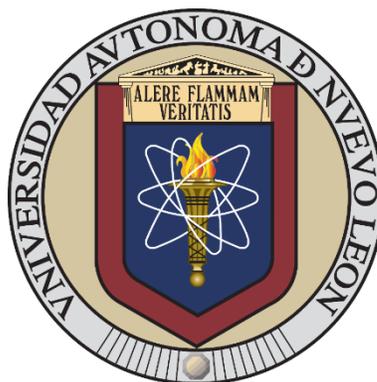


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDO BENZOTRIAZOLIL-
ACRÍLICO, EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* Y SU POTENCIAL APLICACIÓN
EN LA GENERACIÓN DE BIOIMÁGENES POR MICROSCOPIA
DE FLUORESCENCIA**

Presentado por:

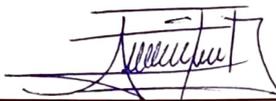
CAMILA TERESA QUEZADA CERVANTES

Como requisito parcial para obtener el grado de:
**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
FARMACIA**

Marzo, 2025

**SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDO BENZOTRIAZOLIL-ACRÍLICO,
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* Y SU
POTENCIAL APLICACIÓN EN LA GENERACIÓN DE BIOIMÁGENES POR
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

Aprobación de la tesis:



DR. EUGENIO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

Presidente



DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA

Secretario



DRA. KARLA RAMÍREZ ESTRADA

Vocal



DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Sub-Directora de Posgrado

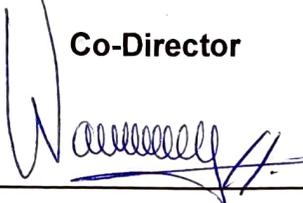
**SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDO BENZOTRIAZOLIL-ACRÍLICO,
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* Y SU
POTENCIAL APLICACIÓN EN LA GENERACIÓN DE BIOIMÁGENES POR
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

Revisión de la tesis:



DR. MOISÉS ARMIDES FRANCO MOLINA

Co-Director



DR. SUSANA THELMA LÓPEZ CORTINA

Comité tutorial



DRA. MÓNICA AZUCENA RAMÍREZ CABRERA

Comité tutorial



DRA. KARLA RAMÍREZ ESTRADA

Comité tutorial



DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Sub-Directora de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que estuvieron presentes en esta etapa de mi vida que han sido parte muy fundamental para poder llevar a cabo todo este trabajo. Principalmente a mis padres por apoyarme en todos mis proyectos personales y cuidarme a la distancia.

A la familia Rivera Escobedo en especial a Noemi y a Luis por estar siempre al pendiente de mí. A Luis por procurarme y cuidarme durante tantos años, y apoyarme con todo lo que pudiera faltarme en mi estancia en Nuevo León.

A mis compañeros de generación de la Maestría, Evelin, Abi, Quique y Gustavo quienes me apoyaron durante toda mi estancia y quienes compartieron conmigo muchos momentos fundamentales durante este trayecto, les agradezco por no dejarme sola y ayudarme a solucionar muchas situaciones como foránea.

Agradezco a mi Asesor el Dr. Eugenio por tenerme paciencia y enseñarme lo más posible de química orgánica, por apoyarme en mis decisiones y ayudarme con mis inquietudes y siempre resolverme dudas. A todos mis compañeros de laboratorio de química industrial en especial a Luis, David, Samuel, Torres, Keyel Dianita y Goyo por apoyarme y ayudarme en mis dudas y pendientes.

A la Dra. Susana, la Dra. Mónica, la Dra. Karla y a la Dra. Lucy por orientarme y ayudarme a resolver cuestionamientos de mi proyecto.

Quiero agradecer al Laboratorio 6 de Inmunología y virología de FCB-UANL, y todo su equipo de trabajo, al Dr. Moisés por recibirme en su laboratorio y permitirme usar sus instalaciones y trabajar con su equipo de trabajo y realizarme observaciones y un agradecimiento especial a Kenia y a Bety por apoyarme tanto durante mi estancia, por su paciencia enseñando y explicando con detalle cada paso, por no dejarme sola o con dudas y siempre estar al pendiente.

Agradezco al Dr. Emanuel Hernández y al Dr. José García por permitirme realizar una estancia con ustedes en el CINVESTAV y por explicarme pacientemente el acoplamiento molecular.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitirme el uso de sus instalaciones y recursos, a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por los recursos y la beca otorgada, al CINVESTAV-Mérida por permitirme realizar una estancia en su centro de investigación.

Resumen

Monterrey, Nuevo León
Marzo, 2025

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDO BENZOTRIAZOLIL-ACRÍLICO, EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA GENERACIÓN DE BIOIMÁGENES POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Área de estudio: Farmacia

Número de páginas: 134

Propósito y método de estudio: Actualmente, el cáncer prevalece como una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial en la población y la resistencia a los fármacos antineoplásicos representa una problemática alarmante, esto ha promovido la búsqueda de nuevas alternativas que permitan superar la resistencia a fármacos en células cancerígenas. En este trabajo se realizó la síntesis de diez derivados de ácido benzotriazolil-acrílico y se realizó el acoplamiento molecular de estos derivados con la Proteína Caseína Quinasa 2 (CK2); se evaluó su posible actividad anticancerígena y se determinaron sus propiedades fotofísicas para su potencial aplicación en la generación de bioimágenes.

Contribuciones y conclusiones: Se obtuvieron diez derivados de ácido benzotriazolil-acrílico, se realizó la caracterización estructural de los derivados mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (^1H) y carbono-13 (^{13}C) y Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS). En los resultados del acoplamiento molecular con la proteína CK2, se determinó que el tamaño y

restricción de los grados de libertad en las moléculas **46-47a-e** influye en la energía de afinidad de la proteína CK2. Por otro lado, los resultados de la actividad anticancerígena (línea celular Caco-2) mostraron que los compuestos que redujeron más del 20% la viabilidad celular son el **46a**, **46b** y **46e** a las tres concentraciones probadas (100, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$). Mientras que la evaluación de la toxicidad utilizando timocitos murinos para los compuestos **46b** y **46e** a la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ después de 24 h, mostraron porcentajes de viabilidad de 75% y 97%, respectivamente, lo que sugiere que el compuesto **46e** es un candidato para ser utilizado como tinte celular en la generación de bioimágenes, considerando que los compuestos **46-47a-e** presentaron propiedades fotofísicas óptimas como un desplazamiento de Stokes mayores de 70 nm y los compuestos **46b**, **46e**, **47a** y **47b** presentaron un coeficiente de absortividad molar mayor de 30 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Dr. Eugenio Hernández Fernández

Director de Tesis

Dr. Moisés Armides Franco Molina

Co-director de tesis

**SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDO BENZOTRIAZOLIL-ACRÍLICO,
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *IN VITRO* Y SU
POTENCIAL APLICACIÓN EN LA GENERACIÓN DE BIOIMÁGENES POR
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

Presentado por:

Camila Teresa Quezada Cervantes.

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Química industrial del Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas (CELAES-FCQ-UANL), en el Laboratorio 6 de Inmunología y Virología de la Unidad C de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB-UANL) pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-Mérida). Fungiendo como director de tesis el Dr. Eugenio Hernández Fernández y como co-director el Dr. Moisés Armides Franco Molina; con los recursos otorgados por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), con clave de proyecto CF-2023-I-1693 y con la beca otorgada 826587.

Índice de contenido

Capítulo	Página
1. Introducción	1
1.1. Cáncer	1
1.2. Características de las células de cáncer.	2
1.3. Tratamientos contra el cáncer.....	4
1.4. Resistencia a la quimioterapia	7
1.5. Proteína caseína quinasa 2 (CK2).....	9
1.5.1 CK2 como blanco terapéutico contra el cáncer.	10
1.5.2 Estrategias de inhibición de la proteína CK2	12
1.6. Compuestos heterocíclicos	13
1.6.1. Benzotriazoles	14
1.6.2. Actividad biológica de los benzotriazoles.	15
1.7. Generación de bioimágenes por microscopia de fluorescencia.....	16
1.7.1. Limitaciones de los tintes fluorescentes actuales.....	16
2. Antecedentes	18
2.1. Derivados de benzotriazol con actividad anticancerígena	18
2.2. Benzotriazoles en microscopia confocal de fluorescencia.....	27
2.3. Análisis crítico	30
3. Hipótesis.....	33
4. Objetivos	33
4.1. Objetivo general	33
4.2. Objetivos específicos.	33
5. Materiales y Métodos	34
5.1. Equipos e instrumentos	34
5.2. Reactivos.....	34
5.3. Manejo de animales de experimentación	35

5.4.	Disposición de residuos	36
5.5.	Metodología	37
5.5.1.	Síntesis Orgánica	37
5.5.1.1.	Síntesis de benzotriazolil acetato de etilo 41 y 42	37
5.5.1.2.	Síntesis de derivados de benzotriazolil-acrilatos de etilo 44-45a-e ..	37
5.5.1.3.	Síntesis de derivados de ácido benzotriazolil-acrílico 46-47a-e	38
5.5.2.	Acoplamiento molecular	38
5.5.3.	Pruebas biológicas	40
5.5.3.1.	Actividad anticancerígena <i>in vitro</i> de los derivados de ácido benzotriazolil acrílico.....	41
5.5.3.2.	Actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los derivados de ácido benzotriazolil acrílico	42
5.5.4.	Determinación de propiedades fotofísicas	43
6.	Resultados y Discusión.....	44
6.1.	Síntesis Orgánica.....	44
6.1.1.	Síntesis de ésteres de benzotriazolil acetato de etilo 41 y 42.	44
6.1.2.	Síntesis de derivados de benzotriazolil-acrilatos de etilo 44-45a-e	51
6.1.3.	Síntesis de los ácidos de benzotriazolil-acrílico 46-47a-e.	59
6.2.	Acoplamiento molecular	66
6.3.	Actividad biológica	75
6.3.1.	Actividad anticancerígena <i>in vitro</i> de los derivados de ácido benzotriazolil acrílico en la línea celular Caco-2	75
6.3.2.	Actividad citotóxica <i>in vitro</i> de los derivados de ácido benzotriazolil acrílico.	
6.4.	Propiedades fotofísicas.....	86
6.4.1.	Espectro de absorción.....	87
6.4.2.	Espectro de excitación y emisión.	89
7.	Conclusiones	93
8.	Perspectivas.....	95
9.	Referencias.....	96

Lista de figuras

Figura 1. Hallmarks del cáncer (características de las células cancerígenas), adaptada de: Hanahan D & Weinberg R, 2022. ⁸	2
Figura 2. Mecanismos de resistencia de las células cancerígenas, adaptada de Lei, <i>et al.</i> , 2023. ²⁸	8
Figura 3. Estructura de la proteína de CK2 (Holoenzima), reimpressa de Wang, <i>et al.</i> , 2022. ³⁷ ..	10
Figura 4. Intervención de la proteína CK3 en la vía PI3K/AKT/mTOR. ³⁹	11
Figura 5. Inhibidores de la proteína quinasa 2 (CK2).	13
Figura 6. Estructura del Benzotriazol.	14
Figura 7. Compuesto BmOB , con actividad antiproliferativa en células MCF-7 y BEL-7402, obtenido por. Zhang <i>et al.</i> en 2008. ⁶⁹	18
Figura 8. 6-Mercaptopurina (6-MP) y derivado de benzotriazol-acrilonitrilo 1 , obtenido por Carta <i>et al.</i> en 2011. ⁷⁰	19
Figura 9. Derivado de benzotriazol activo contra proteína FAK, Zhang <i>et al.</i> 2013. ⁷²	20
Figura 10. Derivados de benzimidazol y benzotriazol, por Łukowska-Chojnacka, <i>et al.</i> ⁷³	21
Figura 11. Derivados 1H-benzotriazol con actividad anticáncer, adaptada de Paprocki, <i>et al.</i> ³⁵	24
Figura 12. Derivados de benzotriazol 33a-c , adaptada de Mioc, <i>et al.</i> ⁷⁶	26
Figura 13. Bioimagen generada a partir del compuesto 39f	28
Figura 14. Bioimagen generada a partir del compuesto 45a , imagen obtenida de Ortega-Villareal, <i>et al.</i> ⁶⁸	30
Figura 15. Tautomería del benzotriazol.....	45
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H de 41 (300 MHz, CDCl ₃).	46
Figura 17. Espectro de RMN de ¹³ C de 41 (126 MHz, CDCl ₃).	47
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H de 42 (300 MHz, CDCl ₃).	49
Figura 19. Espectro de RMN de ¹³ C de 42 (126 MHz, CDCl ₃).	50
Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H de 44a (400 MHz, CDCl ₃).	54
Figura 21. Espectro de RMN de ¹³ C de 44a (101 MHz, CDCl ₃).	55
Figura 22. Espectro de RMN de ¹ H del compuesto 46a RMN (300 MHz, CD ₃ OD).	62
Figura 23. Espectro de RMN de ¹³ C de 46a (101 MHz, CDCl ₃).	63
Figura 24. Validación del acoplamiento molecular de 3pe1 con el ligando co-cristalizado 3NG (color rosa), ligando calculado en validación (color turquesa), RMSD=0.146 Å y energía de afinidad de -14.86 kcal/mol.	68
Figura 25. Resultados de validación. Diagrama 2D de interacciones del ligando 3NG con la proteína 3pe1.	69
Figura 26. Estructura de compuestos 46-47a-e	69
Figura 27. Gráfico de energía de afinidad.....	70

Figura 28. Representación 3D de compuesto 47e en el sitio activo de la proteína CK2. A) Ligando 3NG y compuesto 47e, B) Compuesto 47e , C) Parte externa de la bolsa hidrofóbica de la proteína y ácido carboxílico del compuesto 47e , D) Diagrama 2D de las interacciones del compuesto 47e	71
Figura 29. Diagrama 3D del acomodo de los compuestos en la bolsa hidrofóbica de la proteína CK2. A) Ligando 3NG, B) Compuesto 46d , C) Compuesto 46d y ligando 3NG, D) TBBT y ligando 3NG.	72
Figura 30. Comparación de las energías de unión de los compuestos 46-47a-e	73
Figura 31. Representación 3D en la cavidad de la bolsa hidrofóbica, A) Ligando 3NG, B) Compuesto 46d , C) TBBT y diagrama 2D de interacciones, D) Ligando 3NG, E) Compuesto 46d y F) TBBT con la proteína.	74
Figura 32. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 después de 24 h del tratamiento con los compuestos 46a-e . Las células fueron tratadas con las concentraciones de 100, 250 y 500 µg/mL de cada compuesto. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm. Los resultados representan el promedio y las barras de error muestran la desviación estándar.	76
Figura 33. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 después de 24 h tratamiento con los compuestos 47a-e . Las células fueron tratadas con las concentraciones de 100, 250 y 500 µg/mL de cada compuesto. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm. Los resultados representan el promedio y las barras de error muestran la desviación estándar.	77
Figura 34. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 expuesta a los compuestos 46-47a-e en una concentración de 100 µg/mL. Se incubaron 2×10^4 células por pozo se incubó a 37 °C y 5 % CO ₂ por 24 h, como control positivo se utilizó Cisplatino (100 µg/ml) y como control negativo las células sin tratamiento. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm. Se realizó una prueba estadística ANOVA, seguida de una prueba de comparación múltiple de medias Dunnett's. Los resultados representan el promedio, las barras de error muestran la desviación estándar, los asteriscos (*) muestran los grupos que presentan una diferencia significativa (p <0.05).	78
Figura 35. Curvas de actividad anticancerígena de los compuestos 46-47a-e en la línea celular CACO-2 expuestos durante 24 h a tres concentraciones (100, 250 y 500 µg/mL). Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm. Los resultados representan el promedio y las barras de error muestran la desviación estándar.	79
Figura 36. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 a las 72 h del compuesto 46b y 46e a tres concentraciones diferentes. Las células fueron tratadas con las concentraciones de 100, 250 y 500 µg/mL durante 72 h de exposición a los compuestos 46b y 46e . Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm.	81

Figura 37. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 a las 72 h de los compuesto 46b y 46e en una concentración de 100 µg/mL. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm. Los resultados representan el promedio y las barras de error muestran la desviación estándar. Control positivo (Cisplatino 100 µg/mL), control negativo (Células sin tratamiento). El asterisco (*) Indica que existe diferencia significativa respecto al control negativo (p <0.05).	81
Figura 38. Comparación grafica de la viabilidad celular a 24 y 72 h de los compuestos 46b y 46e en la línea celular Caco-2. Las células fueron tratadas con las concentraciones de 100, 250 y 500 µg/mL de los compuestos 46b y 46e . Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm.	82
Figura 39. Viabilidad celular de timocitos murinos expuestos durante 24 h a 37 °C con los compuestos 46b , 46e y el cisplatino. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de resazurina. Se realizo una prueba estadística ANOVA, seguida de una prueba de comparación múltiple de medias Dunnett's, los asteriscos (*) muestran los grupos que presentan una diferencia significativa (p <0.05) respecto al control, los resultados representan el promedio, las barras de error muestran la desviación estándar.....	84
Figura 40. Espectro de absorción de los compuestos 46a-e	88
Figura 41. Espectros de absorción de los compuestos 47a-e	89
Figura 42. Espectros de excitación y emisión para los compuestos 46a-e	90
Figura 43. Espectros de excitación y emisión para los compuestos 47a-e	90
Figura 44. Espectro de RMN de ¹ H de 44b (400 MHz, CDCl ₃).....	110
Figura 45. Espectro de RMN de ¹³ C de 44b (101 MHz, CDCl ₃).	111
Figura 46. Espectro de RMN de ¹ H de 44c (400 MHz, CDCl ₃).....	111
Figura 47. Espectro de RMN de ¹³ C de 44c (101 MHz, CDCl ₃).	112
Figura 48. Espectro de RMN de ¹ H de 44d (400 MHz, CDCl ₃).....	112
Figura 49. Espectro de RMN de ¹³ C de 44d (101 MHz, CDCl ₃).	113
Figura 50. Espectro de RMN de ¹ H de 44e (400 MHz, CDCl ₃).....	113
Figura 51. Espectro de RMN de ¹³ C de 44e (101 MHz, CDCl ₃).	114
Figura 52. Espectro de RMN de ¹ H de 45a (400 MHz, CDCl ₃).....	114
Figura 53. Espectro de RMN de ¹³ C de 45a (101 MHz, CDCl ₃).	115
Figura 54. Espectro de RMN de ¹ H de 45b (400 MHz, CDCl ₃).....	115
Figura 55. Espectro de RMN de ¹³ C de 45b (101 MHz, CDCl ₃).	116
Figura 56. Espectro de RMN de ¹ H de 45c (600 MHz, CDCl ₃).....	116
Figura 57. Espectro de RMN de ¹³ C de 45c (101 MHz, CDCl ₃).	117
Figura 58. Espectro de RMN de ¹ H de 45d (400 MHz, CDCl ₃).....	117
Figura 59. Espectro de RMN de ¹³ C de 45d (101 MHz, CDCl ₃).	118
Figura 60. Espectro de RMN de ¹ H de 45e (400 MHz, CDCl ₃).....	118
Figura 61. Espectro de RMN de ¹³ C de 45e (101 MHz, CDCl ₃).	119

Figura 62. Espectro de RMN de ^1H de 46b (400 MHz, DMSO- d_6)	120
Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C de 46b (101 MHz, DMSO- d_6).....	120
Figura 64. Espectro de RMN de ^1H de 46c (500 MHz, DMSO- d_6)	121
Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C de 46c (126 MHz, DMSO- d_6).....	121
Figura 66. Espectro de RMN de ^1H de 46d (400 MHz, DMSO- d_6)	122
Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C de 46d (101 MHz, DMSO- d_6).....	122
Figura 68. Espectro de RMN de ^1H de 46e (400 MHz, DMSO- d_6)	123
Figura 69. Espectro de RMN de ^{13}C de 46e (101 MHz, DMSO- d_6).....	123
Figura 70. Espectro de RMN de ^1H de 47a (400 MHz, DMSO- d_6)	124
Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C de 47a (101 MHz, DMSO- d_6).....	124
Figura 72. Espectro de RMN de ^1H de 47b (400 MHz, DMSO- d_6)	125
Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C de 47b (101 MHz, DMSO- d_6).....	125
Figura 74. Espectro de RMN de ^1H de 47c (400 MHz, DMSO- d_6)	126
Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C de 47c (101 MHz, DMSO- d_6).....	126
Figura 76. Espectro de RMN de ^1H de 47d (600 MHz, DMSO- d_6)	127
Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C de 47d (151 MHz, DMSO- d_6).....	127
Figura 78. Espectro de RMN de ^1H de 47e (400 MHz, DMSO- d_6)	128
Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C de 47e (101 MHz, DMSO- d_6).....	128

Lista de tablas

Tabla 1. Fármacos usualmente utilizados en la quimioterapia. ^{19,21,22}	5
Tabla 2. Resultados obtenidos de viabilidad celular de 21-24 y cisplatino.	24
Tabla 3. Clasificación de residuos.	36
Tabla 4. Características y propiedades obtenidas de los compuestos 41 y 42	45
Tabla 5. Desplazamientos químicos obtenidos del RMN de ¹ H del compuesto 41 (500 MHz, CDCl ₃).	46
Tabla 6. Desplazamientos químicos obtenidos del RMN de ¹ H del compuesto 42 (500 MHz, CDCl ₃).	48
Tabla 7. Características y propiedades de ésteres de acrilatos de etilo 44-45a-e	52
Tabla 8. Desplazamientos químicos obtenidos del RMN de ¹ H del compuesto 44a (500 MHz, CDCl ₃).	53
Tabla 9. Características y propiedades de ácidos de benzotriazolil-acrílico 46-47a-e	60
Tabla 10 Desplazamientos químicos obtenidos del RMN de ¹ H del compuesto 46a (500 MHz, CDCl ₃)	61
Tabla 11. Energías de afinidad resultados de acoplamiento molecular.	70
Tabla 12. Energía de afinidad de los compuestos 46-47a-e	70
Tabla 13. Viabilidad celular de los compuestos 46-47a-e en la línea celular Caco-2.	76
Tabla 14. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 expuesta durante 72 h a los compuesto 46b y 46e	80
Tabla 15. Citotoxicidad de timocitos murinos expuestos a los compuestos 46b, 46e y cisplatino por 24 h.	85
Tabla 16. Coeficientes de absortividad y longitud máxima de absorción de los compuestos 46-47a-e	88
Tabla 17. Propiedades fotofísicas de los compuestos 46-47a-e	91
Tabla 18 Validación de sitio activo de proteína CK2 (3pe1) con AutoDock 4.2.	130
Tabla 19. Tabla de interacciones del ligando 3NG, compuesto 46d y TBBT.	130
Tabla 20. Estructuras en 3D en el bolsillo hidrofóbico de la proteína CK2.	132
Tabla 21. Interacciones de compuestos 46-47a-e	133

Lista de esquemas

Esquema 1. Obtención de derivados de benzotriazolil-acilhidrazonas, adaptado de Kassab AE y Hassan RA. ⁷⁴	22
Esquema 2. Derivados de benzotriazol con actividad anticancerígena, adaptado de Li, <i>et al.</i> ⁷⁵	23
Esquema 3. Derivados de benzotriazol, inhibidores de proteína CK2, adaptada de El-Kardocy <i>et al.</i> ⁴⁶	25
Esquema 4 . Síntesis de benzotriazolil-1,3,4-oxidiazoles con actividad anticancerígena, adaptado de Nava-Ramírez <i>et al.</i> ⁷⁷	27
Esquema 5. Síntesis de acrilatos de etil (Z)-benzotriazolilo, por Ortega-Villareal, <i>et al.</i> ⁶⁸	30
Esquema 6. Síntesis de derivados de ácido benzotriazolil-acrílico 46-47a-e	32
Esquema 7. Síntesis de ésteres de benzotriazolil acetato de etilo 41-42	44
Esquema 8. Síntesis de derivados de benzotriazolil-acrilatos de etilo 44-45a-e	51
Esquema 9. Síntesis de los ácidos de benzotriazolil-acrílico 46-47a-e	60

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µM	Micromolar
¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
3NG	Silmitasertib
6-MP	6-mercaptopurina
A	Absorción
Å	Angstroms
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de adenosina
B	Longitud de la celda
BmOB	3-(1 <i>H</i> -benzo [d] [1,2,3] triazol-1-il)-1-(4-metoxifenil)-1-oxopropan-2-il benzoato
BODIPY	Dipirrometeno de boro
C	Concentración
CC ₅₀	Concentración citotóxica media
CDCl ₃	Cloroformo
CELAES	Centro de Laboratorios Especializados
CHK1	Proteína serina/treonina cinasa Chk1
CK2	Proteína caseína quinasa
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONAHCYT	Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías
DMAT	4,5,6,7-tetrabromo-1 <i>H</i> -benzi-midazol
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido Deuterado

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EMEM	Medio Esencial Mínimo de Eagle
EtOH	Etanol
FAK	Proteínas quinasa de adhesión focal
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
FQC	Facultad de Ciencias Químicas
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo
GLOBOCAN	Observatorio Global del Cáncer
H _{arom}	Protón aromático
HCl	Ácido clorhídrico
Hex	Hexano
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
H _{Vinílico}	Protón vinílico
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración media inhibitoria
IGF	Factor de Crecimiento de Insulina
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K ₂ CO ₃	Carbonato de potasio
LiOH	Hidróxido de litio
M	Molaridad
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio anhidro
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer de fosfatos salino
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

ppm	Partes por millón
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
SN ₂	Sustitución nucleofílica tipo 2
SS	Desplazamiento de Stokes
TBBI	4,5,6,7-tetrabromo-1 <i>H</i> -bencimidazol
TBBT	4,5,6,7-tetrabromo-1 <i>H</i> -benzotriazol
TLC	Cromatografía en capa fina
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV-vis	Espectrofotometría ultravioleta-visible
ε	Coefficiente de Absortividad molar o coeficiente de extinción

1. Introducción

1.1. Cáncer

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muertes en el mundo.¹ De acuerdo con los datos del GLOBOCAN, tan solo en el año 2022 se le atribuyeron alrededor de 10 millones de muertes. Los tres tipos de cáncer con mayor incidencia reportados en 2022 fueron el cáncer de pulmón, mama y colorrectal con 2.48, 2.31 y 1.93 millones de casos, respectivamente.²

Se estima que, debido a diferentes factores ambientales, genéticos, malos hábitos alimenticios, el consumo de alcohol y tabaco llevarán al alza el número de incidencia mundial de casos nuevos de cáncer hasta 35 millones para el año 2050.³

El cáncer es considerado como un desorden celular, en donde las células se dividen de manera anormal, existiendo un crecimiento descontrolado de células anómalas que pueden dispersarse a otros órganos a través del sistema circulatorio, donde posteriormente encuentran un nicho apropiado para continuar con su crecimiento descontrolado originando la metástasis.^{4,5} El cáncer se desarrolla por un proceso denominado carcinogénesis, donde una célula normal se transforma en una célula cancerosa.⁵ Este proceso es generalmente provocado por la exposición a agentes cancerígenos (químicos, físicos o biológicos) o bien por factores genéticos, que inducen mutaciones en el ADN; estas alteraciones en el ADN se presentan en los genes que regulan el crecimiento celular, la reparación del ADN y la apoptosis (muerte celular programada).^{5,6}

A medida que las células cancerígenas adquieren mutaciones, desarrollan características que les permiten proliferar de manera descontrolada y evadir

mecanismos de defensa del cuerpo, las cuales son fundamentales para su progresión.⁷

1.2. Características de las células de cáncer.

De acuerdo con *Hanahan D. y Weinberg R*⁸⁻¹⁰, las células cancerígenas son capaces de desarrollar mecanismos que les permite generar resistencia contra fármacos y evadir el sistema inmunológico permitiéndoles sobrevivir dentro del cuerpo. Estas características las denominaron “Hallmarks” del cáncer (**Figura 1**).

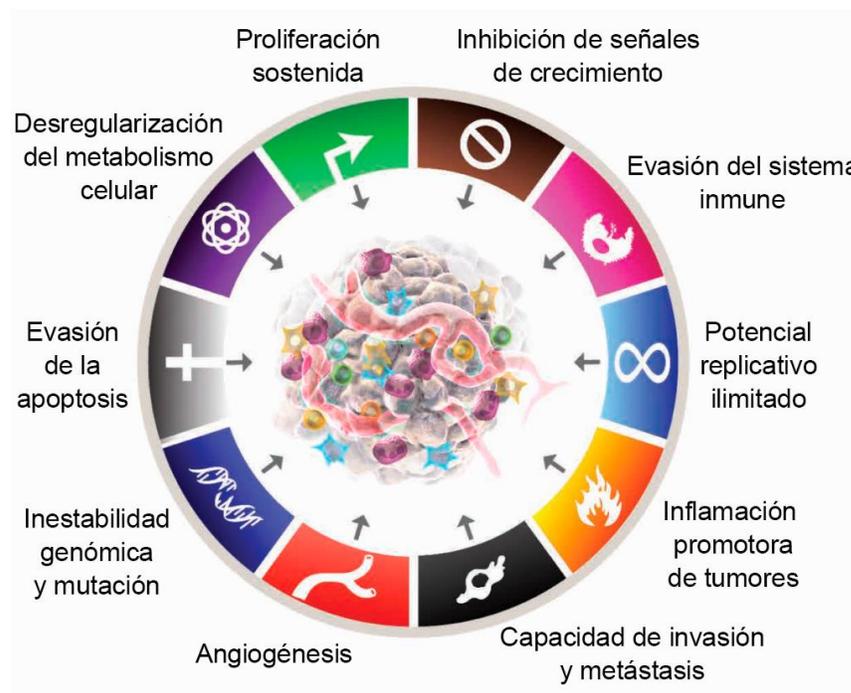


Figura 1. Hallmarks del cáncer (características de las células cancerígenas), adaptada de: *Hanahan D & Weinberg R, 2022.*⁸

Entre las principales características del cáncer se encuentra la **proliferación sostenida**. En las células cancerígenas, la proliferación sostenida les permite dividirse y multiplicarse sin depender de estímulos externos y adaptarse

adquiriendo mutaciones que les permiten activar vías de señalización para su proliferación en ausencia de factores de crecimiento, a diferencia de las células sanas que requieren de factores de crecimiento para su división celular,⁸⁻¹¹

Entre los factores de crecimiento más importantes involucrados en el desarrollo del cáncer se encuentra el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el cual promueve la proliferación y supervivencia celular al activar a su receptor (EGFR), el cual suele estar sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, como el de mama y pulmón.¹² El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) está involucrado en la generación de angiogénesis y provee de nutrientes a los tumores. El Factor de Crecimiento de Insulina (IGF), este factor se asocia en la proliferación y en promover la resistencia a la apoptosis celular.^{12,13} La sobreexpresión de factores de crecimiento y la falta de proteínas supresoras puede provocar una división celular rápida y descontrolada.

Otras características relevantes de las células cancerosas es la **inhibición de señales de crecimiento**, donde estas células son capaces de bloquear las señales supresoras de tumor, las cuales se encargan de regular el crecimiento y proliferación tumoral. Por otra parte, las células cancerígenas son capaces de **evadir la apoptosis**, generando una sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas o inclusive generando mutaciones en el gen p53 impidiendo la activación de la apoptosis permitiendo que estas puedan dividirse indefinidamente.¹⁰ Adicionalmente a esto, las células cancerosas presentan un **potencial replicativo ilimitado** debido a que son capaces de activar la telomerasa permitiendo que éstas puedan dividirse indefinidamente, mientras que las células sanas sufren de acortamiento en los telómeros por lo que presenta una división limitada.¹⁴

Además, estas células son capaces de inducir la formación de vasos sanguíneos (**angiogénesis**) que permitan a éstas suplirse de nutrientes para su crecimiento; Estos mismos autores mencionan que estas células son capaces de **modificar**

su metabolismo para aprovechar mejor los nutrientes que tienen a su alcance y adicionalmente son capaces de **evadir el sistema inmunológico** inhibiendo la activación de los linfocitos T, lo que les permite evadir muchos mecanismos que naturalmente el cuerpo realiza para contrarrestar un desorden celular.⁸⁻¹⁰

Adicionalmente, la **inflamación** crónica también está relacionada con el desarrollo y la progresión tumoral, pues generan un microambiente ideal para las células cancerígenas debido a que se liberan moléculas proinflamatorias (citoquinas y factores de crecimiento) que pueden estimular el crecimiento celular y promover la invasión y migración de las células cancerígenas.¹⁵ La **metástasis** es la migración de las células cancerígenas a otros tejidos u órganos, esto es debido a que en las células cancerígenas las proteínas encargadas de la adhesión celular se ven disminuidas (Cadherinas) o se encuentran inactivas, lo que les permite a las células cancerosas diseminarse a otros órganos.^{9,10,16}

1.3. Tratamientos contra el cáncer.

Los tratamientos contra el cáncer son variados y entre los más utilizados están la intervención quirúrgica para extraer el tumor, el uso de radioterapia y la quimioterapia, y en muchas ocasiones se realiza una combinación de estos tratamientos para una mayor eficacia.¹⁷

Cuando se decide realizar la extracción del tumor, se ha reportado que algunos pacientes pueden reincidir en la enfermedad, por tal motivo grupos de investigación están estudiando si las intervenciones quirúrgicas al inducir respuestas inflamatorias, pueden influenciar en el crecimiento acelerado de las células residuales presentes.¹⁸ Desafortunadamente, cuando se realiza una cirugía para extraer un tumor maligno, no se logran extraer en su totalidad las células cancerígenas, generándose la posibilidad de que la persona vuelva a desarrollar este padecimiento.

Hasta el momento, la quimioterapia es considerada como uno de los tratamientos más eficaces para combatir el cáncer, ya sea sola o en combinación con la radioterapia. El objetivo principal de la quimioterapia es inhibir la proliferación celular, evitando que las células se diseminen e invadan otros órganos generando metástasis.^{19,20} Los fármacos usados en quimioterapia actúan principalmente en la síntesis de ADN, ARN o proteínas. Interfiriendo en estas funciones, se puede desencadenar la apoptosis celular, pero en algunas ocasiones solo se retrasa la muerte celular, por lo cual en muchos casos es necesario repetir el tratamiento. Los fármacos regularmente usados en la quimioterapia se pueden clasificar según su mecanismo de acción (**Tabla 1**).^{19,21}

Tabla 1. Fármacos usualmente utilizados en la quimioterapia.^{19,21,22}

Agentes quimioterapéuticos	Mecanismo	Ejemplo
Agentes alquilantes	Inhiben la replicación y transcripción del ADN, formando enlaces covalentes con el ADN, producen un grupo alquilo inestable capaz de reaccionar con los centros nucleofílicos de las proteínas y ácidos nucleicos.	Mostazas nitrogenadas (bendamustina, ciclofosfamida, ifosfamida) Nitrosoureas (carmustina, lomustina) Análogos del platino (carboplatino, cisplatino, oxaliplatino) Triazeno (dacarbazina, procarbazona, temozolamida)
Antimetabolitos	Inhiben la síntesis del ADN. Se incorporan directamente al ADN, actúan como análogos estructurales a los nucleótidos. Reducen la síntesis del folato, el cual es esencial en la síntesis de nucleótidos; actuando como falsos sustratos.	Análogos de citidina (azacitidina, decitabina, citarabina, gemcitabina) Antagonistas del folato (metotrexato, pemetrexed) Análogos de purinas (cladribina, clofarabina, nelarabina) Análogos de pirimidina (Fluorouracilo, capecitabina)
Agentes antimicrotubulares	Actúan en los microtúbulos interfiriendo en la mitosis. Taxanos: inhibe el ensamblaje de microtúbulos, provocando una alteración en la división celular. Alcaloides: Inhiben la formación de microtúbulos, deteniendo la mitosis en la metafase.	Taxanos (paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel) Alcaloides (vinblastina, vincristina, vinorelbina)
Inhibidores de topoisomerasas	Inhibidores de la topoisomerasa I: Bloquean la enzima por lo que no se permite el desenrollamiento del ADN. Inhibidores de la topoisomerasa II: Inducen roturas en el ADN interfiriendo en la síntesis del ARN y ADN.	Inhibidores de la topoisomerasa I (irinotecán, topotecán) Inhibidores de la topoisomerasa II Antraciclinas(doxorrubicina)

Antibióticos	Inhiben la síntesis de ARN y ADN, se unen al ADN y causan roturas o en caso de la doxorubicina se intercalan en el ADN interfiriendo en la síntesis del ADN.	Actinomicina D, doxorubicina.

Sin embargo, los fármacos usados en la quimioterapia pueden afectar células cancerígenas, así como células sanas, causando daño en órganos y tejidos sanos; hasta el momento, se tiene reportado que los fármacos utilizados durante el tratamiento del cáncer provocan efectos adversos.^{17,22}

Los efectos secundarios provocados por los fármacos usados en la quimioterapia se dan principalmente en las células que tienden a multiplicarse rápidamente; por ejemplo, las células de la médula ósea, del tracto gastrointestinal y los folículos pilosos, provocando diferentes efectos tales como náuseas, vómitos, fatiga, pérdida de cabello, infertilidad, estreñimiento, colitis, problemas cardíacos, disminución de apetito, entre otros.^{19,21}

Por esta razón, surge la necesidad de desarrollar nuevos fármacos para combatir el cáncer, lo cual se espera que éstos presenten un mayor efecto sobre células cancerígenas y un menor daño sobre células sanas, para de esta manera reducir los efectos secundarios causados por la quimioterapia. Algunos compuestos utilizados para el desarrollo de nuevos fármacos son los compuestos heterocíclicos de nitrógeno, tales como los benzotriazoles,²³ los cuales son ampliamente utilizados como andamios debido a que poseen una estructura análoga a las purinas y han mostrado tener actividad anticancerígena, antibacteriana, antiviral, antimicótica, por mencionar algunas.²⁴

1.4. Resistencia a la quimioterapia

En los últimos años se ha determinado que las células cancerígenas son capaces de evadir y contrarrestar los efectos de los fármacos utilizados en la quimioterapia, generando una problemática global, debido a que la quimioterapia es uno de los principales tratamientos para muchos tipos de cáncer.

El objetivo principal de la quimioterapia es inhibir la proliferación celular y la multiplicación tumoral para evitar que las células cancerígenas invadan a otros órganos y causen metástasis.¹⁹ Sin embargo, los fármacos antineoplásicos no presentan selectividad por las células cancerígenas, razón por la cual estos fármacos afectan a todas las células que presentan una alta proliferación celular.²⁵

Se busca desarrollar alternativas con diferentes vías de administración más eficientes o la búsqueda de nuevas moléculas que presenten menor toxicidad ante células sanas y permita reducir efectos secundarios, a la vez que contrarresten la resistencia a fármacos que presentan las células cancerígenas.²⁶

Se considera que existen diferentes factores que generan la resistencia a los fármacos, estos factores se pueden dividir en factores intrínsecos, donde existen alteraciones genotípicas, que incluyen reordenamientos cromosómicos, mutaciones y alteraciones en el microARN. Por otra parte, están los factores extrínsecos que incluyen el ambiente tumoral, el pH, la hipoxia, la señalización con otras células tumorales, entre otros.²⁷

Entre los mecanismos de resistencia de las células cancerígenas a la quimioterapia, se encuentran la inactivación metabólica de fármacos, la disminución de captación del fármaco alterando su membrana celular, la

alteración de las dianas terapéuticas en donde actúan los fármacos y la activación de vías que permiten inhibir la muerte celular programada (**Figura 2**).²⁸

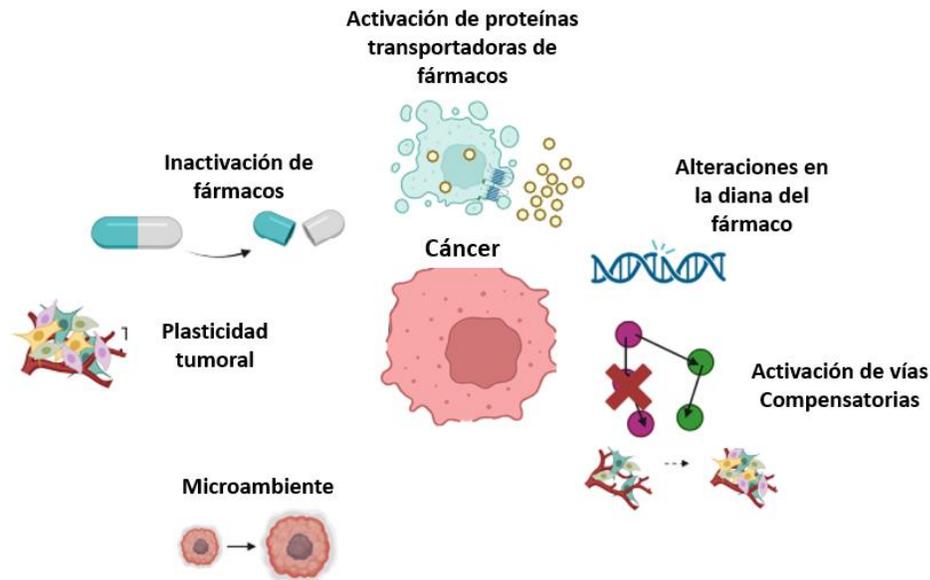


Figura 2. Mecanismos de resistencia de las células cancerígenas, adaptada de Lei, *et al.*, 2023.²⁸

El microambiente tumoral es un factor importante en la resistencia de los fármacos usados en la quimioterapia, debido a que existe una comunicación entre las células tumorales. Se menciona que se presentan factores de crecimiento y citoquinas que son producidas en este ambiente, mandando señales adicionales para el crecimiento y supervivencia tumoral.^{27,29}

Las células de cáncer son capaces de adaptarse y mantener un pH único que es más ácido extracelularmente y más básico intracelularmente. Se dice que este microambiente es capaz de debilitar el sistema inmunológico e inhibir el crecimiento de células normales, además de que es capaz de inactivar fármacos anticancerígenos. Otro aspecto importante del microambiente tumoral es la hipoxia, es decir carencia de oxígeno, la cual altera la actividad de diversas enzimas encargadas de metabolizar los fármacos.^{27,29}

También existen las células madre cancerosas, las cuales son capaces de expresar proteínas transportadoras de fármacos como la glicoproteína-P, también conocida como proteína de resistencia a múltiples fármacos, esta proteína se localiza en la membrana plasmática y es capaz de secretar metabolitos e inducir la expresión del CYP9A4, quien es capaz de desactivar fármacos usados contra el cáncer. Adicionalmente, las células madre cancerosas poseen la capacidad de activar la reparación del ADN y activar mecanismos de evasión de apoptosis.^{29,30}

La creciente resistencia de las células cancerígenas a los fármacos usados en la quimioterapia ha impulsado la búsqueda de nuevas moléculas dirigidas a nuevos blancos terapéuticos relacionados con el cáncer, un blanco terapéutico prometedor es la proteína CK2 la cual se ha asociado con diversos procesos celulares que favorecen en la proliferación de las células cancerígenas.

