



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
CAMPUS TUXTEPEC

---

**“Síntesis y evaluación de la actividad citotóxica de Piperlotinas en las líneas celulares MCF-7 y HepG2”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

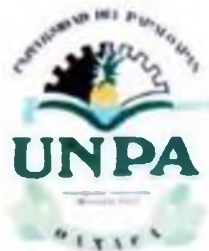
FLAVIO MANZANO PÉREZ

Director: Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín

Codirector: Dr. Genaro Vázquez Victorio

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2022



## UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

---

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 02 de marzo de 2022 a las 16:15 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Síntesis y evaluación de la actividad citotóxica de piperlotinas en las líneas celulares HepG2 y MCF-7** presentada por el alumno Flavio Manzano Pérez, con número de matrícula 15090124, aspirante al título de Licenciatura.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 02 de marzo de 2022.

ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA

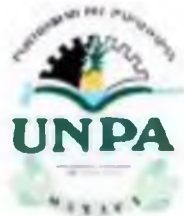
Dr. Óscar Abelardo Ramirez Marroquin  
Universidad del Papaloapan  
Director de Tesis

Dr. Lemuel Pérez Picaso  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

Dr. Miguel Ángel Peña Rico  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

Dr. Paúl Mauricio Sánchez Ocampo  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 02 de marzo de 2022  
Oficio No. JCIB/07/03/2022


**Lic. Yesenia Barrientos Arenal**  
Jefa de Servicios Escolares  
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Flavio Manzano Pérez** titulado **"Síntesis y evaluación de la actividad citotóxica de piperlotinas en las líneas celulares HepG2 y MCF-7"** para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en **Biología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:


- Dr. Lemuel Pérez Picaso (Presidente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Vocal, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo (Secretario, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Alma Xochil Ávila Alejandre (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
- Dr. Adolfo López Torres (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Por el momento le envío un cordial saludo.

  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC

**Aientamenis**  
*Terra uberrima, mens aperta*  
*Berilo-tilma, chi ji ju*

**Drá. Jacqueline Capataz Tatur**  
Jefa de Carrera de Ingeniería en  
Biología  
Universidad del Papaloapan  
CAMPUS TUXTEPEC

  
**Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjo**  
Vice Rector Académico  
Universidad del Papaloapan



El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

La presente tesis se realizó en los laboratorios de: Química Orgánica, Resonancia Magnética Nuclear y Análisis Instrumental de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec bajo la dirección del Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín; y en el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del Dr. Genaro Vázquez Victorio. El financiamiento del presente trabajo provino de los proyectos CONACyT CB-2017-2018 A1-S-10787 e INFRA-2019-301144.

Lo que sea que hagas, hazlo con pasión Y  
busca que repercuta en un bien  
para los demás.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec por brindarme las herramientas para cumplir este objetivo en mi vida.

A los profesores que me brindaron de sus conocimientos durante mi transcurso en la carrera, con especial cariño a los doctores: Miguel A. Peña, Edgar García, Blanquita, José Abad, Ariana, Paul, Víctor Meza, Adolfo, Aurelio y Marcos, por su gran calidad humana y compromiso para que aprendiera en sus clases.

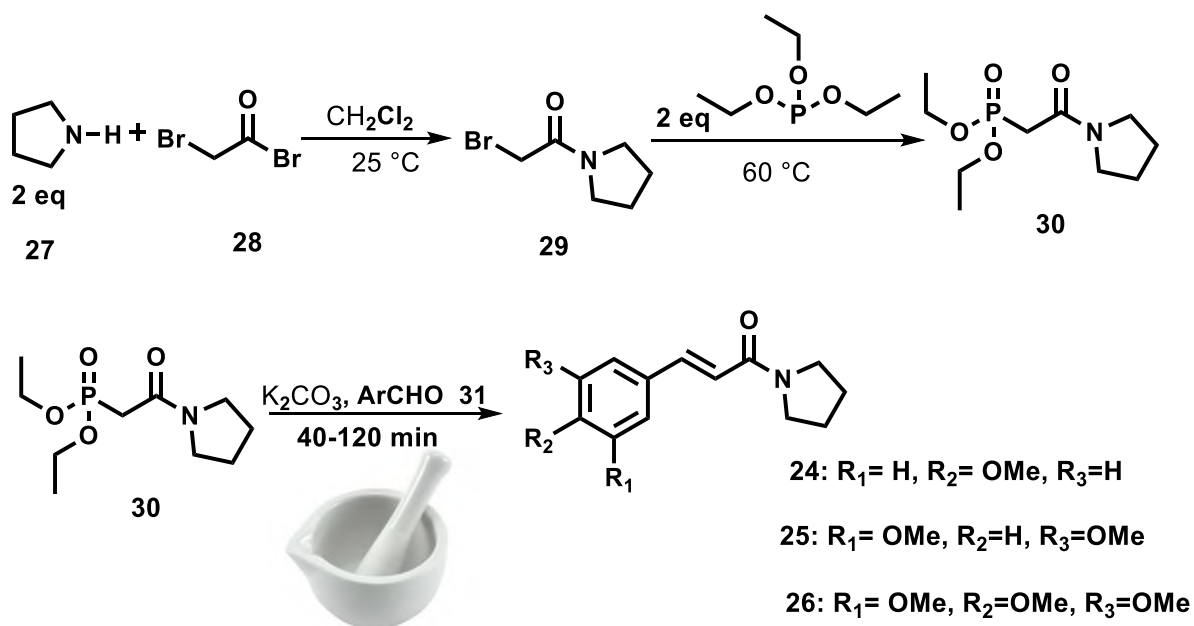
A los doctores: Genaro Vázquez Victorio, Beatriz Díaz bello, Mathieu Hautefeuille, por recibirme en el LaNSBioDyT y brindarme todas las atenciones para aprender cultivo celular y poder llevar a cabo mis experimentos. De igual manera a los compañeros que tuve en el LaNSBioDyT, a Félix, Xime, Dani, Daniel, Yasab, Adri, Ale, Sagrario, por brindarme su confianza y su atención.

Al Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia, por brindarme la oportunidad de laborar en sus instalaciones.

Y especialmente a mi director de tesis, el Dr. Oscar Abelardo, infinitas gracias por integrarme en su equipo de trabajo, por su paciencia y su motivación por sacar adelante este proyecto, por todas facilidades que me brindo durante mis estancias y la durante la redacción de mis resultados, por su tiempo, dedicación y su profesionalismo.

## RESUMEN

Basados en la evidencia científica sobre la actividad citotóxica de los metabolitos secundarios de plantas del género *Piper* y sus derivados sobre diversas líneas celulares en modelos *in vitro*, se propuso a las piperlotinas **24**, **25** y **26** como nuevos agentes citotóxicos en dos líneas celulares de cáncer, la línea celular MCF-7 de cáncer de mama y la línea HepG2 de cáncer hepatocelular, utilizando una técnica de evaluación de la viabilidad celular con un marcador fluorescente. Se sintetizaron las piperlotinas **24**, **25** y **26** mediante un método reportado en la literatura, que consistió en tres pasos de síntesis: amidación, reacción de Michaelis–Arbuzov y olefinación de Horner Wadsworth Emmons (HWE), obteniendo un rendimiento global de 36-62% como se muestra en el siguiente esquema. Estos compuestos fueron caracterizados mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y espectrometría de masas (MS).

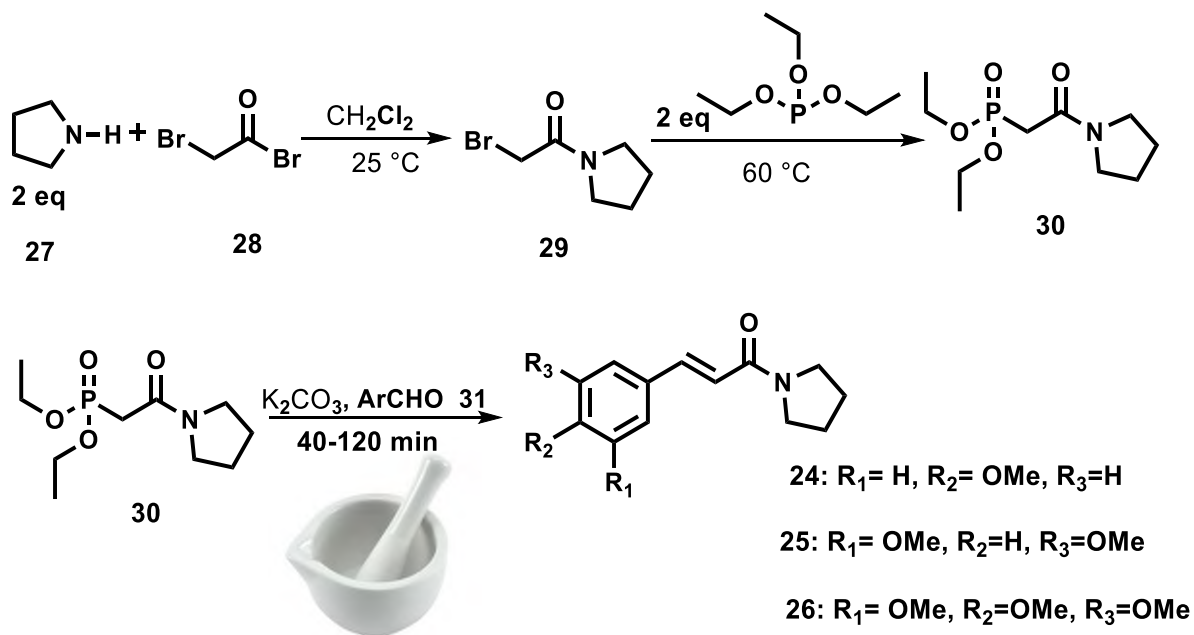


Para la evaluación de la actividad citotóxica de las piperlotinas se empleó un modelo *in vitro*, el cultivo de las líneas celulares MCF-7 y HepG2 y posterior exposición a 5 concentraciones seriadas de las piperlotinas: 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 24 horas, utilizando un control negativo de solo medio de cultivo, posteriormente se cuantificó la viabilidad celular por el método de calceína AM. La actividad citotóxica significativa comenzó a

observarse desde la concentración de 62.5 µg/mL de piperlotina en ambas líneas celulares. Se calculó la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de cada piperlotina, y se encontró que las piperlotinas **24**, **25** y **26** presentaron actividad citotóxica con una CI<sub>50</sub> de: 242.8, 104.5 y 159 µg/mL sobre la línea celular MCF-7 y de 202.5, 81.42, 264.5 µg/mL sobre la línea celular HepG2. Se observó que la piperlotina **25** fue la que presentó una mayor potencia y de igual manera eficacia sobre ambas líneas celulares en comparación con las piperlotinas **24** y **26**. Se concluyó que, si bien, las tres piperlotinas presentaron la actividad citotóxica sobre todas las líneas celulares, la piperlotina **25** es que se podría considerar para continuar con otros ensayos, ahora con líneas celulares normales.

## ABSTRACT

Based on scientific evidence on the cytotoxic activity of *Piper* genus secondary metabolites and their derivatives on various cell lines in *in vitro* assays, piperlotines were proposed as novel cytotoxic agents in two cancer cell lines, the breast cancer cell line MCF-7 and the hepatocellular cancer line HepG2. piperlotines **24**, **25** & **26** were prepared by a three-step synthesis strategy: bromoacetyl bromide amidation, Michaelis-Arbuzov and Horner Wadsworth Emmons (HWE) reaction. Target compounds were obtained: in 36-62% yield. These compounds were characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  carbon nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS).



To evaluate the cytotoxic activity of piperlotines, an *in vitro* model was used, the culture of MCF-7 and HepG2 cell lines and subsequent exposure to 5 serial concentrations of piperlotines: 500, 250, 125, 62.5 and 31.25 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 hours, using a negative control of only culture medium, subsequently cell viability was quantified by the calcein AM method. Significant cytotoxic activity started to be observed from the 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration of piperlotines in both cell lines. The mean inhibitory concentration (CI50) of each piperlotines was calculated, and it was found that piperlotins **24**, **25** and **26** presented

cytotoxic activity with CI50 of: 242.8, 104.5 and 159  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on MCF-7 cell line and 202.5, 81.42, 264.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  on HepG2 cell line. It was observed that piperlotines 25 had the highest potency and equal efficacy on both cell lines compared to piperlotins 24 and 26.

It was concluded that, although all three piperlotins presented cytotoxic activity on all cell lines, piperlotine **25** could be considered for further testing, now with normal cell lines.

## INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	VIII
ABREVIATURAS .....	XV
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEORICO .....	4
2.1 Modelos de evaluación de actividad citotóxica .....	4
2.2 Determinación <i>in vitro</i> de actividad citotóxica en compuestos bioactivos.....	5
2.2.1 Línea celular MCF-7 .....	5
2.2.2 Línea celular HepG2.....	7
2.2.3 Ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,3-difeniltetrazol (MTT).....	8
2.2.4 Colorante de exclusión azul de tripano .....	9
2.2.5 Ensayo de viabilidad con marcadores fluorescentes .....	9
3. ANTECEDENTES.....	11
3.1 Quimioterapia del cáncer de mama .....	11
3.2 Quimioterapia del cáncer de hígado.....	12
3.3 Metabolitos secundarios con actividad citotóxica o antitumoral .....	13
4. JUSTIFICACIÓN .....	19
5. HIPÓTESIS.....	20
6. OBJETIVOS.....	21
6.1 Objetivo general .....	21
6.2 Objetivos específicos .....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1 Síntesis y caracterización de piperlotinas 24, 25 y 26 .....	22
7.2 Evaluación de actividad citotóxica en líneas celulares .....	23
7.2.1 Cultivo de células MCF-7 y HepG2 .....	24
7.2.2 Ensayo de viabilidad celular .....	24
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
8.1 Síntesis de los compuestos 29, 30 y las piperlotinas 24, 25 y 26.....	29
8.2 Efecto citotóxico de las piperlotinas 24, 25 y 26 sobre la línea celular MCF-7.....	32
8.3 Efecto citotóxico de las piperlotinas 24, 25 y 26 sobre la línea celular HepG2 .....	38
9. CONCLUSIONES.....	44
10. BIBLIOGRAFÍA .....	45
11. ANEXOS .....	52

Síntesis de (E)-3-(4-metoxifenil)-1-(pirrolidin-1-il) prop-2-en-1-ona (24, C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>2</sub> ) .....	55
Síntesis de (E)-3-(3,5-dimetoxifenil) -1- (pirrolidin-1-il) prop-2-en-1-ona (25, C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>3</sub> ) ....	56
Síntesis de (E) -1- (pirrolidin-1-il) -3- (3,4,5-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona (26, C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub> )	57
Espectros de Resonancia Magnética Nuclear .....	58

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidad por cáncer en el mundo reportado por la OMS-----	2
Figura 2. Células de la línea celular MCF-7 bajo microscopio óptico-----	6
Figura 3. Células de la línea celular HepG2 bajo microscopio óptico-----	7
Figura 4. Reducción de MTT (1) a formazan (2) por acción de la reductasa mitocondrial -----	8
Figura 5. Mecanismo de hidrólisis de la calceína AM-----	10
Figura 6. Estructura molecular de la Doxorrubicina (5), ciclofosfamida (6) y metotrexato (7)-----	11
Figura 7. Estructuras moleculares de sorafenib (8) y lenvatinib (9)-----	12
Figura 8. Estructuras moleculares de vinblastina (10), vincristina (11) y paclitaxel (12)-----	14
Figura 9. Ácido cinámico (13) y cinamamidas 14, 15 Y 16 -----	15
Figura 10. Metabolitos aislados de extractos de <i>Piper boehmeriaefolium</i> -----	16
Figura 11. Estructuras de pipartina 21 y piperina 22, ensayados in vivo contra sarcoma en ratones-----	17
Figura 12. Estructura general de las Piperlotinas.-----	17
Figura 13. Piperlotinas con actividad antiagregante plaquetario.-----	17
Figura 14. Ruta de síntesis de compuestos objetivo 24, 25 y 26.-----	18
Figura 15. Representación de las cajas de cultivo utilizadas en los ensayos de citotoxicidad. -----	24
Figura 16. Regiones del pocillo con células en las que se tomaron las fotografías durante el ensayo de viabilidad celular con calceína AM -----	26
Figura 17. Síntesis del bromuro de alquilo -----	29
Figura 18. Síntesis del intermediario -----	29
Figura 19. síntesis de las Piperlotinas 24, 25 y 26 -----	30
Figura 20. Espectro de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la piperlotina 24.-----	31
Figura 21. Espectro de <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de la piperlotina 24-----	32

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Evaluación de la citotoxicidad a 24 h de exposición de las piperlotinas 24, 25 y 26 en MCF-7 con las concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .....	33
<b>Esquema 2.</b> Curva concentración-respuesta de las piperlotinas 24, 25 y 26 obtenidas de los ensayos de citotoxicidad sobre la línea celular MCF-7 .....	34
<b>Esquema 3.</b> Micrografías de las células MCF-7 expuestas a las concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las piperlotinas 24, 25 y 26 tras 24 h de exposición .....	36
<b>Esquema 4.</b> Evaluación de la citotoxicidad a 24 h de exposición de las piperlotinas 24, 25 y 26 en HepG2 con las concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .....	38
<b>Esquema 5.</b> Curva concentración-respuesta de las piperlotinas 24, 25 y 26 obtenidas de los ensayos de citotoxicidad sobre la línea celular Hepg2 .....	40
<b>Esquema 6.</b> Micrografías de las células HepG2 expuestas a las concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las piperlotinas 24, 25 y 26 tras 24 h de exposición .....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> $CI_{50}$ de cinamamidas 14, 15 Y 16 sobre dos líneas celulares de cáncer de colon.....	15
<b>Tabla 2.</b> Representación del acomodo de los datos de porcentajes de viabilidad normalizados para la realización del análisis de varianza (ANOVA) de las piperlotinas 24, 25 y 26 .....	27
<b>Tabla 3.</b> Representación del acomodo de los datos de porcentajes de viabilidad normalizados para la determinación de las concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ) de las piperlotinas 37, 38 y 39, el software GraphPad Prism graficó la media de +/- SD.....	28
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ) de las piperlotinas 24, 25 y 26 sobre la línea celular MCF-7. ....	35
<b>Tabla 5.</b> Comparativo de las $CI_{50}$ de las piperlotinas 24, 25 y 26 en la línea celular HepG2.....	41

## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
Cl <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
DMSO	Dimetilsulfóxido
Eq.	Equivalentes
ER	Receptor de estrógeno (por sus siglas en inglés)
ESI+	Ionización por electronebulización (por sus siglas en inglés)
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución (por sus siglas en inglés)
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
JACK2	Janus quinasa 2
<i>MMP9</i>	Metaloproteinasa de matriz 9 (por sus siglas en inglés)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,3-difeniltetrazolio por sus siglas en inglés
PASS	Prediction of Activity Spectra for Substances (Programa de predicción del espectro de actividad biológica de sustancias, por sus siglas en inglés)
PBS	Buffer salino de fosfatos (por sus siglas en inglés)
ppm	Partes por millón
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad (por sus siglas en inglés)
Q-TOF	Cuadrupolo de Tiempo De Vuelo (por sus siglas en inglés)

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TMS	Tetrametilsilano
$\Delta$	Calentamiento
$\delta$	Desplazamiento químico

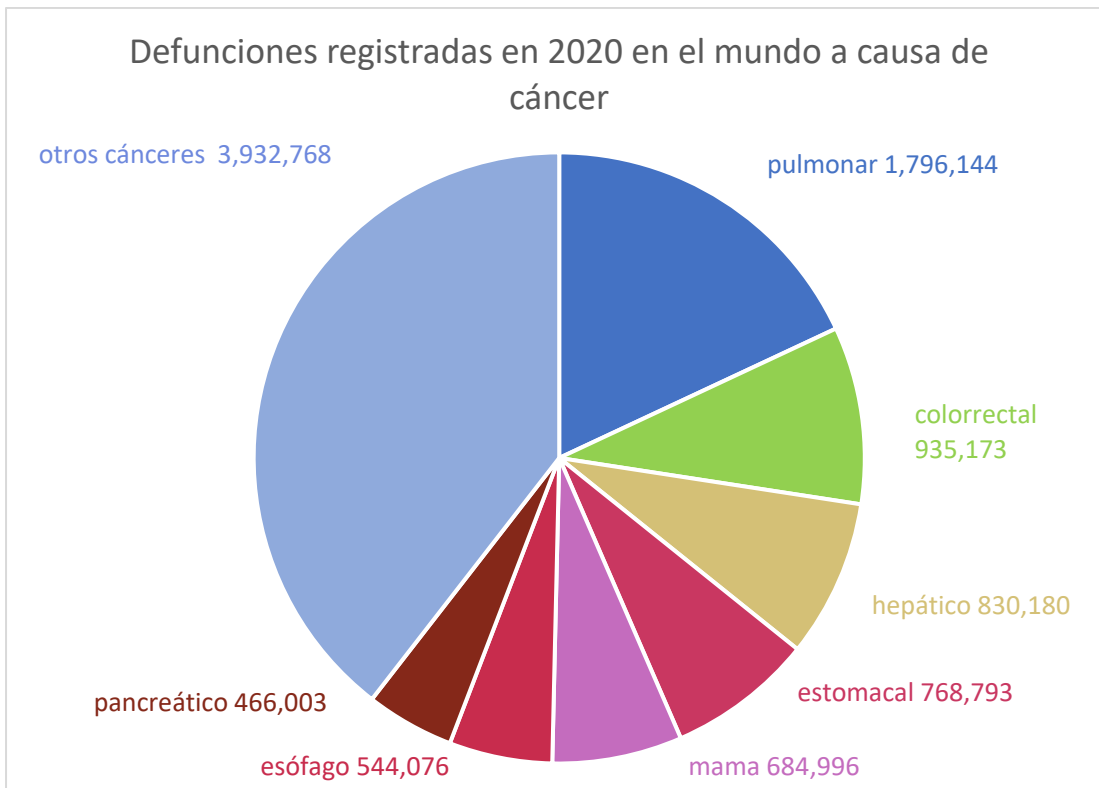
## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una patología crónico-degenerativa, cuya característica principal es el descontrol de la división celular formando tumores en la parte afectada del organismo, y que puede invadir localmente o a distancia otros tejidos (Organización Mundial de la Salud, 2014). Algunos informes indican que el cáncer data de aproximadamente 1.7 millones de años, de acuerdo con evidencias de osteosarcoma (cáncer de huesos) encontradas en fósiles (Odes *et al.*, 2016). El término cáncer proviene de la etimología griega *karkinoma* que significaba lesión ulcerosa (Salaverry., 2013). Estudios sobre el origen del cáncer dan evidencia del impacto que tiene el fondo genético y el ambiental, propiciando la generación de tumores que divergen en dos casos: tumores benignos y malignos (Parsa., 2012). Esto como consecuencia de múltiples factores que podemos englobar en 3 grupos:

- Carcinogénicos físicos como son: radiación ultravioleta, rayos x, radiación gamma.
- Carcinogénicos químicos: sustancias como el asbesto, contaminantes del humo de tabaco, aflatoxinas (contaminantes de alimentos) y sustancias intercalantes del ADN (acridinas, proflavina y bromuro de etidio).
- Carcinogénicos biológicos: parásitos, bacterias, virus y las mutaciones naturales durante procesos de división celular en los mamíferos.

