



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“SÍNTESIS, EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE Y ESTUDIOS DE  
ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE DERIVADOS DEL ÁCIDO 1,5-  
DIARILPIRAZÓLICO COMO HERRAMIENTAS FARMACÉUTICAS PARA EL  
TRATAMIENTO DEL SÍNDROME METABÓLICO.”**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**PRESENTA**

**SANDYBEL SALGADO BARRERA**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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: ANA ADELA SÁNCHEZ MENDOZA**

**VOCAL:**                   **Profesor: ALFONSO SEBASTIÁN LIRA ROCHA**

**SECRETARIO:**           **Profesor: FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: ELENA GUADALUPE RAMÍREZ LÓPEZ**

**2° SUPLENTE:**           **Profesor: MARTIN ANDRÉS IGLESIAS ARTEAGA**

**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:**   **DR. EDUARDO HERNÁNDEZ VÁZQUEZ**

**SUSTENTANTE:**           **SANDYBEL SALGADO BARRERA**

*Cuando una persona quiere alcanzar algo, piensa de manera espontánea en tres cosas ¿qué he conseguido hasta el momento? ¿En qué posición me encuentro ahora? ¿Qué debo hacer de aquí en adelante? Si uno no puede contestar a estas tres cosas, sólo le queda el miedo, la falta de confianza en sí mismo y el cansancio.*

*Haruki Murakami.*

## **Agradecimiento**

El primer reconocimiento es para mis padres y hermanas, ya que siguen siendo el pilar principal de mi vida. A mi mamá por ser un ejemplo de entereza, que me ha apoyado en todo momento, por esperarme despierta siempre que salía tarde de la facultad y preocuparse por mi bienestar. A mi papá que me ha demostrado que el trabajo duro y el ser responsable de las cosas que hacemos rinden frutos y son protagonistas de grandes satisfacciones.

A mis hermanas Erika y Cecilia, gracias, por que en cualquier momento están dispuestas a escuchar sobre mis alegrías, tristezas y frustraciones, así como para ofrecerme un consejo (o un regaño), acorde a la situación. Le agradezco a Karina, por acompañarme en esa gran travesía de la universidad a la casa, era un retorno muy divertido, te quiero compañera.

Junto con ellas he experimentado la enorme satisfacción de pertenecer a esta magnánima casa de estudios que es la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual, además de prepararme profesionalmente, me dio la oportunidad de conocer a grandes personas de las cuales he aprendido mucho, gracias a todos por su amistad.

Agradezco de sobremanera al Dr. Francisco Hernández Luis, por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo, por su apoyo durante el servicio social y durante el desarrollo de la tesis, por sus consejos y buenos deseos.

Un enorme reconocimiento a mi supervisor el Dr. Eduardo Hernández Vázquez, por su apoyo en la realización de este proyecto, gracias por su ayuda, por sus consejos y enseñanzas.

Agradezco a Marcela, Silvia y Eduardo por ser mis compañeros de comidas, en todo ese año, fueron lindos momentos y muy graciosos.

También expreso mi reconocimiento a los integrantes del Laboratorio 122, diversas personalidades conviviendo en un mismo espacio. Extiendo este reconocimiento a mis

compañeros actuales de trabajo y a la empresa que me dio la oportunidad de adentrarme en el ámbito laboral.

Agradezco al QFB. Rodrigo Aguayo Ortiz por su apoyo en el desarrollo del apartado de modelado molecular, así como a la Dra. Lilián Yépez Mulia, por las facilidades prestadas para el uso de la herramienta Prime de Schrödinger versión 9.5.

Mi agradecimiento para el Doctor Samuel Enoch Estrada Soto y al alumno Juan José Ramírez Espinoza, de la UAEM (Universidad Autónoma del Estado de Morelos) por su contribución en el desarrollo de las pruebas de actividad hipoglucemiante.

## **Agradecimientos institucionales**

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

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser la institución donde realicé mis estudios profesionales.

Al **Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF)** por el apoyo recibido para la compra de reactivos y materias primas dentro del proyecto **PICSA235/2010 (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); Espectrometría de Masas (Georgina Artemisa Duarte Lisci, Margarita Guzmán Villanueva); Espectroscopía de Infrarrojo (Marisela Patricia Gutiérrez Franco). Análisis elemental (Nayeli López Balbiaux y Victor Lemus).

## Glosario

### A

AGA	Alteración de la Glucosa en Ayunas
AGES	Productos finales de glicosidación avanzada
ATP III	Panel III de Tratamiento en Adultos

### B

Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
-----	------------------------------

### C

CB1	Receptor de Canabinoides tipo 1
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva del 50 %

### D

DIPEA	Diisopropiletilamina
$\Delta G_{\text{unión}}$	Energía libre de unión.
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfoxido

### E

EEM	Error estándar de media
EGIR	Grupo para el Estudio de Resistencia a la Insulina Europeo
EM	Espectrometría de masas
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
EtOH	Etanol

### F

FRAP	Poder antioxidante reductor del hierro ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> )
------	---

### G

GPCR	Receptores Acoplados a Proteínas G
------	------------------------------------

### H

H	Hombre
HDL	Lipoproteínas de alta densidad ( <i>High density lipoprotein</i> )
HTG	Hipertriacilgliceridemia



5-HT	5-hidroxitriptamina
<b>I</b>	
IC	Intolerancia a los carbohidratos
IDF	Fundación Internacional de Diabetes
IE	Impacto electrónico
IMC	Índice de Masa Corporal
IR	Infrarrojo
<b>L</b>	
LiHMDS	<i>bis(trimetil)sililamiduro de litio</i>
LDL	Lipoproteínas de baja densidad ( <i>Low density lipoprotein</i> )
<b>M</b>	
M	Mujer
<b>N</b>	
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NOS	Oxido nítrico sintasa
<b>O</b>	
OMS	Organización Mundial de la Salud
<b>P</b>	
PA	Perímetro abdominal
PAI	Factor inhibidor de la fibrinólisis
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
p.f.	Punto de fusión
PKC	Proteína cinasa C
POPC	1-palmitoil-2-oleil-sn-glicerol-3-fosfolina
PPAR	Receptores Proliferadores de Peroxisomas Activados
<b>Q</b>	
Q	QSAR-3D Relación cuantitativa estructura-actividad en tercera dimensión ( <i>Quantitative structure-activity relationship</i> ).

## **R**

RCC	Relación cintura/cadera
R.f	Factor de retención
RI	Resistencia a la Insulina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root Mean Square Desviation</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive oxygen species</i> )

## **S**

SET	Transferencia de un solo electrón
SM	Síndrome Metabólico

## **T**

TCA	Ácidos tricarboxílicos
TFA	Ácido trifluoroacético
TG	Triacilgliceroles
TGF	Factor de crecimiento transformante
THF	Tetrahidrofurano
TPTZ	2,4,6- <i>tris</i> -(2-piridil)triazina
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

## Índice

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 Síndrome metabólico.....	3
2.1.1 Definición e Historia.....	3
2.1.2 Componentes del síndrome metabólico.....	6
2.1.2.1 Dislipidemia.....	6
2.1.2.2 Hipertensión arterial.....	7
2.1.2.3 Resistencia a la insulina.....	7
2.1.2.4 Obesidad.....	8
2.2 Terapia contra el síndrome metabólico, papel del receptor de cannabinoides tipo I.....	9
2.3 Estrés oxidante y Antioxidantes.....	13
2.3.1 Papel del síndrome metabólico en la generación de estrés oxidante.....	16
2.4 Herramientas de la química farmacéutica para el diseño de fármacos.....	19
3. Planteamiento del problema.....	21
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos.....	22
5.1. Objetivo General.....	22
5.2. Objetivos Específicos.....	22
6. Metodología.....	27
6.1 Parte química.....	27
6.1.1 Síntesis del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxílico.....	30
6.1.2 Síntesis de las <i>N</i> -acilhidrazidas <b>1-9</b> .....	32

6.2 Actividad antioxidante.....	33
6.2.1 Ensayo FRAP.....	33
6.2.2 Ensayo Inhibición de la Peroxidación de Lípidos.....	33
6.3 Modelado molecular (Docking).....	34
6.4 Actividad hipoglucemiante.....	36
7. Resultados y Discusión de resultados.....	37
7.1 Parte química.....	37
7.1.1 Síntesis y caracterización de 5-(4-clorofenil)-1-(3,4- diclorofenil)-4-metil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carbohidrazina.....	37
7.1.2 Obtención de las <i>N</i> -acilhidrazidas <b>1-9</b> .....	40
7.2 Análisis elemental.....	62
7.3 Actividad antioxidante.....	63
7.4.1 Ensayo FRAP.....	64
7.4.2 Ensayo peroxidación de lípidos.....	69
7.4 Modelado molecular Docking.....	70
7.5.1 Construcción del modelo.....	70
7.5.2 Acoplamiento molecular (Docking).....	80
7.5 Actividad hipoglucemiante.....	82
8. Conclusiones.....	83
9. Referencias.....	84
10. Perspectivas del proyecto.....	88

## **ANEXOS**

ANEXO I. Parte experimental

ANEXO II. Espectros

ANEXO III. Ensayos de actividad antioxidante

ANEXO IV. Docking

ANEXO V. Actividad hipoglucemiante

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las costumbres y hábitos de consumo han cambiado vertiginosamente; las ocupaciones de alta demanda física disminuyeron mientras que las profesiones de mayor actividad intelectual, caracterizadas por un estilo de vida sedentario, se incrementaron. Todo esto, aunado a la mayor disponibilidad de alimentos y al corto plazo que se dedica a su preparación, ha permitido el desarrollo de padecimientos que antes eran considerados exclusivos de la población con un mayor desarrollo industrial.

Actualmente nuestro país experimenta un aumento inusitado de padecimientos tales como diabetes e hipertensión arterial, así como sobrepeso y obesidad. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012), patologías como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y obesidad concentran el 11.5% de las causas de consulta de servicio ambulatorio, sólo después de enfermedades y síntomas respiratorios agudos con 36.5%.

Los aumentos en la prevalencia de obesidad en México se encuentran entre los más rápidos reportados a nivel mundial. De 1988 a 2012, el sobrepeso en mujeres de 20 a 49 años de edad se incrementó de 25 a 35.3% y la obesidad de 9.5 a 35.2%. Siete de cada 10 adultos presentan sobrepeso, y de éstos, la mitad presenta obesidad. Lo anterior constituye un serio problema de salud pública, lo cual se refleja, en el hecho de que México ocupa el primer lugar a nivel mundial de niños obesos y el segundo en adultos: por ello el 7% del presupuesto del sector salud se destina en la atención y prevención de este padecimiento.

La obesidad es un desorden fisiológico, que juega un papel central en el desarrollo del síndrome metabólico (SM), junto con hipertensión arterial, resistencia a la insulina y dislipidemias. En este sentido, el síndrome metabólico se ha convertido en una entidad de alto impacto en la población mundial, ya que no sólo predispone al desarrollo de enfermedades metabólicas, como diabetes, sino que desencadena enfermedades cardiovasculares catastróficas e incapacitantes.

En el campo de investigación, se ha estado buscando el desarrollo de nuevas sustancias con la intención de contar con posibles fármacos para el tratamiento o prevención de este padecimiento. Algunos de los candidatos más citados en la literatura son: agonistas selectivos de la 5-hidroxitriptamina 2c (5HT-2c), agonistas para receptores proliferadores de peroxisomas activados (PPAR $\alpha/\gamma$ ), y antagonistas del receptor de canabinoides tipo 1 (CB1).

En este contexto se ubica el presente trabajo de tesis, el cual tuvo como propósito contar con moléculas que pudiesen considerarse como candidatos potenciales para el tratamiento de al menos dos de los síntomas que integran el SM. Para alcanzar este cometido se sintetizaron y evaluaron nueve híbridos derivados del 1,5-diarilpirazol. Posteriormente, se realizó un estudio de acoplamiento molecular a moléculas representativas de la serie con la finalidad de, en primer lugar, predecir un posible mecanismo de acción hipoglucemiante y además, generar posibles explicaciones a las diferencias observadas en los resultados experimentales.

## **2. MARCO TEÓRICO**

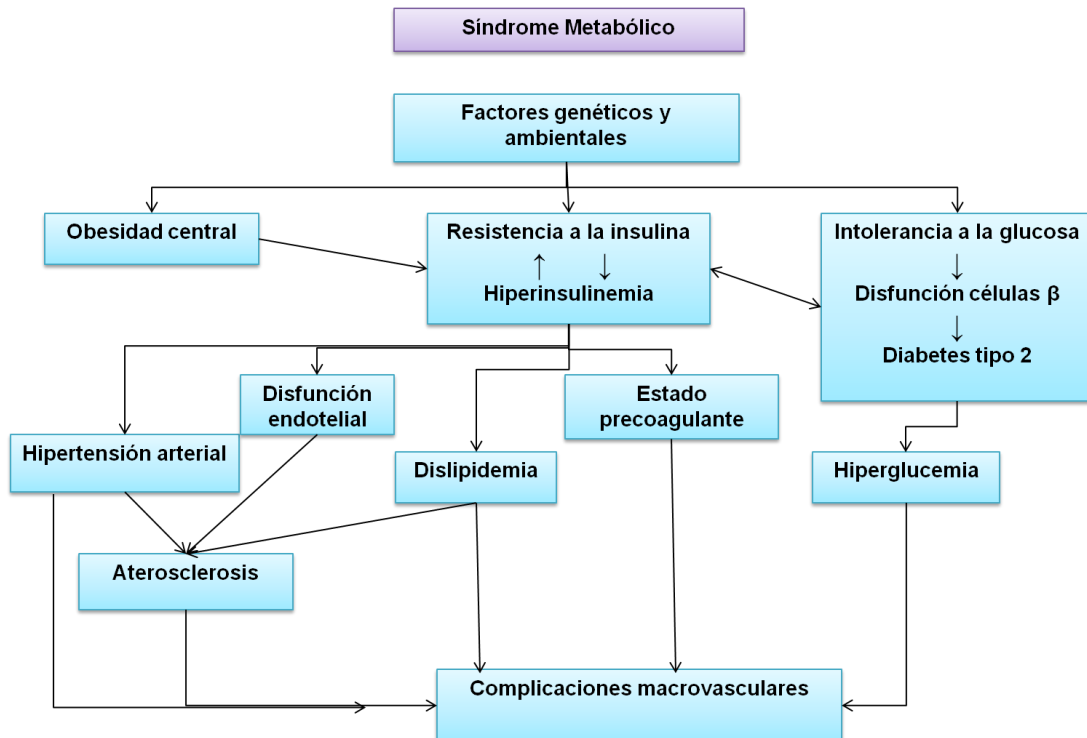
En este capítulo se presenta la información previa que da lugar al problema planteado e hipótesis del presente trabajo de tesis. La información se encuentra estructurada en cuatro apartados principales: el síndrome metabólico como entidad clínica de interés, el estrés oxidante y la acción de los antioxidantes, el papel del receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1) en la terapia contra el síndrome metabólico y finalmente, el panorama general de las herramientas que emplea la Química Farmacéutica en el diseño de nuevas moléculas.

### **2.1. Síndrome metabólico**

El síndrome metabólico, junto con la obesidad, son considerados dos pandemias con un alto índice de mortalidad y morbilidad, además de representar una enorme carga económica para su control y tratamiento. La Organización Mundial de la Salud estima que para el 2015, 700 millones de adultos tendrán algún grado de obesidad (Hernández-Vázquez, 2012). Es por ello que el número de trabajos experimentales relacionados con esta patología se ha incrementado a lo largo de las últimas décadas.

#### **2.1.1. Definición e Historia**

El síndrome metabólico (SM) se define como un desbalance de la fisiología normal caracterizada por la presencia de tres o más de los siguientes marcadores o factores de riesgo: dislipidemia, hipertensión arterial, resistencia a la insulina y obesidad, principalmente visceral (Pineda, 2008), (Figura 1).



**Figura 1.** Factores de riesgo en el desarrollo del síndrome metabólico (Adaptación de Rev. Mex. Cardiol. 2002).

En la década de los 60's la asociación de obesidad, hiperlipidemia, diabetes e hipertensión se definió con el nombre de "síndrome plurimetabólico". Posteriormente, en 1974, Haller vinculó estos factores con la aterosclerosis (acumulación de grasa, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias). En 1980, Vague sugirió que la masa adiposa por sí misma tiene un efecto sobre el progreso desde la obesidad hacia la diabetes. En 1988, Reaven, observó que varios factores de riesgo, tales como la dislipidemia, hipertensión e hiperglicemia, se asociaban en diversos pacientes; a este conjunto lo llamó *Síndrome X* y lo reconoció como un factor de riesgo múltiple para enfermedades cardiovasculares. Posteriormente, publicó que la resistencia a la insulina es la base del *Síndrome X* (por tanto el síndrome también fue conocido con el nombre de síndrome de resistencia de insulina) (Pineda 2008). En 1998, la OMS introdujo el término síndrome metabólico (SM) como entidad diagnóstica con criterios definidos. Así, en 2001 el ATP III (Panel III de Tratamiento en Adultos, por sus siglas en inglés) del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol, uso este término en su informe, convirtiéndose así en la definición más utilizada (Crepaldi, 2006).



Existe un profundo debate sobre los criterios diagnósticos del SM, por lo cual diversas organizaciones han propuesto sus propios lineamientos (Povel, 2013). La Tabla 1 resume algunos de los criterios establecidos para el diagnóstico del SM.

**Tabla 1.** Criterios para el diagnóstico del Síndrome Metabólico, de acuerdo a distintos organismos de salud.

Criterio	OMS	EGIR (1999)	ATP III (2001)	IDF (2005)
<b>Resistencia a la Insulina (RI)</b>	AGA, IC, DM2 o sensibilidad disminuida a la insulina	Insulina plasmática >75%. Dos o más de los siguientes	Ninguno. Tres o más de los siguientes	Ninguno
<b>Obesidad</b>	Dos más de los siguientes RCC: H>0.9 m M>0.85 m	PA: H≥94 cm, M≥80 cm	PA: H≥102 cm, M≥88 cm	PA elevado según la población. Más dos de los siguientes
<b>Dislipidemia</b>	TG≥150 mg/dL o colesterol HDL: H<35 mg/dL y M<39 mg/dL	TG≥ 150 mg/dL y/o HDL<39 mg/dL	TG≥150 mg/dL, HDL: H<40 mg/dL y M<50 mg/dL	TG≥150 mg/dL o con medicamento para disminuir TG, HDL: H<40 mg/dL y M<50 mg/dL o con medicamentos para aumentar HDL
<b>Presión Arterial</b>	≥140/90 mm Hg	≥140/90 mm Hg o con antihipertensivos	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg o en tratamiento antihipertensivo
<b>Glicemia</b>	AGA, IC o DM2	AGA o IC pero no DM	>110 mg/dL incluyendo DM	≥100 mg/dL incluyendo DM
<b>Otros</b>	Microalbuminuria		Proteína C reactiva y Fibrinógeno.	

OMS: Organización Mundial de la Salud; EGIR: Grupo para el Estudio de Resistencia a la Insulina Europeo; ATP III: Panel III de Tratamiento de Adultos; IDF: Fundación Internacional de Diabetes; AGA: Alteración de la Glucosa en Ayunas; IC: Intolerancia a los Carbohidratos; DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2; RCC: Relación cintura/cadera; H: Hombre; M: Mujer; PA: Perímetro Abdominal; TG: Triglicéridos; IMC: Índice de Masa Corporal (Pineda, 2008).

### **2.1.2. Componentes del Síndrome Metabólico.**

El SM no puede considerarse una enfermedad, puesto que carece de una patología clínica definida, así como de una etiología de hallazgos clínicos invariables y de hallazgos de laboratorio específicos (Mohamed, 2004). El SM se manifiesta como un conjunto de factores de riesgo para desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares, el cual se caracteriza por la manifestación de dislipidemia aterogénica, resistencia a la insulina, hipertensión arterial, así como por la presencia de obesidad principalmente visceral (Ogbera, 2010).

#### **2.1.2.1. Dislipidemia**

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2002, se define a la dislipidemia como la alteración de la concentración normal de lípidos en la sangre. Las dislipidemias pueden obedecer a causas genéticas o primarias, o a causas secundarias, tales como hipertensión arterial, diabetes, tabaquismo, obesidad y el sedentarismo (Esper, 2003).

La dislipidemia se caracteriza por:

- Hipertriacilgliceridemia: TG>150 mg/dL
- Colesterol de baja densidad (HDL) disminuido
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas
- Aumento de ácidos grasos libres en plasma
- Aumento de apolipoproteínas B

El HDL bajo y la hipertriacilgliceridemia (HTG) son predictores independientes de riesgo cardiovascular en pacientes con SM (Pineda, 2008). Este tipo de alteración de lípidos (mejor conocida como dislipidemia aterogénica) es la más frecuente en la clínica, además de ser la dislipidemia característica de pacientes con enfermedad cardíaca coronaria. La HTG está fuertemente relacionada con la obesidad visceral y la resistencia a la insulina (Ros, 2006).

### **2.1.2.2. Hipertensión Arterial**

Se define como la elevación de la presión arterial hasta un nivel que aumenta el riesgo de lesión en distintos lechos vasculares, especialmente retina, cerebro, corazón y riñones (Esper, 2003).

### **2.1.2.3. Resistencia a la insulina**

El concepto de resistencia a la insulina (RI) fue descrito por Himsworth desde hace más de 60 años y se consideró su participación etiopatogénica en diversas enfermedades metabólicas. La resistencia a la insulina es una anomalía fisiológica caracterizada por la disminución de la acción de esta hormona en los tejidos muscular, hepático y adiposo, que condiciona hiperinsulinemia y se ha relacionado con complicaciones tales como hipertensión arterial sistémica, obesidad y diabetes (Pineda, 2008).

Aunque la mayoría de los pacientes con resistencia a la insulina/ hiperinsulinemia no presentan hiperglucemia, tienen un riesgo elevado de desarrollar diabetes mellitus. Al principio los pacientes con resistencia a la insulina mantienen su homeostasis a través de la hiperinsulinemia, sin embargo, la diabetes se presenta cuando ya no son capaces de mantener esta compensación (Esper, 2003).

#### **2.1.2.4. Obesidad**

De especial interés para el presente trabajo es la obesidad, componente que se ubica en la gran mayoría de los criterios propuestos por las diversas organizaciones de salud (Tabla 1).

La obesidad se puede definir como un aumento en el porcentaje de grasa corporal total, por encima de un valor estándar, que refleja a nivel celular un aumento en el número y/o tamaño de los adipocitos. Esta situación es por lo general producto de un desequilibrio entre las calorías que se ingieren y las que se gastan. Comprende mecanismos biológicos (genéticos, hormonales, inmunológicos, etc.), psicológicos y sociales que hacen de este un fenómeno complejo (Lucrano 2012).

La obesidad está acompañada por anormalidades en la coagulación y en la fibrinólisis, mientras que la grasa intra-abdominal o visceral es un factor de riesgo independiente de RI, intolerancia a la glucosa, dislipidemia e hipertensión arterial (Pineda, 2008).

En cuanto a su diagnóstico se refiere, el Índice de Masa Corporal (siglas IMC , Tabla 2) es la medida más utilizada y con mayor evidencia sobre su relación con eventos adversos en salud, sin embargo, el perímetro abdominal y la relación cintura-cadera evalúa la adiposidad central, siendo ésta última la más recomendada.

El tejido adiposo es el principal sitio de depósito de ácidos grasos en forma de triacilglicéoles; después de ser liberados por los adipocitos, los ácidos grasos son transportados por la albúmina y removidos rápidamente de la circulación (Esper, 2003).

Tabla 2. Valores de IMC

Valor de IMC	Interpretación (en > 18 años)
<18	Desnutrición
18-24.9	Normal
25-29.9	Sobrepeso
30-34.9	Obesidad grado 1
35-39.9	Obesidad grado 2
≥40	Obesidad grado 3 o severa

Se calcula al dividir el peso en Kg sobre la talla en metros cuadrados ( $IMC = P/T^2$ )

## 2.2. Terapia contra el síndrome metabólico: papel del receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1).

El síndrome metabólico es una entidad clínica caracterizada por la asociación de varias enfermedades vinculadas fisiopatológicamente. Es por ello que su manifestación clínica presenta variaciones fenotípicas. Por ejemplo, puede manifestarse inicialmente con hipertensión u obesidad, y en otros casos como alteraciones en la regulación de la glucosa o de los lípidos u otros trastornos, como la asociación de hipertrigliceridemia y el perímetro de cintura. Es por ello que su diagnóstico requiere de la integración de diversos criterios. De forma similar, el abordaje del tratamiento para los pacientes con síndrome metabólico debe ser integral y el tipo de intervención puede hacerse a nivel de la prevención primaria o secundaria dependiendo del estado evolutivo del paciente (González 2002).

*Prevención primaria:* Modificación del estilo de vida, donde es importante la restricción calórica, dieta que minimice las fluctuaciones de glucosa y triacilgliceroles postprandial, restricción en el consumo de alcohol y cigarrillo, así como la práctica regular de ejercicio.

*Prevención secundaria:* Terapia farmacológica de cada uno de los componentes del síndrome metabólico.

Cuando hay manifestación de diabetes mellitus tipo 2, el tratamiento se centra en inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa (ejemplo la acarbosa), biguanidas (metformina), sulfonilureas (glibenclamida), secretagogos (nateglinida), así como el uso de insulina.

Del mismo modo, el tratamiento de la hipertensión arterial se basa en: diuréticos (tiazidas), bloqueadores adrenérgicos (atenolol), inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o IECA (captopril), mientras que para la dislipidemia el tratamiento se basa en el uso de fibratos y estatinas.

En la actualidad, el control de la obesidad se divide en dos grandes categorías: 1) Inhibidores de los depósitos de grasa: uso de anorexigénicos, inhibidores de la síntesis de ácidos grasos, 2) estimulantes de la utilización de tejido adiposo (Rev. Mex. Cardiol., 2002).

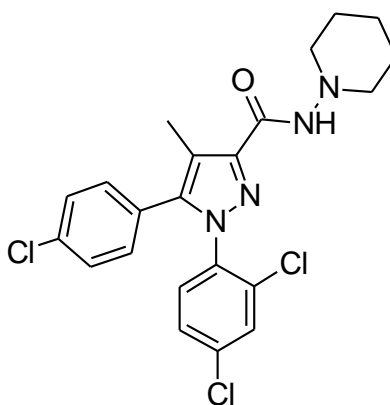
Como se mencionó anteriormente, el SM se constituye de varias patologías (llamados componentes) y varias estrategias se han empleado para el tratamiento de éste, tales como agonistas selectivos de la 5HT-2c, agonistas PPAR  $\alpha/\gamma$ , así como antagonistas del receptor de cannabinoides (Hernández-Vázquez, 2012).

Específicamente, el receptor de cannabinoides es uno de los blancos biológicos que ha llamado la atención de diversos grupos de investigación orientados al diseño y síntesis de fármacos para el tratamiento del síndrome metabólico. Dicho receptor pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés) y se divide en dos subtipos: el receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1), el cual se encuentra principalmente en sistema nervioso central tanto a nivel pre- y postsináptico, además de estar presente en órganos como glándulas salivales, bazo, corazón y en determinadas zonas de los aparatos reproductor, urinario y gastrointestinal; y el receptor de cannabinoides tipo 2, localizado principalmente en células del sistema inmune (células B, NK y monocitos) (Worth, 2009).

A nivel fisiológico, los mecanismos intracelulares en los que se ven implicados los receptores de cannabinoides son principalmente la inhibición de la adenilato ciclasa y la regulación de diferentes canales iónicos.

El receptor CB1, es el subtipo de mayor interés farmacéutico, ya que se asocia a enfermedades relacionadas con regulación metabólica, dolor y ansiedad, por lo cual ha sido objeto de diversos estudios (Ai, 2012).

Considerando la estrecha relación entre la regulación del receptor CB1 y diferentes desórdenes metabólicos, Sanofi-Aventis desarrolló el primer fármaco antagonista/agonista inverso selectivo del receptor CB1 conocido como Rimonabant (SR141716, Acomplia®) (Menozzi, 2008) (Figura 3). Fue autorizado para su venta en la Unión Europea (UE) en junio de 2006 bajo la indicación terapéutica de “adyuvante de la dieta y el ejercicio en pacientes obesos ( $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ ), o pacientes con sobrepeso ( $IMC > 27 \text{ Kg/m}^2$ ), o bien aquellos con factores de riesgo asociados, como la diabetes tipo 2 o dislipidemias” (Comunicado 2008/12, AEMPS, 2008).



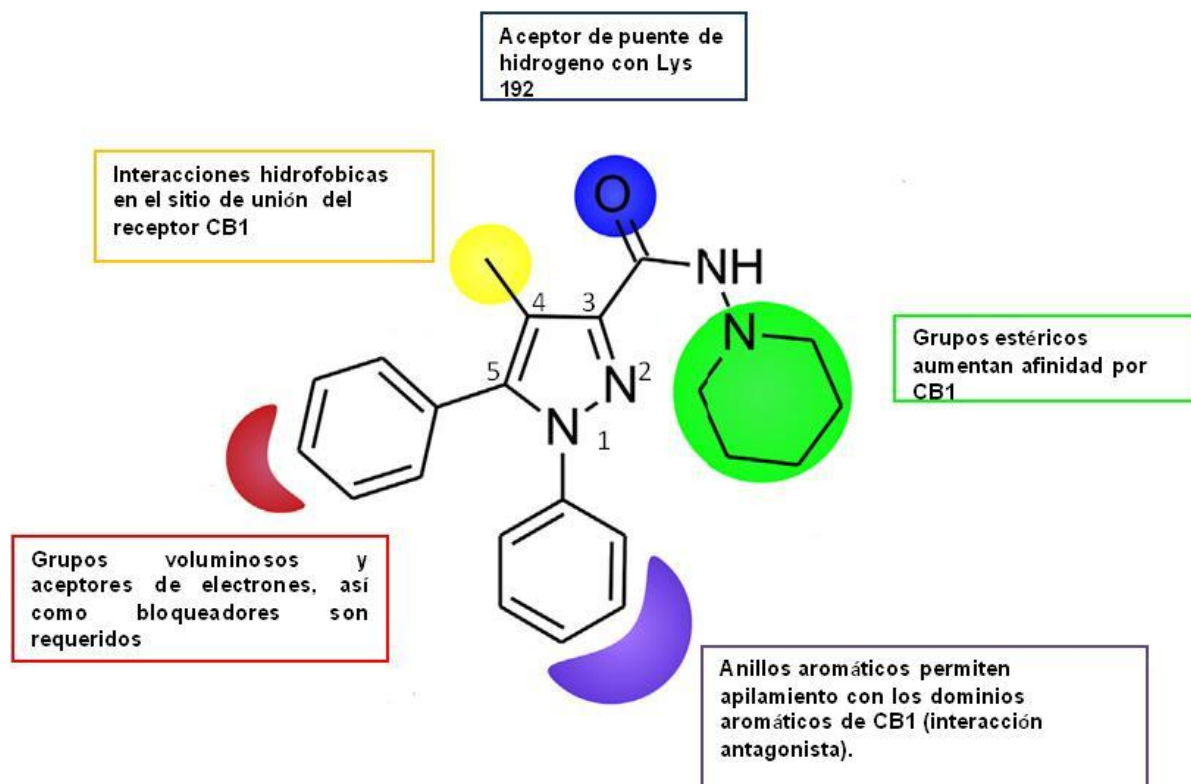
**Figura 3.** Rimonabant (Acomplia®) desarrollado por Sanofi-Aventis.

En 2009, se llevó a cabo el retiro del mercado de este medicamento, ya que se identificó que las alteraciones psiquiátricas, en particular los trastornos depresivos, eran un problema de seguridad más relevante asociado al uso del medicamento (Comunicado 2008/18, AEMPS, 2009).

Como ya se mencionó anteriormente, el mecanismo de acción del rimonabant es a través del antagonismo del receptor CB1 en órganos periféricos tales como hígado, tejido adiposo y músculo esquelético y ha mostrado resultados interesantes al modular funciones metabólicas incluyendo la reducción de la adipogénesis y de la hiperglicemia, la termogénesis, incremento de la lipogénesis y la regulación de la adiponectina. Se ha demostrado que la administración de antagonistas CB1, no solo contribuye a la pérdida de peso, sino que también está implicada en la sensibilización de la insulina y la homeostasis de lípidos (Hernández-Vázquez, 2013).

Empleando un modelo QSAR-3D de una serie de derivados 1,5-diarilpirazólicos (Hernández-Vázquez, 2012), se demostró que la presencia de grupos funcionales voluminosos y con alta densidad electrónica, en la posición *para* del grupo fenilo del C5 del pirazol, son importantes para aumentar la afinidad por el receptor CB1. De igual forma lo es la presencia de grupos voluminosos como sustituyentes del grupo fenilo del N1; mientras que la presencia del grupo carbonilo en la posición C3 también es importante, debido a su capacidad para formar un puente de hidrógeno con la lisina 192 del receptor CB1. Ésta interacción es la que permite el efecto de agonista inverso que presentan estos derivados y al cual se atribuyen los efectos periféricos como la hipoglucemia. Por otro lado, para el grupo metilo en el C4 y la presencia de un N-enlace al grupo carbonilo en la posición C3 son importantes en el efecto antagonista, ya que favorecen la formación de interacciones hidrofóbicas (Figura 4).





**Figura 4.** Características estructurales principales para mejorar la afinidad sobre el receptor CB1 conservando la actividad de antagonista/agonista inverso (Adaptación de Hernández-Vázquez, 2013).

### 2.3. Estrés oxidante y el papel de los antioxidantes

El estrés oxidante en las células y tejidos se presenta cuando hay una sobreproducción de especies reactivas, las cuales provocan un desajuste en la relación prooxidante/antioxidante de la célula, con tendencia favorable hacia el primero (Galano, 2012).

Son tres las alteraciones celulares que de forma directa ocasionan el estrés oxidante:

- La sobreproducción de especies oxidantes como  $\text{H}_2\text{O}_2$  y radicales libres, como el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ).
- La liberación de complejos iónicos presentes en algunas macromoléculas de importancia biológica.

c) La modificación de las defensas contra los radicales libres.

Las condiciones para que se lleven a cabo dichas alteraciones pueden ser ocasionadas por factores de naturaleza externa o bien factores endógenos (Bandeira, 2013) (Tabla 3). A nivel endógeno, las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generadas principalmente en la mitocondria, las cuales en condiciones normales son menos del 0.2% de oxígeno convertido a radicales.

**Tabla 3.** Factores que favorecen el estrés oxidante en el ser humano

<b>Factores exógenos</b>	<b>Factores endógenos</b>
<p><b><i>Alimentos</i></b></p> <p>Dietas ricas en proteínas y lípidos Xenobióticos pro-oxidantes Dietas pobres en antioxidantes Bebidas (café y alcohol)</p> <p><b><i>Contaminantes</i></b></p> <p>Humo de cigarros O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, hidrocarburos Plaguicidas Exposición ocupacional (metales, asbesto)</p> <p><b><i>Fármacos</i></b></p> <p>Anticancerígeno Psoralenos (furocumarinas)</p> <p><b><i>Radiaciones</i></b></p> <p>Radiación ionizante Radiación ultravioleta Microondas</p>	<p>Vida sedentaria Ejercicio físico exhaustivo Procesos inflamatorios (crónicos) Cáncer Isquemia/perfusión Muerte celular Estrés psicológico Respiración celular</p>

Entre las especies reactivas que cobran mayor importancia se encuentra el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el óxido nítrico (NO), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Varias células y enzimas mitocondriales están involucradas en la desintoxicación de las moléculas entre las que se encuentran: superóxido dismutasa (SOD<sup>-</sup>): presente en el citosol como CuZnSOD y en la mitocondria como MnSOD, la

glutathión peroxidasa (GSH) y la catalasa (CAT). Otras enzimas antioxidantes son la superóxido reductasa (SOR), peroxiredoxina (PRX), la glutathión reductasa (GR) y la tioredoxin reductasa (TRX/TRXR) (Mokini, 2010).

En otro contexto, un antioxidante se define como una sustancia que en menor concentración con respecto a la del sustrato oxidable es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato.

Estos se clasifican en dos grupos:

Primarios o tipo 1, los cuales actúan como aceptores/eliminadores de radicales libres y así capaces de retrasar o inhibir la etapa de iniciación o interrumpir el paso de propagación de la autooxidación.

Secundarios o tipo 2, actúan a través de varios mecanismos para reducir la tasa de reacciones de oxidación; como ejemplo están los quelantes para iones metálicos prooxidantes o moléculas que proporcionan átomos de hidrógeno a los antioxidantes primarios, descomponen especies no radicales, absorben radiación ultravioleta, o actúan como eliminadores de oxígeno (Wanasundara, 2005).

El estrés oxidante, es un importante problema de salud pública, ya que se asocia al desarrollo de numerosas enfermedades tales como cáncer, trastornos cardiovasculares, aterosclerosis, crecimiento fetal restringido y varios desórdenes neurológicos, incluidas las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Galano, 2012).

### 2.3.1. Papel del síndrome metabólico en la generación de estrés oxidante.

Las alteraciones metabólicas, asociadas a la hiperglicemia, muestran una fuerte relación con el estrés oxidante. La hiperglicemia se relaciona con la activación de la vía del poliol, el incremento de la producción de productos finales de glicosidación avanzada (AGEs), activación de isoformas de la Proteína cinasa C (PKC) e incremento de la vía biosintética de la hexosamina; las cuales producen directamente daño celular y molecular, así como un incremento en la producción de oxidantes (Ogbera, 2010). A continuación se describirá brevemente cada una de estas vías metabólicas que se activan durante un estado hiperglicémico.

*-Vía del Poliol:* vía de gran trascendencia en las complicaciones diabéticas, consta de dos reacciones principales, 1) reducción de la glucosa a sorbitol por medio de la aldosa reductasa, y 2) la posterior transformación de sorbitol a fructosa por medio de sorbitol deshidrogenasa, consumiéndose en este proceso NADPH y  $\text{NAD}^+$ . Normalmente el metabolismo de glucosa por esta ruta es bajo, pero aumenta en estado de hiperglicemia. La disminución de las concentraciones citosólicas de NADPH dificultan la generación de glutatión reducido por la enzima glutatión reductasa, potenciando el estrés oxidante. Por otra parte el incremento de la relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  produce la inhibición de la gliceraldehído-3-fosfato (G3P) deshidrogenasa e incrementa la concentración de metilglioxal (precursor de AGEs).

*-Productos Finales de la Glicosidación Avanzada:* ocurre entre un grupo ceto o aldehído del azúcar reductor y los grupos amino libres de proteínas y aminoácidos transformándose posteriormente a un producto de Amadori estable. El incremento de los AGEs conlleva a: 1) la producción de proteínas intracelulares modificadas con alteraciones funcionales; 2) modificación de los componentes de la matriz extracelular por precursores de AGEs, ocasionando interacciones anormales con receptores proteínicos (integrinas); 3) modificación de proteínas plasmáticas que se unen a receptores en células endoteliales, mesangiales o macrófagos induciendo la producción

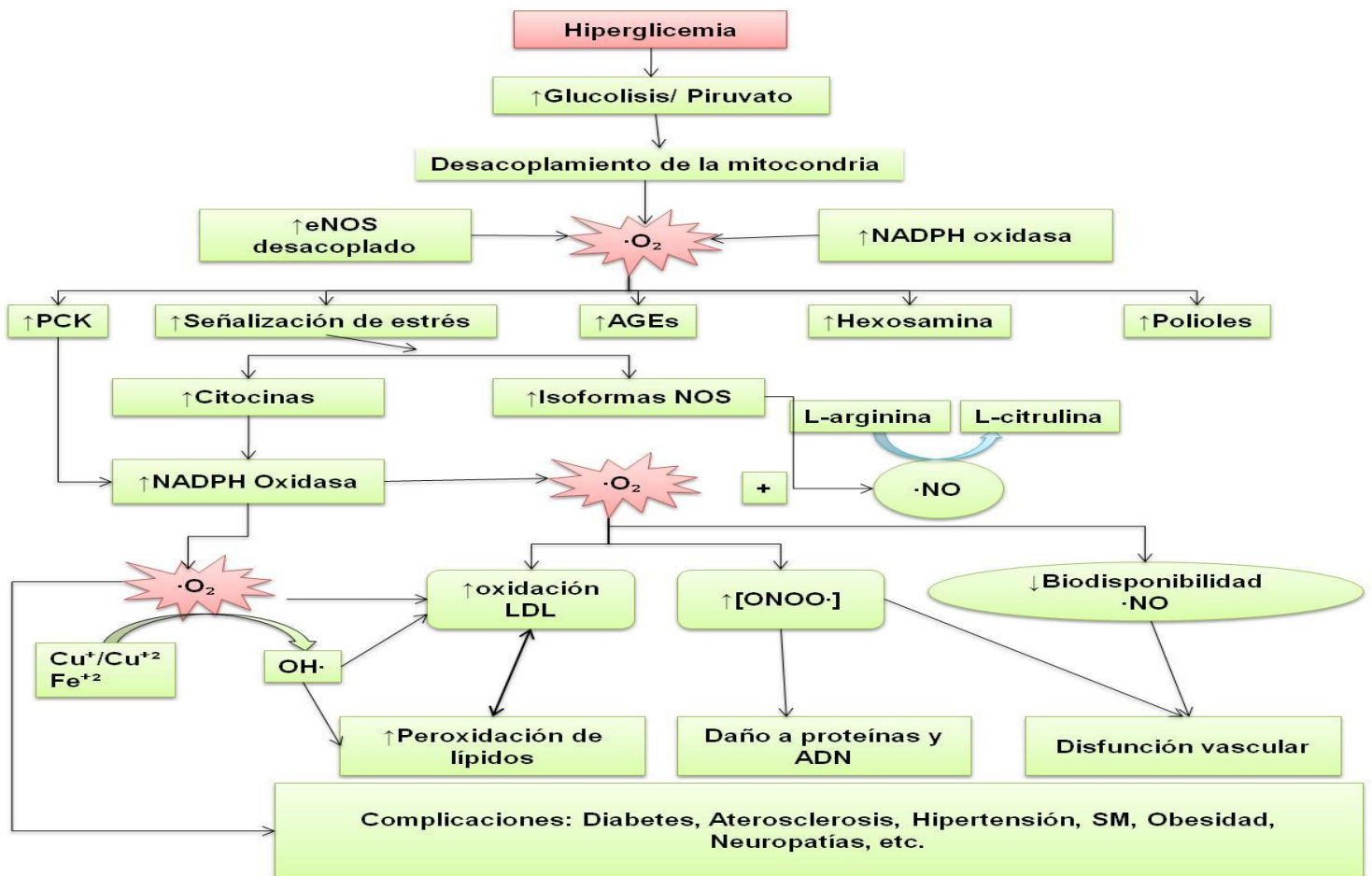
de ROS y activando el factor nuclear kB (NF-kB) que origina modificaciones patológicas en la expresión genética (Mohamed, 2004).

*-Activación de PKC:* La hiperglicemia activa esta vía como consecuencia de la unión de AGEs a su receptor (RAGE's) o activación de la vía del Polirol por el incremento de ROS. Los parámetros que se ven alterados por la actividad de las PKC son: 1) disminución de la óxido nítrico sintetasa (NOs) endotelial (disminuyendo la producción de NO) e incremento de la endotelina 1, lo cual conduce a anormalidades del flujo sanguíneo; 2) induce la expresión del factor promotor de la permeabilidad en células del músculo liso; 3) induce la expresión de factor de Crecimiento transformante  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) el cual incrementa la producción de proteínas como fibronectina y colágeno tipo IV, propiciando la acumulación de proteínas en la matriz microvascular y por lo tanto la oclusión vascular; 4) sobreexpresión del factor inhibidor de la fibrinólisis (PAI-1), activación de NF-kB y regulación de la activación de varias enzimas NADPH dependientes asociadas a membranas.

*-Activación de la Vía de las Hexosaminas:* en esta ruta la fructosa-6-fosfato (F6P) es derivada de la glicolisis hacia la producción de sustratos para las reacciones que requieren UDP-N-acetilglucosamina, como la síntesis de glicoproteínas. Se produce un incremento en la transcripción de TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta_1$  y PAI-1, conduce a modificaciones en la expresión génica y a la expresión de proteínas que, en conjunto contribuyen a la patogénesis de las complicaciones del diabético (Mohamed, 2004).

Por otro lado, altos niveles G3Py F6P van directamente a la vía de los ácidos tricarboxílicos (TCA), incrementando la disponibilidad de NADH y FADH<sub>2</sub>. Como consecuencia de ello, hay un incremento en el gradiente protónico mitocondrial que se eleva hasta un nivel capaz de inhibir a C-III (miembro del complejo macromolecular enzimático de transporte de electrones, correspondiente a la ubiquinona citocromo c oxidoreductasa), para deprimir la respiración celular con acumulación de electrones en la ubiquinona (C-I), la cual transfiere el exceso de energía a el O<sub>2</sub> con el consecuente incremento de ROS (Mokini,2010).

El estrés oxidante activa la vía de señalización de estrés, apoptosis, expresión de genes, factor transcripcional y cinasas sensibles a procesos de óxido-reducción, así como, la inducción de daño a proteínas, DNA y lípidos, acelerando la formación de AGEs y la activación de la vía homeostática y función de la defensa celular. Las ROS inducen la peroxidación de lípidos, alteran la estructura y flujo de las membranas biológicas, causando pérdidas secundarias de función catalítica de enzimas y promover su degradación (Mokini, 2010) (Figura 5).



**Figura 5.** Representación esquemática de las vías de estrés oxidante, simbología: AGEs: Productos finales de la glicosidación avanzada; NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NOS: Oxido nítrico sintasa; PKC: Proteína quinasa C; eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial; LDL: Lipoproteínas de baja densidad; NO: Oxido nítrico;  $\cdot O_2$ : anión superóxido;  $\cdot OH$ : radical hidroxilo;  $\cdot ONOO$ : Peroxinitrilo (Adaptación de Bandeira, 2013).

Las células  $\beta$  pancreáticas son muy sensibles al estrés oxidante por su bajo contenido en enzimas antioxidantes. El estrés oxidante modifica directamente el fenotipo de las células endoteliales incrementando la expresión génica de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión, introduciendo el concepto etiopatogénico de inflamación crónica de bajo grado, la cual también contribuye al mecanismo patogénico de resistencia a la insulina y aparición de la diabetes mellitus tipo 2. También se ha sugerido que los antioxidantes ejercen una influencia sobre las vías de señalización, mediadas por la insulina y el consumo de glucosa (Peydró 2005).

Basado en la fuerte evidencia del rol del estrés oxidante en la patogénesis del síndrome metabólico, el uso de antioxidantes representa un enfoque atractivo para su control. Es de particular interés el descubrimiento de fármacos que muestren propiedades antioxidantes importantes, los cuales podrían contribuir a la terapia de los múltiples padecimientos asociados.

#### **2.4. Herramientas de la Química Farmacéutica para el diseño de fármacos.**

Una de las metas de la Química Farmacéutica, es buscar la optimización de moléculas que presenten actividad biológica de interés, con mejores propiedades fisicoquímicas que permitan tener una mejor “permeación” celular, disminuir la unión a proteínas y disminuir el metabolismo de primer paso, entre otras.

En el caso de las enfermedades multifactoriales, como es el caso del SM, la hibridación molecular resulta ser una de las estrategias más ampliamente utilizadas. La hibridación molecular se basa en la combinación de dos porciones estructurales o moleculares de principios activos capaces de desencadenar una respuesta biológica.

Existen tres tipos de híbridos en los cuales:

1. Ambas entidades de la molécula híbrida interactúan en el mismo sitio diana (Tipo A).
2. Las dos entidades de la molécula híbrida interactúan en dianas independientes (Tipo B).
3. Las dos entidades de la molécula híbrida actúan al mismo tiempo en dos sitios de la misma diana (Tipo C) (Avendaño, 2001).



### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El síndrome metabólico es en la actualidad un problema serio de salud pública a nivel nacional y mundial, ya que favorece el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y de diabetes mellitus tipo 2, donde la obesidad juega un papel central para el desarrollo de estas patologías.

La terapia farmacológica tradicional sólo se ha enfocado al tratamiento de cada uno de los componentes del síndrome, situación que complica el tratamiento o prevención del mismo por el uso de varios fármacos con sus correspondientes problemas de co-administración y riesgo de presentar interacciones después de ingresar al organismo. Por lo anterior, ¿Será posible contar con moléculas que puedan afectar al menos dos de los componentes del SM para disminuir el número de fármacos a utilizar en este padecimiento?

### **4. HIPÓTESIS**

La conjunción del ácido 1,5-diarilpirazol-3-carboxílico (antagonista/agonista inverso sobre el receptor de cannabinoides tipo 1), con sustancias con propiedades antioxidantes, dará origen a híbridos con acción dual destinadas a disminuir la obesidad y el estrés oxidante, implicados en los inicios de las enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus tipo 2.

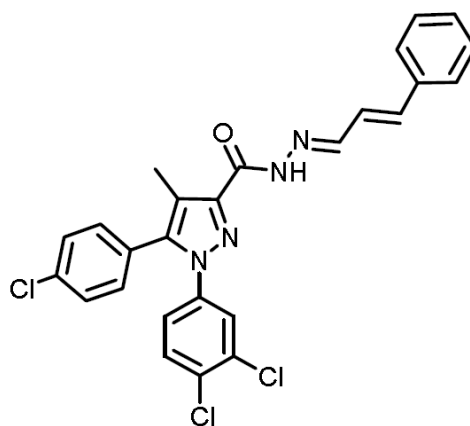
## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

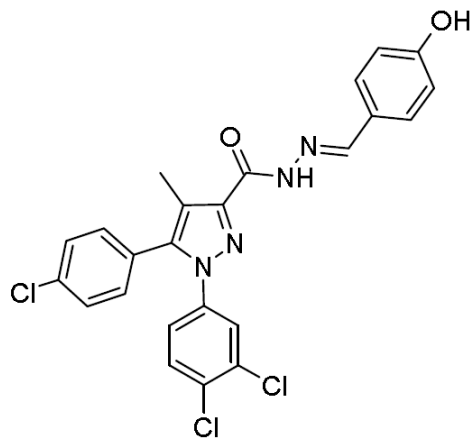
Obtener moléculas que se comporten como híbridos, constituidas por una porción 1,5-diarilpirazolica y otra porción antioxidante, como posibles agentes terapéuticos contra el estrés oxidante y la hiperglicemia.

