

Síntesis, Actividad Analgésica y Antiinflamatoria de Análogos del Piroxicam

Mónica DAL MASO¹, Isabel A. PERILLO¹, Celia SCHAPIRA¹,
Susana GORZALCZANY², María C. ACEVEDO² y Susana M. SICARDI^{2*}

¹ Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

² Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires, Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN. Seis nuevas 4-hidroxi- 1,2-benzotiazina 3- carboxamidas 1,1-dióxido 2N sustituidas con restos alquilos funcionalizados (alcoxicarbonilalquil-, cianoalquil- y dialquilaminoalquil-) de estructura I, fueron sintetizadas y evaluadas en su actividad analgésica y antiinflamatoria. La actividad analgésica fue evaluada por el ensayo de contorsión inducido por el ácido acético utilizando ratones S.J.L. Swiss y la actividad antiinflamatoria fue determinada mediante el ensayo de la carragenina en ratas Wistar. En ambas actividades se utilizaron como referencia el W 7477 (Ig) y el piroxicam. Los compuestos más activos resultaron ser el 2- metoxicarbonilmetil- y el 2- etoxicarboniletil- 4-hidroxi-1,2-benzotiazina-3(N-fenilcarboxamidas)-1,1-dióxido, Ia y Ib, respectivamente, con una actividad anti-inflamatoria similar al piroxicam pero de corta duración . En cuanto a analgesia fueron 3 veces más activos que el Ig pero 6 a 7 veces menos activos que el piroxicam. La funcionalización del 2 sustituyente aumenta el carácter ácido y la actividad analgésica frente al dolor de rápido comienzo, tal como las contorsiones, aunque no se encontró una correlación entre ambos parámetros.

SUMMARY. "Synthesis, Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Piroxicam Analogs". Six new 4-hydroxy-1,2-benzothiazine-3-carboxamides-1,1-dioxide 2N substituted with functionalized alkyl groups (alkoxycarbonylalkyl, cyanoalkyl and dialkylaminoethyl) of structure I were prepared and evaluated in their analgesic and anti-inflammatory activities. The analgesic activity was tested by the acetic acid-induced writhing syndrome using S.J.L. Swiss mice and the anti-inflammatory activity was investigated by carragenin test using Wistar rats. In both tests, piroxicam and W 7477, Ig, were used as reference. 2-Metoxycarbonylmethyl and 2-etoxy-carbonylethyl-4-hydroxy-1,2-benzothiazine-3 (N-phenylcarboxamides) 1,1-dioxide, Ia and Ib, respectively, were the most active compounds. Their anti-inflammatory activities were comparable to piroxicam but of short action and their analgesic activities were 3 times more active than Ig but 6-7 times less active than piroxicam. The 2- Me functionalized decrease the pKa values and increase the analgesic effect of rapid onset such as writhing although no correlation was found between them.

PALABRAS CLAVE: Analgésicos, Antiinflamatorios, Piroxicam, W 7477, Análogos 2-sustituídos, Síntesis, Actividad analgésica y antiinflamatoria.

KEY WORDS: Analgesics, Anti-inflammatories, Piroxicam, W 7477, 2-substituted analogs synthesis, Analgesic and Anti-inflammatory activities.

* A quien la correspondencia debe ser dirigida.

INTRODUCCION

En la búsqueda de agentes antiinflamatorios no esteroides sin los efectos colaterales de los corticoides, se han ensayado a través del tiempo gran cantidad de estructuras químicas. La mayoría de las que resultaron efectivas son compuestos acídicos, ya sea derivados de ácidos carboxílicos: salicílico (aspirina, flufenisal), aril o heteroailacéticos (ibufenaco, indometacina), α -arilpropiónicos (flubiprofeno), antranílico (ácido flufenámico), o compuestos β -dicarbonílicos potencialmente enolizables: β -dicetonas derivadas del pirazol y β -cetoamidas.

En 1971, un grupo de investigadores ^{1,2} reportan la potente actividad antiinflamatoria de una serie de 4-hidroxi-2-alquil-1,2-benzotiazina-3-carboxamidas 1,1-dióxido, conocidas actualmente como "familia de los oxicanes". Dentro de ésta, uno de los compuestos más activos resultó ser la amida derivada de la 2-aminopiridina ^{3,4} (piroxicam) que demostró gran actividad antiinflamatoria y una excepcional vida media de 45 horas. Se comercializa desde 1979 bajo múltiples nombres comerciales: Feldene, Solocam, Pironal, Roxicam, etc.

