

**FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS**

**Departamento de
Ciencias Biológicas**



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**

Trabajo de tesis Doctoral

***Síntesis de sulfamidas con acción
anticonvulsiva***

Lic. María Luisa Villalba

Director: Prof. Dr. Luis E. Bruno Blanch

Co-directora : Prof. Dra. Luciana Gavernet

2016

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el LIDeB (Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Biactivos, Catedra de Química Medicinal, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, U.N.L.P; bajo la dirección del **Prof. Dr. Luis E. Bruno-Blanch** y la Co-dirección de la **Prof.Dra. Luciana Gavernet**.

Todo lo logrado hasta el momento no hubiera sido posible sin la compañía y el apoyo de todas las personas que la vida ha puesto en mi camino, es por esto que agradezco:

A mis directores: Prof.Dra. Luciana Gavernet por su paciencia, dedicación y por sus enseñanzas. Al Prof. Dr. Luis Bruno Blanch, por haberme permitido iniciarme en este camino a lo largo de todos estos años, por todo lo que aprendí a través de sus enseñanzas.

A la Doctora Ileana Daniela Lick, por ayudarme en este trabajo y por estar siempre al pie del cañon.

A la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) y al LIDeB por brindarme el lugar de trabajo

A la Agencia nacional de promoción Científica y tecnológica por la beca otorgada para iniciar este trabajo y al programa de retención de recursos humanos del departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas por permitir finalizarlo.

A mis compañeros y amigos del LIDeB siempre presentes!!Por el apoyo, charlas motivadoras, contención, y demás locuras, gracias!!: Laureano, Andrea, Meli, Pablo, Caro, Roque, Malala, Lucas, Mauricio, Alan, Sofia, Pachi, Sebastian

A mi grupo amigos de la facu siempre presente Leticia, Romina, Alicia, Danila, Florencia Leo, Gustavo, Florencia, Julian, Marita, Valentina,

A mis amigas de siempre Valeria, Nelida, Celeste, Anabel, Andrea, Carolina, Silvana.

A mis compañeros de cátedra: Mati, Mari, Pablo, Mecha y Turco.

A mi familia por haberme apoyado en todo.

INDICE

Objetivos.....	1
CAPITULO I: EPILEPSIA.....	2
Epilepsia: aspectos generales	3
Crisis epilépticas	4
Métodos de diagnóstico complementarios en epilepsia.....	6
Tratamientos	7
Canales Iónicos dependientes de voltaje	15
Inhibición de la neurotransmisión mediada por (GABA).....	15
Neurotransmisión excitatoria mediada por glutamato	16
Anhidrasa carbónica: un nuevo blanco molecular en la epilepsia	16
¿Es necesario el desarrollo de nuevos fármacos anticonvulsivos?	18
Referencias bibliográficas del capítulo I	21
CAPITULO II: Descubrimiento de Fármacos	25
Breve introducción al descubrimiento de fármacos	27
Etapas implicadas en la búsqueda de un nuevo medicamento.....	28
Descubrimiento de fármacos: búsqueda del compuesto líder	29
Identificación de la Relación Estructura-Actividad	32
Síntesis química.....	38
Evaluación de la Actividad Biológica	39
El diseño racional aplicado en el descubrimiento de drogas anticonvulsivas	40
Búsqueda del Perfil farmacológico	42
Patrones farmacofóricos para la actividad antiepiléptica	43
Diseño racional y reemplazo bioisostérico aplicado al farmacóforo propuesto	47
Sulfamidas derivadas de aminoésteres	48
Referencias bibliográficas del CapítuloII.....	51
CAPITULO III: Síntesis de sulfamidas	53
Sulfamidas: su interés en Química Medicinal.....	55
Antecedentes: Métodos de síntesis	57
Síntesis de sulfamidas asimétricas	58
Síntesis de sulfamidas derivadas de aminoésteres.....	65
Síntesis asistida por microondas: una alternativa novedosa en la síntesis orgánica	67

Breve reseña del descubrimiento	68
Fundamento	68
Calentamiento por Microondas versus calentamiento convencional	69
Antecedentes del uso de radiación microondas en la síntesis de sulfamidas.....	71
Síntesis de sulfamidas derivadas de aminoesteres por microondas.....	73
Referencias Bibliográficas del CapítuloIII	73
CAPITULO IV: Adsorbentes	82
Procesos de Adsorción: Aspectos generales.....	84
Adsorbentes	85
Interacción de Alúmina con moléculas orgánicas	88
Determinación de la capacidad de adsorción de catecol.....	89
Ensayos de Adsorción	90
Control de catecol	90
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
Referencias Bibliográficas del capítulo IV.....	98
CAPITULO V: Trabajo experimental de síntesis.	98
Consideraciones Generales.....	98
Procedimiento.....	101
Referencias bibliográficas capítulo V.....	122
CAPITULO VI: Evaluaciones biológicas	129
Procedimiento experimental de evaluación biológica	135
Ensayo PTZ.....	139
Ensayo RotoRod	139
Resultados de la evaluación biológica.....	141
Referencias bibliográficas del Capítulo VI.....	155
Capítulo VII Análisis de los resultados y conclusiones	155
ANEXO I: Espectros RMN.....	163

Objetivo de este trabajo de tesis:

El Observatorio Mundial de la Salud (GHO), entidad responsable de las evaluaciones estadísticas mundiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la epilepsia como uno de los desordenes neurológicos crónicos más frecuentes. Se estima que afecta al 1-2% de la población mundial y particularmente el 80% de los enfermos se encuentra en los países en vías de desarrollo. Las personas con epilepsia responden a los tratamientos farmacológicos en aproximadamente un 70% de los casos, mientras que entre el 30 a 40% de los pacientes presentan resistencia a los medicamentos actuales (fenómeno conocido como farmacorresistencia). A pesar de las mejoras en la terapia alcanzadas por la incorporación de nuevos antiepilépticos en los últimos 30 años, se encuentra que estos no han logrado superar en forma significativa la farmacorresistencia y en muchos casos presentan serios efectos adversos. Este escenario genera la necesidad de descubrir nuevas entidades químicas que sean capaces de superar la farmacorresistencia y que no presenten efectos secundarios de consideración, a fin de lograr una respuesta adecuada para la totalidad de los pacientes.

Se plantea entonces como *objetivo general* de esta tesis obtener nuevos compuestos con acción anticonvulsiva mediante estrategias eficientes de síntesis. Como *objetivo particular* se propone abordar racionalmente modificaciones estructurales de sulfamidas derivadas de aminoesteres a fin de optimizar su acción antiepiléptica.

El criterio utilizado en el diseño de las sulfamidas fue el de buscar la mejor combinación de sustituyentes de dicha función (aminoester / estructura hidrocarbonada) para obtener un incremento de la actividad anticonvulsiva. La síntesis implicó buscar distintas alternativas de preparación, que tuvieran en cuenta el medio ambiente. Para ello se recurrió a la utilización de reacciones con microondas, y al uso de agentes secuestrantes de intermediarios agresivos para el medio ambiente.

Posteriormente se procedió a la evaluación biológica de los compuestos sintetizados en modelos de epilepsia aguda en animales. También se realizaron ensayos *in vitro*

para analizar la capacidad inhibitoria frente a blancos moleculares específicos: diferentes isoformas de anhidrasa carbónica y un receptor inotrópico de ácido γ -amino butírico (GABA_A).

Finalmente, y de acuerdo a los resultados obtenidos, se analizaron los sustituyentes presentes en las sulfamidas más activas y menos tóxicas. Con esta información se propusieron nuevas estructuras a fin de continuar con la optimización de la acción anticonvulsiva.

La presente tesis se ha ordenado por capítulos, en donde los tres primeros abordan los aspectos generales relacionados con la Epilepsia (capítulo 1), con el desarrollo de fármacos (capítulo 2) y con los antecedentes hallados hasta el momento sobre la síntesis de sulfamidas (capítulo 3). En los capítulos subsiguientes se detallan las metodologías aplicadas, los resultados obtenidos, el análisis de los mismos y la conclusión final del trabajo realizado.

CAPITULO I

EPILEPSIA

Epilepsia: aspectos generales

La epilepsia es una de las afecciones más frecuentes del sistema nervioso central (SNC) la cual se estima que afecta 65 millones de personas en el mundo, es decir al 1-2% de la población mundial. [1-3] Esta enfermedad crónica tiene su mayor prevalencia en las primeras décadas de vida y luego de un decrecimiento, su frecuencia aumenta en la tercera edad. [4-6]

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que el número de pacientes con esta afección es mayor en los países en vías de desarrollo, 57 casos por cada 1000 habitantes. En los países desarrollados esta cifra decrece de 3 a 4 casos por cada 1000 habitantes. [4]

En nuestro país no hay cifras oficiales actuales, la última estimación informada data del año 2010 donde se reportaba que había aproximadamente 180.000 personas con diagnóstico de epilepsia, [7] y sólo existen reportes de dos estudios realizados con anterioridad a este período. El primero, elaborado por Melcon y colaboradores en el año 2007, [8] describe la prevalencia de la enfermedad en la población de la ciudad de Junín, provincia de Buenos Aires y años más tarde Somoza y colaboradores llevaron a cabo un estudio representativo de la población escolar en niños de 6-16 años en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. [9]

Las cifras presentadas anteriormente muestran que esta afección es un problema de salud pública de importancia, ya que las limitaciones en el tratamiento influyen en el curso evolutivo de la enfermedad, generando una brecha que puede observarse en las cifras de los países en vías de desarrollo respecto de los desarrollados.

Por otro lado, junto a la prevalencia de la enfermedad existen otros factores que afectan al paciente, entre ellos uno de los más importantes es la estigmatización que toleran y que con frecuencia es un obstáculo para el ejercicio de sus derechos y su integración social.

La etiología de la epilepsia es multifactorial en la mayoría de los casos y puede deberse a causas adquiridas, hereditarias o congénitas:

- **Causas adquiridas:** entre ellas se encuentran los traumatismos, lesiones postquirúrgicas, lesiones post-infecciosas (secuela de meningitis bacteriana o encefalitis viral), infarto y hemorragia cerebrales, tumores (astrocitomas, meningiomas, oligodendrogliomas), esclerosis del hipocampo (del lóbulo temporal). También en este conjunto se ubican las epilepsias causadas por enfermedades degenerativas (Alzheimer y otras), enfermedades metabólicas adquiridas y por el consumo de sustancias tóxicas (alcohol, drogas, etc).

- **Causas hereditarias:** son aquellas epilepsias genéticamente determinadas.
- **Causas congénitas:** en este conjunto se encuentran las originadas por lesiones intrauterinas, malformaciones vasculares, síndromes neurocutáneos (neurofibromatosis, Sturge-Weber, esclerosis tuberosa), anomalías cromosómicas (Síndrome de Down, Síndrome de Angelman), trastornos congénitos del metabolismo (aminoacidurias, leucodistrofias) y miopatías congénitas.

De todas las causas mencionadas anteriormente, las infecciones del sistema nervioso central representan el origen más frecuente de la epilepsia. Por ejemplo, la neurocisticercosis, una infección que se presenta en el cerebro o en la médula espinal y es causada por la infestación de la forma larvaria de la *Taenia solium* (los *Cisticercos*), [10] presenta como principal manifestación clínica, crisis epiléptica en un 50-68% de los casos [10-12] y es la causa del desarrollo de la enfermedad particularmente en adultos [10,12] en países como México, Colombia, Brasil, Guatemala, Honduras donde la enfermedad es endémica.[4]

Crisis epilépticas

Según la Liga Internacional contra la Epilepsia (International League against Epilepsy – ILAE) la *crisis epiléptica* es la manifestación de síntomas o signos producidos por una actividad neuronal anormalmente excesiva o sincrónica en el cerebro. [2]

Clínicamente, las crisis epilépticas pueden manifestarse de múltiples formas, dependiendo de la parte del área cerebral afectada, lo que da lugar a una clasificación que atiende a su origen. Estas pueden dividirse en focales o generalizadas. Las primeras involucran a una región del cerebro (por ejemplo crisis frontales, temporales, parietales, occipitales) y las segundas abarcan ambos hemisferios o son de origen desconocido. [2] Estas clasificaciones propuestas por la ILAE se detallan en la tabla 1.2.

En países desarrollados se han realizado estudios poblacionales donde entre el 54-65% de los pacientes con epilepsia, son de origen desconocido (idiopático). [13]

Las crisis focales y generalizadas se subdividen en diferentes tipos (tabla 1.1), de acuerdo a la función que se vio afectada (actividad motora, sensitiva, visual, memoria, etc.) y pueden ser del tipo convulsivas o no convulsivas. En particular las crisis epilépticas convulsivas son aquellas que presentan un movimiento involuntario de cualquier parte del

	Tipos de Crisis	Características principales
Crisis Generalizadas	Ausencia	<i>Breve episodio agudo (de segundos), con comienzo y terminación súbitos. Alteración de la conciencia Movimiento ocular con o sin sacudidas de extremidades o de todo el cuerpo</i>
	Ausencias atípicas	<i>Comienzo y terminación más lento de lo habitual de crisis de ausencia</i>
	Crisis mioclónica	<i>Sacudidas breves, únicas y leves a violentas de brazos o cabeza</i>
	Crisis Clónicas	<i>Múltiples sacudidas rítmicas de todas las partes del cuerpo con pérdida de la conciencia.</i>
	Crisis Tónica	<i>Violentas contracciones musculares rígidas (las extremidades toman posición de tensión) con pérdida de la conciencia.</i>
	Crisis Atónica	<i>Pérdida del tono postural, con caída total o solamente de cabeza</i>
	Crisis Tónico-clónica	<i>Convulsiones mayores. Espasmos tónicos de todos los músculos, seguidos por sacudidas rítmicas de los miembros. Su duración es de varios minutos con pérdida de la conciencia.</i>
Crisis focales	Aura	<i>Cociencia no alterada que involucra solo al sistema motor o sensitivo</i>
	Crisis motoras	<i>Contracciones tónicas o clínicas confinadas a un segmento corporal, que pueden propagarse hasta involucrar todo un hemicuerpo. Posturales: Detención del movimiento</i>
	Autonómicas	<i>Sensación epigástrica, náuseas, cambios de la presión arterial o de la frecuencia cardíaca</i>
	Nivel de conciencia	<i>Trastorno para la comprensión o expresión del lenguaje, Cognitivas afectivas: cambios paroxísticos del talante, como sensación placentera, miedo, depresión, ira. Ilusiones</i>
Desconocidas	Evidencia insuficiente para caracterizarla como generalizadas, focales o ambos	<i>Espasmos epilépticos, Otros</i>

Tabla 1.1- Clasificación de crisis propuesta por la International League Against Epilepsy [2]

cuerpo o de las extremidades. Este movimiento puede presentar varias características y dependiendo de las mismas se denominan:

- **Crisis Clónicas:** movimiento repetitivo de una extremidad, que presenta cierta regularidad.
- **Crisis Tónica:** en ellas hay un aumento del tono muscular generalizado. Tienden a durar menos de dos minutos.
- **Crisis Mioclónica:** presentan sacudidas bruscas con elevación y extensión de las extremidades generalmente de las superiores. Son de corta duración de menos de un minuto, pueden ser aisladas o repetidas.

Por otra parte las crisis epilépticas no convulsivas se clasifican en:

- **Crisis de ausencia:** presentan un trastorno a nivel de conciencia, durante este tiempo el paciente está completamente ausente del medio, sin pérdida del tono postural. Son de comienzo y terminación brusca, con una duración estimada en unos 10 segundos.
- **Crisis atónica:** presenta alteración del nivel de conciencia, de comienzo y final atípico, son de mayor duración y con pérdida del tono postural.

Métodos de diagnóstico complementarios en epilepsia

El diagnóstico de las crisis epilépticas y de los síndromes epilépticos es realizado por médicos, y la confirmación de los mismos se efectúa a través de los métodos complementarios de diagnóstico como:

- **Electroencefalograma (EEG):** está técnica constituye la base de la evaluación de estos pacientes. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad para distinguir la epilepsia de otros tipos de trastornos paroxísticos es limitada. Por esto se suelen utilizar métodos como la privación de sueño o la fotoestimulación, para aumentar su sensibilidad.^[14]
- **Neuroimágenes:** la tomografía computada (TC) y la resonancia magnética (RM) son las técnicas de elección para detectar lesiones estructurales del SNC, siendo la segunda más sensible y específica, especialmente para el estudio de la esclerosis temporal.^[15]
- **Video electroencefalografía:** método que resulta de la asociación y sincronización del registro electroencefalográfico y vídeo. Permite identificar, descartar y clasificar las crisis epilépticas.

Cuando se realiza la intervención quirúrgica en estos pacientes es fundamental, además de los métodos diagnósticos básicos, el estudio neurofisiológico mediante la electrocorticografía, que consiste en la colocación de unas mantas de electrodos sobre la superficie de la corteza cerebral, a nivel subdural. [15]

Tratamientos

La historia de la epilepsia y los intentos para tratar las crisis se remonta a varios milenios, desde las antiguas civilizaciones. El modo y la manera de realizar las terapias, en cualquier época histórica, dependía del conocimiento que disponía el hombre para darle solución a la enfermedad. En épocas remotas las convulsiones se trataban con pócimas, hierbas medicinales, remedios caseros y trepanaciones, en base a falsas creencias e ideas sobre su origen. [17,18] Actualmente existen diversos tratamientos para la epilepsia, siendo el farmacológico más utilizado, orientado a reducir las crisis convulsivas. La farmacoterapia se inicia usualmente administrando bajas dosis de un solo fármaco antiepiléptico (monoterapia), que se va incrementando poco a poco hasta llegar a una dosis que sea capaz de controlar el cuadro convulsivo. Sí a pesar del aumento de la dosis siguen persistiendo las crisis o aparecen efectos secundarios, se cambia a otro fármaco, procediendo de la misma manera. Cuando el resultado de esta segunda opción también fracasa, puede intentarse usar dos o más medicamentos antiepilépticos juntos, método conocido como politerapia.



La Artemisa Vulgaris, fue la hierba mágica por excelencia para el tratamiento de las crisis. Incluso en la medicina se consideraba hasta muy entrado el siglo XIX, que sus raíces eran un poderoso remedio contra la epilepsia. [16]

Actualmente se estima que un 30-40% de pacientes fracasan a los diferentes esquemas de terapias farmacológicas, [19] es decir no pueden controlar sus crisis con mono o politerapia, por lo que deben utilizar terapias alternativas, denominándose a esta patología como epilepsia farmacoresistente o refractaria (EFR). [19,20] Entre las opciones disponibles, podemos mencionar, la estimulación del nervio vago, la estimulación cerebral y la dieta cetogénica. [18] En los casos donde el paciente tiene una mala calidad de vida, la cirugía se presenta como alternativa para el tratamiento. [21,22] A continuación se describirán en detalle los diferentes procedimientos previamente mencionados.

Tratamiento farmacológico

El objetivo de la terapia farmacológica anticonvulsiva es suprimir la actividad neuronal del foco epiléptico lo suficiente como para prevenir la hiperactividad. Estos fármacos no modifican directamente el curso de la enfermedad, sino que tratan los síntomas, disminuyendo o inhibiendo las crisis, para mejorar la calidad de vida del paciente. [23]

El tratamiento farmacológico de la epilepsia se inició a mediados del Siglo XIX con la introducción del bromuro de potasio por Sir Charles Locock. [24] En 1912 se comenzó a utilizar el fenobarbital como anestésico (Figura 1.1) y en el mismo año Hauptmann señaló su utilidad en las crisis epilépticas. Desde entonces fue prácticamente el único fármaco utilizado durante un cuarto de siglo, hasta la introducción de la fenitoína (PHT) [25] en 1938, que fue descubierta intentando obtener un nuevo fármaco antiepiléptico con menores efectos sedantes que su antecesor (Figura 1.1). A partir de ese momento fueron introducidos una serie de derivados relacionados estructuralmente con el fenobarbital y la fenitoína, [26] es decir, derivados de hidantoínas, oxazolidindionas, succinimidas y acetil ureas. Ejemplos exitosos de estos compuestos son la primidona, trimetadiona y la etosuccimida (Figura 1.1). [26]

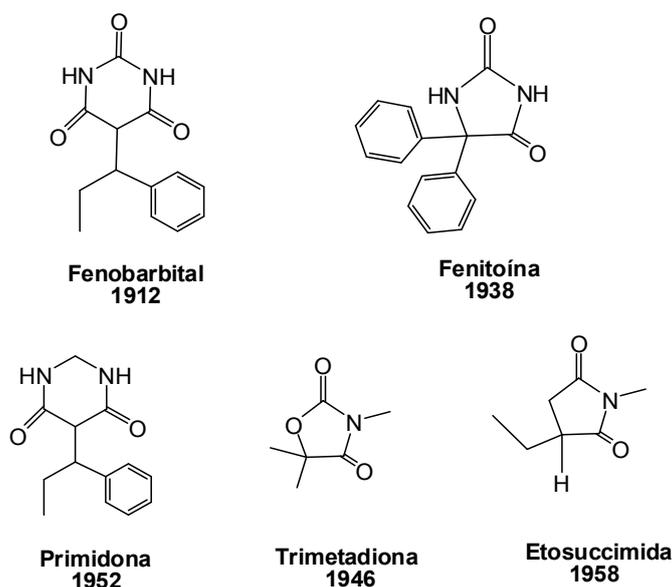


Figura 1.1-Primeros Fármacos comercializados entre los años 1912 y 1958

Posteriormente, en las décadas de 1960-70 el desarrollo de nuevas drogas se concentró en compuestos estructuralmente diferentes, entre los que pueden destacarse a:

- La carbamazepina, (Figura 1.2) que es una dibenzodiazepina, obtenida a partir de un estudio de relaciones estructura-actividad (cuya metodología se detallará en el

siguiente capítulo), llevado a cabo a fines de los años 50. Se utilizó inicialmente para el tratamiento de la neuralgia del trigémino. En la actualidad, se considera un medicamento de primera opción en el tratamiento de las convulsiones parciales y tónico-clónicas. [27]

- El ácido Valproico o valproato de sodio, que fue sintetizado en 1881, [27] pero no se asoció con ningún efecto terapéutico hasta el año 1963. Las propiedades antiepilépticas de este agente fueron descubiertas accidentalmente (por serendipia) cuando se lo empleaba como vehículo de otros compuestos que eran estudiados en busca de propiedades anticonvulsivas. Desde su comercialización como fármaco antiepiléptico (FAE) en Francia hace 53 años, el valproato ha sido uno de los más extensamente usados mundialmente, para el tratamiento de las crisis en adultos y en niños. [27]
- Las Benzodiazepinas, cuyo valor para el tratamiento de la epilepsia fue reconocido rápidamente después de su síntesis y el desarrollo por Leo Sternbach, en 1960. [28] Años más tarde Henry Gastaut publicó un informe sobre la eficacia del Diazepam (Figura 1.2) en el tratamiento del status epilepticus. Más tarde aparecerían el Clonazepam y el Clobazam, entre otros nuevos derivados de benzodiazepinas con acción antiepiléptica.

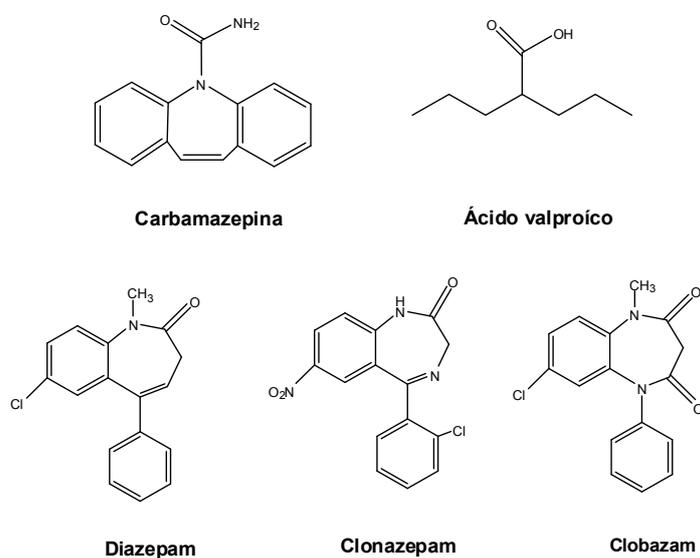


Figura 1.2-Fármacos descubiertos entre 1960-1970 [28]

Luego de la introducción del ácido valproico y de las benzodiazepinas, y aún con el impulso otorgado por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NINCDS-NIH); tuvo lugar una pausa en el desarrollo de nuevos medicamentos que se prolongó hasta 1993.

En el año 1962, se creó el ente regulatorio de los medicamentos de Estados Unidos (FDA, (Food and Drug Administration the USA), organismo que se volvió más estricto en cuanto a los requerimientos necesarios para que una nueva droga sea incorporada al mercado. No sólo se exigía determinar la seguridad de una droga sino también su eficacia, previa a la comercialización. [29] Entonces, la elección del anticonvulsivante estaba limitada a Fenobarbital, Primidona, Fenitoína, Carbamazepina y ácido Valproico. Aunque estos “FAE clásicos” tenían la ventaja de su familiaridad y de su probada eficacia, muchos pacientes presentaban crisis convulsivas refractarias a éstos y/o efectos adversos indeseados que obligaban a discontinuar la terapia.

A partir de la década del noventa, la FDA, aprobó el uso de nuevos fármacos antiepilépticos marcando el comienzo de una nueva serie de FAE, agrupados como fármacos tercera generación. Esta nueva etapa incluye los fármacos, Progabida, Vigabatrina, Zonisamida, Lamotrigina, Oxcarbazepina, Felbamato, Gabapentina, Topiramato, Fosfenitoina, Tiagabina, Levetiracetam, Pregabalina, Rufinamida, Estiripentol, Lacosamida, Eslicarbazepina, Retigabine, Perapamel y Brivaracetam. [26,30-33]

El crecimiento exponencial en el número de fármacos descubiertos desde el bromuro de potasio hasta el Brivatacetam puede observarse en la Figura 1.3

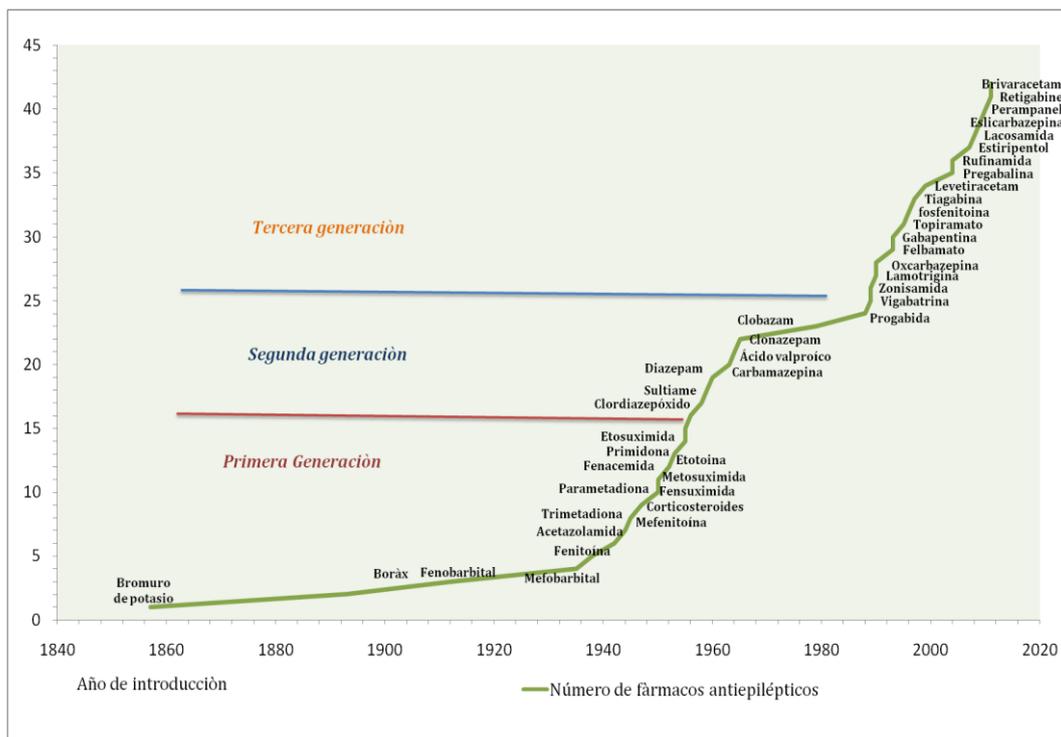


Figura 1.3- Representación histórica de la incorporación de fármacos a través de los años. Adaptado del trabajo de Löscher y colaboradores. [26] Con permiso de John Wiley and Sons

Estos nuevos antiepilépticos son mejor tolerados que los de primera generación cuando se utilizan en monoterapia [33], tienen menos interacciones farmacocinéticas que los clásicos [34] y han aumentado la posibilidad de tratamiento de crisis epilépticas que no eran controlada por los antiepilépticos clásicos. [35] Sin embargo, no han logrado controlar los cuadros de farmacoresistencia de los anticonvulsivos de primera generación, ya que el número de pacientes resistentes al tratamiento sigue siendo el porcentaje histórico del 30-40%. [20-21,36-37] Por otra parte, aunque los antiepilépticos de segunda generación sean mejor tolerados, siguen teniendo serios efectos secundarios.[27,38] Algunos pueden producir, por ejemplo, inducción al suicidio, [39] efectos teratógenos e incluso se ha tenido que restringir su uso por aplasia medular (felbamato) y alteraciones visuales (vigabatrina). [27]

Tratamiento quirúrgico

El tratamiento quirúrgico es aceptado como de última elección, cuando la terapia farmacológica ha fallado y la calidad de vida del paciente se ve seriamente afectada.

La principal dificultad que se presenta es la selección de pacientes para cirugía, es decir, decidir que candidato tendrá una mejor calidad de vida luego de este tratamiento, mediante reducción o eliminación de las crisis. Se debe definir la zona epileptogénica focalizada y la relación de ésta con áreas funcionales adyacentes, de manera de generar el

menor impacto posible sobre el bienestar del paciente luego de la intervención quirúrgica. [17,40]

Para la selección del candidato quirúrgico se debe contar con un equipo multidisciplinario de especialistas (epileptólogos, neurólogos, neurocirujanos, especialistas en neuroimagen, neuropsicólogos, psiquiatras, etc.) con formación específica en la materia y debe contarse con los medios tecnológicos adecuados. [40]

Los procedimientos quirúrgicos aplicables al tratamiento de la epilepsia se clasifican en curativos y paliativos. Los tratamientos curativos incluyen la resección anterior del lóbulo temporal en un 70% del total, y extratemporales, en un 23% de los casos. [17] Los tratamientos paliativos lo constituyen la callosotomía y la transacción subpial múltiple. [17] Aún cuando este tipo de operaciones detenga por completo las crisis epilépticas, se recomienda que se siga con el tratamiento farmacológico durante 2 años después de la cirugía, de manera de evitar la ocurrencia de nuevas crisis. [41]

Estimulación del nervio vago

El estimulador del nervio vago fue aprobado en 1997 por la FDA para su uso en personas con crisis que no son controladas por los medicamentos. El estimulador del nervio vago es un dispositivo, que envía descargas eléctricas al cerebro a través del nervio vago. Se implanta mediante un procedimiento quirúrgico, semejante a poner un marcapaso, se aloja bajo la piel del pecho, y se conecta a nivel de la porción cervical del nervio vago izquierdo (Figura 1.4). [42]

Los datos informados sobre los resultados de este método indican que aplicado en pacientes mayores de doce años se observa una reducción promedio de crisis de 25 a 30 por ciento de los casos. [42,43]

En general los pacientes disminuyen la frecuencia de las crisis convulsivas con el dispositivo, aunque su uso no los excluye de la medicación y se observan, además, efectos secundarios leves (como ronquera, dolor de oídos, dolor de garganta o náuseas). [44]

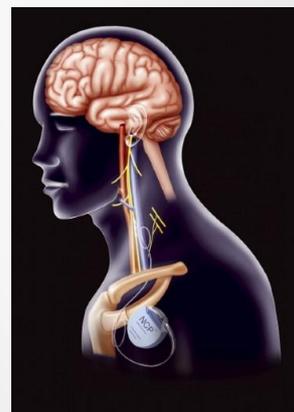


Figura 1.4- Estimulador del nervio vago, consiste en un implante subcutáneo a nivel subclavicular izquierdo de un dispositivo que conectado con el nervio vago izquierdo, envía estímulos intermitentes al SNC.

Estimulación cerebral profunda

A pesar del gran desarrollo de fármacos antiepilépticos, de la posibilidad de resección de los focos epileptógenos en pacientes seleccionados y de la estimulación del nervio vago, existe un subgrupo de pacientes que continúan con un mal control de sus crisis, para los que surge una nueva posibilidad terapéutica denominada estimulación cerebral profunda. El objetivo de este tratamiento es reducir la aparición de crisis o modificar su propagación mediante una estimulación de alta frecuencia sobre un pequeño volumen cerebral (blanco quirúrgico) que inhibe o bloquea la actividad patológica de dicha estructura afectada, mediante implante de electrodos. [45] Existen dos enfoques del tratamiento en epilepsia mediante estimulación cerebral, dependiendo de la zona de localización del electrodo:

- Cuando se conoce la zona epileptogénica se realiza una estimulación en la propia zona o cerca de ella. Se puede realizar mediante la colocación de electrodos subdurales o profundos, pero suelen requerir un registro previo de la crisis.
- Cuando no se conoce el origen exacto de las crisis se puede optar por la colocación de un electrodo en ganglios de la base (tálamo o subtálamo principalmente).

Se han presentado los resultados del dispositivo SANTE (Stimulation of the Anterior Nucleus of the Thalamus in Epilepsy) basado en un estudio clínico realizado durante 5 años, sobre la utilización de la terapia de estimulación cerebral profunda (DBS, por sus siglas en inglés) en adultos con epilepsia refractaria. [46,47] Este tratamiento consiste en el implante quirúrgico de un dispositivo que envía estímulos eléctricos en el núcleo anterior del tálamo, en donde se desencadena la crisis. [46,47] Esta terapia está aprobada para su uso en más de 30 países, incluyendo Canadá, Australia y países de la Unión Europea, [46] como tratamiento complementario de las crisis parciales en adultos con epilepsia refractaria a la medicación.

El principal efecto adverso que se encuentra en un 3-10% de los pacientes, son infecciones en la zona del implante. [48]

Dieta cetogénica (DC)

Esta dieta reemplaza los hidratos de carbono (HC) por lípidos. El metabolismo de los ácidos grasos genera cuerpos cetónicos (CC) (beta-hidroxibutirato, acetoacetato y acetona en menor medida), durante el período de ayuno o por la disminución de la ingesta de HC. [49]

Hasta el momento, no se conoce el mecanismo de acción específico por el cual la dieta cetogénica tiene un efecto anticonvulsivo. La investigación realizada en torno a ella sugiere múltiples mecanismos de acción en neurotransmisores, metabólicos y genéticos.

[50] Hay evidencias que sugieren que la dieta cetogénica favorece la síntesis de glutamina, precursor esencial del ácido γ -aminobutírico, que es un neurotransmisor inhibitorio y un importante agente anticonvulsivo. Otros estudios sugieren entre los posibles mecanismos de acción, que la dieta también altera el metabolismo o la función de las aminos biógenas. [50,51]

Existen 2 dietas cetogénicas conocidas, la clásica ideada en los años setenta, por el Dr. Huttenlocher conocida como dieta MCT (triglicéridos de cadena media) y se basa en la adición de un aceite “cetogénico” de manera de hacer más flexible el consumo de carbohidratos, pero que en la práctica resulta restrictiva, debido a los efectos secundarios. Desde el 2006 se implementó la dieta de Atkins modificada, [52] que ha resultado muy efectiva y en la cual consiste en un 60% del valor calórico total en forma de grasas, un 30% del valor calórico total en forma de proteínas y un aporte inicial de 10 g/día de carbohidrato. Se ha observado que provoca menos efectos adversos, y es mejor tolerada por el paciente, ya que disminuye los episodios de náuseas, vómitos y pérdida de apetito. Actualmente se ha demostrado que la dieta puede ser eficaz no sólo en epilepsias generalizadas o multifocales sintomáticas, sino también en parciales y lesionales. [49]

Mecanismos de acción de los fármacos antiepilépticos

Como ya lo definimos anteriormente, una crisis epiléptica es una ocurrencia transitoria de signos y / o síntomas debido a la actividad neuronal excesiva o síncrona anormal en el cerebro. [1] El objetivo de la farmacoterapia es restablecer el balance entre la excitación y la inhibición neuronal, controlando o suprimiendo las crisis epilépticas. La actividad antiepiléptica de los fármacos depende de su capacidad para interactuar con uno a más blancos moleculares en el cerebro. Estos blancos comprenden diferentes tipos de macromoléculas: canales iónicos, receptores de neurotransmisores y enzimas encargadas de la metabolización de estos neurotransmisores. [53]

Se reconocen, al momento, 3 clases de mecanismos de acción principales: la regulación de canales iónicos voltajes operados o dependientes de voltaje; el aumento de la inhibición de la neurotransmisión mediada por el ácido gama-aminobutírico (GABA); y la atenuación de la neurotransmisión excitatoria mediada por glutamato. [54] A continuación se mencionara brevemente como actúa cada uno:

Canales Iónicos dependientes de voltaje

Los canales iónicos son proteínas que atraviesan la membrana plasmática que permiten la difusión selectiva y 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. Suelen denominarse en función de la permeabilidad y selectividad para iones (p.ej., canal de sodio o cloro). Son ejemplos de canales iónicos dependientes de voltaje los canales de calcio, potasio y sodio. [55]

- *El canal de sodio* produce potenciales de acción en respuesta a la despolarización parcial de la membrana. Este canal es el lugar de acción de la mayor parte de los antiepilépticos clásicos y nuevos que, al inhibir este canal, estabilizan la membrana. [54]
- *La activación de los canales de calcio* dependientes de voltaje se acompaña del aumento del calcio intracelular y la disminución del calcio extracelular. Se ha asociado con la liberación de neurotransmisores, con la despolarización sostenida de la neurona, con los fenómenos de potenciación prolongada, con los fenómenos del kindling y con los fenómenos de excitotoxicidad que subyacen en la epileptogénesis. [56]
- *El canal de potasio* dependiente de voltaje participa en la repolarización e hiperpolarización de la membrana. [55]

Inhibición de la neurotransmisión mediada por (GABA)

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio, el cual se forma en el cerebro por descarboxilación del glutamato. Está relacionado con la entrada de iones cloro en la neurona, que impiden que esta puede ser estimulada. En presencia del GABA, el receptor GABA_A, se abre y produce un flujo de iones cloro que aumenta la polarización de la membrana.

El incremento de la inhibición sináptica mediada por el GABA reduce la excitabilidad neuronal y eleva el umbral convulsivo. [57] 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, por ejemplo existen fármacos que disminuyen el metabolismo del GABA (ácido Valproico, Vigabatrina) y otros actúan sobre el receptor GABA_A (barbitúricos, benzodiazepinas, felbamato, topiramato). [1]

Neurotransmisión excitatoria mediada por glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central que realiza su acción excitadora actuando sobre receptores específicos localizados en la membrana neuronal. Los receptores de glutamato se han clasificado en dos grupos principales: receptores ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos son designados según su especificidad en agonistas selectivos; de este modo se clasifican como receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), del kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA). Estos receptores responden a la unión del glutamato incrementando la conductancia a un catión. [57] Los receptores metabotrópicos glutamatérgicos están asociados a proteínas G y actúan predominantemente regulando canales iónicos. Algunos estudios parecen indicar que mutaciones en estos receptores podrían estar involucradas en el desarrollo de epilepsia. [57]

Perampanel y talampanel, son los únicos fármacos antiepilépticos actuales con efecto selectivo sobre los receptores de glutamato. [53] Muchos otros antiepilépticos ejercen su efecto, en parte, a través del bloqueo de la neurotransmisión glutamatérgica, como Felbamato, que bloquea al receptor NMDA, el Topiramato que bloquea a los receptores kainato y AMPA. El fenobarbital que inhibe al receptor AMPA, entre otros. [57]

Anhidrasa carbónica: un nuevo blanco molecular en la epilepsia

La anhidrasa carbónica (CA) es una metaloenzima responsable de la catálisis reversible de la hidratación del CO_2 para formar HCO_3^- y H^+ . Al regular la concentración intra y extracelular de estas especies, resultan de vital importancia en diferentes procesos que involucran el transporte de iones, regulación de pH e intercambio gaseoso. [58] En mamíferos se han descubierto hasta el momento 16 isoformas de anhidrasa carbónica, clasificadas como α -CA. Estas presentan diferente localización a nivel subcelular, propiedades cinéticas y afinidad a inhibidores. Ocho son citosólicas (CA I, CA II, CA III, CA VII, CAVIII, CA X, CA XI, CA XIII), dos mitocondriales (CA VA, CA VB), una secretada (CAVI) y cinco asociadas a membranas (CA IV, CA XV, CA IX, CA XII, CA XIV). [58] Las isoformas activas conservan la arquitectura del sitio activo, formado por una molécula de zinc que coordina con los anillos imidazol de 3 residuos de histidina (Figura 1.5). La cuarta posición es ocupada por una molécula de agua (o un ión hidróxido, dependiendo del pH).

Los inhibidores clásicos de CA poseen la función sulfonamida y actúan ocupando la cuarta posición de coordinación que ocupa el agua (Figura 1.5). [59] El grupo sulfonamida se une al Zn (II) mediante un átomo de Nitrógeno desprotonado, y generalmente interacciona con

un residuo de treonina cercano al Zn (II) (Figura 1.5). Otros inhibidores que operan con el mismo mecanismo son los bioisómeros no clásicos de la sulfonamida, [59-61] como la función sulfamida (-NH-SO₂-NH-) o sulfamato (-O-SO₂-NH-).

Anticonvulsivos como la Acetazolamida, Topiramato y Zonisamida presentan acción inhibitoria frente α-CAs. [58] Sin embargo, no existe al momento una relación directa entre esta inhibición y sus propiedades anticonvulsivas, dado que estos compuestos presentan más de un mecanismo de acción y fueron descubiertos independientemente de su interacción con CAs.[58,62-63] De hecho, en muchos casos la inhibición de la isoforma CAII resulta desfavorable, debido a que esta interacción contribuye a la tolerancia de los fármacos y a la manifestación de efectos adversos (formación de cálculos renales, oligohidrosis e hipertermia).[57] Expertos en el área proponen que estas limitaciones pueden salvarse mediante el diseño de inhibidores selectivos de las isoformas implicadas en las patologías.[57]

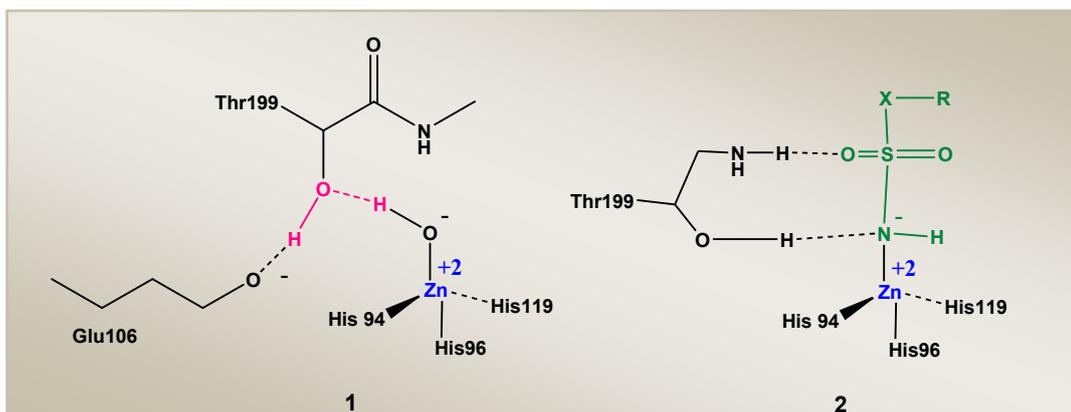


Figura 1.5. (1) Coordinación del Zinc en el sitio activo del hCAII, con 3 ligandos de histidina (His 94, 96 y 119) y dos residuos cercanos de (Glu 106 y Th 199). **(2)** Esquema del sitio activo de CA interaccionando con un inhibidor clásico. X puede ser un átomo de C (en sulfonamidas), O (en sulfamatos) o N (en sulfamidas). Los residuos del sitio activo se numeraron relativos a la isoforma CAII [59]

Respecto a la epilepsia, se conoce que la excitabilidad neuronal se ve influenciada por el pH de distintas maneras, entre la que se encuentra la modulación de la activación del receptor del ácido γ-aminobutírico GABA_A. [58] Este receptor de membrana transporta a través de su poro iones cloruro hacia el interior de la célula, lo que genera una hiperpolarización de la neurona y por lo tanto causa un efecto inhibitorio sobre la neurotransmisión, disminuyendo las chances de ocurrencia de un potencial de acción. Se ha observado, sin embargo, que una activación intensa de la sinapsis GABAérgica es capaz de promover, en vez de suprimir, la excitación neuronal. [59-67] Se ha demostrado que en el caso de la epilepsia febril, esta excitación es estrictamente dependiente del flujo continuo de iones HCO₃⁻ producidos por CAVII, una isoforma presente en neuronas.[63] Puesto que

esta excitación se suprime mediante la adición de inhibidores de CAs, se ha postulado que esta enzima influye en la generación de crisis epilépticas.^[64-65] Por ello actualmente se propone a la isoforma CAVII de anhidrasa carbónica como nuevo blanco molecular validado para el tratamiento de la epilepsia febril. ^[64-65]

¿Es necesario el desarrollo de nuevos fármacos anticonvulsivos?