### 5.2 Objetivos específicos

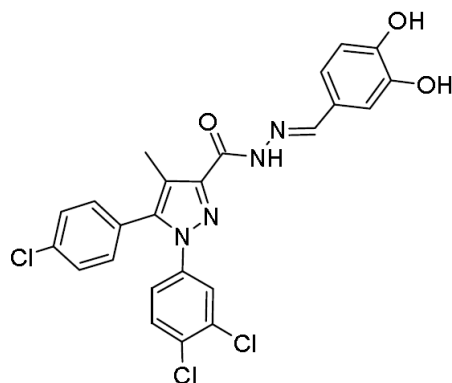
- ❖ Sintetizar y caracterizar por espectroscopía y espectrometría las siguientes moléculas:



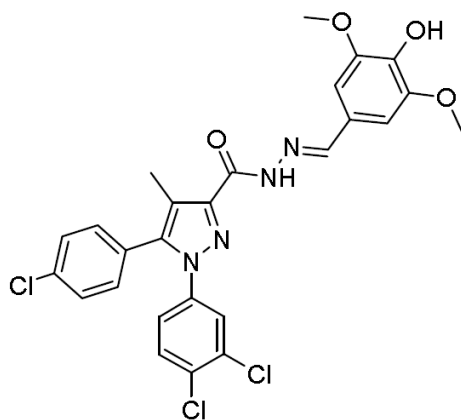
1. 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(1*E*, 2*E*)-3-fenilaliliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



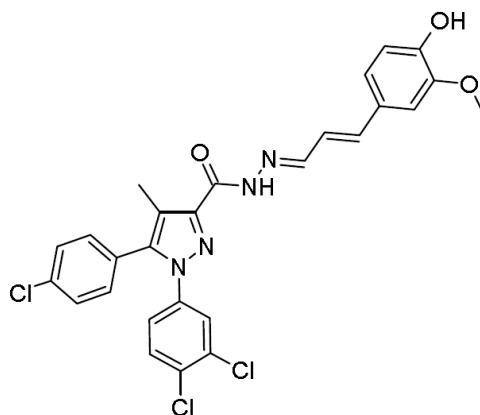
2. 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-4-hidroxi-benciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



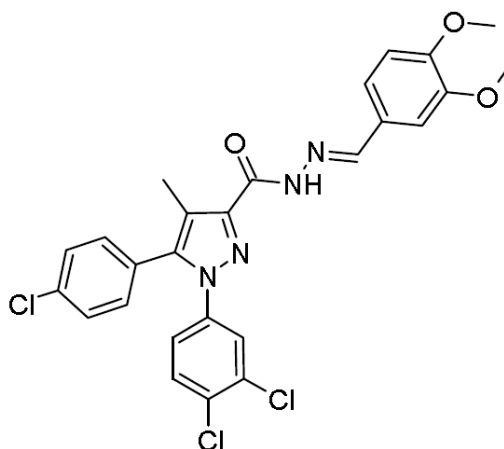
3. 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-3,4-dihidroxi-benciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



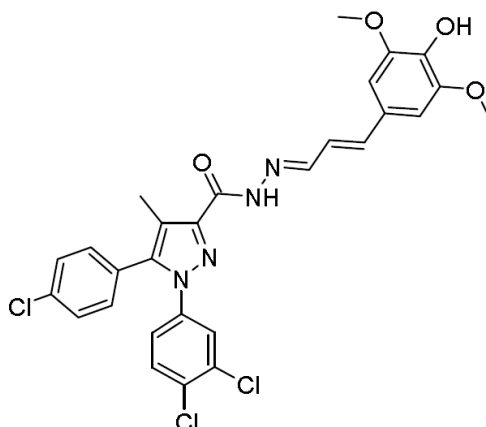
4. 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(*E*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



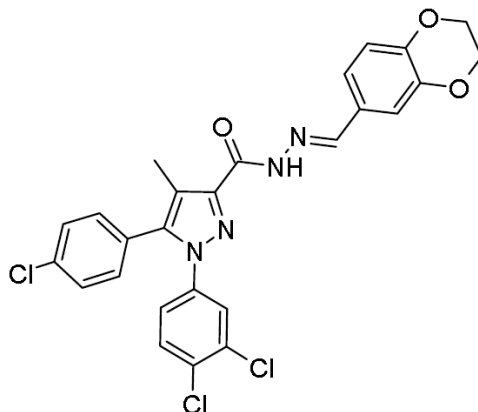
5. 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(1*E*, 2*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)aliliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



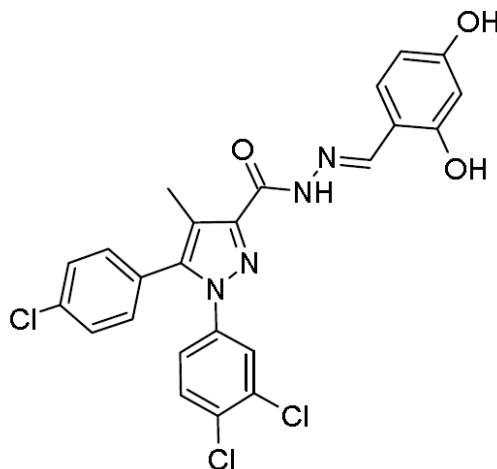
6. 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(*E*)-3,4-dimetoxibenciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



7. 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(1*E*, 2*E*)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)aliliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



8. 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(*E*)-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)metiliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



9. 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(*E*)-2,4-dihidroxibenciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.

- ❖ Determinar cuali- y cuantitativamente la actividad antioxidante *in vitro* de los compuestos sintetizados empleando la técnica de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).

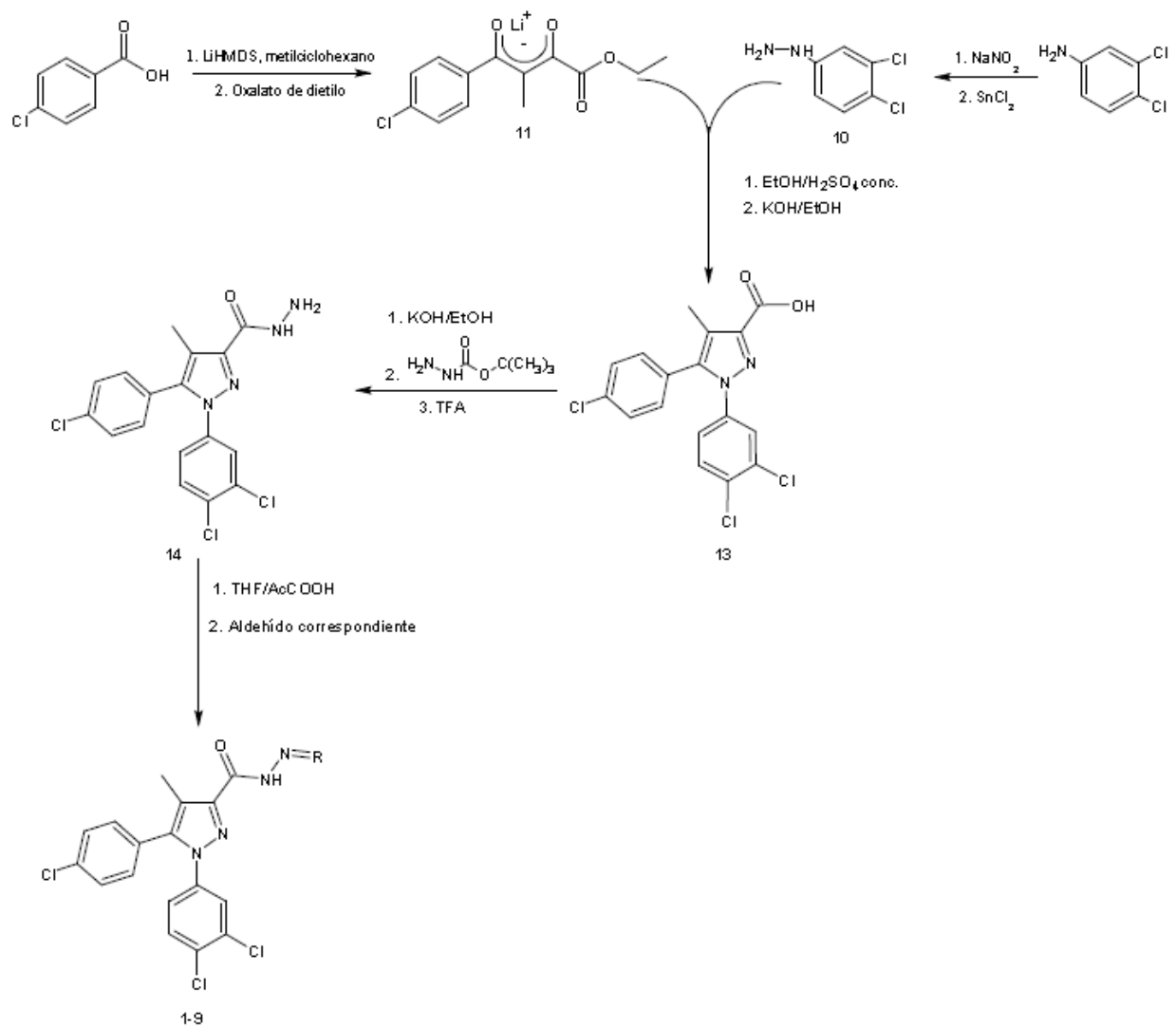
- ❖ Determinar la capacidad de inhibición de la peroxidación de lípidos de los compuestos sintetizados mediante el uso de la técnica del tiocianato.
- ❖ Llevar a cabo un estudio de acoplamiento molecular (Docking) con un grupo de prueba de tres compuestos sintetizados y determinar su energía de unión ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ), empleando un modelo obtenido por homología del CB1.
- ❖ Remitir los compuestos sintetizados a pruebas biológicas para determinar su actividad hipoglucemiante.

## 6. Metodología

En el presente apartado se muestra la ruta sintética seguida para obtener los compuestos propuestos en los objetivos del presente trabajo, así como la descripción breve de los modelos empleados de actividad antioxidante. Finalmente en el apartado tres se detalla el proceso de la obtención del modelo del receptor de cannabinoides tipo 1, así como el desarrollo del acoplamiento molecular (docking).

### 6.1 Parte química

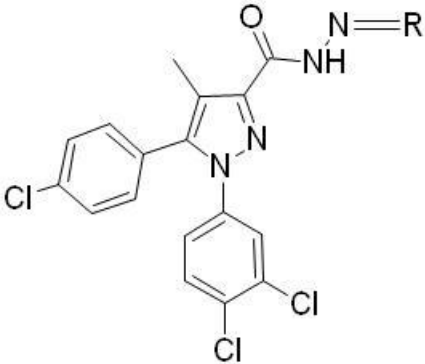
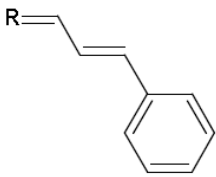
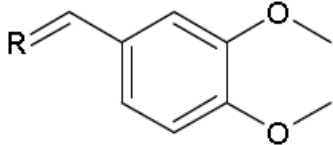
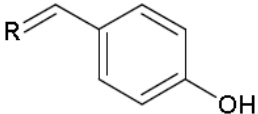
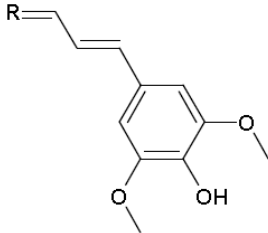
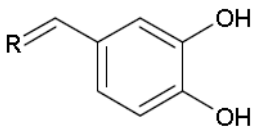
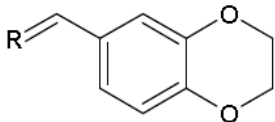
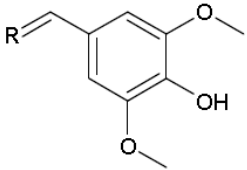
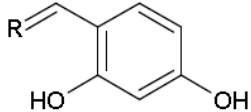
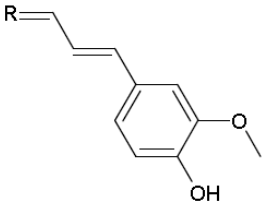
En esta sección, se describe la metodología seguida para la síntesis de los derivados del ácido 1,5-diarilpirazol-3-carboxílico. La ruta sintética seguida se divide en tres apartados principales, la formación del ácido 1,5-diarilpirazólico, posteriormente, la formación de la carbohidrazida del ácido correspondiente y por último los productos finales que se obtienen de la reacción entre la carbohidrazida y diferentes aldehídos propuestos. Lo anterior descrito se ilustra en el Esquema 1. La estructura general y particular de los compuestos a obtener se resume en la Tabla 4.



**Esquema 1.** Panorama general de la ruta sintética a seguir.

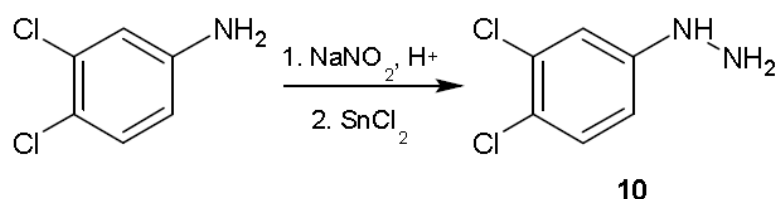


Tabla 4. Estructuras de los productos finales

			
Compuesto	R	Compuesto	R
1		6	
2		7	
3		8	
4		9	
5			

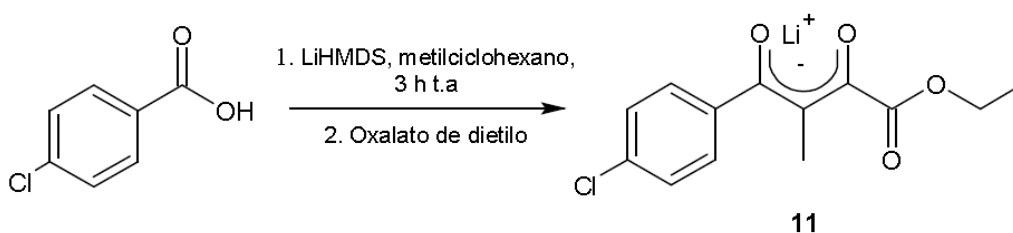
### 6.1.1 Síntesis del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxílico.

El paso inicial en la síntesis de los compuestos **1–9**, fue la obtención de la 3,4-diclorofenilhidrazina (**10**), empleando 3,4-dicloroanilina y nitrito de sodio en medio ácido, lo que permitió la formación de la sal de diazonio correspondiente; posteriormente, con el empleo de cloruro de estaño (II) se llevó a cabo la reducción para así obtener la 3,4-diclorofenilhidrazina (Esquema 2).



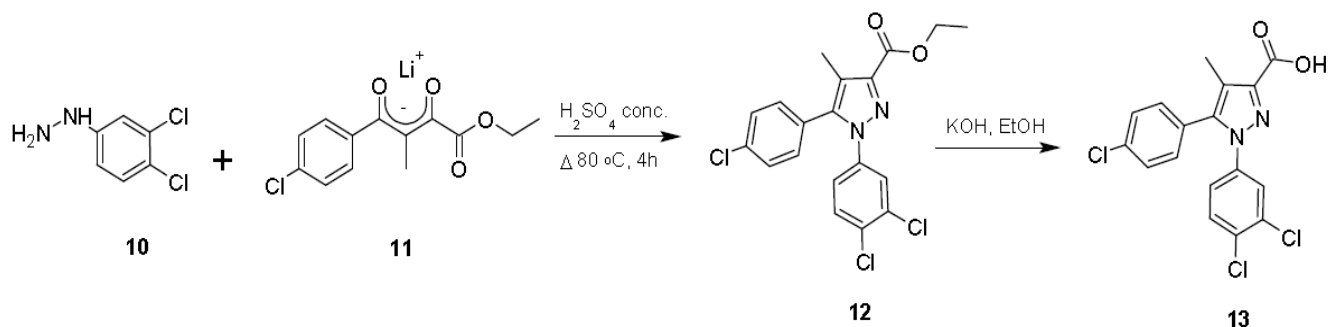
**Esquema 2.** Formación de la 3,4-diclorofenilhidrazina

Simultáneamente, se llevó a cabo la obtención del compuesto tricarbónico (**11**), cuya síntesis inicia con la reacción entre la 4-cloropropiofenona y el *bis*(trimetil)sililamiduro de litio (LiHMDS), formando así el enolato de litio correspondiente, el cual se hace reaccionar con oxalato de dietilo para obtener la sal de litio del compuesto tricarbónico (Esquema 3).



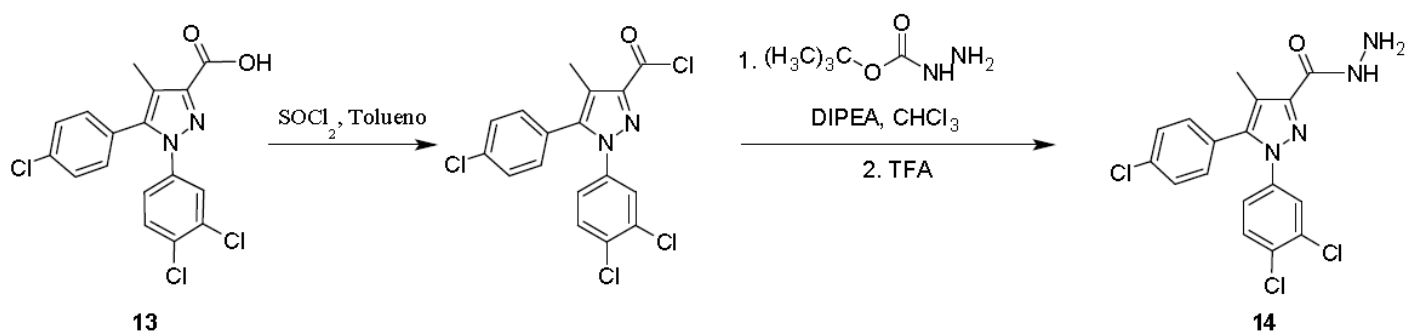
**Esquema 3.** Formación de la sal de litio del 4-fenil-3-metil-2,4-dioxobutanoato de etilo.

La formación del heterociclo (pirazol) se llevó a cabo mediante la ciclocondensación de los dos precursores mencionados anteriormente. Se hizo reaccionar la hidrazina **10** con el éster **11** en condiciones de reflujo y catálisis ácida (Ver Esquema 4).



**Esquema 4.** Ciclocondensación (**12**) y posterior hidrólisis para la formación del ácido 1,5-diarilpirazol (**13**).

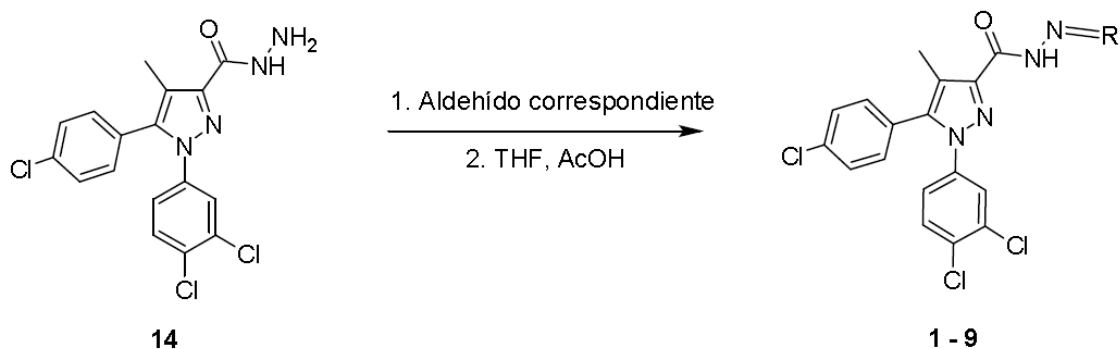
Posteriormente, el compuesto **12** fue sometido a una hidrólisis alcalina empleando  $\text{KOH}$ , en agitación a temperatura ambiente, formando de esta manera el ácido 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (**13**, Esquema 4). Este intermediario se utilizó como sustrato para la obtención de la carbohidrazida correspondiente. Como primer paso se llevó a cabo la activación del ácido, convirtiéndolo al correspondiente cloruro mediante el empleo de cloruro de tionilo en condiciones de reflujo. Posteriormente, mediante un ataque nucleofílico al carbono  $\text{sp}^2$  del grupo carbonilo, se adicionó la hidrazina protegida con el grupo Boc. El grupo protector se eliminó en un paso posterior empleando ácido trifluoroacético (Esquema 5).



**Esquema 5.** Formación del 1,5-diarilpirazol-3-carbohidrazida correspondiente

### 6.1.2. Síntesis de las hidrazidas 1-9

Para la síntesis de los productos finales, se llevó a cabo la formación de la hidrazona entre el compuesto **14** y el aldehído correspondiente (Ver Tabla 4), empleando como catalizador ácido acético glacial y malla molecular como agente desecante en el medio de reacción (Esquema 6).



**Esquema 6.** Reacción general de la obtención de las hidrazonas **1–9**.

### 6.2. Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante de las moléculas sintetizadas se realizó mediante el empleo de dos metodologías: en primera instancia se determinó la capacidad de las hidrazonas sintetizadas de reducir el Fe (III) a Fe (II); este estado de oxidación es capaz de formar un complejo azul con 2, 4, 6-*tris*-(2-piridil)triazina (TPTZ) que puede ser cuantificado por absorbancia en el espectro visible a 593 nm. Este método se conoce como FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power por sus siglas en inglés).

Por otro lado, en un modelo *in vitro* de lipoperoxidación, se determina la capacidad de las moléculas sintetizadas para inhibir la oxidación del ácido linoleico. Una mezcla de reacción que contiene ácido linoleico y los compuestos sintetizados **1–9**, fue expuesta a condiciones de temperatura elevadas y posteriormente se hizo reaccionar indirectamente con Fe (II), el cual se oxida a Fe (III). El catión férrico en presencia de tiocianato de amonio forma un complejo color rojo, el cual se cuantifica a 500 nm.

### 6.2.1. Ensayo FRAP (ferric reducing antioxidant power)

Como se mencionó anteriormente, uno de los métodos que se empleó para evaluar la capacidad antioxidante de la serie sintetizada fue el FRAP. Este método se basa en la reducción del complejo  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$  a  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$  por efecto de compuestos con poder reductor. La determinación se realizó de acuerdo con lo indicado por Descalzo en 2007 con sutiles modificaciones. Se tomó una alícuota de 30  $\mu\text{L}$  de la muestra (concentraciones aproximadas de 4000, 1500, 800 y 400  $\mu\text{M}$  disueltas en DMF), a la cual se le adicionaron 90  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 900  $\mu\text{L}$  de una disolución de FRAP, compuesta por 2.5 mL de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina 10mM) en HCl (40 mM), 2.5 mL de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM) y 25 mL de buffer de acetatos (300mM pH=3.6). Se empleó como control negativo una muestra que contenía únicamente TPTZ y el disolvente de la solución de FRAP (buffer de acetatos, 300mM pH=3.6), y un blanco correspondiente a la disolución de FRAP y el disolvente con el cual se homogeneizó la muestra (DMF). Las absorbancias se determinaron a 593 nm y las lecturas se tomaron a los 6 y 30 minutos de iniciada la reacción. Las muestras se realizaron por triplicado.

La curva estándar se realizó con Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) en concentraciones de 600 a 25  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresan como equivalentes  $\mu\text{M}$  de Trolox/mg de muestra.

### 6.2.2. Inhibición de la peroxidación de lípidos.

La evaluación de la protección a la peroxidación de lípidos se llevó a cabo mediante la técnica modificada de inhibición de la oxidación del ácido linoleico descrita por Elmastas en 2007. En primer lugar se preparó una disolución de ácido linoleico 2.5 % en etanol. Para la mezcla de reacción se emplearon: 1000  $\mu\text{L}$  de la muestra en concentraciones de 1 mg/mL y 0.5 mg/mL, 500  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos (40 mM, pH=7) y 500  $\mu\text{L}$  de la solución de ácido linoleico al 2.5 %, se incubó a 40°C para acelerar el proceso de oxidación, con agitación constante y en total oscuridad.

La determinación de los niveles de peroxidación se llevaron a cabo siguiendo el método de tiocianato: se tomaron 1400  $\mu\text{L}$  de etanol y se adicionan 100  $\mu\text{L}$  de tiocianato de amonio al 30 % y 100  $\mu\text{L}$  de la muestra que se encontraba previamente en incubación. Esta mezcla se dejó en agitación por un periodo de 3 minutos, tras lo cual se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_2$  (20 mM) disuelto en una solución de HCl (40 mM). La absorbancia se determinó a 500 nm.

De acuerdo con la técnica, a menor coloración roja de la disolución, mayor es la capacidad de la muestra de inhibir la oxidación del ácido linoleico.

### **6.3. Modelado Molecular (Docking)**

La problemática en la actualidad del estudio del receptor CB1 humano es que no existen registros cristalográficos acerca de su estructura tridimensional, es por ello que el presente apartado describe el proceso para el desarrollo del modelo del receptor CB1 que se empleó para el estudio de acoplamiento molecular (docking) de un grupo de prueba representativo de las moléculas sintetizadas.

Como primer objetivo, se llevó a cabo la búsqueda de la información relacionada con el receptor CB1 de humano empleando el servidor NCBI. Posteriormente, con el uso del servidor Protein Data Bank (PDB), se realizó la búsqueda de la estructura cristalográfica del receptor, sin embargo, a la fecha solo se han descrito cuatro fragmentos resueltos por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), por lo cual se procedió a la búsqueda de proteínas con secuencia homóloga al receptor, empleando para ello la base de datos del PDB. De acuerdo a este análisis, se eligió al receptor de Esfingosina-1-fosfato tipo I de humano (PDB: 3V2Y) como plantilla para construir el modelo del receptor de canabinoides tipo 1 (CB1).

Basados en análisis previos de dicho receptor (González, 2008), se realizó un ajuste de la secuencia de aminoácidos, para llevar a cabo la construcción de la estructura secundaria de la proteína. El modelo tridimensional fue construido empleando la

herramienta de Prime de Schrödinger versión 9.5. Posteriormente se realizó la minimización de energía del modelo final del receptor CB1 empleando el campo de fuerza modificado GROMOS 96 43a1 (software GROMOS 4.5.5). La validación del modelo propuesto se realizó al comparar con una base de datos de proteínas reportadas (PROCHECK), además de determinar el grado de confiabilidad del modelo (QMEAN 6) y el cálculo de los ángulos  $\phi$  (phi) y  $\psi$  (psi) de los aminoácidos que lo componen (comportamiento conformacional, diagrama de Ramachandran).

La estructura tridimensional fue embebida en un fragmento de bicapa lipídica de 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicerol-3-fosfocolina (POPC), con el fin de obtener un modelo final optimizado en condiciones reales.

Finalmente se llevó a cabo el acoplamiento en el receptor de los ligandos propuestos en el presente trabajo **(2, 6, 7)** empleando el software AutoDock 4.2.

#### 6.4 Actividad hipoglucemiante

Para determinar la actividad hipoglucemiante se emplearon ratas Wistar previamente diabetizadas con estreptozotocina.

Posteriormente los compuestos a probar se disolvieron en Tween 80 al 10 % en agua (vehículo) a una dosis de 50 mg/kg. Se administraron vía intragástrica a grupos de cinco ratas y se tomó como control negativo al vehículo (1 mL/rata) y como control positivo a la sulfonilurea glibenclamida a una dosis de 5mg/kg. Se recolectaron muestras sanguíneas por la vena de la cola a las 0, 3, 5 y 7 horas después de la administración, midiéndose la glucosa con un glucómetro comercial. Se calculó el porcentaje de la variación de la glicemia en relación a los niveles basales (0 h) utilizando la ecuación:

$$\% \text{ variación de la glicemia} = [(Gx - G0) / G0] \times 100$$

Donde G0 corresponde a los niveles iniciales de glicemia y Gx los niveles a los tiempos del estudio.

Los valores se expresaron como media  $\pm$  EEM y la significancia se estimó por análisis ANOVA, con un valor de  $p < 0.05$ .



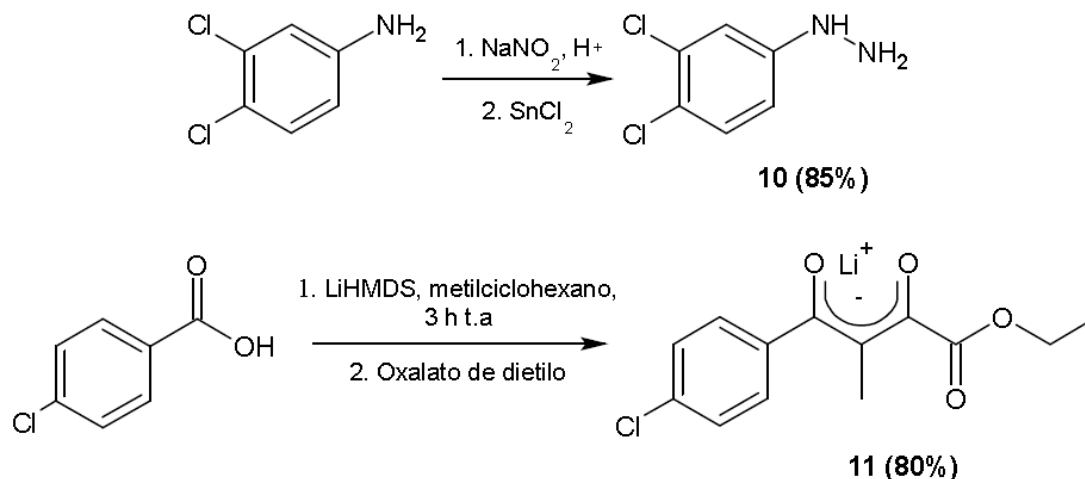
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el presente apartado se profundizará sobre los resultados obtenidos y su correspondiente análisis sobre la caracterización de las moléculas planteadas en el objetivo del presente trabajo mediante el empleo de técnicas espectrométricas y espectroscópicas convencionales; de igual forma, se describen los resultados obtenidos de las pruebas de actividad antioxidante y del modelado molecular de las estructuras **2,6** y **7** con el receptor de cannabinoides tipo I.

### 7.1. Parte química

#### 7.1.1. Síntesis y caracterización de 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazina.

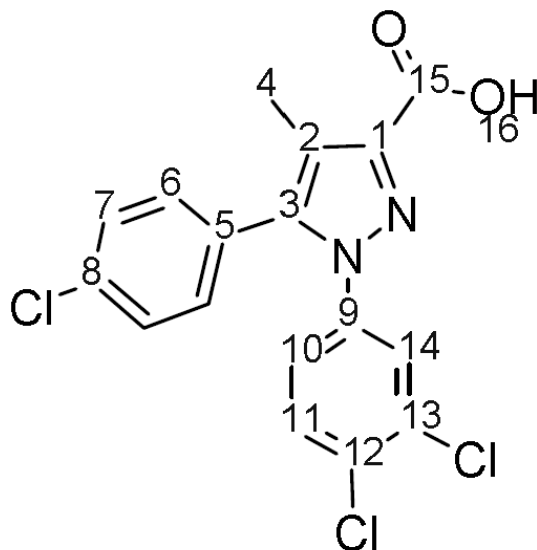
En la síntesis planteada, el último paso involucra la condensación del anillo de pirazol-3-carbohidrazida con diferentes aldehídos con posible actividad antioxidante. En este sentido, para la formación del anillo pirazólico, en primer lugar se llevó a cabo la síntesis de la 3,4-diclorofenilhidrazina, mediante la formación de la sal de diazonio a partir de la 3,4-dicloroanilina, empleando para ello nitrito de sodio en medio ácido, seguida de una reducción química con cloruro de estaño (II) en un buen rendimiento (85 %). El segundo intermediario a sintetizar fue el 4-(4-clorofenil)-3-metil-2,4-dioxobutanoato de etilo, obtenido de la reacción entre el enolato de litio de la 4-cloropropiofenona (formado con la base *bis*(trimetilsilil) amiduro de litio), seguido de una reacción de sustitución nucleofílica en el grupo carbonilo con oxalato de dietilo, formando así una sal de litio tricarbónica con rendimientos relativamente buenos (80 %). Esquema 7.



**Esquema 7.** Intermediarios en la síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxihidrazida.

Con los dos anteriores intermediarios se propuso una ciclocondensación en una solución de ácido sulfúrico/etanol, generando así el pirazol-3-carboxilato de etilo. El cual, fue convertido al ácido carboxílico correspondiente por tratamiento con hidróxido de potasio a temperatura ambiente, en un rendimiento de 76%. Debido a que es considerado uno de los intermediarios claves para la síntesis de los productos finales, este intermediario se caracterizó por técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

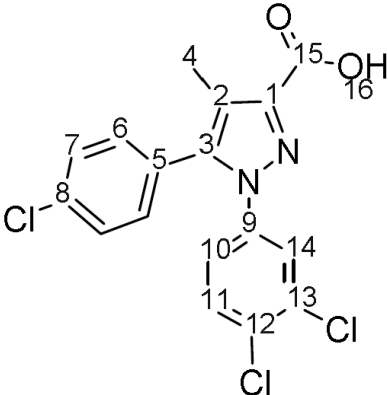
De acuerdo con la espectrometría de masas, este compuesto presenta un ion molecular ( $M^{+}$ ) de 381 m/z, además de que pudo apreciarse la presencia del ion  $M+2$  de 383 m/z. Por otro lado, el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno fue analizado. (Tabla 5, Anexo II).



**Figura 6.** Ácido 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxílico, asignación numérica de los hidrógenos presentes en la molécula. NOTA: La numeración se coloca de forma arbitraria.

Se observa la señal simple del metilo, que integran para tres hidrógenos a 2.2 ppm. Los hidrógenos del anillo aromático en C5 del pirazol (en figura numerado como 6, Figura 6), presentan un conjunto de señales del tipo AA'BB', que integra para un total de cuatro carbonos con un desplazamiento a 7.3 ppm. El hidrógeno en posición 10, presenta un sistema del tipo doble de dobles por efecto del hidrógeno en posición 11 y además la presencia de un protón adyacente en la posición 14 del anillo, se aprecia con un desplazamiento de 7.12 ppm y con constantes de acoplamiento de 8.8 y 2.4 Hz. El hidrógeno en posición 14, presenta una señal doble a 7.67 ppm con  $J= 8.7$  Hz y finalmente el hidrógeno en posición 15 muestra una señal doble a 7.85 ppm con  $J= 2.4$  Hz.

**Tabla 5.** Resultados espectroscópicos y espectrométricos del intermediario principal.

Compuesto	Resultado espectrométrico
 <p data-bbox="188 779 755 863"><b>Ácido 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxílico.</b></p> <p data-bbox="399 930 542 961"><b>MM: 381.6</b></p>	<p data-bbox="781 348 1406 380"><b>Espectro 1.</b> EM [FAB] <math>m/z</math> 381 (<math>M^+</math>), 383 (<math>M+2</math>).</p> <p data-bbox="781 447 1414 678"><b>Espectro 2.</b> RMN-<math>^1H</math> (DMSO-<math>d_6</math>, <math>\delta</math> ppm) 2,21 (s, 3H, H-5), 7.12 (dd, 1H, H-10, <math>J= 8.8</math> y 2.4 Hz), 7.35 (AA'BB', 2H, H-6), 7.56 (AA'BB', 2H, H-7), 7.67 (d, 1H, H-11, <math>J= 8.7</math> Hz), 7.85 (d, 1H, H-14, <math>J= 2.4</math> Hz).</p>

Una vez corroborada la estructura del ácido pirazol-3-carboxílico (**13**), se llevó a cabo la activación del ácido empleando cloruro de tionilo para así obtener del cloruro de ácido correspondiente, el cual, en presencia del carbazato de *terbutilo* y el empleo de DIPEA como base (para neutralizar el HCl que se libera de la reacción), permitió la formación de la carbohidrazida-*N*-Boc protegida. Finalmente la carbohidrazida protegida se trató con ácido trifluoroacético, para remover el grupo protector, obteniéndose la carbohidrazida en un rendimiento de 72 %.

### 7.1.2. Obtención de las *N*-acilhidrazidas 1–9.

Para obtener los compuestos finales, se hizo reaccionar la pirazol-3-carbohidrazida (**14**) con el aldehído correspondiente a través de una reacción de condensación y así obtener las *N*-acilhidrazidas **1-9**. La reacción se vio favorecida por la adición de ácido acético glacial empleado como catalizador, así como el empleo de malla molecular que permitieron eliminar el agua liberada de la reacción y favorecer el equilibrio a la formación de los productos finales.

El seguimiento de las reacciones descritas en este apartado se realizó mediante cromatografía en capa fina en placas de gel de sílice. La purificación de los productos finales se realizó por medio de columna cromatográfica fase normal y la precipitación subsecuente con alcohol isopropílico. Los rendimientos obtenidos fueron de buenos a moderados, mientras que la caracterización física de los compuestos finales, se realizó mediante la determinación del punto de fusión y la apariencia física de los sólidos obtenidos (Ver Tabla 6).

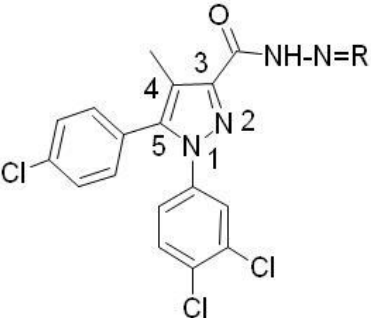
**Tabla 6.** Propiedades físicas y rendimientos de los compuestos obtenidos.

<b>Compuesto</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>p.f (°C)</b>	<b>Rf<sup>a</sup></b>	<b>Aspecto</b>
<b>1</b>	58.4	163 – 164	0.85	Sólido blanco
<b>2</b>	81,7	285 – 286	0.63	Sólido beige
<b>3</b>	83,1	244 – 245	0.47	Sólido blanco cristalino
<b>4</b>	53.7	269	0.65	Sólido beige
<b>5</b>	46,8	213 – 214	0.78	Sólido naranja
<b>6</b>	72.8	233 – 234	0.83	Sólido beige
<b>7</b>	60,7	249	0.70	Sólido amarillo
<b>8</b>	48.0	205 – 206	0.85	Sólido beige
<b>9</b>	74.7	274 – 275	0.70	Sólido beige

<sup>a</sup>Sistema de elución mezcla CHCl<sub>3</sub>/MeOH 90:10

En la Tabla 7, se presentan los datos generales de la espectroscopía de infrarrojo de los productos finales, el cual fue el primer acercamiento en la elucidación estructural de cada uno estos.

Tabla 7. Principales señales de IR.

		
Tipo de enlace	Tipo de vibración	Señal (cm <sup>-1</sup> )
<b>-C-H C4</b>	Estiramiento	2900
<b>=C-H</b>	Estiramiento	3100-3000
<b>-C=C-</b>	Estiramiento	1600-1450
<b>-NH-C=O-</b>	Estiramiento	3350-3310 sobretono 1550
<b>-O-CH<sub>3</sub> Compuestos 4-7</b>	Estiramiento	2820
<b>-OH Compuestos 2-5, 7 y 9</b>	Estiramiento	3500-3000

Las diferencias entre cada compuesto radican en la presencia de una banda en aproximadamente 2820 cm<sup>-1</sup>, pertenecientes a la vibración de estiramiento O-CH<sub>3</sub>, de aquellos grupos con sustituyente metoxilo (compuestos **4** al **7**), o bien una banda entre 3000–3500 cm<sup>-1</sup>, que pertenece a vibraciones de estiramiento del sustituyente O-H, encontradas en la mayoría de los compuestos a excepción de los compuestos **1**, **6** y **8**.

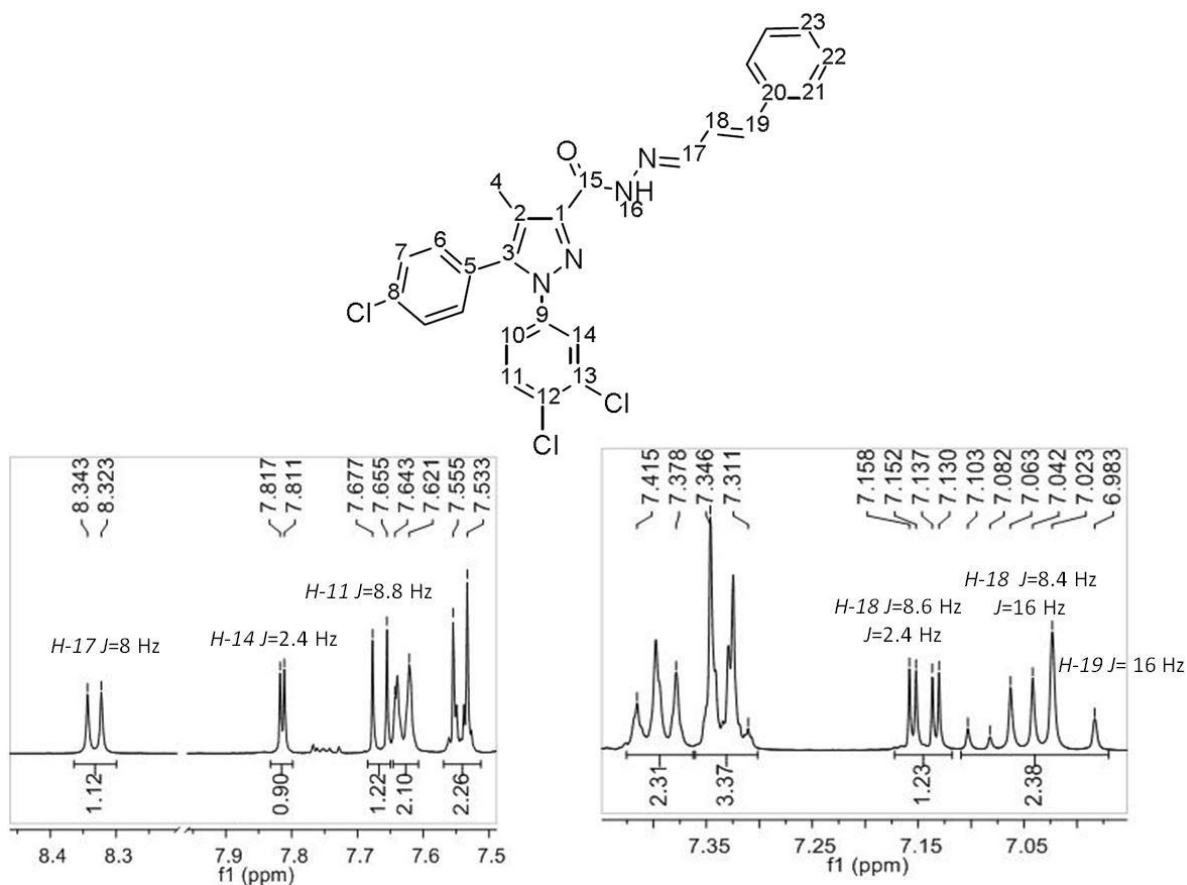
Por otro lado, las *N*-acilhidrazidas del **1–9**, presentan un patrón en resonancia magnética nuclear de protón muy similar para la porción 1,5-diarilpirazólica, identificándose el siguiente perfil: una señal simple que integra para tres hidrógenos en aproximadamente 2.23 ppm perteneciente al grupo metilo unido al C4 del anillo pirazol. A 7.34 ppm y 7.54 ppm se presenta un sistema del tipo AA'BB' que integra para un total de cuatro hidrógenos, de los hidrógenos en posiciones 2 y 3 del grupo fenilo unido

al C5 del pirazol. Una señal doble en aproximadamente 7.67 ppm que integra para un hidrógeno con una constante de acoplamiento de 8.8 Hz y que se asigna al hidrógeno en posición 5 del fenilo unido al N1 del anillo pirazol. Una señal doble de dobles con un desplazamiento en aproximadamente 7.14 ppm y constantes de acoplamiento de 8.6 y 2.4 Hz, que corresponde al hidrógeno en posición 6 al anillo fenilo enlazado al N1 del anillo pirazol. En aproximadamente 7.81 ppm se puede apreciar una señal doble con una  $J = 2.4$  Hz perteneciente al último hidrógeno aromático, el cual se encuentra en posición 2 del grupo fenilo unido a N1 del pirazol.

A continuación se detallarán las señales de RMN- $^1\text{H}$  que son características de cada producto final.

El compuesto **1** (Figura 7), formado a partir del aldehído cinámico, además de las señales descritas anteriormente, presenta el siguiente patrón de señales: una señal doble que integra para un hidrógeno a 8.33 ppm, el cual se encuentra enlazado al carbono que forma en enlace *N*-acilhidrazida (H-17); un hidrógeno con una señal doble de dobles a 7.07 ppm, con constantes de acoplamiento de 8.4 y 16 Hz, que se encuentran enlazados al segundo protón vinílico (H-18); una señal doble a 7.00 ppm que integra para un hidrógeno y con una constante de acoplamiento de 16 Hz, que corresponde al hidrógeno unido al tercer carbono del dieno (H-19). Cabe señalar de señales, también se encuentra presente en los compuestos **5** y **7**, los cuales presentan también en su estructura un dieno. Es importante señalar que H-18 y H-19, presentan constantes de acoplamiento de 16 Hz, lo cual es indicativo de la isomería *trans*, presente en estas estructuras.

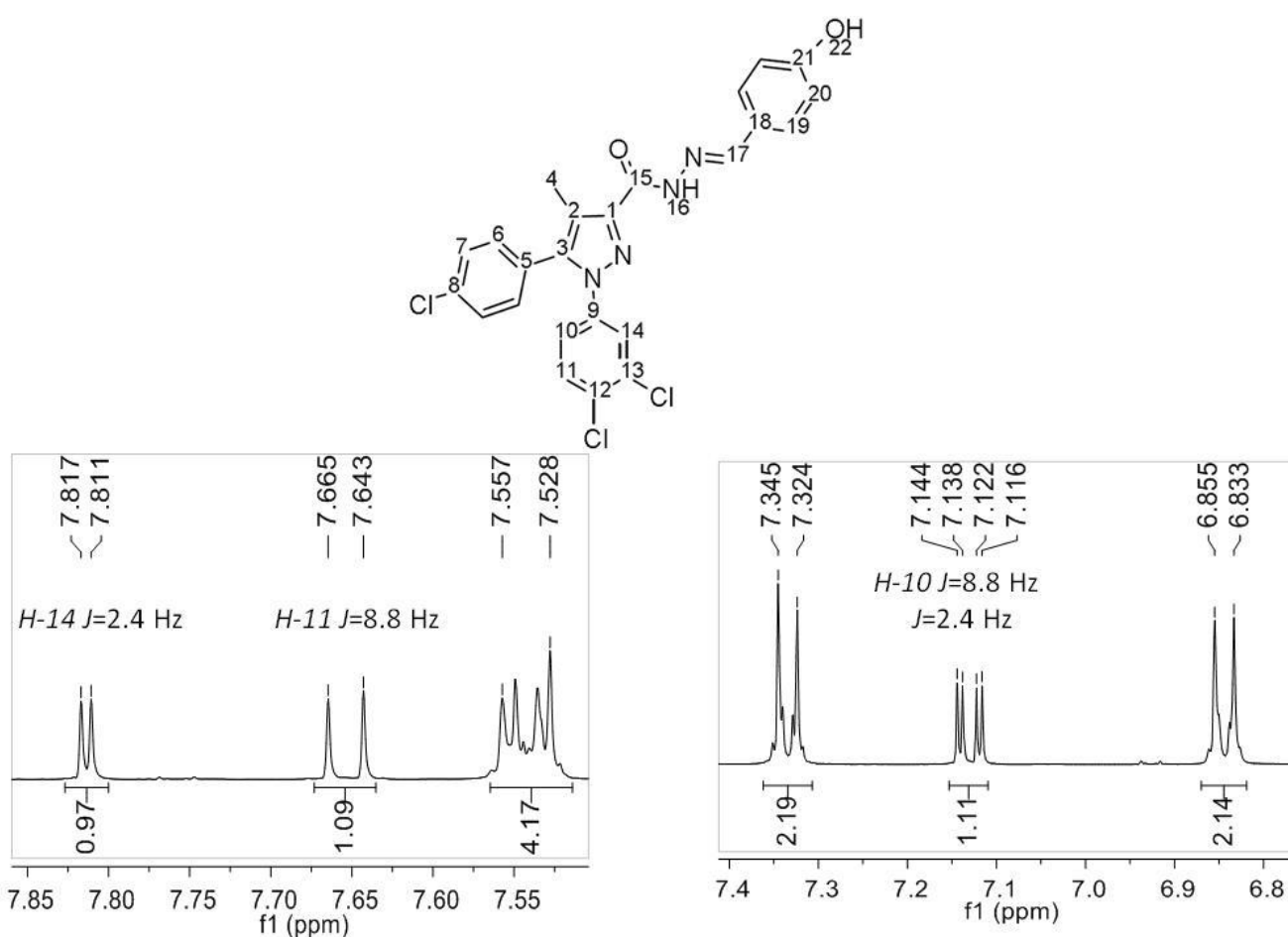
El compuesto **1**, que es un anillo aromático conjugado con un dieno, presenta señales complejas a 7.35 y 7.31 ppm (H-6), que integra para 3 hidrógenos, 7.42- 7.38 ppm (H-22), que integran para 1 hidrógeno y finalmente 7.64- 7.62 ppm, que integran para un hidrógeno.



**Figura 7. 5-** 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N'-[(1E, 2E)-3-fenilaliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.

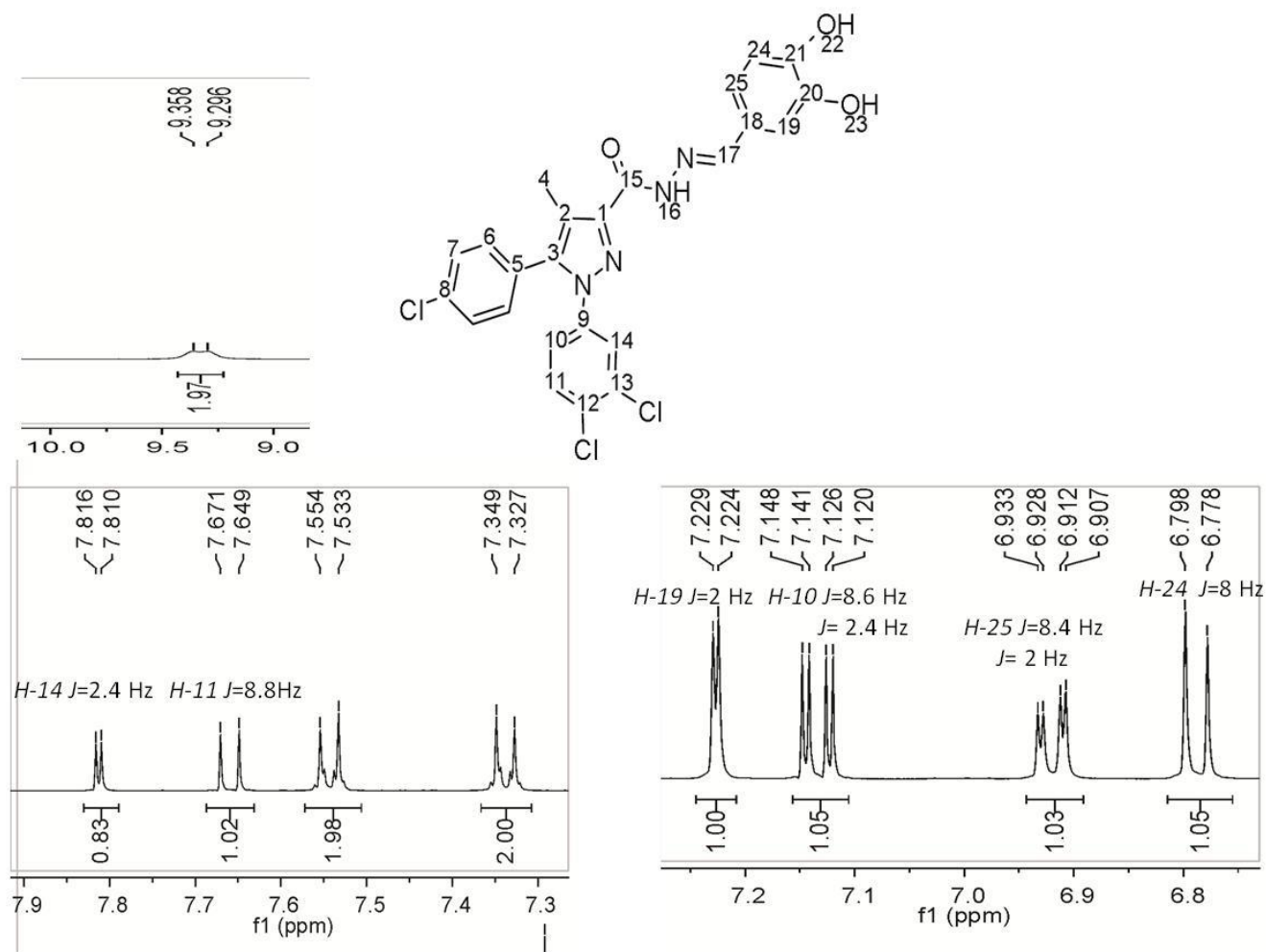


En el caso del compuesto **2** (Figura 8), formado a partir del 4-hidroxibenzaldehído (así como para los compuestos **3**, **4**, **6**, **8** y **9**), el hidrógeno unido al carbono de la *N*-acil hidrazida se presenta como una señal simple que integra para un hidrógeno en aproximadamente 8.4 ppm. Esto se debe a que no existen hidrógenos adyacentes que favorezcan un acoplamiento a través del enlace y, por tanto, presencia de multiplicidad. Los dos protones adyacentes al grupo hidroxilo, presentan como una señal simple, a campo bajo (9.94 ppm). Los protones H-19 y adyacente, se presentan como señales complejas entre 7.56 y 7.53 ppm



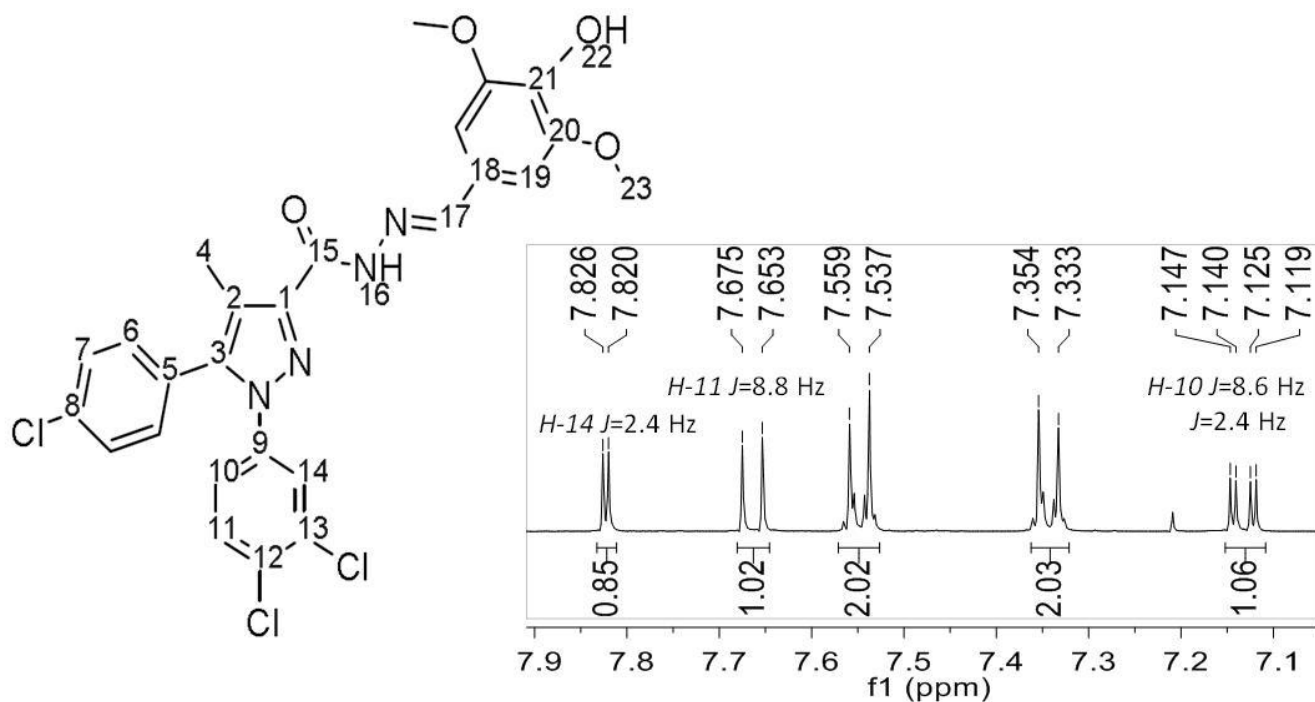
**Figura 8.** 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-4-hidroxienciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.