Si bien existe un gran número de oxicanes descritos en numerosas patentes y publicaciones científicas, prácticamente no se encuentran citas de compuestos de este tipo, sustituidos en el nitrógeno sulfonamídico con restos funcionalizados.

Las propiedades farmacológicas de esta familia se atribuyen, al igual que en otros antiinflamatorios no esteroides (AINEs), a las características acídicas que le confiere la presencia del hidroxilo enólico y actúan principalmente por inhibición de la prostaglandina H sintetasa (ciclooxigenasa, COX).

El amplio y antiguo uso de los AINEs ha puesto de manifiesto la toxicidad asociada a la inhibición de la COX, especialmente en el tracto gastrointestinal, provocando el uso continuo, ulceraciones y sangrado. Recientemente ⁵⁻⁷ el descubrimiento de una isoforma de esta enzima (COX-2), inducible durante el proceso inflamatorio, renueva el interés por la búsqueda de AINEs selectivos que no afecten la síntesis de prostanoides en su función moduladora gastrointestinal y, por lo tanto, menos tóxicos. En este sentido se ha determinado que el piroxicam, al igual que la indometacina, si bien son potentes inhibidores de la ciclooxigenasa tienen aparentemente poca afinidad por la COX-2.

Dado que por modificación molecular es usualmente posible lograr mayor selectividad, hemos sintetizado seis nuevas 4-hidroxi-1,2-benzotiazina-3-carboxamidas 1,1-dióxido 2-sustituídas **I**, con restos alcoxicarbonilalquilos **Ia,b**; cianoalquilos **Ic** y dialquilaminoalquilos **Id-f** con el fin de evaluar sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas. El N-metil derivado **1g**, previamente descrito ¹ y registrado como W 7477, fue sintetizado y evaluado como término comparativo.

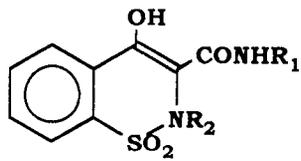
	Compuesto N°	R ₁	R ₂
	Ia	C ₆ H ₅	CH ₂ CO ₂ CH ₂ CH ₃
Ib	C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₂ CO ₂ CH ₂ CH ₃	
Ic	C ₆ H ₅	CH ₂ CN	
Id	C ₆ H ₅	CH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂	
Ie	i-C ₃ H ₇	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	
If	i-C ₃ H ₇	CH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CH ₃) ₂	
Ig	C ₆ H ₅	CH ₃	

Figura 1. 4-Hidroxi-1,2-benzotiazina-3-carboxamidas 1,1-dióxido 2-sustituídas.

La ruta sintética utilizada involucra la obtención de las 4-hidroxi-2*H*-1,2-benzotiazinas **III** por una reacción de expansión inducida por alcóxidos de la sacarín-2-acetamida isómera **II**, preparada a su vez a partir de sacarina sódica y la correspondiente cloroacetamida. La posterior 2*N*-sustitución de **III** conduce a los compuestos **I** (Figura 2).

Para evaluar la actividad analgésica y antiinflamatoria de estos nuevos derivados se utilizaron los ensayos del ácido acético (ensayo de las contorsiones, writing test) en ratones ^{9,10} y de la carragenina en ratas ¹¹; en ambos, el piroxicam fue utilizado como referencia.

