



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE
NUEVOS DERIVADOS PIPERAZINIL
BENZO[b]TIOFENOS CON POTENCIAL AFINIDAD
SEROTONINÉRGICA POR EL RECEPTOR 5-HT_{1A}**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al Grado Académico de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

por

NADIA BETSABÉ RON HIGUERA

Director de Tesis: Dr. Hernán Armando Pessoa Mahana

SANTIAGO-CHILE

Noviembre, 2008

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

NADIA BETSABÉ RON HIGUERA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas, en el examen de defensa de tesis rendido el día ____ de _____ de 2008

Director de Tesis

Dr. Hernan Pessoa Mahana

Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Luis Núñez Vergara

Dr. Jaime Valderrama Guerrero

Dr. Claudio Saitz Barría

PUBLICACIONES

H. Pessoa-Mahana*, Johann Kosche C., **Nadia Ron H.**, Gonzalo Recabarren G., Claudio Saitz B., Ramiro Araya M., and C. David Pessoa-Mahanna. “**Solvent-free microwave synthesis of 3-(4-benzo[*b*]thiophene-2-carbonyl)-1-piperaziny-1-benzo[*b*]thiophene-2-yl-1-propanones. New hetero bis-ligands with potencial 5-HT_{1A} serotonergic activity**”. Heterocycles, volumen 75, 8, **2008**.

Manuscrito en preparación

Hernán Pessoa-Mahana*, Marcos González C.¹, Marcelo González S.², C. David Pessoa-Mahana². Ramiro Araya- Maturana¹, **Nadia Ron H.** and Claudio Saitz B¹. “**Microwave-promoted Michael addition of some aza-nucleophiles to 1-(4,7-dimethoxy benzo[*b*]thio-phen-2-yl)-2-propen-1-one**”.

PRESENTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

Ron-Higuera, N., Kosche-Cárcamo, J., Recabarren-Gajardo, G., Pessoa-Mahanna, H., “**Microwave assisted synthesis of new 1-benzo[*b*]thiophene-2-carboxamide long chain arylpiperazine derivatives. Potential 5-HT_{1A} receptor ligands**”. 12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 27 - 31 de Agosto de **2007**, Plaza Itapema Resort, Itapema, SC, Brasil.

PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES

Hernán Pessoa Mahana*, **Nadia Ron H.**, Johann Kosche C., Gonzalo Recabarren G., Gerald Zapata T., Ramiro Araya Maturana, C.David Pessoa Mahana y C.Saitz B. “**Síntesis asistida por microondas y ensayos de afinidad al receptor 5-HT_{1A} de nuevos derivados de 3-[4-(benzotiofeno-2-carbonil)-1-piperazi-nil-2-benzotiofenil-1-propanona**” (oral), XXVII Jornadas Chilenas de Química, 20 – 23 Noviembre de **2007**, Termas de Chillan, Chile.

Nadia Ron Higuera. H. Pessoa-Mahana*; “**Síntesis y evaluación farmacológica de nuevos derivados arilpiperazinilmetil benzo[*b*]tiofenos con potencial afinidad**”

serotonérgica por el receptor 5-HT_{1A}”, Feria de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 19 de Agosto de **2008**, Facultad de Ciencias Química, Santiago de Chile.

Con mucho cariño a mis padres; Martha y Homero

*Todos mis éxitos en esta vida atribuyo a la enseñanza moral e intelectual
que recibí de ustedes, gracias por su amor incondicional, por su
comprensión, y sus consejos, han sido mi inspiración.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme terminar este camino, por darme valor, perseverancia y fuerza para afrontarlo en los momentos difíciles, y capacidad para disfrutarlo en los momentos felices.

A mis padres, Martha y Homero, porque cada uno, en su momento, buscó lo mejor para mí y me hizo una persona con valores y principios para toda la vida.

A mi querido hermano y amigo, Byron, por ser mi ángel y estar en los momentos que más lo necesito.

A mis queridos ñaños Paula Molina y Juanito Ugrin, por su cariño, por cuidarme, ayudarme y alentarme siempre, por ser mis amigos y consejeros, por compartir conmigo penas y alegrías, y sobre todo por hacerme parte de su linda familia.

A mi Director de Tesis Dr. Hernán Pessoa Mahana, por aceptar ser mi tutor y confiar en mi trabajo aún sin conocerme, ha sido para mí un gran maestro, gracias por sus enseñanzas, orientación, paciencia y motivación.

Al Dr. Ramiro Araya, su calor humano enriquece.

A la comisión evaluadora de la Tesis, por sus comentarios y consejos en relación con este trabajo, que enriqueció la visión crítica del mismo.

A los compañeros del laboratorio de Mecanismos de Reacción: Oney Ramírez por su ayuda constante y desinteresada, Christian González, Ignacio Cuevas, Marcos González, Johann Kosche, y Jorge Toledo, por su apoyo y por hacer más agradable el trabajo en el laboratorio. Así como también a Gonzalo Recabarren por su ayuda y orientación, especialmente en la realización de los ensayos de competencia y discusión de los resultados.

A mis dos amigos Elizabeth Chulde y Alex Clavijo, estaré eternamente agradecida, para mi son los mejores compañeros que se puede tener, con su motivación, cariño y optimismo me han ayudado en momentos críticos, para ellos, muchas gracias por todo.

A las secretarias de postgrado, Gladys Urzúa y Miriam Salazar, y a Héctor Bravo por su amabilidad y disposición a coordinar todos los aspectos formales de esta tesis.

Finalmente agradezco al Proyecto Fondecyt 1050289, Investigador responsable: Dr Hernán Pessoa

INDICE DE MATERIAS

	INDICE DE MATERIAS	ii
	INDICE DE FIGURAS	vi
	INDICE DE ESQUEMAS	viii
	ABREVIATURAS	x
	RESUMEN	xii
	ABSTRACT	xiv
1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Neuroquímica de la depresión.....	2
1.2.	Receptores serotoninérgicos.....	3
1.3.	Farmacoterapiaantidepresiva.....	5
1.3.1.	Antidepresivos de primera generación.....	5
1.3.1.1.	Antidepresivos tricíclicos.....	5
1.3.1.2.	Inhibidores de la mono-amino oxidasa (IMAOs).....	6
1.3.2.	Antidepresivos de segunda generación.....	7
1.3.2.1.	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina	7
1.3.3.	Tendencias y desafíos actuales en el diseño de nuevos antidepresivos.....	9
1.3.3.1.	Agonistas/Antagonistas del Receptor 5-HT _{1A} – Inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT	9
1.3.3.1.1.	Familia de las Aminotetralinas: 8-OH-DPAT.....	10
1.3.3.1.2.	Arilpiperazinas de cadena larga.....	10
1.3.3.1.3.	Familia de las Indolalquilaminas.....	13
1.4.	Hipótesis.....	16
1.5.	Objetivos.....	17

1.5.1	Objetivo General.....	17
1.5.2.	Objetivos Específicos.....	17
2.	MATERIALES Y EQUIPOS.....	18
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
3.1.	Síntesis.....	21
3.1.1.	Síntesis de 3-[4-(4,7-dimetoxi-benzo[<i>b</i>]tiofen-2-carbonil)-1-piperazinil] 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[<i>b</i>]tiofenil)-1-propanona (I)	21
3.1.1.1.	Síntesis de 1-[(4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]Piperazina.....	22
3.1.1.2.	Síntesis de (4,7-dimetoxi-benzo[<i>b</i>]tiofenil)-1- propanona.....	27
3.1.1.3.	Adición de Michael de Piperazino benzotiofeno (7) sobre benzotiofen enona (11)	31
3.1.2.	Síntesis de 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[<i>b</i>]tiofenil)-3-[4-(4,7-dimetoxi -2 -benzo[<i>b</i>]tiofenilmetil)-1-piperazinil]-1-propanona (II)	33
3.1.2.1.	Síntesis del 4,7-dimetoxi-benzo[<i>b</i>]tiofenpiperazino (12)	33
3.1.2.2.	Adición de Michael del derivado piperazino benzotiofeno (12) sobre la benzotiofen enona (11)	35
3.1.3.	Síntesis de 3-[4-(benzo[<i>b</i>]tiofen-2-carbonil)-1-piperazinil]-1- (4,7dimetoxi -2- benzo[<i>b</i>]tiofenil)- 1-propanona (III)	36
3.1.3.1.	Benzo [<i>b</i>]tiofen piperazino carboxamida (17)	36
3.1.3.2.	Adición de Michael del derivado piperazino benzotiofeno (17) sobre la benzotiofen enona (11)	37
3.1.4.	Obtención de 5 y 6-cloro-derivados del cloruro de 4,7- dimetoxibenzotiofen carbonilo (5)	38
3.2.	Estudios de Radioligandos	45
3.2.1.	Ensayos de saturación.....	46
3.2.2.	Determinación de IC ₅₀ para 8-OH-DPAT.....	49

3.2.3.	Ensayos de competencia de los ligandos I, II, III y IV.....	51
3.2.4.	Estudio de las relaciones estructura-actividad de los compuestos I, II, III y IV.....	53
3.2.5.	Diseño de drogas. Estrategias y Avances	55
3.2.5.1.	Docking.....	56
3.2.5.2.	Técnicas QSAR y métodos de modelamiento molecular.....	56
3.2.5.3.	Bioisosterismo.....	57
4.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	59
4.1.	Síntesis.....	59
4.1.1.	3,6-Dimetoxi-2-nitrobenzaldehído.....	59
4.1.2.	4,7-Dimetoxi-1-benzo[<i>b</i>]tiofen-2-carboxilato de metilo.....	60
4.1.3.	Ácido 4,7-dimetoxi-benzo[<i>b</i>]tiofen-2-carboxílico.....	60
4.1.4.	Obtención del cloruro de 4,7-dimetoxi-benzo[<i>b</i>]tiofen-2-carbonilo.....	61
4.1.5.	4-(4,7-Dimetoxi-benzo[<i>b</i>]tiofeno-2-carbonil)- <i>N</i> -Boc-1-piperazina.....	62
4.1.6.	1-[(4,7-Dimetoxi-1-benzo[<i>b</i>]tiofeno-2-il)carbonil] piperazina.....	62
4.1.7.	(4,7-Dimetoxi-1-benzotiofen-il) metanol.....	63
4.1.8.	4,7-Dimetoxibenzo[<i>b</i>]tiofen-2-carboxaldehído	64
4.1.9.	1-(4,7-Dimetoxi benzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-2-propen-1-ol.....	65
4.1.10.	1-(4, 7-Dimetoxi benzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-2-propen-1-ona.....	65
4.1.11.	Reducción del derivado 1-[(4,7-Dimetoxi-1-benzo[<i>b</i>]tiofeno-2-il) carbonil]piperazino.....	66
4.1.12.	2- Metoxicarbonil Benzo[<i>b</i>]tiofeno.....	67
4.1.13.	Acido Benzo[<i>b</i>]tiofen-2-carboxílico.....	68
4.1.14.	Cloruro de benzo[<i>b</i>]tiofen-2-carbonilo.....	69
4.1.15.	<i>ter</i> -Butil 4-(1-benzo[<i>b</i>]tiofeno-2-il-carbonil) piperazina -1-carboxilato	69

4.1.16.	1-(1- Benzo[b]tiofeno-2-il-carbonil) piperazina.....	70
4.1.17.	Síntesis de 3-[4-(4,7-Dimetoxi-benzo[b]tiofen-2-carboxo)- 1-piperazinil]-1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[b]tiofenil)-1-propanona (I).....	71
4.1.18.	Síntesis de 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[b]tiofenil)-3-[4-(4,7-dimetoxi-2-benzo[b]tiofenilmetil) -1-piperazinil]-1-propanona (II).....	72
4.1.19.	Síntesis de 3-[4-(Benzo[b]tiofen-2-carbonil)-1-piperazinil]- 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[b]tiofenil)- 1-propanona (III).....	73
4.1.20	<i>tert</i> -Butil 4-[(5 y 6-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil] piperazina-1-carboxilato (18-a) y (18-b)	74
4.1.21.	1-[(5) y(6)-Cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazina 19(a) y 19(b).....	75
4.1.22.	3-{4-[(5 / 6-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazin-1-il}-1-(4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)1- propanona. IV (20 a y b).....	76
4.2.	Ensayos de Unión con Radioligandos.....	78
4.2.1.	Adquisición del radioligando estándar.....	78
4.2.2.	Preparación de las membranas	78
4.2.3.	Cuantificación de proteínas.....	79
4.2.4.	Determinación de la Constante de Disociación (K_D) y Unión Máxima ($B_{máx}$) para [3H]-8-OH-DPAT.....	79
4.2.5.	Determinación de IC_{50} para 8-OH-DPAT.....	80
4.2.6.	Ensayo de competencia.....	80
5.	CONCLUSIONES	82
6.	BIBLIOGRAFÍA	83
7.	ANEXOS	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Estructura química de catecolaminas.....	2
Figura 1.2.	Estructura putativa del relector 5HT _{1A}	4
Figura 1.3.	Modelo de Neurotransmisión.....	5
Figura 1.4.	Estructura de antidepresivos tricíclicos.....	5
Figura 1.5.	Estructura química de Iproniazida.....	6
Figura 1.6.	Estructura química de Moclobemida.....	7
Figura 1.7.	Estructura química de Inhibidores selectivos de recaptación de serotonina.....	8
Figura 1.8.	Estructura química de Reboxetina.....	9
Figura 1.9.	Estructura 8-hidroxi-2- <i>N,N</i> -dipropilaminotetralina (8-OH-DPAT).....	10
Figura 1.10.	Estructura química de Buspirona.....	11
Figura 1.11.	Estructura química de Flesinoxan.....	11
Figura 1.12.	Estructura general de arilpiperazinas de Monge.....	11
Figura 1.13.	Estructura de derivados de benzo[<i>b</i>]tiofen arilpiperazinil.....	12
Figura 1.14.	Derivados dicetopiperazinas. Estructuras de Lopez – Rodríguez.....	12
Figura 1.15.	Estructura de moléculas híbridas. ISRS/antagonistas 5HT _{1A}	13
Figura 1.16.	Estructura química de Vilazodone.....	14
Figura 1.17.	Avance terapéutico de fármacos antidepresivos.....	15
Figura 3.1.	Espectro de RMN del 1-(4,7-Dimetoxi benzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-2- propen-1-ol.....	29
Figura 3.2.	Espectro de RMN del 1-(4, 7-Dimetoxi benzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-2- propen-1-ona.....	30

Figura 3.3.	Curva de saturación para [^3H]-8-OH-DPAT.....	47
Figura 3.4.	Análisis de Scatchard para [^3H]-8-OH-DPAT.....	48
Figura 3.5.	Curva de competencia homóloga de 8-OH-DPAT.....	50

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 3.1.	Esquema retrosintético para la obtención del compuesto (I) 3-[4-(4,7-dimetoxi-benzo[<i>b</i>]tiofen-2-carboxo)-1-piperazinil]-1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[<i>b</i>]tiofenil)-1-propanona.....	21
Esquema 3.2.	Ruta sintética para la obtención del precursor 1-[(4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il) carbonil] piperazina (7)	22
Esquema 3.3.	Reacción de nitración del 2,5-dimetoxibenzaldehído.....	23
Esquema 3.4.	Mecanismo probable de nitración del 2,5-dimetoxi-benzaldehído.....	23
Esquema 3.5.	Mecanismo de reacción para la obtención del 4,7-dimetoxi-1-benzotiofen-2-carboxilato de metilo (3)	24
Esquema 3.6.	Síntesis de 4-(4,7-dimetoxi-benzo[<i>b</i>]tiofeno-2-carbonil)- <i>N</i> -Boc-1-piperazina (6)	25
Esquema 3.7.	Síntesis de <i>N</i> -benzotiofen caboxamida (7)	26
Esquema 3.8.	Mecanismo de hidrólisis del derivado <i>N</i> -Boc piperazina (6)	26
Esquema 3.9.	Mecanismo de hidrólisis del semiester <i>ter</i> -butílico del ácido carbónico.....	27
Esquema 3.10.	Ruta sintética para la obtención del precursor (4,7-dimetoxi-benzo [<i>b</i>]tiofenil)-1- propenona (11)	28
Esquema 3.11.	Reacción de adición de Michael asistida por microondas para la obtención del compuesto I	32
Esquema 3.12.	Esquema retrosintético para la obtención del compuesto (II) 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[<i>b</i>]tiofenil)-3-[4-(4,7-dimetoxi-2-benzo [<i>b</i>]tiofenilmetil)-1-piperazinil]-1-propanona.....	33
Esquema 3.13.	Reacción de reducción del derivado 1-[(4,7-Dimetoxi-1-benzo[<i>b</i>]tiofeno-2-il) carbonil] piperazino (7)	33
Esquema 3.14.	Estructuras de los derivados 12A y 12B	34

Esquema 3.15.	Reacción de adición de Michael asistida por microondas para la obtención del compuesto II	35
Esquema 3.16.	Esquema retrosintético para la obtención del compuesto (III) 3-[4-(benzo[<i>b</i>]tiofen-2-carboxo)-1-piperazinil]-1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[<i>b</i>]tiofenil)- 1-propanona.....	36
Esquema 3.17.	Ruta sintética para la obtención del precursor benzo [<i>b</i>]tiofen piperazino carboxamida (17)	37
Esquema 3.18.	Reacción de adición de Michael asistida por microondas para la obtención del compuesto III	37
Esquema 3.19.	Ruta sintética para la obtención de los derivados clorados 18 a, 18 b, 18 c	39
Esquema 3.20.	Método computacional de cálculo para estimar la densidad de carga sobre los átomos de carbono en la estructura optimizada del derivado (5)	41
Esquema 3.21.	Mecanismo de sustitución aromática electrofílica por reacción de SOCl ₂ sobre el sistema aromático.....	42
Esquema 3.22.	Mecanismo de sustitución aromática electrofílica por reacción de Cl ₂ sobre el sistema aromático.....	43
Esquema 3.23.	Reacción de Hidrólisis del derivado clorado <i>N</i> -Boc-piperazina (18a,b)	44
Esquema 3.24.	Reacción de adición de Michael asistida por microondas para la obtención de los compuestos IV(a,b)	44

ABREVIATURAS

5-HT	5- Hidroxitriptamina
LCR	Líquido céfalo raquídeo
IMAO	Inhibidor de la mono amino oxidasa
MAO	Enzima Mono amino oxidasa
ISRS	Inhibidor selectivo de la recaptación de la serotonina
ISRN	Inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina
[³ H]	Tritio
8-OH-DPAT	8-Hidroxi-2-(<i>N,N</i> -di- <i>n</i> -propilamino)tetralina
Asp	Acido aspártico
PCC	Clorocromato de piridinio
DMSO	Dimetil sulfóxido
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
DMF	Dimetilformamida
THF	Tetrahidrofurano
Boc	<i>t</i> -butoxicarbonilo
B _{max}	Número máximo de receptores
IC ₅₀	Concentración de inhibidor que produce el 50% del efecto
K _d	Constante de disociación
K _i	Constante de inhibición
BCA	Ácido Bicinconínico
Ci	Curie
fmol	Femtamol

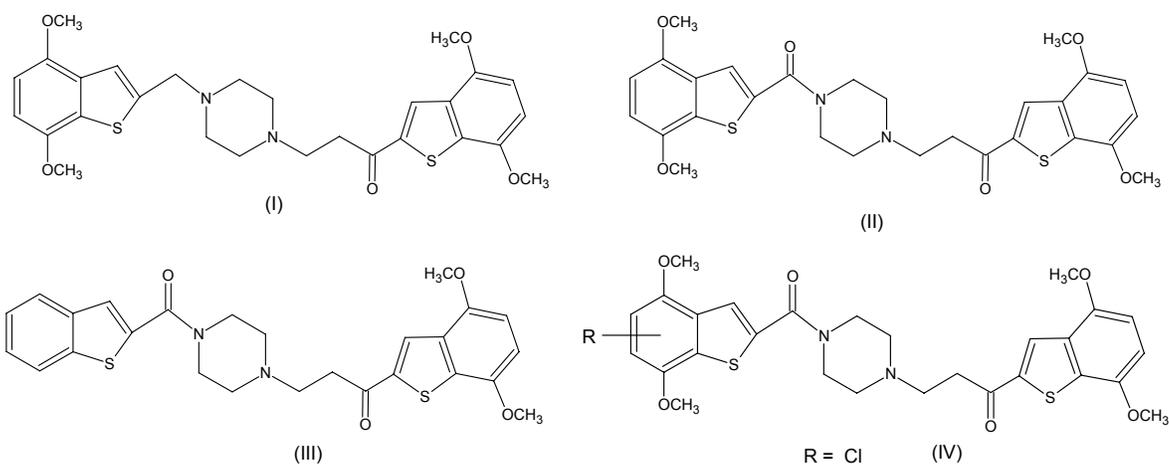
mM	Milimolar
mmol	Milimol
nM	Nanomolar
μ M	Micromolar
PEI	Polietilenimina
POPOP	1,4-Bis(5-fenil-2-oxazolil)benceno(fluoróforo secundario)
PPO	2,5-Difeniloxazol (fluoróforo primario)
RFC	Fuerza centrífuga relativa
rpm	Revoluciones por minuto
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

La depresión constituye un trastorno del estado anímico, que se expresa con una pérdida manifiesta del interés o de las actividades placenteras del vivir, atribuidas fundamentalmente a una alteración en la neurotransmisión serotoninérgica.

En esta tesis, se abordó la síntesis y ensayos farmacológicos exploratorios de nuevos derivados de piperazinil benzo[*b*]tiofenos como potenciales ligandos del receptor serotoninérgico 5HT_{1A}.

Específicamente, se sintetizaron los derivados (I), (II) y (III), por reacción de adición de Michael asistida por microondas de derivados de benzotiofenopiperazinas sobre el aceptor de Michael: 1-(4,7-dimetoxibenzo[*b*]tiofen-2-il)-2-propen-1-ona.



Los compuestos I, II y III fueron obtenidos con buenos rendimientos (75 – 86%) y en cortos periodos de reacción. La afinidad de los nuevos compuestos sintetizados por los receptores serotoninérgicos, fueron evaluados *in vitro* mediante ensayos de competencia frente al radioligando ³[H]-8-OH-DPAT en homogenizado de corteza cerebral de rata. Todos los ligandos estudiados desplazaron menos del 50% de la unión, a la concentración establecida de 1 μ M, exhibiendo una afinidad moderada

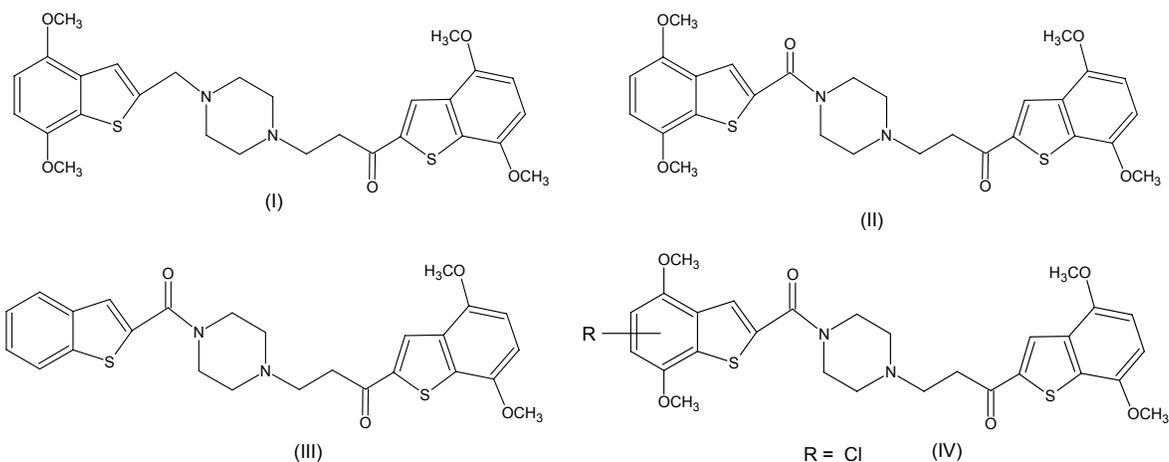
por el sitio de unión para los compuestos I= 32%, II = 14% y III = 39% y una baja afinidad para el compuesto IV = 1.6%, en comparación con el 92% de desplazamiento de la unión que exhibió el ligando 8-OH-DPAT a la misma concentración.

ABSTRACT

Depression is a common mental disorder consisting in depressed mood with a lack of interest and pleasure in activities of daily living and mainly attributed to a disorder in the serotonergic neurotransmission.

The present thesis encompassed the synthesis and pharmacological assays of new piperazinyl benzothiophenes as potential 5-HT_{1A} receptor ligands.

The synthesized compounds (I), (II), (III), were obtained by a microwave – assisted Michael addition reaction of piperazine benzothiophenes in the presence of 1-(4,7-dimethoxybenzo[*b*]thiophen-2-yl)-2-propen-1-one acting as Michael's acceptor.



Compounds (I-III), were obtained in good yield (75-86%), with short reaction times. The affinity of the new compounds, was evaluated *in vitro* through radioligand binding assays, carried out in homogenized rat cerebral cortex, using ³[H]-8-OH-DPAT as standard radioligand. The studied compounds showed a moderate affinity I: 32%, II = 14% y III = 39% and 1.6% (IV) against the 92% displacement exhibited for the 8-OH-DPAT.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neuropsiquiátricas son una causa importante de discapacidad, ocupando cada vez un lugar principal en la patología humana. Entre ellas, la depresión se ha convertido en la cuarta condición médica en importancia en relación a los años de vida perdidos por muerte prematura o vividos con una discapacidad severa y de larga duración según la Organización Mundial de la Salud (OMS), proyectando que para el año 2020 será la primera causa de baja laboral en los países desarrollados y la segunda enfermedad más frecuente en el mundo.¹

Depresión viene del latín *depressus*, que significa "abatido", "derribado", es un trastorno emocional que se presenta como un estado de abatimiento e infelicidad que puede ser transitorio o permanente. La Organización Panamericana de la Salud (2006) definió depresión como "un desorden mental común que se manifiesta como estados de ánimo deprimido, con pérdidas de interés o del placer por vivir, sentimientos de culpa o baja autoestima, alteraciones del sueño o del apetito y baja capacidad de concentración". Todos estos síntomas pueden tener importantes consecuencias sociales y personales, desde la incapacidad laboral hasta el suicidio.¹

La depresión se caracteriza por aflicción, malestar, desesperación, sensación de culpa, apatía, indecisión, disminución de la energía y cansancio, cambios en el patrón del sueño, pérdida del apetito e ideas de suicidio².

Los desórdenes depresivos agrupan una diversa variedad de síndromes, incluyendo depresión unipolar (depresión mayor y distimia), desórdenes de ajuste, depresión subsindromal (depresión menor), desórdenes afectivos estacionales, desorden disfórico premenstrual, depresión postparto, depresión atípica y desórdenes bipolares. Las causas de la depresión son multifactoriales, incluyendo aspectos hereditarios, medioambientales o eventos traumáticos, los cuales predisponen o gatillan episodios depresivos, aunque se acepta que desórdenes neuroquímicos son finalmente responsables de la aparición de síntomas depresivos.^{3,4}

1.1. Neuroquímica de la depresión

Las primeras hipótesis acerca de la etiología de la depresión se enfocaron en los sistemas monoaminérgicos. Es así como se planteó que la depresión se originaría principalmente por un déficit en la neurotransmisión vinculada a catecolaminas (Fig.1.1.), tal como: norepinefrina, epinefrina, y dopamina.⁵ Sin embargo esta teoría lentamente comenzó a debilitarse, ya que no era capaz de explicar algunos hechos, como por ejemplo: i) hay drogas (cocaína y anfetaminas) que pueden incrementar la disponibilidad funcional de monoaminas y no tienen ningún efecto en el estado de ánimo de los pacientes depresivos, ii) no todos los pacientes depresivos responden de igual forma al mismo antidepresivo, iii) los antidepresivos atípicos como la mianserina, producen su efecto sin actuar sobre los sistemas monoaminérgicos, y iv) existe un retraso terapéutico de dos semanas entre los efectos neuroquímicos de los antidepresivos y el comienzo de su efecto terapéutico.⁶

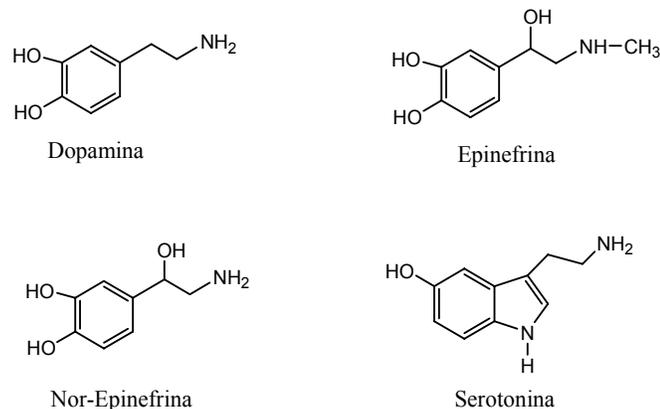


Figura 1.1. Estructura química de catecolaminas

Aunque se ha documentado la participación de estos neurotransmisores en la patogénesis de la depresión, es improbable que los mecanismos relacionados con las monoaminas sean los únicos responsables de los síntomas depresivos. Hoy se asume que la **serotonina** (5-hidroxitriptamina, 5-HT) cumple un papel clave en la expresión de varias de las conductas asociadas con este trastorno, postulándose con mayor certeza que el déficit de la actividad serotoninérgica aumenta la vulnerabilidad en el

desarrollo de la depresión mayor. Esta hipótesis se apoya en el hallazgo de anomalías de la función serotoninérgica a nivel pre y postsináptico en el paciente deprimido. Así, se ha comprobado: i) una disminución de los niveles de triptófano plasmático, ii) niveles de su producto metabólico ácido 5-hidroxi-indolacético en LCR (líquido cefalorraquídeo) disminuidos, iii) disminución de la captación de serotonina a nivel de las plaquetas, con respecto a los receptores serotoninérgicos (en depresión mayor), iv) se ha observado así mismo una sensibilización del receptor 5-HT_{1A}, y un aumento de la fijación, la respuesta funcional y del número de receptores 5-HT_{2A}, y 5-HT_{2C}^{7, 8}

Actuales estudios en el ámbito de la química medicinal, han abordado esta deficiente neurotransmisión serotoninérgica bajo dos alternativas farmacológicas:

1. Aumentar la concentración del ligando natural en el espacio sináptico, inhibiendo su recaptura e impedir su posterior metabolismo (Inhibidores de la recaptación).
2. Emular las acciones farmacológicas de serotonina a través de la obtención de compuestos agonistas totales o parciales que actúen selectivamente a nivel del receptor 5HT_{1A}.

1.2. Receptores serotoninérgicos

Actualmente, se reconocen siete tipos de receptores serotoninérgicos 5HT (1-7) que contienen a su vez catorce distintos subtipos; agrupados sobre la base de su secuencia aminoacídica, propiedades farmacológicas y rutas de transducción de señales. Todos los receptores están acoplados a proteína G, excepto el 5HT₃, que es un receptor operado por canales de Na⁺ /K⁺ ^{9,10}

En los años 90, Blier y de Montigny ¹¹ involucraron al receptor 5HT_{1A} (Fig. 1.2.) en el mecanismo responsable de la actividad antidepresiva.

Este receptor posee una estructura terciaria formada por 7 dominios transmembranales con sitios para glicosilación dentro de la región N-terminal

extracelular y sitios para fosforilación a nivel del tercer *loop* (lazo) intracelular¹². Este receptor no ha sido cristalizado aún, por lo que los estudios teóricos de modelación se basaban hasta el año pasado en los modelos de rodopsina bovina como templatado estructural, aunque recientemente Cherezov¹³ ha informado de la cristalización de un adrenoceptor β_2 en presencia de carazolol, lo que por el momento permitirá mejores aproximaciones en la modelación receptorial.

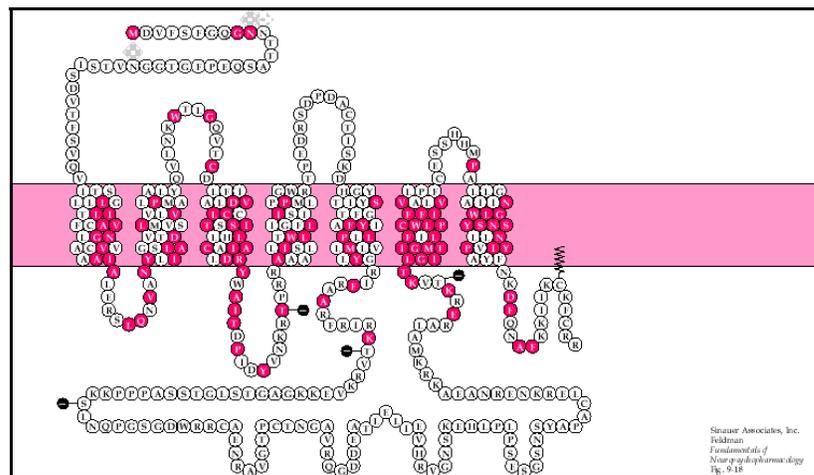


Figura 1.2. Estructura putativa del receptor 5-HT_{1A}, los aminoácidos coloreados indican residuos en común con el receptor β_2 -adrenérgico. Las marcas de diamante indican posibles sitios de glicosilación, las cargas negativas corresponden a sitios de fosforilación

Este receptor es uno de los más estudiados, se halla constituido por una cadena de 421 aminoácidos, codificados por el cromosoma 5 (humano), se encuentra expresado en el Sistema Nervioso Central (SNC), con una alta densidad en el núcleo rafe dorsal y medial, también en el hipocampo, septum, núcleo estriado y la corteza frontal.¹⁴

A nivel del núcleo rafe dorsal, estos receptores están ubicados presinápticamente como autorreceptores somatodendríticos (Fig. 1.3.) modulando la liberación de serotonina, a través de un mecanismo feed-back (-), en las regiones corticales y límbicas, el receptor 5-HT_{1A} se le encuentra postsinápticamente donde atenúa y regula la actividad neurotransmisora.¹⁵

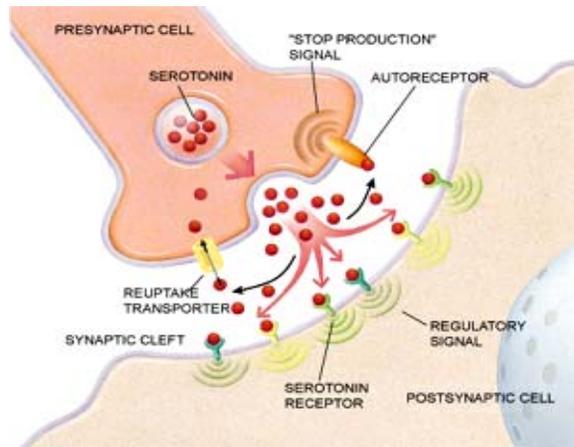


Figura 1.3. Modelo de Neurotransmisión

1.3. Farmacoterapia antidepresiva.

1.3.1. Antidepresivos de primera generación.

1.3.1.1. Antidepresivos tricíclicos

Los primeros antidepresivos que mostraron cierta eficacia fueron la imipramina y la amitriptilina (Fig. 1.4.) y desde principios de 1960 fueron utilizados en el tratamiento de la depresión mayor. El mecanismo de acción de esta familia incluye la inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina, sin embargo actúan como antagonistas post sinápticos de los receptores α_1 , histamina (H_1) y $5HT_2$.¹⁶

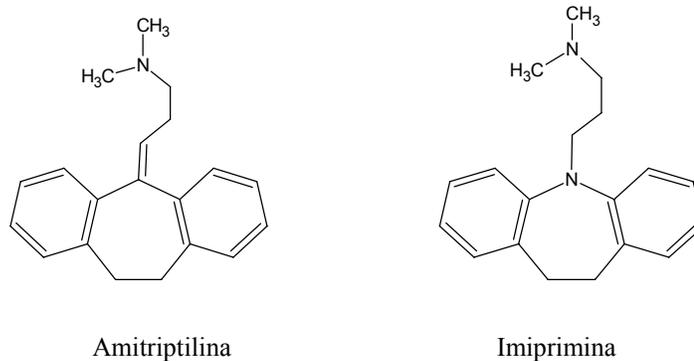


Figura 1.4. Estructura de antidepresivos tricíclicos

Esta poca especificidad generó su reemplazo por nuevas drogas, debido principalmente a sus indeseables efectos colaterales como son: cardiotoxicidad, sequedad de boca, visión borrosa, hipotensión postural, sedación, aumento de peso, lo que ha afectado el cumplimiento por parte del paciente y ha disminuido su aceptación del tratamiento.¹⁷

1.3.1.2. Inhibidores de la Monoamino oxidasa (IMAOs)

En 1951, al estudiar compuestos para el tratamiento de la tuberculosis como fueron la isoniazida y la iproniazida (Fig. 1.5.), se observó que la iproniazida producía efectos benéficos en el ánimo de los pacientes tuberculosos. En 1952 Zeller y colaboradores descubrieron que la iproniazida a diferencia de la isoniazida, era capaz de inhibir a la enzima monoaminoxidasa (MAO) encargada de metabolizar en el organismo bioaminas y xenobióticos.¹⁶

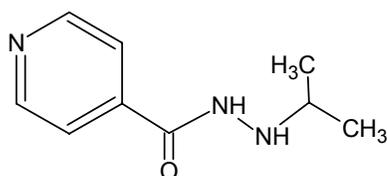


Figura 1.5. Estructura química de la Iproniazida

Posteriores estudios han determinado que la enzima monoamino oxidasa (MAO) posee dos isoformas principales la MAO_A y la MAO_B, que difieren en cuanto a la preferencia que muestran por distintos sustratos; la inhibición de la forma MAO_A se correlaciona mejor con la eficacia antidepresiva.

La inhibición de la isoenzima MAO-B impide el metabolismo de tiramina, que es un aminoácido que actúa como un simpaticomimético indirecto, provocando la liberación de noradrenalina por las terminaciones nerviosas, lo que puede desencadenar severas crisis hipertensivas, así como también cefalea, midriasis, diaferesis y palpitaciones. Otros efectos secundarios asociados con el uso de IMAO

irreversibles son efectos en el SNC (insomnio, irritabilidad, etc), disfunciones cardiovasculares, etc. Esto llevó al desarrollo de inhibidores reversibles de la monoamina oxidasa A, como la moclobemida (Fig. 1.6.), que parece tener eficacia clínica y menor capacidad para potenciar las acciones presoras de la tiramina que los inhibidores no selectivos de la MAO.¹⁸

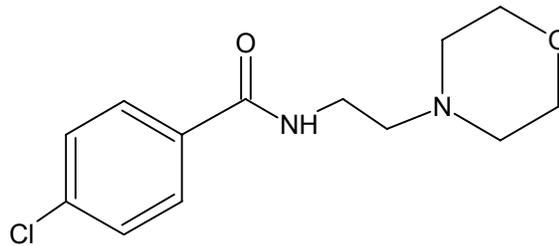


Figura 1.6. Estructura química de Moclobemida

1.3.2. Antidepresivos de segunda generación

En el afán de conseguir nuevos fármacos antidepresivos con un mayor nivel de eficacia y mejor tolerancia que los antidepresivos clásicos, se han sintetizado una amplia gama de moléculas con variadas estructuras químicas, algunas de ellas exhiben un perfil toxicológico más aceptable especialmente desde el punto de vista cardiovascular y vegetativo, así como una mayor seguridad en la sobre dosificación, pero no están exentos de efectos adversos particulares.¹⁹

1.3.2.1. Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) se introdujeron como fármacos a fines de los 80's, son indudablemente más seguros ya que carecen del efecto bloqueante muscarínico, bloqueante de receptores histaminérgicos H₁ y bloqueante α₁ adrenérgico que conducen a la emergencia de

sintomatología colateral en el tratamiento antidepresivo clásico. Esta selectividad por el receptor serotoninérgico tiene numerosas ventajas, incluyendo la menor toxicidad en los casos de sobredosificación y se han posicionado como las drogas antidepresivas de elección a nivel mundial para el tratamiento de cuadros depresivos.

Entre los principales ISRS usados en el tratamiento de la depresión incluye: sertralina, fluvoxamina, fluoxetina, paroxetina, citalopram (Fig. 1.7.)²⁰

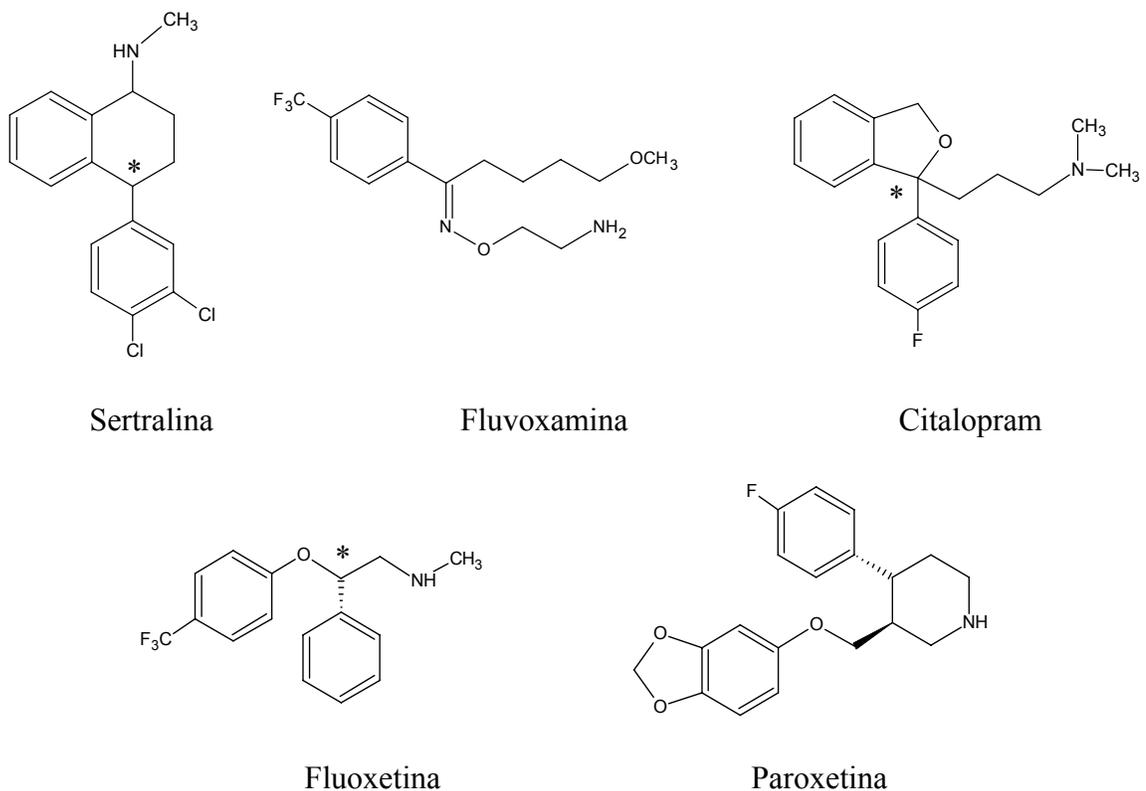


Figura 1.7. Estructura química de inhibidores selectivos de recaptación de serotonina

La desventaja de estos fármacos al igual que los agonistas parciales (buspirona) es que exhiben un inicio tardío de su efecto terapéutico (2 semanas), además de algunos efectos secundarios (disfunción sexual, náuseas, anorexia). Esta

desventaja terapéutica se generaría por una elevación inicial de serotonina extracelular en el núcleo rafe (producto de una inhibición del transporte en el caso de los recaptadores y producto de un agonismo parcial en el caso de buspirona), en el que inhibiría la actividad de las neuronas serotoninérgicas, por un mecanismo de feedback o retroalimentación negativa originado por activación de los autorreceptores somatodendríticos presinápticos $5HT_{1A}$. Después del tratamiento sostenido con un ISRS, los receptores $5HT_{1A}$ somatodendríticos llegan a desensibilizarse, restaurando la actividad de las neuronas serotoninérgicas y el incremento de serotonina extracelular². Estos fueron seguidos a fines de la década de los 90's por el altamente selectivo inhibidor de recaptación de noradrenalina (ISRN) la reboxetina (Fig. 1.8.).²¹

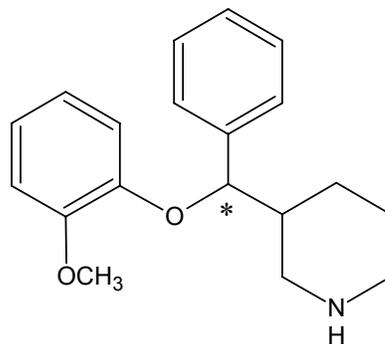


Figura 1.8. Estructura química de Reboxetina

1.3.3. Tendencias y desafíos actuales en el diseño de nuevos antidepresivos

1.3.3.1. Agonistas / Antagonistas del Receptor $5HT_{1A}$ –Inhibidores Selectivos de la Recaptación de 5-HT

En las últimas dos décadas se han llevado a cabo grandes esfuerzos dirigidos a la síntesis de compuestos con propiedades agonistas y/o antagonistas para el receptor $5HT_{1A}$, que permitan emular las acciones farmacológicas del ligando natural serotonina. Actualmente se dispone de una gran variedad de compuestos afines a éste receptor entre las que se encuentran las familias de las: arilpiperazinas, aminotetralinas, ergolinas, indolalquilaminas y benzopiranos^{2, 14}.