1.5. Proteína caseína quinasa 2 (CK2)

En los últimos años la proteína quinasa 2 (CK2) ha sido objetivo de diversas investigaciones, debido a que esta proteína está involucrada en procesos celulares esenciales (proliferación, crecimiento y supervivencia celular) y también promueve la angiogénesis.^{31,32} Esta enzima se encarga de catalizar la fosforilación de hasta casi 300 sustratos proteicos utilizando el ATP,^{33,34} fosforilando residuos de serina y treonina. Esta proteína se puede localizar en el núcleo y en el citoplasma.³⁰

La CK2 es una proteína tetramérica; es decir, que está conformada por dos subunidades catalíticas α y dos reguladoras β . Su sitio activo se encuentra en la subunidad alfa, presenta una cavidad hidrofóbica donde el ATP se une y es capaz de llevar a cabo la fosforilación de diversos sustratos proteicos (**Figura 3**).^{35,36}

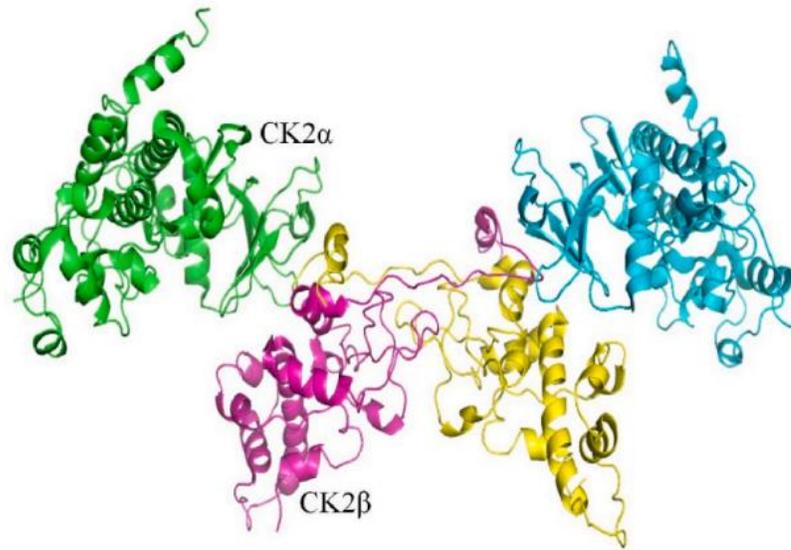


Figura 3. Estructura de la proteína de CK2 (Holoenzima), reimpressa de Wang, *et al*, 2022.³⁷

1.5.1 CK2 como blanco terapéutico contra el cáncer.

Diversos estudios han determinado que la proteína CK2 se encuentra sobreexpresada en diversos tipos de cáncer como el cáncer de próstata, ovario, páncreas, pulmón, mama y colorrectal presentan una sobreexpresión de esta proteína y se ha determinado que el presentar niveles elevados de CK2 conlleva a un mal pronóstico contra el cáncer.³¹

La sobreexpresión de la proteína CK2 está asociada a un mal pronóstico en del cáncer, debido a que se relaciona con la progresión tumoral, se asocia con un incremento en la proliferación celular, en la generación de vasos sanguíneos, en la secreción de factores de crecimiento y en la resistencia de fármacos antineoplásicos.^{32,36,38}

La proteína CK2 es capaz de intervenir en la regulación de la proliferación celular mediante la activación de vías de señalización como la PI3K/AKT, promoviendo así la división celular descontrolada.³⁸ La vía PI3K/AKT/mTOR se activa cuando

factores de crecimiento se unen a receptores que se encuentran en la membrana celular, lo que desencadena la fosforilación de PI3K y la activación de proteínas como AKT y mTOR. En esta vía la proteína PTEN actúa como un regulador, se encarga de defosforilar a PIP3 e inhibir la activación de AKT. La CK2 en esta vía puede actuar de dos formas, fosforilando directamente a AKT, lo que aumenta su actividad incluso sin PI3K; o bien fosforilando PTEN causando que la inhibición de PTEN y por consiguiente desregulando la vía causando que AKT permanezca activa. Generando como resultado que se dé una señalización constante de proliferación celular contribuyendo al crecimiento tumoral (**Figura 4**).³⁹

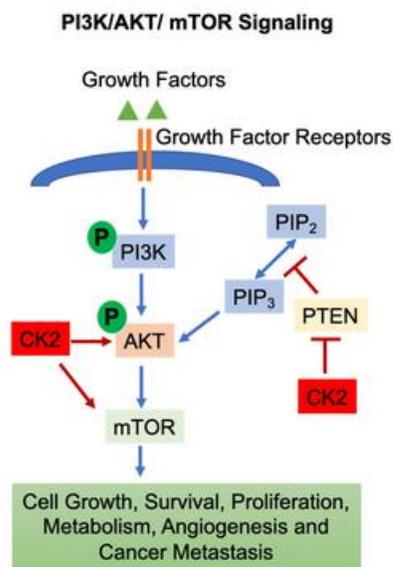


Figura 4. Intervención de la proteína CK3 en la vía PI3K/AKT/mTOR.³⁹

Además, la proteína CK2 puede involucrarse en la resistencia a la apoptosis, la cual interfiere en la señalización de apoptosis al actuar directamente sobre el p53 inactivándolo mediante su fosforilación; esta fosforilación evita que el p53 actúe como supresor del crecimiento, bloqueando la capacidad de activar las vías que inducen la muerte celular.⁴⁰

Se ha determinado que puede estimular la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), promoviendo así la formación de vasos sanguíneos que nutren el tumor. Adicionalmente, la CK2 puede interferir en la activación de los linfocitos T y NK, reduciendo la capacidad del sistema inmunológico de atacar las células cancerígenas.³⁸

Debido a que ha mostrado ser una proteína importante en la progresión del cáncer, es que la CK2 se ha convertido en un blanco terapéutico prometedor para combatir el cáncer.

Como se mencionó con anterioridad, esta proteína se encuentra en diversos tipos de cáncer, entre ellos el cáncer colorrectal.^{31,41} El cáncer colorrectal es uno de los más comunes a nivel mundial, este se encuentra en el 3er lugar de mayores incidencias de nuevos casos y en 2do lugar de causas de muerte por cáncer.² Se ha reportado una mayor expresión de la proteína CK2 en tejidos tumorales de pacientes con cáncer colorrectal, especialmente en adenocarcinomas, en comparación con tejidos no tumorales.⁴¹⁻⁴³ De acuerdo con la base de datos de Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>),⁴⁴ la sobreexpresión de esta proteína también se observa en diversas líneas celulares de cáncer colorrectal, incluyendo a la línea Caco-2, que corresponde a un adenocarcinoma colorrectal. Por lo cual, esta línea celular puede ser considerada como modelo celular para investigar nuevas moléculas con potencial efecto sobre la proteína CK2 y evaluar su efecto anticancerígeno.

1.5.2 Estrategias de inhibición de la proteína CK2

En el contexto actual sobre la búsqueda de inhibidores competitivos (nuevas moléculas) para la proteína CK2 ha tomado mayor interés. Investigaciones recientes han desarrollado moléculas que actúan como inhibidores que compiten con el ATP para bloquear el bolsillo hidrofóbico de la proteína de tal forma que no permiten que la proteína pueda seguir fosforilando sustratos proteícos.⁴⁵

El inhibidor más utilizado de esta proteína es el Silmitasertib (CX-4549), el cual ya se encuentra en ensayos clínicos (<https://clinicaltrials.gov/search?term=cx-4945&viewType=Table>) con código de ensayo: NCT03897036 y NCT02128282.⁴⁶

En los últimos años se han desarrollado una variedad de moléculas que incluyen benzimidazoles y benzotriazoles polihalogenados. Entre estas moléculas se encuentra el TBBT (4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-benzotriazol), un derivado halogenado de benzotriazol con un tamaño pequeño que le permite interactuar con el bolsillo hidrofóbico de la proteína (**Figura 5**).^{46,47}

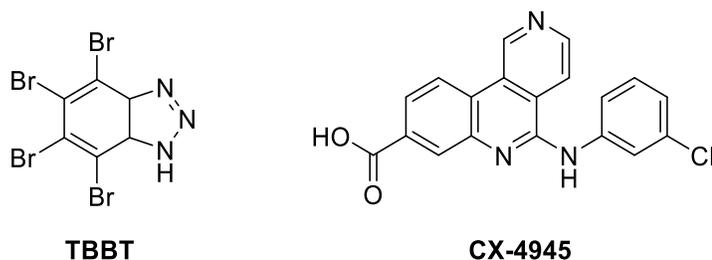


Figura 5. Inhibidores de la proteína quinasa 2 (CK2).

Se espera que al desarrollar nuevos inhibidores de la proteína CK2 se logre reducir la proliferación celular, restaurar las vías de apoptosis e inhibir la angiogénesis y lo que limitaría la capacidad de metástasis de las células cancerígenas.^{40,48} Por lo anterior, el desarrollo de inhibidores de CK2 podrían ofrecer nuevas opciones terapéuticas para distintos tipos de cáncer.

1.6. Compuestos heterocíclicos

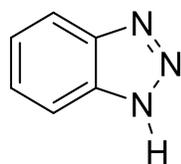
Los compuestos heterocíclicos son aquellos compuestos conformados en ciclos que poseen uno o más heteroátomos (oxígeno, nitrógeno o azufre), es decir, poseen átomos diferentes al carbono en el anillo.⁴⁹ Un ejemplo de estos compuestos son el pirrol, el imidazol, el pirazol, la piridina y la pirimidina, los

cuales presentan en su estructura anillos con átomos de nitrógeno otro ejemplo son los benzotriazoles, los cuales son la fusión de un benceno con un triazol.^{50–52} Las modificaciones en la estructura del anillo afectan en sus propiedades físicas y químicas conllevando a que se puedan generar un efecto biológico obteniendo propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antitumorales, antivirales y antifúngicas.^{50,53}

Estos compuestos conforman más de la mitad de los compuestos orgánicos conocidos, incluyendo los alcaloides, colorantes, herbicidas, fármacos, vitaminas; incluso algunos aminoácidos poseen anillos heterocíclicos, por ejemplo, las bases nitrogenadas poseen una estructura heterocíclica.^{49,50} Los heterociclos que contienen nitrógeno han exhibido gran diversidad en la actividad biológica y farmacológica debido a su similitud con diversas moléculas endógenas.⁵⁴

1.6.1. Benzotriazoles

El benzotriazol es un compuesto heterocíclico conformado por la fusión de un benceno con un anillo de triazol. Es un compuesto de bajo costo, muy estable y fácil de introducir en diversas reacciones.⁵⁴ Por ello ha resultado de gran interés para el desarrollo de nuevos fármacos, incluso es denominado como un “andamio molecular” debido a la facilidad que posee la molécula para ser transformada en otros derivados de interés, (**Figura 6**).⁵⁵



Benzotriazol

Figura 6. Estructura del Benzotriazol.

Las principales características de los benzotriazol es que son excelentes donadores o aceptores de electrones y ayudan en la estabilización de cargas negativas y radicales. Muchos de los derivados de benzotriazol se caracterizan por tener síntesis sencilla y son fácilmente escalables.⁵⁵

1.6.2. Actividad biológica de los benzotriazoles.

Los benzotriazoles poseen en su estructura un sistema conjugado que le permite formar interacciones $\pi - \pi$ y sus tres átomos de nitrógeno facilitan la formación de puentes de hidrógeno y enlaces de coordinación, permitiéndoles interactuar con enzimas y receptores biológicos mediante interacciones no covalentes.⁵⁶

Algunos derivados de benzotriazol han demostrado tener la capacidad de actuar como antimetabolitos en procesos metabólicos de purinas. Esto se debe a que la estructura de un benzotriazol mimetiza la estructura de una purina, actuando como sustrato falso y pudiendo anclarse e interactuar con enzimas, o bien, interactuando en el metabolismo de las purinas. Por esta razón la síntesis de compuestos que presenten similitud estructural a las purinas como el benzotriazol podrían ser derivados prometedores para su uso en el tratamiento contra cáncer.
57,58

La inhibición de proteínas quinasas representa una alternativa para combatir el cáncer, dado que las quinasas realizan un papel importante en la división celular. La estructura de los derivados de benzotriazol facilita su interacción con proteínas quinasas mediante interacciones no covalentes, puentes de hidrogeno, enlaces de coordinación, ion-dipolo, fuerzas de Van der Waals, permitiéndole inhibir la actividad de proteínas quinasas como las proteínas caseína quinasas (CK2 y CHK1), histonas desacetilasas, quinasas de adhesión focal, entre otras.^{56,59}

1.7. Generación de bioimágenes por microscopia de fluorescencia

La generación de imágenes por microscopia de fluorescencia es una técnica que utiliza tintes o sondas fluorescentes (moléculas fluorescentes), la cual está presentando gran importancia en áreas como la biología molecular, inmunología y oncología, debido a que permite visualizar estructuras o compartimentos celulares e inclusive monitorear biomoléculas y así estudiar procesos celulares.

60–62

La generación de imágenes fluorescentes resulta ser una técnica de bajo costo no invasiva, que implica una metodología sencilla, permite obtener resultados rápidos y que a su vez presenta una alta sensibilidad de detección. Inclusive, las imágenes fluorescentes se han utilizado en cirugías guías preoperatorias e intraoperatorias.^{63–65}

Para la generación de bioimágenes de calidad, donde se pueda observar de manera clara donde se localiza el compuesto en la célula, es importante considerar las propiedades ópticas de los tintes fluorescentes. Estas propiedades incluyen su capacidad de absorción y emisión de luz, su coeficiente de absorción el cual determina la capacidad de la molécula de captar la luz, un alto rendimiento cuántico que indica la eficiencia de la conversión de fotones absorbidos en fotones emitidos para una mayor emisión de fluorescencia, su desplazamiento de Stokes y su estabilidad.^{64,66}

1.7.1.Limitaciones de los tintes fluorescentes actuales.

Existen varios colorantes o tintes como la rodamina, el borodipirrometano (BODIPY) el isotiocianato de fluoresceína (FITC), entre otros, que son usados en investigaciones preclínicas; sin embargo, presentan algunas limitantes, la mayoría de esos tintes presentan una longitud de emisión inferior a 550 nm generando interferencia con los tejidos. Asimismo, algunos presentan un

desplazamiento de Stokes menor a 70 nm lo cual genera una interferencia entre la luz de excitación y la de emisión, limitando la aplicación de los tintes celulares actuales.⁶⁴

Por otra parte, para que una molécula presente la propiedad de fluorescencia, ésta debe, de manera general, presentar una estructura rígida, plana y conjugada; no obstante, moléculas con estas características resultan muchas veces en compuestos de alto peso molecular afectando directamente en la farmacocinética y en la biodistribución de éstas, siendo una limitante muy importante para considerar en los tintes celulares.⁶⁴

Para superar las limitaciones anteriormente mencionadas, actualmente se investigan moléculas orgánicas fluorescentes que presentan un diseño estructural donador- π -aceptor con desplazamientos de Stokes altos (mayores de 70 nm), aumentando de esta manera la eficiencia de la fluorescencia y permitiendo reducir las interferencias ópticas.^{63,64}

Es importante mencionar que algunos derivados de benzotriazol además de presentar actividad biológica, han demostrado poseer propiedades fluorescentes lo que amplía su potencial en aplicaciones biológicas. La aromaticidad del benzotriazol, combinada con su estructura plana y su buena capacidad de aceptación de electrones,⁶⁷ permite la generación de sistemas del tipo π conjugados. Estas características permiten que una molécula sea capaz de absorber y emitir luz, por lo que son capaces de presentar fluorescencia. Gracias a esto, los benzotriazoles son utilizados en el diseño de moléculas para la generación de tintes fluorescentes con posibles aplicaciones en la obtención de bioimágenes, para futuros estudios de procesos celulares.⁶⁸

2. Antecedentes

A continuación, en esta sección se presentan diversos estudios evidenciando la actividad biológica y fluorescente de diversos derivados de benzotriazol.

2.1. Derivados de benzotriazol con actividad anticancerígena

En 2008 Zhang *et al.*⁶⁹ llevaron a cabo la preparación del compuesto 3-(1*H*-benzo [d] [1,2,3] triazol-1-il)-1-(4-metoxifenil)-1-oxopropan-2-il benzoato (**BmOB**) derivado de benzotriazol, (**Figura 7**). Posteriormente evaluaron su actividad antiproliferativa en diferentes líneas celulares, entre ellas cáncer de mama (MCF-7) y células de hepatocarcinoma (BEL-7402), determinaron la concentración media inhibitoria (IC₅₀), donde obtuvieron un IC₅₀ = 0.154 ± 0.018 mM y un IC₅₀ = 0.0082 ± mM, respectivamente, presentando una mayor susceptibilidad por las células de hepatocarcinoma. Los autores sugieren que la muerte celular pudiera deberse a la modulación de las funciones mitocondriales por las especies reactivas de oxígeno, es decir, detectaron una mayor producción de especies reactivas de oxígeno en presencia de este compuesto; sin embargo, no lograron concluir de manera efectiva el posible mecanismo de acción del compuesto.^{56,69}

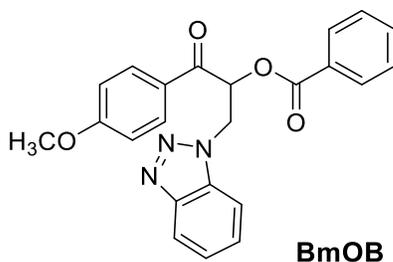


Figura 7. Compuesto **BmOB**, con actividad antiproliferativa en células MCF-7 y BEL-7402, obtenido por. Zhang *et al.* en 2008.⁶⁹

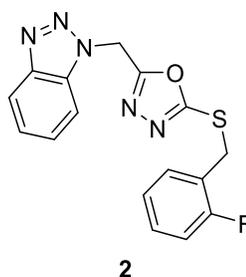


Figura 9. Derivado de benzotriazol activo contra proteína FAK, Zhang *et al.* 2013.⁷²

Adicionalmente, realizaron un análisis de acoplamiento molecular de este compuesto utilizando la proteína quinasa de adhesión focal (FAK, por sus siglas en inglés), donde determinaron que el compuesto **2** lograba interactuar con el sitio catalítico de la proteína. Evaluaron experimentalmente su capacidad inhibitoria y obtuvieron un IC_{50} de $1.2 \pm 0.3 \mu\text{M}$ contra la proteína FAK; considerando este compuesto como un potente inhibidor de dicha proteína. Las proteínas FAK son proteínas tirosina quinasas que también se ven involucradas en los procesos de proliferación, supervivencia celular, motilidad, invasión y metástasis. A su vez, están encargadas de una parte importante de la transducción de señales, por lo que una sobre señalización de estas señales puede generar una proliferación descontrolada, supervivencia o migración de células cancerígenas, por lo que las proteínas FAK también son otro tipo de proteínas que se encuentran como objetivo de estudio para el tratamiento de cáncer.^{56,72}

En 2016, Łukowska-Chojnacka *et al.*⁷³ sintetizaron un grupo de moléculas que contienen en su estructura benzotriazol, benzimidazol y tetrazol, partiendo de los compuestos TBBT y 4,5,6,7-tetrabromo-1*H*-bencimidazol (TBBi), inhibidores de la proteína CK2. Evaluaron el efecto citotóxico de las moléculas en dos líneas celulares, CCRF-CEM (células T) y MCF-7, (**Figura 10**). De manera general, los resultados mostraron que los derivados de benzotriazol presentaron menor citotoxicidad contra CCRF-CEM a diferencia del benzimidazol; no obstante, la

línea celular MCF-7 resultó ser más susceptible a los derivados de benzotriazol **3a-3d**.⁷³

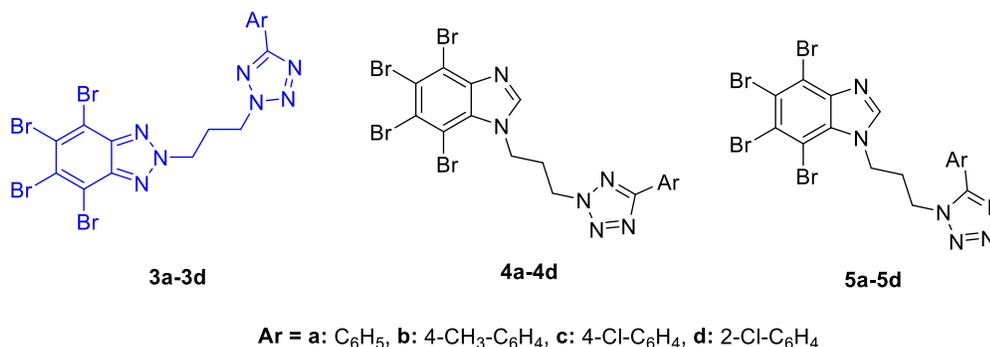
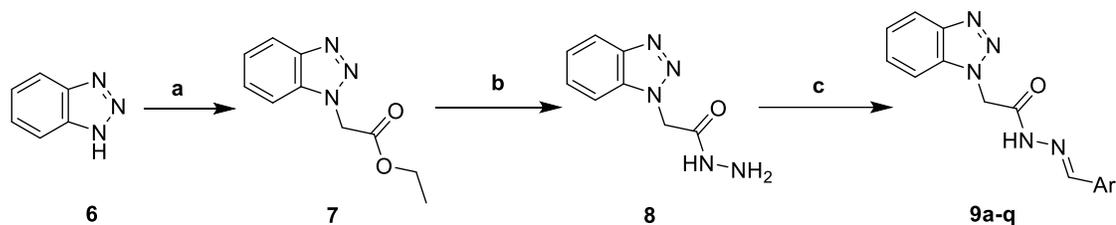


Figura 10. Derivados de benzimidazol y benzotriazol, por Łukowska-Chojnacka, *et al.*⁷³

El grupo de investigación de Kassab AE y Hassan RA en 2018⁷⁴ realizaron la síntesis de derivados de benzotriazolil *N*-acilhidrazonas (**Esquema 1**) con la finalidad de inhibir la proteína FAK, la cual se ha reportado sobre expresada en muchos tipos de cáncer. La actividad anticancerígena de los compuestos **9a-9q** se evaluó en 60 líneas celulares, usando doxorrubicina como control positivo. Este trabajo mostró que los compuestos **9d**, **9e**, **9f**, **9o** y **9q** presentaron actividad anticáncer a concentraciones bajas; de estos, los compuestos **9e** y **9q** mostraron actividad anticáncer en un amplio espectro dentro de las líneas celulares evaluadas. Por otra parte, los compuestos **9d**, **9e**, **9f** y **9q** mostraron actividad anticáncer en las líneas celulares HL-60 y OVCAR-3, provenientes de leucemia y cáncer de ovario, respectivamente, con valores de IC₅₀ en un rango nanomolar de concentración (25-130 nM); mostrando mejor actividad que incluso el fármaco de referencia.⁷⁴



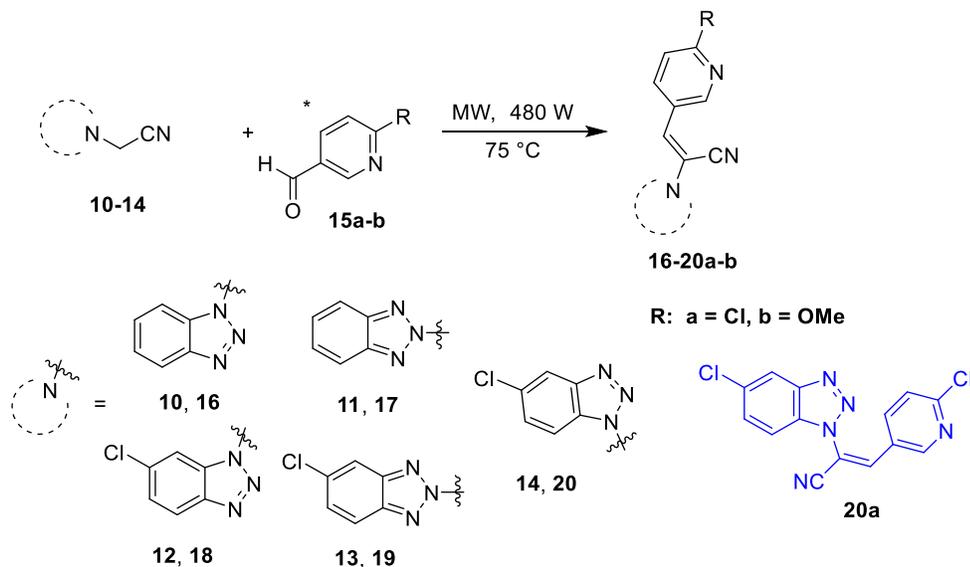
9a: Ar = 2-fluorofenil
9b: Ar = 3-fluorofenil
9c: Ar = 4-fluorofenil
9d: Ar = 2-hidroxifenil
9e: Ar = 2,3-dihidroxifenil
9f: Ar = 2,4-dihidroxifenil
9g: Ar = 3,4-dihidroxifenil
9h: Ar = 4-metoxifenil
9i: Ar = 4-hidroxi-3-metoxifenil

9j: Ar = 3,4,5-trimetoxifenil
9k: Ar = furan-2-il
9l: Ar = pirrol-2-il
9m: Ar = piridin-4-il
9n: Ar = benzofuran-2-il
9o: Ar = benzotiofen-2-il
9p: Ar = indol-2-il
9q: Ar = indol-2-il

a) $\text{ClCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$, K_2CO_3 anhidro, secado con acetona, reflujo 8 h.
 b) Hidrazina hidratada, etanol, reflujo 5 h.
 c) ArCHO , etanol, GAA, reflujo 6 h.

Esquema 1. Obtención de derivados de benzotriazolil-acilhidrazonas, adaptado de Kassab AE y Hassan RA.⁷⁴

Por otra parte, en 2020, Li *et al.*⁷⁵ reportaron la obtención de derivados de benzotriazolil-vinil-nitrilos mediante el uso de irradiación de microondas utilizando benzotriazolil-acetonitrilo y diferentes aldehídos aromáticos (**Esquema 2**); además, evaluaron su capacidad como inhibidores de la proteína tirosina quinasa, la cual está involucrada en procesos celulares como la proliferación, diferenciación y/o apoptosis celular.



Esquema 2. Derivados de benzotriazol con actividad anticancerígena, adaptado de Li, *et al.*⁷⁵

Además, los autores determinaron la actividad anticancerígena *in vitro* de los diez derivados empleando gefitinib como control positivo, un fármaco comercial utilizado para tratar el cáncer de pulmón, mediante el ensayo CCK-8 (Kit de Conteo Celular-8), utilizando las siguientes líneas celulares VX2 (carcinoma de células escamosas), A549 (cáncer de pulmón), MKN45 y MGC (cáncer de estómago). Todos los derivados mostraron actividad, siendo el derivado **20a** el que presentó la mayor actividad en las cuatro líneas celulares e incluso mejor actividad que gefitinib, obteniendo valores de IC₅₀ en un rango de 5.4 - 3.04 μM para el compuesto **20a** y valores de IC₅₀ entre 6.94 - 12.88 μM para el gefitinib.⁷⁵

En 2021, Paprocki *et al.*³⁵ evaluaron la actividad anticancerígena de los compuestos 5,6-diiodo-1*H*-benzotriazol **21**, 4,7-dibromo-5,6-diiodo-1*H*-benzotriazol **22** y 5,6-dibromo-1*H*-benzotriazol **23**, los cuales son análogos al TBBT **24**, el cual es utilizado comúnmente para inhibir la actividad de la proteína quinasa CK2 (**Figura 11**) utilizando cisplatino como control positivo.

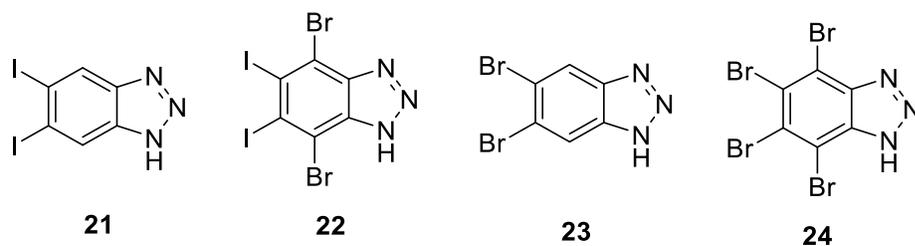


Figura 11. Derivados 1H-benzotriazol con actividad anticáncer, adaptada de *Paprocki, et al.*³⁵

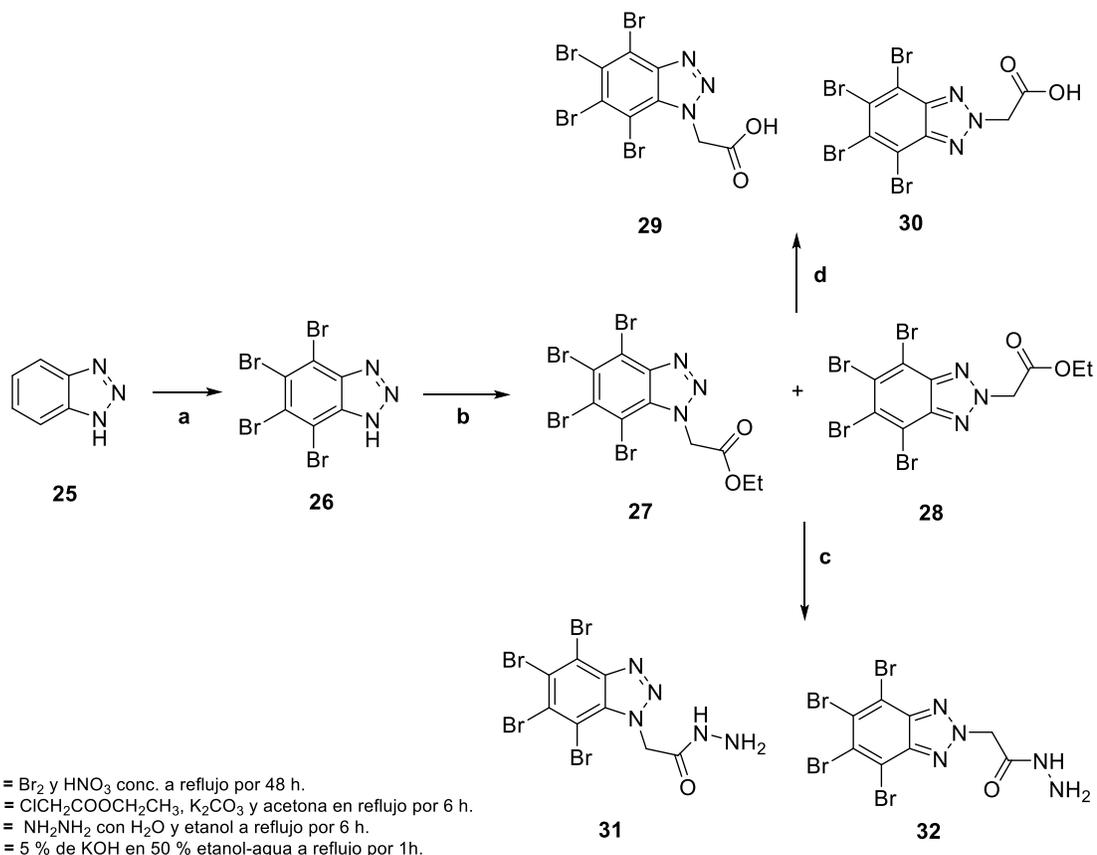
El análisis de viabilidad celular (**Tabla 2**) en las líneas celulares de carcinoma epidermoide (A-431), carcinoma hepatocelular (HEPG2), y carcinoma colorrectal (HCT116 y HCT116p53), mostró que los compuestos **21** y **22** tuvieron mayor actividad que los compuestos **23** y **24**. Observándose que el compuesto **21** fue el que presentó las mejores propiedades físicas y químicas, debido a que presentó menor hidrofobicidad, menor acidez y fue más soluble en medio acuoso. No obstante, el compuesto **22** presentó mayor actividad que el fármaco de referencia (cisplatino) con respecto al IC₅₀.³⁵

Tabla 2. Resultados obtenidos de viabilidad celular de **21-24** y cisplatino.

Viabilidad Celular, IC ₅₀ (μM)					
Línea Celular	Compuesto				
	21	22	23	24	Cisplatino
A-431	5.3 ± 0.7	2.2 ± 0.3	12 ± 2	7.8 ± 1.2	2.02 ± 0.06
HEPG2	3.3 ± 0.4	1.5 ± 0.3	18 ± 4	13 ± 2	2.43 ± 0.14
HCT116	6.1 ± 1.3	1.8 ± 0.3	19 ± 6	23 ± 9	4.7 ± 0.6
HCT116p53	9.4 ± 1.4	2.5 ± 0.2	13 ± 3	48 ± 18	2.94 ± 0.13

En 2020, El-Kardocy *et al.*⁴⁶, realizaron la obtención de nuevos compuestos de benzotriazol, basándose en el TBBT, DMAT y el CX-4945, realizando modificaciones principalmente en el andamio del benzotriazol bromado (TBBT) el cual hasta ahora es el inhibidor más potente y selectivo de la proteína CK2 ($K_i = 0.4 \mu\text{M}$), (**Esquema 3**). En su trabajo realizaron la síntesis de los derivados, introduciendo grupos hidrofílicos como un ácido carboxílico o una hidracida al

anillo de triazol del TBBT, esperando que se pudieran dar interacciones polares más fuertes fuera de la bolsa hidrofóbica.



Esquema 3. Derivados de benzotriazol, inhibidores de proteína CK2, adaptada de El-Kardocy *et al.*⁴⁶

Además, se determinó la actividad anticancerígena de los compuestos en A549 (cáncer de pulmón) y MCF-7; reportando que el TBBT mostró un IC₅₀ = 0.131 μM (CK2α), IC₅₀ = 9.1 μM (MCF-7) y IC₅₀ = 0.131 μM (A549). Realizaron acoplamiento molecular y determinaron que el triazol del TBBT le provee importantes interacciones con residuos como Asp175, Lys68 y Trp176, en el sitio catalítico de la enzima. En sus resultados determinaron que el derivado **32** presentó mejor actividad que los ácidos **29** y **30**, esto se atribuyó a que los derivados son más lipofílicos, permitiéndole interactuar mejor en la bolsa hidrofóbica de la enzima. Los compuestos más activos contra la proteína CK2

fueron el compuesto **30** y **32**, pues lograron colocarse en el mismo sitio que el CX-4945 e interactuaron con residuos de Val116, Lys68 y Asp175. Del derivado **29** se obtuvo un $IC_{50} = 0.5 \mu M$ (CK2) y $IC_{50} = 37.5 \mu M$ (MCF-7), el compuesto **30** mostro un $IC_{50} = 0.098 \mu M$ (CK2) y $IC_{50} = 36.8 \mu M$ (MCF-7) y el **32** obtuvo un $IC_{50} = 0.0131 \mu M$ (CK2) y $IC_{50} = 9.1 \mu M$ (MCF-7), siendo este último el compuesto con mayor actividad contra MCF-7.⁴⁶

En 2022 Mioc *et al.*,⁷⁶ realizaron la síntesis de tres derivados de benzotriazol acoplados con ácido betulínico **33a**, ácido oleanólico **33b** y ácido ursólico **33c** (**Figura 12**) mediante reacciones de esterificación usando *N,N'*-dodiclohexilcarbodiimina. Además, evaluaron su actividad anticancerígena en células de melanoma A375 y evaluaron la citotoxicidad utilizando células sanas de queratinocitos HaCaT.

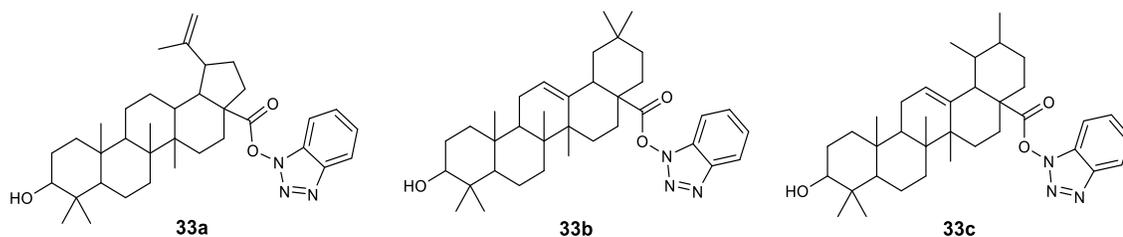
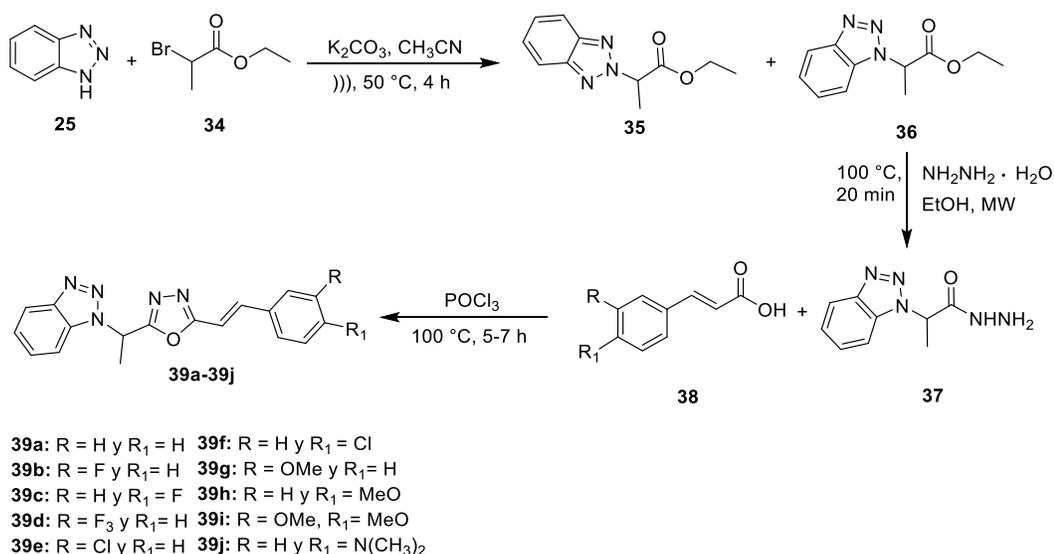


Figura 12. Derivados de benzotriazol **33a-c**, adaptada de Mioc, *et al.*⁷⁶

Reportaron que los compuestos **33a-c** no mostraron efectos citotóxicos en células normales a una concentración menor de $25 \mu M$. Los resultados obtenidos utilizando células de melanoma (A375) mostraron que los compuestos **33a** y **33b** a $25 \mu M$ redujeron significativamente la viabilidad celular (81.25% y 87.4% vs control 100%) y a $50 \mu M$ (69.8% y 62.5% vs control 100%); el compuesto **33c** redujo la viabilidad celular únicamente a una concentración de $50 \mu M$ (77% vs control 100%).⁷⁶

2.2. Benzotriazoles en microscopia confocal de fluorescencia.

En el 2022 Nava-Ramírez *et al.*,⁷⁷ llevaron a cabo la preparación de diez derivados de benzotriazolil-oxidiazol, usando derivados de ácido cinámico y una benzotriazolil hidrazida (**Esquema 4**). Estos compuestos fueron evaluados para determinar su actividad anticancerígena en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y 4T1, que corresponden a cáncer de mama, así como su viabilidad para la obtención de bioimágenes celulares por microscopía de fluorescencia. Los autores reportaron que los derivados con mejor respuesta frente a la línea celular MCF-7 fueron los compuestos **39c**, **39f** y **39i**, siendo el compuesto **39f** el que mostró mayor actividad anticancerígena al presentar un $0.12 \pm 0.07\%$ de viabilidad celular para una concentración de 4 mg/mL.⁷⁷



Esquema 4 . Síntesis de benzotriazolil-1,3,4-oxidiazoles con actividad anticancerígena, adaptado de Nava-Ramírez *et al.*⁷⁷

En el caso de la línea celular MDA-MB-231, los compuestos que mostraron mayor actividad fueron **39a**, **39c**, **39f** y **39g**, siendo el compuesto **39f** el que presentó la mayor actividad anticancerígena al obtener resultados de $0.04 \pm 0.14\%$ de viabilidad a 4 mg/mL, (**Figura 13**). Para la línea 4T1, las moléculas que mostraron mejores resultados fueron **39c**, **39d**, **39f** y **39g**, siendo una vez más el compuesto **39f** el más activo al presentar $0.00 \pm 0.77\%$ de viabilidad celular a 1 mg/mL. En este estudio también evaluaron la actividad citotóxica de los compuestos utilizando esplenocitos murinos, demostrando que los compuestos **39e**, **39h** y **39a** fueron los que presentaron la mejor viabilidad con $89.84 \pm 3.52\%$, $87.66 \pm 4.55\%$ y $84.89 \pm 4.23\%$, respectivamente.

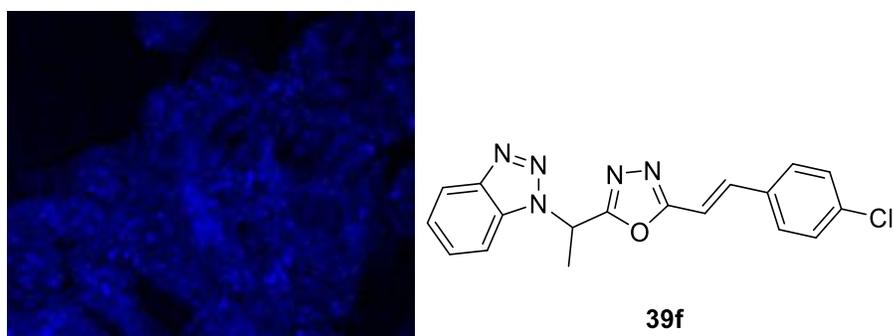


Figura 13. Bioimagen generada a partir del compuesto **39f**.

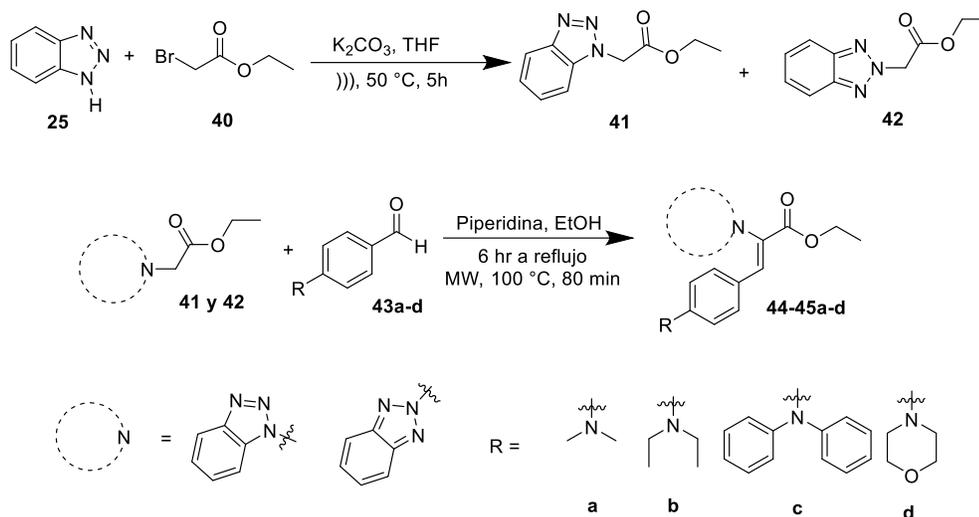
Es importante mencionar que los compuestos que sintetizaron fueron diseñados con base en un sistema conjugado donador-aceptor (D-A), es decir, la estructura de la molécula posee una parte donadora y una parte aceptora de electrones. Lo anterior permite que las moléculas puedan transferir la carga del grupo donador al aceptor (estado excitado) tras haber absorbido luz y, mediante un proceso de relajación para alcanzar su estado basal, liberan energía en forma de fotones manifestándose de esta manera la propiedad de fluorescencia.⁶⁸

Estos compuestos fueron evaluados para determinar su capacidad en la generación de bioimágenes utilizando la línea MCF-7, reportando que los

derivados **39f** y **39i** presentaron las mejores características de fluorescencia, demostrando que estos compuestos tienen el potencial para ser usado como pigmentos en la generación de bioimágenes.⁷⁷

En 2019 Ortega-Villareal *et al.*⁶⁸ realizaron la síntesis de ocho moléculas fluorescentes, (Z)-benzotriazolil-acrilatos de etilo, sintetizadas mediante una reacción de condensación de Knoevenagel, presentando rendimientos mayores del 50%, (**Esquema 5**). El diseño de estos compuestos consiste en un sistema push-pull, es decir, presentan un grupo donador, una conjugación pi y un grupo aceptor lo que les permite la capacidad de exhibir fluorescencia. Determinaron sus propiedades fotofísicas, esperando obtener un desplazamiento de Stokes (SS) mayor de 80 nm y un coeficiente de absortividad molar (ϵ) mayor de 30 000 $M^{-1}cm^{-1}$) para determinar si podrían ser utilizados en la generación de bioimágenes.

