



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

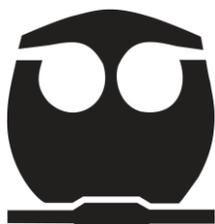
**“Síntesis y determinación de la actividad farmacológica de
nuevos análogos 1,4-Benzodiazepinas como Sedante-
Hipnóticos”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

LORENA PÉREZ SALDAÑA



México, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

NO DESISTAS

Cuando vayan mal las cosas como a veces suelen ir;

Cuando ofrezca tu camino sólo cuestas que subir,

Cuando tengas poco haber, pero mucho que pagar y precise sonreír aún

teniendo que llorar,

Cuando el dolor te agobie y no puedas ya sufrir,

Descansar acaso debes;

Pero nunca desistir.

Lucha pues, por más que en la brega tengas que sufrir

iCuándo todo está peor, mas debemos insistir!

GRACIAS DIVINA MISERICORDIA!!!

Dedicatorias

A mis padres Zita y Víctor:

Por el amor, comprensión y apoyo que me han brindado siempre, por ayudarme a levantarme ante cualquier fracaso siempre con la frente en alto y a conseguir cada una de mis metas. Mil gracias papás, los amo.

A mi esposo Gustavo:

Porque a su lado obtuve el regalo más valioso que he tenido en toda mi vida y por quien tengo la fuerza necesaria para seguir adelante, mi Emily... los buenos momentos jamás se olvidan. Y por ayudarme en este proyecto tan importante. Los amo.

A mis hermanas:

Olga, Bety y a mi hermano Víctor porque siempre me han apoyado, porque nunca me han dejado sola, los quiero mucho y siempre serán mis mejores amigos.

A mis profesores:

Al Dr. Atonatiu Gómez, la Profa. Ruth Bustamante, la Profa. Ana María Vázquez y especialmente a la Dra. Elia B. Naranjo por tenerme paciencia, por ocuparse y preocuparse por mí y mi tesis, gracias a todos; Dra. Elia, gracias por ser parte de mis triunfos, por su confianza y ser una gran amiga.

A mis amigos y a la Facultad de Química:

Por ser parte de mi vida y por haber estado conmigo en esta faceta tan importante de mi carrera. Un orgullo ser parte de la Facultad de Química, UNAM, por supuesto, VIVA LA UNIVERSIDAD!!.

Jurado Asignado

Presidente:	Dra. Naranjo Rodríguez Elia B.
Vocal:	M. en C. Vázquez Álvarez Ana M.
Secretario:	MVZ. Gómez Martínez Atonatiu E.
1er Suplente:	M. en C. Ortiz Osronio Alejandro.
2º Suplente:	M. en C. Bustamante García Ruth.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Neurofarmacología Edificio "A", Laboratorio 1/E, Sección de Farmacología, Departamento de Farmacia. Facultad de Química y Laboratorio de Química Orgánica, FES Cuautitlán, UNAM.

Asesor: _____
DRA. NARANJO RODRÍGUEZ ELIA
B.

Asesor Técnico: _____
DRA. GARCÍA MELLADO OLIVIA.

Sustentante: _____
PÉREZ SALDAÑA LORENA

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. Índice de abreviaturas	3
2. Índice de figuras	5
3. Índice de tablas	5
4. Índice de cuadros	6
5. Índice de diagramas	6
6. Índice de gráficas	6
7. Resumen	8
8. Introducción	9
9. Generalidades	11
9.1 Benzodiazepinas	11
9.1.1 Historia	11
9.1.2 Clasificación de las Benzodiazepinas.	12
9.2 Farmacocinética de Benzodiazepinas	14
9.3 Farmacodinamia de Benzodiazepinas	16
9.4 Receptor GABA-BZP	21
9.5 Diazepam	24
10. Relación estructura actividad	25
11. Justificación	27
12. Objetivos	27
13. Hipótesis	28
14. Material y Métodos	28
14.1 Material	28
14.2 Reactivos	28
14.3 Método	29
15. Resultados	34

15.1 Selección del vehículo para la administración del compuesto.	34
15.2 Prueba de toxicidad para determinar la CL ₅₀ de cada análogo de Benzodiazepinas.	34
15.3 Curva Dosis Respuesta Cuantal de Diazepam.	44
15.4 Curva Dosis Respuesta Cuantal para los análogos de Benzodiazepinas.	46
16. Tabla de resultados	52
17. Discusión de resultados	53
18. Conclusiones	55
19. Anexo	56
19.1 Metilcelulosa	56
19.2 Propilenglicol	56
19.3 Tween 80	56
19.4 Clave de las benzodiazepinas	57
sintetizadas.	
20. Bibliografía	59

1. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre
Dra	Doctora
BZP	Benzodiazepinas
DZP	Diazepam
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
GABA	Ácido Gamma Amino Butírico
Ctrl+	Control Positivo
CMRGB	Complejo Macromolecular del Receptor del Ácido Gamma Amino Butírico
Cl ⁻	Ión Cloro
CO ₂	Bióxido de Carbono
SSA	Ácido Succínico Semialdehído
i.p.	Intra Peritoneal
DE ₅₀	Dosis Efectiva 50
DT ₅₀	Dosis Tóxica 50
DL ₅₀	Dosis Letal 50
ppm	Partes Por Millón
CYP 450	Citocromo P450
SSDH	Succinil Semialdehído Deshidrogenasa
GAD	Ácido Glutámico Descarboxilasa
KDa	Kilo Daltons
GABA _A	Receptores A del Ácido Gamma Aminobutírico
GABA _B	Receptores B del Ácido Gamma Aminobutírico
GABA T	Ácido Gamma Aminobutírico Transaminasa
SNC	Sistema Nervioso Central
BZ ₁ (ω1)	Subtipo 1 de receptor de Benzodiazepinas
BZ ₂ (ω2)	Subtipo 2 de receptor de Benzodiazepinas
LS	Latencia de Sedación
LH	Latencia de Hipnosis

LRH	Latencia de Recuperación de la Hipnosis
S	Sedación
H	Hipnosis
RH	Recuperación de la Hipnosis
UP	Unidades Probits

2. ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura y nombre sistemático de las Benzodiazepinas.
- Figura 2. Clave de Benzodiazepinas sintetizadas.
- Figura 3. Estructura y nombre sistemático del Clordiazepóxido.
- Figura 4. Diagrama de mecanismo de acción del neurotransmisor GABA.
- Figura 5. Complejo macromolecular del receptor GABA.
- Figura 6. Ciclo de Krebs.
- Figura 7. Síntesis del GABA a partir del glutamato.
- Figura 8. Receptor GABA – A.
- Figura 9. Resumen esquemático de síntesis del GABA y su receptor.
- Figura 10. Estructura química y tridimensional del Diazepam.
- Figura 11. Estructura general de las Benzodiazepinas.

3. ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Solubilidad de los análogos de Benzodiazepinas.
- Tabla 2. Número de Artemias para determinar la CL_{50} del compuesto IE-III-(1).
- Tabla 3. Número de Artemias para determinar la CL_{50} del compuesto IE-IV-H.
- Tabla 4. Número de Artemias para determinar la CL_{50} del compuesto IE-IV-7.
- Tabla 5. Número de Artemias para determinar la CL_{50} del compuesto IE-IV-8.
- Tabla 6. Número de Artemias para determinar la CL_{50} del compuesto IE-IV-5.
- Tabla 7. Valores obtenidos del efecto Sedante-Hipnótico para Diazepam.
- Tabla 8. Valores obtenidos para el compuesto IE-III-(1).

Tabla 9. Valores obtenidos para el compuesto IE-IV-H.

Tabla 10. Valores obtenidos para el compuesto IE-IV-7.

Tabla 11. Valores obtenidos para el compuesto IE-IV-8.

Tabla 12. Valores obtenidos para el compuesto IE-IV-5.

Tabla 13. CL_{50} determinada por la prueba de Artemia Salina para análogos de Benzodiazepinas.

Tabla 14. DE_{50} y DT_{50} para análogos de Benzodiazepinas.

4. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Metabolismo de algunas Benzodiazepinas.

5. ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Prueba de solubilidad.

Diagrama 2. Prueba de Artemia Salina.

Diagrama 3. Determinación del efecto sedante – hipnótico.

6. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. % de mortalidad por la prueba de Artemia Salina para compuesto IE-III-(1).

Gráfica 2. Número de Artemias Acumulada para el compuesto IE-III-(1).

Gráfica 3. Determinación de la CL_{50} por el método Probits para el compuesto IE-III-(1).

Gráfica 4. % de mortalidad por la prueba de Artemia Salina para compuesto IE-IV-H.

Gráfica 5. Número de Artemias Acumuladas para el compuesto IE-IV-H.

Gráfica 6. Determinación de la CL_{50} por el método Probits para el compuesto IE-IV-H.

Gráfica 7. % de mortalidad por la prueba de Artemia Salina para compuesto IE-IV-7.

- Gráfica 8. Número de Artemias Acumuladas para el compuesto IE-IV-7.
- Gráfica 9. Determinación de la CL_{50} por el método Probits para el compuesto IE-IV-7.
- Gráfica 10. % de mortalidad por la prueba de Artemia Salina para compuesto IE-IV-8.
- Gráfica 11. Número de Artemias Acumuladas para el compuesto IE-IV-8.
- Gráfica 12. Determinación de la CL_{50} por el método Probits para el compuesto IE-IV-8.
- Gráfica 13. % de mortalidad por la prueba de Artemia Salina para compuesto IE-IV-5.
- Gráfica 14. Número de Artemias Acumuladas para el compuesto IE-IV-5.
- Gráfica 15. Determinación de la CL_{50} por el método Probits para el compuesto IE-IV-5.
- Gráfica 16. Efecto de Sedación-Hipnosis para el Diazepam Comercial en Unidades Probits.
- Gráfica 17. Efecto de Sedación-Hipnosis para el compuesto IE-III-(1).
- Gráfica 18. Efecto de Sedación-Hipnosis para el compuesto IE-IV-H.
- Gráfica 19. Efecto de Sedación-Hipnosis para el compuesto IE-IV-7.
- Gráfica 20. Efecto de Sedación-Hipnosis para el compuesto IE-IV-8.
- Gráfica 21. Efecto de Sedación-Hipnosis para el compuesto IE-IV-5.
- Gráfica 22. % de efecto de Sedación para los compuestos que presentan dicho efecto.
- Gráfica 23. % de efecto de Hipnosis para compuestos que presentan dicho efecto.
- Gráfica 24. % de efecto de Recuperación de la Hipnosis para compuestos que presentan dicho efecto.

7. RESUMEN

"Síntesis y determinación de la actividad farmacológica de nuevos análogos 1,4-Benzodiazepinas como Sedante-Hipnóticos"

Las Benzodiazepinas (BZP) como el Diazepam (DZP), son fármacos que se utilizan como ansiolíticos, relajantes musculares, preanestésicos y sedantes hipnóticos, pero presentan efectos adversos severos, como la tolerancia y la dependencia, estos últimos efectos, generan la posibilidad de plantear la búsqueda de "nuevos fármacos", "tipo BZP", pero que carezcan de los efectos adversos de las mismas. En esta tesis se evalúa el efecto Sedante – Hipnótico de nuevos derivados o análogos BZP en ratones machos, con la finalidad de encontrar fármacos que puedan administrarse a menor dosis de la usualmente recomendada. Este trabajo se llevó a cabo en 2 etapas, la primera correspondió a la síntesis de los análogos BZP, la cual se realizó en la Facultad de Química y en el Instituto de Química, UNAM. Una vez obtenidos los compuestos, se les realizó un ensayo de solubilidad a cada uno de ellos, utilizando diferentes disolventes. Posteriormente, cada uno de los nuevos derivados de BZP's, se sometieron a la prueba de toxicidad la cual fue evaluada por el método de Artemia Salina. En la segunda etapa, se realizó un estudio piloto para encontrar las dosis a las cuales se obtendrían el efecto sedante – hipnótico.

Posteriormente, con las dosis seleccionadas se realizó una curva dosis respuesta cuantil; determinándose la dosis efectiva 50 (DE₅₀) y tóxica 50 (DT₅₀). Con estos nuevos derivados se espera obtener sustancias con potencial farmacológico con un grado de seguridad que permita desplazar a fármacos "antiguos" utilizados para el tratamiento del insomnio y la ansiedad. Las probabilidades terapéuticas de los análogos de BZP sintetizados están relacionadas con las acciones farmacológicas, mecanismo de acción y farmacocinética de las BZP ya patentadas.

8. INTRODUCCIÓN

Las Benzodiazepinas (BZP) de nombre sistemático 5-fenil-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-ona (Figura 1), son medicamentos psicotrópicos que actúan sobre el SNC, con características farmacológicas en común, son sedantes e hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos, amnésicos y relajantes musculares (McKernan RM; Dawson GR, Jun 2000), el término Benzodiazepina se refiere a la porción en la estructura química de estos fármacos compuesto por el anillo de benceno unido a otro anillo de siete miembros heterocíclicos llamado diazepina.

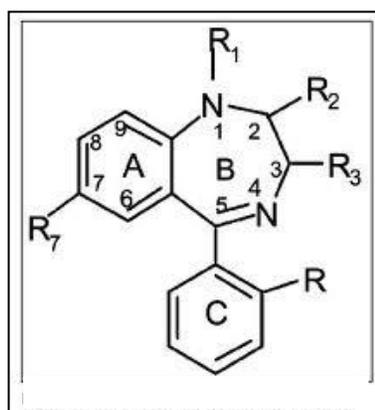
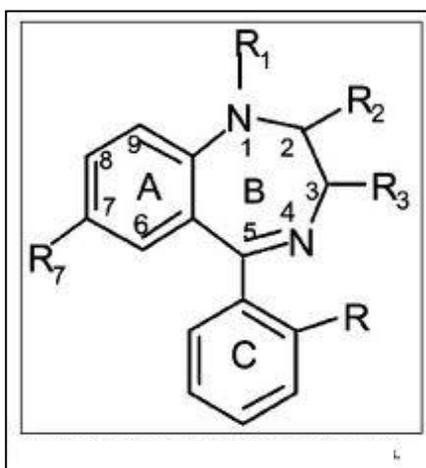


Figura 1. Benzodiazepina. Nombre sistemático: 5-fenil-1H-benzo[e][1,4] diazepin-2(3H)-ona. (Petrucci R. S., 2002).

Las BZP's son útiles en la medicación preanestésica y con dosis mayores son utilizadas como inductores de la anestesia general y para el mantenimiento de la misma. Estos fármacos pueden también producir efecto orexígeno, disartria y ataxia con dosis altas. Su uso crónico e indiscriminado puede producir dependencia psíquica y física y ante la supresión brusca pueden desencadenar un síndrome de abstinencia con efectos contrarios a los que producían o efecto "rebote". (Quesada P., 2008).

Posiblemente por sus propiedades ansiolíticas, las BZP son en la actualidad los fármacos más ampliamente prescritos en el mundo y su utilización indiscriminada e irracional ha producido millones de usuarios crónicos.

Debido a la importancia que tienen este tipo de fármacos a nivel clínico, resulta de gran interés el desarrollo de nuevos derivados benzodiazepínicos (figura 2 y anexo), analizados en esta tesis, con actividad farmacológica, que puedan usarse de forma efectiva como Sedantes - Hipnóticos y que además, presenten el menor número de efectos secundarios.



R1	R2	R	R7	Clave
H	= O	O - Cl	- Cl	IE-III-(1)
CH ₃	= O	H	- Cl	IE-IV-H (DIAZEPAM)
CH ₃	= O	O - F	- Cl	IE-IV-5
CH ₃	= O	P - F	- Cl	IE-IV-7
Et-	= O	P - F	- Cl	IE-IV-8

Figura 2. Clave de Benzodiazepinas sintetizadas.

Un fármaco hipnótico produce somnolencia y facilita la iniciación y el mantenimiento de una fase de sueño, que se asemeja al sueño natural en sus características electroencefalográficas y del que es fácil despertar al paciente. Un sedante es una sustancia química que deprime el sistema nervioso central (SNC), resultando en efectos potenciadores o contradictorios entre: calma, relajación, reducción de la ansiedad, adormecimiento, reducción de la respiración, habla trabada, euforia, disminución del juicio crítico, y retardo de ciertos reflejos. Por tal motivo, en este trabajo se realiza un estudio de cernimiento farmacológico para evaluar el efecto Sedante – Hipnótico de una síntesis nueva de análogos de BZD.

9. GENERALIDADES

9.1 BENZODIAZEPINAS (BZP)

9.1.1 Historia

Desde la antigüedad, se han usado pociones para inducir la Sedación, Hipnosis y /o sueño, sin embargo, eran demasiado imprevisibles para perdurar en la medicina moderna. El primer agente específicamente introducido como sedante - hipnótico fue el bromuro. A mediados de la década de los 50 ´s se empezaron a estudiar métodos para evaluar el comportamiento de fármacos con efectos tranquilizantes.

La primera BZD fue el Clordiazepóxido (Figura 3), descubierta en 1949 por el científico Leo Sternbach (1908–2005), sintetizada en 1955, inicialmente el compuesto fue dejado de lado porque se creyó que era inerte, dos años más tarde se descubrieron en forma inesperada sus efectos sedantes y miorelajantes, posteriormente, el uso a dosis relativamente pequeñas de Clordiazepóxido en animales demostraron que el compuesto era un efectivo hipnótico, ansiolítico y relajante muscular, a partir de entonces se promovió su evaluación clínica en el hombre para el alivio de la ansiedad.

Después del lanzamiento del Clordiazepóxido, se comercializó el Diazepam con el nombre de Valium (Bulach R.; Russnak M., 2004) y de ahí en adelante se descubrieron varios grupos de dichas sustancias, algunas de las cuales se han ido discontinuando y han quedado otras entre nuevas y antiguas. (Goodman, 2009).

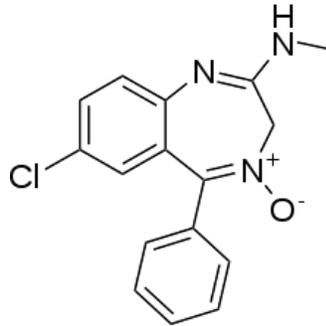


Figura 3. Estructura del Clordiazepóxido. Nombre sistemático 7-cloro-5-fenil-2-metil-amino-4-óxido-3H-1,4-benzodiazepina. (Petrucci, R. S., 2002).

La mayoría de las BZP poseen propiedades Sedante – Hipnóticas en grado variable, estas propiedades se han explotado en la clínica médica, en especial para inducir el sueño.

