



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
INSTITUTO EN CIENCIAS

**Síntesis estereocontrolada de derivados morfolínicos en la
obtención de compuestos con actividad anticancerígena.**

Tesis presentada para obtener el grado:

Maestría en Ciencias Químicas

Presenta:

QFB. Andrea Sosa Barrios

Dirección de Tesis:

Dr. Jorge Rigoberto Juárez Posadas

Dra. Rosmarbel Morales Nava

MARZO 2026

1. CONTENIDO

1.	CONTENIDO	2
2.	AGRADECIMIENTOS.....	5
3.	ABREVIATURAS	7
4.	RELACIÓN DE COMPUESTOS	9
5.	RESUMEN	10
6.	ABSTRACT	11
7.	INTRODUCCIÓN.....	12
8.	ANTECEDENTES	14
8.1.	<i>Los heterociclos en química farmacéutica.....</i>	14
8.2.	<i>Morfolina: estructura y relevancia farmacológica.....</i>	15
8.3.	<i>El cáncer como problema de salud.</i>	16
8.4.	<i>Morfolinas en fármacos anticancerígenos aprobados.</i>	17
8.5.	<i>Síntesis estereocontrolada de morfolinas.....</i>	18
8.6.	<i>Inducción quiral en la síntesis diastereoselectiva de derivados de morfolina. ...</i>	19
8.7.	<i>Mecanismo de acción de los agentes anticancerígenos.....</i>	21
8.9.	<i>Herramientas in silico para la predicción de objetivos biológicos.....</i>	23
8.10.	<i>Métodos de evaluación de la actividad anticancerígena.....</i>	24
9.	JUSTIFICACION	26
10.	OBJETIVOS	27
10.1.	<i>General.....</i>	27
10.2.	<i>Particulares.....</i>	27
11.	METODOLOGÍA.....	28
11.1.	<i>Plan sintético</i>	28
11.2.	<i>Uso de Swiss Target Prediction.....</i>	28
11.3.	<i>Bioensayo de viabilidad celular de cáncer</i>	29
12.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
12.1.	<i>Síntesis de (R)-2-morfolino-2-feniletan-1-ol (32)</i>	31

12.2.	Síntesis de (R)-4-(2-hidroxi-1-feniletil) morfolin-3-ona (33).....	33
12.3.	Reacciones de α -alquilación para la obtención de derivados de morfolina sustituidos en posición α (34).	35
12.5.	Reacción de desbencilación de los compuestos 35 para la obtención de morfolin-3-ona quirales.	49
12.6.	Análisis de la molécula 34a en el software <i>Swiss Target Prediction</i>	52
12.7.	Análisis de la molécula 34b en el software <i>Swiss Target Prediction</i>	55
12.8.	Análisis de la molécula 34c en el software <i>Swiss Target Prediction</i>	58
12.9.	Ensayo MTT de viabilidad celular y citotoxicidad	60
13.	CONCLUSIONES.....	66
14.	SECCIÓN EXPERIMENTAL	67
14.1.	Síntesis de (R)-2-morfolino-2-feniletan-1-ol (32)	67
14.2.	Síntesis de (R) -4- (2-hidroxi-1-feniletil) morfolin-3-ona (33).....	68
14.3.	Procedimiento general para reacciones de α -alquilación	69
14.4.	Caracterización de compuestos de alquilación.....	69
	(R)-4-((R)-2-hidroxi-1-feniletil)-2-(3-metilbut-2-en-1-il) morfolin-3-ona (34a).	69
	(R)-2-bencil-4-((R)-2-hidroxi-1-feniletil) morfolin-3-ona (34b).	70
	(R)-2-etil-4-((R)-2-hidroxi-1-feniletil) morfolin-3-ona (34c).	70
14.5.	Procedimiento general para la reducción de los productos alquilados.	71
14.6.	Procedimiento General para las reacciones de desbencilación	73
15.	BIBLIOGRAFÍA.....	76



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la D.C. Jacqueline Jiménez Hernández, D.C. Martha Virginia Sosa Rivadeneyra, D.C. María del Rayo Santellán Olea y el D.C. María del Refugio Rocha Pizaña, informan haber leído y aprobado, la tesis denominada **“Síntesis estereocontrolada de derivados morfolínicos en la obtención de compuestos con actividad anticancerígena”**, que presenta la alumna **Andrea Sosa Barrios (224470037)**, para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los cinco días del mes de marzo del año dos mil veintiséis.

ATENTAMENTE

D.C. Jacqueline Jiménez Hernández

D.C. Martha Virginia Sosa Rivadeneyra

D.C. María del Rayo Santellán Olea

D.C. María del Refugio Rocha Pizaña

2. AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis padres Alicia y Daniel por ser los pilares de mi vida y mi más grande orgullo, gracias a ellos y a mis hermanos por brindarme siempre su apoyo incondicional y todo su cariño, también un agradecimiento muy especial a mi abuelo Eduardo por siempre demostrar su orgullo por mí a pesar de no entenderme, un abrazo hasta el cielo.

A mis amigas Raquel, Julissa, Mayra, Yuliana, Karen, Naomi y Victoria por siempre animarme a dar lo mejor de mí, por el aprecio y su amistad todos estos años.

A mis compañeros y amigos de la maestría Gois, Marifer, Abraham, Adrián y Lili por todas sus palabras de apoyo, sus consejos en momentos difíciles, por cada viaje y congreso donde tuvimos la oportunidad de convivir y divertirnos juntos.

A mi mentora y codirectora de tesis, la Dra. Rosmarbel Morales Nava, por brindarme siempre su apoyo en el ámbito profesional y emocional, gracias por ayudarme en mi desarrollo académico e infundir en mí el amor por la investigación, sin dudar de mi potencial y siempre animándome a tomar oportunidades que me beneficien profesionalmente.

A mi director de tesis, el Dr. Jorge R. Juárez Posadas, por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación en el laboratorio para llevar a cabo el desarrollo de mi tesis, por todos sus comentarios y sugerencias, así como también por el apoyo incondicional durante todo este periodo.

A los miembros de mi comisión revisora, Dra. Jaqueline Jiménez Hernández, Dra. Martha Virginia Sosa Rivadeneyra, Dra. María del Rayo Santellán Olea y Dra. María del Refugio Rocha Pizaña, por su apoyo en cuanto a los trámites necesarios para la revisión de esta tesis, así como por todos sus comentarios en cuanto a mejoras en este y en futuros proyectos.

Un agradecimiento especial a la Dra. María del Refugio por la realización de las pruebas *in vitro* para la evaluación de la actividad anticancerígena.

DEDICATORIA

Esta tesis quiero dedicarla a mis padres Alicia y Daniel, quienes nunca dudaron en apoyarme en todos mis proyectos, por ser la razón principal de mis sueños y éxitos. Ellos son los primeros en escuchar mis dudas y miedos sin juzgarlos ni rechazarlos,

También quiero dedicarla a mis abuelos Adelaida y Eduardo, quienes siempre fueron mis segundos padres, actualmente están en el cielo, no lograron verme cumplir este sueño que les conté hace 3 años, pero sé que estarían muy orgullosos de mí.

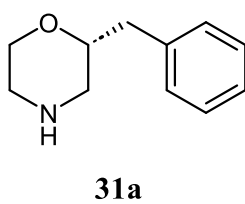
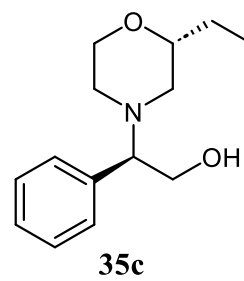
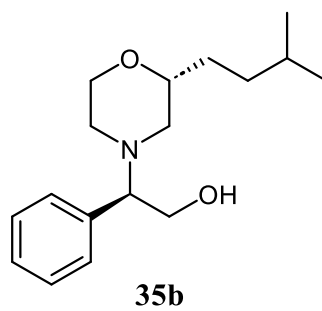
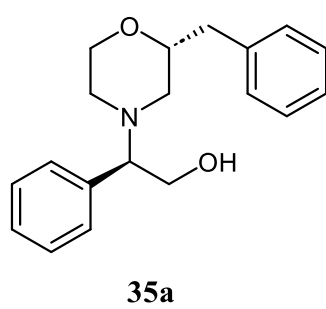
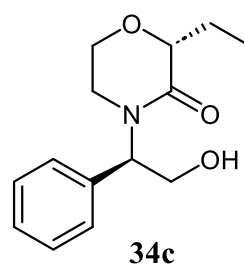
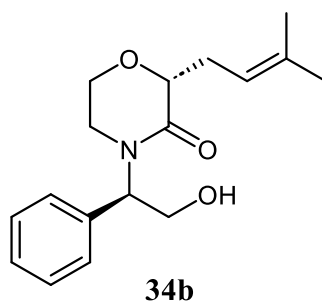
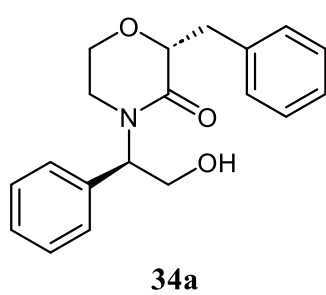
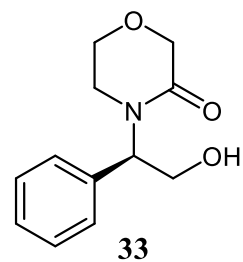
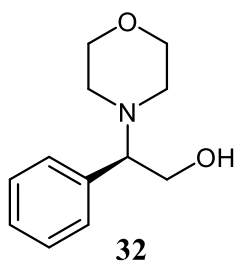
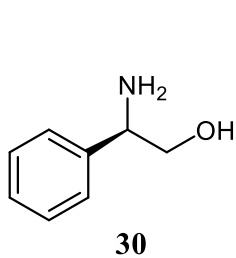
LOS AMO

3. ABREVIATURAS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotación específica a 20°C
A549	Células epiteliales adherentes inmortalizadas de carcinoma de pulmón
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ar	Aromático
BMS	Complejo de sulfuro de dimetilborano
CaCO ₂	Carbonato de calcio
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
°C	Grados Celsius
d	Doble
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de doble de dobles
DO	Densidad Óptica
Eq	Equivalente
Et	Etilo
ETA	Endotelina A
ETB	Endotelina B
EtOH	Etanol
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FP2	Falciapaína 2
GP	Grupo protector
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
h	Horas
H ₂	Hidrogeno molecular
H ₂ O	Agua
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50 % de las células.
<i>J</i>	Constantes de acoplamiento
K ₂ CO ₃	Carbonato de Potasio
LC ₅₀	Concentración letal del 50 % de las células
LPA	Ácido lisofosfatídico

LDA	Diisopropilamiduro de litio
m	Múltiple
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MeOH	Metanol
Met	Metilo
mg	Miligramo
µg	Microgramo
mL	Mililitro
MHz	Mega Hertz
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducido
NaOH	Hidróxido de Sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP	poli-ADP ribosa polimerasas
pH	Potencial de Hidrogeno
pka	Logaritmo negativo de la constante de acidez Ka
ppm	Partes por millón
Pd/C	Paladio sobre carbono
r. f	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SMILES	Sistema de introducción lineal molecular simplificada
StdDV	Cálculo de la desviación estándar
t	triple
t.a	Temperatura ambiente
td	Triple de dobles
tdd	Triple de doble de dobles
THF	Tetrahidrofurano
TKIs	Inhibidores de las tirosin quinasas

4. RELACIÓN DE COMPUESTOS



5. RESUMEN

El cáncer representa uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, con millones de muertes registradas cada año. A pesar de los avances terapéuticos actuales, la quimioterapia convencional enfrenta limitaciones críticas, como la falta de selectividad, la resistencia farmacológica y la toxicidad sistémica, lo que justifica la búsqueda continua de nuevas moléculas con mayor eficacia y selectividad antitumoral.

En el presente trabajo se describe la síntesis estereocontrolada de derivados morfolínicos sustituidos en la posición 3 del anillo heterocíclico, empleando el (*R*)-(-)-2-fenilglicinol como auxiliar quiral. La ruta sintética establecida comprende 5 etapas principales, (1) la reacción de ciclación para obtener a la morfolina **32**, (2) la oxidación selectiva en posición 2 del anillo de morfolina para la obtención de la morfolinona **33**, (3) las reacciones de α -alquilación con distintos halogenuros de alquilo para generar los derivados (**34a-c**), la etapa (4) reducción del grupo carbonílico seguida de la etapa (5) reacción de desbencilación para eliminar el auxiliar quiral usado en la primera etapa, para finalmente obtener las morfolinas quirales **31**.

Los compuestos **34a-c** fueron evaluados mediante el ensayo de viabilidad celular MTT frente a líneas celulares cancerosas de colon (Caco2), de mama (MCF-7) y de pulmón (A549), así como frente a fibroblastos dérmicos humanos (HDFa) como control de células sanas. Los resultados mostraron que el compuesto **34c**, con un sustituyente etilo en la posición 3 del anillo de morfolina, exhibió la mayor actividad citotóxica, con porcentajes de viabilidad entre 35.1 y 43.7 % en las 3 líneas celulares de cáncer con una concentración de 5000 $\mu\text{g/mL}$.

Complementariamente, el análisis *in silico* mediante el uso de Swiss Target Prediction reveló que los compuestos sintetizados presentan afinidad predicha hacia quinasas, receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y proteínas de lectura epigenética, familias proteicas vinculadas con la proliferación y supervivencia tumoral.

Estos resultados posicionan al compuesto **34c** como uno de los candidatos sintetizados para estudios de optimización estructural y de validación de posibles mecanismos de acción.

6. ABSTRACT

Cancer represents one of the main health problems worldwide, with millions of deaths recorded each year. Despite current therapeutic advances, conventional chemotherapy faces critical limitations such as a lack of selectivity, drug resistance, and systemic toxicity, which justifies the continuous search for new molecules with greater antitumor efficacy and selectivity.

In the present work, the stereocontrolled synthesis of morpholine derivatives substituted at the 3-position of the heterocyclic ring is described, using **(R)-(-)-2-phenylglycinol** as a chiral auxiliary. The established synthetic route comprises five main stages: (1) the cyclization reaction to obtain morpholine **32**, (2) selective oxidation at position 2 of the morpholine ring to obtain morpholinone **33**, (3) α -alkylation reactions with different alkyl halides to generate derivatives (**34a–c**), (4) reduction of the carbonyl group followed by (5) a debenzylation reaction to remove the chiral auxiliary used in the first stage, ultimately yielding the chiral morpholines **31**.

Compounds **34a–c** were evaluated by the MTT cell viability assay against colon (Caco-2), breast (MCF-7), and lung (A549) cancer cell lines, as well as against human dermal fibroblasts (HDFa) as a healthy-cell control. The results showed that compound **34c**, bearing an ethyl substituent at position 3 of the morpholine ring, exhibited the highest cytotoxic activity, with viability percentages between 35.1 and 43.7 % in the three cancer cell lines at a concentration of 5000 $\mu\text{g/mL}$.

Complementarily, the *in silico* analysis using Swiss Target Prediction software, revealed that the synthesized compounds show predicted affinity toward kinases, G protein-coupled receptors (GPCRs), and epigenetic reader proteins, protein families linked to tumor proliferation and survival.

These results position compound **34c** as one of the synthesized candidates for structural optimization studies and validation of possible mechanisms of action.

7. INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye una de las enfermedades con mayor impacto en la salud pública global. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta patología agrupa un conjunto de neoplasias caracterizadas por la proliferación descontrolada de células con morfología y función anormal, capaces de invadir tejidos adyacentes y diseminarse hacia órganos distantes mediante el proceso de metástasis. En 2022 el cáncer de pulmón ocupó el primer lugar en mortalidad oncológica con 1.8 millones de muertes (18.7 %), seguido por el cáncer colorrectal, hepático, mamario y gástrico. La quimioterapia representa uno de los pilares terapéuticos más empleados, ya sea de forma individual, combinada o complementaria a otras intervenciones; sin embargo, enfrenta desafíos fundamentales, como la resistencia farmacológica, la toxicidad sistémica y la escasa selectividad hacia las células tumorales.

En este contexto, la química medicinal orientada al diseño y síntesis de nuevas moléculas bioactivas representa una estrategia central en la búsqueda de agentes terapéuticos más eficaces y selectivos. En esta disciplina, los compuestos heterocíclicos ocupan un lugar preponderante: se estima que más del 85 % de los fármacos aprobados por la FDA contienen al menos un anillo heterocíclico en su estructura. En particular, la morfolina, un heterociclo de 6 miembros con átomos de nitrógeno y oxígeno en posiciones 1 y 4, ha demostrado ser un núcleo farmacológico de alta relevancia, gracias a sus propiedades fisicoquímicas, entre ellas sus valores de pK_a los cuales rondan el valor de 8.7, su capacidad de establecer interacciones hidrofílicas, lipofílicas y la conformación flexible que tiene, todo esto contribuye a la mejora de su biodisponibilidad. Fármacos anticancerígenos de uso clínico, como el gefitinib y el pemigatinib, incorporan el anillo de morfolina en su estructura, lo que refuerza su relevancia farmacológica.

La estereoquímica desempeña un papel determinante en la actividad biológica de las moléculas orgánicas. En el campo de la síntesis asimétrica, el uso de auxiliares quirales derivados de aminoácidos naturales constituye una estrategia eficiente para el control de la configuración absoluta de los nuevos centros quirales generados. El (*R*)-(-)-2-fenilglicinol ha sido reportado como un inductor quiral de amplia utilidad en la síntesis estereocontrolada de heterociclos como lo son la piperidina y la morfolina sustituidas.

Paralelamente, la integración de herramientas computacionales en las etapas tempranas del desarrollo de fármacos ha transformado la identificación de dianas moleculares. Plataformas como Swiss Target Prediction permiten predecir, a partir de la similitud 2D/3D con ligandos de actividad conocida, las proteínas con mayor probabilidad de interactuar con la molécula de interés, lo que genera hipótesis mecanísticas que orientan de manera racional las validaciones experimentales posteriores.

A continuación, en el presente trabajo se describe la síntesis estereocontrolada de derivados de morfolina sustituidos en posición 3, partiendo del (*R*)-(-)-2-fenilglicinol como inductor quiral. Los compuestos sintetizados fueron evaluados biológicamente mediante el ensayo MTT de viabilidad celular frente a líneas de cáncer de colon, mama y pulmón, y complementados con el análisis *in silico* de posibles dianas moleculares. Este enfoque multidisciplinario, de síntesis orgánica estereoselectiva, evaluación biológica *in vitro* y predicción computacional de dianas busca contribuir al desarrollo racional de nuevos candidatos farmacéuticos con actividad anticancerígena.

8. ANTECEDENTES

8.1. Los heterociclos en química farmacéutica.

En el campo de la química orgánica, el estudio de los sistemas heterocíclicos ha despertado un gran interés, ya que estas estructuras se encuentran constantemente en la naturaleza. Los heterociclos forman parte esencial de productos naturales de alta complejidad, tales como carbohidratos, alcaloides, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormonas, hemoglobina, cofactores enzimáticos y vitaminas, en los que desempeñan diferentes funciones y participan en los procesos biológicos de los seres vivos.¹

Por su versatilidad, los heterociclos se consideran uno de los pilares de la química farmacéutica moderna. Se estima que más del 85 % de los fármacos aprobados por la FDA contienen al menos un anillo heterocíclico en su estructura, lo que evidencia la importancia de estos anillos en el diseño de nuevas terapias. Además, en la síntesis química, estas moléculas son herramientas clave que se emplean como auxiliares quirales, intermediarios de reacción, catalizadores o grupos protectores.¹

En la industria farmacéutica, los núcleos heterocíclicos constituyen el esqueleto central de una amplia variedad de medicamentos. Estos presentan un extenso catálogo de actividades, que incluyen propiedades antivirales, antihistamínicas, antiinflamatorias, antibióticas, analgésicas, antiepilépticas, antipalúdicas, antiobesidad, antidepresivas, antidiabéticas, anestésicos, ansiolíticos, antineoplásicos, antioxidantes, antihipertensivos, antituberculosos, antifúngicos y anticancerígenas² (Figura 1). La relevancia de estas moléculas radica en su capacidad para establecer múltiples interacciones con sus objetivos biológicos, como puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, enlaces metálicos o interacciones de tipo π . Estas fuerzas permiten que el fármaco se acople de manera eficaz a los receptores o a las enzimas específicas.³

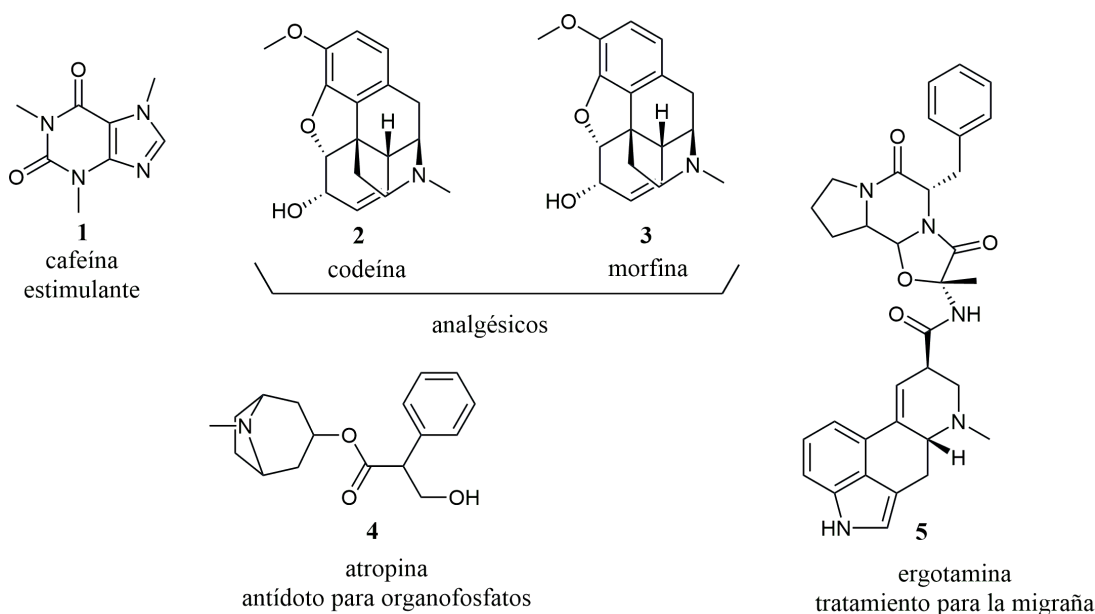


Figura 1. Ejemplos de fármacos heterocíclicos con diferentes actividades biológicas.

En el área de la oncología, los heterociclos que contienen átomos de nitrógeno, oxígeno y azufre (Figura 2) son fundamentales para el diseño de fármacos anticancerígenos. El desarrollo de tratamientos más eficaces se ha centrado en el uso de estos anillos debido a su capacidad para adaptarse a distintas dianas biológicas, lo que los convierte en el eje de las investigaciones actuales.¹

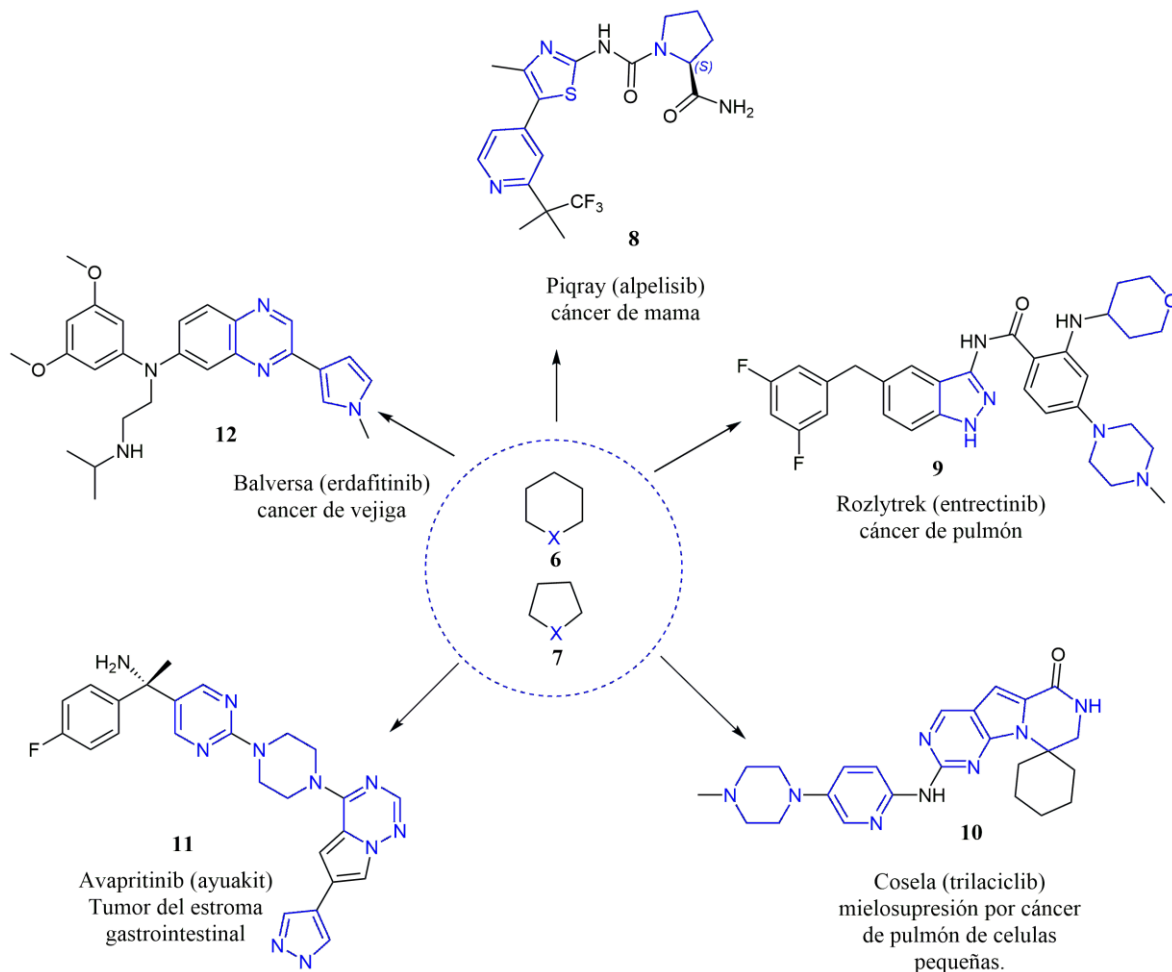
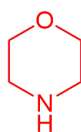


Figura 2. Ejemplos de fármacos anticancerígenos heterocíclicos aprobados por la FDA.