El compuesto **45a** presentó buenas propiedades fotofísicas, SS = 128 nm y $\epsilon = 3.28 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$, y baja citotoxicidad, por lo que fue utilizado para la generación de bioimágenes, donde determinaron que los compuestos son capaces de ingresar a las células y estos se localizaban en lisosomas y endosomas, (**Figura 14**). Además, evaluaron su citotoxicidad en células HEK 293T (células de riñón), determinando que presentaban una baja toxicidad a 0.6 μM .⁶⁸



Esquema 5. Síntesis de acrilatos de etil (Z)-benzotriazolilo, por Ortega-Villareal, *et al.*⁶⁸

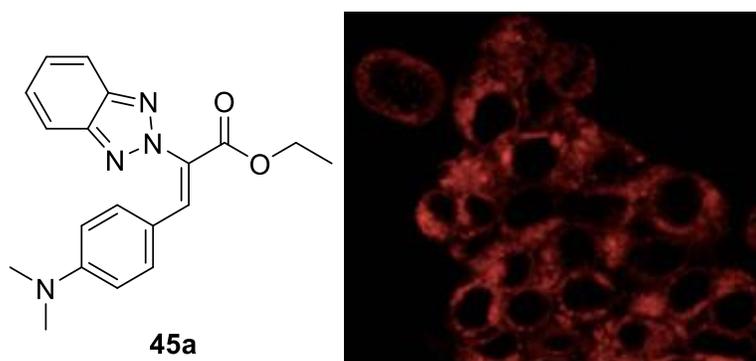


Figura 14. Bioimagen generada a partir del compuesto **45a**, imagen obtenida de Ortega-Villareal, *et al.*⁶⁸

2.3. Análisis crítico

En la actualidad el cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y el cáncer de colorrectal se encuentra entre los tres tipos principales de cáncer más comunes y prevalentes, afectando tanto a hombres como mujeres. A pesar de todos los avances en el tratamiento oncológico, la resistencia a fármacos es uno de los principales desafíos debido a que las células cancerígenas desarrollan mecanismos que les permiten evadir la apoptosis

celular e inclusive son capaces de activar vías de transporte de fármacos limitando la eficacia de los tratamientos actuales. Es por ello que surge la necesidad de buscar nuevas moléculas que permitan superar la resistencia de las células cancerígenas a la quimioterapia.^{78,79}

De acuerdo con lo reportado en la literatura, el benzotriazol es un compuesto heterocíclico utilizado como un “andamio” para el desarrollo de nuevas moléculas activas. Se han sintetizado derivados de benzotriazol que han presentado actividad anticancerígena. Esta actividad biológica se atribuye a que el benzotriazol es considerado un bioisómero de las purinas,⁵⁷ lo que le permite interactuar como sustrato falso, con la capacidad de anclarse e interactuar con enzimas involucradas en la proliferación celular, como es el caso de la proteína CK2 la cual juega un papel importante en la proliferación celular y en la progresión tumoral.⁸⁰

Debido a esto, los derivados de benzotriazol podrían ser utilizados como fármacos potenciales para el tratamiento de cáncer. Por ejemplo, un derivado de benzotriazol con actividad anticancerígena es el Vorozole, un inhibidor de la aromatasa utilizado en el tratamiento del cáncer de mama.^{57,81}

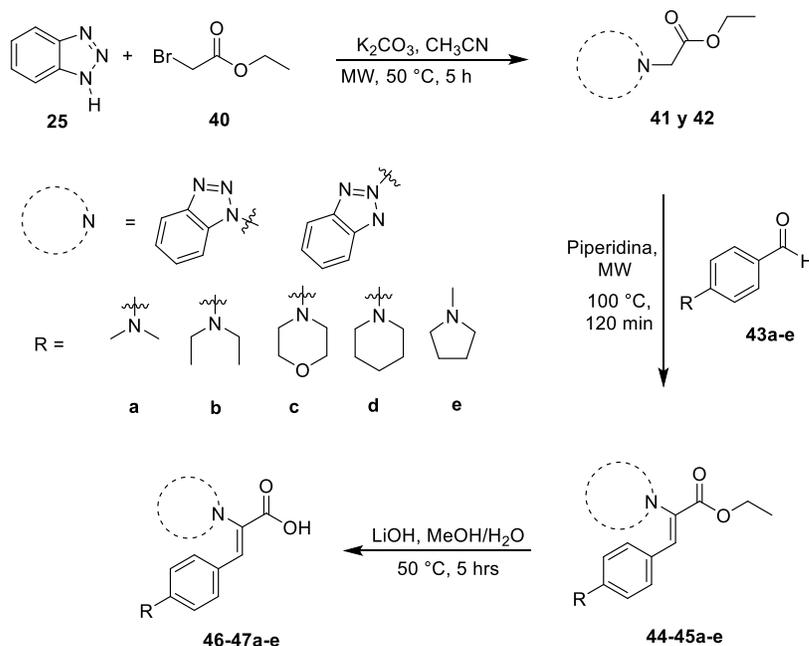
Además, el desarrollo de nuevas moléculas que incorporen heterociclos como el benzotriazol en sus estructuras, representan una prometedora alternativa para el tratamiento del cáncer, cuya tasa de mortalidad y de nuevos casos al año es elevada y va en incremento año con año.

En el presente proyecto se planteó la síntesis de diez derivados de ácido benzotriazolil-acrílico **46-47a-e** siguiendo la ruta de síntesis mostrada en el **Esquema 6**. Se realizó una reacción de sustitución nucleofílica entre el benzotriazol **25** y el bromoacetato de etilo **40** para generar los ésteres **41** y **42**, seguido de una reacción de condensación de Knoevenagel utilizando diferentes

aldehídos aromáticos **43a-e**, finalizando con una reacción de hidrólisis de los ésteres correspondiente **44-45a-e** con hidróxido de litio.

Estos compuestos presentan una estructura similar a la propuesta por El-Kardocy *et al.* (2020), quienes reportaron que sus derivados mostraron actividad anticancerígena y que eran capaces de inhibir la proteína CK2, involucrada en la proliferación celular de las células cancerígenas. Al igual que los compuestos descritos por El-Kardocy *et al.*, en esta investigación los compuestos planteados mantienen el núcleo de benzotriazol y la parte del ácido carboxílico en su estructura, el cual con los resultados obtenidos está asociado con la capacidad de inhibir el sitio catalítico de la proteína CK2.

Además, estos compuestos poseen en su estructura un sistema conjugado donador-aceptor que les confiere la capacidad de emitir fluorescencia, permitiendo que estos derivados tengan un uso potencial como tintes celulares y puedan ser usados en la generación de bioimágenes.



Esquema 6. Síntesis de derivados de ácido benzotriazolil-acrílico **46-47a-e**.

3. Hipótesis

Al menos uno de los derivados del ácido benzotriazolil-acrílico presenta actividad anticancerígena *in vitro* mayor que la del fármaco de referencia, Cisplatino, frente a la línea celular Caco-2 (que presenta expresión de la proteína CK2) y presenta valores de $SS \geq 70$ nm y $\epsilon \geq 30\,000$ M⁻¹cm⁻¹ para su potencial aplicación en la generación de imágenes celulares.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Sintetizar derivados del ácido benzotriazolil-acrílico, evaluar su actividad anticancerígena *in vitro* y evaluar sus propiedades fotofísicas para su potencial aplicación en la generación de imágenes celulares.

4.2. Objetivos específicos.

1. Sintetizar el benzotriazolil acetato de etilo **41-42**.
2. Sintetizar los derivados de benzotriazolil-acrilatos de etilo **44-45a-e**.
3. Sintetizar los derivados de ácido benzotriazolil-acrílico **46-47a-e**.
4. Caracterizar los compuestos obtenidos por medio de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y resonancia magnética nuclear de protón y carbono-13 (RMN ¹H y ¹³C).
5. Evaluar las propiedades fotofísicas de los compuestos por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-Vis) y fluorescencia.
6. Realizar y analizar *in silico* el acoplamiento molecular de los compuestos **46-47a-e** a la proteína CK2.
7. Determinar la actividad anticancerígena de los compuestos en la línea celular de cáncer colorrectal (Caco-2).
8. Evaluar la citotoxicidad de los compuestos más activos en células no cancerígenas (timocitos murinos).

5. Materiales y Métodos

5.1. Equipos e instrumentos

Balanza analítica AND HR-200 ultrasonido Branson 5510, Microondas Anton Paar Monowave 300, Ultrasonido Branson 5510, Mel-Temp Electrothermal, espectrofotómetro UV-vis Mettler-Toledo UV5, espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN) Varian 500 y Bruker 500, espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) Agilent TOF 6210, espectrofotómetro de fluorescencia PerkinElmer FL8500, Lector de placas Varioskan Lux Thermo Fisher Scientific cámara Neubauer, campana de flujo laminar Nauire Clase II Tipo A/B3, centrifuga Eppendorf 5804R y 5416.

5.2. Reactivos

Proveedores	Materiales
- CTR	Guantes, espátula, parafilm, vasos de precipitado 100 mL, vasos
- Anton Paar	de precipitado 250 mL, agitador magnético, embudo de separación
- Desarrollo de Especialidades Químicas (DEQ)	250 mL, placas cromatográficas de silica gel, embudo Büchner, viales microondas (G-10), probeta de 100 mL, probeta de 50 mL, probeta de 10 mL, soporte universal, gradilla, perrillas de succión, papel filtro Whatman # 41, matraz bola 250 mL, tubos de ensayo 150 x 18, vidrio de reloj, sanitas, guantes, puntas de micropipetas (10, 200, 1000 µL), tubos de centrifuga (2 y 10 mL), frasco estériles T25, placas de 96 pocillos con tapa estériles, equipo de filtración, filtros de 0.22 µm.
Proveedores	Reactivos

<ul style="list-style-type: none"> - Sigma Aldrich - Desarrollo de Especialidades Químicas (DEQ) - ATCC 	<p>1<i>H</i>-Benzotriazol, carbonato de potasio, acetonitrilo, bromoacetato de etilo, acetato de etilo, hexano, sulfato de sodio anhidro, piperidina, etanol absoluto, metanol, cloroformo, acetona, hidróxido de litio, dimetilsulfoxido, 4-(dimetilamino)benzaldehído, 4-(dietilamino)benzaldehído, 4-(1-pirrolidino)benzaldehído, 4-(1-piperidinil)benzaldehído, 4-(4-morfolinil)benzaldehído, Noveldexis (Cisplatino L16T015) medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino, sal de tetrazolio (1047385-1), sal de sodio de Resazurina, solución sódica de tripsina, etanol \geq 99.8 %, dimetilsulfóxido \geq 99.9%. Línea celular: Caco-2 (ATCC, HTB-37™).</p>
--	--

5.3. Manejo de animales de experimentación

Ratones macho de la cepa BALB/c fueron mantenidos en jaulas bajo condiciones de bioterio a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ y en un fotoperiodo de 12 h de luz con 12 h de oscuridad, con alimento (LabDiet) y con acceso libre de agua. El procedimiento de sacrificio de los ratones se llevó a cabo de acuerdo con la norma mexicana de manejo de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999 y el Comité de Bioética Animal del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (CEIBA), código de registro al comité de bioética: CEIBA-FCB-24/2024.

5.4. Disposición de residuos

La disposición de residuos se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos establecidos en la Facultad de Ciencias Químicas y la Facultad de Ciencias biológicas de la UANL.

Tabla 3. Clasificación de residuos.

Colector	Tipo de Residuo
A	Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas.
B	Sólidos inorgánicos, sales inorgánicas.
C	Tóxicos e inflamables, aminas, disolventes orgánicos no halogenados.
D	Tóxicos e inflamables, aminas, disolventes orgánicos halogenados.
E_{orgánico}	Orgánico: muy tóxico, cancerígeno, orgánico.
E_{inorgánico}	Orgánico: muy tóxico, cancerígeno, inorgánico.
G	Combinaciones orgánicas sólidas.
R.P.B.I.	Residuos peligrosos biológico-infecciosos
Verde	Basura industrial
Azul	Plásticos impregnados con sustancias peligrosas
Rojo	Vidrio impregnado de sustancias peligrosas

5.5. Metodología

5.5.1. Síntesis Orgánica

5.5.1.1. Síntesis de benzotriazolil acetato de etilo **41** y **42**

En un matraz redondo se adicionó 1.0 Eq de benzotriazol **25**, 1.1 Eq de bromoacetato de etilo **40** y 1.5 Eq de carbonato de potasio (K_2CO_3), y se agregó 30 mL de acetonitrilo para disolver el benzotriazol. Se colocó en baño de ultrasonido por aproximadamente 5 h. La reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina (TLC) usando una fase móvil (7:3 v/v) de hexano (Hex) y acetato de etilo (AcOEt). Una vez finalizada la reacción, se adicionaron 30 mL de agua destilada y se efectuaron por triplicado extracciones con 30 mL de AcOEt y se conservó la fase orgánica. Se adicionó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) a la fase orgánica, la cual se filtró y evaporó. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de Hex:AcOEt (8:2 v/v) como fase móvil. Los productos obtenidos fueron caracterizados estructuralmente por RMN de 1H y ^{13}C , así como HRMS.

5.5.1.2. Síntesis de derivados de benzotriazolil-acrilatos de etilo **44-45a-e**

En un vial de microondas G-10 se adicionó un agitador magnético, 1.0 Eq de benzotriazolil-acetato de etilo **41-42** 1.0 Eq del aldehído aromático correspondiente **43a-e** [4-(dimetilamino)benzaldehído, 4-(dietilamino)benzaldehído, 4-(1-pirrolidino)benzaldehído, 4-(1-piperidinil)benzaldehído, y 4-(4-morfolinil)-benzaldehído], 2.0 Eq de piperidina y 3.5 mL de etanol absoluto. Se colocó el vial en la cavidad del microondas y se programó el equipo a 100 °C por 120 min. El avance de la reacción se siguió por

TLC utilizando una mezcla de Hex:AcOEt en relación 7:3 v/v. El residuo resultante se purificó mediante filtración con etanol absoluto frío o mediante cromatografía en columna utilizando una mezcla de Hex/AcOEt en proporción 7:3 v/v.

5.5.1.3. Síntesis de derivados de ácido benzotriazolil-acrílico 46-47a-e

En un matraz bola, se pesó 1.0 Eq del benzotriazolil-acrilato de etilo correspondiente **44-45a-e** más 2.0 Eq de hidróxido de litio (LiOH) y se adicionaron 3 mL de H₂O y 6 mL de MeOH. Se sometió a baño de ultrasonido por 4 h. Se monitoreó el avance de la reacción mediante TLC. Una vez terminada la reacción, se evaporó el disolvente, se adicionaron 30 mL de H₂O y se realizaron por triplicado extracciones con 30 mL de AcOEt cada una. Se conservó la fase acuosa y, bajo agitación constante, se acidificó gota a gota con ácido clorhídrico (HCl) concentrado hasta un pH de aproximadamente 3 - 4. El precipitado se filtró a vacío y el sólido obtenido se dejó secar por 15 min a 200 °C. El sólido obtenido se purificó por medio de recristalización utilizando una solución de MeOH:AcOEt 1:1 v/v.

5.5.2. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una técnica utilizada para el diseño de nuevos fármacos que consiste en el uso de herramientas computacionales que permiten predecir la interacción entre un ligando (molécula pequeña) y una diana terapéutica (proteínas, ADN o ARN) y en la mayoría de los casos permite determinar la afinidad que presenta un ligando al sitio activo de una diana terapéutica. Existen diferentes metodologías de acoplamiento molecular, usando receptor rígido - ligando rígido, receptor rígido-ligando flexible o receptor flexible-ligando flexible.⁸²⁻⁸⁴

En este proyecto se realizó un acoplamiento receptor rígido – ligando flexible. Para ello se obtuvo la estructura cristalina de la proteína CK2 subunidad alfa con código asignado 3pe1, proteína cristalizada con el ligando 3NG de la base de datos Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/search>).

Se preparó la proteína mediante el uso del software PyMOL, retirando los iones y las moléculas de agua. Se obtuvieron por separando la proteína CK2 (**3pe1**) y el ligando (**3NG**). Las moléculas se optimizaron mediante el software Avogadro con la finalidad de obtener el conformero más estable y de menor energía. La proteína y los ligandos fueron preparados en el software AutoDock 4.2 en donde solo se mantienen los hidrógenos polares y se añaden las cargas necesarias en la proteína y los ligandos.

Los cálculos computacionales se realizaron utilizando AutoDock4.2, el cual utiliza un algoritmo genético Lamarckiano.⁸⁵ Primeramente, se realizó la validación del sitio activo utilizando la función gridbox de AutoDock 4.2, donde se designaron diferentes tamaños de gridbox desde 20 hasta 50, centrando las coordenadas con base en la ubicación espacial del ligando en las coordenadas X = 22.657, Y = -31.002 y Z = 14.951. Una vez realizada la validación, se realizó la visualización de resultados comparando con el ligando original para obtener el valor de RMSD y finalmente se obtuvieron los mapas correspondientes de cada molécula. Se realizaron los cálculos correspondientes en AutoDock 4.2 en las coordenadas anteriormente mencionadas para obtener la energía de unión.

La visualización de los resultados se llevó a cabo mediante el uso de PyMOL (<https://pymol.org/>) y las interacciones obtenidas de los compuestos fueron analizadas y obtenidas mediante el software Discovery Studio Visualizer (<https://www.3ds.com/>).

5.5.3. Pruebas biológicas

La actividad anticancerígena se realizó en la línea celular Caco-2 (ATCC®, CRL-HTB-37), que corresponde a células epiteliales de cáncer colorrectal, células adherentes, estas células crecen en monocapa.⁸⁶ Esta línea celular se encuentra en la cuarta posición de expresión de la proteína CK2 en las líneas celulares de cáncer colorrectal de acuerdo con la base de datos The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>).⁴⁴ Se cultivó la línea celular Caco-2 en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS) a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 80% de humedad, dicha línea celular se mantuvo hasta tener una confluencia del 80%.

Las pruebas de citotoxicidad se realizaron en timocitos murinos. Los timocitos son células que se producen en la médula ósea y que terminan de madurar en el timo para dar lugar a los linfocitos T, siendo de las principales células inmunes que se encargan de generar una respuesta inmune para eliminar las células tumorales. Es importante evaluar el uso de nuevos fármacos en timo esto debido a que la quimioterapia puede causar que el timo se atrofie y por ende se genere una reducción en la producción de linfocitos T, lo cual comprometa la respuesta inmune adecuada para combatir las células tumorales.^{87,88}

Los compuestos sintetizados se disolvieron en una solución menor al 0.5% de DMSO. Cada prueba se realizó por triplicado técnico. Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó el ensayo de MTT y el ensayo de reducción de resazurina.

El ensayo de viabilidad celular con la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), es un ensayo que permite determinar la actividad metabólica de las células. El MTT es capaz de atravesar la membrana celular de las células, este compuesto se reduce por enzimas oxidorreductasas y deshidrogenasas (NAD(P)H) presentes en células viables, generando que el

MTT se reduce a cristales de formazán que son insolubles en el medio. Esta sal insoluble de formazán es posible solubilizarla en DMSO, para después cuantificar por densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm la cantidad de formazán producido por el número de células viables.^{89,90}

La prueba de reducción de resazurina, es un ensayo colorimétrico que permite detectar la viabilidad de las células. La resazurina es un compuesto de coloración azul, este compuesto es reducido a resofurina por las enzimas mitocondriales presentes en las células viables, generando el cambio de color, donde la fluorescencia generada es proporcional a la cantidad de células viables en el medio, siendo posible cuantificar esta señal en un espectrofotómetro para determinar el porcentaje de viabilidad celular.^{91,92}

Los cálculos de viabilidad celular se realizaron mediante la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{DO_{Muestra} - DO_{Blanco}}{DO_{Control} - DO_{Blanco}} \times 100$$

Donde:

DO_{Blanco}: Densidad óptica del blanco.

DO_{Control}: Densidad óptica del control.

DO_{Muestra}: Densidad óptica de la muestra.

5.5.3.1. Actividad anticancerígena *in vitro* de los derivados de ácido benzotriazolil acrílico.

La determinación de la actividad anticancerígena se llevó a cabo por triplicado mediante un ensayo de MTT; En una placa de 96 pocillos se colocaron 2×10^4 células por pozo de la línea celular Caco-2. Se procedió a incubarlas en medio DMEM suplementado con 10% de FBS a 37 °C en una atmósfera del 5% de CO₂ y 80% de humedad, por 24 h. Una vez adheridas, se decantó el medio,

consecuentemente se sometieron las células a 3 concentraciones diferentes (100, 250 y 500 µg/mL) de los derivados **46-47a-e**, se utilizó Cisplatino como control positivo a una concentración de 100 µg/mL, como control negativo se cultivaron las células con medio y como blanco se empleó medio con MTT. Las muestras se incubaron durante 24 h bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Se seleccionaron dos compuestos que se sometieron a 72 h bajo las mismas condiciones.

Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS y se adicionaron 100 µL de una solución al 10% de MTT en medio; se incubaron por 2.5 h a 37 °C con una atmosfera de 5% de CO₂ y 80% humedad. Una vez finalizado el tiempo, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 100 µL de DMSO para disolver los cristales de formazán. Finalmente se realizó la lectura de las placas a una longitud de 570 nm, en un lector de placas.

5.5.3.2. Actividad citotóxica *in vitro* de los derivados de ácido benzotriazolil acrílico

Por medio de dislocación cervical fueron sacrificados ratones de la cepa BALB/c de 6 - 8 semanas. Se recolecto el timo y fue disgregado en medio DMEM, la suspensión celular fue recolectada en tubos de 2 mL, a los cuales se les agregó antibiotico-antimicótico al 1%. Las células fueron centrifugadas a 1600 rpm por 10 min, realizando dos lavados con medio DMEM.

La determinación de la actividad citotóxica de los compuestos se llevó a cabo por triplicado mediante el ensayo de reducción de resazurina; se sembraron en una placa de 96 pocillos alrededor de 2×10^5 células por pozo de timocitos murinos en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y se incubó por 12 h a 37 °C con una atmosfera de 5% de CO₂ con 80% de humedad. Se retiró el medio y se aplicaron tres concentraciones (100, 250 y 500 µg/mL) de los compuestos

que presentaron mejor actividad (**46b** y **46e**), se incubó por 24 h bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el medio y se adicionaron 100 μL de una solución al 20% de resazurina; se incubaron durante 4 horas a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizó la lectura de las placas a una longitud de onda de 530 nm de excitación y 590 nm de emisión.

5.5.4. Determinación de propiedades fotofísicas.

Para la determinación de las propiedades fotofísicas de los compuestos **46-47a-e** se realizaron preparando una solución de 15 ppm de cada compuesto disolviendo con metanol. Con un espectrofotómetro de UV-visible se obtuvo el espectro de absorción, donde se determinó la longitud máxima de absorción.

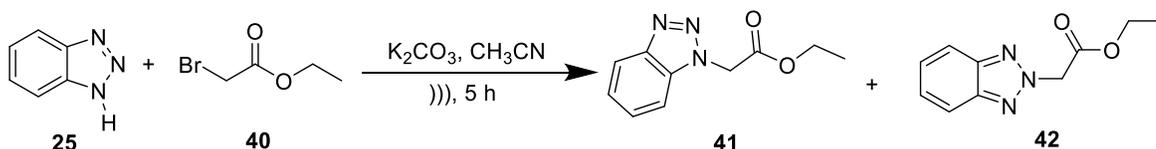
Se prepararon soluciones con una concentración aproximada de 0.1 ppm de cada compuesto y se obtuvo el espectro de excitación y emisión con un espectrofluorómetro; se determinó el desplazamiento de Stokes realizando la diferencia de la longitud máxima de emisión menos la de excitación.

6. Resultados y Discusión

6.1. Síntesis Orgánica

6.1.1. Síntesis de ésteres de benzotriazolil acetato de etilo **41** y **42**.

Para obtener los ésteres de benzotriazolil acetato de etilo **41** y **42** se realizó una reacción de sustitución nucleofílica (S_N2), en la que se hizo reaccionar el benzotriazol con bromoacetato de etilo **40**, usando como base K_2CO_3 y acetonitrilo como disolvente; esta reacción se llevó a cabo mediante sonicación por 5 h a 50 °C, (**Esquema 7**).



Esquema 7. Síntesis de ésteres de benzotriazolil acetato de etilo **41-42**.

Esta reacción fue monitoreada por TLC, utilizando como fase móvil Hex:AcOEt 7:3 v/v, esto con la finalidad de verificar que la reacción se estuviera llevando a cabo para la obtención de los productos de interés; donde se obtuvieron dos productos, el compuesto **41** y el compuesto **42**, esto debido a que el benzotriazol en solución presenta tautomería, es decir, el cambio de posición de uno de sus átomos en la molécula, que en este caso es el átomo de hidrógeno el que cambia de posición, donde el isómero más estable es el que se presenta en la posición 1H (**Figura 15**).

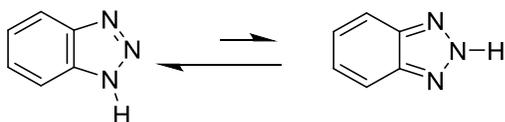


Figura 15. Tautomería del benzotriazol.

Una vez terminada la reacción, se realizaron tres extracciones con 30 mL de AcOEt, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y evaporó. El sólido obtenido se purificó por cromatografía en columna, donde se utilizó una fase móvil Hex:AcOEt en proporción 8:2 v/v. Se obtuvieron dos sólidos blancos cristalinos con un porcentaje de rendimiento del 88% para el compuesto **41** y 12% para el compuesto **42** (**Tabla 4**).

Tabla 4. Características y propiedades obtenidas de los compuestos **41** y **42**.

Características y propiedades			
 41	Rendimiento: 88% Sólido blanco R.f.: 0.4 P.F. 96 - 98 °C	 42	Rendimiento: 12% Sólido blanco R.f.: 0.61 P.F. 112 - 114 °C

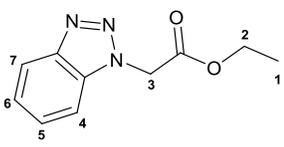
R.f.: Fase móvil (Hex:AcOEt, 7:3 v/v).

Para corroborar su obtención, estos compuestos fueron caracterizados por RMN de ¹H y ¹³C y HRMS.

A continuación, en la **Figura 16** se muestra el espectro de RMN del compuesto **41** y en la **Tabla 5** se muestran los datos espectroscópicos de las señales correspondientes del mismo; obteniéndose un triplete y cuarteto que integran para tres y dos protones, respectivamente. Ambas señales presentaron una constante de acoplamiento (*J*) de 7.1 Hz, lo cual indica que estas señales corresponden a la parte del grupo etilo del éster. En 5.42 ppm se observa un singulete que corresponde al metileno entre el benzotriazol y el grupo éster, de

7.36 a 7.54 ppm se observa una señal múltiple y en 8.08 ppm un doblete que integran para tres y un protón, respectivamente, correspondientes a la parte aromática del benzotriazol.

Tabla 5. Desplazamientos químicos obtenidos del RMN de ^1H del compuesto **41** (500 MHz, CDCl_3).

Molécula	RMN de ^1H				
	Posición protón	Desplazamiento (ppm)	Integral (H)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J(Hz)
	1	1.26	3	t	7.1
	2	4.25	2	c	7.1
	3	5.42	2	s	-
	7	8.08	1	d	8.4
	4,5,6	7.36-7.54	3	m	-

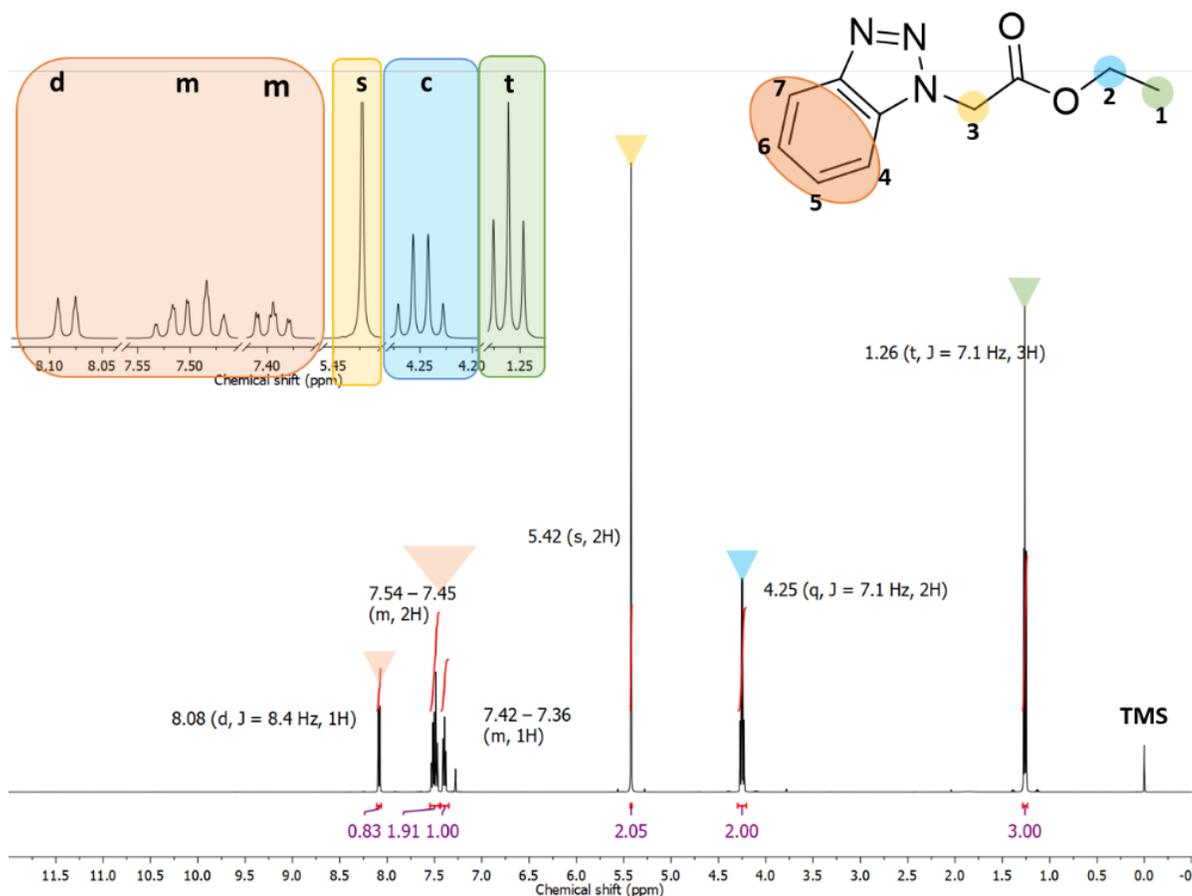


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H de **41** (300 MHz, CDCl_3).

En el espectro de ^{13}C , (**Figura 17**) se observan tres señales con un desplazamiento menor a 100 ppm que corresponden a la parte alifática de la molécula, marcadas en verde. En el caso de los carbonos insaturados se observan siete señales después de 100 ppm, de las cuales, se observó un desplazamiento en 166.2 ppm que corresponde al carbonilo del éster, confirmando la obtención del compuesto.

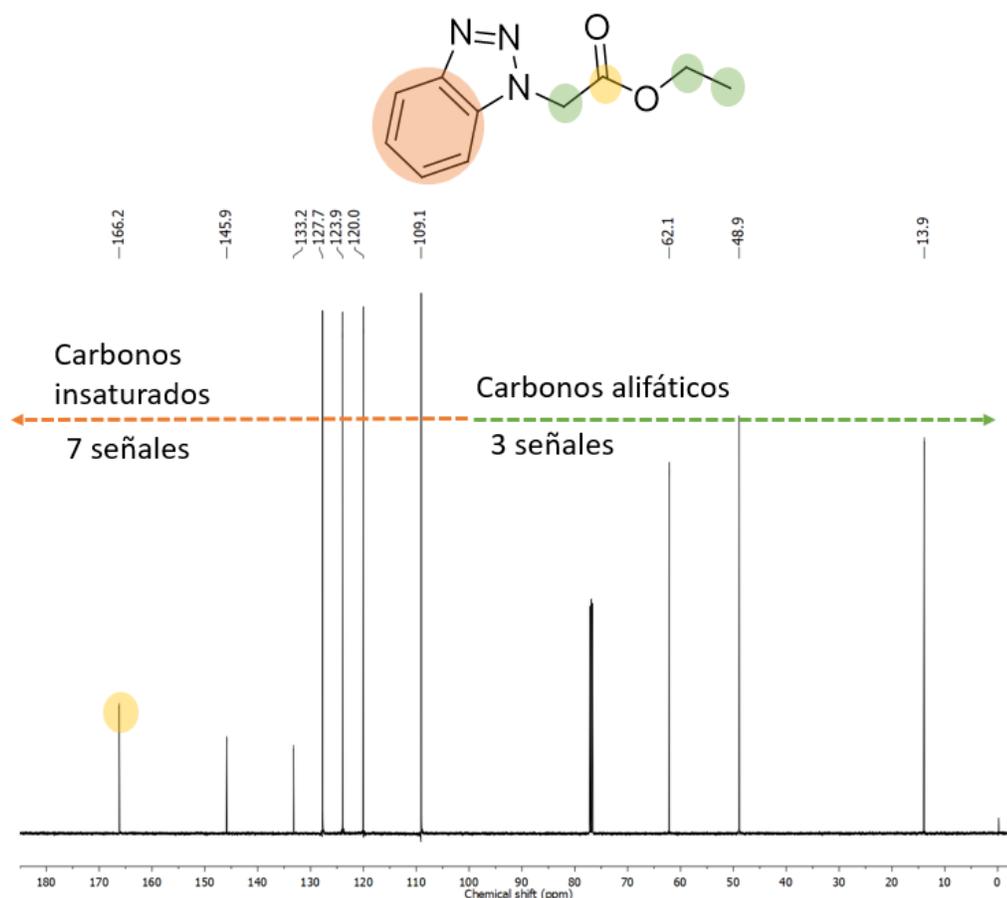


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C de **41** (126 MHz, CDCl_3).

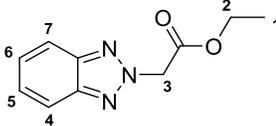
Datos espectroscópicos condensados del compuesto **41**:

2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)acetato de etilo: ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4.25 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 5.42 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 8.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.36-7.54 (m, 2H, H_{arom}); ^{13}C RMN (126

MHz, CDCl₃): δ 13.9, 48.9, 62.1, 109.1, 120.0, 123.9, 127.7, 133.2, 145.9, 166.2.
 HRMS (ESI⁺): C₁₀H₁₁N₃O₂ [M + H]⁺ calculada *m/z* 206.0930, encontrada *m/z* 206.0922.

En la **Tabla 6** se encuentran los datos espectroscópicos del otro isómero obtenido, observando que se mantiene la señal singulete que integra para dos protones que corresponden al metileno, se mantiene el cuarteto y el triplete que integran para dos y tres protones, respectivamente, ambas señales con una constante de acoplamiento de 7.1 Hz, correspondientes a la señal del etilo del éster. Por otra parte, se observan dos conjuntos de señales múltiples simétricas que corresponden a los protones aromáticos del benzotriazol, indicando que se obtuvo el isómero con sustitución en posición *2H* (**Figura 18**).

Tabla 6. Desplazamientos químicos obtenidos del RMN de ¹H del compuesto **42** (500 MHz, CDCl₃).

Molécula	RMN de ¹ H				
	Posición protón	Desplazamiento (ppm)	Integral (H)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J(Hz)
	1	1.27	3	t	7.1
	2	4.27	2	c	7.1
	3	5.53	2	s	-
	5,6	7.47-7.34	2	m	-
	7,4	7.97-7.83	2	m	-

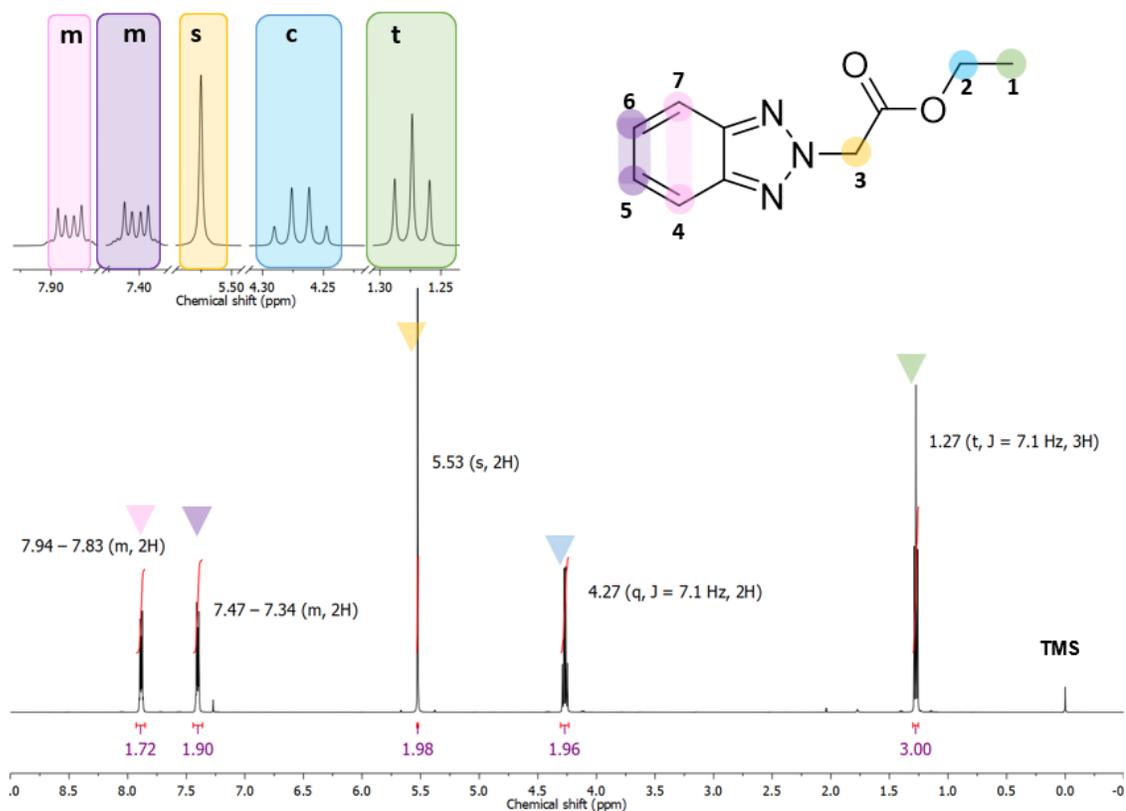


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H de **42** (300 MHz, CDCl_3).

En el caso del espectro de ^{13}C se mantuvieron las tres señales correspondientes a la parte alifática de la molécula, indicados en verde en la **Figura 19**, y se obtuvieron solo cuatro señales en la región de carbonos insaturados, de las cuales la señal en 166.3 ppm corresponde al carbonilo de la molécula y las otras tres señales corresponden a los carbonos insaturados del benzotriazol, esto debido a que la molécula presenta cierta simetría en el isómero *2H*, por lo que se generan únicamente tres señales.

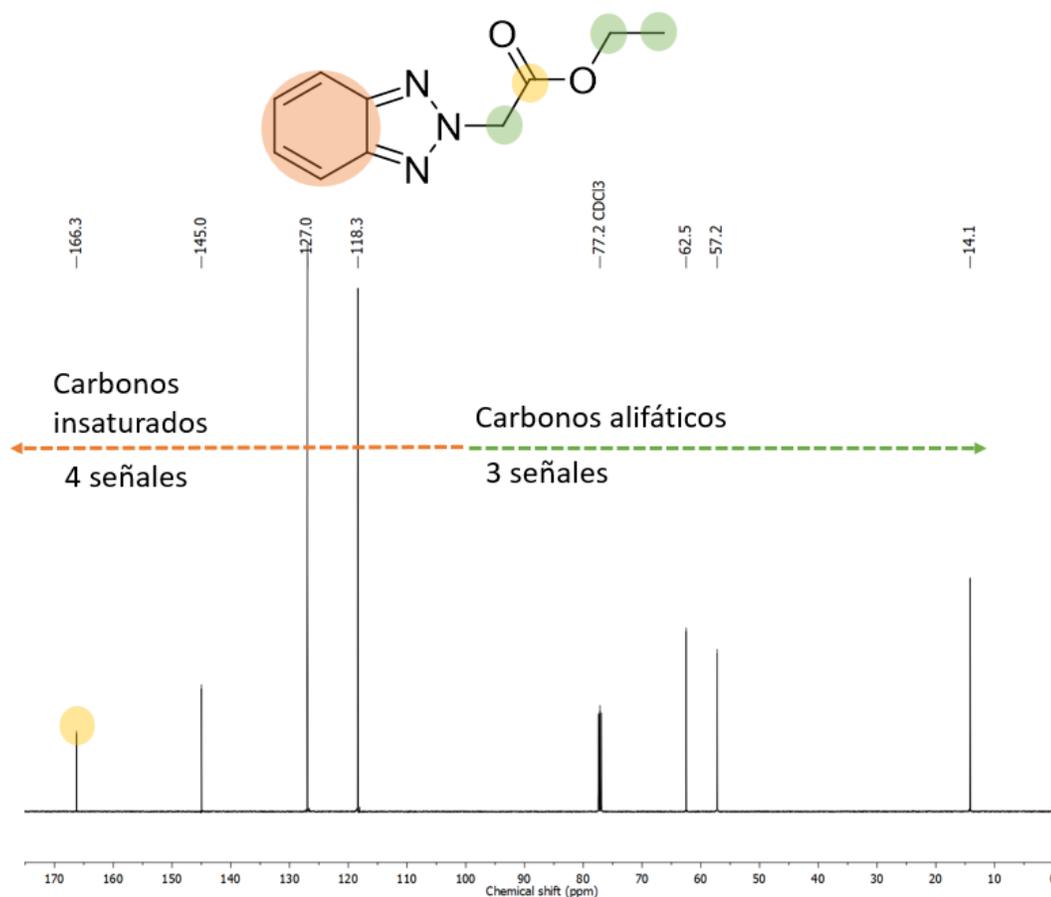


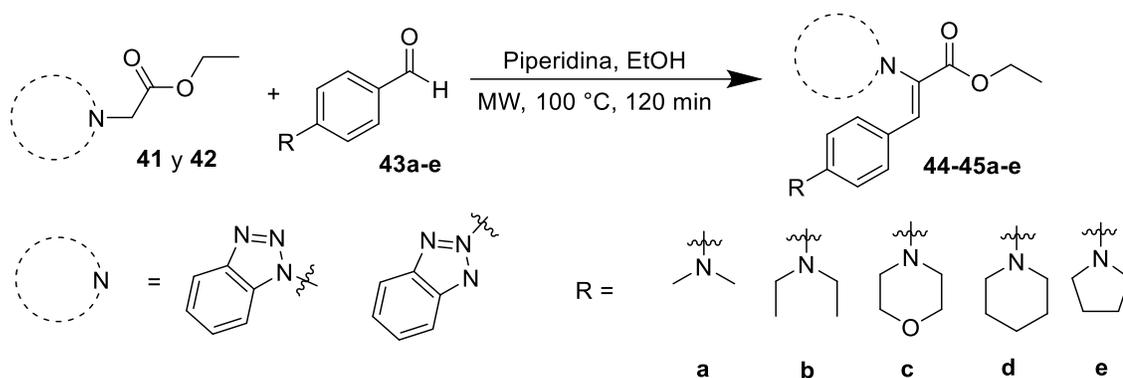
Figura 19. Espectro de RMN de ¹³C de **42** (126 MHz, CDCl₃).

Datos espectroscópicos condensados del compuesto **42**:

2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)acetato de etilo, 42: ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂-CH₃), 4.27 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 5.53 (s, 2H, CH₂-CO), 7.47 -7.34 (m, 2H, H_{arom}), 7.97-7.83 (m, 2H, H_{arom}); ¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃): δ 14.1, 57.2, 62.5, 118.3, 127.0, 145.0, 166.3. HRMS (ESI⁺): C₁₀H₁₁N₃O₂, [M + H]⁺ calculada *m/z* 206.0930, encontrada *m/z* 206.0921.