9.1.2 Clasificación de las Benzodiazepinas

En forma práctica las Benzodiazepinas se dividen en dos grandes grupos según su uso:

- a) Grupo hipnótico o inductor del sueño
- b) Grupo ansiolítico o tranquilizante

Por otra parte en cuanto a la clasificación por vida media de eliminación las Benzodiazepinas se dividen en cuatro grupos:

1. De duración ultra-corta, con un tiempo de vida media menor de 6 horas, los cuales se prefieren por su eliminación más rápida y por tanto menos persistente de efectos secundarios, así mismo el tiempo de iniciación de su acción es más rápida y se prefieren por tal razón como inductores del sueño. Ejemplo son el Triazolam, el Midazolam y el Brotizolam. (León, C., 1999).
2. Duración corta, semivida menor de 12 horas con pocos efectos residuales al tomarse antes de acostarse en la noche, aunque su uso regular puede conducir a insomnio de rebote y ansiedad al despertar (Quesada, P., junio 2008), entre estas están el Lorazepam, Bromazepam y el Alprazolam.
3. Compuestos intermedios, tienen un tiempo de vida media entre 12 y 24 horas, pueden tener efectos residuales durante la primera mitad del día y el insomnio de rebote más frecuente al discontinuar su uso. Con síntomas de abstinencia durante el día. Un ejemplo son el Clonazepam, Flunitrazepam, Nitrazepam. (León, C., 1999).
4. Compuestos de larga duración, donde el tiempo de vida media es mayor de 24 horas. (South African Medical revista, 1990). El fuerte efecto de sedación casi siempre perdura durante el día siguiente si se usan con el fin de tratar el insomnio; sus efectos secundarios como somnolencia, ataxia, hipotensión, trastornos gastrointestinales y vértigo duran más tiempo debido a su tiempo de eliminación, en este último están el Clobazam, Diazepam y el Flurazepam. (León, C., 1999).

9.2 Farmacocinética de las Benzodiazepinas

La dosis administrada, el funcionalismo hepático, la edad del paciente, administración en dosis única o en dosis múltiple del fármaco, la liposolubilidad del fármaco y las interacciones farmacológicas son factores que influyen en la variabilidad inter e intraindividual. (Sociedad Iberoamericana de Información Científica. SIIC, 2002).

Todas las BZP se unen a la albúmina plasmática humana, se metabolizan por sistemas enzimáticos microsomales del hígado produciendo metabolitos activos, mismos que se eliminan principalmente por orina, en forma de glucurónido, sin actividad farmacológica.

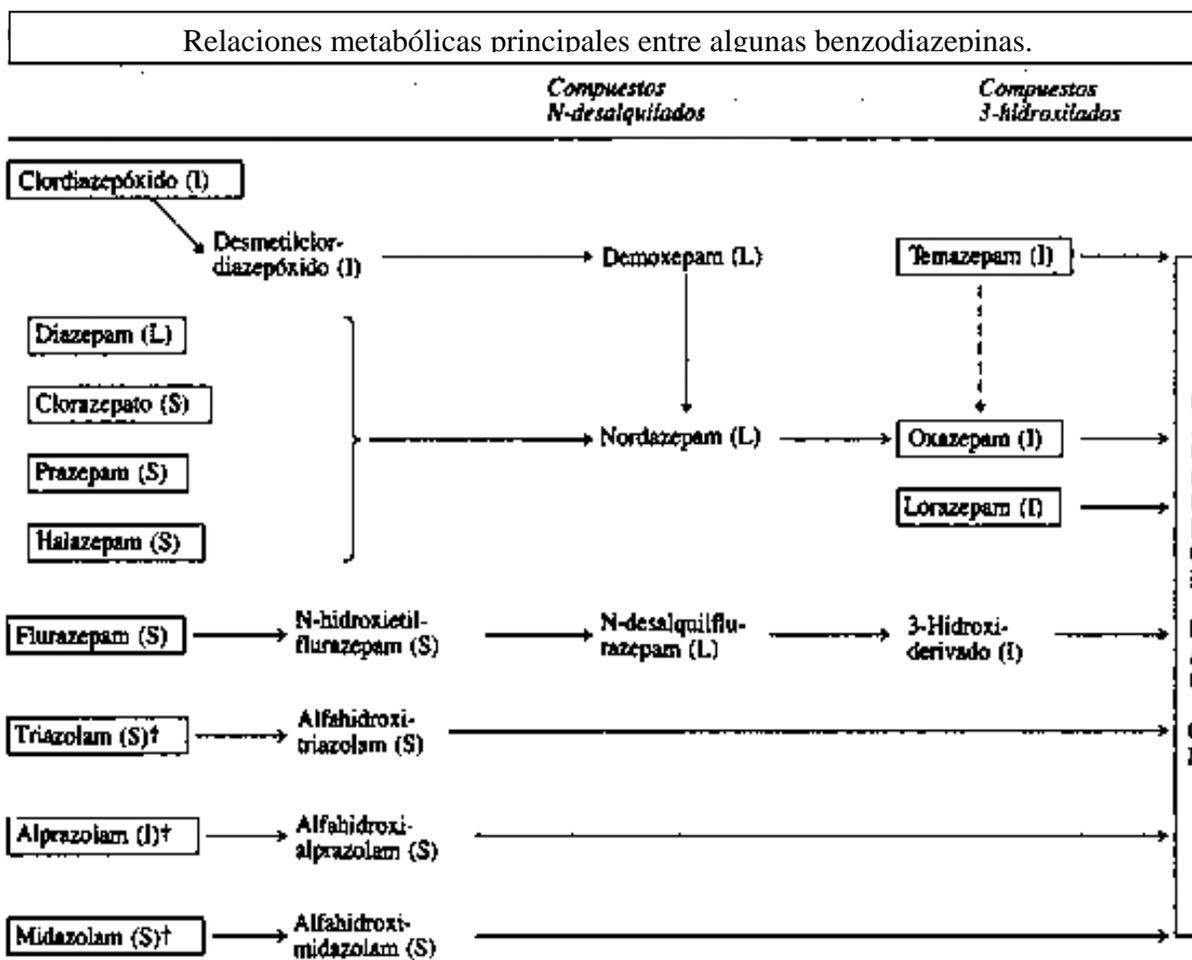
El metabolismo de las BZP es hepático y puede ser en dos fases: la fase I que es una reacción de oxidación microsomal, donde se modifica o remueve el sustituyente que por lo general se encuentra en la posición 1 o 2 del anillo de diazepina dando lugar a una hidroxilación o N-desalquilación en la posición 3 por parte del sistema enzimático citocromo P-450 (CYP 450); durante esta primera fase se producen una serie de metabolitos farmacológicamente activos. La fase II, consiste en una conjugación de grupos hidroxilos y aminos por glucuronil transferasas para formar compuestos inactivos que son excretados por la orina. (Goodman, 2009).

Por ejemplo el desmetildiazepam que tiene una vida media de 40 horas, es un metabolito activo de: Clordiazepóxido, Diazepam y Prazepam.

Las Benzodiazepinas que se utilizan para inducir hipnosis tienen las características mencionadas en el cuadro 1. (Cuadro 1).

Por otra parte las triazolobenzodiazepinas (Alprazolam y Triazolam) sufren alfa hidroxilación y estos compuestos rápidamente se conjugan para formar glucurónidos inactivos de tal forma que sus efectos farmacológicos son cortos.

Metabolismo de BZP



Cuadro 1. Metabolismo de algunas BZP. En las reacciones de la Fase I se obtienen metabolitos activos (*), lo que aumenta su tiempo de vida media, sin embargo, otras no tienen actividad (***) y al metabolizarse se vuelven activas.

Los fármacos más liposolubles administrados en dosis única tienen menor duración de acción debido a la redistribución que presenta el fármaco, mientras que la administración de dosis múltiples aumenta la duración de acción debido a que el fármaco y sus metabolitos activos se acumulan en el tejido adiposo; no obstante, esto no se refleja en el efecto terapéutico. (Bailey IG., Ward M., 1994).

9.3 Farmacodinamia de las Benzodiazepinas

Las BZP ejercen su acción al actuar sobre receptores específicos localizados a nivel del SNC, actuando en particular, sobre el sistema límbico. Los receptores benzodiazepínicos forman parte del complejo macromolecular del receptor del ácido gamma-aminobutírico (CMRGB).

Todas las BZP actúan aumentando la acción de una sustancia química natural del cerebro, el GABA (ácido gamma-aminobutírico), que es un neurotransmisor, es decir, un agente que transmite mensajes desde una célula cerebral (neurona) hacia otra. El GABA transmite un mensaje de inhibición: comunica a las neuronas con las que se pone en contacto que disminuyan la velocidad o que dejen de transmitir, esto significa que el GABA tiene un efecto general tranquilizante en el cerebro: de cierta forma, es el hipnótico y tranquilizante natural con que cuenta el organismo. Las BZP aumentan esta acción inhibitoria mediada por el GABA, ejerciendo de esta forma una acción adicional de inhibición en las neuronas. Cuando el GABA es liberado, busca un receptor de tipo A, se abren los canales del ión cloruro (Cl^-), penetra dicho ión en la neurona y se produce hiperpolarización e inhibición neuronal, el ión Cl^- está en mayor concentración en el líquido extracelular [(103 (mEq/L)] que en el intracelular (4 mEq/L), (Figura 4). El GABA se sintetiza en la terminación axonal y se almacena al igual que otros neurotransmisores en vesículas sinápticas.

Los receptores de las BZP se distribuyen por todo el cerebro y la médula espinal; también se encuentran en las glándulas adrenales, riñones, glándula pineal y plaquetas. (Goodman, 2009).

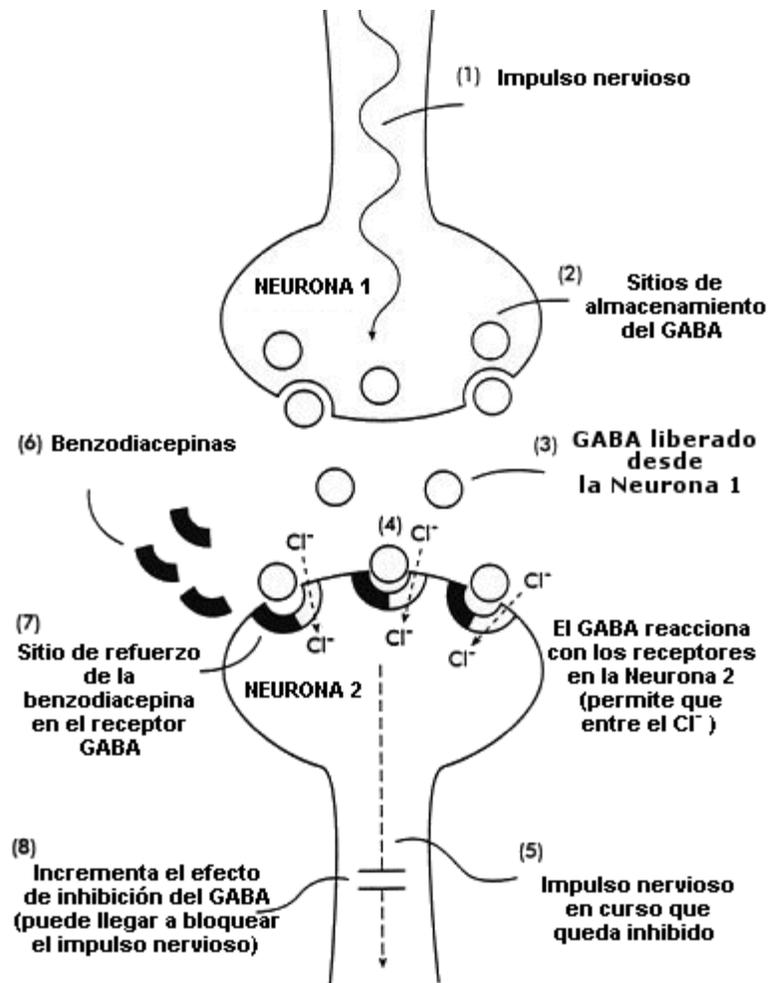


Figura 4. Diagrama del mecanismo de acción del neurotransmisor GABA (ácido gamma-aminobutírico) y de las BZP en las células del sistema nervioso (neuronas) en el cerebro.

En la figura 5 se presenta un modelo hipotético del receptor GABAérgico y su relación con los canales de ión cloruro.

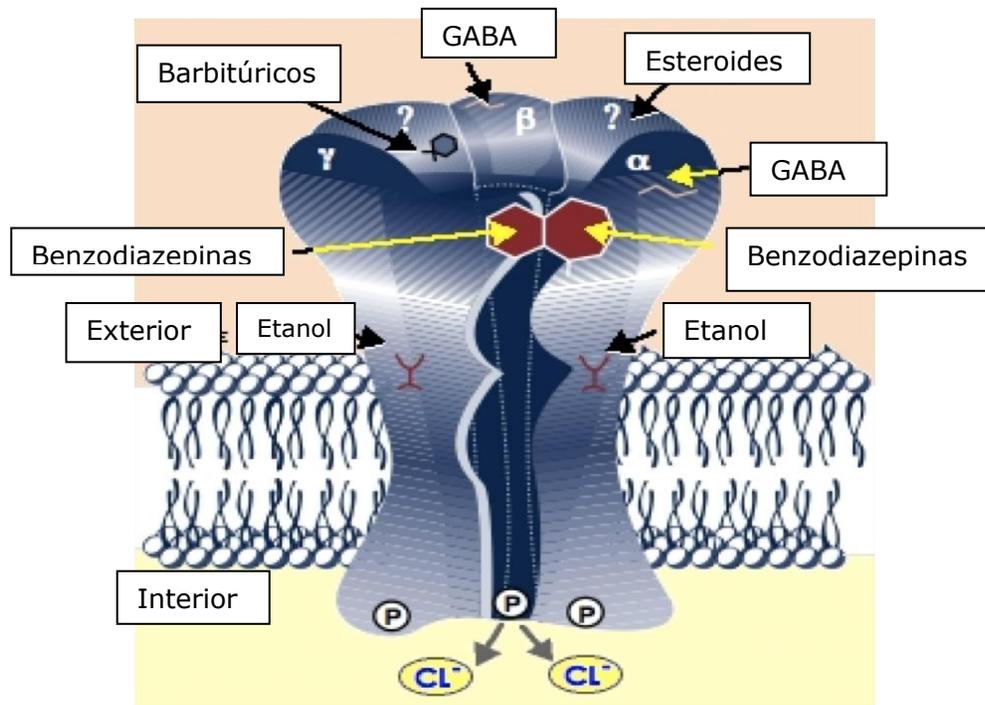


Figura 5. Complejo macromolecular de la proteína heterooligomérica que conforma al receptor GABAérgico, así como la unión a las BZP y como rodean al canal del ión cloruro con el cual están íntimamente relacionados. (Ashton H., 1987).

El GABA se sintetiza utilizando una vía alternativa del ciclo del ácido cítrico o de Krebs, ver Figura 6. (Conocido también como ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo del ácido cítrico). (Miller S. L, Smith D., 1990).

Las reacciones enzimáticas unidas van produciendo ácido oxalacético y alfa-cetoglutarato, que por transaminación produce ácido glutámico que sale del ciclo por vía colateral alternativa.

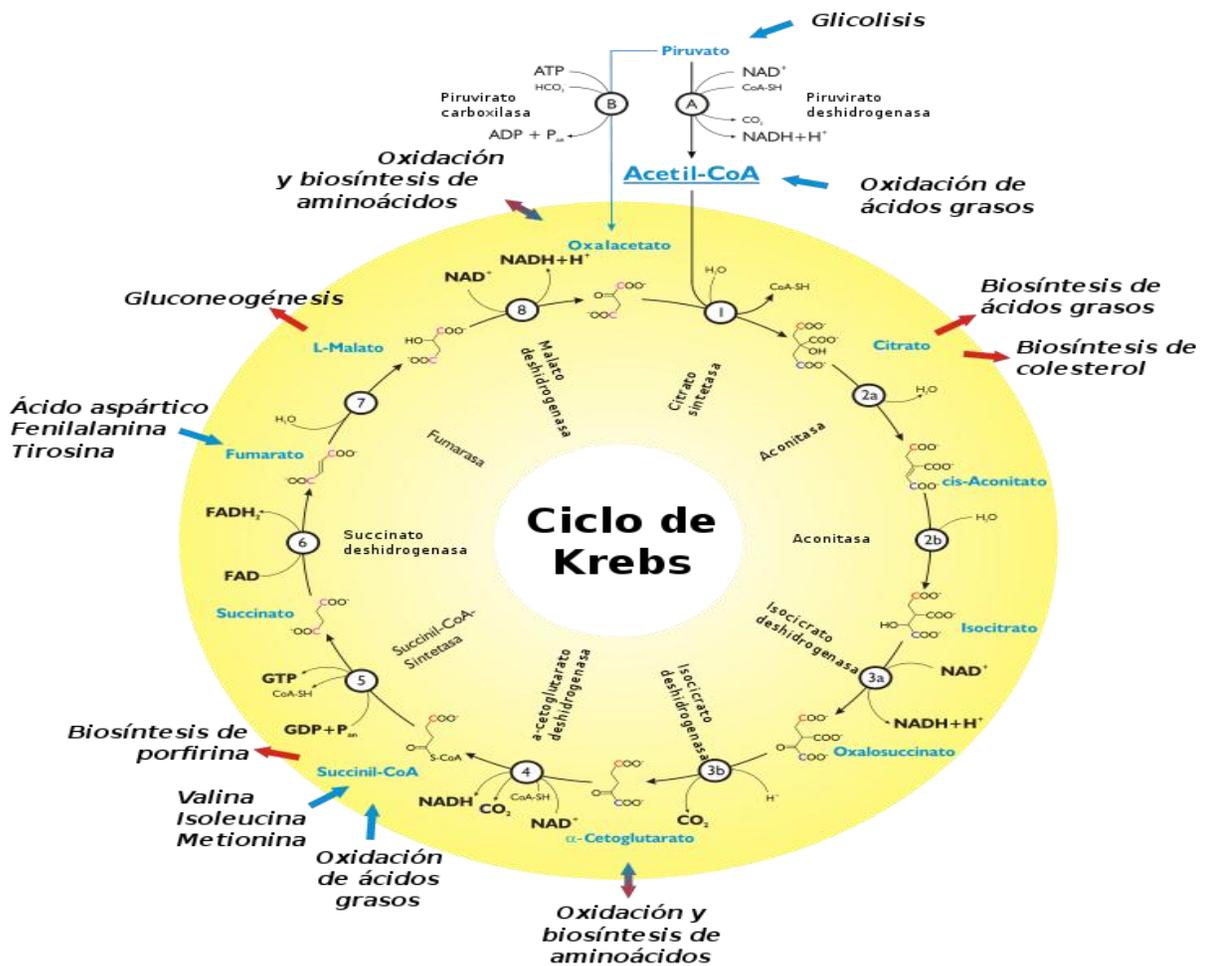


Figura 6. El ciclo de Krebs. Ciclo de conjunción de las rutas metabólicas responsables de la degradación y desasimilación de los carbohidratos, las grasas y las proteínas en anhídrido carbónico y agua, con la formación de energía química. (Pereira, P; Insignares J., 1999).

