

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPLEJOS LANTÁNIDOS CON LIGANDOS
N,O-QUELATO DERIVADOS DE BENCIMIDAZOLES**

Alberto Aragón Muriel



**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI, 2022**

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPLEJOS LANTÁNIDOS CON LIGANDOS
N,O-QUELATO DERIVADOS DE BENCIMIDAZOLES**

Alberto Aragón Muriel, M.Sc.

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Doctor en
Ciencias-Química

Director

Dorian Polo Cerón, Ph.D.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI, 2022**

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICA

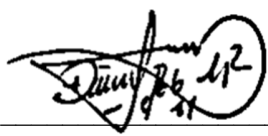
Alberto Aragón Muriel, M.Sc.

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPLEJOS LANTÁNIDOS CON LIGANDOS
N,O-QUELATO DERIVADOS DE BENCIMIDAZOLES**

Palabras Clave: Complejos lantánidos, bencimidazoles, bases de Schiff, actividad antibacteriana, actividad antiparasitaria, actividad antiproliferativa, interacción con modelos de membrana, interacción con ADN, docking molecular, dinámica molecular.

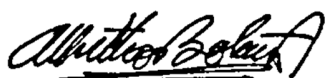
Nota de aceptación

El trabajo de grado titulado “ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPLEJOS LANTÁNIDOS CON LIGANDOS N,O-QUELATO DERIVADOS DE BENCIMIDAZOLES” cumple con los requisitos exigidos por el programa académico de química para que el estudiante Alberto Aragón Muriel opte al título de Doctor en Ciencias Química.



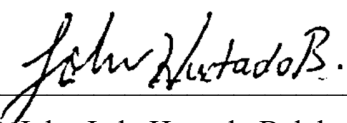
Dr. Dorian Polo Cerón

Director del trabajo



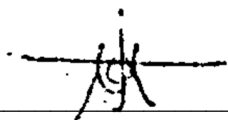
Dr. Alberto Bolaños Rivera

Jurado local



Dr. John Jady Hurtado Belalcazar

Jurado nacional



Dr. Juan Manuel Germán Acacio

Jurado internacional

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A Ivone Vanessa, padres y hermanos

A mi director, el Dr. Dorian Polo Cerón

A mi tutor internacional, el Dr. David Morales Morales

A los jurados designados para la evaluación de este trabajo: Dr. Alberto Bolaños Rivera, Dr. John Jady Hurtado Belalcazar y Dr. Juan Manuel Germán Acacio.

A los Dres. Jose Oñate y Yamil Liscano

A las Dras. Sara Robledo y Yulieth Upegui

A Luis Eduardo Hurtado, Carlos Rodríguez y Alberto Nieto

A los compañeros del grupo de investigación LICAP, en especial al Laboratorio de Bioinorgánica del Departamento de Química de la Universidad del Valle

A los profesores del Departamento de Química de la Universidad del Valle

A los compañeros del posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad del Valle

A los investigadores del Laboratorio IN-3 de la UNAM en México

A los profesionales del Laboratorio de Salud Pública Departamental del Valle

A los colegas del Servicio Nacional de Aprendizaje - SENA

Tabla de contenido

	Pág.
Abreviaturas, acrónimos y símbolos.....	VIII
Lista de Tablas.....	XI
Lista de Figuras	XIII
Lista de Esquemas	XVIII
Resumen	1
Justificación.....	2
Objetivos.....	5
CAPÍTULO I.....	6
1. Introducción.....	6
1.1 Importancia biológica de bencimidazoles	6
1.2 Bencimidazoles como ligandos.....	8
1.3 Complejos lantánidos con bencimidazoles.....	9
2. Síntesis y caracterización	10
2.1 Análisis de espectroscopía infrarrojo.....	12
2.2 Análisis de espectroscopía RMN y EPR.....	13
3. Actividad biológica	17
3.1 Actividad antiproliferativa	17
3.2 Actividad antiparasitaria	19
3.3 Actividad antibacteriana.....	21
3.4 Morfología bacteriana por espectroscopía de fluorescencia	26
4. Conclusiones.....	30
5. Referencias	31
CAPÍTULO II.....	38
1. Introducción.....	38
1.1 Importancia biológica de bases de Schiff.....	38
1.2 Bases de Schiff como ligandos	39
1.3 Complejos lantánidos con bases de Schiff.....	41
2. Síntesis y caracterización	42
2.1 Análisis de espectroscopía infrarrojo.....	43
2.2 Análisis de espectroscopía RMN	44

3.	Actividad biológica	46
3.1	Actividad antiproliferativa	46
3.2	Actividad antiparasitaria	48
3.3	Actividad antibacteriana.....	50
4.	Conclusiones.....	52
5.	Referencias	54
CAPÍTULO III		59
1.	Introducción.....	59
1.1	Mecanismos de acción en fármacos.....	59
1.2	Estudios de interacción con biomoléculas.....	60
1.3	Docking y dinámica molecular	62
2.	Interacción con membranas.....	65
2.1	Membranas sintéticas que imitan membranas celulares.....	66
2.2	Estudio por dinámica molecular con membranas simuladas	77
3.	Interacción con receptores de proteínas específicas.....	90
3.1	Bases de Schiff y sus complejos con receptores parasitarios.....	90
3.2	Ligando HL4 con receptor bacteriano de <i>S. aureus</i>	95
4.	Interacción con ADN	96
4.1	Ensayos de espectrofotometría por UV-Vis	97
4.2	Estudios de acoplamiento molecular (docking)	101
5.	Conclusiones.....	104
6.	Referencias	106
ANEXO 1		113
ANEXO 2		136
ANEXO 3		180
ANEXO 4		184
ANEXO 5		188

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADN-TT:	ADN de timo de ternera
AE:	Análisis Elemental
Ar:	Aromático
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR:	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
CE ₅₀ :	Concentración Efectiva media
CL ₅₀ :	Concentración Letal al 50%
CMH:	Caldo Mueller Hinton
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria
Cp:	ciprofloxacina
DART:	<i>Direct Analysis in Real Time</i>
DAPI:	2-(4-amidinofenil)-1 <i>H</i> -indol-6-carboxamida
DM:	Dinámica Molecular
DMPC:	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfolina
DMPG:	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilglicerol
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DSC:	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EPR:	<i>Electron Paramagnetic Resonance</i>
HEPES:	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
IE:	Impacto Electrónico

IR:	Infrarrojo
MALDI:	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MPE:	Malla de partículas de Ewald
MS:	<i>Mass Spectrometry</i>
MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PBS:	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PMA:	forbol-12-miristato-13-acetato
POPC:	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
POPE:	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidiletanolamina
POPG:	1-palmitoil-2-oleil-sn-glicerol-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
RMSD:	<i>root-mean-square deviation</i>
RPMI:	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB:	Suero Fetal Bovino
SM:	esfingomielina o N-(15Z-tetracosenoil)-esfingo-4-enina-1-fosfocolina)
TGA:	<i>Thermogravimetric Analysis</i>
TOF:	<i>Time-Of-Flight</i>
UFF:	<i>Universal Force Field</i>
UV-Vis:	Ultravioleta Visible
VMD:	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
VML:	Vesículas Multilaminares
ZFS:	<i>Zero field splitting</i>

Símbolos:

δ :	Desplazamiento químico
B_0 :	Campo magnético
g_e :	factor g del electron libre
β :	Magnetón de Bohr
ε :	Coeficiente de extinción molar
Λ :	Conductividad molar
λ :	Longitud de onda
Ln :	Lantánido(s)
ΔH	Entalpía de transición
$\Delta T_m/2$	Amplitud de la mitad de la altura del pico
T_m :	Temperatura de transición de fase
d:	doblete
dd:	doble doblete
dt:	doble triplete
m:	multiplete
s:	singlete
t:	triplete

Lista de Tablas

Tabla 1. Bandas IR de los ligandos HL1, HL2 y sus complejos lantánidos (valores en cm^{-1}).

Tabla 2. Inhibición de crecimiento (%) de líneas celulares tumorales humanas a 25 μM .

Tabla 3. Actividades antiparasitarias y citotóxicas *in vitro* de ligandos aminofenilbencimidazol y sus complejos de La(III), Ce(III) y Sm(III).

Tabla 4. Valores de Absorción (A) obtenidos para los complejos lantánidos a diferentes concentraciones ($\lambda = 330$ o 340 nm) y constantes de estabilidad en medio CMH al inicio del experimento y después de 24 horas.

Tabla 5. Bandas presentes en los espectros de IR de Bz1, Bz2, ligandos de bases de Schiff y sus complejos de lantánidos (valores en cm^{-1}).

Tabla 6. Datos de los espectros RMN- ^1H de las bases de Schiff y sus complejos lantánidos.

Tabla 7. Actividades antiparasitarias y citotóxicas *in vitro* de bases de Schiff y sus complejos de La(III) y Ce(III).

Tabla 8. Cambio en los valores de T_m y ΔH de las VMLs constituidas por DMPC y DMPC/DMPG (3:1) a diferentes concentraciones de péptido Alyteserin-1c.

Tabla 9. Valores de T_m y ΔH de las VMLs constituidas por DMPC/DMPG (3:1) antes y después de la adición de HL2 y La-L2 a diferentes relaciones molares compuesto/lípido.

Tabla 10. Valores de T_m , $\Delta T_m/2$ y ΔH en las VMLs constituidas por DMPC y DMPC/DMPG (3:1) a diferentes concentraciones de la base de Schiff HL4.

Tabla 11. Valores de T_m y ΔH de vesículas multilaminares formadas por DMPC y DMPC/DMPG (3:1) antes y después de la adición de bases de Schiff y sus complejos de La(III) en una relación molar compuesto/lípido de 1:50.

Tabla 12. Valores de constante de unión intrínseca (K_b) para todos los compuestos evaluados.

Tabla 13. Energía de unión y tipo de interacción entre los compuestos evaluados y el ADN.

Lista de Figuras

Figura 1. Complejos lantánidos con ligandos aminofenilbencimidazol (A y B) y bases de Schiff (C y D).

Figura 2. Compuestos derivados del anillo bencimidazol con actividad biológica.

Figura 3. Reacción de ligandos bencimidazolil-fenol con nitratos hidratados de lantánidos.

Figura 4. Espectro RMN- ^1H : (a) superposición de HL1 (rojo) y La-L1 (azul); (b) expansión del espectro RMN- ^1H comparativo en la región aromática.

Figura 5. Diagrama de niveles de energía para Ce^{3+} y desdoblamiento de orbitales a $B_0 = 0$ y a $B_0 > 0$ (efecto Zeeman) en ausencia y presencia de interacciones con espines nucleares.

Figura 6. Espectros EPR a temperatura ambiente de (A) *Ce-L1* (valor $g = 2.003476$); (B) *Ce-L2* (valor $g_{\perp} = 2.013232$); (C) *Sm-L1* (valor $g = 2.003578$); (D) *Sm-L2* (valor $g = 2.006532$).

Figura 7. Concentraciones mínimas inhibitorias encontradas para la serie de compuestos en ensayos antibacterianos ($\mu\text{g/mL}$): (a) cepas Gram-negativas; (b) cepas Gram-positivas.

Figura 8. Espectros de absorción del complejo Sm-1 a diferentes concentraciones (1.0 a 5.0 μM) en medio CMH y el gráfico recíproco doble de $1/(A-A_0)$ vs. $1/[\text{Sm-1}]$ (a) en el inicio del experimento (b) después de 24 h de interacción.

Figura 9. Estudios de fluorescencia: (a) serie de compuestos disueltos en etanol, en ausencia de luz (arriba), en presencia de luz normal (media) y bajo luz ultravioleta con $\lambda = 365 \text{ nm}$ (abajo); (b) Espectros UV-Visibles para el ligando HL2 y sus complejos de La(III), Ce(III) y Sm(III); (c) espectros de emisión (a $\lambda_{\text{Ex}} = 343 \text{ nm}$) del ligando HL1 y sus complejos; (d) espectros de emisión (a $\lambda_{\text{Ex}} = 343 \text{ nm}$) del ligando HL2 y sus complejos.

Figura 10. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia sobre *E. coli*: contraste con dos filtros de microscopio (azul y verde) para *E. coli* utilizando una solución de compuesto

La-L1 a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ (arriba) y el efecto sobre la morfología bacteriana al incrementar la concentración de HL1 (abajo).

Figura 11. Base de Schiff como ligando y su complejo metálico de Pd(II) con posible actividad antimicrobiana.

Figura 12. Complejo de ion Gd(III) con ligando de texaferina.

Figura 13. Inhibición del crecimiento (%) de diferentes líneas celulares de cáncer humano a 25 μM para (A) serie L3, (B) serie L4, (C) serie L5 y (D) serie L6; control = cisplatino. (Las barras faltantes significan que no se observó actividad).

Figura 14. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) determinadas para las series de compuestos en los ensayos antibacterianos ($\mu\text{g/mL}$).

Figura 15. Interacción de ADN con complejos metálicos que contienen ligandos de 2 arilbencimidazoles derivados de bases Schiff.

Figura 16. Microdensitogramas de patrones de difracción de rayos X de (A) dimetilfosfatidilcolina (DMPC) y (B) dimetilfosfatidiletanolamina (DMPE) en agua y su incubación con el complejo Cobre; LA: reflexiones de ángulo bajo, WA: reflexiones de ángulo mayor.

Figura 17. Interacción de bases de Schiff derivadas de bencimidazoles con el surco menor del ADN por docking molecular.

Figura 18. Estudio de acoplamiento molecular para la interacción de ADN con complejos que contienen bases de Schiff derivadas de 2-arilbencimidazoles.

Figura 19. Estudios de la interacción del metronidazol con modelos de membrana simulados.

Figura 20. Termogramas obtenidos por DSC que muestra los picos de las VMLs formadas por (A) DMPC y (B) DMPC/DMPG (3:1) antes y después de la adición del péptido a diferente relación molar péptido/lípido 0:1 (—); 1:100 (—); 1:50 (—); 1:25 (—).

Figura 21. Ligandos aminofenilbencimidazol y bases de Schiff derivadas de bencimidazol.

Figura 22. Termogramas DSC que muestran picos de la transición de fase de las VMLs formadas por DMPC/DMPG (3:1) antes y después de la adición de (A) HL2 y (B) La-L2, en diferentes relaciones molares compuesto/lípido: 0:1 (—); 1:50 (—); 1:10 (—).

Figura 23. Perfil termotrópico de VMLs formadas por (A) DMPC y (B) DMPC/DMPG (3:1) a diferentes concentraciones de HL4. Relación molar compuesto/lípido: 0:1 (—); 1:50 (—); 1:25 (—); 1:10 (—).

Figura 24. Perfil termotrópico de VML preparadas con DMPC antes (—) y después de la adición del ligando (—) y el complejo de lantano (—) en una relación molar compuesto/lípido 1:50. (A) L3; (B) L4; (C) L5; y (D) L6.

Figura 25. Termogramas DSC de VMLs preparadas con mezcla DMPC/DMPG (3:1) antes (—) y después de agregar el ligando (—) y el complejo de lantano (—) en una relación molar compuesto/lípido 1:50. (A) L3; (B) L4; (C) L5; y (D) L6.

Figura 26. Análisis RMSD de los átomos de HL2 en membranas modelo (a) DMPC/DMPG; y (b) POPE/POPG (*E. coli*).

Figura 27. Perfil de densidad parcial en la dirección z para los sistemas de membranas DMPC/DMPG y POPE/POPG a 0 y 10 ns.

Figura 28. Mecanismo de inserción del ligando HL2 a través de 10 ns en los sistemas de membrana (A) DMPC/DMPG; y (B) POPE/POPG.

Figura 29. Número de enlaces de hidrógeno entre las dos partes del ligando (aminofenol y bencimidazol) con los modelos (A) DMPC/DMPG; y (B) POPE/POPG.

Figura 30. Comportamiento de HL4 en el sistema modelo de membrana de eritrocitos durante 30 ns. (A) Desviación cuadrática media (RMSD); (B) Movimiento de HL4 desde la superficie de la membrana eritrocitaria durante los 30 ns.

Figura 31. Enlaces de hidrógeno entre HL4 y los fosfolípidos del sistema modelo de membranas de eritrocitos.

Figura 32. Comportamiento de HL4 en el sistema modelo de membrana de *E. coli* durante 30 ns. (A) Desviación cuadrática media (RMSD); (B) Movimiento de HL4 desde la superficie del sistema modelo de membrana de *E. coli* durante los 30 ns.

Figura 33. Enlaces de hidrógeno entre HL4 y los fosfolípidos del sistema modelo de membranas de *E. Coli*.

Figura 34. Desviación cuadrática media (RMSD) de HL4 en el sistema que imita membrana celular de PC-3. En verde: HL4, en azul: POPC, en violeta: POPS y en naranja: POPE. Los sistemas en círculos rojos representan la posición de HL4 a lo largo del tiempo.

Figura 35. Enlaces de hidrógeno entre HL4 y los fosfolípidos del sistema que imita membrana celular de PC-3.

Figura 36. Interacción de HL4 con las moléculas del sistema modelo de membrana celular de PC-3. (A) 2 ns. (B) 5 ns. (C) 9 ns. Tip: molécula de agua; Unk0: HL4; Pop: POPE.

Figura 37. Ubicación del ligando HL4 con receptores parasitarios: (A) Cruzaína; (B) Leishmanina; (C) Alfa-tubulina.

Figura 38. Interacción entre bases de Schiff y residuos de cruzaína. (A) HL3 (B) HL4 (C) HL5 (D) HL6.

Figura 39. Interacción por dinámica molecular entre HL4 y leishmanina. (A) 0 ns; (B) 5 ns; (C) 10 ns. Tip: molécula de agua.

Figura 40. Resultados de los estudios de dinámica molecular para HL4: (A) RMSD entre ligando con leishmanina; (B) Distancia entre ligando, agua y residuos de leishmanina ALA348, ALA350, PRO460; (C) Enlaces de hidrógeno entre ligando y leishmanina; (D) Energía total entre ligando y leishmanina.

Figure 41. Superficie de lesihmanina con HL4. (A) 0 ns. (B) 6 ns ;(C) 8 ns; (D)10 ns.

Figura 42. Receptor PBP2A de *S. aureus* con ligando HL4 en el centro.

Figura 43. Estudio fotométrico a 60 μM de (A) HL3, (B) HL4, (C) HL5 y (D) HL6, con ADN-TT en concentraciones entre 0 y 96 μM (línea negra continua = 0 μM).

Figura 44. Interacciones entre las bases nitrogenadas del ADN con (A) HL3; (B) Ce-L3. IH: interacciones hidrofóbicas, PH: enlaces de hidrógeno, EI: interacciones electrostáticas.

Lista de Esquemas

Esquema 1. Síntesis de ligandos aminofenilbencimidazol HL1 y HL2.

Esquema 2. Síntesis de complejos lantánidos con ligandos HL1 y HL2.

Esquema 3. Síntesis de bases de Schiff (ligandos) y sus complejos lantánidos de lantano y cerio ($L_n = \text{La(III)}, \text{Ce(III)}$).

Esquema 4. Equilibrio ceto-enólico de ligandos bases de Schiff ($R = \text{H}$ para HL3 y HL5, OH para HL4 y HL6).

Resumen

Los bencimidazoles se consideran una clase prometedora de compuestos heterocíclicos bioactivos que muestran una amplia variedad de propiedades biológicas útiles debido a sus similitudes estructurales con bases nitrogenadas como las purinas. Cuando estos compuestos presentan grupos aminofenil como sustituyentes en el anillo imidazol, es posible obtener bases de Schiff que resultan adecuadas para mejorar en gran medida el efecto en su actividad biológica y farmacológica. Además de su importancia biológica, estos compuestos forman complejos estables con varios metales de transición, entre ellos, los lantánidos, que también han logrado demostrar un gran número de propiedades biológicas en diferentes estudios. Esta estabilidad aumenta cuando el ligando orgánico presenta más de un punto de coordinación al metal, lo cual es común en compuestos heterocíclicos con sistemas N,N-quelato, N,S-quelato o N,O-quelato.

Con el interés de desarrollar nuevos complejos metálicos con potencial actividad biológica, y considerando la posible aplicación terapéutica de complejos lantánidos con ligandos N,O-quelato basados en 2-arilbencimidazoles, esta investigación describe la síntesis y caracterización de complejos lantánidos (La^{3+} , Ce^{3+} , Sm^{3+}) que contienen ligandos tipo aminofenil-bencimidazol y bases de Schiff obtenidas a partir de salicilaldehído y 2,4-dihidroxibenzaldehído. La actividad antiproliferativa de los compuestos fue estudiada sobre células U251 (glioblastoma humano), PC-3 (cáncer de próstata), K562 (leucemia mielógena), HCT-15 (carcinoma colorrectal), MCF-7 (adenocarcinoma epitelial de mama) y células SKLU-1 (carcinoma de pulmón) empleando sulforodamina B (SRB) en un ensayo de microcultivo. La evaluación antibacteriana se realizó frente a las cepas ATCC de *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, por el método de microdilución, mientras que la actividad antiparasitaria se llevó a cabo por métodos fluorométricos y MTT frente a *P. falciparum*, *L. braziliensis* y *T. cruzi*.

La actividad biológica fue complementada con estudios adicionales de interacción de los compuestos químicos con diferentes objetivos moleculares que incluyen modelos de membrana bacteriana, ADN de timo de ternera, docking molecular con los receptores PBP2A (*S. aureus*), Cruzaina, Leishmanina y Alfa-tubulina, así como la dinámica molecular para los sistemas de membrana DMPC-DMPG / POPE-POPG, y para la interacción con la superficie de Leishmanina. Los resultados muestran que los complejos lantánidos presentados en este trabajo son generalmente más activos con relación a sus ligandos libres, confirmando un efecto sinérgico, mientras que los estudios de interacción con diferentes objetivos moleculares indican que existe una clara relación estructura-actividad.

Justificación

El control de enfermedades infecciosas y de cáncer son un problema de interés mundial tanto para la salud pública como para la medicina. Las enfermedades infecciosas contemplan aquellas producidas por bacterias, que junto a las virales son las más comunes a nivel mundial, también se encuentran enfermedades infecciosas producidas por protozoos como la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, enfermedades parasitarias que actualmente prevalecen en condiciones tropicales en 149 países del mundo y afectan a millones de personas, por lo general en zonas de pobreza, siendo responsables de una elevada morbilidad, mortalidad y adversidad económica en los países en las que son endémicas. La quimioterapia ha sido una de las principales estrategias de lucha en contra tanto de las enfermedades infecciosas como de los diferentes tipos de cáncer, pero factores como el intercambio de viajeros, la expansión geográfica de insectos vectores de infección y la falla en los tratamientos terapéuticos, han generado un desafío importante para la química medicinal, fomentando la investigación y desarrollo de nuevos medios de diagnóstico; así como, la obtención de medicamentos más efectivos, menos tóxicos y de fácil administración.

Uno de los inconvenientes encontrados frecuentemente en el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias, parásitos y hongos, es la resistencia múltiple que estos microorganismos han generado hacia los fármacos de primera línea. La lucha contra este tipo de enfermedades, así como la lucha contra el cáncer, es uno de los campos de investigación más activos en la química medicinal, el cual ha estado en continuo desarrollo durante los últimos años como consecuencia de la imposibilidad de controlar su crecimiento con los tratamientos tradicionales¹. Sumado a esto, muchos agentes citotóxicos tienen limitaciones, por ejemplo, el efecto hacia células tumorales que se dividen rápidamente y no a las que se encuentran en fase de reposo, el poco efecto sobre la invasión de tejidos o metástasis, además de efectos adversos que incluyen supresión de médula ósea, alopecia, mucositis, náuseas y vómitos², por lo tanto, es de gran importancia desarrollar nuevos compuestos que sirvan como precursores para el desarrollo de mejores fármacos.

En este sentido, la modificación estructural de compuestos biológicamente activos resulta ser una opción atractiva para la química medicinal. Los compuestos heterocíclicos, particularmente los derivados del bencimidazol, son una alternativa plausible dentro de las modificaciones estructurales, ya que estos compuestos orgánicos han demostrado tener amplio espectro de actividad biológica. Los derivados heterocíclicos imidazólicos en la actualidad forman parte de la estructura molecular de fármacos usados en medicina, particularmente por su actividad como agentes antifúngicos, antiinflamatorios, analgésicos, antialérgicos, antibacterianos y recientemente anticancerígenos^{3,4}. Es por ello, que, en los

últimos años, este tipo de moléculas han aumentado notablemente su espectro terapéutico y se les ha incorporado como importantes biocidas en el tratamiento de infecciones gástricas causadas por *Helicobacter pylori*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*; así como también han sido útiles coadyuvantes en terapias contra el cáncer⁵. Como consecuencia de su demostrada actividad biológica, los derivados bencimidazólicos son una potencial alternativa como ligandos en el desarrollo de precursores para fármacos que sean más efectivos en el tratamiento de diferentes enfermedades.

Otra forma de contribuir en la búsqueda de nuevos y mejores medicamentos es aplicar el concepto de sinergismo empleado en las últimas décadas en química bioinorgánica medicinal, el cual se logra sintetizando complejos de coordinación producto de la interacción de una molécula orgánica con actividad biológica conocida y un metal, aumentando la actividad biológica de la molécula inicial. En química bioinorgánica, los derivados bencimidazólicos son de gran interés, ya que en la estructura del anillo heteroaromático presentan átomos donores que actúan como bases de Lewis, lo que les permite comportarse como ligantes multidentados, como los del tipo N,O-quelato, que potencialmente facilitan la formación de complejos de coordinación estables con una amplia gama de iones metálicos. El demostrado efecto sinérgico que tiene sobre la actividad biológica, la interacción ligando orgánico-centro metálico, hacen a los complejos de coordinación una alternativa actual en el diseño de novedosos agentes terapéuticos^{6,7}. Dentro de los nuevos medicamentos que se desarrollan a nivel mundial para el control de diferentes enfermedades, los complejos de coordinación derivados de iones lantánidos han generado, debido a sus características químicas, gran atención en química medicinal para el desarrollo de sondas moleculares luminiscentes y precursores de fármacos biocompatibles con actividad antibacteriana, antiparasitaria y antiproliferativa⁸⁻¹¹.

Basados en los registros de actividad biológica que presentan diferentes compuestos orgánicos derivados del bencimidazol, así como en la evidencia demostrada de la actividad biológica de complejos lantánidos, el presente estudio se realizó empleando ligandos y complejos de coordinación de lantano, cerio y samario con las estructuras químicas representadas en la figura 1.

Los resultados permitieron dar respuesta a la pregunta planteada al inicio del proyecto de investigación: *¿servirán los derivados bencimidazólicos para el desarrollo de nuevos complejos lantánidos con propiedades terapéuticas efectivas contra enfermedades infecciosas y cancerígenas?*

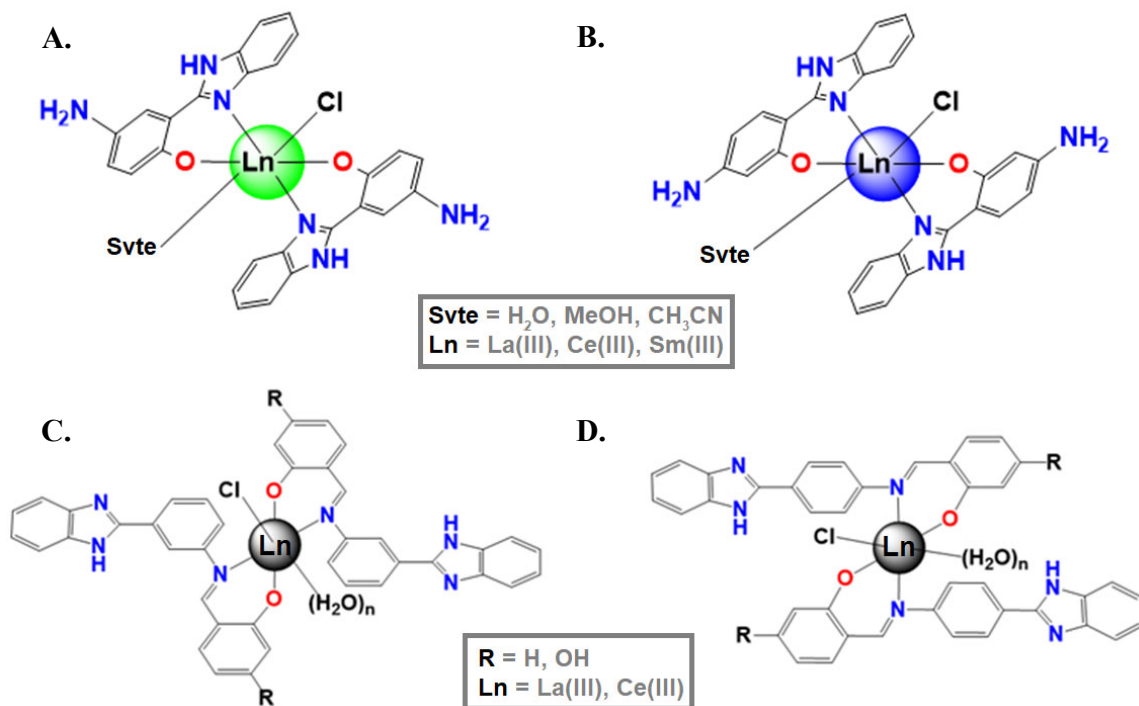


Figura 1. Complejos lantánidos con ligandos aminofenilbencimidazol (A y B) y bases de Schiff (C y D).

Referencias

1. Lüllmann, H.; Mohr, K. y Hein, L. *Farmacología: Texto y Atlas*. 6 ed. España: Editorial Médica Panamericana S.A., 2010.
2. Nussbaumer, S.; Bonnabry, P.; Veuthey, J.L.; Fleury-Souverain, S. *Talanta*, **85** (2011), 2265.
3. Aouad, M.R.; Messali, M.; Rezki, N.; Ali, A.A.; Lesimple, A. *Acta Pharmaceutica*, **65** (2015), 117.
4. Sharma, A. *New J. Chem.*, **40** (2016), 764.
5. Velázquez-Olvera, S.; Salgado-Zamora, H.; Jiménez-Cardoso, E.; Campos-Aldrete, M.E.; Pérez-González, C.; Hadda, T.B. *Acta Tropica*, **155** (2016), 6.
6. Lewis, A.; McDonalda, M.; Scharbach, S.; Hamawaya, S.; Ploosterb, M.; Petersb, K.; Foxa, K.M.; Cassimerisb, L.; Tanskic, J.M.; Tyler, L.A. *J. Inorg. Biochem.*, **157** (2016), 52.
7. Sharifi-Rad, J.; Hoseini-Alfatemi, S.M.; Sharifi-Rad, M.; Iriti, M. *Annals Med. HealthSci. Res.*, **4** (2014), 863.
8. Zhou-Qin, X. *J. Mol. Struct.*, **1102** (2015), 86.
9. Ajibade, P.A.; Kolawole, G.A. *Transit. Met. Chem.*, **33** (2008), 493.
10. Camacho, J.; Ferrer, R.; Maldonado, A.; Navarro, M. *Rev. Fac. Farm.*, **68** (2005), 27.
11. Aragón-Muriel, A.; Polo-Cerón, D. *J. RareEarths*, **31** (2013), 1106.

Objetivos

Objetivo general

Sintetizar complejos lantánidos con ligandos bencimidazólicos y evaluar su posible actividad antibacteriana, antiparasitaria y antiproliferativa.

Objetivos específicos

- Sintetizar complejos coordinados de Ln(III) con ligandos bencimidazólicos.
- Caracterizar espectroscópica, espectrométrica y termogravimétricamente los compuestos sintetizados.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y citotóxica (*in vitro*) que puedan presentar las diferentes series de los complejos sintetizados.

CAPÍTULO I

Complejos lantánidos con ligandos aminofenilbencimidazol

1. Introducción

El núcleo de bencimidazol es un sistema heterocíclico aromático donde el anillo de benceno se fusiona a las posiciones 4 y 5 de un anillo imidazol¹. Los derivados del anillo bencimidazol poseen propiedades redox, ácido-base, fotofísicas², y fluorescentes que les confieren aplicaciones biológicas, farmacéuticas, OLED, como dispositivos switch, y como inhibidores de la corrosión para superficies metálicas y de aleación en procesos industriales³. Además, son empleados en la síntesis de sensores ópticos, organocatalizadores, tintes orgánicos, cromóforos y como etiquetas fluorescentes para la detección de moléculas biológicas, como ADN, ARN, proteínas y enzimas^{4,5}.

1.1 Importancia biológica de bencimidazoles

El anillo bencimidazol es un farmacóforo interesante para la química médica gracias a su analogía estructural con compuestos heterocíclicos aromáticos naturales como las purinas⁶. Se ha demostrado que, compuestos derivados del anillo bencimidazol inhiben la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas a través de interacciones π - π e hidrófobas, entre los heteroátomos presentes en la estructura del anillo y enzimas o receptores⁷⁻⁹.

Compuestos derivados del anillo bencimidazol sustituidos en la posición 2, como los 2-fenilbencimidazol han presentado actividad antimicrobiana en bacterias Gram-positivas y hongos con una concentración mínima inhibitoria desde 0.156 mg/mL, similar al fármaco ceftazidima. De esta manera, se consideran fragmentos prometedores para la obtención de fármacos antibacterianos, ya que pueden formar complejos con proteínas extracelulares lo que genera la inactivación celular y pérdida de la función bacteriana¹⁰.

Particularmente, Huang y colaboradores¹¹, encontraron que derivados del compuesto B-norcolesteril bencimidazol inducen cambios morfológicos en las líneas celulares HeLa e inhiben su proliferación, invasión y metástasis, causando la apoptosis de las células de cáncer de cuello uterino, bloqueando la proliferación celular en la etapa inicial del ADN.

Por lo anterior, derivados del anillo bencimidazol presentan una importancia emergente en la química médica debido a su amplia actividad biológica^{12,13}. Diversos fármacos que poseen este anillo en su estructura muestran propiedades biológicas eficientes (ver figura 2) como agente antitumoral (bendamustina), antimicrobiano (albendazol), antiulcerativo (omeprazol), antiinflamatorio (análogo de benoxaprofeno), antihistamínico (astemizol), antihipertensivo (candesartán) y antiviral (enviradina).

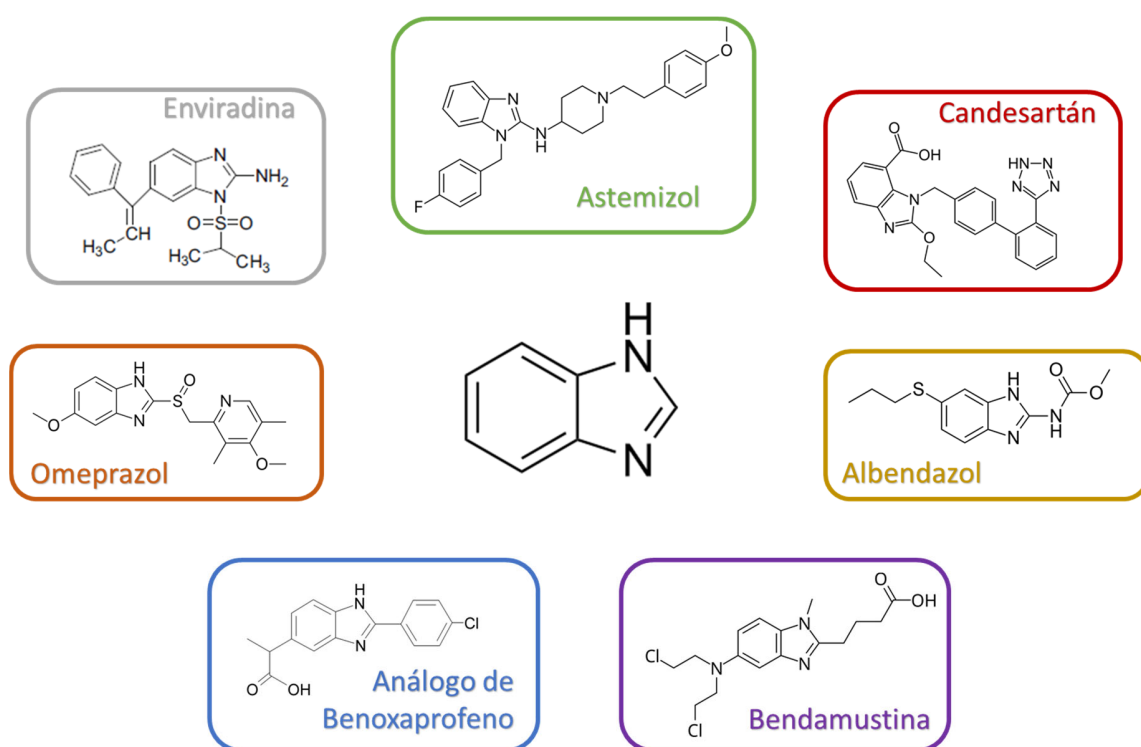


Figura 2. Compuestos derivados del anillo bencimidazol con actividad biológica.

Sin embargo, los fármacos empleados actualmente presentan diferentes efectos adversos, y en la mayoría de los casos, los mecanismos de acción no son claros. Sumado a esto, la resistencia a los antimicrobianos coloca en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de diferentes enfermedades, por lo que existe un creciente interés por el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas basados en moléculas con previa actividad biológica demostrada.

1.2 Bencimidazoles como ligandos

Los compuestos heterocíclicos que contienen átomos donores como O, N, S, (bases de Lewis) al interaccionar con iones de los metales de transición pueden formar complejos de coordinación estables químicamente¹⁴. Dentro de los ligandos orgánicos heterocíclicos destacan los 1,2 y 1,3 azoles, que contienen en su estructura un átomo de nitrógeno, así como otro heteroátomo que puede ser azufre (tiazoles), oxígeno (oxazoles) o nitrógeno (imidazoles)¹⁵. En la familia de los imidazoles, el bencimidazol y sus derivados han sido ampliamente estudiados por su actividad biológica.

Compuestos derivados del anillo bencimidazol son candidatos prometedores como ligandos orgánicos en la síntesis de complejos metálicos estables con actividad biológica. Donde, las propiedades espectroscópicas y redox únicas de este compuesto heterocíclico¹⁴, dan la posibilidad que iones metálicos y sus complejos presenten potenciales aplicaciones medicinales, que podrían ser complementarias al compuesto orgánico. Esto se debe principalmente, a la presencia del sistema π conjugado del anillo y al grupo amino, el cual actúa como un sitio de anclaje primario para los iones metálicos¹⁶.

La actividad biológica de complejos metálicos con ligandos derivados del anillo bencimidazol se ha atribuido principalmente al heterocíclico bioactivo, sin embargo, varios autores evidencian que la eficacia biológica de tales compuestos heterocíclicos aumenta después de la coordinación a un ion metálico^{17,18}, en particular si se combinan con otros compuestos de reconocimiento biológico como los aminofenoles¹⁹.

Por tanto, complejos metálicos de bencimidazol con diferentes metales de transición y su química de coordinación sigue recibiendo una gran atención no solo por sus interesantes propiedades espectrales, magnéticas y estructurales, sino también por sus aplicaciones terapéuticas tales como agentes anticancerígenos, antioxidantes, inhibidores enzimáticos y quimiosensores²⁰.

1.3 Complejos lantánidos con bencimidazoles

La importancia bioquímica de los iones lantánidos data del año 1964 cuando Lettvin y colaboradores hallaron similitudes entre los radios iónicos del Ca^{2+} y La^{3+} . Esta propiedad permitió establecer las funciones que ejerce el ion Ca^{2+} en el sistema nervioso y facilitó su aplicación como aglutinante del ion fosfato en el tratamiento de la hiperfosfatemia en pacientes con diálisis renal^{21,22}. Recientemente se ha sugerido que un detallado conocimiento de los efectos biológicos que presentan los iones lantánidos, podría ser un punto de partida racional para el diseño de nuevos fármacos, basados en el empleo de cationes lantánidos²¹. Debido a su alta densidad de carga positiva, se ha evidenciado que los cationes lantánidos pueden generar procesos oxidativos producidos por radicales libres, causando afectación de las membranas celulares que posteriormente desencadena la apoptosis celular²¹. Los iones lantánidos al ser ácidos de Lewis oxofílicos, se coordinan fuertemente con bases duras de Pearson como los átomos de $\text{O} \geq \text{F} > \text{Cl} > \text{N}$. Esta propiedad es la base de su implicación en la homeostasis de radicales libres²¹.

Dentro de las bases duras que pueden contener átomos de O y N que se puedan coordinar a iones lantánidos, encontramos los 2-arilbencimidazoles, los cuales pueden formar enlaces a través de sustituyentes en el anillo de benceno (no central) y el átomo de nitrógeno (con hibridación sp^2) del imidazol, formando complejos estables con varios metales, ya sea como ligandos monodentados^{23,24}, ligandos N,O-quelatos bidentados^{25,26}, o ligandos N,N,O-quelatos tridentados²⁷. Sin embargo, son pocos los estudios biológicos de complejos de 2-arilbencimidazoles con elementos de tierras raras; como por ejemplo la evaluación del potencial citotóxico de complejos de Gd(III), Tb(III) y Dy(III) con ligandos bencimidazolil-fenol (ver figura 3) frente a células epiteliales de endocarcinoma cervical²⁸.

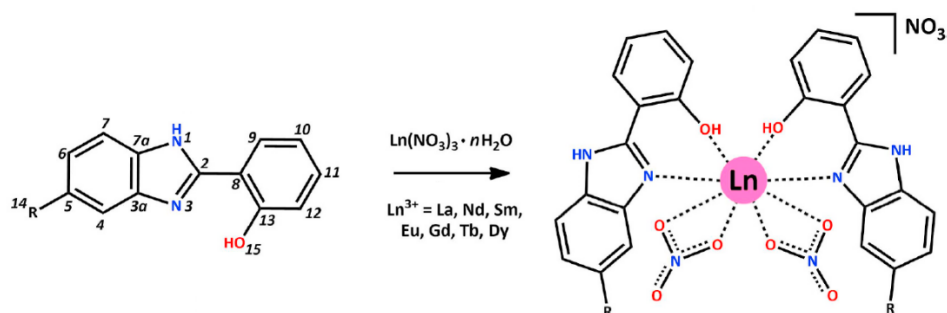
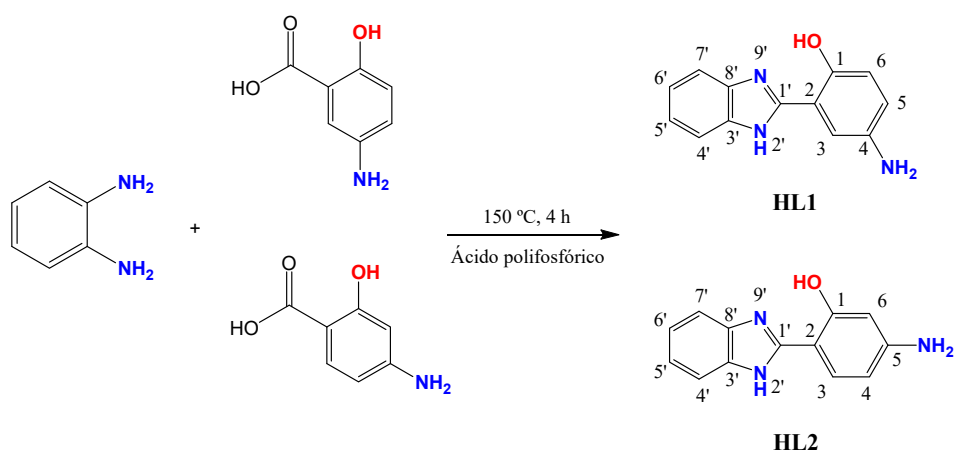


Figura 3. Reacción de ligandos bencimidazolil-fenol con nitratos hidratados de lantánidos.

Por tanto, considerando la potencial aplicación terapéutica de complejos de lantánidos con ligandos de N,O-quelato basados en 2-arilbencimidazoles, en este capítulo se presenta la síntesis y evaluación de la actividad antiproliferativa, antibacteriana y antiparasitaria, de nuevos complejos de lantánidos con ligandos 4 y 5-amino-2-(1*H*-bencimidazol-2-il)fenol.

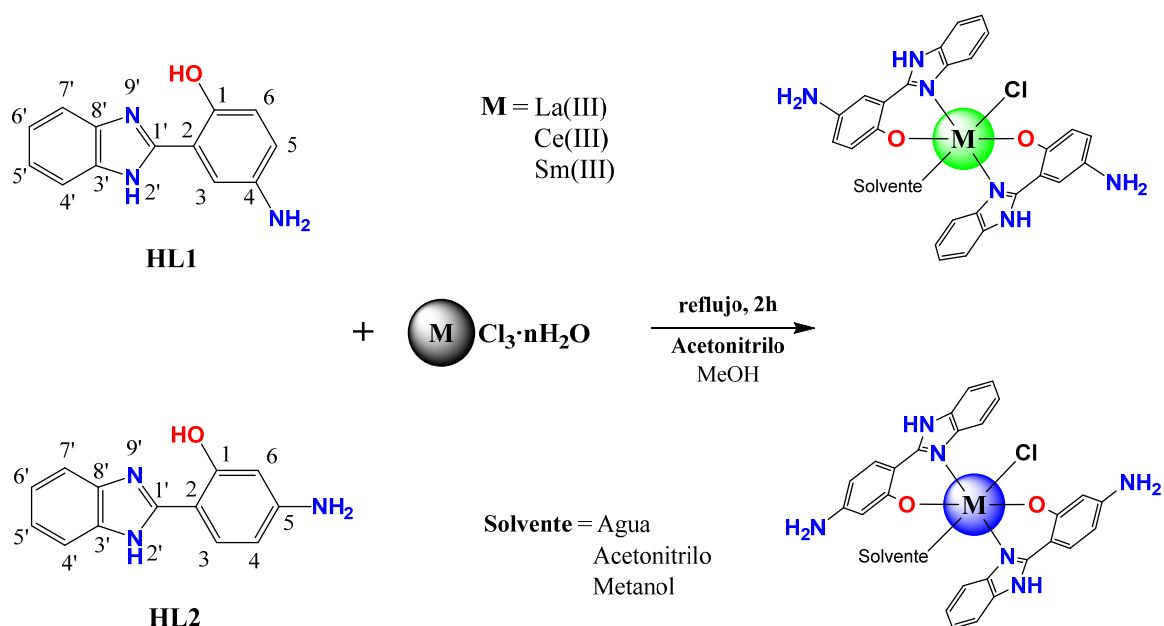
2. Síntesis y caracterización

La síntesis de los ligandos 4-amino-2-(1*H*-bencimidazol-2-il)fenol (HL1) y 5-amino-2-(1*H*-bencimidazol-2-il)fenol (HL2) se realizó mediante reacciones de condensación de *o*-fenilendiamina con el correspondiente ácido carboxílico (ver esquema 1), adaptando procedimientos descritos en la literatura²⁹⁻³¹. Los ligandos se obtuvieron como sólidos cristalinos blancos solubles en metanol, etanol, acetona, DMSO y DMF; y ligeramente solubles en agua y acetonitrilo.



Esquema 1. Síntesis de ligandos aminofenilbencimidazol HL1 y HL2.

Los complejos de lantánidos se prepararon de acuerdo a los reportes de la literatura³² (ver esquema 2). La numeración de los protones en los complejos es la misma que se usa para los ligandos. La reacción de $\text{LnCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Ln} = \text{La (III)}, \text{Ce (III)}, \text{Sm (III)}$) con el correspondiente ligando de bencimidazolil-fenol en acetonitrilo, produjo los complejos La-L1, La-L2, Ce-L1, Ce-L2, Sm-L1 y Sm-L2 con rendimientos entre el 74% y 97%. Estos compuestos fueron obtenidos como polvos microcristalinos solubles en DMSO y DMF; y ligeramente solubles en metanol y acetona. Los resultados obtenidos por análisis elemental (para C, H y N), complexometría con EDTA (para Ln), análisis TGA y espectrometría de masas $[\text{M}+1]$ por DART-MS permitieron proponer las estructuras con una relación 1:2 metal:ligando^{29,33}. Las medidas de conductividad molar de los complejos preparados a una concentración de 1×10^{-3} M en etanol ($T = 26^\circ\text{C}$) fueron muy bajas, en el rango de $0.002\text{--}0.030 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$, indicando la naturaleza no electrolítica de los complejos^{34,35}.



