

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***DISEÑO RACIONAL Y SINTESIS DE DERIVADOS DE ANILLOS
BENZO[D]IMIDAZÓLICOS Y BENZO[B]TIOFÉNICOS COMO
LIGANDOS DEL RECEPTOR CANNABINOIDES TIPO II***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Química y Memoria para optar al Título de
Químico por:**

VALERIA PAZ ZÚÑIGA SALAZAR

Director de Tesis: Dr. Javier Romero Parra

Santiago-CHILE

Noviembre de 2024.

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

VALERIA PAZ ZÚÑIGA SALAZAR

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química y Título de Químico

Director de Tesis:

Dr. Javier Romero Parra

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Oleksandra Trofymchuk

Dr. Luis Marcelo Vilches

Dra. Margarita Gutierrez Cabrera

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia y también a Hanna y Vaqui.

AGRADECIMIENTOS

Quiero iniciar agradeciendo en primer lugar, a mis padres Jessica y Luis, por su apoyo permanente en este camino de la ciencia, que desde pequeña me inculcaron la importancia del estudio y me motivaron a seguir formándome constantemente.

A mi director de tesis el Dr. Javier Romero Parra, por su dedicación, esmero, guía y consejos otorgados a lo largo de este largo proceso, como también la paciencia y el esfuerzo invertido en mi formación y desarrollo de este proyecto.

También quiero dedicar un agradecimiento especial a mi pareja, amigos y compañeros, quienes me brindaron su apoyo incondicional durante mi formación académica en el transcurso de estos años. Comenzando con mi pareja y mejor amigo, Felipe Barría por su compañía y cariño en todo momento. A Carlos, Analía y Andrés que me ayudaron en cada paso y tontera que me pasara en el laboratorio, como también consejos sintéticos y sermones totalmente merecidos. A mis compañeros de laboratorio, Jonathan, Luis y Héctor, por la compañía, apoyo y discusiones, como también excelentes momentos que nunca olvidaré. A mi amiga Camila, por acompañarme en cada prueba y momentos de estudio durante este largo proceso, igualmente las penas, frustraciones y alegrías que compartimos por nuestro paso en la universidad, que sin duda fortaleció nuestra amistad.

A mis amigos Franco, Javo, Laura, Carla, Jose y Paolo, me dieron los mejores inolvidables momentos en la Chile.

A Renato de la Pontifica Universidad Católica, que me enseñó y acogió durante mi última parte de la tesis. Sin su ayuda no habría sido posible terminar este magister.

RESUMEN

El sistema endocannabinoide (SEC) es un conocido sistema de señalización endógeno de alta complejidad compuesto principalmente por mediadores lipídicos, enzimas y receptores. Los principales receptores del SEC son los de tipo cannabinoides I y tipo cannabinoides II (receptores CB₁ y CB₂ respectivamente). El descubrimiento de este sistema fisiológico llevó a poder relacionar su comportamiento biológico y bioquímico con el alto potencial terapéutico que refleja en diversos trastornos, tales como aquellos de tipo neurológico, inmunológico y neurodegenerativo, entre otros. Lo anterior permitió considerar estrategias que permitieran la modulación del SEC para obtener ventajas clínicas. Una de las estrategias de modulación consiste en el diseño de agentes sintéticos selectivos por el receptor CB₁ o por el receptor CB₂. En este sentido, se destacan los ligandos selectivos por el receptor de cannabinoides tipo II, debido a sus implicancias en patologías tales como cáncer, Parkinson y enfermedades neuro-inflamatorias entre otras. Además, es fundamental considerar que los ligandos agonistas selectivos por el receptor CB₂ no presentan efectos psicotrópicos, a diferencia de ligandos agonistas selectivos por el receptor CB₁ y los ligandos que carecen de selectividad. Teniendo en cuenta esta base, se han reportado una gran variedad de ligandos agonistas selectivos por el receptor CB₂, los que presentan una gran diversidad estructural química. Entre dichas diversidades, encontramos ligandos derivados de anillos benzo[*d*]imidazólicos y benzo[*b*]tiofénicos, cuyos marcos estructurales heterocíclicos muestra importancia debido a que son isómeros del anillo aromático indol presente en una gran variedad de ligandos conocidos del receptor cannabinoide tipo II llamados aminoalquilindoles. Considerando lo mencionado, se propuso la síntesis de ligandos con núcleos de benzo[*d*]imidazoles y benzo[*b*]tiofenos, sustituidos en las posiciones *N*1 ó 3-, según corresponda, con anillo de naftaleno y/o anisol mediante un puente carbonilo o metilénico. También, se ha propuesto que la posición 2- de los benzo[*d*]imidazoles y benzo[*b*]tiofenos sea derivatizada con los heterociclos de anisol, piridina, furano e isoxazol.

Mediante síntesis se obtuvo una totalidad de dieciocho compuestos diferentes. Ocho de ellos corresponden a la serie **1** perteneciente a los benzo[*d*]imidazoles con puente carbonilo, otros ocho compuestos comprenden la serie **1.2** de benzo[*d*]imidazoles con puente metilénico, y dos ligandos finales correspondiente a los benzo[*b*]tiofenos acilados en posición 3- con un grupo 4-metoxibenzoilo y naftoilo. Se ensayó la viabilidad celular de

estos compuestos en líneas celulares HEK293-T, U-87MG y HL-60 mediante el ensayo de reducción de MTT a formazán. Se ejecutó el ensayo a una concentración de cada compuesto de 10 μ M por un tiempo de incubación de 72hrs. Aquellos compuestos que demostraron una reducción selectiva de la viabilidad celular en la línea celular HL-60, que expresa predominantemente el receptor cannabinoide tipo II, en comparación con la línea celular U-87MG, que expresa los receptores cannabinoide tipo I, sugerirían un mecanismo de muerte celular mediante apoptosis, ya que el agonismo cannabinoide estaría relacionado con este tipo de muerte celular programado. Los compuestos que exhibieron este comportamiento fueron (5-cloro-2-(3-metoxifenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3a**), (6-cloro-2-(piridin-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3b**'), (5-cloro-2-(furan-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3c**) y 5-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(piridin-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**3.2b**). También fueron seleccionados para realizar ensayos de citometría de flujo para comprobar el mecanismo de muerte celular por el cual estaban actuando en la línea celular HL-60. Se descubrió con este último ensayo que los compuestos **3a** y **3c**, actuaban mayoritariamente mediante apoptosis temprana, mientras que los compuestos **3b**' y **3.2b** actuaban mediante un mecanismo de muerte celular no concordante con apoptosis o necrosis.

Con los resultados obtenidos, preliminarmente se podría sugerir un diseño de ligandos selectivos por el receptor cannabinoide tipo II, con un anillo principal de benzo[*d*]imidazol, con un átomo de cloro en la posición 5- en este mismo y anillos lipofílicos π -conjugados, como piridina, furano o 3-metoxibenceno en la posición 2- del marco benzoimidazólico principal.

ÍNDICE DE MATERIAS.

TABLA DE CONTENIDOS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	11
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	12

TABLA DE CONTENIDOS

1.-INTRODUCCION.....	14
1.1.-Sistema endocannabinoide.....	14
1.2.-Receptores cannabinoides.....	14
1.3.-Endocannabinoides.....	15
1.4.- Potencial terapéutico.....	16
1.5.- Ligandos cannabinoides agonistas.....	17
1.6.- Ligandos cannabinoides antagonistas/ agonistas inversos.....	19
1.7.- Receptor CB ₂ como blanco farmacológico.....	20
1.8.- Química de los ligandos cannabinoides del receptor CB ₂	22
1.9.- Benzo[<i>d</i>]imidazoles y benzo[<i>b</i>]tiofenos como marco estructural.....	24
1.10.- Benzo[<i>d</i>]imidazol como ligando del receptor cannabinoides tipo II.....	24
1.11.- Benzo[<i>b</i>]tiofeno como ligando del receptor cannabinoides tipo II.....	27
1.12.- Estrategia para la obtención de benzo[<i>d</i>]imidazoles y benzo[<i>b</i>]tiofenos como ligandos CB ₂	29
2.-HIPÓTESIS.....	33
2.1.-OBJETIVOS.....	33
2.1.1.-Objetivo general.....	33
2.1.2.-Objetivos específicos.....	33
3.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
3.1.- Síntesis: resultados y discusión.....	34
3.1.1.- Síntesis de derivados de 5/6-cloro-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol con puente carbonilo en posición 1 (serie 1).....	34
3.1.2.- Síntesis de derivados de 5/6-cloro-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol con puente metilénico en posición 1 (serie 1.2).....	46

3.1.3.- Síntesis de derivados de benzo[<i>b</i>]tiofenos (serie 2 y 3)	55
3.2.1- Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i> de los compuestos a 10 µM, mediante el método colorimétrico de reducción de MTT	60
3.2.2.- Ensayo de muerte celular por citometría de flujo	65
3.2.3.- Análisis estructura-actividad	69
4.-CONCLUSIONES	71
5.-MATERIALES Y MÉTODOS	72
5.1.-Técnicas e instrumentos	72
5.1.2.- Líneas celulares	72
5.1.3.- Ensayo de viabilidad celular por MTT	72
5.1.4.- Ensayo de muerte celular por citometría de flujo	73
5.1.5.- Instrumentos de caracterización	73
5.2.- Reactivos	74
5.3.-Síntesis	74
5.3.1.- 5-cloro-2-(3-metoxifenil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (2a).....	74
5.3.2.- 5-cloro-2-(piridin-3-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (2b)	75
5.3.3.- 5-cloro-2-(furan-2-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (2c)	75
5.3.4.- 5-cloro-2-(isoxazolil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (2d).....	76
5.3.5.- (5-cloro-2-(3-metoxifenil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3a).....	77
5.3.6.- (5-cloro-2-(piridin-3-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3b).....	78
5.3.7.- (6-cloro-2-(piridin-3-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3b´)	79
5.3.8.- (5-cloro-2-(furan-2-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3c).....	79
5.3.9.- (6-cloro-2-(furan-2-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3c´).....	80
5.3.10.- (5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3d).....	81
5.3.11.- (6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3d´)	82
5.3.12.- 5-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(3-metoxifenil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (3.2a)	82
5.3.13.- 6-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(3-metoxifenil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (3.2a´)	83
5.3.14.- 5-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(piridin-3-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (3.2b)	84
5.3.15.- 6-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(piridin-3-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (3.2b´)	85
5.3.16.- 5-cloro-2-(furan-2-il)-1-(4-metoxibencil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (3.2c).....	85
5.3.17.- 6-cloro-2-(furan-2-il)-1-(4-metoxibencil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (3.2c´).....	86
5.3.18.- 5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (3.2d)	87
5.3.19.- 6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazol (3.2d´)	88

5.3.20.- 2-(3-metoxifenil)-benzo[<i>b</i>]tiofeno (5a)	88
5.3.21.- 2-(3-metoxifenil)-benzo[<i>b</i>]tiofeno (5b)	89
5.3.22.- (4-metoxifenil)(2-(3-metoxifenil)benzo[<i>b</i>]tiofen-3-il)metanona (6a)	90
5.3.23.- (2-(3-metoxifenil)benzo[<i>b</i>]tiofen-3-il)(naftalen-1-il)metanona (7a).....	91
6.-BIBLIOGRAFIA	92
7.-ANEXOS.....	100

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), principal componente psicoactivo del <i>Cannabis sativa</i>	14
Figura 2 .- Estructuras químicas de los ligandos endógenos cannabinoides más representativos: Anandamida, 2-AG, noladin éter, NADA y virodamina	16
Figura 3.- Estructuras de ligandos cannabinoides agonistas más representativos de la clase de cannabinoides “clásicos”: HU-210 y Desacetil-L-nantradol y la categoría de cannabinoides “no clásicos”: CP55940 y CP55244	18
Figura 4.- Ligandos más representativos de la clase de aminoalquilindoles: WIN55,212-2 y JWH-015	18
Figura 5.- Antagonistas del receptor CB ₁ más estudiados de sus series: SR141716A y sus análogos AM251 y AM281. En la parte inferior de la figura, LY320135	20
Figura 6.- Antagonistas/agonistas inversos del receptor CB ₂ más famosos: AM630 y SR144528	20
Figura 7.- Compuestos derivados de aminoalquilindoles selectivos por el receptor CB ₂ con diferentes sustituciones y sus respectivas constantes de afinidad (K _i). Para todos los derivados las K _i /CB ₂ son menores que las K _i /CB ₁ reflejando la selectividad.....	23
Figura 8.- Estructura de ligandos con la porción de benzo[<i>d</i>]imidazol como núcleo principal, selectivos por el receptor CB ₂ y con actividad agonista	27
Figura 9.- Estructuras de benzo[<i>b</i>]tiofenos dirigidos hacia la modulación del receptor CB ₂	28
Figura 10.- Estructuras destacables de la serie sintetizada de tiofenos y tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofenos como ligandos del receptor CB ₂	28

Figura 11.- A) Interacciones efectuadas entre el aminoalquilindol WIN-55,212-2 y distintos aminoácidos del sitio activo del receptor CB₂. **B)** Interacciones de XIE55 y XIE57 en el receptor CB₂ vinculada a WIN55,212-2. (Fig: Xing, et al., *Cryo-EM Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2-Gi Signaling Complex*. *Cell* 2020, 180 (4), 645-654.e13). 31

Figura 12.- Nuevos ligandos propuestos derivados de benzo[d]imidazol y benzo[b]tiofeno, sustituidos con diferentes heterociclos en sus posiciones 2- y anillos de anisol/naftaleno en las posiciones N-1 ó 3-, según corresponda. Para los derivados benzo[d]imidazólicos se considera una serie con un puente metilénico y carbonílico..... 32

Figura 13.- Espectro ¹H-RMN y ampliación de la zona aromática del compuesto (5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3d**) con sus respectivas señales y constantes de acoplamiento:(300 MHz, DMSO-d₆) δ: 9,10 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₂₀), 8,02 (d, *J*_{meta} = 1,9 Hz, 1H, H₆), 7,76 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 7,45 (dd, *J*_{orto, meta} = 8,8; 2,0 Hz, 1H, H₂), 7,37 (d, *J*_{orto} = 8,8 Hz, 1H, H₃), 7,15 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₁₉), 7,06 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 3,85 (s, 1H, H₂₅)..... 40

Figura 14.- Espectro ¹³C-NMR del compuesto (5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3d**) con sus respectivas señales ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 166,42 (**10C**), 164,71 (**15C**), 161,33 (**20C**), 153,56 (**12C**), 143,50 (**8C**), 142,95 (**5C**), 133,28 (**4C**), 133,22 (**13,17C**), 128,60 (**1C**), 125,78 (**2C**), 123,70 (**11C**), 119,86 (**6C**), 114,66 (**14,16C**), 113,86 (**3C**), 105,03 (**19C**), 55,80 (**25C**)..... 40

Figura 15.-Estructura del compuesto 5-cloro-1-etil-2-(furan-2-il)-1H-benzo[d]imidazol utilizado como patrón para poder determinar el desplazamiento (ppm) exacto de los átomos de carbono cuaternarios 4- y 5- a través de la relación de tres enlaces (en rojo) con los protones metilénicos (en azul) 41

Figura 16.- Espectro bidimensional HMBC del compuesto (5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona con sus señales características entre el carbono 4 (C-4) y los protones H₂ y H₆, y el carbono 5 (C-5) con el protón H₃, que corroboran la posición del átomo de cloro..... 42

Figura 17.- Espectro ¹H-RMN y ampliación de la zona aromática del compuesto (6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3d'**) con sus respectivas señales y constantes de acoplamiento: ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 9,08 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₂₀), 7,94 (d, *J*_{orto} = 8,6 Hz, 1H, H₆), 7,75 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 7,48 (dd, *J*_{orto, meta} = 8,6; 2,0 Hz, 1H, H₁), 7,44 (d, *J*_{meta} = 2,0 Hz, 1H, H₃), 7,14 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₁₉), 7,05 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 3,85 (s, 1H, H₂₅)..... 43

Figura 18.- Espectro ¹³C-RMN del compuesto (6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3d'**) con sus respectivas señales:¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d₆) δ 167,00 (**10C**), 165,31 (**15C**), 161,92 (**20C**), 154,21 (**12C**), 143,67 (**8C**), 141,55 (**5C**), 135,66 (**4C**), 133,86 (**13,17C**), 130,60 (**2C**), 125,40 (**1C**), 124,36 (**11C**), 122,43 (**6C**), 115,25 (**14,16C**), 112,96 (**3C**), 105,63 (**19C**), 56,43 (**25C**) 44

Figura 19.- Espectro bidimensional HMBC del compuesto (6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3d'**) con sus señales características entre el

carbono 4- (C-4) y el protón H₆, y el carbono 5- (C-5) con los protones H₁ y H₃, que corroboran la posición del átomo de cloro..... 45

Figura 20.- Espectro ¹H-RMN y ampliación de la zona aromática del compuesto 5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (**3.2d'**) y con sus respectivas señales y constantes de acoplamiento: ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,22 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₂₀), 7,86 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, H₆), 7,70 (d, *J*_{orto} = 8,7 Hz, 1H, H₃), 7,37 (dd, *J*_{orto, meta} = 8,7; 2,0 Hz, 2H, H₂), 7,26 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₁₉), 7,12 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 6,84 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 5,90 (s, 1H, H₁₀), 3,67 (s, 1H, H₂₅)..... 49

Figura 21.- Espectro ¹³C-RMN del compuesto 5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (**3.2d'**) con sus respectivas señales: ¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, DMSO-d₆) δ 160,98 (**20C**), 158,69 (**15C**), 154,96 (**12C**), 143,56 (**8C**), 143,32 (**5C**), 134,71 (**4C**), 128,39 (**11C**), 128,18 (**13,17C**), 127,41 (**1C**), 124,34 (**2C**), 119,28 (**6C**), 114,08 (**14,16C**), 113,13 (**3C**), 105,83 (**19C**), 55,02 (**25C**), 47,57 (**11C**) 50

Figura 22.- Espectro bidimensional HMBC del compuesto 5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (**3.2d'**), con sus señales características entre el carbono 4- (C-4) y los protones H₂ y H₆, y entre el carbono 5- (C-5) y el protón H₃, que corroboran la posición del átomo de cloro..... 51

Figura 23.- Espectro ¹H-RMN y ampliación de la zona aromática del compuesto 6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (**3.2d'**) con sus respectivas señales y constantes de acoplamiento: ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,21 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₂₀), 7,83 (d, *J*_{meta} = 2,0 Hz, 1H, H₃), 7,80 (d, *J*_{orto} = 8,7 Hz, 1H, H₆), 7,33 (dd, *J*_{orto, meta} = 8,7; 2,0 Hz, 1H, H₆), 7,25 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₁₉), 7,12 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 6,85 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 5,91 (s, 1H, H₁₀), 3,68 (s, 1H, H₂₅)..... 52

Figura 24.- Espectro ¹³C-RMN del 6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (**3.2d'**) con sus respectivas señales: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 160,93 (**20C**), 158,69 (**15C**), 154,97 (**12C**), 143,27 (**8C**), 141,30 (**5C**), 136,61 (**4C**), 128,67 (**11C**), 128,40 (**2C**), 128,16 (**13,17C**), 123,40 (**1C**), 121,32 (**6C**), 114,10 (**14,16C**), 111,53 (**3C**), 105,80 (**19C**), 55,02 (**24C**), 47,43 (**10C**) 53

Figura 25.- Espectro bidimensional HMBC de la molécula 6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (**3.2d'**) con las señales importantes entre el protón H₆ y el carbono C-4, destacado en naranja, y la relación de distancia entre los protones H₃ y H₆ con el carbono C-5, destacado con color morado..... 54

Figura 26.- Ciclo catalítico general para el acoplamiento de Suzuki-Miyaura. (Fig: *Miyaura, Norio.; Suzuki, Akira. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. Chem. Rev. 1995, 95 (7), 2457–2483. https://doi.org/10.1021/cr00039a007.*) 57

Figura 27.- Posible reacción entre el intermediario 5b y AlCl₃, que imposibilita la acilación de Friedel-Crafts 59

Figura 28.- Detección de células apoptóticas tempranas y tardías después de la tinción con anexina V –FITC y PI (Figura de: *Piotr Pozarowski, Jerzy Grabarek, and Zbigniew Darzynkiewicz. Current Protocols in Cell Biology. 2003, 18.8.1-18 (8.8.33)*)..... 67

Figura 29.- Compuestos sintetizados con selectividad por el receptor CB₂ y análisis estructura-actividad, indicando los sustituyentes más activos..... 70

Figura 30.- Estructuras del MTT y el producto coloreado Formazán..... 72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Resumen de porcentajes de rendimiento para cada derivado de benzo[*d*]imidazol sustituido en la posición 2- con anillos de heterociclo de anisol, piridina, furano e isoxazol respectivamente 38

Tabla 2.- Resumen de rendimientos para los compuestos finales de la serie de benzo[*d*]imidazoles **3(a-d)** y **3(a'-d')**, donde se informa los rendimientos totales, y los rendimientos detallados de cada regioisómero..... 46

Tabla 3.- Resumen de rendimientos para los compuestos finales de la serie de benzo[*d*]imidazoles **3.2(a-d)** y **3.2(a'-d')**, donde se informa los rendimientos totales, y los rendimientos detallados de cada regioisómero..... 55

Tabla 4.- Resumen de los valores de porcentaje de viabilidad celular en los ensayos de citotoxicidad mediante método de colorimetría de reducción de MTT de los 16 ligandos a 10µM, y el ligando agonista de ambos receptores WIN55,212-2 a una concentración de 5 µM. Asimismo se expresan los valores de las razones de medias como factor de selectividad de la viabilidad celular para las líneas HL-60/U-87MG (CB₂/CB₁). Los valores bajos sugerirían una mayor selectividad por el receptor CB₂ y valores altos sugerirían selectividad por el receptor CB₁..... 64

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.-Estrategia de síntesis de benzo[*d*]imidazoles como ligandos cannabinoides. Reactivos y condiciones: **i)** correspondientes aldehídos o ácidos carboxílicos. Para aldehído; DMF, MgCl₂·6H₂O, 24h, t.a. Para ácidos carboxílicos: ácido polifosfórico (PPA), 180°C. **ii)** Cloruro de 4-metoxibenzoilo, NaH, THFanh, atmósfera de N₂, 1h..... 35

Esquema 2.- Mecanismo general para la formación de benzo[*d*]imidazoles sustituidos en la posición 2- del anillo aromático..... 35

Esquema 3.- Mecanismo general para la obtención de benzo[*d*]imidazoles con derivados de ácidos carboxílicos 36

Esquema 4.- Estrategia de síntesis de benzo[*d*]imidazoles como ligandos cannabinoides de la serie **3.2(a-d)** y **3.2(a'-d')**. Reactivos y condiciones: i) correspondientes aldehídos o ácidos carboxílicos. Para aldehído; DMF, MgCl₂·6H₂O, 24h, t.a. Para ácidos carboxílicos: ácido polifosfórico (PPA), 180°C. ii) Bromuro de 4-metoxibencilo, NaH, THF, 24h..... 47

Esquema 5.-Estrategia de síntesis del reactivo bromuro de 4-metoxibencilo. Reactivos y condiciones: i) 1) LiAlH₄, THF_{anh}, 1h/2) HCl, 1N. ii) PBr₃, Et₂O, 24h 48

Esquema 6.- Síntesis de benzo[*b*]tiofenos como ligandos cannabinoides. Reactivos y condiciones: distintos haluros aromáticos i) Pd(PPh₃)₄, 2.0 eq. Na₂CO₃, MeOH,tolueno, reflujo, N₂, 4h. ii) Cloruro de 4-metoxibenzoilo o Cloruro de 1-naftoilo, AlCl₃, Cl(CH₂)₂Cl_{anh}, t.a, N₂, 1h 56

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.-Porcentaje de viabilidad celular de los 16 compuestos sintetizados como ligandos del receptor CB₂ en la línea celular HEK293-T. Se realizó el ensayo de los compuestos a una concentración de 10 µM por 72 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂. Las barras de los gráficos están normalizadas con respecto al vehículo utilizado (DMSO) y con sus barras de error como la media ± error estándar de la media, con un tamaño muestral de n = 3 para todos los compuestos. ***= p < 0,0001. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una sola vía 61

Gráfico 2.- Porcentaje de viabilidad celular de los 16 compuestos sintetizados como ligandos del receptor CB₂ en la línea celular U-87MG. Se realizó el ensayo de los compuestos a una concentración de 10 µM por 72 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂. Las barras de los gráficos están normalizadas con respecto al vehículo utilizado (DMSO) y con sus barras de error como la media ± error estándar de la media, con un tamaño muestral de n = 3 para todos los compuestos. ***= p < 0,0001, **= p < 0,0091, *= p < 0,0426. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una sola vía. 62

Gráfico 3.- Porcentaje de viabilidad celular de los 16 compuestos sintetizados como ligandos del receptor CB₂ en la línea celular HL-60. Se realizó el ensayo de los compuestos a una concentración de 10 µM por 72 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂. Las barras de los gráficos están normalizadas con respecto al vehículo utilizado (DMSO) y con sus márgenes de error como la media ± error estándar de la media, con un tamaño muestral de n = 3 para todos los compuestos. ***= p < 0,0001, **= p < 0,0010, *= p < 0,0121. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una sola vía. 63

Gráfico 4.- Resultados de ensayo citometría de flujo para compuestos **3.2b**, **3b'**, **3c** y **3a**. También se observan resultados para el control del vehículo (DMSO), el agonista WIN 55,212-2 y etanol 67

1.-INTRODUCCION

1.1.-Sistema endocannabinoide

El sistema endocannabinoide (SEC) se describe como un sistema de señalización distribuido ampliamente en el cerebro, como también en tejidos periféricos¹. Está constituido principalmente por diversas clases de mediadores lipídicos, las enzimas responsables de su síntesis y degradación, diferentes tipos de receptores como aquellos que están acoplados a proteína G y proteínas que controlan la actividad de ligandos y receptores². La composición del SEC se dilucidó gracias a estudios realizados sobre el mecanismo de acción del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), el principal cannabinoide psicoactivo derivado de plantas, específicamente del *Cannabis sativa*³. La Figura 1 refleja la estructura química del Δ^9 -THC.

Es conocido el uso del *Cannabis sativa* por los humanos a través de los años como agente medicinal y las claras propiedades eufóricas y relajantes que ofrece⁴. Es por ello que los primeros estudios se enfocaron en el THC, y gracias a la síntesis de enantiómeros de esta molécula y sus análogos sintéticos se postuló la idea de un receptor cannabinoide². Esto dio paso a la identificación del primer sitio de unión del THC, gracias a varios receptores acoplados a proteína G “huérfanos” previamente clonados. Lo anterior llevó a que, en el año 1990, se descubriera finalmente el receptor cannabinoide tipo I (CB₁)⁵. En 1993, tres años después, se identificó un segundo receptor gracias a una clonación por homología, nombrado como receptor cannabinoide tipo II (CB₂)⁶.

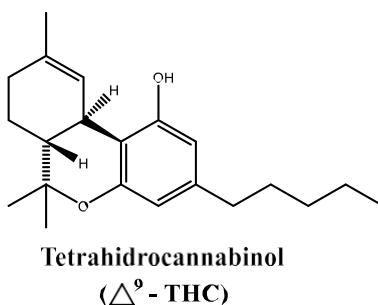


Figura 1. Estructura química del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), principal componente psicoactivo del *Cannabis sativa*.

1.2.-Receptores cannabinoide

Los receptores cannabinoide más estudiados hasta la fecha corresponden al CB₁ y CB₂, como se mencionó anteriormente. Ambos corresponden a receptores acoplados a proteína G (GPCR) heptahelicoidales que se acoplan a proteínas G_{i/o}⁷. El receptor CB₁ se expresa principalmente en el sistema nervioso central y también en algunos tejidos periféricos,

incluida la glándula pituitaria, las células inmunitarias, los tejidos reproductivos, los tejidos gastrointestinales, los ganglios simpáticos, el corazón, los pulmones, la vejiga urinaria y las glándulas suprarrenales⁸. Asimismo, el receptor CB₁ se expresa en las vías del dolor y la medula espinal, como también probablemente en las terminales periféricas de las neuronas aferentes primarias, lo que explicaría la participación de este receptor en la mediación de analgesia inducida por cannabinoides⁹. Por otro lado, el receptor CB₂ se expresa de forma mayoritaria en células inmunitarias y tejidos linfoides. Las células que participan en la respuesta inmune tanto adaptativa como congénita, como bazo, el timo y las células mononucleares de sangre periférica, expresan altos niveles de receptor CB₂¹⁰.

1.3.-Endocannabinoides.

Otros componentes que forman parte del SEC, son los cannabinoides endógenos o endocannabinoides. Estos ligandos corresponden principalmente a etanolamidas de ácidos grasos insaturados, gliceroles o éteres de glicerol. El primero en descubrirse fue la anandamida (AEA) (*N*-araquidonil etanolamida) y seguido de esto, se encontró un metabolito endógeno correspondiente al 2-araquidonilglicerol (2-AG)¹¹. También, se han identificado a través de los años otros endocannabinoides químicamente similares, como 2-araquidonil-glicerol éter (noladin éter), *N*-araquidonil-dopamina (NADA) y virodamina que se han encontrado en tejidos cerebrales específicos¹². La Figura 2.- Estructuras químicas de los ligandos endógenos cannabinoides más representativos: Anandamida, 2-AG, noladin éter, NADA y virodamina., expone las estructuras de los endocannabinoides mencionados. Es importante recalcar que, AEA y 2-AG, son los ligandos endógenos cannabinoides más estudiados. AEA se comporta como un agonista parcial de ambos receptores, con una afinidad levemente mayor por el receptor CB₁ que por el CB₂. Asimismo, exhibe una eficacia mucho menor por el receptor CB₂ que por el CB₁¹³. De la misma forma, 2-AG es conocido como un agonista completo tanto para el receptor CB₁ como para el CB₂¹⁰ y se ha descubierto que 2-AG se encuentra en el cerebro en cantidades 170 veces mayor que la anandamida¹⁴.

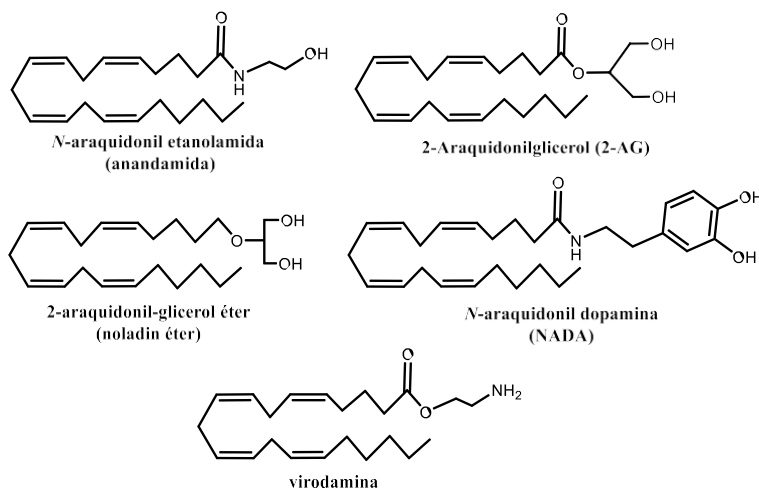


Figura 2 .- Estructuras químicas de los ligandos endógenos cannabinoides más representativos: Anandamida, 2-AG, noladin éter, NADA y virodamina.

1.4.- Potencial terapéutico.

El descubrimiento del SEC impulsó investigaciones que están motivadas a establecer sus funciones fisiológicas y fisiopatológicas. En este sentido, se ha evidenciado que existen ciertos trastornos donde los niveles de endocannabinoides, la densidad de los receptores cannabinoides y/o la eficiencia de acoplamiento de los receptores aumentan en ciertos tejidos. Esta regulación al alza del SEC conduce a una supresión de signos no deseados, además de ser autoprotectora. Dicha desregulación se ha visto en cáncer humano y modelos animales de dolor neuropático e inflamatorio. También, en enfermedades como esclerosis múltiple, trastornos intestinales, trastorno de estrés postraumático, lesión cerebral traumática, shock hemorrágico, séptico y cardiogénico, aterosclerosis y enfermedad de Parkinson¹⁵. Dado que se ha demostrado que el SEC desempeña un rol protector, es posible enfocar estrategias terapéuticas que permitan fomentar este papel preservador de este sistema. En relación con esto, se ha considerado el diseño de moléculas sintéticas agonistas que imiten a los endo- o exocannabinoides con capacidad para interactuar con los receptores CB₁ y/o CB₂, o de la misma forma, fármacos que retrasen la desaparición de los endocannabinoides después de su liberación¹⁶. Dentro de estas estrategias, ha destacado el desarrollo de agentes con actividad agonista, antagonista, agonista inverso y moduladores alostéricos dirigidos a interactuar con los receptores CB₁ o CB₂ aumentando o inhibiendo el tono basal del SEC.

1.5.- Ligandos cannabinoides agonistas.

Como los receptores cannabinoides se han convertido en un blanco farmacológico, la búsqueda de su modulación a través de ligandos sintéticos ha ido en aumento a lo largo de los años¹⁷. Dentro de esto, se pueden encontrar una variedad de moléculas desarrolladas mediante síntesis con actividad agonista por los receptores cannabinoides. Según su estructura química principal, se pueden clasificar en cuatro clases: los cannabinoides “clásicos” (CCs), cannabinoides “no clásicos” (NCCs), aminoalquilindoles (AAIs) y cannabinoides “eicosanoides”. El grupo de los CCs, está compuesto primordialmente por derivados dibenzopirano tricíclicos correspondiente a compuestos que se producen naturalmente en la planta *Cannabis sativa* o análogos sintéticos de estos mismos. El más destacado corresponde al THC, que como se mencionó anteriormente, es el mayor componente psicoactivo del cannabis. Este compuesto se caracteriza por ejercer efectos agonistas y antagonistas, tanto para el receptor CB₁ como para el CB₂¹⁸. Asimismo, dentro de la misma categoría, podemos encontrar a los compuestos 1,1-Dimetilheptil-11-hidroxi-tetrahidrocannabinol (HU-210) y desacetil-L-nantradol (presentes en la Figura 3) que corresponden a cannabinoides sintéticos. HU-210 presenta una afinidad particularmente alta por ambos receptores, destacándose como un potente agonista y exhibiendo una duración excepcionalmente larga en ensayos *in vivo*. Se comporta de forma similar al THC en sus efectos farmacológicos, pero se ha encontrado que es entre 80 y 1100 veces más potente que su análogo natural¹⁹. Dentro de los cannabinoides “no clásicos” (NCCs) encontramos ligandos que carecen del anillo dihidropirano presente en los CCs. En esta categoría, destaca el compuesto CP55940, caracterizándose por ser un potente agonista para ambos receptores²⁰. Su radioligando [³H]CP55940 permitió el descubrimiento y caracterización del receptor CB₂²¹ y sigue siendo el ligando cannabinoide radiomarcado más utilizado. Otro ejemplo de esta clase es CP55244, que también muestra una gran afinidad al menos por el receptor CB₁, siendo inclusive mayor que la de CP55940 y cuya actividad intrínseca también es superior²². Ambos ligandos de la familia NCCs mencionados, se pueden observar en la Figura 3.

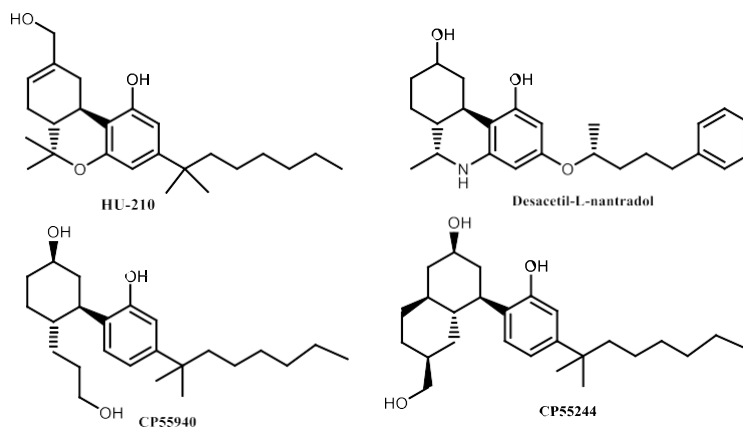


Figura 3.- Estructuras de ligandos cannabinoides agonistas más representativos de la clase de cannabinoides “clásicos”: HU-210 y Desacetil-L-nantradol y la categoría de cannabinoides “no clásicos”: CP55940 y CP55244.

Hasta principios del año 1990, todos los compuestos reportados con acción cannabimimética derivaban estructuralmente del THC. Esto cambió con la introducción de una nueva familia de compuestos, los aminoalquilindoles. En esta categoría encontramos a WIN55,212-2, el más destacado de esta clase y uno de los más caracterizados, siendo utilizado ampliamente en investigaciones. Su estructura está en la Figura 4. Este ligando presenta una alta afinidad por ambos receptores, con una ligera selectividad por el receptor CB₂. En ensayos *in vivo* presenta todo el espectro de efectos farmacológicos del THC²³. La caracterización de este famoso ligando dio paso a la creación de varios agonistas cannabinoides derivados de los aminoalquilindoles. Entre ellos, se encuentra el ligando JWH-015 (estructura en la Figura 4) que se destaca por presentar selectividad hacia el receptor CB₂²⁴.

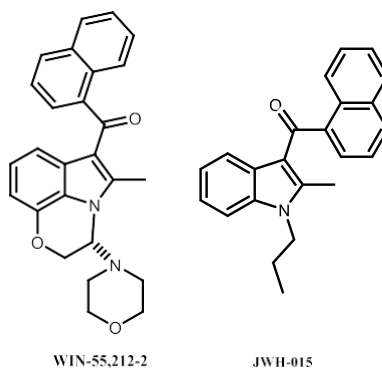


Figura 4.- Ligandos más representativos de la clase de aminoalquilindoles: WIN55,212-2 y JWH-015.

Finalmente, la última clasificación dentro de los compuestos agonistas se encuentra los cannabinoides naturales derivados de ácidos grasos “eicosanoides”, donde se incluyen anandamida, virodamina, 2-AG y noladin éter, mencionados anteriormente en la sección “Endocannabinoides” (ver Figura 2).

1.6.- Ligandos cannabinoides antagonistas/ agonistas inversos.

Al igual que la sección anterior, se pueden describir una amplia cantidad de ligandos con actividad antagonista o agonista inverso por los receptores CB₁ y/o CB₂. El primer antagonista del receptor CB₁ reportado fue SR141716A, que demostró revertir fácilmente los efectos inducidos por los cannabinoides de este receptor, tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro*²⁵⁻²⁶. SR141716A salió al mercado con el nombre de Rimonabant, ya que se encontró que tenía efectos beneficiosos reduciendo el peso, mejorando los perfiles lipídicos y aumentar la sensibilidad a la insulina²⁷. No obstante, su comercialización tuvo que ser discontinuada debido a que producía trastornos del estado de ánimo graves²⁸. La estructura de SR141716A-Rimonabant se encuentra en la Figura 5. Otros antagonistas de los receptores cannabinoides son los compuestos LY320135, AM251 y AM281 que también se exhiben en la Figura 5. LY320135 se destaca por unirse fácilmente al receptor CB₁ que al receptor CB₂, sin embargo, se comporta como un antagonista menos potente en comparación a SR141716A²⁹. AM251 y AM281 son análogos estructurales de SR141716A, donde ambos comparten la capacidad de atenuar las respuestas de los agonistas CB₁ establecidos³⁰.

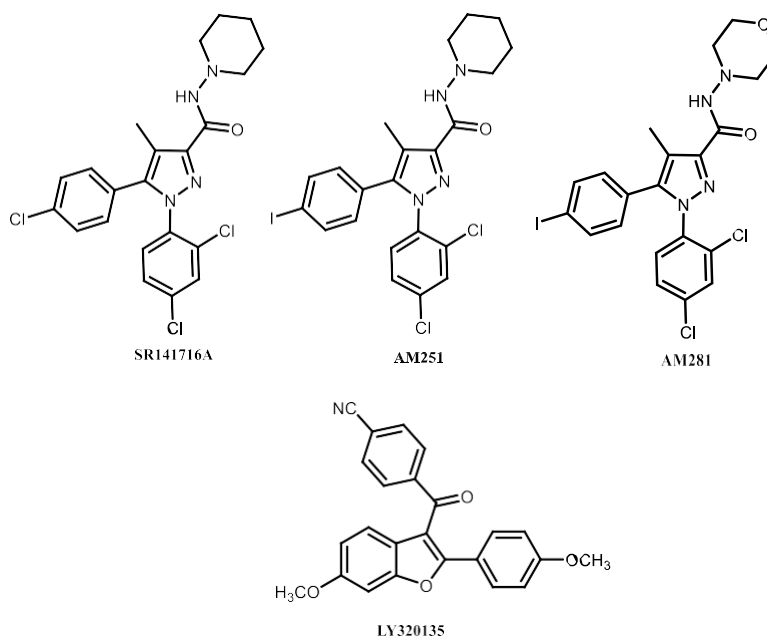


Figura 5.- Antagonistas del receptor CB₁ más estudiados de sus series: SR141716A y sus análogos AM251 y AM281. En la parte inferior de la figura, LY320135.

Por otro lado, algunos antagonistas/agonistas inversos importantes selectivos por el receptor CB₂ corresponden a SR144528 y el aminoalquilindol AM630, donde ambos se destacan por tener una afinidad notablemente mayor por el receptor CB₂ que por el CB₁, habiéndose comprobado lo anterior por ensayos *in vitro*, dado que revierten o previenen los efectos mediados por este receptor³¹⁻³².

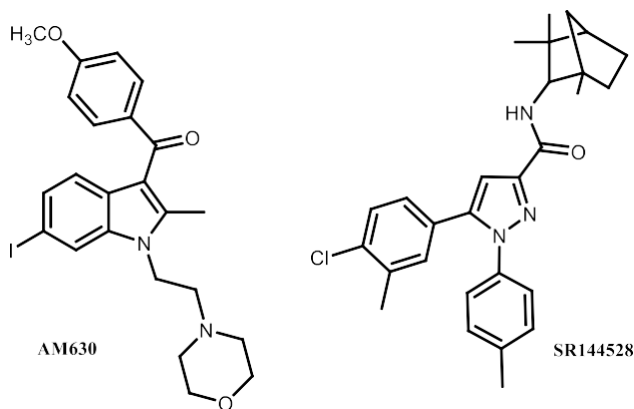


Figura 6.- Antagonistas/agonistas inversos del receptor CB₂ más famosos: AM630 y SR144528.

1.7.- Receptor CB₂ como blanco farmacológico.

Como se puede apreciar en los capítulos anteriores, se considera una vasta cantidad de ligandos selectivos por los receptores cannabinoides que pueden presentar actividad tanto agonista como antagonista/agonista inverso por ambas proteínas de membrana CB₁ y/o CB₂. Dentro de estas investigaciones, se ha buscado la selectividad de un receptor cannabinoide por sobre otro, con una respuesta y afinidad importante o considerable. Se distingue dentro de estas investigaciones, la formulación y obtención de compuestos que actúen de manera selectiva por el receptor CB₂ para obtener una respuesta farmacológica específica distinta a la modulada por el receptor CB₁.

La modulación del receptor CB₂ a través de compuestos sintéticos, ha despertado interés ya que se ha reportado el papel que desempeña este receptor en una variedad de modelos de enfermedades que afectan al sistema nervioso central o periférico, estando este blanco terapéutico implicado en procesos celulares neurales como proliferación y supervivencia. Lo anterior sugiere que esta diana terapéutica podría desempeñar un papel de retraso en la progresión de trastornos neurodegenerativos e inhibición de crecimiento de tumores gliales³³. También, es importante considerar que la activación del receptor CB₂ por agonistas no presenta los efectos psicoactivos asociados a la modulación del receptor

CB₁³⁴, lo que ha sido una limitación para los beneficios terapéuticos que ofrece este blanco farmacológico. De esta forma, es que existen grandes incentivos por indagar en el desarrollo de nuevos compuestos selectivos por el receptor CB₂ como alternativa.

Por otro lado, se ha comprobado que en enfermedades de origen inmunológico existe una alta densidad del receptor CB₂ en células y tejidos que componen este mismo. De esta manera, la modulación del receptor a través de agonistas actuaría como medio potencial para la inducción de apoptosis³⁵. En este sentido, se ha descrito que el agonista conocido JWH-015 provocó apoptosis en timocitos en ensayos *in vitro* e inhibió la respuesta proliferativa de las células T y B a través de este mecanismo de muerte celular²⁴. También se ha dilucidado que este receptor desempeña un rol en el sistema cardiovascular, donde la administración del agonista selectivo JWH-133 durante la isquemia cardiaca, redujo el tamaño del infarto en un modelo de ratón, sugiriendo un papel cardioprotector bajo la activación agonista³⁶. Asimismo, se ha mencionado la importancia del receptor CB₂ en enfermedades del sistema respiratorio. Algunos autores señalan que la activación del receptor cannabinoide tipo II podría prevenir la broncoconstricción en un modelo de cobayas³⁷. También, se ha observado que este receptor podría poseer un efecto protector en el reflejo de la tos, ya que estudios insinúan que el agonista CB₂ GW833972A podría bloquear dicho reflejo en modelos de cobayas, aunque si bien existe aún controversia sobre qué receptor participa en la provocación de estos efectos³⁸. De la misma forma, en enfermedades específicas como la aterosclerosis, una afección donde se acumula colesterol, grasa, calcio y otras sustancias en las arterias, se sugiere que dosis bajas de THC podrían inhibir la progresión de esta enfermedad, debido a la activación del receptor CB₂³⁹. Finalmente, se ha demostrado que la activación del receptor CB₂ a través del compuesto THC, reduce la proliferación de células de cáncer de mama humano al bloquear la progresión del ciclo celular e inducir apoptosis⁴⁰. Otros autores también han señalado y han apoyado el hecho de que la activación de este receptor induce apoptosis, ofreciendo un posible tratamiento de gliomas malignos⁴¹.

Como se puede apreciar, la activación del receptor CB₂ mediante agonistas han demostrado un importante potencial terapéutico en diferentes enfermedades y/o trastornos. Además de los ejemplos mencionados anteriormente, se ha reportado su eficacia potencial en patologías como Parkinson⁴², esclerosis múltiple⁴³, osteoporosis⁴⁴, entre otras¹⁶, lo que en esencia convierte a este receptor en un blanco terapéutico de gran interés.

1.8.- Química de los ligandos cannabinoides del receptor CB₂.

Debido a las diversas investigaciones y evidencias que vinculan al receptor CB₂ en el tratamiento de las numerosas patologías mencionadas anteriormente, dejando claro su rol como diana terapéutica, es que la industria farmacéutica y laboratorios académicos han desarrollado una variada gama de compuestos sintéticos con alta potencia y selectividad por el receptor cannabinoides tipo II. Asimismo, dichos compuestos, han abierto un camino de posibilidades para mejorar el perfil farmacoterapéutico a través de estudios que vinculan la estructura con la actividad de los ligandos desarrollados.

Los ligandos con actividad agonista por el receptor CB₂ se caracterizan por una gran diversidad química en cuanto a sus estructuras, pero en general tanto ligandos tradicionales como aquellos recientemente descubiertos, se distinguen por ser moléculas lipofílicas, con heterociclos aromáticos, unidos a restos alquilo o arilo voluminosos⁴⁵.

Dentro de la categoría de ligandos sintéticos aminoalquilindoles, podemos encontrar una gran variedad de compuestos con actividad agonista por el receptor CB₂. La molécula prototípica que impulsó la creación de varios de estos ligandos fue WIN55,212-2, ya que su estructura química ha permitido en cierta medida dilucidar las porciones y sustituciones que debían tener las futuras moléculas. Dentro de esta categoría encontramos a AM-1241, un derivado antagonista indólico que a diferencia de los otros antagonistas mencionados anteriormente de esta familia (figura 5), demostró una selectividad por el receptor CB₂ por sobre el CB₁, exhibiendo una constante de afinidad para CB₂ de $K_i=7.1$ (nM) y para CB₁ de $K_i=580$ (nM)⁴⁶ (ver Figura 7). Otro derivado indólico a mencionar, corresponde al compuesto **1** de la Figura 7 desarrollado por Hynes Jr, J., *et al*, que debido a análisis de estructura-actividad, se optimizó su estructura química, ya que los anteriores compuestos sintetizados por estos investigadores presentaban problemas de inestabilidad por hidrólisis microsomal (descomposición de sustancias químicas por las enzimas presentes en las microsomas de las células hepáticas). El compuesto **1** presentó una constante de afinidad por el receptor CB₂ de $K_i= 11$ (nM) y una modesta afinidad por el receptor CB₁ $K_i= 245$ (nM)⁴⁷ (Figura 7). También se ha estudiado el reemplazo de porciones comunes en este tipo de ligandos como los marcos naftoilo y benzoilo que regularmente se posicionan en el carbono 3 del indol, presentes, por ejemplo, en compuestos como WIN55,212-2 o JWH-015 (Figura 4), u otros fragmentos como la 2,2,3,3-tetrametilciclopropiletanona, presente en el compuesto **2** (ver Figura 7). Se observó que este tipo de ramificaciones eran toleradas por el receptor, ya que se reportaron constantes de afinidad para CB₂ de $K_i=4.6$ nM y una constante $K_i= 945$ nM

para CB₁⁴⁸. Por otro lado, Gallant, M., *et al.* realizaron reemplazos en las posiciones N1, C3 y C5 en el anillo de indol, llegando a la conclusión de que porciones como benzoilo 2,3-dihalogenado o 1-naftoil en N1 más un alquilmorfolinilo en la posición 3- eran importantes para la afinidad de los ligandos. También, concluyeron que sustituir la posición 5- del anillo indólico con un grupo metoxilo no influía predominantemente en la afinidad por el receptor CB₂. De este modo, los autores obtuvieron los compuestos líderes **3** y **4**, presentes en la Figura 7, con constantes de afinidad K_i de 12 nM para CB₂ y K_i de 1.917 nM para el receptor CB₁ en el caso del derivado **3**. Asimismo, se obtuvieron afinidades de K_i=8,5 nM para CB₂ y K_i=877 nM para el receptor CB₁ en el caso del derivado **4**⁴⁹.

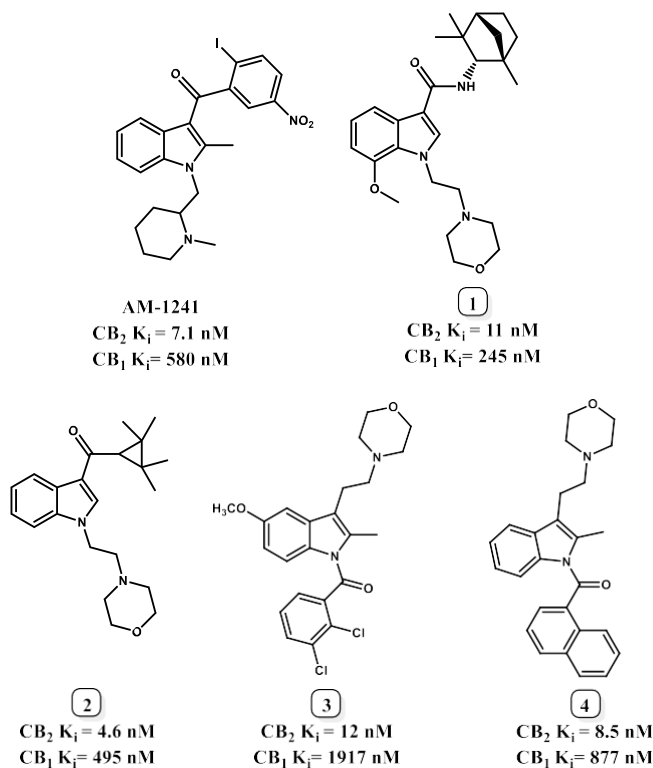


Figura 7.-Compuestos derivados de aminoalquilindoles selectivos por el receptor CB₂ con diferentes sustituciones y sus respectivas constantes de afinidad (K_i). Para todos los derivados las K_i/CB₂ son menores que las K_i/CB₁ reflejando la selectividad.