Extramitocondrialmente, por acción de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), el ácido glutámico se transforma en ácido gamma amino butírico (GABA) con liberación de dióxido de carbono (CO_2), ver Figura 7.

Por otro lado el ciclo de Krebs continúa en la mitocondria formándose ácido succínico, acetil coenzima A (Acetil CoA), oxalacético, etc.

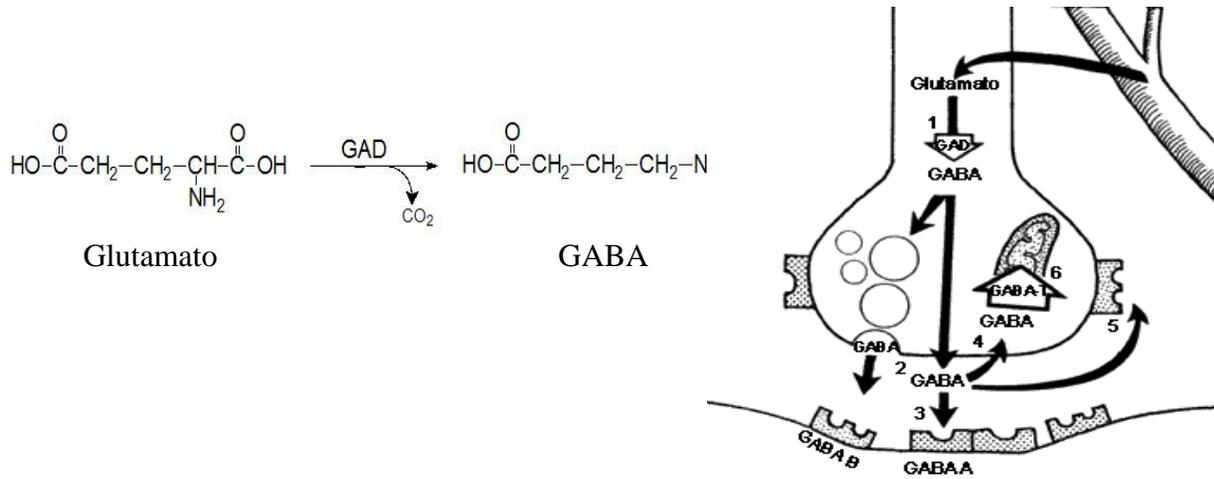


Figura 7. Síntesis del GABA a partir del glutamato. (Gómez N.; Nieto Sampedro, M., 2008).

El GABA recapturado por las terminaciones nerviosas puede ser reutilizado incorporándose a las vesículas sinápticas o metabolizado.

El GABA es sustrato de la enzima GABA transaminasa (GABA-T) que por transaminación lo transforma en ácido succínico semialdehído (SSA), éste sufre oxidación por medio de la enzima succinil semialdehído deshidrogenasa (SSDH) y se transforma en ácido succínico.

El ácido succínico en la mitocondria reingresa al ciclo de Krebs, contribuyendo en la síntesis de un nuevo neurotransmisor. (Malchow R.P; Qian H.H; Ripps, 1996).

9.4 Receptor GABA – BZP

El receptor GABA es una glucoproteína heterooligomérica, un neurotransmisor de 200 a 400 kDa con acción inhibitora, esta proteína está constituida por 4 subunidades distintas denominadas alfa (α), beta (β), gamma (γ) ó delta (δ) y cada uno de estos monómeros posee a su vez tres subunidades:

Subunidad 1: Un sitio receptor específico para el GABA.

Subunidad 2: Un sitio receptor o aceptor para BZP.

Subunidad 3: Un ionóforo del ión cloruro (Cl^-).

La unión de estas 4 subunidades forma canales al ión cloruro (Cl^-), sus receptores forman parte de un sistema bidireccional inhibitorio conectado entre diversas áreas del SNC.

El GABA en el espacio intersináptico interacciona con sus receptores específicos, de este se han identificado por lo menos dos receptores con propiedades diferentes: el Receptor GABA-A y el Receptor GABA-B.

El receptor GABA-A tiene una amplia distribución y es el que posee un sitio aceptor para BZP, es postsináptico y de membrana y predomina a nivel cerebral supraespinal. (Figura 8). (Valsecia, M.; Malgor, L., 1999).

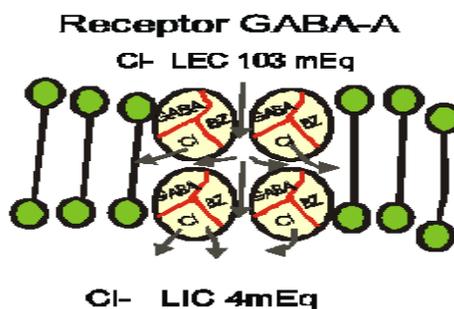


Figura 8. Receptor GABA-A. Molécula formada por monómeros y cada uno de estos posee: Un sitio receptor específico para el GABA, Un sitio receptor o aceptor para BZ y Un ionóforo de cloro (canal iónico). (Valsecia M.; Malgor L, 1999).

Las subunidades del receptor GABA_A están conformadas por 6 alfa, 3 Beta, 3 gamma y 2 delta, y para que haya efecto de las BDZ tiene el receptor GABA_A estar por lo menos constituido por una alfa, una beta y una gamma. (Figura 9). (Ashton, H. 1987).

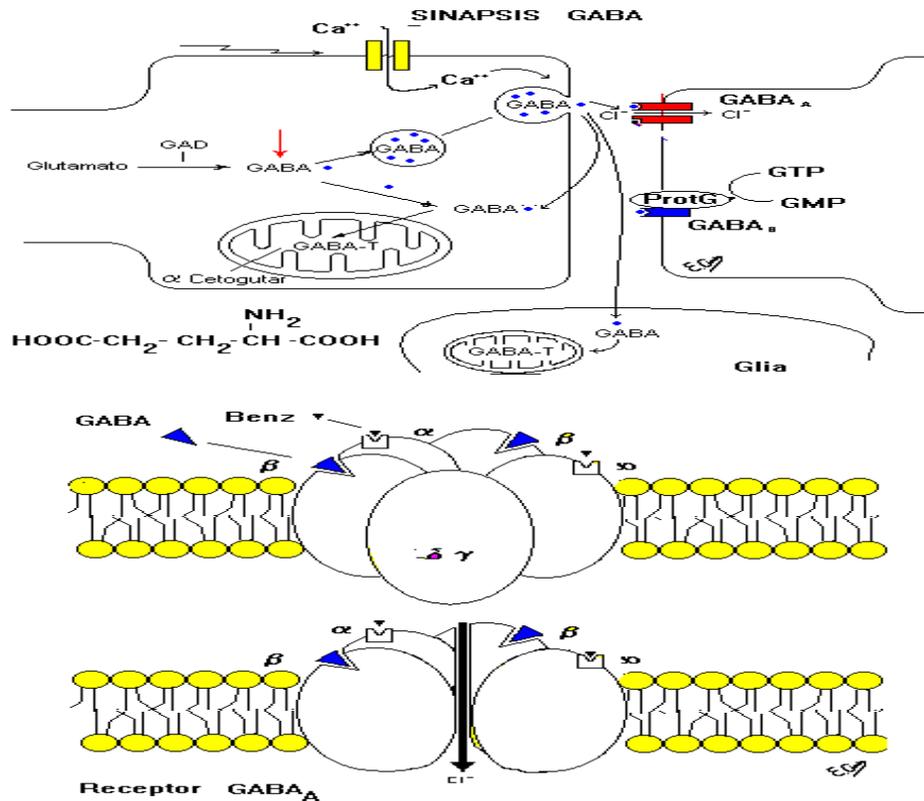


Figura 9. En la glía la glucosa mitocondrial origina el ciclo de Krebs, dando origen a la glutamina-glutamato-GABA. El GABA actúa sobre los receptores postsinápticos de alta afinidad al sodio y los receptores de baja afinidad, abriendo los canales del ión cloro e hiperpolarizando la membrana se logra inhibir la estimulación postsináptica. (Barr, M.; Kiernam J., 1994).

Algunas BZP tienen un efecto ansiolítico mayor que hipnótico o a la inversa, debido a que poseen una mayor afinidad por un determinado subtipo de receptor de BZP.

Los receptores de las BZP fueron inicialmente descritos como centrales y periféricos, pero posteriormente se han denominado como ω_1 (ω_1), ω_2 (ω_2) y ω_3 (ω_3).

Cada uno de estos subtipos se encuentra en determinadas áreas del SNC, siendo cada subtipo particularmente más frecuente en un área que en otra. Los subtipos omega, a su vez están formados por seis subunidades diferentes (α_1 , α_2 , α_3 , α_5 , β_2 , γ_2).

La combinación de cada una de estas subunidades determina cada subtipo omega. Algunas de las BZP se unen de forma preferente a determinados subtipos omega, por ejemplo; el Zolpidem se une al ω_1 ; el Flunitrazepan, Flumazenil (antagonista de las benzodiazepinas), Diazepam y otras benzodiazepinas tienden a actuar sobre los subtipos ω_1 y ω_2 (Lader M., 1987).

1. Receptor BZP 1 u ω_1 : este receptor al ser activado produce predominantemente efectos hipnóticos y miorrelajantes. Su distribución es más amplia en la sustancia reticular, corteza e hipocampo. Posiblemente la activación y sobre ocupación de BZP 1 de hipocampo sea responsable de los efectos amnésicos de las BZP. En el caso del Quazepam; esta BZP, es un agonista selectivo de los receptores BZP 1 y se utiliza como hipnótico.
2. Receptor BZP 2 u ω_2 : es un receptor que al ser activado produce un efecto ansiolítico predominante. Tiene una amplia distribución aunque predomina en sistema límbico y cerebelo. Aún no hay agonistas selectivos de BZP 2. Por otro lado, se han desarrollado algunos agonistas parciales del receptor de BZP, siendo una de las más estudiadas el Bretazenil. Se ha sugerido que las neuronas que median las respuestas ansiolíticas y anticonvulsivantes poseen una mayor densidad de

receptores con respecto a otras neuronas que median los efectos indeseables como sedación, tolerancia y adicción. Estos hallazgos generan interesantes expectativas sobre potenciales usos terapéuticos. (Dennis T., Dubois A., Benavides J., Scatton B., 1988).

El GABA se encuentra en todo el cerebro, pero su mayor concentración está en el cerebelo. Posiblemente todas las neuronas inhibitorias cerebelosas transmitan con GABA, ellas son las Purkinje, las células en canasta, las estrelladas y las de Golgi.

9.5 Diazepam (DZP)

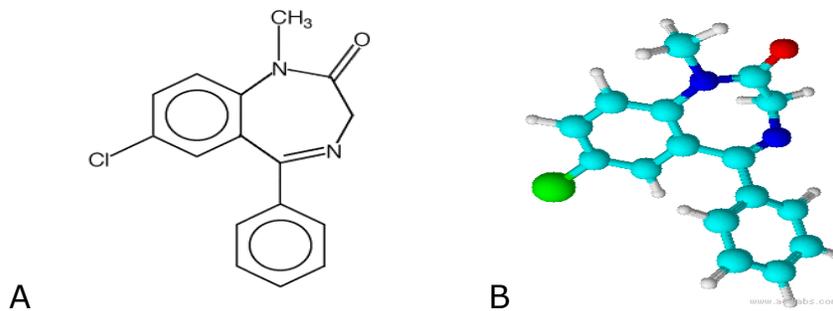


Figura 10. A) Estructura química del Diazepam: 7-Cloro-1,3-dihidro-5-fenil-2H-1-metil-1,4-benzodiazepin-2-ona. B) Estructura tridimensional del Diazepam (B. Bandelow, S. Bleich y S. Kropp, 2004).

EL DZP cuya fórmula Molecular es $C_{16}H_{13}ClN_2O$, tiene un peso molecular de 284.74, sus nombres comerciales son Valium^{MR}, Vazepam^{MR}, Zetran^{MR}.

Tiene como indicaciones terapéuticas la preanestesia, sedación, hipnosis, tranquilizante, ansiolítico, anticonvulsivo y relajante muscular.

La DL_{50} en ratas en dosis oral es de 750 mg/Kg. (<http://www.infodoctor.org/vademecum/index.php/Diazepam>).

El Diazepam (DZP) es una BZP de duración prolongada que actúa principalmente sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), produciendo diversos

grados de depresión, desde sedación hasta hipnosis y estupor dependiendo de la dosis.

El DZP es redistribuido en forma especialmente rápida, con un tiempo de vida media de 1 hora y su principal metabolito del es el N-desmetildiazepam, es menos activo que el compuesto original y puede comportarse como un agonista parcial. El DZP y el N-desmetildiazepam son hidroxilados lentamente dando otros metabolitos activos, como el Oxazepam. El tiempo de vida media del DZP en el plasma es en promedio de 1 a 2 días, mientras que la del derivado N-desmetilado es de 60 hrs.

El DZP deprime la actividad del SNC en los niveles límbicos y subcortical del cerebro y tiene como efectos adversos la insuficiencia respiratoria, paro cardiaco, urticaria, náuseas, vómito, excitación, alucinaciones, leucopenia, daño hepático, flebitis, trombosis venosa, dependencia.

El DZP se presenta en tabletas de 2, 5 y 10 mg, en cápsulas de 15 mg de liberación prolongada para administración oral y para administración inyectable de 5 a 10 mg. (Harrison, 2009).

10. RELACIÓN ESTRUCTURA – ACTIVIDAD

Como se mencionó anteriormente, las BZP son bases orgánicas que químicamente están constituidas por un sistema anular heterocíclico formado por la unión de un anillo bencénico (A) y un anillo (B) que contiene dos átomos de nitrógeno, este es el anillo diazepínico, las BZP importantes contienen un sustituyente 5 fenilo en el anillo C, (5-fenil-1,4 Benzodiazepinas).

Todas comparten una estructura compuesta por un anillo de benceno con seis elementos, el cual está unido a un anillo de diazepina con siete elementos.

Cada BZP específica se formará por la sustitución de diversos radicales, en diferentes posiciones de la estructura anteriormente comentada. (Valsecia, M., Malgor, L., 1999).

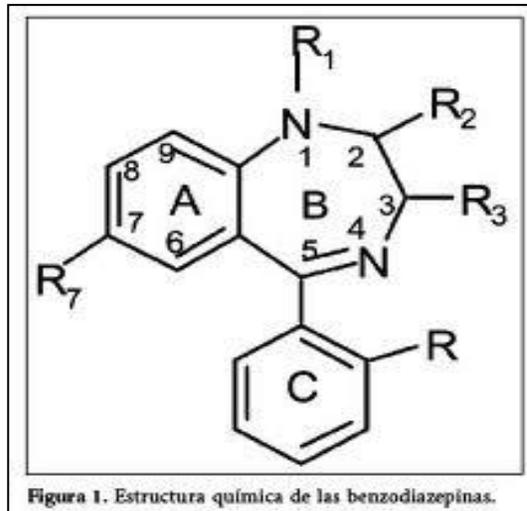


Figura 11. Estructura general de las Benzodiazepinas (donde R representa el número de radicales que puede tener una benzodiazepina).

Las BZP importantes que deprimen al SNC contienen un sustituyente 5-aril. En la posición 7, los grupos de retiro de electrones aumentan los grupos de liberación de electrones y los grupos grandes suprimen la actividad. Los sustituyentes en otras partes del anillo aromático tienen un efecto negativo. La naturaleza química de los sustituyentes de otras partes de este anillo aromático tiene un efecto negativo.

La naturaleza química de los sustituyentes en las posiciones 1 a 3 es muy variable. Una baja densidad electrónica en el nitrógeno 4 es común entre todas las BZP útiles o promisorias. Un sustituyente 2' (u orto) en 5 fenil no es esencial, pero los grupos de retiro de electrones aumentan la potencia, los sustituyentes en otras partes de este anillo decrecen la actividad. (Greenblatt D.J.; Divol M., 1983).

11. JUSTIFICACIÓN

Las BZP's han establecido una nueva terapéutica farmacológica en el tratamiento de la ansiedad, insomnio, agitación, espasticidad y convulsiones, además, de presentar un amplio margen terapéutico y no producir insuficiencia respiratoria fatal o colapso cardiovascular, siempre que no se asocien a otros depresores del sistema nervioso central (SNC).

El perfil farmacológico que presentan todas las BZP's es similar, sin embargo, los fármacos difieren en su selectividad respecto a los receptores y por ello su uso clínico puede variar por lo que la elección de la BZP se hace en función de su perfil farmacocinético y de la clínica del paciente.

El objetivo del presente trabajo es encontrar nuevos derivados BZP's con posible potencial farmacológico.

12. OBJETIVOS

12.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar el efecto Sedante – Hipnótico de nuevos análogos de Benzodiazepinas en ratones machos.

12.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Realizar pruebas de solubilidad para cada uno de los compuestos utilizados
- ❖ Determinar la DL_{50} de cada uno de los compuestos por medio de la prueba de Artemia Salina
- ❖ Determinar la DE_{50} , DT_{50} y DL_{50} para cada uno de los análogos de Benzodiazepina.

13. HIPÓTESIS

Considerando que las Benzodiazepinas presentan una actividad Sedante – Hipnótica, se espera que los compuestos a evaluar (derivados de Benzodiazepinas), presenten una actividad farmacológica mayor o similar que el DZP.

14. MATERIAL Y MÉTODO

14.1 Material

- ❖ Material para la prueba de Artemia Salina
 - Huevecillos del crustáceo Artemia Salina
 - Papel aluminio
 - Pecera
 - Lámpara
 - Sales
 - Propipetas
 - Frascos viales

- ❖ Material para las pruebas de Sedación – Hipnosis
 - Frascos viales
 - Jeringas de 22 * 32 mm
 - Espátula
 - Matraces aforados
 - Balanza
 - Cajas de acrílico con rejilla

14.2 Reactivos

- ❖ Reactivos químicos
 - Tween 80 al 25% (Laboratorio Merck) Lot. B221371000

- Agua destilada
- Diazepam ampolleta inyectable (Valium 10mg/2ml, *Lab. Roche*; Lot.RJ0023).
- Compuestos derivados de Benzodiazepinas (Sintetizados en el Instituto de Química, del laboratorio de Química Heterocíclica).
- ❖ Reactivos biológicos:
 - Ratonos machos de 20 – 30 g (Cepa CFW. Harlan México, S.A de C.V.)