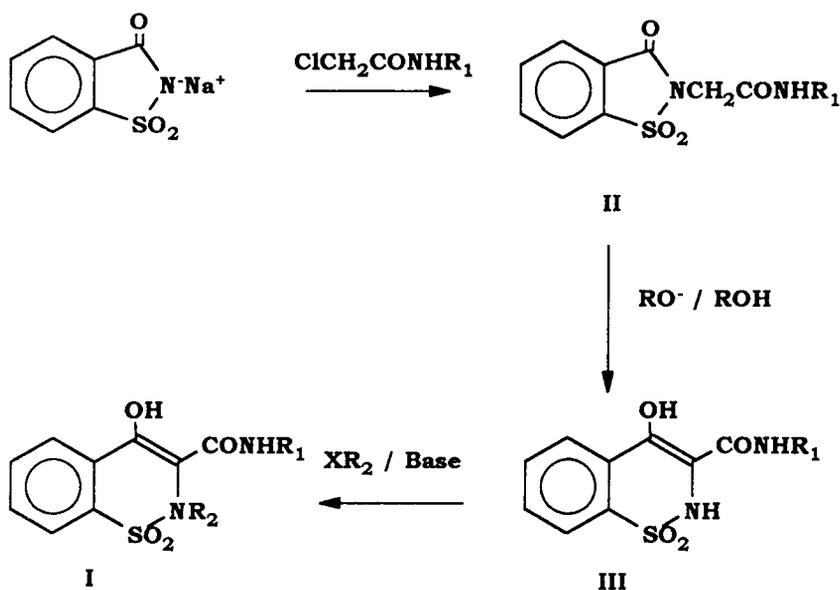


Figura 2. Síntesis de 4-hidroxi-2*H*-1,2-benzotiazina-3-carboxamidas 1,1-dióxido 2- sustituidas.

MATERIALES Y METODOS

Síntesis de 4-hidroxi-2*H*-1,2-benzotiazina-3-carboxamidas 1,1-dióxido 2-sustituidas (Ia-f). *Procedimiento General*

Las carboxamidas **III** ($R_1 = \text{C}_6\text{H}_5$, $i\text{-C}_3\text{H}_7$) se obtuvieron por expansión de las correspondientes sacarín-2-acetamidas siguiendo el método previamente descrito⁸. La *N*-alquilación se llevó a cabo de acuerdo a la siguiente técnica:

A 0,012 moles de la correspondiente carboxamida **III** disuelta en una solución de 0,012 moles de NaOH en 40 ml de etanol y 11 ml de agua, se agregan 0,04 moles del cloruro o bromuro de alquilo funcionalizado. La mezcla se agita a temperatura ambiente, monitoreándose la reacción por TLC (benceno-metanol, 9:1). Cuando no se detecta producto de partida, se filtra el sólido resultante, se seca al aire, se purifica por repetidas trituraciones con metanol caliente y se lleva a peso constante por desecación al vacío. De esta forma se obtuvieron los siguientes compuestos:

2-Etoxicarbonilmetil-4-hidroxi-2*H*-1,2-benzotiazina-3-(*N*-fenilcarboxamida) 1,1-dióxido (**Ia**),
 PF: 255°C, Rto: 72%.

2-(2-Etoxicarboniletíl)-4-hidroxi-2*H*-1,2-benzotiazina-3-(*N*-fenilcarboxamida) 1,1-dióxido (**Ib**),
 PF: 168-70°C, Rto: 68%.

2-Cianometil-4-hidroxi-2H-1,2-benzotiazina-3-(N-fenilcarboxamida) 1,1-dióxido (**Ic**),

PF: 198-200°C, Rto: 51%.

2-(2-Dietilaminoetil)-4-hidroxi-2H-1,2-benzotiazina-3-(N-fenilcarboxamida) 1,1-dióxido (**Id**),

PF: 210°C (desc.), Rto: 75%.

2-(2-Dimetilaminoetil)-4-hidroxi-2H-1,2-benzotiazina-3-(N-isopropilcarboxamida) 1,1-dióxido (**Ie**),

PF: 245°C, Rto: 68%.

2-(2-Dietilaminoetil)-4-hidroxi-2H-1,2-benzotiazina-3-(N-isopropilcarboxamida) 1,1-dióxido (**If**)

PF: 198-200°C, Rto: 70%.

El análisis elemental (C% \pm 0,3; H% \pm 0,2; N% (0,2) y las propiedades espectroscópicas (^1H y ^{13}C NMR, IR y masa) corresponden a las estructuras propuestas.