6.1.2. Síntesis de derivados de benzotriazolil-acrilatos de etilo 44-45a-e

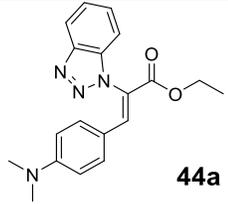
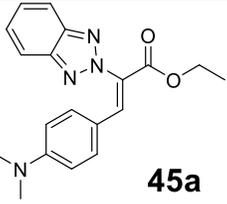
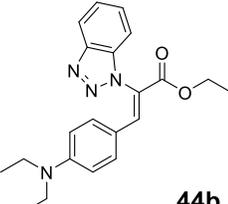
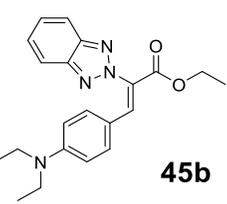
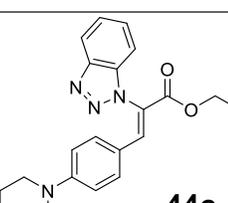
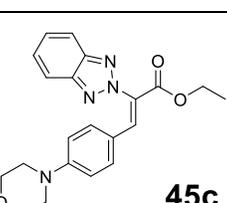
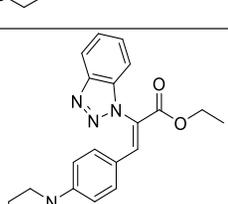
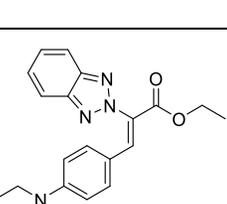
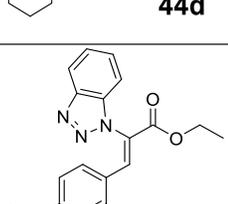
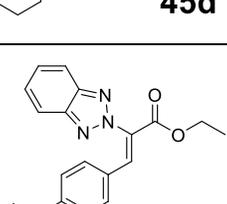
La obtención de los derivados de benzotriazolil-acrilatos de etilo se realizó mediante una reacción de condensación de Knoevenagel sometiendo a reaccionar el éster de benzotriazolil-acetato de etilo **41** y/o **42** previamente sintetizado, con uno de los cinco aldehídos aromáticos [4-(dimetilamino)benzaldehído, 4-(dietilamino)benzaldehído, 4-(4-morfolinil)benzaldehído, 4-(1-piperidinil)benzaldehído, y 4-(1-pirrolidino)benzaldehído, utilizando como base piperidina y etanol absoluto como disolvente; bajo irradiación de microondas a 100 °C por 120 min (**Esquema 8**).



Esquema 8. Síntesis de derivados de benzotriazolil-acrilatos de etilo **44-45a-e**.

La reacción se monitoreo mediante TLC utilizando Hex:AcEOt 7:3 v/v como fase móvil. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se mantuvo en congelación por al menos dos días. El crudo de reacción se purificó mediante filtración con etanol absoluto frío o mediante cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y Hex:AcEOt 7:3 v/v como fase móvil. Se obtuvieron solidos de color amarillo claro hasta naranja opaco, con rendimientos entre el 17% al 47%, (**Tabla 7**).

Tabla 7. Características y propiedades de ésteres de acrilatos de etilo **44-45a-e**.

Características y propiedades			
 44a	Rendimiento: 35.5 % Sólido amarillo R.f.: 0.39 P.F. 142-144 °C	 45a	Rendimiento: 47.2 % Sólido amarillo pálido R.f.: 0.48 P.F. 136-138 °C
 44b	Rendimiento: 17.2 % Sólido amarillo claro R.f.: 0.50 P.F. 118-120 °C	 45b	Rendimiento: 30.4 % Sólido amarillo pálido R.f.: 0.58 P.F. 128-130 °C
 44c	Rendimiento: 30.1 % Sólido amarillo claro R.f.: 0.23 P.F. 132 - 134 °C	 45c	Rendimiento: 28.7 % Sólido amarillo claro R.f.: 0.39 P.F. 102 - 104 °C
 44d	Rendimiento: 29.5 % Sólido amarillo opaco R.f.: 0.57 P.F. 106 - 108 °C	 45d	Rendimiento: 31.7% Sólido amarillo pálido R.f.: 0.60 P.F. 138 - 140 °C
 44e	Rendimiento: 30.0% Sólido amarillo R.f.: 0.38 P.F. 148-150 °C	 45e	Rendimiento: 46.9 % Sólido amarillo R.f.: 0.45 P.F. 152-154 °C

R.f.: Fase móvil (Hex:AcOEt, 7:3 v/v).

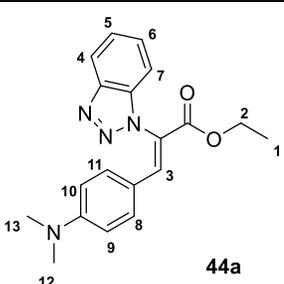
Los rendimientos obtenidos de los compuestos **44-45a-b** son menores a los reportado por Ortega-Villareal *et al.* en 2019, esto se atribuye a dos factores principales; los seguimientos de reacción mostraron la presencia de materia

prima aun sin reaccionar, lo que indica que las reacciones no se llevan a cabo en su totalidad, además de la obtención de un sub-producto que dificultó la purificación de estos compuestos.

El subproducto formado en esta reacción es la formación de una amida, debido a que la piperidina presenta también un carácter nucleofílico, por lo que es capaz de atacar al carbonilo del éster.

Estos compuestos fueron caracterizados por RMN (^1H y ^{13}C) y HRMS para confirmar la obtención de estos. A manera de ejemplo, en la **Tabla 8** se muestran los desplazamientos obtenidos del espectro de RMN de ^1H del compuesto **44a** y en la **Figura 20** se muestra el espectro de ^1H obtenido para el mismo compuesto.

Tabla 8. Desplazamientos químicos obtenidos del RMN de ^1H del compuesto **44a** (500 MHz, CDCl_3).

Molécula	RMN de ^1H				
 <p style="text-align: center;">44a</p>	Posición protón	Desplazamiento (ppm)	Integral (H)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J(Hz)
	1	1.19	3	t	7.1
	2	4.23	2	c	7.1
	3	8.11	1	s	-
	4	8.15	1	d	8.0
	5, 6, 7	7.30-7.47	3	m	-
	8, 11	6.37	2	d	9.1
	9, 10	6.57	2	d	9.1
	12, 13	2.91	6	s	-

En el espectro de protón del compuesto **44a**, (**Figura 20**) se mantuvo la señal triplete con un desplazamiento en 1.19 ppm, que integra para tres protones y en 4.23 ppm un cuarteto que integra para tres protones, ambos con una constante de 7.1 Hz, señales que corresponden a la parte del etilo del éster. Asimismo, se mantuvo en 7.30 – 7.47 un multiplete y en 8.15 ppm un doblete que integran para los cuatro protones aromáticos del benzotriazol. Adicionalmente se obtuvo una señal singulete de los metilos unidos al nitrógeno que integra para seis protones, dos multipletes en aproximadamente 6.37 ppm y 6.57 ppm que corresponden a

cuatro protones aromáticos y una señal singulete en 8.11 ppm que integra para un protón y corresponde al protón vinílico.

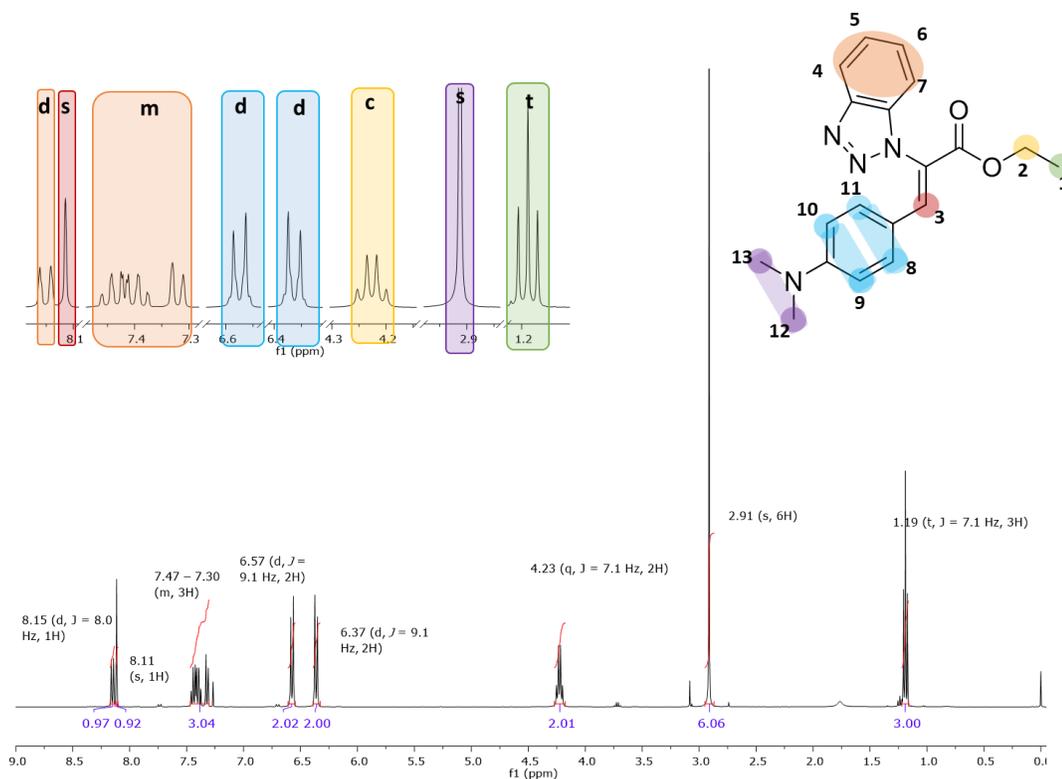


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H de **44a** (400 MHz, CDCl_3).

En el espectro del ^{13}C se obtuvieron 3 señales por debajo de 100 ppm que corresponden a la parte alifática de la molécula, marcados en verde y 13 señales correspondientes a los carbonos insaturados en la molécula, obteniendo nuevamente una señal en aproximadamente 164.3 ppm que corresponden al carbonilo del éster, confirmando la obtención del compuesto deseado (**Figura 21**).

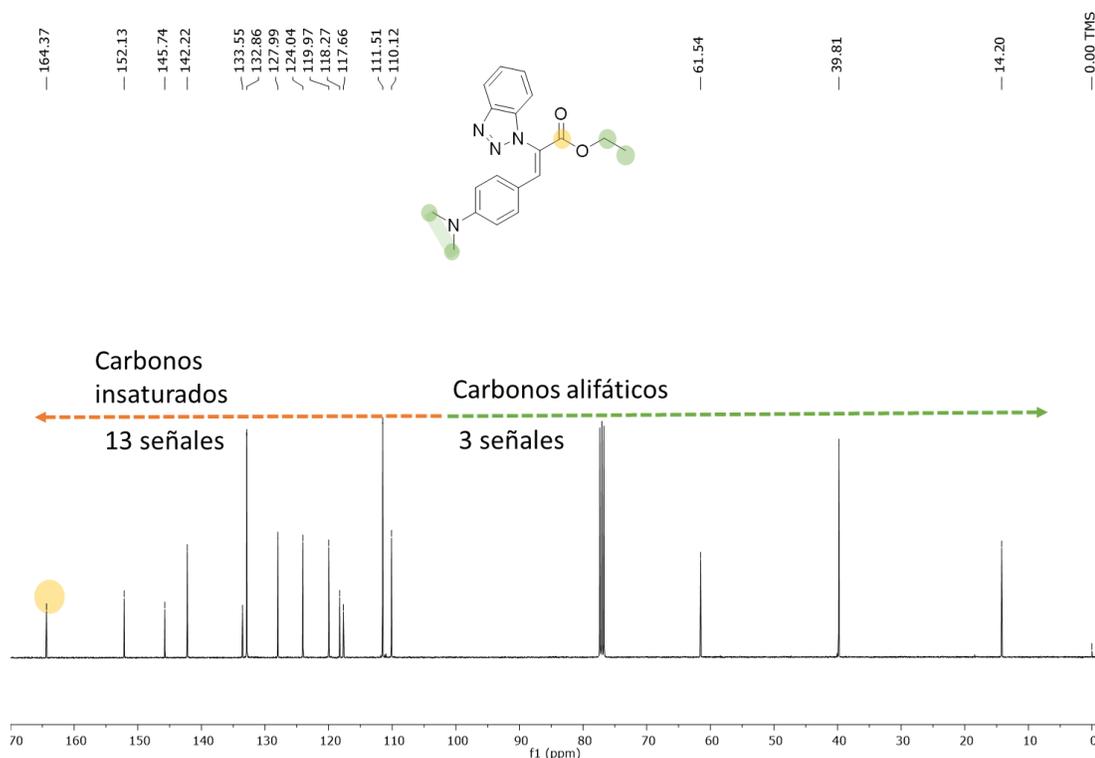


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C de **44a** (101 MHz, CDCl_3).

Los datos espectroscópicos obtenidos del compuesto **44a** fueron los siguientes:

(Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilato de etilo, 44a:

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 2.91 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 4.23 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 6.37 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_{arom}), 6.57 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.30 - 7.47 (m, 3H, H_{arom}), 8.11 (s, 2H, $\text{H}_{\text{vinílico}}$), 8.15 (d, 1H, H_{arom}); ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3): δ 14.2, 39.81, 61.54, 110.12, 111.51, 118.27, 119.97, 124.04, 127.99, 132.86, 133.55, 142.22, 145.74, 152.13, 164.37. HRMS (ESI $^+$): $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada m/z 337.1665, encontrada m/z 337.1718.

Los datos espectroscópicos condensados de los compuestos **44b-e** y **45a-e** se encuentran a continuación, para ver los espectros ir a la sección de apéndices.

(Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilato de etilo, 44b:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.08 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$), 1.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 3.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$), 4.22 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 6.34 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_{arom}), 6.54 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.48 – 7.32 (m, 3H, H_{arom}), 8.10 (s, 1H, $\text{H}_{\text{vinílico}}$), 8.15 (d, 1H, H_{arom}). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 164.47, 150.03, 145.76, 142.25, 133.67, 133.28, 127.95, 124.01, 119.95, 117.60, 117.01, 111.09, 110.19, 61.45, 44.38, 14.21, 12.44. HRMS (ESI⁺): $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada m/z 365.1978, encontrada m/z 365.2027.

(Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(morfolin-1-il)-fenil)acrilato de etilo, 44c:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 3.18 – 3.13 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{O}$), 3.78 -3.73 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{O}$), 4.24 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 6.57 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, H_{arom}), 6.63 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.31 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H_{arom}), 7.48 – 7.37 (m, 2H, H_{arom}), 8.12 (s, 1H, $\text{H}_{\text{vinílico}}$), 8.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_{arom}). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 164.04, 152.76, 145.73, 141.58, 133.43, 132.56, 128.13, 124.15, 121.18, 120.04, 119.64, 113.90, 110.03, 66.42, 61.79, 47.14, 14.16. HRMS (ESI⁺): $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_3$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada m/z 379.1770, encontrada m/z 379.1779.

(Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(piperidin-1-il)-fenil)acrilato de etilo, 44d:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 1.61 – 1.51 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3\text{-CH}_2$), 3.27 - 3.18 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 4.23 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 6.60 – 6.52 (m, 4H, H_{arom}), 7.48 – 7.29 (m, 3H, H_{arom}), 8.10 (s, 1H, $\text{H}_{\text{vinílico}}$),

8.15 (d, $J = 8.1, 1.0$ Hz, 1H, H_{arom}). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) 164.27, 152.92, 145.73, 141.91, 133.53, 132.83, 128.02, 124.06, 119.98, 119.47, 118.34, 113.80, 110.11, 61.61, 48.77, 48.20, 25.23, 24.26, 14.19 HRMS (ESI⁺): $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada m/z 377.1978, encontrada m/z 377.1973.

(Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(pirrolidin-1-il)fenil)acrilato de etilo, 44e:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 1.97 – 1.92 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2$), 3.26 - 3.16 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 4.22 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 6.23 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_{arom}), 6.56 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.46 – 7.30 (m, 3H, H_{arom}), 8.11 (s, 1H, $H_{\text{vinílico}}$), 8.15 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_{arom}). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) 164.27, 152.92, 145.73, 141.91, 133.53, 132.83, 128.02, 124.06, 119.98, 119.47, 118.34, 113.80, 110.11, 61.61, 48.77, 48.20, 25.23, 24.26, 14.19 HRMS (ESI⁺): $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada m/z 363.1821, encontrada m/z 363.1807.

(Z)-2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrilato de etilo, 45a:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 2.92 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 6.37 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, H_{arom}), 6.44 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H, H_{arom}), 7.48 – 7.43 (m, 2H, H_{arom}), 7.99 – 7.95 (m, 2H, H_{arom}), 8.01 (s, 1H $H_{\text{vinílico}}$). ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 163.92, 152.23, 144.95, 141.12, 132.77, 126.88, 123.80, 118.82, 117.99, 111.53, 61.68, 39.83, 14.23. HRMS (ESI⁺): $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada m/z 337.1665, encontrada m/z 337.1669.

(Z)-2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrilato de etilo, 45b:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.09 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 3.28 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_2$), 4.26 (q, $J = 7.1$

Hz, 2H, O(CH₂-CH₃)₂, 6.34 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, H_{arom}), 6.40 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H_{arom}), 7.49 – 7.43 (m, 2H, H_{arom}), 8.02 – 7.91 (m, 3H, H_{arom} y H_{vinílico}). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 164.05, 150.10, 144.97, 141.07, 133.16, 126.82, 123.21, 118.86, 117.26, 111.10, 61.62, 44.39, 14.25, 12.47. HRMS (ESI⁺): C₂₁H₂₄N₄O₂, [M + H]⁺ calculada *m/z* 365.1978, encontrada *m/z* 365.1988.

(Z)-2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(morfolino-1-il)fenil)acrilato de etilo, 45c:

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂-CH₃), 3.15 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, N(CH₂)₂), 3.75 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H (CH₂)₂O), 4.28 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂-CH₃), 6.49 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H_{arom}), 6.57 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{arom}), 7.48 – 7.44 (m, 2H, H_{arom}), 7.99 – 7.94 (m, 2H, H_{arom}), 8.02 (s, 1H, H_{vinílico}). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.60, 152.87, 144.95, 140.54, 132.47, 127.06, 125.56, 120.91, 118.79, 113.96, 66.43, 61.93, 47.22, 18.42, 14.19. HRMS (ESI⁺): C₂₁H₂₂N₄O₃, [M + H]⁺ calculada *m/z* 379.1770, encontrada *m/z* 379.1779.

(Z)-2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(piperidin-1-il)fenil)acrilato de etilo, 45d:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂-CH₃), 1.59 – 1.51 (m, 6H, CH₂-CH₃-CH₂), 3.28 – 3.18 (m, 4H, N(CH₂)₂), 4.27 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂-CH₃), 6.42 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H_{arom}), 6.55 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H_{arom}), 7.49 – 7.43 (m, 2H, H_{arom}), 7.99 – 7.94 (m, 2H, H_{arom}), 8.00 (s, 1H, H_{vinílico}). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.82, 153.05, 144.95, 140.82, 132.73, 126.93, 124.41, 119.19, 118.80, 113.86, 61.75, 48.27, 25.23, 24.30, 14.22. HRMS (ESI⁺): C₂₂H₂₄N₄O₂, [M + H]⁺ calculada *m/z* 377.1978, encontrada *m/z* 377.1990.

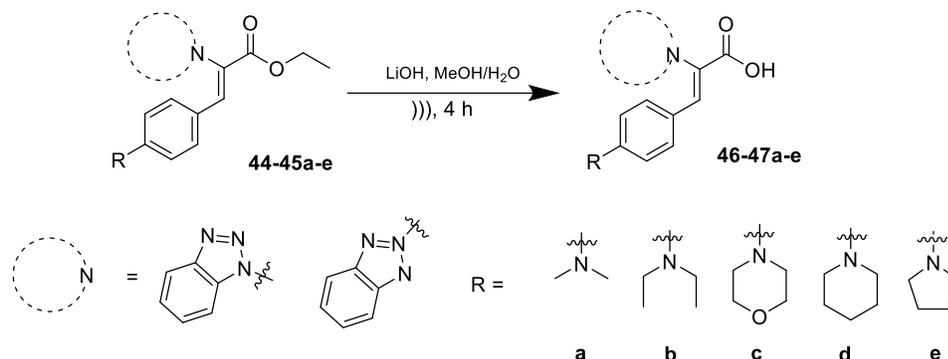
(Z)-2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(pirrolidin-1-il)fenil)acrilato de etilo, 45e:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂-CH₃), 1.98 – 1.91 (m, 4H, N(CH₂-CH₂)₂), 3.25 – 3.17 (m, 3H, N(CH₂-CH₂)₂), 4.26 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H,

OCH₂-CH₃), 6.24 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, **H_{arom}**), 6.42 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, **H_{arom}**), 7.50 – 7.42 (m, 2H, **H_{arom}**), 8.00 – 7.95 (m, 2H, **H_{arom}**), 8.01 (s, 1H, **H_{vinilico}**). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 163.02, 149.87, 144.95, 141.37, 132.97, 126.83, 123.19, 118.82, 117.53, 111.68, 61.60, 47.38, 25.34, 14.25. HRMS (ESI⁺): C₂₁H₂₂N₄O₂, [M + H]⁺ calculada *m/z* 363.1821, encontrada *m/z* 363.1805.

6.1.3. Síntesis de los ácidos de benzotriazolil-acrílico 46-47a-e.

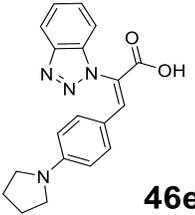
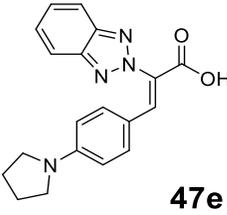
La síntesis de los ácidos benzotriazolil-acrílicos **46-47a-e** se realizó mediante una reacción de hidrólisis, utilizando LiOH como base y utilizando como disolvente una mezcla de MeOH:H₂O 2:1 v/v en baño ultrasónico a 50 °C por 5 h. Donde la reacción se monitoreo mediante TLC usando como fase móvil AcOEt: MeOH 3:1 v/v. Una vez terminada la reacción se evaporó el disolvente, el sólido resultante se disolvió en 30 mL de agua, y se realizaron tres extracciones con AcOEt (3 x 30 mL) cada una. Se conservó la fase acuosa y posteriormente se procedió a precipitar el compuesto, acidificando la fase acuosa con HCl concentrado hasta un pH 3 – 4. Se realizó un filtrado a vacío y finalmente se purificó mediante recristalización usando como disolvente una mezcla de MeOH:AcOEt 1:1 v/v (**Esquema 9**). Se obtuvieron sólidos de color amarillo claro hasta amarillo mostaza, con rendimientos entre el 41% y 82% (**Tabla 9**). Estos compuestos fueron caracterizados por RMN (¹H y ¹³C) y HRMS para corroborar la obtención de estos.



Esquema 9. Síntesis de los ácidos de benzotriazolil-acrílico **46-47a-e**.

Tabla 9. Características y propiedades de ácidos de benzotriazolil-acrílico **46-47a-e**.

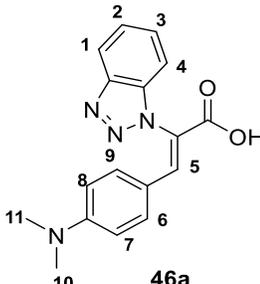
Características y propiedades			
 46a	Rendimiento: 74.3 % Sólido amarillo R.f.: 0.75 P.F. 202 - 204 °C	 47a	Rendimiento: 61.6 % Sólido naranja R.f.: 0.41 P.F. 232 - 234 °C
 46b	Rendimiento: 51.7 % Sólido amarillo R.f.: 0.68 P.F. 198 - 200 °C	 47b	Rendimiento: 51.7 % Sólido amarillo R.f.: 0.78 P.F. 200 - 202 °C
 46c	Rendimiento: 73.6 % Sólido amarillo R.f.: 0.70 P.F. 166 - 168 °C	 47c	Rendimiento: 41.6 % Sólido granuloso amarillo R.f.: 0.77 P.F. 41.6 °C
 46d	Rendimiento: 29.5 % Sólido amarillo R.f.: 0.66 P.F. 192 - 194 °C	 47d	Rendimiento: 62.0 % Sólido amarillo mostaza R.f.: 0.69 P.F. 188 - 190 °C
	Rendimiento: 82.3 %		Rendimiento: 74.1 %

 <p style="text-align: right;">46e</p>	<p>Sólido amarillo R.f.: 0.67 P.F. 210 - 212°C</p>	 <p style="text-align: right;">47e</p>	<p>Sólido amarillo R.f.: 0.31 P.F. 216 – 218 °C</p>
--	---	---	--

R.f.: Fase móvil (AcOEt:MeOH, 1:1 v/v).

A continuación, a manera de ejemplo, en la **Tabla 10** se muestran los desplazamientos obtenidos del espectro de RMN de ^1H del compuesto **46a** y en la **Figura 22** se muestra el espectro de ^1H obtenido para el compuesto **46a**.

Tabla 10 Desplazamientos químicos obtenidos del RMN de ^1H del compuesto **46a** (500 MHz, CDCl_3)

Molécula	^1H				
 <p style="text-align: right;">46a</p>	Posición protón	Desplazamiento (ppm)	Integral (H)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J (Hz)
	1	8.18	1	d	8.1
	2, 3, 4	7.31 -7.55	3	m	-
	5	8.11	1	s	-
	6, 9	6.45	2	d	9.3
	7, 8	6.52	2	d	9.3
	10, 11	2.86	6	s	-

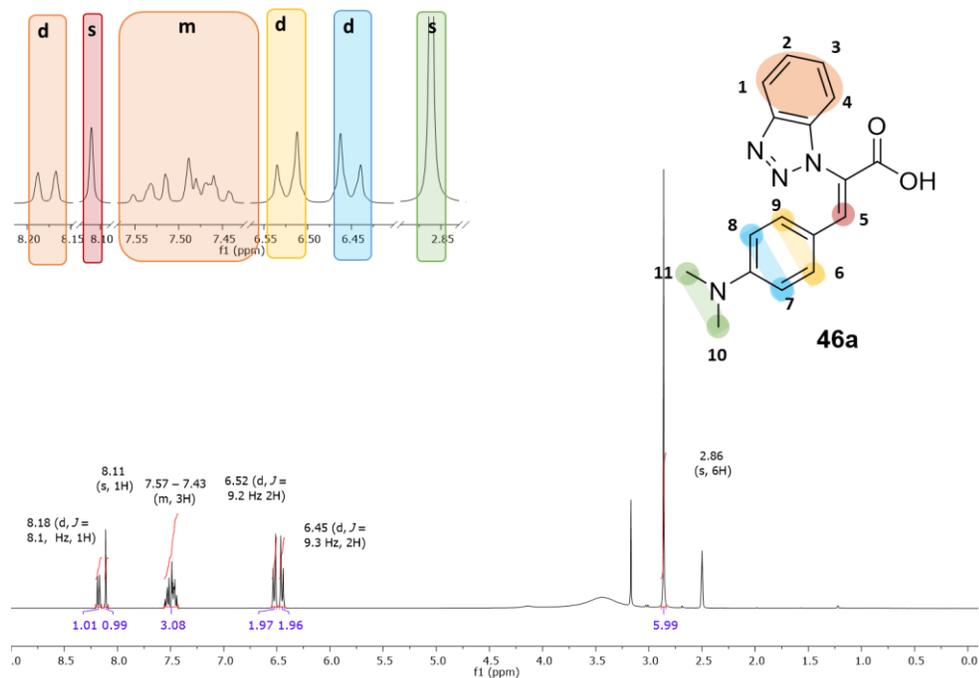


Figura 22. Espectro de RMN de ¹H del compuesto **46a** RMN (300 MHz, CD₃OD).

En el espectro de protón del compuesto **46a** (**Figura 22**), se mantienen la señal singlete que integra para 6H en 2.86 ppm, se mantienen las dobletes que integran para 2H cada una, en 6.45 ppm y 6.52 ppm con una constante de acoplamiento de 9.3 y 9.2 Hz cada una respectivamente. Se mantiene la señal multiplete en la región de 7.57–7.43 ppm que integra para 3H y una señal doblete en 8.18 ppm que corresponden a la parte aromática del benzotriazol. La señal singlete del protón vinílico se observa en 8.11 ppm y en este caso desaparecen las señales triplete y cuarteto correspondientes a la parte del etilo del éster del compuesto **44a**, la desaparición de dichas señales confirma la obtención del compuesto **46a**.

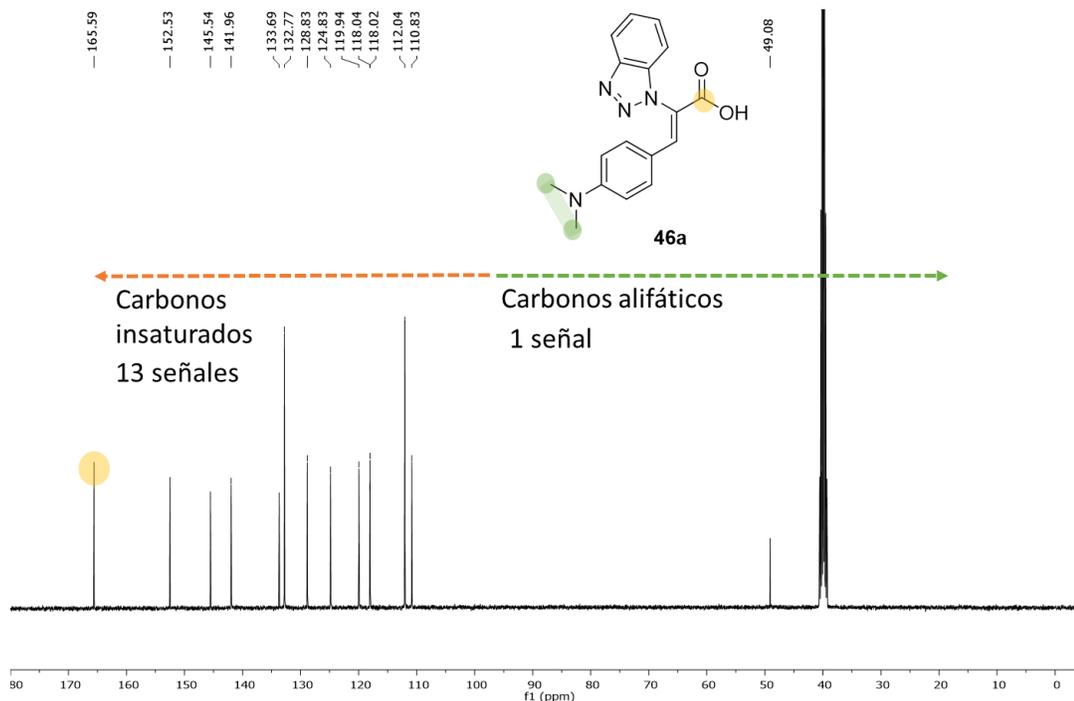


Figura 23. Espectro de RMN de ¹³C de **46a** (101 MHz, CDCl₃).

En el caso del espectro de ¹³C se observa que se mantienen las trece señales de carbonos insaturados del compuesto y se observa que se pierden dos señales que corresponden a los carbonos alifáticos de la parte del etilo del éster del compuesto **44a**, mostrando una sola señal de los carbonos alifáticos que corresponden a los metilos (**Figura 23**).

Los datos espectroscópicos condensados de protón y ¹³C del compuesto **46a**, se encuentran a continuación:

Ácido (Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dimetilamino)fenil)acrílico, 46a:

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 2.86 (s, 6H, N(CH₃)₂), 6.45 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, **H**_{arom}), 6.52 (d, *J* = 9.2 Hz 2H, **H**_{arom}), 7.57 – 7.43 (m, 3H, **H**_{arom}), 8.18 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, **H**_{arom}), 8.11 (s, 1H, **H**_{Vinílico}). ¹³C RMN (101 MHz, CD₃OD) δ 165.59, 152.53, 145.54, 141.96, 133.69, 132.77, 128.83, 124.83, 119.94, 118.04, 118.02,

112.04, 110.83, 49.08. HRMS (ESI⁺): C₁₇H₁₆N₄O₂, [M + H]⁺ calculada *m/z* 309.1352, encontrada *m/z* 309.1360, (**Figura 22** y **Figura 23**).

Los espectros de RMN de los compuestos **46b-d** y del **47a-b** se muestran en la sección de anexos. A continuación, se dan a conocer de manera general los datos espectrales obtenidos de los compuestos anteriormente mencionados:

Ácido (Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-(dietilamino)fenil)acrílico, 46b:

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.97 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, N(CH₃)₂), 3.26 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H, ((CH₂CH₃)₂), 6.42 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 6.50 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 7.57 – 7.42 (m, 3H, H_{arom}), 8.15 (d, 1H, H_{arom}), 8.08 (s, 1H, H_{vinílico}). ¹³C RMN (101 MHz, cdcl₃) δ 165.66, 150.22, 145.54, 141.92, 133.77, 133.24, 128.80, 124.80, 119.94, 117.40, 117.32, 111.52, 110.87, 44.13, 12.75. HRMS (ESI⁺): C₁₉H₂₀N₄O₂, [M + H]⁺ calculada *m/z* 337.1665, encontrada *m/z* 337.1714.

Ácido (Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinilfenil)acrílico, 46c:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.16 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, N(CH₂-CH₂)₂O), 3.62 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, (CH₂-CH₂)₂O), 6.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 6.72 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, H_{arom}), 7.58 – 7.43 (m, 3H, H_{arom}), 8.14 (s, 1H, H_{vinílico}), 8.18 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{arom}) ¹³C RMN (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 164.81, 152.47, 144.93, 140.89, 133.03, 131.94, 128.33, 124.30, 120.01, 119.38, 119.17, 113.48, 110.27, 65.59, 46.31. HRMS (ESI⁺): C₁₉H₁₈N₄O₃, [M + H]⁺ calculada *m/z* 351.1457, encontrada *m/z* 351.1486.

Ácido (Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-piperidinilfenil)acrílico, 46d:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.60-1.35 (m, 6H, N(CH₂-CH₂)₂CH₂), 3.22 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H, N(CH₂-CH₂)₂CH₂), 6.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 6.65 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H_{arom}), 7.57 – 7.42 (m, 3H, H_{arom}), 8.10 (s, 1H, H_{vinílico}), 8.18 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H_{arom}). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.14, 152.46, 145.14, 141.27,

133.31, 132.48, 128.49, 124.49, 119.57, 118.72, 118.31, 113.55, 110.47, 47.49, 24.84, 24.00. HRMS (ESI⁺): C₂₀H₂₀N₄O₂, [M + H]⁺ calculada *m/z* 349.1665, encontrada *m/z* 349.1706.

Ácido (Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-pirrodinilfenil)acrílico, 46e:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.91-1.79 (m, 4H, N(CH₂-CH₂)₂), 3.21 – 3.10(m, 4H, N(CH₂-CH₂)₂CH₂), 6.29 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 6.50 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{arom}), 7.56 – 7.42 (m, 3H, H_{arom}), 8.09 (s, 1H, H_{vinílico}), 8.17 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_{arom}). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.65, 149.99, 145.54, 142.13, 133.68, 132.95, 128.81, 124.82, 119.93, 117.59, 117.44, 112.19, 110.82, 47.57, 25.29. HRMS (ESI⁺): C₁₉H₁₈N₄O₂, [M + H]⁺ calculada *m/z* 335.1508, encontrada *m/z* 335.1495.

Ácido (Z)-2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-dimetilamino)acrílico, 47a:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.87 (s, 6H, N(CH₃)₂), 6.49-6.36 (m, 4H, H_{arom}), 7.56 – 7.50 (m, 2H, H_{arom}), 7.99 (s, 1H, H_{vinílico}), 8.04 - 8.01 (m, 2H, H_{arom}). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.14, 152.65, 144.74, 140.46, 132.74, 127.70, 124.29, 118.88, 117.59, 112.02, 39.89. HRMS (ESI⁺): C₁₇H₁₆N₄O₂, [M + H]⁺ calculada *m/z* 309.1352, encontrada *m/z* 309.1355.

Ácido (Z)-2-(2H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-dietilamino)acrílico, 47b:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.99 (t, 6H, N(CH₂-CH₃)₂), 3.28 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H, N(CH₂-CH₃)₂), 6.46 - 6.34 (m, 4H, H_{arom}), 7.57 – 7.49 (m, 2H, H_{arom}), 7.95 (s, 1H, H_{vinílico}), 8.06 – 7.99 (m, 2H, H_{arom}). ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 165.21, 150.32, 144.74, 140.35, 133.18, 127.66, 123.74, 118.88, 116.88, 111.49, 44.14, 12.76. HRMS (ESI⁺): C₁₉H₂₀N₄O₂, [M + H]⁺ calculada *m/z* 337.1665, encontrada *m/z* 337.1675.

Ácido (Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-morfolinilfenil)acrílico, 47c:

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3.15 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{O}$), 3.61 (t, $J = 4.8$, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{O}$), 6.46 (d, $J = 8.8$, 2H, H_{arom}), 6.71 (d, $J = 8.9$, 2H H_{arom}), 7.58 – 7.58 (m, 2H, H_{arom}), 8.05 – 8.00 (m, 3H, $\text{H}_{\text{arom/Vinílico}}$). ^{13}C RMN (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) 164.94, 153.19, 144.74, 140.08, 132.50, 127.80, 125.79, 120.15, 118.88, 114.04, 66.18, 46.9. HRMS (ESI⁺): $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada m/z 351.1457, encontrada m/z 351.1514.

Ácido (Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-piperidinilfenil)acrílico, 47d:

^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.04 – 8.00 (m, 2H, H_{arom}), 7.97 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Vinílico}}$), 7.56 – 7.50 (m, 2H, H_{arom}), 6.67 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, H_{arom}), 6.41 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 3.25 (t, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}_2$), 1.55 – 1.49 (m, 2H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}_2$), 1.48 – 1.42 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{CH}_2$). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.58, 144.26, 132.39, 132.25, 127.23, 118.25, 113.54, 113.39, 47.46, 24.77, 23.95. HRMS (ESI⁺): $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_2$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada m/z 349.1665, encontrada m/z 349.1727.

Ácido (Z)-2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-3-(4-pirrodinilfenil)acrílico, 47e:

^1H RMN (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.06 – 7.99 (m, 2H, H_{arom}), 7.97 (s, 1H, $\text{H}_{\text{Vinílico}}$), 7.58 – 7.47 (m, 2H, H_{arom}), 6.38 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_{arom}), 6.30 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H_{arom}), 3.21 – 3.10 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2$), 1.91 – 1.78 (m, 4H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2$). ^{13}C RMN (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 164.58, 149.49, 144.11, 140.03, 132.31, 127.06, 123.13, 118.25, 116.56, 111.56, 46.98, 24.69. HRMS (ESI⁺): $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$, $[\text{M} + \text{H}]^+$ calculada m/z 335.1508, encontrada m/z 335.1500.

6.2. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es un método computacional que permite predecir la conformación, orientación y posición de una molécula (llamada normalmente ligando), denominada “pose”. Esta técnica permite realizar la evaluación de la afinidad de unión con la diana de interés (proteínas, ADN o ARN). El acoplamiento conlleva dos pasos, el muestreo de las conformaciones del ligando

en el sitio activo de la proteína y después se hace uso de funciones de puntuación (campos de fuerza, funciones empíricas o basadas en conocimiento) para determinar la mejor conformación encontrada del ligando. A través del acoplamiento molecular se obtiene el valor de energía de unión. Entre menor es el valor de energía, mayor es la afinidad que presenta el ligando con la diana terapéutica.^{84,93,94}

La diana terapéutica de interés del presente trabajo es la proteína CK2 que, de acuerdo con la literatura, se encuentra sobreexpresada en diferentes tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, urotelial, hígado, estómago, colorrectal e inclusive de mama.^{31,94} Por este motivo, se decidió realizar el análisis de acoplamiento molecular con esta diana terapéutica.

Se realizó un acoplamiento molecular, receptor rígido-ligando flexible para obtener los valores de energía de unión de los compuestos **46-47a-e** y así determinar predictivamente cuáles compuestos podrían presentar una mejor actividad inhibiendo la proteína CK2 que, como se mencionó anteriormente, es una diana terapéutica muy estudiada pues se encarga de fosforilar numerosos sustratos proteicos involucrados en la supervivencia de las células cancerígenas y que se encuentra presente en diferentes tipos de cáncer incluyendo el cáncer de mama, pulmón y colorrectal.

Para la ejecución del acoplamiento molecular se utilizó AutoDock 4.2, este programa es de licencia gratis que utiliza un algoritmo genético Lamarckiano.⁸² Inicialmente se realizó la validación del sitio catalítico con el objetivo de determinar que el proceso sea reproducible y confiable. Para ello se tomaron como criterio los valores de energía de afinidad y el valor de desviación de la raíz cuadrática media (RMSD), el cual debe ser menor de 2 Å.

La visualización de los resultados se realizó mediante el programa PyMOL y las interacciones mediante el programa Discovery Studio Visualizer. En la **Figura 24** se visualiza la pose obtenida de la validación realizada con AutoDock 4.2 del

ligando co-cristalizado (3NG) con la proteína con ID PDB **3pe1** mediante PyMOL. Donde se obtuvo un valor RMSD = 0.146 Å y una energía de afinidad de -14.86 kcal/mol. En la **Figura 25** se observan las interacciones obtenidas del ligando 3NG con la proteína **3pe1**. Mostrando en su mayoría interacciones hidrofóbicas (Val66, Ile174, Phe113, His115, His160, Val53, Ile95, Met163, Ile174, Val116, Leu45, Val53), puentes de hidrógeno (Lys68, Val116, Asp175, Trp176 y Glu114), interacciones pi-sulfuro (Met163) e interacciones electrostáticas (Phe113).

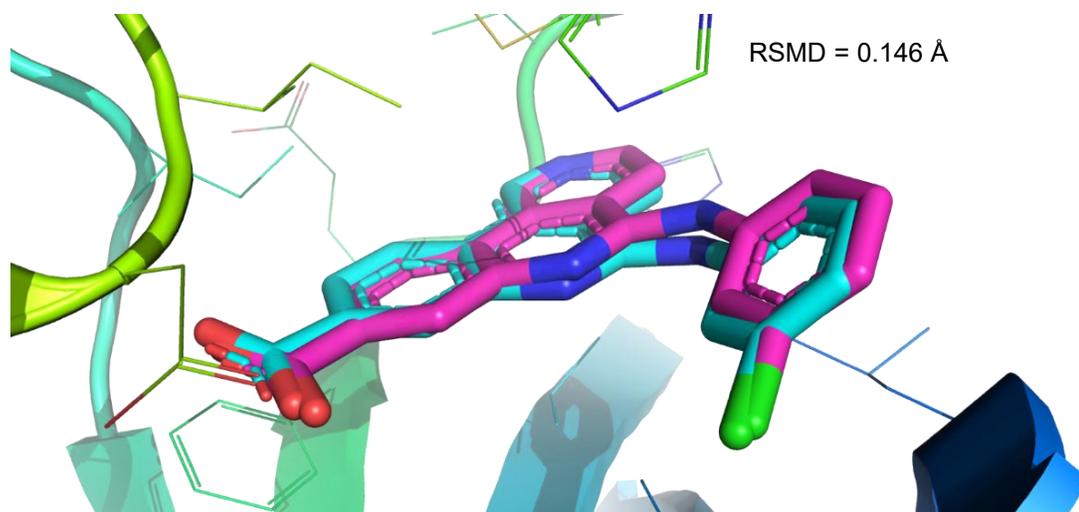


Figura 24. Validación del acoplamiento molecular de 3pe1 con el ligando co-cristalizado 3NG (color rosa), ligando calculado en validación (color turquesa), RMSD=0.146 Å y energía de afinidad de -14.86 kcal/mol.