1.3.3.1.1. Familia de las Aminotetralinas: 8-OH-DPAT

La 8-hidroxi-2-*N,N*-dipropilaminotetralina (8-OH-DPAT) (Fig. 1.9.) ha sido descrito como un ligando muy selectivo y potente para el receptor 5-HT_{1A}²²⁻²⁴, llegando a ser una herramienta farmacológica de gran utilidad para caracterizar diversos subtipos de receptores de serotonina, ya que presenta una alta afinidad para los receptores 5-HT_{1A} (K_i = 0.5 nM) y una baja afinidad frente a receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C}, 5-HT₂, dopaminérgico D₂ (K_i = 86 nM) y adrenérgico α₂ (K_i = 116 nM)²⁵. Posee además una muy baja estereoselectividad, el enantiomero *R* es sólo dos veces más afín que el *S*²⁶. Aunque, el 8-OH-DPAT fue ampliamente usado por mas de dos décadas para caracterizar los receptores 5-HT_{1A}, estudios recientes revelan una afinidad moderada por el receptor 5-HT₇ (K_i = 35 nM)^{27, 28}.

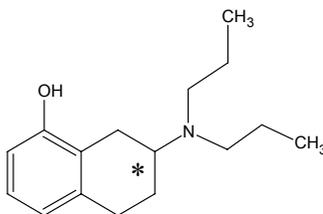


Figura 1.9. 8-hidroxi-2-*N,N*-dipropilaminotetralina (8-OH-DPAT)

1.3.3.1.2. Arilpiperazinas de cadena larga

La agrupación arilpiperazínica, constituye uno de los fragmentos de mayor interés en la búsqueda de nuevos ligandos serotoninérgicos, específicamente en el receptor 5-HT_{1A}. Las arilpiperazinas de cadena larga (conectadas a cadenas polimetilénicas) han demostrado poseer acciones ansiolíticas y/o antidepresivas¹⁸. Las azaspironas comprenden la principal clase de agonistas 5HT_{1A}, entre ellas la bupiriona (Fig. 1.10.); un agonista parcial de los receptores post-sinápticos 5HT_{1A}, se lo utiliza preferentemente como ansiolítico, sus principales efectos secundarios son:

cefalea, náuseas y el ya comentado inicio tardío de acción.¹⁴ Buspirona posee débiles propiedades antagonistas en receptores dopaminérgicos D₂, y su metabolito posee una potente acción antagonista a los receptores α_2 -adrenergicos.

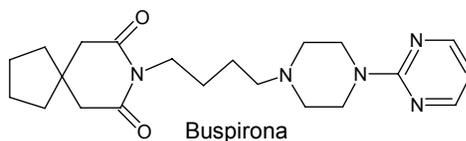
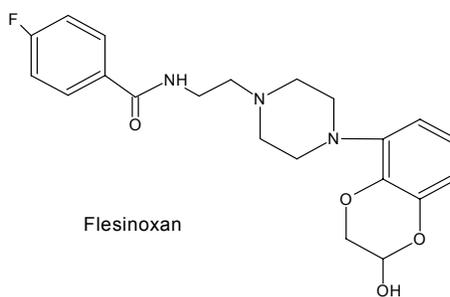


Figura 1.10. Estructura química de Buspirona

Entre otras arilpiperazinas de interés, está el flesinoxán (N-(2-(4-((2R)-2,3-dihidro-2-(hidroximetil)-1,4-benzodioxin-5-il)-1-piperazinil)etil)-4-fluorobenzamida) (Fig. 1.11.), potente y selectivo agonista en receptores post sinápticos 5-HT_{1A} y antagonista presináptico de receptores 5HT_{1A}.²⁹ Se le describe un efecto ansiolítico y antidepresivo en ensayos clínicos en fase III, no obstante se precisan de mayores estudios clínicos debido a observaciones que reportan exacerbaciones en cuadros de pánico.³⁰



Ki 5HT_{1A} = 1.7 nM

Figura 1.11. Estructura química de Flesinoxan

Monge y colaboradores, utilizaron la estrategia de conectar porciones estructurales (templados) que exhibieran dualidad de acción farmacológica

Agonista/ISRS, así conectaron una unidad γ - fenoxipropilamina (ISRS) a un anillo de arilpiperazina (ligando 5HT_{1A})³¹ (Fig. 1.12.)

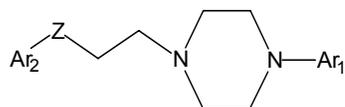


Figura 1.12. Estructura general de arilpiperazinas de Monge

Se estudió la influencia de distintos anillos aromáticos, (benceno, tiofeno, naftaleno y benzo[*b*]tiofeno) en la porción correspondiente a Ar₂, así como la naturaleza del anillo aromático Ar₁ y del grupo funcional Z. Los resultados de los estudios de desplazamiento de radioligandos demostraron que la introducción de una porción de alquilbenzo[*b*]tiofeno unido a arilpiperazinas aumenta la afinidad en el transportador de 5-HT. Estos resultados condujeron a Monge, a estudiar una nueva serie de benzo[*b*]tiofen arilpiperazinil derivados³² (Fig. 1.13.)

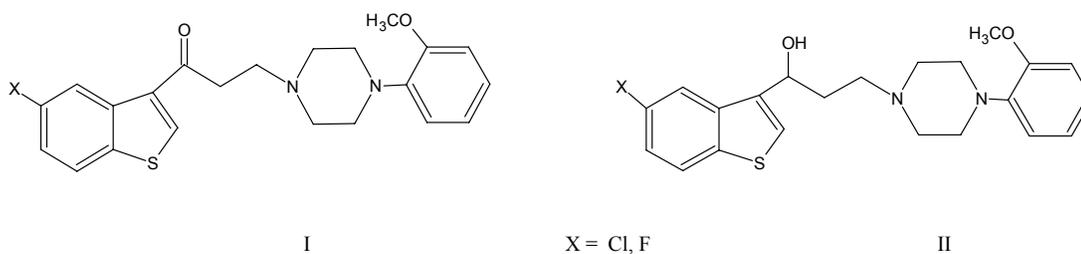


Figura 1.13. Estructura de derivados de benzo[*b*]tiofen arilpiperazinil

Los mejores resultados de afinidad de estos compuestos fueron para el derivado 2- metoxi-1-fluorbenzotiofen alcohol de la serie II con valores de $K_i = 2.3$ nM para el receptor 5HT_{1A} y $K_i = 12$ nM para el transporte de 5HT_{1A}.³³

En este mismo ámbito López- Rodríguez y colaboradores, enfocándose en análogos de biciclohidantoína y dicetopiperazinas (Fig. 1.14.), constataron que la parte farmacófora de estas moléculas es su unidad naftilpiperazina o arilpiperazina, mientras que el resto de la molécula es la unidad no farmacofórica logrando una buena potencia y selectividad sobre el gran competidor del receptor 5-HT_{1A}, el α_1 .³⁴

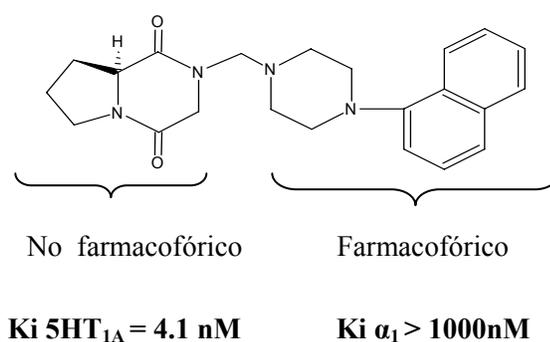


Figura 1.14. Derivados dicetopiperazinas. Estructuras de Lopez-Rodriguez.

No obstante los esfuerzos desplegados en la síntesis de miles de compuestos arilpiperazínicos, solo bupiriona ha alcanzado el mercado farmacéutico mundial desde la década de los 80.

1.3.3.1.3. Familia de Indolalquilaminas.

El prototipo de esta familia es la serotonina, un potente agonista, no selectivo del receptor serotoninérgico 5HT_{1A}. En 1998 Artigas y colaboradores, informaron que la co-administración de pindolol (antagonista 5HT_{1A} / β -bloqueador) con ISRS (Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina), potenciaban y mejoraban los efectos antidepresivos de estos últimos.³⁵

Basándose en este hallazgo, en los últimos años se han propuesto también en esta familia el diseño de moléculas híbridas con bioactividad dual, es decir Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) y antagonistas de los receptores 5HT_{1A} en una sola molécula, así lo han demostrado los trabajos de M. Perez, cuyas moléculas (Fig. 1.15.) contienen las unidades farmacóforas de aminopropanoles (antagonista 5HT_{1A}) unido a fluoxetina o paroxetina (ISRS).³⁶

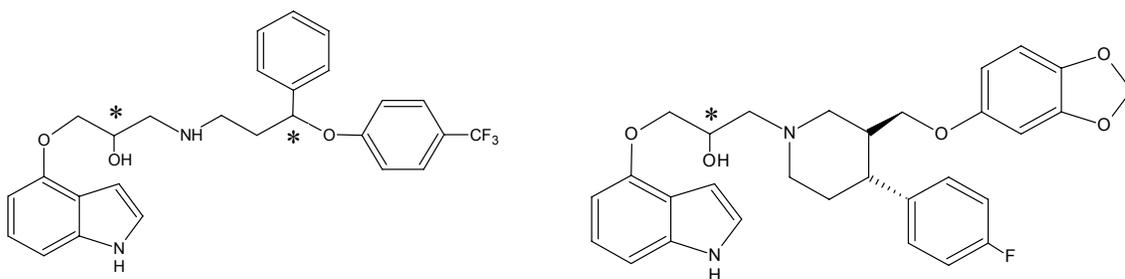


Figura 1.15. Estructura de moléculas híbridas. ISRS/antagonistas 5HT_{1A}

En el 2004 Heinrich encontró que el compuesto vilazodone (Fig. 1.16.), era un agonista parcial del receptor 5-HT_{1A} con propiedades inhibitoras de la recaptación y además muy selectivo, se encuentra actualmente en fase III de experimentación.

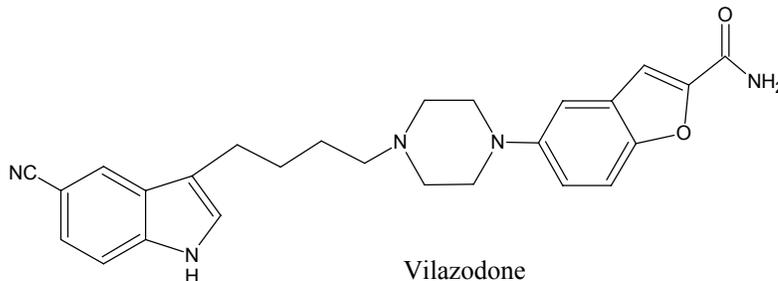


Figura 1.16. Estructura química de Vilazodone

El siguiente esquema representa un cuadro resumen del avance terapéutico para el tratamiento de enfermedad depresiva. La primera generación de antidepresivos

a pesar de su eficacia clínica, presentan varios efectos indeseables como la cardiotoxicidad en el caso de los fármacos tricíclicos y crisis hipertensivas por parte de los inhibidores de la MAO. La segunda generación de drogas conformada por los ISRS y ISRN, son indudablemente mas seguras, sin embargo exhiben su propio espectro de efectos secundarios (disfunción sexual, insomnio, náusea, efecto tardío de inicio de la acción). Es así, que aún existe la necesidad de generar una tercera generación de estructuras mejoradas en cuanto a efectividad y potencia, con un inicio rápido de su efecto terapéutico, menores efectos residuales y recaídas, que permitan el cumplimiento y aceptación del tratamiento por parte del paciente.

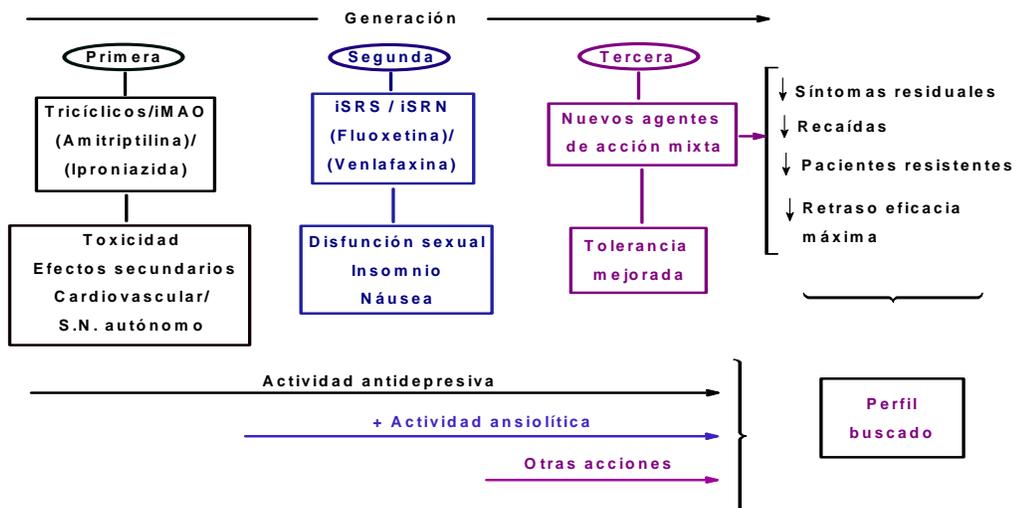


Figura 1. 17. Avance terapéutico de fármacos antidepresivos

Considerando que hasta ahora, los esfuerzos sintéticos y farmacológicos en este ámbito no han sido lo esperado en términos de selectividad, potencia y propiedades farmacocinéticas, hemos decidido estudiar la síntesis de nuevos benzo[b]tiofen-2-carbonil – 1 – piperazinil – 1 – benzo [b] tiofen – 2 – il – 1 - propanonas y realizar ensayos farmacológicos exploratorios de afinidad de los compuestos obtenidos en relación al receptor 5HT_{1A}.

1.4. Hipótesis

El receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} constituye un sitio clave para el neurotransmisor de serotonina en el tratamiento de enfermedades neuropsiquiátricas. Estudios teóricos de modelación molecular asistida por computación y validados experimentalmente, han establecido que los ligandos de arilalquilpiperazinas substituídos adecuadamente, exhiben buenas afinidades por este receptor. Estas interacciones se verificarían a través de puentes hidrógeno entre el residuo de carboxilato del aminoácido Asp¹¹⁶ con el nitrógeno protonado o básico del anillo de piperazina, e interacciones arílicas de los ligandos con residuos aromáticos de Fenilalanina, Tirosina y Triptófano, favoreciendo la estabilidad del complejo ligando-receptor.

En relación a estos antecedentes, las nuevas familias de alquilarilpiperazinas propuestas exhibirán afinidad por el receptor 5-HT_{1A}, en virtud de desplegar un patrón estructural acorde con los requisitos farmacofóricos necesarios para la afinidad.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivos Generales

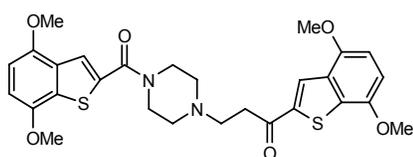
Constituir un aporte al ámbito de la Química Médica, a través de la síntesis y evaluación farmacológica de una nueva familia de derivados piperazino benzo[*b*]tiofenos, con potencial actividad serotoninérgica.

1.5.2. Objetivos Específicos

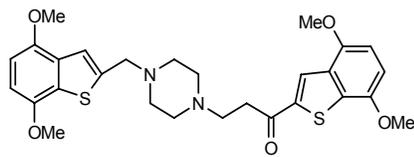
a) Estudio de síntesis de nuevos derivados Piperazinilmetil Benzo[*b*] tiofenos:

- **Compuesto (I) Nombre IUPAC:** 3-[4-(4,7-Dimetoxi-benzo[*b*]tiofen-2-carboxo)-1-piperazinil]-1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-1-propanona.
- **Compuesto (II) Nombre IUPAC:** 1-(4,7-Dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)- 3-[4-(4,7-Dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenilmetil)-1-piperazinil]- 1-propanona.
- **Compuesto (III) Nombre IUPAC:** 3-[4-(Benzo[*b*]tiofen-2-carboxo)-1-piperazinil]- 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)- 1-propanona.

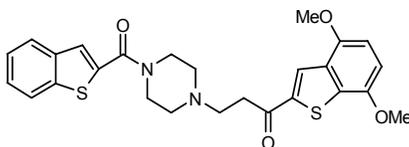
b) Estudio de afinidad de la serie de compuestos (I), (II), (III) sintetizados frente al receptor 5-HT_{1A} aislado de la corteza cerebral de rata, utilizando el 8-OH-DPAT.



(I)



(II)



(III)

2. MATERIALES Y EQUIPOS

2.1. Materiales.

Solventes:

Los solventes utilizados en esta tesis fueron de calidad Sigma-Aldrich, Merck y de grado técnico purificados por destilación y posterior secado con sulfato de sodio anhidro, en el Laboratorio de Mecanismos de Reacción.

Cloroformo, etanol, dimetilformamida (Merck), metanol, tetrahidrofurano (calidad Merck p.a.) para cromatografías y cristalizaciones. Se utilizó diclorometano, acetato de etilo y hexano destilado y secado con sulfato de sodio anhidro para placas cromatográficas. Tolueno (Merck) para la mezcla de centelleo utilizada en los ensayos de desplazamiento de radioligando. Agua destilada nanopura para la preparación de las soluciones de Buffer de los compuestos sintetizados a ensayar, del radioligando [³H]-8-OH-DPAT y del ligando no marcado (8-OH-DPAT) utilizadas en la realización de los ensayos biológicos.

Reactivos : Calidad Sigma-Aldrich y/o Merck :

2,5-Dimetoxi-benzaldehído (99% Aldrich), tioglicolato de metilo (95% Aldrich), hidróxido de potasio (95% Synth), carbonato de potasio anhidro (99.99% Acs) , cloruro de tionilo (100% Merck), terbutil-1-piperazincarboxilato (97% Aldrich), trietilamina, ácido acético glacial (100% Merck) y ácido nítrico (69% d=1,41 Merck), piridina (99.5% Merck), hidruro de litio aluminio (Aldrich), PCC (clorocromato de piridinio), bromuro de vinil magnesio (sol. 1M en THF), clorhidrato de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris-HCl, US biological molecular biology grade), polietilenimina (PEI) (50% p/v en agua, SIGMA), 8-hidroxi-dipropilaminotetralina tritiado ([³H]-8-OH-DPAT) (Activ. espec. 170 Ci/mmol, Amersham).

2.2. Equipos

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (^1H RMN y ^{13}C RMN) se realizaron en un espectrómetro Bruker modelo Advance DRX-300, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) al 99.8% o dimetil sulfóxido (DMSO-d_6) al 99.9%. En todos los espectros se utilizó tetrametil silano como estándar interno. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento J en Hertz (Hz).

Los puntos de fusión se expresan en $^{\circ}\text{C}$, fueron determinados en una placa calefactora Reichert 2102 y no han sido corregidos.

La radiación de microondas fue realizada por un equipo Milestone Mega 240.

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron medidos en un espectrofotómetro FT-IR Brüker IFS 55 utilizando discos de KBr como medio de dispersión. Las señales medidas fueron expresadas en número de onda (cm^{-1}).

Los análisis de espectrometría de masa fueron realizados con un espectrómetro de masas Modelo MAT 95XP, Thermo Finnigan. Analizador de doble enfoque, sector magnético y eléctrico. Referencia utilizada: Perfluoro Kerosene high boiling, PFK. Ionización por Impacto de electrones, EI. Método de determinación: Scan m/z. La determinación de los microanálisis fueron llevados a cabo en un analizador Fisons EA 1108.

La homogenización del tejido cerebral se realizó en un homogenizador vidrio-teflón y en un equipo ultraturrax T8 IKA labortechnik STAUFEN ($5000\text{-}25000\text{ min}^{-1}$).

Las centrifugaciones realizadas durante los ensayos biológicos se llevaron a cabo en una ultracentrifuga Heraeus Sepatech Suprafuge 22. Radio de rotor 22,5 cm.

Las agitaciones de las soluciones en los ensayos biológicos se efectuaron en un vortex Thermolyne type 16700 mixer maxi-mix 1.

El material biológico utilizado fue congelado en un refrigerador (-80°C) calora UF 80-450 S.

Las incubaciones de las soluciones en los experimentos de radioligando fueron realizadas en un baño de agua termorregulado Julabo SW-21 C.

La radioactividad retenida en los filtros durante los ensayos biológicos fue medida en un Contador β liquid scintillation analyzer 1600 TR Packard (Canberra Company) con un 28% de eficiencia.

Otros:

Papel filtro whatman nº 43 velocidad de filtrado medio-rápida. Diámetro 15 cm. Para las cromatografías en columnas (CC) se utilizó sílica gel Merck 60 (70-230mesh), mientras que para las cromatografías en capa fina (TLC) se utilizó DC- alufolien 60 F₂₅₄.

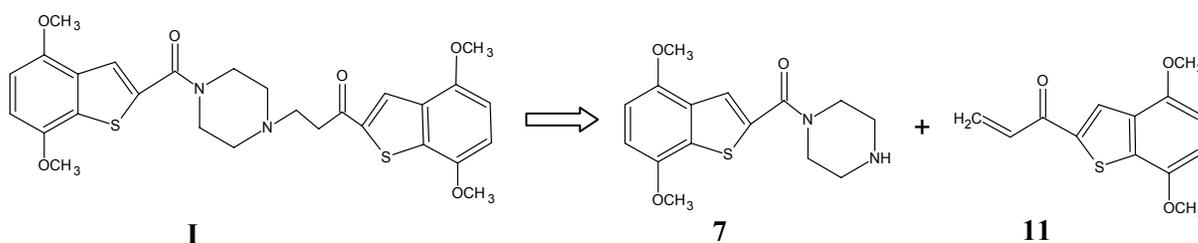
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Síntesis

En este capítulo se describirán primeramente las rutas sintéticas para la obtención de las estructuras propuestas, para finalmente incluir los resultados farmacológicos y su discusión.

3.1.1. Síntesis de 3-[4-(4,7-dimetoxi-benzo[*b*]tiofen-2-carboxo)-1-piperazinil] -1 - (4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-1-propanona (I).

La obtención de la molécula objetivo I, se basa en el esquema retrosintético 3.1., desconectándola en sus unidades heterocíclicas de benzotiofeno piperazinocarboxamida (7) y la 4,7-dimetoxi-benzotiofen enona (11), como componentes de una reacción de Adición de Michael.

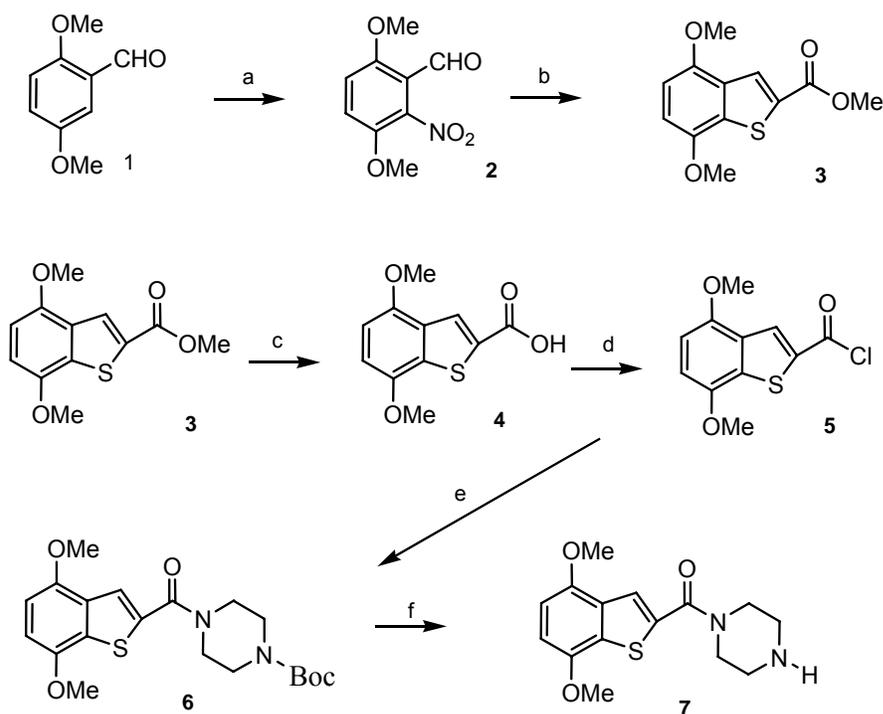


Esquema 3.1. Esquema retrosintético para la obtención del compuesto I

Para tal efecto, como primer paso se describirán las correspondientes rutas sintéticas para los intermediarios (7) y (11).

3.1.1.1. Síntesis de 1-[(4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il) carbonil] piperazina (7)

El esquema 3.2. muestra la secuencia de reacciones que conducen a la obtención del intermediario benzotiofen piperazinocarboxamida (7).

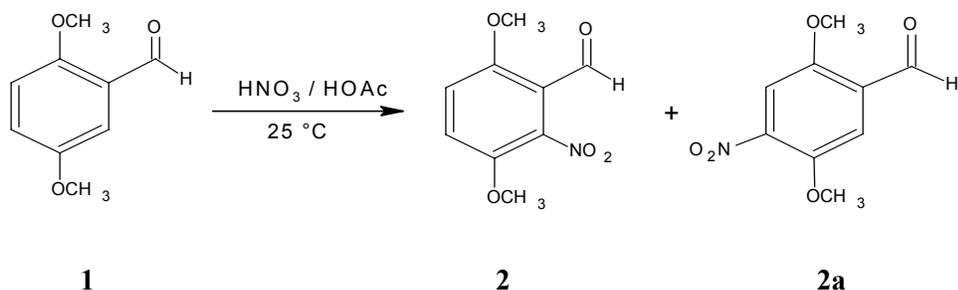


Reactivos : a) HNO_3 / HOAc b) $\text{HSCH}_2\text{COOMe}$ / K_2CO_3 / $N,N\text{-DMF}$ / 70°C c) KOH / MeOH , H_3O^+ , d) SOCl_2 reflujo e) $N\text{-Boc-Piperazina}$ / THF anhidro / Piridina seca. f) HCl (c)/ $\text{THF}:\text{EtOH}$ (1:1) 2 días.

Esquema 3.2. Ruta sintética para la obtención del precursor 1-[(4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il) carbonil] piperazina (7)

La obtención del compuesto 3,6-dimetoxi-2-nitrobenzaldehído (2) fue realizada por tratamiento del sustrato comercial 2,5-dimetoxibenzaldehído con una mezcla HOAc/HNO_3 . El compuesto se obtiene junto a su isómero 2,5-dimetoxi-4-

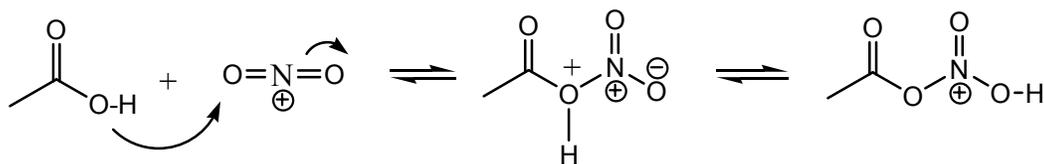
nitrobenzaldehído, (**2a**) en una relación de 2:1, siendo posteriormente purificado por cristalización en EtOH generando el compuesto (**2**) puro (56%)^{37,38}.

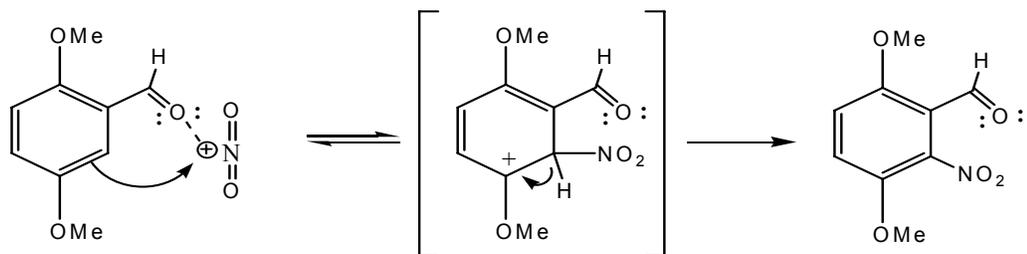


Esquema 3.3. Reacción de nitración del 2,5-dimetoxibenzaldehído

El producto (**2**) exhibe en ^1H RMN dos dobletes a δ : 7.10 ppm (d, 1H, C-4H) y 7.28 ppm (d, 1H, C-5H), que acoplan entre sí con una constante de acoplamiento (J) igual a 8,3 Hz, además de una señal a δ : 10.28 ppm (s, 1H, CHO) para el grupo aldehído. Esta reacción de sustitución aromática electrofílica cursa con una regio selectividad poco predecible respecto de la obtención del isómero (**2**), esto debido principalmente al gran impedimento estérico presente en esa posición. En tal sentido resulta viable asignar un rol al grupo aldehído en el mecanismo involucrado, como se aprecia en el esquema 3.4.

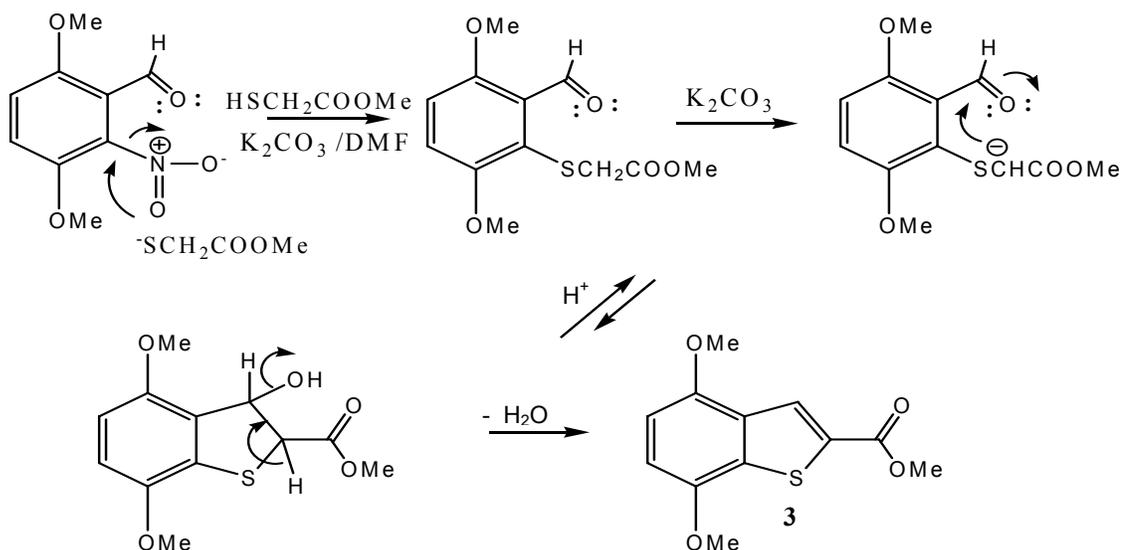
Posibles equilibrios del electrofilo en medio acético





Esquema 3.4. Mecanismo probable de nitración

Posterior condensación de **(2)** con tioglicolato de metilo en medio básico (K_2CO_3) a $65^\circ C-70^\circ C$ utilizando DMF como solvente, generó el 4,7-dimetoxi-1-benzotiofen-2-carboxilato de metilo **(3)**, que se purificó por cromatografía en columna con CH_2Cl_2 para dar **(3)** puro (70%)³⁹⁻⁴¹. Este interesante producto procedería por una sustitución nucleofílica aromática del anión del tioglicolato de metilo sobre el carbono aromático que porta el grupo nitro, desplazando completamente el equilibrio hacia la formación de productos.

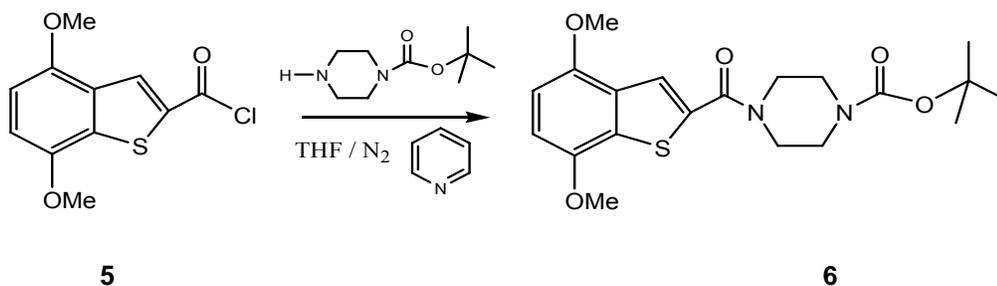


Esquema 3.5. Mecanismo de reacción para la obtención del 4,7-dimetoxi-1-benzotiofen-2-carboxilato de metilo **(3)**

Este producto **(3)** exhibió en ^1H RMN las siguientes señales: dos dobletes a δ : 6.75 y 6.67 ppm para el sistema AB de los protones H-5 y H-6, y un singulete a δ : 8.20 ppm para H-3, además de una señal singulete a δ : 3.91 ppm para el éster metílico. En ^{13}C RMN se aprecia una señal a 163.2 ppm correspondiente al carbono carbonílico del éster.

De acuerdo al esquema 3.2. el paso siguiente es la hidrólisis selectiva de la función éster para obtener el compuesto **(3)**. El éster **(3)** fue hidrolizado en medio básico en una mezcla KOH 0,5 N: EtOH (1:1 v/v), (60 ml) y posteriormente acidificado con HCl (c). El crudo obtenido fue finalmente purificado por cromatografía en una columna y eluida con acetato de etilo, obteniéndose el ácido 4,7-dimetoxi-benzotiofen-2-carboxílico **(4)**^{37,40} en un 78%. En espectroscopia IR se apreció la característica banda ancha a $3650\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ asignable a la tensión (O-H asociado) y una banda a 1670 cm^{-1} para el grupo carbonilo. En ^1H RMN no se aprecia el singulete a δ : 3.88 ppm correspondiente a los protones metilos de la función éster. En espectroscopia de ^{13}C RMN se apreció una señal 171.6 ppm que confirma el presencia del grupo (COOH).

Al continuar con la secuencia, procedimos a sintetizar el cloruro de 4,7-dimetoxi-benzotiofen-2-carbonilo **(5)**. Este compuesto se generó por tratamiento de **(4)** con cloruro de tionilo (solvente y reactivo), a 60°C durante 4 horas. Al cabo de este tiempo, la reacción se completó como lo mostró la cromatografía en capa fina, formándose por concentración, un sólido amarillo que fue purificado por cromatografía en columna (CH_2Cl_2) 91%. Su espectro de IR exhibe una fuerte señal a 1730 cm^{-1} (ArCOCl). En ^1H RMN se evidenció la ausencia de la señal a δ : 12.7 (COOH) y en ^{13}C RMN se detecta una señal desplazada a 161.1 ppm para la función carbonílica (ArCOCl). Este derivado **(5)** fue inmediatamente empleado para la próxima etapa que corresponde a la obtención 4-(4,7-dimetoxi-benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-*N*-Boc-1-piperazina **(6)**.

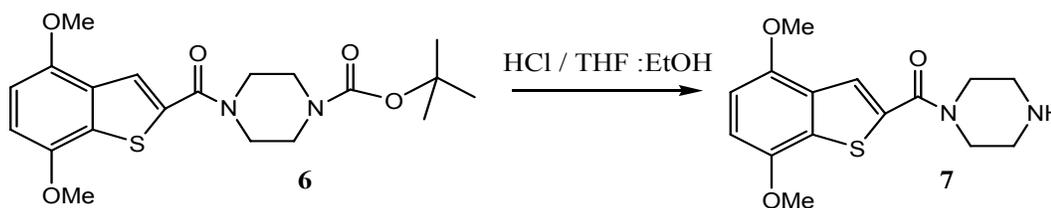


Esquema 3.6. Síntesis de 4-(4,7-dimetoxi-benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-*N*-Boc-1-piperazina (**6**)

Este intermediario de síntesis se generó por tratamiento del haluro de acilo (**5**) con *N*-Boc piperazina, en presencia de piridina seca y THF anhidro como solvente, generándose la correspondiente amida (**6**), que fue purificada por cromatografía en columna obteniéndose finalmente un sólido de color blanco (83% de rendimiento). Su espectro de ^1H RMN nos permite apreciar señales a δ 1.34 ppm para los 9 H del grupo *ter*-butilo, en compañía de las señales a δ 3.39 y 3.61 ppm para los protones piperazínicos.

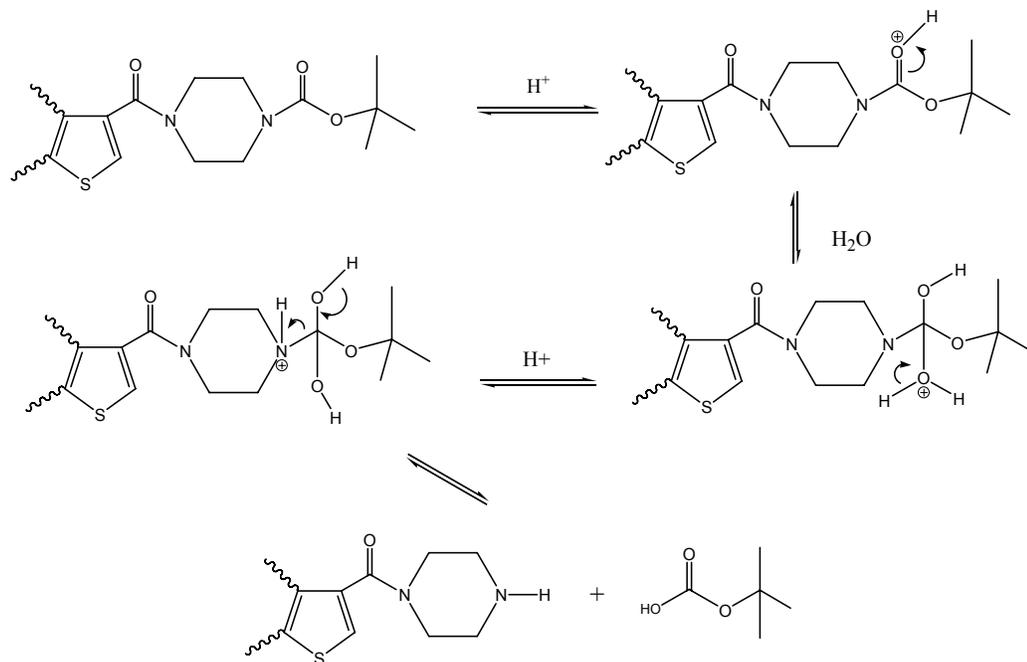
El espectro de masas de alta resolución confirmó la estructura propuesta. Masa Teórica Calculada: 406.15624. Masa Experimental: 406.15643.

Posterior hidrólisis selectiva de la función carbamato de (**6**)^{42,43}, nos condujo a la obtención de la *N*-benzotiofen carboxamida (**7**).



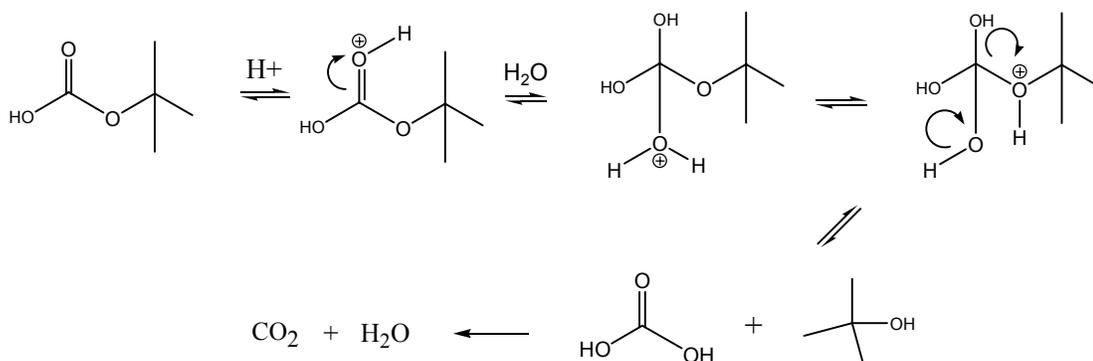
Esquema 3.7. Síntesis de *N*-benzotiofen caboxamida (**7**)

La desprotección del grupo Boc de **(6)**, se realizó por hidrólisis ácida utilizando una mezcla de HCl(c) en THF:EtOH (1:1). El esquema 3.8. representa el probable mecanismos de hidrólisis y sus productos finales.