El pronóstico de los pacientes epilépticos ha variado en forma importante en los últimos años. En 1968, Rodin y colaboradores lograban controlar las crisis mediante el uso de fármacos antiepilépticos en aproximadamente el 20% de la población de su Centro de Epilepsia. ^[66] En la actualidad, este número se ha elevado hasta lograr un control adecuado con farmacoterapia en alrededor del 70% de los pacientes. ^[67]

El nuevo arsenal farmacológico comercializado ofrece algunas ventajas, como ser mejor tolerancia, presentan una menor interacción farmacológica y un mayor espectro terapéutico. Sin embargo todavía no hay evidencias de una mayor eficacia ya que alrededor de un 30-40% de los pacientes continúan presentando epilepsia refractaria.^[14] Además, un 68% de los enfermos tratados presentan efectos adversos, que resultan particularmente serios si se tiene en cuenta que en la mayoría de los casos de farmacoterapia exitosa, los medicamentos son administrados durante un largo período de tiempo (o de por vida) ^[15,24,41] y que un 28% de los pacientes tiene que recurrir a la politerapia. ^[17,21]

Los efectos adversos más frecuentes son: teratogenicidad, somnolencia, deterioro de las capacidades cognitivas (capacidad de memoria, atención y aprendizaje), tendencia al suicidio, incremento del peso, pérdida de cabello, discrasias sanguíneas, reacciones alérgicas y hepatotoxicidad, entre otras.^[22,24,42] Este escenario justifica, entonces, la necesidad de diseñar y validar nuevas entidades químicas que finalmente sean promisorias como fármacos anticonvulsivos capaces de sobrepasar, al menos en parte, las limitaciones de los antiepilépticos actuales, particularmente la farmacorresistencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPITULO I

- [1] Moshé, S.L.; Perucca, E.; Ryvlin, P.; Tomson, T. *Lancet* 385, 884–98. (2015)
- [2] Fisher, R.S.; Van Emde Boas, W.; Blume, W. *Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. *Epilepsia* 46, 470–72.
- [3] Alexopoulos, A V. *Epileptology* 1, 38–42. (2013)
- [4] Velazco Monroy, A.L. *Epilepsia un punto de vista latinoamericano*. (2013)
- [5] Guerrini, R. *Lancet* 367,499–524. (2006)
- [6] Duncan, J.S.; Sander, J.W.; Sisodiya, S.M.; Walker, M.C. *Lancet* 367, 1087–100. (2006)
- [7] Borrueal, M.; Mas, P.; Borrueal, G. *Estudio de carga de Enfermedad en Argentina*. Ministerio de Salud.Presidencia de la Nación.pp 213. (2010)
- [8] Melcon, MO.; Kochen, S.; Vergara, RH. *Neuroepidemiology* 28 (1), 8-15. (2007)
- [9] Somoza, M.J.;Forlenza, R.H.; Brussino, M.;Centurión, E. *Neuroepidemiology* 32 (2), 129-35. (2009)
- [10] San-Juan Orta, D.; Rodríguez Zubia, E.; Gómez González, G.J.;Vázquez Gregorio, R.; Tabera Tarello,P.M.;Agnes Fleury,A. *Anales Médicos (México)* 59 (3), 212-218. (2014)
- [11] Argueta, V.; Rodas, B.; Orozco,R. *Revista Española de Patología* 47 (3), 137-141. (2014)
- [12] Vezzani, A.; Fujinami, R.S.; White, S.;Preux, P.M.;Blümcke, I.; Sander, J.W.; Löscher,W. *Acta Neuropatholy*. DOI 10.1007/s00401-015-1481-5. (2015)
- [13] Reyes Botero, G; Uribe, C .S. *Acta Neurologica Colombiana* 26, 34-46. (2010)
- [14] Viteri Torres, C. *Medicine* 11 (73), 4364-73. (2015)
- [15] Panayiotopoulos, CP Clinical Aspects of the diagnosis of epileptic seizures and epileptic syndromes. In Panayiotopolos (ed.) .*The Epilepsies* (1st ed.). NBN international Ltd., Estover Road, Ply mouth, UK, pp. 1-23. (2005)
- [16] Singh, A.P.; Duggal, S. *Danish Journal of Medical and Biology Sciences* 37-41. (2015)
- [17] Bender del Busto, J. E.; Morales Chacón, L.; Garcia Maeso, I.; Garcia Navarro,M.E. *Revista Mexicana de Neurociencia* 7(2), 112-119. (2006).
- [18] Rodríguez-Sala, M.L.; Soriano-Cuevas, N.K. *Revista Mexicana de Neurociencia* 13(5), 286-293. (2012)
- [19] Laxer, K.D.; Trinka, E.; Hirsch, L.J.; Cendes, F.; Langfitt, J ;Delanty, N.; Resnick, T, Benbadis, S.R.; *Epilepsy & Behavior* 37, 59–70. (2014)
- [20] Alexopoulos A V. *Epileptology* 1, 38–42(2013)
- [21] Engel J Jr; Wiebe, S.;French ,J; Sperling, M.;Williamson, P.; Spencer ,D.; Gumnit ,R.; Zahn, C.; Westbrook ,E ;Enos, B . *Neurology* 60, 538-47. (2003)

- [22] Cross J.H.; Jayakar, P.; Nordli ,D.; Delalande, O.; Duchowny, M.; Wieser,H.G.; Guerrini, R.;Mathern ,G.W. *Epilepsia* 47,952-9. (2006)
- [23] Thomas, R.; Browne, M.D.; Gregory, L.; Holmes, M.D. *The Journal of Medicine* 344, 1145-1151. (2001)
- [24] Locock C. *Lancet*; i: 527.(1857)
- [25] Hauptmann A. *Luminal bei Epilesie. Munch Med Wochenschr* 59,1907-9. (1912)
- [26] Löscher, W.; Schmidt, D. *Epilepsia* 52(4), 657–678. (2011)
- [27] Shorvon, SD. *Epilepsia*. 50 (Suppl. 3): 93-130. (2009)
- [28] Brodie, M.J. *Seizure* 19: 650-5. (2010)
- [29] *Drug Amendments Act*, Public Law 87-781, 21 USC 355, EEUU, (1962)
- [30] Rocha L.; Santana Gómez, C.; Rosillo de la Torre, A.; Magdaleno Madrigal, V; Alonso-Vanegas M.;Velasco F.; Bruno-Blanch L. *Epilepsy Therapeutics* In: Arthur W. Toga, editor. *Brain Mapping: An Encyclopedic Reference*, vol. 3, pp. 887-894. Academic Press: Elsevier (2015)
- [31] Ferlazzo, E.; Russo, E.; Mumoli, L.; Sueri, C.; Gasparini, S.; Palleria, C.; Labate, A.; Gambardella, A.; De Sarro, G.; Aguglia, U. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 11,2967-2973. (2015)
- [32] Glauser, T; Laurenza, A; Yang, H; Williams, B; Mac, T; Fain, R; *Epilepsy Research* 119 34–40. (2016)
- [33] Löscher, W.; Klitgaard, H.; Schmidt .*Nature Reviews Drug Discovery* 12,757–776. (2013)
- [34] Kwan, P.; Brodie, MJ. *Neurology* 60 (11), S2-12. (2003)
- [35] Armijo, J.A.; Herranz J.L. *Revista de Neurología* (Barcelona) 45,163-73. (2007)
- [36] Schmidt, D. *Epilepsy Research* 50, 21-32.(2002)
- [37] Loscher W.; Schmidt D.*Epilepsy Research* 69:183-272. (2006)
- [38] Andrade Machado, R.; García Espinosa, A.; Melendrez, D.; Remón Gonzalez, Y.; Frades García, V.; Quintana Rodríguez, Y . *Seizure* 20 ,280–284. (2011)
- [39] Machado, R. A.; García Espinosa, A.; Melendrez, D.; Remón Gonzalez, Y.; Frades García, V.; Quintana Rodríguez, Y. *Seizure* 20 ,280-284. (2011)
- [40] Carreño Martínez, M; Serratosa Fernández, J. *Cirugía de Epilepsia.194-196. Guías diagnósticas y terapéuticas de la sociedad Española de neurología. (2012)*
- [41] http://espanol.ninds.nih.gov/trastornos/crisis_epilepticas.htm
- [42] Sell, E. *Acta Neurológica Colombiana* 24 (1). (2008)
- [43] Rodríguez Uranga, J.J. *Revista del Grupo de Epilepsia de la Sociedad Española de Neurología*, 11-17. (2012)
- [44] García-March, G.; Sánchez-Ledesma, M. J.; Broseta, J. *Neurocirugía* 19, 416-426. (2008)

- [45] Torres, C.V.; Pastor, J; Navarrete, E. G.; Sola, R. G. *Revista de Neurología* 53, 153-64. (2011)
- [46] Salanova, V.; Witt, T.; Worth, R.; Henry, T. R.; Gross, R. E.; Nazzaro, J. M.; Labar, D.; Sperling, M. R.; Sharan, A.; Sandok, E.; Handforth, A.; Stern, J. M.; Chung, S.; Henderson, J.M.; French, J.; Baltuch, G.; William E.; Rosenfeld, W.E.; Garcia, P.; Barbaro, N.M.; Fountain, N.B.; Jeffrey Elias, W.J.; Goodman, R.R.; John, R.; Pollard, J. R.; Tröster, A. I.; Irwin, C. P.; Lambrecht, K.; Graves; Fisher, R. *Neurology* 84(10),1017-1025. (2015)
- [47] Fisher, R.; Salanova, V.; Witt, T.; Worth, R.; Henry, T.; Gross, R. and the SANTE study group. *Epilepsia*.51, 899-908. (2010)
- [48] Le Kossoff, E.H.; Zupec-Kania, B.A.; Amark, P.E.; Ballaban-Gil, K.R.; Bergqvist, A.G.C.; Blackford, R. *Epilepsia* 50, 304-17. (2009)
- [49] Messer, R.D.; Kossoff, E.H. Ketogenic Diets for the Treatment of Epilepsy .Capítulo 46 pp 441 en *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease* .Elsevier Inc. (2015)
- [50] Bough, K.J.; Rho, J.M. *Epilepsia* 48, 43-58. (2007)
- [51] Yudkoff , M.; Daikhin ,Y.; Melo ,T.M.; Nissim ,I.; Sonnewald ,U.; Nissim ,I. *Annual Review of Nutrition* 27, 415-30.(2007)
- [52] Tonekabone, S. H.; Mostaghimi, P.; Mirmiran, P.; Abbaskhanian, A.; Abdollah, F.; Gorji F. *Archive of Iranian Medicine* 13,492-7. (2010)
- [53] White, H.S.; Smith, M. D.; Wilcox, K.S. *International Review of Neurobiology* 85–110. (2007)
- [54] Rogawski, M.A.; Löscher, W. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 553-564. (2004)
- [55] Papazian, D. M.; Bezanilla, F. *Voltage-dependent activation of ion channels*. En Delgado-Escueta A.V., Wilson W.A., Olsen R.W., Porter R.J., eds. Jasper's basic mechanisms of the epilepsies. *Advances in neurology*. Vol. 79. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins; 1999. p. 481-9
- [56] Delgado-Escueta AV.; Wilson WA.; Olsen RW.; Porter RJ. *New waves of research in the epilepsies: crossing into the third millennium*. En Delgado-Escueta AV., Wilson WA., Olsen RW., Porter RJ., eds. Jasper's basic mechanisms of the epilepsies. *Advances in neurology*. Vol. 79. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins; .p. 3-58.(1999)
- [57] Meldrum, BS. *Epilepsia* 37, 4-11. (1996)
- [58] Frost, S. *Physiological Functions of the Alpha Class of Carbonic Anhydrases*, en: S. Frost, R. McKenna (Eds.) *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. Springer, pp. 9-30.(2014)
- [59] Alger, B.E.; Nicoll, R. A. *The Journal of Physiology* 328: 125-141. (1982)

- [60]Gavernet, L.; Gonzalez Funes, J.L.;Bruno Blanch,L.; Estiu,G.; Maresca,A.; Supuran,C.T. *Journal of chemical information and modeling*, 50 (6),1113-1122, (2010)
- [61]Gavernet, L.; Gonzalez Funes, J.L.; Palestro, P.H.; Bruno Blanch,L.; Estiu,G.; Maresca,A.; Barrios,I.;Supuran,C.T.*Bioorganic and Medicinal Chemistry* 21, 1410-1418. (2013)
- [62]Shank,R. P.; Gardocki,J. F.; Vaught, J. L.; Davis, C. B.; Schupsky, J. J.; Raffa, R. B.; Dodgson, S.J.; Nortey, S. O.; Maryanoff,B.E.*Epilepsia*. 35 (2), 450-60. (1994)
- [63]Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G. *Chemistry review* 112(8), 4421-68. (2012)
- [64]Kaila, K.; Lamsa, K.; Smirnov, S.; Taira, T.; Voipio, J. *The Journal of Neuroscience* 17 (20), 7662–7672. (1997)
- [65]Rusuvuori, E.; Huebner , A. K.; Kirilkin, I.;Yukin, A. Y.;Blaesse, P.;Helmy, M.;Kang, H. J.;El Muayed, M.; Hennings, J.C.;Voipio, J.;Šestan, N.; Hübner, C. A.; Kaila, K. *The EMBO Journal* 32, 2275–2286. (2013)
- [66]Rodin, E.A. *The prognosis of patients with epilepsy*. Springfield.Illinois:Thomas. (1968)
- [67]Silva, R.C.; Montenegro, M. A.; Guerreiro, C. A.; Guerreiro,M. M. *Neurotherapeutics* 4, 138–44. (2007)
- [67]Bialer, M.;White, H.S. *Nature Reviews. Drug Discovery* 9,68-82.(2010)

CAPITULO II

Descubrimiento de Fármacos

Breve introducción al descubrimiento de fármacos

Los fármacos han acompañado y acompañan el desarrollo del hombre a lo largo de su historia, contribuyendo a mejorar su calidad de vida mediante la cura o control de sus enfermedades. El proceso de descubrimiento de fármacos se puede dividir, de manera simplificada, en tres períodos. Estos se diferencian entre sí por los métodos de descubrimiento utilizados para su obtención.

El primer período I, podemos definirlo desde tiempos inmemorables hasta el inicio del siglo XX, donde los procedimientos utilizados básicamente eran el uso de minerales molidos ^[1] y la extracción de principios activos de origen natural, ya sea mediante el uso de infusiones, cocciones, extracciones o la administración/aplicación directa de la hoja o tallo sobre la zona afectada. También pueden mencionarse en esta etapa el uso de compuestos aislados con actividad biológica determinada y estructura elucidada. Entre los ejemplos más destacados y que aún perduran, podemos mencionar a la quinina (1820), la morfina (1805), la papaverina (1848) y la aspirina (1899).

El segundo período II, se caracteriza por un mayor conocimiento químico disponible sobre los compuestos y procedimientos químicos. Aquí comienza la era de la química farmacéutica, cuando Paul Ehrlich, demuestra que las enfermedades producidas por gérmenes pueden ser tratadas con compuestos de síntesis química, como fue el caso del azul de metileno (para la malaria) o el salvarsán (para el tratamiento de la sífilis). Ehrlich propone el concepto de receptor, una de las piezas clave en la investigación y desarrollo de fármacos. También tiene lugar el descubrimiento de sustancias tan importantes como las vitaminas en 1914 y el aislamiento de la insulina en 1922. Se descubren además las propiedades antibacterianas de las sulfas (o sulfonamidas) a partir del colorante prontosil, utilizado en infecciones estreptocócicas en 1935. Este compuesto dió pie, con posterioridad, a numerosas sulfonamidas antibacterianas sintetizadas, mediante la modificación exhaustiva de su estructura química. ^[2] El descubrimiento de las sulfas como antibacterianos fue un verdadero avance, ya que representaron los primeros fármacos eficaces contra las infecciones bacterianas sistémicas. Posteriormente se desarrollaron las penicilinas, descubiertas por Alexander Fleming en 1928 y utilizadas como fármacos a principios de 1940 por E. Chain y H. Florey. La aparición de estos novedosos y efectivos compuestos facilitó el desarrollo de nuevas técnicas de purificación, en la búsqueda de nuevos compuestos líderes para diferentes patologías.

El último y tercer período III (finales del siglo XX) se orientó a la búsqueda del conocimiento que permitiera saber cómo y dónde se producía la interacción de los fármacos en el sistema biológico. Por esta razón se caracteriza por el avance en nuevas técnicas de elucidación estructural de macromoléculas, basadas en resonancia magnética nuclear (RMN) y cristalografía de rayos X; en conjunto con el desarrollo de la Bioquímica, Biología Molecular y la Genética. Por ejemplo, con la finalización del proyecto del genoma humano se hizo posible una mejor comprensión de las diferentes vías moleculares responsables de ciertas enfermedades, y pudo utilizarse esta información como punto de partida para la búsqueda de nuevos fármacos que interaccionan con proteínas específicas. [3] Todas estas herramientas, sumadas al desarrollo de la química computacional, han permitido el empleo de métodos más racionales para el descubrimiento de estructuras activas, basados en el conocimiento de enzimas, receptores y ligandos. El desarrollo logrado en estos temas fue acompañado por los avances en los métodos de síntesis química y ensayos biológicos, particularmente respecto a reactivos y métodos no agresivos al medio ambiente. La química combinatoria y el cribado biológico de alto rendimiento (HTS), han permitido automatizar en gran medida estas dos etapas, trayendo beneficios inmediatos al pasar rápidamente del "descubrimiento de compuesto líder" a la "optimización" del mismo mediante un ciclo iterativo de refinamiento de la síntesis y la detección hasta que se alcancen las propiedades de fármacos deseadas en un menor tiempo. [3]

Etapas implicadas en la búsqueda de un nuevo medicamento

El descubrimiento de fármacos resulta un largo y complejo proceso interdisciplinario, que requiere mucho tiempo, esfuerzo e involucra grandes recursos económicos. De hecho, se han llegado a sintetizar y evaluar hasta 20.000 compuestos como posibles fármacos y sólo uno de ellos llegará a convertirse en un medicamento autorizado. [4] Según lo informado por la industria farmacéutica internacional, el proceso del descubrimiento de un nuevo fármaco dura entre 12 a 15 años y la inversión ronda los US\$ 2.000 millones de dólares. [5] En este contexto es que cobran importancia los criterios y metodologías que son aplicadas desde el inicio del descubrimiento de un fármaco, donde es necesario delinear estrategias que permitan incrementar la tasa de éxito y la consecuente reducción en el gasto y el tiempo necesario para la producción de nuevas moléculas.

Debe aplicarse tempranamente procedimientos que tengan en cuenta las características del fármaco de acuerdo al objetivo molecular elegido, teniendo para ello en cuenta sus propiedades ADMETox (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) lo

que permitirá continuar con las distintas etapas de la investigación de sólo aquellos compuestos que cumplan con los requisitos moleculares seleccionados.

De manera general y simplificada, podemos diferenciar distintos procedimientos a aplicar para generar una nueva entidad química activa. [6] Para ello existen distintas etapas implicadas en el proceso de descubrimiento y desarrollo.

A continuación se describirán brevemente las fases de mayor relevancia en cada etapa de descubrimiento.

Descubrimiento de fármacos: búsqueda del compuesto líder [6]

Una vez identificada la enfermedad, la siguiente etapa será la seleccionar el/los blancos terapéuticos (enzimas, receptores o proteínas) de acuerdo al conocimiento respecto de su intervención en la patología en estudio y que serán el objetivo al que se enfocaran las nuevas entidades químicas a desarrollar. Posteriormente estos blancos moleculares deben ser validados. La validación consta de la comprobación experimental de que el blanco seleccionado es el objetivo válido para el tratamiento de la enfermedad en cuestión. Para demostrar esto se realizan ensayos tanto en modelos *in vitro* (es decir, en células aisladas, tejidos, enzimas, o receptores) como *in vivo* (animales). De forma general los fármacos suelen interferir en la actividad de una proteína (enzima, receptor, canal iónico, etc.) impidiendo que se realice el proceso mediado por la misma. Este mismo efecto se puede conseguir por métodos diversos en modelos celulares o en animales, y el resultado de estos experimentos ayuda a determinar la validez del blanco molecular seleccionado, si el efecto observado coincide con el esperado.

A partir del blanco terapéutico validado se identifica el compuesto líder, que es una estructura química que se caracteriza por interactuar con el blanco seleccionado y tiene un efecto activador o inhibidor sobre ella. Este compuesto obtenido, también llamado **prototipo activo**, es el punto de partida para desarrollar moléculas estructuralmente relacionadas, hasta la obtención de una serie de candidatos sobre los que se trabaja en las fases preclínicas, buscando, con sus modificaciones, un incremento de actividad y/o disminución de efectos adversos. Estos compuestos pueden obtenerse de distintas fuentes: [6]

- *Cribado de Productos Naturales*: los productos naturales son una fuente rica, estructuralmente diversa y compleja de compuestos que han mostrado diferentes actividades biológicas. Los principios activos pueden ser aislados de plantas,

microorganismos, animales, venenos y toxinas. Un ejemplo de descubrimiento de relevancia a partir de productos naturales fue la artemisinina aislada de la *Artemisia annua* y utilizado en el tratamiento de la malaria

- *Cribado de compuestos sintéticos o Bibliotecas*: las estructuras bioactivas pueden encontrarse a través de la búsqueda de compuestos sintéticos obtenidos previamente y colectados en bibliotecas o quimiotecas, provenientes tanto de la industria o de la academia. Una de las metodologías que más contribuyeron a su formación, es la química combinatoria, que permite a bajo costo obtener la producción simultánea de una colección de moléculas en forma rápida y automatizada, que luego pueden ser testeadas en diferentes ensayos biológicos.
- *Análisis de fármacos ya existentes*: aquellos compuestos con una acción biológica probada en clínica, pueden ser utilizados como el origen de compuestos líderes en la misma patología. Por ejemplo, estructuras que cuentan con una probada acción farmacológica pueden modificarse mediante una variación estructural que conserve o mejore su potencia o farmacocinética (metodología denominada *me too*). También pueden obtenerse nuevos líderes por el estudio de los efectos secundarios de un medicamento ya existente para otro blanco terapéutico, mediante modificaciones estructurales que permitan incrementar el efecto secundario con reducción o eliminación del efecto primario. Otra alternativa consiste en utilizar fármacos conocidos para el tratamiento de otras indicaciones (métodos de reposicionamiento de drogas). Esto trae como ventaja que se trabaja con compuestos cuya toxicidad y propiedades farmacocinéticas ya han sido probadas en humanos.
- *Diseño asistido por computadora*: esta es una técnica que utiliza la química computacional para la búsqueda de nuevos líderes. Existen diferentes estrategias de descubrimiento de fármacos mediante cálculos computacionales, las cuales pueden clasificarse en *directas* o *indirectas* de acuerdo a la información disponible. Las denominadas directas implican el conocimiento de los sitios de unión del blanco molecular y su estructura en 3D. Con esta información (ya sea mediante métodos experimentales o por modelados comparativos) se puede realizar la búsqueda de ligandos que se ajusten a los requisitos del sitio activo modelado. Ejemplos de esta metodología son el cribado molecular (*screening virtual*) por *Docking* y el *Diseño de novo*. La técnica de screening virtual por docking se utiliza para simular, mediante modelos computacionales, el evento de reconocimiento molecular entre una pequeña molécula (ligando o fármaco) y una biomolécula para la formación de un complejo estable. De esta manera pueden identificarse ligandos

de bases de datos virtuales de compuestos orgánicos, que cumplan con el requisito de ser capaces de interactuar eficientemente con un blanco molecular. [7] Como ejemplo de lo expresado, se muestra en la Figura 2.1, la interacción entre una sulfamida y la isoforma II de la anhidrasa Carbónica (blanco molecular). [8]

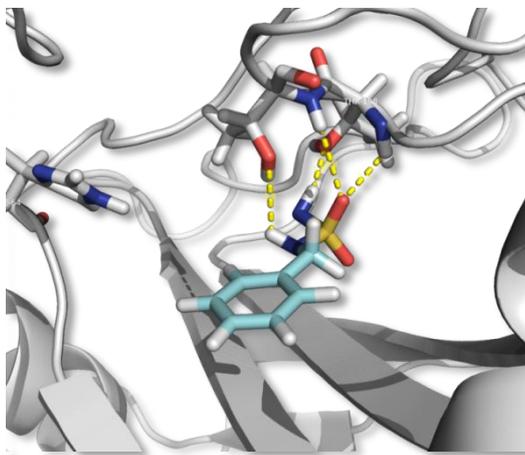


Figura 2.1-Interacción entre *bencilsulfamida* y la isoforma *CAII* de la *anhidrasa Carbónica*, obtenida por *Docking* [8]

El Diseño de Novo es una alternativa que utiliza el conocimiento de la proteína y las características electrónico-estructurales de los sitios activos. A diferencia del cribado virtual (que busca compuestos activos en una biblioteca), en el diseño de novo se construye el compuesto dentro del sitio activo mediante docking de distintos fragmentos de moléculas. Finalmente, se propone una estructura resultante, que según los cálculos, tendrá la suma de las interacciones favorables con el receptor. [9]

Las técnicas indirectas se independizan de la estructura del blanco molecular y utilizan un conjunto de ligandos/inhibidores conocidos para la construcción de funciones matemáticas capaces de diferenciar entre posibles compuestos activos e inoactivos. Ejemplos de esta metodología son el screening virtual basado en funciones QSAR (relaciones cuantitativas estructura actividad) o en patrones farmacofóricos basados en ligandos.

El compuesto activo, o prototipo activo, resulta el punto de partida para el desarrollo de fármacos. La siguiente etapa es la optimización del mismo de manera de mejorar sus propiedades hasta obtener la estructura que tenga las condiciones para incluirse en las pruebas clínicas y eventualmente llegar a ser un compuesto aprobado para su uso masivo en alguna patología.

Diseño de fármacos: optimización de la interacción del prototipo activo con el blanco molecular

La siguiente fase en el descubrimiento de fármacos es la optimización del prototipo activo, que tiene como objetivo refinar la estructura química del mismo orientado a un incremento de su actividad o disminución de los efectos adversos. Se busca maximizar la interacción entre el sitio y el blanco molecular de forma de mejorar la potencia. ^[1,2] A continuación se presentaran brevemente estrategias de optimización de farmacos.

Identificación de la Relación Estructura-Actividad (REA, en ingles SAR)

El conocimiento de la relación estructura-actividad permite reconocer cuales pueden ser las causas estructurales vinculadas a la actividad o potencia del prototipo activo. Usualmente este análisis puede efectuarse habiendo hecho modificaciones en la estructura del dicho prototipo activo y observando los cambios que se producen en la actividad biológica, de manera de identificar aquellos grupos que son importantes para dicha acción. A continuación se presentaran brevemente estrategias de optimización de fármacos basadas en el conocimiento del patrón farmacofórico, utilizadas en esta tesis.

1. Optimización del compuesto líder: Identificación del farmacóforo

Podemos definir como farmacóforo a la porción estructural común de una serie de estructuras que manifiestan una actividad biológica determinada, que se caracteriza además por presentar propiedades estéricas y electrónicas semejantes. [10]

La búsqueda de un farmacóforo es una metodología indirecta de búsqueda de nuevos fármacos, cuando no se conoce la estructura 3D del receptor. Esta metodología se basa en la búsqueda de patrones comunes en la estructura química de múltiples ligandos que manifiesten semejante respuesta biológica en el modelo elegido (blanco molecular). Para esto, se utilizan diferentes programas computacionales que permiten la visualización tridimensional de las estructuras, a través del cual se pueden realizar sistemáticamente rotaciones, traslaciones y operaciones de superposición de compuestos. De este modo se detectan aquellas regiones comunes que son indispensables para la actividad, como así también los requerimientos electrónicos y estructurales que las soportan.

Este tipo de estrategias necesita de un análisis conformacional riguroso de cada una de las moléculas, a fin de conocer la conformación preferencial, energéticamente factible, que pueden adoptar los ligandos en el sitio de unión (*conformación bioactiva*). Luego se hace un mapeo de las mismas y se resuelve gráficamente cuales son las conformaciones accesibles para la determinación del farmacóforo. [11]

La identificación del farmacóforo provee el punto de partida para el diseño de otras moléculas con actividad biológica semejante. Además, se convierte en un medio eficaz para caracterizar la topografía de un sitio receptor cuando este se desconoce (*receptor mapping*) al permitir determinar tanto el volumen asequible al farmacóforo como el volumen adyacente que debe ser excluido. No sólo brinda información sobre la forma y tamaño del sitio de unión, sino también sobre la posible naturaleza de los grupos funcionales presentes en el receptor, responsables de la afinidad. Sobre esta base Lloyd en 1986 propuso, por ejemplo, que existe un farmacóforo común para 14 clases diferentes de fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central. [12]

2. Optimización del prototipo activo: estrategias en el diseño

Una vez que se han identificado los grupos responsables de la actividad es posible sintetizar análogos que contienen el mismo farmacóforo, lo que permite validar el modelo y definir las características que deben poseer las nuevas moléculas en la búsqueda de

compuestos con mejor actividad y mayor selectividad. Para esto se utilizan las siguientes estrategias de optimización de estructuras:

- **Variación de sustituyentes** [6]

Esta metodología fue usada a principios del siglo XX, y es también conocida como variación exhaustiva. Representa un procedimiento común desde el punto de vista sintético así como una estrategia muy utilizada en la búsqueda de incrementar las interacciones entre el compuesto y el receptor. Por lo expresado anteriormente, se puede inferir que es un procedimiento que no tiene una base racional fuerte, porque es prueba-error, es decir, se debe sintetizar la molécula para confirmar mediante una evaluación biológica si dicho cambio incremento o no la actividad. Así por ejemplo el análisis del efecto de la sustitución de grupos alquilo da información acerca de la influencia de la longitud, tamaño, volumen de las cadenas carbonadas y lipofilidad en la actividad. Si estas interacciones están involucradas con un bolsillo lipofílico del receptor, su variación dará idea de las dimensiones del mismo.

La sustitución sobre compuestos aromáticos también resulta asequible. Puede implicar, por ejemplo, el reemplazo de grupos dadores por aceptores de electrones y viceversa; así como cambios de posiciones relativas en los anillos. De este modo diferentes propiedades estéricas, electrónicas e hidrofílicas pueden alterarse para detectar su influencia en la actividad.

- **Modificación de la extensión de la estructura** [6]

Involucra la inclusión de diferentes grupos para encontrar nuevas interacciones adicionales con el receptor o para mejorar la farmacocinética de la nueva entidad química. Por ejemplo, la introducción de grupos metilo aumenta la lipofilidad y reduce la solubilidad en agua, mejorando la absorción a una membrana biológica. Por el contrario, la introducción de grupos hidroxilo produce análogos con aumentada solubilidad en agua y baja lipofilidad, además de proveer un nuevo centro capaz de formar enlaces puente hidrógeno que pueden ser muy importantes en la unión a sitios activos.

- **Expansión o contracción de anillos aromáticos** [6]

Mediante una alteración del tamaño del grupo aromático se puede localizar a los átomos en posiciones relativas diferentes, afectando la eficiencia de la interacción con el sitio activo. Además, la extensión de la aromaticidad mediante la *fusión de anillos* puede resultar en un incremento de la energía de unión y de la selectividad. Otra modificación

que puede hacerse con este tipo de estructuras es la *inclusión o cambio de posición de heteroátomos* en los anillos. Esto trae como ventaja cambios en la distribución electrónica del mismo y la posibilidad de nuevas uniones del tipo puente de hidrógeno.

- ***Cambio en la longitud de la cadena*** [6]

Algunos compuestos poseen dos grupos importantes que interaccionan con el receptor, los cuales están unidos por una cadena. Es posible que la longitud de esa cadena no sea la óptima para obtener un mejor acoplamiento con el receptor. Por lo tanto, prolongando o reduciendo la cadena se puede mejorar la interacción fármaco y el receptor.

- ***Rigidización de la estructura*** [6]

La rigidización es una alternativa para la búsqueda del aumento de la actividad y la disminución de efectos secundarios de una estructura determinada. La misma se realiza por una ciclación de la molécula, o la introducción de grupos voluminosos que impiden la libre rotación de un enlace. Como consecuencia de esta rigidización se elimina la posibilidad de adquirir conformaciones vinculadas a interacciones negativas relacionadas con determinados grupos (o blancos moleculares) que son responsables de efectos no deseados.

- ***Sustitución isostérica-Bioisosterismo***

El isosterismo es un concepto químico que se ha aplicado al desarrollo de nuevas moléculas con actividad farmacológica. En la definición original de Langmuir, en 1881, este término se utilizó para describir la semejanza en propiedades físicas y químicas que presentan una serie de iones y moléculas que contienen el mismo número de átomos y electrones de valencia. [13] En 1925 Grimm amplía el concepto de isosterismo al enunciar la ley de “desplazamiento de hidruro” donde considera que un átomo es isótero con la especie que resulta al añadir un hidrógeno y dos electrones al átomo que precede en el sistema periódico. [14-15]

Posteriormente, y con el avance sobre el conocimiento de las estructuras de las moléculas, Erlenmeyer en 1932 redefinió a los isósteros como “átomos, iones o moléculas en los que las capas periféricas de electrones se pueden considerar que son idénticas”. [16] Este concepto define al isosterismo clásico, lo que puede observarse en los ejemplos presentados en la Figura 2.2. Cuando se incluyen otros criterios para la definición (como geometría, solubilidad, acidez, reactividad química, polaridad, capacidad de formar

puentes de hidrógeno) se llega a equivalencias correspondientes a un isosterismo denominado no clásico (Figura 2.2).^[17]

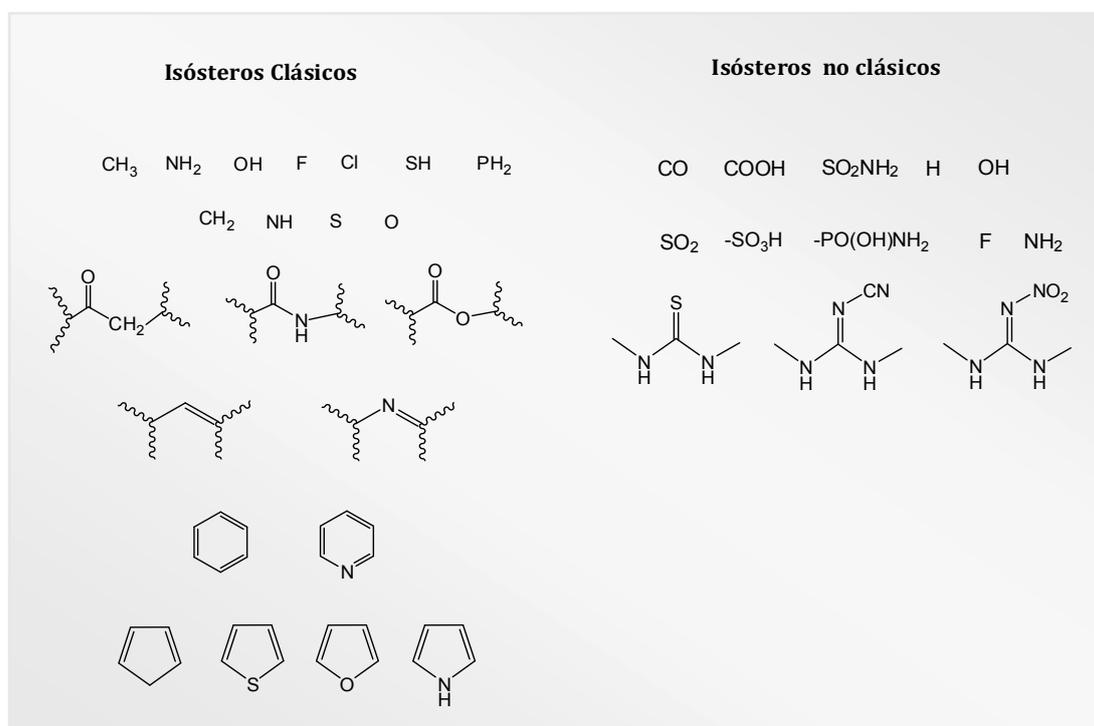


Figura 2.2-Ejemplos de isósteros clásicos y no clásicos ^[6]

A causa de la frecuente aplicación del concepto de isosterismo en estudios relativos a la acción sobre sistemas biológicos de compuestos estructuralmente relacionados, Friedman introduce en 1951, el término de *bioisósteros* para definir a las moléculas o grupos que poseen propiedades físicas o químicas análogas capaces de producir una respuesta farmacológica semejante u opuesta.

Los cambios de bioisósteros son utilizados en el diseño de fármacos para aumentar la potencia de un compuesto o para reemplazar un grupo que genere algún efecto no deseado, conservando su actividad. Por ejemplo, un anillo de pirrol se ha utilizado con frecuencia como un bioisósteros de una amida. Esta sustitución efectuada en la Sultropida (antagonista de la dopamina) condujo a un aumento de la actividad y selectividad en el receptor D₃ de la dopamina respecto alreceptor D₂ (Figura 2.3). Tales agentes son prometedores como agentes antipsicóticos dado que carecen de los efectos secundarios asociados a la interacción con el receptor D₂.^[6]

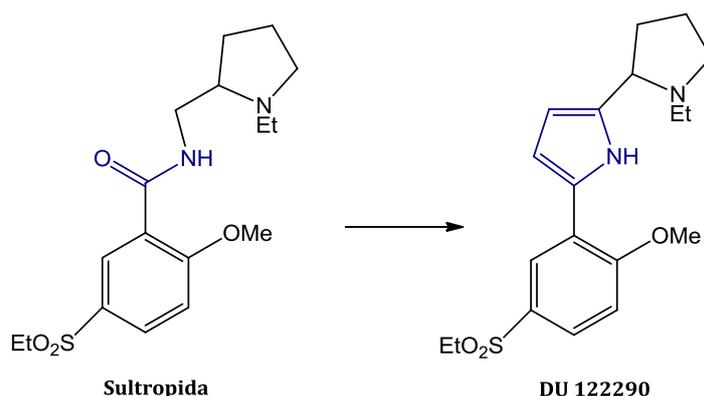


Figura 2.3-Introducción de un anillo de pirrol como bioisótero de un grupo amida

La aplicación de los principios de bioisosterismo ha conducido al descubrimiento de un gran número de fármacos. Como ejemplos podemos citar las oxazolidinonas y las hidantoínas que son bioisósteros clásicos con acción anticonvulsiva (figura 2.4).

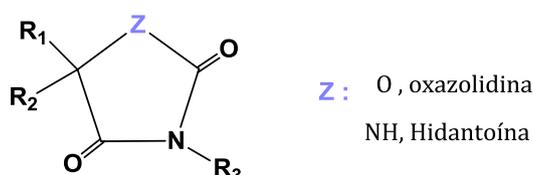


Figura 2.4-Ejemplo de fármacos anticonvulsivantes diseñados por aplicación de los principios de bioisosterismo

- **Simplificación estructural** [6]

Esta estrategia se basa en eliminar de la molécula aquellos grupos o porciones estructurales que no sean estrictamente necesarios para la acción biológica. Con este fin se diseñan compuestos más sencillos, que contengan los fragmentos responsables de la actividad. Estos grupos no tienen necesariamente que encontrarse unidos entre sí, sino que pueden estar separados por una serie de átomos que no intervienen en la interacción con el receptor, si bien cumplen con la función de unir a los grupos activos.

La simplificación estructural ha sido muy útil para la obtención de compuestos activos derivados de productos naturales. Estas tácticas de simplificación se han utilizado con éxito en el alcaloide cocaína en donde las modificaciones se han dirigido fundamentalmente en dos direcciones, por un lado, lograr compuestos más simples que mantengan la actividad anestésica y por otro, conseguir que se elimine la adicción. Su simplificación condujo al desarrollo de anestésicos locales, como la procaína, donde la

estructura original se ve drásticamente reducida, según se observa en el esquema de la Figura 2.5.

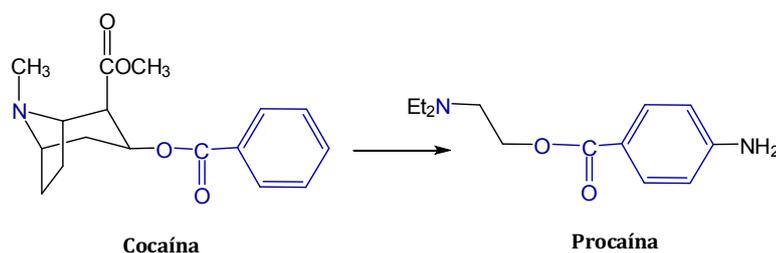


Figura2.5- *Simplicación estructural de la cocaína*

- **Modelado molecular** ^[18]

En la optimización por modelado molecular podríamos incluir todas aquellas técnicas computacionales que tienen como finalidad el estudio estructural tridimensional de las moléculas. Estas técnicas permiten simular su estructura y calcular la estabilidad de los distintos conformeros posibles para las mismas. También es posible calcular distintas propiedades fisicoquímicas, dependiendo del programa utilizado, como ser por ejemplo el coeficiente de reparto, el momento dipolar, la densidad electrónica, etc.; las cuales pueden resultar de gran importancia para el estudio de la interacción ligando-blanco molecular.

En función de la información necesaria para realizar el modelado, existen diversas técnicas computacionales como por ejemplo el Docking, que no sólo se utiliza como una estrategia de búsqueda de líderes, sino que permite mediante el análisis de las interacciones de compuestos activos generar propuestas de modificaciones estructurales orientadas a aumentar la unión al receptor.

Síntesis química

Para la optimización de prototipos activos (y en muchos casos para su descubrimiento), es necesario recurrir a la síntesis química. En esta etapa el objetivo es desarrollar el mejor procedimiento de obtención del fármaco de manera sencilla, segura, con un mínimo de etapas de síntesis, eficiente, económica y ecológica. Además, el análisis de impurezas es un aspecto clave en este proceso, ya que su presencia podría invalidar los resultados de los estudios toxicológicos y farmacológicos.

También aquí podría considerarse la etapa de la formulación del candidato, la cual debe pensarse en función de diversos factores como estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad

del fármaco, la vía de administración deseable o la dosis terapéutica adecuada, para ser empleada en las fases posteriores de investigación clínica en humanos.

Evaluación de la Actividad Biológica

Una vez establecido el objetivo terapéutico y en forma paralela al diseño de fármacos y la síntesis química, se plantean modelos de laboratorio, tanto *in vitro* como *in vivo* que sirvan para valorar los prototipos activos que se perfilen como posibles futuros fármacos. Esta etapa es de suma importancia ya que con cada ensayo realizado, así como con la documentación consultada, se va obteniendo nueva información que ayuda a definir las relaciones estructura-actividad y permite identificar los grupos funcionales, los fragmentos, o las propiedades moleculares que favorecen que algunos compuestos resulten más o menos activos en los test. La continua incorporación de este conocimiento hace que este proceso de optimización sea cíclico.

Los ensayos *in vitro* permiten determinar el grado de unión de un candidato a fármaco a un blanco implicado en la enfermedad de interés. Este modelo es limitado, pero de alguna manera nos permite ir seleccionando los compuestos que han respondido satisfactoriamente al modelo biológico propuesto. También existen ensayos como la técnica de cribado de alta resolución HTS (en inglés, high throughput screening) un método que implica la miniaturización y automatización de los ensayos *in vitro* de manera tal de testear grandes colecciones de compuestos químicos o productos naturales para identificar moléculas biológicamente activas o compuestos líderes. Se trata de pruebas de un gran número de compuestos frente a una o varias proteínas blanco, en un corto plazo de tiempo.

Una vez seleccionadas aquellas estructuras que por su actividad justifican continuar con modelos biológicos más complejos, se inician los ensayos *in vivo* en animales. Los resultados de los estudios anteriores proporcionan información sobre el perfil de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los candidatos, incluyendo su potencial toxicológico, (por ejemplo dosis letal, potencial teratogénico y carcinogénico). En líneas generales podemos definir dos fases de ensayos biológicos.

- ***Ensayos preclínicos:*** La fase preclínica permite determinar el perfil inicial de actividad y seguridad del candidato. Se efectúan análisis toxicológicos completos, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* en animales a fin de reducir y anticipar en lo posible el riesgo existente para humanos antes de comenzar el ensayo clínico. También deberán realizarse pruebas farmacocinéticas, como estudios sobre su absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) en animales de

laboratorio. Si el nuevo compuesto activo se evalúa de manera satisfactoria al final de los estudios citados, se realizan estudios de biofarmacia para establecer como debe ser formulado para su administración en humanos durante la fase de investigación clínica siempre que las autoridades regulatorias pertinentes (FDA- *Food and Drug Administration en los Estados Unidos*, EMA-*European Medicines Agency*, la Unión Europea, etc.) aprueben el pasaje a la siguiente fase.

- **Ensayos clínicos:** es necesario que antes de comercializar un fármaco éste sea probado en humanos. Esto se hace, con la finalidad de asegurar la efectividad del nuevo fármaco, en tres fases consecutivas en diferentes grupos poblacionales. Las etapas del desarrollo clínico se conocen con los nombres de fases clínicas I, II y III-

[19]

Para la aprobación y el registro de un medicamento nuevo, se recopilan los resultados de todos los estudios preclínicos y clínicos, los datos de calidad y la descripción del proceso de fabricación y se presentan a las autoridades reguladoras. Si las entidades reguladoras están de acuerdo con los resultados y demuestran la calidad, eficacia y seguridad del fármaco se emite la aprobación y el registro para permitir su comercialización.

En esta tesis doctoral se presentan los resultados obtenidos de las etapas de descubrimiento y diseño de fármacos anticonvulsivos. A continuación se desarrollaran brevemente las metodologías empleadas previamente para el diseño de este tipo de farmacos. Posteriormente se detalla la estrategia empleada por el grupo de investigación para la definición del farmacóforo, que sirvió como criterio racional para sintetizar los compuestos aquí presentados.

El diseño racional aplicado en el descubrimiento de drogas anticonvulsivas

La mayor parte de las drogas anticonvulsivas clásicas han sido descubiertas por azar, mediante metodologías de *screening* en modelos animales o a través de la variación estructural de drogas conocidas. Por ejemplo, las drogas antiepilépticas desarrolladas entre 1912 y 1960 se basaron en una estructura heterocíclica simple común (Figura 2.6). Durante este período, no se crearon compuestos con estructuras novedosas, sino que la atención se centró en las hidantoínas, barbitúricos, oxazolidinodionas, succinimidas y acetilureas, ^[20] moléculas desarrolladas por modificaciones estructurales, simplificaciones estructurales, cambios bioisómeros, etc, todos métodos clásicos.

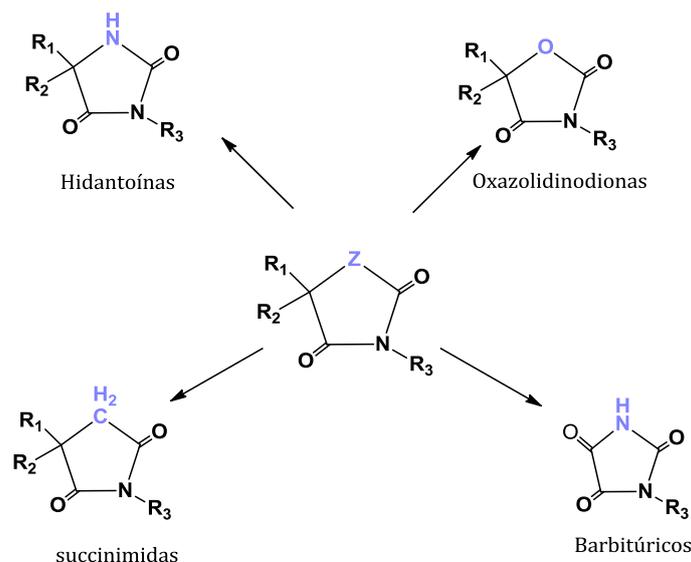


Figura 2.6. Estructura general de las drogas antiepilépticas comercializadas entre 1912 y 1960s. R_1 , R_2 y R_3 indican distintas cadenas laterales. $Z = -NH-$ en hidantoínas, $Z = -CO-NH-$ en barbitúricos, $Z = -O-$ en oxazolidinodionas, $Z = -CH_2-$ en succinimidas, $Z = -NH_2-$ en acetilureas.

El conocimiento de los mecanismos de acción de las drogas anticonvulsivas y de la patofisiología de las enfermedades cerebrales se ha incrementado notoriamente en los últimos años. A partir de esta información se han implementado estrategias de diseño racional, basadas en la comprensión de estos procesos. Como ejemplo podemos citar el desarrollo de compuestos miméticos del ácido γ -amino butírico (GABA), principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro, como son la Vigabatrina y la Tiagabina (Figura 2.7). [21] La estrategia en estos dos casos se basó en propiciar un aumento de los niveles de GABA. Esto se logró mediante la inhibición de la enzima GABA-transaminasa, una de las responsables del catabolismo de GABA (Vigabatrina) o de uno de sus transportadores (Tiagabina). Otro caso es el diseño racional enfocado a la reducción o bloqueo de la neurotransmisión mediada por glutamato, uno de los principales neurotransmisores excitatorios. [22]

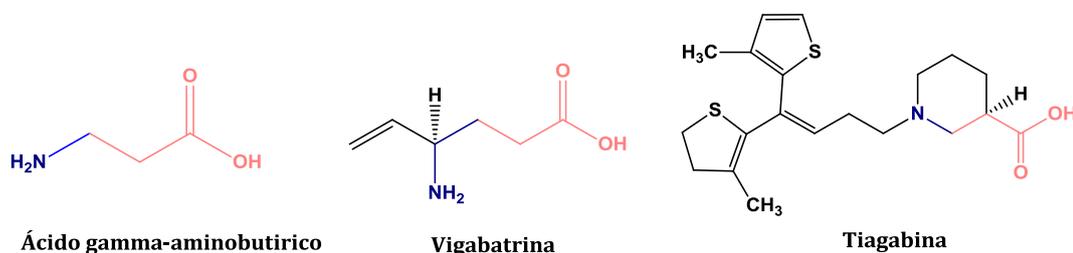


Figura 2.7. Compuestos miméticos del GABA

Los ejemplos citados anteriormente son, hasta el momento, los únicos casos exitosos de diseño racional de anticonvulsivos. Esto evidencia que las metodologías racionales no han

sido completamente explotadas para esta patología. Por otro lado, los fármacos accesibles al momento presentan limitada eficacia e importantes efectos adversos. [23,24] Todo esto direcciona a la búsqueda de nuevos compuestos antiepilépticos más seguros y eficaces mediante el mayor aprovechamiento de estrategias de diseño racional. Debe señalarse además que la situación resulta aún más compleja porque los anticonvulsivos conocidos usualmente poseen más de un mecanismo de acción, involucrando interacciones con más de un sitio de unión. [24] Es por eso que el empleo de estrategias basadas en la estructura del ligando y no desde el receptor biológico, resulta una alternativa útil, dado que puede postularse la búsqueda de compuestos activos frente a un test biológico *in vivo*, independizándose de un blanco molecular específico.

Búsqueda del perfil farmacológico

Existe una importante batería de ensayos que han sido desarrollados para detectar la actividad anticonvulsiva, [24] dado que el uso adecuado de modelos biológicos preclínicos evita seguir avanzando en los estudios de aquellos compuestos que no manifiestan respuestas aceptables en dichos modelos. Entre los más usados se encuentra el test de inducción eléctrica (ensayo MES) y el de inducción química por administración de pentilentetrazol (ensayo PTZ o Met). [25] Estos ensayos han detectado la actividad de la mayoría de las drogas actuales y, en particular, han sido los modelos de evaluación anticonvulsiva elegidos para el análisis de los compuestos preparados en esta tesis. Las características de los test se encuentran detalladas en el capítulo VI.