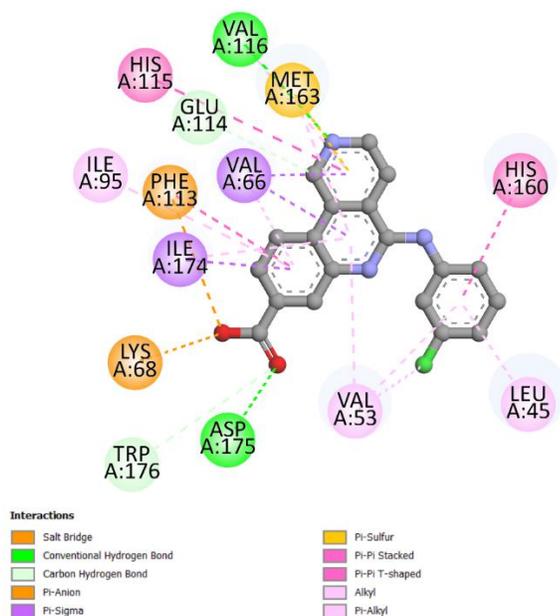


Figura 25. Resultados de validación. Diagrama 2D de interacciones del ligando 3NG con la proteína 3pe1.

Una vez terminada la validación, se procedió a realizar el acoplamiento molecular de las moléculas **46-47a-e** (**Figura 26**) y el **TBBT**, utilizando una población de 150 dockings. Se utilizó el programa autogrid para generar el tamaño de caja de 40, centrado en las coordenadas en $X = 22.657$, $Y = -31.002$ y $Z = 14.951$ y finalmente obteniendo las energías de afinidad de las moléculas anteriores, ver **Tabla 11** y **Figura 27**.

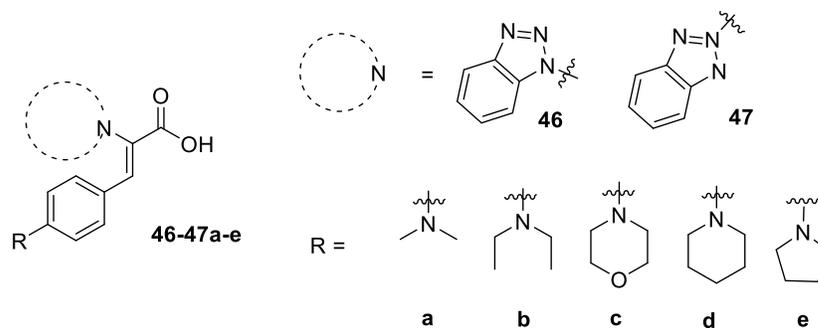


Figura 26. Estructura de compuestos **46-47a-e**.

Tabla 11. Energías de afinidad resultados de acoplamiento molecular.

Compuesto	Energía (Kcal/mol)
3NG	-11.68
47e	-10.41
46d	-10.09
47c	-9.99
46e	-9.66
47d	-9.51
47b	-9.5
46c	-9.41
47a	-9.24
46b	-9.02
46a	-8.96
TBBT	-8.77

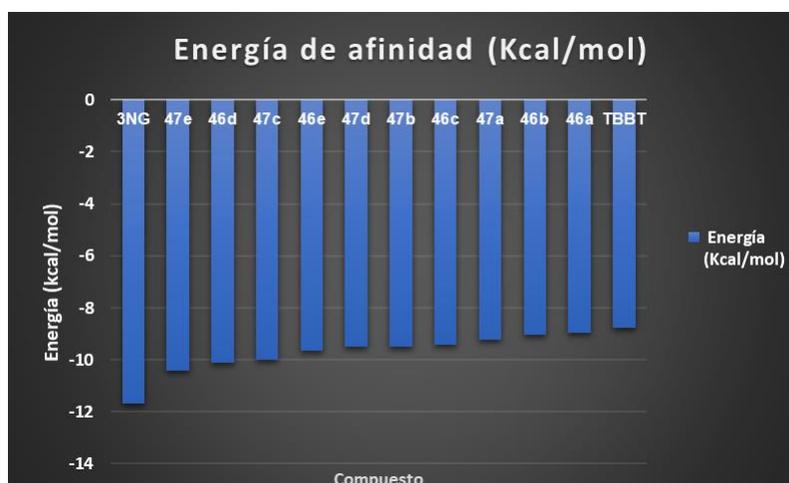


Figura 27. Gráfico de energía de afinidad.

Se logró obtener las energías de afinidad de los compuestos **46-47a-e**, el ligando co-cristalizado 3NG y el compuesto TBBT (**Tabla 11**), mostrando que los compuestos no poseen una mejor afinidad que el ligando co-cristalizado 3NG, pero presentan mejor energía que inclusive el compuesto TBBT, el cual actualmente es el derivado de benzotriazol más estudiado como inhibidor competitivo del ATP en la proteína CK2, (**Figura 27**).⁹⁵ Este derivado de benzotriazol presenta átomos de bromo en su estructura, los cuales, son enlaces lábiles y por tanto muy reactivos que pueden generar enlaces covalentes con biomoléculas en el cuerpo y generar efectos adversos.

Tabla 12. Energía de afinidad de los compuestos **46-47a-e**.

Sustituyente	Compuestos 46		Compuestos 47	
	Energía (kcal/mol)	Bolsa hidrofóbica Dentro / Fuera	Energía (kcal/mol)	Bolsa hidrofóbica Dentro / Fuera
a	-8.96	Dentro	-9.24	Fuera
b	-9.02	Dentro	-9.50	Fuera
c	-9.41	Dentro	-9.99	Fuera
d	-10.09	Dentro	-9.51	Fuera
e	-9.66	Dentro	-10.41	Fuera

Las energías obtenidas de los compuestos **46-47a-e** se pueden observar en la **Tabla 12**, mostrando que el compuesto **47e** obtuvo una mejor energía de afinidad que el resto de los compuestos; no obstante, el compuesto **47e** mostró dos interacciones desfavorables, una de ella se produce entre el grupo hidroxilo del ácido carboxílico y el Asp175, la otra interacción desfavorable se produce entre un nitrógeno del benzotriazol y la Lys68, adicionalmente al realizar su visualización por PyMOL se observó que el compuesto **47e** (**Figura 28**), y el grupo de compuestos **47a-e** presentaron la región del ácido carboxílico de la molécula fuera de la bolsa hidrofóbica de la proteína CK2.

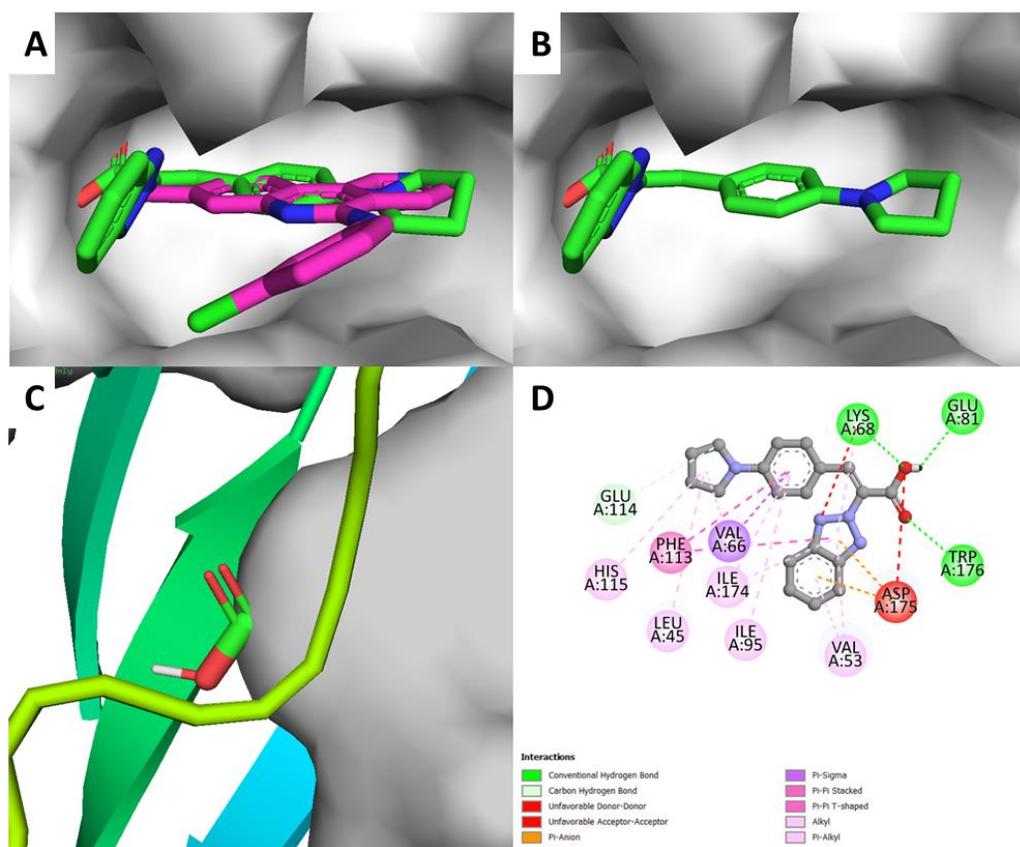


Figura 28. Representación 3D de compuesto **47e** en el sitio activo de la proteína CK2. A) Ligando 3NG y compuesto **47e**, B) Compuesto **47e**, C) Parte externa de la bolsa hidrofóbica de la proteína y ácido carboxílico del compuesto **47e**, D) Diagrama 2D de las interacciones del compuesto **47e**.

Los compuestos con interacciones desfavorables fueron el compuesto **47e** con dos interacciones de repulsión con los aminoácidos Asp175 y Lys68, el compuesto **46c** y el compuesto **47b** presentaron interacciones desfavorables con Glu81 y Asp175, respectivamente. Las interacciones desfavorables pueden indicar la presencia de fuerzas repulsivas entre el compuesto y los residuos de los aminoácidos ocasionando que pueda influir en la estabilidad del complejo compuesto-proteína⁹⁶, por lo que se podría considerar que el compuesto **47d** presenta mejor energía de afinidad al carecer de interacciones desfavorables; sin embargo, es importante recalcar que en su visualización por PyMOL presenta la región del ácido carboxílico fuera del bolsillo hidrofóbico lo cual también podría generar inestabilidad en el complejo compuesto-proteína lo que conllevaría a un menor efecto biológico.⁹⁷

Por otra parte, en la **Figura 29-C**, se observa que el compuesto **46d**, es el segundo en presentar la mejor energía de afinidad (-10.09 kcal/mol), el cual se ubica en la misma zona del ligando 3NG de la bolsa hidrofóbica de la proteína CK2.

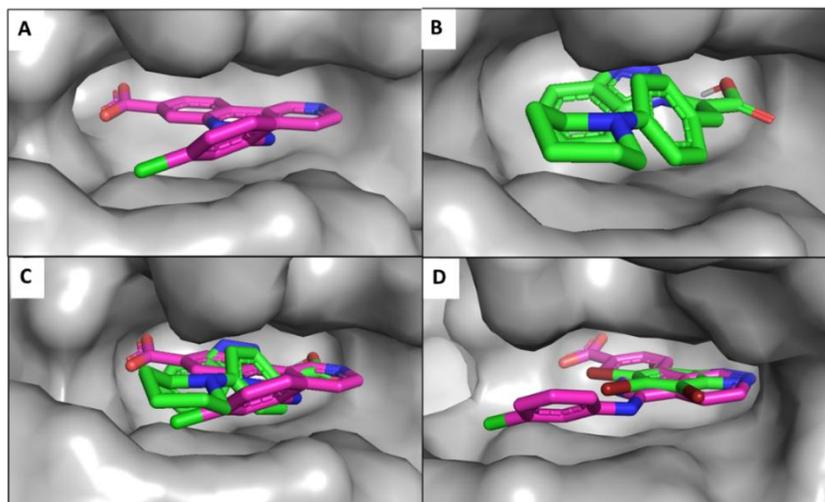


Figura 29. Diagrama 3D del acomodo de los compuestos en la bolsa hidrofóbica de la proteína CK2. A) Ligando 3NG, B) Compuesto **46d**, C) Compuesto **46d** y ligando 3NG, D) TBBT y ligando 3NG.

En la **Figura 30**, se observa de manera general (en los compuestos) que al aumentar el largo de la cadena alquílica o ciclo se obtiene menor energía de unión, es decir, mejor afinidad con el sitio activo. Esto puede atribuirse a que, al agregar un grupo más voluminoso y rígido como un ciclo establece restricción en los grados de libertad en la molécula, origina una disminución de las interacciones de puente de hidrogeno, generando interacciones hidrofóbicas con el compuesto **46d**.

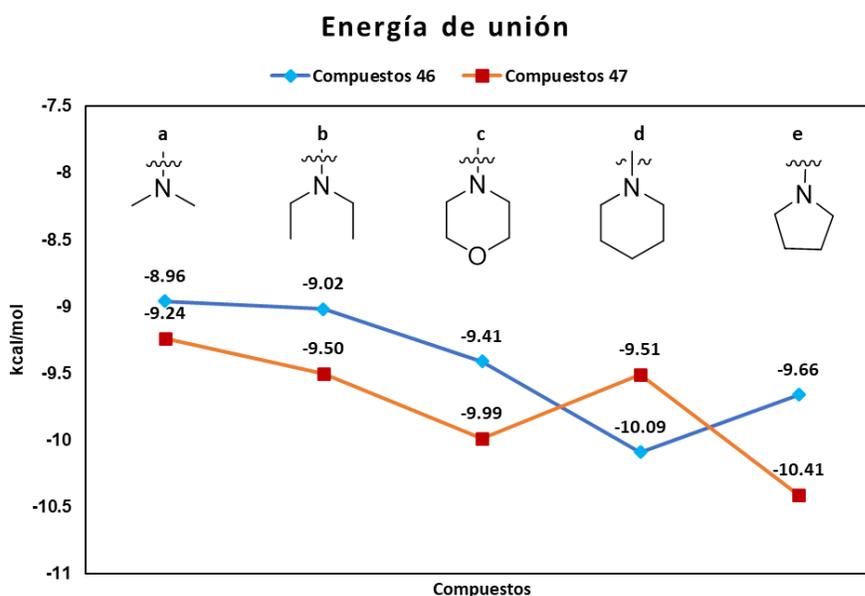


Figura 30. Comparación de las energías de unión de los compuestos **46-47a-e**.

Observando el diagrama de interacciones en 3D y 2D del compuesto **46d** (**Figura 31**), el compuesto **46d** se acopla en la bolsa hidrofóbica de manera semejante al ligando co-cristalizado 3NG, pero no presenta mayor energía de unión. Esto pudiera atribuirse a que pierde las interacciones de puente de hidrógeno con Asp175 y Trp176. La interacción electrostática del tipo pi-anión con el residuo de Phe113 se mantiene, pero se convierte en una interacción hidrofóbica; la interacción pi-sulfuro con MET163 se convierte en una interacción hidrofóbica del tipo pi-sigma. El compuesto **46d** presenta mayor energía incluso que el TBBT,

esto pudiera deberse a que el TBBT no presenta interacciones con Asp175, Trp176, His115.

Con los resultados obtenidos a partir del acoplamiento molecular, los compuestos que se espera que tengan mejor actividad biológica contra la proteína CK2 serian la serie de compuesto **46a-e**. Esto debido a que en el docking sugiere que dichos compuestos se mantienen dentro del área del bolsillo hidrofóbico y aquellos que presentan en su estructura el sustituyente piperidino y pirrolidino, que corresponden a los compuestos **46d** y **46e** presentando energías de unión de -10.06 y -9.66 kcal/mol respectivamente.

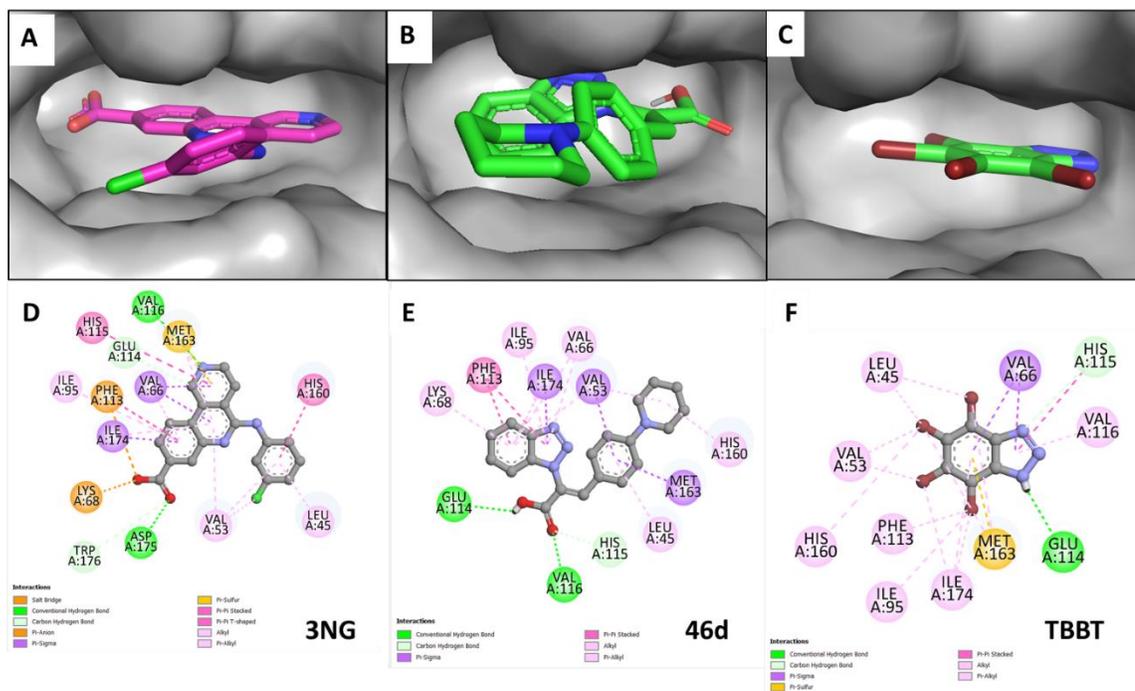


Figura 31. Representación 3D en la cavidad de la bolsa hidrofóbica, A) Ligando 3NG, B) Compuesto **46d**, C) TBBT y diagrama 2D de interacciones, D) Ligando 3NG, E) Compuesto **46d** y F) TBBT con la proteína.

Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado con *El-Kardocy, et al., 2020*, quienes mencionan que las interacciones generadas por el ácido

carboxílico del ligando co-cristalizado con la Lys68, Asp175 y Trp176 son interacciones estratégicas dentro de la bolsa hidrofóbica de la proteína que permiten tener una mayor interacción con esta.⁴⁶ El TBBT al carecer de este grupo funcional no presenta estas interacciones y se ve disminuida su energía de afinidad.

Por otra parte, de *Al-Qhahi, et al., 2024* menciona que el tamaño de la molécula impacta para la generación de interacciones con los residuos Phe113, Val66 y Ile174.⁹⁸ Los compuestos sintetizados no presentan ciertas interacciones de las anteriormente mencionadas, esto se debe principalmente por el acomodo de las moléculas dentro del sitio activo, que en el caso de la molécula **46d** se observa claramente que el ácido carboxílico de la molécula se coloca del lado opuesto perdiendo interacciones con el Asp175 y Trp176, lo que conlleva a una menor energía de afinidad con el sitio activo.

6.3. Actividad biológica

6.3.1. Actividad anticancerígena *in vitro* de los derivados de ácido benzotriazolil acrílico en la línea celular Caco-2

La evaluación de la actividad anticancerígena de los compuestos **46-47a-e**, se realizó a tres concentraciones (100, 250 y 500 µg/mL) de cada compuesto sobre la línea celular Caco-2, empleando el ensayo de MTT para la cuantificación de la viabilidad celular.

En la **Tabla 13** se muestra el porcentaje de viabilidad celular de cada uno de los derivados después de ser incubados por 24 h.

Tabla 13. Viabilidad celular de los compuestos **46-47a-e** en la línea celular Caco-2.

Compuesto	Viabilidad celular (%)		
	Concentración		
	100 (µg/mL)	250 (µg/mL)	500 (µg/mL)
46a	69.39 ± 7.21	65.68 ± 5.23	54.08 ± 0.86
46b	76.01 ± 4.62	57.76 ± 9.96	33.40 ± 0.62
46c	95.38 ± 8.80	89.67 ± 10.29	63.29 ± 3.23
46d	96.02 ± 5.62	84.12 ± 2.92	48.73 ± 2.04
46e	59.85 ± 10.85	60.62 ± 2.84	44.41 ± 3.52
47a	97.97 ± 1.22	91.32 ± 2.26	88.44 ± 4.21
47b	91.79 ± 0.54	90.48 ± 2.24	93.04 ± 7.05
47c	97.07 ± 3.44	93.14 ± 5.85	92.29 ± 2.38
47d	95.08 ± 3.45	96.25 ± 6.73	95.08 ± 3.45
47e	98.51 ± 4.47	95.30 ± 3.38	83.82 ± 6.36

La **Figura 32** muestra los porcentajes de viabilidad celular obtenidos de los compuestos **46a-e**, después de 24 h del tratamiento. Los compuestos mostraron un efecto dependiente de dosis, es decir, que a mayor concentración menor viabilidad celular.

Los compuestos **46b**, **46d** y el **46e** presentaron un porcentaje de viabilidad de $33.40 \pm 0.62\%$, $48.73 \pm 2.04\%$ y $44.41 \pm 3.52\%$, respectivamente, a una concentración del 500 µg/mL, siendo el compuesto **46b** el que presentó mayor efecto al disminuir la viabilidad celular hasta 33.40% a una concentración de 500 µg/mL.

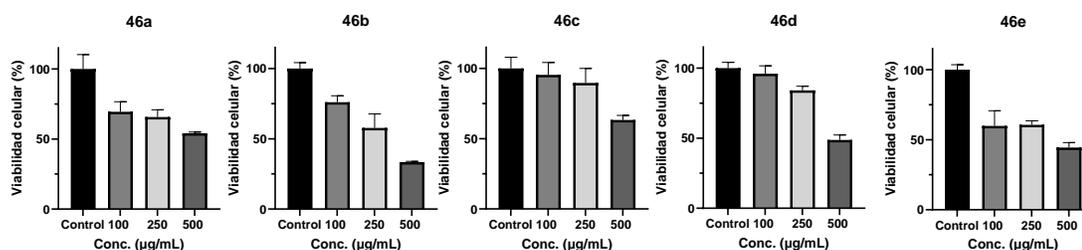


Figura 32. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 después de 24 h del tratamiento con los compuestos **46a-e**. Las células fueron tratadas con las concentraciones de 100, 250 y 500 µg/mL de cada compuesto. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm. Los resultados representan el promedio y las barras de error muestran la desviación estándar.

En el caso de los compuestos **47a-e** (**Figura 33**), se observa que esta serie de compuestos no presentan viabilidad celular menor del 83% a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$.

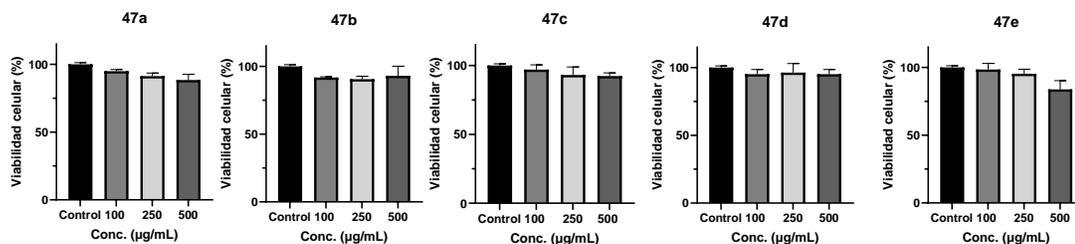


Figura 33. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 después de 24 h tratamiento con los compuestos **47a-e**. Las células fueron tratadas con las concentraciones de 100, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ de cada compuesto. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm. Los resultados representan el promedio y las barras de error muestran la desviación estándar.

Como control positivo se utilizó el Cisplatino, siendo este el fármaco de referencia para el tratamiento de cáncer colorrectal. Se puede observar que a pesar de que se usó la misma concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ los compuestos no lograron disminuir la viabilidad celular de manera comparable con el cisplatino. Sin embargo, a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ los compuestos **46a**, **46b**, **46e** y **47b** disminuyeron la viabilidad celular de manera significativa con respecto al control.

En la **Figura 34** se muestra el análisis estadístico de los compuestos a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ comparados con el control negativo (células sin tratamiento).

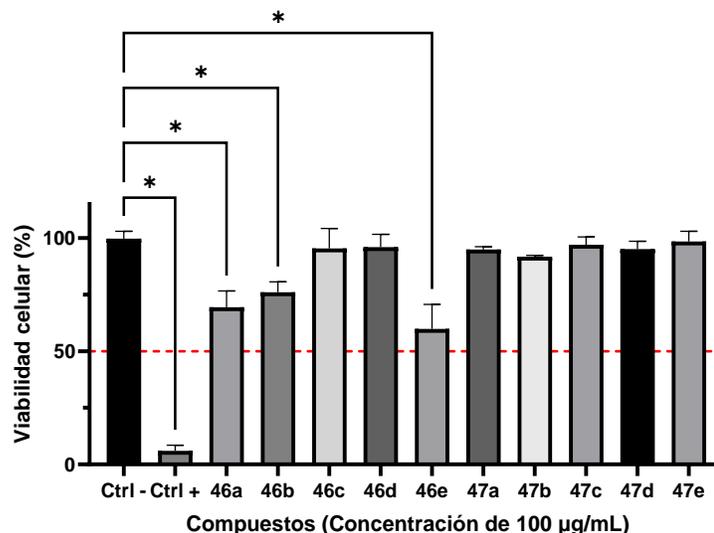


Figura 34. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 expuesta a los compuestos **46-47a-e** en una concentración de 100 µg/mL. Se incubaron 2×10^4 células por pozo se incubó a 37 °C y 5 % CO₂ por 24 h, como control positivo se utilizó Cisplatino (100 µg/ml) y como control negativo las células sin tratamiento. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm. Se realizó una prueba estadística ANOVA, seguida de una prueba de comparación múltiple de medias Dunnett's. Los resultados representan el promedio, las barras de error muestran la desviación estándar, los asteriscos (*) muestran los grupos que presentan una diferencia significativa ($p < 0.05$).

De acuerdo con la norma ISO 10993-5:2009, si se aplica un tratamiento y este logra reducir a menos del 70% la viabilidad celular, quiere decir que tiene un potencial citotóxico.⁹⁹ En la **Figura 35** se logra observar mejor el efecto dosis dependiente de los compuestos **46a-e**, mientras que los compuestos **47a-e** no muestran un efecto citotóxico en la línea celular Caco-2.

Es importante mencionar que los compuestos **46a** y **46e** logran disminuir la viabilidad a menos del 50% con una concentración de 500 µg/mL después de 24 h, sin embargo, analizando los resultados con lo reportado por otros estudios, se observa que la citotoxicidad de los compuestos sintetizados es menor. Por ejemplo, Leong K. *et al.* en 2016, reportó que el IC₅₀ del Cisplatino en la línea celular Caco-2 es de 120µM, que equivale a una concentración de 36.4 µg/mL.¹⁰⁰ En el caso del compuesto TBBT, Paprocki, D., *et al.* en 2021 reportó un IC₅₀ del 23 µM para el TBBT en la línea celular HCT116 (Cáncer de colón) lo que

equivale a 10.0 $\mu\text{g/mL}$.³⁵ Asimismo, El-Kardocy, A., *et al.*, en 2020 reportó un IC_{50} de 36.8 μM lo equivalente a 18.1 $\mu\text{g/mL}$ en MCF7 (Cáncer de mama) para compuesto **30**.⁴⁶

Estos datos indican que las concentraciones empleadas de los compuestos **46-47a-e** resultan ser mayores en comparación con lo reportado en la literatura.¹⁰⁰ Una posible explicación de esta diferencia podría ser atribuida a la ausencia de halógenos en los compuestos sintetizados en este proyecto. Dado que los halógenos son átomos reactivos y su presencia podría incrementar la reactividad de las moléculas¹⁰¹ previamente reportadas por la literatura.

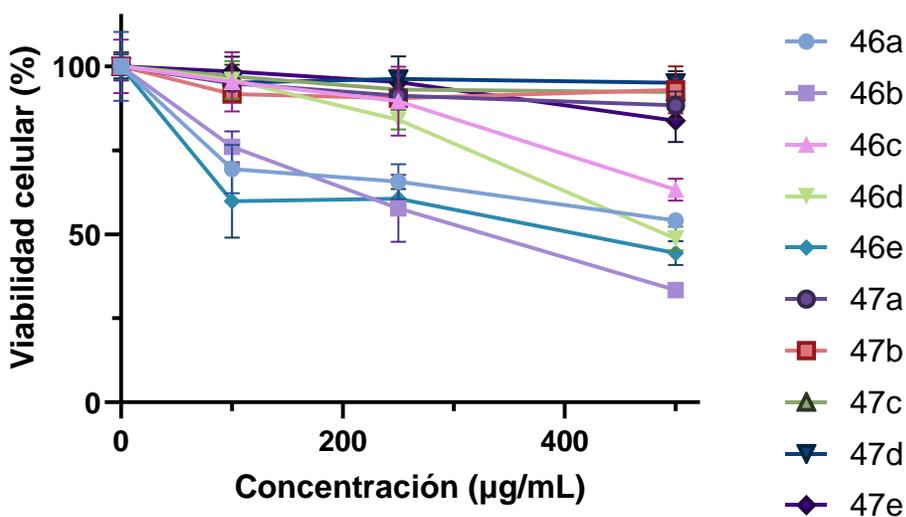


Figura 35. Curvas de actividad anticancerígena de los compuestos **46-47a-e** en la línea celular CACO-2 expuestos durante 24 h a tres concentraciones (100, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$). Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm. Los resultados representan el promedio y las barras de error muestran la desviación estándar.

De acuerdo con los resultados teóricos mostrados en la sección 6.3 Acoplamiento molecular, se esperaba que la serie de compuestos **47a-e** fueran menos activos que los compuestos **46a-e** debido a que al realizar la visualización de estos compuestos dentro del sitio activo de la proteína CK2 presentaban la región del

ácido carboxílico fuera de esta zona y algunos presentaban interacciones desfavorables con el aminoácido Asp175, el cual, de acuerdo con la literatura es un aminoácido muy importante en la generación de interacciones en la proteína CK2.^{46,98}

Los resultados mostrados anteriormente concuerdan con los datos teóricos calculados, pues la serie de compuestos **47a-e** no logró disminuir a menos del 70% de la viabilidad celular de las células Caco-2 en ninguna de las tres concentraciones probadas, mientras que los compuestos **46a-e** mostraron una disminución de la viabilidad a menos del 70% a concentraciones mayores de 250 µg/mL.

Los compuestos que presentaron una viabilidad celular menor fueron el compuesto **46b** y **46e**, con valores de 33 ± 0.62 y $44.41 \pm 3.52\%$ de viabilidad respectivamente a una concentración de 500 µg/mL. Estos compuestos al presentar menores valores de viabilidad celular se seleccionaron y se aplicaron por 72 h a las mismas concentraciones (100, 250 y 500 µg/mL), para evaluar si a mayor tiempo de exposición presentan mayor efecto citotóxico. En la **Tabla 14** se muestran los datos obtenidos de la viabilidad celular obtenida a las 72 h de exposición en la línea celular Caco-2 con los compuestos **46b** y **46e**.

Tabla 14. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 expuesta durante 72 h a los compuestos **46b** y **46e**

Compuesto	Viabilidad celular (%) a las 72 h		
	Concentración		
	100 (µg/mL)	250 (µg/mL)	500 (µg/mL)
46b	75.19 ± 10.27	35.37 ± 1.48	0.08 ± 0.00
46e	81.29 ± 6.29	41.98 ± 5.29	20.99 ± 1.42

En la **Figura 36** se puede observar que los compuestos **46b** y **46e** logran disminuir la viabilidad celular a menos del 50% después de 72 h de exposición a una concentración de 250 µg/mL, mientras que a 500 µg/mL se alcanza una viabilidad celular de 0.08% en el compuesto **46b**.

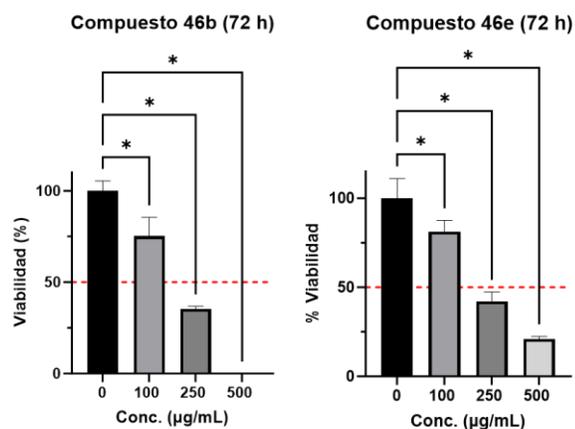


Figura 36. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 a las 72 h del compuesto **46b** y **46e** a tres concentraciones diferentes. Las células fueron tratadas con las concentraciones de 100, 250 y 500 µg/mL durante 72 h de exposición a los compuestos **46b** y **46e**. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm.

El cisplatino (control positivo) a una concentración de 100 µg/mL disminuyó hasta $0.70 \pm 0.43\%$ la viabilidad de las células a las 72 h, mientras que los compuestos **46a** y **46e** logran disminuir la viabilidad a esta misma concentración a un $75.19 \pm 10.27\%$ y $81.29 \pm 6.29\%$ respectivamente, ver **Figura 37**.

Viabilidad Celular a 72 h en CACO-2 (100 µg/mL)

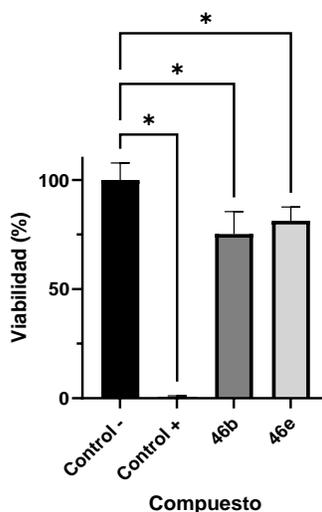


Figura 37. Viabilidad celular de la línea celular Caco-2 a las 72 h de los compuesto **46b** y **46e** en una concentración de 100 µg/mL. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm. Los resultados representan el promedio y las barras de error muestran la desviación estándar. Control positivo (Cisplatino 100 µg/mL), control negativo (Células sin

tratamiento). El asterisco (*) Indica que existe diferencia significativa respecto al control negativo ($p < 0.05$).

Se observa que a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ se obtiene un efecto citotóxico únicamente del compuesto **46b** y con forme se aumenta la concentración, disminuye la viabilidad hasta cero después de las 72 h de exposición con este compuesto.

Los compuestos después de las 72 h de exposición no lograron disminuir la viabilidad a dosis comparables con el cisplatino, sin embargo, el compuesto **46b** fue el único que logró disminuir la viabilidad al igual que el cisplatino, únicamente aumentando su concentración a 500 $\mu\text{g/mL}$ después de las 72 h de exposición.

En la **Figura 38** se muestra la comparación de la viabilidad celular de cada compuesto (**46a** y **46e**) a las 24 y 72 h. Se puede observar que los compuestos a una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ logran disminuir la viabilidad celular a menos del 50% después de 72 h.

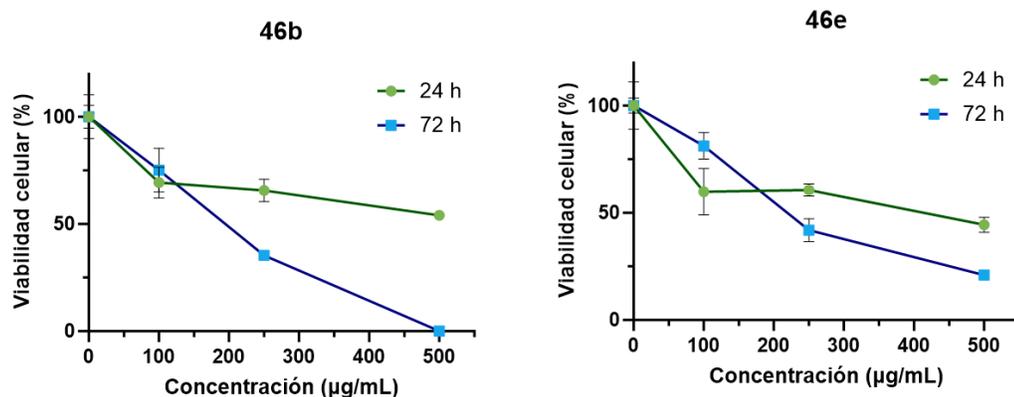


Figura 38. Comparación grafica de la viabilidad celular a 24 y 72 h de los compuestos **46b** y **46e** en la línea celular Caco-2. Las células fueron tratadas con las concentraciones de 100, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ de los compuestos **46b** y **46e**. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT, la lectura se realizó a 570 nm.

Ambos compuestos **46b** y **46e** no muestran actividad citotóxica a 100 $\mu\text{g/mL}$ debido a que disminuye la viabilidad celular a 75.19 ± 10.27 y 81.29 ± 6.29 , respectivamente. Se considera que un compuesto es citotóxico cuando logra

disminuir la viabilidad más del 30%; en ambos casos ambos compuestos muestran a las 72 h un efecto citostático, es decir, que se reduce o detiene el crecimiento celular y no necesariamente se induce la muerte celular.^{102,103} No obstante, al aumentar la concentración se puede observar que la viabilidad se reduce hasta cero en el caso del compuesto **46b** y al 20% para el compuesto **46e**, esto pudiera sugerir que la concentración y el tiempo de exposición de los compuestos son claves para determinar si los compuestos pueden tener un efecto citostático o citotóxico.

6.3.2. Actividad citotóxica *in vitro* de los derivados de ácido benzotriazolil acrílico.

La actividad citotóxica se determinó colocando alrededor de 2×10^5 células por pozo de timocitos murinos en una placa de 96 pocillos y se expusieron durante 24 h a tres concentraciones (100, 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$) de los compuestos **46b**, **46e** y cisplatino. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se determinó la viabilidad celular por el ensayo de resazurina y se realizó la lectura a una longitud de excitación de 530 nm y 590 nm de emisión en un lector de placas.

En la **Figura 39**, se puede observar que los compuestos presentan una alta toxicidad a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ de ambos compuestos y el cisplatino, reduciendo la viabilidad celular hasta el 4.79, 6.31 y 0% respectivamente.

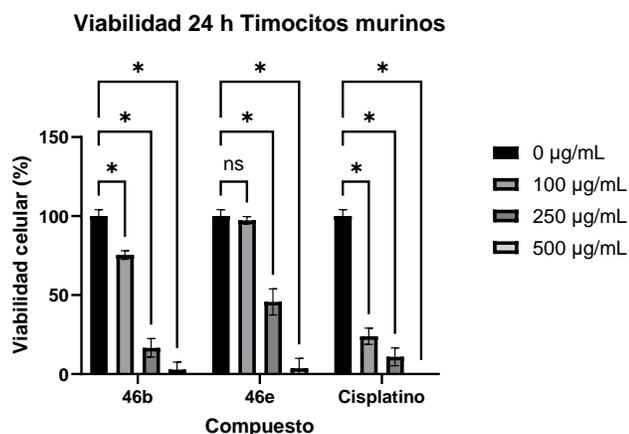


Figura 39. Viabilidad celular de timocitos murinos expuestos durante 24 h a 37 °C con los compuestos **46b**, **46e** y el cisplatino. La viabilidad celular fue determinada por el ensayo de resazurina. Se realizó una prueba estadística ANOVA, seguida de una prueba de comparación múltiple de medias Dunnett's, los asteriscos (*) muestran los grupos que presentan una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control, los resultados representan el promedio, las barras de error muestran la desviación estándar.

Los datos obtenidos del ensayo de resazurina para determinar la viabilidad celular de los timocitos murinos después de ser expuestos durante 24 h a los derivados **46b**, **46e** y cisplatino se muestran de manera condensada en la **Tabla 15**. Se observa que al aumentar la concentración de compuesto se presenta una mayor disminución de la viabilidad celular de los timocitos. El cisplatino resulta ser muy citotóxico debido a que inclusive a una concentración de 100 µg/mL presenta una alta toxicidad en timocitos murinos reduciendo hasta 23.93 ± 5.09 % la viabilidad celular de estos.

Por otra parte, los compuestos **46b**, **46e** a una concentración de 100 µg/mL redujeron la viabilidad celular de los timocitos murinos a 75.38 ± 2.74 y 97.33 ± 2.42 %, respectivamente y a 250 µg/mL, se redujo a 16.61 ± 5.79 y 45.70 ± 8.25 %, respectivamente, la viabilidad celular de los timocitos.

Tabla 15. Citotoxicidad de timocitos murinos expuestos a los compuestos **46b**, **46e** y cisplatino por 24 h.

Viabilidad celular (%)			
Concentración (µg/mL)	46b	46e	Cisplatino
100	75.38 ± 2.74	97.33 ± 2.42	23.93 ± 5.09
250	16.61 ± 5.79	45.70 ± 8.25	10.92 ± 5.66
500	2.77 ± 4.79	3.64 ± 6.31	0.00 ± 0.00

El compuesto **46b** presentó mayor citotoxicidad frente a los timocitos murinos que a la línea celular Caco-2 a las concentraciones de 250 y 500 µg/mL. Para el compuesto **46e**, se observó un menor efecto citotóxico a 100 µg/mL en los timocitos murinos que en la línea celular Caco-2, pero a concentraciones mayores de 250 µg/mL presentó mayor disminución de la viabilidad celular en timocitos murinos que en las células Caco-2.

Al presentar efecto citotóxico en los timocitos murinos sugiere que los compuestos podrían ser tóxicos en células sanas, lo que limita su potencial uso como antineoplásicos a concentraciones mayores de 250 µg/mL. Como se mencionó anteriormente los tratamientos contra el cáncer deben centrarse en inhibir el crecimiento de células tumorales sin dañar excesivamente las células sanas, lo cual, en este caso no ocurre, por lo cual las concentraciones utilizadas de los compuestos (250 µg/mL y 500 µg/mL) no pueden ser consideradas adecuadas para su uso como agentes anticancerígenos.

Los compuestos sintetizados presentan una estructura similar a la reportada por *Ortega- Villareal, et al.* en 2019, los autores determinaron que sus compuestos lograban ingresar en las células y concluyeron que estos se ubicaban en endosomas y lisosomas,⁶⁸ si bien la proteína CK2 es considerada ubicua.

Chon et al. en 2015 mencionan que la CK2 en células sanas se localiza en el compartimento citoplasmático y el núcleo, mientras que en las células

cancerígenas se encuentra una mayor cantidad dentro del núcleo.^{43,48} Por lo tanto, hasta el momento no podemos determinar en qué compartimentos de las células cancerígenas estos compuestos pueden alojarse.

Los compuestos mostrados en el presente proyecto presentan una estructura similar a la presentada por *Ortega- Villareal, et al.* en 2019, con base en lo reportado por *Ortega- Villareal, et al.*, sus compuestos se alojaban en lisosomas y endosomas, no ingresan al núcleo. En dado caso de que los compuestos sintetizados en este proyecto presentaran un comportamiento similar a lo reportado *Ortega- Villareal, et al.* los compuestos **46-47a-e** no lograrían llegar al núcleo y no lograrían entrar en contacto con la mayor cantidad de proteína CK2 disponible que está en las células cancerígenas.