Esquema 3.8. Mecanismo de Hidrólisis del derivado *N*-Boc piperazina (**6**)

El semiester ter-butílico del ácido carbónico puede reaccionar finalmente en el medio ácido presente, a los productos mostrados a continuación.



Esquema 3.9. Mecanismo de hidrólisis del semiester ter-butílico del ácido carbónico

El compuesto **(7)**, es purificado por cromatografía en columna utilizando CH₂Cl₂:MeOH (1:1) con un rendimiento de 68%. En ¹H RMN se apreció la ausencia de la señal singulete correspondiente al grupo *ter*-butilo y un desplazamiento a campo alto de δ 3.39 a δ 2.91 ppm para los protones piperazínicos de H-3' y H -5'. El espectro de masas de alta resolución nos entregó valores acordes a la estructura propuesta. Masa Teórica Calculada: 306.10381. Masa Experimental: 306.10321.

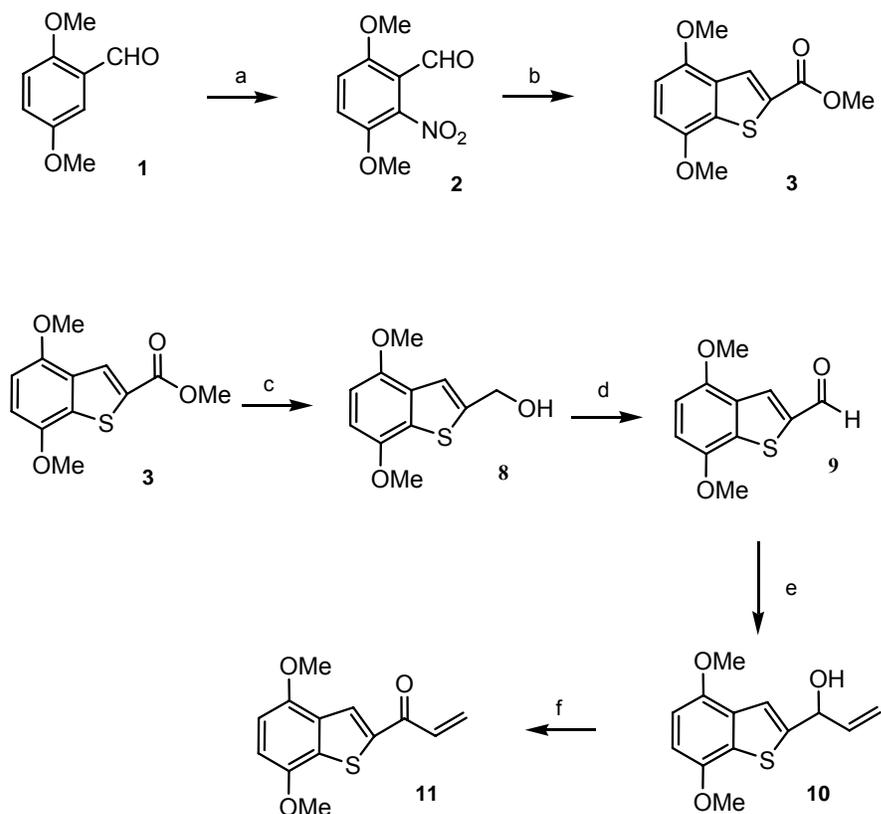
Obtenido ya uno de los sustratos propuestos (donor de Michael ver esquema 1 retrosintético), en el siguiente capítulo abordaremos la obtención de la enona **(11)** (electrófilo o aceptor de Michael).

3.1.1.2. Síntesis de (4,7-dimetoxi-benzo [*b*]tiofenil)-1- propenona **(11)**.

En este segundo apartado, describiremos los pasos sintéticos necesarios para la obtención de la benzotiofen propenona **(11)**. (Esquema 3.10.).

Por tratamiento del benzotiofen éster **(3)** con LiAlH₄ en THF anhidro, y posterior hidrólisis se obtuvo un compuesto crudo, el cual fue purificado por cromatografía en columna de silica gel CH₂Cl₂/AcOEt (1:1), obteniéndose el benzotiofen alcohol puro **(8)** (320 mg,65 %) (sólido blanco).

El benzotiofen alcohol **(8)** así obtenido, exhibe en ¹H RMN un doblete a δ: 4.81 ppm para 2H de -CH₂-OH y una señal singulete a δ: 6.65 ppm para los hidrógenos aromáticos de C-5 y C-6. En espectroscopia IR se advierte una señal ancha centrada en 3356 cm⁻¹ para la tensión (O-H) asociado.



Reactivos: a) $\text{HNO}_3 / \text{HOAc}$ b) $\text{HSCH}_2\text{COOMe} / \text{K}_2\text{CO}_3 / \text{N,N-DMF}$; c) $\text{LiAlH}_4 / \text{THF-H}_3\text{O}^+$, d) $\text{PCC} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$; e) Bromuro de vinil magnesio / THF anhidro, $\mu\nu$ (600 W), 7 min; f) $\text{MnO}_2 / \text{CH}_2\text{Cl}_2$ 25 °C.

Esquema 3.10. Ruta sintética para la obtención del precursor (4,7-dimetoxi-benzo [*b*]tiofenil)-1- propenona (**11**)

El compuesto (**8**) es oxidado controladamente con clorocromato de piridinio (PCC) en diclorometano para generar cuantitativamente el derivado aldehídico (**9**), que fue purificado por cromatografía en columna (CH_2Cl_2), para dar 83% de un sólido amarillo pálido.

En ^1H RMN se aprecia principalmente la desaparición de un doblete a δ : 2,21 ppm asignable a la función CH_2OH y la aparición de una señal singulete a δ : 9.98 ppm característica de la función aldehído.

La reacción de **(9)** con bromuro de vinil magnesio en THF anhidro, asistida por microondas⁴⁴⁻⁴⁶ y seguida de hidrólisis, generó el alilbenzotiofen alcohol **(10)**, en rendimiento cuantitativo, el cual fue purificado por cromatografía en columna (62%). En ¹H RMN (Fig. 3.1. y anexo) se aprecia una señal singulete a δ: 6.65 ppm para los protones aromáticos de C-5 y C-6, una señal singulete a δ: 7.36 ppm para H-3 y la ausencia del singulete a δ 9.98 ppm (CHO). En la zona media del espectro se observa un multiplete de 7 señales para el hidrógeno vinílico de C-2' (H₂), una señal doblete a δ: 5.28 ppm para el protón vinílico terminal de C-3'(H₃) y un multiplete que integra dos hidrógenos a δ: 5.42-5.47 correspondientes al protón metínico de C-1'(H₁) y al segundo protón vinílico de C-3'(H₄).

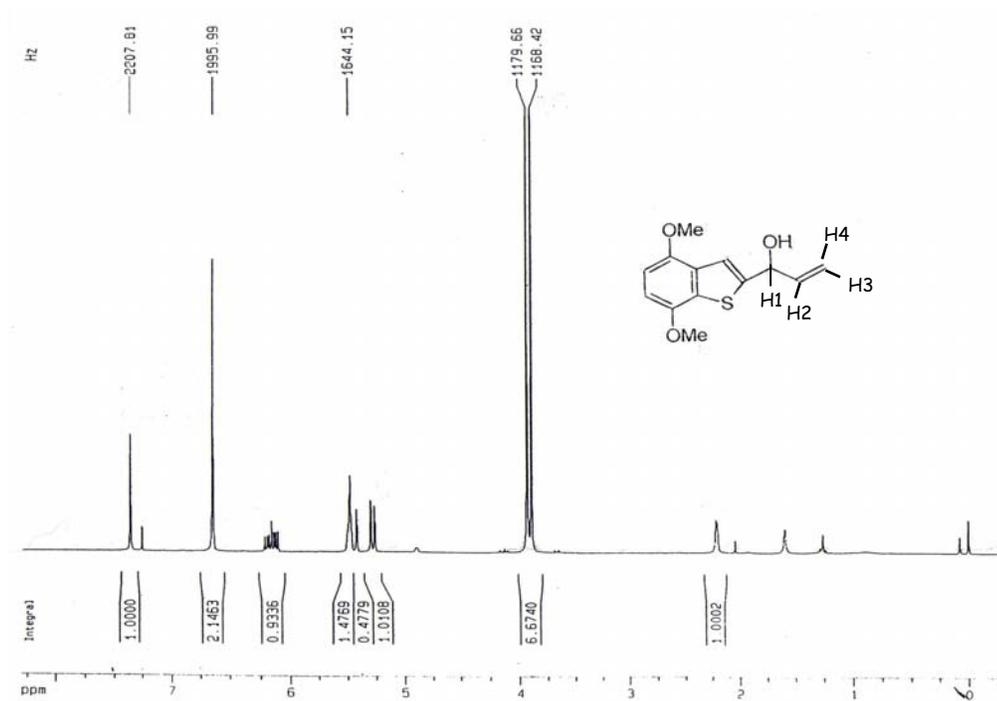


Figura 3.1. Espectro de RMN del 1-(4,7-dimetoxi benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-propen-1-ol (**10**)

Este alcohol es un líquido amarillento viscoso que solidificó al agregar ciclohexano. La oxidación de **(10)** con MnO_2 en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente nos condujo a la benzotiofen enona **(11)**, siendo purificada por columna de silica gel (CH_2Cl_2) con un rendimiento de 58 %.

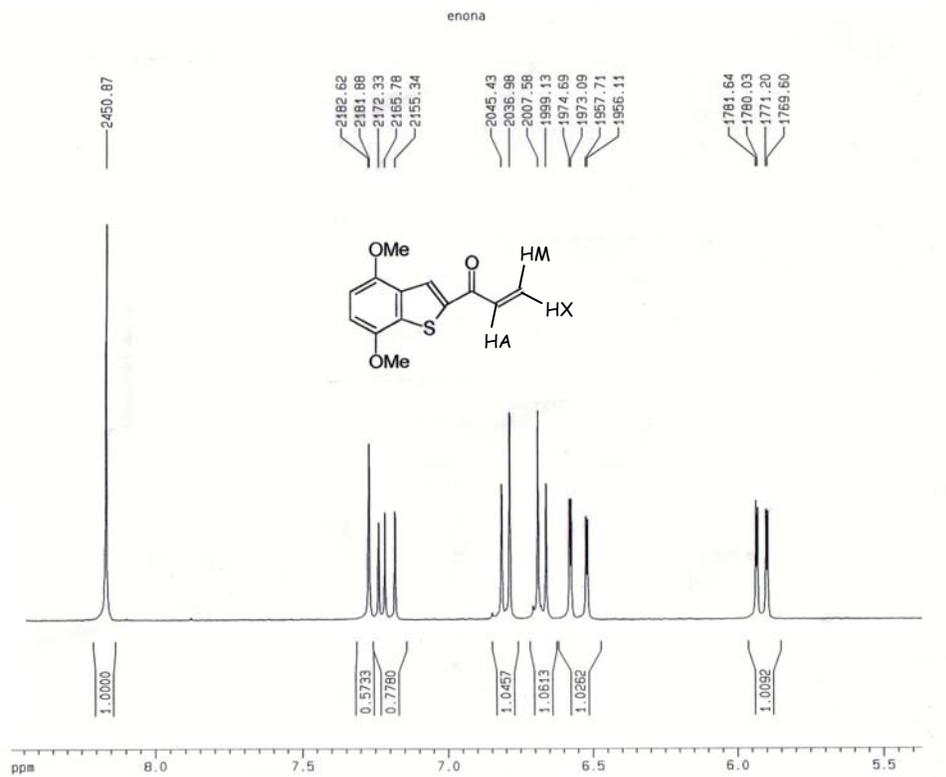


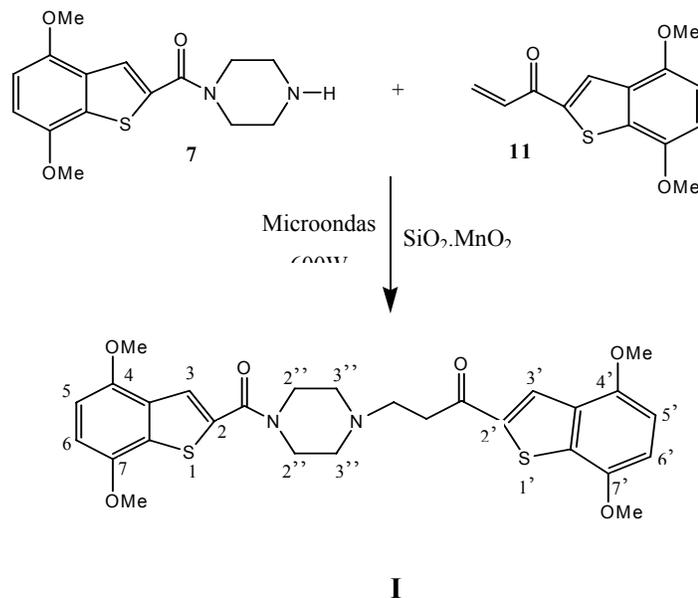
Figura 3.2. Espectro de RMN del 1-(4,7-dimetoxi benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-propen-1-ona (**11**)

La enona **(11)** obtenida exhibió en ^1H RMN señales para un doblete de doblete a δ : 5.92 ppm para el protón H_X , un doblete de doblete δ : 6.55 ppm para el protón H_M , un doblete de doblete a δ : 7.23 ppm para H_A , dos dobletes para el sistema AB para los protones de C-5 y C-6 y un singulete a δ : 8.17 ppm para el hidrógeno de C-3 (Fig. 3.2.).

3.1.1.3. Adición de Michael de Piperazino benzotiofeno (7) sobre benzotiofeno enona (11)

El esquema 3.11. muestra la reacción de adición de Michael asistida por radiación de microondas de las dos unidades potencialmente farmacofóricas en fase seca.⁴⁷ La adición de Michael asistida por microondas ha sido utilizada con mucho éxito, generalmente estas adiciones son efectuadas en presencia de un solvente adecuado, y algunos casos de bases fuertes a temperaturas elevadas. En tal sentido es posible que se produzcan reacciones laterales de condensación, polimerizaciones, reordenamientos o reacciones retro-Michael. Estas reacciones laterales disminuyen el rendimiento haciendo más dificultosa su purificación. Para subsanar este problema se ha recurrido a un método no convencional que es la irradiación por microondas en medios libres de solventes, que forma parte de la estrategia mundial de química no contaminante (química verde). La irradiación por microondas constituye un procedimiento que ha revolucionado la síntesis orgánica ya que ofrece ventajas significativas como ser: reducciones significativas en los tiempos de reacción, menores reacciones laterales, aumentos en los rendimientos, y facilidad de purificación.⁴⁸

En nuestro caso, la reacción se efectuó utilizando como soporte una mezcla inorgánica de SiO₂-MnO₂ (4:1) en la cual se incorporó el par nucleófilo-electrófilo (**7 – 11**) irradiándose por 6 minutos a 600 W. Posteriormente de la mezcla sólida se extraen los componentes orgánicos con AcOEt y se purifica por cromatografía en columna con AcOEt: CH₂Cl₂ (4:1), obteniéndose un sólido de color amarillo con un rendimiento de 86%.

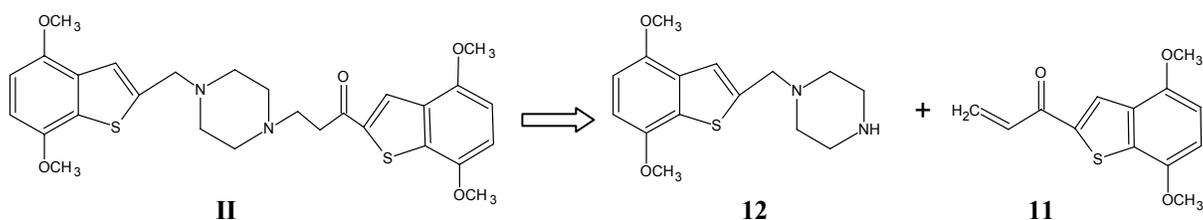


Esquema 3.11. Reacción de adición de Michael asistida por microondas para la obtención del compuesto **I**

Nuestra primera molécula blanco exhibió en ^1H RMN dos señales tripletes a δ : 2.93 y 3.24 ppm para la cadena metilénica conectora, junto con 2 señales multiplete asignables a los protones piperazínicos a δ : 2.61 y 3.80 ppm. Además se observa un patrón de 2 tripletes a δ : 6.69 y 6.79 ppm que integra para 4 hidrógenos (anillo bencénico) en compañía de 2 singuletes a δ : 7.62 y 8.14 ppm para el protón de H-3 y H-3' del anillo de tiofeno. Un interesante problema se presentó en ^{13}C -RMN con este producto, los carbonos piperazínicos vecinos al grupo amida no se logran visualizar, este problema fue resuelto por aplicación de la técnica de HMQC donde se aprecia el acoplamiento C-H a δ : 45.1 ppm para estos carbonos. El espectro de masa de alta resolución nos entregó valores según: ión molecular teórico para $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ (M^+): 554.15453 y experimental: 554.15625.

3.1.2. Síntesis de 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-3-[4-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenilmetil)-1-piperazinil]-1-propanona (II)

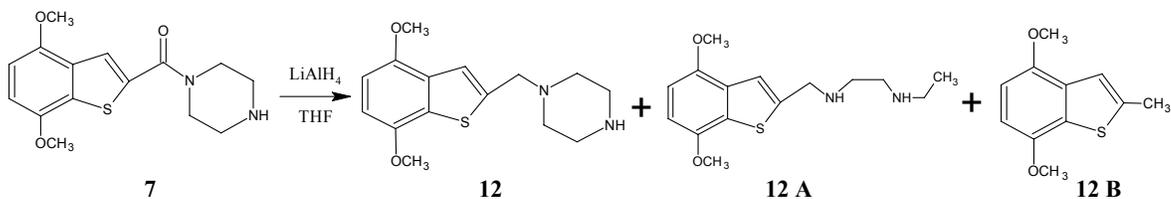
El esquema 3.12. plantea la retrosíntesis para el segundo compuesto objetivo II, y análogo al caso anterior corresponde a una adición de Michael de la piperazina (12) (un derivado reducido de la carboxamida (7), sobre la enona (11).



Esquema 3.12. Esquema retrosintético para la obtención del compuesto (II) 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-3-[4-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenilmetil)-1-piperazinil]-1-propanona

3.1.2.1. Síntesis del 4,7-dimetoxi-benzo[*b*]tiofenpiperazino (12)

La síntesis de la benzotiofenometilpiperazina (12), fue abordada vía reducción con hidruro metálico de su precursor amídico (7), de acuerdo al procedimiento siguiente:

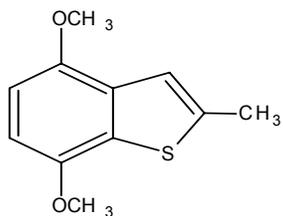


Esquema 3.13. Reacción de reducción del derivado 1-[(4,7-Dimetoxi-1-benzo[*b*]tiofeno-2-il) carbonil] piperazino (7)

El sustrato (**7**) se trata con LiAlH_4 en THF anhidro en condiciones de reflujo suave por 5 hrs., una vez constatada la desaparición del producto de partida, se elimina el exceso de reductor metálico por tratamiento con $\text{AcOEt:H}_2\text{O}$ (2:1) a bajas temperaturas. Al realizar un análisis cromatográfico en placa fina, se aprecian 3 productos (Esquema 3.13.), que fueron purificados posteriormente en columna cromatográfica con gradiente de polaridad utilizando inicialmente como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1), y finalmente CH_3OH .

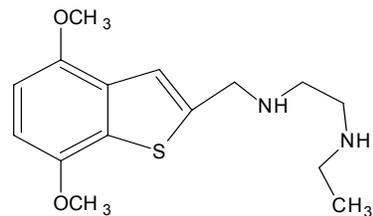
Se envió la fracción mayoritaria a ^1H RMN, resultando ser el producto esperado (**12**) (232mg, 36%). La amina obtenida (**12**) exhibió en ^1H RMN, una señal singulete a δ : 3.69 ppm para los hidrógenos metilénicos tipo bencílicos. Además se aprecia una señal semejante a un triplete a δ : 6.77 ppm para los protones H-5 y H-6, muy diferente de su amida precursora (**7**) la cual exhibe para los protones de H-5 y H-6 dos doblete a δ : 6.65 y 6.70 ppm.

Los otros dos productos **12-A** y **12-B** exhiben en ^1H RMN señales que pueden asignarse a los productos: 2-metil-4,7-dimetoxi-benzotiofeno (**12-A**) (δ : 2.59 singulete, integrando para 3H y señales para el núcleo benzotiofénico) y la *N*-(4,7-dimetoxi-benzotiofen-2-il-metil)-*N'*-etil-1,2-diaminoetano (**12-B**) (δ : 3.75 singulete para $\text{Ar-CH}_2\text{-NH-}$, δ : 1.06 triplete $\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ y multiplete para las demás señales metilénicas). En el espectro de IR se observa para **12-A** principalmente señales aromáticas y alifáticas a 3058 cm^{-1} y $2955\text{-}2835\text{ cm}^{-1}$ respectivamente, y 1259 cm^{-1} para la tensión (C-O). Para **12-B** se aprecia en IR una absorción a 3441 cm^{-1} (NH). La espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) generó valores de ión molecular en concordancia con las estructuras propuestas.



12 A

Teórico: 208.05580
Experimental: 208.054478



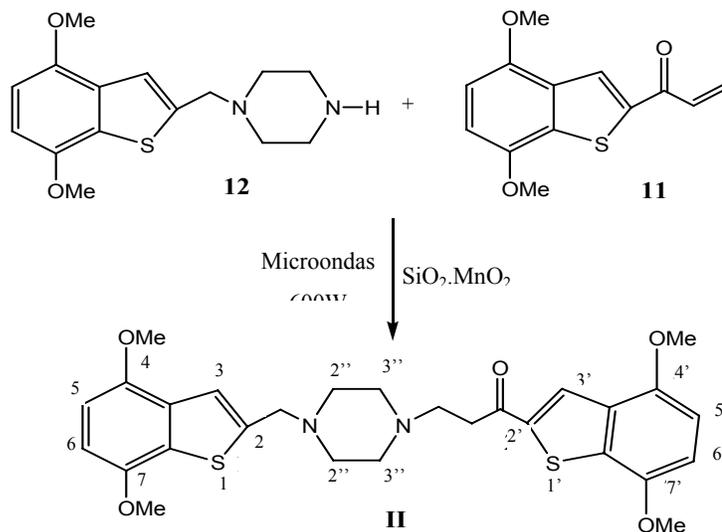
12 B

Teórico: 294.14020
Experimental: 294.12038

Esquema 3.14. Estructuras de los derivados **12A** y **12B**

3.1.2.2. Adición de Michael del derivado piperazino benzotiofeno (12) sobre la benzotiofen enona (11)

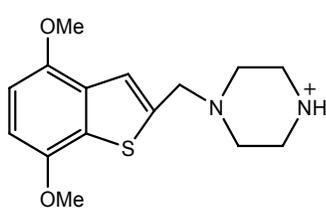
La adición 1,4 de Michael se realiza bajo las mismas condiciones que se emplearon para obtener el compuesto **I**. Esta reacción produjo un crudo con un rendimiento de 82.9%. Posterior purificación por cromatografía en columna utilizando como mezcla eluyente AcOEt: CH₂Cl₂ (4:1) generó un sólido amarillo oscuro con un rendimiento del 79.7%.



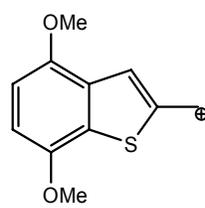
Esquema 3.15. Reacción de adición de Michael asistida por microondas para la obtención del compuesto **II**

En ^1H RMN, el producto **II** exhibió un par de tripletes a δ : 2.97 y 3.26 ppm correspondientes a la cadena metilénica y un singulete a δ : 3.78 ppm para el metileno alfa al anillo tiofénico. En la zona aromática se aprecia un singulete para los protones de H-5, H-6 y un sistema de dos dobletes a δ : 6.65 y 6.77 ppm para H-5' y H-6'.

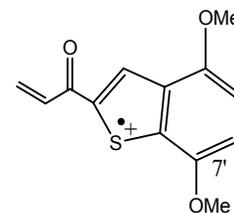
El análisis del espectro de masas de alta resolución dio valores según: ión molecular teórico para $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}_2$: 540.17526 y experimental: 540.17406. Otros fragmentos detectados podrían ser los siguientes:



Teórico: 292.12
Experimental: 292.05



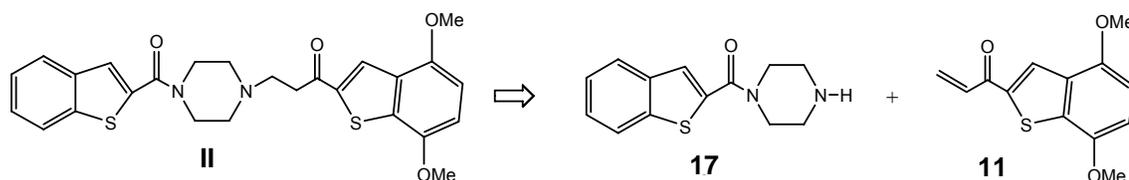
Teórico: 207.00
Experimental: 207.00



Teórico: 247.99
Experimental: 248.05

3.1.3. Síntesis de 3-[4-(benzo[*b*]tiofen-2-carboxo)-1-piperazinil]- 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)- 1-propanona. (III).

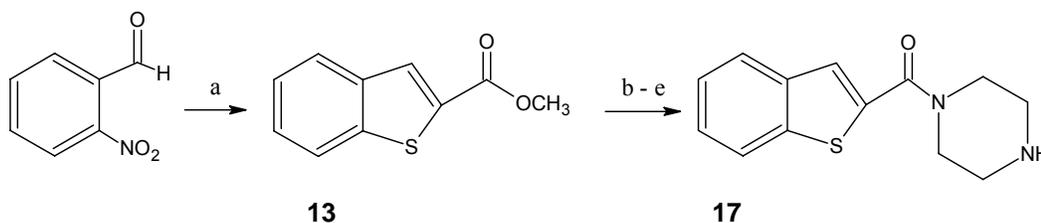
El siguiente esquema retrosintético muestra el tercer compuesto objetivo generado por la adición de Michael del derivado benzotiofen piperazino (**17**) sobre la benzotiofen enona (**11**).



Esquema 3.16. Esquema retrosintético para la obtención del compuesto (**III**) 3-[4-(benzo[*b*]tiofen-2-carboxo)-1-piperazinil]- 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)- 1-propanona

3.1.3.1. Benzo [*b*]tiofen piperazino carboxamida (**17**)

El procedimiento para la obtención de (**17**), sigue la misma secuencia de reacciones empleadas para la obtención del 4,7-dimetoxi-benzo[*b*]tiofenpiperazino carboxamida (**7**). El producto final es purificado por cromatografía en columna utilizando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (1:1) generando un sólido blanco cristalino con un rendimiento de 82% (Esquema 3.17.)

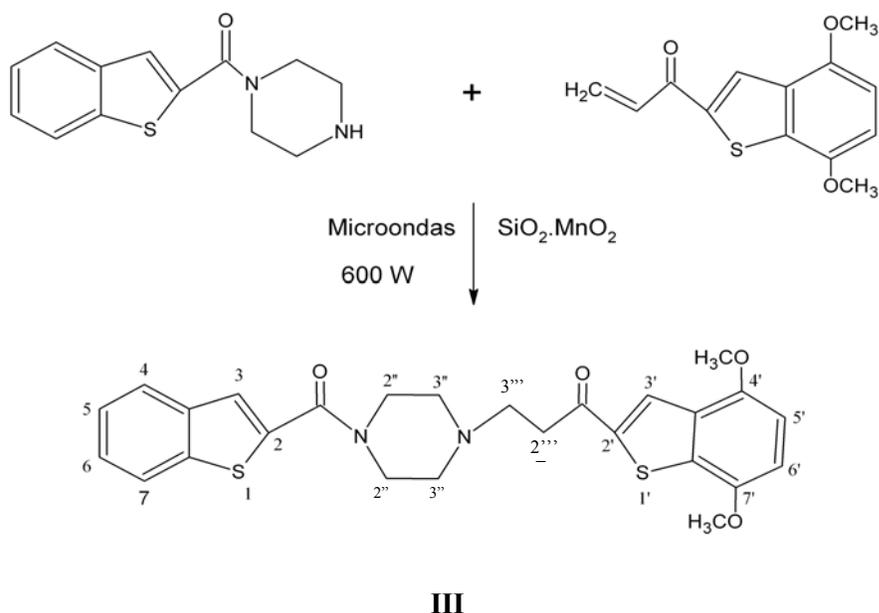


Reactivos : a) HSCH₂COOMe /K₂CO₃ / *N,N*-DMF/ 70°C b) KOH /MeOH, H₃O⁺, c) SOCl₂ reflujo d) *N*-Boc-Piperazina / THF anhidro / Piridina seca. e) HCl _(c)/THF:ETOH (1:1) 2 días.

Esquema 3.17. Ruta sintética para la obtención del precursor benzo [*b*]tiofen piperazino carboxamida (**17**)

3.1.3.2. Adición de Michael del derivado piperazino benzotiofeno (17) sobre la benzotiofen enona (11)

La adición 1,4 de Michael se realiza bajo las mismas condiciones que se emplearon para obtener el compuesto I. El producto crudo generado en esta reacción (rendimiento cuantitativo) es purificado por cromatografía en columna de sílica gel utilizando como eluyente una mezcla de AcOEt:CH₂Cl₂ (4:1), obteniendo así al compuesto III, como un sólido amarillo intenso (75%) (Esquema 3.18.)



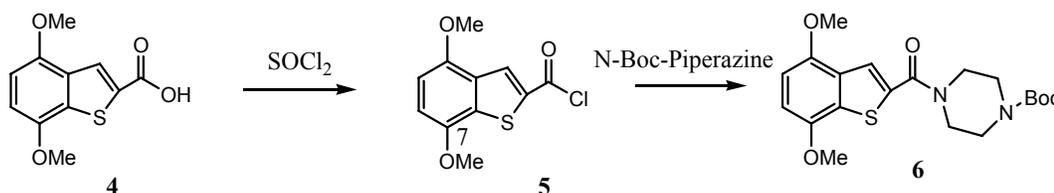
Esquema 3.18. Reacción de adición de Michael asistida por microondas para la obtención del compuesto III

El compuesto III exhibió el esperado par de tripletes a δ : 2.94 y 3.23 ppm para los protones de H-3''' y H-2''' respectivamente, un sistema AB de dos dobletes a δ : 6.68 y 6.80 ppm para H-5' y H-6' respectivamente, dos señales singulete a δ : 7.48 ppm, para 3-H y 8.14 ppm para H-3', además de una señal multiplete a δ 7.81 - 7.88 ppm, para H-4 y H-7.

El espectro de masas de alta resolución dio valores según: ión molecular teórico para $C_{26}H_{26}N_2O_4S_2$: 494.13340 y valor experimental: 494.13175.

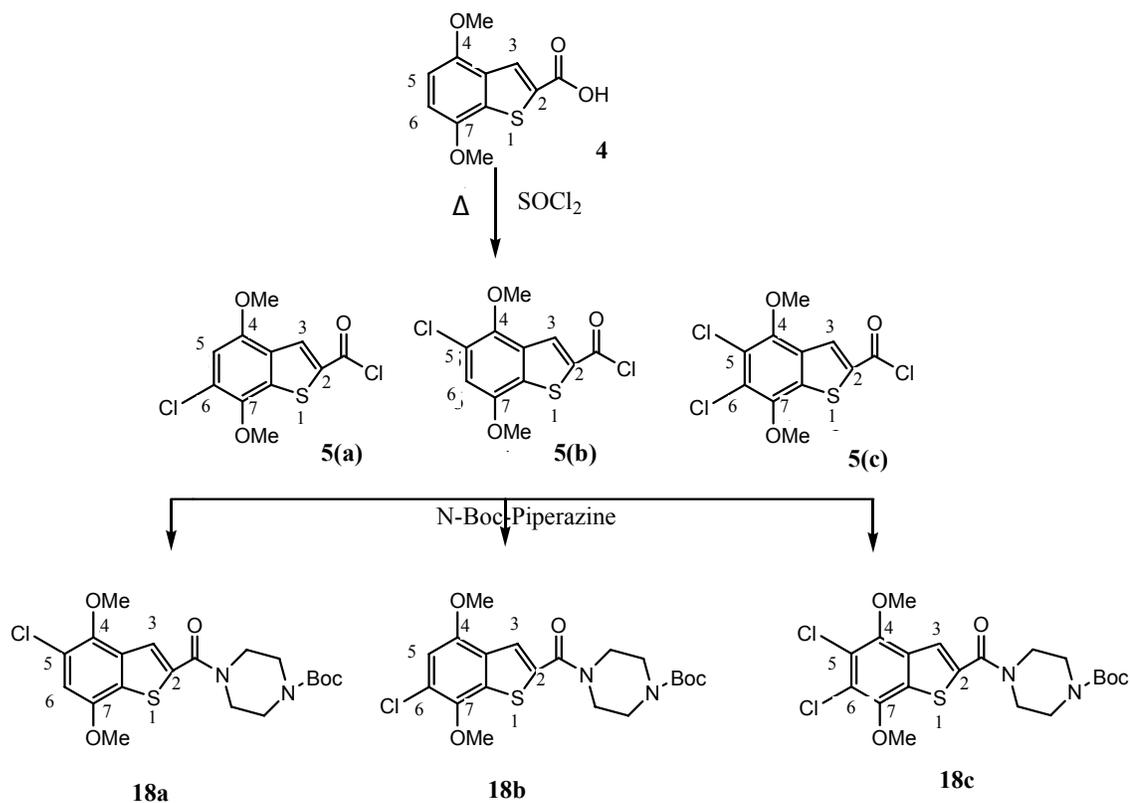
3.1.4. Obtención de 5 y 6- cloro -derivados del cloruro de 4,7-dimetoxi benzotiofen carbonilo (5).

En el proceso de síntesis del derivado I, en un ensayo para generar el cloruro de 4,7-dimetoxi-benzo[*b*]tiofenpiperazin carbonilo (5), siguiendo el procedimiento descrito, se expuso accidentalmente el ácido benzotiofencarboxílico (4) a temperaturas de aproximadamente 60°C por un período mayor a 24 horas, originándose un producto crudo de color café-negrusco, que en cromatografía de capa fina, presentaba el mismo Rf que el producto esperado haluro de aroílo (5), por lo que decidimos purificarlo asumiendo que disponíamos de (5) y continuamos por tanto con la formación de la benzotiofencarboxamida (6).



Sin embargo, al efectuar el espectro 1H RMN al esperado producto (6), nos percatamos de la no concordancia de las señales, no solo respecto de la multiplicidad sino también de la integración de éstas.

Fundamentalmente en la zona aromática se observaron señales correspondientes a tres nuevos productos, que fueron asignados como los derivados monoclorados **18(a,b)**, en una relación aproximada de 9:3, en compañía de trazas de su probable derivado diclorado en 5-H y 6-H, **18(c)**.



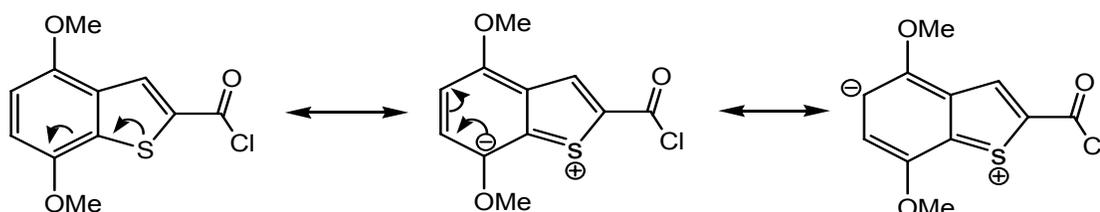
Esquema 3.19. Ruta sintética para la obtención de los derivados clorados 18 a, 18 b, 18 c

La presencia de tres productos fue confirmado fundamentalmente por la información proporcionada en ^1H RMN que daba cuenta de la existencia de tres singuletes a campo bajo δ : 7.55, 7.56 y 7.57 ppm en una relación aproximada de intensidades (1:9:3) respectivamente para el protón H-3, del anillo tiofénico, además de tres pares de señales singulete para los grupos metoxilos a campo alto δ : 3.94 y 3.96; δ : 3.91 y 3.97; δ : 3.98 y 4.01 y en una relación similar a la anterior. Así mismo se aprecian dos señales singulete a δ : 6.80 para H-6 y δ : 6.74 para H-5, en una relación 3:1. Los productos de monocloración fueron confirmados por el espectro de masas. Masa Teórica Calculada: 440.11727. Experimental: 440.11188.

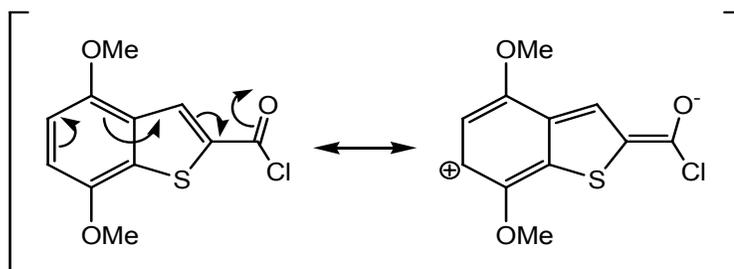
Esta reacción de cloración aromática con cloruro de tionilo corresponden a productos poco esperados con este reactivo, y que según nuestra revisión bibliográfica da cuenta de solo dos trabajos: Otto Soidinsalo⁴⁹, 2007 y Michael Davis⁵⁰, 1977. En

antecedentes de la reactividad del ácido carboxílico, y de acuerdo a lo que se obtiene en condiciones normales, cabe esperar la formación primaria del haluro de acilo y la cloración del sistema aromático en una segunda reacción.

Utilizando la teoría de la resonancia es posible proponer que el derivado mayoritario de mono cloración, debiera corresponder al cloruro de 5-cloro-4,7-dimetoxi-benzotiofencarbonilo **18-a**.



Si bien la activación del anillo bencénico viene dada fundamentalmente por la presencia de los grupos metoxilos donores, resulta interesante discutir el efecto eléctrico que induciría la función haluro de acilo sobre el anillo bencénico.

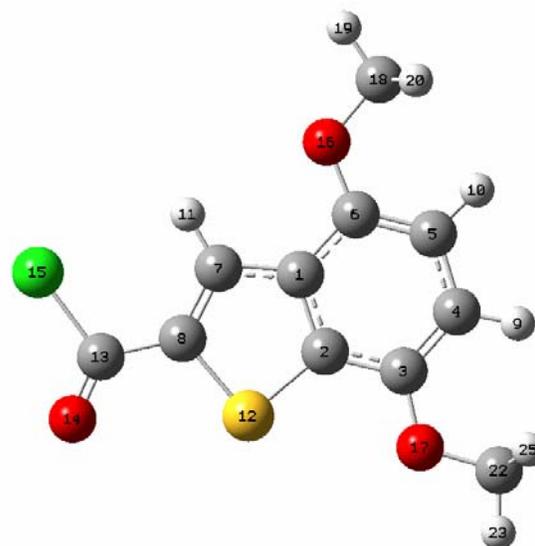


El desplazamiento coplanar de los enlaces π conduce a la generación de una carga positiva en C-6 lo que puede ser interpretado como un hecho que desfavorecería la cloración electrofílica en esa posición.

Esta hipótesis fue sustentada a través del estudio de métodos computacionales de cálculo que permiten estimar la densidad de carga sobre los átomos de carbono en la estructura optimizada, utilizando el programa Gaussian 0.3W versión 6.1 instalado en un equipo PC con un Intel Core2 Quad Q 6600 y 4 Gb de memoria RAM,

empleando el formalismo DFT (B3LYP / 6-311+G* d,p) (Esquema 3.20). Los resultados obtenidos proporcionan una buena aproximación a nuestra propuesta teórica, entregándole al C-5 la mayor carga negativa de la estructura, siendo por tanto el ataque electrofílico más factible en esta posición. En tal sentido, fundamentamos nuestra propuesta del isómero **18-a** como el mayoritario.

	Mulliken	NPA
1 C	0.493915	-0.12628
2 C	0.199683	-0.19535
3 C	-0.333298	0.29493
4 C	0.048093	-0.25373
5 C	-0.689226	-0.28243
6 C	0.057382	0.34177
7 C	-0.210611	-0.14818
8 C	1.271659	-0.31213
9 H	0.127389	0.21143
10 H	0.128459	0.21117
11 H	0.179324	0.24692
12 S	-0.481596	0.48253
13 C	-1.181132	0.50087
14 O	-0.134671	-0.49653
15 Cl	0.378960	-0.06368
16 O	-0.186336	-0.53396
17 O	-0.195263	-0.53713
18 C	-0.199561	-0.20304
19 H	0.164866	0.19226
20 H	0.146284	0.16902
21 H	0.146287	0.169
22 C	-0.191054	-0.1921
23 H	0.166676	0.19187
24 H	0.146886	0.16651
25 H	0.146885	0.16651

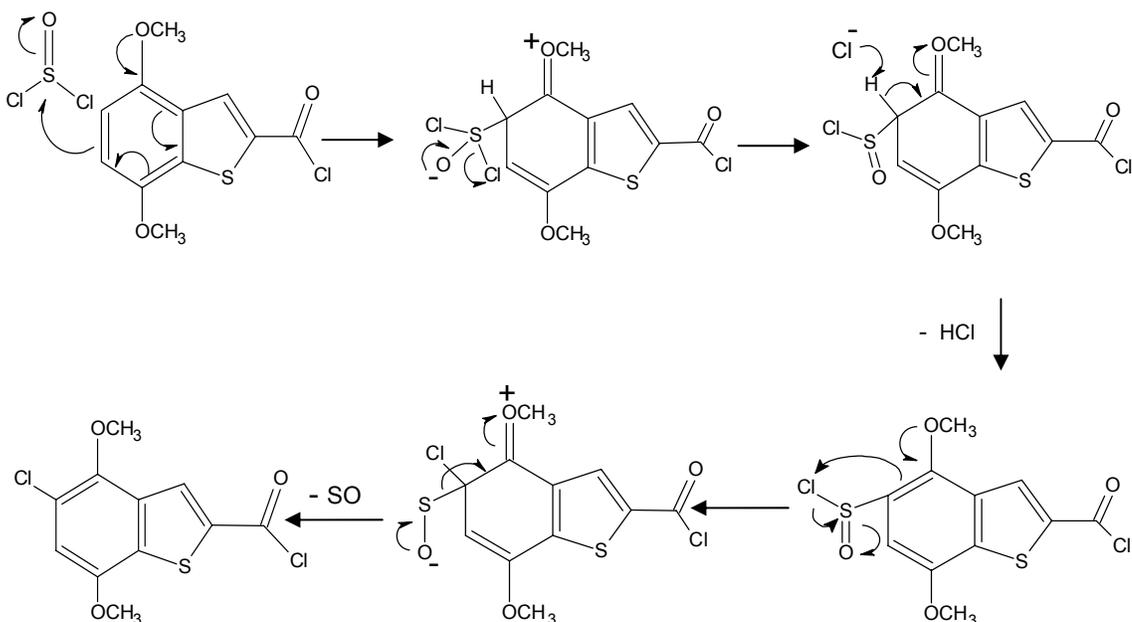


Esquema 3.20. Método computacional de cálculo para estimar la densidad de carga sobre los átomos de carbono en la estructura optimizada del derivado (**5**)

Ahora respecto de los probables mecanismos de cloración aromática del ácido 4,7-dimetoxi-benzoico, estos pueden resumirse como sigue:

1.- Ataque del SOCl₂ al sistema aromático (Isómero Mayoritario)⁴⁹.-

La reacción se iniciaría por un ataque electrofílico del anillo bencénico activado sobre el cloruro de tionilo, para generar una secuencia de intermediarios que se estabilizarían finalmente por eliminación de monóxido de azufre (SO), como lo muestra el esquema 3.21.