Actividad analgésica

La actividad analgésica fue evaluada por el ensayo de estiramiento o contorsión, inducido por el ácido acético ^{9,12}. Ratonos machos, S.J.L. Swiss, endocriados en nuestro laboratorio, respetando el ciclo 12 hs luz / 12 hs oscuridad y una temperatura de 20-25 °C, fueron mantenidos con libre acceso al agua y al alimento balanceado (Dieta 3, Nutrimentos, S.A.) hasta el momento de la experimentación. A 8 ratones por grupo, pesando 20-25 g, les fue inyectado por vía intraperitoneal (i.p) una solución de ácido acético al 0,6% (10 ml/Kg). Los compuestos en estudio o el vehículo (suspensión acuosa al 2% de goma arábiga) fueron inyectados i.p, 10 min. antes de la administración del ác. acético. El número de estiramientos o contorsiones inducidos en cada ratón fue observado en un período de 5 min, comenzando 5 min después de la administración del ácido acético. El piroxicam fue evaluado en forma similar con fines comparativos.

La actividad analgésica (Tabla 1) fue expresada en términos de porcentaje de inhibición en relación a los controles, evaluándose estadísticamente mediante el ANOVA de un solo factor y análisis de Dunnet ($p < 0,05$). La dosis efectiva cincuenta (DE₅₀) fue calculada por el método de Litchfield y Wilcoxon ¹³ ($p < 0,05$).

Actividad Antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria fue evaluada utilizando básicamente el método descrito por Winter *et al.* ¹¹. Ratas Wistar (machos, 180-200 g) fueron mantenidas en ayunas y con agua *ad libitum* 16 h antes del experimento. Se usaron 5 ratas por grupo. La inducción del edema fue provocada con 0,1 ml de una solución al 2% de λ -carragenina en 0,9% de ClNa (P/V), inyectada subcutáneamente en la pata derecha debajo de la aponeurosis plantar. Los compuestos en estudio, incluyendo el piroxicam como referencia (30 mg/Kg) fueron administrados por vía oral (5 ml/Kg) en una suspensión al 0,5% de tilosa (carboximetilcelulosa) una hora antes de la inyección de carragenina. Un grupo control recibió el vehículo solamente.

La inflamación fue cuantificada midiendo el volumen desplazado por la pata, mediante un pletismómetro (Ugo Basile) inmediatamente antes y 3, 4 y 5 h después de la inyección de carragenina. La diferencia entre los volúmenes de la pata izquierda y derecha indicaron el grado de inflamación. Los resultados (Tabla 2) fueron expresados como el promedio \pm SEM. El efecto antiinflamatorio de los compuestos en estudio fue estimado en términos de porcentaje de inhibición del edema (Inh. %, Tabla 2) y calculado por la fórmula $C-T/C \cdot 100$, en la cual C y T denotan el incremento medio del volumen de la pata del control y de los animales tratados, respectivamente.

Comp. N°	Dosis (mg/Kg)	Inhibición ^b %	DE ₅₀ ^c (mg/Kg)	Σf _{R1+R2} ^d	pKa
Ia	5	43,30**	6,07 (5,12 a 8,02)	2,38	6,88
	10	63,67**			
	25	80,89**			
	50	85,98**			
Ib	1	24,32 n.s	7,24 (6,35 a 8,26)	3,08	6,80
	5	43,42*			
	10	59,90**			
	25	78,66***			
	50	81,20**			
Ic	5	35,20**	17,50 (15,90 a 19,25)	1,30	6,55
	10	41,85**			
	25	65,65**			
	50	78,29**			
Id	5	37,72*	20,20 (18,00 a 22,40)	3,29	6,23
	10	42,03**			
	25	54,28**			
	50	77,14**			
Ie	10	7,02 n.s	> 50	3,03	6,97
	25	21,05*			
	50	28,07*			
If	10	13,22 n.s	> 50	1,97	6,92
	25	17,44 n.s			
	50	20,11 *			
Ig	5	14,20 n.s	27,50 (23,91 a 31,62)	2,60	7,30
	10	31,60 *			
	25	44,83**			
	50	69,20**			
Piroxicam	0,5	41,16**	0,76 (0,31 a 1,87)	1,92	6,30
	1,0	51,04**			
	5,0	80,78**			
	10,0	91,51**			
	50,0	97,36**			

a: n=8 para cada dosis y grupo control

b: Calculado como % Inh= 100 - (xt.100/x_c); n.s = no significativo, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

c: Determinado por el método de Litchfield & Wilcoxon, p < 0,05

d: Sumatoria de la contribución de los sustituyentes R1 y R2 a la lipofilicidad, calculado en base a la constante de fragmentos "f" de Nys y Rekker¹⁴.