8.2. Morfolina: estructura y relevancia farmacológica.

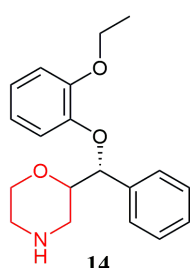
La morfolina es un compuesto orgánico cuya estructura consiste en un anillo heterocíclico de seis miembros que contiene dos heteroátomos: nitrógeno y oxígeno en posiciones 1 y 4, respectivamente (Figura 3). Estas características estructurales, junto con sus propiedades conformacionales, la convierten en un núcleo de gran importancia presente en diversos fármacos ya probados y en otros que aún se encuentran en fase experimental.⁴ En química medicinal, los derivados de morfolina se utilizan ampliamente debido a sus propiedades fisicoquímicas, biológicas y metabólicas favorables.⁴ La presencia de un átomo de nitrógeno débilmente básico y de un átomo de oxígeno en la posición opuesta proporciona un valor de pKa peculiar de 8.7 y una conformación flexible del anillo, lo que le permite participar en diversas interacciones lipofílicas e hidrofílicas, mejorando así su solubilidad en sangre.⁵



13

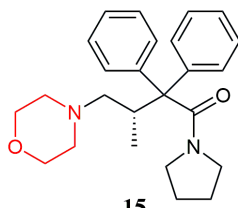
Figura 3. Estructura del heterociclo morfolina.

Los derivados de morfolina han demostrado una amplia gama de actividades biológicas, incluyendo efectos estimulantes, analgésicos, antioxidantes, antiobesidad, antihiperlipidémicos, antiinflamatorios, anticancerígenos, antidepresivos, antimicrobianos y antivirales (Figura 4).⁴



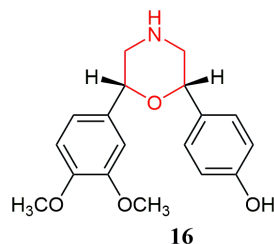
14

reboxetina
antidepresivo



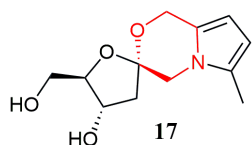
15

dextromoramida
analgésico



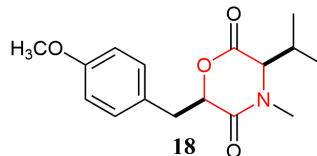
16

quelonina A4
antiinflamatorio y antimicrobiano



17

acortartarina A2
estimulante del apetito



18

syn-3-isopropil-1-6-(4-metoxibencil)-4-metilmorfolina-2,5-diona
anticancerígeno

Figura 4. Compuestos naturales y sintéticos con actividad biológica que contienen un anillo de morfolina.

8.3. El cáncer como problema de salud.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer se define como un conjunto de enfermedades que pueden afectar a distintos órganos y tejidos del cuerpo humano. Este fenómeno se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células con morfología y funciones anormales, capaces de invadir tejidos circundantes y, eventualmente, propagarse a otros órganos mediante un proceso conocido como metástasis. La transformación de una célula normal en cancerosa es un proceso gradual y multifásico denominado carcinogénesis, que implica la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas.⁶

A nivel global, el cáncer es la segunda causa principal de muerte. En el año 2018 se registraron aproximadamente 9.6 millones de muertes, lo que equivale a 1 de cada 6 muertes. En la población masculina, los tipos de cáncer con mayor prevalencia son los de pulmón, próstata, estómago y colorrectal; por su parte, en las mujeres destacan los de pulmón, colorrectal, cuello uterino y tiroides.⁷

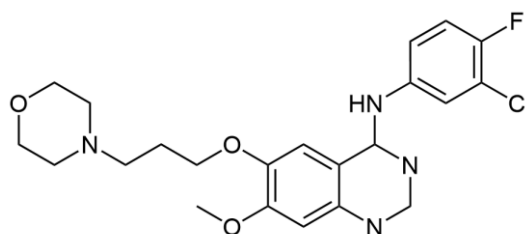
Respecto a la mortalidad específica por tipo de neoplasia, los datos de 2022 sitúan al cáncer de pulmón como la causa de muerte por cáncer que ocupó el primer lugar, con 1.8 millones de muertes, lo que representa el 18.7 % del total. A esto le siguen el cáncer colorrectal, con 900,000 muertes (9.3 %), el cáncer de hígado, con 760,000 muertes (7.8 %), el cáncer de mama, con 670,000 muertes (6.9 %) y el cáncer de estómago, con 660,000 muertes (6.8 %).⁶

Históricamente, las opciones terapéuticas para estos pacientes se han limitado principalmente a la intervención quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia. Esta última ha demostrado una alta efectividad, ya sea como tratamiento único, combinado o complementario. No obstante, el éxito de las terapias actuales enfrenta desafíos críticos, tales como la determinación de dosis precisas para minimizar la toxicidad y los efectos adversos, así como la creciente resistencia a los agentes quimioterapéuticos.⁸

8.4. Morfolinas en fármacos anticancerígenos aprobados.

La morfolina es una molécula privilegiada en el diseño de agentes anticancerígenos; su incorporación en diversas estructuras ha llevado al desarrollo de fármacos aprobados y de algunos candidatos a ensayos clínicos. Las relaciones de tipo estructura-actividad refuerzan la idea de la posición, la conectividad y la modificación de este tipo de moléculas y pueden llevar a la mejora de la potencia, la selectividad o las propiedades farmacocinéticas.

Un fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas es el gefitinib, un inhibidor de la quinasa de tirosina del receptor del factor de crecimiento. Este medicamento cuenta con un anillo de morfolina, el cual está sustituido en la posición 1, donde se encuentra el átomo de nitrógeno.^{4,5}

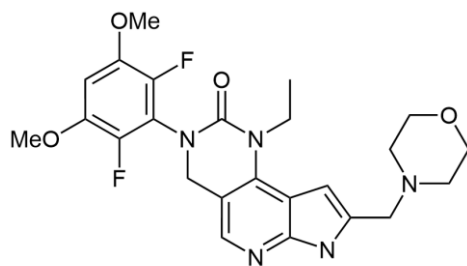


19

Figura 5. Estructura del fármaco gefitinib.

Además del gefitinib, otro fármaco conocido por su actividad anticancerígena es el pemigatinib, un inhibidor de las quinasas del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1, FGFR2 y FGFR3). Esto la hace una molécula utilizada como tratamiento de enfermedades

como el colangiocarcinoma (cáncer de conductos biliares) y también de neoplasias mieloides/linfoides (cáncer de sangre), con reordenamientos del gen FGFR1.⁵



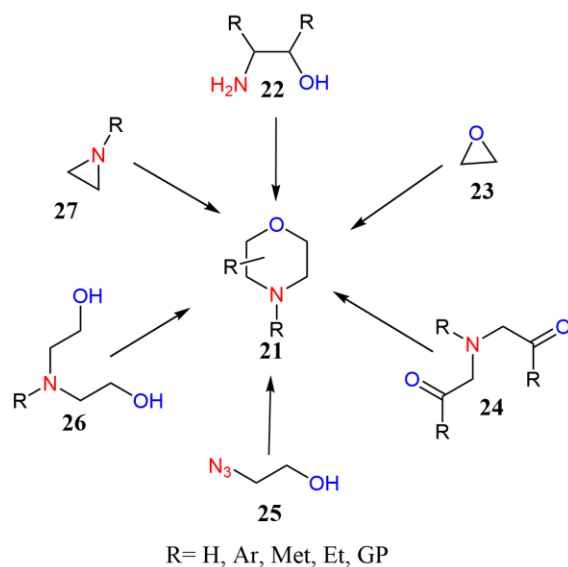
20

Figura 6. Estructura del fármaco pemigatinib

8.5. Síntesis estereocontrolada de morfolinas

Actualmente, la búsqueda de rutas sintéticas que promuevan la formación de anillos heterocíclicos, como la morfolina, ha despertado un gran interés, ya que dichos anillos están relacionados con diversas actividades biológicas. En las últimas décadas, los químicos han desarrollado rutas sintéticas para la obtención de morfolinas mono-, di- o tri-sustituidas, con gran énfasis en reacciones diastereo- y enantioselectivas. En el artículo de revisión de Vitalii A. Palchykov y Valentyn A. Chebanov se presentan diferentes metodologías de síntesis de este tipo de derivados a partir de materias primas de naturalezas químicas distintas. Una de las materias primas más comunes para la formación de anillos de morfolina son los aminoalcoholes 1,2-aziridinas, los epóxidos y los compuestos con grupos amina y carbonilo.

9



Esquema 1. Principales materias de partida para la síntesis de derivados de morfolina.

Los 1,2-aminoalcoholes son los más comunes como materia prima; esto se debe a su versatilidad: son de fácil disponibilidad y permiten sintetizar una amplia variedad de morfolin, mono-, di- y trisustituídas (Figura 7) mediante secuencias de reacciones que incluyen acoplamiento. Ciclización y reducción.

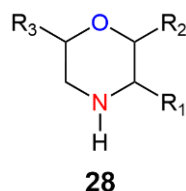


Figura 7. Derivado de morfolin trisustituído

Otros compuestos de partida son las aziridinas, ya que estos anillos tensionados se abren mediante reacciones de apertura de anillo con diferentes nucleófilos, seguidas de ciclización, lo que permite obtener los productos de manera estereoselectiva. Siendo especialmente útiles para la síntesis de derivados de 3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazina (Figura 7), el cual es un biciclo fusionado de un anillo aromático con un anillo de morfolin.

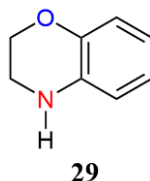


Figura 8. 3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazina.

Los epóxidos u oxiranos también se emplean con frecuencia como precursores. Entre los ejemplos específicos de este tipo de compuestos obtenidos destacan la epiclorohidrina, los glicidol, los nitro epóxidos y los viniloxiranos. Estos llevan a cabo reacciones de apertura del epóxido, seguidas de una ciclización, para formar el anillo de morfolin.

Además de estos 3 grupos, otros precursores relevantes incluyen los α -haloácidos, las α -bromoenonas, los aminodiol, las 1,5-dicetonas y las O-propargilinas. (Esquema 1)⁹

8.6. Inducción quiral en la síntesis diastereoselectiva de derivados de morfolin.

La quiralidad está ampliamente presente en la naturaleza. Los compuestos quirales son estereoisómeros formados por diferentes configuraciones espaciales de los centros quirales (átomos con sustituyentes distintos). Cuando la molécula del fármaco entra al cuerpo humano, es identificada y transportada por macromoléculas biológicas estereoselectivas, como las enzimas, lo que conduce a diferencias en la absorción, el transporte y el

metabolismo de las moléculas de fármacos quirales y, en última instancia, a diferencias en la eficacia del fármaco.¹⁰

Los auxiliares quirales se han utilizado ampliamente en la síntesis de compuestos enantioméricamente puros. El creciente interés de la comunidad científica en la síntesis asimétrica de compuestos biológicamente activos se debe al descubrimiento de sustancias naturales cuyas actividades farmacológicas pronunciadas se deben a la presencia de uno de sus enantiómeros.

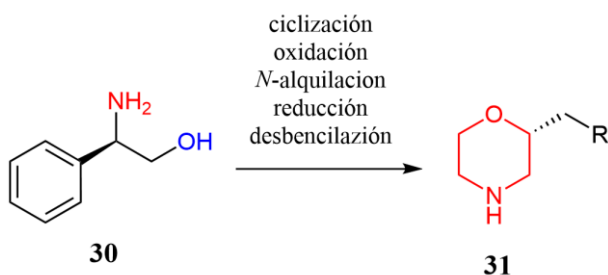
En la síntesis asimétrica, uno de los principales compuestos usados como auxiliares quirales es el aminoácido. Esto se debe a que son fáciles de obtener, ya sea de origen natural o de forma sintética y a bajo costo. La utilización de estos da, además, una alta estereoselectividad.¹¹

La síntesis de morfolinas quirales enantiopuras se ha convertido en un tema de amplio interés, ya que la relación con las actividades biológicas a menudo se explica por motivos estructurales ligados a la quiralidad de los compuestos sintetizados. Con esto en mente, surge un desafío importante en el desarrollo de estrategias para la preparación de fármacos potenciales.

Uno de los enfoques tradicionales para la síntesis de morfolinas sustituidas es el empleo de una estrategia sintética paso a paso a partir de materiales con naturaleza enantioselectivamente enriquecida, derivados principalmente de aminoácidos.

El control por auxiliar quiral implica una aproximación a la síntesis asimétrica en la que una molécula aquiral se convierte en un derivado quiral mediante el uso de una especie fácilmente removible que regresa al grupo funcional original. Los auxiliares quirales se incorporan en rutas sintéticas para controlar la configuración absoluta de los centros estereogénicos.

En 2019, Torres y colaboradores introdujeron la síntesis diastereoselectiva de morfolinas sustituidas en C2 mediante un aminoalcohol quiral como material de partida, en la que el uso de (R)-(-)-2-fenilglinol permitió obtener diastereoisómeros, lo que facilitó la purificación y caracterización de los compuestos.¹²



Esquema 2. Síntesis de morfolinas quirales.

8.7. Mecanismo de acción de los agentes anticancerígenos.

Los principales mecanismos de acción relacionados con compuestos químicos para el tratamiento del cáncer son los siguientes:

Inhibidores de tirosina quinasa (TKIs): terapias especializadas diseñadas para bloquear tirosina quinasas específicas, enzimas que regulan las vías de señalización celular y el crecimiento, la división y la supervivencia celulares. Frecuentemente estas enzimas se encuentran hiperactivadas en varios tipos de cáncer. Los TKIs interrumpen la señalización descendente que impulsa el avance del cáncer al dirigirse directamente a las quinasas mutadas o hiperactivadas que favorecen la resistencia al tratamiento. Ejemplos de fármacos capaces de superar la resistencia son el imatinib, que se emplea en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, y el erlotinib, que actúa sobre el receptor del factor de crecimiento (EGFR) en el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Inhibidores de PARP: estos bloquean las enzimas esenciales para los procesos de reparación del ADN, en particular la vía de reparación por escisión de bases (BER). Este tipo de inhibidores funciona bien en cánceres causados por mutaciones en BRCA1 o BRCA2. Se dirigen específicamente a células cancerosas con deficiencias en la recombinación, lo que provoca acumulación de daño en el ADN y la muerte celular. Los fármacos olaparib y rucaparib son altamente eficaces en cánceres de mama y de ovario con mutaciones en BRCA.

Inhibidores de Mtor: compuestos que inhiben la proteína Mtor, blanco de la rapamicina en mamíferos, clave en procesos de crecimiento, proliferación y supervivencia celular. El Mtor es un componente central de la vía PI3K-akt-Mtor, que las células cancerosas pueden activar para sobrevivir al estrés inducido por los medicamentos. Ejemplos de fármacos de esta naturaleza son everolimus y temsirolimus, que interrumpen las vías de supervivencia que las células cancerosas suelen activar como mecanismo de resistencia a los fármacos.

Inhibidores de proteasomas: El bloqueo de la función del proteasoma conduce a la acumulación de proteínas dañadas e induce la muerte celular, especialmente en células cancerosas. La acumulación de proteínas dañadas y anormales resulta tóxica, especialmente en células de naturaleza cancerosa. Ejemplos de fármacos de esta naturaleza incluyen bortezomib y carfilzomib, utilizados en el tratamiento del mieloma múltiple.

Inhibidores de BRAF y MEK: Estos inhibidores se dirigen a las proteínas de la vía de señalización que a menudo presentan mutaciones en el melanoma. La vía que involucra a BRAF y MEK regula el crecimiento y la división celulares. Un ejemplo es que, cuando BRAF está mutado, esta vía permanece activa, lo que promueve el crecimiento tumoral. Fármacos con esta actividad de inhibición son vemurafenib y dabrafenib, que bloquean las proteínas mutadas, lo que ha mostrado mejores respuestas al tratamiento en melanomas y un desarrollo lento de la resistencia.¹³

Inhibidores de GPCRs: se dirigen a la sobreexpresión de estos receptores y participan en múltiples procesos relacionados con el cáncer, como la proliferación celular, la angiogénesis, las metástasis y la supervivencia tumoral. Aproximadamente el 20 % de los GPCRs están asociados con la progresión tumoral y muchos de ellos se sobreexpresan en diversos tipos de cáncer. Los receptores de quimiocinas, como CXCR4, están involucrados en la metástasis y son blancos terapéuticos en desarrollo. Los receptores de endotelina (ETA y ETB) están implicados en cánceres como los de próstata y de ovario. Los receptores de prostaglandinas, en particular EP4, se asocian con la inflamación y la progresión tumoral. El receptor de LPA (ácido lisofosfatídico) también ha mostrado relevancia en varios tipos de cáncer.¹⁴

8.8. Principales métodos actuales de tratamiento del cáncer.

Dado que las células malignas se originan a partir de tejidos sanos, resulta extremadamente difícil tratarlas de forma selectiva con quimioterapia tradicional. Esta falta de selectividad, sumada a la resistencia a los fármacos ¹⁵ y los elevados costos de los agentes citotóxicos, ha impulsado el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antitumoral más eficaz.

La cirugía sigue siendo fundamental para los tumores sólidos localizados, ya que extirpa el tumor y el tejido circundante.

Quimioterapia: utiliza fármacos para destruir células cancerosas de rápido crecimiento. Ahora es más dirigida y presenta menos efectos secundarios que antes.

Radioterapia: técnicas modernas como IMRT y protonterapia permiten una mayor precisión y dañan menos tejido sano.

Inmunoterapia: ha revolucionado el tratamiento. Los inhibidores de puntos de control (anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4) ayudan al sistema inmune a atacar el cáncer. Muy efectivos en el melanoma, el cáncer de pulmón y otros tipos de cáncer.

Terapias dirigidas: fármacos que atacan mutaciones específicas, como BRAF, EGFR y ALK. Permiten realizar tratamientos personalizados según el perfil genético del tumor.

Terapia CAR-T: células T modificadas genéticamente para atacar células cancerosas. Muy prometedor en leucemias y linfomas.

Hormonoterapia: esencial en los cánceres de mama y de próstata, así como en otros sensibles a las hormonas.⁷

En cuanto a la quimioterapia, hay que tener en cuenta varias consideraciones, como la selección del agente, que depende de diversos factores: tipo específico de cáncer, estadio,

perfil genético del tumor y condición del paciente. En la práctica moderna, estos fármacos rara vez se usan solos; se combinan en protocolos específicos para maximizar la efectividad y minimizar la toxicidad.

Los efectos secundarios principales incluyen mielosupresión (afectación de la médula ósea), mucositis, alopecia y náuseas, aunque varían según el agente específico.¹⁶

Los medicamentos más utilizados actualmente como quimioterapia son los que:

Modifican el ADN directamente e interfieren con la replicación celular:

- Sales de platino: cisplatino, carboplatino y oxalilplatino muy efectivos en diversos tumores sólidos
- Derivados del gas mostaza: ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucil
- Nitrosureas: Carmustina, lomustina y estreptozocina únicos que atraviesan la barrera hematoencefálica, útiles en tumores cerebrales
- Hidrazinas y triazinas: temozolomida, dacarbazina, procarbazona

Antimetabolitos interfieren con la síntesis de ADN al imitar componentes naturales:

- Análogos del ácido fólico: metotrexato uno de los más usados
- Análogos de pirimidina: 5-fluorouracilo, citarabina (ara-c), gemcitabina, capecitabina
- Análogos de purina: 6-mercaptopurina, fludarabina.

Antibióticos antitumorales que dañan el ADN:

- Doxorubicina (Adriamicina), daunorubicina, epirubicina efectivos en leucemias, linfomas y tumores sólidos

Otros Agentes Importantes

- Bleomicina: usada en el cáncer testicular y en el linfoma de Hodgkin.¹⁶

8.9. Herramientas in silico para la predicción de objetivos biológicos.

Durante la última década, la generación de extensas bases de datos sobre interacciones proteína-molécula pequeña ha transformado el desarrollo de aproximaciones computacionales basadas en el conocimiento. Estas metodologías no solo permiten identificar dianas de moléculas no caracterizadas, sino también descubrir dianas secundarias de compuestos conocidos. Este aspecto es crucial, dado que se ha documentado que los fármacos convencionales actúan, en promedio, sobre seis dianas moleculares distintas, lo que

subraya la necesidad de caracterizar exhaustivamente el perfil de interacciones de cualquier compuesto bioactivo.

En este contexto, **Swiss Target Prediction** se presenta como una herramienta de alto valor que integra bases de datos masivas con algoritmos sofisticados de similitud química. Su implementación acelera la identificación de dianas y optimiza el descubrimiento de fármacos al reducir significativamente los costos del cribado experimental. La plataforma se consolida como un recurso fundamental para el diseño racional de fármacos al combinar tres pilares metodológicos:

1. **Similitud 2D (Química):** Utiliza huellas moleculares FP2 (vía OpenBabel 2.2.0) y el **coeficiente de Tanimoto** para cuantificar patrones estructurales y grupos funcionales compartidos.
2. **Similitud 3D (Estructural):** Evalúa la forma molecular y el potencial electrostático mediante la generación de 20 conformaciones por molécula, comparadas mediante vectores Electroshape y la distancia de Manhattan.

Actualmente, la base de datos de la plataforma comprende **280,381 moléculas** que interactúan con **2,686 dianas**, con una fuerte representatividad en el modelo humano (66 %). Antes de la inclusión de la homología, la distribución se centra en *Homo sapiens* (1,768 dianas), seguida de modelos clave como *Rattus norvegicus* (469) y *Mus musculus* (342).

Finalmente, *Swiss Target Prediction* ofrece una interfaz intuitiva que facilita la entrada de datos mediante la notación SMILES o el dibujo molecular en 2D (ChemAxon). Esta accesibilidad, sumada a su carácter gratuito y la capacidad de exportar resultados en múltiples formatos, la convierte en la herramienta idónea tanto para la validación experimental como para el análisis bioinformático avanzado.¹⁷

8.10. Métodos de evaluación de la actividad anticancerígena.

Ensayo MTT:

El ensayo MTT, descrito inicialmente por Mosmann en 1983, constituye una de las metodologías colorimétricas más extendidas para la determinación de la citotoxicidad y la viabilidad celular en estudios *in vitro*.

Su fundamento reside en la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir la sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) a cristales de formazán de color púrpura, insolubles en medio acuoso. Aunque tradicionalmente esta conversión se ha vinculado de forma exclusiva a la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, la evidencia actual indica que la reducción es mediada por un complejo sistema de enzimas oxidorreductasas y de donadores de electrones

(principalmente NAD(P)H) localizado también en el retículo endoplásmico, los microsomas y la membrana plasmática.

