





FACULTAD DE QUÍMICA Y DE FARMACIA  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

**DEPARTAMENTO DE FARMACIA**

**“BÚSQUEDA DE MODULADORES DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE:  
SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE CARBAMOILLOS DE ANILLOS  
BENZOIMIDAZÓLICOS, DISEÑADOS POR ACOPLAMIENTO MOLECULAR  
INDUCIDO, DIRIGIDOS A LA ENZIMA FAAH”**

**ROSSY ANDREA ESCOBAR VALDERRAMA**

**Tesis para optar al Grado  
Académico de Doctor en Química**

**Director de Tesis : Dr. Carlos David Pessoa Mahana**

**Santiago, Enero 2021**

**DIRECCION DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

## AGRADECIMIENTOS

---

## AGRADECIMIENTOS

## **AGRADECIMIENTOS**

---

### **Agradecimientos**

En este camino largo y de muchísimo aprendizaje, quisiera dar las gracias a todos quienes han acompañado y aportado en este proceso, especialmente a mis padres, mi tutor, mis docentes y mis amigos.

Por otro lado, quisiera expresar mi mayor gratitud a mi comisión de postgrado por participar en las diferentes etapas de mi tesis y en cada una de las revisiones de los escritos entregados.

Además, agradezco a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (Beca Doctoral 21130881 y Fondecyt 1130701, 1150121), a la Vicerrectoría de Postgrado (Beca VRI) y a la Dirección de Investigación y Postgrado de la Facultad de Química por su constante preocupación y apoyo.

Finalmente, quisiera reconocer a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y los doctores Leonardo Pardo y Angel González, por guiarme en mi estadía doctoral.

## ÍNDICES

---

## ÍNDICES

# ÍNDICES

---

## ÍNDICE GENERAL

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| <b>ÍNDICES</b>           | <b>i</b> |
| ÍNDICE GENERAL           | ii       |
| ÍNDICE DE TABLAS         | v        |
| ÍNDICE DE FIGURAS        | vi       |
| <b>RESÚMENES</b>         | <b>x</b> |
| RESUMEN                  | xi       |
| ABSTRACT                 | xii      |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>      | <b>1</b> |
| Sistema Cannabinoide     | 2        |
| Reseña Histórica         | 2        |
| Receptores Cannabinoides | 4        |
| Endocannabinoides        | 5        |
| Sistema Enzimático       | 6        |
| Funciones Fisiológicas   | 9        |
| Fitocannabinoides        | 10       |
| Potencial Terapéutico    | 11       |
| Disponibilidad Comercial | 12       |
| Blancos Terapéuticos     | 13       |

## ÍNDICES

---

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>MARCO TEÓRICO</b>                                       | <b>14</b> |
| Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH)                          | 15        |
| Distribución tisular de FAAH                               | 16        |
| FAAH en el mecanismo de señalización endocannabinoide      | 17        |
| Modelos “ <i>in vivo</i> ” deficientes de FAAH             | 17        |
| Características estructurales de FAAH                      | 19        |
| Estructura cuaternaria de FAAH                             | 20        |
| Mecanismo catalítico de FAAH                               | 23        |
| Inhibidores de FAAH                                        | 27        |
| Inhibidores reversibles                                    | 28        |
| Inhibidores irreversibles                                  | 31        |
| <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>                               | <b>35</b> |
| Hipótesis                                                  | 36        |
| Objetivo General                                           | 37        |
| Objetivos Específicos                                      | 37        |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                              | <b>38</b> |
| Diseño Racional de Ligandos: Síntesis Química              | 39        |
| Diseño Racional de Ligandos: Evaluación Biológica          | 63        |
| Diseño Racional: Acoplamiento Molecular Inducido           | 69        |
| Diseño Racional de Ligandos: Relación Estructura Actividad | 86        |
| <b>CONCLUSIONES</b>                                        | <b>87</b> |

## ÍNDICES

---

|                                                                                                                                                   |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Conclusiones                                                                                                                                      | 88         |
| <b>CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN<br/>ESPECTROSCÓPICA</b>                                                                           | <b>90</b>  |
| Parte Experimental Sintética                                                                                                                      | 91         |
| Procedimiento general para la síntesis de 2-alkuil-1 <i>H</i> -<br>benzo[ <i>d</i> ]imidazoles (REA)                                              | 92         |
| Procedimiento general para la síntesis de derivados de cloruros<br>de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo (REB)                                        | 97         |
| Procedimiento general para la síntesis de derivados de [(4-<br>fenilpiperazinil)-1-carbonil]-2-alkuil-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol (REC) | 108        |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>                                                                                                                               | <b>155</b> |

## ÍNDICES

---

### ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1:</b> Actividad hidrolítica de FAAH (nmol/min/mg). <sup>81</sup>                 | 18 |
| <b>Tabla 2:</b> Rendimientos de reacción de 2-alkil-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol. | 41 |
| <b>Tabla 3:</b> Análisis elemental del producto ureico.                                    | 46 |
| <b>Tabla 4:</b> Análisis elemental de REB.                                                 | 50 |
| <b>Tabla 5:</b> Rendimientos de reacción de los carbamoilos sintetizados.                  | 54 |
| <b>Tabla 6:</b> Rendimientos de formación de los productos finales.                        | 62 |
| <b>Tabla 7:</b> Porcentaje de inhibición y actividad de los inhibidores.                   | 64 |
| <b>Tabla 8:</b> IC <sub>50</sub> del primer grupo de inhibidores propuestos.               | 65 |
| <b>Tabla 9:</b> Resultados del ensayo de viabilidad celular.                               | 66 |
| <b>Tabla 10:</b> IC <sub>50</sub> de los compuestos finales en r-FAAH y r-MAGL.            | 68 |
| <b>Tabla 11:</b> Acoplamiento molecular inducido de los compuestos REC-1 a REC-23.         | 78 |

## ÍNDICES

---

### ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura1:</b> Estructura química de $\Delta^9$ -THC.                              | 3  |
| <b>Figura2:</b> Estructuras químicas de ligandos endógenos. <sup>22</sup>           | 6  |
| <b>Figura3:</b> Mecanismo de formación de AEA. <sup>24</sup>                        | 7  |
| <b>Figura4:</b> Mecanismo de degradación de AEA. <sup>25</sup>                      | 7  |
| <b>Figura5:</b> Mecanismo de degradación de 2-AG. <sup>27</sup>                     | 8  |
| <b>Figura6:</b> Clasificación estructural de los fitocannabinoides. <sup>40</sup>   | 10 |
| <b>Figura7:</b> Esquema de señalización endocannabinoide en SNC. <sup>74</sup>      | 16 |
| <b>Figura8:</b> Sitio activo de la enzima en presencia del inhibidor MAFP.          | 21 |
| <b>Figura9:</b> Estructura cristalina del dímero de FAAH. <sup>70</sup>             | 21 |
| <b>Figura10:</b> Mecanismo hidrolítico propuesto para FAAH. <sup>92</sup>           | 24 |
| <b>Figura11:</b> Agujero oxianiónico cercano al sustrato. <sup>72</sup>             | 26 |
| <b>Figura12:</b> Agujero oxianiónico dentro del sitio activo de FAAH. <sup>72</sup> | 26 |
| <b>Figura13:</b> Primeros inhibidores de FAAH. <sup>86</sup>                        | 28 |
| <b>Figura14:</b> Estado de transición tetraédrico. <sup>99</sup>                    | 29 |
| <b>Figura15:</b> Inhibidores reversibles. <sup>100</sup>                            | 29 |
| <b>Figura16:</b> Estructura química de OL-135. <sup>74</sup>                        | 30 |
| <b>Figura17:</b> OL-135 co-cristalizado con r-FAAH. <sup>99</sup>                   | 30 |

## ÍNDICES

---

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura18:</b> Inhibidor covalente irreversible URB-597. <sup>105</sup>            | 31 |
| <b>Figura19:</b> Interacciones entre FAAH y URB-597. <sup>105</sup>                  | 31 |
| <b>Figura20:</b> Inhibidores irreversibles desarrollados por Pfizer. <sup>106</sup>  | 32 |
| <b>Figura21:</b> Inhibición de PF-622 sobre h-FAAH. <sup>106</sup>                   | 32 |
| <b>Figura22:</b> Tiadiazolilpiperazin-urea propuesta por Kono. <sup>64</sup>         | 33 |
| <b>Figura23:</b> Molécula utilizada para corroborar el grupo saliente. <sup>64</sup> | 34 |
| <b>Figura24:</b> Tiadiazolilpiperazin-urea propuesta por Kono. <sup>64</sup>         | 34 |
| <b>Figura25:</b> Estructura general de la serie de compuestos propuestos.            | 36 |
| <b>Figura26:</b> Esquema retrosintético de la serie propuesta.                       | 39 |
| <b>Figura27:</b> Síntesis de 2-alkil-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazoles.        | 40 |
| <b>Figura28:</b> Mecanismo de reacción de la condensación oxidativa.                 | 42 |
| <b>Figura29:</b> Espectro <sup>1</sup> H-RMN para el compuesto REA-2.                | 43 |
| <b>Figura30:</b> Espectro <sup>13</sup> C-RMN para el compuesto REA-2.               | 43 |
| <b>Figura31:</b> Síntesis propuesta para equivalente sintético.                      | 44 |
| <b>Figura32:</b> Espectro <sup>1</sup> H-RMN para el carbamoilo esperado.            | 45 |
| <b>Figura33:</b> Espectro <sup>13</sup> C-RMN para el carbamoilo esperado.           | 45 |
| <b>Figura34:</b> Síntesis completa entre fenilpiperazina y fosgeno.                  | 47 |
| <b>Figura35:</b> Nuevo esquema de reacción para el síntón propuesto.                 | 47 |
| <b>Figura36:</b> Espectro <sup>1</sup> H-RMN para REB-1.                             | 49 |

## ÍNDICES

---

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura37:</b> Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN para REB-1.                      | 49 |
| <b>Figura38:</b> Mecanismo de descomposición de trifosgeno.                     | 52 |
| <b>Figura39:</b> Ruta sintética de los compuestos finales.                      | 55 |
| <b>Figura40:</b> Curva dosis-respuesta de los inhibidores.                      | 65 |
| <b>Figura42:</b> <i>Ranking</i> alineamiento respecto a la secuencia de h-FAAH. | 70 |
| <b>Figura43:</b> Alineamiento de los modelos de la enzima FAAH.                 | 72 |
| <b>Figura44:</b> Validación entre 2VYA y 4HBP.                                  | 73 |
| <b>Figura45:</b> Validación entre 3PPM y 4HBP.                                  | 73 |
| <b>Figura46:</b> Validación entre 2VYA y 3PPM.                                  | 73 |
| <b>Figura47:</b> Validación del modelo y estructuras nativas.                   | 73 |
| <b>Figura48:</b> Modelo computacional de r/h-FAAH de tipo dimérico.             | 74 |
| <b>Figura49:</b> Validación del modelo de r/h-FAAH.                             | 75 |
| <b>Figura50:</b> Canales de acceso en el modelo de r/h-FAAH.                    | 76 |
| <b>Figura51:</b> REC-1.                                                         | 79 |
| <b>Figura52:</b> REC-2.                                                         | 79 |
| <b>Figura53:</b> REC-3.                                                         | 79 |
| <b>Figura54:</b> REC-4.                                                         | 79 |
| <b>Figura55:</b> REC-5.                                                         | 80 |
| <b>Figura56:</b> REC-6.                                                         | 80 |

## ÍNDICES

---

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura57:</b> REC-7.                                                                                                                       | 80  |
| <b>Figura58:</b> REC-8.                                                                                                                       | 80  |
| <b>Figura59:</b> REC-9.                                                                                                                       | 80  |
| <b>Figura60:</b> REC-10.                                                                                                                      | 80  |
| <b>Figura61:</b> REC-11.                                                                                                                      | 81  |
| <b>Figura62:</b> REC-23.                                                                                                                      | 81  |
| <b>Figura63:</b> Farmacóforo rígido.                                                                                                          | 82  |
| <b>Figura64:</b> Farmacóforo flexible.                                                                                                        | 82  |
| <b>Figura65:</b> Dinámica molecular de JG1.                                                                                                   | 84  |
| <b>Figura66:</b> Distancia entre JG1 y Ser241.                                                                                                | 84  |
| <b>Figura67:</b> Dinámica molecular de REC-9.                                                                                                 | 85  |
| <b>Figura68:</b> Distancia entre REC-9 y Ser241.                                                                                              | 85  |
| <b>Figura69:</b> Relación estructura actividad de la serie propuesta.                                                                         | 86  |
| <b>Figura70:</b> Esquema general de reacción de 2-alkil-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol.                                                | 92  |
| <b>Figura71:</b> Esquema general de reacción de derivados de cloruro de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo.                                       | 97  |
| <b>Figura72:</b> Esquema general de reacción de derivados de [(4-fenilpiperazinil)-1-carbonil]-2-alkil-1 <i>H</i> -benzo[ <i>d</i> ]imidazol. | 108 |

## RESÚMENES

---

## RESÚMENES

## RESÚMENES

---

### RESUMEN

Desde tiempos remotos, la *Cannabis* ha sido utilizada tanto por sus acciones medicinales como por sus efectos recreacionales. En la actualidad, hay un sin número de estudios científicos que avalan su uso terapéutico en el manejo del dolor, problemas cardiometabólicos, alteraciones gástricas y diversas enfermedades neurodegenerativas.

En esta investigación, se describe el diseño racional de ligandos, síntesis química y evaluación biológica de una serie de 23 compuestos que tendrían la capacidad de modular el sistema endocannabinoide a través de la inhibición de la enzima FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase), que es la encargada de degradar los ligandos endógenos producidos “a demanda”, para mantener los procesos homeostáticos relacionados con las acciones primarias del ser humano.

El diseño del esqueleto estructural fue construido a través de estudios de acoplamiento molecular inducido, desarrollado previamente por el grupo de investigación y refinado posteriormente. La síntesis química se desarrollo en tres pasos de reacción, siendo el uso de trifosgeno vital para el éxito de la reacción, ya que permitió controlar la cinética y velocidad de la misma. Por último, se midió la capacidad inhibitoria de la serie, donde 8 moléculas fueron activas, siendo REC-2 el con menor IC<sub>50</sub> (2,08  $\mu$ M). Cabe destacar, que se determinó que la serie es selectiva por la enzima y no tiene efecto sobre MAGL (Mono Acyl Glycerol Lipase).

Con esto, se obtuvo la relación estructura-actividad y el farmacóforo de la serie propuesta que permitirá futuros rediseños moleculares para aumentar la capacidad inhibitoria de los compuestos.

### ABSTRACT

Since ancient times Cannabis has been used by humans for medical and recreational practices. Currently, there is a number of scientific studies supporting the therapeutic properties of cannabis in the management of pain, cardiometabolic problems, gastric alterations and various neurodegenerative diseases.

In this work, we describe an *in silico* drug design, chemical synthesis and biological evaluation of a series of 23 compounds that would have the ability to modulate the endocannabinoid system through the inhibition of the Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) enzyme. The FAAH degrades the endogenous ligands produced "on demand" to conserve the homeostatic processes balanced in the body.

The structure-based drug design was performed through studies of induced molecular coupling, previously developed by our research group and subsequently optimized. The chemical synthesis was developed during three reaction steps, being the use of triphosgene vital for the success of the chemical reaction. This allowed to control the kinetics and speed of the chemical reaction. Finally, the inhibitory activity of the 23 compounds was measured on FAAH was evaluated. Eight molecules were active, with REC-2 having the lowest  $IC_{50}$  (2.08  $\mu$ M). It is worth to mention that the 23 molecules designed were selective for the FAAH and had no effect on Monoacyl Glycerol Lipase (MAGL) activity.

In summary, the work described in this thesis provides essential information on the structural features of the 23 compounds and their structure-activity relationship that will be important regarding its use in drug design.

## INTRODUCCIÓN

---

## INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

---

### Sistema Cannabinoide

En los últimos años, los científicos especialistas en Química Médica han puesto un especial énfasis en el estudio del sistema endocannabinoide. La evidencia científica muestra que la manipulación de este sistema es absolutamente innovadora y presenta importantes aplicaciones terapéuticas.

### Reseña Histórica

Desde tiempos remotos, la naturaleza ha sido utilizada por el hombre debido a sus cualidades medicinales, recreacionales, textiles, agrícolas, entre otras. La *Cannabis*, o también denominada marihuana, es uno de los cultivos más longevos de la historia, fue utilizada como un precursor de fibra, alimentos y medicina desde la antigüedad <sup>1</sup>; así, la datación por carbono, estima el uso de fibras en forma de cáñamo ya en el año 4.000 AC <sup>2</sup>.

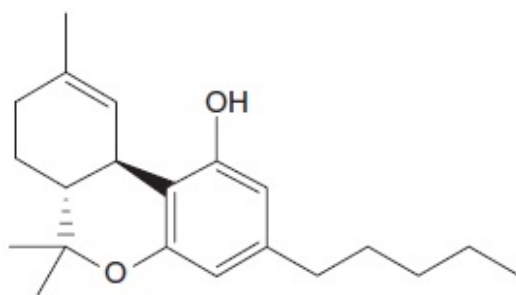
Por otro lado, el uso medicinal de *Cannabis* se describe desde el 5.000 AC; en esos años, el emperador chino Chen Nung habría escrito “Shen-nung pen ts’ao ching”, la farmacopea china más antigua existente hasta nuestros días. En ella, Nung describe que las flores de la planta hembra de marihuana contiene la mayor cantidad de energía yin o energía femenina; se prescribía en casos de fatiga menstrual, reumatismo, malaria y estreñimiento. En caso de sobredosis, se experimentaban visiones con demonios y de ser utilizada por largos períodos de tiempo, el paciente podía establecer comunicación con espíritus <sup>3</sup>. Además de la presencia en la cultura china, existen reportes de uso clínicos en diversas

## INTRODUCCIÓN

---

civilizaciones como la Asiria, Egiptia, India, Aria, Griega, Helénica y en textos religiosos como el Antiguo Testamento <sup>4</sup>.

El primer componente psicoactivo de la marihuana fue aislado e identificado por Gaoni y Mechoulam en 1964, siendo denominado  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) <sup>5</sup>. Posteriormente, sobrevino el hallazgo de diversos fitocannabinoides y ligandos endógenos, destacando la anandamida en 1992 <sup>6</sup>. En la Figura1, se describe la estructura química de  $\Delta^9$ -THC.



**Figura1:** Estructura química de  $\Delta^9$ -THC.

En 1990, las investigaciones realizadas hasta ese minuto, permitieron el descubrimiento de dos receptores acoplados a proteína G ( $CB_1$  y  $CB_2$ ) que eran capaces de unirse a fitocannabinoides y endocannabinoides <sup>7</sup>. Seis años más tarde, se identifica la enzima FAAH (por sus siglas en inglés: *Fatty Acid Amide Hydrolase*) perteneciente a la familia de las amidasas; ésta, tenía la capacidad de hidrolizar anandamida y otros endocannabinoides <sup>8</sup>. En 2004, Di Marzo propone la existencia de un sistema de regulación endógeno denominado “Sistema Endocannabinoide” (ECS, por sus siglas en inglés) formado por: receptores cannabinoides, “endocannabinoides”, enzimas encargadas

## INTRODUCCIÓN

---

de la síntesis-degradación de los ligandos endógenos y un mecanismo de recaptación celular no identificado totalmente <sup>9</sup>.

La *Cannabis* es una planta de la familia de las *Cannabaceae* con tres especies primarias que varían según sus componentes bioquímicos: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* y *Cannabis ruderalis* <sup>1</sup>. Actualmente, la *Cannabis* es la droga ilícita más utilizada a nivel mundial, se estima que su consumo alcanza el 4 % de la población y el 10 % de estos usuarios la consume diariamente <sup>10</sup>.

### Receptores Cannabinoides

Acerca de los receptores cannabinoides, hasta la fecha se han identificado dos subtipos: receptor cannabinoide tipo 1 (CB<sub>1</sub>) y receptor cannabinoide tipo 2 (CB<sub>2</sub>). Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs); caracterizados por poseer 7 dominios transmembranales y controlar una amplia variedad de transducción de señales <sup>11</sup>. Adicionalmente, el primer subtipo, tiene la capacidad de acoplarse a canales de potasio y calcio a través de proteína G<sub>s</sub>.

El receptor CB<sub>1</sub>, está distribuido principalmente en el sistema nervioso central en axones y terminales nerviosos; además, es el GPCRs más abundante a nivel cerebral y su modulación está relacionada con procesos cognitivos, funciones motoras y sensoriales <sup>12</sup>. CB<sub>1</sub> también se expresa, aunque en menor cuantía, a nivel periférico en tracto gastrointestinal, páncreas, hígado, riñones, próstata, testículos, útero, ojos, células adiposas y corazón <sup>13</sup>.

## INTRODUCCIÓN

---

CB<sub>2</sub>, por el contrario, se encuentra expresado de manera mayoritaria en células y tejidos del sistema inmune como bazo, timo <sup>14</sup>, amígdalas, linfocitos, monocitos y neutrófilos <sup>15</sup>; en tanto, en tejidos periféricos, se encuentra en miocardio, intestino, endotelio, músculo liso, páncreas, hueso y órganos reproductivos como también en varios tipos de células tumorales <sup>16</sup>. La activación de CB<sub>2</sub> regula procesos inflamatorios y de dolor <sup>17</sup>; sin embargo, recientemente se ha encontrado presencia de receptores de este tipo a nivel cerebral que participarían en procesos de neuroprotección <sup>18</sup>.

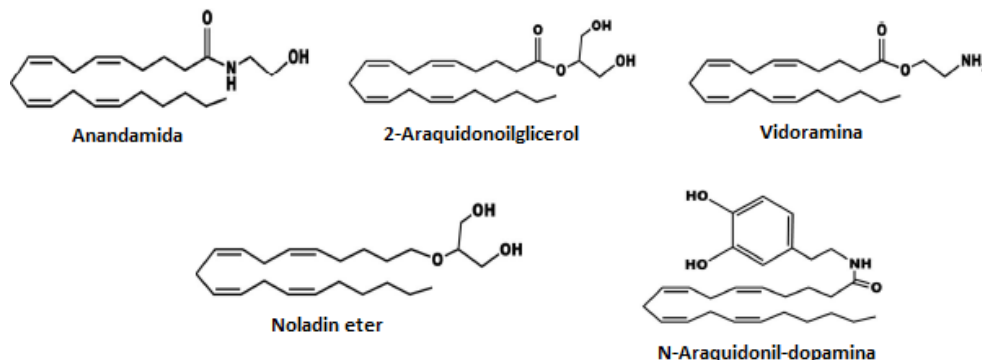
### Endocannabinoides

Tanto CB<sub>1</sub> como CB<sub>2</sub>, son modulados por ligandos endógenos denominados “endocannabinoides” quienes tienen la capacidad de acoplarse a dichos receptores; esta acción, produce la activación de la proteína heterotrimérica G<sub>i/o</sub> provocando una inhibición de adenilciclase y la consecuente reducción en la acumulación de AMP cíclico <sup>19</sup>.

Estos ligandos son amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos de cadena larga que debido a su elevado carácter lipofílico no pueden ser almacenados en vesículas por lo que su producción es “a demanda”; es decir, se sintetizan y se liberan sólo cuando son necesarios <sup>20</sup>. Los principales endocannabinoides son anandamida (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG); por una parte, AEA tiene una afinidad agonista parcial ligeramente más elevada por CB<sub>1</sub> que por CB<sub>2</sub>; en cambio, 2-AG se une con afinidad similar por ambos receptores; pero, en comparación con AEA, tiene mayor potencia tanto en CB<sub>1</sub> como en CB<sub>2</sub>, enlazándose con mayor eficacia a CB<sub>1</sub> <sup>21</sup>. En la Figura 2, se observan las

## INTRODUCCIÓN

estructuras químicas de diversos endocannabinoides, siendo los más relevantes anandamida (AEA) y 2-Araquidonoilglicerol (2-AG).

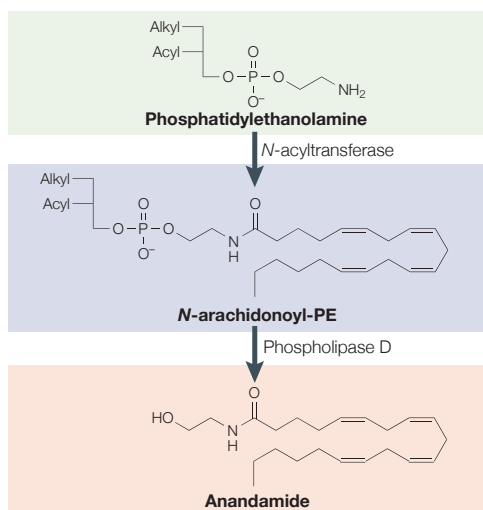


**Figura2:** Estructuras químicas de ligandos endógenos. <sup>22</sup>

### Sistema Enzimático

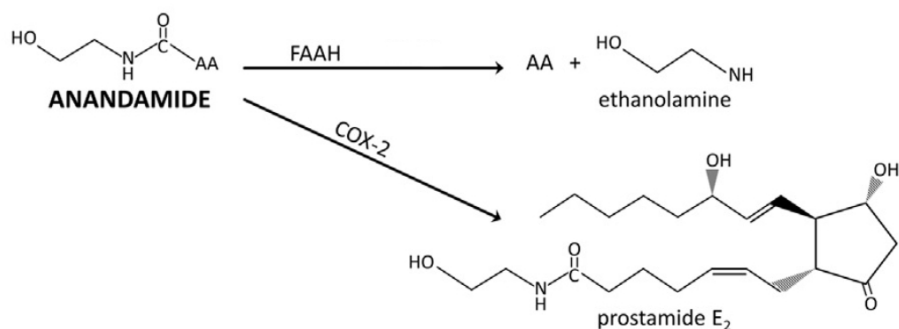
En relación al sistema enzimático, la obtención de AEA se produce en dos pasos. La primera etapa es estímulo-dependiente, el precursor *N*-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) es hidrolizado por una fosfolipasa D específica (NAPE-PLD) para ser convertido en AEA <sup>23</sup>; como las cantidades existentes de NAPE a nivel cerebral son muy pequeñas para mantener la liberación de AEA por un período largo de tiempo; en una segunda etapa, los reservorios celulares de NAPE son restablecidos por la enzima *N*-acetil-transferasa (NAT), encargada de catalizar la transferencia del grupo Ácido Araquidónico (AA) a fosfatidiletanolaminas, que son un conjunto de ácidos grasos encontrados a nivel de fosfolípidos de membrana. Se ha observado que este último proceso, es regulado por dos segundos mensajeros: Ca<sup>2+</sup> y AMPc, ya que en su ausencia, NAT se vuelve inactiva <sup>24</sup>. En la Figura3, se esquematiza la formación de AEA.

## INTRODUCCIÓN



**Figura3:** Mecanismo de formación de AEA. <sup>24</sup>

A nivel cerebral AEA es mayoritariamente inactivada por hidrólisis mediada por la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH: Fatty Acid Amide Hydrolase), principalmente por la isoforma FAAH-1 y en menor medida por FAAH-2. Los metabolitos resultantes son AA y etanolamina. Una segunda vía de degradación de AEA es por oxidación, a través de la enzima COX-2, generando prostamidas <sup>25</sup>. En la Figura4, se pueden examinar ambas vías.

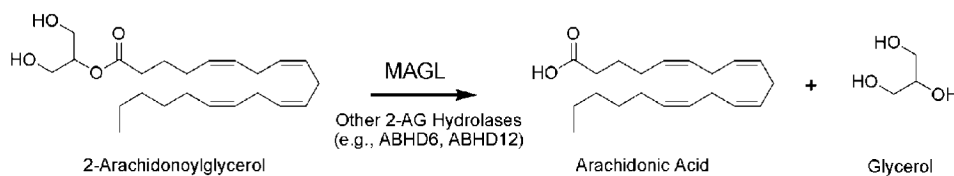


**Figura4:** Mecanismo de degradación de AEA. <sup>25</sup>

## INTRODUCCIÓN

2-AG es biosintetizado desde 1-acil-2-araquidonoilglicerol; éste precursor se encuentra en los fosfolípidos de membrana y es degradado por hidrólisis enzimática promovida por dos diacilglicerol lipasas selectivas: DAGL $\alpha$  y DAGL $\beta$  <sup>26</sup>.

Por otro lado, la degradación de 2-AG es promovida principalmente por monoacilglicerol lipasa (MAGL) produciendo AA y glicerol. Sin embargo, como se aprecia en la Figura5, algunos autores postulan que un 85 % de la metabolización de 2-AG se debe a MAGL y que el 15 % restante, depende de diversas hidrolasas específicas que difieren según la distribución celular <sup>27</sup>.



**Figura5:** Mecanismo de degradación de 2-AG. <sup>27</sup>

Acerca de la distribución enzimática, FAAH se encuentra mayoritariamente en forma intracelular y de manera post-sináptica. En gran parte de los tejidos, ésta enzima determina la actividad de los receptores CB<sub>1</sub> que se encuentran a nivel pre-sináptico; en otras regiones regula los niveles post-sinápticos de anandamida e incluso, por ejemplo, en el *globus pallidus* y la sustancia nigra pars reticulata, los receptores CB<sub>1</sub> no se asocian con la expresión de FAAH <sup>28</sup>.

Por otra parte, MAGL está distribuido intracelularmente, en las mismas regiones cerebrales que CB<sub>1</sub>; es sintetizado en las neuronas post-sinápticas actuando como una señal retrógrada en las fibras pre-

## INTRODUCCIÓN

---

sinápticas para luego ser inactivado cerca de su sitio de acción en el receptor CB<sub>1</sub> <sup>29</sup>.

### Funciones Fisiológicas

El sistema endocannabinoide (ECS) juega un papel crucial en la homeostasis en regiones como el cerebro, la piel, el tracto digestivo, sistema cardiovascular, sistema genitourinario y huesos <sup>30</sup>. También, se ha descrito que modula el desarrollo embriológico, la plasticidad neuronal, la neuroprotección, la inmunidad, la inflamación, la apoptosis, la carcinogénesis, el dolor, la memoria emocional, el hambre, la alimentación y el metabolismo. En resumen, los roles homeostáticos asociados al ECS han sido descritos en acciones primarias para el ser humano: relajarse, comer, dormir, olvidar y proteger <sup>31</sup>.

Diversos factores ambientales (incluidos estilo de vida, dieta, actividad aeróbica, etc.), pueden afectar el “tono endocannabinoide” relacionado con la densidad de receptores, regulación positiva/negativa y la relativa presencia o ausencia de cannabinoides endógenos. Por esto, algunos autores han propuesto que la deficiencia endocannabinoide pudiera ser responsable de enfermedades que cursan con dolor o con trastornos psicológicos y/o psiquiátricos <sup>32</sup>.

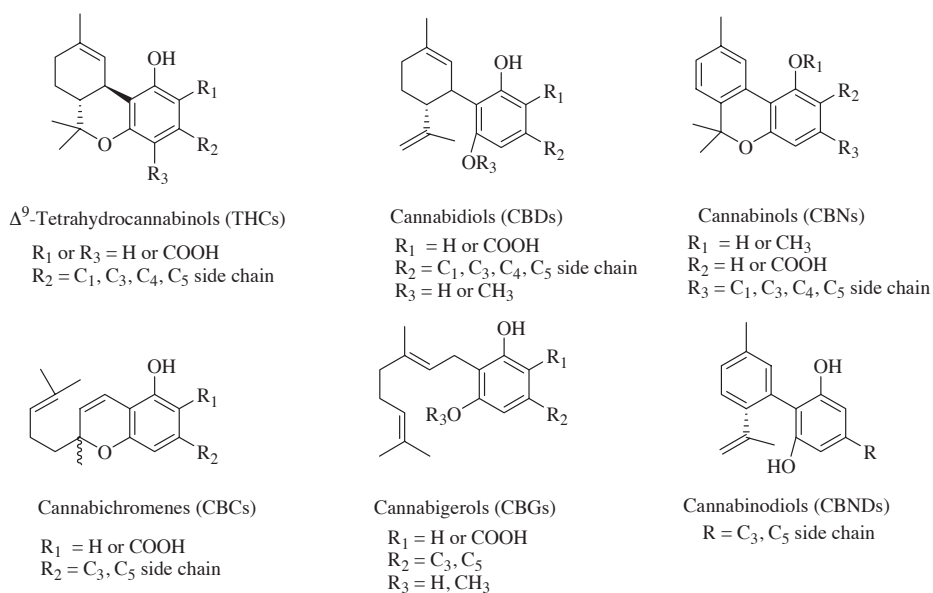
Por ejemplo, en individuos obesos, se aprecia un aumento en el tono cannabinoide produciendo una disfunción alimenticia <sup>33</sup>. Por otro lado, se ha planteado que la migraña, fibromialgia y el síndrome del intestino irritable constituyen “síndromes de deficiencia de endocannabinoides” <sup>34</sup>. Adicionalmente, hay reportes que indican que una desregulación del tono cannabinoide, estaría implicado en las descompensaciones de las

## INTRODUCCIÓN

siguientes patologías: esquizofrenia <sup>35</sup>, esclerosis múltiple <sup>36</sup>, enfermedad de Huntington <sup>37</sup>, anorexia <sup>38</sup>, cinetosis <sup>39</sup>.

### Fitocannabinoides

Actualmente, se ha determinado que *Cannabis sativa* tiene la capacidad de sintetizar cerca de 500 biomoléculas de diversas estructuras químicas. Entre estos derivados, se distinguen los fitocannabinoides que son alrededor de 70 compuestos que solo se encuentran en esta planta <sup>40</sup>. En orden de abundancia, los más presentes son: tetrahidrocannabinoles (THCs), cannabidiolos (CBDs), cannabinoles (CBNs), cannabigeroles (CBGs) y cannabicromenos (CBCs). La mayoría de ellos son terpenoides tricíclicos con 21 átomos de carbono; aunque esto difiere según el largo de la cadena lateral que sustituye al anillo aromático (C-3) <sup>41</sup>. En la Figura6 se presentan las correspondientes estructuras químicas.



**Figura6:** Clasificación estructural de los fitocannabinoides. <sup>40</sup>

## INTRODUCCIÓN

---

Como se mencionó, el uso medicinal y recreacional de marihuana proviene desde la antigüedad; el principal responsable es  $\Delta^9$ -THC que se encuentra presente en grandes cantidades en la planta. Los efectos clínicos del uso de *Cannabis sativa*, ya sea por ingesta o inhalación, son prometedores <sup>42</sup>; se asocian principalmente a la activación a nivel central del receptor CB<sub>1</sub>, siendo utilizada en pacientes con problemas relacionados con: dolor inflamatorio y/o neuropático <sup>43</sup>, náuseas, vómitos <sup>44</sup>, disminución del apetito <sup>45</sup>, aumento de la presión intraocular <sup>46</sup>, desórdenes neurodegenerativos <sup>47</sup>, control de espasticidad <sup>48</sup>, psicosis <sup>49</sup>, procesos tumorales <sup>50</sup>, epilepsia <sup>51</sup>, estrés y ansiedad <sup>52</sup>.

### Potencial Terapéutico

Referente al potencial terapéutico de los cannabinoides, los ligandos agonistas CB<sub>1</sub> actúan como estimulantes del apetito, antieméticos, analgésicos, inhibidores en el crecimiento tumoral y neuroprotectores. Conjuntamente, los ligandos antagonistas a este receptor han sido estudiados para combatir la obesidad y problemas cardiometabólicos <sup>53</sup>.

Por otro lado, los agonistas CB<sub>2</sub> están relacionados con el tratamiento del dolor, aterosclerosis, infarto de miocardio, isquemia, alteraciones gástricas de tipo inflamatorio y autoinmune, desórdenes neurodegenerativos como enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington, isquemia hepática, inflamación, fibrosis, desórdenes renales, trastornos óseos y cáncer <sup>54, 55</sup>. En el caso de los antagonistas CB<sub>2</sub>, están indicados como antiinflamatorios y antialérgicos <sup>56</sup>. Cabe destacar que los antagonistas CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> también podrían actuar como agonistas inversos <sup>57</sup>.

### Disponibilidad Comercial

Comercialmente, se encuentran disponibles en el mercado estadounidense y europeo los siguientes agonistas cannabinoides: Marinol® (dronabinol/ $\Delta^9$ -THC sintético) que es utilizado como antiemético y estimulante del apetito en pacientes con SIDA que presentan excesiva disminución de peso o caquexia; Cesamet® (nabilona) utilizado para combatir los efectos adversos de la quimioterapia como náuseas y/o vómitos y Sativex® que contiene igual proporción de  $\Delta^9$ -THC y de cannabinoides no psicoactivos siendo prescrito para dolor neuropático en esclerosis múltiple y como analgésico en cáncer avanzado <sup>58</sup>.

Cabe destacar, que en octubre de 2016, en Chile se aprueba el registro de Sativex® para ser comercializado con la siguiente indicación clínica: “tratamiento de los síntomas en pacientes adultos con espasticidad moderada o grave debida a esclerosis múltiple, que no han respondido de forma adecuada a otros medicamentos antiespásticos”, siendo el primer medicamento a base de cannabis autorizado en el país ([www.ispch.cl](http://www.ispch.cl)).

En 2006, se lanzó al mercado Acomplia® (SR1411716A, Rimonabant); convirtiéndose en el primer antagonista CB<sub>1</sub> desarrollado para el tratamiento de la obesidad. Lamentablemente, debió ser retirado por los efectos ansiogénicos e ideas suicidas asociadas a su uso <sup>59</sup>.

## INTRODUCCIÓN

---

### Blancos Terapéuticos

Los blancos terapéuticos asociados al sistema cannabinoide están relacionados principalmente con la modulación sobre CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> junto con la inhibición de las enzimas FAAH y MAGL <sup>60</sup>.

Es importante destacar que si bien la modulación de CB<sub>1</sub> provee importantes aplicaciones terapéuticas, la activación de este receptor es responsable de diversos efectos psicoactivos en el sistema nervioso central, como por ejemplo: sedación, dependencia, deterioro cognitivo, psicosis y afecciones en el sistema cardiovascular <sup>61</sup>.

Aunque la acción de CB<sub>2</sub> es periférica y al parecer no produce activación a nivel central; en los ensayos preclínicos, los posibles fármacos muestran promisorios efectos pero clínicamente fallan. Algunas de las razones son: irreproducibilidad de los estudios, falta de selectividad de los ligandos, dosis inviables en modelos humanos, etc <sup>62</sup>.

Por esto, se considera innovadora la regulación de la enzima FAAH ya que su inhibición activa los receptores cannabinoides por bloqueo en la degradación de AEA. Ésta, al ser estimulada por mecanismos fisiológicos, se sintetiza a demanda sólo donde se encuentra la alteración disminuyendo los efectos adversos mencionados anteriormente <sup>63</sup>. Asimismo, este aumento endógeno de AEA, puede provocar a nivel periférico la estimulación de CB<sub>2</sub> logrando un efecto antiinflamatorio por supresión en la secreción de mediadores químicos, asociados a la inflamación <sup>64</sup>.

**MARCO TEÓRICO**

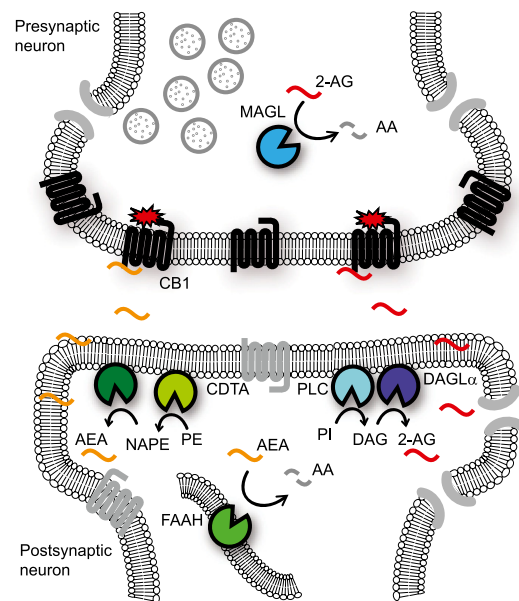
### Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH)

A mediados de la década de los 80's, Schmid *et al.*<sup>65</sup> aislaron desde hígado de rata una enzima asociada a membrana que podía hidrolizar diversas amidas de ácidos grasos, tanto saturados como insaturados. Luego, fue descrita una enzima con propiedades parecidas en células de neuroblastoma y en tejido cerebral de mamífero; ésta, transformaba anandamida en ácido araquidónico. Al mismo tiempo, era reportada otra enzima cerebral que hidrolizaba oleamida (sustancia inductora del sueño) en su correspondiente ácido graso<sup>66</sup>. Estos estudios de enzimas que poseen actividad hidrolítica y características comunes, como: distribución en tejidos, asociación a membranas y sensibilidad a inhibidores de enzimas hidrolasas de serinas y cisteínas, fueron realizados de manera independiente entre sí; sugiriendo, que podría tratarse de una enzima muy similar<sup>67</sup>.

En 1996, se purificó desde la membrana plasmática de hígado de rata, la proteína que hidrolizaba oleamida; sin embargo, cuando las células fueron transfectadas se observó actividad hidrolítica no sólo en oleamida sino que también en anandamida, confirmando que la misma enzima tenía la capacidad de degradar amidas y ésteres unidos a grandes cadenas carbonadas de tipo lipofílico<sup>8</sup>. Debido a los numerosos ácidos grasos endógenos que puede aceptar como sustratos, a esta enzima se le denominó: amida hidrolasa de ácidos grasos (Fatty Acid Amide Hydrolase: FAAH, por sus siglas en inglés). En un corto plazo, fueron clonados ortólogos de FAAH provenientes de humanos, ratones<sup>68</sup> y cerdos<sup>69</sup>, mostrando más de un 90 % de homología en su identidad de secuencia. Asimismo, la selectividad de los sustratos y la sensibilidad de los inhibidores fue equivalente entre las especies mencionadas<sup>70</sup>.