Para el compuesto **3** (Figura 9), además de las características antes descritas, se pueden observar dos señales complejas entre 9.43 y 9.30 ppm que integran para un total de dos hidrógenos, los cuales pertenecen a los hidrógenos del grupo hidroxilo en posiciones 3, 4 (respectivamente) del grupo fenilo proveniente del 3,4-dihidroxibenzaldehído.



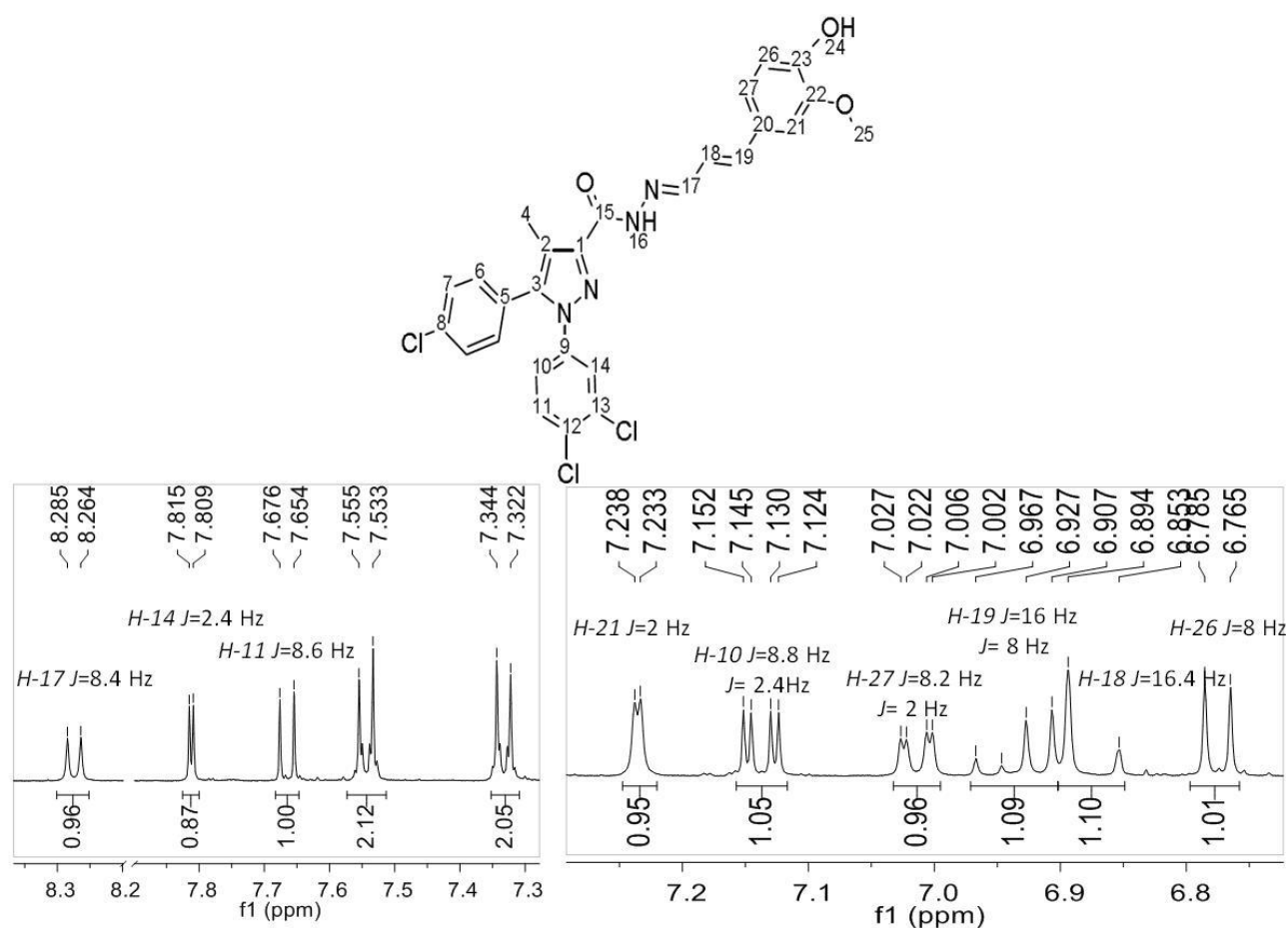
**Figura 9.** 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-(3,4-dihidroxibenciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.

Por otro lado, el compuesto **4** (Figura 10), que se obtuvo por condensación con el siringaldehído, presenta una señal simple a 3.83 ppm que integra para seis hidrógenos, los cuales pertenecen a los grupos metoxilo unidos en la posición 3, 5 al anillo aromático. El grupo hidroxilo presente en la molécula tiene un desplazamiento de 8.91 ppm y se presenta como una señal simple que integra para un hidrógeno.



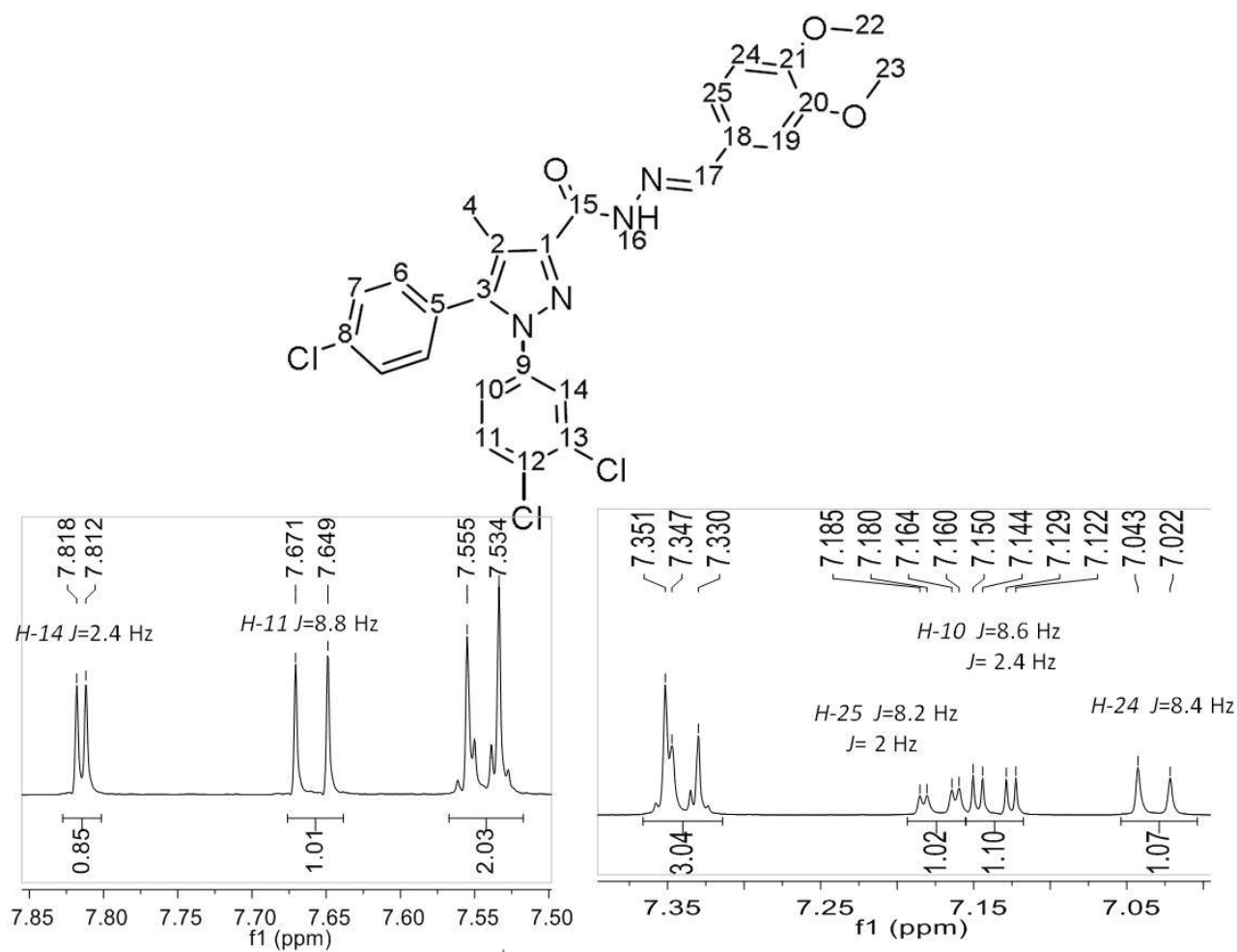
**Figura 10.** 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida

El espectro del compuesto **5** (Figura 11), además de los desplazamientos propios del dieno, revela las siguientes señales de importancia: una señal simple a 3.83 ppm que integra para tres hidrógenos los cuales pertenecen al grupo metoxilo en las posición 3 del grupo fenilo. También se puede apreciar una señal simple que integra para un hidrógeno a 9.36 ppm y que pertenece al grupo hidroxilo en posición 4 del grupo fenilo derivado del 4-hidro-3-metoxicinamaldehído. El H-21 del mismo anillo aromático, se presenta como una señal doble a 7.20 ppm con una constante de acoplamiento de 2 Hz, al igual el H-26 se muestra como otra señal doble a 6.78 ppm con una  $J = 8$  Hz. Finalmente el hidrógeno numerado como 27 en la figura, se presenta como un doble de dobles con constantes de acoplamiento y que integran para un solo hidrógeno  $J = 8.2$  y 2 Hz.



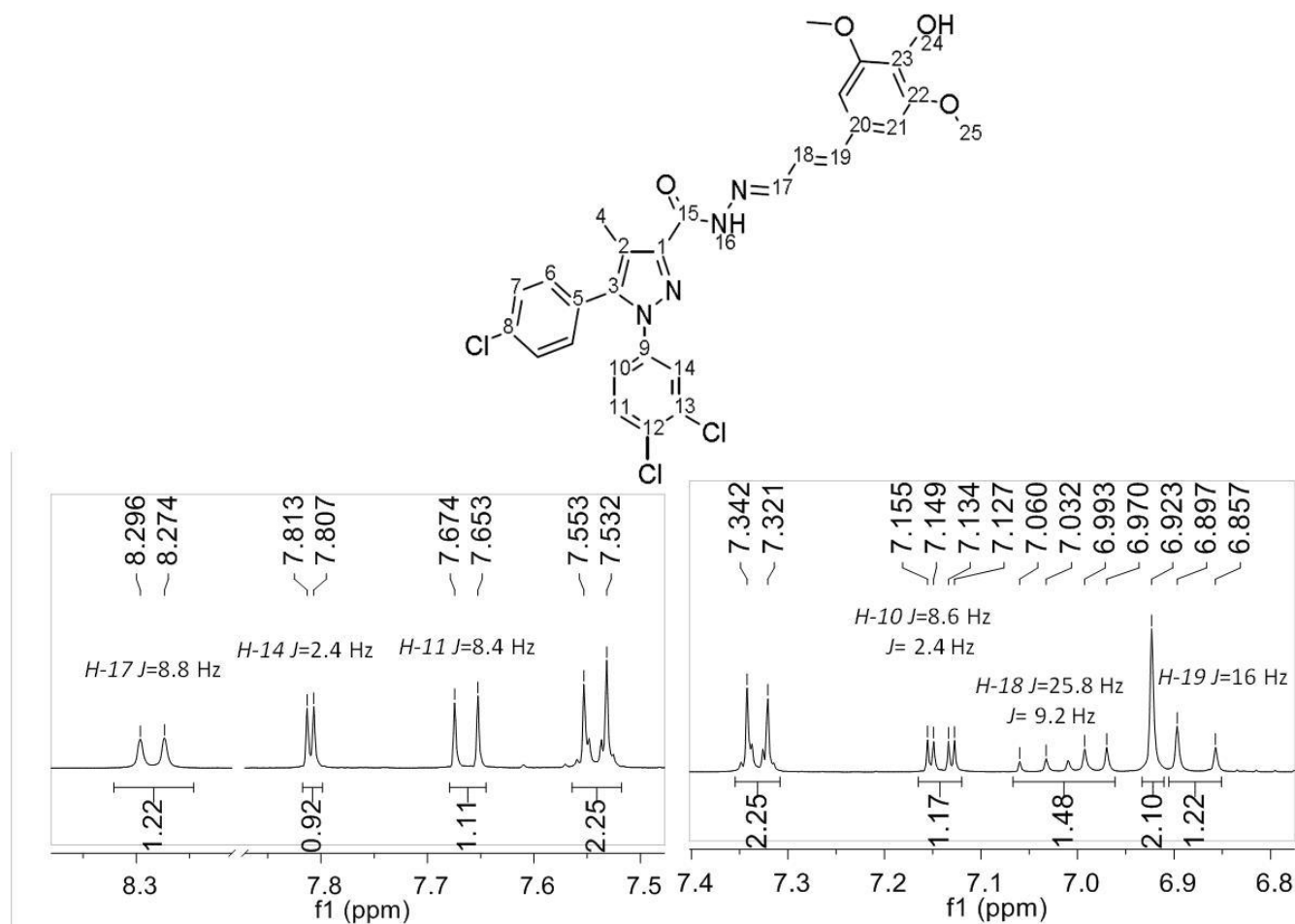
**Figura 11.** 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(1*E*, 2*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)aliliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida

Las señales de importancia para el compuesto **6**, derivado del compuesto 3,4-dimetoxibenzaldehído, (Figura 12), son dos señales simples que se presentan a 3.81 ppm y 3.83 ppm y que pertenecen a los sustituyentes metoxilo en posición 3 y 4 al anillo respectivamente, integran para un total de seis hidrógenos. El H-19, se presenta como una señal compleja a 7.35 ppm, e integra para un hidrógeno. El H-24, se muestra como una señal doble a 7.03 ppm con una  $J = 8.4$  Hz. Finalmente el H-25 se presenta como una señal doble de dobles a 7.17 ppm con constantes de acoplamiento de 8.2 y 2 Hz y que integra para un solo hidrógeno.



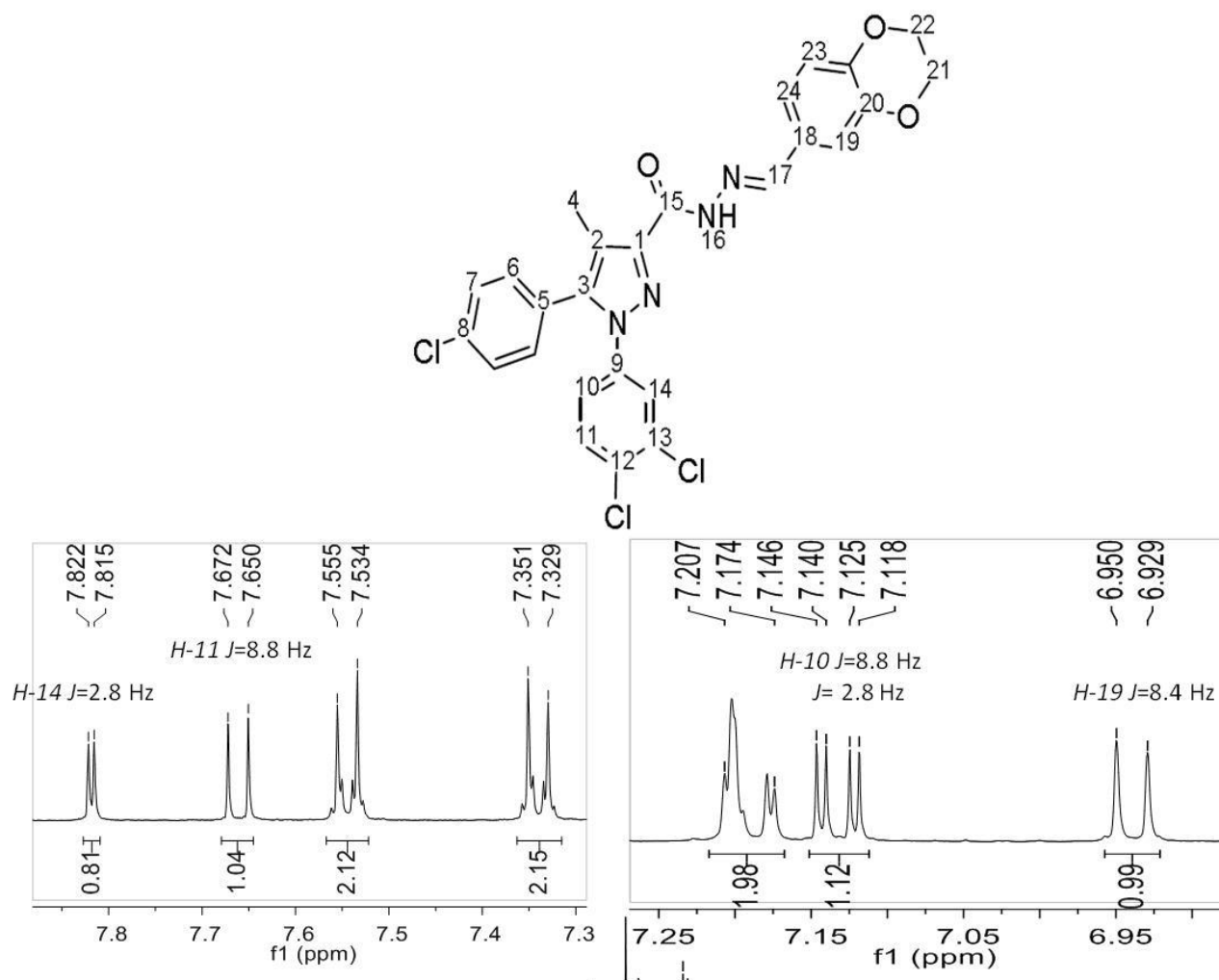
**Figura 12.** 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-(3,4-dimetoxibenciliden)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida

En el caso del compuesto **7** (Figura 13), se presenta una señal simple a 3.81 ppm, que integra para un total de seis hidrógenos, que corresponden a los dos sustituyentes metoxilo en posiciones 3, 5 del grupo aromático derivado del *trans* 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamaldehído, además de una señal simple que integra para un hidrógeno a 8.73 ppm y que pertenece al hidrógeno del sustituyente hidroxilo en posición 4. El valor de las constantes de acoplamiento del hidrógeno 18 y 19 ayudan a confirmar la isomería *trans*, presente en la molécula.



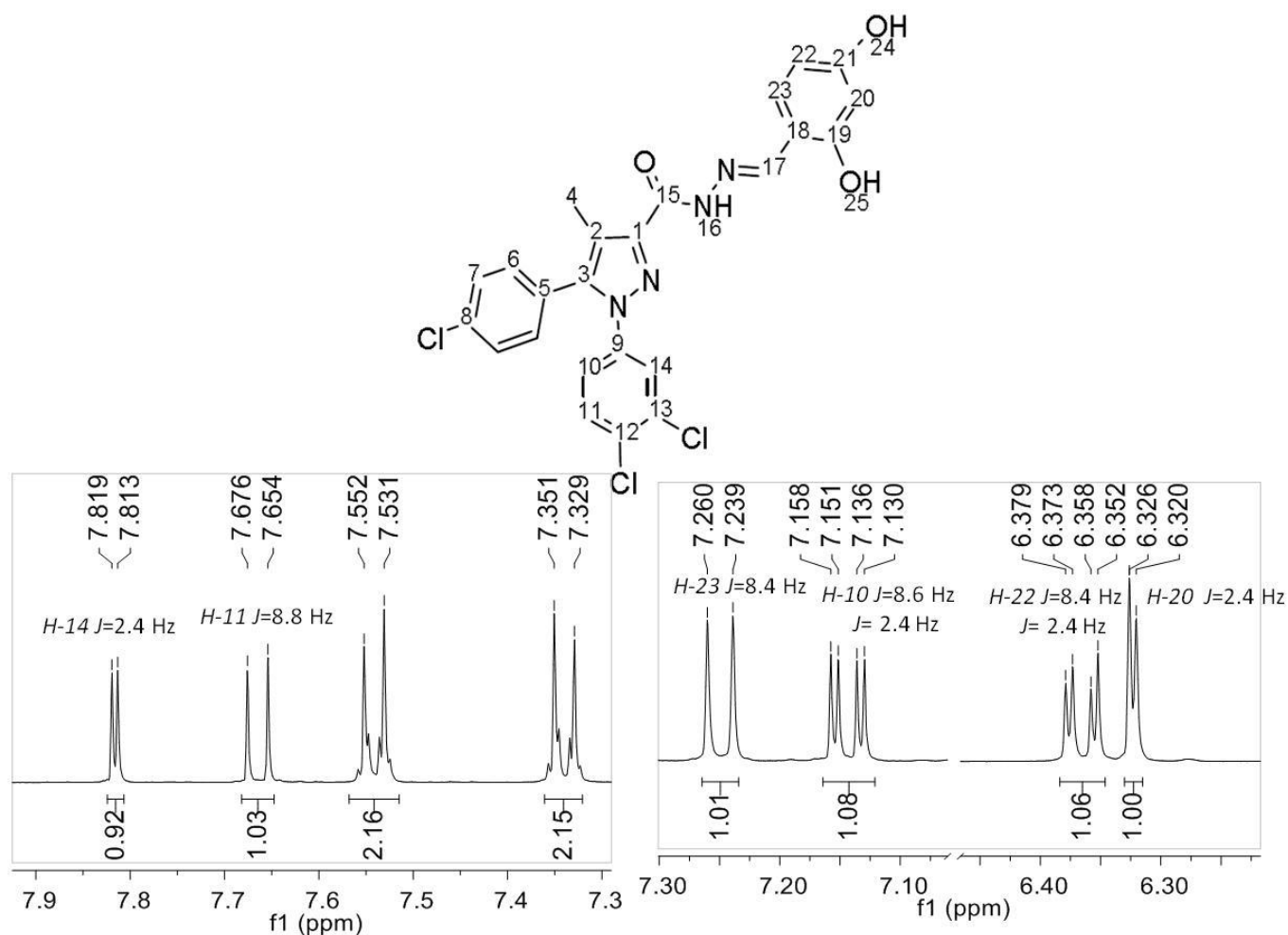
**Figura 13.** 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(1*E*, 2*E*)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)aliliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida

Del compuesto **8** (Figura 14), los cuatro hidrógenos que se presentan a 4.28 ppm como una señal ancha, numerados en la figura como 21 y 22 del 1,4-dioxano derivado del aldehído 1,4-benzodioxan-6-carboxialdehído. El H-19 presenta una señal doble a 6.94 ppm con una  $J = 8.4$  Hz. El H-19 se presenta como señales compleja a 7.21 y 7.17 ppm, respectivamente.



**Figura 14.** 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)metiliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida

Finalmente, para el compuesto **9** (Figura 15), las señales importantes son: una señal simple a 9.96 ppm que integra para un hidrógeno perteneciente al sustituyente hidroxilo en posición 4 del grupo aromático, y otra señal simple pero a 11.52 ppm que integra para un hidrógeno perteneciente al sustituyente hidroxilo pero en posición 2 al anillo aromático. El aldehído del cual deriva este compuesto es el 2,4-dihidroxibenzaldehído.



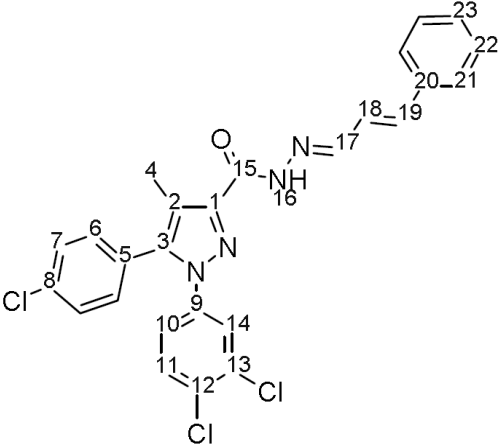
**Figura 15.** 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-2,4-dihidroxibenciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida

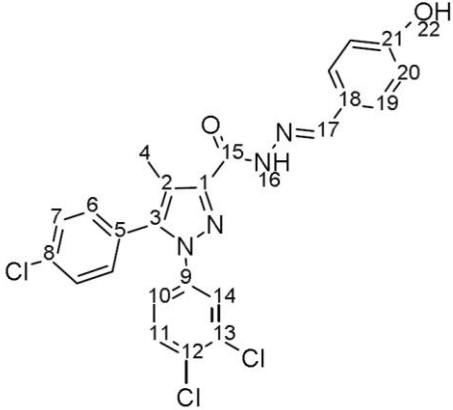


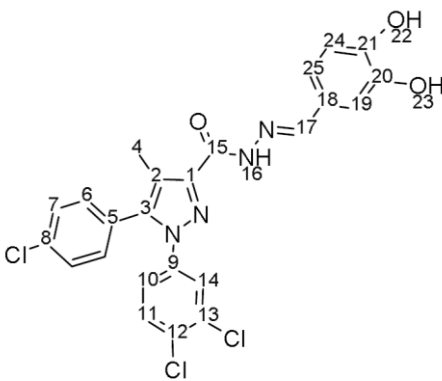
En el caso de los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , se observan todas las señales y en desplazamientos químicos esperados, donde a radiofrecuencias bajas se localizan los carbonos de los anillos aromáticos de cada compuesto, o bien los carbonos del dieno para los compuestos **1**, **5** y **7**. Una característica importante es el mostrado por el grupo metilo unido al C4 que presenta a un desplazamiento de 9.0 ppm en todos los espectros obtenidos. Además cada compuesto muestra diferencias en el número y desplazamiento químico debido a un sustituyente unido a la *N*-acilhidrazona. Los compuestos **1**, **2**, **3** y **9**, no presentan otras señales a radiofrecuencias altas, a diferencia de los compuestos **4**, **5**, **6**, **7** y **8**, los cuales contienen en su estructura grupos alquilo como sustituyentes ( $-\text{CH}_3$  o  $-\text{CH}_2$ ), que permiten la presencia de señales a radiofrecuencias altas (cerca de 60 ppm).

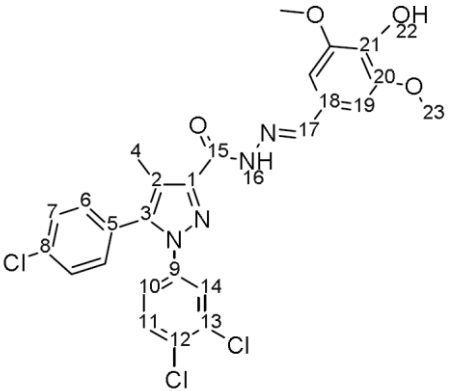
Por otro lado, la masa molar se corroboró mediante la técnica de espectroscopía de masas, mostrándose en la mayoría de los compuestos el ion molecular ( $\text{M}^{+\bullet}$ ), así como un patrón ( $\text{M}+2$ ) y ( $\text{M}+4$ ), propio de los compuestos con sustituyentes halogenados.

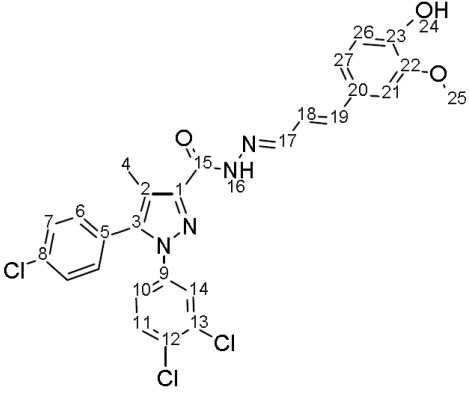
**Tabla 8.** Resultados espectroscópicos y espectrométricos de las carbohidrazidas **1-9**.

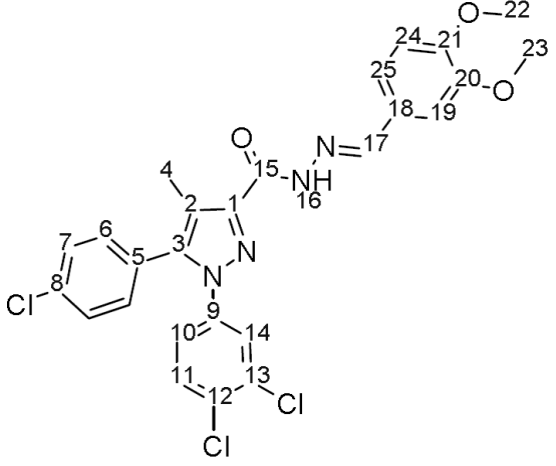
Compuesto	Resultados espectrométrico y espectroscópicos
 <p data-bbox="191 913 800 1045">5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N</i>-[(1<i>E</i>, 2<i>E</i>)-3-fenilaliliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida.</p> <p data-bbox="418 1115 571 1144">MM: 509.81</p>	<p data-bbox="833 394 1268 424"><b>Espectro 3.</b>EM [IE] m/z: 509(M<sup>+</sup>).</p> <p data-bbox="833 493 1490 877"><b>Espectro 4.</b> RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm) 2,23 (s, 1H, H-4), 7.00 (d,1H, H-19, J=16 Hz), 7.07 (dd, 1H, H-18, J=8.6, 16 Hz), 7.14 (dd, 1H, H-10, J=8.6, 2.4 Hz), 7.35-7.31 (sc, 3H, H-6, 34), 7.42-7.38 (sc, 1H, H-22), 7.53 (AA'BB', 2H, H-7), 7.64-7.62 (sc, 1H, H-21), 7.68 (d, 1H, H-11, J=8.8), 7.81 (d,1H, H-14, J=2.4 Hz), 8.33 (d, 1H, H-17, J=8 Hz), 11.69 (s, 1H, H-16).</p> <p data-bbox="833 947 1490 1283"><b>Espectro 5.</b>RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm) 9.0 (C-4), 118.7 (C-2), 125.0 (C-10), 125.8 (C-18), 127.08 (C-14), 127.11 (C-21), 127.4 (C-5), 128.8 (C-22, 23), 129.0 (C-7), 130.7 (C-12), 130.8 (C-11), 131.6 (C-13), 131.9 (C-6), 134.0 (C-8), 135.9 (C-20), 138.6 (C-9), 138.9 (C-19), 140.9 (C-3), 143.8 (C-1), 149.9 (C-17), 158.3 (C-15).</p> <p data-bbox="833 1352 1490 1535"><b>Espectro 6.</b> IR (Reflectancia cm<sup>-1</sup>) 3380.83, 1547.67 (-NH-C=O-), 3001.06, 3026.74, 3059.97 (=C-H), 2925.39 (-CH<sub>3</sub>), 1654.57 (-C=O), 1477.09 (-C=C-).</p>

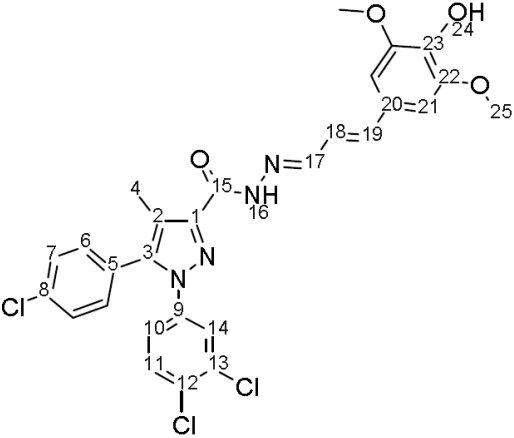
Compuesto	Resultados espectrométrico y espectroscópicos
 <p data-bbox="191 800 734 926">5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N'</i>-[(<i>E</i>)-4-hidroxienciliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida.</p> <p data-bbox="386 999 539 1031">MM: 499.78</p>	<p data-bbox="768 317 1230 348"><b>Espectro 7.</b> EM [IE] m/z: 502(M+2).</p> <p data-bbox="768 415 1279 447"><b>Espectro 8.</b> RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm) 2.23(s, 1H, H-4), 6.85 (AA'BB', 2H, H-20), 7.13 (dd, 1H, H-10, J= 8.8, 2.4 Hz), 7.33 (AA'BB', 2H, H-6), 7.56-7.53 (sc, 4H, H-19, 7), 7.65 (d, 1H, H-11, J= 8.8 Hz), 7.81 (d, 1H, H-14 J=2.4 Hz), 8.43 (s, 1H, H-17), 9.94 (s, 1H, H-20), 11.56 (s, 1H, H-16).</p> <p data-bbox="768 768 1287 800"><b>Espectro 9.</b> RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm) 9.0(C-4), 115.8 (C-7), 118.7 (C-2), 124.9 (C-10), 125.4 (C-18), 127.0 (C-14), 127.4 (C-5), 128.8 (C-19), 129.0 (C-15), 130.6 (C-12), 130.8 (C-11), 131.6 (C-14), 131.9 (C-6), 134.0 (C-8), 138.6 (C-7), 140.9 (C-3), 144.0 (C-1), 148.2 (C-17), 158.1 (C-15), 159.4 (C-21).</p> <p data-bbox="768 1119 1230 1150"><b>Espectro 10.</b> IR (Reflectancia cm<sup>-1</sup>) 3323.04, 1219.55 (-O-H), 3184.49, 3095.16 (=C-H), 2925.43 (-C-H<sub>3</sub>), 1666.99 (-C=O), 1540.86 (-N-H-), 1597.62, 1511.81, 1475.07 (-C=C-).</p>

Compuesto	Resultado espectrométrico y espectroscópicos
<div style="text-align: center;">  </div> <p data-bbox="186 682 738 819">5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N'</i>-[(<i>E</i>)-3,4-dihidroxibenciliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida.</p> <p data-bbox="381 882 544 924">MM: 515.78</p>	<p data-bbox="763 241 1250 283"><b>Espectro 11.</b> EM [IE] m/z: 516 (M+1)</p> <p data-bbox="763 336 1299 378"><b>Espectro 12.</b> RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="763 388 1494 682">2.23 (s, 1H, H-4), 6.79 (d, 1H, H-24, J=8), 6.92 (dd, 1H, H-25, J= 8.4, 2), 7.13 (dd, 1H, H-10, J= 8.6, 2.4), 7.23 (d, 1H, H-19, J=2), 7.34 (AA'BB', 2H, H-6), 7.54 (AA'BB', 2H, H-7), 7.66 (d, 1H, H-11, J= 8.8), 7.81 (d, 1H, H-14, J= 2.4), 8.35 (s, 1H, H-17), 9.30 (sa, 1H, H-23), 9.34 (sc, 1H, H-22), 11.51 (s, 1H, H-16).</p> <p data-bbox="763 735 1307 777"><b>Espectro 13.</b> RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="763 787 1494 1081">9.0 (C-4), 112.7 (C-19), 115.6 (C-24), 118.6 (C-2), 120.5 (C-25), 124.9 (C-10), 125.8 (C-18), 126.9 (C-14), 127.4 (C-5), 129.0 (C-7), 130.6 (C-12), 130.8 (C-11), 131.6 (C-13), 131.9 (C-6), 134.0 (C-8), 138.6 (C-9), 140.8 (C-3), 144.0 (C-1), 145.7 (C-20), 147.9 (C-21), 148.4 (C-17), 158.1 (C-15).</p> <p data-bbox="763 1144 1234 1186"><b>Espectro 14.</b> IR (Reflectancia cm<sup>-1</sup>)</p> <p data-bbox="763 1197 1494 1333">3561.24, 3542.21, 1288.01 (-OH), 3131.44 (=C-H), 1666.03 (-C=O), 1514.93 (-NH-), 1590.20, 1474.57 (-C=C-).</p>

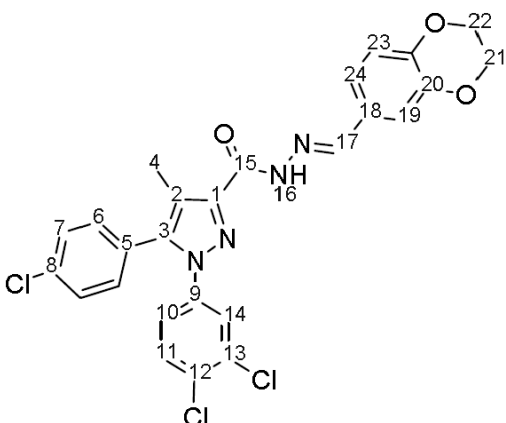
Compuesto	Resultado espectrométrico y espectroscópicos
<div style="text-align: center;">  </div> <p data-bbox="191 709 734 844">5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N'</i>-[(<i>E</i>)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenciliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida.</p> <p data-bbox="386 909 539 940">MM: 559.83</p>	<p data-bbox="768 247 1377 279"><b>Espectro 15.</b> EM [IE] m/z: 560(M<sup>+</sup>), 562 (M+2).</p> <p data-bbox="768 344 1295 375"><b>Espectro 16.</b> RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="768 396 1490 632">2.23 (s, 3H, H-4), 3.83 (s, 6H, H-23), 6.97 (s, 2H, H-19), 7.13 (dd, 1H, H-10, J= 8.6, 2.4 Hz), 7.34 (AA'BB', 2H, H-6), 7.65 (AA'BB', 2H, H-7), 7.66 (d, 1H, H-11, J=8.8 Hz), 7.82 (d, 1H, H-14, J=2.4 Hz), 8.41 (s, 1H, H-17), 8.91 (s, 1H, H-22), 11.63 (s, 1H, H-16).</p> <p data-bbox="768 697 1317 728"><b>Espectro 17.</b> RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="768 749 1490 1035">9.0(C-4), 56.0 (C-23), 104.5 (C-19), 118.7 (C-2), 124.6 (C-18), 124.9 (C-10), 127.0 (C-14), 127.4 (C-5), 129.1 (C-7), 130.6 (C-12), 130.8 (C-11), 131.6 (C-13), 131.9 (C-6), 134.0 (C-8), 137.9 (C-21), 138.6 (C-9), 140.9 (C-3), 144.0 (C-1), 148.2 (C-20), 148.5 (C-17), 158.2 (C-15).</p> <p data-bbox="768 1100 1227 1131"><b>Espectro 18.</b> IR (Reflectancia cm<sup>-1</sup>)</p> <p data-bbox="768 1152 1490 1335">3251.58, (-OH), 3087.37, 3059.09 (=C-H), 2955.11, 2932.62 (-CH<sub>3</sub>), 2836.49 (-O-CH<sub>3</sub>), 1667-31 (-C=O), 1554.36 (-NH-), 1512.25, 1477.65 (-C=C-), 1208.56 (-C=C-O-).</p>

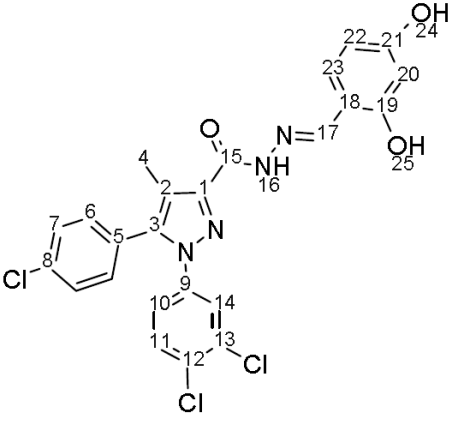
Compuesto	Resultado espectrométrico y espectroscópicos
 <p data-bbox="186 724 738 850">5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N'</i>-[(1<i>E</i>, 2<i>E</i>)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)aliliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida.</p> <p data-bbox="381 919 544 955">MM: 555.84</p>	<p data-bbox="763 247 1242 283"><b>Espectro 19.</b> EM [IE] m/z: 556(M<sup>+</sup>).</p> <p data-bbox="763 346 1299 382"><b>Espectro 20.</b> RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="763 399 1494 787">2.23 (s, 3H, H-4), 3.83 (s, 3H, H-25), 6.78 (d, 1H, H-26, J= 8 Hz), 6.87 (d, 1H, H-18, J=16.4 Hz), 6.96 (dd, 1H, H-19, J= 16 y 8 Hz), 7.03 (dd, 1H, H-27, J=8.2 y 2 Hz), 7.15 (dd, 1H, H-10, J= 8.8, 2.4 Hz), 7.20 (d, 1H, H-21, J=2 Hz), 7.33 (AA'BB', 2H, H-6), 7.54 (AA'BB', 2H, H-7), 7.67 (d, 1H, H-11, J=8.6 Hz), 7.81 (d, 1H, H-14, J=2.4 Hz), 8.28 (s, 1H, H-17, J= 8.4 Hz), 9.36 (s, 1H, H-24), 11.58 (s, 1H, H-16).</p> <p data-bbox="763 798 1307 833"><b>Espectro 21.</b> RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="763 850 1494 1134">9.0 (C-4), 55.6 (C-25), 110.2 (C-21), 115.6 (C-26), 118.6 (C-2), 121.2 (C-27), 122.9 (C-18), 124.9 (C-10), 127.0 (C-14), 127.4 (C-20), 127.6 (C-5), 129.0 (C-7), 130.6 (C-12), 130.8 (C-11), 131.6 (C-13), 131.9 (C-6), 134.0 (C-8), 138.6 (C-9), 139.5 (C-19), 140.9 (C-3), 143.9 (C-1), 147.8 (C-23), 150.4 (C-17), 158.1 (C-15).</p> <p data-bbox="763 1197 1234 1232"><b>Espectro 22.</b> IR (Reflectancia cm<sup>-1</sup>)</p> <p data-bbox="763 1249 1494 1438">3535.69, 3251.97 (-OH), 3093.14 (=C-H), 2966.11, 2939.76 (-CH<sub>3</sub>), 2841.63 (-O-CH<sub>3</sub>), 1668.27 (-C=O), 1527.75 (-NH-), 1592.51, 1475.06 (-C=C-), 1207.98 (-C=C-O-).</p>

Compuesto	Resultado espectrométrico y espectroscópicos
 <p data-bbox="186 777 738 913">5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N'</i>-[(<i>E</i>)-3,4-dimetoxibenciliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida.</p> <p data-bbox="381 976 544 1018">MM: 543.83</p>	<p data-bbox="771 243 1380 283"><b>Espectro 23.</b> EM [IE] m/z: 544(M<sup>+</sup>), 546 (M+2).</p> <p data-bbox="771 336 1299 378"><b>Espectro 24.</b> RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="771 388 1494 682">2.23 (s,3H, H-4), 3.81 (s, 3H, H-23), 3.83 (s, 3H, H-22), 7.03 (d, 1H, H-24, J= 8.4 Hz), 7.14 (dd,1H, H-10, J= 8.6, 2.4 Hz), 7.17 (dd, 1H, H-25, J= 8.2, 2 Hz), 7.34 (AA'BB', 2H, H-6), 7.35 (sc, 1H, H-19), 7.54 (AA'BB', 2H, H-7), 7.66 (d, 1H, H-11, J= 8.8 Hz), 7.82 (d, 1H, H-14, J= 2.4 Hz), 8.46 (s, 1H, H-17), 11.65 (s, 1H, H-16).</p> <p data-bbox="771 693 1299 735"><b>Espectro 25.</b> RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="771 745 1494 1039">9.0 (C-4), 55.5 (C-22), 55.6 (C-23), 108.0 (C-19), 111.5 (C-24), 118.9 (C-2), 122.0 (C-25), 124.9 (C-10), 127.0 (C-14), 127.1 (C-18), 127.4 (C-5), 129.0 (C-7), 130.6 (C-12), 130.8 (C-11), 131.6 (C-13), 131.9 (C-6), 134.0 (C-8), 138.6 (C-9), 140.9 (C-3), 143.9 (C-1), 148.0 (C-17), 149.1 (C-20), 150.8 (C-21), 158.2 (C-15).</p> <p data-bbox="771 1050 1234 1092"><b>Espectro 26.</b> IR (Reflectancia cm<sup>-1</sup>)</p> <p data-bbox="771 1102 1494 1281">3184.19, 3077.53, 3006.75 (=C-H), 2958.63, 2933.24 (-CH<sub>3</sub>), 2839.24 (-O-CH<sub>3</sub>), 1648.46 (-C=O), 1511.79 (-NH-), 1575.28, 1478.82 (-C=C-), 1264.97, 1240.46 (-C=C-O-).</p>

Compuesto	Resultado espectrométrico y espectroscópicos
 <p data-bbox="186 772 738 903">5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N'</i>-[(1<i>E</i>, 2<i>E</i>)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)aliliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida.</p> <p data-bbox="381 976 544 1008">MM: 585.87</p>	<p data-bbox="771 247 1226 279"><b>Espectro 27.</b> EM [IE] <math>m/z</math>: 586(<math>M^+</math>).</p> <p data-bbox="771 346 1299 378"><b>Espectro 28.</b> RMN-<math>^1H</math> (DMSO-<math>d_6</math>, <math>\delta</math> ppm)</p> <p data-bbox="771 399 1494 724">2.23 (s, 3H, H-4), 3.81 (s, 6H, H-25), 6.88 (d, 1H, H-19, <math>J=16</math> Hz), 6.92 (s, 2H, H-21), 7.01 (dd, 1H, H-18, <math>J=25.8, 9.2</math> Hz), 7.14 (dd, 1H, H-10, <math>J=8.6, 2.4</math> Hz), 7.33 (AA'BB', 2H, H-6), 7.54 (AA'BB', 2H, H-7), 7.66 (d, 1H, H-11, <math>J=8.4</math> Hz), 7.81 (d, 1H, H-14 <math>J=2.4</math> Hz); 8.29 (d, 1H, H-17, <math>J=8.8</math> Hz), 8.73 (s, 1H, H-24), 11.59 (s, 1H, H-16).</p> <p data-bbox="771 798 1307 829"><b>Espectro 29.</b> RMN-<math>^{13}C</math> (DMSO-<math>d_6</math>, <math>\delta</math> ppm)</p> <p data-bbox="771 850 1494 1134">9.1 (C-4), 56.0 (C-25), 104.8 (C-21), 118.7 (C-2), 123.4 (C-18), 125.0 (C-10), 126.5 (C-20), 127.1 (C-14), 127.4 (C-5), 129.0 (C-7), 130.6 (C-12), 130.8 (C-11), 131.6 (C-13), 131.9 (C-6), 134.0 (C-8), 136.8 (C-23), 138.6 (C-9), 139.7 (C-19), 140.9 (C-3), 143.9 (C-1), 148.1 (C-22), 150.2 (C-17), 158.1 (C-15).</p> <p data-bbox="771 1207 1226 1239"><b>Espectro 30.</b> IR (Reflectancia <math>cm^{-1}</math>)</p> <p data-bbox="771 1260 1494 1438">3276.15, (-OH), 3071.89, 3030.24 (=C-H), 2989.28, 2959.58, 2937.22 (-CH<math>_3</math>), 2837.37 (-O-CH<math>_3</math>), 1665.90 (-C=O), 1539.78 (-NH-), 1593.62, 1514,55 (-C=C-), 1251.99, 1201-14 (-C=C-O-).</p>



Compuesto	Resultado espectrométrico y espectroscópicos
<div style="text-align: center;">  <p data-bbox="191 766 779 903">5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N'</i>-[(<i>E</i>)-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)metiliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida.</p> <p data-bbox="406 966 552 997">MM:541.81</p> </div>	<p data-bbox="812 243 1429 275"><b>Espectro 31.</b> EM [IE] m/z: 542(M<sup>+</sup>), 544 (M+2).</p> <p data-bbox="812 336 1347 367"><b>Espectro 32.</b> RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="812 388 1494 682">2.23(s, 3H, H-4), 4.28 (sc, 4H, H-21), 6.94 (d, 1H, H-19, J= 8.4 Hz), 7.14 (dd, 1H, H-10, J= 8.8, 2.8 Hz), 7.21-7.17 (sc, 2H, H-19); 7.34 (AA'BB', 2H, H-6), 7.55 (AA'BB', 2H, H-7), 7.66, (d, 1H, H-11, J=8.8 Hz), 7.82 (d, 1H, H-14, J= 2.8 Hz), 8.42 (s, 1H, H-17), 11.65 (s, 1H, H-16).</p> <p data-bbox="812 745 1347 777"><b>Espectro 33.</b> RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="812 798 1494 1134">9.0 (C-4), 64.0 (C-21), 64.3 (C-22), 115.2 (C-19), 117.5 (C-23), 118.7 (C-2), 120.7 (C-24), 124.8 (C-10), 126.9 (C-14), 127.4 (C-5), 127.8 (C-18), 129.0 (C-7), 130.6 (C-12), 130.8 (C-11), 131.6 (C-13), 131.9 (C-6), 134.0 (C-8), 138.6 (C-9), 140.9 (C-3), 143.6 (C-20), 143.9 (C-1), 147.5 (C-17), 158.2 (C-15).</p> <p data-bbox="812 1144 1266 1176"><b>Espectro 34.</b> IR (Reflectancia cm<sup>-1</sup>)</p> <p data-bbox="812 1197 1494 1333">3330.15, 1549.19 (-NH-C=O), 3063.69 (=C-H), 2922.60, 2875.66 (-CH<sub>3</sub>), 1669.84 (-C=O), 1506.10, 1477.12 (-C=C-), 1259.09, 1240.27 (-C=C-O-).</p>

Compuesto	Resultado espectrométrico y espectroscópicos
 <p data-bbox="186 745 738 871">5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N'</i>-[(<i>E</i>)-2,4-dihidroxi<b>ben</b>ciliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida.</p> <p data-bbox="381 945 544 976">MM: 515.78</p>	<p data-bbox="771 247 1226 279"><b>Espectro 35.</b> EM [IE] m/z: 516(M<sup>+</sup>).</p> <p data-bbox="771 346 1299 378"><b>Espectro 36.</b> RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="771 399 1494 724">2.24 (s, 3H, H-4), 6.32 (d, 1H, H-20, J=2.4 Hz), 6.37 (dd, 1H, H-22, J= 8.4, 2.4 Hz), 7.14 (dd, 1H, H-10, J=8.6, 2.4 Hz), 7.25 (d, 1H, H-23, J= 8.4 Hz), 7.34 (AA'BB', 2H, H-6), 7.54 (AA'BB', 2H, H-7), 7.67 (d, 1H, H-10, J= 8.8 Hz), 7.82 (d,1H, H-14, J=2.4 Hz), 8.61 (s, 1H, H-17); 9.96 (s, 1H, H-24), 11.52 (s, 1H, H-25), 11.90 (s, 1H, H-16).</p> <p data-bbox="771 798 1307 829"><b>Espectro 37.</b> RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm)</p> <p data-bbox="771 850 1494 1134">8.9 (C-4), 102.7 (C-20), 107.7 (C-22), 110.5 (C-18), 118.7 (C-2), 124.8 (C-10), 127.0 (C-14), 127.3 (C-5), 129.0 (C-7), 130.6 (C-12), 130.8 (C-11), 131.4 (C-23), 131.5 (C-13), 131.8 (C-6), 138.6 (C-9), 139.0 (C-8), 140.9 (C-3), 143.5 (C-1), 149.5 (C-17), 157.8 (C-15), 159.5 (C-19), 160.6 (C-21).</p> <p data-bbox="771 1197 1226 1228"><b>Espectro 38.</b> IR (Reflectancia cm<sup>-1</sup>)</p> <p data-bbox="771 1249 1494 1386">3321.48, 3252.35, 1217.47 (-OH), 3093.47 (=C-H), 2978.29 (-CH<sub>3</sub>), 1669.10 (-C=O), 1535.65 (-NH-), 1535.65, 1477.13 (-C=C-).</p>

## 7.2. Análisis elemental

Finalmente, para complementar la información recabada en la caracterización espectroscópica y espectrométrica, se llevó a cabo el análisis elemental de cada uno de los compuestos sintetizados, sin embargo, como se observa en la Tabla 9, debido a las capacidades del equipo empleado, sólo fue posible la determinación de la proporción de

carbono, hidrógeno y nitrógeno, los resultados experimentales se manejan con un  $\pm 0.4$  % de intervalo de confianza derivado de las características del equipo.

La técnica es sumamente sensible, por lo que, la presencia de trazas de disolvente o bien pequeñas impurezas en los compuestos, hace que los valores obtenidos (principalmente para carbono e hidrógeno), no concuerden con los valores teóricos, sin embargo, como se observa las variaciones se presentan después del punto decimal, lo cual nos lleva a asegurar que los resultados obtenidos experimentalmente corresponden a los valores teóricos calculados.