De acuerdo con datos de la OMS, el cáncer es la segunda causa de defunciones en el mundo, representando 9,958,133 muertes en 2020. A nivel mundial, 1 de cada 6 muertes se debió al cáncer. El cáncer de pulmón, hígado, colorrectal, estómago y de próstata son los tipos más comunes en el género masculino. Mientras que el de mama, pulmón, colorrectal, cuello uterino y estómago son los más comunes entre las mujeres (Observatorio Global de Cáncer, 2020).

La figura 1 muestra el número de defunciones a causa de cáncer, destacando al cáncer de pulmón, colorrectal, de hígado, estómago, y mama (Observatorio Global de Cáncer, 2020).



**Figura 1.** Mortalidad por cáncer en el mundo reportado por la OMS. Adaptado de Observatorio Global de Cáncer, 2020.

En México, el cáncer de mama en 2016 causó 16 defunciones por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2018). Mientras que para el sexo masculino fue el carcinoma hepatocelular el predominante en individuos mayores de 60 años (Cisneros *et al.*, 2018).

Si bien el cáncer es una enfermedad que puede ser mortal si se detecta en etapas avanzadas, en algunos casos es curable, cuando la detección se realiza de forma oportuna y se sigue el tratamiento adecuado. Los tratamientos contra el cáncer son principalmente:

- Intervención quirúrgica: La cirugía se realiza en casos en que el tumor es sólido y localizado en una sola parte del cuerpo o que no haya diseminación a otros órganos o tejidos (De la Garza & Juárez, 2014).
- Quimioterapia: consiste en la destrucción directa de las células tumorales. Este concepto se deriva del hecho de que los fármacos citotóxicos interfieren con la

síntesis y replicación del ADN. La quimioterapia consiste en el suministro de fármacos que inhiben la división celular, evitando el crecimiento del tumor o tumores, induciendo a la muerte celular. El inconveniente de esta estrategia es que las moléculas suministradas no diferencian a las células sanas de las células de cancerosas, por lo tanto, también atacan e inducen la muerte de las células sanas (Cheung *et al.*, 2013).

- Radioterapia, que consiste en la utilización de radiación de alta energía como los rayos X o rayos gamma para dañar o eliminar a las células cancerosas. El mecanismo de acción de esta terapia es que, la radiación daña la integridad del genoma de las células de cáncer, también se puede dañar a las células sanas del tejido cercano. Una de las mayores desventajas de este tratamiento es que las mismas radiaciones que eliminan células cancerosas puedan generar nuevas mutaciones en las células de tejido sano, y, por tanto, que haya una recaída tras el tratamiento (Bhide & Nutting, 2010).
- Inmunoterapia dirigida: esta terapia consiste en suministrar anticuerpos diseñados para unirse a antígenos específicos, estos anticuerpos son obtenidos mediante tecnología de ADN recombinante. El mecanismo de acción de estos tratamientos es inducir una respuesta inmunitaria contra las células tumorales; esta acción produce muerte celular (Esteve *et al.*, 2019). De igual manera que otras terapias contra el cáncer, la inmunoterapia dirigida tiene efectos adversos severos y graves, los cuales pueden ser desde fiebre, hipotensión y enfermedades cutáneas hasta afecciones neuronales como son: convulsiones y encefalopatías (Kroschinsky *et al.*, 2017).

Debido a que las opciones de terapia contra el cáncer existentes son ineficientes y generan efectos adversos contraproducentes en los pacientes, en este trabajo se hizo un enfoque en el descubrimiento de nuevos agentes citotóxicos basados en la estructura de metabolitos secundarios.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 Modelos de evaluación de actividad citotóxica

Para lograr el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer se requiere de estudios preclínicos y clínicos. Dentro de los preclínicos se cuenta con los estudios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

Los estudios *in silico* (también llamados de cribado virtual) predicen el posible comportamiento que pueden tener las moléculas que se estén proponiendo como compuestos bioactivos en un sistema biológico: una enzima, un receptor, un cultivo celular, etc. Se define compuesto bioactivo, como una sustancia que tiene una actividad biológica, relaciona con su capacidad de moderar algún proceso metabólico dentro de un organismo, para obtener mejores condiciones de salud (Šeregelj *et al.*, 2020).

Por otra parte, los estudios *in vitro* son los que se realizan en un ambiente controlado dentro de un laboratorio, para ello se utilizan líneas celulares aisladas de tumores cancerosos y se aplican los compuestos de interés directamente en ellos dentro de cajas de cultivo (Atyabi & Dinarvand, 2012). Por último, se encuentra el estudio *in vivo*, que es la última parte de la evaluación biológica preclínica, donde se emplean modelos animales como el ratón, a los cuales se les suministra el compuesto por diversas vías (oral, intravenosa, tópica, etc.) simulando una terapia farmacológica a un paciente (Gould *et al.*, 2015).

Como última fase para el desarrollo de nuevos fármacos están los ensayos clínicos. Estos solo se inician una vez superadas las fases preclínicas con éxito.

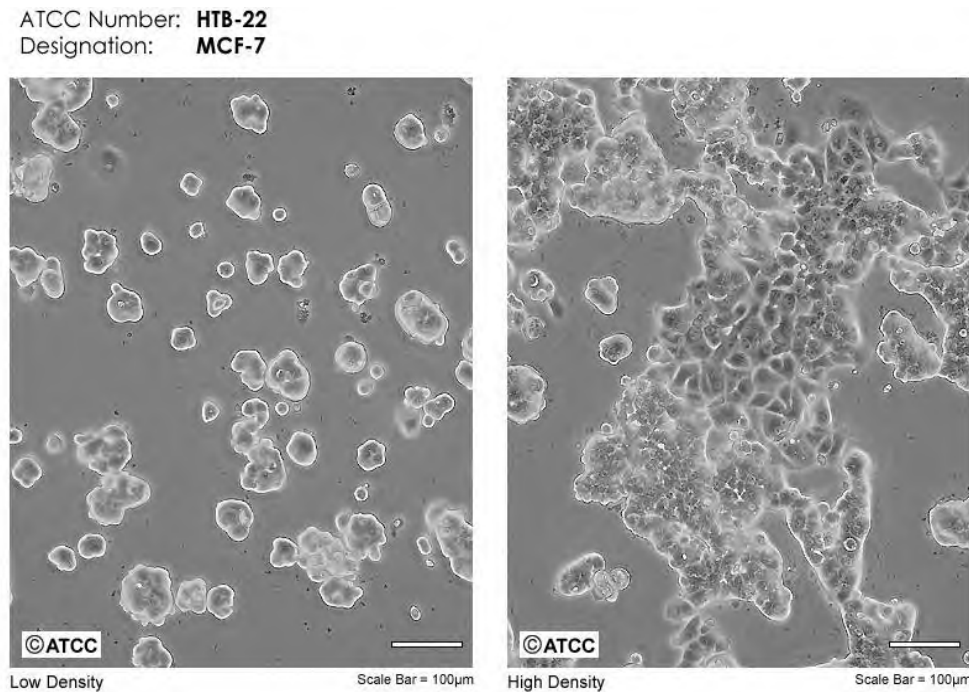
## **2.2 Determinación *in vitro* de actividad citotóxica en compuestos bioactivos.**

Una línea celular es una población de células genéticamente estables de un solo tipo celular, las cuales se cultivan fuera del organismo original dotándoles de los nutrimentos esenciales para su subsistencia, como son sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas y otros componentes como la glucosa. (Sarntivijai *et al.*, 2014). A las líneas celulares que han sido modificadas para proliferar indefinidamente se les llaman inmortales, las líneas celulares inmortalizadas se usan en la investigación para estudiar procesos biológicos. Las líneas celulares han revolucionado la investigación científica y se están utilizando en la producción de vacunas, probando el metabolismo y la citotoxicidad de los fármacos, la producción de anticuerpos, el estudio de la función génica, la generación de tejidos artificiales (por ejemplo, piel artificial) y la síntesis de compuestos biológicos, por ejemplo, proteínas terapéuticas (Kaur & Dufour, 2012).

### **2.2.1 Línea celular MCF-7**

En el presente trabajo se determinó la actividad citotóxica de compuestos bioactivos en la línea celular MCF-7 que fue establecida en el año 1973 por el Dr. Soule en la fundación del cáncer de Michigan. Son células que fueron aisladas de un derrame pleural de una paciente caucásica de 69 años con cáncer de mama metastásico, el cual había sido tratado con radioterapia y terapia con hormonas, pero resultó resistente a éstas últimas (Comsa *et al* 2015). MCF-7 es una línea celular que ha sido propagada a lo largo de muchos años por diversos grupos de investigación y ha mostrado ser un buen modelo para la investigación y desarrollo de tratamientos contra el cáncer de mama (Baguley & Leung, 2011). En la figura 2 se muestran dos fotomicrografías de las células MCF-7 tomadas de la página de ATTC (American Type Culture Collection, por sus siglas en inglés), son células cultivadas bajo condiciones estándares, por ello las células se encuentran con su morfología característica. La primera imagen a la izquierda es de un cultivo a baja confluencia, lo que significa que las células están creciendo, pero hay poca población dentro del cultivo; a baja confluencia estas

células tienen una morfología semicircular, están separadas entre sí y es posible distinguirlas individualmente. Por otro lado, a la derecha está una micrografía de células MCF-7 en alta confluencia, aquí la concentración de células en el cultivo es mucho mayor, en este punto estas células cambian de morfología y adquieren una forma poligonal, además se agrupan, en los grupos muy numerosos ya no es posible distinguir a las células individualmente.



**Figura 2.** Células de la línea celular MCF-7 bajo microscopio óptico (tomado de la página de la American Type Culture Collection).

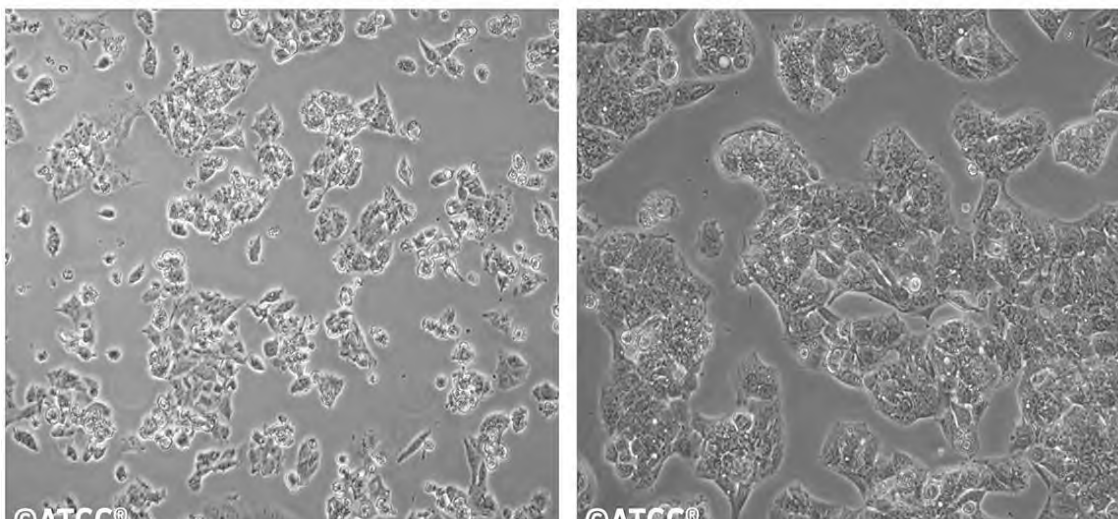
Las células MCF-7 tienen receptores de estrógenos y progesterona (ER+ por sus siglas en inglés), los estrógenos tienen un efecto proliferativo. Las células MCF-7 son de tipo endotelial y crecen en monocapa en cultivo *in vitro*, generalmente su tiempo de duplicación es lento, oscila entre 30 y 40 horas (Lee *et al.*, 2015). Aunque la línea celular MCF-7 se trata como una sola entidad, está compuesta por una variedad de fenotipos individuales que constituyen una parte de la población total, estos fenotipos difieren en su nivel de expresión génica y de la ruta de señalización de receptores. Además de que se tienen diferencias en la tasa de proliferación, esta logra un equilibrio gracias al cultivo constante de la línea celular (Comsa *et al* 2015).

### 2.2.2 Línea celular HepG2

Por otro lado, en el presente trabajo de tesis se utilizó la línea celular HepG2 para la determinación de actividad citotóxica de compuestos bioactivos. Esta línea celular originalmente se aisló de un carcinoma hepatocelular (cáncer de hígado) mediante biopsias a un varón caucásico de 15 años; estas células son del tipo endotelial y no tienen la capacidad de formar tumores al ser depositadas en otros mamíferos (Donato *et al.*, 2014).

Dentro de las características de la línea celular HepG2 se sabe que tienen bajos niveles de expresión del gen *CYP1A1* que codifica la enzima de citocromo P450, la cual es crucial para el metabolismo de fármacos antineoplásicos como el 3-hidroxi paclitaxel (Schulz *et al.*, 2019), (Quiñones *et al.*, 2008). En la figura 3 se muestran dos micrografías de las células HepG2 en las que se muestra la morfología y el crecimiento en condiciones normales de esta línea celular. En la primera imagen se muestran células HepG2 con baja confluencia, en este punto las células presentan una morfología de tipo rómbica alargada, están separadas y es posible distinguir algunas células individuales. Por otra parte, a la derecha se muestra una micrografía de células con alta confluencia, en este punto las células están agrupadas sin una forma definida y es imposible distinguir células individuales.

ATCC Number: HB-8065  
Designation: Hep G2

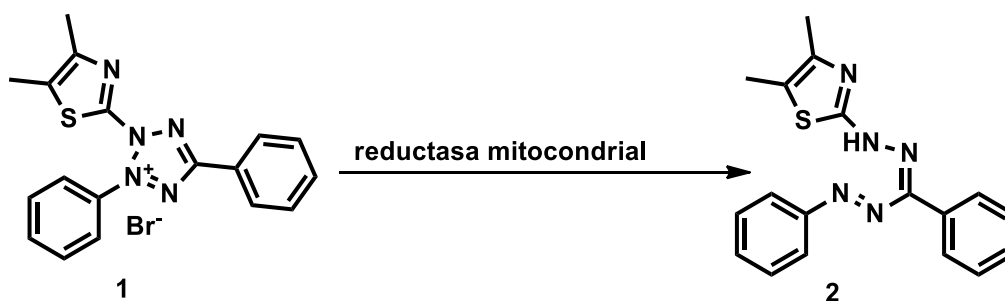


**Figura 3.** Células de la línea celular HepG2 bajo microscopio óptico (tomado de la página de la American Type Culture Collection)

Por otra parte, existen diversos ensayos que miden la viabilidad y muerte de las células tras estímulos de compuestos bioactivos. Entre los más empleados están los métodos colorimétricos y luminiscentes. Un método colorimétrico se basa en la actividad de enzimas que se encuentran en las células, activas en células viables como la deshidrogenasa mitocondrial, y un método luminiscente como la de anexina, mide la integridad en las células de la membrana, organelos y material genético como el ADN. A continuación, se describen los más relevantes para el presente trabajo de investigación.

### 2.2.3 Ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,3-difeniltetrazol (MTT)

Quizá la prueba colorimétrica más utilizada para determinar la viabilidad celular es la del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) **1** (Boncler *et al.*, 2014), este es un compuesto sólido amarillo el cual es reducido a formazan **2**, de color morado, por la acción de deshidrogenasas mitocondriales de las células mediante la reacción bioquímica que se muestra en la figura 4 (Riss *et al.*, 2016). Este método ha sido utilizado para la determinación de la actividad citotóxica de extractos vegetales, metabolitos secundarios y compuestos puros de origen sintético en las líneas celulares HepG2 y MCF-7 (Bahuguna *et al.*, 2017), que fueron las líneas celulares utilizadas en este proyecto de investigación.



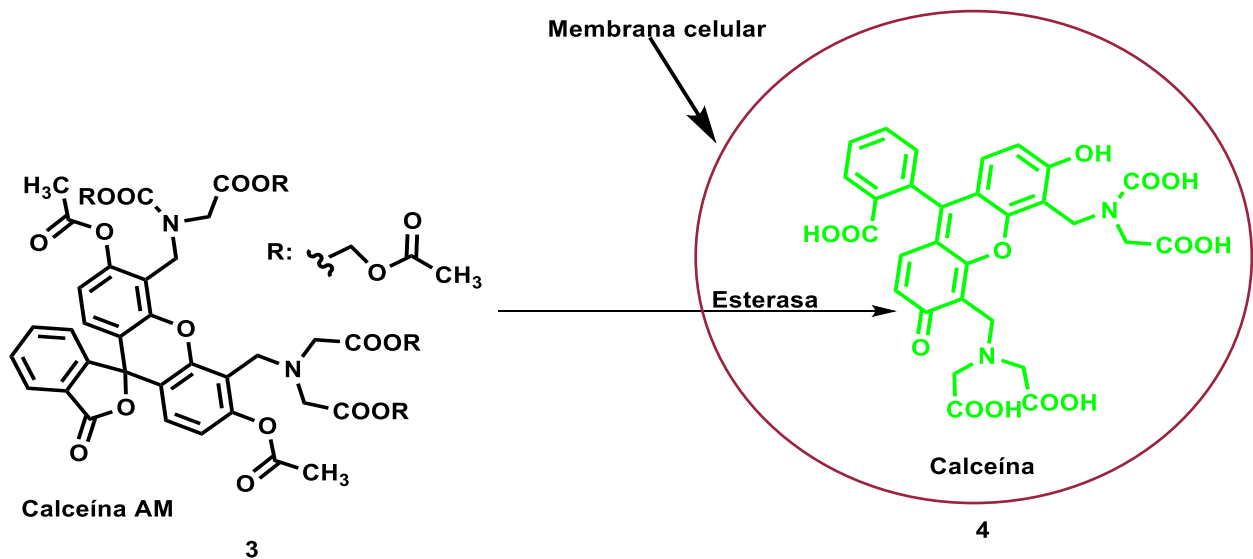
**Figura 4.** Reducción de MTT (1) a formazan (2) por acción de la reductasa mitocondrial durante las pruebas de viabilidad celular (Riss et al., 2016).

#### **2.2.4 Colorante de exclusión azul de tripano**

Otra prueba para determinar la viabilidad celular es el recuento de células vivas con un colorante de exclusión, el azul de tripano, este se introduce en la membrana de las células que han perdido su integridad, por lo tanto, las células vivas no captan el colorante y es posible distinguir las al contarlas en el hemocitómetro (Strober, 2015).

#### **2.2.5 Ensayo de viabilidad con marcadores fluorescentes**

Por otra parte, se tienen los ensayos de viabilidad basados en la utilización de compuestos fluorescentes para conocer el estado de las células. Los compuestos fluorescentes tienen la capacidad de absorber radiación electromagnética de longitud de onda menor a 380 nm y emitirla nuevamente a una longitud de onda mayor (luz visible) (Lombardi *et al.*, 2017). Los compuestos fluorescentes son de gran utilidad y dan una información más precisa sobre la condición de las células, puesto que estas tienen regiones específicas de unión como son la membrana y los núcleos (ADN) de las células. Los fluoróforos más utilizados en los ensayos de viabilidad celular son la anexina y la calceína AM (acetoximetilada). La anexina V es una proteína capaz de marcar a las células apoptóticas mediante la unión a fosfatidil serina, un indicador de apoptosis celular. Por lo tanto, la anexina marca a las células que no mantienen su viabilidad. Esta técnica se emplea generalmente para detectar la viabilidad celular con un citómetro de flujo (Lombardi *et al.*, 2017). Mientras que la calceína únicamente marca las membranas de las células vivas, y se administra a las células en forma de calceína AM (**3**), la cual no es fluorescente, pero por acción de las esterasas de las células vivas se convierte a calceína (**4**) y fluoresce en color verde que puede ser visto con microscopía de fluorescencia. La reacción de hidrólisis bioquímica se muestra en la figura 5 (Stoddart, 2011).



**Figura 5.** Mecanismo de hidrólisis de la calceína AM (3) (no fluorescencia calceína (4) (fluorescente verde) por acción de esterases presentes en las células vivas (Stoddart, 2011).

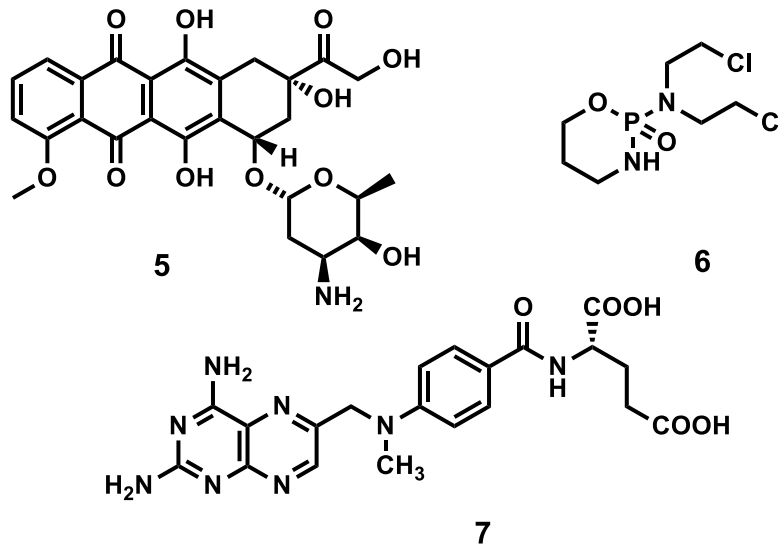
Otros marcadores fluorescentes son el yoduro de propidio y el bromuro de etidio, ambos son intercalantes de las bases nitrogenadas del ADN de las células. Al irradiarse luz de una longitud de onda de 493 nm emiten radiación de color rojo-anaranjado. Nos da información sobre la muerte de las células puesto que las moléculas de estos compuestos solo llegan al núcleo cuando la membrana celular se encuentra deteriorada (Demarchi *et al.*, 2006). Estos ensayos se han empleado en trabajos recientes para evaluar la viabilidad de células tumorales MCF-7 tratadas con compuestos citotóxicos de plata (Coccini *et al.*, 2014).

