



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“SÍNTESIS Y PREFORMULACIÓN DE DERIVADOS DEL
1, 5-DIARILPIRAZOL COMO POSIBLES AGENTES PARA EL
TRATAMIENTO DEL SÍNDROME METABÓLICO.”**

T E S I S

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

PRESENTA

NORMA ADRIANA LUMBRERAS ZAVALA

MÉXICO, D.F.

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: OFELIA ESPEJO GONZÁLEZ
VOCAL: Profesor: FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
SECRETARIO: Profesor: ELENA GUADALUPE RAMÍREZ LÓPEZ
1er. SUPLENTE: Profesor: ERNESTINA HERNANDEZ GARCÍA
2° SUPLENTE: Profesor: ABRAHAM FAUSTINO VEGA

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 122, CONJUNTO E,
FACULTAD DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA: Dr. Francisco Hernández Luis

SUPERVISOR TÉCNICO: M. en C. Eduardo Hernández Vázquez

SUSTENTANTE: Norma Adriana Lumbreras Zavala

...Me encontraba sentado escribiendo en mi libro de texto, pero las investigaciones no prosperaban, mis pensamientos estaban en otra parte. Volví la silla hacia el fuego y empecé a quedarme dormido. Una vez más los átomos comenzaron a brincar ante mis ojos. Pero esta vez los grupos más pequeños se mantenían discretamente en el fondo. Mi ojo mental, entrenado por las repetidas visiones de este tipo, ahora podía distinguir estructuras más grandes; largas filas se entrelazaban y mezclaban en un movimiento como de serpientes. ¡Pero mira! ¿Qué fue eso? Una de las serpientes había mordido su propia cola, y la forma giró burlescamente ante mis ojos. Como iluminado por el resplandor de un relámpago, me desperté...

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, porque en sus aulas, pasillos, instalaciones y comunidad, encontré un mundo de cultura e integridad que son hoy las herramientas con las que enfrento la vida. Particularmente la **Facultad de Química** fue un reto, me mostró el mundo de la ciencia y con ello mis limitaciones y miedos, así como el valor del esfuerzo, de la perseverancia y de la imperfección.

Le agradezco al **Dr. Francisco Hernández Luis** brindarme la oportunidad de colaborar en su grupo de investigación y todo el apoyo para la realización de este proyecto. Mostar siempre una actitud humana, humilde, comprensiva y empática, y también, el transmitir sus conocimientos con tanto entusiasmo.

Al **M. en C. Eduardo Hernández Vázquez** por todas y cada una de sus enseñanzas, por su paciencia y tolerancia, por transmitirme sus deseos de superación y crecimiento día con día, y sobre todo, por brindarme su amistad.

A la Dra. Elena Ramírez y demás miembros del jurado, por cada una de las aportaciones al presente escrito.

Expreso mi agradecimiento a las siguientes instituciones por el apoyo recibido:

Al **Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF)** por la beca proporcionada y el apoyo recibido para la compra de reactivos y materias primas dentro del proyecto **PICSA 235/2010 (ICyTDF)**.

A la Unidad de Servicios Analíticos (USAI) de la **Facultad de Química UNAM** y a su personal que realizó el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (Rosa Isela del Villar Morales y Nuria Esturau Escofet); Espectrometría de Masas (Georgina Artemisa Duarte Lisci, Margarita Guzmán Villanueva); Espectroscopia de Infrarrojo (Marisela Patricia Gutiérrez Franco), Análisis térmico (Margarita Portilla Bauza, Elvia del Socorro Reynoso Herrera), Microscopía electrónica (Iván Puente Lee).

A la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y al Dr. Samuel Enoch Estrada Soto por su valioso apoyo en la realización de la evaluación biológica de los compuestos sintetizados.

A Silvia le agradezco ser una mujer amorosa, educarme con tantos valores, cuidar de mí en todo momento, acompañarme en mis enfermedades, en mis ratos de mal carácter, en mis desvelos, cada lunch y cada sonrisa llena de ternura. Todo eso fue vital para culminar este proceso, es de sobra mencionar que te adoro y que cada logro es de ambas, que jamás habrá manera de plasmar cuan agradecida estoy de que seas tú, mi madre.

A Fabián le agradezco sembrar en mí la inquietud de búsqueda, de ser diferente, impulsarme a madurar y formar el carácter que me mantiene de pie. El apoyo y el creer en mí siempre.

A Rodrigo le agradezco todos los enfrentamientos y cuidarme tantos años.

A Sofía por tanto cariño, por todo el amor y los sermones, por ser parte fundamental en la formación de mi personalidad y mis valores. Por la calidez de sus cuidados y las grandes expectativas.

A Leticia; el carácter, la influencia desde niña, el apoyo en todos los aspectos, las charlas y consejos.

A Jesús el acompañarme por este sendero, la infinidad de vivencias acumuladas, levantarme de mis caídas, hacerme sonreír y ser la bondad necesaria para concebir un mundo menos trágico.

A Andrea, Alejandra, Alma y Karla les agradezco el impulso, el apoyo, la presencia y la alegría.

A Fernando, el creer en mí.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Síndrome metabólico	2
2.1.1 Definición	2
2.1.2 Componentes del síndrome metabólico	4
2.1.2.1 Resistencia a insulina	4
2.1.2.2 Dislipidemia aterogénica	5
2.1.2.3 Hipertensión arterial	5
2.1.2.4 Obesidad	5
2.1.3. Tratamiento del síndrome metabólico	5
2.2 Derivados diarilpirazólicos como antagonistas del receptor CB1	9
2.3 La preformulación farmacéutica en la etapa de descubrimiento de prototipos	11
2.3.1 Introducción a la preformulación	11
2.3.2 Dispersiones sólidas	12
2.3.3 Polivinilpirrolidona	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17

6. METODOLOGIA	19
6.1 Parte química	19
6.1.1 Síntesis del 1-(2,4-diclorofenil)-5-fenil-4-metil- <i>N</i> -piperidin-1-il-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (1)	21
6.1.2 Síntesis del 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil- <i>N</i> -piperidin-1-il-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (2)	23
6.1.3 Síntesis del 1,5-difenil-4-metil- <i>N</i> -(piperidin-1-il)-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (3)	25
6.2 Preformulación	26
6.2.1 Dispersiones sólidas con polivinilpirrolidona	26
6.3 Evaluación biológica	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Parte química	29
7.2 Preformulación	33
7.3 Evaluación biológica	35
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
8.1 Parte química	39
8.1.1 Síntesis	39
8.1.2 Caracterización	40
8.2 Preformulación y evaluación biológica	46
8.2.1 Preformulación	46
8.2.2 Caracterización de dispersiones sólidas	49
8.2.3 Actividad hipoglucémica	53
9. CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56
APÉNDICE I	60
APÉNDICE II	73

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los padecimientos que actualmente ocasiona serios problemas de salud pública a nivel mundial y nacional es el síndrome metabólico, el cual está constituido por un conjunto de síntomas que incrementan la probabilidad de padecer trastornos cardiovasculares y/o diabetes tipo 2. Los principales componentes de este síndrome son la resistencia a la insulina, hiperglicemia, hiperlipidemia, obesidad central, hipertensión y niveles bajos de la lipoproteína de alta densidad (HDL). Por tal motivo, muchos grupos de investigación trabajan en el desarrollo de diferentes tratamientos para este síndrome.

En este sentido, uno de los grupos estructurales que han sido estudiados como antagonistas al receptor de canabinoides 1, son los derivados del 1,5-diarilpirazol. Al interaccionar con estos receptores, estos compuestos han logrado regular el apetito, y en consecuencia, ser una alternativa para combatir la obesidad. Sin embargo, algunos compuestos que llegaron al mercado presentaron efectos no deseados en los pacientes bajo su tratamiento, situación atribuible a los efectos que estas moléculas ocasionan al sistema nervioso central (SNC). Adicionalmente se detectó que algunos de estos derivados ocasionaron hipoglucemia. Por ello, se ha iniciado la búsqueda de derivados del 1,5-diarilpirazol con la idea de encontrar una molécula de acción hipoglucémica preponderantemente y poca acción sobre el SNC.

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo la síntesis y preformulación de tres derivados del 1,5-diarilpirazol que pudiesen presentar acción hipoglucemiante. Dada su naturaleza estructural, los derivados del 1,5-diarilpirazol son lipofílicos y presentan un pobre solubilidad en agua, por lo que se prepararon dispersiones sólidas empleando polivinipirrolidona para tratar de contar con un sistema que pudiera incrementar su eficiencia biológica. Los productos finales e intermedarios fueron caracterizados estructuralmente mediante métodos espectrométricos y espectroscópicos. Finalmente, los productos, solos y preformulados, fueron enviados para su evaluación biológica en un modelo murino.

2. MARCO TEÓRICO

En este apartado se presenta la información que dio lugar al planteamiento del problema e hipótesis del presente trabajo de tesis. El capítulo se divide en tres apartados principales; el primero abarca definiciones e importancia clínica del síndrome metabólico, el segundo contiene lo referente al grupo químico considerado en este estudio, el tercero presenta generalidades sobre la importancia de la preformulación de moléculas recién descubiertas para los estudios de evaluación biológica.

2.1. El síndrome metabólico

2.1.1. Definición

El síndrome metabólico (SM) —también conocido como síndrome X, cuarteto de la muerte, síndrome dismetabólico, síndrome plurimetabólico, síndrome cardiometabólico y como síndrome de insulino-resistencia— es un término que fue propuesto por Reaven en 1988¹ para indicar que la resistencia a insulina juega un papel fundamental en la presencia de dislipidemias, hipertensión arterial e hiperglucemia.² Actualmente, es un grave problema de salud pública en México y en el mundo ya que según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca del 10% de las personas con tolerancia normal a la glucosa, 40% de las personas con intolerancia a la glucosa y 90% de los pacientes con diabetes tipo 2, podrían tener SM.³ No está por demás mencionar que en México, alrededor de 6 830 00 personas padecen de diabetes tipo 2.⁴

Posterior a la propuesta de Reaven,¹ surgieron diferentes criterios para diagnosticar al SM.⁵ En 1999, la OMS estableció cinco componentes principales: obesidad abdominal, hipertensión arterial, dislipidemia (hipertrigliceridemia y niveles bajos de colesterol HDL), diabetes tipo 2 o resistencia a insulina, y microalbuminuria; mencionando que se necesitaba la presencia de resistencia a insulina y dos componentes adicionales para considerar que una persona presentaba SM.⁶ En 2001, la National Cholesterol Education Program: Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII), conservó tres de los criterios anteriores, desglosando la dislipidemia en sus dos componentes, cambió la diabetes tipo 2 por la intolerancia a la glucosa, y eliminó la microalbuminuria; estableció que se requeriría la presencia de al menos tres de los cinco componentes para establecer el SM.⁷ En el año

2003, la American Association of Clinical Endocrinology (AACE) unificó y publicó una serie de criterios para el diagnóstico del SM.³ Otros grupos que han publicado propuestas de diagnóstico son la Federación Internacional de Diabetes (FID) y el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a Insulina (EGIR). La Tabla 1 muestra un resumen de los criterios establecidos por estas cinco organizaciones.

Tabla 1. Criterios clínicos de la OMS, NCEP-ATPIII, AACE, FID y EGIR para describir al síndrome metabólico.

	OMS	NCEP- ATP III	AACE	FID	EGIR
	Obesidad abdominal Índice de masa corporal $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$ Relación cintura cadera: Hombres ≥ 0.90 Mujeres ≥ 0.85	Obesidad abdominal Circunferencia de cintura H $>102 \text{ cm}$ M $>88 \text{ cm}$	Índice de masa corporal ≥ 25 Circunferencia de cintura H $>102 \text{ cm}$ M $>88 \text{ cm}$	Circunferencia abdominal H $> 94 \text{ cm}$ M $<80 \text{ cm}$	Circunferencia abdominal H $> 94 \text{ cm}$ M $<80 \text{ cm}$ IMC $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$
	Resistencia a la insulina Diabetes tipo 2 definida por HOMA_{IR} (Modelo homeostático para valorar resistencia a insulina)	Intolerancia a la glucosa ($\geq 110 \text{ mg/Dl}$)	Glucosa plasmática en ayuno $110 - 125 \text{ mg/dL}$ o $> 140 \text{ mg/dL}$ 2h después de una carga de glucosa de 75 g	Glucosa plasmática en ayuno $>100 \text{ mg/dL}$ o previo diagnóstico de diabetes tipo 2	Resistencia a insulina o hiperinsulinemia en ayuno $> p75$
	Hipertensión arterial bajo tratamiento hipertensivo y/o $\geq 140/90 \text{ mmHg}$	Presión sanguínea $\geq 130/85 \text{ mmHg}$	Presión sanguínea $\geq 130/85 \text{ mmHg}$	Presión arterial $>130/85 \text{ mmHg}$ o diagnóstico previo / fármaco específico.	Hipertensión arterial bajo tratamiento hipertensivo y/o $\geq 140/90 \text{ mmHg}$
Dislipidemia	Colesterol HDL: H $<35 \text{ mg/dL}$ M $< 39 \text{ mg/dL}$	Colesterol HDL H $<40 \text{ mg/dL}$ M $<50 \text{ mg/dL}$	Colesterol HDL H $<40 \text{ mg/dL}$ M $<50 \text{ mg/Dl}$	Colesterol HDL H $<40 \text{ mg/dL}$ M $<50 \text{ mg/dL}$ ó fármaco específico	Colesterol HDL $<40 \text{ mg/dL}$
	Triacilgliceroles $\geq 150 \text{ mg/dL}$ ($\geq 1.7 \text{ mmol/L}$)	Triacilgliceroles $>150 \text{ mg/dL}$	Triacilgliceroles $>150 \text{ mg/dL}$	Triacilgliceroles en ayuno $>150 \text{ mg/dL}$	Triacilgliceroles $\geq 180 \text{ mg/Dl}$
	Microalbuminuria $\geq 20 \text{ } \mu\text{g/min}$			Diagnóstico de enfermedad cardiovascular, hipertensión, síndrome de ovarios poliquísticos, o acantosis nigricans.	

A pesar de que la existencia de diferentes criterios para diagnosticar al SM, para fines de investigación en la búsqueda nuevos fármacos, se puede enfatizar en aquellos factores cuya regulación o eliminación, brinden una mayor prevención para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 y/o enfermedades cardiovasculares.⁶

2.1.2. Componentes del síndrome metabólico

2.1.2.1. Resistencia a insulina

La resistencia a insulina se presenta cuando la glucosa no ingresa a la célula a pesar de la presencia de insulina endógena y/o exógena.² Está presente en las personas con SM y se considera como uno de los factores de riesgo para diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.⁷

Existen múltiples causas de la resistencia a insulina pero un elemento importante en su aparición es la abundancia de ácidos grasos circulantes que provienen predominantemente de las reservas de triacilglicérol de tejido adiposo y de la lipólisis de lipoproteínas de otros tejidos; los primeros liberados por la lipasa sensible a hormonas y los segundos por la lipasa de lipoproteína (LPL). La lipólisis es inhibida por la insulina y estimulada por las catecolaminas, el cortisol y la hormona del crecimiento. Por su parte, la resistencia a insulina incrementa la lipólisis y con ello la cantidad y acumulación de ácidos grasos en forma de triacilglicérol en los músculos estriados, incluyendo el miocardio.⁸ La aparición de la resistencia a insulina es precedida de hiperinsulinemia o de hiperglucemia.⁸

Los factores de riesgo cardiovascular en pacientes con resistencia a la insulina, no sólo se relacionan con la presencia de alteraciones en el perfil lipídico, también se asocian con procesos inflamatorios, estrés oxidante y alteraciones de coagulación sanguínea.² El estado pro-inflamatorio, reconocido clínicamente como la elevación de la proteína C reactiva (PCR), se presenta comúnmente en personas con SM. Una causa de este estado es la obesidad, ya que el exceso de tejido adiposo provoca la liberación de citocinas pro-inflamatorias que generan niveles elevados de PCR. Niveles de PCR mayores de 3.0 mg/L tienen mayor incidencia de desarrollar eventos coronarios.³

2.1.2.2. Dislipidemia aterogénica

Se caracteriza por hipertrigliceridemia, disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y una alta proporción de lipoproteínas de baja densidad (LDL).⁷ Estudios más detallados revelan otras anormalidades como elevadas lipoproteínas remanentes y apolipoproteínas B (apoB). La hiperinsulinemia disminuye la producción de triacilgliceroles en cerca de 67% y aumenta la LDL pequeñas y densas (LDL clase B), que son más susceptibles a ser oxidadas y por lo tanto más aterogénicas.⁸

2.1.2.3. Hipertensión arterial

La hipertensión, no obstante que tiene un origen multifactorial, está fuertemente asociada con obesidad y comúnmente se presenta en personas con resistencia a insulina.⁷

2.1.2.4. Obesidad

La obesidad es un exceso de masa de tejido adiposo,⁸ y fue declarada por la OMS como una enfermedad en 1988; está definida como un índice de masa corporal mayor a 30 Kg/m²,⁹ el cual es una medida del peso y grasa corporal con relación a la estatura. La obesidad ha recibido gran atención pues se asocia con hipertensión, altos niveles de colesterol en suero, bajo nivel de colesterol HDL, hiperglucemia, y por ende, enfermedades cardiovasculares.⁷

2.1.3. Tratamiento del síndrome metabólico

Se ha informado que un factor determinante que no debe excluirse para el tratamiento del SM es la obesidad.⁹ En este sentido se ha demostrado que una reducción del peso corporal del 5 al 10% provoca un descenso significativo en la presión sanguínea de hipertensos y una mejora en el control de la glicemia en pacientes diabéticos.¹⁰

El tratamiento para la obesidad debe iniciarse con la dieta y el ejercicio físico, lo cual aumenta la sensibilidad a la insulina, mejora la tolerancia a la glucosa, disminuye las cifras de presión arterial, incrementa el colesterol HDL, disminuye el colesterol LDL y mejora la reserva y función cardiopulmonar.¹¹ Sin embargo, la falta de participación de los pacientes, o bien de resultados pobres a corto plazo, provoca la necesidad de buscar tratamientos

farmacológicos, que en conjunto con los ya mencionados, les permitiría mejorar su salud y calidad de vida.

En este sentido, existen dos clases de fármacos para el tratamiento de la obesidad, los anorexigénicos (disminuyen el apetito) y los inhibidores de la absorción. Algunos de los fármacos que han sido aprobados por la FDA en los Estados Unidos para el tratamiento a largo plazo de la obesidad son la Sibutramina (anorexigénico) y Orlistat (inhibidor de la absorción de grasa),⁸ mientras que la Fentermina (anorexigénico) solamente fue aprobado para usarse por 3 meses (Figura 1), cabe mencionar que la Sibutramina fue retirada del mercado mexicano en el 2010 debido a que el perfil de seguridad no fue aceptable. No obstante, estos agentes tienen una eficacia variable o bien efectos secundarios no deseados que restringen su potencial terapéutico.⁹

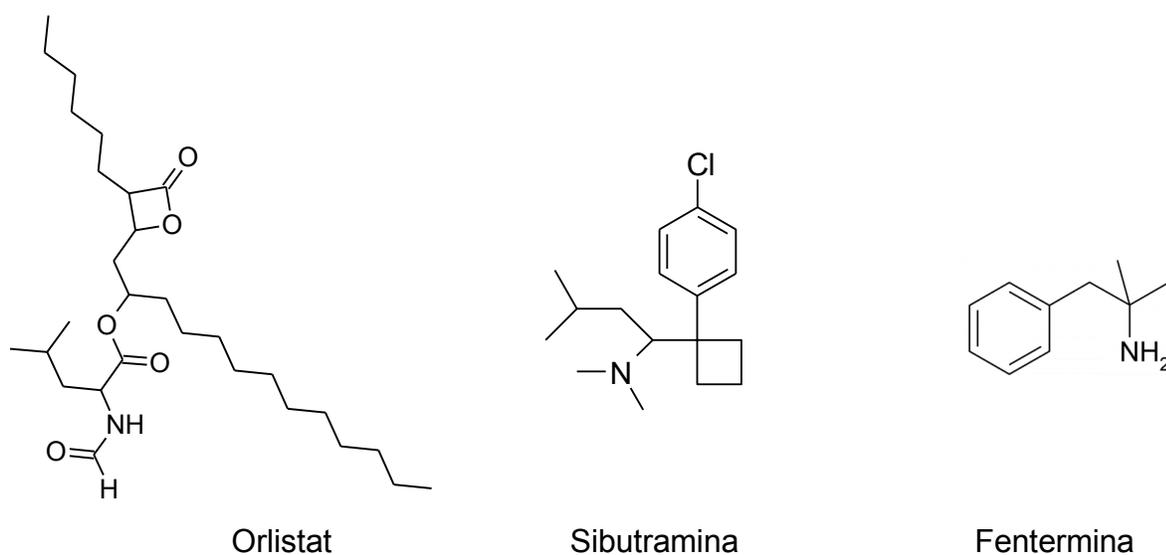


Figura 1. Estructura de algunos de los fármacos empleados para el tratamiento de la obesidad.

Una de las macromoléculas diana para la búsqueda de fármacos anti-obesidad es el receptor de cannabinoides CB1 el cual es conocido por participar en la regulación del consumo de comida, la acumulación de grasa y el balance de energía.¹² Además, tiene influencia en numerosos comportamientos, facilitando el incremento de energía consumida y el decremento de la acumulación de grasa en el cuerpo.¹³

La familia de receptores canabinoides incluye dos receptores distintos: el receptor canabinoide CB1 y el receptor canabinoide CB2. Ambos son receptores formados por 7 dominios transmembranales (7TM) acoplados a proteína G.^{14,15}

El receptor CB1 se ha encontrado predominantemente en el cerebro y en los tejidos nerviosos, donde moderan el consumo de alimentos, así como también en numerosos órganos implicados en la regulación de energía,¹⁰ como intestino, hígado, músculo esquelético y páncreas, órganos que están involucrados en la patofisiología de la diabetes tipo 2.¹³ Los receptores CB2 están presentes casi exclusivamente en la sangre y células inmunes pero también están expresados con menor proporción en el cerebro.¹⁶

Los dos receptores canabinoides regulan una variedad de funciones fisiológicas centrales y periféricas, incluyendo el desarrollo neuronal, el proceso neuromodulatorio, el metabolismo energético y las funciones cardiovasculares, respiratorias y reproductivas. Además estos receptores modulan la proliferación, motilidad, adhesión y apoptosis celular.¹⁶

Como miembros de la superfamilia GPCR ambos receptores se reportaron inicialmente como activantes del heterotrímero Gi/o de proteínas G. A consecuencia, la activación de estos receptores canabinoides permite primariamente la inhibición de la adenilato ciclasa y la reducción en la acumulación de AMP cíclico en la mayoría de los tejidos. Además regulan la fosforilación y activación de diferentes miembros de la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), incluyendo la regulación de la señalización extracelular de cinasa 1 y 2 (ERK1/2), p38 MAPK y la proteína cinasa N terminal Jun (JNK). En adición a lo anterior el receptor canabinoide CB1 modula la transmisión sináptica ya que puede acoplarse negativamente al tipo de voltaje N y P/Q operado por canales de Ca²⁺ provocando su inhibición y acoplarse positivamente a los de tipo A activando los canales de K⁺ en las terminales presinápticas (Figura 2).^{13, 14}

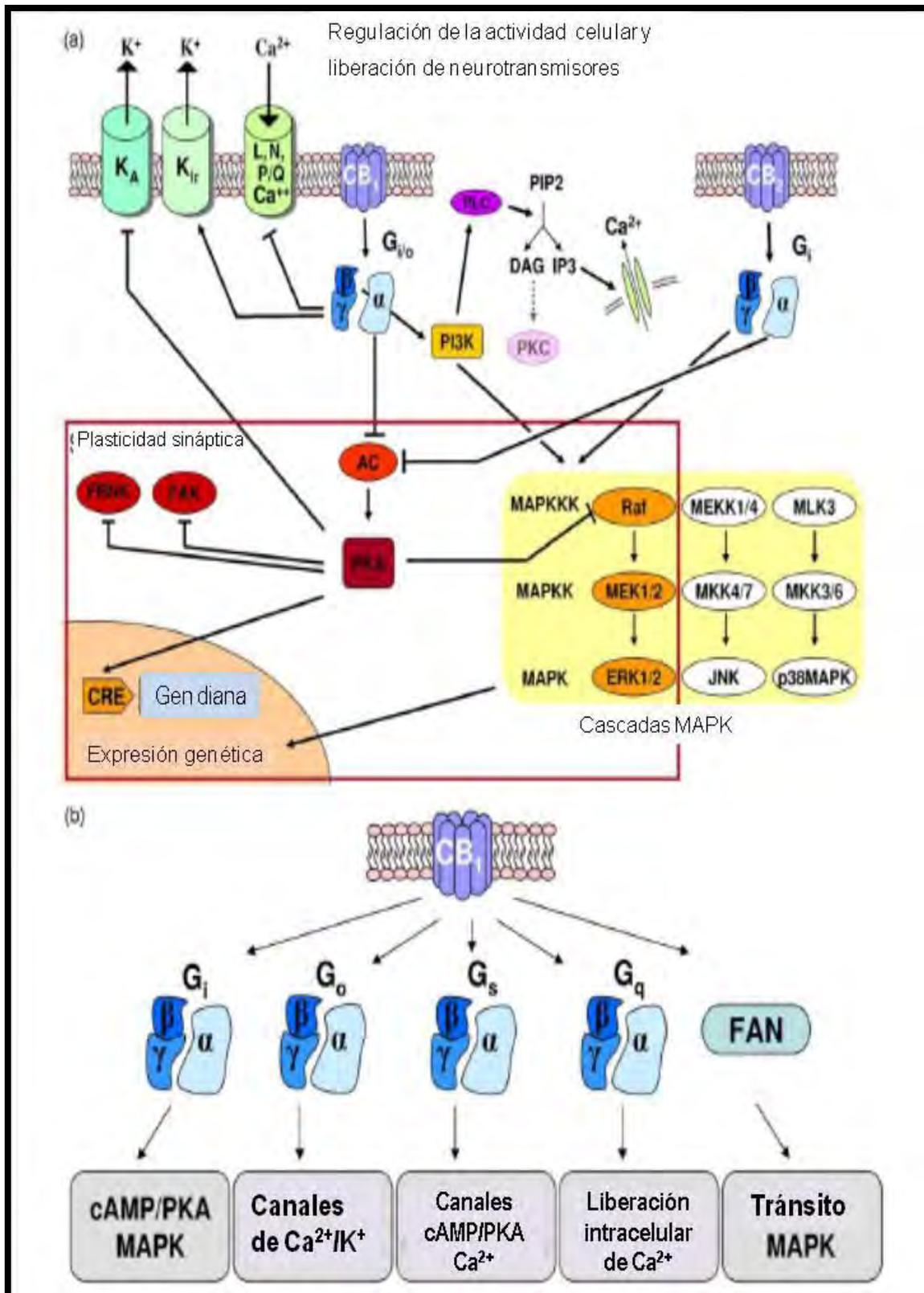


Figura 2. Complejo de señalización de receptores canabinoides (Adaptación de Bosier B. *Biochem. Pharm.* 2010, 80, 1–12).

La sobreactivación del sistema endocanabinoide está relacionada con la obesidad abdominal y el desarrollo del síndrome metabólico. La regulación a la baja del sistema canabinoide por bloqueos específicos del receptor CB1 puede inducir la reducción del peso corporal, por ello, el interés particular se concentra en el antagonismo del receptor CB1.⁹

2.2. Derivados diarilpirazólicos como antagonistas del receptor CB1

Los antagonistas al receptor CB1 conocidos hasta el momento son derivados 1,5-diarilpirazoles, aminoalquilindoles o triazoles.¹³ El derivado 1,5-diarilpirazólico llamado Rimonabant, (Figura 3) fue el primer antagonista al receptor CB1 reportado y extensamente investigado. Descubierta por Sanofi-Aventis fue el único comercializado en varios países, desde entonces el antagonismo para el receptor CB1 ha sido considerado como una estrategia para el tratamiento de la obesidad.⁹

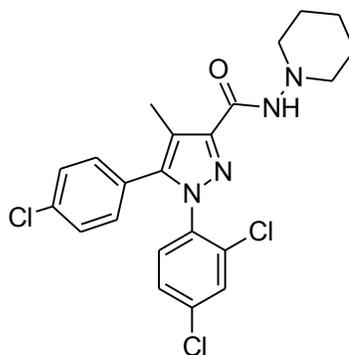


Figura 3. Estructura química de Rimonabant.

Rimonabant es un antagonista selectivo al receptor CB1 con poca o ninguna afinidad por otros receptores, incluyendo a los receptores CB2. Algunos estudios sugieren que puede funcionar como un agonista inverso y hacer frente a la actividad intrínseca de los agonistas o bien inhibir la actividad del receptor CB1. Cruza la barrera hematoencefálica y se une ampliamente a las proteínas en plasma (<99%). In vitro, es metabolizado predominantemente por el hígado, principalmente por el CYP3A4 y amidohidrolasa. Sólo la dosis de 20 mg fue comercializada.^{10, 13}

El modelo para el acoplamiento del Rimonabant en el receptor CB1 señala que la principal interacción corresponde a un puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo del fármaco y la lisina 192-asparagina 366 del receptor CB1, así ejerce un efecto de estabilización en las interacciones electrostáticas y en el puente de hidrógeno de lisina y asparagina como se ve en la Figura 4.⁹ Estos estudios indican la porción farmacofórica de este grupo de compuestos.

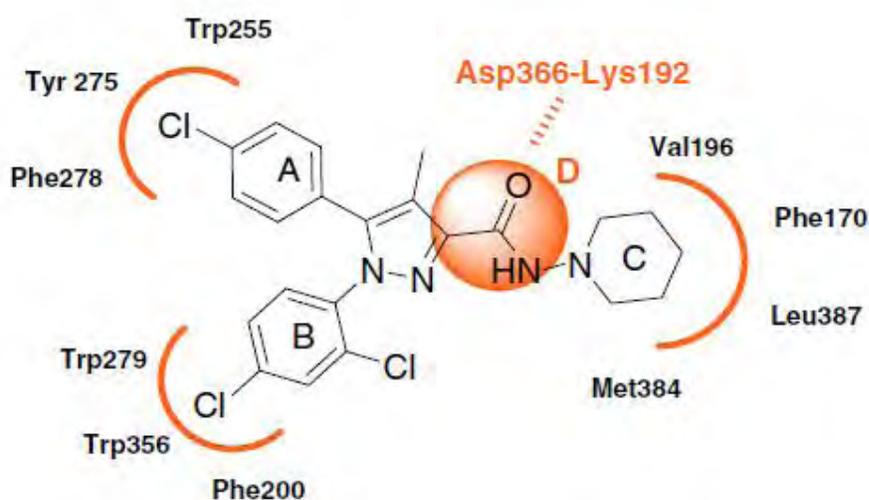


Figura 4. Interacción ligando-receptor de Rimonabant.

Estos estudios de acoplamiento molecular indican que las porciones de interacción con la tirosina 275, la fenilalanina 278, los triptófanos 279 y 356, constituyen un área estructural para la búsqueda de otros derivados del 1,5-diarilpirazol.

A pesar de la actividad farmacológica demostrada (Fig. 5) y su eficacia en el tratamiento de la obesidad, el Rimonabant fue retirado de mercado al igual que otros análogos en desarrollo clínico (Taranabant y el Otenabant), debido a severos efectos adversos de tipo psiquiátricos como depresión, ansiedad y suicidio. Sin embargo, el desarrollo de antagonistas del receptor CB1 con mejores propiedades fisicoquímicas y menores efectos adversos puede ser una alternativa para el tratamiento de la obesidad y con ello, del SM. Con esto en mente, nuestro grupo de investigación ha iniciado la indagación de derivados 1,5-diarilpirazólicos, análogos al Rimonabant que conservando la

parte farmacofórica de esta molécula para el receptor CB1, presenten una mayor acción hipoglucémica para encontrar una estructura prototipo que con su posterior desarrollo se pueda convertir en un agente hipoglucémico con una menor actividad sobre el sistema nervioso central.

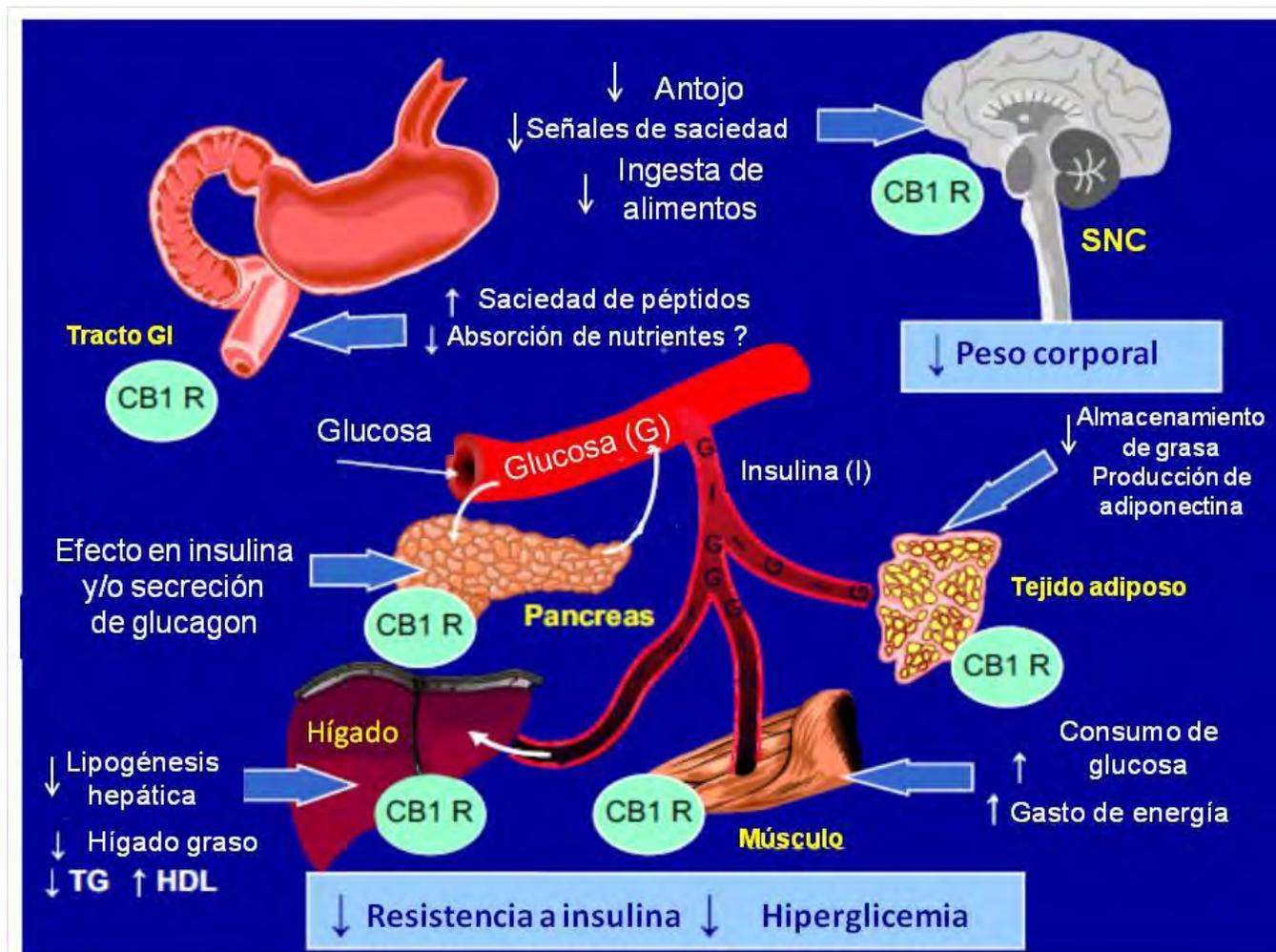


Figura 5. Mecanismo de acción de Rimonabant en obesidad y diabetes tipo 2. (Adaptación de Scheen A. *Best Prac. Res.*, 2007, 21, 535-553).

2.3. La preformulación farmacéutica en la etapa de descubrimiento de prototipos

2.3.1 Introducción a la preformulación

El proceso de descubrimiento y desarrollo racional de nuevas entidades químicas con potencial farmacéutico puede ser más eficiente si desde etapas tempranas se comienza con un proceso de preformulación. Muchas de las moléculas prototipos que son evaluadas

en estudios *in vivo* no alcanzan a presentar una respuesta favorable debido a que presentan propiedades fisicoquímicas inadecuadas para una buena biodisponibilidad. Una de estas propiedades es la pobre solubilidad acuosa (<1 mg/L). Para tratar de que estos prototipos no sean descartados, se han propuesto diversas estrategias para resolver la inconveniencia de su insolubilidad acuosa. Una de éstas es la preformulación donde su aplicación desde del descubrimiento es crucial¹⁷ debido a que ciertos problemas relacionados con la inestabilidad o la insolubilidad, causantes de una baja biodisponibilidad o ineficacia, pueden evitarse mediante la aplicación de esta estrategia.^{18,19}

Las técnicas más comunes para tratar de resolver el problema de la insolubilidad acuosa de los principios activos son el ajuste del pH, la co-solvencia, la formación de micelas y la complejación para lo cual pueden emplearse diferentes excipientes. Algunos ejemplos son: i) para la cosolvencia: etanol, glicerol, propilenglicol, PEG400, etc, ii) para la formación de micelas, los surfactantes Tween 80, Cremophor EL, etc.; iii) para la formación de complejos, las ciclodextrinas. Otras técnicas reportadas son las micelas poliméricas, emulsiones y liposomas. Dentro de este contexto, uno de los métodos comúnmente empleados para optimizar la biodisponibilidad de los fármacos que mejora su perfil de disolución es la formación de dispersiones sólidas.¹⁷

2.3.2 Dispersiones sólidas

El concepto de dispersiones sólidas fue desarrollado por Sekiguchi en 1961 para mejorar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua.²⁰ Chiou y Riegelman definen a las dispersiones sólidas como la dispersión de uno o más principios activos en una matriz o excipiente inerte, en donde los principios activos pueden estar en un estado cristalino o amorfo.²⁰

Las dispersiones sólidas finas pueden incrementar la superficie disponible mejorando la humectación y la disolución. Las diferentes formas de los fármacos en estado sólido pueden influenciar la disolución, biodisponibilidad, estabilidad y otras propiedades. La ventaja de las dispersiones sólidas es que cuando el acarreador se disuelve, el fármaco se

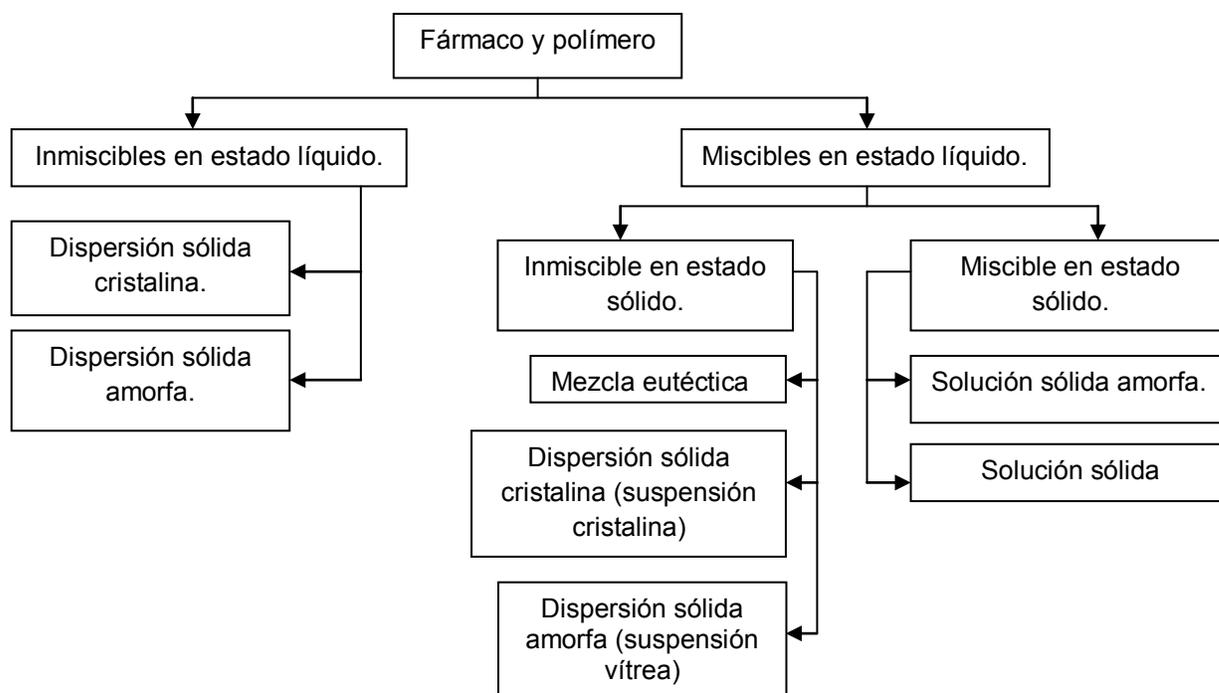
libera como partículas coloidales muy finas con un tamaño menor a 1 μm aumentando el área superficial y la velocidad de disolución; mientras que en las formulaciones convencionales la velocidad de disolución muchas veces no se ve favorecida (tamaño de partícula mayor a 5 μm).²¹

Las dispersiones sólidas pueden prepararse por tres métodos principales,²⁰ el método de fusión, el método de disolución con un disolvente orgánico y el método de fusión-disolución; existen otros que son empleados con menor frecuencia como el uso de spray-drying.²¹ El método de fusión consiste en la fundición de la mezcla del fármaco y el acarreador a una temperatura mayor que la temperatura de fusión del acarreador empleado, después se enfría y pasa por un proceso de pulverizado y tamizado. La disolución con disolventes orgánicos involucra la disolución del fármaco y acarreador en un mismo disolvente, el cual posteriormente se evapora. Finalmente, el método de fusión-disolución consiste en la disolución del fármaco en un disolvente para después incorporarse al acarreador fundido; enseguida, el disolvente empleado se retira. Este método se emplea cuando el acarreador no es soluble en el disolvente y además la adición del líquido afecta sus propiedades.²²

Las propiedades fisicoquímicas de los principios activos y de los acarreadores empleados son diferentes y por ello los métodos utilizados no permiten obtener siempre los mismos resultados, en cuanto a las características de los sólidos producidos. Por este motivo, se han clasificado los diferentes tipos de dispersiones sólidas dependiendo de la miscibilidad y el estado amorfo o cristalino (Esquema 1).