La implementación técnica del ensayo se realiza típicamente en placas de microtitulación de 96 pozos, lo que facilita el cribado de alto rendimiento de diversos compuestos. El proceso implica una fase de exposición celular al agente citotóxico (que puede oscilar entre 72 y 96 horas para asegurar que las células se encuentren en fase logarítmica de crecimiento), seguida de la adición del reactivo MTT. Tras un periodo de incubación adicional de 4 a 6 horas, los cristales de formazán resultantes se solubilizan en disolventes orgánicos, como el isopropanol acidificado o el DMSO, lo que permite cuantificar la densidad óptica (DO) mediante espectrofotometría. Generalmente, se emplea una longitud de onda de 540 nm para la señal principal y otra de 720 nm para la corrección de fondo, a fin de eliminar artefactos ópticos.

Para garantizar la reproducibilidad y la validez científica de los resultados, es imperativo optimizar previamente la densidad celular inicial, asegurando una relación lineal entre el número de células viables y la absorbancia obtenida. En el análisis de datos, el parámetro fundamental es el porcentaje de supervivencia celular respecto al control no tratado, lo que permite calcular indicadores de potencia biológica, como la concentración inhibitoria 50 (IC50) para líneas celulares en división o la concentración letal 50 (LC50) para células primarias.

No obstante, la interpretación de los resultados debe considerar posibles interferencias. Algunos compuestos químicos pueden reducir el MTT de forma abiótica o presentar absorbancia propia en la región del espectro evaluada, lo que exige el uso de controles en medios libres de células. Asimismo, dado que el ensayo mide la actividad metabólica y no la integridad de la membrana *per se*, es recomendable complementar estos hallazgos con otras técnicas (como la liberación de LDH o ensayos de exclusión de colorantes) para obtener una visión integral del mecanismo de muerte celular inducido. A pesar de estas limitaciones, la robustez, el bajo costo y la correlación demostrada entre la sensibilidad *in vitro* y las respuestas clínicas consolidan al ensayo MTT como una herramienta de primera línea en la caracterización de nuevos agentes citotóxicos.¹⁸

9. JUSTIFICACION

El cáncer de colon, de mama y de pulmón se encuentra entre las neoplasias de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial. La quimioterapia es una de las principales opciones terapéuticas, pero, debido a sus limitaciones críticas, como la falta de selectividad, la resistencia farmacológica y los efectos adversos severos, se justifica la búsqueda de nuevas moléculas con mayor eficacia y selectividad antitumorales.

Los compuestos heterocíclicos constituyen una de las clases estructurales más relevantes en la química médica, dado que los fármacos aprobados por la FDA, en su mayoría, contienen este tipo de compuestos en su estructura. En particular, los derivados de morfolina han demostrado un perfil farmacológico favorable, con capacidad para interactuar con diversas dianas moleculares de relevancia oncológica y, además, constituyen un núcleo presente en fármacos antitumorales de uso clínico.

El uso de auxiliares quirales derivados de aminoácidos ha sido una estrategia eficiente, económica y estereoselectiva para la síntesis de compuestos heterocíclicos, que permite controlar la configuración absoluta de los nuevos centros quirales generados, dado que la actividad biológica que pueda tener está relacionada con este aspecto. Mientras que la combinación de estudios *in vitro* e *in silico* ayuda a generar una hipótesis sobre la posible actividad biológica que las moléculas sintetizadas puedan llevar a cabo.

10.OBJETIVOS

10.1. General

- Síntesis y evaluación biológica de heterociclos derivados de morfolina.

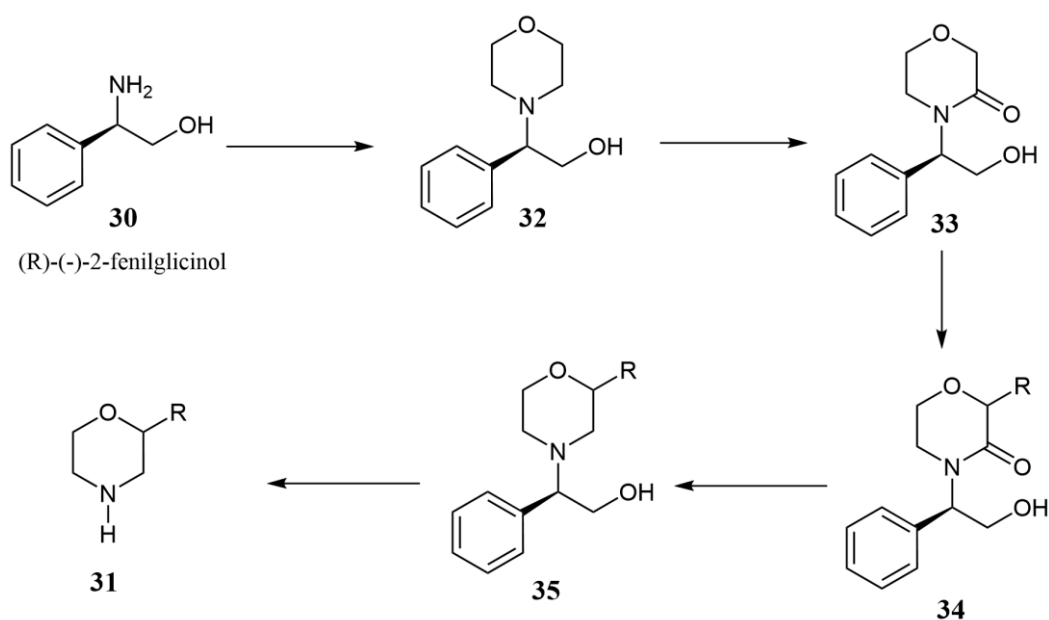
10.2. Particulares

- Establecer la ruta sintética para la obtención de compuestos heterocíclicos derivados de anillos de morfolina
- Evaluación *in silico* con el software *Swiss Target Prediction* para identificar posibles interacciones con dianas moleculares.
- Evaluar la actividad biológica de estos compuestos en líneas celulares cancerosas de colon, de seno y de pulmón.

11.METODOLOGÍA

11.1. Plan sintético

El precursor establecido para acceder a los derivados de morfolina sustituidos en posición 3 fue el inductor quiral ®-(-)-2 fenilglicinol, el cual, al tener una estereoquímica ya definida, nos permitirá crear un ambiente de diasterodiferenciación. Para llevar a cabo este plan sintético se estableció la ruta mostrada en el esquema 3, donde la primera reacción que se genera es una reacción de ciclación intermolecular para generar el compuesto **27**, seguido de una reacción de oxidación en posición 2 del anillo de morfolina para formar la morfolinona **28**, favoreciendo con esto la reacción de *N*-alquilación en la posición 3 haciendo uso de halogenuros de alquilo con ambientes químicos distintos, donde se probarán sustituyentes aromáticos, alquílicos y alílicos. Una vez obtenidas las morfolinonas sustituidas en posición 3, se realiza una reacción de reducción del grupo carbonilo para obtener los compuestos **30**, que serán sometidos a una reacción de desbencilación para obtener las morfolinas libres **26**.



Esquema 3. Plan sintético para la obtención de derivados de morfolina quirales.

11.2. Uso de Swiss Target Prediction

Para identificar posibles dianas terapéuticas de los compuestos seleccionados, se utilizó la plataforma en línea *Swiss Target Prediction*, desarrollada por el grupo de quimioinformática de la Universidad de Lausana, Suiza. Esta herramienta predice los blancos moleculares más probables para moléculas pequeñas con base en la similitud de sus estructuras químicas con ligandos de actividad conocida, mediante la combinación de métodos de similitud 2D y 3D sobre una base de datos de compuestos bioactivos.

Las estructuras de los compuestos de interés fueron ingresadas mediante la interfaz Marvin JS, que permite dibujar la molécula de interés para generar un código SMILES. El organismo objetivo se estableció como Homo sapiens. Los resultados fueron filtrados para contemplar solamente el TOP 15 de dianas biológicas con las que se tenga interacción posible.

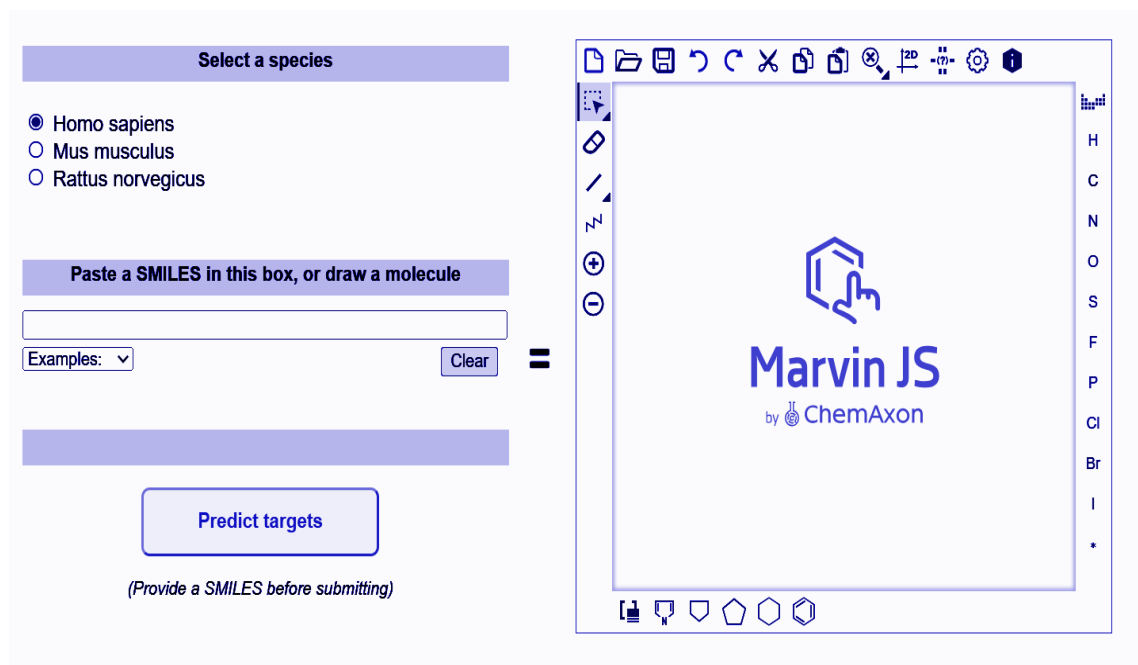


Figura 9. Pantalla de inicio del software libre *Swiss Target Prediction*.

11.3. Bioensayo de viabilidad celular de cáncer

El ensayo MTT es un indicador sensible orientado a la evaluación del metabolismo celular. El ensayo se basa en la reducción del reactivo MTT, un tinte de tetrazolio soluble en agua, que, principalmente, es metabolizado por las deshidrogenasas mitocondriales a cristales de formazán de color púrpura. Los cristales se analizan espectrofotométricamente a 490 nm, y los espectros de las células tratadas y no tratadas con los compuestos seleccionados del esquema sintético 3 constituyen una estimación del grado de citotoxicidad.

Se planteó evaluar los compuestos derivados de la reacción de *N*-alquilación **34**, para su evaluación como agentes anticancerígenos en líneas celulares: Caco-2 (ATCC[®]HTB-37) cáncer de colon, MCF-7 (ATCC[®]HTB-22) cáncer de mama, A549 (CCL-185) cáncer de pulmón y HDFa (ATCC[®] PCS-201-012) fibroblastos dérmicos humanos adultos como células sanas de control.

En resumen (Figura 10), las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2.5×10^4 /mL en medio DMEM-F12 y se incubaron durante 24 horas a 37 °C con 5 % de CO₂.

Posteriormente, las células se expusieron a diferentes concentraciones de los compuestos sintetizados (2500 y 5000 $\mu\text{g/mL}$) por triplicado para cada una de las líneas celulares, dejando también una línea de control donde no se trataron las células con ningún compuesto. Después de incubar la placa durante 24 h después de la exposición con los compuestos de interés, se añadió el reactivo MTT 20 μL a cada pozo, incubando la placa una vez más durante una hora. Tras la incubación, se leyeron las absorbancias a 490 nm usando un medidor de placas BioTek Cytation 5 imaging reader. De las absorbancias obtenidas se exportan los datos para el posterior análisis de % de viabilidad celular.

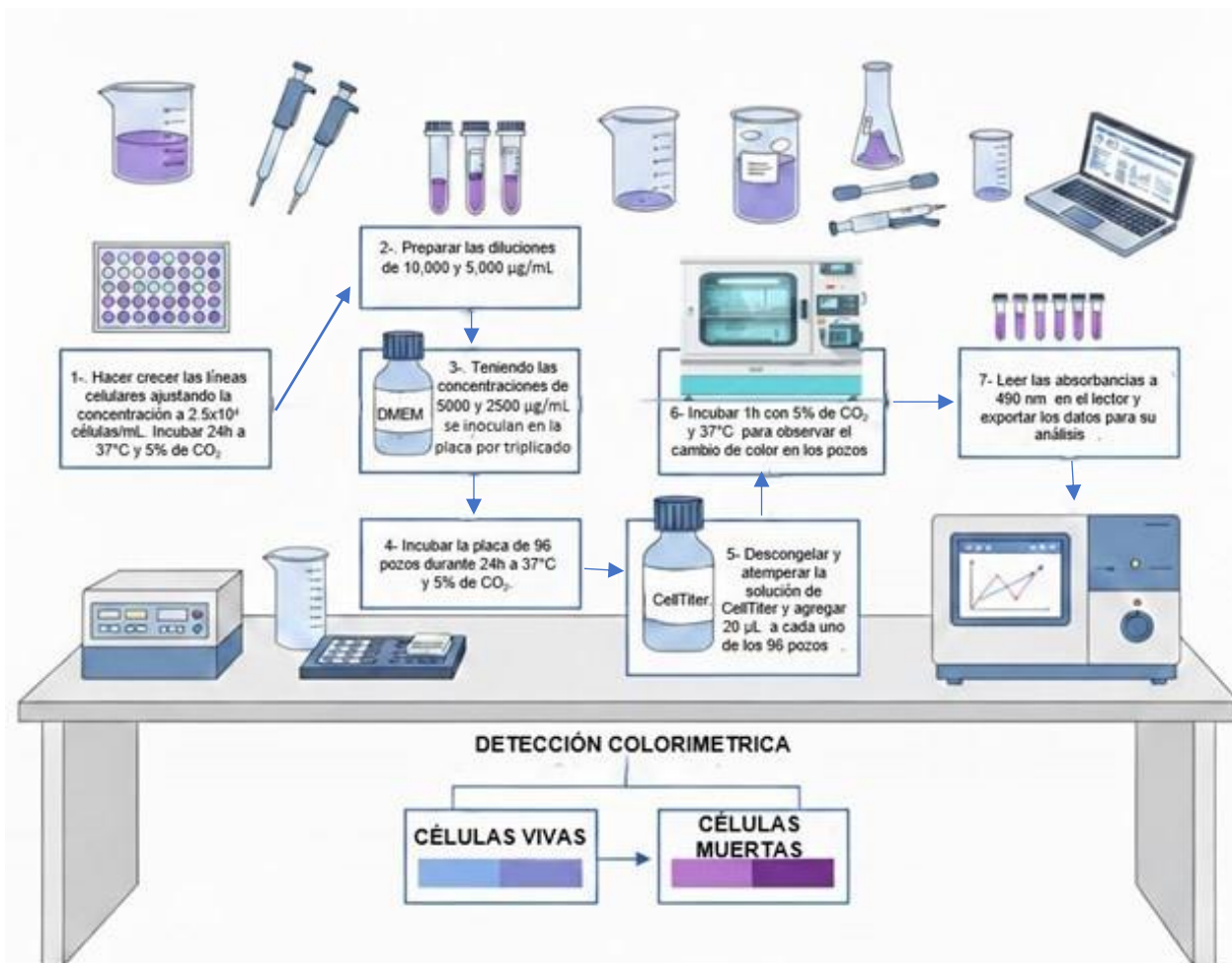
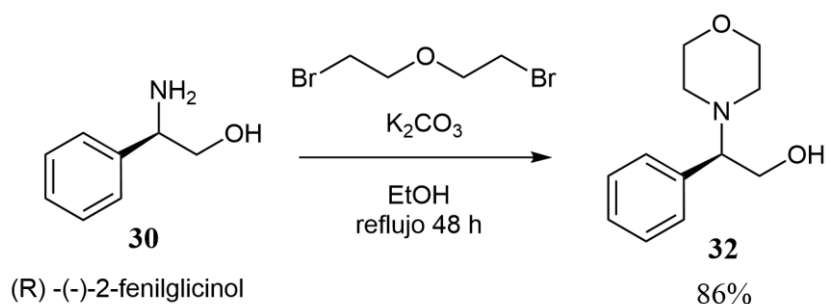


Figura 10. Esquema de desarrollo del ensayo MTT de citotoxicidad.

12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12.1. Síntesis de (R)-2-morfolino-2-feniletan-1-ol (32)

Para iniciar con la ruta establecida en el esquema 1, se tomó el (R)-(-)-2-fenilglicinol como materia prima, ya que este reactivo cuenta con un centro quiral ya establecido. La reacción se hizo tomando como condiciones de reacción las establecidas por Torres y colaboradores¹², realizando variaciones en cuanto a equivalentes de reactivos y tiempos de reacción.



Esquema 4. Reacción de ciclación para la obtención de la morfolina **32**.

La materia prima se hace reaccionar con el bis-(2-bromoetil) éter disuelto en etanol, en condiciones básicas con K₂CO₃, a reflujo durante 48 h, logrando obtener el compuesto **32** en un rendimiento del 86 %.

La obtención de este compuesto se corroboró mediante el uso de RMN de una y dos dimensiones, donde para el espectro de RMN ¹H del compuesto **32** (Figura 11) podemos observar las señales características de los H-aromáticos en la región de 7.35 y 7.21 ppm, seguido de estas señales podemos observar una señal doble de dobles (**dd**) correspondiente a uno de los protones H2 base al grupo Hidroxilo, la señal correspondiente a los protones base O del grupo éter H3, H5 y uno de los protones base l grupo hidroxilo H2' se encuentran en 3.71 ppm en una señal múltiple (**m**), en 3.60 ppm se observa una señal doble de dobles (**dd**) la cual corresponde a H1', en la región de 2.57 y 2.39 ppm se logran observar señales de multiplicidad, doble de doble de dobles (**ddd**) y doble de dobles(**dd**) pertenecientes a H2, H6 de base al átomo de N, del anillo de morfolina formado, todas estas señales no ayudan a confirmar la estructura del compuesto obtenido satisfactoriamente.

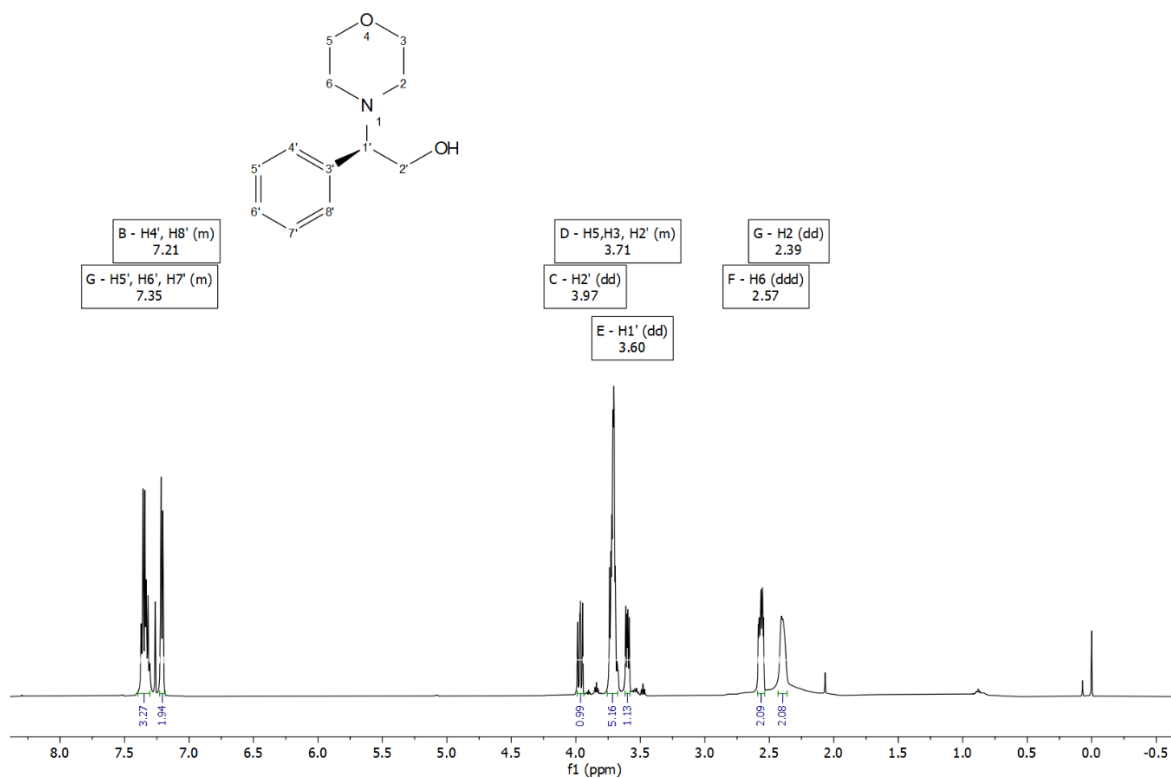


Figura 11. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **32**.

En el espectro de ^{13}C de **32** (Figura 12) presenta una señal en 135 ppm correspondiente al carbono ipso C3', seguido de esta señal encontramos las señales de 128.99, 128.54 y 128.33 pertenecientes a la región de aromáticos donde se pueden identificar a C5, C7, C6, C4 y C8, en 70.67 ppm se encuentra C1' del carbono base al anillo de morfolina, en 67.37 la señal que corresponde a C3 y C5 carbonos base al oxígeno del grupo éter, para la señal de 60.75 ppm se identificó que pertenece a C2' del carbono base al grupo OH y finalmente se observan C2 y C6 carbonos base al átomo de N pertenecientes al anillo de morfolina.

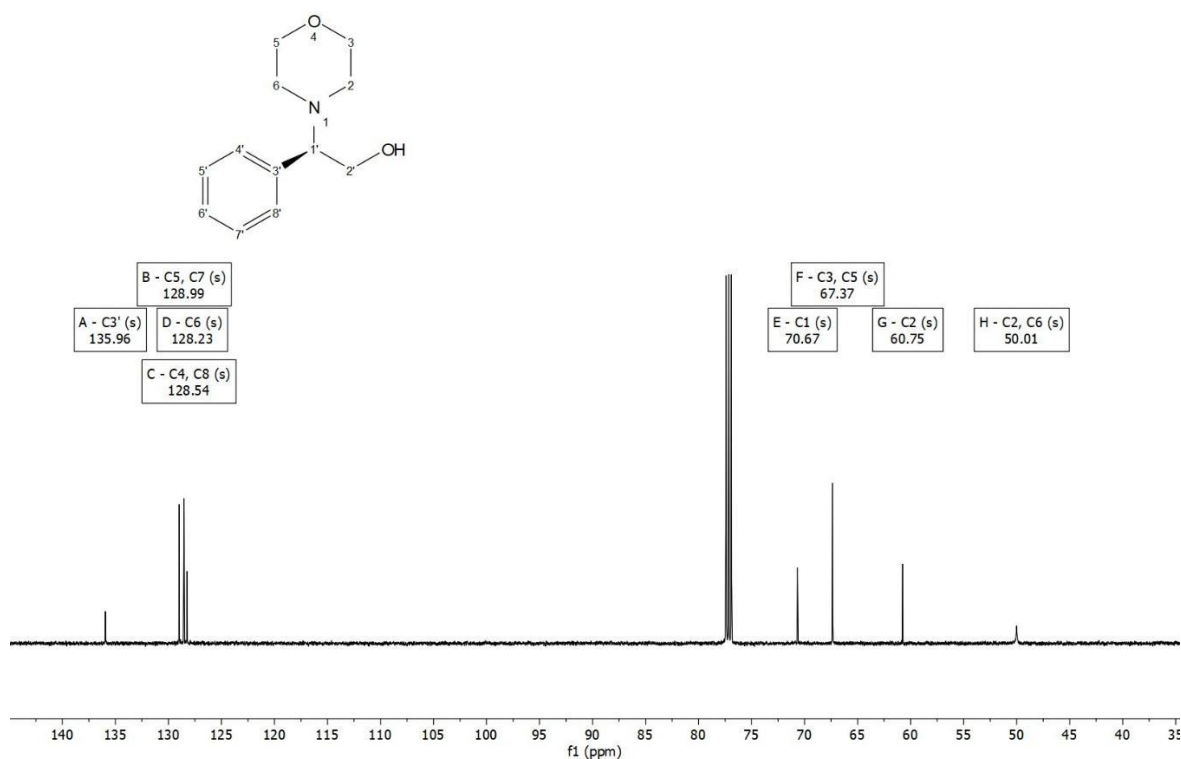
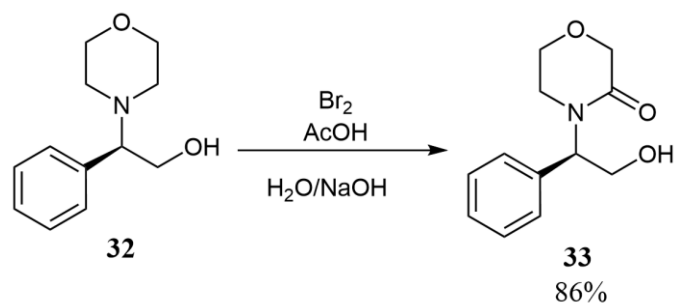


Figura 12. Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de **32**.

