

R.2714

T. 122

CATEDRA DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

"ESTUDIO FARMACODINAMICO PRELIMINAR DE LA 5-BENZAL-  
-HIDANTOINA Y DE LA 5-BENZAL-2-TIO-HIDANTOINA".

Trabajo para aspirar al grado  
de Licenciatura que presenta

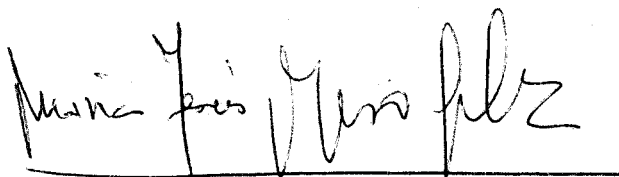
Ma CARMAEN MARTIN GARCIA

~~Carmaen Martin Garcia~~

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
BIBLIOTECA

El presente trabajo, ha sido realizado en la Cátedra de FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA de la FACULTAD DE FARMACIA de la Universidad de SEVILLA, bajo la dirección de la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Ayuso González y de la Dra. Elisa Marhuenda Requena.

Los directores del trabajo:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'María Jesús Ayuso González', written over a horizontal line.

Dra. M<sup>a</sup> Jesús Ayuso González

Dra. Elisa Marhuenda Requena

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Ma Jesús Ayuso y a la Dra. Elisa Marhuenda por la dirección de este trabajo.

Al Dr. José Luis Gómez Ariza y a la Dra. Ma Teresa Montaña por la valiosa colaboración que nos han prestado.

A Guillermina y a mis compañeras del Departamento.

A mis padres

# S U M A R I O

pag.

## I.- O B J E T O

## II.- P A R T E T E O R I C A

II.1.- ESTUDIO MONOGRAFICO DE HIDANTOINAS	1
II.1.1.- <u>Historia</u>	1
II.1.2.- <u>Clasificación</u>	3
II.1.3.- <u>Relación estructura química-</u> <u>-actividad</u>	4
II.1.4.- <u>Acción farmacológica</u>	5
II.1.5.- <u>Mecanismo de acción</u>	8
II.1.6.- <u>Farmacocinética</u>	12
II.1.6.1.- Absorción	12
II.1.6.2.- Distribución	13
II.1.6.3.- Biotransformación	15
II.1.6.4.- Excreción	16
II.1.7.- <u>Toxicidad</u>	19
II.1.8.- <u>Vías de administración</u> <u>y dosis</u>	21

	<u>pag.</u>
II.1.9.- <u>Aplicaciones terapéuticas</u>	22
II.1.10.- <u>Contraindicaciones</u>	26
II.1.11.- <u>Interacciones farmacoló- gicas</u>	26
II.2.- REVISION DE TECNICAS DE VALORACION DE FARMACOS ANTICONVULSIVANTES	29
III.- <u>P A R T E   E X P E R I M E N T A L</u>	
III.1.- MATERIAL	33
III.1.1.- <u>Muestras</u>	33
III.1.2.- <u>Reactivo animal y vía de administración</u>	34
III.2.- ENSAYOS DE TOXICIDAD	35
III.2.1.- <u>Determinación de la toxi- cidad de la 5-benzal-2- -tio-hidantoina</u>	36
III.2.1.1.- Síntomas de into- xicación	36
III.2.1.2.- DL 50	-

	<u>pag.</u>
III.2.2.- <u>Determinación de la toxicidad de la 5-benzal-</u> <u>-hidantoína</u>	37
III.2.2.1.- Síntomas de intoxicación	37
III.2.2.2.- DL 50	37
III.2.3.- <u>Discusión de resultados</u>	43
III.3.- METABOLISMO	44
III.3.1.- <u>Determinación de la BAH en la orina de rata</u>	44
III.3.2.- <u>Determinación de la BAH en heces de rata</u>	62
III.3.3.- <u>Discusión de resultados</u>	67
III.3.4.- <u>Determinación de la BATH en la orina de rata</u>	67
III.3.5.- <u>Determinación de la BATH en heces de rata</u>	80
III.3.6.- <u>Discusión de resultados</u>	82
IV.- <u>C O N C L U S I O N E S</u>	83
V.- <u>B I B L I O G R A F I A</u>	85

## I.- O B J E T O

Las hidantoinas son fármacos de elección en el tratamiento de algunas formas de la epilepsia.

El reducido número de estas sustancias con aplicación terapéutica es debido a una serie de factores tales como marcada toxicidad y las peculiares propiedades físico-químicas de la molécula.

Por ello emprendimos el presente trabajo de tesina con los derivados 5-benzal-hidantoina y 5-benzal-2-tio-hidantoina, con la intención de comprobar si la introducción de nuevos radicales en la molécula, mejoraban su índice terapéutico.



II.- P A R T E T E O R I C A

II.1.- ESTUDIO MONOGRAFICO DE HIDANTOINAS

Las hidantoinas, en su mayoría, constituyen un grupo de fármacos con propiedades anticonvulsivantes, es decir, útiles contra los estados convulsivos. De ellos el más importante es la epilepsia, hasta el extremo de eclipsar clínica y farmacológicamente a todos los demás, razón por la cual, en la actualidad se conocen como fármacos "antiepilépticos".

Se definen como fármacos depresores del SNC que tienen la propiedad de suprimir selectivamente las crisis de la epilepsia en algunas de sus formas, impidiendo su aparición.

II.1.1.- Historia

El núcleo de la hidantoina fue descubierta en 1861 por Baeyer. La aisló como uno de los productos de reducción de la alantoina en el curso de su clásico estudio del ácido úrico (1). Sin embargo, su configuración no fue esclarecida hasta 1870 (2).

Posteriormente se aislaron de numerosas fuentes naturales, tales como las yemas de los plátanos orientales (3), en los brotes blancos de la remolacha (4),

etc. Una hidantoina metilada, se aisló de un extracto testicular que contenía sustancias presoras (5).

También se ha comprobado, que tras la ingestión o inyección intravenosa de grandes cantidades de aminoácidos, entre ellos la tirosina (6), aparecían en la orina hidantoinas derivadas de estos aminoácidos.

En 1908 Biltz presentó la síntesis de varias hidantoinas mientras estudiaba derivados de la urea y fenol. Estaba incluido en este grupo la 5,5'-difenilhidantoina (DFH).

Más tarde, ensayaron sus efectos hipnóticos y su toxicidad. Debido a su baja actividad como hipnótico y su semejanza estructural con barbitúricos, Merritt y Putnam (1938) probaron su acción anticonvulsivante frente a convulsiones electricamente producidas en gatos, encontrando, que eran altamente efectivas, y además, no tenía efectos sedantes como los bromuros y el fenobarbital descubiertos anteriormente como anticonvulsivantes.

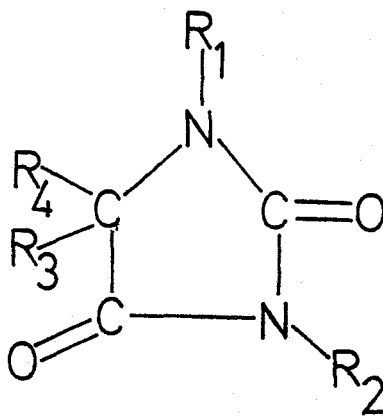
El descubrimiento de las hidantoinas como anticonvulsivantes fue el resultado de cuidadosos estudios de laboratorio sobre una larga serie de sustancias químicas, lo que establece la importancia de la búsqueda de nuevos anticonvulsivantes (7).

Posterior al descubrimiento de la DFH, Loscalzo en 1945 introdujo la 3-metil-5-etil-5'-fenil-

hidantoina(mefenitoina) y más tarde Schwade y col. en 1956 (8), obtuvieron la 3-etil-5-fenil-hidantoina(etotoina).

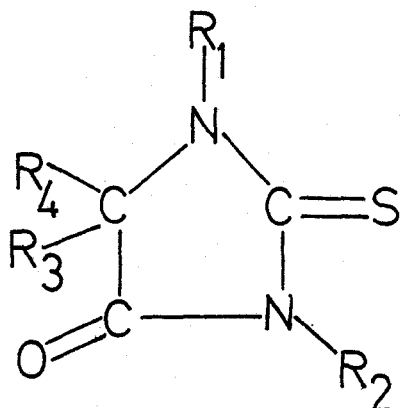
### II.1.2.- Clasificación

#### A) Derivados de la hidantoina



	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>R<sub>3</sub></u>	<u>R<sub>4</sub></u>
5,5'-difenil-hidantoina (DFH) (fenitoina)	-H	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
3-metil-5-etil-5'-fenil- hidantoina (mefenitoina)	-H	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
3-etil-5-fenil-hidan- toina (etotoina)	-H	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-H
5-etil-5-fenil-hidan- toina (nirvanol)	-H	-H	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
1-metil-5-etil-5'-fenil- hidantoina (metotoina)	-CH <sub>3</sub>	-H	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>

## B) Derivados de la 2-tiohidantoina



	<u>R<sub>1</sub></u>	<u>R<sub>2</sub></u>	<u>R<sub>3</sub></u>	<u>R<sub>4</sub></u>	
3-alil-5-isobutil-	-H	-CH <sub>2</sub> -CH=CH <sub>2</sub>	-H	-CH <sub>2</sub> -CH	CH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>
-2-tio-hidantoina					
(albutoina)					

II.1.3.- Relación estructura química-actividad

La presencia de un grupo fenilo en el C<sub>5</sub> u otro sustituyente aromático, es requisito fundamental para la actividad anticonvulsivante de las hidantoinas, concretamente para la actividad contra ataques generalizados tónico-clónico y para la abolición del ataque patrón por electroshock en animales de laboratorio (9,10).

La acción anticonvulsivante es modificada por la introducción de diferentes radicales.

La adición de un segundo grupo fenilo en el C<sub>5</sub> reduce la actividad antielectroshock en comparación con el efecto de una cadena corta alquilo en el carbono 5 (11), pero sin embargo la presencia de este grupo alquilo contribuye a la sedación. Esto ocurre en la 3-metil-5-etil-5-fenil-hidantoina (mefenitoina), en que existe un grupo etilo en posición 5.

Un grupo carbonilo en posición 4 aumenta la actividad antielectroshock (12).

La presencia de un grupo metilo en el C<sub>3</sub> como ocurre también en la mefenitoina, aumenta ligeramente el espectro de acción de ésta sobre la difenilhidantoina, pues parece desarrollar potencia antimetrazol en animales de laboratorio, pero también aumenta la toxicidad (13).

Un grupo ceto en el C<sub>2</sub> parece presentar mayor actividad anticonvulsivante que un grupo tio (14).

La introducción de un sustituyente en el N en posición 1 disminuye la actividad anticonvulsivante (15).

#### II.1.4.- Acción farmacológica

Las hidantoinas ejercen una acción antiepiléptica, sin causar depresión general manifiesta del SNC.

Las propiedades más demostradas son su capacidad para limitar el desarrollo del ataque máximo y reducir el proceso de extensión del ataque desde el foco activo (16).

La acción más significativa de las hidantoínas es su capacidad para modificar el patrón de ataque por electroshock máximo (tónico-clónico) producido en animales por corriente supramáxima. Esta modificación se caracteriza por una abolición primero, del componente extensor y luego, del flexor de la fase tónica, y una prolongación de la fase clónica (17,18,19).

Estos fármacos, producen alteraciones similares en las convulsiones de pacientes psiquiátricos sometidos a terapia electroconvulsiva, así como en ataques máximos inducidos en animales por picrotoxina y pentilentetrazol.

La DFH en una única dosis aguda en animales adultos no elevan el umbral para ataques inducidos por estimulación del cerebro con 60 ciclos de corriente alterna (60 Hz) o por inyección de fármacos convulsivos como estriknina, picrotoxina o pentilentetrazol. Sin embargo, eleva el umbral de ataque con 60 Hz disminuido anormalmente por hiponatremia aguda, debido a la administración de cortisona o tirosina (8). La DFH, sin embargo, no abole el ataque tónico inducido por la estriknina, que actúa por bloqueo de la inhibición postsináptica.

tica (16).

La 3-metil-5-etil-5'-fenil-hidantoina (mefenitoina) abole la fase tónica de ataques por electroshock máximo. También antagoniza las convulsiones por pentilentetrazol y eleva el umbral de ataque en animales normales y en animales experimentalmente inducidos por electroshock. Al contrario que la DFH tiene propiedades sedantes (20,21).

El efecto estabilizador de las hidantoinas es aparente en todas las membranas neuronales (incluyendo nervio periférico) y probablemente en todas las membranas excitables y algunas no excitables, pero no parece interferir con la función normal de células excitables, excepto en dosis prácticamente tóxicas.

Quizás el hallazgo más significativo se refiere a la capacidad de las hidantoinas para reducir la potenciación postetánica (PTT) de la transmisión sináptica dentro del cordón espinal, así como del ganglio estrellado del gato (22). Estas experiencias sólo se han llevado a cabo con la DFH.

De las ~~ta~~ hidantoinas, a las que hemos hecho referencia, la etotoina es la que presenta menor actividad anticonvulsivante.

II.1.5.- Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la mefenitoina y etotoina, es prácticamente desconocido, por el contrario el de la DFH ha sido ampliamente estudiado, por lo cual en este apartado se hará referencia a esta última.

El mecanismo de acción de la DFH consiste en impedir la difusión del foco epileptógeno a las neuronas normales, pues bloquea la potenciación posttetánica (PTP) suprimiendo con ello la potenciación a estímulos repetitivos.

Parece ser que tiene efectos fundamentales sobre los movimientos iónicos a través de las membranas de células excitables. Woodbury (1955) demostró, que la DFH tiene influencia sobre el transporte de  $Na^+$ , disminuyendo su concentración y aumentando de esta forma la relación de concentración extracelular de  $Na^+$  a concentración intracelular de  $Na^+$ .

Esto se probó en animales normales, así como también en animales hiponatremicos y en animales tratados con electroshock máximo.

El descubrimiento de un aumento de la relación extracelular a intracelular de  $Na^+$ , unido a un aumento en el movimiento del mismo ión fue interpretado como indicativo de una elevada actividad de la bomba de  $Na^+$ .



La elevación de la relación extracelular a intracelular de  $\text{Na}^+$ , asociado, por tanto, con aumento de  $\text{K}^+$ , podría contribuir a un aumento en el potencial de reposo de membrana. Woodbury calculó que bajo estas condiciones la DFH aumenta el potencial de reposo en unos 12 mv. Esto podría ser la base de la relación de la excitabilidad nerviosa y quizás, el aumento del umbral de excitabilidad de las células nerviosas.

Hartmann (1966) demostró, usando electro-microscopía, que se produce una reducción del contenido de  $\text{Na}^+$  en células nerviosas corticales de animales tratados con DFH.

La elevación de la bomba de  $\text{Na}^+$  puede también explicar la reducción de la potenciación post-tetánica por la DFH.

Algunos autores sugieren que la PTP es causada por hiperpolarización de las terminaciones pre-sinápticas. Así, un periodo de estimulación de alta frecuencia origina un prolongado periodo de potencial aumentado de membrana, comunmente referido como hiperpolarización post-tetánica.

El mecanismo iónico exacto que lleva a la hiperpolarización post-tetánica no es conocido, pero se ha sugerido que durante la estimulación tetánica y despolarización repetida, tiene lugar un marcado influjo de  $\text{Na}^+$  en la fibra nerviosa y sus terminaciones.

La porción mielinizada de la fibra, puede recuperarse rápidamente, pero en las terminaciones tiene lugar una acumulación temporal de  $\text{Na}^+$  intracelular que estimula fuertemente la bomba de  $\text{Na}^+$ . Esta bomba activada, empuja  $\text{Na}^+$  hacia fuera y después de la estimulación tetánica resulta una hiperpolarización de las terminaciones presinápticas.

El PTP se produce por el hecho de que la hiperpolarización de las terminaciones produce una mayor descarga que acaba en una excitación de un gran número de neuronas motoras. Parece que el camino más lógico por el que la DFH previene la PTH y PTP podría ser un aumento de la actividad de la bomba de  $\text{Na}^+$ , de manera, que la acumulación excesiva de  $\text{Na}^+$  intracelular durante la estimulación tetánica no tiene lugar y previene la hiperpolarización.