El acarreador empleado en la formación de dispersiones sólidas debe poseer ciertas características como una adecuada solubilidad acuosa (o en su defecto, poseer la capacidad de captar agua en altas proporciones), debe ser inocuo y, estable química y termodinámicamente; por otro lado, debe tener un punto de fusión relativamente bajo para poder ser empleado en el método de fusión pero si el método de elección es disolución debe ser soluble en el disolvente orgánico elegido. Además, el acarreador deberá

aumentar la solubilidad del fármaco por lo cual no deberá formar complejos de asociación muy fuertes ya que esto disminuiría la velocidad de disolución.²³



Esquema 1. Clasificación de dispersiones sólidas.

Los acarreadores que se emplean usualmente son el polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), crospovidona y polivinilpirrolidona (PVP).²⁴

2.3.3. Polivinilpirrolidona

La polivinilpirrolidona (Figura 6) —también llamada plasdon, povidona, E1201, polividona y poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno]— es un polímero sintético conformado por grupos lineales de 1-vinil-2-pirrolidona, cuyos diferentes grados de polimerización dan como resultado diferentes masas moleculares, en un rango de 2 500 a 3 000 000.²⁵

La PVP es un excipiente empleado como aglutinante en la granulación húmeda en tabletas y como solubilizante de soluciones orales. Se ha empleado desde 1940 en la industria farmacéutica como un expansor plasmático. También es empleado como agente

de recubrimiento, agente de suspensión, estabilizante y viscosante en soluciones y suspensiones tópicas y orales.^{25, 26}

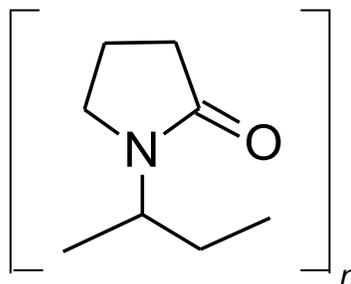


Figura 6. Estructura de la polivinpirrolidona.

La temperatura de transición vítrea (T_g) de PVP no sólo depende de la masa molar sino también de la humedad que contiene. Generalmente esta temperatura es alta por lo que su aplicación en la preparación de dispersiones sólidas por el método de fusión es limitada. Por otra parte, posee una buena solubilidad en una gran variedad de disolventes orgánicos, por tal motivo es muy utilizada para preparar dispersiones sólidas por el método de disolventes.²⁷

El consumo de PVP por vía oral se considera no tóxico pues no se absorbe en el tracto gastrointestinal ni en las mucosas, no es irritante para la piel y no causa sensibilización. Sin embargo, cuando se administran formulaciones por vía intramuscular se presenta la formación de granulomas subcutáneos y puede acumularse en los órganos del cuerpo después de una inyección por la misma vía.²⁵

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome metabólico es actualmente un grave problema de salud pública en nuestro país y a nivel mundial. Por los factores de riesgo que lo constituyen, sería conveniente contar con moléculas que aminoraran o desaparecieran la presencia de los mismos. Dado que los derivados del 1,5-diarilpirazol, catalogados como agentes antiobesidad, por el efecto antagonistas a los receptores canabinoides que ocasiona la inhibición del apetito, presentan como reacción colateral la disminución de glucosa sanguínea, ¿existe la posibilidad de que mediante modificaciones en su estructura se pueda favorecer este tipo de acción biológica, rebasando el inconveniente de la hidrofobicidad mediante algún sistema de preformulación para su administración por vía oral?

4. HIPÓTESIS

Si se modifican las porciones arílicas del 1,5-diarilpirazol se tendrán moléculas con mayor actividad hipoglucémica cuando sean administradas por vía oral como tales o preformulados en forma de dispersión sólida con polivinilpirrolidona.

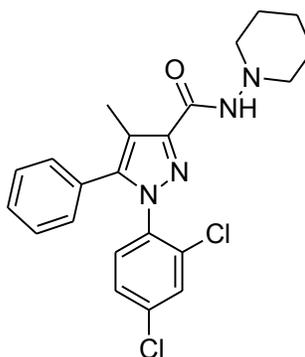
5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

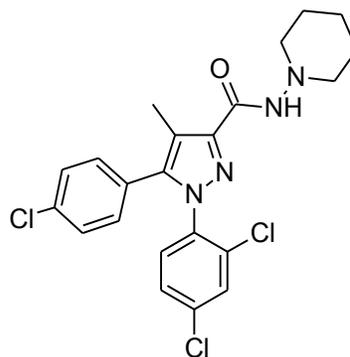
Sintetizar tres moléculas derivadas del 1,5-diarilpirazol como agentes de acción hipoglucemiante.

5.2 Objetivos particulares.

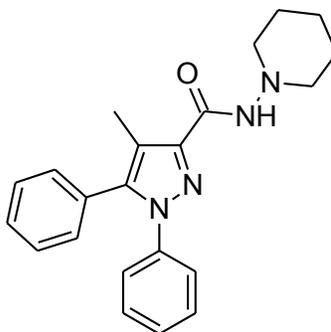
- Sintetizar las siguientes moléculas:



1-(2,4-diclorofenil)-5-fenil-4-metil- *N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazol-3-carboxamida **(1)**



5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil- *N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazol-3-carboxamida **(2)**



1,5-difenil-4-metil- *N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**3**)

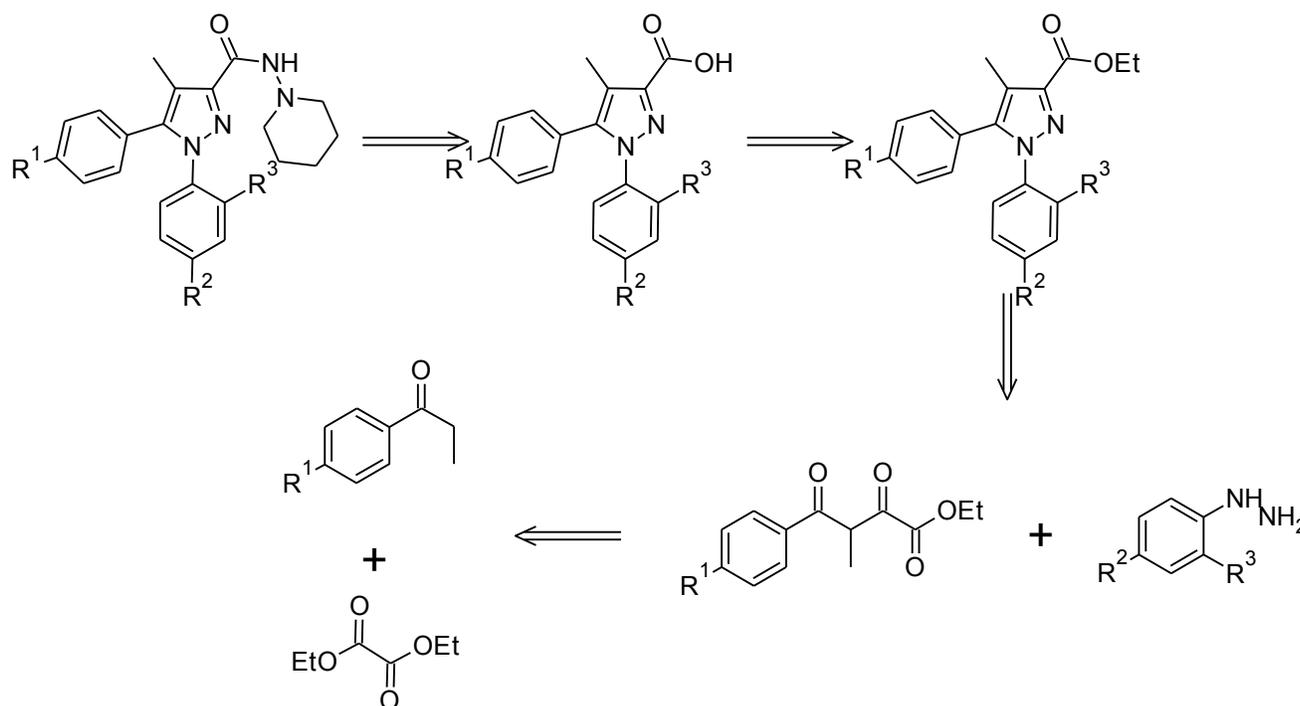
- Caracterizar por métodos espectrométricos y espectroscópicos la estructura de las moléculas sintetizadas.
- Realizar dispersiones sólidas de los compuestos **1**, **2** y **3** empleando polivinilpirrolidona como acarreador.
- Registrar las microscopías electrónicas de barrido de las dispersiones sólidas obtenidas.
- Enviar a evaluación biológica los tres compuestos sintetizados y sus preformulaciones correspondientes.

6. METODOLOGÍA

La metodología se divide en tres apartados generales: el primero comprende la parte química, donde se presenta la síntesis de los tres productos propuestos; el segundo apartado describe la preformulación mediante la preparación de dispersiones sólidas de las moléculas sintetizadas y el tercero indica brevemente el modelo empleado en la evaluación biológica.

6.1 Parte química.

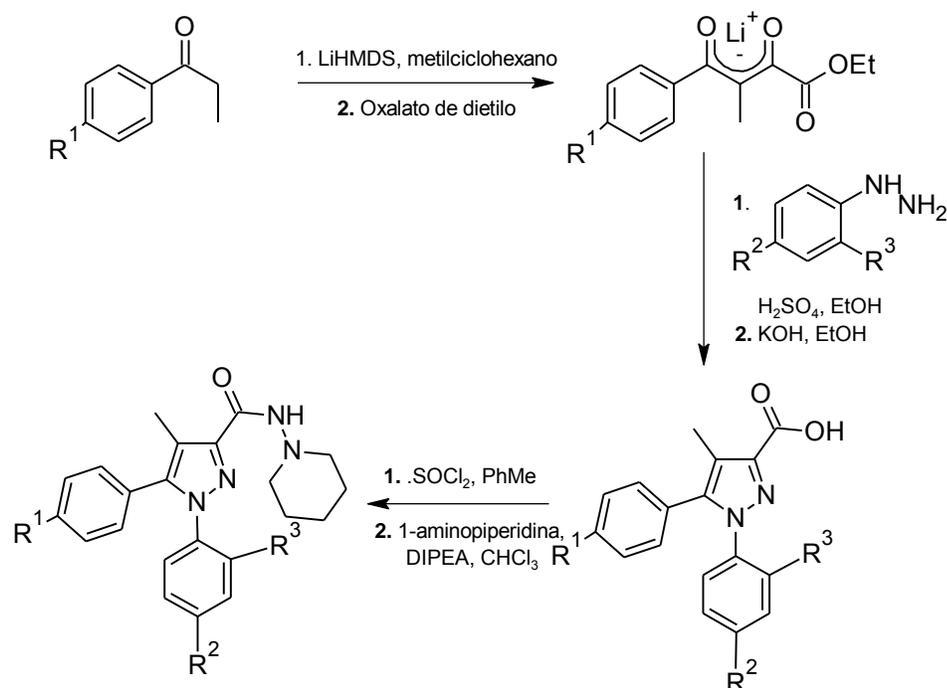
En esta sección, se describe la metodología seguida para la síntesis de los derivados del 1,5-difenilpirazol. En el análisis retrosintético (Esquema 2), los productos finales se obtienen a través del acoplamiento del derivado del ácido 1,5-diaril-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico y 1-aminopiperidina. El precursor del ácido antes mencionado será su correspondiente éster etílico. Este último se obtendrá de la reacción entre la fenilhidrazina, sustituida o no con átomos de cloro, y el derivado del 3-metil-2,4-dioxo-4-fenilbutanoato de etilo (compuesto tricarbonílico mostrado en el Esquema 2). El compuesto tricarbonílico será el producto de la reacción del enolato del derivado de propiofenona y oxalato de dietilo.



Esquema 2. Análisis retrosintético para la obtención de los productos propuestos.

Con el análisis retrosintético establecido, se prosiguió con el desarrollo de los procedimientos, presentándose de manera general la síntesis de los tres derivados 1,5-diaril-1*H*-pirazólicos. En el Apéndice I se describen de forma detallada los procedimientos implementados.

La ruta sintética general para la obtención de **1**, **2** y **3**, se muestra en el Esquema 3.

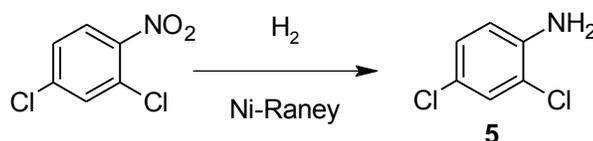


	Compuesto		
	1	2	3
R^1	H	Cl	H
R^2	Cl	Cl	H
R^3	Cl	Cl	H

Esquema 3. Ruta sintética general para **1**, **2** y **3**.

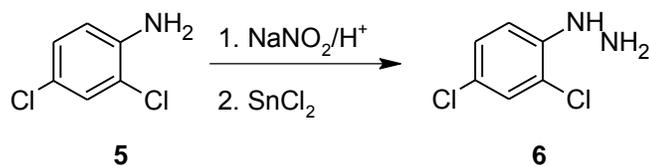
6.1.1 Síntesis del 1-(2,4-diclorofenil)-5-fenil-4-metil-N-piperidin-1-il-1H-pirazol-3-carboxamida (1)

El paso inicial fue la obtención de la 2,4-diclorofenilhidrazina (**6**), a partir de la reducción del 2,4-dicloronitrobenceno para obtener la 2,4-dicloroanilina (**5**) (Esquema 4).



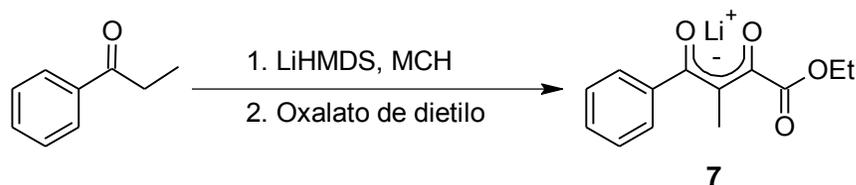
Esquema 4. Reducción catalítica del 2,4-dicloronitrobenceno.

Como lo muestra el Esquema 5, el compuesto **6** se obtuvo mediante la formación de la sal de diazonio y una reducción posterior. El compuesto **5** se hizo reaccionar con NaNO_2 en condiciones ácidas y después se realizó una reducción química con $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en medio ácido, consiguiendo la formación de la fenilhidrazina correspondiente.



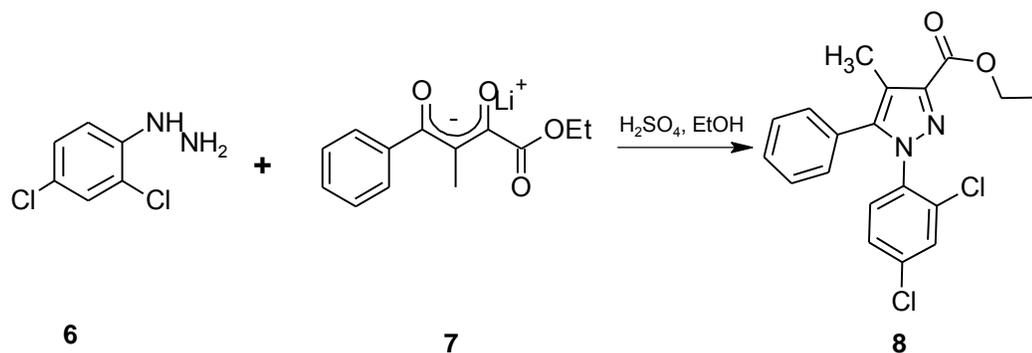
Esquema 5. Formación de 2,4-diclorofenilhidrazina.

Por otro lado, la obtención del compuesto tricarbónico se inició con la preparación de la sal de litio del 4-fenil-3-metil-2,4-dioxobutanoato de etilo, la cual se señala en el Esquema 6. La sal mencionada se generó del enolato de propiofenona por medio del tratamiento con la base *bis*(trimetil)sililamiduro de litio (LiHMDS) en metilciclohexano (MCH) y después se realizó el ataque nucleofílico del enolato formado al oxalato de dietilo para generar el derivado tricarbónico (**7**).



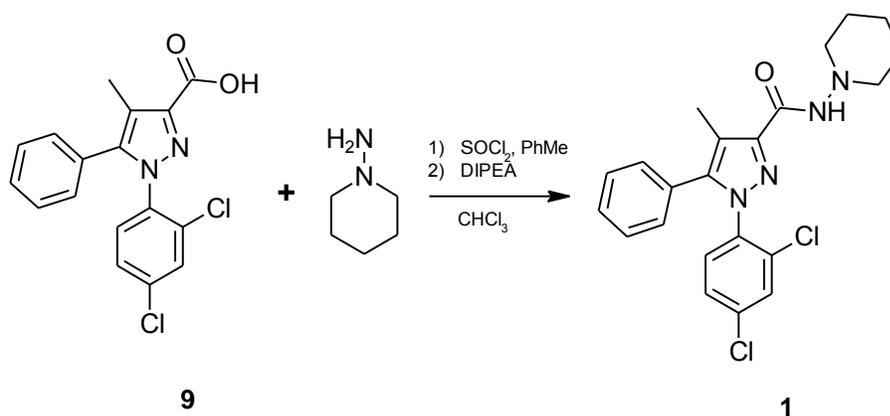
Esquema 6. Obtención de sal de litio del 4-fenil-3-metil-2,4-dioxobutanoato de etilo.

La formación del anillo pirazólico se llevó a cabo mediante la ciclocondensación de los dos precursores obtenidos en los pasos anteriores. Para ello, se hizo reaccionar el compuesto **6** con el compuesto **7** en condiciones de reflujo y catálisis ácida. (Esquema 7).



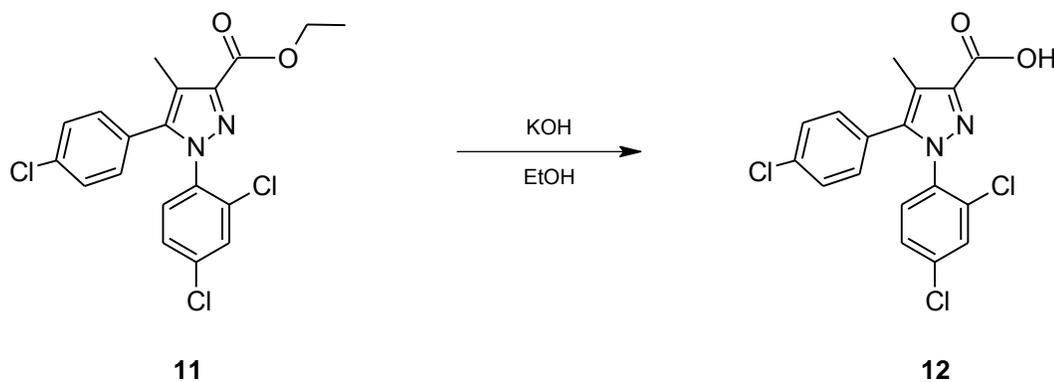
Esquema 7. Formación del anillo de 1*H*-pirazol.

El compuesto **8** fue sometido a una hidrólisis alcalina con KOH para formar el ácido 1-(2,4-diclorofenil)-5-fenil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (**9**). Este último, se trató con SOCl₂ para obtener el cloruro de ácido correspondiente. Finalmente, se agregó 1-aminopiperidina y diisopropiletilamina (DIPEA) en CHCl₃ para conseguir la formación del compuesto **1** (Esquema 8).



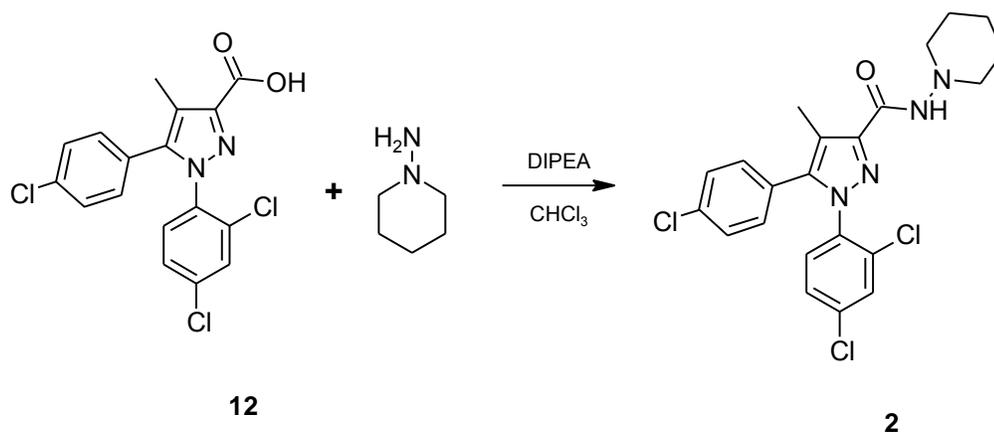
Esquema 8. Obtención del compuesto **1**.

Posteriormente, se realizó la hidrólisis con KOH de acuerdo al Esquema 11 para obtener el ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (**12**).



Esquema 11. Hidrólisis básica del compuesto **11**.

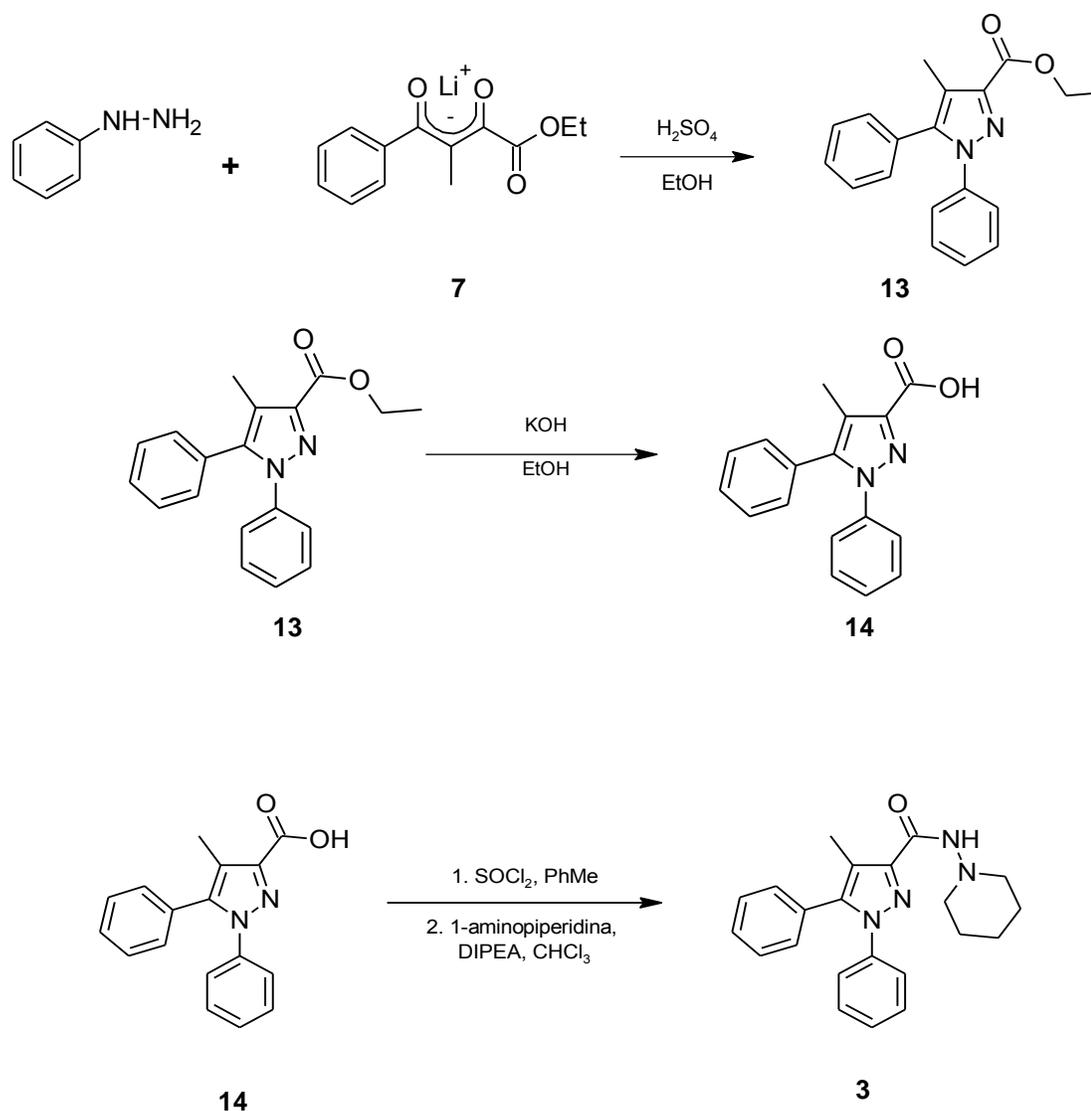
Finalmente para obtener el compuesto **2** el intermediario se trató de la misma manera que el compuesto **1** como se muestra en el Esquema 12.



Esquema 12. Obtención del compuesto **2**.

6.1.3 Síntesis del 1,5-difenil-4-metil- *N*-(piperidin-1-il)-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**3**)

El compuesto **3** carece de átomos de cloro en los grupos fenilo unidos al anillo pirazólico, por ello, para realizar su síntesis, la sal de litio se obtuvo empleando propiofenona y posteriormente se llevó a cabo la reacción con fenilhidrazina, en las mismas condiciones ya descritas previamente. Este compuesto se trató con KOH y se obtuvo el ácido 1,5-difenil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (**13**), a partir del cual se sintetizó el cloruro de ácido correspondiente para finalmente tratarse con 1-aminopiperidina y DIPEA en CHCl₃, para obtener la 1,5-difenil-4-metil-*N*-piperidin-1-il-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**3**) (Esquema 13).



Esquema 13. Obtención del compuesto **3**.

6.2 Preformulación.

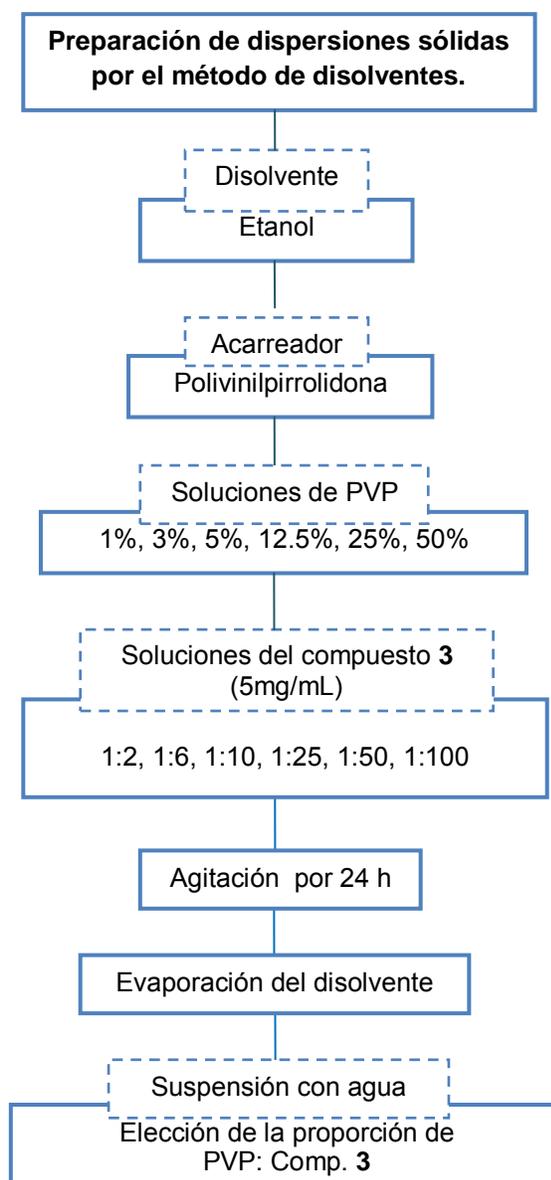
En esta sección se explica de forma general como se prepararon las dispersiones sólidas de los compuestos **1**, **2** y **3**. En el Apéndice I se encuentra la descripción detallada de la metodología empleada.

6.2.1 Dispersiones sólidas con polivinilpirrolidona.

Para la preparación de las dispersiones sólidas se empleó el método de disolventes el cual, como ya se había descrito, consiste en la mezcla del acarreador y el fármaco a evaluar en un disolvente en el cual ambos sean solubles; la mezcla se agita durante un tiempo considerable y posteriormente el disolvente se elimina por algún método que lo permita. En este caso el disolvente de elección fue etanol ya que en él son solubles los tres compuestos sintetizados y también la polivinilpirrolidona.

Para encontrar la relación adecuada del fármaco:acarreador fue necesario realizar pequeñas pruebas variando la cantidad de polivinilpirrolidona en relación al compuesto **3** elegido para tal propósito.

Las pruebas se iniciaron con la preparación de seis soluciones porcentuales de PVP en etanol (1%, 3%, 5%, 12.5%, 25% y 50%), después con cada una de ellas se realizaron soluciones con el compuesto **3**, todas con una concentración de 5 mg/mL, de esta manera la proporción del compuesto con el polímero en relación masa:masa fue de 1:2, 1:6, 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100 respectivamente. Estas soluciones se agitaron alrededor de 24h, posteriormente se eliminó el disolvente por evaporación. El siguiente paso fue la suspensión de cada dispersión en agua para observar las características y comportamiento de cada una de ellas y así elegir la mejor (los resultados se muestran en la sección correspondiente). El Esquema 14 muestra de forma general el proceso ya mencionado.



Esquema 14. Preparación de pruebas preliminares de dispersiones sólidas.

Con las pruebas del compuesto **3** realizadas y optimizadas, se realizaron las dispersiones sólidas del compuesto **1**, **2** y **3** en mayor cantidad obteniendo los sólidos de dispersión **POV 1**, **POV 2** y **POV 3** respectivamente, se utilizó el mismo método, usando PVP al 5% y la evaporación del disolvente se realizó con presión reducida. En el Apéndice I se encuentran los detalles de la preparación de cada uno y de las técnicas de caracterización puesto que a los tres compuestos se les realizaron estudios de IR y DSC.

Adicional a lo anterior, se realizó la microscopía electrónica de barrido del compuesto **2** y su respectiva dispersión sólida (**POV 2**) en comparación con la PVP y la mezcla física, para ello se enviaron las muestras en estado sólido al laboratorio de microscopía de la Facultad de Química en donde el Ing. Q. Iván Puente Lee realizó la preparación de la muestra cubriendo cada sólido con una fina capa de oro para poder obtener las imágenes por medio de la incidencia de electrones.

6.3 Evaluación biológica.

La evaluación biológica de los 3 compuestos sintetizados así como de las dispersiones sólidas preparadas, se llevó a cabo por el Dr. Samuel Enoch Estrada Soto en la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) usando un modelo de diabetes que brinda información sobre el síndrome metabólico.

En este modelo se emplean ratas Wistar macho de 200-250 g a las cuales se les induce la diabetes mellitus tipo 2 por medio de la administración intraperitoneal de 110 mg/Kg de nicotidamina en solución fisiológica, y 15 minutos después 65 mg/Kg de estreptozotocina disuelta en buffer de citratos con pH de 4.5. La hiperglucemia se confirma 72 horas después de la administración, por la presencia de glucosa elevada en sangre mayor a 250 mg/dL, se utiliza glibenclamida como fármaco hipoglucemiante de referencia y agua destilada como vehículo, las muestras de sangre se recolectan a las 0, 1, 3, 5 y 7 horas después de la administración de los compuestos y del vehículo. La concentración de glucosa en sangre se obtiene por el método enzimático de glucosa oxidasa, usando un glucómetro comercial. Los resultados de la variación de la glucemia (%) se obtienen empleando la siguiente relación: $[(G_x - G_0)/G_0] \times 100$, en donde G_0 es el valor de glucemia inicial (0 horas) y G_x el valor en las horas posteriores. ²⁷

7. RESULTADOS

En esta sección, se mencionan los resultados correspondientes a la síntesis de las moléculas y su caracterización mediante el empleo de técnicas espectrométricas y espectroscópicas convencionales; así mismo, se anexan los resultados generales que se obtuvieron con la preformulación de los compuestos **1**, **2** y **3**; y finalmente, la evaluación de la actividad hipoglucémica de los compuestos (preformulados y no preformulados) en un modelo *in vivo* de diabetes mellitus tipo II. En el Apéndice II se encuentran los espectros de las diferentes técnicas utilizadas para la caracterización de los compuestos finales y las dispersiones sólidas.

7.1 Parte Química

Para la obtención de las moléculas objetivo, se siguió la ruta sintética propuesta en el Esquema 3. Los detalles del procedimiento se presentan en el Apéndice I.

La Tabla 2 muestra las propiedades físicas (punto de fusión, factor de retención y aspecto físico) y el rendimiento de los productos finales e intermediarios aislados. Como se aprecia, los rendimientos en el último paso de la síntesis fueron de regulares a buenos (37 a 80 %), generando así los pirazoles **1–3** como sólidos con punto de fusión estrecho.

Para la corroboración de la estructura química propuesta de las moléculas, se utilizaron técnicas analíticas espectroscópicas (IR, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN) y espectrométricas (EMFAB, EMIE) convencionales. En la Tabla 3 se encuentran los valores de la espectrometría de masas de los espectros 1–3 ubicados en el Apéndice II y que corresponden a los carboxilatos de etilo; moléculas producto de la formación del pirazol. Los valores de los tres intermediarios claves que se aislaron y purificaron se presentan en la Tabla 4. La Tabla 5 resume los valores de las técnicas antes mencionadas en la caracterización de los compuestos **1–3**, donde en espectrometría de masas se identificó el ion molecular y patrón isotópico; las principales bandas presentes en el espectro de infrarrojo y los desplazamientos químicos, multiplicidad e integración de los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. En la discusión de Resultados se puede encontrar la interpretación detallada que llevó a la elucidación estructural.

Tabla 2. Constantes físicas y rendimiento de los intermediarios y compuestos finales.

Compuesto	Rendimiento (%)	p.f. (°C)	R _f	Aspecto
1	37	190.1-190.3	0.33 Sistema B	Sólido blanco
2	72	149-150	0.58 Sistema A	Sólido crema
3	80	188-189	0.47 Sistema A	Sólido crema
9	67.2	189.2-190.7	0.16 Sistema B	Sólido café
12	75.4	207.7-209.6	0.14 Sistema B	Sólido rojizo
14	82	220- 223	0.15 Sistema B	Sólido café

Tabla 3. Datos espectrométricos de los carboxilatos de etilo.

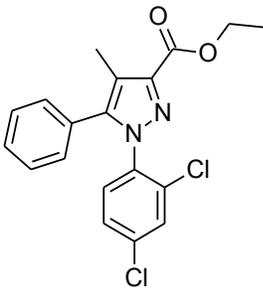
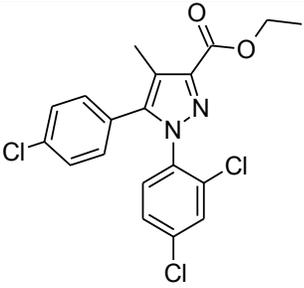
Compuesto	Datos espectrométricos.
 <p>5-fenil-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carboxilato de etilo (8) MM: 375.25 g/mol</p>	<p>Espectro 1. EM [IE] m/z: 374 (M⁺), 376 (M+2)⁺.</p>
 <p>5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carboxilato de etilo (11) MM: 409.7 g/mol</p>	<p>Espectro 2. EM [IE] m/z: 410 (M⁺), 412 (M+2)⁺.</p>

Tabla 3. Datos espectrométricos de los carboxilatos de etilo. (Continuación)

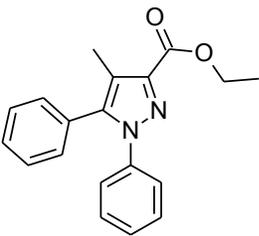
 <p>1,5-difenil-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carboxilato de etilo (13) MM: 306.4 g/mol</p>	<p>Espectro 3. EM [FAB (+)]m/z: 307 (M+1)⁺.</p>
--	---

Tabla 4. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los intermediarios claves.