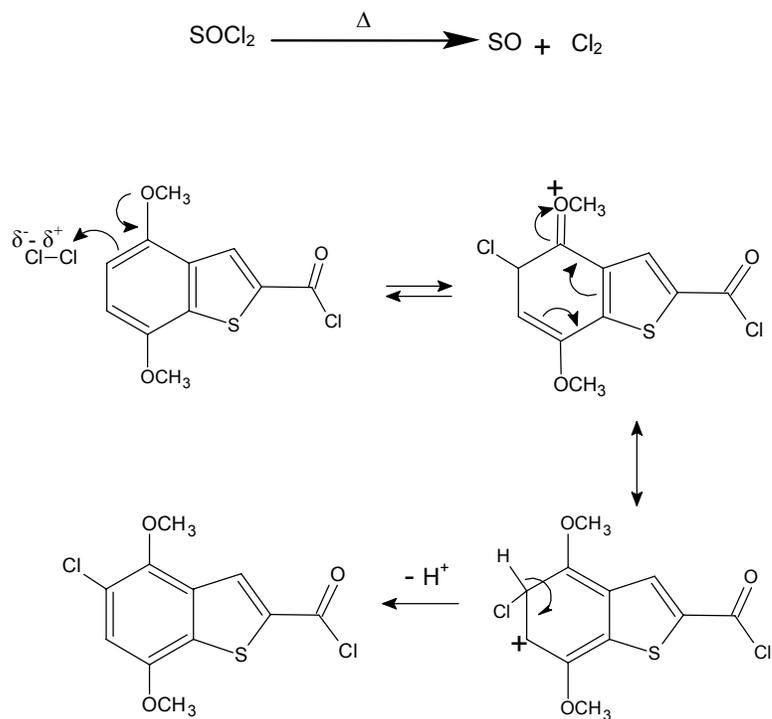


Esquema 3.21. Mecanismo de sustitución aromática electrofílica por reacción de SOCl₂ sobre el sistema aromático.

2.- Descomposición térmica del SOCl₂ (Esquema 3.22.)⁵⁰.-

El cloruro de tionilo se descompone lentamente a temperatura de reflujo, en monóxido de azufre (SO) y cloro molecular, por lo que podría eventualmente dar lugar también a una sustitución aromática electrofílica a través del mecanismo que se muestra, no obstante careciendo del catalizador de halogenuro de hierro. Una forma de verificar esta hipótesis consistiría en repetir esta reacción en presencia de cloro molecular a reflujo, como se muestra en la secuencia de reacciones heterolíticas,

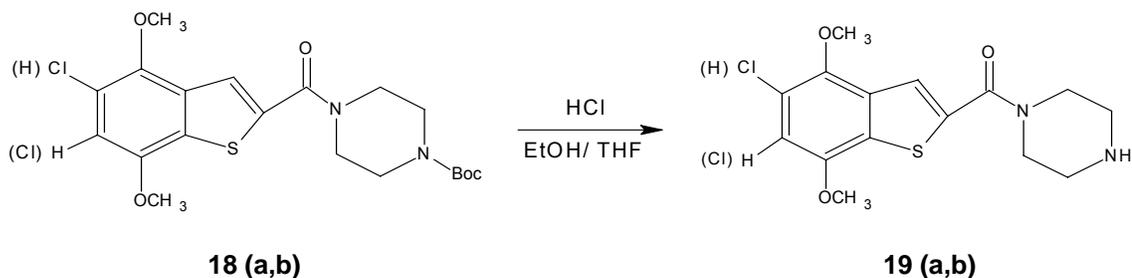
aunque no se puede descartar un mecanismo radicalario de sustitución, dada la facilidad de descomposición del halógeno en presencia de luz.



Esquema 3.22. Mecanismo de sustitución aromática electrofílica por reacción Cl_2 sobre el sistema aromático.

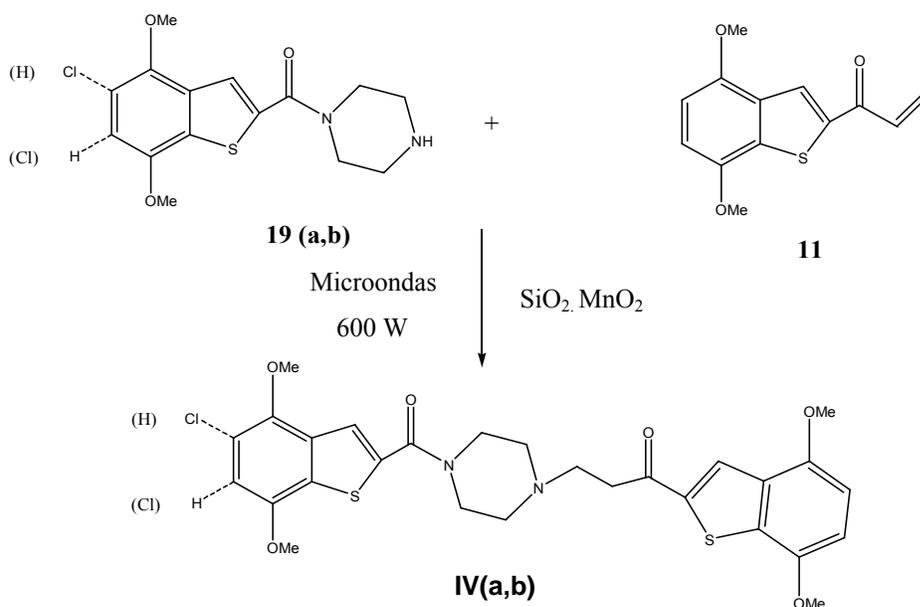
Si bien no se dispone de los datos analíticos de la mezcla inicial de haluros de acilo clorados **5 (a,b)**, esta fue indirectamente validada por la caracterización de sus intermediarios de orden superior en la secuencia sintética.

Al continuar con la hidrólisis de **18 (a,b)**, se aprecia espectralmente solo dos nuevos derivados piperazínicos clorados **19 (a,b)**, con una sola mancha cromatográfica, y que fueron aislados por cromatografía en columna $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1). Estos isómeros monoclorados tampoco pudieron ser purificados. El rendimiento de esta reacción es de 76% como mezcla.



Esquema 3.23. Reacción de Hidrólisis del derivado clorado *N*-Boc piperazina (**18a,b**)

Con los sustrato **19(a,b)** obtenidos, se ensayó la adición de Michael sobre la benzotiofen enona (**11**). El producto crudo formado en esta reacción con un rendimiento de 95%, es purificado por cromatografía en columna utilizando como eluyente AcOEt: CH₂Cl₂ (4:1), accediendo así a la mezcla de compuestos **IV** monoclorados **20(a,b)** como un sólido amarillo cristalino con un rendimiento del 79 %.



Masa Exacta Teórica : 588.11555 . Masa Experimental : 588.11345.

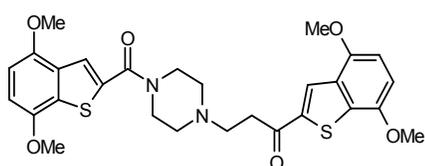
Esquema 3.24. Reacción de adición de Michael asistida por microondas para la obtención de los compuestos **IV(a,b)**

3.2. Estudios de radioligandos

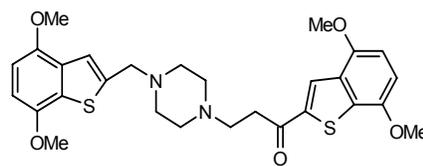
Durante los últimos 20 años la técnica de unión de radioligandos a receptores se ha convertido en una importante herramienta para el estudio farmacológico de los receptores de importancia fisiológica. Esta técnica permite establecer las características intrínsecas del receptor (número y población de receptores), y determinar la afinidad y selectividad que el radioligando presenta en el receptor estudiado, siendo estos datos de interés en el desarrollo de nuevos fármacos.

Los ensayos biológicos realizados tienen por objetivo medir la afinidad relativa de nuestros compuestos por el subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} presente en diversas estructuras del sistema nervioso central (SNC). El grado de afinidad ligando-receptor se determinó por la capacidad de los compuestos obtenidos de desplazar 8-hidroxi-di-n-propilaminotetralina tritiada [³H] 8-OH-DPAT un ligando de reconocida selectividad y afinidad por los receptores 5-HT_{1A}, el cuál fue descrito por Arvidsson en 1981.²⁴ Se evaluó la capacidad de unión de los compuestos I, II, III, IV.

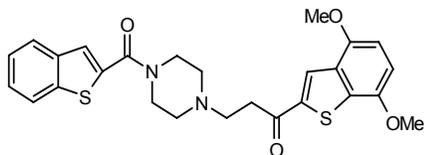
Esta parte del trabajo se realizó en el laboratorio de Neurobioquímica, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.



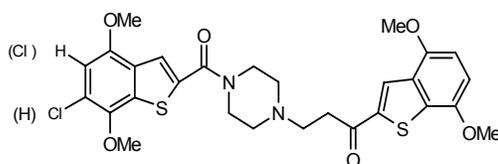
(I)



(II)



(III)



(IV) (a,b)

Los ensayos de unión de radioligando a receptores son reacciones químicas reversibles que tienen lugar entre un ligando marcado radiactivamente (neurotransmisor, fármaco, hormona, etc.) y un receptor, en un medio determinado.



En estos ensayos se deberá disponer, por un lado, de un radioligando adecuado y con la suficiente selectividad y afinidad, y por otro, se necesitará una suspensión de tejido homogeneizado, en la que se hallara el receptor.

El radioligando que se ha unido al receptor es fácilmente detectable por la técnica de contaje mediante centelleo líquido.

La reacción tendrá lugar en un medio en el que se han fijado adecuadamente valores como la concentración de radioligando, suspensión proteica, pH, temperatura, etc, factores que pueden influenciar en la unión del radioligando al receptor.⁵¹

3.2.1. Ensayos de saturación

Los ensayos de saturación miden la unión específica en equilibrio a varias concentraciones del radioligando para determinar los parámetros de afinidad (expresada como constante de disociación K_D (nM)) y el número máximo de sitios de unión (B máx. (fmol/mg prot.))⁵²

Los experimentos de saturación fueron llevados a cabo con concentraciones de [³H] 8-OH-DPAT entre 0.13 – 105 nM, con un tiempo de incubación de 30 minutos a 37°C, en un volumen de ensayo de 200µL. La unión inespecífica (unión del radioligando a otros componentes del ensayo, como tubos de ensayo, papel filtro, estructuras biológicas no relacionadas a receptores, etc.) fue cuantificada con 100µM de 8-OH-DPAT no marcado. La unión inespecífica se resta de la cantidad total de radioligando unido para obtener la cantidad de radioligando específicamente unido al receptor.⁵³

Unión específica = Unión total – Unión inespecífica

La ecuación que relaciona la cantidad de complejo radioligando – receptor (B) con la concentración de radioligando libre (F) es:

$$[B] = \frac{B_{\max} [F]}{K_D + [F]}$$

Esta ecuación describe una hipérbola rectangular, denominada curva de saturación, cuando el eje de ordenadas es el fármaco fijado (B) y el de abscisas, el fármaco libre (F).

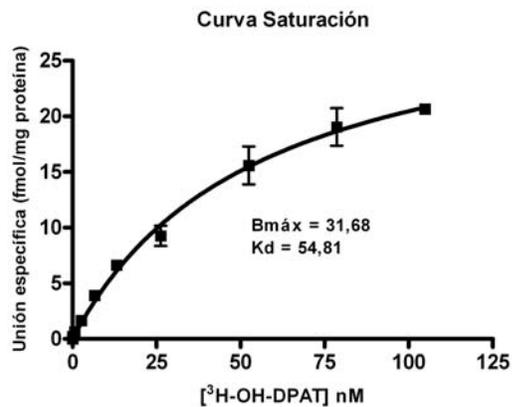


Figura 3.3. Curva de saturación para [³H]-8-OH-DPAT en el sitio de unión. B_{máx} 31,68 ± 2,51 fmol/mg de proteína y K_D 54,81 ± 8,87 nM. Resultados expresados con su respectivo error estándar.

Con los datos representados de esta manera es difícil establecer los valores de K_D y B_{max}, ya que la ecuación no es lineal, por lo que se recurre a la representación de

Scatchard, para obtener una recta por una sencilla transformación de la ecuación anterior:

$$\frac{[B]}{[F]} = \frac{-[B]}{K_D} + \frac{B_{\max}}{K_D}$$

Graficando $[B]$ vs $[B]/[F]$, se puede obtener los valores de K_D y B_{\max} , de la pendiente ($-1/K_D$) y el intercepto de la recta con el eje X respectivamente.⁵⁴

Sin embargo, en nuestro análisis de los experimentos de saturación para la unión de $[^3\text{H}]\text{-8-OH-DPAT}$, se obtiene una representación de Scatchard curvilínea (Fig. 3.4.), indicando la presencia de más de un sitio de unión para el radioligando, o la existencia de una interacción de tipo cooperativa. Una exhaustiva revisión bibliográfica⁵⁵⁻⁶² es consistente con la presencia de más de un sitio de fijación para el radioligando en la población marcada, con valores de afinidad diferentes.

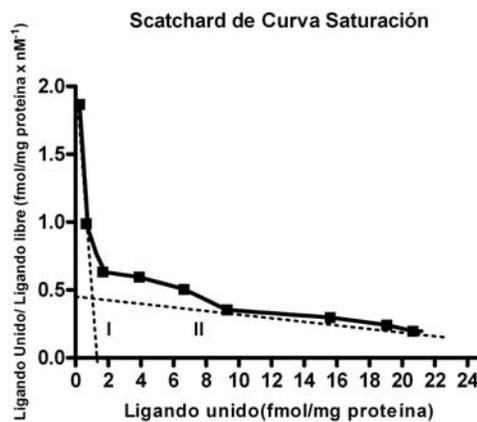


Figura 3.4.

Las líneas punteadas representan los sitios de unión de alta (I) y baja afinidad (II). Los valores de K_D y B_{\max} obtenidos para ambos sitios son:

	SITIO ALTA AFINIDAD	SITIO BAJA AFINIDAD
K_D (nM)	0,47 ± 0,17	55,54 ± 12,40
B_{máx} (fmol/mg proteína)	1,11 ± 0,19	31,86 ± 3,49

Los estudios realizados alrededor de los años 90, informan la unión de 8-OH-DPAT a una sola población homogénea de receptores ($K_i \approx 1\text{nM}$), pero recientemente, se ha demostrado que el 8-OH-DPAT no es completamente selectivo para el receptor 5 HT_{1A}, si no que tiene una moderada afinidad por el receptor 5 HT₇.⁵⁵ Weinstein y cols.⁵⁷ informaron para el [³H]-8-OH-DPAT, dos sitios con afinidades distintas: a concentraciones de radioligando entre 0,3 – 2,5 nM, este se une a un sitio saturable de alta afinidad con una K_D de 1,1 – 1,2 nM y para concentraciones de radioligando mayores de 5 nM, marca un segundo sitio con una K_D de baja afinidad (8,3 - 10,2 nM), la que no es detectable a bajas concentraciones. Otros trabajos informan que 8-OH-DPAT presenta una moderada afinidad al receptor 5HT₇ con valores de K_i de 30 – 150 nM.⁵⁸⁻⁶¹

En base a estos antecedentes bibliográficos se puede plantear en nuestro estudio, la presencia de una población heterogénea de receptores en corteza cerebral de rata. Los valores de K_D obtenidos experimentalmente correlacionan con los informados en bibliografía. Así el K_D = 0,47 ± 0,17 nM para el sitio de alta afinidad correspondería al receptor 5 HT_{1A} y el K_D = 55,54 ± 12,40 nM del sitio de baja afinidad al receptor 5 HT₇.

3.2.2. Determinación de IC₅₀ para 8-OH-DPAT.

Para determinar la IC₅₀ (Concentración de ligando que desplaza 50% de ligando marcado) se realizó un experimento de competencia homóloga de 8-OH-DPAT frente al ligando marcado ([³H]-8-OH-DPAT). Las soluciones del ligando 8-OH-DPAT no marcado, fueron agregadas en triplicado a la muestra de ensayo de competencia a 7 distintas concentraciones (0,1nM-0,1mM), y una concentración fija de radioligando de

5nM (valor obtenido a partir de los experimentos de saturación), con un tiempo de incubación de 30 minutos a 37°C.

La separación del ligando unido y el ligando libre fue realizada por filtración rápida a través de filtros Whatman GF/C (previamente tratados con una solución al 0.3% de polietilenimina), posteriormente fueron lavados 2 veces (2mL cada vez) con buffer Tris-HCl frío. La radioactividad unida al filtro fue medida en un contador de centelleo líquido después de la adición de 4mL de una solución Arcopal-PPO, POPOP.

Todos los datos fueron analizados usando un ajuste de curva de regresión no lineal con el programa GraphPad PRISMA versión 4.03 para Windows. Figura 3.

El valor de la IC_{50} se obtiene de la gráfica del porcentaje de unión específica del ligando marcado vs logaritmo de la concentración de 8-OH-DPAT no marcado. $IC_{50} = 48.97$ nM.

El valor de IC_{50} obtenido de la curva de competencia homóloga, es un valor referencial que nos permitió comparar las potencias relativas de los compuestos sintetizados.

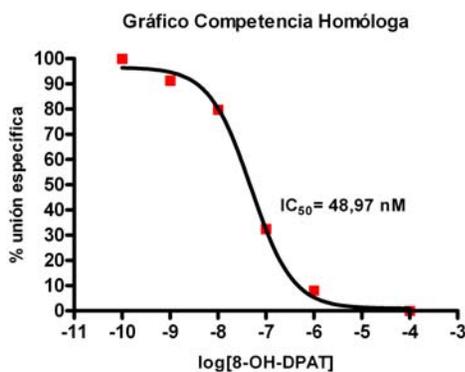


Figura 3.5. Curva de competencia homóloga de 8-OH-DPAT

Debido a la existencia de más de un sitio de fijación en la población marcada, se determinó la contribución de cada sitio a la cantidad total de receptores, lo que nos

permitirá estimar que sitios están siendo ocupados por el radioligando a la concentración de 5 nM (concentración de radioligando utilizado en los estudios de competencia) y también en que sitios presentan mayor afinidad los compuestos evaluados.

Conociendo los $B_{\text{máx}}$ y el K_D del radioligando en cada sitio, podemos calcular esta contribución mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Unión Específica} = \frac{B_{\text{máx}_1} [L]}{Kd_1 + [L]} + \frac{B_{\text{máx}_2} [L]}{Kd_2 + [L]}$$

Los resultados obtenidos indican que del total de sitios marcados, a una concentración de radioligando de 5 nM, los sitios de alta afinidad corresponden a un 28% y los sitios de baja afinidad a un 72%, observándose que la mayor contribución al número de sitios marcados corresponde a los sitios de baja afinidad.

3.2.3. Ensayos de competencia de los ligandos I, II, III y IV

Los ensayos de competencia miden la unión de una concentración constante de ligando marcado en presencia de varias concentraciones de ligando no marcado.⁵²

La teoría de los estudios de competencia señala que si uno de los ligandos (A) presenta una alta afinidad conocida y se utiliza en forma radiactiva, la capacidad de desplazamiento del otro ligando (X) frente a la fijación de A es un indicador de la afinidad de X por el receptor.

El perfil de competencia se obtiene cuantificando el porcentaje de la fijación de una concentración constante de A que va quedando en la muestra a medida que se le añaden concentraciones crecientes de X en forma no radiactiva. La disminución de la fijación específica de A es proporcional al aumento de la concentración de X,

adoptando esta relación una curva en forma de S invertida cuando se representa en forma semilogarítmica.⁵⁴

La constante de inhibición K_i indica la afinidad de X, a través de la ecuación de Cheng-Prusoff:⁶²

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[ligando]}{K_D}}$$

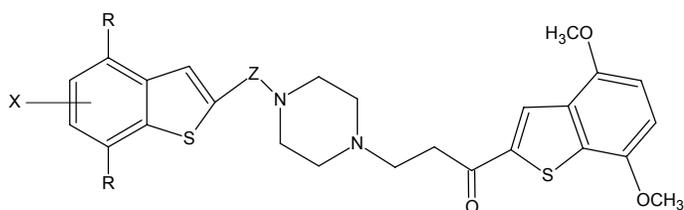
donde K_D es la constante de disociación de A y la IC_{50} es la concentración capaz de producir el 50% de desplazamiento.

La afinidad de las moléculas sintetizadas, por los receptores serotoninérgicos presentes en la corteza cerebral de rata fue estudiada mediante ensayos de competencia frente al radioligando [³H]-8-OH-DPAT.

Todos los compuestos fueron solubilizados en 100% de DMSO para obtener una concentración inicial 10 mM. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas de los compuestos con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.4 para alcanzar una concentración final de los compuestos de 1 uM (1 % de DMSO), esperando una inhibición a esta concentración $\geq 55\%$ ⁶³, en cuyo caso se realizará la curva de competencia para los ligandos elegidos. Este ensayo fue realizado en triplicado, en presencia de una concentración de ligando marcado de 5 nM en un volumen total de 200 μ L. Se utilizó como control en paralelo y en triplicado un ensayo con 1 μ M de 8-OH-DPAT no marcado, a la misma concentración final de ligando marcado.

La temperatura de incubación fue de 37°C (temperatura de equilibrio). Las membranas de corteza cerebral de rata, previamente tratadas y almacenadas fueron resuspendidas en 1,6 mL de buffer Tris-HCl frío. Una alícuota de 50 μ L de esta suspensión fue adicionada para iniciar el ensayo. Los filtros para la medición de radioactividad y el procesamiento de los datos fueron realizados de la misma forma descrita anteriormente.

Todos los compuestos ensayados desplazaron menos del 50% de la unión, a la concentración establecida de 1 μM , en términos de unión específica (I = 32%, II = 13.52%, III = 38.91%, IV = 1.6%), en comparación con el 92% de desplazamiento de la unión que exhibió el ligando 8-OH-DPAT no marcado a la misma concentración. Por lo tanto para estos compuestos no se realizó la curva de competencia a distintas concentraciones para determinar su K_i , ya que el valor esperado sería superior a 10000 μM , lo que no representaría un valor útil para este tipo de receptor.

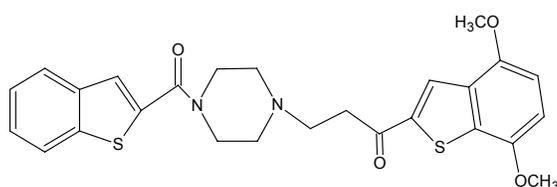


Compuesto	R	Z	X	% Inhibición
I	OCH ₃	CO	H	32
II	OCH ₃	CH ₂	H	13.52
III	H	CO	H	38.91
IV	OCH ₃	CO	Cl	1.60
8-OH-DPAT				92

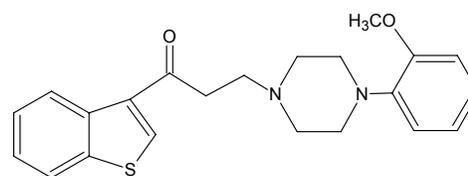
3.2.4. Estudio de las relaciones estructura-actividad de los compuestos I, II, III y IV.

Probables factores que afectan la afinidad ligando-receptor. Es sabido que la unión ligando-receptor viene mediada por fuerzas del tipo puente de hidrógeno, atracciones coulómbicas (ion-ion), atracciones dipolo-dipolo (δ^+ - δ^-) y por fuerzas de Van der Waals. Nuestro compuesto III, que no presenta sustitución aromática en la porción de benzotiofen amida, exhibió el mejor porcentaje de competencia (38.91%) por la unión específica frente a [³H]8-OH-DPAT, lo que en términos de K_i sería del orden micromolar. Esta baja afinidad podría deberse en parte a repulsiones de los

electrones no enlazantes en los orbitales del oxígeno, con el sistema π de residuos aromáticos de los lazos del receptor, como también a efectos estéricos del grupo metilo que impediría el acercamiento necesario en la cavidad del receptor para desplazar al ligando 8-OH-DPAT. Así mismo es conocido el hecho además que uno de los farmacóforos del receptor 5-HT_{1A}, lo constituye la familia de las arilpiperazinas, una de las benzotiofenarilpiperazinas de la serie sintetizada por Monge³¹ presentó buenos resultados de afinidad cuando no existían sustituyentes en el anillo benzo[*b*]tiofeno (K_i= 45 nM).



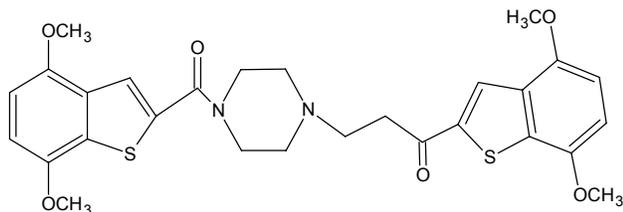
(III)



Estructura de Monge, K_i = 45 nM

Nuestras familias son solo derivados piperazínicos conectados a porciones arílicas, por lo que una propuesta interesante para favorecer la afinidad en el receptor, sería por tanto diseñar un estructura arilpiperazínica formal, conectando directamente el anillo de benzotiofeno sin sustituyentes al anillo de piperazina, de esta forma se conformaría un análogo estructural de la serie estudiada por Monge.

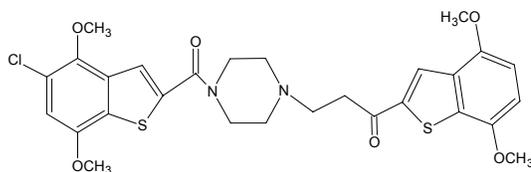
En el compuesto I, se observa una disminución de la afinidad (porcentaje de inhibición 32%), probablemente también debido a la presencia de grupos metoxilo en las posiciones C-4 y C-7 del anillo de benzotiofenamida los cuales ejercerían un efecto desfavorable por su gran volumen, en relación a la afinidad con residuos aminoacídicos claves (Serina, Treonina, Aspartato).



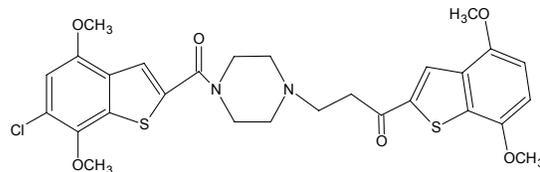
(I)

La reducción del grupo ceto a metileno en el derivado (I) disminuye aún más el porcentaje de inhibición (13.52%). Siendo este grupo un aceptor de puentes de hidrógeno, es posible que su ausencia elimine las interacciones favorables de este tipo, que estabilizan al complejo ligando-receptor probablemente con un residuo de cisteína, como se aprecia en la interacción por docking de flunoxán.⁶⁴ Así mismo se espera un cambio importante en la conformación del anillo piperazínico al eliminarse la conjugación con el centro carbonílico sp^2 , esto podría incidir en una interacción energéticamente desfavorable para su unión con el receptor.

Respecto al compuesto (IV), formado por una mezcla de los cloro derivados IVa y IVb, la presencia de un grupo electroattractivo de gran volumen como el átomo de cloro en el anillo de benzo[*b*]tiofeno es desfavorable para la afinidad, exhibiendo un porcentaje de inhibición de 1.60%.



IV (a)



IV (b)

Este resultado puede interpretarse debido al tamaño atómico que presenta el átomo de cloro, lo que asociado al volumen de los grupos metoxilos vecinos, generaría un congestión estérica considerable que impediría el acercamiento al sitio farmacóforo.

3.2.5. Diseño de drogas. Estrategias y Avances.

El sostenido avance experimentado por la bioquímica, la biología molecular y la farmacología en relación a identificar nuevas dianas farmacológicas, ha permitido crear modelos tridimensionales del ligando y del receptor; y definir muy acertadamente las fuerzas interatómicas que gobernarían la interacción ligando-receptor, así como el comportamiento dinámico de este complejo.

En este sentido las técnicas de modelación molecular (estudios de docking), y estudios de QSAR (quantitative structure activity relationship) son de utilidad para un mejor entendimiento en el diseño de nuevos ligandos a nivel subcelular, permitiendo establecer comparaciones entre los datos teóricos y los experimentales, e incluso realizar predicciones cuantitativas.

3.2.5.1. Docking

Las técnicas de modelación molecular proporcionan una información útil sobre los aspectos estructurales y funcionales de los receptores acoplados a proteína G y sus interacciones con los ligandos. En ausencia de estructuras tridimensionales (3D) de los receptores 5-HT, los modelos de receptor 5-HT_{1A} de la rata han sido construidos por un diseño de modelado comparativo y utilizados para estimular la dinámica molecular del complejo ligando-receptor. Tales modelos han sido utilizados para examinar las interacciones de los receptores con los ligandos, proporcionando hipótesis en relación a los determinantes estructurales, especificando las uniones de alta afinidad o selectividad de los ligandos. En futuros diseños incorporaremos estudios

de docking como herramienta predictiva destinada a optimizar la afinidad de los ligandos por el receptor.

3.2.5.2. Técnicas QSAR y métodos de modelación molecular

Los métodos que relacionan la estructura química con la actividad biológica, asistidas por computadoras pueden dividirse en dos grandes categorías: los Métodos QSAR y los Métodos de Modelación Molecular ó SAR.⁶⁵

Los métodos SAR consideran las propiedades de las moléculas en tres dimensiones y son importantes entre otros, el análisis conformacional, la mecánica-cuántica, los campos de fuerzas y los gráficos moleculares interactivos. Estos últimos permiten la representación y la manipulación de las molécula en tres dimensiones, lo que proporciona una información espacial que es esencial para comparar moléculas y para estudiar la interacción entre ligandos y receptores macromoleculares.⁶⁵

Métodos QSAR

Entre las herramientas que dispone la química medicinal para orientar la búsqueda hacia compuestos con bioactividad destacada están los estudios cuantitativos de relación estructura-actividad (QSAR, Quantitative Structure-Activity Relationship), los que correlacionan la estructura química (hidrofobicidad, topología, propiedades electrónicas y efectos estéricos) con la actividad farmacológica en una manera cuantitativa para una serie de compuestos, constituyendo un método mediante el cual se puede buscar los productos mas activos entre un conjunto de candidatos.⁶⁶

3.2.5.3. Bioisosterismo

Una técnica de apoyo que resulta de interés en la obtención de derivados bioactivos, es la aplicación del concepto de bioisosterismo.

Inicialmente fue un concepto puramente químico, aplicado a las moléculas el hecho de que en el caso de los átomos, una distribución electrónica similar conduce a propiedades similares.

Langmuir en 1919, estudio el comportamiento químico y la reactividad de determinados compuestos que tenían átomos o grupos con el mismo numero de electrones de valencia (isoelectrónicos), creando el concepto de *isosterismo* para definir a átomos o moléculas orgánicas o inorgánicas que poseen el mismo numero y/o arreglo de electrones.⁶⁷

Friedman⁶⁸ propuso llamar *Bioisósteros* a aquellos compuestos que cumplan alguna de las definiciones de isosterismo y posean el mismo tipo de actividad biológica agonista o antagonista. Thonrber⁶⁹ propuso ampliar el término de *Bioisósteros*, definiéndolos como “grupos o moléculas que tienen propiedades físicas y químicas semejantes y que producen efectos fisiológicos aproximadamente similares.

El Bioisosterismo es una estrategia de la Química Medicinal que se emplea en el diseño experimental de nuevas drogas, mediante la modificación racional de compuestos líderes, obteniéndose así agentes cuya acción es idéntica a los compuestos tomados como modelo, mas seguros y clínicamente mas eficaces.⁷⁰

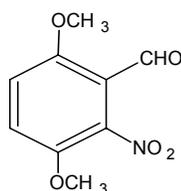
Los compuestos líderes, deben ser de una estructura química y mecanismo de acción muy bien conocido, si es posible a nivel de interacción topográfica con el receptor. Así como también sus propiedades fisicoquímicas las cuales regulan su biodisponibilidad, y efectos secundarios.⁶⁷

El uso del bioisosterismo en el diseño de nuevas drogas, nos permite mejorar la actividad farmacológica, obtener selectividad para un determinado receptor, reducción de efectos adversos, e incluso optimizar la farmacocinética del compuesto líder, minimizando los esfuerzos de trabajo sintético

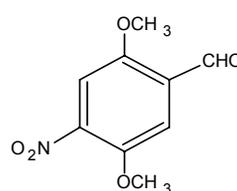
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1. Síntesis

4.1.1. 3,6-Dimetoxi-2-nitrobenzaldehído (2)



(2)

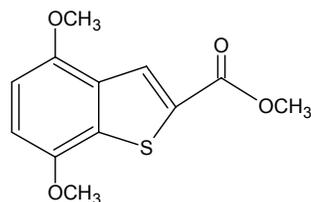


(2a)

Su obtención a escala preparativa, fue realizada por tratamiento del sustrato comercial 2,5-dimetoxibenzaldehído (1.20 g, 7.2 mmol) en una mezcla HOAc:HNO₃ (c) (50 mL/ 10 mL, 0.15 mmoles de HNO₃). Posteriormente se adiciona agua (50 mL), y se neutraliza con NaHCO₃ sólido hasta pH neutro. El producto es extraído con CH₂Cl₂ (3x60 mL) y las fases orgánicas son reunidas y secadas con Na₂SO₄ anhidro. La fase orgánica se filtra y se concentra por evaporación rotatoria obteniéndose una mezcla de los nitrobenzaldehídos isoméricos **2** y **2-a** que se purifica por cristalización en etanol dando lugar al isómero 3,6-dimetoxi-2-nitro-benzaldehído 833 mg, (56 %) de producto puro.

pf: 170-171° C. IR ν_{\max} : 2980 (C-H Alifático), 2860 y 2840 (C-H Aldehído), 1680 (C=O), 1520 (NO₂) Asimétrica, 1360 (NO₂) Simétrica. ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ : 3.85 (s, 3H, C-6 OMe), 3.94 (s, 3H, C-3 OMe), 7.10 (d, 1H, C-5H, *J* = 8.3 Hz), 7.28 (d, 1H, C-4 H, *J* = 8.3 Hz), 10.35 (s, 1H, CHO). ¹³C-RMN_(ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ : 56.8 (C-6 OMe), 57.2 (C-4 OMe), 114.2 (C-5 o C-6), 116.2 (C-2), 121.0 (C-3), 144.5 (C-4), 155.3 (C-1), 186.1 (CHO).

4.1.2. 4,7-Dimetoxi-1-benzo[*b*]tiofen-2-carboxilato de metilo (3)

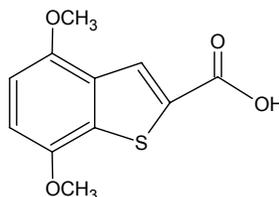


(3)

A una mezcla de nitrobenzaldehído **2** (552 mg, 2.61 mmol), K₂CO₃ anhidro (436 mg, 2.61 mmol) y DMF como solvente (10 mL), se le agrega tioglicolato de metilo (0.3 mL, 2.61 mmol) a temperatura ambiente. Una vez terminada la adición, la mezcla se calienta a 70°-75°C, con agitación por 4 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla se vierte sobre un vaso de agua-hielo con agitación, hasta aparición de un precipitado color pardo-amarillento. El sólido es filtrado al vacío, lavado con agua (3X25 mL) y posteriormente secado. El producto es purificado por cromatografía en columna de sílica gel, utilizando CH₂Cl₂ como eluyente, generando 462mg (70%) de producto puro.

pf: 124-125 °C. Análisis Elemental (C₁₂H₁₂O₄S): Teórico = C (57.13%), H (4.80%), S (12.69%). Experimental= C (56.78%), H (4.90%), S (12.52%). IR ν_{\max} : 3010 (C-H, Aromáticos), 1702 (C=O), 1260 (C-O) (cm⁻¹). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ : 3.91 (s, 3H, COOCH₃), 3.93 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3.94 (s, 3H, Ar-OCH₃), 6.67 (d, 1H, 5-H, *J* = 8.5 Hz), 6.75 (d, 1H, 6-H, *J* = 8.5 Hz), 8.20 (s, 1H, 3-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ : 52.4 (COOCH₃), 55.8 (OCH₃-Ar), 56.0 (OCH₃-Ar), 104.6 (C-5), 106.8 (C-6), 128.0 (C-3), 131.1 (C-7a), 132.4 (C-2), 132.9 (C-3a), 148.4 (C-7 o C-4), 150.5 (C-4 o C-7), 163.2 (COOCH₃).

4.1.3. Ácido 4,7-dimetoxi-benzo[*b*]tiofen-2-carboxílico (4)

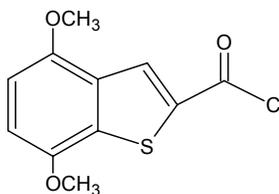


(4)

Se obtuvo por hidrólisis en medio básico con KOH 0,5N:EtOH (1:1 v/v, 60 ml) del éster **3** (562 mg, 2.23 mmol). La solución fue posteriormente concentrada y acidificada con HCl (c) a bajas temperaturas, formándose un precipitado color crema, que es luego filtrado. El rendimiento del crudo es prácticamente cuantitativo. Su purificación se realizó por cromatografía en una columna eluída con acetato de etilo, obteniéndose un sólido amarillo pálido **4** (345 mg, 65%).

pf: 129-130°C, Análisis Elemental (C₁₂H₁₂O₄S): Teórico = C (55.45%), H (4.23%), S (13.46%). Experimental= C (55.45%), H (4.50%), S (13.21%). IR ν_{\max} : 3650-2800 (O-H), 1670 (C=O), 1529(ArC=C). ¹H-RMN(ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ : 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.94 (s, 3H, OCH₃), 6.86 (d, 1H, 5-H, *J*= 8.5 Hz), 6.95 (d, 1H, 6-H, *J*=8.5 Hz), 8.24 (s, 1H, 3-H), 12.7 (s, 1H, COOH). ¹³C-RMN(ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ : 56.2, 56.4, 105.9, 107.3, 122.6, 130.7, 131.4, 135.4, 148.3, 150.0, 171.6.

4.1.4. Obtención del cloruro de 4,7-dimetoxi-benzo[*b*]tiofen-2-carbonilo (5)

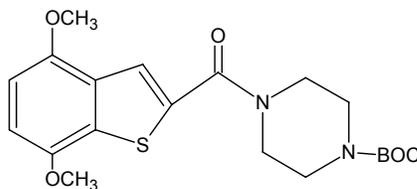


(5)

A una solución del ácido carboxílico **4** (1.30g, 5.50 mmol) con cloruro de tionilo (50 ml), fue calentado a reflujo a 60°C por 4 horas. Posteriormente la solución es concentrada al vacío, obteniéndose un sólido amarillento que fue purificado por cromatografía en columna usando CH₂Cl₂ como eluyente. Rendimiento producto puro **5**, 91%.

pf: 84-85°C, Análisis Elemental (C₁₁H₉ClO₃S): Teórico = C (51.47%), H (3.53%), S (12.49%). Experimental= C (50.54%), H (3.64%), S (12.45%). IR ν_{\max} : 1730 (ArCOCl), 1600 (ArC=C). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ : 3.93 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 6.68 (d, 1H, 5-H, *J*= 8.5 Hz), 6.84 (d, 1H, 6-H, *J*=8.5 Hz), 8.38 (s, 1H, 3-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ : 55.8, 56.1, 104.9, 108.6, 130.6, 133.5, 134.8, 135.5, 148.0, 151.1, 161.1.

4.1.5. 4-(4,7-Dimetoxi-benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-*N*-Boc-1-piperazina (**6**)



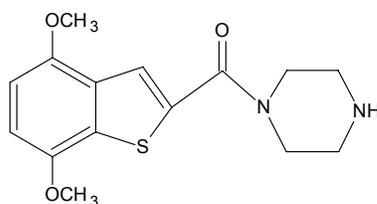
(**6**)

A una solución de haluro de acilo **5** (1.07 g, 4.17 mmol) en THF anhidro (60 ml), se agrega *N*-Boc piperazina (778 mg, 4.17mmol) y piridina seca (330 mg, 4.17 mmol). La mezcla fue agitada por 4 horas y posteriormente diluida con agua (50 ml) y extraída con AcOEt (3 x 50 ml), la fase orgánica es concentrada al vacío obteniéndose la amida cruda (1.54 g, 91%) la cual fue purificada por cromatografía en columna CH₂Cl₂/AcOEt (3:1) (1.41 g, 83%).

pf: 100-101°C, IR ν_{\max} : 1694 (NCOO), 1630 (CON), 1484 (ArC=C). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ : 1.35 (s, 9H, *ter*-butil), 3.39 (s. ancho, 4H, Piper. 3''-H y 5''-H), 3.61 (s.ancho, 4H, Piper. 2''-H y 6''-H), 3.74 (s, 3H, C-4 o C-7, OMe), 3.77 (s, 3H, C-7 o C-4,

OMe), 6.50 (d, 1H, 5-H, $J=8.5\text{Hz}$), 6.56 (d, 1H, 6-H, $J=8.5\text{ Hz}$), 7.49 (s, 1H, 3-H). ^{13}C -RMN_(ppm) (75 MHz, CDCl_3) δ : 28.5 (3C), 43.9 (2C), 45.2 (2C), 55.8, 56.0, 80.3, 105.0, 106.0, 123.0, 130.8, 130.9, 135.7, 148.5, 150.0, 154.6, 164.1. EMAR ($\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$) (M^+): Teórico = 406.15624. Experimental = 406.15643

4.1.6. 1-[(4,7-Dimetoxi-1-benzo[*b*]tiofeno-2-il)carbonil] piperazina (7)

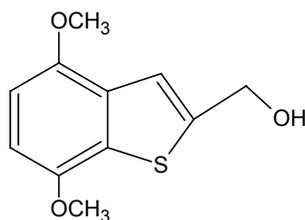


(7)

A una solución del carbamato **6** (1.37 g, 3.37 mmol) en THF:EtOH (1:1, 50 ml), se añade HCl (c), se deja en agitación durante 2 días a temperatura ambiente. Posteriormente se lleva a pH 8 – 9 con un solución NaHCO_3 para luego extraer con AcOEt, la fase orgánica es concentrada al vacío obteniéndose un sólido de color café **7**, el cual es purificado por cromatografía en columna utilizando CH_2Cl_2 :MeOH (1:1) (763 mg, 74%).

pf: 108-108,5°C, IR ν_{max} : 3480 (N-H), 1597 (NHCO), 1488 (ArC=C). ^1H -RMN_(ppm) (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.95-2.15 (s.ancho, 1H, NH), 2.91 (s.ancho, 4H, Piper. 3''-H y 5''-H), 3.73 (s.ancho, 4H, Piper. 2''-H y 6''-H), 3.89 (s, 3H, Ar-OMe, C-7 o C-4), 3.92 (s, 3H, Ar-OMe, C-4 o C-7), 6.65 (d, 1H, 5-H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.70 (d, 1H, 6-H, $J=8.4\text{ Hz}$), 7.59 (s, 1H, 3-H). ^{13}C -RMN_(ppm) (75 MHz, CDCl_3) δ : 46.2 (2C), 53.0 (2C), 55.7, 56.0, 104.7, 105.6, 122.4, 130.6, 130.8, 135.8, 148.4, 149.8, 163.8. EMAR ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$) (M^+): Teórico = 306.10381. Experimental = 306.10321.