El sustrato anatómico o químico de la bomba de  $\text{Na}^+$  no está bien conocido, pero un gran número de investigadores defienden la idea de que una Na-K-ATPasa interviene en el transporte activo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  por la membrana celular.

Lewin y McCrimmon (1967) observaron un aumento de la Na-K-ATPasa en el cortex de rata en lesiones epileptógenas experimentales causadas ~~por~~ por congelación (23).

Festoff y Appel (1968) observaron que la

la DFH producía una significativa estimulación de la Na-K-ATPasa cuando la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  era alta (50:1), pero en relaciones bajas (5-10:1) tuvo poco o ningún efecto. Para relaciones bajas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (menos que 5:1) el efecto fue inhibitorio. Si la Na-K-ATPasa es la base de la bomba de  $\text{Na}^+$ , está influida por la DFH (23,24).

También se ha sugerido, que el PTP puede resultar de un aumento de la liberación de transmisor de las terminaciones presinápticas causado por movimientos de  $\text{Ca}^{++}$  en el área presináptica durante la estimulación. Es posible, que la DFH pueda prevenir el PTP por modificación del transporte del ión  $\text{Ca}^{++}$ .

Otra hipótesis defiende que la DFH en dosis altas, puede influir la liberación y almacenamiento de  $\text{AcCo}$ , pero los datos son incompletos y no dan una evaluación del papel de este factor en la acción anticonvulsivante de la DFH.

Woodbury y Esplin (1959) observaron que la DFH disminuía la concentración de ácido glutámico en el cerebro, aumenta la concentración de glutamina y reduce la relación ácido glutámico a glutamina.

Algunos autores consideran que los cambios del sistema ácido glutámico-glutamina podían estar relacionados con los cambios en el transporte de  $\text{Na}^+$  causados por la DFH. Estudiando estos cambios encontraron que la alteración de la relación ácido glutámico-glutamina

precedió al cambio de la razón extracelular a intracelular de  $\text{Na}^+$  y concluyó que el ácido glutámico y glutamina pueden jugar un papel en el sistema de la bomba de  $\text{Na}^+$  (23).

La concentración de GABA fue despreciable y no aumentó significativamente.

### II.1.6.- Farmacocinética

#### II.1.6.1.- Absorción

Las hidantoinas son extremadamente insolubles en el jugo gástrico (pH alrededor de 2,0) y por tanto su absorción por la mucosa gástrica es muy limitada (8).

La absorción se efectúa rápidamente en el duodeno por difusión pasiva. El pH en la zona de absorción es de 7 a 7,5, habiéndose demostrado que las sales biliares incrementan la absorción (25).

Se absorben más lentamente cuando se administran por vía intramuscular que por vía oral, debido a una serie de factores, entre ellos podemos citar la cristalización que sufre el principio en el interior de la masa muscular.

La concentración máxima en plasma de una dosis única de DFH puede ocurrir entre 3 y 12 horas (26). Los niveles plasmáticos máximos pueden permanecer durante

24 horas.

Para la mefenitoina el tiempo del efecto máximo es de 2 a 4 horas después de la ingestión.

La absorción de la etotoina es menos conocida.

#### II.1.6.2.- Distribución

Se realiza gracias a la unión rápida y reversible con las proteínas plasmáticas.

Para la mefenitoina y etotoina, esta unión no es bien conocida, así como tampoco su vida media.

Respecto a la DFH, en el hombre la unión a proteínas plasmáticas es por término medio de un 90% a 37°C. En niños recién nacidos la unión a proteínas es significativamente más baja que en adultos (8).

La distribución se verá, pues, afectada en aquellos pacientes cuyas proteínas plasmáticas sean anormales, si bien por otra parte fármacos como el ácido salicílico, fenilbutazona, etc., pueden competir con la DFH en la unión a determinados "locus" especializados en el transporte de esta sustancia.

En realidad, se considera como sustancia activa aquella porción de DFH que se halla en plasma libre, es decir, no unida a la fracción albuminoidea.

La vida media de la DFH varía cuantitativamente de una especie a otra y también depende de los

distintos fármacos antiepilépticos. En el hombre, la vida media después de la administración oral tiene una media de 22 horas con un intervalo de 7,0 a 42,0 horas; la vida media después de la administración intravenosa es menor y varía de 10 a 15 horas.

Existen factores que pueden alterar la vida media de la DFH; así los fármacos que interfieren con el metabolismo de la DFH en el hígado, aumentan su vida media en el plasma; factores genéticos, tales como la no capacidad del hígado para p-hidroxilar la DFH también prolongan su vida media y los niveles en sangre. Aumentando la dosis de DFH aumenta la vida media. Fármacos que aceleran su metabolismo por inducción de enzimas disminuyen su vida media.

Una vez en el plasma la DFH se distribuye libremente en el organismo: líquido cerebro espinal, saliva, líquido gastrointestinal, y bilis. Atraviesa la barrera placentaria y rápidamente alcanza un equilibrio entre la madre y el feto(27).

En cuanto al cerebro, después de una dosis de DFH, ésta penetra rápidamente en él. Después de una administración intravenosa, en el hombre alcanza el nivel en 50 minutos. Sin embargo, la concentración disminuye, así como los niveles en el plasma con la redistribución de DFH por unión o almacenamiento en otros tejidos.

En una administración continua, estos lu-

gares se saturan, aumenta otra vez los niveles plasmáticos; en 4 o 5 días se alcanza el estado de nivel estable.

En cuanto a los niveles séricos para la DFH, se ha determinado como nivel terapéutico una concentración plasmática de 10 a 20 microgramos/ml. El nivel tóxico es de 30 microgramos/ml. El coma sobreviene cuando la concentración es mayor de 50 microgramos/ml. Con concentraciones menores de 10 microgramos/ml no ocasionan mejoría clínica.

Niveles de 10 a 20 microgramos/ml se obtienen generalmente con dosis de 6-7mg/kg/día en adultos y 9-13 mg/kg/día en niños (28).

La determinación del nivel sérico de DFH en el plasma es la más conocida, en la actualidad.

Aunque no conocemos la distribución exacta de los fármacos en los tejidos orgánicos, pensamos que está en relación con el nivel sérico de los mismos, por lo que ante la imposibilidad de medir la concentración del anticonvulsivante en el tejido cerebral, recurrimos a la medida del nivel sérico (29,30).

#### II.1.6.3.- Biotransformación

Se realiza en el hígado por el sistema microsomal enzimático.

En la biotransformación de la DFH se forman principalmente tres metabolitos activos:

- 5-fenil-5'-(p-hidroxifenil)hidantoina (HPPH) (31).
- 5-(3,4-dihidroxifenil)-5-fenil-hidantoina.
- 5-(3-O-metil-4-hidroxifenil)-5-fenil-hidantoina(8).

En el caso de la mefenitoina, es demetilada en un agente anticonvulsivante activo, la 5-etil-5-fenil-hidantoina (nirvanol), aislado de la orina de los pacientes sometidos a tratamiento con mefenitoina.

Parece este metabolito el responsable de los efectos terapéuticos y tóxicos de la mefenitoina cuando se administra en dosis continuadas en pacientes epilépticos.

De los productos de biotransformación de la etotoina el metabolito que aparece en mayor cantidad es el 5-fenil-hidantoina (por N-deetilación del compuesto) y en menor proporción 3-etil-5-(p-hidroxifenil)-hidantoina (derivado hidroxilado) que se presenta en orina como glucurónido. Otro metabolito es el ácido fenilhidantoico.

II.1.6.4.- Excreción

De acuerdo con lo expuesto en apartados anteriores vamos a describir este proceso refiriendonos a la DFH ya que es la más estudiada en la actualidad.

Aparece en orina alrededor de un 60 a 70% de la dosis diaria administrada como 5-fenil-5'-(p-hidroxifenil)hidantoina, en un 25 a un 30% como los demás metabolitos citados anteriormente y de un 1 a 5% en forma no



metabolizada (8).

La excreción por orina se realiza por procesos de filtración glomerular y de secreción tubular.

Los metabolitos son inicialmente excretados en la bilis, pero entonces entra en el líquido intestinal, siendo a continuación reabsorbido y excretado por orina.

La DFH como tal es excretada en mínima cantidad en heces.

En el hombre la excreción completa requiere de 72 a 120 horas después de la administración oral y un tiempo parecido después de la administración intravenosa.

En pequeña proporción también se elimina por la saliva (32).

En el cuadro I se recogen las principales características farmacocinéticas de las hidantoinas.

CUADRO I.- Principales características farmacocinéticas de hidantoinas.

	Absorción	Máxima concentración en plasma	Vida media	Metabolitos	Excreción
Fenitoina	Difusión pasiva en duodeno	3-12 h. en administración oral	vía oral 22 h. (entre 7 y 42 h.)  vía IV entre 10 y 15 h.	5-fenil-5'- -(p-hidro- xifenil)hi- dantoina (HPPH)  5-(3,4-di- hidroxife- nil)-5'-fe- nil hidan- toina  5-(3-O-me- til-4-hidro- xifenil)-5'- fenil-hidan- toina	60-80%       15%  10%
Mefenitoina	"	2-4h. en administración oral	-	5-etil-5'- fenil-hi- dantoina	-
Etotoina	"	-	-	5-fenil-hi- dantoina  3-etil-5- (p-hidroxif- enil)-hi- dantoina  ácido fenil hidantoico	-

### II.1.7.- Toxicidad

De las hidantoinas utilizadas actualmente en clínica, la etotoina es la que presenta menor toxicidad. El síndrome tóxico ocasionado por la mayoría de las hidantoinas lo constituyen:

-Trastornos nerviosos: temblores, nistagmo, ataxia, diplopia, vértigo, cefalea, bradiquinesia, visión borrosa, confusión, apatía (33).

La mefenitoina causa menos trastornos nerviosos que la DFH, pero causa sedación. Se ha visto también, daño en las células de Purkinje en el cerebelo por altas dosis de DFH, pero solo si va acompañada de hipoxia.

-Trastornos digestivos: anorexia, constipación, vómitos, náuseas, gingivitis hiperplásica.

Acerca del mecanismo por el que se produce la gingivitis hiperplásica existen datos que sugieren es debida a alteraciones del metabolismo del colágeno, al ser insolubilizado en el tejido conectivo de las encías por la DFH excretada por la saliva (34).

-Trastornos endocrinos: se han presentado como consecuencia de la administración de DFH. Así, inhibe la liberación de hormona antidiurética (ADH).

Produce hiperglucemia y glucosuria, debido al parecer, a la secreción de insulina por los islotes de

Langherans.

De igual manera, se ha observado osteomalacia con hipocalcemia e incremento de los fosfatos alcalinos en suero, lo que se atribuye a una alteración en el metabolismo de la vitamina D e inhibición de la absorción intestinal de Ca (35), y se ha determinado cambios adrenocorticales relacionados con el metabolismo del cortisol (aumenta su metabolismo convirtiendolo en 6 hidroxí-cortisol (8)).

-Reacciones de hipersensibilidad: dermatitis, eritema, erupciones, hirsutismo, pigmentación, acné (36). Estas reacciones también son menos frecuentes con la administración de la mefenitoina.

-Trastornos hemáticos: anemia megaloblástica (debido a una interferencia en la absorción y metabolismo del ácido fólico), neutropenia, leucopenia, trombocitopenia, agranulocitosis y anemia aplástica. Alteraciones, en su mayoría, ocasionadas de forma preferente por la DFH.

Al interferir, algunas hidantoinas, con la vitamina K ocasionan una disminución de los factores de coagulación dependientes de esta vitamina (II, VII, X); así, han aparecido hemorragias neonatales como consecuencia de la terapia anticonvulsivante materna (37,38).

En el caso de la mefenitoina se han presentado anemias morbiliformes, que exigen la retirada del

fármaco. A veces se produce la muerte por anemia aplás-tica y otras causas.

-Trastornos hepáticos: Han sido descritos casos de hepatitis y necrosis hepáticas en el tratamien-to con mefenitoina(23).

-Trastornos inmunológicos: La DFH puede producir una linfadenopatía parecida al Hodgkin y lin-foma maligno asociado a la producción de inmunoglobu-lina A (39).

-Otros trastornos: Se ha comprobado que la administración de DFH produce fibrosis pulmonar (31).

Por otra parte, los comunes expuestos en la mayoría de las publicaciones han permitido descubrir el llamado "síndrome fetal hidantoinico", que, constituye un patrón tipo de anormalidades craneofaciales, defectos de los miembros, retraso de crecimiento y deficit mental, así como, trastornos de coagulación (40,41,42).

#### II.1.8.- Vías de administración y dosis

Se administran por vía oral, dándose la in-travenosa en el "status epiléptico".

Existe, además una difenilhidantoina sódi-ca para vía parenteral vehiculizada en un disolvente es-pecial, constituido por una mezcla de propilenglicol al 40%, alcohol etílico al 10% y agua para inyectables (43).

La dosis usual es 100mg tres veces al día en adultos. La infantil oscila en función del peso entre 7,5mg/kg/día en niños de 15 a 20kg y 10mg/kg/día en niños de 10 a 15 kg.

### II.1.9.- Aplicaciones terapéuticas

Epilepsia.- En el cuadro III se encuentran recogidas los principales tipos de la epilepsia.

Las hidantoinas están especialmente indicadas en :

-ataques tónico-clónico generalizados (gran mal). La más usada es la fenitoina, que puede abolir completamente estos ataques en un 60 a 65% de los pacientes y reducir su frecuencia y gravedad en un 20% de los mismos. La mefenitoina presenta a veces mayor actividad que la fenitoina en este tipo de alteraciones, pero esta ventaja está disminuida por su mayor toxicidad. La etotoina también efectiva, posee menor toxicidad y acción farmacológica.

-crisis focales jacksonianas (sensoriales y motoras).

-epilepsia psicomotora o del lóbulo temporal). Se utilizan la fenitoina y mefenitoina y de ellas la primera es fármaco de elección.

-"status epiléptico". Puede utilizarse la

DFH.

-No se utilizan en el pequeño mal, cuyos accesos pueden ser aún agravados.

Arritmia.- Se utilizan como antiarrítmico por vía intravenosa en las arritmias ventriculares, sobre todo en las producidas por intoxicación digitalíca.

CUADRO II.- Clasificación de las epilepsias (modificación de la clasificación internacional de ataques epilépticos).

---

TIPO DE ATAQUE

CARACTERISTICAS

---

I.- Ataques parciales  
(ataques focales)

A) Ataques parciales con sintomatología elemental (cortical focal)

Generalmente sin pérdida de conciencia. Incluye convulsiones de un grupo de músculos (epilepsia motora jacksoniana), perturbaciones sensoriales específicas y localizadas y otros signos y síntomas limitados al área cortical que produce la descarga anormal.

B) Ataques parciales con sintomatología compleja (lóbulo temporal, psicomotora)

Conducta confusa, generalmente con debilitación de la conciencia, con una gran variedad de manifestaciones clínicas asociadas con una actividad rara generalizada del EEG durante el ataque pero con evidencia de anormalidades focales del lóbulo temporal anterior incluso en periodos entre ataques en muchos casos.

C) Ataques parciales secundariamente generalizados

II.- Ataques generalizados  
(bilateral, simétricos)

A) Ausencias (pequeño mal)

Pérdida breve y brusca de conciencia asociadas con picos y ondas en el EEG de alto voltaje, bilateral sincrónica y 3 por sg, generalmente con actividad



CUADRO II (cont.)

TIPO DE ATAQUE

CARACTERISTICAS

A) Ausencias(cont.)	motora clónica simétrica que varía desde el párpado a sacudidas del cuerpo entero a veces con actividad no motora.
B) Mioclonos epilépticos bilateral masivo	Sacudidas clónicas aisladas asociadas con breves explosiones de picos en el EEG.
C) Espasmos infantiles	Desordenes progresivos en niños con espasmos motores u otros signos convulsivos, cambios difusos raros entre ataques en el EEG(hypsarritmia y deterioro progresivo mental.
D) Ataques clónicos	En jovenes, contracciones rítmicas clónicas de todos los músculos, pérdida de conciencia y marcadas manifestaciones autonómicas.
E) Ataques tónicos	En jovenes, pérdida de conciencia y marcadas manifestaciones autonómicas.
F) Ataques tónicos-clónicos(gran mal)	Convulsiones mayores, generalmente una secuencia de espasmos tónicos máximos de toda la musculatura del cuerpo seguidos por sacudidas clónicas sincrónicas y una prolongada depresión de todas las funciones nerviosas.
G) Ataques atónicos	Pérdida del tono postural, con cabeza baja o caída.
H) Ataques aquinéticos	Debilitación de la conciencia y relajación completa de toda la musculatura secundaria a una excesiva descarga inhibitoria.