### Distribución tisular de FAAH

FAAH se encuentra principalmente a nivel cerebral; aunque estudios realizados con técnicas de RT-PCR, evidencian su presencia en: riñones, hígado, intestino delgado, pulmón, próstata y testículos <sup>71</sup>. Particularmente; se encuentra alojada post-sinápticamente, en las membranas intracelulares que se encuentran citosólicamente, tanto en el aparato de *Golgi* como en el retículo endoplasmático (Figura7) <sup>72, 73</sup>.



**Figura7:** Esquema de señalización endocannabinoide en SNC. <sup>74</sup>

Relacionado con la distribución del receptor cannabinoide tipo 1, en diversas regiones del cerebro; incluyendo el neocórtex, la corteza cerebelosa y el hipocampo; la enzima y CB<sub>1</sub> presentan distribuciones subcelulares complementarias <sup>75</sup>.

### **FAAH en el mecanismo de señalización endocannabinoide**

La señalización endocannabinoide difiere de otros mecanismos de señalización en el sistema nervioso central (SNC); en este caso, pareciera actuar de manera retrógrada, esto quiere decir que la estimulación de la neurona post-sináptica desencadena la biosíntesis de AEA y 2-AG, que son liberados y transportados hacia los receptores CB<sub>1</sub> que se encuentran a nivel pre-sináptico. Una vez que los endocannabinoides se acoplan al receptor y provocan su activación, la proteína G<sub>i/o</sub> inicia la cascada de señalización que regula canales de calcio y potasio lo que, finalmente, suprime la biosíntesis de estos neurotransmisores (Figura7) <sup>76</sup>.

Es importante considerar que la activación de CB<sub>1</sub> inhibe la neurotransmisión; por lo tanto, el resultado final de la cascada de señalización endocannabinoide depende de la naturaleza de las células participantes. Por ejemplo, en el caso que el receptor se active en neuronas glutamatérgicas, la señalización será globalmente inhibitoria; por el contrario, si la estimulación del receptor se produce en neuronas GABAérgicas, el efecto será "desinhibitorio" (excitatorio) <sup>77</sup>.

### **Modelos “*in vivo*” deficientes de FAAH**

Anandamida, es un ligando endógeno que activa el receptor CB<sub>1</sub> de manera débil y transitoria si se compara con ligandos exógenos; como THC y cannabidiol. La vida media de AEA en cerebro de rata es menor a 5 minutos <sup>78</sup>, mientras que THC administrado por vía oral puede alcanzar las 25 horas <sup>79</sup>. Entonces, se podría sugerir que la acción farmacológica de anandamida, en vivo, se ve limitada por una rápida degradación donde

## MARCO TEÓRICO

---

estarían involucrados diversos mecanismos, tales como: difusión pasiva a través de la membrana celular; un transportador transmembrana funcional en torno a la acumulación de AEA y/o la acción hidrolítica por parte de FAAH <sup>80</sup>.

La determinación de la función específica de FAAH, en el proceso de degradación, fue posible gracias a la generación y caracterización de un modelo de ratón transgénico carente de la enzima [FAAH (-/-)]. Estos ratones FAAH (-/-) se generaron por procedimientos estándares de modificación genética; resultando viables, saludables y fértiles <sup>81</sup>. Se analizó la reducción en la hidrólisis de anandamida y oleamida en extractos de tejidos de cerebro e hígado de ratones control [FAAH (+/+)] y ratones knockout [FAAH (-/-)]; en la siguiente tabla se observan los resultados:

| Tejido  |            | Hidrólisis<br>Anandamida | Hidrólisis<br>Oleamida |
|---------|------------|--------------------------|------------------------|
| Cerebro | FAAH (-/-) | 0,33 ± 0,04              | 0,24 ± 0,03            |
|         | FAAH (+/+) | 0,003 ± 0,002            | 0,004 ± 0,002          |
| Hígado  | FAAH (-/-) | 0,53 ± 0,06              | 0,54 ± 0,01            |
|         | FAAH (+/+) | 0,01 ± 0,01              | 0,03 ± 0,01            |

**Tabla 1:** Actividad hidrolítica de FAAH (nmol/min/mg). <sup>81</sup>

En ambos tejidos, la tasa de hidrólisis de anandamida se redujo drásticamente en los ratones con genes desactivados; en cerebro e hígado, disminuyó 100 y 50 veces respectivamente frente al control. Esto hace presumir, que la principal enzima responsable del metabolismo hidrolítico en vivo de AEA, fue FAAH. Para confirmar dicha presunción,

los ratones FAAH (-/-) fueron sometidos a la administración de anandamida por vía intraperitoneal, presentando efectos fisiológicos exagerados respecto a los ratones nativos, entre los que se incluyen: hipomotilidad, hipoalgesia, hipotermia y catalepsia. Finalmente, todos los síntomas que produjo la administración de AEA, descritos anteriormente, fueron bloqueados por un antagonista CB<sub>1</sub> (SR141716A), sugiriendo que anandamida actuaría como ligando selectivo en dicho receptor <sup>72, 81</sup>.

Lichtman *et al.* <sup>82</sup>, se interesaron particularmente por la hipoalgesia exhibida por los ratones FAAH (-/-); considerando, que es uno de los promisorios efectos clínicos que se desea obtener con la modulación de la enzima. En su estudio, expusieron a estos ratones con genes desactivados a distintos estímulos dolorosos e inflamatorios, tanto en casos crónicos como agudos. Se determinó que la carencia de FAAH produce elevados niveles de anandamida en médula espinal y cerebro provocando hipoalgesia, probablemente mediada por CB<sub>1</sub>; sin embargo, presentaron movilidad y termorregulación normal, lo que es altamente afectado cuando se administran agonistas de este receptor. Por otro lado, se observó anti-inflamación, probablemente mediada por CB<sub>2</sub>, en presencia de carragenina. (sustancia precursora de procesos inflamatorios). Con estos hallazgos, se propone que la inhibición de FAAH puede aumentar el tono endocannabinoide a nivel local; siendo una notable estrategia en trastornos de dolor, incluso cuando están acompañados de inflamación.

### **Características estructurales de FAAH**

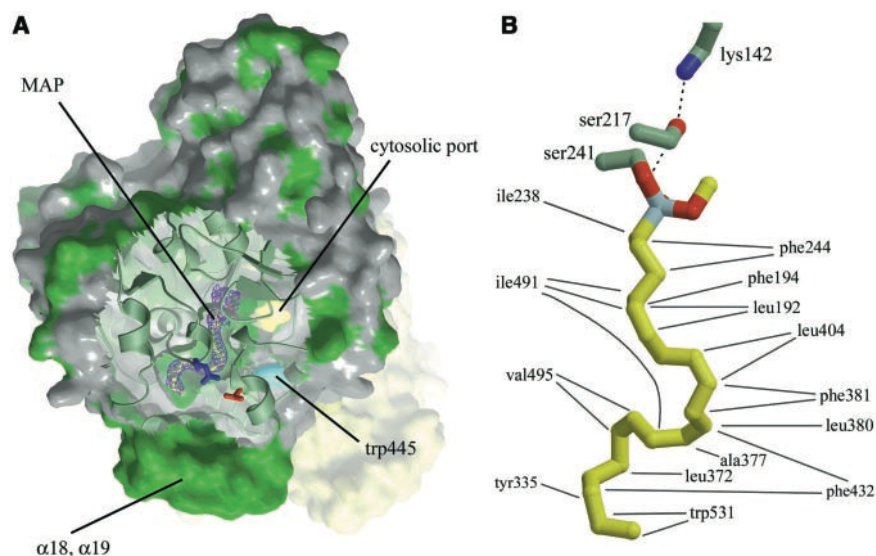
FAAH es una enzima hidrolasa anclada a membrana con forma globular. Posee 28  $\alpha$ -hélices y 11 hojas plegadas  $\beta$  que representan cerca de un

53 % y un 13 %, respectivamente, de la estructura total de la proteína <sup>83</sup>. Pertenece a la familia de las amidasas (AS) que contienen una secuencia altamente conservada con cerca de 130 aminoácidos; la gran mayoría de estas amidasas se encuentran en bacterias y hongos siendo FAAH, hasta hace pocos años, conocida como la única enzima de este tipo que se presenta en tejidos mamíferos <sup>68</sup>. La transfección del gen FAAH en células COS-7 resulta en la expresión de una proteína de 63 kDA con 579 aminoácidos <sup>72</sup> y un 73 % de similitud en todas las especies donde se encuentra presente, incluyendo las no mamíferas <sup>84</sup>. FAAH se considera inusual dentro de las AS ya que es una enzima con un dominio *N*-terminal transmembrana (aminoácidos desde 9-29) que no está presente en este tipo de proteínas <sup>68</sup>; sin embargo, cuando se realizó una delección de los 30 primeros aminoácidos, se produjo una especie mutante, catalíticamente activa, que se mantenía unida a la membrana, lo que sugiere que FAAH posee múltiples mecanismos de integración a la membrana plasmática <sup>85</sup>.

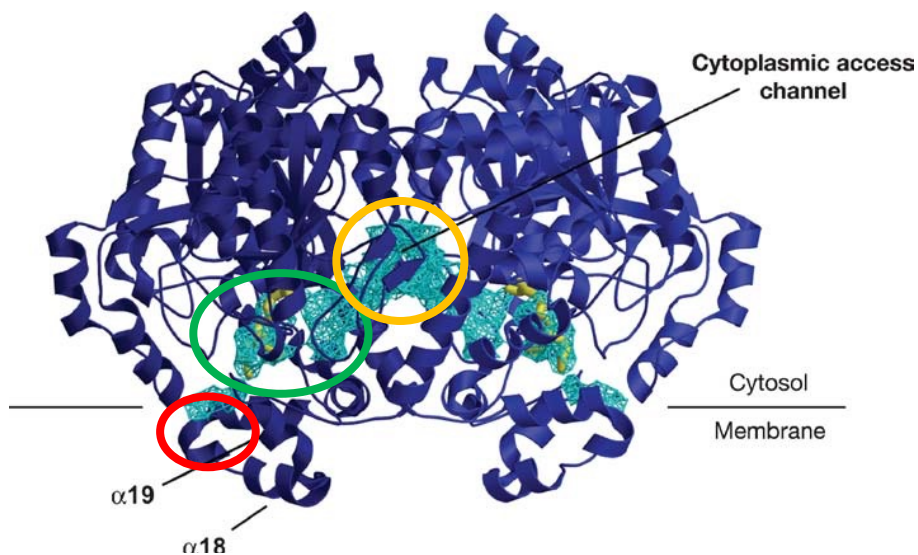
### Estructura cuaternaria de FAAH

En el año 2002, Bracey *et al.* <sup>83</sup> reportan la primera estructura cristalina de FAAH proveniente de rata, a través de difracción de rayos X; para esto, co-cristalizaron la enzima con el inhibidor metoxi araquidonoil fluorofosfonato (MAFP) obteniendo una resolución de 2,8 Å (código PDB: 1MT5).

En la Figura 8, se presenta: (a) en violeta, la disposición espacial de MAFP dentro de FAAH; (b) en amarillo, la unión covalente de MAFP a Ser241 y las interacciones que ejercería con los aminoácidos del sitio activo; cabe notar la presencia de Lys142 y Ser217.



**Figura8:** Sitio activo de la enzima en presencia del inhibidor MAFP. <sup>83</sup>



**Figura9:** Estructura cristalina del dímero de FAAH. <sup>70</sup>

En la Figura9, se observa unido al sitio activo de la enzima el inhibidor MAFP (amarillo). Los tres canales que atraviesan la enzima se muestran

## MARCO TEÓRICO

---

en celeste y se identifican de color rojo, verde y naranja. El dominio transmembrana propuesto se destaca entre las hélices  $\alpha$ -18 y  $\alpha$ -19.

La enzima cristalizada muestra tres propiedades importantes a destacar:

1. r-FAAH es una enzima dimérica, lo que fue corroborado con posteriores estudios analíticos de ultra centrifugación <sup>85</sup>.
2. El dominio transmembrana se encuentra en las hélices  $\alpha$ -18 y  $\alpha$ -19 <sup>86</sup>.
3. La presencia de tres canales interiores que facilitarían el acceso a FAAH, tanto a la membrana como al citoplasma celular <sup>83</sup>:
  - a. El primer canal, va desde la superficie de la enzima, hasta donde comienza la estructura del inhibidor (destacado en color rojo); se podría considerar que es una entrada anfipática que acomoda la porción polar de los sustratos y permite su movimiento hacia el sitio activo.
  - b. El segundo canal o “canal de membrana”, conduce al sitio activo de la enzima (destacado en color verde) y está compuesto casi exclusivamente por residuos hidrófobos y es donde se aloja la cadena alquílica de MAFP. <sup>87</sup>
  - c. El tercer canal o “canal de acceso citosólico” nace del sitio catalítico a unos 80° de la cavidad de unión creando un puerto expuesto hacia el citosol (destacado en color naranja). Esto permite que después de la acción enzimática, el grupo saliente más hidrófilo fluya hacia dicha región.

La ubicación general de los canales en la enzima, propondrían un mecanismo simple para la unión de los sustratos y la liberación de los metabolitos. Así, los sustratos entrarían a través de la membrana (primer canal) al sitio activo. Posterior a la hidrólisis, los ácidos grasos saldrían por el canal de membrana (segundo canal) y la aminos saldrían por el canal de acceso citosólico (tercer canal).

Adicionalmente, el canal de acceso citosólico tendría como función facilitar la entrada de una molécula de agua; ésta, es indispensable para la desactivación del estado de transición tetraédrico involucrado en el mecanismo catalítico de FAAH<sup>88, 89</sup>.

### Mecanismo catalítico de FAAH

Como se mencionó anteriormente, FAAH pertenece a la familia de las amidasas, caracterizadas por una secuencia aminoacídica altamente conservada, rica en residuos tipo serina y glicina. Además, las AS presentan una tríada catalítica clásica, utilizada por bastantes serinas hidrolasas, que consiste en: serina - histidina - ácido aspártico.

En 1999, Patricelli *et al.*<sup>90</sup> reportaron un posible mecanismo catalítico para esta enzima. Luego de realizar estudios de mutagénesis y afinidad de enlace, comprobaron que la mutación de serina 241 (S241) inactiva la enzima, llegando a la conclusión que este residuo sería el nucleófilo presente en FAAH; S241 se encuentra completamente conservada en la familia AS.

Para confirmar la tríada catalítica clásica (Ser-His-Asp), se mutaron las histidinas conservadas en FAAH de ratas, ratones y humanos (H184,



## MARCO TEÓRICO

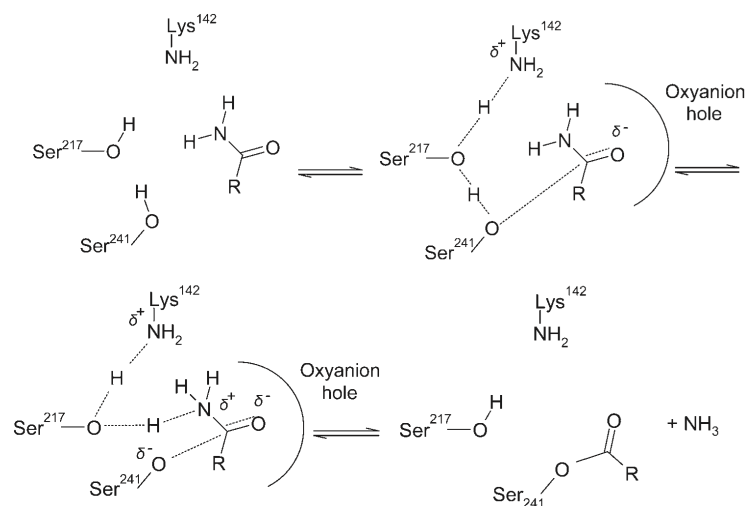
---

El mecanismo catalítico comienza con Lys142 desprotonada (A) quien realiza un ataque nucleofílico al grupo hidroxilo de Ser217 que, a su vez, ataca al grupo hidroxilo de Ser241 formando el nucleófilo para reaccionar con el ligando (B). En un paso concertado, Ser241 reacciona con el grupo carbonilo y se produce una protonación, proveniente de Ser217, al átomo de nitrógeno amídico del sustrato (C). Finalmente, el estado de transición formado entre el grupo acilo y la enzima vuelve a su estado inicial por escisión de la función amina (D).

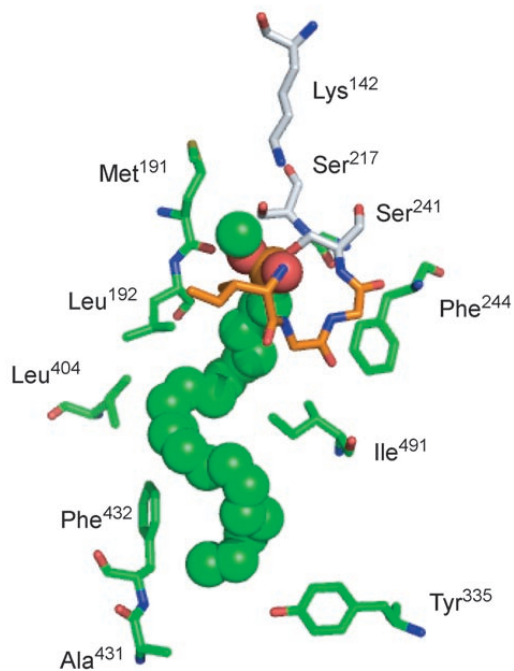
Si bien, en el esquema se utiliza una amida como ejemplo para asemejar a AEA; es importante destacar, que la hidrólisis de grupos ésteres se realizaría bajo la misma lógica. Considerando que dicho grupo químico es más reactivo, la medición de la actividad hidrolítica sobre éstos debiera ser mucho mayor que la hidrólisis sobre amidas; sin embargo, se observa que son similares. La explicación viene dada por esta inusual tríada catalítica que estabiliza el estado de transición tetrahédrico formado entre el sustrato y la enzima; además, los aminoácidos que se encuentran dentro del sitio activo, forman un agujero oxianiónico que contribuye a equilibrar la carga negativa del átomo de oxígeno del grupo carbonilo, perteneciente al ligando, ya que puede establecer enlaces de hidrógeno con la función amina del mismo, facilitando el equilibrio entre las etapas B y C <sup>72, 93</sup> (Figura10). Esto permite entender que la simultaneidad en la activación de Ser241 como nucleófilo y el entorno químico del sitio activo, le ha entregado a FAAH la capacidad de ser una hidrolasa más selectiva para amidas que para ésteres <sup>94</sup>. En la Figura11, se visualiza la posición del agujero oxianiónico alrededor del sustrato.

En la Figura12, se visualiza el entorno químico del sitio activo de FAAH; en color verde un sustrato tipo amida (MAFP), en gris la tríada catalítica y en naranja el agujero oxianiónico conformado por Gly<sup>240</sup>-Gly<sup>239</sup>-Ile<sup>238</sup>.

## MARCO TEÓRICO



**Figura11:** Agujero oxianiónico cercano al sustrato. <sup>72</sup>



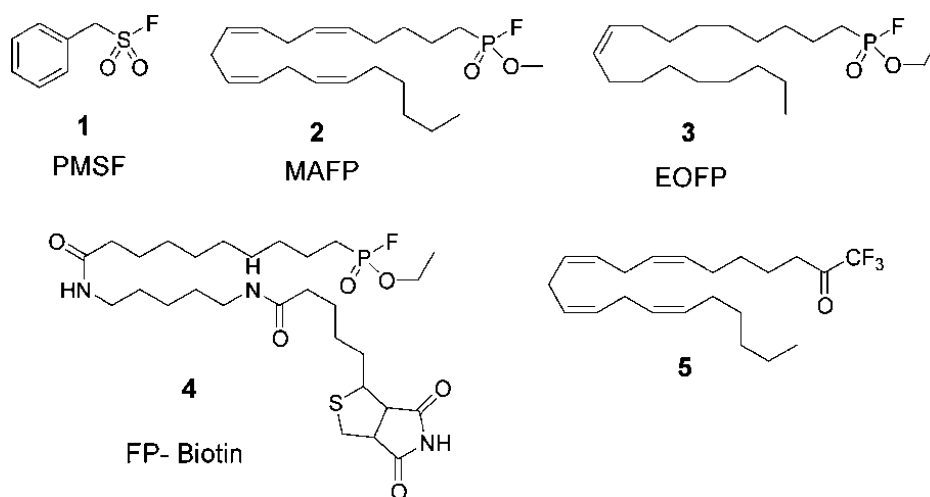
**Figura12:** Agujero oxianiónico dentro del sitio activo de FAAH. <sup>72</sup>

### Inhibidores de FAAH

El desarrollo de los inhibidores de FAAH se produjo antes de que la enzima se caracterizara completamente y se comprendiera su mecanismo catalítico. El primero fue fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), descubierto por accidente, cuando fue utilizado en cerebro de rata para inhibir actividad proteasa, encontrando que disminuía la hidrólisis de anandamida (Figura23) <sup>86</sup>. Con esto, se desarrollaron moléculas similares como fluoruro de laurilsulfonilo (LSF), metoxi-araquidonoil-fluorofosfonato (MAFP) y etoxi-oleil-fluorofosfonato (EOFP).

Lamentablemente, estos inhibidores mostraron tener baja reactividad y selectividad; sin embargo, su importancia radica en ser pilares para la identificación del sitio activo y determinación del nucleófilo (Ser241) de la enzima y la posterior cristalización de r-FAAH complejada con MAFP (PDB:1MT5). Además, permitieron definir la tasa de resíntesis de la enzima en vivo, estimando que en cerebro de ratón, la vida media es cercana a 52 horas <sup>95</sup>; hallazgo crucial para considerar la duración del efecto farmacológico de los inhibidores irreversibles de FAAH.

Los primeros inhibidores realmente diseñados para actuar en FAAH, fueron desarrollados por Koutek *et al.* <sup>96</sup> en 1994, basándose en esqueletos químicos con cetonas activadas que enlazaran al sitio activo. Así, se sintetizaron derivados de trifluorometilcetona,  $\alpha$ -cetoésteres y  $\alpha$ -cetoamidas de ácido araquidónico u otros ácidos grasos similares (Figura13) para determinar la inhibición en la hidrólisis de anandamida. El más activo fue araquidonoil-trifluorometil-cetona (5); que también se aprecia en la Figura13.



**Figura13:** Primeros inhibidores de FAAH. <sup>86</sup>

Posteriormente, la búsqueda de inhibidores de FAAH, se centró en diseñar compuestos con alta potencia y selectividad; según la interacción que formen con la enzima, pueden distribuirse en dos grandes grupos: reversibles e irreversibles.

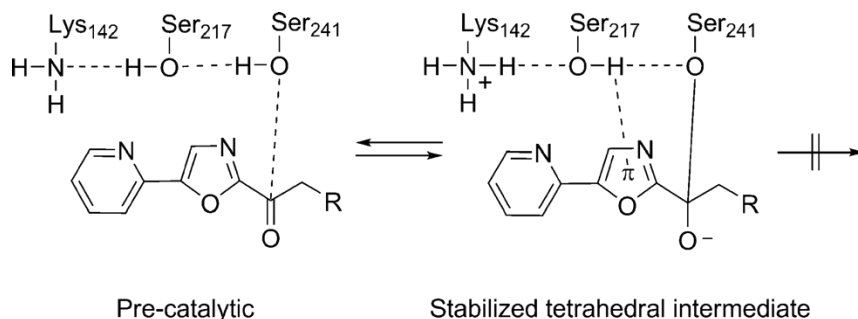
### Inhibidores reversibles

Los inhibidores reversibles se enlazan de manera no covalente a FAAH; las uniones intermoleculares predominantes son de tipo iónico, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas; no se produce una reacción química entre la enzima y el ligando, pudiendo removerlo fácilmente por dilución o diálisis.

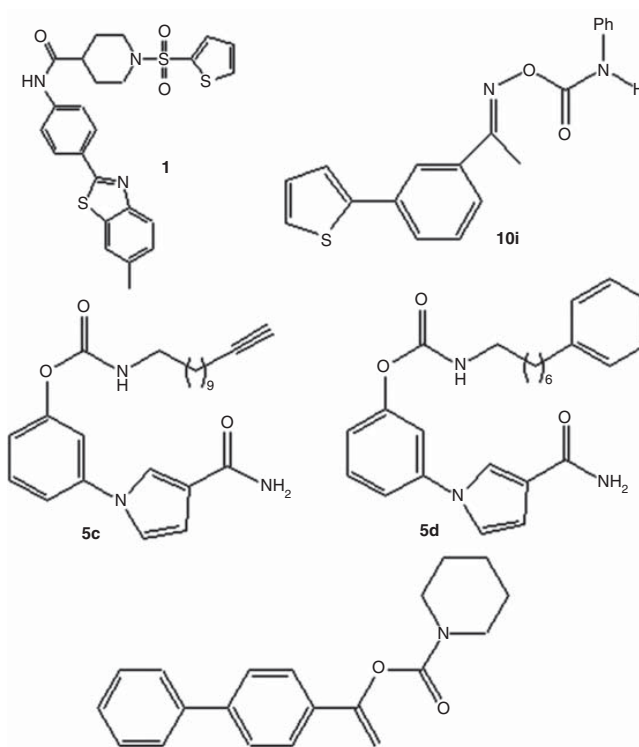
El diseño de estos inhibidores se focalizó en desarrollar compuestos similares a los sustratos endógenos de FAAH; estas moléculas, tienen átomos de carbonos electrofílicos que forman hemiacetales con Ser241,

## MARCO TEÓRICO

estabilizando el estado de transición tetrahédrico producido por la interacción del inhibidor y la enzima (Figura14); dentro de ellos, se encuentran ácidos grasos de: aldehídos,  $\alpha$ -cetoamidas,  $\alpha$ -cetoésteres y trifluorometilcetonas (Figura15) <sup>97, 98</sup>.



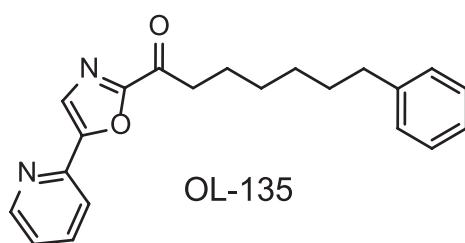
**Figura14:** Estado de transición tetrahédrico. <sup>99</sup>



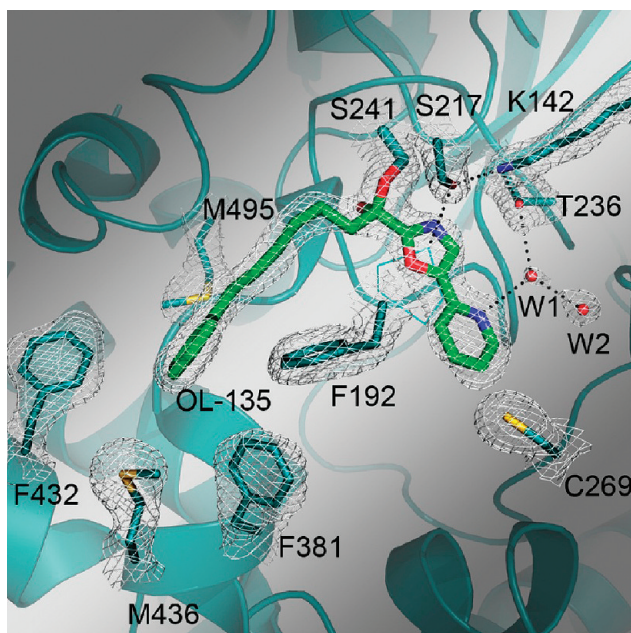
**Figura15:** Inhibidores reversibles. <sup>100</sup>

## MARCO TEÓRICO

En esta clasificación, los más estudiados son los  $\alpha$ -cetoheterociclos (mono- y bi-sustituidos) derivados de ácido oleico; éstos, permitieron demostrar que tanto el anillo oxazol como el largo y grado de saturación de la cadena del ácido graso serían relevantes para aumentar la potencia inhibitoria en la enzima <sup>101, 102</sup>. El más reconocido es OL-135 (Figura16), que se ha reportado co-cristalizado enlazado a r-FAAH [PDB: 2WJ2], confirmando el mecanismo de inhibición reversible (Figura17).



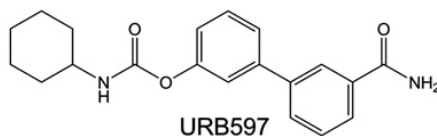
**Figura16:** Estructura química de OL-135. <sup>74</sup>



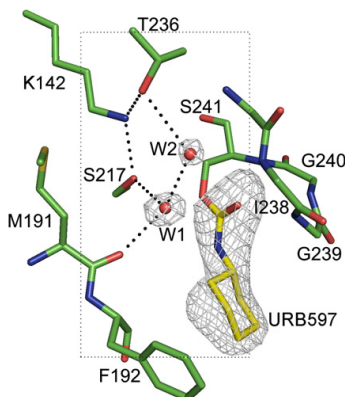
**Figura17:** OL-135 co-cristalizado con r-FAAH. <sup>99</sup>

### Inhibidores irreversibles

Los inhibidores irreversibles, por su mecanismo de acción, modifican covalentemente a la enzima por lo que sus efectos no pueden ser revertidos; esto implica que, la recuperación de la acción catalítica, requiere la re-síntesis de FAAH a nivel celular <sup>103</sup>. En esta categoría, las moléculas más desarrolladas son derivados de carbamatos y ureas arílicas. URB-597 (Figura18) es uno de los carbamatos mejor caracterizados, dentro de los inhibidores covalentes; fue diseñado junto a una serie de ésteres de ácido carbámico <sup>104</sup> y, posteriormente co-cristalizado con h/r-FAAH [PDB: 3LJ7]. Esto ratificó el mecanismo de acción irreversible ejercido sobre la enzima y planteó la importancia de una molécula de agua dentro del sitio catalítico <sup>105</sup>. En la Figura19, se aprecian las interacciones que realiza el sustrato en el sitio catalítico.



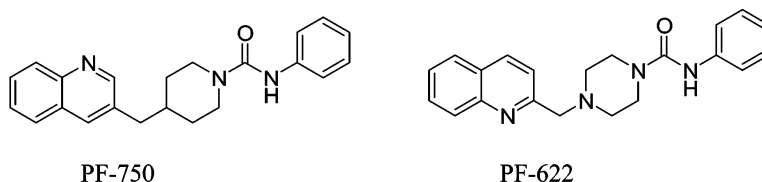
**Figura18:** Inhibidor covalente irreversible URB-597. <sup>105</sup>



**Figura19:** Interacciones entre FAAH y URB-597. <sup>105</sup>

## MARCO TEÓRICO

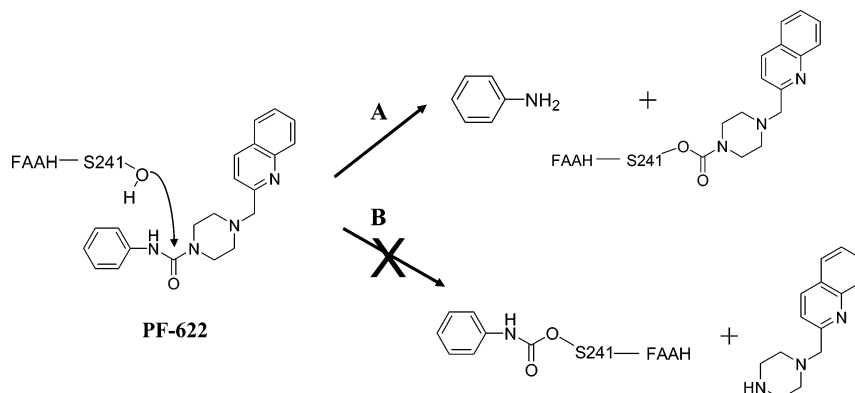
Los inhibidores con estructura ureica (Figura20), impulsados por laboratorios Pfizer, iniciaron su desarrollo con la síntesis de PF-750 (piperidin-urea) y PF-622 (piperazin-urea).



**Figura20:** Inhibidores irreversibles desarrollados por Pfizer. <sup>106</sup>

Estos compuestos demostraron que <sup>106</sup>:

1. La inhibición sobre h-FAAH es dependiente del tiempo de exposición, aumentando en 37 veces su potencia a los 60 minutos.
2. La inhibición es de tipo covalente e irreversible.
3. El enlace covalente se forma entre Ser241 y el sustrato; liberando como grupo saliente, la fracción que resulta más hidrofílica (en este caso: anilina), similar a la porción etanolamínica de anandamida (Figura21).

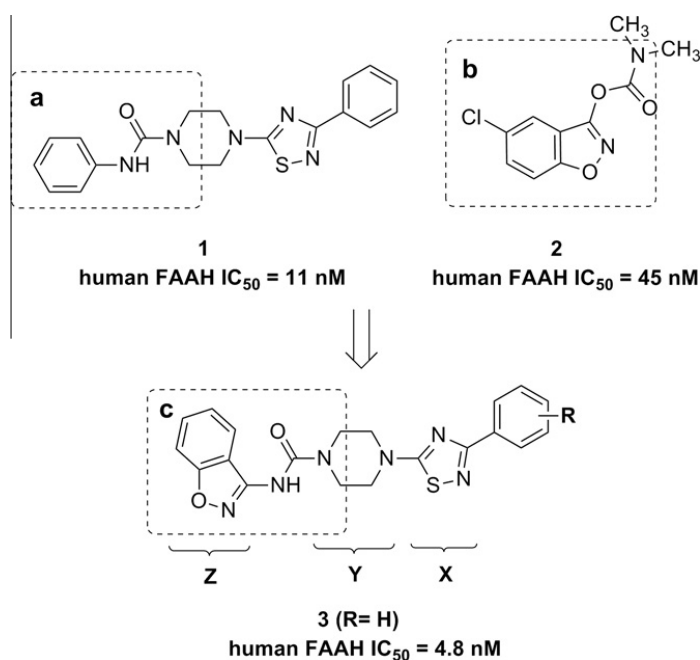


**Figura21:** Inhibición de PF-622 sobre h-FAAH. <sup>106</sup>

## MARCO TEÓRICO

4. Son altamente selectivos por FAAH en ratas, ratones y humanos debido, probablemente, a la estabilización que realiza la enzima sobre el fragmento ureico.
5. PF-750 y URB-597 son inactivados selectivamente en el sistema nervioso central; sin embargo, al analizar tejidos periféricos, sólo se observa la presencia de URB-597, indicando que PF-750 no alteraría la enzima en el nivel mencionado.

En 2013, Kono *et al*<sup>64</sup>., diseñaron una serie de inhibidores para FAAH de tipo piperazin-urea; en su estudio, propusieron un compuesto híbrido (Figura22) entre dos inhibidores irreversibles ya reportados, realizando cambios bioisostéricos en el carbamato del compuesto 2 por fenil-urea y la inclusión de un anillo benzoisoxazolil; esto, con la finalidad de aumentar la actividad. En conclusión, la molécula híbrida, presenta mayor inhibición que sus predecesores.

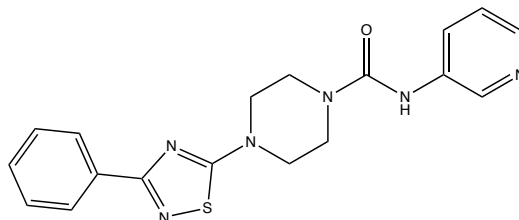


**Figura22:** Tiadiazolilpiperazin-urea propuesta por Kono.<sup>64</sup>

## MARCO TEÓRICO

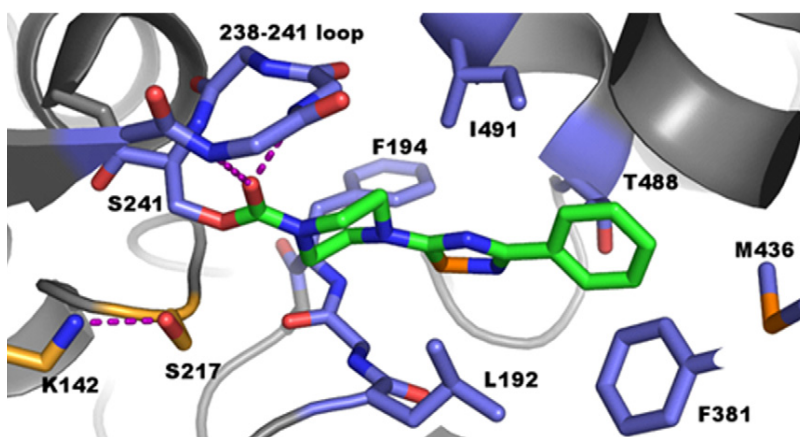
---

Adicionalmente, decidieron confirmar el mecanismo de acción inhibitorio sobre r-FAAH; así, co-cristalizaron la enzima con el compuesto 60d (Figura23) observando la unión covalente entre Ser241 y la urea de la molécula, liberándose 3-aminopiridina como grupo saliente; esto, corrobora que se favorece la pérdida de la porción más hidrofílica del sustrato.



**Figura23:** Molécula utilizada para corroborar el grupo saliente. <sup>64</sup>

Interesantemente; luego del ataque nucleofílico por parte de FAAH, se produce una interacción entre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo de 60d y los átomos de nitrógeno presentes en el loop 238-241 de la enzima (Figura24), provocando una conformación tipo silla en el anillo piperazínico que estabilizaría el sitio activo, explicando el aumento en la actividad inhibitoria sobre la enzima [PDB: 4HBP].



**Figura24:** Tiadiazolilpiperazin-urea propuesta por Kono. <sup>64</sup>

## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

---

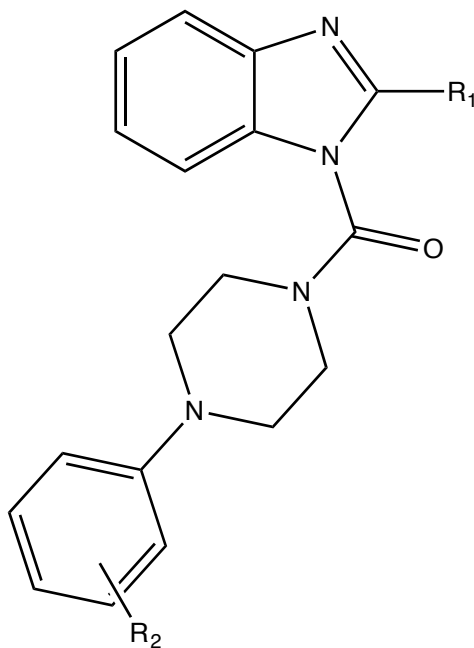
## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPOTESIS Y OBJETIVOS

---

### Hipótesis

Basados en estudios de modelamiento molecular inducido realizados previamente por el equipo de investigación y en el conocimiento de farmacóforos asociados a la acción de FAAH, se propone que variados 2-carboxamido-benzoimidazoles sustituidos con fenilpiperazinas, actúan como inhibidores de la enzima humana amida hidrolasa en ensayos *in vitro*. La estructura general de los compuestos propuestos se muestra en la Figura25.



**Figura25:** Estructura general de la serie de compuestos propuestos.

## HIPOTESIS Y OBJETIVOS

---

### Objetivo General

El objetivo general de esta tesis es extender el estudio del núcleo benzoimidazol como anillo central y funcional para el diseño de nuevos inhibidores de FAAH, estableciendo la relación estructura-actividad de los ligandos diseñados.

### Objetivos Específicos

#### 1. Objetivos computacionales

- a. Optimizar el modelo computacional de la enzima FAAH construido previamente por el grupo de investigación.
- b. Realizar los estudios de acoplamiento molecular inducido de la serie de compuestos propuestos.

#### 2. Objetivos sintéticos

- a. Sintetizar una serie de compuestos con estructura general tipo 1-[(4-fenilpiperazinil)-1-carbonil]-2-alkuil-1*H*-benzo[*d*]imidazol.