Se sabe que los fármacos que actúan mediante el bloqueo de los canales de sodio son activos frente al ensayo MES, además de presentar un comportamiento característico en estudios *in-vitro*; mientras que el ensayo de PTZ responde bien para compuestos GABA-érgicos. [24]

Una cantidad importante de fármacos anticonvulsivos estructuralmente diversos presentes en el mercado muestran un perfil farmacológico similar: son activos frente al ensayo MES e inactivos frente al ensayo PTZ. Entre ellos se encuentra la fenitoína (PHE), la carbamacepina (CZ), topiramato (TOP), zonisamida (ZON), oxcarbamacepina (OCZ), fármacos que presentan el bloqueo de canales de sodio como uno de los mecanismos de acción asociados. [24]

En el presente trabajo se ha utilizado como criterio de diseño de nuevas estructuras anticonvulsivas a sintetizar que los compuestos cumplan con las características electrónicas, estructurales y espaciales necesarias para que los compuestos presenten

actividad frente al ensayo MES. Es decir, se ha empleado un patrón farmacofórico previamente definido para anticonvulsivos activos frente a este ensayo biológico. [26]

A continuación se hará una breve descripción de los patrones farmacofóricos reportados en literatura para la actividad antiepiléptica.

Patrones farmacofóricos para la actividad antiepiléptica

Inicialmente los modelos farmacofóricos de anticonvulsivos derivaron de la comparación de compuestos activos estructuralmente relacionados. Por ejemplo, se han estudiado las N-bencilamidas del ácido γ -hidroxibutírico (Figura 2.8), [27] detectándose que la actividad se debía a la presencia del fragmento de N-bencilamida, una unidad hidrofóbica (anillo aromático) como un sitio de unión distante y un grupo capaz de formar puentes de hidrógeno.

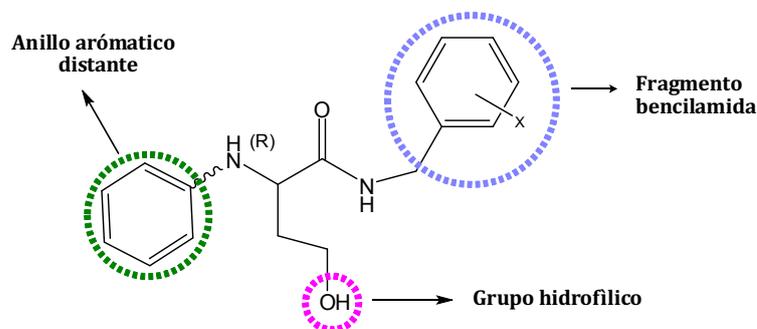


Figura 2.8- Estructura del farmacóforo propuesto para N-bencilamidas α -sustituídas del ácido γ -hidroxibutírico. [27]

Para derivados de la urea y semicarbazonas también se propusieron farmacóforos que tienen en común un grupo que puede formar puentes de hidrógeno ubicado entre dos regiones hidrofóbicas (figura 2.9). [28-29] Este modelo sirvió posteriormente para el diseño de nuevas semicarbazonas con propiedades anticonvulsivas, dos de las cuales el 4-(4-fluoro fenoxi) benzaldehído semicarbazona y N'-(4-clorofenil)-4-N(2-nitrobenzaldehído) semicarbazona, se encuentran en diversas etapas de desarrollo como fármacos antiepilépticos. [29]

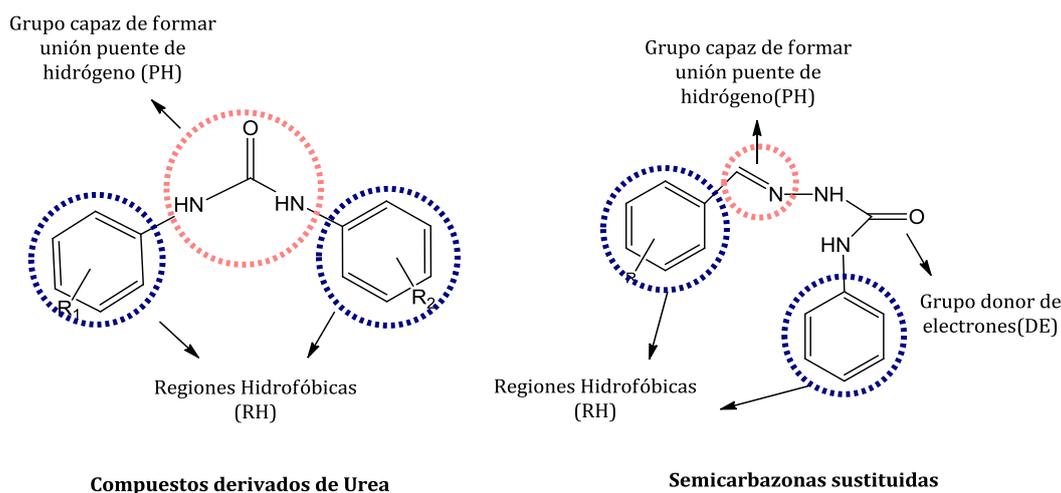


Figura 2.9- Representación de los derivados de la urea y semicarbazonas estudiados y del farmacóforo sugerido para cada tipo de compuestos.

Dado que los anticonvulsivos derivados de fenilureas son bloqueantes del canal de sodio, estas estructuras se compararon con anestésicos locales suponiendo que estos dos conjuntos de compuestos se unen al canal en la misma región. [27] Se propuso que los anestésicos tienen tres puntos de interacción con el receptor mientras que este tipo de anticonvulsivos poseen sólo dos (Figura 2.10). Esta diferencia se debe a que estos últimos carecen del grupo amino terminal (presente en los anestésicos considerados en este estudio).

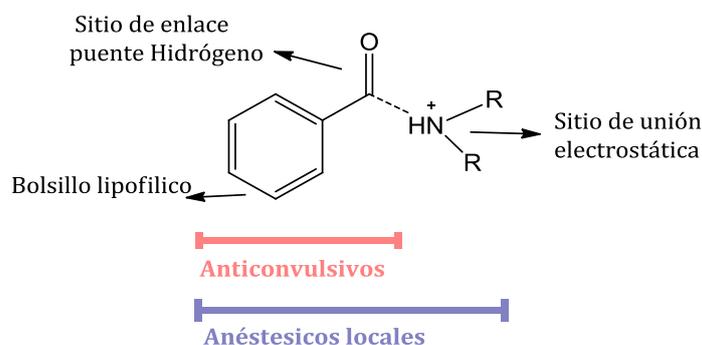


Figura 2.10- Representación esquemática del farmacóforo de fenilurea y del sitio de unión para anestésicos locales y anticonvulsivos que actúan por bloqueo del canal de sodio. [27]

Unverferth y colaboradores reportaron un modelo general para la actividad bloqueante de canales de sodio en base a la comparación estructural de cinco (5) anticonvulsivos diferentes estructuralmente, como son la CZ, PHE, lamotrigina (LAM), ZON y rufinamida (RUF) (Figura 2.11). Estos autores identificaron tres grupos necesarios para la actividad,

ubicados a distancias definidas que involucra un anillo aromático, un átomo dador de electrones cercano a un grupo NH capaz de conformar una unidad dadora/aceptora por puente de hidrógeno y un segundo átomo donador de electrones.^[30]

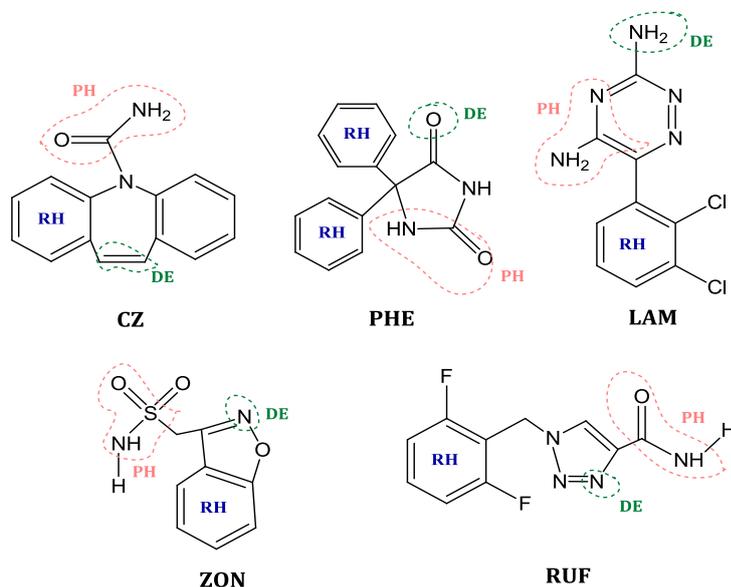


Figura 2.11- Anticonvulsivos seleccionados para el desarrollo de un modelo de farmacóforo por Unverferth y colaboradores. ^[30] Los elementos esenciales que forman parte se indican en líneas punteadas en las moléculas (**RH**: Regiones hidrofóbicas, **DE**: grupo donador de electrones y **PH**: grupo capaz de formar unión puente de hidrógeno).

Nuestro grupo de trabajo analizó exhaustivamente los requerimientos que definen al patrón farmacofórico de drogas antiepilépticas activas frente al ensayo MES (Figura 2.12), donde se utilizó un conjunto de entrenamiento más diverso estructuralmente y mayor en número a los antes mencionados. ^[26,31-33]

El farmacóforo identificado muestra similitudes con el propuesto por Unverferth y colaboradores, pero difiere en la necesidad de que se encuentren presentes en la molécula el segundo grupo dador de electrones y el anillo aromático. En este caso el farmacóforo incluye: ^[26,31-33] una porción polar conformada por dos unidades donoras de electrones (átomos 1-2 en la Figura 2.13) y un grupo aceptor de electrones (átomo 3 en la Figura 2.13) situadas en una determinada disposición espacial.

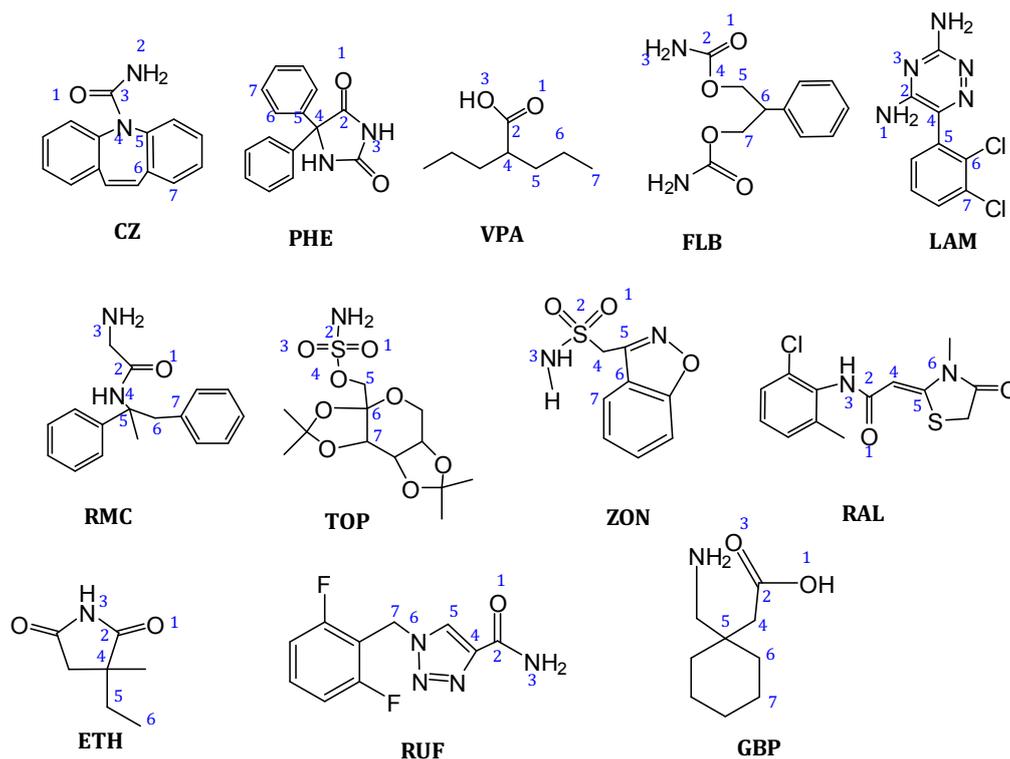


Figura 2.12- Fármacos antiepilépticos pertenecientes al conjunto de entrenamiento que se utilizaron para definir el patrón farmacofórico.

El farmacóforo identificado muestra similitudes con el propuesto por Unverferth y colaboradores, pero difiere en la necesidad de que se encuentre presentes en la molécula el segundo grupo dador de electrones y el anillo aromático. En este caso el farmacóforo incluye ^[26,31-33] una porción polar, conformada por dos unidades donoras de electrones (átomos 1- 3 en las Figuras 2.12 y 2.13) y un grupo aceptor de electrones (átomo 2 en las Figuras 2.12 y 2.13) situadas en una determinada disposición espacial. Además presenta una región lipofílica cuya posición, respecto a la porción polar, está definida por 3 ángulos de torsión y una distancia d (átomos 4 y 7 en la Figura 2.13).

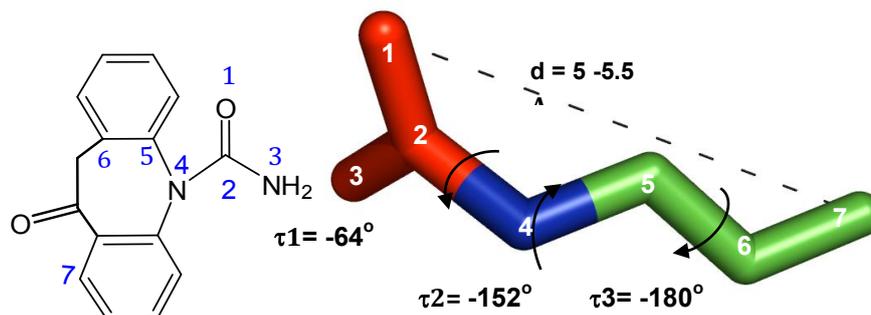


Figura 2.13- Patrón farmacofórico propuesto. ^[34] Los requisitos anti MES se pueden resumir como un resto polar (átomos 1-3, en rojo), y una cadena hidrófoba (5-7 átomos en verde) colocado en una conformación definida por t_1 , t_2 , t_3 y a una distancia d , conectado al resto polar a través de un átomo de enlace (átomo de 4, en azul), este patrón puede observarse en la Oxcarbacepina. ^[32]

Respecto a la porción polar (átomos 1-3, en rojo en la Figura 2.13), se observa que los fármacos que sirvieron para la definición del farmacóforo (Figura 2.12) ^[26,32-34] poseen en esta región similitud bioisostérica: Los grupos CH_2 , NH , y O son isósteros de acuerdo a la ley de desplazamiento de Grimm ^[14,15] y son considerados bioisósteros clásicos. ^[6,16] Por otra parte, la diferencia de electronegatividad entre el átomo de carbono y de oxígeno en el grupo carbonilo resulta en una densidad de carga positiva parcial sobre el carbono y una negativa sobre el oxígeno. Es por ello que los bioisósteros de esta función son generalmente grupos atractores de electrones y con un tamaño relativamente grande ^[35,36] como por ejemplo, los sulfóxidos y las sulfonas, reconocidos bioisósteros no clásicos del grupo carbonilo. ^[37]

Empleando la información contenida en el farmacóforo se logro diseñar, nuevas drogas antiepilépticas derivadas del ácido valproico, que presentan el perfil farmacológico buscado y son más activas en muchos casos que los antiepilépticos usados actualmente en clínica. ^[32-34]

Diseño racional y reemplazo bioisostérico aplicado al farmacóforo propuesto

Del análisis anterior surgió un nuevo grupo polar en el farmacóforo, la función sulfamida, para el reemplazo bioisostérico de las funciones amida, carbamato, ester, urea, sulfonamida, sulfamato y sulfato, (Figura 2.14) muchas de ellas presentes en las estructuras de los anticonvulsivos que definen el farmacóforo de compuestos activos frente al ensayo MES. ^[31-34]

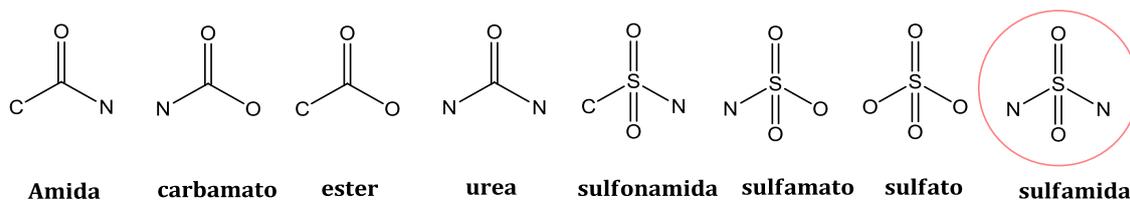


Figura 2.14. Funciones presentes en las drogas antiepilépticas estudiadas que se corresponden con la porción polar del farmacóforo. Se incluye la función sulfamida como nuevo bioisómero propuesto.

Debe aclararse que el concepto cualitativo de bioisómeros resulta muchas veces demasiado amplio. Es por eso que sólo ha sido utilizado como una herramienta inicial y adicional en el diseño de nuevos anticonvulsivos, contribuyendo a la elección de la porción polar del farmacóforo. Sin embargo, lo que se ha tenido en cuenta principalmente para la selección de compuestos son los requerimientos específicos para la actividad anti-Mes que han quedado definidos con el nuevo patrón farmacofórico.

En base al modelo de farmacóforo 3D propuesto y a los compuestos sintetizados anteriormente por nuestro grupo de trabajo, se planteó en este trabajo de tesis el diseño de nuevas estructuras, en busca de un incremento de actividad, y en la medida de lo posible, selectividad de acción. Esta propuesta se orientó a respetar el grupo funcional sulfamida, e introducir modificaciones en las cadenas laterales, teniendo en cuenta que en trabajos anteriores se habían sintetizado y evaluado un pequeño conjunto de sulfamidas unidas a aminoácidos depresores del SNC. [26] En esta oportunidad se propuso diseñar sulfamidas que cumplan con el patrón farmacofórico mediante la introducción de diferentes cadenas hidrocarbonadas (lineales, ramificadas, cíclicas, aromáticas) como así también de grupos aminoésteres.

Sulfamidas derivadas de aminoésteres

Los aminoácidos, junto con sus derivados funcionalizados, han sido objeto de estudio por presentar en muchos casos una marcada acción antiepiléptica. [36,39] Esto puede observarse en las estructuras presentes de fármacos de tercera generación, como lo indica la Figura 2.15, en gabapentina, levetiracetam, tiagabina, vigabatrina, lacosamida y brivaracetam entre otras. [22]

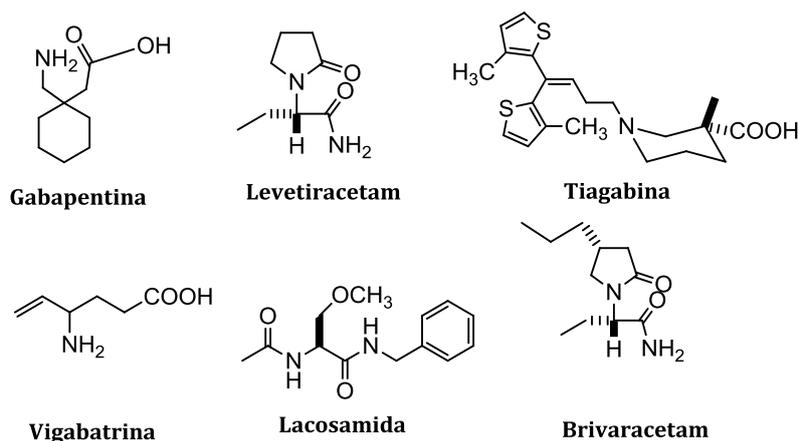


Figura 2.15- Fármacos antiepilépticos de tercera generación que presentan aminoácidos funcionalizados en su estructura.

En la presente tesis se utilizó la sulfamida como función no hidrolizable conectora de entre un grupo amino ester y una cadena hidrocarbonada, para la construcción de compuestos capaces de presentar acción anticonvulsiva.

En la Figura 2.16 se resumen los compuestos sintetizados, los cuales presentan en su estructura los requisitos necesarios para la acción farmacológica según lo predicho por las metodologías de diseño racional mencionadas previamente en este capítulo.

Los compuestos poseen la función sulfamida, pensada como nuevo grupo polar del farmacóforo, o sulfamato, intermediario de la síntesis de sulfamidas utilizada. El resto de los requerimientos puede satisfacerse con las diferentes cadenas hidrocarbonadas pertenecientes a grupos alquilo o arilo sencillos, y/o con las presentes en los amino ester.

Como se mencionó anteriormente, previo a este trabajo de tesis existía una pequeña cantidad de sulfamidas derivadas de glicina y β -alanina preparadas por el grupo de trabajo, encontrándose mayor actividad anticonvulsiva en este último grupo de compuestos. [26] Es por esto que en esta tesis se prepararon nuevos derivados de β -alanina, y también de L-fenilalanina y de L-valina, a fin de analizar la influencia tanto de las cadenas laterales hidrocarbonadas como de los aminoácidos a la actividad anticonvulsiva. A continuación pueden observarse las estructuras de los compuestos sintetizados en este trabajo.

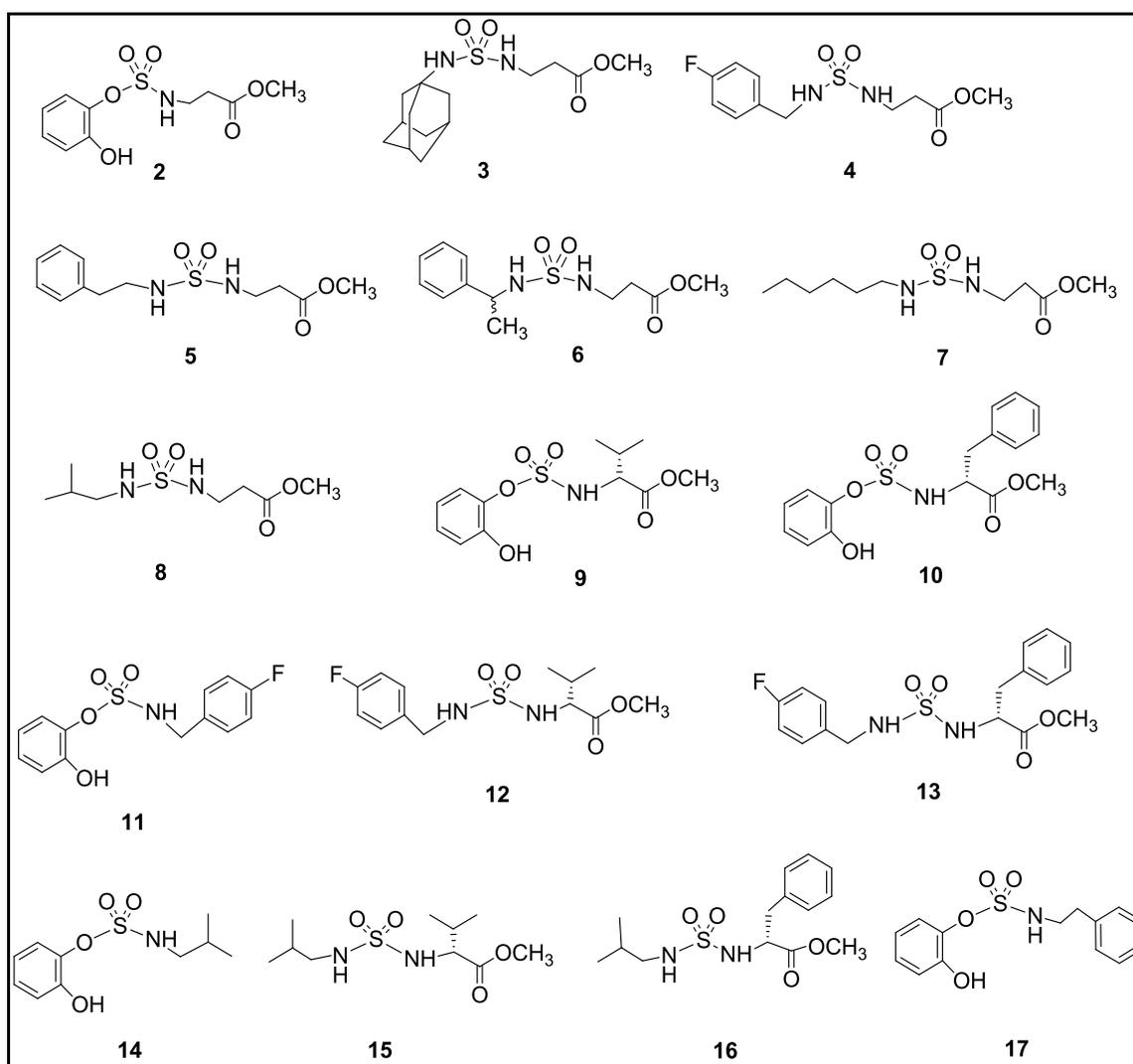


Figura 2.16- Sulfamidas y sulfamatos preparados de acuerdo a lo propuesto por el diseño:

(2) 2-hidroxifenil- β -alanina-metilester sulfamato **(3)** *N'*-adamantil-sulfamoil-*N*- β -alaninato de metilo **(4)** *N*-(*p*-fluorobencil)-sulfamoil-*N*- β -alaninato de metilo **(5)** *N'*-fenetil-sulfamoil-*N*- β -alaninato de metilo **(6)** *N*-(*N'*- α (\pm) metilbencil) sulfamoil- β -alaninato de metilo **(7)** *N'*-hexil-sulfamoil-*N*- β -alaninato de metilo **(8)** *N'*-isobutil-sulfamoil-*N*- β -alaninato de metilo **(9)** Sulfamato de 2-hidroxifenil-*L*-valinato de metilo **(10)** Sulfamato de 2-hidroxifenil-*L*-fenilalaninato de metilo **(11)** *p*-fluorobencil-*O*-(2-hidroxifenil) sulfamato **(12)** *N'*-(*p*-fluorobencil) sulfamoil-*N*-*L*-valinato de metilo **(13)** *N'*-(*p*-fluorobencil)sulfamoil-*N*-*L*-fenilalaninato de metilo **(14)** *N*-isobutil-*O*-(2-hidroxifenil) sulfamato **(15)** *N'*-isobutil-sulfamoil-*N*-*L*-valinato de metilo **(16)** *N'*-isobutil-sulfamoil-*N*-*L*-fenilalaninato de metilo **(17)** *N*-fenetil-*O*-(2-hidroxifenil)sulfamato

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DEL CAPITULO II

- [1] Wolff, M.E. *Burger's Medicinal Chemistry*. Part I. The Basis of Medicinal Chemistry. Fourth Edition 1980. John Wiley & Sons, New York. Canada
- [2] Drews, J. *Drug Discovery* 287, 1960-1964. (2000)
- [3] Pina, A. S.; Hussain, A.; Roque, A. C. *An Historical Overview of Drug Discovery* 3-12, en *Methods in Molecular Biology*, vol. 572, Humana Press, a part of Springer Science + Business Media. (2010)
- [4] Barnes, P. J.; Bonini, S.; Seeger, W.; Belvis, M. G.; Ward, B.; Holmes, A. *European Respiratory Journal* 45, 1197-1207. (2015)
- [5] Kinch, M. S.; Hoyer, D. *A history of drug development in four acts*, *Drug Discovery Today*. (2015) doi.org/10.1016/j.drudis.2015.04.003
- [6] Patrick, G L. *An Introduction to Medicinal Chemistry* published Fifth Edition. (2013) Oxford University Press, USA
- [7] Medina-Franco, J. L.; Fernández de Gortari, E.; Jesús Navejaa, J. J. *Educación Química* 26, 180-186. (2015)
- [8] Villalba, M. L.; Palestro, P.; Ceruso, M.; Gonzales Funes, J. L.; Talevi, A.; Bruno Blanch, L.; Supuran, C. T.; Gavernet, L. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 4(24), 894-891. (2016)
- [9] Schneider, G.; Fechner, U. *Natural Reviews Drug Discovery* 4, 649-663. (2005)
- [10] IUPAC, *Pure and Applied Chemistry* 70, 1129-1143. (1998)
- [11] Bernard, D.; Coop, A.; Mac Kerell, A. D. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 7773. (2005)
- [12] Lloyd, E. J.; Andrews, P. R. *Journal of Medicinal Chemistry* 29, 453-462. (1986)
- [13] Langmuir, I. *Journal of the American Chemical Society* 41, 1543-1559. (1919)
- [14] Grimm, H. G. *Electrochem* 31, 474. (1925)
- [15] Grimm, H. G. *Naturwissenschaften* 17, 557-564. (1929)
- [16] Erlenmeyer, H.; Leo, M. *Helvetica Chimica Acta* 15, 1171-1186. (1932)
- [17] Burger, A. *In Medicinal Chemistry, 3rd ed.; Burger, A. Ed.; Wiley-Interscience: New York*, pp 64-80. (1970)
- [18] Delgado Cirilo, A.; Minguillón Llombart, C.; Tamargo, J. *Introducción a la química terapéutica, 2ª. Ed.* Editorial Díaz de Santos, S.A. (2003)
- [19] Cuadro, A. M.; burgos, C.; Alvarez builla, J. *Anales de Química* 203(3), 13-21. (2006)
- [20] Brodie, M. J. *Seizure* 19, 650-655. (2010)
- [21] Bialer, M.; Johannessen, S.I.; Kupferberg, H.J.; Levy, R.H.; Perucca, E.; Tomson T. *Epilepsy Research* 61(1-3), 1-48. (2004)
- [22] Dalkara, S.; Karakurt, A. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12, 1033-1071. (2012)
- [23] Shorvon, S. D. *Epilepsia* 50 (3) 93-130. (2009)

- [24] Bialer, M.; White, H.S. *Nature Reviews | Drug Discovery* 9, 68-82. (2010)
- [25] Löscher W. *Seizure*. 20: 359-68. (2011)
- [26] Gavernet, L.; Elvira, J. E.; Samaja G. A.; Pastore, V.; Sella Cravero, M.; Enrique A.; Estiu G. L.; Bruno Blanch L. E. J. *Journal of Medicinal Chemistry* 52, 1592–1601. (2009)
- [27] Malawska, B.; Kulig, K.; Spiewak, A.; Stables, J. P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 625-632. (2004)
- [28] Pandeya, S. N.; Raja, A. S., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2,66.(2002)
- [29] Pandeya, S. N. *Acta Pharmaceutica*. 62, 263–286. (2012)
- [30] Unverferth, K.; Engel, J.; Höfgen, N.; Rostock, A.; Günther, R.; Lankau, H. J.; Menzer, M.; Rolfs, A.; Liebscher, J.; Müller, B.; Hofmann, H. *Journal of Medicinal Chemistry* 41, 63-73. (1998)
- [31] Tasso, S.; Bruno-Blanch, L.; Estiú, G.L. *Journal of Molecular Modeling* 7, 231-239. (2001)
- [32] Tasso, S. M.; Moon, S. Ch.; Bruno-Blanch, L. E.; Estiú, G. L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 3857-3869. (2004)
- [33] Barrios, I. A. ; Bruno-Blanch, L. E.; Estiú, G. L. *Journal Molecular Structure. (Theochem)* 580, 243-250. (2002)
- [34] Gavernet, L.; Barrios, I. A.; Sella Cravero, M.; Bruno-Blanch L. E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 5604-5614. (2007)
- [35] Rizzi, J. P; Schnur, R.C; Hutson, N. J; Kraus, K. G; Kelbaugh, P. R. *Journal of Medicinal Chemistry* 32, 1208-1213. (1989)
- [36] Malawska, B. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 5, 69-85. (2005)
- [37] Patani, G. A.; La Voie, E. J. *Chemical Reviews* 96, 3147-3176. (1996)
- [39] King, A. M.; Salomé, C.; Dinsmore, J.; Salomé-Grosjean, E.; De Ryck, M.; Kaminski, R.; Valade, A.; Kohn, H. *Journal of Medicinal Chemistry* 54 (13), 4815–4830. (2011)

CAPITULO III

Síntesis

de

Sulfamidas

Sulfamidas: su interés en Química Medicinal

El azufre presenta distintos estados de oxidación (II, IV, VI) y una química covalente, esencialmente no metálica. Es capaz de formar enlaces fuertes consigo mismo y con otros átomos, y además establecer uniones puente de hidrógeno.

Este elemento químico tiene una gran importancia biológica, se encuentra presente en varios componentes importantes del organismo como las vitaminas (tiamina B₁, biotina B₈), hormonas (insulina), como constituyente de los aminoácidos (cisteína y metionina), entre otras moléculas; y participa en múltiples reacciones metabólicas.

Por otro lado, hay una gran variedad de fármacos para tratar diferentes enfermedades en donde el azufre está formando parte en diferentes funciones tales como: tioéter cíclico en antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalinas), sulfonamidas como parte de fármacos antibacterianos (sulfatiazol), hipoglucémicos (tolbutamida), diuréticos (furozamida) e hipertensivos (furosemida), entre los más destacados.

La función sulfamida (=NSO₂ N=) es un grupo destacado y desde su descubrimiento [1] se siguen hallando derivados que forman parte de las nuevas entidades químicas utilizadas para tratar diferentes patologías. Sólo por citar un ejemplo, durante el período comprendido entre el año 2006-2008 fueron publicadas nueve patentes cuyos compuestos contienen a esta función [2] y que presentan distintas actividades farmacológicas. Como ejemplo de lo anteriormente expresado, se muestran estructuras de fármacos en la Figura 3.1. [2,3]

Entre las acciones farmacológicas encontradas para las sulfamidas se destacan su potente actividad antibacteriana y antibiótica en muchos casos, [2, 3] su acción como inhibidores de la NS5B polimerasa del virus de la hepatitis C [4], y desde hace varios años se han probado con éxito como inhibidores de la anhidrasa carbónica. [5, 6, 7] Además se investigó su afinidad por los receptores canabinoides. [8] También se encuentran trabajos que demuestran su capacidad agonista sobre los receptores β_3 -adrenérgicos. [9]

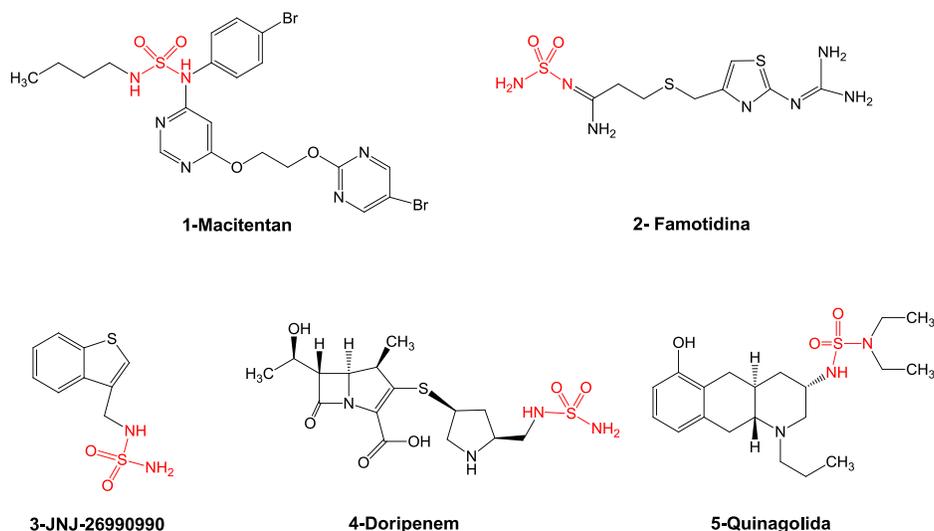


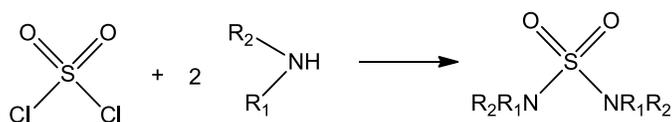
Figura 3.1- Ejemplos de fármacos utilizados en distintas patologías que contienen la función sulfamida en su estructura. Macitentan: utilizado para controlar la hipertensión arterial pulmonar; Famotidin: antagonista H2 utilizado para el tratamiento de úlcera gástrica; JNJ-26990990: fármaco anticonvulsivo en fase clínica, [2] Doripenem: antibiótico de amplio espectro; Quinagolida: inhibidor de la secreción de prolactina en el tratamiento de hiperprolactinemia.

Como se ha detallado en el capítulo 2, las funciones sulfamida y sulfamato han demostrado en estudios hechos por el LIDeB, una cierta actividad anticonvulsiva, y son las funciones que se consideraron importantes desarrollar en el presente trabajo de tesis, cuyo objetivo es la búsqueda de nuevos anticonvulsivos. Estas funciones, surgieron del modelo 3D del farmacóforo, anteriormente presentado, y puede describirse, de manera simple, como el reemplazo bioisostérico del grupo polar del patrón farmacóforico. [10-12] En esta tesis se propone abordar un trabajo original, donde con el cambio propuesto, se busca incrementar la actividad anticonvulsiva, mediante la modificación de los sustituyentes sobre los nitrógenos, en donde también se propone la inclusión de aminoácidos, tales como β -alanina, fenil alanina y valina, aminoácidos depresores del SNC, los cuales cumplen con los requisitos propuestos.

Antecedentes: Métodos de síntesis

La función sulfamida $\text{NH}_2\text{SO}_2\text{NH}_2$, desde el punto de vista químico, es una diamina del ácido sulfúrico, sintetizada y caracterizada por primera vez por Regnault en el año 1838. [1] Este compuesto y sus derivados fueron preparados luego por diversos métodos, que fueron recopilados en literatura años después por Audrieth y Sveda. [1]

Inicialmente, una gran variedad de sulfamidas fueron sintetizadas directamente por reacción de cloruro de sulfurilo con aminas primarias o secundarias (Esquema 1). [13] En estos casos se obtienen compuestos $\text{N,N}'$ -disustituídos o tetrasustituídos respectivamente, con la particularidad de que los sustituyentes unidos a los átomos de nitrógeno son iguales, por lo que a este grupo de compuestos los denominaremos sulfamidas “simétricas”.



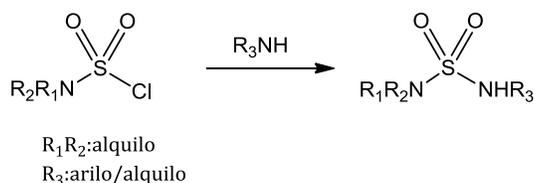
Esquema 1- Síntesis de sulfamidas simétricas, utilizando cloruro de sulfurilo y una amina primaria o secundaria. [13]

Esta reacción presenta como principal desventaja el uso de un compuesto altamente reactivo y tóxico como es el cloruro de sulfurilo, capaz de generar subproductos poliméricos. Además las condiciones de reacción requieren trabajar en ausencia de humedad y luz, debido a su descomposición en estas condiciones. [1,14]

A continuación se describirán las metodologías recopiladas de literatura para la síntesis de sulfamidas $\text{N, N}'$ sustituídas con diferentes sustituyentes, “asimétricas”, debido a que este tipo de compuestos son los preparados en esta tesis.

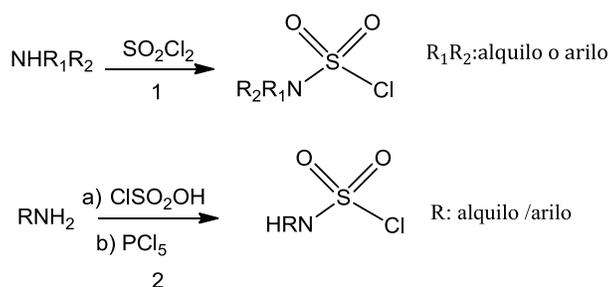
Síntesis de sulfamidas asimétricas

Esta familia de sulfamidas fueron sintetizadas por primera vez utilizando como reactivo de partida un Cloruro de N-sulfamoilo derivado de aminas secundarias o cíclicas. [14,15] Este compuesto reacciona en presencia de una alquil o aril amina para obtener la correspondiente sulfamida *N, N'* sustituida, como lo indica el esquema 2.



Esquema 2- Síntesis de sulfamidas *N, N'* sustituidas, utilizando cloruro de N-sulfamoilo como reactivo de partida

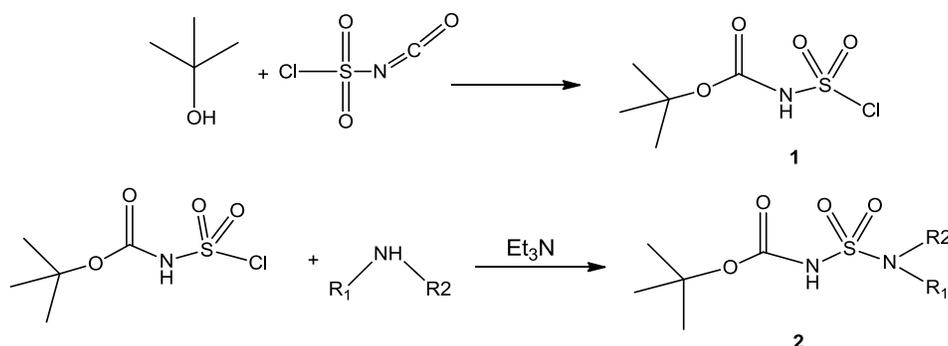
Esta reacción permite elaborar una gama limitada de sulfamidas asimétricas, [14-18] debido a que el cloruro de sulfamoilo, se obtiene por reacción de cloruro de sulfurilo (altamente reactivo) y aminas secundarias (1-esquema 3). [14-18] La sustitución del cloruro de sulfurilo por el ácido clorosulfónico, ClSO₂OH en presencia de pentacloruro de fosforo (PCl₅) permite generar nuevos derivados de cloruro de sulfamoilo (2, esquema 3) por reacción con aminas primarias [19,20]



Esquema 3- Vías sintéticas de obtención de cloruro de sulfamoilo

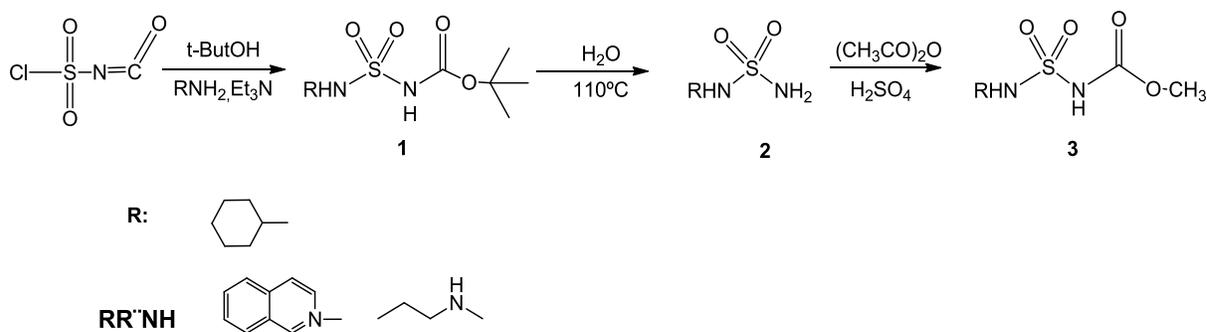
Otra metodología comúnmente utilizada para sulfamidas *N, N'*-disustituidas es la reacción entre una sulfamida y una amina (aromática/alifática) que, en determinadas condiciones de reacción, genera el producto deseado a través de una reacción de transamidación. [21-24].

Por otro lado, Dewynter y colaboradores presentaron una vía alternativa en la obtención de sulfamidas asimétricas, utilizando clorosulfonil isocianato (CSI), un alcohol y una amina, la cual puede ser primaria o secundaria, alifática o aromática, [25,26] para generar una sulfamida protegida (compuesto 2, esquema 4) [25,27-31] la que por remoción del grupo, genera una sulfamida, donde uno de los nitrógenos no posee sustituciones.



Esquema 4- Reacción general propuesta por Dewynter y colaboradores para la obtención de sulfamidas protegidas. [25]

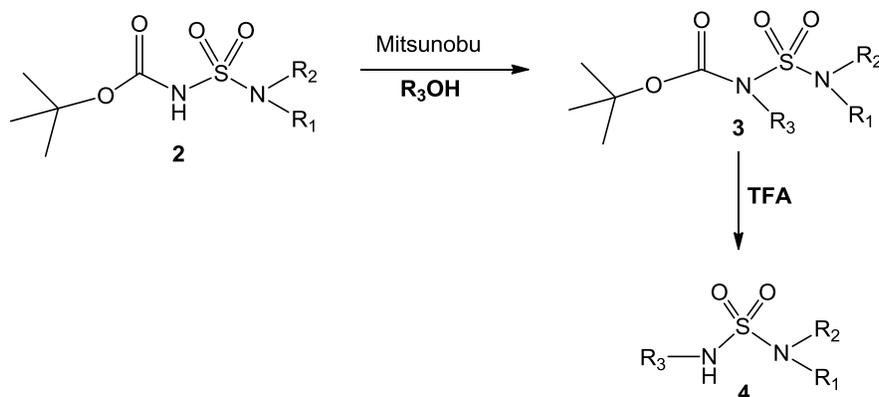
Similarmente, Berredjem y colaboradores utilizaron CSI como reactivo de partida para obtener N-acilsulfamidas (compuesto 3, esquema 4), las cuales presentan propiedades antibacterianas. [32] La reacción se lleva a cabo en 3 etapas (compuestos 1-3, esquema 5) y la amina utilizada puede ser primaria o secundaria.



Esquema 5- Obtención de acilsulfamidas, en 3 etapas: carbamoilación/sulfamoilación, desprotección y acilación. [32]

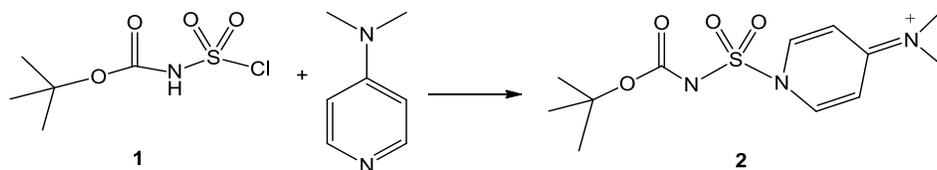
Un método alternativo en la obtención de sulfamidas asimétricas es mediante la N-alkilación del sulfonil carbamato (compuesto 2, esquema 6) por reacción de Mitsunobu y la posterior

hidrólisis de grupo N-terbutilcarbamato (N-Boc) (compuesto 3, esquema 6) en condiciones ácidas. [26]



Esquema 6- Reacción general para la obtención de sulfamidas N, N'disustituidas vía alquilación de sulfonilcarbamato. [26] R₂ puede ser alquilo, arilo o H.

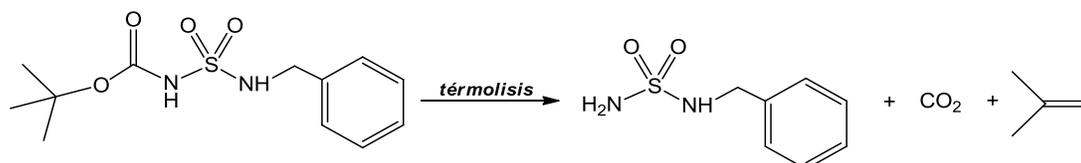
La reacción de Mitsunobu ha sido utilizada ampliamente en síntesis orgánica, debido a su estereoselectividad, a su compatibilidad con un amplio rango de grupos funcionales y por su posibilidad de fácil control de reacción. La reacción transcurre entre un alcohol (R-OH) y un sustrato ácido (Z-H) en presencia de cuplas redóx tales como azodicarboxilato de dietilo (DEAD) y trifenilfosfina para dar el derivado alquilado (R-Z). Desde su descubrimiento en 1967, [33] ha sido empleada debido a la utilización de alcoholes como fuente de grupos alquilo, sin necesidad de su transformación en otros grupos funcionales más reactivos. En el caso de la síntesis de sulfamidas, el sustrato ácido es la sulfamida protegida (compuesto 2, esquemas 4 y 6) que presenta en principio dos grupos NH susceptibles a alquilarse. Sin embargo, sólo se genera la alquilación de uno de los NH, el correspondiente al grupo N-acilo, dado que el otro grupo no es lo suficientemente ácido. Esta selectividad representa una ventaja en la reacción, dado que se evita la producción de otros subproductos. [33,34-37] Debe mencionarse que el intermediario de la reacción clorosulfonilcarbamato (compuesto 1, esquema 7) es altamente reactivo, lo cual acota su aplicación. Para minimizar este efecto se ha buscado estabilizarlo con 4-N, N-dimetil aminopiridina (4-DMAP)[26] generando un producto más estable, y que se usa para transferir el grupo sulfurilo (compuesto 2, esquema 6).