### II.1.10.- Contraindicaciones

Se encuentran especialmente contraindicadas en pacientes con:

- afecciones hepáticas
- afecciones sanguíneas
- hipersensibilidad
- el "pequeño mal"

### II.1.11.- Interacciones farmacológicas

Este apartado es ampliamente discutido y continuamente renovado.

Existen fármacos capaces de elevar los niveles plasmáticos de las hidantoinas en el hombre, siendo en algunos casos debido a un efecto inhibitor de dichos principios sobre el metabolismo de éstas (algunos anticoagulantes, antibióticos, antituberculosos, estimulantes, tranquilizantes, anestésicos, ...) a nivel hepático y por tanto bloquean la hidroxilación microsomal del compuesto, impidiendo su destrucción y aumentando así sus niveles plasmáticos (25,45,46). En otros casos, se debe a la capacidad de ciertas sustancias de elevar la vida media de hidantoinas.

Por otra parte, existen fármacos que disminuyen los niveles de hidantoinas o su vida media.

El caso de interacción entre fenitoina y fenobarbital es variable, pues el fenobarbital puede aumentar la biotransformación de la fenitoina por inducción del sistema enzimático microsomal hepático, pero también puede disminuir su inactivación aparentemente por inhibición competitiva (47,48).

De igual manera existen descritas alteraciones en el nivel plasmático de otros fármacos por efecto de hidantoinas.

También encontramos interacciones de estos fármacos anticonvulsivantes con sustancias endógenas. Algunos autores (25) han descrito disminuciones significativas de los niveles séricos de tiroxina en sujetos sometidos a tratamiento prolongado con DFH.

Pueden inducir a modificaciones en la vida media de algunas hormonas a través de un mecanismo de acción enzimático, así, induce las oxidasas hepáticas que afectan la metabolización del estradiol y testosterona.

En el cuadro III exponemos un resumen de las principales interacciones atribuidas a la DFH, por ser el fármaco de mayor uso.

CUADRO III.- Principales interacciones atribuidas a la DFH.

Fármacos capaces de elevar los niveles plasmáticos de DFH en el hombre	Fármacos capaces de elevar la vida-media de la DFH en plasma	Fármacos capaces de disminuir los niveles plasmáticos de DFH o su vida-media	Alteración del nivel plasmático de otros fármacos por DFH
Bishidroximarínicos	Bishidroximarínicos	Carbamacepina (de efecto discutido)	Fenobarbital (incremento)
Feniramidol	Feniramidol		Digitoxina (decremento)
Disulfiram	Sultiamina	Etanol (de forma temporal)	Bishidroximarínicos (decremento)
Sultiamina	Cloramfenicol	Fenobarbital	Metirapona (decremento)
Cloramfenicol			DDT (decremento)
Metilfenidato			Carbamacepina (no se conoce aún la modificación que sufre)
Clordiacepóxido o diacepam			
Isoniacida			

## II.2.- REVISION DE TECNICAS DE VALORACION DE FARMACOS ANTICONVULSIVANTES

El riesgo que lleva implícito todo nuevo fármaco exige una serie de ensayos en animales de experimentación antes de su administración en humanos.

Los métodos de valoración de fármacos anticonvulsivantes podemos agruparlos en tres categorías:

- a) Inducción eléctrica.
- b) Inducción por agentes químicos.
- c) Inducción por lesiones epileptógenas crónicas.

### a) Inducción eléctrica

Albertoni (49) para el estudio de la acción de fármacos anticonvulsivantes utiliza la estimulación eléctrica de la corteza cerebral por medio de electrodos craneales.

Sehlf (50) emplea la estimulación por medio de electrodos corneales y mide el umbral de ataque para corriente alterna aplicado durante 0,5 sg.

Merrit y Putnam (51) aplican pulsos rectangulares de corriente continua de 10sg. de duración mediante electrodos bucales.

Kozelka y Hine (52) y más tarde Alles, Hellis, Felgen y Redemann (53,54) emplearon corriente alter-

na de intensidad fija. Para determinar el valor del umbral variaban la duración del shock en lugar de la intensidad de la corriente.

Bárány y Stein-Jensen (55,56) utilizan corriente alterna a través de electrodos colocados en el conducto auditivo externo. Estos investigadores observaron la acción de los fármacos tanto sobre las características del ataque como sobre el umbral del mismo.

Toman y col. (57) han considerado el efecto de ciertos agentes anticonvulsivantes sobre el tipo de ataque obtenido por shocks supramaximales, independientemente de su efecto sobre el umbral.

Swinyard y col. (58) introdujeron la técnica de disminución artificial del umbral de ataque por hidratación de animales experimentales para, de este modo, comprobar la acción protectora de los fármacos anticonvulsivantes.

Actualmente los métodos eléctricos más usados son:

-Test de ataque por electroshock máximo (M.E.S.), en él se mide la capacidad de los fármacos para modificar el patrón de máximo ataque inducido por corriente supramáxima (59).

-Test del umbral para electroshock normal (N.R.T.), consiste en determinar el efecto de fármacos sobre el umbral de ataques mínimos por electroshock en

animales normales (60).

-Test del umbral para electroshock por hidratación (H.E.T.), se valora el efecto de fármacos en el umbral para ataques mínimos por electroshock en animales en que la susceptibilidad ha sido aumentada por hidratación (59).

En todos estos métodos la corriente se aplica mediante electrodos que se fijan sobre el occipucio depilado, boca, sienes, conducto auditivo externo, globos oculares, etc. (61).

b) Inducción por agentes químicos

Albertoni (50) aplicó cretina a la corteza cerebral de animales experimentales produciendo ataques convulsivos por medio de este compuesto.

Baglioni y Magnini (62) introdujeron la aplicación tópica de estriknina.

Goldstein y Weinberg (63) y Frost (64) utilizaron el umbral de ataque producido por el cardiazol, para probar la acción anticonvulsivantes de fármacos en pacientes.

Watanabe y col. (65), utilizaron inyección cerebroventricular de la sal potásica de penicilina para producir convulsiones.

Actualmente el método más utilizado es el del cardiazol, dentro del cual existen dos modalidades: (66)

-Test de ataque máximo por cardiazol(MMS), en el que se determina la capacidad de los fármacos para abolir el ataque máximo producido por inyección intravenosa de dosis convulsivantes de cardiazol.

-Test del cardiazol administrado por vía subcutánea (METs.c.), en que se observa como modifica el principio el umbral de ataque cuando se administra el cardiazol por esta vía.

c) Inducción por lesiones epileptógenas

Speransky y col. (67) introdujeron el método de producir lesiones epileptógenas de tipo crónico en perros por congelación focal de la corteza cerebral.

Posteriormente, Keith y col. (68) y Kopeloff y col. (69,70) hacen uso de la implantación de alúmina y otras sustancias para la producción de lesiones focales en cerebro.

Actualmente, también se utiliza el método de implantación de alúmina para el estudio de fármacos anticonvulsivantes (71).



### III.- P A R T E E X P E R I M E N T A L

#### III.1.- MATERIAL

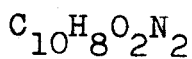
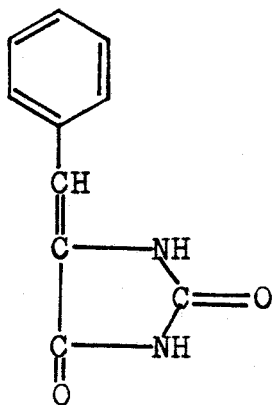
##### III.1.1.- Muestras

Los productos, objeto de nuestro estudio, han sido sintetizados y cedidos amablemente por el Dpto. de Análisis químico de la Facultad de Farmacia.

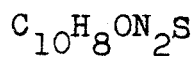
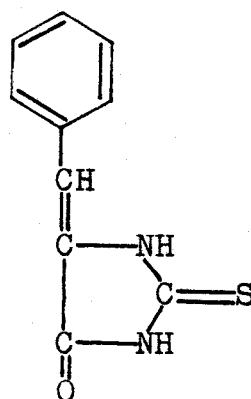
Estos productos son la 5-benzal-hidantoina (BAH) y la 5-benzal-tiohidantoina (BATH).

Constituyen compuestos derivados de la hidantoina y tiohidantoina, respectivamente y presentan un doble enlace en posición 5 conjugado con un anillo aromático.

Sus fórmulas estructurales y moleculares son:



(BAH)



(BATH)

Ambos productos son polvos microcristalinos de color amarillo, con P.F. de 225 °C y 245 °C para BAH y BATH, respectivamente.

Escasamente solubles en agua, poco solubles en alcohol, propilenglicol y aceites vegetales.

### III.1.2.- Reactivo animal y vía de administración

Al iniciar un ensayo farmacodinámico uno de los primeros problemas que se plantean, es la elección del adecuado animal de experimentación que nos va a condicionar en cierta manera, la vía de administración.

A la hora de plantearse un ensayo de toxicidad, el animal seleccionado la mayoría de las veces, es el ratón, debido a su sencillo manejo, capacidad reproductora y posibilidad económica.

La dificultad inherente al propio animal de utilizar como vía de administración, la oral implica que en estos ensayos se seleccione como vía, la intraperitoneal.

Dada la insolubilidad de las muestras en estudio en los disolventes citados anteriormente aptos, en la debida proporción, para ser administrados parenteralmente procedimos a la micronización de los productos

con objeto de facilitar su paso a través de las membranas corporales.

La micronización se llevó a cabo de forma manual, debido a la reducida cantidad de muestras con que contabamos, en un mortero de ágata, molturando el producto durante varias horas, y midiendo el tamaño de las partículas que permanecían en suspensión en cámara de recuento, mediante un microscopio provisto de un ocular micrométrico.

Los ensayos previos efectuados con las muestras micronizadas por este procedimiento, no ofrecieron resultados satisfactorios y como consecuencia optamos por seleccionar como animal de experimentación ratas hembras de raza Wistar. Utilizamos en este caso la vía oral, administrando la suspensión acuosa mediante sonda esofágica.

### III.2.- ENSAYOS DE TOXICIDAD

Para que una sustancia que posee efectos farmacológicos pueda ser utilizada como medicamento, es necesario que la actividad aparezca a dosis para las cuales la toxicidad es despreciable.

En este estudio de nuevas sustancias con posible efecto farmacológico hemos determinado la toxicidad aguda.

Esta determinación nos permite apreciar:

- Síntomas de intoxicación.
- DL 50.

Para los ensayos de toxicidad hemos utilizado en cada dosis un lote de 6 animales (ratas Wistar) de un peso medio de 200-250 g, de unos dos meses de edad y procedentes de la misma camada.

### III.2.1.- Determinación de la toxicidad de la 5-benzal-hidantoína

#### III.2.1.1.- Síntomas de intoxicación

Los animales estuvieron sometidos a observación durante un periodo de seis días y las dosis ensayadas oscilaron entre 100 mg/kg y 2000 mg/kg, no apareciendo en ningún momento síntomas apreciables de intoxicación.

Por ello, hemos seleccionado para experiencias posteriores la última dosis (2000 mg/kg). Dosis mayor a la equivalente humana de las hidantoínas que se encuentra en el mercado.

III.2.2.- Determinación de la toxicidad de la 5-benzal-tiohidantoina

III.2.2.1.- Síntomas de intoxicación

Se observaron los animales durante un periodo de 6 días después de la administración.

Entre los síntomas tóxicos más ostensibles podemos citar: temblores, ataxia y movimiento circular no coordinado, rigidez en las patas y en la cola y algunas presentaban somnolencia, observándose a dosis elevadas fuertes convulsiones clónicas y tónicas.

La intensidad de estos síntomas está en función de la dosis administrada.

Los ensayos llevados a cabo con un intervalo de dosis que abarca desde 1400 mg/kg hasta 100mg/kg dosis ésta en la que no aparecen los síntomas tóxicos anteriormente mencionados.

III.2.2.2.- Dosis letal 50 (DL,50)

Corresponde a la dosis capaz de causar la muerte, en condiciones determinadas, del 50% de los animales de la misma especie animal utilizados en la experiencia (72).

Esta determinación se funda en la evaluación de respuesta de todo o nada: muerte o supervivencia de los animales.

Como sería simple coincidencia obtener inmediatamente 50 % de muertes a partir de un solo lote, el método consiste en experimentar sobre varios lotes distintas dosis de la sustancia a ensayar de manera que el porcentaje de mortalidad varía entre 0 y 100 %.

Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla I. En la curva de Trévan (fig. 1), se representan los valores de las dosis desde DL 0 o dosis máxima tolerada, dosis soportada por todos los animales hasta la dosis letal 100, dosis mínima que origina la muerte de todos los animales.

La representación gráfica de los datos obtenidos la hemos realizado calculando los probit de los porcentajes de mortalidad.

El probit se obtiene sumando 5 a la desviación tipificada para cada valor. La desviación tipificada viene dada por la fórmula:

$$\frac{Y_i - \mu}{\sigma} \quad (73)$$

donde  $Y_i$  es cada uno de los valores  
 $\mu$  es la media de los valores  
 $\sigma$  es la desviación típica

Los valores de los probit en nuestro caso se encuentran en la tabla I, de Fisher y Yates (74).

TABLA I

Resultados obtenidos de la administración de BATH a diferentes dosis

dosis(mg/kg)	log.dosis	N	V	M	% mortalidad	probit
800	2,9	6	0	6	100	+ $\infty$
600	2,77	6	1	5	83	5,95
500	2,69	6	3	3	50	5
400	2,6	6	4	2	33	4,56
200	2,3	6	6	0	0	- $\infty$

N: nº de animales del lote

V: animales vivos

M: animales muertos

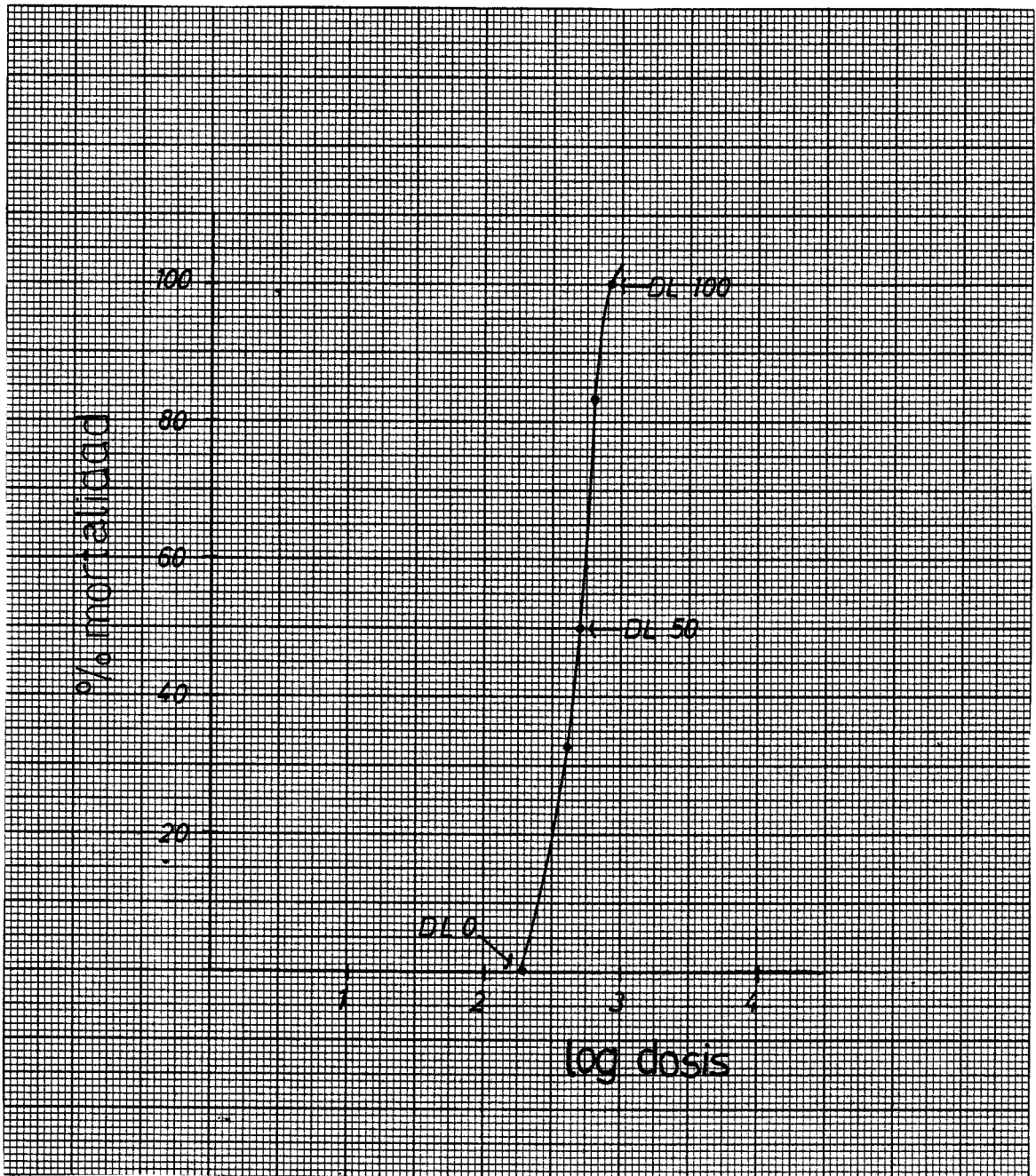


Fig. 1



Para el cálculo de la DL 50 hemos seguido el método de Miller y Tainter (72).