Para este trabajo de investigación se utilizó el método de viabilidad utilizando calceína AM marcador fluorescente de la viabilidad celular, porque que es un método de detección directa de las células. La calceína únicamente marca las membranas de las células viables y esto permite detectar visiblemente a las células viables al microscopio provisto con lampara de fluorescencia, además nos permite observar posibles cambios morfológicos que pueden sufrir las células al ser tratadas con el agente citotóxico.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Quimioterapia del cáncer de mama

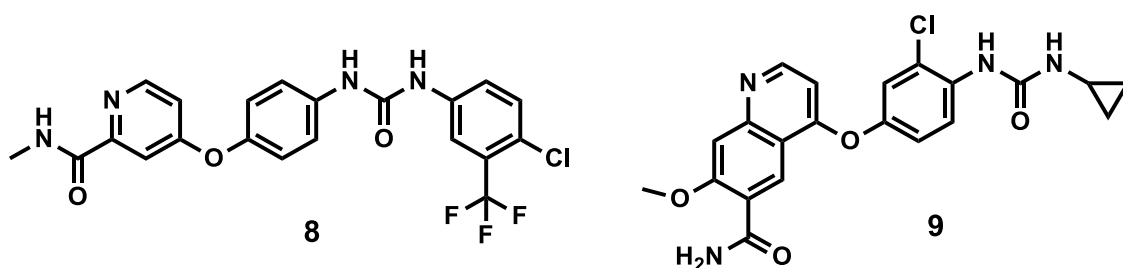
Actualmente la quimioterapia es el tratamiento más común para el cáncer de mama. Entre los fármacos más utilizados están: Doxorubicina **5**, la cual es una antraciclina que tiene un doble efecto, actúa como inhibidor de la división celular y como intercalante del ADN también impidiendo la replicación. Por otra parte, se encuentra la ciclofosfamida **6**, es un agente alquilante del ADN que al unirse impide su replicación. Otro fármaco ampliamente empleado es el Metotrexato **7** (figura 6), el cual tiene como función interrumpir la síntesis de bases nitrogenadas, propiciando así la inhibición de la división celular (Spallanzani *et al.*, 2018). Todos los fármacos citados tienen efectos secundarios importantes como son: hipertensión, pérdida del apetito, fatiga y pérdida de peso, puesto que, al inhibir la división celular, también se ven afectadas las células sanas de los pacientes (Azim *et al.*, 2011).



**Figura 6.** Estructura molecular de la Doxorubicina (5), ciclofosfamida (6) y metotrexato (7) empleados en la quimioterapia contra el cáncer de mama.

### 3.2 Quimioterapia del cáncer de hígado

La quimioterapia es una alternativa ampliamente empleada para tratar a los pacientes con cáncer de hígado también. En ocasiones se aplica de manera combinada con la radioterapia cuando el órgano hepático de los pacientes ha sido afectado significativamente por enfermedades como la cirrosis y hepatitis (Park *et al.*, 2009). Entre los fármacos aprobados para su uso en quimioterapia encontramos al sorafenib **8**, que es un fármaco antagonista del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (vasos sanguíneos) que impide el progreso de la vascularización del tumor (Reig *et al.*, 2010; Peck-Radosavljevic., 2014). Si bien este fármaco prolonga la supervivencia de los pacientes, produce efectos adversos como son: fatiga, alopecia, diarrea, náuseas, anorexia, entre otros (Pitoia *et al.*, 2017). Otro fármaco empleado en quimioterapia contra el cáncer de hígado es lenvatinib **9** (figura 7) el cual es un inhibidor selectivo de la actividad cinasa de los factores de crecimiento del endotelio vascular, además incrementa la supervivencia de los pacientes a un tiempo comparable con sorafenib, pero también tiene efectos adversos, dentro de los que se encuentran la alopecia, dolor de boca, sangrado nasal, dolor de cabeza u mareos (Spallanzani *et al.*, 2018).



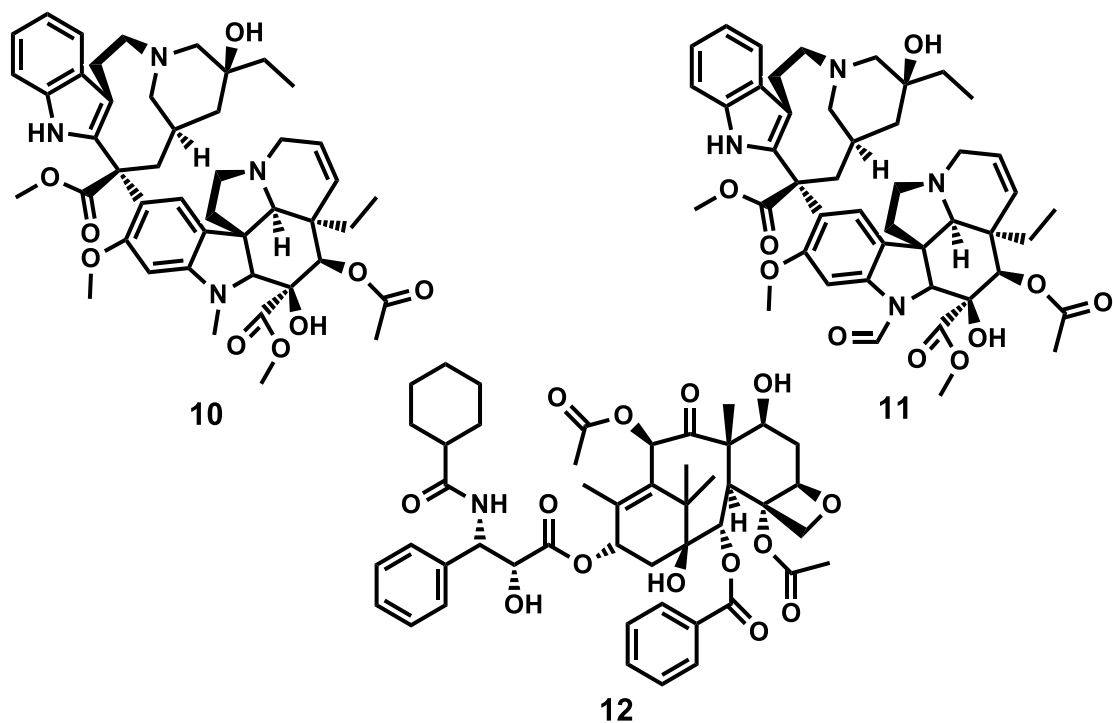
**Figura 7.** Estructuras moleculares de sorafenib (8) y lenvatinib (9) utilizadas para el tratamiento del cáncer hepático.

### 3.3 Metabolitos secundarios con actividad citotóxica o antitumoral

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que son producidos por hongos, bacterias y plantas. Por medio del metabolismo secundario generan compuestos que no son esenciales para su desarrollo, sino que los emplean como mecanismo de defensa contra depredadores o especies, contra las que compiten por el sustrato o bien para atraer a otras especies que les confiere algún beneficio (Aguirre *et al.*, 2020).

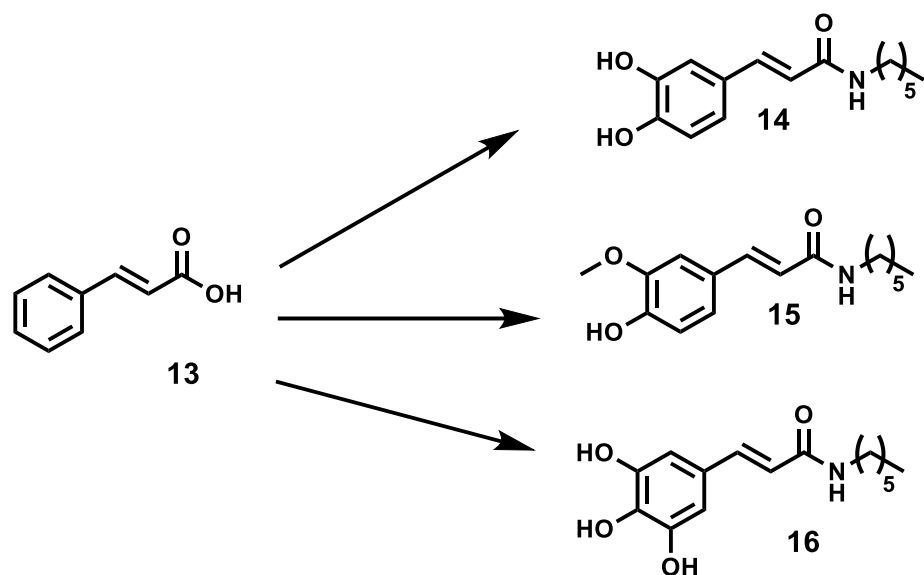
Los metabolitos secundarios tienen una gran importancia farmacológica, ya que son empleados actualmente para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, vinblastina **10** y vincristina **11**, que son alcaloides extraídos de la planta *Catharanthus roseus*, conocida en muchas regiones del país como “ninfa” y se emplea como planta ornamental.

Los compuestos mostrados en la figura 8 se comercializan para el tratamiento de algunos tipos de cáncer como: linfomas, leucemia, cáncer de mama y de pulmón (Gezici & Şekeroğlu., 2019). También se conocen otro tipo de metabolitos secundarios como el paclitaxel **12**, que se encuentra de forma natural en la corteza de *Taxus brevifolia*, y se emplea para el tratamiento de cáncer de mama, ovario y pulmón (Zhang & Fan., 2014).



**Figura 8.** Estructuras moleculares de vinblastina (10), vincristina (11) y paclitaxel (12) con actividad antitumoral empleadas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

Al mismo tiempo que existen metabolitos secundarios que ya se comercializan para el tratamiento de cáncer, se han realizado investigaciones sobre más especies vegetales en la búsqueda de metabolitos secundarios con diversas actividades como la anticancerígena. Un ejemplo de estos metabolitos es el ácido cinámico (**13**), este es un ácido orgánico presente en el aceite esencial de la canela. Las amidas que se han aislado del género *Cinnamomum* se denominan cinamamidas. Al ácido cinámico se le han realizado diversas modificaciones estructurales como son polisustituciones con metoxilos en el anillo aromático, de esta manera se obtuvieron las cinamamidas mostradas en la figura 9, han presentado actividad antitumoral, los compuestos **14**, **15** y **16**. Tuvieron actividad antitumoral en estudios *in vitro* en dos líneas celulares de cáncer colorrectal, las líneas celulares C2Bbe1 y WiDr tras 24 horas de exposición, obtuvieron las  $CI_{50}$  que se muestran en la tabla 1 (Tavares *et al.*, 2016).



**Figura 9.** Ácido cinámico (13) y cinamamidas 14, 15 Y 16 con similitud estructural que mostraron actividad antitumoral.

	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
<b>Línea celular</b>	Cl <sub>50</sub> ( μM)	Cl <sub>50</sub> ( μM )	Cl <sub>50</sub> ( μM )
<b>C2Bbe1</b>	37.3	132.3	114.8
<b>WiDr</b>	56.1	84.9	71.4

**Tabla 1.** Cl<sub>50</sub> de cinamamidas 14, 15 Y 16 sobre dos líneas celulares de cáncer de colon.

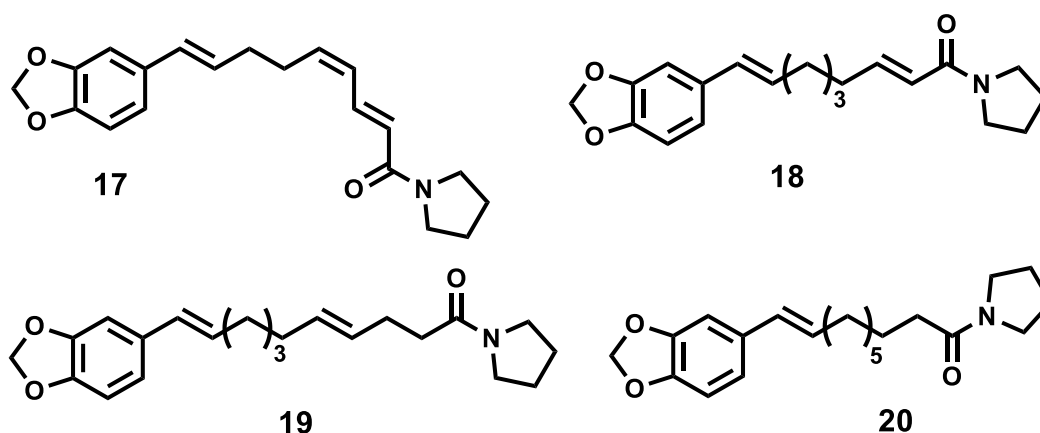
Por otra parte, la familia *Piperaceae* consta de 700 especies que crecen en varias partes del mundo como el continente asiático y americano, específicamente en Vietnam, China, India, Brasil, Perú y México. El género *Piper* es el más grande de la familia y tiene numerosos usos tradicionales para tratar enfermedades intestinales como diarreas, para tratar dolor, y principalmente inflamación, (Ravindran & Kallapurackal., 2012).

Varias especies se utilizan como condimentos en la gastronomía de muchos países. Por ejemplo: *Piper nigrum* (pimienta negra), *Pimenta dioica* (pimienta gorda), *Piper auritum* (hierba santa o acuyo) (Nascimento *et al.*, 2012). Asimismo, se trabajos que reportan actividad antitumoral o citotóxica de extractos etanólicos de *Piper nigrum* sobre las líneas celulares HCT-116, HCT-15 y HT-29 de cáncer colorrectal (Prashant *et al.*, 2017). En otro

trabajo se reporta que los extractos etanólicos tuvieron actividad citotóxica e inhibitoria sobre la línea de cáncer de mama MCF-7 (Souza *et al.*, 2016).

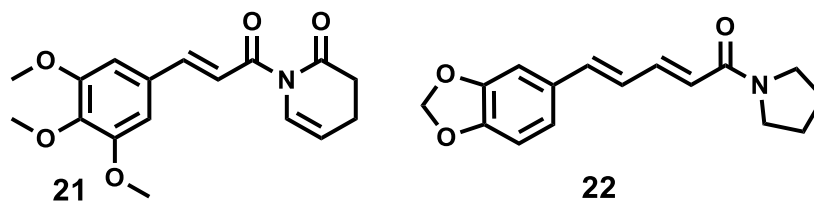
Las plantas del género *Piper* han demostrado tener metabolitos secundarios bioactivos que presentan algunas características en común, estas moléculas con actividad biológica tienen un grupo amida  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado con anillos aromáticos sustituidos con un metoxilo (-MeO) (Tang *et al.*, 2011). Por esta razón en este trabajo se tomaron como referencia para el desarrollo de nuevos derivados con actividad citotóxica.

Varios metabolitos aislados del género *Piper* han sido probados como agentes citotóxicos y antitumorales, por ejemplo, los compuestos **17** y **18**, **19**, **20** fueron aislados de la planta *Piper boehmeriaefolium* (figura 10) y tuvieron efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa con valores de  $Cl_{50}$  de 7.2, 11.61, 12.19, 2.7  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tang *et al.*, 2011).



**Figura 10.** Metabolitos aislados de extractos de *Piper boehmeriaefolium*.

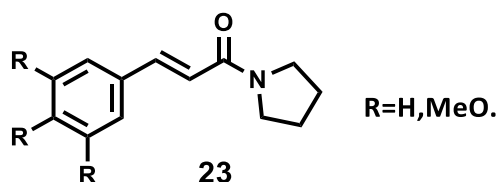
También se reportó actividad citotóxica de la piplartina **21** y piperina **22** (figura 11) aislados de extractos de raíz de *Piper tuberculatum*, los cuales fueron evaluados *in vivo* en ratones con tumor de sarcoma obteniendo porcentajes de inhibición significativos en el crecimiento de los tumores. Se obtuvo una inhibición de 28.7 % para piplartina y de 55 % para piperina utilizando dosis de 50 mg/Kg de peso de los ratones, siendo la piperina la que generó mayor inhibición (Bezerra *et al.*, 2006).



**Figura 11.** Estructuras de pipartina 21 y piperina 22, ensayados in vivo contra sarcoma en ratones.

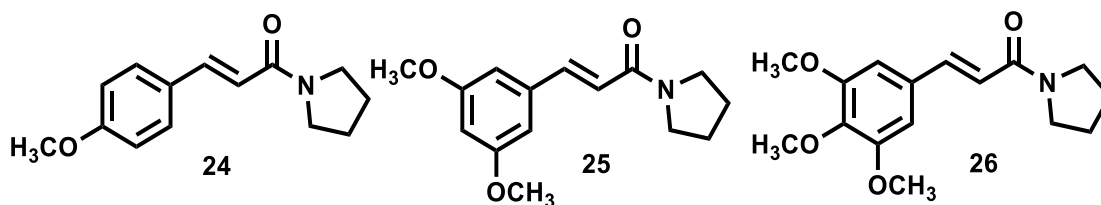
Debido a todo lo anterior, se propusieron las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas unidas a un anillo aromático, denominadas también piperlotinas para inhibir la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y hepatocelular (HepG2). Hasta donde se sabe, no hay reportes de que hayan sido evaluados en estas dos líneas celulares de relevancia clínica.

Las piperlotinas son un tipo específico de cinamamidas que han sido poco estudiadas y que su estructura molecular (**23**) se caracterizan por la presencia de una amida cíclica de pirrolidina conjugada con un anillo bencénico como se representa en la figura 12.



**Figura 12.** Estructura general de las Piperlotinas.

Las piperlotinas **24**, **25** y **26** mostradas en la figura 13 son amidas que presentaron actividad inhibitoria sobre la agregación plaquetaria y anticonvulsivante (Li *et al.*, 2007).



**Figura 13.** Piperlotinas con actividad antiagregante plaquetario.

Sin embargo, no se ha reportado su potencial actividad citotóxica. Siendo que estos compuestos son aislados del género *Piper* se espera que al igual que otras cinamamidas antes citadas tengan actividad citotóxica. Debido a que la cantidad de metabolito que es posible obtener por extractos de plantas es baja, para la realización de este trabajo las piperlotinas se sintetizaron a través de un método previamente desarrollado en nuestro grupo de investigación, el cual se muestra en la figura 14 (Ramírez et al., 2019).

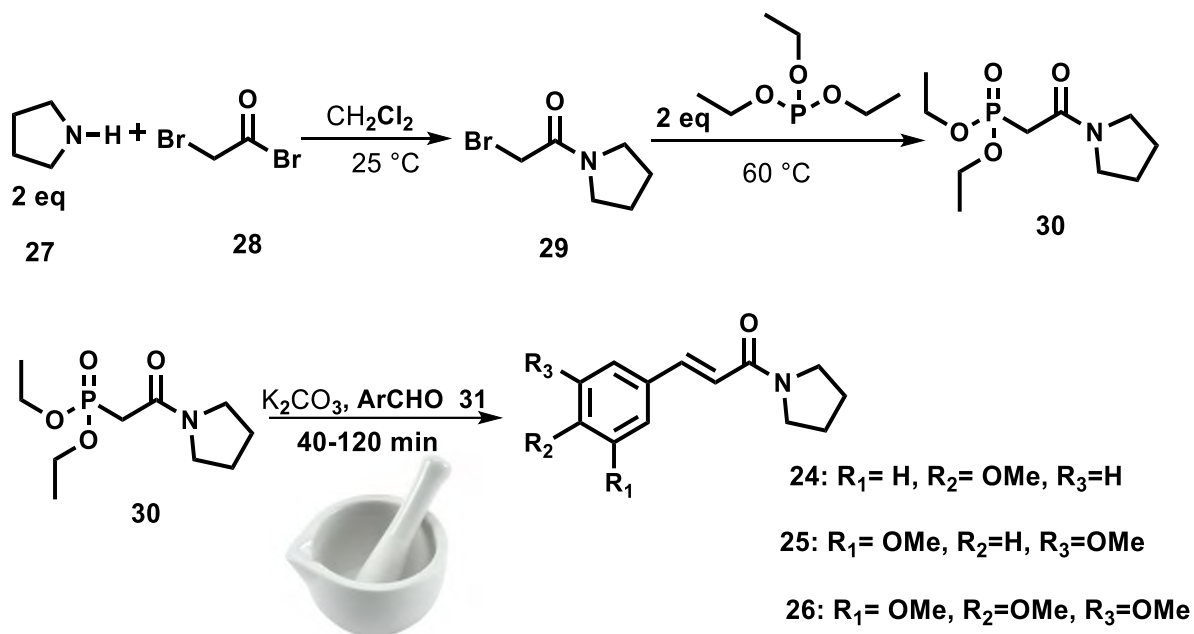


Figura 14. Ruta de síntesis de compuestos objetivo 24, 25 y 26.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en México el cáncer de mama e hígado representan un problema de salud pública que inhabilita a la población en edad productiva, disminuyendo la calidad de vida y la productividad laboral, que se traduce en una elevada pérdida económica. Adicionalmente, las terapias existentes siguen siendo insuficientes y además tienen efectos secundarios, por lo que existe la necesidad de descubrir nuevos agentes citotóxicos. Diversas amidas aisladas de plantas del género *Piper* han sido descritas como agentes citotóxicos. Sin embargo, con las piperlotinas no se han descrito esta actividad, por lo que en este trabajo se propuso su evaluación en líneas celulares de cáncer de mama y de hígado.

## 5. HIPÓTESIS

Las piperlotinas **24, 25 y 26** presentarán actividad citotóxica sobre las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama) y HepG2 (hepatocarcinoma) en cultivo *in vitro*

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Sintetizar, purificar, caracterizar y evaluar la actividad citotóxica de las piperlotinas **24, 25 y 26** en las líneas celulares HepG2 y MCF-7.

### 6.2 Objetivos específicos

- Preparar las piperlotinas **24, 25 y 26** utilizando el método de síntesis previamente explorado por el grupo de investigación.
- Purificar los productos finales de síntesis mediante cromatografía en columna, caracterizarlos mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y determinar su punto de fusión.
- Evaluar la actividad citotóxica de las piperlotinas **24, 25 y 26** en cultivo *in vitro* de las líneas celulares HepG2 y MCF-7 utilizando un marcador fluorescente de viabilidad celular.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Síntesis y caracterización de piperlotinas 24, 25 y 26

Actualmente los metabolitos secundarios se pueden obtener mediante síntesis orgánica. La síntesis de metabolitos ofrece ventajas importantes comparado con la obtención de fuentes naturales: obtener cantidades grandes y de metabolitos en un periodo de tiempo corto sin necesidad de la destrucción de poblaciones de organismos productores. Además, permite realizar modificaciones a las estructuras para modular la actividad. También mediante la síntesis es posible obtener compuestos que no se encuentran de forma natural (Shamaila *et al.*, 2016; Laev y Salakhutdinov, 2015).

Para obtener las piperlotinas **24, 25 y 26** se siguió la ruta de síntesis reportada por nuestro grupo de investigación (Ramírez *et al.*, 2019).

La primera etapa consistió en una reacción de amidación de pirrolidina (**27**) con bromuro de bromoacetilo (**28**), en diclorometano a 25 °C para obtener el compuesto **29**. Posteriormente se trató al intermediario recién formado con fosfito de trietilo a 60 °C para obtener el segundo intermediario **30** por la reacción de Michaelis-Arbuzov. Finalmente, se hizo reaccionar el compuesto **30** con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y un benzaldehído sustituido (**31**) (olefinación de Horner Wadsworth Emmons) en mortero con pistilo por 120, 60 y 70 minutos, para obtener las piperlotinas **24, 25 y 26** respectivamente.