Esquema 2. Síntesis de complejos lantánidos con ligandos HL1 y HL2.

2.1 Análisis de espectroscopía infrarrojo

La espectroscopía FT-IR proporciona información complementaria para dilucidar la forma en que los ligandos se unen a los iones metálicos. Los datos experimentales FT-IR de HL1 y HL2 y sus complejos se presentan en la tabla 1 y en las figuras A1 y A2 (ver sección de anexos). Las bandas de absorción características (O-H y N-H) de los ligandos aparecen por separado debido a la debilidad del enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo -OH y el átomo de N del anillo heterocíclico. En los espectros infrarrojos de los complejos metálicos, las frecuencias de vibración $\nu(\text{C}=\text{N})$ se desplazan a números de onda más bajos ($20\text{-}40\text{ cm}^{-1}$), lo que indica la coordinación del nitrógeno con el átomo metálico (Ln-N). La falta de la banda $\nu(\text{O}-\text{H})$ en los espectros FT-IR de los complejos indica coordinación a través del oxígeno fenólico desprotonado con los iones Ln(III). Esta conclusión también está respaldada por las vibraciones de estiramiento fenólico $\nu(\text{C}-\text{O})$ que se desplazan a números de onda más altos en la formación del complejo. Todas las vibraciones de los compuestos de coordinación fueron similares a las de otros complejos metálicos con iones lantánidos publicados previamente²⁸. Para todos los compuestos, las bandas características de diferentes vibraciones de los enlaces N-H correspondientes a aminas primarias y secundarias (N-H de imidazol) se observaron entre $3550\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ (estiramiento N-H) y $1640\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ (flexión N-H). Las frecuencias entre $1600\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$ se atribuyeron a las absorciones de estiramiento $\nu(\text{C}=\text{C})$ y $\nu(\text{C}=\text{N})$ en los anillos aromáticos, mientras que las bandas intensas a aproximadamente 750 cm^{-1} , se lograron asignar a las vibraciones de flexión del C-H (fuera del plano), correspondientes a los átomos de hidrógeno aromático³⁶.

Tabla 1. Bandas IR de los ligandos HL1, HL2 y sus complejos lantánidos (valores en cm^{-1}).

Compuesto	$\nu(\text{N-H})$	$\delta(\text{N-H})$	$\nu(\text{C}=\text{N})$	$^*\Delta\nu$	$\nu(\text{C}=\text{C})$	$\nu(\text{C}-\text{O})$	$^{**}\Delta\nu$	$\delta(-\text{OH})_{\text{ep}}^1$	$\delta(-\text{OH})_{\text{fp}}^2$	$\delta(\text{C-H})$
HL1	3500-3300	1615	1578	-	1509	1240	-	1402	942	754
La-L1	3500-3300	1618	1558	20	1492	1262	22	-	-	749
Ce-L1	3500-3300	1621	1555	23	1496	1272	32	-	-	752
Sm-L1	3500-3300	1612	1558	20	1496	1278	38	-	-	755
HL2	3500-3300	1638	1590	-	1505	1253	-	1404	944	740
La-L2	3500-3300	1624	1548	42	1508	1275	22	-	-	742
Ce-L2	3500-3300	1621	1549	41	1505	1278	25	-	-	740
Sm-L2	3500-3300	1624	1568	22	1508	1278	25	-	-	743

¹ ep = en el plano. ² fp = fuera del plano.

$^*\Delta\nu(\text{C}=\text{N}) = \nu(\text{C}=\text{N})_{\text{Complejo}} - \nu(\text{C}=\text{N})_{\text{Ligando}}$.

$^{**}\Delta\nu(\text{C}-\text{O}) = \nu(\text{C}-\text{O})_{\text{Complejo}} - \nu(\text{C}-\text{O})_{\text{Ligando}}$.

2.2 Análisis de espectroscopía RMN y EPR

Los resultados obtenidos por espectroscopía de RMN, espectrometría MS y análisis elemental estuvieron en concordancia con reportes anteriores^{29,30}. Debido a la tautomería (equilibrio cetoenólico) entre estos ligandos, y debido a que los protones de hidroxilo son intercambiables con el disolvente deuterado, los picos correspondientes a OH y NH (imidazol) podrían disminuir o desaparecer del espectro de RMN-¹H.³⁰ El enlace de hidrógeno alarga el enlace O-H y disminuye la densidad de electrones alrededor del protón (efecto de desprotección), lo que da como resultado un cambio de frecuencia más alto en comparación con el NH, como sugieren otros autores^{31,37}.

Los complejos de Ce(III) y Sm(III) son paramagnéticos, por lo que únicamente los complejos La-L1 y La-L2 se caracterizaron por resonancia magnética nuclear (¹H y ¹³C{¹H}). Los espectros RMN-¹H de los complejos La-L1 y La-L2 exhiben las señales esperadas respecto a las estructuras propuestas (ver figura 4 y sección de anexos: figura A14). El protón fenólico del ligando (HL1 y HL2) no aparece en los espectros de RMN-¹H de los complejos de lantano tras la desprotonación de los compuestos de bencimidazolil-fenol. La ausencia de la señal correspondiente al grupo N-H del imidazol podría explicarse por el rápido intercambio entre este protón y el disolvente, y tanto la señal de OH como la señal de NH podrían desaparecer en presencia de metal²⁹; sin embargo, en el espectro de RMN-¹H de La-L2 (anexo 2: figura A14), se observó una señal de baja intensidad cercana a 11.5 ppm, lo que confirma que la señal del protón correspondiente a NH es la de menor frecuencia entre las dos señales, sugiriendo que la señal de NH se puede encontrar en el campo bajo, mientras que la señal correspondiente a OH no aparece tras la formación del enlace La-O. Por otro lado, los cambios químicos debidos a los protones H3, H5, H6 y H7', también se vieron afectados por la desprotonación del grupo fenólico y la coordinación del nitrógeno (C=N) al ion La(III) (para el caso de La-L1). Finalmente, la señal H3 en La-L1 se desplaza a campo abajo con respecto al ligando L1, mientras que las resonancias de los protones NH₂ están protegidas (ver figura 4). Los espectros de RMN de ¹³C{¹H} mostraron las señales de carbono esperadas para los ligandos. Para los complejos La(III), la señal de carbono hidroxílico se registró en $\delta \approx 141$ ppm y 160 ppm para La-L1 y La-L2, respectivamente, mientras que el carbono del

grupo amina se observó en 140 ppm y 153 ppm, respectivamente. Se encontraron carbonos cuaternarios de bencimidazol (C1', C3', C8') en el rango de desplazamiento químico característico, entre 130-160 ppm, y fueron confirmados por el experimento dept-135.

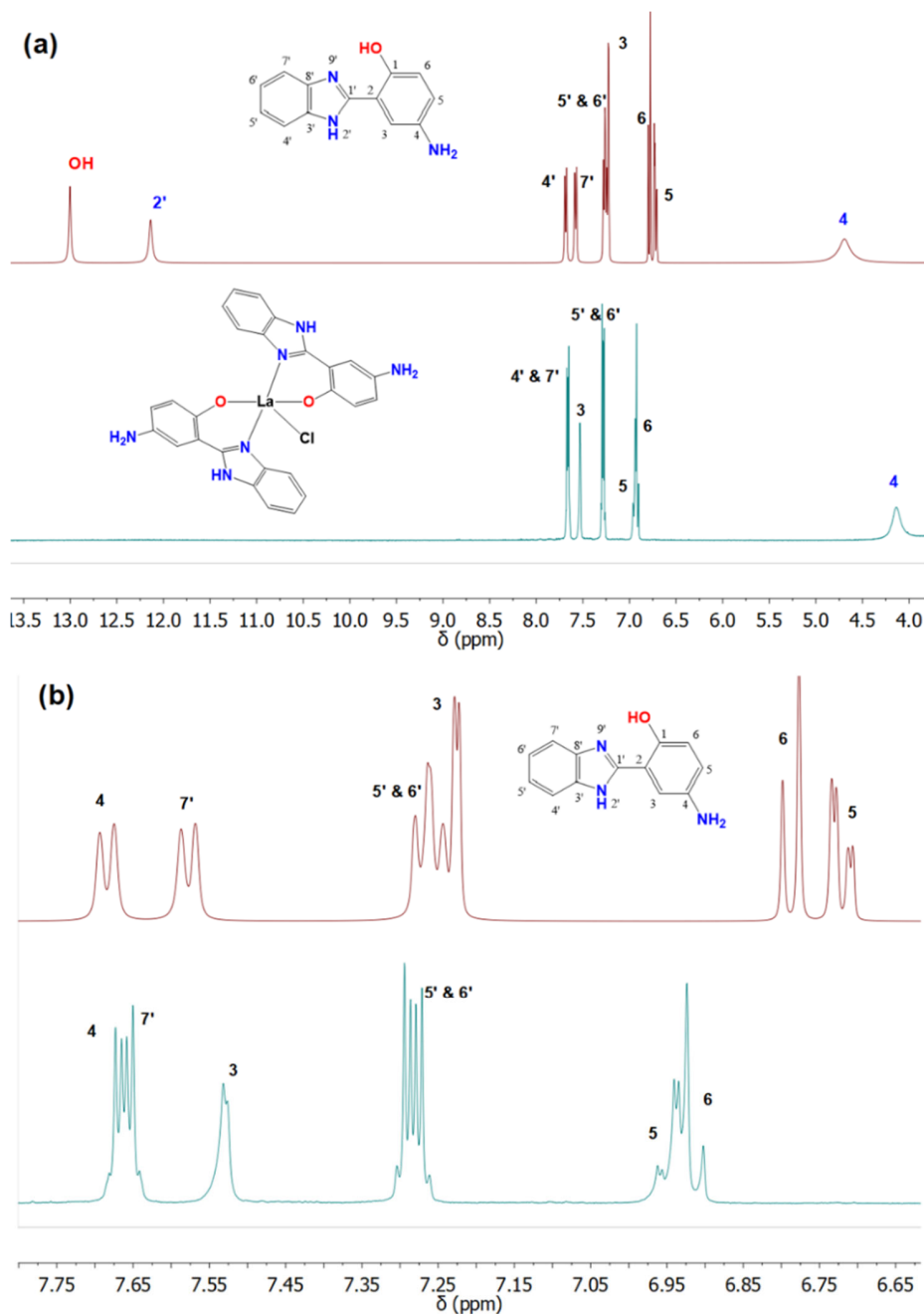


Figura 4. Espectro RMN- ^1H : (a) superposición de HL1 (rojo) y La-L1 (azul); (b) expansión del espectro RMN- ^1H comparativo en la región aromática.

Debido a que los complejos de Ce(III) y Sm(III) contienen electrones no apareados, las especies metálicas se pueden estudiar a través de resonancia paramagnética electrónica (EPR). La técnica permite obtener información de simetría y de la distribución electrónica de un ion paramagnético en relación a los átomos de los ligandos que constituyen el campo cristalino involucrado con el ion. La interacción entre el electrón y otro electrón de la red, se conoce como interacción de campo cristalino, sin embargo, la EPR permite estudiar otros tipos de interacción que puede sufrir el electrón de interés: el electrón en presencia de un campo magnético presenta el efecto Zeeman (interacción del momento del electrón con el campo externo), mientras que cuando el electrón interactúa con el momento magnético del núcleo, se presenta una interacción hiperfina. Por otro lado, cuando el electrón interactúa con otros núcleos, esta se conoce como interacción superhiperfina (ver Figura 5)³⁸.

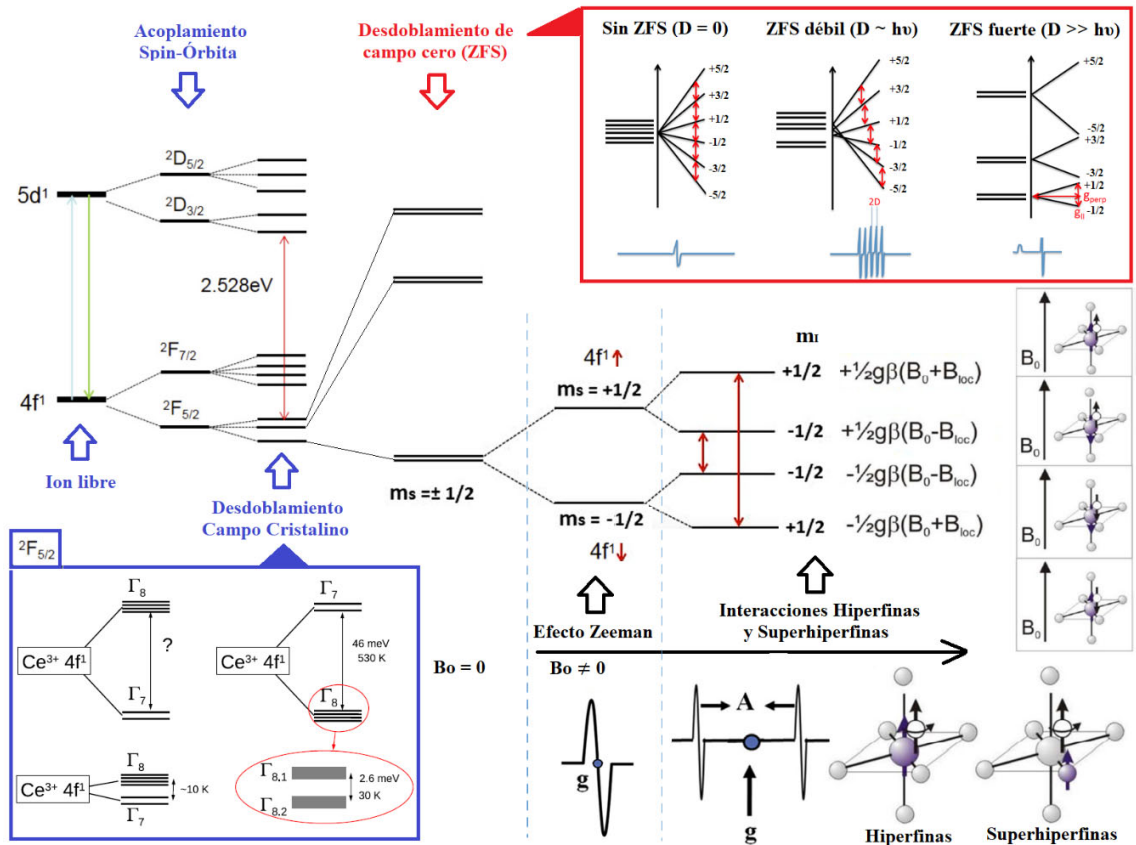


Figura 5. Diagrama de niveles de energía para Ce^{3+} y desdoblamiento de orbitales a $B_0 = 0$ y a $B_0 > 0$ (efecto Zeeman) en ausencia y presencia de interacciones con espines nucleares.

La presencia de iones lantánidos paramagnéticos en los complejos se confirmó mediante espectroscopía EPR de banda X a temperatura ambiente. Los espectros de EPR (ver figura 6) mostraron picos de resonancia amplios, con valores g y anchos de línea similares a los informados para otros complejos de lantánidos a temperatura ambiente^{39,40}, la desviación de los valores g del valor g_e del espín del electrón libre ($g_e = 2.00232$) y su dependencia de la orientación, se debe al acoplamiento espín-órbita³⁸. En ninguno de los casos se observó acoplamiento hiperfino o superhiperfino, sin embargo, estas interacciones del electrón con algún espín nuclear podrían observarse si los experimentos se llevaran a 5 K, como sugieren otros autores⁴¹, en donde la interacción de electrones no apareados con los nitrógenos de los enlaces Ln-N podría ser verificado teniendo en cuenta que el isótopo ^{14}N presenta un espín nuclear $I = 1$.

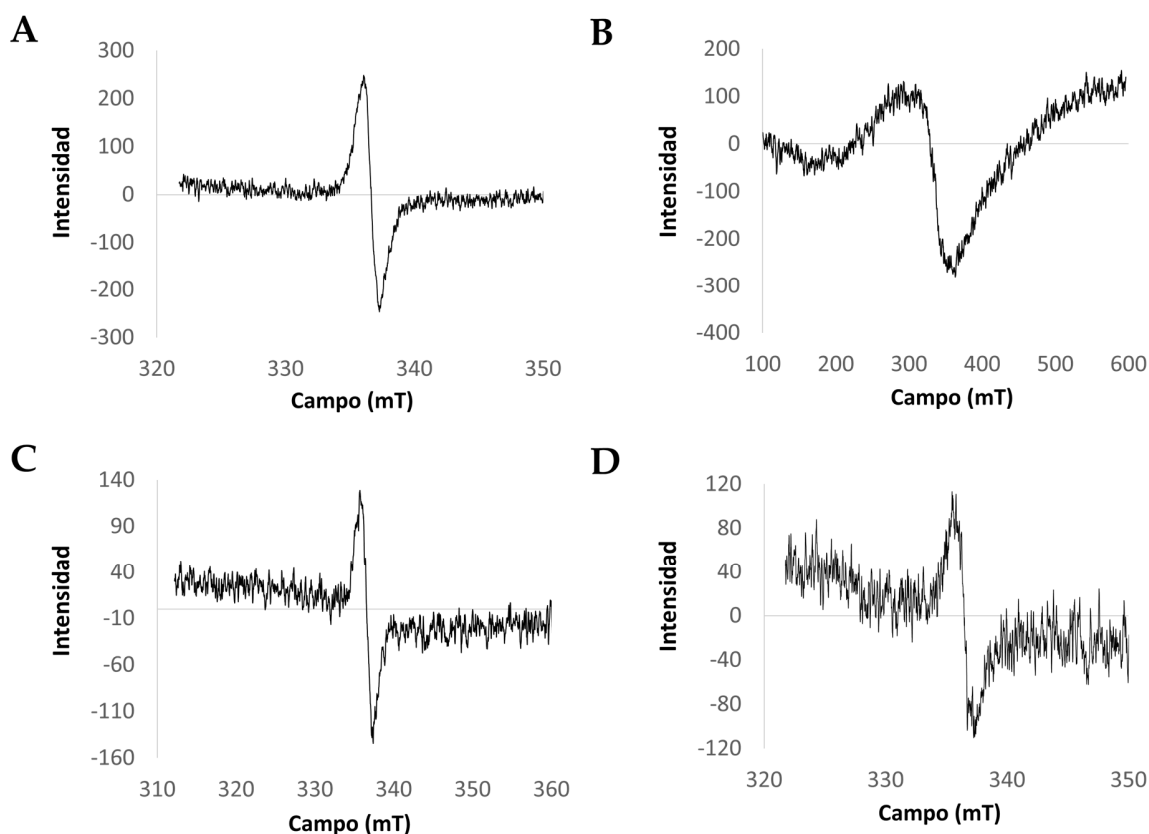


Figura 6. Espectros EPR a temperatura ambiente de (A) *Ce-L1* (valor $g = 2.003476$); (B) *Ce-L2* (valor $g_{\perp} = 2.013232$); (C) *Sm-L1* (valor $g = 2.003578$); (D) *Sm-L2* (valor $g = 2.006532$).

Los patrones observados en los espectros EPR de Ce-L1, Sm-L1 y Sm-L2 indican un comportamiento isotrópico ($g_x = g_y = g_z$) característico de simetrías octaédricas (O_h) sin desdoblamiento de campo cero (ZFS), mientras que para Ce-L2 se observa una anisotropía axial alargada ($g_z > g_x = g_y$) característica para simetrías D_{4h} , C_{4v} y D_{3h} ³⁸. En este último caso, las señales generales obtenidas por EPR sugieren que el complejo Ce-L2 se encuentra en un entorno desordenado, en donde la estructura fina pudo ser afectada debido al fuerte desdoblamiento de campo cero del Ce(III) como se ilustra en la figura 5. Los enlaces H aleatorios formados por moléculas de complejos y solvente (en este caso metanol), inducen pequeñas distorsiones, lo que resulta en ensanchamientos de línea. Este fenómeno, llamado deformación g, explica las amplias formas asimétricas de la línea EPR^{42,43}.

3. Actividad biológica

Las propiedades biológicas *in vitro* de la serie de compuestos se exploraron mediante la determinación de la actividad antiproliferativa, antiparasitaria y antibacteriana.

3.1 Actividad antiproliferativa

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, precedida sólo por las enfermedades cardiovasculares. Los fármacos utilizados actualmente para su tratamiento tienen una limitada actividad y causan una variedad de efectos indeseables, por lo cual es necesario descubrir nuevos agentes anticancerosos con mayor eficacia y elevada selectividad por células tumorales. Una manera de obtener información preliminar de la capacidad anticancerosa de un fármaco es a través de estudios citotóxicos hacia células que aumentan su cantidad como resultado del crecimiento y multiplicación celular (proliferación) descontrolada. En este sentido, la citotoxicidad tumoral humana se determinó según los protocolos aprobados por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI por sus siglas en inglés)⁴⁴. Se exploró la actividad antiproliferativa de todos los derivados de bencimidazolil-fenol (ligandos y complejos) en seis líneas de células tumorales y una línea de células no cancerosas (riñón de mono). La tabla 2 presenta los resultados de estos experimentos, donde se puede observar fácilmente que los ligandos libres exhibieron actividades más bajas o nulas

en comparación con sus complejos. Por tanto, es claro que la presencia de los lantánidos produce una sinergia mejorada independientemente del metal. Por otro lado, los derivados de HL1 producen porcentajes de inhibición superiores a los complejos que incluyen el ligando HL2, sugiriendo que la posición del grupo sustituyente -NH₂, juega un papel clave en el comportamiento biológico de estos complejos.

Tabla 2. Inhibición de crecimiento (%) de líneas celulares tumorales humanas a 25 μ M.*

Compuesto	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7**
HL1	NA	19.6 $\pm$ 0.7	21.6 $\pm$ 1.1	NA	NA	29.3 $\pm$ 1.1	NA
La-L1	1.1 $\pm$ 0.9	51.3 $\pm$ 1.8	70.9 $\pm$ 2.3	15.7 $\pm$ 1.0	23.3 $\pm$ 0.7	44.1 $\pm$ 0.9	13.7 $\pm$ 0.5
Ce-L1	59.6 $\pm$ 2.1	53.3 $\pm$ 0.7	55.8 $\pm$ 0.6	23.2 $\pm$ 0.9	30.9 $\pm$ 1.2	37.0 $\pm$ 0.8	10.4 $\pm$ 0.4
Sm-L1	30.3 $\pm$ 1.3	47.7 $\pm$ 1.6	56.3 $\pm$ 1.5	42.8 $\pm$ 1.2	18.7 $\pm$ 0.5	47.7 $\pm$ 1.1	10.4 $\pm$ 0.7
HL2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
La-L2	NA	31.5 $\pm$ 1.3	42.1 $\pm$ 2.2	NA	NA	27.3 $\pm$ 1.6	NA
Ce-L2	NA	26.1 $\pm$ 0.7	34.9 $\pm$ 1.4	NA	NA	14.3 $\pm$ 1.0	NA
Sm-L2	NA	17.5 $\pm$ 0.5	36.5 $\pm$ 1.0	7.9 $\pm$ 1.2	NA	13.4 $\pm$ 0.7	NA
Cisplatino***	90.3 $\pm$ 2.0	64.8 $\pm$ 1.3	55.3 $\pm$ 2.2	50.2 $\pm$ 1.4	79.9 $\pm$ 1.6	94.8 $\pm$ 2.3	ND

*los resultados son el promedio de tres pruebas. Los valores se expresan como la media $\pm$ DE (Desviación Estándar). NA= No Activo; ND= No Determinado

**línea celular no-cancerosa (riñón de mono)

***fármaco de referencia

Para la serie de complejos que incluyen HL1, se presentó alguna actividad contra todas las líneas celulares cancerosas examinadas, destacando que el complejo La-L1 presentó un porcentaje de inhibición de 70.9 $\pm$ 2.3% para K562, siendo incluso más activo que el fármaco de referencia (55.3 $\pm$ 2.2), mientras que para las líneas celulares cancerosas HCT-15, MCF-7, PC-3 y SKLU-1, las actividades observadas fueron de baja a moderada. Se observó una tendencia similar para los derivados Ce(III) y Sm(III), con actividades citotóxicas moderadas en todas las líneas de células tumorales, mientras que para la serie de complejos de lantánidos que contienen ligando HL2, las actividades fueron de bajas a moderadas para las líneas celulares PC-3, K562 y SKLU-1, no observando cambios significativos. Sin embargo, cabe destacar el hecho de que el ligando HL2 y sus derivados metálicos no mostraron actividad frente a la línea celular sana (COS-7), revelando así la mejor especificidad de los derivados lantánidos de HL2. Con base en lo anterior, se pueden elegir potenciales dianas que interactúen con este tipo de compuestos de bencimidazol para comprender mejor dicha selectividad. Por ejemplo, en un estudio anterior, el imidazol triaril sustituido sirvió como un

ligando telomérico G-cuádruplex que altera el mantenimiento de los telómeros, un evento crucial para el potencial proliferativo ilimitado de las células cancerosas; también se ha demostrado que pueden estar involucrados enlaces de hidrógeno en la región bencimidazol del ligando, lo que puede estar relacionado con mecanismos que involucran la inhibición de la ADN-topoisomerasa I humana, un proceso bien conocido que ocurre con derivados de bencimidazol⁴⁵. Otro objetivo selectivo puede ser la membrana celular de las células tumorales, ya que contiene fosfatidilserina, un fosfolípido aniónico, que se encuentra solo en la valva de la membrana externa de las células tumorales. Por tanto, la superficie de la membrana de la célula cancerosa podría atraer electrostáticamente de forma selectiva al ligando cuando está cargado positivamente en un estado de equilibrio ceto-enólico.

3.2 Actividad antiparasitaria

La leishmaniasis, la tripanosomiasis y la malaria son enfermedades infecciosas causadas por parásitos que afectan principalmente a poblaciones de escasos recursos y con limitado acceso a los servicios de salud. La lucha por combatir este tipo de enfermedades ha sido un reto para la comunidad científica debido a la falta de apoyo en el desarrollo de proyectos que permita encontrar fármacos más efectivos y que generen menos efectos adversos, solo en los últimos años se ha logrado impulsar fuertemente la búsqueda de moléculas alternativas que presenten actividad antiparasitaria, siempre iniciando con los estudios *in vitro*.

Para realizar los estudios de actividad antiparasitaria de los compuestos sintetizados frente a cepas de *L. braziliensis*, *T. cruzi* y *P. falciparum*, se inició determinando la actividad citotóxica de los compuestos con base en la viabilidad de la línea celular promonocítica humana U-937 (ATCC CRL-1593.2TM) utilizando el micro-método enzimático MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)⁴⁶, así como la determinación de la citotoxicidad sobre eritrocitos extraídos de sangre humana. Se utilizó el método probabilístico probit para expresar los resultados como concentración letal al 50% (CL₅₀)⁴⁷. La tabla 3 presenta los valores de CL₅₀ obtenidos de los estudios de citotoxicidad, encontrando que todos los complejos presentaron menor toxicidad hacia la línea celular U-937 en comparación con los ligandos, y que la concentración máxima evaluada

(200 µg/mL) no conduce a la muerte celular de al menos el 50% de los eritrocitos. Para el caso de la actividad antiparasitaria, los resultados fueron expresados como la concentración efectiva media (CE₅₀) la cual indica la concentración a la cual el 50% de los organismos presentan algún efecto ante la exposición de un compuesto.

Tabla 3. Actividades antiparasitarias y citotóxicas *in vitro* de ligandos aminofenilbencimidazol y sus complejos de La(III), Ce(III) y Sm(III)*.

Compuesto	Citotoxicidad				Actividad antiparasitaria								
	Células U-937		Eritrocitos		Anti- <i>L. braziliensis</i> ^a			Anti- <i>T. cruzi</i> ^b			Anti- <i>P. falciparum</i> ^c		
	CL ₅₀	DE	CL ₅₀	DE	CE ₅₀	DE	IS	CE ₅₀	DE	IS	CE ₅₀	DE	IS
HL1	16.63	3.49	>200	NA	>8	NA	<2.08	26.50	3.34	0.63	14.54	0.93	>13.76
La-L1	41.66	15.37	>200	NA	>20	NA	<2.08	51.26	7.07	0.81	13.72	0.96	>14.58
Ce-L1	27.51	2.24	>200	NA	21.07	4.28	1.31	>14	NA	<1.97	14.30	1.68	>13.99
Sm-L1	22.13	1.12	>200	NA	95.65	28.48	0.23	8.09	1.17	2.74	15.17	0.15	>13.18
HL2	16.26	4.59	>200	NA	>30	NA	<0.54	36.68	2.19	0.44	12.58	1.13	>15.90
La-L2	23.00	5.26	>200	NA	35.23	5.38	0.65	>12	NA	<1.92	12.57	0.99	>15.91
Ce-L2	48.99	5.28	>200	NA	25.80	3.88	1.90	127.55	18.11	0.38	13.39	0.35	>14.94
Sm-L2	18.56	4.63	>200	NA	>10	NA	<1.86	5.56	0.35	3.34	16.36	0.36	>12.22
Anfotericina B	36.5	2.8	ND	ND	0.31	0.08	456.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benznidazol	>200	NA	ND	ND	ND	ND	ND	11.89	3.30	>16.8	ND	ND	ND
Cloroquina	ND	ND	>200	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.003	>200

*Resultados expresados en µg/mL. DE = Desviación Estándar; IS = Índice de Selectividad; NA = No Aplica; ND = No Determinado. La inhibición de células U-937 o parásitos fue determinada por citometría de flujo⁴⁸ para amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, por fluorometría para todas las formas de *P. falciparum* y por el método colorimétrico de la β-galactosidasa para amastigotes intracelulares de *T. cruzi*; controles: ^aAnfotericina B, ^bBenznidazol, y ^cCloroquina.

Los resultados de la actividad leishmanicida *in vitro* mostraron que, en la mayoría de los casos, la CE₅₀ fue similar o mayor a la CL₅₀, por lo que se podrían clasificar en general como bajamente activos contra *L. braziliensis*, sin embargo, al realizar comparaciones entre las series de compuestos se puede observar que ambos complejos de cerio presentan concentraciones efectivas menores a las concentraciones citotóxicas, encontrando así un comportamiento selectivo para este ion, lo cual concuerda con resultados previos de nuestro

grupo de investigación con complejos que contienen Ce(III)⁴⁶, en donde se evidenció que los complejos con cerio inhiben significativamente el crecimiento de parásitos de *Leishmania* en comparación con complejos similares con otros iones lantánidos, sugiriendo que la actividad de los compuestos de cerio podría estar asociada a procesos redox, en donde puede aumentar el estrés oxidativo intracelular al variar fácilmente su estado de oxidación de III a IV, logrando afectar el metabolismo redox del parásito⁴⁹. Los resultados de la actividad tripanocida muestran que los complejos de Sm(III) son los más activos frente a *T. cruzi*, con los índices de selectividad más altos (IS = 2.74 y 3.34 para Sm-L1 y Sm-L2 respectivamente), lo que indica una clara relación entre la naturaleza del ion metálico y su actividad biológica, la cual podría estar relacionada con la capacidad de generar estrés oxidativo e inducir roturas de ADN según estudios de actividad antiparasitaria de otros complejos con samario⁵⁰. En cuanto a la actividad antiplasmodial, todos los compuestos examinados mostraron una concentración efectiva inferior a 20 µg/mL, lo que los clasificaría como compuestos altamente activos⁵¹, sin especificidad del tipo de ligando o ion metálico. En general, los resultados de actividad antiparasitaria no mostraron un comportamiento relacionado con la posición del grupo sustituyente -NH₂ de los ligandos, por lo que la acción de los compuestos depende en gran medida de la presencia y tipo de ion metálico.

3.3 Actividad antibacteriana

La búsqueda de nuevos agentes antibacterianos ha aumentado en los últimos años debido al crecimiento de la resistencia que generan las bacterias hacia los fármacos de primera línea. Para la química medicinal, es necesario continuar con investigaciones que permitan conocer las propiedades antibacterianas de posibles moléculas terapéuticas de origen natural o sintético, por lo que para los estudios iniciales se recomienda la evaluación *in vitro* por métodos de difusión o métodos de dilución (micro o macrodilución). La actividad antibacteriana *in vitro* de los ligandos aminofenilbencimidazólicos y sus complejos, fue determinada empleando el método de microdilución en caldo^{52,53}, contra dos bacterias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 19115) y dos bacterias Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27583). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se presentan en la figura 7, en donde se observa que los ligandos (HL1 y

HL2) y sus complejos de lantánidos fueron inactivos frente a *P. aeruginosa*, sugiriendo una pronunciada resistencia a la acción antibacteriana de esta serie de compuestos a las concentraciones ensayadas, lo que concuerda con reportes anteriores donde se ha encontrado que esta bacteria presenta una mayor resistencia a los antibióticos^{54,55}. Con respecto a *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*, los valores de CMI obtenidos para el ligando HL2 y sus complejos de lantánidos fueron inferiores a los obtenidos a partir del ligando HL1 y sus complejos. La notable actividad del ligando HL2 y sus complejos lantánidos puede surgir de la posición del grupo sustituyente -NH₂ en el anillo fenólico, que puede desempeñar un papel importante en el comportamiento biológico de los compuestos.

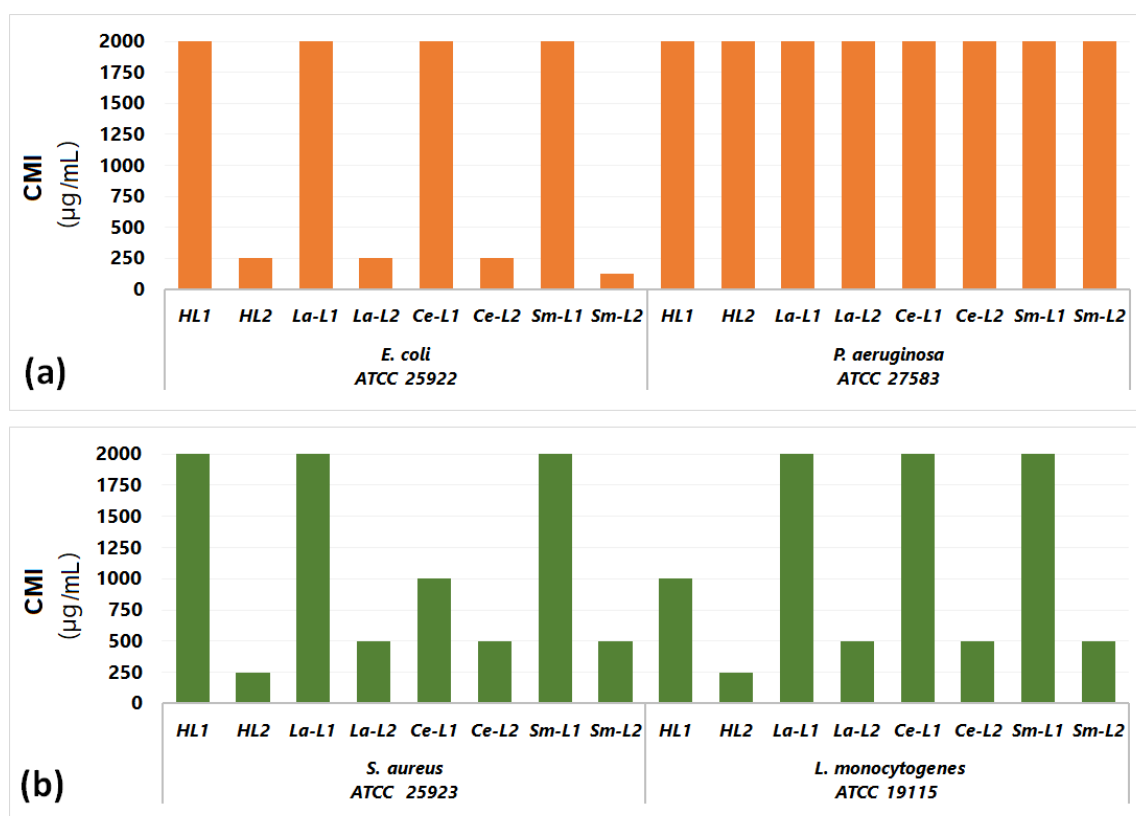


Figura 7. Concentraciones mínimas inhibitorias encontradas para la serie de compuestos en ensayos antibacterianos (µg/mL): (a) cepas Gram-negativas; (b) cepas Gram-positivas.

Los valores de la CMI obtenidos para las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas son evidencia de la amplia actividad antibacteriana de los compuestos sintetizados. Curiosamente, para el análisis con cepas Gram-positivas, la presencia del metal disminuye el efecto bacteriostático en comparación con el ligando, mientras que para *E. coli* se observaron los mismos valores de CMI, siendo el complejo Sm-L2 el único que presenta un valor menor (125 µg/mL). Por lo tanto, se puede sugerir que la coordinación del metal con el ligando inhibe parcialmente la actividad antibacteriana del ligando libre, pues la coordinación por parte del grupo -OH del aminofenol disminuye la posibilidad de participación de este grupo en la formación de enlaces de hidrógeno para la interacción con membranas bacterianas. Mientras que, la disminución en el valor de la CMI para Sm-L2 podría racionalizarse en términos de las moléculas de agua y metanol presentes en la esfera de coordinación interna y externa del complejo, lo cual podría mejorar su solubilidad en medios fisiológicos y así su biodisponibilidad, aumentando finalmente su actividad.

Los estudios de estabilidad de los complejos en el medio de cultivo (Caldo Mueller Hinton, CMH) se realizaron controlando los cambios en los espectros de absorción electrónica a diferentes concentraciones y tiempos de interacción. La espectroscopía UV-Vis es uno de los métodos más utilizados para determinar las constantes de unión y la estabilidad de los sistemas porque es un método simple y fácil de entender para monitorear la formación o descomposición de complejos^{56,57}. Para comparar los resultados de estabilidad de los complejos, con respecto al tiempo, se determinaron las constantes de estabilidad al inicio del ensayo y 24 h después de la interacción compuesto-medio de cultivo. Se siguió la banda de absorción a 340 nm y 330 nm, para los complejos de las series Ln-L1 y Ln-L2, respectivamente, y se observó un aumento constante en la intensidad a medida que aumentaban las concentraciones de cada complejo (ver figura 8 y sección de anexos: figuras A64-A66).

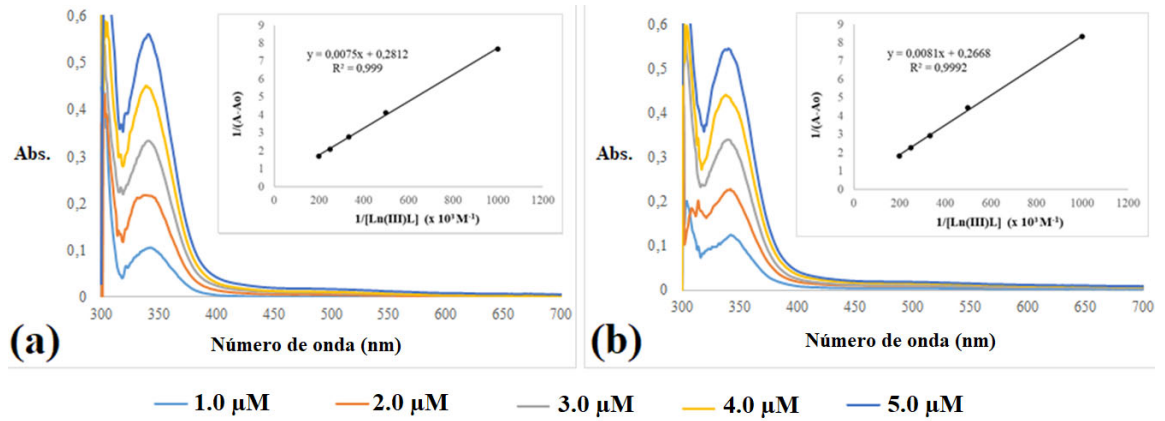
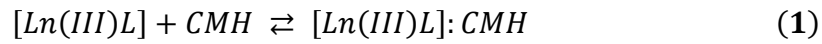


Figura 8. Espectros de absorción del complejo Sm-L1 a diferentes concentraciones (1.0 a 5.0 μM) en medio CMH y el gráfico recíproco doble de $1/(A-A_0)$ vs. $1/[\text{Sm-L1}]$ (a) en el inicio del experimento (b) después de 24 h de interacción.

Estos estudios se basaron en la metodología sugerida por la literatura para la determinación de las constantes de unión⁵⁸, asumiendo un tipo de interacción entre los complejos y los medios:



$$K = \frac{[[\text{Ln(III)L}]:\text{CMH}]}{[\text{Ln(III)L}][\text{CMH}]} \quad (2)$$

donde Ln(III)L es cada complejo (La(III) , Ce(III) o Sm(III)) y K es la constante de estabilidad condicional para el complejo en el medio de cultivo. Suponiendo $[[\text{Ln(III)L}]:\text{CMH}] = C_B$:

$$K = \frac{C_B}{(C_{[\text{Ln(III)L}]} - C_B)(C_{\text{CMH}} - C_B)} \quad (3)$$

donde $C_{[\text{Ln(III)L}]}$ y C_{CMH} son las concentraciones analíticas de complejos y medio, respectivamente. De acuerdo con la ley de Beer-Lambert:

$$C_{CMH} = \frac{A_o}{\varepsilon_{CMH} \cdot l} \quad (4)$$

$$C_B = \frac{A - A_o}{\varepsilon_B \cdot l} \quad (5)$$

donde A_o = absorbancia del medio CMH en ausencia de los complejos lantánidos, y A = absorbancia del medio CMH en presencia de los complejos lantánidos. ε_{CMH} es el coeficiente de extinción molar para el medio CMH sin complejo, ε_B es el coeficiente de extinción molar para el medio con complejo, y l es la trayectoria de la luz de la cubeta (1 cm). Reemplazando las Ecs. (4) y (5) en la Ec. (3), se puede deducir la Ec. (6):⁵⁶

$$\frac{A_o}{A - A_o} = \frac{\varepsilon_{CMH}}{\varepsilon_{[Ln(III)L]}} + \frac{\varepsilon_{CMH}}{\varepsilon_{[Ln(III)L]} \cdot K} \cdot \frac{1}{C_{[Ln(III)L]}} \quad (6)$$

La constante de estabilidad (K) se puede obtener del gráfico lineal recíproco doble, mediante la relación entre la pendiente y la intersección. Los valores de absorción y las constantes de estabilidad se reportan en la tabla 4. Los resultados encontrados al inicio del experimento fueron similares a los que se encontraron luego de 24 h de interacción con cada complejo en el medio de cultivo, sugiriendo que estos complejos de lantánidos son estables en Caldo Mueller Hinton y que la actividad biológica no depende de la interacción entre el compuesto y el medio, sino que depende de la estructura y propiedades de las moléculas.

Tabla 4. Valores de absorción (A) obtenidos para los complejos lantánidos a diferentes concentraciones ($\lambda = 330$ o 340 nm) y constantes de estabilidad en medio CMH al inicio del experimento y después de 24 horas.

Concentración [μ M]	La-L1		La-L2		Ce-L1		Ce-L2		Sm-L1		Sm-L2	
	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
1.0	0.1992	0.1980	0.4362	0.5542	0.1526	0.1838	0.1963	0.2141	0.1048	0.1199	0.2562	0.2897
2.0	0.3923	0.3829	0.8409	0.9483	0.3317	0.3634	0.3990	0.4028	0.2166	0.2247	0.4748	0.5517
3.0	0.5995	0.5580	1.2763	1.2763	0.4968	0.5188	0.6075	0.5980	0.3327	0.3390	0.7272	0.7882
4.0	0.8297	0.7394	1.5980	1.4708	0.6993	0.6963	0.7951	0.7930	0.4491	0.4371	0.9871	1.0198
5.0	1.0291	0.9252	1.7367	1.6156	0.8831	0.8487	0.9527	1.0410	0.5583	0.5441	1.2376	1.3005
Constante, K $\times 10^4$ [M^{-1}]	8.37	8.91	9.24	9.90	4.51	4.38	2.95	3.53	3.75	3.29	3.55	3.59

3.4 Morfología bacteriana por espectroscopía de fluorescencia

Dadas las propiedades fluorescentes que se han reportado para estos ligandos aminofenilbencimidazol, se procedió a realizar estudios de la morfología bacteriana por espectroscopía de fluorescencia para evaluar, por un lado, la potencial aplicación de los compuestos como biomarcadores de membranas bacterianas, y, por otro lado, si estos compuestos pueden generar efectos diferentes al bacteriostático o al bactericida. La marcación se realizó sobre bacterias de *E. coli* (ATCC 25922), siguiendo el procedimiento recomendado en la literatura⁵⁹. Todos los compuestos mostraron fluorescencia cuando sus soluciones etanólicas se expusieron a luz ultravioleta con lámpara ($\lambda = 365$ nm) y se verificó por espectroscopía UV-Vis, luego se procedió a obtener los espectros de fluorescencia. Los espectros UV-Visible fueron tomados en el rango de longitud de onda de 200 a 800 nm y posteriormente se utilizaron para determinar la longitud de onda de excitación. Se determinó que los experimentos de fluorescencia deberían realizarse a una excitación fija de 343 nm, ya que se esperaba una fuerte absorción para todos los compuestos a esta longitud de onda. Para el estudio de epifluorescencia, también se utilizó una longitud de onda de excitación fija. El espectro UV-Visible para HL2 y los espectros de fluorescencia para toda la serie de ligandos y complejos se presentan en la figura 9.

Los espectros de absorción electrónica de HL1 y HL2 muestran una banda ancha a aproximadamente 343 nm, que corresponden a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del sistema conjugado en el ligando, y se desplazó a longitudes de onda más altas (desplazamiento al rojo) tras la complejación. La aparición de desplazamientos al rojo para los complejos de lantánidos indica una disminución de los correspondientes estados de energía (HOMO-LUMO) en los niveles de energía electrónica de los ligandos como resultado de la quelación⁴⁶. Además, se tomaron espectros de fluorescencia a la misma concentración (μM) para cada compuesto en etanol a una longitud de onda de excitación de 343 nm, encontrando bandas de emisión máxima a $\lambda = 424$ nm para los complejos que incluyen el ligando HL1 y a $\lambda = 365$ nm para la serie de complejos que tienen ligando HL2. Es de destacar el hecho de que las intensidades de las bandas aumentaron con la presencia de los iones lantánidos, confirmando el efecto potenciador esperado tras la quelación.