Para utilizar los porcentajes 0 y 100 % cuyos probit tienden hacia el infinito, se reemplazan éstos por los valores  $\frac{0,5}{n} \cdot 100$  y  $n - \frac{0,5}{n} \cdot 100$ ,

siendo "n" el número de animales utilizados en cada uno de los lotes.

La fig. 2 representa el cálculo de la DL 50.

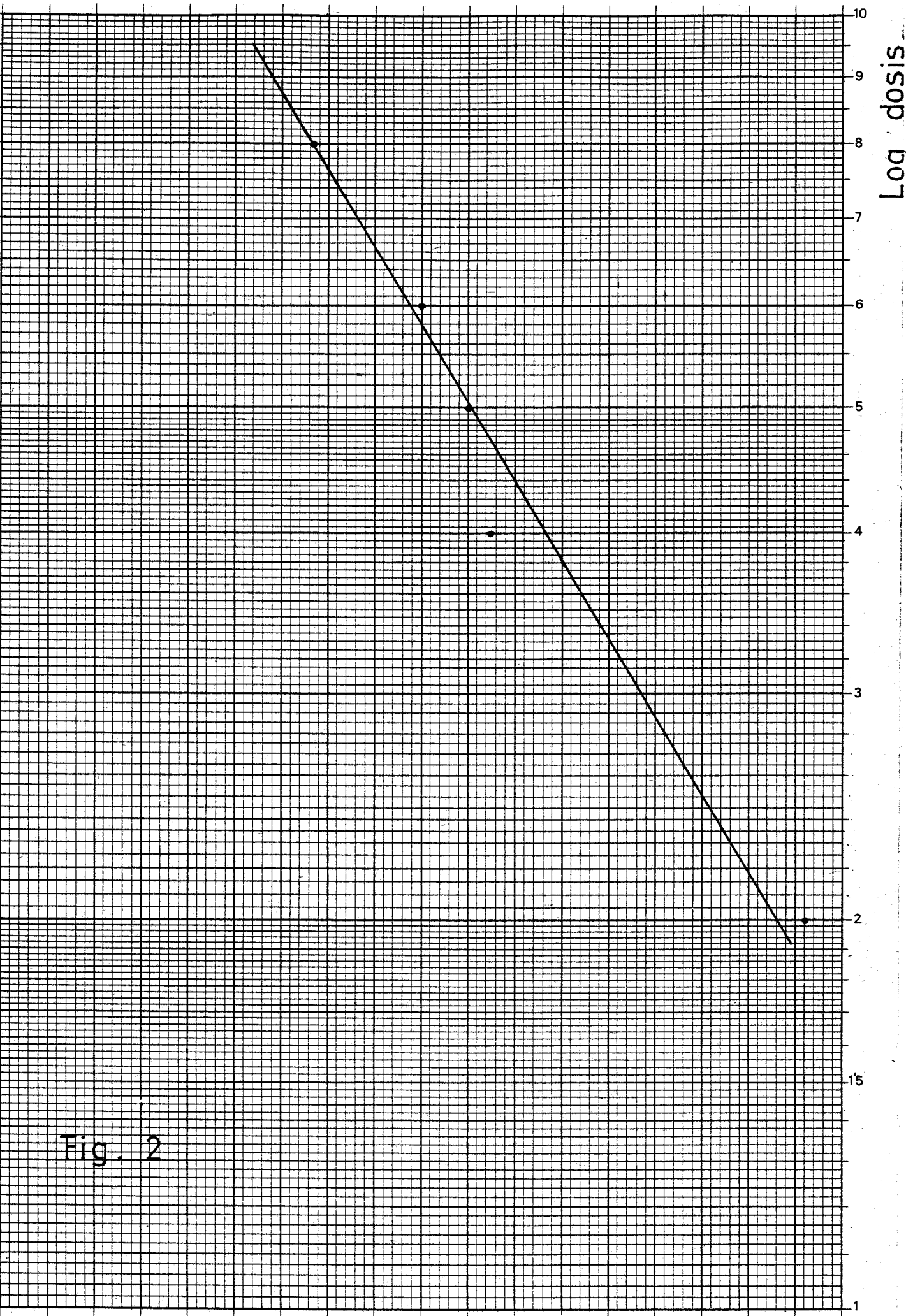


Fig. 2

### III.2.3.- Discusión de resultados

Al efectuar los ensayos de toxicidad hemos podido comprobar que existe una grandisparidad en los resultados obtenidos de moléculas que solo se diferencian en un heteroátomo.

Así, al administrar BATH aparecen síntomas de intoxicación, aunque las dosis que pudiéramos llamar "tóxicas" superiores a los 200 mg/kg/animal superan en mucho las dosis usuales terapéuticas de otras hidantoinas del mercado.

Por ello hemos seleccionado la dosis de 100 mg/kg que es la dosis máxima tolerada, y en la que no aparecen síntomas de toxicidad.

La BAH se muestra aún más inocua ya que hemos administrado 2000 mg/kg/animal, es decir, 10 veces más que de BATH, sin que aparezcan síntomas tóxicos aparentes.

### III.3.- METABOLISMO

#### III.3.1.- Determinación de la BAH en la orina de rata

Para la determinación del contenido de BAH en la orina del animal de experimentación, se recogen las muestras procedentes de ratas mantenidas en jaulas de metabolismo individuales a las cuales se les ha administrado el producto en estudio.

La orina se recoge a intervalo de 24 horas durante 6 días, con objeto de averiguar la posible eliminación, a través del fluido biológico, de concentraciones indeterminadas de compuesto no metabolizado y de poder establecer un balance:

$$\text{BAH}_{\text{administrado}} = \text{BAH}_{\text{orina}} + \text{BAH}_{\text{heces}} + \text{BAH}_{\text{metabolizado}}$$

El esquema de trabajo fue el siguiente:

- a) Determinación espectrofotométrica u.v. del compuesto.
- b) Estudio del espectro u.v. de la orina de rata sin tratar.
- c) Determinación de BAH en la orina de rata tratada con dicho producto.

#### a) Determinación espectrofotométrica del compuesto

Se ha registrado el espectro u.v. del

compuesto en disolución acuosa utilizando una concentración del mismo  $4 \cdot 10^{-5}$  M.

Los resultados obtenidos se encuentran en la fig. 3, en donde se observa un máximo bien definido a 320 nm ( $\epsilon = 2,0 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) y una banda de menor absorptividad a 225 nm ( $\epsilon = 4,5 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

El espectro se ha realizado en un espectrofotómetro UNICAM SP 8000 de registro automático con cubetas de cuarzo de 1,0 cm de paso de luz.

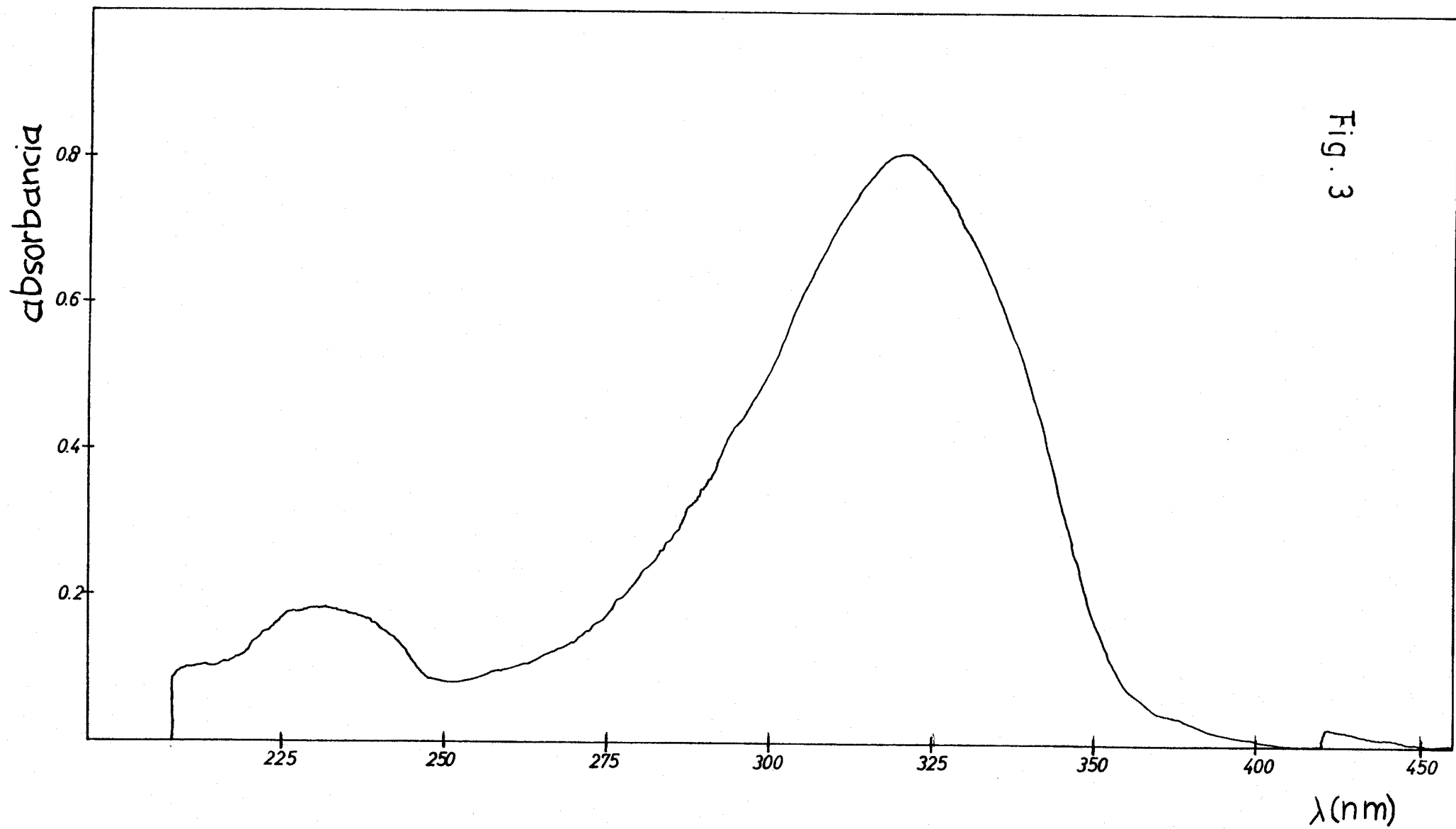
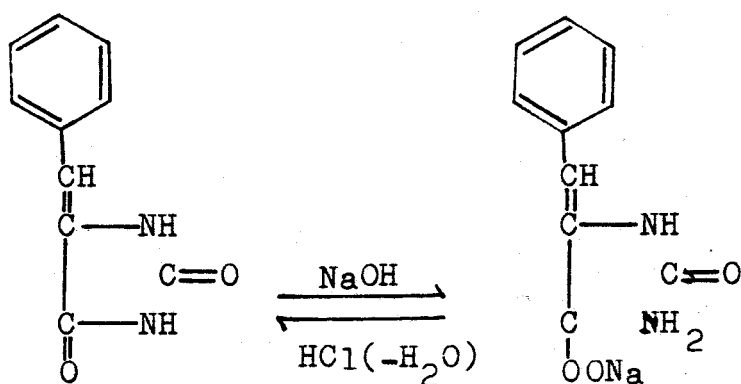


Fig. 3

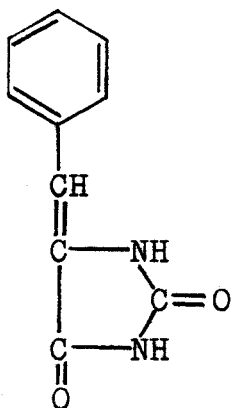
Se ha completado este estudio, con la determinación de los espectros del compuesto a diferentes pH, con el fin de comprobar la variabilidad de su absorción al pH de la orina.

Previamente, se ha estudiado la estabilidad del compuesto en disolución acuosa ( $4.10^{-5}$  M) a pH variables, comprobándose que son estables y que sus espectros no experimentan cambio alguno durante cierto tiempo (un mes) para pH ácido y neutro. No obstante, su comportamiento cambia a pH alcalino (pH superior a 12) ya que los espectros sufren una disminución en el valor de la absorbancia que puede relacionarse de acuerdo con la bibliografía (75), con una variación en la estructura del compuesto formándose el ácido hidantoico correspondiente:

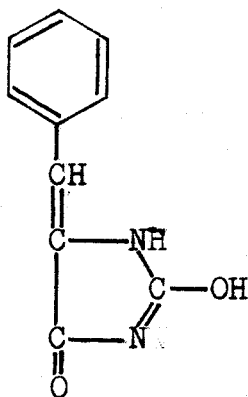


También se han estudiado los espectros ultravioleta a diferentes pH. Los equilibrios ácido-base que experimenta el compuesto en disolución acuosa da lugar a que varíe el sistema de dobles enlaces conjuga-

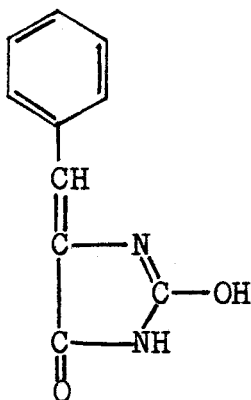
dos de la molécula y correlativamente la energía de resonancia de la misma. Según la bibliografía (75), la molécula de hidantoina puede existir en varias formas tautómeras en cuya formulación participa un doble tautomerismo amido-imidol, originándose las especies siguientes:



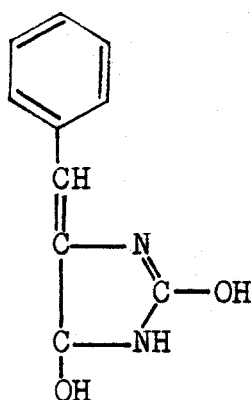
I



II



III



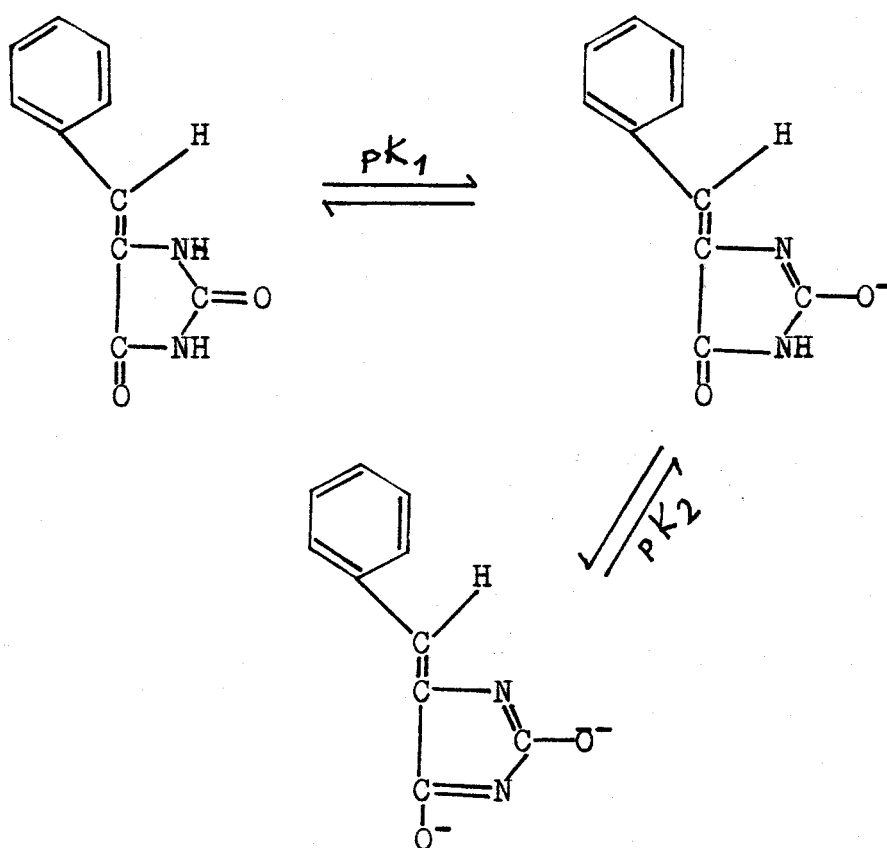
IV

No hay certeza sobre cuál de estas formas tautómeras existe principalmente en disolución. Sin embargo, parece probable que el compuesto se encuentre



en la forma III. Esta hipótesis se apoya en las investigaciones realizadas por Komatsu (76) en relación con la desulfuración de la 2-tiohidantoina, la cual tiene lugar a partir de la forma III.