4.1.7. (4,7-Dimetoxi-1-benzotiofen-íl) metanol (8).

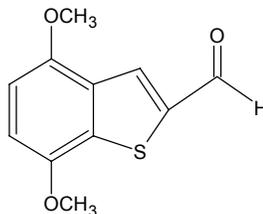


(8)

A una solución de benzotiofen éster **3** (540 mg, 2.14 mmoles) en THF anhidro (50 mL) a 0°C se añade LiAlH₄ (325 mg, 8.6 mmoles) bajo atmósfera de nitrógeno, la solución se agita por 3 horas. Una vez que la reacción se completa (detección cromatográfica) la suspensión resultante es enfriada colocando el matraz sobre un baño de hielo, y se comienza a eliminar el exceso de LiAlH₄ agregando con precaución una mezcla de solución de AcOEt:H₂O (3:1), una vez terminada esta operación, la suspensión de color blanco se filtra al vacío y se lava el precipitado en el filtro con AcOEt. Al filtrado se le adiciona 50 mL de agua y se extrae con AcOEt (3x50 mL), se seca con sulfato de sodio anhidro y se concentra por evaporación rotatoria formándose 413 mg, (86 %) de alcohol crudo. La posterior purificación por cromatografía en columna de sílica gel (CH₂Cl₂:AcOEt, 1:1), genera 320mg (65%) del benzotiofen alcohol **8** puro.

pf .125-126 °C (H₂O/ EtOH). Anal Elemental: C₁₁H₁₂O₃S. Teórico: C (58.91%), H (5.39%), S (14.30%). Experimental: C (58.23%), H (5.68%) S (14.74%). IR ν_{\max} : 3356 (O-H). 3017 (C-H Aromático), 1262 (C-O) cm⁻¹. ¹H-RMN_(ppm) (CDCl₃) δ : 1.94 (t, 1H, OH), 3.89 (s, 3H, Ar-OMe), 3.94 (s, 3H, ArOMe), 4.81 (d, 2H, -CH₂-OH), 6.65 (s, 2H, 5-H y 6-H), 7.36 (s, 1H, 3-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ : 55.8, 55.9, 66.6, 104.3, 104.6, 116.8, 130.3, 131.6, 144.0, 148.7, 149.3.

4.1.8. 4,7-Dimetoxibenzo[*b*]tiofen-2-carboxaldehído (9)

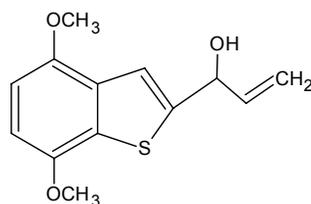


(9)

A una solución del alcohol **8** (327 mg, 1.46 mmoles) en 50 mL de CH₂Cl₂ se adiciona clorocromato de piridinio PCC (948 mg, 4.4 mmoles), y la solución se agita a temperatura ambiente por 4 horas. Posteriormente la solución se filtra y el filtrado es lavado con CH₂Cl₂ (30 mL). Finalmente la solución resultante es concentrada al vacío obteniéndose un crudo cuantitativo que es inmediatamente purificado por cromatografía en columna de sílica gel, eluída en CH₂Cl₂ formándose 298 mg (92%) de aldehído **9** puro.

pf. 109-110°C. Anal.Elemental C₁₁H₁₀O₃S: Teórico: C (59.44%), H (4.53%), S (14.43%). Experimental : C (59.65%), H (4.68%); S (14.43%). IR ν_{\max} : 2910 y 2840 (C-H, CHO), 1667 (C=O), 1603 y 1526 (C=C) cm⁻¹. ¹H-RMN_(ppm) (CDCl₃) δ : 3.86 (s, 3H, Ar-OMe), 3.88 (s, 3H, Ar-OMe), 6.61(d, 1H, 5-H *J*=8.4 Hz), 6.75 (d, 1H, 6-H, *J*=8.4 Hz), 8.10 (s, 1H, 3-H), 9.98 (s, 1H, CHO). ¹³C-RMN_(ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ : 55.8 (ArOMe C-4 o C-7), 56.0 (ArOMe C-7 o C-4), 104.8 (C-5), 108.2 (C-6), 131.1 (C-7a), 132.0 (C-3), 133.6 (C-4a), 142.5 (C-4), 148.6 (C-2), 151.0(C-7), 184.6 (CHO).

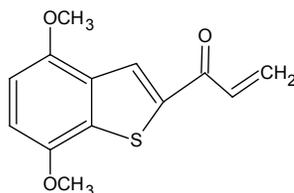
4.1.9. 1-(4,7-Dimetoxi benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-propen-1-ol (10)



A una solución de aldehído **9** (356 mg, 1.42 mmol) disuelto en THF anhidro (30 mL) se le añade bromuro de vinil magnesio (1.5 mL, 1.5 mmol, solución 1M en THF) y se irradia por 6 minutos a 600 W en un equipo de microondas y atmósfera inerte (N₂), hasta que por cromatografía en capa fina se aprecia que el producto de partida ha desaparecido. La mezcla resultante es vertida sobre agua (50mL) y extraída con AcOEt (2x 50 mL). Los extractos orgánicos reunidos son secados con Na₂SO₄ y evaporados a sequedad. El residuo crudo (rendimiento cuantitativo), se purifica por cromatografía en columna de sílica gel (CH₂Cl₂) proporcionando 249 mg (62%) del alcohol alílico **10** como un aceite amarillo pálido, que solidifica por adición de éter de petróleo.

pf 105-106 °C. IR ν_{\max} : 3183 (O-H), 2966 (C-H Alif.), 1600 (C=C), 1485 (Ar C=C) cm⁻¹. ¹H-RMN_(ppm) (CDCl₃) δ : 2.21 (d, 1H, OH, *J* = 3.2 Hz), 3.93 (s, 3H, Ar-OMe), 3.95 (s, 3H, Ar-OMe), 5.28 (d, 1H, 3-H, *J* = 10.3 Hz), 5.45 (d, 2H, 3-H y 1-H, *J* = 17.2 Hz), 6.16 (m, 1H, 2-H), 6.65 (s, 2H, 5'-H_{BT}, y 6'-H_{BT}), 7.35 (s, 1H, 3'-H_{BT}). ¹³C-RMN_(ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ : 55.9 (ArOMe C-4' o C-7'), 56.0 (ArOMe C-7' o C-4'), 71.7 (C-1), 104.4(C-5'), 104.7 (C-6'), 118.0 (C-3'), 116.3 (C-3), 130.1 (C-7a), 131.6 (C-4a), 138.9 (C-2), 146.6 (C-2'), 148.7(C-4'), 149.3 (C-7'). EMAR (C₁₃H₁₄O₃S)(M⁺): Teórico= 250.06637. Experimental = 250.06437.

4.1.10. 1-(4, 7-Dimetoxi benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-propen-1-ona (**11**)



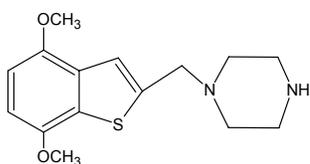
(11)

A una solución del alcohol **10** (242 mg, 0.97 mmol) en CH₂Cl₂ (50 mL) se añade MnO₂ anhidro (252mg 2.91 mmol) y MgSO₄ (117 mg, 0.97 mmol), se agita la mezcla a temperatura ambiente por 5 horas. La mezcla de reacción es filtrada y el solvente eliminado por evaporación rotatoria obteniéndose (151 mg). El crudo es purificado por

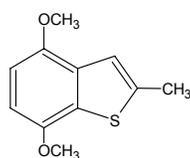
cromatografía en columna de sílica gel (CH₂Cl₂) formándose 140mg (58 %) de la enona **11** como un sólido amarillo.

pf. 99-100°C. IR ν_{max} : 3054 (C-H Ar), 2968 (C-H Alif.), 1665 (C=O), 1556 (C=C) cm⁻¹. ¹H-RMN_(ppm) (CDCl₃) δ : 3.94 (s, 3H, Ar-OMe), 3.96 (s, 3H, Ar-OMe), 5.92 (dd, 1H, 3-H, $J = 10.4$ Hz y $J = 1.6$ Hz), 6.55 (dd, 1H, 3-H, $J = 17$ Hz y $J = 1.6$ Hz), 6.67 (d, 1H, 5'-H_{BT}, $J = 8.5$ Hz), 6.80 (d, 1H, 6'-H_{BT}, $J = 8.5$ Hz), 7.23 (dd, 1H, 2-H, $J = 17$ Hz y $J = 10.4$ Hz), 8.17 (s, 1H, 3'-H_{BT}). ¹³C-RMN_(ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ : 55.8 (ArOMe C-4' o C-7'), 56.0 (ArOMe C-7' o C-4'), 104.6(C-5'), 107.6 (C-6'), 127.0 (C-3), 129.6 (C-2), 131.4 (C-3'), 131.6 (C-7a), 133.7 (C-4a), 143.6 (C-2'), 148.6 (C-4'), 150.8 (C-7'), 183.83 (C=O). EMAR (C₁₃H₁₂O₃S)(M⁺): Teórico = 248.05072. Experimental = 248.05001.

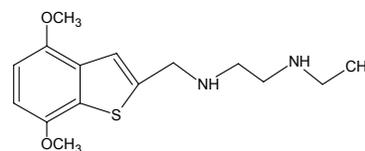
4.1.11. Reducción del derivado 1-[(4,7-Dimetoxi-1-benzo[b]tiofeno-2-il) carbonil] piperazino (**7**)



(**12**)



(**12 A**)



(**12 B**)

El sustrato **7** (809 mg, 2.64 mmol) se sometió a una reducción con LiAlH₄ en THF anhidro (50 ml) en condiciones de reflujo suave a 50° - 55°C por 5 hrs y en atmósfera inerte (N₂). La reacción generó el producto de reducción esperado **12**, en compañía de dos productos secundarios (**12-A** y **12-B**). El exceso de reductor metálico es eliminado por tratamiento con AcOEt:H₂O (2:1) a bajas temperaturas, la suspensión es filtrada y extraída con AcOEt, obteniéndose un líquido viscoso de color café amarillento como producto crudo (646 mg, 83.7%), el cual es purificado por cromatografía en columna con gradiente de polaridad, utilizándose inicialmente CH₂Cl₂ como eluyente y aislándose primeramente un sólido amarillo pálido puro que fue caracterizado como el 4,7-dimetoxi-2-metil-benzo[b]tiofeno **12-A** (102 mg, 16%).

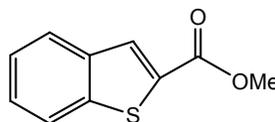
p.f. : 71.5-72 °C. IR ν_{\max} : 3058 (C-H Ar), 2955-2906 (C-H alif.), 1487(C=C), 1260 (C-O). $^1\text{H-RMN}_{(\text{ppm})}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 2.59 (s, 3H, CH_3), 3.89 (s, 3H, ArOCH_3), 3.93 (s, 3H, ArOCH_3), 6.59 (d, 1H, 5-H o 6-H, $J=8.4$ Hz), 6.64 (d, 1H, 6-H o 5-H, $J=8.4$ Hz), 7.13 (s, 1H, 3-H). $^{13}\text{C-RMN}_{(\text{ppm})}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 16.2, 55.83, 55.9, 103.4, 104.6, 118.8, 129.6, 132.3, 140.0, 148.4, 148.6. EMAR ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{OS}$) (M^+): Teórico=208.05580. Experimental =208.054478.

Posterior elución de la columna utilizando una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (1:1) permitió obtener un sólido blanco pálido que resultó ser el derivado *N*-(4,7- dimetoxibenzo[*b*]tiofen-2-ilmetil)-*N'*-etil-etano-1,2-diamina **12-B**. (188 mg, 28%).

p.f.: 115-116 °C. IR ν_{\max} : 3441 (N-H), 2971-2907(C-H), 1257 (C-O). $^1\text{H RMN}_{(\text{ppm})}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.06 (t, 3H, CH_3 , $J=7.1$ Hz), 2.42-2.56 (m, 8H, 3x CH_2 , y 2x NH), 3.75 (s, 2H, Ar-CH_2), 3.87 (s, 3H, Ar-OCH_3), 3.90 (s, 3H, Ar-OCH_3), 6.60 (s, 2H, 5-H y 6-H), 7.27 (s, 3-H). $^{13}\text{C RMN}_{(\text{ppm})}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 11.8, 52.2, 52.6, 52.7, 55.8, 55.9, 57.8, 103.9, 104.3, 119.3, 130.2, 131.6, 142.7, 148.6, 148.9. EMAR ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) (M^+): Teórico = 294.14020 Experimental = 294.12038.

Finalmente al eluir la columna con CH_3OH puro se logró aislar el compuesto que esperábamos el 1-(4,7-dimetoxi-benzo[*b*]tiofen-2-il-metil)piperazina **12** como un sólido blanco-amarillento. (232 mg, 36%). pf: > 350°C, IR ν_{\max} : 3300 (N-H), 1487 (C=C Ar), 1259 (C-O). $^1\text{H-RMN}_{(\text{ppm})}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.30 (s.ancho, 1H, NH), 3.27 (s.ancho, 8H, $\text{CH}_2\text{-Pip-}$), 3.69 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{-}$), 3.83 (s, 3H, ArOMe), 3.86 (s, 3H, ArOMe), 6.77 (s, 2H, 5-H y 6-H), 7.25 (s, 1H, 3-H). $^{13}\text{C-RMN}_{(\text{ppm})}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : 45.6 (2C), 52.4 (2C), 55.6, 55.7, 57.6, 104.5, 105.0, 118.8, 128.9, 130.8, 143.0, 147.9, 148.3. EMAR ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{OS}$) (M^+): Teórico = 292.12455. Experimental = 292.12303

4.1.12. 2- Metoxycarbonil Benzo[*b*]tiofeno (13)

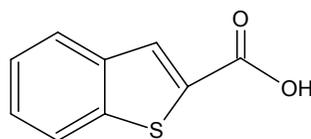


(13)

A una mezcla de 2-nitro benzaldehído comercial (700 mg, 4.63 mmol), en DMF (10 mL) se adiciona tioglicolato de metilo (0.42 mL, 4.63 mmol) y K_2CO_3 anhidro (639 mg, 4.63 mmol), se calienta con agitación a 70° C durante 4h. Después de este tiempo la mezcla de reacción es vertida en un recipiente con una mezcla de agua-hielo, obteniéndose un precipitado el cual es filtrado al vacío formando 615 mg de éster crudo. La mezcla es purificada por cromatografía en columna (CH_2Cl_2) obteniéndose 594mg (67%) de éster **13**.

pf 62-63°C. IR v_{max} : 1725 (C=O), 1522 (C=C), 1252 (C-O). 1H -RMN_(ppm) (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.97 (s, 3H, COOMe), 7.46 (q, 2H, 5-H y 6-H, $J=8.9$ Hz), 7.91 (d, 1H, 4-H o 7-H, $J=4.5$ Hz), 7.88 (d, 1H, 7-H o 4-H, $J=4.3$ Hz), 8.10 (s, 1H, 3-H). ^{13}C -RMN_(ppm) (75MHz, $DMSO-d_6$): 52.5, 122.8, 124.9, 125.6, 126.9, 130.7, 133.3, 138.7, 142.2, 163.3. EMAR ($C_{10}H_8O_2S$)(M^+): Teórico = 192.02450. Experimental = 192.02343.

4.1.13. Acido Benzo[*b*]tiofen-2-carboxílico (14)

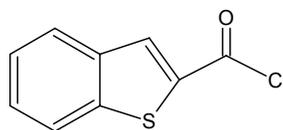


(14)

Una mezcla de metil ester **13** (800 mg, 4.17 mmol) en KOH 0,5N:MeOH (1:1 v/v, 60 ml) es agitada por 3 horas a temperatura ambiente, posteriormente es concentrada al vacío y acidificada con HCl (c) a 0°C. El precipitado obtenido es filtrado y lavado con agua formándose un sólido amarillo pálido **13** (721 mg, 97%), el cual es purificado por cromatografía en columna (CH₂Cl₂:MeOH (1:1)) obteniéndose 609 mg (82%) de ácido **14**.

pf 224-225°C. IR ν_{\max} : 3220 – 2574 (O-H), 1664 (C=O), 1520 (ArC=C). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 3.50 (s, 1H, COOH), 7.38 – 7.46 (m, 2H, 5-H y 6-H), 7.94 (d, 1H, 4-H o 7-H, *J* = 7.8 Hz), 7.98 (d, 1H, 7-H o 4-H, *J* = 7.8 Hz), 8.10 (s, 1H, 3-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75MHz, CDCl₃) δ : 123.4, 125.5, 126.2, 127.5, 130.7, 135.2, 139.2, 141.8, 164.0. EMAR (C₉H₆O₂S)(M⁺): Teórico = 178.00885. Experimental = 178.00877.

4.1.14. Cloruro de benzo[*b*]tiofen-2-carbonilo (**15**)

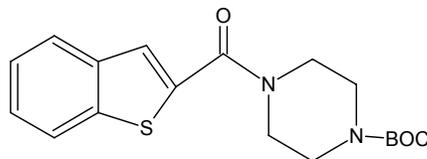


(**15**)

Una solución de ácido carboxílico **14** (600 mg, 3.37 mmol) en cloruro de tionilo (50 ml) es calentada a reflujo por 4 horas. Posteriormente la solución es concentrada al vacío, obteniéndose un sólido café amarillento **15** (662 mg).

pf: 76 -77°C. IR ν_{\max} : 1744 (ArCOCl), 1509 (ArC=C). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 7.39 (t, 1H, 5-H o 6-H, *J* = 7.6 Hz), 7.44 (t, 1H, 6-H o 5-H, *J* = 7.6 Hz), 7.94 (d, 1H, 4-H o 7-H, *J* = 7.6 Hz), 7.97 (d, 1H, 7-H o 4-H, *J* = 7.6 Hz), 8.10 (s, 1H, 3-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 123.4, 125.5, 126.2, 127.4, 130.6, 135.2, 139.2, 141.8, 163.9. EMAR (C₉H₅ClOS)(M⁺): Teórico = 195.97496. Experimental = 195.97458.

4.1.15. *tert*-Butil 4-(1-benzo[*b*]tiofeno-2-il-carbonil) piperazina-1-carboxilato (16).

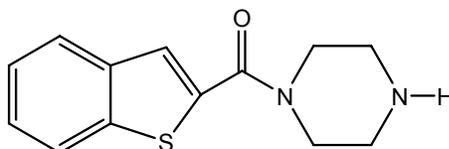


(16)

Al haluro de acilo **15** (662 mg, 3.37 mmol) en THF anhidro (25 ml), se agrega lentamente a una solución de *tert*-butil-1-piperazincarboxilato (627 mg, 3.37mmol), piridina seca (340mg, 3.37 mmol) en THF anhidro (25 ml), en un ambiente de N₂ gaseoso y em baño de hielo. La mezcla fue agitada por 6 horas y posteriormente diluída con agua (100 ml) y extraída con AcOEt (3 x 50 ml), la fase orgánica es concentrada al vacío obteniéndose la amida cruda con rendimiento cuantitativo, esta fue purificada por recristalización en etanol obteniéndose 852 mg (73%) de carboxilato puro **(16)**.

pf: 140-141°C, IR ν_{\max} : 1689 (NCOOR), 1618 (CON). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.37 (s, 9H, *tert*-butil), 3.38 (s.ancho, 4H, CH₂-Piper-NCO), 3.62 (s.ancho, 4H, -CH₂-Piper-NCOO), 7.36 – 7.43 (m, 2H, 4-H, 7-H), 7.70 (s, 1H, 3-H), 7.86 (m, 1H, 5-H o 6-H), 7.97 (m, 1H, 6-H o 5-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 28.1 (3C), 43.6 (2C), 45.8 (2C), 80.0, 123.0, 125.4, 126.4, 126.6, 137.1, 138.1, 139.1, 140.1, 154.2, 163.1. EMAR (C₁₈H₂₂N₂O₃S) (M⁺): Teórico = 346.13511. Experimental = 346.13245

4.1.16. 1-(1- Benzo[*b*]tiofeno-2-il-carbonil) piperazina (17)

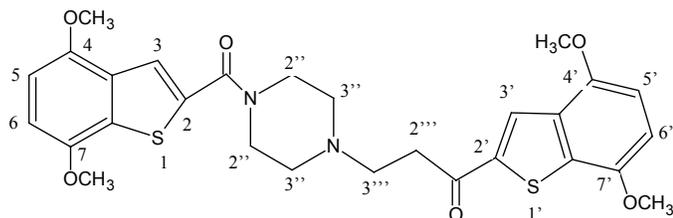


(17)

A una solución del carbamato **16** (400mg, 1.26 mmol) en THF:EtOH (1:1, 40 ml), se añade HCl (c), se deja en agitación durante 12 hrs a temperatura ambiente. Posteriormente se lleva a pH 8 – 9 con un solución NaHCO₃ para luego extraer con AcOEt, la fase orgánica es concentrada al vacío obteniéndose un sólido de color café, el cual es purificado por cromatografía en columna utilizando CH₂Cl₂/MeOH (1:1), se obtiene un líquido viscoso **17** (260 mg, 84%).

IR ν_{\max} : 3475 (N-H), 1620 (NHCO), 1488 (ArC=C). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.98 (s, 1H, NH), 2.75 (s.ancho, 4H, -CH₂-Piper), 3.60 (s.ancho, 4H, -CH₂-Piper-CO), 7.44 (m, 2H, 4H y 7H), 7.70 (s, 1H, 3-H), 7.91 (m, 1H, 5-H o 6-H), 8.00 (m, 1H, 6-H o 5-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 44.5 (2C), 48.5 (2C), 122.5, 123.8, 124.9, 125.1, 125.8, 137.0, 138.6, 139.2, 162.4. EMAR (C₁₃H₁₄N₂OS) (M⁺): Teórico = 246.08268. Experimental = 246.08060

4.1.17. Síntesis de 3-[4-(4,7-Dimetoxi-benzo[*b*]tiofen-2-carboxo)-1-piperazinil]-1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-1-propanona (**I**)



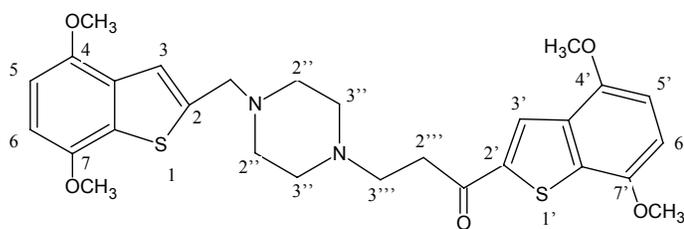
I

A una solución de 1-(4, 7-dimetoxi benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-propen-1-ona (**11**) (60 mg, 0.24 mmol) y 1-[(4,7-dimetoxi-1-benzo[*b*]tiofeno-2-il)carbonil] piperazino (**7**) (74.0 mg, 0.24 mmol), disuelta en diclorometano (20 mL) se le añade una mezcla de SiO₂-MnO₂ (1.0g. 4:1) como soporte inorgánico, la mezcla es homogenizada en diclorometano y agitada vigorosamente por 15 minutos a temperatura ambiente. El solvente es eliminado con evaporación rotatoria hasta obtener una mezcla sólida libre de solvente. La mezcla es irradiada por microondas a 600 W por 6 minutos, hasta

observar por TLC la desaparición del producto de partida. El sólido luego es lavado y filtrado con tres partes 3 x 50 mL acetato de etilo a 30°C, obteniéndose 133mg de producto crudo, posteriormente es purificado por cromatografía en columna (AcOEt:CH₂Cl₂, 4:1), obteniéndose 87 mg (86%) del producto puro **(I)**.

pf: 193-194°C. IR ν_{\max} : 1660 (C=O), 1620 (CONH), 1260 (C-O). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz,CDCl₃) δ : 2.61 (s.ancho, 4H, Piper. 3''-H), 2.93 (t, 2H, 3'''-H, J= 7.0 Hz), 3.24 (t, 2H, 2'''-H, J= 7.0 Hz), 3.80 (s.ancho, 4H, Piper. 2''-H), 3.92 (s, 3H, Ar-OMe), 3.95 (s, 3H, Ar-OMe), 3.96 (s, 6H, 2 x Ar-OMe), 6.69 (t, 2H, 5-H y 6-H, o 5'-H y 6'-H, J = 8.0 Hz), 6.79 (t, 2H, 5'-H y 6'-H o 5-H y 6-H, J=8.4 Hz), 7.72 (s, 1H,3-H), 8.14 (s, 1H, 3'-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75MHz,CDCl₃) δ : 36.6, 45.1 (2C), 53.0 (3C), 55.7 (2C), 56.0 (2C), 104.6, 104.7, 105.6, 107.4, 122.5, 126.5, 130.7, 130.9, 131.4, 133.3, 135.8, 142.8, 148.4, 148.5, 149.9, 150.7, 163.7, 193.1. EMAR (C₂₈H₃₀N₂O₆S₂) (M⁺): Teórico = 554.15453. Experimental = 554.15625.

4.1.18. Síntesis de 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[b]tiofenil)-3-[4-(4,7-dimetoxi-2-benzo[b] tiofenilmetil) -1-piperazinil]-1-propanona (**II**)



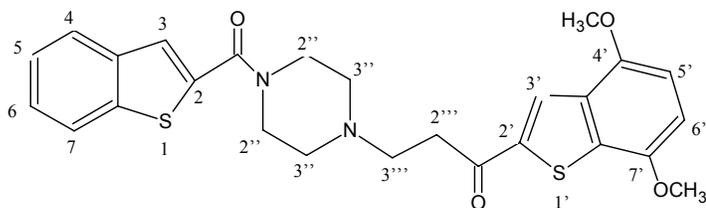
II

A una solución de 1-(4, 7-dimetoxi benzo[b]tiofen-2-il)-2-propen-1-ona (**11**) (11.1 mg, 0.04 mmol) y 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[b]tiofenilmetil)-piperazina (**12**) (13.1 mg, 0.04 mmol), disuelta en diclorometano (20 mL) se le añade una mezcla de SiO₂-MnO₂ (1.0g, 4:1) como soporte inorgánico, la mezcla es homogenizada en diclorometano y agitada vigorosamente por 15 minutos a temperatura ambiente. El solvente es eliminado con evaporación rotatoria hasta obtener una mezcla sólida libre de solvente. La mezcla es

irradiada por microondas a 600 W por 6 minutos, hasta observar por TLC la desaparición del producto de partida. El sólido luego es lavado y filtrado con tres partes 3 x 50 mL acetato de etilo a 30°C, obteniéndose 20.0 mg de producto crudo, siendo posteriormente purificado por cromatografía en columna (AcOEt:CH₂Cl₂ ,4:1), para dar 19.3 mg (79.7%) del producto puro **(II)**.

pf: 156.0-157°C. IR ν_{\max} : 2955 (C-H alifático), 1660 (C=O), 1484 (C=C Aromática), 1256 (C-O). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ : 2.59 (s.ancho, 8H, Piperazínicos), 2.97 (t, 2H, 3'''-H, $J = 6.5$ Hz), 3.26 (t, 2H, 2'''-H, $J = 6.5$ Hz), 3.78 (s, 2H, -CH₂-), 3.89 (s, 3H, Ar-OMe), 3.92 (s, 3H, Ar-OMe), 3.93 (s, 3H, Ar-OMe), 3.94 (s, 3H, Ar-OMe), 6.63 (s, 1H, 5-H y 6-H), 6.65 (d, 1H, 5'-H $J = 8.5$ Hz), 6.77 (d, 1H, 6'-H $J = 8.5$ Hz), 7.28 (s, 1H, 3-H), 8.11 (s, 1H, 3'-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75MHz, CDCl₃) δ : 36.7, 52.9 (2C), 53.1 (2C), 53.2, 55.7(2C), 55.9, 56.0, 57.8 103.9, 104.4, 104.5, 107.3, 119.3, 126.5, 130.2, 131.4, 131.6, 133.3, 142.7, 142.9, 148.5, 148.6, 148.9, 150.7, 193.4. EMAR (IE) teórico para C₂₈H₃₂N₂O₅S₂ (M⁺): 540.17526. Experimental: 540.17406.

4.1.19. Síntesis de 3-[4-(Benzo[*b*]tiofen-2-carboxo)-1-piperazinil]- 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)- 1-propanona (**III**).



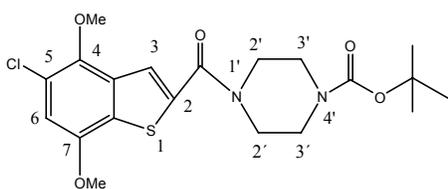
III

A una solución de 1-(4, 7-dimetoxi benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-propen-1-ona (**11**) (207 mg, 8.35 mmol) y benzo[*b*]tiofeno-2-piperazino carboxamida (**15**) (206 mg, 8.35 mmol), disuelta en diclorometano (20 mL) se le añade una mezcla de SiO₂-MnO₂ (1.0g. 4:1) como soporte inorgánico, la mezcla es homogenizada en diclorometano y agitada vigorosamente por 15 minutos a temperatura ambiente. El solvente es eliminado con

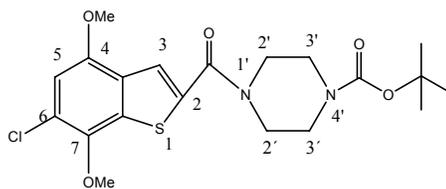
evaporación rotatoria hasta obtener una mezcla sólida libre de solvente. La mezcla es irradiada por microondas a 600 W por 6 minutos, hasta observar por TLC la desaparición del producto de partida. El sólido luego es lavado y filtrado con tres partes 3 x 50 mL acetato de etilo a 30°C. El rendimiento del crudo es cuantitativo, posteriormente es purificado por cromatografía en columna (AcOEt:CH₂Cl₂, 4:1), obteniéndose 310 mg (75%) de producto puro **(III)**.

pf: 128.0-128.5°C. IR ν_{\max} : 1673 (C=O), 1612 (CO-N), 1260 (C-O). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ : 2.60 (s.ancho, 4H, Piper. 3''-H), 2.94 (t, 2H, 3'''-H, *J* = 6.5 Hz), 3.23 (t, 2H, 2''-H, *J* = 6.5 Hz), 3.79 (s.ancho, 4H, Piper. 2''-H), 3.95 (s, 3H, Ar-OMe), 3.96 (s, 3H, Ar-OMe), 6.68 (d, 1H, 5'-H, *J* = 8.5Hz), 6.80 (d, 1H, 6'-H, *J* = 8.5 Hz), 7.39 – 7.42 (m, 2H, 5-H y 6-H), 7.48 (s, 1H, 3'-H), 7.81 – 7.88 (m, 2H, 4-H y 7-H), 8.14 (s, 1H, 3-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75MHz, CDCl₃) δ : 36.1, 45.1 (2C), 52.6 (3C), 55.3, 55.6, 104.1, 106.9, 121.9, 124.1, 124.3, 124.7, 125.3, 126.0, 130.9, 132.8, 136.0, 138.1, 139.7, 142.4, 148.0, 150.2, 163.3, 192.7. EMAR (IE) teórico para C₂₆H₂₆N₂O₄S₂ (M⁺): 494.13340. Experimental: 494.13175.

4.1.20. *tert*-Butil 4-[(5 y 6-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazina-1-carboxilato (**18-a**) y (**18-b**) .



18-a



18-b

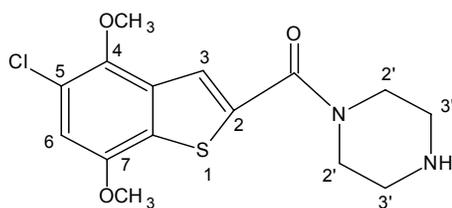
A una solución de la mezcla de haluros de acilo clorados **5(a-c)** (937.5 mg, 3.65 mmol) en THF anhidro (50 ml), se agrega *N*-Boc piperazina (680.4 mg, 3.65mmol) y piridina seca (288.7 mg, 3.65 mmol). La mezcla fue agitada por 4 horas y posteriormente diluída con agua (50 ml) y extraída con AcOEt (3 x 50 ml), la fase orgánica es concentrada al vacío obteniéndose la amida cruda (8.31 g, 58%), la cual

fue purificada por cromatografía en columna $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (3:1) para dar una mancha única (8.03 g, 56%) que al ser examinada por $^1\text{H-RMN}$ arrojó la presencia de dos productos mayoritarios que fueron caracterizados como **18-a** y **18-b** en una proporción aproximada de 9:3, y en compañía de trazas de un probable producto diclorado en C-5 y C-6, **18-c** que no fue caracterizado.

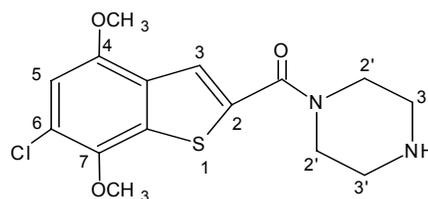
Compuesto (**18-a**): IR ν_{max} : 3030 (C-H aromático), 2976-2935 (C-H alifático), 1709 (NCOOtBu), 1682 (NCO). $^1\text{H-RMN}_{(\text{ppm})}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.48 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 3.53 (m, 4H, 2'-H pip), 3.70 (m, 4H 3'-H pip.), 3.94 (s, 3H, OMe), 3.96 (s, 3H, OMe), 6.80 (s, 1H, 6-H), 7.56 (s, 1H, 3-H). $^{13}\text{C-RMN}_{(\text{ppm})}$ (75MHz, CDCl_3) δ : 28.6 (3C), 44.1 (4C), 56.5, 62.1, 80.7, 107.8, 122.9, 122.3, 129.8, 134.9, 137.7, 145.8, 150.7, 154.8, 163.9. EMAR: Teórico= 440.11727. Experimental= 440.11188.

Compuesto (**18-b**): IR ν_{max} : 3030 (C-H aromático), 2976-2935(C-H alifático), 1709 (NCOOtBu), 1682(NCO). $^1\text{H-RMN}_{(\text{ppm})}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 1.48 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 3.53 (m, 4H, 2'-H pip), 3.70 (m, 4H, 3'-H pip.), 3.91 (s, 3H, OMe), 3.97 (s, 3H, OMe), 6.74 (s, 1H, 5-H), 7.57 (s, 1H, 3-H). $^{13}\text{C-RMN}_{(\text{ppm})}$ (75MHz, CDCl_3) δ : 28.6 (3C), 44.1(4C), 56.2, 60.8, 80.7, 107.5, 123.3, 124.2, 129.0, 136.1, 137.7, 144.2, 151.9, 154.7, 163.9. EMAR : Teórico= 440.11727. Experimental= 440.11188.

4.1.21. 1-[(5) y(6)-Cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il]carbonil]piperazina **19(a)** y **19(b)**.



19-a



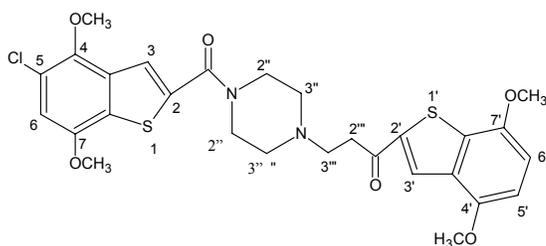
19-b

A una mezcla del benzotiofen-*N*-Boc-piperazinas **18-a** y **18-b** (571.7mg, 1.29 mmoles), en una mezcla de THF:EtOH (1:1 40 ml), se mantuvo con agitación durante 12 h. a temperatura ambiente. Se neutralizó con NaHCO₃ sólido y se extrajo con AcOEt para dar 339 mg de la mezcla de **19-a** y **19-b**, con un rendimiento del 77% y cuya relación porcentual de isómeros se estimó por su espectro de ¹H RMN, correspondiendo a una relación aproximada de 7.5 : 3.5 , y donde el isómero mayoritario corresponde a **19-a**.

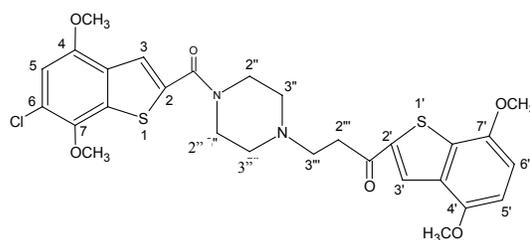
Compuesto (**19-a**): IR ν_{\max} :3346 (N-H), 1439-1418 (C-H alifático), 1618(NCO). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz,CDCl₃) δ : 1.88 (s,1H, N-H), 2.93 (m, 4H, 3'-H pip), 3.74 (m, 4H, 2'-H pip.), 3.94 (s,3H,OMe), 3.96 (s,3H,OMe), 6.79 (s,1H,6-H), 7.53 (s,1H,3-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75MHz, CDCl₃) δ : 46.5(4C), 56.5, 62.1, 107.7, 121.9, 122.6, 129.2, 135.0, 138.2, 145.2, 150.7, 163.7.

Compuesto (**19-b**): IR ν_{\max} : 3346 (N-H), 1439-1418(C-H alifático), 1618(NCO), 1682(NCO). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz,CDCl₃) δ : 1.88 (s,1H,N-H), 2.93 (m, 4H, 3'-H pip), 3.74(m, 4H, 2'-H pip.), 3.98 (s, 3H, OMe), 3.97 (s, 3H, OMe), 6.74(s,1H,5-H), 7.55 (s, 1H, 3-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75MHz, CDCl₃) δ : 46.5 (4C), 56.2, 60.8, 107.5, 123.2, 124.0, 129.9, 138.4, 145.8, 151.8, 154.7, 163.5.

4.1.22. 3-{4-[(5 / 6-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazin-1-il}-1-(4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)1- propanona. IV (**20-a** y **20-b**).



20-a



20-b

A una solución de 1-(4, 7-dimetoxi benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-propen-1-ona (**11**) (98.1mg, 0.39mmol) y 1-[(5) y (6)-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il] carbonil] piperazina (**19-a y 19-b**) (121 mg, 0.39 mmol), disuelta en diclorometano (20 mL) se le añade una mezcla de SiO₂-MnO₂ (1.0g. 4:1) como soporte inorgánico, la mezcla es homogenizada en diclorometano y agitada vigorosamente por 15 minutos a temperatura ambiente. El solvente es eliminado con evaporación rotatoria hasta obtener una mezcla sólida libre de solvente. La mezcla es irradiada por microondas a 600 W por 6 minutos, hasta observar por TLC la desaparición del producto de partida. El sólido luego es lavado y filtrado con tres partes 3 x 50 mL acetato de etilo a 30° C. El rendimiento del crudo es de 95%, posteriormente es purificado por cromatografía en columna (AcOEt / CH₂Cl₂ = 4:1), obteniéndose 165 mg (79%) de una mezcla de productos formada por **20-a y 20-b (IV)**.

Compuesto mayoritario (**20-a**) . IR ν_{\max} : 1660 (C=O), 1626 (CONH), 1262 (C-O). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz,CDCl₃) δ : 2.59 (s.ancho, 4H, Piper. 3''-H), 2.91 (t, 2H, 3'''-H, *J* = 7.1 Hz), 3.21 (t, 2H, 2'''-H, *J* = 7.1 Hz), 3.77 (s.ancho, 4H, Piper. 2''-H), 3.92 (s, 3H, Ar-OMe), 3.94 (s, 6H, 2x Ar-OMe), 3.95 (s, 3H, Ar-OMe), 6.65 (d, 1H, 5'-H, *J*= 8.5 Hz), 6.77 (s, 1H, 6-H), 6.78 (d, 1H, 6'-H), 7.54 (s, 1H, 3-H), 8.11(s,1H, 3'-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75MHz,CDCl₃) δ : 36.8, 46.5(2C), 53.3 (3C), 56.0 (2C), 56.2, 62.1, 104.8, 107.7, 122.1 (2C), 122.7, 123.2, 126.7, 129.0, 129.9, 135.0, 143.0, 145.8, 150.7, 151.8, 163.5, 193.3. EMAR (IE) teórico para C₂₈H₂₉N₂O₆S₂ (M⁺): 588.11555 , experimental: 588.11345.

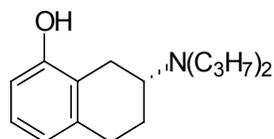
Compuesto minoritario (**20-b**). IR ν_{\max} : 1660 (C=O), 1626 (CONH), 1262 (C-O). ¹H-RMN_(ppm) (300 MHz,CDCl₃) δ : 2.59 (s.ancho, 4H, Piper. 3''-H), 2.91 (t, 2H, 3'''-H, *J*= 7.1 Hz), 3.21 (t, 2H, 2'''-H, *J*= 7.1 Hz), 3.77 (s.ancho, 4H, Piper. 2''-H), 3.91 (s, 3H, Ar-OMe), 3.94 (s, 6H, 2x Ar-OMe), 3.96 (s, 3H, Ar-OMe), 6.65 (d, 1H, 5'-H, *J*= 8.5 Hz), 6.72 (s, 1H, 5-H), 6.78 (d, 1H, 6'-H), 7.55 (s, 1H, 3-H), 8.11(s,1H, 3'-H). ¹³C-RMN_(ppm) (75MHz,CDCl₃) δ : 36.8, 46.5(2C), 53.3 (3C), 56.0 (2C), 56.2, 60.7, 104.8, 107.4, 107.6, 122.1, 122.7, 123.2, 124.0(2C), 126.7, 135.0, 145.8, 148.7(2C), 150.7, 163.5, 193.3. EMAR (IE) teórico para C₂₈H₂₉N₂O₆S₂ (M⁺): 588.11555. Experimental: 588.11345.