Esquema 7- Reacción de estabilización del sulfonilcarbamato propuesta por Winun y colaboradores. [26]

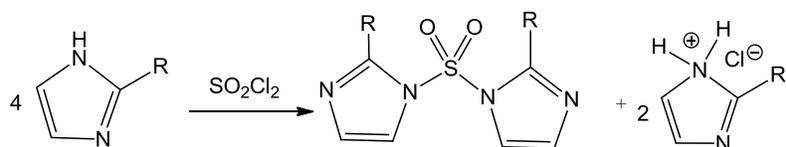
Finalmente, las sulfamidas protegidas (acilsulfamidas) se obtienen en condiciones similares a las mencionadas anteriormente, por reacción con aminas alifáticas, primarias o secundarias. [26]

La desprotección de acilsulfamidas tradicionalmente se realiza mediante hidrólisis con ácido trifluoroacético (TFA). [25-26,38] Esta última estrategia fue realizada por Aksu y colaboradores para obtener sulfamidas derivadas estructuralmente de la dopamina, que presentan actividad inhibitoria frente a la anhidrasa carbónica. [39] También fue aplicada previamente en nuestro grupo de trabajo para la obtención de sulfamidas anticonvulsivas. [40] Existen actualmente varias metodologías que reemplazan a este ácido, como por ejemplo silica funcionalizada con ácido fenilsulfónico, [41] o la termólisis, que evita el uso de solventes y la generación de subproductos tóxicos (esquema 8). [12]



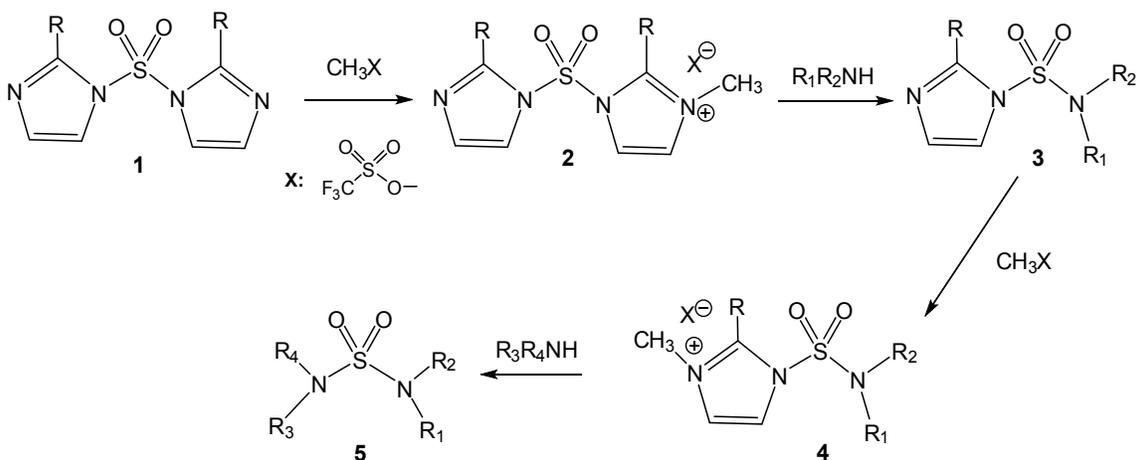
Esquema 8- Reacción de termólisis aplicada a la desprotección del *N*-(bencil)-*N'*-(*tert*-butoxicarbonil) sulfamida. [12]

Las metodologías de síntesis planteadas hasta aquí proponen al cloruro de sulfurilo y al CSI como reactivos capaces de transferir el grupo sulfurilo. Debe mencionarse que existen otros ejemplos de transportadores como el *N*, *N'*-sulfurildiimidazol, [42] y su análogo *N*, *N'*-sulfurilbis-2-metilimidazol. [42-44] Estos reactivos se obtienen como resultado de la reacción entre el cloruro de sulfurilo y el correspondiente imidazol (esquema 9) y presentan la ventaja de estabilizar el grupo sulfurilo, lo que permite trabajar con reacciones en condiciones más controladas.



Esquema 9- Reacción de obtención del *N, N'*-sulfurildiimidazol, donde *R* puede ser *H* ó *CH₃*. [42]

Una vez obtenido el reactivo, la síntesis de las sulfamidas *N, N'* sustituidas puede ser llevada cabo según la siguiente secuencia de pasos:

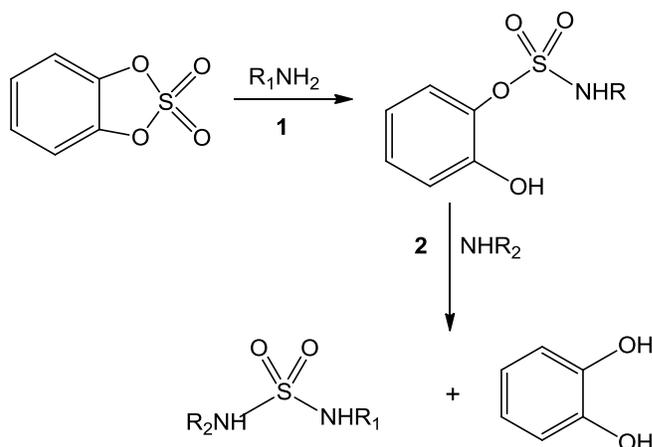


Esquema 10- Reacción general en la síntesis de sulfamidas asimétricas, utilizando un reactivo transportador del grupo sulfurilo. *R* puede ser *H* ó *CH₃*. [42]

El primer paso de alquilación se hace en presencia de triflato de metilo ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$). Luego, la sal de imidazolio (compuesto 2, esquema 10) es desplazada por una amina primaria o secundaria. Estas sales son buenos grupos salientes, ya probados en la preparación de amidas, ésteres [26] y sulfonamidas. [45] Posteriormente se repite la secuencia para la preparación de sulfamidas *N, N'*-sustituidas (compuesto 5, esquema 10).

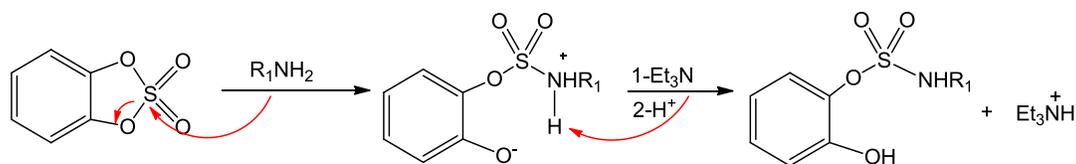
Otra ruta interesante de síntesis es la que plantea el uso de benzo[d][1,3,2]dioxatiol-2,2-dióxido (catecol sulfato) como reactivo transportador del grupo sulfurilo (esquema 11). Esta reacción fue realizada por Kaiser y colaboradores, [46] a partir del conocimiento de que los fosfatos y sulfatos cíclicos de cinco miembros muestran una extraordinaria velocidad de hidrólisis alcalina frente a sus análogos acíclicos y anillos de seis miembros. [46-48] Los investigadores estudiaron la cinética de la hidrólisis alcalina de este sulfato cíclico, el catecol sulfato, y del difenilsulfato, su análogo de cadena abierta. Observaron que la velocidad de hidrólisis del sulfato cíclico era 2×10^7 veces mayor que su análogo difenil sulfato, así como de

esteres cíclicos de anillos de seis miembros. [46] Este trabajo resulto de interés a Dubois y Stephenson, quienes investigaron el comportamiento del catecol sulfato frente aminas. [49-50] Ellos plantearon la síntesis de sulfamidas simétricas y asimétricas en 2 etapas de reacción. En una primera etapa las aminas alifáticas reaccionan con el catecol sulfato para generar 2-hidroxifenil-N-alquilsulfamatos en condiciones suaves de reacción (etapa 1, esquema 11). [47-48] Luego, en condiciones más enérgicas, se puede producir la aminación del sulfamato para dar lugar a una sulfamida (etapa 2, esquema 11).



Esquema 11- Reacción de obtención de sulfamidas a partir de catecol sulfato. [49]

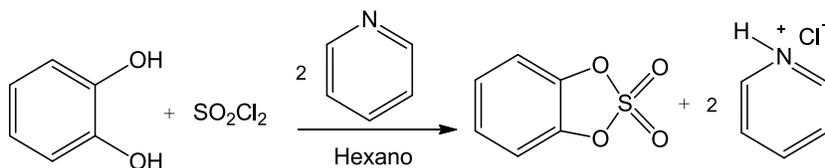
La relación entre la amina y el catecol sulfato, en la primera etapa de síntesis, es de 2:1, de manera que se produzca el ataque nucleofílico con la apertura del anillo del catecol sulfato, esquema 12. [49-51] Dubois y colaboradores también plantearon utilizar una relación de 1 mol de amina por cada mol de catecol sulfato en presencia de 1 mol de trietilamina (Et_3N), que actúa como base, para obtener el 2-hidroxifenil-N-sulfamato (esquema 12).



Esquema 12- Mecanismo de reacción en la obtención de sulfamato, entre el catecol sulfato y la amina. En la segunda etapa de síntesis se utiliza trietilamina como base.

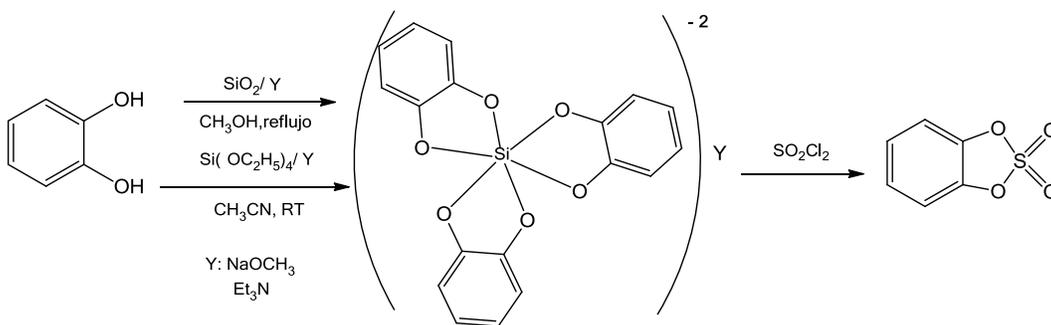
En relación a la síntesis de catecol sulfato, este fue sintetizado originalmente por Denivelle en 1936, [52] y luego su obtención fue optimizada por Kaiser. [53] La síntesis se lleva a cabo por

reacción entre el pirocatecol y cloruro de sulfurilo en presencia de piridina como muestra el siguiente esquema:



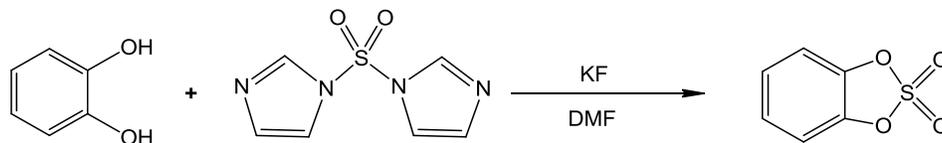
Esquema 13- Reacción de obtención de catecol sulfato. [53]

Un método alternativo para la preparación de catecol sulfato, planteado por Kingston y Sudheendra, [54] implica una síntesis en 2 pasos. En la primera etapa se obtiene el silicato de tris-catecolato, a través de dos vías posibles de preparación. La primera, como lo indica el esquema 14, implica el uso de silica gel ó el etóxido derivado, en presencia de metóxido de sodio o trietilamina, utilizando metanol/acetonitrilo, como solvente según el reactivo. En una segunda etapa este compuesto reacciona con cloruro de sulfurilo para obtenerse el catecol sulfato. Esta vía de síntesis no resulta eficiente, debido a presenta mayor cantidad de etapas en su obtención. [55]



Esquema 14- Síntesis del silicato de tris-catecolato por diferentes vías y posterior reacción con cloruro de sulfurilo.

Tickner y colaboradores, [56] llevaron a cabo la preparación de catecol sulfato, utilizando N, N'-sulfurildiimidazol como reactivo alternativo al cloruro de sulfurilo (Esquema 15). Emplearon fluoruro de potasio (KF) como base no nucleofílica, sustituyendo a otras más comúnmente utilizadas (como piridina y trietilamina).

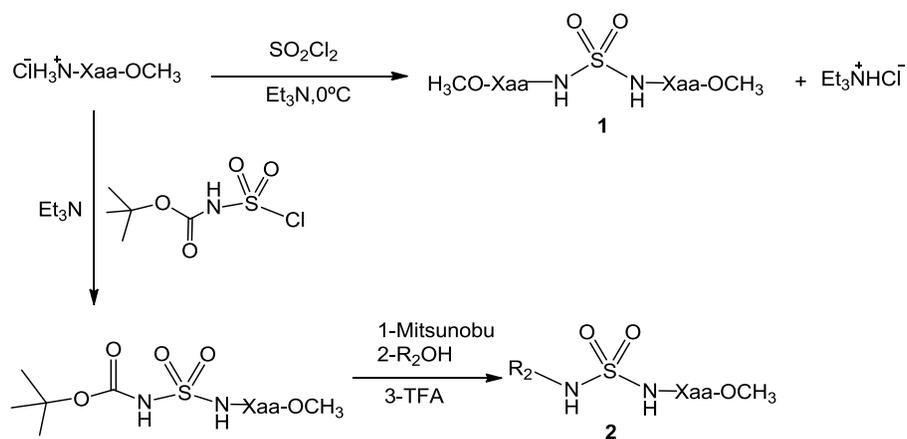


Esquema 15-Ruta de síntesis utilizada por Tickner y colaboradores para obtener catecol sulfato.

Síntesis de sulfamidas derivadas de aminoesteres

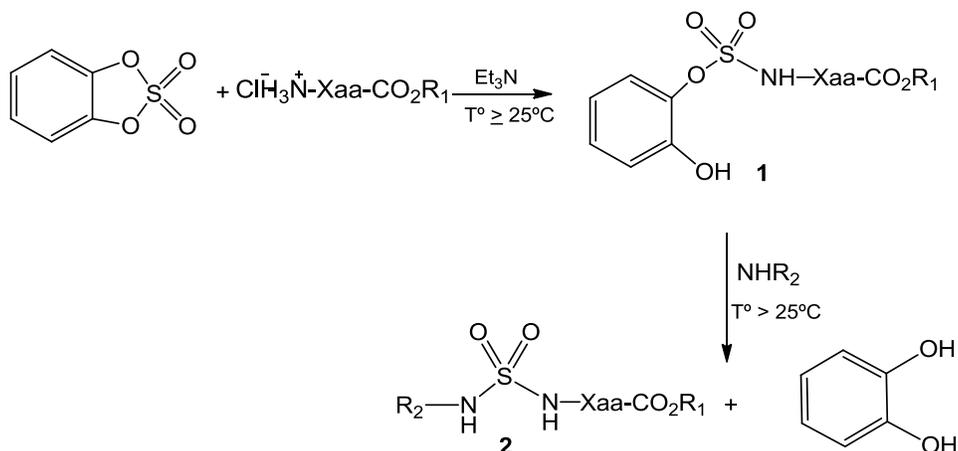
La preparación de sulfamidas de aminoesteres implica otra propuesta de síntesis, dado que plantea la obtención de sulfamidas asimétricas, donde uno de los sustituyentes es una amina alifática/aromática pero el otro es un aminoéster (como se explica en el capítulo II). Investigaciones previas muestran que, en algunos casos, la obtención de este tipo de compuestos puede realizarse con reacciones químicas similares a las descriptas para aminas. Por ejemplo, la condensación de aminoácidos esterificados con cloruro de sulfurilo permitió obtener la sulfamida simétrica (compuesto 1, esquema 16).^[40,57] Por otra parte, las N-sulfamidas monosustituidas derivadas de aminoácidos fueron sintetizadas con cloruro de sulfurilo y pentacloruro de antimonio. Esta reacción presenta muchas muchas desventajas, no sólo por la toxicidad del pentacloruro de antimonio, sino también por la generación como producto secundario de la sulfamida simétrica N,N'-disustituida, que disminuye notablemente el rendimiento de la reacción.^[58]

En la preparación de sulfamidas asimétricas N,N'-disustituidas que contienen un grupo aminoéster (compuesto 2, esquema 16) se ha utilizado CSI y terbutanol en la etapa inicial, para luego llevar a cabo la N-alkilación del sulfonil carbamato y posterior hidrólisis del grupo N-boc en condiciones ácidas (Esquema 16).^[40] Otra alternativa atractiva para la preparación de este tipo de compuestos es el empleo de catecol sulfato, de manera similar a la explicada anteriormente para el caso de aminas (Esquema 11).



Esquema 16- Vías de síntesis para la obtención de sulfamidas simétricas y asimétricas derivadas de aminoésteres, donde R₂: 2-propilpentil, bencil, y Xaa aminoácido^[40]

Inicialmente se genera como producto un sulfamato (etapa 1, esquema 17) mediante la reacción de catecol sulfato con un aminoéster. Este intermediario reacciona con otras aminas o aminoésteres para obtener sulfamidas N, N'-disustituidas. De acuerdo a literatura, mediante esta técnica ya se ha obtenido varias sulfamidas de este tipo. ^[41] Comparada con la reacción vía CSI anteriormente mencionada, esta ruta sintética permite la obtención de sulfamidas asimétricas con menor cantidad de pasos de reacción, y puede trabajarse con intermediarios más estables. En este trabajo de tesis se decidió hacer uso de esta ruta sintética, dada las características expuestas, y en este caso se ha reemplazado el calentamiento térmico por el calentamiento asistido por microondas. Debe aclararse que comercialmente los aminoésteres se disponen como sales por lo que requieren el agregado de una base en las primeras etapas de reacción (Esquemas 16 y 17) se utiliza para liberar el grupo amino y convertirlo en un mejor nucleófilo.



Esquema 17- Ruta de síntesis de sulfamidas derivadas de *N*-alquil aminoesteres vía catecol sulfato, donde *N*-Xaa-CO₂R₁: β-alaninametiléster y R₂: ciclohexil, butil y bencil. [59]

Síntesis asistida por microondas: una alternativa novedosa en la síntesis orgánica

El calentamiento por microondas es una poderosa herramienta benigna con el medio ambiente que, aplicada a un amplio rango de reacciones químicas, ha permitido llevar a cabo importantes contribuciones en el campo de la síntesis orgánica. Mediante su uso, como alternativa al calentamiento térmico, se ha logrado disminuir tiempos de reacción, aumentar el rendimiento, evitar la obtención de productos secundarios y reducir procesos de purificación. [67] Así mismo, esta técnica permite trabajar tanto con disolvente como en ausencia del mismo. En este último caso la radiación se absorbe directamente por los reactivos, aumentando de esta manera su eficacia y evitando el proceso posterior de eliminación del disolvente. [60] Por lo tanto, la síntesis asistida por microondas constituye una interesante oportunidad para desarrollar nuevas transformaciones químicas no asequibles mediante la síntesis convencional y, al mismo tiempo, optimizar reacciones que tienen lugar bajo calentamiento térmico. [60]

Breve reseña del descubrimiento

La utilización de la irradiación de microondas comenzó en el año 1946, cuando el ingeniero e inventor estadounidense Percy Spencer (1894-1970) realizaba las últimas pruebas con un dispositivo para radar llamado Magnetron, cuya función era localizar aeronaves y baterías antiaéreas.^[61] En ese momento realizó observaciones relacionadas con el calentamiento de los alimentos sometidos a microondas que posteriormente le permitieron la fabricación, bajo la patente de la marca Raytheon Company, ^[61] del primer horno de microondas (bautizado como 1161Radarange). Las ventas de este dispositivo, costoso y de gran tamaño, se limitaron a instalaciones militares y restaurantes, hasta que en 1967 se hicieron los primeros modelos para uso doméstico.

El primer trabajo de aplicación de microondas en síntesis fue realizado por Vanderhoff en 1969 para la polimerización de monómeros vinílicos solubles en agua. ^[62] Sin embargo, recién en 1986 aparecen las primeras publicaciones en revistas de síntesis orgánica, realizada por R. Gedye ^[63] y R. J. Giguere. ^[64] Estos autores describen varias reacciones llevadas a cabo en pocos minutos en cavidades selladas (de vidrio o teflón) en hornos domésticos. La gran dificultad de esta técnica radicaba en las explosiones que tenían lugar debido al rápido desarrollo de altas presiones en sistemas cerrados, ^[65] generadas por la presencia de disolventes orgánicos. Para prevenir estos inconvenientes se desarrollaron nuevos procedimientos y equipos más seguros. Entre las nuevas alternativas aparecieron las reacciones en recipientes abiertos y/o sin disolventes, que se comenzaron a emplear a partir de 1990. ^[66]

Fundamento

Los equipos de microondas industriales y de laboratorio utilizan una frecuencia de 2,45 GHz, la cual está regulada a nivel nacional e internacional para evitar la interferencia con las telecomunicaciones. A esta frecuencia, la radiación por microondas posee un bajo contenido energético en sus fotones (0,0016 eV), si se la compara con la energía de los enlaces químicos (que van de un intervalo de 7 a 0.44 eV, tabla 3.1). ^[67] Por lo tanto, la excitación de las moléculas por las microondas genera un incremento de su energía cinética, pero no contiene suficiente energía como para provocar cambios químicos en los compuestos por ionización.

Tipo de Enlace	Cantidad de Energía (eV)
C-C	3,83
C=C	6,35
CO	3,74
C=O	7,71
CH	4,51
OH	4,80
Puente de hidrógeno	0,04-0,44

Tabla 3.1- *Energía necesaria para la escisión de enlaces.* [68]

El potencial que tiene la radiación por microondas en la síntesis química se basa principalmente en la eficiencia del calentamiento de los materiales por efecto del calentamiento dieléctrico. [69,70] La interacción del componente eléctrico del campo electromagnético con la materia genera este tipo de calentamiento por dos mecanismos principales: la polarización dipolar y la conducción iónica. [71] Ambos mecanismos requieren que el acoplamiento entre el material irradiado y el campo eléctrico de las microondas sea efectivo. Por lo tanto, la polarización dipolar y la conducción iónica están influenciadas por varios factores como la longitud de onda de la radiación, las propiedades físicas de la sustancia (constante dieléctrica, polaridad, temperatura, viscosidad, capacidad térmica) y sus características (tamaño, concentración, carga y movilidad). En otras palabras, el calentamiento dieléctrico es dependiente de la habilidad específica del material (por ejemplo solvente o reactivo) para transformar la energía de microondas en calor.

Calentamiento por Microondas versus calentamiento convencional

Existen diferencias apreciables entre el calentamiento dieléctrico con microondas y el calentamiento clásico. Tradicionalmente la síntesis orgánica se ha llevado a cabo mediante el calentamiento generado por conducción y convección térmica de una fuente externa de calor. Una de las grandes ventajas de la irradiación con microondas es que la distribución de la temperatura con el volumen de la muestra es más homogénea que en el calentamiento clásico, ya que las microondas se acoplan directamente con las moléculas que están presentes en la mezcla de reacción. Esto permite una rápida elevación de la temperatura. Además, como el mecanismo no depende de la conductividad térmica de los materiales de los recipientes, el

resultado es un calentamiento selectivo, instantáneo y localizado de cualquier sustancia que reaccione ante la polarización dipolar y/o la conducción iónica. Este efecto difiere de la calefacción clásica, donde se calienta en primer lugar la superficie del recipiente que contiene la mezcla de reacción, transmitiéndose el calor por conducción y convección. En la Figura 3.2 se observa la diferencia en el perfil térmico de las reacciones activadas mediante calentamiento clásico (2) y las reacciones activadas por microondas (1) tras un minuto de calentamiento.^[72]

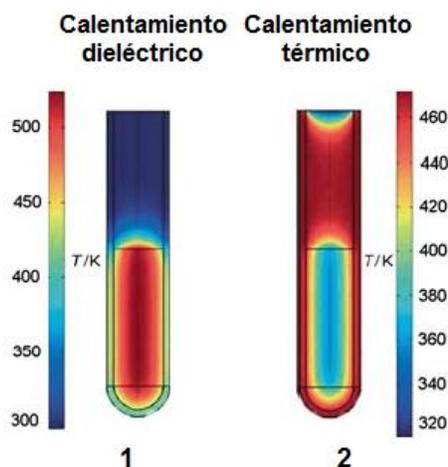


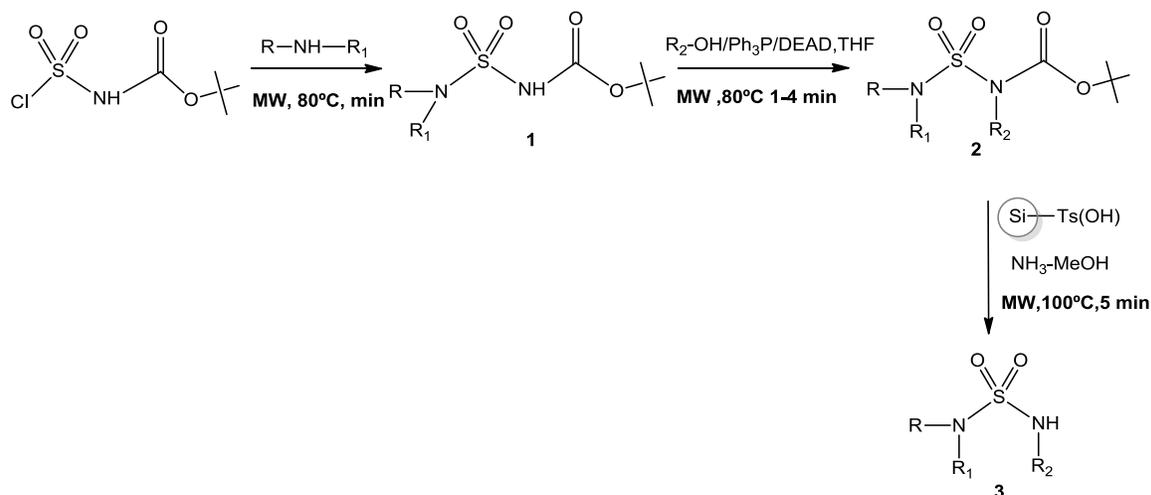
Figura 3.2- Perfiles de temperatura tras un minuto de reacción en microondas y en un baño de aceite.

Figura tomada con permiso de John Wiley and Sons. ^[72]

Las velocidades de calentamiento que proporciona la irradiación mediante microondas pueden ser mucho mayores que las obtenidas mediante calentamiento clásico y a menudo no pueden ser reproducibles con este tipo de fuente energética. Este hecho permite una notable reducción de los tiempos de reacción, lo que evita la descomposición térmica de los productos o reactivos sensibles y la generación de subproductos.

Antecedentes del uso de radiación microondas en la síntesis de sulfamidas

Inicialmente se utilizó la radiación por microondas como método de calentamiento alternativo en la reacción de Mitsunobu tanto para la alquilación de Boc-sulfamidas con diferentes alcoholes (compuesto 2, esquema 18) como en su posterior desprotección (compuesto 3, esquema 18). En esta última etapa se utilizó además silica funcionalizada con ácido fenilsulfónico. [37] Este método de síntesis por microondas permitió a los autores no sólo desproteger a las sulfamidas, sino que facilitó la preparación y purificación de los distintos derivados.



Esquema 18-Reacción de Mitsunobu y de desprotección utilizando radiación microondas. La amina de partida puede ser aromática, primaria o secundaria mientras que el alcohol es bencílico. [41]

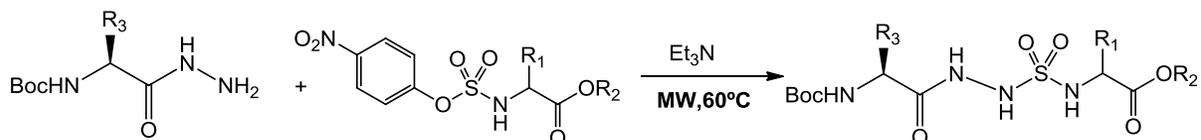
Posteriormente, Roberts y colaboradores plantearon la síntesis de acilsulfamidas utilizando también este tipo de calentamiento como lo indica el esquema 19. Esta vía de síntesis permitió no sólo reducir la temperatura sino también el tiempo de reacción. [74,75]



R_2, R_3 : H, alquil, aril, bencil
 R_1 : H, alquil
 X : halógeno, Ar : aril, heteroaril

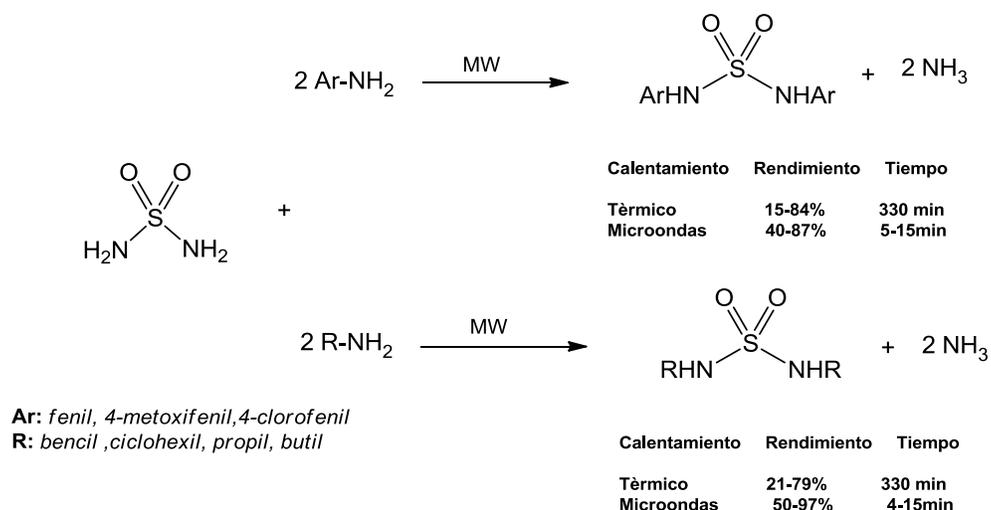
Esquema19- Síntesis de acilsulfamidas utilizando radiación microondas como fuente de calentamiento.^[74,75]

También fueron utilizadas microondas en la síntesis de N-aminosulfamidas derivadas de péptidos (esquema 20).^[76] En este caso, la síntesis tradicional transcurre en un tiempo aproximado de 18-24 h, mientras que utilizando microondas la reacción se completa en sólo 2,5 h.



Esquema20- Síntesis general de N-aminosulfamidas derivadas de péptidos.^[76] Donde R_1, R_3 : metil, bencil, *terbutil* y R_2 : metil, bencil

Por otra parte, Erturk y colaboradores sintetizaron varias N,N'-difenilsulfamidas y N,N'-dialquilsulfamidas sustituidas mediante la reacción de transamidación utilizando microondas. Estos autores lograron obtener una serie compuestos reportados previamente y comparar los resultados con el método clásico de calentamiento, consiguiendo un aumento en el rendimiento (esquema 20).^[77] Además, como en los ejemplos anteriores, se redujo drásticamente el tiempo de reacción y se eliminó la formación de subproductos(esquema 21).^[77]



Esquema 21- *Tiempos de reacción y rendimientos obtenidos en los procedimientos clásicos y por microondas en la preparación de N, N'-difenilsulfamidas y N, N'-dialquilsulfamidas.* [77]

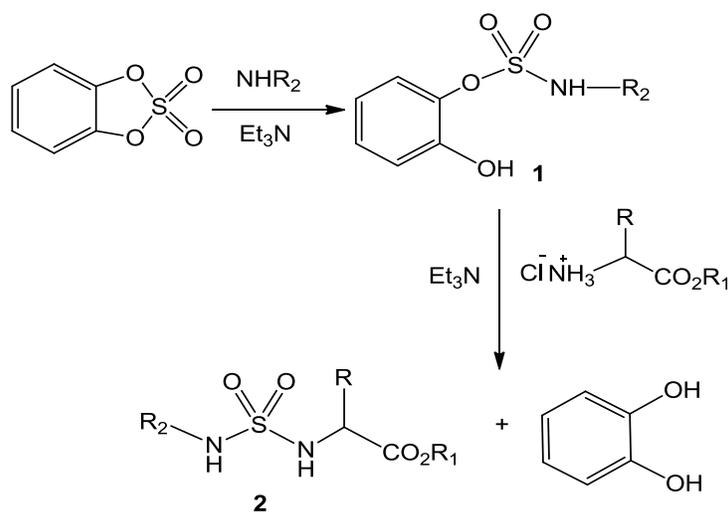
Síntesis de sulfamidas derivadas de aminoesteres por microondas

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo de tesis se sintetizaron nuevas sulfamidas asimétricas donde uno de los sustituyentes es una amina alifática (o aromática) y el otro un aminoéster. En particular se utilizó la ruta sintética del catecol sulfato como reactivo de partida para la preparación de las sulfamidas, ya detallada en este capítulo (esquema 17) pero sometida a ciertas modificaciones. En primer lugar se mejoró el proceso de obtención del catecol sulfato planteado por Kaiser y colaboradores (esquema 12). En la técnica original el aislamiento se realiza mediante lavados con solución de acetato de cobre al 5% para eliminar el pirocatecol en exceso del medio de reacción, mediante la formación de un complejo.^[53] Este proceso resulta engorroso ya que el complejo formado hace difícil la separación de fases, por lo que hay que realizar varias extracciones del medio acuoso con solvente, generando pérdida de producto. Se propuso entonces una vía alternativa de aislamiento de catecol sulfato, que implica el uso de cromatografía en columna y permite aumentar el rendimiento de reacción.

El sulfamato (compuesto 1, esquema 17), intermediario de reacción, formado por reacción de catecol sulfato y clorhidrato de β-alanina metilester fue obtenido, utilizando radiación

microondas como medio de calentamiento alternativo, y en ausencia de solvente. Los detalles se explicaran en el capítulo V.

Por otra parte, los sulfamatos derivados de L-valina y L-fenilalanina no pudieron obtenerse por esta vía en cantidades significativas, debido a la formación de varios subproductos, entre el que pudo identificarse la sulfamida simétrica derivada del correspondiente aminoácido, que posee similar relación de frente (RF) que el sulfamato. Se plantearon distintas condiciones de reacción, utilizando distintas proporciones de catecol/aminoéster, por calentamiento tradicional y/o microondas y diferentes técnicas de aislamiento. En todos los casos el rendimiento fue muy bajo o directamente no se logró obtener el producto buscado, que debe conseguirse en cantidades suficientes para ser utilizado como reactivo de partida en la siguiente etapa de síntesis de sulfamidas. Por lo tanto se decidió invertir la ruta de síntesis para el caso de derivados de L-valina y L-fenilalanina, partiendo de la formación del sulfamato de la amina (compuesto 1, esquema 22) y adicionando en una etapa posterior el aminoéster correspondiente. Este método alternativo resultó exitoso para la obtención de este tipo de sulfamidas.



Esquema 22-Síntesis de sulfamidas derivadas de L-valina y L-fenilalanina metil ester. R1:CH₃, R y R₂: alquilo o arilo. [40]

En todos los casos, una vez obtenido el intermediario sulfamato se hizo reaccionar el mismo con diferentes aminas (etapa final del esquema 16) o aminoésteres (etapa final del esquema 22) para dar lugar a las sulfamidas asimétricas N, N'-disustituidas. Esta segunda reacción se llevó a cabo con radiación de microondas durante 10 a 35 minutos, según cada caso y en

presencia de solvente (acetonitrilo) y base (triethylamina). Los detalles se presentarán en el capítulo V de la presente tesis.

Finalmente se propuso y realizó una modificación en la etapa de aislamiento del producto final, en la búsqueda de un incremento del mismo, y que además se protegiera el medio ambiente. Por tales motivos se desarrolló un método basado en la adsorción de catecol por sólidos adsorbentes, para retener selectivamente a este producto de la reacción, logrando mejorar notablemente el proceso de purificación de las nuevas sulfamidas.

En el capítulo siguiente se describirá brevemente el proceso de adsorción, las características de los adsorbentes utilizados en esta tesis (óxido de zirconio, quitosano y alúminas) así como la metodología empleada, y los resultados obtenidos en lo que se refiere al estudio de la capacidad de los distintos sólidos de retener selectivamente catecol. Este análisis permitió elegir el mejor sistema para la eliminación de catecol en la síntesis de sulfamidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DEL CAPÍTULO III

- [1] Audrieth, L. F.; Sveda, M.; Sisler, H. H.; Butler, M. J. *Chemical Reviews* 26, 49-94. (1940)
- [2] Reitz, A. B.; Smith, G. R.; Parker, M. H. *Expert Opinion. Ther Patents* 19(10), 1449-1453. (2009)
- [3] Nishino, Y.; Kobayashi, M.; Shinno, T.; Izumi, K.; Yonezawa, H.; Masui, Y.; Takahira, M. *Organic Process Research & Development* 7(6), 846-850. (2003)
- [4] Krueger, A. C.; Madigan, D. L.; Jiang, W. W.; Kati, W. M.; Liu, D.; Liu, Y.; Maring, C. J.; Masse, S.; Mc Daniel, K. F.; Middleton, T.; Mo, H.; Molla, A.; Montgomery, D.; Pratt, J. K.; Rockway, T. W.; Zhang, R.; Kempf, J. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 16, 3367-3370. (2006)
- [5] Gavernet, L.; Gonzalez Funes, J. L.; Palestro, P. H.; Bruno Blanch, L.; Estiu, G.; Maresca, A.; Barrios, I.; Supuran, C. T. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 21 :1410-1418. (2013)
- [6] McKenna, R.; Supuran, C. T. *Carbonic Anhydrase Inhibitors Drug Design. En: S. C. Frost, R. McKenna (Eds) Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. Springer, p p 291-323. (2014)
- [7] Villalba, M. L.; Enrique, A. V.; Higgs, J.; Castaño, R. A.; Goicoechea, S.; Taborda, F. D.; Gavernet, L.; Lick, I. D.; Marder, M.; Bruno Blanch, L. E. *European Journal of Pharmacology* 774, 55-63. (2016)
- [8] Cano, C.; Goya, P.; Paez, J. A.; Girón, R.; Sánchez, E.; Martín, M. I. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15, 7480-7893. (2007)
- [9] Dow, R. L.; Paight, E. S.; Schneider, S. R.; Hadcock, J. R.; Hargrove, D. M.; Martin, K. A.; Maurer, T. S.; Nardone, N. A.; Tess, D. A.; Da Silva-Jardine, P. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 14, 3235-3240. (2004)
- [10] Gavernet, L.; Domínguez Cabrera, M. J.; Bruno-Blanch. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15, 1556-1567. (2007)
- [11] Gavernet, L.; Barrios, I. A.; Sella Cravero, M.; Bruno-Blanch, L. E.; Estiú, G. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15, 5604-5614. (2007)
- [12] Gavernet, L.; Villalba, M. L.; Bruno Blanch, L. E.; Lick, D. *European Journal of Chemistry* 4(1), 44-48. (2013)
- [13] Sowada, R. *Journal für Praktische Chemie* 20, 310-319. (1963)
- [14] Vandi, A.; Moeller, T.; Audrieth, L. F. *Journal Organic of Chemistry* 26, 1136-1138. (1961)
- [15] Binkley, W. W.; Degering, E. F. *American Chemical Society* 61, 3250-3251. (1939).
- [16] Audrieth, L. F.; Brauchitsch, M. V. *Organic Chemistry*, 21, 426-428. (1956).

- [17] Berredjem, M.; Jean-Yves Winum, J.Y.; Toupet, L.; Masmoudi, O.; Aouf, N.E.; Montero, J.L. *Synthetic Communications* 9 (34), 1653–1662. (2004)
- [18] Rodriguez De Fonseca, F.A.; Macias Gonzalez, M.; Pavón Morón, J.; Goya Laza, M.P.; Paez Prosper, J.A.; Cano Ramos, C. US Patent US 8,188, 312 B2. (2012)
- [19] Guo, CH.; Dong, L.; Kephart, S.; Hou, X. *Tetrahedron Letters* 51, 2909–2913. (2010)
- [20] Tortoioli, S.; Bacchi, S.; Tortoreto, C.; Strachan, J. B.; Perboni, A. *Tetrahedron Letters* 53, 1878–1881. (2012)
- [21] Spillane, W. J. *International Journal of Sulfur Chemistry* 8, 469-475. (1973)
- [22] Spillane, W. J.; Hannigan, T. J. *Journal Chemical Research (S)* 851-855. (1982)
- [23] McDermott, S. D.; Spillane, W. J. *Synthesis* 192-198. (1983)
- [24] Borghese, A.; Antoine, L.; Van Hoeck, J. P.; Mockel, A.; Merschaert, A. *Organic Process Research & Development* 10, 770–775. (2006)
- [25] Dewynter, G.; Montero, J.-L. *C. R. Académie d. Sci., Paris, Ser. II* 315, 1675. (1992)
- [26] Winum, J.; Toupet, L.; Barragan, V.; Dewynter, G.; Montero, J.L. *Organic Letters* 14 (3), 2241-2243. (2001).
- [27] Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Aouf, N.; Favre, G.; Morere, A.; Montero, J. L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4, 1227-1235. (1996)
- [28] Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Montero, J. L. *Tetrahedron Letters* 37, 5695-5698. (1996)
- [29] Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Aouf, N.; Montero, J. L. *Phosphorus, Sulfur Silicon* 118, 39-47. (1996)
- [30] Dewynter, G.; Abdaoui, M.; Regainia Z.; Montero, J. L. *Tetrahedron* 52, 14217-14224. (1996)
- [31] Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Toupet, L.; Montero, J. L. *Tetrahedron* 56, 2427-2435. (2000)
- [32] Berredjem, M.; Bouchareb, F.; Ait Kaki, S.; Dekhil, M.; Aouf, N.E. *Arabian Journal of Chemistry*. (2013)
- [33] Mitsunobu, O.; Yamada, Y. *The Bulletin of the Chemical Society of Japan* 40, 2380-2382. (1967)
- [34] Dewynter, G.; Aouf, N.; Criton M.; Montero, J.L. *Tetrahedron*, 49, 65-76. (1993)
- [35] Abdaoui, M.; Dewynter, G.; Aouf, N.; Favre, G.; Morere, A.; Montero, J.L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4, 1227-1235. (1996)
- [36] Regainia, Z.; Abdaoui, M.; Aouf, N.; Dewynter, G.; Montero, J. L. *Tetrahedron* 56, 381-387. (2000)

- [37] Park, J. D.; Kim, D. H.; Kim, S.J.; Woo, R.; Ryu, S. E. *Journal Medicinal Chemistry* 45, 5295-5302. (2002)
- [38] Daly, N.J.; Ziolkowski, F.; *Journal of Chemical*. 24, 2451-2544. (1971)
- [39] Aksu, K. ; Nar, M.; Tanc, M.; Vullo, D.; Gulcin, İ.; Goksu, S.; Tumer, F.; Supuran, C.T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21(11), 2925-2931 . (2013)
- [40] Gavernet, L.; Elvira, J.; Samaja, G.; Pastore, V.; Sella Cravero, M.; Enrique, A.; Estiu, G.; Bruno-Blanch, L. *Journal of Medicinal Chemistry* 52, 1592-1601. (2009)
- [41] Ghassemi, S.; Fuchs, K. *Molecular Diversity* 9, 295-299. (2005)
- [42] O'Connell, J. F.; Rapaport, H. *Journal Organic of Chemistry* 57, 4775-4777 . (1992)
- [43] Beaudoin, S.; Kinsey, K. E.; Burns, J. F. *Journal Organic of Chemistry* 68, 115-119. (2003)
- [44] Lee, H. K.; Bang, M.; Pak, Ch. S. *Tetrahedron Letters* 46, 7139-7142. (2005)
- [45] Monjoint, P.; Ruasse, M. *Tetrahedron Letters* 25, 3183-3186. (1984)
- [46] Kaiser, E. T.; Katz, I. R.; Wulfers, T. F. *Journal of the American Chemical Society* 87, 3781-3782. (1965)
- [47] Kaiser, E. T.; Kudo, K.; Zaborsky, O.R. *Ibid* 89, 1393. (1967)
- [48] Davis, R. E. *Journal of the American Chemical Society* 84, 599-604. (1962)
- [49] DuBois, G. E.; Stephenson, R. A. *Journal Organic of Chemistry* 45, 5371-5373. (1980)
- [50] DuBois, G. E. *Journal Organic of Chemistry* 45, 5373-5375. (1980)
- [51] DuBois, G. E. US Patent .4,290,975. (1981)
- [52] Denivelle, L. C. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l' Academie des Sciences* 203, 194. (1936)
- [53] Zaborsky, O. R.; Kaiser, E. T. *Ibid* 88, 3084. (1966)
- [54] Kingston, J.V.; Sudheendra, R. *Tetrahedron Letters* 38(27), 4841-4844. (1997)
- [55] a) Furniss, B.W.; Hannaford, A.J.; Smith, P.W.G.; Tatchell, A.R. *Voguel's textbook of practical organic chemistry*. ELBS with Longman, England (1991), 5th edn, 569-70 b) Sulkowski, W; Wygleda, R. *Przemysl Chemiczny* ,53, 14-18. (1974)
- [56] Tickner, A.M.; Liu, C.; Hild, E.; Mendelson, W. *Synthetic Communications* 24(11), 1631-1637. (1994)
- [57] Dougherty, J. M.; Probst, D. A.; Robinson, R. E.; Moore, J. D.; Klein, T. A.; Snelgrove, K. A.; Hanson, P. R. *Tetrahedron* 56, 9780-9790 . (2000)
- [58] Cheeseright, T. J.; Edwards, A. J.; Elmore, D. T.; Jones, J. H.; Raissi, M. ; Lewis, E. C. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1, 1595-1600. (1994)

- [59]Gavernet L.; Barrios IA.; Cravero M.S.; Bruno-Blanch LE. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 ,5604–5614.(2007)
- [60]Rathi,A.K.;Gawande,M.B.;Zboril,R.;Varma,R.S. *Coordination Chemistry Reviews* 291,68-95 (2015)
- [61]Spencer, P. L. *US Patentes* 245429.(1950), 2593067.(1952), 2605383.(1952)
- [62]Vanderhoff, J. W. *US Patente* 3432413.(1969)
- [63]Gedye, R.; Smith, F. ;Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L. ; Rousell, J. *Tetrahedron Letters* 27, 279-282.(1986)
- [64]Giguere, R. J.;Bray,T.L.;Duncan, S.M.;Majetich,G. *Tetrahedron Letters* 27,4945-4948. (1986)
- [65]Kappe, C. O.; Stadler, A. *Microwaves in organic and medicinal chemistry*, Wiley-VCH Volume 25. (2005)
- [66]Dallinger, D.; Kappe, O.C. *Chemical Reviews* 107, 2563-2591.(2007)
- [67]Kappe,C.O.; Stadler, A. *Microwaves in organic and medicinal chemistry*,Wiley-VCH Volume 25.(2005)
- [68]Loupy, A.*In Microwaves in Organic Synthesis*;Wiley-VCH Verlag GmbH & Co:Weinheim 1-73.(2002)
- [69]Kappe,C. O.; Dallinger, D.; Murphree, S. S. *Practical microwave synthesis for Organic Chemists Strategies, instruments,and protocols*.1st Ed. Wiley-VCH,Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.(2009)
- [70]Mingos, M. P.; Baghurst, D. R. *Chemical Society Reviews* 20, 1-47. (1991)
- [71]Kappe, C.O. *Chemical Society Reviews* 37,1127–1139.(2008)
- [72]Kappe O,C.*Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 6250–6284.(2004)
- [74]Roberts, B. ;Liptrot, D.;Alcaraz, L. *Organic Letters* 12 (6), 1264-1267.(2010)
- [75]Liptrot, D.; Alcaraz, L. ;Roberts, B. *Tetrahedron Letters* 51, 5341–5343.(2010)
- [76]Turcotte,S.; Bouayad-Gervais, S. H.; Lubell, W. D. *Organic Letters* 14(5), 1318–1321. (2012)
- [77]Erturk , A.G; Bekdemir, Y. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 189(2), 285-292. (2014)

CAPITULO IV

Adsorbentes

ADSORBENTES

Procesos de Adsorción: Aspectos generales

La adsorción es una operación destinada a la separación de un componente disuelto en una fase fluida, gas o líquida, por retención sobre la superficie de un sólido (adsorbente). Este proceso ha sido de gran utilidad en la química orgánica a gran escala, por ejemplo para la eliminación de agentes químicos tóxicos presentes en el agua como consecuencia del desarrollo acelerado de las actividades industriales; donde las sales metálicas, compuestos fenólicos, colorantes, etc., constituyen varias clases de contaminantes para el medio ambiente. [1,2] Debe mencionarse que existen otras técnicas también utilizadas para separar tóxicos presentes en el agua como ósmosis inversa, intercambio iónico, cromatografía, extracción con disolventes, etc. En particular, los procesos de separación basados en fenómenos de adsorción son de gran importancia para eliminar compuestos a nivel de traza, debido a su alta eficiencia y selectividad. [3,4]

El fenómeno de adsorción se produce por la acción de fuerzas que existen en la superficie del sólido y que provocan la aparición de una fuerza atractiva neta, normal a la superficie del mismo. En función de la naturaleza de estas fuerzas, la adsorción se puede clasificar en dos tipos generales:

- *Adsorción física o fisisorción:* las interacciones que se establecen entre la superficie del sólido y el adsorbato son de naturaleza física, fundamentalmente fuerzas de Van der Waals. Se trata de un proceso reversible, ya que la unión puede romperse por cambios en parámetros como la temperatura, presión o concentración.
- *Adsorción química o quimisorción:* las fuerzas que se establecen son verdaderos enlaces químicos, perdiéndose la individualidad de las moléculas y resultando un fenómeno irreversible. No ocurre sobre toda la superficie del sólido, sino solamente sobre los centros activos. Este tipo de adsorción es de gran interés en catálisis.