Finalmente, gracias a los análisis de estructura-actividad obtenidos desde los ligandos activos como los que podemos ver en la Figura 7 y otros ejemplares reportados, los autores han resumido los patrones de sustitución que deben tener los derivados de aminoalquilindoles para presentar una actividad importante por el receptor CB₂. Dichos autores coinciden en la sustitución con un biciclo, específicamente naftilo en la posición 3-

del indol, un sustituyente pequeño o ninguno en la posición 2- y un sustituyente morfolinoetilo o amino cíclico en la posición 1-.

1.9.- Benzo[*d*]imidazoles y benzo[*b*]tiofenos como marco estructural.

Anteriormente se mencionaron ejemplares de ligandos pertenecientes a la categoría de los aminoalquilindoles que fuesen ligandos del receptor CB₂, pero existe una gran variedad de moléculas sintéticas con actividad agonista que se han desarrollado y obtenido bajo diversos métodos para esta diana biológica. En este contexto se han reportado moléculas con ciclos centrales de piridina, oxadiazol, imidazol, benzoimidazol, purina, quinolina, sulfamoil benzamida, entre otras. Esto demuestra la gran variedad química de los ligandos del receptor CB₂, además de la intensa búsqueda por la obtención de moléculas con parámetros de afinidad y selectividad importantes por este blanco farmacológico⁴⁵.

Dentro del diseño de ligandos selectivos por el receptor CB₂, encontramos moléculas que presentan en su estructura los anillos heterocíclicos de benzo[*d*]imidazol y benzo[*b*]tiofeno como núcleo principal. Lo anterior se debe a que estos anillos aromáticos se han caracterizado por ser versátiles e importantes en la búsqueda de nuevos fármacos. La presencia del núcleo benzo[*d*]imidazol se puede encontrar en diversos agentes terapéuticos como antimicrobianos, antivirales, inmunomoduladores, moduladores hormonales, entre otras aplicaciones⁵⁰. De la misma forma, el anillo de benzo[*b*]tiofeno forma parte de moléculas con propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobianos, etcétera⁵¹.

Es evidente entonces que las estructuras químicas de benzo[*d*]imidazol y benzo[*b*]tiofeno pueden participar en el diseño de nuevas moléculas con propiedades terapéuticas. En este sentido, dentro del área del diseño de nuevos ligandos selectivos por el receptor CB₂, no es novedad encontrar ligandos agonistas con el marco estructural de benzo[*d*]imidazol y benzo[*b*]tiofeno, siendo estas utilizadas como núcleo principal, debido a su versatilidad sintética. Además, es importante considerar que estos anillos heterocíclicos corresponden a bioisómeros del anillo indol⁵²⁻⁵³, que como se discutió anteriormente participa en varios diseños de ligandos selectivos para el receptor CB₂. Por lo tanto, es factible hacer un intercambio entre el anillo indol por el anillo de benzo[*d*]imidazol o benzo[*b*]tiofeno.

1.10.- Benzo[*d*]imidazol como ligando del receptor cannabinoides tipo II.

Como se mencionó en el capítulo anterior (sección 1.10), el anillo de benzo[*d*]imidazol participa en el diseño de nuevos ligandos por el receptor CB₂. En relación con esto, se han reportado una gran cantidad de ligandos con actividad agonista por este blanco terapéutico. Algunos ejemplares destacables son la serie descubierta por *Page et al.* de AstraZeneca,

los benzo[d]imidazoles desarrollados por *Ryckmans Thomas et al.* y los derivados sintetizados por *Giisen Harrie JMK et al.*, entre otros que se recopilan en la Figura 8.

Una de las series reportadas fue por el grupo de investigación de *Page et al.* de AstraZeneca a partir del benzo[d]imidazol inicial **5** de la Figura 8. Este grupo reveló que la posición *N1* del heterociclo tolera varios grupos alquilo y aromáticos. De esta serie, los compuestos sustituidos con los radicales *N*-ciclopropilmetilo **6** y *N*-isopentilo **7** mostraron una potencia y selectividad óptima por el receptor CB₂⁵⁴. De esta manera, se realizaron más investigaciones en torno a este tipo de ligandos, donde el equipo de *Ryckmans Thomas et al.* de Pfizer reportaron una serie de benzo[d]imidazoles derivados de sulfonilo, dentro de los cuales destacó el compuesto **8** por su gran selectividad y potencia. La estructura de este derivado exhibe un grupo neopentilo (*tert*-butilmetilo) en la posición 2- del anillo de benzo[d]imidazol⁵⁵(Figura 8). Posteriormente, por derivación del compuesto **8**, surgieron otras estructuras análogas, siendo el ligando **9** aquel que mostró una mejora en su perfil farmacodinámico al incluir fracciones de sulfonamida e isoxazol dentro de su estructura⁵⁵ que puede observarse también en la Figura 8. Dentro de la misma familia de derivados de sulfonilo, RaQualia Pharma reportó una serie de compuestos de tipo sulfonas heterocíclicas saturadas *N*-sustituidas con actividad agonista por el receptor CB₂ y con poca afinidad por CB₁. Confirmaron además que el sustituyente 2-*tert*-butilmetilo influía en la potencia como en la eficacia farmacológica⁵⁶. De este modo, es como el compuesto **10** mostró una excelente selectividad por el receptor CB₂ por sobre el receptor CB₁, así como también ser metabólicamente estable. No obstante, la permeabilidad de este ligando a través de membranas disminuyó significativamente, haciéndolo un candidato inadecuado para uso oral. Lo anterior podría justificarse dada la polaridad que entrega el grupo urea dentro de la estructura y su capacidad de formar interacciones por puentes de hidrógeno. Para mejorar el perfil del derivado **10**, se obtuvo al compuesto **11** (RQ-00202730), reemplazándose la porción de urea por un grupo hidroxietilo (Figura 8), mejorando por consiguiente, las características generales en términos de potencia, selectividad y permeabilidad de membrana. El ligando **11** mostró un valor de EC₅₀ de 19 nM, y selectividad >1300 veces sobre el receptor CB₁. También se expuso un efecto analgésico dependiente de la concentración sobre la hipersensibilidad visceral inducida en modelos de rata, cuando el ligando fue administrado por vía oral⁵⁷.

Por otro lado, *Giisen Harrie JMK et al.* de la Farmacéutica Janssen Research & Development reportaron el compuesto **12**, dentro de una serie de derivados de

benzo[d]imidazoles, el que se caracteriza por tener un grupo 5-piridilsulfona dentro de su estructura. Dicho compuesto si bien evidenció un perfil farmacocinético adecuado no logró demostrar ningún efecto analgésico en modelos experimentales de dolor. Con el fin de mejorar la serie representada por el compuesto líder **12**, se realizaron estudios de relación estructura-actividad, lo que llevó a una optimización de esta estructura inicial. Se obtuvieron así los compuestos benzo[d]imidazólicos **13** y **14**, los que demostraron ser altamente selectivos por el receptor CB₂ aunque con efectos analgésicos limitados⁵⁸. De igual manera, Pfizer continuando con el perfeccionamiento de la serie, logró la obtención del compuesto **15**, el cual demostró ser un agonista selectivo por el receptor CB₂ y con la cualidad de ser totalmente penetrante en el sistema nervioso central en ratas⁵⁹. También Nimczick, M., *et al.* desarrollaron y estudiaron ligandos bivalentes para el receptor CB₂, donde analizaron las interacciones de unión ejercidas por los grupos funcionales como patrones de sustitución en el núcleo principal de benzo[d]imidazol. Los autores determinaron que la longitud del espaciador entre el anillo benzo[d]imidazólico unido por el nitrógeno heterocíclico y el núcleo tetrahidrofunánico (para el caso del derivado **15**) alteraba la eficacia del ligando, convirtiéndolo de agonista a antagonista o agonista inverso. Finalmente, consiguieron la obtención mediante síntesis del compuesto líder **16** con actividad agonista por el receptor CB₂⁶⁰.

Por otro lado, *Romero-Parra et al.*, desarrollaron una serie de 2-alkil y 2-aril benzo[d]imidazoles con afinidad por el receptor CB₂, destacándose el compuesto **17**, de la Figura 8.

Como se puede observar en la figura 8, existen muchos ligandos ya sintetizados derivados de benzo[d]imidazoles con selectividad por el receptor CB₂, demostrando la activa participación de este núcleo heteroaromático en el diseño de estas moléculas como ligandos. Además, su diseño estructural y patrones de sustitución permite dilucidar y ayudar al diseño de futuras moléculas a sintetizar para fines de actividad dentro del sistema endocannabinoide.

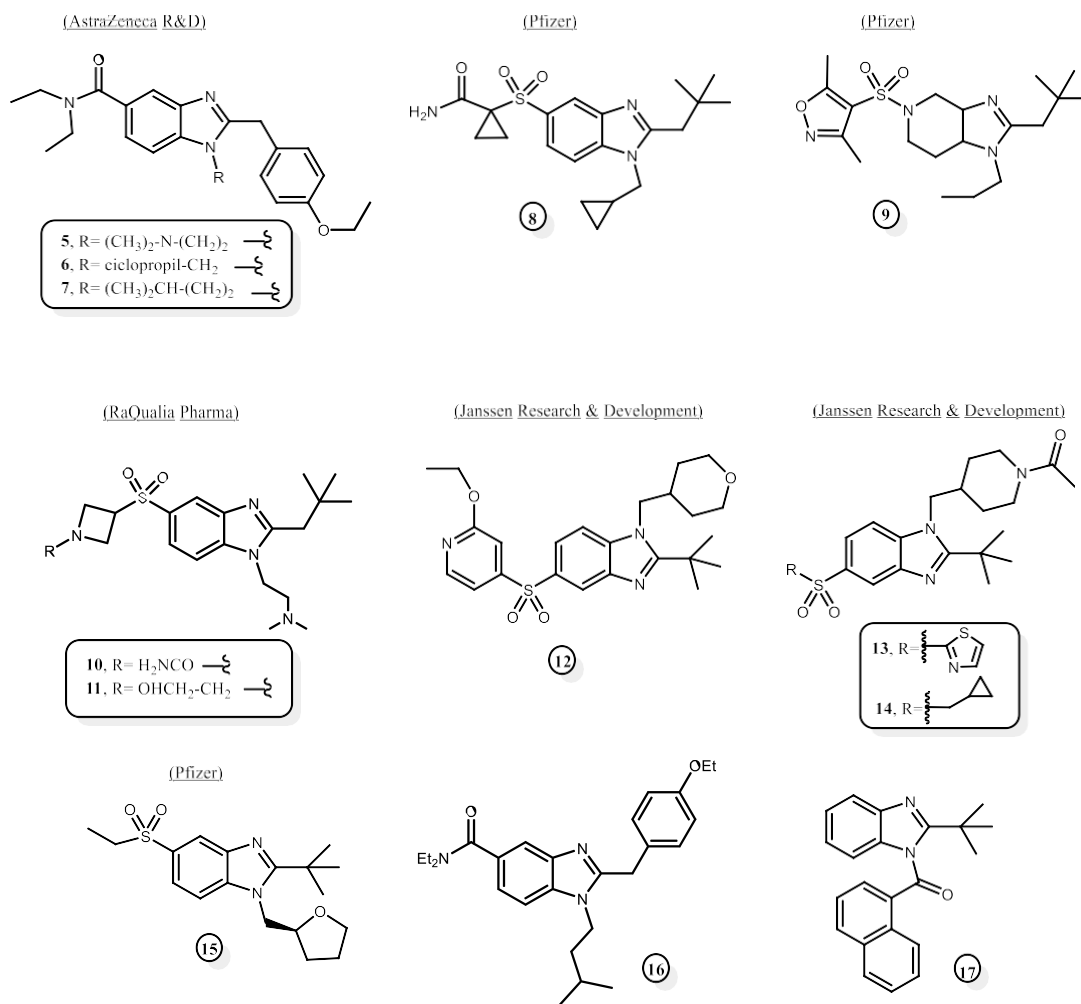


Figura 8.- Estructura de ligandos con la porción de benzo[d]imidazol como núcleo principal, selectivos por el receptor CB_2 y con actividad agonista.

1.11.- Benzo[b]tiofeno como ligando del receptor cannabinoides tipo II.

Dentro de los estudios de derivados de benzo[b]tiofenos orientados a la selectividad por el receptor CB_2 , se encuentra el compuesto **18** reportado por *Dixon et. al.* Este equipo de trabajo desarrolló una serie de cannabinoides tricíclicos de los cuales, aquel que poseía un grupo -tipo- benzofenona entre el anillo benzo[b]tiofeno y benceno con un marco estructural similar al de los CCs, presentó los mejores resultados en cuanto a los parámetros de unión al receptor CB_2 ⁶¹. Asimismo, *Romero-Parra et al.* reportaron una serie de 2-arilbenzo[b]tiofenos, con valores de constante de afinidad (K_i) del orden μM , demostrando una unión eficiente hacia el receptor CB_2 por parte de estos derivados⁶², destacándose el ligando **19**. La Figura 9 muestra los ejemplos de benzo[b]tiofenos desarrollados por los autores mencionados anteriormente.

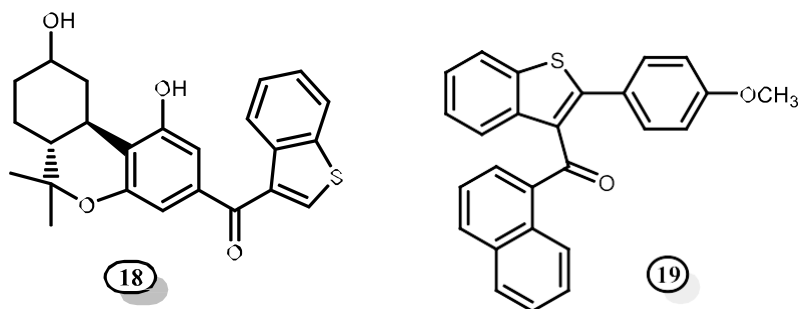


Figura 9.- Estructuras de benzo[*b*]tiofenos dirigidos hacia la modulación del receptor CB₂.

Como se puede observar, no se ha indagado ni desarrollado en gran manera derivados que contengan el anillo benzo[*b*]tiofeno como estructura principal en ligandos afines al receptor CB₂. Sin embargo, se han reportado estructuras similares a este núcleo como se discutirá a continuación.

Algunas estructuras químicas semejantes que se han investigado son derivados de tiofeno y tetrahydrobenzo[*b*]tiofenos como ligandos del receptor CB₂. En este sentido, *Claudia Mugnaini et al.* reportaron una serie de derivados de tiofenos, de los cuales, aquellos que presentaban sustituciones con grupos 3-carboxilato, 2-(adamantan-1-il)carboxamido y grupos alquilo/arilo apolares en las posiciones 4/5 del anillo tiofeno, demostraron alta afinidad por el receptor CB₂ y actividad agonista. De esta serie destacó el compuesto **20**, presente en la Figura 10, donde en ensayos experimentales *in vitro* de un modelo de dermatitis demostró resultados exitosos, evidenciando un potencial agente para el tratamiento de esa patología⁶³. Igualmente, se han indagado derivados de tetrahydrobenzo[*b*]tiofenos como potenciales ligandos cannabinoides, donde *Noha A. Osman et al.* sintetizaron una serie de tetrahydrobenzo[*b*]tiofenos y pirroles, donde el compuesto **21** de la Figura 10, fue el más potente y selectivo por el receptor CB₂ ($K_i = 2,15 \mu\text{M}$), además de mostrar una actividad agonista por este mismo⁶⁴.

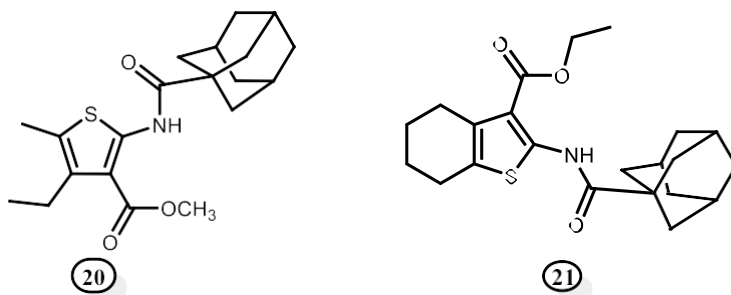


Figura 10.- Estructuras destacables de la serie sintetizada de tiofenos y tetrahydrobenzo[*b*]tiofenos como ligandos del receptor CB₂.

En los ejemplos expuestos en la Figura 10, se puede observar que los anillos de tiofeno y tetrahidrobenzo[*b*]tiofeno pueden participar en el diseño de ligandos selectivos por el receptor CB₂. El uso de estos marcos estructurales en esta área de trabajo surgió debido a las relaciones de isosterismo que presentan con anillos heterocíclicos clásicos presentes en ligandos conocidos, como el 1,3-tiazol y el anillo indol. Estos compuestos presentan estas propiedades isostérica con los anillos de tiofeno y tetrahidrobenzo[*b*]tiofeno respetivamente.

1.12.- Estrategia para la obtención de benzo[*d*]imidazoles y benzo[*b*]tiofenos como ligandos CB₂.

Considerando los efectos adversos asociados a la activación del receptor CB₁, se ha dirigido bastante atención hacia el receptor CB₂. De este modo, la obtención racional de nuevos compuestos que posean afinidad y selectividad por el receptor cannabinoides tipo II otorgaría un valioso aporte para su comprensión farmacológica, así como también para generar posibles avances en el desarrollo de estrategias terapéuticas en tratamientos relacionados con la modulación de este receptor objetivo.

En este sentido, considerando el bioisosterismo antes mencionado del anillo indol de los famosos ligandos aminoalquídolicos con los heterociclos de benzo[*d*]imidazol y benzo[*b*]tiofeno, más las moléculas ya reportadas con selectividad hacia el receptor CB₂ que presentan estos marcos estructurales, se propone el diseño de nuevos ligandos derivados de unidades aromáticas de benzo[*d*]imidazoles y benzo[*b*]tiofenos, junto con los grupos funcionales esenciales para garantizar selectividad por el receptor CB₂ y una posible actividad agonista o antagonistas de estos mismos.

De esta forma, el diseño de los nuevos ligandos propuestos se efectuó mediante el estudio de los patrones de sustitución otorgados por las series ya reportadas, las que proporcionan información de los requisitos espaciales que deben cumplir los futuros ligandos formados. Asimismo, es importante considerar los estudios reportados por *Xing et al.* quienes obtuvieron mediante técnicas de microscopia crioelectrónica (cryo-EM) el complejo de unión entre el receptor CB₂, su proteína G inhibitoria (G_i) y el ligando WIN55,212-2, que permitió establecer interacciones importantes entre este conocido ligando y el sitio activo de esta proteína. Lo anterior, ha permitido detectar la relevancia de los distintos marcos estructurales de WIN55,212-1, que se observan en la Figura 11A, tal como la porción de naftaleno que se extendería entre los dominios de transmembrana 2 y 3 del receptor (TM2 y TM3) efectuando interacciones de tipo π-π con los aminoácidos de Phe91 (F91^{2.61}) y

Phe94 (F94^{2.64}); además, de interacciones hidrofóbicas con los residuos de Phe87 (F87^{2.57}), His95 (H95^{2.65}), Pro184 (P184^{ECL2}) y Phe281(F^{7.35}). Asimismo, el anillo indólico de WIN55,212-2 (bioisostérico con los anillos de benzo[*d*]imidazol y benzo[*b*]tiofeno) se ve envuelto en interacciones de tipo π - π con Phe117 (F117^{3.36}) y Trp258 (W258^{6.48}), pero también participaría en interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos de Ile110 (I110^{3.29}), Val113 (V113^{3.32}) y Phe183 (F183^{ECL2}) entre otros. Por último, el anillo de morfolina también efectuaría interacciones hidrofóbicas adicionales dentro del bolsillo del receptor, las que han sido reportadas como importantes para la unión de los ligandos a esta diana⁶⁵. Adicionalmente, este estudio ha sugerido que posiblemente las interacciones con los residuos de Trp194 (W194^{5.43}), Phe117 (F117^{3.36}) y Trp258 (W258^{6.48}) con las porciones de indol y morfolina serían importante a la hora de distinguir entre un agonista o antagonista de este receptor. Por consiguiente, para comprobar esto, los autores realizaron un diseño racional de dos moléculas que fueran selectivas por el receptor CB₂, presentes en la Figura 11B. Como se observa en dicha figura, ambos ligandos son estructuralmente parecidos, excepto por la función unida a la porción sulfonamida, que proporciona diferentes distancias. Con lo anterior, se concluyó que XIE57 al tener un grupo tiosulfonamido no se extendería lo suficiente para interactuar con Trp258 (W258^{6.48}) comportándose como agonista, mientras que XIE55 al contener un fragmento de esterilsulfonamida si lo haría comportándose como agonista inverso. Por lo tanto, se sugiere que esta interacción con el aminoácido Trp258 sería decisiva en cuanto a determinar la actividad agonista o antagonista de un ligando, lo que además, proporciona mayores antecedentes para un diseño racional⁶⁵.

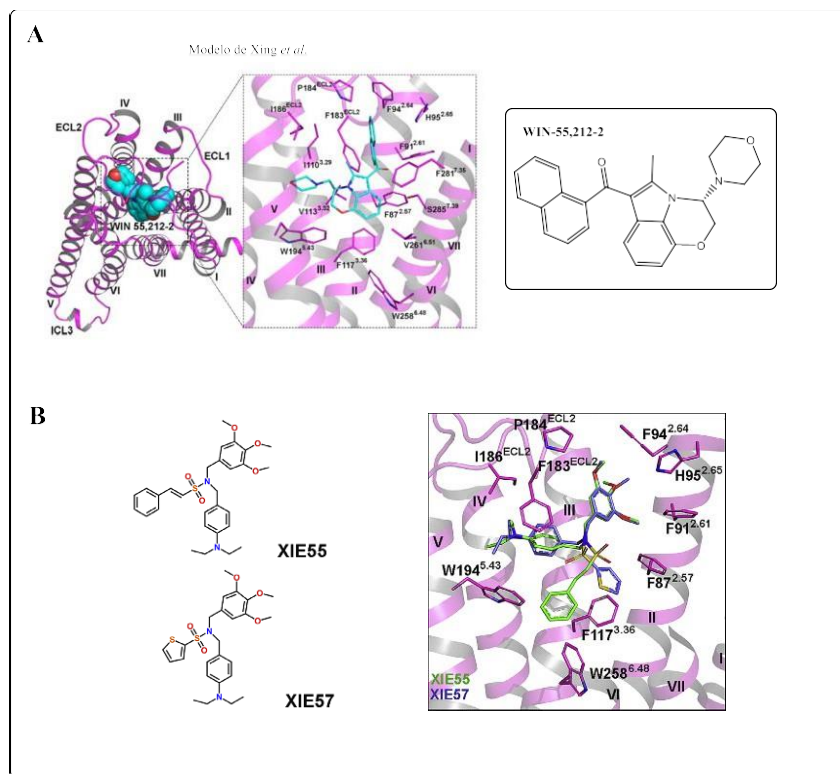


Figura 11.- A) Interacciones efectuadas entre el aminoalquilindol WIN-55,212-2 y distintos aminoácidos del sitio activo del receptor CB₂. **B)** Interacciones de XIE55 y XIE57 en el receptor CB₂ vinculada a WIN55,212-2. (Fig: Xing, *et al.*, *Cryo-EM Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB₂-Gi Signaling Complex*. *Cell* 2020, 180 (4), c45-c54.e13).

Considerando lo anteriormente planteado, los ligandos con anillos aromáticos de benzo[*d*]imidazol y benzo[*b*]tiofeno que se sintetizarán seguirán patrones de sustitución de grupos que funcionalicen la posición *N*-1 en el caso del heterociclo benzo[*d*]imidazólico, y en la posición 3- para el caso del heterociclo benzo[*b*]tiofénico. Estos grupos propuestos que corresponden a los anillos de naftaleno y/o anisol, estarán unidos a los heterociclos aromáticos principales mediante un puente o “linker” que será un carbonilo o carbono metilénico. En este sentido con las funciones de benzo[*d*]imidazol, benzo[*b*]tiofeno y naftaleno y/o anisol, se buscará emular las mismas interacciones importantes que tiene el anillo indol y la porción morfolina de WIN55,212-2 con los aminoácidos Trp194 (W194^{5.43}), Phe117 (F117^{3.36}) y Trp258 (W258^{6.48}). De la misma forma, las posiciones 2- de los anillos heterociclos se funcionalizarán con grupos lipofílicos, voluminosos, planos y π -conjugados, con un átomo electronegativo de oxígeno y/o nitrógeno, favoreciendo interacciones de tipo hidrofóbicas o π -stacking, además de considerar una distancia prudente para eventualmente tener actividad agonista con este receptor, considerando lo anteriormente descrito con respecto a la interacción con el aminoácido Trp258 (W258^{6.48}). En base a esta

descripción, los heterociclos de anisol, piridina, furano e isoxazol serían ideales para ser incluidos en la posición 2- de los anillos heterocíclicos principales. Finalmente, los derivados benzo[*d*]imidazólicos a diferencia de los análogos benzo[*b*]tiofénicos, poseerán un átomo de cloro (-Cl) en el anillo de benceno del marco heterocíclico fusionado para identificar si la presencia de electroattractores dentro del sistema anular aromático es relevante para la selectividad biológica en esta posición de los anillos principales.

La Figura 12 muestra los patrones de sustitución anteriormente descritos de los derivados benzo[*d*]imidazoles y benzo[*b*]tiofenos planteados como objetivo sintético.

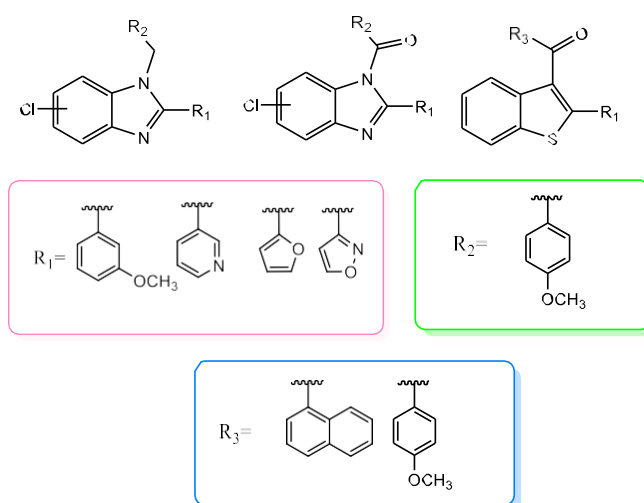


Figura 12.- Nuevos ligandos propuestos derivados de benzo[*d*]imidazol y benzo[*b*]tiofeno, sustituidos con diferentes heterociclos en sus posiciones 2- y anillos de anisol/naftaleno en las posiciones N-1 ó 3-, según corresponda. Para los derivados benzo[*d*]imidazólicos se considera una serie con un puente metilénico y carbonílico.

2.-HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes ya expuestos donde se considera:

- 1) Las propiedades terapéuticas de los ligandos cannabimiméticos.
- 2) Los efectos adversos asociados a la activación del receptor CB₁ que no se observan en la activación del receptor CB₂.
- 3) Que los núcleos de benzo[*d*]imidazol y benzo[*b*]tiofeno son bioisómeros del anillo indólico presente en los conocidos ligandos cannabinoides aminoalquilindólicos (AAls), y
- 4) Los estudios de Xing et al. correspondientes a las interacciones entre el ligando aminoalquilindólico WIN55,212- 2 y el complejo/cristal del receptor CB₂ efectuados por microscopía crioelectrónica (cryo-EM).

Se postula que 5/6-cloro-1*H*-benzo[*d*]imidazoles y benzo[*b*]tiofenos funcionalizados en sus posiciones 2- con distintos anillos heterocíclicos aromáticos y derivatizados en sus posiciones N-1 o 3- respectivamente con anillos de naftoilo o 4-metoxibenzoilo darán origen a ligandos cannabinoides por el receptor CB₂, así como también una posible actividad agonista sobre este mismo.

2.1.-OBJETIVOS.

2.1.1.-Objetivo general.

Sintetizar derivados benzo[*d*]imidazólicos y benzo[*b*]tiofénicos sustituidos en las posiciones 2- y N-1 con afinidad y selectividad por el receptor cannabinoides tipo II (CB₂).

2.1.2.-Objetivos específicos.

Objetivos sintéticos.

1.-Síntesis y caracterización de ligandos cannabinoides derivados del anillo 5/6-cloro-1*H*-benzo[*d*]imidazol sustituidos en la posición 2- con anillos de 3-metoxibenceno, 3-piridina, furano e isoxazol. Asimismo, serán derivatizados en la posición N-1 con el anillo aromático de anisol (serie 1 y serie 1.2).

2.-Síntesis y caracterización de ligandos cannabinoides derivados del anillo benzo[*b*]tiofeno sustituidos en la posición 2- con anillos de 3-metoxibenceno, 3-piridina, furano e isoxazol.

Asimismo, serán derivatizados en la posición 3- con los anillos naftaleno y/o anisol (serie 2 y 3).

Objetivos biológicos.

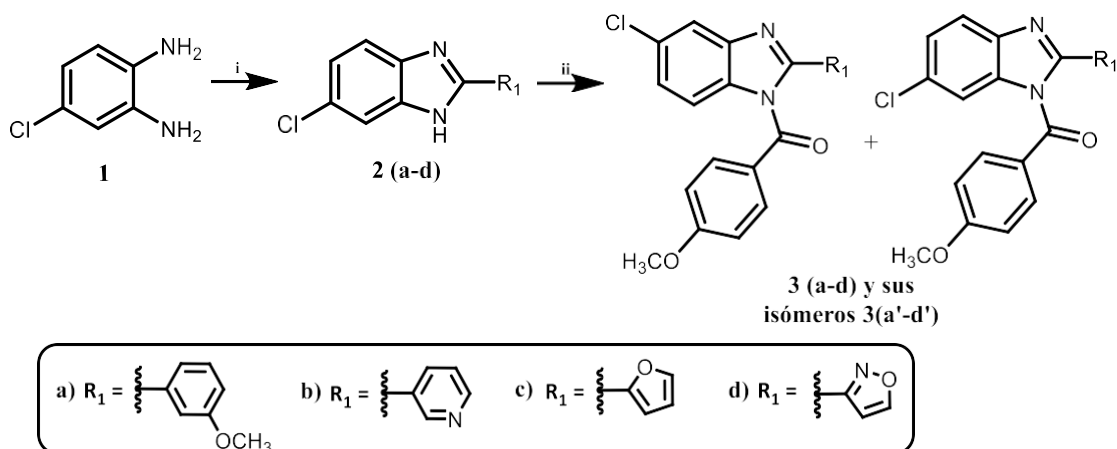
1.-Evaluación de la viabilidad celular (efecto citotóxico) de los nuevos ligandos benzo[*d*]imidazólicos (serie 1 y 1.2) y benzo[*b*]tiofénicos (serie 2 y 3) mediante el método colorimétrico de reducción de sales de tetrazolio a formazán (ensayo MTT) determinando los valores de concentración efectiva media máxima (EC₅₀) sobre cultivos de células HEK293T (células embrionarias de riñón humano con baja densidad de expresión de receptores CB) HL-60 (leucemia promielocítica humana, que expresan en mayor cantidad el receptor CB₂) y U-87MG (cerebro humano-glioblastoma astrocitoma-, que expresan en mayor cantidad al receptor CB₁). Se determinará el índice de selectividad citotóxico entre células que expresan receptores CB₂ y células que expresan receptores CB₁ [EC₅₀(Cel. exp CB₂)/ EC₅₀(Cel. exp CB₁)]. Los resultados darían indicios del posible comportamiento agonista de los nuevos ligandos.

3.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- Síntesis: resultados y discusión.

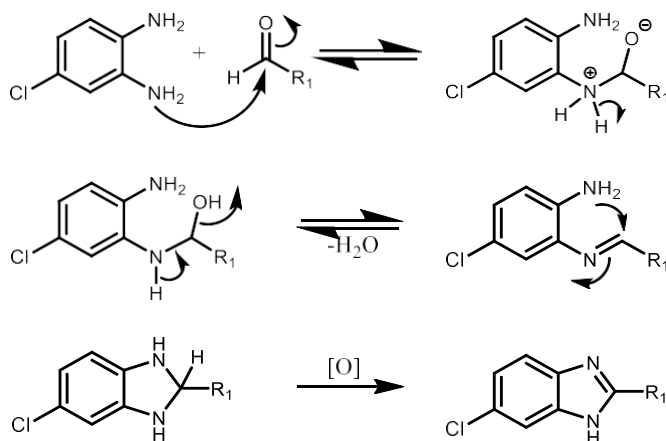
3.1.1.- Síntesis de derivados de 5/6-cloro-1*H*-benzo[*d*]imidazol con puente carbonilo en posición 1 (serie 1)

Para obtener la familia de benzo[*d*]imidazoles sustituidos en la posición 2- con los heterociclos 3-metoxibenceno, 3-piridina, furano e isoxazol, y que a su vez presentan un puente carbonilo unido al nitrógeno 1 del anillo benzo[*d*]imidazol que conecta con una porción aromática de anillo anisol (serie 1), se planteó la siguiente estrategia sintética representada en el Esquema 1, la cual comprende dos pasos distintos de reacción:



Esquema 1.-Estrategia de síntesis de benzo[*d*]imidazoles como ligandos cannabinoides. Reactivos y condiciones: **i)** correspondientes aldehídos o ácidos carboxílicos. Para aldehído; DMF, MgCl₂·6H₂O, 24h, t.a. Para ácidos carboxílicos: ácido polifosfórico (PPA), 180°C. **ii)** Cloruro de 4-metoxibenzoilo, NaH, THFanh, atmósfera de N₂, 1h.

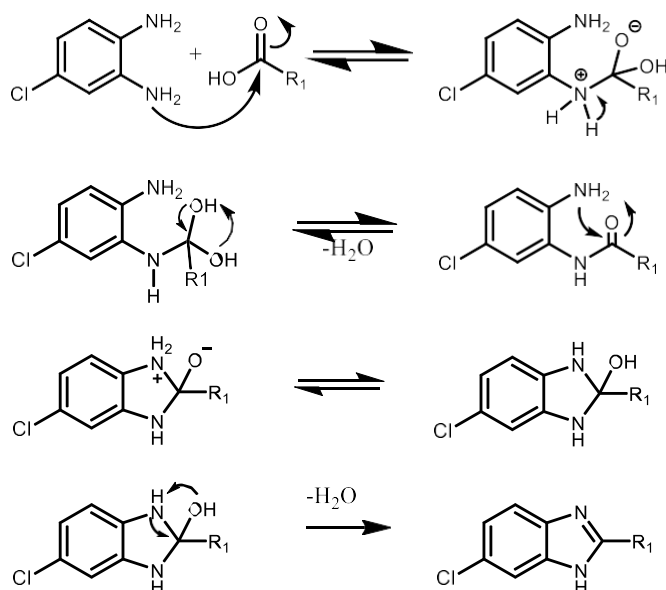
El primer paso involucra la formación de los anillos benzo[*d*]imidazol para la obtención de los intermediarios **2(a-b)** a través de la condensación entre la 4-cloro-*o*-feniléndiamina (**1**) y distintos derivados de aldehídos. En un principio, ocurre un ataque nucleofílico por parte de uno de los grupos amino (-NH₂) de la 4-cloro-*o*-feniléndiamina hacia el carbono carbonílico del aldehído, eliminándose una molécula de agua y formando una base de Schiff intermediaria⁶⁶. Luego, mediante un ataque intramolecular del segundo grupo amino, ocurre la ciclación dando lugar a un anillo de cinco miembros fusionado al benceno clorado⁶⁷. Finalmente, con ayuda de un proceso de oxidación se forma el núcleo aromático de benzo[*d*]imidazol. El Esquema 2 explica el mecanismo anteriormente descrito.



Esquema 2.- Mecanismo general para la formación de benzo[*d*]imidazoles sustituidos en la posición 2- del anillo aromático.

Como se explyaya en el Esquema 2, para completar la formación del anillo de benzo[*d*]imidazol es necesario un paso de oxidación, lo cual involucra la participación de un agente oxidante que propicie esta parte final. Se han reportado una gran variedad de compuestos que cumplen el papel de ácidos de Lewis, que catalizan la obtención de benzo[*d*]imidazoles^{68,69,70,71}. Sin embargo, para la formación específica de este núcleo bicíclico nitrogenado, necesario para dar origen a la serie 1, se utilizó el ácido de Lewis cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂·6H₂O),ya que se han reportado buenos rendimientos al emplearlo, corresponde a un reactivo de bajo costo y no promueve la formación de subproductos ni estancamiento de las especies intermediarias⁷².

El primer paso de reacción anteriormente descrito permite obtener los benzo[*d*]imidazoles sustituidos en la posición 2- con anillos heterocíclicos de 3-metoxibenceno, 3-piridina y furano **2(a-c)**. Para conseguir el benzo[*d*]imidazol sustituido en la posición 2- con el grupo isoxazol **2(d)**, se utilizó el reactivo ácido isoxazol-3-carboxílico, el cual reacciona con la 4-cloro-*o*-feniléndiamina (**1**) por medio de un mecanismo de condensación con derivados de ácidos carboxílicos⁷³, el cual se detalla en el esquema 3. Esta reacción involucra esta vez ácido polifosfórico (PPA del inglés *Polyphosphoric acid*) como catalizador y medio de reacción, reemplazando a un solvente tradicional⁷⁴.

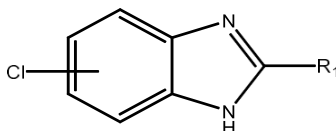


Esquema 3.- Mecanismo general para la obtención de benzo[*d*]imidazoles con derivados de ácidos carboxílicos.

El segundo paso de reacción, como se puede ver en el Esquema 1, propicia conseguir los compuestos finales denominados como **3(a-d)** y **3(a'-d')**, donde se utiliza la base fuerte hidruro de sodio (NaH) que realiza la abstracción del protón 1*H* del átomo de nitrógeno del benzo[*d*]imidazol. Luego este anión actuará como nucleófilo atacando al carbonilo del cloruro de 4-metoxibenzoilo, desplazando al átomo de cloro de esta estructura dando origen a dos distintos compuestos regioisómeros que tendrán al átomo de -Cl en las posiciones 5- o 6- del anillo benzo[*d*]imidazólico. Una vez purificados los intermediarios **2(a-d)**, fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de protones 1 (¹H-RMN) y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (¹³C-RMN). Todas las muestras fueron preparadas con el solvente dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) observándose las diversas señales de protones para cada molécula. Particularmente, se identifica para los

cuatro intermediarios la señal del protón unido al nitrógeno 1 del benzo[*d*]imidazol, el cual se observa como un singlete a un desplazamiento químico (δ) de 12,93 ppm, 13,29 ppm, 13,13 ppm y 13,57 ppm para los intermediarios **2a**, **2b**, **2c** y **2d** respectivamente.

Los procedimientos anteriormente descritos para la obtención de los intermediarios benzo[*d*]imidazólicos **2(a-d)** con el oxidante $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y PPA muestran rendimientos mayores o iguales al 50% (Tabla 1). Los valores obtenidos se consideraron adecuados para avanzar con el siguiente paso de reacción planteado. Asimismo, al momento de monitorear la reacción a través de cromatografía en capa fina (TLC del inglés *Thin Layer Chromatography*), se observaron en cada uno de los ensayos y eluciones, los factores de retención (R_f) correspondientes a los reactivos de partida, junto con la señal de R_f correspondiente al producto deseado. Debido a lo anterior, indica la nula formación de intermediarios y subproductos, considerando que es común la formación de estos mismos en la síntesis de benzo[*d*]imidazoles bajo diferentes condiciones de reacción, siendo los más comunes la estructura de imina intermediaria correspondiente y aquellos derivados de benzo[*d*]imidazoles disustituídos en las posiciones 1- 2 del heterociclo⁷⁵. La siguiente Tabla 1 muestra los porcentajes de rendimiento para cada intermediario benzo[*d*]imidazólico **2(a-d)**:



Compuesto	R ₁	Rendimiento (%)
2a		58
2b		55
2c		56
2d		50

Tabla 1.- Resumen de porcentajes de rendimiento para cada derivado de benzo[*d*]imidazol sustituido en la posición 2- con anillos anisol y heterociclos de piridina, furano e isoxazol respectivamente.

Una vez caracterizados e identificado los cuatro intermediarios, se prosigue al paso dos del esquema 1 de síntesis presentado anteriormente. Para obtener los productos finales **3(a-d)** y **3(a'-d')**, se realiza la abstracción del protón 1*H* del átomo de nitrógeno del benzo[*d*]imidazol con la base fuerte hidruro de sodio (NaH) formando un anión para cada intermediario benzo[*d*]imidazólico. Luego, cada anión actuará como nucleófilo atacando al carbonilo del cloruro de 4-metoxibenzoilo, desplazando al átomo de cloro de esta estructura dando origen a dos distintos compuestos regioisómeros que tienen al átomo de -Cl en las posiciones 5- o 6- del anillo benzo[*d*]imidazólico.

Inmediatamente finalizada la formación de estos, se separaron ambos regioisómeros mediante diferentes tipos de purificación como columna cromatográfica sobre gel de sílice y placas de capa preparativa, empleando diversas fases móviles gracias a que presentan distintos factores de retención (Rf).

Una vez separados los pares de regioisómeros obtenidos por reacción de acilación, se contó con ocho compuestos totales, los que se identificaron y caracterizaron mediante espectroscopía ¹H-RMN y ¹³C-RMN. Las muestras para los compuestos **3(a-c)** y **3(a'-c')**, fueron preparadas con el solvente cloroformo deuterado (CDCl₃) y para los compuestos **3(d)** y **3(d')**, se les solubilizó en DMSO-d₆.

Una vez obtenidos los espectros unidimensionales fue imprescindible obtener y analizar el espectro DEPT-135 (*Distortionless enhancement by polarization transfer*), y aquellos bidimensionales (2D), es decir, COSY (*Homonuclear correlation spectroscopy*), HMBC (*Heteronuclear multiple bond correlation*) y HSQC (*Heteronuclear single quantum coherence*), para obtener una correcta identificación de las señales de cada átomo, y por tanto, la confirmación de la posición del átomo de cloro en cada regioisómero.

A modo de ejemplo, se presenta a continuación los análisis espectroscópicos y la caracterización de los regioisómeros **3(d)** y **3(d')**, los cuales en la posición 2- del anillo benzo[*d*]imidazol contienen el heterociclo isoxazol. Las moléculas de benzo[*d*]imidazol se han enumerado acorde a una nomenclatura propia, la cual no se coincide con la nomenclatura IUPAC de benzo[*d*]imidazoles. Primeramente, es necesario identificar las

señales de los protones en el espectro de ^1H -RMN, lo cual es posible gracias a los desplazamientos químicos predecibles y a las constantes de acoplamiento (J) que presenta la molécula. La Figura 13, muestra el espectro de protones y la ampliación de la zona aromática de este mismo, para el compuesto **3(d)** con sus respectivas asignaciones. Los análisis ya realizados que se detallarán próximamente indican que este regioisómero presenta el átomo de cloro en la posición 5- del anillo benzo[d]imidazólico. Asimismo, se puede observar que en la leyenda de la figura se informan las señales y constantes de acoplamiento (J) para cada una de ellas.

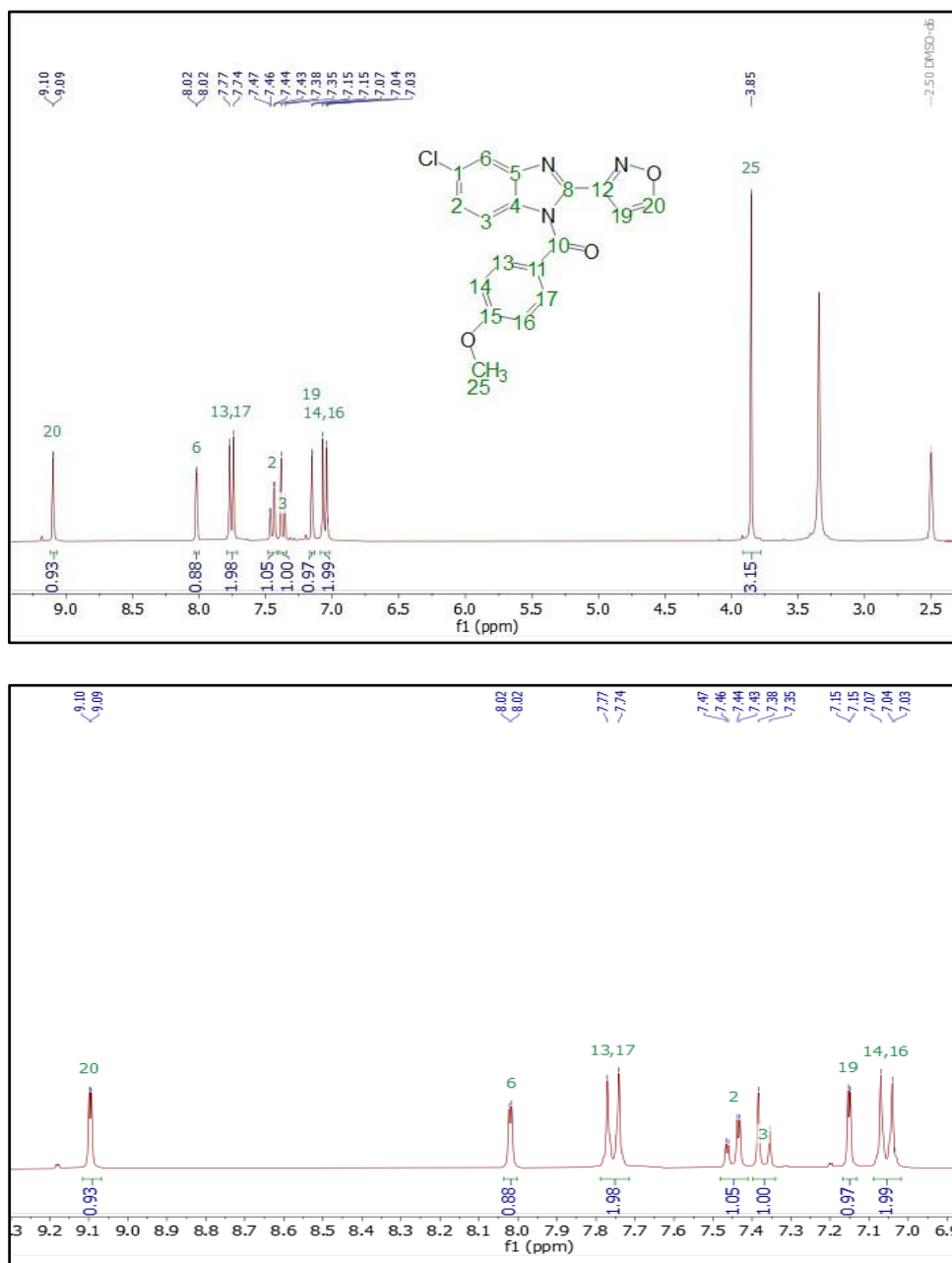


Figura 13.- Espectro ^1H -RMN y ampliación de la zona aromática del compuesto (5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3d**) con sus respectivas señales y constantes de acoplamiento:(300 MHz, DMSO- d_6) δ : 9,10 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₂₀), 8,02 (d, $J_{meta} = 1,9$ Hz, 1H, H₆), 7,76 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 7,45 (dd, $J_{orto, meta} = 8,8; 2,0$ Hz, 1H, H₂), 7,37 (d, $J_{orto} = 8,8$ Hz, 1H, H₃), 7,15 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₁₉), 7,06 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 3,85 (s, 1H, H₂₅).

De la misma forma, se presenta en la Figura 14, el espectro de ^{13}C -RMN de la molécula **3(d)**, con las señales de carbono y sus respectivas asignaciones.

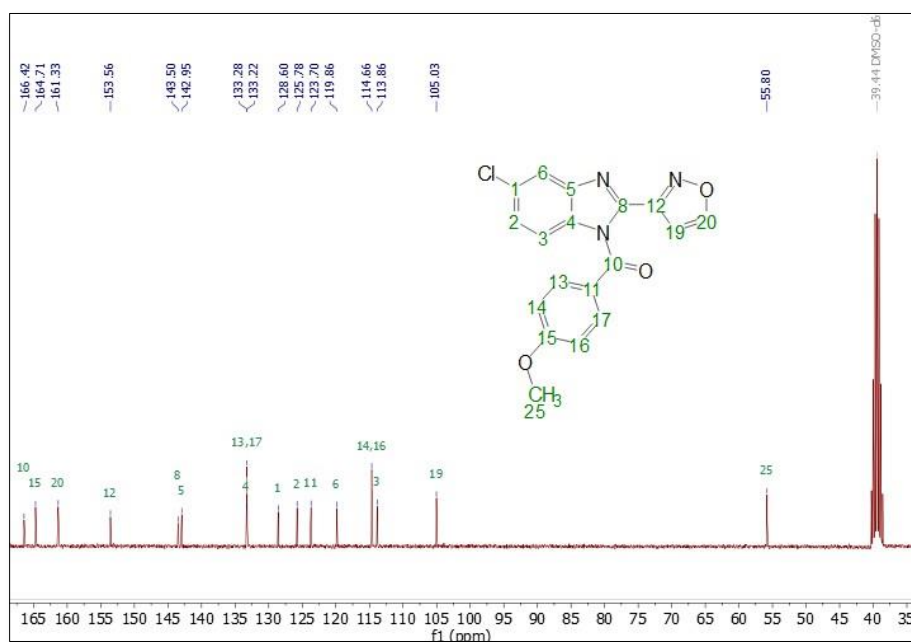


Figura 14.- Espectro ^{13}C -NMR del compuesto (5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3d**) con sus respectivas señales ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 166,42 (**10C**), 164,71 (**15C**), 161,33 (**20C**), 153,56 (**12C**), 143,50 (**8C**), 142,95 (**5C**), 133,28 (**4C**), 133,22 (**13,17C**), 128,60 (**1C**), 125,78 (**2C**), 123,70 (**11C**), 119,86 (**6C**), 114,66 (**14,16C**), 113,86 (**3C**), 105,03 (**19C**), 55,80 (**25C**).