Los aldehídos aromáticos utilizados fueron: 4-metoxibenzaldehído, 3,4-dimetoxibenzaldehído y 3,4,5-trimetoxibenzaldehído para generar las piperlotinas **24, 25 y 26**, respectivamente.

La purificación de los compuestos intermediarios y productos finales se realizó mediante cromatografía en columna. Durante las reacciones se monitoreo la conversión de los reactivos y formación de productos por cromatografía en capa fina.

La caracterización de compuestos objetivo es de vital importancia, pues nos permitió conocer la masa molar del compuesto, su estructura y sus grupos funcionales.

Se contaron con técnicas de análisis instrumental que posibilitó la elucidación estructural de los metabolitos, como la espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear, espectrometría de Masas (Skoog *et al.*, 2001).

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica no destructiva que brinda información sobre la estructura y la estereoquímica de los analitos en función de los núcleos de elementos como: el protón ( $^1\text{H}$ ), carbono ( $^{13}\text{C}$ ), flúor ( $^{19}\text{F}$ ) y fósforo ( $^{31}\text{P}$ ). Además, la técnica de espectrometría de masas nos brinda información sobre la masa molecular de los analitos (Lambert *et al.*, 2019). Como parte de la caracterización de compuestos sólidos se determinó el punto de fusión, que es el cambio de fase de sólido a líquido a una temperatura y presión específica. Esto nos ayuda a conocer el grado de pureza de estos (Yuniati & Rollado, 2018).

## 7.2 Evaluación de actividad citotóxica en líneas celulares

La determinación de la actividad antiproliferativa se realizó en el Laboratorio Nacional de Soluciones Biomiméticas para Diagnóstico y Terapia (LaNSBioDyT, Facultad de ciencias, UNAM, CDMX). Se utilizaron dos líneas celulares, MCF-7 y HepG2 preservadas en nitrógeno líquido. Las condiciones de cultivo fueron de acuerdo con el método de cultivo de la ATCC con ligeras modificaciones (Colección de Biología Celular ATCC, 2020) y está disponible en:

[http://: www.atcc.org](http://www.atcc.org).

### 7.2.1 Cultivo de células MCF-7 y HepG2

Las células MCF-7 se cultivaron en Medio Esencial Modificado por Dulbecco (**DMEM** por sus siglas en inglés) y las HepG2 en medio esencial mínimo (**MEM** por sus siglas en inglés). Los medios de cultivo se suplementaron con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 1% de piruvato de sodio y 1% de una mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad relativa.

Se evaluó la actividad citotóxica por separado para cada línea celular empleando la misma metodología, únicamente se cambió de medio de cultivo correspondiente a cada línea celular.

### 7.2.2 Ensayo de viabilidad celular

Se realizaron por duplicado los ensayos empleando las concentraciones 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 µg/mL de las tres piperlotinas.

Para ello se rotularon dos cajas de cultivo de 12 pozos como se muestra en la figura 15.

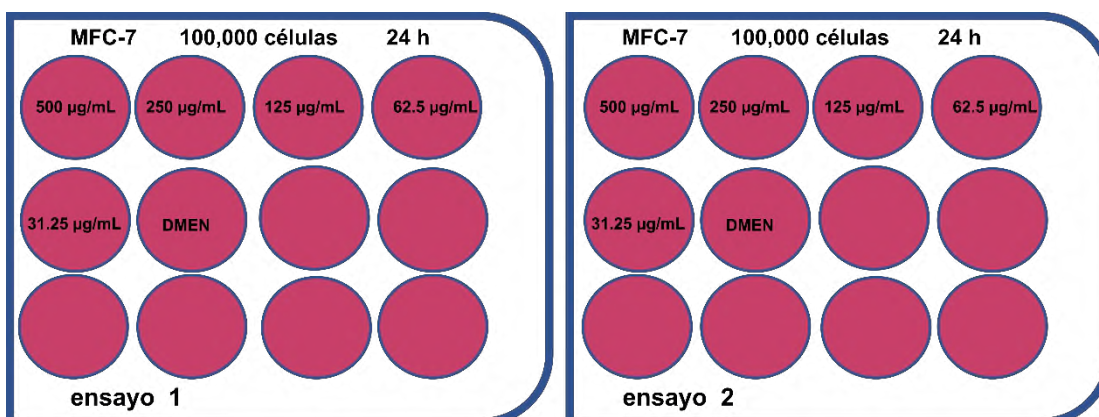


Figura 15. Representación de las cajas de cultivo utilizadas en los ensayos de citotoxicidad.

Después una caja de 10 cm de diámetro con células MCF-7 con una confluencia de 90%, se retiró el medio de cultivo, después se realizó un lavado con 2 mL de solución de tripsina-EDTA. Para desprender a las células de la caja de Petri se agregaron 2 mL de tripsina-EDTA y se incubó a 37°C por 4 minutos. Posteriormente para inactivar la tripsina-EDTA se agregaron 3 mL de DMEM suplementado. Se resuspendieron las células de la caja con ayuda de un pipeteador automático. Para realizar el conteo de las células en la cámara de Neubauer, en un microtubo para PCR se añadieron 10 µL de la suspensión celular + 10 µL de azul de tripán, se homogeneizó el contenido y se tomaron 10 µL de la solución para aplicar a la cámara de Neubauer, se registró lo cuantificado.

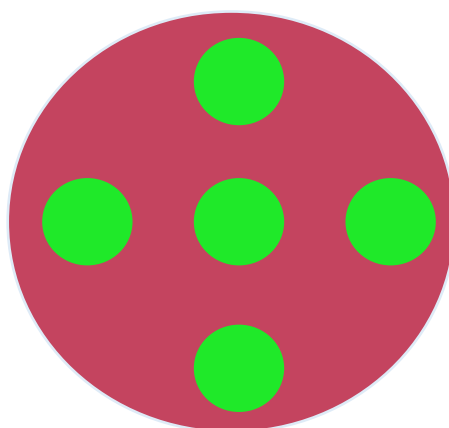
Se realizaron los cálculos para sembrar 100,000 células en cada pozo rotulado previamente en la placa de 12 pocillos.

Se adicionó medio DMEM fresco suficiente para obtener un volumen final de 1 mL por pozo junto con las células, las cuales se incubaron a 37° C, con 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas. Transcurridas las 24 horas de incubación de las células, se realizó la aplicación de las muestras de la piperlotina **24**. Para ello se definió medio DMEM como control negativo, se preparó el stock de la piperlotina **24** a una concentración de 30 mg/mL, pesando 30 mg del compuesto puro y disolviendo en DMSO hasta aforar a 1 mL.

Posteriormente se retiró el medio de cultivo de las cajas de 12 pozos sembradas el día anterior. Se realizó un lavado con 1 mL de PBS estéril y a cada pozo se le agregaron 983.3, 991.67, 995.84, 997.917 y 998.96 µL de DMEM fresco a los pozos rotulados con 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 µg/mL respectivamente, en el pozo del control solo se agregó 1 mL de medio fresco. Se incubaron a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Por último, se realizó el ensayo de viabilidad celular como se describe en la bibliografía (Venter & Niesler, 2019), cambiando el medio de cultivo suplementado por medio de ayuno con la proporción de 1 µL de calceína de la marca Sigma-Aldrich grado reactivo por cada mL de medio de ayuno para marcaje fluorescente, para ello se atemperó el medio DMEM de ayuno y el PBS. Para preparar 25 mL de la solución de medio de marcaje para las dos placas de cultivo se agregaron 25 µL de calceína AM a 24.975 mL de DMEM de ayuno en un tubo

cónico de 50 mL. Para aplicar la solución de marcaje a las células se retiró el medio de cultivo, posteriormente realizó un lavado con PBS estéril 1 mL por pocillo con células, se aplicó 1 mL de medio de marcaje a cada pozo con células y se incubaron por 15 minutos, posteriormente se realizó la visualización de las cajas de cultivo en microscopio de fluorescencia ZOE de la marca Bio-Rad en el canal verde con las especificaciones: excitación a 480/17 nm; emisión a 517/23 nm. Se tomaron cinco fotografías por pozo, en 5 regiones diferentes como se muestra en la figura 16.



**Figura 16.** Regiones del pocillo con células en las que se tomaron las fotografías durante el ensayo de viabilidad celular con calceína AM.

Para cuantificar las áreas totales con presencia de células viables marcadas en verde de las imágenes capturadas se empleó el software *ImageJ* versión 1.8.0\_112 para sistema operativo Windows con arquitectura de 64 bits. Se registraron todas las áreas de las células viables en una hoja de cálculo y se procedió a normalizarlas para obtener el valor de cada experimento con referencia en el valor del control negativo, para ello se calculó el promedio de las 5 áreas de las imágenes del control, se calcularon los porcentajes de viabilidad de todas las imágenes tomando el promedio del área de las células del control como el 100 % de viabilidad como describe la siguiente formula.

$$\frac{\text{área de células (píxeles}^2\text{)}(100)}{\text{promedio del área de imagen control (píxeles}^2\text{)}} = \% \text{ de viabilidad celular.}$$

Una vez obtenidos los porcentajes de viabilidad, se prosiguió a realizar el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía con el software GraphPad Prism versión 8.0.1.. Para el análisis se formaron 3 grupos experimentales, cada grupo representaba a una de piperlotinas **24, 25 y 26**, respectivamente, cada grupo quedó conformado por seis subcolumnas que representan a las 5 concentraciones de cada piperlotina además el control de medio de cultivo, en total se obtuvieron 10 datos de viabilidad, 5 porcentajes de viabilidad de cada ensayo por duplicado como se ejemplifica en la tabla 2.

		Piperlotina					
		Concentraciones µg/mL					
		Control (0)	31.25	62.5	125	250	500
porcentajes de viabilidad	muestra 1	muestra 1	muestra 1	muestra 1	muestra 1	muestra 1	muestra 1
	muestra 2	muestra 2	muestra 2	muestra 2	muestra 2	muestra 2	muestra 2
	muestra 3	muestra 3	muestra 3	muestra 3	muestra 3	muestra 3	muestra 3
	muestra 4	muestra 4	muestra 4	muestra 4	muestra 4	muestra 4	muestra 4
	muestra 5	muestra 5	muestra 5	muestra 5	muestra 5	muestra 5	muestra 5
	muestra 6	muestra 6	muestra 6	muestra 6	muestra 6	muestra 6	muestra 6
	muestra 7	muestra 7	muestra 7	muestra 7	muestra 7	muestra 7	muestra 7
	muestra 8	muestra 8	muestra 8	muestra 8	muestra 8	muestra 8	muestra 8
	muestra 9	muestra 9	muestra 9	muestra 9	muestra 9	muestra 9	muestra 9
	muestra 10	muestra 10	muestra 10	muestra 10	muestra 10	muestra 10	muestra 10

**Tabla 2.** Representación del acomodo de los datos de porcentajes de viabilidad normalizados para la realización del análisis de varianza (ANOVA) de las piperlotinas 24, 25 y 26 usando una prueba de Tukey.

Por otra parte, para realizar el cálculo de las  $CI_{50}$  de las piperlotinas para cada línea celular se formaron 3 grupos correspondientes a cada piperlotina, como variable independiente se colocaron las concentraciones contra los porcentajes de viabilidad con 10 repeticiones obtenidas para cada piperlotina como se ejemplifica en la tabla 3. Posteriormente se normalizaron las concentraciones a log de la concentración, luego se ejecutó el análisis mediante la opción de curva con regresión lineal.

Concentraciones $\mu\text{g/mL}$	Piperlotina									
control	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7	muestra 8	muestra 9	muestra 10
31.25	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7	muestra 8	muestra 9	muestra 10
62.5	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7	muestra 8	muestra 9	muestra 10
125	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7	muestra 8	muestra 9	muestra 10
250	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7	muestra 8	muestra 9	muestra 10
500	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7	muestra 8	muestra 9	muestra 10

**Tabla 3.** Representación del acomodo de los datos de porcentajes de viabilidad normalizados para la determinación de las concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ) de las piperlotinas 37, 38 y 39, el software GraphPad Prism graficó la media de +/- SD.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Síntesis de los compuestos **29**, **30** y las piperlotinas **24**, **25** y **26**.

La síntesis de las piperlotinas se llevó a cabo en tres etapas de reacción. La primera etapa consistió en la amidación de la pirrolidina **27** con bromuro de bromoacetilo **28** para la formación del primer intermediario de reacción **29**, el producto de reacción se purificó por un proceso de extracción líquido-líquido, obteniéndose un sólido de color blanco con un rendimiento de 89 % (figura 17).

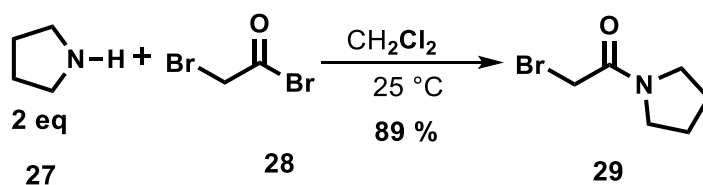


Figura 17. Síntesis del bromuro de alquilo (**29**).

Una vez obtenido el primer intermediario de reacción **29**, se trató con fosfito de trietilo a 60 °C sin disolvente durante 6.5 horas para obtener el fosfonato **30** como se describe en la figura 18.

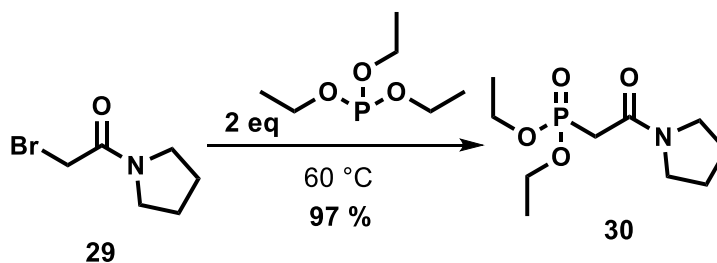


Figura 18. Síntesis del intermediario **30**.

Finalmente se realizó la tercera etapa de reacción para obtener las piperlotinas **24**, **25** y **26** mediante la reacción de olefinación de Horner Wadsworth Emmons del fosfonato **30** con

un benzaldehído sustituido y  $K_2CO_3$  en un mortero con pistilo durante una hora de molienda constante (figura 19). Se obtuvieron los productos **24**, **25** y **26** con rendimientos de 60, 77 y 56 %, respectivamente.

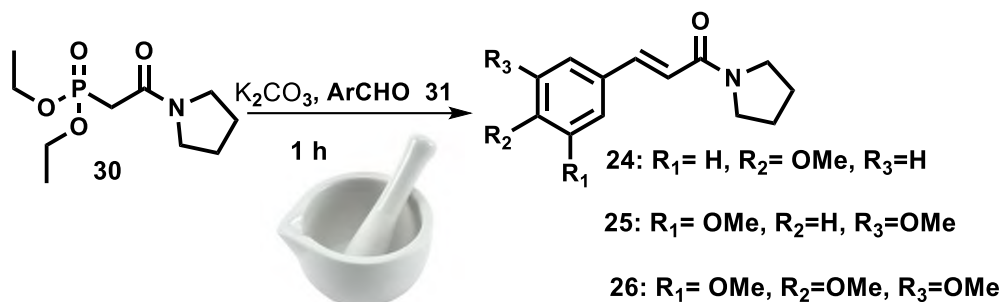


Figura 19. síntesis de las Piperlotinas 24, 25 y 26.

La reacción de Horner-Wadsworth-Emmons fue selectiva para la síntesis de los tres productos finales, aislando únicamente el isómero *E*, lo cual se confirmó con la caracterización mediante RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$ . En la figura 20 se muestra el espectro obtenido de análisis de RMN de  $^1H$  y RMN de  $^{13}C$  del producto 24 (figura 21).

En el espectro de RMN  $^1H$  se observaron señales múltiples en 1.87-2.01 ppm correspondientes a los hidrógenos más desprotegidos de la piperidina, en 3.59-3.62 se observaron dos señales triples correspondientes a los hidrógenos cercanos al nitrógeno, en 3.82 ppm se observó una señal sencilla correspondiente a los hidrógenos del metoxilo, los hidrógenos vinílicos aparecen en 6.60 y 7.66 ppm correspondientes a los protones unidos a los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$ , con una constante de acoplamiento de 15.5 Hz, típica de protones en configuración *trans*. Por último, se observaron en 6.88 y 7.47 ppm las señales correspondientes a los hidrógenos del anillo aromático.

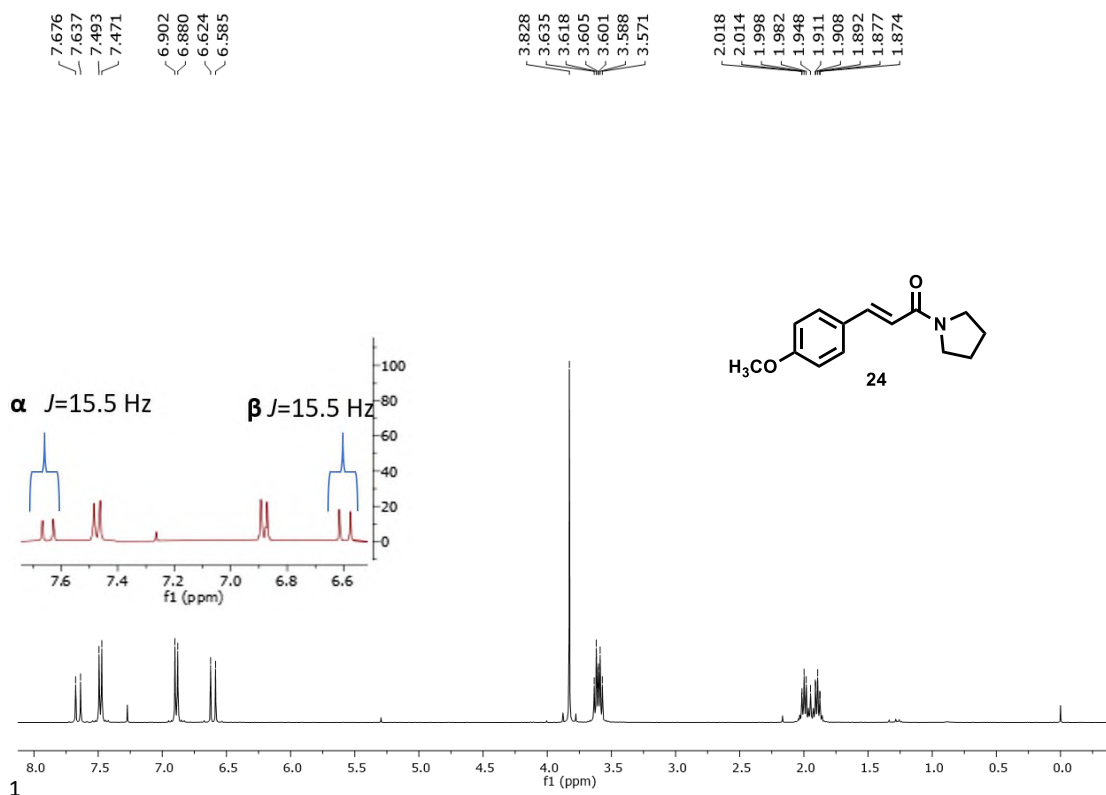


Figura 20. Espectro de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la piperlotina **24**.

Para el caso del espectro de  $^{13}\text{C}$  se observaron las 12 señales, en 24.5 y 26.3 se observan los carbonos más protegidos de la piperidina, mientras que en 46.18 y 46.72 se ven las señales correspondientes a los carbonos unidos al nitrógeno, hasta en 55.52 ppm se observa el carbono característico del metoxilo. Las señales de los carbonos vinílicos aparecen en 116.65 ( $\alpha$ ) ppm y 141.46 ( $\beta$ ) ppm, las señales correspondientes a los carbonos del fenilo aparecen en 114.35, 128.26, 129.54 y 160.94 ppm, mientras que en 165.21 ppm aparece la señal correspondiente al carbono del carbonilo.

Con la información obtenida de los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , pudimos comprobar que obtuvimos la piperlotina **24**.

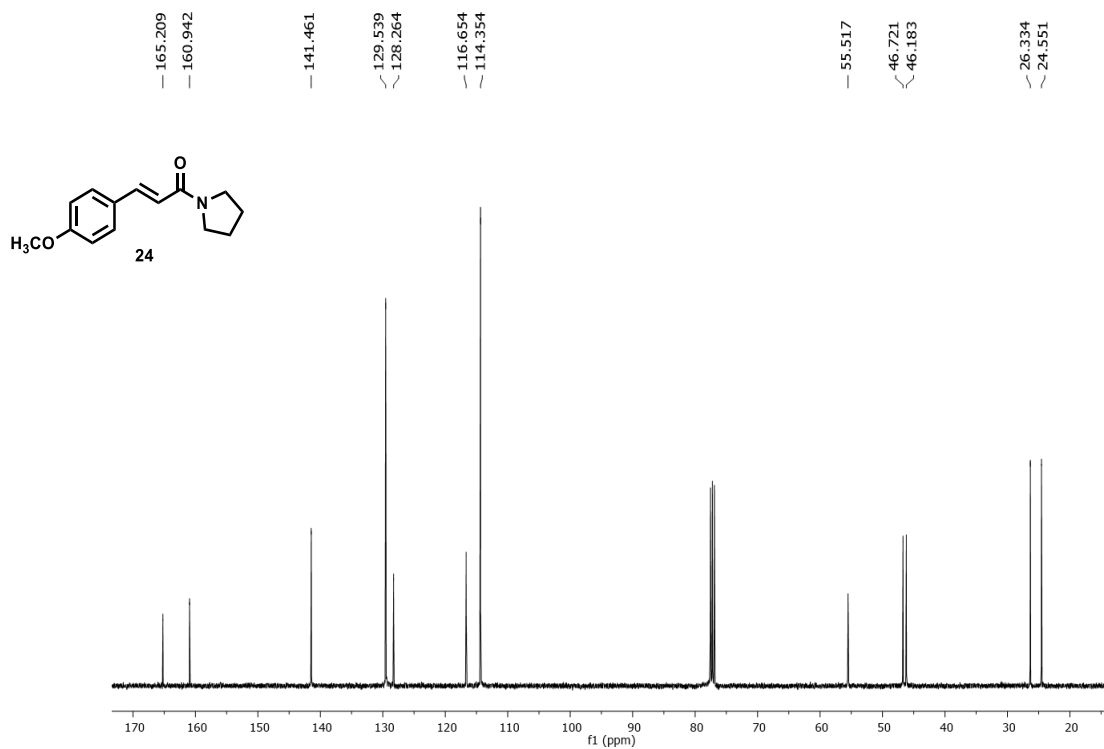
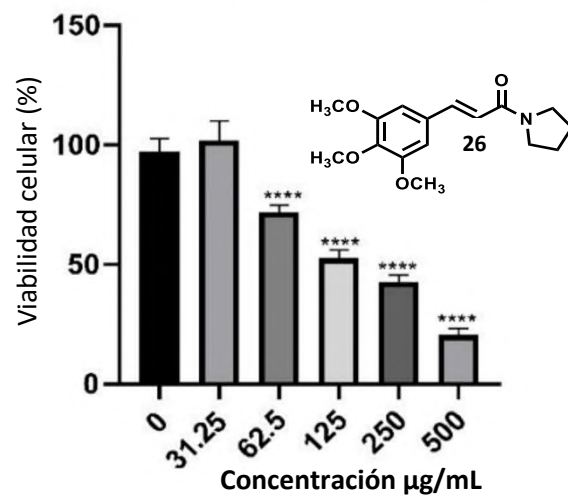
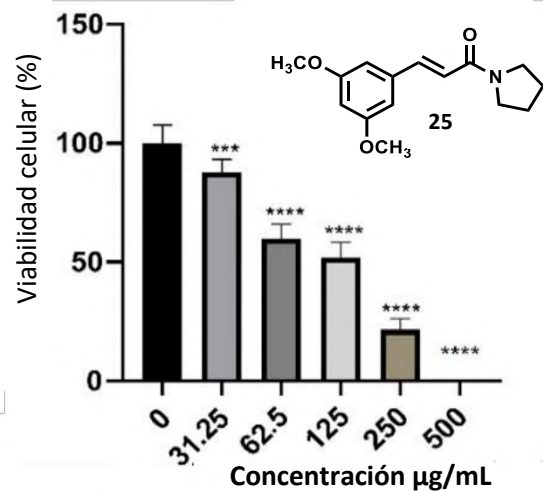
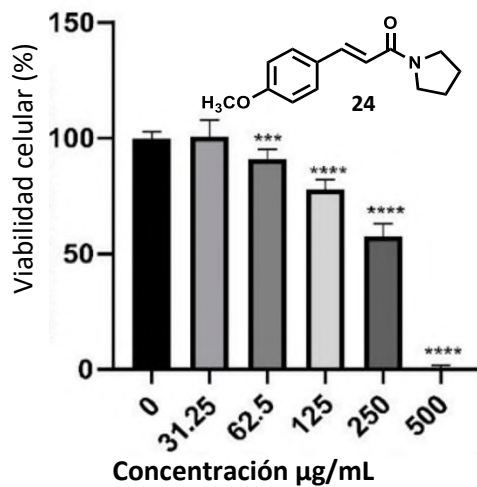


Figura 21. Espectro de 13C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la piperlotina 24.