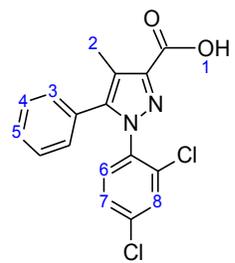
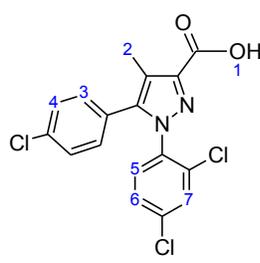
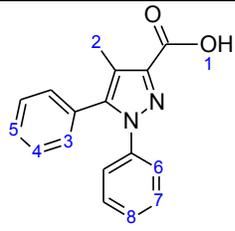
Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos
 <p>Ácido 5-fenil-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carboxílico (9). MM: 347.2 g/mol</p>	<p>Espectro 4. EM [FAB (+)] m/z: 349 (M+1)⁺, 350 (M+2)⁺.</p> <p>Espectro 5. RMN-¹H (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm) 2.218 (s, 3H, H₂), 7.181-7.213 (m, 2H, H₄), 7.332-7.402 (m, 3H, H₃ y H₅), 7.545 (dd, 1H, H₇, J=2.2, 8.5 Hz), 7.7605 (d, 1H, H₆, J=2.3 Hz), 12.915 (bs, 1H, H₁).</p>
 <p>Ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carboxílico (12). MM: 381.6 g/mol</p>	<p>Espectro 6. EM [FAB (+)] m/z: 383 (M+1)⁺, 384 (M+2)⁺.</p> <p>Espectro 7. RMN-¹H (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm) 2.209 (s, 3H, H₂), 7.214 (d, 2H, H₄, J=6.3 Hz), 7.443 (d, 2H, H₃, J=6.3 Hz), 7.559 (dd, 1H, H₆, J=1.8, 6.6 Hz), 7.765 (d, 1H, H₇, J=1.5 Hz), 7.694 (d, 1H, H₅, J=6.3 Hz).</p>
 <p>Ácido 1,5-difenil-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carboxílico (14). MM: 278.3 g/mol</p>	<p>Espectro 8. EM [FAB (+)] m/z: 279 (M+1)⁺.</p> <p>Espectro 9. RMN-¹H (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm) 2.188 (s, 1H, H₂), 7.166-7.184 (m, 2H, H₄), 7.198-7.213 (m, 2H, H₇), 7.280-7.335 (m, 3H, H_{3y5}), 7.363-7.403 (m, 3H, H_{6y8}).</p>

Tabla 5. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos finales.

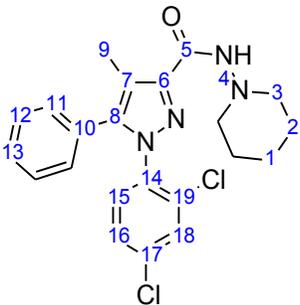
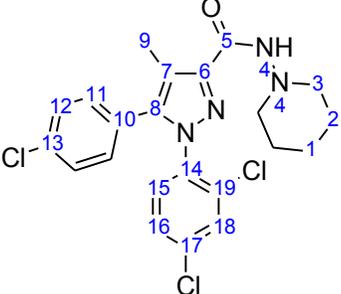
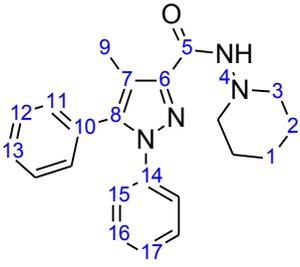
Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos.
 <p data-bbox="251 682 771 745">1-(2,4-diclorofenil)-5-fenil-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carboxamida (1)</p> <p data-bbox="406 766 609 798">MM: 429.3 g/mol</p>	<p data-bbox="803 304 1404 367">Espectro 10. EM [FAB (+)] m/z: 429 (M+1)⁺, 431 (M+2)⁺.</p> <p data-bbox="803 388 1421 577">Espectro 11. RMN-¹H (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm) 1.320 (bs, 2H, H₁), 1.56 (qu, 4H, H₂, J=6 Hz), 2.20 (s, 3H, H₉), 2.76 (t, 4H, H₃, J=5.6 Hz), 7.17-7.20 (m, 2H, H₁₂), 7.31-7.38 (m, 3H, H₁₁ y ₁₃), 7.54 (dd, 1H, H₁₆, J=2.4, 8.8 Hz), 7.71 (d, 2H, H₁₅, J=8.8 Hz), 7.72 (s, 1H, H₁₈), 9.02 (s, 1H, H₄).</p> <p data-bbox="803 598 1421 819">Espectro 12. RMN-¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm) 9.565 (C-9), 23.459 (C-1), 25.808 (C-2), 55.741 (C-3), 116.637 (C-7), 128.606 (C-16), 128.784 (C-13), 128.98 (C-11), 129.219 (C-10), 129.875 (C-12), 129.905 (C-15), 132.486 (C-18), 132.713 (C-19), 135.324 (C-14), 136.445 (C-17), 144.002 (C-8), 144.841 (C-6), 159.88 (C-5).</p> <p data-bbox="803 850 1421 976">Espectro 13. IR (KBr, cm⁻¹) γ: 3289.56 (-C=O-NH₂-), 3061.87 (Ph), 2939.80, 1455.14, 1381.39 (-CH₃), 2925.38, 2858.87 (-CH₂-), 1658.93 (-C=O), 1501.45 (-NH₂)</p>
 <p data-bbox="292 1365 730 1449">5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-N-(piperidin-1-il)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (2)</p> <p data-bbox="406 1480 609 1512">MM: 463.8 g/mol</p>	<p data-bbox="803 1018 1421 1081">Espectro 14. EM [FAB (+)] m/z: 465 (M⁺), 465 (M+2)⁺.</p> <p data-bbox="803 1102 1421 1291">Espectro 15. RMN-¹H (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm) 1.33 (bs, 2H, H₁), 1.57 (q, 4H, H₂, J=5.6 Hz), 2.20 (s, 3H, H₉), 2.78 (t, 4H, H₃, J=5.2 Hz), 7.21 (d, 2H, H₁₁, J=8.4 Hz), 7.44 (d, 2H, H₁₂, J=8.4 Hz), 7.56 (dd, 1H, H₁₆, J=8.4, 2.1 Hz), 7.74 (d, 1H, H₁₅, J= 8.4 Hz), 7.74 (d, 1H, H₁₈, J= 2.4 Hz), 9.14 (s, 1H, H₄).</p> <p data-bbox="803 1312 1421 1533">Espectro 16. RMN-¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm) 11.659 (C-9), 25.614 (C-1), 27.966 (C-2), 57.862 (C-3), 119.140 (C-7), 129.827 (C-10), 130.895 (C-16), 131.322 (C-12), 132.145 (C-15), 133.884 (C-11), 134.624 (C-18), 134.672 (C-19), 136.313 (C-13), 137.624 (C-14), 138.334 (C-17), 144.945 (C-8), 147.061(C-6), 161.910 (C-5)</p> <p data-bbox="803 1564 1421 1659">Espectro 17. IR (KBr, cm⁻¹) γ: 3383.52 (-C=O-NH₂-), 3077.63 (Ph), 2936.09, 1383.85 (-CH₃), 2853.98 (-CH₂-), 1656.25 (-C=O), 1496.06 (-NH-).</p>

Tabla 5. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos finales. (Continuación)

Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos.
 <p>1,5-difenil-<i>N</i>-(piperidin-1-il)-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carboxamida (3)</p> <p>MM: 360.5 g/mol</p>	<p>Espectro 18. EM [FAB (+)] <i>m/z</i>: 361M⁺ (100%), 362 (M+1)</p> <p>Espectro 19. RMN-¹H (CHCl₃-<i>d</i>₆, δ ppm) 1.441 (q, 2H, H₁, J=6 Hz), 1.763 (q, 4H, H₂, J=5.6 Hz) 2.362 (s, 3H, H₉), 2.895 (T, 4H, H₃, J=5.2 Hz), 7.131-7.155 (m, 2H, H₁₂), 7.203-7.235 (m, 3H, H₁₅), 7.269-7.299 (m, 3H, H₁₁ y ₁₃), 7.328-7.352 (m, 3H, H₁₅ y ₁₇), 7.818 (s, 1H, H₄)</p> <p>Espectro 20. RMN-¹³C (DMSO-<i>d</i>₆, δ ppm) 9.303 (C-9), 23.350 (C-1), 25.442 (C-2), 57.053 (C-3), 118.964 (C-7), 124.984 (C-15), 127.647 (C-13), 128.445 (C-17), 128.511 (C-16), 128.831 (C-11), 129.610 (C-10), 129.988 (C-12), 139.565 (C-14), 142.182 (C-8), 143.468 (C-6), 160.371 (C-5)</p> <p>Espectro 21. IR (KBr, cm⁻¹) γ: 3321.71 (-C=O-NH₂-), 3064.47 (Ph), 2940.61, 1382.12 (-CH₃), 2850.81, 1473.54 (-CH₂-), 1685.17 (-C=O), 1499.91 (-NH-)</p>

7.2 Preformulación

Debido a la naturaleza lipofílica de los compuestos sintetizados, se prepararon las dispersiones sólidas (DS) siguiendo el método de disolventes. En esta sección, se describen de manera general los resultados de las pruebas preliminares de la elección del acarreador, así como de la elección de la proporción compuesto/acarreador utilizando el compuesto **3**. Adicionalmente, se proporcionan dos tablas con las características generales de las dispersiones sólidas.

En las pruebas preliminares para la elección del acarreador de las dispersiones sólidas de los compuestos sintetizados, se consideraron al quitosán y la polivinilpirrolidona (PVP). El quitosán es un excipiente que se ha utilizado en la administración de fármacos relacionados con el tratamiento de obesidad y diabetes; sin embargo, no es empleado comúnmente en la preparación de dispersiones sólidas, ya que es soluble solamente en medios ácidos (pH < 2) e insoluble en disolventes orgánicos. Con la intención de utilizar este excipiente, se decidió aprovechar su favorable solubilidad en soluciones ácidas para disolverlo en una solución etanólica de ácido cítrico o glicina o *N*-acetil-L-cisteína, sin éxito alguno. Por lo anterior, se descartó su uso en este proyecto de tesis.

Por otro lado, a diferencia del quitosán, la povidona (PVP) es un polímero con una excelente solubilidad en etanol. Comercialmente se disponen de PVP con varios valores de masa molecular (MM) con diferentes viscosidades. Para llevar a cabo la preformulación fue necesario realizar estudios previos con el propósito de identificar la concentración de PVP más adecuada para conseguir una mejora de la solubilidad mediante suspensiones que pudieran incrementar la absorción de los compuestos en estudio y con ello incrementar los efectos farmacológicos. Los mejores resultados se obtuvieron con la solución al 3% y al 5% de PVP, eligiendo la solución al 5% por sus características cualitativas y por tener una mayor cantidad de acarreador.

Con base en los estudios previos, se generaron dispersiones sólidas de los compuestos **1**, **2** y **3** con PVP al 5%. Las dispersiones sólidas formaron suspensiones estables durante varias horas, en comparación de los compuestos sin preformulación, en cuyo caso se observó precipitación y escasa solubilidad.

La Tabla 6 muestra el rendimiento obtenido y la descripción física de las dispersiones sólidas generadas; además, se resumen las proporciones utilizadas para la preparación de las dispersiones sólidas (elección realizada con base en los estudios antes descritos).

Tabla 6. Rendimiento y aspecto físico de las dispersiones sólidas.

Compuesto	Rendimiento	Aspecto	Proporción compuesto/PVP (m/m)
POV 1	99.5%	Sólido amarillento con aspecto cristalino brillante	1:7.5
POV 2	99.6%	Sólido crema con aspecto cristalino brillante	1:7.7
POV 3	99.5%	Sólido amarillento con aspecto cristalino brillante	1:7.5

La caracterización de los sólidos de dispersión se realizó mediante técnicas como IR y calorimetría diferencial de barrido (DSC), con la finalidad de observar los cambios en las moléculas y conocer el carácter cristalino o amorfo de las dispersiones realizadas. Evidentemente, la apariencia microscópica del compuesto formulado debe ser considerablemente diferente al arreglo en estado sólido del compuesto sin preformular; es

por ello que se empleó la microscopía electrónica de barrido con intención de observar y analizar las diferencias a nivel microscópico. La Figura 7 corresponde a los resultados del estudio, los cuales se analizan y detallan en la Discusión de Resultados al igual que la información proporcionada por la DSC e IR.

7.3 Evaluación biológica.

En este apartado se presentan los resultados de la evaluación biológica de **1–3** y su correspondiente preformulación.

El modelo empleado, evalúa la capacidad de las moléculas para disminuir la hiperglucemia inducida con estreptozotocina y nicotinamida (modelo de diabetes mellitus tipo II) en ratas Wistar.

El vehículo se utilizó como control negativo, mientras que la Glibenclamida, sulfonilurea con actividad hipoglucémica, se tomó como control positivo. La dosis empleada fue 50 mg/Kg de peso. Con fines comparativos, se muestra el porcentaje de la disminución de los compuestos con y sin preformulación (Gráficas 1, 2 y 3). En las gráficas también se incluye la evaluación de la PVP, la cual se realizó para conocer si esta poseía algún efecto farmacológico relacionado con el metabolismo de glucosa, que pudiera reflejarse en este modelo. Como se observa en todas las gráficas, el polímero no presentó ninguna actividad en el modelo de diabetes mellitus tipo II.

En la Gráfica 1 se observa que no hay efecto hipoglucemiante del compuesto **1** sin preformular y tampoco preformulado, de hecho no se observa mejora alguna de la dispersión sólida, ya que el comportamiento de ésta es similar al del vehículo empleado.

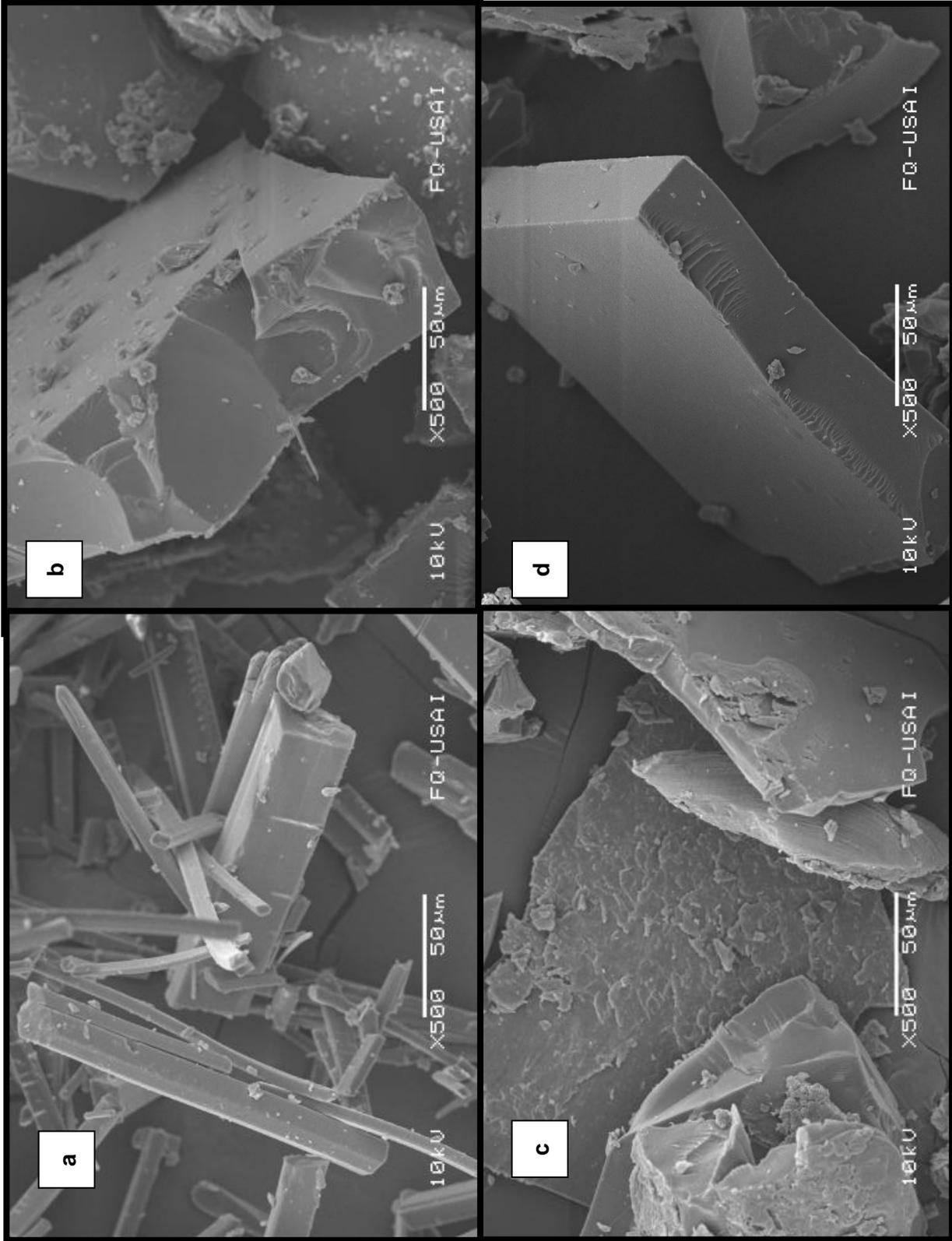
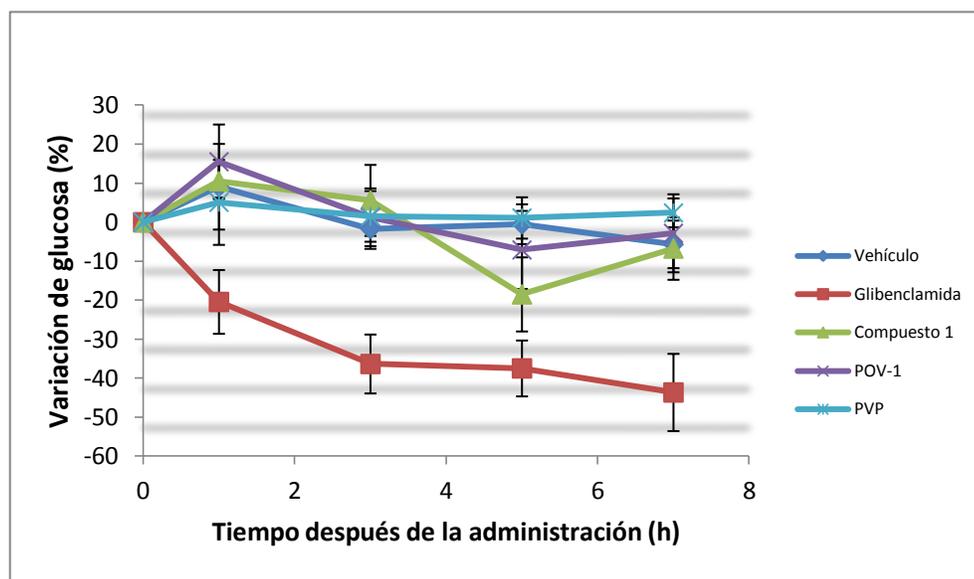


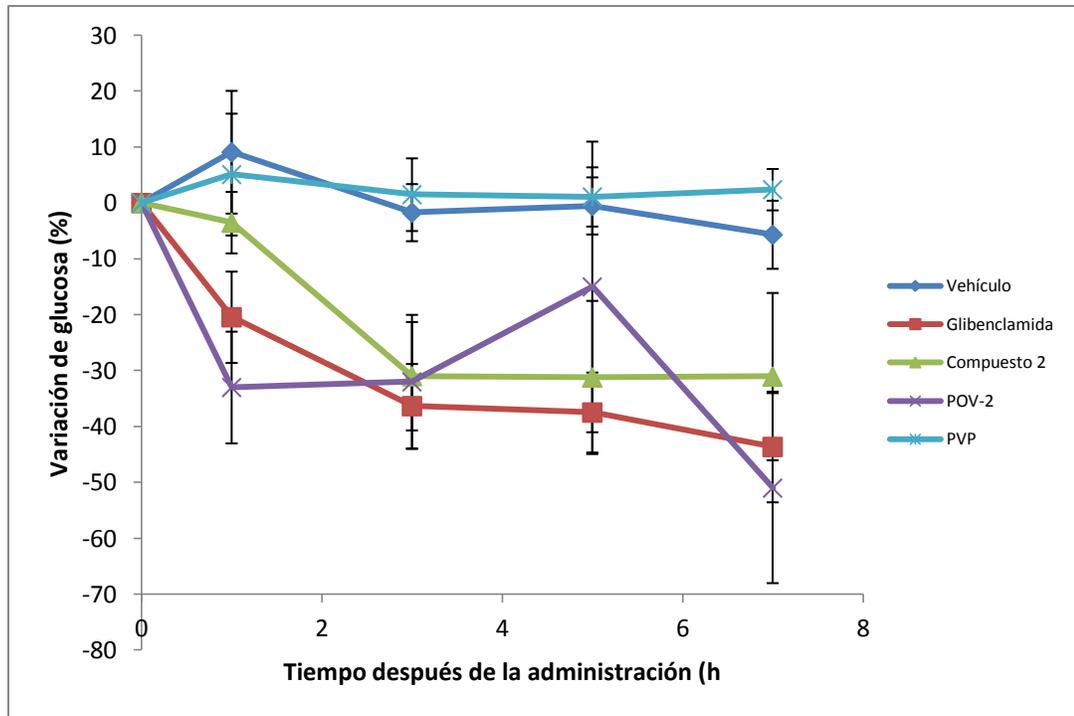
Figura 7. Microscopía electrónica. a) Compuesto 2 b) Mezcla Física c) **POV 2** d) PVP tratada.

El compuesto **2** si presentó actividad hipoglucémica significativa, se observa un efecto sostenido a partir de la tercera hora de administración; a su vez se percibe un efecto favorable de la dispersión sólida correspondiente desde la primera hora de estudio. Sin embargo, en la hora cinco, existe una inversión en el comportamiento.

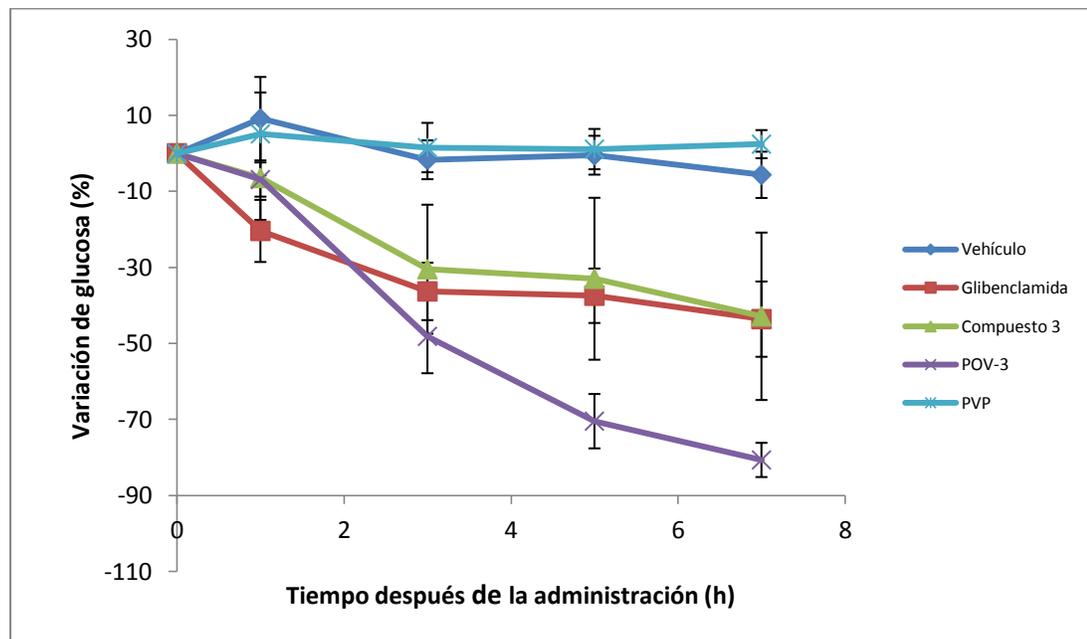


Gráfica 1. Resultados de evaluación biológica del Compuesto 1 y su correspondiente dispersión sólida (**POV 1**), en comparación con Glibenclamida.

En el caso del compuesto **3**, se aprecia que posee un efecto hipoglucémico similar al control positivo y en el último punto de la evaluación (hora siete) alcanza los mismos valores de disminución. Por su parte, la dispersión sólida de este compuesto mejoró de manera significativa el efecto farmacológico, desde la segunda hora de evaluación presenta casi el doble de efecto en la disminución en comparación con el compuesto sin preformular y en menor forma con la glibenclamida, situación que se mantuvo hasta la última hora del estudio.



Gráfica 2. Resultados de evaluación biológica del Compuesto 2 y su correspondiente dispersión sólida (POV 2), en comparación con Glibenclamida.



Gráfica 3. Resultados de evaluación biológica del Compuesto 3 y su correspondiente dispersión sólida (POV 3), en comparación con Glibenclamida.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El síndrome metabólico es una pandemia con grandes repercusiones sociales, económicas y psicológicas¹, que ha llamado el interés científico de una enorme cantidad de grupos de investigación. En esta sección, dividida en tres apartados, se analizan los resultados obtenidos durante el presente proyecto de investigación.

8.1 Parte química

8.1.1 Síntesis

Los compuestos **1**, **2** y **3** son análogos estructurales que sólo poseen diferencias en el patrón de sustitución de los átomos de cloro presentes en los anillos aromáticos de la molécula, lo cual permitió analizar la influencia de éstos en la actividad biológica. La ruta sintética para esos tres compuestos es la misma (Esquema 2) y se detalla a continuación.

La reducción del grupo nitro del 2,4-dicloronitrobenceno, en presencia de cantidades catalíticas de Niquel-Raney permitió obtener la 2,4-dicloroanilina con un alto rendimiento (99.8%) la cual se utilizó para la síntesis de los compuestos **1** y **2**; el monitoreo de la conversión del 2,4-dicloronitrobenceno se realizó únicamente por cromatografía en capa fina observándose una conversión total de la materia prima. La posterior obtención de la 2,4-diclorofenilhidrazina es un procedimiento que debe optimizarse debido a que el rendimiento fue bajo, principalmente por el tratamiento empleado para la reducción con $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Para obtener los compuestos tricarbonílicos; 4-fenil-3-metil-2,4-dioxobutanoato de etilo (**7**) y 4-(4-clorofenil)-3-metil-2,4-dioxobutanoato de etilo (**10**), necesarios para la formación del anillo heterocíclico de pirazol, se realizó una reacción aldólica empleando *bis*(trimetil)sililamiduro de litio. Esta base tiene la fuerza suficiente para formar al ion enolato de la propiofenona y así reaccionar con el oxalato de dietilo, mediante una reacción de ataque al grupo carbonilo.

La formación de los ésteres etílicos de pirazol **8**, **11** y **13**; se realizó haciendo reaccionar a los compuestos tricarbonílicos asimétricos con las correspondientes fenilhidrazinas; estos compuestos se caracterizaron únicamente por espectrometría de

masas (Espectros 1, 2 y 3). La hidrólisis alcalina de los ésteres generó los ácidos pirazol-3-carboxílicos **9**, **12** y **14**; intermediarios claves para este proyecto y los posteriores del grupo de investigación, puesto que permite la incorporación de diferentes estructuras, así como la hibridación molecular con diferentes porciones farmacofóricas. Los ácidos carboxílicos, al ser intermediarios importantes, se caracterizaron por espectrometría de masas (técnica de FAB) y resonancia magnética nuclear de hidrógeno.

A partir de los ácidos carboxílicos, se realizó la activación de los compuestos **9**, **12** y **14** con cloruro de tionilo para obtener el cloruro de ácido correspondiente que funcionará como buen grupo saliente. El cloruro se sustituyó con 1-aminopiperidina en presencia de la amina terciaria DIPEA, la cual funciona como base para neutralizar el HCl que se liberó en la reacción. Finalmente, el tratamiento para purificar y obtener los tres compuestos finales no fue el mismo para todos, ya que la recristalización mostraba variaciones para cada compuesto, obteniendo así rendimientos finales elevados para el compuesto **2** y **3** mas no para el compuesto **1**.

8.1.2 Caracterización

La caracterización física de los compuestos mediante la determinación del punto de fusión de los tres intermediarios muestra una cercanía en los valores del compuesto **1** y **5**, siendo ambos más elevados que para el compuesto **2** (Tabla 3). Adicionalmente, se realizó la caracterización por espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C , así como espectroscopia de infrarrojo de los cuatro productos.

Con la espectrometría de masas fue posible corroborar la masa esperada de los intermediarios y de los compuestos finales. En el caso de los ésteres etílicos, fue la única técnica de identificación utilizada, para el **9** y **12** se utilizó el método de fragmentación de impacto electrónico (IE) y para el **14** se empleó FAB (bombardeo rápido de átomos) con la finalidad de disminuir la fragmentación de la molécula, debido a los buenos resultados obtenidos con ésta técnica de fragmentación, se utilizó para el resto de los compuestos. Como se observa en la Tabla 4 los ácidos carboxílicos presentaron el ion cuasimolecular (M^{*+1}), además, los compuestos **9** y **12** presentan el patrón isotópico característico de los

compuestos clorados. En la Tabla 5 se encuentran los compuestos finales de los cuales se identificó el ion (M^{*+}), (M^{*+1}) y (M^{*+2}) en los espectros **10**, **14**, **18** y **22**.

En el caso de la caracterización espectroscópica por IR, en el compuesto **1** se observan señales de estiramiento de las vibraciones carbono-hidrógeno de los anillos aromáticos a 3061.87 cm^{-1} . La presencia de la amida se caracteriza por la señal de estiramiento de las vibraciones N-H en 3289.56 cm^{-1} , y la señal de estiramiento de la vibración del enlace carbono-oxígeno del grupo carbonilo a 1658.93 cm^{-1} , mientras que la torsión de las vibraciones del enlace N-H presente en el grupo amídico se observa a 1501.45 cm^{-1} . El metilo en posición 4 del anillo pirazólico, se caracteriza por las señales de estiramiento simétrico y asimétrico a 2939.80 cm^{-1} y 2858.87 cm^{-1} respectivamente, así como las bandas de torsiones asimétricas a 1455.14 cm^{-1} y simétricas a 1381.39 cm^{-1} . Además es posible apreciar una banda a 729.03 cm^{-1} con la que se identifica al anillo de piperidina ya que es propia de las vibraciones de la torsión de balanceo de más de cuatro metilenos.

Para el compuesto **2**, la presencia de la amida se identifica por las bandas de estiramiento de la vibración N-H en 3383.52 cm^{-1} y la banda de estiramiento de la vibración del enlace C-O del grupo carbonilo en 1656.25 cm^{-1} de forma intensa; también se pueden apreciar los anillos aromáticos por la banda de estiramiento C-H a 3077.63 cm^{-1} , además del metilo unido al pirazol en la posición 4 por las señales a 2936.09 cm^{-1} y 1383.85 cm^{-1} . A su vez, los metilenos que conforman el anillo de piperidina se caracterizan por las señales de estiramiento asimétrico de las vibraciones C-H a 2853.98 cm^{-1} .

La caracterización del compuesto **3** por IR presenta el mismo patrón de señales que los compuestos **1** y **2** con pequeñas diferencias en los valores numéricos. En la Tabla 7 se pueden observar la similitud en las señales características de la amida componente de la carboxamida de los tres compuestos análogos, así como las señales correspondientes a los anillos aromáticos y el metilo, las cuales se observan desde los intermediarios.

Es posible observar diferencias en los sobretonos de los espectros para identificar las diferentes sustituciones en los anillos aromáticos para cada compuesto; sin embargo, la RMN fue la técnica que permitió esclarecer este aspecto. La RMN- ^1H permitió confirmar el

carácter de sustitución de las moléculas sintetizadas. Las señales, en términos de desplazamiento químico y multiplicidad, son prácticamente las mismas en los hidrógenos comunes, las variaciones se presentan en los anillos aromáticos por la presencia y ausencia de cloros en distintas posiciones, tanto en los intermediarios como para los compuestos **1**, **2** y **3**.

Tabla 7. Señales características en los espectros de IR de los compuestos finales.

Grupo funcional	Compuesto 1 (cm^{-1})	Compuesto 2 (cm^{-1})	Compuesto 3 (cm^{-1})
Amida (Estiramiento de vibraciones N-H)	3289.56	3383.52	3321.71
Amida (Estiramiento de vibraciones C-O)	1658.93	1656.25	1685.17
Amida (Torsión de vibraciones N-H)	1501.45	1496.06	1499.91
Aromático (Estiramiento de vibraciones C-H)	3061.87	3077.63	3064.47
Aromático (Estiramiento de vibraciones C=C)	1563.94	1606.23	1598.08
Metilo (Estiramiento asimétrico de vibraciones C-H)	2939.80	2936.85	2940.61
Metilo (Torsión asimétrica C-H)	1381.39	1383.83	1382.12

La RMN-¹H de los intermediarios **9**, **12** y **13** se realizó en un espectrofotómetro de 300 MHz; debido a la similitud estructural con los compuestos finales, se observa una gran semejanza en sus espectros de resonancia. En el caso de los compuestos finales, los espectros **11**, **15** y **19** se realizaron en un espectrofotómetro de 400 MHz. A continuación se describe el desplazamiento químico y multiplicidad de las señales observadas en los compuestos finales.

Los hidrógenos del carbono 1 (H_1 , Tabla 3) correspondientes al metileno en posición 3 del anillo de piperidina, se presentan en el espectro de RMN-¹H como una señal ancha para los compuesto **1** y **2**, y como un quintuplete para el compuesto **3**, debido a que

percibe las señales de los cuatro hidrógenos equivalentes vecinos, presentes en el anillo; en los tres casos, las señales integran para 2 hidrógenos. Siguiendo la interpretación del anillo de piperidina, el hidrógeno unido al carbono 2 (H_2) se observa como un quintuplete que integra para cuatro hidrógenos debido al acoplamiento con dos pares de hidrógenos vecinos químicamente equivalentes (H_1 y H_3), lo que confirma la asignación de la señal. De la misma manera, los hidrógenos del carbono 3 integran para 4 hidrógenos, se presentan como un triplete por el acoplamiento del par de hidrógenos equivalentes H_2 ; en este caso el desplazamiento químico se aprecia a radiofrecuencias más bajas en comparación con los otros hidrógenos alifáticos por la presencia del nitrógeno de la piperidina en la posición alfa. Para los tres compuestos, el hidrógeno 4, correspondiente a la carbohidrazida, es la señal que se presenta en radiofrecuencias bajas, debido al efecto no protector del grupo carbonilo. Los hidrógenos del metilo (H_9) se observan como un singulete en los tres espectros e integran para tres hidrógenos. En la Tabla 8 se muestran de manera resumida las señales antes descritas para las tres moléculas.

Tabla 8. Comparación de las señales alifáticas de RMN- 1H de los compuestos finales.

Número de hidrógeno	Desplazamiento químico		
	Compuesto 1 (ppm)	Compuesto 2 (ppm)	Compuesto 3 (ppm)
1	1.320	1.330	1.441
2	1.563	1.567	1.763
3	2.762	2.781	2.895
4	9.016	9.145	7.816
9	2.205	2.201	2.361

Una vez analizadas y confirmadas las asignaciones de las señales alifáticas y del hidrógeno de la carbohidrazida, se prosigue a la asignación de las señales aromáticas. En el caso de los compuestos **1** y **2**, comparten el anillo de 2,4-diclorofenil en la posición 1 del anillo pirazólico. El desplazamiento químico y multiplicidad de las señales del espectro de RMN- 1H de dicho anillo es prácticamente la misma: se presentan radiofrecuencias bajas por la influencia del átomo de nitrógeno al cual se encuentra unido el anillo. El H_{18} , ubicado en la posición 3 del anillo, integra para 1 hidrógeno y se presenta como un doblete por el acoplamiento *meta* con el hidrógeno en la posición 5 del anillo (H_{16}); Debido a que el

acoplamiento se da con un hidrógeno en posición *meta*, la constante de acoplamiento es pequeña (2.4 Hz) y confirma la asignación. Por su parte el H₁₆ integra para un sólo hidrógeno y es un doble de dobles por tener acoplamiento con dos hidrógenos vecinos, uno en *orto* y otro en *meta*; por ello se observan dos constantes de acoplamiento diferentes, acordes a los valores teóricos que van de 7 a 9 Hz para la ubicación en *orto* (experimentalmente es de 8.8 Hz), mientras que en *meta* es de 1 a 3 Hz (2.4 Hz experimentalmente). El H₁₅ (posición 6 del anillo) únicamente presenta acoplamiento con el H₁₆ en posición *orto* y muestra una constante de acoplamiento similar en ambos compuestos (Figura 8).

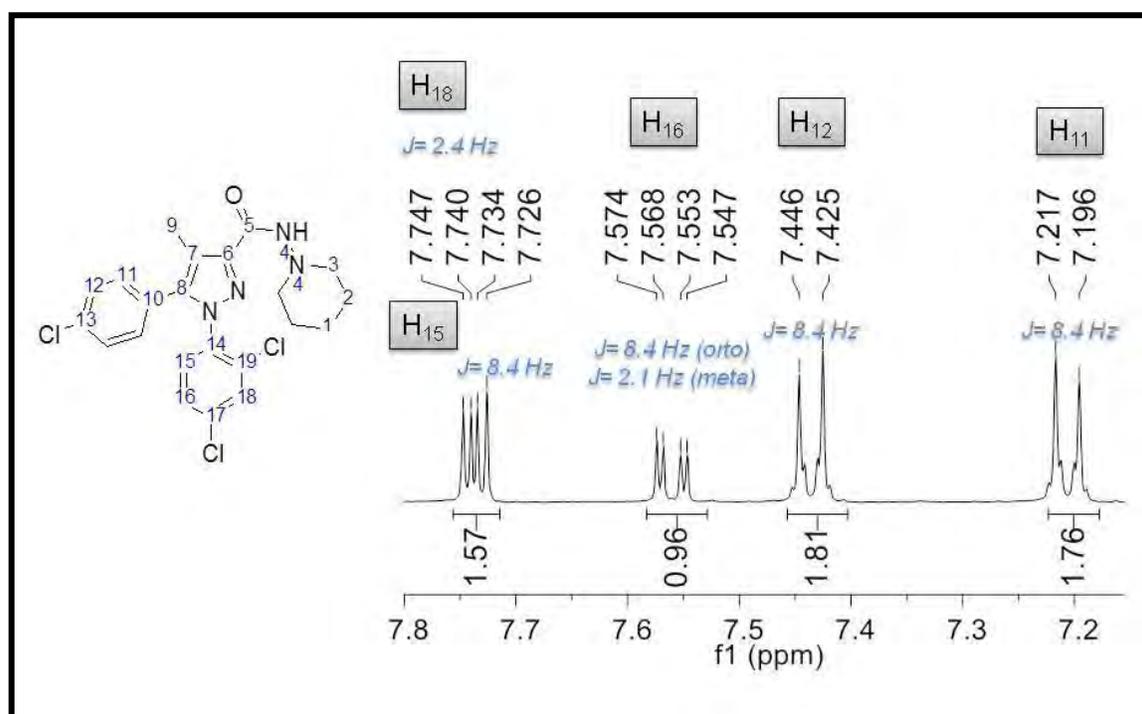


Figura 8. Asignación de las constantes de acoplamiento y desplazamiento de los hidrógenos aromáticos en el compuesto 2.