#### 3. Objetivos farmacológicos

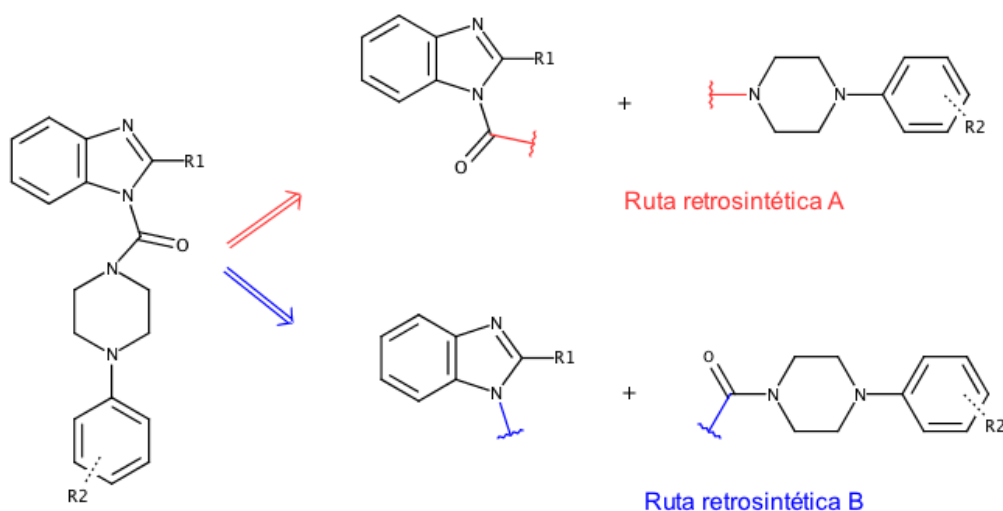
- a. Evaluar la capacidad inhibitoria sobre FAAH de la serie propuesta.
- b. Determinar el IC<sub>50</sub> de los compuestos sintetizados.
- c. Definir la selectividad de unión h-FAAH/h-MAGL de los productos obtenidos.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### Diseño Racional de Ligandos: Síntesis Química

#### Retrosíntesis química de la estructura propuesta

La siguiente investigación comenzó con la planificación de los objetivos sintéticos; para esto, se evaluó una síntesis química racional considerando la estructura general propuesta en la hipótesis. A continuación, en la Figura26, se presenta el esquema retrosintético diseñado:

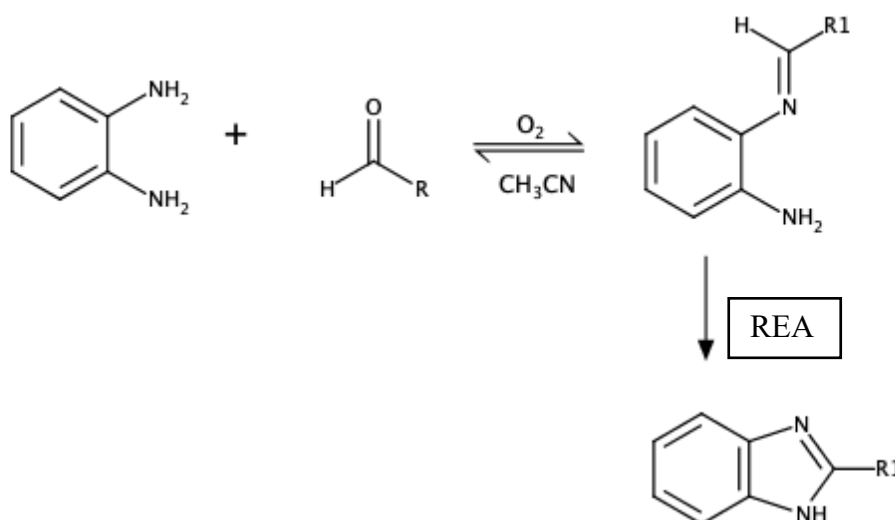


**Figura26:** Esquema retrosintético de la serie propuesta.

Comparando ambas vías, se observa que la ruta retrosintética A consiste en realizar un ataque nucleofílico a partir de fenilpiperazina, a un benzoimidazol activado electrofílicamente por un grupo carbonilo; en cambio, la ruta retrosintética B presenta al grupo imidazol del anillo principal como un nucleófilo. La segunda opción presenta grandes ventajas ya que por medio de una reacción ácido-base, se puede generar el nucleófilo regulando la reacción a través de dicho equilibrio químico.

### Síntesis de 2-alkil-1*H*-benzo[*d*]imidazoles (REA)

Para la obtención de los anillos benzoimidazólicos se tomó en cuenta la disponibilidad comercial de 1*H*-benzo[*d*]imidazol y la factibilidad de la síntesis de 2-alkil-1*H*-benzo[*d*]imidazol a través de condensación oxidativa <sup>107, 108</sup>. Como procedimiento general, se adicionan cantidades equimolares de 1,2-fenilendiamina y los correspondientes aldehídos alifáticos utilizando acetonitrilo, como solvente, agitando la mezcla a temperatura ambiente por 24 horas. La reacción se describe en la Figura27.

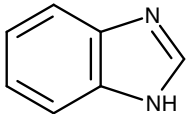
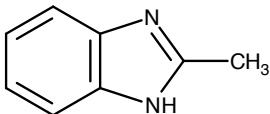
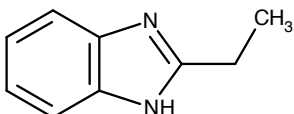
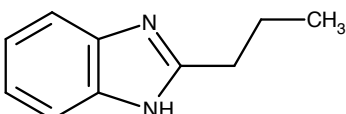
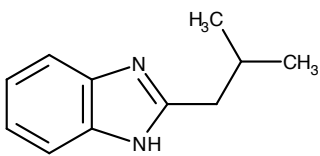


**Figura27:** Síntesis de 2-alkil-1*H*-benzo[*d*]imidazoles.

Si bien, la síntesis química de benzoimidazoles es simple, las condiciones ambientales y la volatilidad de los correspondientes aldehídos producen bajos rendimientos de reacción. Por este motivo, se consideró la adición de estos últimos, en alícuotas con dos horas de diferencia cada una en ambiente inerte; esto produjo, un incremento en

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los porcentajes de rendimiento debido al desplazamiento del equilibrio químico hacia los productos. En la tabla 2, se comparan los rendimientos de reacción, para ambas condiciones, que se incrementa cuando se aumenta la estabilidad de los aldehídos en función de la cadena alquílica.

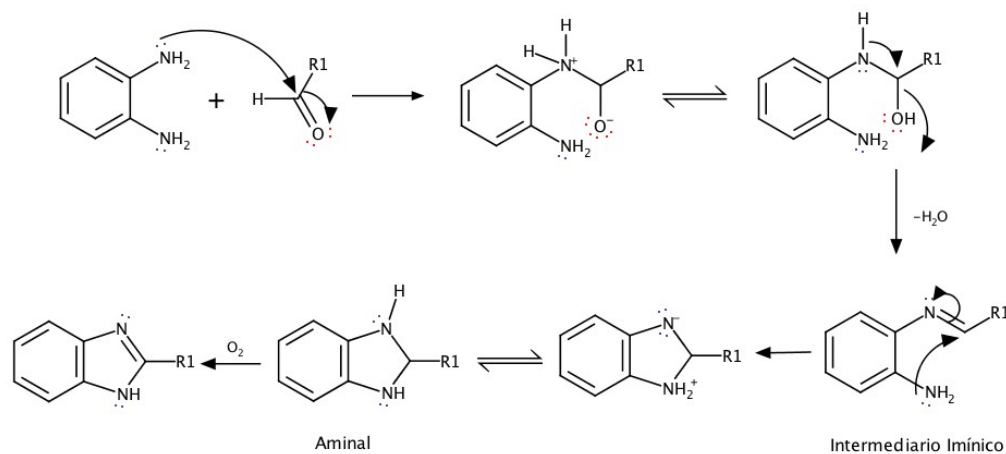
| Nº    | Estructura                                                                          | Rendimiento<br>(condiciones<br>iniciales) | Rendimiento<br>(cambio de<br>condiciones) |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 0     |    | Disponible comercialmente                 |                                           |
| REA-1 |    | 22 %                                      | 36 %                                      |
| REA-2 |  | 28 %                                      | 40 %                                      |
| REA-3 |  | 37 %                                      | 50 %                                      |
| REA-4 |  | 52 %                                      | 59 %                                      |

**Tabla 2:** Rendimientos de reacción de 2-alkil-1*H*-benzo[*d*]imidazol.

La síntesis química fue seguida a través de cromatografía en placa fina, donde a partir de las tres horas, se observó la aparición de un producto que fue aislado en el crudo de reacción; sin embargo, debido a la

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

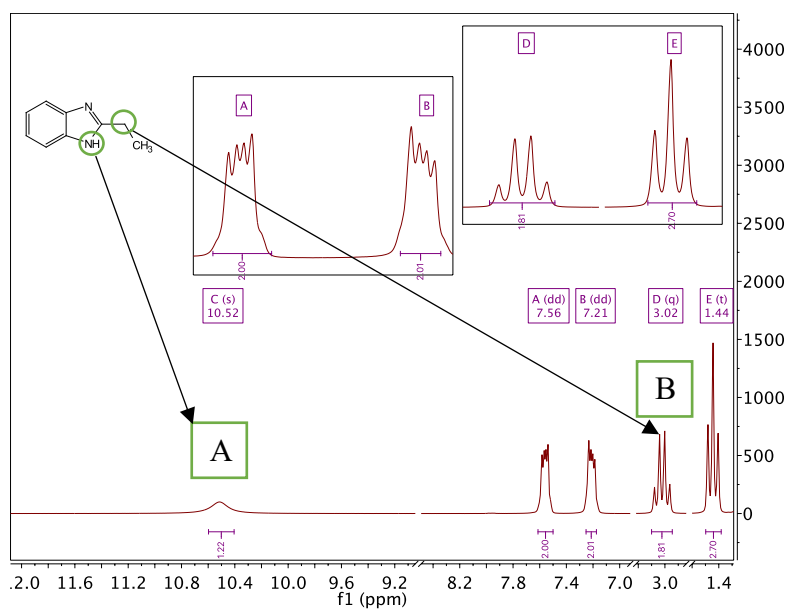
inestabilidad atmosférica de éste, no pudo ser aislado. Probablemente, este hallazgo corresponde al estado de transición imínico descrito en la Figura28, que debido a su rápida cinética de reacción se transforma en amina para su posterior ciclación y aromatización.



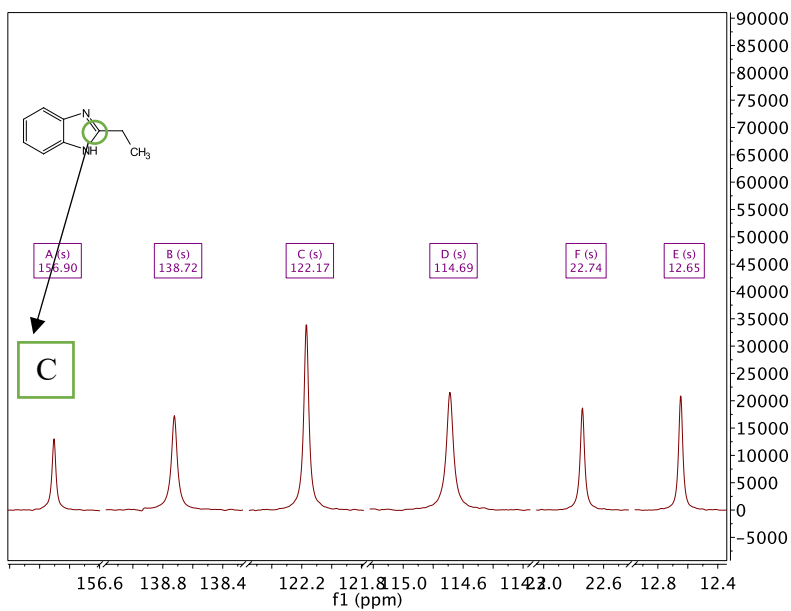
**Figura28:** Mecanismo de reacción de la condensación oxidativa.

La caracterización del compuesto se realizó a través de espectroscopia <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN; en estos y a modo de ejemplo, se verifica en el compuesto REA-2, la presencia de: (a) señal ancha en 10,52 ppm asignada al hidrógeno unido al nitrógeno aromático (<sup>1</sup>H-RMN); (b) señal en 3,02 ppm correspondiente a los hidrógenos alquílicos vecinos al anillo imidazólico (<sup>1</sup>H-RMN ); (c) señal en 156,90 ppm equivalente a un carbono cuaternario con hibridación tipo sp (<sup>13</sup>C-RMN ). Todas estas señales se encuentran desplazadas a campo bajo, debido al desapantallamiento producido por la presencia del par electrónico libre del nitrógeno aromático del anillo benzoimidazólico. En las figuras 29 y 30, se muestran las interpretaciones de los respectivos espectros para el compuesto REA-2.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



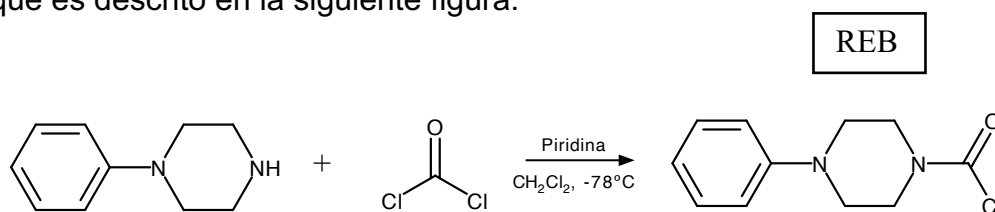
**Figura29:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN para el compuesto REA-2.



**Figura30:** Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN para el compuesto REA-2.

### Síntesis de derivados de cloruro de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo (REB)

Tomado en cuenta el sintón fenilpiperazínico propuesto en la retrosíntesis inicial, se meditó respecto a la pertinencia de los equivalentes sintéticos y las condiciones de reacción para su ejecución. Así, el primer diseño incluyó la presencia de una especie extremadamente reactiva al ambiente como es el gas fosgeno (cloruro de carbonilo); en condiciones de temperatura y atmósfera controlada, lo que es descrito en la siguiente figura:



**Figura31:** Síntesis propuesta para equivalente sintético.

En la cromatografía de capa fina se observó la presencia de una nueva especie y, a los sesenta minutos de iniciada la reacción, no se visualiza la presencia de reactantes implicando la finalización del procedimiento mediante la adición de ácido clorhídrico para su neutralización; sin embargo, llamó la atención que el desplazamiento del producto y el factor de retención en la fase móvil utilizada (diclorometano), no fueron los esperados. La purificación se llevó a cabo a través de placa preparativa de sílica gel, utilizando acetato de etilo como fase móvil. La caracterización se realizó mediante <sup>1</sup>H-RMN donde se pesquió la desaparición de la señal correspondiente al protón unido al átomo de nitrógeno fenilpiperazínico y <sup>13</sup>C-RMN con la aparición de una señal a campo bajo en 163,80 ppm, correspondiente al átomo de carbono carbonílico. En la Figura32 y 33, se señala la ubicación de las asignaciones mencionadas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

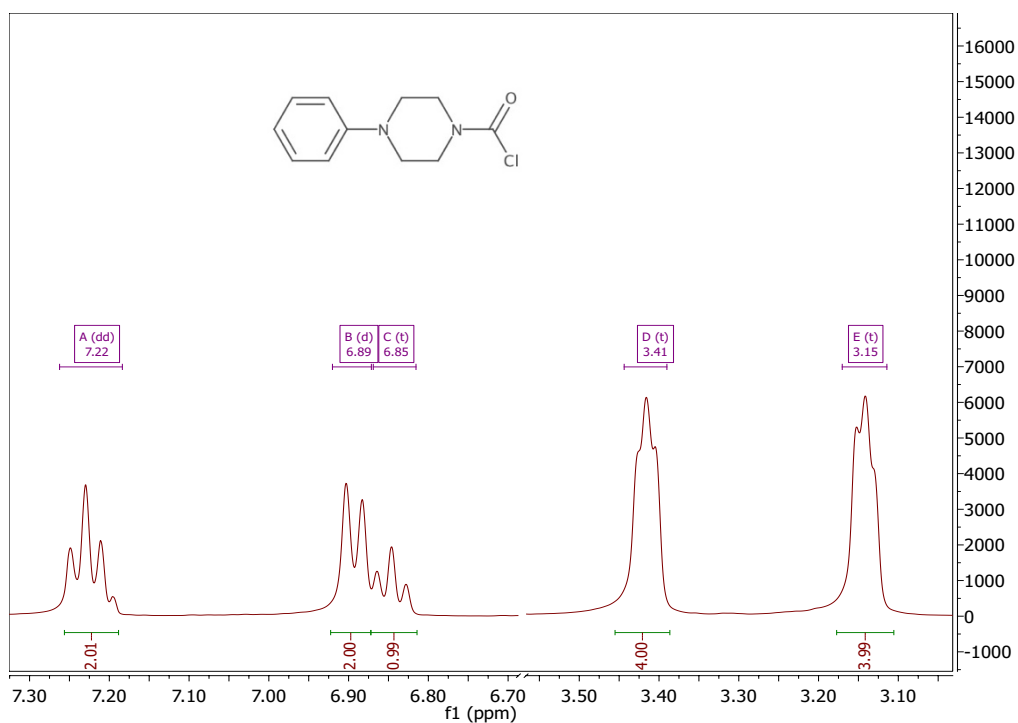


Figura32: Espectro  $^1\text{H}$ -RMN para el carbamoilo esperado.

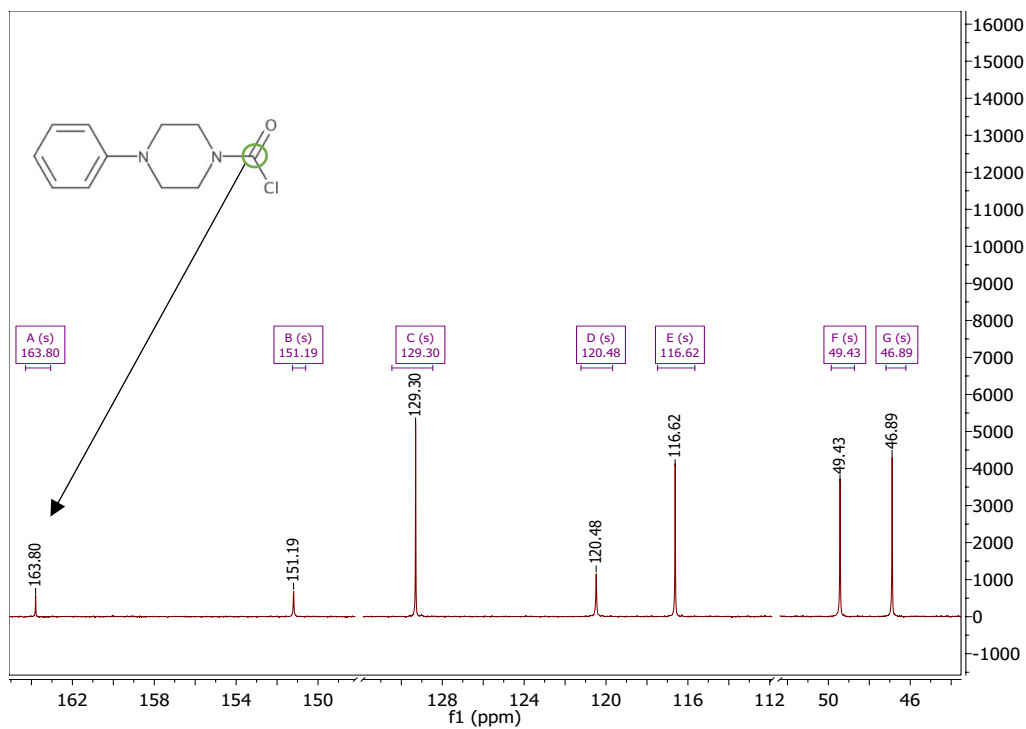


Figura33: Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN para el carbamoilo esperado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

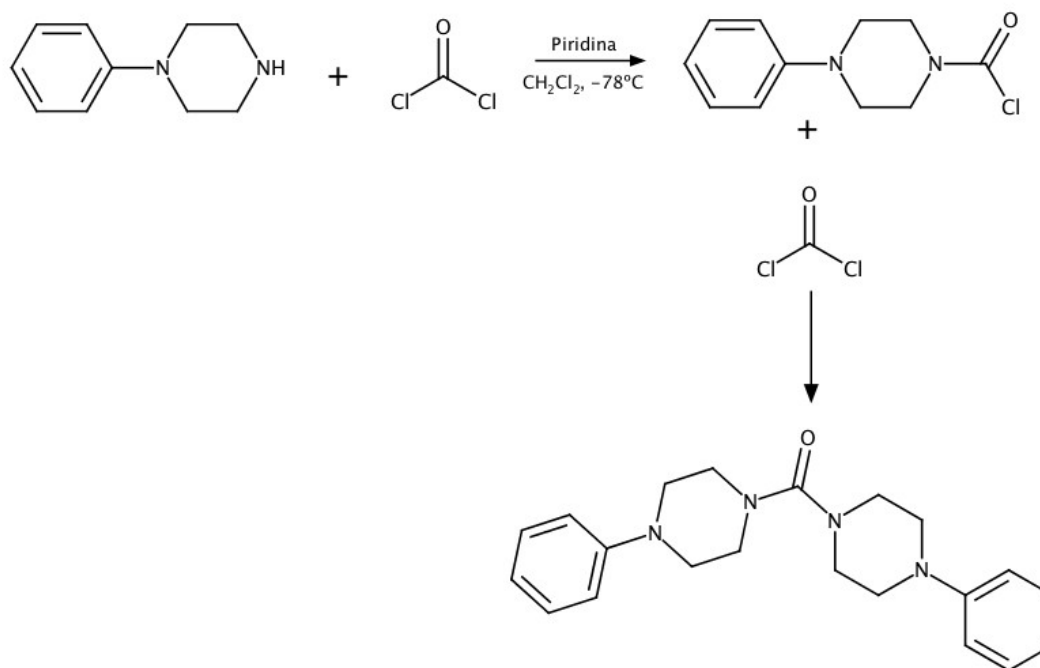
Contemplando los análisis de  $^{13}\text{C}$ -RMN, la señal carbonílica de la estructura deseada debiese aparecer cercano a los 150 ppm; correspondiente a un átomo de carbono amídico, desapantallado debido a la presencia del átomo de cloro, que al ser un atractor de electrones, le quita densidad electrónica al grupo carbonilo desplazándolo a campo bajo; no obstante, se observa la señal en 163,80 ppm lo que sugiere, más bien, la existencia un compuesto de tipo ureico; en el que el átomo de carbono central se encuentra desplazado a campo bajo debido a los dos átomos de nitrógenos adyacentes que anularían el efecto de apantallamiento descrito anteriormente. Para corroborar esta hipótesis, se realizó un análisis elemental (tabla 3) donde efectivamente se determina que no se logró aislar el compuesto propuesto.

| Elemento | Análisis Elemental Esperado | Análisis Elemental Obtenido |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|
| N        | 12,47 %                     | 15,75 %                     |
| C        | 58,80 %                     | 71,28 %                     |
| H        | 5,83 %                      | 7,95 %                      |
| S        | ---                         | ---                         |

**Tabla 3:** Análisis elemental del producto ureico.

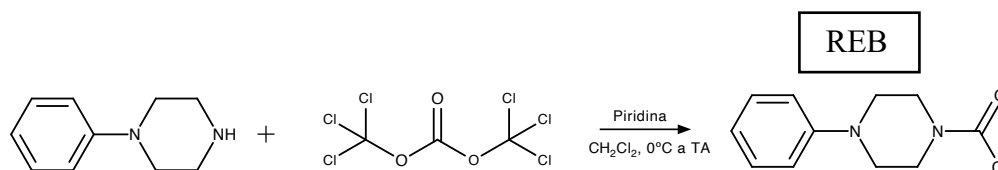
Entonces, se plantea que la síntesis diseñada para la obtención del equivalente sintético tiene dos etapas; en las cuales, existe una doble alquilación producto de la reactividad del fosgeno. La síntesis completa en estas condiciones de reacción, se detallan en el siguiente esquema (Figura34):

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura34:** Síntesis completa entre fenilpiperazina y fosgeno.

En virtud de los resultados expuestos, se diseñó una nueva síntesis con precursores menos reactivos que permiten controlar la cinética de reacción; con esto, se decide emplear trifosgeno, que es utilizado comúnmente en la preparación de ureas disustituidas asimétricamente, de manera segura y eficiente <sup>109</sup>. Así, la propuesta de reacción (Figura35) se plantea como sigue:



**Figura35:** Nuevo esquema de reacción para el sintón propuesto.

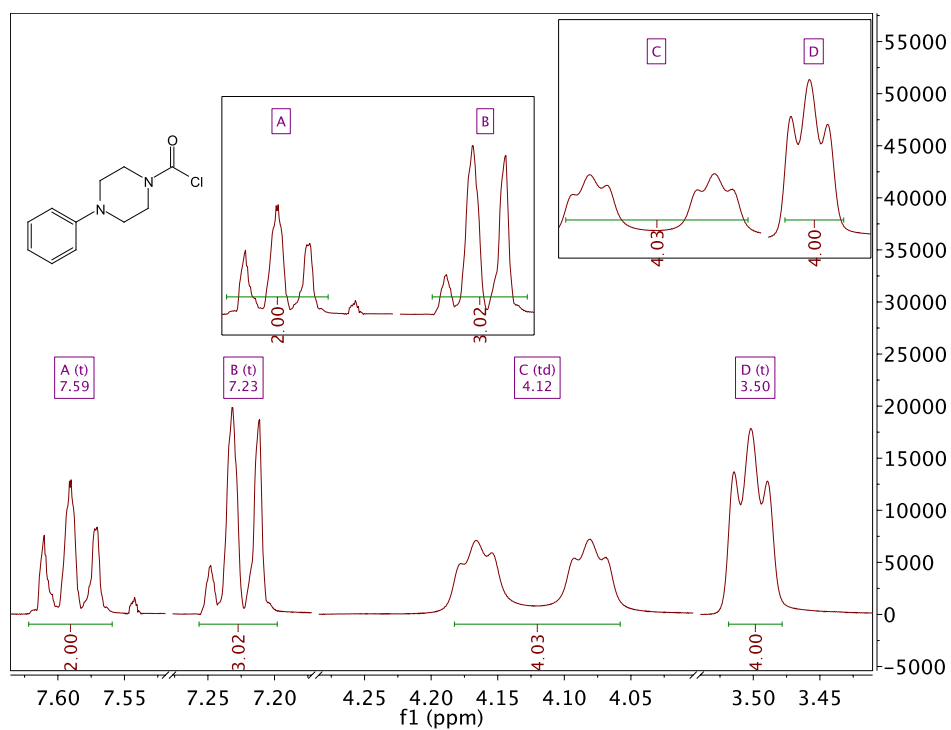
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

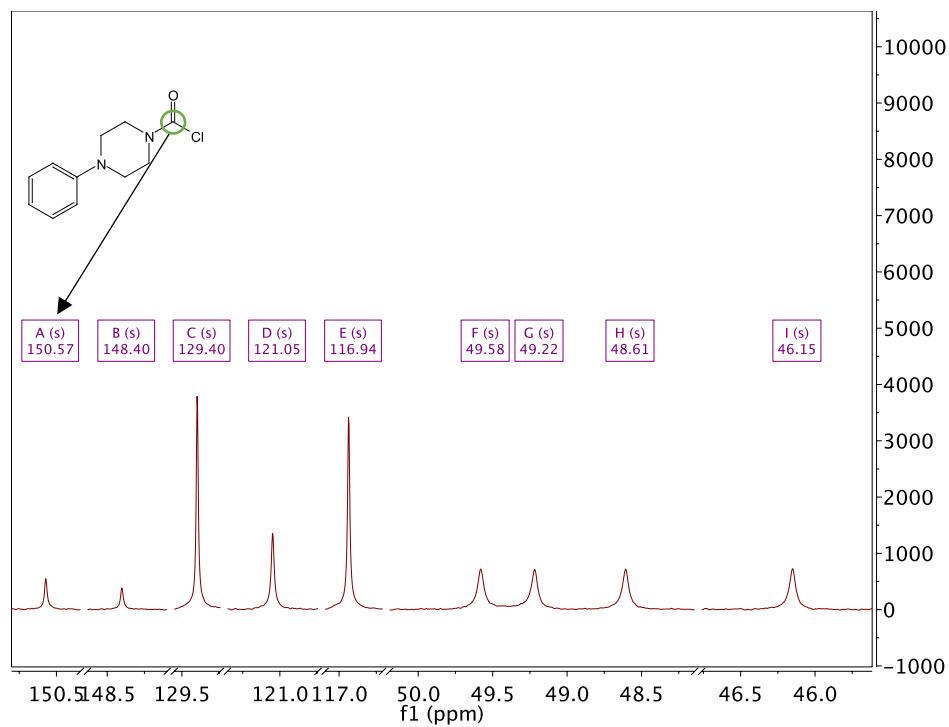
La reacción se llevó a cabo en condiciones de atmósfera y temperatura controlada; dejando enfriar el disolvente hasta los 0°C para la posterior adición de la base piridínica y trifosgeno. La formación de fosgeno “*in situ*” es visualmente apreciable por la aparición de una turbidez blanca y un elemento gaseoso en el balón de reacción que fue cerrado de manera hermética; posteriormente, se agregó fenilpiperazina gota a gota para controlar la formación del producto deseado percibiendo la desaparición de la nube gaseosa inicial a los 10 minutos. Finalmente, se llevó a temperatura ambiente por dos horas para asegurar el máximo rendimiento. Al observar la aparición de un nuevo producto en la cromatografía de capa fina, se procede a neutralizar el crudo de reacción con ácido clorhídrico. El desplazamiento de la especie a través de la placa de sílica, utilizando diclorometano como fase móvil; fue el esperado, calculando el factor de retención en 0,99. La purificación se llevó a cabo a través de columna cromatográfica, obteniendo un 95 % de rendimiento. La caracterización, presentada en las figuras 36 y 37, se realizó mediante resonancia magnética nuclear, obteniendo:

- (a)  $^1\text{H}$ -RMN, desaparición de la señal asignada al átomo de hidrógeno unido al átomo de nitrógeno fenilpiperazínico, junto al desplazamiento del espectro hacia la izquierda.
- (b)  $^{13}\text{C}$ -RMN, presencia de una señal a campo bajo en 150,57 ppm correspondiente, probablemente, al átomo de carbono carbonílico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura36:** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN para REB-1.



**Figura37:** Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN para REB-1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para corroborar el éxito de la síntesis, se realiza un análisis elemental a REB (tabla 4), que confirma la obtención y aislamiento de la molécula propuesta.

| Elemento | Análisis Elemental Esperado | Análisis Elemental Obtenido |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|
| N        | 12,47 %                     | 12,79 %                     |
| C        | 58,80 %                     | 59,52 %                     |
| H        | 5,83 %                      | 6,03 %                      |
| S        | ---                         | ---                         |

**Tabla 4:** Análisis elemental de REB.

Considerando lo expuesto, se propone que el éxito de la reacción está determinado por el uso de trifosgeno en el ambiente sintético adecuado, ya que la descomposición de esta molécula en fosgeno se produce alrededor de los 100 °C, lo que es imposible de ejecutar debido a la peligrosidad de manipular el compuesto gaseoso en dichas condiciones. Entonces, ¿como se podría descomponer el trifosgeno en fosgeno “*in situ*” de manera eficiente y segura?:

- (a) Controlando la temperatura: trifosgeno tiene un rango de fusión entre 77 y 81 °C por lo que, al mantener la reacción a bajas temperaturas, el estado físico en que se presenta la sustancia dentro del balón de trabajo es de manera sólida; esto implica, una menor cantidad de colisiones efectivas y la subsecuente disminución en la cinética de descomposición <sup>110</sup>.

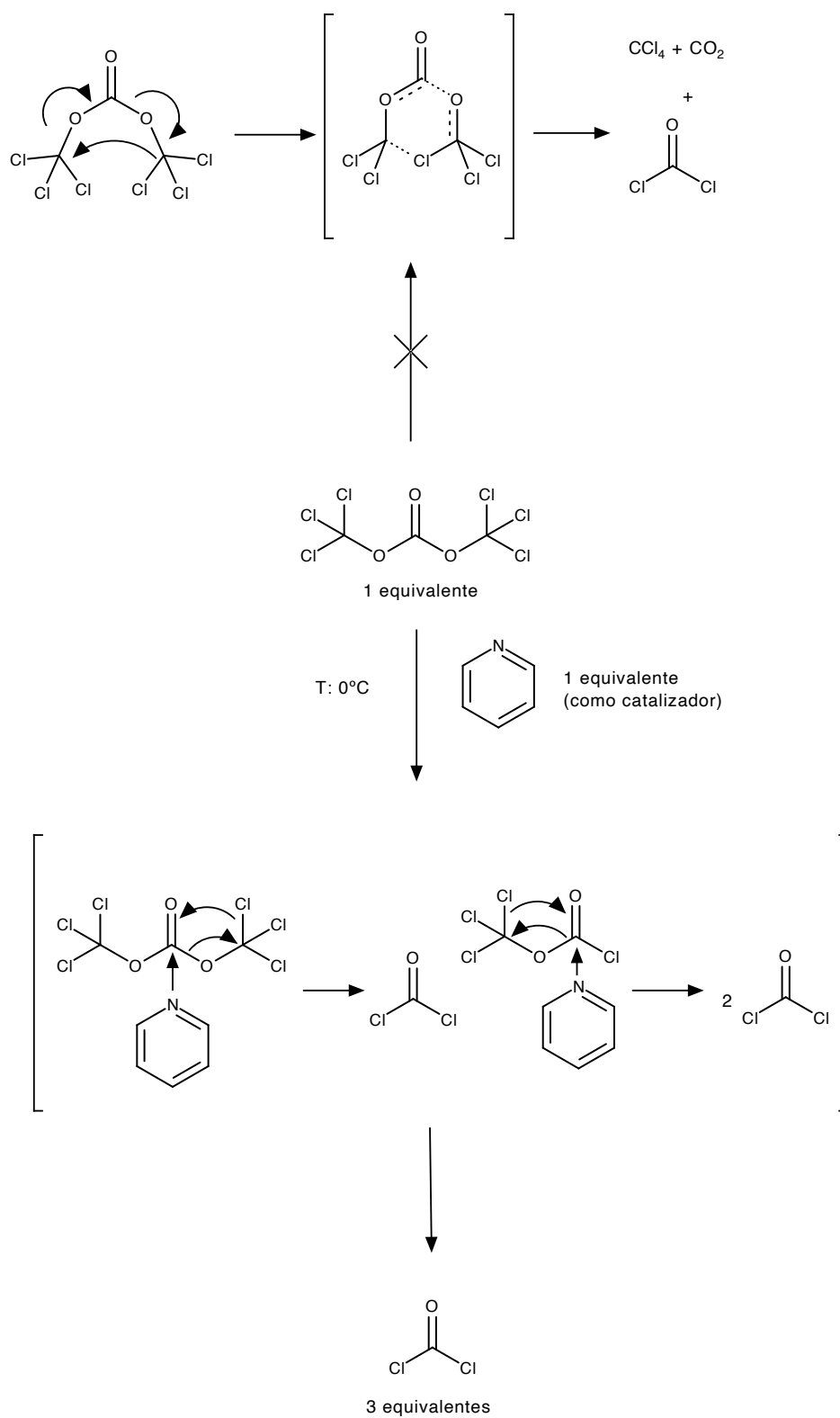
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

(b) Utilizando un catalizador: el par electrónico libre del átomo de nitrógeno piridínico actúa como un activador del átomo de carbono central de trifosgeno, lo que disminuye la entalpía de descomposición; este heterociclo planar, se dispone alrededor de la molécula ocasionando obstaculización estérica que, por un lado, favorece la migración de cloruros a nivel intramolecular y, por otra parte, impide la formación de un estado de transición de seis miembros que facilita la disgregación en fosgeno, dióxido de carbono y tetracloruro de carbono. Es importante considerar que el catalizador debe estar impedido para formar posibles subproductos de síntesis; por ejemplo, compuestos de tipo imínico, para potenciar el rendimiento de la aislación <sup>110</sup>.

A continuación, en la Figura 38, se detallan dos posibles mecanismos de descomposición de trifosgeno, donde se aprecia que la utilización de piridina y el control térmico, permiten dirigir la reacción hacia la formación de tres equivalentes de fosgeno por 1 equivalente del compuesto inicial, aumentando la eficiencia del proceso. En cambio, cuando el entorno químico no es regulado, se produce 1 equivalente de fosgeno, 1 equivalente de tetracloruro de carbono y un equivalente de dióxido de carbono por cada molécula de reactante, lo que implica tres equivalentes de gas; esto, eleva la presión interna en el interior del balón provocando una disminución en la seguridad del operador, debido a posibles explosiones del material de vidrio <sup>111, 112</sup>.

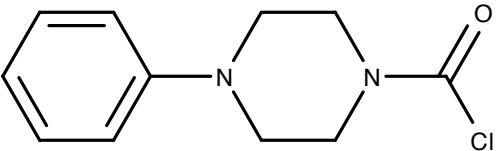
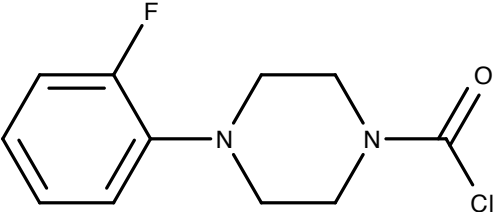
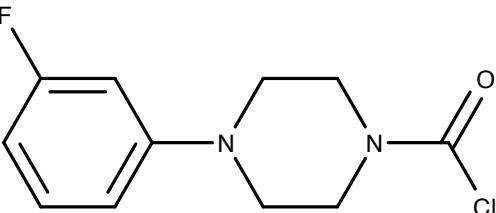
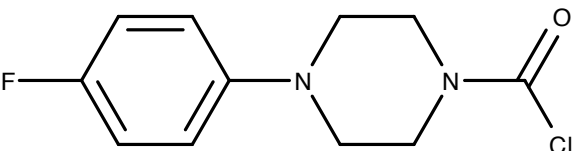
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



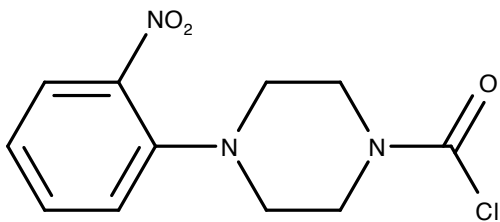
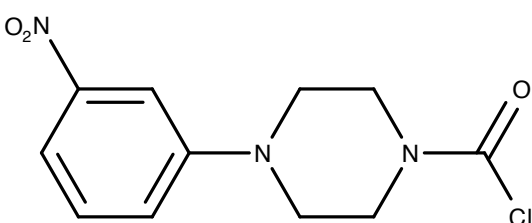
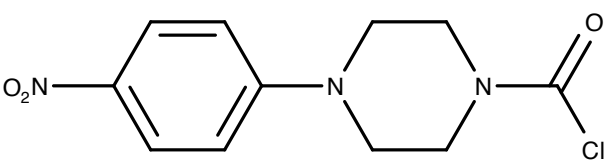
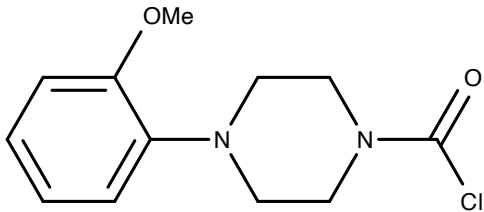
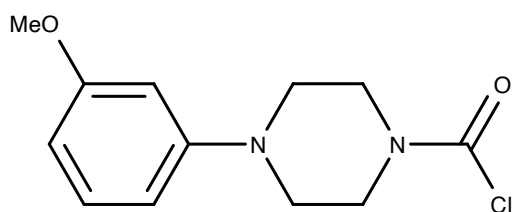
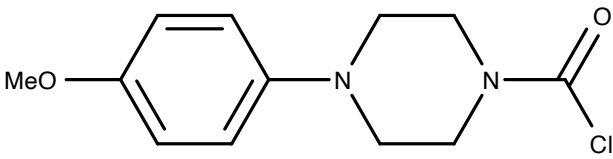
**Figura38:** Mecanismo de descomposición de trifosgeno.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez definida la estrategia sintética, se prepararon 10 carbamoilos con el mismo sustituyente en diversas posiciones del anillo aromático, para así, evaluar relación estructura-actividad en una siguiente etapa. En la tabla 5, se presentan las estructuras y rendimientos de reacción de los compuestos obtenidos.

| N°    | Estructura                                                                           | Rendimiento de reacción |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| REB-1 |    | 95 %                    |
| REB-2 |   | 94 %                    |
| REB-3 |  | 91 %                    |
| REB-4 |  | 93 %                    |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

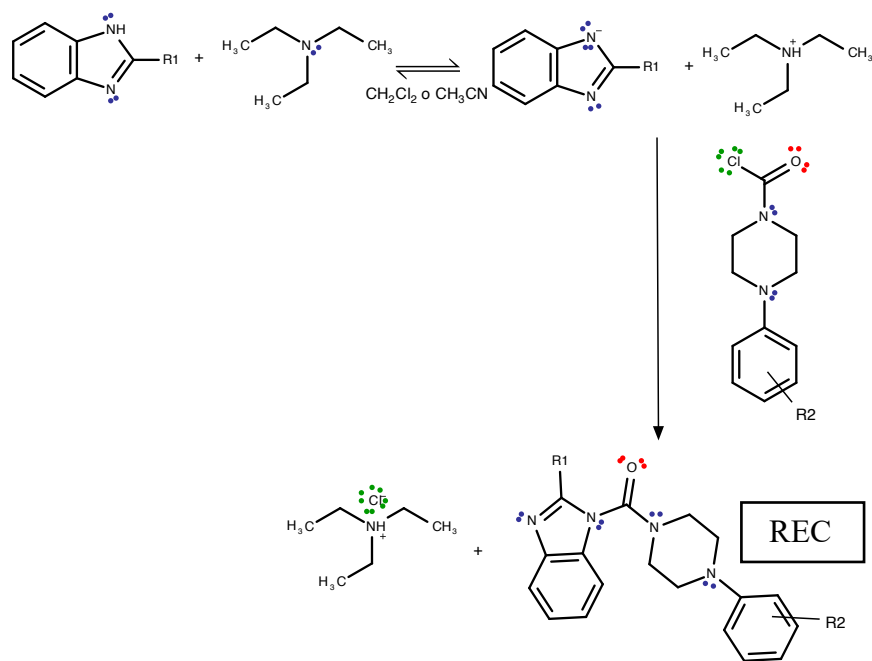
|        |                                                                                      |      |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------|------|
| REB-5  |    | 99 % |
| REB-6  |    | 99 % |
| REB-7  |    | 99 % |
| REB-8  |  | 89 % |
| REB-9  |  | 86 % |
| REB-10 |  | 91 % |

**Tabla 5:** Rendimientos de reacción de los carbamoilos sintetizados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntesis de derivados de 1-[(4-fenilpiperazinil)-1-carbonil]-2-alkuil-1*H*-benzo[d]imidazol (REC)

Posterior a la obtención de los precursores planteados en la retrosíntesis inicial, se procede al acople de ambos compuestos, a través de un ataque nucleofílico de tipo acílico por parte del benzoimidazol hacia el carbamoilo. La reacción propuesta, se plantea en la Figura39.