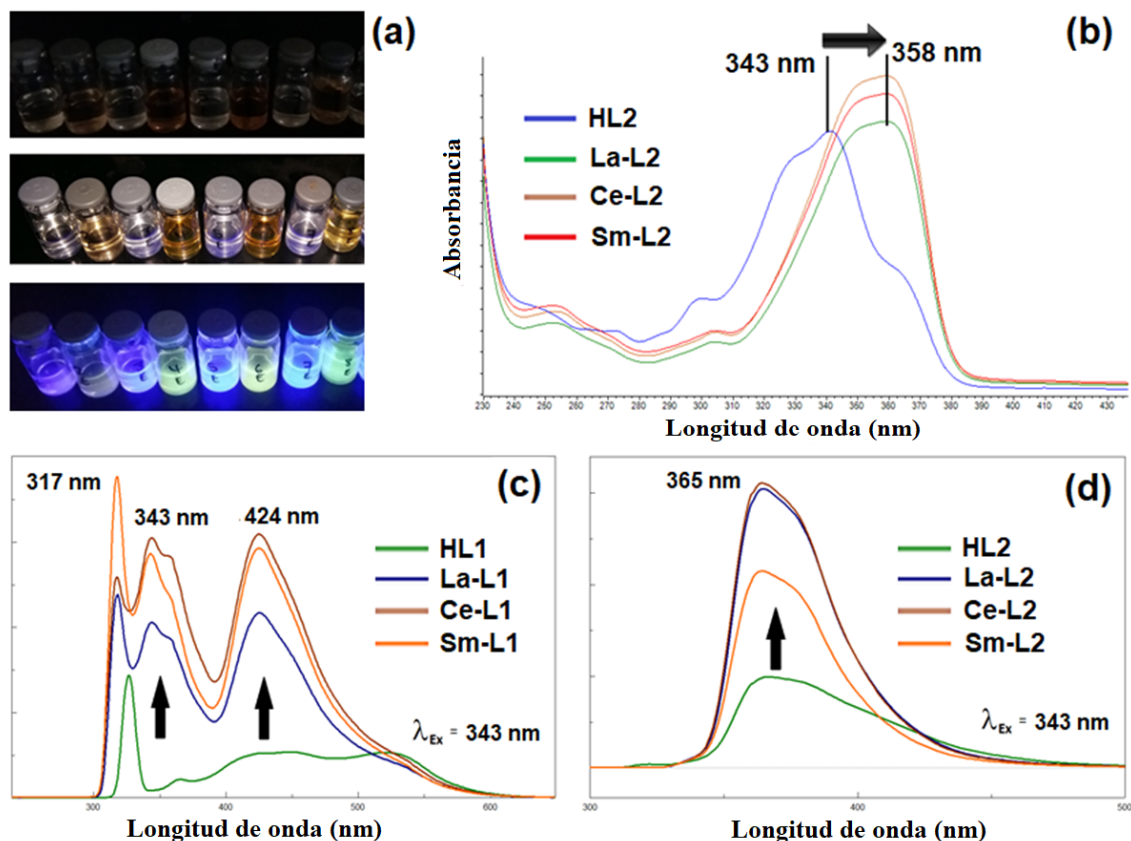


Figura 9. Estudios de fluorescencia: (a) serie de compuestos disueltos en etanol, en ausencia de luz (arriba), en presencia de luz normal (media) y bajo luz ultravioleta con $\lambda = 365$ nm (abajo); (b) Espectros UV-Visibles para el ligando HL2 y sus complejos de La(III), Ce(III) y Sm(III); (c) espectros de emisión (a $\lambda_{\text{Ex}} = 343$ nm) del ligando HL1 y sus complejos; (d) espectros de emisión (a $\lambda_{\text{Ex}} = 343$ nm) del ligando HL2 y sus complejos.

A partir de los espectros de fluorescencia, se encuentra que para el ligando HL1 y sus complejos, el rango de longitud de onda donde se produce la emisión alcanza casi hasta 600 nm, mientras que para HL2 y sus complejos, el rango de emisión es cercano a 450 nm. Debido a esto, se estudió la epifluorescencia en *E. coli* utilizando filtros Azul (B-1) y Verde (G-1) que emiten a 450 y 535 nm, respectivamente. Ambos filtros se utilizaron para obtener imágenes con el complejo La-L1 a 125 $\mu\text{g/mL}$ (concentración por debajo de la CMI). La figura 10 (arriba) presenta las imágenes comparativas utilizando los dos filtros, donde es posible observar la morfología de un bacilo a 100X.

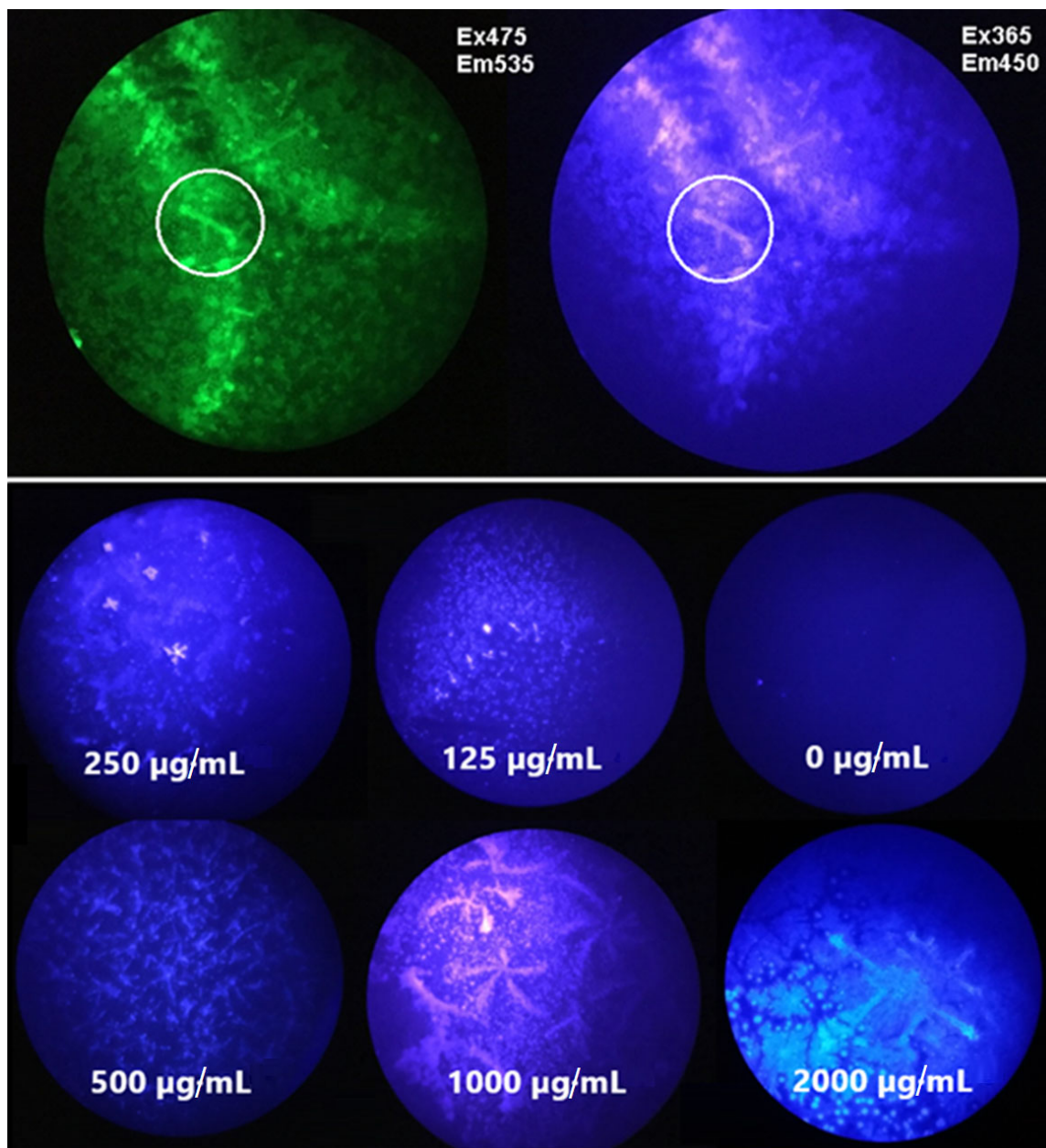


Figura 10. Imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia sobre *E. coli*: contraste con dos filtros de microscopio (azul y verde) para *E. coli* utilizando una solución de compuesto La-L1 a una concentración de 125 µg/mL (arriba) y el efecto sobre la morfología bacteriana al incrementar la concentración de HL1 (abajo).

Con el fin de mejorar la definición en la imagen para apreciar el efecto antibacteriano de la serie de compuestos evaluados, se obtuvieron imágenes de 40X con un filtro azul para el medio bacteriano utilizando diferentes concentraciones de ligando HL1. En la Figura 10 (abajo) se puede observar que, en ausencia del compuesto, no es posible identificar ningún bacilo de *E. coli*, mientras que a concentraciones bajas como 125 µg/mL, se pueden observar claramente unidades de bacilo marcadas. Sin embargo, a una concentración de 250 µg/mL, comienza a observarse aglomeración y elongación del bacilo, fenómeno que aumenta con la concentración, hasta un máximo de concentración de 2000 µg/mL, donde la morfología de la bacteria es muy afectada, lo que sugiere que la inhibición del crecimiento podría ocurrir debido a efectos genotóxicos, epigenéticos⁶⁰ o alteraciones en la membrana⁶¹. Estos resultados motivaron la realización de nuevos estudios para evaluar el efecto de los compuestos sobre la integridad de la membrana bacteriana.

Los sitios de transferencia de protones intramoleculares en estado excitado (ESIPT por sus siglas en inglés) de los ligandos, explican la capacidad de los compuestos para actuar como fluorocromos en la obtención de imágenes por microscopía de epifluorescencia, el uso de ligandos similares para el análisis morfológico de hongos⁶² y de la monocapa confluyente de células madre humanas (tejido) han sido reportados con resultados comparables a DAPI⁶³. Dado que las imágenes de microscopía de fluorescencia permitieron la observación de la morfología de los bacilos de *E. coli*, podemos concluir que tanto los ligandos como la serie de complejos pueden servir como posibles biomarcadores de la membrana bacteriana. Esta afirmación está respaldada por estudios de dinámica molecular que se presentan en el capítulo III del presente documento, a partir de los cuales se encontró que existe un mecanismo de inserción de membrana en el que el fragmento bencimidazol del ligando permanece en la región hidrófoba de la membrana. Además, se encontró que, de cuatro ligandos que interaccionan en la superficie de una membrana simulada por 10 ns, sólo uno logra ingresar completamente a la membrana, mientras que los otros tres permanecen anclados a la superficie de la membrana.

4. Conclusiones

Seis nuevos complejos lantánidos (La^{3+} , Ce^{3+} , Sm^{3+}) con ligandos aromáticos del tipo aminofenilbencimidazol fueron sintetizados y caracterizados estructuralmente mediante análisis elemental, espectroscopía de RMN, EPR e IR, medidas de conductancia molar y espectrometría de masas. Los datos espectroscópicos sugieren que los ligandos de bencimidazolil-fenol actúan como ligandos N,O-quelatos a través de los átomos de nitrógeno imínico (imidazol) y del oxígeno fenólico. El análisis elemental y de masas indicó que los compuestos lantánidos se formaron en una estequiometría 1:2 (metal:ligando). La evaluación biológica *in vitro* frente a seis líneas celulares tumorales humanas (U251, glioblastoma humano; HCT-15, carcinoma colorrectal; MCF-7, adenocarcinoma epitelial de mama; PC-3, cáncer de próstata; K562, leucemia mielógena; SKLU-1, carcinoma de pulmón), demostró que los complejos metálicos presentan una actividad antiproliferativa moderada con porcentajes de inhibición superiores a los ligandos libres. Además, estos compuestos presentaron menor toxicidad contra una línea celular no cancerosa (COS-7, riñón de mono). Este estudio permitió comprobar un efecto sinérgico entre los centros metálicos y los ligandos orgánicos. En la determinación de la actividad antiparasitaria, los estudios demostraron baja citotoxicidad para los compuestos frente a células U-937 y eritrocitos, poca efectividad frente a *L. braziliensis* y alta actividad contra *P. falciparum*, mientras que la actividad tripanocida estuvo asociada a la naturaleza del ion metálico, obteniendo mejores resultados para los complejos de Sm(III). Respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana los compuestos resultaron ser, en general, más activos frente a las cepas Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 19115) que frente a las cepas Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27583), por lo que su actividad antibacteriana podría estar relacionada con mecanismos que involucren su interacción con las membranas, tal y como se demuestra en los estudios posteriores; además, la notable actividad antibacteriana de los compuestos de la serie L2 estaría relacionada con la posición del grupo sustituyente - NH_2 en el anillo fenólico del ligando, atribuyendo mejores resultados para posición 1,3 (amino-fenol) con relación a la posición 1,4. Finalmente, en los estudios de morfología bacteriana por espectroscopía de fluorescencia, se encontró que tanto los ligandos como los complejos pueden servir como posibles biomarcadores de las membranas de bacterias.

5. Referencias

1. Alamgir, M.; Black, D.S.C.; Kumar, N. Synthesis, Reactivity and Biological Activity of Benzimidazoles. In *Bioactive Heterocycles III. Topics in Heterocyclic Chemistry*. Berlín: Springer. **2007**, 9, 87.
2. Verdasco, G.; Martin, M.A.; Del Castillo, B.; Lopez-Alvarado, P.; Melendez, J.C. Solvent effects on the fluorescent emission of some new benzimidazole derivatives. *Anal. Chim. Acta*. **1994**, 303, 73.
3. Shehab, O.R.; Mansour, A. M. Exploring electronic structure, and substituent effect of some biologically active benzimidazole derivatives: Experimental insights and DFT calculations. *J. Mol. Struct.* **2021**, 1223, 128996.
4. Horak, E.; Vianello, R.; Steinberg, I. M. Optical Sensing (Nano)Materials Based on Benzimidazole Derivatives. In *Chemistry and Applications of Benzimidazole and its Derivatives*. London: IntechOpen. **2019**, 10.5772/intechopen.85643.
5. Hranjec, M.; Pavlovic, G.; Marjanovic, M.; Kralj, M.; Karminski-Zamola, G. Benzimidazole derivatives related to 2,3-acrylonitriles, benzimidazo[1,2-a]quinolines and fluorenes: synthesis, antitumor evaluation in vitro and crystal structure determination. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 2405.
6. Jimenez-Juarez, R.; Cruz-Chavez, W.; de Jesus-Ramirez, N.; Castro-Ramirez, G.I.; Uribe-Gonzalez, I.; Martinez-Mejia, G.; Ruiz-Nicolas, R.; Aguirre-Alvarado, C.; Castrejon-Jimenez, N.S.; Garcia-Perez, B.E. Synthesis and antimycobacterial activity of 2,5-disubstituted and 1,2,5-trisubstituted benzimidazoles. *Front. Chem.* **2020**, 8, 433.
7. Gao, C.; Li, B.; Zhang, B.; Sun, Q.; Li, L.; Li, X.; Chen, C.; Tan, C.; Liu, H.; Jiang, Y. Synthesis and biological evaluation of benzimidazole acridine derivatives as potential DNA-binding and apoptosis-inducing agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 1800.
8. Lombardy, R.L.; Tanious, F.A.; Tidwell, K.R.R.R.; Wilson, W.D. Synthesis and DNA Interactions of Benzimidazole Dications Which Have Activity against Opportunistic Infections. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1452.
9. Acar Cevik, U.; Saglik, B.N.; Osmaniye, D.; Levent, S.; Kaya Cavusoglu, B.; Karaduman, A.B.; Atlid, O.; Atli Eklioglu, O.; Kaplancikli, Z.A. Synthesis, anticancer

- evaluation and molecular docking studies of new benzimidazole-1,3,4-oxadiazole derivatives as human topoisomerase types I poison. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 1657.
10. Sameut, A.; Zannoudouche, S.Y.; Boumaza, C.; Dikes, C.; Ziani, B.E.C. Chemical Synthesis and Hemi-Synthesis of Novel Benzimidazole Derivatives Using Microwave-Assisted Process: Chemical Characterization, Bioactivities and Molecular Docking. *Chem. Proc.* **2020**, *3*, 71.
 11. Huang, X.; Wu, Y.; Huang, Y.; Liu, Q.; Chen, H.; Dai, F.; Liang, F.; Gan, C. Studies on apoptosis induced by B-norcholesteryl benzimidazole compounds in HeLa cells. *Steroids*. **2021**, *168*, 108802.
 12. Tahlan, S.; Kumar, S.; Narasimhan, B. Antimicrobial potential of 1*H*-benzo[d]imidazole scaffold: a review. *BMC Chem.* **2019**, *13*, 18.
 13. Rajasekhar, S.; Maiti, B.; M. Balamurali, M.; Chanda, K. Synthesis and Medicinal Applications of Benzimidazoles: An Overview. *Curr. Org. Synth.* **2016**, *14* (1), 40.
 14. Paison, F.; Pan, B.; Pan, D.; Yan, T.; Wu, J. The Study of Biological Activities of Various Mixed.pdf. *Austin Biochem.* **2020**, *5*, 1.
 15. Kuznetsov, A. E. Introductory Chapter: Azoles, Their Importance, and Applications. In *Azoles - Synthesis, Properties, Applications and Perspectives*. London: IntechOpen, **2020**, 10.5772/intechopen.87765.
 16. Manjuraj, T.; Krishnamurthy, G.; Bodke, Y.D.; Naik, H.S.B.; Anil Kumar, H.S., Synthesis, XRD, thermal, spectroscopic studies and biological evaluation of Co(II), Ni(II) Cu(II) metal complexes derived from 2-benzimidazole. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1171*, 481.
 17. Hernández-Romero, D.; Rosete-Luna, S.; López-Monteon, A.; Chávez-Piña, A.; Pérez-Hernández, N.; Marroquín-Flores, J.; Cruz-Navarro, A.; Pesado-Gómez, G.; Morales-Morales, D.; Colorado-Peralta, R. First-row transition metal compounds containing benzimidazole ligands: An overview of their anticancer and antitumor activity. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *439*, 213930.

18. Hussain, A.; AlAjmi, M.F.; Rehman, M.T.; Khan, A.A.; Shaikh, P.A.; Khan, R.A. Evaluation of Transition Metal Complexes of Benzimidazole-Derived Scaffold as Promising Anticancer Chemotherapeutics. *Molecules* **2018**, *23*, 1232.
19. Kumaravel, G.; Ponnukalai, P.U.; Mahendiran, D.; Raman, N. Exploring the DNA interactions, FGF growth receptor interaction and biological screening of metal(II) complexes of NNN donor ligand derived from 2(aminomethyl)benzimidazole. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *126*, 1303.
20. Liu, H.; Zhang, B.; Tan, C.; Liu, F.; Cao, J.; Tan, Y.; Jiang, Y. Simultaneous bioimaging recognition of Al(3+) and Cu(2+) in living-cell, and further detection of F(-) and S(2-) by a simple fluorogenic benzimidazole-based chemosensor. *Talanta* **2016**, *161*, 309.
21. Fricker, S.P. The therapeutic application of lanthanides. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 524.
22. Cotruvo, J.A., Jr. The Chemistry of Lanthanides in Biology: Recent Discoveries, Emerging Principles, and Technological Applications. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 1496.
23. Cheng, Z.; Yin, Q.; Wu, H.; He, T.; Luo, L.; Liu, X. Regulating Cu(II)-benzimidazole coordination structure in rigid-rod aramid fiber and its composites enhancement effects. *Compos. Sci. Technol.* **2019**, *184*, 107837.
24. Rani, V.; Singh, H.B.; Butcher, R.J. Synthesis and structure of the mercury chloride complex of 2,20-(2-bromo-5-tert-butyl-1,3-phenyl-ene)bis-(1-methyl-1Hbenzimidazole). *Acta Crystallogr. Sect. E Crystallogr. Commun.* **2017**, *73*, 341.
25. Tong, Y.P.; Zheng, S.L.; Chen, X.M. Syntheses, structures, photoluminescence and theoretical studies of two dimeric Zn(II) compounds with aromatic N,O-chelate phenolic ligands. *J. Mol. Struct.* **2007**, *826*, 104.
26. Tong, Y.P.; Zheng, S.L.; Chen, X.M. Syntheses, structures, photoluminescence, and theoretical studies of a class of beryllium(II) compounds of aromatic N,O-chelate ligands. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 4270.
27. Hussain, A.; AlAjmi, M.F.; Rehman, M.T.; Amir, S.; Husain, F.M.; Alsalme, A.; Siddiqui, M.A.; AlKhedhairi, A.A.; Khan, R.A. Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: in vitro and in vivo studies. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1.

28. Hernández-Morales, A.; Rivera, J.M.; López-Monteon, A.; Lagunes-Castro, S.; Castillo-Blum, S.; Cureño-Hernández, K.; Flores-Parra, A.; Villaseñor-Granados, O.; Colorado-Peralta, R. Complexes containing benzimidazolyl-phenol ligands and Ln(III) ions: synthesis, spectroscopic studies and preliminary cytotoxicity evaluation. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *201*, 110842.
29. Tong, Y.P.; Zheng, S.L.; Chen, X.M. Structures, photoluminescence and theoretical studies of two Zn II complexes with substituted 2-(2-hydroxyphenyl) benzimidazoles. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005*, 3734.
30. Bansal, Y.; Kaur, M.; Silakari, O. Benzimidazole-ibuprofen/mesalamine conjugates: potential candidates for multifactorial diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *89*, 671.
31. Holler, M.G.; Campo, L.F.; Brandelli, A.; Stefani, V. Synthesis and spectroscopic characterisation of 2-(20-hydroxyphenyl)benzazole isothiocyanates as new fluorescent probes for proteins. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **2002**, *149*, 217.
32. Ain, Q.; Pandey, S.K.; Pandey, O.P.; Sengupta, S.K. Synthesis, spectroscopic, thermal and antimicrobial studies of neodymium(III) and samarium(III) complexes derived from tetradentate ligands containing N and S donor atoms. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2015**, *140*, 27.
33. Xia, Q.; Cui, Y.; Yuan, D.; Wang, Y.; Yao, Y. Synthesis and characterization of lanthanide complexes stabilized by N-aryl substituted β -ketoiminato ligands and their application in the polymerization of rac-lactide. *J. Organomet. Chem.* **2017**, *846*, 161.
34. Boskovic, P.; Sokol, V.; Tomas, R.; Prkic, A. Conductometric study of potassium chloride in ethanol-water mixtures. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 10961.
35. Geary, W.J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coord. Chem. Rev.* **1971**, *7*, 81.
36. Abood, N.A.; AL-Askari, M.; Saeed, B.A. Structures and vibrational frequencies of Imidazole, benzimidazole and its 2-alkyl derivatives determined by DFT Calculations. *Basrah J. Sci.* **2012**, *30*, 119.
37. Padalkar, V.S.; Patil, V.S.; Gupta, V.D.; Phatangare, K.R.; Umapé, P.G.; Sekar, N. Synthesis, characterization, thermal properties, and antimicrobial activities of

- 5-(Diethylamino)-2-(5-nitro-1*H*-benzimidazol-2-yl)phenol and its transition metal complexes. *ISRN Org. Chem.* **2011**, 2011, 1.
38. Karunakaran, C.; Balamurugan, M. Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. In *Spin Resonance Spectroscopy*. Oxford: Elsevier. **2018**, 169.
 39. Gudasi, K.B.; Shenoy, R.V.; Vadavi, R.S.; Patil, M.S.; Patil, S.A.; Hanchinal, R.R.; Desai, S.A.; Lohithaswa, H. Lanthanide(III) and yttrium(III) complexes of benzimidazole-2-acetic acid: synthesis, characterisation and effect of La(III) complex on germination of wheat. *Bioinorgan. Chem. Appl.* **2006**, 2006, 1.
 40. Dunbar, T.D.; Warren, W.L.; Tuttle, B.A.; Randall, C.A.; Tsur, Y. Electron paramagnetic resonance investigations of lanthanide-doped barium titanate: Dopant site occupancy. *J. Phys. Chem. B.* **2004**, 108, 908.
 41. Ortu, F.; Zhu, H.; Boulon, M.E.; Mills, D.P. Synthesis and reactivity of a cerium(III) scorpionate complex containing a redox non-innocent 2,2'-bipyridine ligand. *Inorganics.* **2015**, 3, 534.
 42. Bencini, A.; Benelli, C.; Caneschi, A.; Carlin, R.L.; Dei, A.; Gatteschi, D. Crystal and molecular structure of and magnetic Coupling in two complexes containing Gadolinium(III) and Copper(II) ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 8128.
 43. George, G.N.; Prince, R.C.; Bare, R.E. Electron paramagnetic resonance spectroscopy of the iron-molybdenum Cofactor of *Clostridium pasteurianum* Nitrogenase. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 434.
 44. Liu, Y.; Grimm, M.; Dai, W.T.; Hou, M.C.; Xiao, Z.X.; Cao, Y. CB-Dock: A web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, 41, 138.
 45. Blaszcak-Swiatkiewicz, K.; Mirowski, M.; Kaplinska, K.; Kruszynski, R.; Trzesowska-Kruszynska, A.; Mikiciuk-Olasik, E. New benzimidazole derivatives with potential cytotoxic activity - study of their stability by RP-HPLC. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, 59, 279.
 46. Aragón-Muriel, A.; Upegui, Y.; Muñoz, J.A.; Robledo, S.M.; Polo-Cerón, D. Synthesis, characterization and biological evaluation of rare earth complexes against tropical diseases Leishmaniasis, Malaria and Trypanosomiasis. *Av. Quim.* **2016**, 11, 53.

47. Otero, E.; Vergara, S.; Robledo, S.M.; Cardona, W.; Carda, M.; Vélez, I.D.; Rojas, C.; Otálvaro, F. Synthesis, leishmanicidal and Cytotoxic activity of triclosan-chalcone, triclosan-chromone and triclosan-coumarin hybrids. *Molecules*. **2014**, *19*, 13251.
48. Pulido, S.A.; Muñoz, D.L.; Restrepo, A.M.; Mesa, C.V.; Alzate, J.F.; Vélez, I.D.; Robledo, S.M. Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania* spp. for the *in vitro* and *in vivo* screening of antileishmanial drugs. *Acta Trop.* **2012**, *122*, 36.
49. Otero, L.; Vieites, M.; Boiani, L.; Denicola, A.; Rigol, C.; Opazo, L.; Olea-Azar, C.; Maya, J.D.; Morello, A.; Krauth-Siegel, R.L.; Piro, O.E.; Castellano, E.; González, M.; Gambino, D.; Cerecetto, H. Novel Antitrypanosomal Agents Based on Palladium Nitrofuryl-thiosemicarbazone Complexes: DNA and Redox Metabolism as Potential Therapeutic Targets. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3322.
50. Kusriani, E.; Hashim, F.; Gunawan, C.; Mann, R.; Nadhirah, W.N.; Azmi, W.N.; Amin, N.M. Anti-amoebic activity of acyclic and cyclic-samarium complexes on *Acanthamoeba*. *Parasitol. Res.* **2018**, *117*, 1409.
51. Palacios, G.; Parodi, A.; Upegui, Y.A.; Montoya, A.; Pulido, S.; Vélez, I.D.; Robledo, S.M. Studies *in vitro* on infectivity and sensitivity to antileishmanial drugs in NewWorld *Leishmania* species transfected with the green fluorescent protein [pIR3(-)-eGFP]. *Parasitology*. **2017**, *144*, 1718.
52. Andrews, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 5.
53. Andrews, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, 1049.
54. Pachori, P.; Gothwal, R.; Gandhi, P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis.* **2019**, *6*, 109.
55. Deredjian, A.; Colinon, C.; Brothier, E.; Favre-Bonte, S.; Cournoyer, B.; Nazaret, S. Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Res. Microbiol.* **2011**, *162*, 689.

56. Abo El-Maali, N.; Wahman, A.Y.; Aly, A.A.M.; Nassar, A.Y.; Sayed, D.M. Estimating of the binding constant of the anticancer 5-fluorouracil with Samarium and Europium. *Inorg. Chem. Commun.* **2019**, *107*, 107440.
57. Le, M.; Rathje, O.; Levina, A.; Lay, P.A. High cytotoxicity of vanadium(IV) complexes with 1,10-phenanthroline and related ligands is due to decomposition in cell culture medium. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, *22*, 663.
58. Ackermann, T.; Connors, K.A. Binding constants - the measurement of molecular complex stability. *Berichte Der Bunsengesellschaft Für Phys. Chemie.* **1987**, *91*, 1398.
59. Lepore, A.; Taylor, H.; Landgraf, D.; Okumus, B.; Jaramillo-Riveri, S.; McLaren, L.; Bakshi, S.; Paulsson, J.; El Karoui, M. Quantification of very low-abundant proteins in bacteria using the HaloTag and epi-fluorescence microscopy. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1.
60. Chindera, K.; Mahato, M.; Kumar-Sharma, A.; Horsley, H.; Kloc-Muniak, K.; Kamaruzzaman, N.F.; Kumar, S.; McFarlane, A.; Stach, J.; Bentin, T.; Good, L. The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1.
61. Hyde, A.J.; Parisot, J.; McNichol, A.; Bonev, B.B. Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 19896.
62. Scroferneker, M.L.; de Oliveira, I.P.; Carissimi, M.; Stefani, V.; Stopiglia, C.D.O.; Corbellini, V.A. The use of 2-[2'-hydroxy-5'-aminophenyl]benzoxazole (HAMBO), a new fluorochrome for the morphological analysis of *Fonsecaea pedrosoi* ATCC 46428 using a microculture technique. *Rev. Brasileira Biociencias.* **2010**, *8*, 406.
63. Oliveira, F.F.D.; Santos, D.C.B.D.; Lapis, A.A.M.; Correa, J.R.; Gomes, A.F.; Gozzo, F.C.; Moreira, P.F.; De Oliveira, V.C.; Quina, F.H.B.; Neto, A.D. On the use of 2,1,3-benzothiadiazole derivatives as selective live cell fluorescence imaging probes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6001.

CAPÍTULO II

Complejos lantánidos con bases de Schiff derivadas de bencimidazoles

1. Introducción

Las bases de Schiff reciben su nombre en honor a Hugo Schiff (1834-1915), el químico ítalo-alemán quien sintetizó en 1884 los primeros compuestos que contienen el grupo azometino o imina. La síntesis clásica reportada por Schiff implicó la condensación de un compuesto carbonilo (aldehído o cetona) con una amina primaria bajo destilación azeotrópica^{1,2}. Por tanto, se considera un ligando privilegiado ya que procede en condiciones ambientales y solo implica agua como subproducto. El grupo azometino ($R^1R^2C=NR^3$) es la característica estructural común de bases de Schiff, donde los sustituyentes (R) pueden ser alquilo, cicloalquilo, arilo o grupos heterocíclicos. El átomo de carbono del enlace $C=N_{\text{imina}}$ es propenso a sufrir adición nucleofílica, mientras que el átomo de nitrógeno es altamente reactivo, ya que posee un par de electrones libres que puede formar enlaces con iones metálicos, produciendo complejos estables.

El interés real en la química sintética con los compuestos derivados de bases de Schiff, se debe a la facilidad de su preparación y la posibilidad de modificar su estructura con distintos sustituyentes, dada la diversidad existente de aminas y compuestos con grupos carbonilo. Por tanto, las bases de Schiff se encuentran entre los compuestos orgánicos más utilizados, mostrando una amplia gama de aplicaciones como intermediarios en síntesis orgánica, quimiosensores y estabilizadores poliméricos, en la industria de alimentos, colorantes y pigmentos, también como catalizadores y en los últimos años reconocidos por sus propiedades biológicas.

1.1 Importancia biológica de bases de Schiff

La presencia de un solo par de electrones en el átomo de nitrógeno con hibridación sp^2 del grupo azometino es de importancia química y biológica ya que, puede interferir en los

procesos celulares normales a través de enlaces de hidrógeno con los centros activos de los constituyentes celulares. Además, en los sistemas biológicos, el nitrógeno azometino de las bases de Schiff, proporciona un sitio de unión de iones metálicos que pueden interactuar con biomoléculas como aminoácidos y proteínas, demostrando su potencial biológico.

Dentro de las propiedades que presentan las bases de Schiff se encuentra la autofluorescencia, la cual se atribuye a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del enlace C=N. Esta propiedad es beneficiosa para seguir *in vitro* o *in vivo* la eficacia de portadores farmacológicos, evitando el uso de fluorocromos. Además, el enlace presente en las bases de Schiff, es un enlace covalente dinámico que presenta reversibilidad frente a factores externos como el pH. La estabilidad de este enlace disminuye a medida que disminuye el pH, siendo una característica útil al momento de la liberación controlada de un fármaco a un pH específico³. Por otro lado, diversas investigaciones han mostrado que compuestos derivados de las bases de Schiff presentan actividad farmacológica como agentes antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos, anticonvulsivos, antituberculosos, anticáncerígenos, antioxidante y antihelmínticos⁴, sin embargo, los diferentes mecanismos biológicos de acción de este tipo de compuestos, aún no están completamente definidos y, por tanto, es necesario continuar con su investigación.

1.2 Bases de Schiff como ligandos

Debido a su síntesis altamente modular que permite el control de la naturaleza de los átomos donadores, la denticidad, la capacidad quelante, así como sus propiedades electrónicas y estéricas, las bases de Schiff se consideran “ligandos privilegiados”. La unión al centro metálico depende en gran medida de la naturaleza de los átomos donores que actúan como sitio de coordinación, es decir, de la presencia de heteroátomos donantes, que generalmente aparecen en sus estructuras como átomos de nitrógeno y oxígeno. De esta manera, es posible obtener complejos altamente estables con iones metálicos en diferentes estados de oxidación, que permiten modular su acción farmacológica^{5,6}.

Durante la última década, se han desarrollado complejos metálicos con bases de Schiff que han presentado propiedades electroluminiscentes, fluorescentes, ópticas no lineales y

biológicas como antivirales, antibacterianas, antiapoptóticas, antifúngicas, antiinflamatorias y como inhibidores de la ureasa. También, han generado gran interés por sus aplicaciones como materiales poliméricos, sensores, materiales fotovoltaicos orgánicos, materiales energéticos, materiales nucleares en medicina y como componentes de productos farmacéuticamente activos⁴. En la literatura se encuentran diferentes estudios con bases de Schiff como ligandos quelato y su capacidad de formar complejos estables, como se reporta en el trabajo de Alterhoni y colaboradores, en donde sintetizaron complejos metálicos de Co(II), Pd(II), Cu(II) y Zn(II) con bases de Schiff (ver figura 11) y evaluaron su actividad biológica sobre seis cepas bacterianas y tres fúngicas, encontrando que la concentración mínima inhibitoria sobre *S.aureus* resultó menor en comparación al ligando cuando hay presencia de iones metálicos (36 µg/mL)⁷.

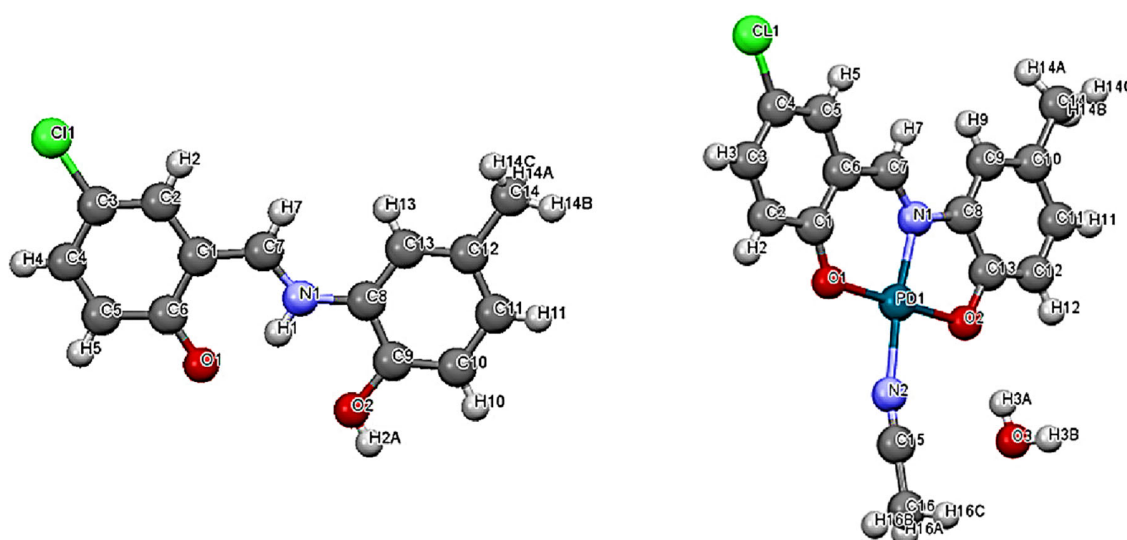


Figura 11. Base de Schiff como ligando y su complejo metálico de Pd(II) con posible actividad antimicrobiana.

Se ha demostrado que complejos metálicos con ligandos de bases de Schiff derivados del anillo bencimidazol interactúan con el ADN vía intercalación con capacidad de unión al surco menor del ADN^{6,8}. Las bases de Schiff derivadas de bencimidazoles son bastante atractivas para aplicaciones en química médica debido a la amplia actividad biológica del anillo de bencimidazol⁹⁻¹², como se presentó en el capítulo anterior. El fragmento bencimidazol se

considera un isómero estructural de purina y, por lo tanto, puede inhibir la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas¹³. Además, el bencimidazol puede causar la degeneración selectiva de los microtúbulos de tubulina^{14,15} e inducir la apoptosis y la fragmentación del ADN^{8,16}. Los estudios de acoplamiento molecular han demostrado interacciones entre los derivados del anillo de bencimidazol y el complejo de topoisomerasa IA en bacterias Gram-positivas¹⁷ y Gram-negativas¹⁸ a través de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Además, las pruebas *in silico* realizadas en la proteína FPK mostraron que es probable que los derivados de bencimidazol inhiban el ciclo de glucólisis en *Trypanosoma cruzi*, resaltando su potencial actividad antiparasitaria¹⁹.

1.3 Complejos lantánidos con bases de Schiff

Algunas bases de Schiff coordinadas con iones lantánidos han sido estudiadas debido a sus perfiles de baja toxicidad y resultados interesantes de actividad biológica, una vez formado el complejo metálico^{5,20}. Esto ha motivado la síntesis de nuevos complejos con iones lantánidos con amplio rango de actividad biológica como antimicrobianos, quimioterapéuticos y agentes de contraste^{21,22}. Uno de los grupos de compuestos con bases de Schiff más importantes que han tenido éxito en la fase III de las pruebas clínicas son los complejos de texafirina con iones lantánidos Ln(III), aplicados en la terapia de metástasis de células cancerosas de los pulmones al cerebro. El complejo de iones Gd(III) con texafirina (figura 12) conocido como gadolinio(III) motexafirina (MGd) no sólo es un buen agente radioterapéutico, sino también un potencial agente quimioterápico cuya actividad anticancerígena se atribuye a sus excepcionales propiedades redox²¹. La justificación de su uso en la terapia del cáncer es que, al igual que las porfirinas naturales, tiende a concentrarse selectivamente en las células cancerosas y tiene un mecanismo de acción novedoso, ya que induce estrés redox, desencadenando la apoptosis en una amplia gama de tipos de cáncer²³.

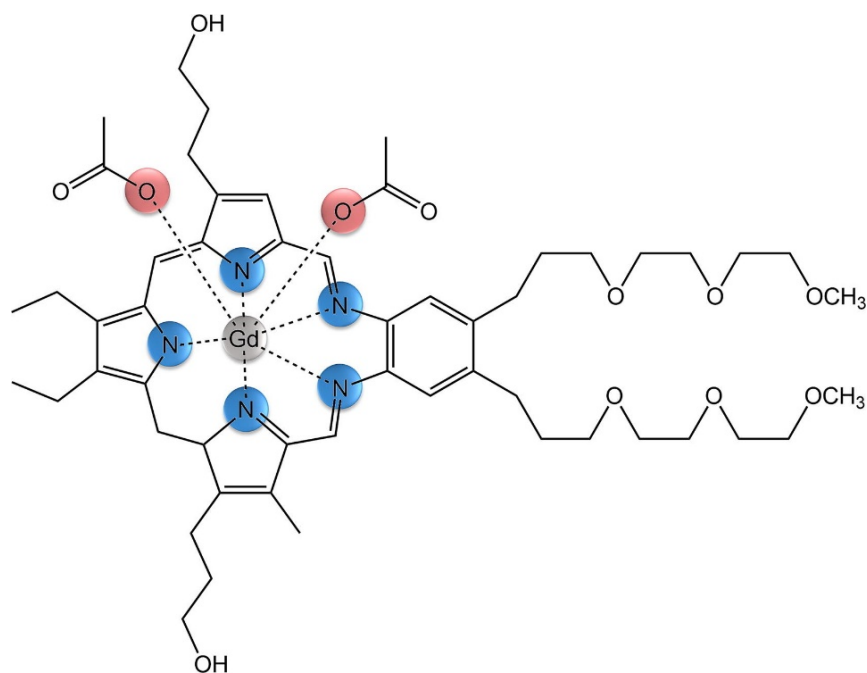


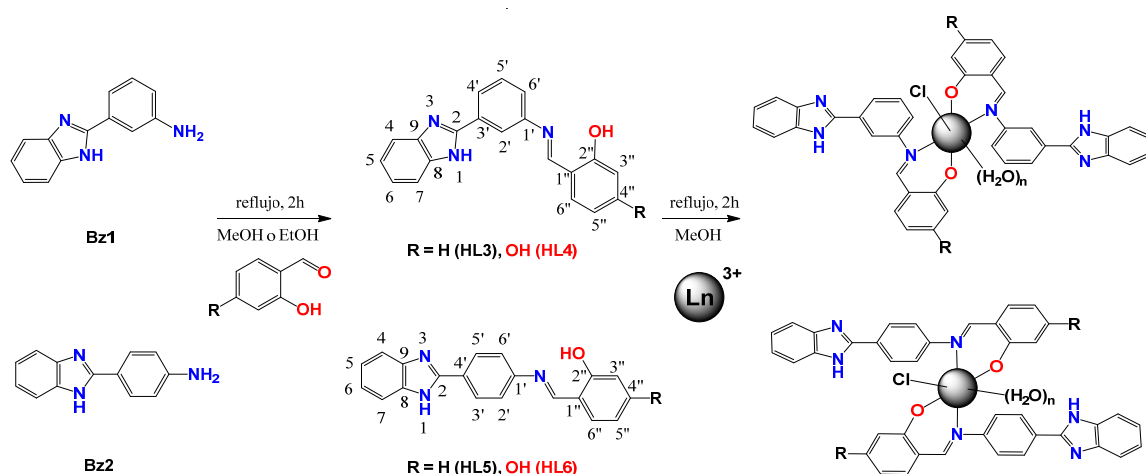
Figura 12. Complejo de ion Gd(III) con ligando de texafirina.

Teniendo en cuenta la actividad biológica demostrada de bases de Schiff derivadas de bencimidazol, y las propiedades farmacológicas de los complejos lantánidos, se espera que complejos metálicos con ligandos bases de Schiff derivados de bencimidazoles puedan mostrar efectos sinérgicos en la evaluación de sus propiedades farmacológicas. Por tanto, este capítulo presenta resultados sobre la síntesis y caracterización de compuestos La(III) y Ce(III), incluidos los ligandos de base de Schiff obtenidos a partir de (1*H*-bencimidazol-2-il)anilina con salicilaldehído y 2,4-dihidroxibenzaldehído.

2. Síntesis y caracterización

La síntesis de las bases de Schiff se llevó a cabo en dos pasos. Inicialmente, se obtuvieron aminofenilbencimidazoles (Bz1 y Bz2) tras la condensación de *o*-fenilendiamina con el correspondiente ácido carboxílico. Posteriormente, se realizó la formación de la imina usando salicilaldehído o 2,4-dihidroxibenzaldehído en etanol o metanol (ver esquema 3). Estos compuestos se obtuvieron como polvos amarillos, con rendimientos mayores al 70%,

y se utilizaron para obtener los complejos lantánidos (La-L3, Ce-L3, La-L4, Ce-L4, La-L5, Ce-L5, La-L6, Ce-L6) en metanol a partir de sus sales $\text{LnCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Ln} = \text{La(III)}, \text{Ce(III)}$), con rendimientos superiores al 65%. Todos los compuestos se caracterizaron mediante espectrometría de masas (MS), análisis elementales (C, H y N), espectroscopía infrarroja (IR) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Además, los complejos metálicos se caracterizaron por titulación complexométrica con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y análisis termogravimétrico (TGA), lo que sugirió la formación de estructuras con una relación 1:2 metal:ligando^{24,25}. La naturaleza no electrolítica de los complejos obtenidos se confirmó a través de los estudios de conductividad molar²⁶.



Esquema 3. Síntesis de bases de Schiff (ligandos) y sus complejos lantánidos de lantano y cerio ($\text{Ln} = \text{La(III)}, \text{Ce(III)}$).

2.1 Análisis de espectroscopía infrarrojo

Los espectros de IR de los compuestos sintetizados confirmaron la formación de iminas y los sitios de unión de iones metálicos. La formación de iminas fue demostrada por la ausencia de $\nu(\text{N-H}_2)$ en los precursores **Bz1** y **Bz2** en el rango de $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$, y la aparición de una banda característica para el grupo azometino $\nu(\text{N=CH})$ ²⁷ a aproximadamente 1600 cm^{-1} . Las bandas principales en los espectros de IR se observan en la tabla 5. Para los complejos metálicos fue posible observar un desplazamiento (entre $15\text{-}35\text{ cm}^{-1}$) de las frecuencias de vibración correspondientes a $\nu(\text{N=CH})$ hacia números de onda más altos, este cambio en la

banda para el azometino sugirió la coordinación de este grupo con el metal²⁸. Las vibraciones de estiramiento fenólico $\nu(\text{C-OH})$ en las bases de Schiff se identificaron inequívocamente por la presencia de bandas intensas en el rango de $1280\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$, mientras que la banda cerca de 1570 cm^{-1} se asignó a la $\nu(\text{N=C})$ del anillo de imidazol. Para los complejos de lantánidos, la banda fenólica $\nu(\text{C-O})$ se desplazó a una frecuencia más alta, en el rango de $1350\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, lo que demostró la coordinación del átomo de oxígeno con el ion lantánido, estando en concordancia con otros estudios de complejos de coordinación con bases de Schiff^{25,29}.

Tabla 5. Bandas presentes en los espectros de IR de Bz1, Bz2, ligandos de bases de Schiff y sus complejos de lantánidos (valores en cm^{-1}).

Compuesto	$\nu(\text{N-H}_2)$	$\delta(\text{N-H}_2)$	$\nu(\text{N=CH})$	$\Delta\nu^*$	$\nu(\text{N=C})$	$\nu(\text{C=C})$	$\nu(\text{C-O})$	$\Delta\nu^{**}$
Bz1	3437, 3338	1619	-	-	1566	1507	-	-
HL3	-	-	1602	-	1575	1509	1258	-
La-L3	-	-	1622	20	1563	1506	1347	89
Ce-L3	-	-	1624	22	1565	1507	1349	91
HL4	-	-	1605	-	1568	1495	1260	-
La-L4	-	-	1624	19	1559	1493	1310	50
Ce-L4	-	-	1619	14	1555	1492	1310	50
Bz2	3401, 3328	1638	-	-	1561	1492	-	-
HL5	-	-	1600	-	1570	1495	1277	-
La-L5	-	-	1634	34	1562	1493	1308	31
Ce-L5	-	-	1635	35	1562	1493	1310	33
HL6	-	-	1600	-	1566	1505	1277	-
La-L6	-	-	1635	35	1560	1494	1313	36
Ce-L6	-	-	1636	36	1559	1492	1313	36

* $\Delta\nu(\text{N=CH}) = \nu(\text{N=CH})_{\text{Complejo}} - \nu(\text{N=CH})_{\text{Ligando}}$.

** $\Delta\nu(\text{C-O}) = \nu(\text{C-O})_{\text{Complejo}} - \nu(\text{C-O})_{\text{Ligando}}$.

2.2 Análisis de espectroscopía RMN

Los espectros de RMN- ^1H mostraron las señales características de los diferentes sistemas presentes en estas bases de Schiff³⁰⁻³². En un campo bajo, se observaron las señales

correspondientes a los protones del imidazol y el -OH presentes en el anillo de salicilideno. La señal que aparece cerca de 9.0 ppm confirma la formación de las iminas, demostrando la presencia del protón en -CH=N-. Las señales restantes se observaron en la región típica de los protones aromáticos (ver tabla 6). La caracterización por RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ proporcionó espectros donde las señales para los carbonos de -CH=N- y OH-C aparecieron entre 165-160 ppm, siendo característico de las iminas, mientras que la señal de imidazol CH=N se observó en aproximadamente 151 ppm.