Para poder realizar la correcta asignación de todas las señales de protones y carbono, es preciso analizar los espectros en dos dimensiones, y como se mencionó anteriormente, para poder determinar la posición del átomo de cloro en la molécula. En la Figura 16, se observa una ampliación del espectro **HMBC** del compuesto **3d** que muestra las señales más importantes que permiten identificar la posición exacta del átomo de -Cl. Es preciso identificar los desplazamientos de los carbonos cuaternarios 4- y 5- (C-4 y C-5) que corresponden a aquellos átomos puente de la fusión entre los anillos que componen el heterociclo de benzo[*d*]imidazol. Para conseguir certeramente la asignación por desplazamiento en ppm de estas señales de los átomos de carbono señalados se efectuó un análisis al espectro HMBC del compuesto 5-cloro-1-etil-2-(furan-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol previamente sintetizado para efectos de estudios espectroscópicos considerando que esta molécula posee una estructura similar a los compuestos objetivo en este estudio, pero de menor complejidad estructural. El compuesto 5-cloro-1-etil-2-(furan-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol presenta una relación de 3 enlaces de distancia entre los protones metilénicos a 4,37 ppm y el carbono cuaternario puente asignado con el número 4- (Figura 15). Con esto, se logró identificar con claridad que dichos protones del grupo -CH₂- sólo interactúan con el carbono cuaternario a 133,77 ppm y no con aquel a 143,85 ppm correspondiente al átomo de carbono designado con el número 5- (C-5). Con el análisis anterior, se concluyó que en el sistema anular benzo[*d*]imidazólico, el carbono 4- aparece siempre a campo bajo en comparación con el carbono cuaternario 5-.

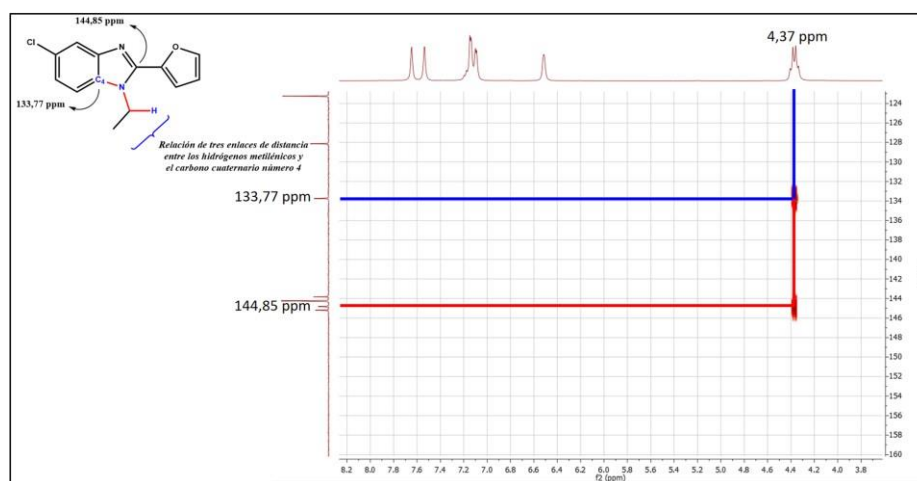


Figura 15.-Estructura del compuesto 5-cloro-1-etil-2-(furan-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol utilizado como patrón para poder determinar el desplazamiento (ppm) exacto de los átomos de carbono

cuaternarios 4- y 5- a través de la relación de tres enlaces (en rojo) con los protones metilénicos (en azul).

Ahora con los datos descritos anteriormente, fue posible identificar los mismos carbonos de numeración 4- y 5- en el compuesto **3d**. Como se indica anteriormente, la Figura 16, muestra una ampliación de la zona aromática del espectro HMBC de dicho compuesto, permitiendo identificar la posición exacta del átomo de -Cl. En este regioisómero **3d**, el carbono 4- (C-4) se encontraría a un desplazamiento de 133,28 ppm y el carbono 5- (C-5) a un desplazamiento de 142,95 ppm más desapantallado. La identificación de estas señales permite ahora encontrar relaciones entre carbonos e hidrógenos, y por tanto, en concordancia con las multiplicidades de cada señal de hidrógeno en el anillo de benzo[d]imidazol, es posible dilucidar la posición exacta del átomo de cloro. De forma análoga que para el compuesto 5-cloro-1-etil-2-(furan-2-il)-1*H*-benzo[d]imidazol de la Figura 15, se encuentra que los únicos protones que tienen una relación de 3 enlaces con el carbono 4-, son los designados como H₆ y H₂. Igualmente, el protón H₃ es el único que presenta una relación de 3 enlaces con el carbono 5-. Estas correspondencias están destacadas con color amarillo y azul, respectivamente en la Figura 16.

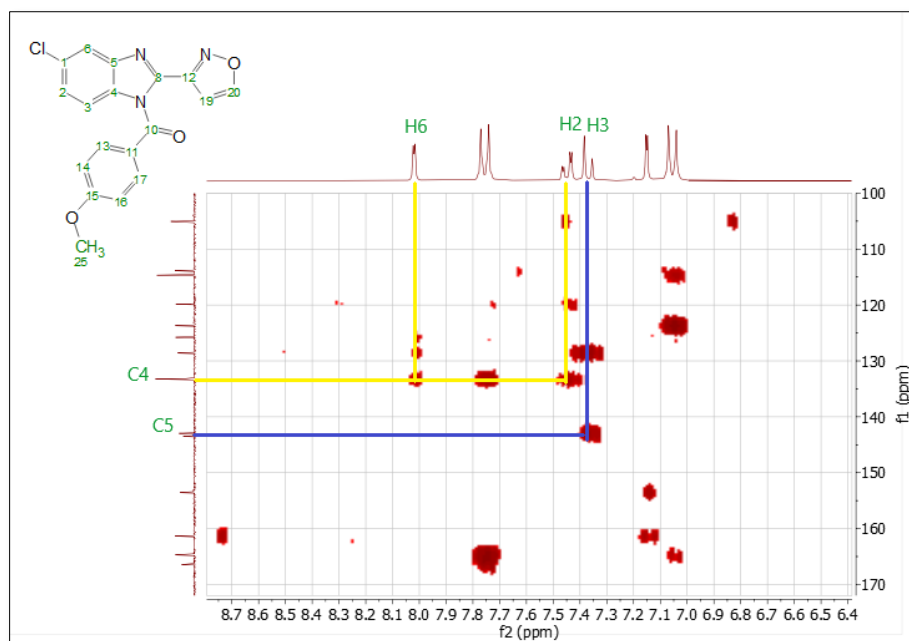
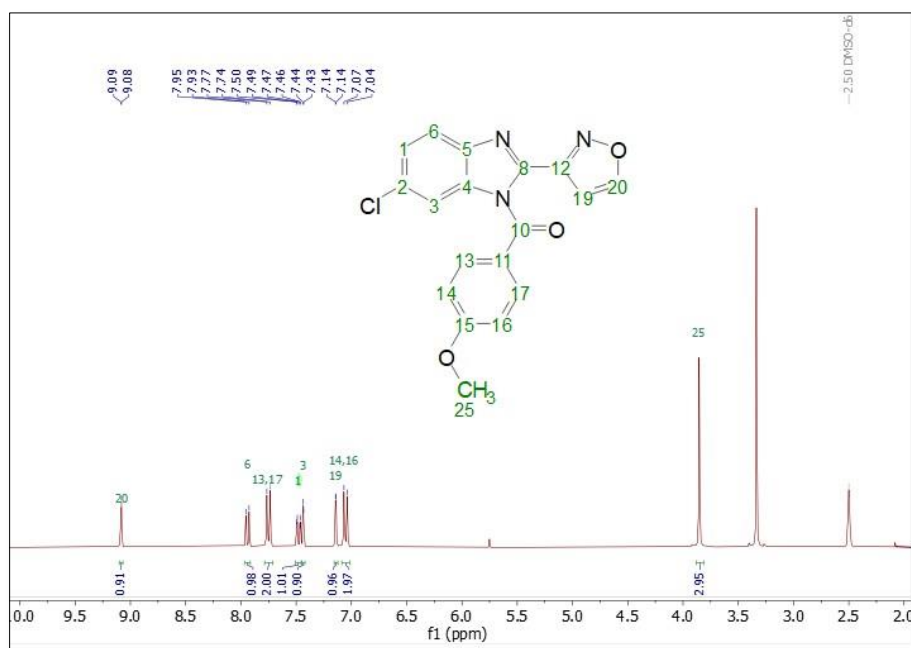


Figura 16.- Espectro bidimensional HMBC del compuesto (5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona con sus señales características entre el carbono 4 (C-4) y los protones H₂ y H₆, y el carbono 5 (C-5) con el protón H₃, que corroboran la posición del átomo de cloro.

De la misma forma, existen otros antecedentes que confirman la posición del átomo de Cl- en la posición 5- del anillo de benzo[*d*]imidazol. El protón H₆ que interactúa con C-4 y cuyo desplazamiento es de 8,02 ppm en el espectro de ¹H-RMN, cuenta con una constante de acoplamiento pequeña (por su posición *meta* con respecto al protón H₂) de $J = 1,9$ Hz, confirmando que su átomo vecino (carbono 1) debe sostener al átomo de -Cl. De la misma manera, el protón H₂ que también interactúa con C-4, con desplazamiento a 7,45ppm corresponde a un doblete de dobletes (dd) mostrando dos tipos distintos de constantes de acoplamiento (interacciones *orto* y *meta* con los protones H₃ y H₆ respectivamente) de $J= 8,8$ Hz y $J= 2,0$ Hz.

De igual modo, en la Figura 17 y Figura 18, se encuentran los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN, respectivamente del regioisómero **3d'** donde se observa la asignación para cada protón y carbono de esta molécula. Al igual que para el regioisómero anterior, se observa en las leyendas de las figuras las señales y constantes de acoplamiento.



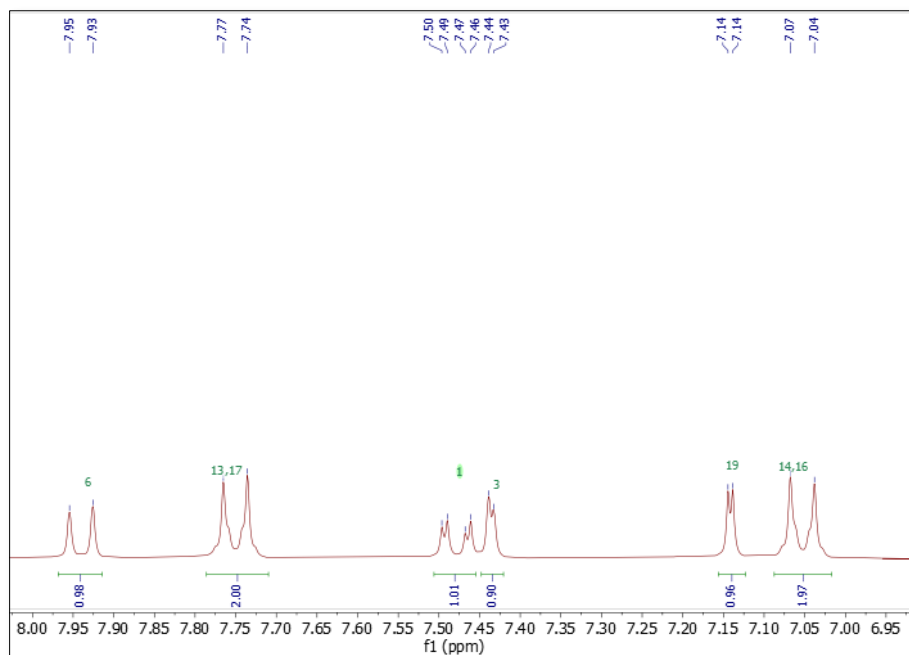


Figura 17.- Espectro ^1H -RMN y ampliación de la zona aromática del compuesto (6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3d**) con sus respectivas señales y constantes de acoplamiento: ^1H -NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ : 9,08 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H_{20}), 7,94 (d, $J_{\text{orto}} = 8,6$ Hz, 1H, H_6), 7,75 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H_{13} - H_{17}), 7,48 (dd, $J_{\text{orto, meta}} = 8,6; 2,0$ Hz, 1H, H_1), 7,44 (d, $J_{\text{meta}} = 2,0$ Hz, 1H, H_3), 7,14 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H_{19}), 7,05 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H_{14} - H_{16}), 3,85 (s, 3H, H_{25}).

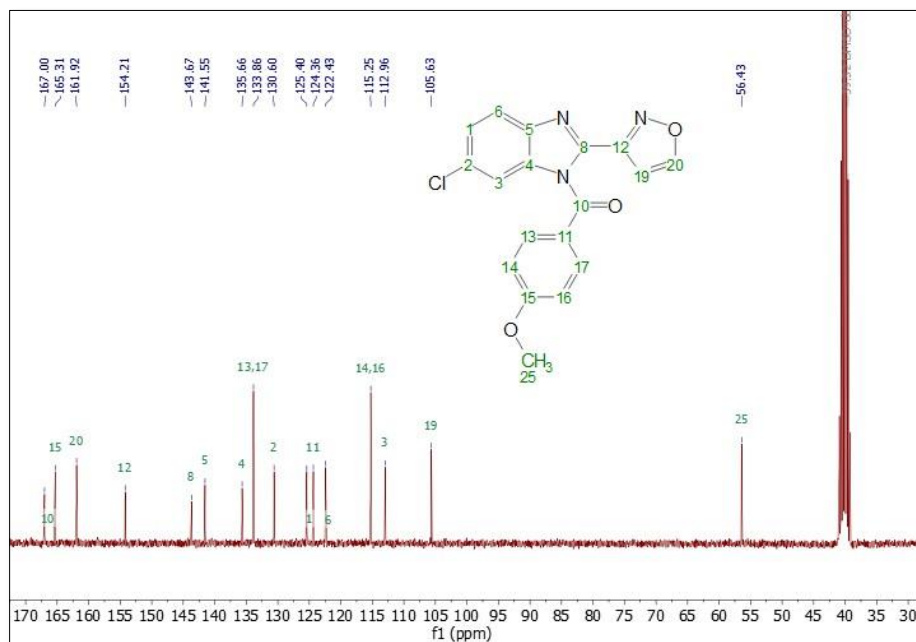


Figura 18.- Espectro ^{13}C -RMN del compuesto (6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3d**) con sus respectivas señales: ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 167,00 (**10C**), 165,31 (**15C**), 161,92 (**20C**), 154,21 (**12C**), 143,67 (**8C**), 141,55 (**5C**), 135,66 (**4C**), 133,86 (**13,17C**), 130,60 (**2C**), 125,40 (**1C**), 124,36 (**11C**), 122,43 (**6C**), 115,25 (**14,16C**), 112,96 (**3C**), 105,63 (**19C**), 56,43 (**25C**).

De igual manera que para el regioisómero **3d** anterior, se identificaron los carbonos 4- y 5- efectuando esta vez un parangón con el compuesto isomérico 6-cloro-1-etil-2-(furan-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol de menor complejidad. Por lo tanto, nuevamente con los antecedentes espectroscópicos de este patrón es posible extrapolar el desplazamiento de las señales para **3d'**.

El desplazamiento de los carbonos 4- y 5- del compuesto **3d'** tienen un valor de 135,66 ppm para el carbono 4- (C-4) y 141,55 ppm para el carbono 5- (C-5). Una vez identificados estos carbonos, es posible establecer que el único protón que tiene una interacción de distancia a 3 enlaces con el carbono 4- es H₆ (ver estructura de **3d'** en Figura 19). Asimismo, los protones H₁ y H₃, son los únicos que tienen interacción a 3 enlaces de distancia con el carbono 5-. De esta manera, se pueden corroborar las relaciones anteriormente mencionadas observando el espectro HMBC de **3d'** que se muestra en la Figura 19. Las relaciones anteriormente mencionadas se han destacado con color naranja y morado respectivamente.

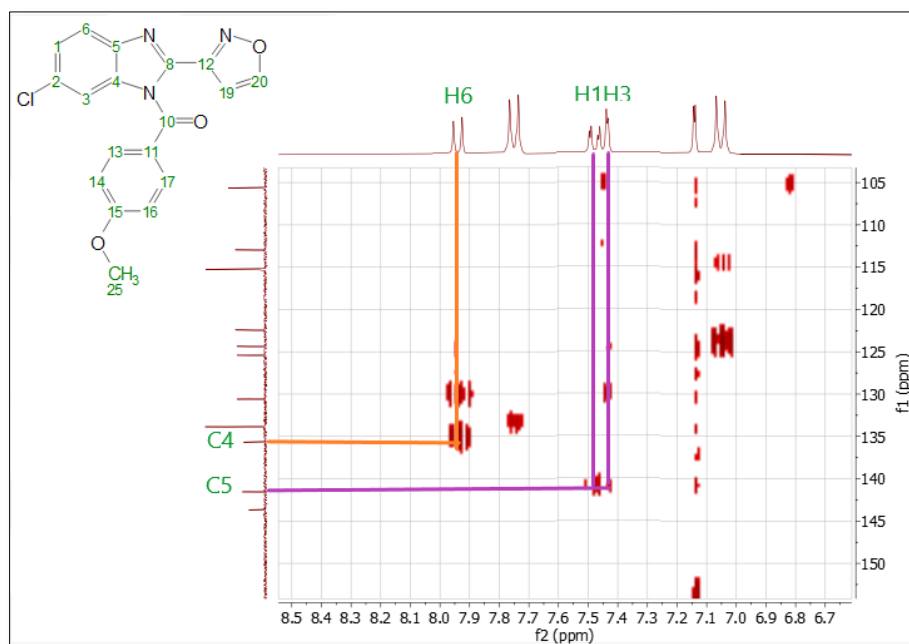


Figura 19.- Espectro bidimensional HMBC del compuesto (6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3d'**) con sus señales características entre el carbono 4- (C-4) y el protón H₆, y el carbono 5- (C-5) con los protones H₁ y H₃, que corroboran la posición del átomo de cloro.

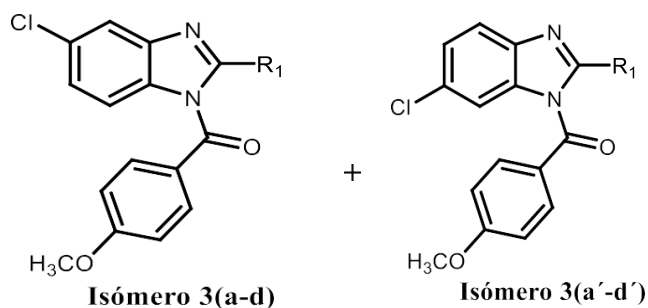
Al igual que para el derivado **3d** anteriormente discutido, se puede corroborar la posición 6- del átomo de cloro en el anillo benzo[*d*]imidazol del compuesto **3d'** viendo las constantes de acoplamiento que presentan los protones del heterociclo, y combinando estas propiedades con la identificación inequívoca a tres enlaces que se hizo previamente con el

espectro HMBC. El protón H₆ presenta un desplazamiento de 7,94ppm en el espectro de ¹H-RMN, con una constante de acoplamiento de *J* = 8,6 Hz (interacción *orto* con el protón H₁), y se puede observar, además, que no existe una interacción *meta* con ningún protón, lo que indica con certeza el átomo de cloro ya no se encuentra en la posición 5- como en el regioisómero anterior **3d**, sino en la posición 6- del anillo benzo[*d*]imidazol.

Los análisis para identificar los compuestos **3d** y **3d'** también fueron efectuados para determinar los regioisómeros **3(a-c)** y **3(a'-c')** correspondientes a los derivados sustituidos con anillos de 3-metoxibenceno, 3-piridina y furano en la posición 2- del núcleo benzo[*d*]imidazol, respectivamente. Se pudo establecer mediante los estudios espectroscópicos realizados, que todos los regioisómeros **3(a-d)** presentan el átomo de cloro en la posición 5-, mientras que los compuestos **3(a'-d')** lo tienen en la posición 6- del mismo núcleo heterocíclico central.

A continuación, se expone la Tabla 2 con los rendimientos obtenidos para los compuestos **3(a-d)** y **3(a'-d')**, donde se ha expresado en una columna el rendimiento total para ambos regioisómeros, y de este mismo, se desglosa en la siguiente columna, el rendimiento por regioisómero.

Como se puede ver, hay prácticamente una relación 1:1 para la formación de cada isómero



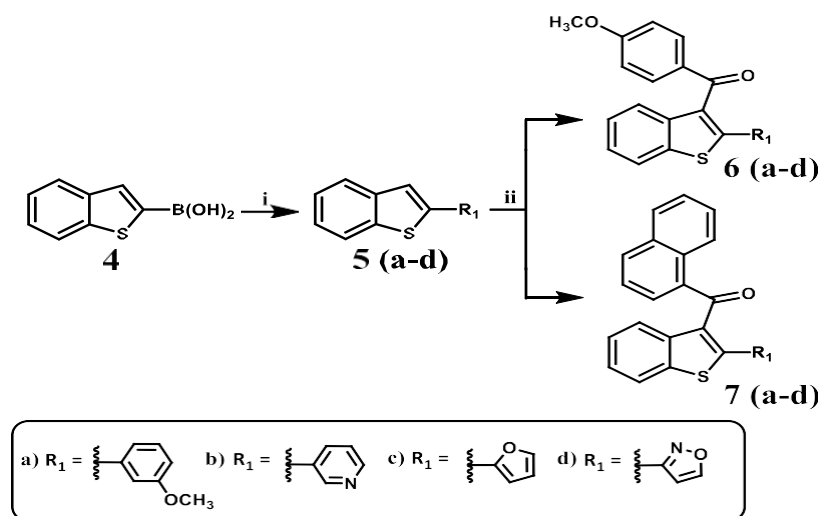
Compuesto	R ₁	Posición átomo cloro	Rendimiento por regioisómero (%)
3a		5	32
3a'		6	28
3b		5	28
3b'		6	27

3c		5	20
3c'		6	20
3d		5	30
3d'		6	25

Tabla 2.- Resumen de rendimientos para los compuestos finales de la serie de benzo[d]imidazoles **3(a-d)** y **3(a'-d')**, donde se informa los rendimientos detallados de cada regioisómero.

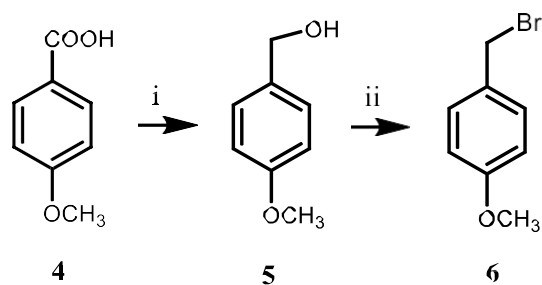
3.1.2.- Síntesis de derivados de 5/6-cloro-1*H*-benzo[d]imidazol con puente metilénico en posición 1 (serie 1.2)

Para la obtención de los compuestos de la serie 1.2, se propuso el siguiente esquema sintético, que se detallará a continuación. El primer paso de reacción, al igual que la síntesis de la serie 1, contempló la formación del núcleo benzo[d]imidazol a través de la condensación entre la 4-cloro-*o*-feniléndiamina (**1**) con los diferentes derivados de aldehídos/ácido carboxílico. Esta reacción dio formación a los intermediarios **2(a-d)**, los cuales se encuentran sustituidos en la posición 2- del anillo, con las porciones del tipo 3-metoxibenceno, 3-piridina, furano e isoxazol. El Esquema 4 de reacción, muestra los dos pasos que contemplan la formación total de los compuestos de la serie 1.2.



Esquema 4.- Estrategia de síntesis de benzo[d]imidazoles como ligandos cannabinoides de la serie **3.2(a-d)** y **3.2(a'-d')**. Reactivos y condiciones: i) correspondientes aldehídos o ácidos carboxílicos. Para aldehído; DMF, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 24h, t.a. Para ácidos carboxílicos: ácido polifosfórico (PPA), $180^\circ C$. ii) Bromuro de 4-metoxibencilo, NaH, THF, 24h.

A diferencia de la síntesis de la serie 1 de benzo[*d*]imidazoles (Esquema 1), la obtención de esta serie **3.2(a-d)/3.2(a'-d')** contempla un segundo paso diferente. Para proceder al siguiente paso de reacción según el Esquema 4 , se sintetizó en primera instancia el reactivo bromuro de 4-metoxibencilo (**6**) a partir del ácido 4-metoxibenzoico (**4**) como se muestra en el Esquema 5. El primer paso comienza con la reducción del derivado de ácido carboxílico (**4**) con hidruro de litio y aluminio (LiAlH₄) para dar formación al respectivo alcohol⁷⁶ (**5**). A continuación dicho alcohol en un segundo paso realiza un ataque al compuesto tribromuro de fósforo (PBr₃), expulsando un átomo de bromo como ion bromuro (Br⁻), con el fin de obtener un buen grupo saliente que sea capaz de ser desplazado por el mismo Br generado anteriormente mediante una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2)⁷⁷ , y por consiguiente, dar origen al compuesto (**6**) deseado.



Esquema 5.-Estrategia de síntesis del reactivo bromuro de 4-metoxibencilo. Reactivos y condiciones: i) 1) LiAlH₄, THF_{anh}, 1h/2) HCl, 1N. ii) PBr₃, Et₂O, 24h.

Una vez obtenido el derivado de haluro de bencilo, se prosiguió con la síntesis de los regioisómeros **3.2(a-d)** y **3.2(a'-d')** del Esquema 4. Para ello se realiza la abstracción del protón 1*H*- de los átomos de nitrógeno de los benzo[*d*]imidazoles **2(a-d)** con ayuda de la base NaH formando los aniones respectivos, los cuales atacan al átomo de carbono que sostiene al grupo saliente átomo de bromo (-Br) del bromuro de 4-metoxibencilo (**6**), desplazándolo. Al igual que para la obtención de los benzo[*d*]imidazoles de la serie 1, este ataque da origen a dos diferentes regioisómeros que presentan al átomo de -Cl en posiciones 5- o 6- del anillo heterocíclico benzo[*d*]imidazol.

Una vez separados y purificados los regioisómeros, estos fueron caracterizados mediante espectroscopia en una dimensión: ¹H-RMN y ¹³C-RMN y también en dos dimensiones: COSY, DEPT-135, HMBC y HSQC. Los compuestos **3.2(a-c)** y **3.2(a'-c')** fueron solubilizados con CDCl₃ y los compuestos **3.2(d)** y **3.2(d')** se utilizó el solvente DMSO-*d*₆ para preparar las muestras para espectroscopía. Una vez obtenidos los resultados, se asignaron completamente las señales para cada protón y carbono de los compuestos, como

también la correcta posición que tiene el átomo de cloro en cada molécula. De la misma forma como se describió anteriormente el análisis de los compuestos **3(d)** y **3(d')**, se realizará la misma explicación para los compuestos **3.2(d)** y **3.2(d')**, ya que ambos pares de regiosómeros presentan al núcleo isoxazol en la posición 2- del anillo principal benzo[d]imidazol.

A continuación, en la Figura 20 y Figura 21, se presenta los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN con la asignación correspondiente para cada protón y carbono del compuesto **3.2(d)**.

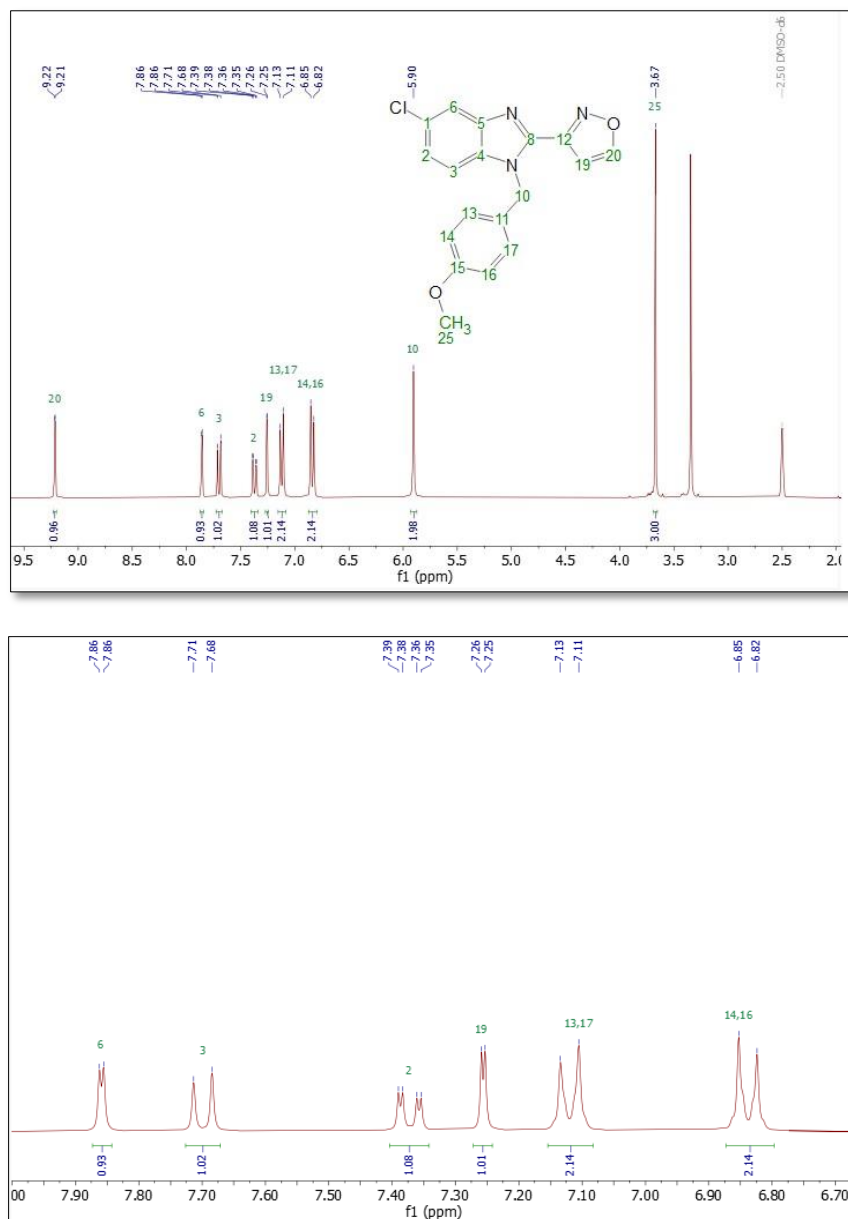


Figura 20.- Espectro ^1H -RMN y ampliación de la zona aromática del compuesto 5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1*H*-benzo[d]imidazol (**3.2d**) con sus respectivas señales y constantes de acoplamiento: ^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9,22 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H_{20}), 7,86 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H

, H₆), 7,70 (d, $J_{orto} = 8,7$ Hz, 1H, H₃), 7,37 (dd, $J_{orto, meta} = 8,7; 2,0$ Hz, 2H, H₂), 7,26 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₁₉), 7,12 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 6,84 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 5,90 (s, 1H, H₁₀), 3,67 (s, 3H, H₂₅).

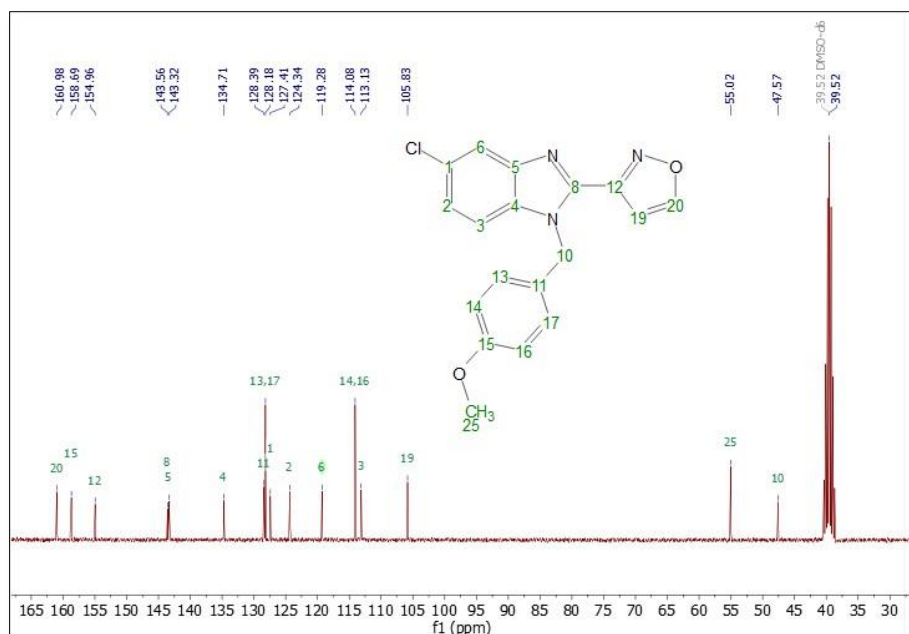


Figura 21.- Espectro ^{13}C -RMN del compuesto 5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzod[imidazol] (**3.2d**) con sus respectivas señales: ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 160,98 (**20C**), 158,69 (**15C**), 154,96 (**12C**), 143,56 (**8C**), 143,32 (**5C**), 134,71 (**4C**), 128,39 (**11C**), 128,18 (**13,17C**), 127,41 (**1C**), 124,34 (**2C**), 119,28 (**6C**), 114,08 (**14,16C**), 113,13 (**3C**), 105,83 (**19C**), 55,02 (**25C**), 47,57 (**11C**).

Para obtener una íntegra asignación de las señales espectrales, se recurrió al análisis del espectro HMBC, así como también se utilizó esta técnica con el fin de asignar correctamente la posición del átomo de cloro en el anillo heterocíclico principal. La Figura 22 muestra una ampliación de este espectro 2D-HMBC con las señales importantes a considerar del compuesto **3.2d**.

Debido a la relación de 3 enlaces de distancia que existe entre el protón metilénico asignado como H₁₀, es posible encontrar el carbono cuaternario asignado con el número 4- (C-4), cuyo desplazamiento es de 134,71 ppm en el espectro de carbono-13. Considerando esto, y teniendo identificado dicho carbono, los únicos protones que tienen una relación de 3 enlaces con este átomo son los asignados como H₂ y H₆, como se ve en la Figura 22, donde dichas relaciones se han destacado en color amarillo. De la misma forma, podemos encontrar una relación de 3 enlaces de distancia entre el protón H₃ y el C-5, lo que permite encontrar dicho desplazamiento a 143,32 ppm. Esta correspondencia se muestra con color azul en la Figura 22.

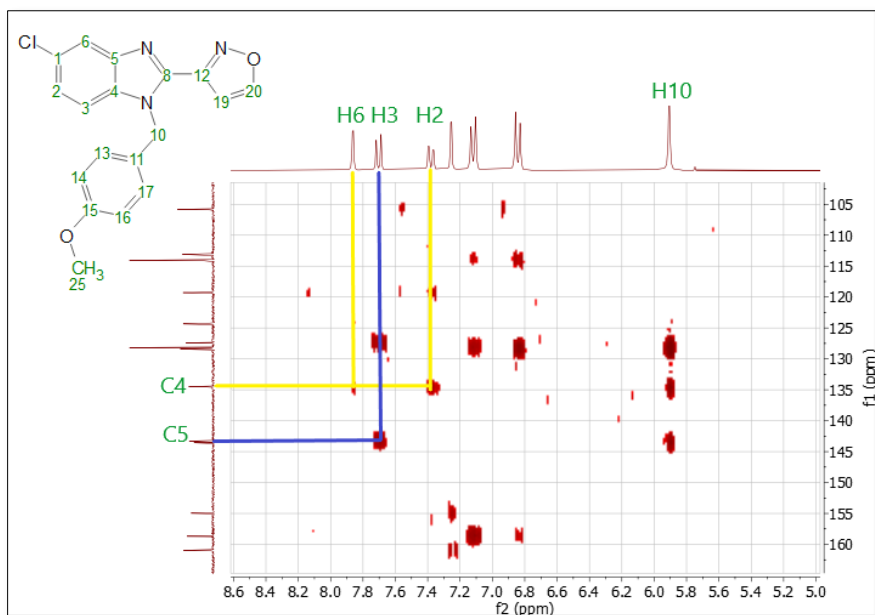


Figura 22.- Espectro bidimensional HMBC del compuesto 5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**3.2d**) con sus señales características entre el carbono 4- (C-4) y los protones H₂ y H₆, y entre el carbono 5- (C-5) y el protón H₃, que corroboran la posición del átomo de cloro.

Por otro lado, también se pueden mencionar algunas consideraciones que corroboran la posición del átomo de Cl- en la posición 5- del anillo de benzo[*d*]imidazol. El protón H₆ que interactúa con C4 y cuyo desplazamiento es de 7,86 ppm en el espectro de ¹H-RMN, cuenta con una constante de acoplamiento pequeña (por su posición meta con respecto al protón H₂) de $J = 2,0$ Hz, confirmando que su átomo vecino (carbono 1) debe sostener al átomo de -Cl. De la misma manera, el protón H₂ que también interactúa con C-4 a tres enlaces de distancia en el espectro HMBC y con desplazamiento de 7,37ppm, corresponde a un doblete de dobletes (dd) mostrando dos tipos distintos de constantes de acoplamiento (interacciones *orto* y *meta* con los protones H₃ y H₆, respectivamente) de $J = 8,7$ Hz y $J = 2,0$ Hz.

Del mismo modo a lo descrito anteriormente, se pueden interpretar los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN para el compuesto **3.2d'** y así obtener la correcta identificación de sus señales y saber la posición del átomo de cloro en el anillo heterocíclico nitrogenado bifusionado. La Figura 23 y Figura 24, exhiben los espectros de resonancia magnética nuclear de protones y carbono, además de las identificaciones para cada señal del compuesto **3.2d'**.

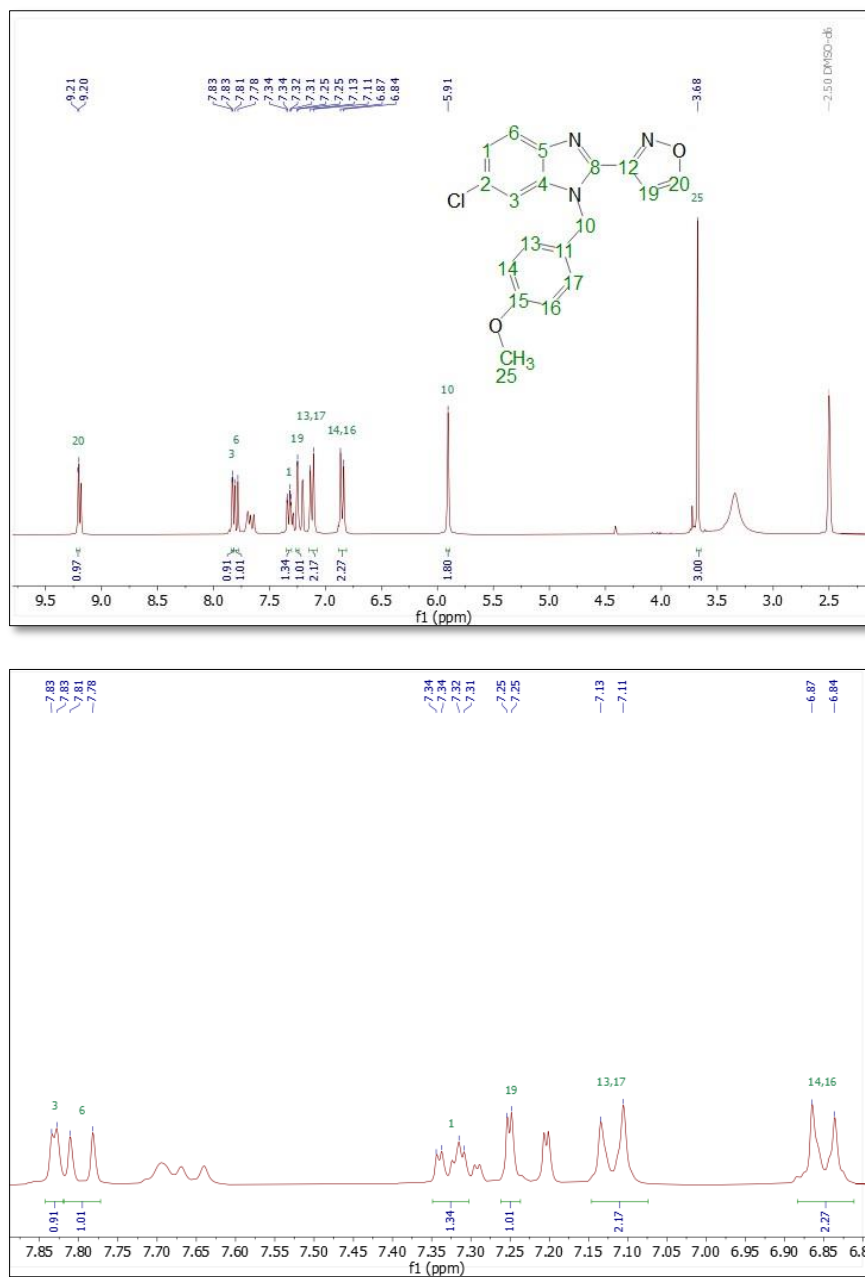


Figura 23.- Espectro ¹H-RMN y ampliación de la zona aromática del compuesto 6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1*H*-benzo[d]imidazol (**3.2d**) con sus respectivas señales y constantes de acoplamiento: ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,21 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₂₀), 7,83 (d, $J_{meta} = 2,0$ Hz, 1H, H₃), 7,80 (d, $J_{ortho} = 8,7$ Hz, 1H, H₆), 7,33 (dd, $J_{ortho, meta} = 8,7; 2,0$ Hz, 1H, H₆), 7,25 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₁₉), 7,12 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 6,85 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 5,91 (s, 1H, H₁₀), 3,68 (s, 3H, H₂₅).

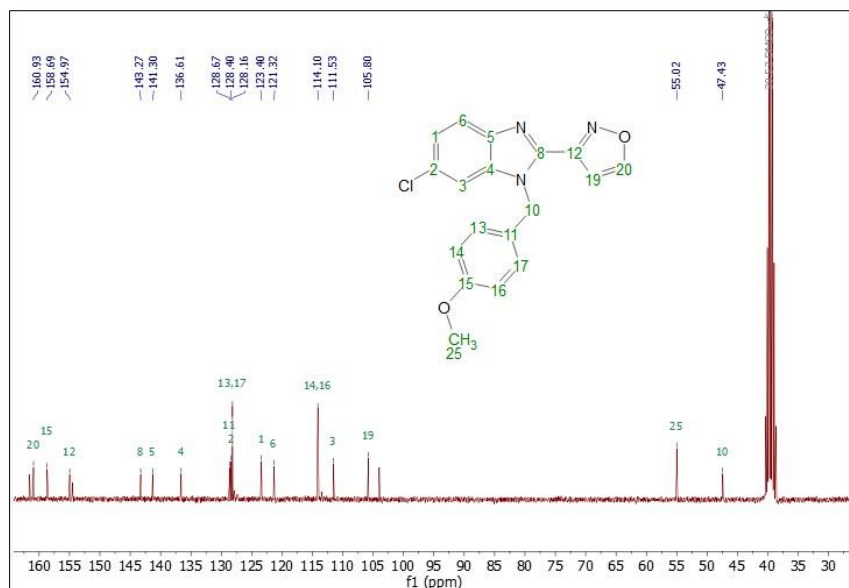


Figura 24.- Espectro ¹³C-RMN del 6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (**3.2d**) con sus respectivas señales: ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 160,93 (**20C**), 158,69 (**15C**), 154,97 (**12C**), 143,27 (**8C**), 141,30 (**5C**), 136,61 (**4C**), 128,67 (**11C**), 128,40 (**2C**), 128,16 (**13,17C**), 123,40 (**1C**), 121,32 (**6C**), 114,10 (**14,16C**), 111,53 (**3C**), 105,80 (**19C**), 55,02 (**24C**), 47,43 (**10C**).

Se puede observar que tanto para el espectro de protones ¹H-RMN y carbonos ¹³C-RMN, hay señales que no corresponden a la estructura de la molécula **3.2 (d)**. Estas impurezas fueron identificables como el intermediario benzo[d]imidazol **2d**. Es decir, el compuesto benzo[d]imidazol sustituido únicamente en la posición 2- con el anillo isoxazol. A pesar de ello, no hubo ningún inconveniente para lograr identificar con certeza este regioisómero.

En la Figura 25 se observa la ampliación del espectro HMBC correspondiente a las señales más importantes que finalmente, en conjunto con los demás análisis espectroscópicos, permiten la correcta asignación de todos los átomos de hidrógeno, carbono y cloro del compuesto. De este modo, es posible identificar la señal del carbono cuaternario asignado con el número 4- (C-4), que se encuentra a 136,61 ppm, gracias a la relación de 3 enlaces que tiene con el protón metilénico asignado como H₁₀. Una vez identificado este carbono cuaternario, el único protón que es capaz de tener relación a 3 enlaces de distancia dentro del anillo bencénico del benzo[d]imidazol con C-4, es aquel asignado como H₆, cuya interacción se representa con líneas naranjas en la Figura 25. El protón doblete H₆ que se encuentra a un desplazamiento aproximado de 7,80 ppm y posee una única constante de acoplamiento de valor $J = 8,7\text{Hz}$, correspondiente a la interacción *orto* que tiene con el protón vecino H₁, y no presenta ninguna interacción de posición *meta* confirmando entonces, la posición del átomo de cloro en la molécula que corresponde al carbono 6-(C-

6). Por otro lado, se puede identificar el desplazamiento del átomo de carbono-5 (C-5), debido a la relación de 3 enlaces de distancia que tiene con los protones H₁ y H₃ los que son fácilmente identificables por sus multiplicidades y constantes de acoplamiento. Las interacciones mencionadas se destacan con líneas moradas en la Figura 25. La interacción entre H₁, H₃ y C-5 hacen identificable el átomo de carbono cuaternario C-5 a 141,30 ppm de desplazamiento en el espectro de carbono-13.

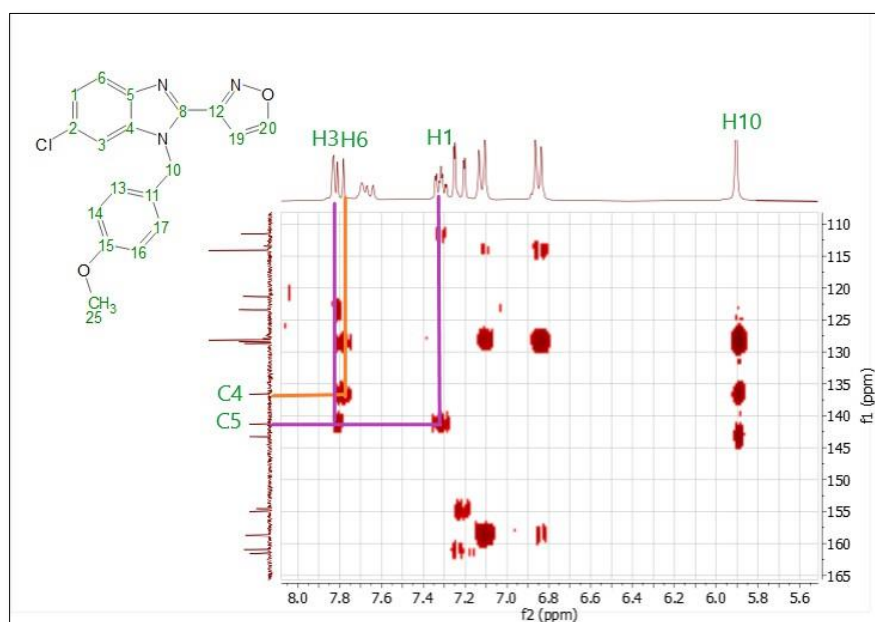
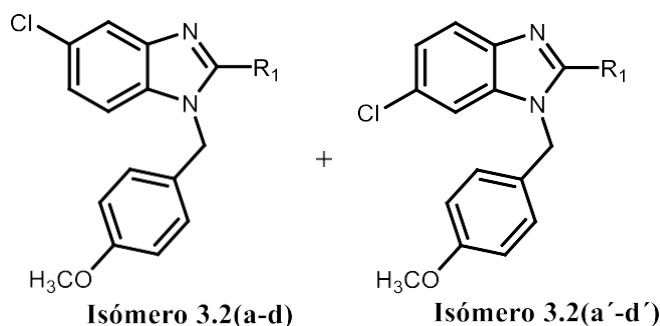


Figura 25.- Espectro bidimensional **HMBC** de la molécula 6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (**3.2d'**) con las señales importantes entre el protón H₆ y el carbono C-4, destacado en naranja, y la relación de distancia entre los protones H₃ y H₆ con el carbono C-5, destacado con color morado.

El análisis espectroscópico anterior, se realizó para la correcta identificación de los compuestos **3.2(a-c)** y **3.2(a'-c')**, que corresponden a los compuestos sustituidos con los anillos de 3-metoxibenceno, 3-piridina y furano respectivamente, en la posición 2- del núcleo benzo[*d*]imidazol, más el grupo 4-metoxibenzoilo en el átomo de nitrógeno de la posición 1. Con los estudios espectroscópicos efectuados se pudo establecer que los productos **3.2(a-d)** tienen al átomo de cloro en la posición 5- en el anillo principal benzo[*d*]imidazólico, y los regioisómeros **3.2(a'-d')**, presentan el átomo de cloro en la posición 6- del mismo anillo heterocíclico.

A continuación, se expone en la Tabla 3 un resumen de los rendimientos obtenidos de cada regioisómero de los derivados de benzo[*d*]imidazoles sintetizados, correspondiente a la serie 1.2. Como se observa, los rendimientos totales fueron por sobre el 50% exceptuando para aquel compuesto que presenta el heterociclo de furano en la posición 2- del núcleo

principal. De igual manera, al determinar los rendimientos detallados de cada regioisómero, se puede establecer una razón aproximada de 1:1 para la obtención de ellos.



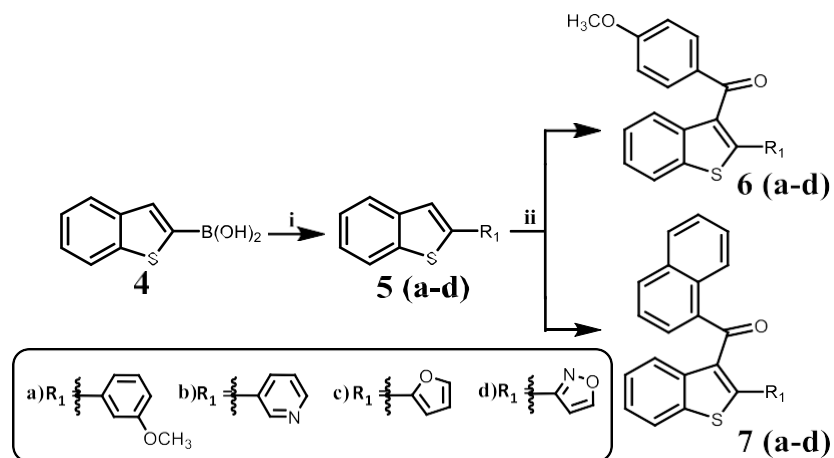
Compuesto	R ₁	Posición átomo cloro	Rendimiento por regioisómero (%)
3.2a		5	31
3.2a'		6	27
3.2b		5	26
3.2b'		6	28
3.2c		5	26
3.2c'		6	20
3.2d		5	28
3.2d'		6	39

Tabla 3.- Resumen de rendimientos para los compuestos finales de la serie de benzo[*d*]imidazoles **3.2(a-d)** y **3.2(a'-d')**, donde se informa los rendimientos detallados de cada regioisómero.