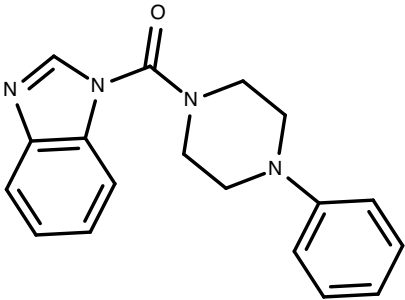
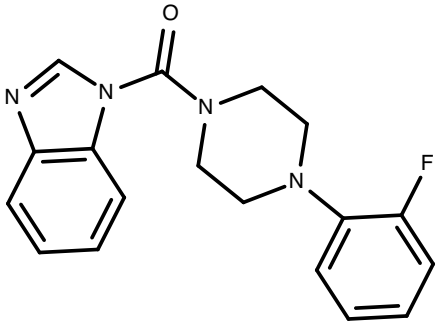


**Figura39:** Ruta sintética de los compuestos finales.

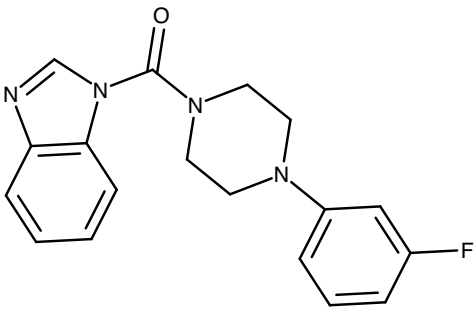
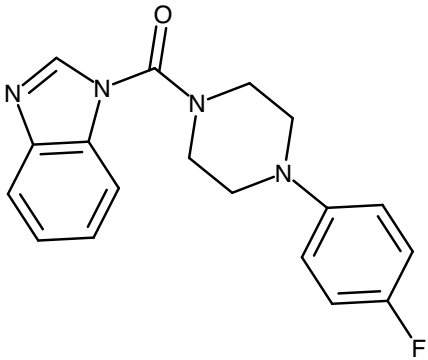
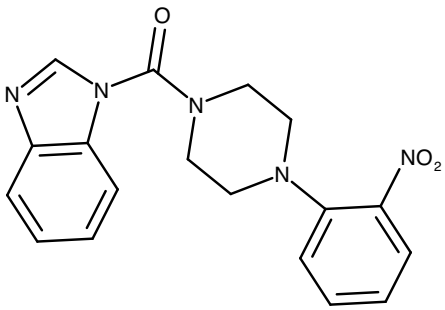
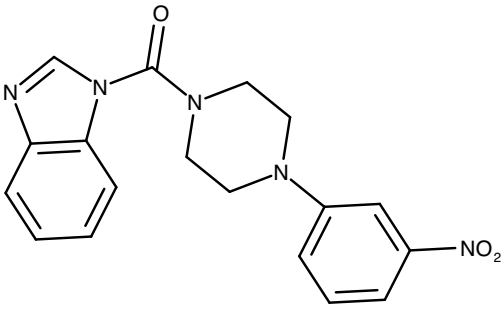
La síntesis comienza con la adición de trietilamina al anillo benzoimidazólico, para producir un equilibrio ácido-base, potenciando el carácter nucleofílico del átomo de nitrógeno aromático; el solvente para esta reacción debe poseer carácter aprótico para evitar productos de hidrólisis y favorecer la velocidad de reacción. Por lo tanto, se utilizó como solvente diclorometano (p.e: 39,6°C) para los compuestos con R<sub>1</sub> = H y acetonitrilo (p.e: 82,0°C) para los compuestos con R<sub>1</sub> = metilo, etilo

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

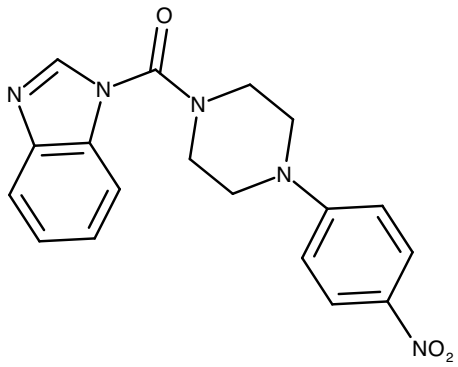
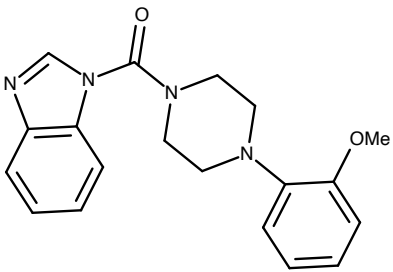
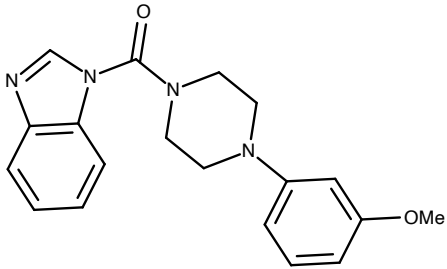
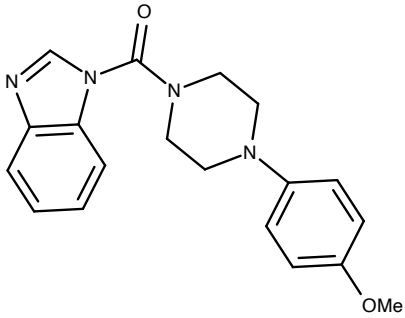
propilo e isopropilo; ya que el aumento en el tamaño de la cadena alquílica del anillo benzoimidazólico y los subsecuentes impedimentos estéricos, provocan un requerimiento mayor en la energía de activación que es obtenido a través del calentamiento a reflujo, con una temperatura equivalente a la de ebullición del solvente. A continuación, se agrega el compuesto y se realiza el seguimiento de la reacción cada 1 hora, a través de cromatografía en capa fina, verificando que a las 24 - 48 horas, respectivamente según el solvente, la síntesis no sufre variaciones. En ambos casos, la purificación se llevó a cabo a través de placa preparativa de sílica gel, utilizando diclorometano : acetato de etilo (2:1) como fase móvil. Se presentan, en la tabla 6, los rendimientos de reacción y las moléculas finales.

| Nº    | Estructura                                                                          | Rendimiento de reacción |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| REC-1 |  | 45 %                    |
| REC-2 |  | 43 %                    |

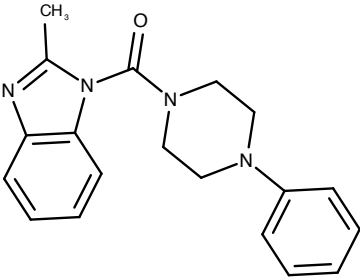
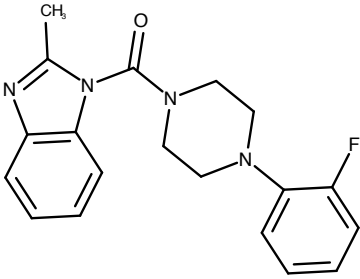
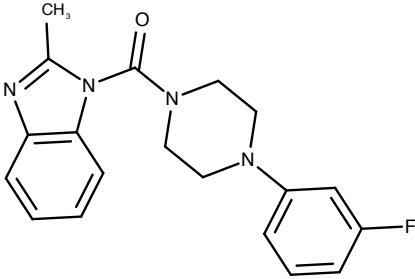
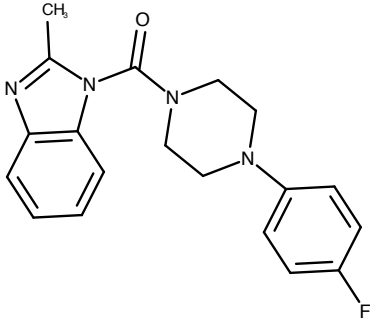
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|       |                                                                                                                                                                  |      |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| REC-3 | <br><chem>O=C1N2C=NC3=CC=CC=C3N2C1=O.N1CCN(CC1)c2ccc(F)cc2</chem>              | 52 % |
| REC-4 | <br><chem>O=C1N2C=NC3=CC=CC=C3N2C1=O.N1CCN(CC1)c2cccc(F)c2</chem>               | 48 % |
| REC-5 | <br><chem>O=C1N2C=NC3=CC=CC=C3N2C1=O.N1CCN(CC1)c2ccccc2[N+](=O)[O-]</chem>    | 60 % |
| REC-6 | <br><chem>O=C1N2C=NC3=CC=CC=C3N2C1=O.N1CCN(CC1)c2ccc([N+](=O)[O-])cc2</chem> | 58 % |

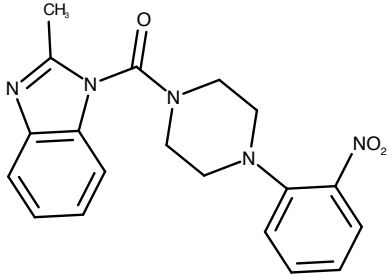
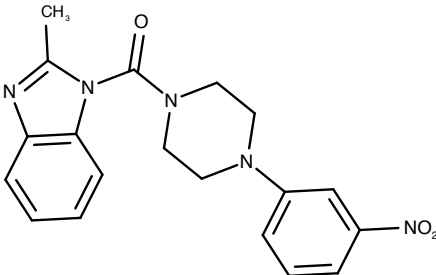
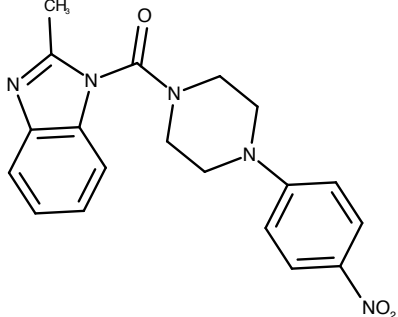
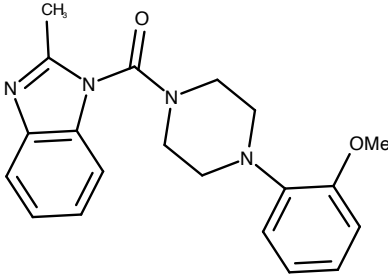
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|        |                                                                                                                                                                         |      |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| REC-7  | <br><chem>O=[N+]([O-])c1ccc(cc1)N2CCN(CC2)C(=O)N3C=CN4C(=CC=CC=C45C=CC=CC=C35)</chem> | 65 % |
| REC-8  | <br><chem>COc1ccccc1N2CCN(CC2)C(=O)N3C=CN4C(=CC=CC=C45C=CC=CC=C35)</chem>              | 42 % |
| REC-9  | <br><chem>COc1cccc(c1)N2CCN(CC2)C(=O)N3C=CN4C(=CC=CC=C45C=CC=CC=C35)</chem>           | 46 % |
| REC-10 | <br><chem>COc1ccc(cc1)N2CCN(CC2)C(=O)N3C=CN4C(=CC=CC=C45C=CC=CC=C35)</chem>          | 48 % |

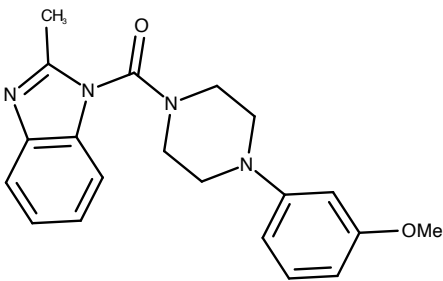
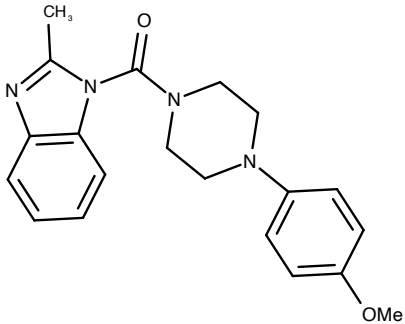
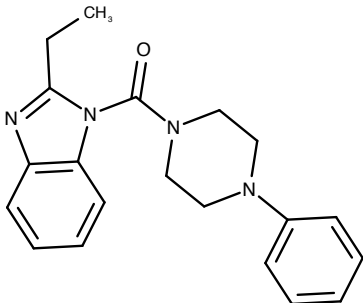
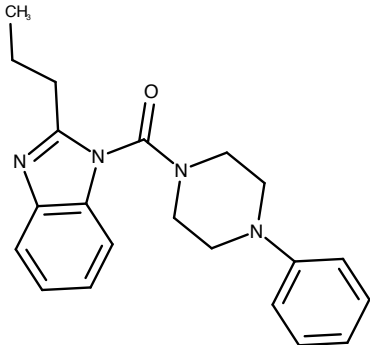
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|        |                                                                                     |      |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| REC-11 |    | 45 % |
| REC-12 |    | 47 % |
| REC-13 |   | 44 % |
| REC-14 |  | 48 % |

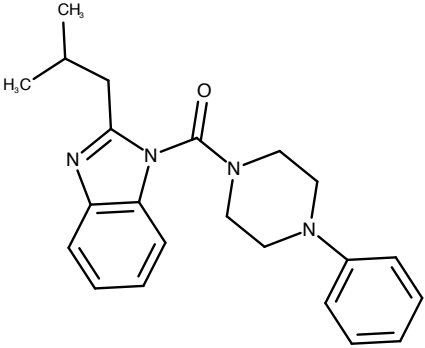
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|        |                                                                                     |      |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|------|
| REC-15 |    | 53 % |
| REC-16 |    | 55 % |
| REC-17 |   | 54 % |
| REC-18 |  | 46 % |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|        |                                                                                                                                                     |      |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| REC-19 | <br><chem>Cc1nc2ccccc2n1C(=O)N3CCN(Cc4ccc(OC)cc4)CC3</chem>        | 44 % |
| REC-20 | <br><chem>Cc1nc2ccccc2n1C(=O)N3CCN(Cc4ccc(OC)cc4)CC3</chem>        | 45 % |
| REC-21 | <br><chem>CCc1nc2ccccc2n1C(=O)N3CCN(Cc4ccccc4)CC3</chem>          | 52 % |
| REC-22 | <br><chem>CCC1=CN2C(=C1)C=CC=C2N2C(=O)N3CCN(Cc4ccccc4)CC3</chem> | 50 % |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|        |                                                                                                                                                     |      |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| REC-23 | <br><chem>CC(C)CC1=C2C(=N1)c3ccccc3N2C(=O)N3CCN(C3)c4ccccc4</chem> | 48 % |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|

**Tabla 6:** Rendimientos de formación de los productos finales.

### Diseño Racional de Ligandos: Evaluación Biológica

#### Inhibición h-FAAH

Si bien en el apartado anterior se reportó la síntesis orgánica de los compuestos propuestos, cabe destacar que la preparación de estos se planificó en dos etapas: en la primera, se obtuvieron las moléculas REC-1, REC-2, REC-4, REC 7, REC-9 y REC-23 y con ellas se realizaron pruebas preliminares determinando que los ligandos efectivamente muestran capacidad inhibitoria; posteriormente, en una segunda etapa, se completó el set de estructuras químicas que componen el diseño racional inicial.

Los ensayos biológicos del primer grupo de compuestos se realizaron con el kit de detección de inhibidores para h-FAAH, comercializado por Cayman Chemical. Este kit contiene la enzima humana recombinante, el sustrato 7-amino-4-metilcumarina-araquidonoilamida y el inhibidor JZL 195. La reacción enzimática tiene lugar con la incubación de h-FAAH con 7-AMC-araquidonoilamida, que por su acción hidrolasa, escinde el enlace amídico generando la liberación del producto fluorescente 7-amino-4-metilcumarina. Este compuesto fluorescente, es cuantificado por espectrofotometría UV y la absorbancia obtenida se relaciona con la máxima actividad enzimática por parte de h-FAAH.

Posteriormente, se somete a h-FAAH a la acción del primer grupo de moléculas, a manera de análisis cualitativo, para comprobar la disminución de su función hidrolítica. Así, se determina el porcentaje de inhibición producido por la acción de los compuestos, mediante la fórmula especificada por el fabricante del kit, descrita a continuación:

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\text{actividad inicial} - \text{actividad con inhibidor})}{\text{actividad inicial}} \times 100$$

En la tabla 7, se muestran los porcentajes de inhibición y actividad de la enzima, obtenidos experimentalmente, junto a los reportados por el estándar JZL 195, que es un potente inhibidor de h-FAAH. Para llevar a cabo la comparación, en todos los casos, se utilizaron concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  para los inhibidores.

| Compuesto | % Inhibición de h-FAAH | % Actividad de h-FAAH |
|-----------|------------------------|-----------------------|
| JZL 195   | 30,10 %                | 69,90 %               |
| REC-1     | 37,21 %                | 62,79 %               |
| REC-2     | 55,64 %                | 44,36 %               |
| REC-4     | 44,62 %                | 55,38 %               |
| REC-7     | 59,14 %                | 40,86 %               |
| REC-9     | 67,68 %                | 32,32 %               |
| REC-23    | 0 %                    | 100 %                 |

**Tabla 7:** Porcentaje de inhibición y actividad de los inhibidores.

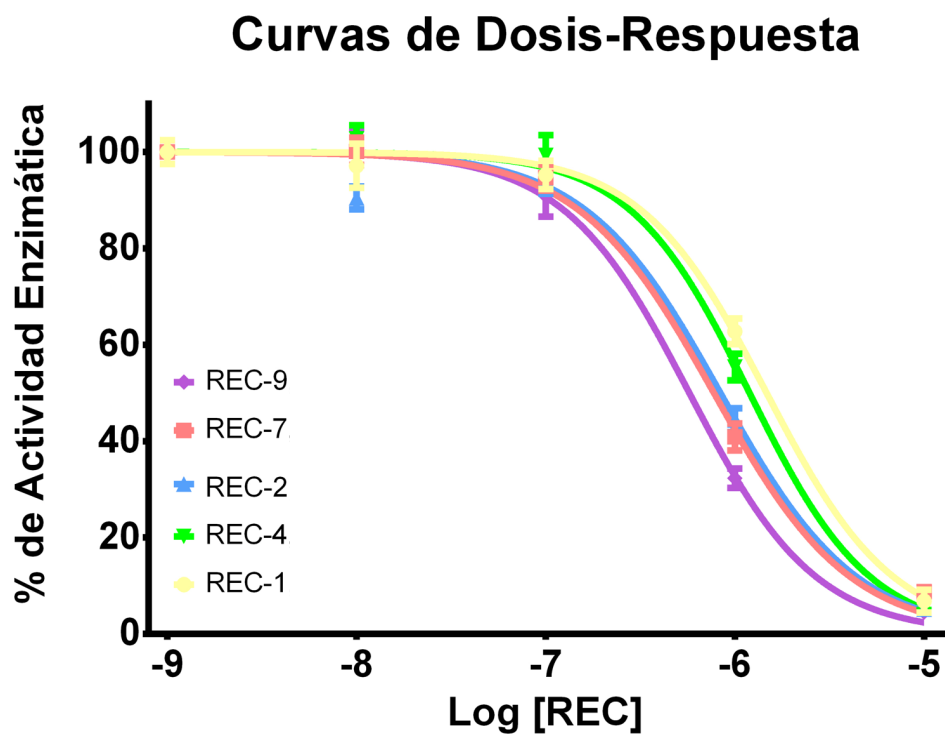
Una vez determinado que los compuestos REC-1, REC-2, REC-4, REC-7 y REC-9 actúan inhibiendo h-FAAH en el rango micromolar, se procede a la determinación de la concentración de ligando necesaria para disminuir en un 50 % la acción enzimática ( $\text{IC}_{50}$ ) mediante la medición del porcentaje de inhibición y el subsecuente porcentaje de actividad, a concentraciones crecientes de 10nM, 100 nM, 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 8, se aprecia el valor de  $IC_{50}$  para el primer grupo de inhibidores propuestos; adicionalmente, en la Figura40, se presenta el gráfico asociado a las curvas dosis-respuesta de estos.

| Nº     | $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) |
|--------|-----------------------|
| REC-1  | 1.47                  |
| REC-2  | 0.84                  |
| REC-4  | 1.20                  |
| REC-7  | 0.78                  |
| REC-9  | 0.57                  |
| REC-23 | >10                   |

**Tabla 8:**  $IC_{50}$  del primer grupo de inhibidores propuestos.



**Figura40:** Curva dosis-respuesta de los inhibidores.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Considerando los valores de  $IC_{50}$  obtenidos, se puede dar cuenta que efectivamente la capacidad inhibitoria de los compuestos se encuentra en el rango micromolar; si esto se compara con JZL 195, que es un inhibidor de FAAH y MAGL con un  $IC_{50}$  en el rango de 2 a 4 nM <sup>113</sup>, la potencia de las moléculas REC es mucho menor. Sin embargo, la selectividad de JZL 195 es baja, lo que provoca efectos adversos similares a los presentados por agonistas  $CB_1$  <sup>113</sup>. Por este motivo, se decide realizar un análisis cualitativo en h-MAGL, observando una nula actividad sobre esta enzima, lo que entrega una ventaja comparativa en relación a JZL 195.

Adicionalmente, se ejecuta el ensayo de viabilidad celular por reducción del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) en células de riñón (VERO), células cancerígenas de leucemia (HL-60), células cancerígenas cervicouterinas (HELA) y células cancerígenas de colon (HTC116), para comprobar la posible citotoxicidad de los compuestos sintetizados hasta el momento, en los rangos terapéuticos reportados. Los resultados son expuestos en la tabla 9.

| Nº    | $IC_{50}$ ( $\mu$ M)<br>h-FAAH | $IC_{50}$ ( $\mu$ M)<br>VERO | $IC_{50}$ ( $\mu$ M)<br>HL60 | $IC_{50}$ ( $\mu$ M)<br>HELA | $IC_{50}$ ( $\mu$ M)<br>HTC116 |
|-------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| REC-1 | <b>1.47</b>                    | 56.3                         | 11.7                         | 97.3                         | 66.0                           |
| REC-2 | <b>0.84</b>                    | 64.6                         | 10.6                         | 74.8                         | 30.3                           |
| REC-4 | <b>1.20</b>                    | 70.3                         | 5.04                         | 63.6                         | 42.1                           |
| REC-7 | <b>0.78</b>                    | 76.0                         | 4.19                         | 43.7                         | 35.4                           |
| REC-9 | <b>0.57</b>                    | 8.12                         | ND                           | 21.3                         | 21.2                           |

**Tabla 9:** Resultados del ensayo de viabilidad celular.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba de citotoxicidad permite deducir que el  $IC_{50}$ , en las líneas celulares ensayadas, sobrepasa entre un 421 % (REC-4 / HL60) a un 9800 % (REC-7 / VERO) respecto al  $IC_{50}$  que presentan los compuestos en la enzima; por lo tanto, considerando la selectividad sobre h-FAAH y la posible ventana terapéutica exhibida por las moléculas REC, se decide proseguir con la síntesis del segundo grupo de moléculas, que completa la serie inicialmente propuesta.

Posterior a la finalización de la segunda etapa sintética, se procede a las gestiones para la compra del kit de detección para inhibidores de h-FAAH, reportándose por parte de Cayman Chemical, el desabastecimiento de este producto. Entonces, se decide enviar los veintitrés compuestos al Instituto de Química Biomolecular en Nápoles, Italia, dirigido por el Dr. Vincenzo Di Marzo, quién es colaborador de nuestro grupo de investigación. Aquí, se realizaron las pruebas necesarias para reportar los resultados de  $IC_{50}$  tanto en r-FAAH y r-MAGL que se presentan en la tabla 10.

| Nº    | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub>    | r-FAAH<br>IC <sub>50</sub> (µM) | r-MAGL<br>IC <sub>50</sub> (µM) |
|-------|----------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| REC-1 | -H             | -H                | 3.97 ± 0.20                     | >10                             |
| REC-2 | -H             | o-F               | 12.57 ± 2.41                    | >10                             |
| REC-3 | -H             | m-F               | 3.69 ± 0.70                     | >10                             |
| REC-4 | -H             | p-F               | >10                             | >10                             |
| REC-5 | -H             | o-NO <sub>2</sub> | 2.08 ± 0.08                     | >10                             |
| REC-6 | -H             | m-NO <sub>2</sub> | 2.91 ± 0.94                     | >10                             |
| REC-7 | -H             | p-NO <sub>2</sub> | 2.36 ± 0.18                     | >10                             |
| REC-8 | -H             | o-OMe             | >10                             | >10                             |
| REC-9 | -H             | m-OMe             | 7.73 ± 0.89                     | >10                             |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|        |                                                    |                   |             |     |
|--------|----------------------------------------------------|-------------------|-------------|-----|
| REC-10 | -H                                                 | p-OMe             | 3.81 ± 0.07 | >10 |
| REC-11 | -CH <sub>3</sub>                                   | -H                | >10         | >10 |
| REC-12 | -CH <sub>3</sub>                                   | o-F               | >10         | >10 |
| REC-13 | -CH <sub>3</sub>                                   | m-F               | >10         | >10 |
| REC-14 | -CH <sub>3</sub>                                   | p-F               | >10         | >10 |
| REC-15 | -CH <sub>3</sub>                                   | o-NO <sub>2</sub> | >10         | >10 |
| REC-16 | -CH <sub>3</sub>                                   | m-NO <sub>2</sub> | >10         | >10 |
| REC-17 | -CH <sub>3</sub>                                   | p-NO <sub>2</sub> | >10         | >10 |
| REC-18 | -CH <sub>3</sub>                                   | o-OMe             | >10         | >10 |
| REC-19 | -CH <sub>3</sub>                                   | m-OMe             | >10         | >10 |
| REC-20 | -CH <sub>3</sub>                                   | p-OMe             | >10         | >10 |
| REC-21 | -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                   | -H                | >10         | >10 |
| REC-22 | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | -H                | >10         | >10 |
| REC-23 | -CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | -H                | >10         | >10 |

**Tabla 10:** IC<sub>50</sub> de los compuestos finales en r-FAAH y r-MAGL.

Como se mencionó anteriormente, los ensayos preliminares fueron efectuados en la enzima humana; sin embargo, su replicabilidad no fue posible por desabastecimiento de la proteína. Por esta razón, los experimentos debieron ser ejecutados en enzima de rata, lo que entregaría una aproximación bastante cercana a la realidad ya que el porcentaje de identidad entre r-FAAH y h-FAAH es de un 82 %, sus sitios activos difieren en 6 aminoácidos que no interactúan con los inhibidores con los que la enzima ha sido co-cristalizada y la tríada catalítica Lys142, Ser217 y Ser241 se encuentra conservada <sup>114</sup>. Respecto al inhibidor JZL-195, utilizado en los primeros ensayos, el IC<sub>50</sub> en r-FAAH también está dentro del rango nanomolar (13 a 19 nM), por lo que se pudiese extrapolar la relación estructura-actividad desde la enzima de rata a la humana.

### Diseño Racional: Acoplamiento Molecular Inducido

#### Modelo *in silico* de la enzima h-FAAH

En el diseño racional de los ligandos se utilizó un modelo *in silico* de la enzima, elaborado previamente por el grupo de investigación, el cual fue construido a partir de la secuencia aminoacídica de r-FAAH que se encuentra en el repositorio de secuencias proteicas e información funcional, UNIPROT, bajo el código P97612 (versión inicial: año 1997).

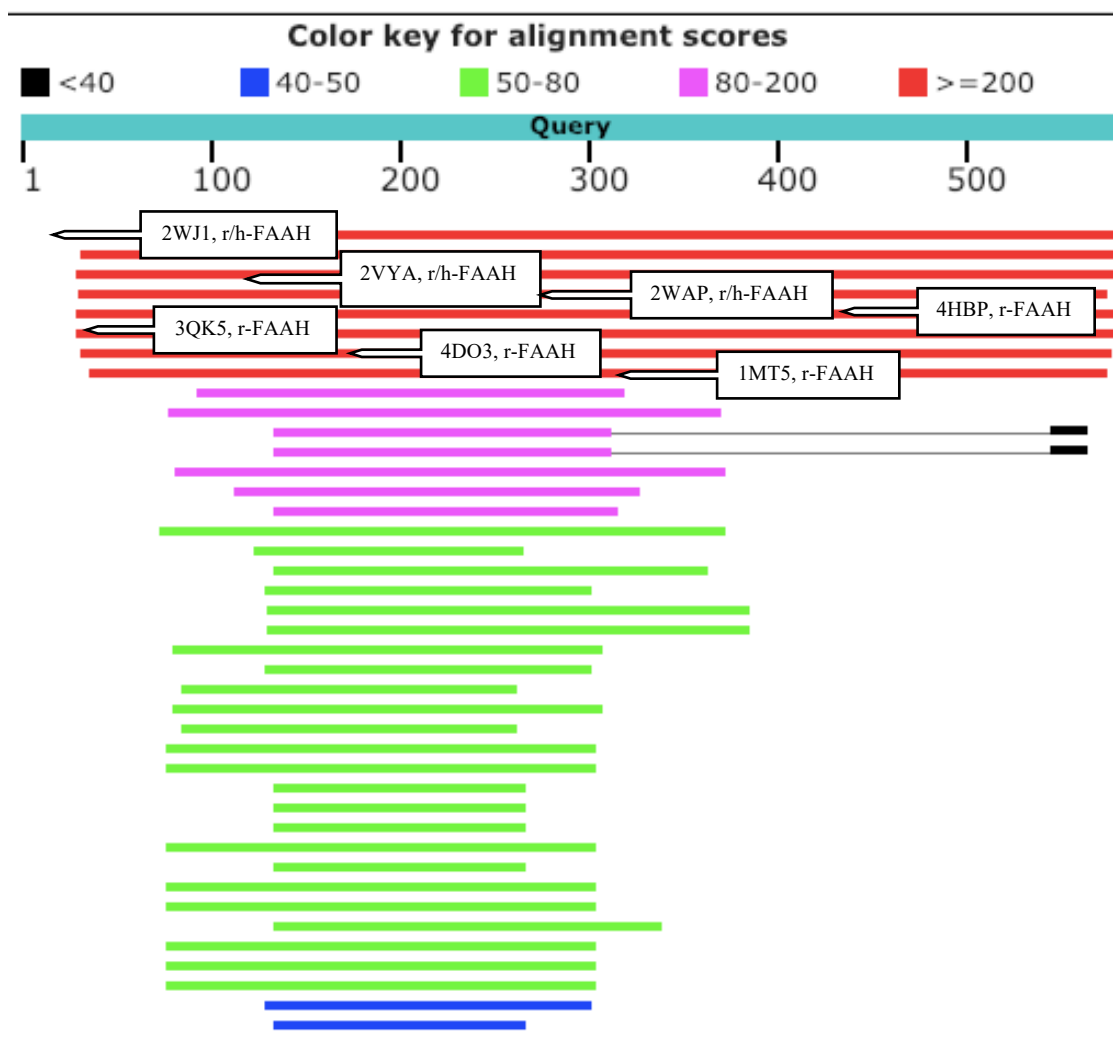
En el año 2005, se integra al repositorio bajo el código O00519, la secuencia aminoacídica de h-FAAH permitiendo realizar, a través de mutagénesis, un modelo molecular por homología de la enzima de rata humanizada (r/h-FAAH). A continuación, se detallan las etapas realizadas para la elaboración del nuevo modelo.

#### 1. Puntuación de los cristales de UNIPROT respecto a h-FAAH

En el repositorio UNIPROT se descargó la secuencia aminoacídica de h-FAAH y se comparó mediante la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés), con todas las estructuras cristalinas (*templates*) disponibles hasta el momento de la enzima; esto conformó, un ranking basado en la resolución de los cristales y el tamaño de la porción cristalizada frente a la secuencia aminoacídica de h-FAAH (O00519).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura42, se presenta el ranking de alineamiento frente a la enzima humana; como se puede observar, los segmentos en rojo representan los cristales con mayor similitud frente a h-FAAH.



**Figura42:** *Ranking* de alineamiento respecto a la secuencia de h-FAAH.

La definición de las estructuras cristalinas con las que se trabajó posteriormente en la construcción del nuevo modelo está relacionada con los parámetros ya mencionados: resolución de los cristales y el tamaño de la porción cristalizada; sin embargo, también se consideró la

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

pertinencia de los estudios realizados y que éstos fueran concordantes con la investigación que se está llevando a cabo. Así, para realizar el alineamiento se utilizaron los siguientes modelos:

- **2VYA:** la enzima r/h-FAAH esta co-cristalizada con el inhibidor PF-750 que se une covalentemente a ella y es utilizado como control en pruebas biológicas de inhibición.
- **3PPM:** la enzima r/h-FAAH esta co-cristalizada con un inhibidor ceto-heterocíclico similar al propuesto en la hipótesis y posee una excelente resolución (1,78 Å).
- **4HBP:** la enzima r-FAAH esta co-cristalizada con un inhibidor piperazin-ureico similar al propuesto en la hipótesis.

### 2. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas seleccionadas

El alineamiento de las secuencias aminoácidas de los tres modelos elegidos, se ejecutó a través del programa JALVIEW utilizando la estructura co-cristalizada con piperazin-ureas (4HBP) como cristal líder. Los colores utilizados para la representación que se observa en la Figura 43, son: (a) membrana celular en fucsia (b) 2VYA en rosado, (c) 4HBP en verde y (d) 3PPM en celeste. Por último, el inicio y final del alineamiento están demarcados por (e) Arg 37 en amarillo y (f) Thr 573 en naranja.



**Figura43:** Alineamiento de los modelos de la enzima FAAH.

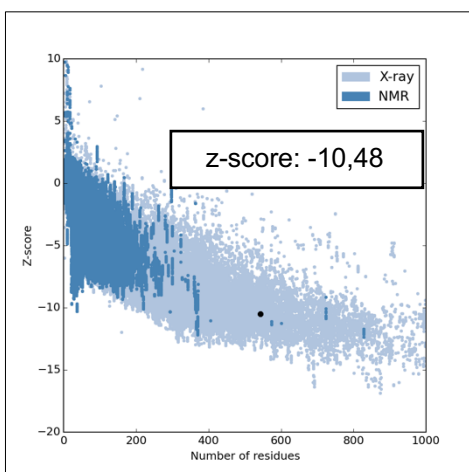
### 3. Obtención del modelo *in silico* de r/h-FAAH

Una vez alineadas las secuencias aminocídicas de las estructuras cristalinas seleccionadas, se procedió a realizar el modelamiento de la enzima mediante el uso del software MODELLER. Se construyeron 50 modelos que fueron ranqueados a través de una puntuación estándar, denominada *molpdf*, que es emanada por el mismo programa y permite estimar la mejor versión de los modelos generados a través de una minimización energética que incluye parámetros fisico-químicos, como: potencial de enlace, ángulos de enlace, estereoquímica energía electrostática, distancia entre átomos, etc.

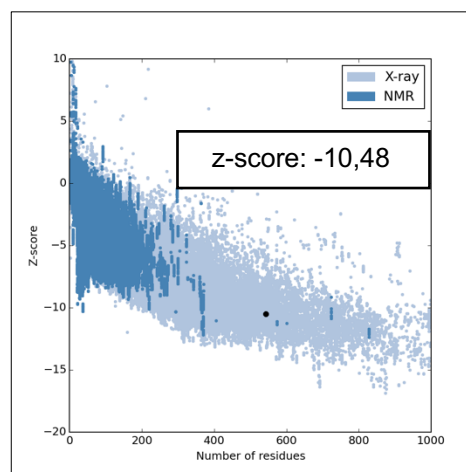
El modelo elegido fue el que posee menor puntuación en el ranking y fue validado a través del programa Protein Structure Analysis (PROSA-WEB); este indica, que el modelo posee una calidad (z-score) similar a

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

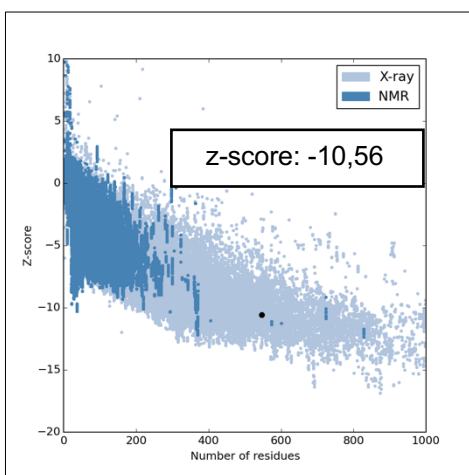
los cristales con los que se realizó el alineamiento inicial, verificando que tanto el modelo como las proteínas nativas tienen tamaños y formas muy similares (figuras 44 - 47).



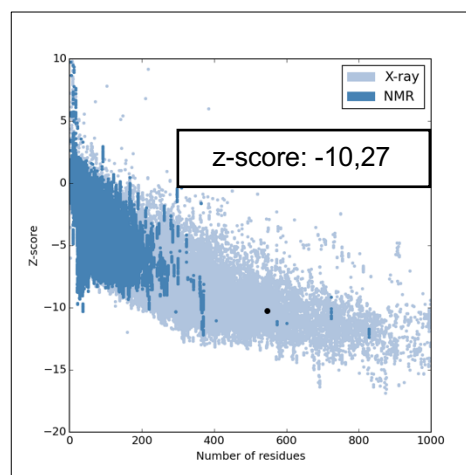
**Figura44:** Validación entre 2VYA y 4HBP.



**Figura46:** Validación entre 2VYA y 3PPM.



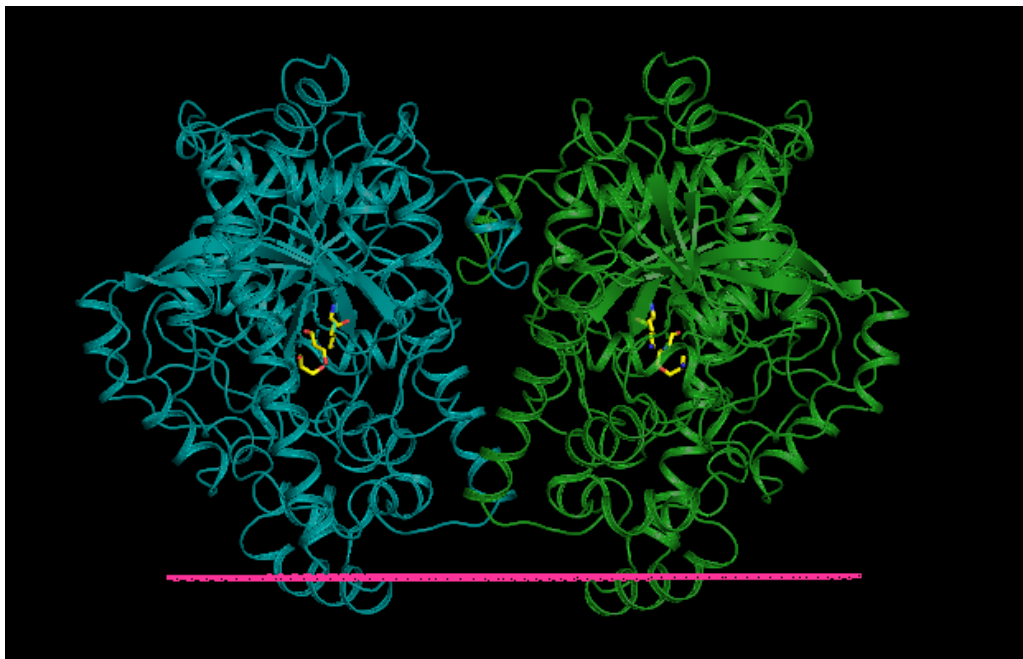
**Figura45:** Validación entre 3PPM y 4HBP.



**Figura47:** Validación del modelo y estructuras nativas.

### 4. Construcción del modelo r/h-FAAH dimérico

Debido a la naturaleza de la enzima h-FAAH, la construcción del modelo final considera el diseño de un dímero, que es presentado en la Figura48. En amarillo se aprecia la tríada catalítica Lys142 – Ser217 – Ser241.