Tabla 6. Datos de los espectros RMN- ^1H de las bases de Schiff y sus complejos lantánidos.*

Com- puesto	Anillo bencimidazol				Anillo aminofenil					Anillo salicilideno				
	NH	H ₄	H ₇	H _{5,6}	H _{2'}	H _{4'}	H _{5'}	H _{6'}	N=CH	OH	H _{3''}	H _{4''}	H _{5''}	H _{6''}
HL3	12.99s	7.56dd (7.6, 2.2)	7.73dd (8.1, 1.8)	7.23dt (6.4, 3.5)	8.20s	8.12d (7.7)	7.65t (7.8)	7.64d (7.8)	9.10s	12.99s	7.03d (7.4)	7.46t (7.8)	7.04t (7.4)	7.64d (7.8)
La-L3	13.02s	7.56d (7.7)	7.76d (7.5)	7.23m	8.35s	8.20d (7.5)	7.64t (7.2)	7.63d (7.2)	9.18s	-	7.03d (7.8)	7.46t (7.9)	7.03d (7.8)	7.63d (7.2)
	NH	H ₄	H ₇	H _{5,6}	H _{2'}	H _{4'}	H _{5'}	H _{6'}	N=CH	OH(2)	H _{3''}	OH(4)	H _{5''}	H _{6''}
HL4	13.47s	7.56d (7.7)	7.69d (7.8)	7.23m	8.14s	8.08d (7.7)	7.61t (7.8)	7.49d (7.9)	8.94s	12.98s	6.35s	10.34s	6.45d (8.5)	7.51d (8.6)
La-L4	13.48s	7.60d (7.8)	7.63d (7.6)	7.24m	8.26s	8.14d (7.7)	7.64t (7.6)	7.47d (8.6)	9.01s	-	6.42s	10.58s	6.49d (8.5)	7.52d (8.7)
	NH	H ₄	H ₇	H _{5,6}	H _{2',6'}	H _{3',5'}			N=CH	OH	H _{3''}	H _{4''}	H _{5''}	H _{6''}
HL5	13.00s	7.63d (8.4)	7.71d (7.7)	7.24dt (6.2, 3.5)	7.63d (8.4)	8.29d (8.4)			9.09s	13.00s	7.01d (7.7)	7.46t (7.8)	7.02t (7.7)	7.63d (8.4)
La-L5	12.97s	7.61d (8.3)	7.72d (7.6)	7.22dd (5.8, 3.0)	7.61d (8.3)	8.35d (8.3)			9.09s	-	7.02d (6.4)	7.45t (7.7)	7.02t (6.4)	7.61d (8.3)
	NH	H ₄	H ₇	H _{5,6}	H _{2',6'}	H _{3',5'}			N=CH	OH(2)	H _{3''}	OH(4)	H _{5''}	H _{6''}
HL6	13.45s	7.53d (7.4)	7.66d (7.2)	7.21t (9.2)	7.54d (8.6)	8.24d (8.6)			8.92s	12.91s	6.32s	10.33s	6.43d (8.5)	7.47d (8.5)
La-L6	13.46s	7.61m	7.61m	7.21dd (5.9, 3.0)	7.54d (8.3)	8.31d (8.4)			8.93s	-	6.40s	10.60s	6.48d (8.5)	7.49d (8.5)

* solvente: DMSO-*d*₆; desplazamiento químico (δ) en ppm y constante de acoplamiento (*J*) en Hz se dan entre paréntesis

La espectroscopía de RMN también confirmó la unión de los ligandos al centro metálico. Los espectros RMN- ^1H de los complejos de La(III) no mostraron la presencia de la señal correspondiente al -OH ubicado en la posición 2" del anillo de salicilideno, lo cual confirma la desprotonación de este grupo para garantizar la coordinación al centro metálico, mientras que algunas señales de protones ubicados en los anillos de aminofenilo y salicilideno, tuvieron un leve desplazamiento. Los espectros de RMN $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de los complejos de La(III) exhibieron una pequeña variación en los corrimientos químicos para la mayoría de las señales; sin embargo, el carbono del grupo azometino presentó el cambio más destacado, pasando de 163.69 ppm en el ligando HL4 a 165.79 ppm en el complejo La-L4, y de 163.64

ppm en el ligando HL6 a 165.83 ppm en el complejo La-L6, siendo estos valores similares a los reportados en complejos análogos de metales de transición²⁴.

3. Actividad biológica

Debido a las diversas aplicaciones farmacológicas que se han reportado para bases de Schiff derivadas de bencimidazoles^{25,33-35}, se realizó la evaluación preliminar *in vitro* de los compuestos sintetizados, examinando las propiedades antiproliferativas, antiparasitarias y antibacterianas tanto de los ligandos como de sus complejos.

3.1 Actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa *in vitro* tanto de las bases de Schiff como de sus correspondientes complejos se determinó empleando una serie de líneas de células cancerosas humanas (U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 y SK-LU-1) y una línea celular no-cancerosa de mono (COS-7). Los resultados presentados en la figura 13 muestran que todas las moléculas inhiben el crecimiento celular de las líneas celulares de cáncer U251, PC-3 y K562. Además, los complejos de lantano y cerio fueron generalmente más citotóxicos que los correspondientes ligandos de base de Schiff, lo que demuestra un efecto sinérgico provocado por la presencia de los centros metálicos. Al comparar los resultados de las series L3 y L4, se observó un mayor efecto inhibidor para las bases de Schiff preparadas a partir de 2,4-dihidroxibenzaldehído, lo que indica que tener una función -OH en la posición *para*- del anillo de salicilideno es muy relevante para el comportamiento biológico de estos compuestos. El efecto de la sustitución en el anillo de aminofenilo fue evaluado comparando las series L4 y L6. Los resultados mostraron una mayor actividad inhibidora para la posición 1,3 en comparación con la posición 1,4, similar al efecto observado para la posición del grupo amino en ligandos N,O-quelato derivados de aminofenilbencimidazol (ver Capítulo I).

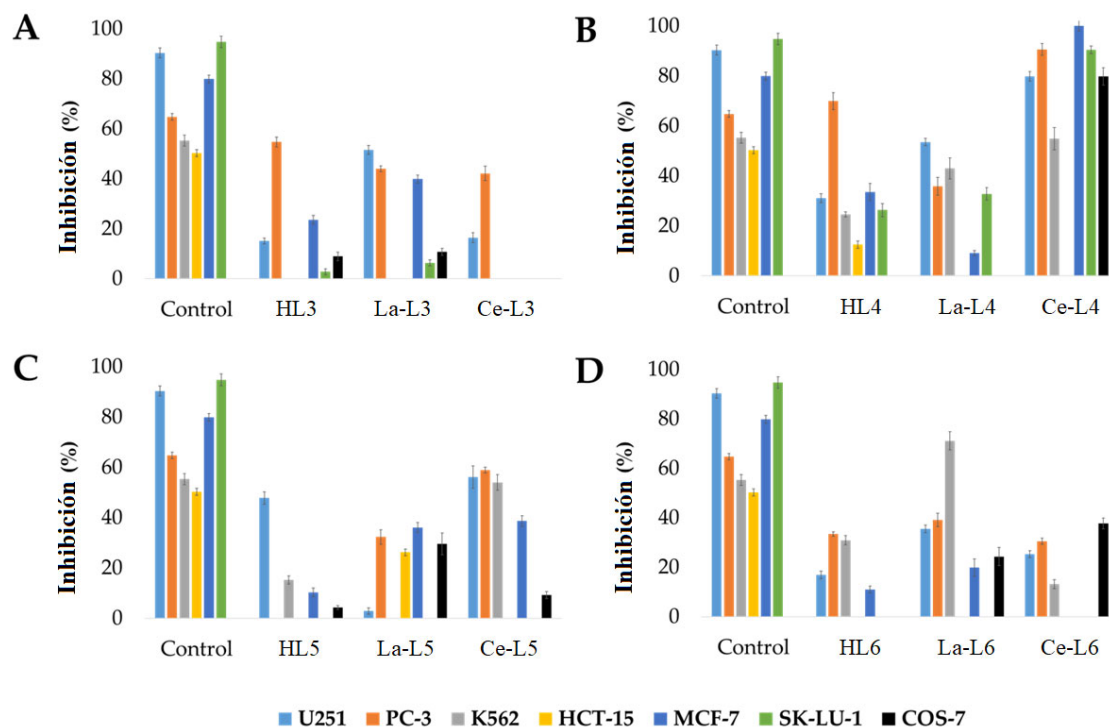


Figura 13. Inhibición del crecimiento (%) de diferentes líneas celulares de cáncer humano a 25 μ M para (A) serie L3, (B) serie L4, (C) serie L5 y (D) serie L6; control = cisplatino. (Las barras faltantes significan que no se observó actividad).

El complejo La-L6 fue el único compuesto que mostró un mayor efecto inhibitorio sobre la línea celular cancerosa K562 en comparación con el fármaco de referencia (55.3 ± 2.2), mientras que el complejo Ce-L4 produjo los resultados de inhibición más altos contra U251 (79.8 ± 1.9), PC-3 (90.6 ± 2.4), MCF-7 (100.0 ± 2.2) y SK-LU-1 (90.4 ± 1.5). Se observó que las actividades para el complejo Ce-L4 frente a las células PC-3 y MCF-7 fueron más altas que las observadas con el fármaco de referencia (64.8 ± 1.3 y 79.9 ± 1.6 , respectivamente). Sin embargo, el alto porcentaje de inhibición observado contra la línea celular no cancerosa (COS-7, 79.8 ± 3.4) muestra que este compuesto tiene efectos no específicos, por lo cual no debería recomendarse para estudios posteriores.

Algunas potenciales dianas biológicas con las que puedan interactuar los compuestos derivados del bencimidazol, podrían estar implicadas en el mecanismo subyacente de este

comportamiento, incluida la inhibición de la Aurora A quinasa, una quinasa dependiente de ciclina (CDK) y la dihidrofolato reductasa²⁵; sin embargo, la inhibición de las proteínas de choque térmico (Hsps) representa el mecanismo propuesto más prometedor para el desarrollo futuro de agentes anticancerosos utilizando las bases de Schiff generadas en el presente estudio, ya que se sabe que HL6 es un inhibidor potente y selectivo de la chaperona molecular Hsp90 con importantes consecuencias citotóxicas frente a las células de carcinoma (PC-3)³². Además, los estudios de acoplamiento molecular que se analizan en el siguiente capítulo, indican que estos ligandos podrían interactuar con dianas moleculares a través de enlaces hidrófilos y enlaces de hidrógeno convencionales, así como de interacciones pi-alquilo con los tres anillos aromáticos, que también puede ser otro de los mecanismos involucrados en la inhibición de la topoisomerasa I en ADN humano³⁶. Otro objetivo selectivo podría ser la fosfatidilserina (fosfolípido aniónico), que se encuentra en la membrana externa de las células cancerosas y puede atraer electrostáticamente al ligando cargado positivamente cuando se encuentra en equilibrios cetoenólicos, como ocurre con las bases de Schiff sintetizadas en el presente estudio.

3.2 Actividad antiparasitaria

Antes de realizar los estudios de actividad antiparasitaria, se siguió el protocolo para determinar la actividad citotóxica de los compuestos con base a la viabilidad de la línea celular promonocítica humana U-937 (ATCC CRL-1593.2TM) utilizando el micro-método enzimático MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)³⁷, y se utilizó el método probabilístico probit para expresar los resultados como concentración letal al 50% (CL₅₀)³⁸. La tabla 7 presenta los resultados de la actividad citotóxica, en donde se encontraron valores considerados de moderada o de alta citotoxicidad en todas las series de compuestos, según los valores de referencia³⁹. Cabe mencionar que se realizaron estudios citotóxicos sobre eritrocitos antes de la evaluación frente a *P. falciparum*, obteniendo valores de CL₅₀ > 200 µg/mL en todos los casos (compuestos y control). Para el caso de la actividad anti-*L. braziliensis*, anti-*T. cruzi* y anti-*P. falciparum*, los resultados fueron expresados como la concentración efectiva media (CE₅₀).

Tabla 7. Actividades antiparasitarias y citotóxicas *in vitro* de bases de Schiff y sus complejos de La(III) y Ce(III).*

Compuesto	Citotoxicidad				Actividad antiparasitaria								
	Células U-937		Eritrocitos		Anti- <i>L. braziliensis</i> ^a			Anti- <i>T. cruzi</i> ^b			Anti- <i>P. falciparum</i> ^c		
	LC ₅₀	SD	LC ₅₀	SD	EC ₅₀	SD	SI	EC ₅₀	SD	SI	EC ₅₀	SD	SI
HL3	7.77	0.46	>200	NA	>4	NA	<1.94	17.03	2.13	0.46	14.04	1.01z	>14.24
La-L3	53.65	8.06	>200	NA	106.09	61.07	0.51	62.24	8.25	0.86	13.80	1.06	>14.49
Ce-L3	44.64	10.68	>200	NA	>25	NA	<1.78	178.99	28.94	0.25	15.16	0.26	>13.19
HL4	17.09	4.74	>200	NA	>8	NA	<2.13	14.97	0.05	1.14	15.57	0.92	>12.84
La-L4	18.17	3.94	>200	NA	12.67	2.47	1.43	29.27	4.62	0.62	12.81	0.54	>15.63
Ce-L4	45.37	10.12	>200	NA	26.17	1.46	1.73	56.39	4.18	0.80	13.73	0.63	>14.56
HL5	20.40	5.62	>200	NA	>10	NA	<2.04	30.53	2.72	0.67	15.54	0.99	>12.87
La-L5	28.83	6.55	>200	NA	>14	NA	<2.05	>15	NA	<1.92	12.79	1.81	>15.63
Ce-L5	61.73	3.81	>200	NA	>30	NA	<2.06	130.58	14.63	0.47	16.05	0.56	>12.46
HL6	14.27	1.34	>200	NA	>7	NA	<2.03	13.64	1.72	1.05	13.98	0.44	>14.30
La-L6	122.39	18.06	>200	NA	>50	NA	<2.44	>50	NA	<2.44	18.35	0.49	>10.89
Ce-L6	41.77	7.41	>200	NA	>20	NA	<2.09	>20	NA	<2.09	15.54	0.45	>12.87
Anfotericina B	36.5	2.8	ND	ND	0.31	0.08	456.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benznidazol	>200	NA	ND	ND	ND	ND	ND	11.89	3.30	>16.8	ND	ND	ND
Cloroquina	ND	ND	>200	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	0.003	>200

*Resultados expresados en µg/mL. DE = Desviación Estándar; SI = Índice de Selectividad; NA = No Aplica; ND = No Determinado. La inhibición de células U-937 o parásitos fue determinada por citometría de flujo⁴⁰ para amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, por fluorometría para todas las formas de *P. falciparum* y por el método colorimétrico de la β-galactosidasa para amastigotes intracelulares de *T. cruzi*; controles: ^aAnfotericina B, ^bBenznidazol, y ^cCloroquina.

Los resultados de la actividad leishmanicida *in vitro* mostraron que, en la mayoría de los casos, la actividad leishmanicida fue similar a la citotoxicidad, y el complejo La-L4 mostró un alto nivel de actividad contra *L. braziliensis*, lo que implica que la actividad depende tanto del tipo de ligando, como del centro metálico. Los resultados de la actividad tripanocida muestran claramente que las bases de Schiff tienen una actividad entre moderada y alta según valores de referencia³⁹, mientras que para la actividad antiplasmodial, todos los compuestos examinados alteraron el proceso respiratorio de los parásitos, reduciendo efectivamente la

tasa de infección en al menos un 50% a la concentración estudiada; como la concentración efectiva fue inferior a 20 µg/mL, estos pueden considerarse compuestos altamente activos³⁹. Las actividades antiparasitarias observadas podrían estar relacionadas con la capacidad de estos compuestos para formar interacciones hidrofóbicas a través de los anillos de benceno, como se demostró en los estudios de acoplamiento molecular para leishmanina, cruzaína y alfa-tubulina que se presentarán en el siguiente capítulo. Se ha demostrado que la naturaleza altamente hidrofóbica de las bases de Schiff, que contienen varios anillos de benceno, aumenta sus propiedades lipofílicas y facilita sus movimientos a través de la bicapa de la membrana⁴¹. Otras posibles rutas de acción de las actividades biológicas observadas para las bases de Schiff que contienen bencimidazol, incluyen interacciones con el ADN¹⁶. Los estudios han demostrado que la capacidad de unión al ADN es posible a través del único par de electrones del nitrógeno sp^2 del grupo imina⁴².

3.3 Actividad antibacteriana

Las actividades antibacterianas *in vitro* tanto de los ligandos como de los complejos se evaluaron frente a cepas bacterianas Gram-positivas (*S. aureus* ATCC® 25923, *L. monocytogenes* ATCC® 19115) y Gram-negativas (*E. coli* ATCC® 25922, *P. aeruginosa* ATCC® 27583) empleando la técnica de microdilución en caldo. La figura 14 muestra que los resultados de actividad antibacteriana de los compuestos dependen del tipo de bacteria evaluada, y que todos los compuestos estudiados generalmente presentan mejores efectos frente a las bacterias Gram-positivas que frente a las bacterias Gram-negativas, confirmando que en este caso la membrana externa desempeña un papel de barrera permeable, evitando que algunos antibióticos alcancen sus objetivos⁴³. Además, estos resultados sugirieron que los compuestos pueden ejercer sus actividades antibacterianas a través de interacciones con fosfolípidos que se encuentran en las membranas celulares bacterianas³⁵, como lo confirman los estudios realizados en modelos de membrana que se discutirán en el capítulo posterior.

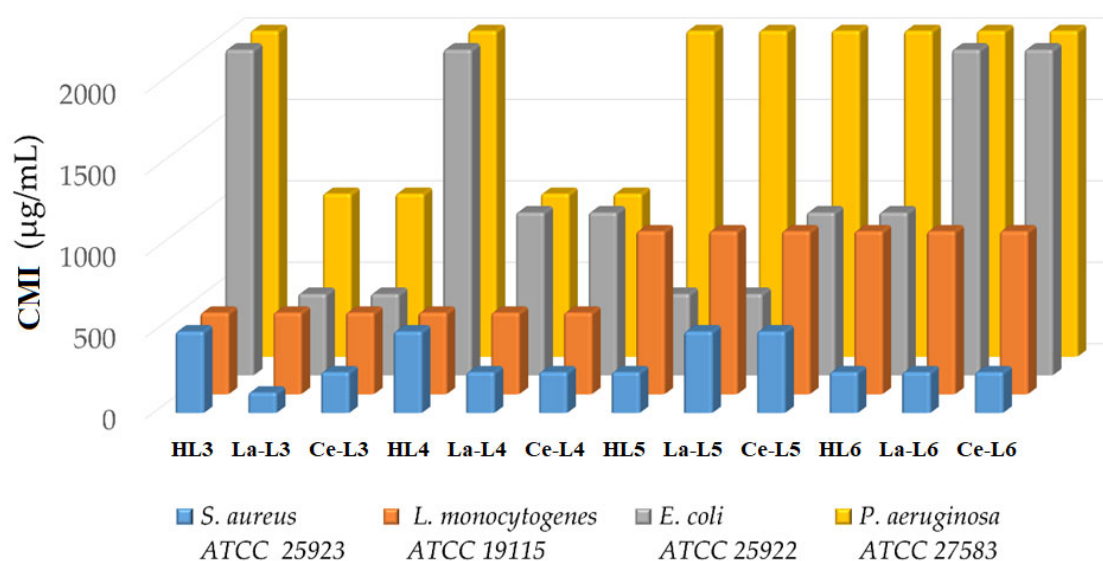


Figura 14. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) determinadas para las series de compuestos en los ensayos antibacterianos (µg/mL).

En general, HL3 y HL4 mostraron valores de CMI más bajos, tanto en la forma libre como en la forma acomplexada, en comparación a HL5 y HL6, lo que sugiere un efecto causado por la sustitución del anillo de aminofenilo que es favorecido por la posición 1,3. Este resultado también está respaldado por los resultados del acoplamiento molecular para la proteína PBP2A de *S. aureus* resistente a la meticilina, para la cual las energías de unión sugieren una mejor afinidad por HL3 y HL4 que por HL5 y HL6, como se presentará en el siguiente capítulo. Curiosamente, para el análisis de la actividad antibacteriana contra la cepa de *S. aureus*, la presencia del metal pareció disminuir el efecto bacteriostático en comparación con el ligando HL5, mientras que para la cepa de *E. coli*, el efecto bacteriostático de los complejos disminuyó en comparación al ligando HL6.

Los bajos niveles de actividad antibacteriana observados para los compuestos evaluados contra *P. aeruginosa* fueron atribuidos al alto nivel de resistencia que esta cepa ha demostrado previamente contra varios antibióticos⁴⁴; sin embargo, las actividades antibacterianas de ambos ligandos HL3 y HL4 mejoraron cuando formaron complejos con los iones metálicos. Se observó un efecto similar contra la cepa de *S. aureus*, para la cual los

complejos de lantano y cerio coordinados con HL3 y HL4 mostraron mayor actividad biológica que los ligandos libres, siendo La-L3 el complejo que mostró el valor más bajo de CMI (125 µg/mL). La-L3 también presentó la mejor energía de unión con la proteína *S. aureus* PBP2A, mediada por la formación de múltiples interacciones hidrofóbicas según estudios de acoplamiento molecular. Otros complejos lantánidos formados con bases de Schiff también han mostrado mejores resultados antibacterianos frente a *S. aureus*²³, y el mecanismo potencial de tal actividad podría implicar interacciones con la membrana bacteriana o interacciones con el ADN²⁴.

4. Conclusiones

Se obtuvieron y caracterizaron ocho nuevos complejos lantánidos con ligandos derivados de bases de Schiff preparadas a partir de aminofenilbencimidazoles y dos aldehídos (salicilaldehído y 2,4-dihidroxibenzaldehído). Los datos espectroscópicos sugieren que las bases de Schiff actúan como ligandos N,O-quelatos a través de los átomos de nitrógeno del grupo azometino y del oxígeno fenólico del anillo salicilideno. El análisis elemental y por espectrometría de masas indicó que los compuestos lantánidos se formaron en una estequiometría 1:2 (metal:ligando). Se realizaron ensayos preliminares *in vitro* para evaluar sus posibles aplicaciones farmacológicas a través de varios bioensayos, incluidos ensayos antiproliferativos, antiparasitarios y antibacterianos. El efecto sinérgico provocado por la presencia de los centros metálicos fue demostrado en los estudios de actividad antiproliferativa debido a que los complejos de lantano y cerio fueron generalmente más citotóxicos que los correspondientes ligandos de base de Schiff. Los resultados de actividad antiparasitaria mostraron dependencia al parásito a evaluar: en el caso de *L. braziliensis*, el complejo La-L4 mostró un alto nivel de actividad contra esta cepa, mientras que en la actividad tripanocida, los ligandos presentaron mejores resultados en comparación a los complejos metálicos; por otro lado, todos los compuestos estudiados se encontraron altamente activos contra *P. falciparum*, siendo resultados promisorios debido a la baja toxicidad (CL₅₀ > 200 µg/mL) mostrada frente a eritrocitos. Respecto a la actividad

antibacteriana, los resultados sugieren que las modificaciones estructurales en los compuestos juegan un papel importante en sus actividades biológicas, revelando que los ligandos HL3 y HL4, así como sus complejos metálicos presentan valores de CMI más bajos en comparación con los ligandos HL5 y HL6, y sus complejos, diferencias que pueden estar asociadas a sus sustituciones en el anillo aminofenilo de la base de Schiff.

5. Referencias

1. Schiff, H. Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen. *Ann. Chem. Pharm.* **1864**, 131, 118.
2. Schiff, H. Eine neue Reihe organischer Diamine. *Ann. Chem. Pharm.* **1866**, 140, 92.
3. Jia, Y.; Li, J. Molecular assembly of Schiff Base interactions: construction and application. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 1597.
4. Uddin, M.N.; Ahmed, S.S.; Alam, S.M.R. Biomedical applications of Schiff base metal complexes. *J. Coord. Chem.* **2020**, 73, 3109.
5. Andiappan, K.; Sanmugam, A.; Deivanayagam, E.; Karuppasamy, K.; Kim, H.S.; Vikraman, D. *In vitro* cytotoxicity activity of novel Schiff base ligand-lanthanide complexes. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 3054.
6. Banerjee, A.; Chattopadhyay, S. Synthesis and characterization of mixed valence cobalt(III)/cobalt(II) complexes with N,O-donor Schiff base ligands. *Polyhedron*. **2019**, 159, 1.
7. Alterhoni, E.; Tavman, A.; Hacıoglu, M.; Şahin, O.; Birteksöz, A.S. Synthesis, structural characterization and antimicrobial activity of Schiff bases and benzimidazole derivatives and their complexes with CoCl₂, PdCl₂, CuCl₂ and ZnCl₂. *J. Mol. Struct.* **2021**, 1229, 129498.
8. Singhal, S.; Khanna, P.; Khanna, L. Synthesis, DFT studies, molecular docking, antimicrobial screening and UV fluorescence studies on ct-DNA for novel Schiff bases of 2-(1-aminobenzyl) benzimidazole. *Heliyon*. **2019**, 5, e02596.
9. Hranjec, M.; Starčević, K.; Pavelić, S.K.; Lućin, P.; Pavelić, K.; Karminski, G. Synthesis, spectroscopic characterization and antiproliferative evaluation *in vitro* of novel Schiff bases related to benzimidazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 2274.
10. Bansal, Y.; Silakari, O. The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 6208.
11. Andrasiak, I.; Rybka, J.; Knopinska-Posluszny, W.; Wrobel, T. Efficacy and Safety of Bendamustine and Ibrutinib in Previously Untreated Patients With Chronic

- Lymphocytic Leukemia: Indirect Comparison. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* **2017**, *17*, 268.
12. Castro, L.S.E.P.W.; Kwiecinski, M.R.; Ourique, F.; Parisotto, E.B.; Grinevicius, V.M.A.S.; Correia, J.F.G.; Wilhelm Filho, D.; Pedrosa, R.C. Albendazole as a promising molecule for tumor control. *Redox Biol.* **2016**, *10*, 90.
 13. Fang, X.J.; Jeyakkumar, P.; Avula, S.R.; Zhou, Q.; Zhou, C.H. Design, synthesis and biological evaluation of 5-fluorouracil-derived benzimidazoles as novel type of potential antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2584.
 14. Robinson, M.W.; McFerran, N.; Trudgett, A.; Hoey, L.; Fairweather, I. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J. Mol. Graph. Model.* **2004**, *23*, 275.
 15. Zhou, Y.; Xu, J.; Zhu, Y.; Duan, Y.; Zhou, M. Mechanism of Action of the Benzimidazole Fungicide on *Fusarium graminearum*: Interfering with Polymerization of Monomeric Tubulin But Not Polymerized Microtubule. *Phytopathology.* **2016**, *106*, 807.
 16. Wang, Y.T.; Qin, Y.J.; Yang, N.; Zhang, Y.L.; Liu, C.H.; Zhu, H.L. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of novel 1-benzene acyl-2-(1-methylindol-3-yl)-benzimidazole derivatives as potential tubulin polymerization inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *99*, 125.
 17. Wang, Y.N.; Bheemanaboina, R.R.Y.; Cai, G.X.; Zhou, C.H. Novel purine benzimidazoles as antimicrobial agents by regulating ROS generation and targeting clinically resistant *Staphylococcus aureus* DNA groove. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 1621.
 18. Ranjan, N.; Story, S.; Fulcrand, G.; Leng, F.; Ahmad, M.; King, A.; Sur, S.; Wang, W.; Tse-Dinh, Y.C.; Arya, D.P. Selective Inhibition of *Escherichia coli* RNA and DNA Topoisomerase I by Hoechst 33258 Derived Mono-and Bisbenzimidazoles. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 4904.
 19. Miana, G.E.; Ribone, S.R.; Vera, D.M.A.; Sánchez-Moreno, M.; Mazzieri, M.R.; Quevedo, M.A. Design, synthesis and molecular docking studies of novel N-

- arylsulfonyl-benzimidazoles with anti Trypanosoma cruzi activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *165*, 1.
20. Hijazi, A.K.; Taha, Z.A.; Ajlouni, A.M.; Al-Momani, W.M.; Idris, I.M.; Hamra, E.A. Synthesis and Biological Activities of Lanthanide (III) Nitrate Complexes with N-(2-hydroxynaphthalen-1-yl)methylene) Nicotinohydrazide Schiff Base. *Med Chem.* **2016**, *13*, 77.
 21. Kaczmarek, M.T.; Zabiszak, M.; Nowak, M.; Jastrzab, R. Lanthanides: Schiff base complexes, applications in cancer diagnosis, therapy, and antibacterial activity. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *370*, 42.
 22. Siddiqi, Z.A.; Shahid, A.M.; Khalid, M.; Sharma, P.K.; Siddique, A. Spectroscopic, luminescence, electrochemical and antimicrobial studies of lanthanide complexes of bis-benzimidazole derived ligands. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1037*, 402.
 23. Evens, A.M. Motexafin gadolinium: a redox-active tumor selective agent for the treatment of cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **2004**, *16*, 576
 24. Mahmood, K.; Hashmi, W.; Ismail, H.; Mirza, B.; Twamley, B.; Akhter, Z.; Rozas, I.; Baker, R.J. Synthesis, DNA binding and antibacterial activity of metal(II) complexes of a benzimidazole Schiff base. *Polyhedron.* **2019**, *157*, 326.
 25. Magd-El-Din, A.A.; Mousa, H.A.; Labib, A.A.; Hassan, A.S.; Abd El-All, A.S.; Ali, M.M.; El-Rashedy, A.A.; El-Desoky, A.H. Benzimidazole-Schiff bases and their complexes: Synthesis, anticancer activity and molecular modeling as Aurora kinase inhibitor. *Zeitschrift Naturforsch. Sect. C J. Biosci.* **2018**, *73*, 465.
 26. Geary, W.J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. *Coord. Chem. Rev.* **1971**, *7*, 81.
 27. Chandrakala, M.; Sheshadri, B.S.; Nanje Gowda, N.M.; Murthy, K.G.S.; Nagasundara, K.R. Synthesis and spectral studies of 2-salicylidine-4-aminophenyl benzimidazole and its reaction with divalent Zn, Cd and Hg: Crystal structure of the cadmium bromide complex. *J. Chem. Res.* **2010**, *2010*, 576.
 28. Roopashree, B.; Gayathri, V.; Gopi, A.; Devaraju, K.S. Syntheses, characterizations, and antimicrobial activities of binuclear ruthenium(III) complexes containing 2-substituted benzimidazole derivatives. *J. Coord. Chem.* **2012**, *65*, 4023.

29. Chandrakala, M.; Nanje Gowda, N.M.; Murthy, K.G.S.; Nagasundara, K.R. Activation of -N=CH- bond in a Schiff base by divalent nickel monitored by NMR evidence. *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, 335.
30. Suman, G.R.; Bubbly, S.G.; Gudennavar, S.B.; Muthu, S.; Roopashree, B.; Gayatri, V.; Nanje Gowda, N.M. Structural investigation, spectroscopic and energy level studies of Schiff base: 2-[(30-N-salicylidene)phenyl]benzimidazole] using experimental and DFT methods. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1139*, 247.
31. Chandrakala, M. Hydrolysis of -N=CH- Bond in 2-Salicylidene-4-aminophenyl benzimidazole by Palladium(II). *Asian J. Chem.* **2019**, *31*, 287.
32. Dutta Gupta, S.; Revathi, B.; Mazaira, G.I.; Galigniana, M.D.; Subrahmanyam, C.V.S.; Gowrishankar, N.L.; Raghavendra, N.M. 2,4-dihydroxy benzaldehyde derived Schiff bases as small molecule Hsp90 inhibitors: Rational identification of a new anticancer lead. *Bioorg. Chem.* **2015**, *59*, 97.
33. Alam, S.A.M.F.; Ahmad, T.; Nazmuzzaman, M.; Ray, S.K.; Sharifuzzaman, M.; Karim, M.R.; Alam, M.G.; Ajam, M.M.; Maitra, P.; Mandol, D.; et al. Synthesis of Benzimidazole Derivatives Containing Schiff Base Exhibiting Antimicrobial Activities. *Int. J. Res. Stud. Biosci.* **2017**, *5*, 18.
34. Singh, A.K.; Goswami, B. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Some Mannich Schiff Base Derivatives of Substituted Benzimidazole. *Int. J. Pharm. Phytopharm. Res.* **2013**, *2*, 302.
35. Fonkui, T.Y.; Ikhile, M.I.; Njobeh, P.B.; Ndinteh, D.T. Benzimidazole schiff base derivatives: Synthesis, characterization and antimicrobial activity. *BMC Chem.* **2019**, *13*, 1.
36. Blaszcak-Swiatkiewicz, K.; Mirowski, M.; Kaplinska, K.; Kruszynski, R.; Trzesowska-Kruszynska, A.; Mikiciuk-Olasik, E. New benzimidazole derivatives with potential cytotoxic activity - study of their stability by RP-HPLC. *Acta Biochim. Pol.* **2012**, *59*, 279.
37. Aragón-Muriel, A.; Upegui, Y.; Muñoz, J.A.; Robledo, S.M.; Polo-Cerón, D. Synthesis, characterization and biological evaluation of rare earth complexes against tropical diseases Leishmaniasis, Malaria and Trypanosomiasis. *Av. Quim.* **2016**, *11*, 53.

38. Otero, E.; Vergara, S.; Robledo, S.M.; Cardona, W.; Carda, M.; Vélez, I.D.; Rojas, C.; Otálvaro, F. Synthesis, leishmanicidal and Cytotoxic activity of triclosan-chalcone, triclosan-chromone and triclosan-coumarin hybrids. *Molecules*. **2014**, *19*, 13251.
39. Palacios, G.; Parodi, A.; Upegui, Y.A.; Montoya, A.; Pulido, S.; Vélez, I.D.; Robledo, S.M. Studies *in vitro* on infectivity and sensitivity to antileishmanial drugs in NewWorld Leishmania species transfected with the green fluorescent protein [pIR3(-)-eGFP]. *Parasitology*. **2017**, *144*, 1718.
40. Pulido, S.A.; Muñoz, D.L.; Restrepo, A.M.; Mesa, C.V.; Alzate, J.F.; Vélez, I.D.; Robledo, S.M. Improvement of the green fluorescent protein reporter system in Leishmania spp. for the *in vitro* and *in vivo* screening of antileishmanial drugs. *Acta Trop.* **2012**, *122*, 36.
41. Fonkui, T.Y.; Ikhile, M.I.; Ndinteh, D.T.; Njobeh, P.B. Microbial activity of some heterocyclic schiff bases and metal complexes: A review. *Trop. J. Pharm. Res.* **2018**, *17*, 2507.
42. Touafri, L.; Hellal, A.; Chafaa, S.; Khelifa, A.; Kadri, A. Synthesis, characterisation and DFT studies of three Schiff bases derived from histamine. *J. Mol. Struct.* **2017**, *1149*, 750.
43. Arzanlou, M.; Chai, W.C.; Venter, H. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochem.* **2017**, *61*, 49.
44. Pachori, P.; Gothwal, R.; Gandhi, P. Emergence of antibiotic resistance Pseudomonas aeruginosa in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis.* **2019**, *6*, 109.

CAPÍTULO III

Interacción con biomoléculas como dianas moleculares

1. Introducción

El descubrimiento de fármacos ha evolucionado desde la identificación de sustancias activas en las medicinas tradicionales hasta la búsqueda directa de nuevos medicamentos, sin embargo, debido a la complejidad que presentan los sistemas biológicos, se dificulta la comprensión del modo de acción que ejerce el fármaco sobre la diana farmacológica¹.

El término "diana" se utiliza con mayor frecuencia en la literatura científica para describir el blanco u objetivo molecular específico con el que interactúa un fármaco, para iniciar una respuesta biológica². En general, pueden ser proteínas o glicoproteínas, como receptores acoplados a proteínas, receptores ligados a enzimas, receptores de apertura de canales iónicos, receptores transmembrana o receptores nucleares (transportadores de ligandos, hormonas o material genético como el ADN o ARN³); también se incluyen enzimas, inhibidores enzimáticos, agonistas o antagonistas de los receptores de la superficie celular y bloqueadores de transportadores de membrana⁴.

1.1 Mecanismos de acción en fármacos

Varios autores han evidenciado que entre las principales dianas farmacológicas sobre las cuales actúan los compuestos derivados del anillo bencimidazol y las bases de Schiff, está el ADN, a través de intercalación en la doble hélice y escisión de este, causando fragmentación y apoptosis celular, además pueden inhibir la biosíntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Estos compuestos también actúan sobre microtúbulos de tubulina causando degeneración selectiva en células tumorales y se consideran inhibidores patentados específicos de la β -secretasa, una enzima presente en pacientes con Alzheimer⁵. Además, se ha demostrado que complejos de cobre con base de Schiff se dirigen e inhiben reversiblemente las enzimas caspasas implicadas en la apoptosis celular.

Sin embargo, a pesar de las propiedades fisicoquímicas que les confieren actividad biológica a los complejos lantánidos con ligandos derivados del anillo bencimidazol y bases de Schiff, no es muy claro el modo de acción de estos compuestos sobre las dianas farmacológicas.

1.2 Estudios de interacción con biomoléculas

Dentro de los métodos que se emplean para determinar el modo de acción de los fármacos con la diana farmacológica, se encuentran los estudios de interacción con biomoléculas, como interacción con ADN a través de espectrofotometría por UV-Vis. Esta técnica es muy útil para evaluar la capacidad de unión de moléculas pequeñas al ADN y puede proporcionar información sobre el modo de unión e interacción⁶. También, es posible evaluar el sistema fármaco-diana a través de estudios en membranas sintéticas y simuladas a partir de ensayos *in silico* como docking y dinámica molecular⁷.

Mahmood y colaboradores⁸ determinaron la interacción del ADN con complejos metálicos que contienen ligandos 2 aril-bencimidazoles derivados de bases Schiff, observando que el modo de interacción entre el ADN, el ligando y los complejos metálicos ocurre vía intercalación (ver figura 15). El ligando se intercala entre los pares de bases del ADN dando como resultado el acoplamiento del orbital π^* del intercalador con los pares de bases del ADN, reduciendo la energía de transición $\pi \rightarrow \pi^*$, lo que provoca un corrimiento hacia el rojo (batocromismo). Además, si el orbital π^* del acoplamiento está parcialmente lleno de electrones, disminuye las probabilidades de transición y se puede observar un cambio hipocrómico en la absorbancia. Por lo tanto, la presencia de cambios hipocrómicos y batocrómicos en los espectros UV-Vis resultantes de la titulación de un compuesto con ADN indica que dicho compuesto puede actuar como intercalador.

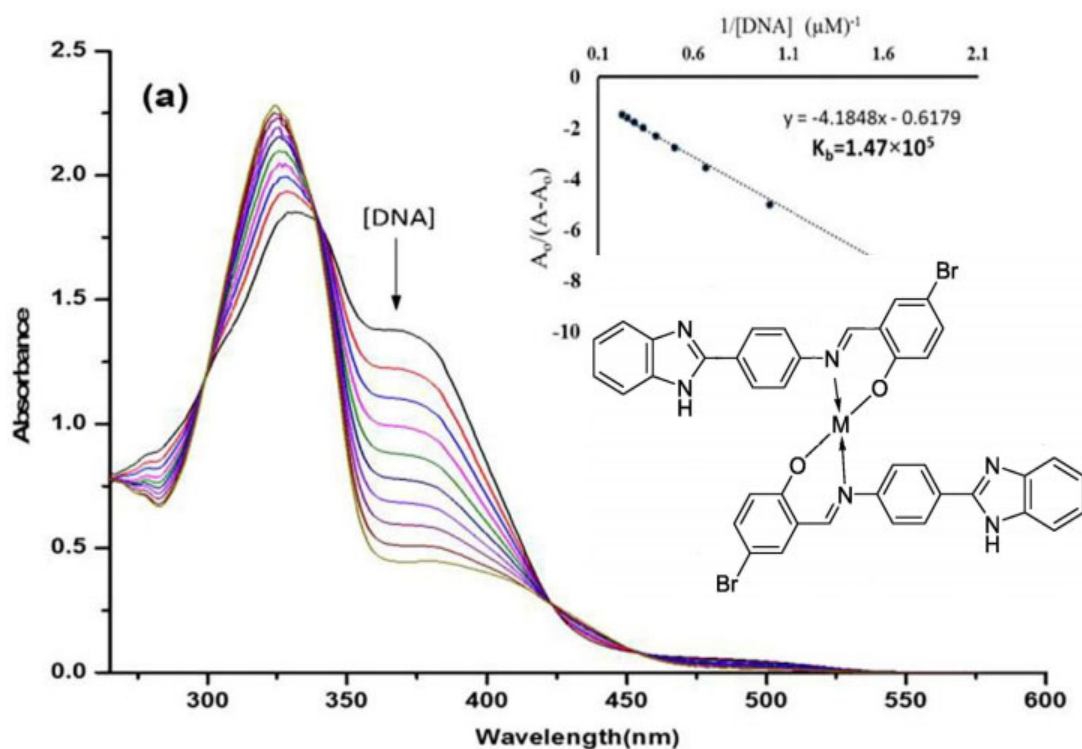


Figura 15. Interacción de ADN con complejos metálicos que contienen ligandos de 2 aril-bencimidazoles derivados de bases Schiff.

Por otra parte, Castillo y colaboradores⁹ evaluaron complejos de cobre(II) con ligandos derivados del anillo bencimidazol en modelos moleculares de membranas plasmáticas como bicapas lipídicas de dimetilfosfatidilcolina (DMPC) y dimetilfosfatidiletanolamina (DMPE), presentes en el exterior e interior de membranas de eritrocitos humanos, respectivamente (ver figura 16). Los resultados de difracción de rayos X, muestran que los complejos N-metilados interactúan con la DMPC a través de difusión pasiva, mientras que, los complejos con grupo amino interactúan a través de enlaces de hidrógeno con los grupos polares presentes en el modelo DMPE.

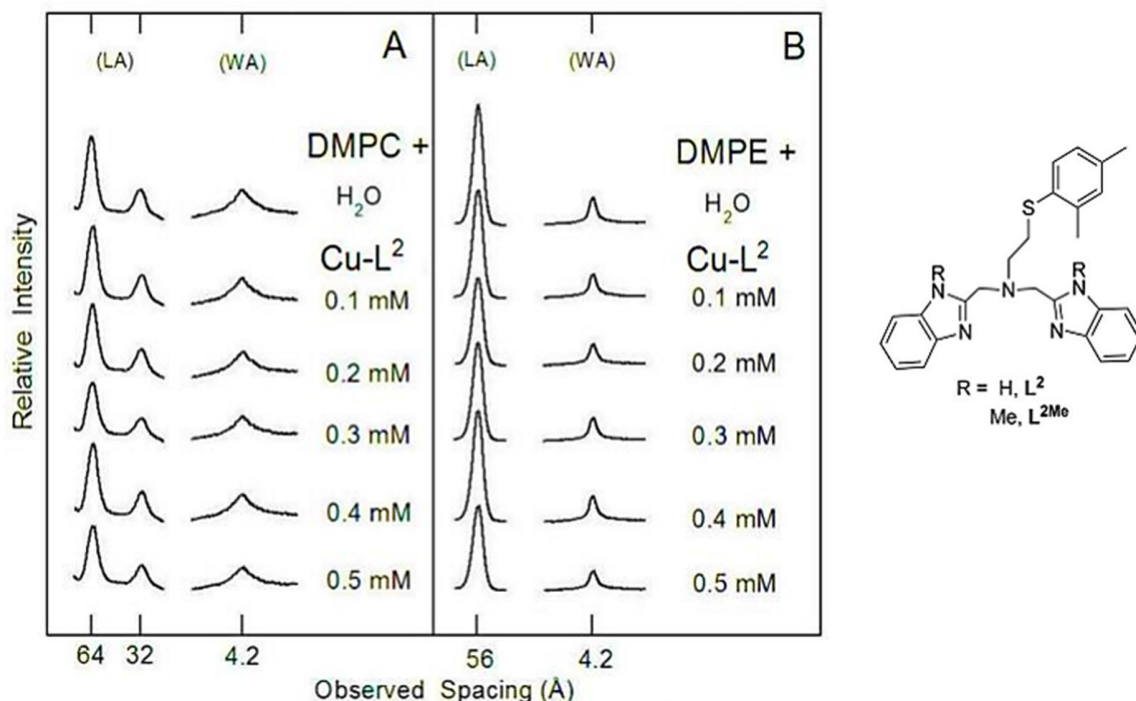


Figura 16. Microdensitogramas de patrones de difracción de rayos X de (A) dimetilfosfatidilcolina (DMPC) y (B) dimetilfosfatidiletanolamina (DMPE) en agua y su incubación con un complejo de cobre; LA: reflexiones de ángulo bajo, WA: reflexiones de ángulo mayor.

1.3 Docking y dinámica molecular

Las técnicas de acoplamiento molecular como docking y dinámica molecular, tienen como objetivo predecir el mejor modo de unión de un compuesto a su diana farmacológica macromolecular. Este método consiste en la obtención de varias conformaciones y orientaciones posibles del ligando dentro del sitio de unión a la proteína. Particularmente, esta técnica ayuda a comprender las interacciones fármaco-ADN no covalentes de moléculas pequeñas en la región objetivo del ADN para el diseño y descubrimiento racional de fármacos. Se prefiere el surco menor del ADN al mayor debido a un menor impedimento estérico, factores electrostáticos y su forma estrecha^{10,11}.

Singhal y colaboradores¹² encontraron que bencimidazoles derivados de bases de Schiff presentan interacciones no covalentes al surco menor del ADN (con PDB ID: 1BNA). Las interacciones no covalentes incluyen enlace de hidrógeno, apilamiento pi-pi, anión-pi y donante-pi (ver figura 17).

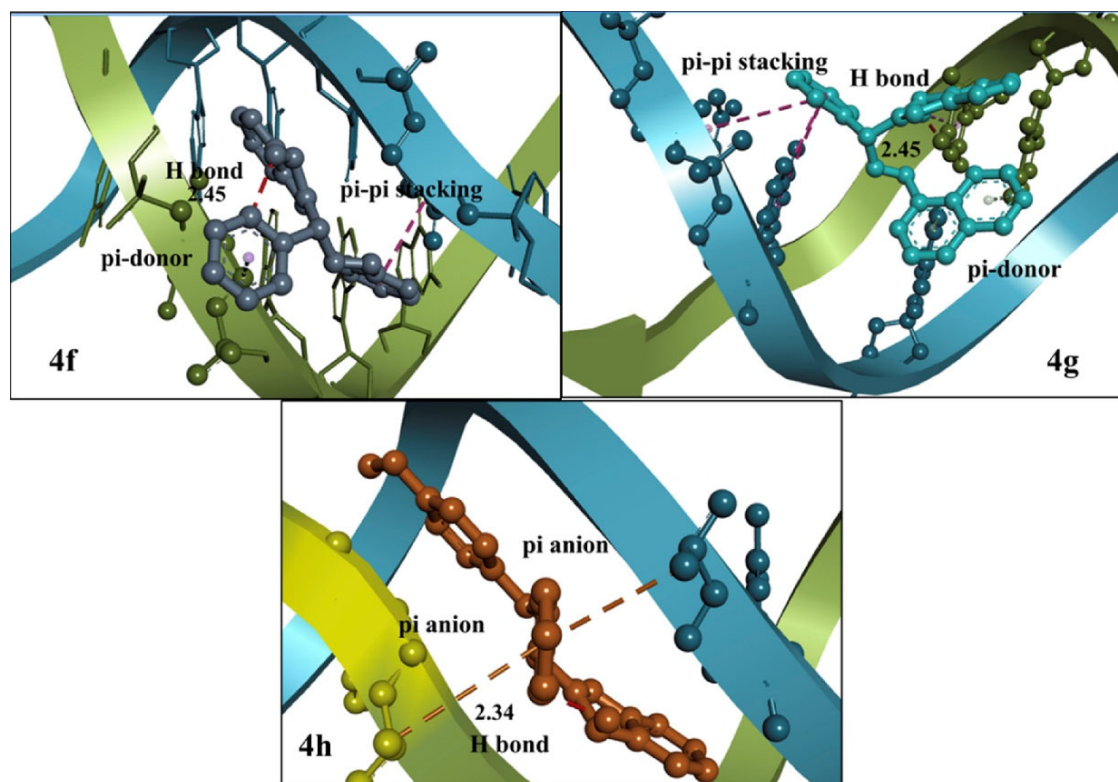


Figura 17. Interacción de bases de Schiff derivadas de bencimidazoles con el surco menor del ADN por docking molecular.