14.3 MÉTODO

Para evaluar si los compuestos proporcionados presentan efecto Sedante – Hipnótico, es necesario primero solubilizarlos, para lo cual se sugirieron vehículos en base al tipo de estructura del compuesto en estudio, para determinar cuál de ellos solubiliza mejor el compuesto y lograr una mejor administración. Los vehículos propuestos son: agua, metilcelulosa, propilenglicol y tween 80 al 0.5%. Las pruebas de solubilidad se realizaron a micro escala de la siguiente forma:

- Se toma 1 mg del análogo de BZP y se coloca en una placa con oradaciones, se agrega una gota del vehículo y se agita con la espátula, observando si el compuesto solubiliza.
- Una vez elegido el vehículo se procede a realizar la prueba de Artemia Salina a cada uno de los compuestos.
- los experimentos para determinar el efecto Sedante – Hipnótico en las nuevas síntesis de análogos de BZP:
 1. Los ratones se pesan y marcan por el método binario, colocándolos en cajas de acrílico transparente con aserrín.
 2. Se forman grupos aleatorios de ratones con una $n = 5$ para cada dosis.
 3. Se administra el compuesto a probar por vía intraperitoneal.
 4. Se observa el comportamiento de los ratones, buscando una respuesta del tipo todo o nada.

5. Se evalúan los criterios para establecer el efecto sedante:
 - a. Movimientos desordenados
 - b. Disminución de la actividad motora (movimientos cada vez más torpes y se hace difícil caminar)
 - c. Moderada excitación
 - d. Se observa calma, relajación
 - e. Reducción de la ansiedad
 - f. Adormecimiento
 - g. Reducción de la respiración
 - h. Retardo de ciertos reflejos
6. Se evalúan los criterios para establecer el efecto hipnótico:
 - a. Somnolencia
 - b. Pérdida del reflejo de enderezamiento
 - c. Facilidad del inicio y el mantenimiento de un estado de sueño parecido al normal.
 - d. Recuperación

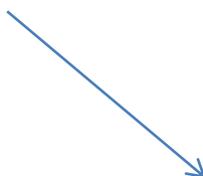
Diagrama 1. Prueba de Solubilidad



Pesar 1.0 mg de cada uno de los compuestos en una la placa con horadaciones



Agregar una gota del vehículo a probar



Disolver con ayuda de una espátula



Anotar observaciones



Diagrama 2. Prueba de Artemia Salina

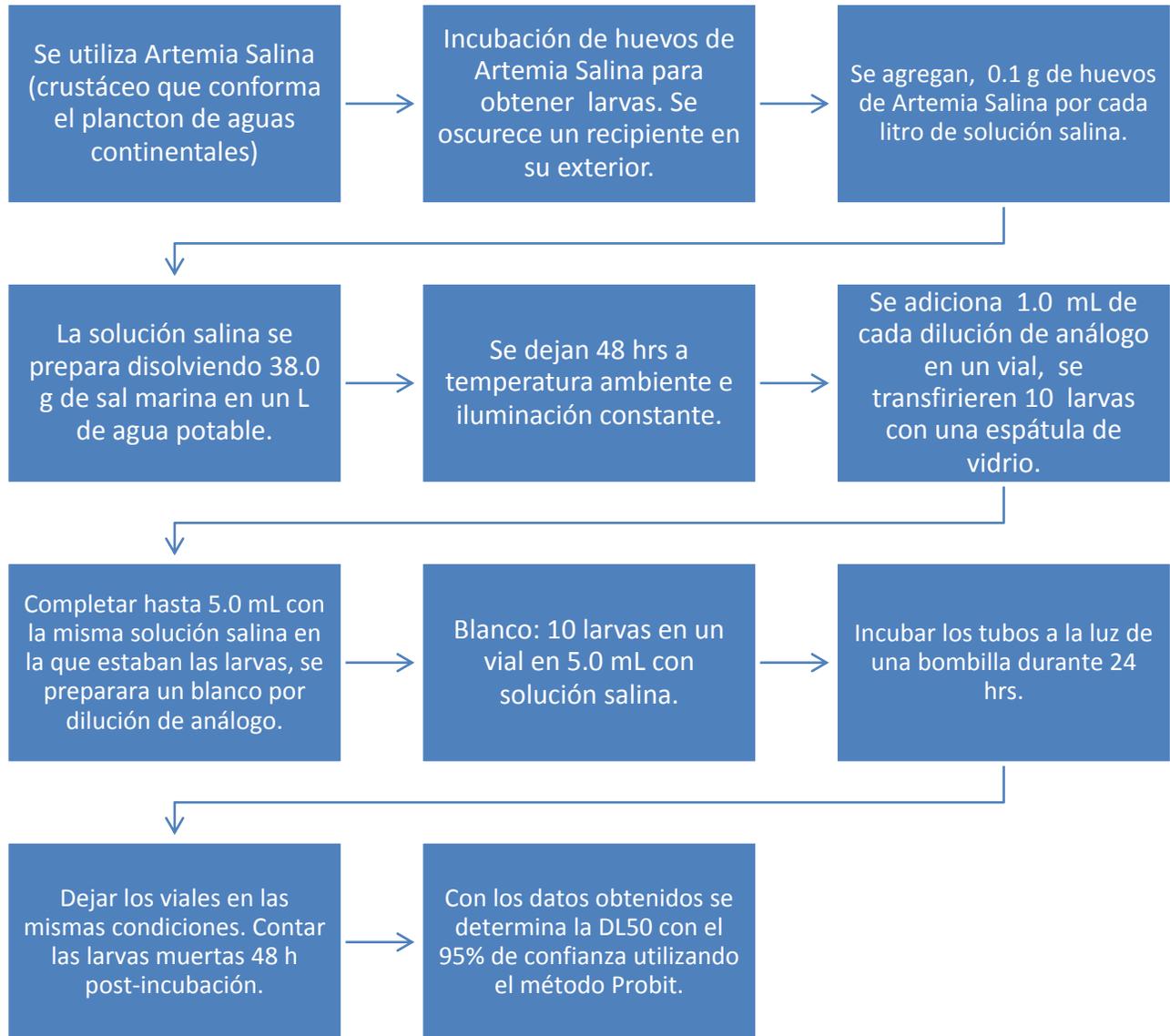


Diagrama 3. Determinación del efecto Sedante – Hipnótico



Pesar y marcar los ratones



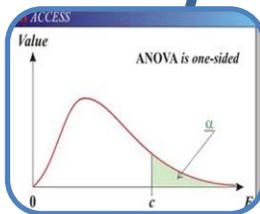
Administrar el compuesto por vía IP con el vehículo seleccionado



Evaluar si el compuesto presenta una actividad farmacológica como Sedante-Hipnótico
Recopilación de resultados en tablas, cuadros, gráficas.



Recopilación de resultados en tablas, cuadros, gráficas.



Análisis de resultados. Análisis estadístico (ANADEVA)
 $p < 0.05$ si hay diferencias, prueba post-hoc



Conclusiones.

15. RESULTADOS

15.1 SELECCIÓN DEL VEHÍCULO ADECUADO PARA LA ADMINISTRACIÓN DEL COMPUESTO.

Resultados de solubilidad en diferentes solventes para cada uno de los compuestos evaluados. (Tabla 6).

Tabla 1. Solubilidad de los análogos benzodiazepínicos en cada uno de los vehículos.

DISOLVENTE	IE-III-(1)	IE-IV-H	IE-IV-7	IE-IV-8	IE-IV-5	DIAZEPAM
Agua	-	-	-	-	-	↓
Metilcelulosa	-	-	-	-	-	-
Propilenglicol	-	-	-	-	-	-
Tween 80 (25%)	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Tween 80 (100%)	++++	++++	++++	++++	++++	++++

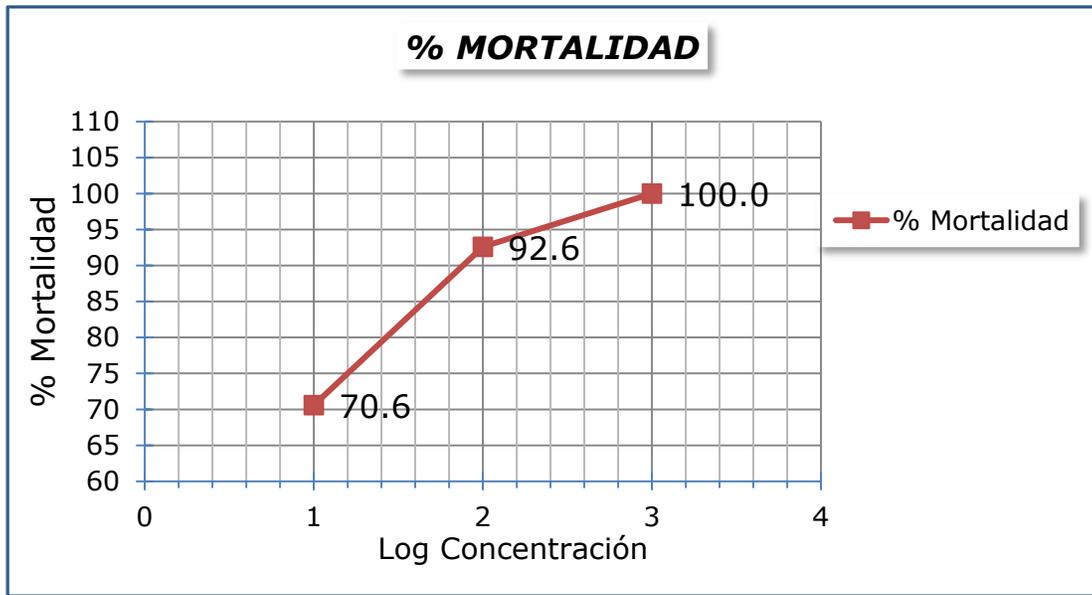
-NO SOLUBLE +POCO SOLUBLE ++SOLUBLE +++MUY SOLUBLE ↓PRECIPITA

15.2 PRUEBA DE TOXICIDAD PARA DETERMINAR LA CL₅₀ DE CADA ANÁLOGO DE BENZODIAZEPINAS.

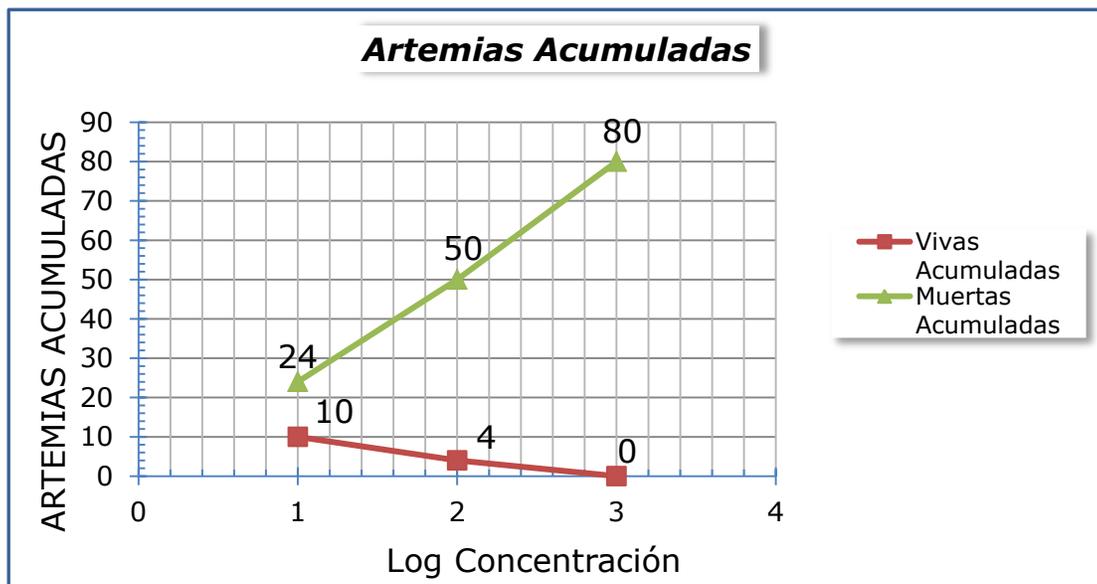
Los compuestos analizados previamente fueron sometidos a una prueba de toxicidad (*Artemia Salina*) con la finalidad de conocer la Concentración Letal al 50 % (CL₅₀) de cada compuesto para saber que dosis utilizar al evaluarlos y conocer el efecto Sedante – Hipnótico.

Tabla 2. Número de Artemias Acumuladas para determinar la CL₅₀ del compuesto IE-III-(1).

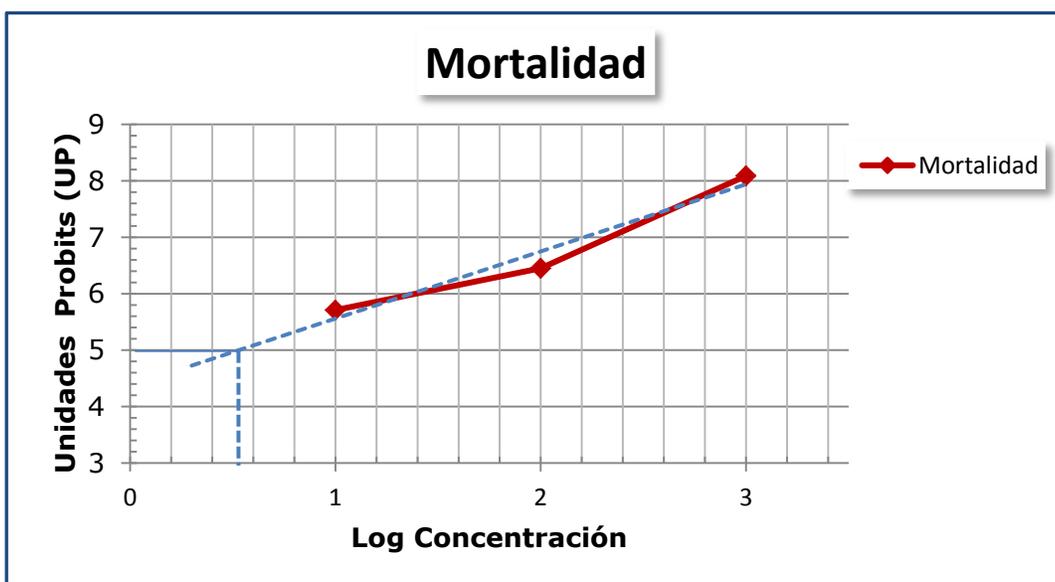
[] (ppm)	Log []	Artemias Muertas	Artemias Vivas	Acumuladas Muertas	Acumuladas Vivas	Proporción Muertas	Mortalidad %	U.P
1000	3	30	0	80	0	1.000	100.0	8.09
100	2	26	4	50	4	0.926	92.6	6.45
10	1	24	6	24	10	0.706	70.6	5.71



Gráfica 1. % de Mortalidad por la prueba de Artemia Salina para el compuesto IE-III-(1).



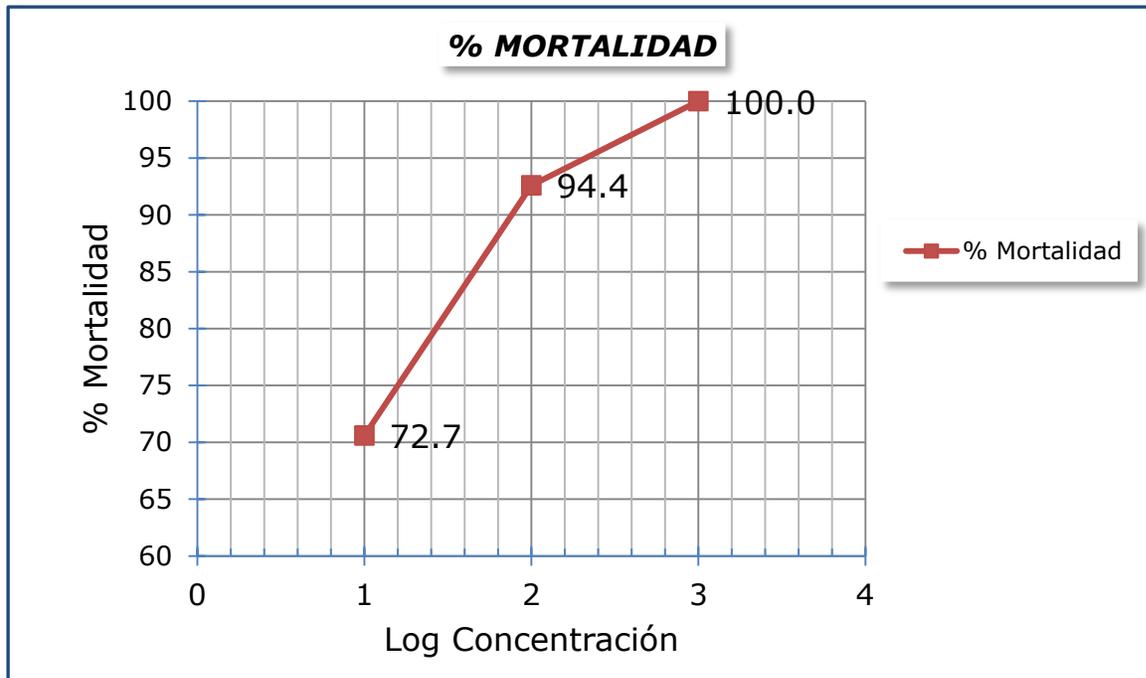
Gráfica 2. Número de Artemias Acumuladas para el compuesto IE-III-(1).