## 8.2 Efecto citotóxico de las piperlotinas 24, 25 y 26 sobre la línea celular MCF-7

Para evaluar la citotoxicidad de las piperlotinas **24**, **25** y **26**, se procedió a la evaluación de su actividad citotóxica sobre las líneas celulares MCF-7 y HepG2, mediante el ensayo de calceína AM.

En esquema 1 se muestran los histogramas obtenidos de la prueba ANOVA del ensayo con la línea celular MCF-7.



**Esquema 1.** Evaluación de la citotoxicidad a 24 h de exposición de las piperlotinas 24, 25 y 26 en MCF-7. Se realizó un ANOVA de una vía usando una prueba de Tukey. \*  $P < 0.05$  vs control, \*\*\*  $P = 0.0001$  vs control, \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs control.

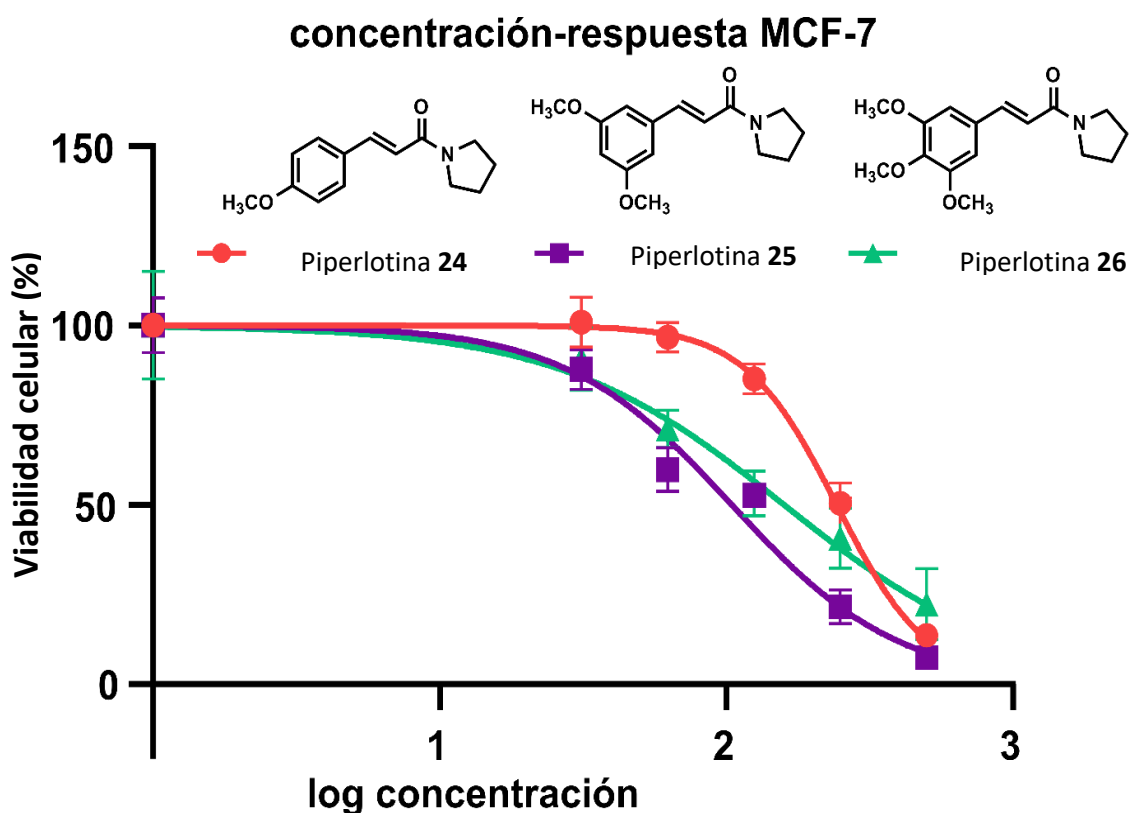
La piperlotina **24** se presentó un efecto significativo desde la concentración 62.5 µg/mL, para las concentraciones de 125 µg/mL hasta 500 µg/mL con valor de  $P < 0.0001$  vs control. Para la piperlotina **25** se observa diferencia significativa desde la concentración mínima de 32.25 µg/mL con  $P = 0.0001$  vs control, y  $P < 0.0001$  vs control, respectivamente.

Por último, en el ensayo con la piperlotina **26**, se mostró diferencia significativa a partir de la concentración 62.5 µg/mL y con una  $P < 0.0001$  vs control.

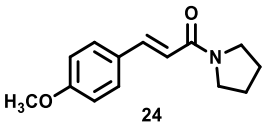
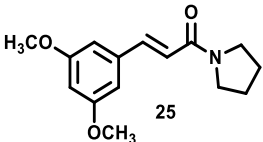
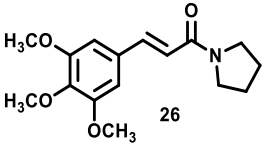
Este comportamiento al parecer es dependiente de la concentración de las piperlotinas en los 3 casos, ya que los valores de viabilidad disminuyen conforme incrementan las concentraciones de los compuestos.

Aunque el efecto es similar para los tres casos. Se observó mayor citotoxicidad para la piperlotina 25 en las concentraciones de 62.5, 125, 250 y 500  $\mu\text{g/mL}$ , comparada con 24 y 26 en la línea celular MCF-7.

Por otra parte, para poder definir el efecto de las piperlotinas **24, 25 y 26** para la línea celular MCF-7, se determinaron las concentraciones inhibitorias medias ( $\text{CI}_{50}$ ) de cada una (esquema 2), además, en la tabla 4 se muestran las concentraciones inhibitorias medias obtenidas para cada piperlotina, que fueron 242.8, 104.5 y 159  $\mu\text{g/mL}$ , para las piperlotinas **24, 25 y 26**, respectivamente.



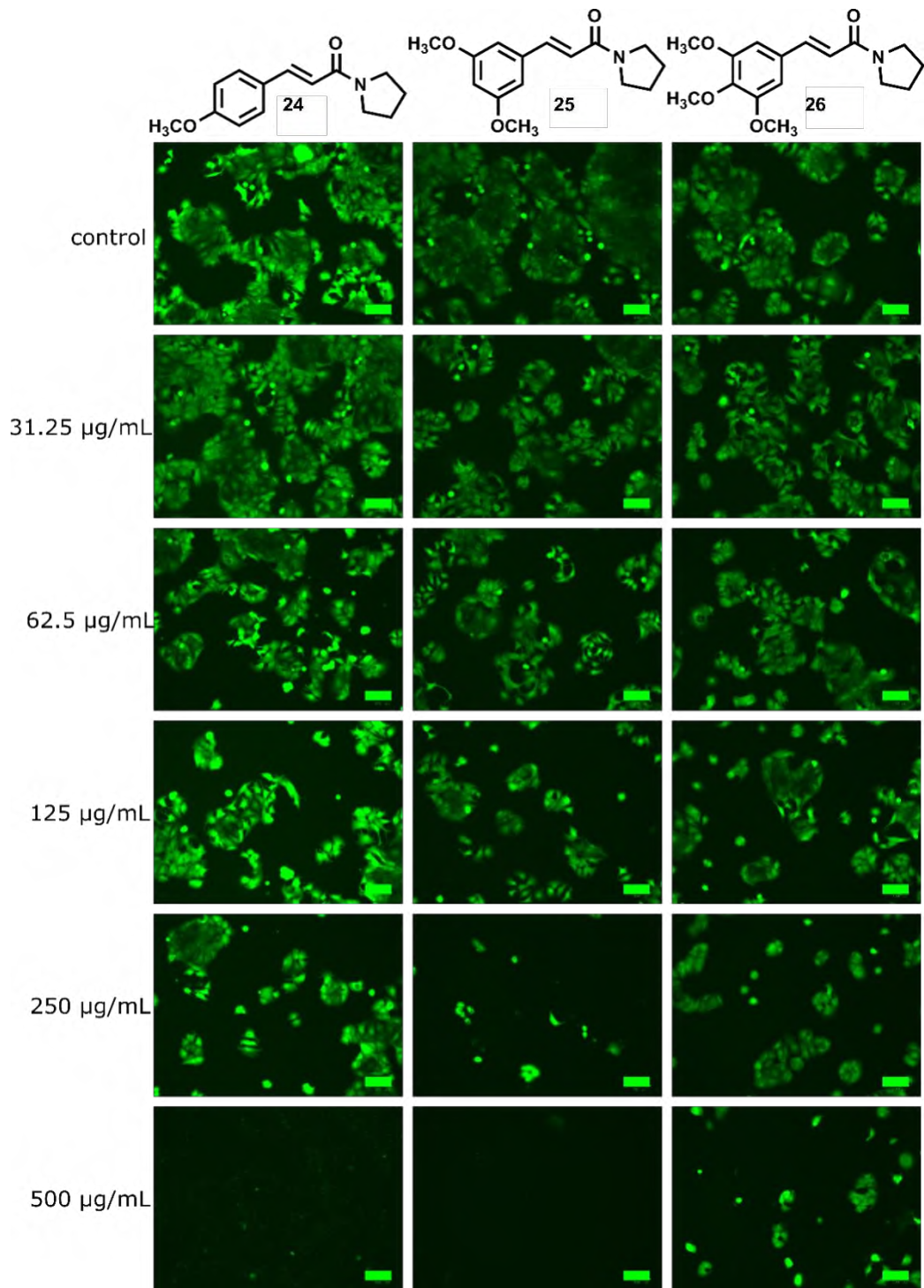
**Esquema 2.** Curva concentración-respuesta de las piperlotinas 24, 25 y 26 obtenidas de los ensayos de citotoxicidad sobre la línea celular MCF-7. Los datos son expresados como la media  $\pm$  SD.

Compuesto	Cl <sub>50</sub> (μg/mL)
 <p>24</p>	242.8
 <p>25</p>	104.5
 <p>26</p>	159

**Tabla 4.** Concentraciones inhibitorias medias (Cl<sub>50</sub>) de las piperlotinas 24, 25 y 26 sobre la línea celular MCF-7.

Comparando las Cl<sub>50</sub> obtenidas para las tres piperlotinas, observamos que en las piperlotinas **24, 25 y 26** tienden a incrementar su potencia, al pasar de uno a dos sustituyentes en el anillo aromático. Pero esta tendencia se pierde cuando en la molécula se agregan tres sustituyentes metoxilo, pues su potencia disminuye considerablemente.

Se seleccionaron algunas fotomicrografías que representan el efecto descrito por el análisis estadístico para representar de manera visual la reducción de la viabilidad causada por las piperlotinas **24, 25 y 26**. En el esquema 3 de la siguiente página se presenta el comparativo entre lo observado para las células MCF-7 con el tratamiento de las concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 μg/mL de cada piperlotina contra micrografía del control.



**Esquema 3.** Micrografías de las células MCF-7 expuestas a las concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 µg/mL de las piperlotinas 24, 25 y 26 tras 24 h de exposición. Las piperlotinas se muestra en el encabezado de las columnas de imágenes marcadas con calceína AM tomadas en microscopio con filtro en verde bajo la lente de 20 X (cada micrografía tiene una barra de escala de 100 µm).

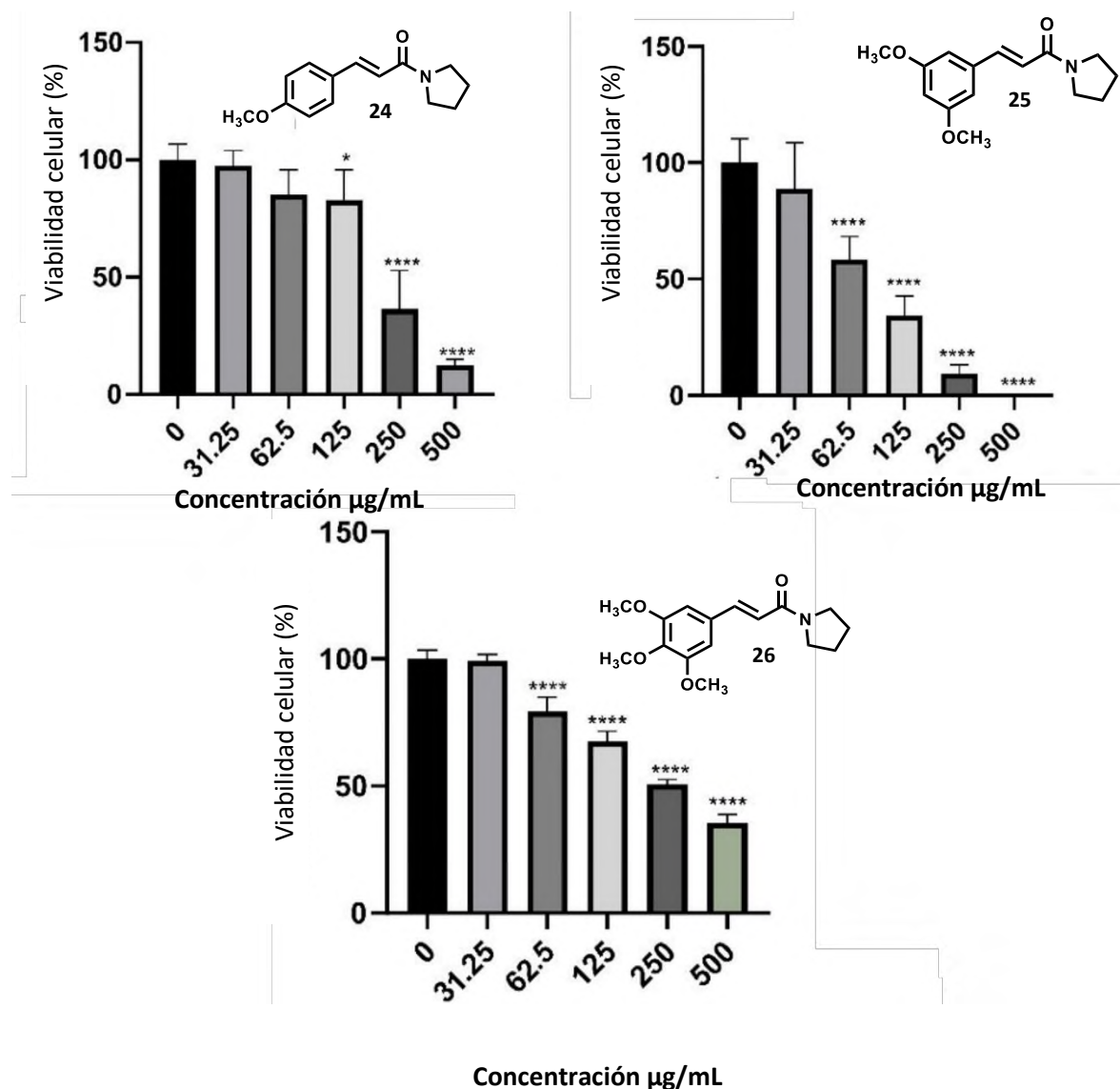
En primer lugar, se observa para el caso de la piperlotina **24**, comparando la micrografía del control de solo medio de cultivo, las micrografías obtenidas empleando las concentraciones 31.25, 62.5, 125, 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  muestran que, si bien, la población viable (marcadas en verde por la calceína AM) es dependiente de la concentración del tratamiento, las células mantienen su morfología característica de forma poligonal alargada, formando colonias compactas con forma poligonal (Comsa *et al*, 2015). Para la micrografía de la concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no se logran observar células viables.

Para el caso de las micrografías obtenidas en el ensayo con la piperlotina **25**, la disminución de la población de células debido a la pérdida de su viabilidad es visible desde la concentración de 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , además desde esta concentración hasta 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la morfología se conserva salvo en de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se pierde la morfología original de las células MCF-7 y solo pocas células redondeadas. Ya en micrografía obtenida de la concentración más alta, prácticamente no se observan células viables ni tampoco partículas suspendidas, lo que nos lleva a pensar que la piperlotina **25** en la concentración de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  acaba completamente con la población de células, pero no genera desprendimiento de estas de la caja de cultivo.

Por último, describimos el comportamiento de la piperlotina **26**, la cual tuvo un efecto aparentemente paulatino sobre la viabilidad de las células conforme aumentó la concentración, en las micrografías observamos un descenso visible en la población de las células viables conforme aumenta la concentración del tratamiento. En la micrografía de las células expuestas a la mayor concentración (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se observan únicamente dos cúmulos de células agrupadas, mientras que hay partículas circulares que fueron afectadas por el tratamiento y perdieron su morfología poligonal.

### 8.3 Efecto citotóxico de las piperlotinas 24, 25 y 26 sobre la línea celular HepG2

Posterior al ensayo con MCF-7, las piperlotinas 24-26 fueron evaluadas en la línea celular HepG2. De la prueba ANOVA de una vía se obtuvieron los histogramas que se muestran en el esquema 4.



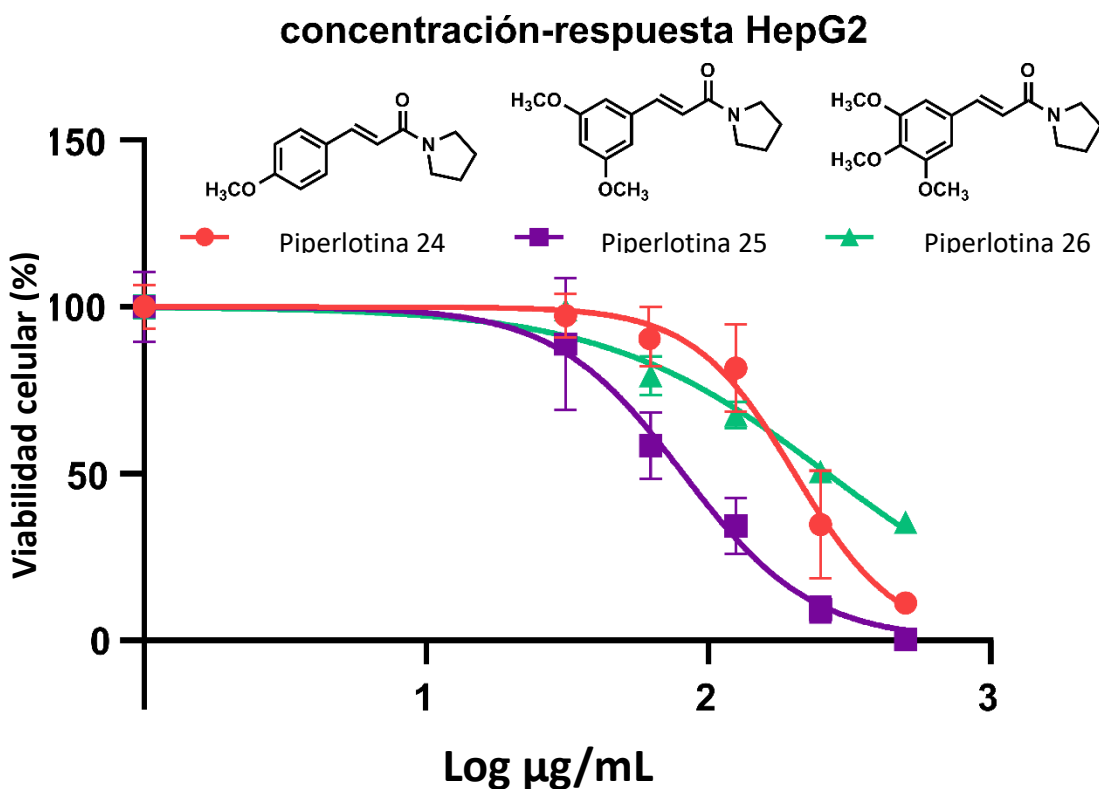
**Esquema 4.** Evaluación de la citotoxicidad a 24 h de exposición de las piperlotinas 24, 25 y 26 en HepG2. se realizó el cálculo de ANOVA de una vía usando una prueba de Tukey. \*  $P < 0.05$  vs control, \*\*\*\*  $P < 0.0001$  vs control.

Analizando el histograma de la piperlotina **24**, se observó disminución significativa de la viabilidad celular desde la concentración de 125 µg/mL. Pero en las concentraciones siguientes de 250 y 500 µg/mL la reducción de la viabilidad es visiblemente mayor.

Por otra parte, el efecto citotóxico de la piperlotina **25** se observa desde la concentración mínima (31.25 µg/mL) pero con diferencia significativa a partir de la concentración de 62.5 µg/mL, la viabilidad celular en este ensayo sufre un descenso gradual hasta ser prácticamente nula para la concentración de 500 µg/mL.