**Figura48:** Modelo computacional de r/h-FAAH de tipo dimérico.

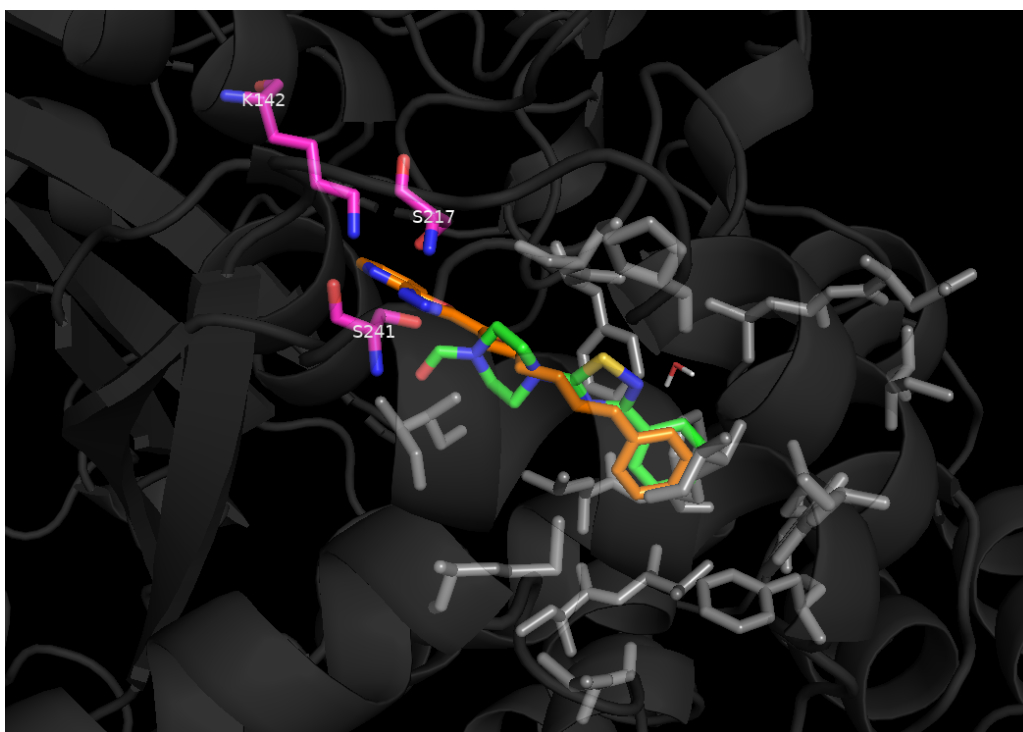
### 5. Determinación del sitio de unión de los ligandos

El sitio de unión de la enzima fue definido a través de la observación de los ligandos co-cristalizados de los modelos seleccionados inicialmente para el diseño de r/h-FAAH, se determinaron 19 aminoácidos que interactúan con los inhibidores enzimáticos y se consideró la presencia de una molécula de agua que participaría en la desacilación del estado de transición tetrahédrico, involucrado en el mecanismo catalítico de la enzima.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

La efectividad del modelo propuesto se validó realizando un acoplamiento molecular inducido con los inhibidores JG1 (3PPM) y 17J (4HBP), observando que efectivamente las moléculas se posicionan en el sitio de unión y se disponen espacialmente como lo hacen en la enzima nativa. En la Figura49, se presenta en color gris el sitio de unión de la enzima, en colores según los elementos químicos la tríada catalítica y la molécula de agua; en naranja el inhibidor JG1 y en verde el inhibidor 17J.



**Figura49:** Validación del modelo de r/h-FAAH.

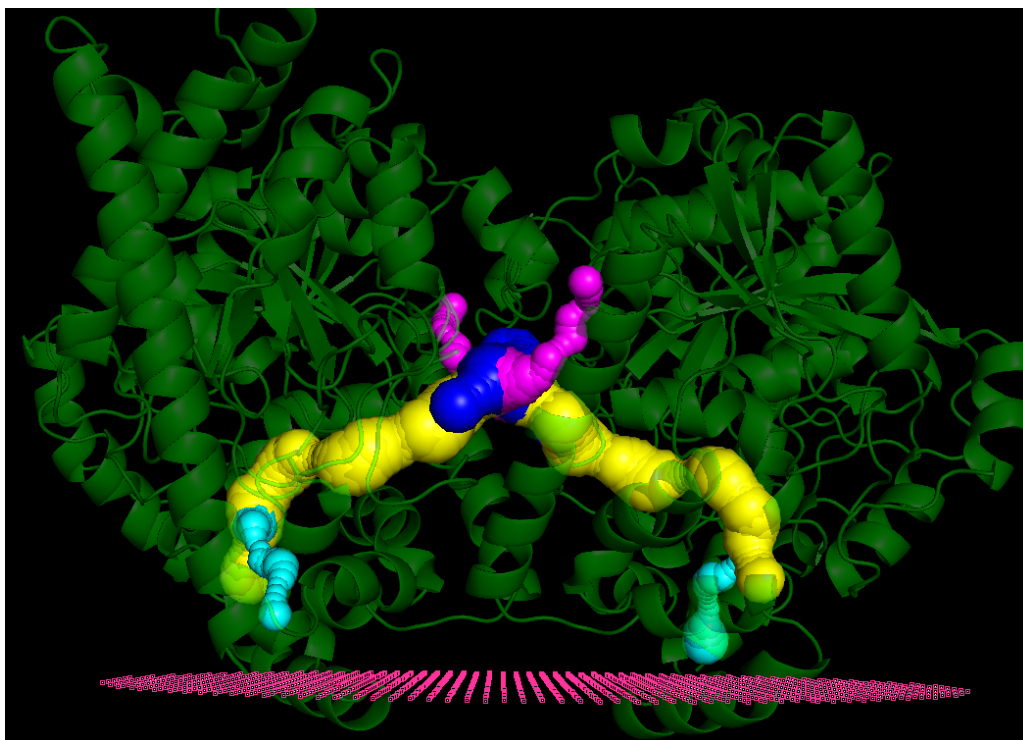
### 6. Canales de acceso de la enzima

En relación a lo expuesto en la página 22, respecto a los canales de acceso que tiene la enzima desde la membrana para facilitar el ingreso de los ligandos endógenos, se utilizó el programa CAVER-PYMOL para verificar que en el modelo, éste se estuviera reproducido. Efectivamente

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

en la Figura50, se puede apreciar en color celeste el canal cercano a la membrana lipídica que tiene por función alinear la porción polar de los sustratos permitiendo la entrada al sitio activo, actuando como puerta de acceso de los ligandos. En amarillo, se observa el canal de membrana que contiene la porción hidrofóbica de los ligandos y conduce al sitio activo de la enzima. En azul, se encuentra dicho sitio activo de la enzima e inserto en él, la tríada catalítica Lys142, Ser217 y Ser241. Finalmente, en magenta, se encuentran los canales de acceso citosólico que permitirían la salida de los grupos hidrófilos de los ligandos, posterior a la acción enzimática de FAAH.



**Figura50:** Canales de acceso en el modelo de r/h-FAAH.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7. Acoplamiento molecular inducido de los compuestos sintetizados

Los estudios de acoplamiento molecular inducido se realizaron mediante el programa computacional MOLECULAR OPERATING ENVIRONMENT (MOE). Se preparó el modelo ejecutando una minimización de energía para hacer una simulación de tipo flexible, que permite establecer sitios de interacción en condiciones más similares a las presentadas biológicamente; ya que considera, entre otros parámetros, los efectos de las cargas parciales de los aminoácidos y del solvente.

Los compuestos sintetizados fueron sometidos a acoplamiento molecular inducido obteniendo los resultados expuestos en la tabla 11, donde se reportan: número de soluciones entregadas por el programa, energía de unión del ligando con la enzima y la distancia de Ser241 y el átomo de carbono carbonílico que sería atacado nucleofílicamente por el aminoácido para formar el enlace covalente.

| Nº    | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | r-FAAH<br>IC <sub>50</sub> (μ M) | Nº de soluciones | Distancia S241 y carbonilo (Å) |
|-------|----------------|----------------|----------------------------------|------------------|--------------------------------|
| REC-1 | -H             | -H             | 3.97 ± 0.20                      | 3                | 6,0                            |
| REC-2 | -H             | o-F            | 12.57 ± 2.41                     | 6                | 4,0                            |
| REC-3 | -H             | m-F            | 3.69 ± 0.70                      | 4                | 3,4                            |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|        |                                                    |                   |             |    |     |
|--------|----------------------------------------------------|-------------------|-------------|----|-----|
| REC-4  | -H                                                 | p-F               | >10         | 2  | 5,6 |
| REC-5  | -H                                                 | o-NO <sub>2</sub> | 2.08 ± 0.08 | 3  | 4,7 |
| REC-6  | -H                                                 | m-NO <sub>2</sub> | 2.91 ± 0.94 | 2  | 5,2 |
| REC-7  | -H                                                 | p-NO <sub>2</sub> | 2.36 ± 0.18 | 2  | 5,2 |
| REC-8  | -H                                                 | o-OMe             | >10         | 3  | 5,3 |
| REC-9  | -H                                                 | m-OMe             | 7.73 ± 0.89 | 2  | 5,5 |
| REC-10 | -H                                                 | p-OMe             | 3.81 ± 0.07 | 2  | 5,3 |
| REC-11 | -CH <sub>3</sub>                                   | -H                | >10         | 7  | 5,1 |
| REC-12 | -CH <sub>3</sub>                                   | o-F               | >10         | 6  | 5,7 |
| REC-13 | -CH <sub>3</sub>                                   | m-F               | >10         | 2  | 4,7 |
| REC-14 | -CH <sub>3</sub>                                   | p-F               | >10         | 6  | 5,5 |
| REC-15 | -CH <sub>3</sub>                                   | o-NO <sub>2</sub> | >10         | 9  | 4,3 |
| REC-16 | -CH <sub>3</sub>                                   | m-NO <sub>2</sub> | >10         | 5  | 5,5 |
| REC-17 | -CH <sub>3</sub>                                   | p-NO <sub>2</sub> | >10         | 5  | 5,7 |
| REC-18 | -CH <sub>3</sub>                                   | o-OMe             | >10         | 12 | 6,2 |
| REC-19 | -CH <sub>3</sub>                                   | m-OMe             | >10         | 5  | 5,7 |
| REC-20 | -CH <sub>3</sub>                                   | p-OMe             | >10         | 3  | 5,2 |
| REC-21 | -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                   | -H                | >10         | 12 | 7,5 |
| REC-22 | -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>   | -H                | >10         | 15 | 7,4 |
| REC-23 | -CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | -H                | >10         | 18 | 7,7 |

**Tabla 11:** Acoplamiento molecular inducido de los compuestos REC-1 a REC-23.

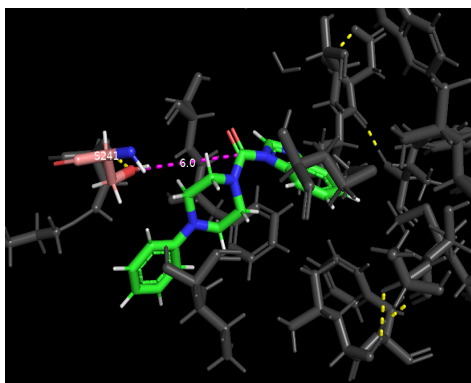
Se puede apreciar que la distancia entre Ser241 y los grupos carbonilos de la serie REC son superiores a los 4,0 Å lo que podría favorecer la capacidad de un ataque nucleofílico por parte del aminoácido; además, se observa que las moléculas ingresarían al sitio catalítico de la enzima pero no efectuarían interacciones electrostáticas con otros aminoácidos en el sitio de unión. El motivo pudiese estar relacionado con la interacción

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

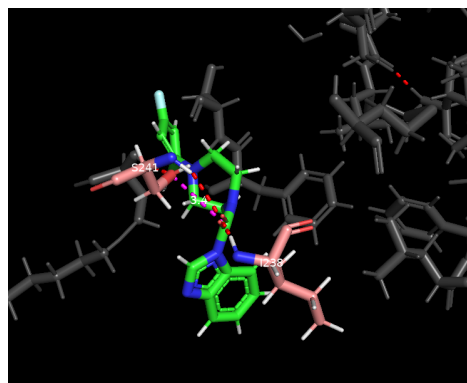
---

que realizan los compuestos con Ile238 impidiendo el movimiento hacia el canal citosólico; sin embargo, se disponen de manera similar que los ligandos co-cristalizados y reportados previamente.

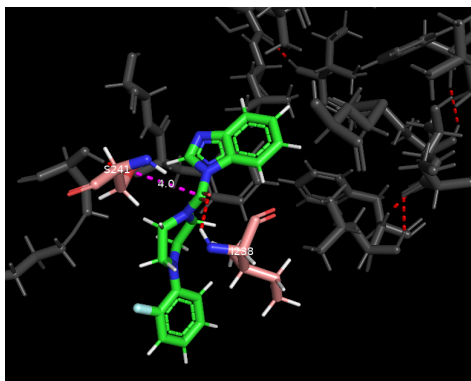
Cabe destacar, que REC-7 y REC-8 serían capaces de establecer un enlace de hidrógeno con Phe192 en vez de una interacción  $\pi$ -stacking, lo que favorece que el compuesto se pliegue impidiendo su entrada al sitio de unión, inactivando su acción; esto se condice con los resultados de las pruebas biológicas donde ambos no tienen acción en la enzima. Finalmente, los compuestos REC-21, REC-22 y REC-23, no podrían ingresar al sitio catalítico por el impedimento estérico que presenta la cadena alquílica conectada al anillo benzoimidazólico. En las siguientes figuras, se presentan los resultados más representativos.



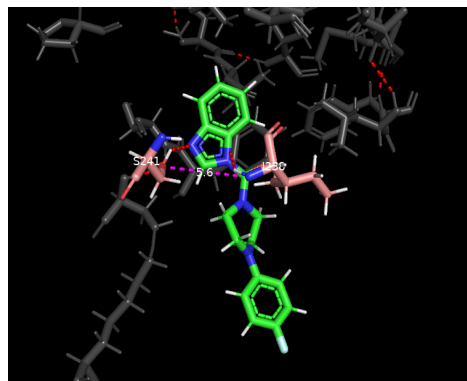
**Figura51:** REC-1.



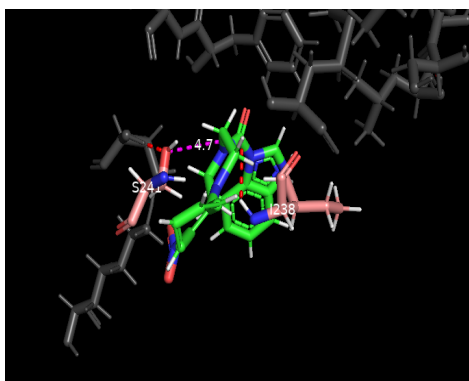
**Figura53:** REC-3.



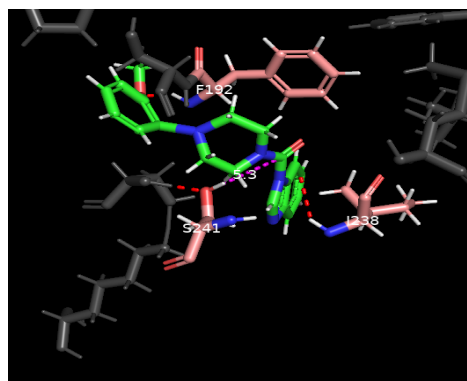
**Figura52:** REC-2.



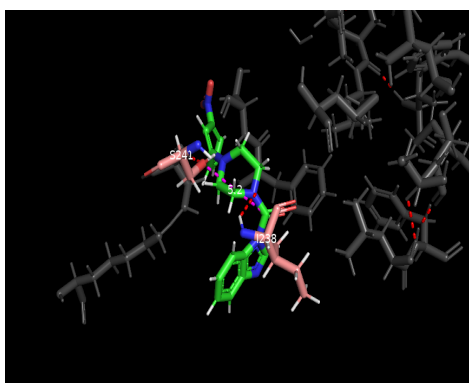
**Figura54:** REC-4.



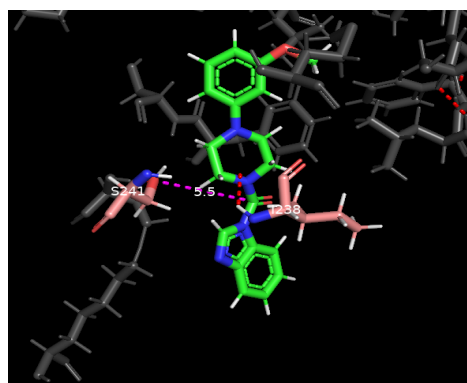
**Figura55:** REC-5.



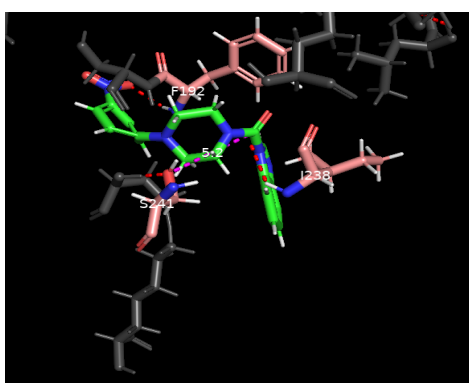
**Figura58:** REC-8.



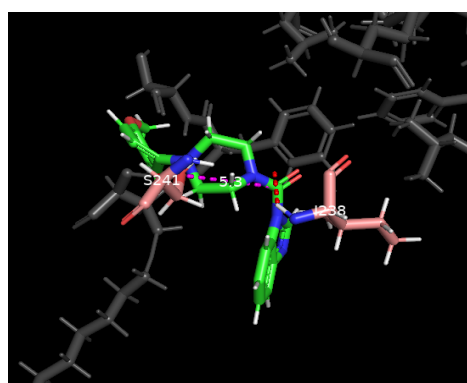
**Figura56:** REC-6.



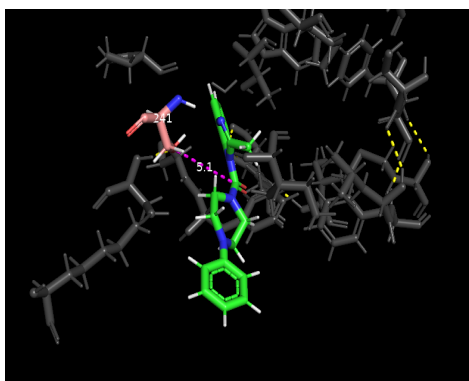
**Figura59:** REC-9.



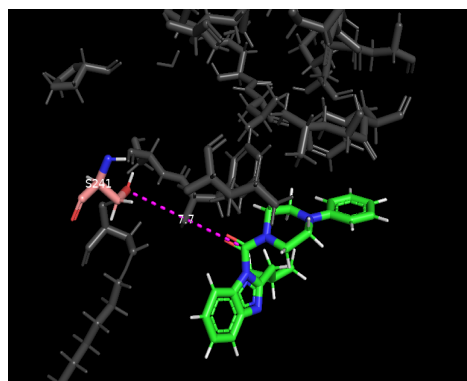
**Figura57:** REC-7.



**Figura60:** REC-10.



**Figura61:** REC-11.



**Figura62:** REC-23.

### 8. Farmacóforo basado en las estructuras

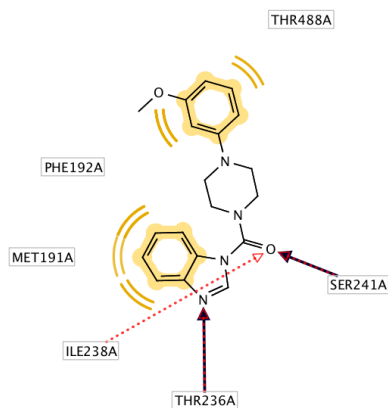
Con los resultados biológicos que se obtuvieron con las seis primeras moléculas sintetizadas y sus respectivos  $IC_{50}$ , se elaboraron dos farmacóforos basados en los esqueletos estructurales a través del programa Ligand Scout.

El primer farmacóforo, fue construido en condiciones rígidas sugiriendo las interacciones que podrían formarse entre los ligandos y el sitio catalítico de la enzima (Figura63), se propone el ataque nucleofílico de Ser241 y la estabilización que realizaría Ile238; sin embargo, las interacciones con Met191 y Thr488 no fueron reflejadas en el acoplamiento molecular inducido.

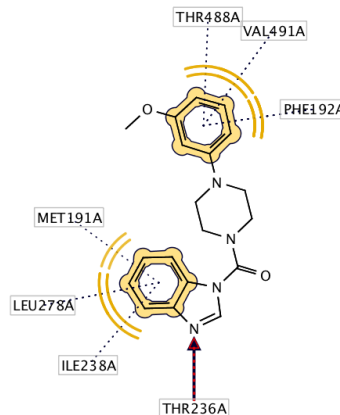
El segundo farmacóforo, fue construido en condiciones flexibles destacando las interacciones con los aminoácidos Thr488, Val491 y Phe192 con el anillo fenílico de la fenilpiperazina (Figura64); por otro lado, Met191, Leu278 e Ile238 realizarían interacciones  $\Pi$ -stacking con el anillo fenilo del sistema benzoimidazol. Adicionalmente, los electrones

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

del grupo hidroxilo de Thr236, tendrían un efecto inductor sobre el anillo imidazólico.



**Figura63:** Farmacóforo rígido.



**Figura64:** Farmacóforo flexible.

### 9. Dinámica Molecular

Por optimización de recursos computacionales, las dinámicas moleculares se realizaron con el ligando JG1 y con la molécula REC-9 ya que tenía el mejor  $IC_{50}$  de las seis elaboradas inicialmente. Los objetivos de realizar estos estudios eran dos: primero, corroborar que efectivamente el ligando se posicionara completamente en el sitio activo de la enzima, lo que no se verificó del todo en los acoplamiento moleculares inducidos y, segundo, que en condiciones biológicas, incluyen: efecto solvente, movimiento de membranas, intercambio de iones entre el espacio intra y extra celular, entre otras, el inhibidor se quedará en el sitio de unión y no se escabulliese por los canales de membrana previamente descritos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Según lo observado en las dinámicas moleculares, los complejos son estables en ambos casos y los dímeros de r/h-FAAH se mantienen en todo momento en contacto con los lípidos mediante los segmentos intramembrana, por lo que el modelo que se ha utilizado es fiable.

Para el caso de JG1 (Figura65), se observa que la molécula se posiciona en el sitio catalítico como lo hace co-cristalizado en la enzima nativa replicando la distancia de enlace desde Ser241 al átomo de carbono carbonílico, favoreciendo la formación del enlace covalente.

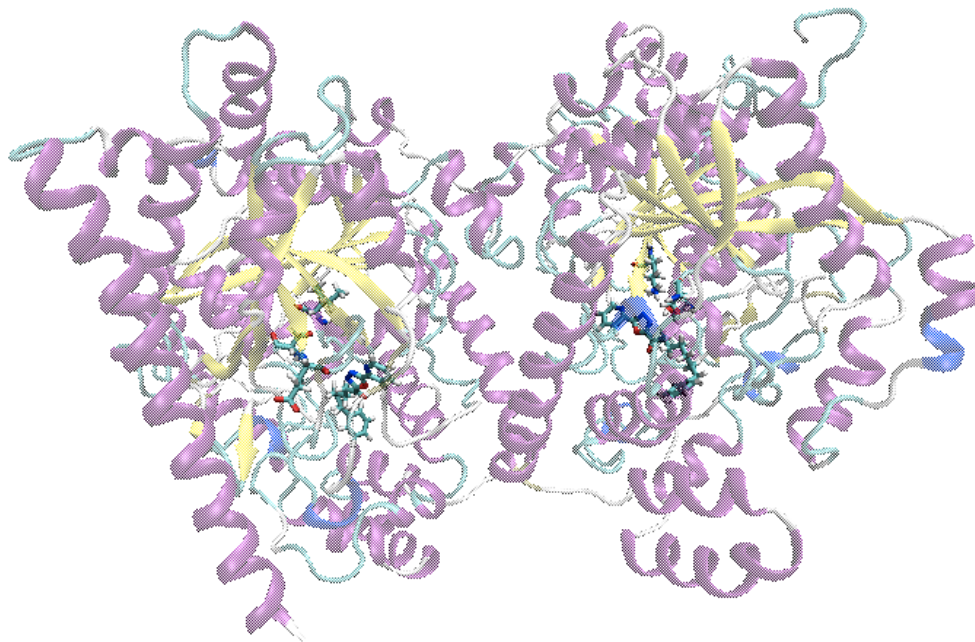
Por otro lado, el modo de unión covalente propuesto para REC-9, parece ser correcto. Las trayectorias muestran que la parte del compuesto más cercana a la tríada catalítica se mantiene muy estable durante toda la simulación, señal de que se establecen interacciones con el sitio de acción; el posicionamiento del ligando permite encontrar una distancia de enlace, entre Ser241 y el átomo de carbono carbonílico de REC-9, de 5 Å en promedio. La parte más variable, se ubica hacia el canal de entrada, teniendo el mismo comportamiento que el ligando cristalográfico; esto valida la importancia de haber hecho la simulación de JG1 para tener una referencia. Con estos resultados, se puede establecer que los compuestos se unirían de manera covalente a la enzima realizando interacciones en el sitio catalítico con la tríada catalítica y los aminoácidos del sitio de unión de la enzima (Figura66).

Respecto a las interacciones mencionadas en el acoplamiento molecular inducido y en el farmacóforo basado en la estructura, en la dinámica molecular se aprecia que los aminoácidos Thr488 y Phe192 tienen la distancia (4 Å) para interactuar con el anillo fenílico de la fenilpiperazina, situación equivalente entre el anillo benceno del benzoimidazol y los

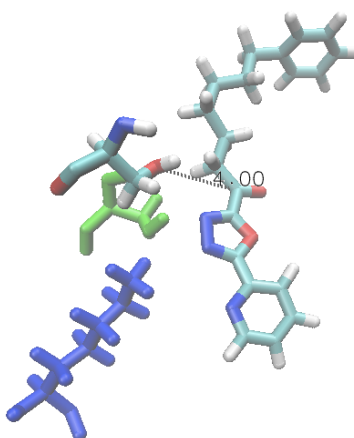
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

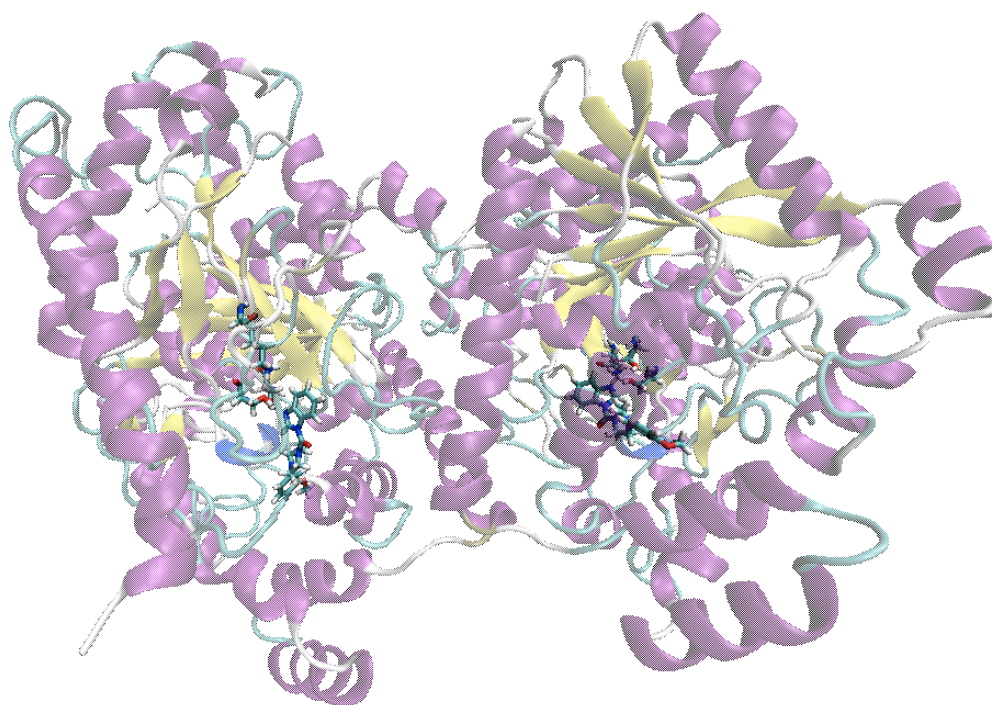
aminoácidos Met191 y Leu278; por otro lado, el efecto inductor de Thr 236, también se ve reflejado.



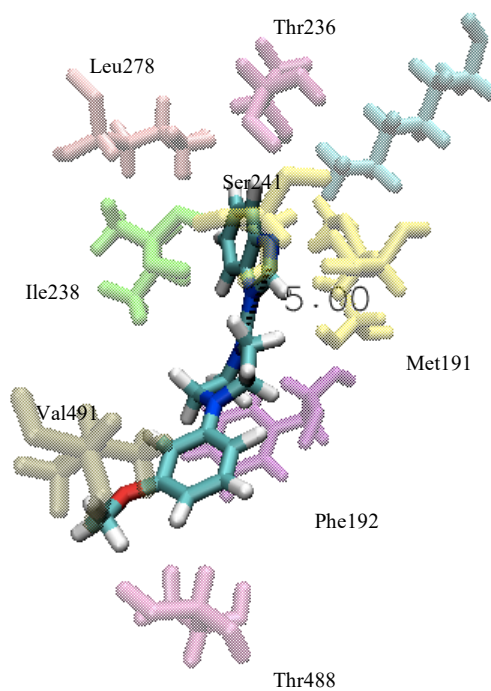
**Figura65:** Dinámica molecular de JG1.



**Figura66:** Distancia entre JG1 y Ser241.



**Figura67:** Dinámica molecular de REC-9.



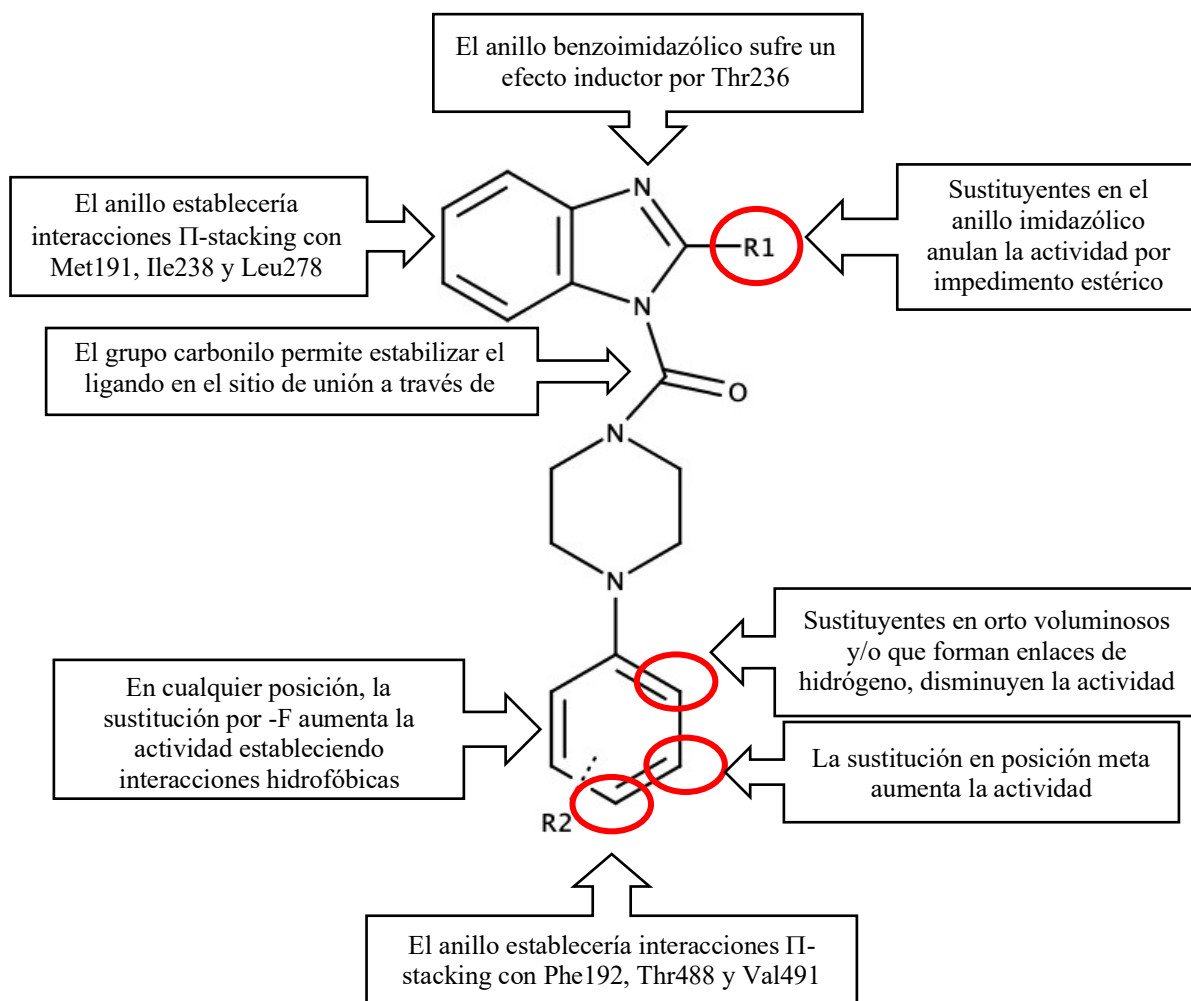
**Figura68:** Distancia entre REC-9 y Ser241.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diseño Racional de Ligandos: Relación Estructura Actividad

#### Relación estructura-actividad

Considerando lo expuesto tanto en los estudios farmacológicos como en los de acoplamiento molecular inducido, se sugiere el siguiente farmacóforo:



**Figura69:** Relación estructura actividad de la serie propuesta.

## CONCLUSIONES

---

## CONCLUSIONES

---

## Conclusiones

De la investigación realizada y según la hipótesis propuesta, se puede concluir que se cumplieron los objetivos, como se desglosa a continuación:

1. Se realizó una propuesta de síntesis orgánica viable para los compuestos de la serie, en tres pasos de reacción, donde en la segunda etapa se utilizó trifosgeno que resultó ser crucial en el manejo de la velocidad y cinética de reacción.
2. Se comprobó que el uso de acetonitrilo como solvente, potencia el medio de reacción en una sustitución nucleofílica acílica, pudiendo hacer acoplamiento a pesar de los impedimentos estéricos.
3. Se evaluó el  $IC_{50}$  sobre la enzima FAAH humana de 6 compuestos iniciales, determinando que 5 de ellos poseen capacidad inhibitoria, siendo el más potente REC-9 con un valor de  $0,57 \mu M$ .
4. Se determinó el valor de  $IC_{50}$  sobre r-FAAH de rata de la serie REC debido al desabastecimiento de la enzima humana; sin embargo, los valores son comparables debido a la elevada identidad que tienen ambas especies. El compuesto con mayor actividad fue REC-2 con un valor de  $2,08 \mu M$ .
5. Se midió el  $IC_{50}$  de la serie REC en la enzima r-MAGL donde no exhibieron acción, con esto se puede concluir que los compuestos son selectivos por r-FAAH.

- 
6. Se confeccionó un modelo computacional de la enzima r/h-FAAH, a partir de tres modelos cristalográficos, que permitió realizar los estudios de acoplamiento molecular inducido de los 23 compuestos propuestos en la serie. Cabe destacar que el modelo fue validado por diversos mecanismos y es capaz de representar la conformación que adoptan los ligandos co-cristalizados con la enzima nativa.
  7. Se estableció la relación estructura-actividad de la serie REC, a través de la correspondencia entre los estudios farmacológicos y de acoplamiento molecular inducido, definiendo que:
    - a. Sustituyentes en el anillo imidazólico anulan la actividad sobre la enzima.
    - b. En cualquier posición del anillo fenilo, la sustitución con un átomo de flúor produce un aumento en la acción inhibitoria.
    - c. En el anillo fenilo, la sustitución en posición -meta, aumenta la actividad sobre la enzima.
  8. Se concluye, finalmente, que el objetivo general fue logrado ya que se consiguió evaluar la respuesta farmacológica de la serie REC, elaborada por síntesis orgánica y dirigida por estudios de acoplamiento molecular inducido.

**CONDICIONES EXPERIMENTALES Y  
CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA**

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

---

### Parte Experimental Sintética

Referente a la síntesis orgánica y caracterización espectroscópica, tanto solventes como reactivos, fueron adquiridos en diversos laboratorios químicos dependiendo de su disponibilidad; entre ellos destacan: Merck®, Sigma-Aldrich®, Ak Scientific®, J.T. Baker®. En cuanto a la pureza, en todos los casos, el reporte del fabricante superó el 99 % siendo clasificados como grado PA o HPLC.

La caracterización de los compuestos sintetizados se realizó mediante técnicas de resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja y análisis elemental. Los equipos utilizados se especifican a continuación:

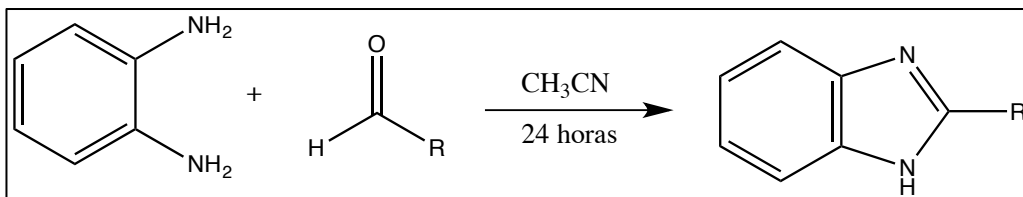
- Espectros de resonancia magnética nuclear: espectrómetro BRUKER AVANCE-400 (400MHz). Las muestras fueron disueltas en solventes deuterados dependiendo de la solubilidad del producto ( $\text{CDCl}_3$  o  $\text{DMSO-d}_6$ ). Los desplazamientos químicos se estandarizaron respecto a TMS siendo expresados en ppm ( $\delta$ ). Las constantes de acoplamiento J están descritas en hercios (Hz).
- Espectroscopía infrarroja: espectrofotómetro BRUKER VECTOR 22 (FT-MIR). Las muestras fueron preparadas en pellets de KBr o en una película líquida de NaCl. La medición se realizó en un rango espectral que va desde los 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .
- Análisis elemental: detector CE INSTRUMENTS EA 1108. Los resultados indican el % de C, H y N presentes en la muestra.

En los casos de las moléculas sólidas, se midió el rango de fusión en un equipo STUART CIENTIFIC SMP3.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

### Procedimiento general para la síntesis de 2-alkil-1*H*-benzo[*d*]imidazoles (REA)

Se adicionan cantidades equimolares de 1,2-fenilendiamina y los correspondientes aldehídos alifáticos a 30 mL de acetonitrilo, agitando la mezcla a temperatura ambiente por 24 horas. Se aísla el crudo de reacción llevando el balón a sequedad. La purificación se realiza mediante columna cromatográfica rellena con sílice gel como fase estacionaria y una mezcla compuesta por acetato de etilo : diclorometano (1:1) como fase móvil.



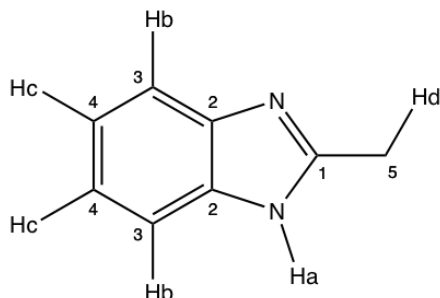
**Figura70:** Esquema general de reacción de 2-alkil-1*H*-benzo[*d*]imidazol.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

---

- 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REA-1**) <sup>115</sup>

Se realiza la reacción entre 1,2-fenilendiamina (1,0 gr, 9,3 mmol) y acetaldehído (0,5 mL, 9,3 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general. Se obtiene un sólido cristalino de color blanco.

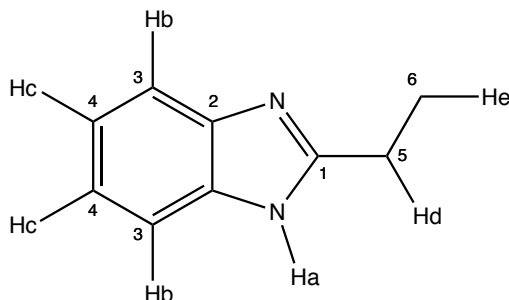


Rendimiento: 36 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 9,48 (s, ancho, 1H, Ha), 7,56 (dd, *J* = 5,9, 3,0 Hz, 2H, Hb), 7,22 (dd, *J* = 5,9, 3,0 Hz, 2H, Hc), 2,66 (s, 3H, Hd). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 151,58 (C1), 138,67 (C2), 122,34 (C4), 114,58 (C3), 14,97 (C5). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3448,74 (N-Ha estiramiento), 735,80 (NHa deformación). Análisis elemental experimental: (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>, PM: 132,17 g/mol) C: 73,10 %, H: 6,50 %, N: 22,40 %. Rango de fusión: 171 - 173 °C.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 2-etil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REA-2**)

Se realiza la reacción entre 1,2-fenilendiamina (1,0 gr, 9,3 mmol) y propionaldehído (0,7 mL, 9,3 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general. Se obtiene un sólido cristalino de color blanco.

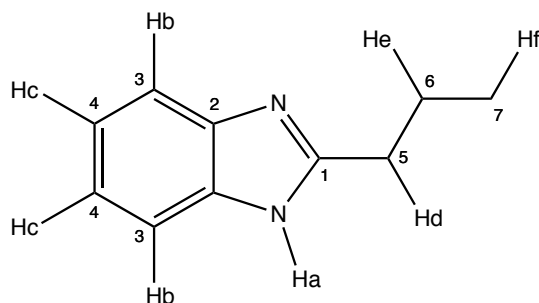


Rendimiento: 40 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 10,52 (s, ancho, 1H, H<sub>a</sub>), 7,56 (dd,  $J$  = 6,1, 3,2 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 7,21 (dd,  $J$  = 6,1, 3,2 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 3,02 (q,  $J$  = 7,7 Hz, 2H, H<sub>d</sub>), 1,44 (t,  $J$  = 7,7 Hz, 3H, H<sub>e</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 156,90 (C1), 138,72 (C2), 122,17 (C4), 114,69 (C3), 22,74 (C5), 12,65 (C6). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3423,93 (N-Ha estiramiento), 741,16 (NH<sub>a</sub> deformación). Análisis elemental experimental: (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>, PM: 146,19 g/mol) C: 74,20 %, H: 7,12 %, N: 20,52 %. Rango de fusión: 174 - 176 °C.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 2-propil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REA-3**) <sup>116</sup>

Se realiza la reacción entre 1,2 fenilendiamina (1,0 gr, 9,3 mmol) y butiraldehído (0,9 mL, 9,3 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general. Se obtiene un sólido amorfo de color amarillo pálido.