De acuerdo con su estructura la 5-benzalhidantoina presentará dos equilibrios ácido-base en disolución: desprotonación de los dos grupos imidol que quedan esquematizados en el diagrama siguiente:



En la figura 4 pueden observarse los espectros a diferentes pH del compuesto, utilizando una concentración del mismo,  $4 \cdot 10^{-5}$  M y manteniendo la fuerza iónica constante ( $\mu = 0,1$ ) con ClK.



Como puede verse, el espectro de la especie individual neutra es el mismo en el intervalo de pH 1,0-8,5 por lo que los estudios posteriores de la ley de Beer y reproductividad del método se harán a pH 7,8 (fijado con tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  de ese valor de pH) y las medidas de absorbancia se efectuarán a 320 nm a la que el espectro del compuesto neutro tiene su máximo de absorción.

Las medidas de pH se han hecho en un medidor de pH RADIOMETER P-28, con electrodos de vidrio calomelanos.

Para comprobar si el compuesto sigue la ley de Beer, se preparan una serie de muestras utilizando el siguiente procedimiento:

Técnica A: En matraces de 25 ml se ponen diferentes concentraciones de BAH, 5ml de tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , 5 ml de KCl 0,5M ( $\mu=0,1$ ) enrasando finalmente con agua destilada y midiendo la absorbancia a 320 nm frente a agua.

A partir de estas muestras se observa que la ley de Beer se cumple, fig. 5, entre  $2,5 \cdot 10^{-6}$  y  $5 \cdot 10^{-5}$  M de BAH.

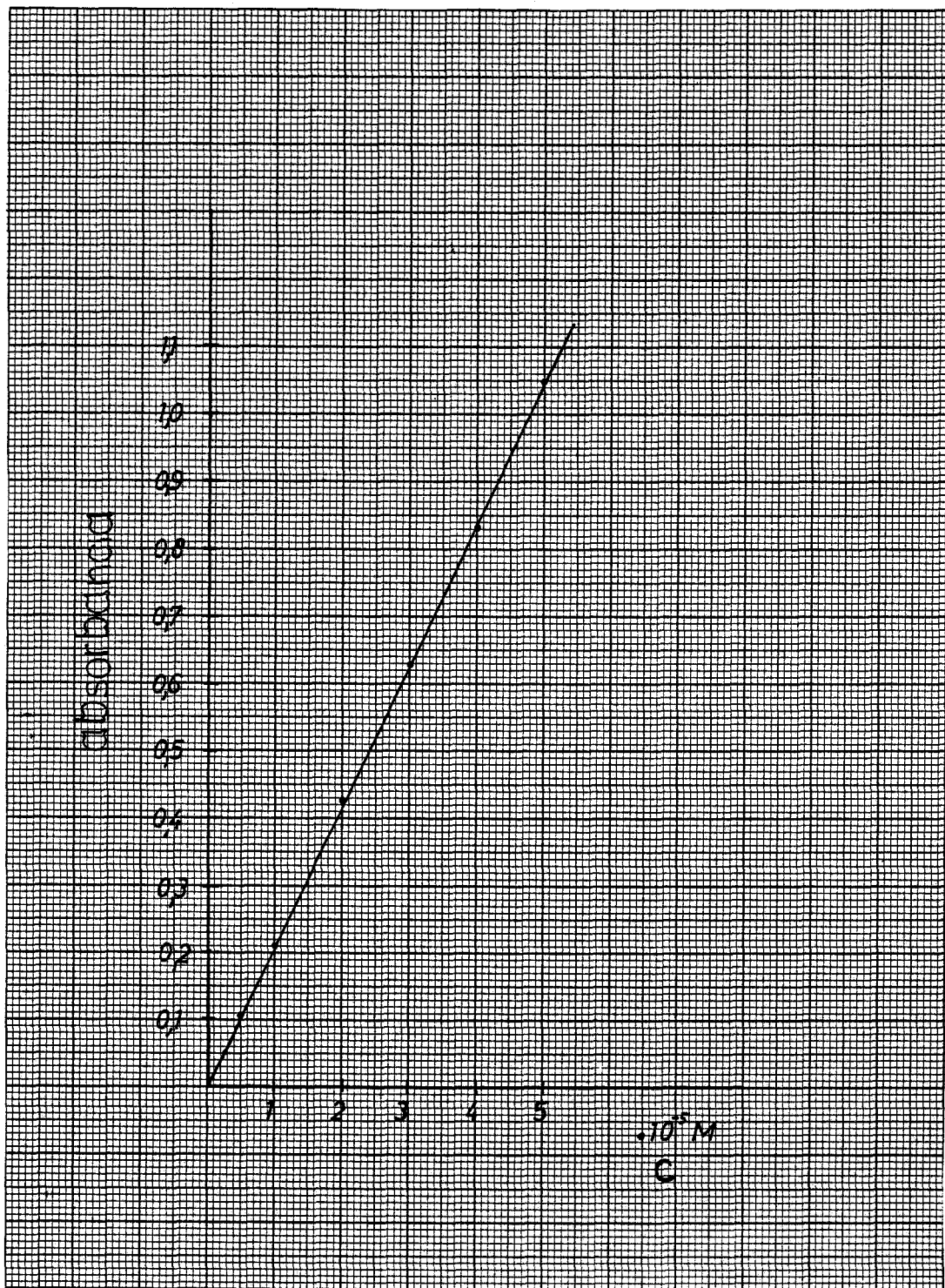


Fig. 5

Para calcular el intervalo de concentración en el cual el error es mínimo (seguridad y precisión del método), seguiremos las indicaciones de Ringbom (77), representando la variación del tanto por ciento de transmisión frente al logaritmo de la concentración del compuesto, fig.6. Por el gráfico de Ringbom podemos comprobar que la zona de mínimo error está comprendida entre  $1 \cdot 10^{-5}$  y  $4 \cdot 10^{-5}$  M a la longitud de onda ( $\lambda$ ) utilizada, que corresponde al tramo recto de la línea representada.

Para estudiar la reproductividad del método se han preparado 11 muestras siguiendo la técnica descrita previamente, con una concentración  $1,6 \cdot 10^{-5}$  M del compuesto, concentración comprendida en la zona de mínimo error.

Según lo descrito por W.J.Youden (78), representando por  $x$  los valores de las absorbancias a 320 nm de cada muestra, por  $(x-\bar{x})^2$  a los cuadrados de estas diferencias, se obtiene la tabla II.

Los valores de las absorbancias se han medido en un espectrofotómetro UNICAM SP 600 con cubetas de cuarzo de 0,1 cm de paso de luz.

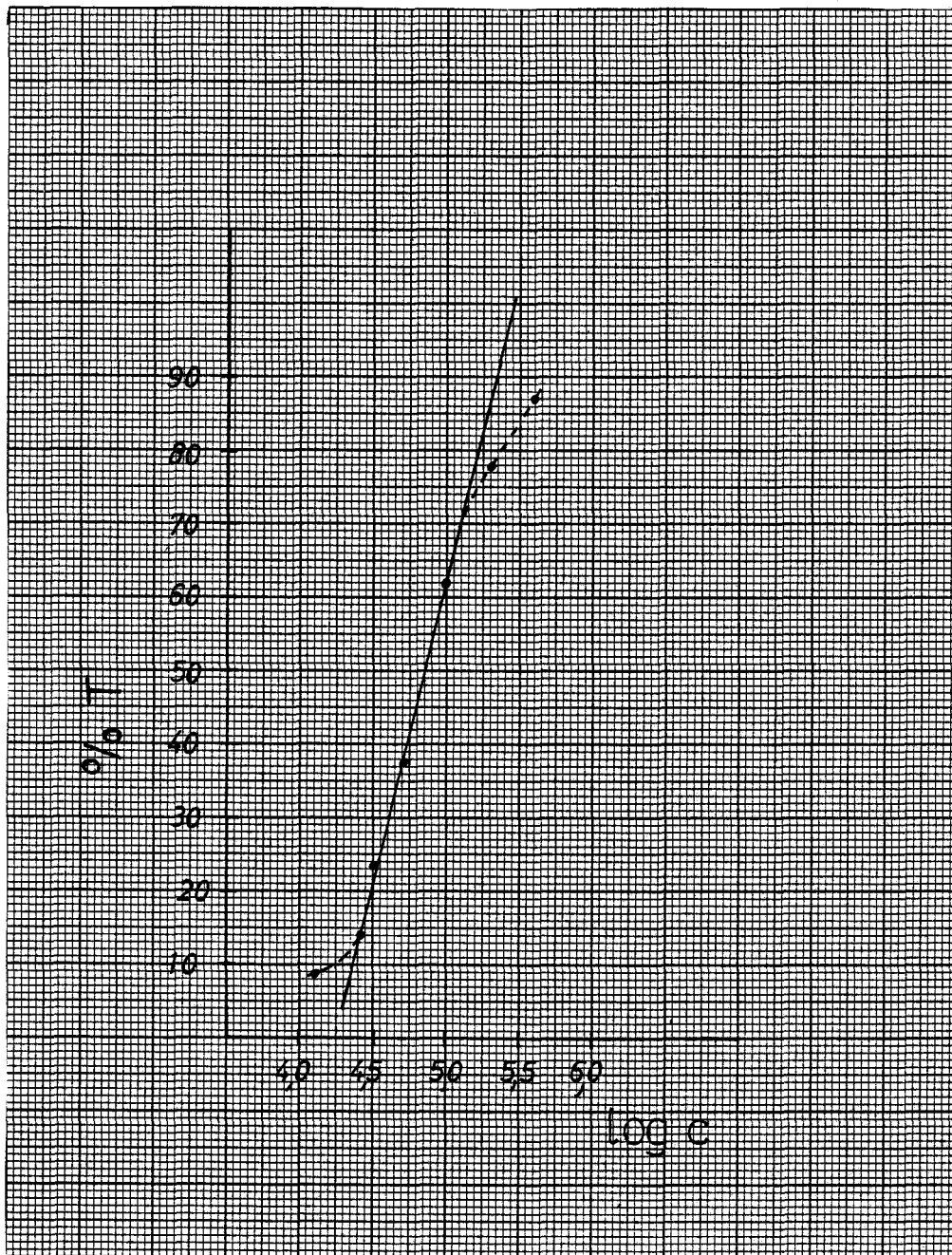


Fig. 6

TABLA II

Reproductividad del método

$x \cdot 10^3$	$(x - \bar{x}) \cdot 10^3$	$(x - \bar{x})^2 \cdot 10^6$
335	+3	9
332	0	0
330	-2	4
335	+3	9
330	-2	4
333	+1	1
334	+2	4
330	-2	4
334	+2	4
333	+1	1
333	+1	1

$\bar{x} = 0,332$

De los valores de la tabla II se deduce:

$$\bar{x} = 0,332 \quad \sum (x - \bar{x})^2 = 41 \cdot 10^{-6}$$

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$s = \pm 2,02 \cdot 10^{-3}$$

$$s_m = \pm \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$s_m = \pm 0,61 \cdot 10^{-3}$$

El tanto por ciento de error de la media:

$$\% \text{ error} = \pm \frac{100 \cdot t \cdot s_m}{\bar{x}}$$

donde t tiene el valor 2,23 para unos límites de confianza del 95 % y con diez grados de libertad; el porcentaje de error será:

$$\% \text{ error} = 0,4$$

b) Estudio del espectro u.v. de la orina de rata sin tratar

Se puede considerar desde un punto de vista espectrofotométrico típico, que el compuesto a determinar en la orina es la benzalhidantoína y que todas las sustancias que absorban a la longitud de onda de su



máximo 320 nm, aunque sean productos normales del metabolismo de la rata, actúan como interferencia del método propuesto. Por ello es importante:

- registrar el espectro, a una dilución adecuada, de las muestras de orina excretadas por una serie de ratas no tratadas con el producto.

- comprobar la absorción experimentada por estas muestras con objeto de determinar si interfieren o no a la  $\lambda$  propuesta.

- si existe interferencia, comprobar si ésta posee una reproductividad admisible que hiciera posible la aplicación del método.

Respecto al primer punto, en la fig. 7 se ha registrado el espectro de una orina de rata no tratada, diluida 166 veces (A) comparandolo con el de otra rata (B) tratada con el producto (2 g/kg de BAH, orina recogida a las 72 horas de la administración) a la misma dilución.

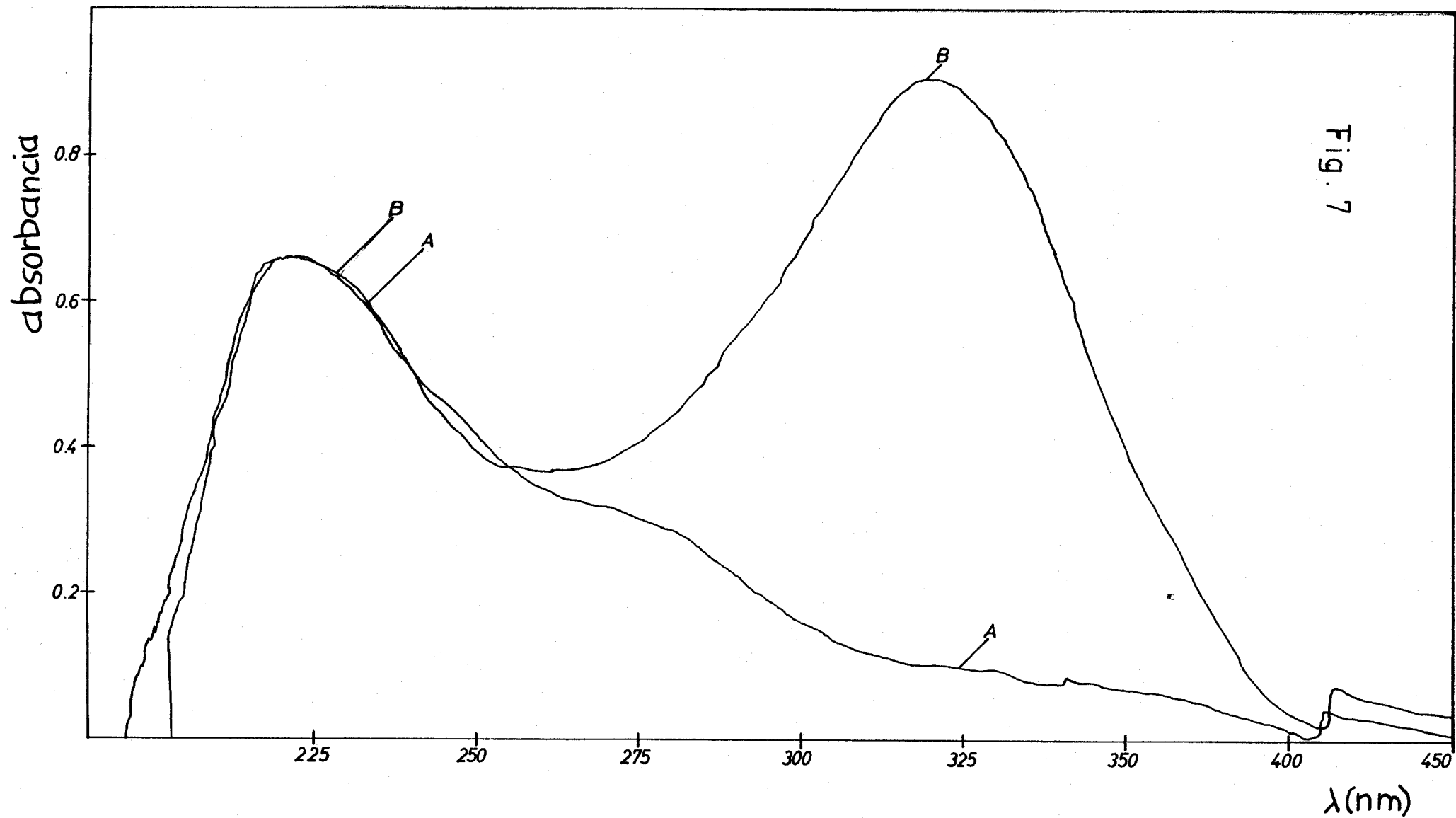


Fig. 7

Por la pequeña absorción que la orina no tratada exhibe a 320 nm parece posible determinar la concentración de BAH con la ley de Beer, midiendo a esta  $\lambda$ , siempre que se compruebe que la absorción a 320 nm de una orina no tratada es pequeña y presenta un valor medio.