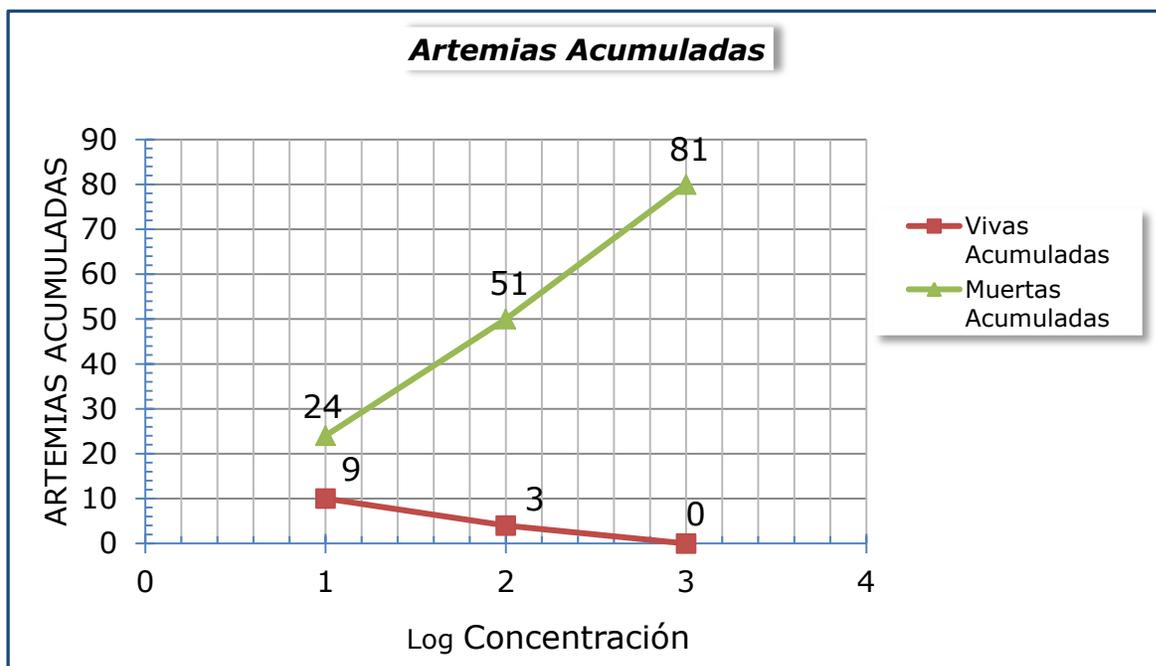
Gráfica 3. Determinación de la CL₅₀ por el método de Probits para el compuesto IE-III-(1).

Tabla 3. Número de Artemias Acumuladas para determinar la CL₅₀ del compuesto IE-IV-H.

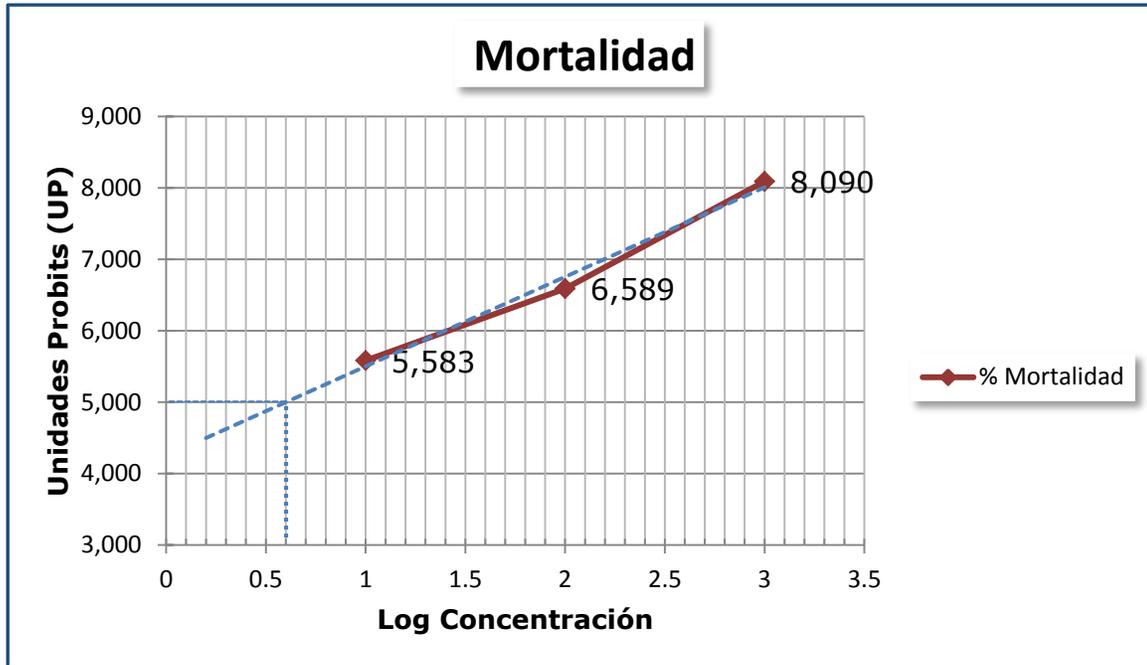
[] (ppm)	Log []	Artemias Muertas	Artemias Vivas	Acumuladas Muertas	Acumuladas Vivas	Proporción Muertas	Mortalidad %	U.P
1000	3	30	0	81	0	1.000	100.0	8.090
100	2	27	3	51	3	0.944	94.4	6.589
10	1	24	6	24	9	0.727	72.7	5.583



Gráfica 4. % de Mortalidad por la prueba de Artemia Salina para el compuesto IE-IV-H.



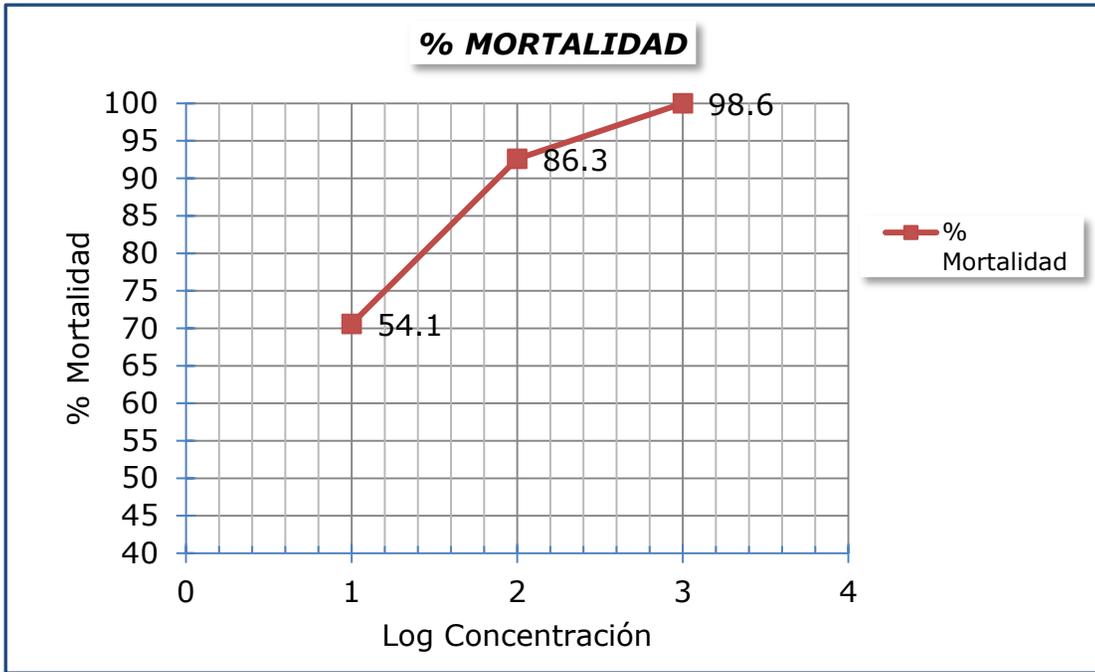
Gráfica 5. Número de Artemias Acumuladas para el compuesto IE-IV-H.



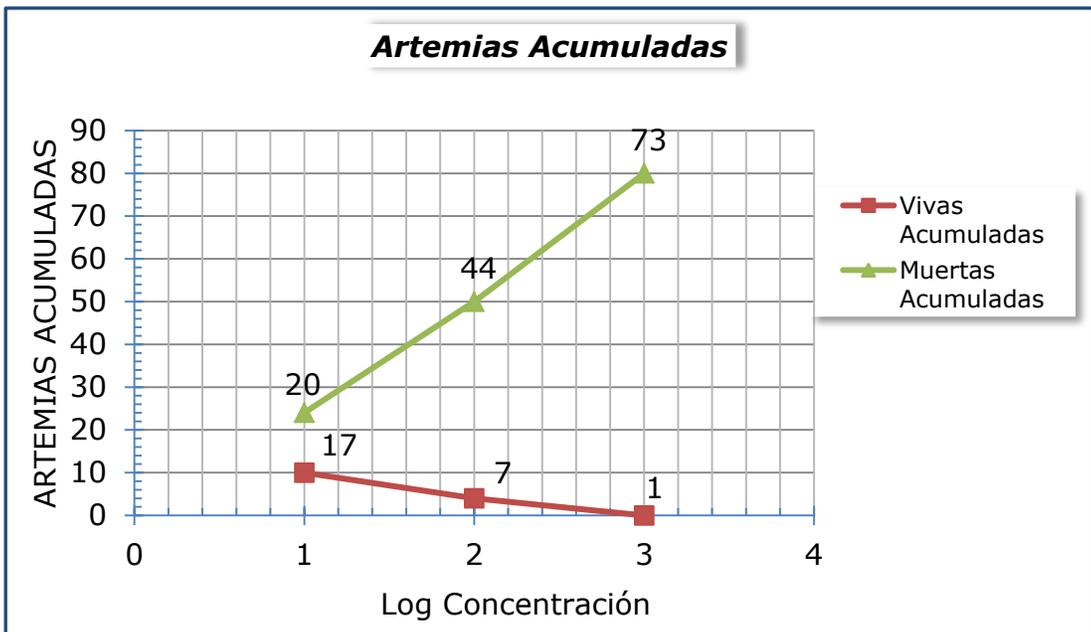
Gráfica 6. Determinación de la CL₅₀ por el método de Probits para el compuesto IE-IV-H.

Tabla 4. Número de Artemias Acumuladas para determinar la CL₅₀ del compuesto IE-IV-7.

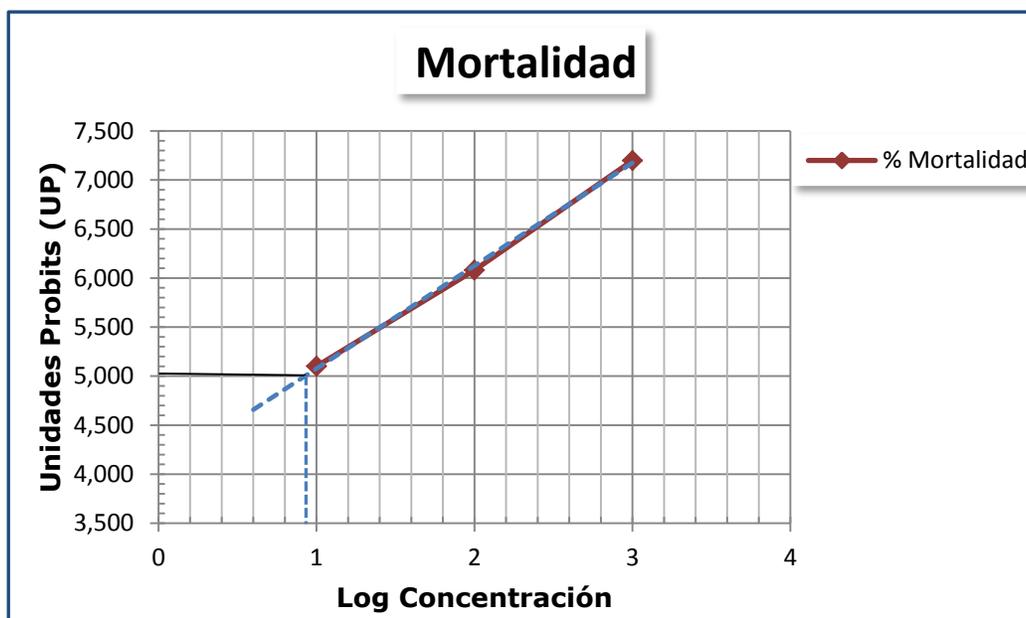
[] (ppm)	Log []	Artemias Muertas	Artemias Vivas	Acumuladas Muertas	Acumuladas Vivas	Proporción Muertas	Mortalidad %	U.P
1000	3	29	1	73	1	0.986	98.6	7.197
100	2	24	6	44	7	0.862	86.3	6.080
10	1	20	10	20	17	0.541	54.1	5.100



Gráfica 7. % de Mortalidad por la prueba de Artemia Salina para el compuesto IE-IV-7.



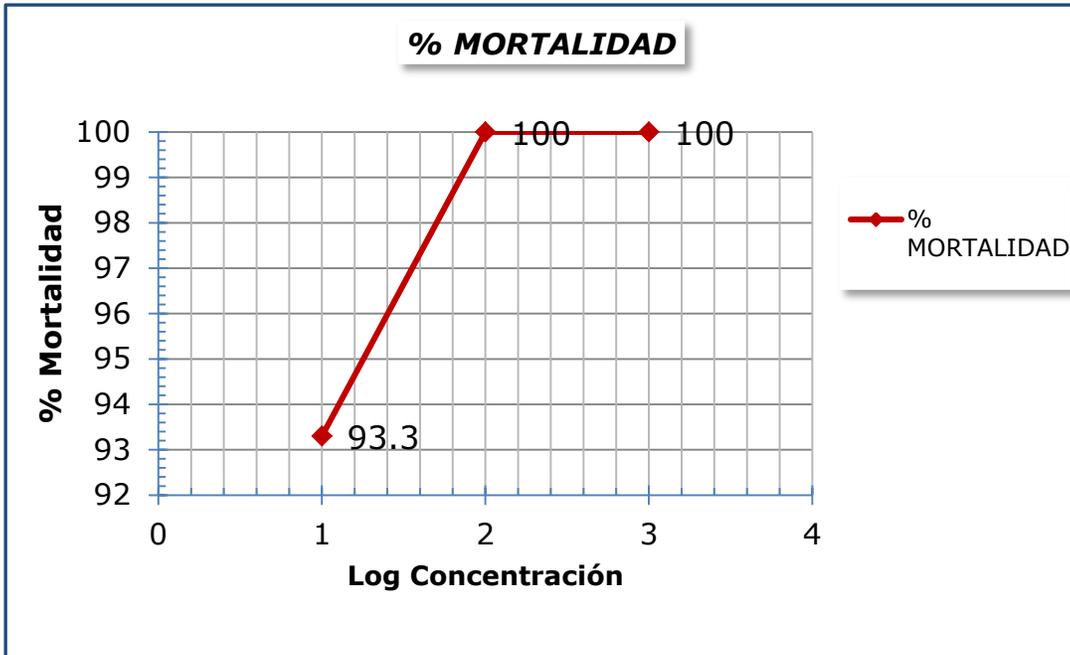
Gráfica 8. Número de Artemias Acumuladas para el compuesto IE-IV-7.



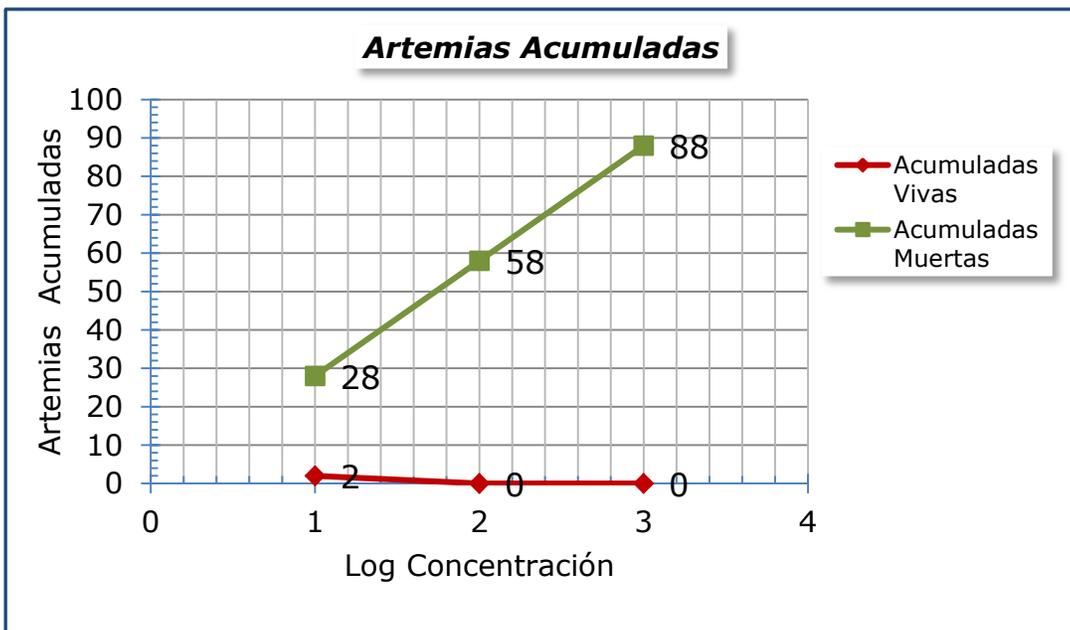
Gráfica 9. Determinación de la CL₅₀ por el método de Probits para el compuesto IE-IV-7.

Tabla 5. Número de Artemias Acumuladas para determinar la CL₅₀ del compuesto IE-IV-8.

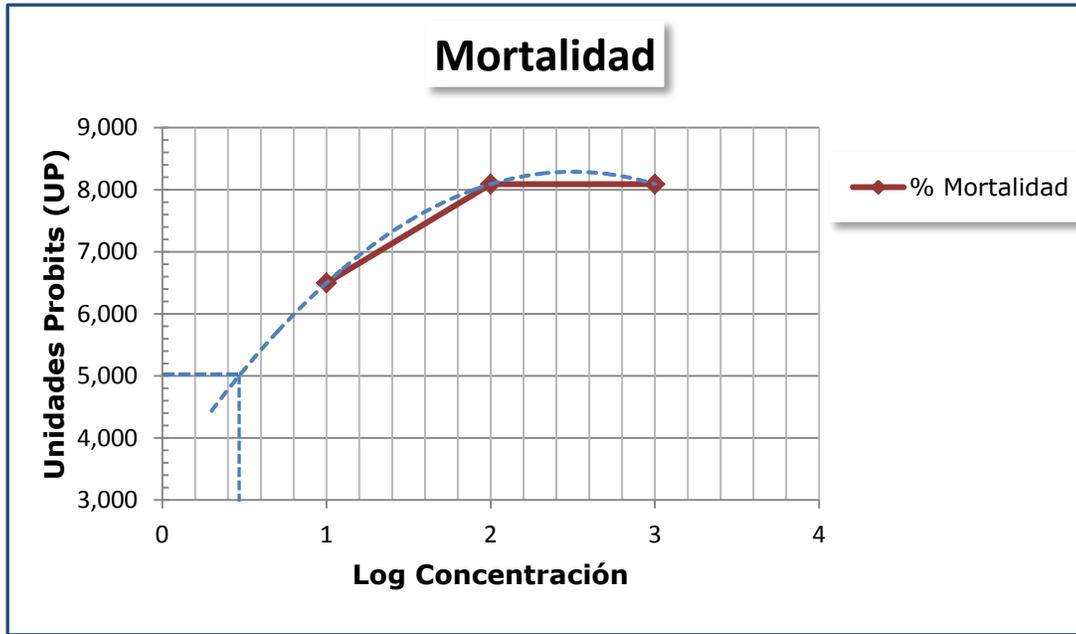
[] (ppm)	Log []	Artemias Muertas	Artemias Vivas	Acumuladas Muertas	Acumuladas Vivas	Proporción Muertas	Mortalidad %	U.P
100	3	30	0	88	0	1.000	100.0	8.090
100	2	30	0	58	0	1.000	100.0	8.090
10	1	28	2	28	2	0.933	93.3	6.498



Gráfica 10. % de Mortalidad por la prueba de Artemia Salina para el compuesto IE-IV-8.