Asignadas las señales del anillo 2,4-diclorofenilo en la posición 1 del anillo de pirazol de los compuestos 1 y 2, se discutirá el fenilo en posición 5 de los compuestos 1 y 3. Debido a la simetría del anillo, sólo se perciben tres señales, todas se observan como multipletes o señales complejas. Primeramente, el H₁₁ y el H₁₃ comparten la señal compleja que integran para tres hidrógenos; en este caso, la complejidad de la señal se explica por el acoplamiento con los demás hidrógenos vecinos en el anillo. De manera

similar, el H₁₂ se observa como una señal compleja por los acoplamientos con los demás hidrógenos vecinos cuyo desplazamiento químico es diferente.

El compuesto **2**, a diferencia de los dos anteriores, presenta un anillo de 4-clorofenilo en la posición 5 del anillo de pirazol. Este anillo presenta un sistema de sustitución para del tipo AA'BB' que integran en total para cuatro hidrógenos. En la Figura 9 se encuentra la asignación esquematizada de las señales en el Espectro 15, correspondiente al compuesto **2**.

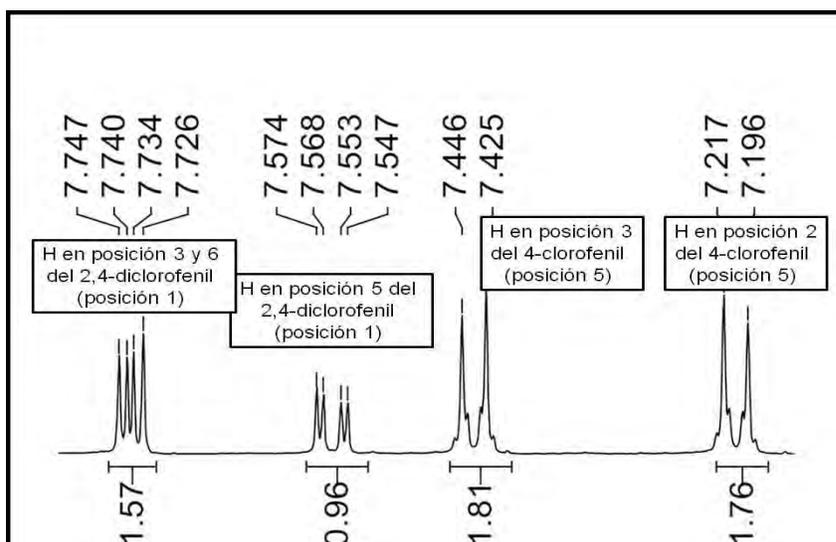


Figura 9. Asignación parcial de señales de los grupos fenilo en posición 1 y 5 del anillo pirazólico del compuesto **2**.

En la RMN-¹³C se observa una tendencia general para los tres compuestos, hacia radiofrecuencias altas se observan las señales del metilo y tres señales de los cinco carbonos que conforman el anillo de piperidina. Cabe señalar que el desplazamiento aumenta según la cercanía de los carbonos con el nitrógeno, debido al efecto desprotector. El desplazamiento de los carbonos de los anillos aromáticos se ve afectado por la electronegatividad de los cloros y el nitrógeno del anillo pirazólico, mostrando una variación para cada compuesto: El compuesto **3**, presenta una menor cantidad de señales por la simetría en ambos anillos aromáticos, mientras que el compuesto **1** y **2** se diferencian por el desplazamiento de los carbonos del anillo en posición 5. Como se esperaba la señal con mayor desplazamiento a campo bajo es del carbonilo en los tres

casos. La Figura 10 muestra de manera esquemática la ubicación de las señales en el Espectro 20 del Compuesto 3.

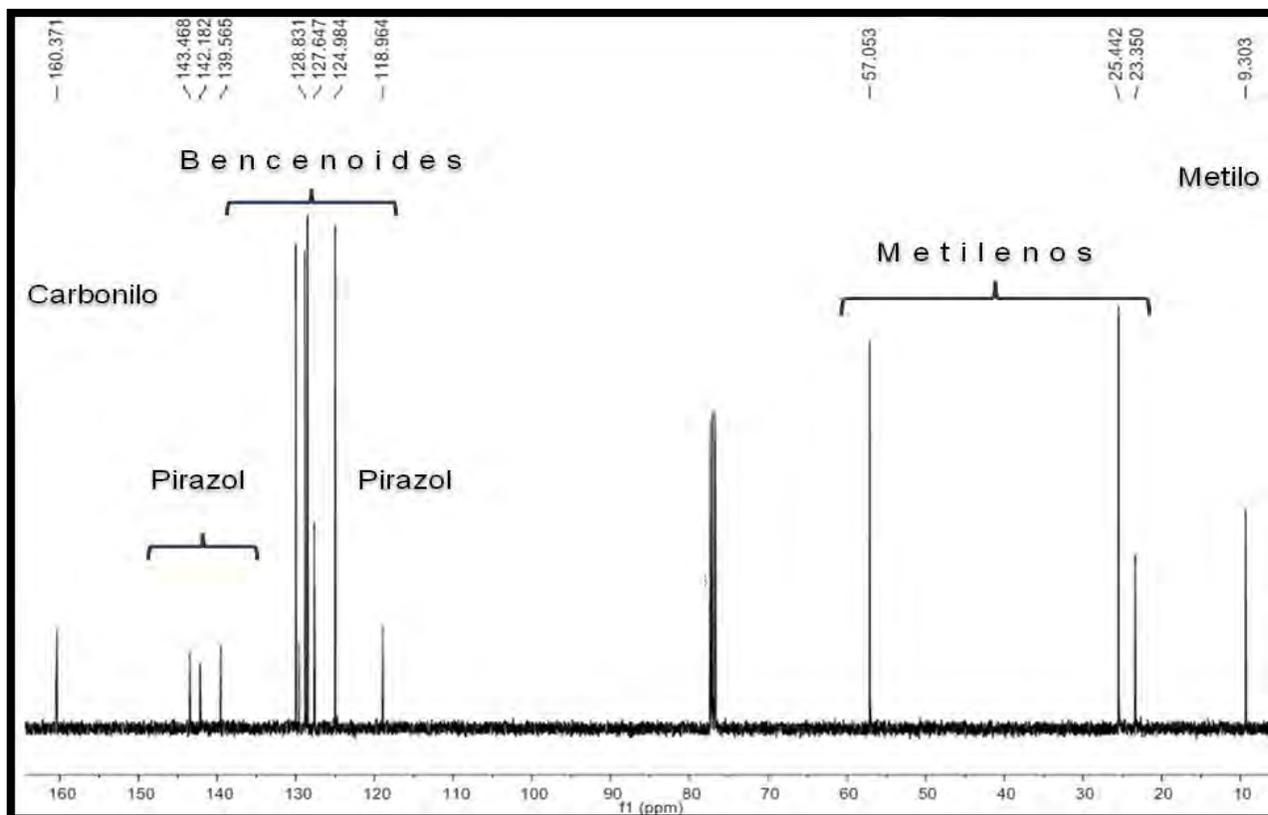


Figura 10. Distribución general de los hidrógenos de los compuestos finales (Espectro del compuesto 3).

8. 2 Preformulación y evaluación biológica

8.2.1 Preformulación

Actualmente en el campo de la química farmacéutica, es importante realizar estudios de preformulación en etapas tempranas del desarrollo del fármaco para descartar que la inactividad de los compuestos en estudio sea debida a la baja biodisponibilidad por las características fisicoquímicas propias de las moléculas. Particularmente, en este escrito se trabajó para modificar la solubilidad acuosa de los compuestos sintetizados mediante la elaboración de dispersiones sólidas, siendo éste un método sencillo y económico para lograr ese objetivo.

En la elaboración de dispersiones sólidas (DS), el tipo de acarreador es uno de los puntos clave a considerar. A lo largo de este trabajo se han expuesto diferentes razones que dieron pauta a la elección de la polivinilpirrolidona como acarreador, siendo preponderantes su uso frecuente en la preparación de DS y su buena solubilidad en diversos disolventes orgánicos.

Experimentalmente se observó que, a pesar de que la PVP posee una alta solubilidad en etanol, el incremento de la cantidad de este excipiente en las soluciones produce una variación directamente proporcional en la viscosidad; esto influyó significativamente en la solubilidad, dificultando la preparación de las soluciones y sus correspondientes suspensiones. Es debido a lo anterior que las soluciones de PVP K30 (MM aproximada de 50 000 g/mol) con una concentración de 25 y 50% se descartaron por su alta viscosidad y difícil manejo, aunado a que los estudios de elección de la relación compuesto activo:acarreador se basaron primordialmente en las características visibles de las suspensiones obtenidas. En este sentido, el tiempo de sedimentación, observado al agregar agua a las dispersiones para la preparación de suspensiones en pequeña escala, fue primordial debido a que las suspensiones tendrían como aplicación la administración oral en ratas para la evaluación de la actividad hipoglucemiante de cada compuesto. Por ello, el tiempo de sedimentación y la facilidad para resuspender los compuestos en agua fueron los factores determinantes en la elección de la proporción del polímero con relación al compuesto **3**. La Tabla 9 describe de manera cualitativa la velocidad de sedimentación de las suspensiones.

Tabla 9. Velocidad de sedimentación de las suspensiones.

% de PVP	1%	3%	5%	12.5%
Proporción compuesto:acarreador	1:2	1:6	1:10	1:25
Velocidad de sedimentación	+	++	+++	++++

Como se observa en la Tabla 9, la solución preparada al 12.5% de PVP fue la que tardó más tiempo en sedimentar; sin embargo, la viscosidad fue mayor desde las etapas iniciales de la preparación, por lo que se eligió la relación 1:10 (solución al 5% de PVP) por

tener una baja viscosidad, sedimentar en un tiempo considerable y sobre todo ser fácil de re-suspender. Con base en las características observadas, la suspensión se comportó como una suspensión floculada debido a la fácil re-dispersión del sedimento, el cual aunque no se forma de manera inmediata lo hace en un tiempo mayor que la proporción al 1 y al 3% de PVP; sin embargo su aspecto es agradable y posee las características adecuadas para la administración oral en ratas. La Tabla 10 muestra las diferencias entre las suspensiones floculadas y defloculadas¹⁸ con la finalidad de esclarecer las características de cada una.

Tabla 10. Descripción de las suspensiones floculadas y defloculadas.

Suspensión defloculada	Suspensión floculadas
Las partículas existen en suspensión como entidades separadas.	Las partículas forman agregados laxos.
La velocidad de sedimentación es baja, cada partícula se sedimenta por separado y el tamaño de partícula es mínimo.	La velocidad de sedimentación es alta, porque las partículas sedimentan en flóculos, que son grupos de partículas.
Un sedimento se forma lentamente.	Un sedimento se forma rápidamente.
El sedimento se hace finalmente muy compacto, debido al peso de las capas superiores del material sedimentado. Las fuerzas de repulsión son superadas y se forma una pasta dura que es difícil o imposible de resuspender.	El sedimento es poco compacto, y tiene una estructura enrejada. Las partículas se unen firmemente unas a otras y no se forma una pasta dura y densa. El sedimento es fácil de redispersar, con lo cual se vuelve a formar la suspensión original.
La suspensión tiene un aspecto agradable, dado que el material suspendido permanece así por un tiempo relativamente largo. El sobrenadante también permanece turbio, aun cuando hay un sedimento visible.	La suspensión es un poco desagradable, debido a la rápida sedimentación y a la presencia de una región sobrenadante clara evidente. Esto puede atenuarse si se aumenta un volumen de sedimento. Idealmente el volumen del sedimento debe incluir el de la suspensión.

Después de elegir la concentración porcentual adecuada (5%), la preparación de las dispersiones sólidas se realizó de la misma manera para los compuestos **1**, **2** y **3**, manteniendo el mismo tiempo de agitación y temperatura. En todos los compuestos se observó un aspecto semejante después de la evaporación a presión reducida del disolvente: el sólido tenía un aspecto cristalino y mostraba gran adhesión al vidrio del matraz empleado. A pesar de ello, en ningún caso se realizó una agitación o daño mecánico que afectara de manera importante el tamaño de partícula, evitando que la caracterización se viera afectada por factores externos.

8.2.2 Caracterización de dispersiones sólidas

Como se observa en la Tabla 6 las proporciones fueron muy similares y el rendimiento para los tres fue cercano al 100%. Para caracterizar a estas dispersiones se realizaron estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopía IR, y se comparó con las mezclas físicas de los tres compuestos con PVP en la misma proporción a las DS. La caracterización por DSC brinda una descripción de las características poliméricas de las dispersiones preparadas porque pueden analizarse las transiciones térmicas al medir el calor (mW) que debe suministrarse o bien que disminuye al aumentar la temperatura. En el termograma de los compuestos **1** y **3** se observa un comportamiento constante del flujo de calor hasta llegar a la temperatura de fusión, donde hay un cambio brusco representado por una endoterma que es además el único cambio durante todo el estudio. El compuesto **3** muestra cierta degradación al exponerse a altas temperaturas como se observa en el termograma del compuesto 3 (Figura 11), a diferencia del **1** que muestra un comportamiento constante después de la endoterma del punto de fusión (Figura 12). El compuesto **2** tiene un comportamiento diferente puesto que la tendencia no es constante al aumentar la temperatura; es más sensible y muestra diferentes señales a lo largo de todo el estudio, sin embargo, en el termograma es evidente cuando la molécula funde (149.54°C).

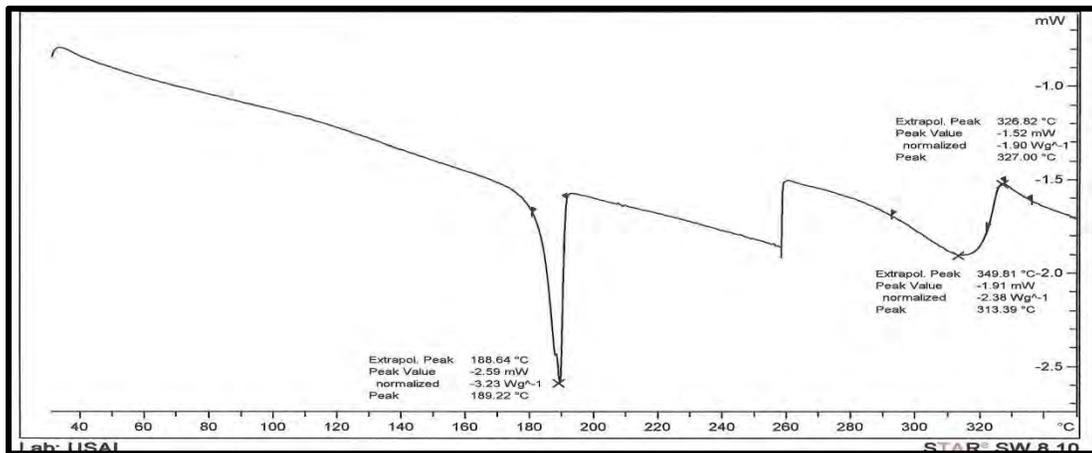


Figura 11. Termograma del Compuesto 3.

Las dispersiones sólidas tienen un comportamiento diferente al igual que la PVP cuyo termograma (Figura 13) presenta una curva endotérmica a menos de 100°C y posteriormente una transición vítrea a 239°C, aunque no se señala en el termograma; se identifica otra transición alrededor de 168 °C, temperatura reportada para PVP 30K³⁰. La comparación de las curvas de los termogramas (Termogramas 1, 2 y 3 en el Apéndice II) de las dispersiones sólidas con los compuestos finales y con la PVP, permite observar un cambio principalmente para **POV 1** y **POV 3**, ya que en ambas, desaparece la endoterma del punto de fusión. Esto indica que hay una interacción de los compuestos con el polímero, no así con la mezcla física donde la endoterma continúa presentándose.

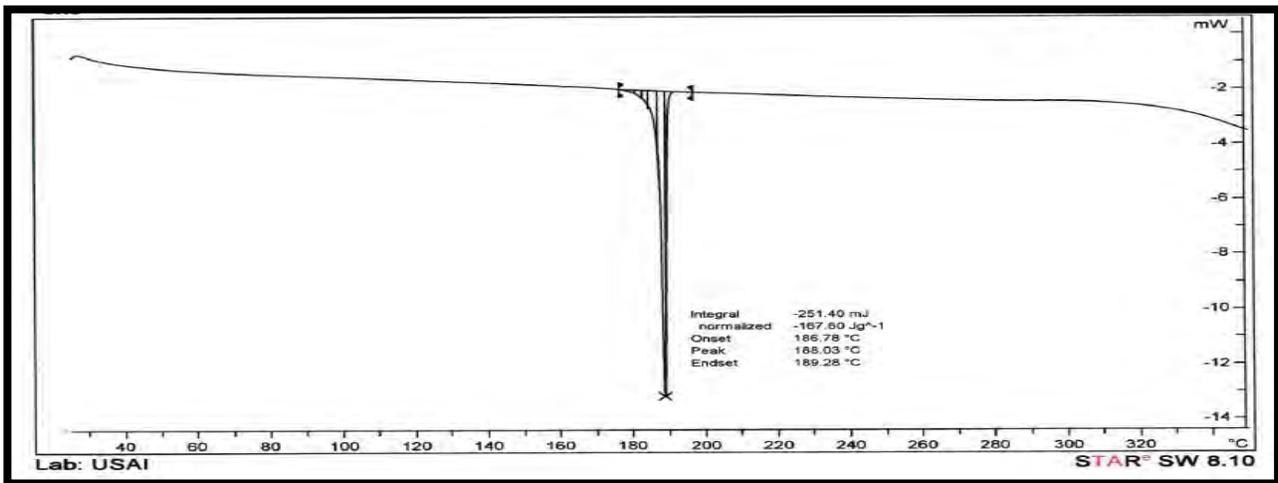


Figura 12. Termograma del Compuesto 2.

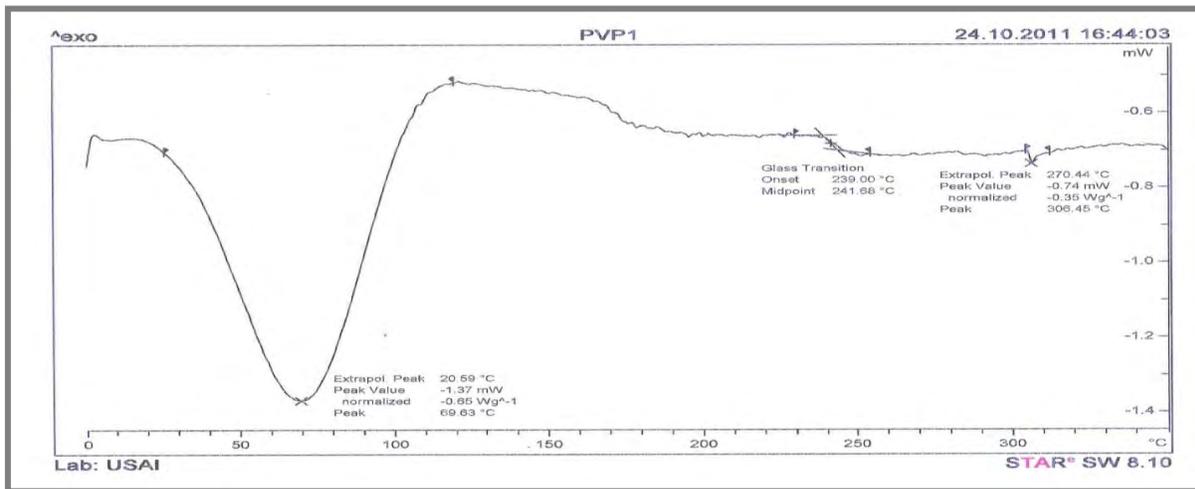


Figura 13. Termograma de PVP.

El termograma de **POV 2** y el de la mezcla física 2 tienen un comportamiento diferente al del compuesto **1**, aunque conservan la curva endotérmica característica del polímero estudiado, pero no se observa alguna otra señal que pueda brindar información acerca de la estructura de la dispersión sólida. Lo mismo se observa con **POV 3**. Por otra parte, el termograma de **POV 1** muestra una temperatura de transición vítrea (T_g) a 153°C , teóricamente este comportamiento gráfico indicaría que el compuesto en interacción con el polímero posee un comportamiento amorfo en su estructura, es decir, no tiene una estructura definida y pierde rigidez por encima de esa temperatura, lo cual le brindaría una mejor solubilidad acuosa; sin embargo, la evaluación biológica y el resto de los estudios complementan esa información.

Otra técnica utilizada para la caracterización de las dispersiones sólidas fue la espectroscopía de infrarrojo. Para realizar una comparación adecuada, se realizó el estudio de PVP, cuyo espectro aparece en la parte superior de los espectros comparativos; como se esperaba las bandas son anchas y menos definidas por tratarse de un polímero pero destaca la presencia de una banda amplia a 3165.09 cm^{-1} que describe el estiramiento de las vibraciones N-H de la amida del anillo de pirrolidinona, y unida a ella una pequeña señal a 2945.75 cm^{-1} propia de los metilenos presentes en la estructura; a 1662.05 cm^{-1} aparece la banda del grupo carbonilo, mientras que a 1586.17 cm^{-1} se observa la otra señal característica del enlace N-H, correspondiente a las torsiones de las vibraciones del enlace.

Las señales que se observan de las tres dispersiones son anchas y poco definidas en comparación con sus correspondientes compuestos, y muchas de las bandas desaparecen o bien se encuentran desplazadas a lo largo del espectro. Las DS presentan espectros de infrarrojo donde se aprecian señales propias de polivinilpirrolidona y del compuesto correspondiente: en su mayoría son bandas extendidas pobremente definidas, mientras que las mezclas físicas logran conservar algunas de las principales señales de los compuestos. Lo anterior nuevamente confirma, que existe una interacción molecular entre el polímero y los compuestos sintetizados, no así con las mezclas físicas. Esto ocurre porque la mezcla física es una mezcla simple de dos compuestos obtenida por técnicas tradicionales de mezclado, mientras que en la dispersión sólida hay una mezcla

que se somete parcial o completamente a una interacción a nivel molecular durante su formación, lo que provoca un aumento del área de contacto, facilitando el cambio en la estructura y propiedades fisicoquímicas del nuevo sólido.

En el espectro de **POV 1** se observa una señal muy ancha por encima de 3000 (hasta 3414.32 cm^{-1}) en la cual se traslapan las señales del polímero y del compuesto, mientras que en la mezcla física si se distingue la señal a 3288.64 cm^{-1} característica de las vibraciones de la amida que en el espectro del compuesto 1 se aprecia a 3289.56 cm^{-1} (Espectro 26). La señal de las vibraciones del estiramiento -C=O (1648.12 cm^{-1}) es ancha, mientras que en la mezcla física es más definida, y la señal de la vibración de la torsión N-H presente en el espectro de PVP desaparece en ambos casos. Continuando el análisis, la banda a 1501.45 cm^{-1} desaparece solamente para **POV 1** porque en la mezcla física 1 se presenta a 1500.47 cm^{-1} . Las bandas de **POV 1** y **POV 3** aparecen a longitudes de onda similares, sin embargo son menores las diferencias de los espectros entre la dispersión sólida y la mezcla física correspondiente. En general los espectros de las tres dispersiones, debido a que la técnica detecta los grupos funcionales presentes en las moléculas y éstos son los mismos en los tres casos.

Dentro de los métodos comúnmente empleados en los estudios de preformulación de fármacos, se ubica a la microscopía electrónica como una técnica cualitativa que brinda una valiosa orientación de los cambios y propiedades estructurales de las moléculas de estudio. Se eligió al compuesto **2** para realizar los estudios de microscopía electrónica por poseer la estructura del fármaco rimonabant y por ende, tener certeza de su actividad antagonista sobre los receptores de cannabinoides 1 (CB1). Las imágenes de la microscopía electrónica (Figura 7), ubicadas en la sección de resultados; corresponden al compuesto **2**, de la mezcla física 2, de **POV 2** y del polímero tratado bajo el mismo procedimiento de obtención de las dispersiones sólidas. En la imagen del compuesto **2** se aprecian estructuras cristalinas de forma tubular alargada y con diferentes grosores; la mezcla física posee bloques rectangulares más grandes que los cristales del compuesto **2**, con extremos que reflejan el efecto de la agitación mecánica y pequeñas estructuras amorfas adheridas a los bloques de mayor tamaño. Por su parte **POV 2** está constituida por “hojuelas” delgadas y alargadas que poseen superficies irregulares, mientras que el

acarreador está conformado por grandes bloques rectangulares similares a los que se aprecian en la imagen de la mezcla física. Las imágenes muestran un cambio en las estructuras de los compuestos estudiados, específicamente el cambio se da en la dispersión sólida, donde el tamaño y forma son cualitativamente diferentes aunque la estructura resultante no es propiamente la de un cristal, ni tampoco completamente amorfa. Con base en los estudios realizados, y en las imágenes obtenidas por la microscopía electrónica, es posible sugerir que el compuesto **2** posee las características propias de un polimorfo metaestable, lo cual explicaría que las transiciones térmicas de la DSC no sean constantes y que en el termograma de **POV 2** no se identifique una estructura amorfa o cristalina a través de la presencia de una temperatura de transición vítrea o alguna curva exotérmica respectivamente; además, la mezcla física **2** no conserva la endoterma del punto de fusión. El hecho de que el compuesto sea un polimorfo metaestable afecta directamente en la estructura final de las dispersiones, debido a que los compuestos metaestables están influenciados por los disolventes con los que entran en contacto, principalmente en la fase de recristalización.

Desafortunadamente, la evaluación de la microscopía electrónica no se realizó para las otras dos dispersiones; sin embargo los resultados de la evaluación biológica junto con los ya mencionados proporcionan un panorama general de las propiedades de cada una.

8.2.3 Actividad hipoglucémica

Los compuestos **1–3** y sus dispersiones sólidas están orientados al tratamiento del síndrome metabólico por medio del control de la obesidad (como derivados del pirazol) y la hipoglucémica, componentes importantes de la pandemia. Se utilizó un modelo de diabetes mellitus tipo 2, evaluado en ratas Wistar que han sido previamente tratadas con estreptozotocina y nicotinamida con la finalidad de inducir hiperglucemia. Este ensayo es preliminar a un estudio complementario y propio del síndrome metabólico, que será utilizado en estudios posteriores con los compuestos que presenten la mejor actividad en este modelo inicial.

Las Gráficas 1, 2, 3 y 4 muestran de manera esquemática los resultados del efecto hipoglucemiante de los compuestos finales y de las dispersiones sólidas durante siete

horas de estudio. El compuesto con mejor actividad hipoglucemiante es el compuesto **3**, seguido del **2**, ambos con un efecto parecido a la glibenclamida. Finalmente el compuesto **1** es el menos activo con sólo 20% de disminución de la glucemia a la hora 5 y en efecto poco sostenido. Esto no es de sorprender debido a que el compuesto **1** ya ha sido reportado con una muy baja afinidad por CB1,²⁸ y sólo se sintetizó para contar con un control negativo y verificar el efecto de la dispersión sólida sobre la actividad biológica. Lo anterior se puede explicar por la conformación adquirida por el compuesto **2** debida a los anillos de 2,4-diclorofenilo en la posición 1 y el 4-clorofenilo en la posición 1 del anillo pirazólico lo que favorece la interacción ligando-receptor y con ello la actividad biológica. Lo mismo aplica en el caso del compuesto **3**. Sin embargo, el compuesto **1**, que carece del anillo de 4-clorofenilo en la posición 1, debe adquirir una conformación tal, que genera interacciones desfavorables en el sitio receptor del receptor CB1 y con ello disminuye la actividad biológica. Estudios posteriores de acoplamiento molecular podrían resolver esta hipótesis.

En las gráficas mostradas en los resultados, también se presenta la actividad biológica de las dispersiones sólidas. *A priori*, se observa un incremento en actividad biológica de las moléculas, excepto para el compuesto **1** donde no se observa actividad, a pesar de que se esperaba lo contrario por ser la única dispersión en donde se observa claramente una estructura amorfa por la presencia de una Tg en los estudios de DSC, debido a que generalmente los fármacos amorfos a pesar de ser termodinámicamente inestables presentan una mayor solubilidad acuosa.¹⁷ **POV 3** resulta ser el compuesto más activo: la preformulación incrementa el efecto hipoglucemiante del compuesto **3**, inclusive superando a la glibenclamida, sobre todo en las últimas horas del estudio. En el caso de **POV 2** resulta más activo que el compuesto sin preformular desde el inicio del estudio, no obstante no conserva una tendencia lineal ni sostenida, dificultando el criterio de evaluación. Los resultados descartan que la mejora de la actividad biológica evaluada sea debida al efecto de la PVP *per se*, porque no posee actividad alguna (incluso administrada a una dosis muy por encima de la encontrada en las preformulaciones) y comprueban que la mejora de la solubilidad, incrementa la biodisponibilidad de la molécula acrecentando el efecto hipoglucémico.

9. CONCLUSIONES

Se cumplieron los objetivos propuestos inicialmente, debido a que se sintetizaron tres moléculas derivadas del 1,5-diarilpirazol; *N*-(piperidin-1-il)-5-fenil-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**1**), *N*-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**2**) y *N*-(piperidin-1-il)-1,5-difenil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**3**).

Se realizaron dispersiones sólidas de los compuestos **1**, **2** y **3** para realizar estudios de preformulación por medio del método de disolventes, utilizando polivinilpirrolidona como agente acarreador y etanol como disolvente, mejorando la solubilidad en todos los casos, lo que permitió la preparación de suspensiones floculadas para la administración oral en ratas.

Con base en los resultados de la evaluación biológica se concluye que la preparación de dispersiones sólidas si provoca una mejor respuesta en la actividad biológica de las moléculas (compuestos **2** y **3**) lo cual demuestra la importancia de contar con moléculas solubles en agua para tener una mejor biodisponibilidad.

La síntesis y preformulación de moléculas con las características estructurales manejadas en este trabajo, representa una oportunidad en el tratamiento de la obesidad y demás componentes del síndrome metabólico, por ello es preciso continuar con el desarrollo de nuevas moléculas híbridas y en determinado caso, preparadas mediante dispersiones sólidas.

BIBLIOGRAFIA

1. Miranda P. J.; DeFronzo R. Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology and mechanisms. *American Heart Journal*. **2005**, 149, 33-45.
2. Tébar F. J.; Escobar F. La Diabetes mellitus en la práctica clínica. Médica Panamericana, España, **2009**
3. Carrillo R.; Sánchez M.; Elizondo S. Síndrome metabólico. *Rev Fac Med UNAM*. **2006**, 49, 98-104.
4. Federación Internacional de Diabetes (2011). *Atlas de Diabetes*. Revisado 20 de agosto de 2011 en www.idf.org
5. Lavin N.; Manual de endocrinología y metabolismo 4ª ed. Lippincott Williams & Wilkins. E.U.A. **2009**
6. Alberti K. G.; Zimmet P.; Shaw J. The metabolic syndrome-a new worldwide definition, *The Lancet* **2005**, 366, 1059-1062.
7. Grundy S. M.; Brewer B. Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *J. Am. Heart As.* **2004**, 109, 433-438.
8. Harrison, Medicina Interna, 17a ed., Mc Graw Hill, España, **2008**
9. Hee Jeong Seo, Min Ju Kim, Suk Ho Lee, Sung-Han Lee, Myung Eun Jung, Mi-Soon Kim, Kwangwoo Ahn, Jeongmin Kim, Jinhwa Lee Synthesis and structure–

- activity relationship of 1,2,4-triazole-containing diarylpyrazolyl carboxamide as CB1 cannabinoid receptor–ligand. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1149–1162.
10. Kwang-Seop Song a, Min Ju Kim a, Hee Jeong Seo, Synthesis and structure–activity relationship of novel diarylpyrazole imide analogues as CB1 cannabinoid receptor ligands. *Biorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3080–3092.
11. André A.; Gonthier M. The endocannabinoid system: Its roles in energy balance and potential as a target for obesity treatment . *The Intern. Jour. Biochem. Cell Biol.*, **2010**, *42*, 1788-1801
12. Vemuri V.; Janero D.; Makriyannis A. Pharmacotherapeutic targeting of the endocannabinoid signaling system: Drugs for obesity and the metabolic syndrome. *Phys. & Beh.*, **2008**, *93*, 671-686
13. Scheen A. J., Cannabinoid-1 receptor antagonists in type-2 diabetes, *Best Prac. & Res. Clin. End. & Met.*, **2007**, *21*, 535-553
14. Kreitzer F. R., Stella N.; The therapeutic potential of novel cannabinoid receptors. *Pharm. & Ther.* **2009**, *122*, 83–96
15. Rang H. P.; Dale M. M.; Ritter J. M.; Flower R. J. ; Farmacología 6a ed. Elsevier, España **2008**
16. Bosier B., Muccioli G. G., Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and opportunities. *Bio. Pharm.*, **2010**, *80*, 1-12.

17. Dong Y.; Kiong W.; Surana U. Solubilization and preformulation of poorly water soluble and hydrolysis susceptible *N*-epoxymethyl-1,8-naphthalimide (ENA) compound. *Int. J. Pharm.* **2008**, 356, 130-136.
18. Gennaro A. R.; Remington Farmacia 19a ed., T. 2, Panaméricana, Argentina, **1995**.
19. Lieberman H. A., Rieger M. M.; Pharmaceutical dosage forms. Disperse systems. Vol. 2, Marcel Dekker Inc., EUA, **1988**.
20. Liu R.; Water insoluble drug formulation, 2a ed., CRC Press, EUA, **2008**
21. Craig D.; The mechanisms of drug release from solid dispersions in water soluble polymers. *Int. J. Pharm.* **2002**, 231, 131-144.
22. Castro S.; Allemanni D.; Palma S. Farmacotecnia. Utilización de dispersiones sólidas como estrategias para aumentar la velocidad de disolución de los fármacos. *Nues. Farm.* **2008**, 54, 24-29.
23. Serajuddin A. Solid dispersions of poorly water soluble drugs: early promises, subsequent problems and recent breakthroughs. *J. Pharm. Sci.* **1999**, 88, 1058–1066.
24. Franco m.; Trapani G.; Latrofa A.; Tullio C. Dissolution properties and anticonvulsant activity of phenytoin-polyethylene glycol 6000 and - polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions. *Int. J. Pharm.* **2001**, 225, 63-73.
25. Rowe R. C., Sheskey P. J.; Handbook of pharmaceutical excipients 5a ed., Pharmaceutical Press, Reino Unido, **2006**

26. Leuner C.; Dressman J. Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Bioph.* **2000**, *50*, 47-60.
27. Ramírez J.J.; Ríos M. Y.; López S.; López F.; Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP-1B: In vitro, in silico, and in vivo approaches *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2243-2251.
28. Qian F.; Huang J.; Zu Q. Is a distinctive single Tg a reliable indicator for the homogeneity of amorphouse solid dispersión?. *Int. J. Pharm.* **2010**, *395*, 232-235.
29. Ruoxi L.; Qian L.; Pusheng F. Structure-Activity Relationships of Pyrazole Derivatives as Cannabinoid, Receptor Antagonists, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 769-776.

APÉNDICE I

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Equipos, reactivos y disolventes.

Para la síntesis de los compuestos y la preparación de las dispersiones sólidas se utilizaron dos rotaevaporadores diferentes, el primero marca Büchi modelo RC-144 acoplado a una bomba de vacío Vacubrand modelo PC160, con regulador VCC2 y baño de calentamiento Büchi modelo B-480, enfriador marca VWRW Scientific modelo 117 y el otro es un modelo R-205 acoplado a un condensador Birkman IC30 conectado a una bomba de vacío Büchi V-800, controlador V-500 y baño de calentamiento R-490. Las pruebas de las dispersiones sólidas se agitaron y concentraron empleando el Termomezclador Eppendor Concentrator 5301. La determinación de puntos de fusión se realizó con un aparato Büchi B-540 usando capilares de vidrio abiertos. La hidrogenación catalítica se llevó a cabo empleado un Hidrogenador marca Paar modelo 3916EG. La masa de reactivos y productos se determinó con la Balanza analítica Sartorius AZ10P.

La caracterización espectroscópica y espectrométrica se realizó en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química con los siguientes equipos:

- Resonancia Magnética Nuclear: Espectrómetros Varian modelos MRS y MR, ambos de 400 MHz
- Espectrometría de masas: Equipo JEOL modelo JMS-SX102A
- Infrarrojo: Espectrofotómetro FT-IR modelo Spectrum Rx1 Perkin Elmer y 1605
- Calorimetría Diferencial de Barrido: Mettler SC 821e, Software Star versión 8.1, utilizando cápsulas de 40 μ L con orificio en la tapa.

Se emplearon disolventes y reactivos de las marcas J. T. Baker, Sigma Aldrich, Merck y Analytyka.

Se utilizó Povidona Sigma Aldrich con valor K de 29-32 por lo tanto la masa molar aproximada es de 50 000 g/mol.

Cromatografía

El avance de cada una de las reacciones y la conversión total de los reactivos a los productos esperados se monitoreó por cromatografía en capa fina utilizando placas de vidrio cubiertas con sílice y lámpara de luz ultravioleta.

Los sistemas utilizados para los intermediarios clave y para los compuestos finales son las siguientes:

SISTEMA	COMPOSICIÓN
A	Hex: AcOEt 85:15
B	CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH 98:2:1
C	Hex: AcOEt 1:1
D	Hex:AcOEt 7:3

El factor de retención se calculó con la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{b}{a}$$

donde

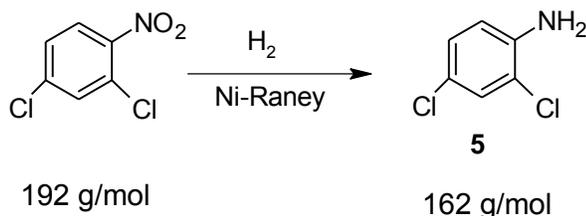
a: distancia del frente del eluyente

b: distancia recorrida por la muestra

Síntesis del compuesto 1.

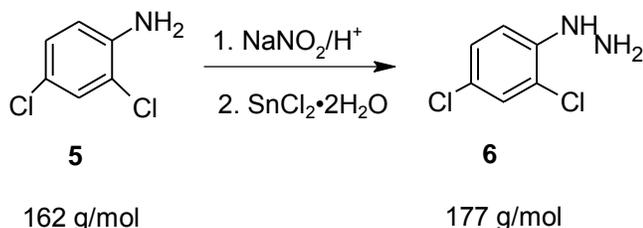
***N*-(piperidin-1-il)-5-fenil-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida**

- Síntesis de 2,4-dicloroanilina (**5**)



Se pesaron 6.1050 g de 2,4-dicloronitrobenceno considerando una pureza del 97% y se colocaron en un frasco para hidrogenación Paar. Se agregaron 600 mg de Ni-Raney previamente lavado con agua y metanol y se adicionaron lentamente al frasco de hidrogenación. La mezcla se resuspendió en 125 mL de MeOH y se redujo en el hidrogenador a temperatura ambiente. Después de 3 horas de reacción, se filtró al vacío en una cama de celita para retirar el catalizador. Finalmente el disolvente se eliminó por evaporación a presión reducida obteniendo 5.139 g (99.8%, *R_f* de 0.43 en el Sistema A) de un sólido amarillo correspondiente a la 2,4-dicloroanilina (**5**).

- Síntesis de 2,4-diclorofenilhidrazina (**6**).