El análisis por RMN de ¹H y ¹³C confirma la obtención del compuesto **32**. Adicionalmente a esta caracterización, los resultados de la espectrometría de masas muestran el pico del ión molecular a *m/z* 176.1070, en relación con la masa calculada de 176.75, lo que evidencia la realización de la reacción de ciclación intermolecular.

12.2. Síntesis de (R)-4-(2-hidroxi-1-feniletil) morfolin-3-ona (**33**).

En el trabajo presentado por Torres y colaboradores¹² ellos probaron diferentes condiciones para la obtención del grupo carbonilo en la posición 2 del anillo de morfolina, obtenido de las condiciones de reacción del (esquema 5), concluyendo que presentaron mejores rendimientos ya que se hace uso de una solución de AcOH/H₂O al 80 % para generar un ambiente ácido que favorezca la formación de la oxidación para finalmente neutralizar la reacción con una solución de NaOH, llegando a un pH neutro para la obtención del compuesto **33** en un rendimiento de 86 %.



Esquema 5. Reacción de oxidación para la obtención de la morfolinona **33**.

La obtención de este compuesto se comprobó mediante el uso de RMN analizando los cambios significativos respecto al espectro del compuesto **32**, donde para el espectro de RMN ^1H del compuesto **33** (Figura 13), podemos observar las señales características de los H-aromáticos con una multiplicidad (**m**) en la región en 7.32 ppm, además de esto podemos ver las señales de H3 se desdoblan de las de H5 y muestran una señal con multiplicidad (**d**) en 4.16 ppm ya que ahora son protones alfa a un grupo carbonilo mientras que las señales que corresponde al H2, ya no se observan en la región 2.39 ppm.

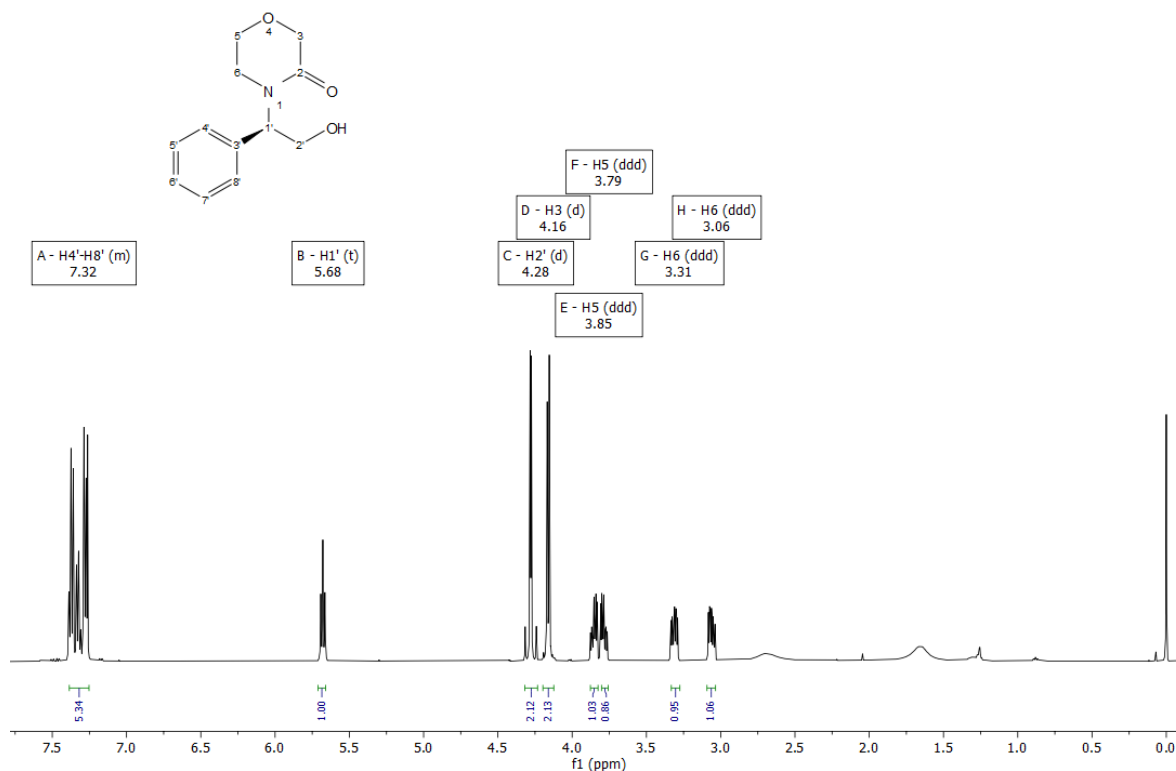


Figura 13. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **33**.

Para el espectro de ^{13}C de **28** (Figura 14), como primera señal representativa de la obtención de este compuesto, tenemos la señal que se presenta en 168.43 ppm, que corresponde a C2

del anillo de morfolina. Tal desplazamiento comprueba la existencia de un grupo carbonilo de tipo amida. Además, se observa la separación de los carbonos C5 y C3 en dos señales con desplazamientos químicos distintos.

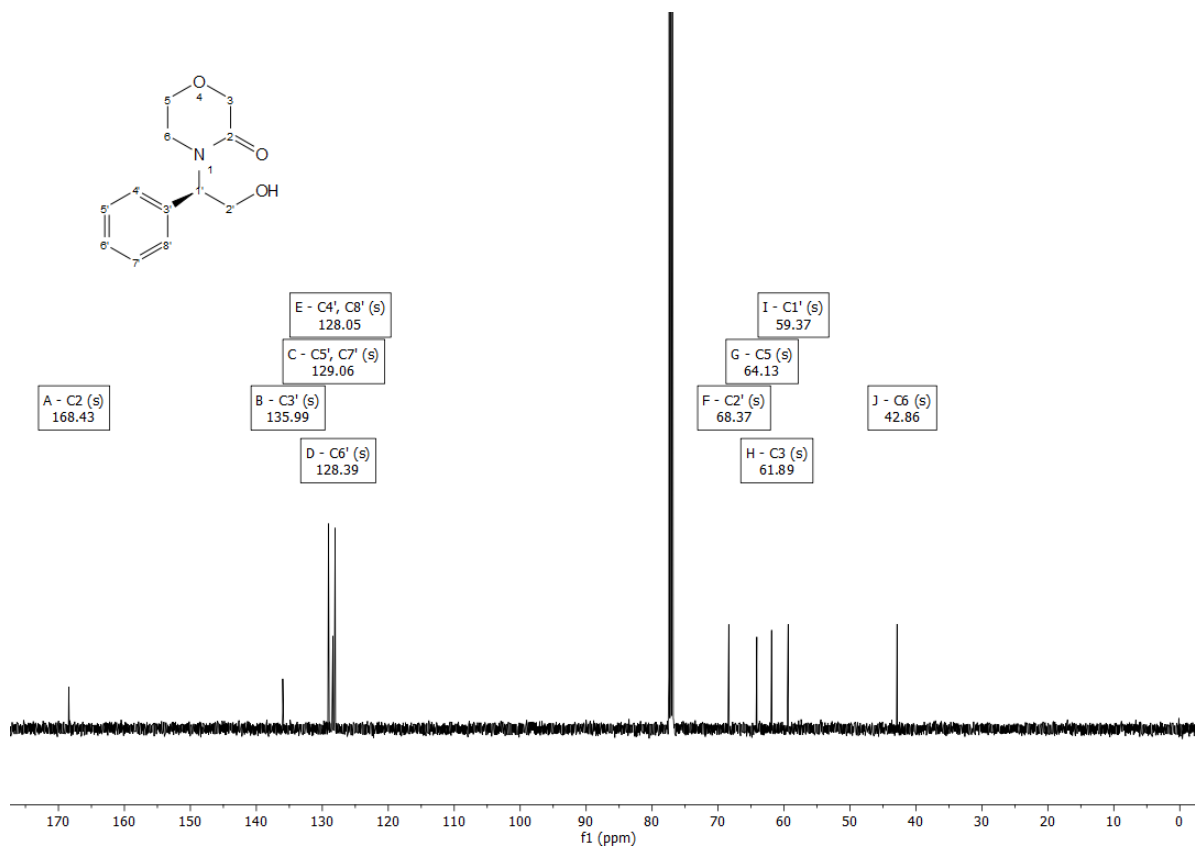
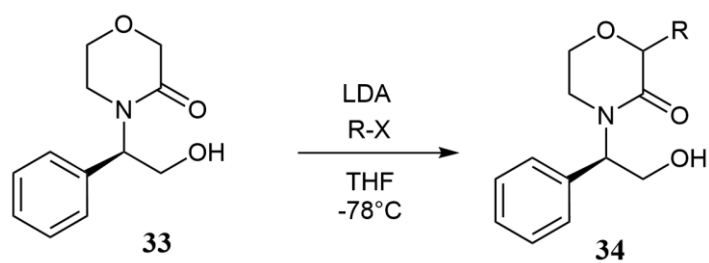


Figura 14. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) de **33**.

12.3. Reacciones de α -alquilación para la obtención de derivados de morfolina sustituidos en posición α (**34**).

Para continuar con el plan sintético del esquema 3, la reacción que se realiza es la α -alquilación la cual es favorecida la oxidación en la posición 2 del esquema 4, los protones presentes en la posición α del compuesto **33** toman un carácter ácido lo cual favorece su extracción haciendo uso de una base en este caso LDA formada in situ, la formación de este ion enolato, como un carbanión en posición 2 favorece poder realizar la sustitución exponiéndose a halogenuros de alquilo de diferentes naturalezas químicas y formar a los compuestos **34**, los halogenuros utilizados, productos obtenidos y rendimientos logrados se muestran a continuación en la Tabla 1.



Esquema 6. Reacción de ciclación para la obtención de los derivados de morfolina **34**.

Tabla 1. Compuestos obtenidos bajo las condiciones de reacción mostradas en el Esquema 4.

Ensayo	Halogenuro de alquilo	Rendimiento	Producto	Tiempo de reacción
1		50 %	 34^a	26h
2		90 %	 34b	24h
3		82 %	 34c	24h

El primer compuesto obtenido de las *N*-alquilaciones fue el compuesto **34a**, después de 26h de reacción, donde el seguimiento se hizo por placa cromatográfica, para posteriormente

hacer extracciones y una purificación de donde obtuvo la fracción que nos permitió acceder a espectro de RMN de ^1H del compuesto **34a** (Figura 15) donde podemos observar cómo señales características del compuesto obtenido, la primer señal se encuentra en 5.22 ppm que se observa como una señal múltiple (**m**) que corresponde a H8 mejor conocido protón alílico. Otra señal representativa de la sustitución en la posición H3 es el cambio en la multiplicidad de esta señal, que ahora es triple (**t**) y se encuentra en 4.29 ppm. A frecuencias más bajas, se observa una señal a 2.63 ppm, que corresponde a H7, y, finalmente, las dos señales simples (**s**) en 1.73 y 1.66 ppm, que pertenecen a los grupos metilo de H10 y H11.

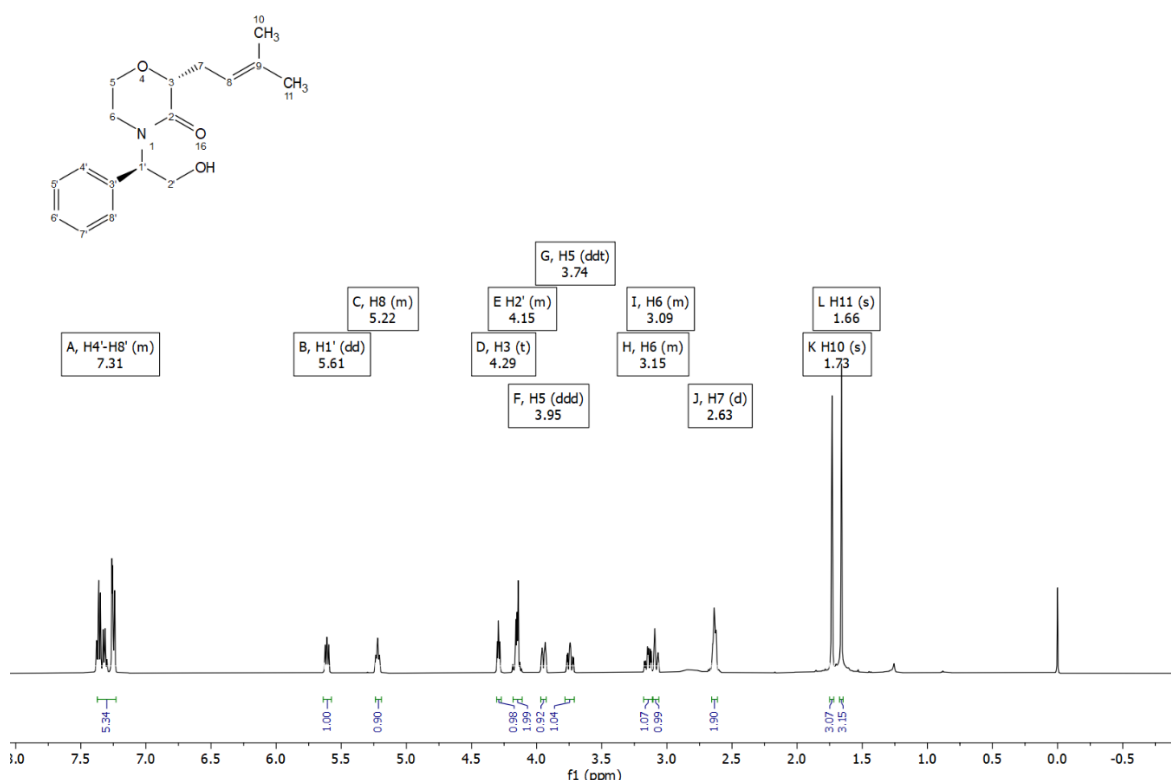


Figura 15. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **34a**.

El espectro de ^{13}C del compuesto **34a** (Figura 16) muestra señales características: podemos observar las señales de C9 en 135.08 ppm y de C8 en 119.19 ppm, indicativas de la presencia de un doble enlace. En 78.28 ppm, tenemos una señal correspondiente al carbono C3 en la posición donde se llevó a cabo la sustitución. En 31.39 se observan las señales de C7, carbono unido al anillo de morfolina, y del doble enlace del sustituyente; finalmente, se observan las señales de los grupos metilo C11 y C10 en 26.7 y 18.22 ppm.

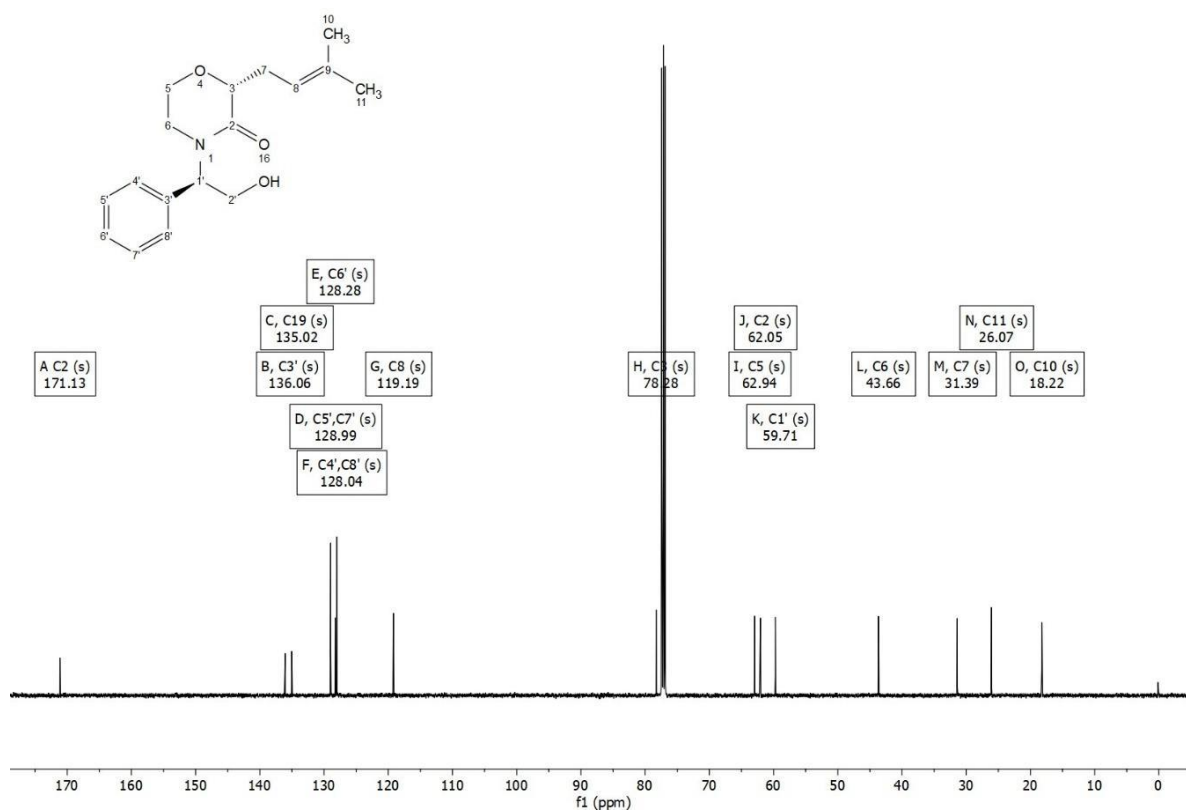


Figura 16. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **34a**.

El segundo compuesto de la serie de N-alquilaciones fue el **34b**, obtenido utilizando bromuro de bencilo como agente alquilante. A continuación, podemos observar el espectro de ^1H (Figura 17) obtenido después de la purificación del crudo de reacción. En el espectro podemos observar cómo cambio significativo el aumento en la señales en la región de aromáticos viendo que la integración deja de ser para 5H y ahora se observa una señal **m** en 7.27 ppm la cual integra para 8H y una señal **dd** en 6.95ppm la cual integra para 2H, esto nos ayuda corroborar la presencia de un segundo grupo fenilo en la estructura de nuestro compuesto, otra señal que cambia sus características es aquella perteneciente a H3 donde se llevó a cabo la sustitución, pues esto cambia su desplazamiento a 4.51 ppm ya que está unida a los protones bencílicos identificados como H7 los cuales muestran su desplazamiento en 3.25 y 3.16 ppm como señales **dd**.

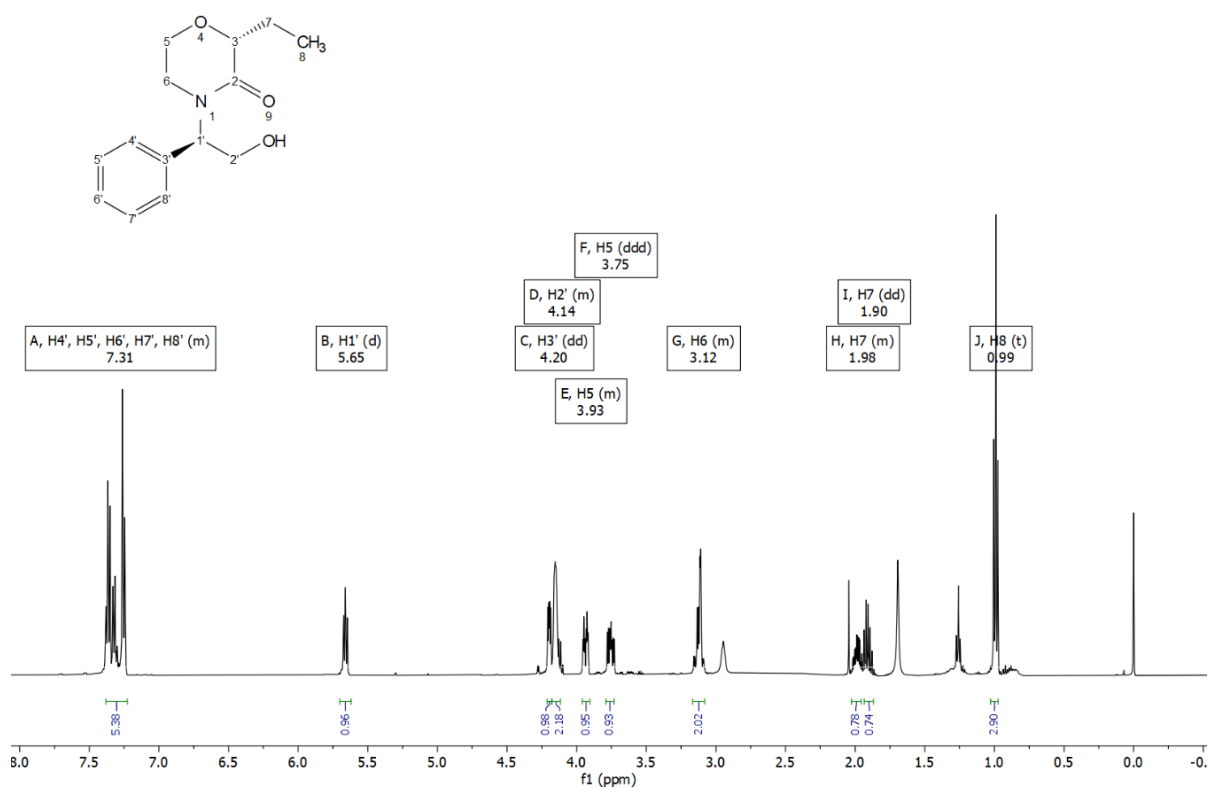


Figura 17. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **29b**.

En el espectro de ^{13}C del compuesto **34b** (Figura 18) se observan las señales duplicadas de las zonas de los carbonos aromáticos, se observa la presencia de 2 carbonos ipso C3' y C8, de ahí las señales de 130.20 a 127.89 ppm correspondientes a los carbonos de posiciones orto, meta y *para* de los anillos aromáticos, la señal de C3 se localiza en 78.57 ppm y finalmente la señal que pertenece a C7, carbono bencílico.

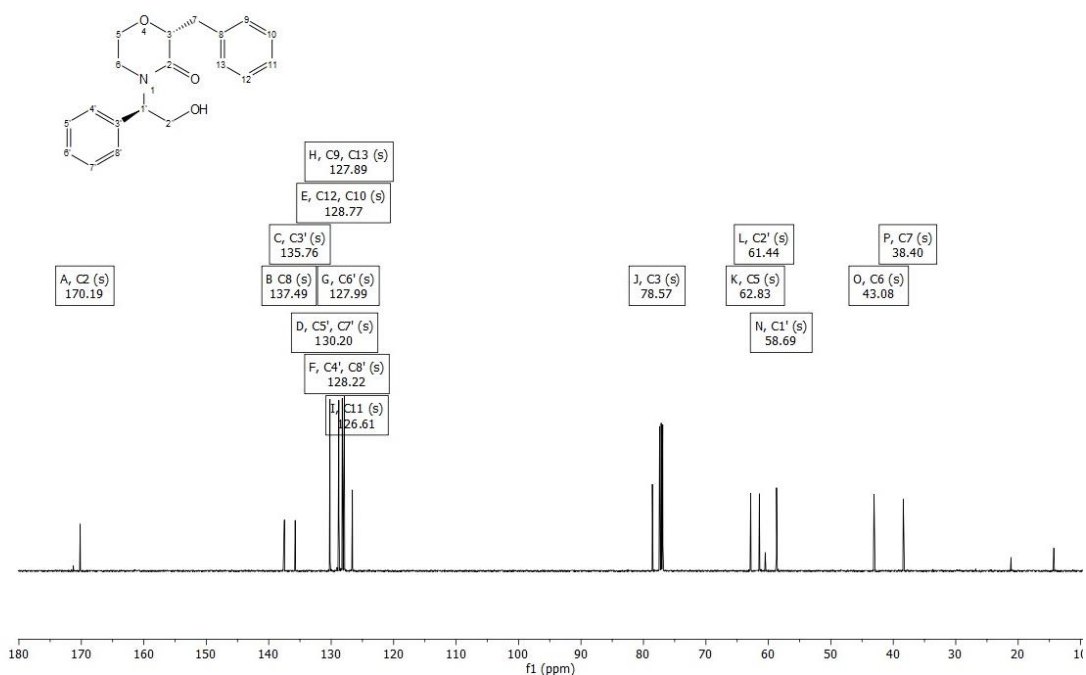


Figura 18. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) de **34b**.