Por último, la piperlotina **26** presentó actividad citotóxica significativa desde la concentración de 62.5 µg/mL la disminución de la viabilidad celular es menor a la observada para las piperlotinas **24** y **25**.

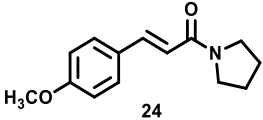
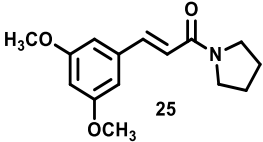
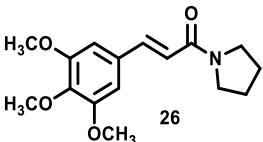
Una vez analizando los histogramas de los ensayos de citotoxicidad de las piperlotinas **24**, **25** y **26**, observando que la viabilidad de las células se ve reducida significativamente conforme incrementa la concentración de la piperlotina aplicada, podemos concluir que este efecto es dependiente de la concentración del compuesto. Por ello se prosiguió a calcular las concentraciones inhibitorias medias ( $CI_{50}$ ) de las piperlotinas **24**, **25** y **26** para así poder conocer la potencia que tiene cada una en esta línea celular (esquema 5).



**Esquema 5.** Curva concentración-respuesta de las piperlotinas 24, 25 y 26 obtenidas de los ensayos de citotoxicidad sobre la línea celular HepG2. Los datos son expresados como la media +/- SD.

Comparando las  $CI_{50}$  obtenidas para las tres piperlotinas, observamos que la piperlotina más potente fue **25**, seguida de **24** y por último **26**. En las piperlotinas **24** y **25** tienden a incrementar su potencia al pasar de uno a dos sustituyentes metoxilo como se ejemplifica en la tabla 5.

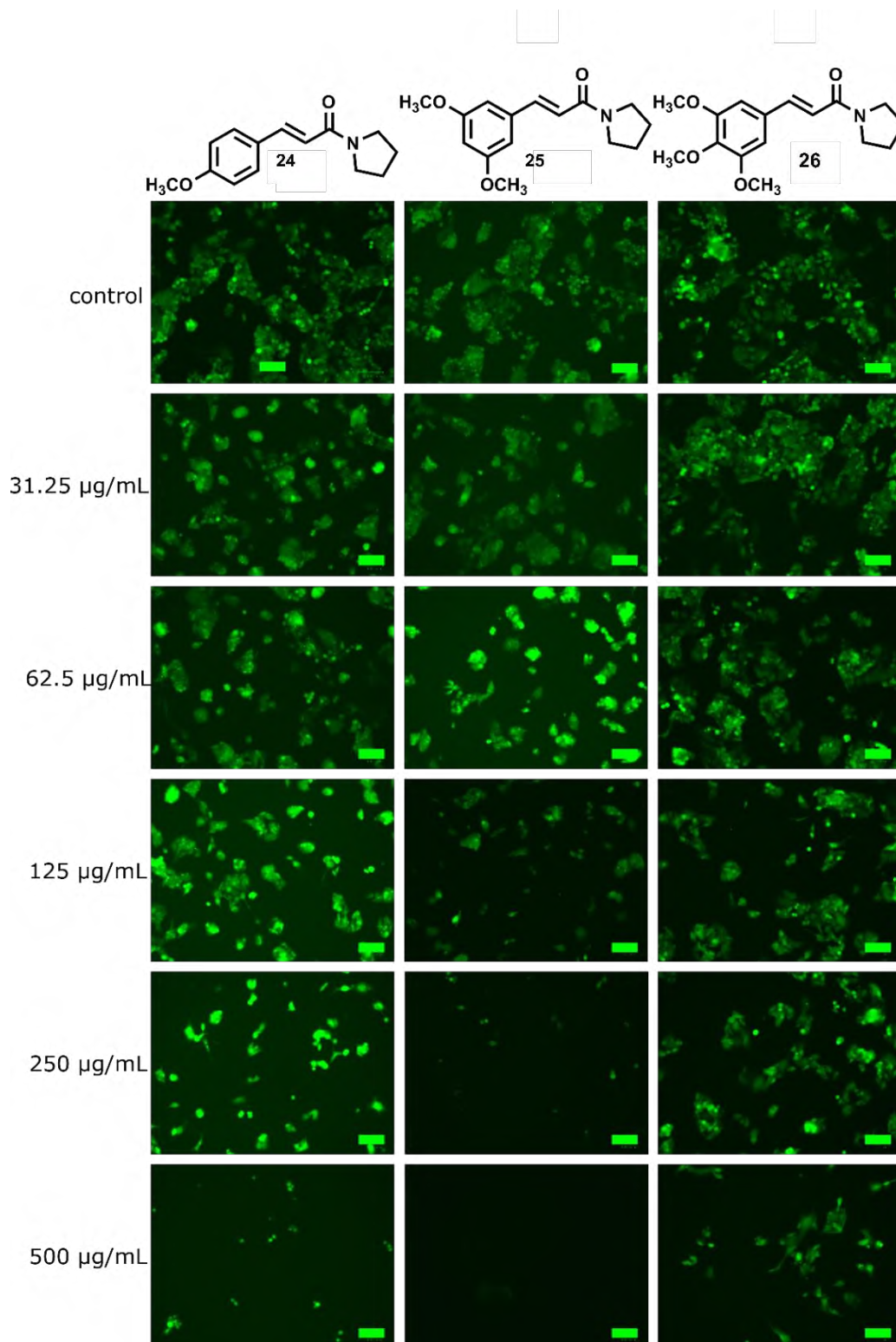
Por otra parte, cuando se pasan a tres sustituyentes metoxilo en la piperlotina **26** se ve drásticamente reducida la potencia, incluso menor a la que se observó para la piperlotina **24** con un solo metoxilo.

Compuesto	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
 <p>24</p>	202.5
 <p>25</p>	81.42
 <p>26</p>	264.5

**Tabla 5.** Comparativo de las CI<sub>50</sub> de las piperlotinas 24, 25 y 26 en la línea celular HepG2.

Para complementar la evidencia de la pérdida de la viabilidad celular a causa la exposición a las piperlotinas **24**, **25** y **26**, se realizó el análisis de micrografías obtenidas de cada ensayo con las células viables marcadas con el fluoróforo calceína AM.

En el esquema 6 se presenta un comparativo entre lo observado para las células HepG2 por la exposición de las concentraciones 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 µg/mL de cada piperlotina contra micrografía del control, las cuales se describen a continuación.



**Esquema 6.** Micrografías de las células HepG2 expuestas a las concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 µg/mL de las piperlotinas 24, 25 y 26 tras 24 h de exposición. Las piperlotinas se muestra en el encabezado de las columnas de imágenes marcadas con calceína AM tomadas en microscopio con filtro en verde bajo la lente de 20 X (cada micrografía tiene una barra de escala de 100 µm).

Para la piperlotina **24** se observó disminución de la viabilidad celular conforme aumentaba la concentración, en todas las concentraciones se observan células viables, estas pierden su morfología característica de formación de grupos con forma poligonal (Bokhari *et al.*, 2007).

En el caso de la piperlotina **25**, se observa una ligera reducción de la viabilidad celular desde la concentración más baja del metabolito respecto al control. Pero desde 62.5 µg/mL se ve una mayor reducción de la viabilidad hasta que en la de 250 µg/mL se ve una reducción muy drástica al observarse solo unas cuantas células viables individuales que perdieron su morfología y adoptaron una forma circular. Ya en la concentración de 500 µg/mL, prácticamente la viabilidad es nula y se puede concluir que el porcentaje de viabilidad celular también es dependiente de la concentración del tratamiento.

Por último, en los tratamientos con la piperlotina **26** sobre la línea celular HepG2, se observa una disminución de la viabilidad de las células que se empieza a ver desde la concentración de 62.5 µg/mL, y va disminuyendo paulatinamente conforme aumenta la concentración de la piperlotina. A la concentración de 500 µg/mL aún se observa un importante número de células viables y que además conservan su morfología.

Habiendo observado que de las 3 piperlotinas evaluadas, la que presentó la mayor potencia fue la piperlotina **25** que tuvo un valor de  $CI_{50}$  menor y además en su máxima concentración prácticamente la viabilidad celular fue cero, se podría considerar que tiene un mayor potencial farmacológico, puesto que se requiere una menor concentración para conseguir el efecto deseado.

Por último, el efecto observado en las piperlotinas **24, 25 y 26** cuando pasan de uno a dos sustituyentes metoxilo en el anillo aromático, posiblemente se deba a que de esta manera la molécula adquiere mayor densidad electrónica en el anillo aromático y se vuelva más afín a alguna diana molecular que genera el efecto citotóxico, por eso incrementa el efecto citotóxico. Por otra parte, cuando pasa de dos a tres sustituyentes metoxilo, la citotoxicidad nuevamente se ve reducida, esto posiblemente por algún efecto de impedimento estérico de la molécula al tener un mayor volumen en su estructura y eso podría estar moderando su acción.

## 9. CONCLUSIONES

Las piperlotinas **24**, **25** y **26** fueron sintetizadas, purificadas y caracterizadas mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear como diastereoisómeros (*E*).

Los compuestos sintetizados fueron evaluados como agentes citotóxicos por primera vez, mostrando potencial farmacológico al presentar actividad inhibitoria sobre las líneas celulares MCF-7 y HepG2 de cáncer de mama y hepático.

Las  $CI_{50}$  de las piperlotinas **24**, **25** y **26** fueron de 242.8, 104.5, 159  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente sobre la línea celular MCF-7. La piperlotina **25** fue la más potente en esta línea celular.

Para la línea celular HepG2 las  $CI_{50}$  de las piperlotinas **24**, **25** y **26** fueron 202.5, 81.42, 264.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. La piperlotina **25** fue la más potente sobre esta línea celular.

La piperlotina **25** fue la más potente para ambas líneas celulares, esta piperlotina se caracteriza por la sustitución en *meta* de dos metoxilos en el anillo aromático.

Por lo tanto, la piperlotina **25** es candidata a ensayos *in vitro* con células no cancerígenas para evaluar su selectividad hacia las líneas celulares MCF-7 y HepG2.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre-Becerra, H., Vazquez-Hernandez, M. C., Saenz de la O, D., Alvarado-Mariana, A., Guevara-Gonzalez, R. G., Garcia-Trejo, J. F., & Feregrino-Perez, A. A. (2021). Role of stress and defense in plant secondary metabolites production. In *Bioactive natural products for pharmaceutical applications*, 151-195).
2. Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2012). Chitosan–Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and in vitro study. *International Journal of Nanomedicine*, 2012:7, 1851—1863.
3. Azim, H., De Azambuja, E., Colozza, M., Bines, J., & Piccart, M. (2011). Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Annals of Oncology*, 22(9), 1939–1947.
4. Baguley, B. C., & Leung, E. (2011). Heterogeneity of phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Cells-carcinogenesis, cell Growth and signaling pathways*: Intech Publishers, 245-256.
5. Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V., & Kang, S. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), Available Online: October 12, 2020.
6. Bezerra, D., Castro, F., Alves, A., Pessoa, C., Moraes, M., Silveira, E., . . . Costa-Lotufo, L. (2006). In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(6), 801–807.
7. Bhide, S. A., & Nutting, C. M. (2010). Recent advances in radiotherapy. *BMC medicine*, 8(1), 25.
8. Bokhari, M., Carnachan, R. J., Cameron, N. R., & Przyborski, S. A. (2007). Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge. *Journal of Anatomy*, (211), 567-576.

9. Boncler, M., Róžalski, M., Krajewska, U., Podsędek, A., & Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *69*(1), 9–16.
10. Cheung, K., Giaever, G., & Nislow, C. (2013). DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chemistry & Biology*, *20*(5), 648–659.
11. Cisneros, L., González, M., López, J., & Kuljacha, A. (2018). Caracterización del carcinoma hepatocelular en México. *Revista de Gastroenterología de México*, *83*(3), 223–227.
12. Coccini, T., Manzo, L., Bellotti, V., & de Simone, U. (2014). Assessment of Cellular Responses after Short- and Long-Term Exposure to Silver Nanoparticles in Human Neuroblastoma (SH-SY5Y) and Astrocytoma (D384) Cells. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–13.
13. Comsa, S., Cimpean, A. M. & Raica, M (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res* *35*, 3147–3154.
14. de Souza Grinevicius, V. M. A., Kwiecinski, M. R., Mota, N. S. R. S., Ourique, F., Castro, L. S. E. P. W., Andregueti, R. R., ... & Pedrosa, R. C. (2016). Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. *Journal of ethnopharmacology*, *189*, 139-147. Spallanzani, A., Orsi, G., Andrikou, K., Gelsomino, F., Rimini, M., Riggi, L., & Cascinu, S. (2018). Lenvatinib as a therapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *18*(11), 1069–1076.
15. Demarchi, F., Bertoli, C., Copetti, T., Tanida, I., Brancolini, C., Eskelinen, E., & Schneider, C. (2006). Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*, *175*(4), 595–605.

16. Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (pp. 77-93). Humana Press, New York, NY
17. Esteva, F. J., Hubbard-Lucey, V. M., Tang, J., & Pusztai, L. (2019). Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer. *The Lancet Oncology*, *20*(3), 175-186.
18. Garza, J. G. De, & Juárez, P. (2014). *El cáncer*. Nuevo León, México: La ciencia a tu alcance.
19. Gezici, S., & Şekeroğlu, N. (2019). Current perspectives in the application of medicinal plants against cancer: novel therapeutic agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, *19*(1), 101-111.
20. Gould, S. E., Junttila, M. R., & de Sauvage, F. J. (2015). Translational value of mouse models in oncology drug development. *Nature Medicine*, *21*(5), 431–439.
21. Kaur, G., & Dufour, J. M. (2012). p70 S6 kinase and actin dynamics: a perspective. *Spermatogenesis*, *2*(1), 44-52.
22. Kroschinsky, F., Stölzel, F., von Bonin, S., Beutel, G., Kochanek, M., Kiehl, M., & Schellongowski, P. (2017). New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Critical Care*, *21*(1), 3-5.
23. Laev, S. S., & Salakhutdinov, N. F. (2015). Anti-arthritic agents: Progress and potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *23*(13), 3059–3080.
24. Lambert, J. B., Mazzola, E. P., & Ridge, C. D. (2019). Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods. John Wiley & Sons. 41 (27), 289-293.

25. Lee, A. V., Oesterreich, S., & Davidson, N. E. (2015). MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 107(7), 073.
26. Li, C., Tsai, W., Damu, A. G., Lee, E., Wu, T., Dung, N. X., . . . Thanh, L. (2007). Isolation and Identification of Antiplatelet Aggregatory Principles from the Leaves of Piper lolot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9436–9442.
27. Lombardi, V. R., Carrera, I., & Cacabelos, R. (2018). In vitro and in vivo cytotoxic effect of AntiGan against tumor cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3), 2547-2556.
28. MCF-7 Tam1 ATCC ® CRL-3435™ Homo sapiens mammary gland; brea. (s.f.). Recuperado 30 enero, 2020, de [https://www.lgcstandards-atcc.org:443/products/all/CRL-3435.aspx?geo\\_country=nl](https://www.lgcstandards-atcc.org:443/products/all/CRL-3435.aspx?geo_country=nl).
29. México - Estadísticas Vitales. Mortalidad, Defunciones Generales 2017 - variable - V158. (s.f.). Recuperado 3 febrero, 2020, de <https://www.inegi.org.mx/rnm/index.php/catalog/407/datafile/F5/V158>
30. Nascimento, J. C., Paula, V. F., David, J. M., & David, J. P. (2012). Occurrence, biological activities and 13C NMR data of amides from Piper (Piperaceae). *Química Nova*, 35(11), 2288–2311.
31. Odes, E. J., Randolph-Quinney, P. S., Steyn, M., Throckmorton, Z., Smilg, J. S., Zipfel, B., & Berger, L. R. (2016). Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *South African Journal of Science*, 112(7-8), 1-5.
32. Organization Mundial de la Salud. Definition cancer. Recuperado de [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1)
33. Park, J., Kim, M., Kim, K., Park, D. H., Moon, S., Song, T. J., . . . Lee, S. K. (2009). Natural History and Prognostic Factors of Advanced Cholangiocarcinoma without Surgery, Chemotherapy, or Radiotherapy: A Large-Scale Observational Study. *Gut and Liver*, 3(4), 298–305.
34. Parsa, N. (2012). Environmental factors inducing human cancers. *Iranian journal of public health*, 41(11), 1.

35. Parsa, N. (2012). Environmental factors inducing human cancers. *Iranian journal of public health*, 41(11), 1.
36. Peck-Radosavljevic, M. (2014). Drug Therapy for Advanced-Stage Liver Cancer. *Liver Cancer*, 3(2), 125–131.
37. Pitoia, F., Schmidt, A., Bueno, F., Mocarbel, Y., Jerkovich, F., & Abelleira, E. (2017). Guía práctica para el manejo de efectos adversos por inhibidores multicinasas (sorafenib y vandetanib) en pacientes con cáncer de tiroides avanzado. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 54(1), 8–20.
38. Prashant, A., Rangaswamy, C., Yadav, A. K., Reddy, V., Sowmya, M. N., & Madhunapantula, S. (2017). In vitro anticancer activity of ethanolic extracts of *Piper nigrum* against colorectal carcinoma cell lines. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 7(1), 67.
39. Quiñones S, L., Rosero P, M., Roco A, N., Moreno T, I., Sasso A, J., Varela F, N., Cáceres L, D., & Saavedra S, I. (2008). Papel de las enzimas citocromo p450 en el metabolismo de fármacos antineoplásicos: Situación actual y perspectivas terapéuticas. *Revista médica de Chile*, 136(10).
40. Ramírez-Marroquín, O. A., Manzano-Pérez, F., López-Torres, A., Hernández-López, A., Cortés-Pacheco, A., & Reyes-González, M. A. (2019). First mechanosynthesis of piperlotines A, C, and derivatives through solvent-free Horner-Wadsworth-Emmons reaction. *Synthetic Communications*, 49(2), 244–255.
41. Reig, M., Matilla, A., Bustamante, J., Castells, L., de La Mata, M., Delgado, M., ... & Varela, M. (2010). Recommendations for the management of Sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterología y hepatología*, 33(10), 741-752.
42. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell viability assays assay guidance manual. *Assay Guidance Manual*, 1-23.

43. Salaverry, O. (2013). La etimología del cáncer y su curioso curso histórico. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(1), 137–141.
44. Sarntivijai, S., Lin, Y., Xiang, Z., Meehan, T. F., Diehl, A. D., Vempati, U. D., ... & He, Y. (2014). CLO: the cell line ontology. *Journal of biomedical semantics*, 5(1), 1-10.
45. Schulz, C., Kammerer, S., & Küpper, J. H. (2019). NADPH-cytochrome P450 reductase expression and enzymatic activity in primary-like human hepatocytes and HepG2 cells for in vitro biotransformation studies. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 73(1), 249–260.
46. Schulz, C., Kammerer, S., & Küpper, J. H. (2019). NADPH-cytochrome P450 reductase expression and enzymatic activity in primary-like human hepatocytes and HepG2 cells for in vitro biotransformation studies. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 73(1), 249–260.
47. Šregelj, V., Vulić, J., Četković, G., Čanadanovć-Brunet, J., Tumbas, V., & Stajčić, S. (2020). Natural bioactive compounds in carrot waste for food applications and health benefits. *Bioactive Natural Products*, 307–344.
48. Shamaila, S., Sajjad, A. K. L., Ryma, N., Farooqi, S. A., Jabeen, N., Majeed, S., & Farooq, I. (2016). Advancements in nanoparticle fabrication by hazard free eco-friendly green routes. *Applied Materials Today*, 5, 150–199.
49. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. McGraw-Hill.
50. Spallanzani, A., Orsi, G., Andrikou, K., Gelsomino, F., Rimini, M., Riggi, L., & Cascinu, S. (2018). Lenvatinib as a therapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 18(11), 1069-1076.
51. Stoddart M.J. (2011) Cell Viability Assays: Introduction. In: Stoddart M. (eds) *Mammalian Cell Viability. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, 740, 1-6.

52. Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, *111*(1).
53. Tang, G., Chen, D., Qiu, B., Sheng, L., Wang, Y., Hu, G., Li, J. (2011). Cytotoxic Amide Alkaloids from *Piper boehmeriaefolium*. *Journal of Natural Products*, *74*(1), 45–49.
54. Tavares, E. J., Varela, C. L., Pires, A. S., Encarnação, J. C., Abrantes, A. M., Botelho, M. F., Roleira, F. M. (2016). Combined dual effect of modulation of human neutrophils' oxidative burst and inhibition of colon cancer cells proliferation by hydroxycinnamic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *24*(16), 3556–3564.
55. The Global Cancer Observatory. Cancer today. Recuperado 17 enero, 2020, de <http://gco.iarc.fr/today/home>
56. Venter, C., & Niesler, C. (2019). Rapid quantification of cellular proliferation and migration using ImageJ. *Biotechniques*, *66*(2), 99–102.
57. Yuniati, Y., & Rollando, R. (2018). Isolation of antibacterial compounds from endophyte fungal of *Fusarium* sp. In *Phyllanthus niruri* Linn. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. *10*(2), 260-264
58. Zhang, Y., & Fan, Z. (2014). 360 Paclitaxel-Eluting Covered Metal Stents Versus Covered Metal Stents for Esophageal Squamous Carcinoma in Rabbits. *Gastrointestinal Endoscopy*, *79*(5), 136–137.

## 11. ANEXOS

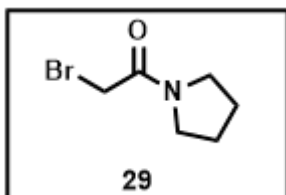
Los espectros de RMN se adquirieron en un espectrómetro Varian MR 400 MHz. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportaron en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia de tetrametilsilano (TMS). La multiplicidad de los sistemas de espín acoplados se denotó con las siguientes abreviaturas: s (señal sencilla), d (doblete), t (tripleto), c (cuadruplete), m (multiplete) y sus posibles combinaciones. Las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz. Se empleo cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como disolvente durante los análisis de RMN.

Los análisis de las muestras por espectrometría de masas fueron realizados por infusión directa utilizando un equipo SYNAPT G2-Si (Waters) equipado con fuente de ionización por electronebulización (ESI), filtro de masas de cuadrupolo sencillo y analizador de masas de tiempo de vuelo (Q-TOF). Con el equipo con la siguiente configuración: voltaje de capilar de 3 kV, voltaje de cono 30 V, temperatura del capilar 120 °C, temperatura de gas de desolvatación 350 °C, flujo de gas de desolvatación 400 L por hora. Para la corrección de masa se infundió continuamente el compuesto Leucina-encefalina con masa en ESI (+) de 556.2771 Da.