En cualquier proceso químico las distintas fases o especies presentes en él pueden presentar estados de equilibrio; de igual modo ocurre en el caso de la adsorción. Es por eso que cualquier proceso de adsorción puede caracterizarse mediante la curva de equilibrio correspondiente, y la eficacia del proceso depende de este equilibrio. Esta

curva quedará definida para condiciones concretas de presión y temperatura, por lo que en ocasiones es denominada “Isoterma de adsorción”.

Adsorbentes

El conocimiento de las propiedades adsorptivas de los sólidos ha sido de gran importancia en muchos campos de la ciencia. Desde hace ya varios años, el uso de materiales inorgánicos empleados para la retención de impurezas presentes en el agua ha adquirido gran relevancia. Esto se refleja en los numerosos trabajos publicados referentes a dichas tecnologías. [5-8] El principal requisito para que un proceso de adsorción sea eficaz y económico, es emplear un material con suficiente selectividad para diferentes especies químicas.

Muchas investigaciones se han llevado a cabo sobre la adsorción de compuestos orgánicos en diferentes adsorbentes, siendo los más empleados el carbón activado, los tamices moleculares, el gel de sílice, los polímeros orgánicos y las alúminas activadas, entre otros. Resulta interesante que, en los diferentes períodos de la historia, el adsorbente utilizado fue variando: antes de la Primera Guerra Mundial el más empleado era el carbón; en el período entre las Guerras Mundiales se trabajó con carbones activos, gel de sílice y óxidos de aluminio; y después de la Segunda Guerra Mundial se produjo un progreso revolucionario con el descubrimiento y aplicación de numerosos tipos de zeolitas. [10]

En este trabajo se han seleccionado una serie de adsorbentes utilizados en la industria para la remoción selectiva de compuestos polifenólicos en aguas residuales, [8] dado que desea utilizar estos sólidos para la eliminación de catecol del medio de reacción. Ellos son: quitosano, alúminas y óxido de zirconio. Los mismos fueron elegidos por su bajo costo, selectividad y/o disponibilidad. Cabe aclarar que si bien estos adsorbentes son usualmente utilizados en agua (el medio principal del cual se desea eliminar contaminantes), en este trabajo se realizaron



El fenómeno de la adsorción se conoce desde 1773, cuando el químico sueco Scheele observó que el carbón era capaz de retener varias veces su volumen de aire. Posteriormente, en el año 1785, Lowitz describió la adsorción en fase líquida, al observar cómo el carbón era capaz de decolorar diversos líquidos. [9]

ensayos de adsorción en el solvente utilizado en las distintas reacciones de síntesis de sulfamidas. A continuación se describen las características generales de dichos adsorbentes.

- **Óxido de zirconio (ZrO_2)**

El dióxido de Zirconio se halla naturalmente como badeleyita y se presenta en tres formas polimórficas en función de la temperatura: la fase monoclinica es estable por debajo de 1170 °C, mientras que en el intervalo entre 1170 y 2370 °C existe como tetragonal, y a temperaturas entre 2370°C y el punto de fusión (2706 °C), el óxido de zirconio puro cristaliza en estructura cúbica (Figura 4.1). [11]



Figura 4.1-Formas polimorfas a distintas temperaturas del dióxido de zirconio.

Este material tiene propiedades interesantes, ya que no sólo presenta propiedades básicas sino que, bajo ciertas condiciones, se comporta como ácido. Esta bifuncionalidad resulta de importancia en catálisis, donde la adición por ejemplo de agentes dopantes como iones sulfatos, fosfatos y/o boratos al hidróxido de zirconio ($Zr(OH)_4$) da como resultado óxidos de zirconio con fuerte acidez y excelentes propiedades catalíticas. [12] Es un óxido muy estable que también puede actuar como agente adsorbente de compuestos contaminantes. Por ejemplo se ha reportado, como material selectivo en la eliminación de flúor del agua debido a su alta afinidad por los iones fluoruros, [13] en la adsorción de arsénico [14] y de fenoles de aguas residuales. [15]

- **Quitosano**

La quitina, bioadsorbente, es un polímero lineal de alto peso molecular de la N-acetil-D-glucosamina, que abunda en las paredes celulares de algunos hongos y en el caparazón de crustáceos como cangrejos, langostas y langostinos. El quitosano es un derivado de la quitina, y se obtiene por hidrólisis de esta última (Figura 4.2). Hay numerosos estudios que comprueban su eficiencia en la eliminación de colorantes y de compuestos fenólicos. [16-22]

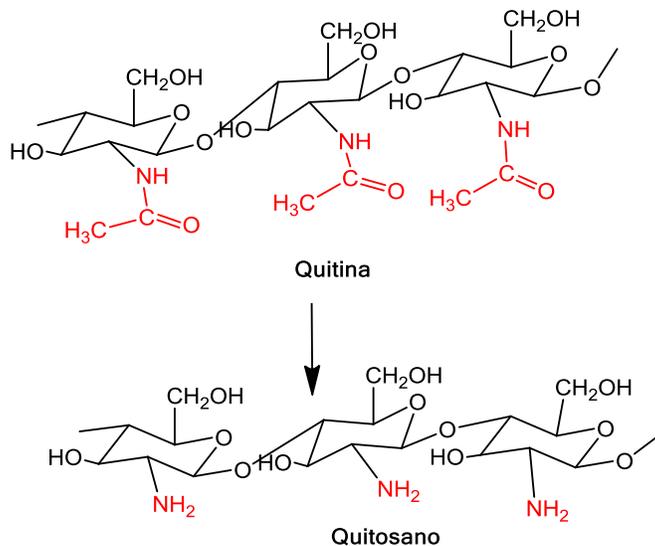


Figura 4.2- Obtención del Quitosano a partir de Quitina, para lo cual se utiliza una solución de NaOH y/o KOH al 30-40% a una temperatura de 100°C. [23]

- **Alúmina**

Las alúminas se han utilizado durante varias décadas en la industria de catálisis y adsorción. Existen cinco tipos de alúminas termodinámicamente estables y diversas fases metaestables, que se obtienen por deshidratación de los oxo/hidróxidos de aluminio. [24] Es su estructura la que determina las características adsorbentes que poseen, la cual depende tanto de la alúmina de partida como de las condiciones de síntesis (es decir, su temperatura de calcinación, Figura 4.3)

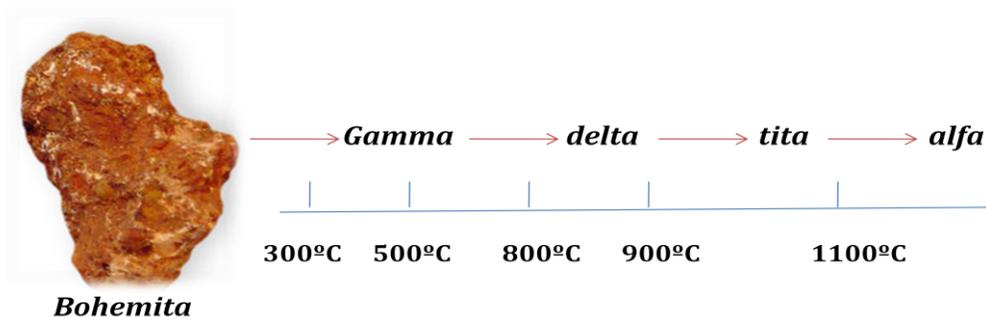


Figura 4.3-Fases de transición de las alúminas, las flechas indican rangos de transición a las temperaturas indicadas en la escala azul, en la figura. [24]

Termodinámicamente, la forma cristalina más estable es α - Al_2O_3 . El resto de fases se denominan gamma (γ)-alúminas o alúminas de transición (debido a su naturaleza meta estable en comparación con la α -alúmina).

Interacción de Alúmina con moléculas orgánicas

En la presente tesis se han utilizado los adsorbentes descritos anteriormente para la adsorción de catecol. Se detallaran a continuación las interacciones más comunes encontradas para alúminas, adsorbente que finalmente resulto elegido en la etapa de aislamiento de sulfamidas.

La afinidad de adsorción que presentan los fenoles hacia superficies de alúmina resulta de gran importancia en la tecnología de tratamiento de aguas, como ya se ha referido anteriormente, dado que estos compuestos se encuentran comúnmente en aguas residuales.

La capacidad de adsorción de alúmina depende de varios factores tales como: propiedades ácido-base de la grupos hidroxilo superficiales, naturaleza de adsorbatos, pH, fuerza iónica y superficie específica. [25] Es por esta última propiedad que las α - Al_2O_3 son poco usadas por si solas en el tratamiento de efluentes, debido su baja área superficial (entre 40-170 m^2g^{-1}) y porosidad, no así las alúminas de transición como la *eta* y *gamma* (100-800 m^2g^{-1}) que poseen una gran área de superficie. [25-28]

La superficie de la alúmina está cubierta de grupos hidroxilos, iones aluminio (ácidos de Lewis) e iones óxido (básicos), responsables de la retención de diferentes compuestos, además de agua, como alcoholes, [29] ácidos carboxílicos [30] y en menor medida aldehídos, ésteres y cetonas. [31]

En el caso de los alcoholes aromáticos (fenoles), la adsorción sobre la superficie de la alúmina se produce por intermedio del grupo fenolato. [32] La afinidad relativa de adsorción está determinada por el número de grupos hidroxilos vecinos presentes en el adsorbato, ya que la adsorción aumenta con el incremento de grupos hidroxilos vecinales (es decir, es mayor en polifenoles). La adsorción de catecol en γ - Al_2O_3 , sistema de nuestro de interés, se lleva a cabo por intermedio del enlace aluminio-catecolato y se han propuesto dos posibles mecanismos para la formación de dicho enlace. [33-34] En la Figura 4.5 el primer modelo representa un mecanismo que implica la interacción con sitios superficiales (ácidos de Lewis) que aceptan un par de electrones del fenóxido formando una unión adicional al enlace Al-O de la alúmina.

[31-35] En el segundo mecanismo propuesto, (Figura 4.5) la formación de enlaces del tipo Al-O con el catecol producen el desplazamiento de grupos hidroxilo preexistentes en la superficie, que se desprenden como moléculas de agua.

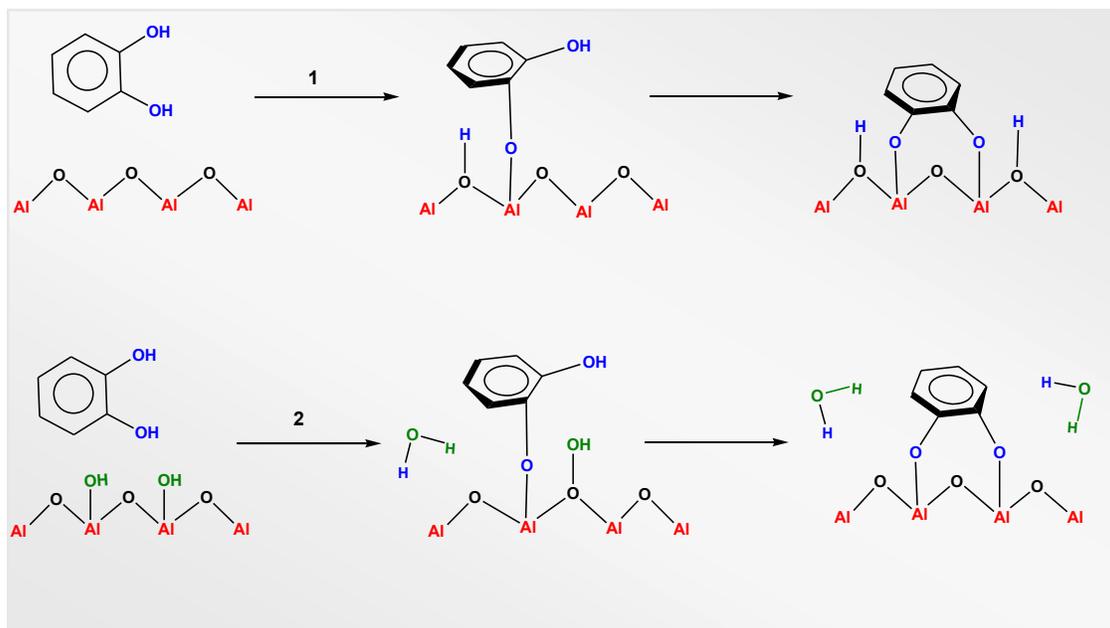


Figura 4.5-Mecanismos propuesto en la adsorción de catecol sobre gamma alúmina [34]

Determinación de la capacidad de adsorción de catecol

En la presente tesis, se determinó la capacidad de diferentes sólidos de retener el catecol disuelto en una solución 0.0167 M. Se utilizaron los siguientes adsorbentes: una α - Al_2O_3 comercial (α - Al_2O_3 área superficial, $5\text{m}^2\text{g}^{-1}$, Shimadzu), Quitosano (Sigma), γ - Al_2O_3 (área de superficie, $190\text{ m}^2\text{g}^{-1}$, AirProducts), ZrO_2 (área de superficie $90\text{ m}^2\text{g}^{-1}$, Zirconia SZ3*164 monoclinica 16052 de Saint-GobainNorPro). Las áreas superficiales se midieron por adsorción-desorción de N_2 a $-196\text{ }^\circ\text{C}$ utilizando el equipo Micromeritics Accusorb 2100E y se calcularon por la ecuación de BET. [1] Adicionalmente se testearon, con el mismo criterio, α - Al_2O_3 y ZrO_2 como soportes del acetato de cobre ($\text{Cu}(\text{OAc})_2\text{-ZrO}_2$, $\text{Cu}(\text{OAc})_2\text{-}\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$). Estos adsorbentes se eligieron debido a que habiendo usado la ruta tradicional de síntesis el aislamiento de las sulfamidas se realiza mediante el lavado de catecol del medio de reacción por formación de complejos de cobre (a partir de una solución acuosa de acetato de cobre al 5% p/p). Dichos complejos se reparten entre la fase orgánica (utilizada como medio de

reacción) y la fase acuosa, el proceso resultó poco eficiente y de difícil manipuleo para la eliminación completa del catecol y productos secundarios de la reacción. Para la preparación estos materiales, los óxidos de ZrO_2 y $\alpha-Al_2O_3$ fueron tratados con una solución acuosa de acetato de cobre y luego llevados a sequedad (durante 24 h a $100^\circ C$), obteniéndose un sólido con un contenido de cobre del 5% p/p.

Los ensayos de adsorción que se detallaran a continuación se realizaron en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas (CINDECA) bajo la dirección de la Dra. Daniela Lick y la Dra. Esther Ponzi.

Ensayos de Adsorción

Los ensayos se realizaron utilizando 100 mg de adsorbentes, realizando dos o tres adsorciones sucesivas, hasta que por control por Cromatografía Gaseosa se observó la adsorción total del catecol. En cada proceso se colocó una nueva porción de adsorbente y se dejó en contacto durante 5 minutos. En el modelo de evaluación se realizó en solución de diclorometano y luego se repitió en algunos casos con acetonitrilo. Ambos solventes son los utilizados en las distintas etapas de reacción de síntesis de sulfamidas de aminoésteres, de acuerdo a literatura. [2] La solución inicial de catecol empleada para en ambos solventes fue de $0,110 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (0,100M). Para realizar las adsorciones se realizó una dilución de esta solución tomando 0,5 mL y llevándolo a 3 mL de solución con el diluyente (diclorometano o acetonitrilo) es decir que la cantidad de mmoles de catecol para ser adsorbida fue de 0,05 y la solución a adsorber resulta de una concentración de 0,0167 M. Esta dilución se realizó para tener un volumen de solución apto para llenar el volumen de poro del adsorbente y tener una cantidad suficiente de filtrado apta para ser analizada.

Control de catecol

El análisis de la fase líquida luego de la adsorción se realizó mediante cromatografía gaseosa. En este último caso se inyectó 0.5 μL del filtrado obtenido a un cromatógrafo gaseoso (CG) Varian Star 3400 CX provisto con detector FID. Se utilizó una columna capilar CP Sil 5CB de 30 metros de longitud y un programa de temperatura de 50 a $170^\circ C$ (rampa= $10^\circ C\cdot\text{min}^{-1}$) y una etapa isotérmica a $170^\circ C$. La temperatura del inyector fue de $140^\circ C$. Se cuantificó el remanente en la solución de catecol, mediante un CG-masa (Perkin Elmer) provisto con una

columna Supelco SPB-5 MS de 30 metros de longitud realizando la separación en las condiciones mencionadas para la cromatografía gaseosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se reportan los resultados obtenidos de los ensayos de adsorción, donde inicialmente se utilizó diclorometano, solvente utilizado en la síntesis original de sulfamidas vía Mitsunobu, (reacción que era llevada a cabo en el laboratorio al inicio de la tesis).^[2]

Se observa que los adsorbentes ZrO_2 , $CuAc_2-\alpha Al_2O_3$, y $\gamma-Al_2O_3$ presentan una retención mayor al 50% de catecol luego de un sólo proceso de adsorción, por lo que en principio resultan ser los más eficientes. Entre ellos se descarta en primer lugar la alúmina modificada, $CuAc_2-\alpha Al_2O_3$, debido a que este sólido modificado no mejora significativamente la capacidad de adsorción en comparación con los otros dos sólidos sin tratar. Además, esta alúmina contiene iones de cobre, que pueden resultar tóxicos si quedaran trazas en el producto final de la reacción. Posteriormente se aumentó el número de adsorciones y se determinó que la $\gamma-Al_2O_3$ retiene la totalidad de catecol en dos contactos sucesivos, además de ser un sólido más económico y accesible que el ZrO_2 . Finalmente se evaluó la capacidad de adsorción de la $\gamma-Al_2O_3$ en acetonitrilo, solvente utilizado en la síntesis de sulfamidas mediante reacción vía catecol sulfato,^[2] encontrándose a este sólido también eficiente con este solvente. Por lo tanto esta alúmina fue la elegida para la eliminación de catecol.

Adsorbente	Cantidad de adsorciones	Masa de adsorbente (mg)	Solvente	% Adsorción
α -Al ₂ O ₃	1	100	CH ₂ Cl ₂	2
Cu(OAc) ₂ - α -Al ₂ O ₃	1	100	CH ₂ Cl ₂	61
ZrO ₂	1	100	CH ₂ Cl ₂	57
ZrO ₂	2	100-100	CH ₂ Cl ₂	69
ZrO ₂	3	100-100-100	CH ₂ Cl ₂	86
Cu(OAc) ₂ -ZrO ₂	1	100	CH ₂ Cl ₂	28
Quitosano	1	100	CH ₂ Cl ₂	5
Quitosano	2	100-100	CH ₂ Cl ₂	22
γ -Al ₂ O ₃	1	100	CH ₂ Cl ₂	93
γ -Al ₂ O ₃	2	100-100	CH ₂ Cl ₂	100
γ -Al ₂ O ₃	1	100	CH ₃ CN	47
γ -Al ₂ O ₃	2	100-100	CH ₃ CN	70
γ -Al ₂ O ₃	3	100-100-100	CH ₃ CN	93

Tabla 1-Porcentajes de adsorción de catecol sobre los adsorbentes propuestos de este compuesto sobre los adsorbentes propuestos calculados por cromatografía gaseosa.

En el capítulo siguiente se presentan los resultados de las síntesis llevadas a cabo en este trabajo de tesis. Entre los compuestos preparados se encuentran las sulfamidas aisladas utilizando el adsorbente seleccionado. A modo de ejemplo, la Figura 4.6 muestra una



Figura 4.1-Empleo de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ en el medio de reacción 1- *medio de reacción antes de la adsorción sobre $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$* 2- *Filtrado obtenido luego del primer contacto sobre $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$* 3- *Filtrado del medio de reacción luego del 3er contacto sobre $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$*

experiencia realizada con 3 adsorciones con $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ sobre el medio de reacción de síntesis de (N'-fenetil) sulfamoil-N- β -alaninato de metilo. En todos los casos se observa que la solución original, color caramelo (imagen 1) disminuye la intensidad en la coloración a medida que se realizan las adsorciones (imagen 2), y el adsorbente, originalmente de color blanco, se torna amarillento en solución orgánica, ^[37] logrando una solución final sin presencia de catecol, de acuerdo a lo observado por cromatografía en capa delgada. La coloración del sólido adsorbente es consistente con las observaciones obtenidas en experiencias de adsorción realizadas por otros autores. ^[37]

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DEL CAPÍTULO IV

- [1]Lin,S.; Juang, R.S. *Journal of environmental Management* 90, 1336-1349. (2009)
- [2]Lian,F.;Chang, C.; Du,Y.; Zhu, L.; Xing, B.; Liu, C. *Journal of Environmental Sciences* 24(9), 1549-58. (2012)
- [3]Mohammed, M. A.; Shitu, A.; Ibrahim A. *Research Journal of Chemical Sciences* 4(1), 91-102. (2014)
- [4]Laxmi Gayatri, S.; Ahmaruzzaman, M. D. *Assam University Journal of Science & Technology: Physical Sciences and Technology* 5(2), 156-166. (2010)
- [5]Paprowicz J.T. *Environmental Technology* 11, 71-82. (1990)
- [6]Okolo, B.; Park, C.; Keane, M.A. *Journal of Colloid and Interface Science* 226, 308-317. (2000)
- [7]Dabrowski, A.; Podkoscielny, P.; Hubicki, Z.; Barczak, M. *Chemosphere* 58, 1049-1070. (2005)
- [8]Ahmaruzzaman, M. *Advances in Colloid and Interface Science* 143, 48-67. (2008)
- [9]Weber, J.W. *Control de la calidad del agua. Procesos fisicoquímicos*: Editorial Reverté S.A. (1979)
- [10]Dabrowski, A. *Advances in Colloid and Interface Science* 93, 135-224. (2001)
- [11]Nawrocki, J.; Rigney, M. P.; McCormick, A.; Carr, P.W. *Review, Journal of Chromatography A* 657, 229-82. (1993)
- [12]Zhao, E.; Isaev, Y.; Sklyarov, A.; Fripiat, J. J. *Catalysis Letters* 60, 173-181. (1999)
- [13]Dou, X.; Mohan, B.D.; Pittman, C.U.;Yang ,S. *Chemical Engineering Journal* 198, 236-245. (2012)
- [14]Cui, H.; Li, Q.; Gao, S.; Shang, J.K. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 18(4), 1418-1427. (2012)
- [15]Hames, B. R. Patent US 6,719,908 B2 (2004)
- [16]Wong, Y.; Szeto, Y.; Cheung W.; McKay, *Process Biochemistry* 39(6), 695-704.(2004)
- [17]Chiou, M. S.; Ho, P.Y.; Li, H.Y. *Dyes and Pigments* 60(1), 69-84. (2004)
- [18]Ruiz, M.; Szygula A.; Rodilla, V.; Barrón J.; Sastre A.; Guibal, E. *Revista Toxicología Ambiental. Asociación Española de Toxicología* 24 (2), 101-114. (2007)
- [19]Crini G; Badot P.M. *Progress in Polymer Science* 33, 399-447. (2008)
- [20]Sun,W.Q.; Payne, G.F.; Moas, M.S.; Chu, J.H.; Wallace, K.K. *Biotechnology progress* 8(3), 179-186.(1992)
- [21]Spagna, G.; Pifferi, P. G.; Rangoni, C.;Mattivi, F; Nicolini,G.;Roberto Palmonari, R. *Food Research*29 (3), 241-248.(1996)

- [22] Dursun, A. Y.; Kalayci, C. D. *Journal of Hazardous Materials* 123, 151-157. (2005)
- [23] Colina, M.; Ayala, A.; Rincón, D.; Molina, J.; Medina, J.; Yncierte, R.; Vargas, J.; Montilla, B. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 5 (1), 21-43. (2014)
- [24] Benítez Guerrero, M.; Pérez Maqueda, L.; Pena Castro, P.; Pascual, J. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 52, 6, 251-267. (2013)
- [25] Cornelius, E.B.; Milliken, T.H.; Mills, G.A.; Oblad, A.G. *Journal of Physical Chemistry* 59, 809. (1955)
- [26] Taylor, D.R.; Ludlum, K. H. *The Journal of Physical Chemistry* 78, 2072-2078. (1972)
- [27] Volchek, K.; Mortazavi, H. Whittaker, Patente 5556545. (EE.UU.9/1996)
- [28] Kasprzyk-Hordén B.K. *Advances in Colloid and Interface Science* 110, 19-48. (2004)
- [29] Laucournet, R.; Pagnoux, C.; Chartier, T.; Baumard, J. F. *Journal of the European Ceramic Society* 21, 869-878. (2001)
- [30] Karaman, M. E.; Antelmi, D. A.; Pashley, R. M. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 182, 285-298. (2001).
- [31] Kummert, R.; Stumm, W. *Journal of Colloid and Interface Science* 75, 373. (1980)
- [32] Taylor, D.R.; Ludlum, K.H. *The Journal of Physical Chemistry* 78(20), 2882-2886. (1972)
- [33] Bowers, A. R.; Huang, C. P. *Journal of Colloid and Interface Science* 105, 197-215. (1985)
- [34] Woodill, L.A.; O'Neill, E. M.; Hinrichs, R. Z. *The Journal of Physical Chemistry A* 117, 5620-5631. (2013)
- [35] Adamson, W. & Gast, A.P. *Physical Chemistry of surfaces*, Sixth Edition: John Wiley & Sons, Inc. (1997)
- [36] Gavernet, L.; Elvira, J.; Samaja, G.; Pastore, V.; Sella Cravero, M.; Enrique, A.; Estiu, G.; Bruno-Blanch, L. *Journal of Medicinal Chemistry* 52, 1592-1601. (2009)
- [37] McBride, M. B.; Sikora, F. J.; Wesselink, L. G. *Soil Science Society of America journal* 52, 985-993. (1988)

CAPITULO V

TRABAJO EXPERIMENTAL DE SINTESIS

Trabajo experimental de síntesis.

Consideraciones Generales

Las síntesis convencionales (con calentamiento térmico) se llevaron a cabo en equipos de vidrio secados por el pasaje de una corriente de nitrógeno 5.0 (contenido de agua ≤ 3 ppm marca Linde), en el equipo primeramente calentados para evitar la presencia de humedad.

Las síntesis en microondas se realizaron en un reactor Monowave 300™ de Anton Paar, potencia máxima 850 W. El control de temperatura se efectuó mediante un detector IR, (incertidumbre en la medición $\pm 5^\circ\text{C}$) y con termómetro de Rubí (incertidumbre $\pm 2^\circ\text{C}$). En estos casos se utilizaron viales de 10 a 30 mL de vidrio borosilicato y con tapa de teflón. En todas las síntesis se trabajó a la potencia del equipo.

El acetonitrilo (CH_3CN) y diclorometano (CH_2Cl_2), usados como solventes de reacción, se secaron previamente, destilaron y almacenaron sobre tamiz molecular 4 Å marca Merck. Los enfriamientos a 0°C se realizaron mediante baños de agua-hielo.

Se tomó como criterio para el punto final de las reacciones la ausencia de reactivo y presencia de nuevo/s producto/s según controles por cromatografía en capa delgada (CCD). La siembra en los mismos se realizó mediante micropipeta graduada sembrando $0,6\mu\text{L}$ del medio de reacción en $0,1$ mL de solvente.

La evaporación del solvente se realizó en evaporador rotatorio a temperatura ambiente y a una presión aproximada de 30 torr. El secado a peso constante se llevó a cabo en tambor de secado a 20 torr y temperatura ambiente.

Las columnas cromatográficas se prepararon con sílica gel 60, (70–230 mesh, Merck .ref. 1.07734.2500). Las CCD se realizaron en cromatofolios de sílica gel 60 con fluorescencia 254 nm marca Merck (ref. 1.05554).

Como técnicas de revelado de las placas cromatográficas se utilizaron: luz UV 254 y 366 nm (método no destructivo) y una solución ácida al 5.5 % p/v de molibdato de amonio (VI) tetrahidratado, las cuales posteriormente fueron calentadas a 110°C durante 5 minutos (método destructivo). Los solventes utilizados tanto para las cromatografías como para las cristalizaciones fueron previamente destilados según técnicas aceptadas internacionalmente y

su pureza se verificó mediante CCD. Las fracciones colectadas fueron reunidas según presentaron el mismo perfil cromatográfico en la CCD.

A los productos sólidos, crudos, se le realizaron ensayos de cristalización con distintos solventes o mezclas de solventes, seleccionando aquel que favorezca la pureza y el rendimiento del producto luego de este ensayo.

Los puntos de fusión de los productos sintetizados se efectuaron en un equipo Electrothermal en capilar cerrado, y no fue corregida la temperatura por vástago emergente.

Los espectros ^1H (200 MHz) y ^{13}C NMR (50 MHz) fueron realizados en un espectrómetro Bruker AC-200 en el Laboratorio de Compuestos Orgánicos de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), mientras que los espectros ^1H (300 MHz) y ^{13}C NMR (75 MHz) se realizaron en un equipo Bruker Avance II, en el IQUIR (Instituto de Química Rosario CONICET-UNR) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Finalmente, los espectros de ^1H (500 MHz) y ^{13}C NMR (126 MHz) fueron realizados en un equipo espectrómetro BRUKER AVANCE II 500 en el UMYMFOR (Unidad De Microanálisis Y Métodos Físicos Aplicados a la Química Orgánica) dependiente de CONICET-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los datos de corrimiento químico se reportan en ppm respecto del estándar interno tetrametilsilano, mientras que las constantes de acoplamiento se expresan en Hertz.

Se realizaron análisis elementales de C, H, N y S. El porcentaje de O se calculó por diferencia. Se utilizó un equipo Carlo Erba EA 1108, aceptándose un error entre $\pm 0,2-0,3 \%$ respecto a los valores calculados a partir de las estructuras propuestas. Los mismos se realizaron en el INQUIMAE (Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Los estudios por espectrometría de masa se realizaron con un Espectrómetro de masa LCQ Duo (ESI-IT) (Thermo Fisher) con fuente de ionización electrospray en el LANAIS-PROEM (Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en péptidos y proteínas) perteneciente al IQUIFIB (Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA.

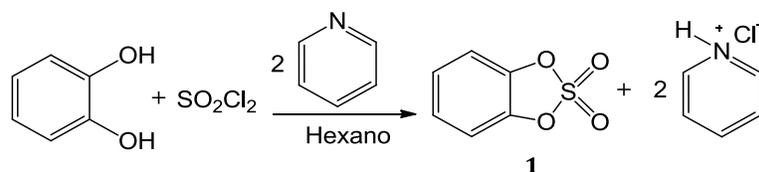
Los derivados de aminoácidos utilizados como reactivos fueron adquiridos comercialmente (marca Sigma-Aldrich). Las aminas utilizadas se purificaron según técnicas extraídas de literatura.^[1] La alúmina utilizada en las etapas de aislamiento ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ marca Air Products)

presenta un área de superficie de $190 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ y fue previamente molida, secada en estufa 24 h a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ y preservada en recipiente cerrado bajo atmósfera de nitrógeno seco. La filtración de este adsorbente se realizó a través de filtros Osmonics Inc.1 800 444 8212 syringe filter teflón 0.45 Micron, 100 /PK .

Procedimiento

Síntesis de catecol Sulfato (1)

Dado que este reactivo no es comercial, se procede a su síntesis modificando tanto su aislamiento como su purificación respecto de la técnica tradicional. [2]



En un balón de 3 bocas, provisto de ampolla de compensación, de un adaptador con pasaje de corriente de nitrógeno seco y en la tercera boca, conectada a trampa de gases mediante el pasaje agua para la retención de gases, se adapta agitación magnética y se adicionan en el siguiente orden 279mmol (30,76 g) de pirocatecol, 558 mmol (44,19g, 45,0mL) de piridina (Peb: 115°C, δ : 0,98 g/mL), formándose una solución amarilla clara. Sobre ésta solución se agregan 300 mL de hexano seco. El medio de reacción se enfría con baño hielo-agua líquida-sal con el fin de mantenerlo entre -5 y -10°C. Con el sistema protegido de la luz se adicionan lentamente, desde ampolla de compensación, una solución de 279 mmol (37,70g, 22,5mL) de cloruro de sulfurilo (Peb: 69°C, δ : 1,67 g/ mL) en 20,0 mL de hexano seco, durante 2h. Finalizado el agregado de la solución anterior, puede observarse la formación de 2 fases líquidas, la cual se deja reaccionar a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno seco, durante 19 h.

- **Aislamiento tradicional** [2]

Se separa el producto del medio de reacción, mediante centrifugación y posterior extracción con acetato de etilo (2 x 80 mL c/u) de la fase remanente. Se realizan lavados sucesivos (2x 45,0mL) con solución acuosa fría, de acetato cúprico 5%, con el fin de extraer el catecol que no ha reaccionado. Se agrega sulfato de sodio anhidro como agente desecante, se filtra y concentra el filtrado en evaporador rotatorio, obteniéndose 15,81 g de un líquido pardo viscoso, el cual se destila a presión reducida (Peb: 132 °C, 10 mmHg). Se obtienen 11,98 g.de un aceite incoloro a temperatura ambiente que se convierte en un sólido blanco cristalino a 0 °C.

Rendimiento: 25 % (bibliografía: 52%) [2]

Punto de fusión: 34-36°C (bibliografía: 34-35°C) [3]

Rf: 0,72 (Hexano: Acetato de Etilo 3:1)

- **Nuevo proceso de Aislamiento**

Una vez que se ha separado el producto del medio de reacción, mediante centrifugación, de la fase remanente se extrae con acetato de etilo (4 x 40 mL c/u), centrifugando en cada etapa para una mejor separación de las fases. Se reúnen los extractos orgánicos, se elimina el solvente en evaporador rotatorio, y se obtiene un líquido viscoso de color ámbar. El producto crudo se seca en tambor de secado con vacío, hasta a obtener peso constante de 20,56 g.

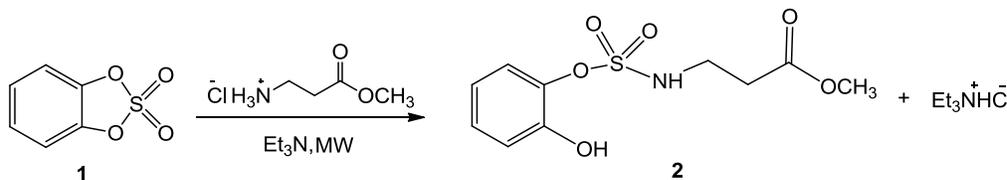
Finalmente se realiza una cromatografía en columna de sílica gel 60, (10 veces en peso) con diclorometano como solvente de elusión. Se recogen 37 fracciones de 10 mL cada una, las cuales se controlan mediante CCD. Se reúnen las fracciones 16-32, a las que se les elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, hasta peso constante de 16,10 g de un sólido blanco.

Rendimiento: 33 % (bibliografía: 52%) [2]

Punto de fusión: 34-36°C (bibliografía: 34-35°C) [3]

Rf: 0,72 (Hexano: Acetato de Etilo 3:1)

Síntesis de Sulfamato de 2-hidroxifenil-N-β-alaninato de metilo (2)



En un tubo de reacción para equipo de microondas y bajo atmosfera de nitrógeno seco, se colocan 22 mmol (1,99 g) de clorhidrato de β-alanina-metilester y se adiciona mediante goteo y agitación magnética 44 mmol (4,50 g, 6.1 mL) de trietilamina (Peb: 89,5°C, δ: 0,73g/mL). Finalmente se agregan 25 mmol (4,20 g) de catecol sulfato sintetizado previamente (**1**). La mezcla de reacción se lleva al equipo de microondas, donde se irradia durante 15 minutos a

una temperatura de 90°C, con agitación magnética, obteniendo un sólido pastoso de color caramelo. Se lleva a temperatura ambiente y adiciona 35,0 mL de diclorometano. Se separa la fase orgánica, y se lava con solución de ácido clorhídrico 5N (2x 15mL), luego con solución saturada de cloruro de sodio (2x 15 mL) y finalmente con agua (2x 15 mL), para eliminar el clorhidrato de trietilamonio formado durante la reacción.

La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro, se filtra y elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, hasta peso constante, obteniéndose 7,59 g de un aceite color caramelo. Al producto crudo se realiza una cromatografía en columna de sílica gel 60, (48 veces en peso) utilizando una mezcla de diclorometano/metanol como solvente de elusión en proporción 15:1 colectándose 228 fracciones de 2 a 5 mL cada una, las cuales se controlan mediante CCD, reuniendo las fracciones con Rf similar. Posteriormente se elimina el solvente y se consiguen 5,16 g de un sólido amarillo que se cristaliza en diclorometano. Se obtiene 3,60 g un sólido blanco.

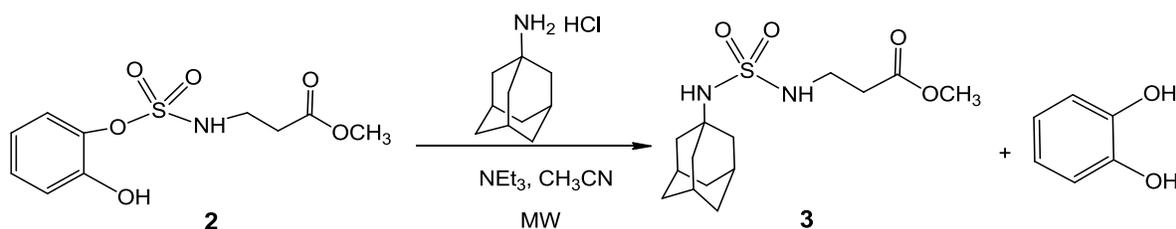
Rendimiento: 59% (bibliografía: 80%) [4]

Punto de Fusión: 102-104 °C (literatura: 102-104°C) [4]

Rf producto: 0,55 (CH₂Cl₂/ MeOH 10:1)

Síntesis de sulfamidas derivadas de β-alaninametiléster

Síntesis de N'-adamantil-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo (3)



En un tubo de reacción para equipo de microondas y bajo atmosfera de nitrógeno seco, se coloca una solución compuesta por 4 mmol (1,14 g) de sulfamato de 2-hidroxifenil-N-β-alaninato de metilo, previamente sintetizado (**2**), 4,4mmol (0,83g) de clorhidrato de amantadina y 5 mL de acetonitrilo (seco sobre tamiz molecular 4 Å). Sobre la misma se adiciona mediante goteo y agitación 8,8mmol (1,2 mL) de trietilamina (Peb: 89,5°C, δ: 0,72 g

/mL). La mezcla de reacción se coloca en un reactor de microondas donde se irradia durante 20 minutos, a una temperatura de 120 °C con agitación magnética, obteniendo una solución color rojiza.

El medio de reacción se diluye en 20 mL de acetonitrilo y se adiciona γ -Al₂O₃ para retener selectivamente al catecol del medio de reacción. Se realizan 3 agregados y filtrados sucesivos sobre 9,25 g de γ -Al₂O₃ cada uno. La desaparición de dicho subproducto se constata mediante CCD. Los filtrados se reúnen y se elimina el solvente en evaporador rotatorio, luego se seca a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente obteniéndose 853 mg de un sólido rosáceo. A este producto crudo se le realiza una cromatografía en columna de sílica gel 60 (39 veces en peso) donde se utiliza una mezcla de diclorometano/metanol como solvente de elusión en proporción 40:1. Se colectan 86 fracciones de 2 a 3mL cada una, las cuales se controlan mediante CCD.

Se reúnen las fracciones 27-60, que presentan el mismo perfil cromatográfico y se elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se obtiene 643mg de un producto crudo de aspecto sólido blanco, sobre el cual se hacen ensayos de cristalización, y se cristaliza de una mezcla de solventes diclorometano/hexano. Se obtiene un producto cristalino blanco de masa 534 mg (42 % de rendimiento).

Punto de fusión: 86-87 °C

Rf: 0,54 (CH₂Cl₂/ MeOH 40:1) ¹

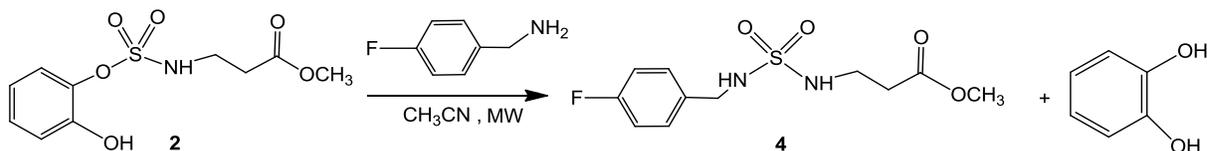
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4,82 (pico ancho, 1H, NH- β -Ala), 3,73 (s, 3H, O-CH₃), 3,33 (t, J = 6,0 Hz, 2H, CH₂-NH), 2,68(t, J =6,0 Hz, 2H, N-CH₂- β -Ala), 2,12(s, 3H , 3CH-adamantil), 1,96 (d, J = 2,3 Hz, 6H, 3CH₂-adamantil), 1,68(t, 6H, 3CH₂-adamantil).

¹³C-NMR (126MHz, CDCl₃) δ 173,32 (C=Oester), 55,74 (O-CH₃), 51,91 (C-adamantil-N), 42,42 (C- α -adamantil), 38,95 (N-C- β -Ala), 35,89 (C-adamantil), 33,76 (C-CO), 29,58 (C- β -adamantil).

IR (KBr) cm⁻¹:3330-3284 (N-H), 2921-2861 (C-H, OCH₃), 1737 (C=O), 1321 (SO₂ asim), 1143 (SO₂ sim)

Análisis Elemental:% calculado para C₁₄H₂₄N₂O₄S, PM: 316,42. C 53,1, H 7,6, N 8,8, S 10,0 .
Experimental: C 52,9,H 7,7, N 8,8, S 9,8.

Síntesis de *N'*-(*p*-fluorobencil)-sulfamoil-*N*-β-alaninato de metilo (**4**)



En un tubo de reacción, bajo atmósfera de nitrógeno seco, se coloca una solución compuesta por 3,5mmol (904 mg) de sulfamato de 2-hidroxifenil-*N*-β-alaninato de metilo (**2**) 3,8 mmol (0,7mL) de *p*-fluorbencilamina (Peb: 70°C (1mmHg), δ: 1,095 g/mL) y 5 mL de acetonitrilo (seco sobre tamiz molecular 4Å). Esta mezcla de reacción se introduce en el reactor de microondas donde se irradia durante 35 minutos a una temperatura de 120°C, con agitación magnética, al cabo del cual se obtiene una solución amarilla.

El medio de reacción se diluye con 30 mL de acetonitrilo y se agrega γ-Al₂O₃. Se trata 4 veces con 5,28 g de γ-Al₂O₃, para lograr la eliminación del producto secundario mediante el control por CCD. El adsorbente se separa mediante filtración y al filtrado se le elimina el solvente, inicialmente en evaporador rotatorio y lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 500 mg de un sólido blanco. A este producto se le realiza una cromatografía en columna de sílica gel 60, (29 veces en peso) con una mezcla de hexano/acetato de etilo en proporción 6:4 como solvente de elusión. Se utiliza siembra sólida, para ello se disuelve el producto crudo en acetona, se adiciona silica gel y luego se evapora el solvente. Se recogen 157 fracciones de 2 a 4 mL cada una, las cuales se controlan mediante CCD. Se reúnen las fracciones 38-152, que presentan igual R_f, obteniéndose 480mg de un sólido blanco luego de la eliminación del solvente. El producto crudo se purifica mediante cristalización con mezcla de diclorometano /hexano. Se obtiene un cristalizado blanco de masa 449 mg (45 % de rendimiento)

Punto de fusión: 87-88°C

R_f: 0,58 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1)

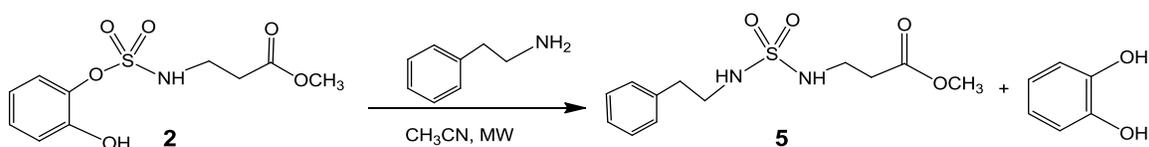
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,33-7,36 (m, 2H, C^{2,6}-Ar), 7,04-7,08 (m, 2H, C^{2,6}-Ar), 4,20 (s, 2H, CH₂-bencil), 3,71 (s, 3H, O-CH₃), 3,29 (t, *J*= 6,0Hz, 2H, N-CH₂-β-Ala), 2,60(t, *J*= 6,0 Hz, 2H, CH₂-CO β-Ala).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 172,57 (C=O ester), 163,47-161, 70 (C-F), 132,46, 129,78, 115,62 ($\text{C}^{1,2,3}\text{-Ar}$), 51,77 (O- CH_3), 46,59 (C-bencil), 38,69 (N-C- β -Ala), 33,67 (C-CO).

IR (KBr) cm^{-1} : 3488-3288 (N-H), 2960-2860 (C-H, OCH_3), 1743 (C=O), 1510 (C-F), 1310 (SO_2 asim), 1141 (SO_2 sim).

Análisis Elemental: % calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{FN}_2\text{O}_4\text{S}$ PM: 290,31: C 45,5, H 5,2, N 9,6, S 11,0 %.
Experimental: C 45,5, H 5,3, N 9,5, S 11,1 %

Síntesis de *N'*-fenetil-sulfamoil-*N*- β -alaninato de metilo(5)



A efectos de comparar los rendimientos de las síntesis en este caso se realizó la preparación del compuesto 5 utilizando calentamiento por microondas y térmico (método convencional). Lo mismo sucede con los compuestos 7 y 8.

- **Síntesis en Microondas**

En un tubo de reacción de microondas se coloca en el siguiente orden: 3 mmol (800 mg) de sulfamato de 2-hidroxifenil-*N*- β -alaninonato de metilo (**2**), 5,0 mL de acetonitrilo seco sobre tamiz molecular y 3 mmol (0,35 g, 0,4 mL) de fenetilamina gota a gota. Se irradia en microondas durante 15 minutos a una temperatura de 130 °C y con agitación magnética. Se obtiene una solución naranja que se concentra en evaporador rotatorio y se seca a peso constante en tambor de vacío. Se obtiene un aceite color durazno al que se diluye en 20 mL de acetonitrilo. Esta solución se trata con $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (3 x 4,0 g). Se filtra el adsorbente del medio y el filtrado se concentra inicialmente en evaporador rotatorio y lleva a peso constante en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtienen 427 mg de un sólido rosáceo, crudo, que es cristalizado mediante mezcla de solventes diclorometano/ éter de petróleo. Se obtiene un sólido blanco de peso 388 mg (rendimiento: 47%).