3.1.3.- Síntesis de derivados de benzo[*b*]tiofenos (serie 2 y 3)

La estrategia de síntesis para la obtención de los derivados de benzo[*b*]tiofenos **6(a-d)** y **7(a-d)** (series 2 y 3 respectivamente) está descrita en el Esquema 6. El primer paso de reacción contempla la obtención de los intermediarios **5(a-d)**, a través de distintos acoplamientos de Suzuki-Miyaura⁷⁸ entre el ácido benzo[*b*]tiofeno-2-borónico (**4**) y los diferentes haluros aromáticos propuestos. Luego de la obtención de los intermediarios **5(a-**

d), se realizará una acilación de Friedel-Crafts⁷⁹ con cloruro de 4-metoxibenzoilo o cloruro de 1-naftoilo para obtener los compuestos **6 (a-d)** y **7 (a-d)** respectivamente.



Esquema 6.- Síntesis de benzo[*b*]tiofenos como ligandos cannabinoides. Reactivos y condiciones: distintos haluros aromáticos i) Pd(PPh₃)₄, 2.0 eq. Na₂CO₃, MeOH, tolueno, reflujo, N₂, 4h. ii) Cloruro de 4-metoxibenzoilo o Cloruro de 1-naftoilo, AlCl₃, Cl(CH₂)₂Cl_{anh}, t.a, N₂, 1h.

Como se mencionó anteriormente, el primer paso comprende la obtención de los intermediarios **5(a-d)** a través de las reacciones de Suzuki-Miyaura. Los acoplamientos de Suzuki han demostrado ser un método bastante efectivo para la formación de enlaces carbono-carbono⁸⁰, donde en términos generales involucra un compuesto de organoboro con un haluro orgánico, más la presencia de una base débil o fuerte con cantidades catalíticas de un ligando de paladio 0 (Pd⁰) como tetrakis(trifenilfosfina) paladio (Pd(PPh₃)₄)⁸¹. A grandes rasgos, el ciclo catalítico general para el acoplamiento de Suzuki-Miyaura incluye tres pasos: Adición oxidativa, transmetalación y eliminación reductiva⁸², como se presenta en la Figura 26. En el ciclo catalítico de la figura, la adición oxidativa corresponde al primer paso donde se rompe el enlace del grupo R y el heteroátomo X, formando dos nuevos enlaces con el paladio (Pd⁰), lo que aumenta su estado de oxidación (especie **11**, Figura 26), formando un complejo estable⁸³. Luego, ocurre la transmetalación, donde con la participación de una base, reacciona el compuesto organoborano(R¹M) con el complejo metálico **11**, transfiriendo el grupo R¹, produciendo el intermediario **12**. Finalmente sucede la etapa de eliminación reductiva, donde se forma el nuevo enlace carbono-carbono, con la regeneración simultánea del catalizador Pd⁰^{15,16}.

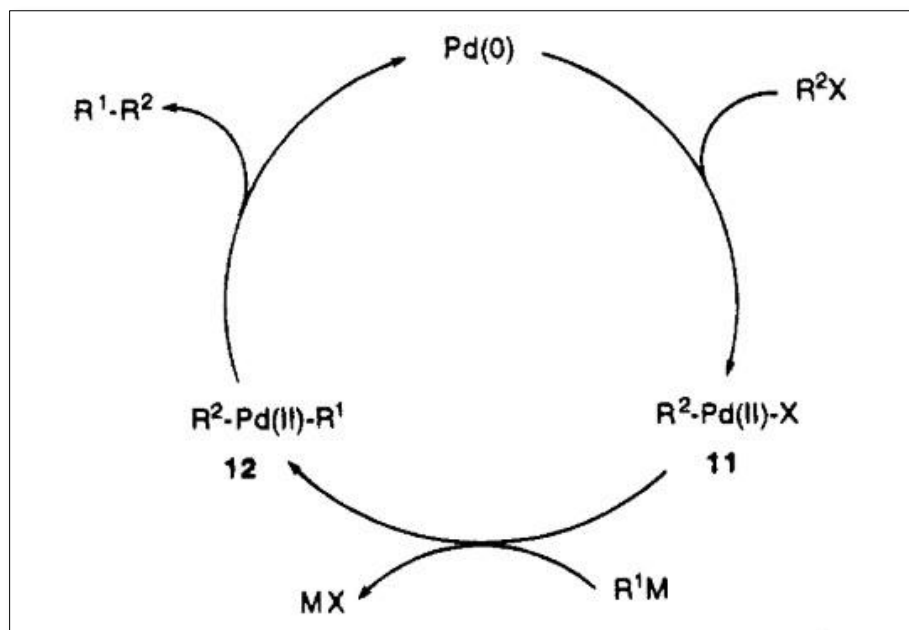


Figura 26.- Ciclo catalítico general para el acoplamiento de Suzuki-Miyaura. (Fig: Miyaura, Norio.; Suzuki, Akira. *Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds*. *Chem. Rev.* **1995**, 95 (7), 2457–2483. <https://doi.org/10.1021/cr00039a007>.)

De los intermediarios **5(a-d)** propuestos en el Esquema 6, solo fue posible sintetizar aquellos que presentan en la posición 2- del benzo[*b*]tiofeno los sustituyentes de 3-metoxibenceno (**5a**) y 3-piridina (**5b**). La síntesis de los otros intermediarios **5(c-d)** no fue exitosa, por lo que no fue viable avanzar al siguiente paso y así obtener los productos **6(c-d)** y **7(c-d)**. Una posible explicación de por qué el acoplamiento de Suzuki no fue exitoso con estos derivados de haluros, es debido quizás a la reactividad que presentan estos derivados en específico. El enlace que une al átomo de bromo con el resto de la molécula aromática debe ser relativamente lábil, ya que autores mencionan que los haluros de arilo con grupos aceptores de electrones, es decir, que retiren densidad de carga, son más reactivos a la adición oxidativa en comparación a aquellos haluros que presentan grupos donadores de electrones⁸², en este caso, los haluros 2-bromofurano y 3-bromoisoxazol que darían origen a los derivados **5c** y **5d** benzo[*b*]tiofénicos por acoplamiento, presentan en sus estructuras átomos de oxígeno, con carácter donador de electrones.

Independiente de los problemas, se realizará una breve explicación de la obtención de los intermediarios **5(a-b)**:

El procedimiento que se utilizó para la síntesis de los dos intermediarios⁸⁴ **5(a-b)** se monitoreó a través de TLC. Se observó que al término de ésta coexistían incipientes señales

correspondientes a los reactivos de partida más dos nuevas señales mayoritarias. Posteriormente, se dilucidó que dichas señales mayoritarias correspondían al producto de acoplamiento cruzado y al co-producto benzo[*b*]tiofeno, de menor polaridad, que ha sufrido protodeboración⁸⁵.

Una vez realizada la reacción de Suzuki-Miyaura para ambos intermediarios, estos se purificaron y caracterización por espectroscopia ¹H-RMN y ¹³C-RMN. Ambas muestras fueron preparadas en CDCl₃. La señal más característica para ambos compuestos es aquella perteneciente al átomo de hidrógeno sobre el átomo de carbono en la posición 3- del anillo benzo[*b*]tiofénico, correspondiente a un singulete alargado.

Con respecto a los rendimientos obtenidos, el derivado 2-(3-metoxifenil)benzo[*b*]tiofeno (**5a**) exhibió un valor de 64%, mientras que el intermediario 3-(benzo[*b*]tiofen-2-il)piridina (**5b**) mostró un 68%. Los rendimientos para ambos intermediarios permitieron avanzar con el siguiente paso de la estrategia sintética propuesta, correspondiente a una reacción de acilación de Friedel-Crafts.

La reactividad del anillo benzo[*b*]tiofeno frente a reacciones de Sustitución Electrofílica Aromática (SEAr), en este caso específico, acilaciones de Friedel-Crafts, es conocida y bien establecida. Debido a los efectos de resonancia que presenta este heterociclo, posee dos lugares con mayor activación nucleofílica, que serían la posición 2- y 3- del anillo. Es por ello que la acilación está más favorecida en esas zonas del heterociclo, dando lugar a la formación de los isómeros correspondientes⁷⁹. Los intermediarios **5(a-b)** al presentar ya un sustituyente en la posición 2-, la acilación ocurrirá exclusivamente en la posición 3- del benzo[*b*]tiofeno.

Esta segunda etapa de reacción con los cloruros de ácido elegidos daría entonces origen a los productos finales **6(a-b)** y **7(a-b)**. Sin embargo, solo fue posible obtener los productos **6a** y **7a** a través de la acilación de Friedel-Crafts entre el compuesto 2-(3-metoxifenil)benzo[*b*]tiofeno (**5a**) con cloruro de 4-metoxibenzoilo y cloruro de 1-naftoilo, respectivamente. La acilación para el intermediario **5b** con los cloruros de ácido elegidos, no fue posible. Es probable que la reacción de acilación a la que fue sometido el derivado 3-(benzo[*b*]tiofen-2-il)piridina (**5b**), no fue posible debido a que su estructura presenta una porción de piridina al presentar un átomo de nitrógeno con electrones no enlazantes, estos se coordinarían con el ácido de Lewis tricloruro de aluminio⁸⁶ (AlCl₃) empleado. De este modo, el derivado de benzo[*d*]tiofeno precipitaría en el medio de reacción. La Figura 27

muestra la formación de la sal de benzo[*b*]tiofeno entre el ácido AlCl_3 y el nitrógeno piridínico de este derivado.

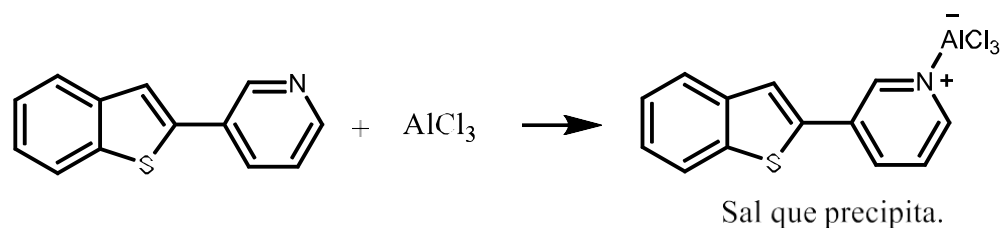


Figura 27.- Posible reacción entre el intermediario **5b** y AlCl_3 , que imposibilita la acilación de Friedel-Crafts.

Posterior a la purificación y obtención de los productos finales **6a** y **7a**, estos se caracterizaron mediante técnicas de resonancia ^1H -RMN y ^{13}C -RMN. Para ambos productos se encontró la integración total de todos los hidrógenos de las moléculas, así como también la cantidad correcta de señales de carbono.

Los rendimientos conseguidos para ambos ligandos **6a** y **7a** fue de 40% y 43% respectivamente, lo cual permite tener la masa necesaria para continuar con los ensayos biológicos.

Finalmente, los objetivos sintéticos concluyeron logrando en su totalidad una cantidad de dieciocho compuestos diferentes. Ocho de ellos pertenecen a la serie **1** correspondiente a los benzo[*d*]imidazoles con puente carbonilo, otros ocho compuestos pertenecen a la serie **1.2** de benzo[*d*]imidazoles con puente metilénico, y dos compuestos finales corresponden a derivados de benzo[*b*]tiofeno acilados en posición 3- con un grupo 4-metoxibenzoilo y narftoilo.

Los compuestos finales fueron preparados para seguir con los ensayos de citotoxicidad. No obstante, solo se ensayaron 16 compuestos, dejando de lado los compuestos **3.2a** y **3.2a'**, que eran aquellos benzo[*d*]imidazoles con el puente metilénico y sustituidos en la posición 2- con 3-metoxibenceno.

3.2-Ensayos biológicos: resultados y discusión.

3.2.1- Ensayos de citotoxicidad *in vitro* de los compuestos a 10 μ M, mediante el método colorimétrico de reducción de MTT.

Como ya ha sido reportado, variados estudios indican que la activación de los receptores CB₁ y CB₂ induciría apoptosis y tendría la capacidad de inhibir el crecimiento celular tumoral ⁸⁷⁻⁸⁸⁻⁸⁹⁻⁹⁰⁻⁹¹⁻⁹². Es decir, el agonismo cannabinoide podría provocar una muerte programada de células neoplásicas bajo un mecanismo controlado. Bajo este antecedente, es posible ejecutar experimentos de viabilidad celular en cultivos cancerígenos cuyas distintas líneas celulares expresen o no los receptores cannabinoide. Si un agonista ejerce citotoxicidad selectivamente frente a una línea celular que expresa en grandes cantidades algunos de los receptores CB₁ o CB₂, y no lo hace frente a una línea celular que no exprese estos mismos, podría atribuirse efectivamente a su carácter agonista ejercido sobre los receptores cannabinoide. De este modo, para determinar un eventual comportamiento agonista de los compuestos sintetizados, estos fueron sometidos a pruebas de citotoxicidad en líneas celulares que no expresan cuantiosamente los receptores cannabinoide, y a pruebas de citotoxicidad en líneas celulares que si los expresan.

Otro de los propósitos de los ensayos biológicos fue evaluar la posible selectividad de los compuestos en los receptores CB₂ por sobre los receptores CB₁. Para ello, se han elegido 3 líneas celulares diferentes para realizar los ensayos: HEK293-T correspondientes a células embrionarias de riñón humano, línea HL-60 proveniente de leucemia promielocítica humana, que expresan en gran cantidad el receptor CB₂ y la línea celular U-87MG de cerebro humano (glioblastoma astrocitoma), que expresa en mayor cantidad al receptor CB₁. En primera instancia, se realizaron las pruebas de citotoxicidad de los 16 compuestos a una concentración de 10 μ M con el fin de obtener resultados preliminares. Estos ensayos se realizaron a 72 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂. También, se incluyó un control de células no tratadas (NT), el control del vehículo (DMSO) usado como co-solvente para disolver cada uno de los compuestos, un control de muerte celular Tritón X-100 (TX100) y un agonista sintético conocido, WIN55,212-2 a una concentración de 5 μ M, para ambos receptores cannabinoide (CB₁ y CB₂).

El Gráfico 1 expone los valores de porcentaje de viabilidad celular de los 16 compuestos en la línea celular HEK293-T.

HEK293T cells, 72h

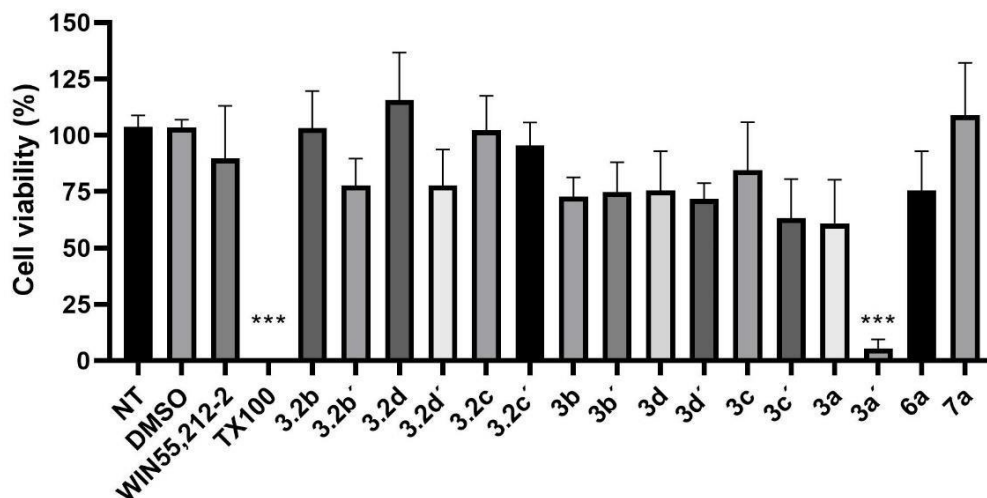


Gráfico 1.-Porcentaje de viabilidad celular de los 16 compuestos sintetizados como ligandos del receptor CB₂ en la línea celular HEK293-T. Se realizó el ensayo de los compuestos a una concentración de 10 μ M por 72 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂. Las barras de los gráficos están normalizadas con respecto al vehículo utilizado (DMSO) y con sus barras de error como la media \pm error estándar de la media, con un tamaño muestral de n = 3 para todos los compuestos. ***= p < 0,0001. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una sola vía.

Se puede ver en el Gráfico 1, que la mayoría de los compuestos no disminuye significativamente la viabilidad celular a concentración de 10 μ M, especialmente las moléculas **3.2b**, **3.2d**, **3.2c**, **3.2c'** y **7a**, que no presentan ningún efecto de muerte celular sobre este tipo de células, y por consiguiente, serían inocuas frente a esta línea sana de riñón, siendo una característica positiva. Asimismo, WIN55,212-2 y el ligando **3c**, disminuyen aproximadamente en un 10% la vida celular. El único compuesto que manifiesta una baja considerable de la viabilidad celular en comparación con los otros es **3a'**, que presenta una media de 5,38%, siendo considerado como un agente tóxico para este tipo de células. Los compuestos **3.2b'**, **3.2d'**, **3b**, **3b'**, **3d**, **3d'** y **6a** presentan una reducción de la viabilidad de aproximadamente un 30%, mientras que los compuestos **3c'** y **3a**, disminuyen la viabilidad de esta línea celular en un 40%. Con estos datos podría desprenderse que los compuestos de síntesis para una línea celular no neoplásica de riñón serían de baja toxicidad, excepto por **3c'**, **3a** y **3a'**.

Adicionalmente, el Gráfico 2 muestra los porcentajes de viabilidad celular de los 16 compuestos en la línea U-87MG que expresa el receptor CB₁ en una densidad considerable, siendo ésta posiblemente un buen modelo para observación.

U87MG cells 72h

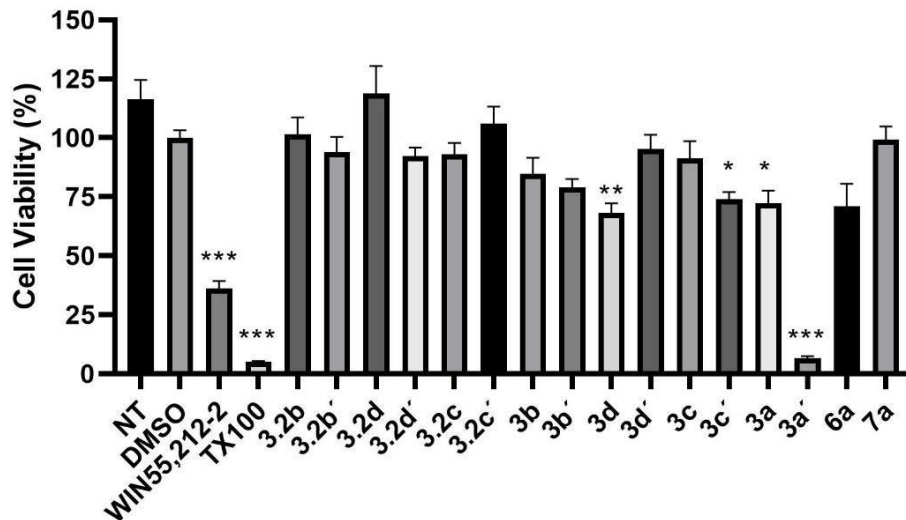


Gráfico 2.- Porcentaje de viabilidad celular de los 16 compuestos sintetizados como ligandos del receptor CB₂ en la línea celular U-87MG. Se realizó el ensayo de los compuestos a una concentración de 10 μ M por 72 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂. Las barras de los gráficos están normalizadas con respecto al vehículo utilizado (DMSO) y con sus barras de error como la media \pm error estándar de la media, con un tamaño muestral de n = 3 para todos los compuestos. ***= p < 0,0001, **= p < 0,0091, *= p < 0,0426. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una sola vía.

Con respecto a los resultados expuestos en el Gráfico 2, se observa que los compuestos **3.2b**, **3.2b'**, **3.2d**, **3.2d'**, **3.2c**, **3.2c'**, **3d'**, **3c**, y **7a** presentan una baja, o bien nula disminución de la viabilidad sobre células U-87MG. Los porcentajes de media para estos compuestos oscilan entre 118,86% a 91,21%, es decir, no se logra ver ningún efecto de muerte celular generado por estos ligandos sobre la línea celular estudiada. Asimismo, se vislumbra que el compuesto **3b'** disminuye la viabilidad celular en un 20% aproximadamente, por mientras que los derivados **3d**, **3c'**, **3a** y **6a**, generan una disminución de la viabilidad celular de casi el 30%. Con respecto a WIN55,212-2, este presenta una media de 36,21% para el ensayo MTT. Comparando los resultados obtenidos en la línea celular HEK293-T, el derivado disminuyó considerablemente la cantidad de células vivas, lo cual es un resultado esperable para este agonista cannabinoide. Lo anterior es considerando lo ya expuesto para esta línea celular que presenta una mayor expresión del receptor CB₁, más la sugerencia bibliográfica de que el agonismo sobre los receptores cannabinoideos promovería la muerte celular.

En cuanto a los resultados obtenidos para la línea celular HL-60, el Gráfico 3 muestra el porcentaje de viabilidad celular de los 16 compuestos ensayados.

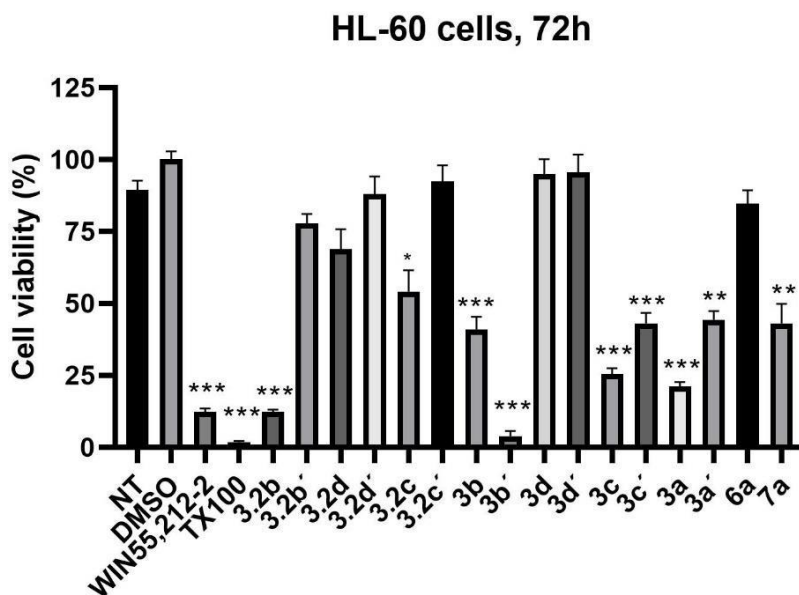


Gráfico 3.- Porcentaje de viabilidad celular de los 16 compuestos sintetizados como ligandos del receptor CB₂ en la línea celular HL-60. Se realizó el ensayo de los compuestos a una concentración de 10 μ M por 72 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂. Las barras de los gráficos están normalizadas con respecto al vehículo utilizado (DMSO) y con sus márgenes de error como la media \pm error estándar de la media, con un tamaño muestral de n = 3 para todos los compuestos. ***= p < 0,0001, **= p < 0,0010, *= p < 0,0121. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una sola vía.

Con relación a los resultados expuestos en el Gráfico 3, se observan cambios importantes en la viabilidad celular por parte de ciertos derivados sintetizados. Los compuestos **3.2d'**, **3.2c'**, **3d**, **3d'** y **6a**, inducen una disminución de la viabilidad en un 10% relativamente, siendo, por tanto, agentes no tóxicos. De la misma forma, los ligandos **3.2b'** y **3.2d**, causan una reducción de la viabilidad celular en un 25%. Por otro lado, las moléculas **3.2c**, **3b**, **3c'**, **3a'** y **7a** muestran una disminución de la viabilidad más notoria en comparación a las otras líneas estudiadas. La media de supervivencia de estas células varía entre un 54% a 40%. Asimismo, **3c** y **3a** tienen una media de vida celular de 25,4% y 21,1% respectivamente, por lo que calificarían como agentes citotóxicos para esta línea celular, y presuntamente podrían ser agonistas del receptor CB₂. Igualmente, el derivado sintético **3.2b** y WIN55,212-2 exhiben una media de viabilidad del 12%, correspondiente a un valor mucho más bajo que los expuestos anteriormente. Finalmente, el compuesto **3b'** presenta una media de viabilidad celular de 3,8%, siendo bastante tóxico para esta línea celular.

Nuevamente, es plausible pensar que los compuestos más tóxicos para las células HL-60 (**3.2b**, **3b'**, **3c** y **3a**) podrían ejercer dicho efecto mediante agonismo cannabinoide sobre el receptor CB₂ cuya expresión en esta línea es considerable. No obstante, para determinar certeramente esta hipótesis, es necesario efectuar más análisis y contar con mayor evidencia.

La siguiente Tabla 4 presenta un resumen de la media de viabilidad celular de los 16 compuestos más WIN55,212-2 (utilizado como control positivo) en las líneas celulares HEK293-T, U-87MG y HL-60.

Compuestos	HEK293-T (%)	U-87MG (%)	HL-60(%)	HL-60/U-87MG
WIN55,212-2	89,6	36,21	12,2177	0,340174
3.2b	103,12	101,6	12,34	0,121441
3.2b'	77,7	93,93	77,9	0,829341
3.2d	115,7	118,86	68,8	0,578832
3.2d'	77,66	92,87	87,98	0,947387
3.2c	102,07	92,94	54,07	0,581876
3.2c'	95,5	105,92	92,43	0,87272
3b	72,71	84,78	40,94	0,482926
3b'	74,71	78,94	3,88	0,049189
3d	75,39	68,23	94,88	1,39067
3d'	71,71	95,21	95,58	1,003952
3c	84,44	91,29	25,42	0,27855
3c'	63,41	73,91	43,04	0,582426
3a	60,87	72,37	21,14	0,292169
3a'	5,38	6,71	21,14	6,598749
6a	75,53	71,11	84,61	1,189878
7a	108,95	99,36	43,08	0,433582

Tabla 4. - Resumen de los valores de porcentaje de viabilidad celular en los ensayos de citotoxicidad mediante método de colorimetría por reducción de MTT de los 16 ligandos a 10µM, y el ligando agonista de ambos receptores WIN55,212-2 a una concentración de 5 µM (control positivo). Asimismo, se expresan los valores de las razones de medias como *factor de selectividad* de la viabilidad celular para las líneas HL-60/U-87MG (CB₂/CB₁). Los valores bajos sugerirían una mayor selectividad por el receptor CB₂ y valores altos sugerirían selectividad por el receptor CB₁.

Luego de haber realizado este experimento preliminar cuyos resultados se han expuestos a una concentración fija en los gráficos 1, 2 y 3, se calculó la división de la media de la viabilidad celular para las líneas HL-60 y U-87MG (HL60/ U-87MG). Esta razón daría una idea de la selectividad de los compuestos sintetizados por el receptor CB₂ sobre el receptor CB₁, y de esta forma, decidir qué compuestos serían adecuados para continuar con los siguientes estudios. Los valores de razón de medias más bajos indicarían un mayor efecto de muerte celular en la línea HL-60 (receptor CB₂) en comparación a la línea U-87MG (receptor CB₁), sugiriendo una mayor selectividad hacia un receptor por sobre el otro como ya ha sido mencionado.

De la misma forma, se observa que la Tabla 4 resume la razón de las medias como *factor de selectividad* (HL-60/U-87MG - CB₂/CB₁) anteriormente discutido para cada uno de los compuestos sintetizados y ensayados en experimentos de viabilidad celular. Se recalcan aquellos compuestos que presentaron menor valor de *factor de selectividad*.

Se ha destacado Tabla 4 los compuestos que presentaron valores del *factor de selectividad* bajos, estos son: el ligando **3.2b**, **3b'**, **3c** y **3a**. De la misma forma, es necesario analizar los resultados de muerte celular de estos compuestos sobre la línea celular HEK293-T, que como ya ha sido mencionado corresponde a una línea sana de células. De este modo, sería deseable que los ligandos no promuevan un efecto de muerte celular importante sobre las células embrionarias de riñón humano, ya que solo se busca la selectividad de muerte celular para la línea HL-60. En este sentido, los compuestos **3.2b**, **3b'**, **3c** y **3a** presentan una reducción de la viabilidad celular en la línea HEK293-T de 0%, 26%, 16% y 39% respectivamente. Por los valores recién expuestos, el único compuesto que muestra una disminución de la viabilidad celular relativamente elevado es **3a**. De la misma forma, se realizaron estudios de citometría de flujo para comprobar el mecanismo de muerte celular por el cual estaban actuando los ligandos elegidos.

3.2.2.- Ensayo de muerte celular por citometría de flujo.

Con el fin de evaluar el mecanismo de muerte celular por el cual está disminuyendo la viabilidad celular de la línea HL-60 al ser tratadas con los compuestos **3.2b**, **3b'**, **3c** y **3a**, se realizaron ensayos de citometría de flujo. Este método permite la cuantificación celular midiendo diversas características como tamaño de las células a analizar, granularidad, morfología, entre otras. De este modo, es que fue utilizada esta técnica para determinar los marcadores apoptóticos o necróticos que una célula manifiesta según ocurra uno u otro proceso de muerte. La técnica empleada evalúa la unión de la anexina V marcada con

fluorescencia y/o una sonda para la fosfatidilserina (PS) de los fosfolípidos de la membrana, junto con yoduro de propidio (PI) que ingresa a las células con membranas dañadas o comprometidas⁹³. La forma de actuar de anexina V se explica de la siguiente manera: los fosfolípidos de la membrana plasmática se distribuyen asimétricamente entre las valvas interior y exterior de dicha membrana. La fosfatidilcolina y la esfingomiélinina están expuestas en la lámina externa de la bicapa lipídica, mientras que la fosfatidilserina se encuentra en la superficie interior. Durante la apoptosis, esta asimetría se altera y la fosfatidilserina se invierte quedando expuesta en la superficie exterior de la membrana plasmática. Debido a que la proteína anticoagulante anexina V se une con alta afinidad con la fosfatidilserina, la anexina V conjugada con un fluorocromo se ha convertido en un marcador de células apoptóticas. Por otro lado, el yoduro de propidio se une al ADN, pero no puede atravesar la membrana celular pasivamente, sino que lo hace en células que poseen una membrana dañada, que es uno de los primeros cambios que se observa en necrosis junto con el daño de la estructura interna de la célula. Esta condición es esencial para que la sonda PI actúe adecuadamente⁹⁴.

La interpretación efectuada para la citometría de flujo es a través de la observación de 4 zonas con poblaciones (Figura 28). Las células vivas no apoptóticas teñidas tienen un mínimo de fluorescencia verde debido a la conjugación del fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (anexina V-FITC), así como también presentan fluorescencia roja mínima (PI) (Población A). En las primeras etapas de apoptosis las células se tiñen de verde, pero aún excluyen el PI y, por lo tanto, continúan sin tener una fluorescencia roja significativa (subpoblación B). En las últimas etapas de la apoptosis, las células muestran una intensa fluorescencia verde y roja (subpoblación C). Por último, los núcleos aislados, las células con membranas dañadas y las células apoptóticas muy tardías se tiñen rápidamente con PI y es posible que no se una anexina V (subpoblación D)⁹⁵.

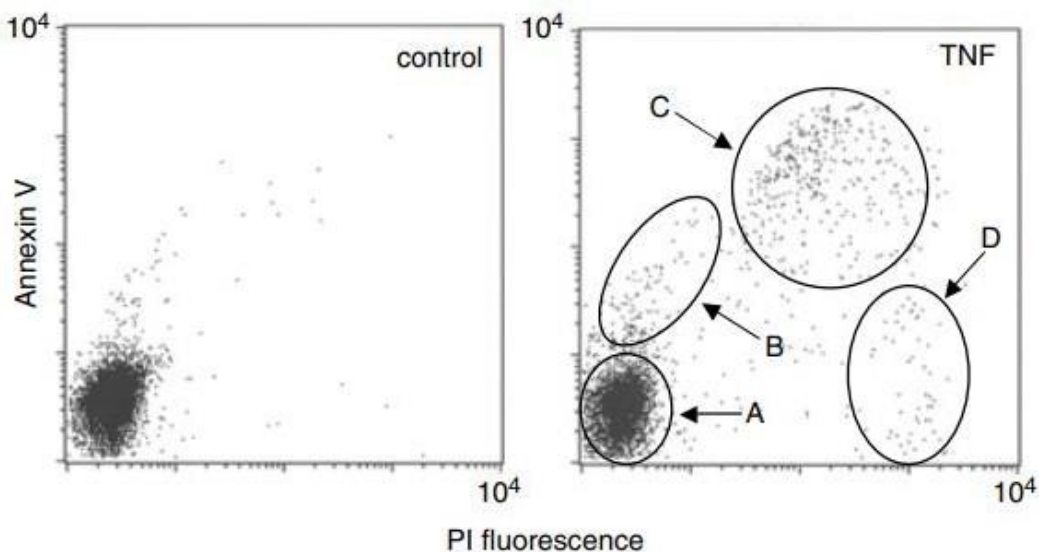


Figura 28.- Detección de células apoptóticas tempranas y tardías después de la tinción con anexina V –FITC y PI (Figura de: Piotr Pozarowski, Jerzy Grabarek, and Zbigniew Darzynkiewicz. *Current Protocols in Cell Biology*. **2003**, 18.8.1-18 (8.8.33).

Los resultados obtenidos para el ensayo de citometría de flujo para los compuestos **3.2b**, **3b'**, **3c** y **3a**, se observan en el Gráfico 4. Los datos se procesaron para ser representados mediante un gráfico de barras donde el eje de las ordenadas (Y) indica el porcentaje de población celular.

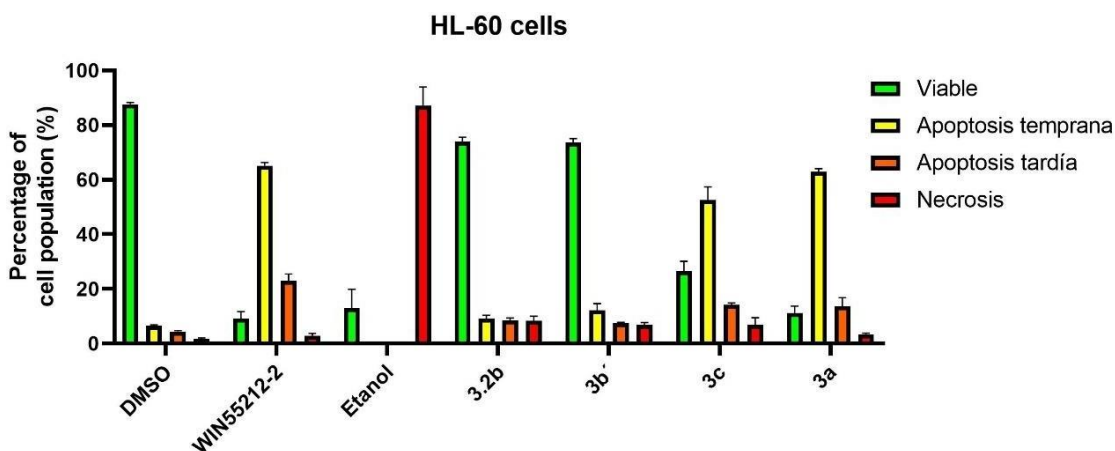


Gráfico 4.- Resultados de ensayo citometría de flujo para compuestos **3.2b**, **3b'**, **3c** y **3a**. También se observan resultados para el control del vehículo (DMSO), el agonista WIN 55,212-2 y etanol.

Del análisis de los datos expuestos en el Gráfico 4 se desprende que el control del vehículo DMSO, tiene un porcentaje de 87,6% de población celular viable. El compuesto WIN55,212-2, agonista conocido para el receptor CB₂, que fue evaluado a una concentración de 5µM, presenta una población mayoritaria de apoptosis temprana del 65%, lo cual correspondería a un control de apoptosis y fortalecería la hipótesis de que estaría ejerciendo una muerte celular vía agonismo cannabinoide. Para las células tratadas con etanol, se observa en su mayoría una población celular no viable por necrosis siendo ésta del 87%, lo que corresponde a un buen control necrótico del ensayo.

Con respecto a los compuestos, se observa que **3.2b** y **3b'** tienen porcentajes de población viable de un 73%, por lo que no se observa mayor efecto de estos compuestos sobre la línea celular HL-60. Por otro lado, el compuesto **3c** muestra un porcentaje de células no viables por apoptosis temprana de un 52,6% y un 26% de población de células viables. Esto indicaría una fuerte inclinación de muerte celular a través de apoptosis temprana principalmente. Finalmente, el compuesto **3a** exhibe una población del 62,9% con muerte de apoptosis temprana y 13,6% de apoptosis tardía.

Los resultados obtenidos para los compuestos **3c** y **3a** confirmarían que el método de muerte celular que ejercen sobre la línea celular HL-60, sería predominantemente vía apoptosis temprana. Esto sugiere que los ligandos ensayados estarían ejerciendo su acción citotóxica mediante un agonismo cannabinoide sobre el receptor CB₂. Estos resultados se complementan con los previamente obtenidos para estos mismos compuestos en el ensayo de MTT (Gráfico 3), los que exponían una viabilidad celular del 25% en la línea celular de HL-60 al ensayar la citotoxicidad de estos derivados.

Por otro lado, para los compuestos **3.2b** y **3b'**, se observa que el porcentaje de población viable en el ensayo por citometría de flujo no concuerda con los ensayos realizados de viabilidad celular por MTT. En los últimos se exponía un porcentaje de viabilidad celular en torno al 12% para ambos compuestos por MTT (Gráfico 3). Esto podría explicarse a un fenómeno en que ambos compuestos podrían disminuir la viabilidad de forma extremadamente tardía (principalmente por necrosis posiblemente), lo que explicaría el alto porcentaje de población viable en los ensayos por citometría de flujo. Además, es preciso mencionar que el ensayo de MTT exhibe limitaciones, siendo un ensayo inespecífico, donde no se conoce del todo qué organelos, enzimas y biomoléculas están involucradas en la reducción del MTT, y por tanto, de los mecanismos celulares de muerte implicados. De la misma forma, es un ensayo donde los resultados son multifactoriales, dependiendo de

parámetros como la cantidad de células a sembrar, la incubación del MTT, la composición del medio celular, entre otras⁹⁶.

3.2.3.- Análisis estructura-actividad

Con respecto a los resultados obtenidos de viabilidad celular y la estructura química que presentan los compuestos **3.2b**, **3b'**, **3c** y **3a**, podemos ver que los compuestos **3.2b** y **3b'** corresponden a los derivados benzo[*d*]imidazólicos sustituidos en la posición 2- del núcleo con el anillo de piridina, donde la principal diferencia es el puente metileno o carbonilo y la posición del átomo de cloro para cada uno de ellos. Pareciera indicar que el uso de estos tipos de puente no tiene gran influencia en la muerte celular, ni tampoco la posición 5- ó 6- en la que se encuentre el átomo de cloro en este tipo de moléculas. Sin embargo, las estructuras de los compuestos **3c** y **3a** presentan el puente carbonilo y tienen como sustituyente en la posición 2- al anillo de furano y 3-metoxibenceno respectivamente, con el átomo de cloro en la posición 5- del anillo de benzo[*d*]imidazol. Analizando las cuatro estructuras y observando también los resultados de viabilidad celular por MTT, se puede confirmar que los núcleos π -conjugados con átomos electronegativos, nitrógeno u oxígeno, encontrados en los anillos de furano y piridina, pueden participar en el diseño de ligandos selectivos por el receptor CB₂, aunque al incluir un sustituyente como el isoxazol no marca una diferencia sobre la selectividad entre el receptor CB₁ o CB₂, teniendo porcentajes de viabilidad relativamente altos para las líneas celulares estudiadas. De la misma forma, al parecer es preferible que el puente carbonilo se incluya en este diseño por sobre el puente metilénico. Con respecto al átomo de cloro en la posición 5- o 6- del anillo heterocíclico principal, se puede ver que aparentemente el sitio de unión de estas moléculas con el receptor CB₂ soporta átomos halógenos electronegativos y grandes como lo es el cloro y es preferible que se encuentre en la posición 5- del núcleo benzo[*d*]imidazólico, ya que de los cuatro compuestos selectivos por el receptor CB₂, tres tienen este átomo de cloro en ésta posición. Una de las interacciones que podría estar favoreciendo el cloro con el sitio de unión del receptor CB₂ sería del tipo agujero sigma o "*sigma hole*"⁹⁷, siendo una interacción característica de los halógenos. La Figura 29 resume los análisis estructura-actividad antes mencionados.

Con respecto a los derivados de benzo[*b*]tiofeno, correspondientes a los compuestos **6a** y **7a**, no se encontró una viabilidad celular adecuada o alguna preferencia por los receptores CB₁ o CB₂, aunque debido a los problemas sintéticos, no se pudo evaluar más compuestos

para realizar una discusión con mayores fundamentos sobre relaciones estructura-actividad.

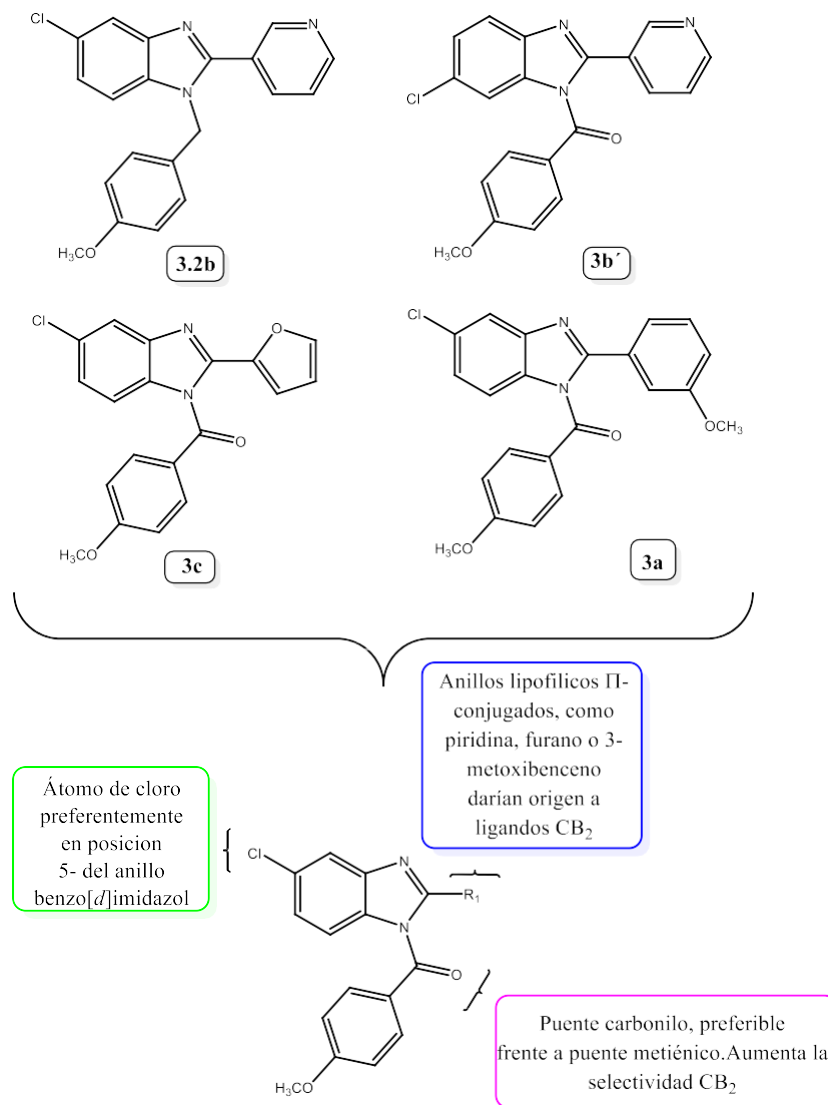


Figura 29.- Compuestos sintetizados con selectividad por el receptor CB₂ y análisis estructura-actividad, indicando los sustituyentes presuntamente favorables.

4.-CONCLUSIONES.

Se sintetizaron derivados de benzo[*d*]imidazol y benzo[*b*]tiofenos mediante métodos sintéticos clásicos como también novedosos, obteniéndose rendimientos aceptables en cuanto a la producción de los precursores como también de los compuestos finales. De la misma forma, con respecto a los benzo[*d*]imidazoles se consiguió mediante diversos métodos de purificación separar compuestos regioisómeros, además de realizar su correcta identificación y posición del átomo de cloro en este tipo de ligando propuesto. Con respecto a los derivados benzo[*b*]tiofénicos, debido a los problemas con el paso de obtención de dos de los precursores faltantes, además de los problemas con el paso de acilación, será necesario considerar otra ruta sintética para obtener la gama completa de moléculas previamente propuestas. Por consiguiente, el objetivo de obtener los derivados benzo[*b*]tiofenos logró cumplirse parcialmente.

Por otro lado, los ensayos de viabilidad celular permitieron dilucidar la posible selectividad de cuatro compuestos por el receptor CB₂, sobre el receptor CB₁, mediante la evaluación de éstos por medio de la viabilidad celular que ejercen en líneas que expresan o no ambos receptores cannabinoides. Los cuatro compuestos selectivos son aquellos sustituidos en la posición 2- del anillo principal de benzo[*d*]imidazol con grupo furano, piridina y 3-metoxibenceno, **3.2b**, **3b'**, **3c** y **3a**, respectivamente. Esto confirmaría la posibilidad de incluir sustituyentes de anillos heterocíclicos con átomos electronegativos para el diseño de ligandos selectivos por el receptor CB₂. De la misma forma, se encontró que al parecer la posición 5- del átomo de cloro beneficiaría la selectividad por el blanco farmacológico objetivo, así como también un puente carbonilo. Igualmente, gracias a los ensayos de citometría de flujo se pudo corroborar que los compuestos **3c** y **3a** provocan muerte celular mayoritariamente mediante un mecanismo por apoptosis temprana en la línea celular HL-60, lo que sugeriría y confirmaría con las evidencias expuestas que estos compuestos estarían actuando mediante un agonismo cannabinoide hacia dicha línea celular que expresa mayoritariamente receptores CB₂.

Con respecto a los compuestos **3.2b** y **3b'**, como los resultados obtenidos sobre la viabilidad celular, evaluados mediante el método de reducción de MTT y los ensayos de citometría de flujo no son congruentes. Se podría aludir esta inconsistencia en los resultados con que estos compuestos inducirían muerte celular en la línea celular HL-60, a través de un mecanismo distinto a los estudiados por citometría de flujo, lo que sugiere que no estarían ejerciendo un agonismo cannabinoide en el receptor CB₂, por lo que sería

necesario realizar futuros estudios para comprobar su mecanismo de muerte celular, además de considerar los errores asociados a los ensayos de viabilidad propuestos.

5.-MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1.-Técnicas e instrumentos.

5.1.2.- Líneas celulares

Se utilizaron como modelos las líneas celulares HL-60, HEK293T y U87MG provenientes de leucemia promielocítica humana, células embrionarias de riñón humano y cerebro humano (glioblastoma astrocitoma), respectivamente. HL-60 se cultivó en medio de cultivo RPMI (MCC-RPMI) (medio RPMI complementado con 20% de suero bovino fetal y 1000 U/mL de penicilina + estreptomycin). HEK293T se cultivó en medio EMEM (complementado con 10% de suero fetal bovino y 1000 U/mL de penicilina + estreptomycin). U87MG se cultivó con medio DMEM (complementado con 10% de suero fetal bovino y 1000 U/mL de penicilina + estreptomycin).

5.1.3.- Ensayo de viabilidad celular por MTT.

Las células previamente tratadas con los compuestos de síntesis de concentración 10 μ M se les realizó el ensayo de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Este ensayo se basa en que las células con metabolismo activo convierten el MTT en un producto llamado formazán, de color púrpura, el cual presenta un máximo de absorbancia cercano a 570nm. Las estructuras de MTT y formazán se observan en la Figura 30. De la misma forma, las células muertas no tienen la capacidad de convertir el MTT a formazán, por lo que convierte a este ensayo en una herramienta útil para cuantificar viabilidad celular⁹⁸.

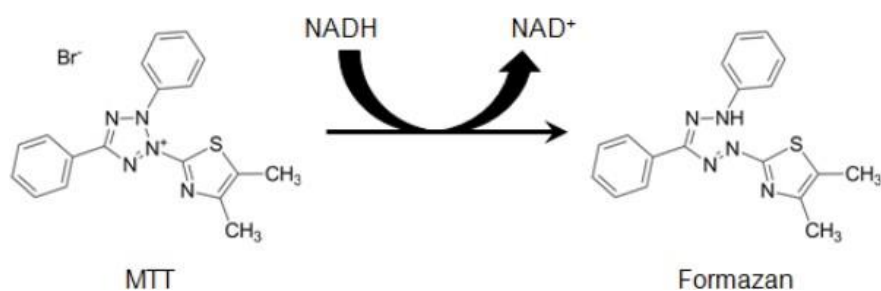


Figura 30.- Estructuras del MTT y el producto coloreado Formazán.

Para realizar el ensayo se añadió 20 μ L de una solución previamente preparada de MTT con una concentración de 5 μ g/ml a cada pocillo de una microplaca que poseía una cantidad

de células adecuadas y determinada, más los distintos compuestos de síntesis a una concentración 10µm, siendo incubadas por 72 horas. Las células, luego de añadir MTT, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ por 2,5 horas. Posteriormente, los cristales de formazán fueron solubilizados con 100 µL de una solución de dodecilsulfato sódico (SDS) (acidificado con HCL 0,01M con pH 7.2) dejándose en incubación por 24 horas. Los resultados se obtuvieron mediante la lectura espectrofotométrica a 570nm en el lector de microplacas Agilent BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader.

5.1.4.- Ensayo de muerte celular por citometría de flujo.

Para evaluar el tipo de muerte que ejercían los compuestos **3.2b**, **3b'**, **3a**, **3c** (apoptosis y necrosis) en la línea celular HL-60 se utilizó la tinción con yoduro de propidio (PI) y 7-aminoactinomicina D (7-AAD).

Las células se incubaron con los compuestos antes mencionados por 72 horas a 10µM, además de un control de células no tratadas y un control del vehículo (DMSO). Tras la incubación se centrifugaron las muestras y el pellet fue resuspendido en 100 µL de solución de *buffer binding*. Luego a cada muestra se le añadió 0,2 µL de PI y 5 µL de 7-AAD, dejándolas a temperatura ambiente y en oscuridad por 10 minutos. Para el control de necrosis, se agregó 300 µL de etanol a -20°C dejándolo actuar por 5 minutos.

Las evaluaciones se realizaron en un citómetro de flujo BD FACSCantoll. La plantilla de adquisición para las poblaciones de hemocitos se fijó según Prado-Álvarez *et al.* (2012). Se adquirieron un mínimo de 10.000 eventos, tomando los datos de los canales FL1 (7-AAD) y FL2 (anexina V-PE). Los datos fueron analizados mediante el programa BD FACSDiva™ Software v6.13 y los índices de apoptosis y necrosis se expresaron como los porcentajes de eventos anexina V+/7-AAD- y anexinaV+/7-AAD+, respectivamente.