**Tabla 9.-** Proporción elemental de los compuestos sintetizados.

Compuesto	% C teórico	% C exp. ( $\pm 0.4\%$ )	% H teórico	% H exp. ( $\pm 0.4\%$ )	% N teórico	% N exp. ( $\pm 0.4\%$ )	% O teórico	% Cl teórico
1	61.25	61.74	3.76	3.22	10.99	11.10	20.86	3.14
2	57.68	58.17	3.43	2.81	11.21	11.43	21.28	6.40
3	55.89	55.86	3.32	2.76	10.86	11.08	20.62	9.31
4	55.78	56.37	3.78	3.19	10.01	10.21	19.00	11.43
5	58.34	58.43	3.81	3.99	10.08	9.66	19.13	8.64
6	57.42	57.56	3.89	3.31	10.30	10.50	19.56	8.83
7	57.40	57.91	3.96	3.72	9.56	9.28	18.15	10.92
8	57.64	57.89	3.53	2.82	10.34	10.46	19.63	8.86
9	55.89	56.07	3.32	2.51	10.86	11.32	20.62	9.31

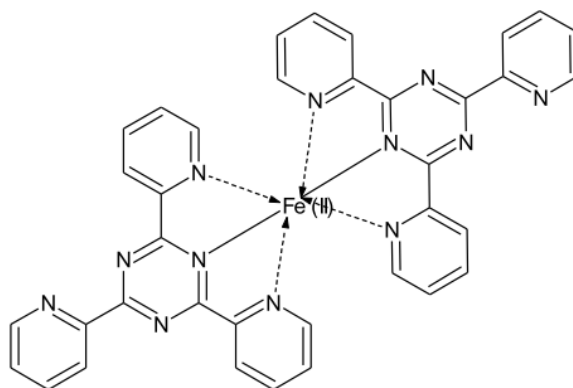
### 7.3. Actividad antioxidante.

El incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, resulta en la acumulación de daño oxidante a proteínas, lípidos y ADN. Estudios recientes sugieren que la longevidad está asociada con el incremento de la resistencia vascular a altos niveles de estrés oxidante inducidos por glucosa en la mitocondria (Luga, 2012).

El estudio de compuestos con capacidad para atrapar radicales libres, frecuentemente referidos como antioxidantes, es un área importante de investigación. Sin embargo, el estudio de esta habilidad es de vital importancia para entender los efectos protectores y también diseñar estrategias contra el estrés oxidante (Medina, 2013).

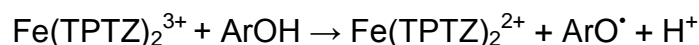
### 7.3.1. Ensayo FRAP

La mayoría de los métodos no enzimáticos para determinar actividad antioxidante involucran procesos redox. Ejemplo de lo anterior es el ensayo de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), el cual se basa en la capacidad de los antioxidantes en reducir moléculas de Fe (III) a Fe (II), siendo este último capaz de formar un complejo azul con TPTZ, que se cuantifica por su absorbancia en el espectro visible a 593 nm (Figura 16).



**Figura 16.** Complejo  $[\text{Fe}(\text{II})(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ ,  $\lambda = 593 \text{ nm}$ .

La reacción llevada a cabo se ejemplifica de la siguiente manera:



En las Tablas 10 y 11, se presentan los resultados del ensayo de FRAP obtenidos de cada molécula sintetizada, esta técnica permite determinar la capacidad de una

molécula de reducir el Fe (III) a Fe (II). Los resultados se expresan en  $\mu\text{M}$  equivalentes de Trolox (empleado como curva de calibración, Anexo III) por cada mg de compuesto. Se realizan dos mediciones de acuerdo con el tiempo de reacción entre el compuesto y la solución de FRAP a 6 minutos y 30 minutos de iniciada la reacción.

**Tabla 10.** Efecto antioxidante medido en  $\mu\text{M TE/ mg}$  de compuesto, determinado a 6 minutos de iniciada la reacción.

Concentración	4000 $\mu\text{M}$	1500 $\mu\text{M}$	800 $\mu\text{M}$	400 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$
Compuesto	$\mu\text{M TE/ mg}$ de compuesto				
1	3.574	1.424	0.711	0.356	--
2	3.628	1.450	0.725	0.363	--
3	>CC	1.433	0.714	0.357	0.221
4	>CC	1.425	0.709	0.354	0.219
5	3.597	1.430	0.714	0.356	--
6	3.427	1.369	0.684	0.342	--
7	>CC	1.423	0.709	0.353	0.219
8	3.497	1.396	0.698	0.349	--
9	3.618	1.440	0.720	0.360	--

**>CC:** Resultado no determinado, para la concentraciones de 4000  $\mu\text{M}$ , la lectura obtenida durante el ensayo es mayor al valor máximo de absorbancia obtenido, en la curva de calibración por lo cual se descarta dicho resultado y se realiza una dilución de la muestra a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ .

**Tabla 11.** Efecto antioxidante medido en  $\mu\text{M TE/ mg}$  de compuesto, determinado a 30 minutos de iniciada la reacción.

Concentración	4000 $\mu\text{M}$	1500 $\mu\text{M}$	800 $\mu\text{M}$	400 $\mu\text{M}$	200 Mm
Compuesto	$\mu\text{M TE/ mg}$ de compuesto				
1	24.919	3.985	1.277	0.420	--
2	11.893	3.638	1.624	0.734	--
3	>CC	18.827	5.616	1.868	1.071
4	>CC	24.687	8.145	2.686	1.231
5	67.860	14.651	4.724	1.510	--
6	14.840	4.120	1.880	0.868	--
7	>CC	22.741	6.759	2.042	0.936
8	14.260	3.027	1.253	0.467	--
9	28.030	3.712	1.540	0.502	--

>CC: Resultado no determinado, para la concentraciones de 4000  $\mu\text{M}$ , la lectura obtenida durante el ensayo es mayor al valor máximo de absorbancia obtenido en la curva de calibración por lo cual se descarta dicho resultado y se realiza una dilución de la muestra a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ .

Se realiza el cálculo de la  $\text{CE}_{50}$  (Tabla 12), de los resultados obtenidos a las diferentes concentraciones determinados a 30 minutos de iniciada la reacción. El modelo que se ajusta a una línea recta es el de Emax sigmoide (Anexo III).

**Tabla 12.**  $\text{CE}_{50}$  del poder reductor de cada compuesto.

Compuesto	$\text{CE}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
1	378.07
2	330.43
3	233.33
4	208.75
5	328.40
6	328.39
7	211.53
8	350.75
9	419.97

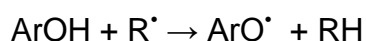
Como pudo apreciarse en las tablas mostradas anteriormente, el efecto es concentración-dependiente, es decir, la capacidad reductora es proporcional a la concentración de cada compuesto. Sin embargo se presentan diferencias significativas entre cada sustancia sintetizada, de acuerdo con los resultados obtenidos, la capacidad reductora en orden decreciente fue: **4 > 7 > 3 > 6 > 5 > 2 > 9 > 8** y finalmente **1**.

La mayor o menor capacidad de reducir el ion férrico a ferroso, está relacionada con la capacidad de cada molécula de estabilizarse después de la transferencia de un electrón. Los compuestos que presentan mayor efecto de resonancia, son los más estables. En este sentido el compuesto **4** derivado del siringaldehído y el compuesto **7** obtenido a partir del *trans* 3, 5-dimetoxi-4-hidroxicinamalaldehído, son los que presentan la mayor capacidad reductora, lo cual se debe a que en su estructura contiene un grupo hidroxilo con dos grupos metoxilo adyacentes que favorecen la estabilización del radical formado. Lo mismo aplica para el compuesto **1**, el cual carece de hidroxilos capaces de generar una transferencia de átomo de hidrógeno (HAT) o bien, ejercer un efecto reductor a través del mecanismo SET (Ver más adelante), (Galano, 2013).

Para evitar interferencias en la determinación de la capacidad reductora de cada muestra, se emplea un control negativo el cual contenía solución de TPTZ y buffer de acetatos. La absorbancia obtenida fue restada a cada una de las lecturas realizadas para las muestras.

Se describen tres mecanismos por medio de los cuales los compuestos que contienen grupos fenólicos en su estructura (como los mostrados en el presente proyecto) y presentan actividad antioxidante (Chiodo, 2010):

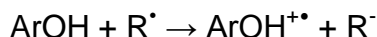
**Inactivación de radicales libres por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)**, el cual se puede describir mediante la siguiente reacción:



Siendo la especie formada RH inocua y el nuevo radical formado  $\text{ArO}^{\bullet}$ , menos reactivo con respecto a  $\text{R}^{\bullet}$ , ya que se estabiliza por varios factores como son la deslocalización

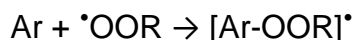
o el fenómeno de conjugación, así como formación de puentes de hidrógeno, establecidos entre el R• y los grupos OH adyacentes.

**El mecanismo de transferencia de un único electrón (SET)**, proporciona un electrón para ser donado a R•:



Siendo el anión R<sup>-</sup> una especie energéticamente estable con un número par de electrones, mientras que el catión ArOH<sup>+•</sup> es una especie menos reactiva que la especie R•.

**Formación de un radical aducto:**



El ensayo de FRAP está gobernado por la transferencia de un simple electrón (Galano, 2013), el cual permite la reducción del Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. La capacidad reductora está íntimamente relacionada con la capacidad antioxidante, debido a que el daño oxidante causado por los radicales libres en las biomoléculas y componentes celulares, puede ser revertido por las moléculas que tienen alta capacidad de donar electrones en reacciones de oxido-reducción (García, 2010).

Por lo anterior es de esperar que los compuestos **4** y **7**, presenten buena actividad antioxidante, ya que fueron los que presentaron la mayor capacidad para reducir el ión férrico.

Una de las desventajas en el uso de esta técnica es que presenta valores no representativos en análisis de muestras de tipo biológicas, ya que el complejo colorido se forma a un pH= 3.6, es decir, mucho más bajo que el pH fisiológico.

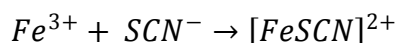


### 7.3.2. Ensayo peroxidación de lípidos.

La peroxidación lípídica es considerada uno de los mecanismos básicos involucrados en el daño celular y en muchas ocasiones es irreversible (Luga, 2012). Se ha comprobado que contribuye significativamente al desarrollo de la aterosclerosis.

Las Especies Reactivas de Oxígeno inducen la peroxidación de los lípidos alterando la estructura y fluidez de las membranas biológicas (Mokini, 2010). Por lo que, el objetivo perseguido en el presente apartado, fue determinar, cuáles de moléculas sintetizadas, presentan actividad para inhibir la peroxidación del ácido linoleico, como resultado, de la inactivación de los radicales libres, formados *in situ*.

En la Tabla 13, se presentan los resultados obtenidos de la capacidad de cada sustancia para inhibir la peroxidación de lípidos a dos concentraciones diferentes. La determinación se realiza empleando la técnica de tiocianato. Se realiza una determinación a las 64 horas de iniciada la reacción.



**Tabla 13.** Porcentaje de inhibición de la peroxidación de lípidos empleando la técnica de tiocianato a 64 horas de iniciada la reacción.

Compuesto	% I concentración 1mg/mL	% I concentración 0.5 mg/mL
1	71.54	64.09
2	70.96	92.59
3	77.10	90.50
4	69.13	90.98
5	72.59	90.98
6	68.87	90.18
7	74.74	92.27
8	74.06	89.53
9	78.30	91.63

% I: Porcentaje de inhibición de la oxidación del ácido linoleico.

El estudio de la formación de peróxidos a partir de los lípidos en el cuerpo humano, está cobrando gran importancia, ya que se ha demostrado contribuye al desarrollo de la aterosclerosis.

Como se puede apreciar en la tabla anterior, todos los compuestos sintetizados presentan la capacidad de inhibir la peroxidación de lípidos. Los compuestos que presentaron la menor capacidad de inhibición fueron el **1, 6 y 8**, es decir, aquellos que no contienen en su estructura al grupo hidroxilo, lo cual nos lleva a suponer que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la captación de radicales libres es por transferencia del hidrógeno del grupo hidroxilo; el radical formado también es estabilizado por resonancia de cada una de las moléculas sintetizadas.

La transferencia de un átomo de hidrógeno es lo que ocurre entre el radical  $\cdot\text{OOCH}_3$  y los grupos OH presentes en la molécula (Chiodo, 2010).

Estos compuestos que contienen grupos fenólicos inhiben la peroxidación de lípidos al transferir un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo al radical lipídico o al radical lipídico peroxilo. Las estructuras formadas exhiben una alta estabilidad (Medina, 2013).

La técnica de inhibición de la peroxidación permite evaluar la actividad antioxidante sobre especies reactivas de oxígeno, que son formadas normalmente a nivel fisiológico, a partir del proceso de peroxidación de ácidos grasos (García, 2010).

## **7.4. Modelado molecular (Docking)**

### **7.4.1. Construcción del modelo**

De acuerdo con la información del servidor NCBI se sabe que el receptor de cannabinoides tipo 1 consta de una secuencia de 472 aminoácidos (Figura 17) y que pertenece al tipo de receptores acoplados a proteínas G, es decir, que posee siete

dominios transmembranales, encontrándose principalmente en la membrana plasmática y se localiza en el cromosoma 6q14-q15 (Tabla 14).

El receptor CB1, pertenece a la clase A de los GPCR, la familia más grande de proteínas membranales, y de gran importancia farmacológica, ya que participa en varios procesos como son: la regulación metabólica, deseo, dolor y ansiedad. Farmacológicamente se emplea, en el tratamiento de las náuseas y vómito inducidos por la quimioterapia, el alivio del dolor neuropático y como estimulante del apetito en pacientes con SIDA (Ai, 2012).

**Tabla 14.** Características del receptor de cannabinoides CB1 obtenidas de NCBI.

Característica	Resultado
Entrada en NCBI	P21554
Nombre del receptor	CNR1_HUMAN
Organismo	Humano
Regiones	7 regiones transmenbranales
Secuencia	472 aminoácidos
Datos de la secuencia	AAB18200.1

10	20	30	40	50	60
MKSILDGLAD	TFTRTITTDL	LYVGSNDIQY	EDIKGDMAK	LGYFPQKFPL	TSFRGSPFQE
70	80	90	100	110	120
KMTAGDNPQL	VPADQVNITE	FYNKSLSSFK	ENEENIQCGE	NFMDIECFMV	LNPSQQLAIA
130	140	150	160	170	180
VLSLTLGTFT	VLENLLVLCV	ILHSRSLRCR	PSYHFIGSLA	VADLLGSVIF	VYSFIDFHFV
190	200	210	220	230	240
HRKDSRNVFL	FKLGGVTASF	TASVGSFLFT	AIDRYISIHR	PLAYKRIVTR	PKAVVAFCLM
250	260	270	280	290	300
WTIAIVIAVL	PLLGWNCEKL	QSVCSDFPH	IDETYLMFWI	GVTSVLLLFV	VYAYMYILWK
310	320	330	340	350	360
AHSHAVRMIQ	RGTQKSIIIH	TSEDGKVQVT	RPDQARMDIR	LAKTLVLILV	VLIICWGPLL
370	380	390	400	410	420
AIMVYDVFGK	MNKLIKTVFA	FCSMLCCLNS	TVNPIIYALR	SKDLRHAFRS	MFPSCEGTAQ
430	440	450	460	470	
PLDNSMGDSD	CLHKHANNAA	SVHRAAESCII	KSTVKIAKVT	MSVSTDTSAE	AL

**Figura 17.** Secuencia de aminoácidos del receptor CB1

Al no contar con una estructura cristalizada del receptor cannabinoides tipo 1, se llevó a cabo la búsqueda de proteínas homólogas empleando para ello la base de datos del servidor PDB (Tabla 15).

**Tabla 15.** Receptores homólogos al receptor CB1

Entrada	Plantilla	Organismo	PDB ID	Resolución (Å)	Puntuación (Score)	Valor- E	% Identidad	% Identidad (Después de alineamiento con CB1)
P21453	Receptor de esfingosina-1-fosfato Tipo I	Humano	3V2Y	2.80	310	$5.0 \times 10^{-31}$	31.0	20.163
P29274	Receptor de adenosina A2a	Humano	4EIY	1.80	201	$2.0 \times 10^{-16}$	28.0	16.141
P07700	Receptor B-adrenérgico	Meleagris gallopavo (Pavo)	4AMJ	2.30	201	$2.0 \times 10^{-16}$	28.0	18.310
P28222	Receptor 5-hidroxitriptamina 1B	Human	4IAR	2.70	190	$3.0 \times 10^{-15}$	27.0	18.182
P07550	Receptor B-2-adrenérgico	Humano	2RH1	2.40	187	$8.0 \times 10^{-15}$	26.0	16.284

De los receptores acoplados a proteínas G que se lograron identificar en el servidor, el que cumple con los mejores criterios es el receptor de esfingosina-1-fosfato Tipo I (con un porcentaje de identidad del 31.0%), el cual se empleó como plantilla (*template*) para realizar la construcción del modelo del receptor CB1.

Con base en lo descrito por otros autores (González, 2008), se llevó a cabo un ajuste de la secuencia de aminoácidos (Tabla 16), minimizando las regiones poco conservadas dentro de la familia de receptores acoplados a proteínas G; como se puede apreciar, al realizar el segundo corte el porcentaje de identidad aumenta a un

25.9% con respecto al primer alineamiento aminoácido que resultó ser del 20.16 %. La secuencia final se presenta en la Figura 18.

**Tabla 16.** Ajustes realizados a la secuencia de aminoácidos del receptor CB1.

	Tipo de corte	Receptor CB1 (P21554)	Receptor de Esfingosina-1-Fosfato tipo 1 (P21453)	% Identidad	Posición Idéntica	Posición Similar
<b>INICIO</b>	0-0	472 aa	382 aa	20.16	99	142
<b>1er corte</b>	16-326	472 aa	311 aa	19.16	91	113
<b>2do corte</b>	110-412	346 aa	311 aa	25.99	92	114

```

1  NPQLVPADQVNIT---EF--YNKSLSSFKEENEIQCGENFMDIECFMVLNPSQQLAIAV  55  P21554  CNR1_HUMAN
1  -----VSDYVNYDIIVRHYNYTGKLNISADKENSIKL-----TSV          35  P21453  S1PR1_HUMAN
      :* **      .. *. *.  ::*:.*:
                                     :*

56  LSLTLGTFTVLENLLVLCVILHSRSLRCPYSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYSFIDFHVFH  115  P21554  CNR1_HUMAN
36  VFILICCFIILENIFVLLTIWKT-KKFHRPMYYFIGNLALSDDLAVAYTANLLLSGATT  94  P21453  S1PR1_HUMAN
      : : : * :****:* * . * : : .  ** * :***,***:***.* : . : : .

116  RKDSRNVFLFKLGGVIASFTASVGSFLTAIDRYISIHRPLAYKRIVTRPKAVVAFCLMW  175  P21554  CNR1_HUMAN
95  YKLTPAQWFLREGSMFVALSASVFSLLAIAIERYITMLKMKLHN-GSNNFRLFLISACW  153  P21453  S1PR1_HUMAN
      * :  : : : * . : : : * * * : * : * : * : : : : : . : . : *

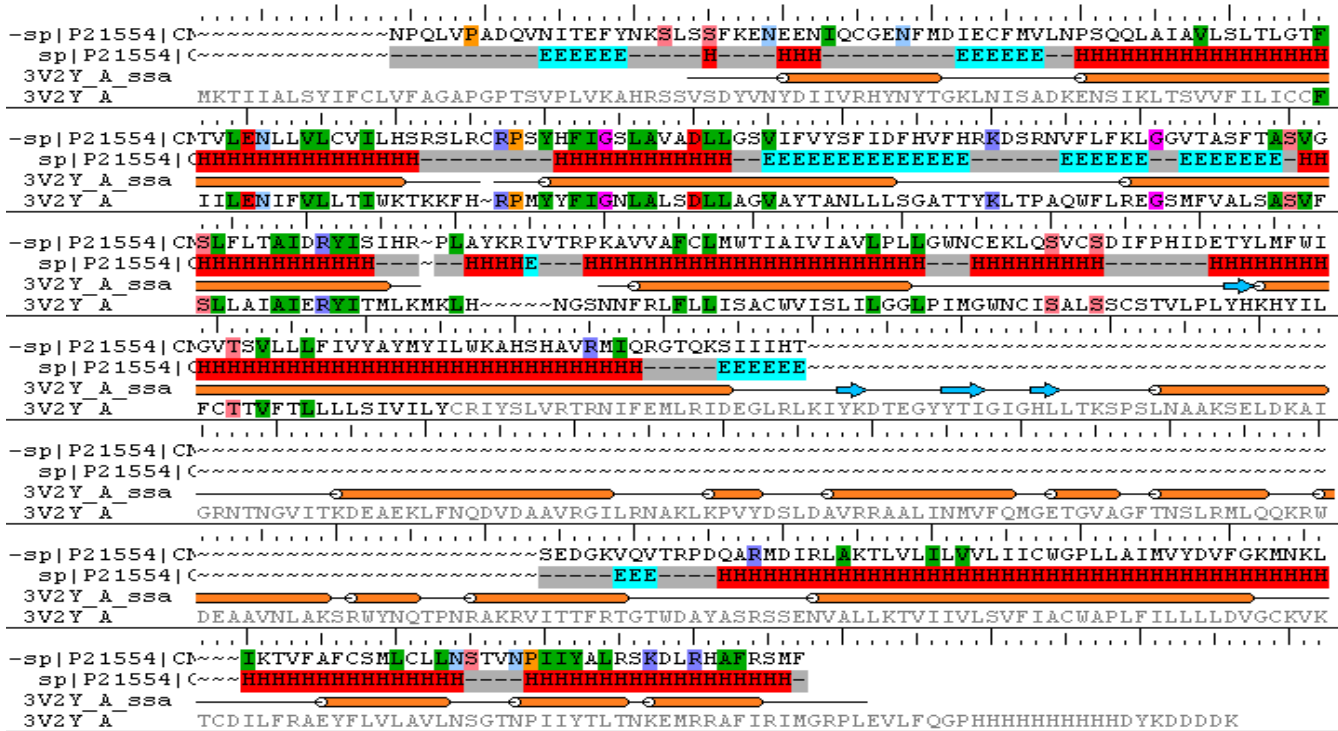
176  TIAIIVIAVLPLLGWNCCKLQSVCSDFPHIDETYLFWIGVTSVLLLFIVYAYM--YILW  233  P21554  CNR1_HUMAN
154  VISLILGGLPIMGWNCISALSSCSTVLPYHKHYILFCTTVFTLLLSIVILYCRISLV  213  P21453  S1PR1_HUMAN
      . * : : : . * : * * * * . * * * : * : : * * * : * * * * * *

234  KAHSHAVRMIQRGTQKSIIIHTSEDGKVQVTRPDQARMDIRLAKTLVLILVLIICWGPL  293  P21554  CNR1_HUMAN
214  RTRSRRLTF--RKN----I-----SKASRSSEKSLALLKTVIIVLSVFIACWAPL  257  P21453  S1PR1_HUMAN
      : : : : : : * . * . . . : * * : : : * * * * * *

294  LAIMVYDVFGKMNKLI-KTVFAFCMLCLLNSTVNPIIYALRSKDLRHAFRSMF  346  P21554  CNR1_HUMAN
258  FILLLLDVGCKVKTCEDILFRAEYFLVLAVLNSGTNPPIIYTLNKEMRRRAFIRIM  311  P21453  S1PR1_HUMAN
      : : : * * * : . : : * : * * * * * * * * * * * * : :
    
```

**Figura 18.** Secuencia final, alineamiento receptor CB1/ receptor de esfingosina-1-fosfato tipo I

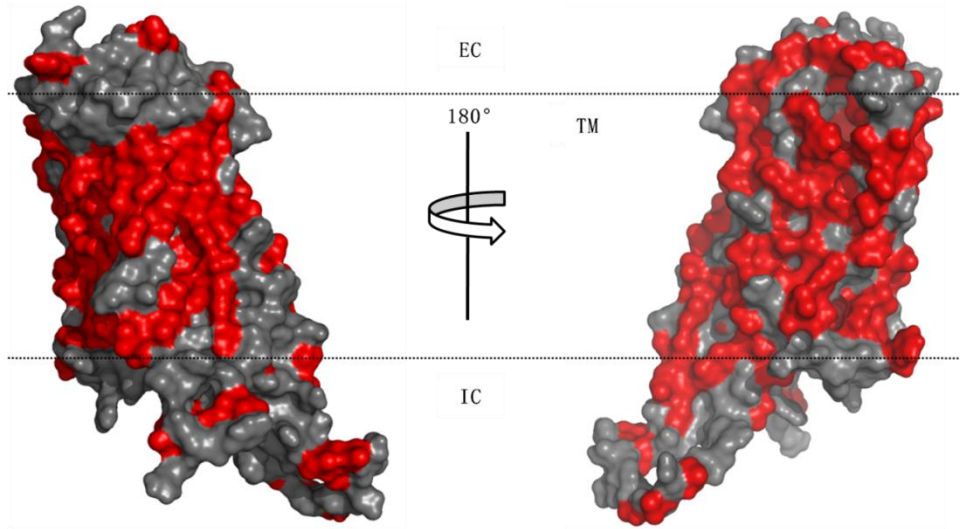
Empleando el software Schrödinger, así como el análisis consenso de la estructura secundaria del receptor CB1 (Ver Anexo IV), se realizó el alineamiento entre la plantilla seleccionada y la secuencia de aminoácidos del receptor CB1 (Figura 19).



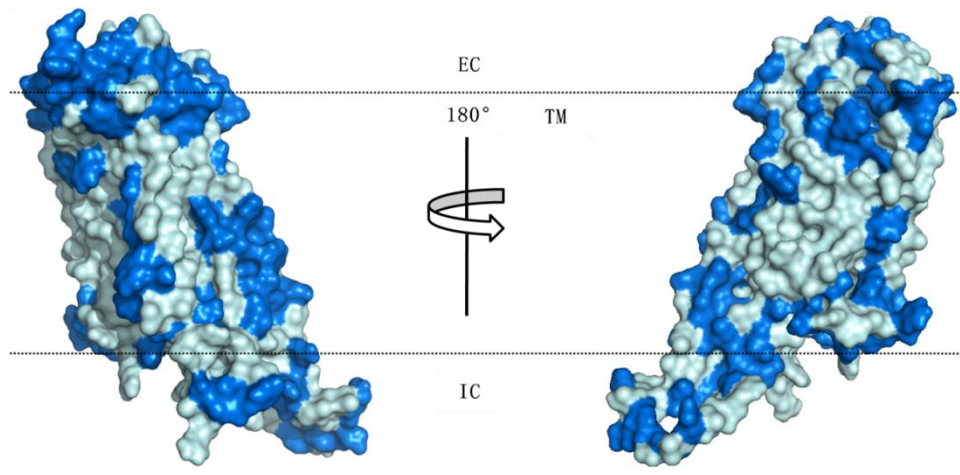
**Figura 19.** Alineamiento receptor CB1/Esfingosina-1-fosfato tipo I, con secuencia de aminoácidos final, H: Alfa-helice; E: Beta-plegada.

Dado que el receptor en estudio es una proteína transmembranal, los residuos de aminoácidos que conforman las alfas-hélices de su estructura pueden disponerse de dos formas 1) interactuando con otras hélices en la parte interna de la proteína o 2) pueden estar expuestos hacia los lípidos membranales; por ello se llevó a cabo un análisis de la distribución de los residuos en la región transmembranal del receptor CB1, como se observa en la Figura 20. En esta figura se muestra la distribución superficial de residuos de acuerdo a su hidrofobicidad, en color rojo se presentan los aminoácidos hidrofóbicos y en gris los hidrofílicos. En la Figura 21, se muestra la disposición de aminoácidos de acuerdo a la escala de Popot, donde se pueden ver los aminoácidos que se disponen generalmente orientados hacia los lípidos en verde agua y en azul los que prefieren la orientación hacia la parte interna del receptor. Los aminoácidos hidrofóbicos se distribuyen homogéneamente en el espacio, orientados a los lípidos, mientras que los aminoácidos hidrofílicos se exponen a los espacios

intracelulares y citoplasmáticos. Esto último nos permitió validar que la distribución de los aminoácidos en el modelo es consistente con las predicciones estructurales y sus propiedades fisicoquímicas.

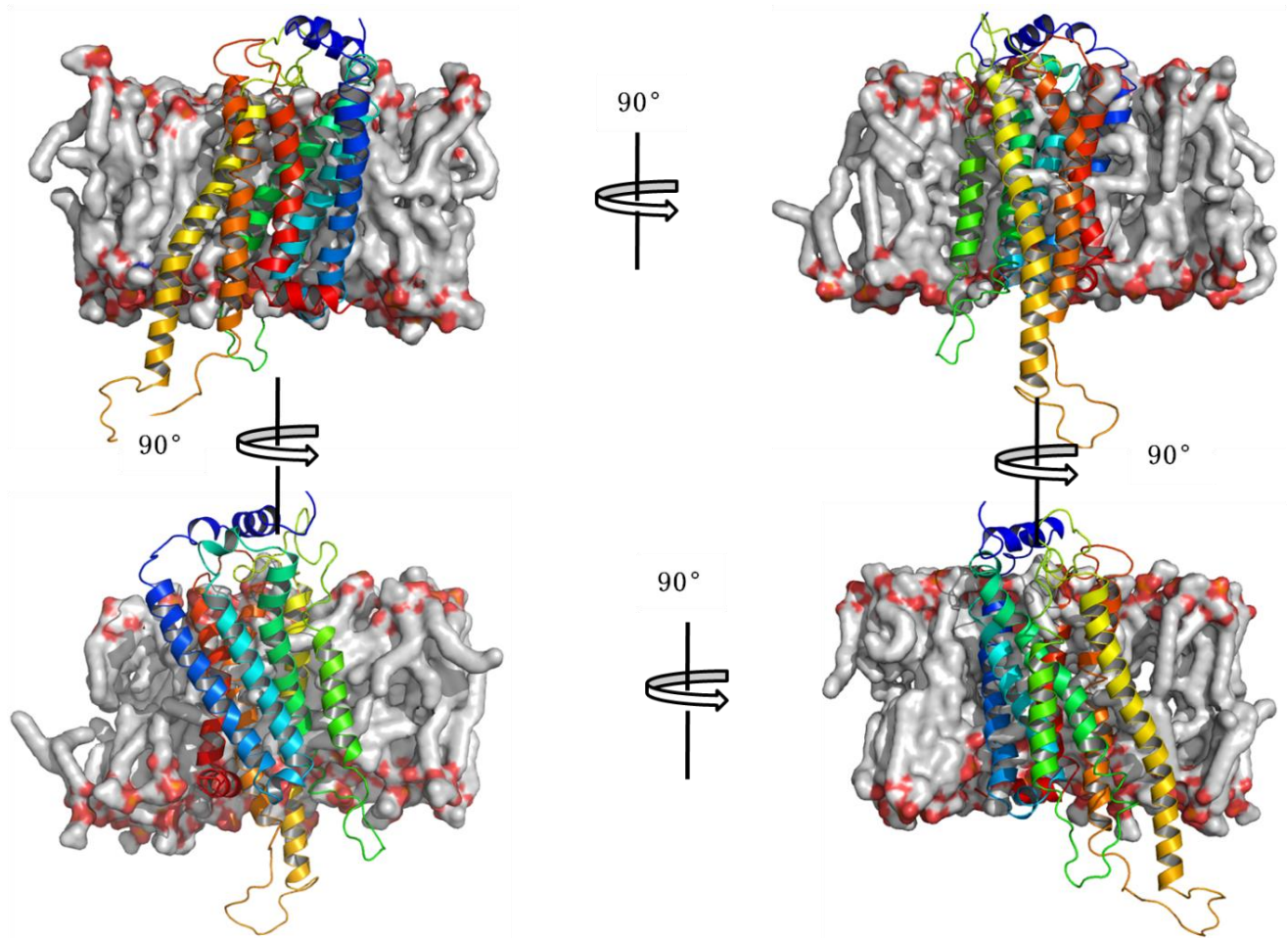


**Figura 20.** Mapa de hidrofobicidad.



**Figura 21.** Diagrama de Popot

Con base en los resultados obtenidos de los diagramas de hidrofobicidad, se identificó la superficie que debe ser cubierta durante la construcción del modelo final de la proteína, el cual fue embebido en un modelo de bicapa lipídica, con la intención de representar un sistema realista y con mayor estabilidad del receptor (Figura 22).



**Figura 22.** Modelo tridimensional del receptor CB1 embebido en el modelo de membrana lípidica (POPC).

El modelo CB1-POPC exhibe un total de siete hélices transmembranales (7 THM) y una hélice yuxtamembranal (H8). La región N-terminal se ubica en la región extracelular y el dominio C-terminal en la región citoplasmática, se presentan tres *loops* (asas) extracelulares y tres intracelulares.

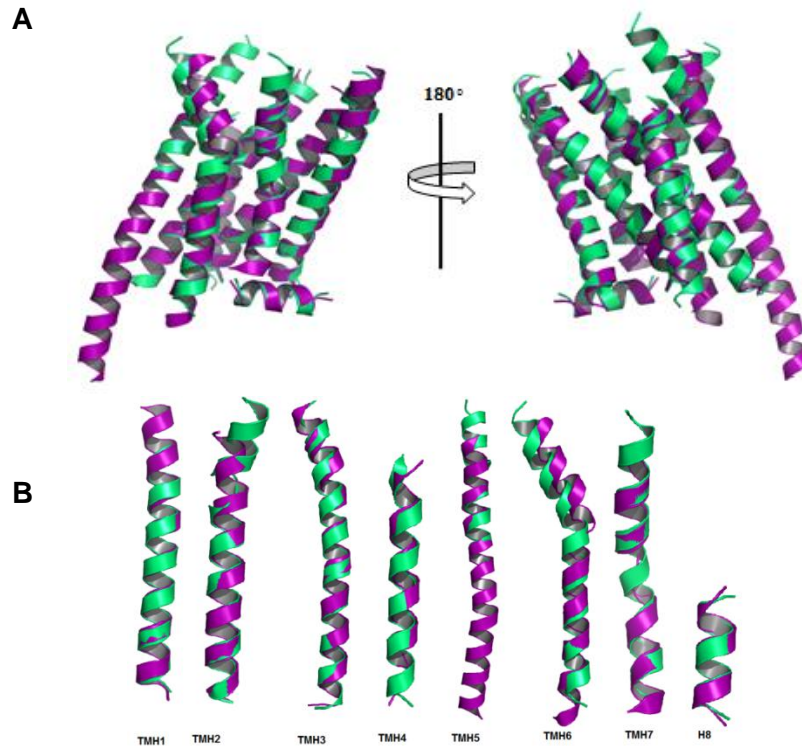
El modelo final obtenido fue validado haciendo una comparación con una base de datos de proteínas reportadas (PROCHECK), así como una evaluación de su calidad estereoquímica (QMEAN6) y los ángulos phi y psi de los aminoácidos que las componen (diagrama de Ramachandran), el valor de QMEAN representa el grado de confiabilidad del modelo creado con otras estructuras que se encuentran en la base de datos, el valor obtenido fue de -4.68. El valor de Z-score permite conocer la similitud



estructural durante el alineamiento múltiple con las estructuras de la base de datos un valor cercano a cero es un buen parámetro, el valor obtenido fue de 0.36. Cabe señalar para los receptores transmembranales el valor de QMEAN y Z-score, no suele ser parámetros de referencia, ya que del total de proteínas cristalizadas reportadas estos abarcan solo el 10%. Un parámetro que cobra importancia es el obtenido por el diagrama de Ramachandran, el cual permite conocer la distribución de los aminoácidos en cuatro cuadrantes, clasificados por letras según el tipo de conformación angular que adquiere dicho aminoácido, a excepción de la glicina y la prolina, el primero debido a que su cadena lateral está compuesta por un hidrógeno, el cual puede adoptar muchas conformaciones estéricamente prohibidas, y el segundo por ser el único aminoácido capaz de generar enlaces *cis* y *trans*. La región favorecida (A, B, L) se representa con rojo y refiere a los aminoácidos con orientaciones angulares estables en el modelo, mientras que las regiones permitidas (a, b, l, p) y generosamente permitidas (~a, ~b, ~l, ~p), que se presentan en amarillo y beige, respectivamente, muestran aquellos aminoácidos cuyas conformaciones angulares están dentro de los parámetros aceptables; por último las regiones no permitidas se representan en color blanco. El valor arrojado presenta al 83.8 % de los residuos en la región de conformación permitida (Anexo III), con lo cual se considera que el modelo empleado es aceptable.

El modelo obtenido del receptor CB1 se compara con el modelo del servidor GPCR-SSFE como método alternativo de validación del modelo propuesto (Figura 23), obteniéndose para ello los valores de desviación cuadrática media (RMSD) (Tabla 17). La desviación cuadrática media o RMSD (*Root Mean Square Deviation*), es el valor resultante de la superposición de la estructura del modelo final con la del servidor GPCR-SSFE, para indicar la presencia de similitudes estructurales dimensionales con base en sus coordenadas atómicas. Un valor menor a 2.0 Å se considera aceptable y entre menor sea el valor de la desviación mayor es la similitud estructural. Cabe mencionar que los valores de RMSD obtenidos para el modelo son menores a 2.0 Å, por lo cual se considera se presenta una alta similitud estructural entre el modelo propuesto y lo que se encuentra reportado en la base de datos, a excepción fue TMH 6

la cual no correlacionó de manera adecuada por lo que el valor de desviación no se determina.

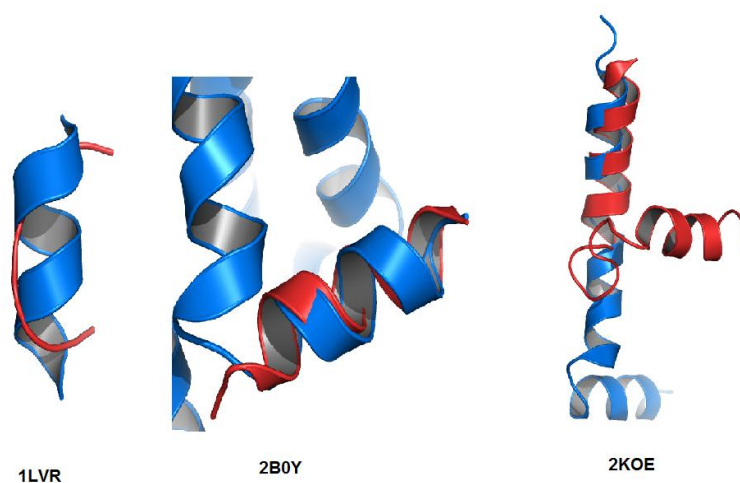


**Figura 23.** (A) Superposición de las alfas-hélices del modelo del receptor CB1 (morado) con el modelo del servidor GPCR-SSFE (verde). (B) Superposición individual de las alfas-hélices que conforman ambos modelos.

**Tabla 17.** Resultados obtenidos de la superposición de las alfas-hélices.

Estructura	Secuencia de aminoácidos		RMSD (Å)
	Plantilla (GPCR-SSFE)	Modelo CB1	
<b>TMH1</b>	K116-S144	P113-H143	1.322 (29 átomos)
<b>TMH2</b>	R150-R182	R150-F177	0.942 (23 átomos)
<b>TMH3</b>	R185-R220	R185-R222	1.105 (35 átomos)
<b>TMH4</b>	T229-P251	P231-P251	1.303 (20 átomos)
<b>TMH5</b>	P269-M295	L276-K315	0.972 (17 átomos)
<b>TMH6</b>	M337-G369	M337-G369	No determinado
<b>TMH7</b>	I375-A398	F379-R400	0.503 (20 átomos)
<b>Helice 8</b>	S401-F412	S401-F412	0.311 (10 átomos)

En la actualidad solo se han resuelto por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) cuatro fragmentos del receptor de cannabinoides tipo I. En la Tabla 18, se presentan los resultados de la superposición entre estos y el modelo del receptor CB1 propuesto (Figura 24).



**Figura 24.** Superposición de segmentos resueltos por RMN y el modelo del receptor CB1

**Tabla 18.** Valores de desviación cuadrática media (RMSD) obtenidos.

Código PDB	Secuencia aminoácidos	
	Secuencia	RMSD (Å)
<b>1LVR</b>	D338-V346	4.19 (9 átomos)
<b>1LVQ</b>	D338-V346	4.19 (9 átomos)
<b>2B0Y</b>	R400-F414	1.275 (12 átomos)
<b>2KOE</b>	T377-F414	1.898 (15 átomos)

Como se puede apreciar, se presenta una baja correlación entre los fragmentos obtenidos por RMN 1LVR y 1LVQ, con el modelo propuesto del receptor CB1, ello debido a que el proceso *per se* de resonancia magnética nuclear favorece la desnaturalización de las proteínas membranales y por ende la pérdida de su conformación tridimensional, el cual es base en la evaluación del RMSD.

### 7.5.2. Acoplamiento molecular (Docking).

Empleando el software Autodock 4.2, se llevó a cabo el acoplamiento de los compuestos **2**, **6** y **7** con el receptor CB1. Está bien establecido que la actividad de agonista inverso del Rimonabant se debe a la interacción del tipo puente de hidrógeno, entre el grupo carbonilo del compuesto y la Lisina 192 del receptor. Por ello se seleccionaron los modos de unión basados en las conformaciones que promovieran esta interacción. Se empleó la plantilla de compuestos deriva del artículo (Hernández, 2013, Anexo IV), los cuales presentan actividad hipoglucemiante. Como otro método de validación del modelo propuestos del receptor, se eligió del total de nueve compuestos a un conjunto de tres que fueran representativos de la serie, por lo cual se emplearon los compuestos **2**, el cual contiene solo un grupo hidroxilo, **6**, el cual contiene dos grupos metoxilo como sustituyentes y finalmente el compuesto **7** el cual contiene al dieno conjugado, dos grupos metoxilo y un grupo hidroxilo.

El valor que arroja el análisis es la energía de unión entre el complejo ligando-receptor, generalmente expresado en términos termodinámicos como energía libre de Gibbs ( $\Delta G_{\text{unión}}$ ), el cual considera factores estéricos, electrostáticos, rigidez de la macromolécula, formación de puentes de hidrógeno, así como energías de solvatación y factores entrópicos rotacionales y traslacionales ( $t/r$  en la ecuación). Para el caso del programa AutoDock, la energía de unión se describe bajo la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{unión}} = \Delta G_{\text{disolvente}} + \Delta G_{\text{conformación}} + \Delta G_{\text{interacción}} + \Delta G_{\text{rotación}} + \Delta G_{t/r} + \Delta G_{\text{vibración}}$$

Los tres compuestos propuestos presentan energías de unión similares a las encontradas por los compuestos de prueba, lo cual sugiere que presentan el mismo mecanismo de acción, es decir, como agonistas inversos del receptor de cannabinoides tipo 1

En la Tabla 19 se presentan los resultados obtenidos para los compuestos probados.

Tabla 19. Docking de los compuestos

Compuesto	$\Delta G_{\text{unión}}$ (kcal/mol)
2	-7.7
6	-7.1
7	-7.0
Rimonabant	-7.6

En la Figura 13, se representa el comportamiento final de cada una de las moléculas empleadas en la validación del modelo y las tres moléculas que constituyen al set de pruebas.

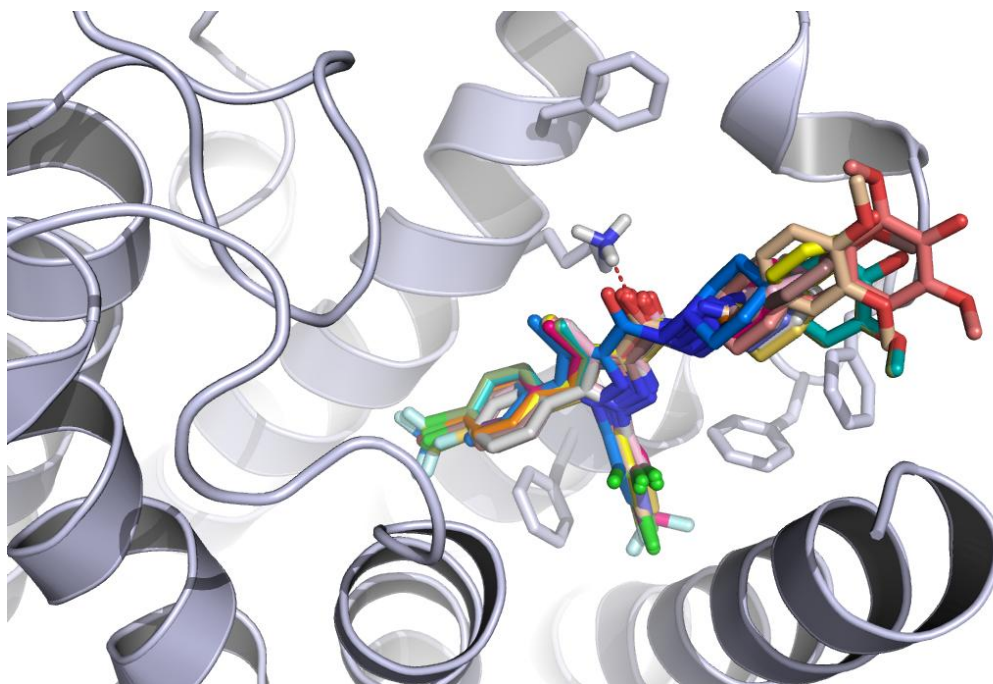
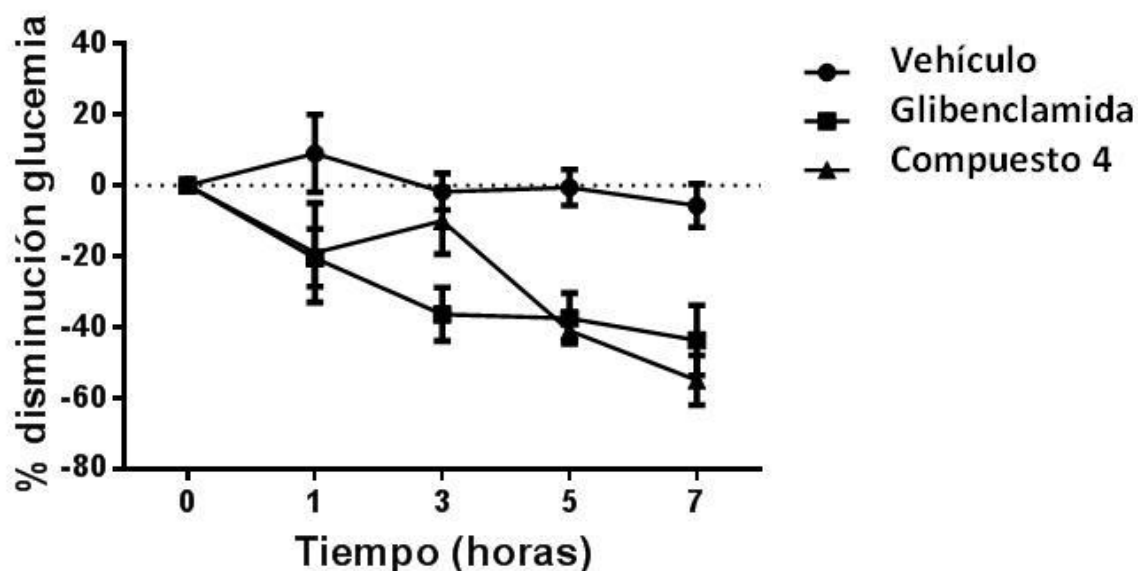


Figura 13. Sitio de interacción entre los diversos ligandos y el modelo del receptor CB1.

### 7.5. Actividad hipoglucemiante

Se evaluó la actividad hipoglucemiante del compuesto **4**, la cual se aprecia en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Actividad hipoglucemiante

Como puede observarse la actividad hipoglucemiante es comparable a la mostrada por el compuesto control positivo, en este caso la glibenclamida, medicamento hipoglucemiante oral de la clase de las sulfonilureas que se emplea en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

Al comparar los perfiles de disminución de la glicemia entre la glibenclamida y el compuesto **4**, que contiene en su estructura al anillo 1,5-diarilpirazol y al siringaldehído, se observa que, conforme avanza el tiempo, los niveles de glucosa sanguíneo disminuyen hasta alcanzar en un tiempo de 7 horas un promedio de 50 % de reducción.

Lo anterior, aunado al hecho de que el compuesto **4** también mostró actividad reductora en la prueba de FRAP y además capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos, nos lleva a promoverlo como un fuerte candidato terapéutico contra el síndrome metabólico.

## 8. CONCLUSIÓN

Se realizó la síntesis de nueve híbridos del ácido 1,5-diarilpirazol, los cuales se caracterizaron estructuralmente empleando técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Estos compuestos se evaluaron *in vitro* para determinar su capacidad antioxidante empleando en primera instancia el modelo de FRAP. En dicho estudio, los compuestos sintetizados **4** y **7** fueron los que presentaron la mayor capacidad de reducir el ion férrico a ferroso. Ello se debe a que tienen mayor capacidad de estabilizar la especie radical que se forma. En el segundo modelo empleado, se observó que todos los compuestos sintetizados presentaron la propiedad de inhibir la peroxidación de lípidos la cual es muy importante debido a que dicha técnica permite evaluar la capacidad antioxidante sobre las especies reactivas de oxígeno, que son formadas normalmente en el organismo a partir del proceso de peroxidación de los ácidos grasos insaturados.

Se efectuó el análisis de acoplamiento molecular con los compuestos **2**, **6** y **7**, los cuales presentaron un  $\Delta G_{\text{unión}}$  similar al obtenido para el compuesto de referencia (Rimonabant), por lo cual se puede inferir, que presentan potencial actividad de antagonista/agonista inverso sobre el receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1).

Finalmente, la evaluación de actividad hipoglucemiante del compuesto **4**, demuestra un efecto de disminución de glucosa plasmática comparable a la glibenclamida, por lo que los compuestos actuarán como híbridos al mostrar capacidad antioxidante y, simultáneamente, actividad hipoglucémica, patologías estrechamente relacionadas con el síndrome metabólico.

La síntesis y evaluación de la actividad de híbridos moleculares del ácido 1,5-diarilpirazol, presenta un panorama alentador en el desarrollo de compuestos para el tratamiento de la obesidad y de los componentes asociados con el síndrome metabólico. Es imperativo continuar trabajando bajo esta premisa y así contribuir a la disminución en los índices de prevalencia de estas patologías.

## 9. REFERENCIAS

Ai, R.; Chang, C.-en A. Ligand-specific homology modeling of human cannabinoid (CB1) receptor. *J. Mol. Grap Mod.* 2012, 38, 155-164.

Aguayo-Ortiz, R. Tesis de licenciatura. Estudio computacional de un modelo del posible sitio de unión de bencimidazoles de la  $\beta$ -tubulina de helmintos y protozoarios. Facultad de Química, 2012, UNAM. D.F.

Avendaño-López, C. Introducción a la química farmacéutica. España Ed. Mc. Graw-Hill, 2001.

Almanza- Pérez, J. C.; Blancas-Flores, G.; García- Macedo, R.; Alarcón-Aguilar, F. J.; Cruz, M. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gac.Méd.Méx.*2008,144, 535-542. [www.anmm.org.mx](http://www.anmm.org.mx) (última revisión 14 JUN 2014).

Bandeira, S. de M.; Fonseca, L. J. S.; Guedes, G. da S.; Rabelo, L. A.; Goulart, M. D. F.; Vasconcelos, S.M. L. Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* .2013, 14, 3265- 3284.

Chiodo, S. G.; Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano M. The inactivation of lipid peroxide radical by quercetin.A theoretical insight. *Phys. Chem. Chem. Phys*, 2010,12, 7662 – 7670.

Crepaldi, G.; Maggi, S. Síndrome metabólico: contexto histórico. *Diabetes voice*, 2006, 51, 8-10.

Comunicado 2008/12 Comunicación sobre riesgos de medicamentos para profesionales sanitarios, Nota informativa: Rimonabant (Acomplia®) y Trastornos psiquiátricos. AEMPS (22 JULIO de 2008) [www.aemps.gob](http://www.aemps.gob) (última revisión 14 JUN 2014)



Comunicado 2008/18 (última actualización Febrero 2009) Comunicado sobre riesgos de medicamentos para profesionales sanitarios, Nota informativa: Rimonabant (Acomplia®) suspensión cautelar de comercialización. AEMPS (23 Octubre 2008) [www.aemps.gob](http://www.aemps.gob) (última revisión 14 JUN 2014).

Descalzo, A.M.; Rossetti, L.; Grigiono, G.; Irurueta, M.; Sancho, A. M. Antioxidant status and odour profile in fresh beef pasture or grain-fed cattle. *Meat Science* 2007, 75, 299-307.

Elmastas, M.; Isildak, O.; Turkecul, I.; Temur N. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *J. Food Comp. Analysis* 2007, 20, 337-345.

Esper, R.C.; Sánchez-Zúñiga, M. de J.; Elizondo-Argueta, S. Síndrome Metabólico, *A. Nal. De Med.* 2003, 1-5.