Se prepararon las muestras para el análisis de masas diluyendo 3 mg de compuesto en 1 mL de metanol (MeOH), posteriormente se centrifugó a 18000 xg por 10 minutos. Del sobrenadante se tomaron 10  $\mu\text{L}$ , los cuales se mezclaron con 10  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico ( $\text{HCOOH}$ ) al 50% y 1 mL de MeOH.

Para la determinación del punto de fusión de los tres productos finales, se utilizó la técnica de capilar abierto en un equipo automatizado Stanford research Systems EZ-Melt MPA 102, en escala de Celsius por triplicado.

### Síntesis de 2-bromo-1-(piperidin-1-il) etanona (29).

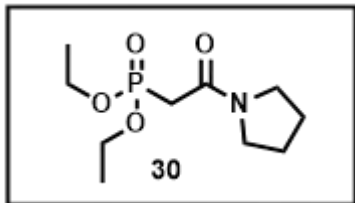


En un matraz redondo provisto de agitación magnética, se colocaron 1.2 mL (2.78g, 13.78 mmol) de bromuro de bromoacetilo en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La disolución resultante se enfrió en un baño de hielo de 0 a 5 °C y se le adicionaron gota a gota vía embudo de adición 2.72 mL (2.348 g, 27.56 mmol) de pirrolidina disuelto en 30 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se agitó de 0 a 25 °C durante 5 h. Transcurrido el tiempo de reacción, se finalizó la reacción adicionando 20 mL de agua destilada, se trasvasó a un embudo de adición separando el producto por bipartición en la fase orgánica. A la fase acuosa resultante se le extrajo el producto remanente (3 X 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Al extracto orgánico combinado se adicionaron 20 mL de HCl 0.2 M en un embudo de adición para eliminar la pirrolidina remanente a través de la fase acuosa. La fase orgánica final se desecó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtró y concentró a presión reducida, obteniendo 2.47 g (87%) de 32 como un líquido amarillo claro (al refrigerarse a 4 °C se solidificó).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.55–1.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.63–1.69 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 3.41–3.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N); 3.52–3.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N); 3.87 (Sistema AB, *J* = 20.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Br). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 24.25 (s, CH<sub>2</sub>Br); 25.34 (s, CH<sub>2</sub>); 26.17 (s, CH<sub>2</sub>); 43.22 (s, CH<sub>2</sub>N); 47.90 (s, CH<sub>2</sub>N); 164.98 (s, NCO).

HRMS [FAB<sup>+</sup>]: calculado para C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>NOBr [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 206.0180; encontrado para [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 206.0184.

### Síntesis de (2-oxo-2- (pirrolidin-1-il) etil) fosfonato de dietilo (30) [C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>P]

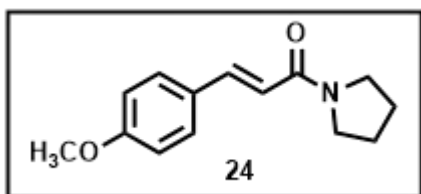


En un matraz de 50 mL provisto de agitación magnética, se colocaron 298 mg (1.55 mmol) del compuesto **29** y 543 mg (3.27 mmol) de fosfito de trietilo, se agitó a 60°C durante 4.5 h. El producto crudo se purificó usando cromatografía en columna flash en fase móvil de una mezcla de AcoEt: MeOH (90:10), produciendo 377 mg (rendimiento de 97%) de un aceite amarillo pálido.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.34 (t, *J*=7.1 Hz, 6 H, CH<sub>3</sub>), 1.83–2.01 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 3.01 (d, δ =22.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>P), 3.49 (td, *J*=6.9, 2,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.60 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 4.11–4.26 (m, 4 H, (CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>P) ppm; RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ =16.28 (d, *J*=6.4 Hz, CH<sub>3</sub>), 24.47, 25.99, 34.64 (d, *J*=133.6 Hz, CH<sub>2</sub>P), 47.00, 47.59, 62.63 (d, *J*=6.4 Hz), 163.16 (d, *J*=5.7 Hz, C=O) ppm; RMN <sup>31</sup>P (161.9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ= 22.01 ppm.

HRMS [FAB<sup>+</sup>]: *m/z* calculado para C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>P [M+H]<sup>+</sup> 250.1208; encontrado para [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 250.1214.

### Síntesis de (*E*)-3-(4-metoxifenil)-1-(pirrolidin-1-il) prop-2-en-1-ona (24, C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub>)



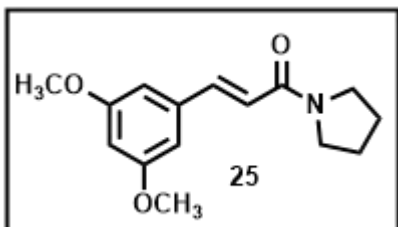
En un mortero se colocaron 200 mg (0.8025 mmol) del compuesto **30**, 131.11 mg (0.8827 mmol) de 3-metoxibenzaldehído y 176.35 mg (1.167 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Con ayuda de un pistilo se molió enérgicamente

la mezcla durante 1 h. Luego, la mezcla de reacción se suspendió en un mínimo de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtrado y concentrado a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna con aire en un sistema Hex:AcoEt:MeOH (50:45:05). Produciendo 68 mg (60% de rendimiento) de un sólido blanco que se funde a 116 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ =1.86–1.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 1.97–2.03 (m, 2H, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 3.59 (t, *J*=6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.62 (t, *J*=6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 6.60 (d, *J*=15.5 Hz, 1 H, CH), 6.89 (sistema AA' BB', *J*=8.8 Hz, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.48 (sistema AA' BB', *J*=8.7 Hz, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.66 (d, *J*=15.5 Hz, 1 H, CH) ppm; <sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ =24.55 (CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 26.33 (CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 46.18 (CH<sub>2</sub>N), 46.72 (CH<sub>2</sub>N), 55.52 (OCH<sub>3</sub>), 114.35, 116.65, 128.26, 129.54, 141.46, 160.94, 165.21 (C=O) ppm.

HRMS [FAB<sup>+</sup>]: *m/z* calculado para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 232.1338, encontrado para [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 232.1335.

Síntesis de (*E*)-3-(3,5-dimetoxifenil)-1-(pirrolidin-1-il)prop-2-en-1-ona (25, C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub>)



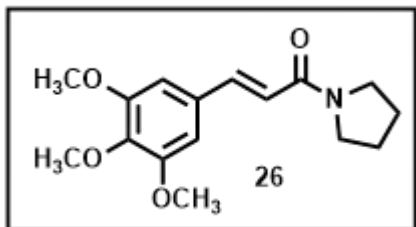
En un mortero se colocaron 200 mg (0.8025 mmol) del compuesto **30**, 160.03 mg (0.963 mmol) de 3,5-dimetoxibenzaldehído y 165.85 mg (1.2 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Con ayuda de un pistilo se molió enérgicamente la mezcla durante 90 minutos. Luego, la mezcla de reacción se

suspendió en un mínimo de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtrado y concentrado a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna con aire en un sistema Hex: AcoEt: MeOH (50:45:05). Produciendo 123.3 mg (61.6 % de rendimiento) de un sólido blanco que se funde a 117 °C.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ=1.87–1.94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 1.97–2.04 (m, 2H, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 3.61 (dt, *J*=13.7, 6.8 Hz, 4 H, CH<sub>2</sub>N), 3.81 (bs, 6H, CH<sub>3</sub>O), 6.46 (t, *J*=2.2 Hz, 1H, H<sub>arom</sub>), 6.67 (d, *J*=2.4 Hz, 2H, H<sub>arom</sub>), 6.69 (d, *J*=15.7 Hz, 1 H, CH), 7.61 (d, *J*=15.4 Hz, 1 H, CH) ppm; <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ=24.53 (CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 26.33 (CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 46.26(CH<sub>2</sub>N), 46.79 (CH<sub>2</sub>N), 55.60 (OCH<sub>3</sub>), 101.74, 106.06, 119.58, 137.48, 141.84, 161.13, 164.76 (C=O) ppm.

HRMS [FAB<sup>+</sup>]: *m/z* calculado para C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 262.1443, encontrado para [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 262.1439.

**Síntesis de (E) -1- (pirrolidin-1-il) -3- (3,4,5-trimetoxifenil) prop-2-en-1-ona (26, C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>)**



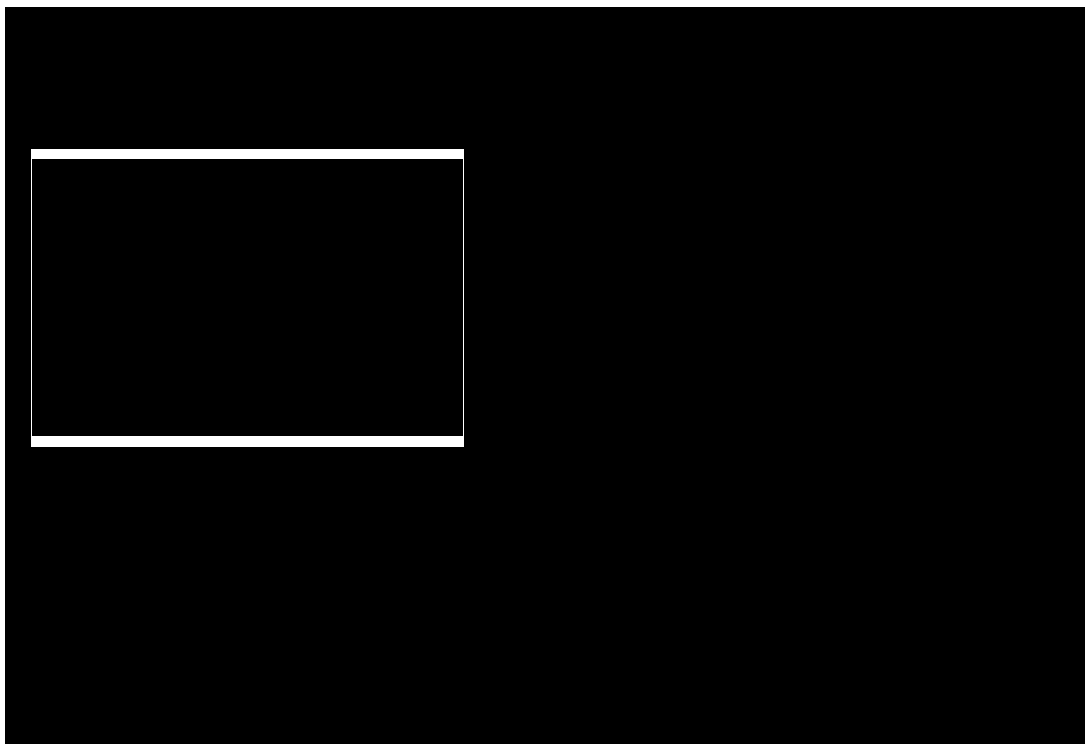
En un mortero se colocaron 200 mg (0.8025 mmol) del compuesto **30**, 131.11 mg (0.963mmol) de 3,4,5-trimetoxibenzaldehído y 176.35 mg (1.2 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Con ayuda de un pistilo se molió enérgicamente la mezcla durante 9 minutos. Luego, la mezcla de

reacción se suspendió en un mínimo de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtrado y concentrado a presión reducida. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna con aire en un sistema Hex: AcoEt: MeOH (50:45:05). Produciendo 70 mg (60% de rendimiento) de un sólido blanco que se funde a 157 °C.

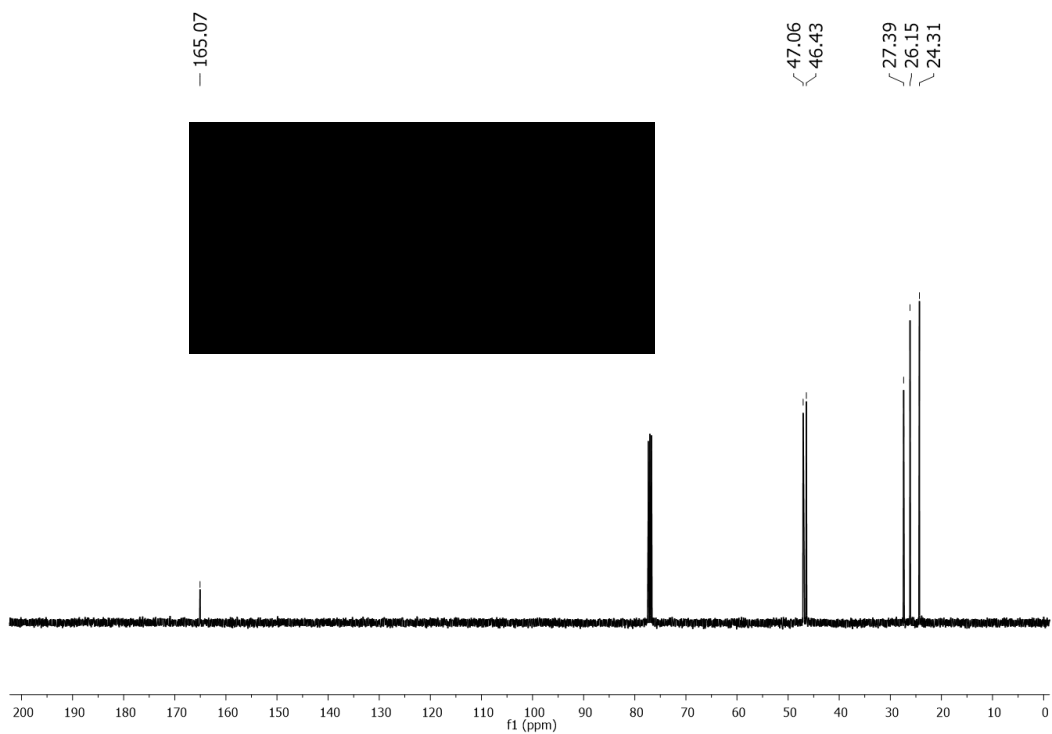
RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ =1.88–1.95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 1.99–2.05 (m, 2H, CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 3.60 (t, *J*=6.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.65 (t, *J*=6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.87 (bs, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.90 (bs, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6.62 (d, *J*=15.4 Hz, 1 H, CH), 6.75 (bs, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.62 (d, *J*=15.4 Hz, 1 H, CH) ppm; RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ =24.53 (CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 26.32 (CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>), 46.26 (CH<sub>2</sub>N), 46.81 (CH<sub>2</sub>N), 56.37 (OCH<sub>3</sub>), 61.12 (OCH<sub>3</sub>), 105.25, 118.25, 131.09, 139.71, 141.96, 153.55, 164.83 (C=O) ppm.

HRMS [FAB<sup>+</sup>]: *m/z* calculado para C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 262.1443, encontrado para [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>.

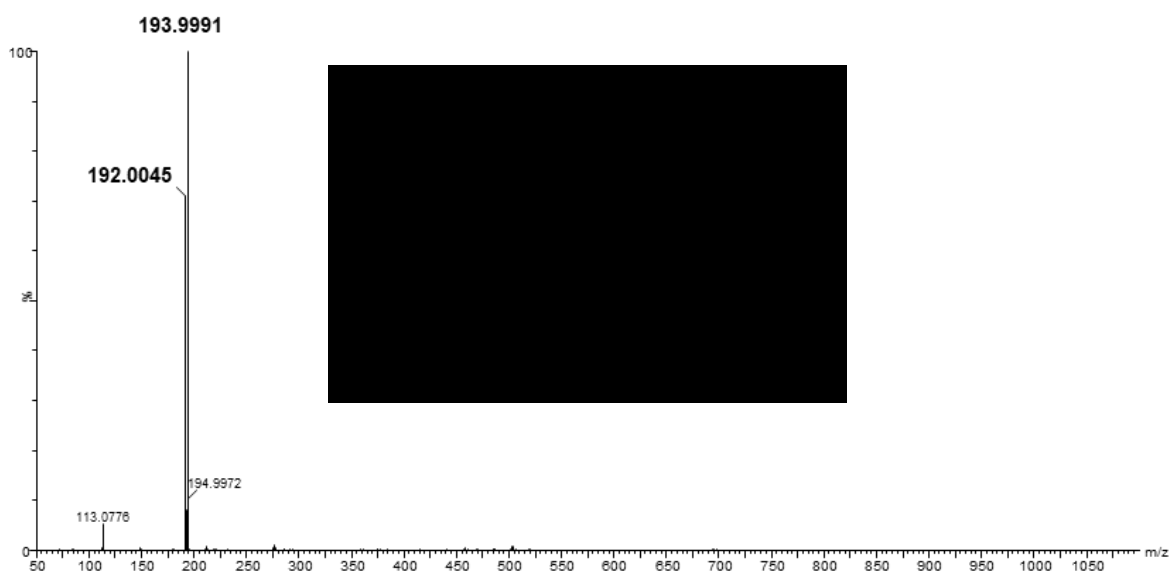
## Espectros de Resonancia Magnética Nuclear



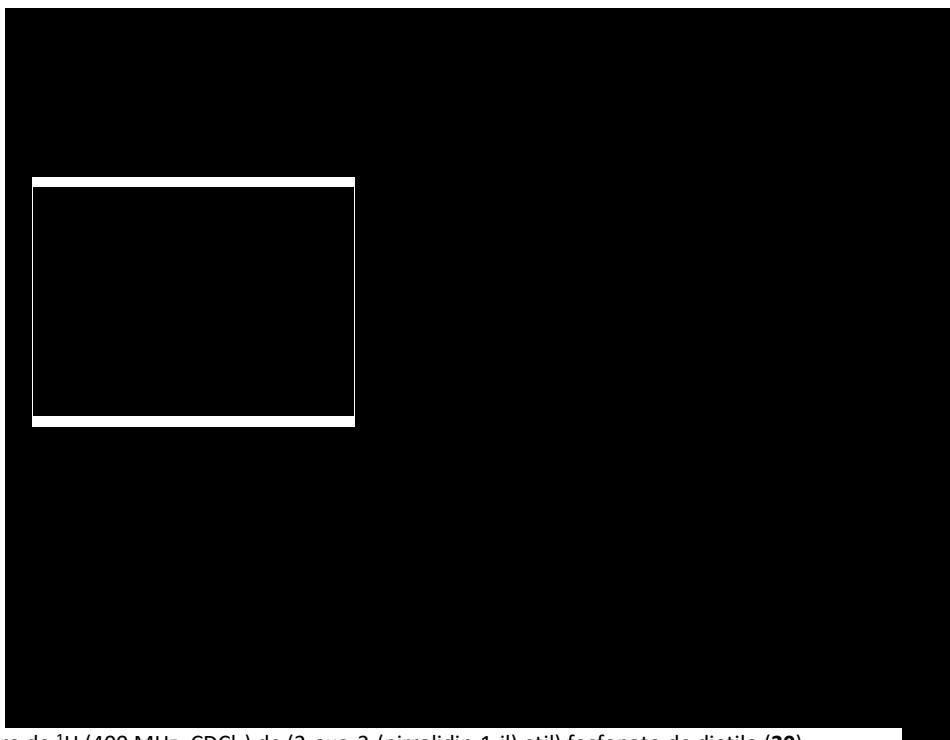
Espectro de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 2-bromo-1-(piperidin-1-il) etanona (**29**).



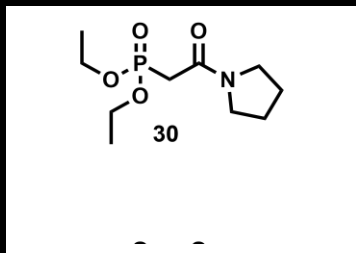
Espectro de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de 2-bromo-1-(piperidin-1-il) etanona (**29**).



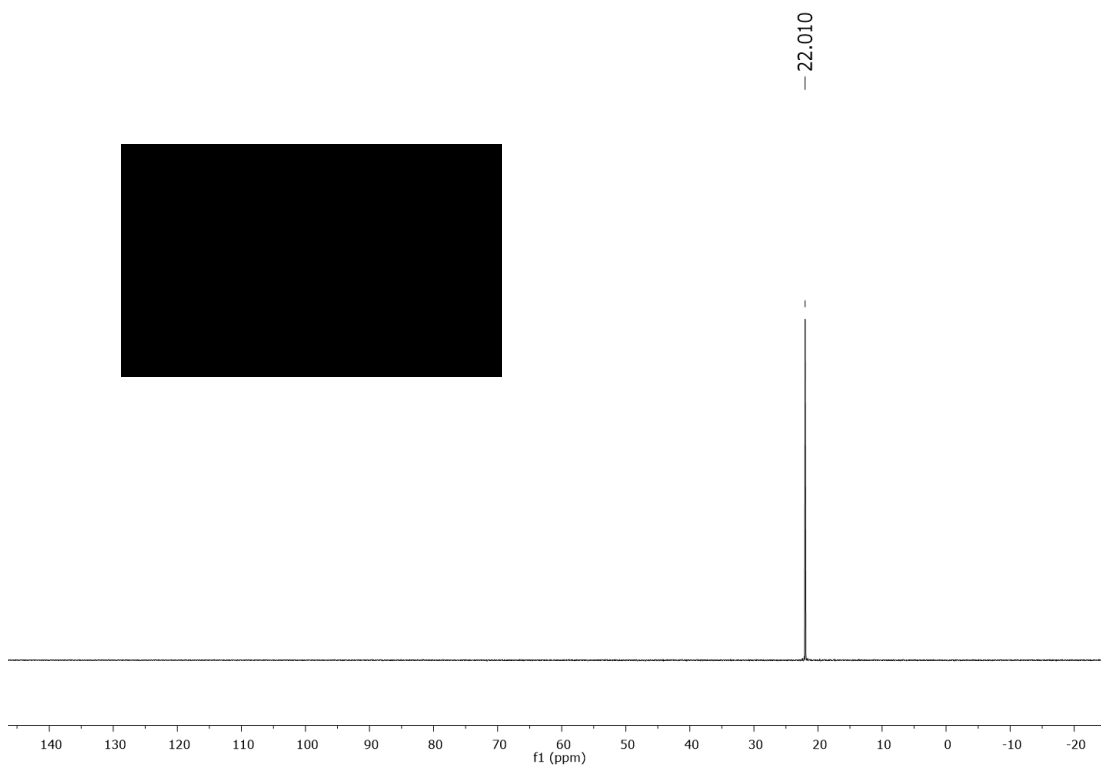
Espectro HRMS de 2-bromo-1-(piperidin-1-il) etanona (**29**).



