.
	31	0,2	
	32	0,2	
	33	0,2	
	34	0,2	
	35	0,3	
	41	0,2	
44	0,3		
5	47	0,2	Defecación, inmovilidad.

Tabla 54. Periodo interictal utilizando acdabz como fármaco protector en roedores *BIOU: NMRI*.

Roedor	Periodo interictal (min)
1	2
	2
	2
	9
2	33
	4
	3
	3
	2
	1
	3
	1
	2
	3
3	
1	
4	5
	1
	1
	1
	1
	6
5	3
	0

Tabla 55. Condición de los roedores durante los ocho (8) días de observación con el acdabz.

Día	Roedor				
	1	2	3	4	5
1 (dosificación)	4	5	5	4	5
2	4	5	5	4	4
3	3	3	5	3	4
4	3	3	4	3	4
5	3	3	3	2	3
6	3	2	3	2	3
7	2	2	2	2	2
8 (sacrificio)	2	2	2	2	2

Tabla 56. Estudio estadístico para el roedor 1 utilizando como fármaco acdabz.

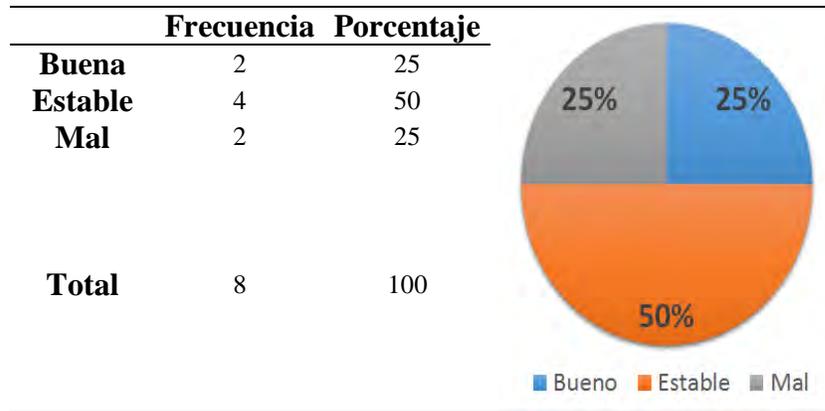


Tabla 57. Estudio estadístico para el roedor 2 utilizando como fármaco acdabz.

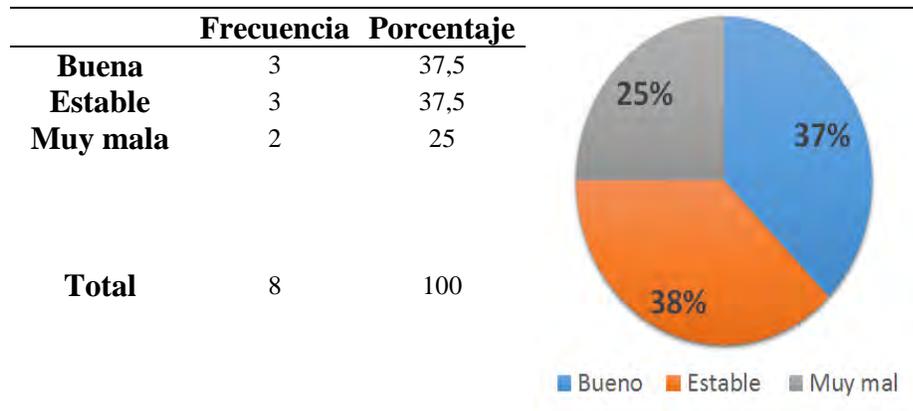


Tabla 58. Estudio estadístico para el roedor 3 utilizando como fármaco acdabz.

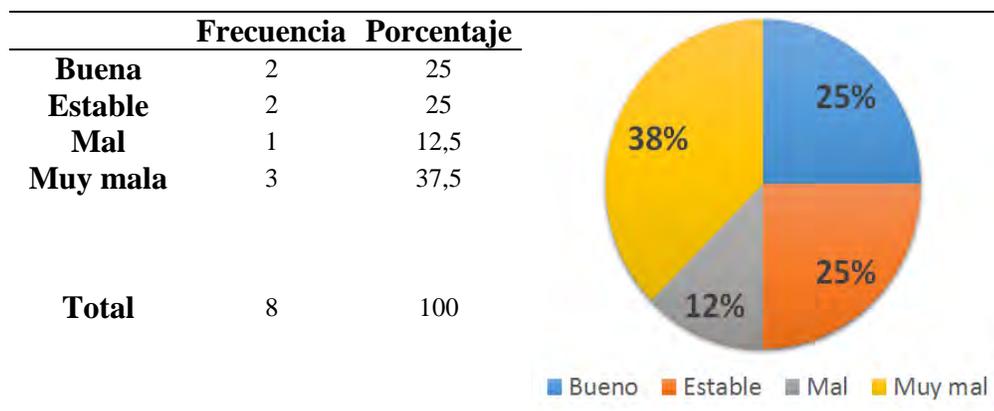
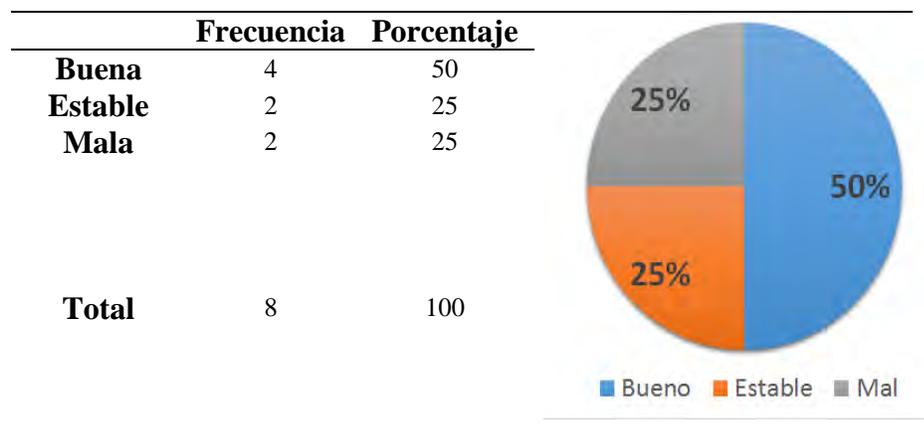
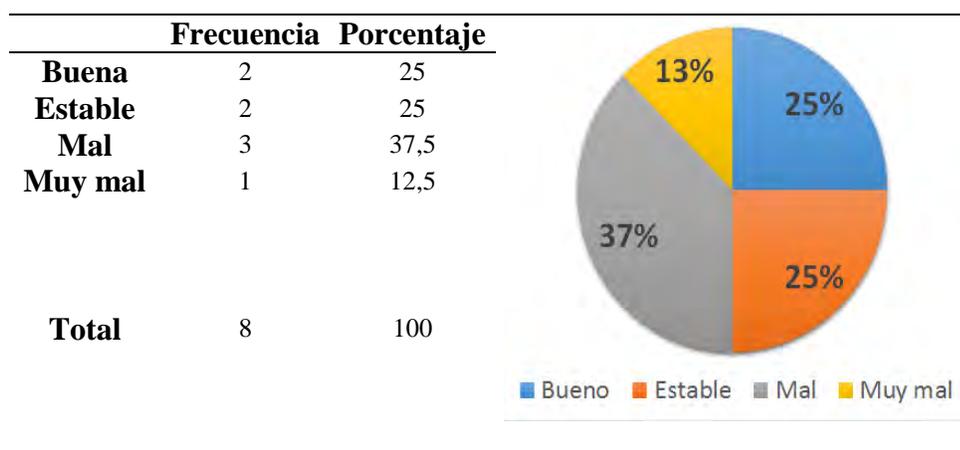