Uno de los principales puntos para realizar reacciones de N-alquilación fue probar sustituyentes en distintos ambientes químicos, por lo que el último halogenuro de alquilo utilizado fue el yodo-etano, para obtener el compuesto **34c** con un rendimiento del 82 % después de 18 h. En el espectro de ¹H (Figura 19) se observa la señal de H3 como una señal **dd** que integra para un solo protón, en cuanto a las señales del grupo etilo, en 1.98 y 1.90 ppm se ven las señales que pertenecen a H7 como una señal **m** y una **dd**, finalmente a frecuencias más bajas se observa una señal **t** en 0.99 ppm que corresponde a H8 la cual integra para 3H del grupo metilo.

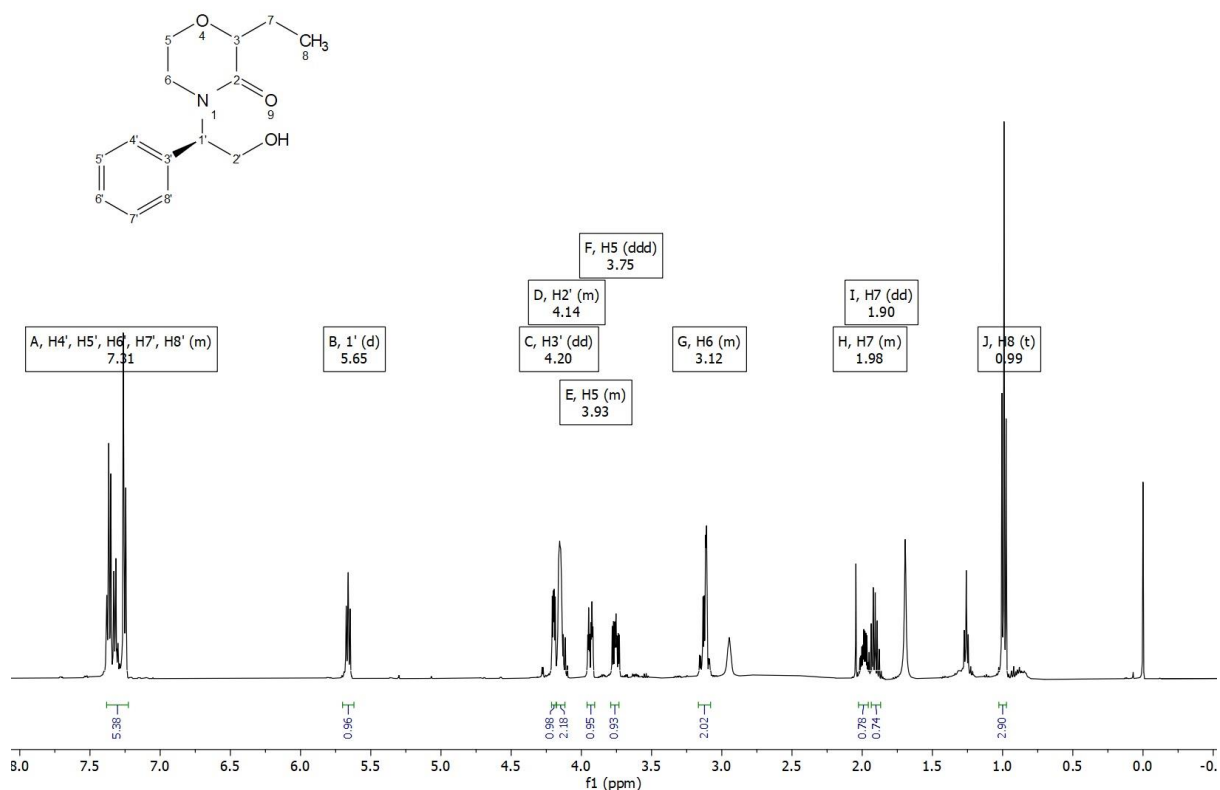


Figura 19. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **34c**.

Para el espectro de ^{13}C del compuesto **34c** (Figura 20) las señales características de la sustitución en posición 3 del anillo de morfolina por el grupo etilo las podemos ver a frecuencias bajas donde lo primero a resaltar es el cambio en cuanto de desplazamiento de H3 en cual está en 79.03 ppm, la señal de C7 en 25.68 ppm y finalmente la señal del carbono C8 en 9.48 ppm la cual se encuentra en la región de alcanos saturados.

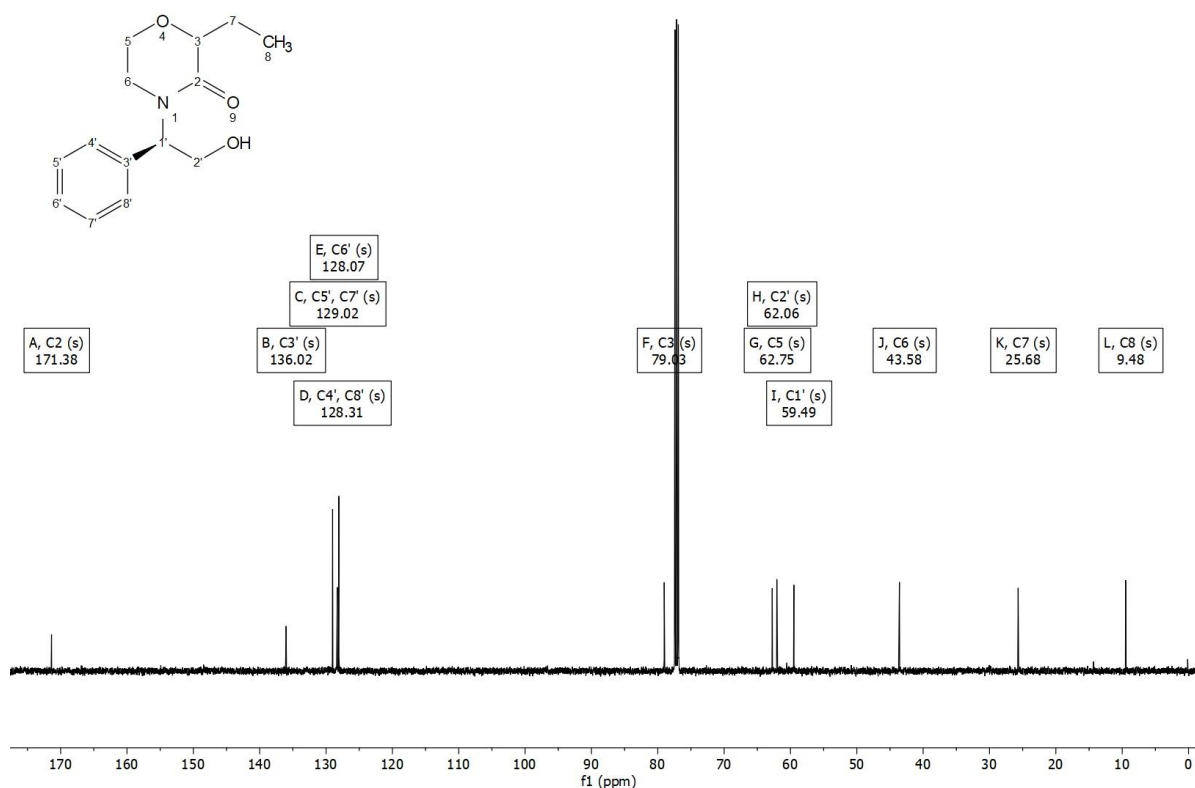


Figura 20. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **34c**.

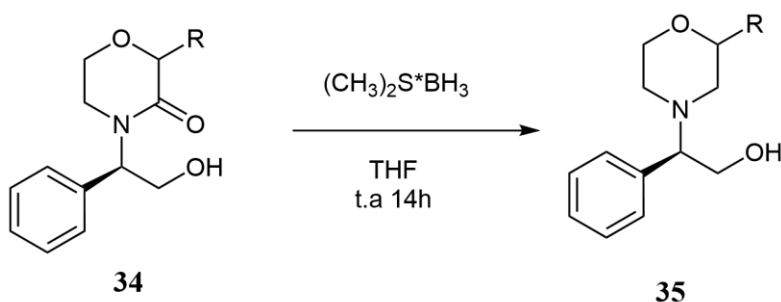
La obtención de los compuestos **34a-34c** es muy importante y la asignación de la estereoquímica es una parte fundamental al momento de formar moléculas quirales ya que la actividad biológica se encuentra ampliamente relacionada a este aspecto.

Para determinar la configuración absoluta en C-3 en las moléculas sintetizadas se midió la rotación específica en un polarímetro, para los compuestos **34b** y **34c** los cuales habían sido reportados anteriormente por Torres y colaboradores ¹², para el compuesto **34b** se obtuvo un valor de $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40.0$ (c 2.5, CHCl_3) mientras que el valor reportado en la literatura es de $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -39.6$ (c 2.5, CHCl_3) y para el compuesto **34c** un valor de $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37.9$ (c 1.0, CHCl_3) experimental, mientras que el valor de la rotación específica en la literatura fue de $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -38.5$ (c 1.0, CHCl_3).

El Dr. Torres asignó la configuración mediante la formación de un Clorhidrato del compuesto **35b** para formar cristales y asignar la configuración del nuevo centro quiral formado, por lo cual en este trabajo solo se compararon los valores de rotación específica para comprobar la estereoquímica de estos centros. Mientras que para el compuesto **34a** se asume que sigue el mismo mecanismo de reacción por lo cual asignamos de igual forma la configuración R al nuevo centro formado en esta molécula.

12.4. Reacciones de reducción de la función carbonilo para la obtención de derivados de morfolina.

Una vez obtenidos los compuestos de alquilación **34**, se buscan las condiciones para reducir el carbonilo en la posición 2 del anillo de morfolina, lo que favorece la reactividad de la posición 3; por ello, se busca eliminar este grupo mediante un reductor selectivo del carbonilo para obtener los compuestos **35**.



Esquema 7. Reacción de reducción para la obtención de los derivados de morfolina **35**.

El primer compuesto obtenido de la reducción del grupo carbonilo haciendo uso del reactivo: complejo de sulfuro de dimetilborano a temperatura ambiente durante 14 h fue el compuesto **35a** con un rendimiento de 82 %, en el espectro de ^1H (Figura 21) el primer cambio significativo que se puede observar fue la desaparición de la señal en 5.22 ppm que correspondía a la insaturación que estaba entre H8 y H9, después el cambio en el desplazamiento para la señal de H1' la cual cambio de 5.61 ppm a 3.98 ppm lo cual confirma el cambio de grupo funcional como sustituyente pues la reducción de la función amida genero una amina terciaria, las nuevas señales que se observan son las de la posición H2 presentes en 2.59 y 1.98 ppm, mientras que los protones de H7, H8 y H9 se observan como una señal múltiple que integra para 5H en 1.43 ppm.

Todas estas señales confirman la obtención del compuesto reducido en la posición H2 de **35^a**. La diferencia en la reactividad de la insaturación entre H8 y H9, comparada con la de la posición H2, no es muy diferente, por lo cual el carácter reductor del reactivo de boro no generó una diferenciación, formando, con esto, el alcano correspondiente en el sustituyente del anillo de morfolina.

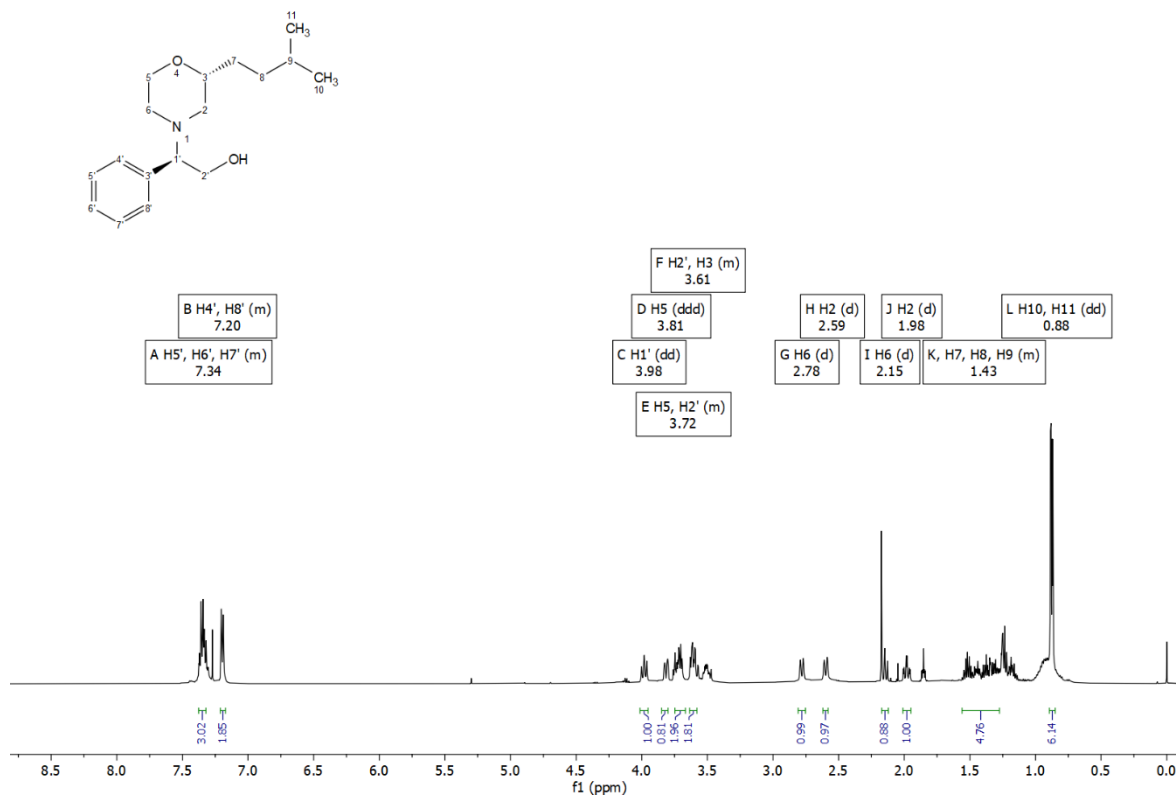


Figura 21. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **35a**.

En el espectro de ^{13}C de **35a** (Figura 22), el primer cambio significativo es que ya no se observa la señal en 171.13 ppm perteneciente al grupo carbonilo, seguido de la desaparición de las señales en 135.05 y 119.19 ppm pertenecientes a la insaturación presente en C8 y C9 de la materia prima **34^a** pero en cambio a frecuencias más bajas podemos observar las nuevas señales pertenecientes a C2 en 48.87 ppm, además de esto las señales en 31.60 y 28.19 ppm, que pertenecen a C8 y C9 en la región de compuestos saturados que muestran al compuesto alcano sustituyente del anillo de morfolina.

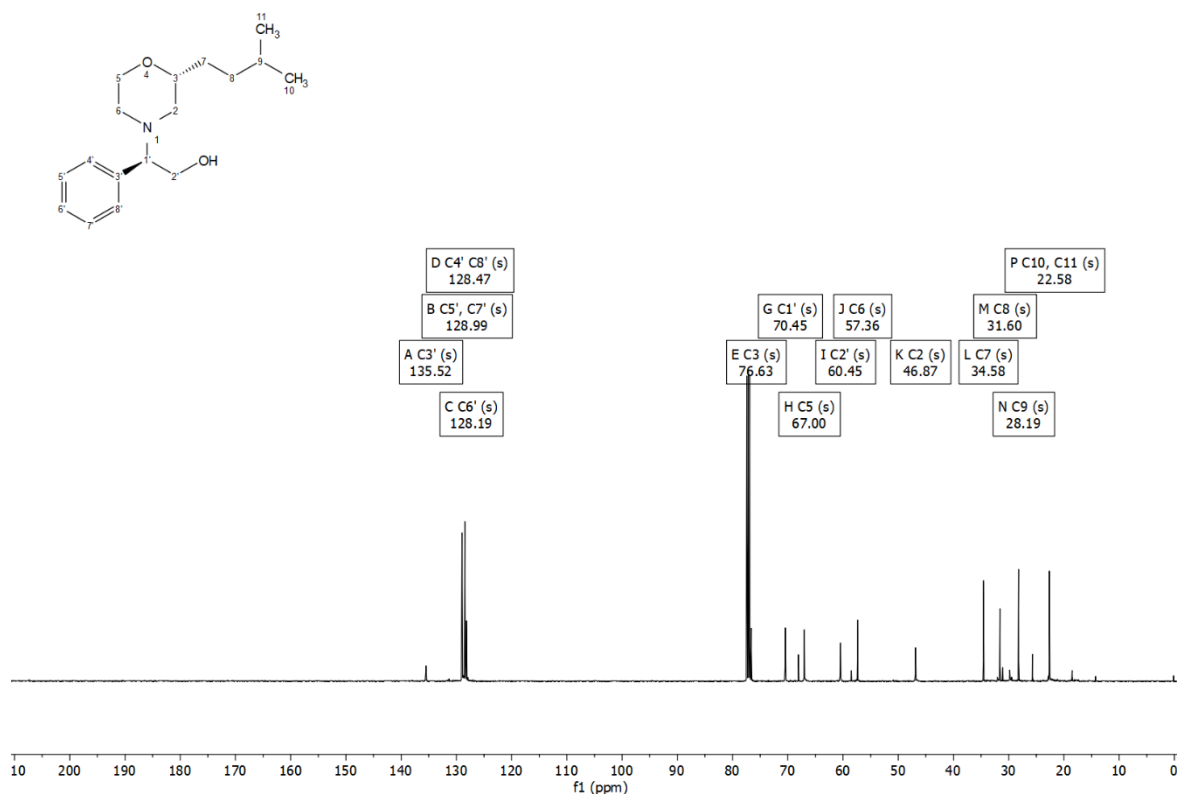


Figura 22. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **35a**

El compuesto **35b** se logró obtener en un rendimiento de 84 %, del cual se obtuvo el espectro de ^1H (Figura 23) después de la purificación, donde se pueden observar las señales representativas de la transformación sufrida por la materia prima, en 2.22 y en 2.20 ppm las cuales corresponden a H2 posición donde se ha eliminado el grupo carbonilo.

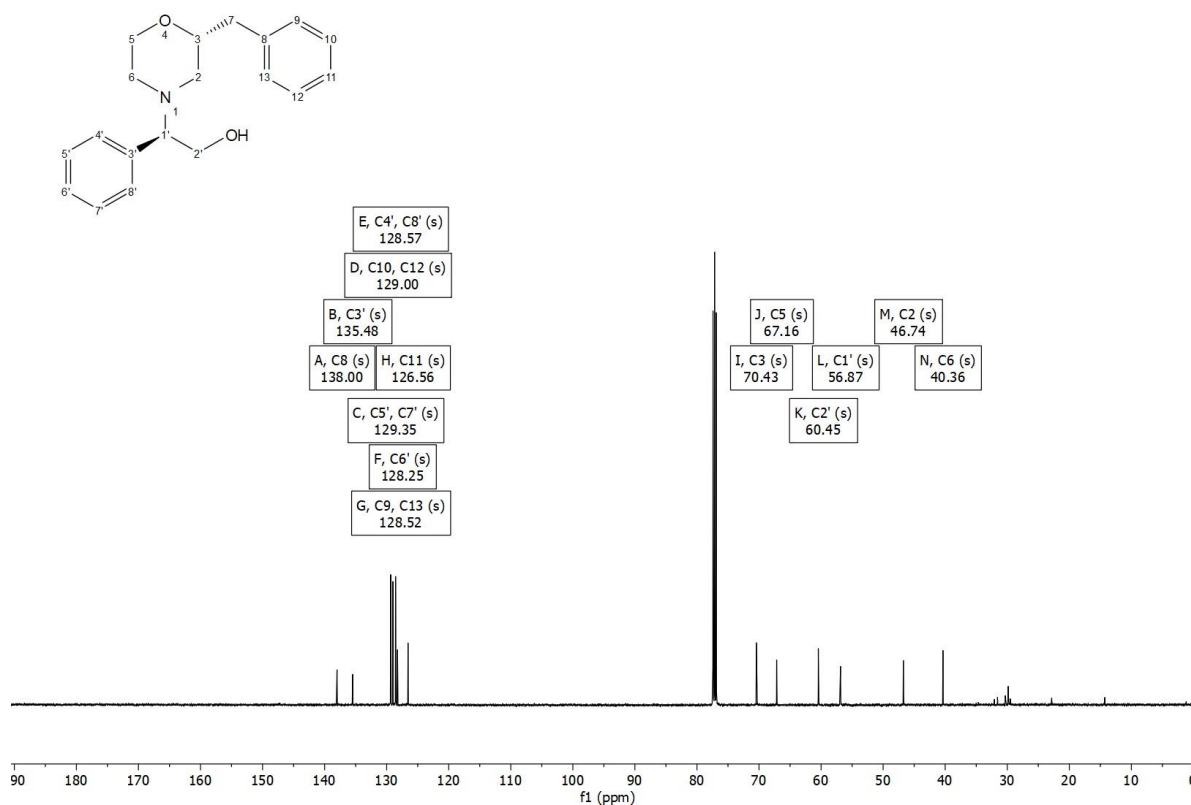


Figura 24. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **35b**.

Otro compuesto que fue tratado bajo estas condiciones fue el compuesto **34c** para la obtención del compuesto reducido **35c**, morfolina con el sustituyente etilo con un rendimiento de 70 % del cual se obtuvo el espectro de ^1H (Figura 25) después de la purificación, donde se pueden observar las señales representativas de la transformación sufrida por la materia prima, en 2.79 y en 2.12 ppm las cuales corresponden a H2 posición donde se ha eliminado el grupo carbonilo, además se esto se observa el cambio en el desplazamiento para la señal correspondiente a H1' de 5.65 ppm a 3.96 cambio que se asocia con el cambio de sustituyente amida por amina.

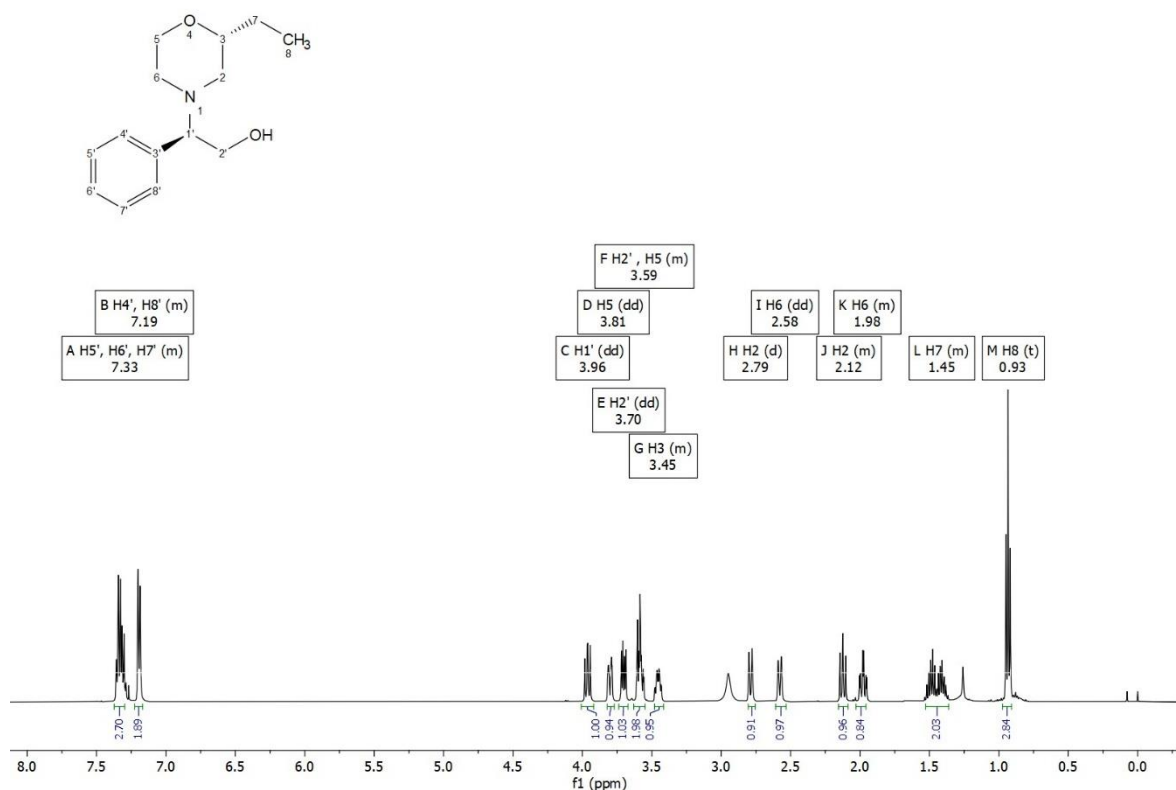


Figura 25. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **35c**.