6.4. Propiedades fotofísicas

Las moléculas sintetizadas en este proyecto presentan un sistema “push-pull”, es decir, presentan un grupo capaz de donar electrones (las aminas en este caso) conectado mediante un sistema conjugado π (benceno con electrones deslocalizados) y un grupo aceptor de electrones (el benzotriazol y el ácido carboxílico), Donador- π -Aceptor.¹⁰⁴ De tal forma que cuando se incide luz ultravioleta a la molécula, ésta es capaz de absorber energía, el grupo donador se excita y transfiere un par de electrones que se deslocalizan a través del sistema conjugado hasta llegar al grupo aceptor.⁶⁴

Estas moléculas tienen aplicaciones en la generación de bioimágenes mediante técnicas de microscopia de fluorescencia, como la microscopia confocal de fluorescencia. Esta técnica excita las moléculas dentro de una muestra y detecta la luz emitida para obtener imágenes a alta resolución. Permitiendo investigar y estudiar la estructura de células o tejidos, así como interacciones de biomoléculas en células y tejidos.

En este contexto, las propiedades fotofísicas, como el coeficiente de absorptividad molar (ϵ) y el desplazamiento de Stokes (SS) son parámetros importantes en el diseño de moléculas fluorescentes, los cuales permiten determinar la capacidad de absorción de luz de una molécula y permiten evitar interferencias ópticas mejorando la calidad en la generación de bioimágenes.^{63,64}

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la determinación del coeficiente de absorptividad molar y el desplazamiento de Stokes de los compuestos **46-47a-e**.

6.4.1. Espectro de absorción

Para la obtención del espectro de absorción, se realizó una solución a 15 ppm de cada compuesto en MeOH y se procedió a leerlo en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-Vis), donde se obtuvo su espectro de absorción con el que posteriormente se determinó el valor de coeficiente de absorptividad molar. El coeficiente de absorptividad molar, o también conocido como coeficiente de extinción molar, indica la capacidad que tienen las moléculas de absorber luz, por lo cual si se cuenta con un coeficiente de absorptividad molar (ϵ) $\geq 30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, entonces la molécula será capaz de absorber una considerable magnitud de luz.

Una vez obtenido el espectro de absorción, se procedió a realizar los cálculos correspondientes, utilizando la Ley de Lambert Beer, para determinar el coeficiente de absorptividad molar.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Donde:

A = Absorción

ϵ = Coeficiente de Absorptividad molar o coeficiente de extinción [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

b = Longitud de la celda [cm]

C = Concentración [M]

En la **Figura 40** y **Figura 41**, se muestran los espectros de absorción de las moléculas **46-47a-e**, obtenidos mediante espectroscopia UV-Visible. Se observan valores de absorción mayores de 300 nm y menores de 450 nm (**Tabla 16**).

Tabla 16. Coeficientes de absorptividad y longitud máxima de absorción de los compuestos **46-47a-e**.

Compuesto	46a	46b	46c	46d	46e	47a	47b	47c	47d	47e
Coeficiente de absorptividad molar ($M^{-1}cm^{-1}$)	28339.9	33877.2	23127.2	24788.6	30294.4	33119.3	36872.9	26215.1	25985.3	20779.8
$\lambda_{m\acute{a}x}$ Absorbancia (nm)	379.4	388.6	362	378.8	384.6	383.2	389.8	366	380	384.8

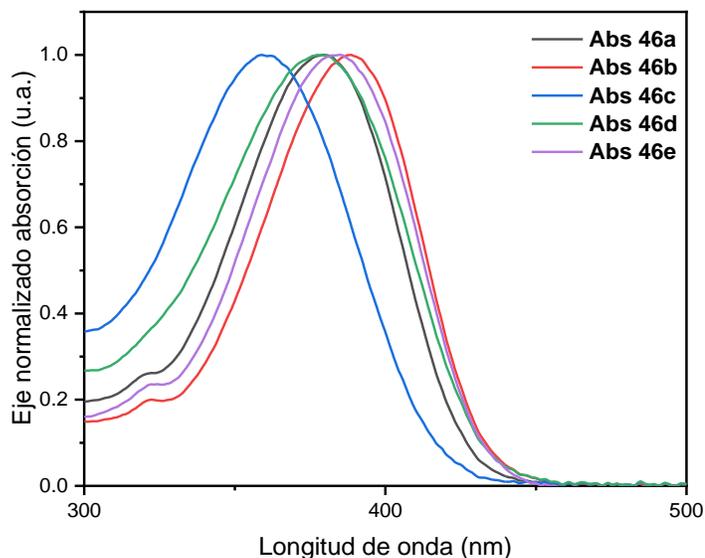


Figura 40. Espectro de absorción de los compuestos **46a-e**.

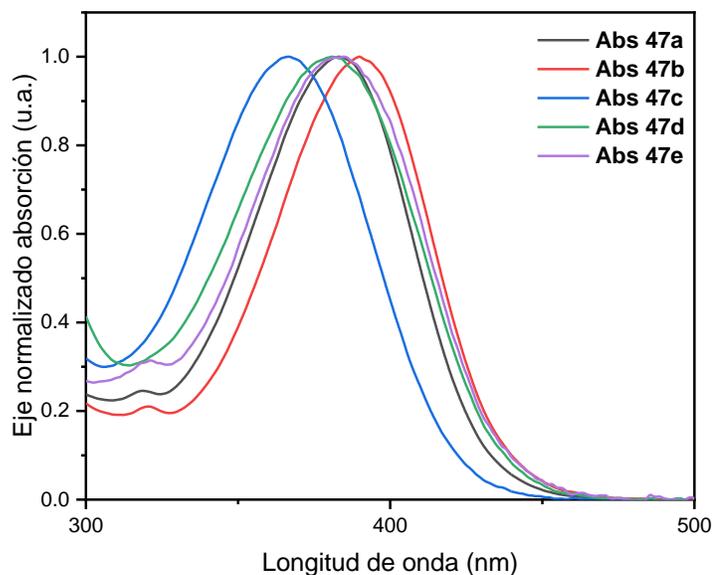


Figura 41. Espectros de absorción de los compuestos **47a-e**.

6.4.2. Espectro de excitación y emisión.

El cálculo del desplazamiento de Stokes se realizó mediante la determinación del máximo de excitación y el máximo de emisión, donde la diferencia del máximo de emisión menos el máximo de excitación nos permite obtener el valor de desplazamiento de Stokes.

$$\text{Desplazamiento de Stokes} = \lambda_{Em} - \lambda_{Ex}$$

Donde:

λ_{Em} = Longitud máxima de emisión

λ_{Ex} = Longitud máxima de excitación

Con lo anterior, se realizó una solución de aproximadamente 0.9 ppm de cada compuesto y posteriormente se realizó la determinación de los máximos

anteriormente mencionados, a través del uso de un espectrofotómetro de fluorescencia (**Figura 42** y **Figura 43**).

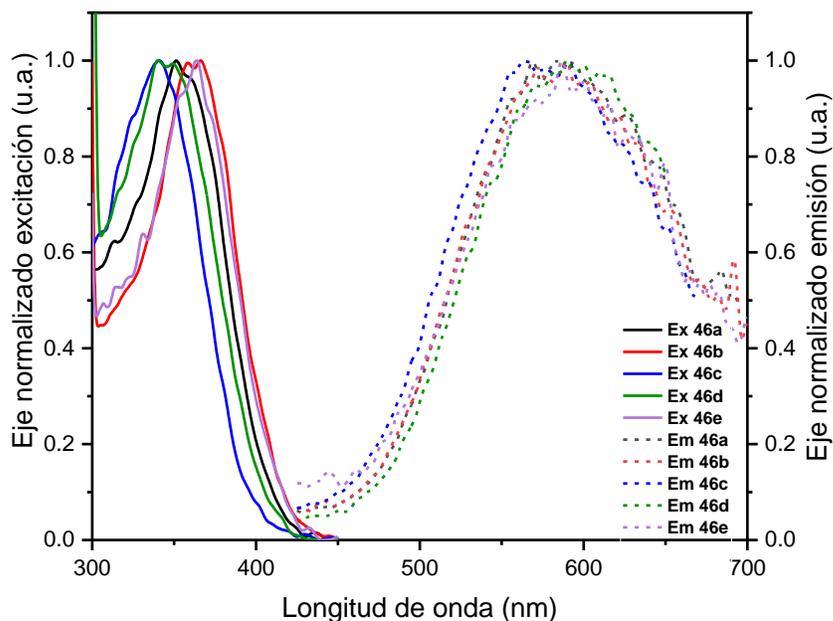


Figura 42. Espectros de excitación y emisión para los compuestos **46a-e**.

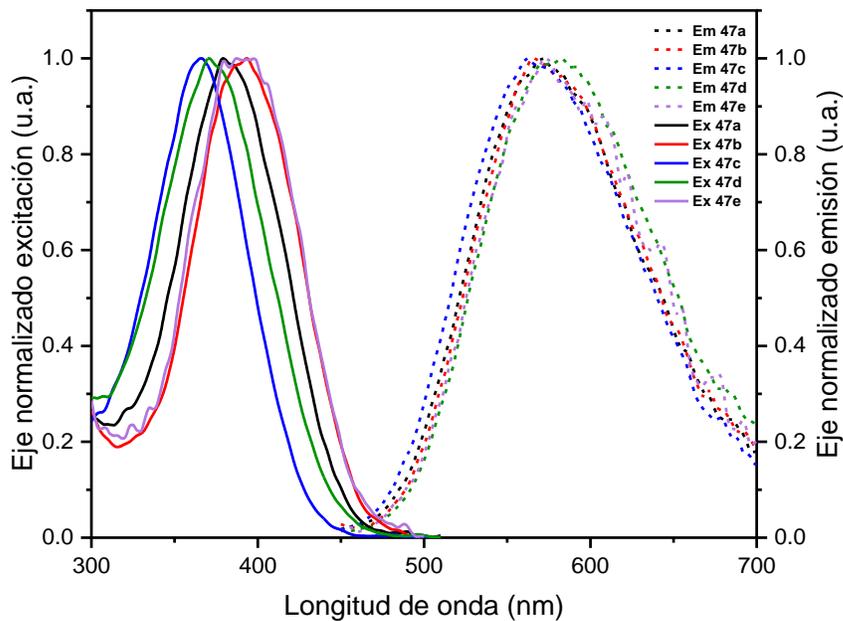


Figura 43. Espectros de excitación y emisión para los compuestos **47a-e**.

Una vez obtenidos los máximos de emisión y excitación se procedió a realizar el cálculo de desplazamiento de Stokes; se obtuvieron desplazamientos desde 170 nm hasta 269 nm. De acuerdo con la literatura, cuando una molécula presenta un desplazamiento de Stokes alto (mayor a 70 nm) permiten diferenciar entre luz emitida por la fuente y la luz emitida por los compuestos, permitiendo mejorar la relación señal-ruido en la generación de bioimágenes.⁶⁴

Tabla 17. Propiedades fotofísicas de los compuestos **46-47a-e**.

Compuesto	Coefficiente de absortividad molar ($M^{-1}cm^{-1}$)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ Absorbancia (nm)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ Excitación (nm)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ Emisión (nm)	Desplazamiento de Stokes (nm)
46a	28339.9	379.4	351.2	583.6	232.4
46b	33877.2	388.6	366.4	589.4	223.0
46c	23127.2	362.0	341.0	574.0	233.0
46d	24788.6	378.8	340.0	609.6	269.6
46e	30294.4	384.6	363.8	586.7	202.1
47a	33119.3	383.2	379.2	571.0	191.8
47b	36872.9	389.8	393.4	566.2	172.8
47c	26215.1	366.0	366.0	559.9	193.9
47d	25985.3	380.0	370.6	580.3	209.7
47e	20779.8	384.8	387.2	572.9	188.1

Analizando los datos de la **Tabla 17**, los compuestos **46b**, **46e**, **47a** y **47b** presentaron un mejor coeficiente de absortividad molar en comparación con los compuestos restantes; el compuesto **47b** presentó un ϵ = de 36872.9 siendo el compuesto con mayor coeficiente de absortividad molar; sin embargo, se observa que este presentó el menor desplazamiento de Stokes.

Se puede observar que la presencia de diferentes sustituyentes afecta directamente en el coeficiente de absortividad molar e impacta en el desplazamiento de Stokes, debido a que se puede perder energía a través de movimientos vibracionales. En el caso de los compuestos **46c** y **47c** presentan en su estructura el grupo morfolino, el cual consiste en un anillo heterocíclico de

seis miembros que contiene un átomo de nitrógeno y un átomo de oxígeno, siendo el nitrógeno responsable de aportar el par de electrones para generar la deslocalización de los electrones π en la molécula. A pesar de que este grupo aporta rigidez en la estructura se observa que presenta un coeficiente de absorción menor, esto puede atribuirse a que la presencia del oxígeno, un átomo más electronegativo que el nitrógeno actúa también como atractor de electrones en lugar de un grupo donador.

Por otra parte, en el caso de los compuestos **46b** y **47b** que presentan el mismo sustituyente (dietilamino), se observa que al aumentar la cadena alquílica ambos presentan mejores propiedades fotofísicas a diferencia de los otros compuestos con diferentes sustituyentes. Esto puede atribuirse a que el grupo dietilamino logra estabilizar mejor la molécula por efecto inductivo.

De manera general, todos los compuestos presentaron un desplazamiento de Stokes mayor a 70 nm y únicamente tres compuestos presentaron un valor mayor a $30000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, **46b**, **46e**, **47a** y **47b**, siendo el compuesto **47b**, el que presentó el valor más alto, indicándonos que este compuesto es capaz de absorber más luz que los demás.

El compuesto **47b** podría ser utilizado en la generación de bioimágenes puesto que ha presentado el mejor coeficiente de absorción, favoreciendo el uso de una menor cantidad de este compuesto al realizar las pruebas para la generación de las bioimágenes; sin embargo, aún falta determinar su citotóxico en células sanas.

El compuesto **46e** presentó menor efecto citotóxico en células sanas a una concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ y presentó valores óptimos de las propiedades fotofísicas, por lo anterior este compuesto resulta ser el mejor candidato para la obtención de bioimágenes.

7. Conclusiones

La metodología planteada permite obtener los derivados de ácido benzotriazolil acrílico (**46a-e** y **47a-e**). Se obtuvieron rendimientos de entre el 17 y 35 % en la reacción de Knoevenagel para la obtención de los compuestos de benzotriazolil acetato de etilo **41** y **42** y rendimientos entre el 41 % y 74 % en la reacción de hidrólisis para la obtención de los ácidos de benzotriazolil acrílico. La purificación de estos compuestos se realizó mediante cromatografía en columna y recristalización. A partir de la caracterización por RMN ¹H y RMN ¹³C y HRMS se confirmó la obtención de los diez compuestos propuestos.

A partir del software AutoDock 4.2 se logró realizar el acoplamiento molecular de los diez compuestos propuestos con la proteína CK2, determinando que al aumentar el largo de la cadena alquílica o al adicionar un ciclo en su estructura les permite tener mayor afinidad al sitio activo de la proteína CK2, inclusive que el TBBT (derivado de benzotriazol más estudiado en la inhibición de la proteína CK2).

Los resultados de la actividad anticancerígena en la línea celular Caco-2 mostraron que los compuestos (**46-47a-e**) no presentaron mayor efecto citotóxico que el fármaco de referencia (cisplatino), el cual fue aplicado a una concentración de 100 µg/mL en las células cancerígenas después de 24 h. Sin embargo, los compuesto **46b**, **46d** y **46e** lograron disminuir la viabilidad celular a menos del 50% en esta línea celular después de 24 h a una concentración de 500 µg/mL.

Los derivados **47a-e** no presentaron actividad anticancerígena relevante, debido a que no lograron disminuir más del 20% la viabilidad celular de las células cancerígenas en las tres concentraciones probadas (100, 250 y 500 µg/mL).

Dentro de la serie de compuestos **46a-e**, los compuestos que lograron disminuir más del 30% la viabilidad celular en la línea celular Caco-2 son el **46a**, **46b** y **46e** a las tres concentraciones probadas (100, 250 y 500 µg/mL) después de 24 h.

Los compuestos que demostraron un potencial efecto anticancerígeno fueron el compuesto **46b** y **46e**, los cuales lograron disminuir la viabilidad celular en menos del 50% después de 24 horas a una concentración de 500 µg/mL. Sin embargo, su efecto citotóxico fue menor en comparación con el fármaco de referencia, cisplatino.

El compuesto **46e** a una concentración de 100 µg/mL no disminuyó de manera significativa la viabilidad celular en timocitos murinos; por otro lado, este compuesto (**46e**) disminuyó la viabilidad celular de la línea celular Caco-2 a 59.85%.

El compuesto **46b** a 100 µg/mL disminuyó a 75.98% la viabilidad celular en timocitos murinos y 69.39% en las células Caco-2. A concentraciones mayores de 250 µg/mL los compuestos (**46b** y **46e**) presentaron un mayor efecto citotóxico, aunque, este fue menor a la citotoxicidad inducida por el cisplatino.

La evaluación de sus propiedades fotofísicas (SS y ϵ) permitió determinar cuáles compuestos son los mejores candidatos para su aplicación en la generación de bioimágenes. Los compuestos **46-47a-e** presentaron un mayor desplazamiento de Stokes superior a 70 nm, mientras que los compuestos **46b**, **46e**, **47a** y **47b** mostraron un ϵ superior a 30 000 M⁻¹ cm⁻¹. El compuesto **46e** presentó menor efecto citotóxico en timocitos murinos a una concentración de 100 µg/mL lo que sugiere que el compuesto **46e** es un candidato para ser utilizado como tinte celular en la generación de bioimágenes.

El presente proyecto solo evalúa la viabilidad celular de los compuestos **8-9a-e** en la línea celular Caco-2 y en timocitos murinos. Se logró identificar que el **8e** es un candidato para ser utilizado como tinte celular en la generación de bioimágenes a concentraciones inferiores a 100 µg/mL.

8. Perspectivas

Ante los resultados obtenidos en el presente trabajo, sería recomendable evaluar los compuestos **46a**, **46c**, **46d** y **47a-e** en otras líneas celulares, debido a que éstos no presentaron un efecto anticancerígeno en la línea celular Caco-2 y no se realizó la evaluación de su efecto citotóxico en células sanas.

Se sugiere realizar un ensayo enzimático de la proteína CK2 para evaluar su potencial actividad como inhibidores de la proteína CK2.

Realizar los análisis por microscopía confocal de fluorescencia para la generación de bioimágenes y visualizar si las moléculas son capaces de ingresar a las células y observar en que compartimento celular se alojan.

Se sugiere realizar una evaluación *in silico* en otras dianas terapéuticas con los compuestos **46-47a-e**, para buscar otras posibles aplicaciones de los compuestos, así como su evaluación en otras líneas celulares relacionadas con padecimientos que presentan la sobreexpresión de la CK2.

9. Referencias

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).
2. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **74**, 229–263 (2024).
3. Organización Panamericana de la Salud. Crece la carga mundial de cáncer en medio de una creciente necesidad de servicios. *Crece la carga mundial de cáncer en medio de una creciente necesidad de servicios* 1 <https://www.paho.org/es/noticias/1-2-2024-crece-carga-mundial-cancer-medio-creciente-necesidad-servicios#:~:text=Se%20calcula%20que%20en%202022,era%20de%2053%2C5%20millones.> (2024).
4. Brown, J. S. *et al.* Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research* **21**, 1142–1147 (2023).
5. Catherine Sánchez, N. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes* **24**, 553–562 (2013).
6. Pitot, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* **72**, 962–970 (1993).
7. American Association for Cancer Research. *Cancer Progress Report 2024 Spotlight on Cancer in Children, Adolescents and Young Adults.* (2024).
8. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31–46 (2022).

9. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
10. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. *The Hallmarks of Cancer Review Evolve Progressively from Normalcy via a Series of Pre*. *Cell* vol. 100 (2000).
11. Mercadante, A. A. & Kasi, A. *Genetics, Cancer Cell Cycle Phases*. (StatPearls Publishing, 2024).
12. Zhang, X., Nie, D. & Chakrabarty, S. *Growth Factors in Tumor Microenvironment*.
13. Witsch, E., Sela, M. & Yarden, Y. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology* vol. 25 85–101 Preprint at <https://doi.org/10.1152/physiol.00045.2009> (2010).
14. Robinson, N. J. & Schieman, W. P. Telomerase in Cancer: Function, Regulation, and Clinical Translation. *Cancers* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers14030808> (2022).
15. Munn, L. L. Cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **9**, (2017).
16. Kaszak, I. *et al*. Role of cadherins in cancer—a review. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 1–17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms21207624> (2020).
17. Debela, D. T. *et al*. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med* **9**, 1–10 (2021).
18. Tohme, S., Simmons, R. L. & Tsung, A. Surgery for cancer: A trigger for metastases. *Cancer Research* vol. 77 1548–1552 Preprint at <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1536> (2017).

19. Amjad, M. T., Chidharla, A. & Kasi, A. *Cancer Chemotherapy*. (StatPearls Publishing, 2024).
20. Amjad, M. T., Chidharla, A. & Kasi, A. *Cancer Chemotherapy*. (2022).
21. Tilsed, C. M., Fisher, S. A., Nowak, A. K., Lake, R. A. & Lesterhuis, W. J. Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Frontiers in Oncology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.960317> (2022).
22. Anand, U. *et al.* Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes Dis* (2022) doi:10.1016/j.gendis.2022.02.007.
23. Wu, L. Q., Ma, X. & Liu, Z. P. Design, synthesis, and biological evaluation of 3-(1-benzotriazole)-nor- β -lapachones as NQO1-directed antitumor agents. *Bioorg Chem* **113**, 1–12 (2021).
24. Briguglio, I. *et al.* Benzotriazole: An overview on its versatile biological behavior. *Eur J Med Chem* **97**, 612–648 (2015).
25. Corrie, P. G. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine* **36**, 24–28 (2008).
26. Davodabadi, F. *et al.* Cancer chemotherapy resistance: Mechanisms and recent breakthrough in targeted drug delivery. *Eur J Pharmacol* **958**, 176013 (2023).
27. Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S. & Baradaran, B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* vol. 7 339–348 Preprint at <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041> (2017).

28. Lei, Z. N. *et al.* Understanding and targeting resistance mechanisms in cancer. *MedComm* vol. 4 Preprint at <https://doi.org/10.1002/mco2.265> (2023).
29. Alfarouk, K. O. *et al.* Resistance to cancer chemotherapy: Failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0221-1> (2015).
30. Chaudhry, G. E. S., Md Akim, A., Sung, Y. Y. & Sifzizul, T. M. T. Cancer and apoptosis: The apoptotic activity of plant and marine natural products and their potential as targeted cancer therapeutics. *Frontiers in Pharmacology* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.842376> (2022).
31. Chua, M. M. J. *et al.* CK2 in cancer: Cellular and biochemical mechanisms and potential therapeutic target. *Pharmaceuticals* **10**, (2017).
32. Ahmad, K. A., Wang, G., Unger, G., Slaton, J. & Ahmed, K. Protein kinase CK2 - A key suppressor of apoptosis. *Adv Enzyme Regul* **48**, 179–187 (2008).
33. Zień, P., Abramczyk, O., Domańska, K., Bretner, M. & Szyszka, R. TBBz but not TBBt discriminates between two molecular forms of CK2 in vivo and its implications. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 623–628 (2003).
34. Olsten, M. E. K. & Litchfield, D. W. Order or chaos? An evaluation of the regulation of protein kinase CK2. in *Biochemistry and Cell Biology* vol. 82 681–693 (2004).
35. Paprocki, D., Winiewska-Szajewska, M., Speina, E., Kucharczyk, R. & Poznański, J. 5,6-diiodo-1H-benzotriazole: new TBBt analogue that minutely affects mitochondrial activity. *Sci Rep* **11**, (2021).
36. Borgo, C., D'Amore, C., Sarno, S., Salvi, M. & Ruzzene, M. Protein kinase CK2: a potential therapeutic target for diverse human diseases. *Signal*

Transduction and Targeted Therapy vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00567-7> (2021).

37. Wang, G., Gao, G., Yang, X., Yang, X. & Ma, P. Casein kinase CK2 structure and activities in plants. *Journal of Plant Physiology* vol. 276 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153767> (2022).
38. Husain, K., Williamson, T. T., Nelson, N. & Ghansah, T. Protein kinase 2 (CK2): a potential regulator of immune cell development and function in cancer. *Immunol Med* **44**, 159–174 (2021).
39. Hong, H. & Benveniste, E. N. The Immune Regulatory Role of Protein Kinase CK2 and Its Implications for Treatment of Cancer. *Biomedicines* **9**, 1932 (2021).
40. Mandato, E., Manni, S., Zaffino, F., Semenzato, G. & Piazza, F. Targeting CK2-driven non-oncogene addiction in B-cell tumors. *Oncogene* **35**, 6045–6052 (2016).
41. Ortega, C. E., Seidner, Y. & Dominguez, I. Mining CK2 in cancer. *PLoS One* **9**, (2014).
42. Zou, J. *et al.* Protein kinase CK2 α is overexpressed in colorectal cancer and modulates cell proliferation and invasion via regulating EMT-related genes. *J Transl Med* **9**, (2011).
43. Lin, K. Y. *et al.* Overexpression of nuclear protein kinase CK2 α catalytic subunit (CK2 α) as a poor prognosticator in human colorectal Cancer. *PLoS One* **6**, (2011).
44. Human Protein Atlas. Human Protein Atlas. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000070770-CSNK2A2/cell+line#colorectal_cancer (2025).

45. Sarno, S., Salvi, M., Battistutta, R., Zanotti, G. & Pinna, L. A. Features and potentials of ATP-site directed CK2 inhibitors. in *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* vol. 1754 263–270 (2005).
46. El-Kardocy, A. *et al.* CK2 inhibition, lipophilicity and anticancer activity of new: N 1 versus N 2-substituted tetrabromobenzotriazole regioisomers. *New Journal of Chemistry* **44**, 13007–13017 (2020).
47. Duncan, J. S. *et al.* An Unbiased Evaluation of CK2 Inhibitors by Chemoproteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**, 1077–1088 (2008).
48. Chon, H. J., Bae, K. J., Lee, Y. & Kim, J. The casein kinase 2 inhibitor, CX-4945, as an anti-cancer drug in treatment of human hematological malignancies. *Front Pharmacol* **6**, (2015).
49. Yurkanis Bruice, P. *Química Orgánica*. (Pearson Education, México, 2008).
50. Kumar, A. *et al.* Nitrogen Containing Heterocycles as Anticancer Agents: A Medicinal Chemistry Perspective. *Pharmaceuticals* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ph16020299> (2023).
51. Hamid, D. M. *et al.* History, Classification and Biological Activity of Heterocyclic Compounds Ibtisam Sodani Forensic DNA Center for Research and Training History, Classification and Biological Activity of Heterocyclic Compounds. *International Journal of Natural and Human Sciences* vol. 4 <https://www.researchgate.net/publication/373392090> (2023).
52. Shukla, P. K., Mishra, P., Kumar Shukla, P. & Verma, A. *Agriculture and Food Processing Technology*. <https://www.researchgate.net/publication/315686285>.

53. Mermer, A. *et al.* Benzotriazole-oxadiazole hybrid Compounds: Synthesis, anticancer Activity, molecular docking and ADME profiling studies. *J Mol Liq* **359**, (2022).
54. Kale, R. R., Prasad, V., Mohapatra, P. P. & Tiwari, V. K. Recent developments in benzotriazole methodology for construction of pharmacologically important heterocyclic skeletons. *Monatshefte fur Chemie* vol. 141 1159–1182 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00706-010-0378-1> (2010).
55. Albers, T. *et al.* *The Chemistry of Benzotriazole Derivatives*. vol. 43 (Springer International Publishing, Cham, 2016).
56. Ren, Y. Recent Development of Benzotriazole-based Medicinal Drugs. *Med Chem (Los Angeles)* **4**, (2014).
57. Ibba, R. *et al.* Synthesis, Antitumor and Antiviral In Vitro Activities of New Benzotriazole-Dicarboxamide Derivatives. *Front Chem* **9**, (2021).
58. Avhad Datta *et al.* Review on synthetic study of benzotriazole. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences* **11**, 215–225 (2020).
59. Yuan, J. *et al.* Triazole and benzotriazole derivatives as novel inhibitors for p90 ribosomal S6 protein kinase 2: Synthesis, molecular docking and SAR analysis. *Chin J Chem* **31**, 1192–1198 (2013).
60. Datta, R., Heaster, T. M., Sharick, J. T., Gillette, A. A. & Skala, M. C. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *J Biomed Opt* **25**, 1 (2020).
61. Yang, Y. *et al.* Fluorescent Organic Small Molecule Probes for Bioimaging and Detection Applications. *Molecules* vol. 27 Preprint at <https://doi.org/10.3390/molecules27238421> (2022).

62. Terai, T. & Nagano, T. Fluorescent probes for bioimaging applications. *Current Opinion in Chemical Biology* vol. 12 515–521 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.08.007> (2008).
63. Chowdhury, P. & Chan, Y. H. Recent advances in D-A-D based Pdots with NIR-II fluorescence for deep-tissue imaging. *Molecular Systems Design and Engineering* vol. 7 702–719 Preprint at <https://doi.org/10.1039/d2me00034b> (2022).
64. Chen, H. *et al.* Bioinspired Large Stokes Shift Small Molecular Dyes for Biomedical Fluorescence Imaging. *Sci. Adv* vol. 8 (2022).
65. Wang, S., Li, B. & Zhang, F. Molecular Fluorophores for Deep-Tissue Bioimaging. *ACS Cent Sci* **6**, 1302–1316 (2020).
66. Tsien, R. Y. *THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN*. *Annu. Rev. Biochem* vol. 67 www.annualreviews.org (1998).
67. Li, S. *et al.* A benzotriazole-coumarin derivative as a turn-on fluorescent probe for highly efficient and selective detection of homocysteine and its bioimaging application. *Microchemical Journal* **185**, 108293 (2023).
68. Ortega-Villarreal, A. S. *et al.* Synthesis and characterization of ethyl benzotriazolyl acrylate-based D- π -A fluorophores for live cell-based imaging applications. *RSC Adv* **9**, 8759–8767 (2019).
69. Zhang, S. S. *et al.* A novel benzotriazole derivative inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cells by increasing oxidative stress concomitant mitochondrial damage. *Eur J Pharmacol* **584**, 144–152 (2008).
70. Carta, A. *et al.* 3-Aryl-2-[1H-benzotriazol-1-yl]acrylonitriles: A novel class of potent tubulin inhibitors. *Eur J Med Chem* **46**, 4151–4167 (2011).
71. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease. Mercaptopurine. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-*

Induced Liver Injury [Internet] vol. 1
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548546/> (2012).

72. Zhang, S. *et al.* Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of novel 1,3,4-oxadiazole derivatives possessing benzotriazole moiety as FAK inhibitors with anticancer activity. *Bioorg Med Chem* **21**, 3723–3729 (2013).
73. Łukowska-Chojnacka, E., Wińska, P., Wielechowska, M. & Bretner, M. Synthesis of polybrominated benzimidazole and benzotriazole derivatives containing a tetrazole ring and their cytotoxic activity. *Monatsh Chem* **147**, 1789–1796 (2016).
74. Kassab, A. E. & Hassan, R. A. Novel benzotriazole N-acylarylhydrazone hybrids: Design, synthesis, anticancer activity, effects on cell cycle profile, caspase-3 mediated apoptosis and FAK inhibition. *Bioorg Chem* **80**, 531–544 (2018).
75. Li, Q., Liu, G., Wang, N., Yin, H. & Li, Z. Synthesis and anticancer activity of benzotriazole derivatives. *J Heterocycl Chem* **57**, 1220–1227 (2020).
76. Mioc, M. *et al.* Novel Triterpenic Acid—Benzotriazole Esters Act as Pro-Apoptotic Antimelanoma Agents. *Int J Mol Sci* **23**, 9992 (2022).
77. Nava-Ramirez, J. C. *et al.* Synthesis of α,β -Unsaturated Benzotriazolyl-1,3,4-Oxadiazole Derivatives: Anticancer Activity, Cytotoxicity, and Cell Imaging. *IEEE Trans Nanobioscience* **21**, 125–134 (2022).
78. Zhong, L. *et al.* Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w> (2021).

79. Liu, B., Zhou, H., Tan, L., Siu, K. T. H. & Guan, X. Y. Exploring treatment options in cancer: Tumor treatment strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01856-7> (2024).
80. Trembley, J. H., Wang, G., Unger, G., Slaton, J. & Ahmed, K. CK2: A key player in cancer biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 1858–1867 (2009).
81. Kassab, A. E. Benzotriazole scaffold: An overview of antiproliferative potential, mechanisms of action, and structure–activity relationships. *Arch Pharm (Weinheim)* **356**, (2023).
82. Agu, P. C. *et al.* Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Sci Rep* **13**, (2023).
83. Torres, P. H. M., Sodero, A. C. R., Jofily, P. & Silva-Jr, F. P. Key topics in molecular docking for drug design. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms20184574> (2019).
84. Meng, X.-Y., Zhang, H.-X., Mezei, M. & Cui, M. *Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery*.
85. Cosconati, S. *et al.* Virtual screening with AutoDock: Theory and practice. *Expert Opinion on Drug Discovery* vol. 5 597–607 Preprint at <https://doi.org/10.1517/17460441.2010.484460> (2010).
86. Van Breemen, R. B. & Li, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* vol. 1 175–185 Preprint at <https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175> (2005).
87. Wang, W., Thomas, R., Sizova, O. & Su, D. M. Thymic Function Associated With Cancer Development, Relapse, and Antitumor Immunity – A Mini-

- Review. *Frontiers in Immunology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00773> (2020).
88. Savino, W. & Lepletier, A. Thymus-derived hormonal and cellular control of cancer. *Frontiers in Endocrinology* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1168186> (2023).
89. Kowapradit, J. *et al.* In vitro permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2) monolayer of water soluble quaternary ammonium chitosan derivatives. *AAPS PharmSciTech* **11**, 497–508 (2010).
90. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S. & Kempson, I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
91. Escobar M, L., Rivera, A. & Aristizábal, F. A. COMPARISON OF RESAZURIN AND MTT METHODS ON STUDIES OF CITOTOXICITY IN HUMAN TUMOR CELL LINES. *REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA, VITAE* **17**, 67–74 (2008).
92. Kuete, V., Karaosmanoğlu, O. & Sivas, H. Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. in *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* 271–297 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8.
93. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* **31**, 455–461 (2010).
94. Buckley, M. E. *et al.* Comparative Assessment of Docking Programs for Docking and Virtual Screening of Ribosomal Oxazolidinone Antibacterial Agents. *Antibiotics* **12**, (2023).

95. Czapinska, H. *et al.* Halogen atoms in the protein–ligand system. Structural and thermodynamic studies of the binding of bromobenzotriazoles by the catalytic subunit of human protein kinase CK2. *Journal of Physical Chemistry B* **125**, 2491–2503 (2021).
96. Abdulhameed Odhar, H. Molecular docking analysis and dynamics simulation of salbutamol with the monoamine oxidase B (MAO-B) enzyme. *Bioinformation* **18**, 304–309 (2022).
97. Hasanain Abdulhameed, O., Ahmed Fadhil, H. & Suhad Sami, H. Molecular docking analysis and dynamics simulation of salbutamol with the monoamine oxidase B (MAO-B) enzyme. *Biomedical Informatics* **18**, 304–309 (2022).
98. Al-Qadhi, M. A., Yahya, T. A. A. & El-Nassan, H. B. Recent Advances in the Discovery of CK2 Inhibitors. *ACS Omega* vol. 9 20702–20719 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c10478> (2024).
99. Internacional Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices-16:45:28 MDT. *Biological evaluation of medical devices - Part 5: tests for in vitro cytotoxicity* Preprint at (2009).
100. Leong, K. H. *et al.* Cycloart-24-ene-26-ol-3-one, a new cycloartane isolated from leaves of *Aglaia exima* triggers tumour necrosis factor-receptor 1-mediated caspase-dependent apoptosis in colon cancer cell line. *PLoS One* **11**, (2016).
101. Jiang, S. *et al.* The Important Role of Halogen Bond in Substrate Selectivity of Enzymatic Catalysis. *Sci Rep* **6**, (2016).
102. Anttila, J. V. *et al.* Contrasting the impact of cytotoxic and cytostatic drug therapies on tumour progression. *PLoS Comput Biol* **15**, (2019).

103. Rixe, O. & Fojo, T. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? *Clinical Cancer Research* vol. 13 7280–7287
Preprint at <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2141> (2007).
104. Benitez-Martin, C. *et al.* Benzotriazole-based multidonor-acceptor systems as attractive two-photon absorption dye platforms. *Dyes and Pigments* **200**, (2022).

APÉNDICES

Espectros de RMN

Espectros de ^1H y ^{13}C de los compuestos 44a-e al 47a-e

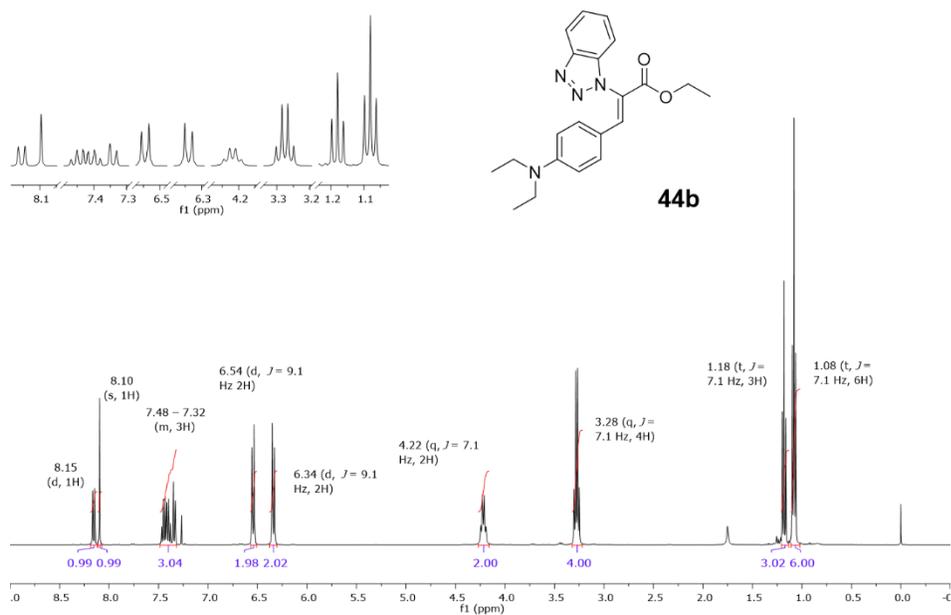


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H de **44b** (400 MHz, CDCl_3).

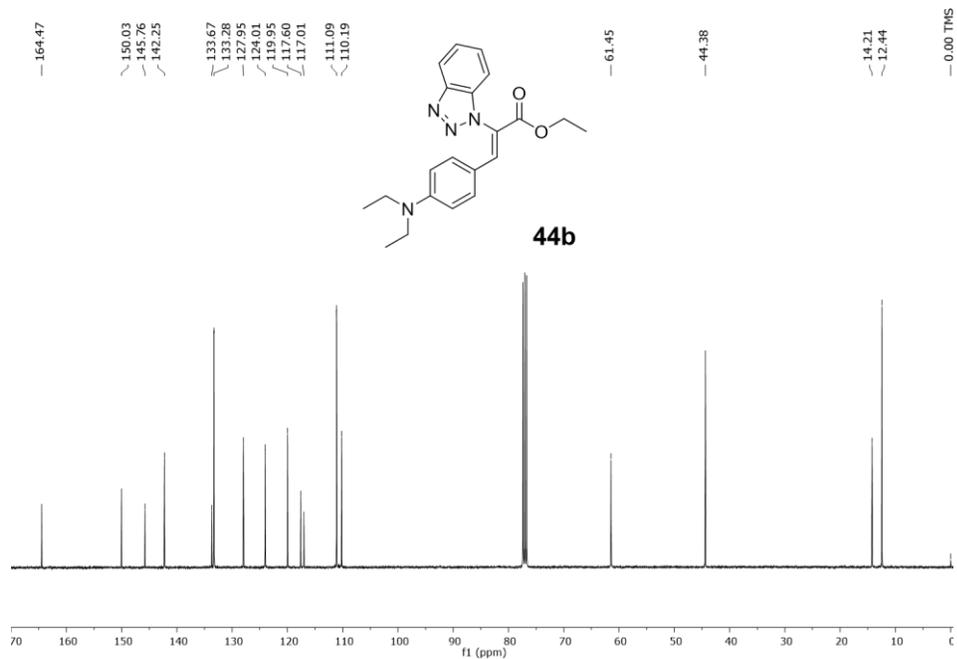


Figura 45. Espectro de RMN de ¹³C de **44b** (101 MHz, CDCl₃).

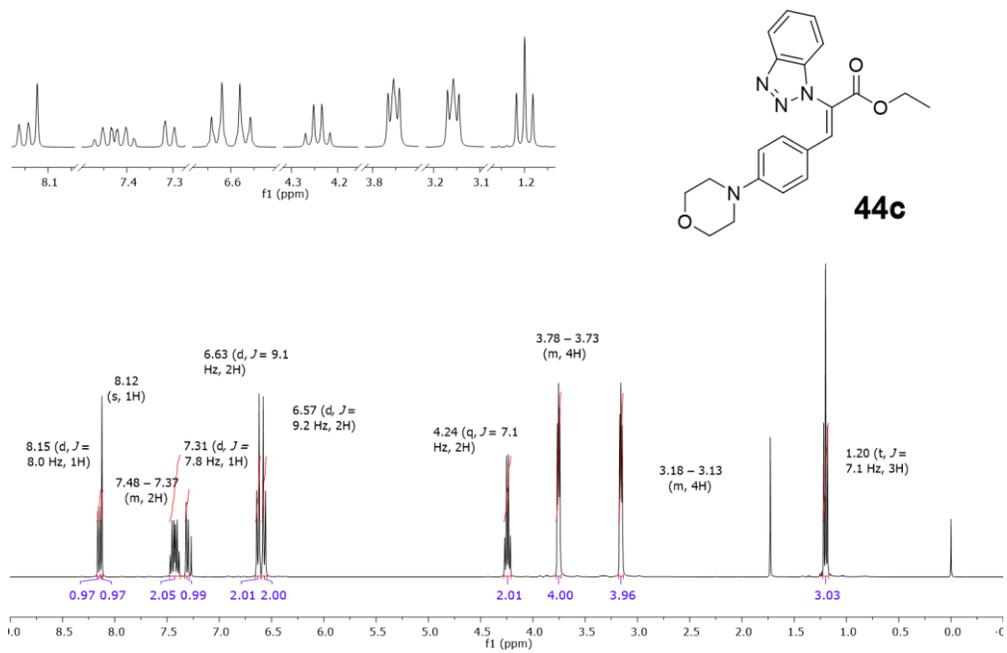


Figura 46. Espectro de RMN de ¹H de **44c** (400 MHz, CDCl₃).

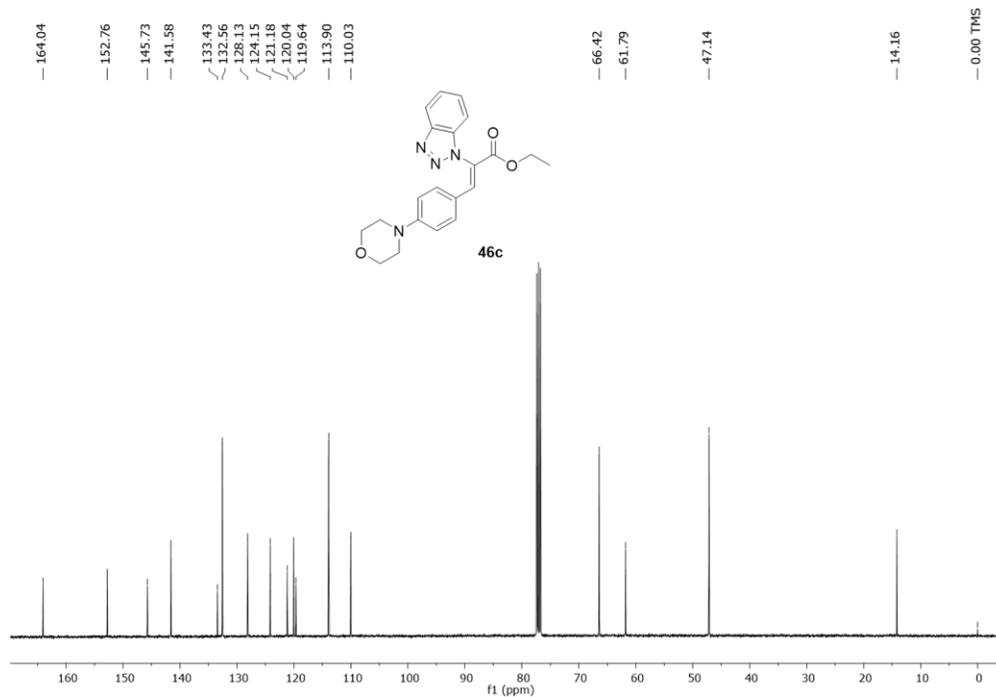


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C de **46c** (101 MHz, CDCl_3).