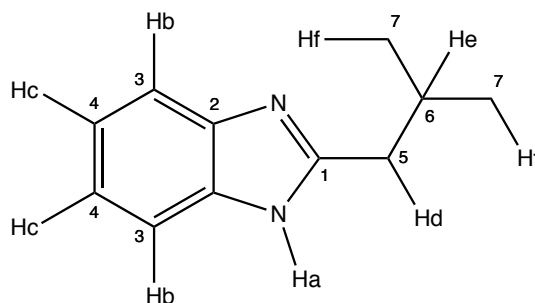


Rendimiento: 50 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 12,20 (s, ancho, 1H, H<sub>a</sub>), 7,46 (s, ancho, 2H, H<sub>b</sub>), 7,10 (dd, *J* = 6,3, 3,1 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 2,77 (qt, *J* = 6,6, 3,6 Hz, 2H, H<sub>d</sub>), 1,79 (qh, *J* = 6,6, 3,6 Hz, 2H, H<sub>e</sub>), 0,93 (qt, *J* = 6,6, 3,6 Hz, 3H, H<sub>f</sub>). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 155,09 (C1), 134,40 (C2), 121,25 (C4), 110,89 (C3), 30,55 (C5), 21,04 (C6), 13,75 (C7). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3448,62 (N-Ha estiramiento), 748,91 (NH<sub>a</sub> deformación). Análisis elemental experimental: (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>, PM: 160,22 g/mol) C: 75,12 %, H: 7,89 %, N: 17,98 %. Rango de fusión: 152 - 155 °C.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 2-(2-isobutil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REA-4**) <sup>116</sup>

Se realiza la reacción entre 1,2-fenilendiamina (1,0 gr, 9,3 mmol) e isovaleraldehído (1,0 mL, 9,3 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general. Se obtiene un sólido cristalino de color blanco nácar.

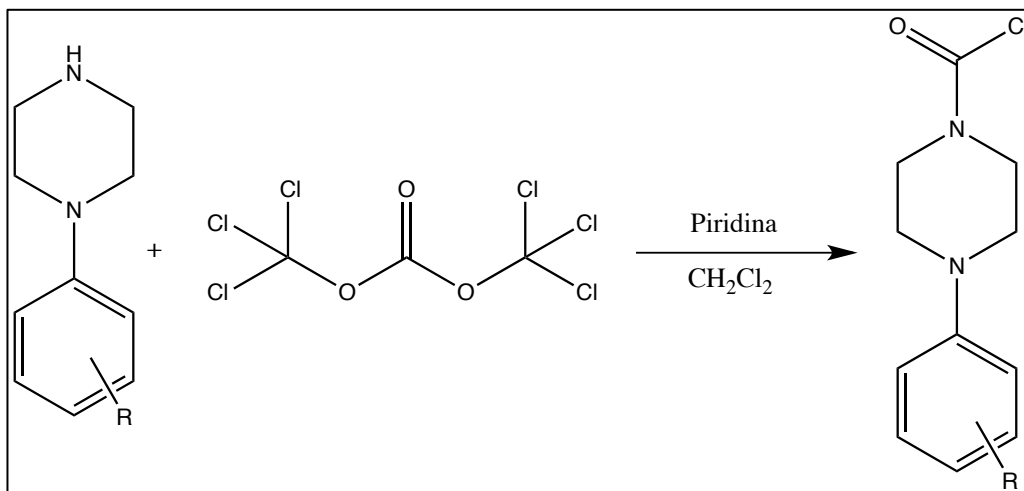


Rendimiento: 59 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 12,50 (s, ancho, 1H, Ha), 7,82 (d, ancho, *J* = 6,4 Hz, 2H, Hb), 7,44 (d, *J* = 6,3 Hz, 2H, Hc), 3,01 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, Hd), 2,84 (s, ancho, 1H, He), 1,27 (d, *J* = 7,3 Hz, 6H, Hf). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 154,37 (C1), 134,22 (C2), 118,08 (C4), 110,70 (C3), 37,69 (C5), 27,69 (C6), 22,36 (C7). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3448,39 (N-Ha estiramiento), 747,46 (NHa deformación). Análisis elemental experimental: (C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>, PM: 174,25 g/mol) C: 76,34 %, H: 8,24 %, N: 16,78 %. Rango de fusión: 189 - 192 °C.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

### Procedimiento general para la síntesis de derivados de cloruros de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo (REB)

Se enfrían 30 mL de diclorometano en un baño de hielo-agua. Se agrega 1 equivalente de trifosgeno, al balón de reacción cerrado de manera hermética, dejando enfriar nuevamente hasta alcanzar 0 °C. A esta mezcla, se incorporan 3 equivalentes de piridina observando la aparición de turbiedad blanca y una nube gaseosa indicando la presencia de fosgeno formado *“in situ”*. Se adicionan gota a gota las correspondientes fenilpiperazinas y luego, de 30 minutos, la disolución se deja reaccionar a temperatura ambiente por dos horas. Posteriormente, se añaden 20 mL de ácido clorhídrico 0,1 N y se realizan 3 extracciones sucesivas con 30 mL de disolución saturada de bicarbonato de sodio. La fase orgánica es secada con sulfato de sodio anhidro y el producto crudo obtenido es purificado a través de columna cromatográfica rellena con sílica gel como fase estacionaria y diclorometano como fase móvil.

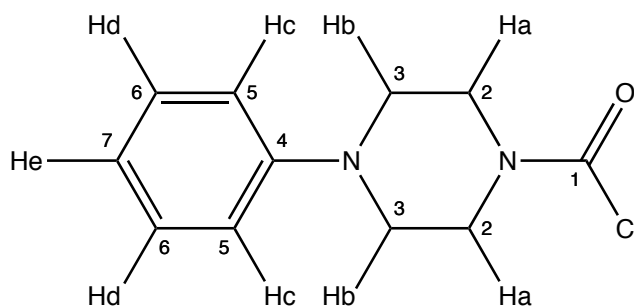


**Figura71:** Esquema general de reacción de derivados de cloruro de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- Cloruro de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo (**REB-1**)

Se realiza la reacción entre 1-fenilpiperazina (1,0 mL, 6,5 mmol), trifosgeno (653 mg, 2,2 mmol) y piridina (0,6 mL, 6,5 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo pardo.

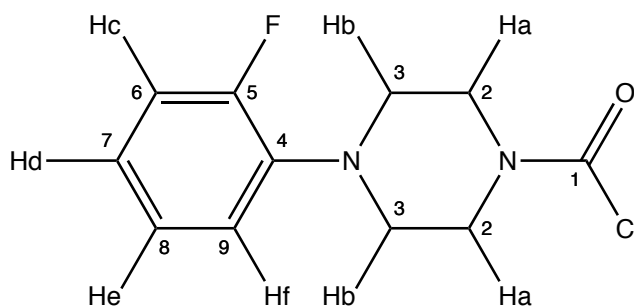


Rendimiento: 95 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo- $d$ )  $\delta$ : 7,59 (t,  $J = 7,8$  Hz, 2H, Hd), 7,23 (t,  $J = 7,8$  Hz, 3H, Hc-He), 4,12 (td,  $J = 6,9$  Hz, 4H, Ha), 3,50 (t,  $J = 6,9$  Hz, 4H, Hb).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo- $d$ )  $\delta$ : 150,57 (C4), 148,40 (C1), 129,40 (C6), 121,05 (C7), 116,94 (C5), 49,58 – 49,22 (C3), 48,61 – 46,15 (C2). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2826,10 (N-H anilínico), 1727,5 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}$ , PM: 224,69 g/mol) C: 59,52 %, H: 6,03 %, N: 12,79 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- Cloruro de 4-(2-fluorofenil)piperazinil-1-carbonilo (**REB-2**)

Se realiza la reacción entre 1-(2-fluorofenil)piperazina (0,5 mL, 3,2 mmol), trifosgeno (310 mg, 1,0 mmol) y piridina (0,3 mL, 3,2 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón claro.

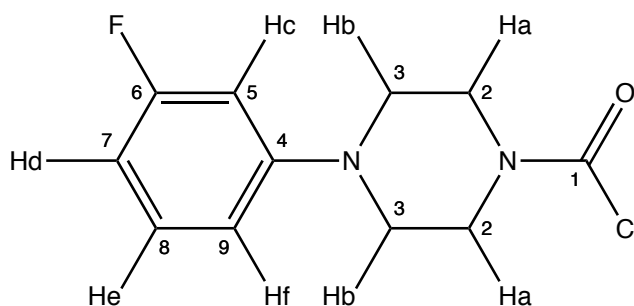


Rendimiento: 94 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,38 (dd,  $J = 7,9, 6,3$ , 2H, Hd-He), 7,30 (t,  $J = 7,9$  Hz, 1H, Hc), 7,23 (t,  $J = 7,9$  Hz, 1H, Hf), 4,13 (d,  $J = 7,8$  Hz, 4H, Ha), 3,41 (s, ancho, 4H, Hb).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 155,76 (d,  $J = 246,1$  Hz, C5), 148,35 (C1), 139,11 (d,  $J = 8,8$  Hz, C4), 124,66 (d,  $J = 3,7$  Hz, C8), 123,55 (d,  $J = 8,0$  Hz, C7), 119,38 (d,  $J = 2,7$  Hz, C9), 116,35 (d,  $J = 20,5$  Hz, C6), 50,51 – 50,04 (C3), 48,79 – 46,32 (C2). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2815,06 (N-H anilínico), 1731,28 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClFN}_2\text{O}$ , PM: 242,68 g/mol) C: 55,22 %, H: 5,05 %, N: 11,90 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- Cloruro de 4-(3-fluorofenil)piperazinil-1-carbonilo (**REB-3**)

Se realiza la reacción entre 1-(3-fluorofenil)piperazina (0,5 mL, 3,2 mmol), trifosgeno (310 mg, 1,0 mmol) y piridina (0,3 mL, 3,2 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón claro.



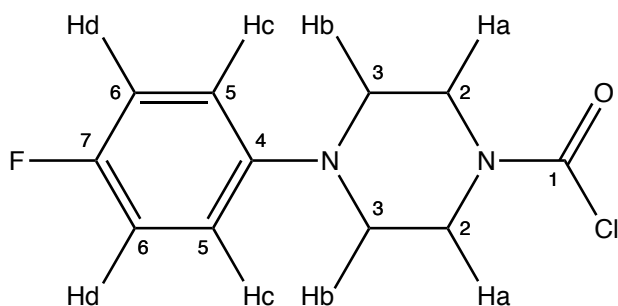
Rendimiento: 91 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,18 (m, 1H, He), 6,62 (dd,  $J = 8,0, 2,5$  Hz, 1H, Hf), 6,56 (dd,  $J = 8,0, 2,5, 1,5$  Hz, 1H, Hd), 6,52 (dt,  $J = 8,0, 1,7$  Hz, 1H, Hc), 3,78 (d,  $J = 7,3$  Hz, 4H, Ha), 3,18 (t,  $J = 7,3$  Hz, 4H, Hb).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 163,90 (d,  $J = 244,5$  Hz, C6), 152,21 (d,  $J = 9,6$  Hz, C4), 148,50 (C1), 130,55 (d,  $J = 9,9$  Hz, C8), 111,97 (d,  $J = 2,6$  Hz, C9), 107,31 (d,  $J = 21,4$  Hz, C7), 103,69 (d,  $J = 24,9$  Hz, C5), 49,05 – 48,72 (C3), 48,41 – 45,94 (C2). IR (KBr)

$\text{cm}^{-1}$ : 2834,59 (N-H anilínico), 1715,97 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClFN}_2\text{O}$ , PM: 242,68 g/mol) C: 54,92 %, H: 5,48 %, N: 11,22 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- Cloruro de 4-(4-fluorofenil)piperazinil-1-carbonilo (**REB-4**)

Se realiza la reacción entre 1-(4-fluorofenil)piperazina (540 mg, 3,2 mmol), trifosgeno (310 mg, 1,0 mmol) y piridina (0,3 mL, 3,2 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo oscuro.

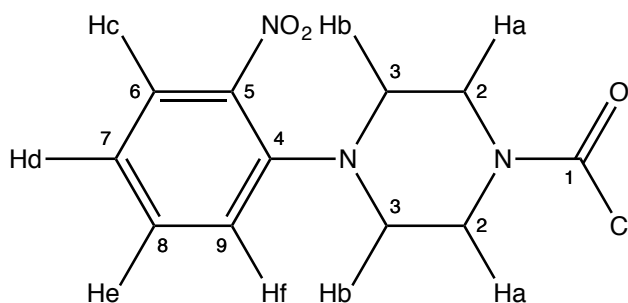


Rendimiento: 93 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 6,97 (t,  $J = 8,7$  Hz, 2H, Hd), 6,88 (d,  $J = 8,7$  Hz, 2H, Hc), 3,81 (d,  $J = 7,7$  Hz, 4H, Ha), 3,11 (d,  $J = 7,7$  Hz, 4H, Hb).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 157,82 (d,  $J = 240,3$  Hz, C7), 148,32 (C1), 147,22 (d,  $J = 2,5$  Hz, C4), 118,87 (d,  $J = 7,7$  Hz, C5), 115,81 (d,  $J = 22,1$  Hz, C6), 50,50 – 50,12 (C3), 48,61 – 46,14 (C2). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2829,89 (N-H anilínico), 1698,51 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ClFN}_2\text{O}$ , PM: 242,68 g/mol) C: 55,28 %, H: 5,45 %, N: 12,03 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- Cloruro de 4-(2-nitrofenil)piperazinil-1-carbonilo (**REB-5**)

Se realiza la reacción entre 1-(2-nitrofenil)piperazina (0,5 mL, 3,1 mmol), trifosgeno (310 mg, 1,0 mmol) y piridina (0,3 mL, 3,2 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo rojizo.

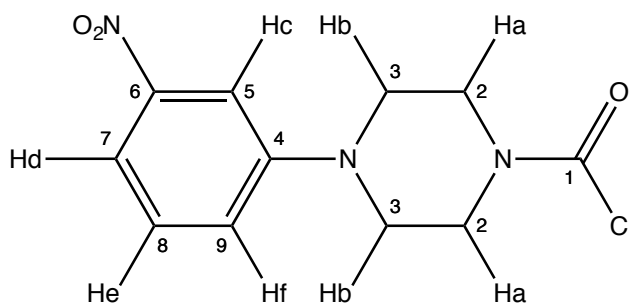


Rendimiento: 99 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 7,80 (td, *J* = 8,0, 1,7 Hz, 1H, Hc), 7,53 (dt, *J* = 8,0, 1,7 Hz, 1H, He), 7,18 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H Hd - Hf), 3,83 (d, *J* = 6,6 Hz, 4H, Ha), 3,10 (t, *J* = 6,7 Hz, 4H, Hb). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 148,59 (C1), 145,30 (C4), 144,65 (C5), 133,81 (C8), 125,90 (C6), 123,81 (C7), 121,99 (C9), 52,19 – 51,62 (C3), 48,89 – 46,43 (C2). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1727,06 (C=O), 1519,74 (NO<sub>2</sub>). Análisis elemental experimental: (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, PM: 269,69 g/mol) C: 48,32 %, H: 4,32 %, N: 16,01 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- Cloruro de 4-(3-nitrofenil)piperazinil-1-carbonilo (**REB-6**)

Se realiza la reacción entre 1-(3-nitrofenil)piperazina (0,5 mL, 3,1 mmol), trifosgeno (310 mg, 1,0 mmol) y piridina (0,3 mL, 3,2 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo pálido.

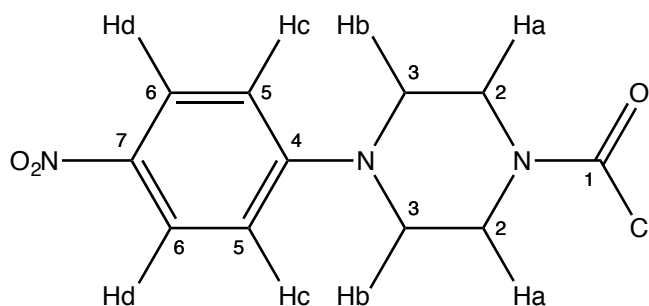


Rendimiento: 99 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 7,72 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, Hd), 7,71 (s, 1H, Hc), 7,42 (t, *J* = 8,2 Hz, 1H, Hf), 7,20 (dd, *J* = 8,2, 2,6 Hz, 1H, He), 3,86 (d, *J* = 7,2 Hz, 4H, Ha), 3,34 (t, *J* = 7,2 Hz, 4H, Hb). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 151,18 (C4), 149,37 (C1), 148,51 (C6), 130,13 (C8), 121,93 (C9), 115,06 (C7), 110,58 (C5), 48,66 – 48,38 (C3), 48,22 – 45,73 (C2). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1759,9 (C=O), 1517,53 (NO<sub>2</sub>). Análisis elemental experimental: (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, PM: 269,69 g/mol) C: 49,03 %, H: 4,58 %, N: 15,94 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- Cloruro de 4-(4-nitrofenil)piperazinil-1-carbonilo (**REB-7**)

Se realiza la reacción entre 1-(4-nitrofenil)piperazina (650 mg, 3,1 mmol), trifosgeno (310 mg, 1,0 mmol) y piridina (0,3 mL, 3,2 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general. Se obtiene un sólido de color amarillo intenso.

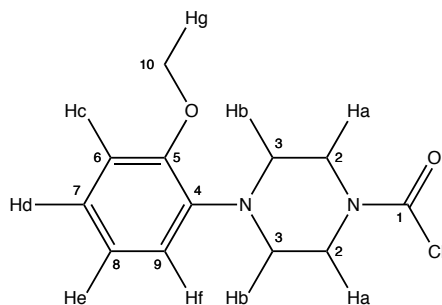


Rendimiento: 99 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 8,14 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, Hd), 6,83 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, Hc), 3,88 (d, *J* = 7,3 Hz, 4H, Ha), 3,51 (s, ancho, 4H, Hb). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 154,21 (C4), 148,62 (C1), 139,62 (C7), 126,07 (C6), 113,40 (C5), 47,83 – 46,95 (C3), 46,75 – 45,36 (C2). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1738,32 (C=O), 1596,23 (NO<sub>2</sub>). Análisis elemental experimental: (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, PM: 269,69 g/mol) C: 50,55 %, H: 4,72 %, N: 15,81 %. Rango de fusión: 158 - 161 °C.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- Cloruro de 4-(2-metoxifenil)piperazinil-1-carbonilo (**REB-8**)

Se realiza la reacción entre 1-(2-metoxifenilfenil)piperazina (577 mg, 3,0 mmol), trifosgeno (300 mg, 1,0 mmol) y piridina (0,3 mL, 3,2 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón claro.

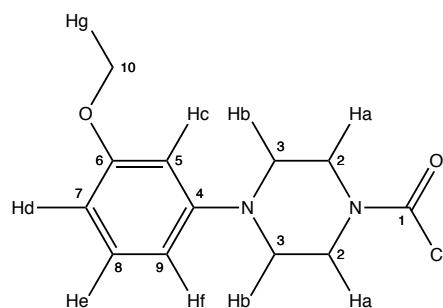


Rendimiento: 89 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,09 – 7,04 (m, 1H, Hd), 6,94 (d,  $J = 7,9$  Hz, 2H, Hc - He), 6,90 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H, Hf), 3,92 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H, Ha), 3,88 (s, 3H, Hg), 3,83 (t,  $J = 6,8$  Hz, 2H, Ha), 3,11 (s, ancho, 4H, Hb).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 152,38 (C5), 148,54 (C1), 140,20 (C4), 124,08 (C8), 121,24 (C7), 118,75 (C6), 111,56 (C9), 55,59 (C10), 50,72 – 50,30 (C3), 49,05 – 46,59 (C2). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2830,98 (OMe), 1727,62 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$ , PM: 254,71 g/mol) C: 57,13 %, H: 5,83 %, N: 11,02 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- Cloruro de 4-(3-metoxifenil)piperazinil-1-carbonilo (**REB-9**)

Se realiza la reacción entre 1-(3-metoxifenil)piperazina (0,5 mL, 3,0 mmol), trifosgeno (310 mg, 1,0 mmol) y piridina (0,3 mL, 3,2 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general. Se obtiene un líquido aceitoso de color rojo claro.

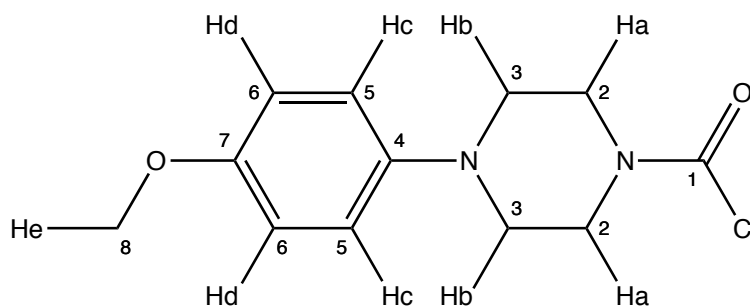


Rendimiento: 86 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 7,20 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H, He), 6,54 (dd, *J* = 8,1, 2,3 Hz, 1H, Hd), 6,49 (dd, *J* = 8,1, 2,3 Hz, 1H, Hf), 6,47 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, Hc), 3,88 (t, *J* = 7,0 Hz, 4H, Ha), 3,80 (s, ancho, 3H, Hg), 3,21 (t, *J* = 7,0 Hz, 4H, Hb). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 160,79 (C6), 151,93 (C4), 148,49 (C1), 130,18 (C8), 109,60 (C9), 105,78 (C7), 103,54 (C5), 55,37 (C10), 49,55 – 49,22 (C3), 48,58 – 46,12 (C2). IR (KBr) cm<sup>-1</sup>: 2836,74 (OMe), 1746,05 (C=O). Análisis elemental experimental: (C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PM: 254,71 g/mol) C: 56,62 %, H: 6,94 %, N: 11,14 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- Cloruro de 4-(4-metoxifenil)piperazinil-1-carbonilo (**REB-10**)

Se realiza la reacción entre 1-(4-metoxifenil)piperazina (580 mg, 3,0 mmol), trifosgeno (310 mg, 1,0 mmol) y piridina (0,3 mL, 3,2 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general. Se obtiene un líquido aceitoso de color rojo intenso.

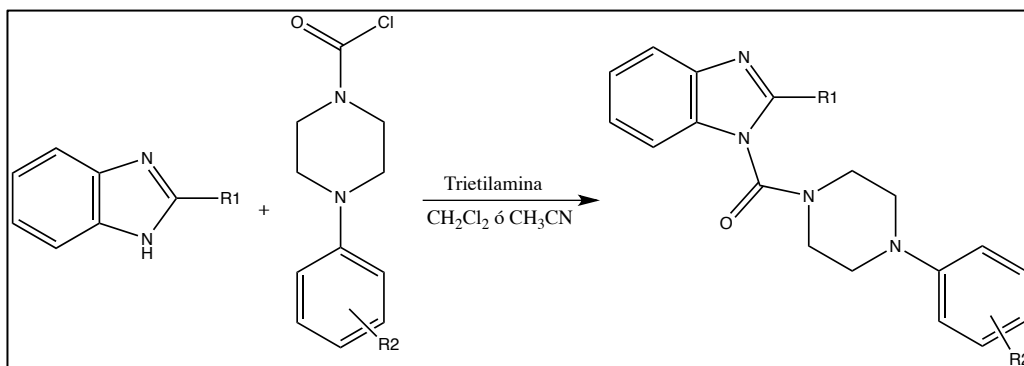


Rendimiento: 91 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 6,90 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H, Hc), 6,86 (d,  $J = 8,9$  Hz, 2H, Hd), 3,87 (t,  $J = 7,9$  Hz, 2H, Ha), 3,77 (s, ancho, 5H, Ha - He), 3,08 (t,  $J = 7,9$  Hz, 4H, Hb).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 154,75 (C7), 148,36 (C1), 144,79 (C4), 119,21 (C6), 114,63 (C5), 55,59 (C8), 51,07 – 50,67 (C3), 48,79 – 46,33 (C2). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2829,70 (OMe), 1735,59 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$ , PM: 254,71 g/mol) C: 55,94 %, H: 6,02 %, N: 11,57 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

### Procedimiento general para la síntesis de derivados de [(4-fenilpiperazinil)-1-carbonil]-2-alkil-1*H*-benzo[d]imidazol (REC)

A una mezcla constituida por 1 equivalente de 2-alkil-1*H*-benzo[d]imidazol en 30 mL de diclorometano ( $R_1 = H$ ) o acetonitrilo ( $R_1 =$  metilo, etilo, propilo e isopropilo), se le añade gota a gota 3 equivalentes de trietilamina a temperatura ambiente y se deja reaccionar por 10 minutos. Paralelamente, se disuelve 1 equivalente de los correspondientes derivados de cloruro de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo (**REB-1 a REB-10**) en 5 mL del solvente; agregándolo, transcurrido el tiempo mencionado, a la mezcla de manera lenta y con agitación constante. El balón de reacción se mantiene a reflujo durante 24 a 48 horas. Posteriormente, se realizan 3 extracciones sucesivas con 30 mL de disolución saturada de carbonato de sodio. La fase orgánica es secada con sulfato de sodio anhidro y el crudo obtenido es purificado a través de placa preparativa recubierta con sílice gel-yeso como fase estacionaria y diclorometano : acetato de etilo (2:1) como fase móvil.

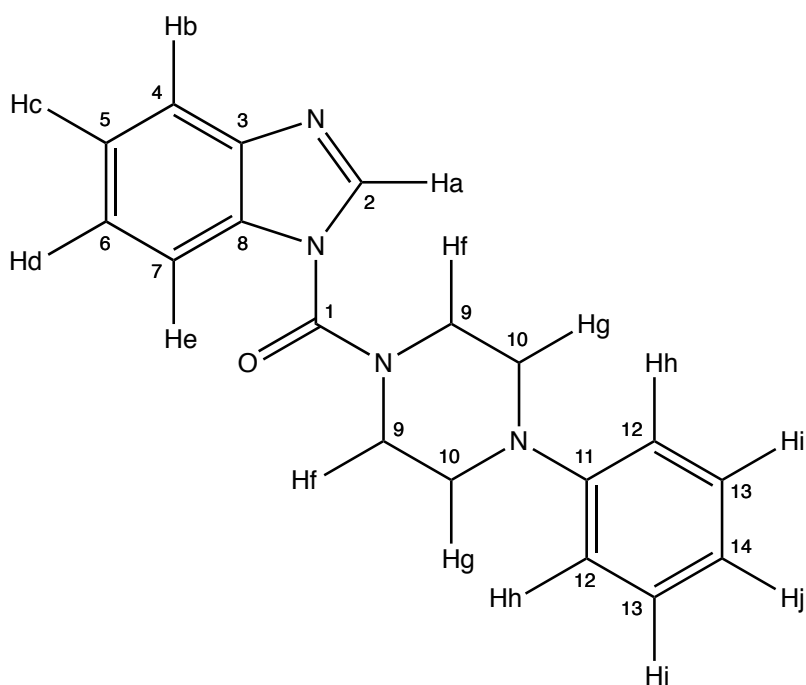


**Figura72:** Esquema general de reacción de derivados de [(4-fenilpiperazinil)-1-carbonil]-2-alkil-1*H*-benzo[d]imidazol.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[(4-fenilpiperazinil)-1-carbonil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-1**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo (112 mg, 0,5 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol (59 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general durante 24 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón traslúcido.



Rendimiento: 45 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 8,25 (s, 1H, Ha), 7,85 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H, He), 7,62 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H, Hb), 7,39 (p,  $J = 7,7$  Hz, 2H, Hc - Hd), 7,31 (t,  $J = 8,0$  Hz, 2H, Hi), 6,95 (t,  $J = 8,0$  Hz, 3H, Hh - Hj), 3,79 (t,  $J = 6,5$  Hz, 4H, Hf), 3,29 (t,  $J = 6,5$  Hz, 4H, Hg).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 151,48 (C1), 150,65 (C11), 143,59 (C2), 141,93 (C8), 131,99 (C3), 129,50 (C13), 125,01 (C6), 124,13 (C5), 121,30 (C4), 120,97 (C14), 117,08 (C12), 112,69 (C7), 49,81 (C10), 46,74 (C9). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2824,27 (N-H anilínico), 1703,85 (C=O). Análisis elemental

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

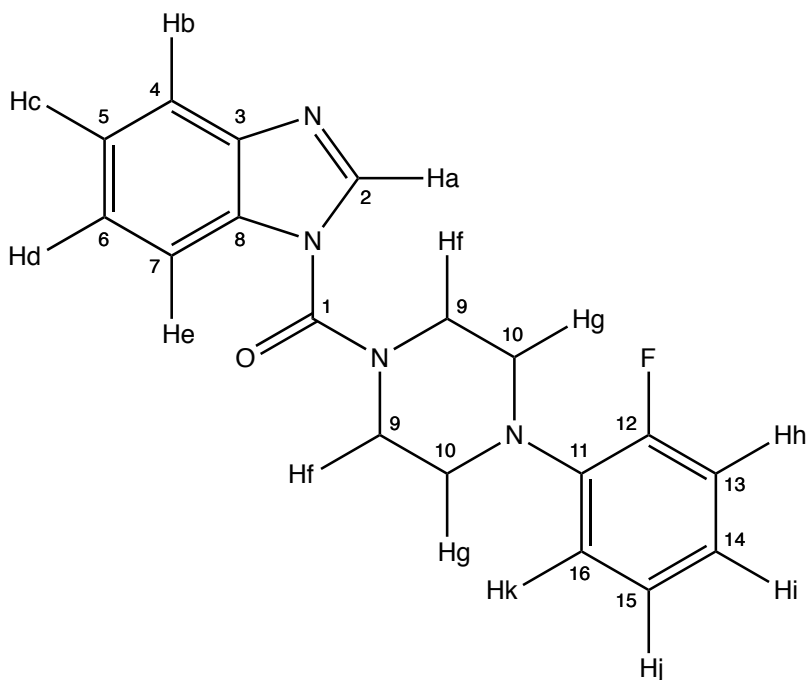
---

experimental: ( $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}$ , PM: 306,37 g/mol) C: 71,12 %, H: 5,83 %, N: 18,96 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(2-fluorofenil)piperazinil-1-carbonil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol (REC-2)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(2-fluorofenil)piperazinil-1-carbonilo (121 mg, 0,5 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol (59 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general durante 24 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo traslúcido.



Rendimiento: 43 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 8,22 (s, 1H, Ha), 7,81 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, He), 7,60 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, Hb), 7,35 (p,  $J = 7,8$  Hz, 2H, Hc - Hd), 7,04 (dq,  $J = 8,3, 1,6$  Hz, 2H, Hi - Hj), 6,98 (dd,  $J = 8,3, 1,3$  Hz, 1H, Hh), 6,92 (t,  $J = 8,2$  Hz, 1H, Hk), 3,76 (t,  $J = 6,5$  Hz, 4H, Hf), 3,15 (t,  $J = 6,5$  Hz, 4H, Hg).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 155,74 (d,  $J = 246,1$  Hz, C12), 151,28 (C1), 143,49 (C2), 141,85 (C8), 139,11 (d,  $J = 8,7$  Hz, C11), 131,86 (C3), 124,81 (C6), 124,64 (d,  $J = 3,6$  Hz, C15),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

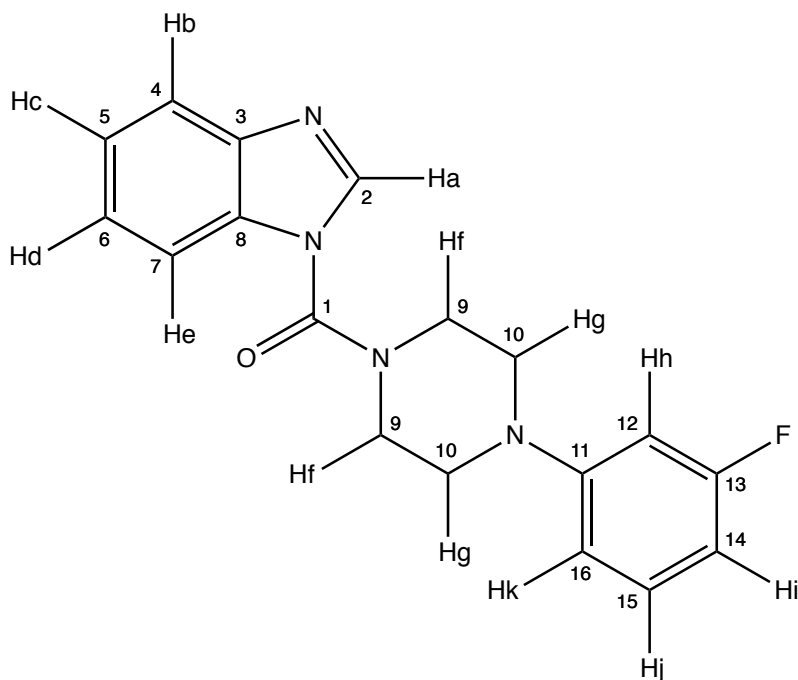
---

123,92 (C5), 123,56 (d,  $J = 7,9$  Hz, C14), 120,80 (C4), 119,34 (d,  $J = 2,6$  Hz, C16), 116,34 (d,  $J = 20,5$  Hz, C13), 112,57 (C7), 50,49 (d,  $J = 3,0$  Hz, C10), 46,75 (C9). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2761,38 (N-H anilínico), 1693,64 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{O}$ , PM: 324,36 g/mol) C: 65,93 %, H: 5,74 %, N: 18,22 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(3-fluorofenil)piperazinil-1-carbonil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol (REC-3)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(3-fluorofenil)piperazinil-1-carbonilo (200 mg, 0,8 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol (97 mg, 0,8 mmol) y trietilamina (0,3 mL, 2,4 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general durante 24 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo pálido.



Rendimiento: 52 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 8,23 (s, 1H, Ha), 7,83 (dd,  $J = 8,2, 1,6$  Hz, 1H, He), 7,61 (dd,  $J = 8,2, 1,6$  Hz, 1H, Hb), 7,38 (dp,  $J = 8,0, 1,6$  Hz, 2H, Hc - Hd), 7,01 (dd,  $J = 8,7, 2,2$  Hz, 1H, Hj), 6,96 (dd,  $J = 8,1, 2,2$  Hz, 1H, Hk), 6,92 (dd,  $J = 8,1, 2,2$  Hz, 1H, Hi), 6,88 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H, Hh), 3,78 (t,  $J = 5,0$  Hz, 4H, Hf), 3,19 (t,  $J = 5,0$  Hz, 4H, Hg).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 158,01 (d,  $J = 240,6$  Hz, C13), 151,48 (C1), 147,34 (d,  $J = 2,5$  Hz, C11), 143,62 (C2), 141,90 (C8),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

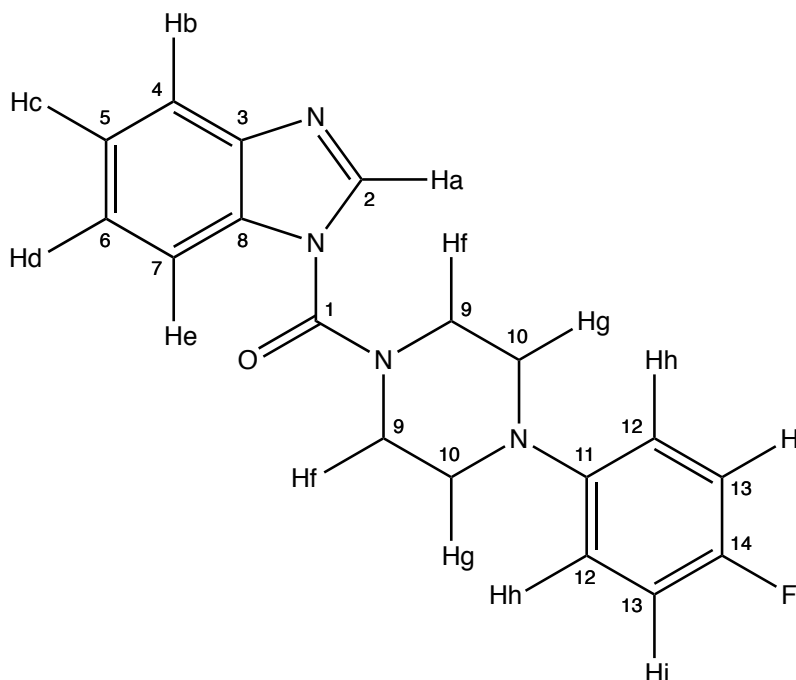
---

131,95 (d,  $J = 2,1$  Hz, C15), 124,99 (C6), 124,11 (C5), 120,98 (C3), 119,02 (d,  $J = 7,8$  Hz, C16), 118,50 (d,  $J = 7,7$  Hz, C14), 115,96 (d,  $J = 22,2$  Hz, C12), 115,65 (C4), 112,65 (C7), 50,72 (C10), 46,78 (C9). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2758,71 (N-H anilínico), 1702,10 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{O}$ , PM: 324,36 g/mol) C: 66,78 %, H: 5,92 %, N: 17,84 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(4-fluorofenil)piperazinil-1-carbonil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol (REC-4)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(4-fluorofenil)piperazinil-1-carbonilo (120 mg, 0,5 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol (59 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general durante 24 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón intenso.



Rendimiento: 48 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 8,23 (s, 1H, Ha), 7,83 (dd,  $J = 7,4, 1,7$  Hz, 1H, He), 7,60 (dd,  $J = 7,4, 1,7$  Hz, 1H, Hb), 7,36 (dp,  $J = 7,4, 1,7$  Hz, 2H, Hc - Hd), 6,98 (d,  $J = 9,2$  Hz, 2H, Hi), 6,89 (d,  $J = 9,2$  Hz, 2H, Hh), 3,76 (t,  $J = 5,1$  Hz, 4H, Hf), 3,18 (t,  $J = 5,1$  Hz, 4H, Hg).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 157,94 (d,  $J = 240,6$  Hz, C14), 151,41 (C1), 147,30 (d,  $J = 2,4$  Hz, C11), 143,56 (C2), 141,89 (C8), 131,92 (C3), 124,94 (C6), 124,06 (C5), 120,91 (C4), 118,95 (d,  $J = 7,8$

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

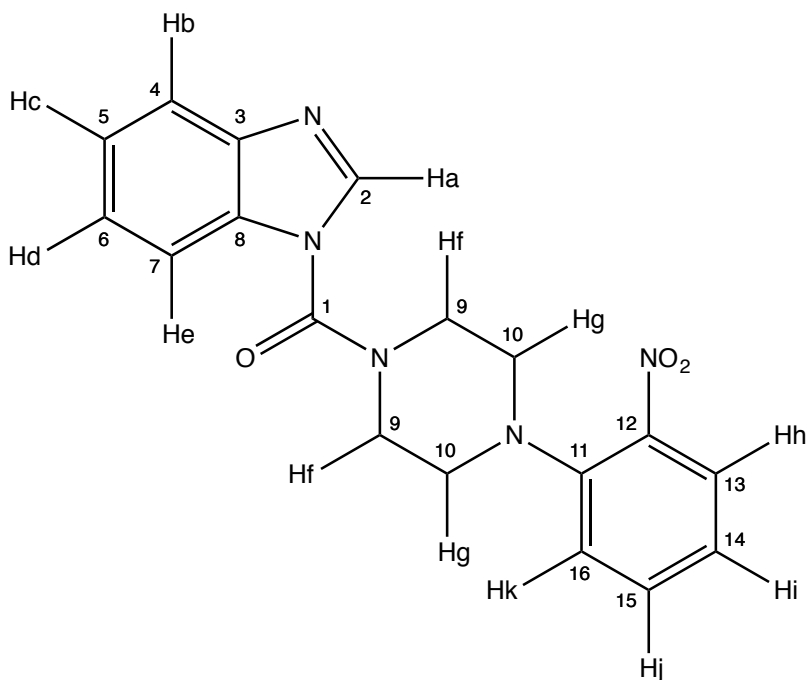
---

Hz, C12), 115,90 (d,  $J = 22,3$  Hz, C13), 112,63 (C7), 50,65 (C10), 46,71 (C9). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2924,18 (N-H anilínico), 1695,7 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{FN}_4\text{O}$ , PM: 324,36 g/mol) C: 65,41 %, H: 5,17 %, N: 17,32 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(2-nitrofenil)piperazinil-1-carbonil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol  
(REC-5)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(2-nitrofenil)piperazinil-1-carbonilo (100 mg, 0,4 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol (44 mg, 0,4 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general durante 24 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo intenso.