En un matraz bola de 250 mL con agitador magnético se depositaron 5.139 g del compuesto **5**, el matraz se colocó en baño de hielo y se agregaron 15 mL de ácido acético glacial y 50 mL de HCl. Se dejó agitando durante 10 minutos, después de lo cual, se

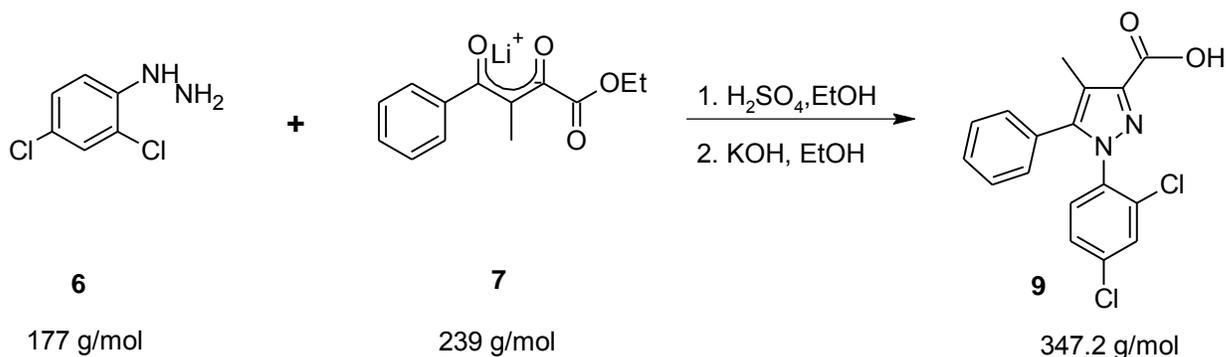
añadieron por goteo 2.4 g de NaNO_2 disueltos en 9 mL de agua. Posteriormente se adicionaron también por goteo 4.4 equivalentes (31.47 g) de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ previamente disueltos en 27 mL de HCl. Se dejó agitando hasta alcanzar temperatura ambiente por 17 horas. Terminado el tiempo se agregó agua (50 mL) y se neutralizó con NaHCO_3 y lentejas de NaOH hasta obtener un pH igual a 10. El remanente de sales de estaño se filtró al vacío y el sólido se lavó con acetato de etilo. El filtrado se extrajo también con el mismo disolvente, el cual se unió con el que se usó en los lavados, finalmente se concentró a presión reducida obteniendo 1.61 g de 2,4-diclorofenilhidrazina (29% y R_f de 0.57 en el Sistema B) que corresponde al compuesto **6**. Este precursor se utilizó para la síntesis del compuesto **1** y **2**.

- Síntesis de la sal de litio de 4-fenil-3-metil-2,4-dioxobutanoato de etilo (**7**)



En un matraz bola de 100 mL con agitador magnético, se colocaron 3.5 mL de metilciclohexano (MCH) y 15.2 mL de una solución de *bis*(trimetil)sililamiduro de litio (LiHMDS) en hexano (1M). Posteriormente se gotearon 2 g (0.015 moles) de propiofenona disueltos en 2 mL de MCH. La reacción se dejó en agitación en baño de hielo por 3 horas. Al concluir las 3 horas se adicionaron 1.1 equivalentes (2.3 mL, 0.0167 moles) de oxalato de dietilo por goteo en baño de hielo y se dejó reaccionar alrededor de 15 horas. El producto de la reacción se filtró al vacío obteniendo 2.735 g (75.7%) de un sólido amarillo opaco.

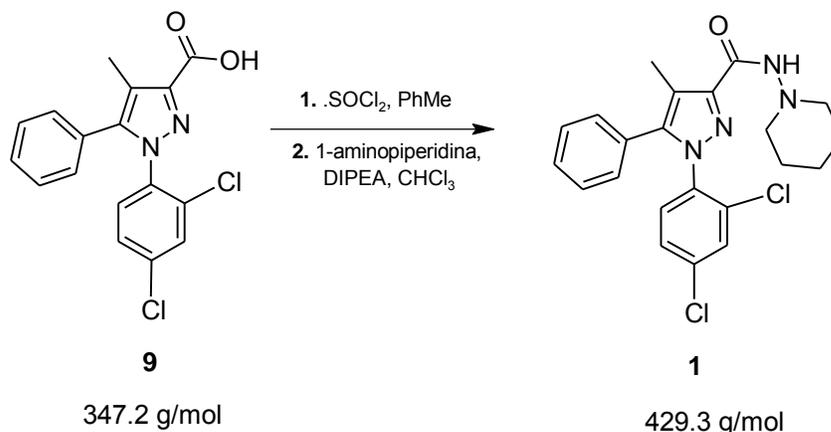
- Síntesis del ácido 1-(2,4-diclorofenil)-5-fenil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (**9**).



En un matraz bola de 100 mL se colocaron 2.735 g (0.011 moles) del remanente del compuesto **7** y 2.688 g (0.0152 moles) del compuesto **6**, se agregaron también 50 mL de etanol y gota a gota 9.9 mL de H₂SO₄ a 0°C. Se agitó, con agitación magnética y refrigerante en posición de reflujo, a reflujo (80°C) durante 7 horas. El etanol se retiró por evaporación a presión reducida y al concentrado se le añadieron 30 mL de agua y llevó a pH =8 con NaHCO₃; se realizaron extracciones múltiples con cloroformo (3 x 20mL) y la fase orgánica se secó con Na₂CO₃, filtró y después se concentró a presión reducida.

El residuo de la reacción anterior se colocó en un matraz bola de 100 mL adaptado con agitación magnética y se agregan 20 mL de etanol y 1.8 g de KOH. La reacción se dejó en agitación 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se concentró a presión reducida y el remanente se resuspendió en 25 mL de agua y se lavó con hexano. Después se adicionó lentamente 1 mL de HCl lo que provocó la aparición de un precipitado café que se filtró al vacío, obteniendo 2.667 g (67.2%) de un sólido opaco y granulado color café claro, el cual posee un punto de fusión de 189.2 - 190.7 °C y un R_f de 0.16 en el sistema B. (Intermediario **9**).

- Síntesis de *N*-(piperidin-1-il)-5-fenil-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**1**).



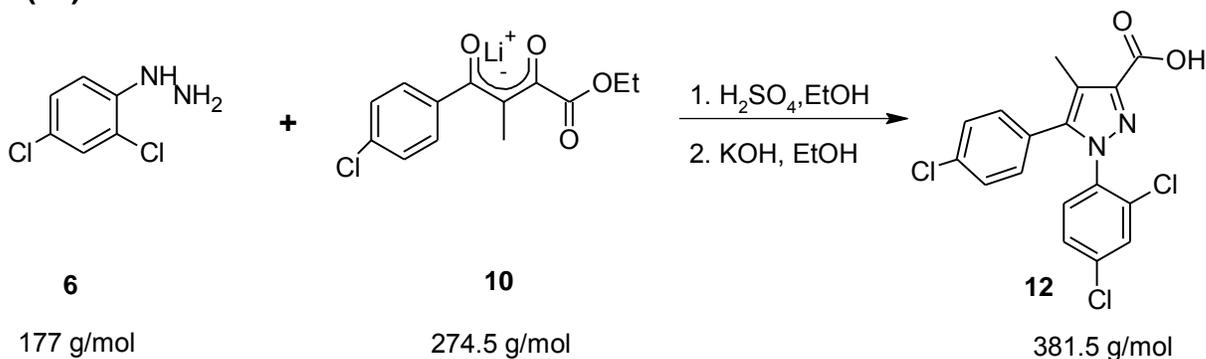
En un matraz bola de 25 mL se depositaron 300 mg del intermediario **9**, producto de la reacción descrita en el paso anterior, en 15 mL de tolueno y lentamente se agregaron 0.23 mL de SOCl₂. Esta reacción se dejó 7 horas a reflujo de 107°C. Transcurridas las 7 horas se codestiló con tolueno (15mL aprox.) por triplicado con la finalidad de retirar el exceso de SOCl₂.

El remanente del paso anterior, correspondiente al cloruro de ácido del intermediario **9**, se disolvió en CHCl₃ y se colocó en baño de hielo; después se adicionó gota a gota, una solución de 0.15 mL de DIPEA y 0.09 mL de 1-aminopiperidina en 20 mL de CHCl₃. La reacción se dejó agitando por 17 horas. Terminada la agitación, se evaporó el disolvente y redisolvió en CHCl₃ y agregaron 30 mg de carbón activado. Se agitó a reflujo por 2 horas y posteriormente se filtró para eliminar el exceso de carbón activado. El cloroformo se eliminó por evaporación al vacío y el remanente se agitó con hexano, con lo que precipitó un sólido blanco cristalino brillante. Finalmente se obtuvieron 137 mg (37%) de un sólido blanco cristalino brillante (Pf: 190.1 -190.3 °C, Rf: 0.33 en el sistema B)

Síntesis del compuesto 2

***N*-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida**

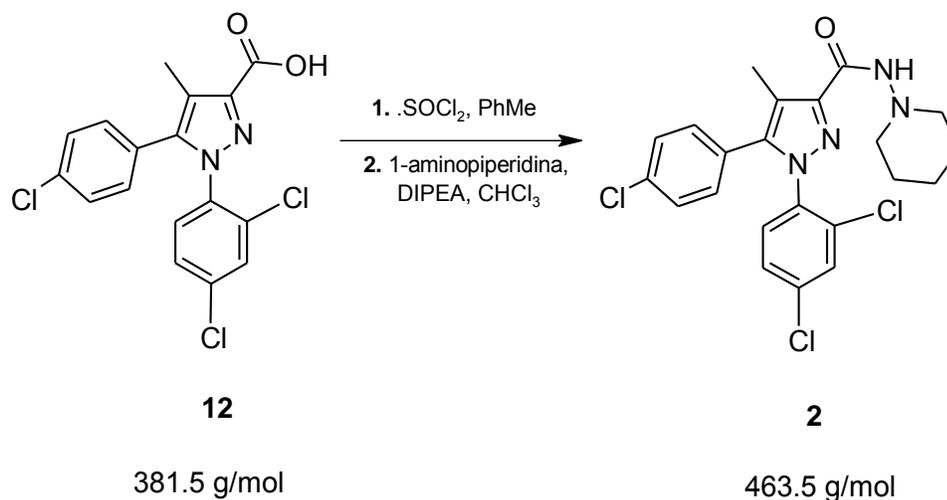
- Síntesis del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (**12**).



En un matraz bola se colocaron 2.44 g del compuesto **10** y 1.61 g del compuesto **6**, se agregaron 50 mL de etanol y gota a gota 7.7 mL de H₂SO₄ a 0°C. Posteriormente se dejó a reflujo de 80°C durante 7 horas. El etanol se retiró por evaporación a presión reducida y al concentrado se le añadieron 30 mL de agua. La solución se llevó a pH=8 con NaHCO₃ y subsecuentemente se realizaron extracciones múltiples con cloroformo (3 x 20mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, filtró y se concentró a presión reducida.

En un matraz bola de 100 mL se colocó el residuo de la reacción anterior, 20 mL de etanol y 2.3 equivalentes (0.9 g) de KOH. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 24 horas; después de este tiempo se concentró a presión reducida. El residuo de la evaporación se resuspendió en 25 mL de agua y se lavó con 15 mL de hexano. Posteriormente se adicionó lentamente HCl concentrado hasta pH=1 lo que provocó la aparición de un precipitado café-rojizo que se filtró al vacío, obteniendo 2.557 g (75.4%) del sólido, que presentó un R_f de 0.14 en el sistema B y un punto de fusión de 207.7-209.6°C.

- *N*-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**2**).

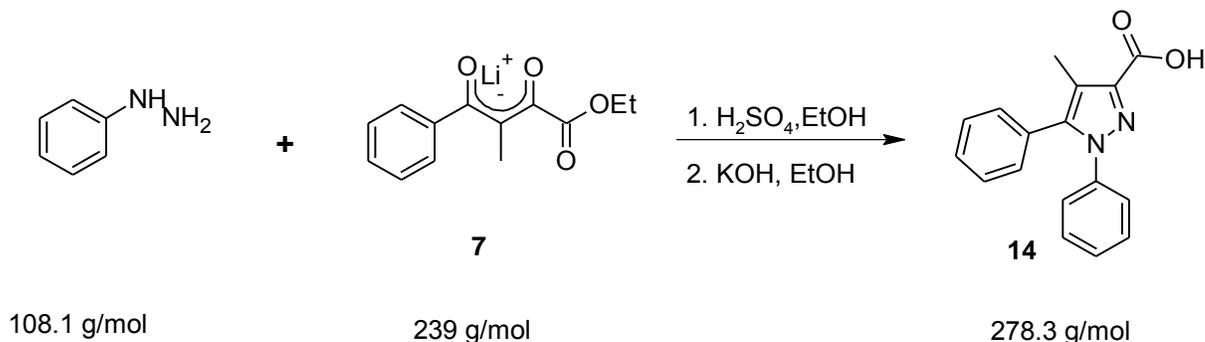


En un matraz bola de 25 mL se colocaron 600 mg del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol carboxílico (intermediario **12**) en 15 mL de tolueno y lentamente se agregaron 0.46 mL de SOCl_2 . Esta reacción se dejó 3 horas a reflujo (107°C). Transcurridas las 3 horas se codestiló tres veces con tolueno (15 mL por cada repetición aprox.).

El remanente de la codestilación mencionada en el paso anterior se disolvió en CHCl_3 y se colocó en baño de hielo y goteó una solución de 0.28 mL de DIPEA y 0.17 mL de 1-aminopiperidina en 20 mL de CHCl_3 . La reacción se dejó agitando 19 horas. El producto de esta reacción se trató con una cama de alumina ácida empleando CHCl_3 para lavar y después se agregaron 50 mg de carbón activado. Se agitó a reflujo por 2 horas y posteriormente la suspensión se separó por filtración para eliminar el exceso de carbón activado. El cloroformo se evaporó por evaporación al vacío y el remanente se agitó con hexano, con lo que precipitó un sólido. Finalmente se obtuvieron 0.525 g (72%) de un sólido crema cristalino brillante, con un R_f de 0.58 en el sistema A y un punto de fusión de $149\text{-}150^\circ\text{C}$.

Síntesis del compuesto 3
(*N*-(piperidin-1-il)-1,5-difenil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida)

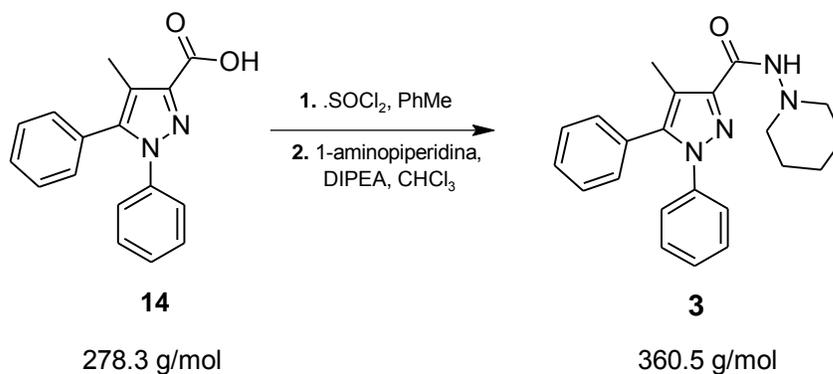
- Síntesis del ácido 1,5-difenil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (**14**).



En un matraz bola de 100 mL, equipado con agitación magnética y refrigerante en posición de reflujo, se colocaron 3.40 g (0.014 moles) del compuesto **7** y 1.39 g (0.0128 moles) de fenilhidrazina. Se agregaron 60 mL de etanol y gota a gota 12 mL de H₂SO₄ a 0°C. La mezcla anterior se dejó a reflujo de 80°C durante 7 horas. El etanol se retiró por evaporación a presión reducida y al concentrado se le añadieron 30 mL de agua y llevó a pH=8 con NaHCO₃. Posteriormente se realizaron extracciones múltiples con cloroformo (3x20mL), secó con Na₂SO₄ y filtró para finalmente concentrarse a presión reducida.

El residuo de la evaporación anterior, se colocó en un matraz bola de 100 mL adaptado con agitación magnética. Se adicionaron 20 mL de etanol y 0.9 g de KOH y la reacción se dejó en agitación por 24 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se agregaron 0.5 equivalentes adicionales de KOH y nuevamente se agitó por 24 horas más. Posteriormente se concentró a presión reducida, y el remanente se resuspendió en agua y se lavó con CHCl₃ (2x20mL). La fase acuosa se llevó a pH = 3 con HCl concentrado, con lo que precipitó un sólido. Se obtuvieron 2.918 g (82%) de un sólido café claro. (Rf. en el sistema A y Pf: 259.9 - 261.5 °C).

- Síntesis de *N*-(piperidin-1-il)-5-fenil-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**3**).



En un matraz bola de 25 mL equipado con agitación magnética y refrigerante para reflujo, se depositaron 500 mg del intermediario **14**, producto de la reacción descrita en el paso anterior, con 20 mL de tolueno y 0.6 mL de SOCl₂, los cuales se agregaron lentamente, se agitó durante 5 horas a reflujo de 108°C para formar el cloruro de ácido correspondiente, después se codestiló tres veces con tolueno (15mL aprox.).

El remanente de la codestilación se disolvió en 10 mL de CHCl₃ y se colocó en baño de hielo para la adición por goteo de 15 mL de CHCl₃ con 0.23 mL de DIPEA y 0.15mL de 1-aminopiperidina; esta reacción se dejó agitando 24 horas. El producto de esta reacción se lavó con ácido cítrico 0.5 M (15x3mL). Se agregaron 50 mg de carbón activado a la fase orgánica. Se agitó a reflujo por 2 horas y posteriormente se filtró para eliminar el exceso de carbón activado. El cloroformo se eliminó por evaporación al vacío y el remanente se agitó con hexano, con lo que precipitó un sólido. Finalmente se obtuvieron 0.5176 g (80%) de un sólido color crema claro cuyo R_f es de 0.47 en el sistema A. Rendimiento global 62%.

Dispersiones sólidas.

Preparación de POV 1

En un matraz bola de 100 mL con agitador magnético se colocaron 110 mg del compuesto **1** y se agregaron 16.5 mL de una solución de polivinilpirrolidona al 5% en etanol, esta mezcla se agitó alrededor de 18 horas a temperatura ambiente y posteriormente se cambió la temperatura a 60°C durante dos horas más. Finalmente el disolvente se retiró por evaporación a presión reducida hasta sequedad total del sólido. Se obtuvieron 0.9303 g (99.5%) de un sólido color crema-amarillento cristalino y brillante, el cual se caracterizó por DSC, DTA y TA.

Preparación de POV 2

En un matraz bola de 100 mL con previo equipamiento de agitación magnética se agregaron 100 mg del compuesto **2** y 15.4 mL de PVP al 5% en etanol, se colocó en agitación a temperatura ambiente obteniendo una solución naranja claro, después de 18 horas de agitación la temperatura se elevó la temperatura a 60°C por dos horas. Posteriormente se evaporó el etanol a presión reducida hasta la eliminación total del disolvente, con ello se obtuvieron 0.8663 (99.6%) g de un sólido crema claro con aspecto cristalino y brillante.

Preparación de POV 3

Se colocaron 110 mg del compuesto **5** en un matraz bola de 100 mL equipado con agitador magnético, al cual se le agregaron 16.5 mL de una solución etanólica de polivinilpirrolidona al 5%, se agitó por 18 horas a temperatura ambiente y 2 horas más a 60°C al igual que los otros compuestos. Finalmente se concentró hasta sequedad a presión reducida para obtener 0.9289 (99.5) g de un sólido color crema (amarillento) de aspecto brillante y cristalino.

Caracterización con Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La caracterización de las dispersiones sólidas se realizó en la Unidad de Servicios Analíticos (USAI) a cargo de Margarita Portilla Bauza y Elvia del Socorro Reynoso Herrera, para realizar esta técnica se necesitaron alrededor de 20 mg de compuesto y de las mezclas físicas, y 30 mg de cada una de las DS, debido a que el polvo presentaba estática, así como, mayor dificultad para la toma de muestra, sin embargo una de las ventajas para esta técnica es que se necesita una mínima cantidad de compuesto sólido, el cual se colocó en cápsulas de aluminio de 40 µL con orificio en la tapa y se sometió a un calentamiento de 5 °C/min en un rango de temperatura de 20 a 350 °C.

Microscopía electrónica de barrido.

Para la realización del estudio con microscopía electrónica, se utilizó un Microscopio Jeol JSM 5900 LV para ello, las muestras se bañaron con oro.

Los parámetros de lectura fueron: tamaño de partículas menor a 5 mm y voltaje de 20 kV.

APÉNDICE II

ESPECTROS

Tabla 11. Índice de espectros.

No. de Espectro	Descripción
1	EMEI de 5-fenil-1-(2,4diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxilato de etilo. (8)
2	EMEI de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxilato de etilo (11)
3	EMFAB de 5-fenil-1-(2,4diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-carboxilato de etilo. (13)
4	EMFAB del ácido 5-fenil-1-(2,4diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxílico. (9)
5	RMN- ¹ H del ácido 5-fenil-1-(2,4diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxílico. (9)
6	EMFAB del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxílico. (12)
7	RMN- ¹ H del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxílico. (12)
8	EMFAB del ácido 1,5-difenil-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxílico (13).
9	RMN- ¹ H del ácido 1,5-difenil-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxílico (13).
10	EMFAB de <i>N</i> -(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (1).
11	RMN- ¹ H de <i>N</i> -(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (1).
12	RMN- ¹³ C de <i>N</i> -(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (1).

Tabla 11. Índice de espectros (Continuación).

13	IR de <i>N</i> -(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (1).
14	EMFAB de <i>N</i> -(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (2).
15	RMN- ¹ H de <i>N</i> -(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (2).
16	RMN- ¹³ C de <i>N</i> -(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (2).
17	IR de <i>N</i> -(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (2).
18	EM FAB <i>N</i> -(piperidin-1-il)-1,5-difenil-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (3)
19	RMN- ¹ H <i>N</i> -(piperidin-1-il)-1,5-difenil-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (3).
20	RMN- ¹³ C <i>N</i> -(piperidin-1-il)-1,5-difenil-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (3).
21	IR de <i>N</i> -(piperidin-1-il)-1,5-difenil-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida (3)
22	IR POV 1
23	IR Mezcla física 1 (Compuesto 1 + PVP)
24	IR POV 2
25	IR Mezcla Física 2 (Compuesto 2 + PVP)
26	IR POV 3

Tabla 11. Índice de espectros (Continuación).

27	IR Mezcla física 3 (Compuesto 3 + PVP)
28	IR Comparativo PVP, Compuesto 1 , POV-1 , Mezcla Física 1
29	IR Comparativo PVP, Compuesto 2 , POV-2 , Mezcla Física 2
30	IR Comparativo PVP, Compuesto 3 , POV-3 , Mezcla Física 3

Tabla 12. Índice de termogramas.

No. de Termograma	Descripción
1	DSC Compuesto 1 , POV 1 y Mezcla Física 1
2	DSC Compuesto 2 , POV 2 y Mezcla Física 2
3	DSC Compuesto 3 , POV 3 y Mezcla Física 3
4	DSC Polivinilpirrolidona

Caracterización de intermediarios.

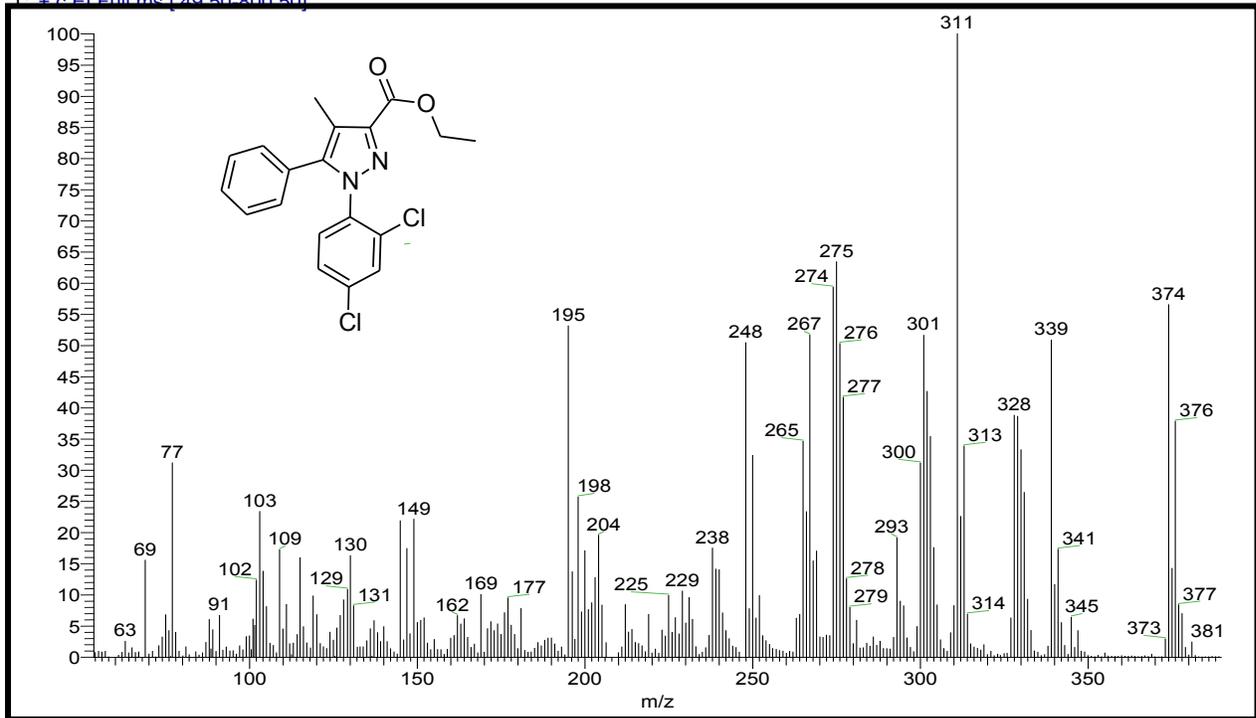
APÉNDICE II: ESPECTROS

D:\Xcalibur\data\USA\ND\OT3999_1
szComment

4/23/2010 5:45:25 PM

PYR-1

OT3999_1 #5-6 RT: 0.82-1.03 AV: 2 SB: 9 4.31-5.54 , 0.21-0.41 NL: 3.76E6
T: +c EI Full.ms [49.50-800.50]



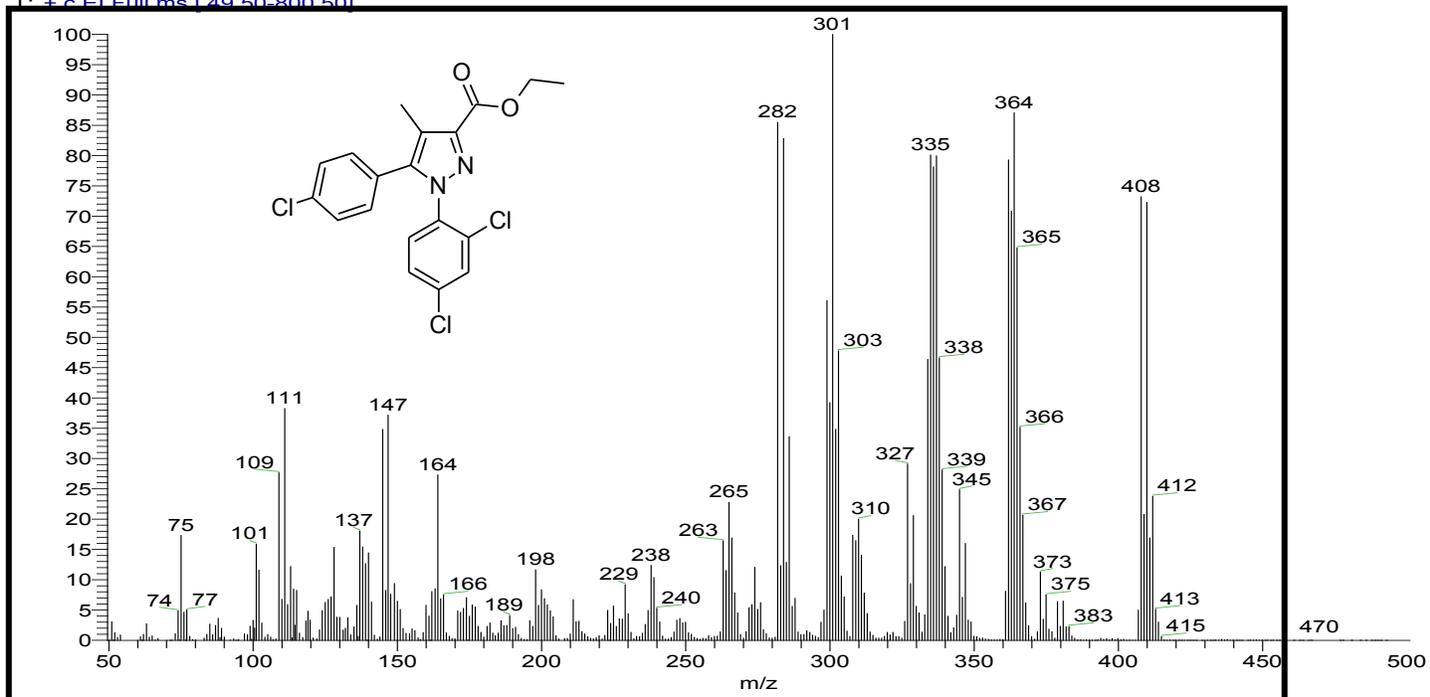
D:\Xcalibur\data\USA\ND\OT4298_1_1

6/11/2010 5:32:27 PM

PYR-2

Espectro 1. EMEI de 5-fenil-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxilato de etilo. (8)

OT4298_1 #5-6 RT: 0.29-1.04 AV: 2 SB: 9 4.31-5.54 , 0.21-0.41 NL: 3.76E6
T: +c EI Full.ms [49.50-800.50]



Espectro 2. EMEI de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxilato de etilo. (11)

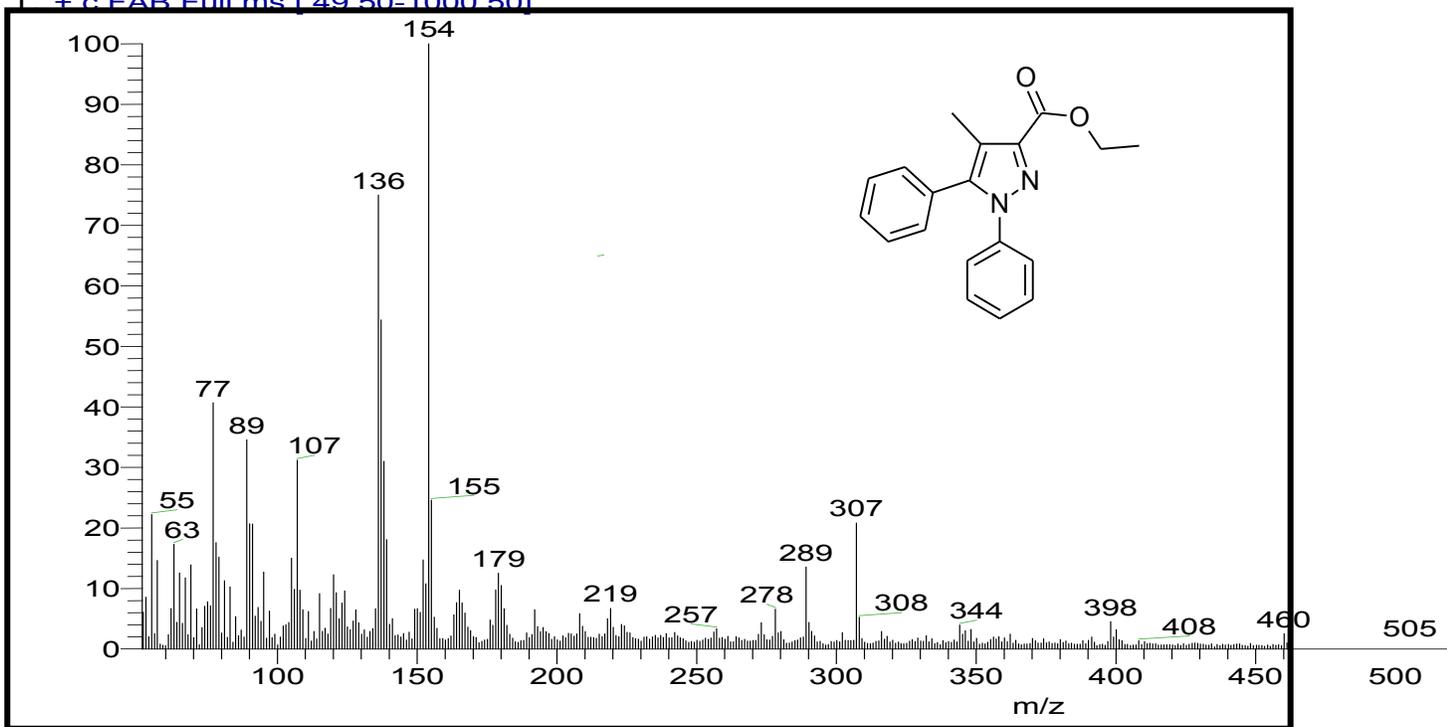
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT5239_2

1/20/2011 7:05:31 PM

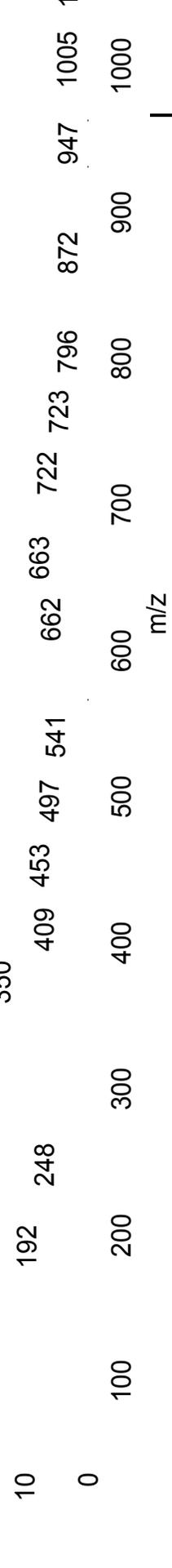
DESC-SOL

OT5239_2 #2-4 RT: 0.22-0.67 AV: 3 NL: 4.07E6

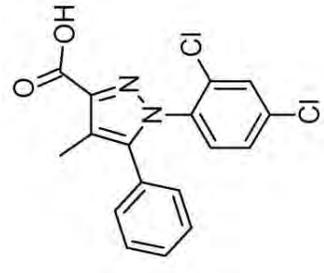
T: + c FAB Full.ms [49 50-1000 50]



Espectro 3. EMFAB de 5-fenil-1-(2,4diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxilato de etilo. (13)



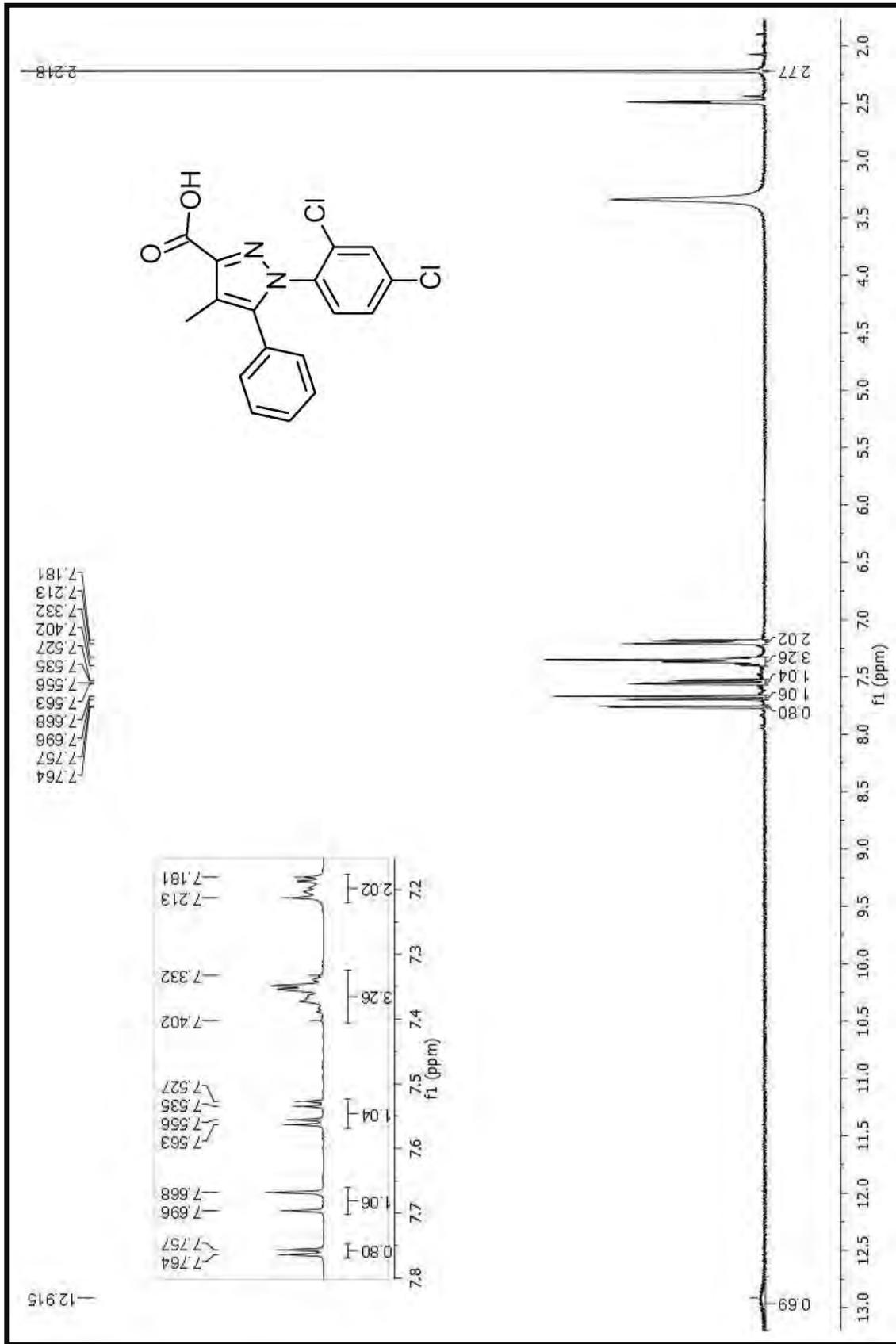
OT7137_1 #1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 6.84E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]



OT7137_1 #1-4 RT: 0.00-0.71 AV: 4 NL: 6.84E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]

Espectro 4. EMFAB del ácido 5-fenil-1-(2,4diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxílico. (9)