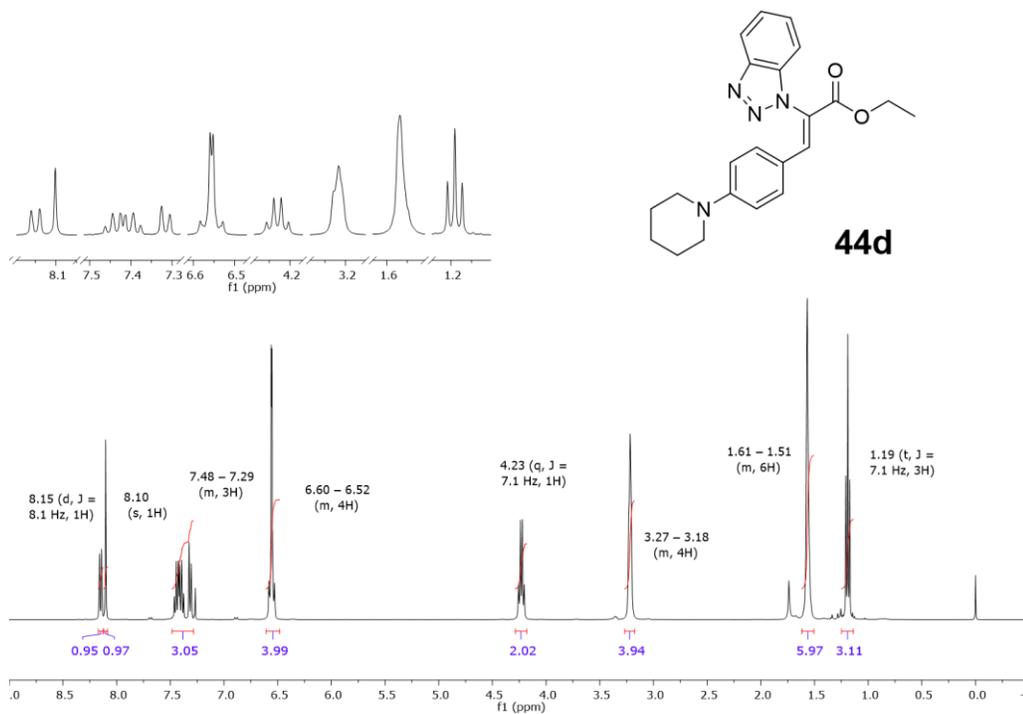


Figura 48. Espectro de RMN de ^1H de **44d** (400 MHz, CDCl_3).

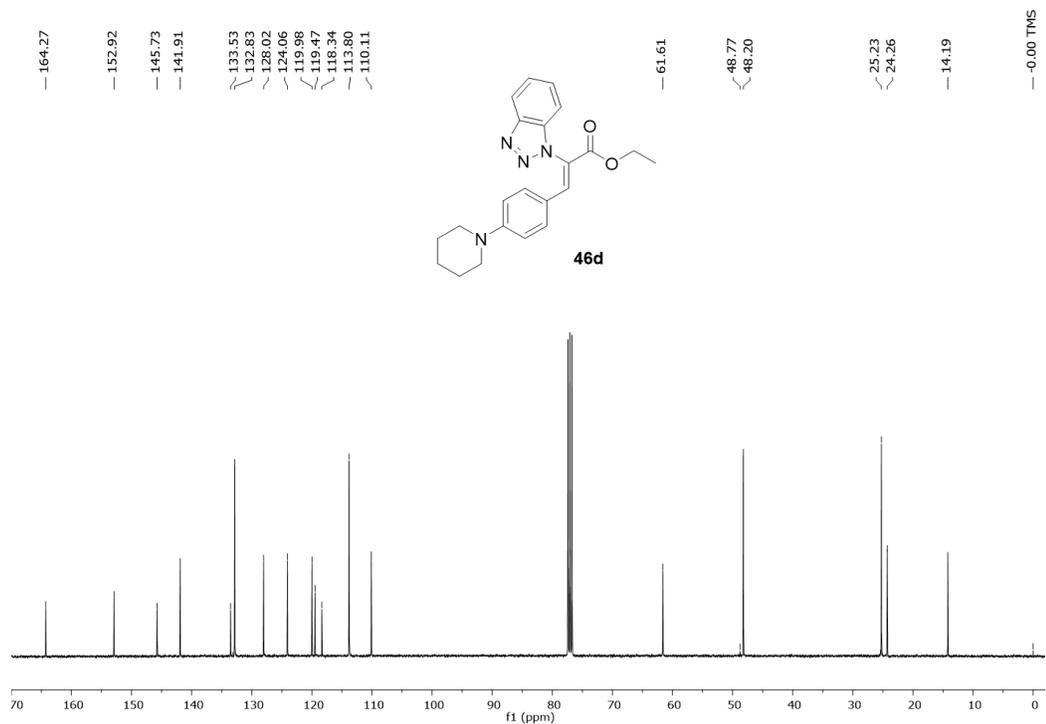


Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C de **46d** (101 MHz, CDCl_3).

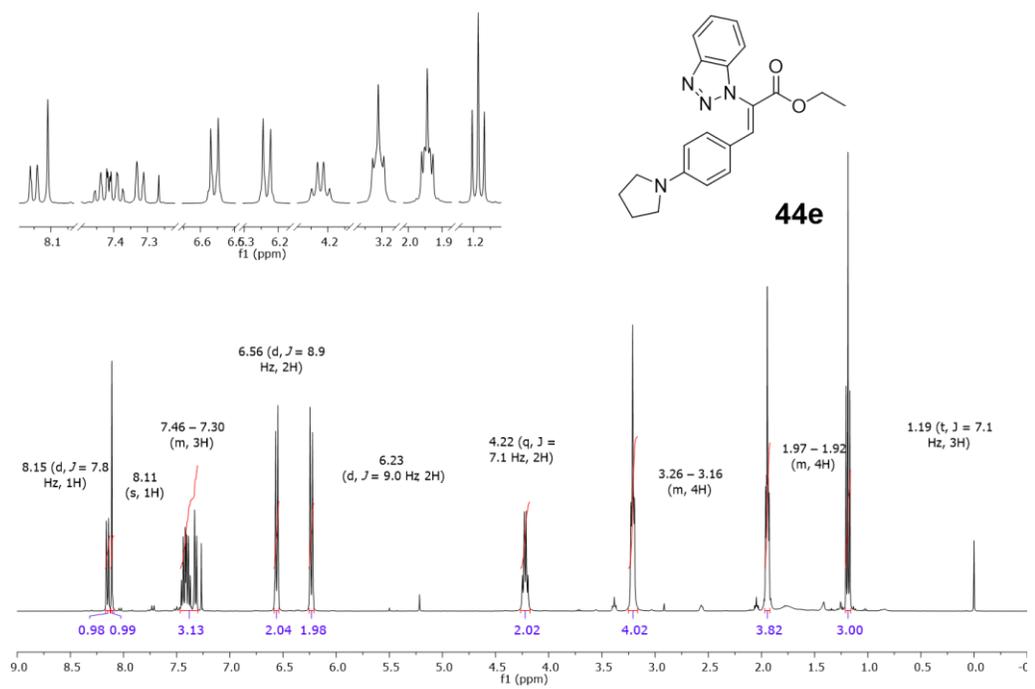


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H de **44e** (400 MHz, CDCl_3).

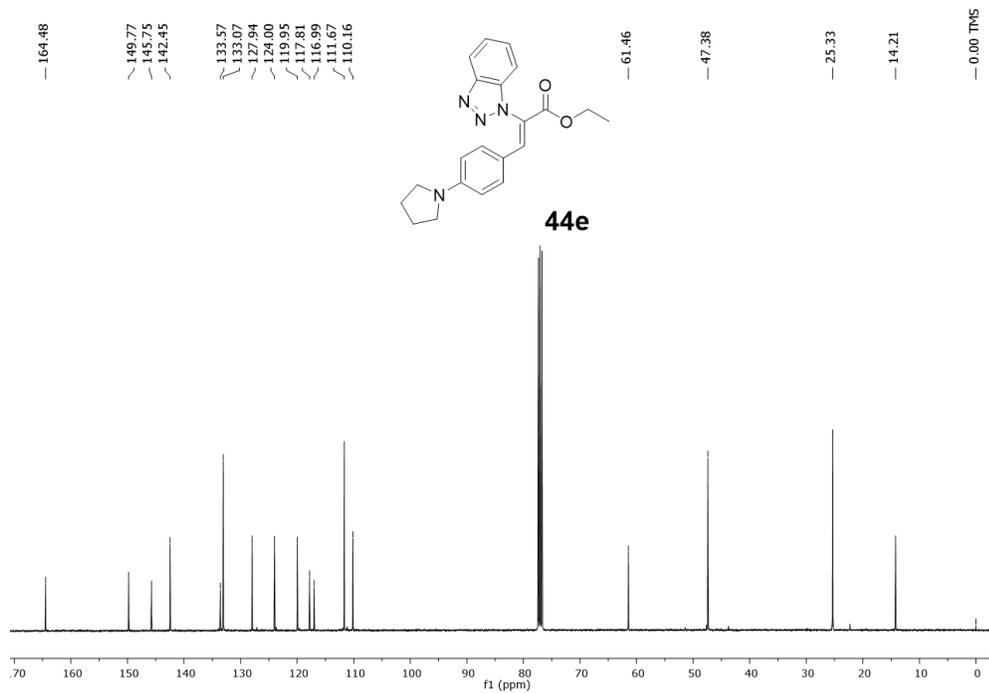


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C de **44e** (101 MHz, CDCl_3).

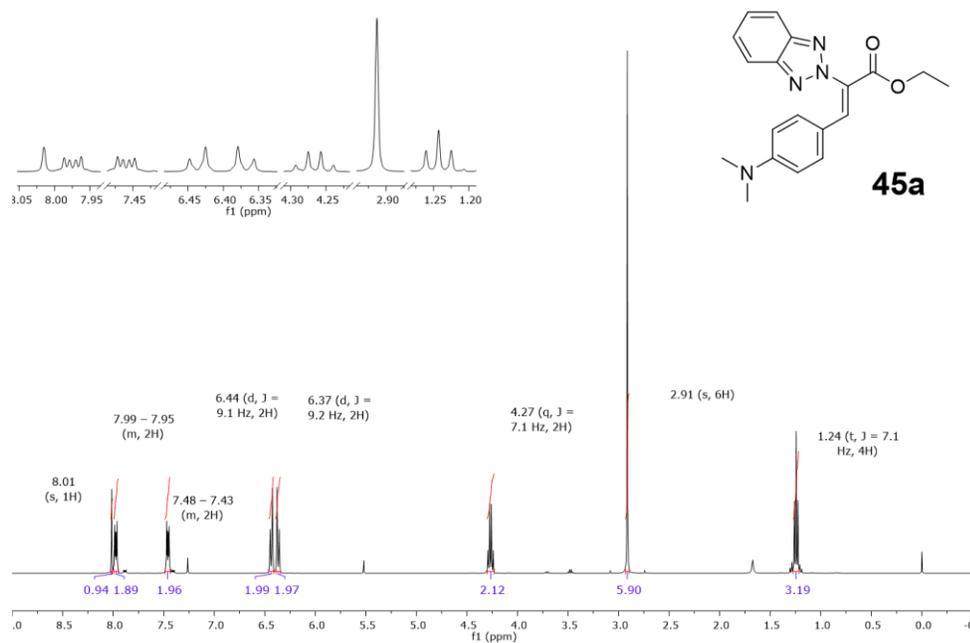


Figura 52. Espectro de RMN de ^1H de **45a** (400 MHz, CDCl_3).

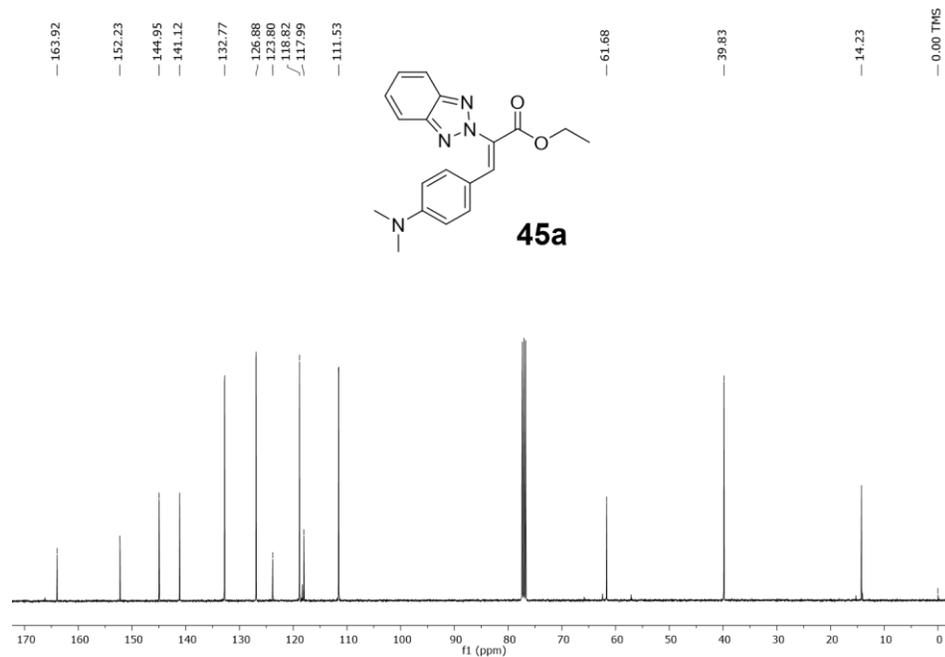


Figura 53. Espectro de RMN de ¹³C de **45a** (101 MHz, CDCl₃).

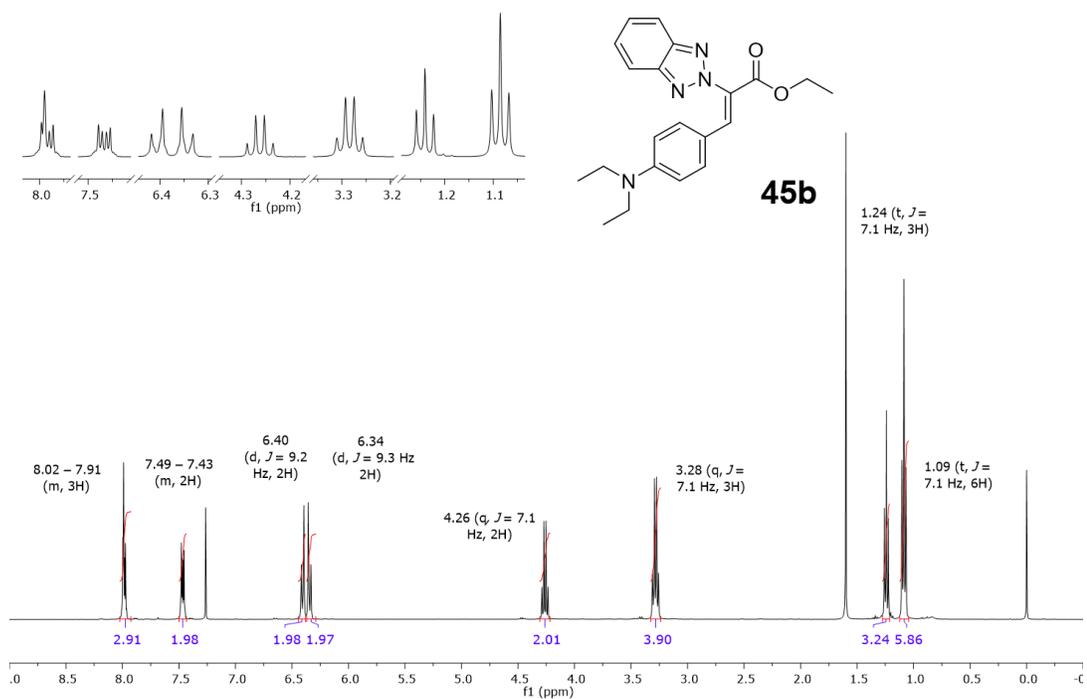


Figura 54. Espectro de RMN de ¹H de **45b** (400 MHz, CDCl₃).

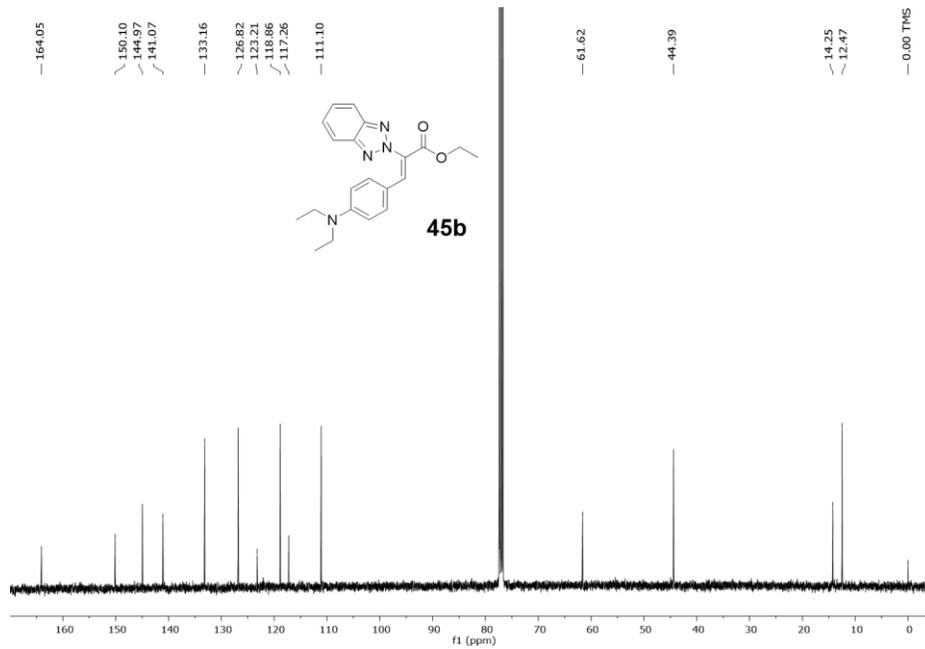


Figura 55. Espectro de RMN de ¹³C de **45b** (101 MHz, CDCl₃).

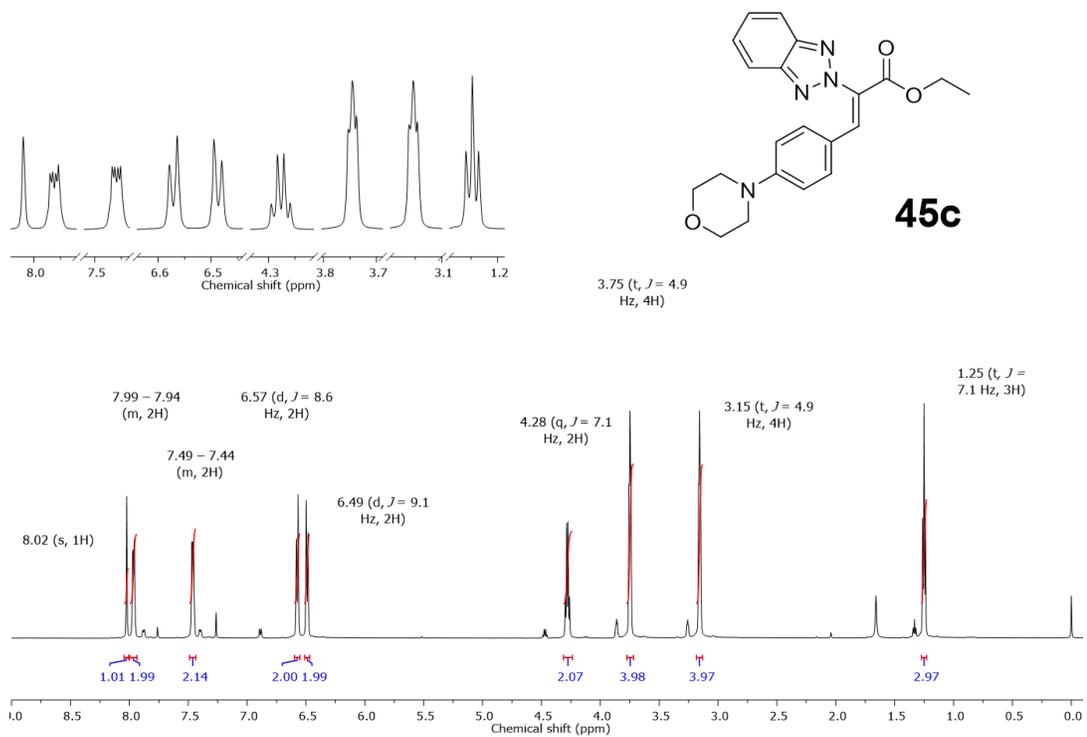


Figura 56. Espectro de RMN de ¹H de **45c** (600 MHz, CDCl₃).

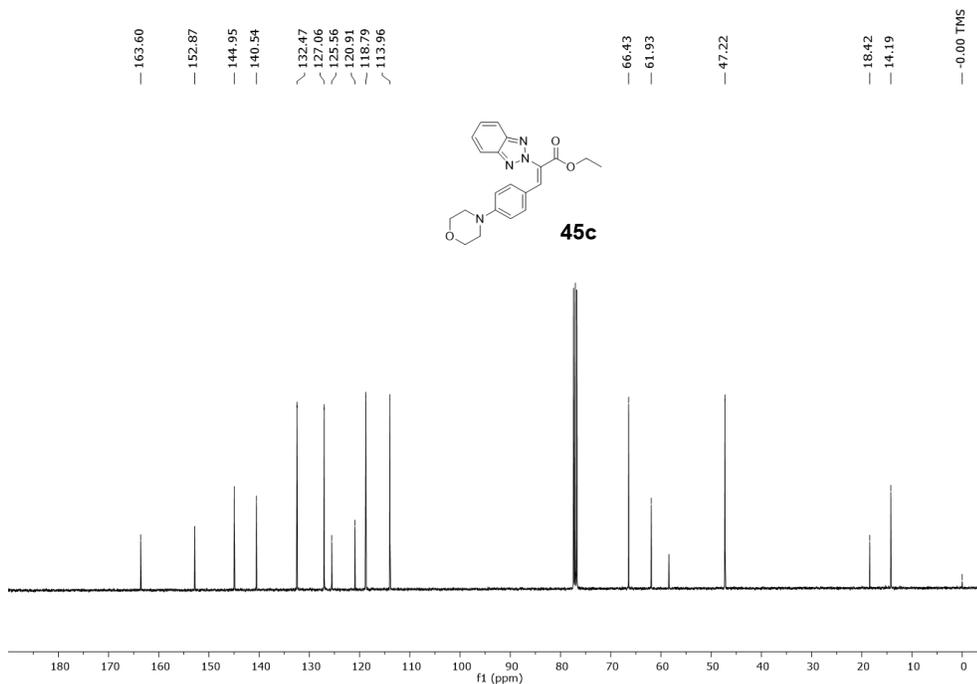


Figura 57. Espectro de RMN de ¹³C de **45c** (101 MHz, CDCl₃).

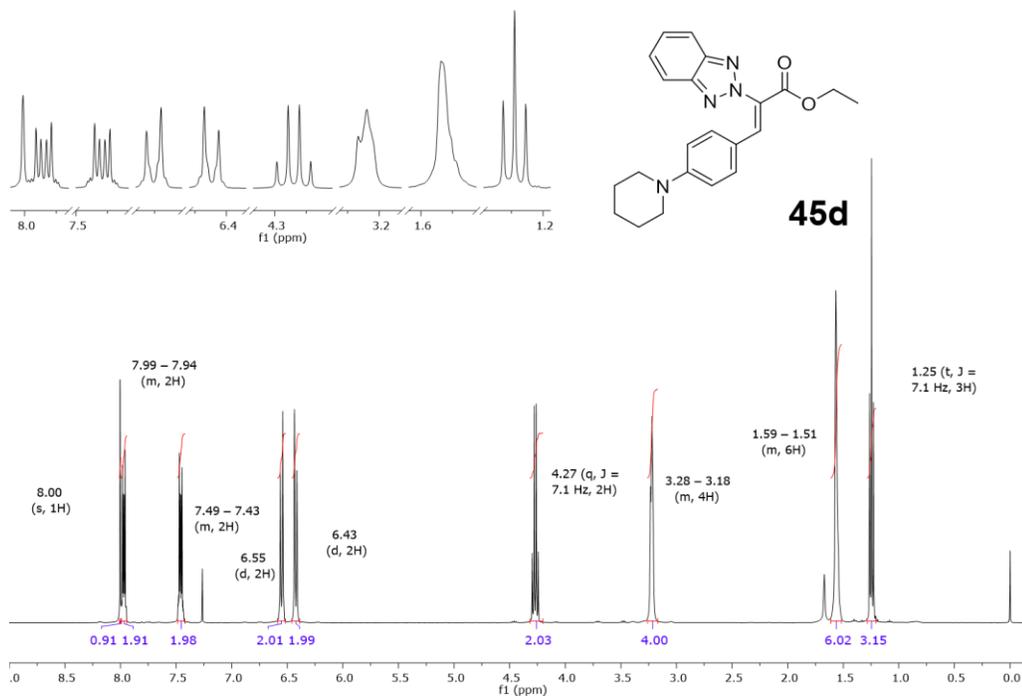


Figura 58. Espectro de RMN de ¹H de **45d** (400 MHz, CDCl₃).

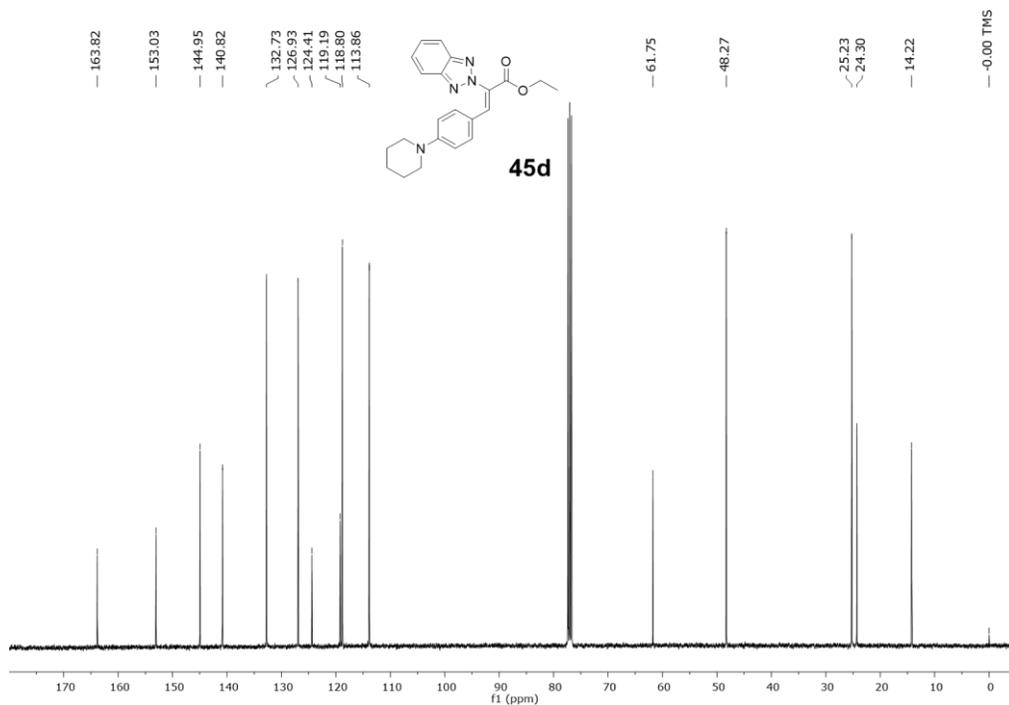


Figura 59. Espectro de RMN de ¹³C de **45d** (101 MHz, CDCl₃).

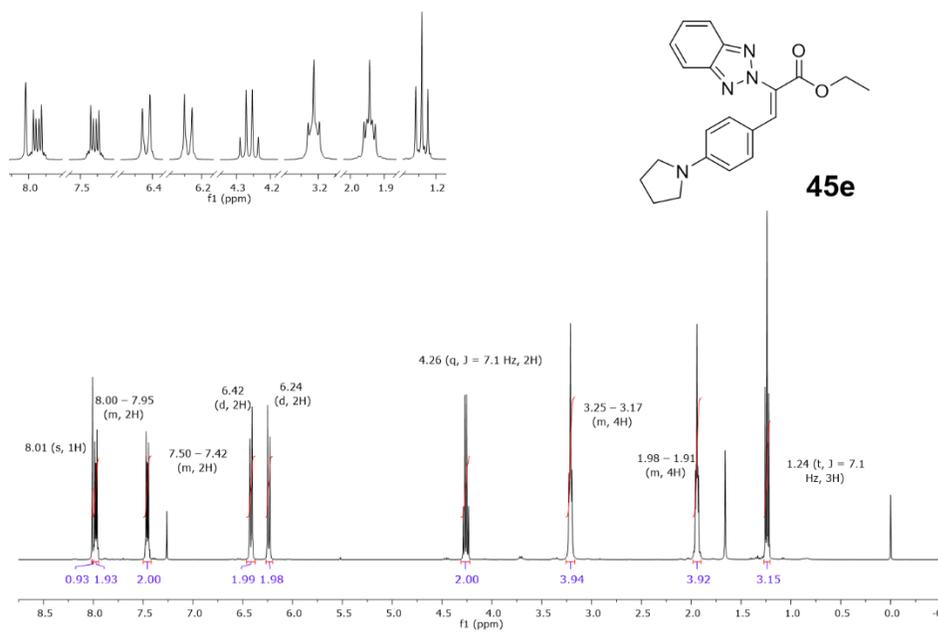


Figura 60. Espectro de RMN de ¹H de **45e** (400 MHz, CDCl₃).

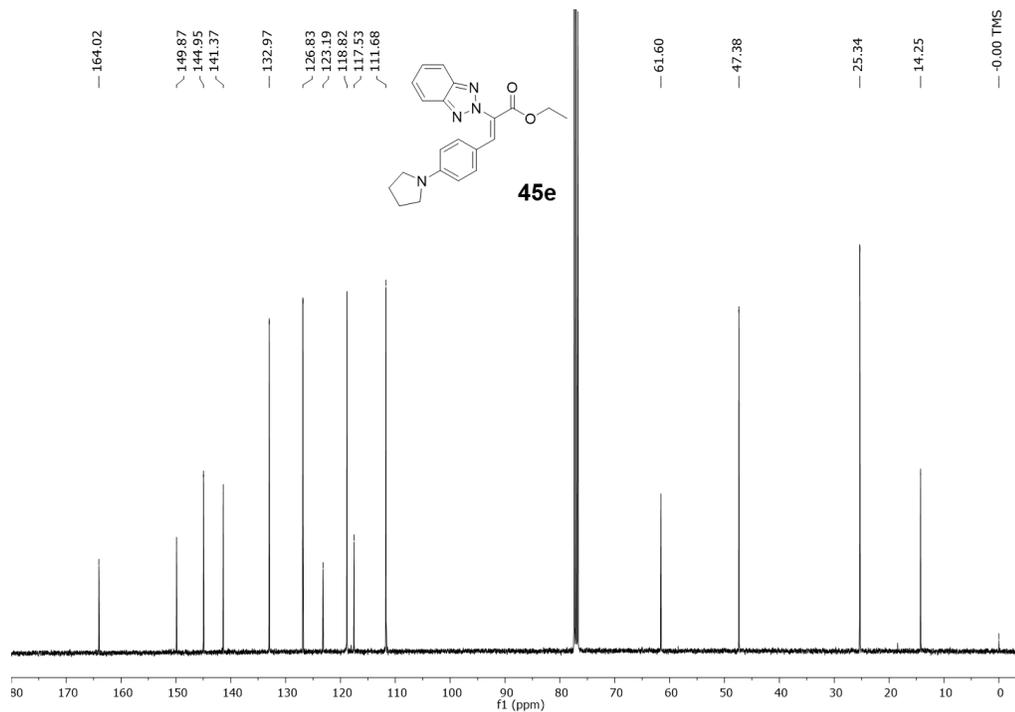


Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C de **45e** (101 MHz, CDCl_3).

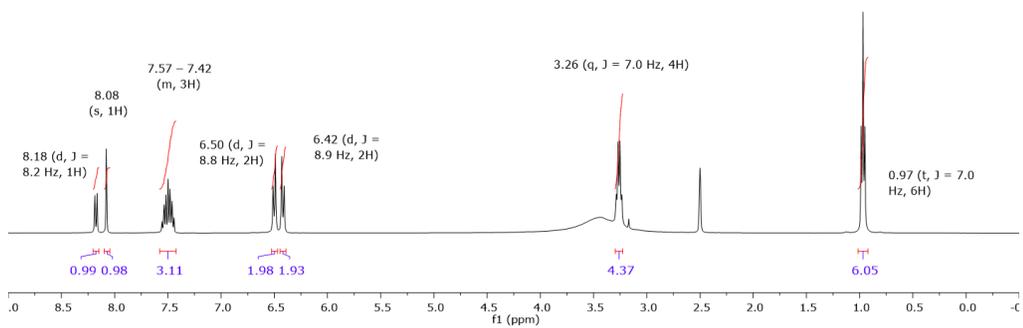
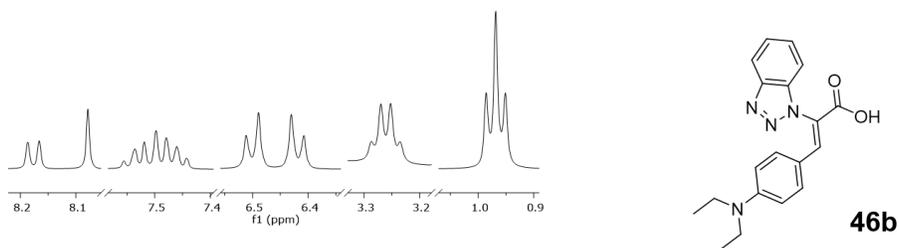


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H de **46b** (400 MHz, DMSO- d_6).

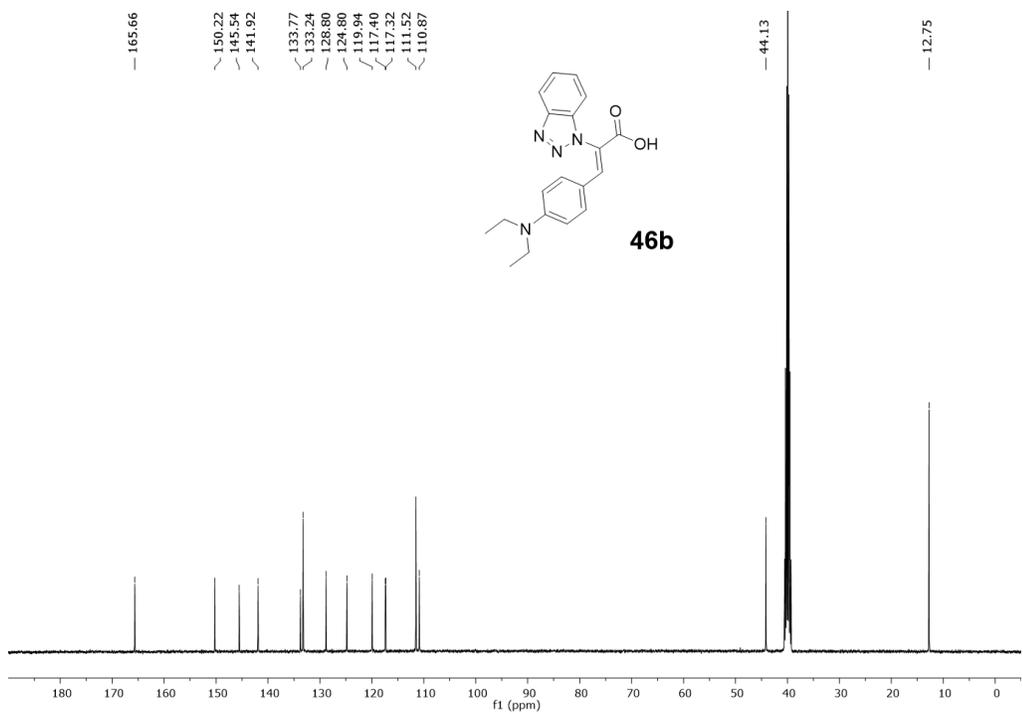


Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C de **46b** (101 MHz, DMSO- d_6).

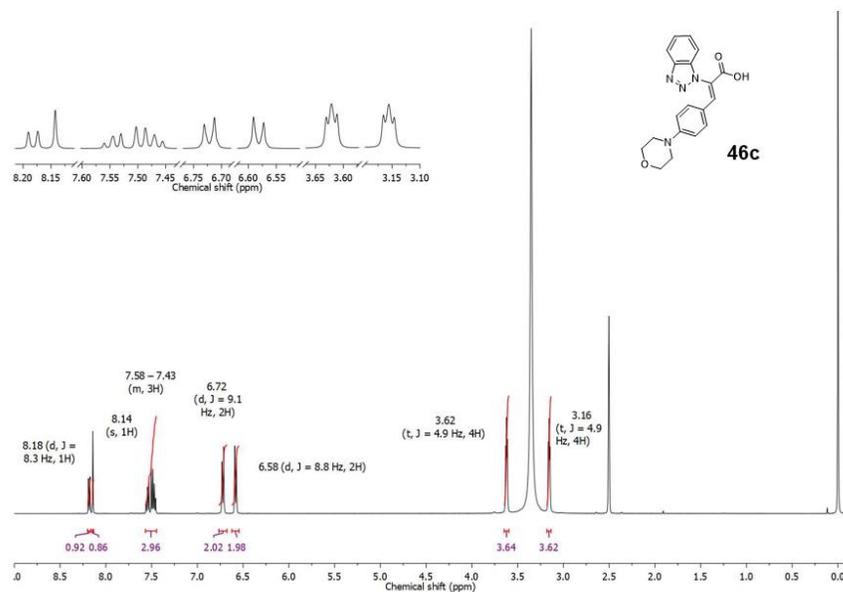


Figura 64. Espectro de RMN de ¹H de **46c** (500 MHz, DMSO-*d*₆).

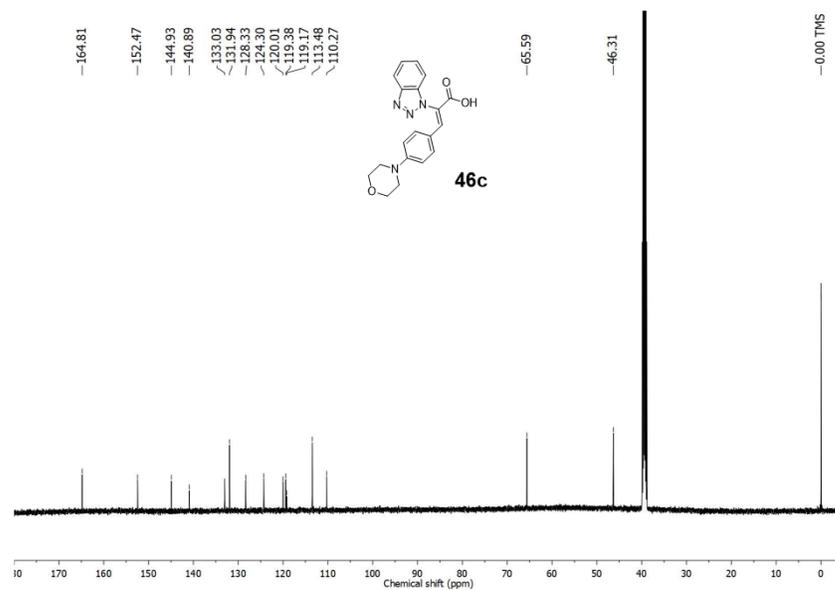


Figura 65. Espectro de RMN de ¹³C de **46c** (126 MHz, DMSO-*d*₆).

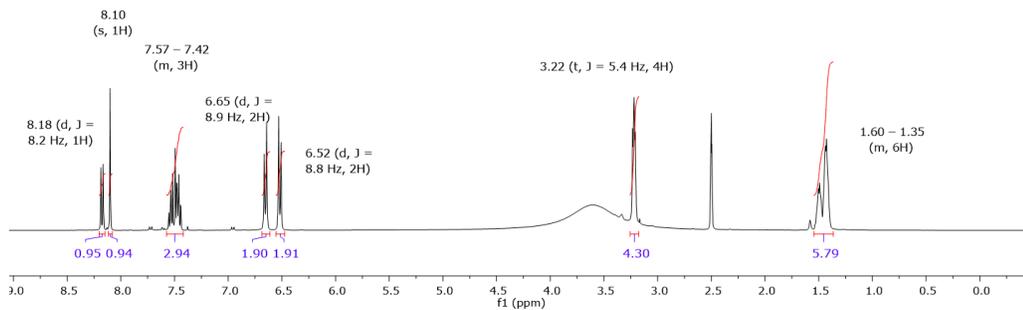
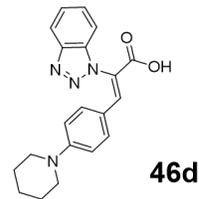
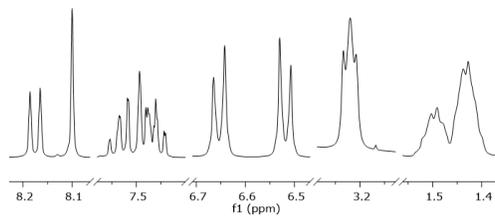


Figura 66. Espectro de RMN de ^1H de **46d** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

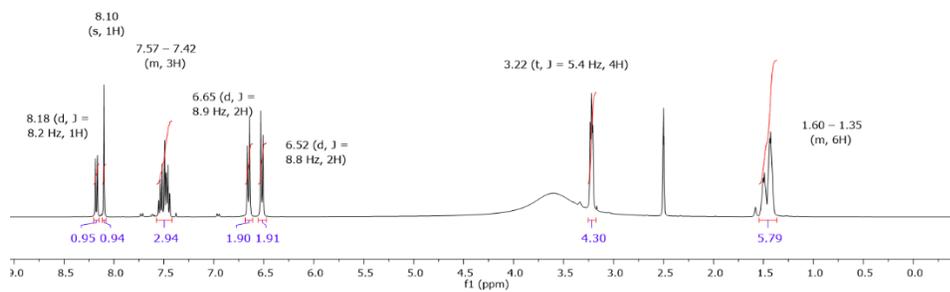
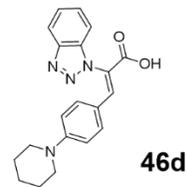
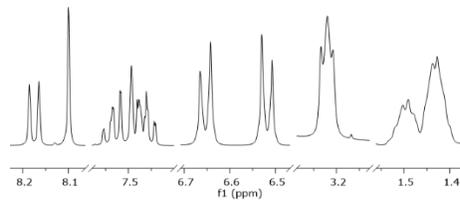


Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C de **46d** (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

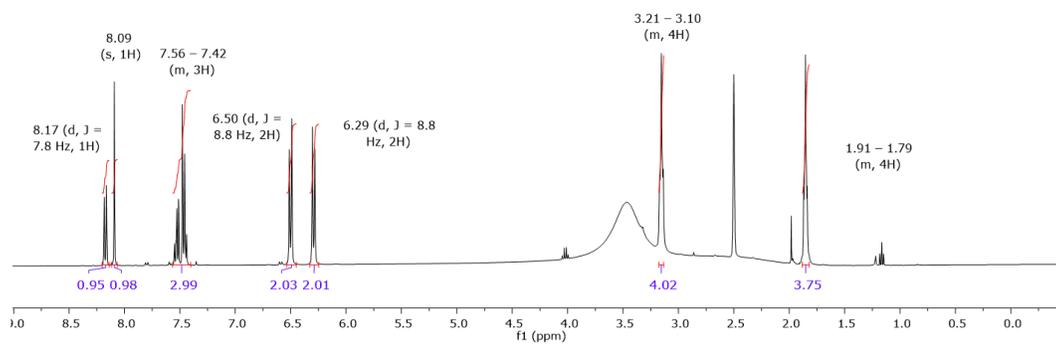
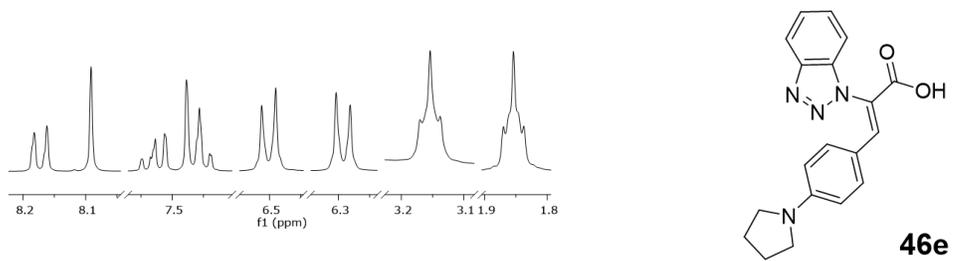


Figura 68. Espectro de RMN de ¹H de **46e** (400 MHz, DMSO-d₆).