Tabla 1. Actividad analgésica de análogos del piroxicam, determinada por el ensayo de contorsión en ratones S.J.L. Swiss^a

Compuesto	Volumen del edema			Inhibición, %		
	3hs	4hs	5hs	3hs	4hs	5hs
Control	1,19 ± 0,14	1,80 ± 0,07	-	-	-	-
Ia	0,27 ± 0,13** ^b	0,88 ± 0,27*	1,13 ± 0,43 **	77,69	49,42	41,75
Ib	0,21 ± 0,08 ***	0,60 ± 0,10***	1,01 ± 0,03***	82,64	65,52	47,94
Ic	0,22 ± 0,06 **	0,33 ± 0,08**	0,47 ± 0,09 **	81,82	81,03	75,77
Id	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
Ie	0,39 ± 0,14 **	0,61 ± 0,23 **	0,81 ± 0,22 **	68,59	64,94	58,25
If	0,55 ± 0,23 *	0,85 ± 0,29 **	1,11 ± 0,18 **	54,54	51,15	42,78
Ig	0,21 ± 0,04 **	0,18 ± 0,04 **	0,23 ± 0,04 **	82,64	89,66	88,14
piroxicam	0,17 ± 0,04 ***	0,29 ± 0,08 ***	0,40 ± 0,15* **	85,95	83,33	79,38

^a n = 5. ^b Análisis de Dunnett: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Tabla 2. Actividad Antiinflamatoria de análogos del piroxicam, determinada por el ensayo de la carragenina a una dosis única de 30 mg/ Kg .

El análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) seguido por el cálculo de "t" de Dunnet (p < 0,05) fueron utilizados para observar la existencia o no, de diferencias significativas entre los animales tratados y controles.

RESULTADOS Y DISCUSION

Hasta la dosis de 50 mg/Kg, la más alta utilizada, no se observaron signos tóxicos en los animales tratados. Como puede observarse en la Tabla 1, columna 4, los compuestos con mayor actividad analgésica resultaron ser las N-fenilcarboxamidas que en posición 2, poseen un resto etoxicarbonilmetilo (**Ia**) y un etoxicarboniletilo (**Ib**), con una dosis efectiva cincuenta de 6,07 (5,12 a 8,02) mg/ Kg y 7,24 (6,35 a 8,26) mg/ Kg, respectivamente. La actividad analgésica de estos compuestos es unas 3 veces superior a la de su análogo 2- metil 3-(N- fenil)carboxamida (**Ig**), pero de 6 a 7 veces menos activos que el piroxicam, DE50 = 0,76 (0,31 a 1,87) mg/Kg. Para el resto de las N-fenilcarboxamidas, la dosis que inhibe los síntomas dolorosos en el cincuenta por ciento de los animales tratados fue inferior a la de **Ig**, mostrando que la introducción de grupos funcionales en el resto mejora la actividad analgésica.

Las N-isopropilcarboxamidas **Ie** e **If** mostraron una abrupta caída de la activi-

dad analgésica. Compárese, por ejemplo, los compuestos **Id** con el **If**, donde la única modificación estructural entre ambos es el cambio de la N-fenil por la N-isopropil carboxamida. Esto confirma los resultados iniciales de Lombardino ¹, sobre la importancia de un grupo aromático o heterocíclico nitrogenado como sustituyente del 3-carboxamido, para incrementar el carácter ácido de los oxicanes.

En la columna 5, Tabla 1, se describe la contribución de los restos R₁ y R₂ a la lipofilicidad total del compuesto; como puede observarse los mismos no se correlacionan con la actividad analgésica. En forma similar, se observa que no hay paralelismo entre actividad analgésica y la acidez. Esto y el hecho de que hasta el presente ⁷ no se hayan podido establecer los parámetros estructurales que inciden en la acción analgésica y antiinflamatoria de los oxicanes probablemente esté relacionado a la complejidad de los distintos mecanismos y mediadores que intervienen en ambos procesos. Al analizar el pKa de las N-fenilcarboxamidas **Ia-d** con **Ig** se observa que la 2-sustitución también influye en el carácter ácido de los compuestos.