Tabla 59. Estudio estadístico para el roedor 4 utilizando como fármaco acdabz.**Tabla 60.** Estudio estadístico para el roedor 5 utilizando como fármaco acdabz.

En el caso del proligando ácido 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxílico (acda4bz), se obtuvo un efecto protector favorable, ya que el número de episodios epilépticos disminuye, y la crisis aparece aproximadamente 6 minutos después (tabla 61), comparándola con el fármaco de referencia HTA1. De igual manera, disminuye el tiempo entre una crisis y otra (tabla 62). Las condiciones físicas de los roedores durante ocho (8) días de observación se encuentran en la tabla 63, teniendo en general un estado físico definido anteriormente como bueno, en las tablas 64 a 68 se puede ver el estudio estadístico para los diferentes roedores utilizados para examinar el proligando acda4bz.

Tabla 61. Manifestaciones de la convulsión utilizando el proligando acda4bz como fármaco protector en ratones *BIOU:NMRI*.

Roedor	Tiempo de aparición de la convulsión (min)	Tiempo de duración de la convulsión (min)	Manifestaciones de la convulsión.
1	35	0,2	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad.
	56	0,3	
2	NC	NC	Defecación, inmovilidad.
3	26	0,1	Piloerección, Temblores, defecación, inmovilidad.
	32	0,2	
	34	0,3	
4	32	0,2	Defecación, inmovilidad.
	46	0,7	
	49	0,1	
	51	0,3	
5	35	0,3	Defecación, inmovilidad.
	44	0,5	
	47	0,3	

Tabla 62. Periodo interictal utilizando acda4bz como fármaco protector en roedores *BIOU:NMRI*.

Roedor	Periodo interictal (min)
1	21
2	0
3	6
	2
4	14
	3
	2
5	9
	3

Tabla 63. Condición de los roedores durante los ocho (8) días de observación con el acda4bz.

Día	Roedor				
	1	2	3	4	5
1 (dosificación)	4	4	4	4	4
2	3	3	2	3	3
3	3	3	2	3	3
4	2	3	2	2	3
5	2	2	2	2	3
6	2	1	2	2	2
7	1	1	2	1	2
8 (sacrificio)	1	1	1	1	2

Tabla 64. Estudio estadístico para el roedor 1 utilizando como fármaco acda4bz.

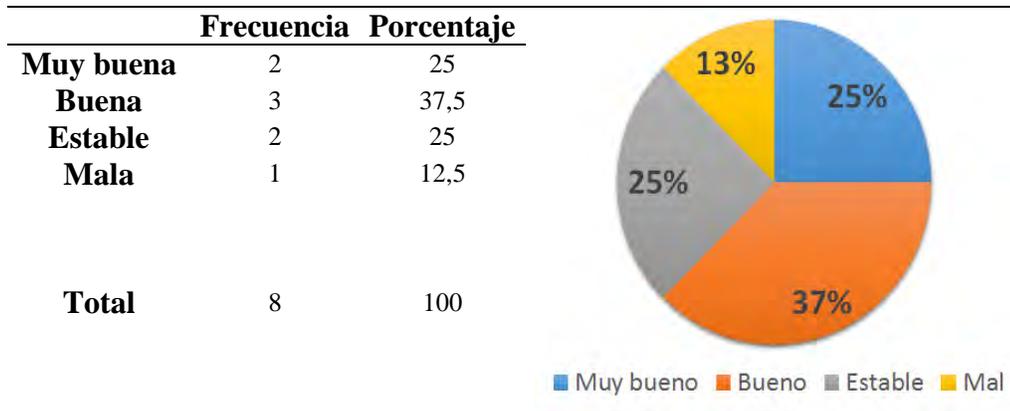


Tabla 65. Estudio estadístico para el roedor 2 utilizando como fármaco acda4bz.