6.0	663	663
5.5	662	663
5.0	453	453
4.5	409	409



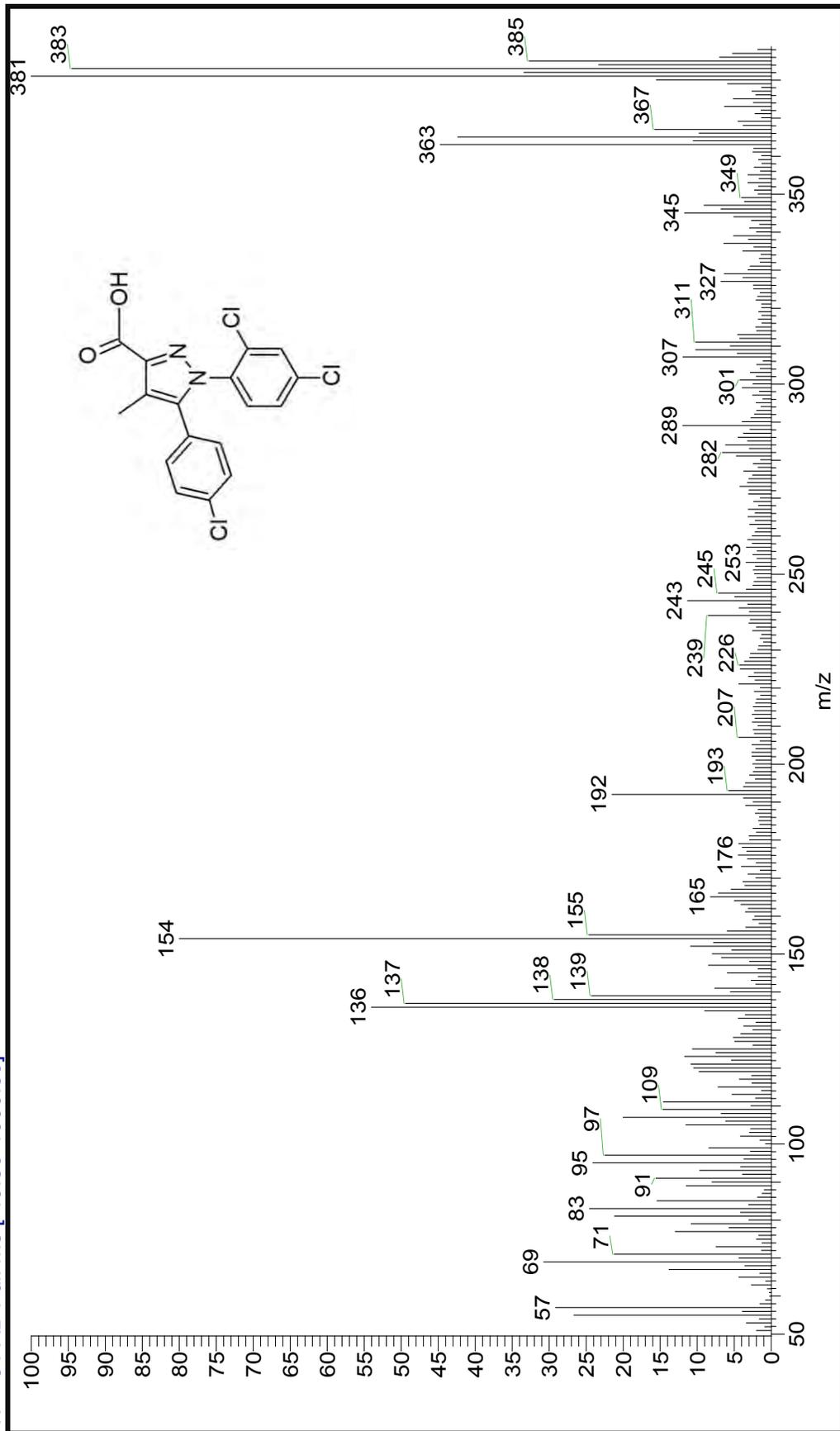
Espectro 5. RMN-¹H del ácido 5-fenil-1-(2,4diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxílico. (9)

PYR2-OH

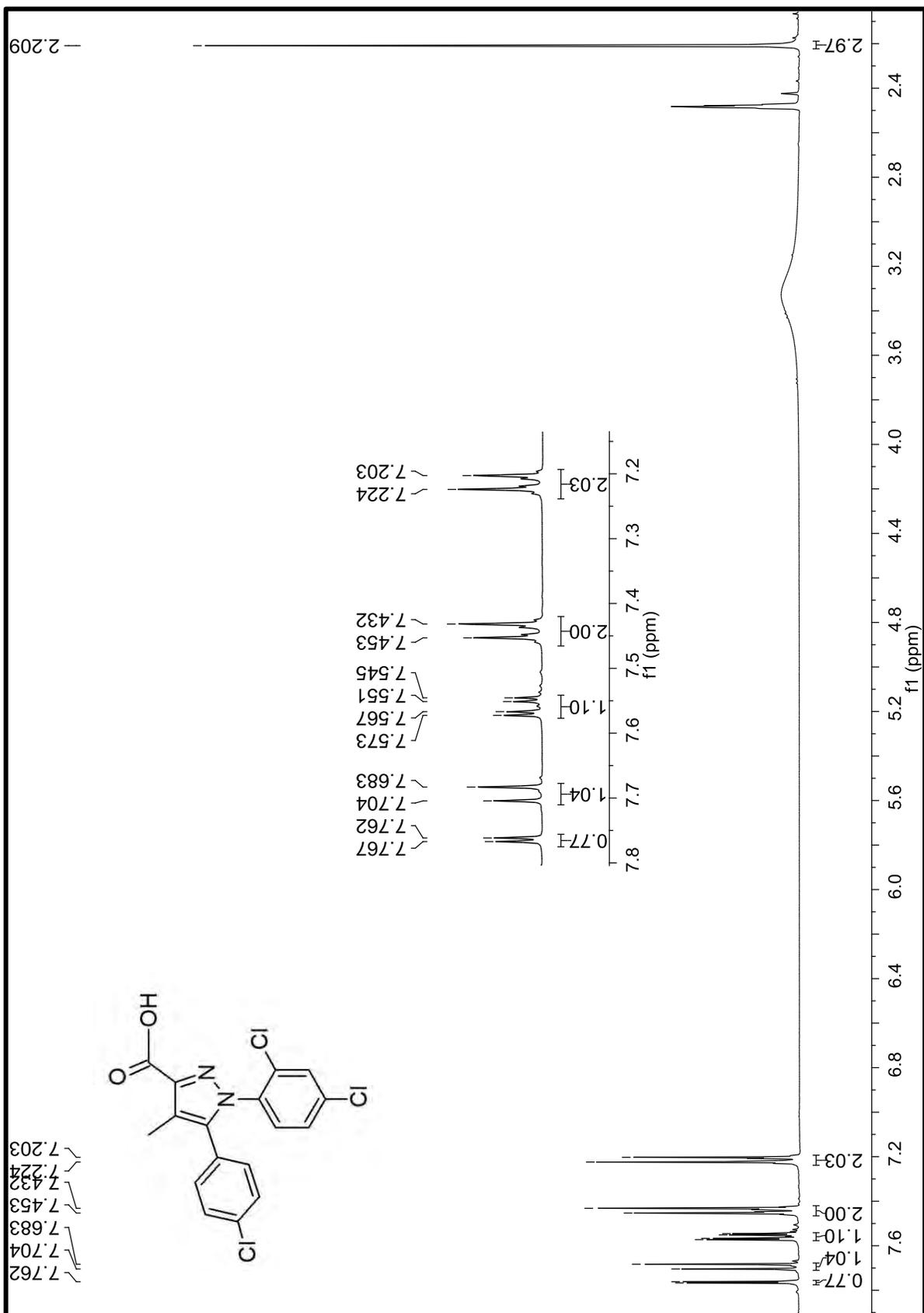
6/30/2010 12:07:08 PM

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT4352_1

OT4352_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 4.23E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



Espectro 6. EMFAB del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxílico. (12)



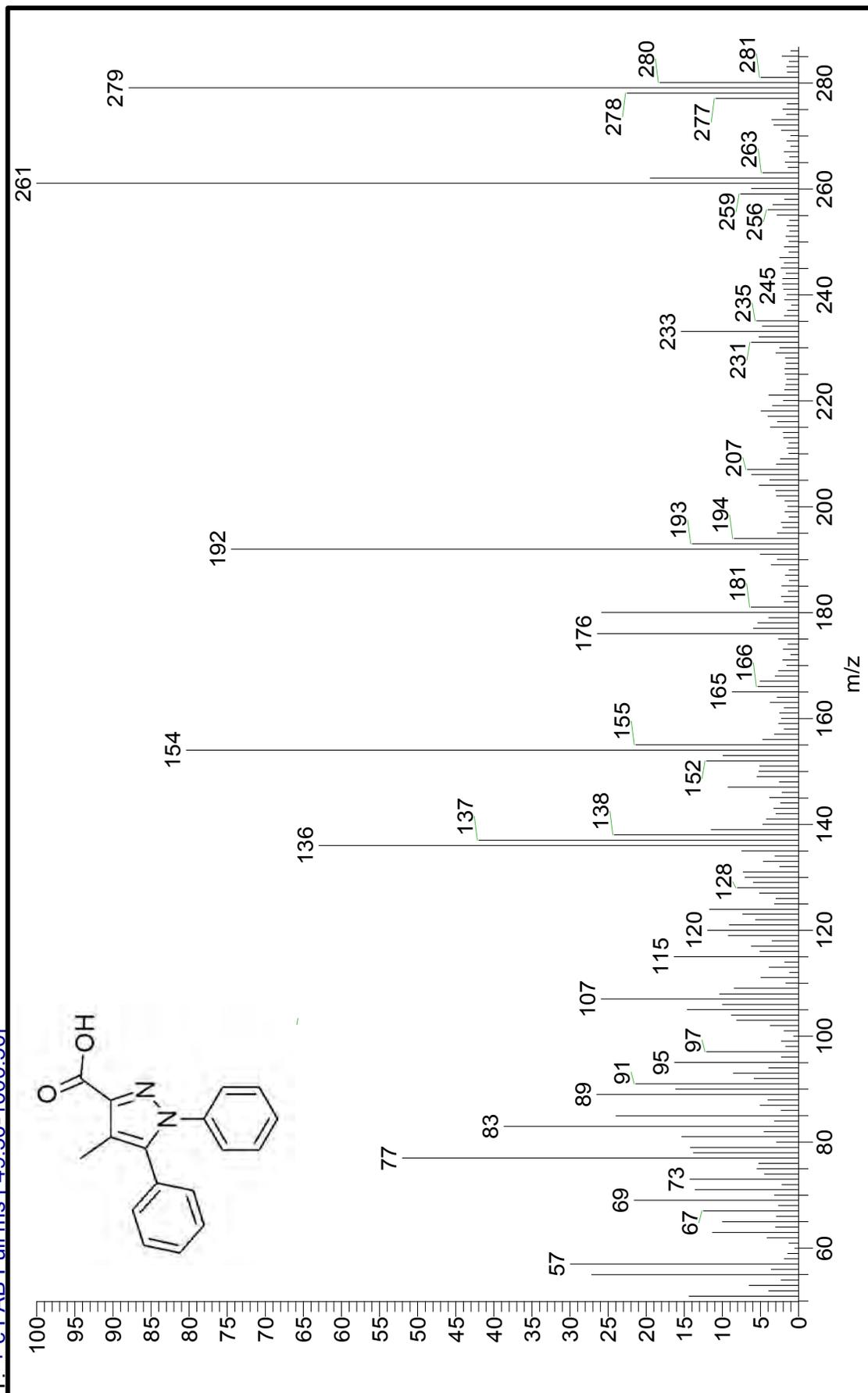
PYR-SOH

10/14/2011 1:36:40 PM

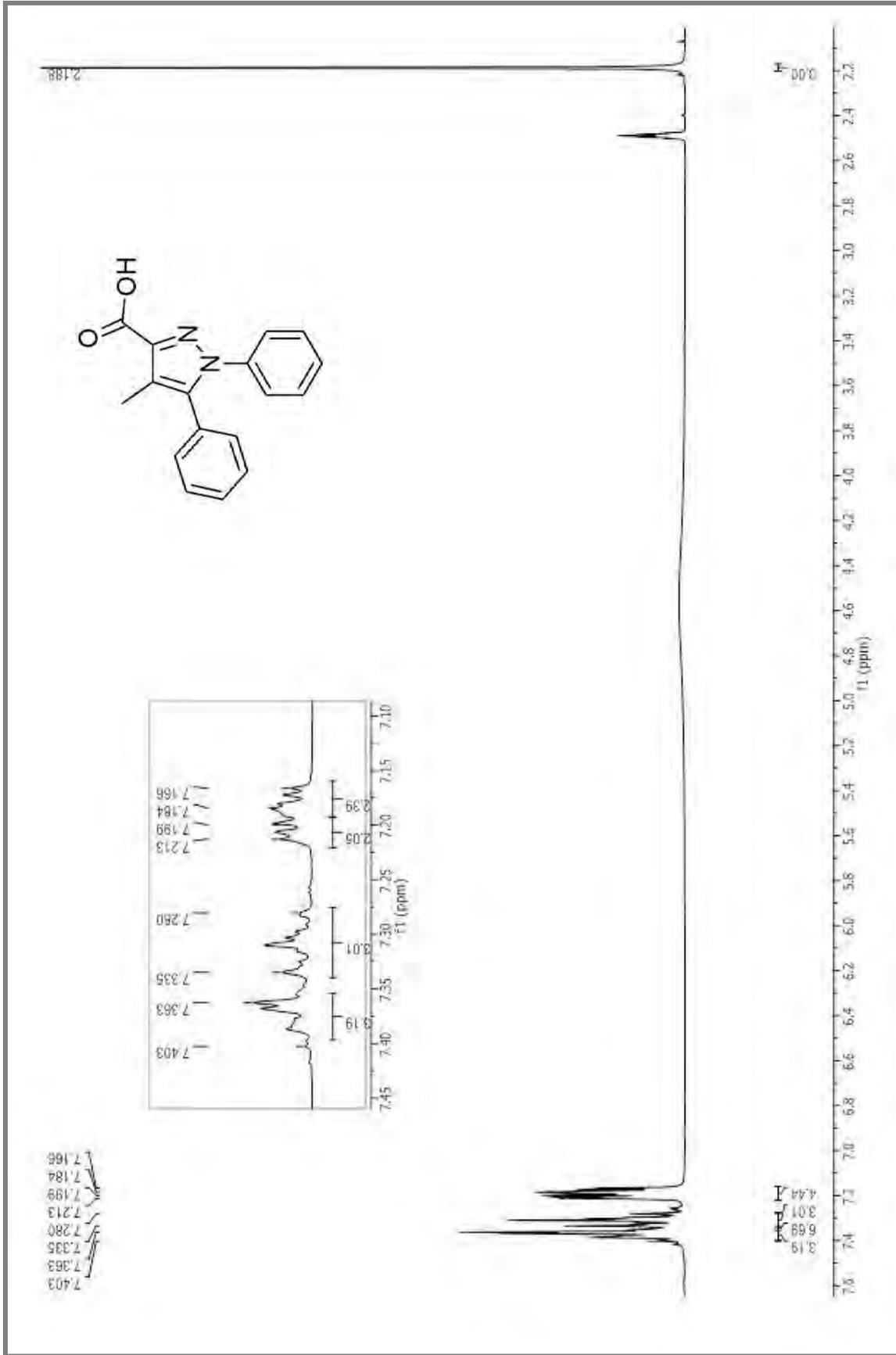
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT6842_1

OT6842_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 3.46E6

T: + c FAB Full.ms [49.50-1000.50]



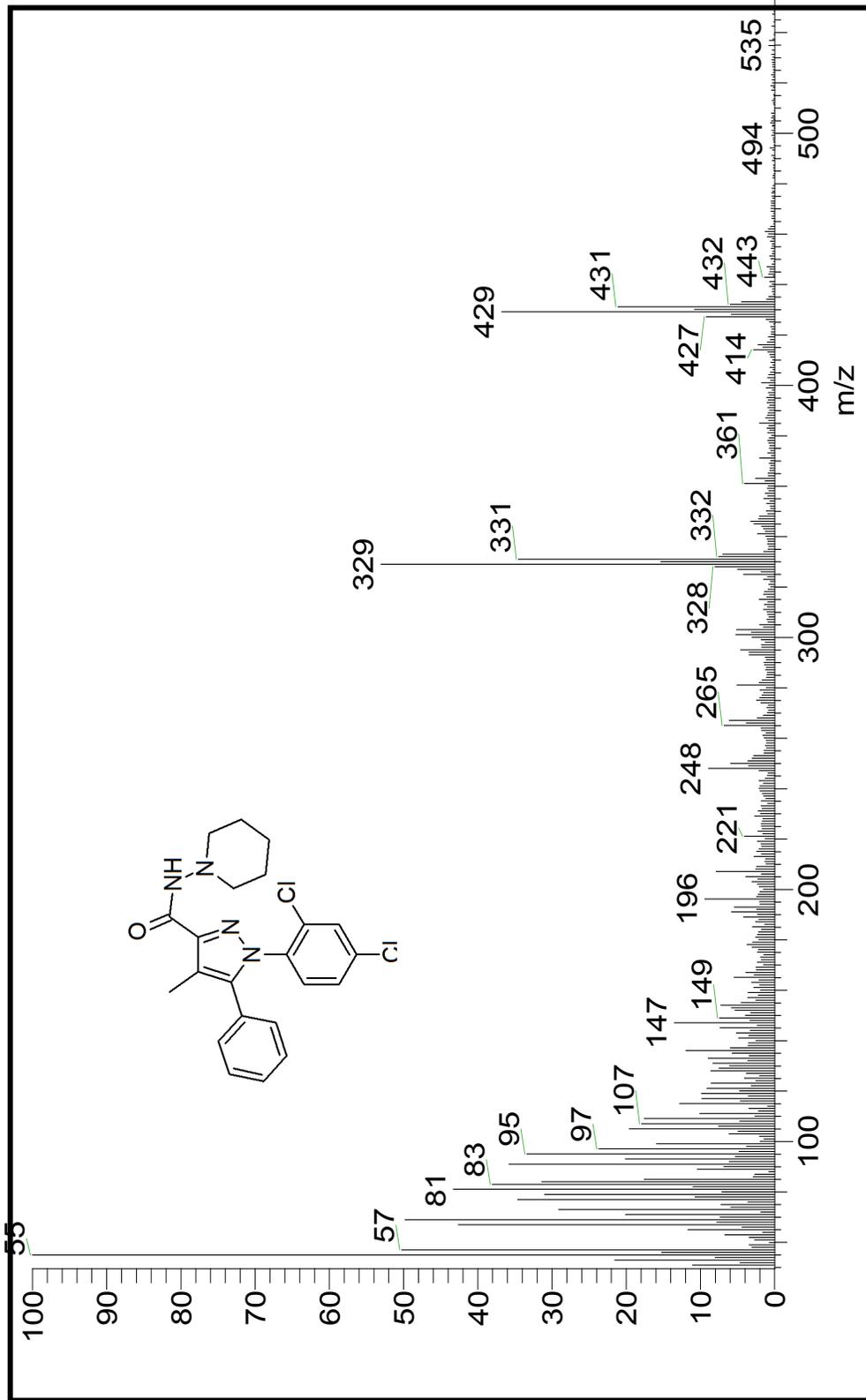
Espectro 8. EMFAB del ácido 1,5-difenil-4-metil-1H-pirazol-3-carboxílico. (14)



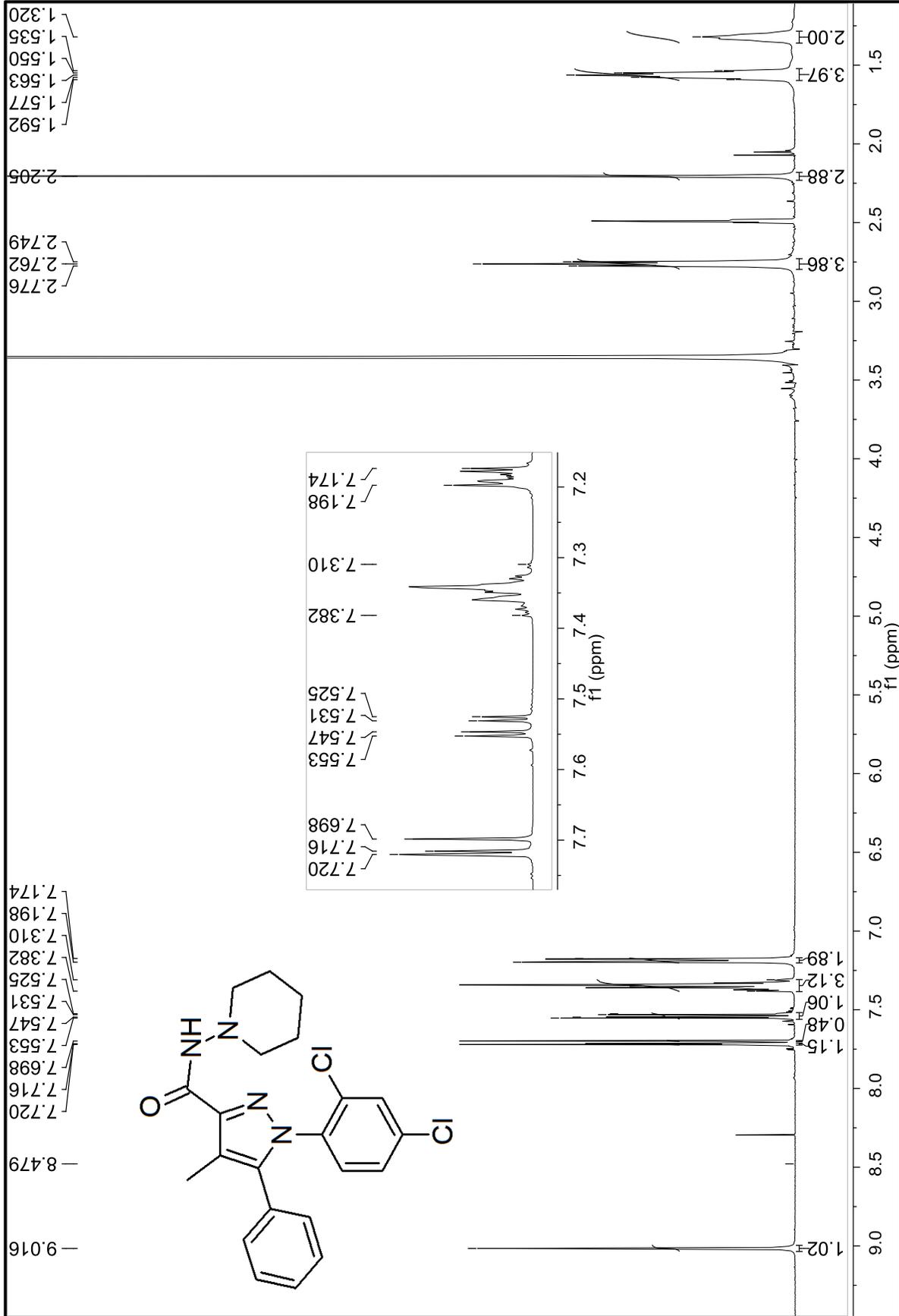
Espectro 9. RMN-¹H del ácido 1,5-difenil-4-metil-1H-pirazol-3-carboxílico. (14)

Caracterización de compuestos finales.

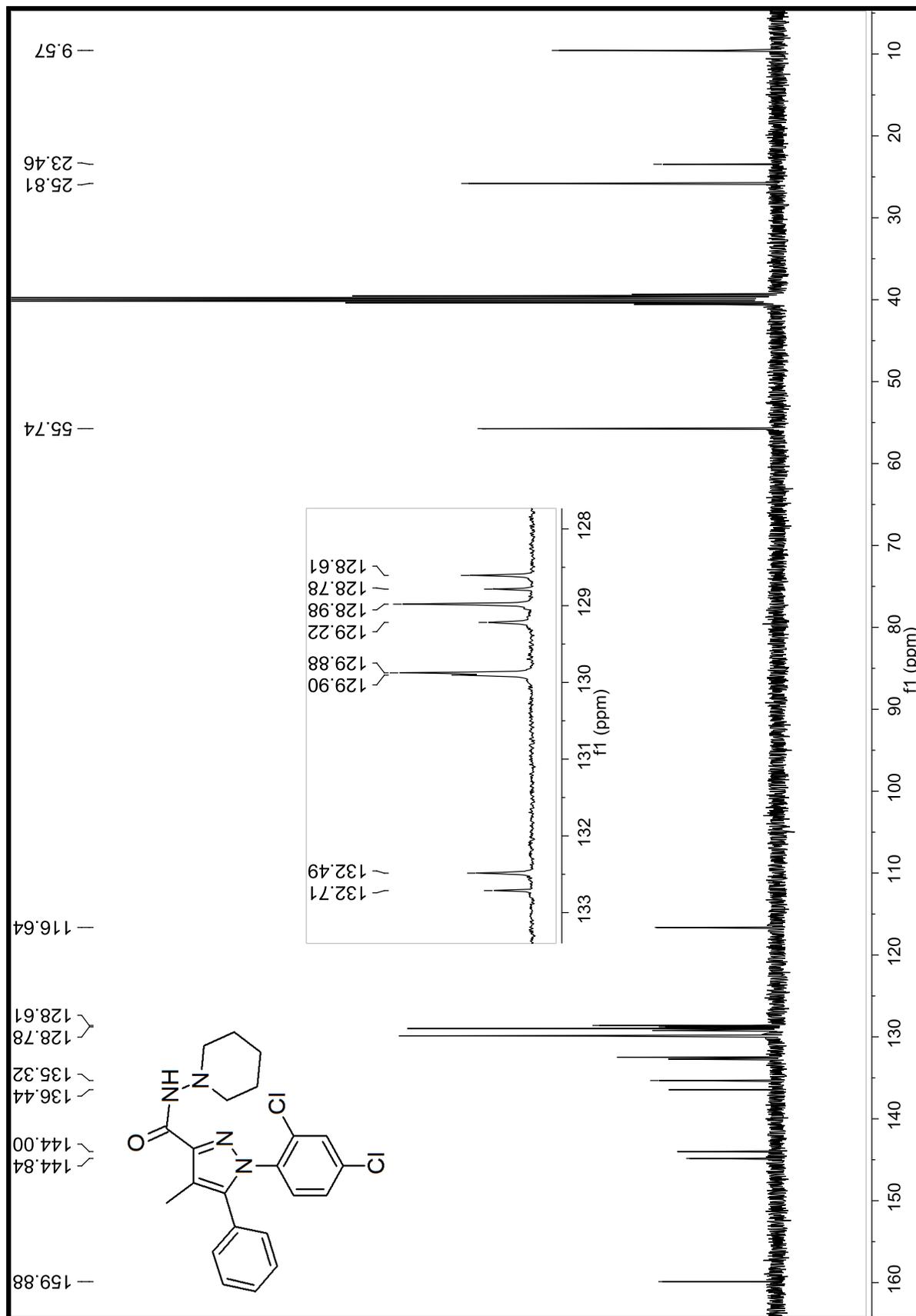
OT5240_1 #2-3 RT: 0.22-0.45 AV: 2 NL: 3.16E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



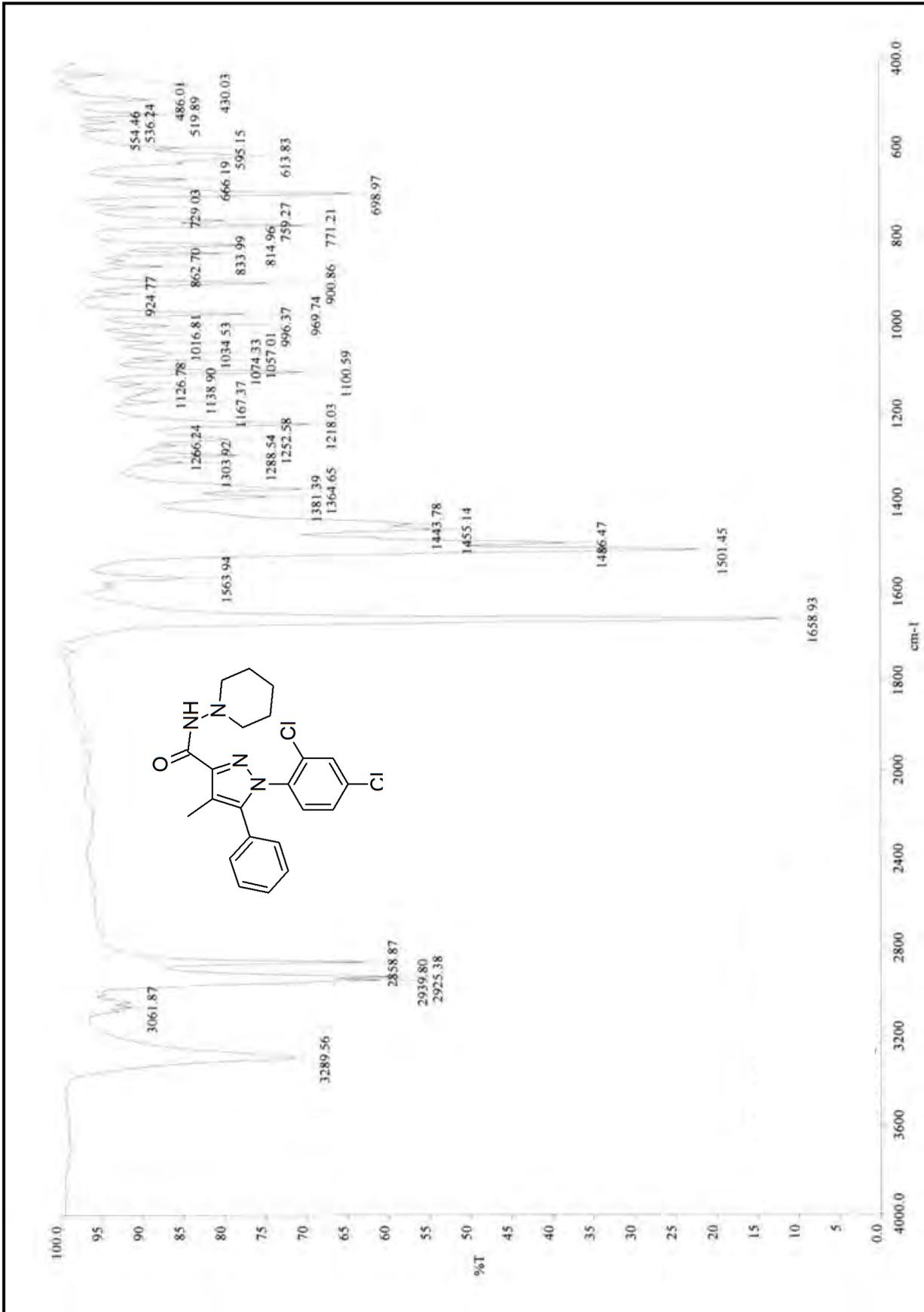
Espectro 10. EMFAB de *N*-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida. (1)



Espectro 11. RMN-¹H de N-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida. (1)



Espectro 12. RMN-¹³C de *N*-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida. (1)

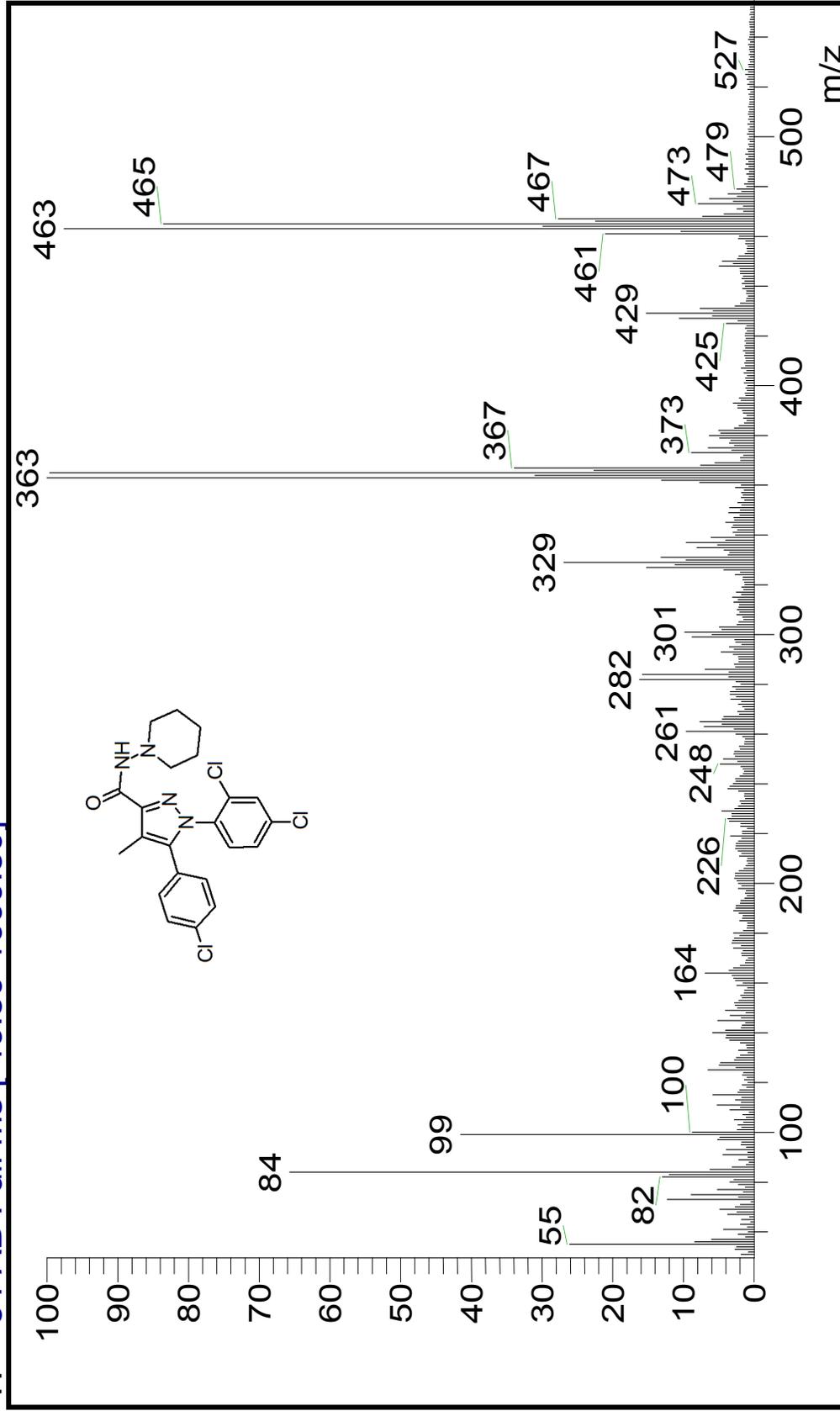


Espectro 13. IR de *N*-(piperidin-1-yl)-5-(4-(2,4-diclorofenil)-1H-pirazol-3-carboxamida. (1)

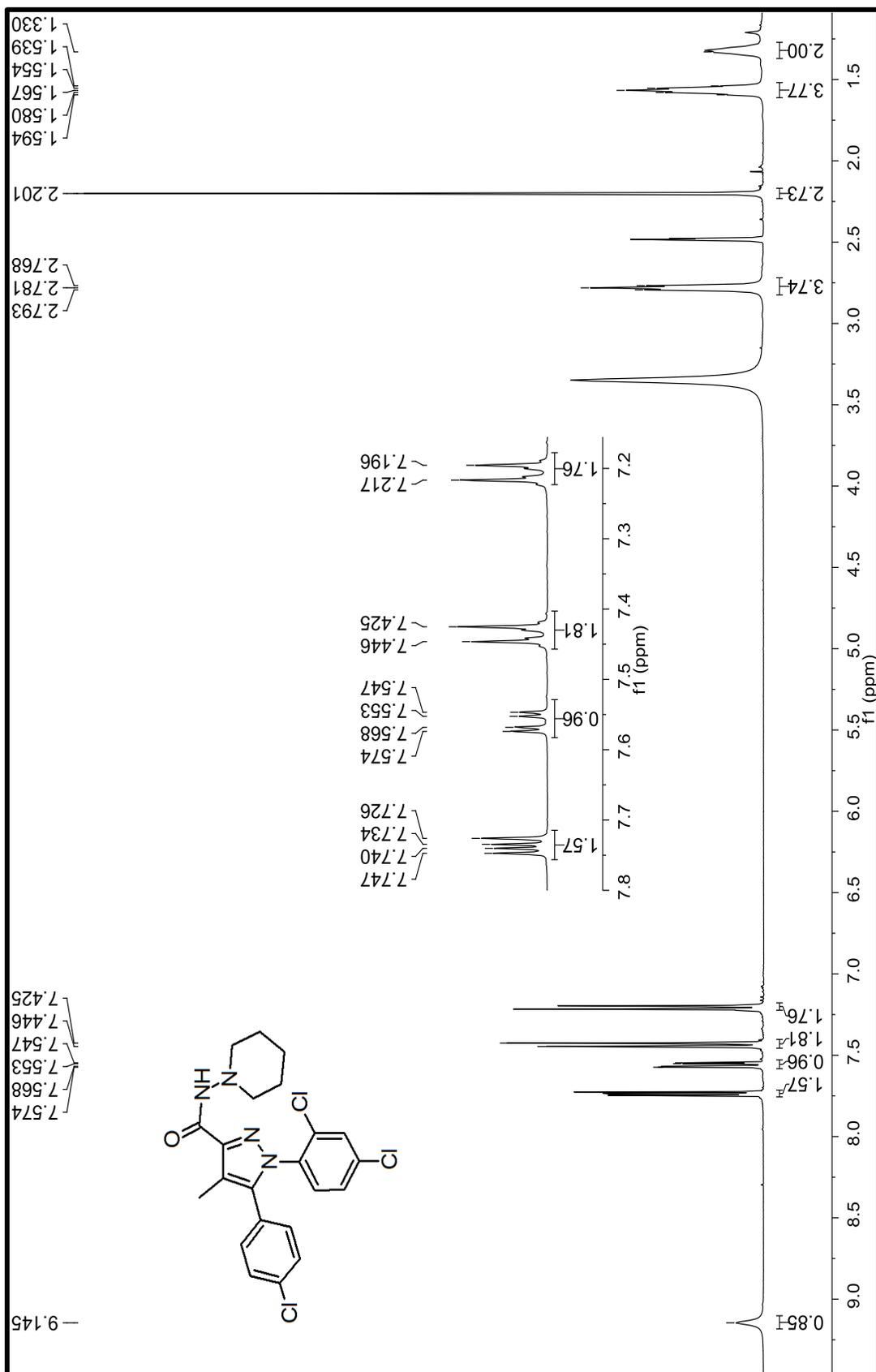
D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT5411_1
GLICEROL