Rendimiento: 60 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 8,21 (s, 1H, Ha), 7,78 (dt, *J* = 7,0, 1,5 Hz, 2H, Hb-He), 7,58 (dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, 1H, Hh), 7,51 (dt, *J* = 8,0, 1,5 Hz, 1H, Hj), 7,35 (dp, *J* = 7,0, 1,5 Hz, 2H, Hc - Hd), 7,17 (dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, 1H, Hi), 7,13 (dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, 1H, Hk), 3,77 (t, *J* = 6,6 Hz, 4H, Hf), 3,14 (t, *J* = 6,6 Hz, 4H, Hg). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 151,39 (C1), 145,25 (C11), 144,56 (C12), 143,51 (C2), 141,88 (C8), 133,78 (C15), 131,80 (C3), 125,85 (C13), 124,89 (C6),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

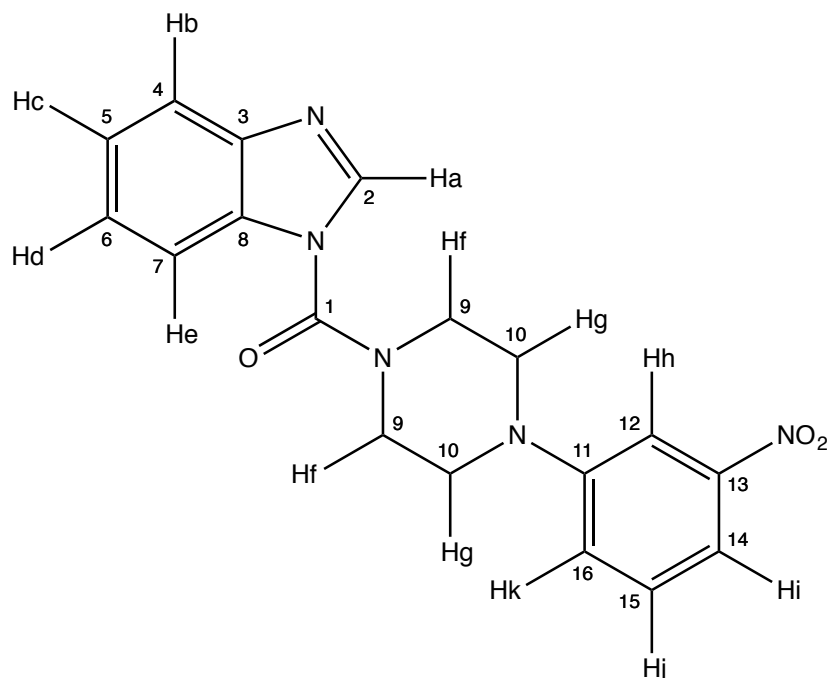
---

124,00 (C5), 123,77 (C14), 121,95 (C16), 120,86 (C4), 112,60 (C7), 52,10 (C10), 46,84 (C9). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 1691,53 (C=O), 1520,32 ( $\text{NO}_2$ ). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$ , PM: 351,37 g/mol) C: 62,24 %, H: 4,72 %, N: 21,17 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(3-nitrofenil)piperazinil-1-carbonil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol  
(REC-6)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(3-nitrofenil)piperazinil-1-carbonilo (100 mg, 0,4 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol (44 mg, 0,4 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general durante 24 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo intenso.



Rendimiento: 58 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 8,24 (s, 1H, Ha), 7,85 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 1H, He), 7,74 (dd,  $J$  = 6,2, 2,1 Hz, 2H, Hh - Hi), 7,61 (dd,  $J$  = 7,6, 1,4 Hz, 1H, Hb), 7,43 (dd,  $J$  = 6,2, 2,1 Hz, 1H, Hk), 7,38 (dp,  $J$  = 7,6, 1,4 Hz, 2H, Hc - Hd), 7,22 (dd,  $J$  = 6,2, 2,1 Hz, 1H, Hj), 3,82 (t,  $J$  = 6,0 Hz, 4H, Hf), 3,40 (t,  $J$  = 6,0 Hz, 4H, Hg).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 151,60 (C1), 151,30 (C11), 149,41 (C13), 143,66 (C2), 141,85 (C8), 131,88 (C3), 130,17 (C15), 125,12 (C6), 124,26 (C5),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

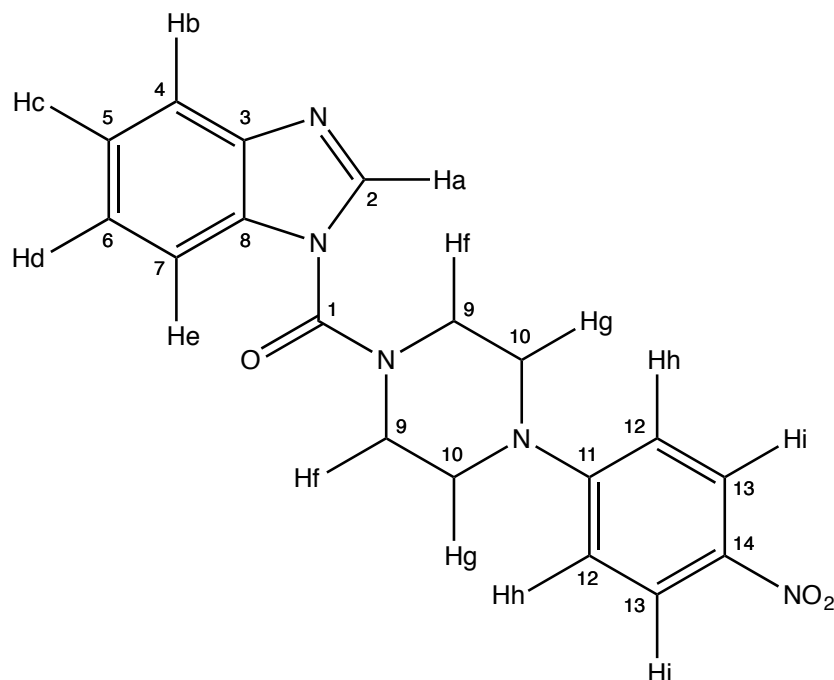
---

122,11 (C16), 121,09 (C4), 115,29 (C14), 112,63 (C7), 110,78 (C12), 48,89 (C10), 46,41 (C9). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 1695,12 (C=O), 1526,55 ( $\text{NO}_2$ ).  
Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$ , PM: 351,37 g/mol) C: 61,19 %, H: 5,15 %, N: 20,83 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(4-nitrofenil)piperazinil-1-carbonil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol (REC-7)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(4-nitrofenil)piperazinil-1-carbonilo (135 mg, 0,5 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol (59 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general durante 24 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo intenso.



Rendimiento: 65 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 8,15 (s, 1H, Ha), 7,67 (d,  $J = 9,1$  Hz, 2H, Hi), 7,33 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H, He), 7,28 (d,  $J = 7,5$  Hz, 1H, Hb), 6,94 (p,  $J = 7,5$  Hz, 2H, Hc - Hd), 6,61 (d,  $J = 9,1$  Hz, 2H, Hh), 3,31 (s, ancho, 4H, Hf), 3,25 (s, ancho, 4H, Hg).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 152,43 (C11), 148,72 (C1), 140,99 (C2), 140,89 (C14), 135,52 (C8), 130,14 (C3), 123,98 (C13), 122,53 (C6), 121,66 (C5), 118,09 (C4), 111,30 (C12), 110,91 (C7), 53,02 (C10), 43,38 (C9). IR (KBr)

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

---

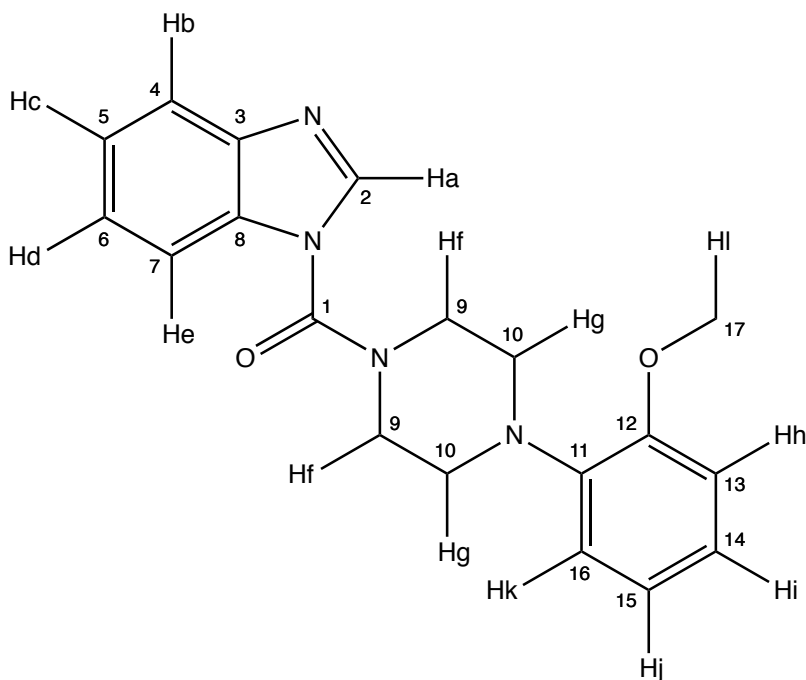
$\text{cm}^{-1}$ : 1689,70 (C=O), 1597,77 ( $\text{NO}_2$ ). Análisis elemental experimental:  
( $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_3$ , PM: 351,37 g/mol) C: 61,87 %, H: 4,65 %, N: 19,13 %.

Rango de fusión: 132 - 133 °C.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(2-metoxifenil)piperazinil-1-carbonil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol (REC-8)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(2-metoxifenil)piperazinil-1-carbonilo (150 mg, 0,6 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol (79 mg, 0,6 mmol) y trietilamina (0,3 mL, 2,1 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general durante 24 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón pálido.



Rendimiento: 42 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 8,23 (s, 1H, Ha), 7,82 (d,  $J = 7,4$  Hz, 1H, He), 7,61 (d,  $J = 7,4$  Hz, 1H, Hb), 7,35 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H, Hc - Hd), 7,04 (ddt,  $J = 8,3, 6,4, 2,9$  Hz, 1H, Hi), 6,92 (dd,  $J = 6,4, 2,8$  Hz, 2H, Hh - Hj), 6,88 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H, Hk), 3,85 (s, 3H, Hl), 3,79 (t,  $J = 6,6$  Hz, 4H, Hf), 3,14 (t,  $J = 6,6$  Hz, 4H, Hg).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 152,25 (C12), 151,28 (C1), 143,47 (C2), 141,88 (C8), 140,16 (C11), 131,90 (C3), 124,76 (C15), 123,91 (C6), 123,86 (C5),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

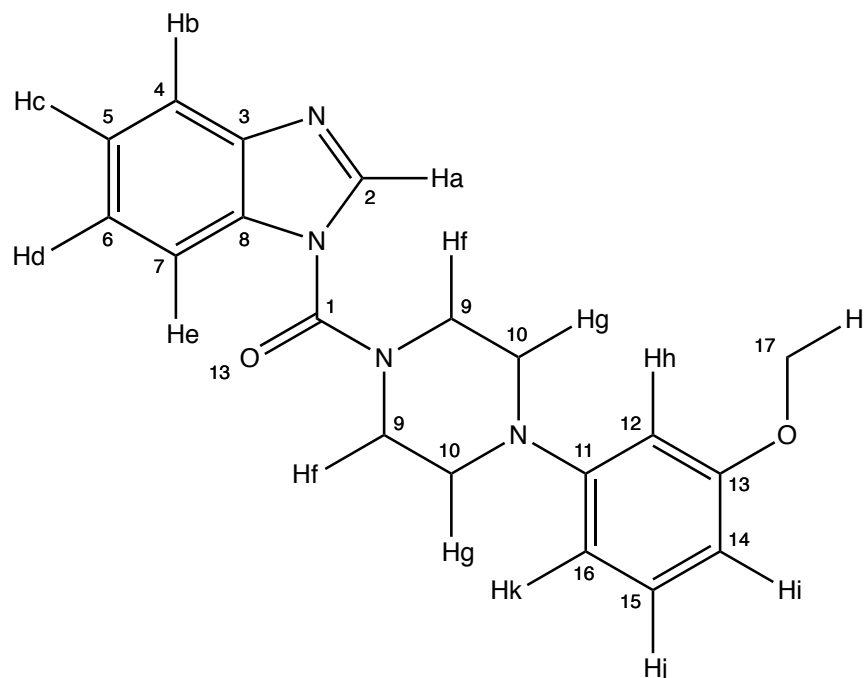
---

121,12 (C14), 120,78 (C4), 118,56 (C13), 112,59 (C7), 111,45 (C16), 55,46 (C17), 50,62 (C10), 46,92 (C9). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2831,83 (OMe), 1692,83 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ , PM: 336,40 g/mol) C: 68,34 %, H: 6,17 %, N: 17,56 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(3-metoxifenil)piperazinil-1-carbonil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol (REC-9)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(3-metoxifenil)piperazinil-1-carbonilo (128 mg, 0,5 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol (59 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general durante 24 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo traslúcido.



Rendimiento: 46 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 8,22 (s, 1H, Ha), 7,83 (dd,  $J = 6,8, 1,5$  Hz, 1H, He), 7,61 (dd,  $J = 6,8, 1,5$  Hz, 1H, Hb), 7,37 (dp,  $J = 6,8, 1,5$  Hz, 2H, Hc - Hd), 7,20 (t,  $J = 8,1$  Hz, 1H, Hj), 6,54 (dd,  $J = 8,1, 2,1$  Hz, 1H, Hi), 6,49 (t,  $J = 2,1$  Hz, 1H, Hk), 6,47 (s, ancho, 1H, Hh), 3,78 (s, 3H, Hl), 3,76 (t,  $J = 6,8$  Hz, 4H, Hf), 3,27 (t,  $J = 6,8$  Hz, 4H, Hg).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 160,74 (C13), 151,99 (C11), 151,39 (C1), 143,56 (C2), 141,87 (C8), 131,91 (C3), 130,13 (C15),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

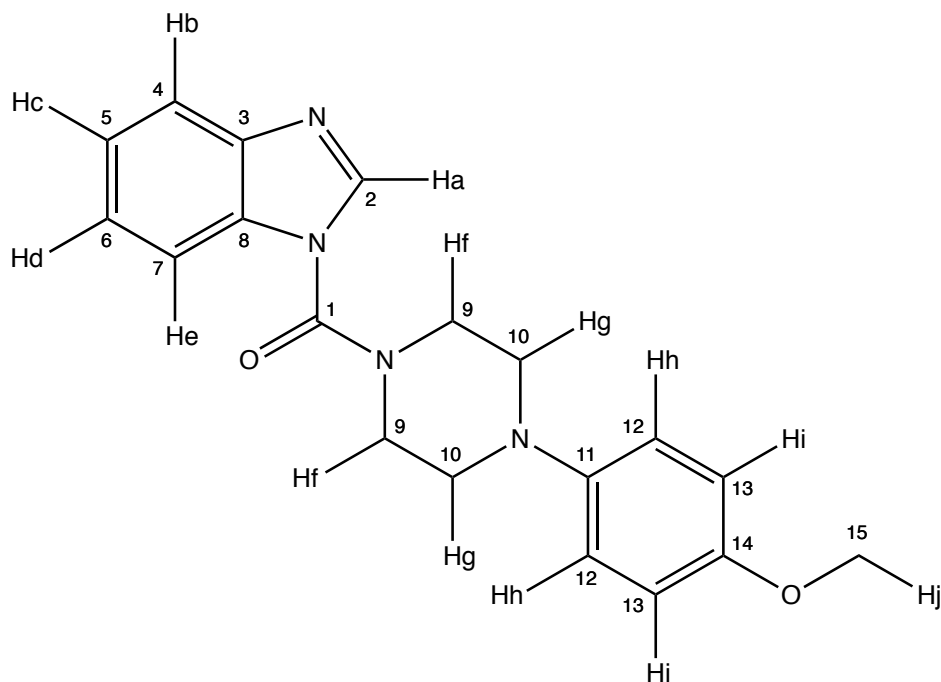
---

124,91 (C6), 124,03 (C5), 120,90 (C4), 112,63 (C7), 109,54 (C16), 105,71 (C14), 103,50 (C12), 55,31 (C17), 49,54 (C10), 46,58 (C9). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2849,49 (OMe), 1692,95 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ , PM: 336,40 g/mol) C: 67,53 %, H: 5,84 %, N: 17,19 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(4-metoxifenil)piperazinil-1-carbonil]-1*H*-benzo[*d*]imidazol (REC-10)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(4-metoxifenil)piperazinil-1-carbonilo (128 mg, 0,5 mmol), 1*H*-benzo[*d*]imidazol (59 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de diclorometano mediante el procedimiento general durante 24 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón oscuro.



Rendimiento: 48 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 8,23 (s, 1H, 8,23), 7,84 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H, He), 7,62 (d,  $J = 7,7$  Hz, 1H, Hb), 7,38 (dp,  $J = 7,7$ , 1,2 Hz, 2H, Hc - Hd), 6,92 (d,  $J = 9,1$  Hz, 2H, Hh), 6,86 (d,  $J = 9,1$  Hz, 2H, Hi), 3,78 (s, ancho, 7H, Hf - Hj), 3,16 (t,  $J = 6,4$  Hz, 4H, Hg).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 154,90 (C14), 151,48 (C1), 144,91 (C11), 143,66 (C2), 141,93 (C8), 131,99 (C3), 124,94 (C6), 124,06 (C5), 120,98 (C4), 119,31 (C13), 114,74 (C12), 112,68 (C7), 55,68 (C15),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

---

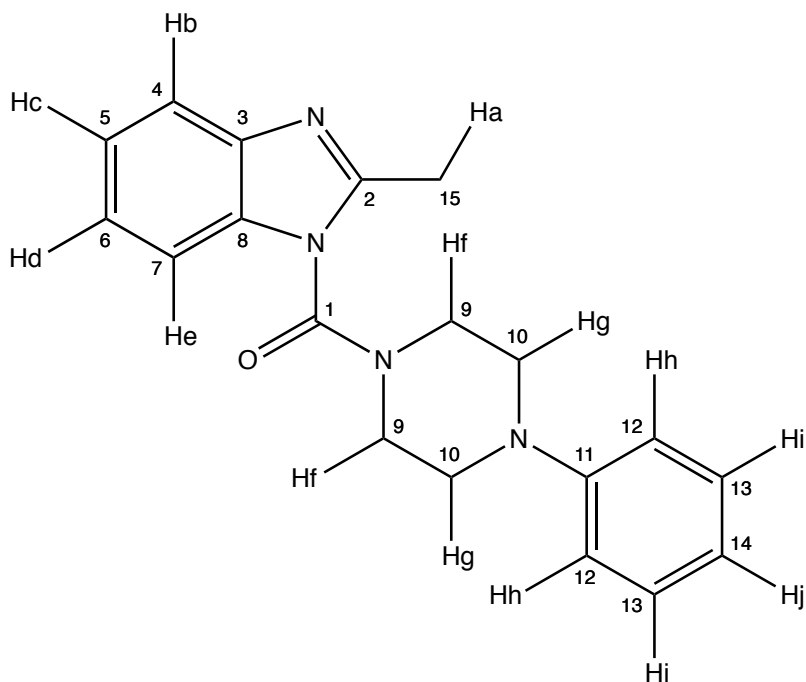
51,22 (C10), 46,90 (C9). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2835,70 (OMe), 1701,70 (C=O).

Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$ , PM: 336,40 g/mol) C: 67,89 %, H: 5,34 %, N: 16,28 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[(4-fenilpiperazinil)-1-carbonil]-2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (REC-11)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo (225 mg, 1,0 mmol), 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (132 mg, 1,0 mmol) y trietilamina (0,4 mL, 3,0 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo traslúcido.



Rendimiento: 45 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,74 - 7,71 (m, 1H, He), 7,36 - 7,25 (m, 5H, Hb - Hc - Hd - Hi), 6,93 (d,  $J$  = 7,8 Hz, 3H, Hh - Hj), 3,70 (s, ancho, 4H, Hf), 3,28 (td,  $J$  = 5,0 Hz, 4H, Hg), 2,69 (s, 3H, Ha).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 151,63 (C2), 151,43 (C1), 150,64 (C11), 142,39 (C8), 133,14 (C3), 129,49 (C13), 123,75 (C6), 123,54 (C5), 121,27 (C4), 119,84 (C14), 117,05 (C12), 110,65 (C7), 49,98 (C10), 46,20 (C9), 15,08 (C15). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2822,68 (N-H

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

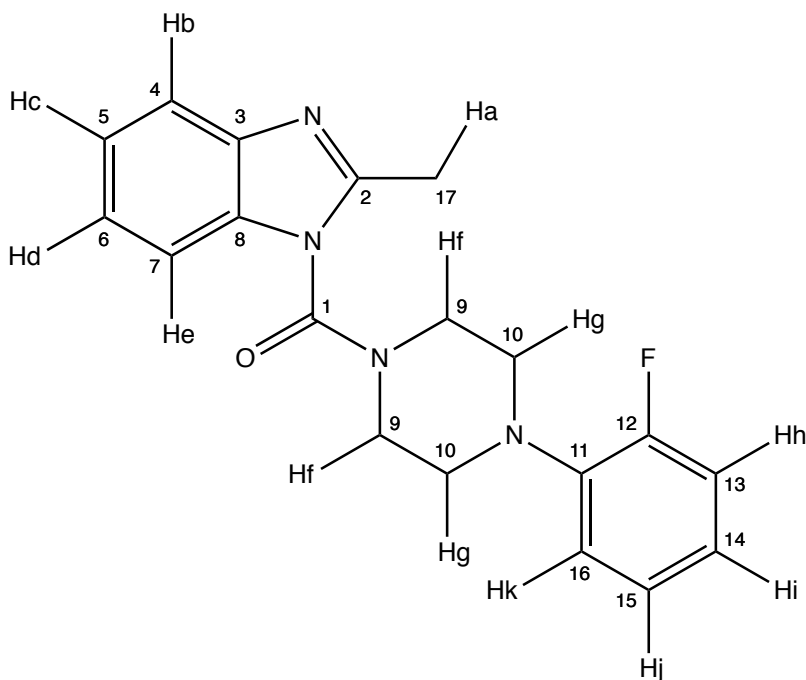
---

anilínico), 1695,62 (C=O). Análisis elemental experimental: (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O,  
PM: 320,40 g/mol) C: 71,64 %, H: 6,48 %, N: 17,69 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(2-fluorofenil)piperazinil-1-carbonil]-2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-12**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(2-fluorofenil)piperazinil-1-carbonilo (243 mg, 1,0 mmol), 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (132 mg, 1,0 mmol) y trietilamina (0,4 mL, 3,0 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón claro.



Rendimiento: 47 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,67 (dd,  $J = 6,3, 3,3$  Hz, 1H, He), 7,29 (dt,  $J = 6,3, 3,3$  Hz, 1H, Hb), 7,24 (dd,  $J = 6,0, 3,3$  Hz, 2H, Hc - Hd), 7,02 (dq,  $J = 7,8, 2,2$  Hz, 2H, Hi - Hj), 6,95 (t,  $J = 7,8$  Hz, 1H, Hh), 6,89 (t,  $J = 7,8$  Hz, 1H, Hk), 3,77 - 3,61 (m, 4H, Hf), 3,13 (t,  $J = 5,3$  Hz, 4H, Hg), 2,65 (s, 3H, Ha).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 155,85 (d,  $J = 246,2$  Hz, C12), 151,62 (C2), 151,39 (C1), 142,35 (C8), 139,13 (d,  $J = 8,7$  Hz, C11), 133,11 (C3), 124,72 (d,  $J = 3,7$  Hz,

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

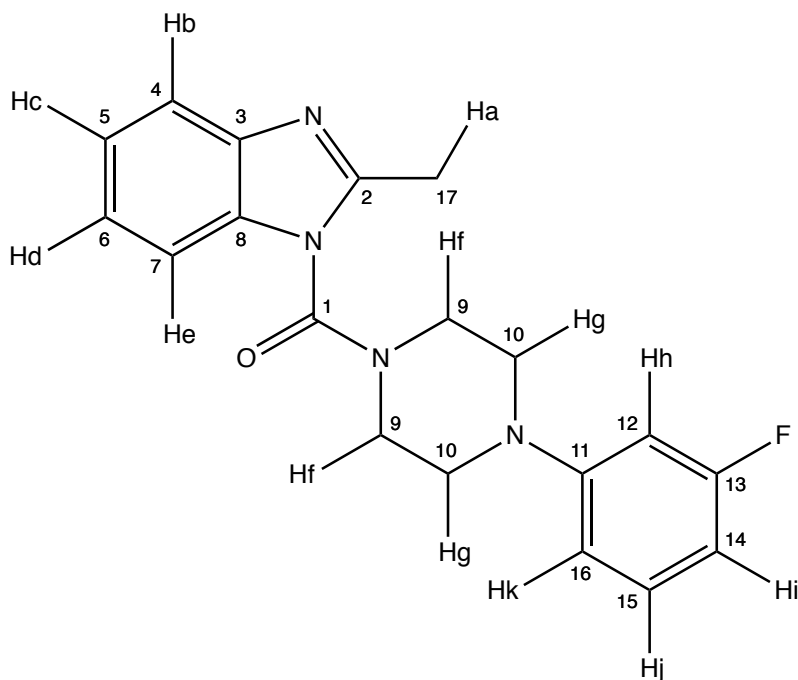
---

C15), 123,76 (C6), 123,70 (d,  $J = 2,7$  Hz, C14), 123,49 (C5), 119,77 (C4), 119,42 (d,  $J = 2,5$  Hz, C16), 116,47 (d,  $J = 20,5$  Hz, C13), 110,62 (C7), 50,82 (d,  $J = 3,0$  Hz, C10), 46,56 (C9), 15,02 (C17). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2828,91 (N-H anilínico), 1689,85 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{FN}_4\text{O}$ , PM: 338,39 g/mol) C: 67,49 %, H: 5,58 %, N: 16,12 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(3-fluorofenil)piperazinil-1-carbonil]-2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-13**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(3-fluorofenil)piperazinil-1-carbonilo (97 mg, 0,4 mmol), 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (53 mg, 0,4 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,2 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color blanco traslúcido.



Rendimiento: 44 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,67 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, He), 7,29 - 7,25 (m, 1H, Hb), 7,25 - 7,21 (m, 2H, Hc - Hd), 7,17 (q,  $J$  = 9,5 Hz, 1H, Hj), 6,62 (dd,  $J$  = 9,5, 2,0 Hz, 1H, Hk), 6,55 (dt,  $J$  = 9,5, 2,0 Hz, 2H, Hh - Hj), 3,63 (s, ancho, 4H, Hf), 3,23 (d,  $J$  = 5,1 Hz, 4H, Hg), 2,64 (s, 3H, Ha).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 163,88 (d,  $J$  = 244,5 Hz, C13), 152,22 (d,  $J$  = 9,6 Hz, C11), 151,64 (C2), 151,45 (C1), 142,42 (C8), 133,08 (C3), 130,56 (d,  $J$  = 9,8 Hz, C15), 123,77 (C6),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

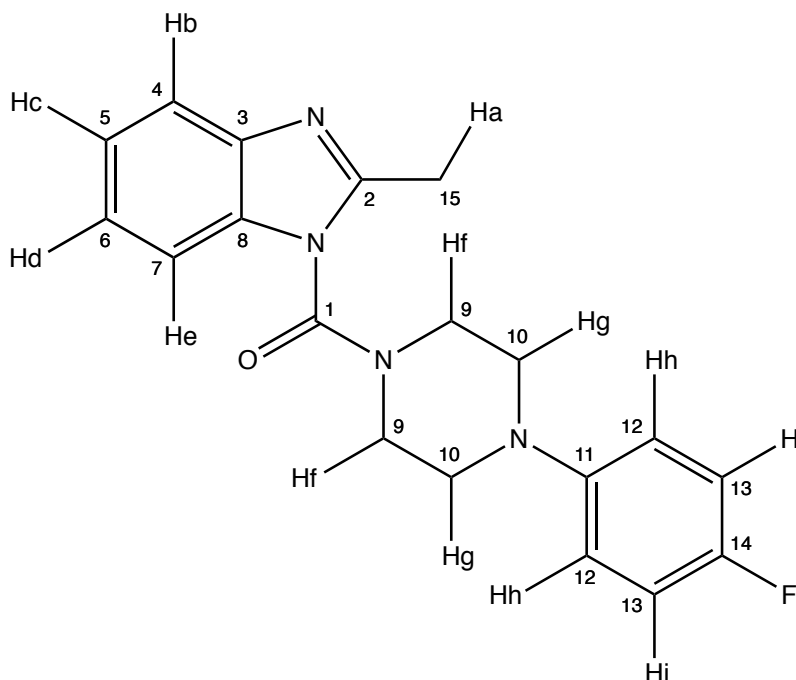
---

123,57 (C5), 119,87 (C4), 112,05 (d,  $J = 2,5$  Hz, C16), 110,60 (C7), 107,46 (d,  $J = 21,3$  Hz, C14), 103,79 (d,  $J = 25,0$  Hz, C12), 49,38 (C10), 45,96 (C9), 15,08 (C17). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2830,74 (N-H anilínico), 1693,95 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{FN}_4\text{O}$ , PM: 338,39 g/mol) C: 68,27 %, H: 5,83 %, N: 17,04 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(4-fluorofenil)piperazinil-1-carbonil]-2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-14**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(4-fluorofenil)piperazinil-1-carbonilo (243 mg, 1,0 mmol), 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (132 mg, 1,0 mmol) y trietilamina (0,4 mL, 3,0 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón oscuro.



Rendimiento: 48 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,67 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, He), 7,27 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, Hb), 7,24 (t,  $J = 4,0$  Hz, 2H, Hc - Hd), 6,93 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, Hi), 6,83 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H, Hh), 3,66 (s, ancho, 4H, Hf), 3,09 (s, ancho, 4H, Hg), 2,64 (s, 3H, Ha).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 157,90 (d,  $J = 240,6$  Hz, C14), 151,57 (C2), 151,31 (C1), 147,20 (d,  $J = 2,4$  Hz, C11), 142,30 (C8), 133,04 (C3), 123,68 (C6), 123,46 (C5), 119,73 (C4), 118,90 (d,  $J = 7,8$  Hz, C12), 115,86 (d,  $J = 22,3$

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

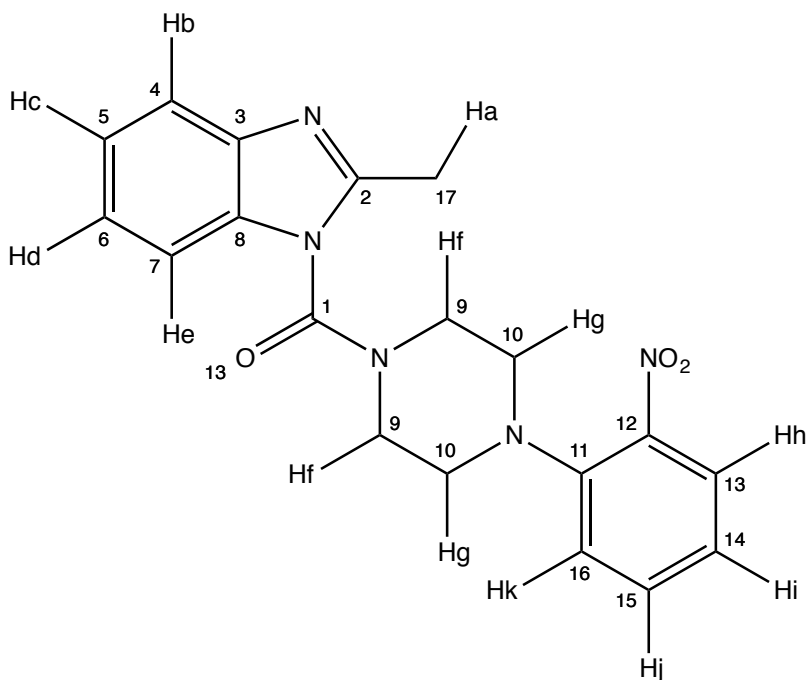
---

Hz, C13), 110,56 (C7), 50,80 (C10), 46,15 (C9), 14,97 (C15). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2830,44 (N-H anilínico), 1697,42 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{FN}_4\text{O}$ , PM: 338,39 g/mol) C: 67,74 %, H: 5,85 %, N: 16,87 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(2-nitrofenil)piperazinil-1-carbonil]-2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-15**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(2-nitrofenil)piperazinil-1-carbonilo (270 mg, 1,0 mmol), 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (132 mg, 1,0 mmol) y trietilamina (0,4 mL, 3,0 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo intenso.



Rendimiento: 53 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,82 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, He), 7,71 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, Hb), 7,55 (d,  $J$  = 7,8 Hz, 1H, Hh), 7,36 - 7,27 (m, 3H, Hc - Hd - Hj), 7,19 (dt,  $J$  = 7,8, 2,8 Hz, 2H, Hk - Hi), 3,75 (s, ancho, 4H, Hf), 3,14 (d,  $J$  = 5,0 Hz, 4H, Hg), 2,71 (s, 3H, Ha).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 151,61 (C2), 151,53 (C1), 145,27 (C11), 144,72 (C12), 142,43 (C8), 133,82 (C15), 133,08 (C3), 125,95 (C13), 123,94 (C6), 123,76 (C14), 123,53 (C5), 122,01 (C16), 119,84 (C4),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

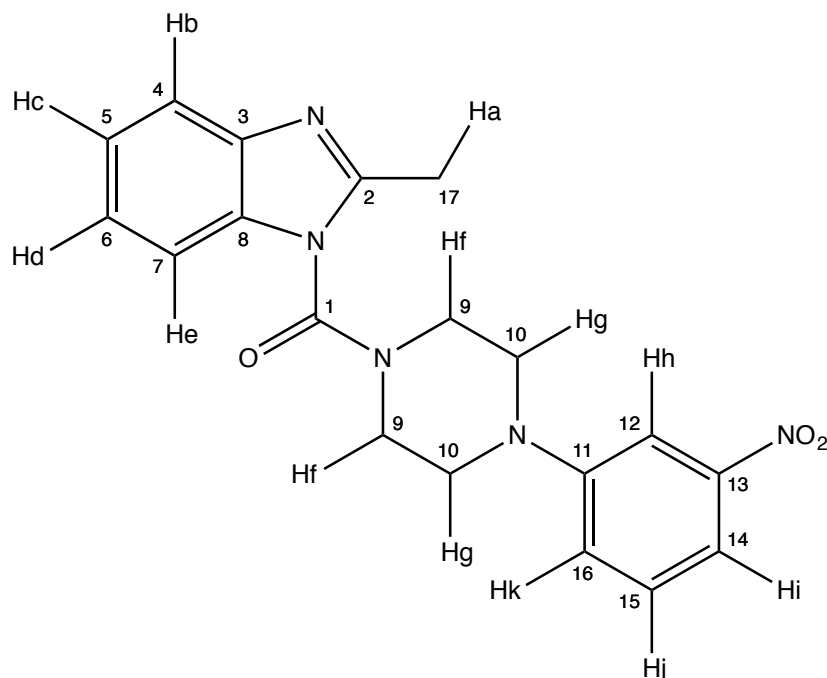
---

110,65 (C7), 52,44 (C10), 46,97 (C9), 15,10 (C17). IR (Pel Liq)  $\text{cm}^{-1}$ : 1694,98 (C=O), 1520,28 ( $\text{NO}_2$ ). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3$ , PM: 365,39 g/mol) C: 63,04 %, H: 5,73 %, N: 18,82 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(3-nitrofenil)piperazinil-1-carbonil]-2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-16**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(3-nitrofenil)piperazinil-1-carbonilo (80 mg, 0,3 mmol), 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (40 mg, 0,3 mmol) y trietilamina (0,1 mL, 0,9 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo intenso.



Rendimiento: 55 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,72 (dt,  $J = 9,6, 7,6, 1,5$  Hz, 3H, He - Hh - Hi), 7,42 (d,  $J = 9,6$  Hz, 1H, Hb), 7,31 (t,  $J = 8,1$  Hz, 2H, Hc - Hd), 7,29 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, Hk), 7,19 (dd,  $J = 7,6, 1,6$  Hz, 1H, Hj), 3,74 (s, ancho, 4H, Hf), 3,35 (s, ancho, 4H, Hg), 2,69 (s, 3H, Ha).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 151,66 (C2), 151,55 (C1), 151,24 (C11), 149,38 (C13), 142,47 (C8), 133,04 (C3), 130,15 (C15), 123,83 (C6), 123,64 (C5), 122,17 (C16), 119,96 (C4), 115,31 (C14),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

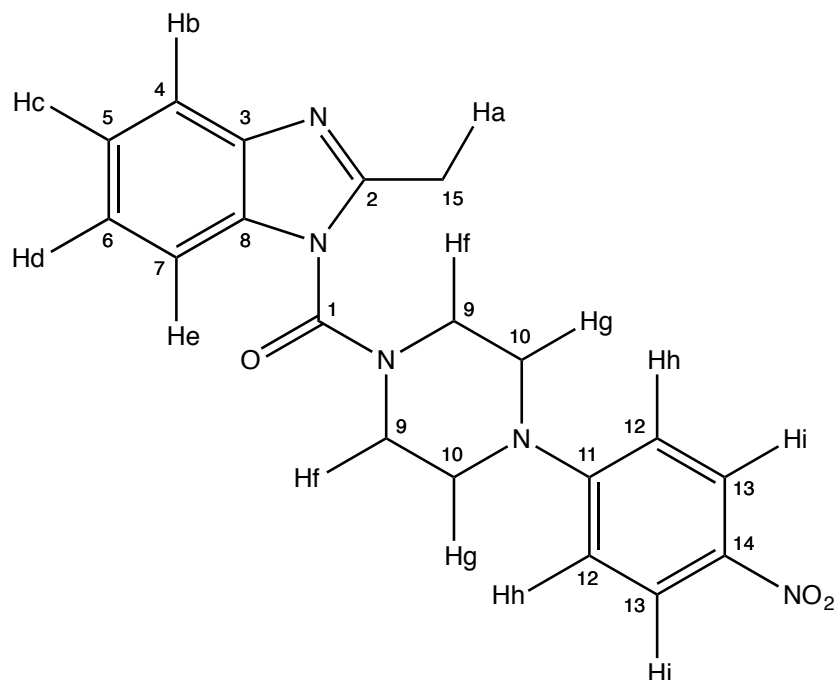
---

110,78 (C12), 110,56 (C7), 49,10 (C10), 45,86 (C9), 15,15 (C17). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 1695,80 (C=O), 1535,93 ( $\text{NO}_2$ ). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_3$ , PM: 365,39 g/mol) C: 62,58 %, H: 5,02 %, N: 19,54 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(4-nitrofenil)piperazinil-1-carbonil]-2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-17**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(4-nitrofenil)piperazinil-1-carbonilo (80 mg, 0,3 mmol), 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (40 mg, 0,3 mmol) y trietilamina (0,1 mL, 0,9 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color amarillo opaco.



Rendimiento: 54 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 8,13 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, Hi), 7,72 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H, He), 7,30 (s, ancho, 3H, Hb - Hc - Hd), 6,84 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, Hh), 3,72 (s, ancho, 4H, Hf), 3,50 (d, *J* = 5,2 Hz, 4H, Hg), 2,69 (s, 3H, Ha). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 154,32 (C11), 151,68 (C2), 151,59 (C1), 142,43 (C8), 139,84 (C14), 132,96 (C3), 126,03 (C13), 123,91 (C6), 123,74 (C5), 120,00 (C4), 113,75 (C12), 110,56 (C7), 47,49 (C10), 45,55 (C9), 15,16 (C15). IR (KBr)

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

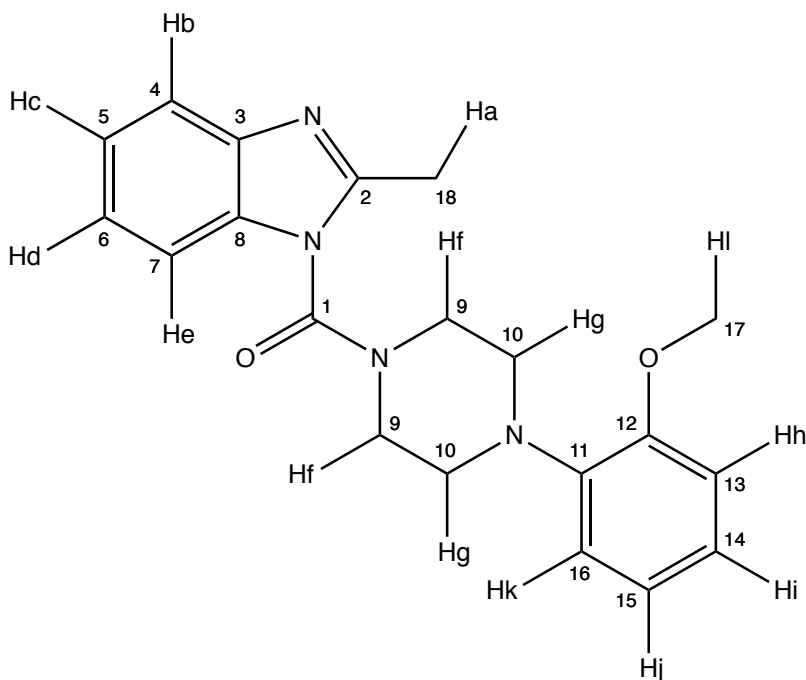
---

cm<sup>-1</sup>: 1696,35 (C=O), 1597,46 (NO<sub>2</sub>). Análisis elemental experimental:  
(C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>, PM: 365,39 g/mol) C: 63,32 %, H: 5,78 %, N: 18,71 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(2-metoxifenil)piperazinil-1-carbonil]-2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-18**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(2-metoxifenil)piperazinil-1-carbonilo (76 mg, 0,3 mmol), 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (40 mg, 0,3 mmol) y trietilamina (0,1 mL, 0,9 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón claro.