En el espectro de ^{13}C de **35c** (Figura 26), el primer cambio significativo es que ya no se observa la señal en 171.38 ppm perteneciente al grupo carbonilo, pero en cambio a frecuencias más bajas, en 56.91 ppm, se observa una nueva señal que corresponde a C2, cercana a la señal de C6 lo que demuestra la presencia de un carbono unido a un átomo de nitrógeno de tipo amina.

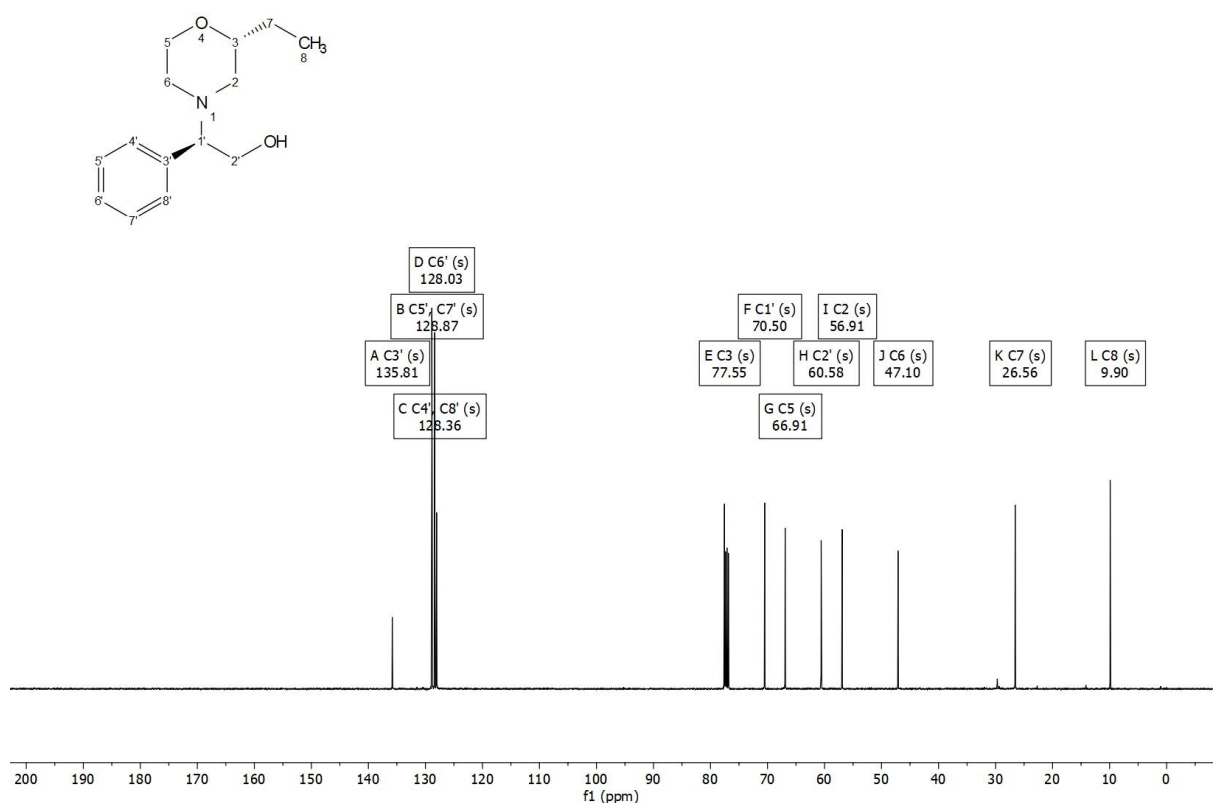
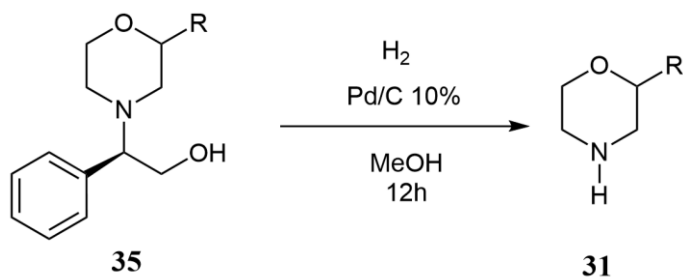


Figura 26. Espectro de RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **35c**.

12.5. Reacción de desbencilación de los compuestos **35** para la obtención de morfolinas quirales.

La síntesis de la (*R*)-2-bencilmorfolina se llevó a cabo mediante hidrogenación catalítica de la morfolina **35**, utilizando paladio/carbono en MeOH bajo atmósfera de H_2 hasta el consumo de la materia prima.



Esquema 8. Reacción de desbencilación para la obtención de morfolinas quirales **31**.

El espectro ^1H de **31b** (*R*)-2-bencilmorfolina), mostrado en (Figura 27) se observan las señales que pertenecen a los desplazamientos de H9,H10,H11,H12,H13 protones aromáticos, los desplazamientos de H5 se encuentran repartidos en 2 señales **m** a 3.87 y 3.59 ppm, mientras que la señal de H3 está en 3.66 ppm con una señal con multiplicidad triple de dobles (**td**) quedando como intermedio de las señales de H5, las señales de H6 y H2 se juntan en una señal (**m**) a frecuencias de 2.83 ppm y finalmente los protones bencílicos H7 presentan una señal (**m**) en 2.61ppm.

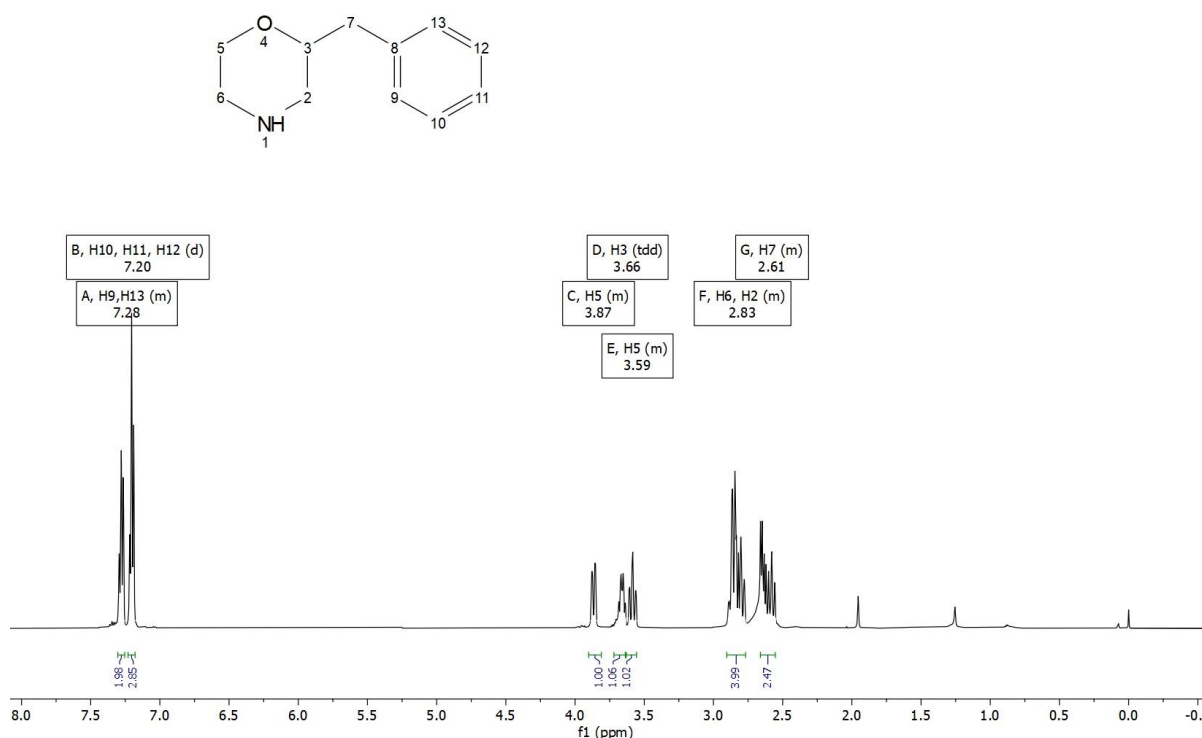


Figura 27. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **31b**.

Mientras que en el espectro de ^{13}C (Figura 28), el cambio significativo que se observa es la disminución de señales en la región de aromáticos, ya que, en lugar de 8 señales, ahora solo se observan 4: para las señales del carbono ipso y las posiciones orto, meta y para del sustituyente fenilo. En 77.56 ppm se observa la señal correspondiente a C3, seguida en 68.07 ppm de la de C5, ambas pertenecientes a carbonos con base de oxígeno. A frecuencias más bajas, 50.74 y 45.65 ppm, corresponden las bases C2 y C5 al átomo de nitrógeno, y finalmente, a 40.37 ppm, la señal de C7.

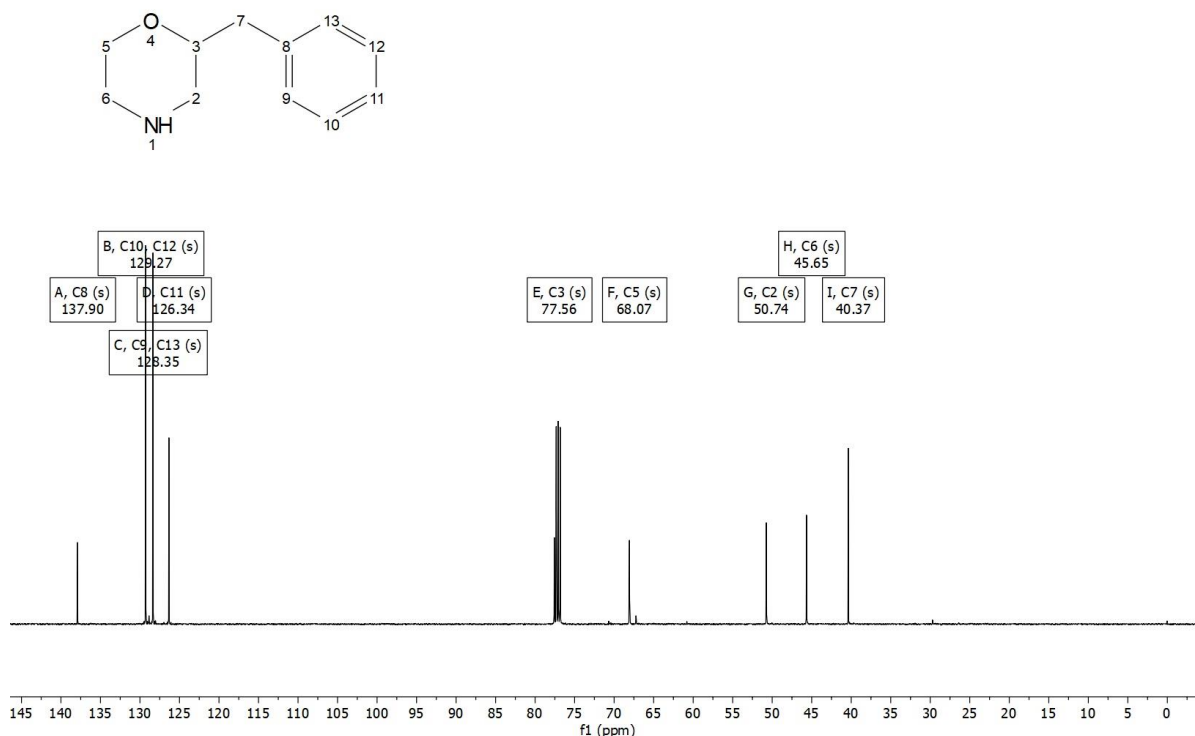


Figura 28. Espectro de RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) de **31b**.

La obtención de los compuestos objetivo en la parte sintética de este trabajo permitió seleccionar compuestos para el análisis *in silico* e *in vitro* y evaluar la posible actividad biológica con la que puedan estar relacionados.

El objetivo principal de la parte sintética era la obtención de las morfolinolas libres como aminas secundarias **31**, pero teniendo en cuenta que no son las únicas que puedan tener actividad biológica comprobable, se escogieron los compuestos 34a-34c (Figura 29) intermediarios clave en la parte sintética, los cuales se usarán para su evaluación.

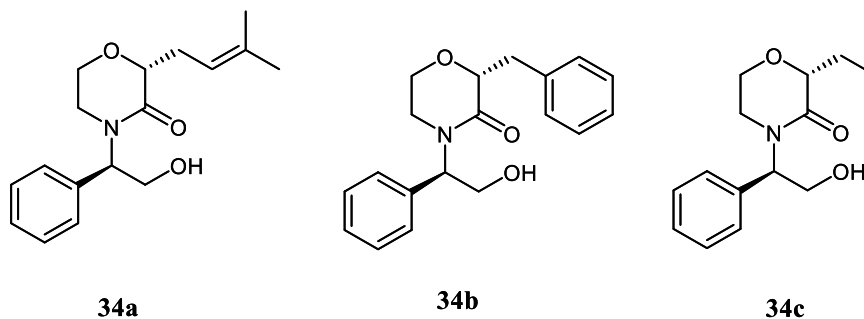


Figura 29. Estructuras a evaluar *in silico* e *in vitro*.

12.6. Análisis de la molécula 34a en el software *Swiss Target Prediction*

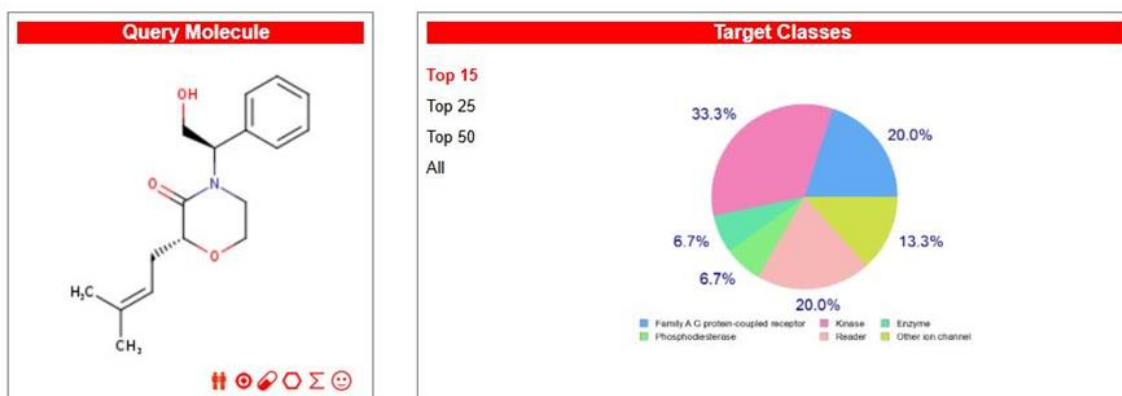


Figura 30. Estructura de consulta para predicción e informe de predicción con porcentaje de afinidad dependiente de la clase de proteína objetivo.

En el software *Swiss Target Prediction* se analiza la molécula mediante la similitud en 2D y 3D con moléculas que presentan actividad frente a dianas objetivo específicas. Por lo cual se analizaron los derivados de morfolina sintetizados a partir de la reacción de *N*-alquilación, donde la primera molécula analizada fue la 3^a, y se observó un mapa de distribución de dianas moleculares (Figura 30): el mayor porcentaje lo tienen las quinasas, con un 33.3 % de afinidad, y el segundo lugar en porcentaje lo tienen tanto los receptores acoplados a proteínas G como las proteínas de lectura de genes, con un 20 % de afinidad.

Tabla 2. Informe de Predicción de *Swiss Target Prediction* del compuesto 34^a que muestra quinasas, receptores acoplados a proteínas G y proteínas de lectura como clases de objetivos potenciales entre los 15 principales objetivos alineados.

Objetivo biológico	Nombre común	Uniprot ID	ChEMBL ID	Clase de objetivo	Función involucrada
Receptor 1 asociado a aminos traza	TAAR1	Q96RJ0	CHEMBL5857	Receptor acoplado a proteínas G	Regulación de la neurotransmisión de dopamina, noradrenalina y serotonina en el SNC.
Receptor Trk-A del factor de crecimiento.	NTRK1	P04629	CHEMBL2815	quinasa	Supervivencia y desarrollo de neuronas en el periodo embrionario
Proteína quinasa C-alfa	PRKCA	P17252	CHEMBL299	quinasa	Regulación de los procesos celulares de proliferación, apoptosis y motilidad.
Proteína quinasa activada por mitógenos de especificidad dual	MAP2K1	Q02750	CHEMBL3587	quinasa	Señalización celular para la proliferación, la diferenciación y la supervivencia.
Glucógeno fosforilasa hepática	PYGL	P06737	CHEMBL2568	enzima	Descomposición de glucógeno en glucosa-1 para mantener los niveles de azúcar en sangre.
Fosfodiesteras a 2 ^a	PDE2A	O00408	CHEMBL2652	fosfodiesterasa	Regulación de los mensajeros secundarios en el corazón, cerebro y otros tejidos.
Proteína 4 de bromodominio	BRD4	O60885	CHEMBL1163125	lectura	Bloquear la proliferación celular tumoral y la producción de citoquinas inflamatorias.
Proteína 2 de bromodominio	BRD2	P25440	CHEMBL1293289	lectura	Involucrada en la proliferación celular, inflamación
Proteína 3 de bromodominio	BRD3	Q15059	CHEMBL1795186	lectura	Regula la transcripción de genes, la miogénesis esquelética y desempeña un papel en la carcinogénesis y la infección viral.

Presenilina 1	PSEN1	P49768	CHEMBL2473	proteasa intramembrana	Fundamental para el procesamiento de proteínas como la proteína precursora amiloide (APP) y el receptor Notch
Subunidad reguladora 1 de la quinasa dependiente de ciclina CDK5R	CDK5R1 CDK5	Q15078 Q00535	CHEMBL1907600	quinasa	Fundamental para el desarrollo del sistema nervioso central, la migración neuronal y la plasticidad sináptica
Proto-oncogén tirosina-proteína quinasa Mer	MERTK	Q12866	CHEMBL5331	quinasa	Mediar la fagocitosis de las células apoptóticas (esferocitosis), regular la respuesta inmunitaria y mantener la homeostasis tisular
receptor de endotelina tipo A	EDNRA	P25101	CHEMBL252	Receptor acoplado a proteínas G	Mediando vasoconstricción potente, proliferación celular y fibrosis en células de músculo liso vascular y renal.
Preselina 2	PSEN2	P49810	CHEMBL3708	proteína integral de membrana	Fundamental para el procesamiento de proteínas como la proteína precursora amiloide (APP) y el receptor Notch
Receptor de Orexina 2	HCRT2R	O43614	CHEMBL4792	Receptores acoplados a proteínas G	Fundamental en la regulación de la vigilia, el sueño y el tono muscular

Con base en los resultados del TOP 15 de Swiss Target Prediction (Tabla 2), se observa que el compuesto 34^a presenta dianas predichas asociadas a procesos de función neuronal; lo cual sugiere (a nivel exploratorio) un posible interés en contextos neurobiológicos. No obstante, en el marco de esta tesis el análisis se interpreta principalmente por su posible relación con fenotipos oncológicos. Adicionalmente, el perfil de dianas incluye receptores acoplados a proteína G (GPCRs) y quinasas, familias proteicas que participan en rutas de señalización vinculadas con proliferación, supervivencia y progresión tumoral. En conjunto, estas predicciones aportan plausibilidad mecánica al efecto observado y permiten priorizar dianas para validación experimental, sin constituir evidencia confirmatoria de interacción directa.

12.7. Análisis de la molécula 34b en el software *Swiss Target Prediction*.

A partir del análisis *in silico*, se puede observar (Figura 31) la presencia de 4 principales grupos de proteínas como posibles targets de interacción siendo los receptores acoplados a proteínas G los que presentan un 26.7 % de interacción con la molécula analizada, mientras que en segundo lugar se encuentran las enzimas, proteasas y quinasas con 13.3 % porcentajes representativos del top 15 de los posibles objetivos biológicos.

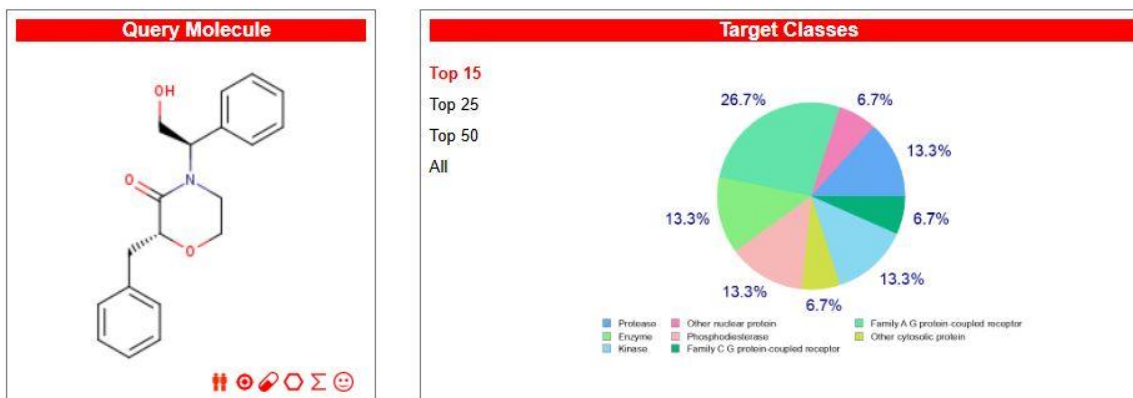


Figura 31. Estructura de consulta para predicción e informe de predicción con porcentaje de afinidad dependiente de la clase de proteína objetivo.

Tabla 3. Informe de Predicción de *Swiss Target Prediction* del compuesto 34b que muestra quinasas, receptores acoplados a proteínas G y proteínas de lectura como clases de objetivos potenciales entre los 15 principales objetivos alineados.

Objetivo biológico	Nombre común	Uniprot ID	ChEMBL ID	Clase de objetivo	Función involucrada
elastasa leucocitaria	ELANE	P08246	CHEMBL248	proteasa	Marcador clave en la inflamación y la degradación de tejido, implicado en patologías como el enfisema pulmonar, la fibrosis quística y la artritis
proteína MDM2 unida a p-53	MDM2	Q00987	CHEMBL5023	proteína nuclear	Regulador negativo del supresor tumoral p53, que se une a él para inhibir su actividad transcripcional y marcarlo para su degradación.
Glucógeno fosforilasa hepática	PYGL	P06737	CHEMBL2568	enzima	Descomposición de glucógeno en glucosa-1 para mantener los niveles de azúcar en sangre
fosfodiesterasa 2ª	PDE2A	O00408	CHEMBL2652	fosfodiesterasa	Hidroliza AMPc y GMPc, reguladores clave en procesos fisiológicos como la señalización celular y la función cardiovascular
fosfodiesterasa 10ª	PDE10A	Q9Y233	CHEMBL4409	fosfodiesterasa	Regula la señalización celular al descomponer los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc en el cerebro
Miembro C3 de la familia 1 de aldosa-ceto reductasas	AKR1C3	P42330	CHEMBL4681	enzima	Desempeña un papel crucial en el metabolismo de hormonas esteroideas y prostaglandinas
Proteína similar a la quinesina 1	KIF11	P52732	CHEMBL4581	proteína citosólica	Regulación de las respuestas al estrés térmico.
Receptor de neuroquinina 1	TACR1	P25103	CHEMBL249	receptores acoplados a proteínas G	Mediador procesos como dolor, inflamación, ansiedad y vómitos

Quinasa de proteínas serina/treonina PIM1	PIM1	P11309	CHEMBL2147	quinasas	Supervivencia, proliferación y diferenciación celular.
Receptor metabotrópico de glutamato 1	GRM1	Q13255	CHEMBL3772	receptores acoplados a proteínas G	Activa la fosfolipasa C y aumenta el calcio intracelular, modulando la plasticidad sináptica y excitabilidad neuronal
Quinasa de proteínas serina/treonina PIM2	PIM2	Q9P1W9	CHEMBL4523	quinasa	Regula el crecimiento, supervivencia y proliferación celular, actuando como un inhibidor de la apoptosis
Probable receptor acoplado a proteína G 88	GPR88	Q9GZN0	CHEMBL3399 910	receptores acoplados a proteínas G	Modulación de vías de señalización cerebral.
Factor D del complemento	CFD	P00746	CHEMBL2176 771	proteasas	Fundamental para la primera línea de defensa contra patógenos.
Receptor B1 de bradicinina	BDKRB1	P46663	CHEMBL4308	receptores acoplados a proteínas G	Moduladores de procesos metabólicos.