4.2. Ensayos de Union con Radioligandos

4.2.1. Adquisición del radioligando estándar.

Se adquirió el agonista serotoninérgico 5-HT_{1A} tritiado 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (³H]-8-OH-DPAT) junto a su correspondiente compuesto no marcado (8-OH-DPAT).

Actividad	
Específica	170 Ci/mmol
Concentración	5.88 μM
P. M.	247 g / mol



4.2.2. Preparación de las membranas ⁷¹

Para los ensayos de unión en el receptor 5-HT_{1A} se utilizaron ratas Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus albinus*) con un peso entre 200-250g, obtenidas desde el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Se procedió a la decapitación de las ratas y la disección posterior de la corteza en hielo. El tejido cerebral se pesó y homogenizó en una relación 1:10 (P/V) en una solución de sacarosa 0,32M en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,4 con un equipo ultraturrax 5 x 30 seg. Posteriormente el homogenizado fue centrifugado a 3000 rpm (1130 RCF) por 10 minutos a 4°C, obteniéndose un sedimento constituido por núcleos y restos celulares no disgregados que se descarta. El sobrenadante fue centrifugado a 15.000 rpm (28350 RCF) por 30 minutos, el pellet así obtenido se resuspendió en 20 volúmenes de tampón frío y se centrifugó a 15.000 rpm por 30 min.

Este proceso de resuspensión y centrifugación se repite a lo menos 3 veces con el objeto de eliminar todo el ligando endógeno (serotonina) unido a sus receptores.

Finalmente el sedimento fue parcelado y congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior utilización.

4.2.3. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó el método del ácido Bicinconínico (BCA)⁷², el cual se basa en la reducción del ión cúprico a ión cuproso por parte de las proteínas. La medición se basa en la formación del cromóforo de cobre con BCA relativamente estable, el cual absorbe a 562 nm.

Para realizar el ensayo se extrajo una alícuota de 1 μL sin diluir de la resuspensión de membranas previamente realizada (resuspensión en 1,6 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4). Se incubó a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ disminuyendo el tiempo requerido para desarrollar el color máximo e incrementando la sensibilidad.

4.2.4. Determinación de la Constante de Disociación (K_D) y Unión Máxima ($B_{m\acute{a}x}$) para [^3H]-8-OH-DPAT.

La determinación de la constante de disociación K_D (nM) y la unión máxima $B_{m\acute{a}x}$ (fmol/mg proteína) para el compuesto tritiado 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina ([^3H]-8-OH-DPAT, 106-170 Ci/mmol; Amersham) se derivan de los experimentos de saturación para receptores 5-HT_{1A} presentes en corteza cerebral de rata.

Los ensayos de unión fueron realizados por una modificación de un procedimiento descrito previamente por Srinivas.⁷³

Las isotermas de saturación se llevaron a cabo usando siete diferentes concentraciones de [^3H]-8-OH-DPAT entre 0,13 - 105 nM con un tiempo de incubación de 30 minutos a 37°C . Los valores de K_D y $B_{m\acute{a}x}$ fueron obtenidos de la pendiente y el intercepto respectivamente de una gráfica de Scatchard [unión] v/s [unión / L.Libre]. Para ello se utilizó el programa computacional Prisma Graph versión 4.03

4.2.5. Determinación de IC₅₀ para 8-OH-DPAT.

Para determinar el IC₅₀ se realizó un experimento de competencia homóloga del compuesto 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT) frente a su ligando marcado. Las soluciones de 8-OH-DPAT no marcado fueron agregadas en triplicado a la muestra de ensayo de unión a siete distintas concentraciones (0.1 nM – 0.1 mM), con un tiempo de incubación de 30 minutos a 37°C. Los datos fueron analizados usando un ajuste de curva de regresión no lineal con el programa Graph Pad PRISMA versión 4.03 para Windows Graph software, San Diego California USA.

4.2.6. Ensayo de competencia ⁷¹⁻⁷⁴

El día del ensayo las membranas previamente tratadas y almacenadas fueron resuspendidas en tampón Tris-HCl 50mM a pH 7,4 con un equipo ultraturrax 5 x 30 segundos. Alícuotas de 50 µL de esta suspensión fueron incubadas por triplicado en tubos de borosilicato a 37°C por 30 minutos con 5nM de [³H]-8-OH-DPAT (actividad específica 170 Ci/mmol), en presencia o ausencia de competidor, en un volumen final de 200 µL de buffer de ensayo (50 mM Tris-HCl, pH 7,4). La unión no específica fue determinada con 0,1 mM de 8-OH-DPAT. Después de la incubación de las membranas a 37°C, la reacción fue detenida por la adición de 2 mL de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) frío. La mezcla de reacción fue filtrada al vacío rápidamente a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C, pretratados por una hora con una solución de polietilenimina (PEI) al 0,3%. Los filtros se lavaron 2 veces con 2 mL de tampón Tris-HCl 50 mM frío, con el objetivo de eliminar la radioactividad no asociada a las membranas. Los filtros fueron secados y transferidos a viales de centelleo, a los cuáles se agregó 4 mL de mezcla de centelleo (PPO 4 g/L; POPOP 0,1 g/L disueltos en tolueno).

La radioactividad fue determinada usando un contador β de centelleo líquido con un 28% de eficiencia para ^3H . La unión específica del [^3H]-8-OH-DPAT se definió como la diferencia entre la unión total y aquella obtenida en presencia de 8-OH-DPAT, 0,1 mM, no marcado. Todos los compuestos evaluados fueron llevados a pH 7,4 con Tris-HCl 50 mM. Todos los datos fueron analizados usando un ajuste de curva de regresión no lineal con el programa GraphPad **PRISMA 4.03**. Graph software, San Diego California USA.

5. CONCLUSIONES

- Se sintetizaron con buen rendimiento los benzotiofen piperazino derivados:
 - **Compuesto (I):** 3-[4-(4,7-Dimetoxi-benzo[*b*]tiofen-2-carbonil)-1- piperazinil] -1-(4,7-dimetoxi-2- benzo [*b*] tiofenil)-1-propanona. Rendimiento: 86%
 - **Compuesto (II):** 1-(4,7-Dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-3-[4-(4,7- Dimetoxi-2-benzo [*b*]tiofenilmetil)-1-piperazinil]- 1-propanona. Rendimiento: 80%
 - **Compuesto (III):** 3 - [4 - (Benzo [*b*] tiofen – 2 –carbonil)-1- piperazinil] - 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)- 1-propanona. Rendimiento: 75%
- Las reacciones de adición de Michael para la síntesis de los compuestos **I, II, III, IV**, fueron asistidas por microondas libre de solvente, con buenos rendimientos y en cortos periodos de reacción.
- Por tratamiento del ácido-2-benzotiofen-carboxílico con cloruro de tionilo, en condiciones de reflujo sostenido (mayor a 24h), se obtuvo una mezcla de haluros de acilo clorados en el anillo bencénico.
- Se determinaron sitios de unión de alta y baja afinidad para el radioligando [³H]-8-OH-DPAT, los cuales se correlacionan con los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} y 5-HT₇ respectivamente.
- Todos los ligandos estudiados desplazaron menos del 50% de la unión, a la concentración establecida de 1 μM, exhibiendo una afinidad moderada por el sitio de unión para los compuestos I = 32%, II = 13.52% y III = 38.91% y una baja afinidad para el compuesto IV = 1.6%, en comparación con el 92% de desplazamiento de la unión que exhibió el ligando 8-OH-DPAT a la misma concentración.
- Los resultados obtenidos para esta serie demuestran que las modificaciones estructurales efectuadas en la agrupación de benzotiofenoamida de las familias

de bis-ligandos benzotiofénicos no ejercen una influencia relevante para la actividad.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Murray C, López A. Evidence – based health policy - lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science*, 274: 740-743, **1996**
2. Pessoa-Mahana, H.; Araya-Maturana, R.; Saitz, C. B.; Pessoa-Mahana, D. C. A synthetic overview of new molecules with 5-HT_{1A} binding affinities. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 3, 77-93, **2003**.
3. P.Blier, N.M.Ward. *Biol. Psychiatry*, 53: 193-203, **2003**.
4. Caliendo, G.; Santagada, V.; Perissutti, E.; Fiorino, F. Derivatives as 5HT_{1A} receptor ligands--past and present. *Curr. Med. Chem.*, 12, 1721-53, **2005**.
5. Schildkraut JJ., The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry.*, 22: 122-509, **1965**.
6. Elhwuegi, A., Central monoamines and their role in major depression, *Prog. Neuro -Psychoph.*, 28: 435 – 451, **2004**.
7. Monti Bloch, Jaime M., The serotonergic hypothesis of depression, [Rev. psiquiatr. Urug](#), 62(1):19-22, **1998**.
8. Moreno, J., Campos, G., Lara, C., Tornet, C., El sistema serotoninérgico en el paciente deprimido. *Salud Mental*, 28: 20 -26, **2005**.
9. López – Rodríguez. M., Ayala. D., Benhamú.B., Morcillo, M.J and Viso, A. *Current. Med.Chem.* 9, 4, 443-469, **2002**.
10. Page, C., Curtis, M. J., Curtis, M., Sutter, M., Walker, M., Hoffman, M., *Farmacología integrada*, España, 103 – 104, **1998**.
11. Blier, P.; Bergeron, R.; de Montigny, C. Selective activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors induces rapid antidepressant response. *Neuropsychopharmacology*, 16, 333-8, **1997**.
12. Muller.C., Carey, R., Huston, J., De Souza.M., Serotonin and psychostimulant addiction: Focus on 5HT_{1A}- receptors, *Prog. Neurobiol.*, 81: 133- 178, **2007**.
13. Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W., Kobilka, B.K., Stevens, R.C., High

Resolution Crystal Structure of an Engineered Human α_1 -Adrenergic G Protein-Coupled Receptors, *Science*, 318, 1258 – 1265, **2007**.

14. Becker, O., Dhanoa, D., Marantz, Y., Chen, D., Shacham, S., Cheruku S., et al, An Integrated in silico 3D Model-Driven Discovery of a Novel, Potent, and Selective Amidosulfonamide 5HT_{1A} Agonist for the treatment of anxiety and depression, *J. Med. Chem.*, 1 – 20, **2005**.
15. Meneses, A., Perez-García, G., 5-HT_{1A} receptores and memory, *Neurosci. Biobehav. R.*, 9, **2007**.
16. Goodman & Gilman, A., Las bases Farmacológicas de la Terapéutica, Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, 9na. ed., I, 19, 459- 485, **1996**.
17. Taylor, M., Reide ,P., Farmacología, Ed. Harcourt. 1ª ed. 1: 47 – 49, **1998**.
18. Iversen L., Glennon R., *Antidepressants*, 6: 504, **2003**.
19. Cuenca E., Alamo C., Antidepresivos y Reguladores del Humor. *Farmacología*, 16: 452 - 458, **1993**.
20. Fuller, Serotonin uptake inhibitors: uses in clinical therapy and in laboratory research. *Prog. Drug Res.*, 45: 167-204, **1995**.
21. Dencker, The need for new and better antidepressants: reboxetine a new option. *Acta Psychiatr. Scand.*, 101(Suppl. 402), S6-S11, **2000**.
22. Hoyer, D.; Pazos, A.; Probst, A.; Palacios, J. M. Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1A} recognition sites. Apparent absence of 5-HT_{1B} recognition sites. *Brain. Res.*, 376, 85-96, **1986**.
23. O'Neill, C.; Cowburn, R. F.; Wiehager, B.; Alafuzoff, I.; Winblad, B.; Fowler, C. J. Preservation of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-G protein interactions in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 133, 15-9, **1991**.
24. Arvidsson, L. E.; Hacksell, U.; Nilsson, J. L.; Hjorth, S.; Carlsson, A.; Lindberg, P.; Sanchez, D.; Wikstrom, H. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. *J. Med. Chem.*, 24, 921-3, **1981**.
25. Piercey, M.F., Smith, M.W., Lumrigan, J.T., Excitation of noradrenergic Cell firing by 5-hydroxytryptamine (1A) agonists correlates with dopamine Antagonist properties. *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 268, 1297–1303, **1994**.

26. Avendaño, C., *Introducción a la Química Farmaceutica*, segunda edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana, España, I, 397, **2001**
27. Assie, M.B., Koek, W., [(3)H]-8-OH-DPAT binding in the rat brain raphe area: involvement of 5-HT_(1A) and non-5-HT_(1A) receptors. *Br. J.Pharmacol.* 130, 1348–1352, **2000**.
28. Bonaventure, P., Nepomuceno, D., Kwok, A., Chai, W., Langlois, X., Hen, R., Stark, K., Carruthers, N., Lovenberg, T.W., Reconsideration of 5-hydroxy tryptamine (5-HT₇) receptor distribution using [³H]5-carboxamido tryptamine and [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetraline: analysis in brain of 5-HT_(1A) knockout and 5-HT(1A/1B) double-knockout mice. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 240–248, **2002**.
29. Spinks, D., Spinks, G., Serotonin Reuptake Inhibition: An Update on current Research Strategies, *Curr.Med. Chem.*, Vol. 9, 8, 799 - 819, **2002**.
30. Renyi, L., Evenden, J., Fowler, C., Jerning.E., Kelder, D., Mohell, N., Sallemark M., Ross, Svante., The pharmacological Profile of (*R*)-3,4-dihydro-*N*-isopropyl-3-(*N*-isopropyl-*N*-propylamino)-2*H*-1-benzopyran-5-carboxamide, a Selective 5-Hydroxytryptamine_{1A} Receptor Agonist, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299, 3, 883 – 893, **2001**.
31. Martinez-Esparza, J.; Oficialdegui, A. M.; Perez-Silanes, S.; Heras, B.; Orus, L.; Palop, J. A.; Lasheras, B.; Roca, J.; Mourelle, M.; Bosch, A.; Del Castillo, J. C.; Tordera, R.; Del Rio, J.; Monge, A. New 1-aryl-3-(4-arylpiperazin-1-yl)propane derivatives, with dual action at 5-HT_{1A} serotonin receptors and serotonin transporter, as a new class of antidepressants. *J. Med. Chem.*, 44, 418-28, **2001**.
32. Martinez, J.; Perez, S.; Oficialdegui, A. M.; Heras, B.; Orus, L.; Villanueva, H.; Palop, J. A.; Roca, J.; Mourelle, M.; Bosch, A.; Del Castillo, J. C.; Lasheras, B.; Tordera, R.; del Rio, J.; Monge, A. New 3-[4-(aryl)piperazin-1-yl]-1-(benzo[b]thiophen-3-yl)propane derivatives with dual action at 5-HT_{1A} serotonin receptors and serotonin transporter as a new class of antidepressants. *Eur. J. Med. Chem.*, 36, 55-61, **2001**.
33. Orus, L.; Martinez, J.; Perez, S.; Oficialdegui, A. M.; del Castillo, J. C.; Mourelle, M.; Lasheras, B.; del Rio, J.; Monge, A. New 3-[4-(3-substituted phenyl)piperazin-1-yl]-1-(benzo[b]thiophen-3-yl)propanol derivatives with dual action at 5-HT_{1A}

serotonin receptors and serotonin transporter as a new class of antidepressants. *Pharmazie*, 57, 515-8, **2002**.

34. Lopez-Rodriguez, M., Morcillo, M., Fernández, E., Benhamú, B., Tejada, I., Ayala, D., Viso A., Campillo, M., Pardo, L., Delgado, M., Manzanares, J., Fuentes, J., Síntesis and Structure-Activity Relationships. Computational Simulation of Ligand-Receptor Interaction of 5HT_{1A}R agonists with selectivity over α_1 -adrenoceptors, *J. Med. Chem.*, 48, 2548-2558, **2005**.
35. Artigas, R., Perez, V.; Alvarez, E., Pindolol induces a rapid improvement of depressed patients treated with serotonin reuptake inhibitors. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 51, 248-51, **1994**.
36. Pérez, M., Pauwels, P. J., Pallard-Sigogneau, I., Fourrier, C., Chopin, P., Palmier, C., et al., Design and synthesis of new potent, silent 5-HT_{1A} antagonists by covalent coupling of aminopropanol derivatives with selective serotonin reuptake inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8: 3423–3428, **1998**.
37. Pessoa - Mahana C.D., Valderrama J.A., Olmos M.G., Espinoza O.A., Pessoa-Mahana H., Rojas de Arias.A, Nakayama H., Torres S., Studies on Quinones. Part 36. Synthesis and Trypanocidal activity of 2-alkoxycarbonyl benzo[b]thiophene-4,7-quinones. *Heterocycl. Commun.*, 8, 2, 135- 140, **2002**.
38. Valderrama, J.A., Valderrama, C., *Synthetic. Commun.*, 27, 2143, **1997**.
39. Kolasa Teodozyj, Brooks Dee., *Synthetic. Commun.*, 23(6), 743- 748, **1993**.
40. Pessoa H., Acevedo, R., Saitz, B., Araya -Maturana, R., Synthesis of 2-Benzothienyl carbonyl 4-Arylpiperazines as Novel Delavirdine Analogs. *Synthetic. Commun.*, 37: 1227 – 1235, **2007**.
41. Valderrama, J. A.; Benites, J.; Cortes, M.; Pessoa-Mahana, H.; Prina, E.; Fournet, A. Studies on Quinones. Part 38: synthesis and leishmanicidal activity of sesquiterpene 1,4-Quinones. *Bioorg. Med. Chem.*, 11, 4713-8, **2003**.
42. Ward S.E., Harrington F., Gordon L., Hopley S., Scott C., Watson J., *J. Med.Chem.*, 29, **2004**.
43. Inamoto, K., Yamamoto, A., Osawa, K., Hiroya, K., and Sakamoto T., *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 1502, **2005**.
44. Peereux L., Loupy A., *Tetrahedron*, 57: 9199 – 9223, **2001**.

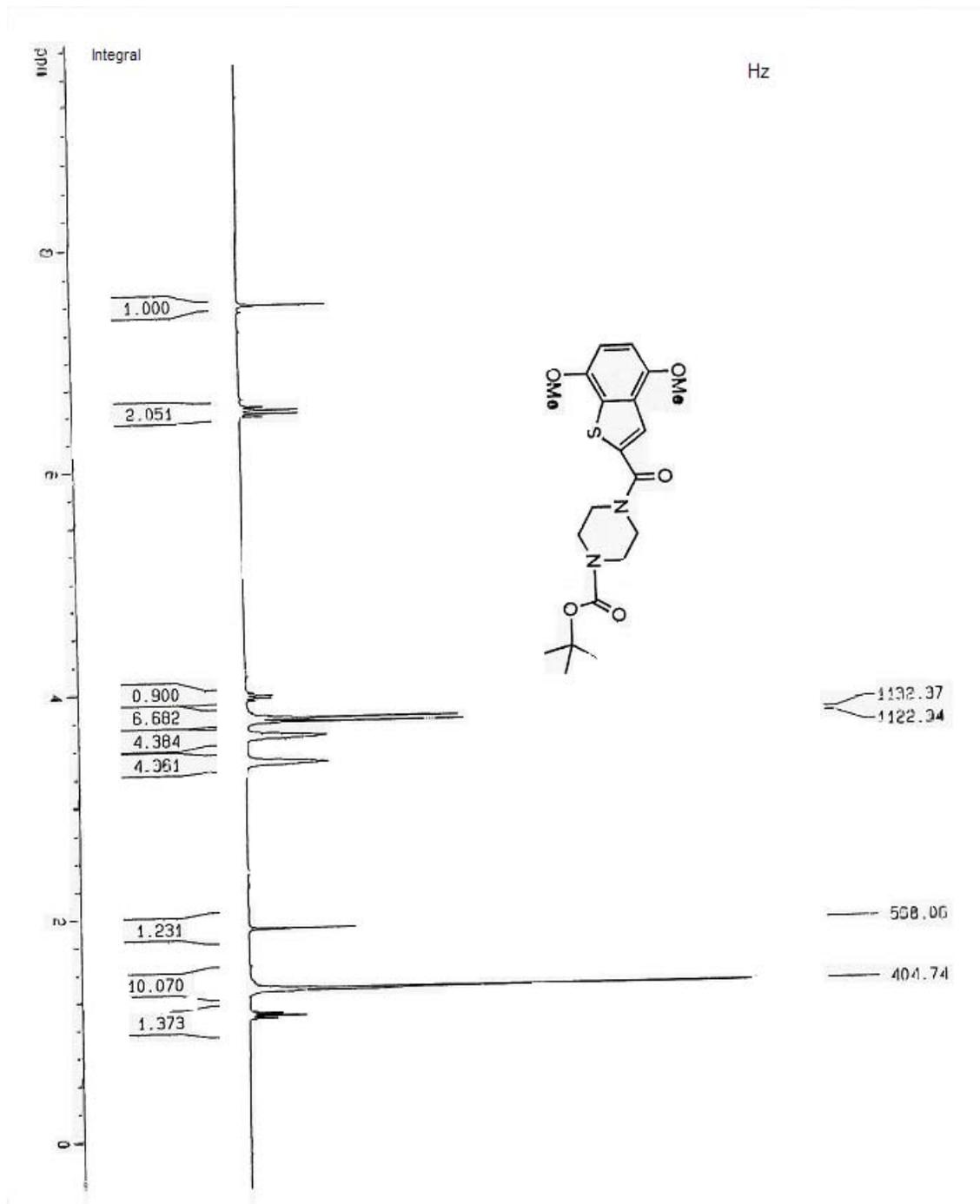
45. Swammy K. M. K., Yeh W., Lin M., Sun C., *Curr. Méd. Chem*, 10, 2403 – 2423, **2003**.
46. Pessoa - Mahana, H., Pessoa - Mahana, C., Salazar, R., Valderrama, J. A., Saez, E., Araya-Maturana, R. Solvent Free Synthesis of 6-Arylbenzimidazo[1,2-c]quinazolines under Microwave Irradiation. *Synthesis*, 3, 436-440. **2003**.
47. H. Surya Prakash Rao, S. Jothilingam, Indian Academy of Sciences. Solvent-free microwave-mediated Michael addition reactions, *J. Chem. Sci.*, Vol. 117, No. 4, 323–328, **2005**.
48. Pessoa-Mahana, H., Kosche, J., Ron, N., Recabarren, G., Saitz, C., Araya, R., Pessoa D., Solvent-Free microwave synthesis of new hetero bis-ligands with potential 5HT_{1A} serotonergic activity. *Heterocycles*, 75, 8, in press, **2008**.
49. Otto Soidinsalo, Synthesis of Isoflavone Conjugates, Department Chemistry, University of Helsinki Finland, 70 – 74, **2007**.
50. Michael Davis, Denis B. Scanlon, The Reaction of Thionyl Chloride with Methyl-Substituted Heteroaromatic Compounds, *Aust. J. Chem.*, 30: 433-5, **1977**.
51. Camara Jorge, La interacción farmaco-receptor, Ed. Universitat de Barcelona, pag. 67 – 77, Barcelona – España, **1997**.
52. Motulsky, Harvey, *Analyzing Radioligand Binding Data*, GraphPad Software, Inc. 1996
53. Sjogren, Benita, Involvement of Lipid rafts in G protein-coupled monoamine receptor trafficking and signaling, Department of Physiology and Pharmacology Karolinska Institutet, Stockholm, 24 -26, **2008**.
54. Flores Jesus, Farmacología Humana, cuarta edición, Ed. Masson S.A., 2, 7-11, **2003**.
55. Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G.R., Molecular, pharmacological and functional diversity of 5HT receptors, *Pharmacol. Biochem.Be.*, 71, 533- 554, **2002**.
56. Bickmeyer, U., Heine, M., Manzke, T., Richter, D.W., Differential modulation of I(h) by 5 HT receptor in Mouse CA1 hippocampal neurons. *Eur. J. Neuorsc.*, 16, 209-218, **2002**.
57. Weinstein, D., Magnuson, D., Lee, J. Altered G-protein coupling of a frontal cortical low affinity [-3H] 8-hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin serotonergic binding site in Alzheimer's disease. *Behav. Brain. Res.*, 73, 325-329, **1996**.

58. Bonaventure, P.; Nepomuceno, D.; Kwok, A.; Chai, W.; Langlois, X.; Hen, R.; Stark, K.; Carruthers, N.; Lovenberg, T. W. Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₇ receptor distribution using [(3)H]5-carboxamidotryptamine and [(3)H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT(1A) knockout and 5-HT(1A/1B) double-knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302, 240-8, **2002**.
59. Eglen, R. M.; Jasper, J. R.; Chang, D. J.; Martin, G. R. The 5-HT₇ receptor: orphan found. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 18, 104-7, **1997**.
60. Glennon, R. A. Higher-end serotonin receptors: 5-HT(5), 5-HT(6), and 5-HT(7). *J. Med. Chem.*, 46, 2795-812, **2003**.
61. Ruat, M.; Traiffort, E.; Leurs, R.; Tardivel-Lacombe, J.; Diaz, J.; Arrang, J. M.; Schwartz, J. C. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 8547-51, **1993**.
62. Cheng Y., Prusoff W, *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108, **1973**.
63. Lopez-Rodriguez, M. L.; Morcillo, M. J.; Fernandez, E.; Benhamu, B.; Tejada, I.; Ayala, D.; Viso, A.; Campillo, M.; Pardo, L.; Delgado, M.; Manzanares, J.; Fuentes, J. A. Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. 8. Computational simulation of ligand-receptor interaction of 5-HT_{1A}R agonists with selectivity over alpha1-adrenoceptors. *J. Med. Chem.*, 48, 2548-58, **2005**.
64. Lagos, C., Gonzalez, A., Perez-Acle. T., *Informe de Análisis de ADME y estudios de interaccion molecular de una serie de ligandos con potencial acción biológica sobre el receptor de serotonina 1A (5-HT_{1A})*, Centro de Genómica y Bioinformática, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad de Chile, **2006**
65. Escalona, J., Carrasco, J., Padron, J., *Introducción al diseño racional de fármacos*, Editorial Universitaria, La Habana, 1-45, **2008**.
66. Bevan David., *QSAR and Drug Design*, Department of Biochemistry and Anaerobic Microbiology, Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, 24061-0308.
67. Moreira Lidia, Barreiro Eliezer, Bioisosterism: A useful strategy for Molecular Modification and Drug design, *Curr. Med. Chem.*, 12, 23 -49, **2005**

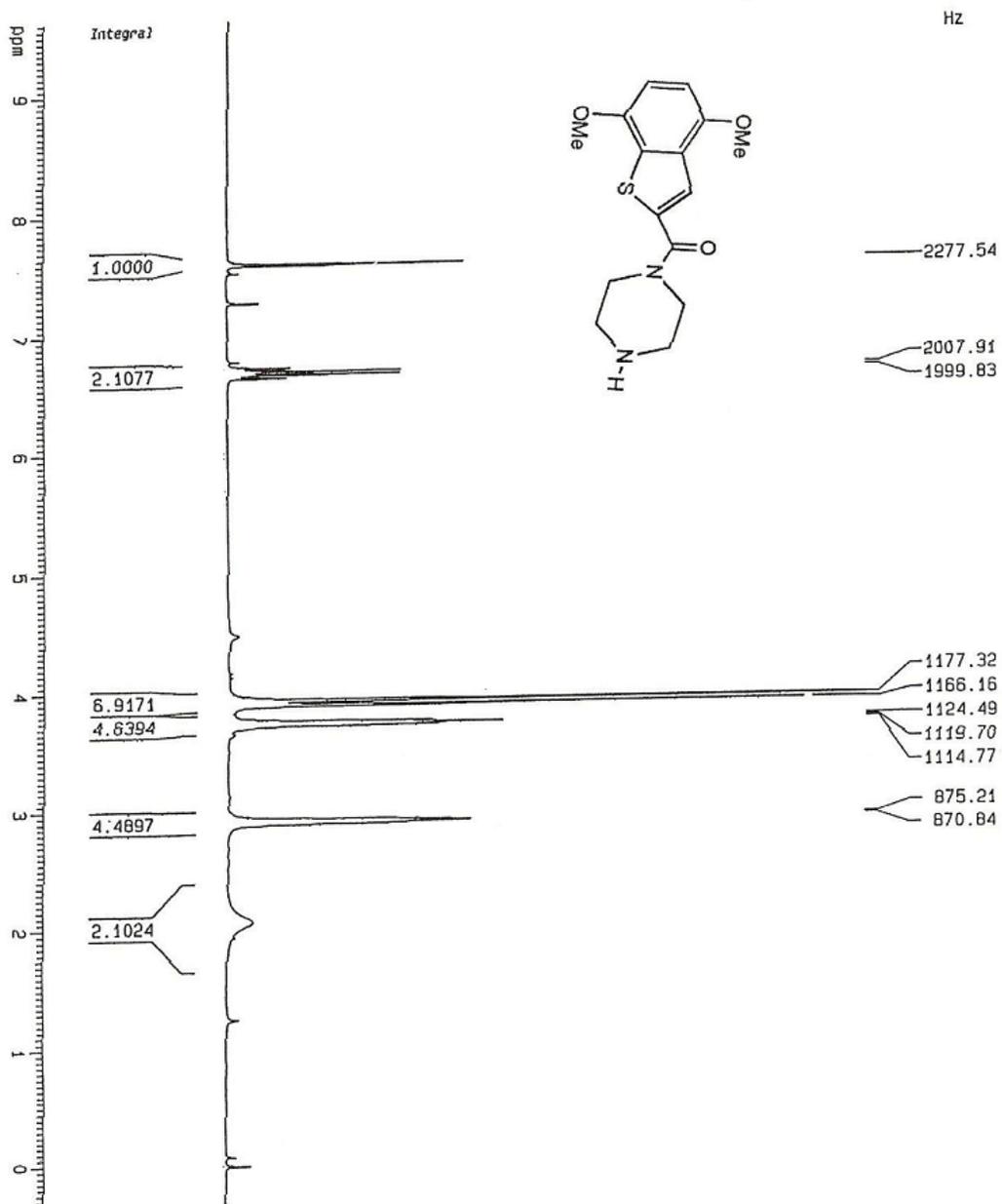
68. Friedman, H., Influence of Isosteric Replacements upon Biological Activity, Washington, National Academy of Science, 206, 295, **1951**.
69. Thornber, C.W., *Chem Soc. Rev.* 8,563, **1979**.
70. Patani George, La Voie Edmond, Bioisosterism: A racional approach in drug design, *Chem. Rev.*, 96, 3147 – 3176, **1996**.
71. Recabarren, G., *Estudio de síntesis de 2-[oxoalquil(4-arilpiperazinil)]-benzo[b]tiofenos sustituidos. Evaluación de su afinidad serotoninérgica mediante ensayos de competencia frente a [³H]-8-OH-DPAT*, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Chile, **2008**.
72. Sapan, C. V.; Lundblad, R. L.; Price, N. C. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29 (Pt 2), 99-108, **1999**.
73. Srinivas, B. N.; Subhash, M. N.; Vinod, K. Y. Cortical 5-HT(1A) receptor down regulation by antidepressants in rat brain. *Neurochem. Int.*, 38, 573-9, **2001**.
74. Lopez-Rodriguez, M. L.; Vicente, B.; Deupi, X.; Barrondo, S.; Olivella, M.; Morcillo, M. J.; Behamu, B.; Ballesteros, J. A.; Salles, J.; Pardo, L. Design, synthesis and pharmacological evaluation of 5-hydroxytryptamine(1a) receptor ligands to explore the three-dimensional structure of the receptor. *Mol. Pharmacol.*, 62, 15-21, **2002**.

7. ANEXOS

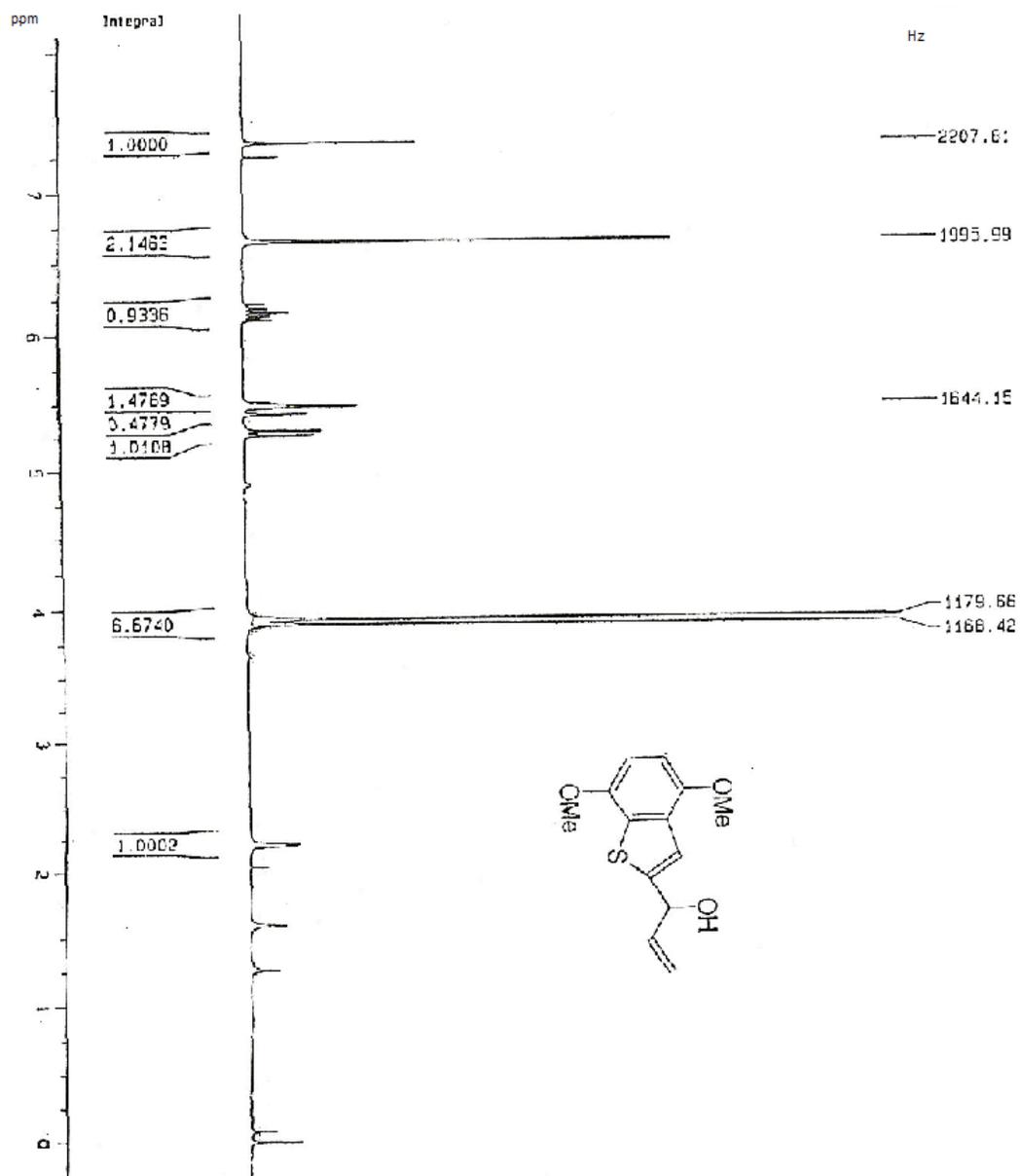
4-(4,7-Dimetoxi-benzo[*b*]tiofeno-2-carbonil)-*N*-Boc-1-piperazina



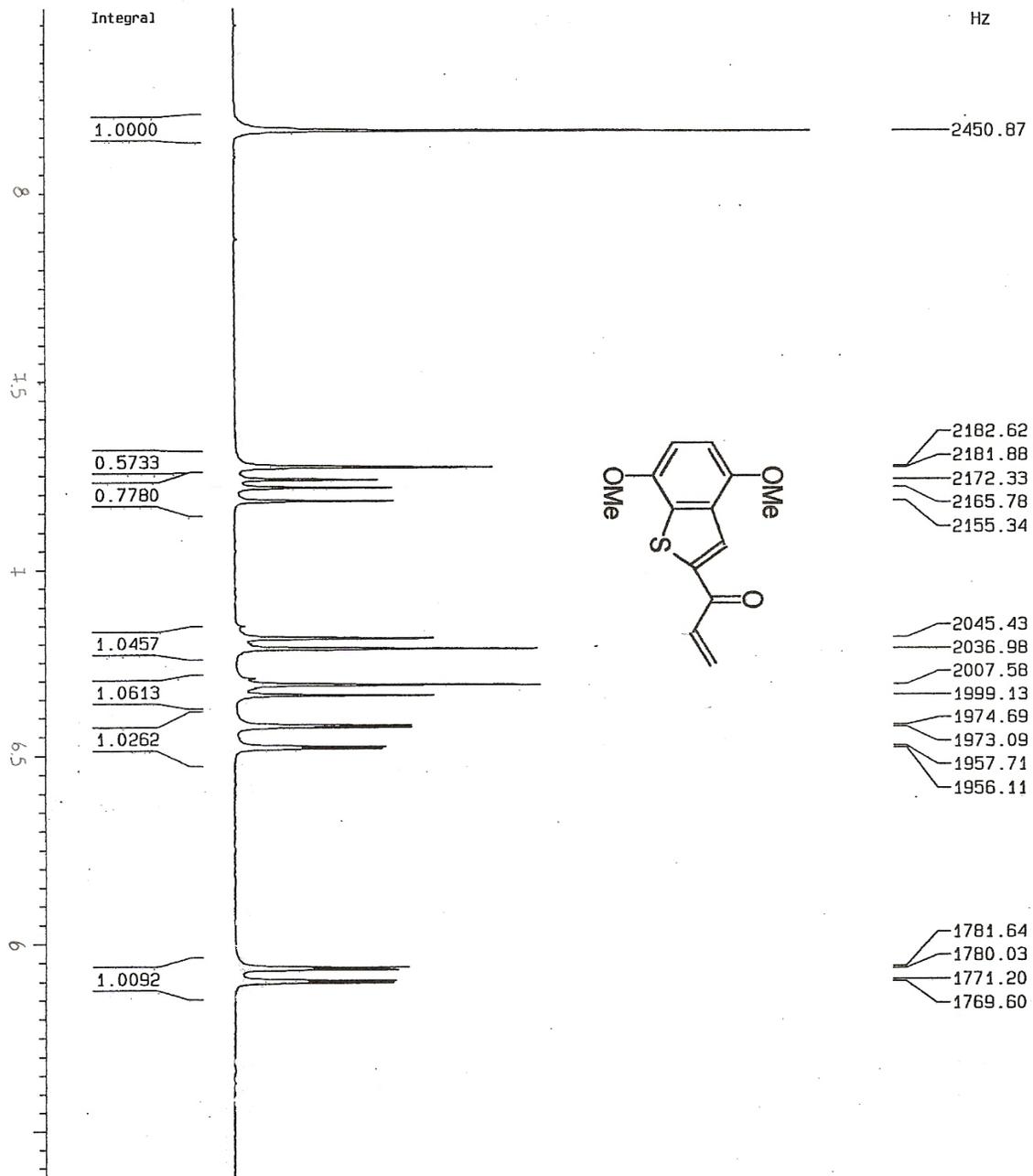
1-[(4,7-Dimethoxy-1-benzo[*b*]tiofeno-2-il)carbonil] piperazina



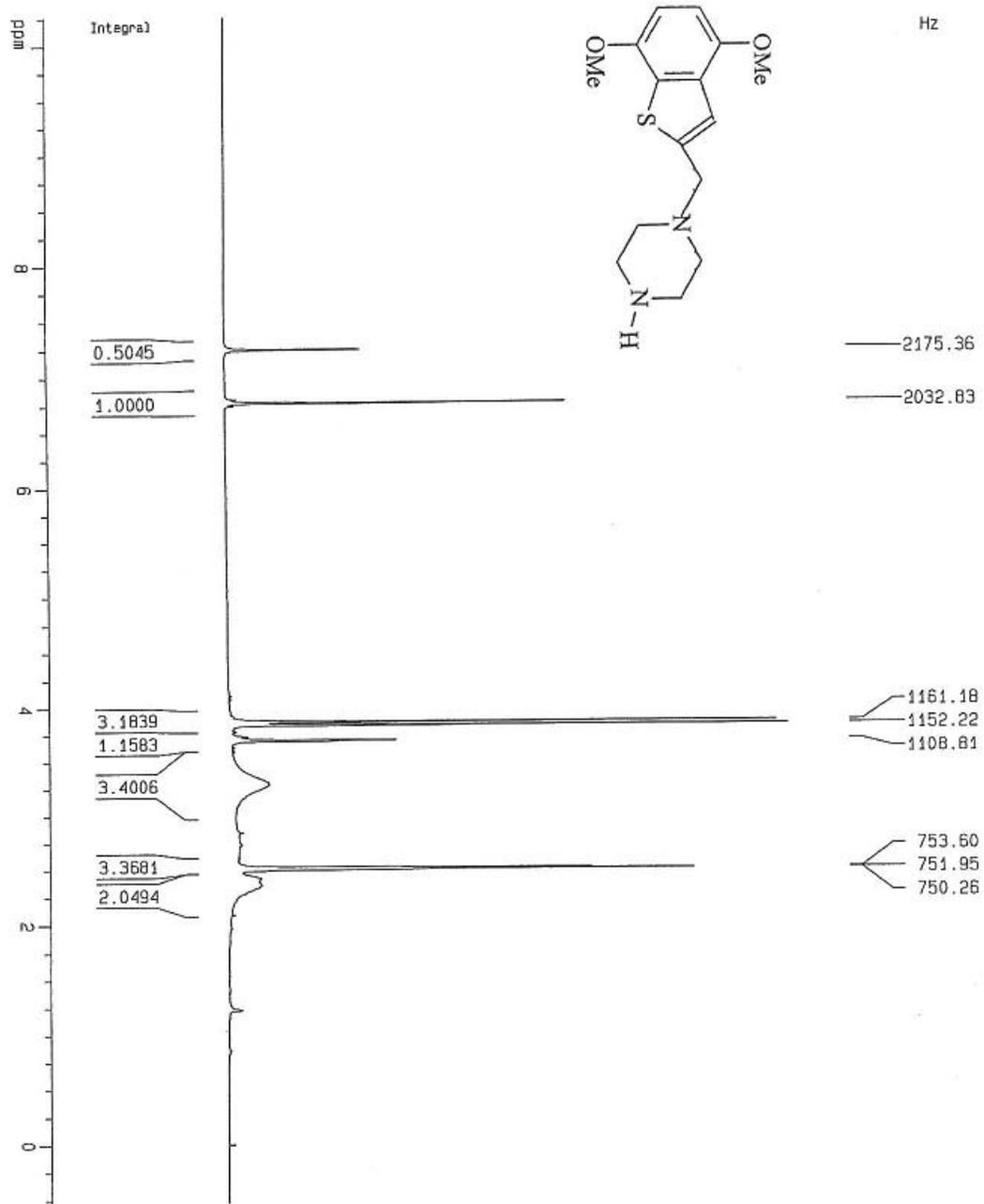
1-(4,7-Dimetoxi benzo[b]tiofen-2-il)-2-propen-1-ol