Punto de Fusión: 72-73°C

Rf: 0,57 (CH₂Cl₂: MeOH 20:1)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7,36-7,18 (m, 5H, Ar-H), 4,86 (s, pico amplio, 1H, NH-βAla), 4,26 (s, pico amplio, 1H, NH-fenetil), 3,70 (s, 3H, O-CH₃), 3,31 (t, J = 6,5 Hz, 2H, N-CH₂-fenetil), 3,17 (s, pico amplio, 2H, CH₂-bencil), 2,87 (t, J = 6,5 Hz, 2H, N-CH₂-β-Ala), 2,55 (t, J = 6,1 Hz, 2H, CH₂-CO β-Ala)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 172,75 (C=O ester), 138,45 (C¹ Ar), 129,29, 129,01, 127,23 (C^{2,3,4} Ar), 51,90 (O-CH₃), 44,81 (CH₂-NH), 39,35 (N-C-β-Ala), 35,64 (CH₂-bencil), 34,39 (C-CO).

IR (KBr) cm⁻¹: 3477-3269 (N-H), 2954-2896 (C-H, OCH₃), 1757 (C=O), 1319 (SO₂ asim), 1145 (SO₂ sim).

Análisis Elemental: % Calculado para C₁₂H₁₈N₂O₄S PM:286,35. C 50,4, H 6,3, N 9,8, S 11,2. Experimental :C 50,7, H 6,5, N 9,6, S 11,1.

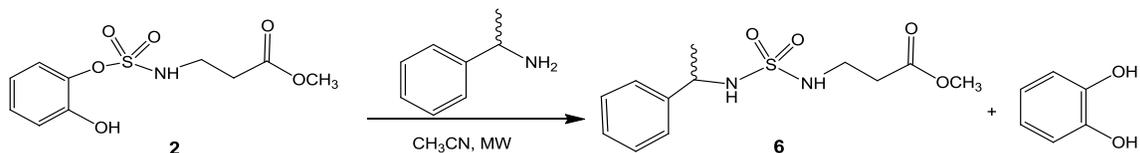
- **Método convencional**

En un tubo de reacción previamente seco y en atmósfera de nitrógeno se colocan 6,1 mmol (1,69 g) de sulfamato de 2-hidroxifenil-N-β-alaninato de metilo (**2**) y 16 mL de acetonitrilo seco. Cuando toda la mezcla resulta homogénea se adiciona mediante goteo, 6,9 mmol (0,84 g, 0,88 mL) de fenetilamina (Peb: 67°C, 1,1 mmHg, δ: 0,962 g/mL). El medio de reacción se lleva a reflujo con baño externo a una temperatura de 90-100°C, con agitación magnética y en atmósfera de nitrógeno seco durante 22 h. Se observa una solución de tonalidad rojiza.

El medio de reacción se deja enfriar a temperatura ambiente y se concentra en evaporador rotatorio. Se obtiene un aceite marrón, que se seca en tambor a vacío hasta peso constante de 2,73 g. El mismo se diluye en 80 mL de acetonitrilo y se trata con γ-Al₂O₃ (3 x 8,5 g), durante 5-10 minutos y luego se filtra. La desaparición del catecol se constata mediante CCD. Se reúnen y concentran los filtrados para posteriormente secar el producto hasta peso constante generando un sólido rojo oscuro de masa 1,10 g. El producto crudo se purifica mediante cristalización con diclorometano/éter de petróleo, obteniéndose 722 mg de un sólido blanco (rendimiento: 41%).

Punto de fusión: 72-73°C

Rf: 0,57 (CH₂Cl₂: MeOH 20:1)

Síntesis de N'-(±) α-metilbencil-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo (6)

En un tubo de reacción, bajo atmosfera de nitrógeno seco, se agregan 3,5 mmol (0,96 g) de sulfamato de 2-hidroxifenil-N-β-alaninato de metilo (**2**), 3,84 mmol (0,49 ml) de (±) α-metilbencilamina (Peb: 185 °C, δ: 0,94 g/mL) y 5,0 mL de acetonitrilo (seco sobre tamiz molecular 4Å). Se introduce en el reactor de microondas donde se irradia durante 25 minutos a una temperatura de 120°C, y agitación magnética, al cabo del cual se observa una solución de tonalidad rosácea.

El medio de reacción se diluye en 15 mL de acetonitrilo y se trata con γ-Al₂O₃ (3 x 4,29 g cada una). Se separa el adsorbente del medio y el filtrado se concentra en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, a peso constante de 695 mg (aceite rosáceo). El producto crudo se purifica mediante cromatografía en columna de sílica gel 60, (29 veces en peso) utilizando como solvente de elusión una mezcla de hexano/acetato de etilo en proporción 1:1 y siembra líquida. Se colectan 80 fracciones de 1 a 2 mL cada una, las cuales se controlan mediante CCD, y reúnen las fracciones 53-80, que posteriormente se filtra a través de un embudo con placa fritada. El solvente se elimina para obtener finalmente 401mg de un aceite incoloro, puro por CCD (rendimiento 40 %).

Rf: 0,62 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1)

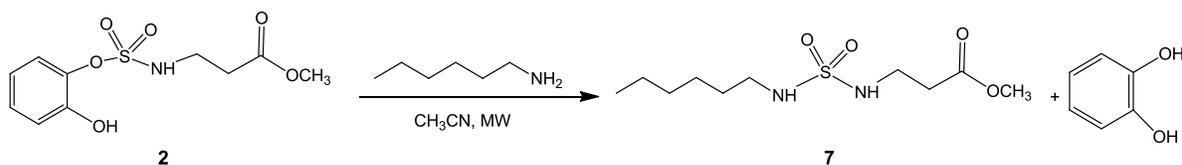
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,40-7,29 (m, 5H, C-Ar), 4,53-4,57 (m, 1H, CH-bencil), 3,68 (s, 3H, O-CH₃) 3,18-2,96 (m, 2H, N-CH₂-β-Ala), 2,49-2,34 (m, 2H, CH₂-CO β-Ala), 1,56 (d, J = 6,3 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 172,07 (C=O ester), 142,25 (C¹ Ar), 128,30, 127,63, 126,43 (C^{2,3,4} Ar), 53,41 (N-C-Ar), 51,57 (O-CH₃), 38,81 (N-C-β-Ala), 33,80 (C-CO), 23,55 (CH₃)

IR (KBr) cm⁻¹: 3311 (N-H), 2977 (C-H, OCH₃), 2370 (C-H aromáticos), 1735 (C=O), 1440 (C-C aromáticos), 1330 (SO₂ asim), 1161 (SO₂ sim)

EM (ES)+calculado para $C_{12}H_{18}N_2O_4S$ m/z :286,10 (100%). Experimental $[M+H]^+m/z =286,9$ (79%).

Síntesis de *N*'-hexil sulfamoil-*N*-β-alaninato de metilo (7)



En un tubo de reacción, bajo atmosfera de nitrógeno seco, se colocan 2.90 mmol (800mg) de sulfamato de 2-hidroxifenil-*N*-β-alaninato de metilo (**2**), 5 mL de acetonitrilo y gota a gota, 3,19 mmol (0,46mL) de hexilamina (Peb: 132°C, δ: 0,76 g/mL). Esta mezcla de reacción se introduce en el reactor de microondas durante 15 minutos, a 120°C y con agitación magnética. Se observa una solución amarilla, que se concentra luego en evaporador rotatorio y se seca a peso constante en tambor de vacío, para obtener un aceite color caramelo. El medio de reacción se diluye con 15 mL de acetonitrilo y se trata con γ-Al₂O₃, durante 5-10 minutos (3 x 4,0 g de γ-Al₂O₃ cada uno). Luego de esta operación se separa el adsorbente del medio y se elimina el solvente del filtrado inicialmente en evaporador rotatorio y posteriormente en tambor de vacío a temperatura ambiente, hasta peso constante de 746 mg (sólido naranja, crudo). Posteriormente se realiza una cromatografía en columna utilizando sílica gel 60 (47 veces en peso), y como solvente de elusión una mezcla de diclorometano/metanol en proporción 20:1. El producto aislado se purifica mediante cristalización desde una mezcla diclorometano/éter de petróleo. Se obtiene 419 mg un sólido blanco (rendimiento: 54 %).

Punto de fusión: 47-47,5 °C

Rf: 0,72 (CH₂Cl₂/ MeOH 20:1)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5,01 (t, *J*= 6,5 Hz, 1H, NH-β-Ala), 4,50 (t, *J*= 6,1 Hz, 1H, NH hexil), 3,72 (s, 3H, O-CH₃), 3,31 (AM₂X₂, *J*= 6,5, 6,2Hz, 2H, N-CH₂-β-Ala), 3,04-2,97(m, 2H, N-CH₂-hexil), 2,64 (t, *J*= 6,1 Hz, 2H, CH₂-CO β-Ala), 1,58-1,48(m, 2H, CH₃-CH₂-hexil), 1,29 (m, 6H, CH₂-CH₂hexil), 0,92-0,86 (m, 3H, CH₃-hexil) .

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 172,46(C=O ester), 51,96 (O-CH₃), 43,45 (N-C-hexil), 38,91 (N-C-β-Ala), 34,10 (C-CO),31,45 (α-C-hexil), 29,86 (β-C-hexil), 26,59 (δ -C-hexil), 22,74 (δ-C hexil), 14,22 (CH₃-hexil).

IR (KBr):3465-3296(N-H), 2956-2852 (C-H, OCH₃),1741 (C=O), 1332 (SO₂asim), 1199 (SO₂ sim).

Análisis Elemental: % Calculado para C₁₀H₂₂N₂O₄S PM: 266,36; C 45.1,H 8,3, N 10,5 ,S 12,0.
Experimental: C 45,3, H 8,4, N 10,4,S 11,9.

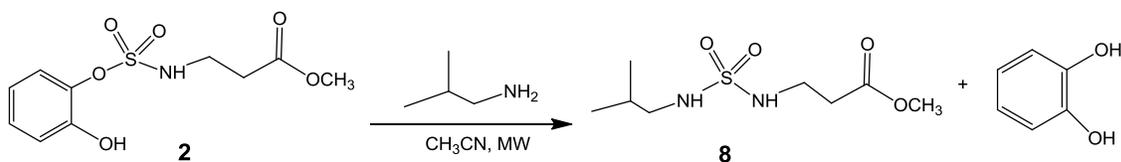
- **Método convencional**

En un tubo de reacción previamente seco, al que se adapta agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se colocan 3,77 mmol (1,05 g) de sulfamato de 2-hidroxifenil-β-alaninato de metilo (**2**) y 7 mL de acetonitrilo seco. Cuando se observa una solución límpida se adiciona mediante goteo, 4,15 mmol (0,42 g, 0,56 mL) de hexilamina (Peb: 132°C, δ: 0,76 g/mL). El medio de reacción se lleva a reflujo con baño externo a una temperatura de 90-100 °C, durante 17 h. Se observa una solución de tonalidad rojiza que se deja llegar a temperatura ambiente y se concentra en evaporador rotatorio. Se advierte la presencia de un aceite color caramelo, que se seca en tambor a vacío hasta peso constante de 1,67 g. El mismo se diluye en 80 mL de acetonitrilo y se trata con γ-Al₂O₃ (3 x 8,5 g), durante 5-10 minutos y posteriormente se filtra. El filtrado obtenido se concentra y seca hasta peso constante de 647 mg de un aceite color caramelo. Luego se realiza una cromatografía en columna utilizando sílica gel 60 (47 veces en peso), y como solvente de elusión una mezcla de diclorometano /metanol en proporción 20:1. El producto aislado se purifica mediante cristalización desde una mezcla diclorometano/éter de petróleo. Se obtiene 334 mg un sólido blanco (rendimiento: 33 %).

Pf:44-46°C

Rf: 0,72 (CH₂Cl₂ : MeOH 20:1)

Síntesis de N'-isobutil- sulfamoil-N-β-alaninato de metilo (8)



En un tubo de reacción para microondas, bajo atmosfera de nitrógeno seco, se coloca una solución compuesta por 3,64 mmol (1,02 g) de sulfamato 2-hidroxifenil-N-β-alaninato de metilo (**2**), 5 mL de acetonitrilo (seco sobre tamiz molecular 4Å) y mediante goteo, 4,36 mmol (0,44 mL) de isobutilamina (Peb: 69 °C, δ: 0,736 g/mL). Esta mezcla se lleva al reactor de microondas donde se irradia durante 20 minutos a una temperatura de 120 °C y con agitación magnética. Al finalizar la reacción se observa una solución rojiza.

El medio de reacción se diluye en 20 mL de acetonitrilo y se trata con γ-Al₂O₃ (3 x 4,24 g) durante 5-10 minutos. Se separa el adsorbente del medio y el filtrado resultante se concentra en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, y se obtienen 605 mg de un aceite color naranja. Este producto crudo se cristaliza desde diclorometano/éter de petróleo obteniéndose 416 mg de producto cristalizado blanco-nacarado (rendimiento 48%).

Punto de fusión: 42-43 °C.

Rf: 0,66 (CH₂Cl₂/ MeOH 20:1)

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 5,02(t, J= 6,3 Hz, 1H , NH-β-Ala), 4,58 (t, J= 6,2Hz, 1H, NH-isobutil), 3,72 (s, 3H , O-CH₃), 3,30(dd, J= 6,3, 6,3Hz, 2H, N-CH₂-β-Ala), 2,85(t, J= 6,5Hz, 2H, CH₂-CO β-Ala), 2,64 (t, J = 6,1 Hz, 2H, CH₂-Isobutil), 1,91-1,70(m, 1H,CH-isobutil), 0,95 (d, J =6,3 Hz, 6H, CH₃)

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 172,83 (CO), 52,19 (O-CH₃), 50,78 (N-C-isobutil), 38,91 (N-C-β-Ala), 34,12 (C-CO), 28,49 (CH-isobutil), 20,23 (CH₃).

IR (KBr): 3280(N-H), 2958-2873 (C-H, OCH₃), 1749 (C=O), 1311 (SO₂asim), 1132 (SO₂ sim)

EM (ES)+Calculado para C₈H₁₈N₂O₄S m/z: 238,10 (100%). Experimental [M+H]⁺ 239,1 (100%)

- **Método convencional**

En un tubo de reacción previamente seco, se adapta agitación magnética y en atmósfera de nitrógeno se colocan 1,69 mmol (400mg) de sulfamato de 2-hidroxifenil- β -alaninato de metilo **(2)** y 6 mL de acetonitrilo seco. Cuando la mezcla resulta homogénea se adiciona mediante goteo, 1,90 mmol (140 mg ,0,19 mL) de isobutilamina (Peb:69 °C, δ : 0,736 g/mL). El medio de reacción se lleva a reflujo con baño externo a una temperatura de 40-50° C en atmósfera de nitrógeno seco durante 29 h. Se observa una solución de tonalidad rojiza, controlada por CCD, y se observa una probable descomposición del reactivo (2) no llegándose a obtener el producto esperado. Luego de este resultado se repite la reacción aumentando la temperatura a 60-70°C, obteniéndose el mismo resultado, motivo por el cual la preparación del compuesto se descarta.

Síntesis de Sulfamatos derivados de L-Valina y de L-fenilalanina metilester

Como se detalló en el capítulo III de este trabajo de tesis, la preparación de los sulfamatos derivados de valina y fenilalanina metilester no pudo ser realizada eficientemente siguiendo la vía sintética exitosa para el derivado del sulfamato de β -alanina metil ester (2).

En estos casos la reacción entre catecol sulfato y los aminoesteres se realizó de manera similar a la del compuesto 2, pero se obtuvo una variada mezcla de compuestos entre los que se separa, purifica e identifica al producto deseado y la sulfamida N, N'-disustituida.

Sin bien, se pudo separar una cantidad mínima de cada compuesto, la masa del producto de interés resulta insuficiente para la etapa posterior donde el mismo será utilizado como reactivo de partida, por lo que se concluyó que no resulta conveniente esta vía sintética. A continuación se describirá brevemente los procedimientos realizados así como los compuestos que pudieron ser identificados.

Síntesis de sulfamato de 2-hidroxifenil-N-L-valinato de metilo (9)

En primer lugar se sintetizó al compuesto según la técnica descrita anteriormente para el compuesto **(2)**, en igual proporción entre los reactivos, esto es 1.1:1 de catecol sulfato/clorhidrato de L-valina metil ester, para lo cual se llevó la mezcla de reacción en

microondas a 45°C durante 75 minutos. Al controlar mediante CCD se observa la desaparición de los productos de partida y la formación de un gran número de productos, por lo que se intentó aislar al compuesto de interés mediante cromatografía en columna, utilizando una mezcla diclorometano/metanol en proporción 20:1. Este procedimiento sólo permitió aislar a uno de los tantos compuestos, en este caso la sulfamida simétrica, que posteriormente se purificó por cristalización con mezcla de diclorometano/éter, obteniendo 444 mg (6%) de N,N'-Sulfonil-bis-L-valina-dimetilester. Por esto se decidió aislar el producto de interés utilizando cromatografía en columna con distintas proporciones de mezclas de solvente, sin llegar a un resultado positivo. Se optó entonces, por variar distintos parámetros como ser la relación catecol/aminoácido, temperatura, sin lograr separar el producto deseado de la mezcla de reacción.

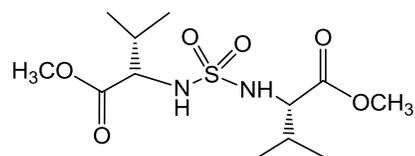
La segunda ruta sintética ensayada se basó en la síntesis tradicional, a temperatura ambiente. Para ello se utilizó la misma proporción en mmol de reactivos, a temperatura ambiente y durante 18h. Al cabo del cual se procedió a aislar el Sulfamato mediante cromatografía en columna (diclorometano/metanol 20:1), con lo que se logró separar, luego de purificar la misma mediante cristalización con mezcla diclorometano/éter, 287,9mg (5,8% de rendimiento) de sulfamato 2-hidroxifenil-N-L-valinato de metilo, cantidad que resulta insuficiente para poder proseguir con la siguiente etapa de síntesis. A continuación se detallan los datos obtenidos en la caracterización de cada compuesto aislado.

Síntesis de sulfamato 2-hidroxifenil-N-L-valinato de metilo (9)

N, N'-Sulfonil-bis-L-valina-dimetilester

Punto de fusión: 76-79°C (bibliografía: 78-79 °C)^[3]

Rf: 0,65 (CH₂Cl₂/ MeOH 20:1)



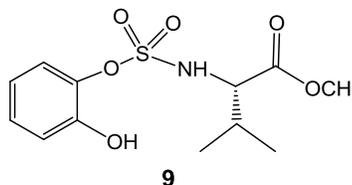
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5,09 (s, 2H, NH), 3,88 (s, 2H, CH-N), 3,80 (s, 6H, OCH₃), 2,19–2,15 (m, 2H, CH), 1,02 (d, J= 6,8 Hz, 6H, CH₃), 0,91 (d, J= 6,9 Hz, 6H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 172, 66 (C=O ester), 60,70 (C-N), 52,31 (OCH₃), 31,25 (CH), 18,83 (CH₃), 17,65 (CH₃).

Sulfamato de 2-hidroxifenil-N-L-valinato de metilo (9)

Punto de fusión: 69-71°C

Rf: 0,57 (CH₂Cl₂/MeOH 20:1)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6,90-7,29 (m, 4H, H-arómicos), 6,82 (s, 1H, OH), 5,55 (s, 1H, NH), 4,14 (s, 1H, CH-N), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 2,19-2,25 (m, 1H, CH), 0,96-1,06 (dd, J = 6,8 Hz, 6,9 Hz, 6H, CH₃).

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 172,36 (C=O ester), 148,16 (C-OH), 137,72, 128,30, 122,99, 120,82, 118,24 (C^{1,3,4,5,6}Ar), 62,74 (C-N), 53,07 (OCH₃), 31,48 (CH), 18,79 (CH₃), 17,37 (CH₃).

IR (KBr): 3272 (O-H), 2983-2881 (C-H, OCH₃), 1714 (C=O), 1371 (SO₂asim), 1168 (SO₂ sim).

Análisis Elemental: % Calculado para C₁₂H₁₇NO₆S PM 303.30, C 47.5, H 5.6, N 4.6, S 10.6
Experimental : C 47.7, H 5.8, N 4.7, S 10.6.

Síntesis de Sulfamato de 2-hidroxifenil-N-L-fenilalaninato de metilo (10)

Como en el caso anterior para sintetizar este compuesto, se ha seguido la misma vía sintética que el compuesto **(2)**, por ello en la reacción se utiliza la misma relación entre reactivos (1.1: 1 de catecol sulfato: clorhidrato de fenilalanina metilester) y se coloca en reactor de microondas durante 9 minutos a 100°C, y con agitación magnética al cabo del cual se pudo constatar por CCD la ausencia de los reactivos de partida, y la aparición de numerosos compuestos. Al igual que en la técnica anterior, se intentó aislar el compuesto de interés

mediante cromatografía en columna utilizando como mezcla de elusión, diclorometano/metanol 10:1, logrando separar y purificar, mediante cristalización, desde una mezcla diclorometano/éter, uno de los componentes de mayor RF (59,2 mg, 3% rendimiento). Mediante el análisis del espectro de RMN de H y C13, se comprobó que el producto obtenido no era el esperado. Por ello se decidió llevar a cabo la reacción sin el uso de microondas, ya que se han variado parámetros como ser temperatura, proporción de cada reactivo sin tener éxito.

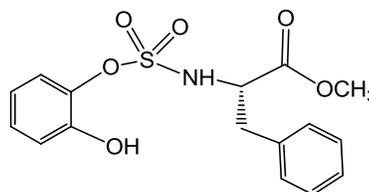
La síntesis se efectúa a temperatura de 50-60°C con baño externo durante 44 h con la misma relación entre los reactivos, se observa por CCD varios productos por lo que el aislamiento del producto de interés se realiza nuevamente por cromatografía en columna utilizando como fase móvil una mezcla de Hexano/acetato de etilo 6:4. El compuesto aislado es purificado por cristalización con diclorometano/hexano. Se obtiene 125 mg (25%) del sulfamato de 2-hidroxifenil-N-L-fenilalaninato de metilo, que como ya se discutió anteriormente no resulta cantidad suficiente para proseguir con la siguiente etapa de síntesis. A continuación se indican los datos obtenidos en los análisis realizados.

Sulfamato de 2-hidroxifenil-N-L-fenilalaninato de metilo (10)

Punto de fusión: 118-119°C

Rf: 0,50 (CH₂Cl₂/ MeOH 40:1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6,86-7,39 (m, 9H, H-



aromáticos), 5,36-5,29 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, NH), 4,58 (m, 1H, CH), 3,81 (s, 3H, OCH₃), 3,19–3,14 (m, 2H, CH₂-bencil).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171,49(C=O ester), 148,22(C-OH), 134,18 (C-O), 134,18 129,31, 128,97, 128,42 (C^{4,3,2,1} Ar-bencil), 127,77, 123,29, 120,55, 118,01(C^{3,4,5,6}Ar), 58,64(CH), 52,74 (OCH₃), 38,79 (CH₂-bencil).

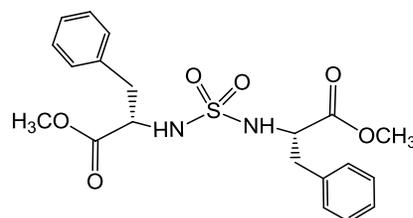
IR (KBr) cm⁻¹: 3458(O-H), 3282 (N-H) 2954-2867 (C-H,OCH₃),1743 (C=O), 1363 (SO₂asim) , 1166 (SO₂ sim).

N, N'-Sulfonil-bis-L-fenilalanina dimetil ester

Punto de fusión: 117-118°C

Rf: 0,67 (CH₂Cl₂/ MeOH 40:1)

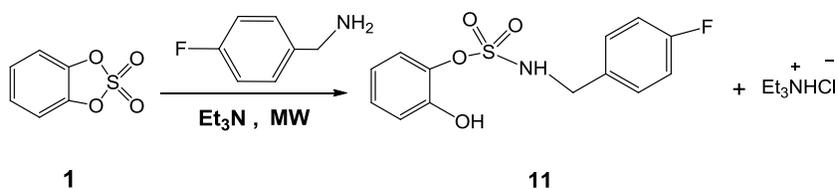
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,25-7,33 (m, 10H, H-aromáticos) 4,93-4,91 (d, $J = 9,4$ Hz, 2H, NH), 4,26-4,21 (m, 2H,CH), 3,71 (s, 6H,OCH₃), 3,05-2,89 (m, 4H,CH₂-bencil).



¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 171,77(C=O ester), 135,05, 129,46, 128,65, 127,36, (C^{4,3,2,1} Aromáticos), 56,47(CH), 52,47(OCH₃), 38,71(CH₂-bencil).

Dado que las vías sintéticas propuestas en la obtención de los Sulfamatos de 2-hidroxifenil-N-L-fenilalanina/valina metilester no han resultado efectivas, se optó por llevar a cabo la reacción mediante la formación del sulfamato de arilo/alquilo y la posterior reacción de este producto con el aminoester correspondiente.

Síntesis de N-p-fluorobencil-O-(2-hidroxifenil) Sulfamato (11)



En un vial de microondas, bajo atmosfera de nitrógeno seco, se coloca una solución de 16.83 mmol (2,91 g) de catecol sulfato (1), sintetizado previamente, en 2 mL de diclorometano

anhidro y se adiciona gota a gota 16,83 mmol (2,30 mL) de trietilamina (Peb: 89,5°C, δ : 0,726 g/mL). Esta mezcla de reacción se coloca en baño de hielo, y se adiciona mediante goteo 16,83 mmol (1,70mL) de p-flúorbencilamina (Peb: 185°C, δ : 1,095 g/mL). El sistema se lleva a microondas, donde se lo irradia durante 3 minutos con agitación magnética y a una temperatura de 55°C. Se obtiene una solución amarilla al que se adiciona 35 mL de diclorometano para proceder al lavado de la fase orgánica con solución de ácido clorhídrico 5N (2x 15mL), luego con solución saturada de cloruro de sodio (2x 15 mL) y finalmente con agua (2x 15 mL).

La fase orgánica se seca con sulfato de sodio, se filtra y se elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, a peso constante, obteniéndose 6,38 g (sólido pastoso amarillo).

Al producto crudo se le realiza una cromatografía en columna de sílica gel 60 (40 veces en peso) utilizando una mezcla diclorometano/metanol en proporción 40:1 como solvente de elusión. Se colectan 315 fracciones de 1-3 mL, las cuales se controlan mediante CCD. Se reúnen las fracciones 210-315, que presentan el mismo RF por CCD, para purificarlas mediante cristalización desde diclorometano. Se obtiene un sólido blanco de masa 1,91 g (rendimiento: 38 %)

Punto de fusión: 129-130 °C

Rf: 0, 53 (CH₂Cl₂/MeOH 40:1)

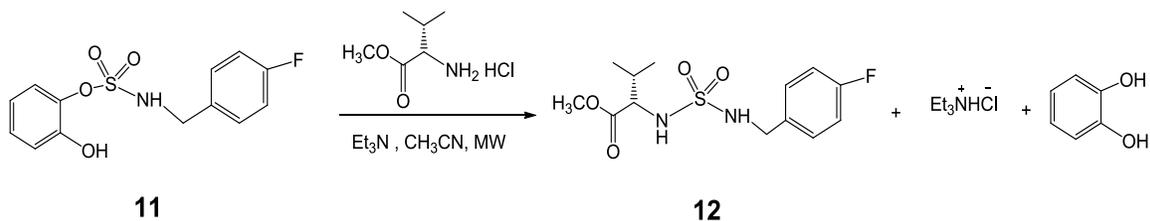
¹H NMR (300 MHz, DMSO) 7,39-6,77 (m, 8H, aromáticos), 6,97 (s, 1H, OH), 4,28 (s, 1H, NH) 3,31 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 163,55, 160,33 (C⁴-F), 150,31 (C-OH), 138,18 (C-O), 134,32, 130,27, 127,70 (C^{3,2,1}-Ar-F), 123,95, 119,52, 117,87,115,40 (C^{3,4,5,6} Ar-OH), 39,97 (CH₂).

¹⁹F NMR (282 MHz, DMSO) δ -115,66 (C-F)

IR (KBr) :3423 (O-H), 3282 (N-H), 2958-2860 (C-H, OCH₃), 1363 (SO₂ asim), 1155 (SO₂ sim), 1220(C-F).

Análisis Elemental: % Calculado para C₁₃H₁₂FNO₄S: PM 297.30: C 52.5, H 4.1, N 4.7, S 10.8. Experimental: C 52.3, H 4.2, N 4.8, S 10.9

Síntesis de N'-(p-fluorobencil) sulfamoil-N-L-valinato de metilo (12)

En un tubo de reacción de microondas, bajo atmósfera de nitrógeno seco, se prepara una solución conteniendo 2,37 mmol (705 mg) de N-p-fluorobencil-O-(2-hidroxifenil) Sulfamato (11), sintetizado previamente en el laboratorio, 2,37 mmol (390 mg) de clorhidrato de L-valina metilester y 5 mL de acetonitrilo (seco sobre tamiz molecular 4Å). A esta solución se adiciona mediante goteo 5,4 mmol (0,65 mL) de trietilamina (Peb: 89,5°C, δ : 0,726 g/mL), se lleva al reactor de microondas donde se irradia durante 20 minutos con agitación magnética y a 120 °C. Se obtiene una solución límpida de color amarilla, que se concentra en evaporador rotatorio y se seca en tambor de secado hasta peso constante.

Al producto crudo, un sólido pastoso amarillo, se lo disuelve en 30 mL de diclorometano y se lava esta solución. Inicialmente se utiliza una solución de HCl 2,5 N (1x 15 mL), luego con solución saturada de NaCl (1 x 15 mL) y finalmente con H₂O destilada (1x 20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, hasta peso constante de 690 mg (sólido pastoso amarillo).

El producto se disuelve en 30 mL de acetonitrilo y se trata con γ -Al₂O₃ (2 x 3,75 g) durante 5-10 minutos. El adsorbente se separa mediante filtrado y a la solución resultante se elimina el solvente en evaporador rotatorio. Luego se seca el producto crudo en tambor de vacío, a peso constante de 447 mg. Este producto se purifica mediante cristalización desde una mezcla de diclorometano/hexano y se obtiene 338 mg un sólido blanco (rendimiento: 45%).

Punto de fusión: 70-71°C

Rf: 0,56 (CH₂Cl₂/MeOH 40:1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,32–7,29 (m, 2H, H-Aromático), 7,07–6,93 (m, 2H, H-Aromático), 5,10 (d, J = 6,8 Hz, 1H, NH- β -Ala), 4,57 (s, 1H, N-CH₂- β -Ala), 4,23–4,16 (m, 2H, CH₂-bencil), 3,87-

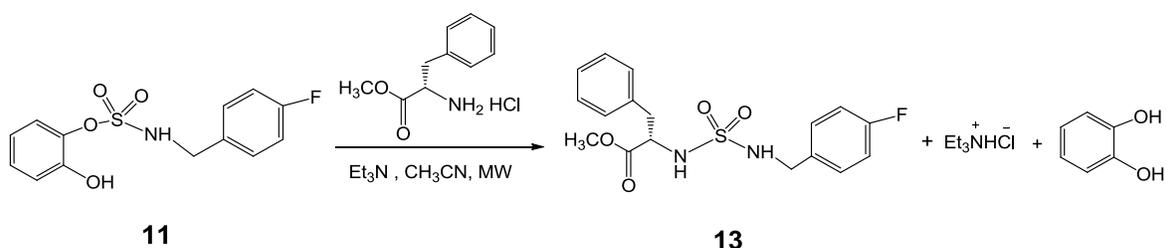
3,85 (m, 1H, CH-N), 3,75 (s, 3H, OCH₃), 2,17–2,10 (m, 1H, CH), 1,03 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, CH₃), 0,93 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, CH₃).

¹³ C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 172,90 (C=O ester), 163,02, 161,41 (C-F), 132,11 (C¹), 129,6 (C³), 115,19 (C²), 61,58 (CH-N), 52,62 (O-CH₃), 46,19 (CH₂-bencil), 30,85 (CH), 19,42 (CH₃), 16,66 (CH₃).

IR (KBr) cm⁻¹: 3313 (N-H), 2973-2881 (C-H, OCH₃), 1743 (C=O), 1321 (SO₂ asim), 1143 (SO₂ sim), 1234 (C-F).

Análisis Elemental: %Calculado para C₁₃H₁₉FN₂O₄S PM 318,1: C 49,0, H 6,0, N 8,8, S 10,1. Experimental : C 49,3, H 6,1, N 8,5, S 10,1.

Síntesis de N⁻(p-fluorobencil) sulfamoil-N-L-fenilalaninato de metilo (13)



En un tubo de reacción de microondas, bajo atmósfera de nitrógeno seco, se prepara una solución compuesta por 3,38 mmol (1,0 g) de N-p-fluorobencil-O-(2-hidroxifenil) Sulfamato (**11**), sintetizado previamente en el laboratorio, 3,38 mmol (730 mg) de clorhidrato de L-fenilalanina metiléster y 5 mL de acetonitrilo seco, sobre tamiz molecular 4Å. A esta solución se adiciona mediante goteo 6,76 mmol (0,93 mL) de trietilamina (Peb: 89,5°C, δ: 0,726 g/mL) y se observa la aparición de un sólido en suspensión. Se lleva al reactor de microondas donde se irradia durante 25 minutos, con agitación magnética y a 120 °C obteniéndose una solución límpida amarilla, que se concentra en evaporador rotatorio y se seca en tambor de vacío, a peso constante. Al producto crudo, un sólido pastoso amarillo, se lo disuelve en 20 ml de diclorometano y se lava inicialmente con solución de HCl 2.5M (1x 5 mL), luego con solución saturada de NaCl (1 x 5 mL) y finalmente con H₂O destilada (2x 5mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y se elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca el crudo en tambor de vacío a temperatura ambiente, hasta peso constante de 1,10 g (aceite amarillo).

El producto se disuelve en 30 mL de acetonitrilo y a esta solución se trata con $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (2 x 5,58 g) durante 5-10 minutos. Se separa el adsorbente del medio y se elimina el solvente del filtrado mediante evaporación a presión reducida. Se seca el crudo en tambor de vacío a temperatura ambiente hasta un peso constante de 718mg (sólido amarillo). Este se purifica mediante cristalización desde una mezcla diclorometano/éter etílico y se obtiene un cristalizado blanco de masa 495 mg (rendimiento: 41 %)

Punto de fusión: 64-65°C

Rf: 0,71(CH₂Cl₂/MeOH 40:1)

¹H NMR(300 MHz, DMSO) δ 7,33-6,96 (m, 9H, Aromáticos), 4,95 (d, $J = 6,4$ Hz, 1H, NH-CH₂-L-fenilalanina), 4,42 (pico ancho, 1H, NH-p-fluorbencil), 4,30-4,23 (m, 1H, CH), 4,01-3,84 (dd, 2H, CH₂-Ar-F), 3,60 (s, 3H, O-CH₃), 3,15-2,94 (dd, 2H, CH₂-bencil).

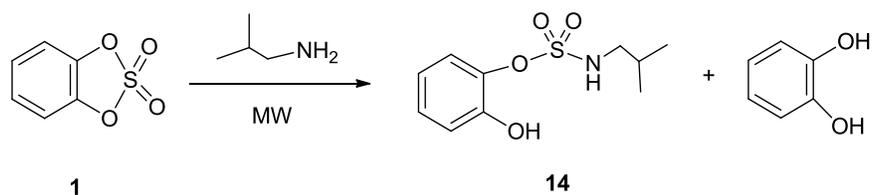
¹³C NMR(75 MHz, DMSO) δ 173,17(C=O ester), 162,73, 160,60 (C-F), 134,75, 129,91, 115,23 (C^{3,2,1}-Ar-F), 137,43, 129,09, 127,24, 115,40 (C^{5,6,7,8}-Ar), 57,63 (CH), 52,24 (O-CH₃), 44,81 (CH₂-Ar-F), 38,41 (CH₂-bencil).

¹⁹F NMR (282 MHz, CDCl₃) δ -114,63.

IR (KBr) cm^{-1} : 3280 (N-H), 2962-2873 (C-H, OCH₃), 1726 (C=O), 1326 (SO₂asim), 1145 (SO₂ sim), 1216 (C-F).

Análisis Elemental: %Calculado para C₁₈H₂₁FN₂O₄S PM 380.43: C 55.7, H 5.2, N 7.6, S 8.7. Experimental :C 55.4, H 5.2, N 7.5, S 8.5

Síntesis de *N*-isobutil-*O*-(2-hidroxifenil) Sulfamato (**14**)



En un vial de microondas, bajo atmosfera de nitrógeno seco, se colocan 14 mmol (2,47g) de catecol sulfato (**1**) sintetizado previamente en el laboratorio, y se agrega mediante goteo 16 mmol (1,42 mL) de isobutilamina (Peb: 69 °C, δ : 0,736 g/mL).

La mezcla de reacción se lleva a microondas, donde se irradia durante 15 minutos con agitación magnética y a una temperatura de 60°C, obteniéndose una solución color caramelo. La misma se concentra en evaporador rotatorio y luego se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, obteniéndose un aceite color caramelo, al cual se le adiciona 25 mL de diclorometano para proceder al lavado mediante la adición de solución de ácido clorhídrico 5N (2x 10mL), luego con solución saturada de cloruro de sodio (2x 10 mL) y finalmente con agua (2x 10 mL).

La fase orgánica se seca con sulfato de sodio, se filtra y se elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, a peso constante, obteniéndose 3,34 g (sólido pastoso amarillo).

Al producto crudo se le realiza una cromatografía en columna de silica gel 60 (38 veces en peso) utilizando una mezcla de diclorometano/metanol en proporción 20:1 como solvente de elusión. Se colectan 232 fracciones de 1-3 mL cada una, las cuales se controlan mediante CCD. Se reúnen las fracciones 105-206 y se obtienen 2.28 g de aceite incoloro (rendimiento: 65%).

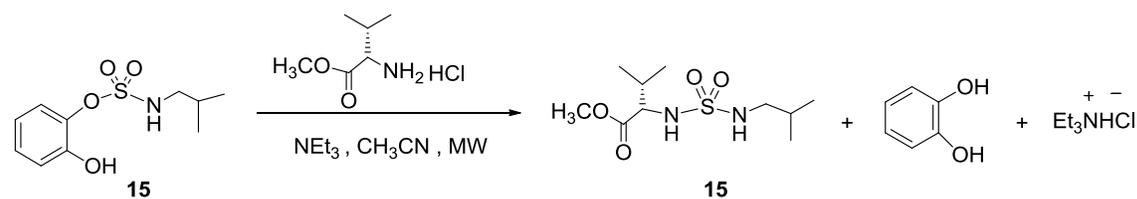
Rf producto: 0,62 (CH₂Cl₂/MeOH 40:1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,29–6,93 (m, 4H, H-Ar), 6,37 (s ,ancho, 1H,OH), 5,05 (s, 1H, NH), 3,11-3,08 (t, J = 6.5 Hz, 1H,N-CH₂), 1,90-1,80 (m, 1H, CH), 0,98-0,96 (d, J= 6,7 Hz, 6H, CH₃).

¹³CNMR (126 MHz, CDCl₃)δ 148,49 (C-OH), 137,31 (C¹Ar), 128,29, 122,70, 120,83, 117,99 (C^{2,3,4,5}Ar), 51,54 (N-C), 28,80 (CH) , 19,68 (CH₃).

IR (KBr)cm⁻¹: 3448 (O-H), 3280 (N-H), 1360 (SO₂asim), 1166 (SO₂ sim).

Síntesis de N`-isobutil sulfamoil N-L-valinato de metilo (15)



En un tubo de reacción de microondas, bajo atmósfera de nitrógeno seco, se coloca una solución compuesta por 3,55 mmol (870 mg) de N-isobutil-O-(2-hidroxifenil) Sulfamato (**15**), previamente sintetizado, 3,56 mmol (608 mg) de clorhidrato de L-valinametilester y 5 mL de

acetonitrilo (seco sobre tamiz molecular 4Å). A esta solución se adiciona mediante goteo 7,10 mmol (0,92 mL) de trietilamina (Peb: 89,5°C, δ : 0,726 g/mL), observándose la aparición de un sólido en suspensión. Se irradia en el reactor de microondas durante 30 minutos a 120 °C y con agitación magnética, obteniéndose una solución naranja que se concentra en evaporador rotatorio y se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente. Se obtiene un sólido pastoso color naranja, el cual se disuelve en 10 mL de diclorometano y se lava inicialmente con solución de HCl 5% (1x 3 mL), luego con solución saturada de NaCl (1 x 5 mL) y finalmente con H₂O destilada (1 x 5mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra el desecante y el filtrado se concentra en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de secado a temperatura ambiente, obteniéndose un aceite caramelo de peso constante de 929 mg.

El producto se disuelve en 30 mL de acetonitrilo y se trata con γ -Al₂O₃ (2 x 5,95 g) durante 5-10 minutos. El adsorbente se separa del medio y al filtrado se le elimina el solvente en evaporador rotatorio. Finalmente se seca en tambor de vacío a peso constante en donde se obtiene 613 mg (65%) de un aceite amarillo, puro por CCD.

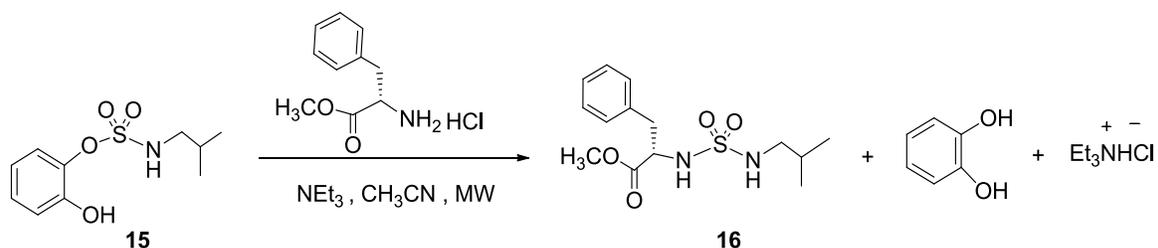
Rf: 0,56 (CH₂Cl₂/MeOH 40:1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5,01 (s, 1H, NH-isobutil), 3,81 (s, 1H, CH-N-Valina), 3,79 (s, 3H, OCH₃), 2,91–2,83 (m, 2H, CH₂), 2,15–2,09 (m, 1H, CH-valina), 1,86–1,75 (m, 1H, CH-isobutil), 1,04–0,93 (m, 12H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 173,22 (C=O ester), 61,21 (CH-N-Valina), 52,30 (OCH₃), 50,55 (CH₂), 31,44 (CH-valina), 28,35 (CH-isobutil), 19,94 (CH₃-valina), 19,17 (CH₃-isobutil), 17,38 (CH₃-valina).

Análisis Elemental: % Calculado para C₁₀H₂₂N₂O₄S PM 266.36; C 45.1 ,H 8.3, N 10.5 ,S 12.0 .Experimental : C 44.9, H 8.5, N 10.7,S 12.1

Síntesis de N'-isobutil sulfamoil-N-L-fenilalaninato de metilo (16)



En un tubo de reacción de microondas, bajo atmosfera de nitrógeno seco, se prepara una solución de 3,17 mmol (778 mg) de N-isobutil-O-(2-hidroxifenil) Sulfamato (**15**), 3,17 mmol (683 mg) de clorhidrato de L-valina metilester en 5 mL de acetonitrilo seco, sobre tamiz molecular. A esta solución se adiciona, mediante goteo, 6,34 mmol (0,82 mL) de trietilamina (Peb: 89,5°C, δ : 0,726 g/mL). Se irradia en reactor de microondas durante 20 minutos con agitación magnética a 120 °C y el medio de reacción resultante (solución amarilla) se concentra a presión reducida. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente obteniéndose un aceite color amarillo. El producto se disuelve en 10 mL de diclorometano y se lava inicialmente con HCl 5%

(1x 3 mL), luego solución saturada de NaCl (1 x 5 mL) y finalmente H₂O destilada (2 x 5mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra el desecante y elimina el solvente a presión reducida. Se seca en tambor de vacío a temperatura ambiente, y se obtienen 862 mg de un aceite amarillo. El producto se diluye en 25 mL de acetonitrilo y se trata con γ -Al₂O₃ (2 x 5,50 g) durante 5-10 minutos. Se separa el adsorbente mediante filtrado, y a la solución resultante se le elimina el solvente en evaporador rotatorio. Se seca en tambor de vacío, a temperatura ambiente hasta obtener un aceite amarillo de peso constante de 614mg. Posteriormente este aceite fue purificado mediante cromatografía en columna de sílica gel 60 (42 veces en peso) utilizando diclorometano como solvente de elusión. Se colectan 86 fracciones de 1-3 mL las cuales fueron controladas mediante CCD. Posteriormente se aumenta la polaridad con mezcla de solventes diclorometano/metanol hasta llegar a una relación 40:1. Se juntan 80 fracciones más de 2-3 mL cada una y se reúnen las fracciones 125-160 las cuales se filtraron a través de placa de vidrio fritada, y se obtienen 555mg (55,5 %) de un aceite amarillo.

Rf producto: 0,55 (CH₂Cl₂/MeOH 40:1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,35–7,20 (m, 5H, Ar-H), 4,93(s ancho, 1H, NH-fenil-Ala), 4,26 (s ancho, 1H, NH-isobutil), 3,77 (s, 3H, O-CH₃), 3,16-2,99 (dd, J = 45,5, 45,5Hz, 2H, CH₂-bencil),

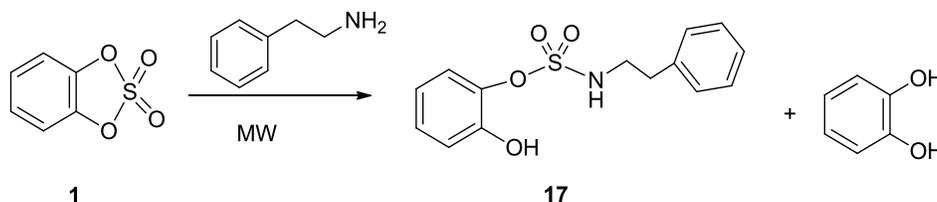
2,89-2,88 (d, 1H, CH-valina), 2,68-2,53 (m, 2H, CH₂-isobutil), 1,68-1,61 (m, 1H, CH-isobutil), 0,87-0,85 (m, 6H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 172,13 (C=O ester), 135,77, 129,61, 128,44, 127,44 (C^{1,2,3,4} Ar), 57,05 (CH-fenilalanina), 52,41 (O-CH₃), 50,18 (CH₂-isobutil), 38,69 (CH₂-bencil), 28,40 (CH-isobutil), 20,13 (CH₃), 50,78 (N-C-isobutil), 38,91 (N-C-β-Ala), 34,12 (C-CO).

IR(KBr): 3363-3284 (N-H), 2956-2877 (CH, OCH₃), 1743 (C=O), 1334 (SO₂asim), 1101 (SO₂ sim)

EM (ES)⁺Calculado para C₁₄H₂₂N₂O₄S m/z 314.13 (100%).Experimental[M+H]⁺ m/z 315,10 (100%)

Síntesis de N-fenetil-O-(2-hidroxifenil) Sulfamato (17)



En un tubo de reacción de microondas, bajo atmosfera de Nitrógeno seco, se coloca 12 mmol (2,09g) de catecol sulfato (**1**) al que se adiciona por goteo, 12 mmol (1,39 mL) de fenetilamina (Peb: 67°C, 1,1 mmHg) y 12 mmol (1,61 mL) de trietilamina (Peb: 89,5 °C, δ: 0,726 g/mL). Se irradia en reactor de microondas, durante 3 minutos con agitación magnética a una temperatura de 51°C, observándose una solución color café y un sólido blanco, se separa previa centrifugación, la fase sólida de la liquida. El sólido blanco se disuelve en 20 mL de diclorometano y se lava con solución de HCl 5% (2x 10 mL), luego con solución saturada de ClNa (1 x 10 mL) y finalmente H₂O destilada (1 x 5 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra el desecante y elimina el solvente en rotavapor. Se seca en tambor de secado a peso constante y a temperatura ambiente, obteniendo 4,28 g de un aceite de tonalidad rojiza. El aceite se aísla mediante cromatografía en columna de sílica gel (34 veces en peso) utilizando una mezcla de diclorometano/metanol en proporción 40:1 como solvente de elusión. Se colectaron 229 fracciones de 1-3mL, las cuales se controlaron mediante CCD. Se reunieron las fracciones 154-229, se evapora el solvente obteniéndose 1,76 g de un sólido

pastoso rosáceo. Este se purifica mediante cristalización desde diclorometano cristalizando un sólido blanco de masa 1,76 g (rendimiento. 51%).