Para ésto se estudia la interferencia de los metabolitos normales de la orina, puesto que, los compuestos que acompañan a la BAH no metabolizada en la orina, que absorban a 320 nm, actuarán como interferencias del método.

Se han hecho las medidas de absorbancia en 11 muestras de orina no tratada a la  $\lambda$  y pH del método propuesto y se confirma que el valor medio de absorbancia es 0,060 y la  $\delta$  de la media  $3,8 \cdot 10^{-3}$ .

c) Determinación de BAH en la orina de rata tratada con el producto

Se ha seguido la eliminación de la BAH en lotes de 6 ratas, a cada una de las cuales se les había administrado una dosis de 2 g/kg del compuesto. Las orinas se recogen durante 6 días en periodos de 24 horas.

Preparando las muestras según las condiciones establecidas en la técnica A (pag.51), se harán las medidas de absorbancia de las orinas tratadas a

320 nm y pH 7,8, sometiendo dichas orinas a una dilución de 166 veces y restandole a los valores de absorbancia obtenidos para todas ellas, 0.060, que corresponde a la corrección del blanco necesaria si se tiene en cuenta la absorción de la orina misma.

Los resultados obtenidos, en cuya expresión se ha tenido en cuenta los volúmenes de orina excretados por las ratas, se recogen en la tabla III.

TABLA III

Eliminación de BAH en orina

Rata nº	Peso(g)	Cantidad de BAH eliminada en la orina (mg)					
		24h.	48h.	72h.	96h.	5ºdía	6ºdía
1	238	36,0	37,86	32,25	14,0	0,53	1,76
2	244	29,41	68,13	42,0	3,27	3,41	2,98
3	224	41,72	131,8	89,7	10,4	0	0
4	238	25,7	53,97	101,6	71,0	35,0	11,5
5	253	35,17	62,0	2,6	4,23	10,3	4,47
6	255	40,6	88,2	106,6	4,0	0,3	3,0

III.3.2.- Determinación de la BAH en heces  
rata

Como expusimos anteriormente, la diferencia del contenido de BAH en orina y heces respecto al administrado, nos daría la cantidad de compuesto metabolizado por las ratas. Para determinar el contenido del compuesto en heces es necesario un tratamiento previo de las muestras según el siguiente

Procedimiento: En un matraz de reflujo de 250 ml se coloca la muestra de heces, previamente triturada en mortero de vidrio, y se le añade 50 ml de etanol, sometiendo a reflujo durante 15 minutos. A continuación se filtra la mezcla y los líquidos de filtrado más los de lavado se llevan a un matraz aforado de 100 ml, enrasando finalmente con etanol.

A partir de esta disolución etanólica se toman alicuotas de 0,15 ml a las cuales se le aplican las condiciones de la técnica A (pag.51), del mismo modo que se hizo con las orinas.

Siguiendo, por tanto, un camino paralelo con las muestras de orina, se ha estudiado primero el espectro u.v. del extracto etanólico obtenido a partir de heces de ratas no tratadas recogidas durante 24 horas,

63

para compararlas con las de ratas que se han sometido a la acción del compuesto. La fig. 8 recoge el espectro correspondiente, comprobando que es perfectamente viable la determinación de BAH en los extractos de heces, haciendo la correspondiente corrección de absorbancia a 320 nm, que en este caso es 0,010.

El estudio se ha hecho en las muestras recogidas en periodos de 24 horas durante 4 días, pues el 5º y 6º días, las cantidades encontradas de BAH en las heces han sido despreciables.

Los resultados obtenidos se han recopilado en la tabla IV.

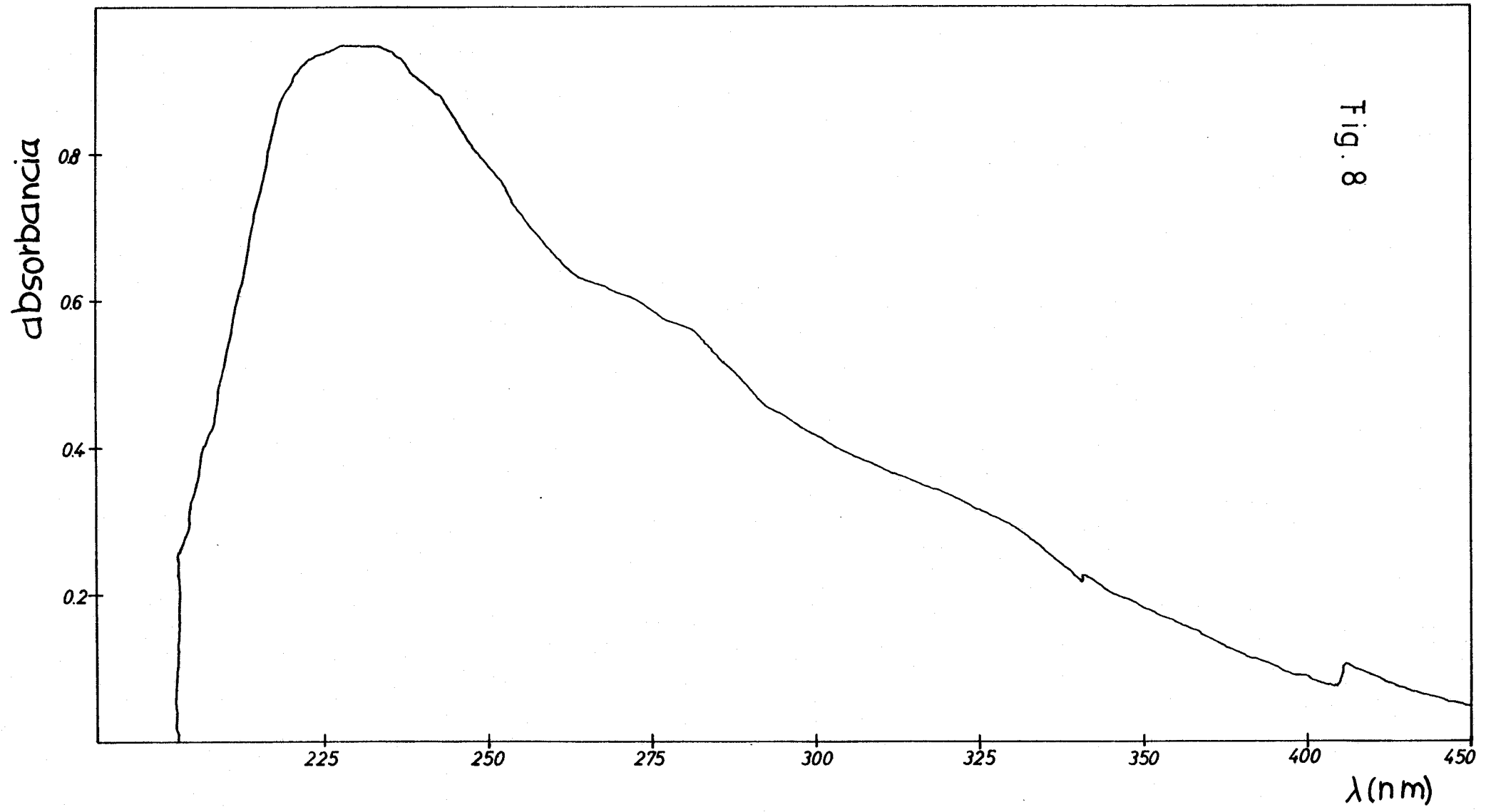


Fig. 8



TABLA IV

Eliminación de BAH en heces

Rata nº	Peso(g)	Cantidad de BAH eliminada en heces (mg)			
		24h.	48h.	72h.	96h.
1	238	65,19	68,29	13,97	3,1
2	244	71,4	17,0	17,0	3,1
3	224	1,55	0	86,91	4,65
4	238	41,9	31,0	10,86	4,65
5	253	266,47	45,0	3,1	4,65
6	255	65,19	38,8	13,96	3,1

TABLA V

## Eliminación total de BAH

Rata nº	Peso (g)	BAH admi- nistrado (mg)	BAH en orina (mg)	BAH en heces (mg)	BAH total eliminado (mg)	% BAH en orina	% BAH en heces	%BAH total elim.
1	238	476	122,4	150,55	272,95	25,7	31,6	57,3
2	244	488	149,2	108,5	257,7	30,5	22,2	52,7
3	224	448	273,62	93,11	366,73	61,0	20,8	81,8
4	238	476	298,77	88,41	387,18	62,7	18,6	81,3
5	253	506	118,76	319,22	437,98	23,4	63,0	86,4
6	255	510	242,7	121,05	363,75	47,6	23,7	71,3

III.3.3.- Discusión de resultados

Al administrar la BAH en dosis de 2 g/kg/  
/animal,hemos podido observar que la eliminación máxima  
en orina del producto, sin metabolizar, tiene lugar entre  
las 24 y 72 horas tras la administración. El porcentaje  
excretado está comprendido entre 23 y 60 %.

La excreción por heces tiene lugar de  
forma mayoritaria a las 24 horas de la administración  
disminuyendo de manera apreciable a partir de las 96  
horas.

Los valores obtenidos oscilan alrededor  
del 25 %, sensiblemente más bajos que los detectados en  
orina.

El producto se elimina como tal en pro-  
porción superior al 50 %, lo cual nos orienta hacia la  
existencia de metabolitos o bien de otras vías de ex-  
creción secundarias.

III.3.4.- Determinación de la BATH en la  
orina de rata

Para la determinación del contenido de  
BATH en la orina de rata, se sigue el mismo procedimien-  
to que para el producto anterior, es decir, se recogen  
las orinas a partir de ratas a las que se administró

BATH, colocadas en jaulas de metabolismo con comida y agua. Las muestras de orina se recogen también a intervalos de 24 horas durante 6 días.

Se sigue un estudio paralelo al anterior.

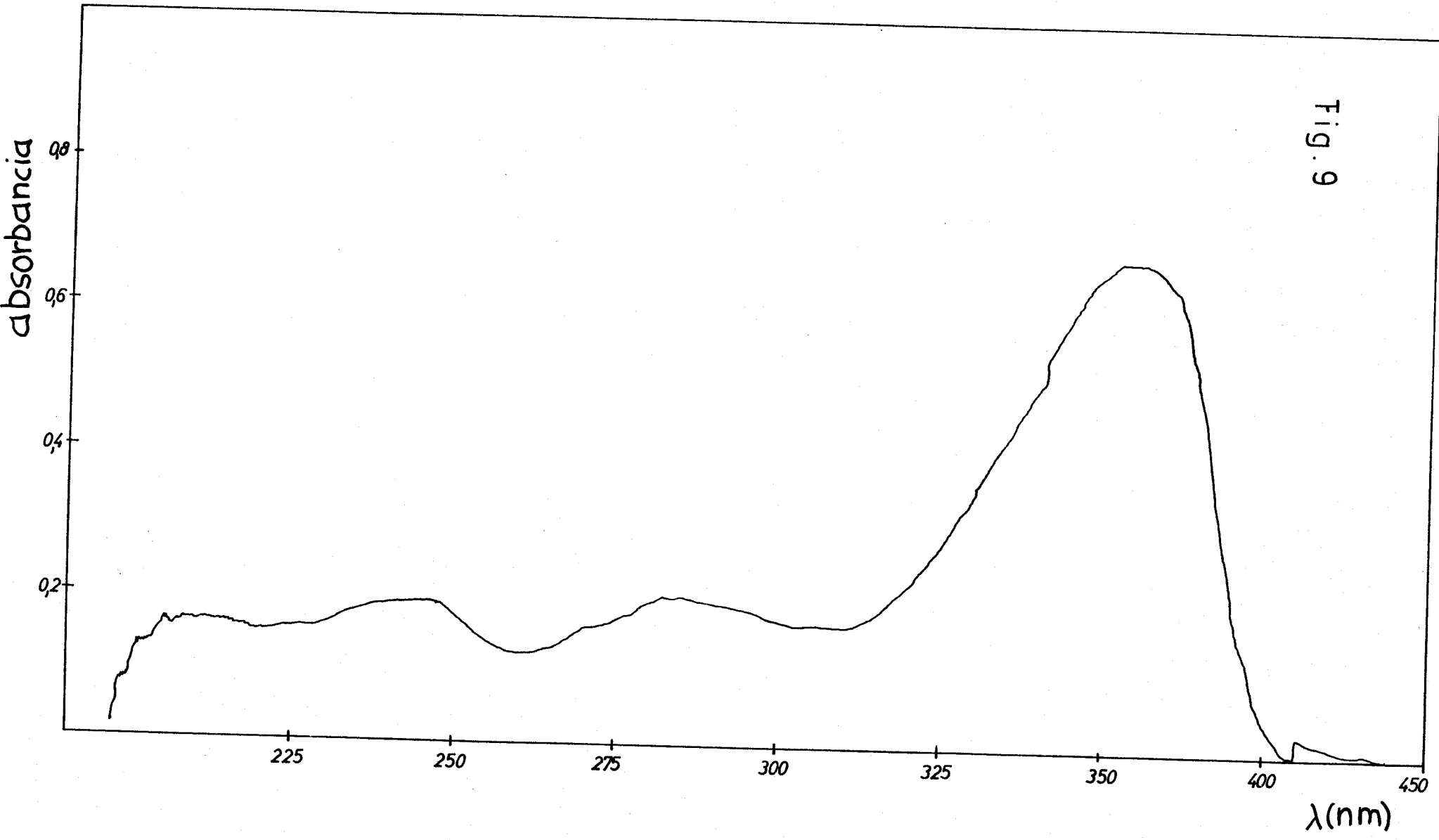
a) Determinación espectrofotométrica u.v. del compuesto

La fig. 9 muestra el espectro u.v. del compuesto en disolución acuosa, utilizando una concentración del mismo  $2 \cdot 10^{-5}$  M. Se observan dos bandas, una con un máximo a 360 nm ( $\epsilon = 3,22 \cdot 10^4 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) y una banda de menor absorptividad molar a 288 nm ( $\epsilon = 7,7 \cdot 10^3 \text{ l.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

La estabilidad del compuesto en disolución acuosa ( $2 \cdot 10^{-5}$  M) a diferentes pH, muestran al igual que BAH, que son estables y que sus espectros no experimentan cambio alguno durante igual tiempo (un mes) para pH ácido y neutro. Sin embargo, se comportan de forma diferente a pH alcalino (pH superior a 12), ya que en el espectro disminuye la absorbancia, relacionado con una variación en la estructura del producto formándose en este caso el ácido tihidantoico.

En la fig. 10, se encuentran los espectros a diferentes pH del compuesto, a una concentración  $2 \cdot 10^{-5}$  M y manteniendo la fuerza iónica constante ( $\mu = 0,1$ ) con ClK.