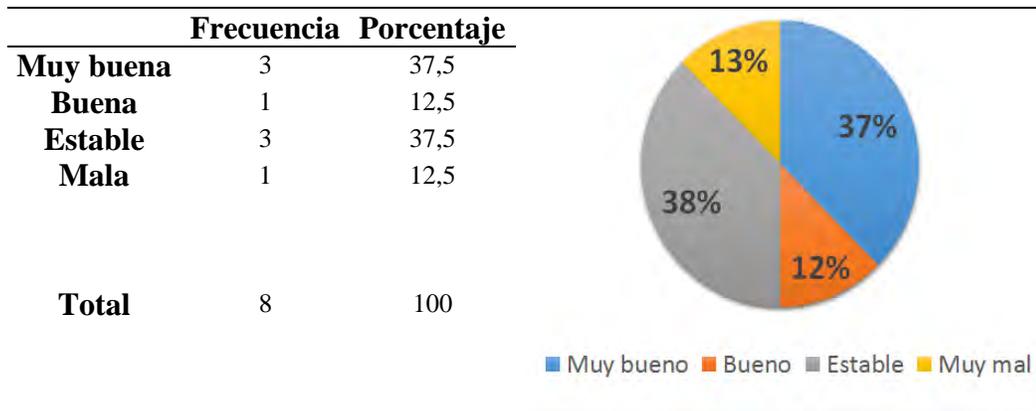


Tabla 66. Estudio estadístico para el roedor 3 utilizando como fármaco acda4bz.

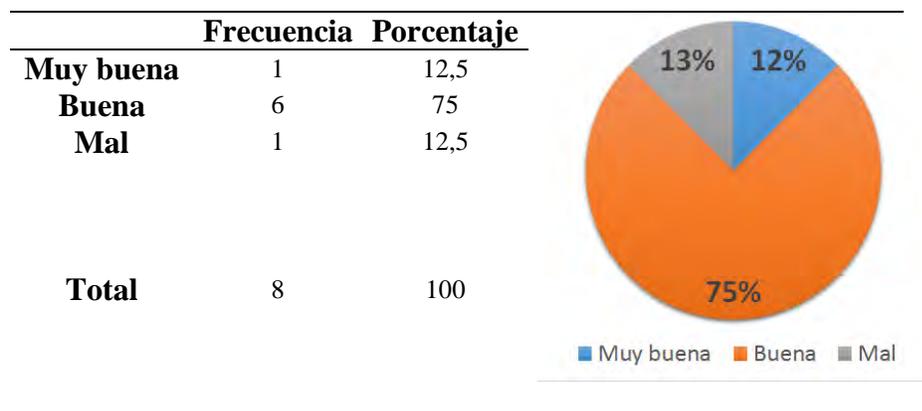
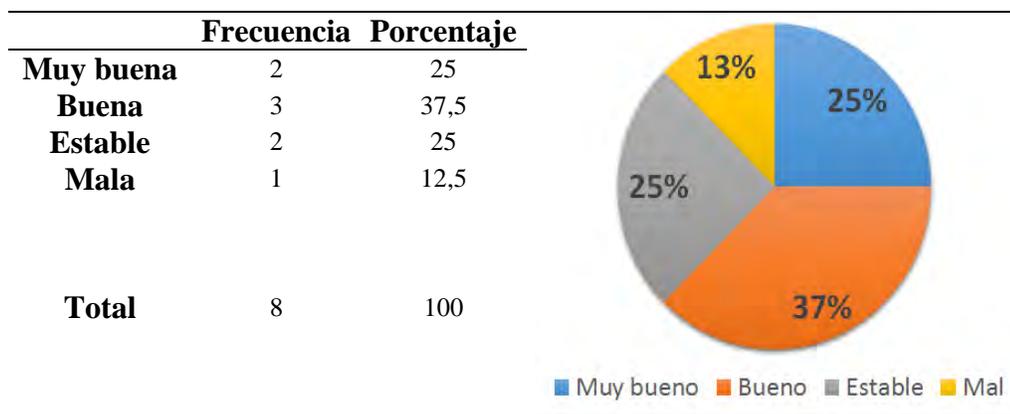
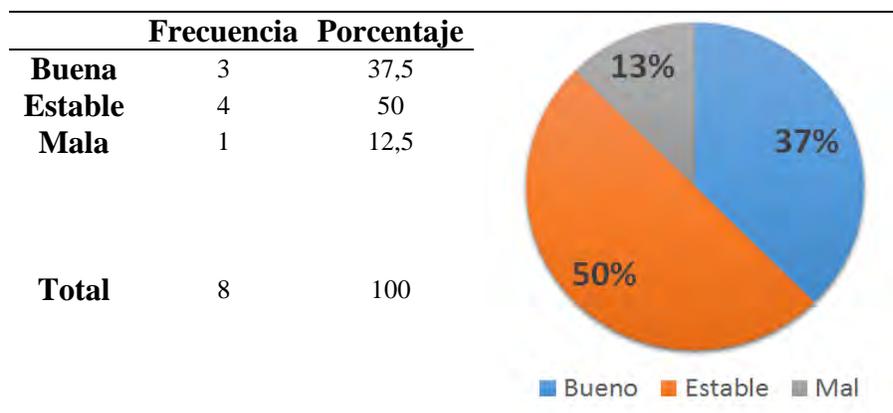


Tabla 67. Estudio estadístico para el roedor 4 utilizando como fármaco acda4bz.**Tabla 68.** Estudio estadístico para el roedor 5 utilizando como fármaco acda4bz.

En la figura 59a se representa un diagrama del estado físico “muy bueno” de los roedores *BIOU:NMRI* dosificados con los distintos compuestos en estudio, en este gráfico se observa que para el compuesto HTA2, los roedores tienen una mejor respuesta en cuanto a su condición que el fármaco comercial (HTA1), con el cual tienen un porcentaje de 28 %, posteriormente se tiene el compuesto HTA3 con un porcentaje de 21 % y el proligando acda4bz con 19 %. El compuesto acdabz no se encuentra en dicha representación, puesto que ningún roedor dosificado con este proligando experimentó un estado físico definido como “muy buena”. Mientras que en la figura 59b se presenta la clasificación del estado físico “malo” de los roedores *BIOU:NMRI*, para cada compuesto en estudio, el compuesto de referencia (HTA1) y el proligando acda4bz muestran un porcentaje de 20 %, seguido del compuesto HTA3 que presenta un porcentaje menor (16 %). Los roedores que se recuperaron mejor fueron aquellos dosificados con el HTA2, por lo tanto la clasificación de su condición física definida como “mala” presenta un menor valor (12 %). Los roedores que mayormente percibieron el estado físico definido anteriormente como “malo” fueron los dosificados con el proligando acdabz, por ende no presenta actividad como fármaco anticonvulsivante.