2/10/2011 3:02:32 PM

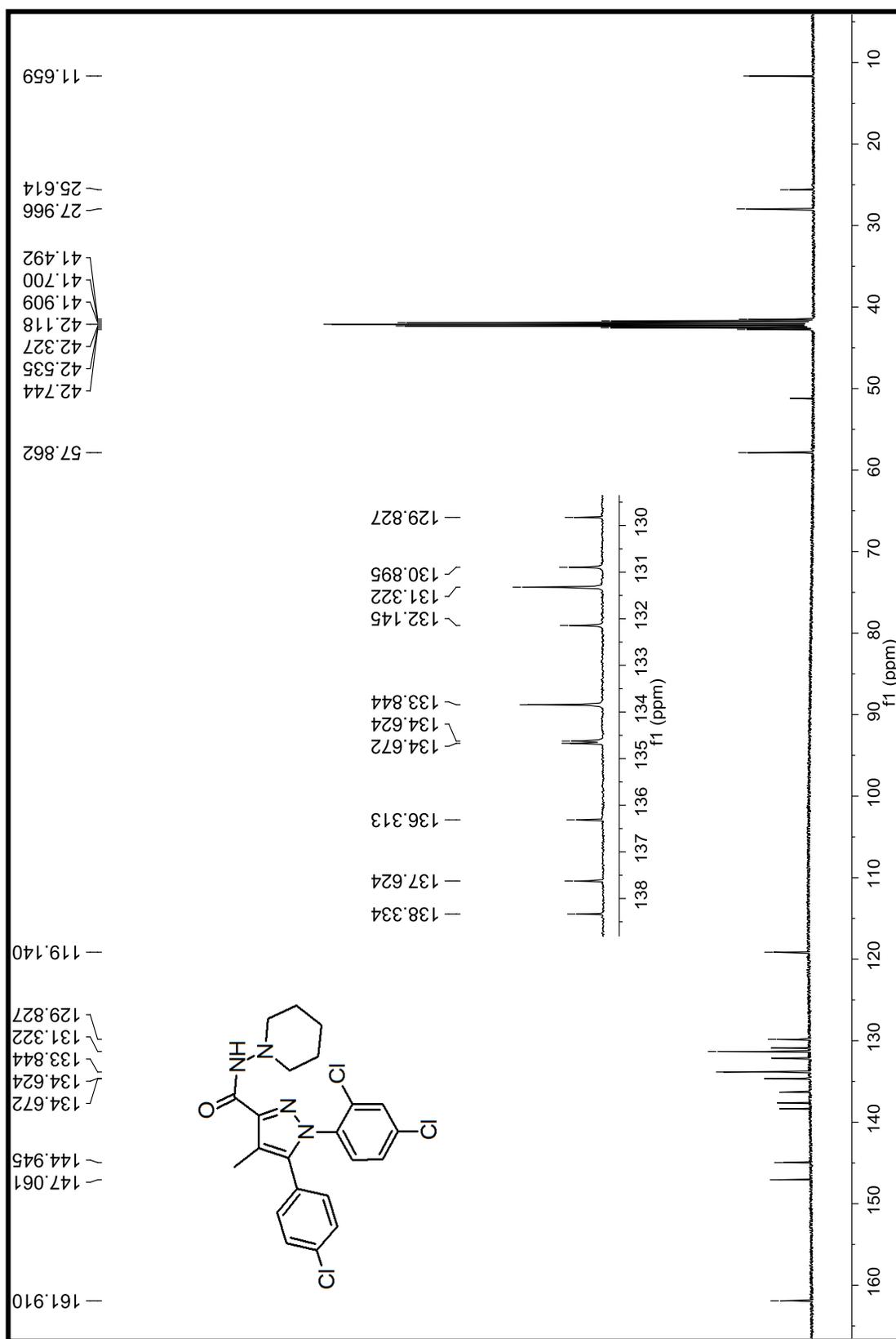
OT5411_1 #1-4 RT: 0.00-0.67 AV: 4 NL: 9.26E6
T: + c FAB Full ms [49.50-1000.50]



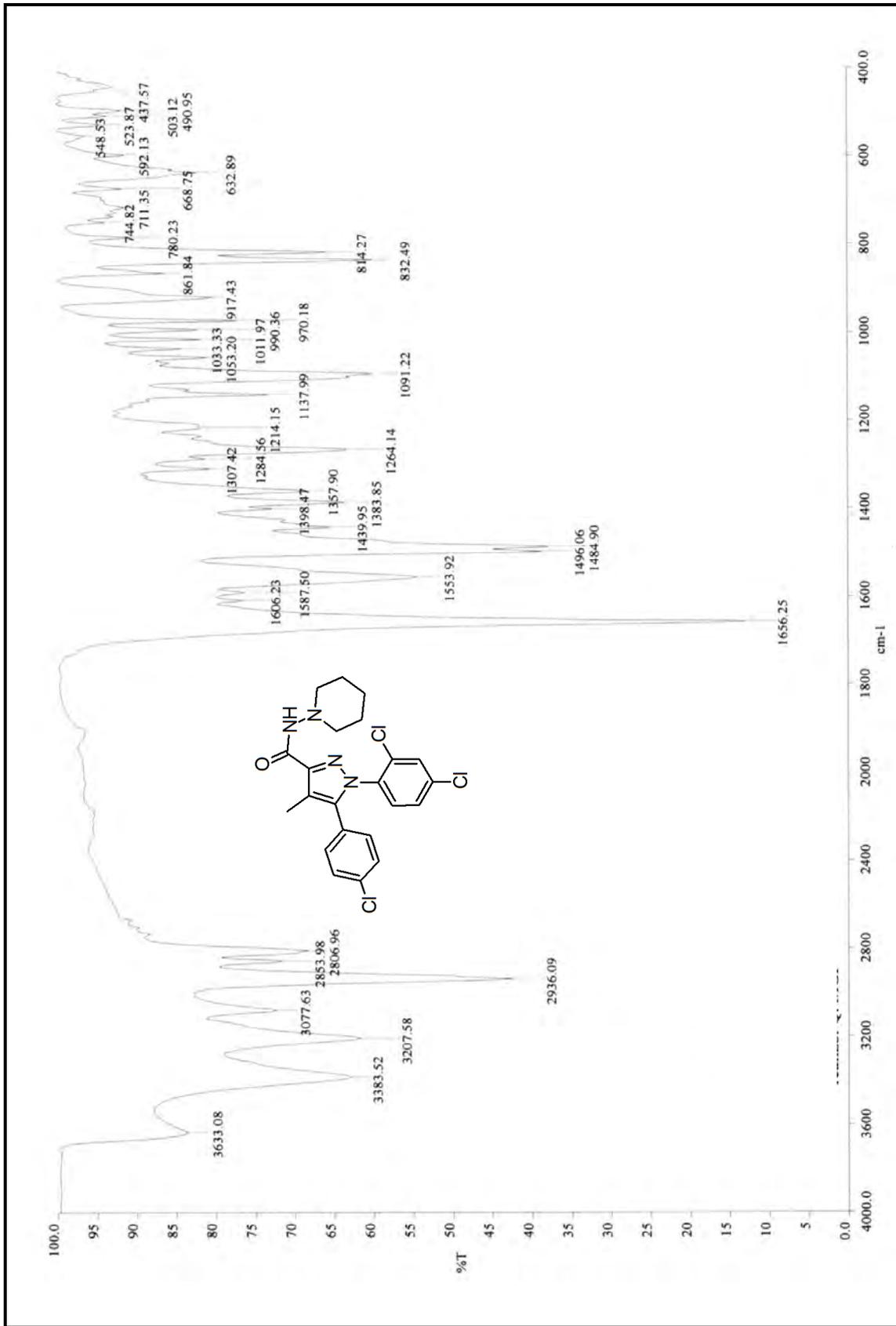
Espectro 14. EMFAB de N-(piperidin-1-il)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida. (2)



Espectro 15. RMN-¹H de *N*-(piperidin-1-yl)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida. (2)



Espectro 16. RMN-¹³C de *N*-(piperidin-1-yl)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida. (2)



Espectro 17. IR de *N*-(piperidin-1-yl)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida. (2)

PYR-5NH6

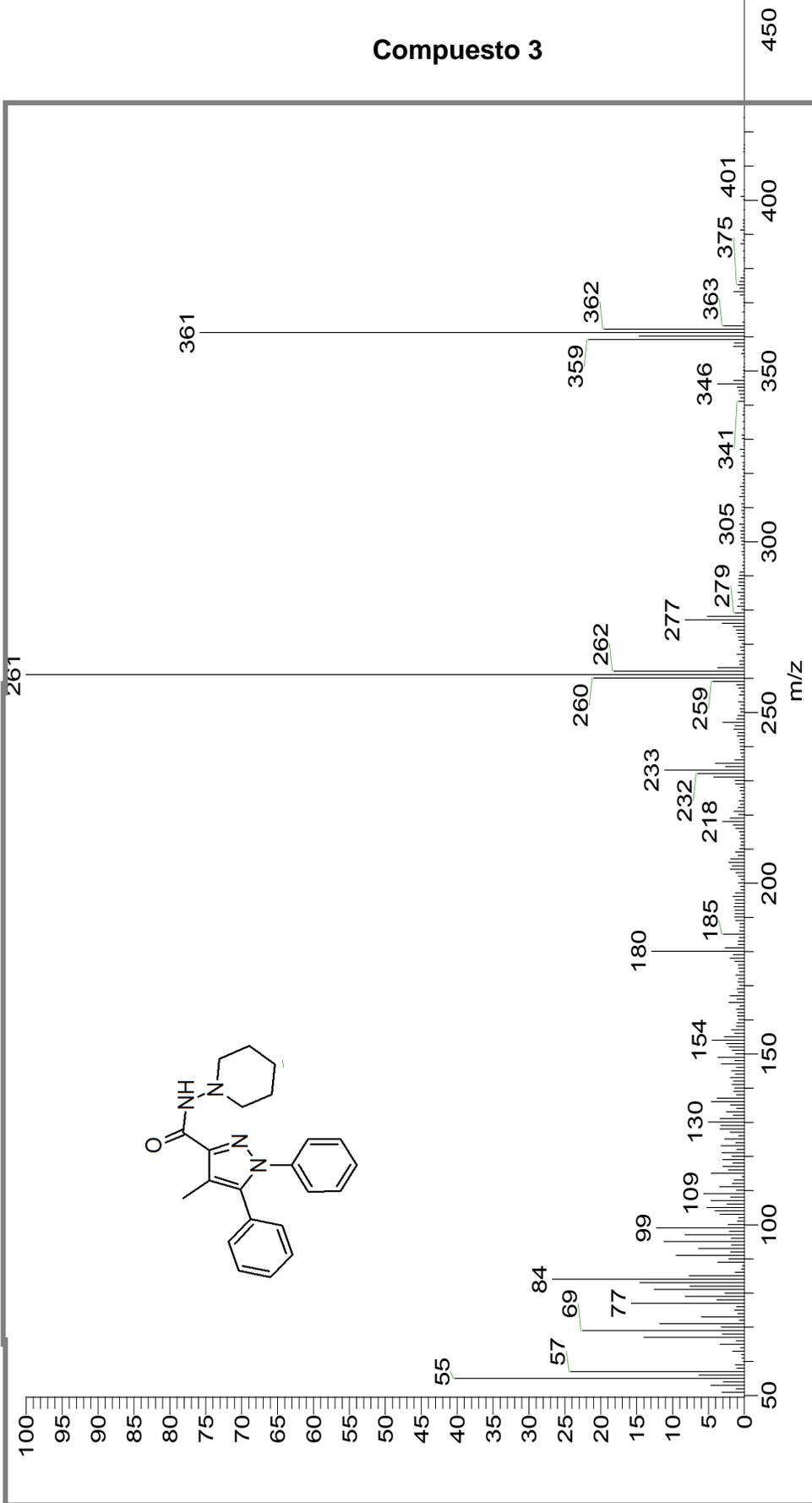
12/9/2010 6:57:42 PM

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT5169_2

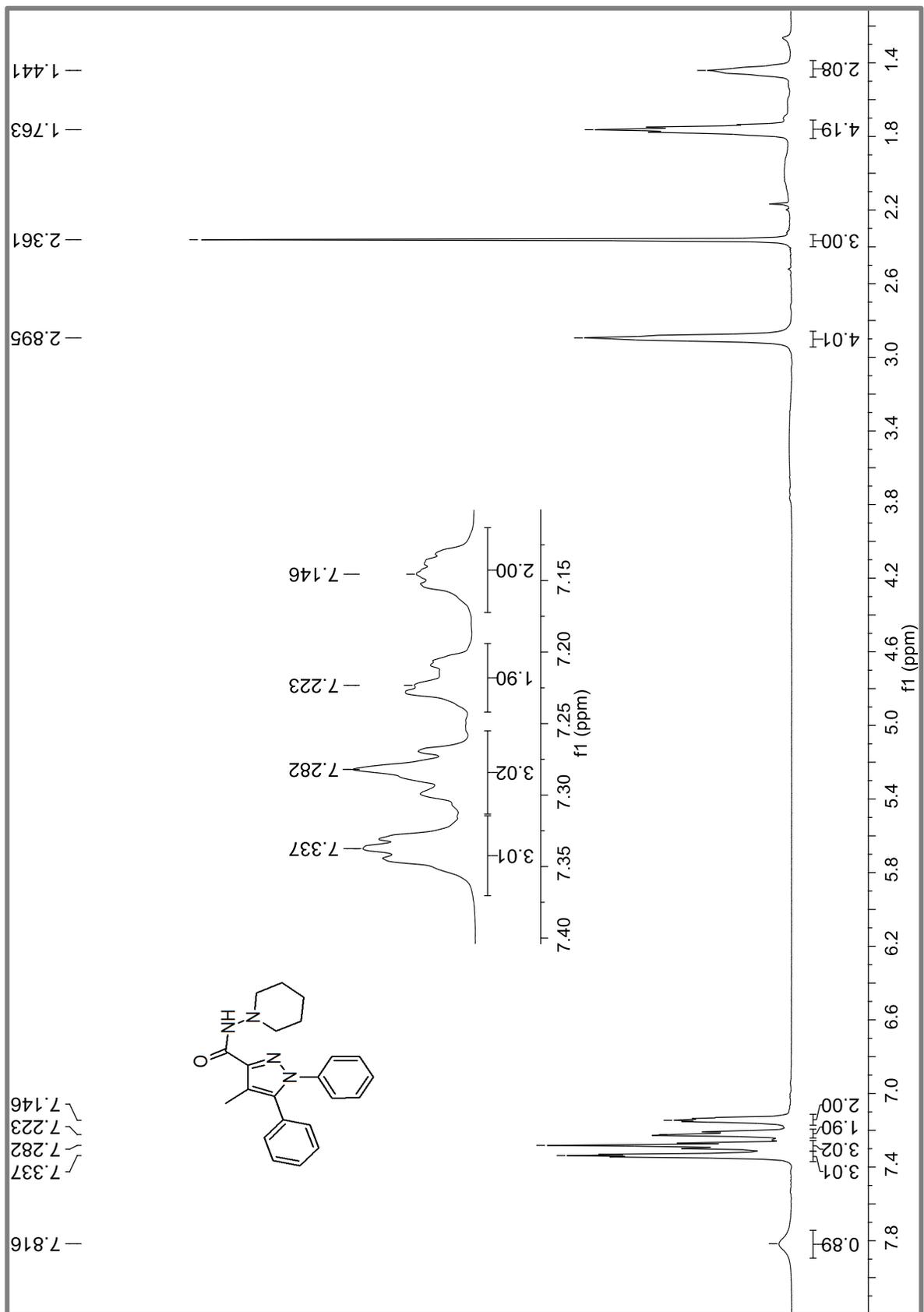
szComment

OT5169_2 #1.

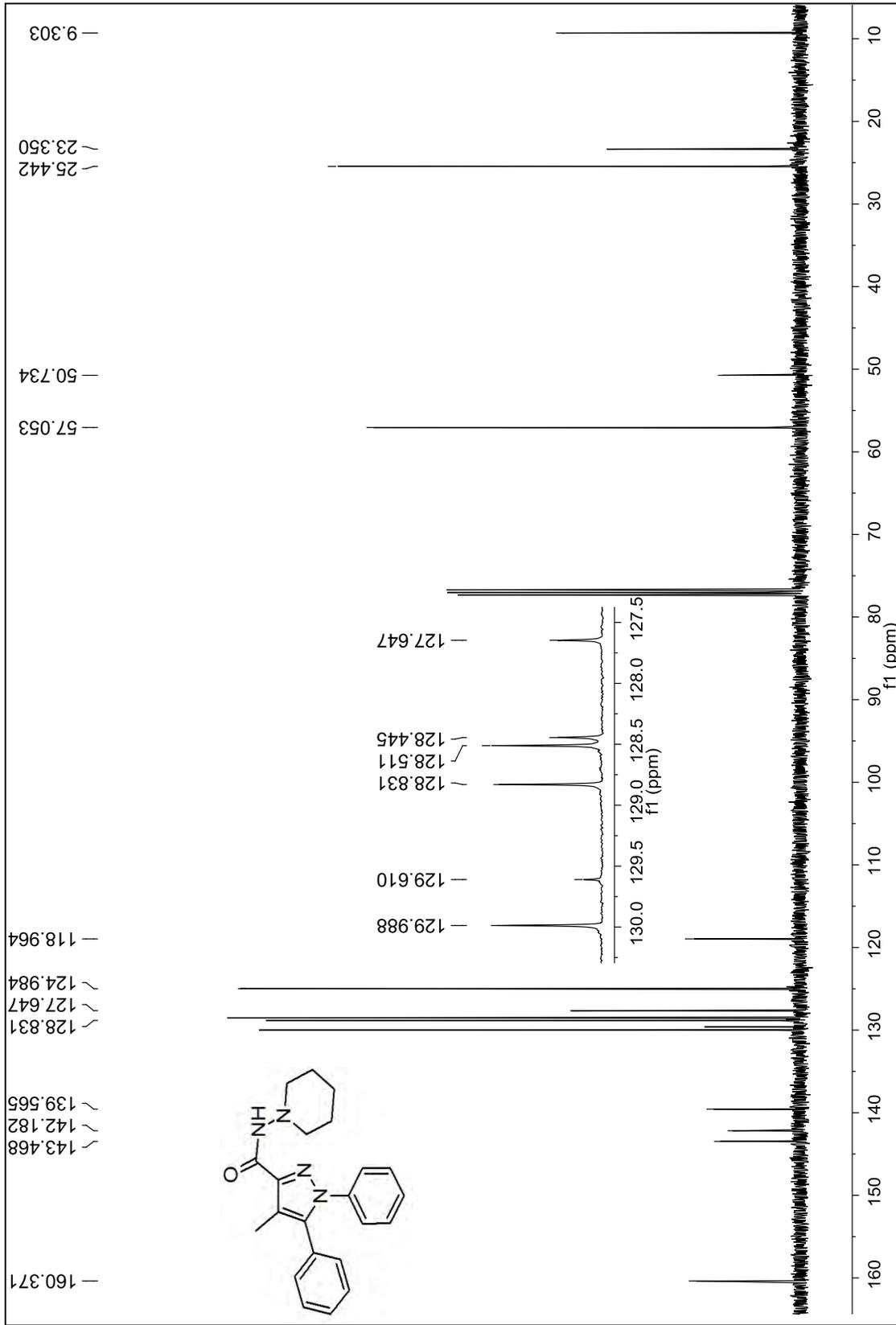
T: + c FAB Fu



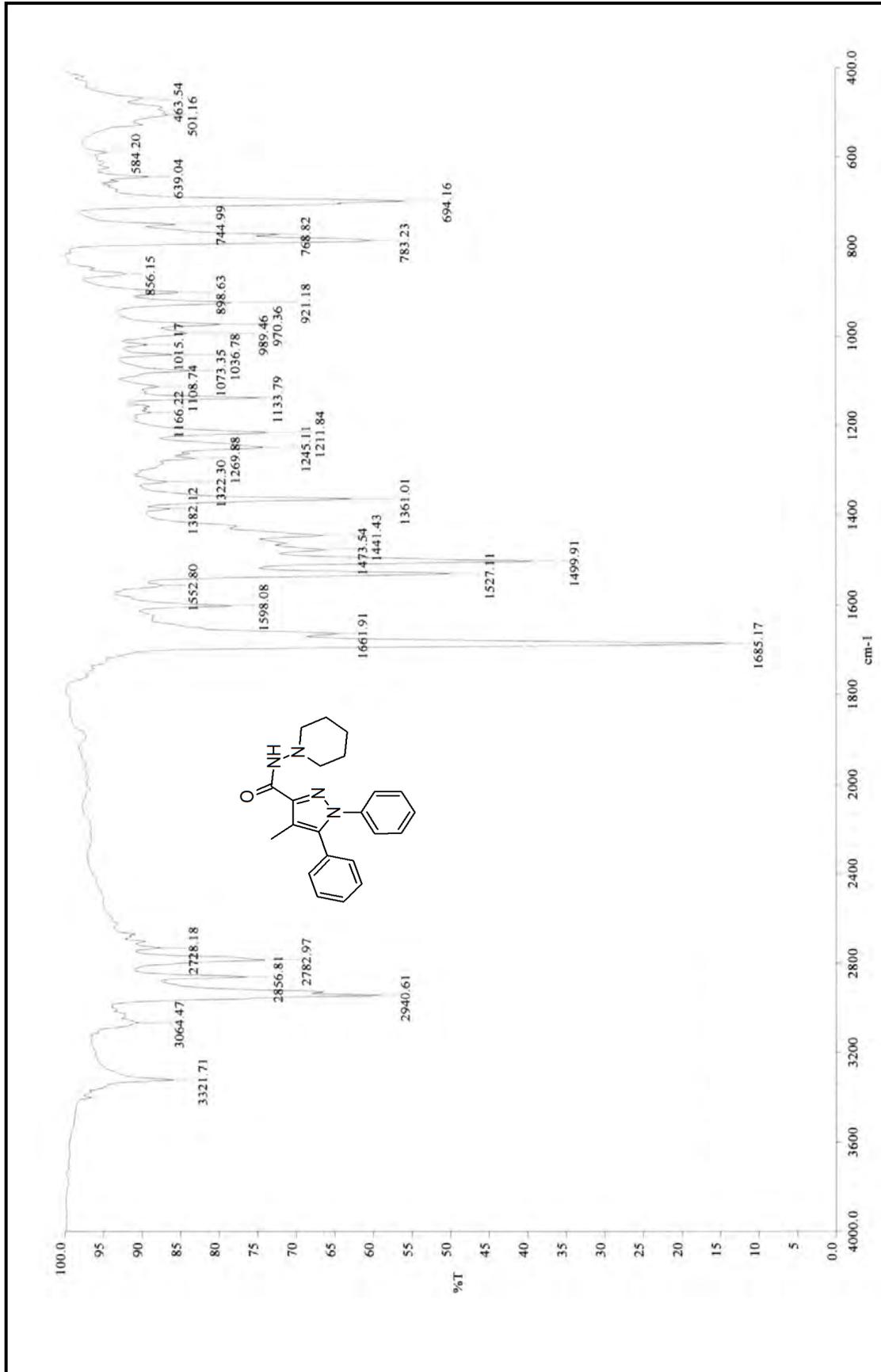
Espectro 18. EM FAB *N*-(piperidin-1-il)-1,5-difenil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida. (3)



Espectro 19. RMN-¹H N-(piperidin-1-il)-1,5-difenil-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida. (3)

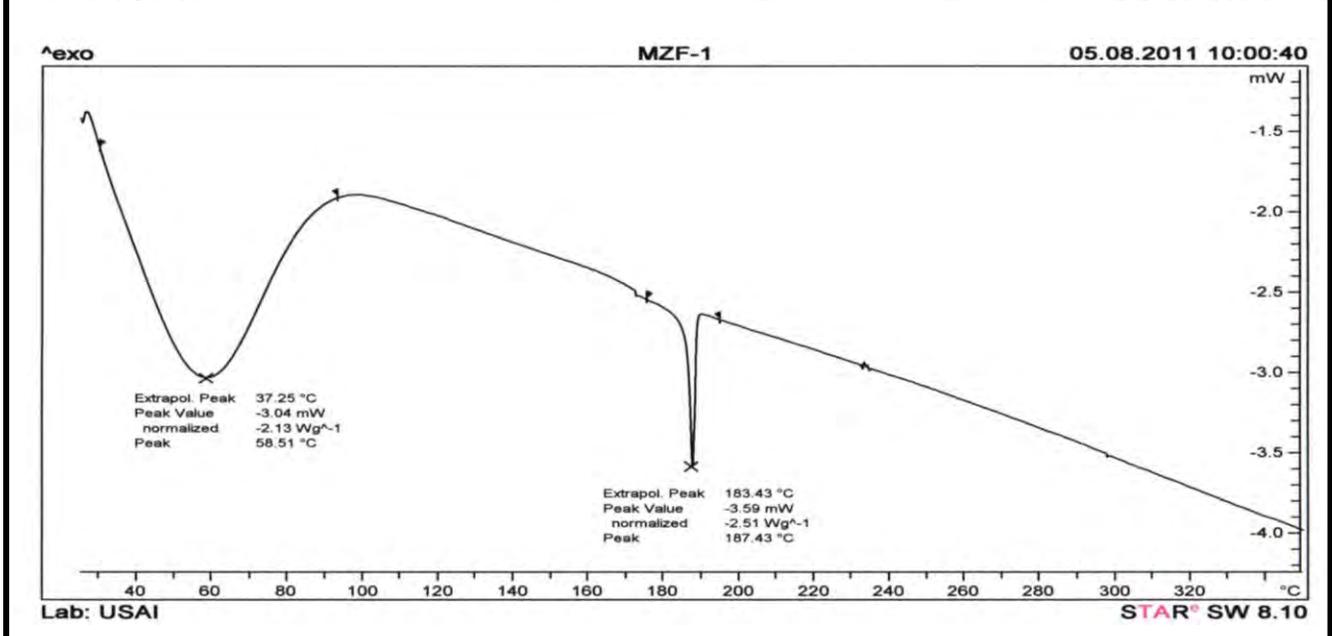
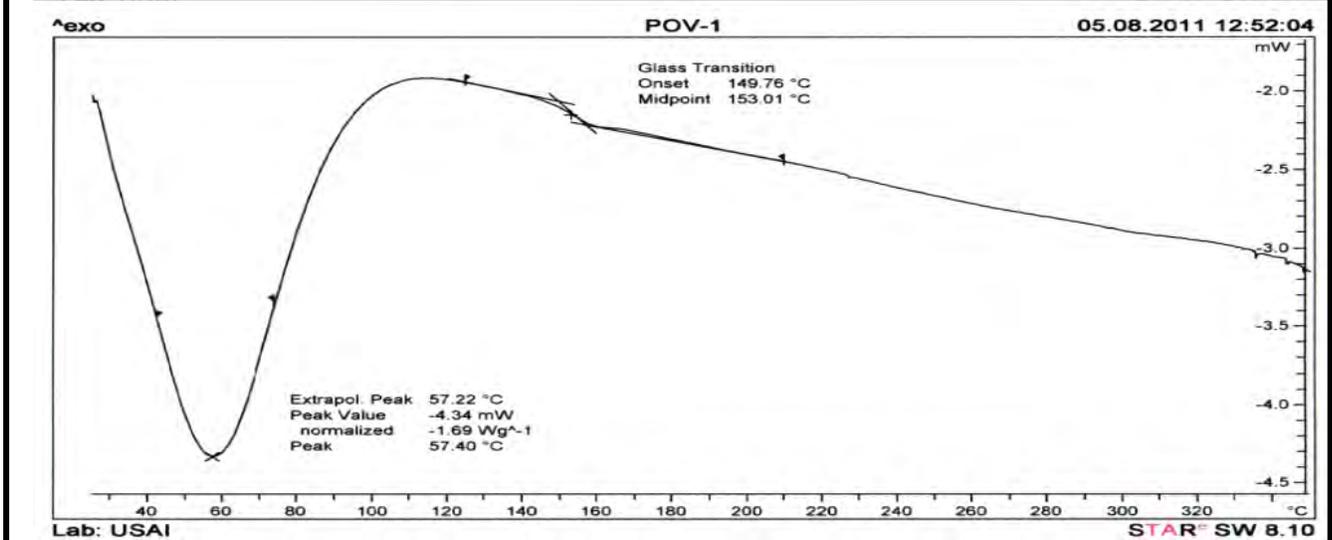
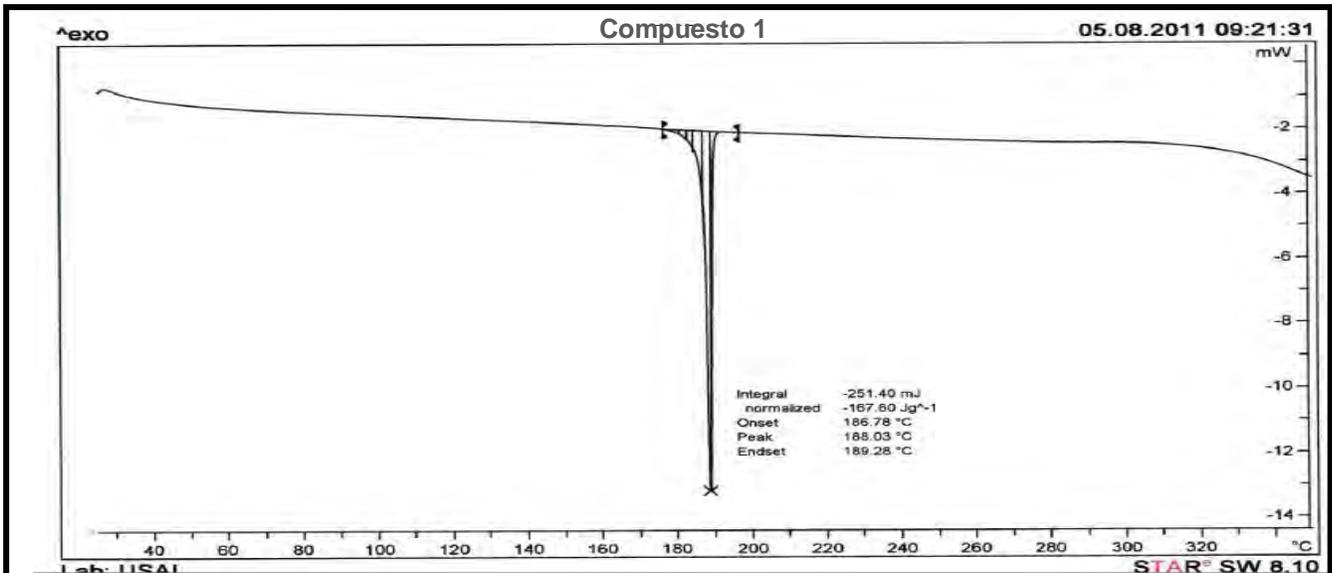


Espectro 20. RMN-¹³C *N*-(piperidin-1-il)-1,5-difenil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida. (3)

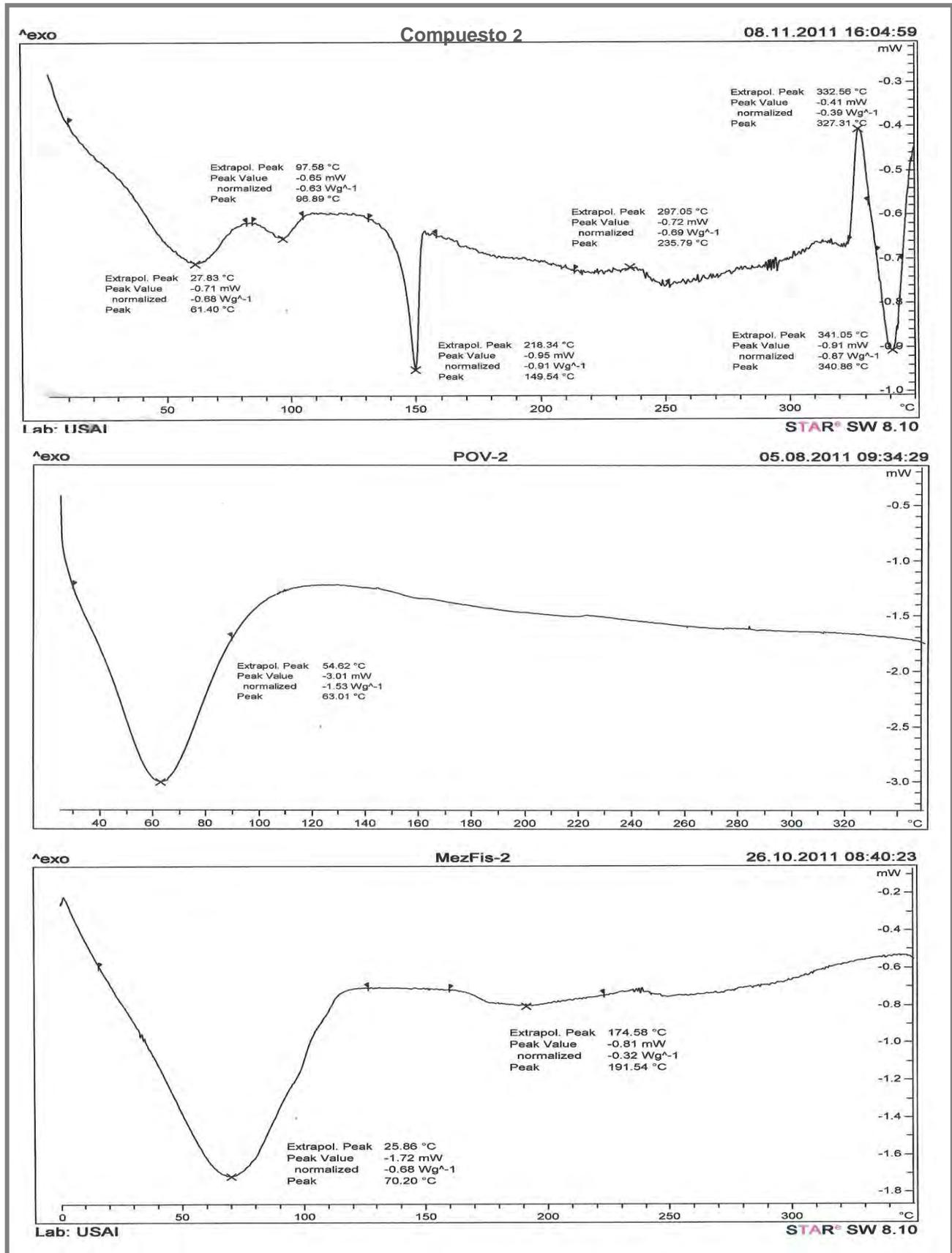


Espectro 21. IR de *N*-(piperidin-1-yl)-1,5-difenil-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida. (3)

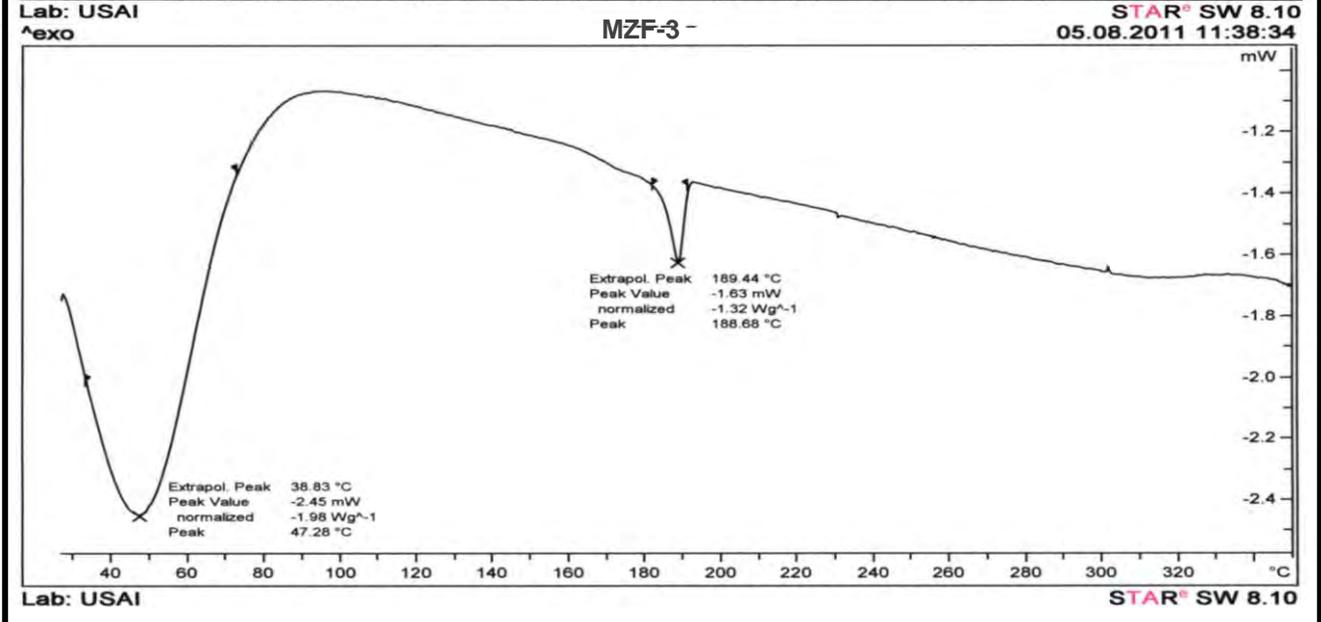
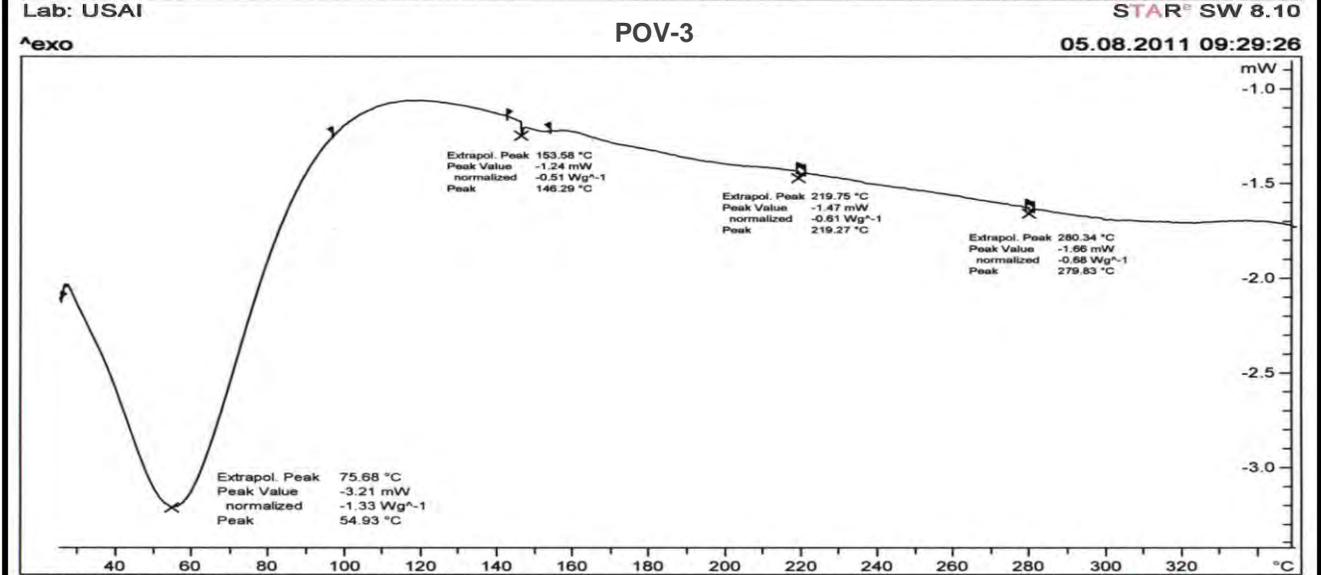
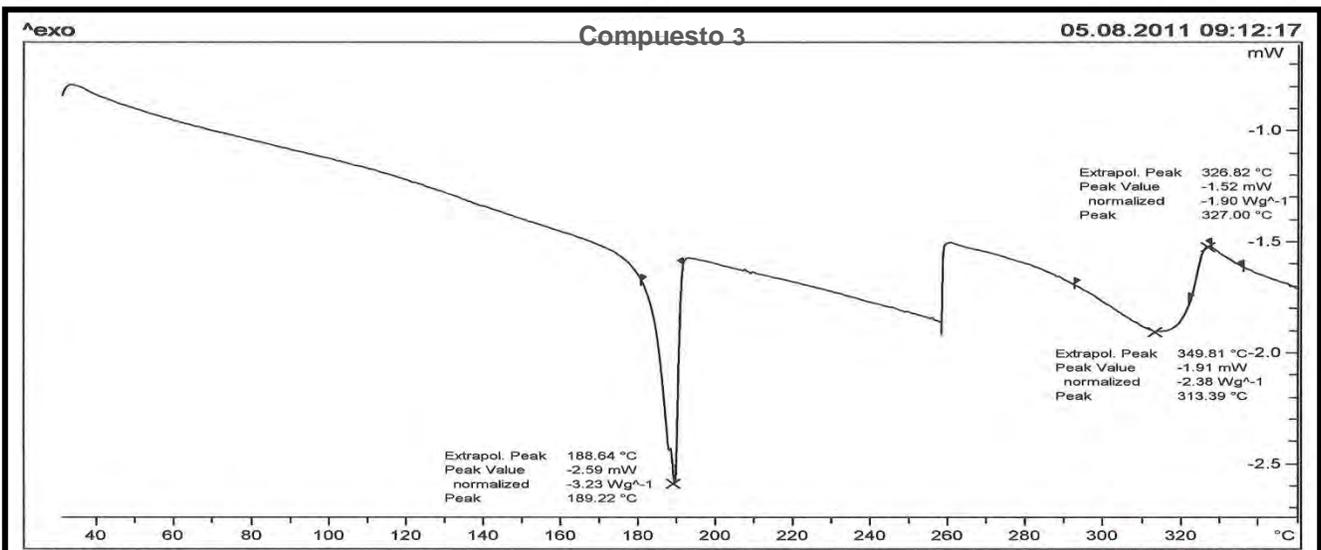
Caracterización de dispersiones sólidas.