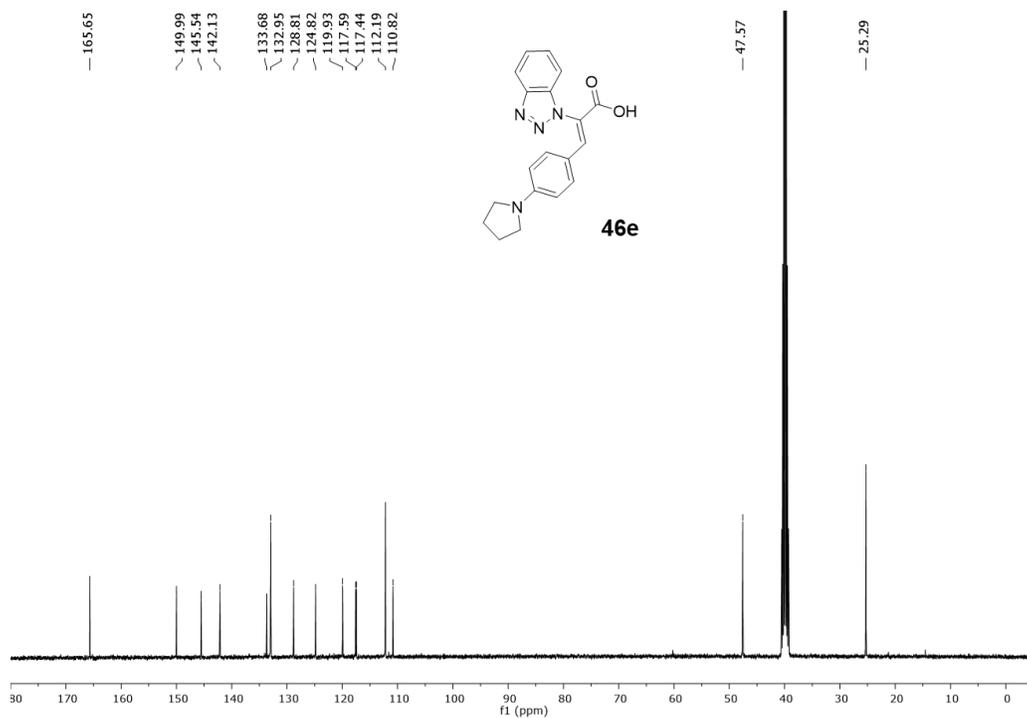


Figura 69. Espectro de RMN de ¹³C de **46e** (101 MHz, DMSO-d₆).

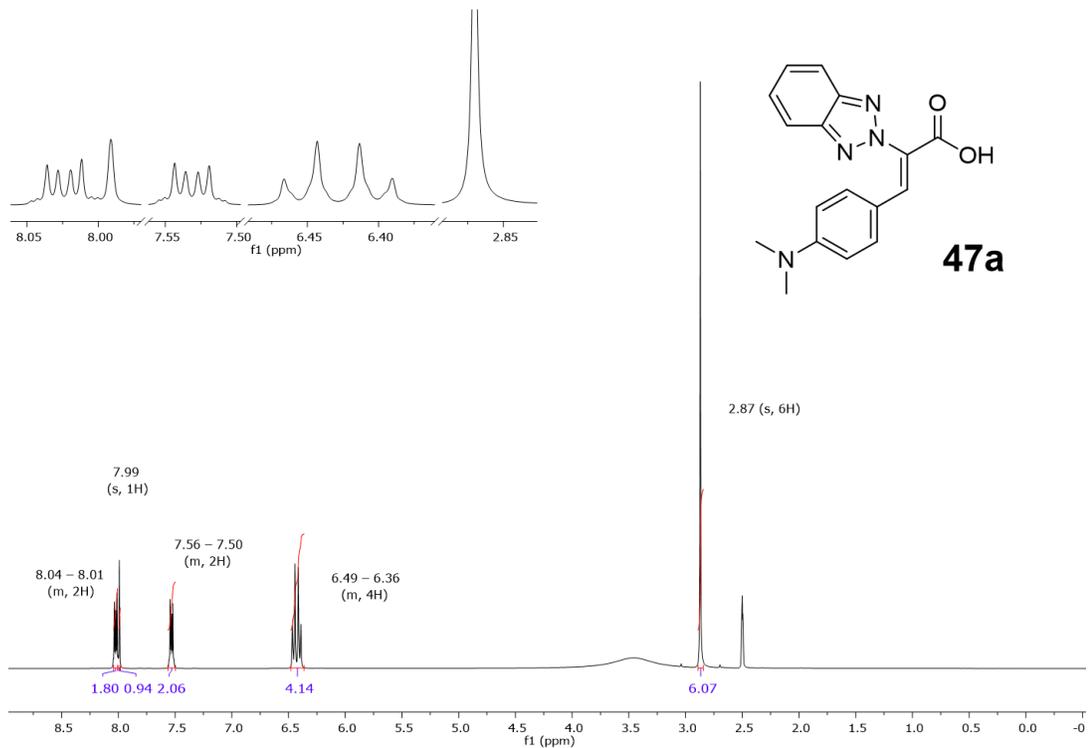


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H de **47a** (400 MHz, DMSO- d_6).

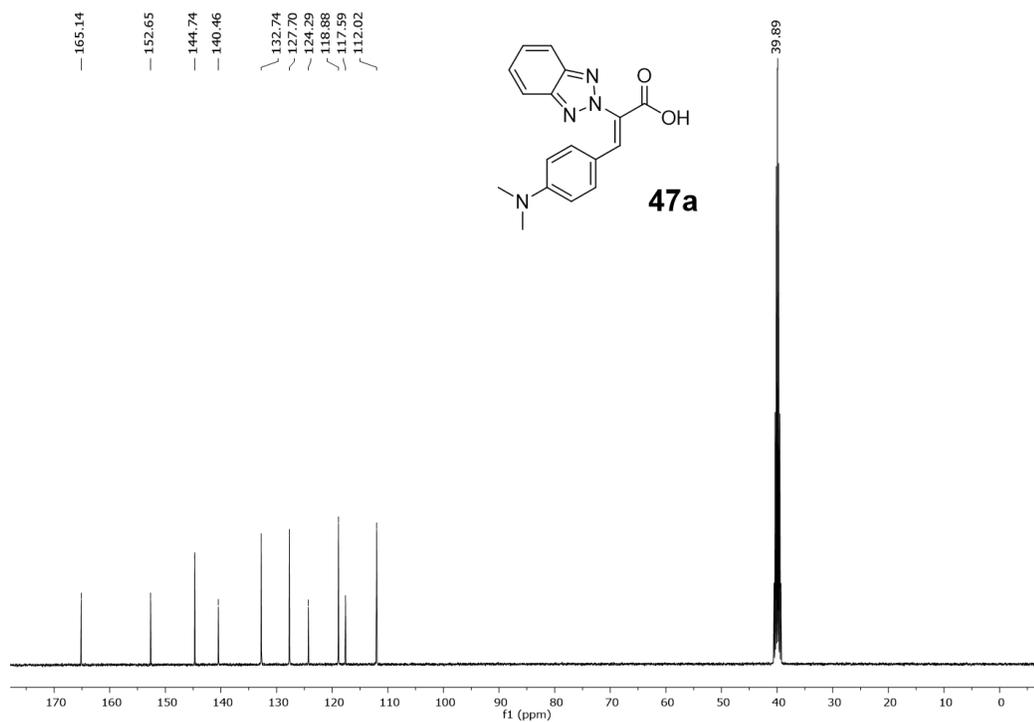


Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C de **47a** (101 MHz, DMSO- d_6).

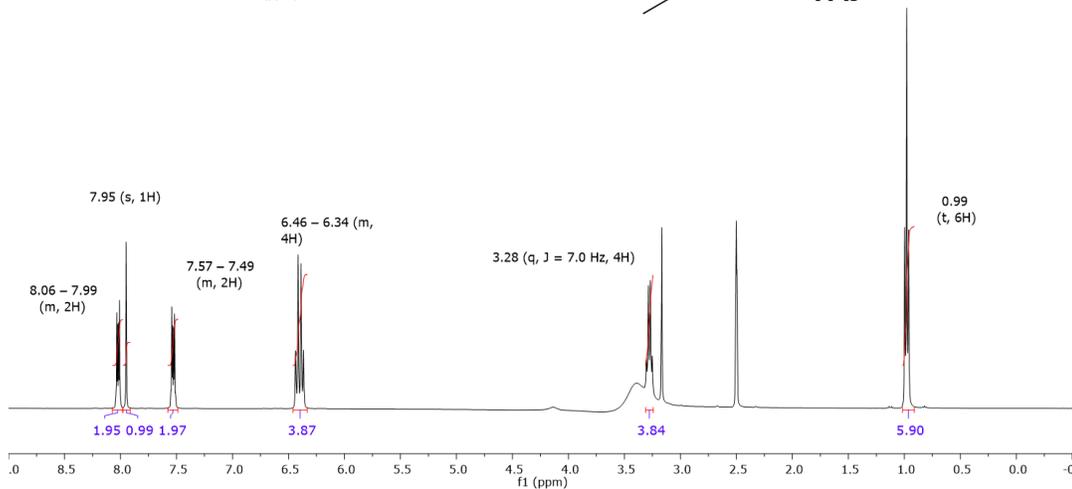
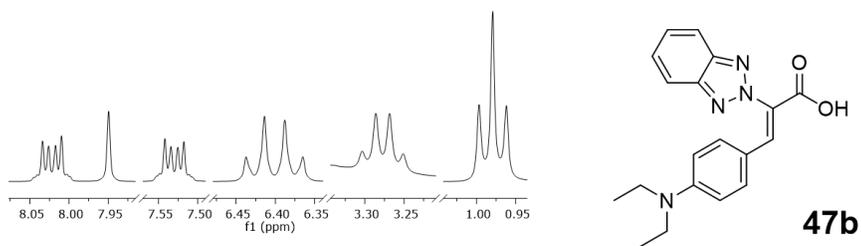


Figura 72. Espectro de RMN de ^1H de **47b** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

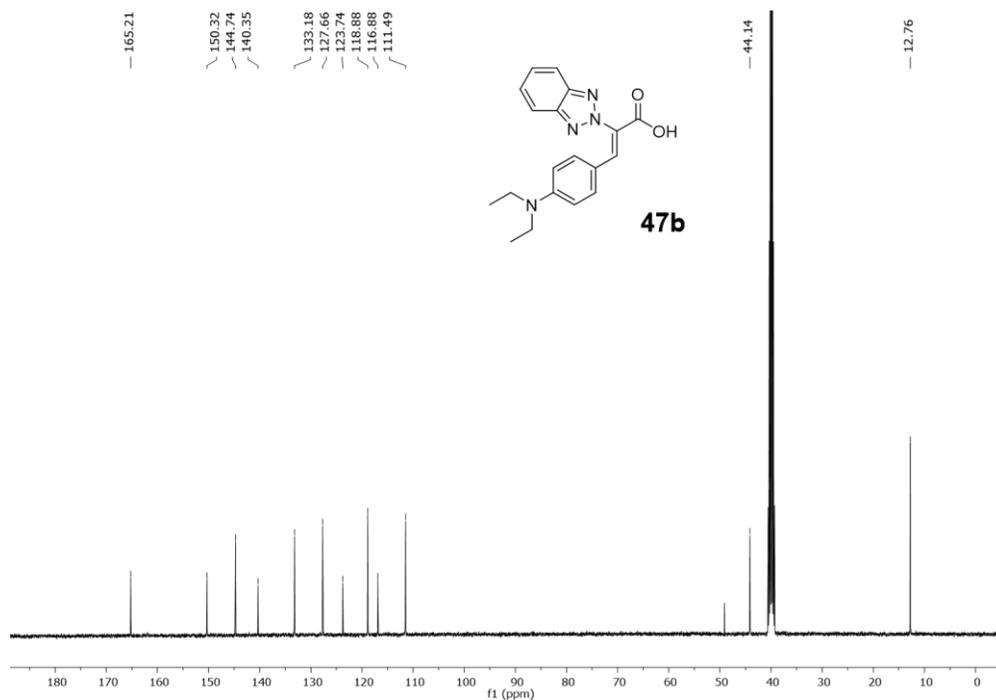


Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C de **47b** (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

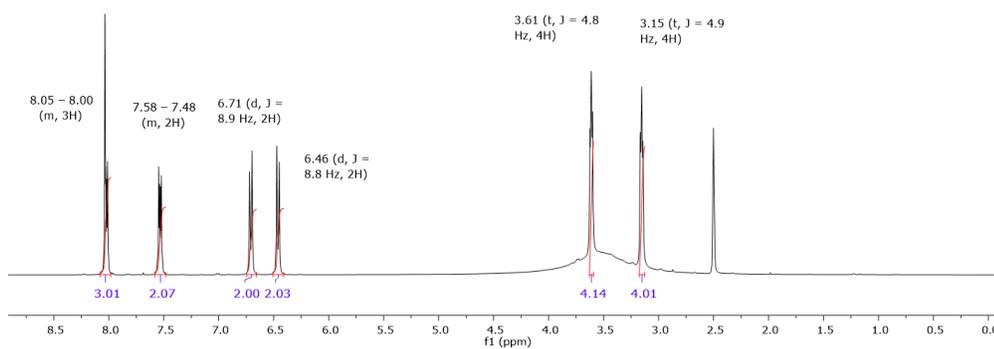
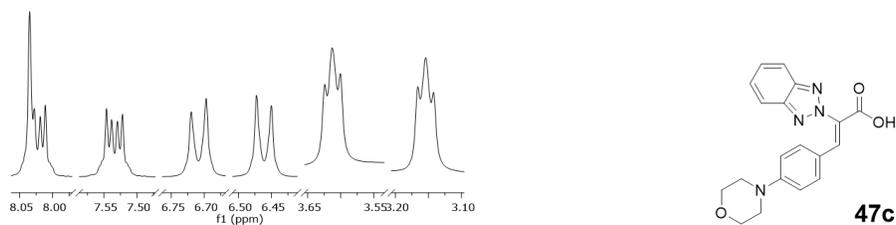


Figura 74. Espectro de RMN de ^1H de **47c** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

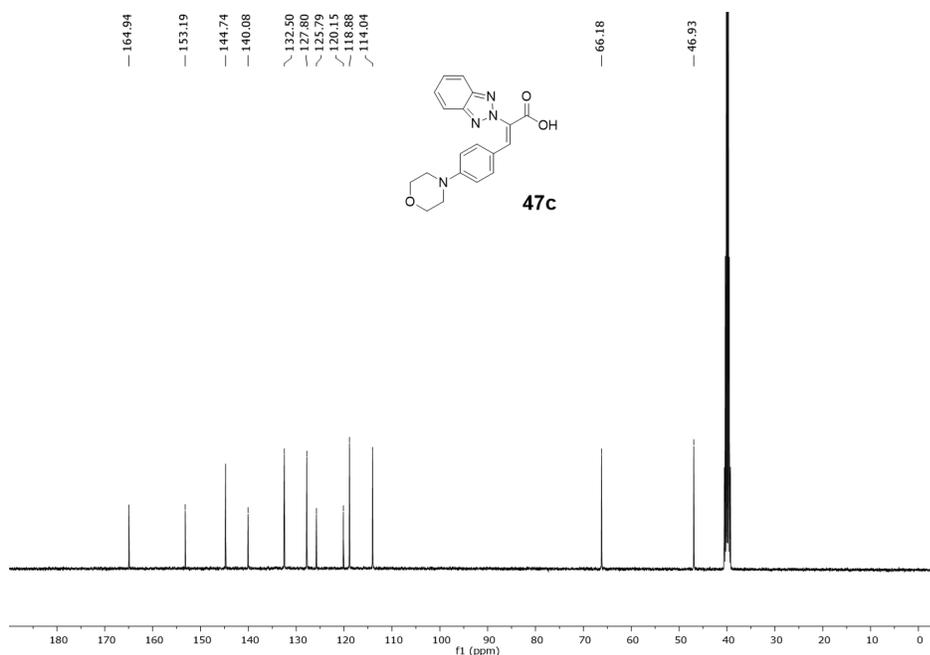


Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C de **47c** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

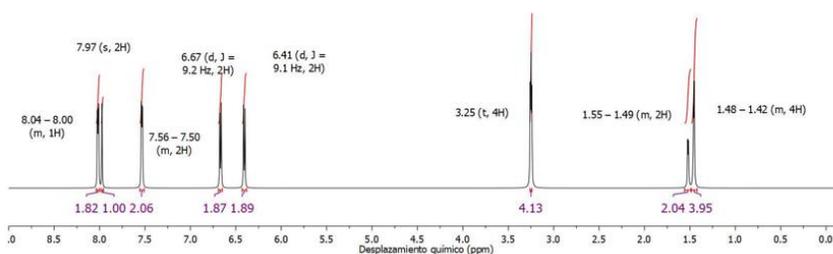
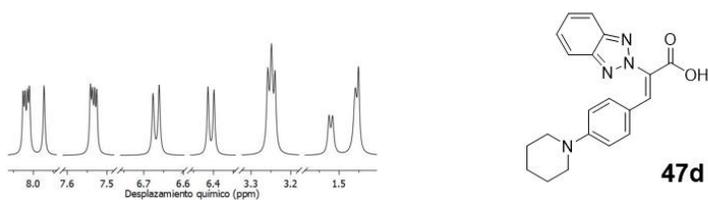


Figura 76. Espectro de RMN de ^1H de **47d** (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

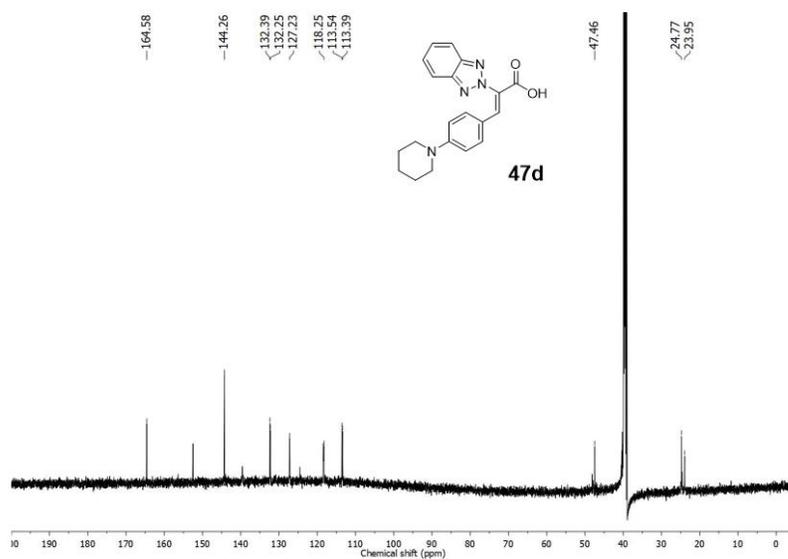


Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C de **47d** (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

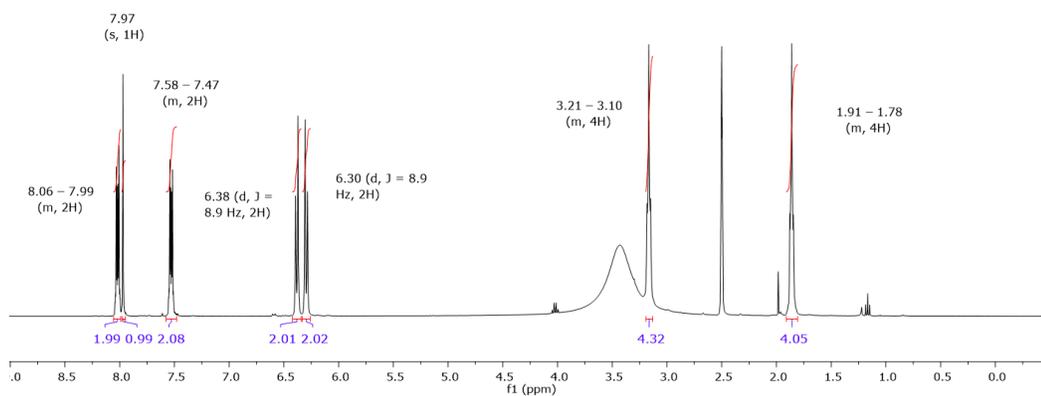
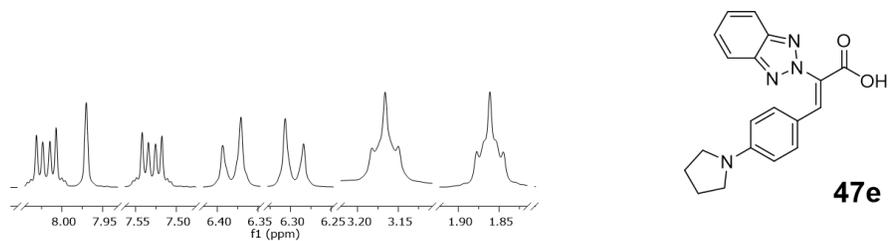


Figura 78. Espectro de RMN de ^1H de **47e** (400 MHz, DMSO- d_6).

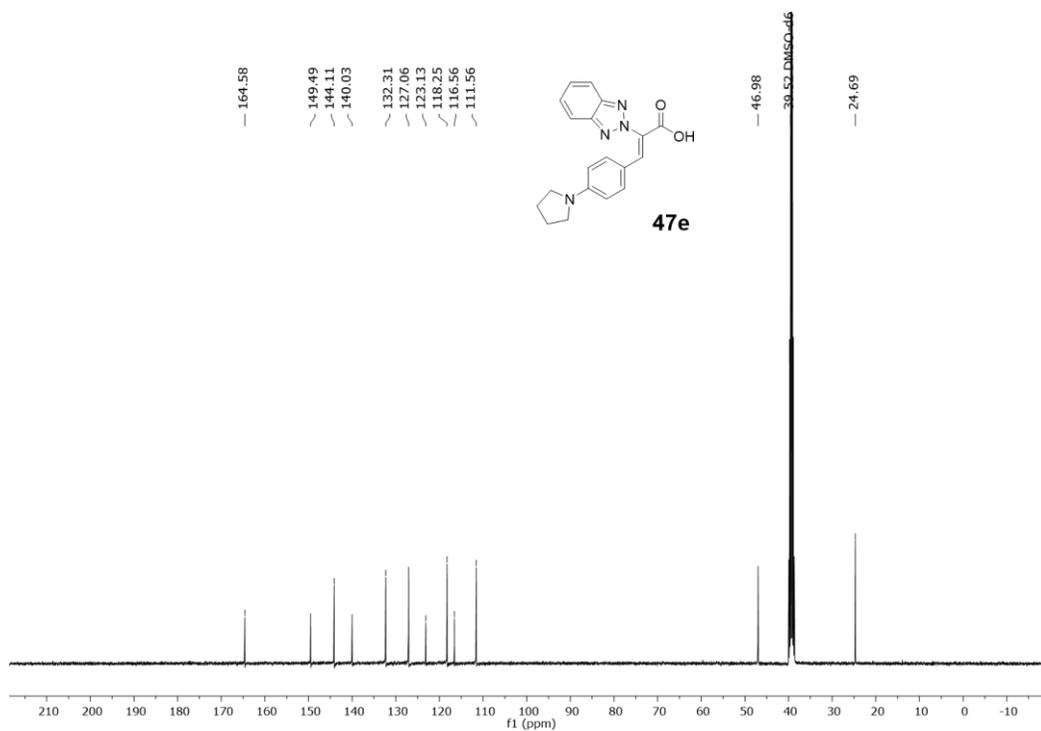


Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C de **47e** (101 MHz, DMSO- d_6).

Resultados de acoplamiento molecular
Compuestos 46-47a-e

Tabla 18 Validación de sitio activo de proteína CK2 (3pe1) con AutoDock 4.2.

Posición						Promedio de la afinidad de enlace	Promedio de RMSD*
Tamaño X	Tamaño Y	Tamaño Z	Centro X	Centro Y	Centro Z		
20	20	20	22.657	-31.002	14.951	3.37 x 10 ⁷	0.916
25	25	25	22.657	-31.002	14.951	12.85	0.290
30	30	30	22.657	-31.002	14.951	-11.68	0.154
40	40	40	22.657	-31.002	14.951	-11.68	0.146
50	50	50	22.657	-31.002	14.951	-11.69	0.134

Tabla 19. Tabla de interacciones del ligando 3NG, compuesto **46d** y TBBT.

Compuesto	Tipo de interacción	Interacción	Distancia de enlace (Å)	
<p style="text-align: center;">3NG</p> <p style="text-align: center;">Energía (kcal/mol) = -11.68</p>	Puente de hidrogeno	VAL116:N - 3NG338:N12 ASP175:N - 3NG338:O25 TRP176:CD1 - 3NG338:O25 3NG338:C13 - GLU114:O	2.86449 2.71394 4.64291 3.59111	
	Hidrofóbicas	VAL66:CG1 - 3NG338 VAL66:CG2 - 3NG338 ILE174:CD1 - 3NG338 PHE113 - 3NG338 HIS115 - 3NG338 HIS160 - 3NG338 3NG338:CL22 - VAL53 3NG338 - VAL53 3NG338 - VAL66 3NG338 - ILE95 3NG338 - MET163 3NG338 - ILE174 3NG338 - VAL116 3NG338 - MET163 3NG338 - LEU45 3NG338 - VAL53	3.79207 3.32865 3.87637 4.70454 5.41433 4.90076 3.86298 5.11643 4.86688 5.17783 5.05794 4.98945 5.29539 4.91742 4.63429 4.77366	
	Electrostáticas	3NG338:O24 - PHE113	4.73922	
	Pi-Sulfuro	MET163:SD:B - 3NG338	3.48742	
	<p style="text-align: center;">TBBT</p>	Puente de hidrogeno	UNL1:H - GLU114:O HIS115:CD2 - UNL1:N	2.16375 4.02159
		Hidrofóbicas	VAL66:CG1 - UNL1 VAL66:CG2 - UNL1 VAL66:CG2 - UNL1 HIS115 - UNL1 UNL1:BR - ILE95 UNL1:BR - ILE174 UNL1:BR - VAL53 UNL1:BR - ILE174 UNL1:BR - LEU45 UNL1:BR - VAL53 UNL1:BR - MET163 UNL1:BR - LEU45 UNL1:BR - MET163 PHE113 - UNL1:BR	3.92297 3.41825 3.92226 5.57747 4.07595 4.18757 4.29686 4.41974 4.86125 4.52987 5.39322 4.58416 5.02925 3.84297

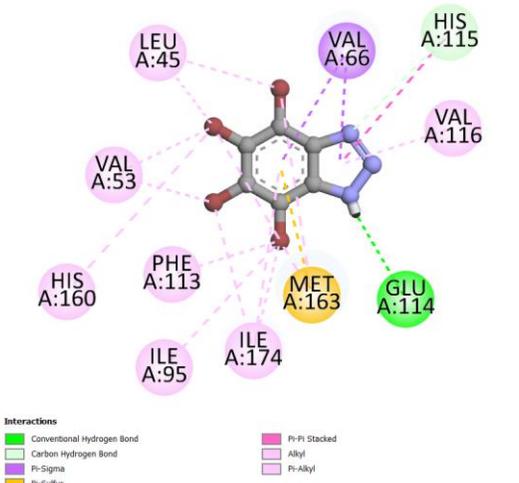
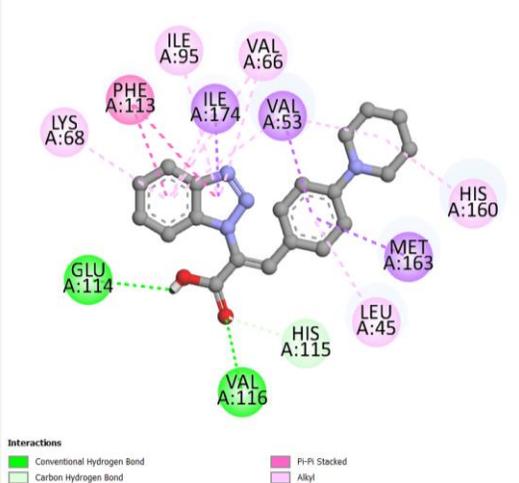
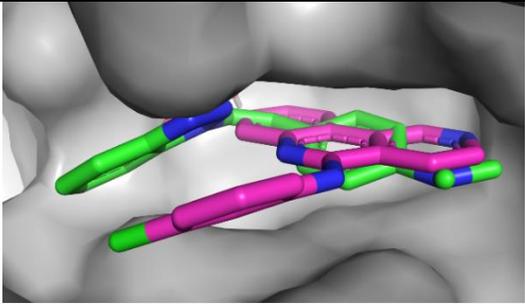
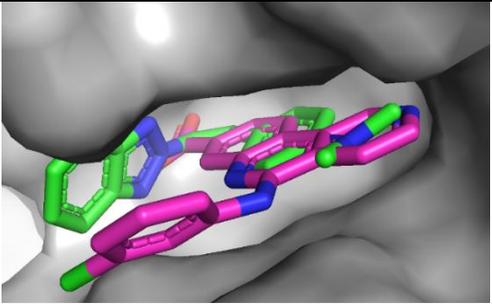
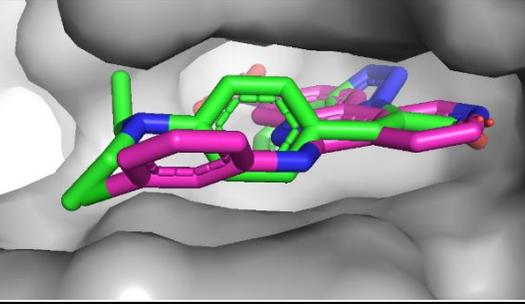
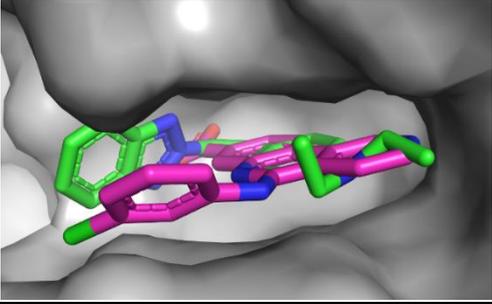
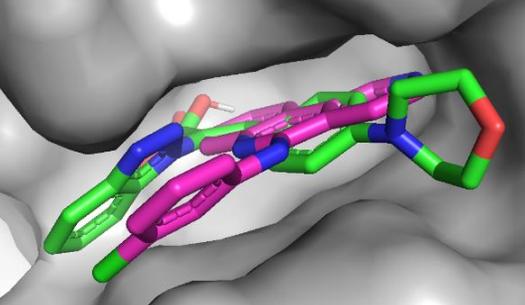
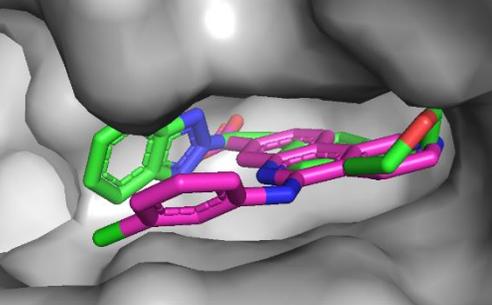
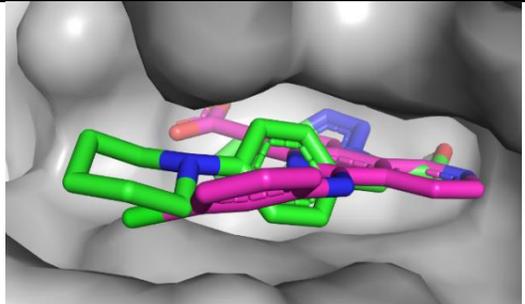
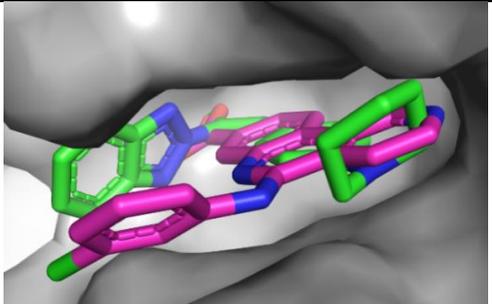
 <p style="text-align: center;">Energía (kcal/mol) = -8.77</p>		HIS160 - UNL1:BR UNL1 - VAL116 UNL1 - MET163 UNL1 - ILE174	5.28464 4.75502 4.80237 5.00639
	Electrostáticas	-	-
	Pi-sulfuro	MET163:SD:B - UNL1	3.31931
<p style="text-align: center;">46d</p>  <p style="text-align: center;">Energía (kcal/mol) = -10.09</p>	Puente de hidrogeno	VAL116:HN - UNL1:O UNL1:H - GLU114:O UNL1:H - UNL1:N HIS115:CD2 - UNL1:O	2.01572 2.08699 2.16769 3.57589
	Hidrofóbicas	VAL53:CG1 - UNL1 MET163:CE - UNL1 ILE174:CG2 - UNL1 PHE113 - UNL1 UNL1 - PHE113 VAL53 - UNL1 HIS160 - UNL1 UNL1 - VAL66 UNL1 - ILE95 UNL1 - VAL53 UNL1 - VAL66 UNL1 - LYS68 UNL1 - ILE174 UNL1 - LEU45	3.86476 3.88518 3.63338 4.08918 4.56789 4.85621 4.6995 4.70027 4.33625 4.9917 4.987 4.91318 4.70243 5.21914
	Electrostáticas	-	-
	Pi-Sulfuro	-	-

Tabla 20. Estructuras en 3D en el bolsillo hidrofóbico de la proteína CK2.

Compuesto 46a	Energía (kcal/mol) = -8.96	Compuesto 47a	Energía (kcal/mol) = -9.24
			
Compuesto 46b	Energía (kcal/mol) = -9.02	Compuesto 47b	Energía (kcal/mol) = -9.50
			
Compuesto 46c	Energía (kcal/mol) = -9.41	Compuesto 47c	Energía (kcal/mol) = -9.99
			
Compuesto 46d	Energía (kcal/mol) = -10.09	Compuesto 47d	Energía (kcal/mol) = -9.51
			

Compuesto **46e** Energía (kcal/mol) = -9.66

Compuesto **47e** Energía (kcal/mol) = -10.41

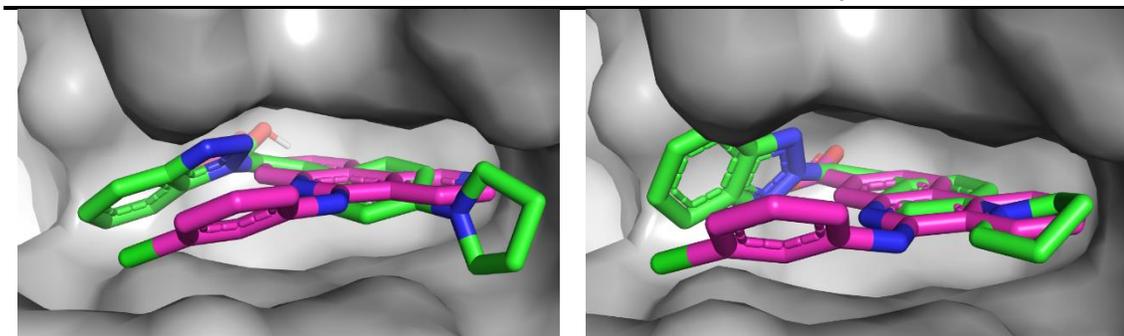
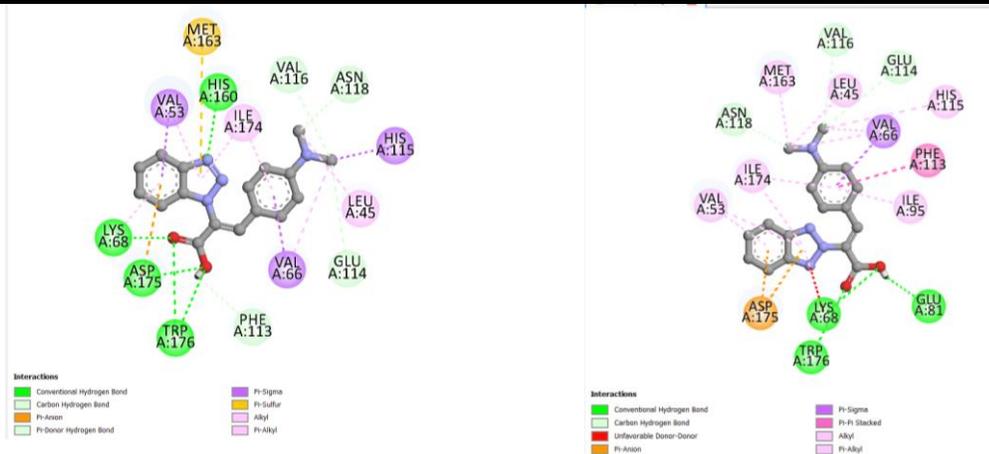


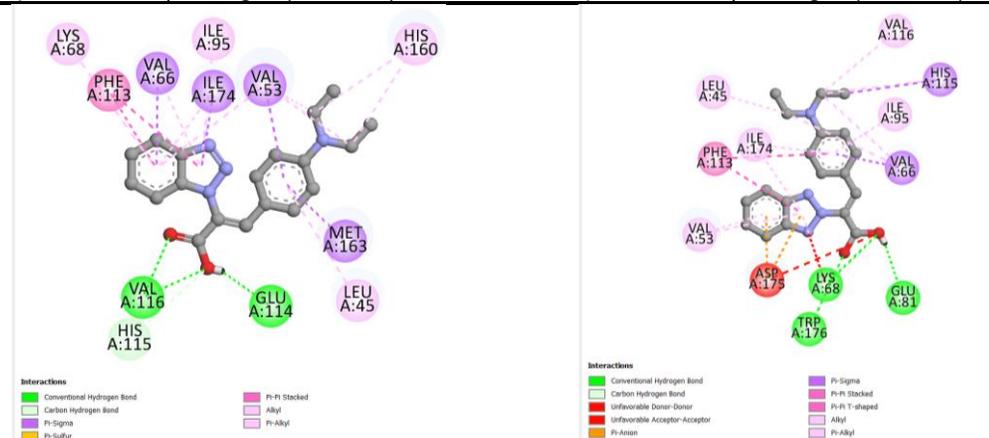
Tabla 21. Interacciones de compuestos **46-47a-e**.

Compuesto **46a** Energía (kcal/mol) = 8.96 Compuesto **47a** Energía (kcal/mol) = -9.24



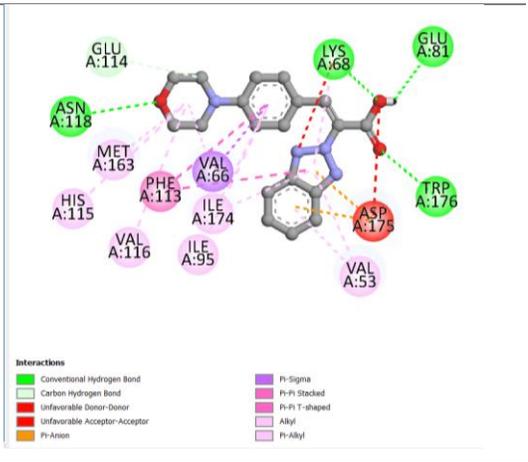
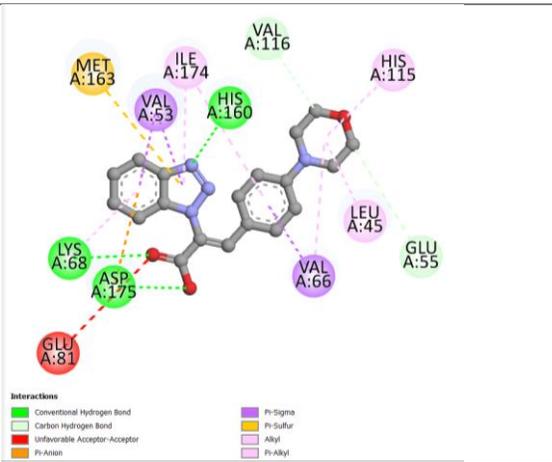
Compuesto **46b** Energía (kcal/mol) = -9.02

Compuesto **47b** Energía (kcal/mol) = -9.50

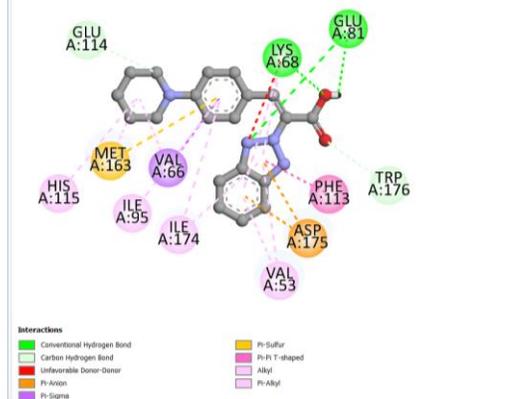
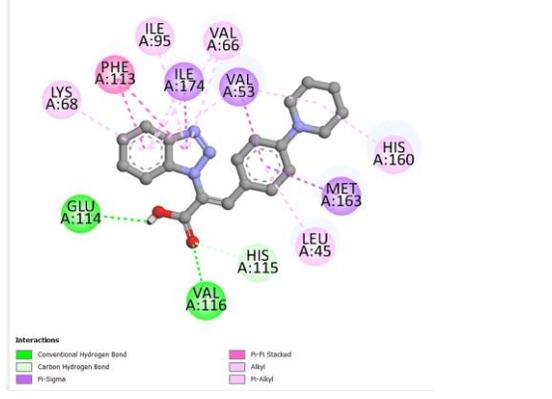


Compuesto **46c** Energía (kcal/mol) = -9.41

Compuesto **47c** Energía (kcal/mol) = -9.99



Compuesto **46d** | Energía (kcal/mol) = -10.09 Compuesto **47d** | Energía (kcal/mol) = -9.51



Compuesto **46e** | Energía (kcal/mol) = -9.66 Compuesto **47e** | Energía (kcal/mol) = -10.41