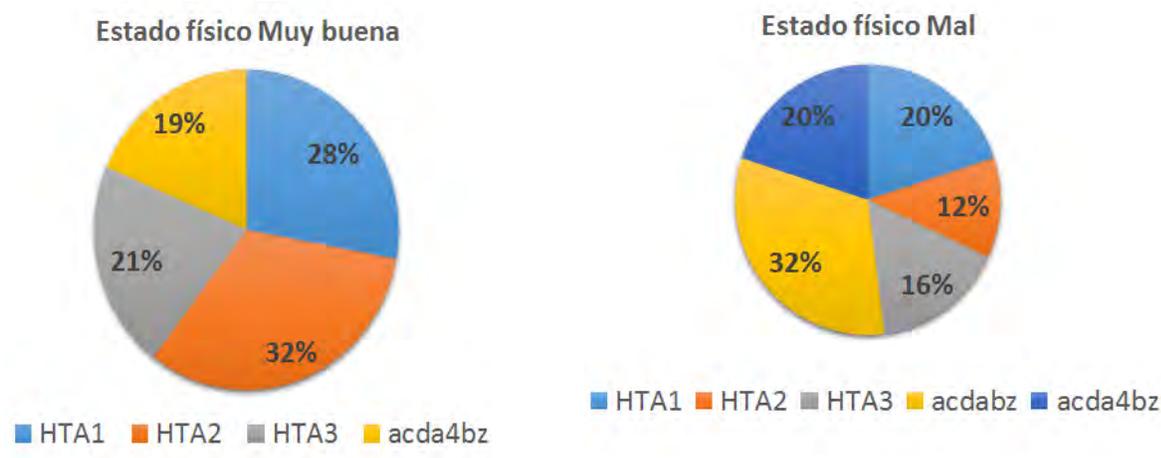


Figura 60. a) Estado físico “muy bueno” en los roedores con los diferentes compuestos. b) Estado físico “malo” en los roedores con los diferentes compuestos.

En la tabla 69 se resume el número de convulsiones experimentadas por los roedores *BIOU:NMRI* para cada compuesto en estudio. Como ya se ha mencionado, el compuesto de referencia en este trabajo es la 5,5-difenilhidantoína (HTA1), en base a esta serán evaluados los demás. Observamos así que el compuesto que reduce notablemente las convulsiones es la 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína (HTA2), teniendo un efecto protector favorable, mayor que el fármaco comercial, de igual manera actúan los compuestos 5,5-difenil-2-tiohidantoína (HTA3) y acda4bz reduciendo la frecuencia de las convulsiones en los roedores. Por su parte, el proligando acdabz aumentó el número de convulsiones, es decir, no muestra un efecto protector en las crisis convulsivas.

Tabla 69. Frecuencia de las convulsiones en roedores *BIOU:NMRI* con los distintos fármacos.

Fármaco	Roedor	Roedor	Roedor	Roedor	Roedor	Promedio
	1	2	3	4	5	
5,5-difenilhidantoína (HTA1)	4	5	4	4	1	3,6
5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoína (HTA2)	1	2	4	0	0	1,4
5,5-difenil-2-tiohidantoína (HTA3)	3	0	2	3	2	2
acda4bz	2	0	3	4	3	2,4
acdabz	5	10	4	8	1	5,6

Por último, se realizaron las respectivas necropsias a los roedores, ocho días después de ser dosificados, sacrificándolos en una cámara de halotano. Cada uno de ellos fue comparado con una muestra de tres roedores control-control, los cuales no fueron dosificados con ningún tipo de compuesto. Los resultados fueron los siguientes:

- Roedores *BIOU:NMRI* control-control

Son aquellos roedores utilizados para evaluar algún tipo de variación en el ambiente, sin ser dosificados. En la figura 61 se muestran tres roedores, en donde se pueden apreciar sus órganos: corazón, pulmones, vesícula y estómago, así como también los intestinos grueso y delgado de los roedores *BIOU:NMRI* en condiciones normales.

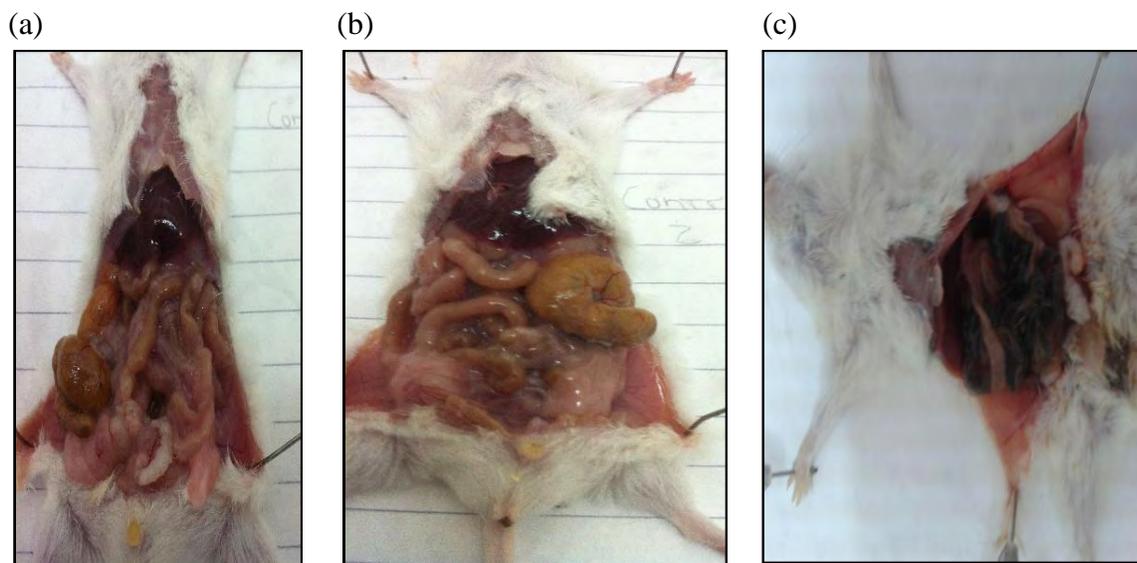


Figura 61. Roedores *BIOU:NMRI* control-control. (a): roedor control 1. (b): roedor control 2. (c): roedor control 3.