La información de la Tabla 3 muestra cómo la molécula analizada puede presentar interacción con proteínas asociadas a diversos procesos biológicos neuronales ayudando a la plasticidad sináptica y excitabilidad neuronal, también proteínas asociadas a procesos metabólicos, función cardiovascular, procesos de inhibición de crecimiento celular en procesos tumorales, mediar respuestas de dolor y ansiedad, siendo todas estas ventanas de oportunidad para la evaluación de la actividad farmacológica del compuesto sintetizado.

12.8. Análisis de la molécula 34c en el software *Swiss Target Prediction*

En el caso de la molécula 34c se obtuvo mediante el uso del software un mapa de distribución donde se pueden observar como grupo principal a la familia de receptores acoplados a proteínas G con un porcentaje de 26.7 %, seguido de las fosfatasa, proteasas y proteínas de lectura con un porcentaje de 13.3 % cada una, grupos más representativos para el TOP 15 de proteínas con las cuales se pueda tener interacción.

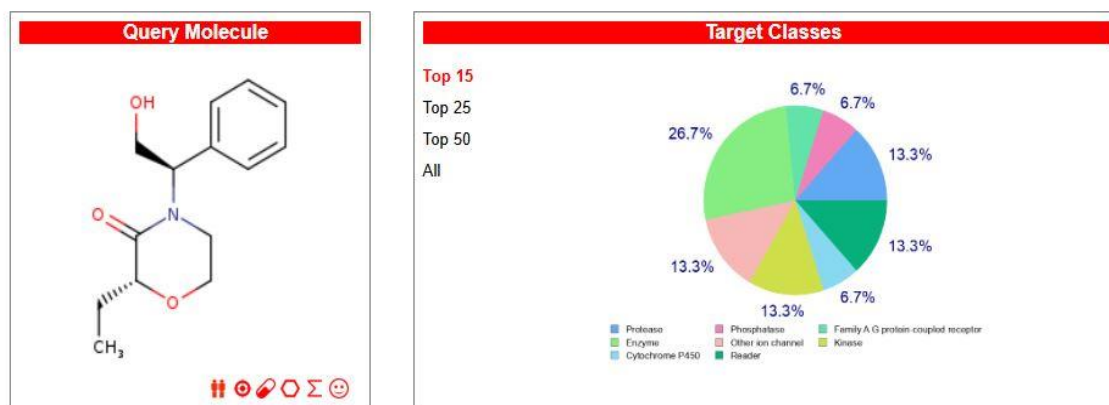


Figura 32. Estructura de consulta para predicción e informe de predicción con porcentaje de afinidad dependiente de la clase de proteína objetivo.

Tabla 4. Informe de Predicción de *Swiss Target Prediction* del compuesto **34c** que muestra enzimas, quinasas, proteínas de membrana relacionadas a canales iónicos y proteasas como principales proteínas objetivo presentadas en el top 15 de los principales objetivos alineados.

Presenilina 1	PSEN1	P49810	CHEMBL2473	proteasa intramembranal	Fundamental para el procesamiento de proteínas como la proteína precursora amiloide (APP) y el receptor Notch
Presenilina 2	PSEN2	P37059	CHEMBL3708	proteína integral de membrana	Fundamental para el procesamiento de proteínas como la proteína precursora amiloide (APP) y el receptor Notch
Estradiol 17-beta deshidrogenasa 2	HSD17B2	P37059	CHEMBL2789	enzima	Actuando como antiandrogénica y antiestrogénica, participa en el metabolismo de esteroides
Proteína quinasa C alfa	PRKCA	P17252	CHEMBL299	quinasa	Regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular
Quinasa dependiente de ciclina 9	CDK9	P50750	CHEMBL3116	quinasa	Regula la transcripción génica en lugar del ciclo celular
Citocromo P450 19 ^a 1	CYP19A1	P11511	CHEMBL1978	citocromo p450	Cataliza la conversión final de andrógenos (testosterona) en estrógenos (estradiol)
Proteína 4 que contiene dominio de bromodominio	BRD4	O60885	CHEMBL1163125	lectura	Bloquear la proliferación celular tumoral y la producción de citoquinas inflamatorias.
Proteína 2 que contiene bromodominio	BRD2	P25440	CHEMBL1293289	lectura	Involucrada en la proliferación celular, inflamación
Transketolasa	TKT	P29401	CHEMBL4983	enzima	Cataliza la transferencia reversible (fragmento de cetol) entre una cetosa y una aldosa

En la Tabla 4, se pueden observar las proteínas que tienen posible interacción con la molécula sintetizada proteínas las cuales están relacionadas a procesos de respuesta inmune, procesos inflamatorios, metabolismo de moléculas esteroideas, así como también regulación en el ciclo celular y también en respuesta al crecimiento de tumores. Por lo cual la molécula 3c puede tener como diana terapéutica el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos microbianos, tratamiento de enfermedades de tipo neurodegenerativas como Alzheimer , además de esto podemos ver que está relacionado con receptores acoplados a proteínas G y quinasas, este tipo de proteínas están relacionadas a diversos procesos celulares de regulación del crecimiento, supervivencia, permeabilidad, por lo cual alguno de estos objetivos biológicos podría relacionarse con el compuesto sintetizado y servir como tratamiento de enfermedades relacionadas a cáncer.

12.9. Ensayo MTT de viabilidad celular y citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad, lo que se hace es evaluar la actividad metabólica mitocondrial de las células sembradas en una placa de 96 pozos. Se realiza con relación a la capacidad de reducir el reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), por las enzimas deshidrogenasas mitocondriales, las cuales reducen el anillo de tetrazolio en formazan, lo que genera un cambio de coloración en células que sufran este proceso.

Al tratar primero las líneas celulares de colon, mama y pulmón con los compuestos sintetizados **34^a-c** y llevar a cabo una incubación durante 24 h, lo que se realizó fue la exposición al reactivo MTT para permitir que se lleve a cabo su reducción por las células que aún se encuentren activas. Se deja en incubación durante una hora con las condiciones de temperatura y % CO₂ señaladas en la parte experimental de esta tesis. Finalmente se realiza la lectura de las absorbancias en el lector de placas a 490 nm. Procedimiento que se sintetiza en la (tabla 5).

Tabla 5. Pasos clave para la evaluación de la viabilidad celular.

Etapa	Acción Clave	Propósito
Tratamiento	Exposición a 34a-34c por 24h	Permitir que el compuesto ejerza su efecto citotóxico o citostático.
Marcaje	Adición de MTT (1 hora)	“Revelar” cuántas células siguen respirando metabólicamente.
Lectura	Absorbancia a 490 nm	Cuantificar la intensidad del color; a mayor absorbancia, mayor viabilidad celular.

El ensayo se realizó 2 veces en dos placas distintas conservando las concentraciones y los agentes sintéticos a evaluar de las cuales se obtuvieron las absorbancias para calcular los porcentajes de viabilidad celular haciendo uso de la siguiente fórmula, donde la absorbancia es **directamente proporcional** al número de células viables.

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del control negativo}} \times 100$$

- **Control negativo (100 % de viabilidad):** células sin tratamiento.
- **Control positivo:** células tratadas con agente citotóxico conocido.

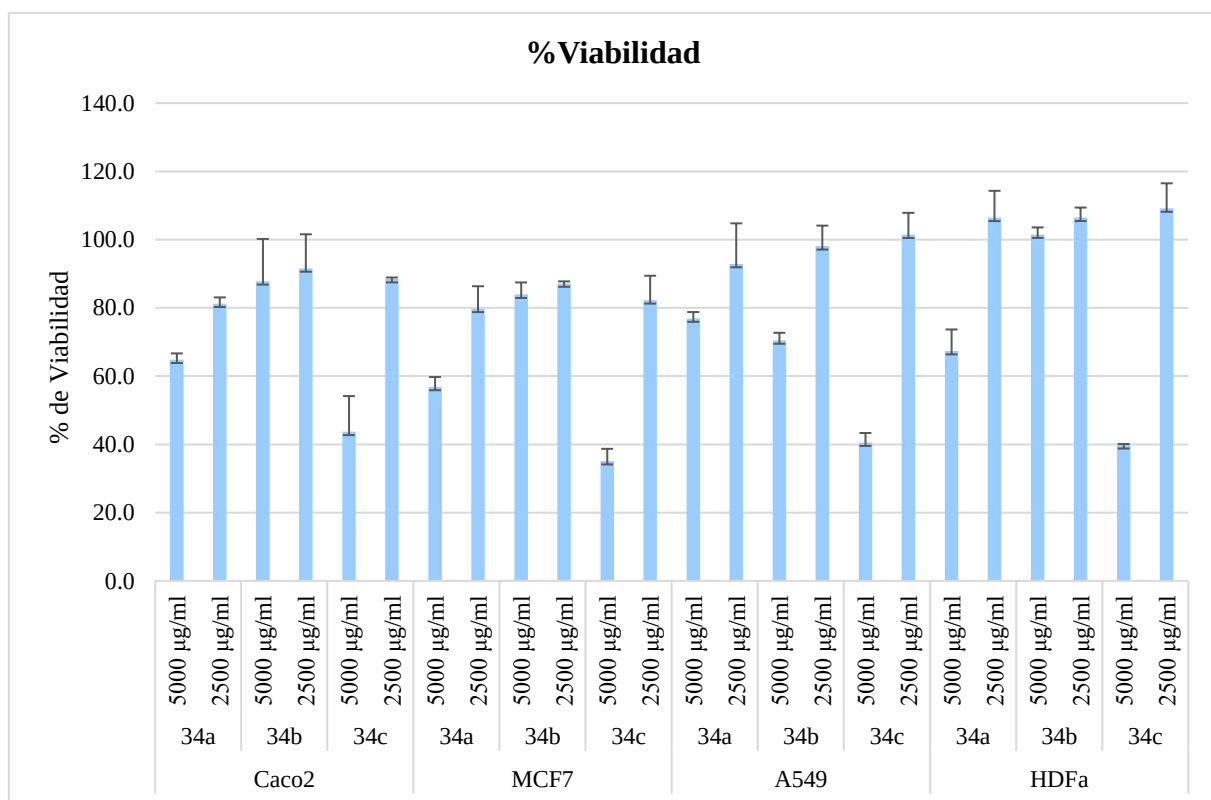
A partir de los valores de absorbancia obtenidos y el cálculo de % de viabilidad celular se obtuvieron los resultados presentados en la **Tabla 6** para posteriormente graficarlos para su análisis.

Tabla 6. Porcentajes de viabilidad obtenidos de la lectura de las 2 placas y % de viabilidad promedio obtenido de los 2 ensayos.

		Concentración	% Viabilidad		% Viabilidad Promedio	StdDV
			Placa 1	Placa 2		
Caco2	34a	5000 µg/Ml	66.1	63.6	64.8	1.8
		2500 µg/Ml	90.0	72.5	81.3	12.4
	34b	5000 µg/Ml	94.9	80.8	87.8	10.0
		2500 µg/Ml	99.0	84.2	91.6	10.4
	34c	5000 µg/Ml	44.0	43.4	43.7	0.4
		2500 µg/Ml	90.5	86.4	88.5	2.9
MCF7	34a	5000 µg/Ml	61.5	52.2	56.9	6.6
		2500 µg/Ml	82.3	77.3	79.8	3.5
	34b	5000 µg/Ml	83.5	84.3	83.9	0.6
		2500 µg/Ml	89.7	84.6	87.2	3.6
	34c	5000 µg/Ml	40.2	30.0	35.1	7.2
		2500 µg/Ml	83.6	80.9	82.2	1.9
A549	34a	5000 µg/Ml	68.5	85.3	76.9	11.9
		2500 µg/Ml	94.5	91.3	92.9	2.2
	34b	5000 µg/Ml	74.7	66.2	70.5	6.0
		2500 µg/Ml	100.0	96.1	98.1	2.8
	34c	5000 µg/Ml	36.0	45.1	40.5	6.4
		2500 µg/Ml	97.0	105.9	101.5	6.3
HDFa	34a	5000 µg/Ml	72.9	61.8	67.4	7.9
		2500 µg/Ml	105.0	107.9	106.4	2.1
	34b	5000 µg/Ml	103.6	99.4	101.5	3.0
		2500 µg/Ml	106.2	106.7	106.4	0.3

	34c	5000 µg/Ml	34.6	45.0	39.8	7.4
		2500 µg/Ml	108.0	110.3	109.1	1.6

Con el uso de los datos presentados en la **Tabla 6**, se presenta la **Gráfica 1**, donde se pueden observar los porcentajes de viabilidad a las concentraciones probadas para cada compuesto sintetizado.



Grafica 1. % de viabilidad para cada compuesto 34^a-c en concentraciones de 2500 µg/Ml y 5000 µg/Ml

Los resultados obtenidos del ensayo MTT muestran que todas las moléculas sintetizadas cuentan con inhibición de crecimiento celular en diferentes cantidades, para el grupo de la línea celular de cáncer de colon (Caco2). Los mejores resultados los presentó la molécula **34c** alcanzando un % de viabilidad de **43.7 %** a la mayor concentración de 5000 µg/Ml, seguidos del compuesto **34a** el cual a esta misma concentración presentó un % de viabilidad de **64.8 %** y finalmente el compuesto **34b** con un porcentaje de **87.8 %** a la máxima concentración.

Para el cáncer de mama de igual forma se observa que el compuesto con mejores resultados es el **34c** con **35.1 %** de viabilidad celular, seguido del compuesto **34a** con **76.9 %** y finalmente el compuesto **34b** con porcentaje de **83.9 %**, todos estos porcentajes a concentraciones máximas de 5000 µg/Ml.

En cuanto al cáncer de pulmón, la evaluación de estas 3 moléculas sintetizadas mostró porcentajes de viabilidad celular de **40.5 %** a 5000 µg/ml del compuesto **34c**, de **70.5 %** para el compuesto **34b** a esta misma concentración y finalmente de **76.9 %** para el compuesto **34a**. En este caso se puede observar cómo se invirtió la posición en cuanto a una mejor actividad citotóxica en los compuestos **34b** y **34a** para esta línea de cáncer.

Finalmente, como parte de este ensayo de actividad citotóxica, también se evaluó la interacción de las moléculas sintetizadas **34a-c** con células sanas de humano donde los resultados arrojados fueron los siguientes. El compuesto **34c** inhibió la actividad de las células sanas mostrando un porcentaje de viabilidad de únicamente **39.8 %** en concentraciones de 5000 µg/ml, mientras que a concentraciones de 2500 µg/ml no mostró efectos citotóxicos. Para el compuesto que también mostró afectaciones a las células sanas a una máxima concentración de 5000 µg/ml fue el **34a** con un porcentaje de viabilidad de **67.4 %** mientras que a concentraciones de 2500 µg/ml no mostró actividad citotóxica. Como último tenemos al compuesto **34b**, el cual ni con su máxima concentración de 5000 µg/ml muestra actividad citotóxica para células sanas de humano.

En los casos de las moléculas **34a** y **34b** no se alcanza un porcentaje de viabilidad celular inferior al 50 % ni en sus dosis más altas, por lo que podemos afirmar que presentan actividad biológica como anticancerígenos, pero la concentración máxima probada indica que no son los mejores candidatos. Mientras que en el caso del compuesto **34c**, se alcanzan valores considerables de citotoxicidad pues sus % de viabilidad rondan entre el **35.1-43.7 %** para líneas de cáncer de colon, mama y pulmón lo cual lo vuelve un candidato prometedor con ajustes en las dosis debido a que pueden presentar actividad citotóxica en células sanas a diferencia de los otros 2 compuestos sintetizados

12.10. Vinculación entre la actividad citotóxica *in vitro* y la predicción de dianas por *Swiss Target Prediction*

La evaluación de la citotoxicidad y la viabilidad celular mediante el ensayo MTT aporta evidencia funcional de que los derivados morfolínicos sintetizados afectan procesos esenciales para la supervivencia de las células tumorales. Sin embargo, el ensayo MTT por sí solo no identifica el mecanismo molecular primario responsable del efecto, ya que integra múltiples fenómenos celulares (alteraciones metabólicas, proliferación, apoptosis/necrosis y estrés celular). En este contexto, el análisis *in silico* mediante *Swiss Target Prediction* se planteó como una estrategia para generar hipótesis mecanísticas que permitieran racionalizar, al menos a nivel exploratorio, qué clases de proteínas podrían estar vinculadas con el fenotipo anticancerígeno observado y así orientar futuras validaciones experimentales.

Swiss Target Prediction predice blancos probables para moléculas pequeñas a partir de similitud 2D/3D con ligandos de actividad conocida; por ello, sus resultados deben interpretarse como posibles dianas y no como confirmación de interacción directa. Bajo este

enfoque, se analizaron los compuestos derivados de las *N*-alquilaciones (**34a–34c**), considerando el TOP 15 de objetivos alineados para *Homo sapiens*.

12.11. Perfil de dianas predicho para 34a y su posible relación con procesos oncológicos

Para el compuesto **34a**, el mapa de distribución de dianas mostró un predominio de quinasas (33.3 %) y, en segundo lugar, receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y proteínas de lectura (20 % cada uno). Este patrón es relevante porque dichas clases proteicas participan de manera central en redes de señalización asociadas a la proliferación, la supervivencia, la migración y la resistencia a fármacos en células tumorales.

Dentro del TOP 15 de objetivos propuestos para **34a**, se identificaron proteínas con funciones biológicas directamente vinculadas a fenotipos de interés en el cáncer. Por ejemplo, se predijeron quinasas como PRKCA, descrita como reguladora de procesos celulares asociados a la proliferación, la apoptosis y la motilidad, y MAP2K1, relacionada con la señalización para la proliferación, la diferenciación y la supervivencia. Asimismo, se predijo NTRK1 (Trk-A), una quinasa asociada a rutas de supervivencia celular.

De forma complementaria, *Swiss Target Prediction* sugirió proteínas de lectura epigenética del tipo bromodominio, como BRD4, BRD2 y BRD3. En particular, en el propio informe se indica para BRD4 una función asociada a “bloquear la proliferación celular tumoral y la producción de citocinas inflamatorias”, y para BRD2 una participación en proliferación celular e inflamación.

Considerando que la viabilidad/proliferación celular es precisamente el parámetro que se ve reflejado en el ensayo MTT, la presencia de quinasas y proteínas de lectura en el perfil predicho de **34a** aporta una coherencia biológica para justificar el análisis *in silico* como una primera aproximación mecanística. Por otro lado, el listado de **34a** incluye el receptor TAAR1, clasificado como GPCR, con función regulatoria de neurotransmisión (dopamina/noradrenalina/serotonina).

Aunque esta función se describe en el contexto del SNC, la presencia de GPCRs en el perfil predicho resulta relevante para la oncología, ya que en esta tesis se señala que los GPCRs pueden participar en la proliferación, la angiogénesis, la metástasis y la supervivencia tumoral, además de que un subconjunto de ellos se sobreexpresa en diversos cánceres.

En consecuencia, el componente GPCR del perfil *in silico* respalda la idea de que **34a** podría modular, directa o indirectamente, rutas celulares relacionadas con el comportamiento tumoral.

12.12. Comparación cualitativa con 34b y 34c: convergencia por clases de proteína.

En el caso de **34b**, el análisis *in silico* mostró como grupo principal a los GPCRs (26.7 %), mientras que enzimas, proteasas y quinasas presentaron porcentajes representativos (13.3 % cada una) dentro del TOP 15. Para **34c**, se reportaron como principales clases objetivo: enzimas, quinasas, proteínas de membrana relacionadas con canales iónicos y proteasas.

Aunque los tres compuestos presentan perfiles particulares, existe una convergencia por clases (quinasas/enzimas/proteasas y, en algunos casos, GPCRs), lo cual es consistente con la idea de que el efecto citotóxico observado podría surgir de la perturbación de rutas celulares centrales (señalización, control del ciclo celular, supervivencia y respuesta al estrés) más que de un único blanco aislado. Esto es especialmente importante en oncología, donde múltiples mecanismos pueden conducir al mismo desenlace fenotípico (disminución de viabilidad). En términos de diseño experimental, este resultado sugiere que la validación futura podría enfocarse primero en rutas altamente integradoras (por ejemplo, señalización mediada por quinasas y/o regulación transcripcional/epigenética) antes de intentar asignar un único target definitivo.

12.13. Consideraciones metodológicas y alcances de la interpretación

Es importante subrayar que *Swiss Target Prediction* se basa en similitud con ligandos previamente anotados; por ello, la predicción puede favorecer dianas asociadas a “quimiotipos” similares y no necesariamente reflejar la afinidad real de los compuestos sintetizados. En consecuencia, la integración de resultados MTT con predicción *in silico* debe comunicarse como una hipótesis mecanística razonable, y no como demostración de mecanismo de acción.

En este trabajo de investigación, la utilidad principal del análisis *in silico* ha sido:

- (i) Aportar plausibilidad biológica al efecto antitumoral observado;
- (ii) Identificar clases de proteínas asociadas a procesos relevantes (proliferación, apoptosis, supervivencia);
- (iii) Proponer una ruta lógica para validaciones posteriores (ensayos enzimáticos/celulares dirigidos, biomarcadores de vía, y/o estudios de docking/MD como refinamiento).

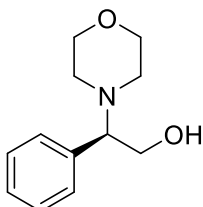
Bajo esta lógica, el puente entre la actividad anticancerígena *in vitro* y los resultados *in silico* se sustenta en que el perfil de dianas predicho para **34a–34c** incluye familias proteicas cuya función está alineada con procesos celulares que el ensayo MTT refleja de manera indirecta.

13.CONCLUSIONES

- Se estableció con éxito una ruta sintética para la obtención de derivados morfolínicos quirales confirmada mediante la caracterización de RMN de 1 y 2 dimensiones, espectrometría de masas de alta resolución y comparación de valores de rotación óptica. Los rendimientos de reacción fueron de moderados a buenos en las diferentes etapas rondando de 50-86 %.
- Los ensayos *in vitro* de viabilidad celular mediante el método MTT revelaron que los 3 compuestos sintetizados 34a-c presentan actividad citotóxica frente a las líneas celulares de cáncer evaluadas. Siendo el compuesto **34c** (sustituyente etilo) el que exhibió la mayor potencia citotóxica con porcentajes de viabilidad de **35.1 %** en cáncer de colon, **43.7 %** en cáncer de mama y **40.5 %** en cáncer de pulmón a una concentración de 5000 µg/mL, alcanzando umbrales por debajo del 50 % de viabilidad en las 3 líneas cancerosas evaluadas.
- El compuesto **34b** mostró una ventaja significativa en cuanto a selectividad, al no exhibir toxicidad sobre células sanas incluso a concentraciones máximas de 5000 µg/mL, a diferencia del compuesto **34c** que a esta concentración sí mostró una citotoxicidad conservando únicamente un **39.8 %** de viabilidad celular.
- El análisis *in silico* mediante Swiss Target Prediction para los compuestos 34a-34c reveló perfiles de dianas moleculares que incluyen, de manera consistente, quinasas (PIM1, PIM2, MAP2KI, NTRK1), receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y proteínas de lectura epigenética (BRD2, BRD3, BRD4). La presencia de estas dianas se vincula a la participación de procesos de regulación, proliferación, supervivencia, diferenciación y apoptosis celular.
- La convergencia de los resultados del ensayo MTT y el perfil de dianas terapéuticas predicho por Swiss Target Prediction sustenta la hipótesis de que los derivados morfolínicos sintetizados ejercen un efecto citotóxico a líneas cancerosas mediante diferentes mecanismos biológicos.

14. SECCIÓN EXPERIMENTAL

14.1. Síntesis de (*R*)-2-morfolino-2-feniletan-1-ol (**32**)



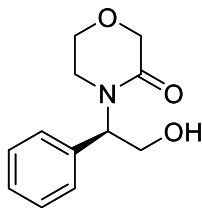
En un matraz de bola de 250 mL se colocaron 0.50 g (3.64 mmol, 1.0 eq) de (*R*)-(-)-2-fenilglicinol con 20 mL de etanol. El matraz se puso en agitación para adicionar 2.73 g (19.80 mmol, 5.5 eq.) de K_2CO_3 . En un matraz Erlenmeyer, se colocaron 1.85 g (7.28 mmol, 2.0 eq.) de bis-(2-bromoetil) éter disueltos en 20 mL de etanol. Un 50 % del bis-(2-bromoetil) éter disuelto se agregó gota a gota al matraz de reacción y se mantuvo a reflujo durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se adicionó gota a gota el volumen restante de la solución de bis-(2-bromoetil) éter y se mantuvo bajo reflujo durante 48 horas. La reacción se enfrió y se filtró para eliminar el K_2CO_3 remanente, se secó sobre Na_2SO_4 y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía de columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y un sistema AcOEt; MeOH 95:05 como fase móvil para obtener 0.649 g (86%) de (*R*)-2-morfolino-2-feniletan-1-ol (**32**), como un aceite amarillo, con $r. f = 0.476$. $[\alpha]_D^{20} = -31.2$ (c 1.0, $CHCl_3$), {lit.1 $[\alpha]_D^{20} = -31.7$ (c 1.05, $CHCl_3$)}

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ H 7.35 (m, 3H), 7.21 (m, 2H), 3.97 (dd, $J = 10.9, 8.7$ Hz, 1H), 3.71 (m, 5H), 3.60 (dd, $J = 8.7, 5.2$ Hz, 1H), 2.57 (ddd, $J = 11.1, 5.8, 3.6$ Hz, 2H), 2.39 (dd, $J = 10.9, 5.5$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ C 135.9, 128.9, 128.5, 128.2, 70.7, 67.4, 60.7, 50.0.