Rendimiento: 46 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,73 (dd,  $J = 6,0, 0,8$  Hz, 1H, He), 7,37 (dd,  $J = 6,0, 0,8$  Hz, 1H, Hb), 7,30 (dq,  $J = 6,0, 0,8$  Hz, 2H, Hc - Hd), 7,13 - 6,99 (m, 1H, Hi), 6,96 (d,  $J = 7,8$ , 1H, Hh), 6,93-6,90 (m, 2H, Hj - Hk), 3,87 (s, 3H, HI), 3,74 (s, ancho, 4H, Hf), 3,15 (s, ancho, 4H, Hg), 2,72 (s, 3H, Ha).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 152,29 (C12), 151,51 (C2), 151,34 (C1), 142,39 (C8), 140,16 (C11), 133,17 (C3), 123,97 (C15), 123,58 (C6), 123,33 (C5), 121,15 (C14),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

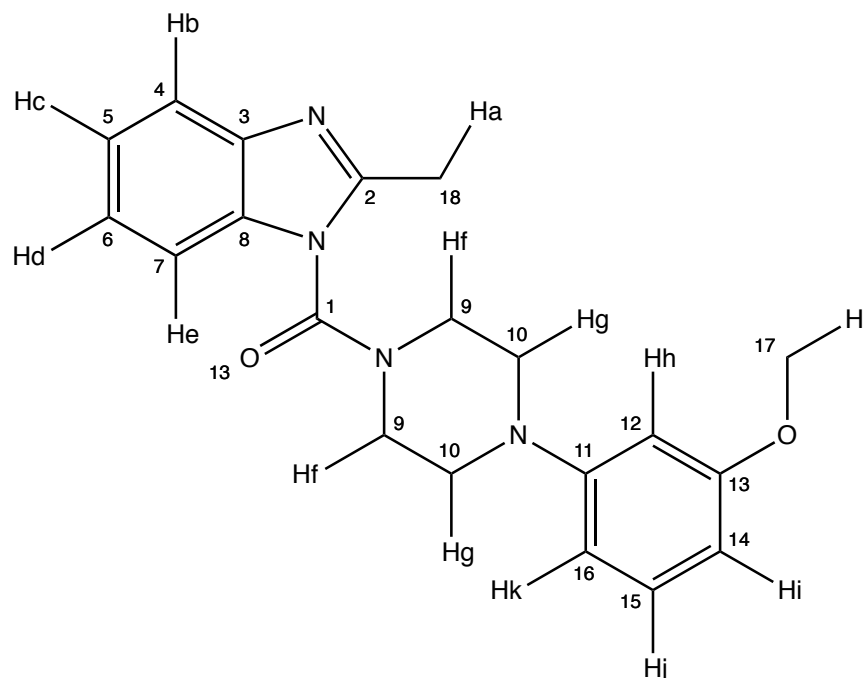
---

119,70 (C4), 118,55 (C13), 111,51 (C16), 110,62 (C7), 55,50 (C17), 50,87 (C10), 46,46 (C9), 14,99 (C18). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2802,04 (OMe), 1689,89 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$ , PM: 350,42 g/mol) C: 68,92 %, H: 6,81 %, N: 16,44 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(3-metoxifenil)piperazinil-1-carbonil]-2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-19**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(3-metoxifenil)piperazinil-1-carbonilo (76 mg, 0,3 mmol), 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (40 mg, 0,3 mmol) y trietilamina (0,1 mL, 0,9 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón traslúcido.



Rendimiento: 44 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,72 (dd,  $J = 5,7, 3,7$  Hz, 1H, He), 7,32 (dd,  $J = 5,7, 3,7$  Hz, 1H, Hb), 7,29 (t,  $J = 5,7$  Hz, 2H, Hc - Hd), 7,20 (t,  $J = 8,1$  Hz, 1H, Hj), 6,53 (dd,  $J = 8,1, 1,7$  Hz, 1H, Hi), 6,49 (dd,  $J = 8,1, 1,7$  Hz, 1H, Hk), 6,46 (s, 1H, Hh), 3,79 (s, 3H, Hl), 3,71 (s, ancho, 4H, Hf), 3,26 (td,  $J = 4,9$  Hz, 4H, Hg), 2,69 (s, 3H, Ha).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 160,82 (C13), 152,01 (C11), 151,66 (C2), 151,46 (C1), 142,45 (C8), 133,15 (C3), 130,22 (C15), 123,75 (C6),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

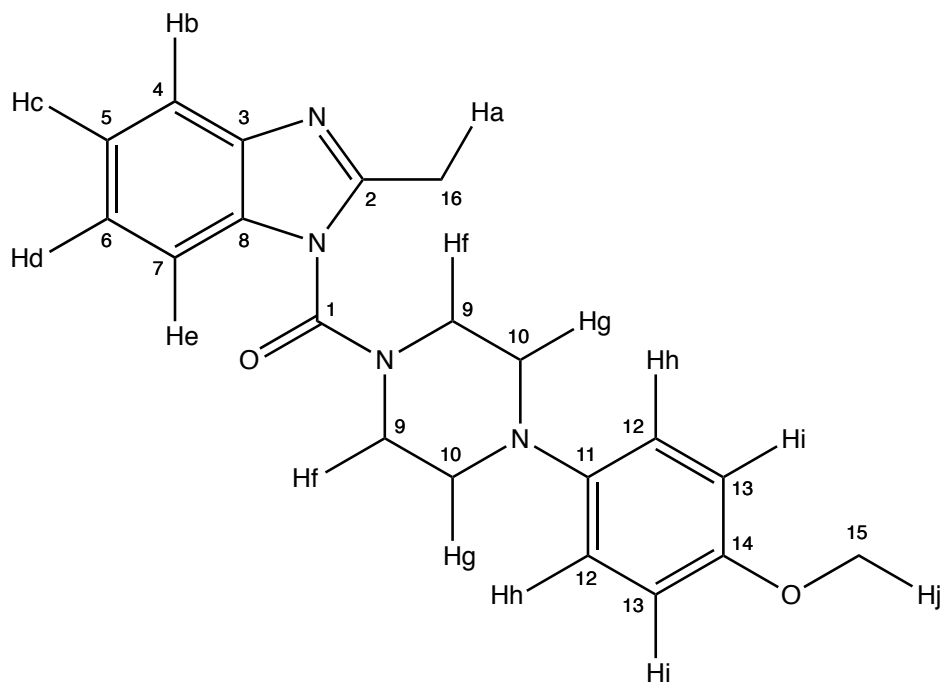
---

123,54 (C5), 119,86 (C4), 110,64 (C7), 109,64 (C16), 105,83 (C14), 103,62 (C12), 55,38 (C17), 49,87 (C10), 46,22 (C9), 15,09 (C18). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2832,98 (OMe), 1697,40 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$ , PM: 350,42 g/mol) C: 69,32 %, H: 6,94 %, N: 15,21 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[4-(4-metoxifenil)piperazinil-1-carbonil]-2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-20**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-(4-metoxifenil)piperazinil-1-carbonilo (76 mg, 0,3 mmol), 2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (40 mg, 0,3 mmol) y trietilamina (0,1 mL, 0,9 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón oscuro.



Rendimiento: 45 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,72 (dd,  $J = 8,2, 2,0$  Hz, 1H, He), 7,37 - 7,27 (m, 3H, Hb - Hc - Hd), 6,91 (d,  $J = 3,0$  Hz, 2H, Hh), 6,84 (d,  $J = 3,0$  Hz, 2H, Hi), 3,77 (s, 3H, Hj), 3,69 (s, ancho, 4H, Hf), 3,12 (td,  $J = 4,8$  Hz, 4H, Hg), 2,69 (s, 3H, Ha).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 154,90 (C14), 151,65 (C2), 151,44 (C1), 144,88 (C11), 142,44 (C8), 133,19 (C3), 123,73 (C6), 123,51 (C5), 119,83 (C4), 119,27 (C13), 114,76 (C12), 110,67 (C7), 55,69 (C15), 51,41 (C10),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

---

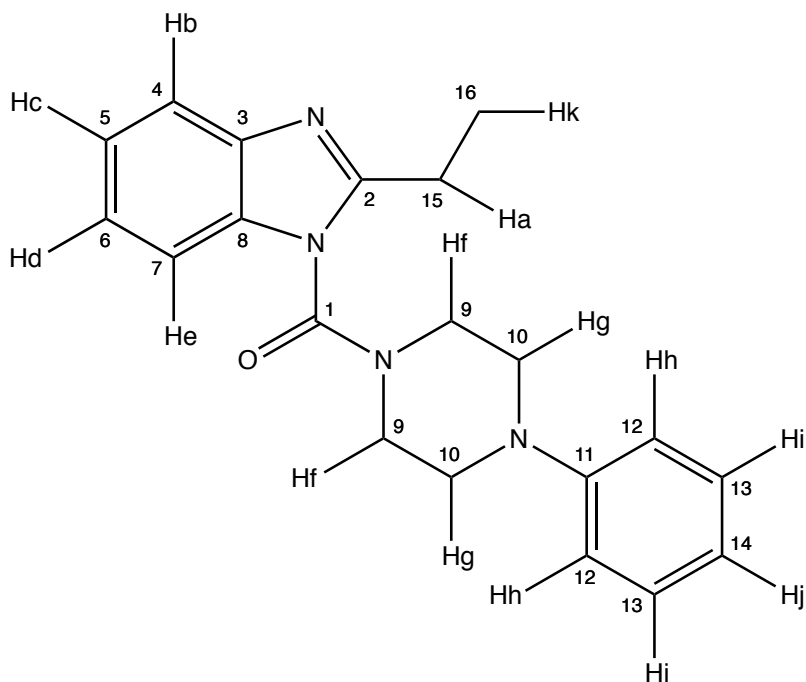
46,39 (C9), 15,08 (C16). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2818,84 (OMe), 1697,32 (C=O).

Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$ , PM: 350,42 g/mol) C: 68,69 %, H: 6,31 %, N: 15,76 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[(4-fenilpiperazinil)-1-carbonil]-2-etil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-21**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo (112 mg, 0,5 mmol), 2-etil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (73 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color blanco opaco.



Rendimiento: 52 %. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 7,75 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, He), 7,34 - 7,28 (m, 5H, Hb - Hc - Hd - Hi), 6,93 (t, *J* = 7,7 Hz, 3H, Hh - Hj), 3,67 (s, ancho, 4H, Hf), 3,27 (td, *J* = 5,1 Hz, 4H, Hg), 3,05 (q, *J* = 7,5 Hz, 2H, Ha), 1,44 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H, Hk). <sup>13</sup>C NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*) δ: 156,49 (C2), 151,42 (C1), 150,65 (C11), 142,36 (C8), 133,10 (C3), 129,49 (C13), 123,72 (C6), 123,44 (C5), 121,26 (C4), 120,00 (C14), 117,04 (C12), 110,55 (C7), 49,94 (C10), 46,94 (C9), 22,10

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

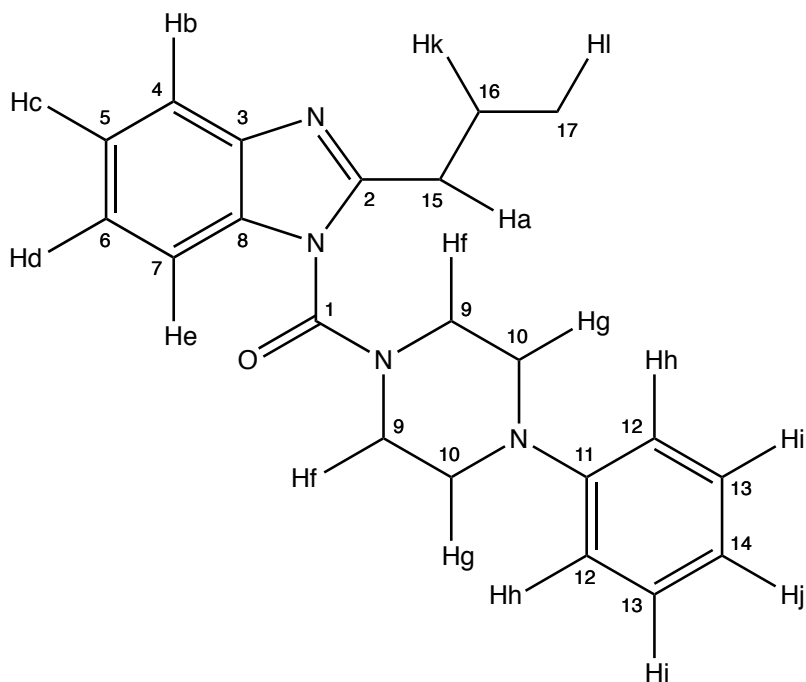
---

(C15), 12,17 (C16). IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 2821,06 (N-H anilínico), 1697,11 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}$ , PM: 334,42 g/mol)  
C: 72,43 %, H: 6,15 %, N: 16,91 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[(4-fenilpiperazinil)-1-carbonil]-2-propil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (REC-22)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo (112 mg, 0,5 mmol), 2-propil-1*H*-benzo[*d*]imidazol (80 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón opaco.



Rendimiento: 50 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,74 (dd,  $J$  = 7,0, 2,7 Hz, 1H, He), 7,32 - 7,27 (m, 5H, Hb - Hc - Hd - Hi), 6,92 (t,  $J$  = 7,4 Hz, 3H, Hh, Hj), 3,67 (s, ancho, 4H, Hf), 3,27 (td,  $J$  = 4,8 Hz, 4H, Hg), 2,99 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 2H, Ha), 1,88 (h,  $J$  = 7,5 Hz, 2H, Hk), 1,02 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 3H, Hl).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 164,52 (C2), 163,82 (C1), 151,36 (C11), 151,27 (C8), 129,46 (C3), 129,29 (C13), 129,24 (C4), 120,40 (C5 - C6), 120,17 (C14), 116,59 (C12), 116,41 (C7), 49,39 (C10),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

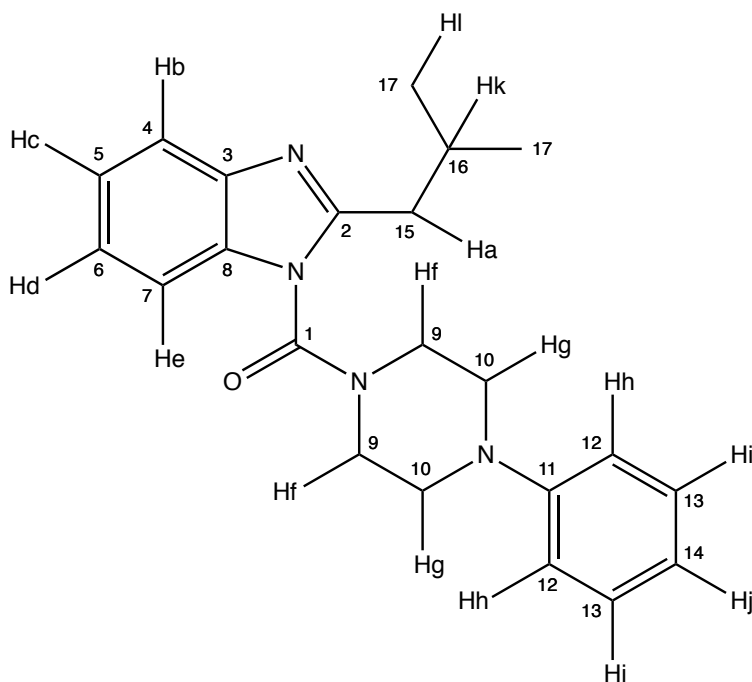
---

46,92 (C9), 41,90 (C15), 29,38 (C16), 13,33 (C17). IR (Pel Liq)  $\text{cm}^{-1}$ : 2821,69 (N-H anilínico), 1696,05 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}$ , PM: 348,45 g/mol) C: 73,09 %, H: 6,43 %, N: 16,32 %.

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

- 1-[(4-fenilpiperazinil)-1-carbonil]-2-(2-isobutil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**REC-23**)

Se realiza la reacción entre cloruro de 4-fenilpiperazinil-1-carbonilo (112 mg, 0,5 mmol), 2-(2-isobutil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (87 mg, 0,5 mmol) y trietilamina (0,2 mL, 1,5 mmol) en 30 mL de acetonitrilo mediante el procedimiento general durante 48 horas. Se obtiene un líquido aceitoso de color marrón oscuro.



Rendimiento: 48 %.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 7,75 (dd,  $J$  = 6,9, 2,2 Hz, 1H, He), 7,33 - 7,25 (m, 5H, Hb, Hc, Hd, Hi), 6,93 (t,  $J$  = 7,5 Hz, 3H, Hh - Hj), 3,73 (s, ancho, 4H, Hf), 3,23 (d,  $J$  = 4,8 Hz, 4H, Hg), 2,91 (d,  $J$  = 4,8 Hz, 2H, Ha), 2,25 (hept,  $J$  = 5,9 Hz, 1H, Hk), 1,01 (d,  $J$  = 5,9 Hz, 6H, Hl).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz, Cloroformo-*d*)  $\delta$ : 154,73 (C2), 151,38 (C1), 150,59 (C11), 142,35 (C8), 132,97 (C3), 129,45 (C13), 123,63 (C6), 123,39 (C5), 121,20 (C4), 119,97 (C14), 116,97 (C12), 110,55 (C7),

## CONDICIONES EXPERIMENTALES Y CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

---

49,83 (C10), 46,27 (C9), 37,42 (C15), 28,25 (C16), 22,68 (C17). IR (Pel Liq)  $\text{cm}^{-1}$ : 2919,50 (N-H anilínico), 1695,66 (C=O). Análisis elemental experimental: ( $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}$ , PM: 362,48 g/mol) C: 73,58 %, H: 7,32 %, N: 15,94 %.

## BIBLIOGRAFÍA

---

## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

---

### BIBLIOGRAFÍA

1. Hillig KW. Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). Article. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Mar 2005;52(2):161-180. doi:10.1007/s10722-003-4452-y
2. Baron EP. Comprehensive Review of Medicinal Marijuana, Cannabinoids, and Therapeutic Implications in Medicine and Headache: What a Long Strange Trip It's Been. *Headache*. Jun 2015;55(6):885-916. doi:10.1111/head.12570
3. Evans B. MEDICINE IN CHINA - A HISTORY OF PHARMACEUTICS - UNSCHULD,PU. *Journal of the Royal Asiatic Society*. 1987;(2):401-402.
4. Hanus LO. Pharmacological and Therapeutic Secrets of Plant and Brain (Endo) Cannabinoids. *Medicinal Research Reviews*. Mar 2009;29(2):213-271. doi:10.1002/med.20135
5. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*. 1964;86(8):1646-1647.
6. Padgett LW. Recent developments in cannabinoid ligands. *Life Sciences*. Aug 2005;77(14):1767-1798. doi:10.1016/j.lfs.2005.05.020
7. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. STRUCTURE OF A CANNABINOID RECEPTOR AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF THE CLONED CDNA. Article. *Nature*. Aug 1990;346(6284):561-564. doi:10.1038/346561a0
8. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Article. *Nature*. Nov 1996;384(6604):83-87. doi:10.1038/384083a0
9. Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. Review. *Nature Reviews Drug Discovery*. Sep 2004;3(9):771-784. doi:10.1038/nrd1495
10. Ramaekers JG, van Wel JH, Spronk DB, et al. Cannabis and tolerance: acute drug impairment as a function of cannabis use history. Article. *Scientific Reports*. May 2016;6:8. 26843. doi:10.1038/srep26843
11. Morrison AJ, Adam JM, Baker JA, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of indole-3-heterocycles as agonists of the CB1

## BIBLIOGRAFÍA

---

- receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Jan 2011;21(1):506-509. doi:10.1016/j.bmcl.2010.10.093
12. Thakur GA, Tichkule R, Bajaj S, Makriyannis A. Latest advances in cannabinoid receptor agonists. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. Dec 2009;19(12):1647-1673. doi:10.1517/13543770903436505
  13. Marini P, Cascio MG, King A, Pertwee RG, Ross RA. Characterization of cannabinoid receptor ligands in tissues natively expressing cannabinoid CB2 receptors. *British Journal of Pharmacology*. Jun 2013;169(4):887-899. doi:10.1111/bph.12191
  14. Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, et al. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*. Oct 2005;310(5746):329-332. doi:10.1126/science.1115740
  15. Mackie K. Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2006;46:101-122. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141254
  16. Pacher P, Kunos G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease successes and failures. *Febs Journal*. May 2013;280(9):1918-1943. doi:10.1111/febs.12260
  17. Brogi S, Corelli F, Di Marzo V, et al. Three-dimensional quantitative structure-selectivity relationships analysis guided rational design of a highly selective ligand for the cannabinoid receptor 2. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Feb 2011;46(2):547-555. doi:10.1016/j.ejmech.2010.11.034
  18. Cichero E, Ligresti A, Allara M, et al. Homology modeling in tandem with 3D-QSAR analyses: A computational approach to depict the agonist binding site of the human CB2 receptor. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Sep 2011;46(9):4489-4505. doi:10.1016/j.ejmech.2011.07.023
  19. Bosier B, Muccioli GG, Hermans E, Lambert DM. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and opportunities. *Biochemical Pharmacology*. Jul 2010;80(1):1-12. doi:10.1016/j.bcp.2010.02.013
  20. Viveros M-P, Bermúdez-Silva F-J, Lopez-Rodriguez A-B, Wagner EJ. The endocannabinoid system as pharmacological target derived from its CNS role in energy homeostasis and reward. Applications in eating disorders and addiction. *Pharmaceuticals*. 2011;4(8):1101-1136.

## BIBLIOGRAFÍA

---

21. Pertwee RG. Receptors and Channels Targeted by Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists and Antagonists. *Current Medicinal Chemistry*. May 2010;17(14):1360-1381.
22. Osorio JH, Tangarife HF. Cannabis, una opción terapéutica. *Biosalud*. 2009;8(1):166-177.
23. Mouslech Z, Valla V. Endocannabinoid System: An overview of its potential in current medical practice. Review. *Neuroendocrinology Letters*. Feb 2009;30(2):153-179.
24. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. Review. *Nature Reviews Neuroscience*. Nov 2003;4(11):873-884. doi:10.1038/nrn1247
25. Lu HC, Mackie K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. Review. *Biological Psychiatry*. Apr 2016;79(7):516-525. doi:10.1016/j.biopsych.2015.07.028
26. Kano M. Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. Review. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences*. Jul 2014;90(7):235-250. doi:10.2183/pjab.90.235
27. Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF. Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. Review. *Chemical Reviews*. May 2008;108(5):1687-1707. doi:10.1021/cr0782067
28. Di Marzo V. Endocannabinoids: synthesis and degradation. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol 160*. 2008;160:1-24. doi:10.1007/112\_0505
29. Murataeva N, Straiker A, Mackie K. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *British Journal of Pharmacology*. Mar 2014;171(6):1379-1391. doi:10.1111/bph.12411
30. Maccarrone M, Bab R, Biro T, et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. Review. *Trends in Pharmacological Sciences*. May 2015;36(5):277-296. doi:10.1016/j.tips.2015.02.008
31. McPartland JM, Guy GW, Di Marzo V. Care and Feeding of the Endocannabinoid System: A Systematic Review of Potential Clinical Interventions that Upregulate the Endocannabinoid System. *Plos One*. Mar 2014;9(3):e89566. doi:10.1371/journal.pone.0089566
32. Russo EB. Beyond Cannabis: Plants and the Endocannabinoid System. *Trends in Pharmacological Sciences*. Jul 2016;37(7):594-605. doi:10.1016/j.tips.2016.04.005

## BIBLIOGRAFÍA

---

33. Di Marzo V, Piscitelli F, Mechoulam R. Cannabinoids and Endocannabinoids in Metabolic Disorders with Focus on Diabetes. In: Schwanstecher M, ed. *Diabetes - Perspectives in Drug Therapy*. Springer-Verlag Berlin; 2011:75-104. *Handbook of Experimental Pharmacology*.
34. Russo EB. Clinical endocannabinoid deficiency (CECD): Can this concept explain therapeutic benefits of cannabis in migraine, fibromyalgia, irritable bowel syndrome and other treatment-resistant conditions? Review. *Neuroendocrinology Letters*. Feb-Apr 2004;25(1-2):31-39.
35. Giuffrida A, Leweke FM, Gerth CW, et al. Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology*. Nov 2004;29(11):2108-2114. doi:10.1038/sj.npp.1300558
36. Di Filippo M, Pini LA, Pelliccioli GP, Calabresi P, Sarchielli P. Abnormalities in the cerebrospinal fluid levels of endocannabinoids in multiple sclerosis. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. Nov 2008;79(11):1224-1229. doi:10.1136/jnnp.2007.139071
37. Van Laere K, Casteels C, Dhollander I, et al. Widespread Decrease of Type 1 Cannabinoid Receptor Availability in Huntington Disease In Vivo. *Journal of Nuclear Medicine*. Sep 2010;51(9):1413-1417. doi:10.2967/jnumed.110.077156
38. Gerard N, Pieters G, Goffin K, Bormans G, Van Laere K. Brain Type 1 Cannabinoid Receptor Availability in Patients with Anorexia and Bulimia Nervosa. *Biological Psychiatry*. Oct 2011;70(8):777-784. doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.010
39. Chouker A, Kaufmann I, Kreth S, et al. Motion Sickness, Stress and the Endocannabinoid System. *Plos One*. May 2010;5(5)e10752. doi:10.1371/journal.pone.0010752
40. ElSohly MA. *Chemical constituents of cannabis*. Haworth Press, New York; 2002.
41. Thakur GA, Duclos RI, Makriyannis A. Natural cannabinoids: Templates for drug discovery. *Life Sciences*. Dec 2005;78(5):454-466. doi:10.1016/j.lfs.2005.09.014
42. Alexander SPH. Therapeutic potential of cannabis-related drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. Jan 2016;64:157-166. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.07.001
43. Burston JJ, Woodhams SG. Conference on 'PUFA mediators: implications for human health' Symposium 3: Cannabinoids in human health

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Endocannabinoid system and pain: an introduction. *Proceedings of the Nutrition Society*. Feb 2014;73(1):106-117. doi:10.1017/s0029665113003650
44. Limebeer CL, Rock EM, Mechoulam R, Parker LA. The anti-nausea effects of CB1 agonists are mediated by an action at the visceral insular cortex. *British Journal of Pharmacology*. Nov 2012;167(5):1126-1136. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02066.x
45. Hao SZ, Avraham Y, Mechoulam R, Berry EM. Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *European Journal of Pharmacology*. Mar 2000;392(3):147-156. doi:10.1016/s0014-2999(00)00059-5
46. Porcella A, Maxia C, Gessa GL, Pani L. The human eye expresses high levels of CB1 cannabinoid receptor mRNA and protein. *European Journal of Neuroscience*. Mar 2000;12(3):1123-1127. doi:10.1046/j.1460-9568.2000.01027.x
47. Fagan SG, Campbell VA. The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration. *British Journal of Pharmacology*. Mar 2014;171(6):1347-1360. doi:10.1111/bph.12492
48. Baker D, Pryce G, Croxford JL, et al. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature*. Mar 2000;404(6773):84-87. doi:10.1038/35003583
49. Iseger TA, Bossong MG. A systematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans. *Schizophrenia Research*. Mar 2015;162(1-3):153-161. doi:10.1016/j.schres.2015.01.033
50. Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortes ML, del Pulgar TG, Izquierdo M, Guzman M. Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Medicine*. Mar 2000;6(3):313-319.
51. Gloss D, Vickrey B. Cannabinoids for epilepsy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014;(3)Cd009270. doi:10.1002/14651858.CD009270.pub3
52. Bluett RJ, Gamble-George JC, Hermanson DJ, Hartley ND, Marnett LJ, Patel S. Central anandamide deficiency predicts stress-induced anxiety: behavioral reversal through endocannabinoid augmentation. *Translational Psychiatry*. Jul 2014;4e408. doi:10.1038/tp.2014.53

## BIBLIOGRAFÍA

---

53. Menozzi G, Fossa P, Cichero E, Spallarossa A, Ranise A, Mosti L. Rational design, synthesis and biological evaluation of new 1,5-diarylpyrazole derivatives as CB1 receptor antagonists, structurally related to rimonabant. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Dec 2008;43(12):2627-2638. doi:10.1016/j.ejmech.2008.01.043
54. Pasquini S, Mugnaini C, Ligresti A, et al. Design, Synthesis, and Pharmacological Characterization of Indol-3-ylacetamides, Indol-3-ylxoacetamides, and Indol-3-ylcarboxamides: Potent and Selective CB2 Cannabinoid Receptor Inverse Agonists. *Journal of Medicinal Chemistry*. Jun 2012;55(11):5391-5402. doi:10.1021/jm3003334
55. Tabrizi MA, Baraldi PG, Borea PA, Varani K. Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Potential Therapeutic Benefits of Cannabinoid CB2 Receptor Agonists. *Chemical Reviews*. Jan 2016;116(2):519-560. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00411
56. Szabo, B. Pharmacology of Cannabinoid Receptors. *Biotrends Reviews*. 2008;2:1-13.
57. Croxford JL. Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease. *Cns Drugs*. 2003;17(3):179-202. doi:10.2165/00023210-200317030-00004
58. Pertwee RG. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *British Journal of Pharmacology*. Feb 2009;156(3):397-411. doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00048.x
59. Kirilly E, Gonda X, Bagdy G. CB1 receptor antagonists: new discoveries leading to new perspectives. *Acta Physiologica*. May 2012;205(1):41-60. doi:10.1111/j.1748-1716.2012.02402.x
60. Di Marzo V, Piscitelli F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*. Oct 2015;12(4):692-698. doi:10.1007/s13311-015-0374-6
61. Zogopoulos P, Vasileiou I, Patsouris E, Theocharis S. The neuroprotective role of endocannabinoids against chemical-induced injury and other adverse effects. *Journal of Applied Toxicology*. Apr 2013;33(4):246-264. doi:10.1002/jat.2828
62. Dhopeshwarkar A, Mackie K. CB2 Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target-What Does the Future Hold? *Molecular Pharmacology*. Oct 2014;86(4):430-437. doi:10.1124/mol.114.094649
63. Porter AC, Felder CC. The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacology & Therapeutics*. Apr 2001;90(1):45-60. doi:10.1016/s0163-7258(01)00130-9

## BIBLIOGRAFÍA

---

64. Kono M, Matsumoto T, Kawamura T, et al. Synthesis, SAR study, and biological evaluation of a series of piperazine ureas as fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Jan 2013;21(1):28-41. doi:10.1016/j.bmc.2012.11.006
65. Schmid PC, Zuzarteaugustin ML, Schmid HHO. PROPERTIES OF RAT-LIVER N-ACYLETHANOLAMINE AMIDOHYDROLASE. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(26):4145-4149.
66. Cravatt BF, Prosperogarcia O, Siuzdak G, et al. CHEMICAL CHARACTERIZATION OF A FAMILY OF BRAIN LIPIDS THAT INDUCE SLEEP. Article. *Science*. Jun 1995;268(5216):1506-1509. doi:10.1126/science.7770779
67. Maurelli S, Bisogno T, DePetrocellis L, DiLuccia A, Marino G, DiMarzo V. Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'. Article. *Febs Letters*. Dec 1995;377(1):82-86. doi:10.1016/0014-5793(95)01311-3
68. Giang DK, Cravatt BF. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Mar 1997;94(6):2238-2242. doi:10.1073/pnas.94.6.2238
69. Goparaju SK, Kurahashi Y, Suzuki H, Ueda N, Yamamoto S. Anandamide amidohydrolase of porcine brain: cDNA cloning, functional expression and site-directed mutagenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*. Oct 1999;1441(1):77-84. doi:10.1016/s1388-1981(99)00143-2
70. McKinney MK, Cravatt BF. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annual Review of Biochemistry*. 2005;74:411-432. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133450
71. Wei BQQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *Journal of Biological Chemistry*. Dec 2006;281(48):36569-36578. doi:10.1074/jbc.M606646200
72. Labar G, Michaux C. Fatty acid amide hydrolase: From characterization to therapeutics. Review. *Chemistry & Biodiversity*. 2007;4(8):1882-1902. doi:10.1002/cbdv.200790157
73. Arreaza G, Deutsch DG. Deletion of a proline-rich region and a transmembrane domain in fatty acid amide hydrolase. Article;

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Proceedings Paper. *Febs Letters*. Jul 1999;454(1-2):57-60.  
doi:10.1016/s0014-5793(99)00774-7
74. Blankman JL, Cravatt BF. Chemical Probes of Endocannabinoid Metabolism. Review. *Pharmacological Reviews*. Apr 2013;65(2):849-871.  
doi:10.1124/pr.112.006387
75. Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. Nov 1998;265(1410):2081-2085.
76. Howlett AC. Cannabinoid receptor signaling. *Cannabinoids*. Springer; 2005:53-79.
77. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nature Reviews Drug Discovery*. May 2008;7(5):438-455.  
doi:10.1038/nrd2553
78. Willoughby KA, Moore SF, Martin BR, Ellis EF. The biodisposition and metabolism of anandamide in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Jul 1997;282(1):243-247.
79. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical Pharmacokinetics*. 2003;42(4):327-360.  
doi:10.2165/00003088-200342040-00003
80. Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*. Aug 1997;277(5329):1094-1097.  
doi:10.1126/science.277.5329.1094
81. Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, et al. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 2001;98(16):9371-9376.  
doi:10.1073/pnas.161191698
82. Lichtman AH, Shelton CC, Advani T, Cravatt BF. Mice lacking fatty acid amide hydrolase exhibit a cannabinoid receptor-mediated phenotypic hypoalgesia. *Pain*. Jun 2004;109(3):319-327.  
doi:10.1016/j.pain.2004.01.022
83. Bracey MH, Hanson MA, Masuda KR, Stevens RC, Cravatt BF. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*. Nov 2002;298(5599):1793-1796.  
doi:10.1126/science.1076535

## BIBLIOGRAFÍA

---

84. Maccarrone M. Fatty acid amide hydrolase: A potential target for next generation therapeutics. Review. *Current Pharmaceutical Design*. 2006;12(6):759-772. doi:10.2174/138161206775474279
85. Patricelli MP, Lashuel HA, Giang DK, Kelly JW, Cravatt BF. Comparative characterization of a wild type and transmembrane domain-deleted fatty acid amide hydrolase: Identification of the transmembrane domain as a site for oligomerization. *Biochemistry*. Oct 1998;37(43):15177-15187. doi:10.1021/bi981733n
86. Seierstad M, Breitenbucher JG. Discovery and Development of Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Inhibitors. Review. *Journal of Medicinal Chemistry*. Dec 2008;51(23):7327-7343. doi:10.1021/jm800311k
87. Patricelli MP, Cravatt BF. Characterization and manipulation of the acyl chain selectivity of fatty acid amide hydrolase. *Biochemistry*. May 2001;40(20):6107-6115. doi:10.1021/bi002578r
88. Patricelli MP, Cravatt BF. Fatty acid amide hydrolase competitively degrades bioactive amides and esters through a nonconventional catalytic mechanism. *Biochemistry*. Oct 1999;38(43):14125-14130. doi:10.1021/bi991876p
89. Mileni M, Garfinkle J, Ezzili C, Cravatt BF, Stevens RC, Boger DL. Fluoride-Mediated Capture of a Noncovalent Bound State of a Reversible Covalent Enzyme Inhibitor: X-ray Crystallographic Analysis of an Exceptionally Potent alpha-Ketoheterocycle Inhibitor of Fatty Acid Amide Hydrolase. *Journal of the American Chemical Society*. Mar 2011;133(11):4092-4100. doi:10.1021/ja110877y
90. Patricelli MP, Lovato MA, Cravatt BF. Chemical and mutagenic investigations of fatty acid amide hydrolase: Evidence for a family of serine hydrolases with distinct catalytic properties. *Biochemistry*. Aug 1999;38(31):9804-9812. doi:10.1021/bi990637z
91. Patricelli MP, Cravatt BF. Clarifying the catalytic roles of conserved residues in the amidase signature family. *Journal of Biological Chemistry*. Jun 2000;275(25):19177-19184. doi:10.1074/jbc.M001607200
92. McKinney MK, Cravatt BF. Evidence for distinct roles in catalysis for residues of the serine-serine-lysine catalytic triad of fatty acid amide hydrolase. *Journal of Biological Chemistry*. Sep 2003;278(39):37393-37399. doi:10.1074/jbc.M303922200
93. Rubio OH, del Mazo S, Monleon LM, Simon L, Temprano AG, Moran JR. A cleft type receptor which combines an oxyanion hole with electrostatic

## BIBLIOGRAFÍA

---

- interactions. *Organic & Biomolecular Chemistry*. Jun 2017;15(21):4571-4578. doi:10.1039/c7ob00679a
94. Tubert-Brohman I, Acevedo O, Jorgensen WL. Elucidation of hydrolysis mechanisms for fatty acid amide hydrolase and its Lys142Ala variant via QM/MM simulations. *Journal of the American Chemical Society*. Dec 2006;128(51):16904-16913. doi:10.1021/ja065863s
95. Quistad GB, Sparks SE, Segall Y, Nomura DK, Casida JE. Selective inhibitors of fatty acid amide hydrolase relative to neuropathy target esterase and acetylcholinesterase: Toxicological implications. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Feb 2002;179(1):57-63. doi:10.1006/taap.2001.9342
96. Koutek B, Prestwich GD, Howlett AC, et al. INHIBITORS OF ARACHIDONOYL ETHANOLAMIDE HYDROLYSIS. *Journal of Biological Chemistry*. Sep 1994;269(37):22937-22940.
97. Boger DL, Sato H, Lerner AE, et al. Trifluoromethyl ketone inhibitors of fatty acid amide hydrolase: A probe of structural and conformational features contributing to inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Jan 1999;9(2):265-270. doi:10.1016/s0960-894x(98)00734-3
98. Boger DL, Sato H, Lerner AE, et al. Exceptionally potent inhibitors of fatty acid amide hydrolase: the enzyme responsible for degradation of endogenous oleamide and anandamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(10):5044-5049.
99. Mileni M, Garfinkle J, DeMartino JK, Cravatt BF, Boger DL, Stevens RC. Binding and Inactivation Mechanism of a Humanized Fatty Acid Amide Hydrolase by alpha-Ketoheterocycle Inhibitors Revealed from Cocrystal Structures. *Journal of the American Chemical Society*. Aug 2009;131(30):10497-10506. doi:10.1021/ja902694n
100. Bisogno T, Maccarrone M. Latest advances in the discovery of fatty acid amide hydrolase inhibitors. Review. *Expert Opinion on Drug Discovery*. May 2013;8(5):509-522. doi:10.1517/17460441.2013.780021
101. Boger DL, Miyauchi H, Hedrick MP. alpha-Keto heterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase: Carbonyl group modification and alpha-substitution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Jun 2001;11(12):1517-1520. doi:10.1016/s0960-894x(01)00211-6
102. Boger DL, Miyauchi H, Du W, et al. Discovery of a potent, selective, and efficacious class of reversible alpha-ketoheterocycle inhibitors of fatty acid amide hydrolase effective as analgesics. *Journal of Medicinal Chemistry*. Mar 2005;48(6):1849-1856. doi:10.1021/jm049614v

## BIBLIOGRAFÍA

---

103. McDonald AG, Tipton KF. Enzymes: irreversible inhibition. *eLS*. 2012;
104. Tarzia G, Duranti A, Tontini A, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of alkylcarbamic acid aryl esters, a new class of fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. Jun 2003;46(12):2352-2360. doi:10.1021/jm021119g
105. Mileni M, Kamtekar S, Wood DC, Benson TE, Cravatt BF, Stevens RC. Crystal Structure of Fatty Acid Amide Hydrolase Bound to the Carbamate Inhibitor URB597: Discovery of a Deacylating Water Molecule and Insight into Enzyme Inactivation. *Journal of Molecular Biology*. Jul 2010;400(4):743-754. doi:10.1016/j.jmb.2010.05.034
106. Ahn K, Johnson DS, Fitzgerald LR, et al. Novel mechanistic class of fatty acid amide hydrolase inhibitors with remarkable selectivity. *Biochemistry*. Nov 2007;46(45):13019-13030. doi:10.1021/bi701378g
107. Bansal Y, Silakari O. The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012;20(21):6208-6236. doi:10.1016/j.bmc.2012.09.013
108. Preston PN. Synthesis, Reactions, and Spectroscopic Properties of Benzimidazoles. *Chemical Reviews*. 1974;74(3):279-314. doi:10.1021/cr60289a001
109. Majer P, Randad RS. A Safe and Efficient Method for Preparation of N,N'-Unsymmetrically Disubstituted Ureas Utilizing Triphosgene. *The Journal of Organic Chemistry*. 1994/04/01 1994;59(7):1937-1938. doi:10.1021/jo00086a061
110. Eckert H, Auerweck J. Solvent-Free and Safe Process for the Quantitative Production of Phosgene from Triphosgene by Deactivated Imino-Based Catalysts. *Organic Process Research & Development*. 2010/11/19 2010;14(6):1501-1505. doi:10.1021/op100239n
111. Varjosaari SE, Suating P, Adler MJ. One-Pot Synthesis of O-Aryl Carbamates. *Synthesis*. 17.12.2015 2016;48(01):43-47. doi:10.1055/s-0035-1560726
112. Villalpando A, Saputra MA, Tugwell TH, Kartika R. Triphosgene-Pyridine Mediated Stereoselective Chlorination of Acyclic Aliphatic 1,3-Diols(). *Chemical communications (Cambridge, England)*. 2015;51(81):15075-15078. doi:10.1039/c5cc06365e
113. Long JZ, Nomura DK, Vann RE, et al. Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in

## BIBLIOGRAFÍA

---

- vivo. 10.1073/pnas.0909411106. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(48):20270.
114. Mileni M, Johnson DS, Wang Z, et al. Structure-guided inhibitor design for human FAAH by interspecies active site conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(35):12820-12824. doi:10.1073/pnas.0806121105
115. Romero-Parra J, Mella-Raipán J, Palmieri V, et al. Synthesis, binding assays, cytotoxic activity and docking studies of benzimidazole and benzothiophene derivatives with selective affinity for the CB2 cannabinoid receptor. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;124:17-35.
116. Espinosa-Bustos C, Lagos CF, Romero-Parra J, et al. Design, Synthesis, Biological Evaluation and Binding Mode Modeling of Benzimidazole Derivatives Targeting the Cannabinoid Receptor Type 1. *Archiv der Pharmazie*. 2015/02/01 2015;348(2):81-88. doi:10.1002/ardp.201400201