Fig. 9



absorbancia

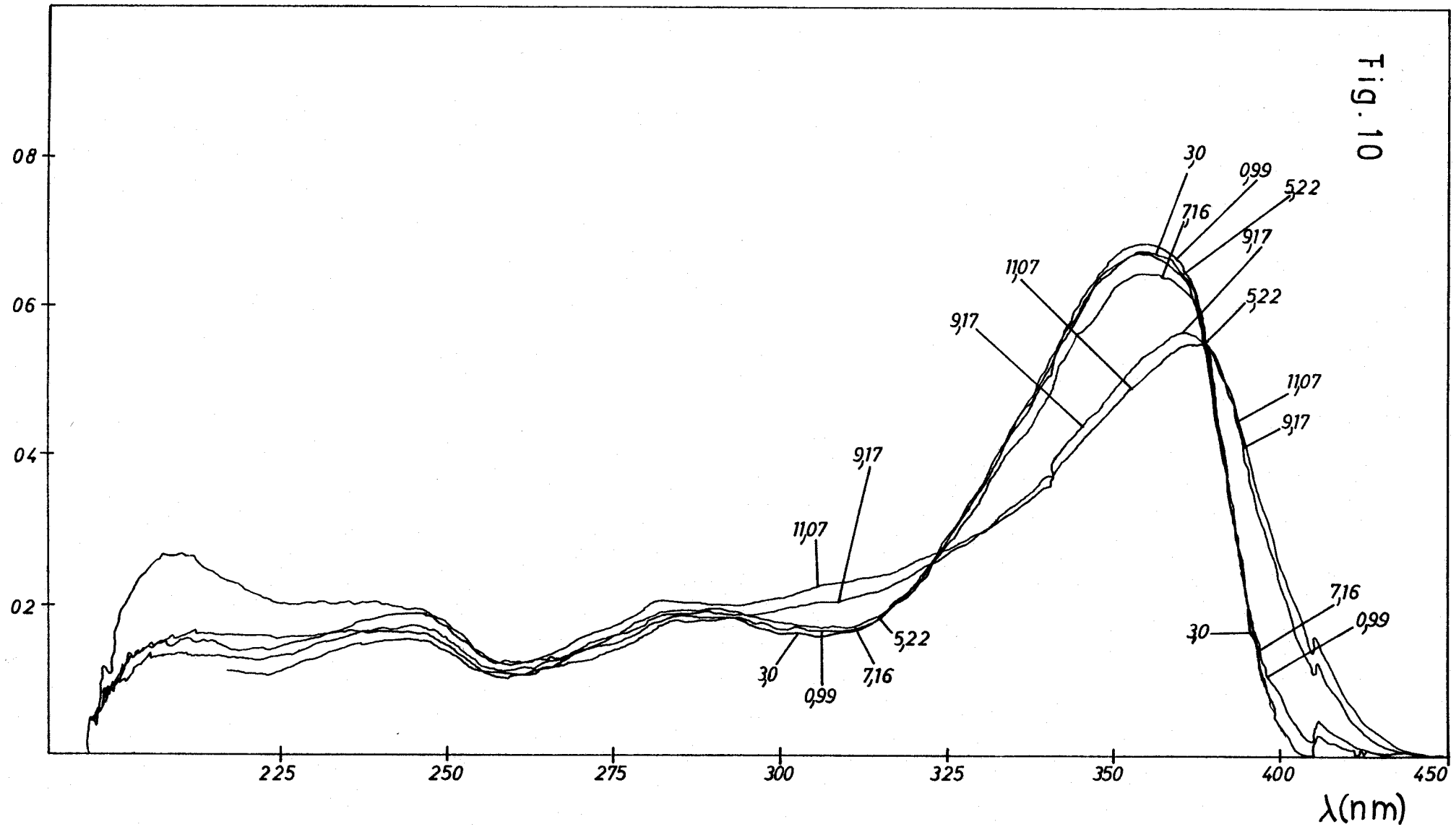


Fig. 10

Los estudios de la ley de Beer y reproductividad del método se harán a pH 7,8 (fijado con tampon  $\text{PO}_4\text{H}_2^-/\text{PO}_4\text{H}^-$  de ese valor de pH), ya que como puede verse en la fig. 10, el espectro de la especie individual neutra es el mismo en el intervalo de pH 1,0-8,5. Las medidas de absorbancias se hacen a 360 nm a la que el compuesto presenta su máximo de absorción.

Para el estudio de la ley de Beer, se preparan una serie de muestras siguiendo la técnica A (pag. 51) descrita para la BAH y midiendo las absorbancias a 360 nm. frente a agua. Se observa que la ley de Beer se cumple, fig. 11, entre  $2,5 \cdot 10^{-6}$  y  $3 \cdot 10^{-5}$  M de BATH.

El gráfico de Ringbom, fig. 12, nos da el intervalo de concentración en el cual el error es mínimo (seguridad y precisión del método). Esta zona de mínimo error está entre  $5 \cdot 10^{-6}$  y  $2 \cdot 10^{-5}$  M a la  $\lambda$  utilizada.

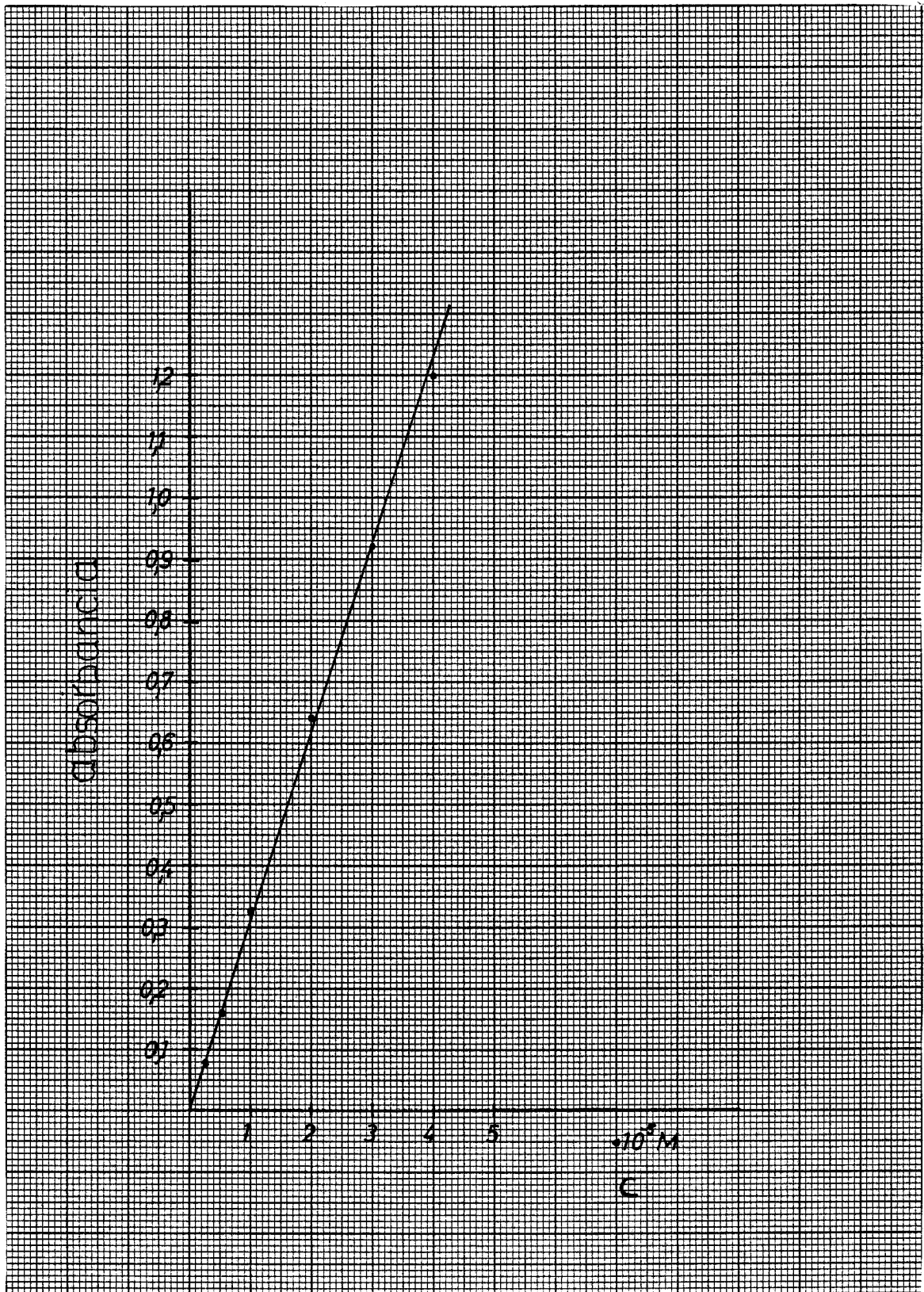


Fig. 11



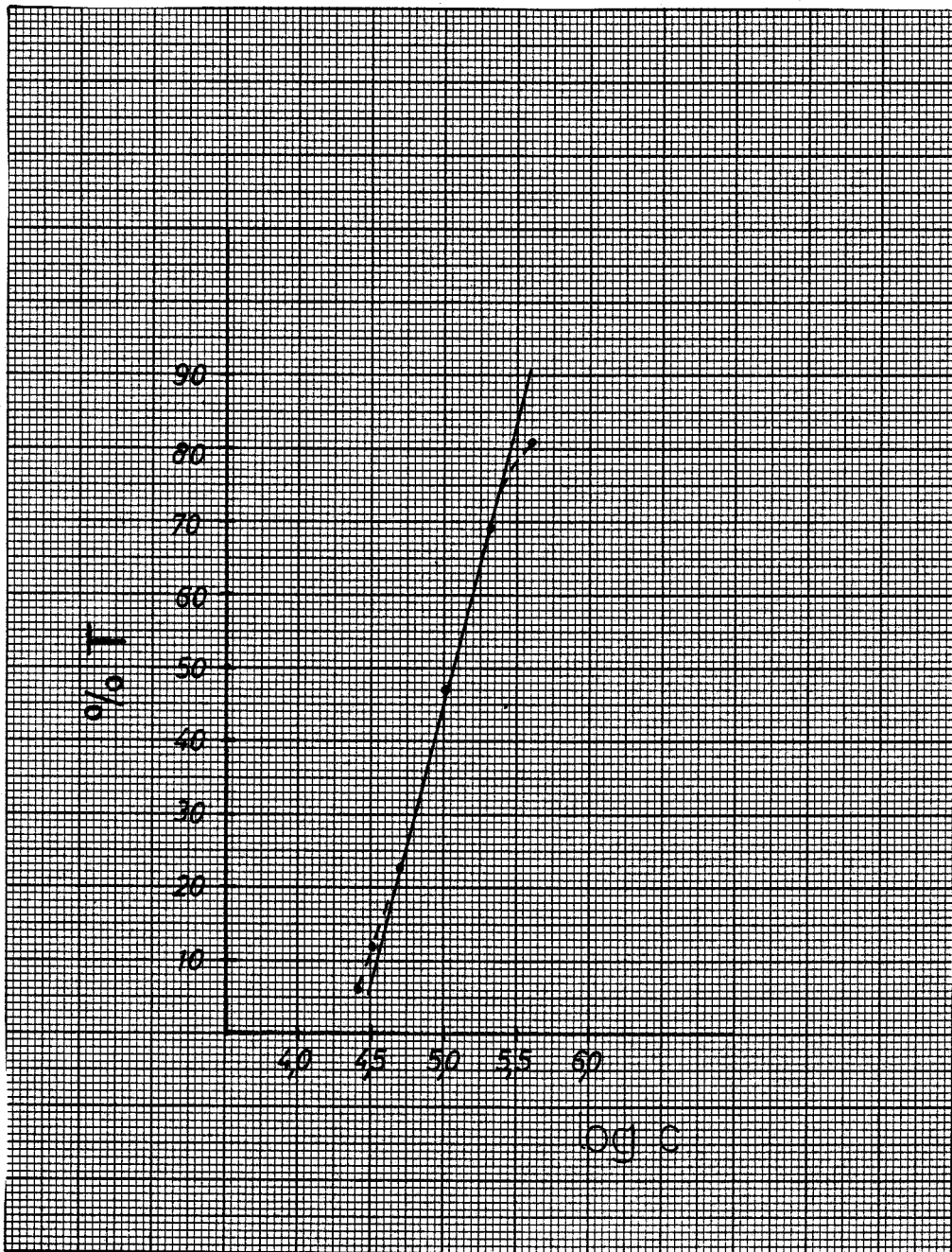


Fig. 12

Con una concentración de  $1.10^{-5}$  M de BATH comprendida en esa zona de mínimo error, se preparan 11 muestras según la técnica descrita, para ver la reproductividad del método.

En la tabla VI, se recogen los valores de  $x$ ,  $(x-\bar{x})$  y  $(x-\bar{x})^2$ .

De estos valores se deduce:

$$\bar{x} = 0,330 \qquad \sum (x-\bar{x})^2 = 39.10^{-6}$$

$$\delta = \pm 1,97.10^{-3}$$

$$\delta_m = \pm 0,59.10^{-3}$$

$$\% \text{ error} = 0,43$$

TABLA VI

Reproductividad del método

$x \cdot 10^3$	$(x - \bar{x}) \cdot 10^3$	$(x - \bar{x})^2 \cdot 10^6$
300	0	0
296	-4	16
300	0	0
301	+1	1
301	+1	1
304	+4	16
300	0	0
300	0	0
302	+2	4
300	0	0
299	-1	1
$\bar{x} = 0,300$		

b) Estudio del espectro u.v. de la orina de rata sin tratar

Este estudio se realiza de forma paralela al de la BAH, con la diferencia de que aquí el compuesto a determinar en la orina es la BATH y que todas las sustancias que absorban a 360 nm. actuarán como interferencias del método.

En la fig. 12, aparece el espectro de la orina de una rata tratada con 100 mg/kg, recogida a las 24 horas de la administración y preparada a la misma dilución que la orina no tratada, cuyo espectro se encuentra en la fig. 7 (A).

Aunque el espectro de esta orina no tratada presenta poca absorción a 360 nm., hay que comprobar que esta es pequeña y presenta un valor medio.

Por ésto, se hacen las medidas de absorbancia en 11 muestras de orina no tratada a la  $\lambda$  y pH del método propuesto, y se confirma que el valor medio es 0,050 y la  $\sigma$  de la media  $4,5 \cdot 10^{-3}$ .