5.1.5.- Instrumentos de caracterización.

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C (RMN) se registraron en un espectrómetro BRUKER AVANCE-300 (300MHz). Las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado (CDCl₃) o dimetilsulfóxido (DMSO-d₆) según corresponda. Los desplazamientos químicos se estandarizaron respecto a tetrametilsilano (TMS) siendo expresados en ppm (δ). Las constantes de acoplamiento *J* están descritas en hercios (Hz), los acrónimos utilizados para la multiplicidad de las señales (s, singulete; d, doblete; t, triplete; c, cuarteto; q, quintuplete; m, multiplete).

Espectroscopia de infrarrojo.

Los espectros infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) fueron efectuados en un espectrofotómetro BRUKER VECTOR 22 (FT-MIR) utilizando el método de reflectancia total atenuada (ATR).

Puntos de fusión.

Los puntos de fusión no corregidos se expresan en °C y se determinaron en un equipo para medir punto de fusión IA-9400.

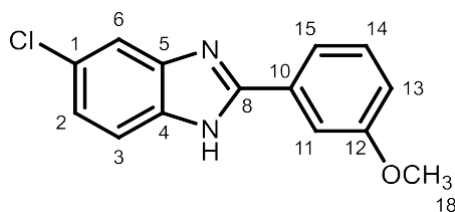
5.2.- Reactivos

Reactivos y solventes utilizados en la parte sintética fueron adquiridos en diversos laboratorios químicos dependiendo de su disponibilidad; entre ellos destacan: Merck, Sigma-Aldrich y Ak Scientific. En cuanto a la pureza, en todos los casos, el reporte del fabricante superó el 99 % siendo clasificados como grado PA o HPLC.

5.3.-Sintesis

Procedimiento general para la obtención de derivados de benzo[d]imidazoles 2a, 2b y 2c (I)

5.3.1.- 5-cloro-2-(3-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol (2a)

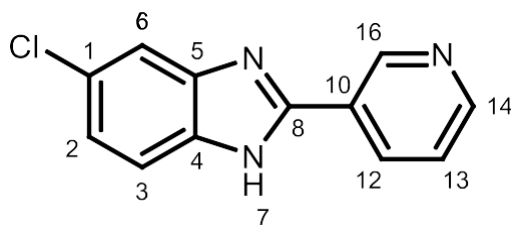


Se disuelve 4-cloro-*o*-fenilendiamina (330mg, 2,31 mmol) en 10 ml de dimetilformamida (DMF) en un balón de reacción de 100 ml provisto de agitación magnética. Luego se agrega el catalizador $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (47mg, 0,23 mmol) y se calienta la mezcla aproximadamente a 50°C. Enseguida se agrega el derivado de aldehído correspondiente, en este caso 3-metoxibenzaldehído (313mg, 280µL, 0,23 mmol) y se deja por aproximadamente 24hrs. Luego, el crudo de reacción se vierte sobre agua y se extrae con tres porciones de acetato de etilo (10ml x 3). Las fracciones orgánicas se remueven mediante evaporador rotatorio y los residuos se purifican por columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando como fase móvil acetato de etilo (AcOEt)/ éter de petróleo en proporciones distintas según corresponda para cada derivado y/o recristalizado. Específicamente para este derivado se utilizó la fase móvil 40% AcOEt, 60% éter de petróleo. Sólido blanco y rendimiento: 58%.

¹H-RMN (ppm) (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,79 (s, 1H, H₁₅), 7,76 (d, $J_{meta} = 1,8$ Hz, 1H, H₁₁), 7,66 (d, $J_{meta} = 2,0$ Hz, 1H, H₆), 7,60 (d, $J_{orto} = 8,6$ Hz, 1H, H₃), 7,45 (t, $J_{orto} = 8,1$ Hz, 1H, H₁₄), 7,22 (dd, $J_{orto, meta} = 8,6; 2,0$ Hz, 2H, H₂), 7,06 (dt, $J_{orto, meta} = 8,5; 1,6$ Hz, 2H, H₁₃), 3,85 (s, 3H, H₁₈).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 159,66; 152,64; 140,68; 137,91; 131,11; 130,13; 126,43; 122,35; 118,92; 116,18; 116,05; 114,99; 111,54; 55,29.

5.3.2.- 5-cloro-2-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol (2b)

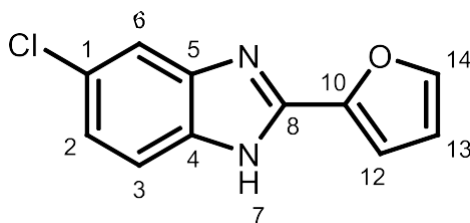


Seguendo el procedimiento general (I) se utilizó 4-cloro-*o*-fenilendiamina (500mg; 3,5 mmol), 3-piridinacarboxaldehído (375mg; 328μL; 3,5 mmol) y MgCl₂·6H₂O (71mg; 0,35 mmol). El crudo de reacción se purifica por columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando como fase móvil 99% AcOEt, 1% amoníaco (NH₃). Sólido blanco y rendimiento: 55%

¹H-RMN (ppm) (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 13,29 (s, 1H, H₁), 9,34 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H, H₁₆), 8,69 (dd, $J = 4,8; 1,6$ Hz, 2H, H₁₄), 8,49 (td, $J = 8,0; 1,8$ Hz, 2H, H₁₂), 7,71 – 7,62 (m, 2H, H₆-H₃), 7,59 (ddd, $J = 8,0; 4,8; 0,9$ Hz, 3H, H₁₃), 7,26 (dd, $J_{orto, meta} = 8,6; 2,0$ Hz, 2H, H₂).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 150,83; 150,30; 147,62; 133,93; 126,79; 125,75; 124,05; 122,78.

5.3.3.- 5-cloro-2-(furan-2-il)-1H-benzo[d]imidazol (2c)



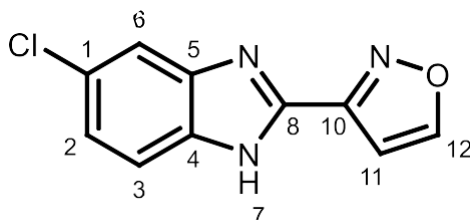
Seguendo el procedimiento general (I) se utilizó 4-cloro-*o*-fenilendiamina (520mg; 3,63 mmol), furfural (390mg; 350μL; 3,5 mmol) y MgCl₂·6H₂O (71mg; 0,35 mmol). El crudo de

reacción se purifica por columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando como fase móvil AcOEt/CH₂Cl₂(1:9). Sólido ocre, rendimiento: 56%.

¹H-RMN (ppm) (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 13,13 (s, 1H, H₇), 7,96 (dd, *J* = 1,8; 0,8 Hz, 2H, H₁₄), 7,74 – 7,45 (m, 2H, H₂-H₃), 7,24 (dd, *J* = 3,5; 0,8 Hz, 2H, H₁₂), 7,21 (d, *J*_{orto} = 7,7 Hz, 1H, H₆), 6,73 (dd, *J* = 3,5; 1,8 Hz, 2H, H₁₃).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, DMSO-d₆) δ 145,12; 144,99; 144,71; 142,50; 135,06; 126,25; 122,67; 119,99; 118,15; 112,43; 111,19.

5.3.4.- 5-cloro-2-(isoxazolil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (2d)



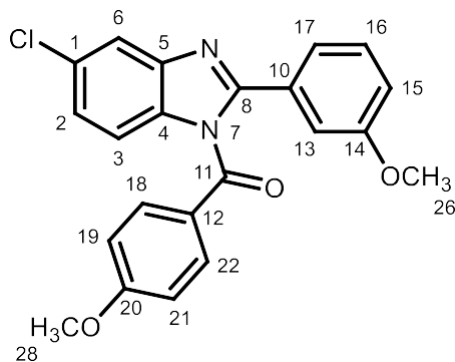
Se agrega 4-cloro-*o*-fenilendiamina (290mg; 2,091 mmol) en un balón de reacción de 100 ml más el ácido polifosfórico (PPA) suministrado de agitación magnética. Posteriormente se lleva la reacción a una temperatura de 150°C, esperando que se disuelva la diamina sustituida. Luego, se agrega el ácido isoxazol-3-carboxílico (260mg; 2,091 mmol) y se deja la reacción por 3 horas. Finalizada esta misma, se vierte sobre agua para neutralizar con una disolución de NaOH 1M y luego una disolución saturada de NaHCO₃ hasta pH≈7. Finalmente, se extrae con tres porciones de acetato de etilo (10ml x 3). El crudo se purifica por columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando 40% AcOEt/ 60% éter de petróleo. Sólido amarillo pastel y rendimiento: 50%.

¹H-RMN (ppm) (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 13,57 (s, 1H, H₇), 9,19 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₁₂), 7,67 (m, 2H, H₆-H₃), 7,31 (dd, *J*_{orto, meta} = 8,6; 2,0 Hz, 2H, H₂), 7,21 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₁₁).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 161,58; 154,52; 143,26; 132,71; 123,56; 114,67; 104,00.

Procedimiento general para la obtención de los productos finales benzimidazólicos (serie 1) (II)

5.3.5.- (5-cloro-2-(3-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3a)



Usando como precursor el 5-cloro-2-(3-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol (2a) (125mg; 0,57 mmol) sintetizado previamente, se incorporó dicho compuesto a un balón de reacción junto con 15 ml de tetrahidrofurano anhidrido (THF_{anh}) bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se agregó hidruro de sodio (NaH) (34mg; 1,41mmol) y luego cloruro de 4-metoxibenzoilo (194mg; 154μL; 1,14mmol). La reacción se dejó por 1 hora a temperatura ambiente. Finalizada esta misma se extrae con tres porciones de acetato de etilo (10ml x 3). Las porciones orgánicas se llevan a sequedad y luego se purifica por columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando como fase móvil 20% AcOEt/ 80% éter de petróleo. Luego de ello se separan los regioisómeros obtenidos con placas de capa preparativas con fase móvil en gradiente: 20% AcOEt, 25% AcOEt. Rendimiento regioisómeros: 32% para 3a y 28% para 7a'.

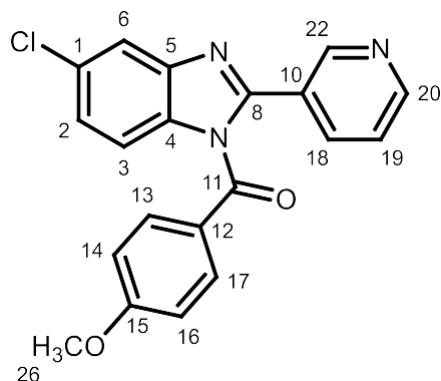
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,86 (d, $J_{meta} = 2,0$ Hz, 1H, H₆), 7,72 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H₁₈-H₂₂), 7,33 (d, $J_{orto} = 8,7$ Hz, 1H, H₃), 7,28 (t, $J = 8,8$, 1H, H₁₆), 7,25 (m, 1H, H₁₇), 7,21 (d, $J_{orto} = 7,8$ Hz, 1H, H₂), 7,16 (m, 1H, H₁₅), 6,92 (dd, $J = 2,6; 1,4$ Hz, 1H, H₁₃), 6,89 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H₁₉-H₂₁), 3,84 (s, 3H, H₂₆), 3,81 (s, 3H, H₂₈),

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ: 167,93 (**11C**), 164,92 (**20C**), 159,64 (**14C**), 154,47 (**8C**), 141,60 (**5C**), 135,81 (**4C**), 133,33 (**18,22C**), 131,31 (**10C**), 130,31 (**1C**), 129,70 (**2C**), 124,98 (**17C**), 124,77 (**12C**), 121,74 (**15C**), 121,07 (**6C**), 116,65 (**13C**), 114,49 (**19,21C**), 114,03 (**16C**), 113,00 (**3C**), 55,81 (**28C**), 55,52 (**26C**).

IR: 1694 cm^{-1} (C=O), 1258 cm^{-1} (C-O)

PUNTO DE FUSION: 170-171°C

5.3.6.- (5-cloro-2-(piridin-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3b)



Siguiendo el procedimiento general (II) se utilizó el precursor 5-cloro-2-(piridin-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (2b) (240mg; 1,05mmol), cloruro de 4-metoxibenzoilo (359mg; 190 μ L; 2,11mmol) y NaH (50mg; 1,3mmol). El crudo de reacción se purificó por columna cromatográfica sobre gel de sílice utilizando fase móvil 60% AcOEt/ 40% éter de petróleo, para luego utilizar placa de capa preparativa con el fin de separar bien los regioisómeros, utilizando fase móvil en gradiente: 50% AcOEt, 55% AcOEt, y 60% AcOEt. Rendimiento regioisómeros: 28% para 3b y 27% 3b´.

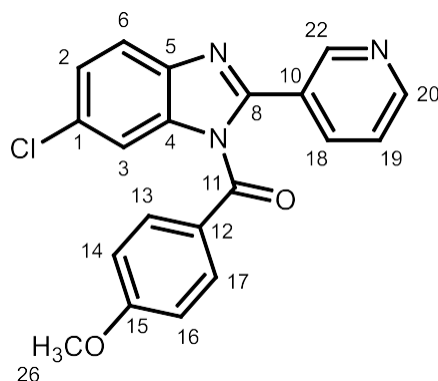
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ : 8,89 (dd, $J = 2,3; 0,9$ Hz, 1H, H₂₂), 8,61 (dd, $J = 4,9; 1,7$ Hz, 1H, H₂₀), 7,98 (dt, $J = 7,9; 2,0$ Hz, 1H, H₁₈), 7,88 (d, $J_{meta} = 1,3$ Hz, 1H, H₆), 7,75 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 7,32 (dd, $J = 7,6; 4,8$ Hz, 1H, H₁₉), 7,29 (m, 2H, H₃-H₂), 6,91 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, H₁₄-H₁₆), 3,89 (s, 3H, H₂₆).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ : 167,43 (11C), 165,18 (15C), 152,31 (8C), 150,89 (20C), 149,84 (22C), 143,87 (5C), 136,40 (18C), 133,82 (4C), 133,51 (13,17C), 130,14 (1C), 126,59 (10C), 125,39 (2C), 124,29 (12C), 123,27 (19C), 120,35 (6C), 114,68 (14,16C), 113,94 (3C), 55,87 (26C).

IR: 1696 cm^{-1} (C=O), 1258 cm^{-1} (C-O)

PUNTO DE FUSION: 172-174°C

5.3.7.- (6-cloro-2-(piridin-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3b´)



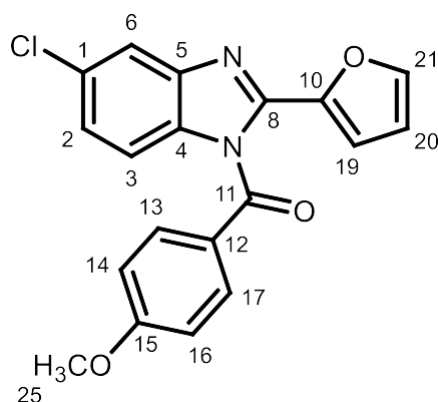
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,87 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, H₂₂), 8,58 (dd, *J* = 5,2; 1,5 Hz, 1H, H₂₀), 7,95 (dt, *J* = 8,1; 1,9 Hz, 1H, H₁₈), 7,79 (dd, *J*_{orto, meta} = 8,5; 0,7 Hz, 1H, H₆), 7,73 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 7,40 (d, *J*_{meta} = 2,0 Hz, 1H, H₃), 7,37 (dd, *J* = 8,5; 2,0 Hz, 2H, H₂), 7,27 (dd, *J* = 7,6; 4,8 Hz, 1H, H₁₉), 6,90 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 3,87 (s, 3H, H₂₆).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ: 167,39 (**11C**), 165,21 (**15C**), 151,74 (**8C**), 150,79 (**20C**), 149,77 (**22C**), 141,64 (**5C**), 136,30 (**18C**), 135,71 (**4C**), 133,51 (**13,17C**), 130,85 (**2C**), 126,61 (**10C**), 125,32 (**1C**), 124,17 (**12C**), 123,26 (**19C**), 121,32 (**6C**), 114,72 (**14,16C**), 113,27 (**3C**), 55,87 (**26C**).

IR: 1696 cm⁻¹ (C=O), 1258 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 173-174°C

5.3.8.- (5-cloro-2-(furan-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3c)



Seguendo el procedimiento general (**II**) se utilizó el precursor 5-cloro-2-(furan-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (2c) (122mg; 0,561mmol), cloruro de 4-metoxibenzoilo (191mg; 152µL; 1,12mmol) y NaH (33mg; 0,842mmol). El crudo de reacción se purificó por columna

cromatográfica sobre gel de sílice utilizando fase móvil 40% AcOEt/ 60% éter de petróleo, para luego utilizar placa de capa preparativa con el fin de obtener regioisómeros más puros. Se utilizó fase móvil: 20% AcOEt (dos eluciones). Rendimiento regioisómeros: 20% para 3c y 20% para 3c'.

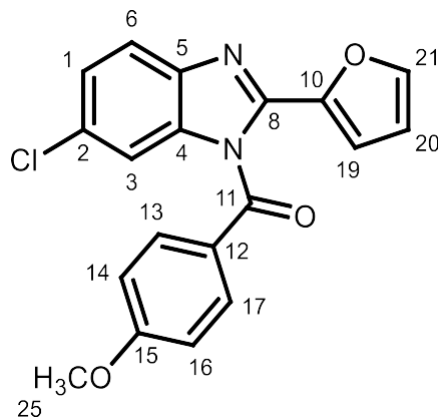
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ 7,79 (d, $J_{meta} = 1,6$ Hz, 1H, H₆), 7,74 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, H₁₃-H₁₇), 7,36 (dd, $J = 1,8; 0,8$ Hz, 2H, H₂₁), 7,20 (dd, $J_{orto, meta} = 8,7, 1,8$ Hz, 2H, H₂), 7,15 (d, $J_{orto} = 8,7$ Hz, 1H, H₃), 7,05 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, H₁₉), 6,90 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 6,43 (dd, $J = 3,5; 1,8$ Hz, 2H, H₂₀), 3,86 (s, 3H, H₂₅).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ: 167,30 (**11C**), 164,99 (**15C**), 145,52 (**8C**), 144,97 (**21C**), 143,90 (**10C**), 143,68 (**5C**), 133,20 (**4C**), 133,15 (**13,17C**), 129,79 (**1C**), 124,86 (**2C**), 124,58 (**12C**), 119,88 (**6C**), 114,51 (**14,16C**), 114,09 (**19C**), 113,34 (**3C**), 112,17 (**20C**), 55,81 (**25C**)

IR: 1711 cm⁻¹ (C=O), 1271 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 165-168°C

5.3.9.- (6-cloro-2-(furan-2-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (**3c**)



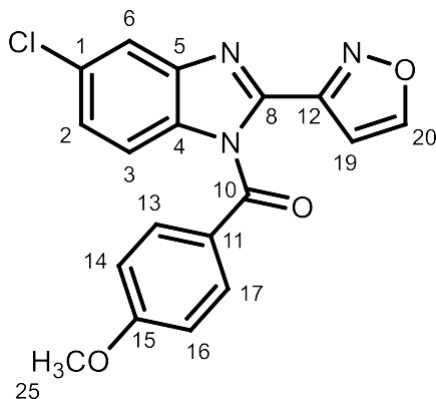
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,75 (d, $J_{orto} = 8,8$ Hz, 1H, H₆), 7,74 (d, $J = 9$ Hz, 2H, H₃-H₁₇), 7,34 (dd, $J_{orto, meta} = 8,7; 1,7$ Hz, 2H, H₁), 7,32 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₂₁), 7,30 (d, $J_{meta} = 8,6$ Hz, 1H, H₃), 7,04 (d, $J = 3,7$ Hz, 1H, H₁₉), 6,92 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 6,43 (dd, $J = 3,5; 1,8$ Hz, 1H, H₂₀), 3,88 (s, 3H, H₂₅).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ: 167,28 (**11C**), 165,05 (**15C**), 145,08 (**10C**), 144,86 (**22C**), 144,02 (**8C**), 141,51 (**5C**), 135,13 (**4C**), 133,13 (**13,17C**), 130,27 (**2C**), 125,03 (**1C**), 124,61 (**12C**), 120,94 (**6C**), 114,57 (**14,16C**), 113,82 (**20C**), 112,69 (**3C**), 112,15 (**21C**), 55,81 (**25C**).

IR: 1701 cm⁻¹ (C=O), 1269 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 168-170°C

5.3.10.- (5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3d)



Siguiendo el procedimiento general (II) se utilizó el precursor 5-cloro-2-(isoxazolil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (2d) (100mg; 0,46mmol), cloruro de 4-metoxibenzoilo (157mg; 125µL; 0,92mmol) y NaH (28mg; 0,69mmol). El crudo de reacción se purificó por placa de capa preparativa con el fin de separar los regioisómeros, utilizando fase móvil en gradiente: 20% AcOEt, 25% AcOEt, y 30% AcOEt,. Rendimiento regioisómeros: 30% para 3d y 25% para 3d'.

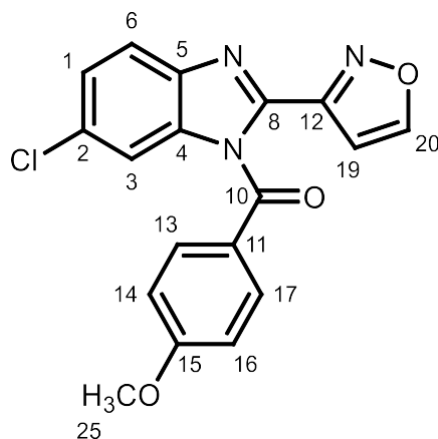
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 9,10 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₂₀), 8,02 (d, *J*_{meta} = 1,9 Hz, 1H, H₆), 7,76 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 7,45 (dd, *J*_{orto, meta} = 8,8; 2,0 Hz, 2H, H₂), 7,37 (d, *J*_{orto} = 8,8 Hz, 1H, H₃), 7,15 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₁₉), 7,06 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 3,85 (s, 3H, H₂₅).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 166,42 (**10C**), 164,71 (**15C**), 161,33 (**20C**), 153,56 (**12C**), 143,50 (**8C**), 142,95 (**5C**), 133,28 (**4C**), 133,22 (**13,17C**), 128,60 (**1C**), 125,78 (**2C**), 123,70 (**11C**), 119,86 (**6C**), 114,66 (**14,16C**), 113,86 (**3C**), 105,03 (**19C**), 55,80 (**25C**).

IR: 1704 cm⁻¹ (C=O), 1261 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 185-187°C

5.3.11.- (6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona (3d')



¹H-RMN (ppm) (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 9,08 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₂₀), 7,94 (d, $J_{orto} = 8,6$ Hz, 1H, H₆), 7,75 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 7,48 (dd, $J_{orto, meta} = 8,6; 2,0$ Hz, 2H, H₁), 7,44 (d, $J_{meta} = 2,0$ Hz, 1H, H₃), 7,14 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₁₉), 7,05 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 3,85 (s, 3H, H₂₅).

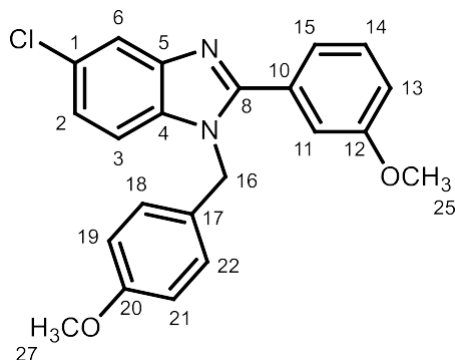
¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, DMSO- d₆) δ 167,00 (**10C**), 165,31 (**15C**), 161,92 (**20C**), 154,21 (**12C**), 143,67 (**8C**), 141,55 (**5C**), 135,66 (**4C**), 133,86 (**13,17C**), 130,60 (**2C**), 125,40 (**1C**), 124,36 (**11C**), 122,43 (**6C**), 115,25 (**14,16C**), 112,96 (**3C**), 105,63 (**19C**), 56,43 (**25C**).

IR: 1704 cm⁻¹ (C=O), 1261 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 187-188°C

Procedimiento general para la obtención de productos finales benzoimidazólicos (serie 1.2) (III).

5.3.12.- 5-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(3-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol (3.2a)



Usando como precursor el 5-cloro-2-(3-metoxifenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (2a) (100mg; 0,402 mmol) sintetizado previamente, se incorporó dicho compuesto a un balón de reacción junto con 10 ml de THF_{anh} bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se agregó NaH (24mg; 0.603mmol), formando una solución 1. En un balón aparte, se disuelve el 1-bromometil-4-metoxibenceno (161mg; 0,805mmol) en 3ml de THF_{anh}, teniendo así una solución 2. Posteriormente, la solución 2 se agrega lentamente sobre la solución 1. Una vez terminada la adición, la reacción se deja a reflujo por 3 horas. Finalizada la reacción se extrae con tres porciones de acetato de etilo (10ml x 3). Las porciones orgánicas se llevan a sequedad y luego se purifica por columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando como fase móvil 30% AcOEt/ 70% éter de petróleo. Luego de ello se separan los regioisómeros obtenidos con placas de capa preparativas con fase móvil :20% AcOEt (2 eluciones). Rendimiento regioisómeros: 31% para 3.2a y 27% para 3.2a´.

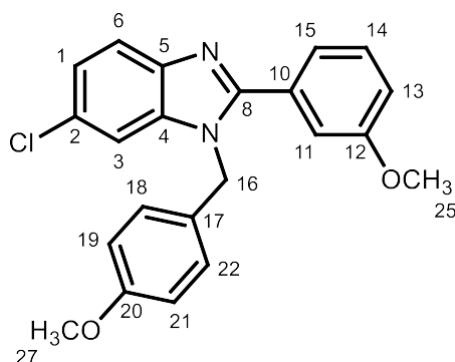
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,85 (d, *J*_{meta} = 1,9 Hz, 1H, H₆), 7,38 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H, H₁₄), 7,26 (dt, *J* = 6,3; 1,6 Hz, 1H, H₁₅), 7,22 (dd, *J* = 8,6; 2,0 Hz, 1H, H₁₃), 7,15 (d, *J*_{orto,meta} = 8,6 Hz, 1H, H₂), 7,07 (dd, *J* = 2,6; 1,2 Hz, 1H, H₁₁), 7,02 (d, *J* = 8,9 Hz, 2H, H₁₈-H₂₂), 6,87 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, H₁₉-H₂₁), 5,41 (s, 2H, H₁₆), 3,8 (s, 3H, H₂₇), 3,79 (s, 3H, H₂₅).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ: 159,94 (12C), 159,38 (20C), 155,30 (8C), 144,05 (5C), 134,78 (4C), 131,02 (10C), 130,01 (14C), 128,36 (1C), 128,05 (17C), 127,33 (18,22C), 123,57 (2C), 121,54 (15C), 119,86 (6C), 116,81 (11C), 114,62 (19,21C), 114,28 (13C), 111,48 (3C), 55,46 (25C), 55,44 (27C), 48,21 (16C).

PUNTO DE FUSION: 138°C

IR: 1247 cm⁻¹ (C-O)

5.3.13.- 6-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(3-metoxifenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (3.2a´)

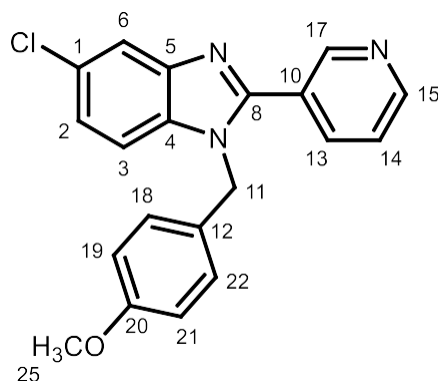


¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,78 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, H₆), 7,38 (t, *J* = 8,1 Hz, 1H, H₁₄), 7,29 (dd, *J* = 8,6; 2,0 Hz, 1H, H₂), 7,25 (m, 2H, H₁₅-H₁₃), 7,24 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H₃), 7,06 (dd, *J* = 2,6; 1,1 Hz, 1H, H₁₁), 7,03 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, H₁₈-H₂₂), 6,89 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, H₁₉-H₂₁), 5,39 (s, 2H, H₁₆), 3,81 (s, 3H, H₂₅), 3,77 (s, 3H, H₂₇)

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ: 159,81 (**12C**), 159,28 (**20C**), 154,81 (**8C**), 141,67 (**5C**), 136,69 (**4C**), 130,81 (**10C**), 129,88 (**14C**), 128,75 (**1C**), 127,80 (**17C**), 127,17 (**18,22C**), 123,41 (**2C**), 121,38 (**15C**), 120,82 (**6C**), 116,72 (**11C**), 114,57 (**19,21C**), 114,09 (**13C**), 110,59 (**3C**), 55,33 (**25,27C**), 48,05 (**16C**).

IR: 1247 cm⁻¹ (C-O)

5.3.14.- 5-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(piridin-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (3.2b)



Seguendo el procedimiento general (**III**), se utilizó el precursor 5-cloro-2-(piridin-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (2b) (110mg; 0,51mmol), NaH (30mg; 0,76mmol) y 1-bromometil-4-metoxibenceno (200mg; 1,02mmol). El crudo se purificó a través de placas de capa preparativas con fase móvil en gradiente: 70%,80% y 90% AcOEt. Rendimiento regioisómeros: 26% para 3.2b y 28% 3.2b´.

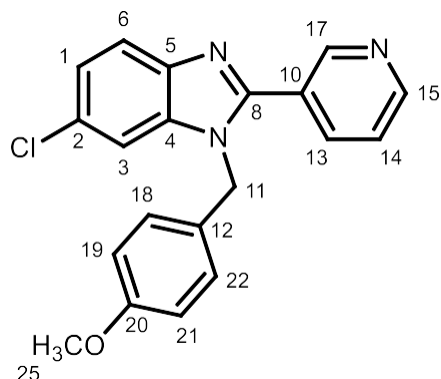
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,92 (t, *J* = 1,5 Hz, 1H, H₁₇), 8,73 (dt, *J* = 4,9; 1,5 Hz, 1H, H₁₅), 8,01 (ddd, *J* = 7,9; 1,9; 1,7 Hz, 1H, H₁₃), 7,84 (d, *J* meta = 1,7 Hz, 1H, H₆), 7,41 (dd, *J* = 7,8; 4,8 Hz, 1H, H₁₄), 7,24 (dd, *J* orto, meta = 8,7; 2,7 Hz, 1H, H₂), 7,18 (d, *J* orto = 8,8 Hz, 1H, H₃), 6,96 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H₁₈-H₂₂), 6,85 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H₁₉-H₂₁), 5,39 (s, 2H, H₁₁), 3,78 (d, 3H, H₂₅).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ: 159,55 (**20C**), 152,33 (**8C**), 151,17 (**15C**), 149,78 (**17C**), 144,09 (**5C**), 136,81 (**13C**), 134,84 (**4C**), 128,70 (**1C**), 127,47 (**12C**), 127,20 (**18,22C**), 126,26 (**10C**), 124,12 (**2C**), 123,69 (**14C**), 120,05 (**6C**), 114,76 (**19,21C**), 111,56 (**3C**), 55,44 (**25C**), 48,20 (**11C**).

IR: 1244 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 121-124°C

5.3.15.- 6-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol (3.2b)



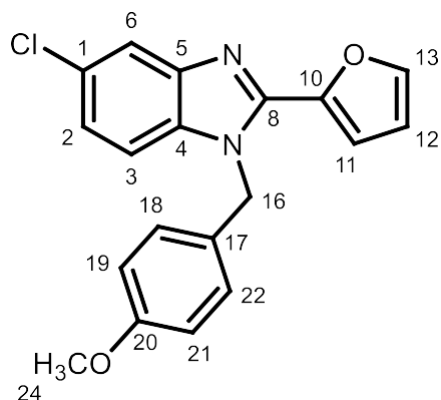
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,92 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H₁₇), 8,72 (dd, *J* = 5,0; 1,7 Hz, 1H, H₁₅), 8,00 (dt, *J* = 7,9; 2,0 Hz, 1H, H₁₃), 7,77 (d, *J*_{orto} = 8,5 Hz, 1H, H₆), 7,41 (ddd, *J* = 7,9; 4,8; 1,4 Hz, 1H, H₁₄), 7,30 (dd, *J*_{orto, meta} = 8,5; 2,0 Hz, 1H, H₁), 7,27 (d, *J*_{meta} = 2,0 Hz, 1H, H₃), 6,98 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, H₁₈-H₂₂), 6,86 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, H₁₉-H₂₁), 5,37 (s, 2H, H₁₁), 3,79 (s, 3H, H₂₅).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ: 159,57 (20C), 151,96 (8C), 151,12 (15C), 149,78 (17C), 141,92 (5C), 136,89 (4C), 136,74 (13C), 129,43 (2C), 127,36 (12C), 127,17 (19,21C), 126,25 (10C), 123,88 (1C), 123,69 (14C), 121,17 (6C), 114,84 (18,22C), 110,76 (3C), 55,45 (25C), 48,15 (11C).

IR: 1244 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 128-130°C

5.3.16.- 5-cloro-2-(furan-2-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (3.2c)



Siguiendo el procedimiento general (III), se utilizó el precursor 5-cloro-2-(furan-2-il)-1H-benzo[d]imidazol (2c) (150mg; 0,69mmol), NaH (50mg; 1,3mmol) y 1-bromometil-4-metoxibenceno (200mg; 1,02mmol). El crudo se purificó por columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando como fase móvil 30% AcOEt/ 70% éter de petróleo Rendimiento regioisómeros: 26% para 3.2c y 20% 3.2c´.

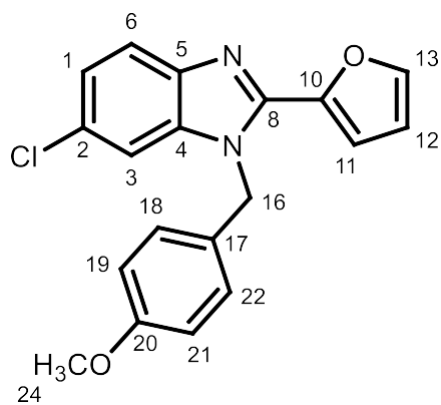
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,77 (d, $J_{meta} = 1,3$ Hz, 1H, H₆), 7,59 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₁₃), 7,19 (m, 2H, H₂-H₃), 7,10 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H, H₁₁), 7,05 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H₁₈-H₂₂), 6,82 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, H₁₉-H₂₁), 6,57 (dd, $J = 3,6; 1,8$ Hz, 1H, H₁₂), 5,61 (s, 2H, H₁₆), 3,75 (s, 3H, H₂₄).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ: 159,38 (20C), 145,60 (8C), 145,03 (5C), 144,45 (13C), 144,09 (10C), 134,48 (4C), 128,61 (1C), 128,04 (17C), 127,72 (18,22C), 123,74 (2), 119,67 (6C), 114,49 (19,21C), 113,45 (11C), 112,23 (12C), 110,99 (3C), 55,40 (24C), 48,17 (16C).

IR: 1247 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 141°C

5.3.17.- 6-cloro-2-(furan-2-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (3.2c´)



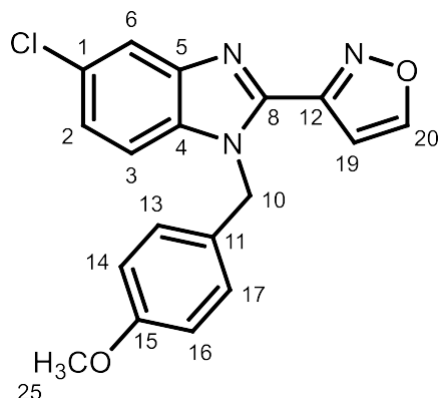
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, CDCl₃) δ: 7,70 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H₆), 7,59 (dd, $J = 1,8; 0,8$ Hz, 1H, H₁₃), 7,27 (t, $J_{orto} = 2,1$ Hz, 1H, H₃), 7,24 (dd, $J_{orto, meta} = 8,5; 2,0$ Hz, 1H, H₁), 7,09 (dd, $J = 3,5; 0,8$ Hz, 1H, H₁₁), 7,06 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H₁₈-H₂₂), 6,83 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H₁₉-H₂₁), 6,56 (dd, $J = 3,5; 1,8$ Hz, 1H, H₁₂), 5,58 (s, 2H, H₁₆), 3,76 (s, 1H, H₂₄).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, CDCl₃) δ: 159,39 (20C), 145,27 (8C), 145,00 (10C), 144,39 (13C), 141,87 (5C), 136,46 (4C), 129,00 (2C), 127,91 (17C), 127,70 (18,22C), 123,75 (1C), 120,77 (6C), 114,53 (19,21C), 113,29 (11C), 112,21 (12C), 110,26 (3C), 55,39 (24C), 48,12 (16C).

IR: 1249 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 121°C

5.3.18.- 5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (3.2d)



Siguiendo el procedimiento general (III), se utilizó el precursor 5-cloro-2-(isoxazolil)-1H-benzo[d]imidazol (2d) (112mg; 0,46mmol), NaH (27mg; 0,69mmol) y 1-bromometil-4-metoxibenceno (111mg; 0,57mmol). El crudo se purificó por columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando como fase móvil 30% AcOEt/ 70% éter de petróleo Rendimiento regioisómeros: 28% para 3.2d y 39% 3.2d'.

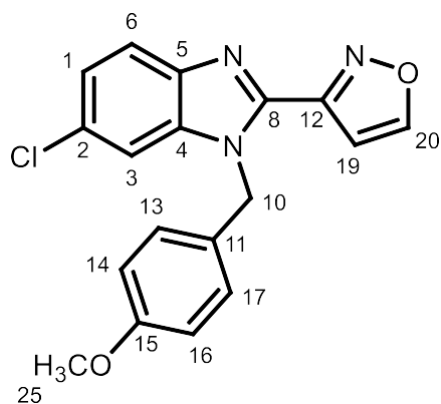
¹H-RMN (ppm) (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,22 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₂₀), 7,86 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H, H₆), 7,70 (d, *J*_{orto} = 8,7 Hz, 1H, H₃), 7,37 (dd, *J*_{orto, meta} = 8,7; 2,0 Hz, 1H, H₂), 7,26 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H, H₁₉), 7,12 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 6,84 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 5,90 (s, 2H, H₁₀), 3,67 (s, 3H, H₂₅).

¹³C-NMR (ppm) (75 MHz, DMSO-d₆) δ 160,98 (20C), 158,69 (15C), 154,96 (12C), 143,56 (8C), 143,32 (5C), 134,71 (4C), 128,39 (11C), 128,18 (13,17C), 127,41 (1C), 124,34 (2C), 119,28 (6C), 114,08 (14,16C), 113,13 (3C), 105,83 (19C), 55,02 (25C), 47,57 (11C).

IR: 1244 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 148-151°C

5.3.19.- 6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol (3.2d´)



¹H-RMN (ppm) (300 MHz, DMSO-d₆) δ 9,21 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₂₀), 7,83 (d, $J_{meta} = 2,0$ Hz, 1H, H₃), 7,80 (d, $J_{orto} = 8,7$ Hz, 1H, H₆), 7,33 (dd, $J_{orto, meta} = 8,7; 2,0$ Hz, 1H, H₁), 7,25 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H, H₁₉), 7,12 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H₁₃-H₁₇), 6,85 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, H₁₄-H₁₆), 5,91 (s, 2H, H₁₀), 3,68 (s, 3H, H₂₅).

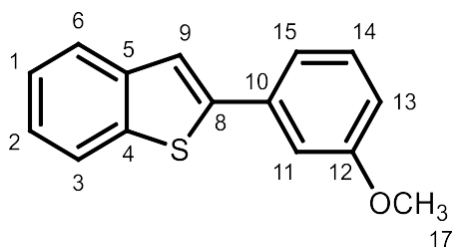
¹³C-NMR (ppm) ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 160,93 (**20C**), 158,69 (**15C**), 154,97 (**12C**), 143,27 (**8C**), 141,30 (**5C**), 136,61 (**4C**), 128,67 (**11C**), 128,40 (**2C**), 128,16 (**13,17C**), 123,40 (**1C**), 121,32 (**6C**), 114,10 (**14,16C**), 111,53 (**3C**), 105,80 (**19C**), 55,02 (**24C**), 47,43 (**10C**).

IR: 1244 cm⁻¹ (C-O)

PUNTO DE FUSION: 142-145°C.

Procedimiento general para la obtención de los derivados de benzo[*b*]tiofeno 5a y 5b (IV).

5.3.20.- 2-(3-metoxifenil)-benzo[*b*]tiofeno (5a).



Se disuelve en 7ml de metanol y 20ml de tolueno a un balón de reacción de dos bocas junto con 1-bromo-4-metoxibenceno (1550mg; 1000μL; 8,29mmol) y se provee la solución a agitación. Luego de ello, se agrega el catalizador tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (Pd(PPh₃)₄) (288mg; 0,25mmol), tornándose la solución de un color rojo intenso. Después se adiciona una solución previamente preparada de carbonato de sodio (Na₂CO₃) (1220mg;

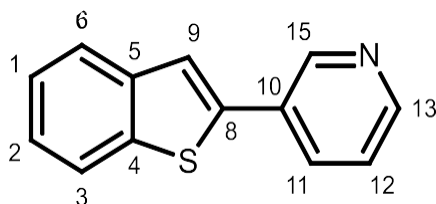
5800 μ L de agua). Finalmente se incorpora el ácido benzotiofeno-3-borónico (2100mg; 12mmol). Se lleva la reacción a reflujo por 4 horas. Terminado el tiempo el crudo de reacción se lleva a sequedad. Luego de ello, se resuspende con 5ml de acetato de etilo y se agrega agua. Se extrae con 3 porciones de acetato de etilo (10ml) y se recolectan las fases orgánicas para luego llevarlas a sequedad. Se purificó por columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando como fase móvil 10% diclorometano (DCM) / 90% éter de petróleo. Sólido blanco y rendimiento: 64%

$^1\text{H-RMN}$ (ppm) (300 MHz, CDCl_3) δ 7,88 – 7,84 (m, 1H, H_3), 7,83 – 7,78 (m, 1H, H_6), 7,58 (d, $J = 0,8$ Hz, 1H, H_9), 7,45 – 7,29 (m, 4H, H_1 - H_2 - H_{15} - H_{14}), 7,29 (dd, $J = 2,1; 1,6$ Hz, 1H, H_{11}), 6,94 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H, H_{13}), 3,91 (s, 3H, H_{17})

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm) (75 MHz, CDCl_3) δ : 160,12 (**12C**); 144,22; 140,74; 139,63; 135,78; 130,11; 124,66; 124,51; 123,73; 122,40; 119,83; 119,24; 113,92; 112,28; 55,49 (**17C**).

PUNTO DE FUSION: 130-132°C

5.3.21.- 2-(3-metoxifenil)-benzo[*b*]tiofeno (**5b**).



Seguendo el procedimiento (**IV**), se agrega 3-bromopiridina (660mg; 4,013mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (140mg; 0,118mmol), Na_2CO_3 (600mg; 2810 μ L de agua) y ácido benzotiofeno-3-borónico (1000mg; 5,62mmol). Se purificó por columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando como fase móvil 20% AcOEt/80% éter de petróleo. Sólido blanco y rendimiento: 68%.

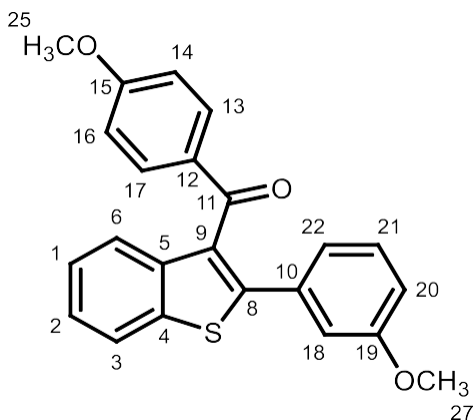
$^1\text{H-RMN}$ (ppm) (300 MHz, CDCl_3) δ : 9,01 (s, 1H, H_{15}), 8,60 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H, H_{13}), 7,98 (dt, $J = 8,0; 2,0$ Hz, 1H, H_{11}), 7,85 (ddd, $J = 13,3; 6,7; 2,6$ Hz, 2H, H_1 - H_2), 7,62 (s, 1H, H_9), 7,39 (m, 3H, H_6 - H_3 - H_{12})

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm) (75 MHz, CDCl_3) δ : 149,16; 147,46; 140,41; 140,26; 139,73; 133,57; 130,39; 124,91; 124,83; 123,88; 123,72; 122,37; 120,77.

PUNTO DE FUSION: 105-106°C

Procedimiento general para la obtención de los compuestos finales derivados de benzo[*b*]tiofénicos 6a y 7a (V)

5.3.22.- (4-metoxifenil)(2-(3-metoxifenil)benzo[*b*]tiofen-3-il)metanona (6a)



En un balón de reacción se agrega cloruro de 4-metoxibencilo (140mg, 0.83mmol) y 6ml de solvente dicloroetano (DCE) anhidrido en ambiente de nitrógeno más tricloruro de aluminio (AlCl_3) (166mg; 1,25mmol) formándose una solución 1. En otro balón se prepara otra solución del intermediario 2-(3-metoxifenil)-benzo[*b*]tiofeno 5a (100mg; 0,42mmol) y 5ml de DCE también en N_2 , obteniéndose una solución 2. Una vez listos ambos contenidos, se vierte lentamente mediante goteo la solución 2 sobre la solución 1, y se observa como mezcla de reacción comienza a tornarse de un color rojo oscuro. Luego de 1 hora la reacción ha finalizado y se agrega una solución previamente preparada de carbonato de sodio (Na_2CO_3 1M) (10ml). Finalmente se extrae con diclorometano (DCM) y se lleva a sequedad para obtener el crudo de reacción, el cual se purifica mediante DCVC con diferentes porciones de mezcla cloroformo/éter de petróleo (CHCl_3 /éter de petróleo), eluyendo el producto en la fracción 70% CHCl_3 , 30%éter de petróleo. Sólido blanco con rendimiento: 40%

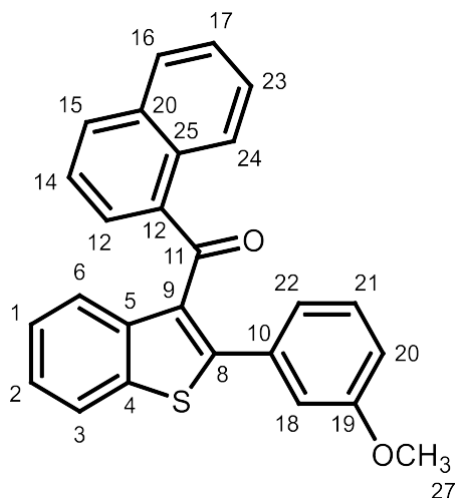
$^1\text{H-NMR}$ (ppm) $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,87 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, $\text{H}_{13}\text{-H}_{17}$), 7,82 (m, 2H, $\text{H}_1\text{-H}_2$), 7,65 (s, 1H, H_{22}), 7,42 (s, 2H, $\text{H}_3\text{-H}_6$), 7,39 (t, $J = 2,3$ Hz, 1H, H_{18}), 7,36 (dd, $J = 7,2; 1,6$ Hz, 1H, H_{20}), 7,32 (s, 1H, H_{21}), 6,95 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, $\text{H}_{14}\text{-H}_{16}$), 3,90 (s, 1H, H_{27}), 3,86 (s, 1H, H_{25}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm) (75 MHz, CDCl_3) δ : 194,52 (**11C**), 163,78 (**15C**), 157,72 (**19C**), 143,45 (**10C**), 140,62 (**5C**), 139,77 (**8C**), 137,71 (**4C**), 132,43 (**13,17C**), 130,79 (**12C**), 130,20 (**21C**), 129,13 (**9C**), 124,90 (**6C**), 124,86 (**3C**), 123,95 (**2C**), 122,46 (**1C**), 120,64 (**22C**), 118,90 (**18C**), 113,68 (**14,16C**), 109,57 (**20C**), 55,94 (**25C**), 55,62 (**27C**).

IR: 1649 cm^{-1} (C=O), 1252 cm^{-1} (C-O).

PUNTO DE FUSION: 166-167°C

5.3.23.- (2-(3-metoxifenil)benzo[b]tiofen-3-il)(naftalen-1-il)metanona (7a)



Siguiendo el procedimiento general (V) se utilizó cloruro de 1-naftoilo (160mg; 0,832mmol), AlCl_3 (170mg; 1,25mmol) y 2-(3-metoxifenil)-benzo[b]tiofeno 5a (100mg; 0,416mmol). El crudo de reacción se purifica mediante DCVC, con diferentes fracciones de fase móvil CHCl_3 /éter de petróleo, en aumento de la polaridad. La fracción de producto eluye en la fracción: 60% CHCl_3 / 40% éter de petróleo. Sólido blanco con rendimiento de: 43%.

$^1\text{H-RMN}$ (ppm) (300 MHz, CDCl_3) δ 8,61 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H_{24}), 8,02 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, H_{12}), 7,94 (m, 1H, H_{23}), 7,88 (m, 1H, H_3), 7,84 (m, 1H, H_6), 7,72 – 7,52 (m, 4H, H_{14} - H_{15} - H_{16} - H_{17}), 7,49 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, H_{21}), 7,44 (m, 1H, H_{22}), 7,40-7,38 (m, 3H, H_2 - H_1 - H_{18}), 7,31 – 7,27 (m, 1H, H_{20}), 3,72 (s, 1H, H_{27}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm) (75 MHz, CDCl_3) δ : 197,11 (**11C**); 158,91; 143,05; 140,46; 139,77; 138,98; 137,00; 133,80; 132,24; 131,81; 130,79; 129,52; 129,45; 128,38; 127,66; 126,33; 125,87; 124,95; 124,81; 124,40; 123,94; 122,37; 120,96; 118,72; 109,86; 55,87 (**27C**).

IR: 1649 cm^{-1} (C=O), 1249 cm^{-1} (C-O).