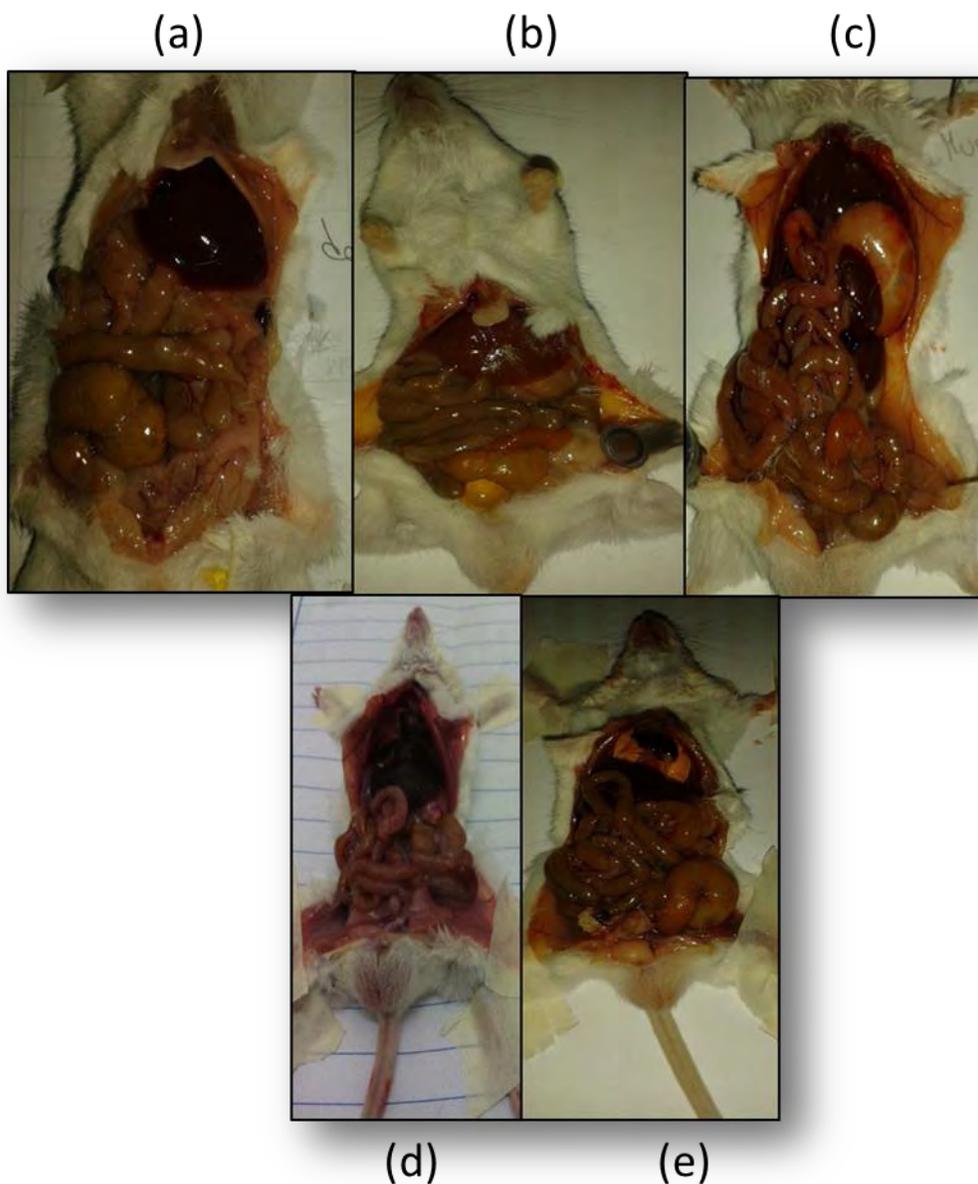


Figura 62. Necropsias de los roedores BIOU:NMRI. (a): Roedor dosificado con HTA1. (b): roedor dosificado con HTA2. (c): roedor dosificado con HTA3. (d): roedor dosificado con acdabz. (e): roedor dosificado con acda4bz.

En la figura 62 se muestran los distintos roedores dosificados con los compuestos HTA1, HTA2, HTA3, acdabz y acda4bz respectivamente, en ellos se observan todos sus órganos en buen estado, comparados con los roedores control-control. Sin embargo, no se puede afirmar que dichos compuestos no presenten efectos adversos a largo plazo, puesto que no se realizaron pruebas de toxicidad crónica ni toxicidad aguda.

12. Conclusiones.

Los proligandos sintetizados fueron suficientemente caracterizados y, a través del cálculo computacional se determinó que los compuestos más duros y menos reactivos, según la escala de Pearson, son los compuestos hidantoínicos.

El estudio computacional permitió confirmar las transiciones electrónicas determinadas a través de la espectroscopia de absorción electrónica, siendo estas de $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$.

Sobre la base de los ensayos biológicos realizados se determinó que el compuesto 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina (HTA2) presentó una actividad anticonvulsivante mayor que el fármaco de referencia 5,5-difenilhidantoina (HTA1). Por otro lado, los compuestos 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina (HTA2), 5,5-difenil-2-tiohidantoina (HTA3) y el ácido 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxílico disminuyeron el número de ataques convulsivos en roedores *BIOU:NMRI*.

El ácido 2-(bencilamino)ciclopent-1-enoditiocarboxílico no tuvo un efecto favorable, por el contrario, induce un mayor número de convulsiones que el fármaco de referencia.

A través del estudio QSAR se determinó que los compuestos que presentan una mayor actividad en sistemas biológicos son el ácido 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxílico, la 5,5-difenilhidantoina (HTA2) y la 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina (HTA3), 5,5-difenil-2-tiohidantoina (HTA1), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por medio de los ensayos biológicos.