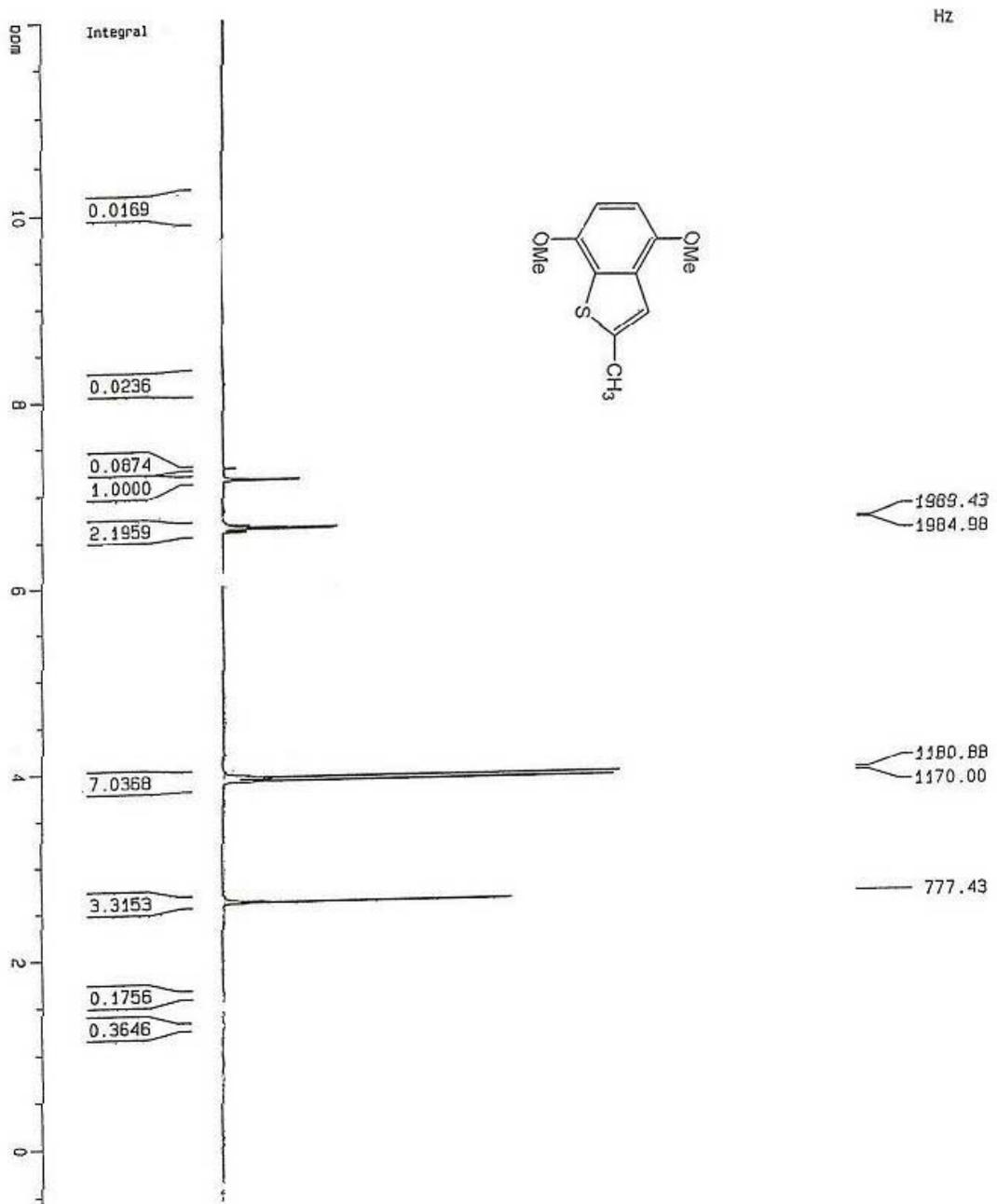
1-(4, 7-Dimetoxi benzo[*b*]tiofen-2-il)-2-propen-1-ona



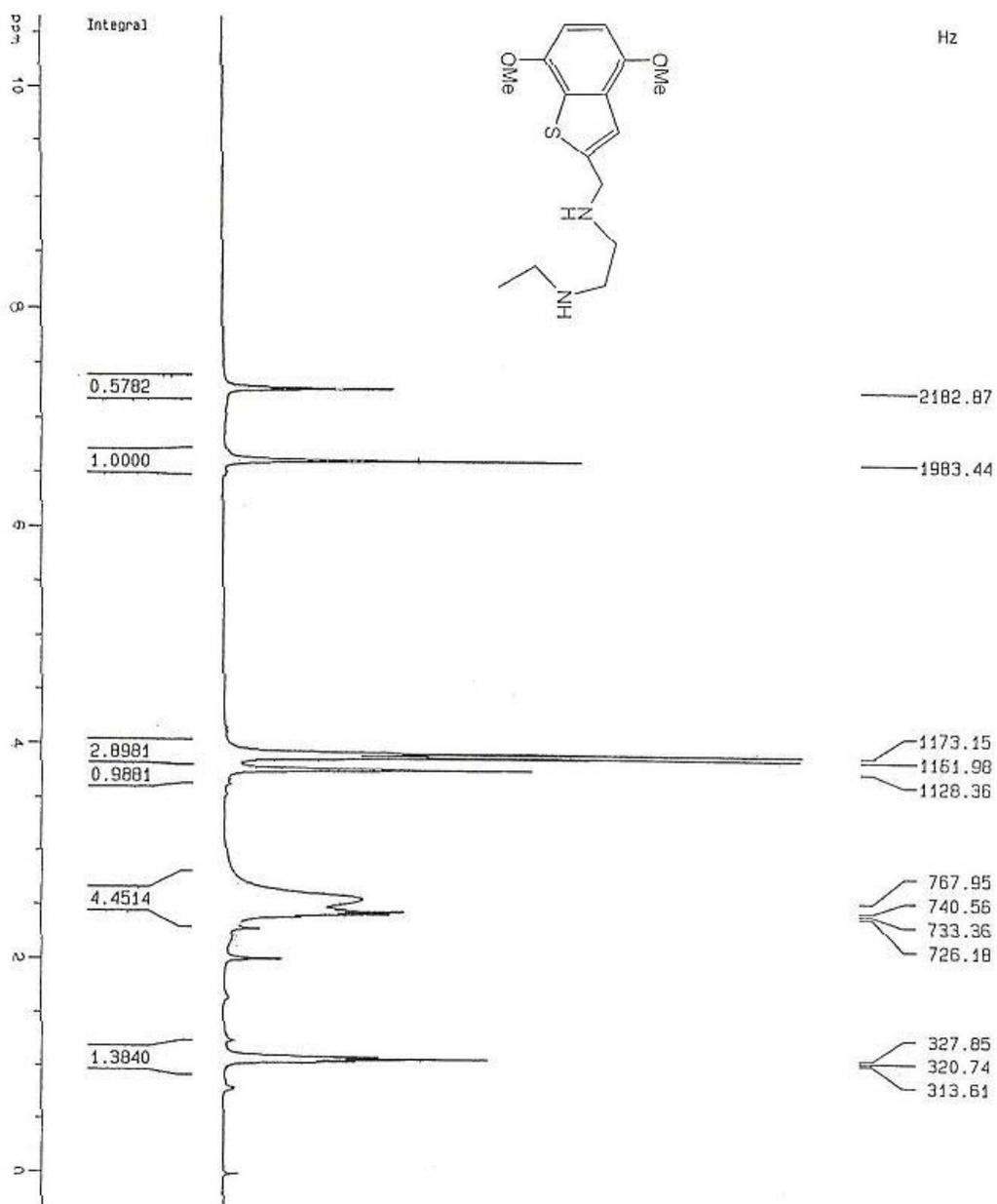
4,7-dimetoxi-benzo [b]tiofenpiperazino



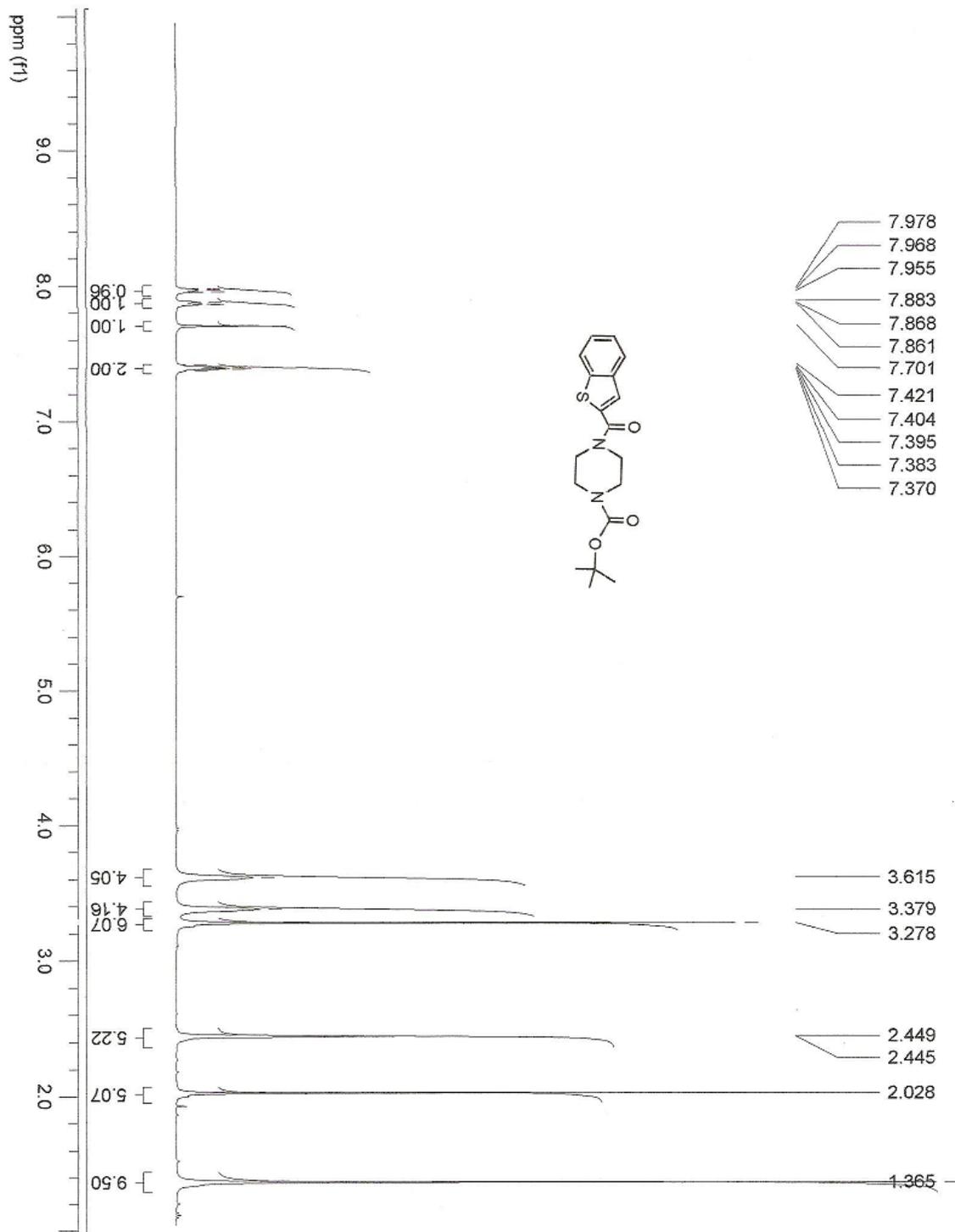
2-metil-4,7-dimetoxi-benzotiofeno



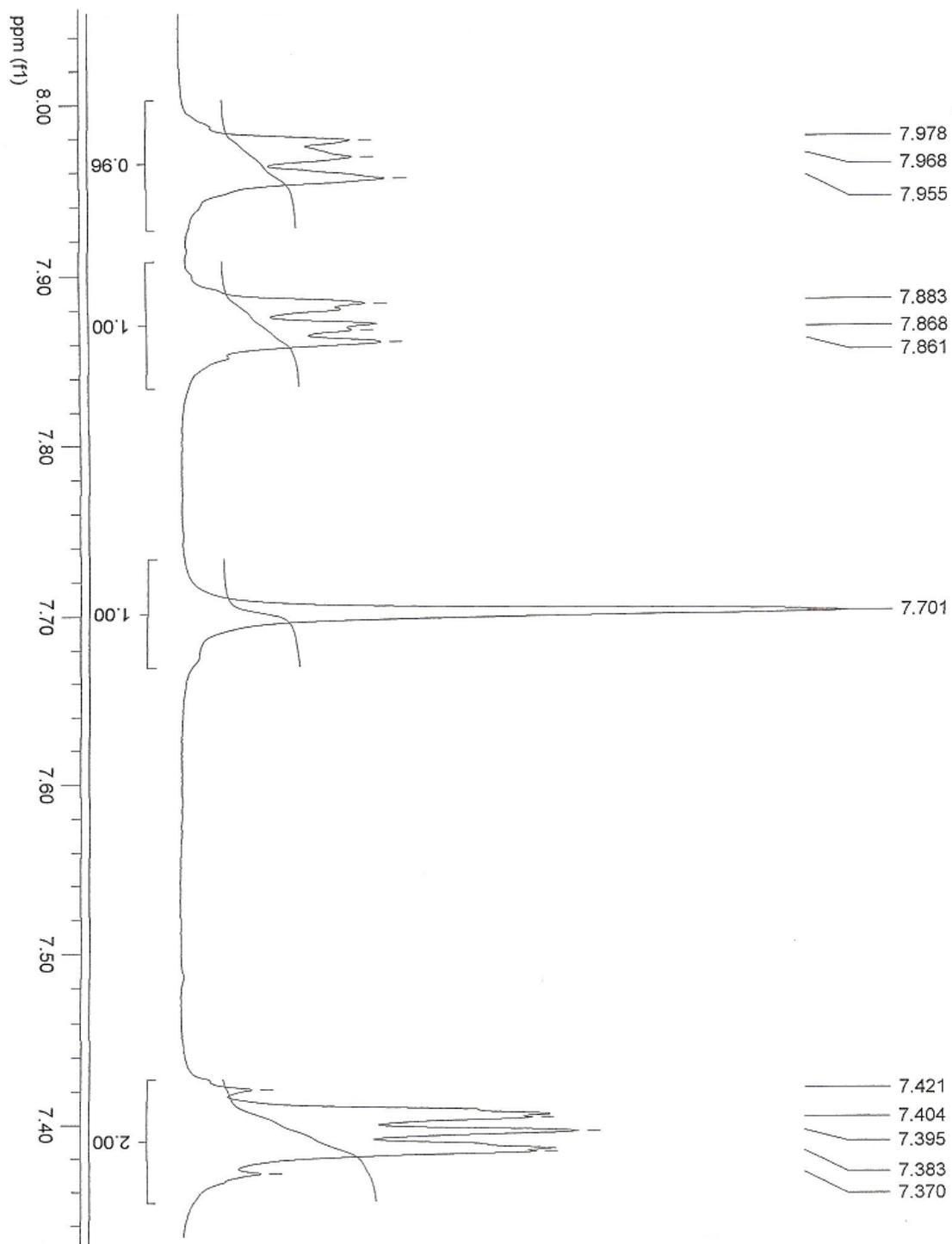
***N*-(4,7-dimethoxy-benzotiofen-2-il-metil)-*N'*-etil-1,2-diaminoetano**



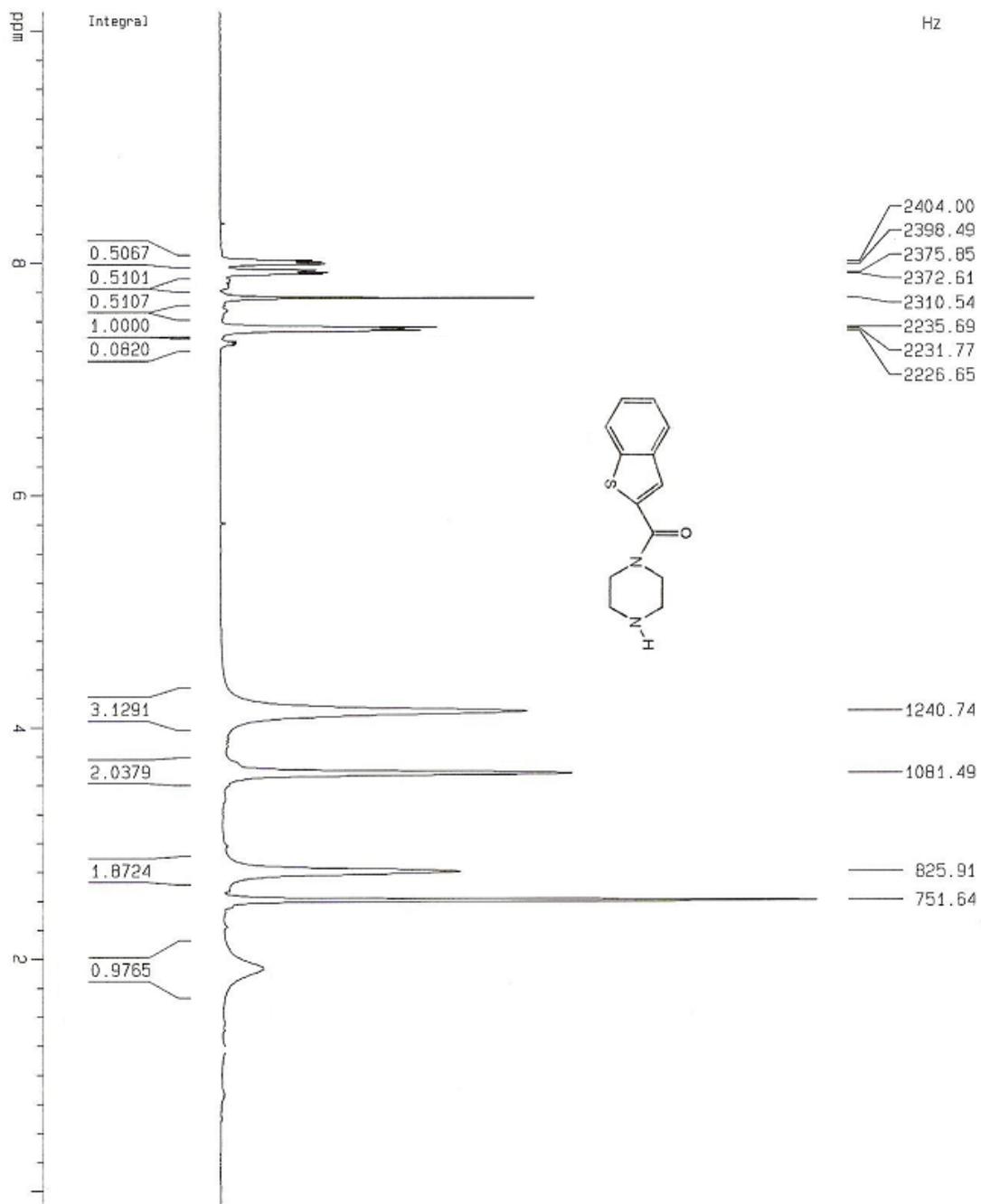
***ter*-Butil 4-(1-benzo[*b*]tiofeno-2-il-carbonil) piperazina-1-carboxilato**



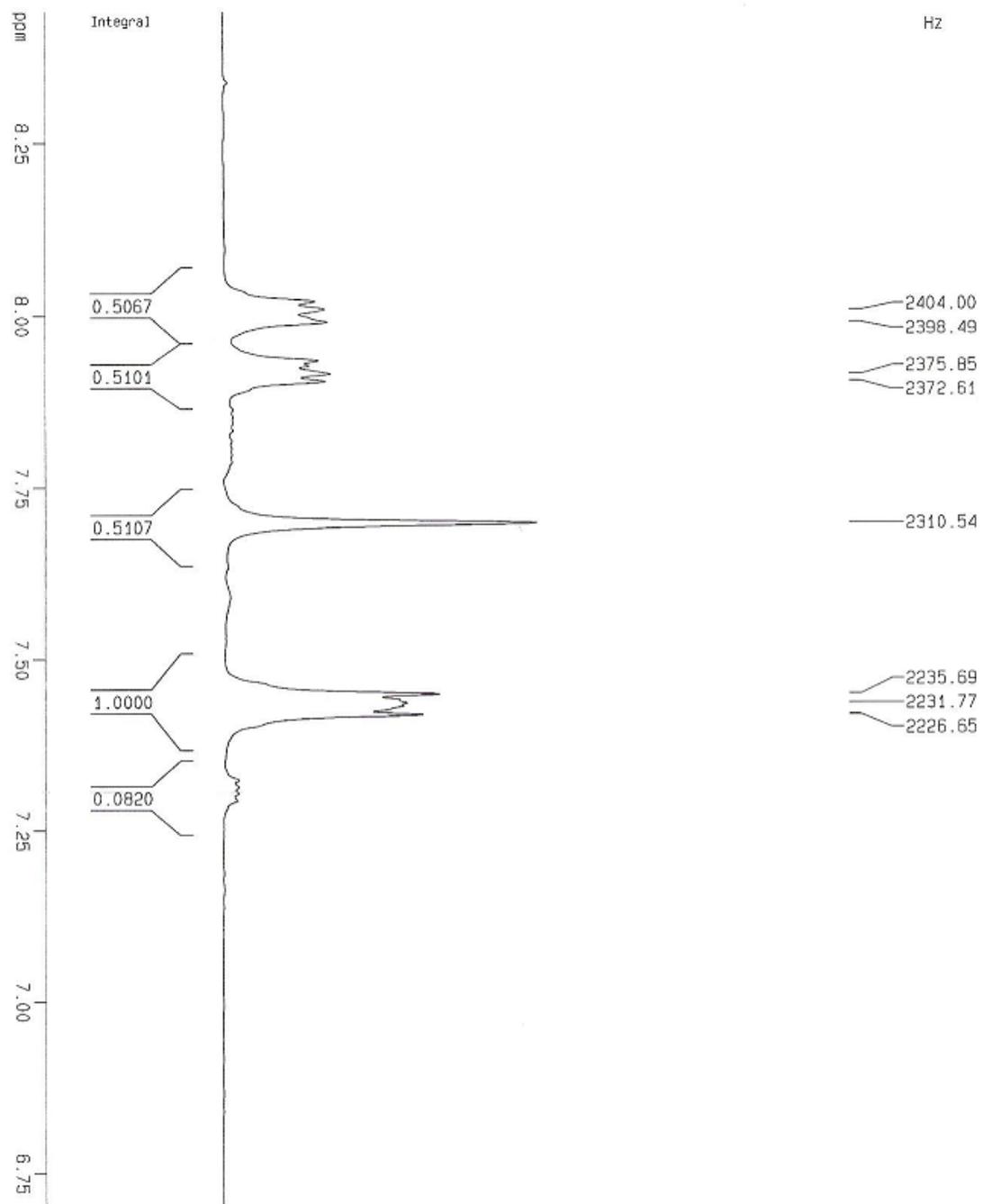
***ter*-Butil 4-(1-benzo[*b*]tiofeno-2-il-carbonil) piperazina-1-carboxilato**



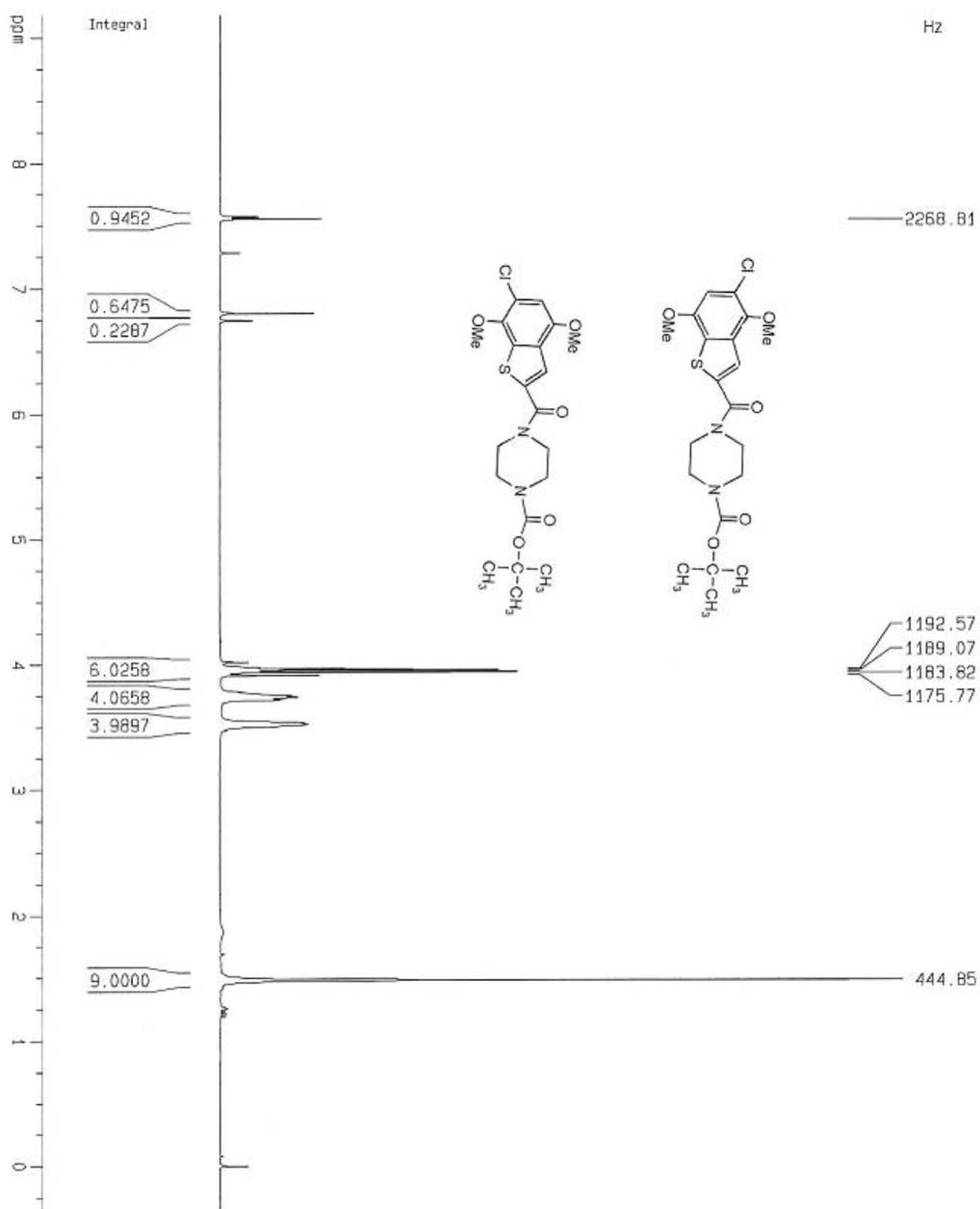
1-(1- Benzo[b]tiofeno-2-il-carbonil) piperazina



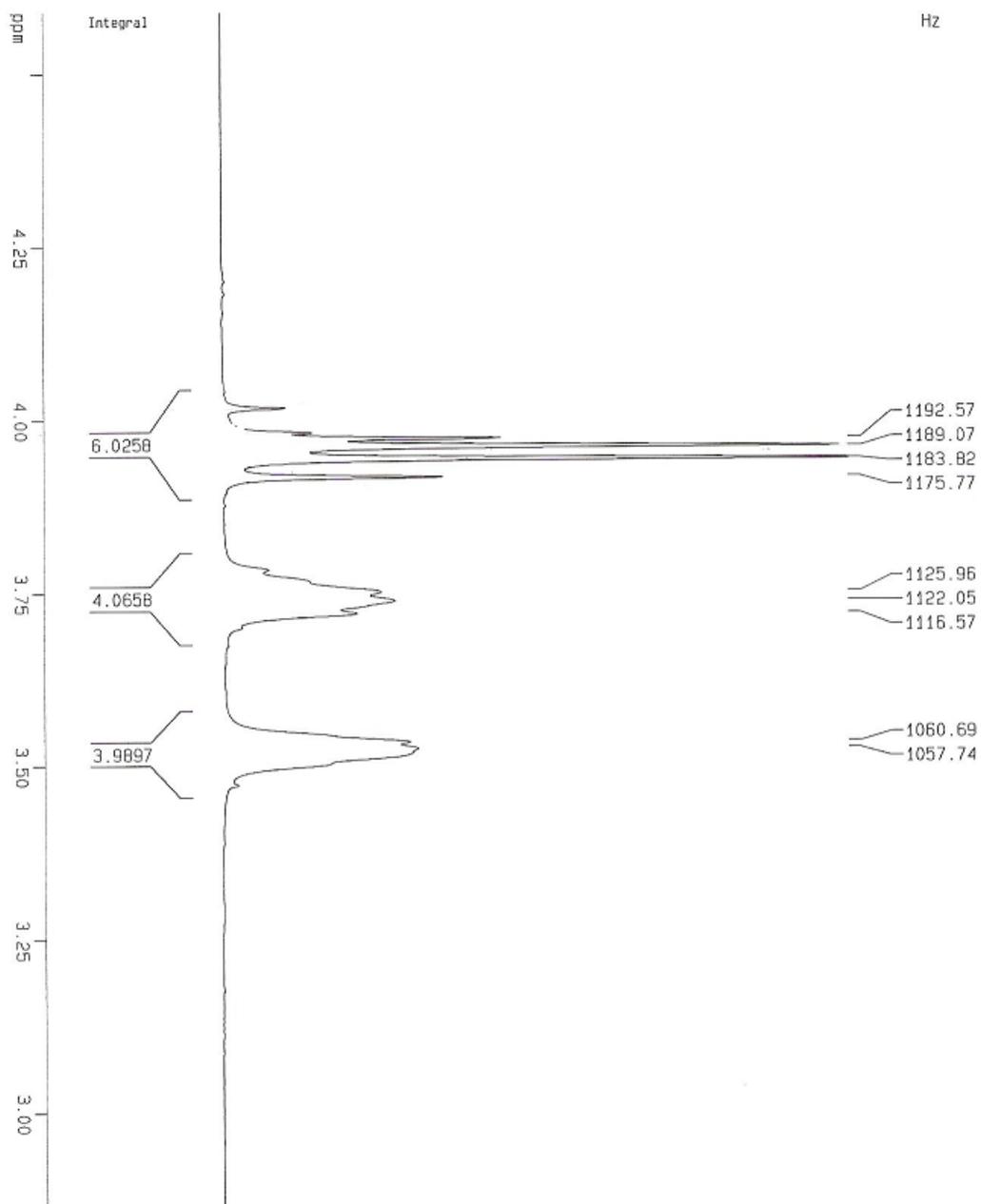
1-(1- Benzo[*b*]tiofeno-2-il-carbonil) piperazina



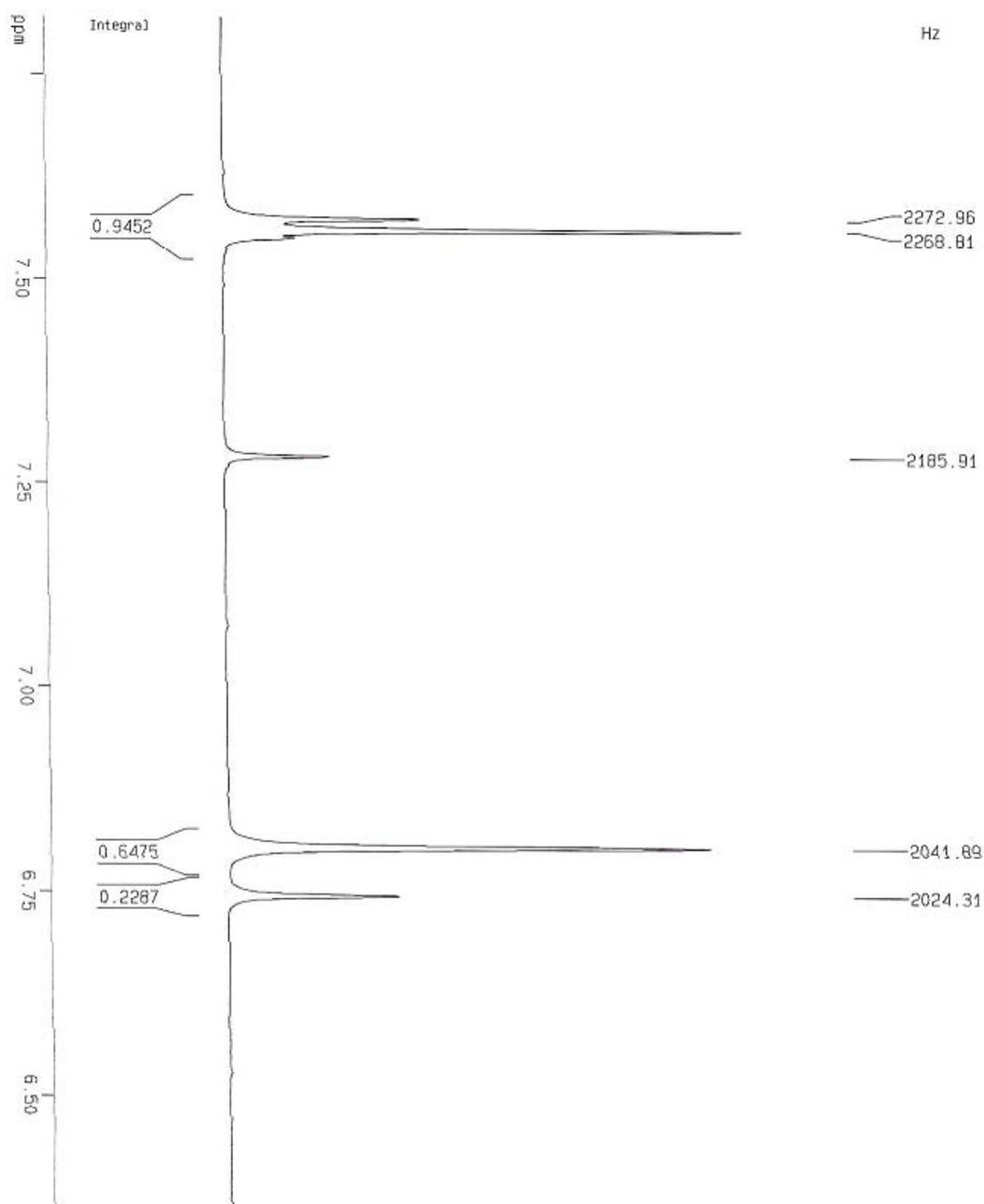
***tert*-Butil 4-[(5 y 6-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazina-1-carboxilato**



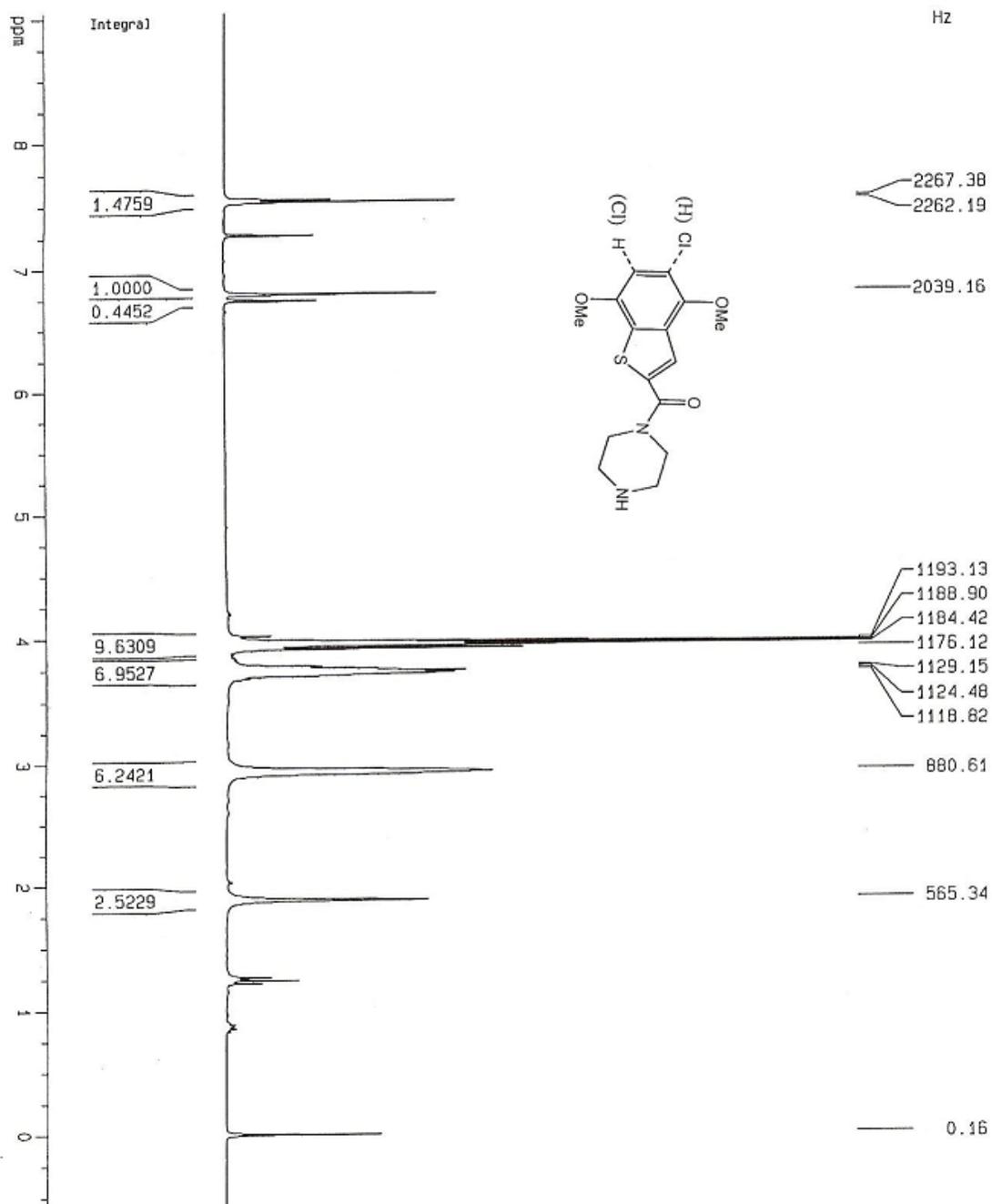
***tert*-Butil 4-[(5 y 6-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazina-1-carboxilato**



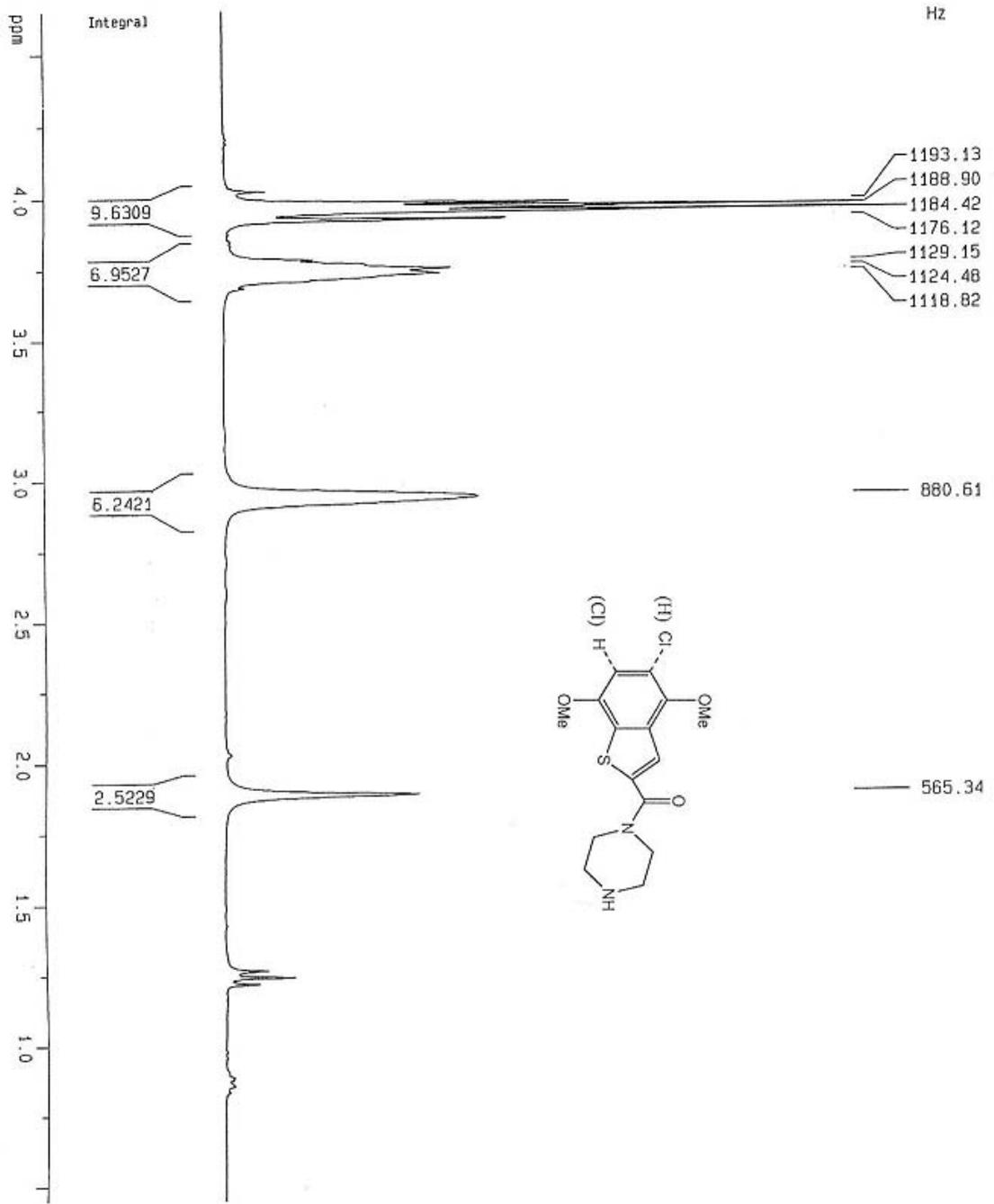
***tert*-Butil 4-[(5 y 6-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazina-1-carboxilato**