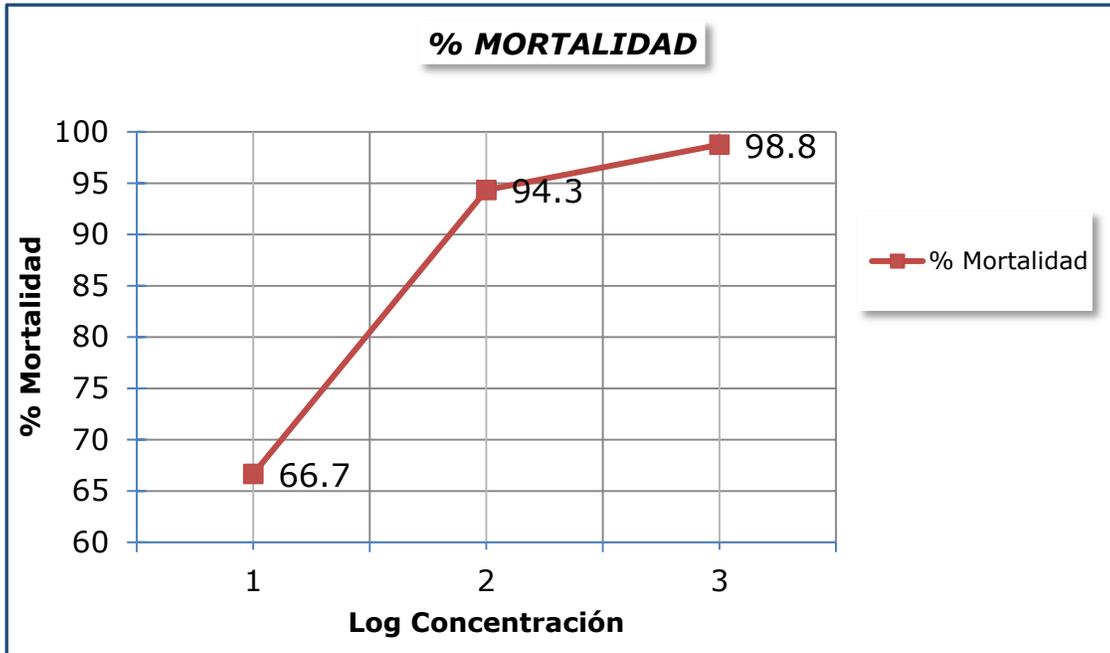
Gráfica 11. Número de Artemias acumuladas para el compuesto IE-IV-8.



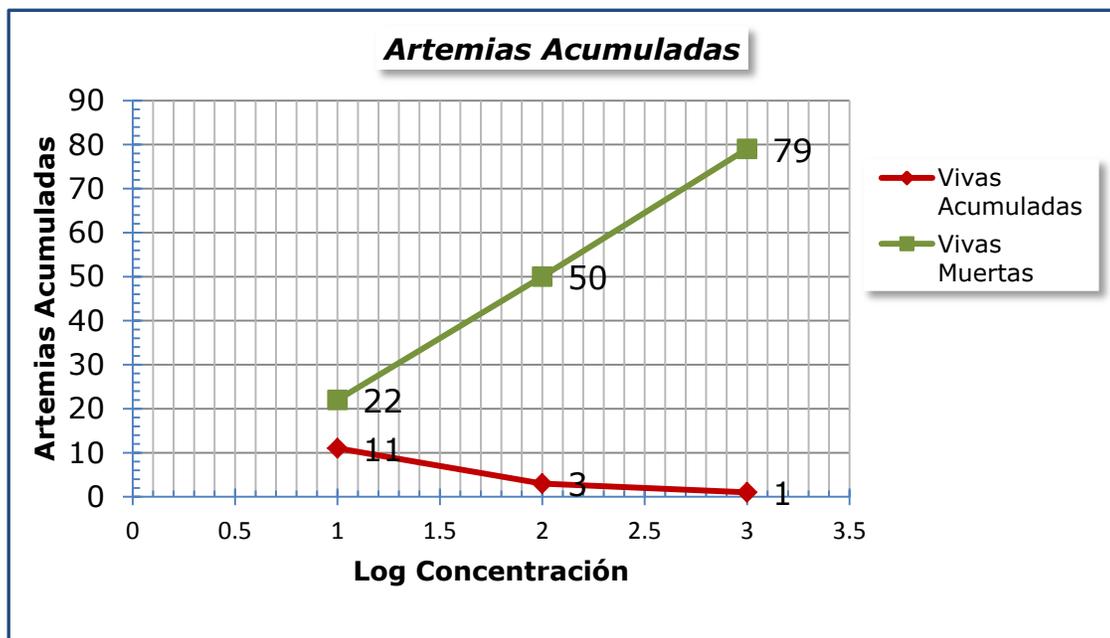
Gráfica 12. Determinación de la CL₅₀ por el método Probits para el compuesto IE-IV-8.

Tabla 6. Número de Artemias Acumuladas para determinar la CL₅₀ del compuesto IE-IV-5.

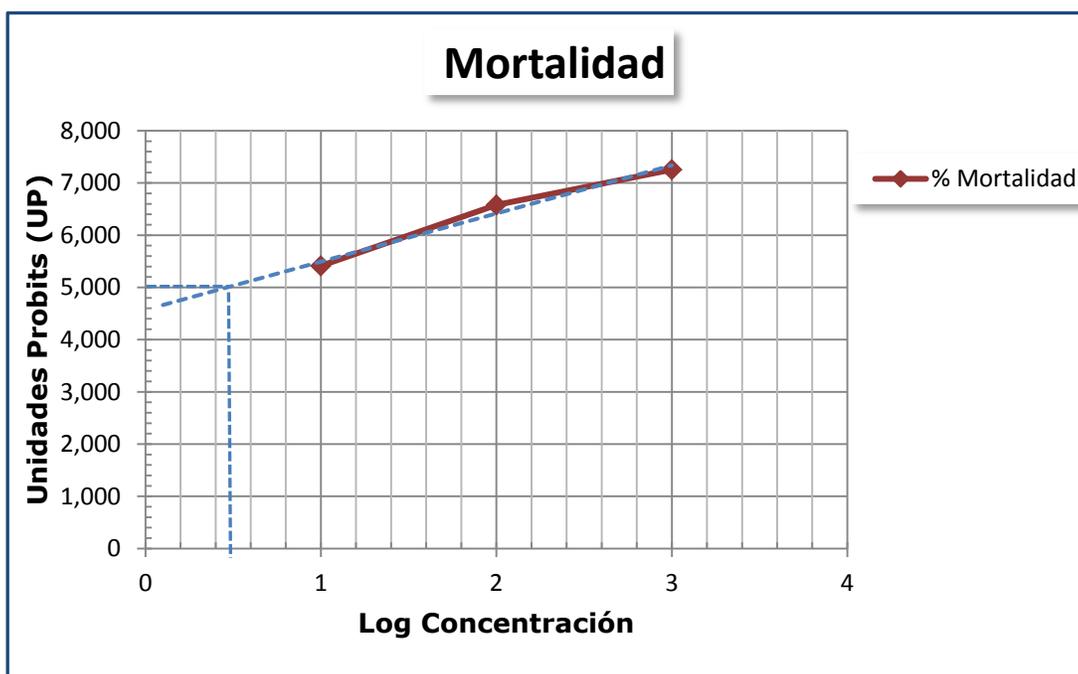
[] (ppm)	Log []	Artemias Muertas	Artemias Vivas	Acumuladas Muertas	Acumuladas Vivas	Proporción Muertas	Mortalidad %	U.P
1000	3	29	1	79	1	0.988	98.8	7.257
100	2	28	2	50	3	0.943	94.3	6.580
10	1	22	8	22	11	0.667	66.7	5.413



Gráfica 13. % de Mortalidad por la prueba de Artemia Salina para el compuesto IE-IV-5.



Gráfica 14. Número de Artemias Acumuladas para el compuesto IE-IV-5.

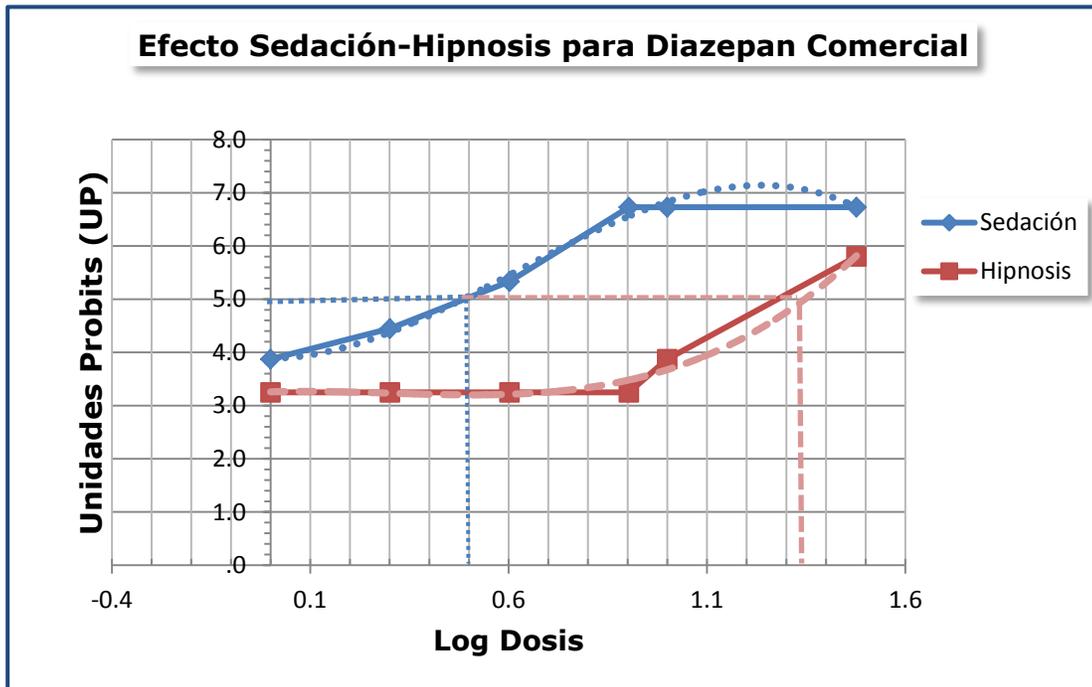


Gráfica 15. Determinación de la CL_{50} por el método Probits para el compuesto IE-IV-5.

15.3 CURVA DOSIS RESPUESTA CUANTAL DE DIAZEPAN

Tabla 7. Determinación de Sedación e Hipnosis para Control + (Diazepan comercial)

Dosis (mg/kg)	Log Dosis	Sedación No. ratones c/efecto	% Efecto (LS)	UP S	Hipnosis No. ratones c/efecto	% Efecto (LH)	UP H	Muerte No. ratones c/efecto	% Efecto (LH)	UP RH
1	0	1/6	12.50	3.874	0/6	4.16	3.249	0/6	4.16	3.249
2	0.3010	2/6	29.17	4.447	0/6	4.16	3.249	0/6	4.16	3.249
4	0.6021	4/6	62.50	5.332	0/6	4.16	3.249	0/6	4.16	3.249
8	0.9031	6/6	95.83	6.728	0/6	4.16	3.249	0/6	4.16	3.249
10	1	6/6	95.83	6.728	1/6	12.50	3.874	0/6	4.16	3.249
30	1.4771	6/6	95.83	6.728	5/6	79.17	5.806	1/6	12.50	3.874



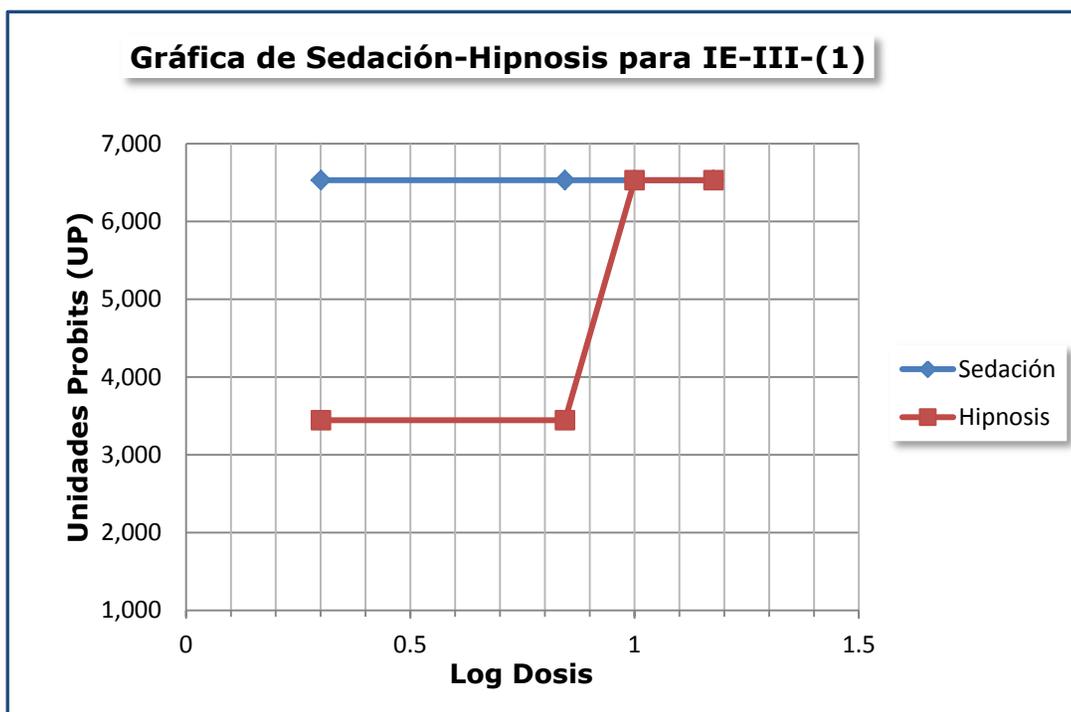
Gráfica 16. Efecto de Sedación e Hipnosis observado para el Diazepam Comercial en unidades Probits.

Cada uno de los nuevos derivados BZP se compararon con el DZP por ser un Sedante – Hipnótico que presenta el menor número de contraindicaciones y efectos secundarios a una DE_{50} menor a la de otros Sedantes – Hipnóticos. Por lo anterior se considera al DZP como el control positivo (Ctrl +) y se realiza una curva Dosis Respuesta Cuantal del mismo.

15.4 CURVA DOSIS RESPUESTA CUANTAL PARA LOS ANÁLOGOS DE BENZODIAZEPINAS (DETERMINACIÓN DE LA DE_{50} , DT_{50} Y DL_{50} PARA CADA COMPUESTO)

Tabla 8. Valores obtenidos para el compuesto IE-III-(1)

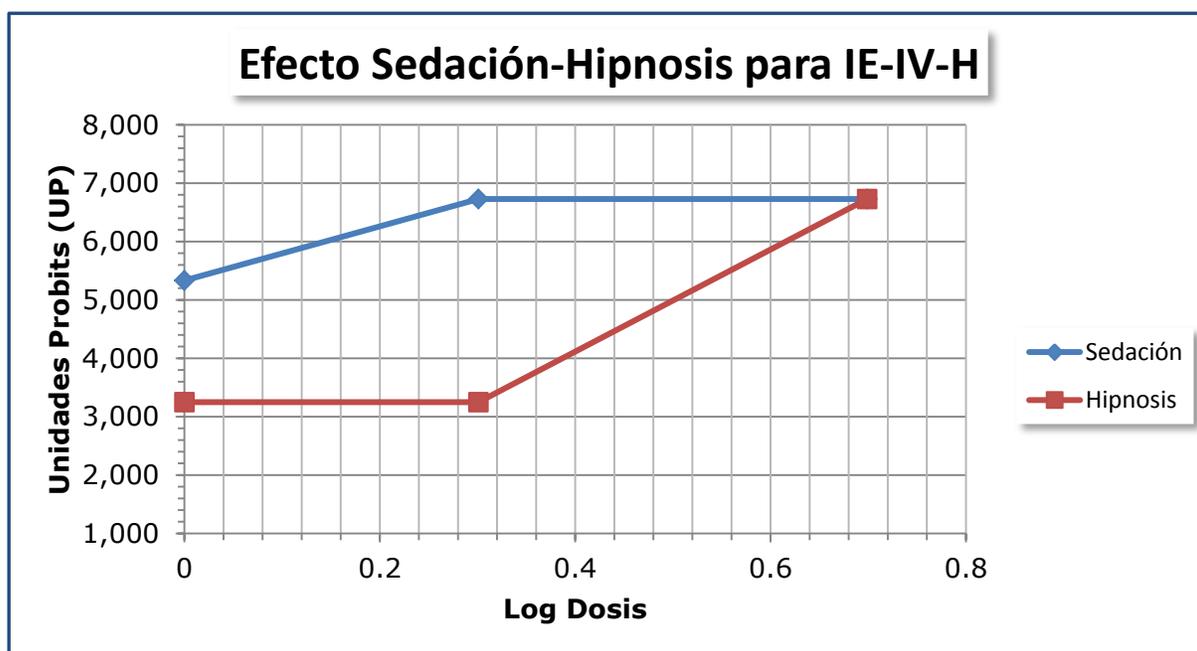
Dosis (mg/Kg)	Log Dosis	No. ratones c/efecto	% Efecto (LS)	No. ratones c/efecto	% Efecto (LH)	No. ratones c/efecto	% Efecto (LRH)	UP (S)	UP (H)	UP (RH)
2	0.3010	4/4	93.75	0/4	6.25	0/4	6.25	6.530	3.445	3.445
7	0.8450	4/4	93.75	0/4	6.25	0/4	6.25	6.530	3.445	3.445
10	1.0	4/4	93.75	4/4	93.75	4/4	93.75	6.530	6.530	6.530
15	1.1761	4/4	93.75	4/4	93.75	4/4	93.75	6.530	6.530	6.530



Gráfica 17. Efecto de Sedación e Hipnosis observado para el compuesto IE-III-(1).