Galano, A. Influence of the Environment on the protective effects of Guayacol derivatives and relative antioxidant activity. *J. Phys. Chem. B.* 2012, 116, 7129-7137.

Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J.R. A computational methodology for accurate predictions of rate constants in solution: Application to the assessment of primary antioxidant activity. *J. Comp Chem*, 2013, 34, 2430-2445.

García, B.L.; Verde, J.; Castro, R.; Chávez, A.; Oranday, A.; Nuñez, A.; Rivas, C. Actividad biológica de un extracto de oruja de uva Mexicana. *Rev. Mex. Ciencias Farm*, 2010, 41, 28-36.

González-Chávez, A. Consenso Mexicano sobre el tratamiento integral del síndrome metabólico, *Rev. Mex. Cardiol.* 2002, 13, 4-30.

González, A.; Sepulveda-Duran, L.; Araya-Secchi, R.; Garate, J.A.; Pessoa-Mahana, C.D.; Lagos, C.F.; Perez-Acle, T. Computational modeling study of functional microdomains in cannabinoid receptor type 1, *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 4378-4389.

Hernández-Vázquez, E.; Aguayo-Ortiz, R.; Ramírez-Espinosa, J.J.; Estrada-Soto, S.; Hernández-Luis, F. Synthesis, hypoglycemic activity and molecular modeling studies of pyrazole-3-carbohydrazides designed by a CoMFA model, *Eur. J. Med. Chem.* 2013, 69, 10-21.

Hernández-Vázquez, E.; Méndez-Lucio, O.; Hernández-Luis, F. Activity landscape analysis COMFA and COMSIA studies of pyrazole CB1 antagonists. *Med. Chem. Res.* 2013, 22, 4133-4145.

Lucrano, C.; Saponara, M.; Barbaro, G.; Specchia, P.; Addessi, E.; Costantini, D.; Tenuta, M.; Di Lorenzo, G. et al. Relationships between body fat distribution, epicardial fat and obstructive sleep apnea in obese patients with and without metabolic syndrome, *Plos One.* 2012, 7, e 47059.

Lumbreras-Zavala, N. A. Tesis de licenciatura. Síntesis y preformulación de derivados del 1,5-diarilpirazol como posibles agentes para el tratamiento del síndrome metabólico. Facultad de Química, 2012, UNAM, D.F.

Medina, M. E.; Iuga, C.; Alvarez-Idaboy J R. Antioxidant activity of propyl gallate in aqueous and lipid media: a theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013, 15, 13137 – 13146.

Menzio, G.; Fossa, P.; Cichero, E.; Spallarossa, A.; Ranise, A.; Mosti, L. Rational design, synthesis and biological evaluation of new 1,5-diarilpyrazole derivatives as CB1 receptor antagonists, structurally related to rimonabant. *E. J. Med. Chem.* 2008, 43, 2627-2638

Mohamed-Al-dallen, S.; Chávez-Rodríguez, T.; Martínez-Sánchez, G.; Ferreira-Bega, E.; León Fernández, O.S. El equilibrio redox en la diabetes y sus complicaciones, *Acta Farmaceutica B.* 2004, 23, 231-242.

Mokini, Z.; Loredana-Marcovecchio, M.; Chiarelli, F. Molecular pathology of oxidative stress in diabetic angiopathy: Role of mitochondrial and cellular pathways, *Diabetes Res.* 2010, 87, 313-321.

Ogbera, A. O. Prevalence and gender distribution of the metabolic syndrome. *Metab. Syndr.* 2010, 2, 1-5.

Peydró, E.D. Evaluación de la disfunción endotelial en pacientes con diabetes, *Av. Diabetol.* 2005, 21, 292-301.

Pineda, C.A. Síndrome metabólico: definición, historia, criterios, *Colom. Med.* 2008, 39, 96-106.

Povel, C. M.; Beulens, J. W.; Van der Schouw, Y.T.; Dolle, M. E. T.; Spijkerman, A. M. W.; Verschuren, W. H. M.; Feskens, E.J. M.; Boer, J. M. A. Metabolic syndrome, model definitions predicting type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes care*, 2013, 36, 362-368.

Ramírez-Espinosa, J. J.; Rios, M. Y.; López-Martínez, S. Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTP: in vitro, in vivo and in silico approaches *Eur. J: Med. Chem.* 2011, 46, 2243–2251.

Wanasundara, P. K. J. P. D.; Shahidi, F. *Antioxidants: Science, technology, and applications*, John Wiley & Sons, 2005, 6, 431-489.

Worth, C. L.; Kleinav, G.; Krause, G. Comparative sequence and structural analysis of G-protein-coupled receptor crystal structures and implications for molecular model. *PLoS ONE*.2009, 4, e 7011 (14 páginas).

## **10. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO**

Se espera concluir con las pruebas de actividad hipoglucemiante de todas las moléculas propuestas en el presente trabajo, con la finalidad de encontrar otros candidatos terapéuticos para el tratamiento del síndrome metabólico. De igual forma es necesario realizar pruebas de toxicidad sobre estos compuestos.

# **ANEXO I. Parte experimental**

### **Información general**

Los reactivos y disolventes empleados fueron de las marcas J. Baker, Sigma Aldrich, Merck y Analytyka.

Las características de los equipos empleados son las siguientes:

Rotaevaporador Büchi modelo RC-144 con una bomba de vacío Vucabrand modelo PC160, con regulador VCC2 y baño de calentamiento Büchi modelo B-480, enfriador marca VWRW scientific modelo 117.

Rotaevaporador modelo R-205 con una bomba de vacío Büchi modelo V-800, controlador V-500 y un baño de calentamiento R-490.

El monitoreo de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina empleando para ello placas de vidrio cubiertas con sílice. Las placas se visualizaron empleando una lámpara de luz ultravioleta (longitud de onda larga y corta) y una cámara de vapores de yodo.

Para la determinación de los puntos de fusión se usó un aparato Büchi modelo B-540 que emplea capilares de vidrio abiertos.

La masa de reactivos y productos se determinó con la Balanza analítica Sartorius AZ10P.

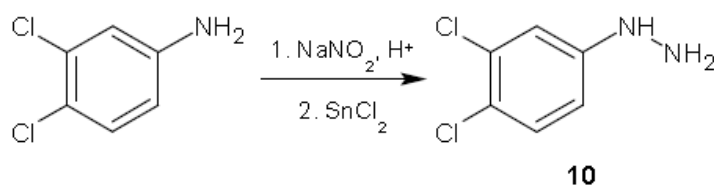
Para la realización de las pruebas de actividad antioxidante, se empleó el Espectrofotómetro Genesys modelo 10S UV-Vis marca Thermo, con una lámpara de xenón, con lecturas desde longitudes de onda de 190 a 1.100 nm, detector con doble fotodiodos de silicio. Se empleó el Bortex modelo MS1 marca IKA®. Las alícuotas fueron tomadas con pipetas eppendorf® Research plus con capacidades de 1-100 µL y 100-1 000 µL.

La caracterización espectroscópica y espectrométrica, así como el análisis elemental de los compuestos obtenidos 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 Hz.
- Espectrometría de masas: Thermo electron modelo DF5.
- Infrarrojo: Espectrofotómetro FT-IR modelo Spectrum Rx1 Perkin Elmer 1605.
- Análisis elemental: Analizador Elemental Perkin Elmer modelo 2400 Serie 2 CHNS.

## Metodología sintética

### Síntesis 3,4-diclorofenilhidrazina



En un vaso de precipitados de 500 mL se colocó 4 g de 3,4-dicloroanilina, se adicionó 1 eq de ácido acético glacial y 2 eq de ácido clorhídrico concentrado. Inicia agitación a temperatura ambiente.

En otro vaso de precipitados de 25 mL se pesó 1 eq de nitrito de sodio y se disolvió en 6 mL de agua. Lo anterior se adiciona a la mezcla anterior lentamente.

En un vaso de precipitados se colocó 4.4 eq de Cloruro de estaño dihidratado y se disolvió en 1 eq de ácido clorhídrico concentrado. Lo anterior se adicionó empleando un embudo de adición a la mezcla de reacción de los pasos anteriores. Inició agitación a temperatura ambiente por el periodo de 1 día.

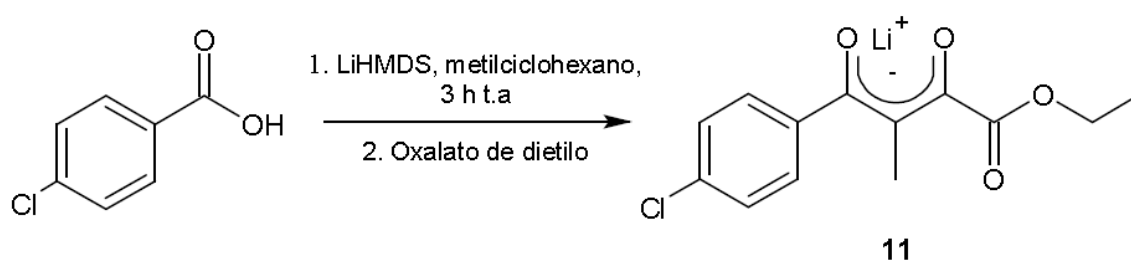
Para el tratamiento de la reacción se procedió a hacer lo siguiente: se adicionó 200 mL de agua y se basificó hasta pH=11 empleando KOH en pellets, se observa la formación

de un precipitado el cual se filtra. El precipitado se lavó en repetidas ocasiones con acetato de etilo caliente hasta que la solución obtenida sea translúcida, la fase orgánica se filtró y secó sobre sulfato de sodio anhidro.

Para la fase acuosa se realizaron extracciones sucesivas empleando un embudo de separación de 500 mL empleando como fase orgánica acetato de etilo, el cual se secó sobre sulfato de sodio anhidro.

La fase orgánica se reunió y concentró en rotaevaporador.

### Síntesis de Sal de litio del 3-metil-4-fenilbutanoato de etilo.



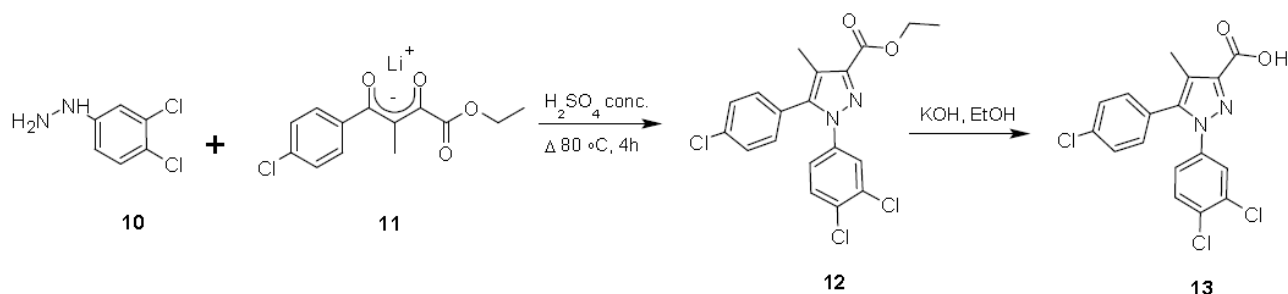
Se colocó 2 g de 4-cloropropiofenona en un vaso de precipitados de 25 mL, se adicionó 5 mL de metilciclohexano y se solubilizó.

En un matraz bola de 100 mL se colocó 5 mL de metilciclohexano, 1 eq de bis(trimetilsilil)amihidruro de litio 1.0 M, a lo anterior se adicionó lentamente la solución el paso anterior. Inició agitación a temperatura ambiente en atmosfera de nitrógeno por un periodo de 3 horas.

Posterior a ello se adicionó 1 eq de oxalato de dietilo y se mantuvo agitación por un día. Después de la agitación constante se observó un precipitado color amarillo el cual se filtró.

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



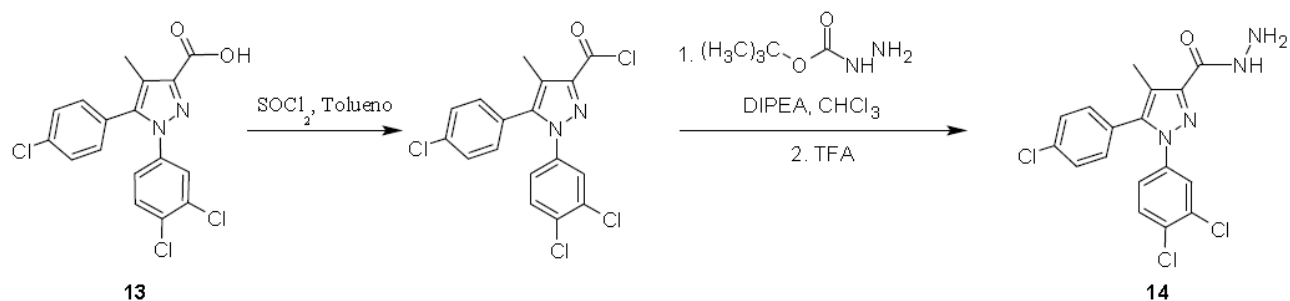


Para la formación del derivado pirazólico se llevó a cabo un reacción de ciclación en donde: se colocó 2 gramos de la sal de litio del 3-metil-4-fenilbutanoato de etilo y 1.2 eq de la 3,4-diclorofenilhidrazina en un matraz bola de 100 mL, se adicionó 50 mL de etanol y 1.5 eq de ácido sulfúrico concentrado. Inició agitación, y calentamiento empleando un sistema de reflujo a 80°C por un periodo de 4 horas. La reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina. Posterior a las 4 horas se concentró la solución en rotaevaporador, se adicionó 20 mL de agua y se basificó la solución con KOH pellets hasta pH=14, se realizaron extracciones empleando un embudo de separación de 125 mL y cloroformo como fase orgánica, esta última se concentró en rotaevaporador.

El estér formado, se hidrolizó en presencia de 2.5 eq de KOH pellets en de 20 mL de etanol con agitación a temperatura ambiente, en atmosfera de nitrógeno por un periodo de 2 días.

Posterior a dicho tiempo la solución se concentró en rotaevaporador, se adicionó 20 mL de agua hasta solubilizar el sólido y se acidificó la solución hasta pH=1 con la formación concomitante de un precipitado (ácido carboxílico correspondiente) el cual se filtró. El precipitado obtenido se lavó con hexano caliente.

**Síntesis del 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.**



Se colocó 0.5 g de ácido diarilpirazòlico en un matraz bola de 100 mL, se adicionó 30 mL de Tolueno y un exceso de  $\text{SOCl}_2$ , inició calentamiento en reflujo a  $110^\circ\text{C}$  por el periodo de 3 horas.

Posterior a ello se concentró empleando una trampa de destilación y lavando el sólido con tolueno (20 mL/ 3 veces). Al sólido obtenido se adicionó 1.2 eq de carbazato de terbutilo en 10 mL de cloroformo, inició agitación a temperatura ambiente en atmosfera de nitrógeno por el periodo de 1 día.

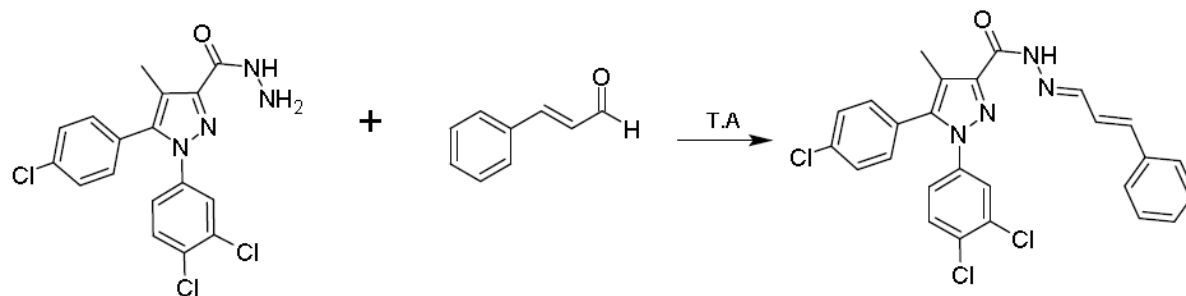
Al término del periodo de reacción se concentró en rotaevaporador, se adicionó 10 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio y se realizaron extracciones empleando cloroformo como fase orgánica, esta última se concentró en rotaevaporador.

Se obtiene un compuesto de consistencia aceitosa al cual se le adicionó un exceso de ácido trifluoacético, inició agitación a temperatura ambiente en atmosfera de nitrógeno por un periodo de 3 horas posterior a las cuales se adicionó 20 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio y se basificó hasta  $\text{pH}=14$  empleando KOH pellets, se realizaron extracciones empleando embudo de separación y como fase móvil cloroformo.

La fase orgánica obtenida se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró en rotaevaporador.

Este compuesto se empleó para las reacciones subsecuentes.

**Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N'-[(1E, 2E)-3-fenilaliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.**



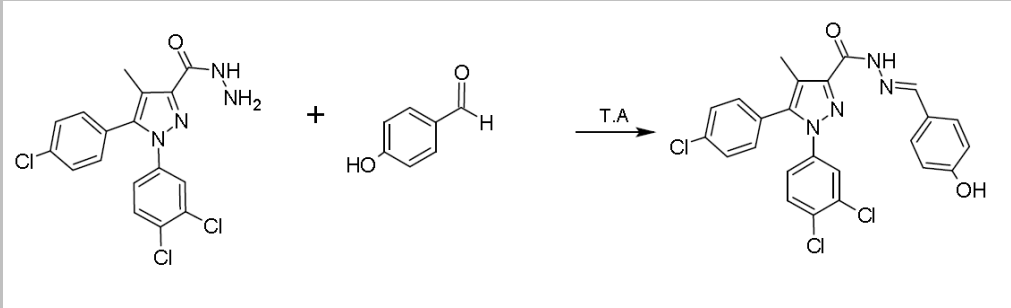
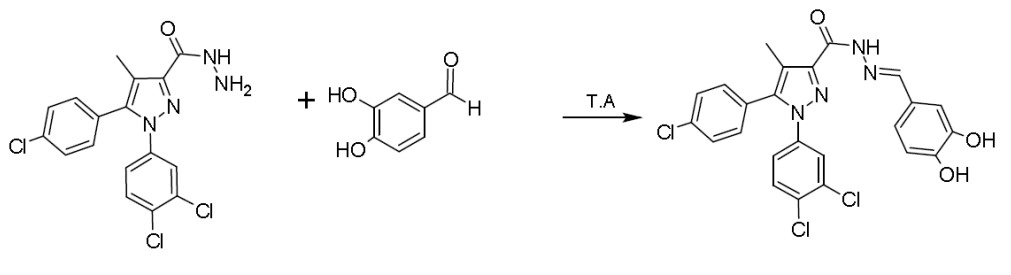
Se pesó 0.4 g de 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida en un matraz bola de 100 mL, se adicionó 1.1 eq del trans-cinamaldehído, se solubilizó la mezcla de reacción con 25 mL de THF, se empleó como catalizador 4 gotas de ácido acético glacial y como agente desecante mallas moleculares.

Inició agitación a temperatura ambiente en atmosfera de nitrógeno por un periodo de 10 horas.

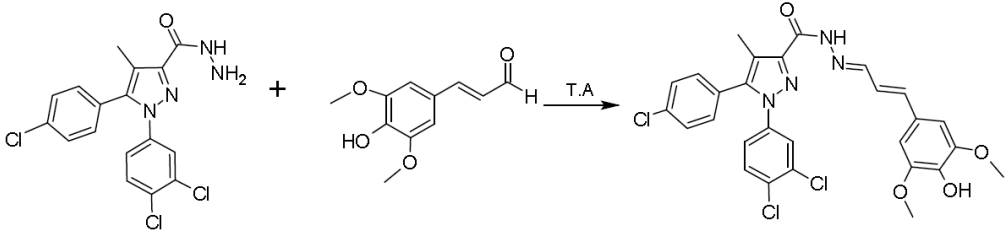
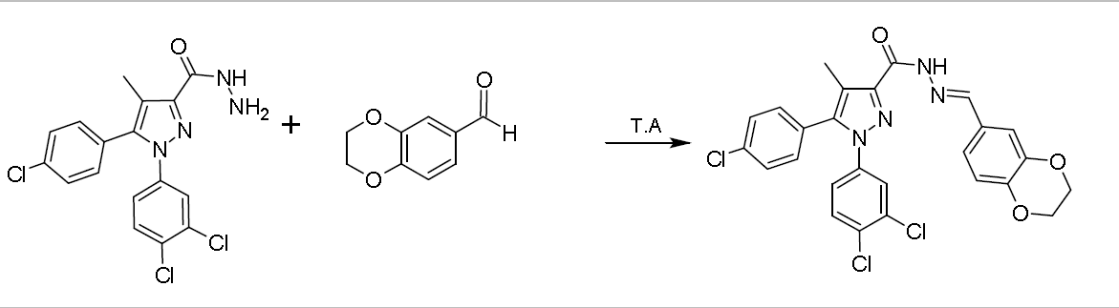
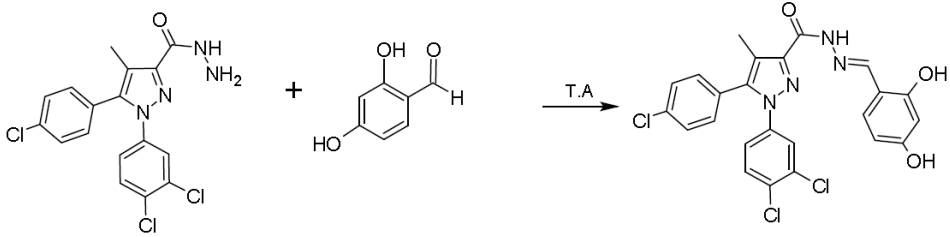
Después de dicho tiempo la reacción se detuvo, se concentró en el rotaevaporador.

La purificación de dichos compuestos fue mediante columna cromatografica, empleando como fase móvil CHCl<sub>3</sub>. Para obtener el sólido, las fracciones obtenidas se concentraron en rotaevaporador, se adicionó 10 mL de alcohol isopropilico, el sólido formado se filtró por un embudo Buhner y se deja secar a vacío.

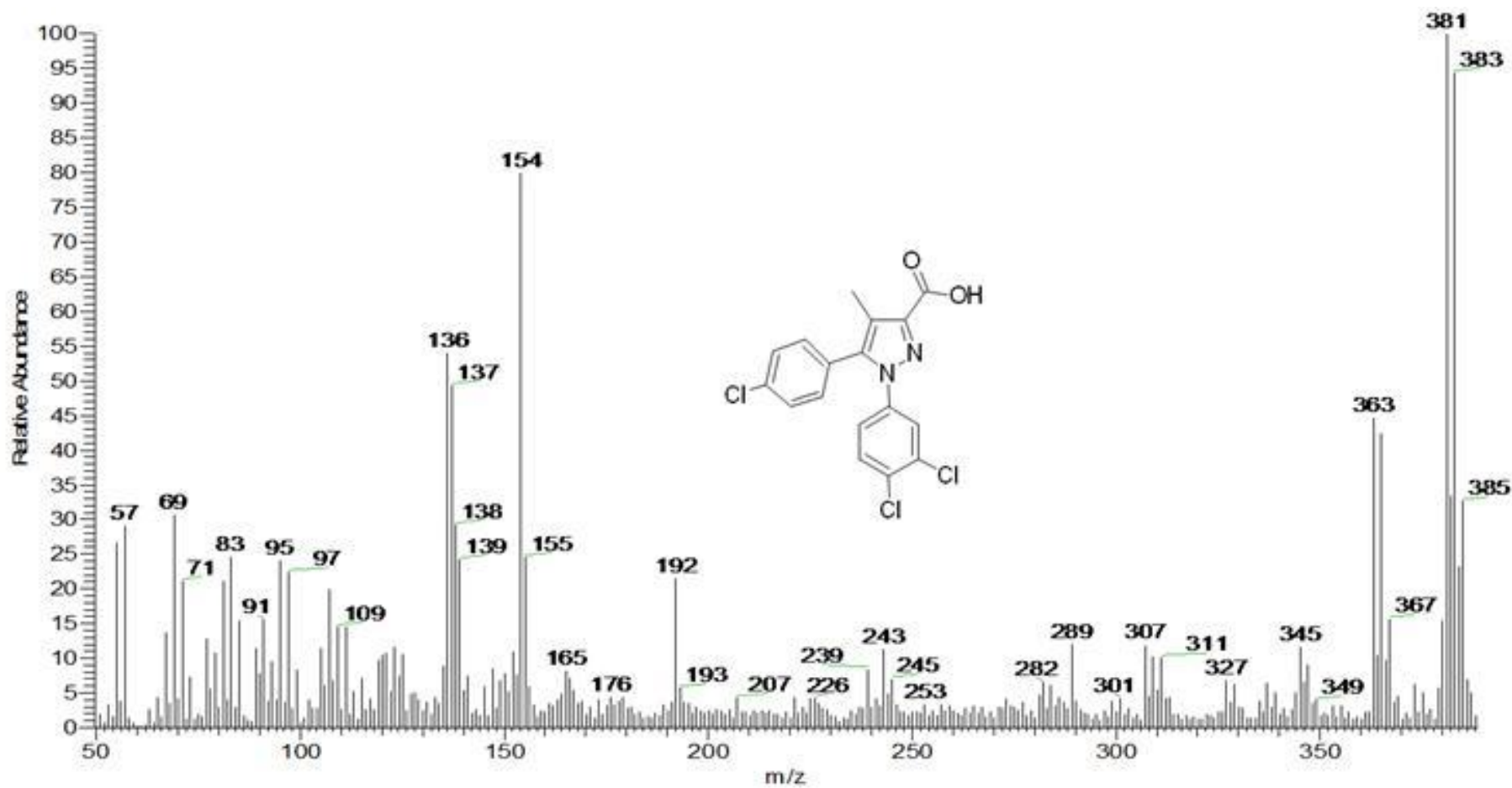
Los siguientes compuestos sintetizados, se llevaron a cabo mediante la técnica descrita anteriormente por lo que, con el objetivo de simplificar el presente apartado se presentan los aspectos más relevantes en la siguiente tabla.

ALDEHÍDO EMPLEADO	RUTA SINTÉTICA	CANTIDADES EMPLEADAS
4-hidroxibenzaldehído	<p data-bbox="575 310 1682 396"><b>5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N</i>-[(<i>E</i>)-4-hidroxibenciliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida</b></p> 	<p data-bbox="1717 310 1957 342">Carbohidrazida:</p> <p data-bbox="1797 363 1877 396">0.4 g</p> <p data-bbox="1717 417 1957 449">Aldehído: 1.1 eq.</p>
3,4-dihidroxibenzaldehído	<p data-bbox="575 748 1682 834"><b>5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N</i>-[(<i>E</i>)-(3,4-dihidroxibenciliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida</b></p> 	<p data-bbox="1717 748 1957 781">Carbohidrazida:</p> <p data-bbox="1797 802 1877 834">0.4 g</p> <p data-bbox="1717 855 1957 888">Aldehído: 1.1 eq.</p>
4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído	<p data-bbox="575 1154 1682 1240"><b>5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-<i>N</i>-[(<i>E</i>)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenciliden]-4-metil-1<i>H</i>-pirazol-3-carbohidrazida</b></p>	<p data-bbox="1717 1154 1957 1187">Carbohidrazida:</p> <p data-bbox="1797 1208 1877 1240">0.4 g</p> <p data-bbox="1717 1261 1957 1294">Aldehído: 1.1 eq.</p>

<b>4-hidroxi-3-metoxicinamaldehído</b>	<p><b>5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(1E, 2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)aliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida</b></p>	<p>Carbohidrazida: 0.4 g Aldehído: 1.1 eq.</p>
<b>3,4-dimetoxibenzaldehído</b>	<p><b>5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-3,4-dimetoxibenciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida</b></p>	<p>Carbohidrazida: 0.4 g Aldehído: 1.1 eq.</p>
<b>4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamaldehído</b>	<p><b>5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)aliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida</b></p>	<p>Carbohidrazida: 0.4 g</p>

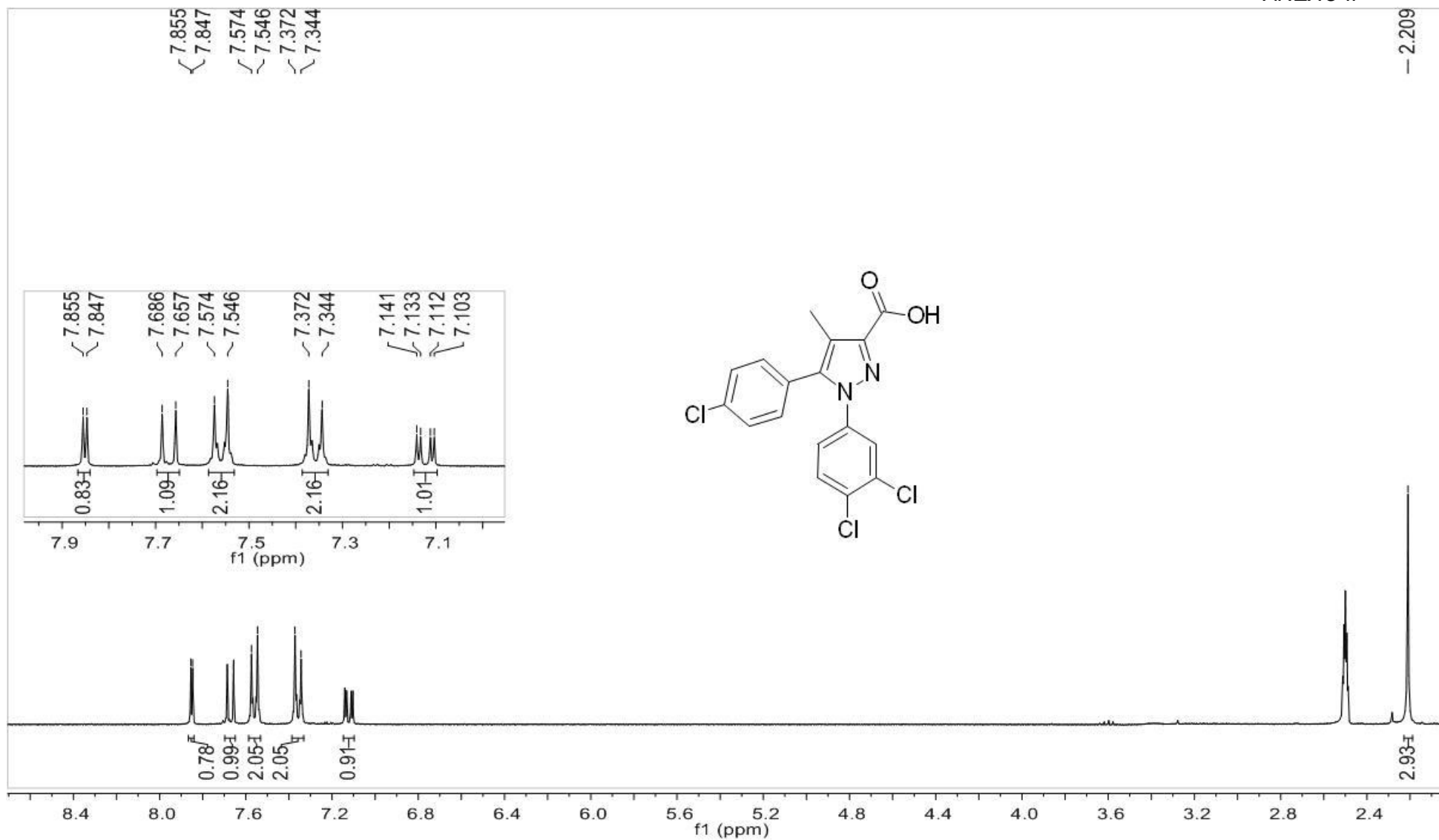
		Aldehído: 1.1 eq.
<b>1,4-benzodioxan-6-carboxialdehído</b>	<p><b>5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)metiliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida</b></p> 	Carbohidrazida: 0.4 g Aldehído: 1.1 eq.
<b>2,4-dihidroxibenzaldehído</b>	<p><b>5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-(2,4-dihidroxibenciliden)-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida</b></p> 	Carbohidrazida: 0.4 g Aldehído: 1.1 eq.

## **ANEXO II. Caracterización de los compuestos finales.**

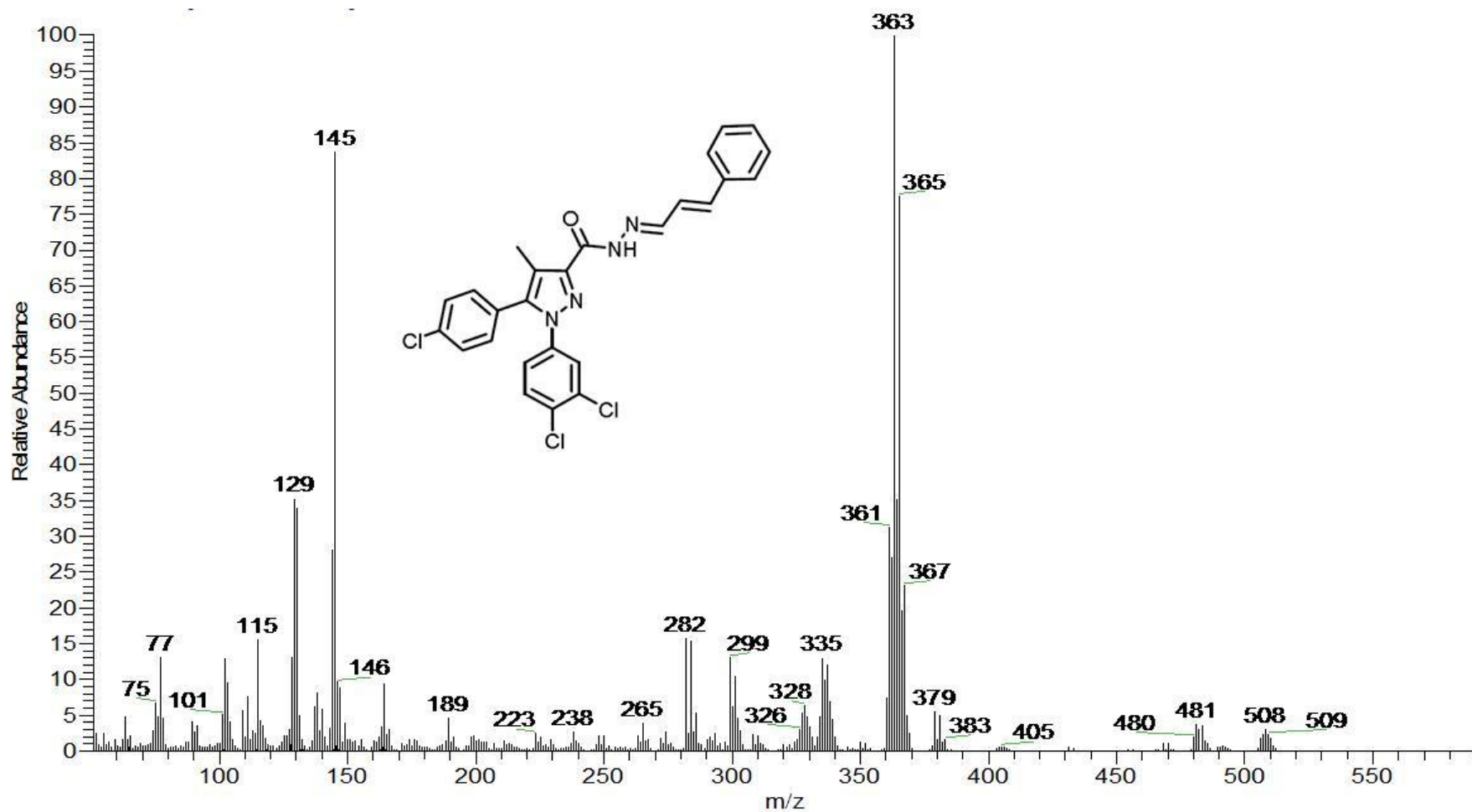


**Espectro compuesto 13.** EM (FAB) Ácido 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico.

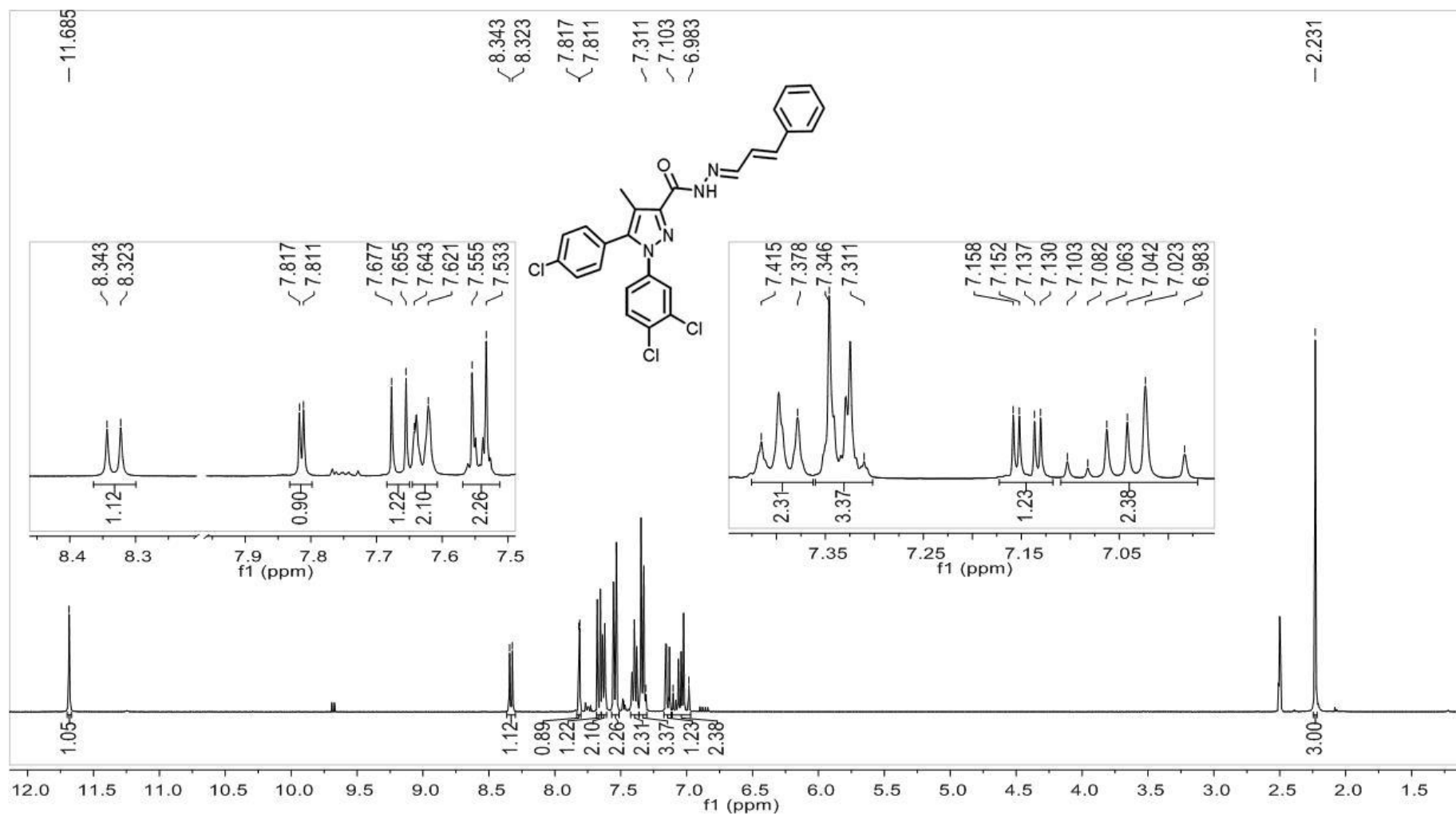




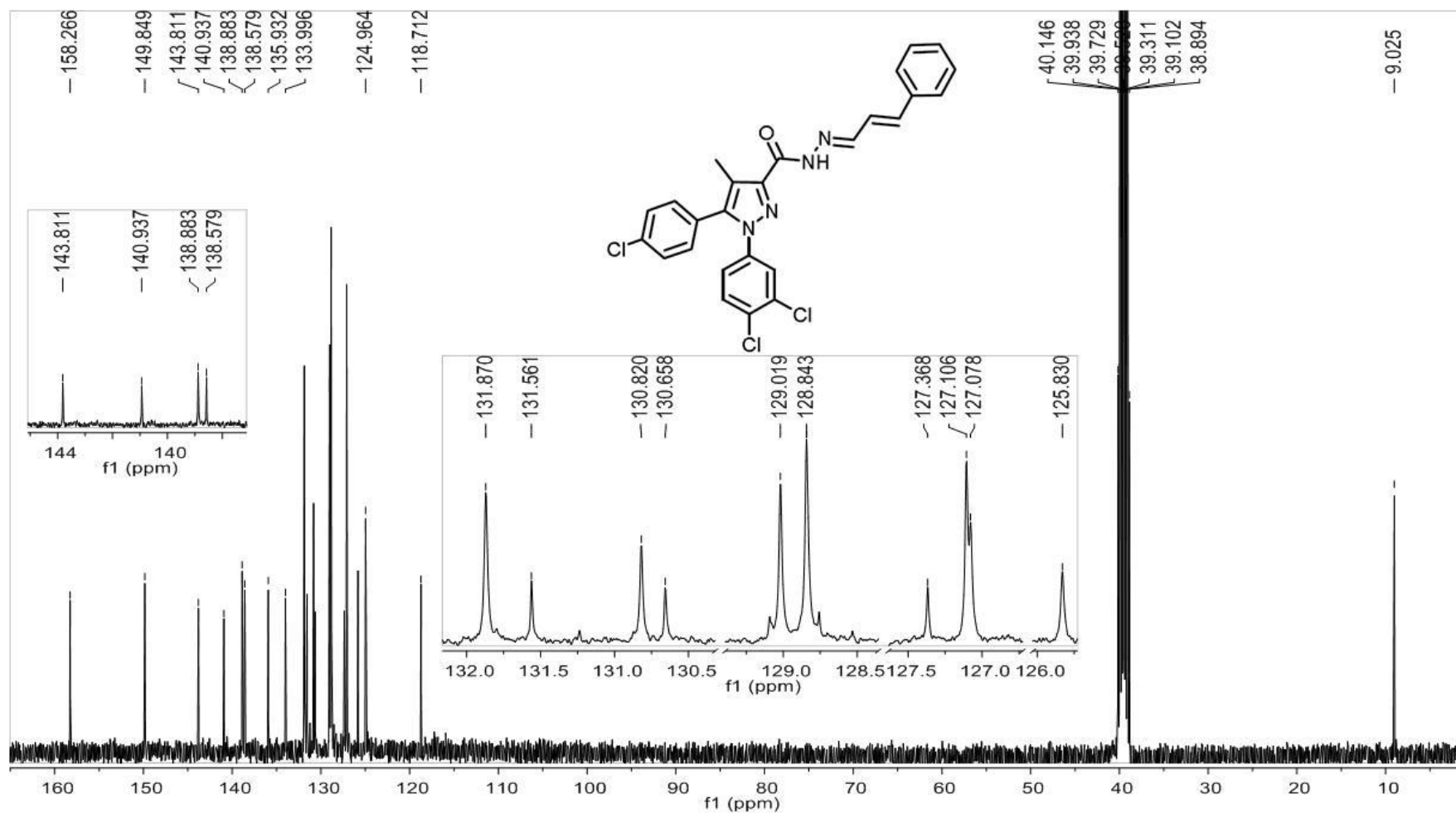
**Espectro compuesto 13.** RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) Ácido 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico.



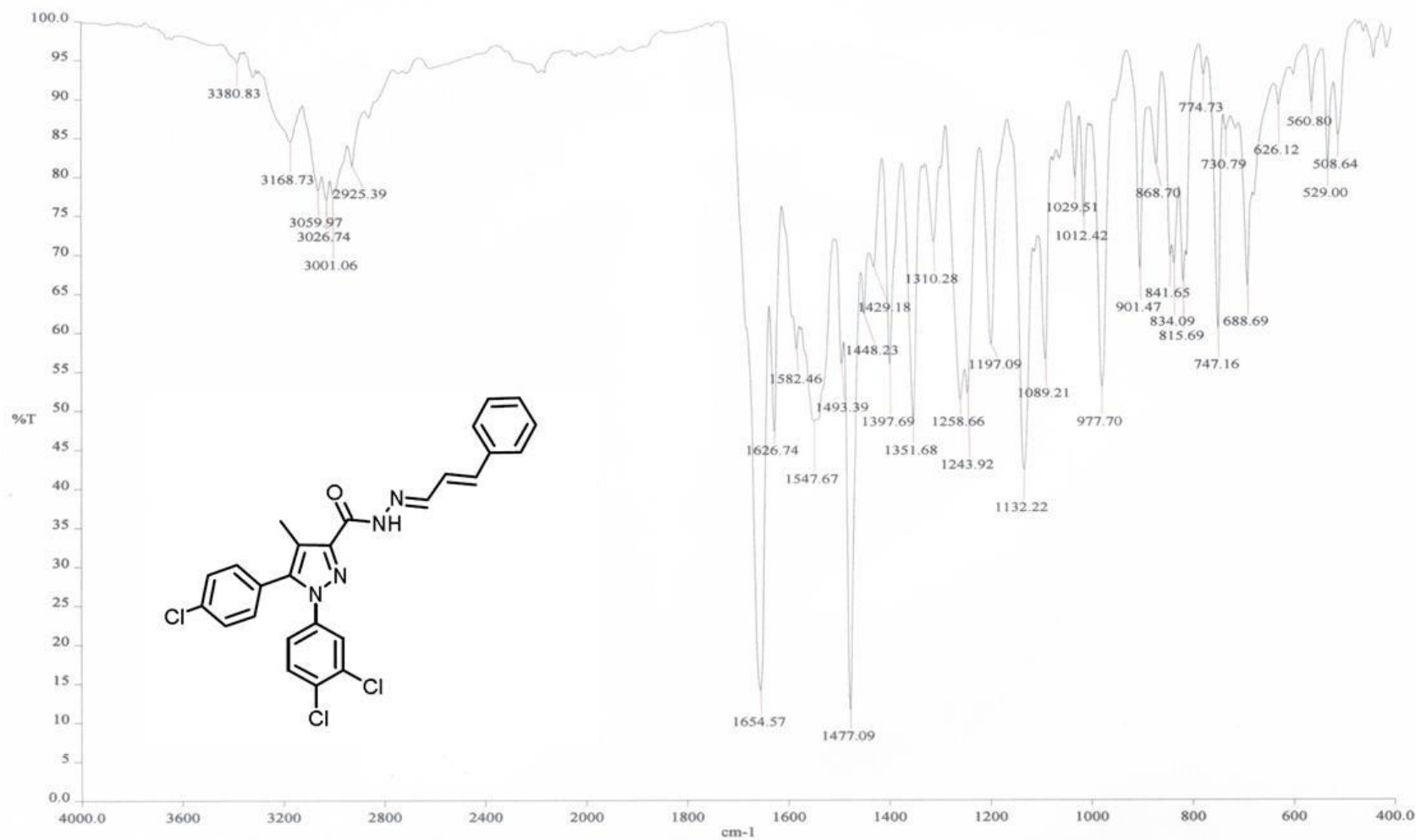
**Compuesto 1.** EM (IE) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N'-[(1E, 2E)-3-fenilaliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida



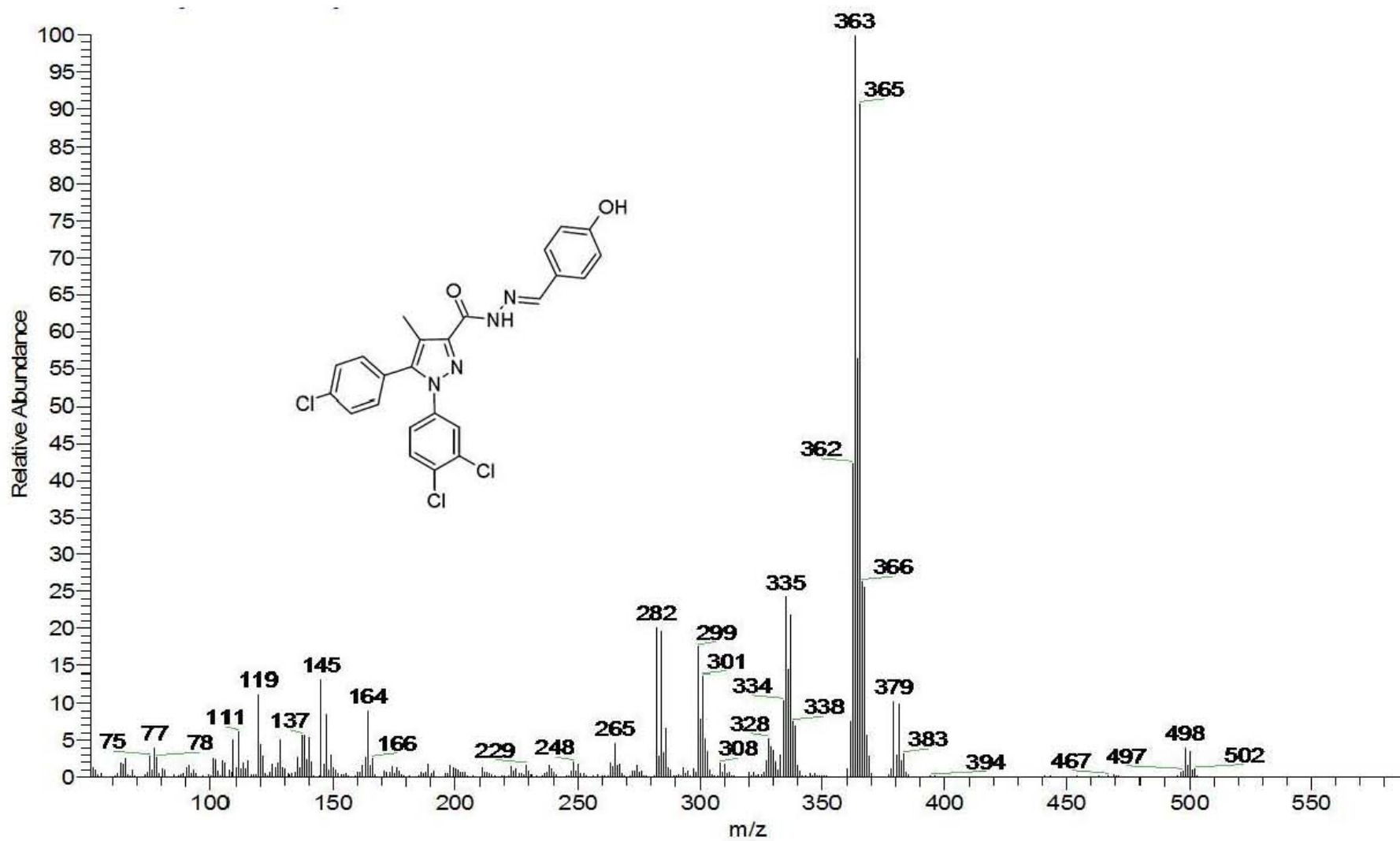
**Compuesto 1.** RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N'-[(1E, 2E)-3-fenilaliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida



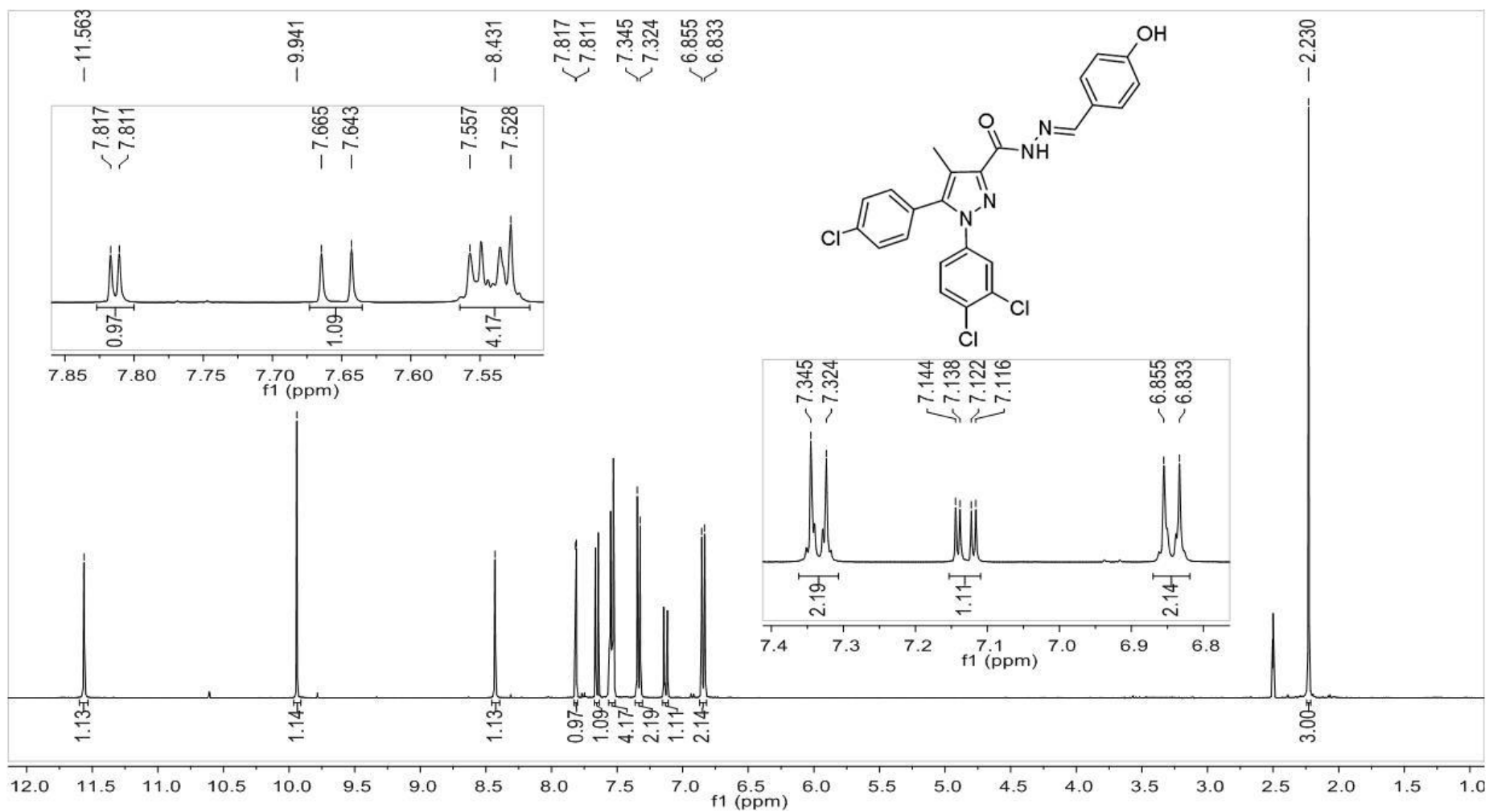
**Compuesto 1.** RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N'-[(1E, 2E)-3-fenilaliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida



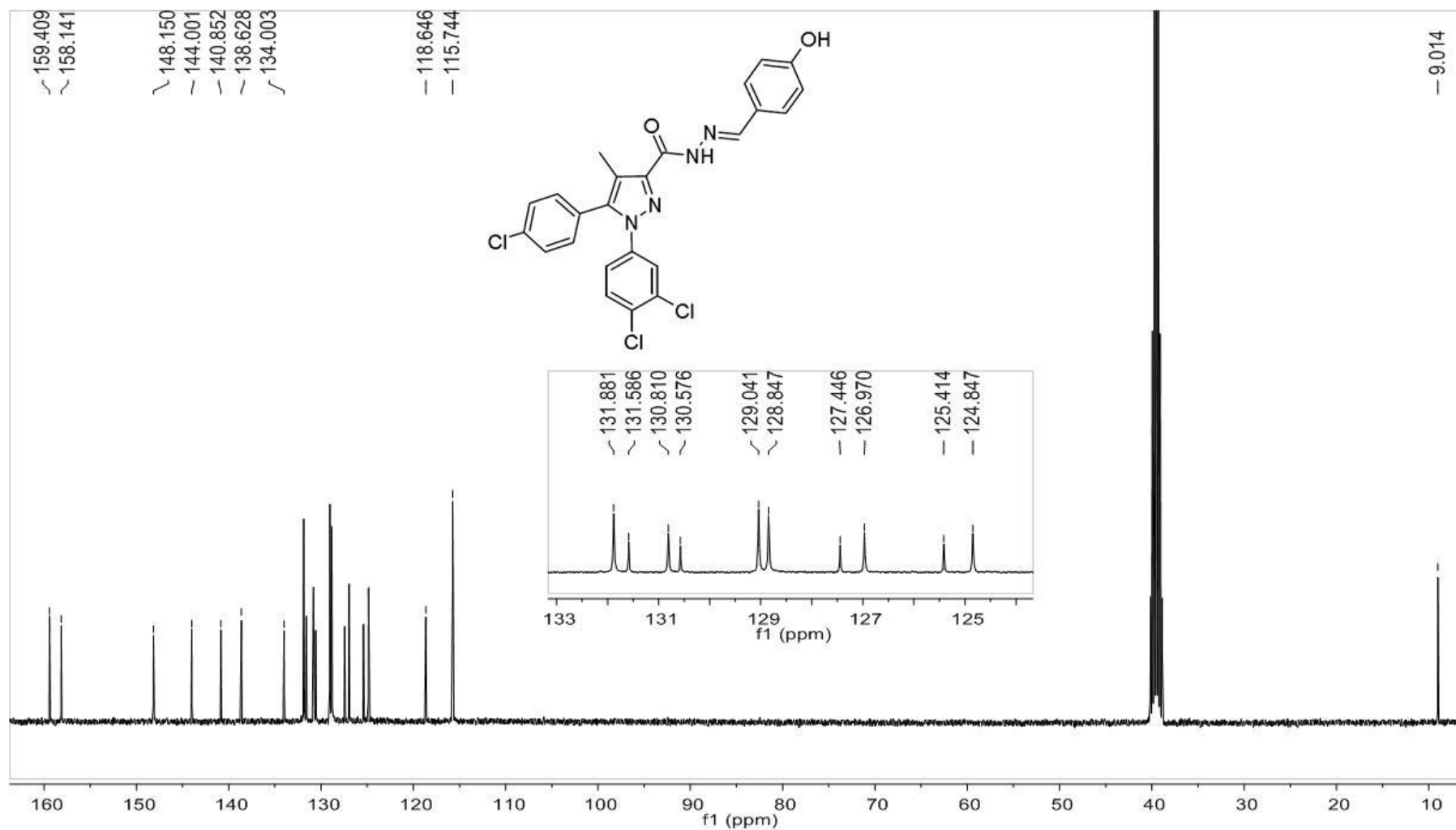
**Compuesto 1.** IR (Reflectancia) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N'-[(1E, 2E)-3-fenilaliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida



**Compuesto 2.** EM (IE) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-4-hidroxienciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.