13. Recomendaciones.

1. Realizar ensayos de toxicidad crónica y toxicidad aguda en roedores *BIOU:NMRI* para los compuestos 5-(4-metilfenil)-5-fenilhidantoina (HTA2), 5,5-difenil-2-tiohidantoina (HTA3) y el ácido 2-[2-(3,4-dimetoxifenil)etanol]ciclopent-1-enoditiocarboxílico y ensayar estos compuestos en otras especies tales como: rata, hámster y cobayos.
2. Realizar estudios histológicos con el fin de evaluar el posible deterioro físico en los roedores *BIOU:NMRI*, producido por los compuestos en estudio.
3. Diseñar y modelar mediante la química computacional una familia de fármacos homólogos con el fin de estudiar la relación cuantitativa estructura-actividad.

14. Bibliografía.

- (1) Misal, L. (2008). Síntesis vía microondas del proligando bidentado ácido N-bencil-2-amino-1-ciclopenteneditiocarboxílico y estudio de su química de coordinación frente a Cobalto (II), Níquel (II), Cobre (II) y Paladio (II). Tesis de Licenciatura. Universidad de Los Andes.
- (2) Samaja, G. (2011). Noveles heterociclos con actividad anticonvulsivante derivados del Myo-inositol y ácido valproico. Tesis doctoral. Universidad nacional de la plata.
- (3) Shriver & Atkins. (2005). Química inorgánica. (4ta edición). México, Distrito Federal: McGraw-Hill Interamericana.
- (4) Takeshima, T., Yokoyama, M., Imamoto, T., Akano, M., Asaba, H. (1969). The reaction of active methylene compounds with carbon disulfide in the presence of ammonia. III. The reaction of cyclopentanone and cycloheptanone. *Journal of Organic Chemistry*. 3(34): 730-732.
- (5) Bordás, B., Sohár, P., Matolcsy, G., Berencsi, P. (1972). Synthesis and antifungal properties of dithiocarboxylic acid derivatives. II. Novel preparation of 2-alkyl-amino-1-cyclopentene-1-dithiocarboxylic acids and some of their derivatives. *Journal of Organic Chemistry*. 37(11); 1727-1730.
- (6) Contreras, R., Fontal, B., Bahsas, A., Suárez, T., Reyes, M., Bellandi, F. (2001). Synthesis of a New Bidentate Nitrogen-Sulfur Ligand: 2,4-dispiro (cyclohexane)-8-methyl- carboxydithio – [1,2,3,4,4a,5,6,7]- octahydro-(1H,3H)quinazoline Derived from Cyclohexanone in One Step. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 38: 1223-1225.
- (7) Contreras, R., Fontal, B., Bahsas, A., Suárez, T., Reyes, M., Bellandi, F., et al. (2004). Synthesis of copper, nickel and cobalt complexes containing a new N₂S₂ ligand: benzyl -N,N'- alkylbis (2-amino –1–cyclopentencarbodithioate). *Transition Metal Chemistry*. 29: 51-55.
- (8) Contreras, R., Fontal, B., Bahsas, A., Reyes, M., Bellandi, F., Suárez, T., et al. (2006). Nueva estrategia de síntesis del 2-amino-1-ciclopentencarboditioato de propilo y de los proligandos derivados tipo [N₂S₂]₂-. *Avances en Química*. 1(2): p. 9-14.
- (9) Ávila, E., Mora, J., Delgado G., Contreras, R., Rincón, L., Fitch, A., Brunelli, M. (2009). Crystal structure and conformational analysis of a bidentate proligand, C₂₁H₃₄N₂S₂, from powder synchrotron diffraction data and solid state DFTB calculations. *Acta Crystallographica*. B65: 639-646.
- (10) Contreras, R., Fontal, B., Bahsas, A., Suárez, T., Reyes, M., Bellandi, F., et al. (2004). Synthesis of copper, nickel and cobalt complexes containing a new N₂S₂ ligand: benzyl-N,N'-alkylbis (2-amino-1- cyclopentencarboxidithioate). *Transition Metal Chemistry*. 29: 51-55.
- (11) Contreras, R., Fontal, B., Romero, I., Briceño, A., Atencio, R. (2006). Intramolecular hydrogen bonding in Benzyl-N,N'-propylbis-(2-amino-1-ciclopentencarbodithioate). *Acta Crystallographica*. E62: 205-208.
- (12) Misal, L. (2008). Síntesis vía microondas del proligando bidentado ácido N-bencil-2-amino-1-ciclopenteneditiocarboxílico y estudio de su química de coordinación frente a: Cobalto(II), Níquel(II), Cobre(II), y Paladio(II). Tesis de Licenciatura. Universidad de Los Andes.
- (13) Torres, L. (2009). Síntesis vía microondas del proligando bidentado ácido N-dodecil-2-amino-1-ciclopenteneditiocarboxílico y estudio de su química de coordinación frente a: Cobalto(II), Níquel(II), Cobre(II), y Paladio(II). Tesis de Licenciatura. Universidad de Los Andes.
- (14) Tofazzal, H., Tarafder, A., Manaf, M., Suhaimi E. (2000). Coordination chemistry and biological activity of bidentate and quadridentate nitrogen-sulfur donor ligands and their complexes. Kluwer Academic Publishers.
- (15) Shorvon, S., Guerrini, R., Cook, M., Lhatoo, S. (2013). Epilepsy and Epileptic Seizures. Oxford Textbook. 1436-1443.