En la Tabla 2 se describen los resultados del ensayo de la carragenina. En general, el efecto antiinflamatorio máximo se encuentra dentro de las primeras 4 h de la administración del flogístico. Los compuestos con mayor efecto antiinflamatorio a las 3 h resultaron ser las 3-(N-fenil) carboxamidas **Ia, Ib, Ic** y **Ig**, con un porcentaje de inhibición muy cercano al del piroxicam.

En los ésteres **Ia** y **Ib** se observa una disminución del efecto a las 4 y 5 h, mientras que **Ig** lo mantiene y aumenta. Las 3-(N-isopropil) carboxamidas **Ie** y **If** tienen poca actividad antiinflamatoria en forma paralela a su baja actividad analgésica.

Analizando los resultados en su conjunto se destaca que la funcionalización del 2-sustituyente mejora el efecto analgésico al dolor de comienzo rápido, detectado por el ensayo de contorsión y atribuido ¹⁰ a la participación de la prostaciclina (PGI₂), sin afectar, en relación a su análogo 2-metilo, la respuesta al dolor de aparición lenta ocasionado por la PGE₂ y otros mediadores no prostanoideos, detectado por el ensayo de la carragenina.

CONCLUSIONES

De los nuevos compuestos, los más activos fueron el 2- metoxicarbonilmetil y el 2-etoxicarboniletil- 4-hidroxi- 2H-1,2-benzotiazina-3-(N-fenilcarboxamida)-1,1-dióxidos (**Ia** y **Ib**, respectivamente), con una actividad antiinflamatoria similar al piroxicam pero de corta duración . El efecto analgésico en ambos resultó ser unas 3 veces superior al de Ig pero de 6 a 7 veces menor al del piroxicam.

La funcionalización del 2-metilo en las 3 (N-fenilcarboxamidas) incrementa en relación al prototipo **Ig**, el carácter ácido y el efecto analgésico al dolor de rápido comienzo, como es el provocado por el ácido acético en el ensayo de contorsión.

No se observó correlación entre la actividad analgésica y antiinflamatoria con la contribución de los distintos sustituyentes a la lipofilicidad o a la acidez de los compuestos estudiados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lombardino, J. G., E. H. Wiseman y M. Mc Lamore (1971) *J. Med. Chem.* **14**: 1171-5
2. Zinnes, H., N.A. Lindo, J.C. Sircar, M.L. Schwartz, J. Shavel Jr. y G. Di Pasquale (1973) *J. Med. Chem.* **16**: 44-8
3. Lombardino, J.G. y E.H. Wiseman (1972) *J. Med. Chem.* **15**: 848-9
4. Lombardino, J.G., E.H. Wiseman y J. Chiani (1973) *J. Med. Chem.* **16**: 493-6.
5. Fletcher, B.S., D.A. Kujubu, D.M. Perrin y H.R. Herschman (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 4338-40
6. Xie, W., J.G. Chipman, D.L. Robertson, R.L. Erikson y D. L. Simmons (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **88**: 2692
7. Griswold, D. E. y J.L. Adams (1996) *Med. Res. Rev.* **16**: 181-206
8. Perillo, I.A., C.B. Schapira y S. Lamdan (1983) *J. Heteroc. Chem.* **20**: 155-6
9. Koster, R., M. Anderson y E.J. de Beer (1959) *Fed. Proc.* **18**: 412
10. Doherty, N.S. (1987) *Ann. Rep. Med. Chem.* **22**: 245-52
11. Winter, C.A., E.A. Risley, G.W. Nuss (1962) *Proc. Exptl. Biol. Med.* **111**: 544-7
12. Sicardi, S.M., J.L. Martiarena y M.T. Iglesias (1991) *J. Pharm. Sci.* **80**: 761-4
13. Litchfield, J.T., Jr. y F. Wilcoxon (1949) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **113**: 99-113
14. Yalkowsky, S.H. y W. Morozowich (1980) *A Physical Chemical Basis for the Design of Orally Active Prodrugs*, en "Drug Design", E.J. Ariens, de., Academic Press: N. York, vol. IX, págs. 138-9