PUNTO DE FUSION: 220-223°C

6.-BIBLIOGRAFIA

- (1) Castillo, P. E.; Younts, T. J.; Chávez, A. E.; Hashimoto, Y. Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function. *Neuron* **2012**, *76* (1), 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.020>.
- (2) De Petrocellis, L.; Di Marzo, V. An Introduction to the Endocannabinoid System: From the Early to the Latest Concepts. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *23* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2008.10.013>.
- (3) Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (8), 1646–1647. <https://doi.org/10.1021/ja01062a046>.
- (4) Howlett, A. C.; Breivogel, C. S.; Childers, S. R.; Deadwyler, S. A.; Hampson, R. E.; Porrino, L. J. Cannabinoid Physiology and Pharmacology: 30 Years of Progress. *Neuropharmacology* **2004**, *47*, 345–358. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.030>.
- (5) Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990 Aug 9;346(6284):561-4. doi: 10.1038/346561a0. PMID: 2165569.
- (6) Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. Molecular Characterization of a Peripheral Receptor for Cannabinoids. *Nat. Med.* **1993**, *365*(6441), 61–65. <https://doi.org/10.1038/365061a0>.
- (7) Reggio, P. Endocannabinoid Binding to the Cannabinoid Receptors: What Is Known and What Remains Unknown. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17* (14), 1468–1486. <https://doi.org/10.2174/092986710790980005>.
- (8) Pertwee, R. G. Pharmacology of Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors. *Pharmacol. Ther.* **1997**, *74* (2), 129–180. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)82001-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(97)82001-3).
- (9) Pertwee, R. G. Cannabinoid Receptors and Pain. *Prog. Neurobiol.* **2001**, *43*.
- (10) Haspula, D.; Clark, M. A. Cannabinoid Receptors: An Update on Cell Signaling, Pathophysiological Roles and Therapeutic Opportunities in Neurological, Cardiovascular, and Inflammatory Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (20), 7693. <https://doi.org/10.3390/ijms21207693>.
- (11) T Sugiura 1, S Kondo, A Sukagawa, S Nakane, A Shinoda, K Itoh, A Yamashita, K Waku. 2-Arachidonoylglycerol: A Possible Endogenous Cannabinoid Receptor Ligand in Brain. *Biochem Biophys Res Commun* **1995**, *215*(1), 89–97. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2437>.
- (12) Basavarajappa, B. S. Cannabinoid Receptors and Their Signaling Mechanisms. In *The Endocannabinoid System*; Elsevier, 2017; pp 25–62. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809666-6.00002-2>.
- (13) Pertwee, R. G.; Ross, R. A. Cannabinoid Receptors and Their Ligands. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids PLEFA* **2002**, *66* (2–3), 101–121. <https://doi.org/10.1054/plaf.2001.0341>.

- (14) Stella, N.; Schweitzer, P.; Piomelli, D. A Second Endogenous Cannabinoid That Modulates Long-Term Potentiation. *Nature* **1997**, *388* (6644), 773–778. <https://doi.org/10.1038/42015>.
- (15) Pertwee, R. G. Targeting the Endocannabinoid System with Cannabinoid Receptor Agonists: Pharmacological Strategies and Therapeutic Possibilities. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2012**, *367* (1607), 3353–3363. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0381>.
- (16) Pertwee, R. G. The Therapeutic Potential of Drugs That Target Cannabinoid Receptors or Modulate the Tissue Levels or Actions of Endocannabinoids. 30.
- (17) Dasram, M. H.; Walker, R. B.; Khamanga, S. M. Recent Advances in Endocannabinoid System Targeting for Improved Specificity: Strategic Approaches to Targeted Drug Delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (21), 13223. <https://doi.org/10.3390/ijms232113223>.
- (18) Paronis, C. A.; Nikas, S. P.; Shukla, V. G.; Makriyannis, A. Δ 9-Tetrahydrocannabinol Acts as a Partial Agonist/Antagonist in Mice. *Behav. Pharmacol.* **2012**, *23* (8), 802–805. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32835a7c4d>.
- (19) Ottani, A.; Giuliani, D. HU 210: A Potent Tool for Investigations of the Cannabinoid System. *CNS Drug Rev.* **2001**, *7* (2), 131–145. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2001.tb00192.x>.
- (20) Thomas, B. F.; Gilliam, A. F.; Burch, D. F.; Roche, M. J.; Seltzman, H. H. Comparative Receptor Binding Analyses of Cannabinoid Agonists and Antagonists. 285, 9.
- (21) Herkenham, M.; Lynn, A.; Johnson, M.; Melvin, L.; de Costa, B.; Rice, K. Characterization and Localization of Cannabinoid Receptors in Rat Brain: A Quantitative in Vitro Autoradiographic Study. *J. Neurosci.* **1991**, *11* (2), 563–583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-02-00563.1991>.
- (22) Herkenham, M.; Lynn, A. B.; Little, M. D.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; de Costa, B. R.; Rice, K. C. Cannabinoid Receptor Localization in Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87* (5), 1932–1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.5.1932>.
- (23) Pertwee, R. G. Pharmacological Actions of Cannabinoids. In *Cannabinoids*; Pertwee, R. G., Ed.; Handbook of Experimental Pharmacology; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 2005; Vol. 168, pp 1–51. https://doi.org/10.1007/3-540-26573-2_1.
- (24) Lombard, C.; Nagarkatti, M.; Nagarkatti, P. CB2 Cannabinoid Receptor Agonist, JWH-015, Triggers Apoptosis in Immune Cells: Potential Role for CB2-Selective Ligands as Immunosuppressive Agents. *Clin. Immunol.* **2007**, *122* (3), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.11.002>.
- (25) Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Héaulme, M.; Shire, D.; Calandra, B.; Congy, C.; Martinez, S.; Maruani, J.; Néliat, G.; Caput, D.; Ferrara, P.; Soubrié, P.; Brelière, J. C.; Le Fur, G. SR141716A, a Potent and Selective Antagonist of the Brain Cannabinoid Receptor. *FEBS Lett.* **1994**, *350* (2–3), 240–244. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00773-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00773-X).
- (26) McMahon, L. R.; Amin, M. R.; France, C. P. SR 141716A Differentially Attenuates the Behavioral Effects of D9-THC in Rhesus Monkeys.

- (27) Gaal, L. F. V.; Rissanen, A. M.; Scheen, A. J.; Ziegler, O.; Rössner, S. Effects of the Cannabinoid-1 Receptor Blocker Rimonabant on Weight Reduction and Cardiovascular Risk Factors in Overweight Patients: 1-Year Experience from the RIO-Europe Study. **2005**, 365.
- (28) Sam, A. H.; Salem, V.; Ghatei, M. A. Rimonabant: From RIO to Ban. *J. Obes.* **2011**, 2011, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2011/432607>.
- (29) Felder, C. C.; Joyce, K. E.; Briley, E. M.; Glass, M.; Mackie, K. P.; Fahey, K. J.; Cullinan, G. J.; Hunden, D. C.; Johnson, D. W.; Chaney, M. O.; Koppel, G. A.; Brownstein, M. LY320135, a Novel Cannabinoid CB1 Receptor Antagonist, Unmasks Coupling of the CB1 Receptor to Stimulation of cAMP Accumulation. **1998**, 284.
- (30) Cosenza, M.; Gifford, A. N.; Gatley, S. J.; Pyatt, B.; Liu, Q.; Makriyannis, A.; Volkow, N. D. Locomotor Activity and Occupancy of Brain Cannabinoid CB1 Receptors by the Antagonist/Inverse Agonist AM281. *Synapse* **2000**, 38 (4), 477–482. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(20001215\)38:4<477::AID-SYN13>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1098-2396(20001215)38:4<477::AID-SYN13>3.0.CO;2-Y).
- (31) Ross, R. A.; Brockie, H. C.; Stevenson, L. A.; Murphy, V. L.; Templeton, F.; Makriyannis, A.; Pertwee, R. G. Agonist-inverse Agonist Characterization at CB₁ and CB₂ Cannabinoid Receptors of L759633, L759656 and AM630. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, 126 (3), 665–672. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702351>.
- (32) Portier, M.; Rinaldi-Carmona, M.; Pecceu, F.; Poinot-Chazel, C.; Calandra, B.; Barth, F. SR 144528, an Antagonist for the Peripheral Cannabinoid Receptor That Behaves as an Inverse Agonist. **1999**.
- (33) Fernández-Ruiz, J.; Romero, J.; Velasco, G.; Tolón, R. M.; Ramos, J. A.; Guzmán, M. Cannabinoid CB2 Receptor: A New Target for Controlling Neural Cell Survival? *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, 28 (1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.11.001>.
- (34) Palazuelos, J.; Aguado, T.; Egia, A.; Mechoulam, R.; Guzmán, M.; Galve-Roperh, I.; Palazuelos, J.; Aguado, T.; Egia, A.; Mechoulam, R.; Guzmán, M.; Galve-Roperh, I. Non-psychoactive CB₂ Cannabinoid Agonists Stimulate Neural Progenitor Proliferation. *FASEB J.* **2006**, 20 (13), 2405–2407. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6164fje>.
- (35) McKallip, R. J.; Lombard, C.; Fisher, M.; Martin, B. R.; Ryu, S.; Grant, S.; Nagarkatti, P. S.; Nagarkatti, M. Targeting CB2 Cannabinoid Receptors as a Novel Therapy to Treat Malignant Lymphoblastic Disease. *Blood* **2002**, 100 (2), 627–634. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0098>.
- (36) Montecucco, F.; Lenglet, S.; Braunersreuther, V.; Burger, F.; Pelli, G.; Bertolotto, M.; Mach, F.; Steffens, S. CB2 Cannabinoid Receptor Activation Is Cardioprotective in a Mouse Model of Ischemia/Reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2009**, 46 (5), 612–620. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.014>.
- (37) Cui, Y.-Y.; D'Agostino, B.; Risse, P.-A.; Marrocco, G.; Naline, E.; Zhang, Y.; Chen, H.-Z.; Finance, O.; Rinaldi-Carmona, M.; Rossi, F.; Advenier, C. Cannabinoid CB2 Receptor Activation Prevents Bronchoconstriction and Airway Oedema in a Model of Gastro-Oesophageal Reflux. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, 573 (1–3), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.040>.

- (38) Belvisi, M. G.; Patel, H. J.; Freund-Michel, V.; Hele, D. J.; Crispino, N.; Birrell, M. A. Inhibitory Activity of the Novel CB₂ Receptor Agonist, GW833972A, on Guinea-pig and Human Sensory Nerve Function in the Airways. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155* (4), 547–557. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.298>.
- (39) Steffens, S.; Veillard, N. R.; Arnaud, C.; Pelli, G.; Burger, F.; Staub, C.; Zimmer, A.; Frossard, J.-L.; Mach, F. Low Dose Oral Cannabinoid Therapy Reduces Progression of Atherosclerosis in Mice. *Nature* **2005**, *434* (7034), 782–786. <https://doi.org/10.1038/nature03389>.
- (40) Caffarel, M. M.; Sarrió, D.; Palacios, J.; Guzmán, M.; Sánchez, C. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Inhibits Cell Cycle Progression in Human Breast Cancer Cells through Cdc2 Regulation. *Cancer Res.* **2006**, *66* (13), 6615–6621. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4566>.
- (41) Sanchez, C.; de Ceballos, M. L.; Velasco, G.; Galve-Roperh, I.; Huffman, J. W. Inhibition of Glioma Growth in Vivo by Selective Activation of the CB₂ Cannabinoid Receptor.
- (42) Little, J. P.; Villanueva, E. B.; Klegeris, A. Therapeutic Potential of Cannabinoids in the Treatment of Neuroinflammation Associated with Parkinson's Disease. *9*.
- (43) Dittel, B. N. Direct Suppression of Autoreactive Lymphocytes in the Central Nervous System via the CB₂ Receptor: Direct Suppression of Autoreactive Lymphocytes. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153* (2), 271–276. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707493>.
- (44) Sun, Y.-X.; Xu, A.-H.; Yang, Y.; Zhang, J.-X.; Yu, A.-W. Activation of Cannabinoid Receptor 2 Enhances Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/874982>.
- (45) Aghazadeh Tabrizi, M.; Baraldi, P. G.; Borea, P. A.; Varani, K. Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Potential Therapeutic Benefits of Cannabinoid CB₂ Receptor Agonists. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (2), 519–560. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00411>.
- (46) Yao, B. B.; Mukherjee, S.; Fan, Y.; Garrison, T. R.; Daza, A. V.; Grayson, G. K.; Hooker, B. A.; Dart, M. J.; Sullivan, J. P.; Meyer, M. D. *In Vitro* Pharmacological Characterization of AM1241: A Protean Agonist at the Cannabinoid CB₂ Receptor? *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149* (2), 145–154. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706838>.
- (47) Hynes, J.; Leftheris, K.; Wu, H.; Pandit, C.; Chen, P.; Norris, D. J.; Chen, B.-C.; Zhao, R.; Kiener, P. A.; Chen, X.; Turk, L. A.; Patil-Koota, V.; Gillooly, K. M.; Shuster, D. J.; McIntyre, K. W. C-3 Amido-Indole Cannabinoid Receptor Modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (17), 2399–2402. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00466-3](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00466-3).
- (48) Frost, J. M.; Dart, M. J.; Tietje, K. R.; Garrison, T. R.; Grayson, G. K.; Daza, A. V.; El-Kouhen, O. F.; Yao, B. B.; Hsieh, G. C.; Pai, M.; Zhu, C. Z.; Chandran, P.; Meyer, M. D. Indol-3-Ylcycloalkyl Ketones: Effects of N1 Substituted Indole Side Chain Variations on CB₂ Cannabinoid Receptor Activity. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (1), 295–315. <https://doi.org/10.1021/jm901214q>.
- (49) Gallant, M.; Dufresne, C.; Gareau, Y.; Guay, D.; Leblanc, Y.; Prasit, P.; Rochette, C.; Sawyer, N.; Slipetz, D. M.; Tremblay, N.; Metters, K. M.; Labelle, M. New Class of Potent

Ligands for the Human Peripheral Cannabinoid Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6* (19), 2263–2268. [https://doi.org/10.1016/0960-894X\(96\)00426-X](https://doi.org/10.1016/0960-894X(96)00426-X).

(50) Bansal, Y.; Silakari, O. The Therapeutic Journey of Benzimidazoles: A Review. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (21), 6208–6236. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.013>.

(51) Keri, R. S.; Chand, K.; Budagumpi, S.; Balappa Somappa, S.; Patil, S. A.; Nagaraja, B. M. An Overview of Benzo [b] Thiophene-Based Medicinal Chemistry. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 1002–1033. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.038>.

(52) Patani, G. A.; LaVoie, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem. Rev.* **1996**, *96* (8), 3147–3176. <https://doi.org/10.1021/cr950066q>.

(53) Bouz, G.; Bouz, S.; Jand'ourek, O.; Konečná, K.; Bárta, P.; Vinšová, J.; Doležal, M.; Zitko, J. Synthesis, Biological Evaluation, and In Silico Modeling of N-Substituted Quinoxaline-2-Carboxamides. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (768). <https://doi.org/10.3390/ph14080768>.

(54) Pagé, D.; Balaux, E.; Boisvert, L.; Liu, Z.; Milburn, C.; Tremblay, M.; Wei, Z.; Woo, S.; Luo, X.; Cheng, Y.-X.; Yang, H.; Srivastava, S.; Zhou, F.; Brown, W.; Tomaszewski, M.; Walpole, C.; Hodzic, L.; St-Onge, S.; Godbout, C.; Salois, D.; Payza, K. Novel Benzimidazole Derivatives as Selective CB2 Agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (13), 3695–3700. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.073>.

(55) Ryckmans, T.; Edwards, M. P.; Horne, V. A.; Correia, A. M.; Owen, D. R.; Thompson, L. R.; Tran, I.; Tutt, M. F.; Young, T. Rapid Assessment of a Novel Series of Selective CB2 Agonists Using Parallel Synthesis Protocols: A Lipophilic Efficiency (LipE) Analysis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (15), 4406–4409. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.05.062>.

(56) Ando, K. HETEROCYCLIC SULFONE COMPOUNDS WITH CB2 RECEPTORAGONSTC ACTIVITY. **2011**.

(57) Iwata, Y.; Ando, K.; Taniguchi, K.; Koba, N.; Sugiura, A.; Sudo, M. Identification of a Highly Potent and Selective CB2 Agonist, RQ-00202730, for the Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (2), 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.11.062>.

(58) Gijzen, H. J. M.; De Cleyn, M. A. J.; Surkyn, M.; Van Lommen, G. R. E.; Verbist, B. M. P.; Nijssen, M. J. M. A.; Meert, T.; Wauwe, J. V.; Aerssens, J. 5-Sulfonyl-Benzimidazoles as Selective CB2 Agonists-Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (1), 547–552. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.091>.

(59) Watson, C.; Owen, D. R.; Harding, D.; Kon-I, K.; Lewis, M. L.; Mason, H. J.; Matsumizu, M.; Mukaiyama, T.; Rodriguez-Lens, M.; Shima, A.; Takeuchi, M.; Tran, I.; Young, T. Optimisation of a Novel Series of Selective CNS Penetrant CB2 Agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (14), 4284–4287. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.05.063>.

(60) Nimczick, M.; Pemp, D.; Darras, F. H.; Chen, X.; Heilmann, J.; Decker, M. Synthesis and Biological Evaluation of Bivalent Cannabinoid Receptor Ligands Based on HCB2R Selective Benzimidazoles Reveal Unexpected Intrinsic Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (15), 3938–3946. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.008>.

- (61) Dixon, D. D.; Tius, M. A.; Thakur, G. A.; Zhou, H.; Bowman, A. L.; Shukla, V. G.; Peng, Y.; Makriyannis, A. C3-Heteroaroyl Cannabinoids as Photolabeling Ligands for the CB2 Cannabinoid Receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (16), 5322–5325. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.013>.
- (62) Romero-Parra, J.; Mella-Raipán, J.; Palmieri, V.; Allarà, M.; Torres, M. J.; Pessoa-Mahana, H.; Iturriaga-Vásquez, P.; Escobar, R.; Faúndez, M.; Di Marzo, V.; Pessoa-Mahana, C. D. Synthesis, Binding Assays, Cytotoxic Activity and Docking Studies of Benzimidazole and Benzothiophene Derivatives with Selective Affinity for the CB2 Cannabinoid Receptor. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 17–35. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.005>.
- (63) Mugnaini, C.; Rabbito, A.; Brizzi, A.; Palombi, N.; Petrosino, S.; Verde, R.; Di Marzo, V.; Ligresti, A.; Corelli, F. Synthesis of Novel 2-(1-Adamantanylcarboxamido)Thiophene Derivatives. Selective Cannabinoid Type 2 (CB2) Receptor Agonists as Potential Agents for the Treatment of Skin Inflammatory Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *161*, 239–251. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.070>.
- (64) Osman, N. A.; Ligresti, A.; Klein, C. D.; Allarà, M.; Rabbito, A.; Di Marzo, V.; Abouzid, K. A.; Abadi, A. H. Discovery of Novel Tetrahydrobenzo[b]Thiophene and Pyrrole Based Scaffolds as Potent and Selective CB2 Receptor Ligands: The Structural Elements Controlling Binding Affinity, Selectivity and Functionality. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 619–634. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.07.012>.
- (65) Xing, C.; Zhuang, Y.; Xu, T.-H.; Feng, Z.; Zhou, X. E.; Chen, M.; Wang, L.; Meng, X.; Xue, Y.; Wang, J.; Liu, H.; McGuire, T. F.; Zhao, G.; Melcher, K.; Zhang, C.; Xu, H. E.; Xie, X.-Q. Cryo-EM Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2-Gi Signaling Complex. *Cell* **2020**, *180* (4), 645-654.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.007>.
- (66) McCarthy, E. J. The Reaction of O-Phenylenediamines with Carbonyl Compounds. 11. Aliphatic Ketones'. 10.
- (67) Dezfoolnezhad, E.; Ghodrati, K.; Badri, R. Fe₃O₄@SiO₂@polyionene/Br₃⁻ Core–Shell–Shell Magnetic Nanoparticles: A Novel Catalyst for the Synthesis of Imidazole Derivatives under Solvent-Free Conditions. *New J. Chem.* **2016**, *40* (5), 4575–4587. <https://doi.org/10.1039/C5NJ02680F>.
- (68) Bahrami, K.; Khodaei, M. M.; Naali, F. Mild and Highly Efficient Method for the Synthesis of 2-Arylbenzimidazoles and 2-Arylbenzothiazoles. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (17), 6835–6837. <https://doi.org/10.1021/jo8010232>.
- (69) Bhatnagar, I.; George, M. V. Oxidation with Metal Oxides—II. *Tetrahedron* **1968**, *24* (3), 1293–1298. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(68\)88080-9](https://doi.org/10.1016/0040-4020(68)88080-9).
- (70) Du, S.I.; Wang, Y.-G. A Rapid and Efficient Synthesis of Benzimidazoles Using Hypervalent Iodine as Oxidant. *N. Y.* **2007**, No. 5, 4.
- (71) Navarrete-Vázquez, G.; Moreno-Díaz, H.; Aguirre-Crespo, F.; León-Rivera, I.; Villalobos-Molina, R.; Muñoz-Muñoz, O.; Estrada-Soto, S. Design, Microwave-Assisted Synthesis, and Spasmolytic Activity of 2-(Alkyloxyaryl)-1H-Benzimidazole Derivatives as Constrained Stilbene Bioisosteres. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (16), 4169–4173. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.05.082>.

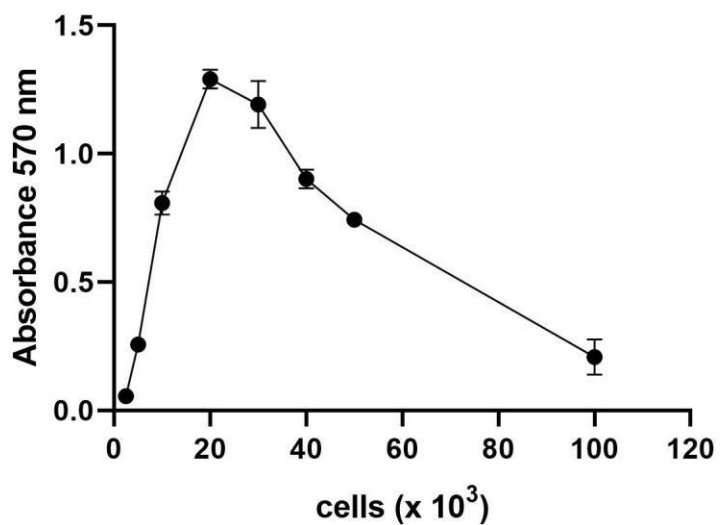
- (72) Ghosh, P.; Subba, R. MgCl₂·6H₂O Catalyzed Highly Efficient Synthesis of 2-Substituted-1H-Benzimidazoles. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (21), 2691–2694. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2015.04.001>.
- (73) Gorepatil, P. B.; Mane, Y. D.; Ingle, V. S. Zirconyl (IV) Nitrate as Efficient and Reusable Solid Lewis Acid Catalyst for the Synthesis of Benzimidazole Derivatives. *J. Chem.* **2013**, *2013* (1), 108318. <https://doi.org/10.1155/2013/108318>.
- (74) Hein, D. W. The Use of Polyphosphoric Acid in the Synthesis of &Aryl- and 2-Alkyl-Substituted Benzimidazoles, Benzoxazoles and Benzothiazoles. **1957**, 3.
- (75) Tzani, M. A.; Gabriel, C.; Lykakis, I. N. Selective Synthesis of Benzimidazoles from O-Phenylenediamine and Aldehydes Promoted by Supported Gold Nanoparticles. *Nanomaterials* **2020**, *10* (12), 2405. <https://doi.org/10.3390/nano10122405>.
- (76) Mounetou, E.; Poisson, C.; Monteil, A.; Madelmont, J.-C. Synthesis of N-[2-(2-Methylpropoxy)Ethyl]-N-{2-[(4-Methoxy) Phenylmethylthio]Phenyl}-1-Pyrrolidineethanamine (E)-2-Butenedioate (1:1) Salt (CERM 12816): A Potential Anti-Anginal Drug. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1998**, *41* (3), 181–189. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1344\(199803\)41:3<181::AID-JLCR68>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1344(199803)41:3<181::AID-JLCR68>3.0.CO;2-8).
- (77) Ghosh, A. K.; Anderson, D. D. Enantioselective Total Synthesis of Pladienolide B: A Potent Spliceosome Inhibitor. *Org. Lett.* **2012**, *14* (18), 4730–4733. <https://doi.org/10.1021/ol301886g>.
- (78) Miyaura, N.; Yamada, K. A NEW STEREOSPECIFIC CROSS-COUPLING BY THE PALLADIUM-CATALYZED REACTION OF 1-ALKENYLBORANES WITH 1-ALKENYL OR I-ALKYNYL HALIDES. 4.
- (79) Farrar, M. W.; Levine, R. Condensations Effected by Acidic Catalysts. IV. The Acylation of Substituted and Condensed Thiophenes and Furans ¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72* (10), 4433–4436. <https://doi.org/10.1021/ja01166a024>.
- (80) Bykov, V. V.; Bumagin, N. A. Effective Heterogeneous Palladium Catalysis of the Reactions of Organoboron Compounds with Aryl Halides. *Russ. Chem. Bull.* **1997**, *46* (7), 1344–1346. <https://doi.org/10.1007/BF02495939>.
- (81) Zhang, H.; Kwong, F. Y.; Tian, Y.; Chan, K. S. Base and Cation Effects on the Suzuki Cross-Coupling of Bulky Arylboronic Acid with Halopyridines: Synthesis of Pyridylphenols. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (20), 6886–6890. <https://doi.org/10.1021/jo980646y>.
- (82) Miyaura, Norio.; Suzuki, Akira. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95* (7), 2457–2483. <https://doi.org/10.1021/cr00039a007>.
- (83) García-Melchor, M.; Braga, A. A. C.; Lledós, A.; Ujaque, G.; Maseras, F. Computational Perspective on Pd-Catalyzed C–C Cross-Coupling Reaction Mechanisms. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (11), 2626–2634. <https://doi.org/10.1021/ar400080r>.
- (84) Miyata, T. (54) PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 INHIBITOR. **2011**.
- (85) No, T. Suzuki–Miyaura Cross-Coupling of Heteroaryl Halides and Arylboronic Acids in Continuous Flow. *Org Lett* **2011**, *13* (19).

- (86) Smith, M. B.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 1st ed.; Wiley, 2006. <https://doi.org/10.1002/0470084960>.
- (87) Romero, J.; Lastres-Becker, I.; de Miguel, R.; Berrendero, F.; Ramos, J. A.; Fernandez-Ruiz, J. The Endogenous Cannabinoid System and the Basal Ganglia: Biochemical, Pharmacological, and Therapeutic Aspects. **2002**, 16.
- (88) Guzmán, M. Cannabinoids: Potential Anticancer Agents. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3 (10), 745–755. <https://doi.org/10.1038/nrc1188>.
- (89) Cudaback, E.; Marrs, W.; Moeller, T.; Stella, N. The Expression Level of CB1 and CB2 Receptors Determines Their Efficacy at Inducing Apoptosis in Astrocytomas. *PLoS ONE* **2010**, 5 (1), e8702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008702>.
- (90) Downer, E.; Boland, B.; Fogarty, M.; Campbell, V. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Induces the Apoptotic Pathway in Cultured Cortical Neurones via Activation of the CB1 Receptor. 6.
- (91) Maccarrone, M.; Finazzi-Agró, A. The Endocannabinoid System, Anandamide and the Regulation of Mammalian Cell Apoptosis. *Cell Death Differ.* **2003**, 10 (9), 946–955. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401284>.
- (92) Campbell, V. A. Tetrahydrocannabinol-Induced Apoptosis of Cultured Cortical Neurones Is Associated with Cytochrome c Release and Caspase-3 Activation. *Neuropharmacology* **2001**, 40 (5), 702–709. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(00\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(00)00210-0).
- (93) Costigan, A.; Hollville, E.; Martin, S. J. Discriminating Between Apoptosis, Necrosis, Necroptosis, and Ferroptosis by Microscopy and Flow Cytometry. *Curr. Protoc.* **2023**, 3 (12), e951. <https://doi.org/10.1002/cpz1.951>.
- (94) Darzynkiewicz, Z.; Bruno, S.; Del Bino, G.; Gorczyca, W.; Hotz, M. A.; Lassota, P.; Traganos, F. Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry. *Cytometry* **1992**, 13 (8), 795–808. <https://doi.org/10.1002/cyto.990130802>.
- (95) Piotr Pozarowski, Jerzy Grabarek, and Zbigniew Darzynkiewicz. Current Protocols in Cell Biology. **2003**, 18.8.1-18 (8.8.33).
- (96) Ghasemi, M.; Turnbull, T.; Sebastian, S.; Kempson, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22 (23), 12827. <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>.
- (97) Politzer, P.; Murray, J. S.; Clark, T. Halogen Bonding and Other σ -Hole Interactions: A Perspective. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15 (27), 11178. <https://doi.org/10.1039/c3cp00054k>.
- (98) Lilly, E. Assay Guidance Manual.

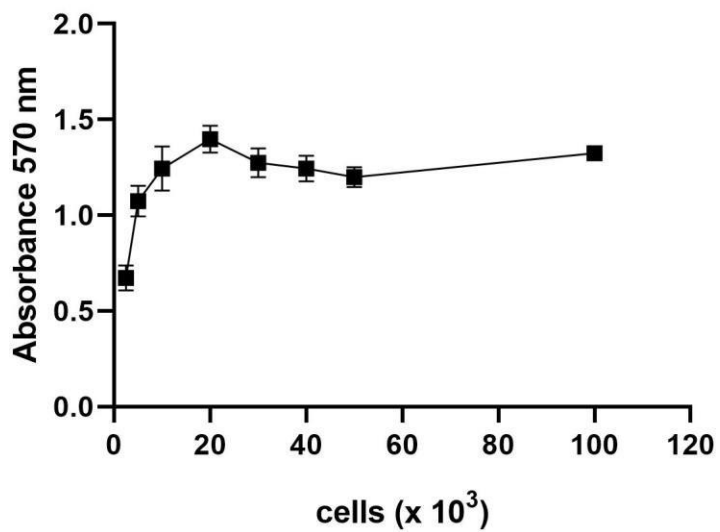
7.-ANEXOS.

7.1.-Ensayo de cantidad de células para cultivos en HL-60 y HEK293T.

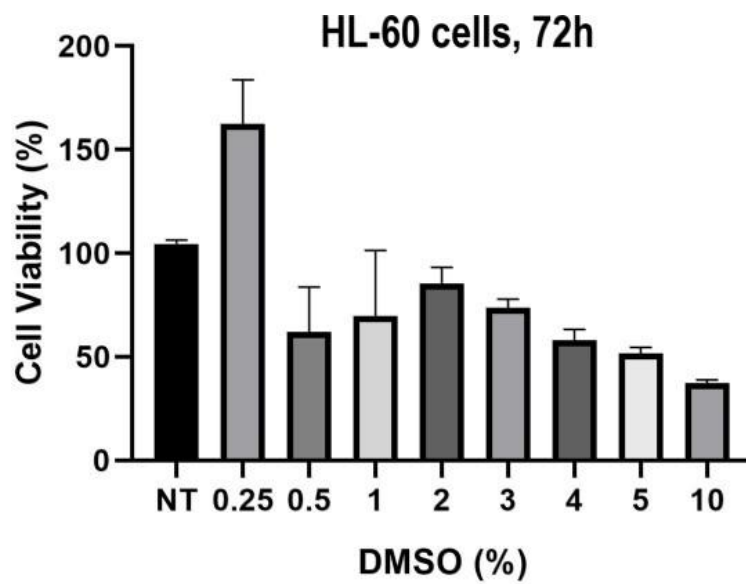
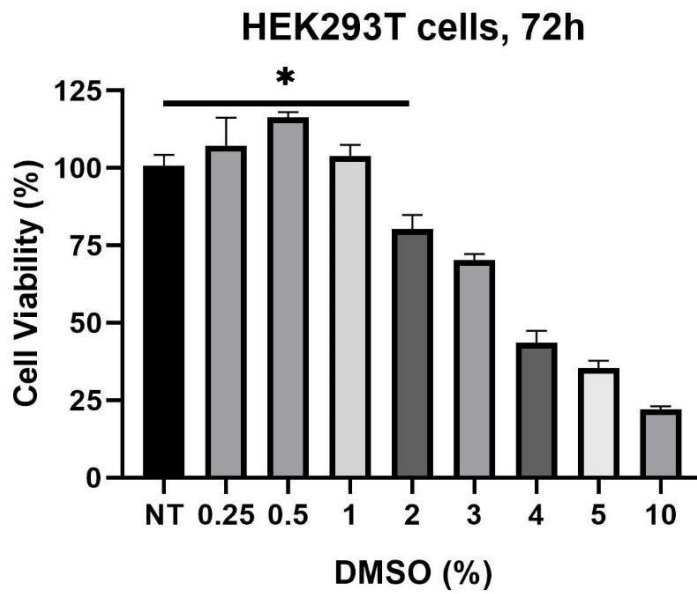
HEK293T cells, 72h



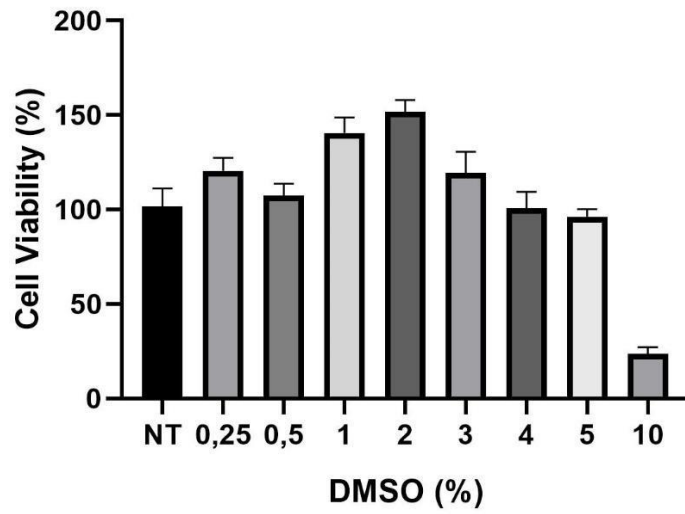
HL-60 cells, 72h



7.2.- Ensayo de viabilidad celular con porcentajes de DMSO al 0.25,0.5,1,2,3,4,5 y 10%.

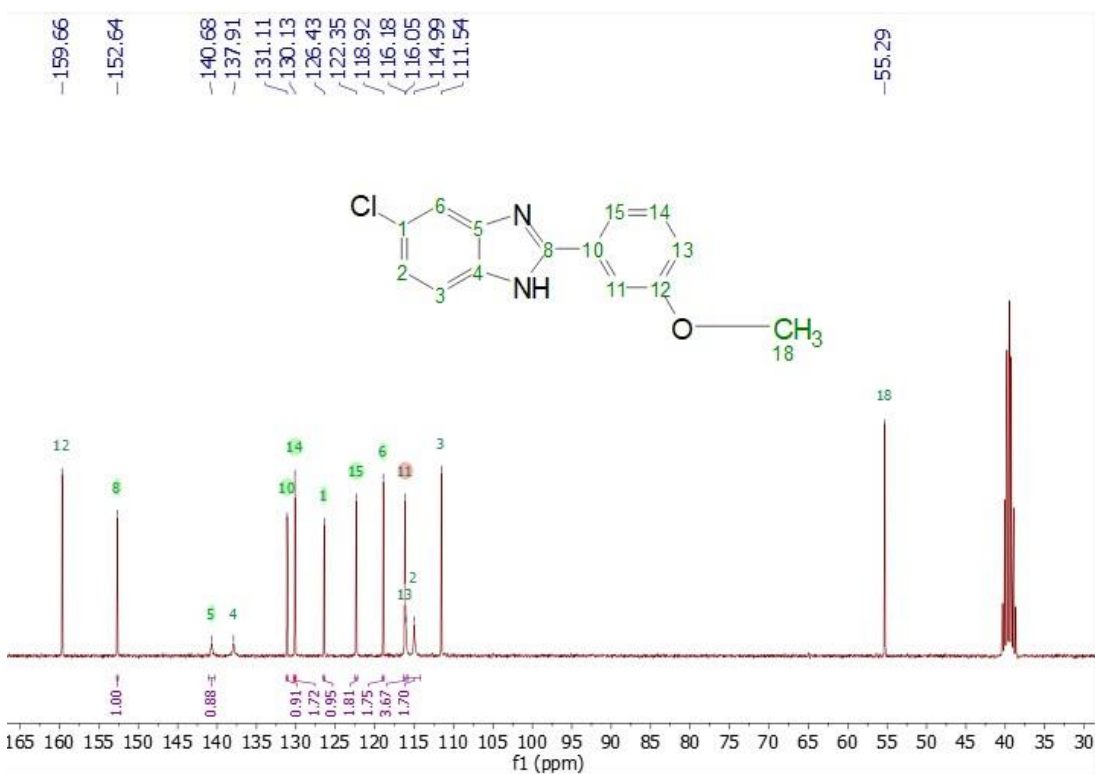
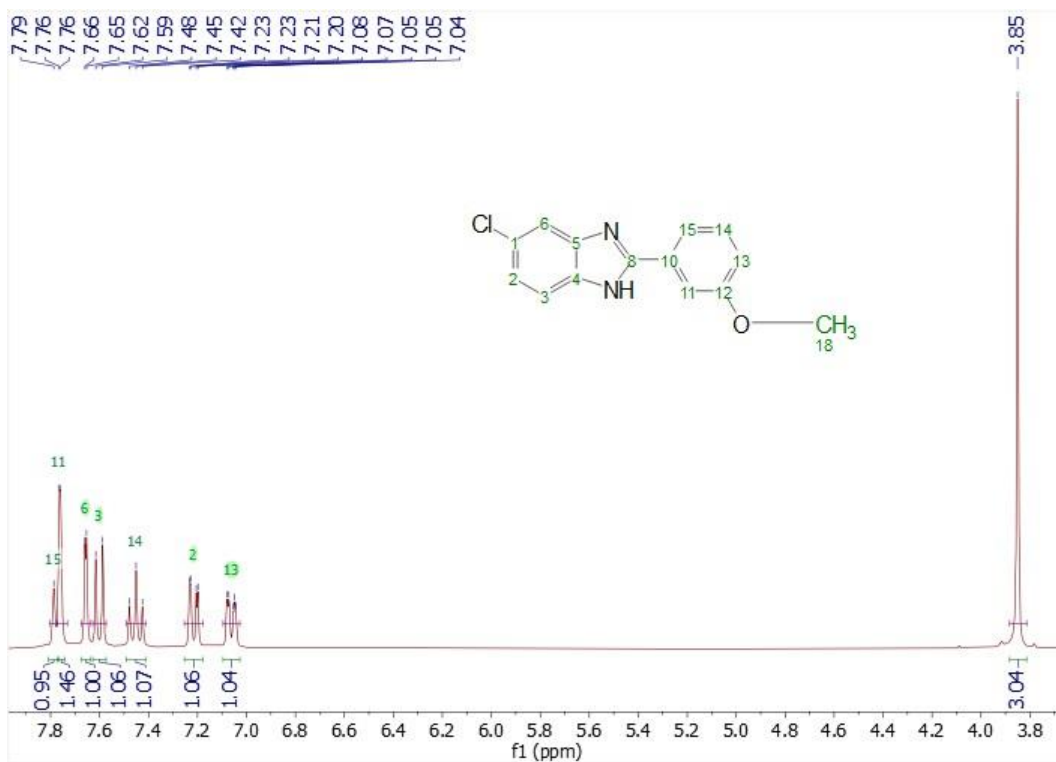


U87MG cells, 72h 5%SFB

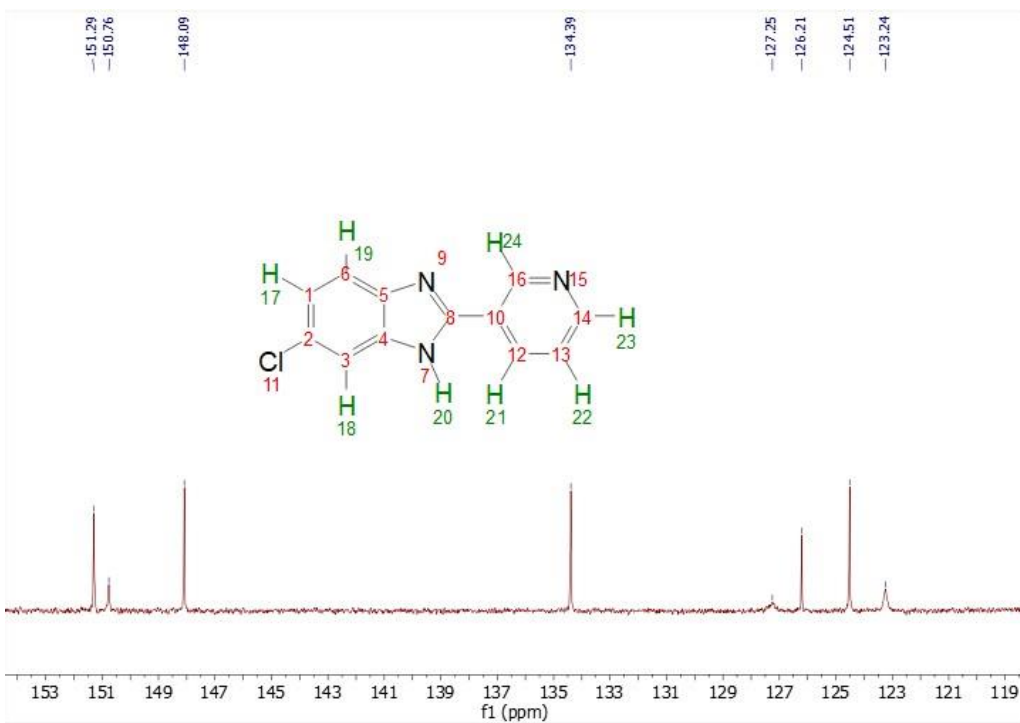
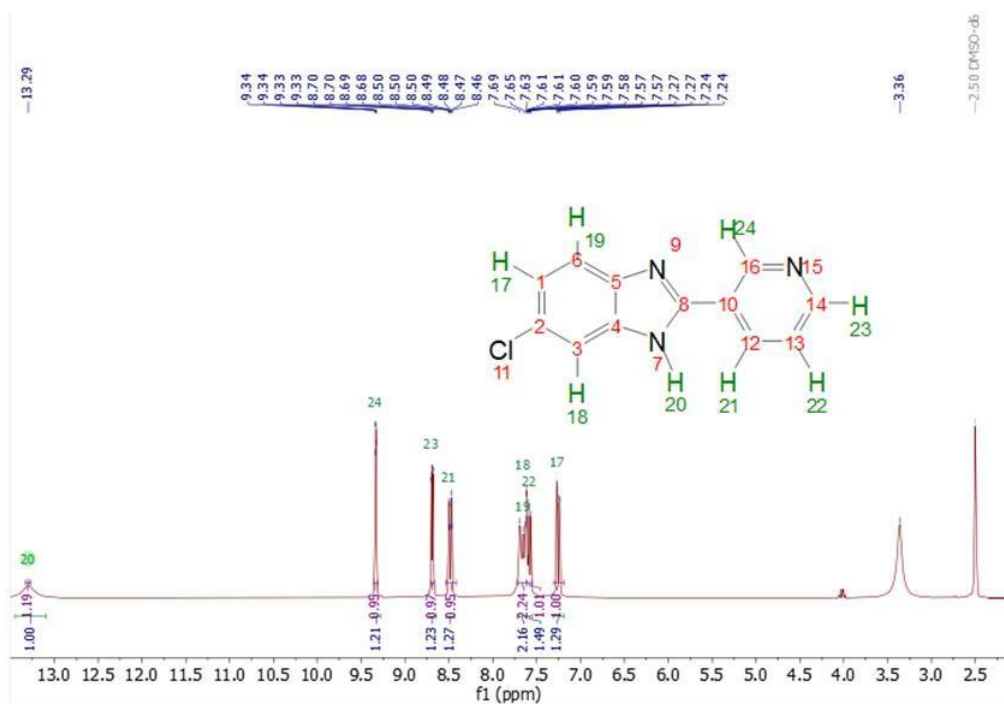


7.3.- Espectros

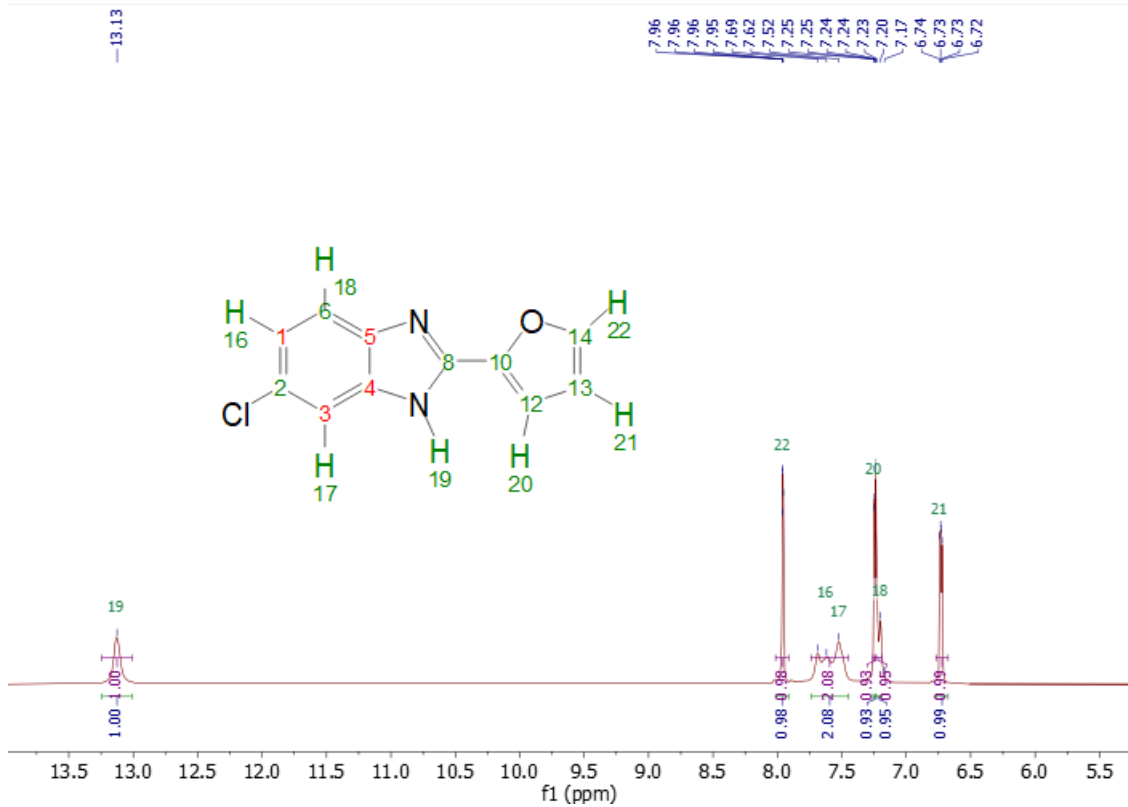
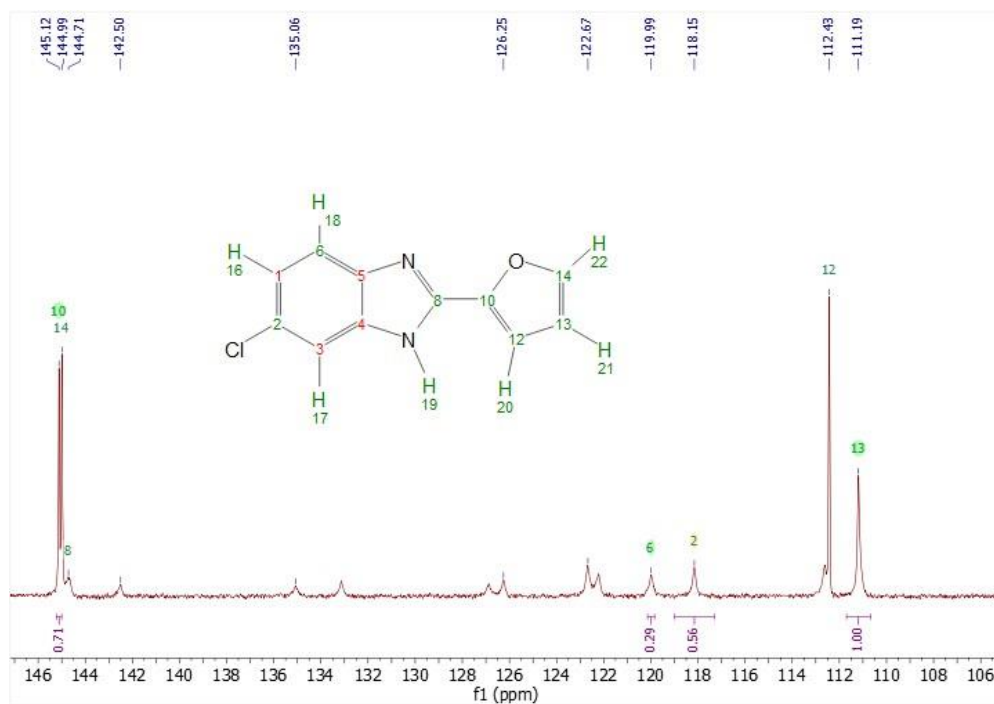
5-cloro-2-(3-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol



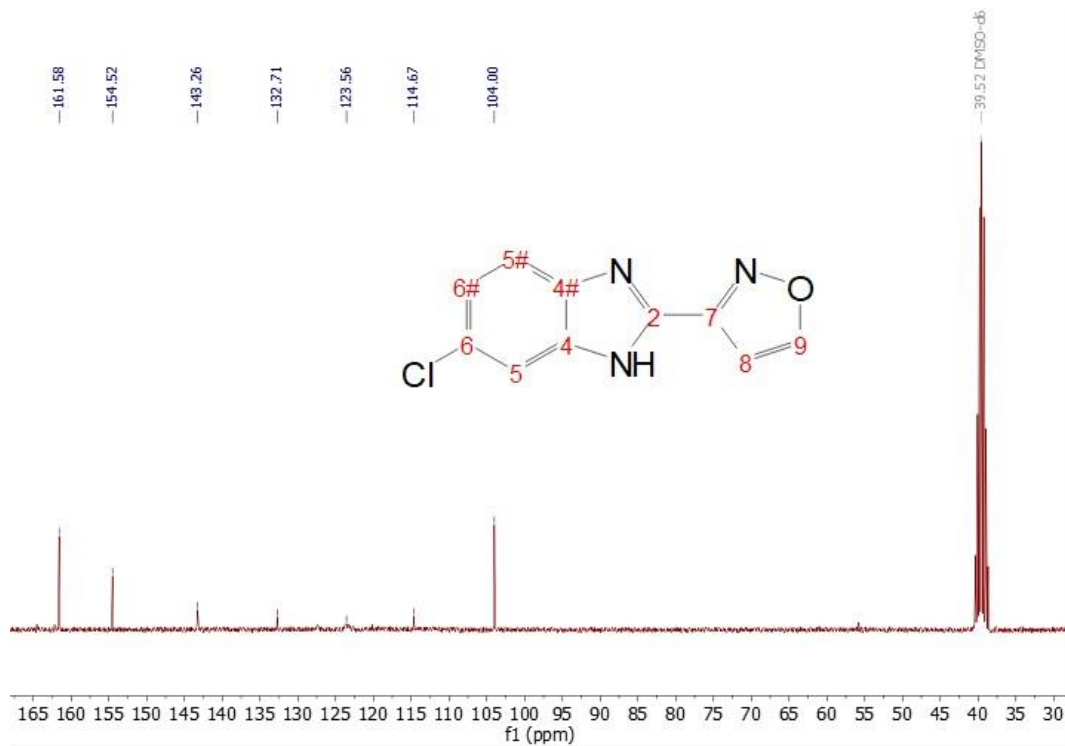
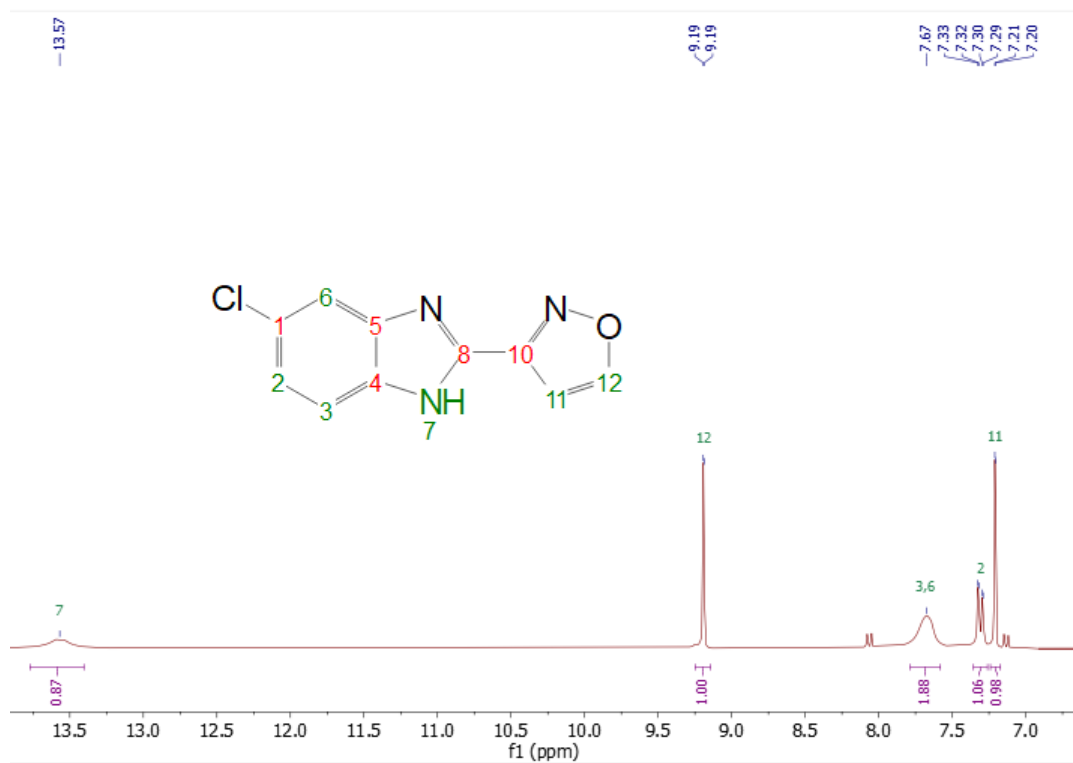
5-cloro-2-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol



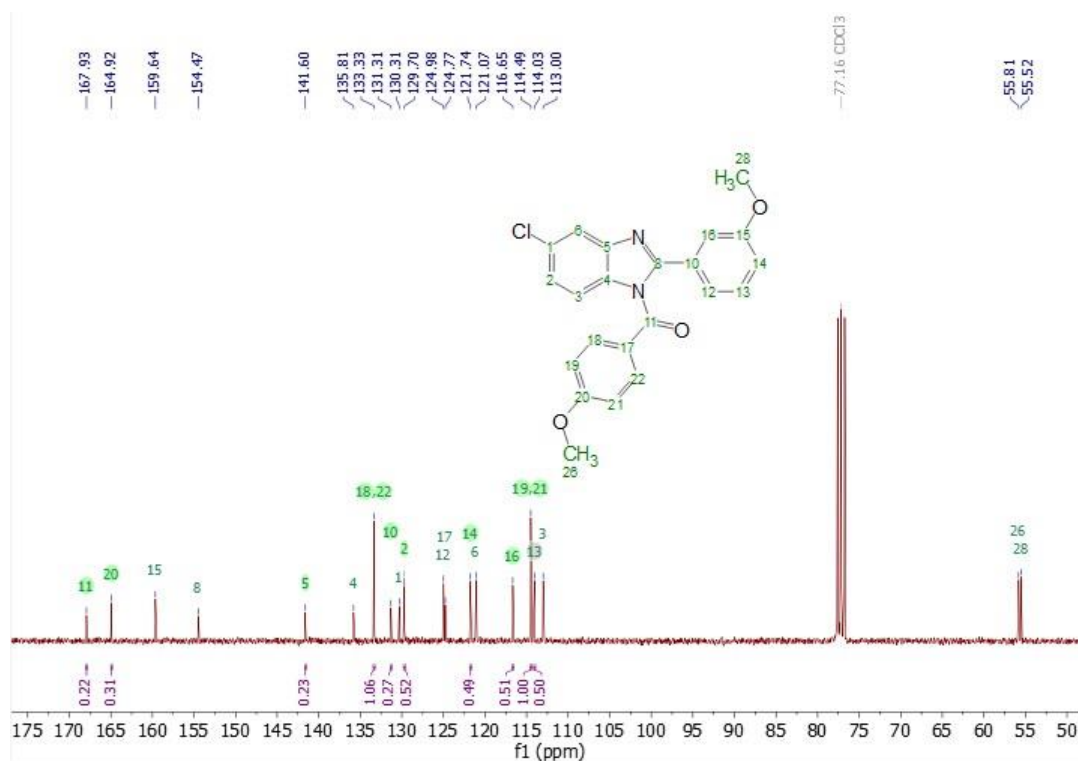
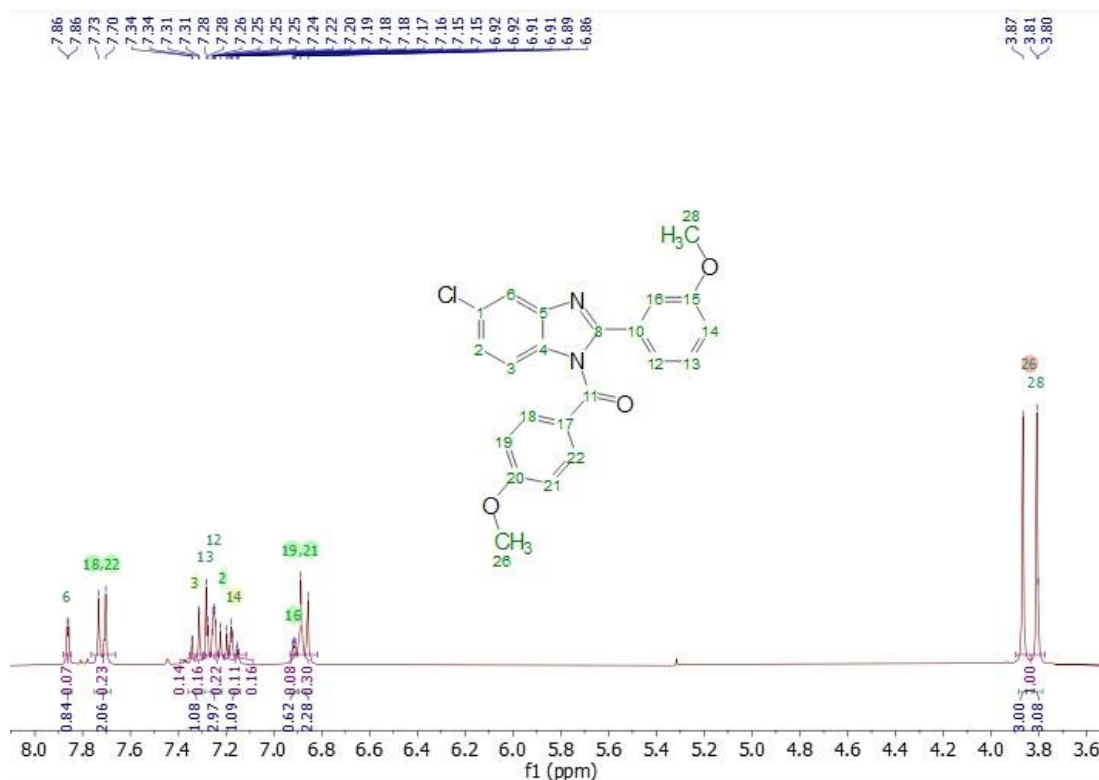
.5-cloro-2-(furan-2-il)-1H-benzo[d]imidazol.



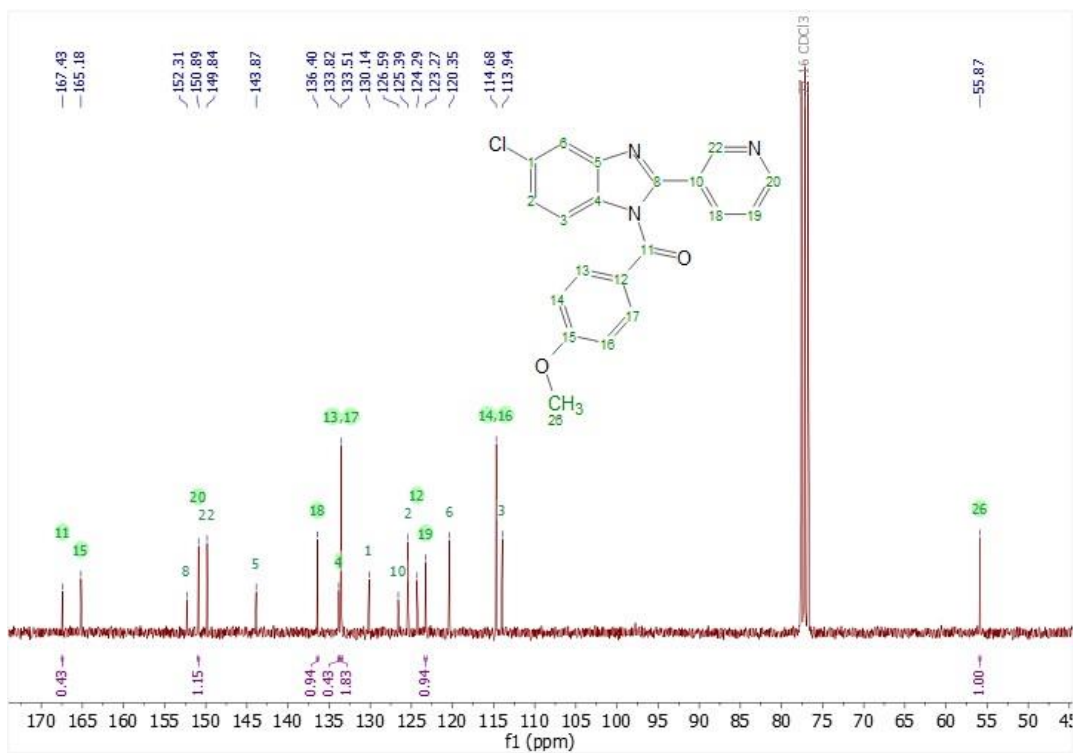
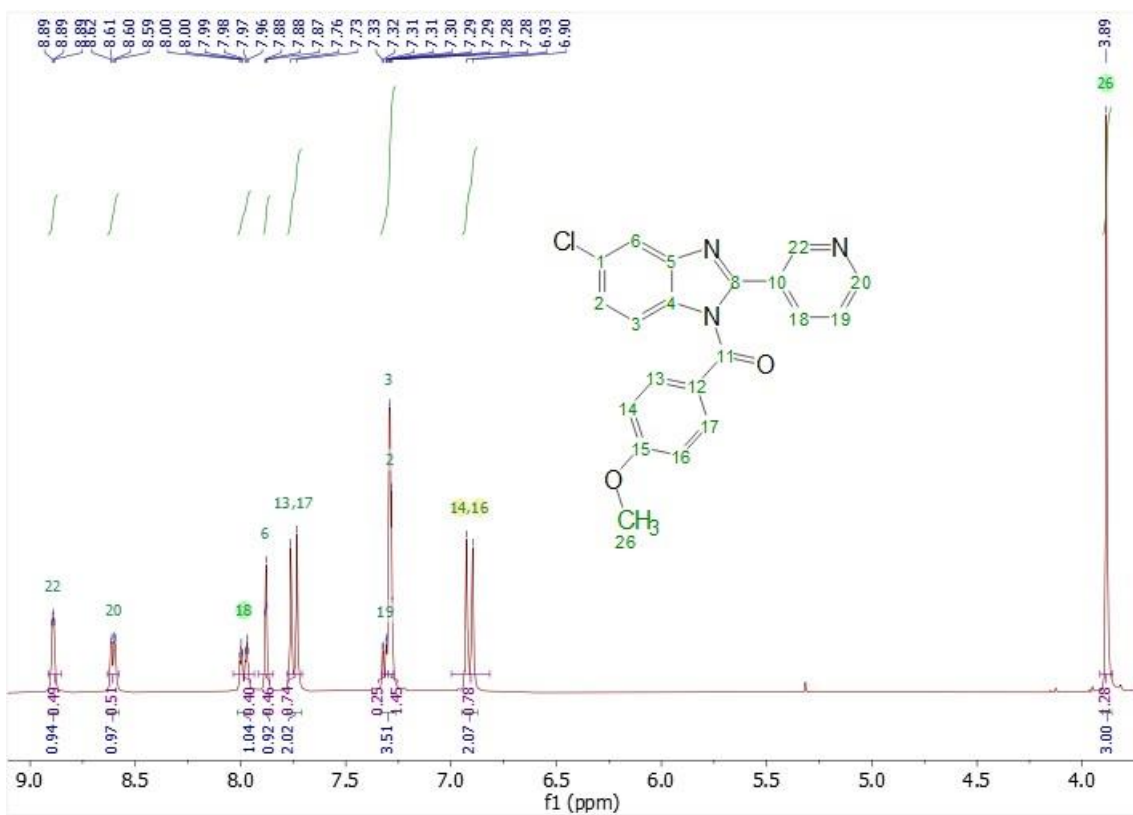
5-cloro-2-(isoxazolil)-1H-benzo[d]imidazol



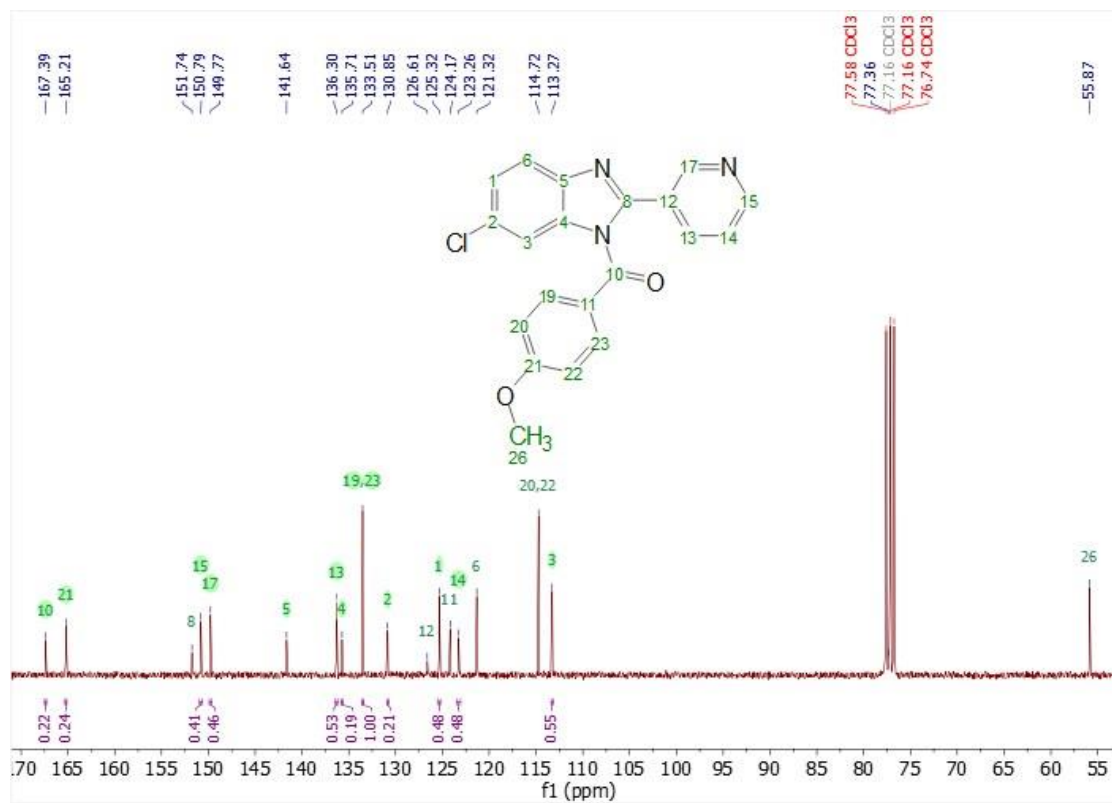
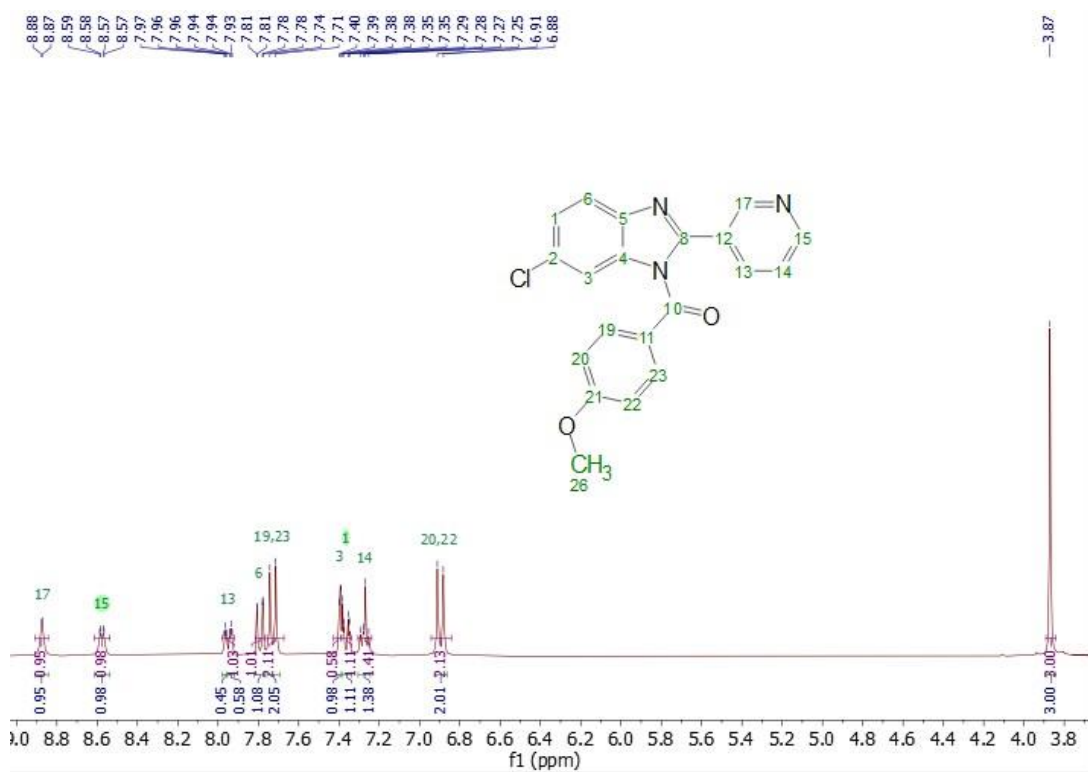
(5-cloro-2-(3-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona



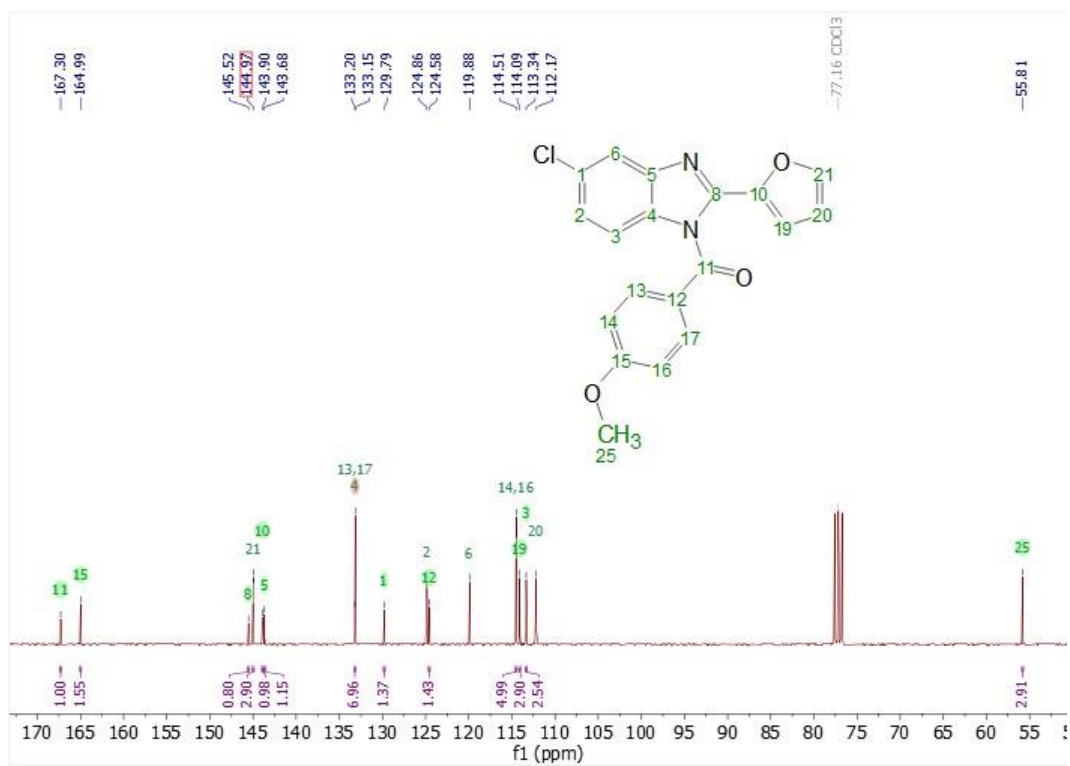
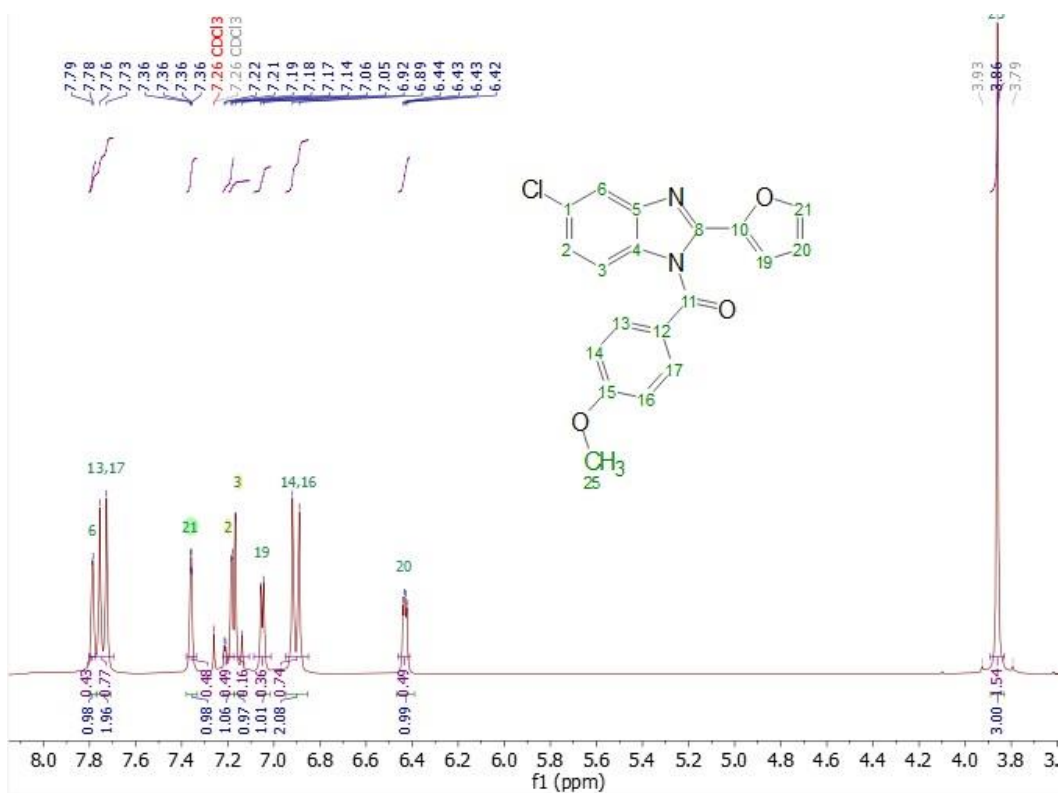
(5-cloro-2-(piridin-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona



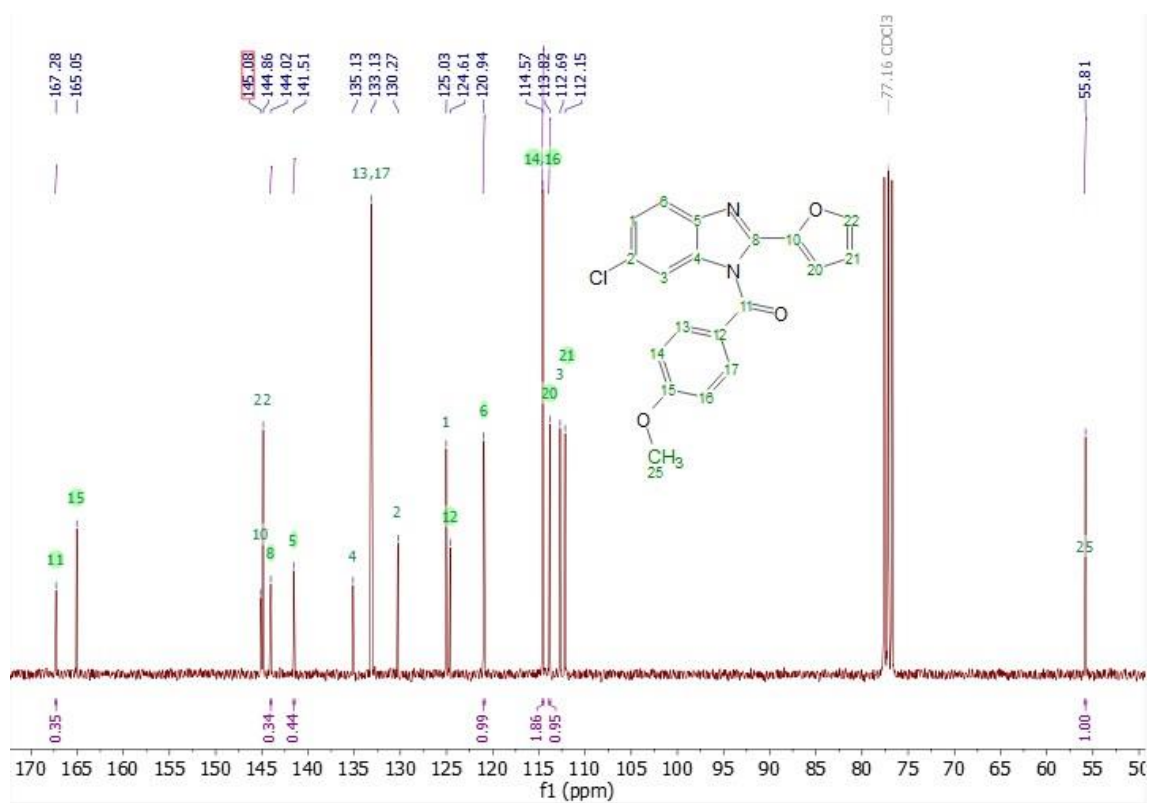
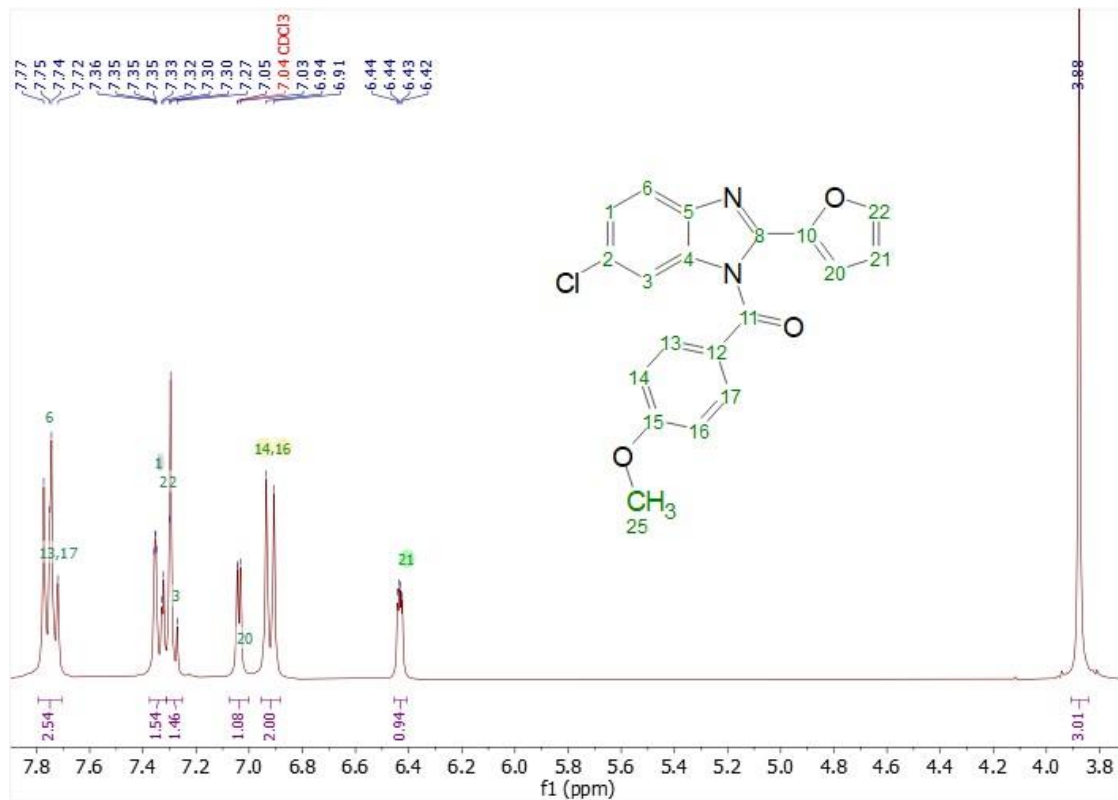
(6-cloro-2-(piridin-3-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona.



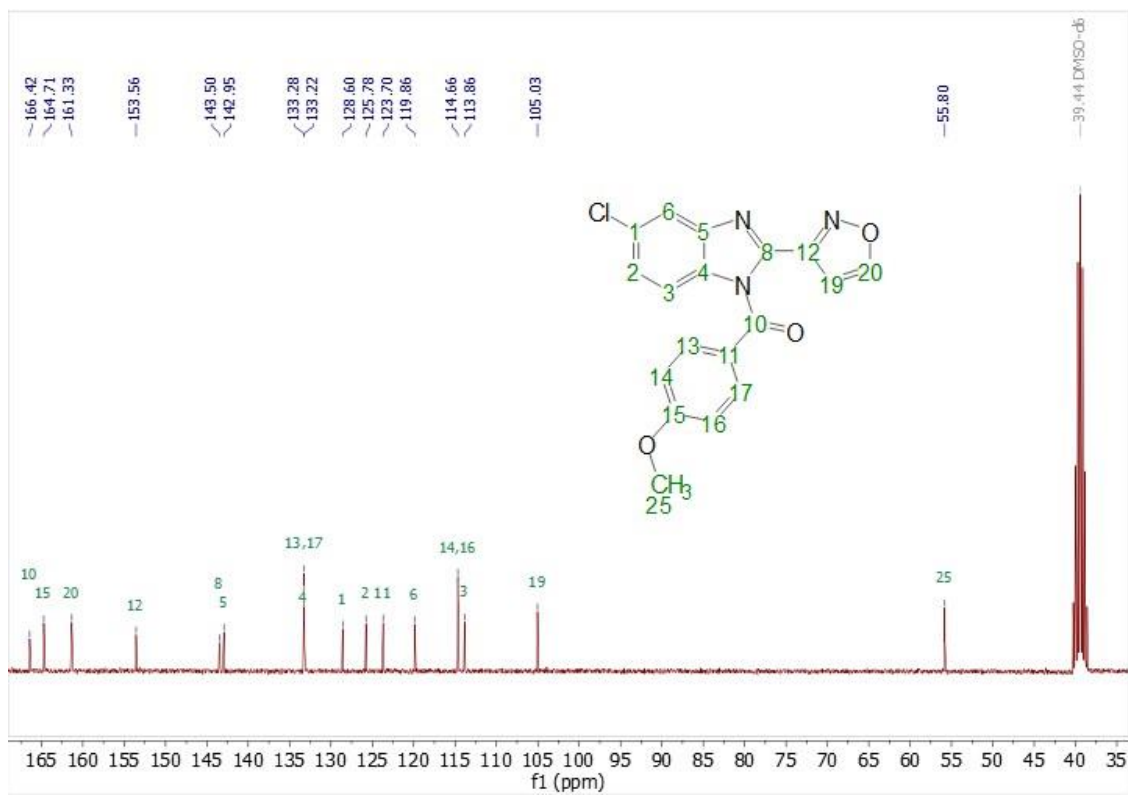
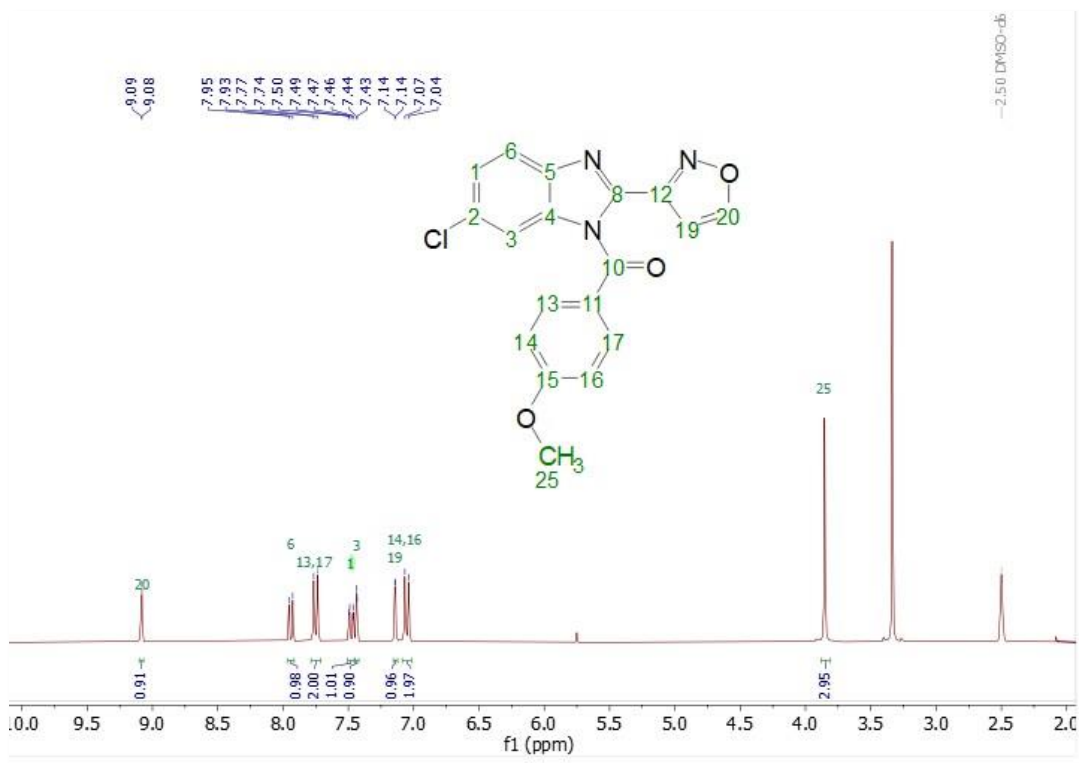
(5-cloro-2-(furan-2-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona



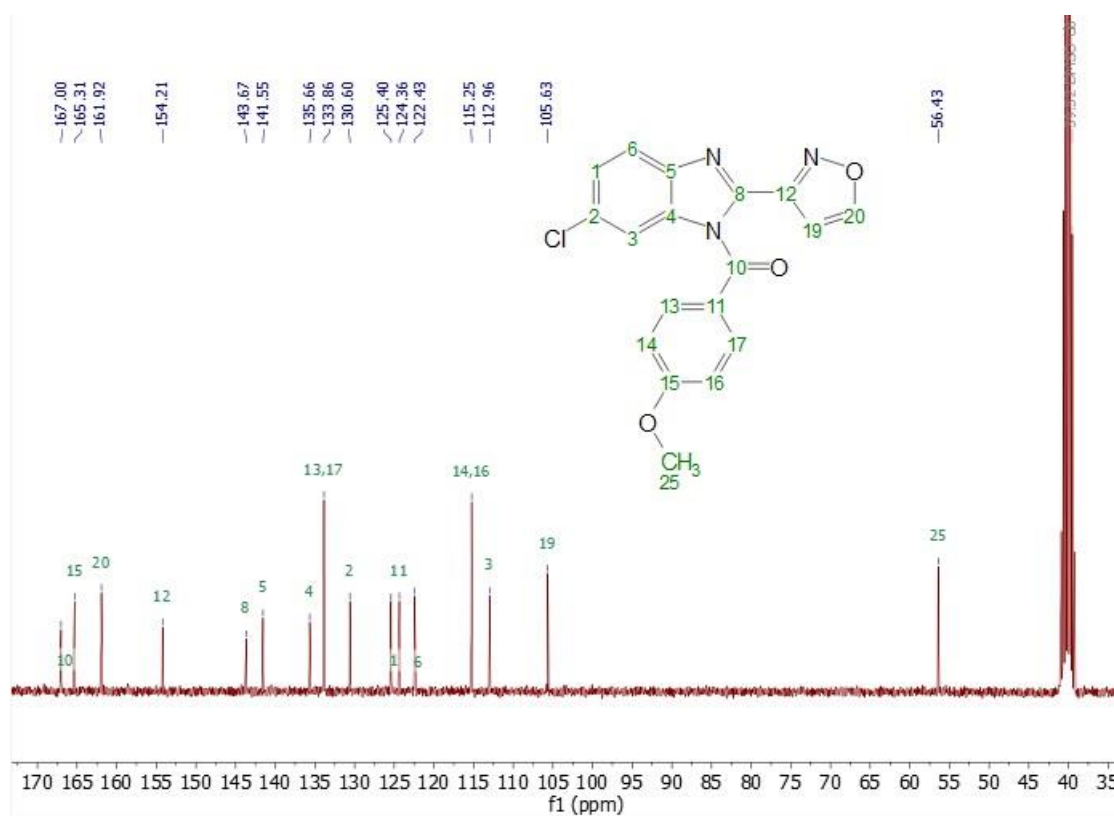
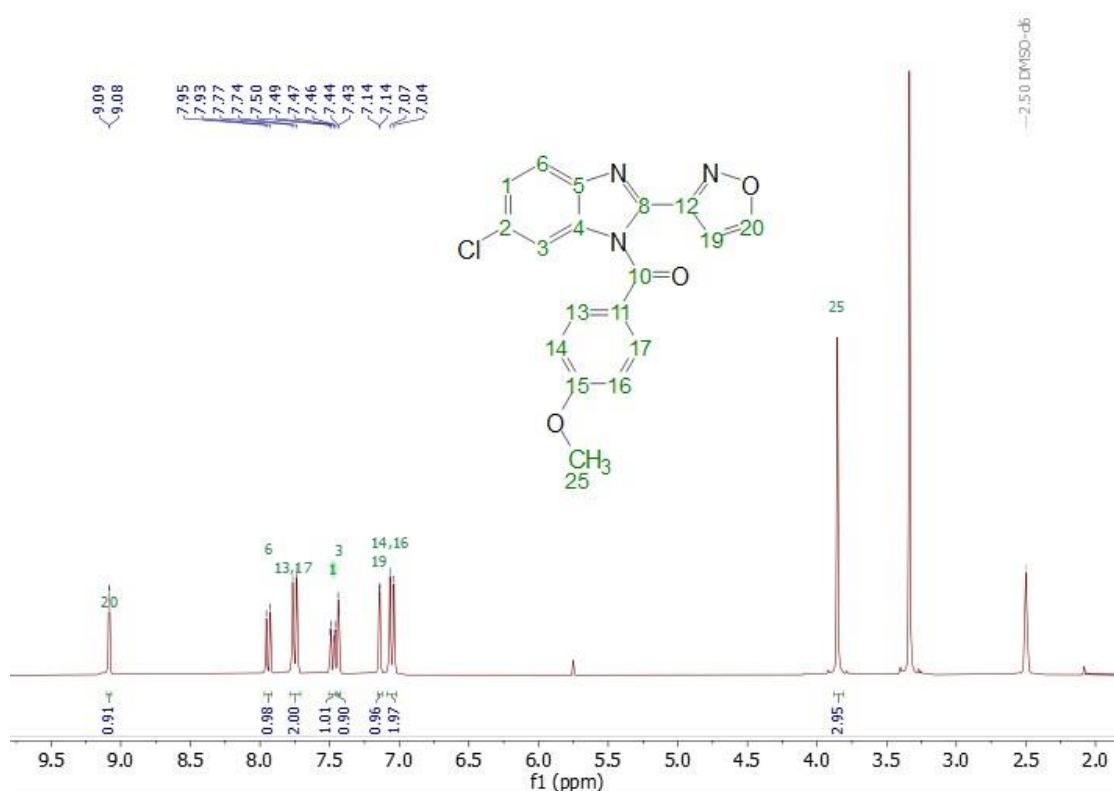
(6-cloro-2-(furan-2-il)-1*H*-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona



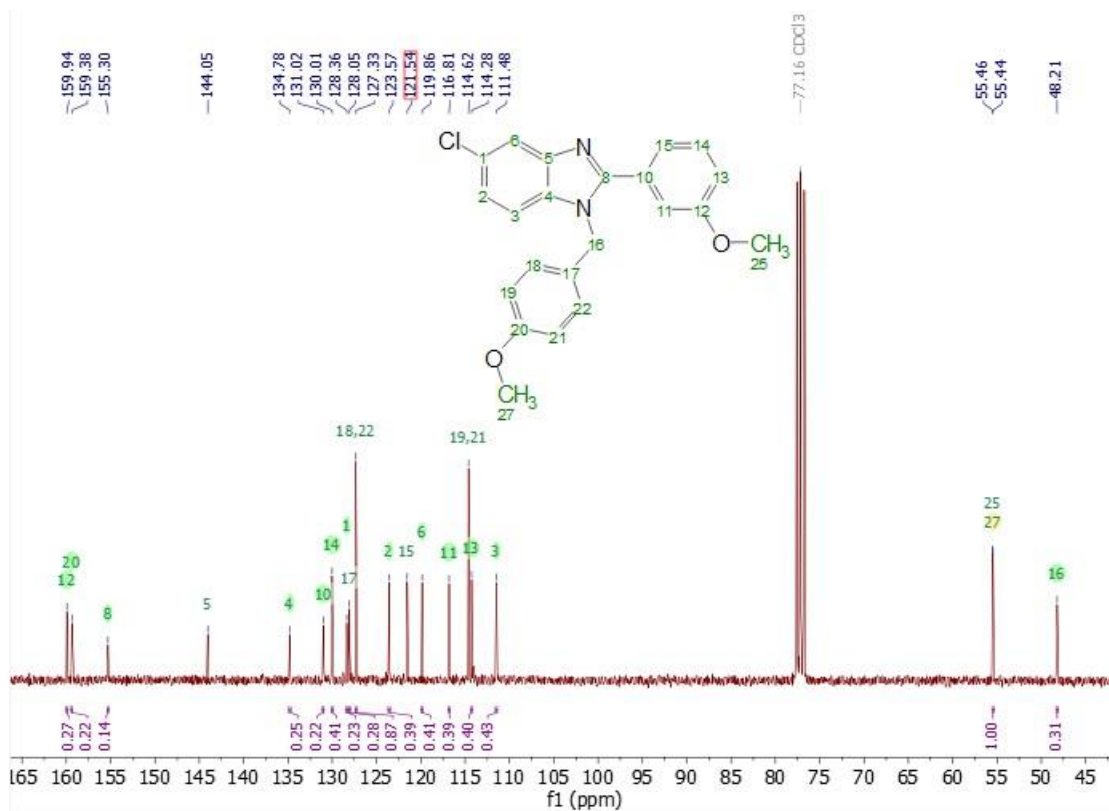
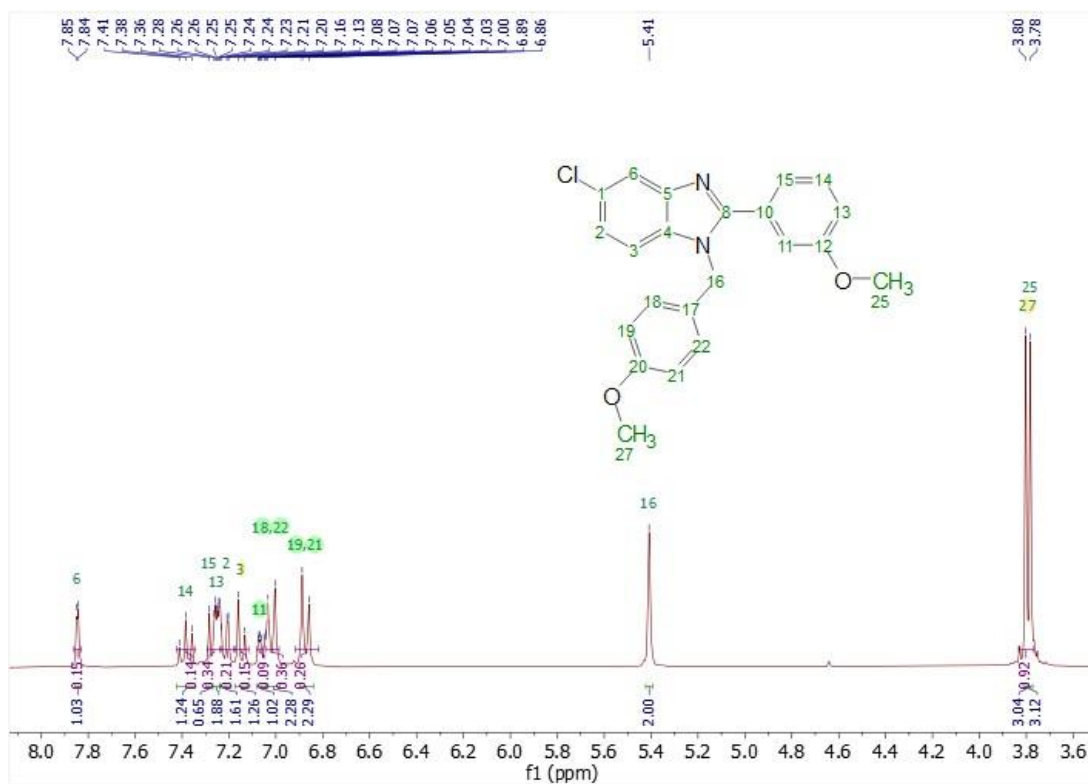
(5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona



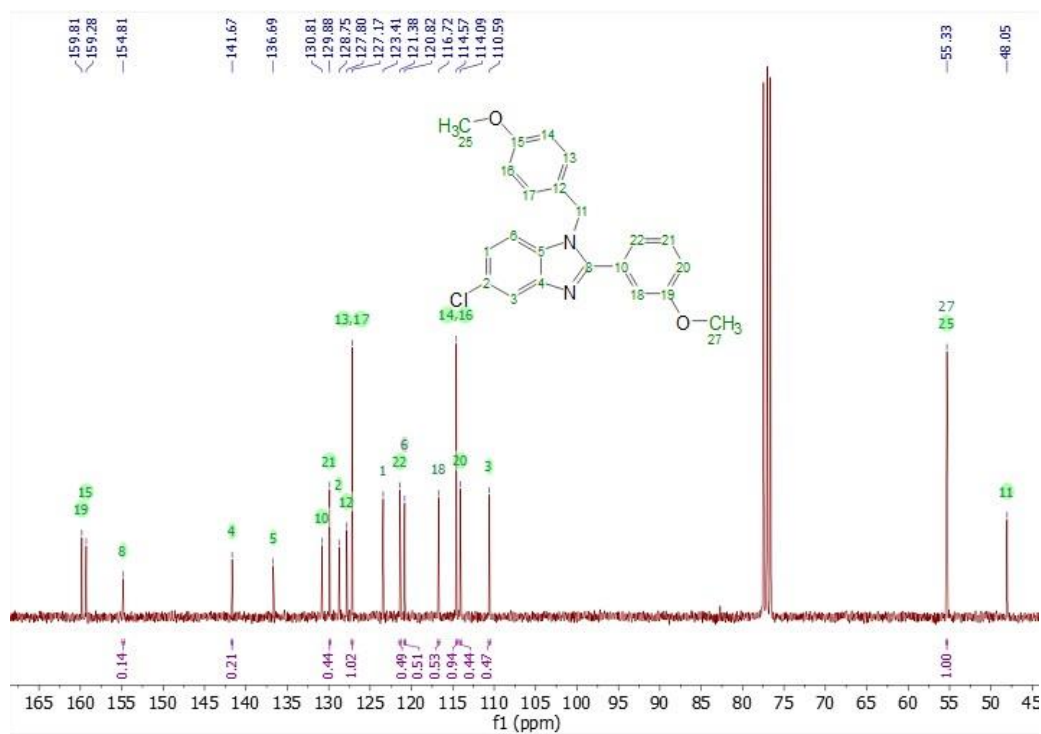
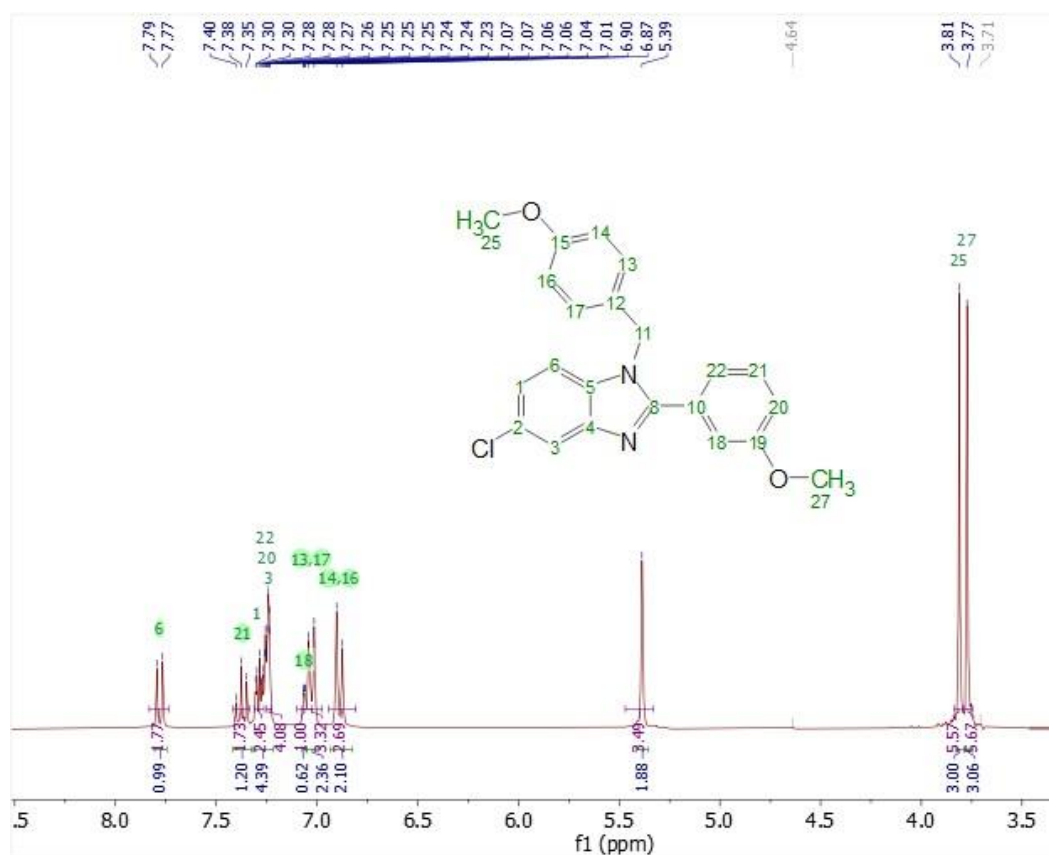
(5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)(4-metoxifenil)metanona