- (16) Organización Mundial de la Salud. (2015). Epilepsia. Nota descriptiva N° 999. Recuperado el 06 de Junio del 2015, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>
- (17) Wyllie, E. (2011). *The Treatment of Epilepsy: Principles and Practices*. (5ta edición) Philadelphia, USA. Wolters Kluwer.
- (18) Theodore, W.H. (2006). Epilepsy in North America: A Report Prepared under the Auspices of the Global Campaign against Epilepsy, the International Bureau for Epilepsy. *International League Against Epilepsy*. 1: 16-23.
- (19) Millikan, D., Rice, B., Silbergleit, R. (2009). Emergency treatment of Status Epilepticus: Current Thinking. *Emergency Medical Clinic North American*. 27(1): 101-113.
- (20) Taoufik, A., Tarek, S. (2015). Language lateratization in a patient with temporal lobe epilepsy and callosal agenesis. *Journal of Neuronal*. 3(1): 1-3.
- (21) Gil-Nagel, A., Garcia, I. (2007). Etiopatogenia y fisiopatología de la epilepsia. *Medicine*. 9(75): 9-13.
- (22) Medel-Matus, J., Medel, A., Bermúdez, D., Martínez, J. (2013). El status epilepticus no modifica la memoria de trabajo en ratas de 21 días. *eNeurobiología*. 4(7): 18-26
- (23) Klemm, W. (1989). Electroencephalography in the diagnosis of epilepsy. *Cleveland Clinic*. 22-29.
- (24) Theodore, W.H. (2006). Epilepsy in North America: A Report Prepared under the Auspices of the Global Campaign against Epilepsy, the International Bureau for Epilepsy. *International League Against Epilepsy*. 1: 1-6.
- (25) Fisher, R. (1995). Cellular mechanism of the epilepsies. *Chapman and Hall*. 2(5): 35-38.
- (26) Hitiris, N., Mohanraj, R., Norrie, J., Brodie, M. (2007). Mortality in epilepsy. *Epilepsy & Behavior*. 10(3): 363-376.
- (27) White, H.S. (199). The anticonvulsant profile of rufinamide. *Epilepsia*, 49(7): 1213-1220.
- (28) Brown, G.B. (1991). A new radioactive ligand for voltage-sensitive sodium channels. *Neurobiol*. 271(19): 19-40.
- (29) McNamara, J.O. (2001). Capítulo 21: Fármacos Eficaces para el Tratamiento de las Epilepsias. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, (p 529-556). México: McGraw-Hill Interamericana,
- (30) Porter, R., Rogawski, M. (2005). Anatomía de la epilepsia y fármacos utilizados en su tratamiento. *Epilepsia*. 1(2): 1-18.
- (31) Williams, K., Romano, C., Dichter, M., Molinoff, P. (1991). Modulation of NMDA receptor by polyamines. *Life Sci*. 48: 469.
- (32) Wamil, A., McLean, M. (1993). Trans-2-en-valproic acid limits action potential firing frequency in mouse central neurons in cell culture. *Pharmacol*. 280: 1349-1356.
- (33) Smeets, V.M., Van Lierop, B., Vanhoutvin, J., Aldenkamp, A., Nijhuis, F. (2007). Epilepsy and employment: literature review. *Epilepsy & Behavior*. 10(3): 354-62.
- (34) Loscher, W. (1989). GABA and the Epilepsies. *Experimental and Clinical Considerations*. En: *GABA. Basic Research and Cellular Applications*. Pythagora Press. 260-300.
- (35) Handforth, A., DeGiorgio, C., Schachter, S., Uthman, B., Naritoku, D. (1998). Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial. *Neurology*. 51(1): 48-55.
- (36) Ronco, A., Diaz, M. (2004). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- (37) Camelo, E. (2011). *Fundamentos de toxicología ambiental*. Toxicología Ambiental. Colombia: Universidad Nacional, abierta y a distancia.
- (38) Putnam, T.J., Merritt, H. (1937). Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. *Science*. 85(2213): 525-526.

- (39) Krall, L., Penry, J., White, B., Kupferberg, H., Swinyard, E. (1985). Effects of anticonvulsants in vivo on high affinity choline uptake in vitro in mouse hippocampal synaptosomes. *Pharmacol.* 84(1): 19-25.
- (40) Brown, W., Schiffman, D., Swinyard, E., Goodman, L. (1953). Comparative assay of antiepileptic drugs by psychomotor seizure test and minimal electroshock threshold test. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107(3): 273-283.
- (41) Jenney, E., Pfeiffer, C. (1956). The predictable value of anticonvulsant indices. *Ann NY Acad Sci.* 64(1): 679-689.
- (42) Serrano, P. (2011). Factores pronósticos de refractariedad a tratamiento médico en la epilepsia del lóbulo temporal. Tesis doctoral. Universidad de Almería.
- (43) Goodman, L., Swinyard, E., Toman, J. (1945). Laboratory technics for the identification and evaluation of potentially antiepileptic drugs. *Journal Medicine.* (1): 100-101.
- (44) Estrada, E., Peña, A. (2000). In silico studies for the rational discovery of anticonvulsant compounds. *Bioorganic & Medicinal chemistry.* (8): 2755-2770.
- (45) Tarko, L., Ivanciuc, O. (2001). QSAR modeling of the anticonvulsant activity of phenylacetanilides with preclav (property evaluation by class variables). *Communications in mathematical and is computer chemistry.* (44): 201-214.
- (46) J. Sutherland, J., Weaver, D. (2002). Development of quantitative structure-activity relationships and classification models for anticonvulsant activity of hydantoin analogues. *American chemical society.* (43): 1028-1036.
- (47) Gavernet, L., Dominguez, J. (2007). 3D-QSAR design of novel antiepileptic sulfamides. *Bioorganic & Medicinal chemistry.* (15): 1556-1567.
- (48) Potter, V. (1970). Bioethics: the science of survival. *Perspective in Biolo Medicine.* (14): 120.
- (49) Contreras, R. (2005). Bioética: reto a la postmodernidad. (1era edición). Mérida, Venezuela: FUNDACITE-Mérida/CDCHT-ULA.
- (50) Post, S. (2004). *Encyclopedia of Bioethics.* (3era edición). New York: Thompson Gale.
- (51) Russell, M., Burch, R. (1959). The principles of humane experimental technique. 1250-1350.
- (52) Contreras, R., Aranguren, J., Bellandi, F., Gutiérrez, A. (2012). Una nueva generación de fármacos a base de compuestos Organometálicos. *CIENCIA.* 20: 15-24
- (53) Marcano, D., Cabrera, C. (2001). Principios de síntesis orgánica. Caracas: Ediciones Vicerrectorado Académico UCV
- (54) Avendaño, C. (2001). Introducción a la química farmacéutica. Madrid: Mc-Grw-Hill.
- (55) Contreras, R., Fontal, B., Bahsas, A., Suárez, T., Reyes, M., Bellandi, F. (2001). Synthesis of a New Bidentate Nitrogen-Sulfur Ligand: 2,4-dispiro (cyclohexane)-8-methyl- carboxydithio – [1,2,3,4,4a,5,6,7]- octahydro- (1H,3H)quinazoline Derived from Cyclohexanone in One Step. *J. Heterocycles Chem.* 38: 1223-1225.
- (56) Paredes, D., Contreras, R., Delgado, G. (2015). Caracterización por espectrometría de masas de una familia de fármacos anticonvulsiantes del grupo de las hidantoínas y tihidantoínas. Trabajo en publicación.
- (57) López-Meraz, et al. (2010). Inducción de status epilepticus durante las fases de luz/oscuridad del día y efecto sobre la muerte neuronal en el hipocampo en la rata en desarrollo. *Rev eNeurobiología.* 1-2: 1-8.
- (58) Zavala-Tecuapetla et al. (2011). Modelos experimentales de epilepsia en ratas en desarrollo. *Rev eNeurobiología.* 2(2): 1-16.
- (59) Torres et al. (2011). Fisiología del estatus epiléptico. *Acta Neuronal.* 27(1):1-10.
- (60) Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. (1980). Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos. (1era edición). México: Editorial Diana S.A.
- (61) Pavia D, Lampman G, Kriz G, Vyvyan J. (2009). Introduction to spectroscopy. (4ta Edition). Belmont: Editorial Brooks/Cole.