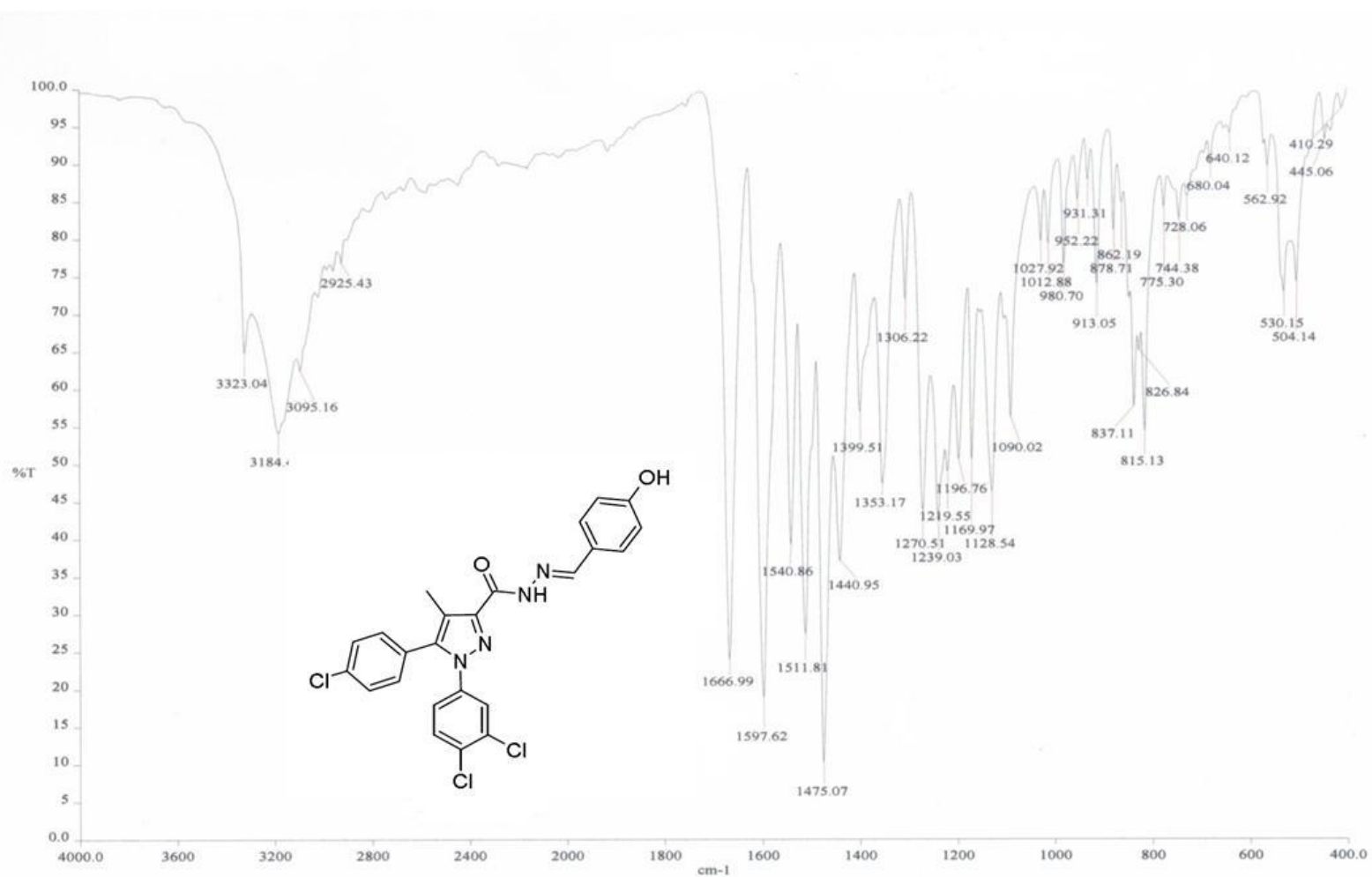


**Compuesto 2.** RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-4-hidroxibenciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.

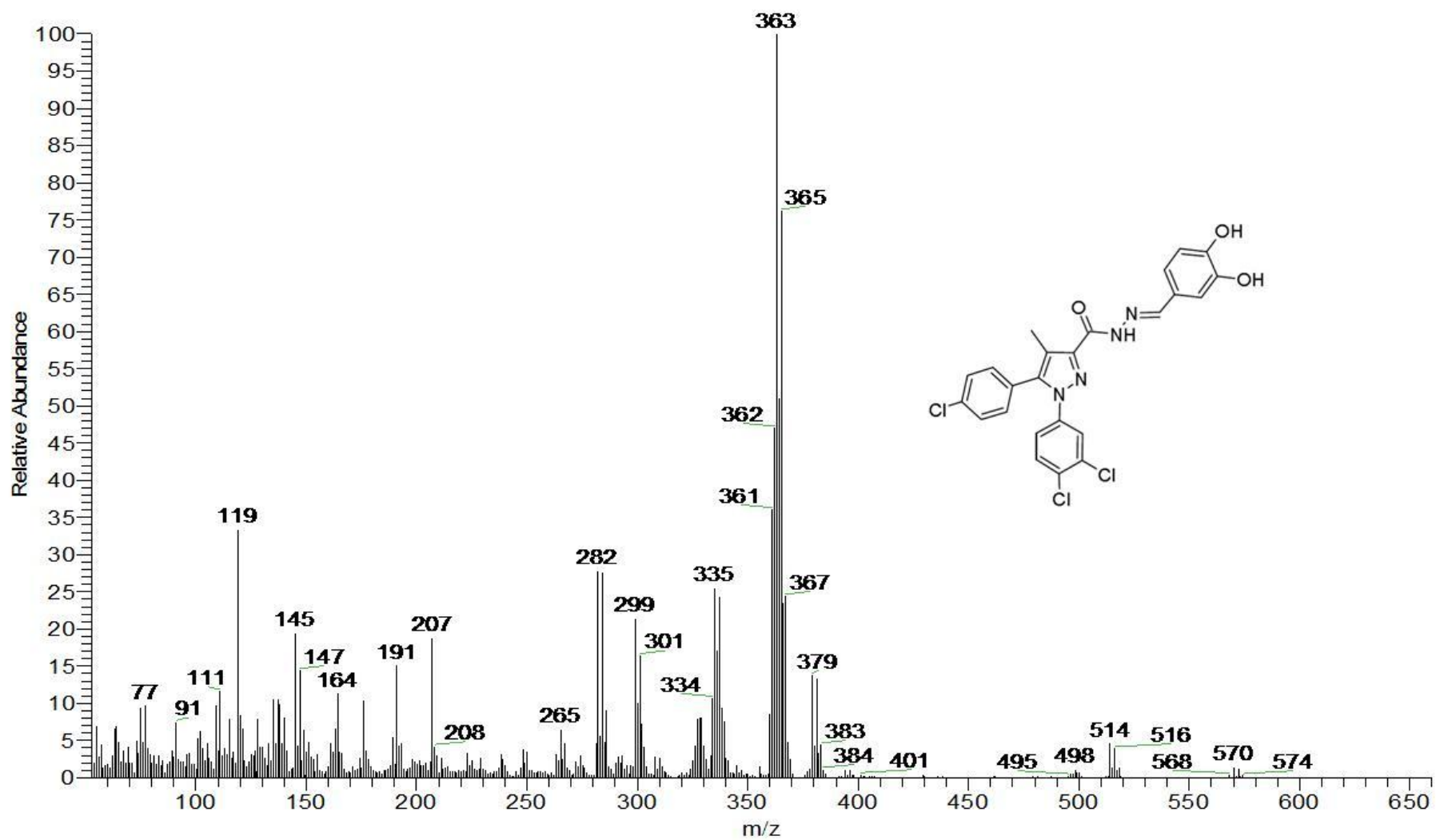


**Compuesto 2.** RMN- $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-4-hidroxi-benciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.

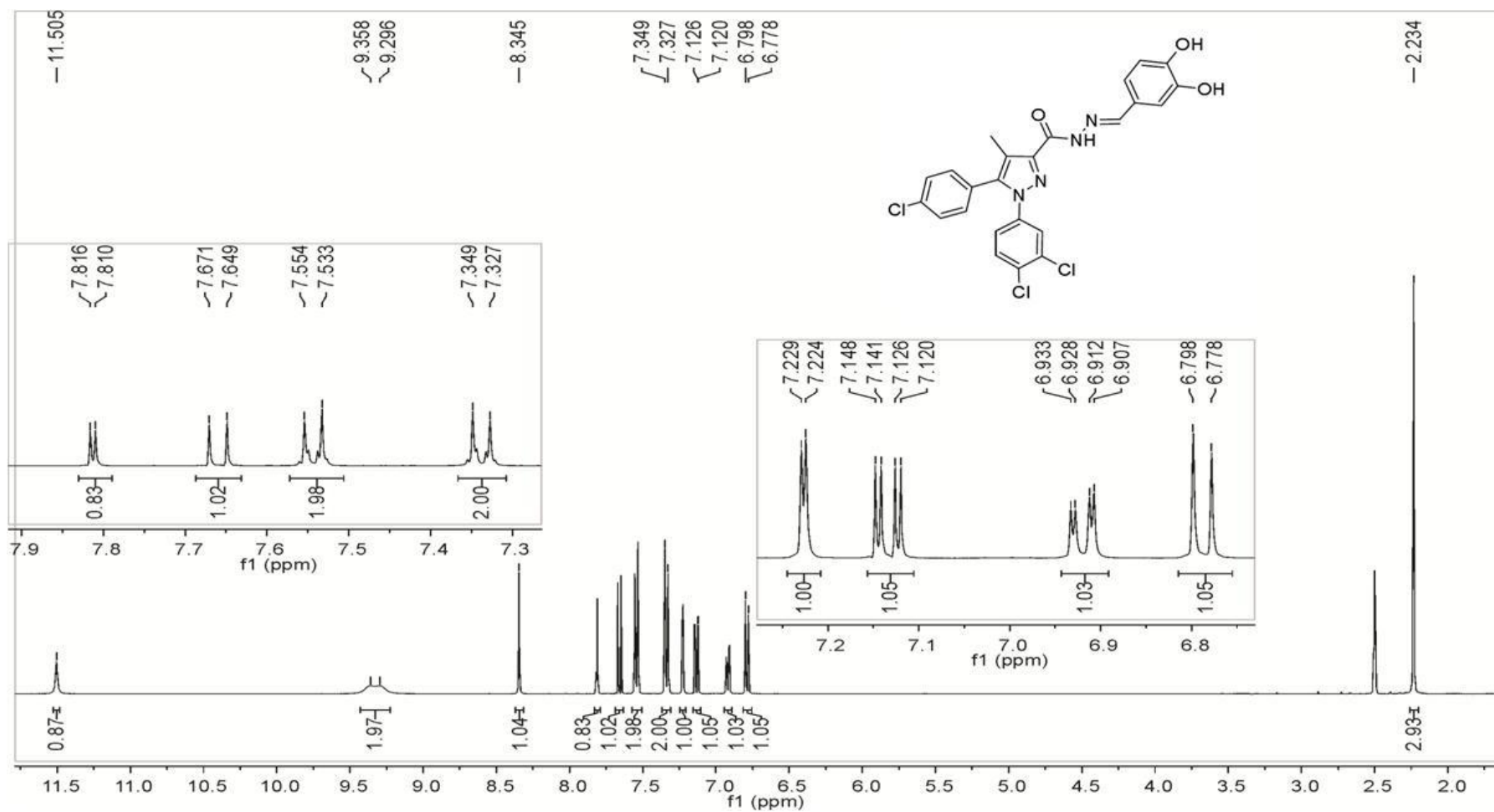




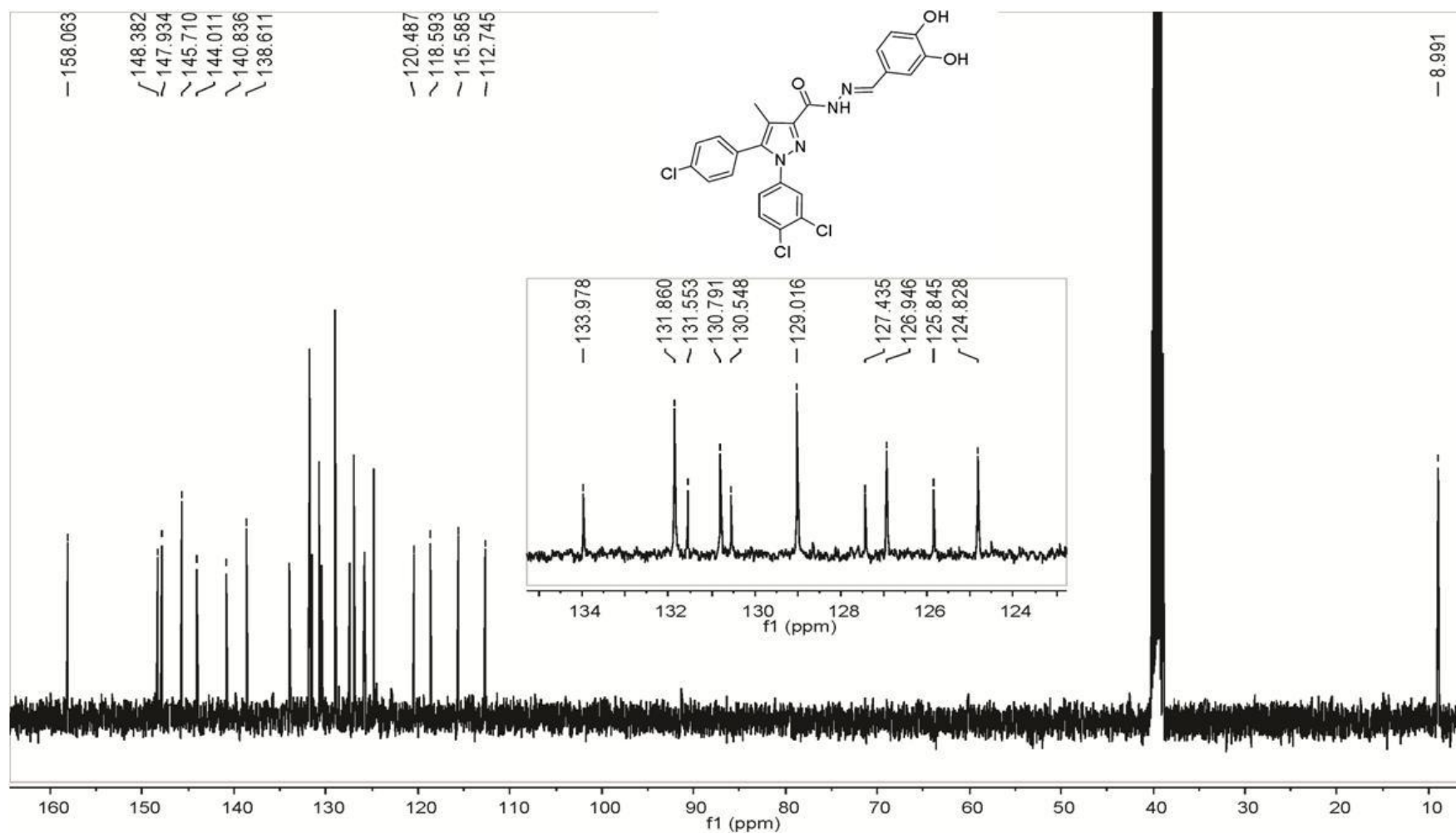
**Compuesto 2.** IR (Reflectancia) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-4-hidroxibenciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.



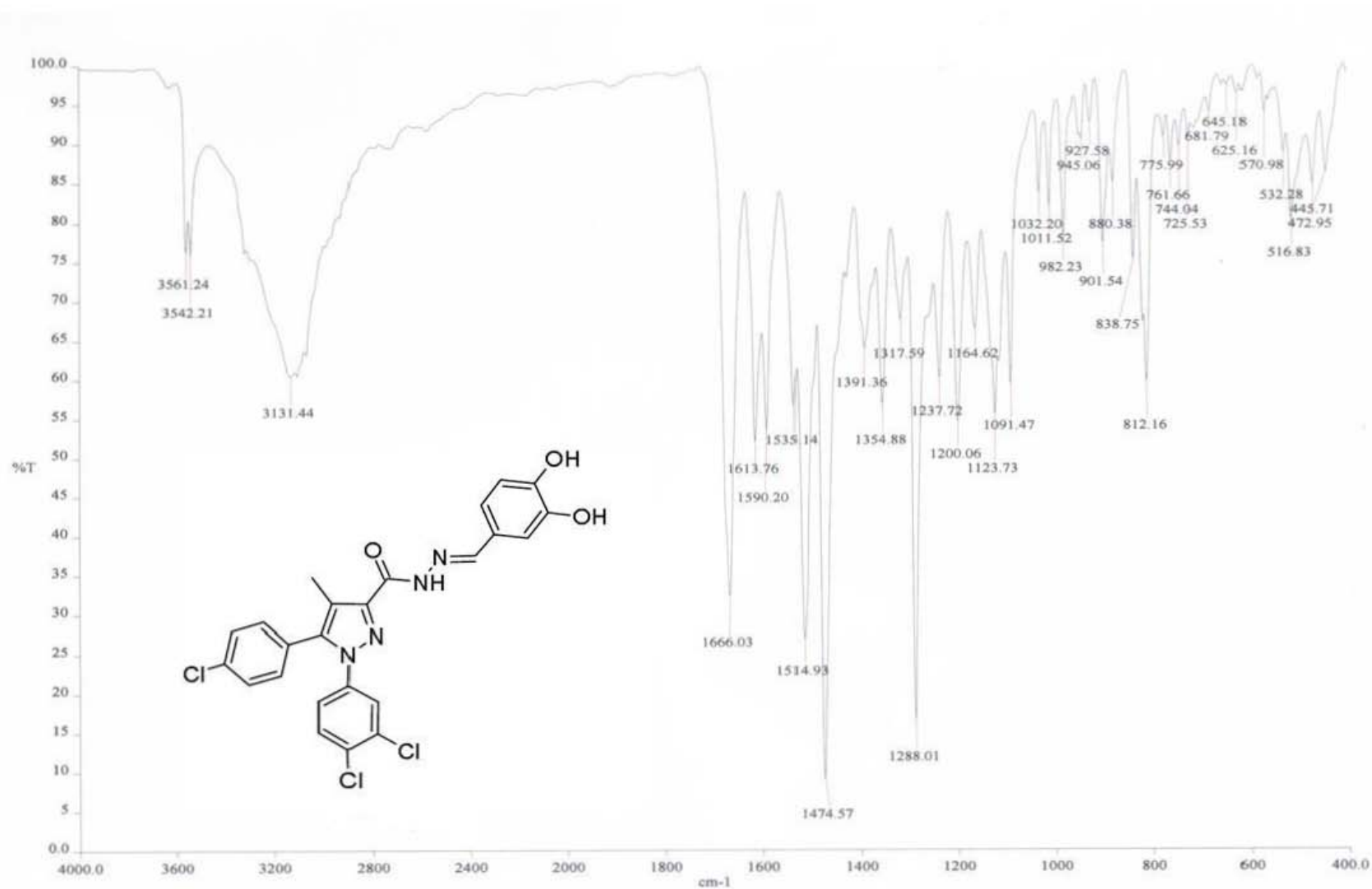
**Compuesto 3.** EM (IE) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-3,4-dihidroxi-benciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.



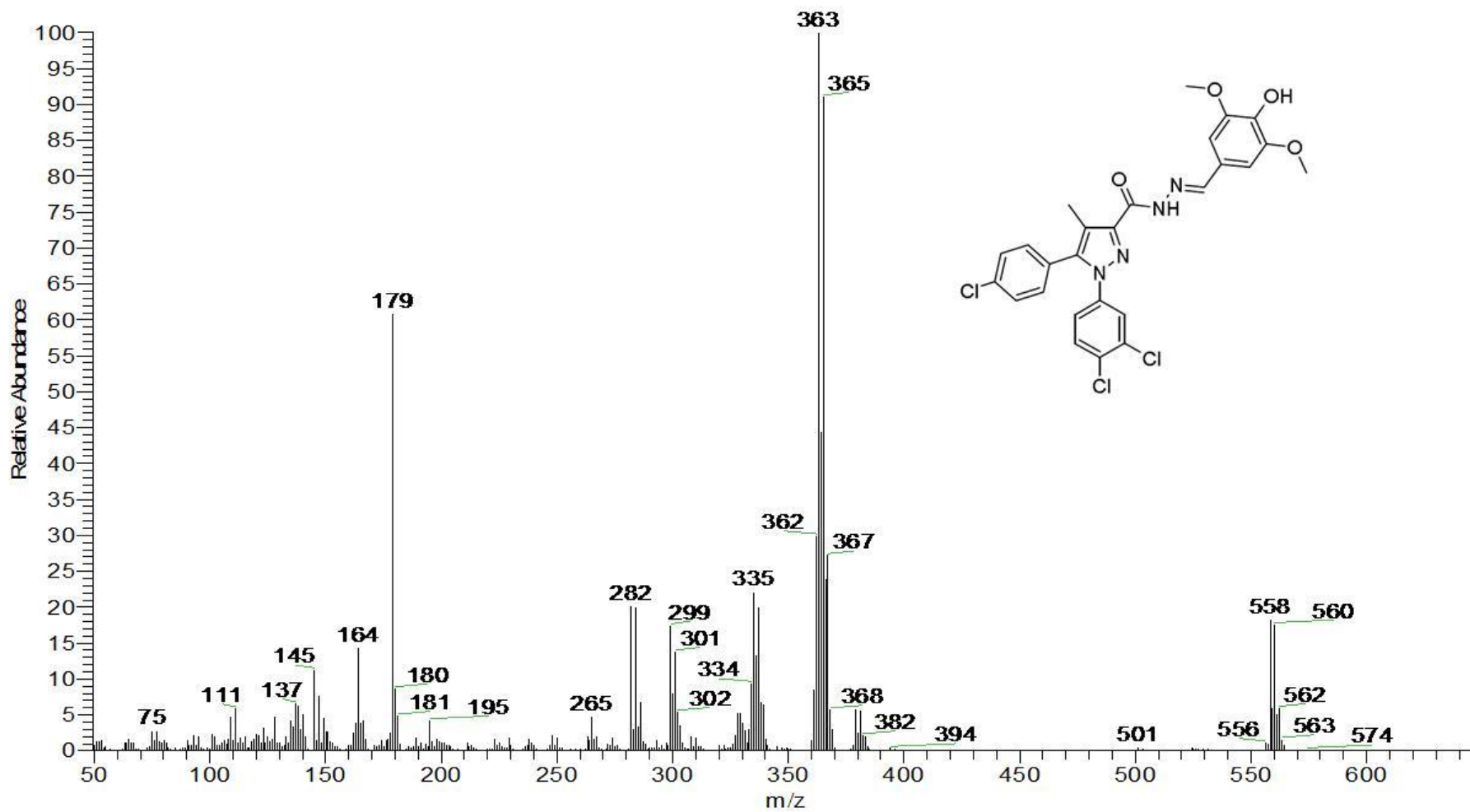
**Compuesto 3.** RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N'-[(E)-3,4-dihidroxi-benciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbhidrazida



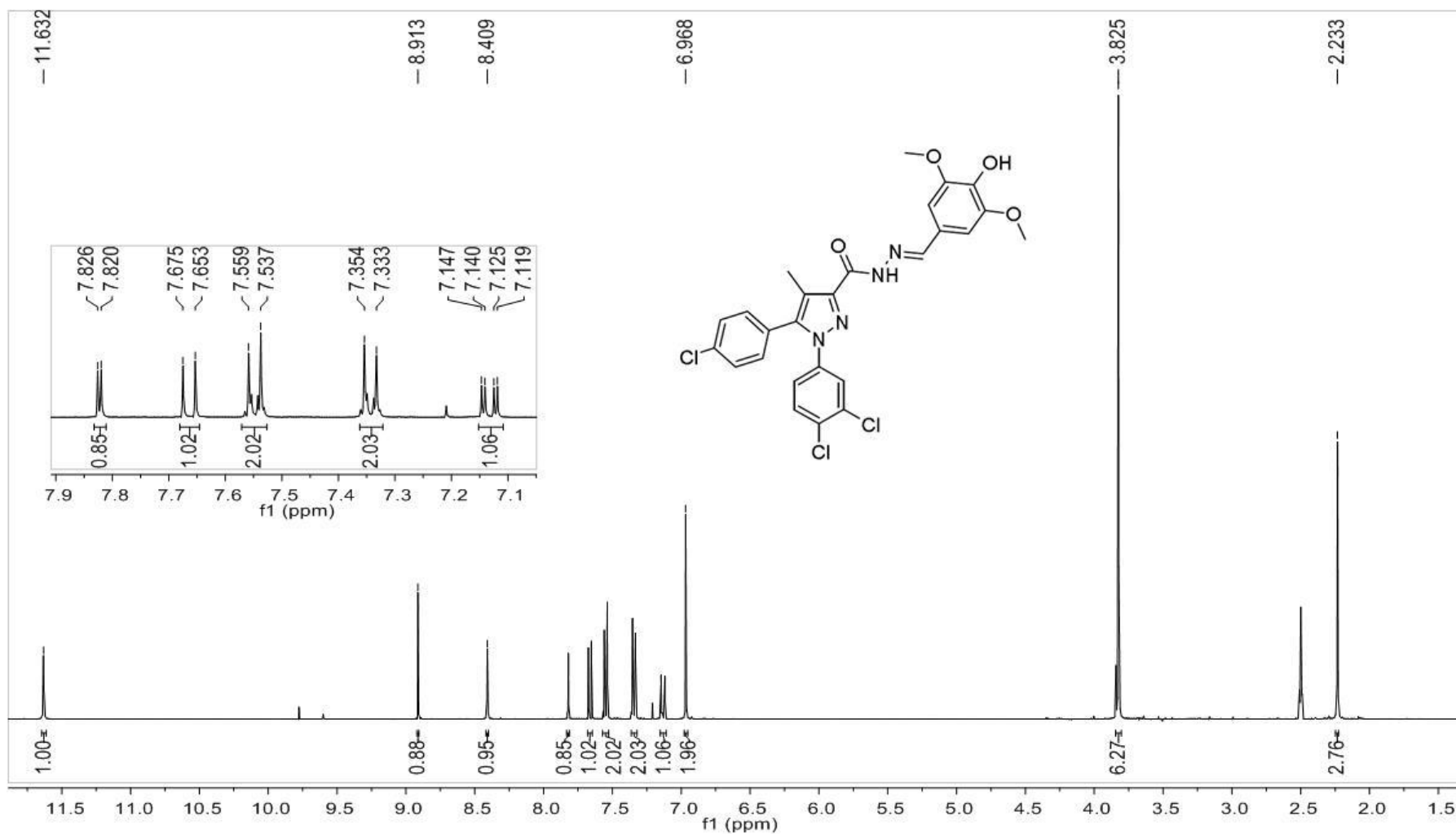
**Compuesto 3.** RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-3,4-dihidroxi-benciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida



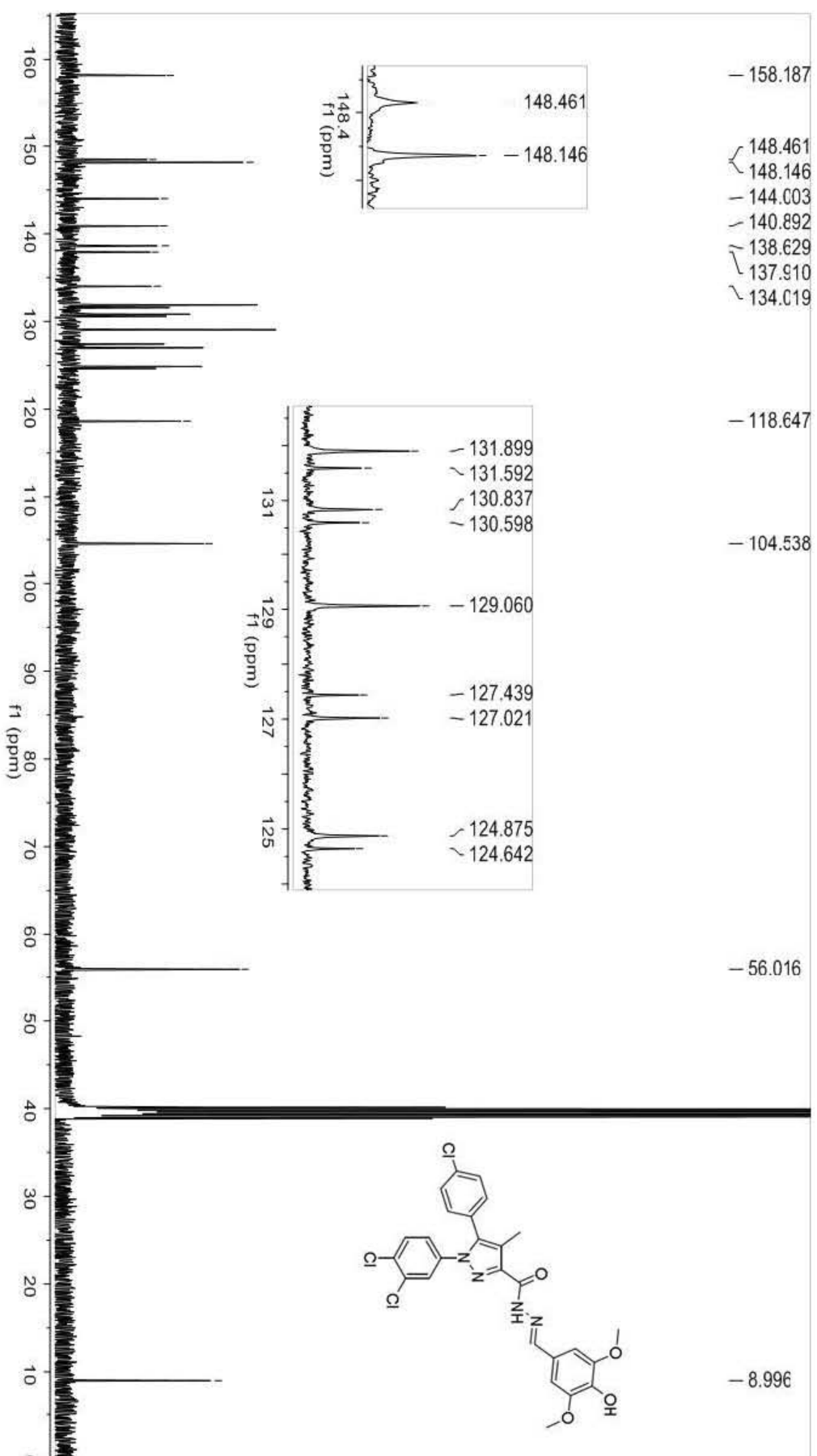
**Compuesto 3.** IR (Reflectancia) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-3,4-dihidroxi-benciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida



**Compuesto 4.** EM (IE) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(*E*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.

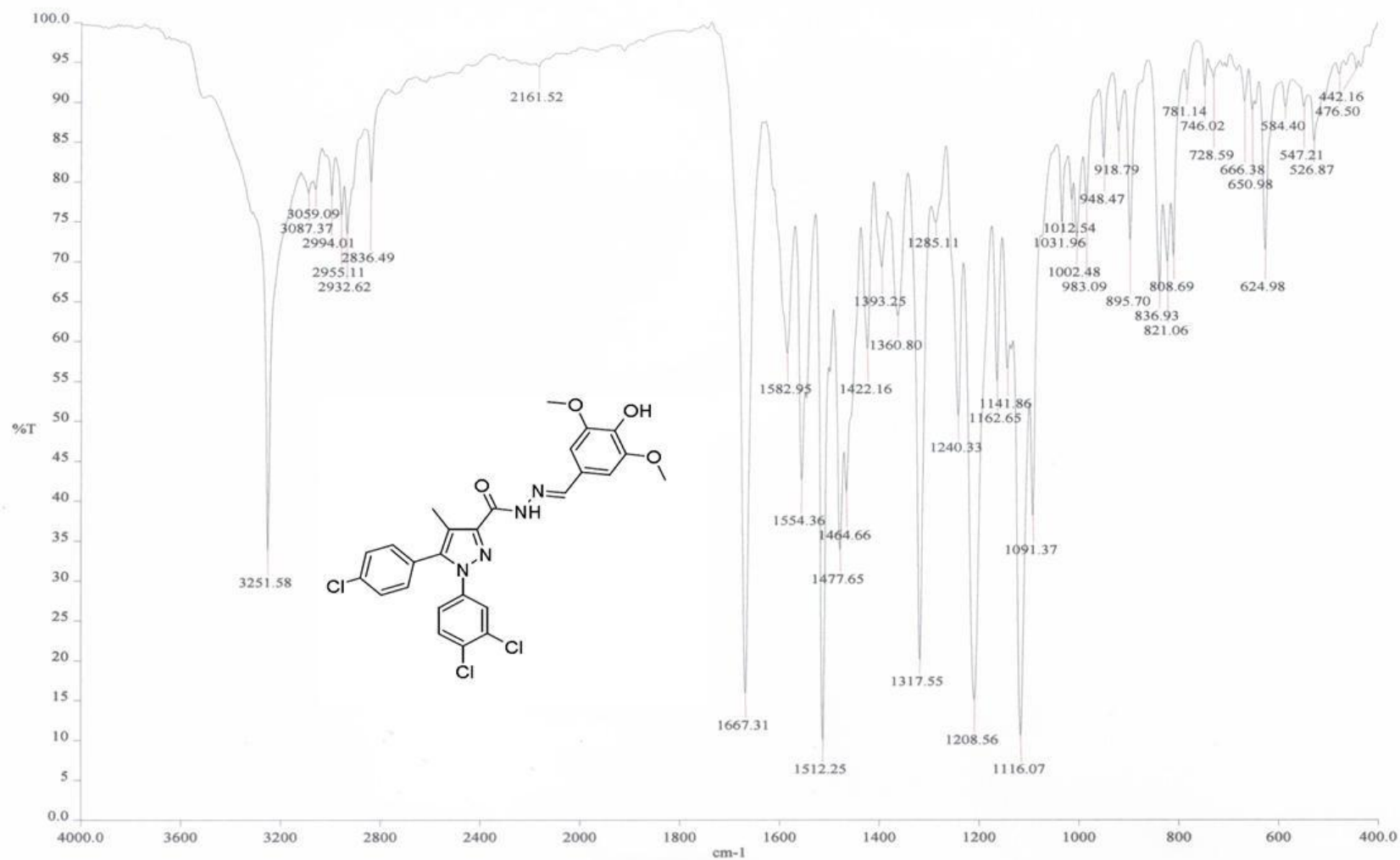


**Compuesto 4.** RMN- $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.

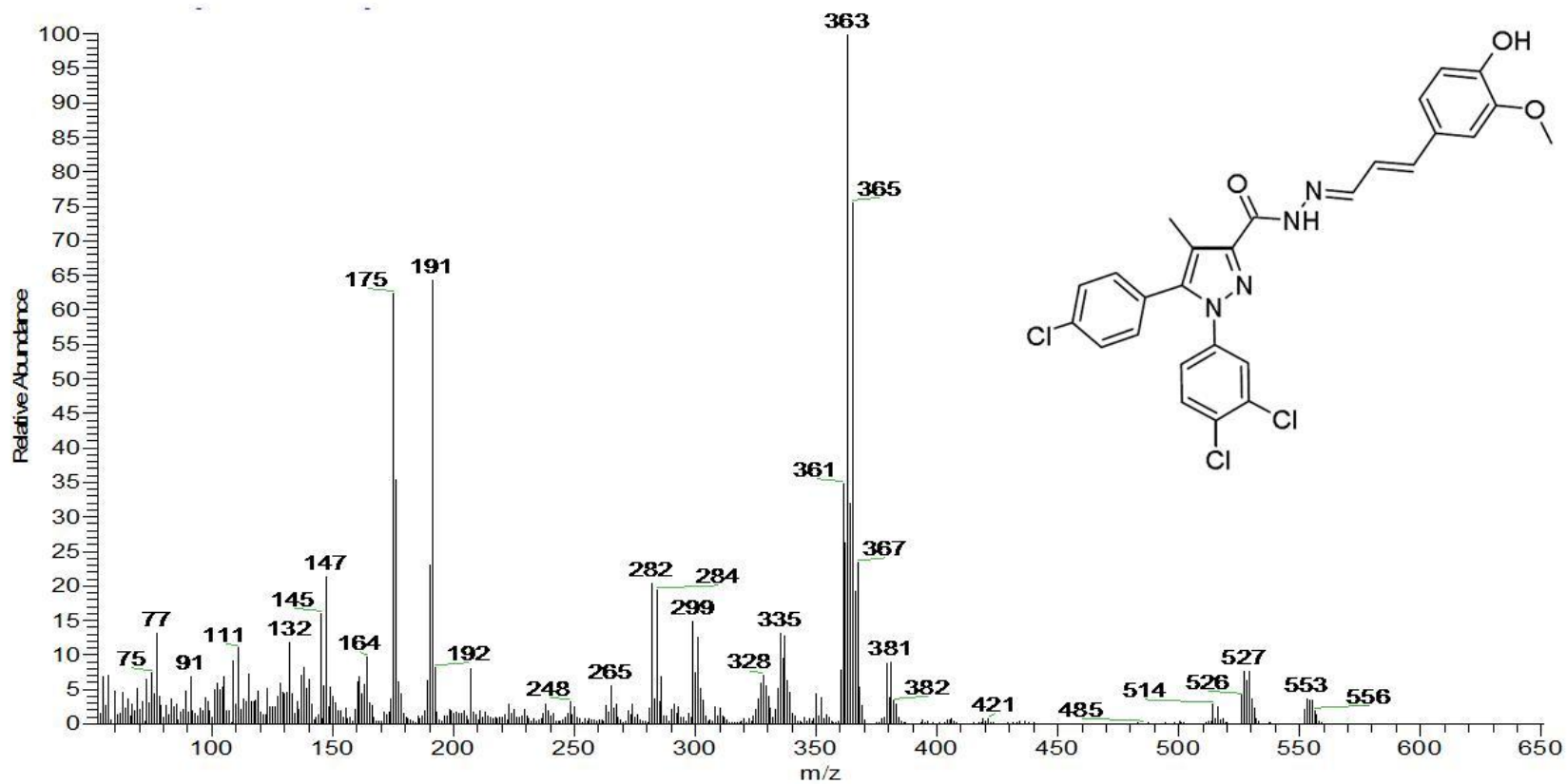


**Compuesto 4.** RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.

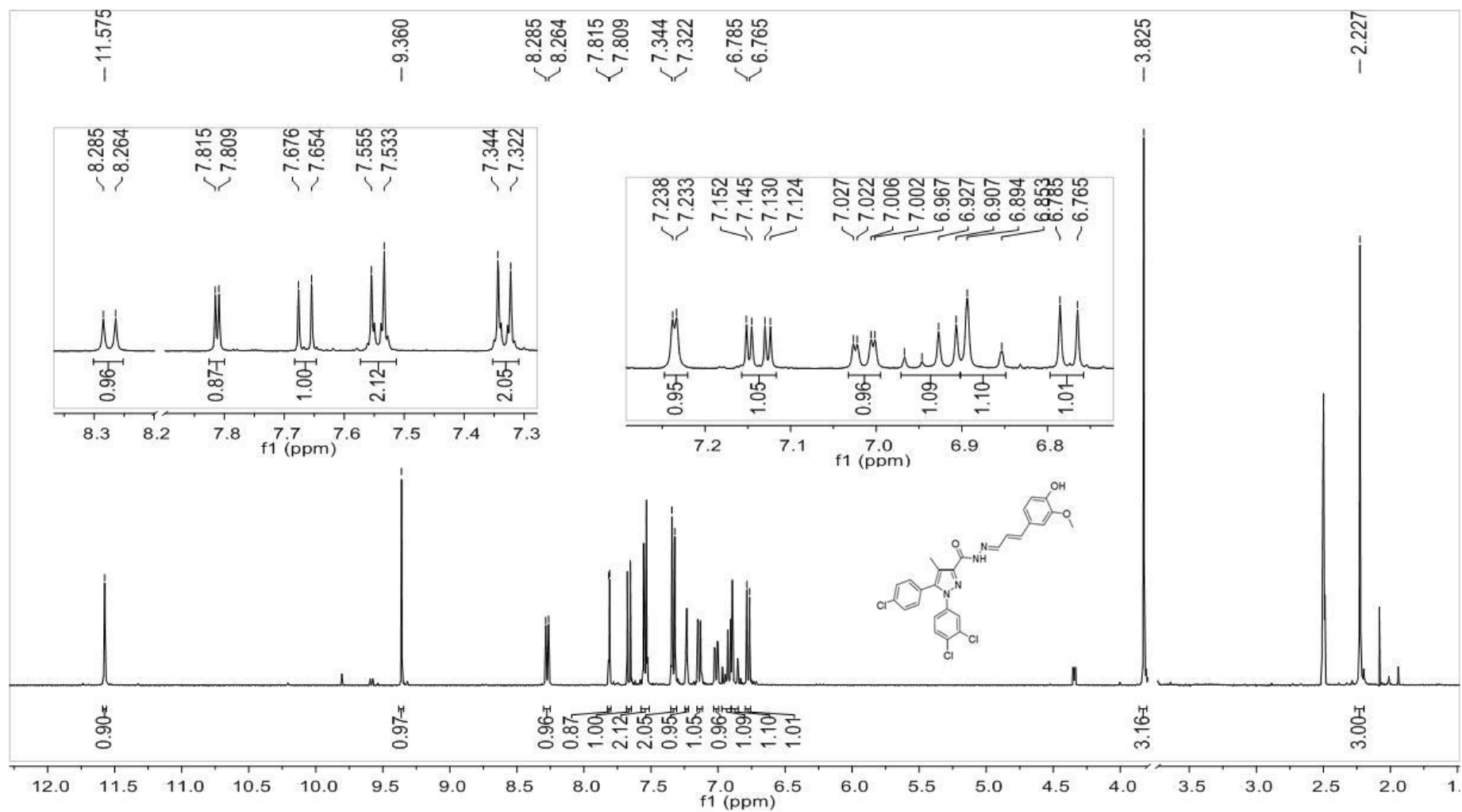




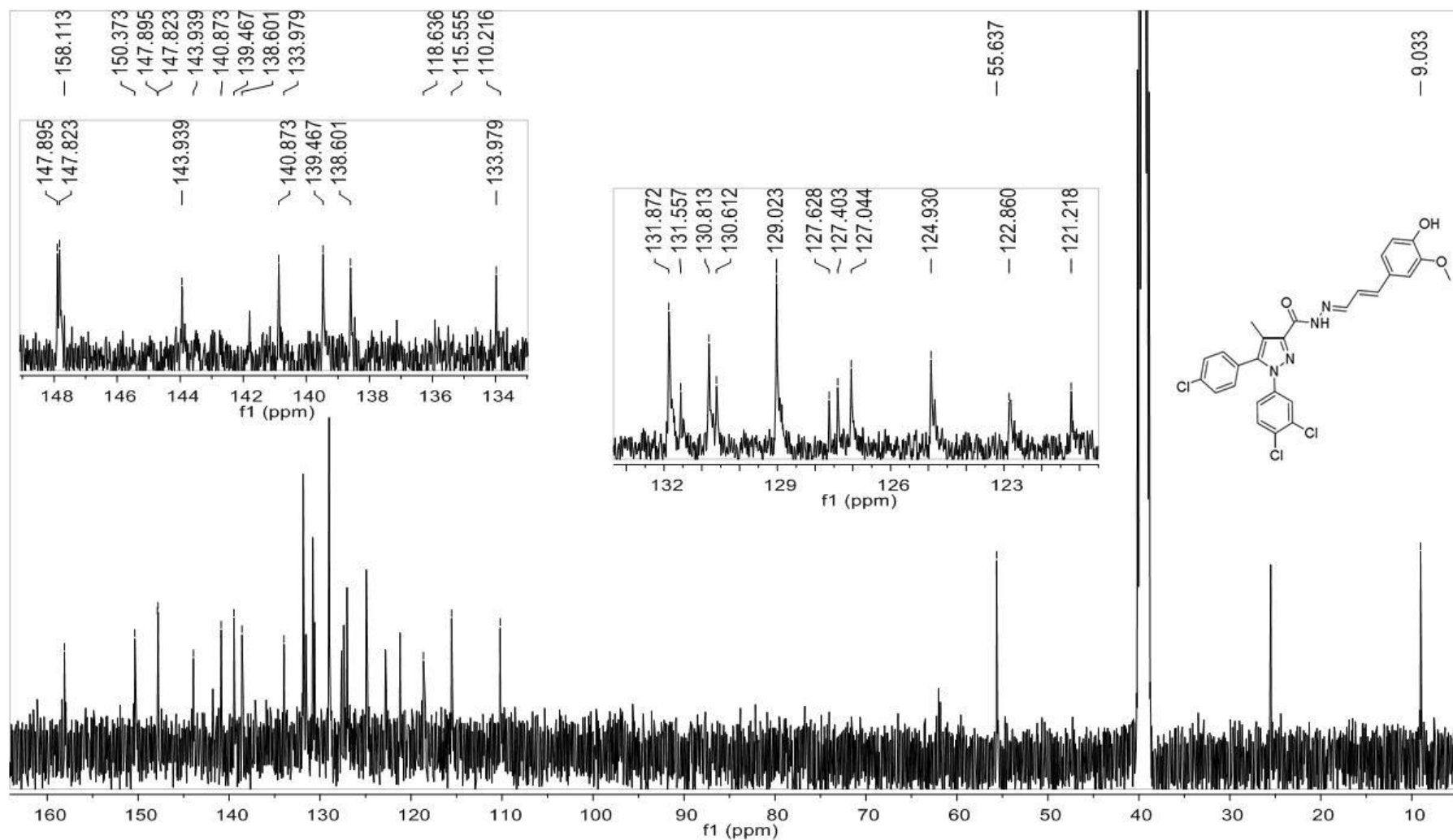
**Compuesto 4.** IR (Reflectancia) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-4-hidroxi-3,5-dimetoxibenciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



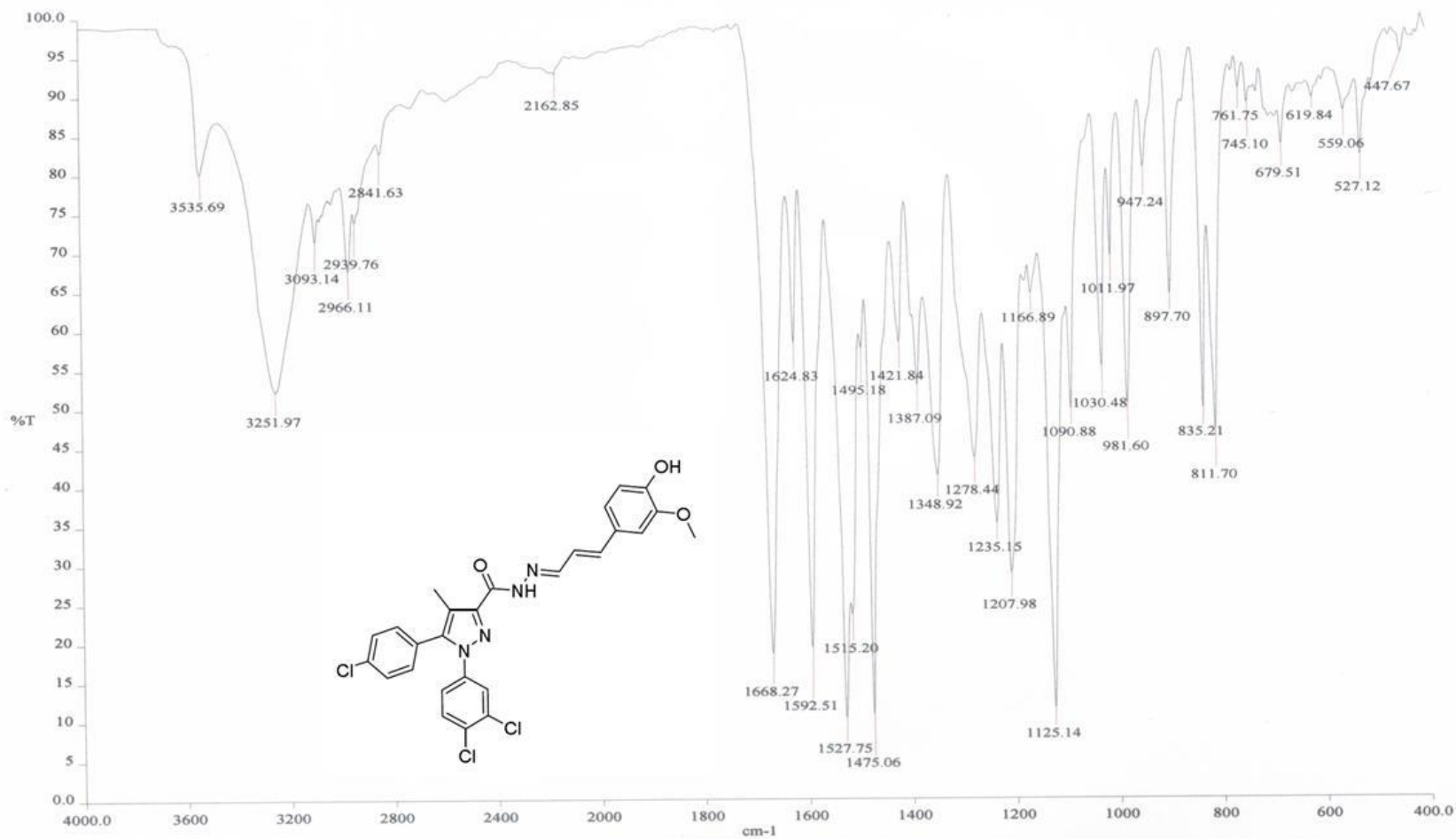
**Compuesto 5.** EM (IE) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N'-[(1E, 2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)aliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.