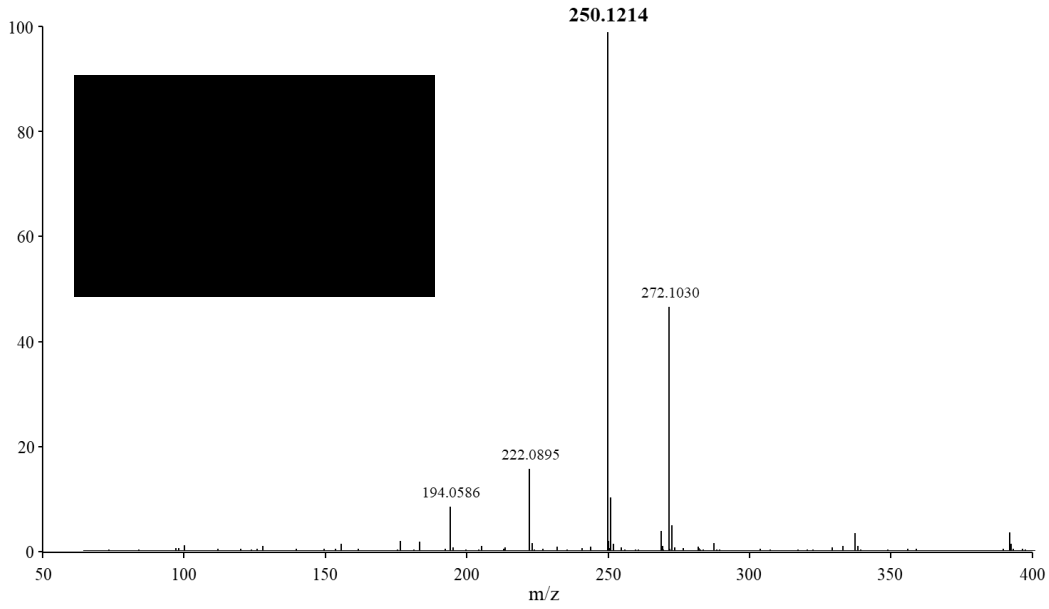
Espectro de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de (2-oxo-2-(piperidin-1-il) etil) fosfonato de dietilo (**30**).



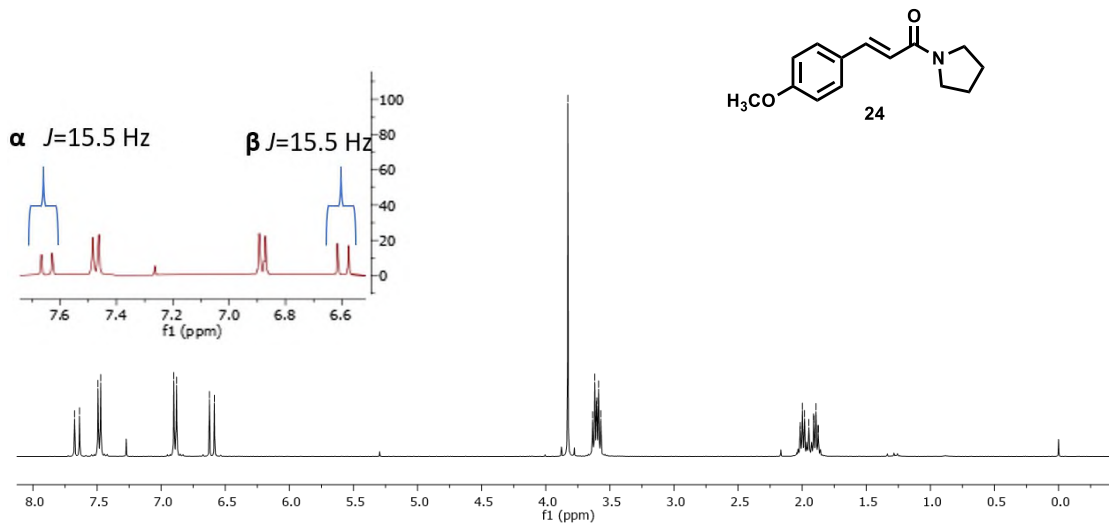
Espectro de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de (2-oxo-2-(pirrolidin-1-il) etil) fosfonato de dietilo (**30**).



Espectro de  $^{31}\text{P}$  (161.9 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de (2-oxo-2-(pirrolidin-1-il) etil) fosfonato de dietilo (**30**).



Espectro HRMS de (2-oxo-2-(pirrolidin-1-il) etil) fosfonato de dietilo (30).



Espectro de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ) de la piperlotina **24**.

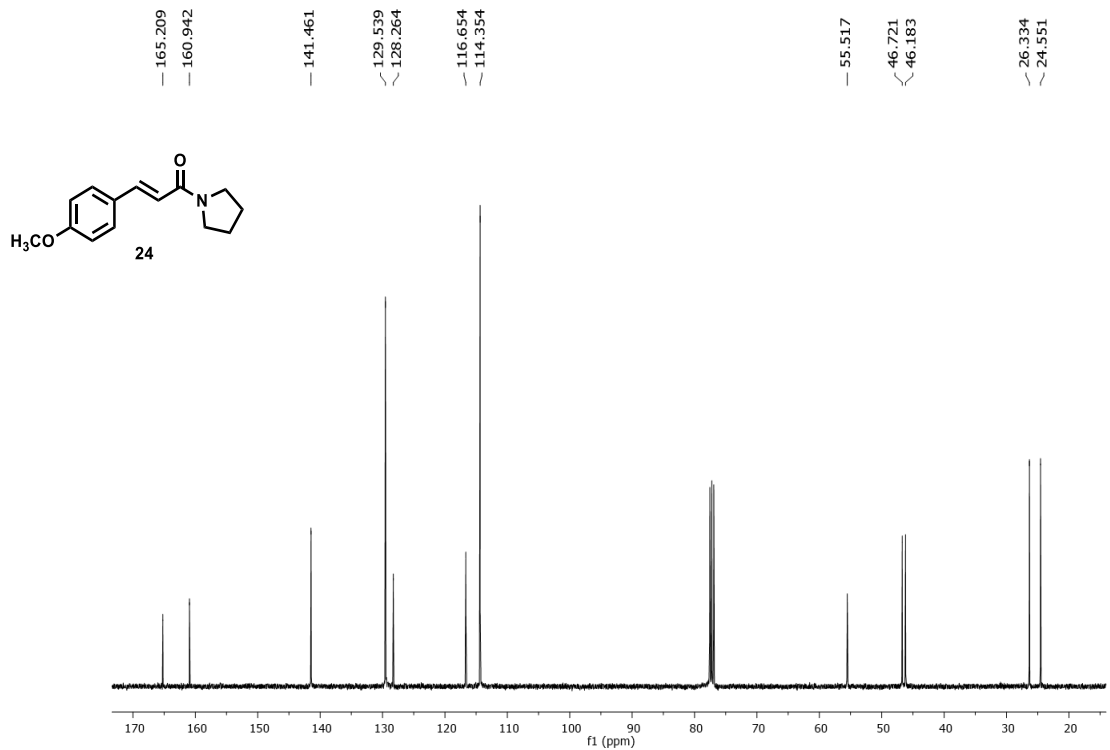
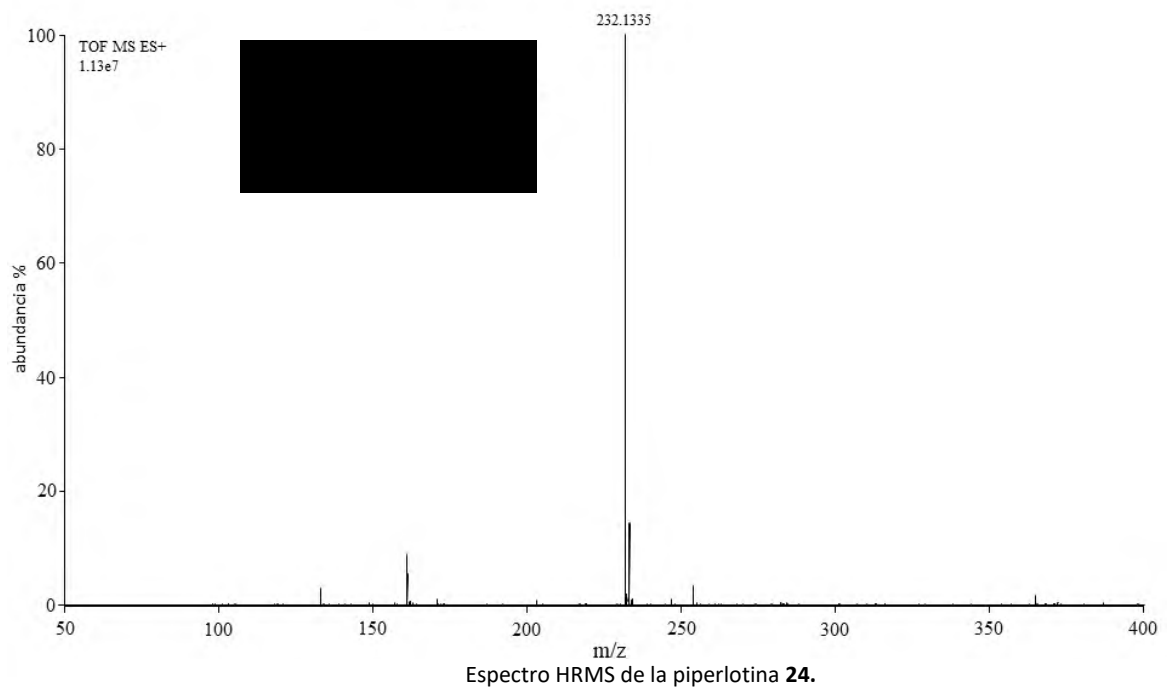
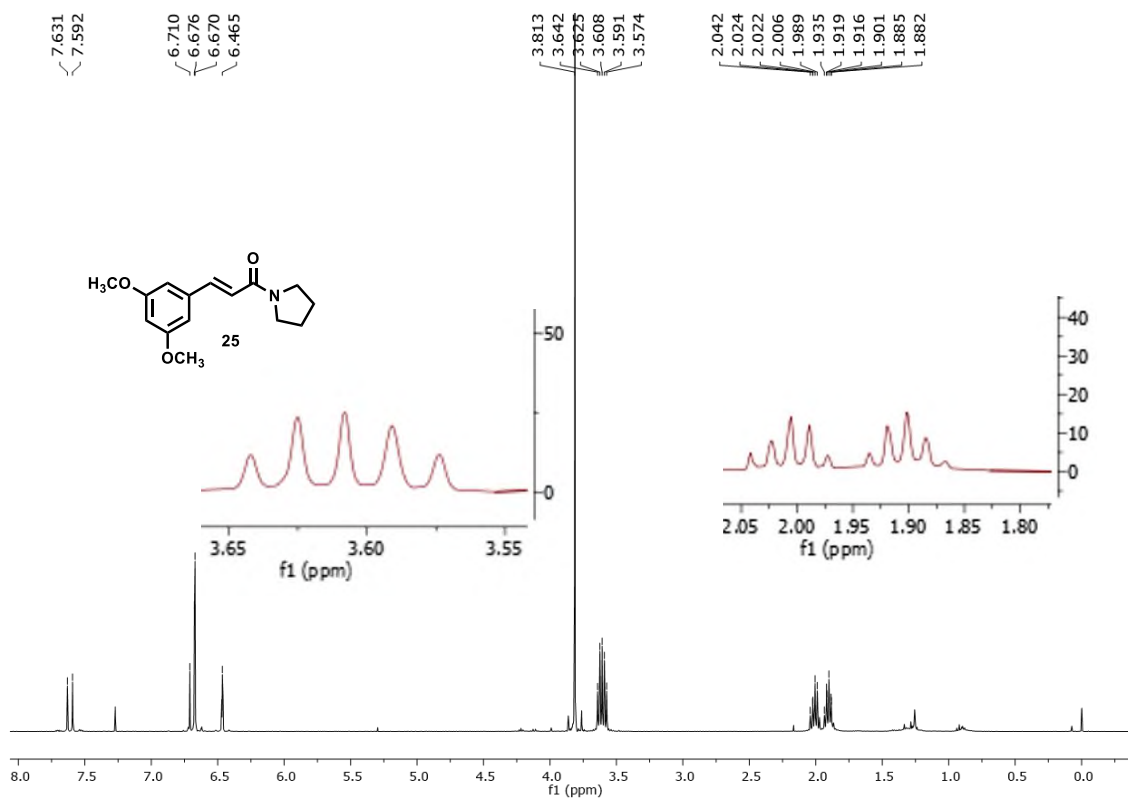
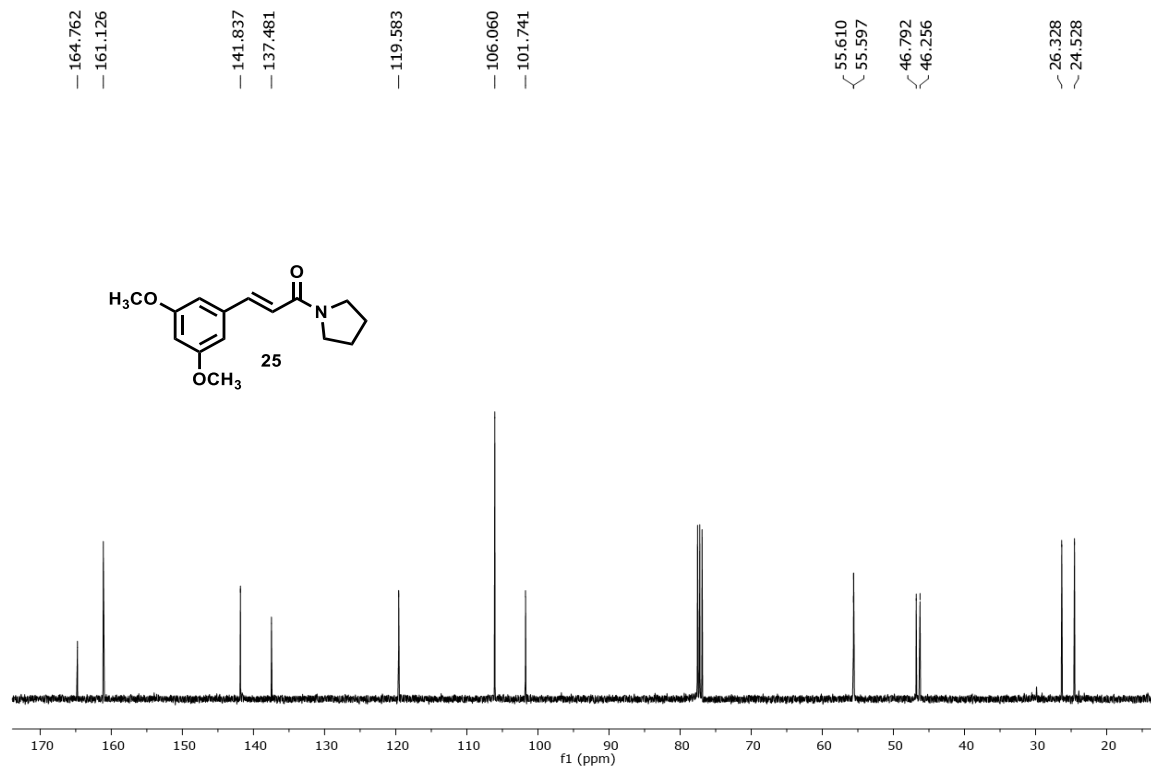


Figura 21. Espectro de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la piperlotina 24.





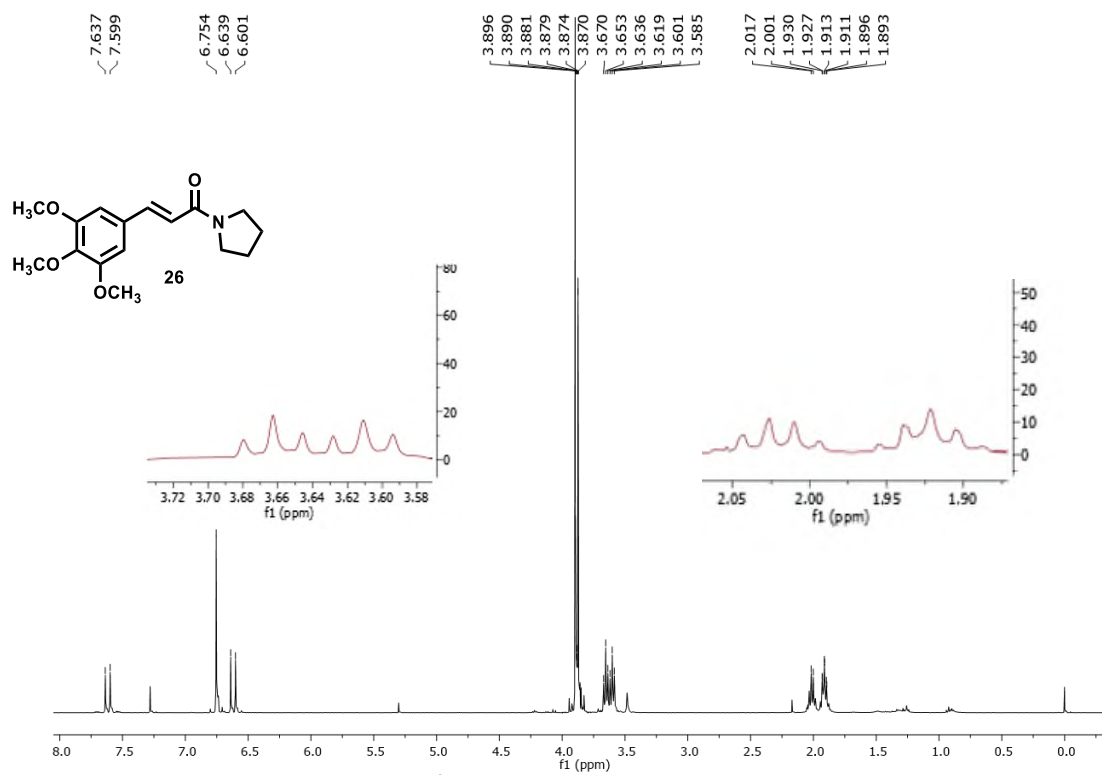
Espectros de <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la piperlotina 25.



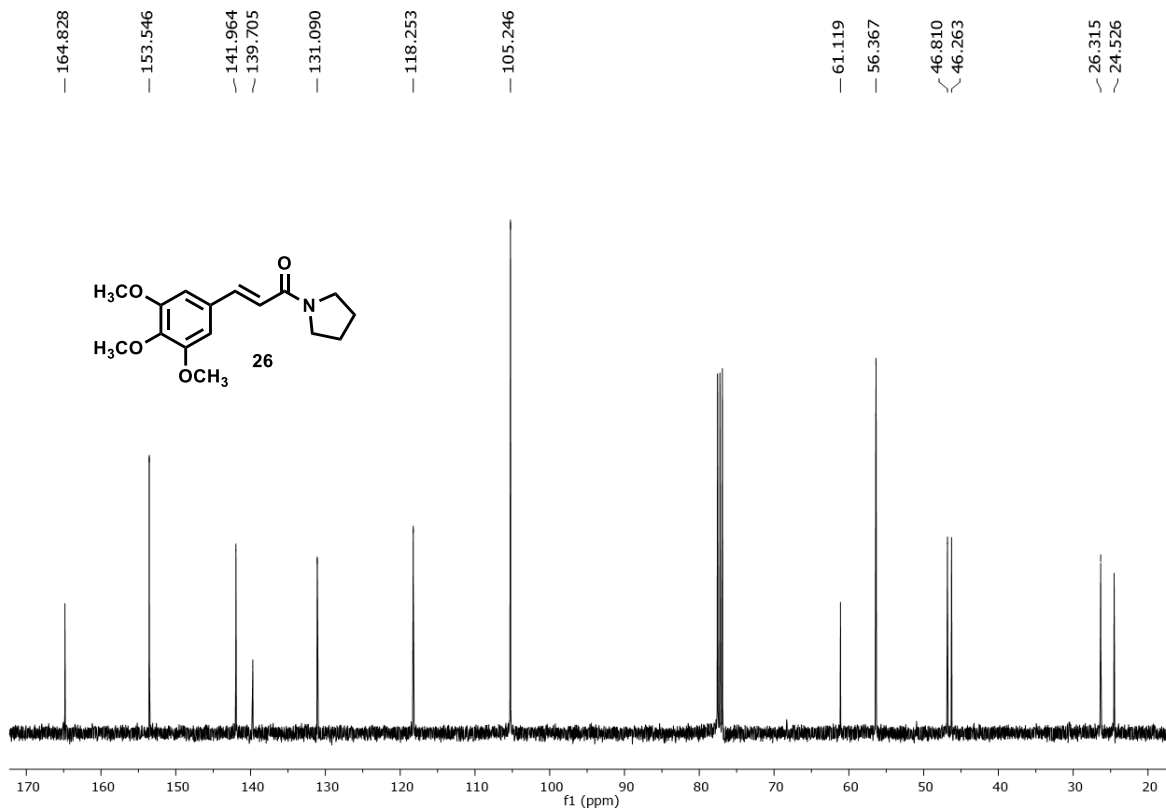
Espectros de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la piperlotina 25.



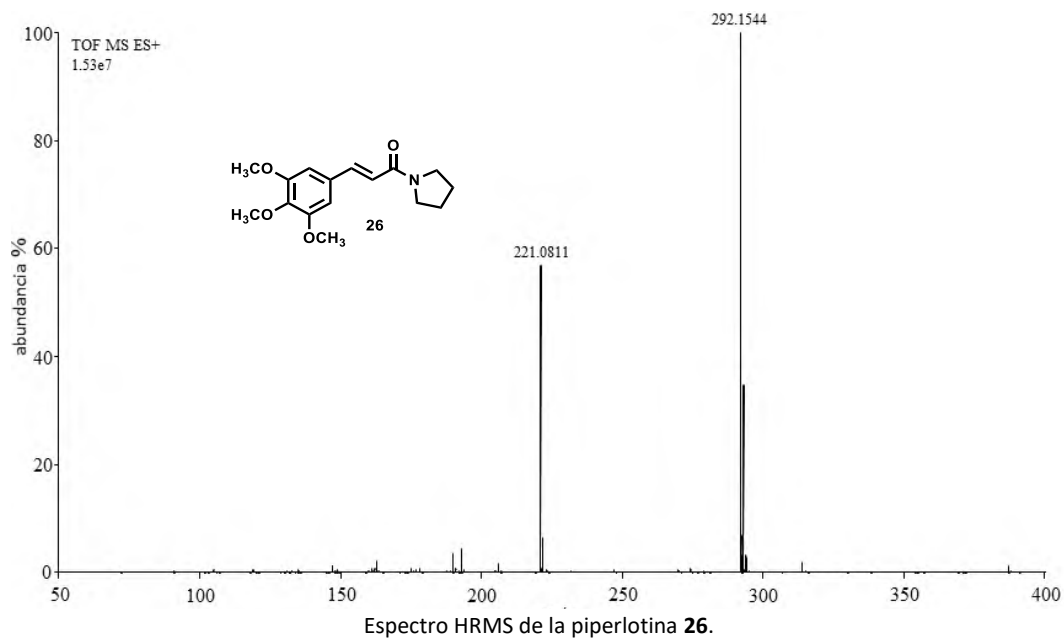
Espectro HRMS de la piperlotina 25.



Espectros de <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de la piperlotina 26.



Espectros de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de la piperlotina **26**.



Espectro HRMS de la piperlotina **26**.