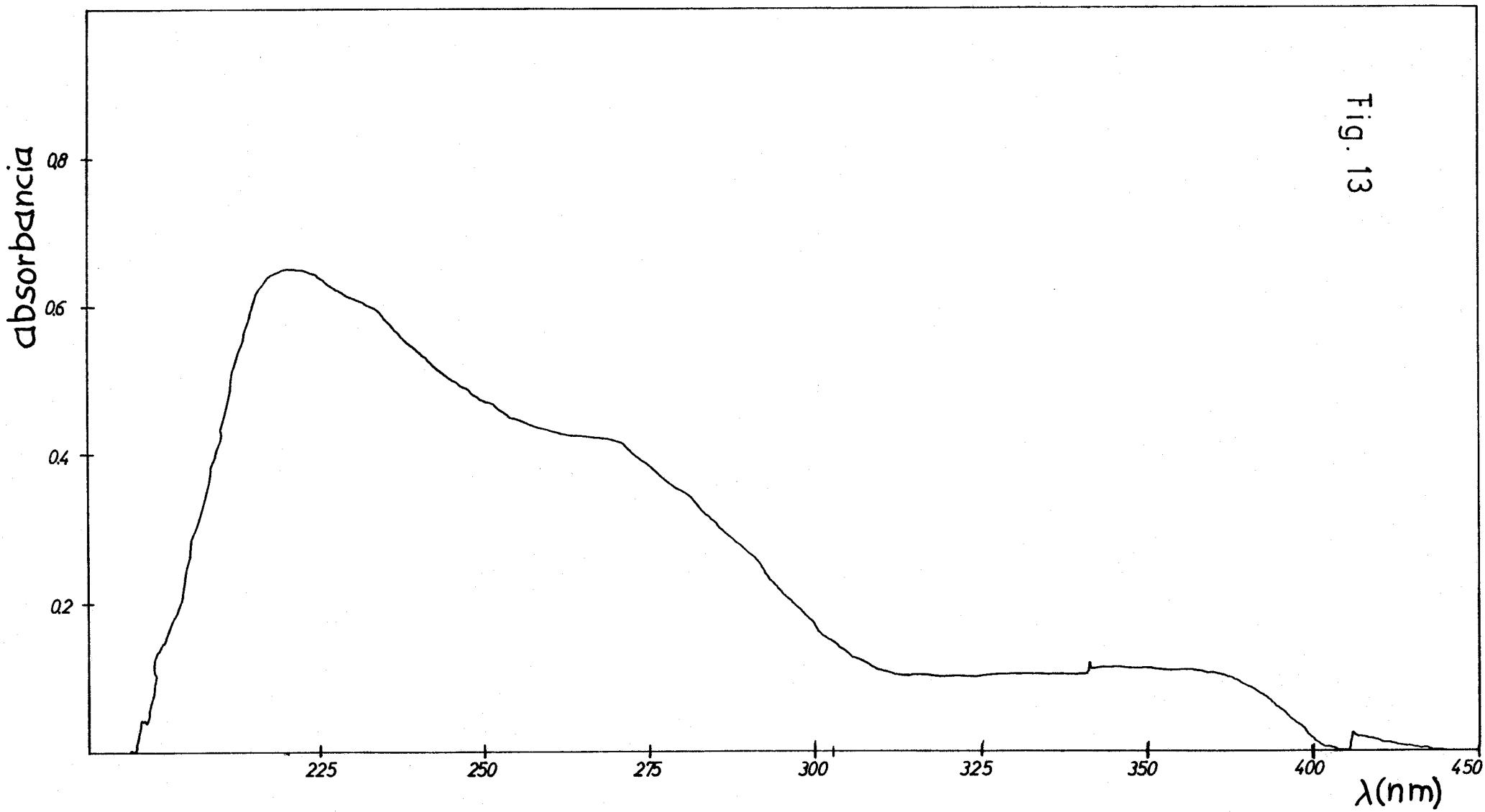


Fig. 13

c) Contenido de BATH en la orina de rata tratada con el producto

Se ha seguido la eliminación de BATH en lotes de 6 ratas a las que se les ha administrado una dosis de 100 mg/kg/animal de BATH. Las orinas se recogen en periodos de 24 horas durante 6 días.

Se preparan las muestras según la técnica A ya descrita (pag. 51) y se miden las absorbancias a 360 nm y pH 7,8. Previamente se diluyen las muestras 166 veces y se restan a los valores de absorbancia obtenidos para todas ellas, 0,050, que corresponde a la corrección del blanco necesaria si se tiene en cuenta la absorción de la orina misma.

Los resultados obtenidos, en los cuales se ha tenido en cuenta los volúmenes de orina excretados por las ratas, se recogen en la tabla VII.

TABLA VII

## Eliminación de BATH en orina

Rata nº	Peso(g)	Cantidad de BATH eliminada en la orina (mg)					
		24h.	48h.	72h.	96h.	5º día	6º día
1	259	0,80	0,35	0,10	0,09	0,10	0,20
2	258	0,30	0,13	0,08	0,13	0,30	0,10
3	255	0,63	0,43	0,18	0,07	0,07	0,07
4	252	0,54	0,20	0,15	0,05	0,10	0,13
5	247	0,43	0,17	0,25	0,17	0,25	0,03
6	245	1,06	0,47	0,15	0	0	0

### III.3.5.- Determinación de la BATH en heces de rata

Siguiendo la metodología ya expuesta para el caso de la BAH (pag.62), se recogen las heces de ratas tratadas con BATH y colocadas en jaulas de metabolismo individuales a intervalos de 24 horas durante 4 días.

A las heces se le aplica previamente el procedimiento descrito para la BAH.

Paralelo a esto, se realiza el mismo estudio en heces de rata no tratadas con el producto, que sirven como blanco.

El espectro u.v. obtenido de la muestra de heces recogidas después del tratamiento con el compuesto y el realizado con la prueba en blanco, son perfectamente superponibles y no presenta absorción a 360 nm.,  $\lambda$  característica de la BATH.

Se deduce, por tanto, la nula excreción del compuesto en estudio por esta vía de eliminación.



TABLA VIII

## Eliminación total de BATH

Rata nº	Peso (g)	BATH admi- nistrado (mg)	BATH en orina (mg)	BATH en heces (mg)	% BATH total eliminado
1	259	25,9	1,64	-	6,3
2	258	25,8	1,04	-	4,0
3	255	25,5	1,45	-	5,7
4	252	25,2	1,14	-	4,5
5	247	24,7	1,30	-	5,3
6	245	24,5	1,68	-	6,8

### III.3.6.- Discusión de resultados

La administración de BATH en dosis de 0,1 g/kg/animal nos ha puesto de manifiesto que dicho producto se excreta como tal, 5-benzal-tiohidantoina, en orina en pequeña cantidad, 4-7%, detectándose a las 24 horas de su administración.

Los ensayos efectuados en heces nos revelan que la eliminación de la BATH por esta vía es nula.

#### IV.- C O N C L U S I O N E S

- 1.- Al realizar el cálculo de la DL 50 hemos podido comprobar que ninguno de nuestros productos en estudio, 5-benzal-hidantoina y 5-benzal-2-tio-hidantoina, presentan una marcada toxicidad, siendo aún más inocuo el BAH que incluso a dosis de 2g/kg/animal no origina síntomas visibles de intoxicación.
- 2.- De la conclusión anterior se deduce la importancia de la relación estructura química-actividad, ya que la sustitución del azufre por el oxígeno en la molécula de la 5-benzal-2-tio-hidantoina, nos va a ampliar el margen terapéutico.
- 3.- La eliminación renal de los derivados de la hidantoina, como tales, es mejor cuando administramos la BAH, al excretar cantidades superiores al 50 % de la dosis administrada.

Sin embargo las cifras obtenidas al administrar BATH oscilan entre 4-7 % de la dosis inicial. Esto nos permite deducir la posibilidad de una mayor biotransformación del compuesto azufrado.

4.- La excreción por heces de nuestros dos productos, en relación a la renal, está disminuida hasta el extremo de no haber detectado cantidades apreciables en una de las muestras (BATH).

V.- B I B L I O G R A F I A

- 1.- BAEYER, A. (1861), Ann., 117, 178-80.
- 2.- BAEYER, A. (1861), Ann., 119, 126-8.
- 3.- SCHULZE, E., BARBIERI, J. (1881), Ber., 14, 1834.
- 4.- VON LIPPMANN, E. O. (1896), Ber., 29, 2645-54.
- 5.- COLLIP, J. B., SANDIN, R. (1928), Trans. Roy Soc. Can., 22, 185-6.
- 6.- BLENDERMANN, H. (1882), Z. Physiol. Chem., 6, 234-62.
- 7.- MERRIT, H. H., PUTNAM, T. J. (1938), Arch. Neurol. Psychiat., 39, 1003-15.
- 8.- AIRD, M. D., DIXON, M., WOODBURY, P. H. D. (1974), The management of epilepsy, Ed. Charles C. Thomas publisher, Illinois, USA, pag. 149.
- 9.- LONG, L. M. (1948), Am. Chem. Soc., 17, 114-118.
- 10.- TOMAN, J. E. P., GOODMAN, L. S. (1948), Anticonvulsants Physiol. Rev., 28, 409-32.
- 11.- ALLES, G. A., ELLIS, C. H., FEIGEN, G. A., REDEMANN, M. A. (1947), J. Pharmacol. Exptl. Therap., 89, 356.
- 12.- SWINYARD, E. A. (1949), J. Am. Pharm. Assoc. (Sci. Ed).
- 13.- PUTNAM, T. J., MERRIT, H. H. (1941), Arch. Neurol. Psychiat., 45, 505.
- 14.- CAHEN, R. L. (1946), J. Pharmacol. Exptl. Therap., 88, 343.

- 15.- NAKAMURA, K., O'HASHI, K., NAKATSUJI, K., HIROOK, T., FUJIMOTO, K., OSE, S. (1965), Arch. Intern. Pharmacodyn., 156(2), 261-70.
- 16.- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. (1975), The pharmacological basis of therapeutics, Ed. MacMillan publishing Co., 5<sup>a</sup> ed., New York, pag. 204.
- 17.- BARANY, E.H., STEIN-JENSEN, E. (1946), Arch. Internat. Pharmacodyn. Thérap., 73, 1.
- 18.- TOMAN, J.E.P., LOEWE, S., GOODMAN, L.S. (1947), Arch. Neurol. Psychiat., 58, 312.
- 19.- TOMAN, J.E.P., SWINYARD, E.A., GOODMAN, L.S. (1946), J. Neurophysiol., 9, 231.
- 20.- TAINTER, M.L., TAINTER, E.G., LAWRENCE, W.S., NEURU, E.N., LACKEY, R.W., LUDENA, E.P., KIRTLAND, H.B., GONZALEZ, R.I. (1943), J. Pharmacol. Exptl. Therap., 79, 42.
- 21.- SWINYARD, E.A., GOODMAN, L.S. (1946), Federation Proc., 5, 205.
- 22.- ESPLIN, D.W. (1957), J. Pharmac. Exptl. Ther., 120, 301-23.
- 23.- VINKEN, P.J., BRUIN, G.W. (1974), Handbook of Clinical Neurology. The epilepsies, vol. 15, Ed. Advisory Board, Amsterdam, pag. 630.
- 24.- ESCUETA, A.V. (1971). The J. of Clinical Investigation., 50, (9), 1977.

- 25.- OLLER, F.V. (1974), Nuevos aspectos del tratamiento de la epilepsia, Ed. Espaxs, pag. 59.
- 26.- GLAZCO, A.J. (1972), Pharmacology, 8, 163-77.
- 27.- MIRKIN, B.L. (1971), J. Pediatr., 78, 329.
- 28.- BUCHANAN, R.A., TURNER, J.L. (1973), The J. of Pediatrics., 83, 473.
- 29.- EVANS, J.E. (1975), Analytical Chemistry, 45, 2428-29.
- 30.- VELAZQUEZ, L.B. (1976), Farmacología y su proyección a la clínica, Ed. Oteo, 13ª ed., Madrid, pag. 370.
- 31.- DILL, W.A., GLAZCO, A.J. (1972), Clinical Chemistry, 18, 675-6.
- 32.- LITTER, M. (1975), Farmacología, Ed. El Ateneo, 5ª ed., México, pag. 154.
- 33.- HOLCOMB, R. (1972), The J. of Pediatrics, 80(4), 627.
- 34.- MARUYAHIA, (1975), No To Mattatsu, 6(6), 483-93.
- 35.- RAMBAND, J.C., LEONORMAND, Y., MIRAVET, L., GRUZON, M., HIOCO, D. (1972), Arch. Fr. Mal. Ippar Dig., 61(6-7), 383.
- 36.- REYNOLDS, E.H. (1978), Lancet, 2(8092), 721.
- 37.- HIL GARTNER, M. (1971), Pediat. Res., 5, 408.
- 38.- SHAPIRO, S., SLONE, D. (1977), J. Pediat., 90, 673.
- 39.- SORRELL, T.C. (1971), The Lancet, 2(7736), 1233.
- 40.- HANSON, J.W. (1976), J. Pediat., 89, 662.

- 41.- MARTINON, J.M., MARTINON, F., MICHELENA, M. (1977), Rev. Esp. Pediat., 33(193), 53.
- 42.- ROMANOS, A., GOMEZ VAZQUEZ, J. (1977), Rev. Esp. Pediat., 33(197), 519.
- 43.- GARAGARZA RUIZ, E., MARCOTEGUI, J.M. (1980), Revista de la asociación española de farmacéuticos de hospitales, 4(2), 105.
- 44.- GOODMAN, L.S., TOMAN, J.E.P., SWINYARD, E.A. (1949), Arch. Int. Pharmacodyn., 78(1), 152.
- 45.- HOUGHTON, G.W., RICHENS, A. (1974), Journal Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 37, 275-81.
- 46.- MANIGEND, G. (1971), La Press Medical, 79(18), 815.
- 47.- CUCINELL, S.A., KOSTER, R., CORNEY, A.H., BURNS, J.J. (1963), J. Pharmac. Exp. Ther., 141, 157-60.
- 48.- KUTT, H., HAYNES, J., VEREBELI, K., McDOWELL, F. (1969), Neurology, 19, 611-16.
- 49.- ALBERTONI, P. (1882), Arch. Exptl. Path. Pharmacol., 15, 248.
- 50.- SEHILF, E. (1922), Z. Ges. Exptl. Med., 28, 127.
- 51.- MERRIT, H.H., PUTNAM, T.J. (1938), Arch. Neurol. Psychiat., 39, 1003.
- 52.- KOZELKA, F.L., HINE, C.H. (1940), J. Pharmacol. Exptl. Therap., 69, 242.



- 53.- ALLES, G.A., HELLIS, C.H., FELGER, G.A., REDEMANN, M.A.  
(1946), Univ. Calif. Pubs. Pharmacol., 2, 173.
- 54.- ALLES, G.A., HELLIS, C.H., FELGEN, G.A., REDEMANN, H.A.  
(1947), J. Pharmacol. Exptl. Therap., 89, 356.
- 55.- BARANY, E.H., STEIN-JENSEN, E. (1946), Acta Pharmacol.  
Toxicol., 2, 264.
- 56.- BARANY, E.H., STEIN-JENSEN, E. (1946), Arch. Intern.  
Pharmacodynamie, 73, 1.
- 57.- TOMAN, J.E.P., SWINYARD, E.A., GOODMAN, L.S. (1946), J.  
Neurophysiol., 9, 231.
- 58.- SWINYARD, E.A., TOMAN, J.E.P., GOODMAN, L.S. (1946), J.  
Neurophysiol., 9, 47.
- 59.- WOODBURY, D.M. (1972), Exp. Model Epilepsy, 557, 83.
- 60.- FOWLER, G.W., JULIEN, R.M. (1974), Proc. West. Phar-  
macol. Soc., 17, 107-9.
- 61.- VALETTE, G. (1966), Manual de Farmacodinamia, Ed. Toray-  
Masson, S.A., 1ª ed., pag. 147.
- 62.- BAGLIONI, S., MAGNINI, M. (1909), Arch. Phisiol., 6, 240.
- 63.- GOLLSTEIN, H.H., WEINBERG, J. (1940), Arch. Neurol. Psy-  
chiat., 43, 453.
- 64.- FROST, I. (1939), J. Mental Sci., 85, 976.
- 65.- WATANABE, H., WATANABE, K., GOTO, Y., YAMAGUCHI, M. (1978),  
98(5), 653-9.

- 66.- GOURET, C., LINEE, P. (1972), *J. Pharmacol.*, 3(1), 57-72.
- 67.- SPERANSKI, A. (1926), *Ann. Inst. Pasteur*, 40, 213.
- 68.- KEITH, H.M., ESSEX, H.E., SCHLOTHAVEN, C.F. (1944), *Am. J. Diseases Children*, 68, 265.
- 69.- KOPELOFF, N., BARRERA, S.E., KOPELOFF, L.M. (1944), *Am. J. Psychiat.*, 101, 201.
- 70.- PACELLA, B.L., KOPELOFF, M., BARRERA, S.E., KOPELOFF, L.M. (1944), *Arch. Neurol. Psychiat.*, 52, 189.
- 71.- LOCKARD, J.S., LEVY, R.H., PATEL, I.H., DuCHARME, L.L., CONGDON, W.C. (1976), *Quant. Anal. Stud. Epilepsy*, 147-64.
- 72.- WEPIERRE, J. (1977), *Abrégé de pharmacodynamie générale*, Ed. Masson, París, pag. 158.
- 73.- SOKAL, R.R., ROHLF, F.J. (1979), *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*, Ed. H. Blume Ediciones, Madrid.
- 74.- GOLDSTEIN, A., ARONOW, L., KALMAN, S.M. (1978), *Farmacología*, Ed. Limusa, 2ª ed., México, pag. 455.
- 75.- WARE, E. (1950), *Chem. Rev.*, 46, 403-70.
- 76.- KOMATSU, S. (1915), *Men Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ.*, 1, 69.
- 77.- RINGBOM, A. (1939), *Anal. Chem.*, 115, 332.
- 78.- YOUDEN, W.J. (1951), *Statistical methods for chemists*, Ed. J. Wiley and sons, N.Y.