Kumaravel y colaboradores¹³ sintetizaron complejos metálicos de Cu, Co, Ni y Zn con ligandos de 2-arilbencimidazoles derivados de bases de Schiff, y se sometieron a análisis de acoplamiento molecular con el dúplex de ADN, la secuencia d (CGCGAATTCGCG) (ID de PDB: 1BNA). Los resultados evidenciaron interacción de la molécula de ADN con cada uno de los compuestos obtenidos a través de intercalación (ver figura 18).

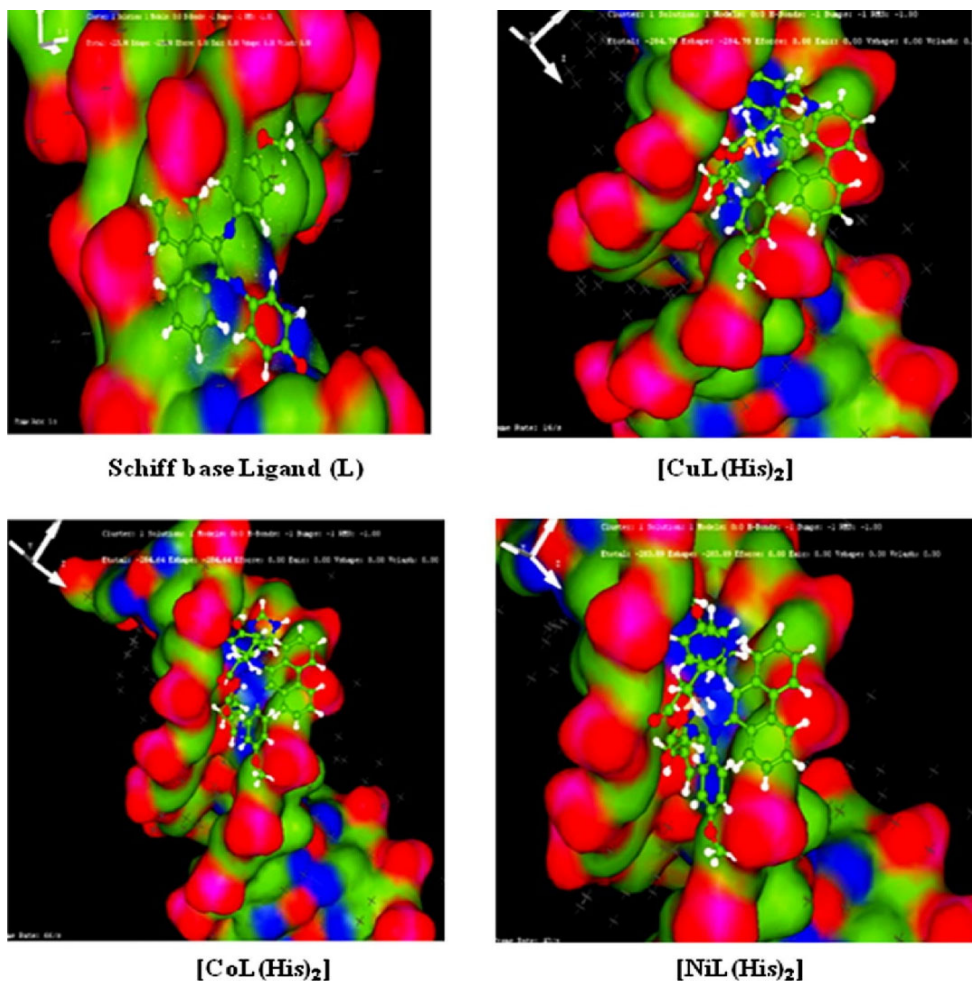


Figura 18. Estudio de acoplamiento molecular para la interacción de ADN con complejos que contienen bases de Schiff derivadas de 2-arilbencimidazoles.

Por otro lado, Lopes de Campos y colaboradores¹⁴ establecieron la relación biofísica entre el pH y el metronidazol, un compuesto con alta actividad antiparasitaria. En un pH ácido, el carácter hidrófilo del metronidazol puede implicar una menor absorción, mientras que, a pH de 7.4, el metronidazol tiene una mayor afinidad por la membrana. Sin embargo, la penetración de metronidazol se asocia con una alteración del orden y el empaquetamiento de los fosfolípidos. Las simulaciones de dinámica molecular mostraron que el grupo hidroxilo del metronidazol es importante para que se den las interacciones con las moléculas de agua incrustadas en la membrana (ver figura 19). Por lo tanto, la presencia de metronidazol promueve la penetración de moléculas de agua, que pueden estar asociadas con una

disminución de la hidrofobicidad de la membrana y una desestabilización de sus propiedades biofísicas. Igualmente, determinaron que los sustituyentes de la cadena lateral del metronidazol promueven su interacción con las membranas lipídicas de fosfatidilcolina y, por tanto, pueden alterar sus propiedades.

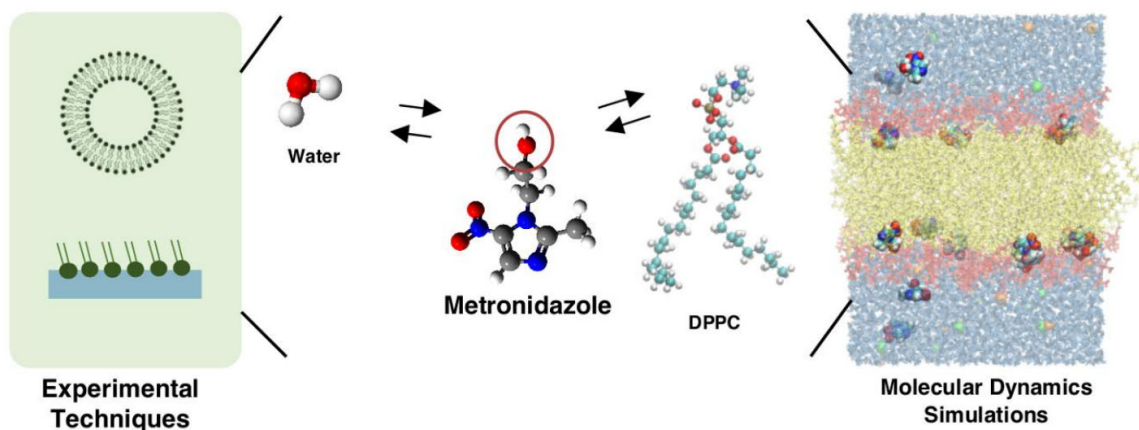


Figura 19. Estudios de la interacción del metronidazol con modelos de membrana simulados.

En el desarrollo de sondas de moléculas pequeñas y en el descubrimiento de fármacos, la identificación de la diana y el mecanismo de acción potencial son de fundamental relevancia⁴. La identificación de dianas moleculares involucra principalmente tres enfoques complementarios que involucran métodos bioquímicos directos, métodos de interacción genética y métodos de inferencia computacional. Por lo tanto, en este capítulo se presenta el estudio de (1) interacciones físicas usando métodos directos, como interacciones con modelos de membranas sintéticas; (2) interacciones entre los compuestos y el ADN; y (3) estudios de interacción computacional, incluyendo acoplamiento molecular y dinámica molecular, utilizando modelos de membrana y proteínas receptoras que se encuentran comúnmente en los organismos que fueron examinados en las pruebas de actividad *in vitro*.

2. Interacción con membranas

Las membranas celulares están formadas por una lámina lipídica con dos hemicapas, una orientada hacia el interior o la otra hacia el exterior de la célula. En la membrana plasmática, la hemicapa orientada hacia el exterior contiene una mayoría de los lípidos que poseen colina,

como la fosfatidil colina y la esfingomielina, mientras que la fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol y la fosfatidil serina se localizan preferentemente en la hemicapa interna¹⁵. Esta desigual distribución de moléculas entre ambas hemicapas se denomina asimetría de membrana, y su rotura funciona como una señal de que hay alteraciones en la célula. Por ejemplo, las células que sufren apoptosis (muerte celular programada), exponen rápidamente la fosfatidilserina en la monocapa externa y esto es una señal para que los macrófagos eliminen esa célula¹⁵. Los daños en la membrana celular pueden ser causados por diferentes factores, entre ellos, por la acción de agentes farmacológicos que involucran mecanismos de acción por interacción con componentes de la membrana externa. La interacción de compuestos químicos con la membrana, puede evaluarse a través de métodos *in vitro*, como el estudio termotrópico de modelos de membrana sintéticos o extraídos de células eucariotas y procariotas, o *in silico*, empleando acoplamiento molecular o dinámica molecular.

2.1 Membranas sintéticas que imitan membranas celulares

Para estandarizar el método de interacción con modelos de membranas sintéticas que imitan membranas bacterianas y de mamífero, fue necesario realizar el estudio de interacción con un péptido antimicrobiano con reconocida actividad (Alyteserin-1c) a través de ensayos calorimétricos. Este péptido de 23 residuos de aminoácidos con una carga neta de +2, se aisló por primera vez de las secreciones cutáneas estimuladas con norepinefrina del sapo partero *Alytes obstetricans*. Se informó la actividad inhibidora contra bacterias Gram-negativas y baja actividad hemolítica contra eritrocitos humanos ($LC_{50} = 220 \text{ M}$)¹⁶. La síntesis del péptido se realizó utilizando un protocolo estándar para el método Fmoc¹⁷ y se procedió a los estudios de interacción con membranas constituidas por 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) y 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilglicerol (DMPG), en donde solo DMPC se utiliza para imitar membranas de mamífero, mientras que la mezcla DMPC/DMPG (3:1) se emplea para imitar membranas bacterianas. El estudio calorimétrico permitió encontrar la temperatura característica a la cual se presentan los picos de transición principal de la fase gel a la fase líquida cristalina en este tipo de modelos de membrana, exhibiendo un comportamiento endotérmico (ver figura 20).

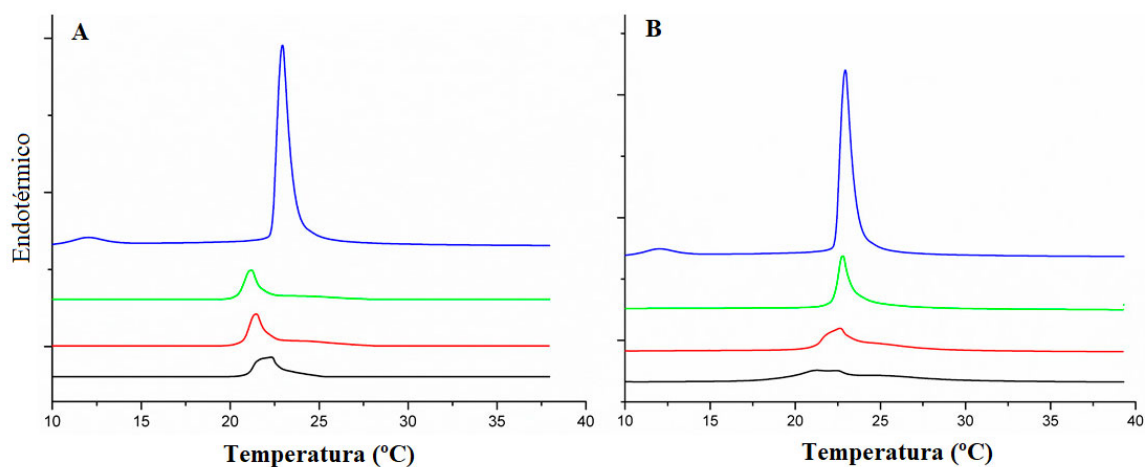


Figura 20. Termogramas obtenidos por DSC que muestra los picos de las VMLs formadas por (A) DMPC y (B) DMPC/DMPG (3:1) antes y después de la adición del péptido a diferente relación molar péptido/lípido 0:1 (—); 1:100 (—); 1:50 (—); 1:25 (—).

Las temperaturas de pretransición y de transición de fase (T_m) para las vesículas multilaminares (VMLs) constituidas por DMPC fueron de 12.9 y 22.9 °C, respectivamente, mientras que para las VMLs constituidas por DMPC/DMPG (3:1) las temperaturas de pretransición y T_m fueron de 12.0 y 22.9 °C (ver tabla 8).

Tabla 8. Cambio en los valores de T_m y ΔH de las VMLs constituidas por DMPC y DMPC/DMPG (3:1) a diferentes concentraciones de péptido Alyteserin-1c.

VML	Relación molar péptido/lípido	Temperatura pretransición (°C)	T_m (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
DMPC	0:1	12.9	22.9	1.47
Péptido-DMPC	1:100	-	21.2	0.63
	1:50	-	21.5	0.62
	1:25	-	21.2	0.62
DMPC/DMPG (3:1)	0:1	12.0	22.9	1.60
Péptido-DMPC/DMPG (3:1)	1:100	-	22.9	0.54
	1:50	-	22.8	0.38
	1:25	-	21.3	0.30

Los resultados de este estudio revelaron que el péptido redujo la temperatura de transición de fase principal (T_m) y la entalpía de transición (ΔH), fluidizando la bicapa de las membranas modelo. Para los dos modelos de membrana, el pico de pretransición desaparece incluso a la concentración más baja del estudio péptido/lípido (1:100), debido a que esta es muy sensible a moléculas extrañas¹⁸, mientras que el pico de transición de fase se observa seriamente afectado a las tres concentraciones de estudio. El aumento de la fluidez de la membrana y la desestabilización térmica de la transición para el estudio del modelo DMPC:DMPG (3:1) podrían estar asociados con la actividad antibacteriana del péptido contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas reportadas en estudios previos^{16,17,19}.

Con el fin de obtener resultados preliminares sobre el posible mecanismo antibacteriano de los ligandos sintetizados (ver figura 21) y sus complejos lantánidos, se realizaron estudios de interacción con membranas modelo que imitaban membranas bacterianas empleando la metodología descrita en el estudio previamente estandarizado con el péptido Alyteserin-1c.

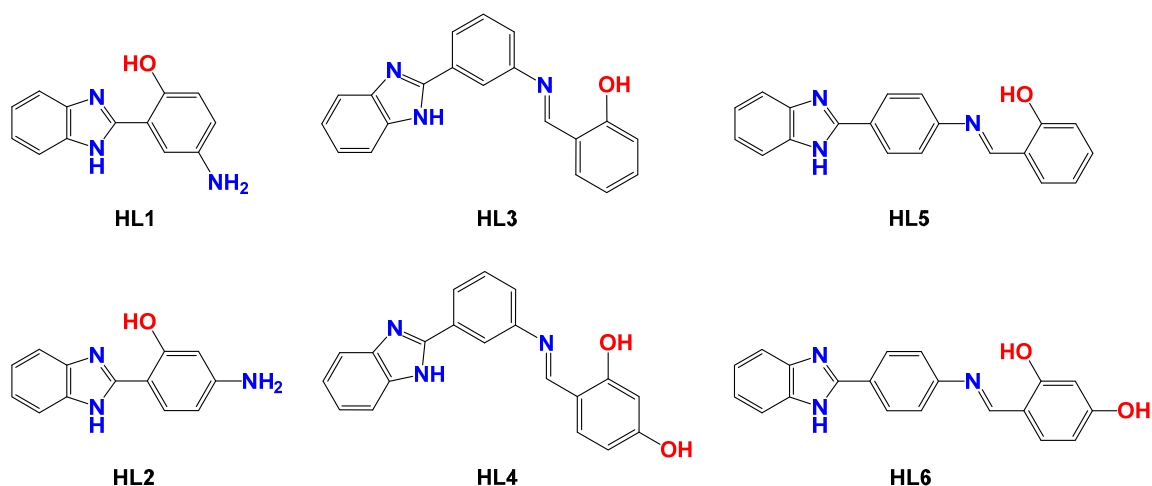


Figura 21. Ligandos aminofenilbencimidazol y bases de Schiff derivadas de bencimidazol.

Los termogramas de las VMLs compuestas por DMPC/DMPG (3:1) en presencia y ausencia de HL2 y su complejo de lantano, se presentan en la figura 22, donde los picos de pretransición y transición mostraron un comportamiento endotérmico. El ligando HL2 mostró un leve efecto sobre la membrana modelo a una relación molar 1:50 (ver tabla 9), aumentando ligeramente la temperatura de transición de fase (T_m) de 22.92 a 23.11 °C.

Además, en todos los casos, el pico de pretransición desapareció después de que se agregaron los compuestos, lo que sugiere que pequeñas cantidades de HL2 o La-L2 pueden alterar estas VMLs, ya que la pretransición es muy sensible a la presencia de otras moléculas en la región polar de los fosfolípidos²⁰. Por otro lado, al aumentar la cantidad de La-L2 o HL2 en una relación molar de 1:10, los valores de T_m y entalpía de transición (ΔH) se redujeron considerablemente. Según las simulaciones de Dinámica Molecular (DM) que se presentarán en la siguiente sección, se observa una baja transición de fase de gel a fluido porque la serie de compuestos puede penetrar la bicapa de fosfolípidos²¹. Por tanto, la fracción hidrófoba del anillo arilo del bencimidazol se insertaría en el núcleo hidrófobo de la bicapa, disminuyendo las interacciones inter e intramoleculares de Van der Waals entre las cadenas de lípidos de acilo, logrando que la entalpía de transición también disminuya²².

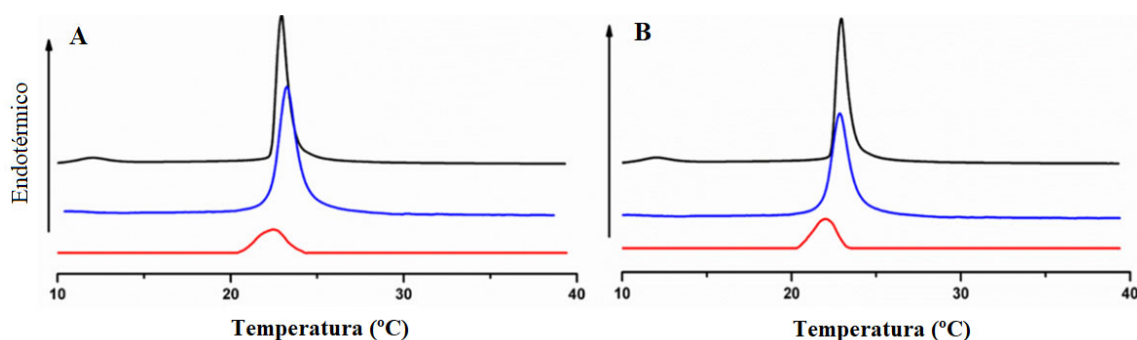


Figura 22. Termogramas DSC que muestran picos de la transición de fase de las VMLs formadas por DMPC/DMPG (3:1) antes y después de la adición de (A) HL2 y (B) La-L2, en diferentes relaciones molares compuesto/lípido: 0:1 (—); 1:50 (—); 1:10 (—).

Curiosamente, el complejo metálico mostró un efecto más fuerte en las membranas que el ligando libre, sugiriendo que el mecanismo de actividad antimicrobiana podría estar relacionado con la rotura de la membrana celular de los microorganismos. Las diferencias entre HL2 y La-L2 podrían deberse a la contribución del ion La(III) a la desestabilización de la bicapa, específicamente en la cabeza polar de los fosfolípidos, ya que esta tiene la capacidad de entrar en contacto con el grupo fosfato de la fosfatidilcolina²³.

Tabla 9. Valores de T_m y ΔH de las VMLs constituidas por DMPC/DMPG (3:1) antes y después de la adición de HL2 y La-L2 a diferentes relaciones molares compuesto/lípido.

VML	Relación molar compuesto/lípido	Temperatura pretransición (°C)	T_m (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
DMPC/DMPG (3:1)	0:1	12	22.92	0.39
HL2- DMPC/DMPG (3:1)	1:50	-	23.11	0.39
	1:10	-	22.51	0.08
La-L2- DMPC/DMPG (3:1)	1:50	-	22.85	0.22
	1:10	-	21.95	0.11

Para el estudio de la segunda serie de compuestos (HL3 – HL6), los ensayos se realizaron con modelos de membranas similares a las de mamíferos (DMPC) y membranas similares a las bacterianas (DMPC/DMPG). Para la selección de la concentración de los compuestos, fue necesario realizar el estudio de interacción para un solo compuesto a diferentes relaciones molares, en este caso se escogió al compuesto HL4 por su mejor actividad biológica en comparación a los otros ligandos bases de Schiff. Los resultados del estudio calorimétrico mostraron que, al calentar gradualmente las vesículas sin compuesto, se logra obtener el perfil termotrópico (ver figura 23), observando un pico endotérmico a 12.94 °C correspondiente a la pretransición para los sistemas DMPC, y a 12.71 °C para los sistemas DMPC/DMPG (3:1). Estos pequeños picos de pretransición observados en las VMLs sin compuesto, se deben a que las fosfatidilcolinas (PC) tienen un grupo de cabezas bastante voluminoso, lo que crea una reorientación en el sistema (fase ondulatoria) en donde sus cadenas de acilo se desalinean, especialmente por debajo de la transición de fase principal²⁴. A medida que aumenta la temperatura, el pico de transición principal aparece a 23.02 °C para los dos sistemas mencionados anteriormente. Después de la adición de HL4 en una relación molar compuesto/lípido 1:50, se observaron cambios en las temperaturas de pretransición de ambos sistemas (ver tabla 10), lo que sugiere que este compuesto afecta la transición de una fase de membrana plana a una fase de ondulación, posiblemente como resultado de los cambios en el desajuste de tamaño con la hidratación del grupo presente en la cabeza de fosfatidilcolina²⁴.

Al aumentar la concentración de HL4 (relación molar compuesto/lípido 1:25), se elimina la pretransición, la T_m cambia moderadamente y el tamaño del pico de la transición principal disminuye a medida que aumenta el ancho del pico en ambos sistemas lipídicos.

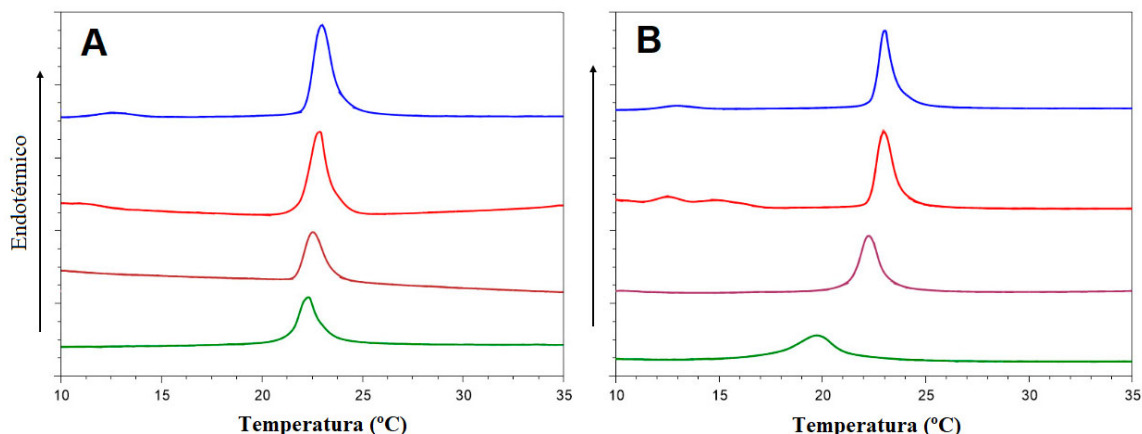


Figura 23. Perfil termotrópico de VMLs formadas por (A) DMPC y (B) DMPC/DMPG (3:1) a diferentes concentraciones de HL4. Relación molar compuesto/lípido: 0:1 (—); 1:50 (—); 1:25 (—); 1:10 (—).

Tabla 10. Valores de T_m , $\Delta T_m/2$ y ΔH en las VMLs constituidas por DMPC y DMPC/DMPG (3:1) a diferentes concentraciones de la base de Schiff HL4.

VML	Relación molar compuesto/lípido	Temperatura pretransición (°C)	T_m (°C)	$\Delta T_m/2$ (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
DMPC	0:1	12.94	23.02	0.98	1.48
	1:50	11.58	22.94	1.09	1.05
	1:25	-	22.60	1.14	0.78
	1:10	-	22.38	1.23	0.76
DMPC/DMPG (3:1)	0:1	12.71	23.02	0.73	1.71
	1:50	12.49	22.98	0.90	1.46
	1:25	-	22.24	1.08	1.38
	1:10	-	19.72	2.34	1.13

La superficie de la bicapa debe considerarse como un conjunto de varios cúmulos de fosfolípidos, donde todas las moléculas de cada clúster exhiben un comportamiento

simultáneo en la transición. Esta propiedad cooperativa del proceso de fusión define curvas más nítidas y simétricas en el pico de transición. De esta forma, HL4 es capaz de penetrar en la bicapa ya que los cúmulos aumentan notablemente en número²⁵. $\Delta T_m/2$ es una medida relativa de cooperatividad molecular y aumenta con la concentración de HL4, pasando de 0.98 a 1.14 °C y de 0.73 a 1.08 °C para los sistemas DMPC y DMPC/DMPG respectivamente a relación compuesto/lípido (1:25), lo que sugiere la inserción del compuesto en los vacíos o huecos que presenta la estructura de la bicapa (volúmenes libres)²⁵. Por lo tanto, el ancho completo a la mitad del máximo del pico de transición principal es una variable que indica cuán cooperativos son los fosfolípidos cuando experimentan una transición²⁶. De manera similar, la entalpía de transición se reduce considerable y moderadamente en DMPC y DMPC/DMPG, respectivamente (ver tabla 10), sugiriendo que la adición de lípidos aniónicos (DMPG) a los lípidos zwitteriónicos (DMPC) evita mayores alteraciones en las interacciones entre las cadenas de lípidos acilo, es decir, la disrupción de la isomerización *trans-gauche* y las interacciones de van der Waals inter e intramoleculares²⁷. Esto se puede explicar por una fuerte adhesión de la base de Schiff sobre la superficie aniónica por el fosfatidilglicerol a esta concentración, donde el tamaño pequeño y la flexibilidad reducida de HL4 evita que sus restos hidrófobos se inserten dentro de la bicapa. A la concentración más alta estudiada para HL4, se observó un cambio pronunciado en T_m y en el ancho del pico para la mezcla DMPC/DMPG (ver figura 23), lo que sugiere que, a esta concentración, HL4 aumenta la fluidez y la separación de fase lateral en membranas que imitan las de bacterias. De hecho, se sabe que la fluidez aumenta en respuesta a un aumento en las velocidades de difusión lateral de las moléculas de lípidos²⁸, y se ha relacionado con alteraciones dentro del núcleo hidrófobo de la bicapa²⁹. Por lo tanto, es probable que más moles de HL4 se unan a una unidad de área más pequeña en DMPC/DMPG que a una superficie completa de DMPC, alcanzando una concentración umbral más baja debido a la presencia de DMPG, que está relacionada con el grado de inserción de compuestos dentro de la bicapa³⁰. Finalmente, es importante destacar que desde la concentración más baja estudiada (relación 1:50) ya se observa un efecto directo sobre las membranas, por lo que esta relación molar se consideró para evaluar los siguientes compuestos.

En los estudios de todas las bases de Schiff y sus complejos de lantano, cada modelo de membrana (libre) exhibió dos picos endotérmicos, un pico de pretransición y un pico de transición principal. Los picos de pretransición ocurrieron a 12.94 y 12.71 °C para DMPC y la mezcla DMPC/DMPG (3:1), respectivamente, mientras que la temperatura de transición (T_m) cuando la mezcla se transformó de gel a líquido cristalino para ambos sistemas lipídicos, fue de 23.02 °C (ver tabla 11).

Tabla 11. Valores de T_m y ΔH de vesículas multilaminares formadas por DMPC y DMPC/DMPG (3:1) antes y después de la adición de bases de Schiff y sus complejos de La(III) en una relación molar compuesto/lípido de 1:50.

VML	Compuesto	Temperatura pretransición (°C)	T_m (°C)	ΔH (J.g ⁻¹)
DMPC	-	12.94	23.02	1.48
	HL3	-	22.39	0.82
	La-L3	-	22.85	0.62
	HL4	-	22.94	1.05
	La-L4	-	22.22	0.57
	HL5	-	22.22	0.54
	La-L5	-	22.46	0.25
	HL6	-	22.53	0.70
	La-L6	-	21.60	0.21
DMPC/DMPG (3:1)	-	12.71	23.02	1.72
	HL3	-	22.41	1.48
	La-L3	-	23.55	0.61
	HL4	-	23.06	1.46
	La-L4	-	22.58	0.51
	HL5	-	23.39	1.50
	La-L5	-	21.64	1.31
	HL6	-	22.86	1.41
	La-L6	-	22.47	1.38

Después de la adición de ligandos y complejos a ambos sistemas de lípidos en una proporción molar de compuesto/lípido de 1:50, el pico previo a la transición desapareció por completo,

lo que sugiere que tanto los ligandos libres como los complejos unidos a metales tienen la capacidad de alterar la organización de las membranas. En vesículas multilaminares compuestas por lípidos de DMPC, la T_m se redujo modestamente después de que se agregaron ligandos y complejos, desplazando los picos de transición principales a temperaturas más bajas (ver figura 24), sugiriendo que los compuestos pueden aumentar la fluidez de la membrana en respuesta a la alteración del núcleo hidrofóbico de la bicapa. Se sabe que la fluidez aumenta en respuesta a un aumento en las velocidades de difusión lateral de las moléculas de lípidos²⁸.

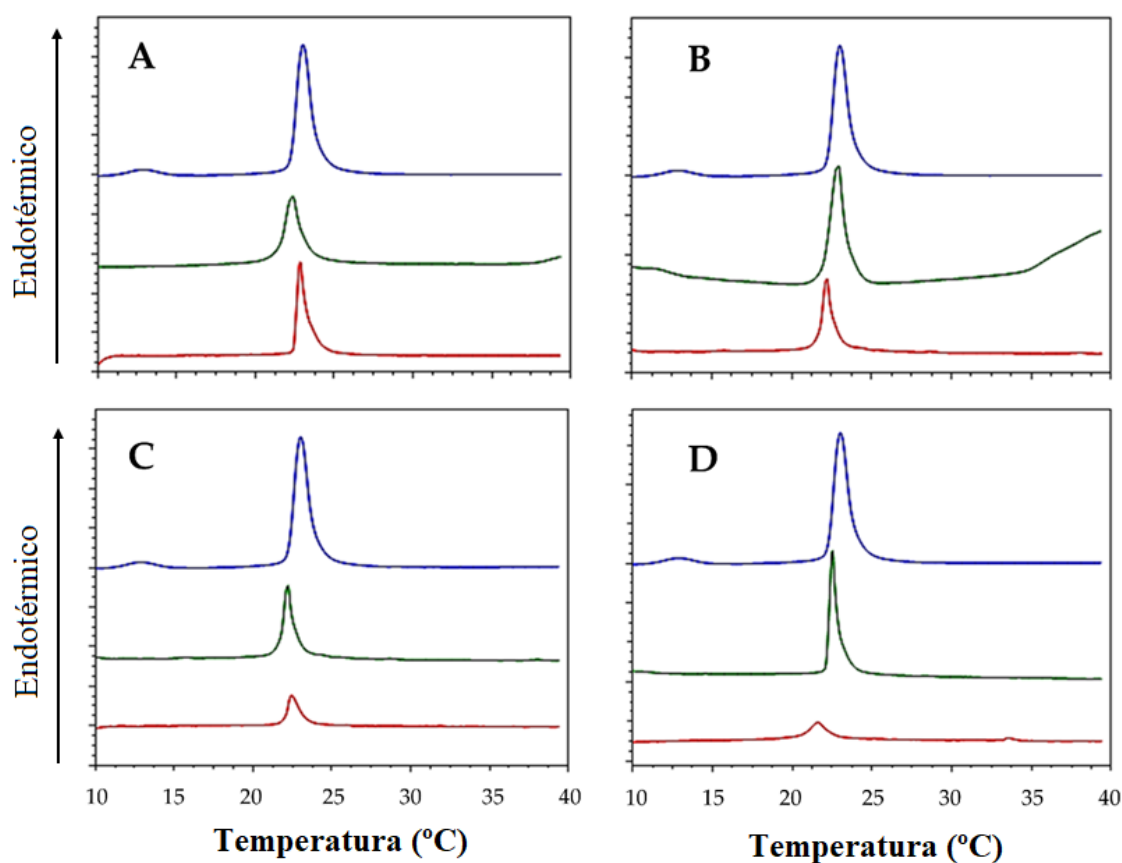


Figura 24. Perfil termotrópico de VML preparadas con DMPC antes (—) y después de la adición del ligando (---) y el complejo de lantano (---) en una relación molar compuesto/lípido 1:50. (A) L3; (B) L4; (C) L5; y (D) L6.

El aumento de la fluidez puede ir acompañado de una mayor permeabilidad³¹, favoreciendo el efecto antiproliferativo que ejercen estos compuestos. Algunos estudios han mostrado correlaciones entre diferentes agentes antitumorales y la fluidez de la membrana^{32,33}. Para comprender la reactividad de los ligandos con DMPC, se debe considerar que, por su estructura, la fosfatidilcolina puede formar enlaces de hidrógeno. Además, los grupos hidroxilo de los fenoles pueden interactuar con las moléculas de agua incrustadas dentro de la membrana, mientras que la fracción hidrófoba de los anillos aromáticos se puede orientar hacia el núcleo de la bicapa hidrófoba. Para los ligandos HL3 y HL5, la T_m aumentó ligeramente después de la adición del ion lantánido (figura 24A y 24C), mientras que para los complejos La-L4 y La-L6, la T_m disminuyó (figura 24B y 24D), esto es similar a los resultados encontrados por Zschörnig y colaboradores³⁴, quienes reportaron que las interacciones de los metales con las cabezas polares de los fosfolípidos afectan el empaquetamiento de la membrana. Igualmente, Le y colaboradores³⁵ mostraron que la zona del grupo de cabeza de la fosfatidilcolina zwitteriónica puede ser penetrada por cationes, coordinándose con las bases de Lewis de acuerdo con su dureza, en lugar de interacciones coulombicas, donde la contribución a la energía de unión de las interacciones lípido-lípido se observa como un cambio en la temperatura de transición de fase. Por el contrario, la entalpía de transición disminuyó considerablemente cuando se adicionaron las bases de Schiff y los complejos lantánidos (ver tabla 11), lo que indica una alteración de las interacciones entre las cadenas de acilo de los lípidos debido a la interrupción de las interacciones intra e intermoleculares de van der Waals y la isomerización *trans-gauche*²⁷.

En las membranas que constan de la mezcla DMPC/DMPG (3:1), la T_m se redujo moderadamente después de la adición de los ligandos y los complejos lantánidos (ver figura 25), mientras que la entalpía de transición disminuyó considerablemente para los complejos La-L3 y La-L4 (ver tabla 11), lo que sugiere que los efectos de los ligandos HL3 y HL4 son alterados cuando hay presencia del metal, pues la fuerte adhesión sobre la superficie aniónica del fosfatidilglicerol que se describió anteriormente, desaparece al pasar de un valor de ΔH de 1.46 J.g⁻¹ (para HL4) a 0.51 J.g⁻¹ (para La-L4). Estos resultados podrían explicar la actividad antibacteriana de estos compuestos contra bacterias Gram-negativas y la relación

estructura/actividad dependiente del anillo de aminofenilo. Sin embargo, los efectos de los complejos La-L5 y La-L6 en relación a la entalpía de transición, fueron claramente más fuertes en las membranas DMPC que en las membranas DMPC/DMPG, lo que podría ser explicando por el modelo de doble capa, que describe la asociación de iones utilizando la ecuación de Stern³⁶, en la que los iones de los compuestos responden a la carga aniónica total de la membrana; así, los compuestos no penetran en la membrana sino que permanecen en la superficie³⁴, impidiendo su inserción en la bicapa aniónica donde pueden lograr un efecto más fuerte, como ocurre con las membranas DMPC.

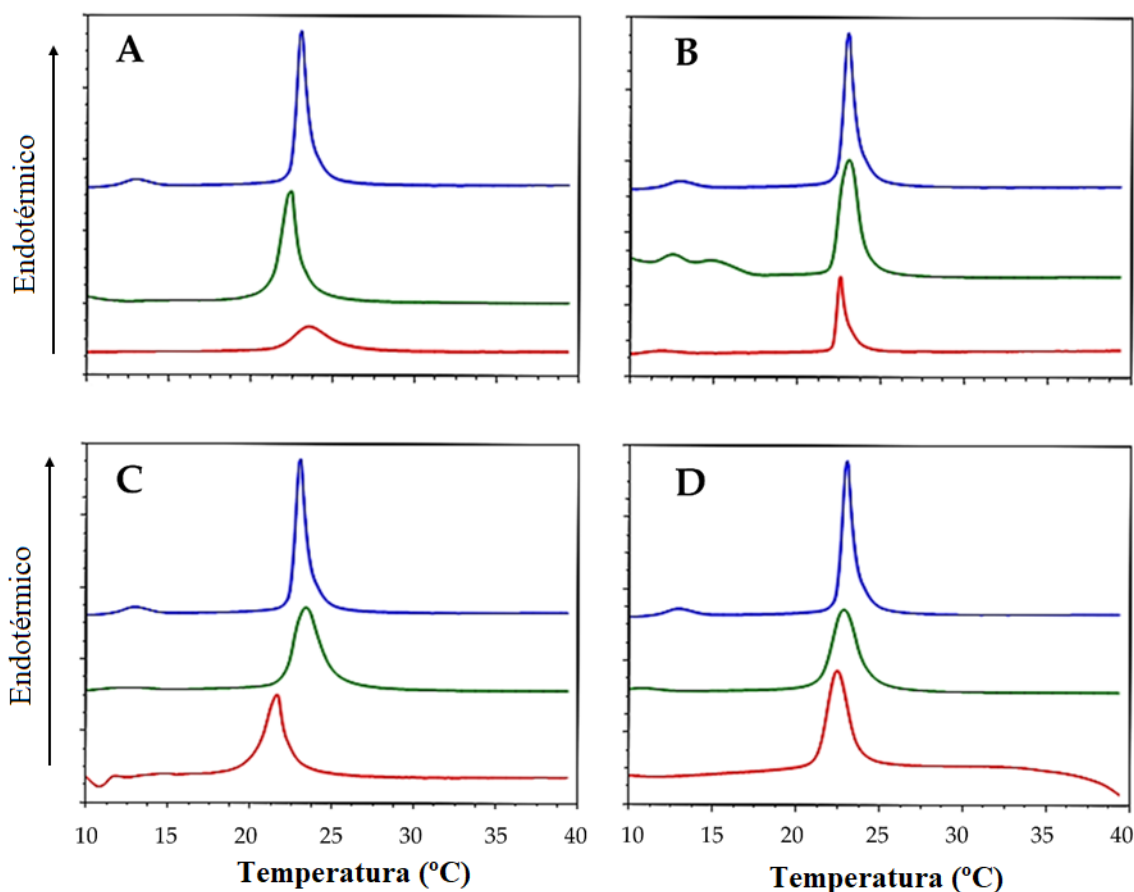


Figura 25. Termogramas DSC de VMLs preparadas con mezcla DMPC/DMPG (3:1) antes (—) y después de agregar el ligando (---) y el complejo de lantano (---) en una relación molar compuesto-lípido 1:50. (A) L3; (B) L4; (C) L5; y (D) L6.

2.2 Estudio por dinámica molecular con membranas simuladas

La construcción del modelo 3D para los compuestos a estudiar por dinámica molecular, se realizó utilizando la herramienta MOLView³⁷; posteriormente, su topología se obtuvo con el servicio web SwissParam³⁸ que ofrece datos para pequeñas moléculas orgánicas compatibles con el campo de fuerza CHARMM o GROMACS. La plataforma CHARMM-GUI³⁹ se utilizó para desarrollar un modelo de membrana sintética DMPC/DMPG y la membrana Gram-negativa de *E. coli* que incluye fosfolípidos neutros (palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina o POPE) y negativos (palmitoiloleoilfosfatidilglicerol o POPG), siguiendo la metodología sugerida por Epanand y Wasan^{40,41}. El análisis de interacción se realizó entre los fosfolípidos y dos moléculas modelo (HL2 y HL4) con mejores resultados dentro de las dos series de ligandos (aminofenilbencimidazol y bases de Schiff), esto con el fin de obtener información relevante que pudiera sugerir el posible mecanismo de acción y su correlación con los experimentos realizados con modelos de membrana sintéticas.

Para el análisis de la interacción entre HL2 y los fosfolípidos DMPC/DMPG y POPE/POPG, se utilizaron los programas GROMACS⁴² y VMD (*visual molecular dynamics*)⁴³. En el análisis de VMD, se estudiaron las interacciones de los fosfolípidos con las moléculas, para determinar si los compuestos atraviesan, o si permanecen dentro o fuera de la membrana. La figura 26 muestra los valores de la desviación cuadrática media (RMSD por sus siglas en inglés) en relación al comportamiento del ligando HL2 a través de los 10 ns de la simulación, tanto para los modelos de membrana POPE/POPG y DMPC/DMPG. Para ambos modelos, se puede observar que la mayor variación se da al inicio de la simulación, esto se debe a la posición inicial de las moléculas en el sistema, ya que se ubicaron por encima de la membrana sin estar en contacto con ella. A medida que pasa el tiempo, la variación disminuye a 8 ns para el modelo POPE/POPG, y a 6 ns para el modelo DMPC/DMPG. Este efecto es causado por la interacción entre las moléculas de ligando y los fosfolípidos, permitiendo que las moléculas se anclen en la superficie de la membrana y moderen su variación estructural.

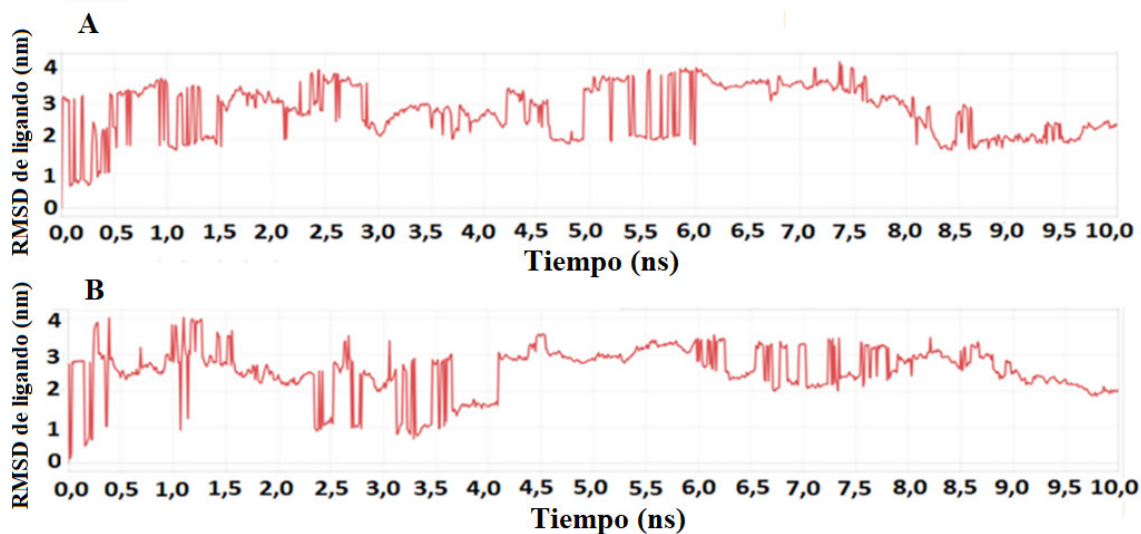


Figura 26. Análisis RMSD de los átomos de HL2 en membranas modelo (a) DMPC/DMPG; y (b) POPE/POPG (*E. coli*).

Los estudios de dinámica molecular permitieron obtener el perfil de densidad de las bicapas DMPC/DMPG y POPE/POPG en presencia del ligando a lo largo del eje z (ver figura 27) para analizar la distribución de estos componentes en el sistema a 0 ns y 10 ns. La densidad máxima del ligando HL2 se encuentra por debajo de la región donde se observan todos los fosfolípidos, tanto a 0 ns como a 10 ns. Esto indica que el ligando se localiza preferentemente cerca de los fosfolípidos tipo DMPG y POPG. La disminución de la densidad de los fosfolípidos en ambos modelos después de 10 ns, es un indicador de la interacción e inserción de la molécula en la membrana. La figura 28 muestra el mecanismo de inserción del ligando HL2 en los sistemas de membranas DMPC/DMPG y POPE/POPG a través de 10 ns. En ambos modelos, se detalla cómo una molécula de aminofenilbencimidazol comienza interactuando con las cabezas de fosfolípidos a través de sus átomos de oxígeno y nitrógeno; sin embargo, la interacción con el átomo de nitrógeno del anillo aminofenol no es lo suficientemente fuerte como para permitir que la molécula quede atrapada. La interacción más fuerte, que es con el átomo de oxígeno del fenol, provoca su anclaje. Posteriormente, la molécula se inserta en la membrana y permanece estable (ligeros cambios en su posición) con el grupo aminofenol orientado hacia la superficie de la membrana y el anillo bencimidazol orientado hacia la región hidrofóbica de la membrana.

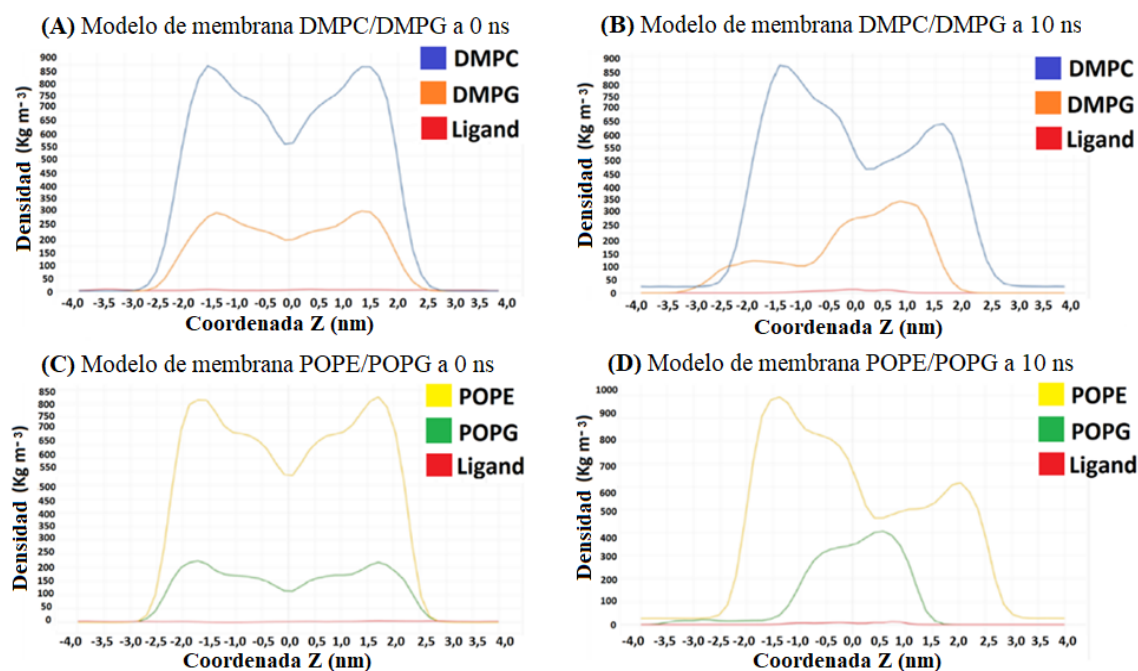


Figura 27. Perfil de densidad parcial en la dirección z para los sistemas de membranas DMPC/DMPG y POPE/POPG a 0 y 10 ns.