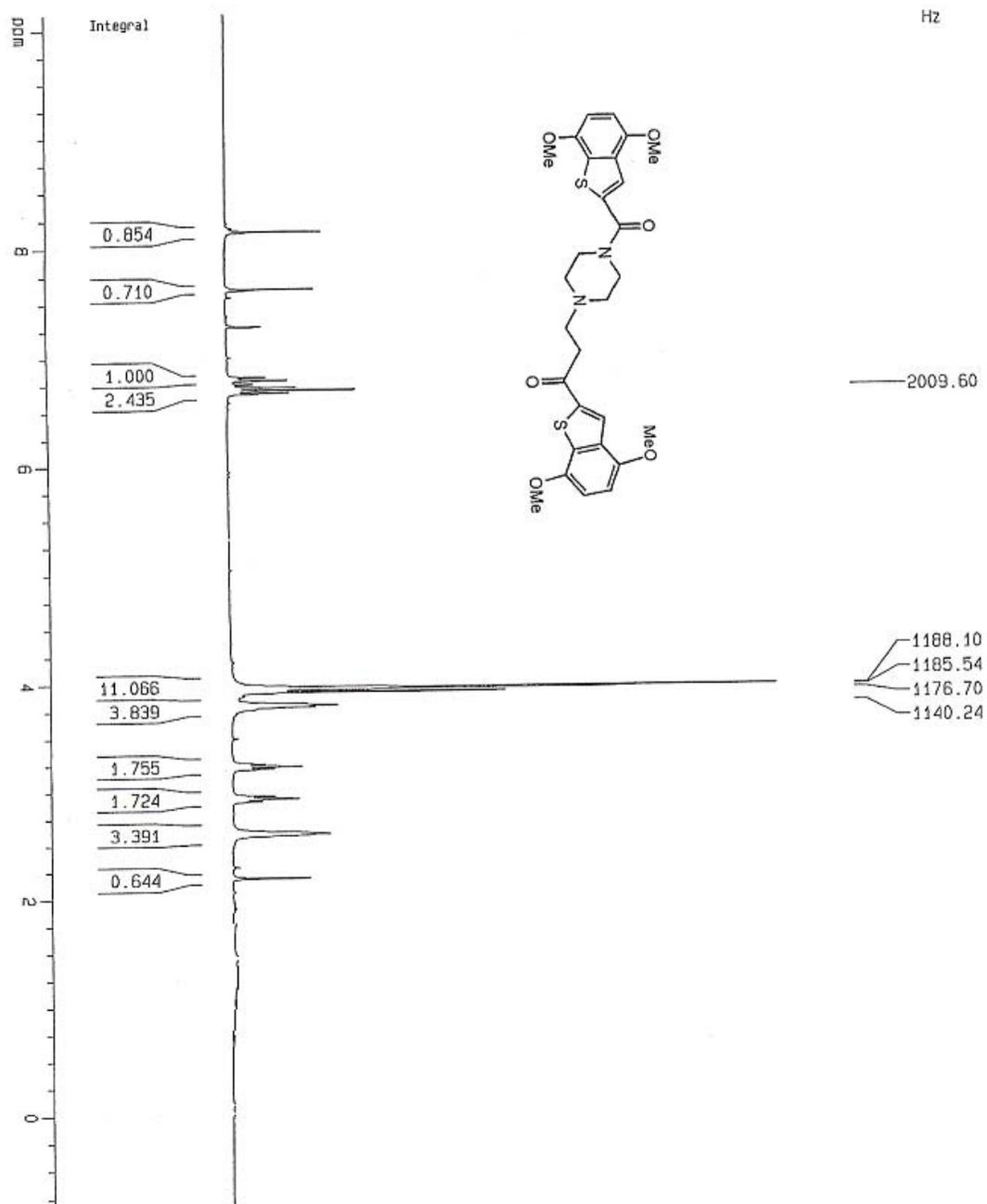
1-[(5 y(6)-Cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazina



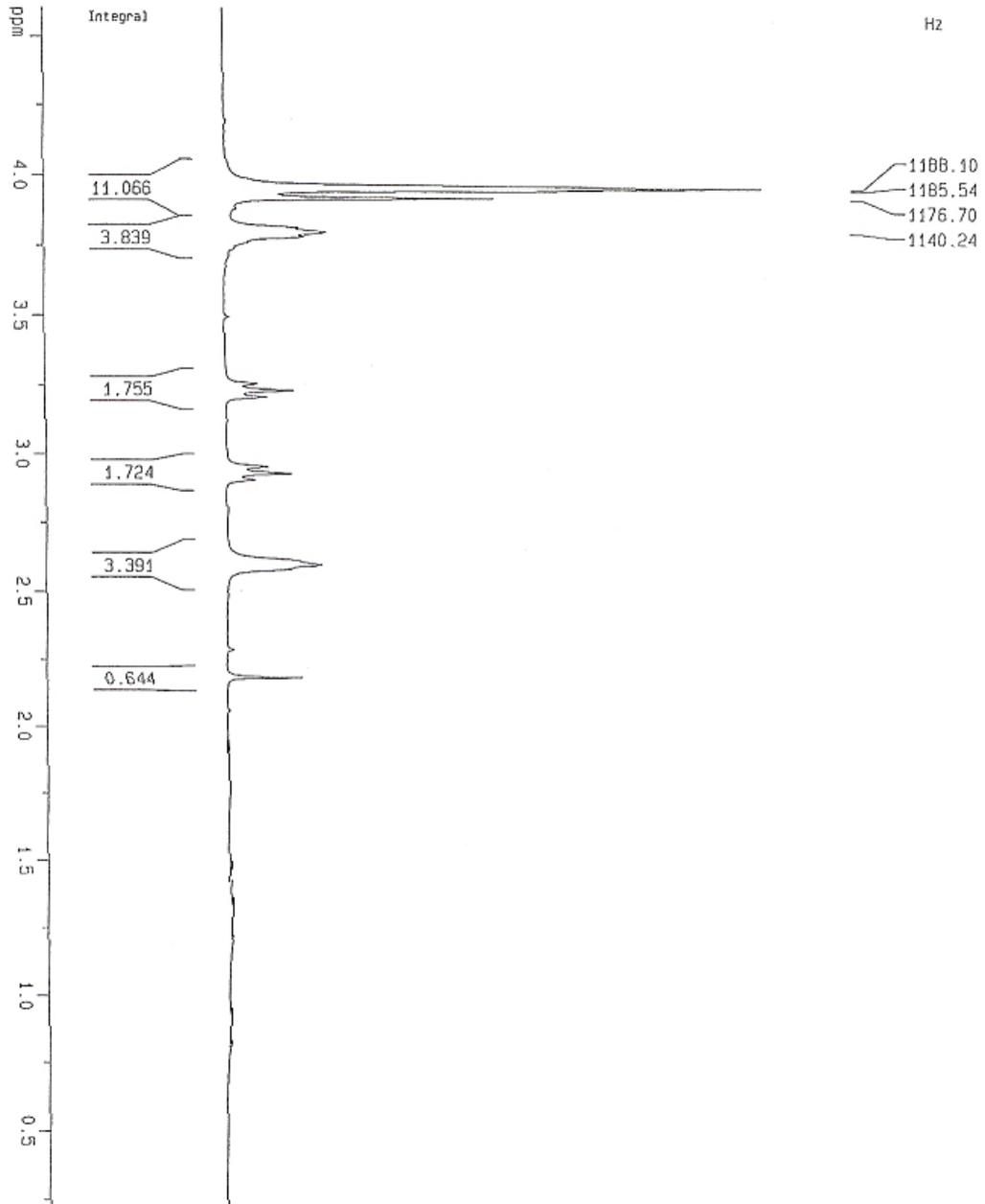
1-[(5) y(6)-Cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il]carbonil]piperazina



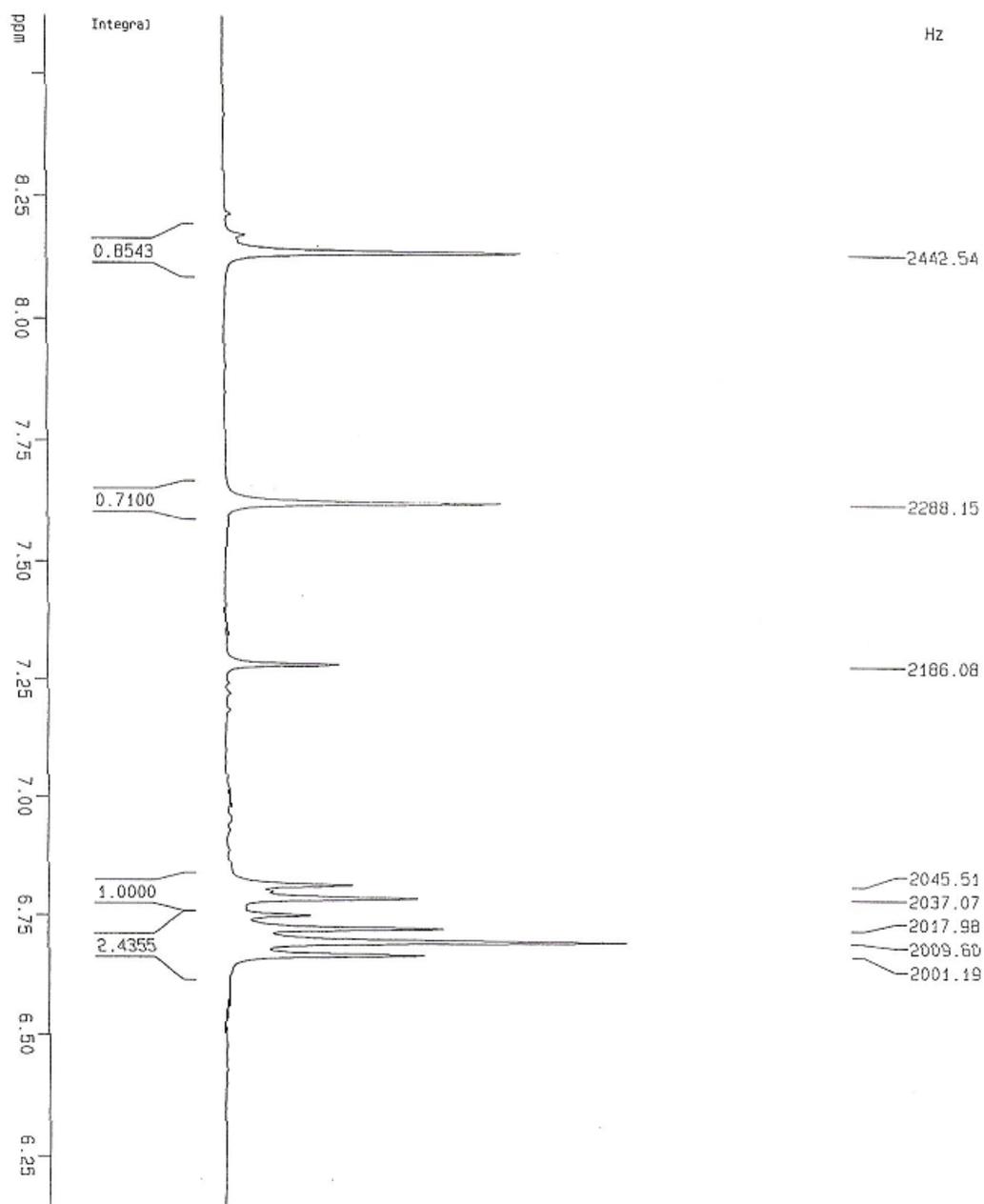
3-[4-(4,7-Dimetoxi-benzo[*b*]tiofen-2-carbonil)-1-piperazinil]-1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-1-propanona



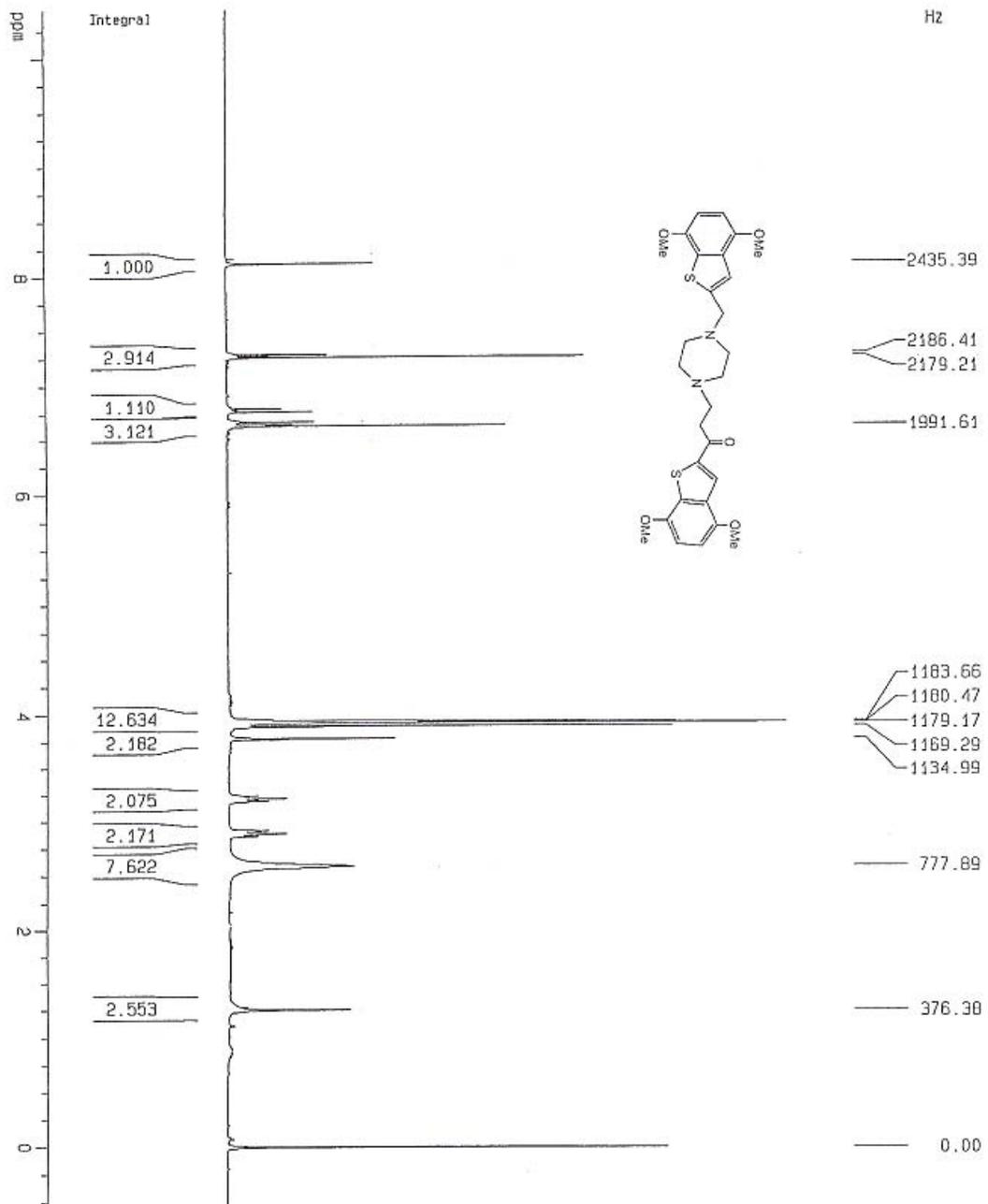
3-[4-(4,7-Dimetoxi-benzo[*b*]tiofen-2-carbonil)-1-piperazinil]-1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-1-propanona



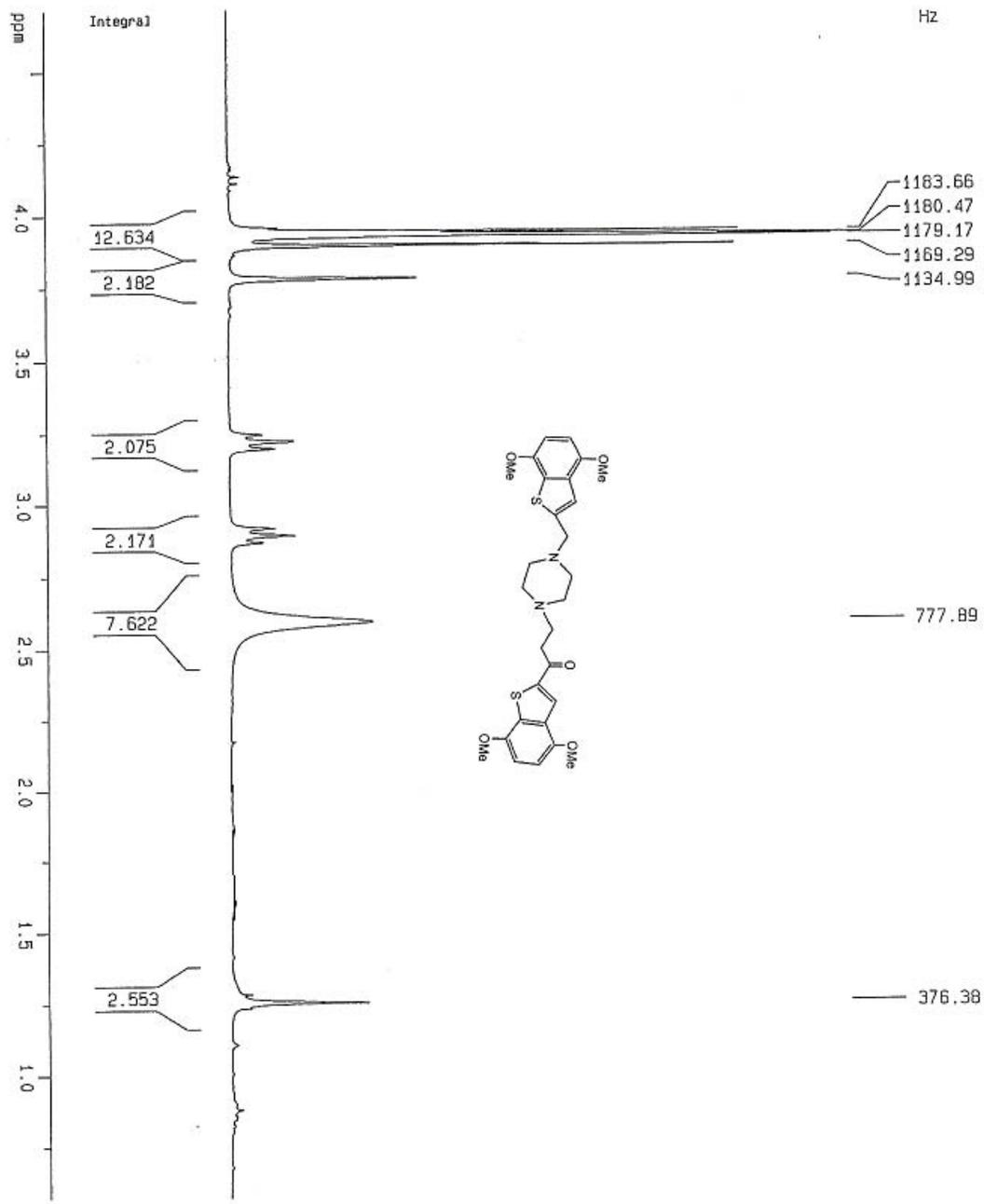
3-[4-(4,7-Dimetoxi-benzo[*b*]tiofen-2-carbonil)-1-piperazinil]-1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-1-propanona



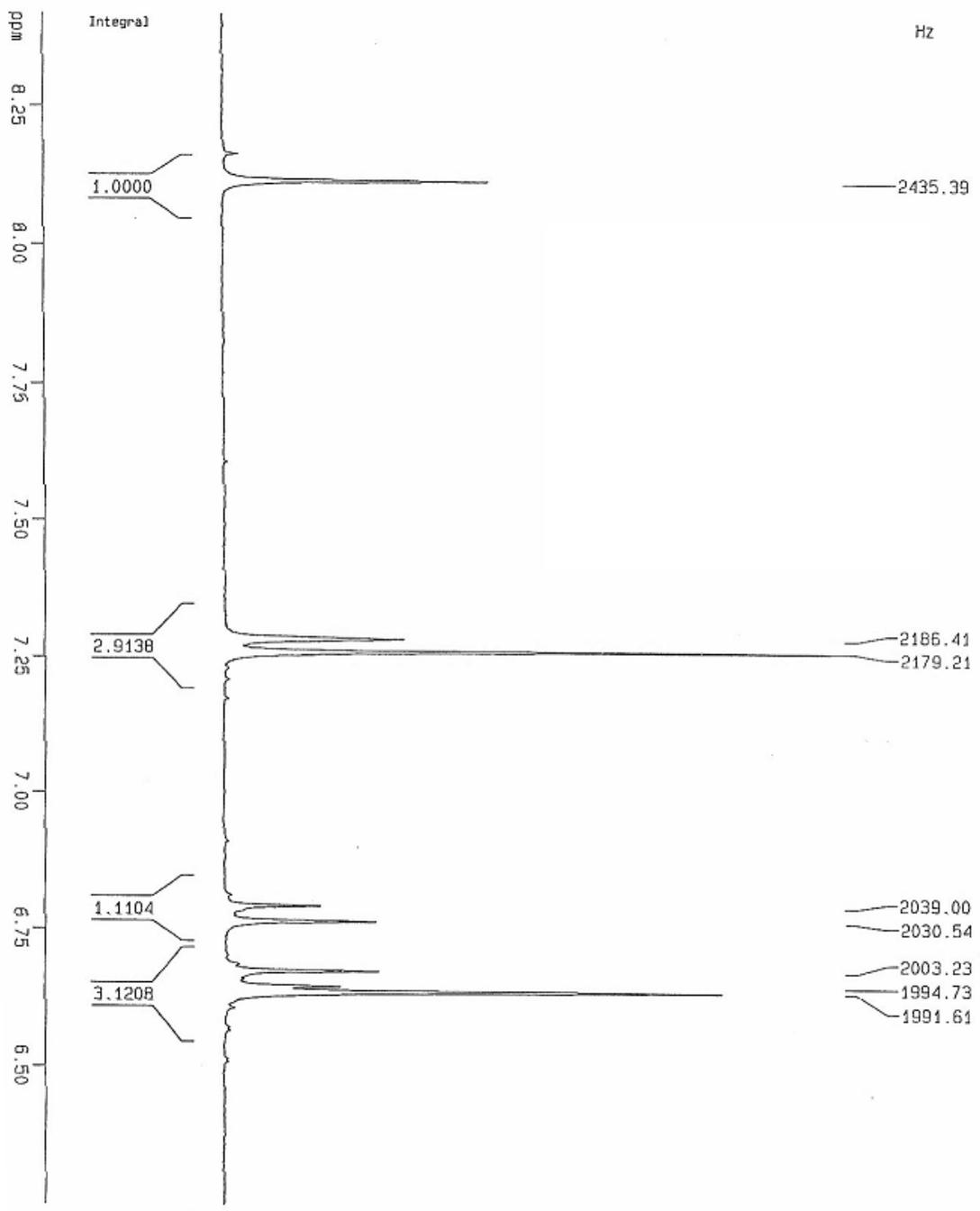
1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-3-[4-(4,7-dimetoxi-2-benzo [*b*] tiofenilmetil) -1-piperazinil]-1-propanona



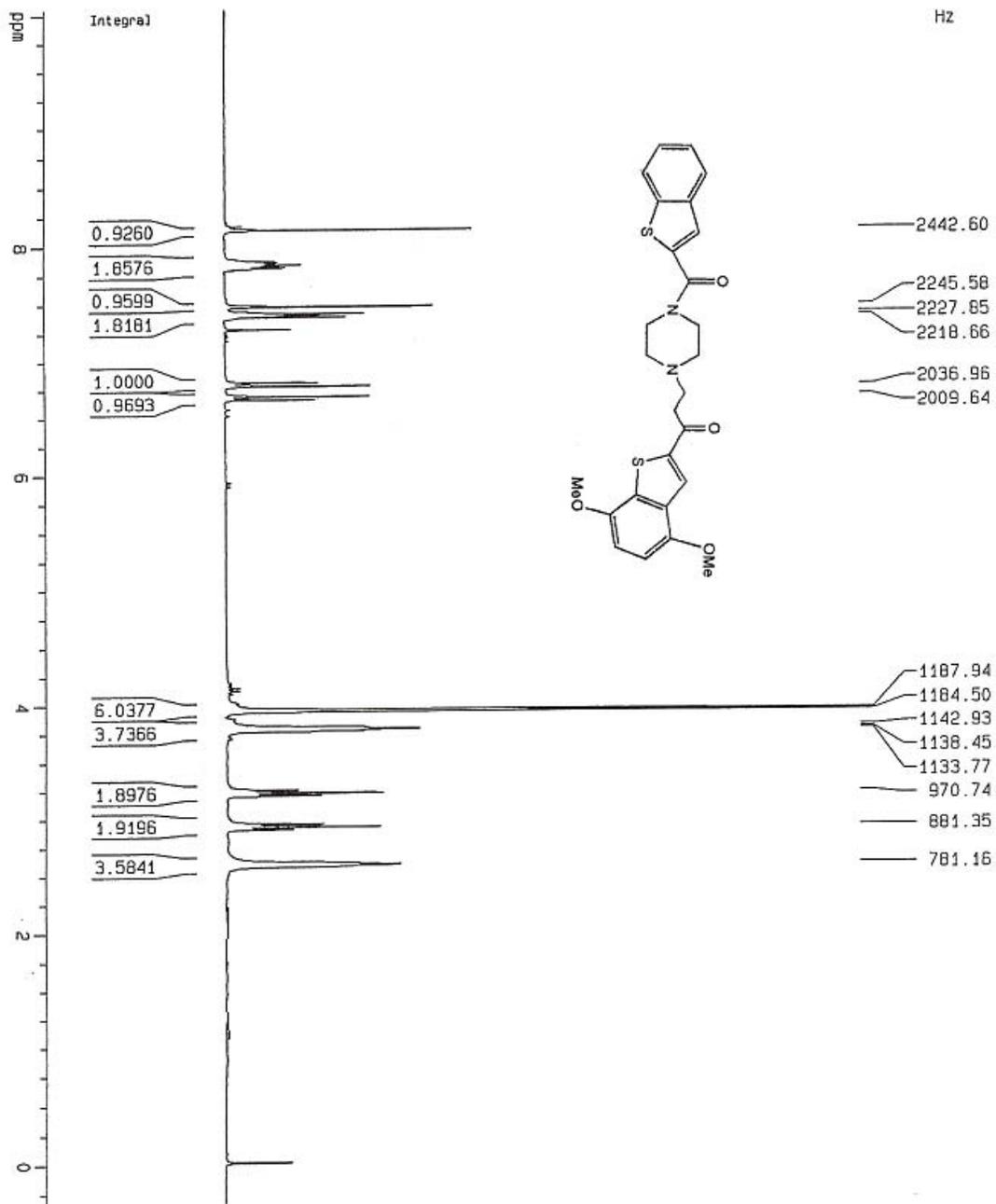
1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-3-[4-(4,7-dimetoxi-2-benzo [*b*] tiofenilmetil) -1-piperazinil]-1-propanona



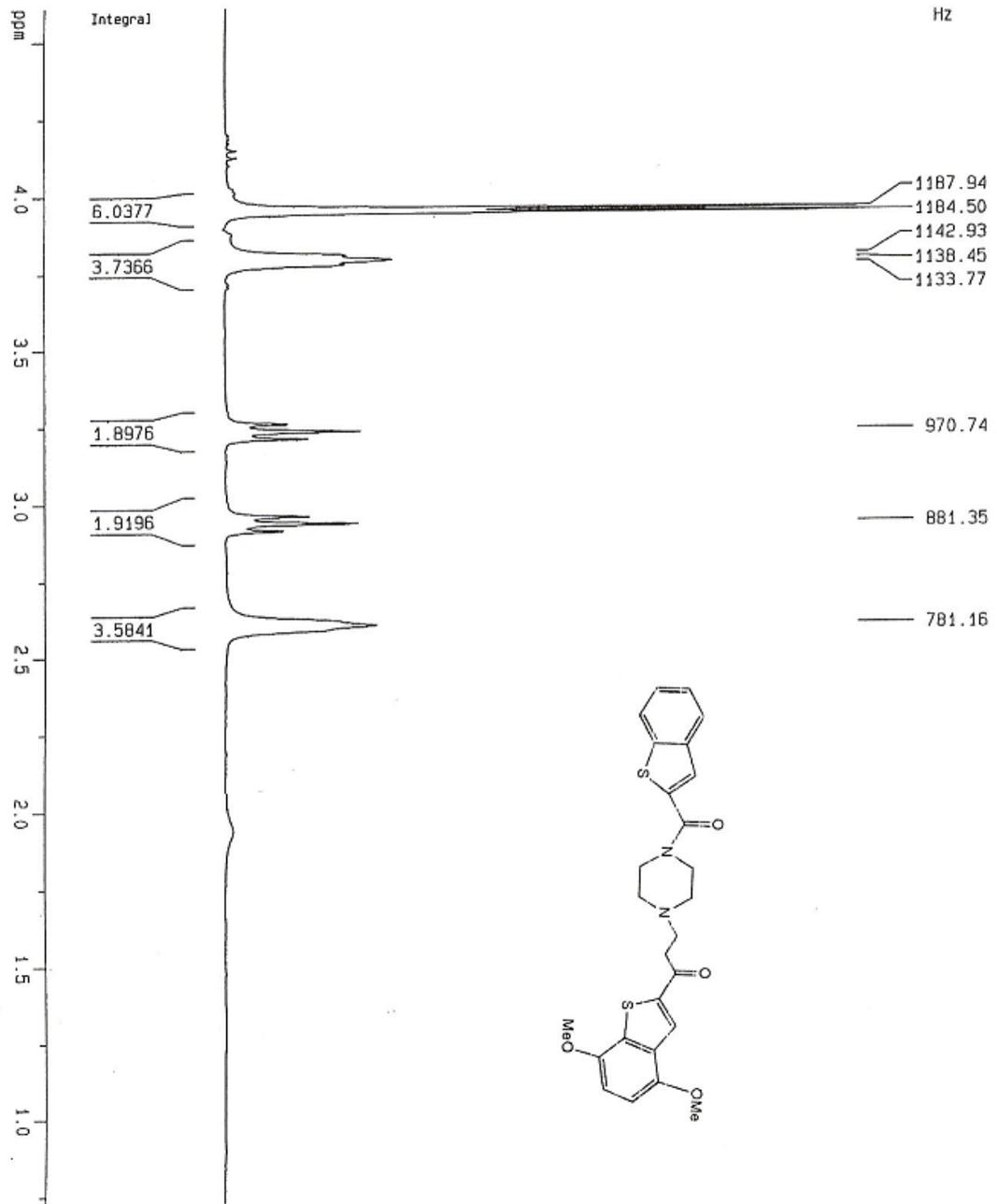
1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-3-[4-(4,7-dimetoxi-2-benzo [*b*] tiofenilmetil) -1-piperazinil]-1-propanona



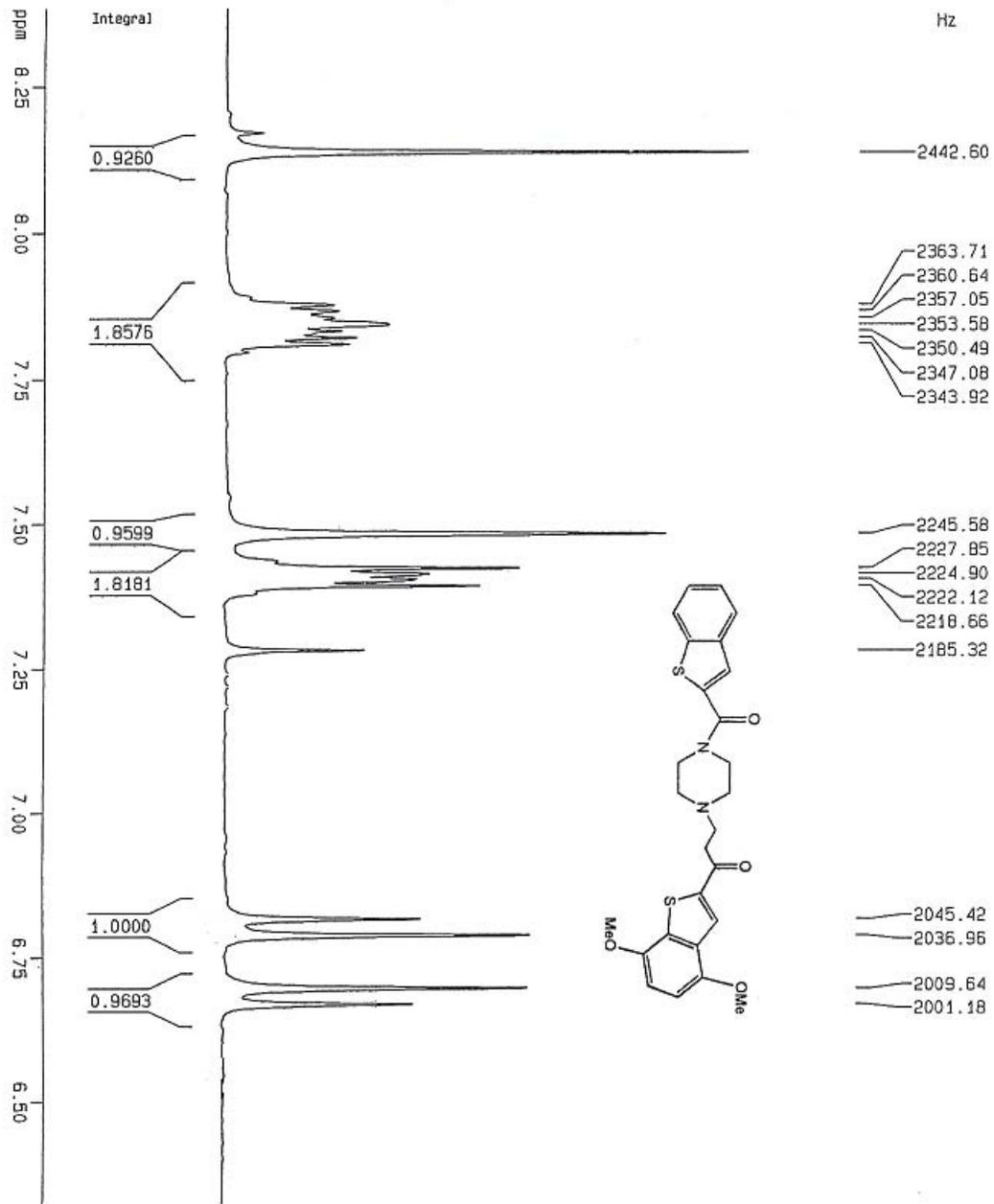
**3-[4-(Benzo[*b*]tiofen-2-carbonil)-1-piperazinil]- 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[*b*]tiofenil)-
1-propanona**



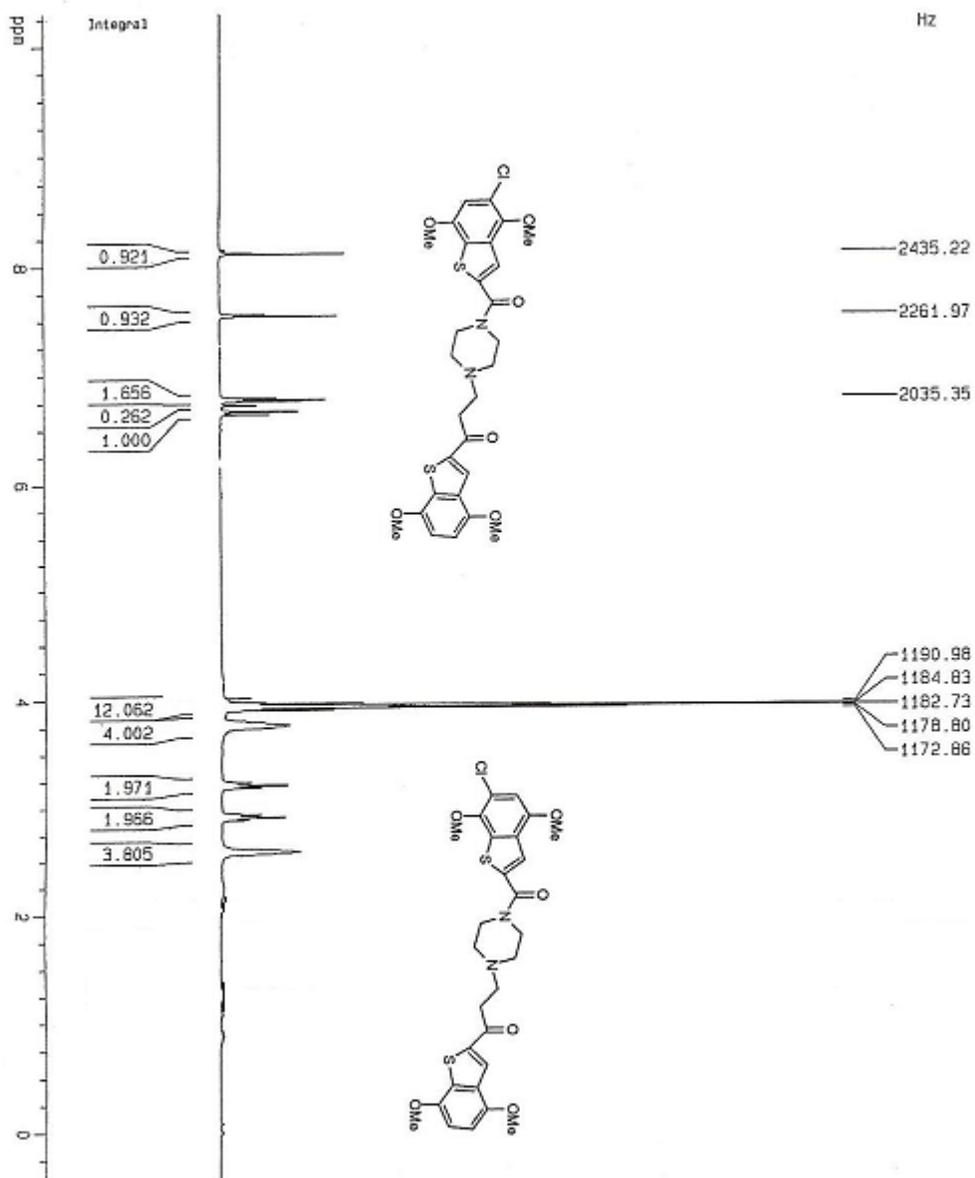
3-[4-(Benzo[b]tiofen-2-carbonil)-1-piperazinil]- 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[b]tiofenil)-
1-propanona



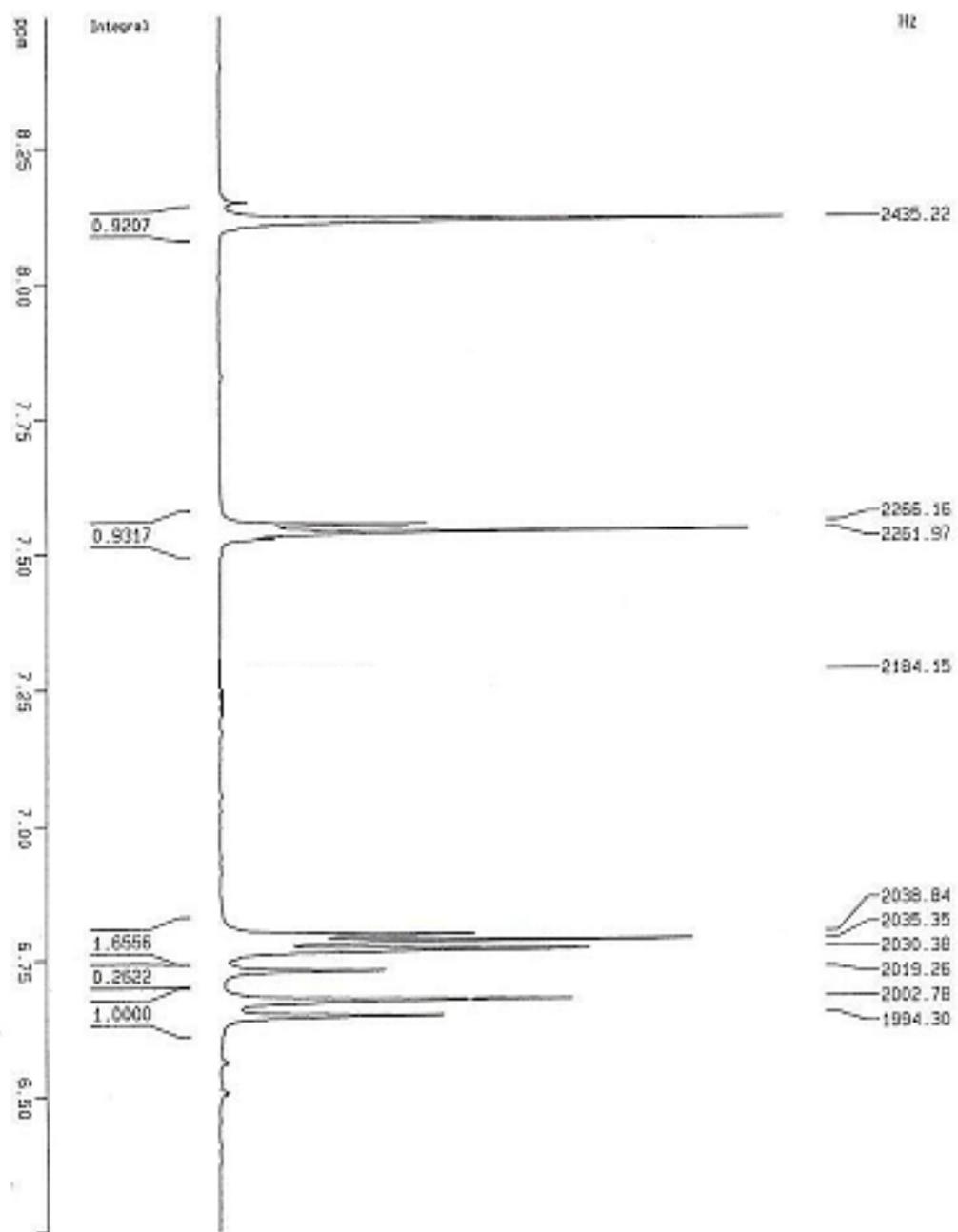
3-[4-(Benzo[b]tiofen-2-carbonil)-1-piperazinil)- 1-(4,7-dimetoxi-2-benzo[b]tiofenil)-
1-propanona



3-{4-[(5 / 6-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazin-1-il}-1-(4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)1- propanona



3-{4-[(5 / 6-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazin-1-il}-1-(4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)1- propanona



3-{4-[(5 / 6-cloro-4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)carbonil]piperazin-1-il}-1-(4,7-dimetoxi-1-benzotien-2-il)1- propanona