Punto de fusión: 112-113 °C

Rf producto: 0,49 (CH₂Cl₂/ MeOH 80:1)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7,38-6,90 (m, 9H-arómicos), 6,15 (s, 1H, OH), 4,79 (s, 1H, NH), 3,58-3,54 (q, J =6,7 Hz, 2H, CH₂), 2,94-2,92 (t, J = 6,9 Hz, 2H, CH₂-bencil).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 148,35 (C-OH), 137,60 (C-O), 137,04, 129,02, 128,82, 128,49 (C^{1,2,3,4} Ar-fenetil), 127,19, 123,03, 121,20, 118,56 (C^{3,4,5,6}Ar), 45,67 (CH₂-bencil), 35,67 (C-CO).

IR (KBr)cm⁻¹ :3336(O-H) ,3292 (N-H), 2972-2873 (C-H,OCH₃), 1323 (SO₂asim), 1157 (SO₂ sim).

Obtenido este sulfamato se procedió a la síntesis de las sulfamidas derivadas de L-fenilalanina y L-valina, de manera análoga a la preparación de los compuestos 12, 13, 15 y 16. Sin embargo en este caso la vía sintética no resulto exitosa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DEL CAPITULO V

- [1]Perrín, D.D.;Armarego,W.L.F.;Perrín, D.R. *Purification of Laboratory Chemicals*,2da edición. Pergamon Press. (1980)
- [2]Dubois ,G.E.*The JournalofOrganicChemistry*45 (26), 5373-5375. (1980)
- [3]Kaiser,E. T.; Katz, I. R.; Wulfers, T. F. *Journal of the American Chemical Society* 20, 3781-3782. (1965)
- [4]Gavernet,L.;Elvira,J.; Samaja,G.; Pastore,V.; SellaCravero, M.; Enrique,A.; Estiu,G.; Bruno Blanch,L.*Journal of Medicinal Chemistry*,52, 1592–1601.(2009)

Capítulo VI

Evaluación de la Actividad Anticonvulsiva

EVALUACIONES BIOLÓGICAS

Consideraciones generales

En este trabajo se realizaron ensayos a nivel preclínico para evaluar la acción anticonvulsiva de los compuestos sintetizados. Para ello se siguieron los lineamientos propuestos por el programa del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos, [1] internacionalmente aceptado. Estos estudios implicaron el manejo de animales de laboratorio y estuvieron a cargo de otros miembros del LIDeB especialistas en el tema.

Como se ha detallado en el capítulo II, el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos con actividad biológica depende marcadamente de la elección de modelos biológicos apropiados, definidos en la etapa inicial de diseño de acuerdo al tipo de acción buscada.

En este trabajo de tesis además de cumplir el protocolo antes mencionado, los compuestos fueron evaluados en ensayos *in vitro* para analizar la capacidad inhibitoria frente a blancos moleculares específicos: diferentes isoformas de anhidrasa carbónica y un receptor inotrópico de ácido gamma-aminobutírico (GABA-A). tarea realizada por otros grupos de investigadores.

Estudios in vivo en modelos de epilepsia

Como se ha detallado en el capítulo 2, los estudios preclínicos en animales han jugado un rol fundamental en el desarrollo de los fármacos anticonvulsivos presentes en el mercado. [2] Estos pueden clasificarse de acuerdo a dos grandes categorías. [3]

1-Modelos de ataques agudos. En estos casos se provoca la convulsión en animales no epilépticos mediante un estímulo físico o químico, y se observa la capacidad del nuevo compuesto (previamente administrado) de evitar dichas convulsiones. Los modelos más usados son la inducción eléctrica (Maximal Electroshock Seizure test o ensayo MES) y la inducción química por administración de pentilentetrazol (ensayo PTZ o Met, Figura 6.1). [4]

En el ensayo MES se induce el episodio convulsivo mediante la aplicación de una descarga eléctrica controlada. Este es empleado como modelo de convulsiones tónico-clónicas, en donde las convulsiones tónicas se caracterizan por la rigidez e hipertonia en los miembros y las convulsiones clónicas por movimientos rápidos en forma de sacudidas. Al generar una crisis convulsiva por inducción eléctrica a un ratón, se puede presentar un cuadro que consta

de 3 fases que comprenden un período corto de flexión tónica, seguido de un período más largo de extensión tónica de los miembros posteriores y, finalmente, se observa un episodio clónico. Puede que en la evaluación, se cumplan las 3 fases, o sólo algunas de ellas. Se considera que un compuesto es efectivo en este modelo cuando es capaz de suprimir la extensión tónica de los miembros posteriores del animal. Es decir que dicha extensión no supera los 90 grados de inclinación con respecto al eje del cuerpo del animal durante la convulsión.^[4]

Si bien el modelo MES es uno de los más usados, debe mencionarse un modelo derivado de este test que ha sido empleado para evaluar la efectividad de compuestos contra crisis parciales.^[2,5-6] Se conoce como modelo de la convulsión psicomotora o de baja frecuencia (6 Hz) y se distingue de su predecesor (además del espectro de efectividad que evalúa crisis parciales) en que emplea una frecuencia del estímulo de 6Hz, una intensidad de 32 mA y una duración de 3 seg (MES emplea 60 Hz, 50 mA y 0,2 seg, respectivamente). Este ensayo ha servido para identificar anticonvulsivos inactivos frente a otros modelos agudos como MES y PTZ test.^[2]

En modelo de inducción con PTZ se induce la crisis convulsiva por la administración al animal de experimentación del agente convulsivante pentilentetrazol (Figura 6.1), generalmente en forma subcutánea. Este test ha sido sugerido como modelo de crisis de ausencia, evaluando la aparición y severidad de las convulsiones clónicas.^[7,8] Se considera que un compuesto administrado previamente protege frente a la convulsión por PTZ si este suprime la aparición de episodios clónicos con más de 5 segundos de duración.^[1,9]

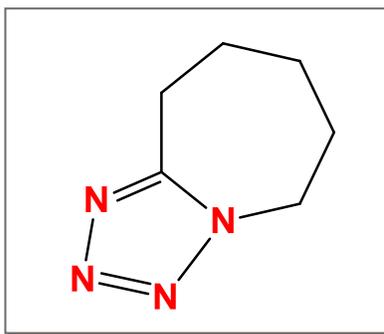


Figura 6.1-*Estructura química del pentilentetrazol.*

2- Modelos de epilepsia crónica. En estos test se busca que los animales manifiesten los ataques epilépticos en forma espontánea. Aquí se incluyen por ejemplo los modelos genéticos, donde los animales poseen epilepsia congénita, capaz de corresponderse con la epilepsia idiopática en humanos mejor que cualquier otro modelo experimental. [8,10]

Por razones prácticas, los ensayos más usados son los modelos de epilepsia aguda. Los ensayos MES y PTZ se realizan fácilmente, requieren animales no epilépticos y un bajo costo en equipamiento. Además, estos test proveen información valiosa respecto a la potencial actividad anticonvulsiva de un compuesto: pueden dar una idea inicial acerca de su biodisponibilidad en el sistema nervioso central y no son selectivos respecto de un único mecanismo de acción. Por el contrario, los modelos de epilepsia crónica son extremadamente laboriosos como para un testeo inicial, requieren mayor cantidad de recursos y demandan mucho mayor tiempo.

A diferencia del gran número de modelos aceptados para determinar la potencia y eficacia antiepiléptica de nuevos compuestos en las primeras etapas de investigación preclínica, existe un tipo de ensayo que se utiliza habitualmente en esta instancia para evaluar efectos adversos en ratones. Este es el test de Rotorod, el cual mide la posible capacidad neurotóxica de la nueva droga, evaluando sedación o ataxia. [1] Si bien este estudio nos brinda una información importante respecto de la toxicidad de los compuestos, hay un estudio más detallado utilizando animales epilépticos, [10] el cual resulta muy útil cuando se evalúan los efectos adversos de compuestos con mecanismos de acción nuevos (o al momento desconocidos). [10]

Los modelos de epilepsia agudos y el test de Rotorod se encuentran incluidos en un protocolo de testeo de anticonvulsivos propuesto por el sector dedicado a la epilepsia del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NINCDS-NIH) previamente mencionado, denominado Anticonvulsant Screening Program (ASP). [1] Actualmente, tanto en la industria como en el ámbito académico se siguen los lineamientos propuestos por el ASP, el cual consta de 7 fases (Tabla 6.1) tendientes a detectar características y magnitud de la acción anticonvulsiva, de la neurotoxicidad y de la tolerancia luego de la administración repetida del compuesto a evaluar. En este trabajo se realizaron las fases 1 y 2 del protocolo, las cuales se detallaran a continuación.

	Descripción	Especie animal	Vía de admin. ^a
	Identificación del nivel de actividad anticonvulsiva y neurotóxica.		
Fase 1	Ensayo MES y PTZ. Ensayo Rotorod	ratón	<i>i.p.</i>
	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica como ED ₅₀ , TD ₅₀ y PI.		
Fase 2	Ensayo MES y PTZ-Ensayo Rotorod	ratón	<i>i.p.</i>
	Perfil de toxicidad.		
Fase 3	LD ₅₀ - HD ₅₀	ratón	<i>i. p.</i>
	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva por vía oral para determinar las características de absorción y metabolismo.		
Fase 4		ratón	<i>p.o.</i>
	Diferenciación y comparación con drogas antiepilépticas conocidas para la determinación del mecanismo de acción.		
Fase 5	Ensayo de umbral convulsivo por PTZ Ensayo de umbral convulsivo por picrotoxina, bicuculina y por estriocnina. Estudios <i>in vitro</i> de unión a receptores	ratón	<i>i. p.</i>
Fase 6	Cuantificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica como ED ₅₀ , TD ₅₀ y PI de otras especies.	rata	<i>p.o.</i>
	Estimación de la dosis letal mínima (LD3) y de los efectos de administración prolongada.		
Fase 7	LD3 luego de administración diaria durante 3 días. Administración durante 5 días Ensayo de duración de sueño por hexobarbital Estudios <i>in vitro</i> de enzima microsomal (mutagenicidad)	rata	<i>p.o.</i>

Tabla 6.1. Descripción de las fases del programa ASP. ^a vía de administración: intraperitoneal (*i.p.*) u oral (*p.o.*). ED₅₀: dosis efectiva media, TD₅₀: dosis toxica media, PI: índice terapéutico, LD₅₀: dosis letal media, HD₅₀: dosis hipnótica media, LD3: dosis letal mínima.

dosis y tiempo. De acuerdo a los resultados encontrados en esta fase los compuestos ensayados pueden clasificarse en cuatro categorías, ^[11] que permiten decidir cuáles resultan promisorios para continuar con el protocolo y cuáles se descartan.

Las categorías son las siguientes: ^[11]

- *Categoría 1:* Compuestos que presentan actividad anticonvulsivante a dosis de hasta 100 mg/kg o menos. Estos compuestos pasan a la fase 2.
- *Categoría 2:* Compuestos que presentan actividad anticonvulsivante a dosis mayores a 100mg/kg. Puede o no seguir con futuras evaluaciones de acuerdo a lo novedoso de su estructura
- *Categoría 3:* Compuestos inactivos a dosis inferiores a 300 mg/Kg. Son excluidos en las futuras consideraciones.
- *Categoría 4:* Compuestos activos y tóxicos a dosis de 30 mg/Kg o menos, los cuales son reensayadas a una dosis menor a 30mg/Kg.

Con esta clasificación aquellos compuestos que no manifiesten actividad apreciable o alta neurotoxicidad pueden descartarse rápidamente (categorías 3 y 4), mientras que las más activas (categoría 1) pasan a la siguiente fase del programa. Las drogas con actividad intermedia (categoría 2), pueden considerarse o no de acuerdo a lo novedoso de su estructura química.

La Fase 2 del programa permite cuantificar la actividad anticonvulsiva y neurotóxica de un fármaco en ratones inyectados por vía intraperitoneal. Los valores de la dosis efectiva media (o dosis efectiva 50: ED₅₀) frente a los ensayos MES y PTZ son los parámetros más ampliamente usados para describir la potencia de los nuevos compuestos con acción anticonvulsiva. De manera similar se utiliza la dosis toxica media en Rotorod (TD₅₀), para medir la toxicidad. Estos valores constituyen la primera cuantificación preclínica de la potencial capacidad antiepiléptica de un compuesto para un determinado tipo de convulsión en humanos. Además, al ser cuantitativo, permite una comparación válida de potencias anticonvulsivas e índices terapéuticos entre compuestos nuevos y/o con distintas drogas antiepilépticas ya establecidas.

Para los cálculos de ED₅₀ (o TD₅₀) previamente debe determinarse el tiempo de efecto máximo (TEM) para cada test. Se evalúa la droga a una concentración fija a distintos tiempos, usualmente 30, 60, 120 y 240 minutos. Se emplean 3-6 animales por tiempo. Los porcentajes de protección (o neurotoxicidad) se grafican en función del tiempo y se determina el TEM por inspección visual de la curva obtenida (Figura 6.2).

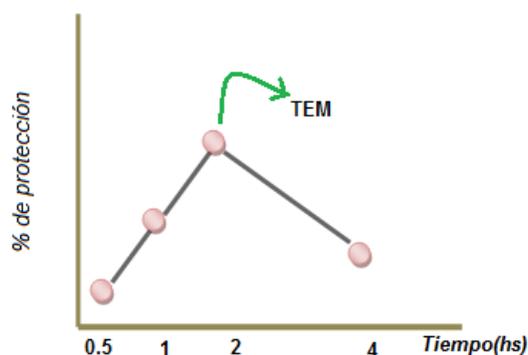


Figura 6.2. Determinación del tiempo de efecto máximo, a concentración fija

Posteriormente, se procede a calcular las ED₅₀ (en el caso del ensayo MES o el ensayo PTZ) y la TD₅₀ (empleando el ensayo RotoRod). Para esto se realiza el análisis de los resultados de la evaluación del compuesto a 4 dosis distintas, al TEM determinado previamente. Se utilizan grupos de 4 ratones por dosis y no se deben incluir aquellas concentraciones de compuesto que no generan protección ante las crisis (0 %) ni las que provocan protección total (100 %). Los porcentajes de protección a cada dosis, convertidos a probits,^[12] se grafican en función del logaritmo de la dosis (Figura 6.3). Mediante un método estadístico se elige la recta más adecuada, para luego interpolar a probit 5, el valor de la ED₅₀. El peso estadístico de la función propuesta se evalúa en base a los valores esperados y observados, obteniendo un valor de (Chi)² para la recta. Se considera que los datos no son significativamente heterogéneos si la suma de los valores de (Chi)² para cada dosis no sobrepasa un límite que depende de los grados de libertad del sistema.^[12]

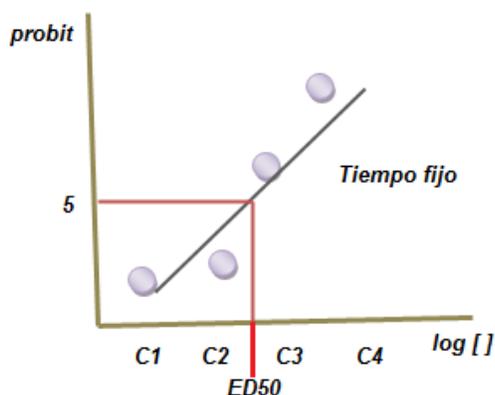


Figura 6.3. Determinación de la ED_{50}

A continuación se describen las condiciones experimentales y los resultados obtenidos respecto a la clasificación de los compuestos de acuerdo a la fase 1 del ASP y del cálculo de las dosis indicadas en la fase 2 de los compuestos más promisorios.

Procedimiento experimental de evaluación biológica

Para la evaluación de las drogas frente a los ensayos descritos se utilizaron ratones albinos Swiss adultos de 18-23 g de peso (Figura 6.4). Se eligieron animales machos de la misma edad y similar peso en cada ensayo, para minimizar la variabilidad biológica. Estos fueron adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y mantenidos en el bioterio de experimentación del área diseño de Fármacos de la Facultad de Ciencias Exactas de la misma universidad en una habitación exclusiva para el acondicionamiento de ratones (Figura 6.5), distinta a la sala de Ensayos Biológicos.



Figura 6.4- Ratones Swiss machos utilizados en los ensayos

Se mantuvieron en jaulas colectivas de hasta 12 animales, con alimento balanceado y agua *ad libitum*, bajo un régimen de ciclos día-noche de 12 horas (7am-7pm: día, 7pm-7am: noche). A los animales recién recibidos en el bioterio se les permitió estabilizarse durante por lo menos 72 horas antes de destinarlos a algún ensayo, para compensar las restricciones de agua y alimento y el estrés que pudieran sufrir durante su traslado. Este accionar es fundamental ya

que la inanición incrementa la severidad de las convulsiones provocadas por el Electroshock. En el momento de someterlos a los ensayos, los ratones se colocaron en compartimientos individuales hasta finalizadas las evaluaciones, las cuales se realizaron en la sala de Ensayos Biológicos (Figura 6.5). Luego los animales retornaron a las jaulas colectivas y cada lote de ratones correspondiente a cada ensayo se mantuvo en observación por separado durante 72 horas, para detectar posibles efectos tóxicos a largo plazo que pudieran llevar a la muerte de los animales. Los ensayos se iniciaron siempre a la misma hora del día.



Figura 6.5-Sala de acondicionamiento: a la izquierda jaula colectiva y a la derecha compartimientos individuales para ensayos

Para una correcta evaluación de los compuestos, estos deben administrarse a los animales en una solución, suspensión o emulsión homogénea. Para ello en el programa ASP admite la disolución de las drogas en solución fisiológica, metilcelulosa, ciclodextrina y/o polietilenglicol 400 (PEG 400), de acuerdo a su solubilidad. [1,13]

Los compuestos ensayados en este trabajo se solubilizaron utilizando mezclas de PEG 400 y agua. Se considera que este agente no interfiere en los resultados biológicos.[11,13] El programa recomienda que los solventes utilizados en investigaciones farmacológicas y toxicológicas no superen en concentración a un cuarto del valor de su dosis letal media (LD_{50}) correspondiente.[10] La LD_{50} del PEG 400 en ratones inyectados por vía intraperitoneal es 12.9 mL/kg, por lo que se permite una concentración no mayor a 3 mL/kg cuando se utiliza sólo, o en proporciones que llegan a 30 % PEG 400 y 70 % agua para mezclas. En este último caso, el volumen total a administrar se eleva a 10 mL/kg. Es por eso que los volúmenes de solución administrada variaron entre 3 mL/Kg y 10 mL/Kg, de acuerdo a la relación de PEG 400/agua utilizada (dependiendo de la solubilidad de la sustancia ensayada).

Para la preparación de las soluciones de compuestos sólidos, se morterearon previamente, se tomó una porción, se pesó y se solubilizaron en la cantidad admitida de PEG 400. Se sometió la mezcla a ultrasonido para favorecer la disolución, y cuando no se logró una solución límpida, se calentó a 37 °C. Luego se adicionó agua, se repitió el sonicado y calentamiento cuando fue necesario. En el caso de compuestos líquidos (aceites), se solubilizaron con PEG 400 y luego se incorporó agua.

Para el cálculo de los volúmenes de inyección para cada ratón se tuvieron en cuenta tanto el peso de cada animal, como las proporciones de PEG 400 y agua utilizadas. Los volúmenes de administración oscilaron entre 0,08 y 0,31 mL de solución, y se aplicaron por medio de jeringas graduadas al 0,01 de mL.

Respecto de las vías de administración, en esta etapa se utilizan las vías intraperitoneal (i.p) y subcutánea (s.c) (Figura 6.6 b) y 6.6 c). La primera vía se emplea en general tanto para la administración de agentes anticonvulsivos como convulsivos; mientras que la segunda se usa sólo para compuestos convulsivos. Particularmente en este trabajo los compuestos a ensayar se administraron por vía i. p y los agentes convulsivos mediante inyección s.c.

- Vía intraperitoneal (i.p): la inyección se realizó en el abdomen del animal, formando un ángulo de 30° con el plano del cuerpo, utilizando agujas 27G ½ cuando se inyectó soluciones (Figura 6.6b).
- Vía subcutánea (s. c): la inyección se efectuó en un pliegue suelto de la piel de la línea media de la nuca del ratón. Se utilizó aguja 27G ½ y se controló que no haya pérdida de la solución de la droga (Figura 6.6c).



Figura 6.6 a) Manipulación manual para la aplicación de la inyección **b)** Inyección intraperitoneal. **c)** Inyección subcutánea. Fuente de la imagen: www.procedureswithcare.org.uk

Ensayo MES

Como se detalló anteriormente, en el ensayo MES debe inducirse la convulsión mediante una descarga eléctrica controlada. Es por eso que inicialmente se administró el compuesto a ensayar al ratón y, al tiempo estipulado en el ensayo, se produjo el estímulo eléctrico. Se midió entonces la capacidad de la droga de prevenir la descarga convulsiva. Para realizar el MES test nuestro laboratorio cuenta con un equipo Ugo Basile (Biological Research Apparatus, Varese, Italia), uno de los modelos de aparatos de electroshock internacionalmente usados en las pruebas de convulsión. [1] La descarga eléctrica llega al animal a través de electrodos. En este trabajo se emplearon electrodos de oreja que, junto con los electrodos corneales, son los más usados para este tipo de ensayos. [14] Para favorecer la conducción eléctrica, los electrodos se humedecieron con solución fisiológica en la zona de contacto con la oreja del ratón.

Los parámetros a fijar en el equipo son: la corriente a aplicar, la frecuencia del estímulo, la duración total de la descarga y el ancho de pulso de corriente. Estos valores se eligieron de acuerdo a lo que establece la literatura como parámetros típicos a utilizar con ratones para provocar una convulsión máxima. [9] Esto significa: una corriente de 50 mA, con una frecuencia de 60 Hz, durante 0,2 segundos y con un ancho de pulso de 28 milisegundos. Con estas magnitudes se obtiene un tren de ondas rectangulares correspondientes a un estímulo aplicado 4-5 veces mayor que el necesario para llegar al umbral de convulsión. Hay que destacar en este punto la diferencia entre *convulsión mínima* y *convulsión máxima*. Una convulsión mínima se caracteriza por una reacción de aturdimiento y movimientos clónicos de la cara y miembros anteriores. En cambio, las convulsiones máximas son las fases ya descritas en el modelo agudo (flexión tónica, extensión tónica y un episodio clónico). Por lo tanto, se consideró que la droga protegió frente a MES cuando en el ensayo no se observó convulsión máxima luego del estímulo eléctrico.

Finalmente, se calculó para cada ensayo MES el porcentaje de protección de la droga:

$$\% \text{ de Protección} = \text{número de animales protegidos} \times 100 / \text{número total de animales}$$

Ensayo PTZ

En este ensayo se inducen los episodios convulsivos por medio de un agente químico: pentilentetrazol (PTZ) o metrazol. Aquí también se analiza la capacidad de un fármaco, administrado previamente, de prevenir la convulsión.

La solución de PTZ a utilizar (1,7 % en 0,9 % de solución salina) se preparó momentos antes de la inyección en frasco opaco para evitar la fotodegradación. ^[15] Luego se administra vía subcutánea a razón de 5 mL/kg, ya que se observó que utilizando volúmenes de inyección mayores se aumentan las probabilidades de derramamiento por el punto de inyección al retirar la aguja.

La cantidad de PTZ administrada por vía s. c. (85 mg/kg) correspondió a la dosis convulsiva CD₉₇ en ratones, es decir aquella que es capaz de inducir convulsiones en el 97 por ciento de los animales. ^[1,9] Una vez inyectados con PTZ, los animales se observaron durante 30 minutos para determinar si se produjo alguna convulsión. El PTZ provoca inicialmente sacudidas clónicas, que luego se hacen más sostenidas, y pueden conducir a un episodio tónico-clónico. Como criterio para decidir protección o no frente a la convulsión, se tomó la aparición de al menos un episodio clónico continuo de más de 5 segundos de duración. ^[1,9] Finalmente, y en forma análoga al test MES, se obtuvo el porcentaje de protección del compuesto para cada ensayo frente a PTZ:

$$\% \text{ de Protección} = \frac{\text{número de animales protegidos} \times 100}{\text{número total de animales}}$$

Ensayo RotoRod

La toxicidad inducida por los compuestos a ensayar se midió mediante el uso del test de Rotorod. Con este modelo se buscó detectar efectos neurotóxicos que se manifiestan como sedación o ataxia.

En el test se utilizó un aparato construido especialmente en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata (Figura 6.7), en analogía con el diseñado por Dunham y Miya.^[16] El equipo consiste en un cilindro estriado de 3 cm de diámetro capaz de girar a una

determinada velocidad, que puede graduarse en forma continua. Los ratones se ubican en el cilindro en movimiento, separados por paneles circulares.

Un ratón normal situado en un cilindro que gira a 6 r.p.m. puede mantener el equilibrio durante un período prolongado de tiempo. Teniendo en cuenta esto, el ensayo de Rotorod mide la capacidad del animal de mantener una caminata en el cilindro giratorio durante 1 minuto durante 3 instancias sucesivas.

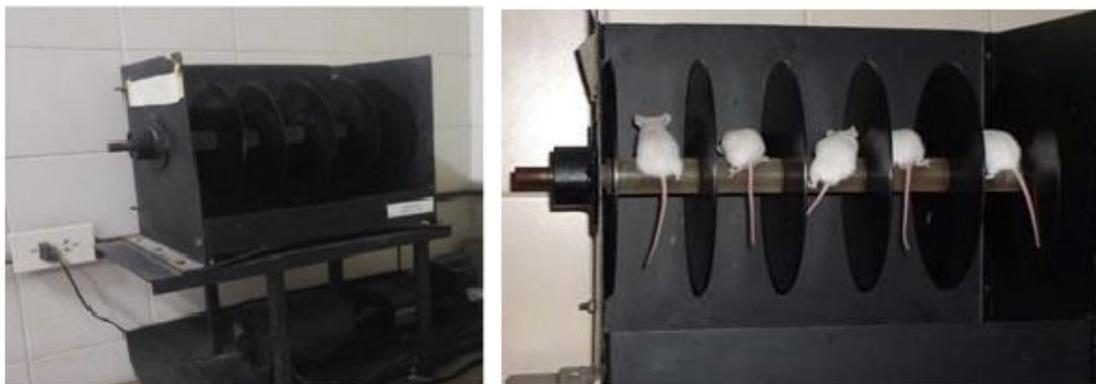


Figura 6.7- *Aparato de Rotorod disponible en nuestro laboratorio*

La evaluación se realizó previa a la administración de las estructuras a ensayar, a fin de verificar el buen estado inicial de los animales. Luego se repitió el test en forma posterior a la administración del compuesto a evaluar (y previo a la inducción convulsiva), con el objeto de verificar si se ha producido una depresión del sistema nervioso central por efectos de dicha estructura.

Como resultado de este último ensayo RotoRod se calcula el porcentaje de toxicidad de la droga:

$$\% \text{ de toxicidad} = \text{número de animales que caen} \times 100 / \text{número total de animales}$$

Resultados de la evaluación biológica

Fase 1. Identificación de la acción anticonvulsiva de sulfamidas

Se presentan en la Tabla 6.2 los resultados obtenidos mediante la evaluación biológica frente a los ensayos MES, PTZ y Rotorod de las sulfamidas sintetizadas en esta tesis, y de aquellos sulfamatos cuya masa disponible fue suficiente para dichas evaluaciones. [1] Se expresan los datos obtenidos en Fase 1, incluyéndose la clasificación de los compuestos de acuerdo a la actividad observada. No fue ensayado el *Sulfamato de 2-hidroxifenil-N-β-alaninato de metilo* (2), ya que este compuesto fue testeado con anterioridad por nuestro grupo de trabajo. A su vez se reportan los resultados obtenidos previamente para las sulfamidas *N'-butil-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo* (1a) y *N'-bencil-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo* (1b) preparadas previamente por nuestro grupo de trabajo. [17]

Siguiendo los lineamientos del ASP se midió la respuesta luego de 0,5 y 4 h de administrado el compuesto; a concentraciones de 30, 100 mg/kg para cada tiempo. Debe aclararse que, como se detalló previamente, el protocolo contempla también el testeo de los compuestos a concentraciones mayores a 100 mg/Kg en Fase 1. El criterio utilizado para evaluar solo las dosis más bajas que propone el programa fue la identificación de compuestos muy activos: se buscan nuevas estructuras capaces de superar la potencia de anticonvulsivos conocidos, por lo que encontrar compuestos activos a concentraciones mayores a los límites de clase 1 implicaría, en este planeo, descartar el compuesto. Por lo tanto, con el objetivo de esta tesis en mente, se consideró que evaluar mayores concentraciones implicaría sacrificar animales y un mayor tiempo en resultados que no se utilizaran.

Compuesto	Clase en MES	Dosis (mg/Kg)	Actividad MES		Actividad PTZ		TOX	
			tiempo (h)		tiempo (h)		tiempo (h)	
			0.5	4	0.5	4	0.5	4
1a	1	30 ^[18]	1/3	1/3	0/3	0/3	0/6	0/6
		100 ^[18]	1/3	1/3	0/3	0/3	0/6	0/6
1b	1	30 ^[18]	0/3	0/3	0/3	0/3	0/6	0/6
		100 ^[18]	1/3	0/3	0/3	0/3	0/6	0/6
2	1	30 ^[18]	0/3	3/3	1/3	0/3	0/6	0/6
		100 ^[18]	1/3	1/3	0/3	0/3	0/6	0/6
3	1	30	0/3	3/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	2/3	2/3	0/2	0/2	0/5	0/5
4	1	30	0/3	1/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	2/3	2/3	0/2	0/2	0/5	0/5
5	1	30	2/3	1/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	3/3	1/3	0/2	1/2	0/5	0/5
6	1	30	1/3	1/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	1/3	1/3	0/2	0/2	0/5	0/5
7	4	30	1/3	2/3	0/2	0/2	1/5	0/5
		100	0/3	0/3	0/2	0/2	0/5	0/5
8	1	30	0/3	3/3	0/2	0/2	0/5	0/5
		100	1/3	3/3	0/2	0/2	0/5	0/5
9	1	30	1/4	0/4	0/2	0/2	0/6	0/6
		100	1/4	2/4	0/2	0/2	0/6	0/6

Compuesto	Clase en MES	Dosis (mg/Kg)	Actividad MES		Actividad PTZ		TOX	
			tiempo (h)		tiempo (h)		tiempo (h)	
			0.5	4	0.5	4	0.5	4
		30	1/2	0/2	0/2	0/2	0/4	0/4
11	1	100	2/4	3/4	0/2	0/2	2/4	1/4
		30	1/3	3/3	0/2	0/2	0/5	0/5
12	1	100	3/3	1/3	Nt	Nt	0/3	0/3
		30	1/2	2/4	0/2	0/2	0/4	0/4
13	1	100	0/2	3/4	0/2	0/2	1/4	2/6
		30	1/4	0/2	Nt	Nt	0/4	0/2
15	1	100	3/4	0/2	0/2	0/2	0/6	0/4
		30	1/3	2/3	Nt	Nt	1/3	0/3
16	4	100	0/3	0/3	1/2	0/2	0/5	0/5
		30	1/2	2/2	Nt	Nt	0/2	0/2
17	1	100	2/2	2/2	1/2	0/2	0/4	1/4

Tabla 6.2- Evaluación farmacológica de los compuestos sintetizados, según lo determinado para la fase 1 del programa ADD. NR: ensayo no realizado. Los compuestos **1a**-corresponde al compuesto N'-butil-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo y el **1b**-N'-bencil-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo, ambos compuestos sintetizados y evaluados por el grupo de trabajo.^[17] Nt: no testeado

Otra modificación empleada en esta tesis fue la disminución del número de ratones empleados en el ensayo PTZ. A diferencia de los ensayos MES, donde se utilizaron generalmente 3 ratones por dosis, en este test se utilizaron alrededor de 2 o 3 ratones por dosis (o, en algunos casos, se evaluaron a una única concentración). Esto se fundamenta en la experiencia recabada en nuestro laboratorio, que muestra que este test es muy concluyente y a la vez muy cruento. Una vez administrado el PTZ, si la droga testeada no es efectiva, el

animal comienza a sufrir episodios convulsivos rápidamente y estos duran mucho tiempo (generalmente más de media hora).

Los ratones usados en MES y PTZ fueron previamente sometidos al test de Rotorod para cada tiempo y dosis de manera de evaluar la neurotoxicidad,

Fase 2. Cuantificación de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica.

Para la determinación cuantitativa de la actividad anticonvulsiva y neurotóxica, se seleccionaron los derivados de β -alanina, 4, 5 y 8. Se calcularon inicialmente los tiempos de efecto máximo de las drogas (TPE). De acuerdo a las etapas del programa ASP, cada compuesto debe ensayarse a distintos tiempos frente a los test de MES, PTZ y Rotorod para construir las respectivas gráficas de respuesta biológica en función del tiempo. Con esto se determinó el momento de mayor actividad o neurotoxicidad. Generalmente los TPE son coincidentes, es decir que los picos de máxima acción anticonvulsiva y neurotóxica se alcanzan simultáneamente. Debido a la actividad encontrada en MES test, se calculo el TPE frente a este ensayo. Se emplearon al menos 4 animales por tiempo. Una vez graficado, se determino el TPE por inspección visual. Definido este, se procedió a la determinación de la ED₅₀.

Se emplearon grupos de aproximadamente 6 ratones por dosis. Las dosis se calcularon de modo de tener al menos 4 puntos comprendidos entre ausencia de protección y protección total. Los resultados se analizaron mediante el método estadístico de Litchfield y Wilcoxon. [12] Este procedimiento es el más usado debido a su alta capacidad de respuesta en experimentos biológicos de tipo dosis-efecto.

A continuación se detallan los cálculos realizados para cada compuesto. Para ello se muestran las curvas que determinaron los TPE y los porcentajes de protección. Los valores de ED₅₀ se expresan en micromoles por kilo de ratón ($\mu\text{mol/kg}$), a fin de facilitar las comparaciones.

N'-(p-fluorobencil)-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo (4)

Se realizó la curva para la determinación del tiempo de efecto máximo (Figura 6.8) utilizando una dosis de 100 mg/Kg para la evaluación, con 4 a 6 ratones para cada tiempo. TPE encontrado: **4 h**

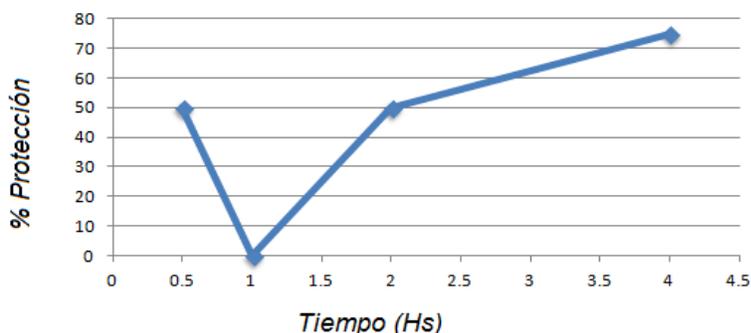


Figura 6.8. Estimación del tiempo de efecto máximo para la *N-(p-fluorobencil)-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo*

La potencia anticonvulsiva se cuantificó entonces a 4 h frente al ensayo MES, midiendo el porcentaje de protección a 6 dosis distintas (tabla 6.3).

Dosis	Tiempo (h)	Animales protegidos/totales	% Protección
15 mg/kg	4 h	2/6	33%
30 mg/kg	4 h	2/4	50%
45 mg/kg	4 h	3/6	50%
60 mg/kg	4 h	3/4	75%
90 mg/kg	4h	3/4	75%
120 mg/kg	4h	0/4	0%

Tabla 6. 3-Resultado de la actividad anticonvulsiva de *N-(p-fluorobencil)-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo*

Con estos valores se realizó el análisis estadístico correspondiente, obteniéndose una **ED₅₀= 152,29 μmol/kg**. Esta dosis efectiva media es equivalente a **44,17mg/Kg**.

(N'-fenetil)-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo (5)

Se realizó la curva para la determinación del tiempo de efecto máximo en MES test (Figura 6.9) utilizando una dosis de 30 mg/Kg para la evaluación y utilizando como vehículo PEG al 30%, con 6 ratones para cada tiempo. TPE encontrado: 4 h

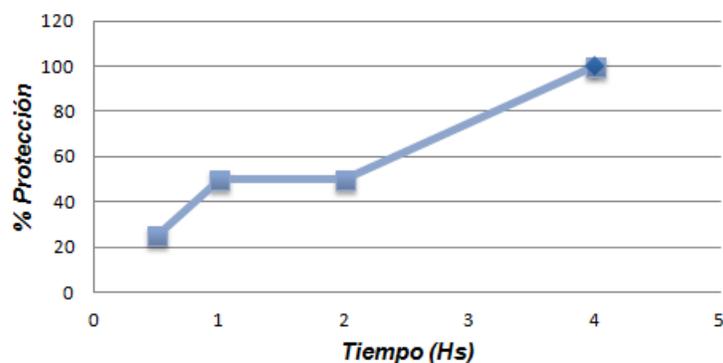


Figura 6.9. Estimación del tiempo de efecto máximo para la N-(N'-fenetil) sulfamoil-β-alaninato de metilo

Dosis	Tiempo (h)	Animales protegidos/totales	% Protección
5 mg/kg	4 h	3/6	50%
10 mg/kg	4 h	3/6	50%
15 mg/kg	4 h	2/6	33.3%
25 mg/kg	4 h	3/6	50%
40 mg/kg	4 h	1/6	16.7%

Tabla 6. 4-Resultado de la actividad anticonvulsiva de N-(fenetil)-sulfamoil-N-β-alaninato de metilo

En base a los resultados obtenidos, se advierte que en el intervalo de dosis examinado no existe una respuesta lineal a distintas dosis, con lo cual no es posible en este intervalo hallar la DE₅₀.

N'-isobutil-sulfamoil-*N*- β -alaninato de metilo (8)

Se realizó la curva para la determinación del tiempo de efecto máximo en MES test (Figura 6.10) utilizando una dosis de 20 mg/Kg para la evaluación y solución fisiológica como vehículo; con 4 ratones para cada tiempo. TPE encontrado: **1 h**.

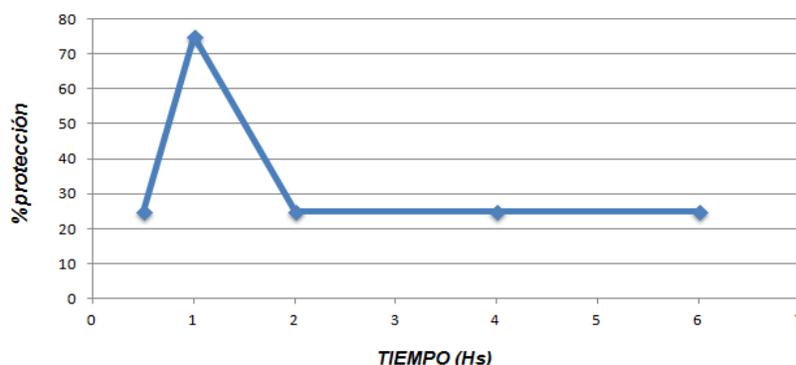


Figura 6.10- Estimación del tiempo de efecto máximo para la *N*-(*N*'-isobutil) sulfamoil- β -alaninato de metilo

Se procedió a realizar los ensayos para cuantificar la potencia anticonvulsiva pero debido a la cantidad limitada de compuesto se calculó la ED₅₀ de forma provisoria con los datos que se muestran en la tabla 6.5.

Dosis	Tiempo (h)	Animales protegidos/totales	% Protección
3 mg/kg	1 h	1/5	20%
4,5 mg/kg	1 h	1/4	25%
5,5 mg/kg	1 h	1/4	25%
10 mg/kg	1 h	2/4	50%
20 mg/kg	1 h	3/4	25%

Tabla 6.5- Resultado de la actividad anticonvulsiva de *N*'-isobutil sulfamoil-*N*- β -alaninato de metilo

Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico, obteniendo una DE₅₀ provisoria de 41.87 μ mol/kg la cual es equivalente a **9.97mg/Kg**.

Estudios *in vitro*

A) Interacción de las sulfamidas con el receptor GABA_A

Se realizó un ensayo de afinidad de las sulfamidas al receptor GABA_A, particularmente al sitio de unión de las benzodiazepinas. Este receptor se encuentra involucrado tanto en epilepsia como en desordenes de ansiedad, comorbilidad frecuente e importante en pacientes con crisis convulsivas. [18] Por lo tanto, diseñar anticonvulsivos con capacidad ansiolítica resultaría interesante para personas que padecen ambos desordenes. Además, investigaciones previas para otro grupo de sulfamidas muestra que estas estructuras pueden ser activas frente a este test. [19]

En esta investigación se analizó la capacidad de las sulfamidas de inhibir la unión de un ligando tritiado denominado [³H]-flunitrazepam (81,8 Ci/mmol; adquirido de Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA) a GABA_A presente en las membranas sinaptosomales de la corteza cerebral de ratas. Estos ensayos fueron realizados bajo la dirección de la Dra. Mariel Marder y su grupo de investigación, perteneciente al Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. La metodología utilizada por estos investigadores para la realización de los ensayos se encuentra publicada en literatura. [19] La tabla 6.6 muestra los resultados obtenidos para la inhibición de los compuestos 2 al 9 y del 11, 12 y 13.

Compuesto	Constante de inhibición [K_i (μM)]^e
2	+
3	-

	++
4	[123 ± 15]
	++
5	[85 ± 21]
6	-
	++
7	[140 ± 31]
8	-
9	-
11	-
	++
12	[61 ± 21]
	+++
13	[14 ± 1]

Tabla 6.6- Datos experimentales de la constante de inhibición de los compuestos obtenidos en esta tesis, donde $[K_i (\mu M)]^e$ indica la Capacidad de los compuestos, en 300 mM, para inhibir la unión de $[^3H]$ -flunitrazepam al sitio de unión de benzodiazepina del receptor $GABA_A$ donde se indica como: inhibición > 80% (+++); 40-80% (++); 20-40% de inhibición (+); y la inhibición < 20% (-). $K_i \pm$ error estándar de los valores medios son medios de 2-3 determinaciones independientes. El Diazepam, usado como control, arrojó un valor de K_i de $0,0070 \pm 0,0005 \mu M$ ($n = 5$). ^g Valor informado en literatura ref. 19

B) Interacción de las sulfamidas con isoformas de anhidrasa carbónica

Como se detalló anteriormente, la anhidrasa carbónica (CA), en particular la isoforma CAVII, ha surgido como un blanco molecular para el tratamiento de la epilepsia febril. ^[20] Mediante la

aplicación de metodologías directas de diseño racional, en nuestro grupo de trabajo se han determinado las características necesarias que deben presentar los inhibidores para ser activos frente a anhidrasa carbónica y selectivos a la isoforma CAVII. [21] Se estableció que las sulfamidas N, N'-disustituidas con un grupo polar y otro no polar pueden presentar interacciones óptimas con el sitio activo de la enzima, el cual se encuentra inmerso en una cavidad que es mitad hidrofílica y mitad hidrofóbica (y disponible para la interacción de sendas cadenas laterales de las sulfamidas). En relación a la selectividad, estudios propios demostraron que el sitio activo en CAVII es capaz de elongarse lo suficiente para permitir el ingreso de inhibidores de mayor tamaño que en CAII. [21] Por lo tanto, la disustitución confiere a las sulfamidas un tamaño apreciable que las hace poco activas en CAII. Como se explicó anteriormente, CAII es una isoforma ubicua responsable de efectos adversos y tolerancia de fármacos anticonvulsivos. [22] Estas conclusiones forman parte de la tesis doctoral en ejecución del Lic. Jose Luis Gonzales Funes perteneciente al grupo de trabajo y sustentan la evaluación de las sulfamidas sintetizadas en este trabajo.

Los ensayos de inhibición fueron efectuados por el grupo del Dr. Claudiu Supuran, perteneciente al laboratorio de Química Bioinorgánica de la Universidad de Florencia, Italia. Para la determinación de las constantes de inhibición estos investigadores realizaron estudios cinéticos con un equipo de espectroscopia de flujo detenido (Applied Photophysics stopped-flow). [21] Los detalles se encuentran reportados en literatura. [23]

La tabla 6.7 muestra los resultados obtenidos para las sulfamidas y se compara con respecto a la Acetazolamida (AAZ) un potente inhibidor de la anhidrasa carbónica, diurético y anticonvulsivo.

Compuesto	Ki (nM) ^a		Selectividad ^b
	CA II	CA VII	
3	4957	0.43	11528

4	8884	0.45	19742
5	> 10000	2.2	>4545
6	> 10000	0.31	>32258
7	7681	0.30	25603
8	> 10000	0.27	>37037
12	> 10000	0.24	>41667
13	> 10000	0.28	>35714
15	> 10000	0.39	>25641
16	8528	0.37	23049
AAZ ^[25]	12.1	2.5	4.8

Tabla 6.7-Resultados de los ensayos de inhibición frente a anhidrasa carbonica, donde K_i (nM)^a es la constante media de inhibición de 3 ensayos diferentes, por una técnica de flujo detenido (los errores estaban en el rango de \pm 5-10% de los valores reportados). ^b La selectividad se calcula por la relación de los valores de k_i para CAII isozima relativa a CA VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÀFICAS DEL CAPITULO VI

[1]Stables, J. P.; Kupferberg H. J. Chapter 16: *The NIH Anticonvulsant Drug Development (ADD) Program: preclinical anticonvulsant screening project. Molecular and cellular targets for antiepileptic drugs*; Avanzani, G. ; Regesta, G. ; Tanganelli, P.; Avoli, M. eds. John Libbey & Company Ltd, 191-198. (1997)

- [2] Löscher, W. *Seizure* 20, 359-368. (2011)
- [3] Rogawski, M. A. *Epilepsy research* 68, 19.(2006)
- [4] Giardina, W.J. *Current Protocols in Pharmacology* 5.22.1-5.22.22. (2000)
- [5] Barton, M.; Klein ,B.; Wolf, H.;White H. *Epilepsy Research* 47, 217-227. (2001)
- [6] Galanopoulou A.S. ;Buckmaster P.S. ;Staley K.J.; Moshé SL. ;Perucca ,E.; Engel J. *Epilepsia* 53, 571-82. (2012)
- [7] Rafo Campos, M.; Sancho-Rieger, J.; Petra, P.; Magramon, X. ;Rojas Gutierrez,P. *Journal Reviews Neurology* 97, 517-524. (2008)
- [8] Pitkänen, A.; Schwartzkroin, P, A.; Moshé S, L. *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier 539-549.(2006)
- [9] Fisher, R. S. *Brain Research Reviews* 14, 245-278 .(1989)
- [10] Klitgaard H.; Matagne A.; Lamberty Y. *Epilepsy Research* 50, 55-65. (2002)
- [11] Malawska, B.; Kulig, K.; Spiewak, A.; Stables, J. P., *Bioorganic Medicinal Chemistry* 12, 625-632. (2004)
- [12] Litchfield, J. T.; Wilcoxon, F. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 96, 99-113 (1949)
- [13] Porter, R. J.; Cereghino, J. J.; Gladding, G. D.; Hessie, B. J.; Kupferberg, H. J.; Scoville, B.; White, B.G. *Antiepileptic Drug Development Program. The Cleveland Clinic Journal Medicinal* 51, 293-305. (1984)
- [14] Löscher, W.; Fassbender, C. P.; Nolting, B. *Epilepsy Research* 8 (2), 79-94 .(1991)
- [15] Stone, W. E. *Pharmacology* 3 ,367-370. (1970)
- [16] Dunham, N. M.; Miya, T. S. *Journal of American Pharmacists Association* 46(3), 208-209. (1957)
- [17] Gavernet, L.; Elvira,J.; Samaja,G.; Pastore, V.; Sella Cravero, M.; Enrique,A.; Estiu,G.; Bruno Blanch, L. *Journal of Medicinal Chemistry* 52, 1592–1601. (2009)
- [18] Beyenburg S., Mitchell,A. J.; Schmidt, D.; Elger ,C. E.; Reuber M. *Epilepsy Behavior* 7(2),161–71. (2005)
- [19] Wasowski, C.; Gavernet, L.; Barrios,I. A.; Villalba, M. L.; Pastore, V.; Samaja, G.; Enrique, A.; Bruno-Blanch, L.E.; Marder, M. *Biochemical Pharmacology* 83, 253-259.(2012)
- [20] Ruusuvuori, E.; Huebner ,A. K.; Kirilkin, I.; Yukin, A. Y.; Blaesse, P.; Helmy, M.;Kang, H. J.; El Muayed, M.; Hennings, J C.; Voipio, J.; Šestan, N.; Hübner, C.A.; Kaila ,K. *The EMBO Journal* 32, 2275–2286. (2013)

- [21]Gavernet, L.; Gonzalez Funes, J. L.; Palestro,P.H.; Bruno Blanch,L.; Estiu, G.; Maresca, A.; Barrios,I; Supuran,C.T. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 21 ,1410-1418. (2013)
- [22]Meldrum,B.S.; Rogawski,M.A. *Neurotherapeutics* 4 ,18-61 .(2007)
- [23]Khalifah, R.G. *The Journal of Biological Chemistry* 246, 2561-2573. (1971)
- [24]Vullo, D.; Voipio, J.; Innocenti, A.; Rivera, C.; Ranki, H.; Scozzafava, A.; Kaila, K.; Supuran, C.T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4 (15) 971-976.(2005)

Capítulo VII

Análisis de los resultados y Conclusiones

Como resultado del presente trabajo de tesis se logró generar una serie de derivados de sulfamidas, optimizados a partir del farmacóforo propuesto. Se obtuvieron quince nuevos compuestos, entre sulfamatos y sulfamidas. Para ello se empleó por primera vez el calentamiento utilizando radiación de microondas en la vía sintética, como alternativa al calentamiento térmico. Tres reacciones testigo, correspondientes a la síntesis de las sulfamidas 5, 7 y 8 se realizaron empleando ambas fuentes de calentamiento a fines comparativos. En los tres casos la vía de microondas resultó más eficiente tanto en tiempos de reacción como en rendimientos.