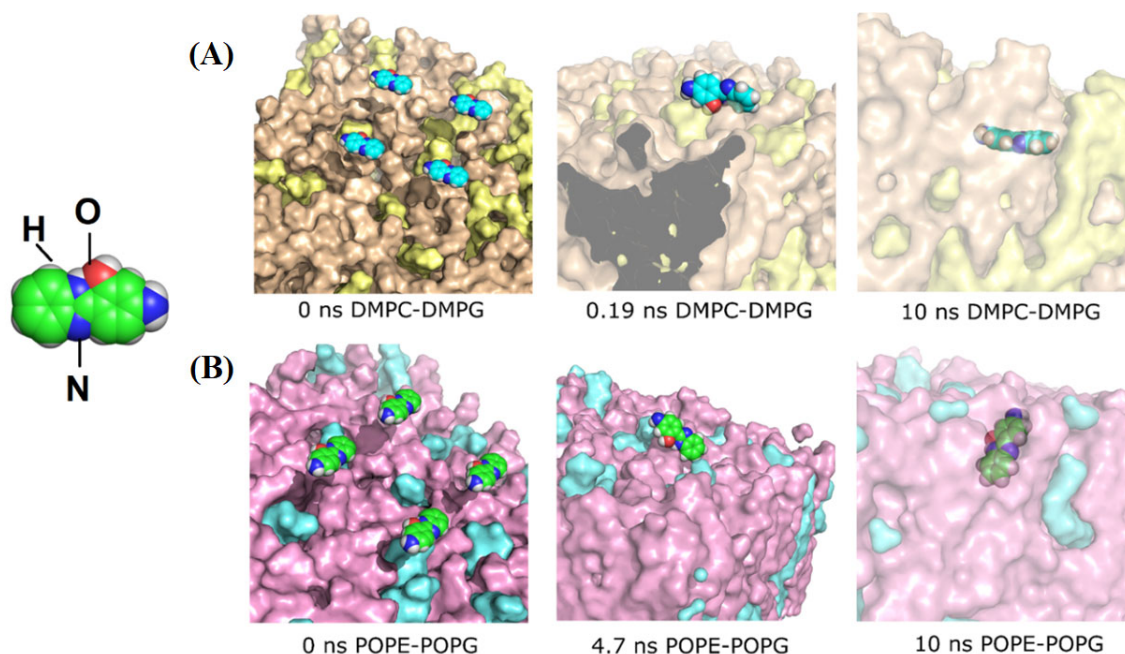


Figura 28. Mecanismo de inserción del ligando HL2 a través de 10 ns en los sistemas de membrana (A) DMPC/DMPG; y (B) POPE/POPG.

La figura 29 muestra los enlaces de hidrógeno entre las regiones de aminofenol/bencimidazol del ligando y los fosfolípidos DMPC/DMPG y POPE/POPG. La interacción nula entre la región de aminofenol/bencimidazol y DMPC es clara. Sin embargo, con DMPG, los enlaces de hidrógeno se forman a partir de la mitad y al final de la simulación. Esto se debe a que, al inicio, las moléculas se colocaron en los modelos de membrana sin estar en contacto con ella. Los resultados muestran que se pueden formar hasta dos enlaces de hidrógeno con DMPG y la región de bencimidazol del ligando. El modelo de membrana POPE/POPG muestra una formación nula de enlaces de hidrógeno en la región del aminofenol con los fosfolípidos, pero la región de bencimidazol exhibe interacciones tanto con el POPG como con el POPE, siendo este último el que forma el mayor número de enlaces de hidrógeno. La preferencia por la formación de enlaces de hidrógeno de los modelos de membrana con la región de bencimidazol del ligando es clara, lo cual se debe a la mayor presencia de átomos propensos a formar enlaces de hidrógeno, como nitrógeno y oxígeno. Esta interacción es fundamental para la inserción y estabilización del ligando en los modelos de membrana evaluados.

Por otro lado, el estudio por dinámica molecular de la interacción de las bases de Schiff con modelos de membrana de eritrocitos y de bacteria Gram-negativa, se realizó con el ligando HL4 como molécula representativa de la serie dados los resultados previos con modelos de membrana sintéticos. En el modelo de membrana zwitteriónico de eritrocitos, se utilizaron los fosfolípidos POPE, POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) y SM (esfingomielina: N-(15Z-tetracosenoil)-esfingo-4-enina-1-fosfocolina). La figura 30 muestra la RMSD de HL4 en la membrana de eritrocitos durante 30 ns, observando que de 0 a 10 ns hay una variación continua de la RMSD, lo que sugiere que toda la estructura fluctúa, o podría reflejar solo grandes desplazamientos de un pequeño subconjunto estructural dentro de una estructura rígida general⁴⁴. Lo anterior, como resultado de la pérdida de enlaces entre fosfolípidos, y la formación de interacciones ligando-membrana durante la inserción y ajuste del compuesto dentro de la cabeza polar de los fosfolípidos en estos primeros nanosegundos. A partir de 10 ns se observa una estabilización de la configuración estructural de HL4 que coincide con la penetración dentro de la región polar de la membrana, lo que indica que no genera cambios considerables a la conformación general del sistema por encima de 30 ns.

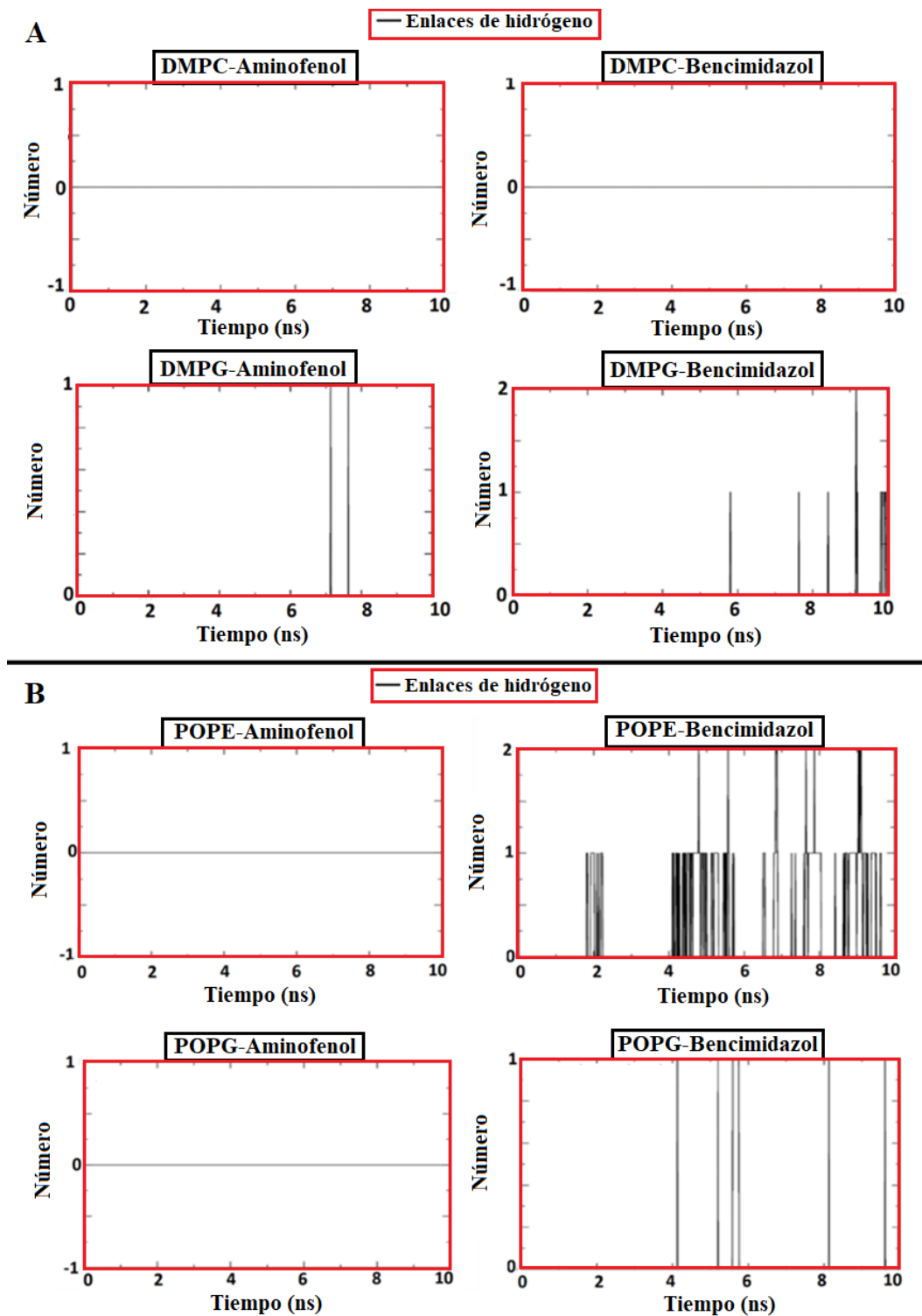


Figura 29. Número de enlaces de hidrógeno entre las dos partes del ligando HL2 (aminofenol y bencimidazol) con los modelos (A) DMPC/DMPG; y (B) POPE/POPG.

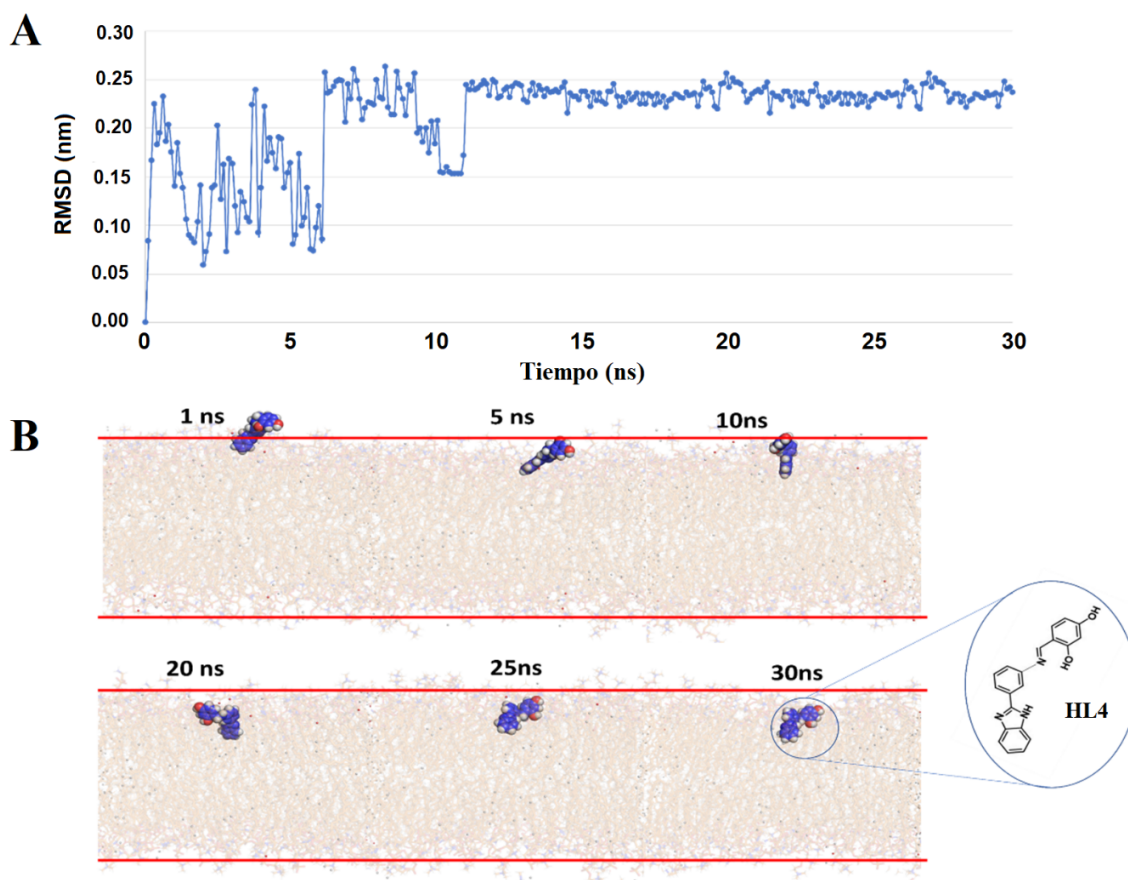


Figura 30. Comportamiento de HL4 en el sistema modelo de membrana de eritrocitos durante 30 ns. (A) Desviación cuadrática media (RMSD); (B) Movimiento de HL4 desde la superficie de la membrana eritrocitaria durante los 30 ns.

En el sistema modelo de membrana de eritrocitos, para HL4 se observó mayor número de interacciones tipo enlace de hidrógeno con moléculas de agua en los primeros nanosegundos, debido a la interacción con la región interfacial membrana-agua. Estas interacciones con el agua disminuyen a medida que pasa el tiempo de 10 a 30 ns. Por el contrario, las interacciones con SM y POPE aumentan a medida que pasa el tiempo, siendo los fosfolípidos que más interactúan con HL4 en comparación con POPC. La presencia del grupo amino en la cabeza de POPE, le permite formar enlaces adicionales⁴⁵. A pesar de que POPC y SM tienen una cabeza polar similar, estos fosfolípidos difieren en sus estructuras interfaciales debido a la composición del alcohol que une al fosfato con la cola hidrofóbica. Dicha composición

influye en el tamaño de la cabeza del fosfolípido, siendo ligeramente más pequeña para SM, lo que podría provocar un empaquetamiento molecular más cercano con HL4. El aumento de las interacciones en la interfaz de la membrana podría incrementar la afinidad de HL4 por SM en comparación con POPC⁴⁶. Tanto las interacciones hidrofóbicas como los enlaces de hidrógeno son responsables de la afinidad de HL4 por PE y SM, lo que sugiere que los enlaces -C=N están orientados hacia el núcleo de la bicapa y los grupos -OH están orientados hacia la fase acuosa, como se observó en la figura 30B. La figura 31 muestra el número de enlaces de hidrógeno entre HL4 y los fosfolípidos a lo largo del tiempo. Curiosamente, las interacciones con SM surgen a partir de 11 ns, permaneciendo hasta los 30 ns, lo que sugiere una selectividad inicial para PE, que interactuaría directamente con la fracción NH_3^+ y no con el grupo amina cuaternaria de la colina. Además, también existen enlaces de hidrógeno entre HL4 y POPC de 2 a 8 ns mientras la molécula ingresaba a la membrana. Esto podría deberse al mayor tamaño de la cabeza polar de POPC en comparación con las de POPE y SM, ya que ocupan un mayor volumen y tienen una mayor probabilidad de contacto inicial con HL4. Una vez la molécula se encuentra en el interior, se mantiene una fuerte interacción con la esfingomielina; se ha reportado que el grupo -OH o la función -NH de SM, desempeñan un papel importante en las interacciones de enlace de hidrógeno con compuestos “extraños”⁴⁷.

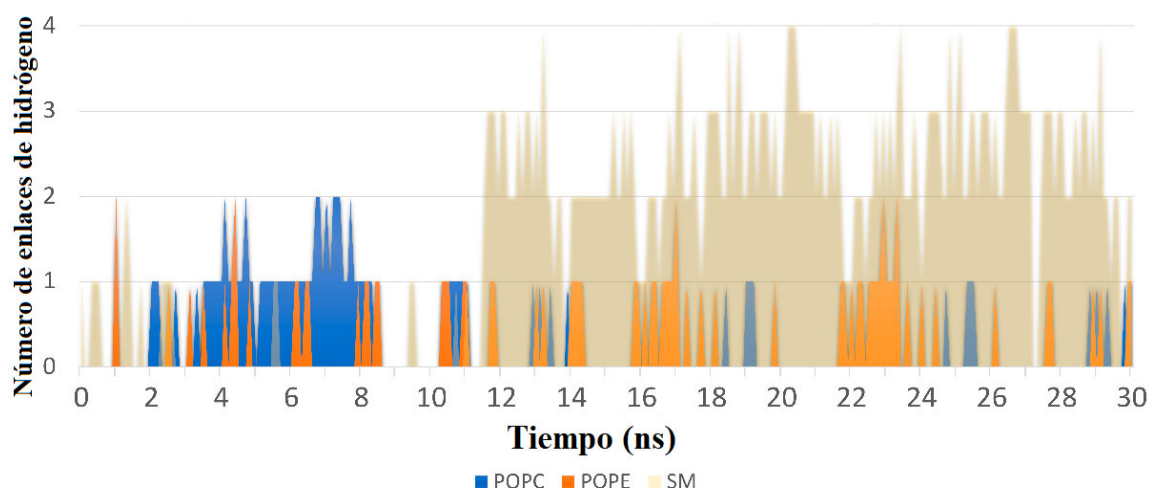


Figura 31. Enlaces de hidrógeno entre HL4 y los fosfolípidos del sistema modelo de membranas de eritrocitos.

La Figura 32 muestra el comportamiento de HL4 en la membrana del modelo de *E. coli* durante 30 ns. El RMSD revela que durante los primeros 6 ns existe una gran variación estructural de HL4 relacionada con su ubicación entre la superficie de la membrana y la fase acuosa, lo que provoca un contacto intermitente tanto con moléculas de agua como con POPE o POPG. Entre 10 y 20 ns hay una ligera variación estructural de HL4, y durante este tiempo la molécula permanece sumergida en la membrana. Nuevamente, la base de Schiff reaparece en la superficie de la membrana entre la fase acuosa y lipídica, lo que se refleja en una mayor desviación estructural entre 20 y 21 ns como resultado de diferentes cambios de solvatación. Finalmente, HL4 se ubica nuevamente dentro del grupo principal de fosfolípidos entre 28 y 30 ns. A diferencia de la membrana de eritrocitos, la posición de HL4 en el modelo de membrana de *E. coli* fluctuó mucho durante los 30 ns. Para explicar esto, hay que considerar que la membrana eritrocitaria está formada únicamente por un 20% de POPE mientras que la de *E. coli* tiene un 80% de POPE. El grupo NH_3^+ de POPE se une al oxígeno del fosfato no esterificado mediante interacciones no covalentes del tipo ion-ion (contactos estrechos)⁴⁸. Posteriormente, los enlaces entre fosfatos adyacentes forman una red muy compacta de cabezas polares de POPE en la superficie de la membrana, dificultando el acceso de la base de Schiff y reorientándola dentro de la fase lipídica durante los primeros 20 ns. Por otro lado, la fracción de glicerol de POPG imita el agua de solvatación del grupo fosfato⁴⁹. Este enlace de hidrógeno interno del glicerol protege al fosfato y al mismo tiempo evita su deshidratación, por lo que el enlace de hidrógeno entre los compuestos “extraños” y el grupo fosfato es menos favorable que cuando el fosfato está unido a las colinas⁵⁰.

En las interacciones de HL4 con los componentes del sistema modelo de membrana de *E. coli*, se observó una mayor interacción con las moléculas de agua a través de enlaces de hidrógeno en los primeros 15 ns. A partir de 10 ns hay tendencia a formar enlaces hidrofóbicos con ambos fosfolípidos; este tipo de interacción se mantiene hasta 30 ns, lo que sugiere que HL4 debe penetrar al menos parcialmente en el núcleo hidrófobo de la bicapa de fosfolípidos. Como el sistema es altamente dinámico, es probable que la fracción hidrófoba del anillo heterocíclico aromático interactúe con las cadenas de acilo en una región cercana a la interfaz (ver figura 32B). La inserción parcial en el núcleo hidrófobo sería responsable

del aumento de la fluidez descrito en las membranas del modelo bacteriano en una relación molar HL4:lípido 1:10 (ver figura 23B), ya que se ha relacionado la interacción de los compuestos con las cadenas de fosfolípidos acilo como un efecto fluidizante neto de la parte apolar de la bicapa²⁹.

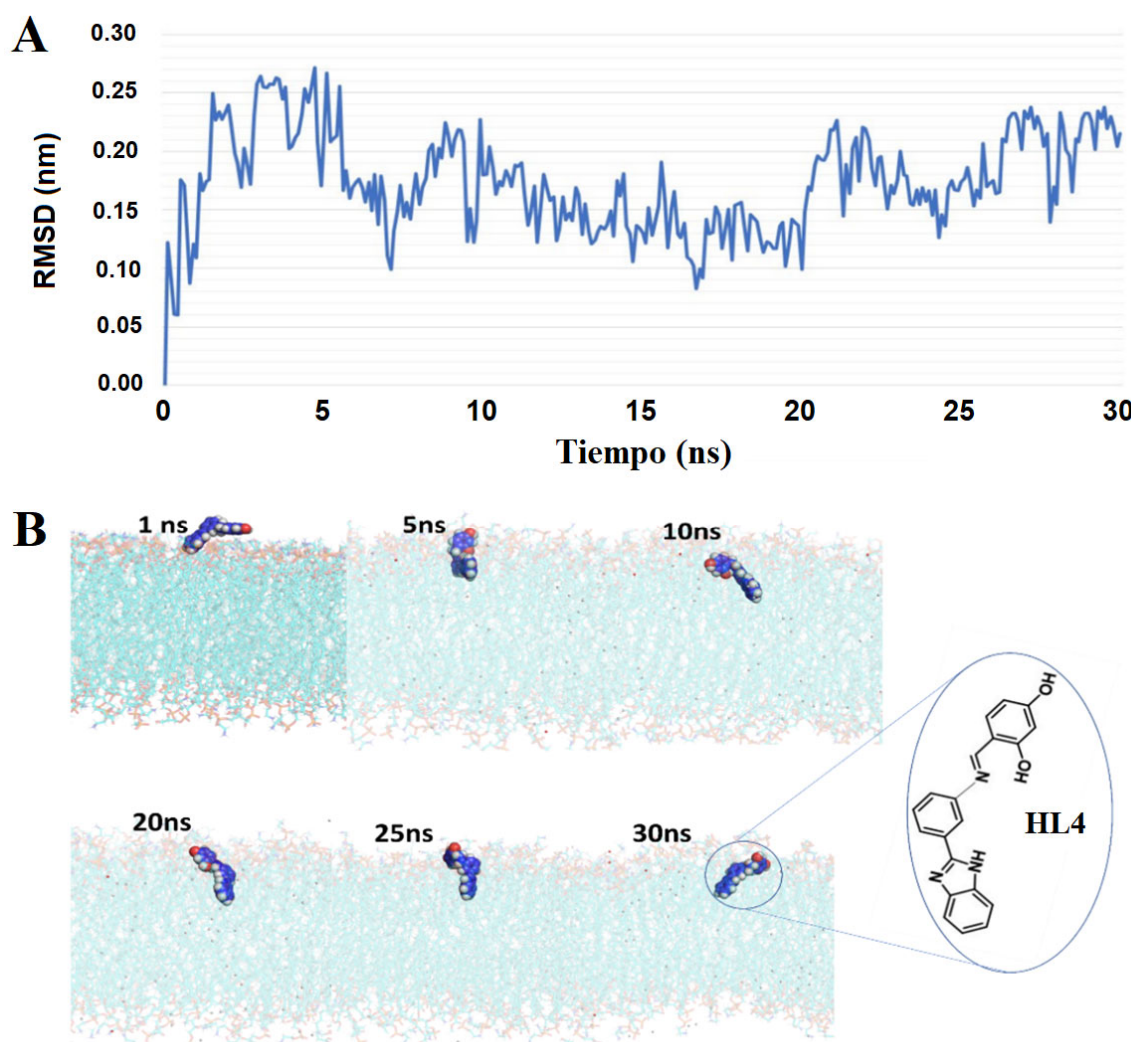


Figura 32. Comportamiento de HL4 en el sistema modelo de membrana de *E. coli* durante 30 ns. (A) Desviación cuadrática media (RMSD); (B) Movimiento de HL4 desde la superficie del sistema modelo de membrana de *E. coli* durante los 30 ns.

Finalmente, la figura 33 muestra el número de enlaces de hidrógeno formados entre HL4 y los fosfolípidos del modelo de membrana de *E. coli*, en donde se observó una interacción similar con POPE y POPG, excepto a los 10 y 22 ns cuando se encontraron picos de interacción con POPE de hasta seis enlaces de hidrógeno. El grupo amina de POPE que forma enlaces adicionales⁴⁵ estaría orientado favorablemente hacia los grupos polares de HL4 en ambos momentos de tiempo.

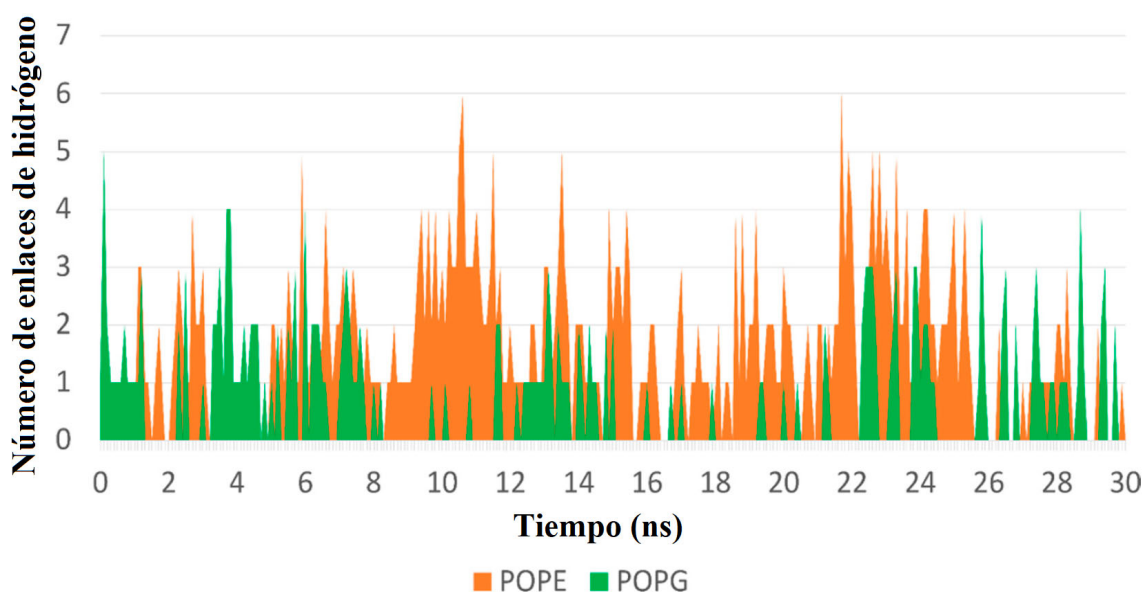


Figura 33. Enlaces de hidrógeno entre HL4 y los fosfolípidos del sistema modelo de membranas de *E. Coli*.

Para identificar la selectividad de HL4 hacia las células cancerosas PC-3, se realizó la simulación con dinámica molecular en el modelo de membrana utilizando POPE, POPC y POPS (palmitoiloleoilfosfatidilserina), este último aumentando su expresión en células cancerosas a diferencia de una célula normal. Por lo tanto, si HL4 tiene una mayor interacción con POPS, podría indicar una tendencia a mejorar el efecto citotóxico hacia las células cancerosas. El comportamiento de HL4 en el sistema se observó por primera vez durante 10 ns con el RMSD; entre 0 ns y 4 ns, la RMSD de la base de Schiff mostró una variación en su estructura, como resultado de interacciones con la superficie de los fosfolípidos (ver figura 34). A 4 ns, la estructura se mantiene con una ligera variación en RMSD, correspondiente al

contacto superficial y la internalización de HL4 dentro del grupo de cabeza polar de fosfolípidos, permaneciendo allí sin llegar a la monocapa interior de fosfolípidos o sin volver al medio acuoso.

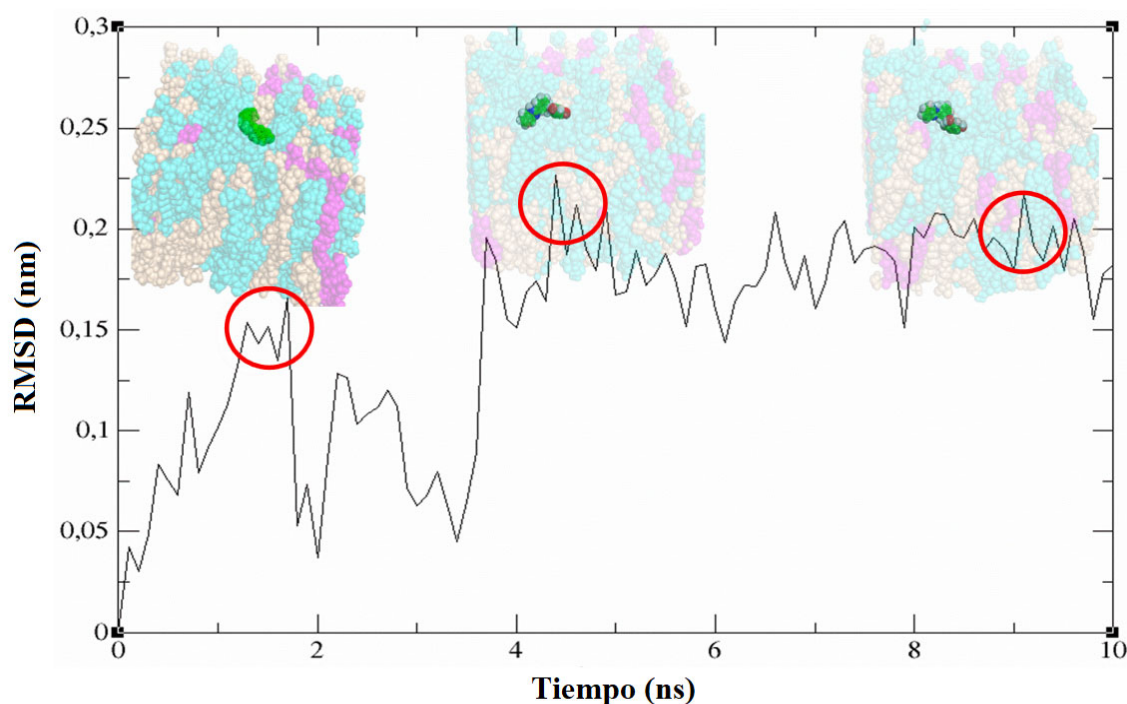


Figura 34. Desviación cuadrática media (RMSD) de HL4 en el sistema que imita membrana celular de PC-3. En verde: HL4, en azul: POPC, en violeta: POPS y en naranja: POPE. Los sistemas en círculos rojos representan la posición de HL4 a lo largo del tiempo.

En la figura 35, se ilustra el número de enlaces de hidrógeno que forma la base de Schiff con los fosfolípidos. En primera instancia, se puede observar que no existen interacciones con POPS, mientras que desde el primer nanosegundo hasta tercer nanosegundo se forman enlaces de hidrógeno con POPE y POPC. Esto ocurre nuevamente para POPC a 5 ns y para POPE a 8 ns. Sin embargo, a lo largo de los 10 ns hay una tendencia a formar al menos dos enlaces de hidrógeno con POPC, probablemente debido a las 44 unidades de este fosfolípido en el sistema frente a las 27 unidades de POPE.

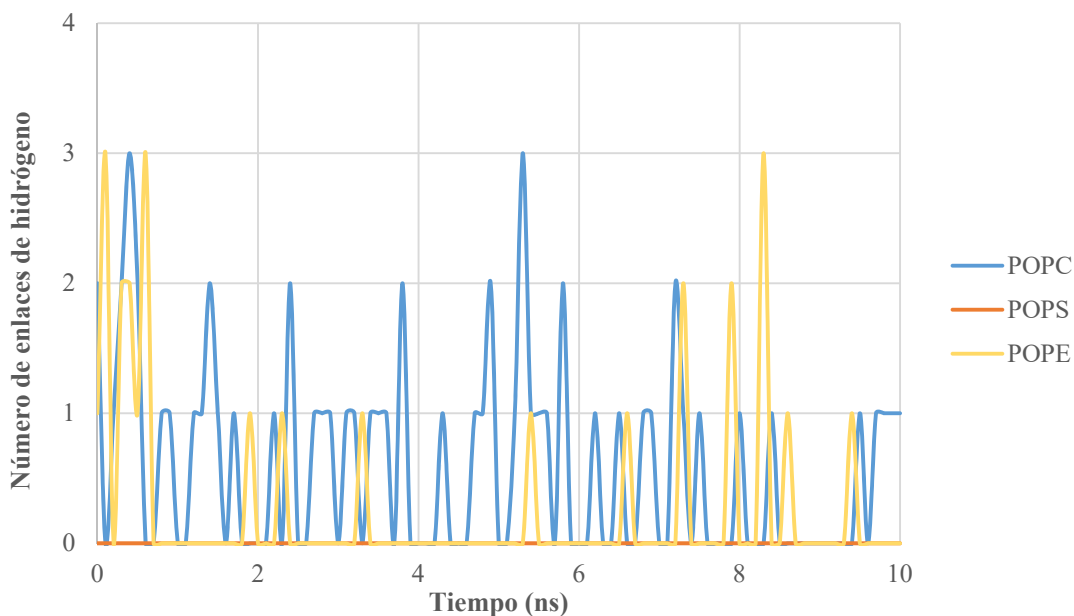


Figura 35. Enlaces de hidrógeno entre HL4 y los fosfolípidos del sistema que imita membrana celular de PC-3.

En la figura 36, se muestran los enlaces de hidrógeno formados entre HL4 y otras moléculas del sistema. A 2 ns hay interacciones con moléculas de agua, a 5 ns todavía se observan las mismas interacciones, mientras que a los 9 ns se logra observar la interacción del átomo de nitrógeno de la imina en HL4 con el oxígeno del carbonilo de POPE. En general, se observa que, hasta 10 ns existe una baja afinidad por las membranas que imitan las de células cancerosas a nivel *in silico*. De esta forma, a nivel experimental este resultado podría interpretarse como que el compuesto HL4 tiene una actividad citotóxica similar con células normales y cancerosas, lo que podría estar relacionado con los efectos observados en la transición de fase para los modelos de membrana sintéticos que imitan membranas de mamíferos, lo cual fue descrito anteriormente.

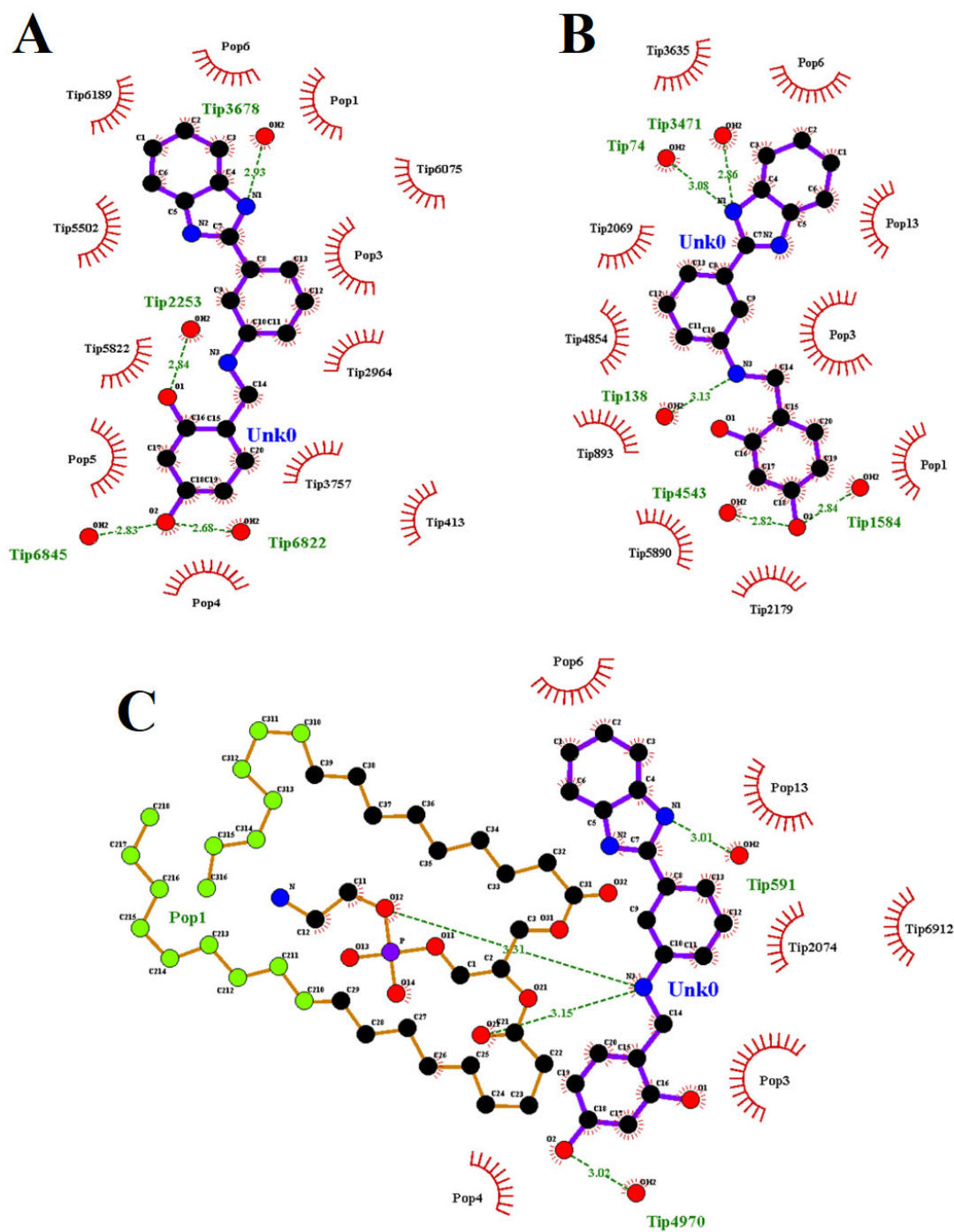


Figura 36. Interacción de HL4 con las moléculas del sistema modelo de membrana celular de PC-3. (A) 2 ns. (B) 5 ns. (C) 9 ns. Tip: molécula de agua; Unk0: HL4; Pop: POPE.

3. Interacción con receptores de proteínas específicas

Las coordenadas utilizadas para localizar los ligandos, complejos y controles fueron las mismas para cada proteína receptora y se obtuvieron con CB-DOCK aplicando predicciones de acoplamiento ciego a los sitios de unión de las proteínas diana mediante detección de cavidades, según la curvatura (CurPocket) y posiciones de unión de los ligandos, utilizando AutoDock Vina⁵¹.

3.1 Bases de Schiff y sus complejos con receptores parasitarios

Las tres proteínas parasitarias que se utilizaron como receptores para los ligandos y complejos en el experimento de acoplamiento molecular se muestran en la figura 37. Para cruzaina, el centro de la cuadrícula fue (18.204, 7.728, -20.409); para leishmanina, el centro de la cuadrícula fue (11.856, 39.761, 15.011); y para la alfa-tubulina fue (73.153, 57.344, 66.622).

Las diferentes moléculas utilizadas para examinar el acoplamiento con cruzaina, sus correspondientes energías de unión y sus interacciones se presentan en la sección de anexos (tabla A1). Comparando los ligandos entre sí, el ligando con la mejor afinidad por la cruzaina fue HL6, que mostró la energía de unión más baja (-7.96 kcal/mol). Cuando se comparó HL6 con HL3, se observaron diferencias en el número de interacciones, con HL6 presentando cuatro interacciones hidrofóbicas, una más que para HL3. Sin embargo, cuando se comparó HL5 con HL6, el número de interacciones fue muy similar, como se muestra en la figura 38; por lo tanto, sus energías vinculantes también fueron similares. Por su parte, HL4 pareció presentar el mayor número de interacciones hidrofóbicas hacia sus anillos de benceno. Las interacciones observadas entre los complejos probados y la cruzaina fueron mejores que las observadas para los ligandos, con la energía más baja observada para el complejo La-L3 (-11.58 kcal/mol). El complejo La-L3 presenta 10 interacciones intramoleculares, cinco de las cuales se deben a la presencia del centro metálico. Además, el estudio mostró que el lantano conserva la coordinación con los átomos de nitrógeno y oxígeno de los ligandos y no se coordina con los átomos del receptor. A pesar de estos resultados, los números de

interacciones con cruzaina fueron los más bajos en comparación con los de las otras moléculas, formando solo dos puentes de hidrógeno con SER64 y LEU160. SER64 también estuvo involucrado en la formación de enlaces de hidrógeno con La-L3, Ce-L3, La-L4 y Ce-L4, lo que indicó que SER64 es importante para la interacción entre la cruzaina y los ligandos que presentan una posición 1,3-aminofenilo en el centro activo. Otro residuo que estuvo involucrado en interacciones a alta frecuencia fue ASP161, que formó enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas con los ligandos y los complejos metálicos. Finalmente, la vinilsulfona (control) tuvo la menor interacción en comparación con los resultados de la energía de unión de los ligandos y los complejos.

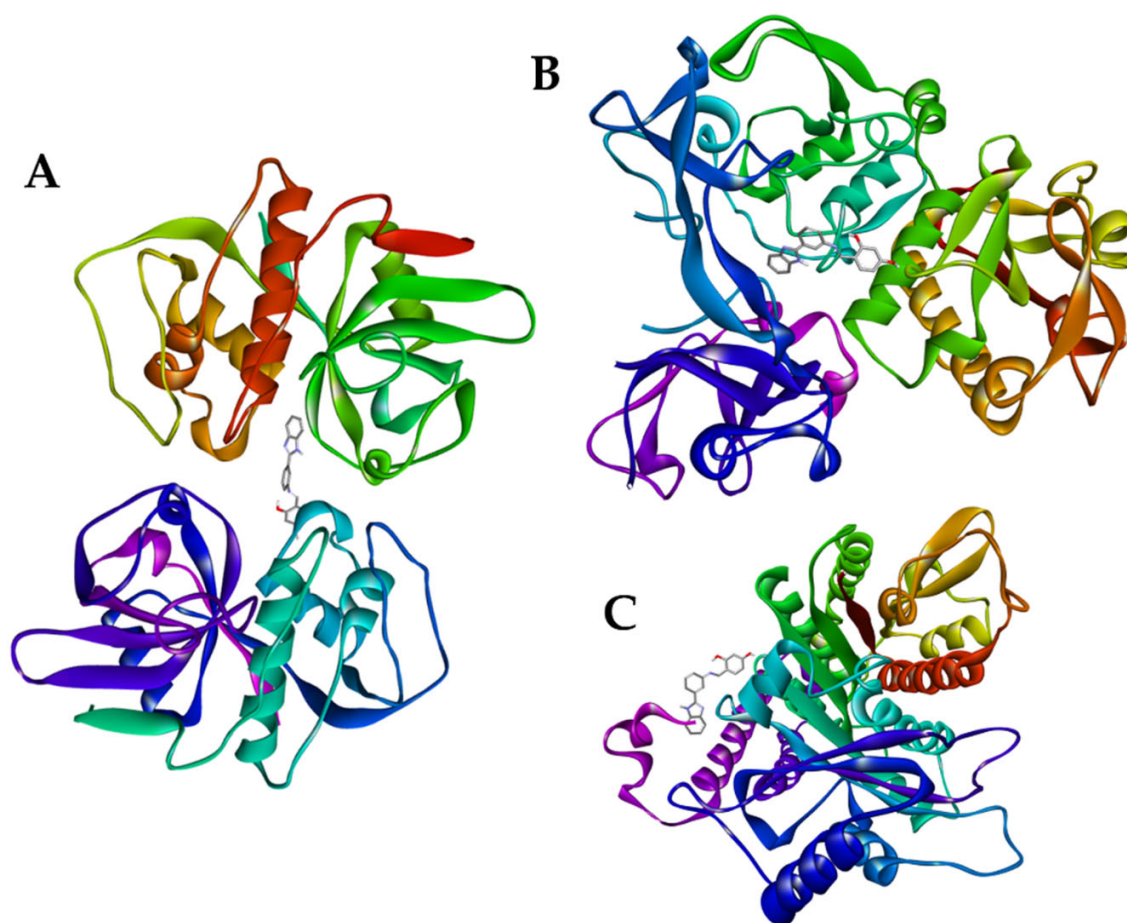


Figura 37. Ubicación del ligando HL4 con receptores parasitarios: (A) Cruzaina; (B) Leishmanina; (C) Alfa-tubulina.

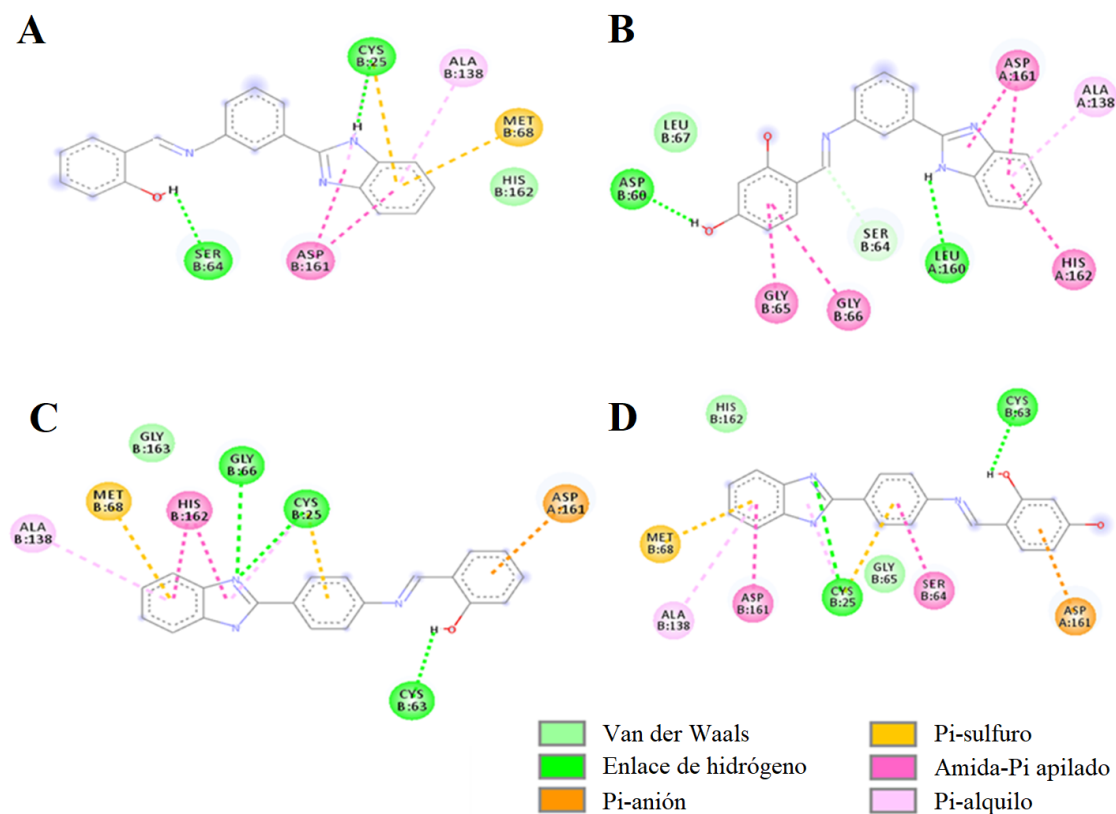


Figura 38. Interacción entre bases de Schiff y residuos de cruzaina. (A) HL3 (B) HL4 (C) HL5 (D) HL6.

En el estudio de las interacciones entre los compuestos HL4, La-L4 y el control de anfotericina B para la leishmanina (ver sección de anexos: tabla A2), la anfotericina B tuvo la afinidad más baja por la leishmanina con una energía de unión de -6.80 kcal/mol en comparación con el ligando HL4 (-8.78 kcal/mol) y el complejo La-L4 (-9.79 kcal/mol), lo que indica que, la acción de este antígeno de leishmania, podría ser más afectada por los compuestos de estudio que por la molécula control. La anfotericina B forma siete enlaces de hidrógeno con la leishmanina, mientras que HL4 y el complejo La-L4 presentan interacciones con leishmanina que son principalmente hidrófobas, ambos interactúan con los residuos ALA348 y PRO460. La figura 39 muestra la interacción de HL4 con leishmanina hasta 10 ns. A 0 ns se observaron tres interacciones hidrofílicas con agua, que permanecieron constantes en número hasta 5 ns, mientras que a 10 ns fueron duplicadas. Por el contrario, las interacciones hidrófobas proceden de seis residuos de leishmanina a 0 ns a sólo dos residuos

a 10 ns. El residuo ALA348 parece interactuar durante toda la simulación con los anillos de benceno; por tanto, se cree que es un residuo importante en el sitio activo de la leishmanina.