- (62) Contreras, R. Tesis doctoral. Universidad De Los Andes. 2003
- (63) Consonni, Viviana, Todeschini, Roberto, (2012). Molecular descriptors. (1era edición). Italia : editorial WILEY-VCH.
- (64) Randic, M. (1996). Molecular Bonding Profiles. *J.Math.Chem.*19: 375-392.
- (65) Pasto DJ, Johnson CR. (1974). Determinación de estructuras orgánicas. (1era edición). España: Editorial Reverté.
- (66) Carlin, Richard. (1963). Electronic spectra of transition metal complexes. *Journal of chemistry education.* 40: 135-142.
- (67) Billes, F., Holmgren, A., Mikosch, H. (2010). Vibrational Spectroscopy. *Journal of coordination chemistry.* 53: 296-300.
- (68) Gökce, H., Öztürk, N., Ceylan, U., Alpaslan, Y., Alpaslan, G. (2016). Thiol–thione tautomeric analysis, spectroscopic (FT-IR, Laser-Raman, NMR and UV–vis) properties and DFT computations of 5-(3-pyridyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol molecule. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 163: 170-180.
- (69) Drago. R. (1967). Physical methods in inorganic chemistry. (3era edición). New York: Editorial Reinhold Publishing Corporation.
- (70) Mohamed, T., Soliman, U., Shaaban, I., Zoghait, W. (2015). Raman, infrared and NMR spectral analysis, normal coordinate analysis and theoretical calculations of 5-(methylthio)-1,3,4-thiadiazole-2(3H)-thione and its thiol tautomer. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 150: 339- 349.
- (71) Baran E. (1994). Química Bioinorgánica. (1era edición) .España: Editorial: Mc Graw Hill.
- (72) Tarassoli, A., Asadi, A., Hitchcock, P. (2002). Synthesis and crystal structures of new complexes of di- and tribenzyltin N-ethyl and N-benzyl-2-aminociclopent-1-ene-1-carbodithioates. *Journal of organometallic chemistry.* 645: 105-111
- (73) Requena Alberto, Zuñiga José. (2004). Espectroscopia. (1era edición). España: Editorial Pearson.
- (74) Hinchliffe, A. (2008). Molecular Modelling for Beginners, 2nd Edition. Recuperado el 15 de marzo de 2016 de <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470513144.html>.
- (75) Edache, E., Azairu, A., Abechi, E. (2016). Development and estimation of an in silico model for Anti-HIV-1 integrase inhibitor using genetic function approximation. *Journal of advances in medical and pharmaceutical.* 5: 1-18.
- (76) Eggins BR. (1974). Estructura química y reactividad. (1era edición). Barcelona (España): Ediciones Ballaterra.
- (77) Housecroft. C & Sharpe. A. (2006). Química inorgánica. (2da edición). Madrid: editorial Pearson.
- (78) Contreras, R. (2013). Materiales híbridos: una aproximación a la química de los compuestos orgOrganometálicos. (1era edición). Merida: CDCHTA-ULA.
- (79) Mulliken, R., Ermler, W. (1981). Polyatomic Molecules. (1era edición). New Jersey: editorial academic press.
- (80) Islan, N. (2010). Correlation between the electronegativity ansatz of Mulliken and Gordy. *Journal of molecular structures.* 497: 1-123.
- (81) Maurya, R., Malik, B., Mir, J., Sharma, A. (2014). Synthesis, characterization, thermal behavior, and DFT aspects of some oxovanadium(IV) complexes involving ONO-donor sugar Schiff bases. *Journal of coordination chemistry.* 67: 3084-3106.
- (82) Brabec, C., Sariciftci, N., Hummelen, J. (2001). Low band-gap polymeric photovoltaic devices. *Synthetic Metals.* 121: 1583-1584.
- (83) R.G. Pearson. (1993). The principle of maximum hardness. *Acc. Chem. Res.*, 26, 250.
- (84) Martinez, J., Hissi, E. (2015). QSAR and 3D-QSAR studies applied to compounds with anticonvulsant activity. *Healthcare.* 1-15.

- (85) Karelson, M., Lobanov, V. (1996). Quantum-Chemical descriptors in QSAR/QSPR studies. American Chemical Society. 96: 1027-1043.
- (86) Wong, K., Mercader, A., Saavedra, L. (2014). QSAR analysis on tacrine- related acetylcholinesterase inhibitor. Journal of biomedical science. 21: 84.