Otra contribución al desarrollo del conocimiento en síntesis fue la utilización de un adsorbente sólido, γ -alúmina, capaz de retener selectivamente al catecol, producto contaminante, de la etapa final de la reacción de síntesis de sulfamidas. Esta modificación evitó en muchos casos el uso de columna cromatográfica, reduciendo así el uso de solventes en grandes cantidades durante el aislamiento de las sulfamidas sintetizadas, cumpliendo con los criterios de la química verde.

Los compuestos planteados en este trabajo se diseñaron con la idea de respetar el grupo funcional sulfamida, unido a aminoesteres y de introducir modificaciones en las cadenas laterales hidrofóbicas. Para ello se modificó principalmente el sustituyente más lipofílico de las sulfamidas, ya sea introduciendo cadenas hidrocarbonadas lineales (hexilo), ramificadas (isobutilo), cíclicas (adamantilo) o grupos aromáticos (fenetil, p-flúor-bencil, metilbencil). Todas las modificaciones planteadas se propusieron en busca de un incremento de la actividad y del conocimiento de las características límites de lipofilidad y de volumen de los sustituyentes.

La actividad encontrada da cuenta de la capacidad del modelo racional empleado para la optimización de nuevas estructuras activas. Todos los compuestos preparados y evaluados presentaron la actividad anticonvulsiva propuesta frente a MES test, a la menor dosis empleada. Además se detectó que dos estructuras muestran efectos tóxicos a esta dosis. Por lo tanto, y de acuerdo al protocolo, todos los compuestos fueron clasificados con clase 1 a excepción de 7 y 16 que se definieron de categoría 4.

En cuanto al ensayo PTZ, las moléculas presentaron menor (o nula) acción anticonvulsiva que la detectada en MES test, demostrando la selectividad del diseño realizado.

Los resultados obtenidos en fase 1 representan la primera aproximación para determinar la actividad de un compuesto y lo hacen de forma cualitativa. Sin embargo, con esta información es posible arribar a interpretaciones preliminares respecto a la influencia de la estructura química en la actividad biológica.

Se observa que la sulfamida **7** (con un sustituyente hexilo) presenta un perfil en ensayo MES test similar a un homólogo previamente preparado por el grupo de trabajo (compuesto **1a**),^[1] en la dosis más baja probada (tabla 2 del capítulo VI). De esto podría inferirse una baja influencia en la longitud de cadena hidrocarbonada en la actividad (al menos a una diferencia de 2 carbonos) en esta etapa de evaluación. Por otra parte, los indicios de neurotoxicidad encontrados en el compuesto **7** a bajas dosis indicarían que no es el compuesto más prometedor del conjunto. Como se propuso previamente, se deberían ensayar dosis menores para ver si la acción anticonvulsiva prevalece sin estos efectos adversos.

Resulta interesante, por otra parte, que el isómero ramificado del compuesto **1a** (compuesto **8**) presenta una importante actividad en fase 1 frente al ensayo MES test, por lo que esta estructura fue seleccionada para continuar con la fase 2 del programa ASP. Un comportamiento similar se observa para la sulfamida **3** con otro sustituyente voluminoso como el adamantilo, con 100% de protección a la menor dosis ensayada. Esto indicaría en principio, que este tipo de sustituyentes resulta beneficioso para la actividad, aunque debería aumentarse el número de evaluaciones (y compuestos a comparar) para arribar a este tipo de conclusiones generales.

En relación a las sulfamidas derivadas del aminoéster de β -alanina que presentan un segundo sustituyente aromático, como los compuestos **1b**, **4**, **5** y **6**, puede observarse que a medida que el anillo aromático se aleja de la porción polar, se incrementa la actividad en el ensayo MES test, como es el caso del compuesto **5** que fue seleccionado para continuar con la fase 2 del programa.

Respecto a las sulfamidas que conservan el sustituyente isobutilo pero que difieren en el sustituyente aminoéster (compuestos **15** y **16**) se puede observar en ambos casos una tendencia a disminuir la actividad respecto del compuesto **8** en MES test. Además, el compuesto **16** muestra signos de neurotoxicidad en el test de Rotorod.

De manera similar se analizó la sustitución del aminoéster en el compuesto aromático **4** generándose las estructuras **12** y **13**. La sulfamida **12** mostró una acción anticonvulsiva interesante en la prueba MES, pero el 75% de los animales ensayados con este compuesto en el ensayo de PTZ murieron después del experimento (dato que no se muestra en la tabla). Por

esta razón no se ha completado el perfil biológico a 100 mg/Kg. El compuesto **13** exhibe una mayor actividad a 4h de administración respecto de la sulfamida **4**, pero presenta también efectos neurotóxicos a altas concentraciones.

Respecto los resultados encontrados en fase 2 del ASP, la DE₅₀ provisoria calculada para el compuesto **8** fue de 41,87 μmol/kg (TPE: 1 h), superando en potencia a su isómero **1a** (DE₅₀:71 μmol/kg). [1] Se prevé ensayar un mayor número de animales para corroborar este resultado.

En el caso del compuesto **5**, no resulto posible hallar la DE₅₀ (como se explicó en el capítulo (VI)). Se encontró que, en el intervalo de dosis ensayadas, se mantiene la protección al disminuir la concentración de compuesto a administrar. Se plantea a futuro ensayar dosis por debajo de 5mg/kg para determinar si la actividad disminuye o continúa con este comportamiento.

También se calculo la ED₅₀ del compuesto aromático **4**, que fue de 152,29 μmol/kg (TPE: 4 h). Este valor es mayor que el encontrado para las estructuras alifáticas **8** y **1a**. Sin embargo, si se comparan los resultados obtenidos en esta fase para un anticonvulsivo comercial que deriva de un aminoácido, Valrocemida (ED₅₀ en el ensayo MES es 755 μmol / Kg) [2], se observa que las sulfamidas superan ampliamente su potencia. El compuesto **4** resulta 5 veces más activo que la Valrocemida mientras que la estructura **8** lo es 18 veces en esta etapa preclínica.

Por otro lado, se observo protección frente a MES test de los sulfamatos derivados de catecol sulfato **9**, **11** y **17** por lo que también se perfilan promisorios como anticonvulsivos. En el caso del sulfamato **17** se detecta también acción frente al test de PTZ y neurotoxicidad a dosis de 100 mg/Kg. Un mayor número de compuestos y de ensayos biológicos serán realizados en forma posterior a esta tesis para adquirir mejores conclusiones respecto a esta familia de compuestos.

Como se detalló en el capítulo anterior, se realizaron también ensayos *in-vitro* de algunos de los compuestos preparados en este trabajo, mediante colaboraciones con otros investigadores.

En relación a los resultados obtenidos para la inhibición al receptor GABA_A de los compuestos **2** al **9** y del **11** al **13** los resultados muestran, en general, una baja actividad inhibitoria (Tabla 6.7 del capítulo VI). Las sulfamidas **12** y **13** resultaron ser las más activas, lo que sugiere que el aminoéster de β-alanina no es el mejor aminoácido para promover la unión a GABA_A. Sin embargo, un mayor número de estructuras deberían evaluarse para confirmar esta hipótesis.

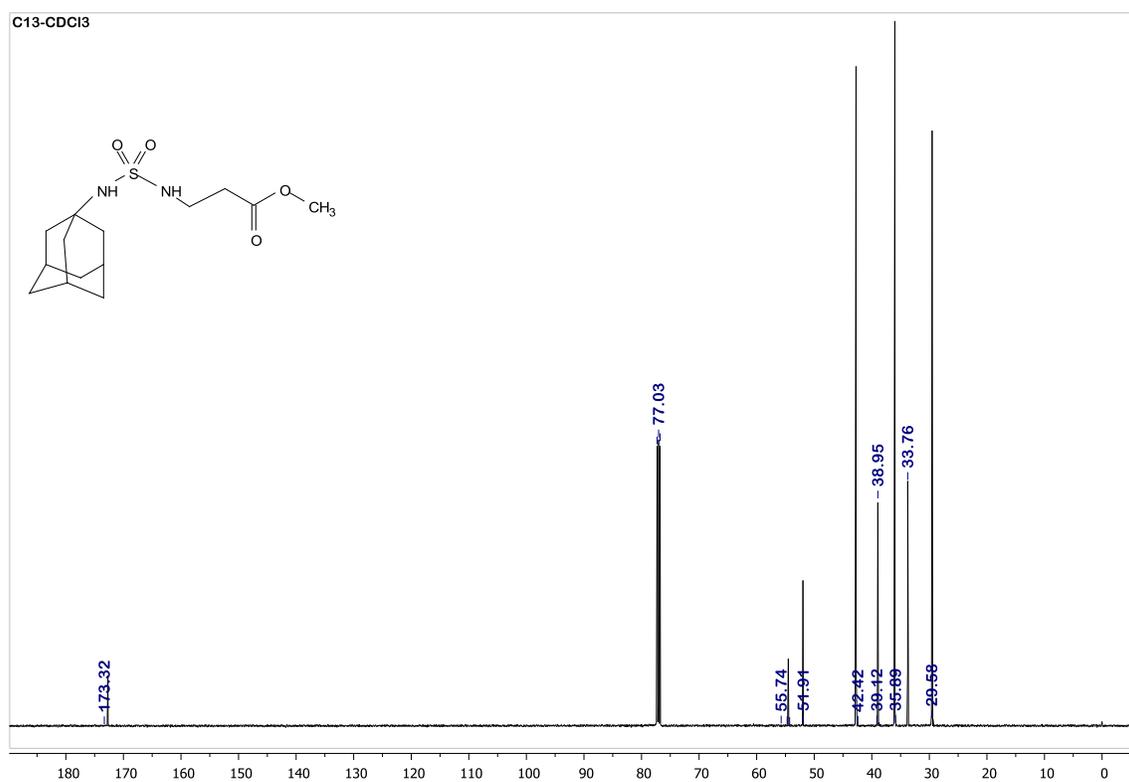
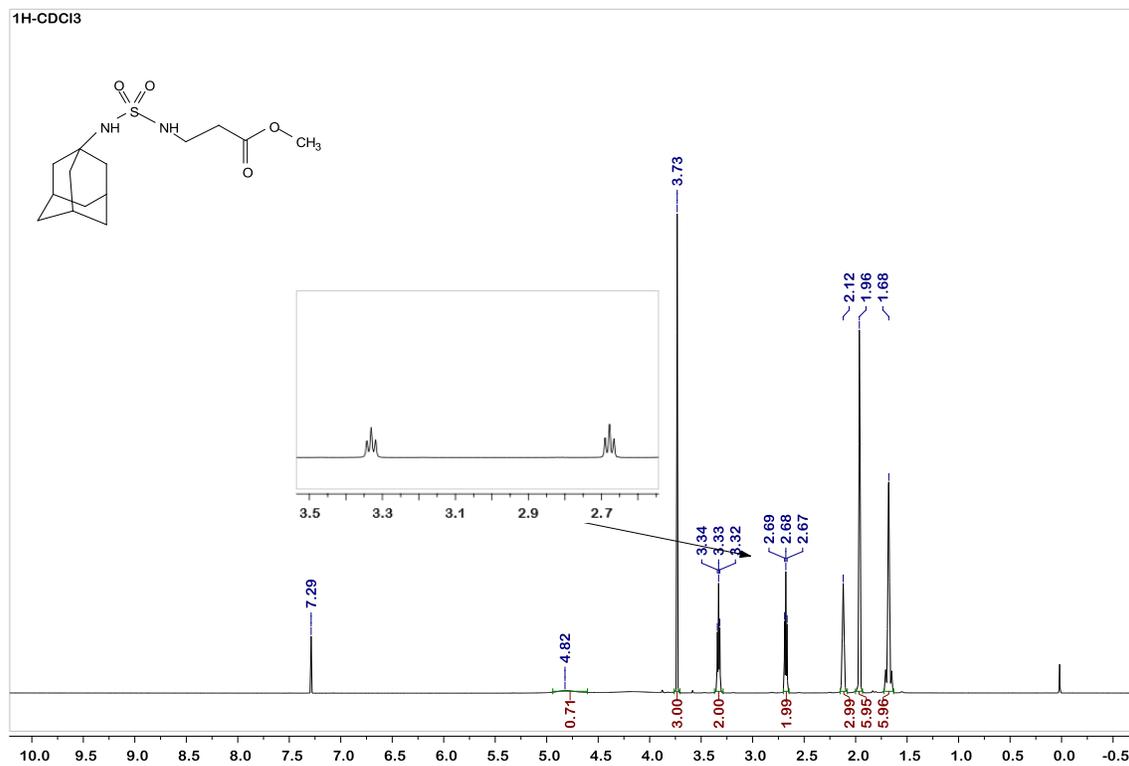
En cuanto a los ensayos realizados de inhibición de las isoformas CAII y CAVII, se observa que las sulfamidas inhiben la anhidrasa carbónica en el orden de nanomolar o subnanomolar para CAVII y, a la vez, son al menos 4000 veces más activas en esta isoforma que para CAII. En relación a la acetazolamida, (un potente inhibidor de anhidrasa carbónica que fue utilizado como anticonvulsivo) [3], se observa un aumento de la potencia y, sobre todo, de la selectividad. La acetazolamida registra un K_i de 2,5 nM frente a CAVII y de 12 nM frente a CAII en las mismas condiciones de evaluación.[4] El compuesto **12** muestra una K_i un orden de magnitud menor que acetazolamida en CAVII y mucha más selectividad respecto de CAII (unas 41000 veces menos activo). Por lo tanto, todas las estructuras evaluadas son muy promisorias en cuanto a su potencia y selectividad frente a CAVII. Estos resultados direccionan futuras investigaciones tendientes a un mayor conocimiento del perfil antiepiléptico *in vivo* de estos compuestos frente a modelos de epilepsia febril.

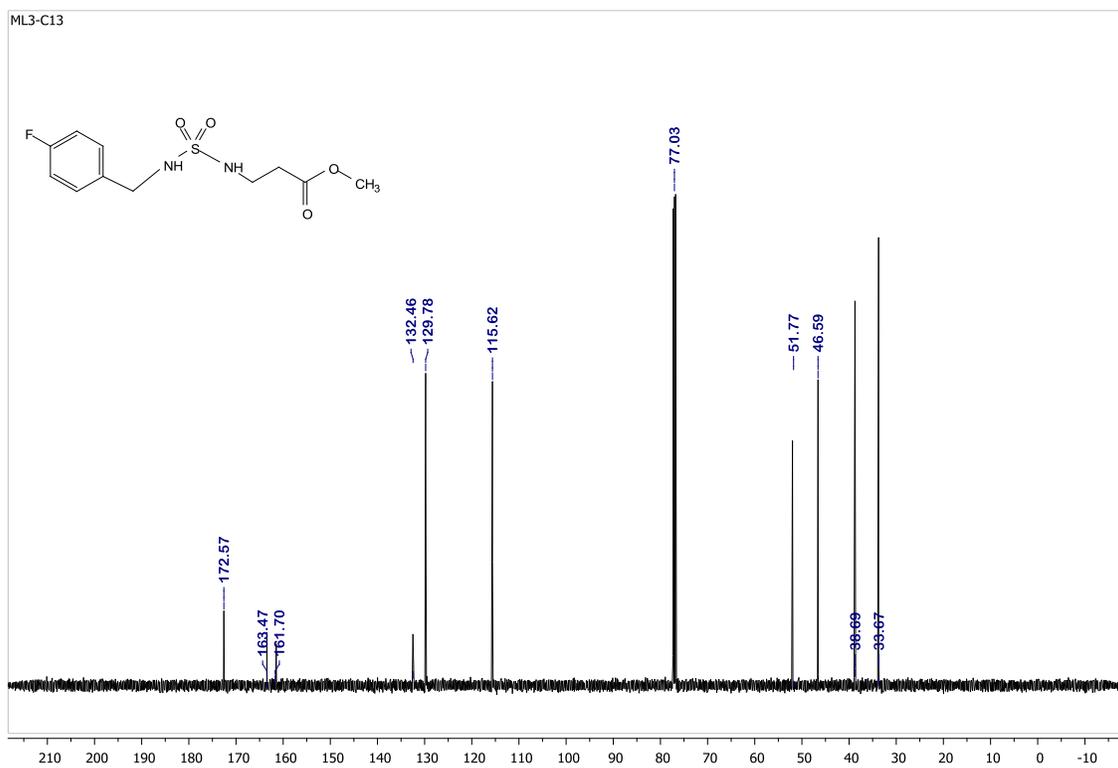
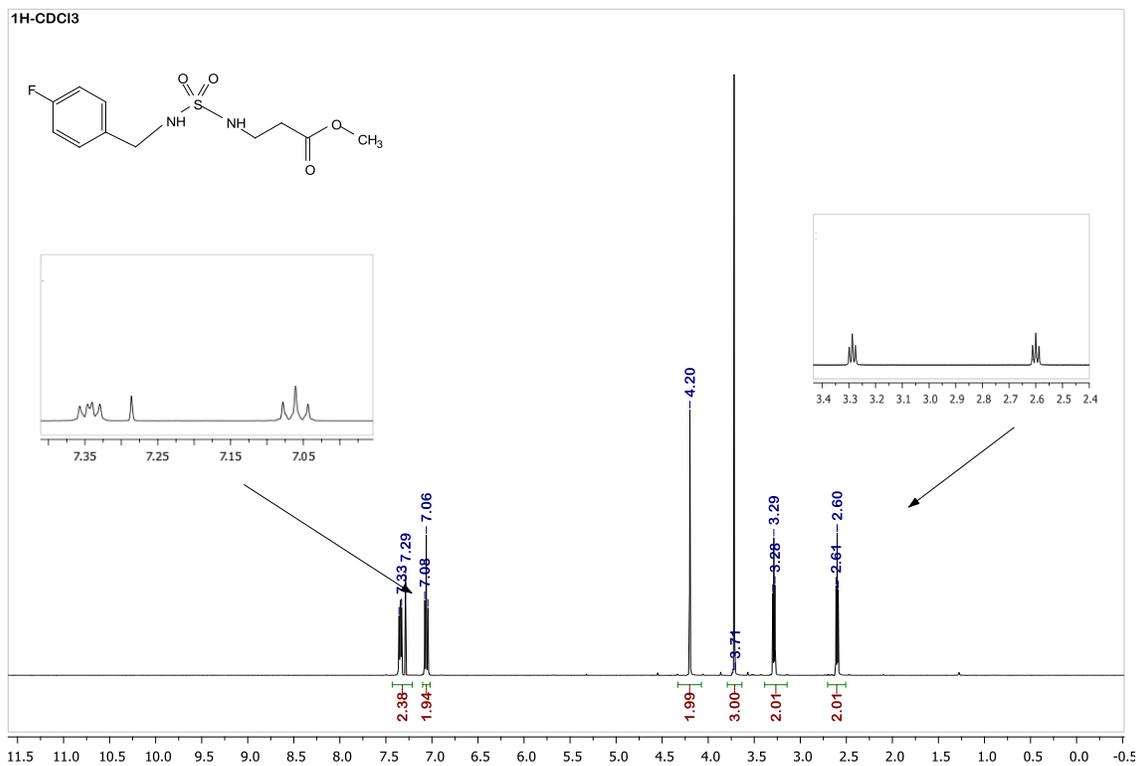
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DEL CAPITULO VII

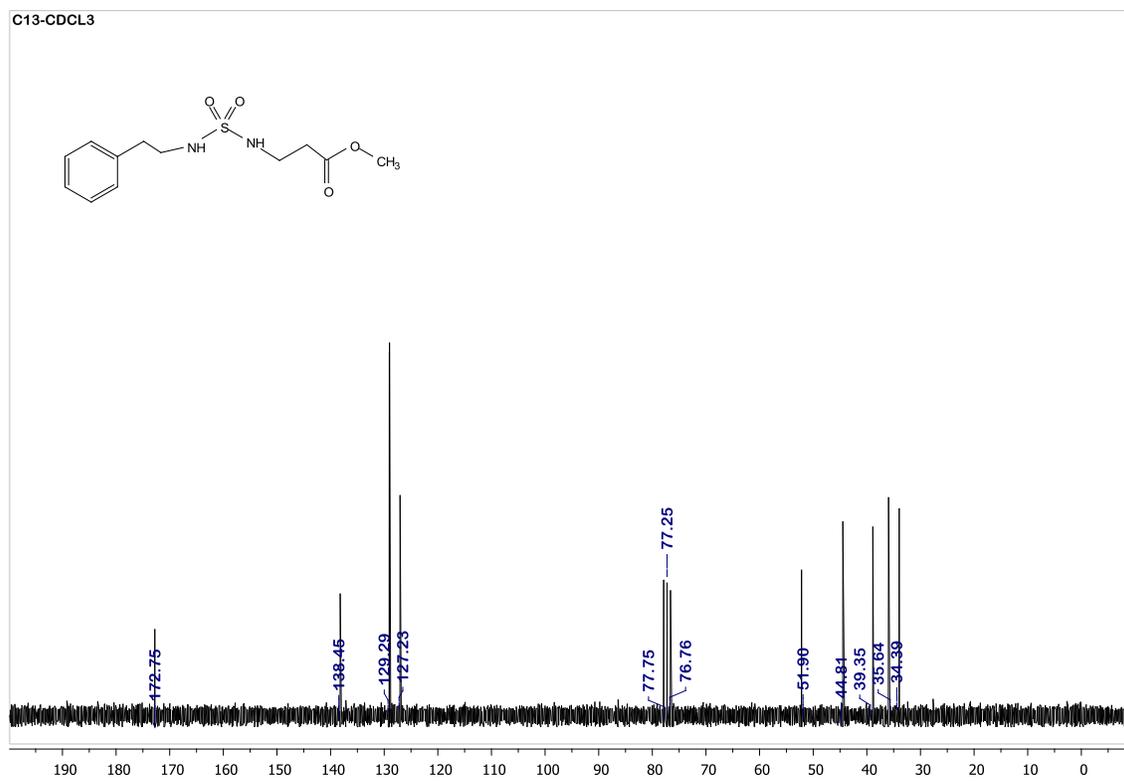
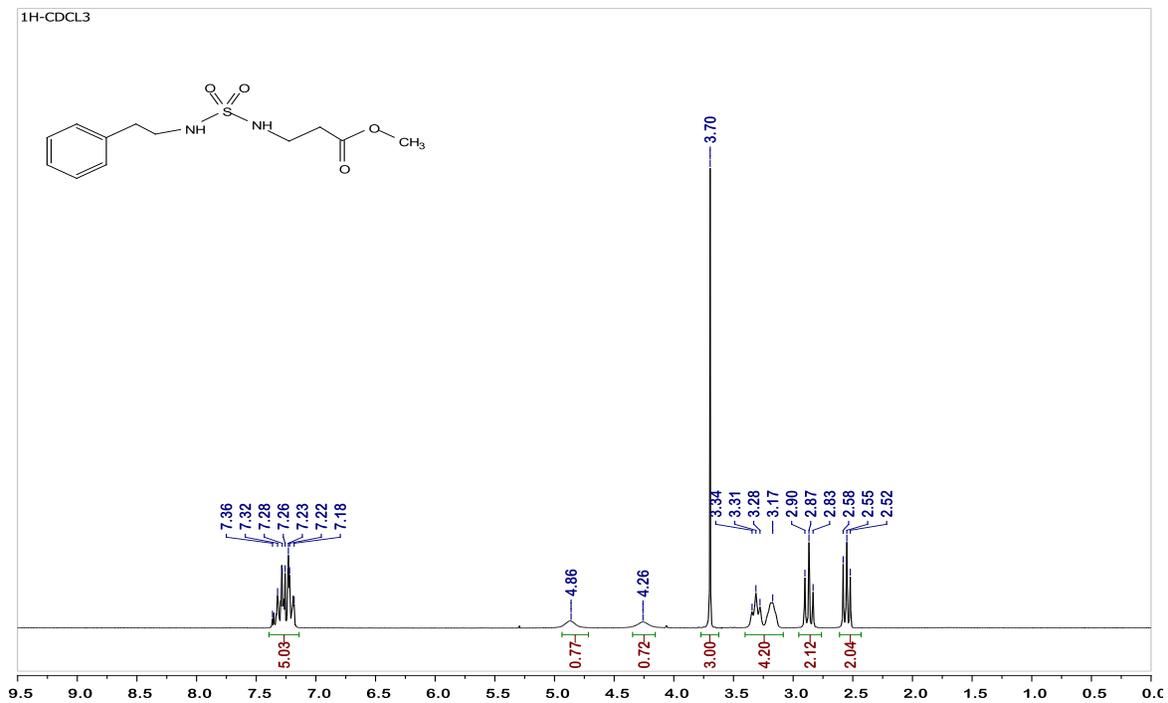
- [1]Gavernet, L.; Elvira,J.; Samaja,G.; Pastore, V.; Sella Cravero, M.; Enrique,A.; Estiu,G.; Bruno Blanch, L.*Journal of Medicinal Chemistry* 52, 1592–1601. (2009)
- [2]Isoherranen, N.; Woodhead, J.H.; White, H.S.; Bialer, M. *Epilepsia* 42, 831-836. (2001)
- [3]Thiry, A.; Dogné, J.M.; Supuran ,C. T.; Masereel, B. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7, 855-864.(2007)
- [4]Vullo, D.; Voipio, J.; Innocenti, A.; Rivera, C.; Ranki, H.; Scozzafava, A.; Kaila, K.; Supuran, C.T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 4 (15), 971–976.(2005)

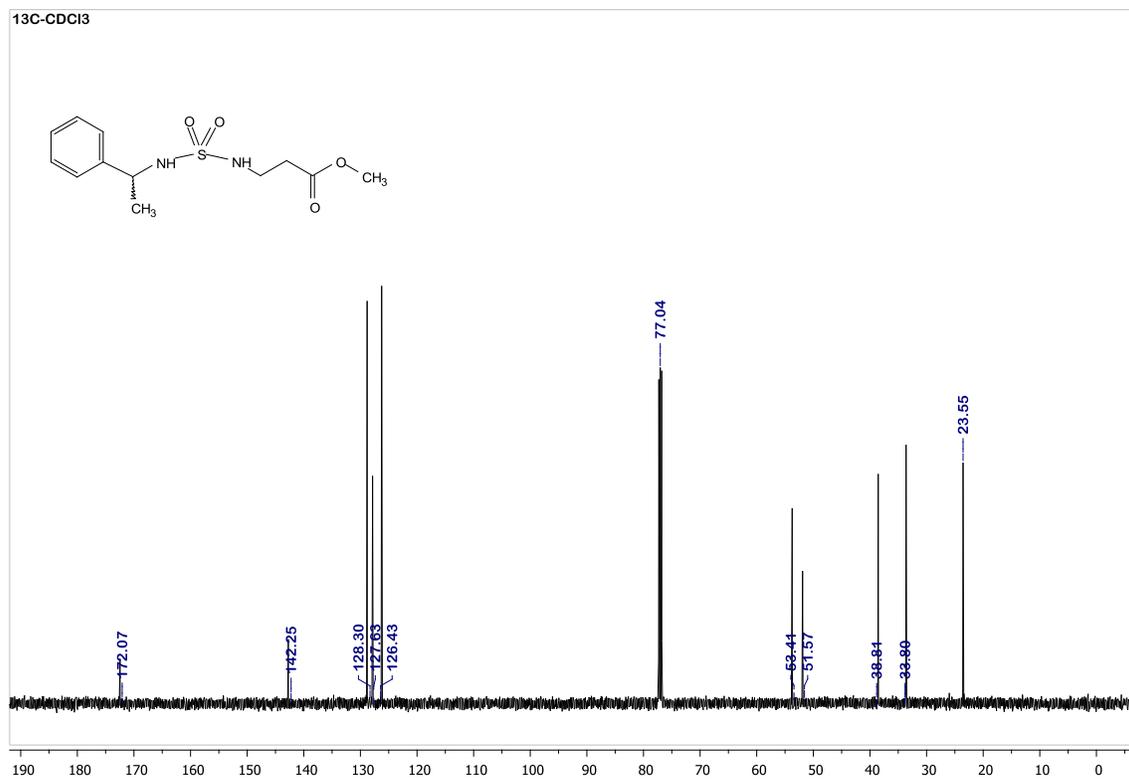
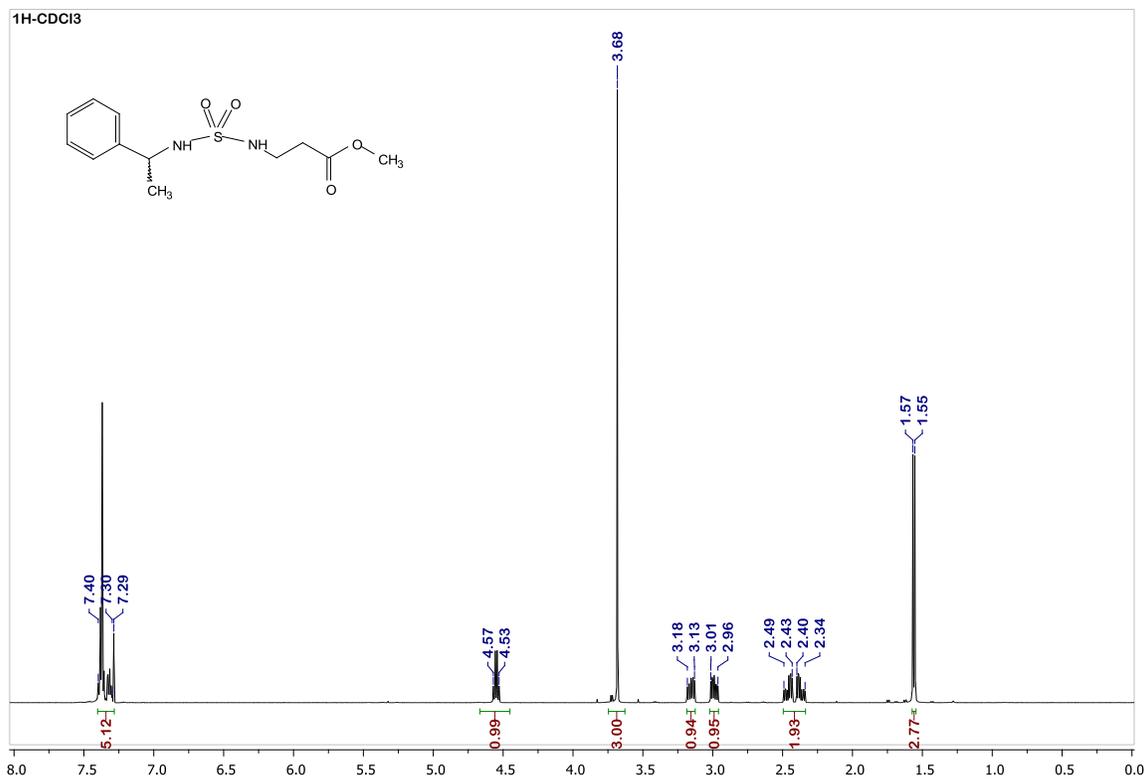
ANEXO I

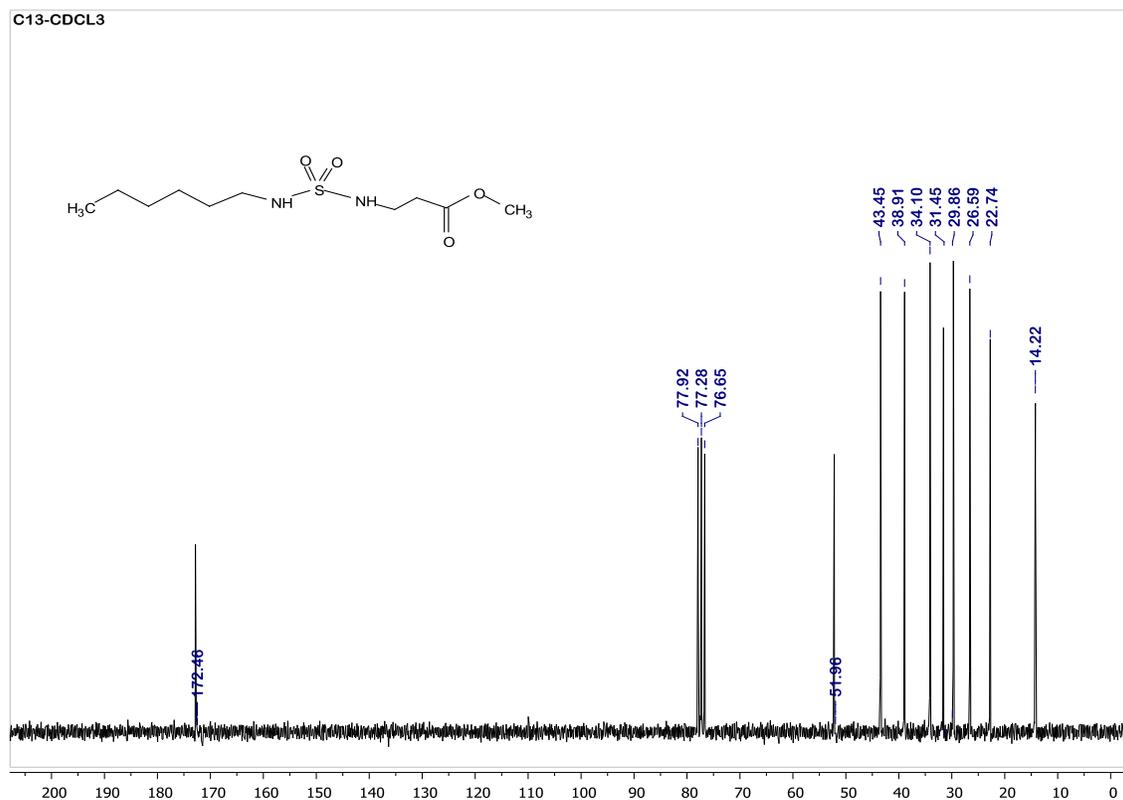
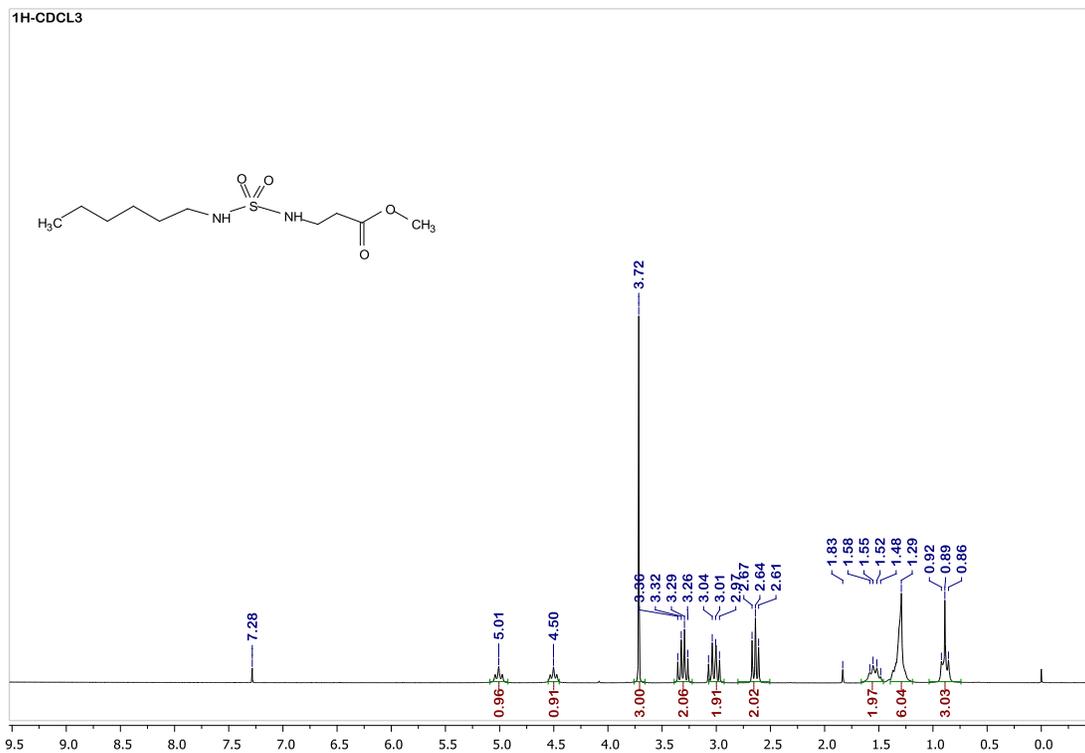
ESPECTROS RMN

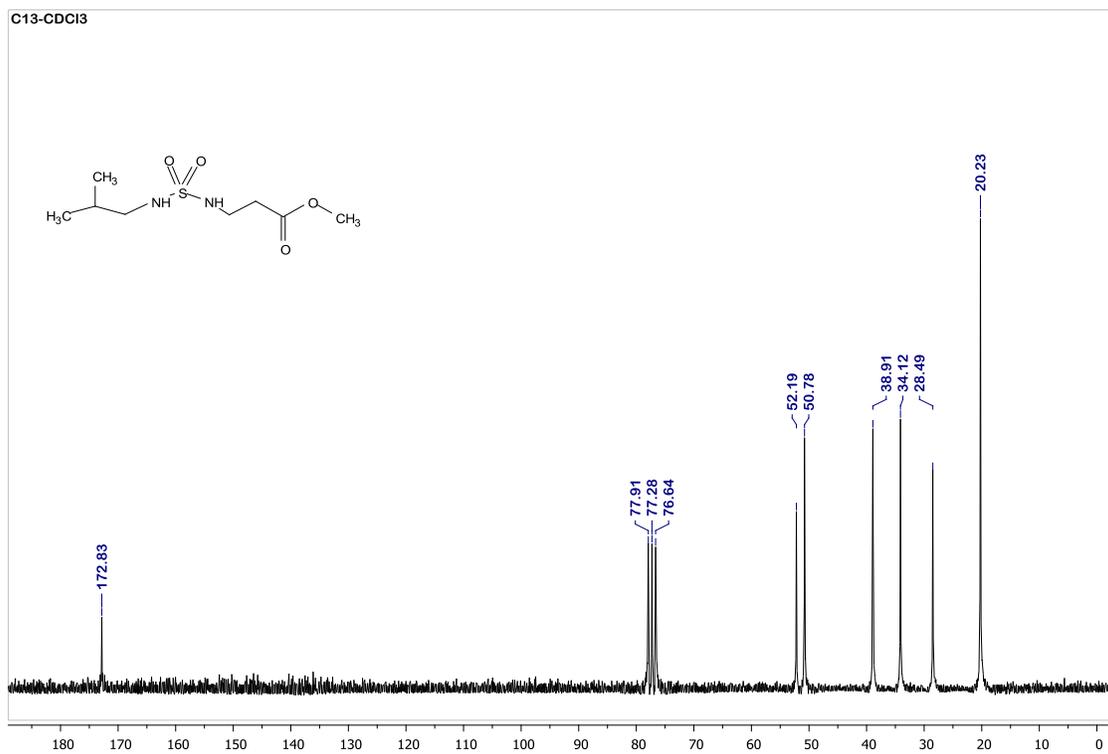
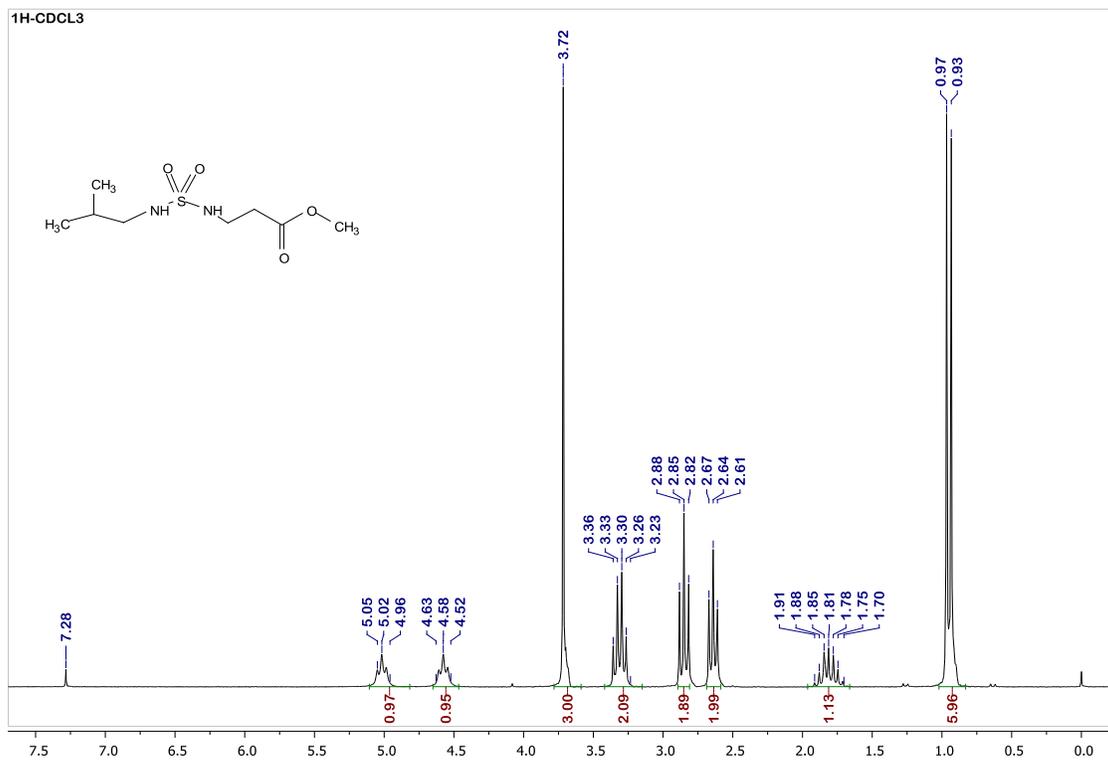


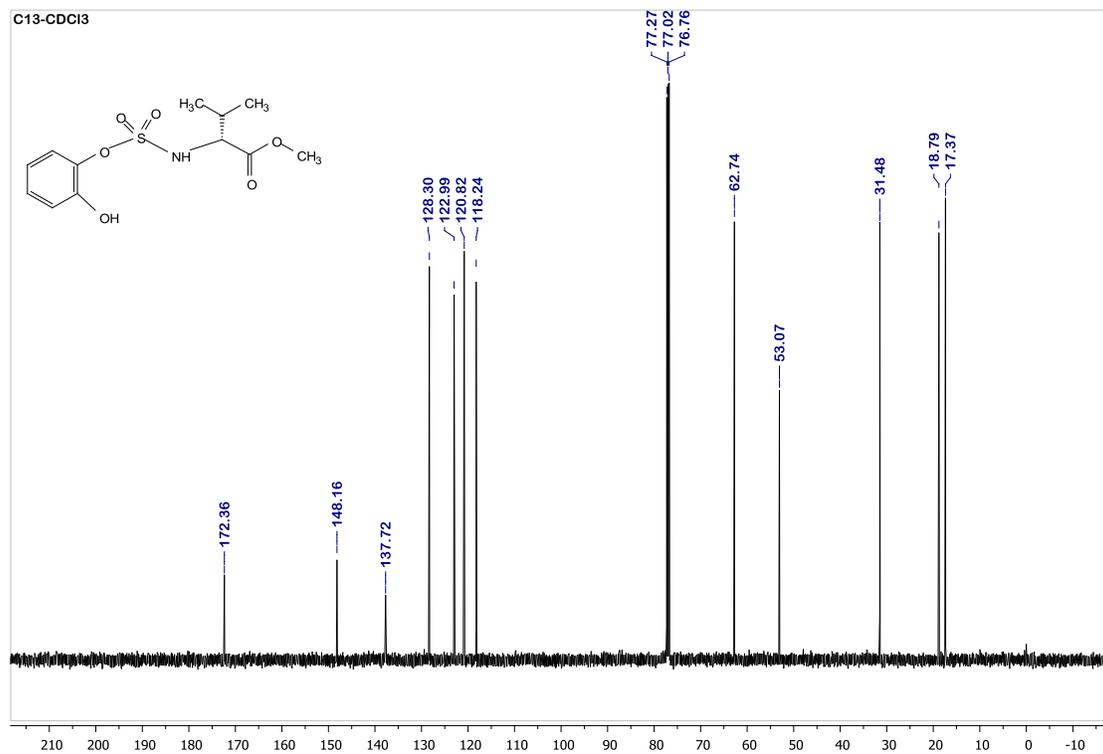
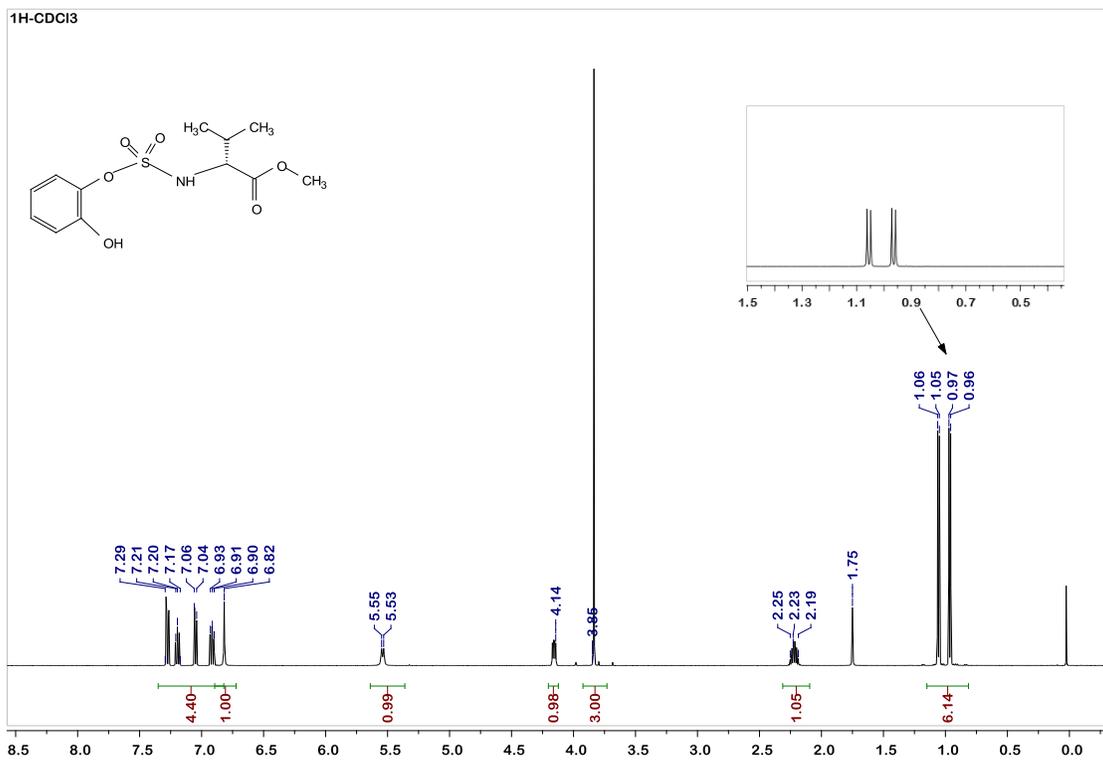












Anexo I