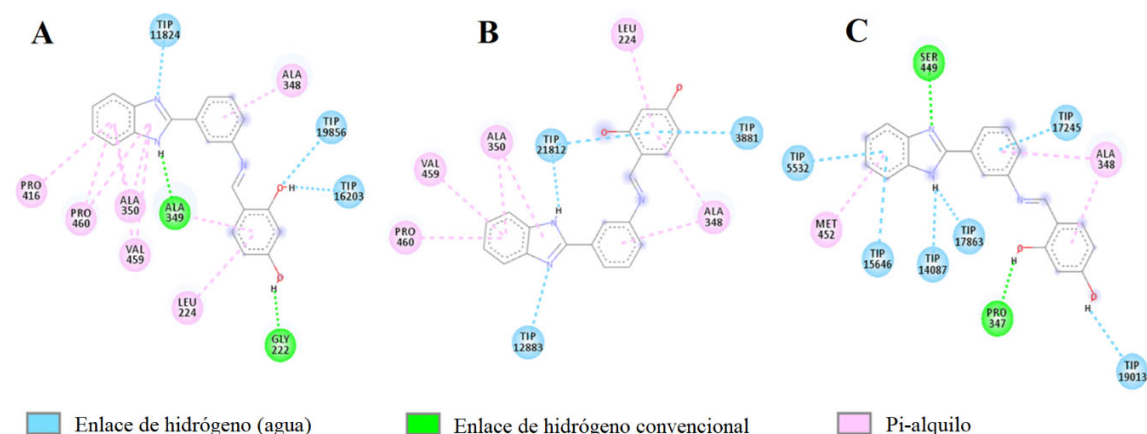


Figura 39. Interacción por dinámica molecular entre HL4 y leishmanina. (A) 0 ns; (B) 5 ns; (C) 10 ns. Tip: molécula de agua.

La figura 40A muestra la RMSD para las variaciones de la estructura HL4 con respecto a su interacción con la leishmanina. Se observó una baja variación en la estructura de esta base de Schiff durante los primeros 6 ns; sin embargo, entre 6 y 8 ns, el comportamiento cambia. Entre 8 y 9 ns la variación disminuye, pero a partir de 9 ns se vuelve a observar una alta variación. La figura 40B muestra las distancias en Angstrom ($\text{\AA}$) entre el ligando y las moléculas de agua, así como las distancias entre el ligando y los residuos ALA348, ALA350 y PRO460 de leishmanina. La distancia al agua que se siguió durante 10 ns osciló entre 2.00 y 3.00 $\text{\AA}$. Los residuos ALA348 y ALA350 tenían entre 4.00 y 5.00 $\text{\AA}$ de distancia a HL4. ALA348 a 4 y 7 ns perdió interacción con HL4, al igual que ALA350 a 8 y 10 ns. El residuo PRO460 tuvo la distancia más larga a HL4 (4-6 $\text{\AA}$) y sus interacciones fueron generalmente constantes, perdiendo interacción con HL4 a los 6 y 8 ns. Los enlaces de hidrógeno entre ALA348 y HL4 se muestran en la figura 40C. Estos hallazgos confirman la importancia de este residuo en la interacción con HL4. En la figura 40D, se observa una disminución en la energía total hasta 4 ns, alcanzando -811000 kJ/mol; luego, sube en 6 ns a -810800 kJ/mol y disminuye a 7 ns nuevamente a -811000 kJ/mol. Finalmente, a 9 ns, la energía total cae a -811600 kJ/mol, lo que se correlaciona con una interacción más fuerte entre HL4 y el residuo

ALA348, formando hasta tres interacciones hidrofóbicas. En la figura 41, HL4 parece estar la mayor parte del tiempo en la cavidad sobre la superficie de leishmanina, y solo a 8 ns se observó una distancia, que coincidió con la distancia calculada y el gráfico RMSD. Por otro lado, en las interacciones observadas para las moléculas probadas y la alfa-tubulina de *P. falciparum*, (ver sección de anexos: tabla A3), el control de vinblastina tuvo las mejores características de interacción, con una energía de unión de -8.89 kcal/mol, la cual fue seguida por el complejo La-L5 (-8.60 kcal/mol). Los residuos ALA451 y PRO263 generaron tanto enlaces de hidrógeno como interacciones hidrofobas con los ligandos y complejos evaluados.

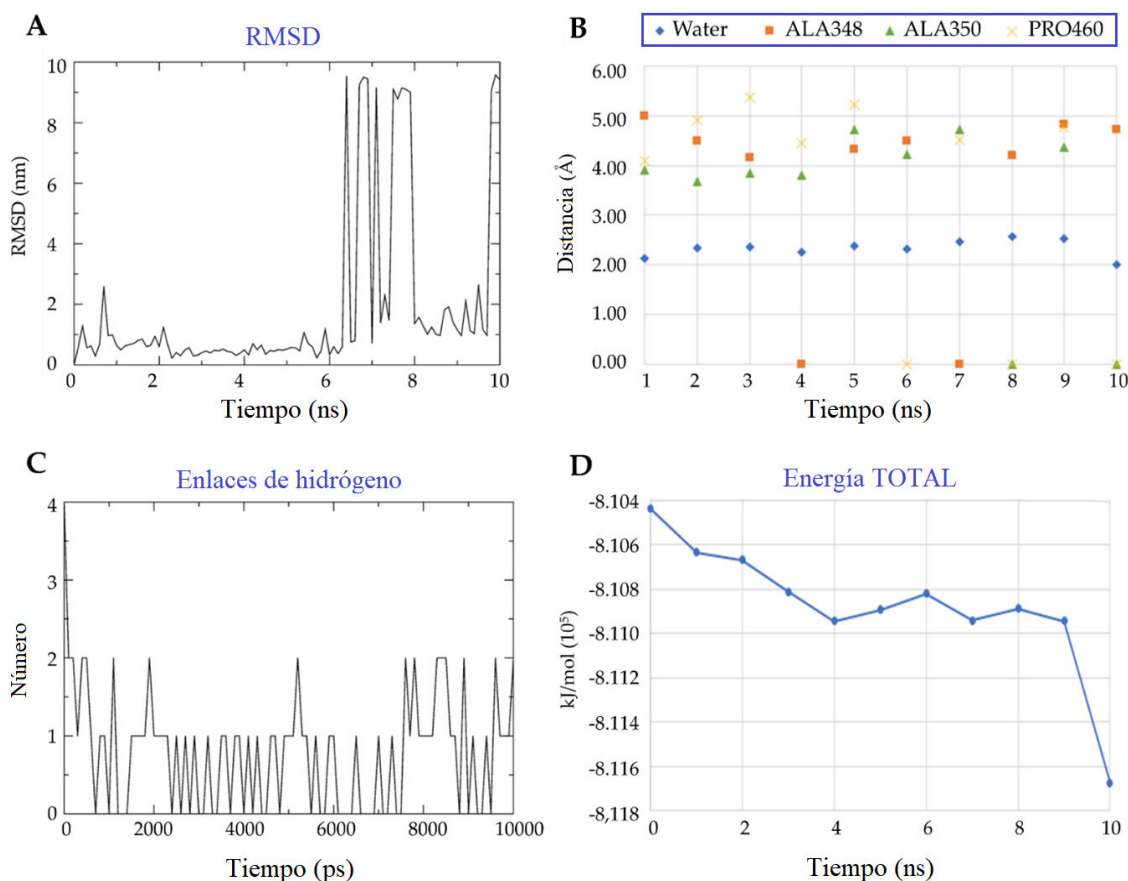


Figura 40. Resultados de los estudios de dinámica molecular para HL4: (A) RMSD entre ligando con leishmanina; (B) Distancia entre ligando, agua y residuos de leishmanina ALA348, ALA350, PRO460; (C) Enlaces de hidrógeno entre ligando y leishmanina; (D) Energía total entre ligando y leishmanina.

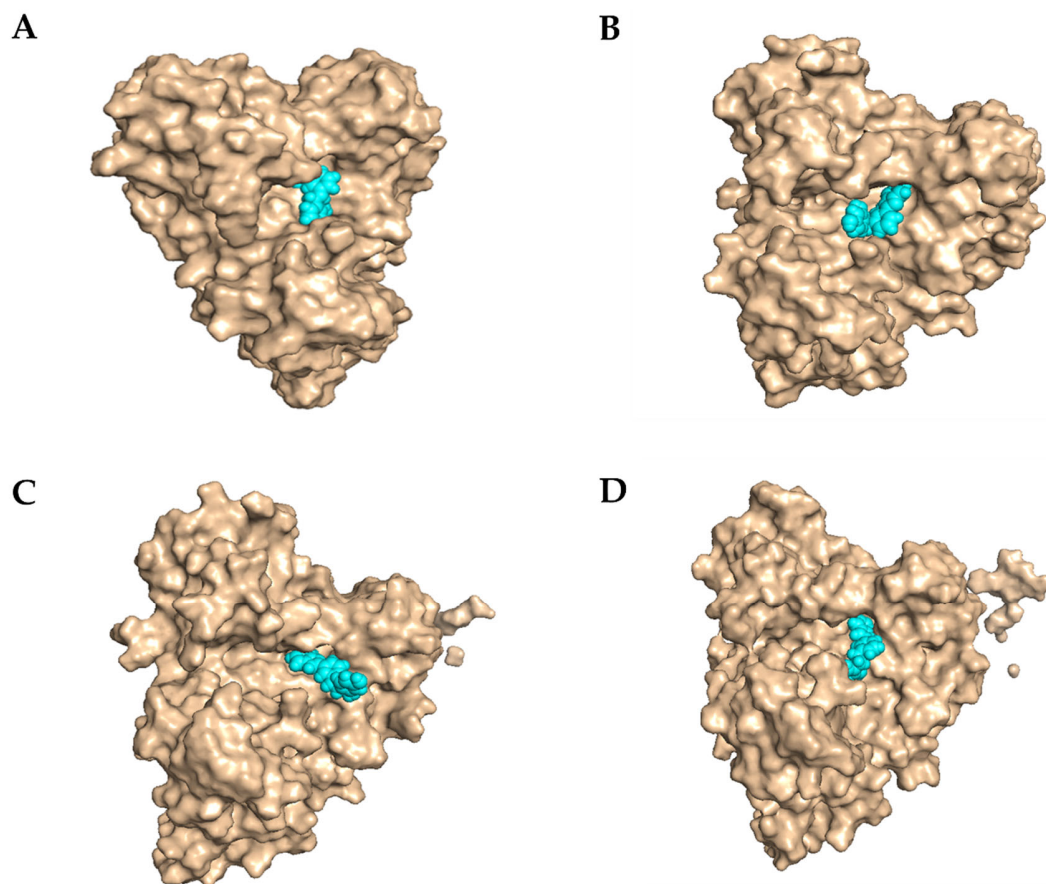


Figure 41. Superficie de lesihmanina con HL4. (A) 0 ns. (B) 6 ns ;(C) 8 ns; (D)10 ns.

3.2 Ligando HL4 con receptor bacteriano de *S. aureus*

Para el receptor PBP2A (ver figura 42), el centro de la cuadrícula fue (17.0, -21.0, -54.0). La tabla A4 (ver sección de anexos) muestra las interacciones y energías de unión entre la proteína PBP2A de *S. aureus* resistente a meticilina y los ligandos, complejos y controles probados. El ceftobiprol fue el antibiótico con mejor afinidad (-7.06 kcal/mol), superando los valores de HL5 y HL6. El complejo La-L3 presentó la mejor energía de unión (-10.01 kcal/mol), con un alto grado de interacciones hidrofóbicas, particularmente con VAL277. Este residuo (VAL277) está presente en todas las interacciones hidrofóbicas con los anillos

de benceno en los complejos de lantano y cerio. ARG151 es otro residuo importante para las interacciones con los complejos probados, ya sea formando enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. Las interacciones hidrofóbicas más frecuentes identificadas entre ligandos y el receptor PBP2A son LEU155, ASP323 y LYS322. Otros residuos de PBP2A que con frecuencia interactuaban con los complejos fueron LYS148, HIS293 y ASP295.

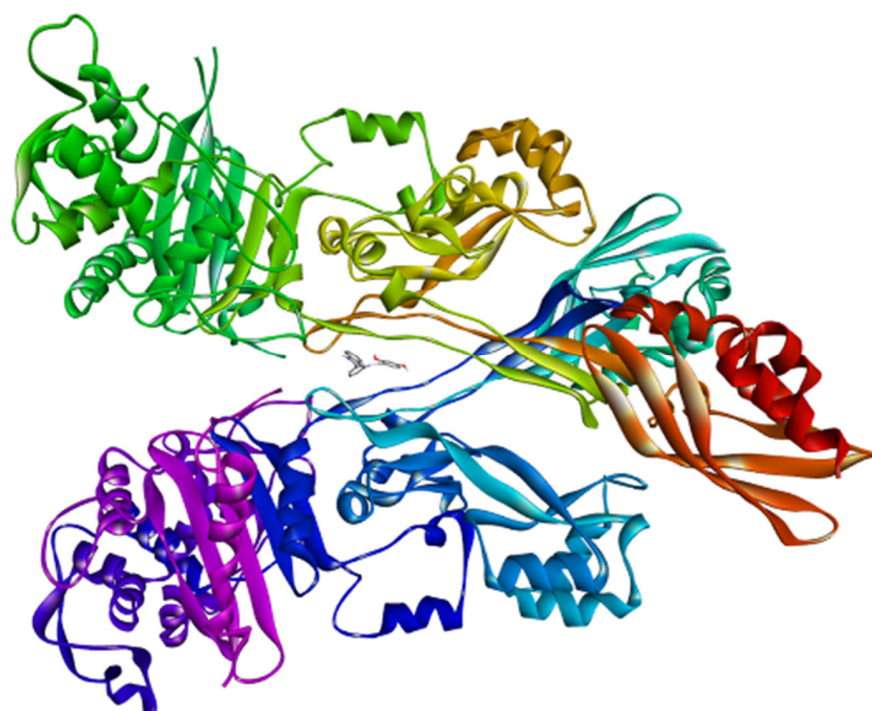


Figura 42. Receptor PBP2A de *S. aureus* con ligando HL4 en el centro.

4. Interacción con ADN

Las interacciones entre moléculas pequeñas y cadenas de ADN representan un importante mecanismo de acción potencial para los agentes quimioterapéuticos, que pueden afectar los procesos genómicos. En diversos estudios de interacción de complejos metálicos con ADN se ha demostrado que el mecanismo de acción de compuestos antitumorales se basa en la inhibición de la síntesis del ADN debido a los enlaces cruzados formados dentro y entre las cadenas de esta.

4.1 Ensayos de espectrofotometría por UV-Vis

La espectrofotometría UV/Vis se puede utilizar para proporcionar una idea general de los tipos de interacción que se producen entre los ácidos nucleicos y los compuestos obtenidos^{52,53}. Siguiendo la metodología reportada por Londoño-Mosquera y colaboradores⁵⁴ se realizaron los experimentos de interacción con ADN-TT a través de ensayos de absorción electrónica. Se verificó que las soluciones de ADN tenían una relación A_{260}/A_{280} entre 1.7 y 1.9, lo que indica que el ADN estaba libre de ARN y proteínas. Los espectros electrónicos de ADN, ligandos y complejos se siguieron mediante fototitulación, y se observaron los cambios a medida que se añadía más titulante. La figura 43 muestra los efectos de la adición de ADN en los espectros electrónicos cuando los ligandos se mantienen a una concentración constante. En todos los espectros, se observó hipocromismo y batocromismo en las bandas de menor energía (tipo $\pi \rightarrow \pi^*$), destacando que se produjo un cambio más considerable para HL5 y HL6 que para los otros compuestos probados. Los puntos isobésticos existentes, denotan un solo modo de interacción entre el ADN bicatenario y los ligandos libres.

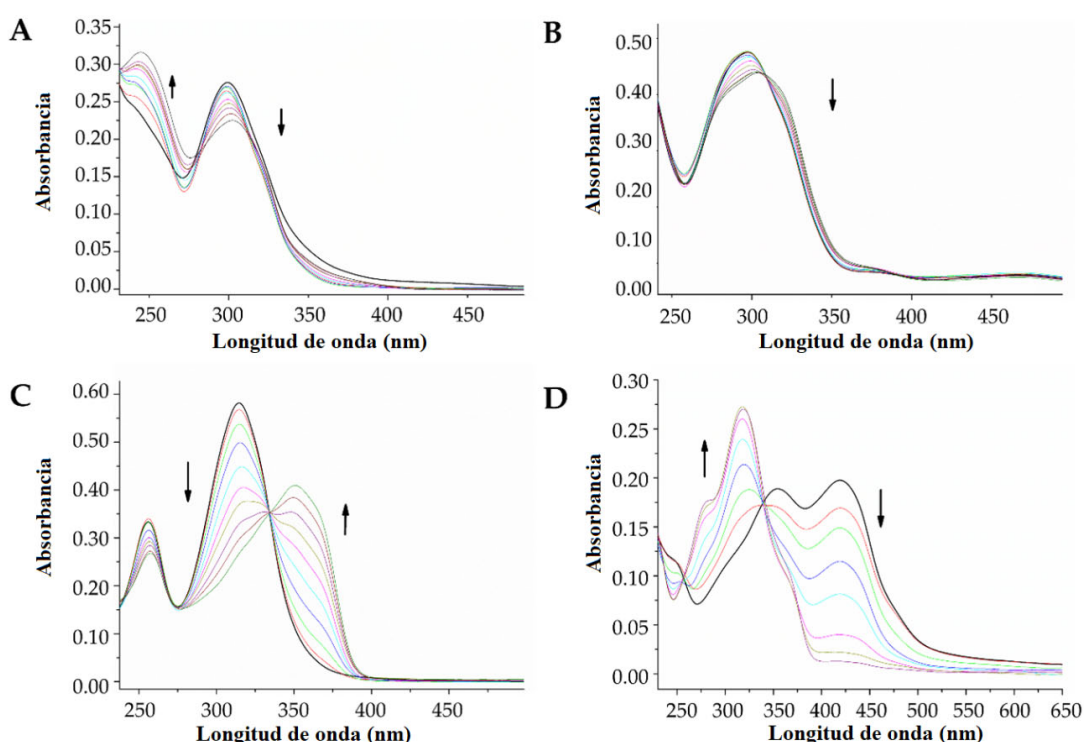
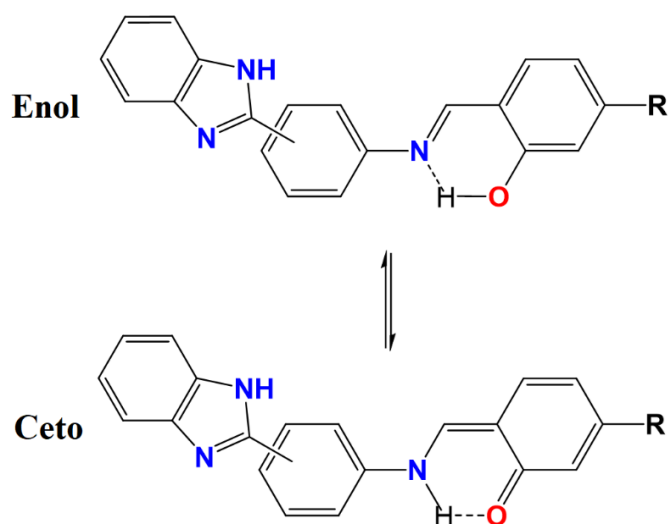


Figura 43. Estudio fotométrico a 60 μM de (A) HL3, (B) HL4, (C) HL5 y (D) HL6, con ADN-TT en concentraciones entre 0 y 96 μM (línea negra continua = 0 μM).

Las bases de Schiff HL3-HL6 pueden estar presentes como varios tautómeros (ver esquema 4). Estas estructuras presentan absorciones en diferentes longitudes de onda, con niveles de energía generalmente más bajos para las formas ceto⁵⁵. Se pueden observar dos bandas de absorción en el espectro de HL5 (ver figura 43C), una a aproximadamente 256 nm y la otra a 315 nm, la banda de energía más alta es característica de la forma enólica. En contraste, para HL6 (ver figura 43D), se pueden observar dos bandas a 354 nm y 420 nm, esta última fue asignada a la absorción de la forma ceto⁵⁵, lo que indica que para HL6, ambas especies coexisten en formas libres.



Esquema 4. Equilibrio ceto-enólico de ligandos bases de Schiff (R = H para HL3 y HL5, OH para HL4 y HL6).

La presencia de ADN en estos sistemas daría como resultado la estabilización de uno de los tautómeros cuando se forma un complejo de ADN-compuesto. Para HL5, a medida que se agregó ADN al sistema, la banda de 315 nm disminuyó y surgió una nueva banda a 350 nm, lo que indicó que, en este sistema, la interacción con el ADN podría favorecer la forma ceto de HL5. Por el contrario, para HL6, la banda de 420 nm disminuyó y la banda de 354 nm aumentó, con un desplazamiento hipsocrómico de hasta aproximadamente 318 nm, lo que indicó que la unión con las hebras de ADN estabilizó la forma enólica. Para HL3 y HL4 (ver figura 43A y 43B), la sustitución en la posición meta por el nitrógeno del enlace imina pareció

favorecer la forma enólica de ambos compuestos ($R = H$ o $R = OH$), que permaneció estable incluso en presencia de ADN, lo que da como resultado solo efectos hipocrómicos y batocrómicos después de la titulación, sin la aparición de nuevas bandas. Los complejos de lantánidos siguieron patrones similares a los de los ligandos (ver figura A67); sin embargo, los compuestos de cerio parecían estar estabilizados en forma de enol, sin la aparición de nuevas bandas después de la titulación (ver figura A68). Las formas enólicas de los compuestos estudiados son también las formas coplanares, que favorecen la intercalación de los compuestos entre las bases de ácidos nucleicos nitrogenados, que podrían ser responsables de los cambios observados en todas las titulaciones^{8,53,56}.

El monitoreo del espectro electrónico del ADN (ver sección de anexos: figuras A69, A70 y A71) también ofreció evidencia de intercalación, revelando un efecto hipocrómico en la banda de absorción a 260 nm para moléculas cuya forma tautomérica inicial no fue cambiada por la interacción, como HL3 y HL4. El resto de los cambios observados en el espectro del ADN probablemente se debieron a cambios estructurales en la molécula de unión que son diferentes del objetivo fotométrico (molécula de unión sin cambios), lo que explica las absorbancias negativas y los retrasos de la línea de base.

Utilizando la ecuación de Wolfe-Shimmer (Ec.1), se estimaron las constantes de unión intrínseca (K_b) para los compuestos evaluados, considerando la información obtenida de los espectros de titulación fotométrica.

$$\frac{[ADN]}{\epsilon_a - \epsilon_f} = \frac{[ADN]}{\epsilon_b - \epsilon_f} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)} \quad (\text{Ec.1})$$

Donde $[ADN]$ representa la concentración de ADN-TT añadido, ϵ_a corresponde al coeficiente de extinción molar aparente, ϵ_f se refiere al coeficiente de extinción molar del compuesto libre y ϵ_b representa el coeficiente de extinción molar en la saturación del ADN⁵³. Las figuras A72, A73 y A74 muestran los ajustes lineales realizados para calcular las constantes de unión, que se resumen en la tabla 12.

Tabla 12. Valores de constante de unión intrínseca (K_b) para todos los compuestos evaluados.

Compuesto	Banda seguida (nm)	Constante estimada ($10^4 M^{-1}$)
HL3	300	0.3
HL4	297	1.1
HL5	314	1.3
HL6	420	0.7
La-L3	299	1.6
La-L4	299	1.3
La-L5	318	1.6
La-L6	323	1.4
Ce-L3	295	0.6
Ce-L4	294	1.1
Ce-L5	329	2.2
Ce-L6	324	1.8

En general, las constantes de unión para los complejos de lantánidos fueron mayores que las de los ligandos libres. La presencia del centro metálico positivo probablemente favorece las interacciones electrostáticas con el surco negativo del ADN, lo que da como resultado un tipo de interacción de inserción que implica tanto mecanismos intercalados como de unión al surco⁵⁷. Los valores de constante de unión más altos se identificaron para los complejos Ce-L5 y Ce-L6, para los cuales la estabilización de la forma enólica coplanar facilitó el apilamiento π entre bases nitrogenadas. Las constantes se registraron en el orden de $10^4 M^{-1}$, dos órdenes de magnitud más bajas que las identificadas para marcadores e intercaladores clásicos, como el bromuro de etidio o el bromuro de propidio, que presentan constantes de unión entre 10^6 y 10^8 .^{52,53} Por lo tanto, todos los compuestos evaluados podrían interactuar con las cadenas de ADN a través de uniones intercaladas y de inserción. Aunque los cambios tautoméricos propuestos deben apoyarse mediante estudios adicionales, la formación del complejo ADN-compuesto puede favorecer múltiples formas. La composición química de

las bases nitrogenadas del ADN en eucariotas es idéntica a la de los procariotas; por lo tanto, el compuesto también podría unirse al ADN bacteriano, inhibiendo la replicación⁵⁸ y, de esta manera, la división celular. Se ha descrito que los derivados de bencimidazol son capaces de unirse al surco menor del ADN, lo que conduce a la formación de una rotura del ADN monocatenario⁵⁹, y, por consiguiente, es posible la detención del ciclo celular⁶⁰. De esta forma, la inhibición de la proliferación bacteriana puede prevenir la progresión de focos infecciosos dentro del hospedador.

4.2 Estudios de acoplamiento molecular (docking)

Para conocer la afinidad de unión y las interacciones de los ligandos (bases de Schiff) y sus complejos con la estructura del ADN, el estudio de acoplamiento molecular se realizó con ADN (1BNA), utilizando mitoxantrona como molécula control por su capacidad de unión irreversible a este ácido nucleico^{61,62}. Las estructuras de los compuestos y el control se prepararon con el software Autodock⁶³ utilizando cargas de Gasteiger⁶⁴. Como se muestra en la tabla 13, el mayor número de interacciones fueron a través de los enlaces de hidrógeno que se lograron a través de los grupos fosfatos del ADN y los átomos de nitrógeno de las bases nitrogenadas. El segundo grupo de interacciones fueron las hidrofóbicas entre los anillos de benceno y las bases nitrogenadas. En menor medida, se tuvieron las interacciones electrostáticas y los enlaces a través de cloro (únicamente para los complejos metálicos). En general, los complejos de Ce(III) fueron los que presentaron el mayor número de interacciones por enlaces de hidrógeno, mientras que las bases de Schiff se caracterizaron por presentar dos o más interacciones hidrofóbicas. Finalmente, la mitoxantrona (agente intercalante del ADN) presentó el menor número de interacciones con el ADN, principalmente con enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Este control presentó una interacción con citosina y dos con guanina como previamente reportan Li y colaboradores^{65,66}, comportamiento similar a las bases de Schiff y sus complejos lantánidos, los cuales presentaron interacción con estas dos bases nitrogenadas, especialmente la guanina (ver tabla 13).

Tabla 13. Energía de unión y tipo de interacción entre los compuestos evaluados y el ADN*

Compuesto	Energía de enlace (kcal/mol)	Base nitrogenada**	EH	IE	IH	Halógeno
HL3	-10.03	Guanina	6	1	4	0
HL4	-9.88	Guanina	9	1	2	0
HL5	-10.76	Guanina	6	0	2	0
HL6	-10.85	Guanina	5	0	2	0
La-L3	-9.55	Guanina	6	1	0	1
La-L4	-9.36	Guanina	6	1	0	1
La-L5	-9.94	Adenina-Citosina	2	1	1	1
La-L6	-9.40	Guanina	2	1	1	1
Ce-L3	-9.33	Guanina	7	1	1	1
Ce-L4	-9.11	Guanina	7	1	1	1
Ce-L5	-11.18	Guanina	7	2	3	1
Ce-L6	-11.19	Guanina	9	2	4	1
Mitoxantrona	-6,40	Guanina	3	2	0	0

*EH: Enlaces de Hidrógeno; IE: Interacciones Electroestáticas; IH: Interacciones Hidrofóbicas.

**Base nitrogenada con la que se enlaza más frecuentemente

En la figura 44 se observan las interacciones que presentó HL3 y Ce-L3 con una molécula de ADN, donde se encontró que las moléculas interaccionan más en el surco menor, donde se puede apreciar la presencia de guanina (verde) y citosina (violeta). Los anillos de benceno fueron importantes para las interacciones hidrofóbicas con el ADN, mientras que los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas permitieron unirse a los grupos fosfato del ADN y a las bases nitrogenadas, principalmente al N2 de la guanina a diferencia de otros autores que mencionan al N7 como átomo importante para la interacción con esta base nitrogenada^{67,68}.

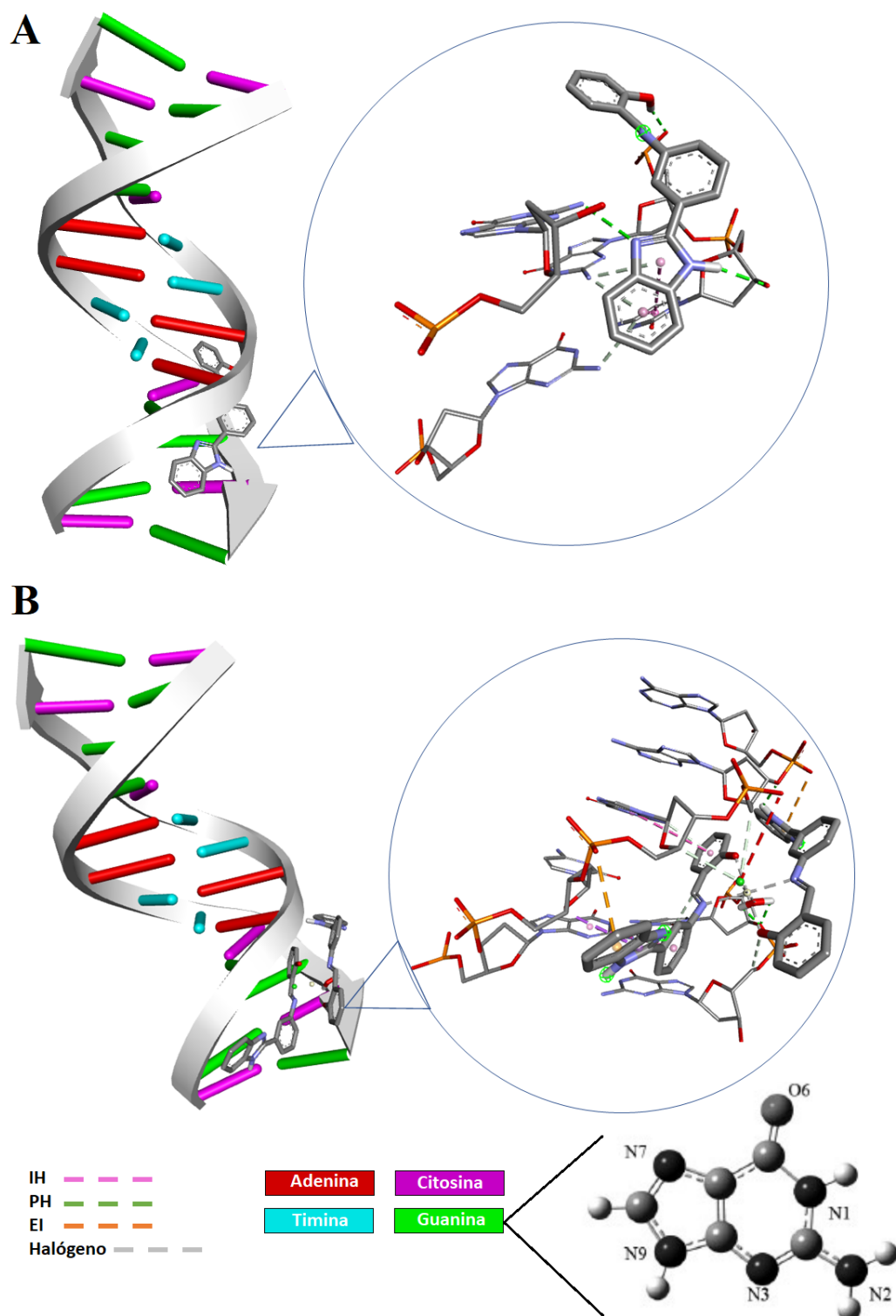


Figura 44. Interacciones entre las bases nitrogenadas del ADN con (A) HL3; (B) Ce-L3. IH: interacciones hidrofóbicas, PH: enlaces de hidrógeno, EI: interacciones electrostáticas.

El número de interacciones se refleja en la afinidad de unión al ADN, donde las mejores energías de unión fueron para los complejos Ce-L5 y Ce-L6 con -11.18 kcal/mol y -11.19 kcal/mol respectivamente (ver tabla 13). Estos complejos presentaron mayor número de interacciones con el ADN en comparación a los demás compuestos evaluados. Presentar un mayor número de interacciones se relaciona con la fuerza de unión al receptor y, por tanto, se refleja en una mejor energía de unión⁶⁹, lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de interacción con ADN-TT por espectroscopía UV, donde Ce-L5 y Ce-L6 fueron los dos compuestos con los mayores valores de las constantes de unión intrínsecas (K_b). Cabe destacar que los compuestos HL5 y HL6 también presentaron una buena afinidad de -10.76 kcal/mol y -10.85 kcal/mol, respectivamente; mientras que el control (mitoxantrona), presentó la menor energía de unión con -6.4 kcal/mol.

5. Conclusiones

Ligandos N,O-quelato derivados de bencimidazoles y sus complejos lantánidos fueron estudiados a través de la interacción con objetivos moleculares como modelos de membrana, receptores de proteínas específicas y ADN. Lo anterior, con el objetivo de aportar al conocimiento del posible mecanismo de acción asociado con la actividad biológica de este tipo de compuestos. Los resultados llevan a la conclusión de que los compuestos sintetizados exhibieron un efecto notable en las membranas modelo que imitan las membranas bacterianas y de mamíferos, pues parecen influir en la fluidez de la membrana al alterar el núcleo hidrófobo de la bicapa, lo que podría estar correlacionado con posibles aplicaciones farmacológicas. Los estudios adicionales realizados por dinámica molecular para el ligando HL4, evidencian que este compuesto presenta afinidad por los fosfolípidos de fosfocolina (PC), lo que sugiere que esta molécula puede tener efectos citotóxicos contra las células humanas normales, además, se encontró que a 30 ns de simulación, las interacciones de enlace de hidrógeno entre esta base de Schiff y la esfingomielina (SM) prevalecen en los modelos de membranas de eritrocitos, mientras que en los modelos de membranas de *E. coli*, las interacciones hidrofóbicas entre HL4 y POPG/POPE son las que juegan un papel importante en el efecto fluidizante exhibido en modelos de membrana bacterianas. Por otro

lado, los estudios de la interacción de bases de Schiff con receptores de proteínas específicas, sugieren que los resultados de las actividades antiparasitarias observadas en el capítulo II podrían estar relacionados con la capacidad de estos compuestos para formar interacciones hidrofóbicas a través de los anillos de benceno, lo cual se pudo demostrar en los estudios de acoplamiento molecular para cruzaína y alfa-tubulina. Finalmente, los resultados de la interacción de los compuestos con ADN de timo de ternera realizados por espectroscopía UV-Vis, muestran que la estructura de los ligandos favorece la intercalación de los compuestos entre las bases nitrogenadas de ácidos nucleicos, lo que podría ser el factor responsable de los cambios observados en los espectros de absorción electrónica. Estos estudios sugieren que los compuestos se enrollan a lo largo de las hebras de ADN a través de interacciones de surcos, lo cual fue confirmado por el estudio de acoplamiento molecular, en el que se encontró que las moléculas interaccionan más en el surco menor, donde se puede apreciar la presencia de guanina y citosina. Los anillos de benceno fueron importantes para las interacciones hidrofóbicas con el ADN, mientras que los enlaces de hidrógeno y las interacciones electrostáticas permitieron unirse a los grupos fosfato del ADN y a las bases nitrogenadas, principalmente con la guanina. Los hallazgos encontrados en estos estudios de interacción con dianas moleculares, podrían convertirse en una referencia útil en futuros intentos de desarrollar racionalmente nuevos agentes farmacológicos.

6. Referencias

1. Davis, R. L. Mechanism of Action and Target Identification: A Matter of Timing in Drug Discovery. *iScience*. **2020**, *23*, 101487.
2. Kenakin, T. P. Pharmacology: The Chemical Control of Physiology. In *Pharmacology in Drug Discovery and Development*. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, París, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Academic Press. **2017**, *2ed*, 1.
3. Santos, R.; Ursu, O.; Gaulton, A.; Bento, A.P.; Donadi, R.S.; Bologa, C.G.; Karlsson, A.; Al-Lazikani, B.; Hersey, A.; Oprea, T.I.; Overington, J.P. A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2017**, *16*, 19.
4. Schenone, M.; Dancik, V.; Wagner, B. K.; Clemons, P. A. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 232.
5. Woltering, T.J.; Wostl, W.; Hilpert, H.; Rogers-Evans, M.; Pinard, E.; Mayweg, A.; Göbel, M.; Banner, D.W.; Benz, J.; Travagli, M.; Pollastrini, M.; Marconi, G.; Gabellieri, E.; Guba, W.; Mauser, H.; Andreini, M.; Jacobsen, H.; Power, E.; Narquizian, R. BACE1 inhibitors: a head group scan on a series of amides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 4239.
6. Husain, M.A.; Ishqi, H.M.; Sarwar, T.; Rehman, S.U.; Tabish, M. Interaction of indomethacin with calf thymus DNA: a multi-spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling approach. *Medchemcomm.* **2017**, *8*, 1283.
7. Knobloch, J.; Suhendro, D.K.; Zieleniecki, J.L.; Shapter, J.G. Koper, I. Membrane-drug interactions studied using model membrane systems. *Saudi J. Biol. Sci.* **2015**, *22*, 714.
8. Mahmood, K.; Hashmi, W.; Ismail, H.; Mirza, B.; Twamley, B.; Akhter, Z.; Rozas, I.; Baker, R.J., Synthesis, DNA binding and antibacterial activity of metal(II) complexes of a benzimidazole Schiff base. *Polyhedron*. **2019**, *157*, 326.
9. Castillo, I.; Suwalsky, M.; Gallardo, M.J.; Troncoso, V.; Sanchez-Eguia, B.N.; Santiago-Osorio, E.; Aguiniga, I.; Gonzalez-Ugarte, A.K., Structural and functional

- effects of benzimidazole/thioether-copper complexes with antitumor activity on cell membranes and molecular models. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *156*, 98.
10. Brogi, S.; Ramalho, T.C.; Kuca, K.; Medina-Franco, J.L.; Valko, M. *In silico* Methods for Drug Design and Discovery. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 612.
 11. Casalini, T. Not only in silico drug discovery: Molecular modeling towards in silico drug delivery formulations. *J. Control Release.* **2021**, *332*, 390.
 12. Singhal, S.; Khanna, P.; Khanna, L. Synthesis, DFT studies, molecular docking, antimicrobial screening and UV fluorescence studies on ct-DNA for novel Schiff bases of 2-(1-aminobenzyl) benzimidazole. *Heliyon.* **2019**, *5*, e02596.
 13. Kumaravel, G.; Ponya Utthra, P.; Raman, N. Exploiting the biological efficacy of benzimidazole based Schiff base complexes with l-Histidine as a co-ligand: Combined molecular docking, DNA interaction, antimicrobial and cytotoxic studies. *Bioorg. Chem.* **2018**, *77*, 269.
 14. Lopes-de-Campos, D.; Nunes, C.; Sarmento, B.; Jakobtorweihen, S.; Reis, S. Metronidazole within phosphatidylcholine lipid membranes: New insights to improve the design of imidazole derivatives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *129*, 204.
 15. Megías, M.; Molist, P.; Pombal, M.A. Membrana Celular. En *Atlas de Histología Vegetal y Animal*. Vigo: Texstudio. **2021**, 21.
 16. Conlon, J.M.; Demandt, A.; Nielsen, P.F.; Leprince, J.; Vaudry, H.; Woodhams, D.C. The alyteserins: Two families of antimicrobial peptides from the skin secretions of the midwife toad *Alytes obstetricans* (Alytidae). *Peptides.* **2009**, *30*, 1069.
 17. Cantor, S.; Vargas, L.; Rojas, O.E.; Yarce, C.J.; Salamanca, C.H.; Oñate-Garzón, J. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Cationic Peptides Loaded in Surface-Modified Nanoliposomes against Foodborne Bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 680.
 18. Lohner, K.; Latal, A.; Lehrer, R.I.; Ganz, T. Differential Scanning Microcalorimetry Indicates That Human Defensin, HNP-2, Interacts Specifically with Biomembrane Mimetic Systems. *Biochemistry.* **1997**, *36*, 1525.
 19. Conlon, J.M.; Ahmed, E.; Pal, T.; Sonnevend, A. Potent and rapid bactericidal action of alyteserin-1c and its [E4K] analog against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides.* **2010**, *31*, 1806.

20. Ezer, N.; Sahin, I.; Kazanci, N. Alliin interacts with DMPC model membranes to modify the membrane dynamics: FTIR and DSC Studies. *Vib. Spectrosc.* **2017**, *89*, 1.
21. Hyde, A.J.; Parisot, J.; McNichol, A.; Bonev, B.B. Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 19896.
22. Papahadjopoulos, D.; Moscarello, M.; Eylar, E.H.; Isac, T. Effects of proteins on the thermotropic phase transitions of phospholipid membranes. *BBA - Biomembr.* **1975**, *401*, 317.
23. Hauser, H.; Phillips, M.C.; Levine, B.A.; Williams, R.J.P. Ion-binding to phospholipids: interaction of Calcium and lanthanide ions with phosphatidylcholine (Lecithin). *Eur. J. Biochem.* **1975**, *58*, 133.
24. Riske, K.A.; Barroso, R.P.; Vequi-Suplicy, C.C.; Germano, R.; Henriques, V.B.; Lamy, M.T. Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, *1788*, 954.
25. Di Foggia, M.; Bonora, S.; Tinti, A.; Tugnoli, V. DSC and Raman study of DMPC liposomes in presence of Ibuprofen at different pH. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2017**, *127*, 1407.
26. Ohline, S.M.; Campbell, M.L.; Turnbull, M.T.; Kohler, S.J. Differential scanning calorimetric study of bilayer membrane phase transitions: A biophysical chemistry experiment. *J. Chem. Educ.* **2001**, *78*, 1251.
27. Oñate-Garzón, J.; Ausili, A.; Manrique-Moreno, M.; Torrecillas, A.; Aranda, F.J.; Patiño, E.; Gomez-Fernández, J.C. The increase in positively charged residues in cecropin D-like *Galleria mellonella* favors its interaction with membrane models that imitate bacterial membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *629*, 54.
28. Bilge, D.; Kazanci, N.; Severcan, F. Acyl chain length and charge effect on Tamoxifen-lipid model membrane interactions. *J. Mol. Struct.* **2013**, *1040*, 75.
29. Carrillo, C.; Teruel, J.A.; Aranda, F.J.; Ortiz, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2003**, *1611*, 91.

30. Huang, H.W. Action of antimicrobial peptides: Two-state model. *Biochemistry*. **2000**, *39*, 8347.
31. Kaddah, S.; Khreich, N.; Kaddah, F.; Khrouz, L.; Charcosset, C.; Greige-Gerges, H. Corticoids modulate liposome membrane fluidity and permeability depending on membrane composition and experimental protocol design. *Biochimie*. **2018**, *153*, 33.
32. Ihlenfeldt, M.; Gantner, G.; Harrer, M.; Puschendorf, B.; Putzer, H.; Grunicke, H. Interaction of the Alkylating Antitumor Agent 2,3,5-Tris(ethyleneimino)-benzoquinone with the Plasma Membrane of Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Cancer Res*. **1981**, *41*, 289.
33. Severcan, F.; Kazanci, N.; Zorlu, F. Tamoxifen increases membrane fluidity at high concentrations. *Biosci. Rep*. **2000**, *20*, 177.
34. Binder, H.; Zschörnig, O. The effect of metal cations on the phase behavior and hydration characteristics of phospholipid membranes. *Chem. Phys. Lipids*. **2002**, *115*, 39.
35. Le, C.T.M.; Hourri, A.; Balage, N.; Smith, B.J.; Mechler, A. Interaction of small ionic species with phospholipid membranes: The role of metal coordination. *Front. Mater*. **2019**, *5*, 1.
36. Ninham, B.W.; Larsson, K.; Lo Nostro, P. Two sides of the coin. Part 1. Lipid and surfactant self-assembly revisited. *Colloids Surfaces B. Biointerfaces*. **2017**, *152*, 326.
37. Smith, T.J. MOLView: a program for analyzing and displaying atomic structures on the Macintosh personal computer. *J. Mol. Graph*. **1995**, *13*, 122.
38. Zoete, V.; Cuendet, M.A.; Grosdidier, A.; Michielin, O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J. Comput. Chem*. **2011**, *32*, 2359.
39. Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V.G.; Im, W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J. Comput. Chem*. **2008**, *29*, 1859.
40. Epand, R.F.; Savage, P.B.; Epand, R.M. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). *Biochim. Biophys. Acta Biomembr*. **2007**, *1768*, 2500.
41. Wasan, K.M.; Brazeau, G.A.; Keyhani, A.; Hayman, A.C.; Lopez-Berestein, G. Roles of liposome composition and temperature in distribution of amphotericin B in serum lipoproteins. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1993**, *37*, 246.

42. Berendsen, H.J.C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 43.
43. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33.
44. Martínez, L. Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. *PLoS ONE*. **2015**, *10*, e0119264.
45. Bera, I.; Klauda, J.B. Molecular Simulations of Mixed Lipid Bilayers with Sphingomyelin, Glycerophospholipids, and Cholesterol. *J. Phys. Chem. B*. **2017**, *121*, 5197.
46. Björkbom, A.; Róg, T.; Kaszuba, K.; Kurita, M.; Yamaguchi, S.; Lönnfors, M.; Nyholm, T.K.M.; Vattulainen, I.; Katsumura, S.; Slotte, J.P. Effect of sphingomyelin headgroup size on molecular properties and interactions with cholesterol. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 3300.
47. Blom, T.S.; Koivusalo, M.; Kuismanen, E.; Kostiainen, R.; Somerharju, P.; Ikonen, E. Mass spectrometric analysis reveals an increase in plasma membrane polyunsaturated phospholipid species upon cellular cholesterol loading. *Biochemistry*. **2001**, *40*, 14635.
48. Hauser, H.; Pascher, I.; Pearson, R.H.; Sundell, S. Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *BBA Rev. Biomembr.* **1981**, *650*, 21.
49. Zhang, Y.P.; Lewis, R.N.A.H.; McElhaney, R.N. Calorimetric and spectroscopic studies of the thermotropic phase behavior of the n-saturated 1,2-diacylphosphatidylglycerols. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 779.
50. Lairion, F.; Disalvo, E.A. Effect of phloretin on the dipole potential of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylglycerol monolayers. *Langmuir*. **2004**, *20*, 9151.
51. Liu, Y.; Grimm, M.; Dai, W.T.; Hou, M.C.; Xiao, Z.X.; Cao, Y. CB-Dock: A web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. *Acta Pharmacol. Sin.* **2020**, *41*, 138.