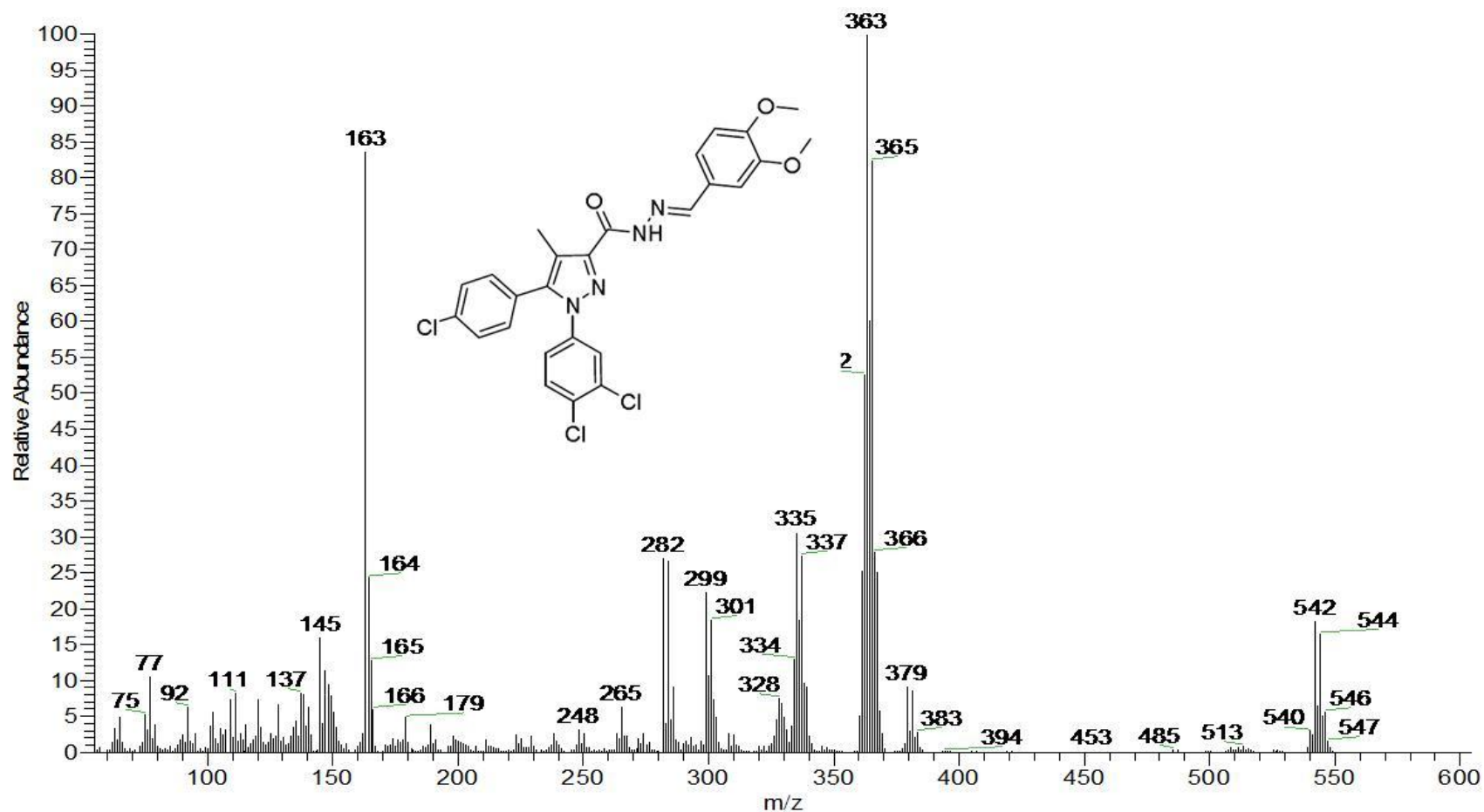
**Compuesto 5.** RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(1*E*, 2*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)aliliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



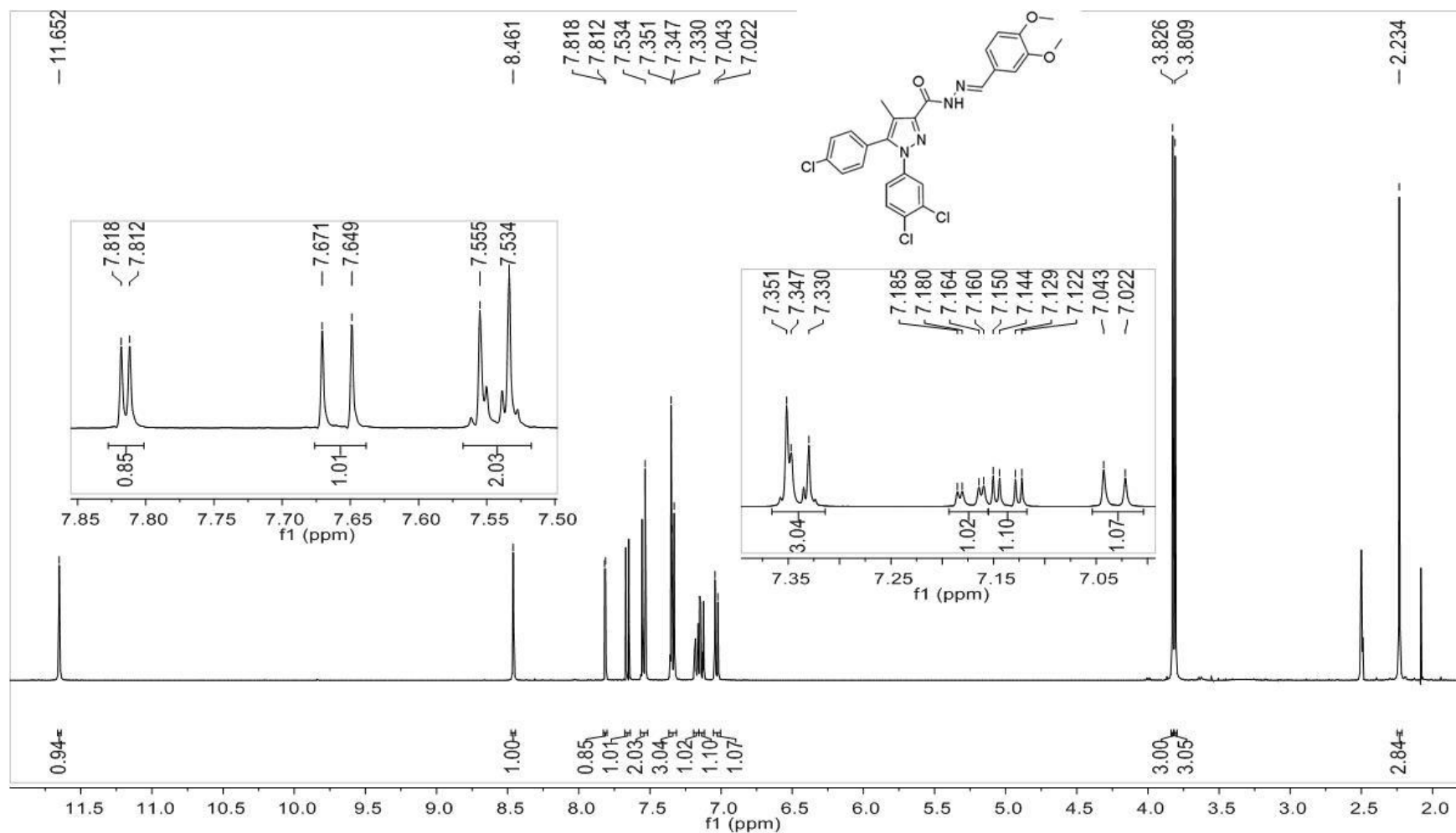
**Compuesto 5.** RMN- $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(1E, 2E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)aliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.



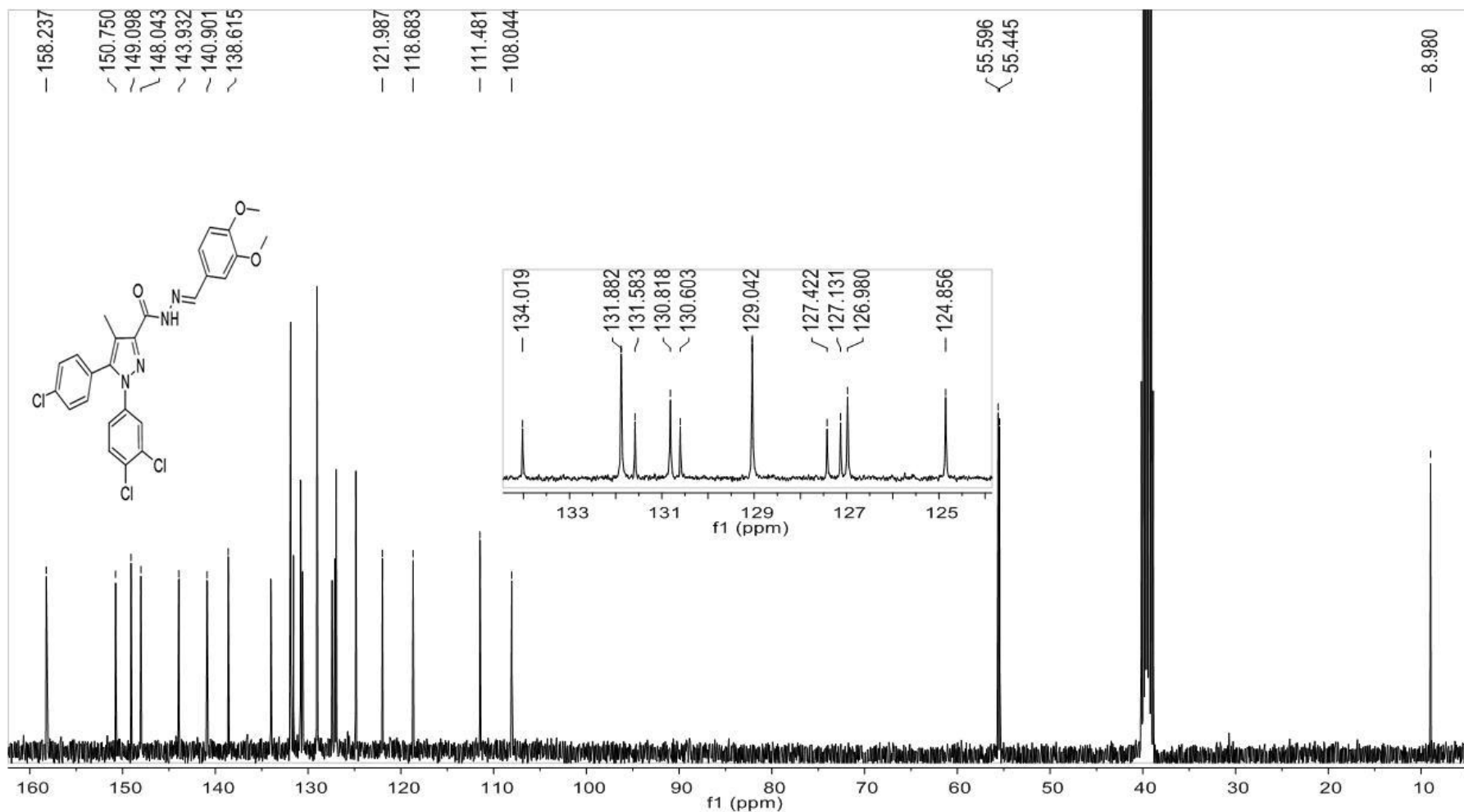
**Compuesto 5.** IR (Reflectancia) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(1*E*, 2*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)aliliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



**Compuesto 6.** EM (IE) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(*E*)-3,4-dimetoxibenciliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.

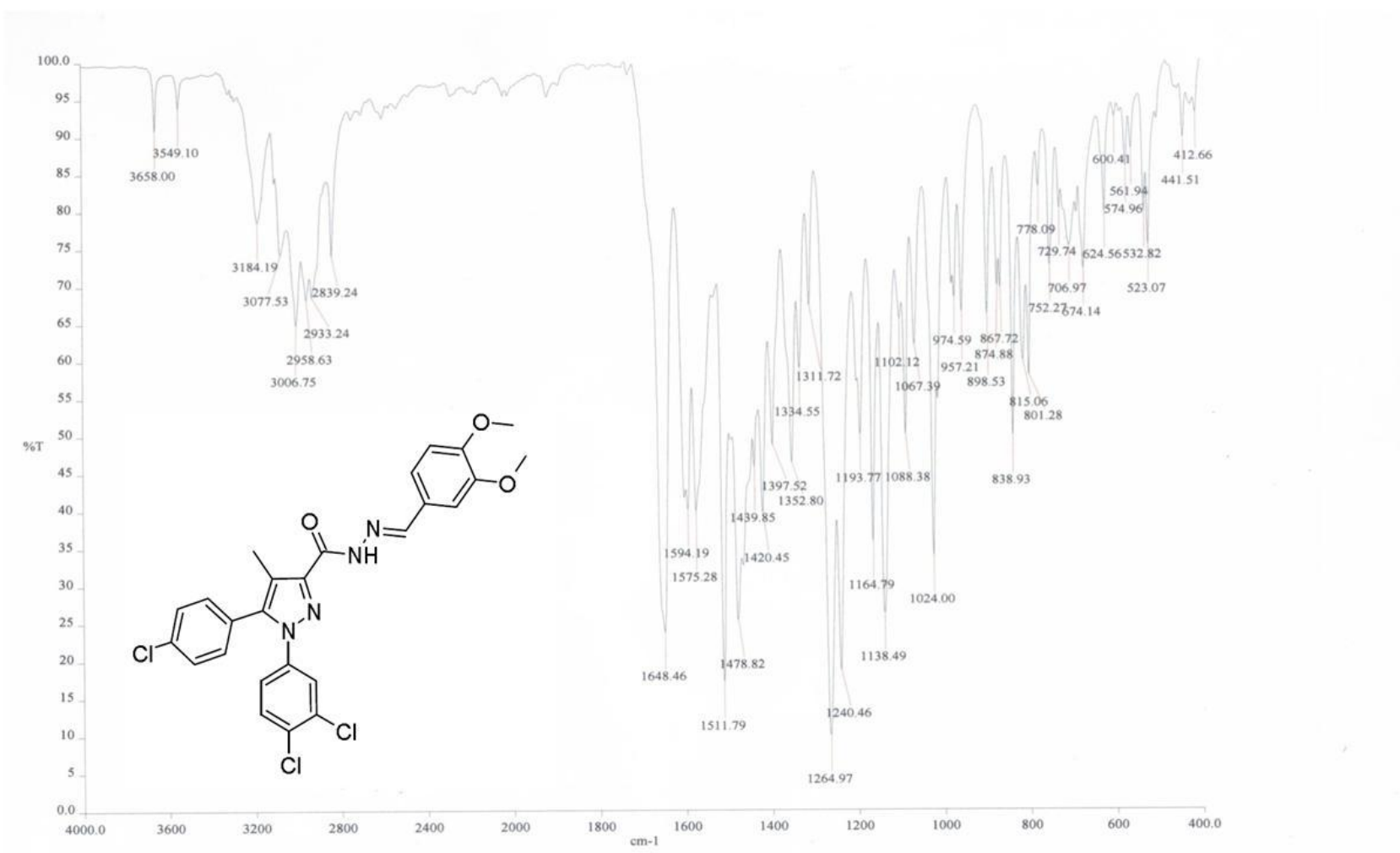


**Compuesto 6.** RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N'-[(E)-3,4-dimetoxibenciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida

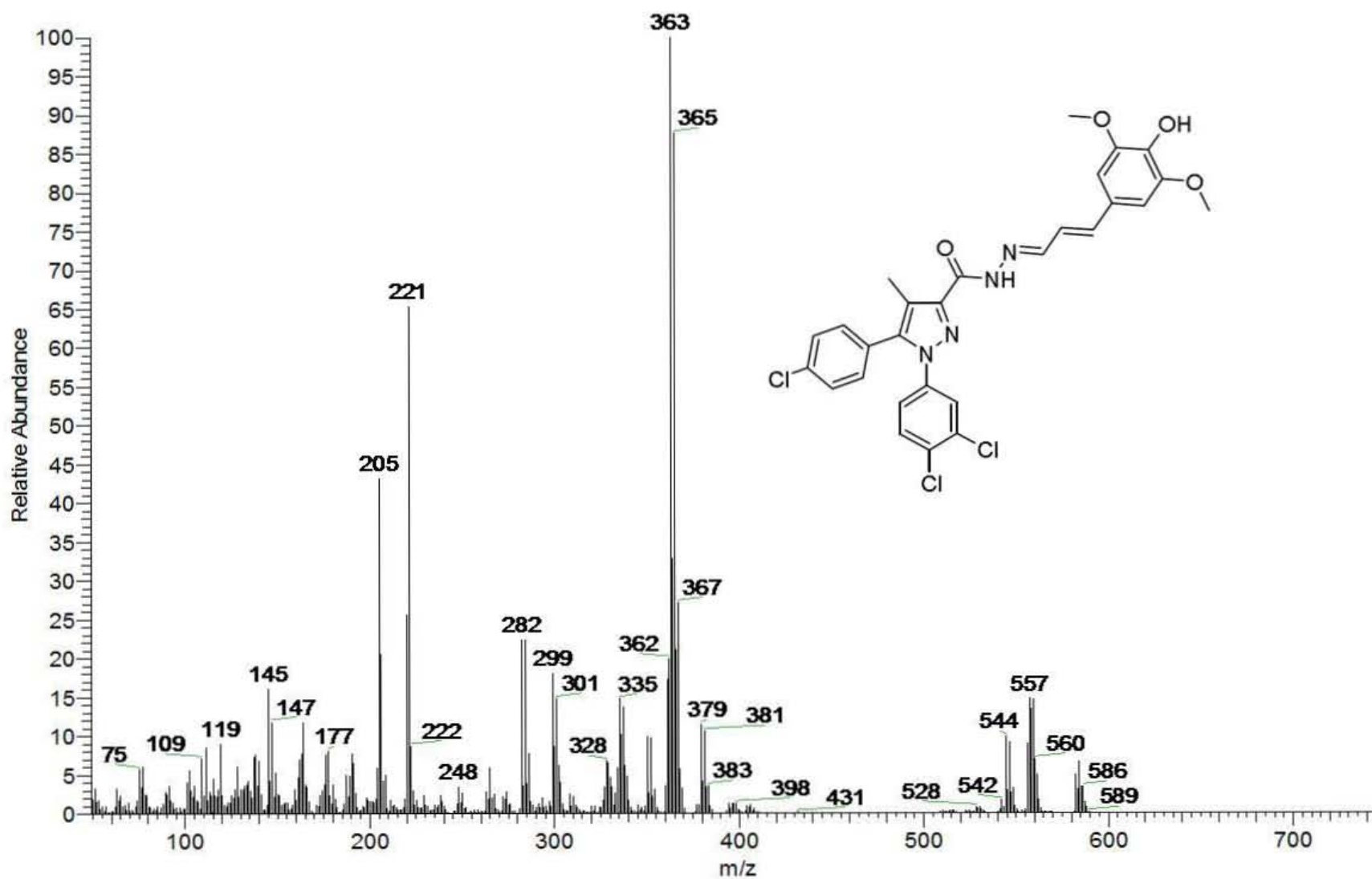


**Compuesto 6.** RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-3,4-dimetoxibenciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida

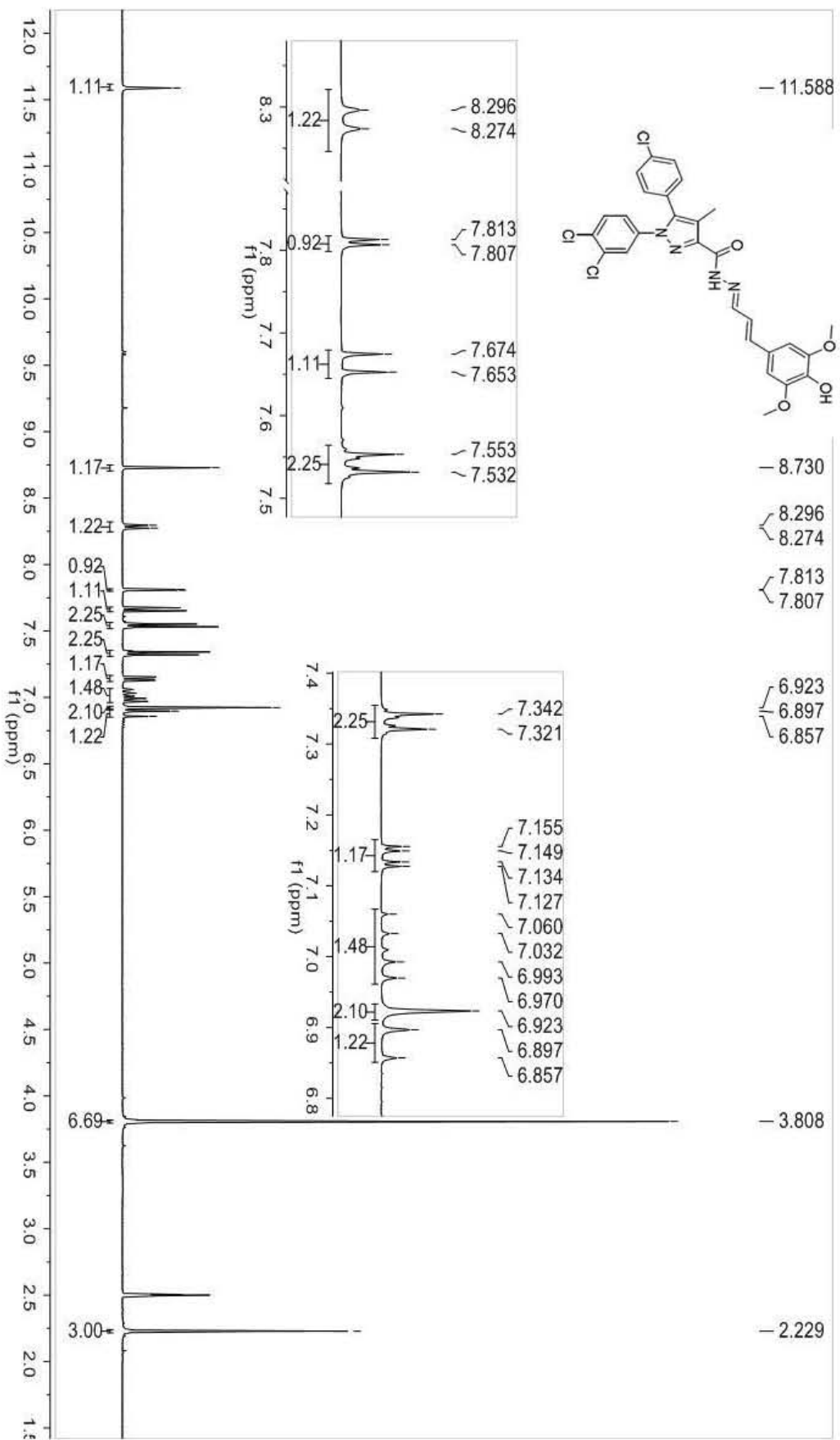




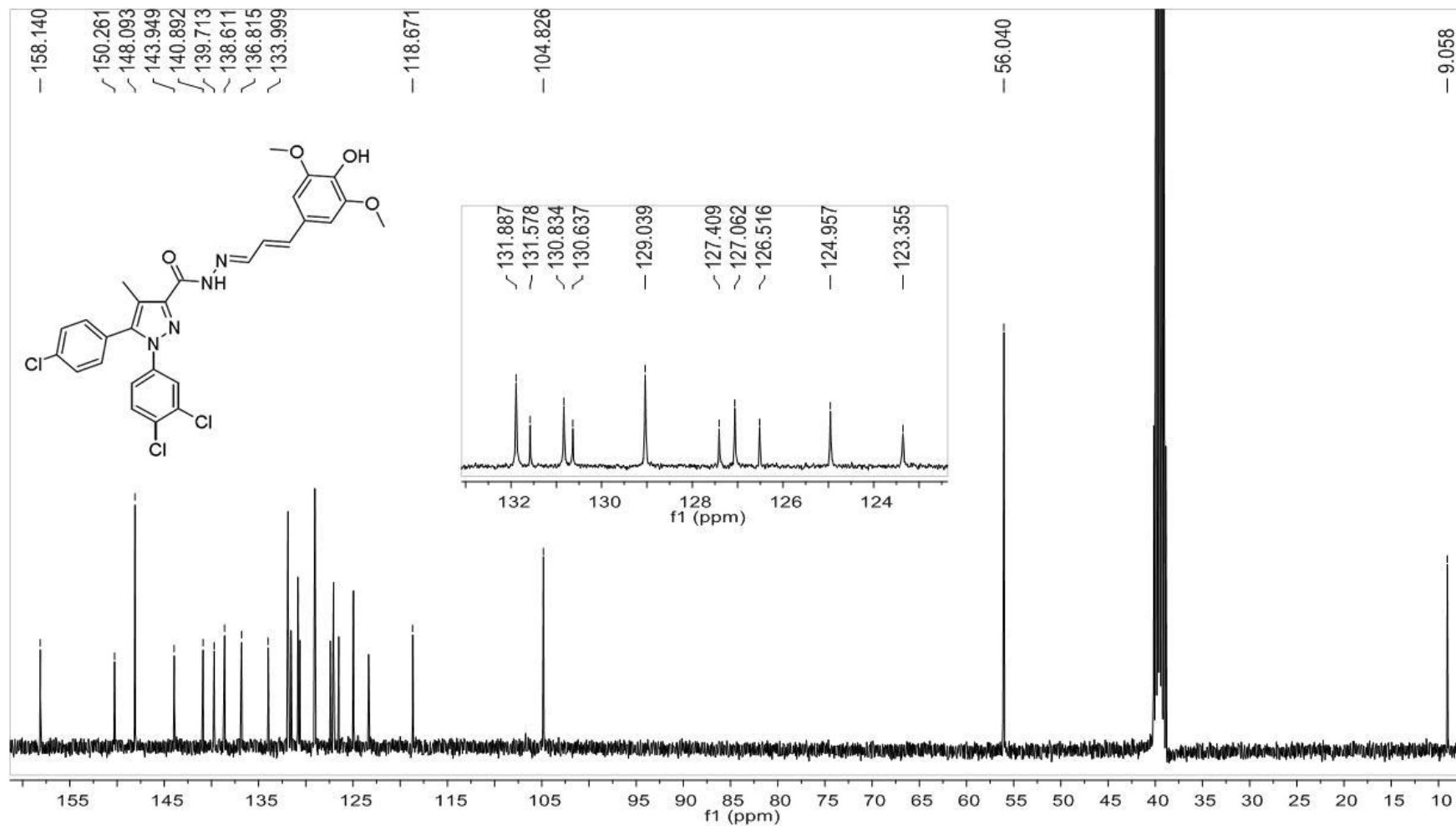
**Compuesto 6.** IR (Reflectancia) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-3,4-dimetoxibenciliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida



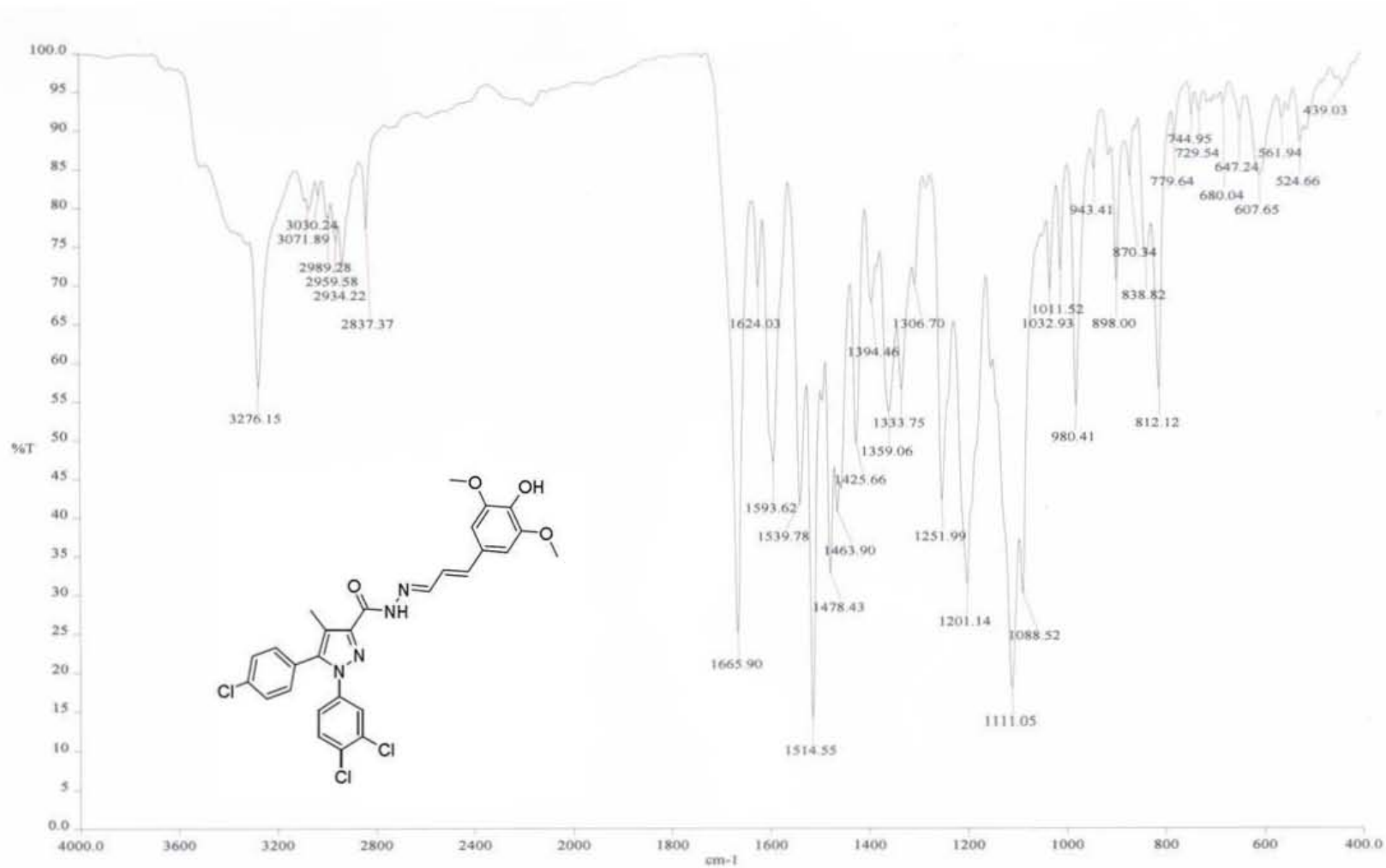
**Compuesto 7.** EM (IE) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(1*E*, 2*E*)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)aliliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



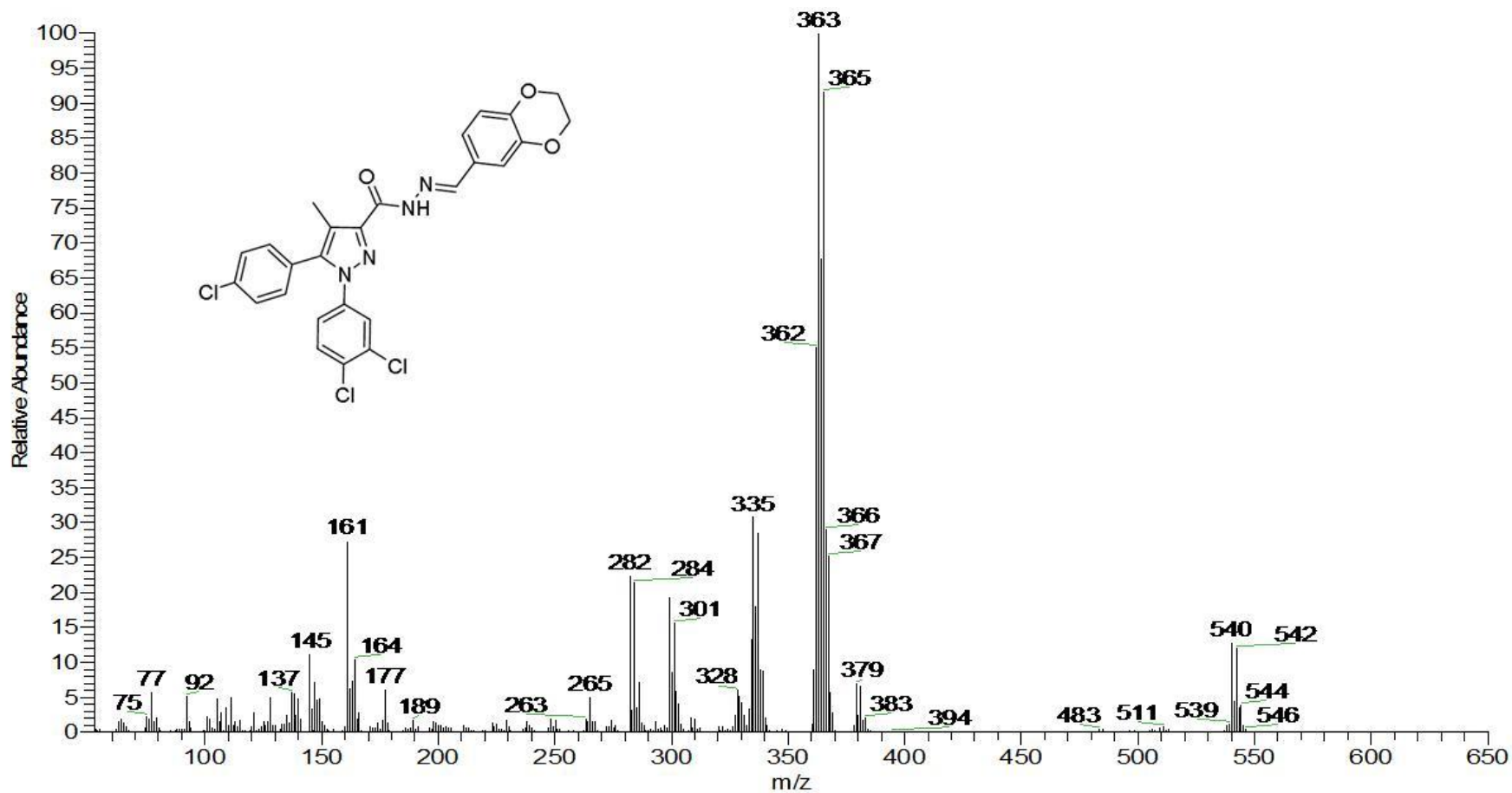
**Compuesto 7.** RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(1E, 2E)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)aliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.



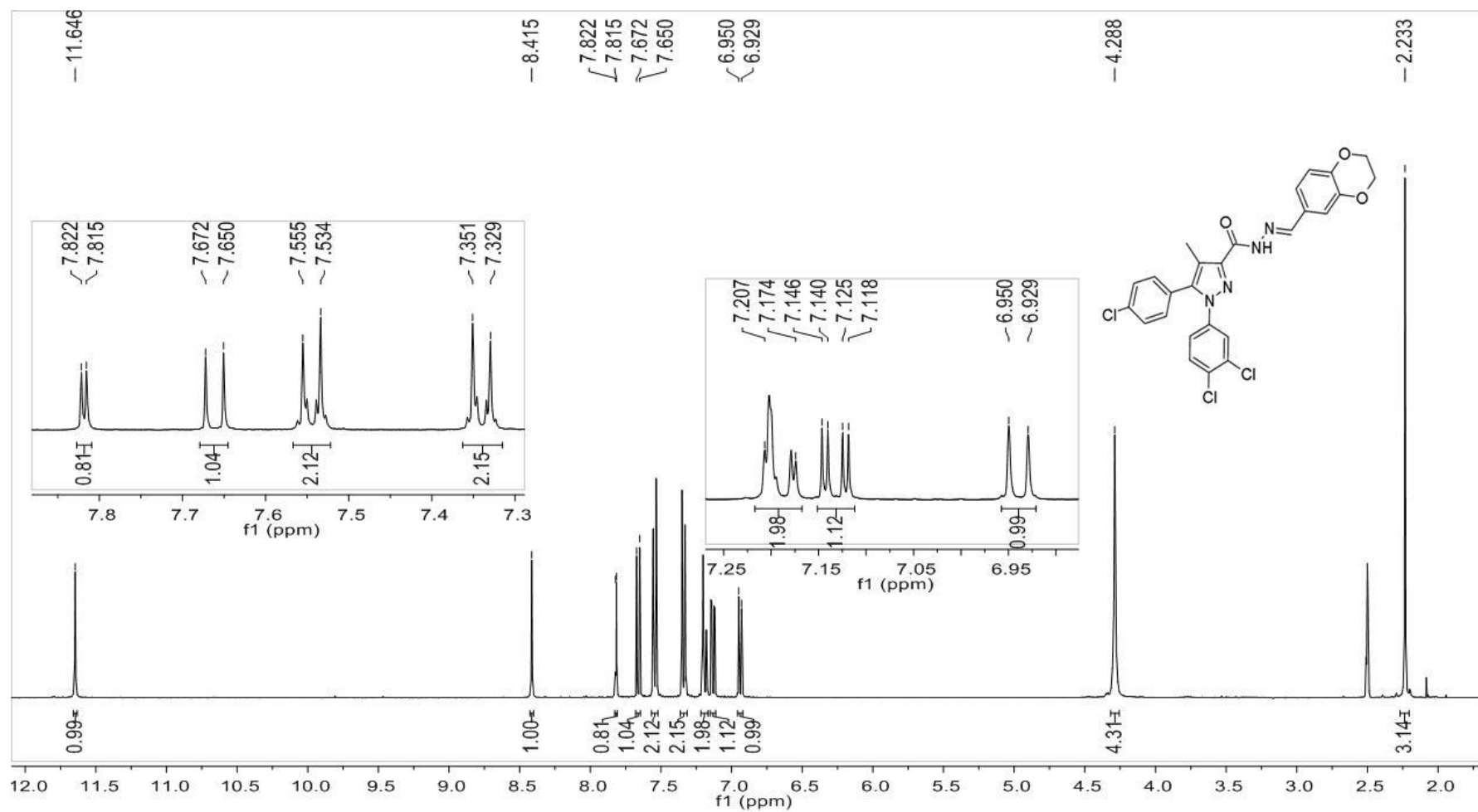
**Compuesto 7.** RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(1*E*, 2*E*)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)aliliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



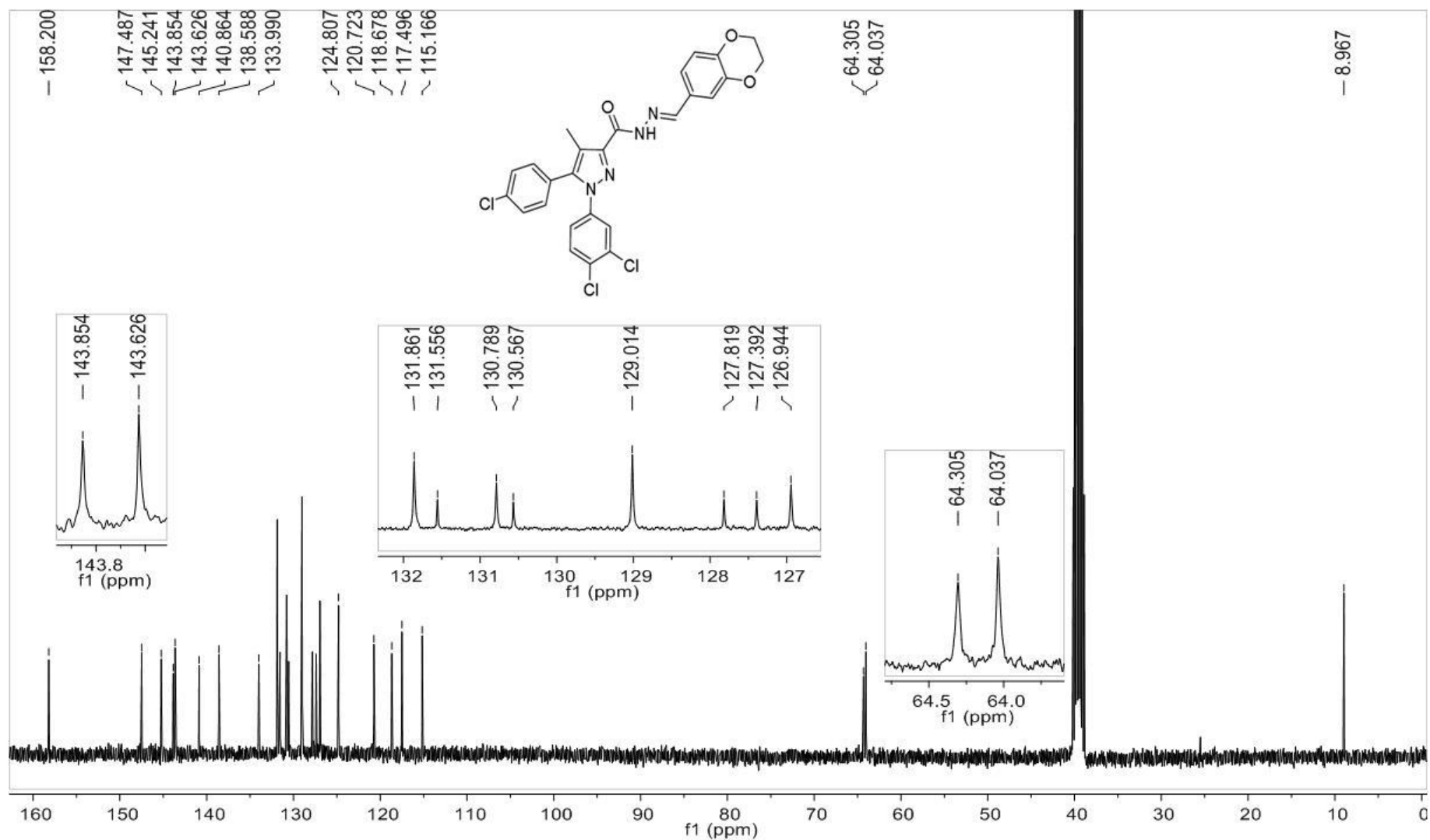
**Compuesto 7.** IR (Reflectancia) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(1E, 2E)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)aliliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.



**Compuesto 8.** EM (IE) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)metiliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.

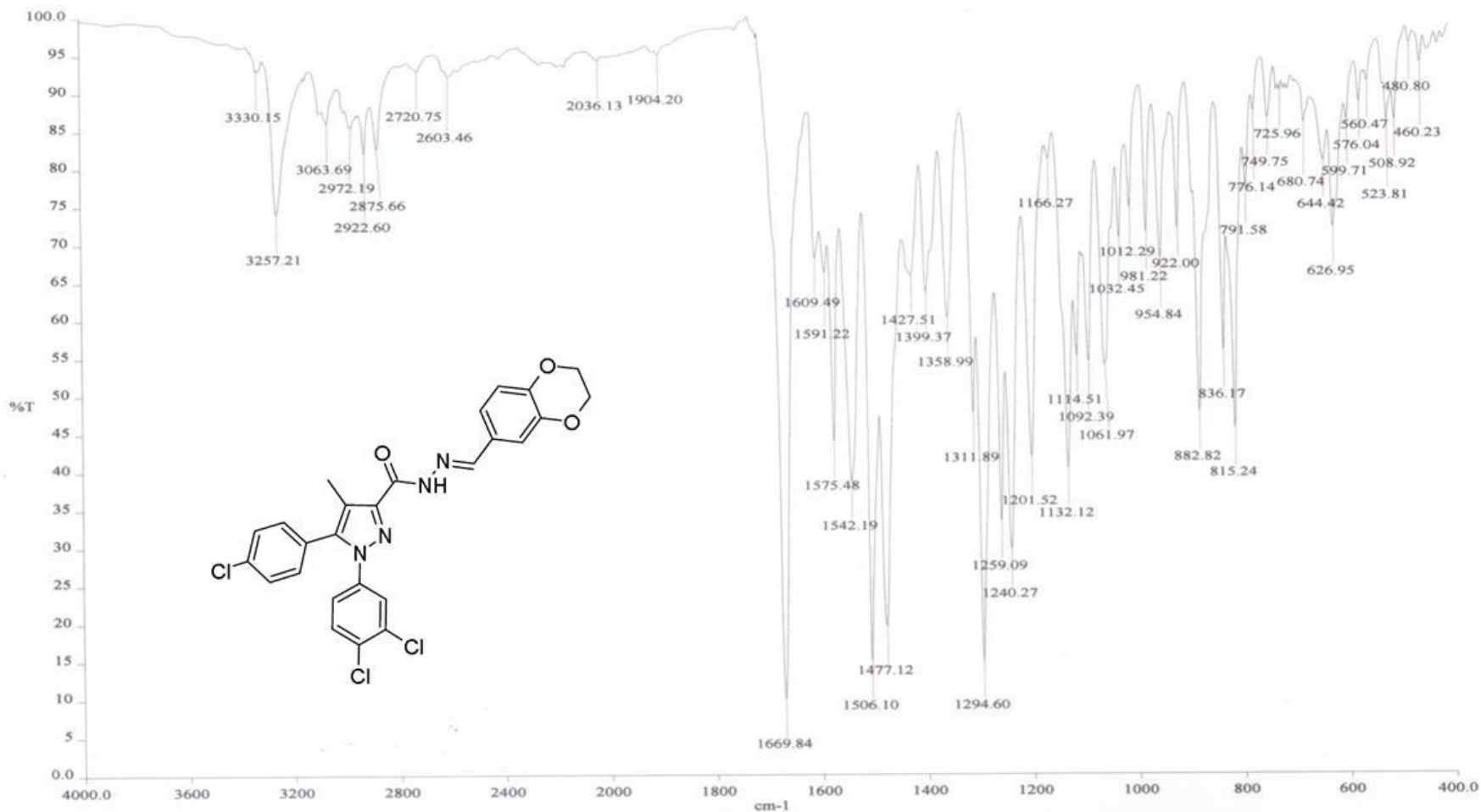


**Compuesto 8.** RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(*E*)-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)metiliden]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.

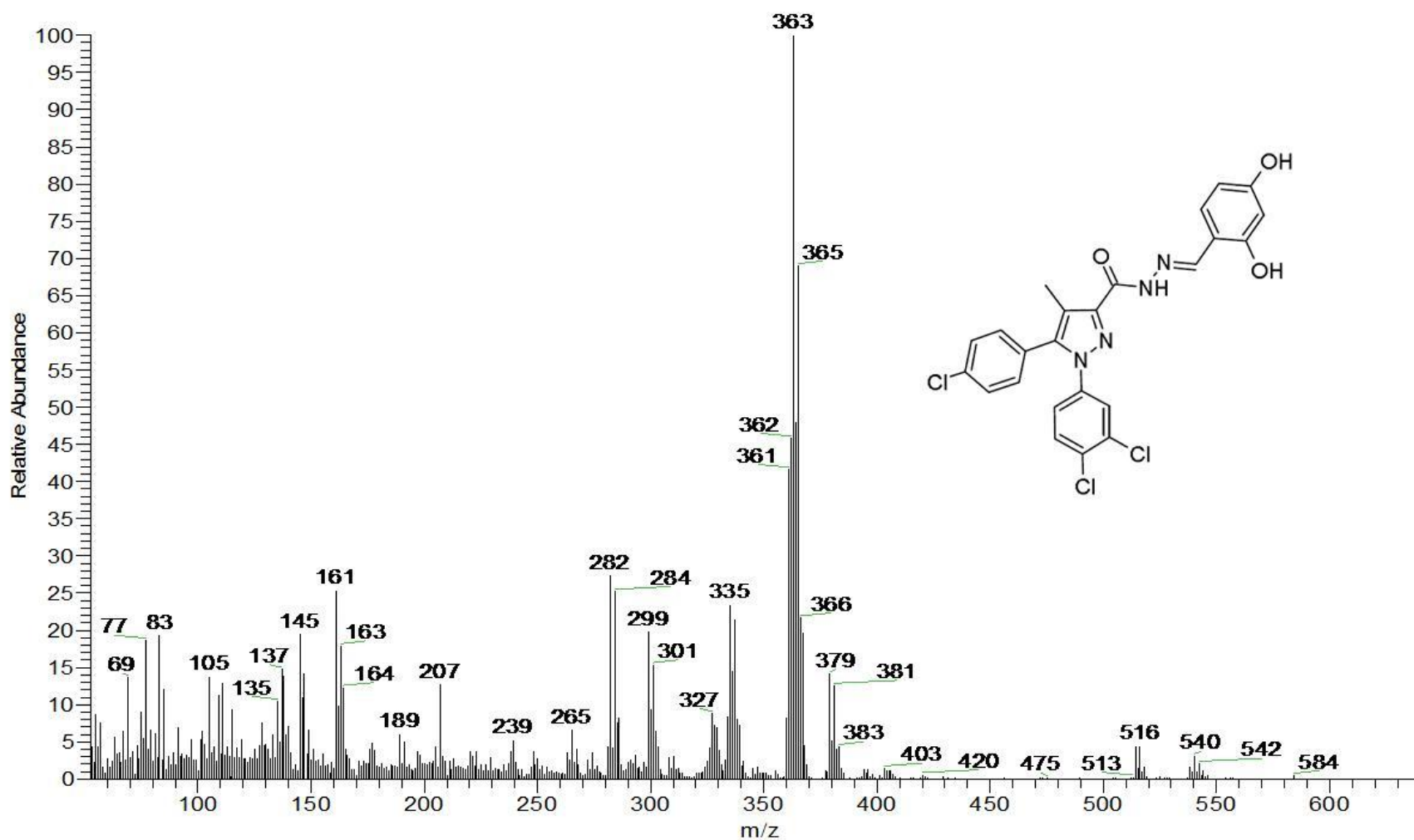


**Compuesto 8.** RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N'-[(E)-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)metiliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.