Tabla 9. Valores obtenidos para el compuesto IE-IV-H

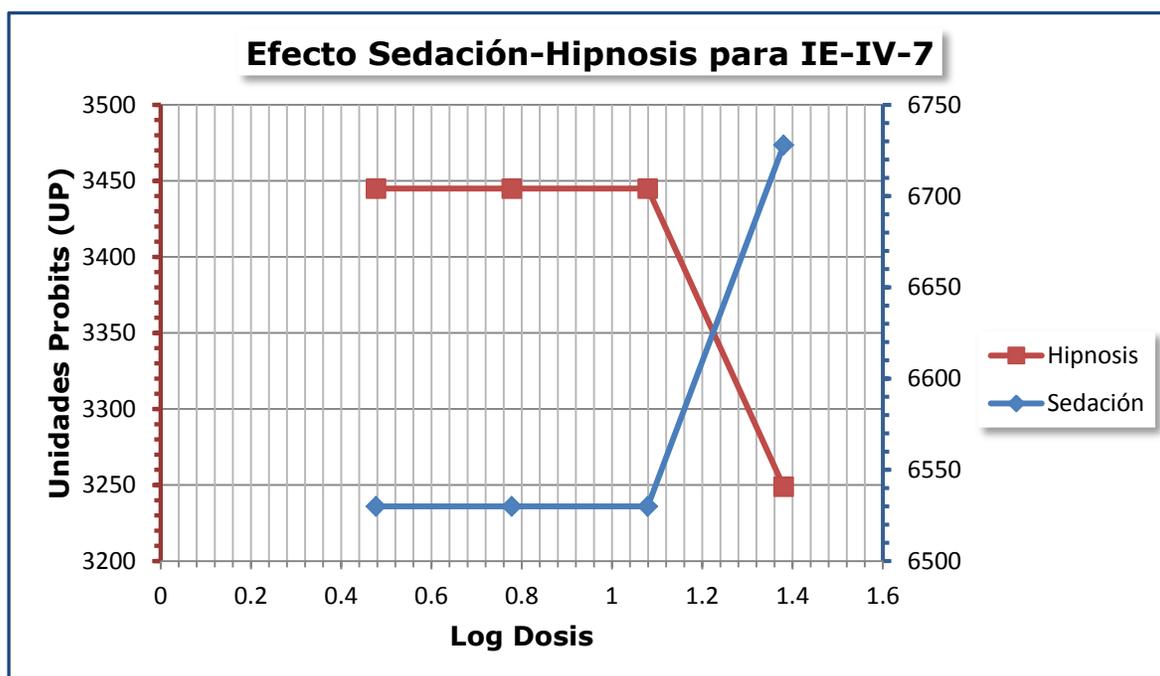
Dosis (mg/Kg)	Log Dosis	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LS)	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LH)	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LRH)	UP (S)	UP (H)	UP (RH)
1	0	4/6	62.50	0/6	4.16	0/6	4.16	5.332	3.249	3.249
2	0.3010	6/6	95.83	0/6	4.16	0/6	4.16	6.728	3.249	3.249
5	0.6989	6/6	95.83	6/6	95.83	0/6	4.16	6.728	6.728	3.249



Gráfica 18. Efecto de Sedación e Hipnosis observado para el compuesto IE-IV-H.

Tabla 10. Valores obtenidos para el compuesto IE-IV-7

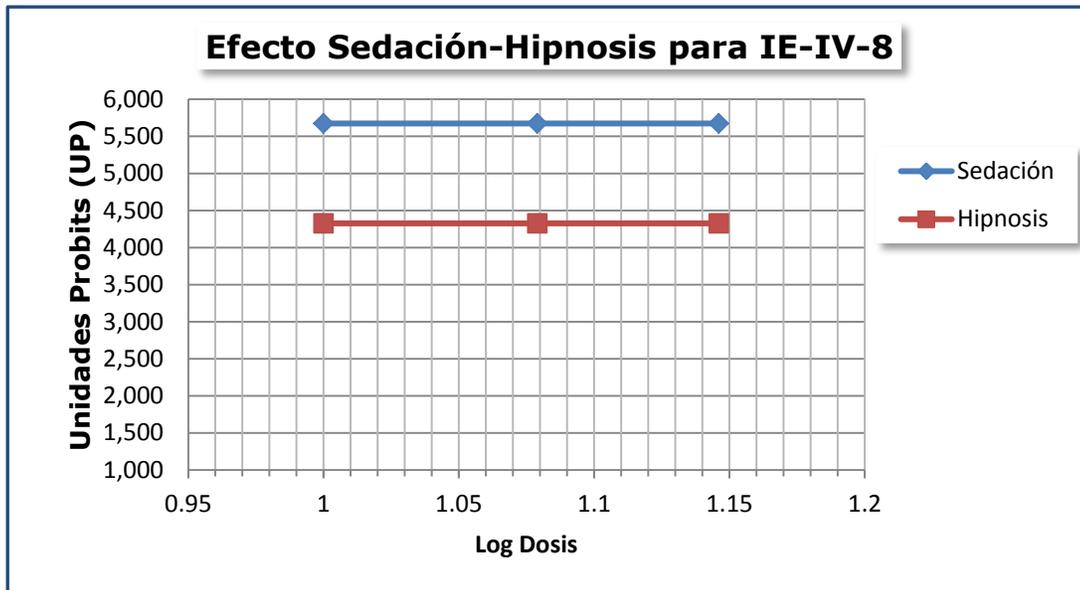
Dosis (mg/Kg)	Log Dosis	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LS)	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LH)	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LRH)	UP (S)	UP (H)	UP (RH)
2	0.4771	4/4	93.75	0/4	6.25	0/4	6.25	6.530	3.445	3.445
7	0.7781	4/4	93.75	0/4	6.25	0/4	6.25	6.530	3.445	3.445
12	1.0791	4/4	93.75	0/4	6.25	0/4	6.25	6.530	3.445	3.445
24	1.3802	6/6	95.83	0/6	4.16	0/6	4.16	6728	3249	3249



Gráfica 19. Efecto de Sedación e Hipnosis observado para el compuesto IE-IV-7

Tabla 11. Valores obtenidos para el compuesto IE-IV-8

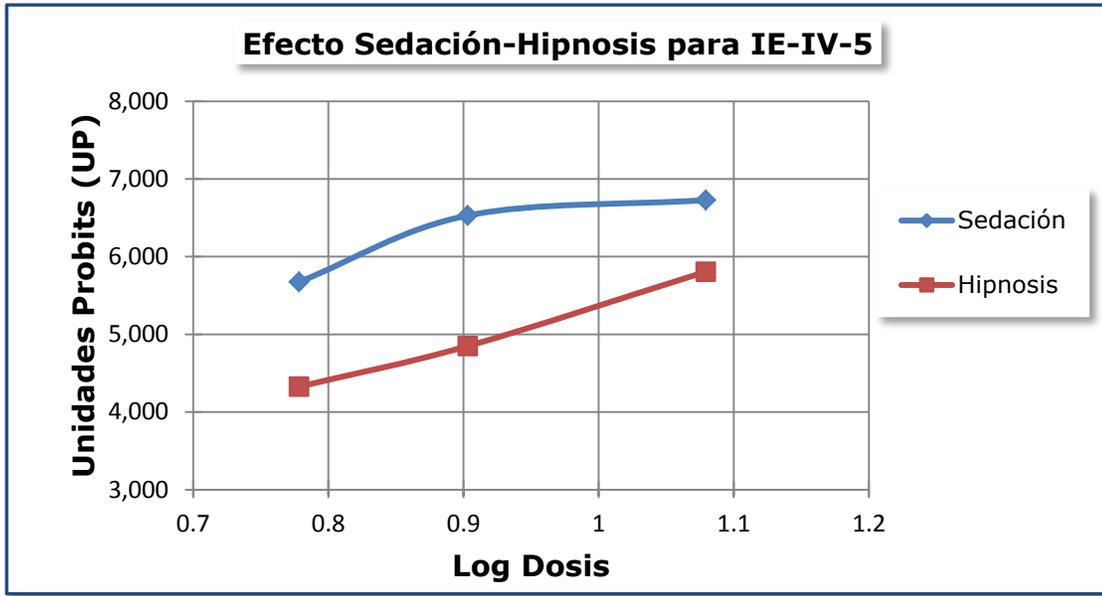
Dosis (mg/Kg)	Log Dosis	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LS)	No. ratones c/efecto	% Efecto (LH)	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LRH)	UP (S)	UP (H)	UP (RH)
10	1.0	1/1	75	0/1	25	0/1	25	5.674	4.326	4.326
12	1.079	1/1	75	0/1	25	0/1	25	5.674	4.326	4.326
14	1.1461	1/1	75	0/1	25	0/1	25	5.674	4.326	4.326



Gráfica 20. Efecto de Sedación e Hipnosis observado para el compuesto IE-IV-8

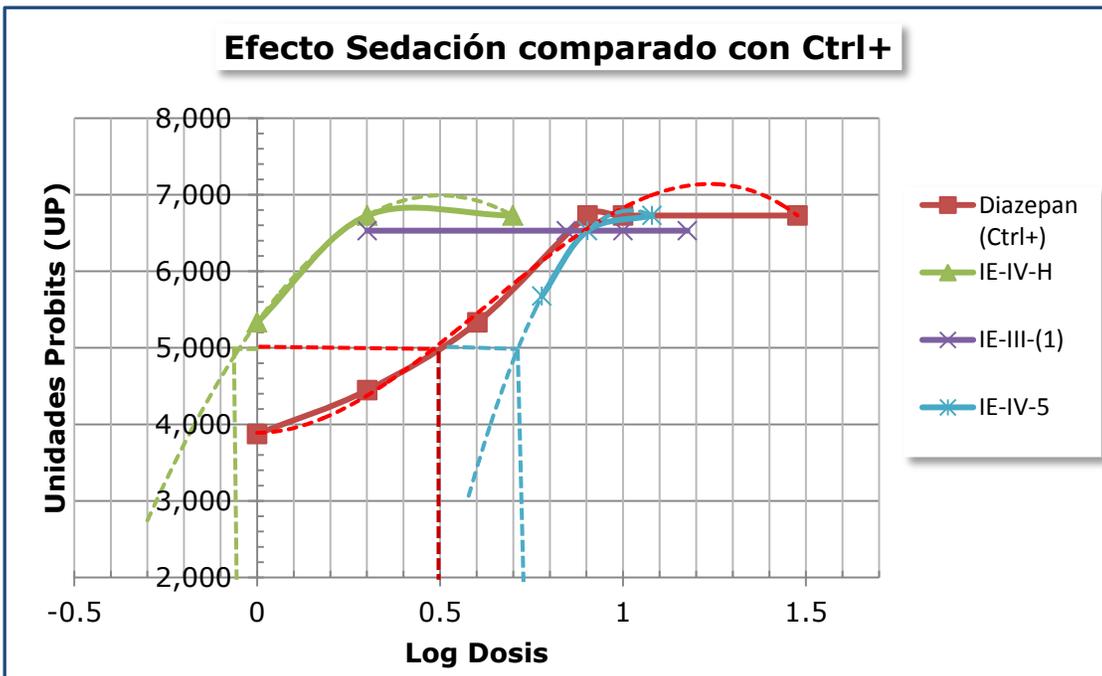
Tabla 12. Valores obtenidos para el compuesto IE-IV-5

Dosis (mg/Kg)	Log Dosis	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LS)	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LH)	No. ratones c/ efecto	% Efecto (LRH)	UP (S)	UP (H)	UP (RH)
6	0.7782	1/1	75	0/1	25	0/1	25	5.674	4.326	4.326
8	0.9031	4/4	93.75	2/4	43.75	2/4	43.75	6.530	4.849	4.849
12	1.0792	6/6	95.83	5/6	79.17	5/6	79.17	6.728	5.806	5.806

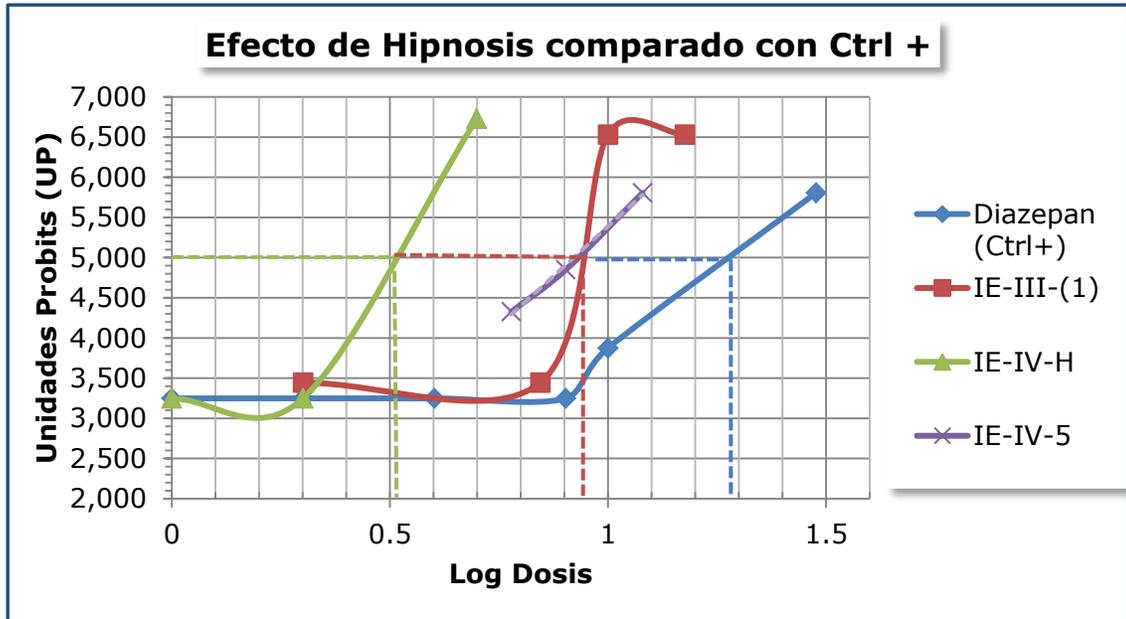


Gráfica 21. Efecto de Sedación e Hipnosis observado para el compuesto IE-IV-5.

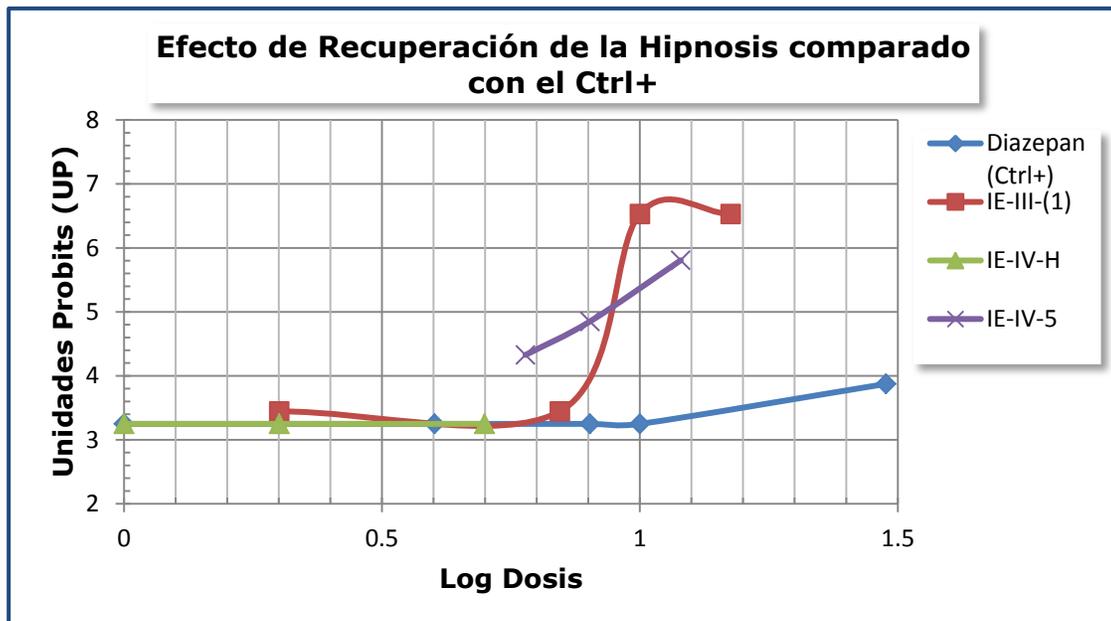
De los cinco compuestos analizados, solo 3 presentaron el efecto Sedante – Hipnótico. (Grafica 22 y 23)



Gráfica 22. Curvas de Sedación obtenida para los compuestos IE-III-(1), IE-IV-H, IE-IV-5 que presentaron dicho efecto y el Ctrl + Diazepam comercial.



Gráfica 23. Curvas de Hipnosis obtenida para los compuestos IE-III-(1), IE-IV-H, IE-IV-5 que presentaron dicho efecto y el Ctrl + Diazepam comercial.



Gráfica 24. Curvas de Recuperación de la Hipnosis obtenida para los compuestos IE-III-(1), IE-IV-5, IE-IV-H que presentaron dicho efecto.

16. TABLA DE RESULTADOS

Tabla 13. CL_{50} determinada por unidades Probits en la prueba de Artemia Salina para cada uno de los compuestos.

Compuesto	CL_{50} (mg/Kg)
IE-III-(1)	3.31
IE-IV-H	3.98
IE-IV-7	7.24
IE-IV-8	2.69
IE-IV-5	3.02

Tabla 14. DE_{50} y DT_{50} determinada para cada uno de los compuestos evaluada en ratones machos.

Compuesto	DE_{50} (Sedación, mg/kg)	DT_{50} (Hipnosis, mg/kg)
IE-III-(1)	No puede detectarse	8.91
IE-IV-H	0.93	3.24
IE-IV-7	-----	-----
IE-IV-8	-----	-----
IE-IV-5	5.24	19.05
DIAZEPAM (Ctrl+)	3.16	19.05

17. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para llevar a cabo la evaluación biológica de los nuevos derivados BZP se realizó como primer paso la prueba de solubilidad de cada uno de los compuestos tomando como referencia que el Tween 80 al 0.5% es un vehículo poco tóxico y excelente disolvente.

Se consideró la capacidad del Tween 80 al 0.5% -para solubilizar de una manera excelente cada uno de los compuestos debida a sus características tensoactivas que presenta, las cuales, permiten establecer una interfase entre la naturaleza hidrofílica del agua y la lipofílica del compuesto. (Anklam, J.E., 2000).

En cuanto a la DL_{50} obtenida por la prueba de Artemia Salina para cada uno de los compuestos BZP como podemos observar en el cuadro 1, resultó igual para tres de los compuestos, incluido para el compuesto IE-IV-H, el cual es el DZP sintetizado, sin embargo para el compuesto IE-IV-8 se observa que no tiene efecto sobre las Artemias y para el compuesto IE-IV-5 se observa un valor de DL_{50} menor al de todos los compuestos analizados, incluyendo al DZP sintetizado, proporcionando un grado de seguridad mayor para poder llevar a cabo las evaluaciones biológicas realizadas.