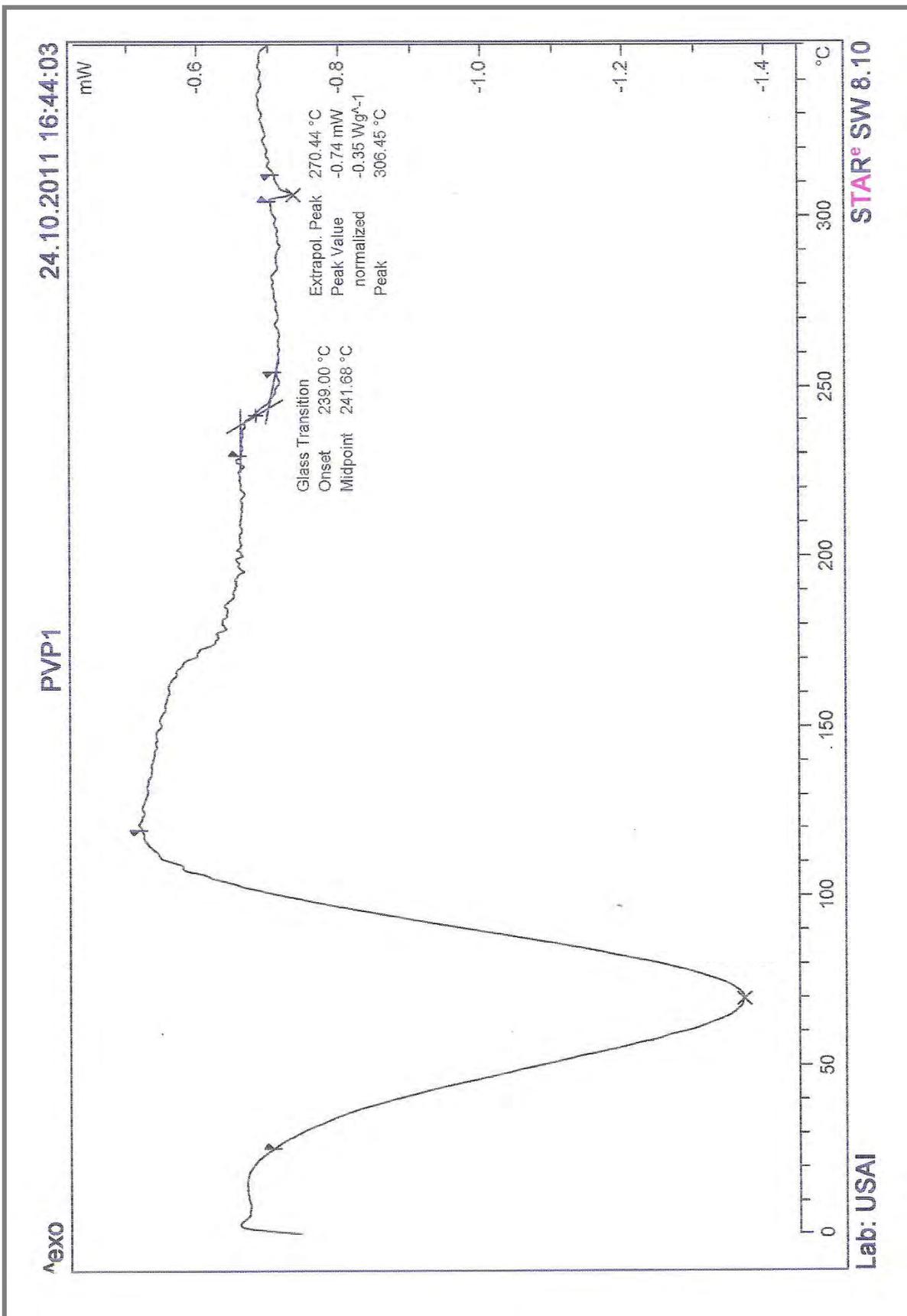
Termograma 1. DSC Compuesto 1, POV 1 y Mezcla Física 1



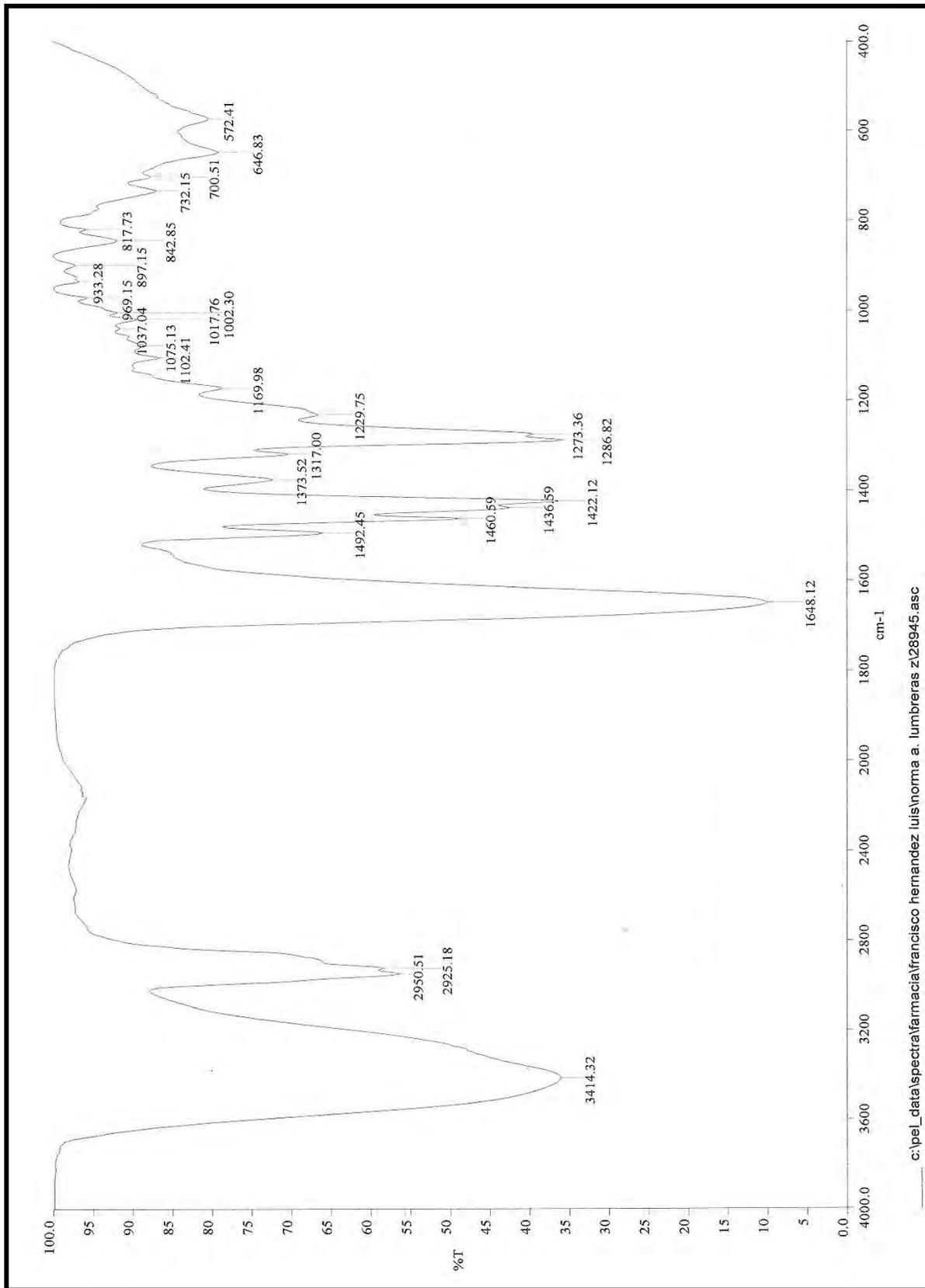
Termograma 2. DSC Compuesto 2, POV 2 y Mezcla Física 2



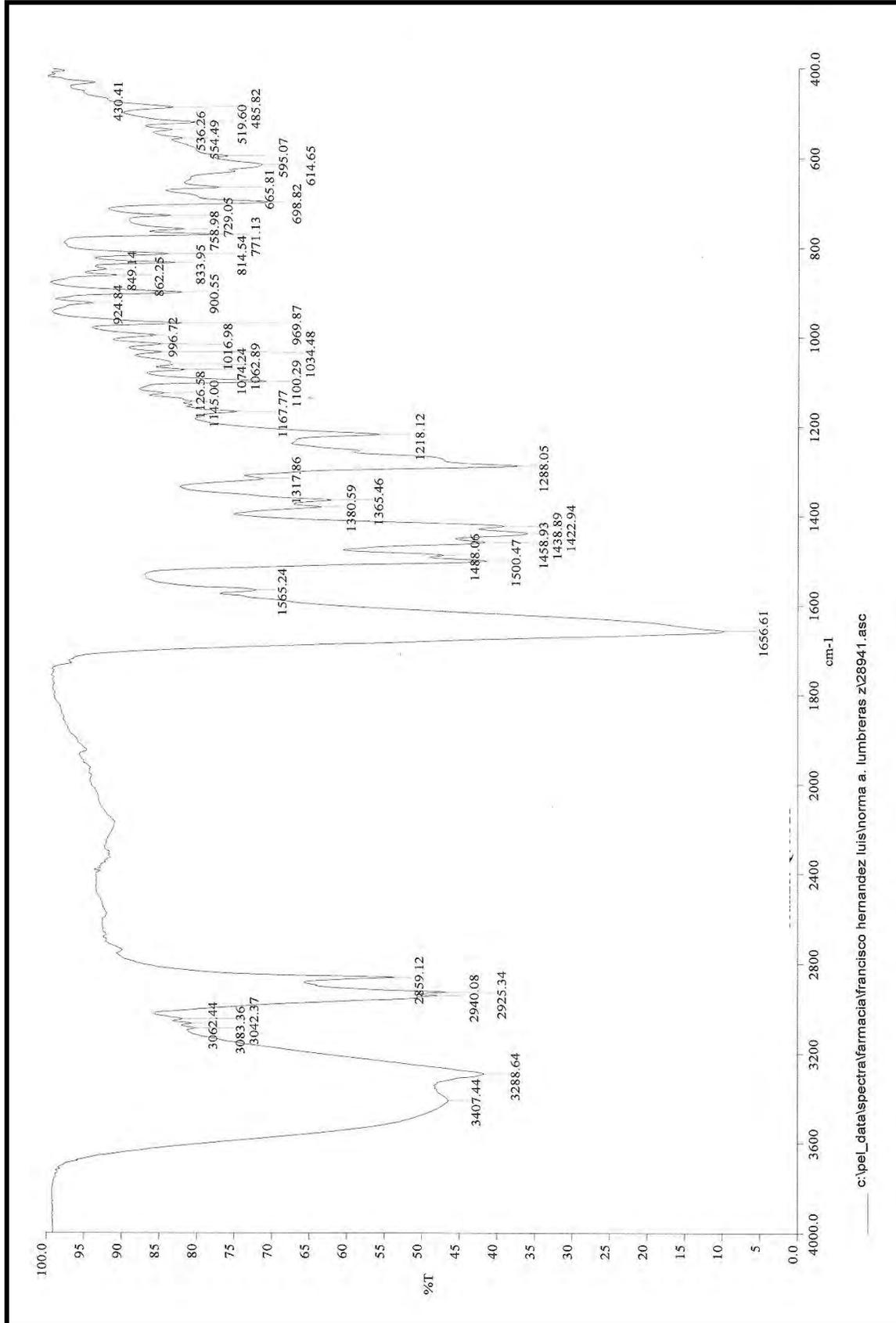
Termograma 3. DSC Compuesto 3, POV 3 y Mezcla Física 3



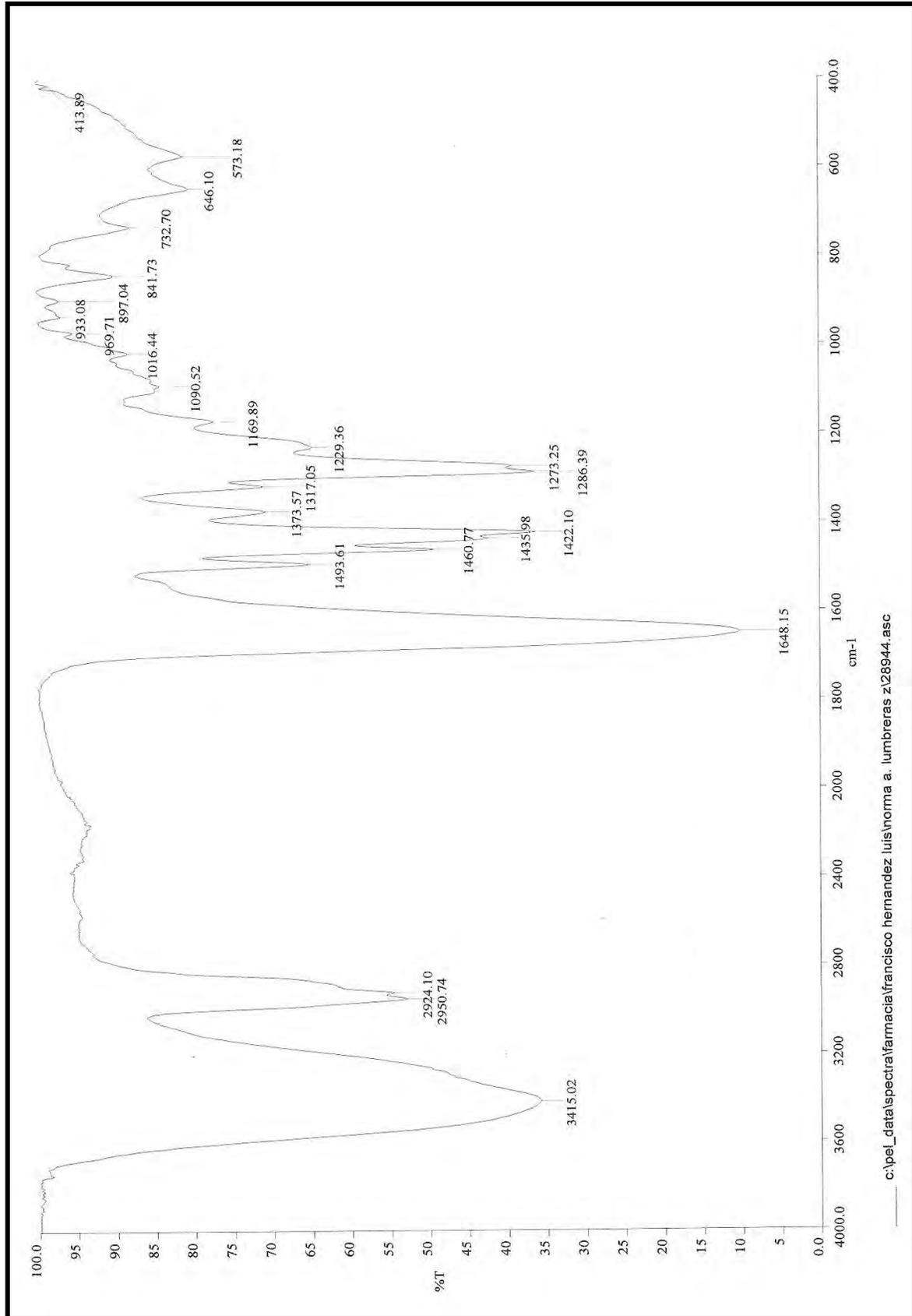
Termograma 4. DSC Polivinilpirrolidona



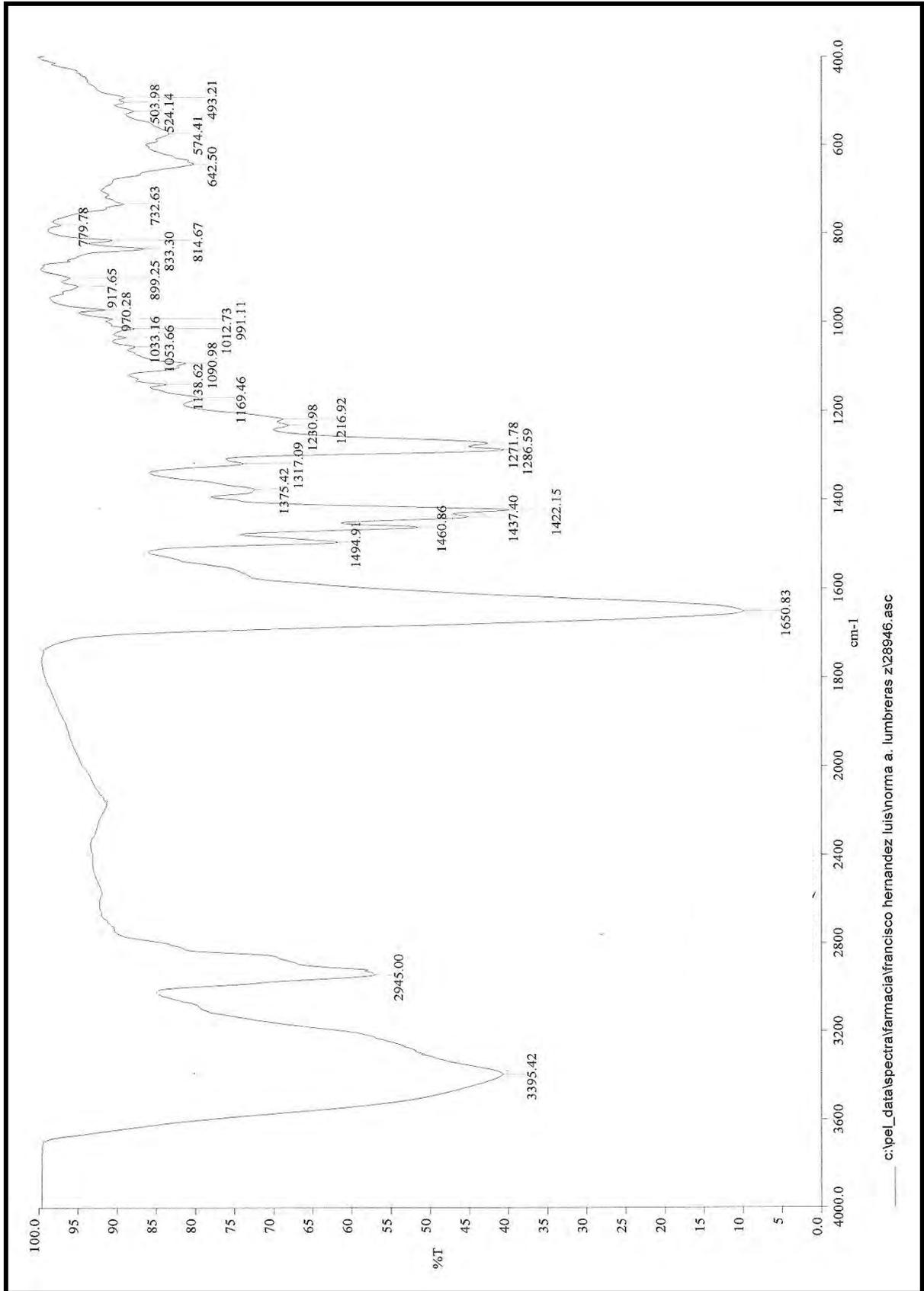
Espectro 22. IR POV 1



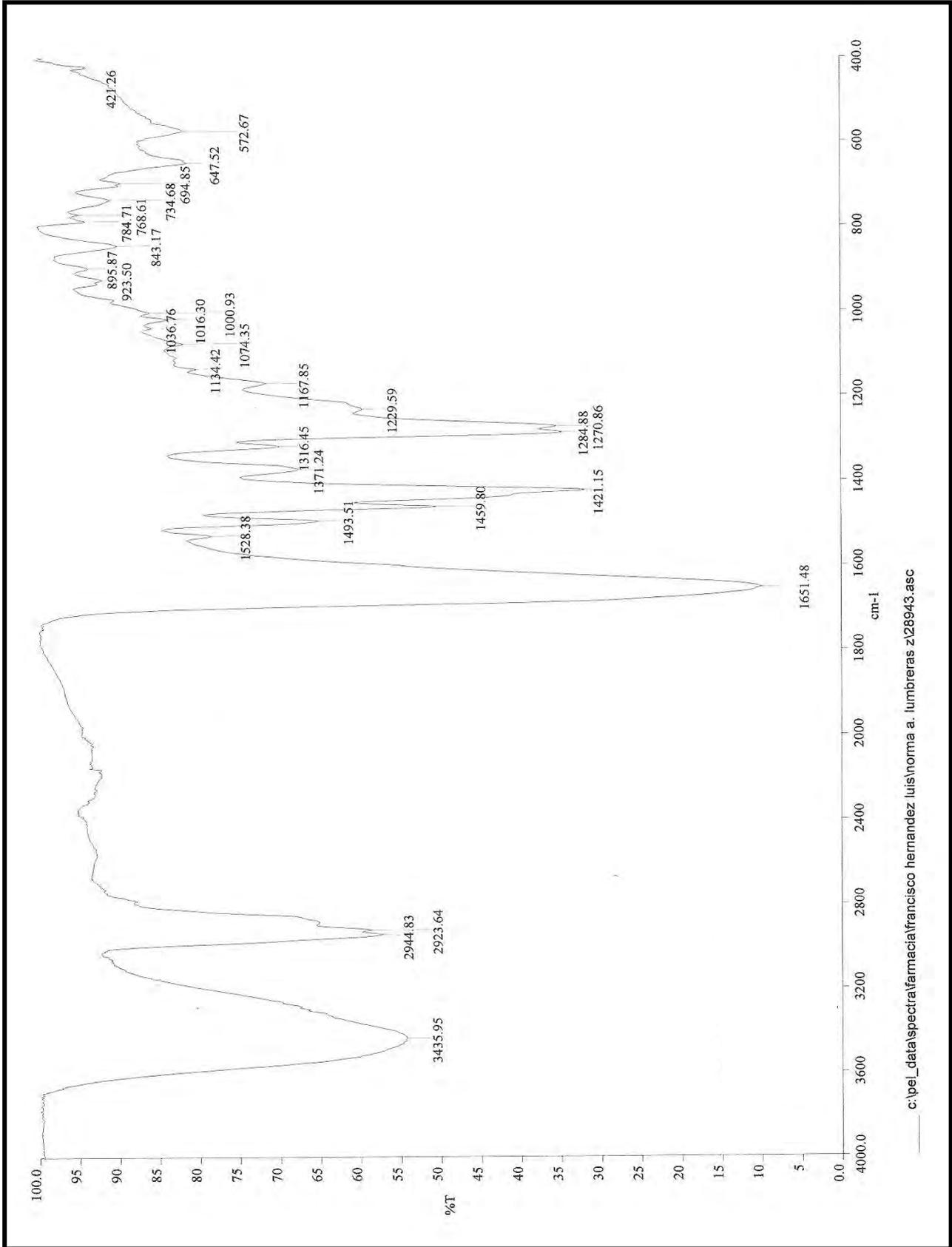
Espectro 23. IR Mezcla Física 1 (Compuesto 1 + PVP)



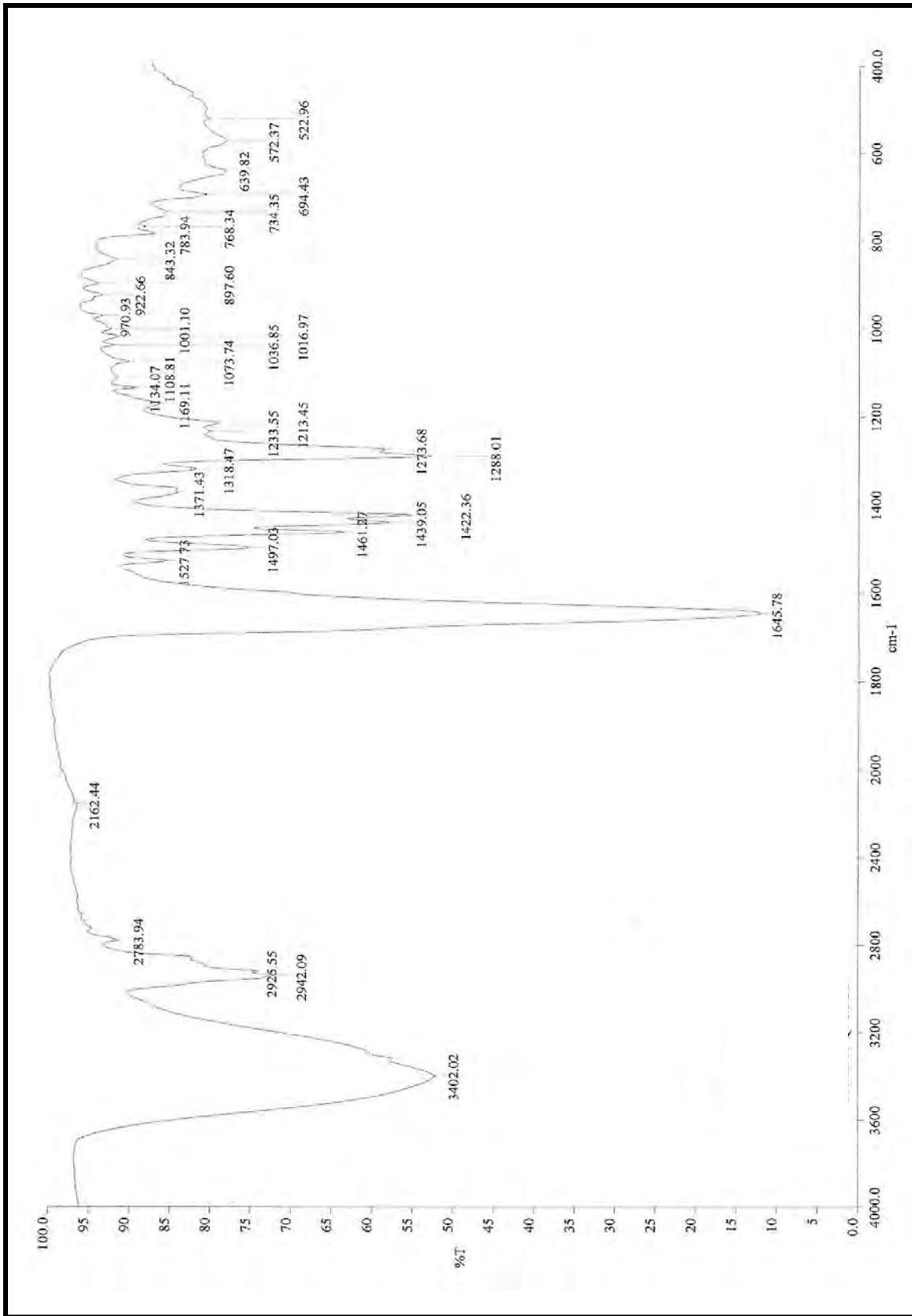
Espectro 24. IR POV 2



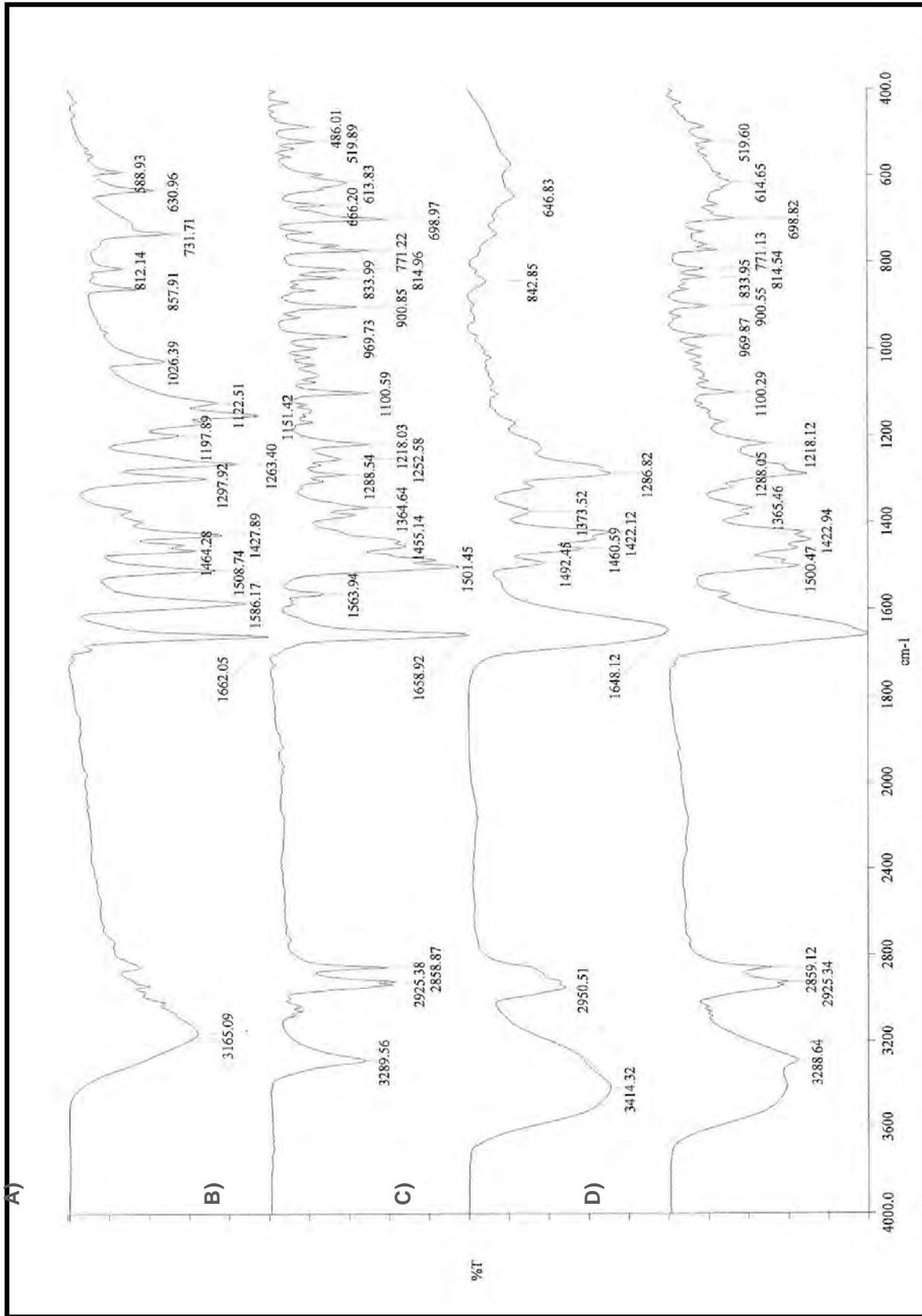
Espectro 25. IR Mezcla Física 2 (Compuesto 2 + PVP)



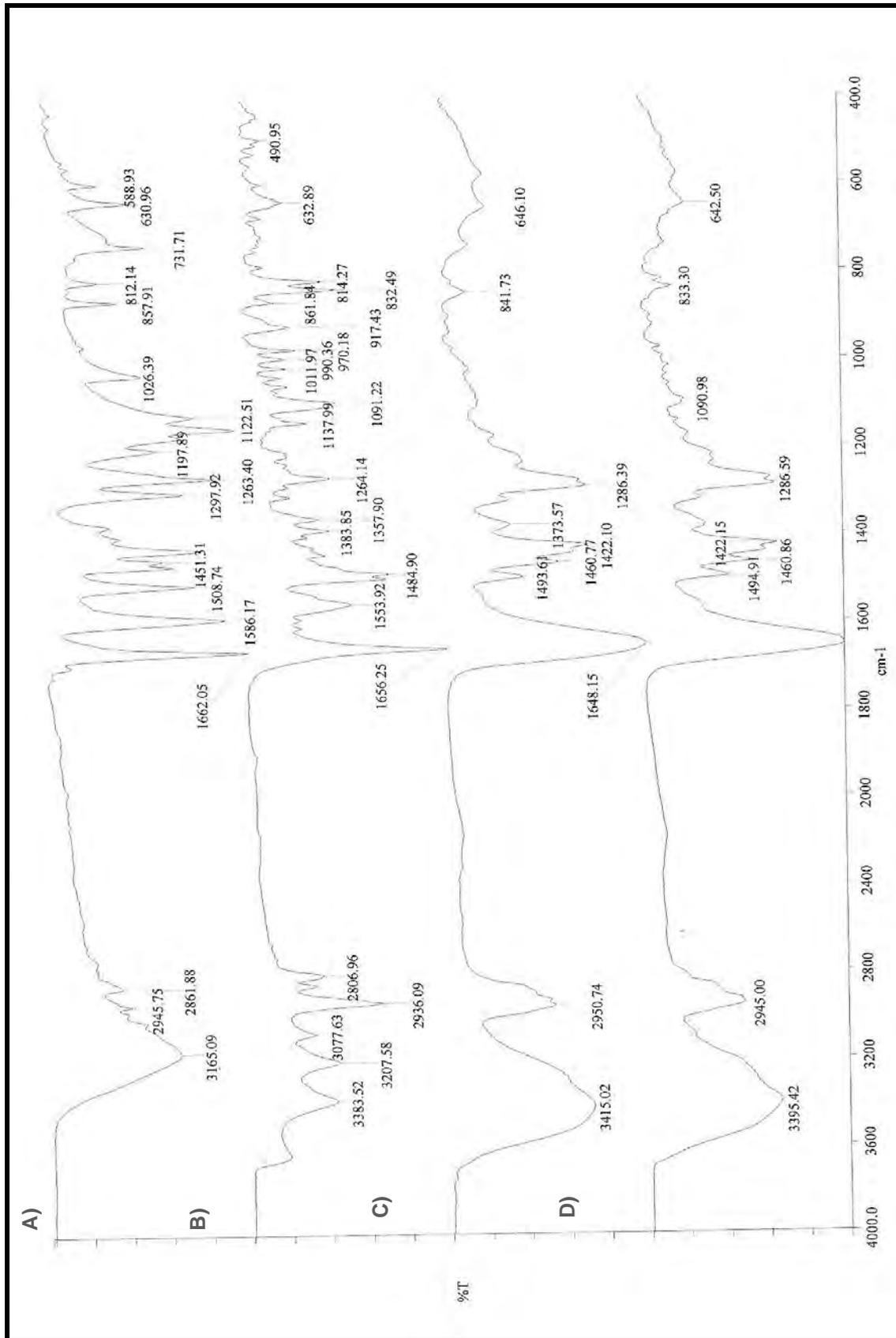
Espectro 26. IR POV 3



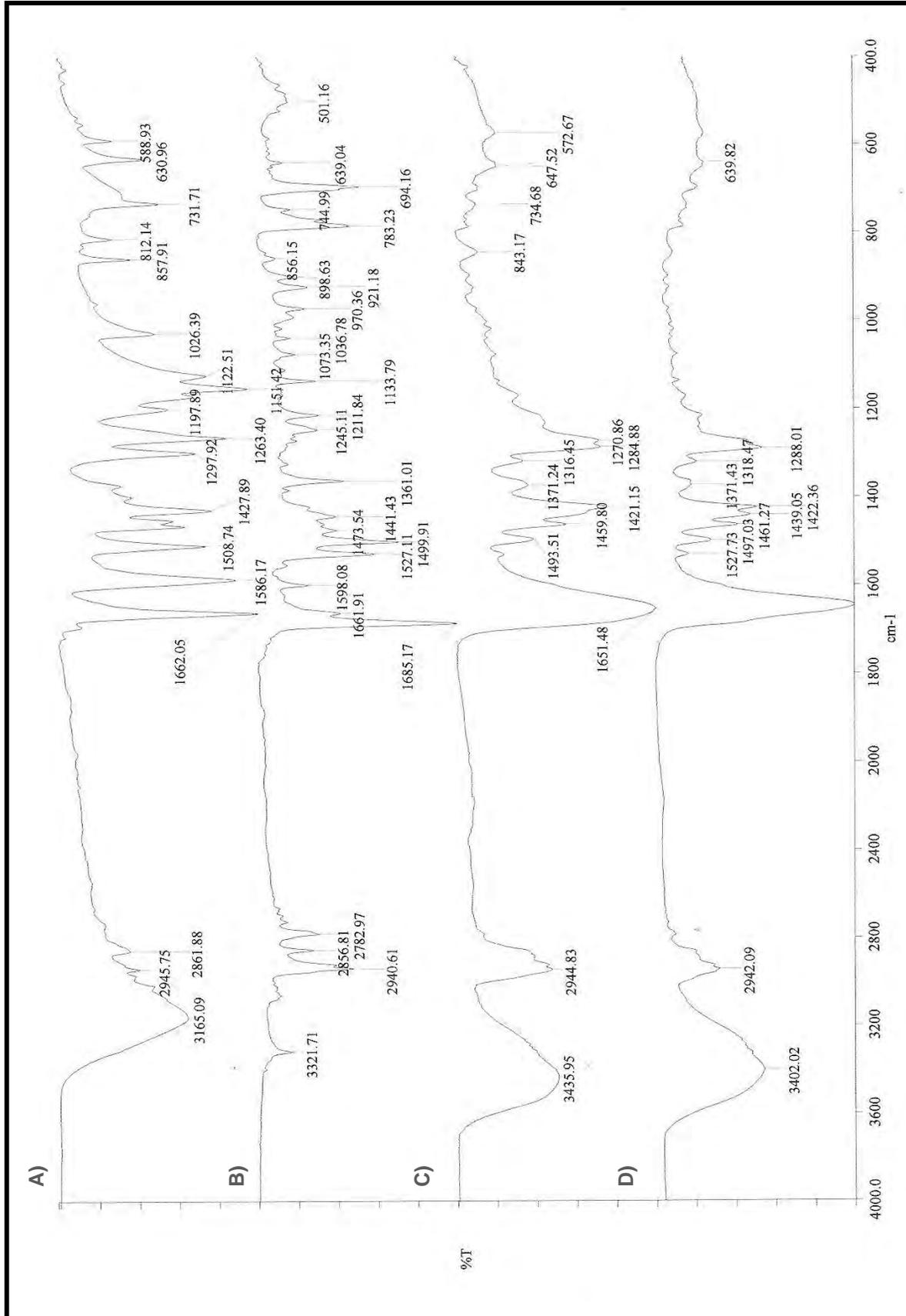
Espectro 27. IR Mezcla Física 3 (Compuesto 3 + PVP)



Espectro 28. IR Comparativo PVP, Compuesto 1, POV 1, Mezcla física 1



Espectro 29. IR Comparativo PVP, Compuesto 2, POV 2, Mezcla física 2



Espectro 30. IR Comparativo PVP, Compuesto 3, POV 3, Mezcla física 3