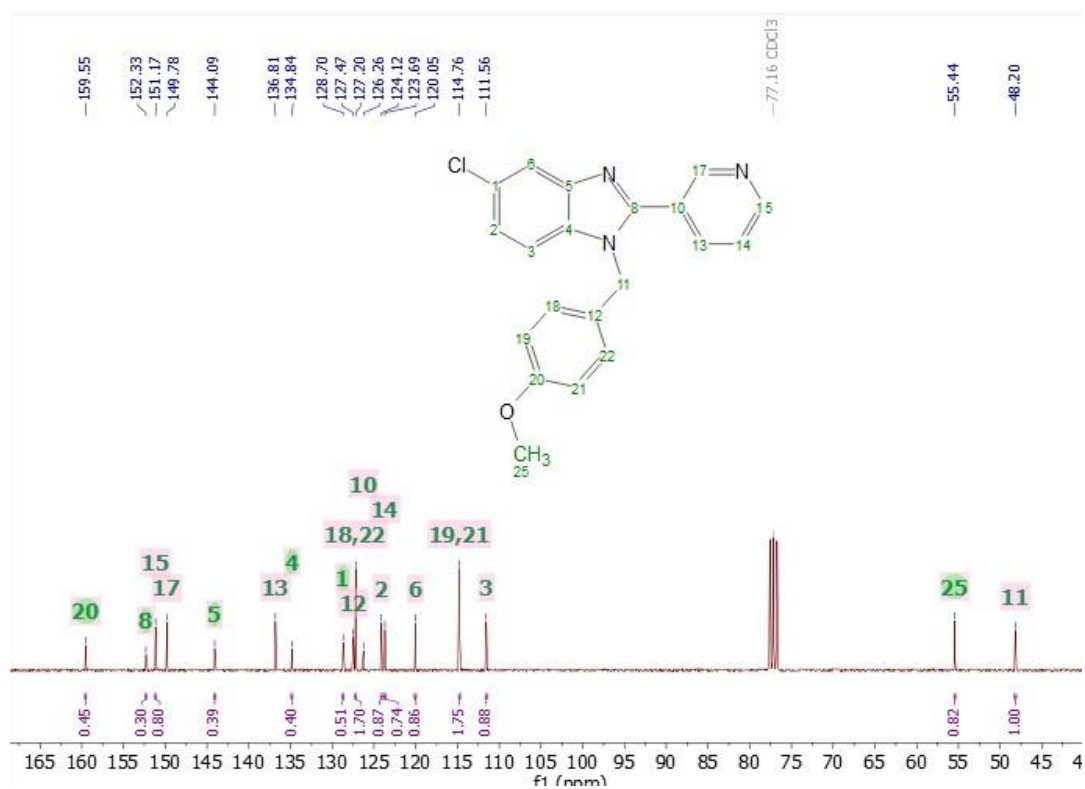
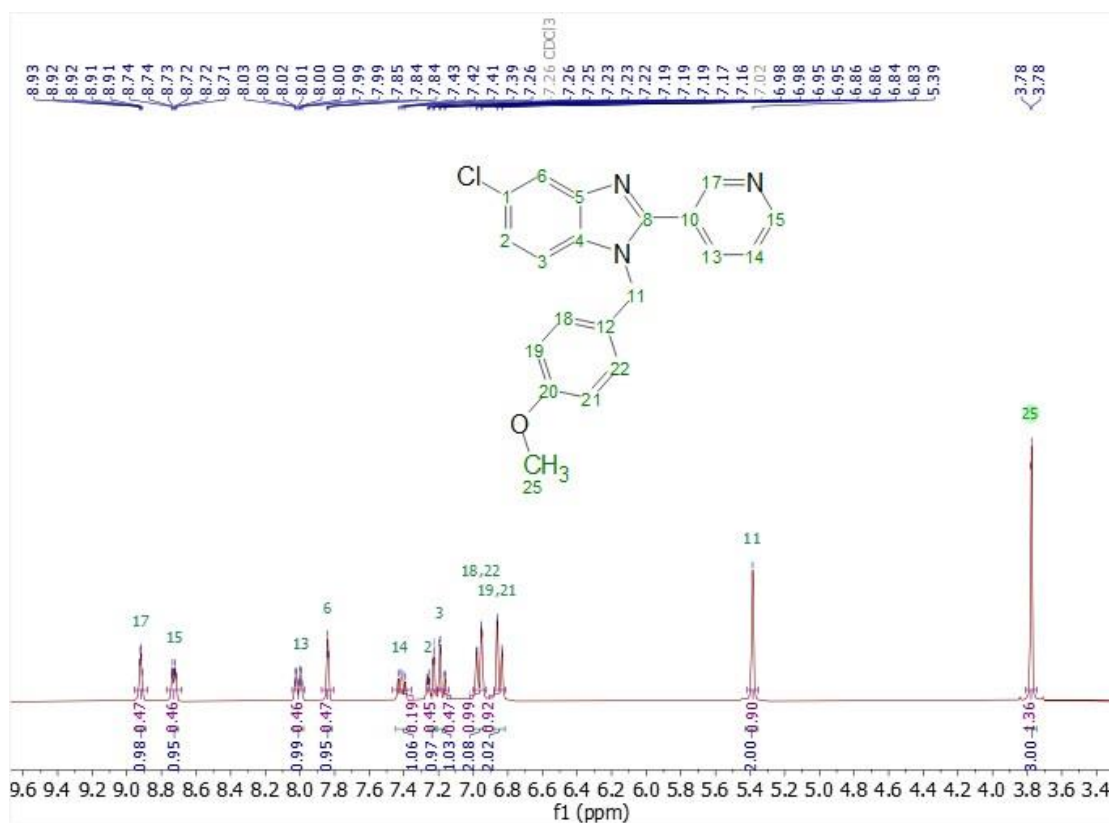
5-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(3-metoxifenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol



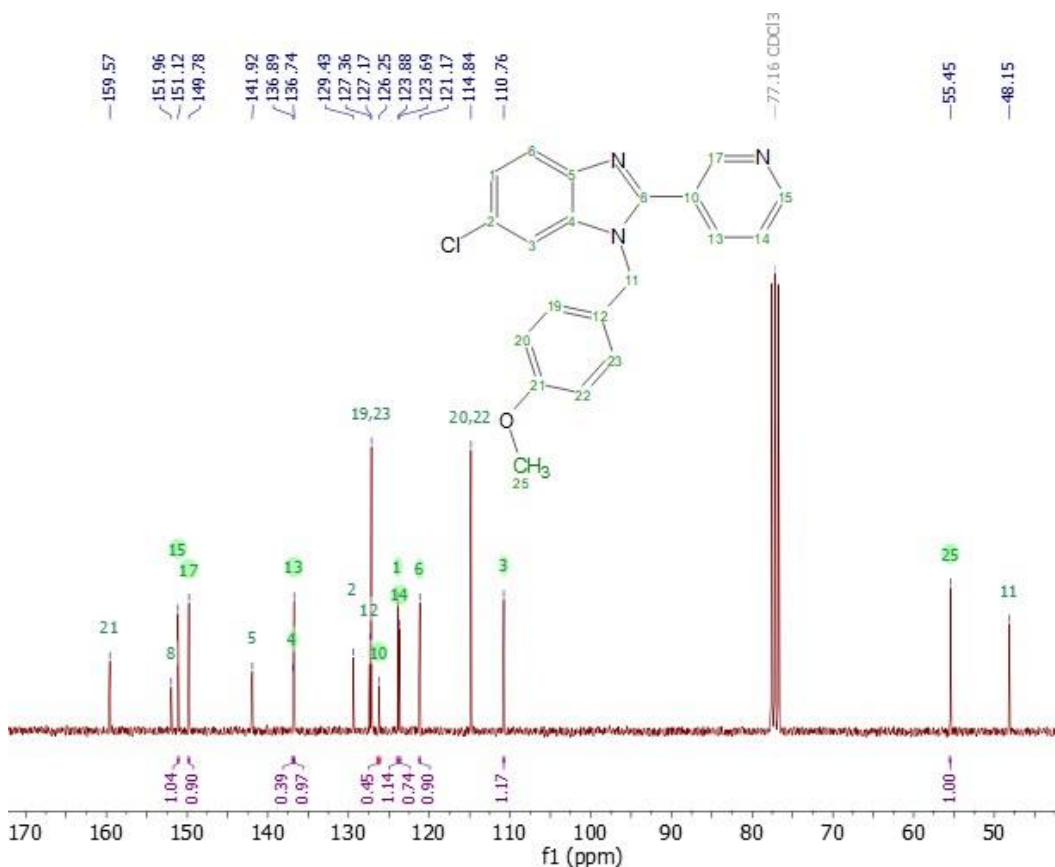
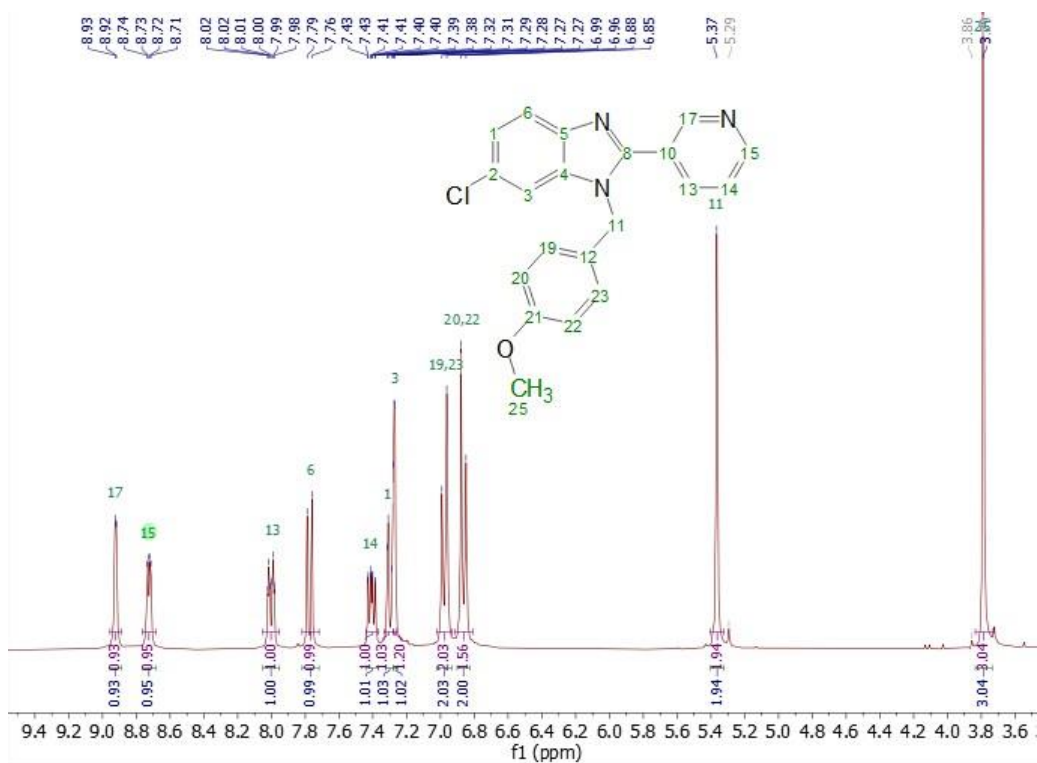
6-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(3-metoxifenil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol



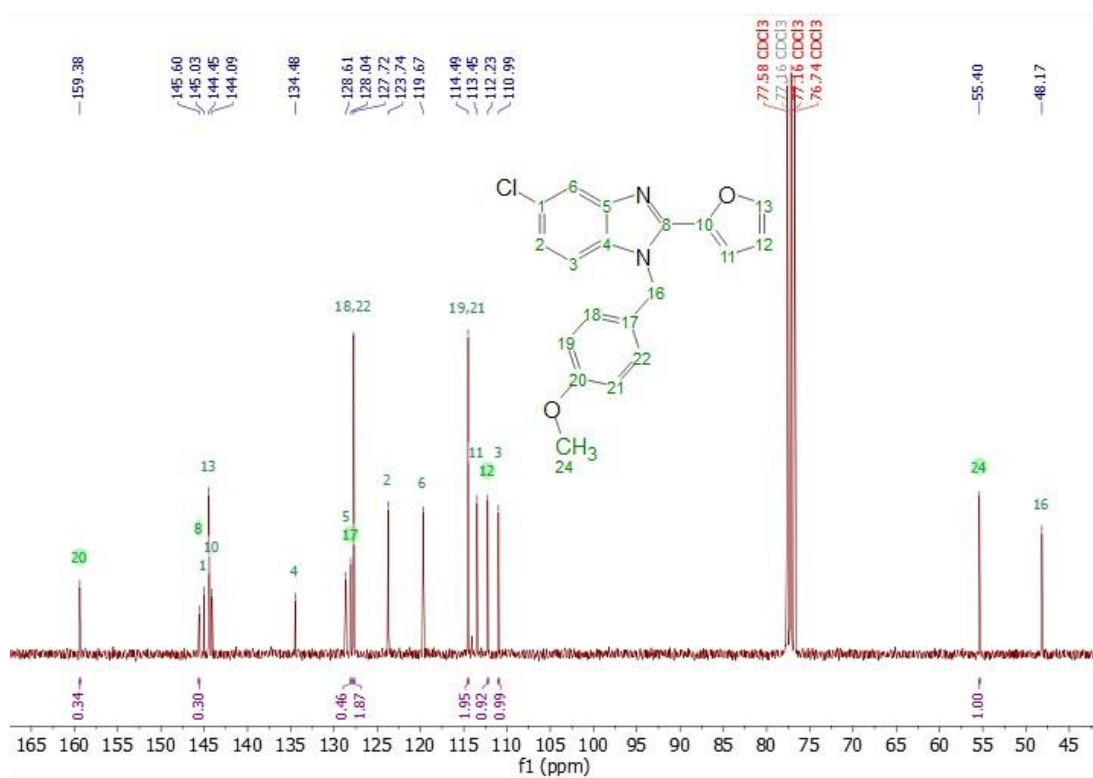
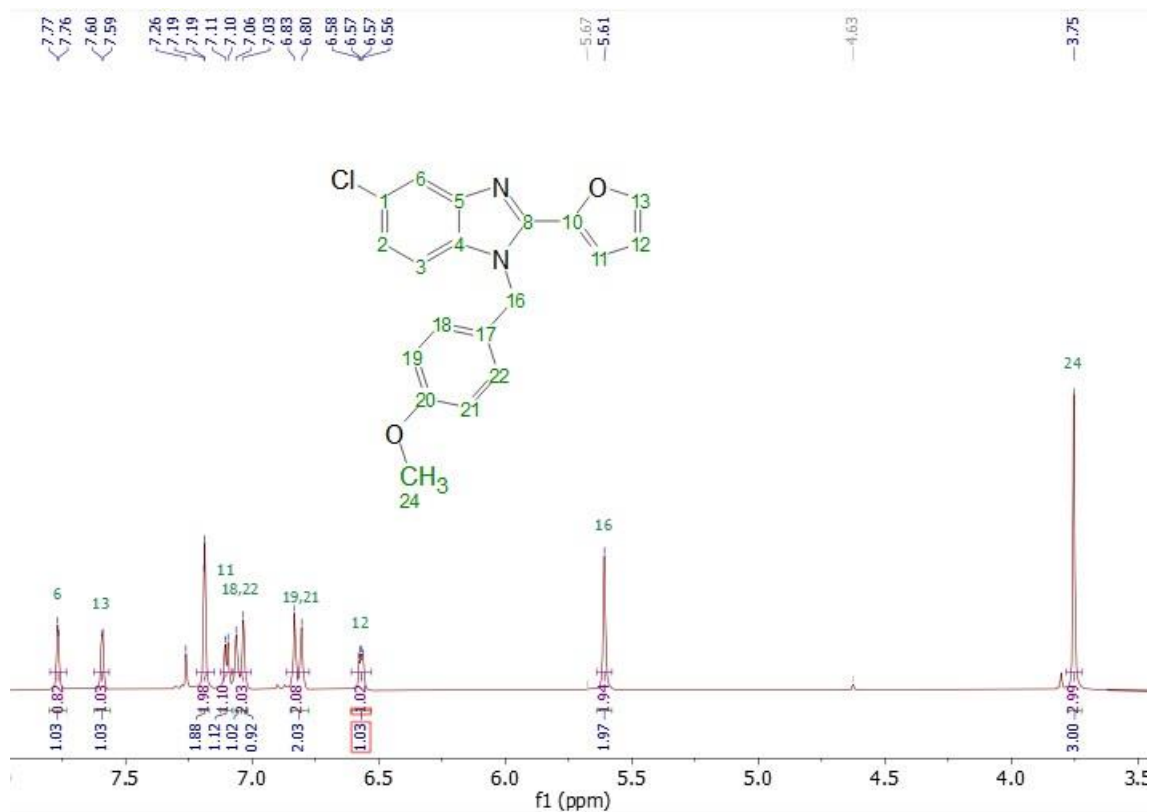
5-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol



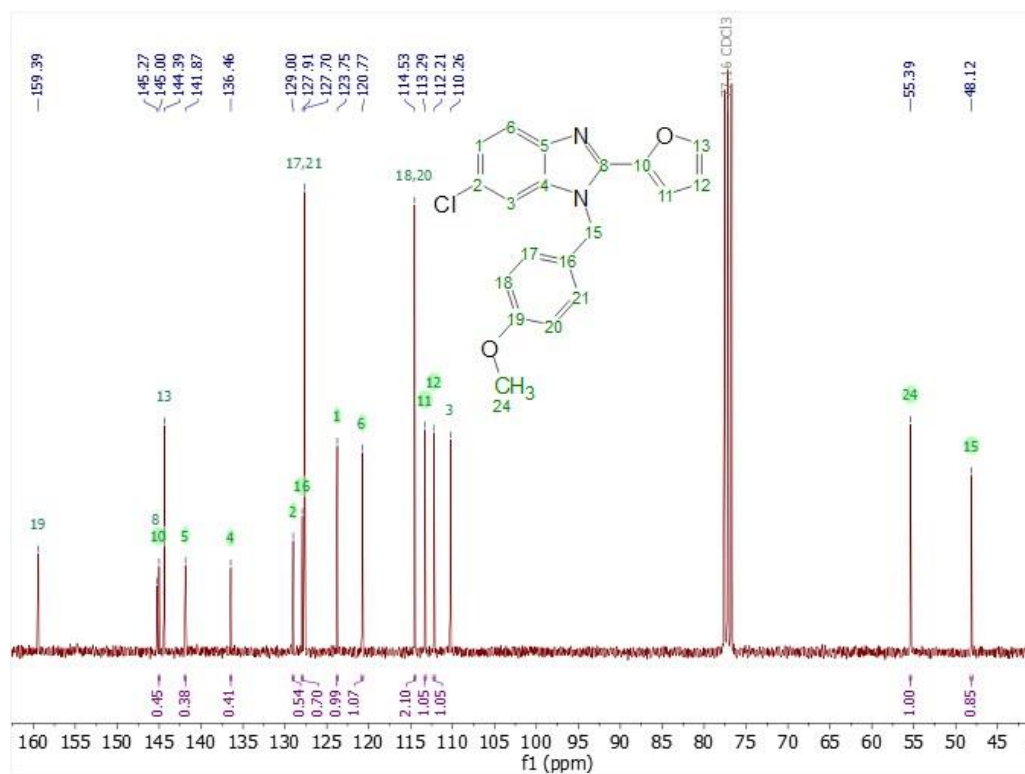
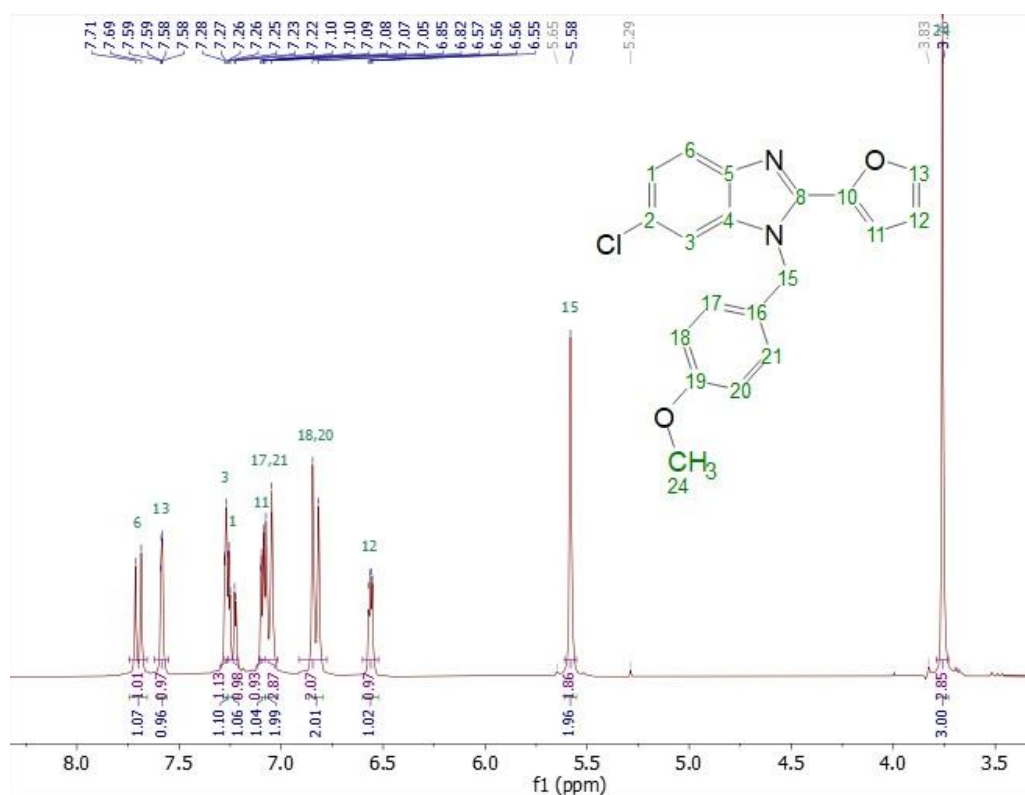
6-cloro-1-(4-metoxibencil)-2-(piridin-3-il)-1H-benzo[d]imidazol



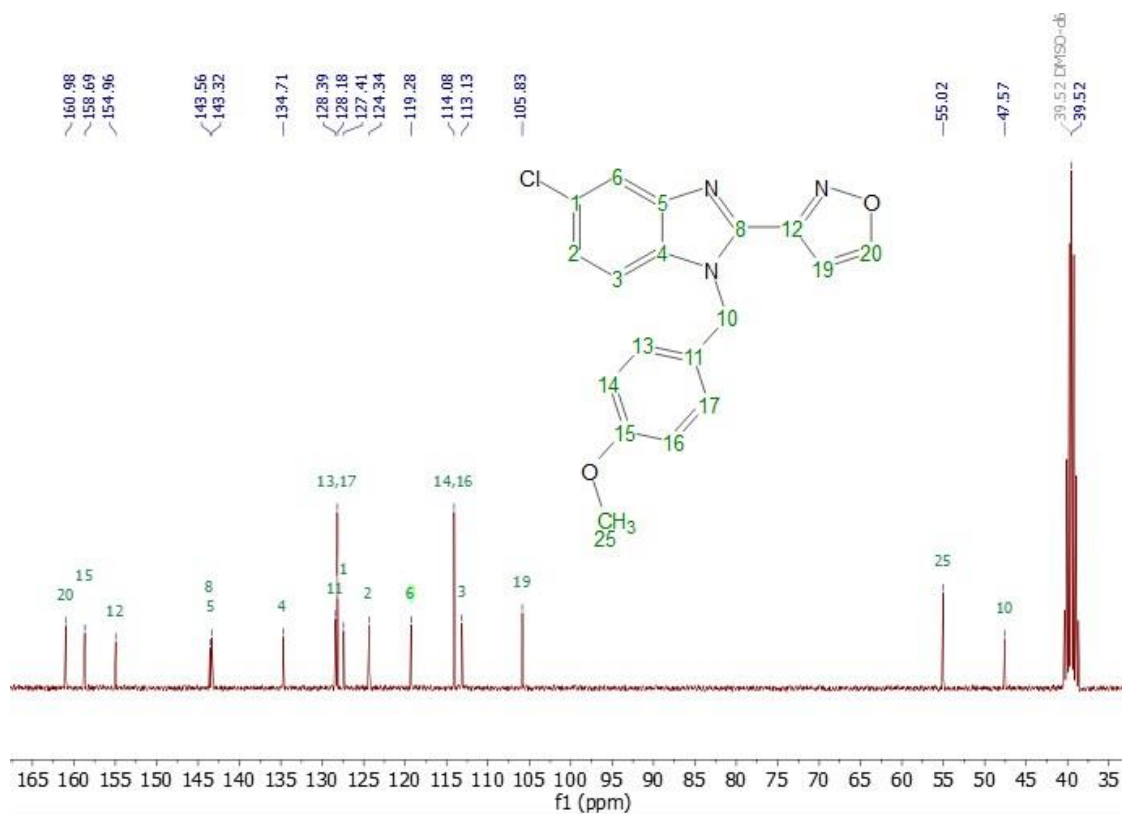
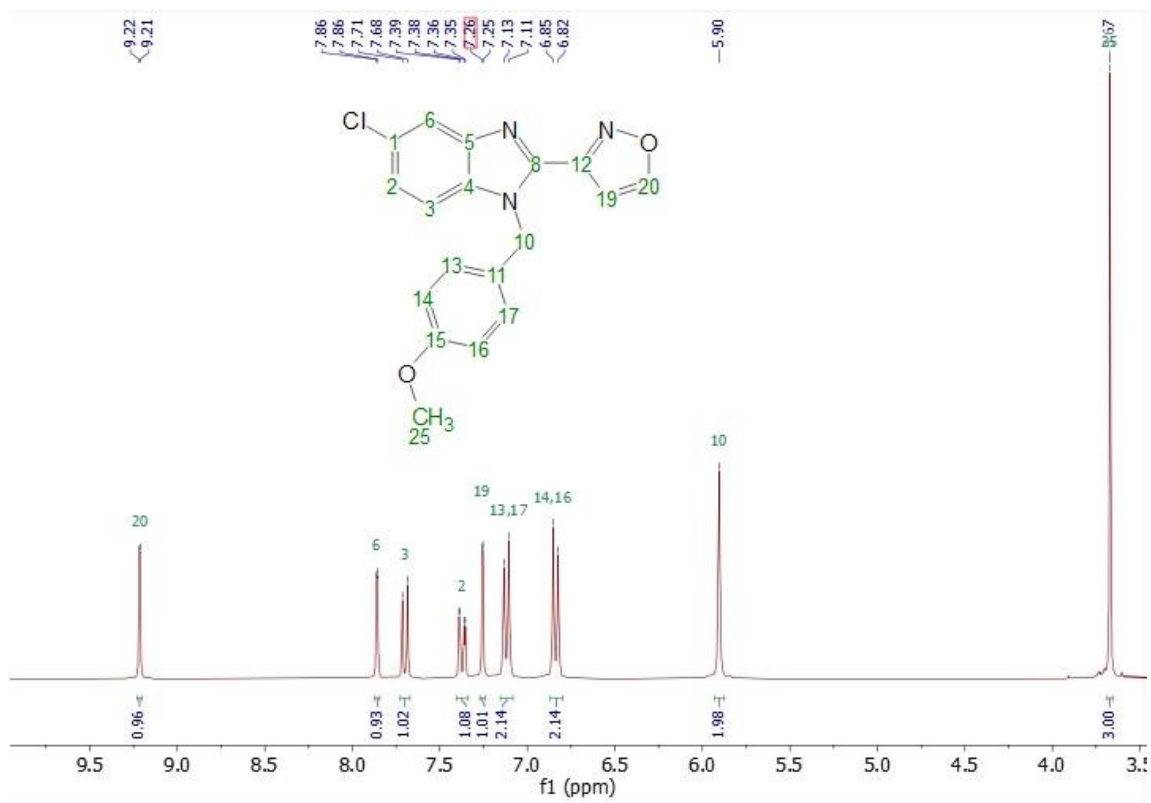
5-cloro-2-(furan-2-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol



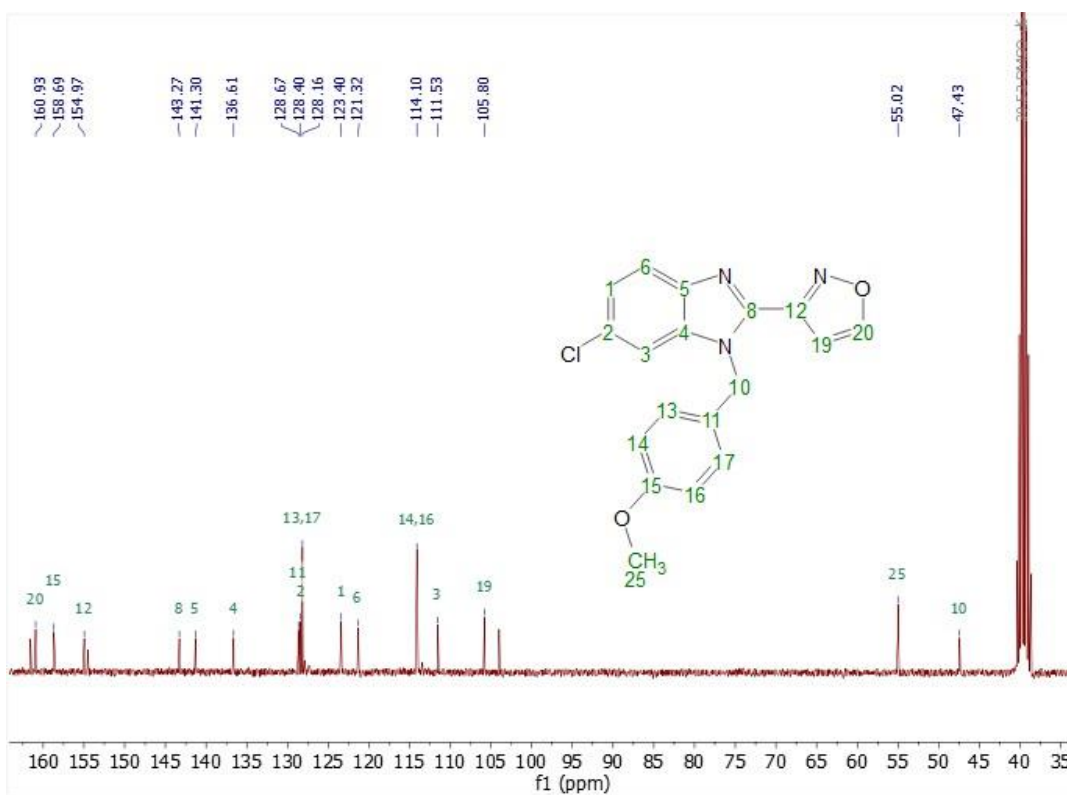
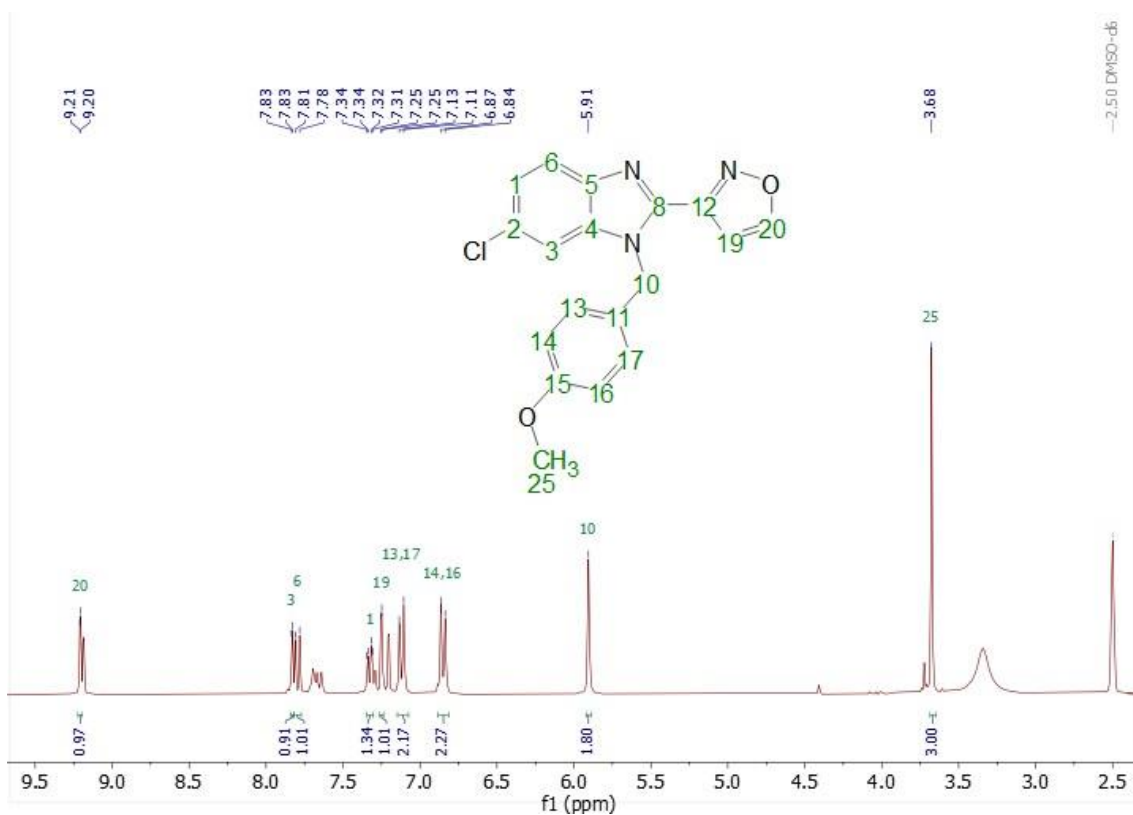
6-cloro-2-(furan-2-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol



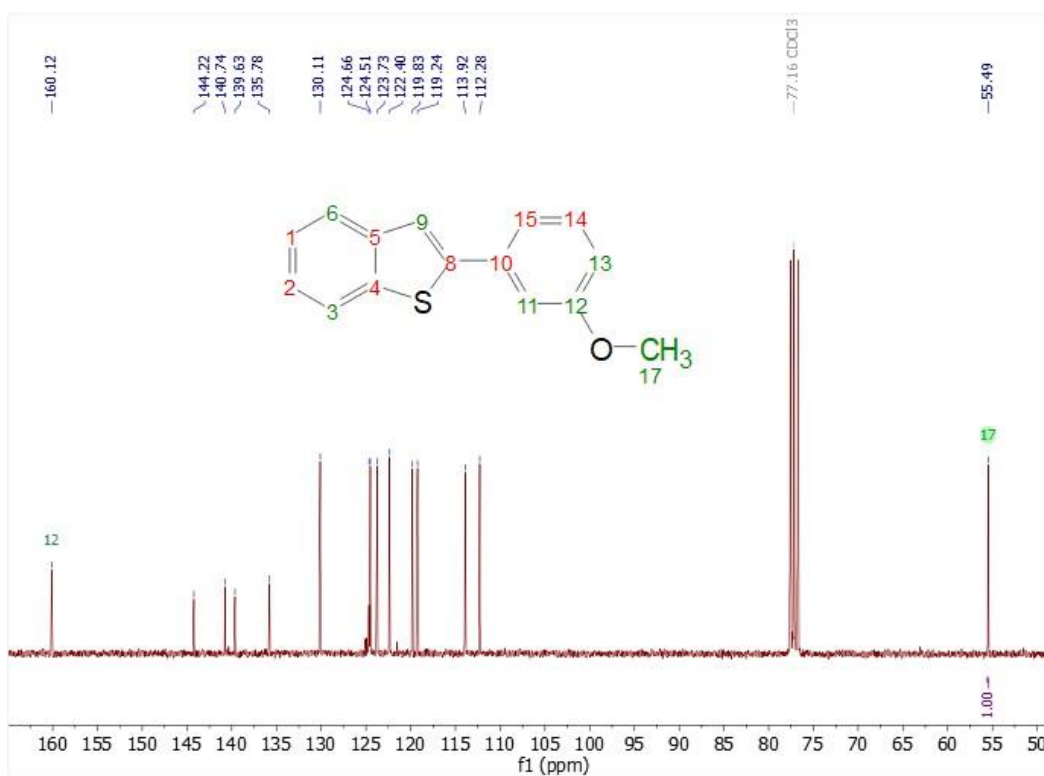
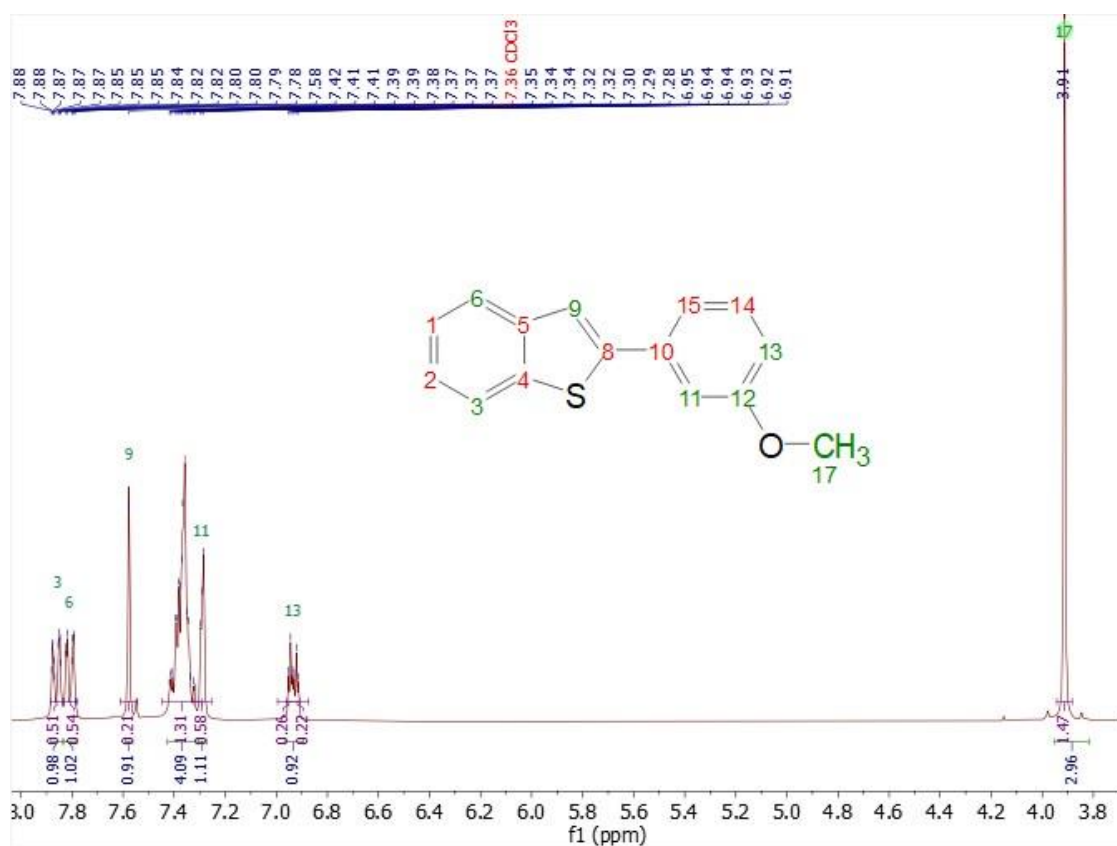
5-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol



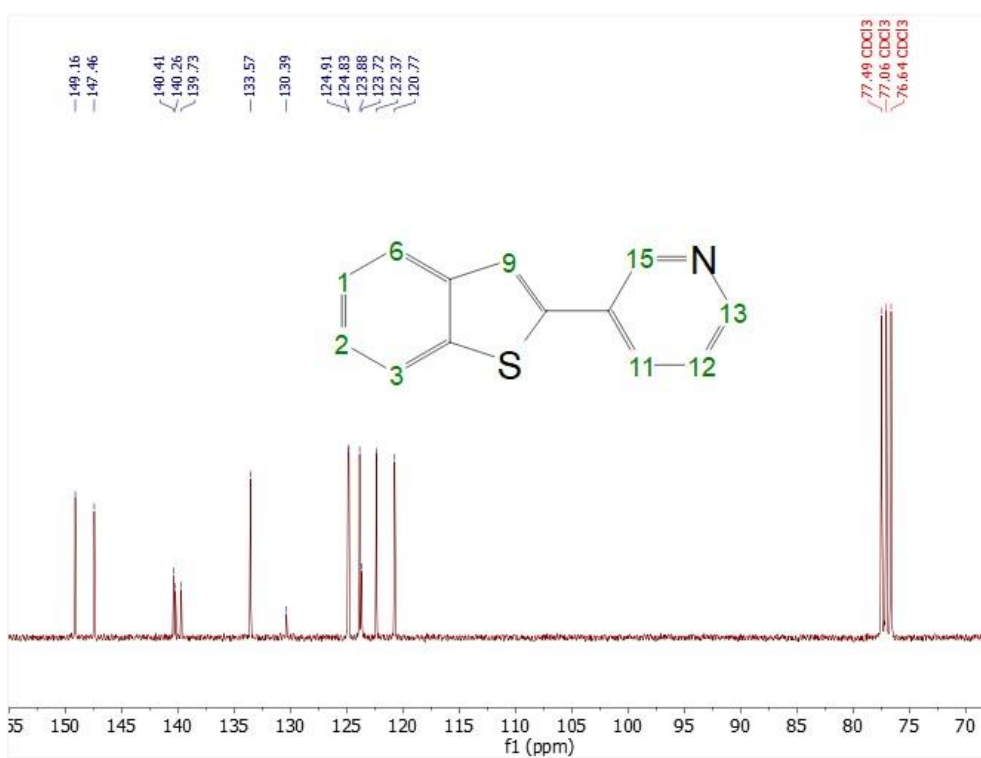
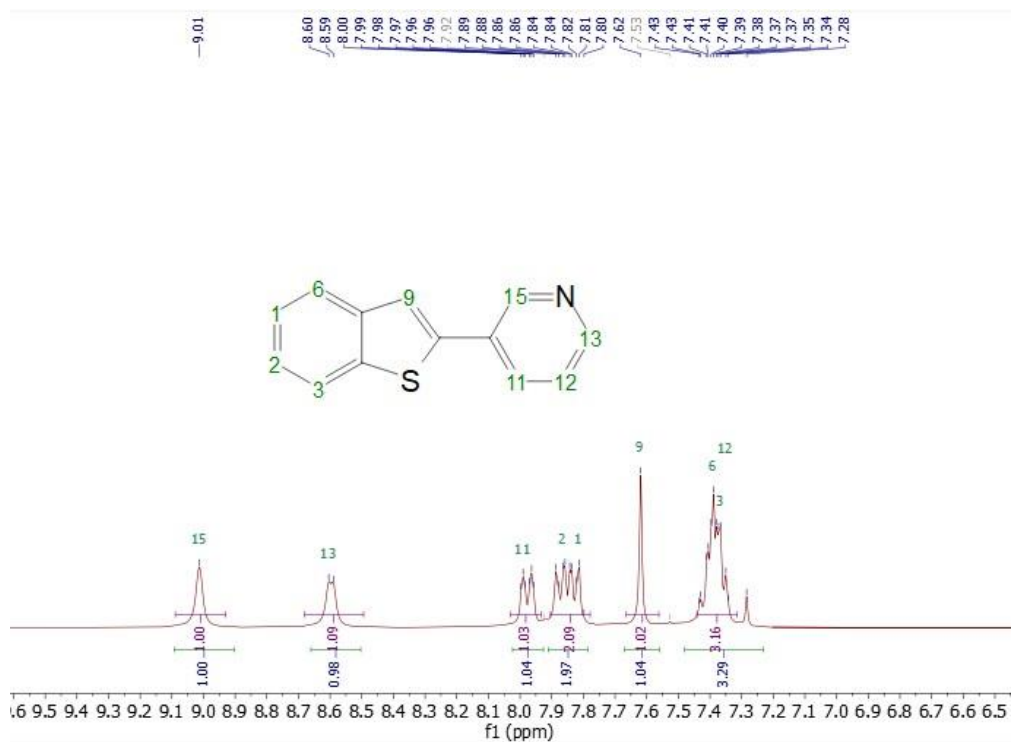
6-cloro-2-(isoxazol-3-il)-1-(4-metoxibencil)-1H-benzo[d]imidazol



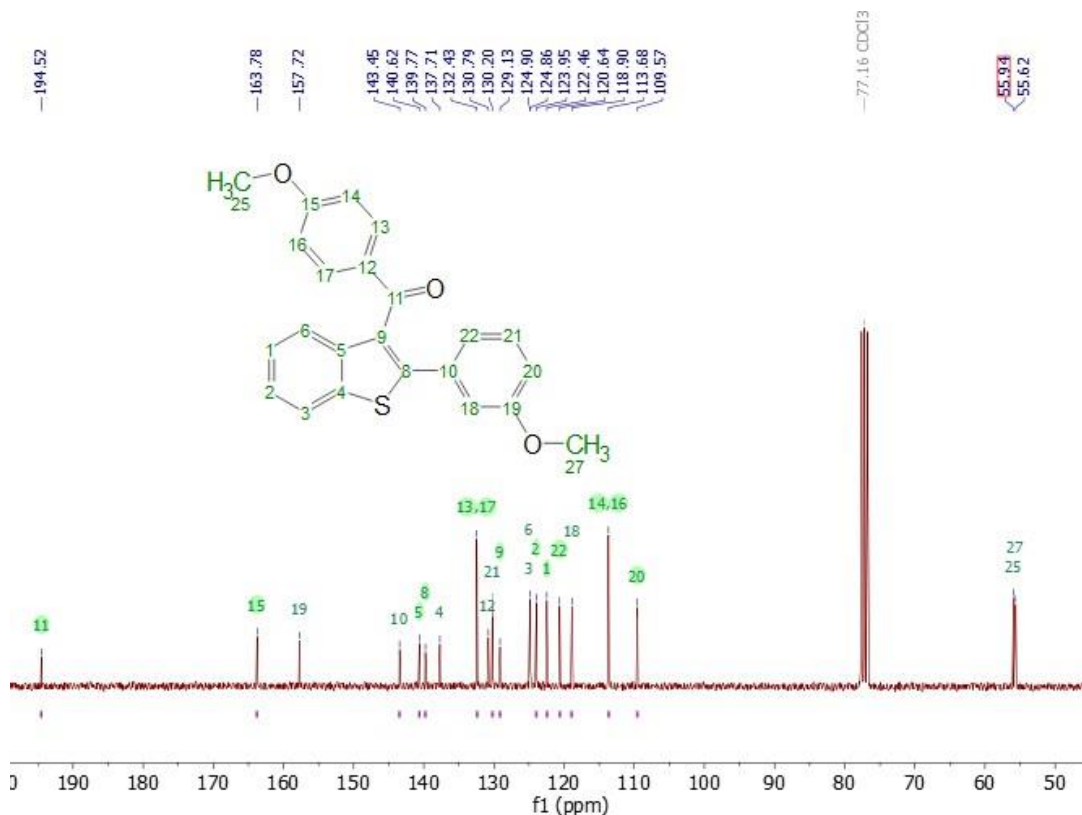
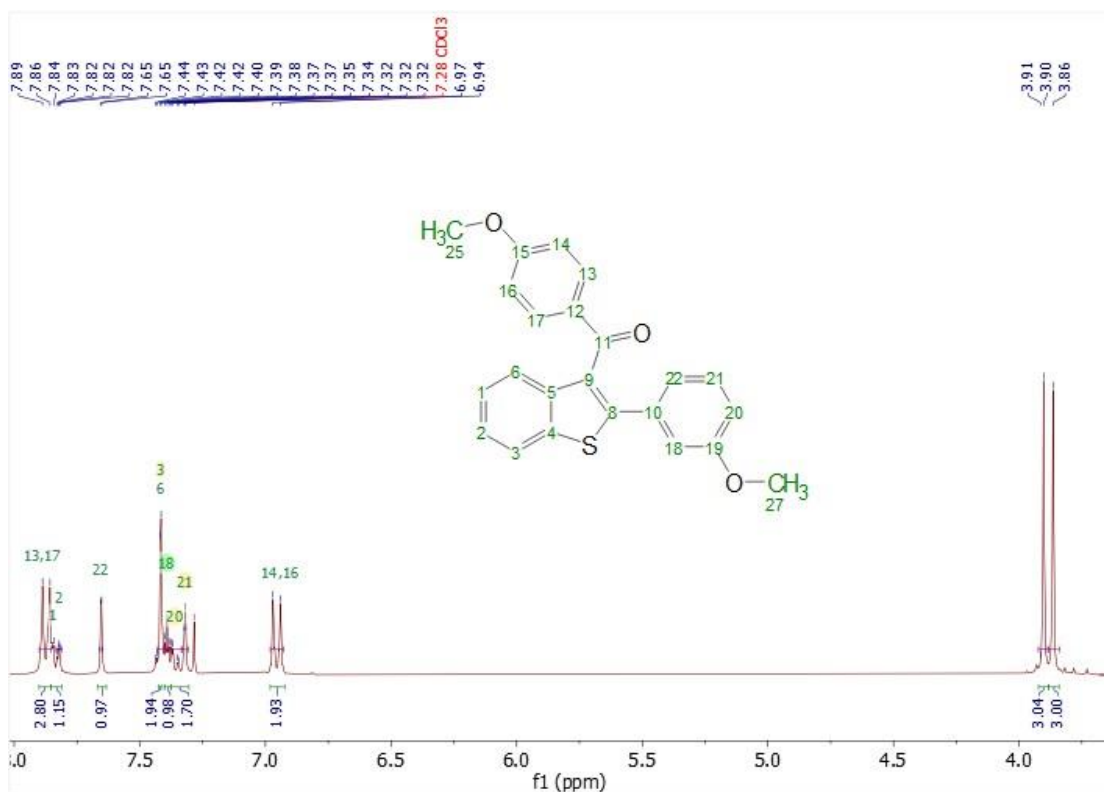
2-(3-metoxifenil)-benzo[b]tiofeno.



2-(3-metoxifenil)-benzo[*b*]tiofeno.



(4-metoxifenil)(2-(3-metoxifenil)benzo[b]tiofen-3-il)metanona



(2-(3-metoxifenil)benzo[b]tiofen-3-il)(naftalen-1-il)metanona.