Por lo que respecta a la evaluación biológica de Sedación – Hipnosis podemos decir que existen, de los cinco compuestos, solo 3 que presentan esta actividad, incluyendo por supuesto al Diazepam comercial que es nuestro Control +, sin embargo, en ninguno se observa actividad Sedante – Hipnótica a una dosis menor que la del Diazepam sintetizado, Dosis: 0.93 mg/kg para producir sedación y una dosis de 3.24 mg/kg para producir hipnosis, obtenido por medio de gráficas.

Con los agonistas parciales que son drogas de baja eficacia o actividad intrínseca se disminuirían los problemas de sobredosis, la tolerancia por descenso de los receptores y de dependencia. La posibilidad de contar en clínica con agonistas parciales radica en tener agentes con propiedades solo ansiolíticas o anticonvulsivantes que a las dosis habituales no produzcan sedación ni relajación muscular, ataxia o tolerancia.

La utilización de las BZ debería ser siempre por cortos períodos de tiempo a fin de evitar el desarrollo de dependencia física. Las acciones ansiolíticas parecen ocurrir por la acción de las BZ sobre receptores del sistema límbico y del cerebro, incrementando la inhibición gabaérgica. (Ashton, H. 2002)

La tolerancia a los efectos ansiolíticos se desarrolla más lentamente que para los efectos hipnóticos; sin embargo luego de 30 a 60 días de tratamiento continuo con estos agentes deja de observarse con claridad la superioridad de estos fármacos frente al placebo.

Las BZ producen sedación (etapa previa al sueño) y también son inductoras del sueño. Estos efectos se desarrollan por activación de los receptores BZ1 ubicados en área gris reticular del mesencéfalo, centro de la vigilia.

La administración de BZ para inducir sueño debe ser cuidadosa y por cortos períodos de tiempo. La utilización por más de dos o tres semanas induce con mucha frecuencia, ante la supresión, un efecto rebote, por dependencia física. Puede también aumentar el sueño con movimientos oculares rápidos (MOR o REM), las pesadillas y el tiempo total de la etapa cero (despierto). Por ello es racional retirar la medicación hipnótica gradualmente. (Saiz J.; Montes J. M., 2003).

El uso crónico de BZP como hipnóticas induce tolerancia para este efecto, a tal punto que a los 30 días de iniciado el tratamiento no se observan diferencias entre estos fármacos y el placebo en el tiempo total de sueño REM, en el tiempo total de sueño de la fase 2.

Las BZP poseen amplio margen terapéutico es decir que la dosis efectiva 50 y la dosis letal 50 están muy distanciadas una de otra. (Jefferson, 2001).

18. CONCLUSIONES

- El tween 80 al 0.5% fue el disolvente en el cual se solubilizaron los compuestos completamente, o donde se obtuvo mejor solubilidad.
- De los cinco análogos BZP's, solo 3 presentaron efecto como Sedantes-Hipnóticos, incluyendo el DZP comercial con el cual se realizaron las comparaciones, sin embargo ninguno tiene actividad a una dosis menor que la presentada por el DZP sintetizado.
- El DZP sintetizado presenta actividad Sedante-Hipnótico a dosis menor que la del DZP comercial (DZP comercial, Dosis: 3.16 mg/kg y Diazepam sintetizado a 0.93 mg/Kg)
- Las DE₅₀ de Sedación para cada uno de los análogos se encuentran en un rango de 0.93 -5.24 mg/kg.
- Las DE₅₀ de Hipnosis para cada uno de los análogos se encuentran en un rango de 3.24 – 19. mg/kg.
- Los compuestos IE-IV-7 e IE-IV-8 no presentaron efecto de Sedación – Hipnosis.
- Sin embargo, no se descarta que en determinado momento pudieran utilizarse, a lo mejor solo como sedantes o incluso solo como inductores del sueño en pacientes en los que otros fármacos no les produzcan efecto.

19. ANEXOS

19.1 Metilcelulosa

Nombre químico: Éter metílico de celulosa

Nombre comercial: Syncelosa, Bagolax

Propiedades: Polvo o gránulos blancos, aumenta su viscosidad con las sales inorgánicas, estable a los álcalis y ácidos grasos, las suspensiones acuosas son neutras al tornasol.

Solubilidad: Soluble en ácido acético glacial, insoluble en agua y en soluciones salinas saturadas; insoluble en éter, alcohol o cloroformo.

Usos: laxante, agente dispersante, espesante, emulsificante y estabilizante.

Dosis: Como laxante: 1 – 5 g con agua de 2 – 4 veces al día.

19.2 Propilenglicol

Nombre químico: 1,2-propanodiol

Propiedades: Densidad (1.037 mg/mL), higroscópico, líquido viscoso, incoloro, sabor ligeramente acre.

Solubilidad: Misible con agua, acetona, cloroformo. Soluble en éter.

Usos: Disolvente para fármacos, cosméticos, lociones y ungüentos, conservador, humectante, emulsificante.

Dosis letal: en ratas 25 mL/kg

19.3 Tween 80

Nombre químico: Polisorbato 80, esteres del sorbitán, derivados de poli (oxi-1,2-etanodiílo).

Nombre comercial: Zeneca

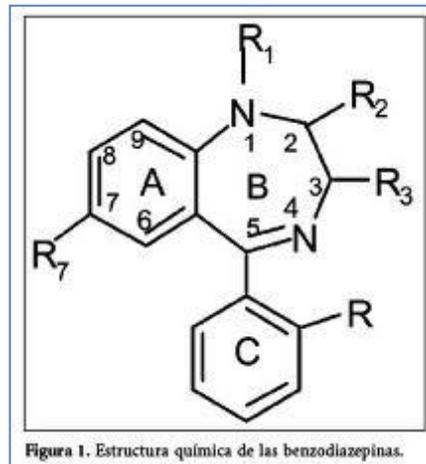
Propiedades: Densidad de 1.09 mg/mL, líquido oleoso color limón a ámbar, olor suave característico, sabor algo amargo, pH 6 a 8 en solución acuosa.

Solubilidad: Muy soluble en agua, soluble en alcohol; insoluble en aceite mineral.

Usos: emulsificante y agente dispersante en productos de medicina, surfactante.

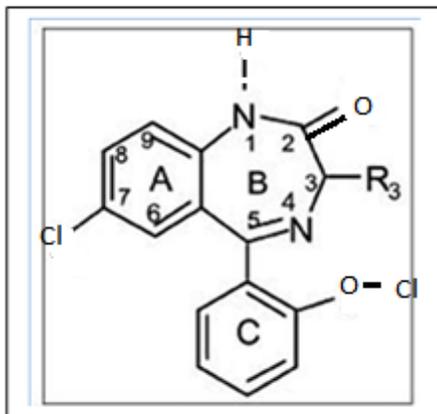
DL₅₀ (ratones): 6.3 – 7.5 mL/Kg, IP

19.4 Clave de Benzodiazepinas sintetizadas.

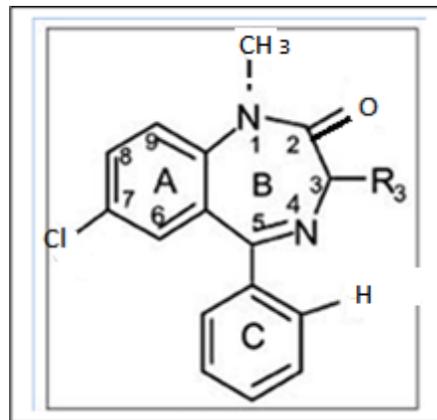


R1	R2	R	R7	Clave
H	= O	O - Cl	- Cl	IE-III-(1)
CH ₃	= O	H	- Cl	IE-IV-H (DIAZEPAM)
CH ₃	= O	O - F	- Cl	IE-IV-5
CH ₃	= O	P - F	- Cl	IE-IV-7
Et-	= O	P - F	- Cl	IE-IV-8

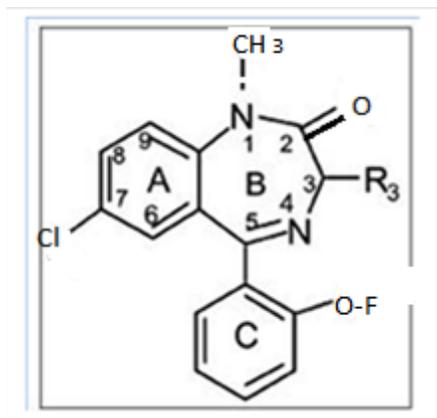
Benzodiazepinas Sintetizadas:



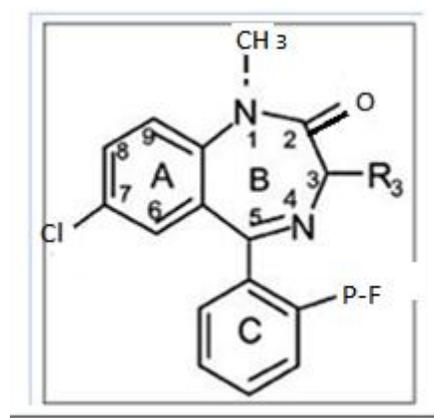
IE-III-(1)



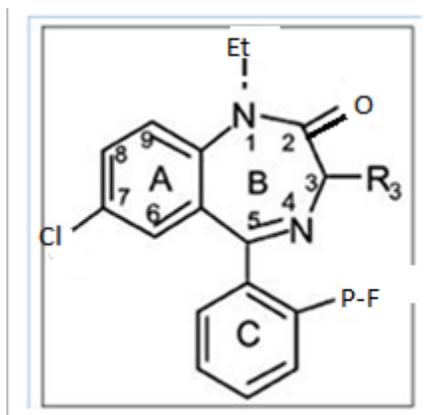
IE-IV-H (DIAZEPAM)



IE-IV-5



IE-IV-7



IE-IV-8

20. BIBLIOGRAFÍA

1. Anklam, E.J.; 2000. *Cosmetología de Harry*; Ediciones Díaz de Santos, S.A., Madrid. Wollgast.
2. Ashton, H. Benzodiazepine withdrawal: outcome in 50 patients. *British Journal of Addiction* (1987) 82,665-671.
3. Ashton, H. Guidelines for the rational use of benzodiazepines. When and what to use. *Drugs* (1994) 48, 25-40.
4. Ashton, H. Toxicity and adverse consequences of benzodiazepine use. *Psychiatric Annals* (1995) 25,158-165.
5. Ashton, H. *Benzodiazepine Abuse, Drugs and Dependence*, Harwood Academic Publishers (2002), 197-212, Routledge, London & New York.
6. Asterios S. Tsiftoglou, 1996. *Tumor Biology: Regulation of Cell Growth, Differentiation, and Genetics in Cancer / Biología del tumor: regulación del crecimiento celular, diferenciación y genética del cáncer.*
7. Bandelow B.; Bleich S. y Kropp S., *Handbuch Psychopharmaka*, 2a. edición, 2004.
8. Barr, M.; Kiernam J., 1994. *El sistema nervioso humano. Un punto de vista anatómico.* Harla S.A. Mexico, D.F., 390 p.
9. Benkert, Hippus, *Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie*, 2003.
10. Bradford H., 1988. *Fundamentos de neuroquímica.* Editorial Labor, S.A. Barcelona, España. 485 p.
11. Buchanan Douglas A., 1996. *Investigation of the Tricarboxylic Acid Cycle of the in Vivo Liver Using ¹³C NMR Spectroscopy / Investigación del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en el hígado in vivo usando espectroscopia.*

12. Bulach R.; Myles P.S., Russnak M., 2004. Double-blind randomized controlled trial to determine extent of amnesia with midazolam given immediately before general anaesthesia. pp. 300-305.
13. Calabrese R.; Gordon J.; Hawkins R. and Qian, N., 1995. Essentials of neural science and behavior. Appleton and Lange Medical Book. Stamford, CT. 385 p.
14. Dennis T.; Dubois A.; Benavides J.; Scatton B.; Distribution of central ω_1 y ω_2 receptor subtypes in the monkey and human brain: An autoradiographic study with flunitrazepan and the ω_1 selective ligand Zolpiden. *F Pharmacol Exp Ther* 1988; 274: 309-314.
15. Dawson Kristine, D., 2003. The Effect of Cycloserine on Metabolism and Contractile Function in Rodent Skeletal Muscle / Efecto de la cicloserina sobre el metabolismo y la función contráctil en el músculo esquelético de roedores.
16. Falk Kimberly L., 1997. Metabolic Bypass of the Tricarboxylic Acid Cycle During Lipid Mobilization in Germinating Oilseed: Bypass metabólico del ciclo de los ácidos tricarboxílicos durante la movilización de lípidos en semillas oleaginosas germinando.
17. Goodman y Gilman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, McGraw-Hill-Interamericana, 2009.
18. Greenblatt D.J; Divol M.; Abernathy D.R.; et al. Current status of benzodiazepines (Part I). *N Engl J Med* 1983; 309: 354-358.
19. Greenblatt D.J.; Shader R.I.; Abernathy D.R.; Drug therapy. Current status of benzodiazepines. *N Engl J Med*. 1983 Aug 18; 309(7):410-416.
20. Harrison. Principios de Medicina Interna 16a edición, 2006. "Tratamiento, vértigo, hipertensión", etc. (en español). *Harrison online en español*. McGraw-Hill. Consultado el 9 de junio de 2008.

21. Katzung, B.F., Farmacología Básica y Clínica, Cap. 21, 6ª Ed., Edit. El Manual Moderno, México, 2002.
22. Kwok-ho Alvin Cheung, 2003. The Role of Human Sodium Dicarboxylate Cotransporter in Oxidative Stress / Papel del cotransportador humano dicarboxilato de sodio en el estrés oxidativo.
23. Lehninger L.A. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y la materia. Visión global del ciclo de Krebs: importancia clínica y metabólica, 2009.
24. Lader M. Clinical pharmacology of benzodiazepines. Annu Rev Med 1987; 38: 19-28.
25. Matalon, Leor. The Relationship Between Insulin-stimulation of Krebs Cycle Activity and Protein Synthesis in... / La relación entre la estimulación de insulina en la actividad del ciclo de Krebs y la síntesis de proteínas, 1990.
26. Levitan, Y. and Kaczmarek, L., 1997. The neuron. Cell and molecular biology. Oxford University Press. New York, NY. 543 p.
27. Malchow R.P., Qian H.H., Ripps H.: Gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced currents of skate Müller (glial) cell are mediated by neuronal-like GABA_A receptors, Proc Natl Acad Sci USA, 1996.
28. Malinowska krystyna, 1993. The Effects of Krebs Cycle Intermediates on Dicamba Degradation by Xanthomonas Maltophilia / Los efectos de los intermediarios del ciclo de Krebs en la degradación Dicamba por Xanthomonas Maltophilia.
29. McKernan R.M.; Rosahl T.W.; Reynolds D.S.; Sur C.; Wafford K.A.; Atack J.R.; Farrar S.; Myers J.; Cook G.; Ferris P.; Garrett L.; Bristow L.; Marshall G.; Macaulay A.; Brown N.; Howell O.; Moore K.W.; Carling R.W.; Street L.J.; Castro J.L.; Ragan C.I.; Dawson G.R.; Whiting P.J.; (Jun 2000). "Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines

- are mediated by the GABA (A) receptor alpha1 subtype". *Nature neuroscience*. 3 (6): pp. 587-92.
30. McMurry John. *Química orgánica*. 6ª ed. Cengage Learning Editores, 2005. ISBN: 9706863540 Pág.56 y ss.
 31. Miller, Stanley L.; Smith-Magowan, David, 1990. *The Thermodynamics of the Krebs Cycle and Related Compounds / La termodinámica del ciclo de Krebs y compuestos relacionados*.
 32. Moore R.J.; Wilkinson J. B.; *Cosmetología de Harry*, Editorial Díaz de Santos, S.A., 1062 páginas, ISBN: 8487189385 ISBN-13: 9788487189388, 1990.
 33. Nieto, M., 1991. *Función cerebral*. Libros de Investigación y Ciencia. Prensa Científica, S.A. Barcelona España.192 p.
 34. Pachecho Quesada, Gerardo Manuel y Rey de Castro Mujica, Jorge. *Insomnio en pacientes adultos ambulatorios de medicina interna del Hospital Nacional Arzobispo Loayza*. *Rev Med Hered.* [online]. abr. 2003, vol.14, no.2 [citado 02 junio de 2008], p.63-68. Disponible en la World Wide Web: [1]. ISSN 1018-130X.
 35. Paternina Pereira, F.J., Viscaino Insignares, J.; *Lect., nutr*, 1999. *Ciclo de los ácidos tricarbóxicos y ruta del fosfogluconato*.
 36. Petrucci, Ralph, S.; Harwood William, S.; Geoffrey Herring, Geoffrey, F.; *General Chemistry*, 8th Edition (Prentice-Hall 2002), cap 3.
 37. Reichert, H. 1992. *Introduction to neurobiology*. Oxford University Press. New York, NY. 255 p.
 38. Roth, H. J. *Pharmaceutical Chemistry*, Vol. 2, Ellis Hoywood, great Britain, 1991.
 39. Smith Odette, A. M.; Ratcliffe, R. G.; Sweetlove, L. J., 2004, *Investigating the TCA Cycle in Isolated Plant Mitochondria Using Nuclear Magnetic Resonance / Investigando el Ciclo ATC en mitocondrias aisladas de plantas usando resonancia magnética nuclear*.

40. Saiz J.; Montes J. M.; Fármacos Sedantes/Hipnóticos. *Medicine*, 2003. 8:5711-4.
41. Seashore, M. and Wappner, R., 1996. *Genetics in primary care and clinical medicine*. Appleton and Lange Medical Book. Stamford, CT. 334 p.
42. Siegel, G., Agranoff, B., Wayne, R., Fisher, S., and Uhler, M. 1999. *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, PA. 1183 p.
43. Theodore L. Brown, Bruce E. Bursten, Julia R. Burdge. *Química: la ciencia central*. 9ª ed. Pearson Educación, 2004. ISBN: 9702604680. Pág. 50.
44. Wolfgang Loscher, Chris Rundfeldt, Dagmar Honack and Uldrich Ebert.; *Characteristics of benzodiazepine Receptor Ligands in Different Seizure models in Mice*.
45. Siegel, G., Agranoff, B., Wayne, R., Fisher, S., and Uhler, M. 1999. *Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects*.
46. Weininger Stephen, J.; Stermitz Frank, R.; Editorial Reverté, 1988. *Química orgánica*. ISBN: 842917527X Pág. 1289.
47. Obtenido de ["http://www.infodoctor.org/vademecum/index.php/Diazepam"](http://www.infodoctor.org/vademecum/index.php/Diazepam). Dosis Letal.