$C_{12}H_{18}NO_2$ $[M + H]^+$ 176.1075; encontrado 176.1070.

14.2. Síntesis de (R)-4-(2-hidroxi-1-feniletíl) morfolin-3-ona (33)



En un matraz bola de 250 mL se pesó (R)- 2-morfolino-2-feniletan-1-ol 0.5 g (2.25 mmol, 1.0 eq.). Se colocó una barra magnética y se disolvió la materia prima con ácido acético al 80 % (8.16 mL de AcOH y 2.04 mL de H₂O). La solución se colocó en agitación en un baño de hielo a 0°C.

En un matraz Erlenmeyer se preparó una solución de Br₂ 0.39 mL (7.20 mmol, 3.20 eq.) en 10 mL de AcOH para adicionarla al matraz a 0°C con ayuda de un embudo de adición. La mezcla se dejó en agitación durante 20 minutos y después se agregaron 25 mL de H₂O dejando la reacción en agitación a esta temperatura por 3 horas.

Posteriormente, la reacción se trató con una solución de NaOH 0.5 M y se calentó a 90°C por 2 horas, pasado este tiempo, se ajustó el pH a 6.0. La solución acuosa se lavó con solución saturada de NaCl (Brine) y se realizaron 3 extracciones con CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y después de filtrarla, el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purificó mediante cromatografía de columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y un sistema AcOEt: MeOH 95:05 con un R_f: 0.45 para obtener el compuesto (R)-4-(2-hidroxi-1-feniletíl) morfolin-3-ona (**33**), sólido blanco en un rendimiento de **86 %** (0.422 g), [α]_D²⁰ = -90.11 (c 1.0, CHCl₃), {lit. [α]_D²⁰ = -87.5 (c 1.0, CHCl₃)}

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ H 7.32 (m, 5H), 5.68 (t, *J*=6.9 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 4.0 Hz, 2H), 4.16 (d, *J*= 6.9 Hz, 2H), 3.85 (ddd, *J*= 12.0, 6.3, 3.8, 1H), 3.79 (ddd, *J*= 11.9, 6.3, 3.8 1H), 3.31(ddd, *J*= 12.2, 6.3, 3.8, 1H), 3.06 (ddd, *J*= 12.1, 6.3, 3.8, 1H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ C 168.4, 135.9, 129.1, 128.4, 128.0, 68.4, 64.1, 61.9, 59.4, 42.9.

C₁₂H₁₆NO₃ [M + H]⁺ 221.1085; encontrado 222.1079.

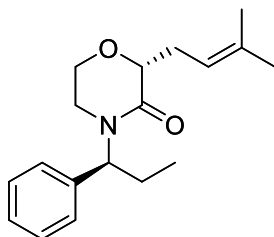
14.3. Procedimiento general para reacciones de α -alquilación

En un matraz bola de 100 mL, se pesaron 0.5 g (2.16 mmol, 1.0 eq.) de **(R) -4- (2-hidroxi-1-feniletil) morfolin-3-ona (33)**. El matraz se purgó con una atmósfera de N₂ para luego adicionar 10 mL de THF anhidro. Paralelamente, en un matraz 250 mL, se colocó una barra de agitación y tapón, se purgó también con una atmósfera de N₂, a este matraz se adicionaron 20 mL de THF anhidro para enfriarlo a -78°C y se mantuvo en agitación a esta temperatura, se añadió diisopropilamina 1.1 mL (7.91 mmol, 3.6 eq) seguido de la adición gota a gota de n-BuLi 2.5 N en hexano 3.62 mL (9.06 mmol, 4.0 eq.). La mezcla se dejó en agitación durante 30 min.

Con ayuda de una aguja larga, la solución de (R) -4- (2-hidroxi-1-feniletil) morfolin-3-ona se transfirió gota a gota al matraz a -78°C. Después de la adición, el matraz se mantuvo en agitación durante 45 minutos a esta misma temperatura. Como paso final, se añadió el halogenuro de alquilo (5.88 mmol, 2.6 eq.) y la reacción se dejó proceder hasta el consumo total de la materia prima.

La reacción se detiene mediante la adición de una solución de NH₄Cl gota a gota, después el matraz se dejó atemperar para realizar 3 extracciones con AcOEt. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida.

14.4. Caracterización de compuestos de alquilación.



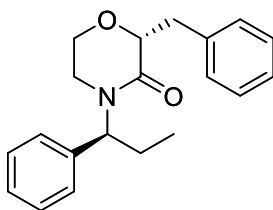
(R)-4-((R)-2-hidroxi-1-feniletil)-2-(3-metilbut-2-en-1-il) morfolin-3-ona (34a).

El compuesto se purificó en un sistema AcOEt: Bencina 9:1 con un r. f= 0.55 donde se obtuvo un aceite amarillo en un rendimiento de 50 % (0.332 g), $[\alpha]_D^{20} = -27.2$ (c 1.0, CHCl₃),

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.31 (m, 5H), 5.61 (dd, $J=8.2, 5.6$ Hz, 1H), 5.22 (m, 1H) 4.29 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 4.15 (m, 2H), 3.95 (ddd, $J= 12.0, 4.4, 2.4$ Hz 1H), 3.74 (ddt, $J=13.4, 10.2, 2.0, 2.0$ Hz, 1H), 3.15(m, 1H), 2.63 (d, $J= 6.8$ Hz, 2H), 1.73 (s, 3H), 1.66 (s, 3H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δC 171.1, 136.1, 135.0, 129.0, 128.3, 128.0, 119.2, 78.3, 62.9, 62.0, 59.7, 43.6, 31.4, 26.1, 18.2.

$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 289.1678; encontrado 289.1675.



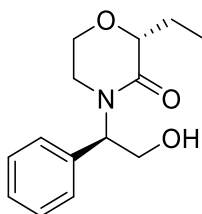
(R)-2-bencil-4-((R)-2-hidroxi-1-feniletil) morfolin-3-ona (34b).

El compuesto se purificó en un sistema AcOEt: Bencina 9:1 con un r. f= 0.42 donde se obtuvo un aceite amarillo en un rendimiento de 90 % (0.633), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40.0$ (c 2.5, CHCl_3), {lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -39.6$ (c 2.5, CHCl_3)}

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δH 7.27 (m, 8H), 6.95 (dd, $J = 6.7, 2.9$ Hz, 2H), 5.60 (dd, $J = 8.9, 5.0$ Hz, 1H), 4.51 (dd, $J = 6.5, 3.7$ Hz, 1H), 4.08 (m, 2H), 3.86 (dt, $J = 12.0, 3.4, 3.4$ Hz, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.25 (dd, $J = 14.3, 3.7$ Hz, 1H), 3.16 (dd, $J = 14.1, 6.4$ Hz, 1H), 2.97 (dt, $J = 12.4, 2.8, 2.8$, 1H), 2.87 (td, $J = 12.0, 11.3, 4.1$, 1H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δC 170.2, 137.5, 135.8, 130.2, 128.8, 128.2, 128.0, 127.9, 126.6, 78.6, 62.8, 61.4, 58.7, 43.1, 38.4.

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 280.1338; encontrado 280.1339.



(R)-2-etil-4-((R)-2-hidroxi-1-feniletil) morfolin-3-ona (34c).

El compuesto se purificó en un sistema AcOEt: Bencina 9:1 con un r.f = 0.46 donde se obtuvo un aceite amarillo con un rendimiento de 82 % (0.458), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37.9$ (c 1.0, CHCl_3), {lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -38.5$ (c 1.0, CHCl_3)}

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δH 7.31(m, 5H), 5.65 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H), 4.20 (dd, $J = 6.9, 3.8$ Hz, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.93(m,1H), 3.75(ddd, $J = 11.8, 9.1, 4.3$ Hz, 1H), 3.12 (m, 2H), 1.98 (m, 1H), 1.90 (dd, $J = 14.2, 7.1$ Hz, 1H), 1.0 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 136.0, 129.0, 128.3, 128.1, 79.0, 62.7, 59.5, 43.6, 25.7, 9.5.

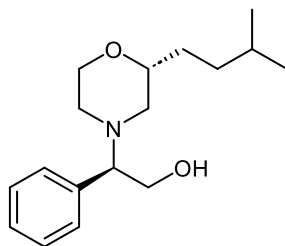
14.5. Procedimiento general para la reducción de los productos alquilados.

En un matraz de bola de 50 mL se pesó 0.1 g de **(R)-2-bencil-4-((R)-2-hidroxi-1-feniletíl) morfolin-3-ona** junto con una barra de agitación; el matraz se purgó con una atmósfera inerte de N_2 .

Posteriormente se adicionaron 10 mL de THF anhidro al matraz y se colocó en agitación a 0°C en un baño de hielo. Se añadieron 0.12 mL (4 eq.) de BMS gota a gota y la reacción se mantuvo a esta temperatura durante 10 min. Transcurrido este tiempo, el matraz se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 14 h.

Finalizado el periodo de reacción, la mezcla se enfrió a 0°C y se neutralizó adicionando 2 mL de MeOH al matraz, a continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida.

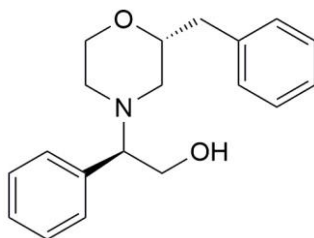
El crudo de reacción obtenido se purificó mediante cromatografía de columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y un sistema AcOEt: bencina 1:1 como eluyente con un R_f : 0.51 para obtener el compuesto.



(R)-2-((R)-2-isopentilmorpholin)-2-phenyletan-1-ol, aceite amarillo en un rendimiento del 70 % (0.355 g).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.32 (m, 4H), 7.22 – 7.17 (m, 2H), 3.98 (dd, J = 10.9, 9.1 Hz, 1H), 3.81 (ddd, J = 11.3, 3.2, 1.7 Hz, 1H), 3.77 – 3.68 (m, 1H), 3.64 – 3.57 (m, 2H), 2.78 (d, J = 11.2 Hz, 1H), 2.59 (d, J = 2.2 Hz, 0H), 2.15 (d, J = 1.2 Hz, 0H), 1.98 (d, J = 3.2 Hz, 0H), 1.56 – 1.28 (m, 1H), 0.88 (dd, J = 6.6, 2.7 Hz, 6H).

^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 135.52, 128.99, 128.47, 128.19, 76.63, 70.45, 67.00, 60.45, 57.36, 46.87, 34.58, 31.60, 28.19, 22.58.

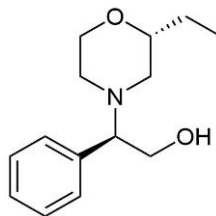


(R)-2-((R)-2-bencilmorfolin)-2-feniletan-1-ol 35b, aceite amarillo, con un rendimiento de **84 %** (0.079 g), $[\alpha]^{D_{20}} = -81.0$ (4.0, CHCl_3), {lit. $[\alpha]^{D_{20}} = -81.8$ (c 4.0, CHCl_3)}.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.33 (m, 5H), 7.19 (m, 5H), 3.95 (dd, $J = 10.8, 9.2$ Hz, 1H), 3.81 (m, 2H), 3.66 (dd, $J = 10.8, 5.1$ Hz, 1H), 3.58 (m, 2H), 2.84 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 2.74 (dt, $J = 11.2, 9.8$ Hz, 1H), 2.61 (m, 2H), 2.22 (dd, $J = 11.2, 9.8$ Hz, 1H), 2.00 (td, $J = 11.4, 11.4, 3.2$ Hz, 1H)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 138.0, 135.5, 129.3, 129.0, 128.6, 128.5, 128.5, 128.2, 126.5, 70.4, 67.2, 60.5, 58.9, 46.7, 40.4.

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 289.1678; encontrado 289.1675



(R)-2-((R)-2-etilmorfolin)-2-feniletan-1-ol (35c) aceite amarillo con un rendimiento del **80 %** (0.377 g).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.33 (m, 3H), 7.19 (m, 2H), 3.96 (dd, $J = 10.9, 8.8$ Hz, 1H), 3.81 (dd, $J = 3.3, 1.8$ Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 11.0, 5.2$ Hz, 1H), 3.59 (m, 2H), 3.45 (m, 1H), 2.79 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 2.58 (dd, $J = 11.5, 2.1$ Hz, 1H), 2.12 (m, 1H), 1.98 (m, 1H), 1.45 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 135.8, 128.9, 128.4, 128.0, 77.5, 70.5, 66.9, 60.6, 59.9, 47.1, 26.6, 9.9

14.6. Procedimiento General para las reacciones de desbencilación

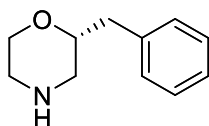
En un matraz bola de 50 mL, se pesaron 0.003 g (0.1 eq) de paladio sobre carbono. Se añadió una barra de agitación y se selló el matraz para la posterior activación del catalizador mediante el calentamiento. Tras la activación, el sistema se purgó con una atmósfera inerte de N₂ y se agregaron 5 mL de metanol.

Simultáneamente, en otro matraz de 50 mL, se pesaron 0.065 g del compuesto **35**. El matraz se purgó con una atmósfera de N₂ y se añadieron 5 mL de MeOH para disolver completamente la materia prima.

Se transfirió la solución de la materia prima al matraz que contenía el catalizador activado. El sistema de reacción se selló y acondicionó una atmósfera de hidrógeno H₂ y vapores de ácido clorhídrico. Finalmente, el matraz se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente durante 12 horas.

Una vez finalizado el tiempo de reacción, el crudo se filtró a través de un sistema compuesto por un matraz Kitasato y un embudo que contenía un lecho filtrante de algodón y Celita. El filtrado resultante se concentró a presión reducida.

El crudo de reacción obtenido se purificó mediante cromatografía de columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y un sistema AcOEt: MeOH 1:1 como eluyente con un R_f: 0.51 para obtener el compuesto.



2-benzilmorfolina 31b, aceite amarillo, con un rendimiento de **78 %** (0.030 g), {lit. [α]_D²⁵ = +1.31 (c 5.0, CHCl₃)}

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ H 7.28(m, 2H), 7.20 (d, J= 7.5 Hz, 3H), 3.87 (m, 1H), 3.66 (tdd, J=8.4, 8.4, 4.20, 1.7 Hz, 1H), 3.59 (m, 1H), 2.83 (m, 4H), 2.61 (m, 2H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ C 137.9, 129.3, 128.3, 126.4, 77.6, 68.1, 50.8, 45.6, 40.4.

14.7. Procedimiento para el bioensayo de viabilidad celular para líneas de cáncer:

1. A partir de una caja, obtenida del descongelamiento de un vial de la línea celular correspondiente: Líneas celulares: Caco-2 (ATCC[®]HTB-37), MCF-7 (ATCC[®]HTB-22), HDFa (ATCC[®] PCS-201-012) y A549 (CCL-185). Las líneas se crecen con medio DMEM-F12 y con suero bovino fetal (SBF) al 10 % y antibiótico/antimicótico al 1%. Cuando llegue del 70-100 % de confluencia, preparar una suspensión de células de acuerdo al procedimiento estándar para tripsinizar. Hacer el conteo celular con cámara de Neubauer.
2. Ajustar la concentración de células a 2.5×10^4 células/ml utilizando medio DMEM-F12 y con suero bovino fetal (SBF) al 10 % y antibiótico/antimicótico al 1%.
3. Asegurarse de colocar al menos 3 pozos con 100 µl de medio (sin células), esto como control de background.
4. Llenar el resto de las líneas B-H, todos los pozos de 100 µl de suspensión de células de las 4 diferentes líneas celulares.
5. Incubar por 24 horas en incubadora a 37°C y con 5 % de CO₂.
6. Para la inoculación de los compuestos se prepararon las siguientes concentraciones de los compuestos:
 - A compuestos alquilados de dimetilalilo, bencilo y etilo se les agregó a cada uno 5 ml de medio DMEM y se filtró en 0.22 micras, para posteriormente preparar las diluciones de 10,000 y 5000 µg/mL (se hace el doble de la concentración a cargar en la placa, ya que al colocar en la placa los 100 µl de la dilución, que fueron colocadas en 100 µl de suspensión de células, se diluye y queda a la mitad de su concentración, es decir 5000 y 2500 µg/ml).
7. Registrar las concentraciones en el orden mostrado en la siguiente placa

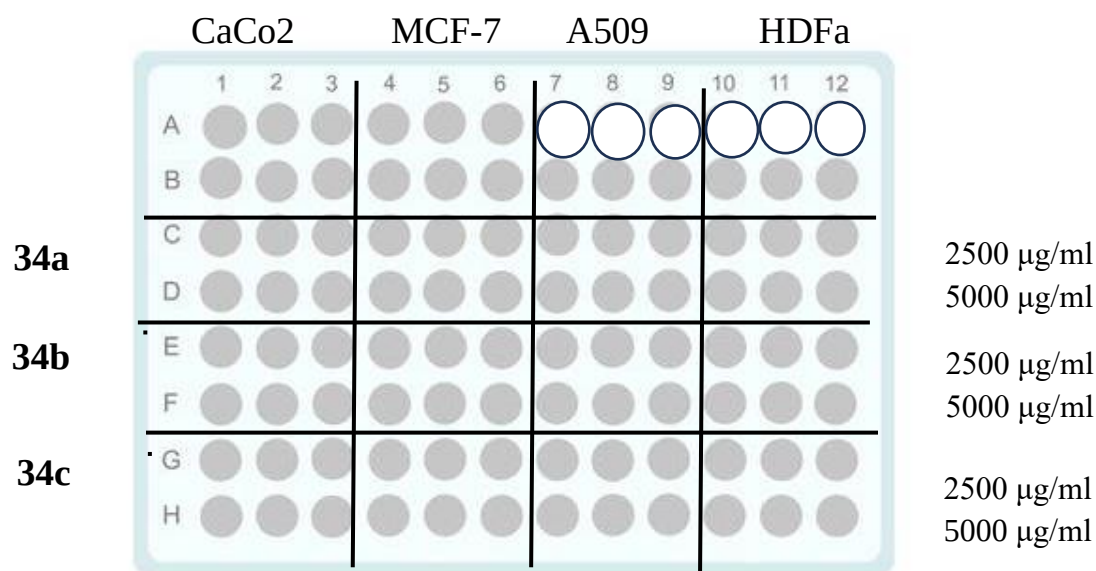


Figura 33. Orden de células en este experimento. Placas de 96 pozos cultivadas con líneas celulares.

8. Programar las líneas que deberán ser utilizadas como testigos positivos (agregar 100 µl de medio solo en los pozos de células, serían todos los pozos de la línea B, los cuales contienen células a las que no se agregarán compuestos) y negativas (agregar 100 µl de medio solo en los primeros 6 pozos de la línea A en la Figura 1, estos no contendrán células).
9. Inocular los compuestos diluidos, agregando 100 µl de cada uno a 3 pozos contiguos (triplicados) con las concentraciones señaladas.
10. Incubar por 24 horas en incubadora con 5 % de CO₂ y 37°C.
11. Pasadas las 24 horas, descongelar y atemperar a 37°C la solución de CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA).
12. Agregar 20 µl de la solución de Cell Titer 96® a cada uno de los 96 pozos.
13. Incubar 1 hora en la incubadora con 5 % CO₂ y 37 °C.
14. Después de la hora, leer la absorbancia a 490 nm con el lector de microplacas BioTek Cytation 5 imaging reader.
15. Exportar los datos obtenidos para después restar el efecto de los controles de color (490D), para posteriormente analizarlos.

15. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hossain, M., Habib, I., Singha, K., & Kumar, A. FDA-approved heterocyclic molecules for cancer treatment: Synthesis, dosage, mechanism of action and their adverse effect. *Heliyon*. **2024**, 10 (1), 1-48 <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23172>
- [2] Kabir, E., & Uzzaman, M. A review on biological and medicinal impact of heterocyclic compounds. *Results in Chemistry*. **2022**, 4, 1-10 <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100606>
- [3] Kerru, N., Gummidi, L., Maddila, S., Gangu, K. K., & Jonnalagadda, S. B. (2020). A review on recent advances in nitrogen-containing molecules and their biological applications. *Molecules*. **2020**, 25 (8), 1-42. <https://doi.org/10.3390/molecules25081909>
- [4] Kumari, A., & Singh, R. K. (2020). Morpholine as ubiquitous pharmacophore in medicinal chemistry: Deep insight into the structure-activity relationship (SAR). In *Bioorganic Chemistry*. **2020**, 96, 1-33. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103578>
- [5] Arshad, F., Khan, M. F., Akhtar, W., Alam, M. M., Nainwal, L. M., Kaushik, S. K., Akhter, M., Parvez, S., Hasan, S. M., & Shaquiquzzaman, M. Revealing quinquennial anticancer journey of morpholine: A SAR based review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2019**, 167, 324-356 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.015>
- [6] World Health Organization. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services; **2024**. <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing-amidst-mounting-need-for-services>
- [7] Zhang, M., Liu, C., Tu, J., Tang, M., Ashrafizadeh, M., Nabavi, N., Sethi, G., Zhao, P., & Liu, S. Advances in cancer immunotherapy: historical perspectives, current developments, and future directions. In *Molecular Cancer*. **2025**, 24(1), 1-48. <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02305-x>
- [8] Senga, S. S.; Grose, R. P. Hallmarks of cancer: the new testament. *Open Biology* **2021**, 11 (1), 200358. <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>.
- [9] Palchykov, V. A., & Chebanov, V. A. Recent progress in the synthesis of morpholines. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. **2019**, 55(4-5), 324-332. <https://doi.org/10.1007/s10593-019-02461-1>
- [10] Huang, Z., Du, Y., Li, X., Feng, Z., Sun, X., Ma, X., & Ma, M. A rapid enantioseparation system of capillary electrochromatography modified by electrostatic adsorption with transfersomes. *Chirality*. **2020**, 32(1), 98-106. <https://doi.org/10.1002/chir.23145>

- [11] Diaz-Muñoz, G., Miranda, I. L., Sartori, S. K., de Rezende, D. C., & Alves Nogueira Diaz, M. Use of chiral auxiliaries in the asymmetric synthesis of biologically active compounds: A review. *Chirality*. **2019**, 31(10), 776–812. <https://doi.org/10.1002/chir.23103>
- [12] Torres, S., Velasco, M., Gallegos-Rojas, J. Á., Bernès, S., Orea, M. L., Terán, J. L., Huelgas, G., Gómez-Calvario, V., & Juárez, J. R). A Concise Stereoselective Synthesis of (R)-2-Benzylmorpholine and ML398 from (R)-(-)-2-Phenylglycinol. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **2019**, 56(9), 2677–2682. <https://doi.org/10.1002/jhet.3657>
- [13] Garg, P., Malhotra, J., Kulkarni, P., Horne, D., Salgia, R., & Singhal, S. S. Emerging Therapeutic Strategies to Overcome Drug Resistance in Cancer Cells. *Cancers*. **2024**, 16(13). <https://doi.org/10.3390/cancers16132478>
- [14] Dorsam, R. T., & Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. In *Nature Reviews Cancer*. **2007**, 7(2), 79-94. <https://doi.org/10.1038/nrc2069>
- [15] Garg, P., Malhotra, J., Kulkarni, P., Horne, D., Salgia, R., & Singhal, S. S. Emerging Therapeutic Strategies to Overcome Drug Resistance in Cancer Cells. *Cancers*. **2024**, 16(13). <https://doi.org/10.3390/cancers16132478>
- [16] Lei, Z. N., Tian, Q., Teng, Q. X., Wurlpel, J. N. D., Zeng, L., Pan, Y., & Chen, Z. S. Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. *MedComm* **2023**, 4(3), 1-38.
- [17] Gfeller, D., Grosdidier, A., Wirth, M., Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Research*. **2014**, 42(1), 32-38. <https://doi.org/10.1093/nar/gku293>
- [18] Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. *Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay*. **2011**, 731, 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20