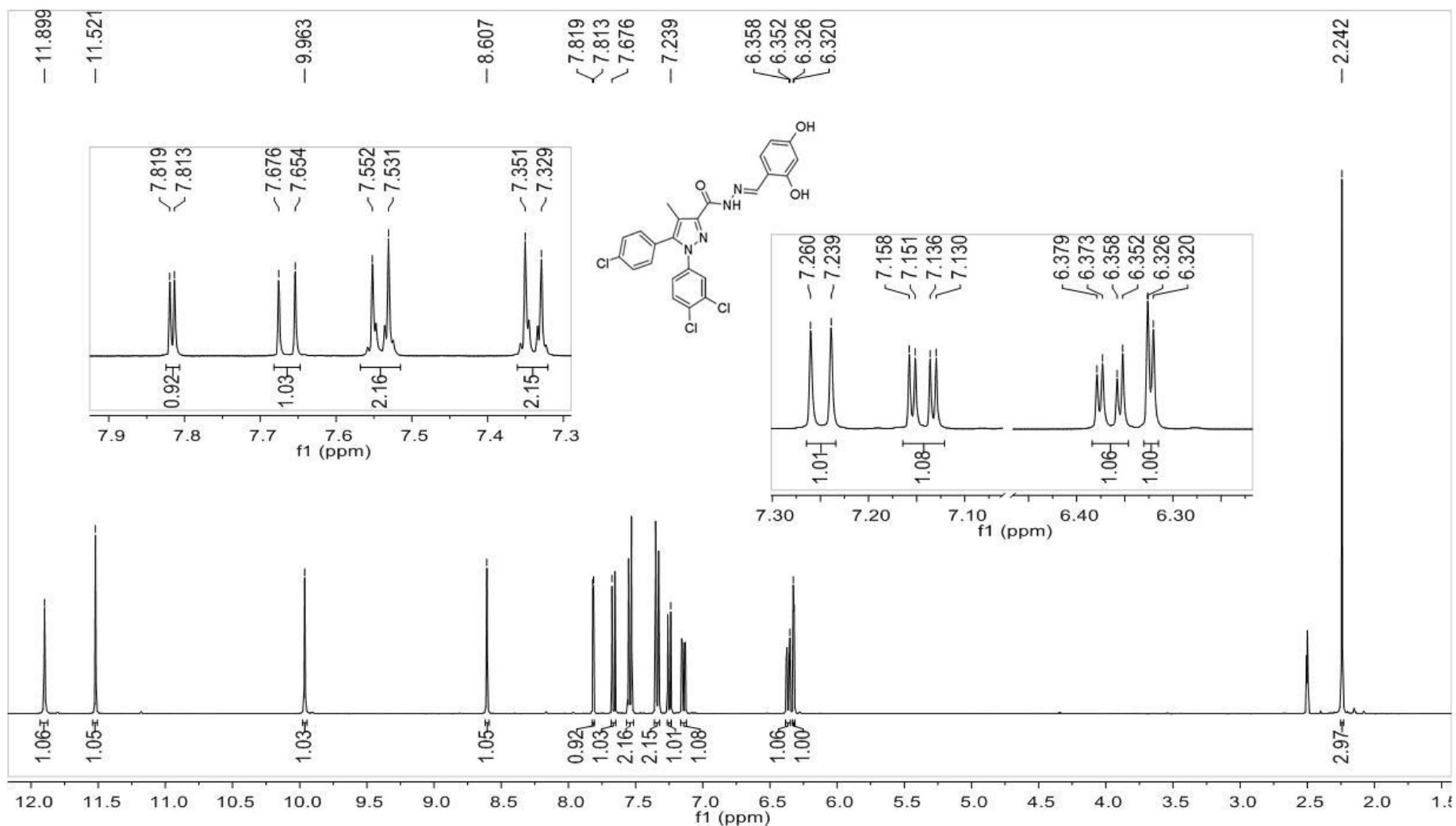




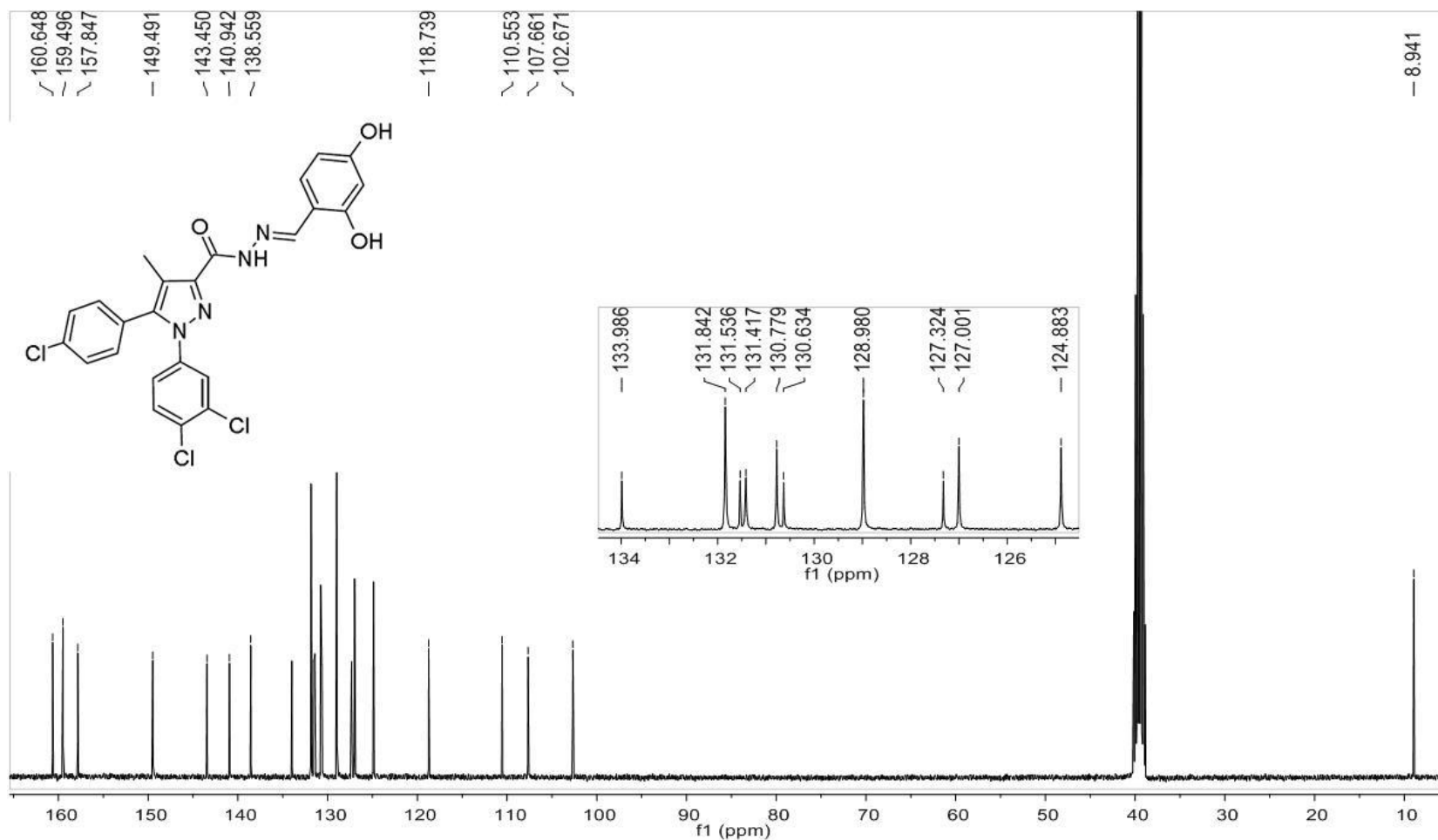
**Compuesto 8.** IR (Reflectancia) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-N-[(E)-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)metiliden]-4-metil-1H-pirazol-3-carbohidrazida.



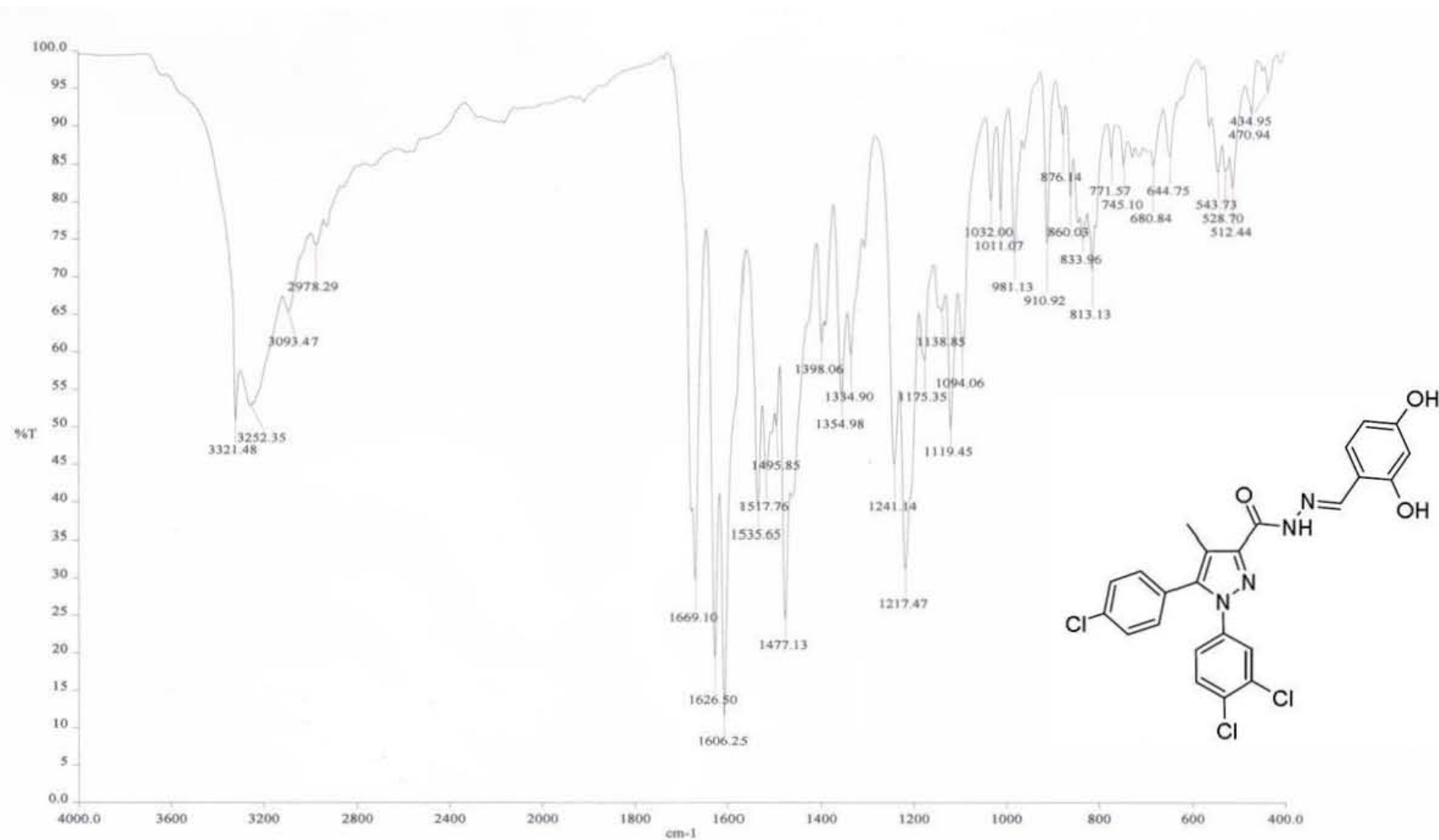
**Compuesto 9.** EM (IE) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-(2,4-dihidroxienciliden)]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



**Compuesto 9.** RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-(2,4-dihidroxi-benciliden)]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



**Compuesto 9.** RMN-<sup>13</sup>C (DMSO-<sub>d6</sub>, δ ppm) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*'-[(*E*)-(2,4-dihidroxi-benciliden)]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.



**Compuesto 9.** IR (Reflectancia) 5-(4-clorofenil)-1-(3,4-diclorofenil)-*N*-[(*E*)-(2,4-dihidroxibenciliden)]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbohidrazida.

## **ANEXO III. Actividad antioxidante**

## ENSAYO DE FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Este método se basó en la reducción del complejo  $[\text{Fe (III)(TPTZ)}_2]^{3+}$  a  $[\text{Fe (II)(TPTZ)}_2]^{2+}$  por efecto de las estructuras con poder reductor. La determinación se realizó de acuerdo con lo indicado por Descalzo en 2007 con modificaciones.

Para la preparación de las soluciones se prosiguió de la siguiente manera:

1.- Buffer de acetatos pH= 3.6, concentración 300 Mm.

$$pH = pka + \log (base/ácido)$$

pka acetato de sodio/ácido acético= 4.76

$$3.6 = 4.76 + \log \frac{|acetato|}{|acido ac. |}$$

$$-1.16 = \log \frac{|acetato|}{|acido ac. |}$$

$$1.16 = \log \frac{|acido ac. |}{|acetato|}$$

$$\text{antilog}(1.16) = \frac{|acido ac|}{|acetato|}$$

$$14.45 = \frac{|acido ac|}{|acetato|}$$

$$14.45|acetato| = |acido ac. | \dots\dots\dots 1$$

Sí:

$$|acido ac. | + |acetato| = 300mM$$

$$|\text{acido ac.}| = 300\text{mM} - |\text{acetato}| \dots\dots 2$$

Sustituyendo 2 en 1:

$$14.45|\text{acetato.}| = 300\text{mM} - |\text{acetato}|$$

$$15.45|\text{acetato}| = 300\text{mM}$$

$$|\text{acetato.}| = 19.4\text{ mM}$$

$$|\text{acido ac.}| = 300\text{mM} - |\text{acetato}| = 300\text{mM} - 19.4\text{mM}$$

$$|\text{acido ac.}| = 280.6\text{ mM} .$$

Para preparar 100mL se pesan:

- 263.84 mg acetato de sodio
- 1.6 mL de ácido acético glacial.

2.- Solución TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-5-triazina), concentración 10mM

Se pesó 78.1 mg y se colocó en un matraz aforado de 25 mL, se adicionó 5 mL de HCl (40 mM) y se completa el volumen con agua deionizada.

3.- Solución de cloruro ferroso hexahidratado concentración 20 mM

Se pesó 135.15 mg de cloruro ferroso hexahidratado a un matraz aforado de 25 mL se completó el volumen con agua.

4.- La solución de FRAP está compuesta por 2.5 mL de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina 10mM) en HCl (40 mM), 2.5 de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (20 mM) y 25 mL de buffer de acetatos (300mM pH=3.6).

5.- Para la preparación de la muestra se pesó 10 mg de los compuestos **1-9** por separado en un matraz aforado de 5 mL, se disolvió cada compuesto con DMF y se



llevó a volumen empleando el mismo disolvente (solución stock). Posteriormente se tomaron alícuotas de la solución stock tomando en cuenta la siguiente tabla:

**Tabla A3.1.** Preparación de muestras.

<b>Toma</b>	<b>Alicuota mL (partiendo de la solución stock)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<b>Stock</b>	0	5	4000
<b>2</b>	2	5	1500
<b>3</b>	1	5	800
<b>4</b>	0.5	5	400

6.- Para determinar la capacidad de reducción de cada uno de los compuestos se llevó a cabo la preparación de una curva patrón empleando para ello Trolox en concentraciones de 600 a 25  $\mu\text{M}$ . Por lo que los resultados se expresan como equivalentes  $\mu\text{M}$  de Trolox por cada mg de muestra.

Para la preparación de la muestra se prosiguió de la siguiente manera: Se tomó una alícuota de 30  $\mu\text{L}$  de la muestra (concentraciones aproximadas de 4000, 1500, 800 y 400  $\mu\text{M}$  disueltas en DMF), a la cual se les adicionó 90  $\mu\text{L}$  de agua deionizada y 900  $\mu\text{L}$  de una solución de FRAP. Se empleó un blanco espectro el cual contenía únicamente TPTZ y el disolvente de la solución de FRAP (buffer de acetatos, 300mM pH=3.6), y un blanco el cual estaba compuesto por la disolución de FRAP y el disolvente con el cual se homogeneizó la muestra (DMF). Las absorbancias se determinaron a 593 nm y las lecturas se tomaron a los 6 y 30 minutos de iniciada la reacción. Las muestras se realizan por triplicado. Los compuestos **3**, **4** y **7** la lectura de absorbancia a la concentración aproximada de 4000  $\mu\text{M}$  fue mayor al máximo de la curva patrón por lo cual fue necesario realizar una dilución tomando 0.3 mL de la solución stock y diluir en un matraz aforado de 5 mL para obtener una concentración aproximada de 200  $\mu\text{M}$ .

Las curvas patrón obtenidas se muestran a continuación:

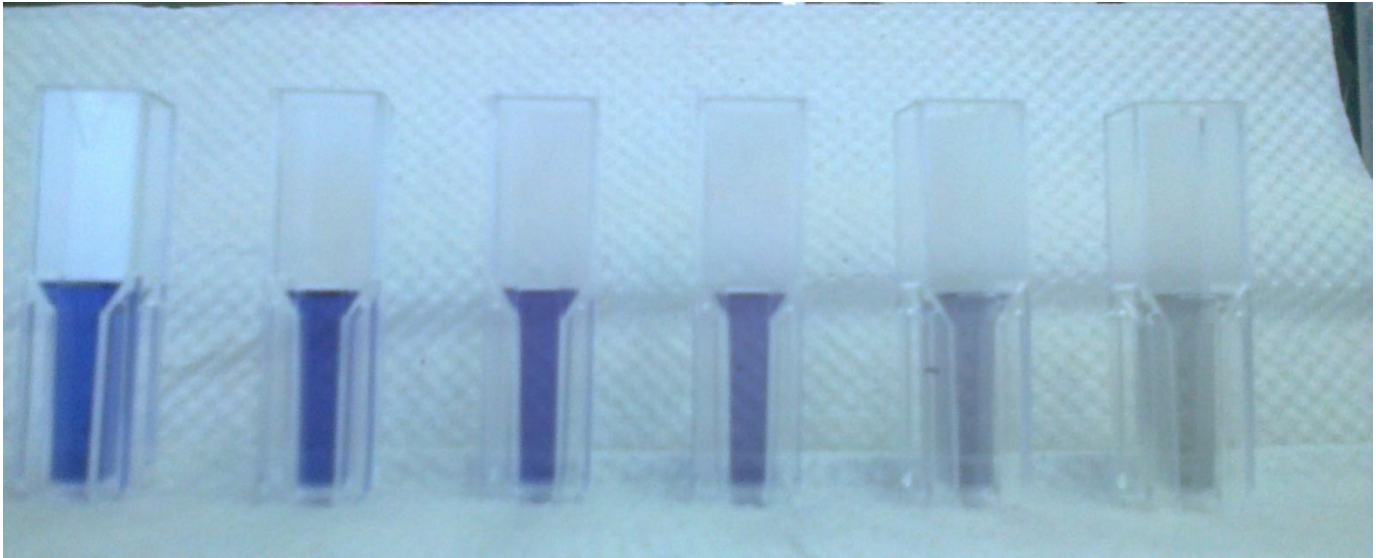
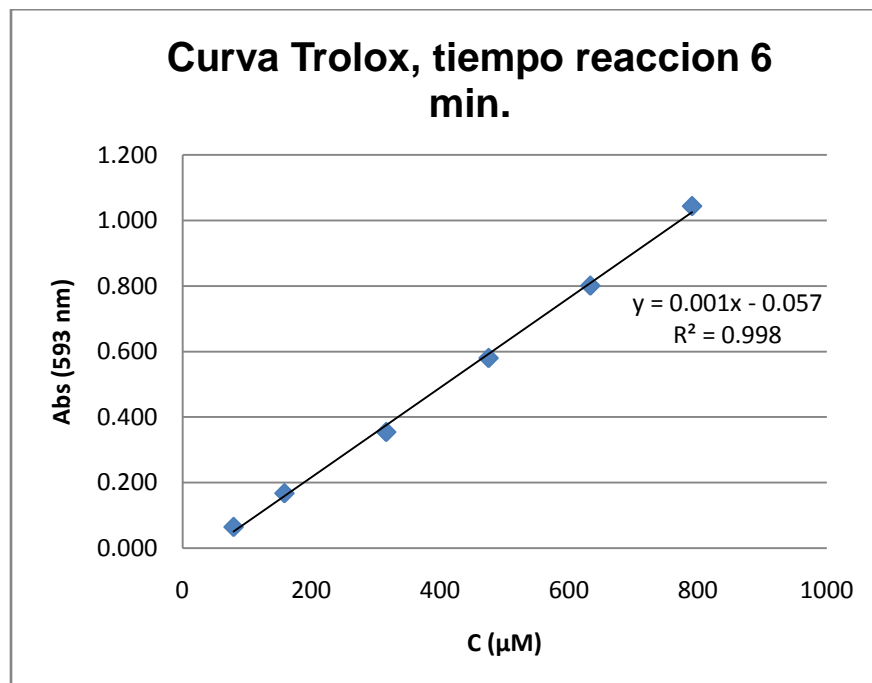
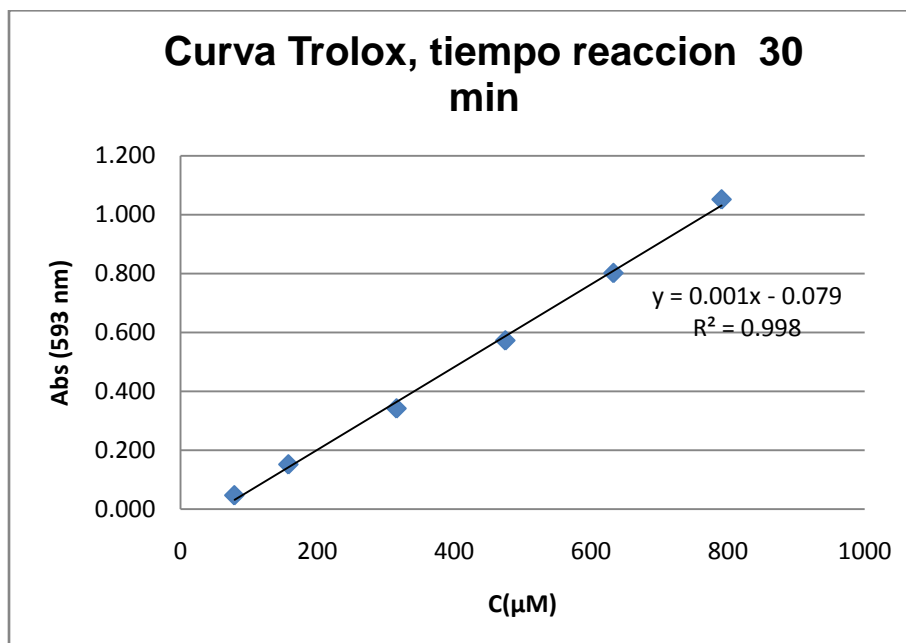


Figura A3.1 Curva patrón

Gráfica A3.1. Curva patrón a 6 minutos de reacción.



Gráfica A3.2. Curva patrón a 30 minutos de reacción.



Como resultados se obtuvieron las absorbancias por triplicado de cada muestra a las diferentes concentraciones, por lo cual el tratamiento fue el siguiente:

- a) Empleando la ecuación de la recta se sustituye  $y$  por los valores obtenidos de absorbancia en cada medición.

$$\frac{\mu\text{M TE}}{\mu\text{M Mtra.}} = \frac{\text{absorbancia} - b}{m}$$

- b) Se determina el promedio de los resultados obtenidos.

- c) Para obtener los equivalentes en Trolox por cada miligramo de muestra se emplea la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{M TE}}{\text{mg Mtra.}} = \left( \frac{\mu\text{M TE}}{\mu\text{M mtra}} \right) \times 30\mu\text{L} \times \left( \frac{1\text{mL}}{1000\mu\text{L}} \right) \times \text{Conc. mtra}(\mu\text{M}) \times \text{Masa Molar mtra} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \right)$$

Para obtener la  $CE_{50}$  de cada compuesto sintetizado en el minuto 30 de reacción se prosiguió de la siguiente manera:

- a) Tomando como el 100% del Efecto el resultado obtenido a la concentración de aproximadamente 4000  $\mu\text{M}$  se determinó %Efecto para cada concentración.
- b) De los resultados obtenidos del tratamiento de los datos ( $\mu\text{M TE/mg mtra}$ ) para cada muestra a las diferentes concentraciones se ajuntan los resultados a una curva dosis-respuesta empleando los siguientes modelos:

Modelo lineal: %E vs C

E<sub>max</sub>: (1/%E) vs (1/C)

Lineal-Log: %E vs LogC

E<sub>max</sub> sigmoide:  $\log(E/E_{\text{max}}-E)$  vs Log C

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos de regresión lineal para cada modelo propuesto:

**Tabla A3.2.** Regresión lineal de los resultados obtenidos.

Compuesto	Parámetro	Modelo			
		Lineal	E <sub>max</sub>	Lineal-Log	E <sub>max</sub> sigmoide
1	m	0.000	26029	0.963	1.736
	b	-0.176	-7.765	-2.665	-6.306
	r <sup>2</sup>	0.966	0.983	0.779	<b>0.999</b>
2	m	0.000	6984	0.930	1.372
	b	-0.074	-0.730	-2.511	-4.799
	r <sup>2</sup>	0.994	0.997	0.862	<b>0.998</b>
3	m	0.000	4804	1.117	1.641
	b	-0.176	-2.084	-2.737	-5.169
	r <sup>2</sup>	0.975	0.980	0.841	<b>0.983</b>
4	m	0.000	5094	1.130	1.868
	b	-0.168	-3.526	-2.721	-5.676
	r <sup>2</sup>	0.985	0.987	0.868	<b>0.997</b>
5	m	0.000	18846	0.966	1.798

	b	-0.149	-7.323	-2.617	-6.278
	r <sup>2</sup>	0.981	0.984	0.818	<b>0.999</b>
6	m	0.000	6703	0.930	1.314
	b	-0.088	-1.148	-2.464	-4.588
	r <sup>2</sup>	0.989	0.997	0.844	<b>0.998</b>
7	m	0.000	5915	1.137	1.911
	b	-0.190	-4.249	-2.731	-5.832
	r <sup>2</sup>	0.978	0.989	0.849	<b>0.995</b>
8	m	0.000	12474	0.949	1.496
	b	-0.136	-3.688	-2.564	-5.322
	r <sup>2</sup>	0.978	0.995	0.810	<b>1</b>
9	m	0.000	24200	0.955	1.532
	b	-0.181	-6.577	-2.645	-5.726
	r <sup>2</sup>	0.955	0.984	0.759	<b>0.997</b>

Como puede apreciarse en la tabla el modelo que mejor se ajusta a una línea recta es el modelo de Emax sigmoide, por lo cual para obtener la CE50 de emplea la siguiente ecuación:

$$CE50 = 10^{\left(-\frac{b}{m}\right)}$$

Los resultados que se obtienen son expresados en  $\mu\text{M}$  de cada compuesto.

**ENSAYO INHIBICIÓN DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS.**

La evaluación de la protección a la peroxidación de lípidos se llevó a cabo mediante la técnica de inhibición de la oxidación del ácido linoleico descrita por Elmastas, en 2007 con algunas modificaciones.

Para la preparación de las soluciones se prosiguió de la siguiente manera:

- Se preparó una solución etanólica de ácido linoleico 2.5 %: 2.5 mL de ácido linoleico en 100 mL de etanol absoluto anhidro.
- Buffer de fosfatos 40 Mm pH= 7.0

$$pH = pka + \log (base/ácido)$$

.pka  $Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4 \cdot H_2O = 7.21$

$$7.0 = 7.21 + \log \frac{|Na_2HPO_4|}{|NaH_2PO_4|}$$

$$-0.21 = \log \frac{|Na_2HPO_4|}{|NaH_2PO_4|}$$

$$\text{antilog} (-0.21) = \frac{|Na_2HPO_4|}{|NaH_2PO_4|}$$

$$0.6166 = \frac{|Na_2HPO_4|}{|NaH_2PO_4|}$$

$$0.6166|NaH_2PO_4| = |Na_2HPO_4| \dots\dots\dots 1$$

Sí:

$$|Na_2HPO_4| + |NaH_2PO_4| = 40mM$$

$$|NaH_2PO_4| = 40mM - |Na_2HPO_4| \dots\dots 2$$

Sustituyendo 2 en 1:

$$0.6166(40mM - |Na_2HPO_4|) = |Na_2HPO_4|$$

$$24.664mM - 0.6166|Na_2HPO_4| = |Na_2HPO_4|$$

$$|Na_2HPO_4| = \frac{24.664}{1.6166}mM$$

$$|Na_2HPO_4| = 15.26 mM$$

$$|NaH_2PO_4| = 40mM - |Na_2HPO_4| = 40mM - 15.26mM$$

$$|NaH_2PO_4| = 24.74 mM$$

Para preparar 100mL se pesan:

- 350 mg  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  fosfato de sodio monobásico
- 22 mg  $Na_2HPO_4$  fosfato de sodio dibásico

- c) Solución de cloruro ferroso (20 mM en HCl 40 mM): Se pesan 25.35 mg de cloruro ferroso en un matraz aforado de 10 mL y se llevan a volumen empleando una solución de HCl 40 mM.
- d) Solución de tiocianato de amonio al 30%: se pesan 3.0 g de tiocianato de amonio y se adicionan 10 mL de agua.

Para la mezcla de reacción se empleó: 1000  $\mu$ L de la muestra en concentraciones de 1 mg/mL y 0.5 mg/mL, 500  $\mu$ L de buffer de fosfato (40 mM, pH=7) y 500  $\mu$ L de la solución de ácido linoleico al 2.5 %, se incubó a 40°C en agitación constante y en la oscuridad para acelerar el proceso de peroxidación por un periodo de 64 horas. La determinación de los niveles de peroxidación se llevó a cabo, siguiendo el método de tiocianato para lo cual, se realizó lo siguiente: se toman 1400  $\mu$ L de etanol, se adicionan 100  $\mu$ L de tiocianato de amonio al 30 % y 100  $\mu$ L de la muestra que se encontraba en incubación, esto se dejó en agitación por un periodo de 3 minutos, posterior a dicho tiempo se adicionó 100  $\mu$ L de  $FeCl_2$  (20 mM) disuelto en una solución de HCl (40 mM). La

absorbancia se determinó a 500 nm empleando para ello una celda de cuarzo, se realiza el ensayo por triplicado.

Se emplearon como control las siguientes soluciones:

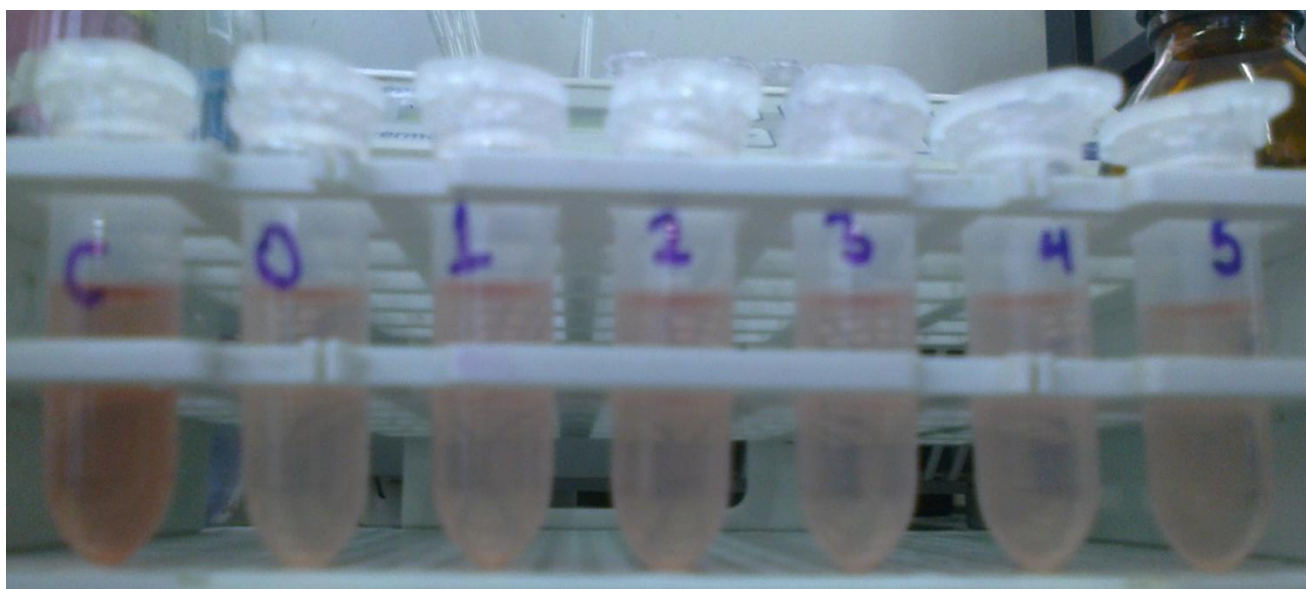
Blanco espectro: Etanol

Blanco reacción: 1400  $\mu$ L EtOH+ 100  $\mu$ L tiocianato de amonio 30 %+ 100  $\mu$ L FeCl<sub>2</sub>

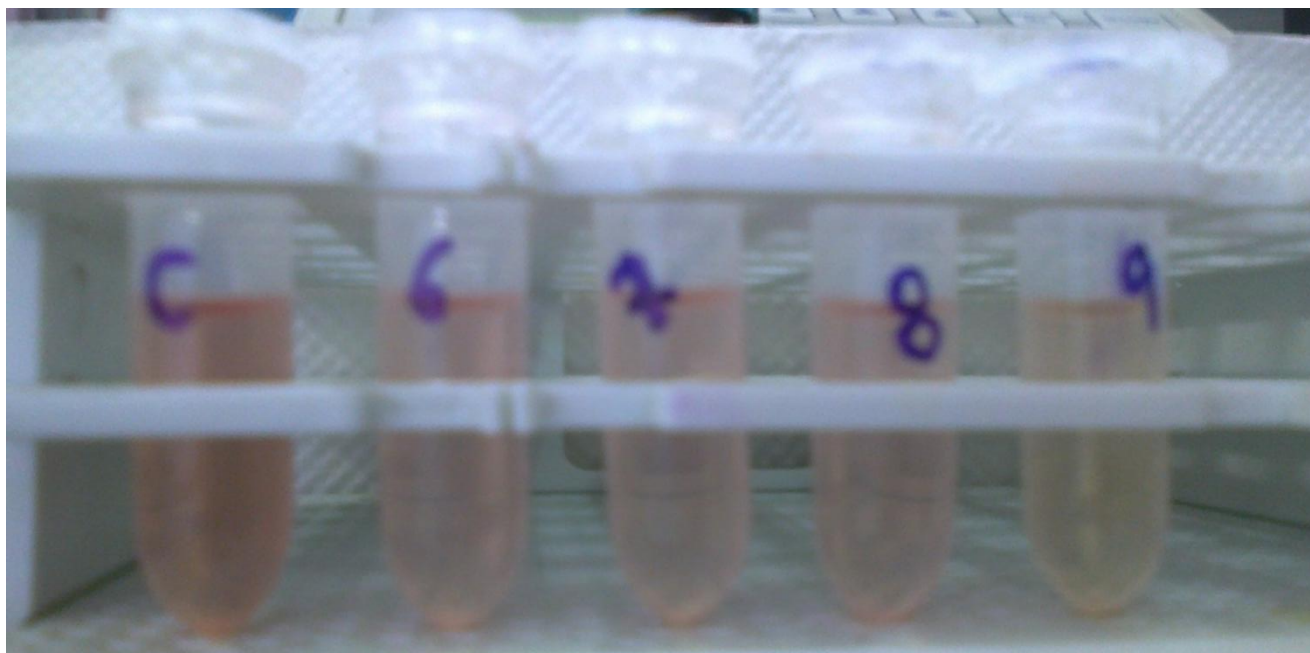
De acuerdo con la técnica a menor coloración roja de la solución, mayor es la capacidad de la muestra de inhibir la autooxidación del ácido linoleico.

Para determinar el % Inhibición se emplea la siguiente ecuación:

$$\%Inhibicion = 100 - \left( \frac{Abs\ mtra}{Abs\ blanco\ rxn} \right) \times 100\%$$







**Figura A3.2. Muestras posterior a la reacción y determinación.**

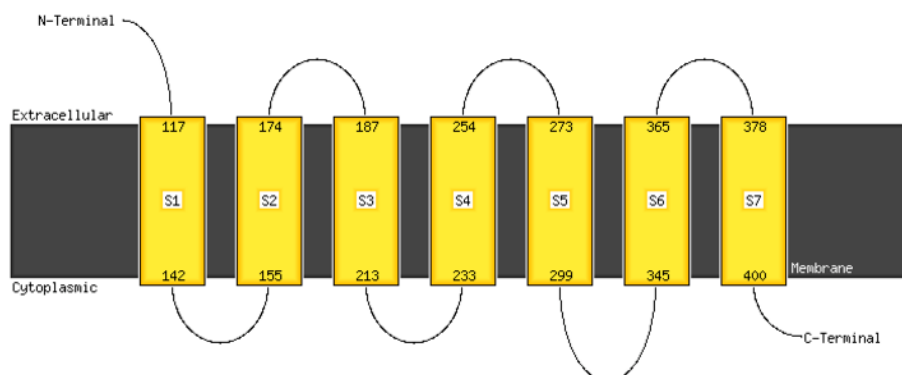
## **ANEXO IV. Modelado molecular (Docking)**

## Construcción del modelo

Para llevar a cabo la predicción de la estructura tridimensional del receptor de cannabinoides tipo I (CB1) se tomaron en consideración los siguientes parámetros:

Como primer acercamiento se realizó un análisis consenso (estructura con mayor número de repeticiones para cada aminoácido) de la estructura secundaria de la secuencia aminoacídica del receptor CB1 mediante el uso de los servidores de acceso libre APSSP2, GOR, Jufo9D, NetSurfP, Porter, PSIPred, PSIPred2, Scratch, Scratch8, MINNOU, SAM-T08, PCI-MSE, SABLE, HNN, SOPma, MLRC, DSC, PHD y SIMPA96; cada uno de los servidores predijo una estructura secundaria para la secuencia del receptor CB1, las cuales fueron utilizadas para el análisis consenso, de este se obtuvo la siguiente proporción: 48.9% alfas hélices (H), 48.5% random coils o asas (C) y 2.5% betas plegadas (E) (Ver Figura A4.2)

Con el fin de confirmar la estructura secundaria final se realizó un estudio de los cruces transmembranales tomando como base un análisis topológico de hidrofobicidad. Se predijeron 7 cruces transmembranales designadas como alfas-hélices transmembranales (TMH) presentes en el receptor CB1, así como tres asas intracelulares (IC1-3), tres asas extracelulares (EC1-3), la región amino terminal en el espacio extracelular (NT\_EC) y la región carboxilo terminal en la región intracelular (CT\_IC). Además se identifica un alfa- hélice no transmembranal (H8) la cual corresponde a una hélice yuxtamembranal (Figura A4.1).





Un análisis de la composición de aminoácidos es de gran importancia para la determinación de la conformación tridimensional final. Se realizó la búsqueda de la distribución de triptófano (W) y tirosina (Y) en las alfas-helices transmembranales, con la finalidad de identificar dichos residuos es para confirmar la presencia de un “cinturón aromático” el cual sugiera la interacción de estos con las cabezas de los fosfolípidos de la membrana.

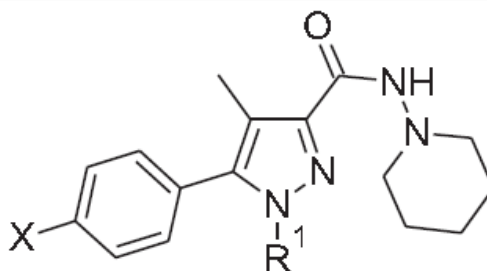
Finalmente se llevó a cabo un alineamiento entre el receptor CB1 con la proteína homóloga a fin de identificar prolinas (P), conservadas en la familia de receptores acoplados a proteínas G, para la identificación de hélices interrumpidas.

Siendo que el receptor CB1 es una proteína transmembranal los residuos de aminoácidos pueden disponerse de dos formas: 1) interaccionando con otras hélices, 2) estar expuestas a los lípidos membranales, por lo cual se estudió la distribución empleando como base la escala de Popot y el cálculo del momento hidrofóbico de Eisenberg. Se encontró que la mayoría de las hélices son altamente hidrofóbicas,

El modelo final fue embebido en una membrana lípida de 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicerol-3-fosfolina (POPC) a fin de optimizar el modelo tridimensional en condiciones reales, para ello se hizo uso del programa GROMACS 4.5.3. El complejo CB1-POPC presentó las dimensiones  $80\text{\AA} \times 80\text{\AA} \times 80\text{\AA}$ , empleando agua explícita en el espacio extracelular y citosólico. Se emplearon 2000 pasos para alcanzar el mínimo energético del sistema.

#### *Acoplamiento molecular (docking)*

Empleando el software Autodock 4.2, se llevó a cabo el acoplamiento de los compuestos **2**, **6** y **7** con el receptor CB1. Se empleó la plantilla de compuestos derivadas del artículo Hernández, 2013, de los cuales se conoce presentan actividad hipoglucemiante.



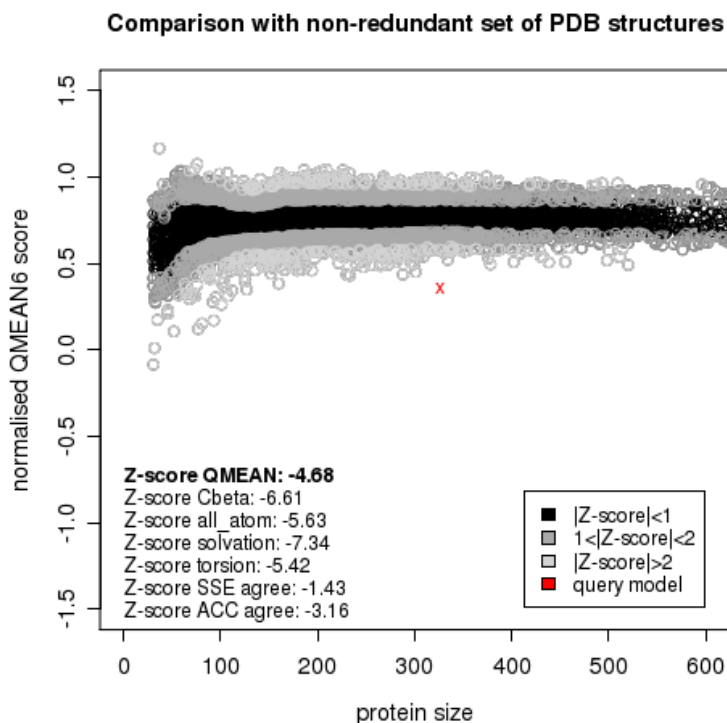
Compound	R <sup>1</sup>	X
<b>1</b> (SR141716A)	2,4-Dichlorophenyl	Cl
<b>2</b>	2,4-Dichlorophenyl	H
<b>3</b>	Phenyl	H
<b>4</b>	3,4-Dichlorophenyl	Cl
<b>5</b>	3-Chloro-4-fluorophenyl	Cl
<b>6</b>	7-Chloroquinolin-4-yl	Cl
<b>7</b>	4-(Trifluoromethyl)phenyl	Cl
<b>8</b>	2,4-Difluorophenyl	F
<b>9</b>	3-Chloro-4-fluorophenyl	F
<b>10</b>	7-Chloroquinolin-4-yl	F
<b>11</b>	4-(Trifluoromethyl)phenyl	Br
<b>12</b>	2,4-Dichlorophenyl	CF <sub>3</sub>
<b>13</b>	2,4-Difluorophenyl	CF <sub>3</sub>

**Figura A4.3.** Plantilla empleada para acoplamiento molecular.

#### *Validación del modelo.*

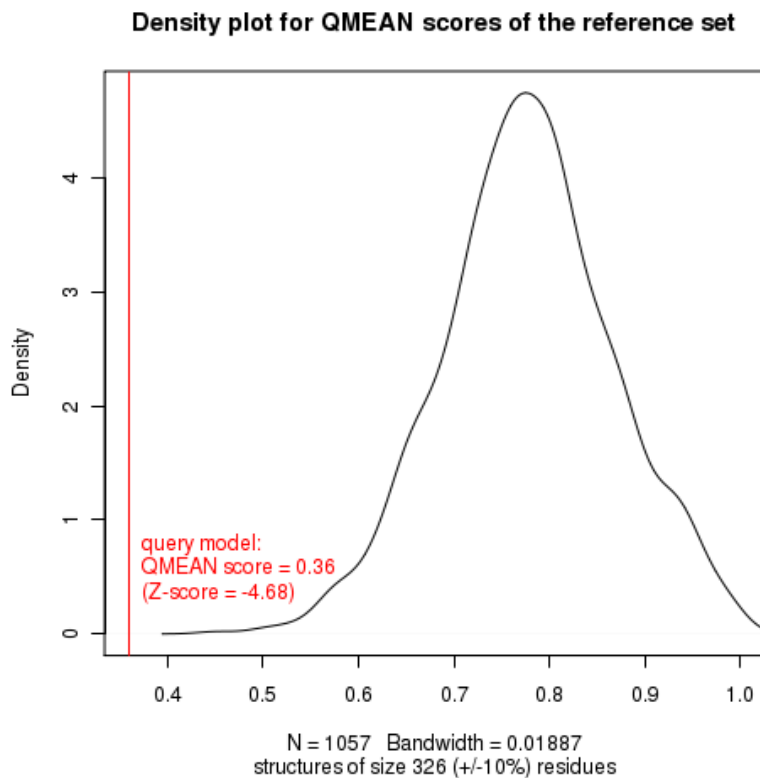
Puntuación Z (Z-score): Es la medida de la significancia estadística del modelo como resultado de una alineación múltiple con otras estructuras conocidas. Este valor permite evaluar la calidad del modelo basado en el tipo de interacciones C $\beta$ , distorsiones angulares, interacciones atómicas, potencial de solvatación, y el grado de conformidad con base en comparaciones secuenciales, estructura secundaria y accesibilidad de solvatación. La evaluación de los parámetros antes mencionados da como resultado una cifra que representa la calidad del modelo, la cual puede ser negativa (baja calidad) o positiva (alta calidad), cuyo valor absoluto se espera sea cercano a cero. La mayoría de las estructuras cristalográficas conocidas son de receptores extramembranales, por

lo cual este parámetro y el valor de QMEAN-score (Ver abajo), no son tan representativos de la calidad del modelo contruido.



**Figura A4.4.** Puntuación Z-score

Puntuación de QMEAN (QMEAN score): Es el valor del grado de confiabilidad del modelo al ser comparado con otras estructuras e involucra los parámetros mencionados anteriormente para su designación, los rangos de calidad estimada que maneja este parámetro van de 0 al 1, en donde los mejores modelos presentan un valor cercano a 1.



**Figura A4.5.** Valor Qmean

Diagrama de Ramachandran: Gráfico que representa las combinaciones angulares  $\psi$  ( $\psi$ ) y  $\phi$  ( $\phi$ ) de todos los aminoácidos que constituyen una proteína. Permite visualizar el comportamiento conformacional de los aminoácidos al representarlos dentro de un esquema de cuatro cuadrantes, cuya localización dependerá del tipo de estructura secundaria que estén conformando. La mayor parte de los valores angulares obtenidos se encuentran dentro de las regiones esperadas, sin embargo, existen excepciones como es el caso de la glicina, que gracias a que su cadena lateral es un hidrógeno puede adoptar muchas conformaciones estéricamente prohibidas, y la prolina, debido a que es el único aminoácido capaz de generar enlaces *cis* y *trans*. También existe la posibilidad de que el diagrama se vea alterado debido a la presencia de un ligando.



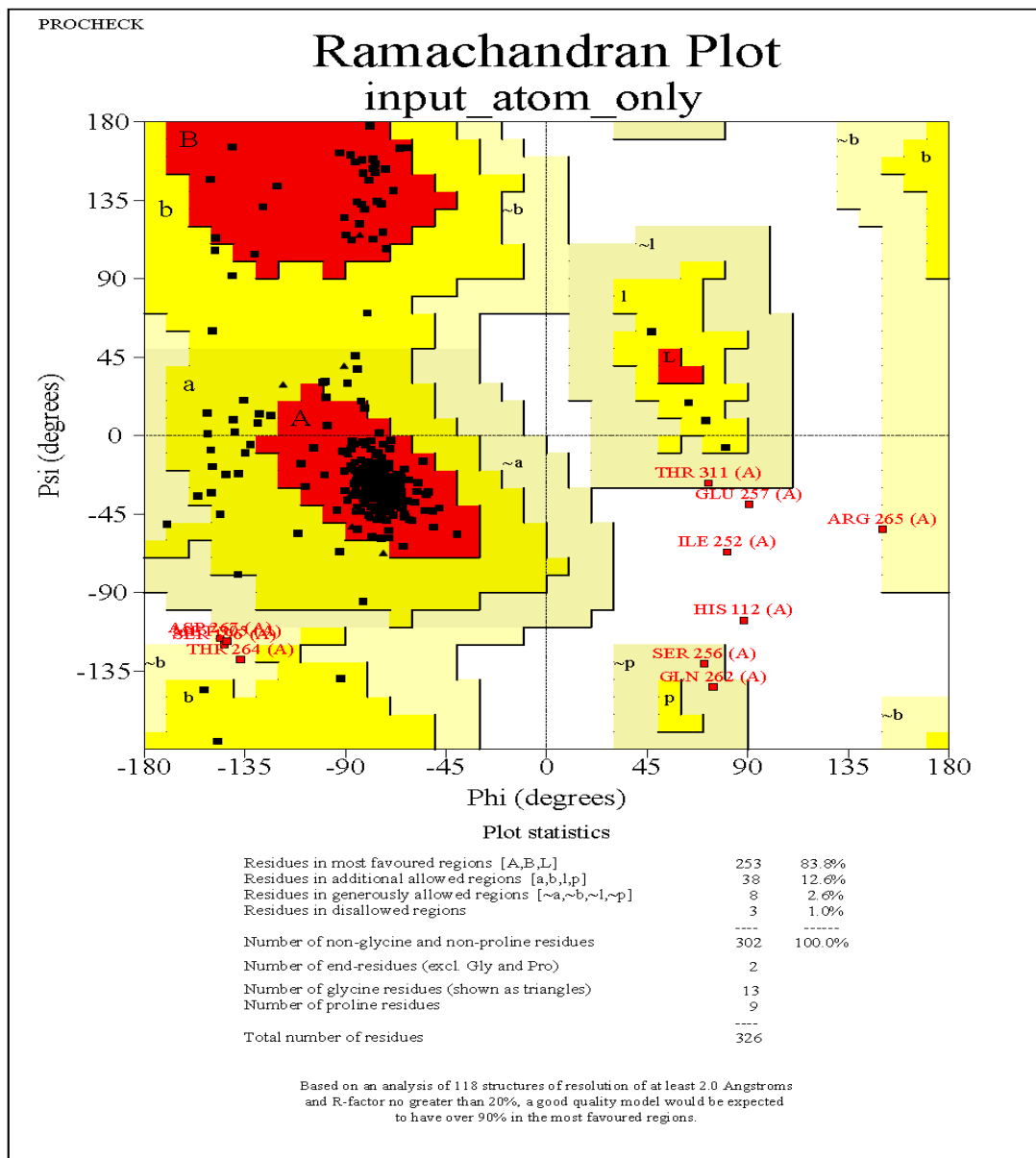


Figura A4.6. Diagrama de Ramachandran.

## **ANEXO V. ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE**

**Evaluación del compuesto 4.****Tabla A5.1.** Datos obtenidos de la evaluación

Tiempo	Vehículo			Glibencamida			<b>compuesto 4</b>		
	Media	E.E.M.	N	Media	E.E.M.	N	Media	E.E.M.	N
0	0.00	0.00	5	0.00	0.00	5	0.	0.00	5
1	9.10	10.98	5	-20.43	8.17	5	-19.	14.00	5
3	-1.71	5.11	5	-36.34	7.55	5	-10.	9.36	5
5	-0.51	5.11	5	-37.48	7.16	5	-41.	3.00	5
7	-5.67	6.09	5	-43.64	9.90	5	-55.	7.00	5

**Tabla A5.2.** Parámetros estadísticos

Vehículo vs Glibencamida							
Row Factor	Vehículo	Glibencamida	Difference	95% CI of diff.	t	P value	Summary
0	0.0000	0.0000	0.0000	-30.56 to 30.56	0.0000	P > 0.05	ns
1	9.100	-20.43	-29.53	-60.09 to 1.029	2.816	P < 0.05	*
3	-1.710	-36.34	-34.63	-65.19 to -4.071	3.303	P < 0.01	**
5	-0.5100	-37.48	-36.97	-67.53 to -6.411	3.526	P < 0.01	**
7	-5.670	-43.64	-37.97	-68.53 to -7.411	3.621	P < 0.01	**
Vehículo vs compuesto 4							
Row Factor	Vehículo	<b>compuesto 4</b>	Difference	95% CI of diff.	t	P value	Summary
0	0.0000	0.0000	0.0000	-30.56 to 30.56	0.0000	P > 0.05	ns
1	9.100	-19.00	-28.10	-58.66 to 2.459	2.680	P < 0.05	*
3	-1.710	-10.00	-8.290	-38.85 to 22.27	0.7907	P > 0.05	ns
5	-0.5100	-41.00	-40.49	-71.05 to -9.931	3.862	P < 0.01	**
7	-5.670	-55.00	-49.33	-79.89 to -18.77	4.705	P < 0.001	***