52. Gil, E.S.; da Silva, C.B.; Nogara, P.A.; da Silveira, C.H.; da Rocha, J.B.T.; Iglesias, B.A.; Lüdtke, D.S.; Gonçalves, P.F.B.; Rodembusch, F.S. Synthesis, photophysical characterization, CASSCF/CASPT2 calculations and CT-DNA interaction study of amino and azido benzazole analogues. *J. Mol. Liq.* **2020**, *297*, 111938.
53. Vamsikrishna, N.; Daravath, S.; Ganji, N.; Pasha, N.; Shivaraj. Synthesis, structural characterization, DNA interaction, antibacterial and cytotoxicity studies of bivalent transition metal complexes of 6-aminobenzothiazole Schiff base. *Inorg. Chem. Commun.* **2020**, *113*, 107767.
54. Londoño-Mosquera, J.-D.; Aragón-Muriel, A.; Polo Cerón, D. Synthesis, antibacterial activity and DNA interactions of lanthanide(III) complexes of N(4)-substituted thiosemicarbazones. *Univ. Sci.* **2018**, *23*, 141.
55. Chatziefthimiou, S.D.; Lazarou, Y.G.; Hadjoudis, E.; Dziembowska, T.; Mavridis, I.M. Keto forms of salicylaldehyde schiff bases: Structural and theoretical aspects. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 23701.
56. Abu-Dief, A.M.; Abdel-Rahman, L.H.; Abdel-Mawgoud, A.A.H. A robust *in vitro* Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Agents Based on New Metal-Azomethine Chelates Incorporating Ag(I), Pd(II) and VO(II) Cations: Probing the Aspects of DNA Interaction. *Appl. Organomet. Chem.* **2020**, *34*, 1.
57. Biver, T. Use of UV-vis spectrometry to gain information on the mode of binding of small molecules to DNAs and RNAs. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2012**, *47*, 272.
58. Zhang, L.; Addla, D.; Ponmani, J.; Wang, A.; Xie, D.; Wang, Y.N.; Zhang, S.L.; Geng, R.X.; Cai, G.X.; Li, S. Discovery of membrane active benzimidazole quinolones-based topoisomerase inhibitors as potential DNA-binding antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *111*, 160.
59. Nimesh, H.; Sur, S.; Sinha, D.; Yadav, P.; Anand, P.; Bajaj, P.; Viridi, J.S.; Tandon, V. Synthesis and biological evaluation of novel bisbenzimidazoles as *Escherichia coli* topoisomerase IA inhibitors and potential antibacterial agents. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5238.
60. Žgur-Bertok, D. DNA Damage Repair and Bacterial Pathogens. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003711.

61. Huang, N.-L.; Lin, J.-H. Drug-Induced Conformational Population Shifts in Topoisomerase-DNA Ternary Complexes. *Molecules*. **2014**, *19*, 7415.
62. Arthur, D.E. Molecular docking studies of some topoisomerase II inhibitors: Implications in designing of novel anticancer drugs. *Radiol. Infect. Dis.* **2019**, *6*, 68.
63. 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.* **2010**, *31*, 455.
64. Gasteiger, J.; Marsili, M. A new model for calculating atomic charges in molecules. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3181.
65. Fox, E. J. Mechanism of Action of Mitoxantrone. *Neurology*. **2004**, *63*, S15.
66. Li, N.; Ma, Y.; Yang, C.; Guo, L.; Yang, X. Interaction of Anticancer Drug Mitoxantrone with ADN Analyzed by Electrochemical and Spectroscopic Methods. *Biophys. Chem.* **2005**, *116*, 199.
67. Madariaga, S. T.; Contreras, J. G. THEORETICAL STUDY OF THE STRUCTURAL AND ENERGETICS PROPERTIES OF THE INTERACTION SIDES OF GUANINE AND ADENINE IN GG AND AA TRANS BASE PAIRS. *J. Chil. Chem. Soc.* **2012**, *57*, 1504.
68. Giese, B.; McNaughton, D. Interaction of anticancer drug cisplatin with guanine: Density functional theory and surface-enhanced Raman spectroscopy study. *Biopolymers*. **2003**, *72*, 472.
69. Pantsar, T.; Poso, A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **2018**, *23*, 1899.

ANEXO 1

Parte Experimental

A1.1. Materiales

Todos los reactivos químicos se adquirieron comercialmente y se usaron directamente sin purificación adicional. Las reacciones de síntesis se llevaron a cabo empleando material de vidrio en sistemas convencionales de reflujo y se realizó seguimiento a los productos empleando cromatografía de capa delgada (CCD). El análisis elemental (AE) se realizó usando un analizador CHN Flash EA 1112 Series. Las concentraciones de metales se determinaron mediante titulación complexométrica con EDTA empleando naranja de Xilenol como indicador. Las medidas de conductividad de los complejos de lantánidos se realizaron en un equipo Orion™ 131S usando soluciones 1×10^{-3} M en etanol. Los espectros infrarrojos se obtuvieron usando un espectrómetro Shimadzu Affinity 1 (FT-IR). Los espectros de RMN ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de los ligandos y complejos lantánidos se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance II 400 usando DMSO- d_6 como disolvente. El análisis térmico se realizó en el analizador TGA 550 TA Instruments bajo atmósfera de nitrógeno entre 50 y 500 °C, con una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Las mediciones de EPR se registraron en un espectrómetro JEOL JES-TE300 que funcionaba en la banda X a una frecuencia de modulación de 100 kHz. Los ajustes del espectrómetro para todos los espectros fueron los siguientes: campo central 336.5 mT; potencia de microondas 8 mW; frecuencia de microondas 9.15 GHz; ancho de barrido 7.5 mT; ancho de modulación 0.1 mT; constante de tiempo 0.1 s; amplitud 200; tiempo de barrido 120 s; acumulación 3 exploraciones. Para los ligandos aminofenilbencimidazol, los espectros de masas se registraron en un dispositivo Shimadzu-GCMS-QP2010 con ionización por impacto electrónico a 70 eV, mientras que los ligandos bases de Schiff, así como la primera serie de complejos lantánidos, se analizaron mediante espectros de masas obtenidos por Análisis Directo en Tiempo Real (DART) en un sistema de ionización JEOL AccuTOF JMS-T100LC. Los espectros de masas para la segunda serie de complejos lantánidos (con bases de Schiff), se obtuvieron en un espectrómetro de masas Bruker Microflex (MALDI-TOF).

A1.2. Síntesis de ligandos

A1.2.1. Síntesis de 4-amino-2-(1*H*-bencimidazol-2-il)fenol (**HL1**)

Ácido 4-aminosalicílico (1.53 g, 10 mmol) y o-fenilendiamina (1.08 g, 10 mmol) fueron mezclados y agitados en ácido polifosfórico (10 mL) a 150 °C. Después de 4 horas de reacción y dejar en reposo, la mezcla fue neutralizada usando carbonato de potasio 20% y después se filtró. El precipitado color gris fue lavado dos veces con 20 mL de agua destilada y luego recristalizado en etanol para obtener el producto final (HL1) como un polvo color beige. Rendimiento: 1.58 g, 70%. C₁₃H₁₁N₃O (225.2 g·mol⁻¹). AE calculado (%): C, 69.32; H, 4.92; N, 18.66. AE encontrado (%): C, 69.07; H, 4.81; N, 18.72. Punto de fusión: 214 - 216 °C. IR (ATR cm⁻¹): ν(N-H) 3500-3300; δ(N-H) 1615; ν(N=C)_{imidazol} 1578; ν(C=C) 1509; ν(C-O)_{fenólico} 1240; δ(O-H)_{ep} 1402; δ(O-H)_{fp} 942; δ(C-H) 754. RMN-¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13.00 (s, 1H, OH), 12.14 (s, 1H, NH), 7.69 (d, 1H, Ar), 7.58 (d, 1H, Ar), 7.26 (t, 2H, Ar), 7.23 (d, 1H, Ar), 6.79 (d, 1H, Ar), 6.72 (dd, 1H, Ar), 4.69 (s, 2H, NH₂). RMN-¹³C{¹H} (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 152.3 (-C= imidazol), 150.7 (-C= imidazol), 139.4 (HO-C1, C-NH₂), 123.1 - 112.2 (Ar, C). MS (IE, m/z): 225.

A1.2.2. Síntesis de 5-amino-2-(1*H*-bencimidazol-2-il)fenol (**HL2**)

El ligando HL2 fue obtenido como un polvo color marrón de acuerdo al procedimiento general descrito para HL1, comenzando a partir de ácido 5-aminosalicílico (1.53 g, 10 mmol) y o-fenilendiamina (1.08 g, 10 mmol). Rendimiento: 1.69 g, 75%. C₁₃H₁₁N₃O (225.2 g·mol⁻¹). AE calculado (%): C, 69.24; H, 4.73; N, 18.79. AE encontrado (%): C, 69.07; H, 4.81; N, 18.72. Punto de fusión: 237 - 239 °C. IR (ATR cm⁻¹): ν(N-H) 3500-3300; δ(N-H) 1638; ν(N=C)_{imidazol} 1590; ν(C=C) 1505; ν(C-O)_{fenólico} 1253; δ(O-H)_{ep} 1404; δ(O-H)_{fp} 944; δ(C-H) 740. RMN-¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.69 (d, 1H, Ar), 7.57 (dd, 2H, Ar), 7.24 (dd, 2H, Ar), 6.25 (dd, 1H, Ar), 6.19 (d, 1H, Ar). RMN-¹³C{¹H} (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 160.1 (HO-C1), 153.6 (C-NH₂), 152.5 (-C= imidazol), 128.2 - 100.4 (Ar, C). MS (IE, m/z): 225.

A1.2.3. Síntesis de 2-(((3-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)fenil)imino)metil)fenol (**HL3**)

2-(*m*-aminofenil)bencimidazol (1.05 g, 5 mmol) y salicilaldehído (0.61 g, 5 mmol) fueron mezclados y agitados en metanol a reflujo. Después de 2 horas de reacción, el precipitado color amarillo fue lavado con una mezcla fría de agua:metanol (1:1) y secado en horno de vacío durante 4 horas. Rendimiento: 1.24 g, 79%. C₂₀H₁₅N₃O (313.36 g·mol⁻¹): AE calculado (%): C, 76.66; H, 4.83; N, 13.41. AE encontrado (%): C, 76.38; H, 4.77; N, 13.49. Punto de fusión: 233 - 235 °C. IR (ATR cm⁻¹): ν(N=CH)_{imina} 1602; ν(N=C)_{imidazol} 1575; ν(C=C) 1509; ν(C-O)_{fenólico} 1258. RMN-¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 12.99 (s, 1H, NH), 12.99 (s, 1H, OH), 9.10 (s, 1H, CH=N), 8.20 (s, 1H, Ar), 8.12 (d, 1H, Ar), 7.73 (dd, 1H, Ar), 7.65 (t, 1H, Ar), 7.64 (d, 1H, Ar), 7.56 (dd, 1H, Ar), 7.46 (t, 1H, Ar), 7.23 (dt, 2H, Ar), 7.04 (t, 1H, Ar), 7.03 (d, 1H, Ar). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 164.52 (CH=N azometino), 160.82 (OH-C2''), 151.18 (CH=N imidazol), 149.28 - 112.38 (Ar, C). MS (IE, m/z): 313.

A1.2.4. Síntesis de 4-(((3-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)fenil)imino)metil)benceno-1,3-diol (**HL4**)

El ligando HL4 fue obtenido como un polvo color amarillo de acuerdo al procedimiento general descrito para HL3, usando 2-(*m*-aminofenil)bencimidazol (1.05 g, 5 mmol) y 2,4-dihidroxibenzaldehído (0.69 g, 5 mmol). Rendimiento: 1.42 g, 86%. C₂₀H₁₅N₃O₂ (329.36 g·mol⁻¹). AE calculado (%): C, 72.94; H, 4.59; N, 12.76. AE encontrado (%): C, 72.73; H, 4.63; N, 13.00. Punto de fusión: 281 - 283 °C. IR (ATR cm⁻¹): ν(N=CH)_{imina} 1605; ν(N=C)_{imidazol} 1568; ν(C=C) 1495; ν(C-O)_{fenólico} 1260. RMN-¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13.47 (s, 1H, NH), 12.98 (s, 1H, OH), 10.34 (s, 1H, OH), 8.94 (s, 1H, CH=N), 8.14 (s, 1H, Ar), 8.08 (d, 1H, Ar), 7.69 (d, 1H, Ar), 7.61 (t, 1H, Ar), 7.56 (d, 1H, Ar), 7.49 (d, 1H, Ar), 7.23 (m, 2H), 6.45 (d, 1H, Ar), 6.35 (s, 1H, Ar). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 163.69 (CH=N azometino), 163.55 (OH-C2''), 163.21 (OH-C4''), 151.28 (CH=N imidazol), 149.33 - 102.91 (Ar, C). MS (DART+) m/z: 330.

A1.2.5. Síntesis de 2-(((4-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)fenil)imino)metil)fenol (**HL5**)

El ligando HL5 fue obtenido como un polvo color amarillo intenso de acuerdo al procedimiento general descrito para HL3, usando 2-(*p*-aminofenil)bencimidazol (1.05 g, 5

mmol) y salicilaldehído (0.61 g, 5 mmol) en etanol. Rendimiento: 1.28 g, 82%. $C_{20}H_{15}N_3O$ (313.36 $g \cdot mol^{-1}$). AE calculado (%): C, 76.66; H, 4.83; N, 13.41. AE encontrado (%): C, 76.26; H, 4.73; N, 13.43. Punto de fusión: 245 - 247 °C. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(N=CH)_{imina}$ 1600; $\nu(N=C)_{imidazol}$ 1570; $\nu(C=C)$ 1495; $\nu(C-O)_{fenólico}$ 1277. RMN- 1H (DMSO- d_6) δ (ppm) 13.00 (s, 1H, NH), 13.00 (s, 1H, OH), 9.09 (s, 1H, CH=N), 8.29 (d, 2H, Ar), 7.71 (d, 1H, Ar), 7.63 (d, 2H, Ar), 7.46 (t, 1H, Ar), 7.24 (dt, 2H, Ar), 7.02 (t, 1H, Ar), 7.01 (d, 1H, Ar). RMN- $^{13}C\{^1H\}$ (DMSO- d_6) δ (ppm) 164.34 (CH=N azometino), 160.85 (OH-C2''), 151.24 (CH=N imidazol), 149.67 - 117.16 (Ar, C). MS (EI, m/z): 314.

A1.2.6. Síntesis de 4-(((4-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)fenil)imino)metil)benceno-1,3-diol (**HL6**)
El ligando HL6 fue obtenido como un polvo color amarillo intenso de acuerdo al procedimiento general descrito para HL3, usando 2-(*p*-aminofenil)bencimidazol (1.05 g, 5 mmol) y 2,4-dihidroxibenzaldehído (0.69 g, 5 mmol) en etanol. Rendimiento: 1.19 g, 72%. $C_{20}H_{15}N_3O_2$ (329.36 $g \cdot mol^{-1}$). AE calculado (%): C, 72.94; H, 4.59; N, 12.76. AE encontrado (%): C, 73.12; H, 4.54; N, 12.91. Punto de fusión: 262 - 263 °C. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(N=CH)_{imina}$ 1600; $\nu(N=C)_{imidazol}$ 1566; $\nu(C=C)$ 1505; $\nu(C-O)_{fenólico}$ 1277. RMN- 1H (DMSO- d_6) δ (ppm) 13.45 (s, 1H, NH), 12.91 (s, 1H, OH), 10.33 (s, 1H, OH), 8.92 (s, 1H, CH=N), 8.24 (d, 2H, Ar), 7.66 (d, 1H, Ar), 7.54 (d, 2H, Ar), 7.53 (d, 1H, Ar), 7.21 (t, 2H, Ar), 6.43 (d, 1H, Ar), 6.32 (s, 1H, Ar). RMN- $^{13}C\{^1H\}$ (DMSO- d_6) δ (ppm) 163.64 (CH=N azometino), 163.49 (OH-C2''), 163.28 (OH-C4''), 151.35 (CH=N imidazol), 149.77 - 102.88 (Ar, C). MS (DART+) m/z: 330

A1.3. Síntesis de complejos

A1.3.1. Síntesis de $[La(L1)_2(Cl)] \cdot CH_3CN$ (**La-L1**)

Una solución de $LaCl_3 \cdot 7H_2O$ (83 mg, 0.22 mmol) en metanol (1 mL) fue adicionada gota a gota a 10 mL de una solución de HL1 (2 eq: 100 mg, 0.44 mmol) preparada en acetonitrilo, dando lugar a la formación inmediata de un precipitado. La mezcla de reacción se dejó a reflujo con agitación constante durante 2 horas, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente.

El sólido color marrón formado en solución fue filtrado, lavado 2 veces con acetato de etilo (20 mL) y luego secado al vacío. Rendimiento: 123 mg, 84%. $C_{28}H_{23}ClLaN_7O_2$ (663.9 g·mol⁻¹). AE calculado (%): C, 50.66; H, 3.49; N, 14.77; La, 20.92. AE encontrado (%): C, 50.50; H, 3.59; N, 14.54; La, 20.34. IR (ATR cm⁻¹): $\nu(N-H)$ 3500-3300; $\delta(N-H)$ 1618; $\nu(N=C)_{imidazol}$ 1558; $\nu(C=C)$ 1492; $\nu(C-O)_{fenolico}$ 1262; $\delta(C-H)$ 749. RMN-¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.66 (dd, 4H, Ar), 7.53 (d, 2H, Ar), 7.28 (dd, 4H, Ar), 6.98-6.89 (m, 4H, Ar), 4.14 (s, 4H, NH₂). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 152.5 (-C= imidazol), 149.3 (-C= imidazol), 141.2 (O-C1), 139.5 (C-NH₂), 134.5 (-C= imidazol), 119.7 - 100.0 (Ar, C). TGA pérdida de masa: 6.23% (160-220 °C, 1 etapa, calculado para 1 x CH₃CN = 6.18%), 27.62% (250-380 °C, 1 etapa, calculado para formación de La₂(CO₃)₃ = 26.49%). MS (DART+) m/z: [M+1]⁺ calculado para $C_{28}H_{24}ClLaN_7O_2^+$: 664.0743, encontrado: 664.2148. Λ (Etanol, 26 °C) ($\Omega^{-1}\cdot cm^2\cdot mol^{-1}$): 0.007.

A1.3.2. Síntesis de [Ce(L1)₂(Cl)]·CH₃CN (**Ce-L1**)

Una solución de CeCl₃·7H₂O (82 mg, 0.22 mmol) en metanol (1 mL) fue adicionada gota a gota a 10 mL de una solución de HL1 (2 eq: 100 mg, 0.44 mmol) preparada en acetonitrilo. La mezcla de reacción se dejó a reflujo con agitación constante durante 2 horas, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sólido formado en solución fue filtrado, lavado 2 veces con acetato de etilo (20 mL) y luego secado al vacío. El complejo se obtuvo como un polvo color verde oliva, rendimiento: 132 mg, 90%. $C_{28}H_{23}CeClN_7O_2$ (664.1 g·mol⁻¹). AE calculado (%): C, 50.56; H, 3.49; N, 14.74; Ce, 21.07. AE encontrado (%): C, 50.68; H, 3.60; N, 14.57; Ce, 21.24. IR (ATR cm⁻¹): $\nu(N-H)$ 3500-3300; $\delta(N-H)$ 1621; $\nu(N=C)_{imidazol}$ 1555; $\nu(C=C)$ 1496; $\nu(C-O)_{fenolico}$ 1272; $\delta(C-H)$ 752. TGA pérdida de masa: 6.34% (160-230 °C, 1 etapa, calculado para 1 x CH₃CN = 6.18%), 27.70% (230-500 °C, 1 etapa, calculado para formación de Ce₂(CO₃)₃ = 26.25%). MS (DART+) m/z: [M+1]⁺ calculado para $C_{28}H_{23}CeClN_7O_2^+$: 664.0656, encontrado: 664.2174. Λ (Etanol, 26 °C) ($\Omega^{-1}\cdot cm^2\cdot mol^{-1}$): 0.005.

A1.3.3. Síntesis de $[\text{Sm}(\text{L1})_2(\text{Cl})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Sm-L1**)

Una solución de $\text{SmCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (80 mg, 0.22 mmol) en metanol (1 mL) fue adicionada gota a gota a 10 mL de una solución de HL1 (2 eq: 100 mg, 0.44 mmol) preparada en acetonitrilo. La mezcla de reacción se dejó a reflujo con agitación constante durante 2 horas, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. El sólido formado en solución fue filtrado, lavado 2 veces con acetato de etilo (20 mL) y luego secado al vacío. El complejo se obtuvo como un polvo color verde oliva, rendimiento: 135 mg, 97%. $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{ClN}_6\text{O}_2\text{Sm}$ ($634.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). AE calculado (%): C, 49.23; H, 3.18; N, 13.25; Sm, 23.70. AE encontrado (%): C, 49.40; H, 3.19; N, 13.34; Sm, 23.65. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3500-3300; $\delta(\text{N-H})$ 1612; $\nu(\text{N=C})_{\text{imidazol}}$ 1558; $\nu(\text{C=C})$ 1496; $\nu(\text{C-O})_{\text{fenólico}}$ 1278; $\delta(\text{C-H})$ 755. TGA pérdida de masa: 5.46% (50-100 °C, 1 etapa, calculado para $2 \times \text{H}_2\text{O} = 5.52\%$), 23.93% (230-450 °C, 1 etapa, calculado para formación de $\text{Sm}_2(\text{CO}_3)_3 = 24.21 \%$). MS (DART+) m/z : $[\text{M}+1]^+$ calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{ClN}_6\text{O}_2\text{Sm}^+$: 635.0534, encontrado: 635.2128. Λ (Ethanol, 26 °C) ($\Omega^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$): 0.002.

A1.3.4. Síntesis de $[\text{La}(\text{L2})_2(\text{Cl})]$ (**La-L2**)

La síntesis del complejo La-L2 se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito para el compuesto La-L1. El complejo se obtuvo como un polvo color rosa, rendimiento: 121 mg, 88%. $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{ClLaN}_6\text{O}_2$ ($622.8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). AE calculado (%): C, 50.14; H, 3.24; N, 13.49; La, 22.30. AE encontrado (%): C, 50.25; H, 3.34; N, 13.87; La, 22.11. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3500-3300; $\delta(\text{N-H})$ 1624; $\nu(\text{N=C})_{\text{imidazol}}$ 1548; $\nu(\text{C=C})$ 1508; $\nu(\text{C-O})_{\text{fenólico}}$ 1275; $\delta(\text{C-H})$ 742. RMN- ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 7.86 (d, 2H, Ar), 7.74 (dd, 4H, Ar), 7.44 (dd, 4H, Ar), 6.37 (s, 4H, Ar). RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 160.2 (O-C1), 153.3 (C-NH₂), 140.7 (-C=imidazol), 137.0 (-C=imidazol), 129.5 - 100.0 (Ar, C). TGA pérdida de masa: 66.12% (50-500 °C, 1 etapa, calc. formación $\text{LaClO} = 69.44 \%$). MS (DART+) m/z : $[\text{M}+1]^+$ calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{ClLaN}_6\text{O}_2^+$: 624.0556, encontrado: 624.2272. Λ (Etanol, 26 °C) ($\Omega^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$): 0.030.

A1.3.5. Síntesis de $[\text{Ce}(\text{L2})_2(\text{Cl})] \cdot (\text{CH}_3\text{CN})(\text{CH}_3\text{OH})$ (**Ce-L2**)

La síntesis del complejo Ce-L2 se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito para el compuesto Ce-L1. El complejo se obtuvo como un polvo color salmón, rendimiento: 114 mg, 74%. $\text{C}_{29}\text{H}_{27}\text{CeClN}_7\text{O}_3$ ($697.1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). AE calculado (%): C, 49.96; H, 3.90; N, 14.06; Ce, 20.10. AE encontrado (%): C, 50.10; H, 3.99; N, 14.18; Ce, 20.24. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3500-3300; $\delta(\text{N-H})$ 1621; $\nu(\text{N=C})_{\text{imidazol}}$ 1549; $\nu(\text{C=C})$ 1505; $\nu(\text{C-O})_{\text{fenólico}}$ 1278; $\delta(\text{C-H})$ 740. TGA pérdida de masa: 5.02% (50-100 °C, 1 etapa, calculado para 1 x CH_3OH = 4.59%), 5.89% (180-240 °C, 1 etapa, calculado para 1 x CH_3CN = 6.18%). MS (DART+) m/z : $[\text{M}+1]^+$ calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{CeClN}_7\text{O}_3^+$: 698.1075, encontrado: 698.2314. Λ (Etanol, 26 °C) ($\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$): 0.010.

A1.3.6. Síntesis de $[\text{Sm}(\text{L2})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})] \cdot (\text{CH}_3\text{OH})$ (**Sm-L2**)

La síntesis del complejo Sm-L2 se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito para el compuesto Sm-L1. El complejo se obtuvo como un polvo color rosa claro, rendimiento: 132 mg, 88%. $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{ClN}_6\text{O}_4\text{Sm}$ ($683.3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$). AE calculado (%): C, 47.39; H, 3.83; N, 12.28; Sm, 21.97. AE encontrado (%): C, 47.50; H, 3.91; N, 12.51; Sm, 22.14. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(\text{N-H})$ 3500-3300; $\delta(\text{N-H})$ 1624; $\nu(\text{N=C})_{\text{imidazol}}$ 1568; $\nu(\text{C=C})$ 1508; $\nu(\text{C-O})_{\text{fenólico}}$ 1278; $\delta(\text{C-H})$ 743. TGA pérdida de masa: 4.30% (100-160 °C, 1 etapa, calculado para 1 x CH_3OH = 4.68%), 3.06% (160-220 °C, 1 etapa, calculado para 1 x H_2O = 2.76%), 25.85% (250–500 °C, 1 etapa, calculado para formación de $\text{Sm}_2(\text{CO}_3)_3$ = 24.21%). MS (DART+) m/z : $[\text{M}+1]^+$ calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{ClN}_6\text{O}_4\text{Sm}^+$: 684.0823, encontrado: 684.23106. Λ (Etanol, 26 °C) ($\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$): 0.016.

A1.3.7. Síntesis de $[\text{La}(\text{L3})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**La-L3**)

Una solución de $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (83 mg, 0.22 mmol) en metanol (1.5 mL) fue adicionada gota a gota a una solución de HL3 (2 eq: 138 mg, 0.44 mmol) preparada en metanol (20 mL). Después de 2 horas de agitación constante, el producto fue filtrado y la solución fue evaporada bajo presión a alto vacío. El complejo obtenido fue recrystalizado en una mezcla etanol:metanol (1:1) y secado al vacío por 4 horas. El producto final se observó como un

polvo color trigo, rendimiento: 149 mg, 79%. $C_{40}H_{34}ClLaN_6O_5$ ($853.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). AE calculado (%): C, 56.32; H, 4.02; N, 9.85; La, 16.28. AE encontrado (%): C, 55.99; H, 4.09; N, 10.10; La, 16.00. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(\text{N}=\text{CH})_{\text{imina}}$ 1622; $\nu(\text{N}=\text{C})_{\text{imidazol}}$ 1563; $\nu(\text{C}=\text{C})$ 1506; $\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{fenólico}}$ 1347. RMN- ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 13.02 (s, 1H, NH), 9.18 (s, 1H, CH=N), 8.35 (s, 1H, Ar), 8.20 (d, 1H, Ar), 7.76 (d, 1H, Ar), 7.64 (t, 1H, Ar), 7.63 (d, 1H, Ar), 7.56 (d, 1H, Ar), 7.46 (t, 1H, Ar), 7.23 (m, 2H, Ar), 7.03 (d, 2H, Ar). RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm) 164.46 (CH=N azometino), 160.81 (OH-C2''), 151.23 (CH=N imidazol), 149.21 - 112.42 (Ar, C). TGA pérdida de masa: 2.10% (60-165 °C, 1 etapa, calculado para $1 \times \text{H}_2\text{O} = 2.11\%$) hidratación, 4.27% (165-230 °C, 1 etapa, calculado para $2 \times \text{H}_2\text{O} = 4.31\%$) coordinación, 26.81% (230-500 °C, 2 etapas, descomposición). MS (MALDI-TOF) m/z : 853.2. λ (Etanol, 26 °C) ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$): 0.012.

A1.3.8. Síntesis de $[\text{Ce}(\text{L3})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})_3]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Ce-L3**)

Una solución de $\text{CeCl}_3\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (82 mg, 0.22 mmol) en metanol (1.5 mL) fue adicionada gota a gota a una solución de HL3 (2 eq: 138 mg, 0.44 mmol) preparada en metanol (20 mL). Después de 2 horas de agitación constante, el producto fue filtrado y la solución fue evaporada bajo presión a alto vacío. El complejo obtenido fue recristalizado en una mezcla etanol:metanol (1:1) y secado al vacío por 4 horas. El complejo se obtuvo como un polvo color dorado, rendimiento: 145 mg, 74%. $C_{40}H_{38}\text{CeClN}_6\text{O}_7$ ($890.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). AE calculado (%): C, 53.96; H, 4.30; N, 9.44; Ce, 15.74. AE encontrado (%): C, 54.12; H, 4.34; N, 9.87; Ce, 16.11. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(\text{N}=\text{CH})_{\text{imina}}$ 1624; $\nu(\text{N}=\text{C})_{\text{imidazol}}$ 1565; $\nu(\text{C}=\text{C})$ 1507; $\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{fenólico}}$ 1349. TGA pérdida de masa: 3.97% (60-165 °C, 1 etapa, calculado para $2 \times \text{H}_2\text{O} = 4.04\%$) hidratación, 6.28% (165-230 °C, 1 etapa, calculado para $3 \times \text{H}_2\text{O} = 6.32\%$) coordinación, 30.56% (230-500 °C, 1 etapa, descomposición). MS (MALDI-TOF) m/z : 890.7. λ (Etanol, 26 °C) ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$): 0.015.

A1.3.9. Síntesis de $[\text{La}(\text{L4})_2(\text{Cl})(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}\cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$ (**La-L4**)

La síntesis del complejo La-L4 se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito para el compuesto La-L3. El complejo se obtuvo como un polvo color verde oliva oscuro,

rendimiento: 161 mg, 76%. $C_{42}H_{44}ClLaN_6O_{10}$ (967.2 $g \cdot mol^{-1}$). AE calculado (%): C, 52.16; H, 4.59; N, 8.69; La, 14.36. AE encontrado (%): C, 53.07; H, 4.59; N, 8.92; La, 14.25. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(N=CH)_{\text{imina}}$ 1624; $\nu(N=C)_{\text{imidazol}}$ 1559; $\nu(C=C)$ 1493; $\nu(C-O)_{\text{fenólico}}$ 1310. RMN- 1H (DMSO- d_6) δ (ppm) 13.48 (s, 1H, NH), 10.58 (s, 1H, OH), 9.01 (s, 1H, CH=N), 8.26 (s, 1H, Ar), 8.14 (d, 1H, Ar), 7.64 (t, 1H, Ar), 7.63 (d, 1H, Ar), 7.60 (d, 1H, Ar), 7.47 (d, 1H, Ar), 7.24 (m, 2H), 6.49 (d, 1H, Ar), 6.42 (s, 1H, Ar). RMN- $^{13}C\{^1H\}$ (DMSO- d_6) δ (ppm) 165.79 (CH=N azometino), 163.60 (OH-C2''), 163.41 (OH-C4''), 151.31 (CH=N imidazol), 149.22 - 102.98 (Ar, C). TGA pérdida de masa: 6.77% (70-120 °C, 1 etapa, calculado para $2 \times CH_3OH = 6.62\%$), 3.99% (120-170 °C, 1 etapa, calculado para $2 \times H_2O = 3.99\%$) hidratación, 4.43% (170-235 °C, 1 etapa, calculado para $2 \times H_2O = 4.15\%$) coordinación, 38.49% (235-500 °C, 1 etapa, descomposición). MS (MALDI-TOF) m/z: 967.3. Λ (Etanol, 26 °C) ($\Omega^{-1} \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$): 0.037.

A1.3.10. Síntesis de $[Ce(L4)_2(Cl)(H_2O)_2] \cdot H_2O \cdot CH_3OH$ (**Ce-L4**)

La síntesis del complejo Ce-L4 se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito para el compuesto Ce-L3. El complejo se obtuvo como un polvo color marrón, rendimiento: 134 mg, 66%. $C_{41}H_{38}CeClN_6O_8$ (918.4 $g \cdot mol^{-1}$): AE calculado (%): C, 53.62; H, 4.17; N, 9.15; Ce, 15.26. AE encontrado (%): C, 53.83; H, 4.28; N, 9.37; Ce, 15.94. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(N=CH)_{\text{imina}}$ 1619; $\nu(N=C)_{\text{imidazol}}$ 1555; $\nu(C=C)$ 1492; $\nu(C-O)_{\text{fenólico}}$ 1310. TGA pérdida de masa: 3.77% (75-120 °C, 1 etapa, calculado para $1 \times CH_3OH = 3.49\%$), 2.22% (120-160 °C, 1 etapa, calculado para $1 \times H_2O = 2.03\%$) hidratación, 4.39% (160-230 °C, 1 etapa, calculado para $2 \times H_2O = 4.15\%$) coordinación, 20.75% (230-500 °C, 1 etapa, descomposición). MS (MALDI-TOF) m/z: 918.4. Λ (Etanol, 26 °C) ($\Omega^{-1} \cdot cm^2 \cdot mol^{-1}$): 0.031.

A1.3.11. Síntesis de $[La(L5)_2(Cl)(H_2O)_3] \cdot 2H_2O$ (**La-L5**)

La síntesis del complejo La-L5 se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito para el compuesto La-L3. El complejo se obtuvo como un polvo color verde pálido, rendimiento: 138 mg, 71%. $C_{40}H_{38}ClLaN_6O_7$ (889.1 $g \cdot mol^{-1}$). AE calculado (%): C, 54.03; H, 4.31; N, 9.45; La, 15.62. AE encontrado (%): C, 53.88; H, 4.24; N, 9.67; La, 15.42. IR (ATR cm^{-1}): $\nu(N=CH)_{\text{imina}}$ 1634; $\nu(N=C)_{\text{imidazol}}$ 1562; $\nu(C=C)$ 1493; $\nu(C-O)_{\text{fenólico}}$ 1308.

RMN-¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 12.97 (s, 1H, NH), 9.09 (s, 1H, CH=N), 8.35 (d, 2H, Ar), 7.72 (d, 1H, Ar), 7.61 (d, 2H, Ar), 7.45 (t, 1H, Ar), 7.22 (dd, 2H, Ar), 7.02 (t, 1H, Ar), 7.02 (d, 1H, Ar). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 164.19 (CH=N azometino), 160.80 (OH-C2''), 151.25 (CH=N imidazol), 149.70 - 114.02 (Ar, C). TGA pérdida de masa: 4.16% (70-165 °C, 1 etapa, calculado para 2 × H₂O = 4.05%) hidratación, 6.49% (165-220 °C, 1 etapa, calculado para 3 × H₂O = 6.33%) coordinación, 33.69% (220-500 °C, 2 etapas, descomposición). MS (MALDI-TOF) m/z: 889.5. *λ* (Etanol, 26 °C) (M⁻¹·cm²·mol⁻¹): 0.007.

A1.3.12. Síntesis de [Ce(L5)₂(Cl)(H₂O)]·CH₃OH (**Ce-L5**)

La síntesis del complejo Ce-L5 se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito para el compuesto Ce-L3. El complejo se obtuvo como un polvo color crema, rendimiento: 155 mg, 83%. C₄₁H₃₄CeClN₆O₄ (850.3 g·mol⁻¹). AE calculado (%): C, 57.91; H, 4.03; N, 9.88; Ce, 16.48. AE encontrado (%): C, 57.40; H, 4.14; N, 10.04; Ce, 16.10. IR (ATR cm⁻¹): ν(N=CH)_{imina} 1635; ν(N=C)_{imidazol} 1562; ν(C=C) 1493; ν(C-O)_{fenólico} 1310. TGA pérdida de masa: 3.82% (60-120 °C, 1 etapa, calculado para 1 × CH₃OH = 3.76%), 2.21% (120-250 °C, 1 etapa, calculado para 1 × H₂O = 2.20%) coordinación, 27.31% (250-500 °C, 1 etapa, descomposición). MS (MALDI-TOF) m/z: 851.2. *λ* (Etanol, 26 °C) (M⁻¹·cm²·mol⁻¹): 0.011.

A1.3.13. Síntesis de [La(L6)₂(Cl)(H₂O)₂]·H₂O (**La-L6**)

La síntesis del complejo La-L6 se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito para el compuesto La-L3. El complejo se obtuvo como un polvo color amarillo verdoso, rendimiento: 150 mg, 77%. C₄₀H₃₄ClLaN₆O₇ (885.1 g·mol⁻¹). AE calculado (%): C, 54.28; H, 3.87; N, 9.50; La, 15.69. AE encontrado (%): C, 54.51; H, 3.98; N, 9.47; La, 15.95. IR (ATR cm⁻¹): ν(N=CH)_{imina} 1635; ν(N=C)_{imidazol} 1560; ν(C=C) 1494; ν(C-O)_{fenólico} 1313. RMN-¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 13.46 (s, 1H, NH), 10.60 (s, 1H, OH), 8.93 (s, 1H, CH=N), 8.31 (d, 2H, Ar), 7.61 (m, 2H, Ar), 7.54 (d, 2H, Ar), 7.21 (dd, 2H, Ar), 6.48 (d, 1H, Ar), 6.40 (s, 1H, Ar). RMN-¹³C {¹H} (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 165.83 (CH=N azometino), 163.68 (OH-C2''), 163.38 (OH-C4''), 151.41 (CH=N imidazol), 149.77 - 102.88 (Ar, C). TGA pérdida de masa: 2.21% (60-110 °C, 1 etapa, calculado para 1 × H₂O = 2.15%) hidratación, 4.33%

(110-220 °C, 1 etapa, calculado para 2 x H₂O = 4.04%) coordinación, 21.61% (220–500 °C, 2 etapas, descomposición). MS (MALDI-TOF) m/z: 885.3. λ (Etanol, 26 °C) ($\Omega^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$): 0.028.

A1.3.14. Síntesis de [Ce(L6)₂(Cl)(H₂O)₂] $\cdot$ H₂O (**Ce-L6**)

La síntesis del complejo Ce-L6 se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento descrito para el compuesto Ce-L3. El complejo se obtuvo como un polvo color mostaza, rendimiento: 133 mg, 68%. C₄₀H₃₄CeClN₆O₇ (886.3 g $\cdot$ mol⁻¹). AE calculado (%): C, 54.21; H, 3.87; N, 9.48; Ce, 15.81. AE encontrado (%): C, 54.35; H, 3.97; N, 9.67; Ce, 15.62. IR (ATR cm⁻¹): $\nu(\text{N}=\text{CH})_{\text{imina}}$ 1636; $\nu(\text{N}=\text{C})_{\text{imidazol}}$ 1559; $\nu(\text{C}=\text{C})$ 1492; $\nu(\text{C}-\text{O})_{\text{fenólico}}$ 1313. TGA pérdida de masa: 2.34% (65-150 °C, 1 etapa, calculado para 1 $\times$ H₂O = 2.14%) hidratación, 4.31% (150-245 °C, 1 etapa, calculado para 2 x H₂O = 4.04%) coordinación, 22.14% (230–500 °C, 1 etapa, descomposición). MS (MALDI-TOF) m/z: 886.0. λ (Etanol, 26 °C) ($\Omega^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$): 0.036.

A1.4. Estudios de citotoxicidad

A1.4.1. Actividad antiproliferativa

Los estudios de actividad antiproliferativa se llevaron a cabo en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM en México con la colaboración de la M. en C. María Teresa Ramírez Apan. Los ensayos se realizaron sobre células U251 (glioblastoma humano), PC-3 (cáncer de próstata), K562 (leucemia mielógena), HCT-15 (carcinoma colorrectal), MCF-7 (adenocarcinoma epitelial de mama) y SKLU-1 (pulmón), las cuales se cultivaron a 37 °C en medio RPMI-1640 (Gibco) enriquecido con 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco), 1% de penicilina:estreptomicina:solución de anfotericina B, 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco) y *L*-glutamina 2 mM (Invitrogen) en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% (v/v). Se utilizó azul tripán como indicador de la viabilidad celular.

Las células se extrajeron de los matraces con cultivo de tejidos mediante tratamiento con tripsina y se diluyeron con medio fresco. Luego, se tomaron 100 μ L/pocillo de las siguientes suspensiones: 7.5×10^4 células/mL (U251), 7.5×10^4 células/mL (PC-3), 5.0×10^4 células/mL (K562), 10.0×10^4 células/mL (HCT-15), 5.0×10^4 células/mL (MCF-7), 7.5×10^4 células/mL (SK-LU-1) y 10.0×10^4 células/mL (COS-7), y se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos (Costar). Posteriormente las placas se dejaron en incubación a 37 °C (5% de CO₂) durante 24 horas para permitir la unión de las células. Los compuestos se prepararon en una concentración stock de 20 mM, solubilizados en DMSO. Para la concentración de 25 μ M, el % de DMSO en el pocillo fue de 0.025%. Acto seguido, 100 μ L de la solución de compuesto 25 μ M se añadió a cada pocillo. Se usó la misma concentración del vehículo como control positivo, en todos los casos el DMSO fue constante durante las mediciones. Las líneas de células cancerosas se expusieron a los compuestos probados durante 48 h. El medio de cultivo celular sin células tumorales ni compuestos se probó como control negativo. El fármaco utilizado como control de referencia fue cisplatino.

A1.4.2. Actividad citotóxica sobre células U-937

Se cultivaron células U-937 en medio RPMI-1640 enriquecido con SFB al 10% y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5% en presencia de los compuestos químicos. Después de 72 horas, se determinó la viabilidad de las células a través del ensayo de la reducción de MTT a formazán, incubando la solución durante 3 horas adicionales. La producción de formazán se midió a 570 nm en un lector de microplacas de 96 pocillos (BioRad Benchmark). Se utilizaron como controles células cultivadas en ausencia de los compuestos y mantenidas en las mismas condiciones. Todos los compuestos se probaron por triplicado en dos experimentos independientes. Los resultados se expresaron como concentración letal al 50% (CL₅₀).

A1.5. Estudios de actividad antiparasitaria

Los estudios de la actividad antiparasitaria se realizaron en el grupo de investigación PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales) de la Facultad de Medicina en

la Universidad de Antioquia (Medellín) con la colaboración de la Dra. Yulieth Upegui y bajo la supervisión de la Dra. Sara María Robledo.

A1.5.1. Actividad leishmanicida *in vitro*

Se cultivaron promastigotes de *Leishmania braziliensis* UA140-epirGFP, que son responsables de las formas cutánea y mucosa de la enfermedad, en un ambiente NNN bifásico modificado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y glucosa en la fase líquida. Se añadieron 0.1 µg/mL de forbol miristato acetato (PMA) a las células U-937 para inducir la formación de macrófagos. El experimento se realizó en placas de 24 pocillos donde las células se infectaron con promastigotes en la fase estacionaria de crecimiento. Después de 4 h de incubación a 34 °C (5% CO₂), los parásitos libres se eliminaron mediante dos lavados sucesivos con PBS. Se agregaron diluciones adaptadas de los compuestos, y los cultivos se incubaron durante 72 h a 37 °C (5% de CO₂). Las células infectadas cultivadas en ausencia de compuestos sirvieron como control. El fármaco de referencia fue anfotericina B. El efecto leishmanicida se midió con un láser de argón en un citómetro de flujo a 488 nm (excitación) y 525 nm (emisión). Cada concentración de solución de compuesto, así como cada control, se ensayó en dos experimentos independientes. Los resultados se expresan como porcentajes de inhibición.

A1.5.2. Actividad tripanocida *in vitro*

Se evaluó la actividad tripanocida *in vitro* de los compuestos en células de *T. cruzi* (cepa Tulahuen) para amastigotes intracelulares que expresan el gen de la beta-galactosidasa de *Escherichia coli*. Los compuestos se agregaron a concentraciones de 20 µg/mL sobre células U-937 infectadas por epimastigotes después de la incubación durante 24 h. Los experimentos se realizaron con dos réplicas por duplicado, y los resultados se expresaron como porcentajes de inhibición. El compuesto de referencia utilizado fue el benznidazol.

A1.5.3. Actividad antiplasmodial *in vitro*

La actividad antiplasmodial *in vitro* se determinó sobre la cepa 3D7 de *P. falciparum* en suspensiones de cultivos preparados en placas de 96 pocillos utilizando la cuantificación de

lactato deshidrogenasa del parásito (pLDH). Los compuestos disueltos en RPMI-1640 se agregaron a concentraciones de 20 µg/mL sobre los parásitos, y se incubaron durante 72 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂. Se utilizó cloroquina como control positivo para medir la actividad. El desarrollo del color de la reacción de LDH se controló colorimétricamente en un espectrofluorómetro (Varioskan, Thermo) leyendo a 650 nm. Los experimentos se realizaron con dos réplicas por duplicado, y los resultados se expresaron como la concentración efectiva 50 (CE₅₀).

A1.6. Estudios de actividad antibacteriana

Los estudios de la actividad antibacteriana se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Salud Pública Departamental del Valle del Cauca, en donde la Secretaría de Salud proporcionó las cepas bacterianas que fueron replicadas con la colaboración de la Dra. Sandra Patricia Rivera.

A1.6.1. Actividad antibacteriana *in vitro*

La actividad antibacteriana *in vitro* de los compuestos químicos, se determinó mediante microdilución en caldo para dos cepas Gram-positivas (*S. aureus* ATCC® 25923, *L. monocytogenes* ATCC® 19115) y dos cepas Gram-negativas (*E. coli* ATCC® 25922, *P. aeruginosa* ATCC ® 27583). La concentración final de los compuestos estuvo en el rango de 4-2000 µg/mL. Se utilizó medio libre con DMSO (0.01%) como control negativo, mientras que medio bacteriano sin agente inhibidor se utilizó como control positivo. Se utilizaron ciprofloxacina (CP) y nitrato de plata (AgNO₃) como antibióticos de control. Las bacterias se incubaron con los compuestos durante 24 h a 37 °C para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para verificar que la inhibición observada en los pocillos correspondía a la misma CMI en todos los casos, los ensayos se realizaron por triplicado.

A1.6.2. Estudios de estabilidad en medios de cultivo

La estabilidad de los complejos en la solución de cultivo se evaluó mediante experimentos de absorción electrónica utilizando un espectrofotómetro UV-visible Evolution 220 Thermo

Scientific equipado con un sistema Peltier de celda única para el control de la temperatura. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de espesor y las mediciones se realizaron en un rango de 300 a 700 nm. Se utilizó caldo Mueller Hinton (CMH) como medio de cultivo celular. Se prepararon soluciones stock de compuestos (10^{-3} M en DMSO) el día de los experimentos, luego se agregaron 2, 4, 6, 8 y 10 μ L de cada solución al medio CMH, obteniendo 2 mL de cada uno con concentraciones entre 1.0 -5.0 μ M. Inmediatamente, se tomaron los espectros UV-Vis a 37 °C. Finalmente, las soluciones se dejaron en las mismas condiciones de crecimiento bacteriano durante 24 h y se midieron de nuevo los espectros UV-Vis. Para los blancos, se utilizó la cantidad correspondiente de DMSO añadida al medio de cultivo.

A1.6.3. Estudios de fluorescencia sobre bacterias

Los espectros de ultravioleta visible se obtuvieron usando un espectrofotómetro UV-Visible V-630BIO (JASCO) equipado con intercambiador de celdas Peltier (JASCO, PAC-743). Los espectros de fluorescencia se obtuvieron utilizando un espectrofluorómetro FP-8500 (JASCO), utilizando celdas de cuarzo de 1 cm de espesor en el rango de 200 a 700 nm. Las imágenes de microscopía de fluorescencia se obtuvieron utilizando un microscopio de Epi-Fluorescencia Unico G500 equipado con filtros azul (B-1), verde (G-1) y UV-1.

El medio de cultivo (CMH) se inoculó con la cepa bacteriana *E. coli* (ATCC 25922) y se incubó durante la noche a 37 °C. Luego, el cultivo se diluyó 1:200 en medio de cultivo fresco hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial a 37 °C. Para marcar las bacterias a una concentración fija, se añadió 1 mL de la solución bacteriana al medio que contenía el compuesto La-L1, a una concentración final de 125 μ g/mL, y se incubó adicionalmente durante 1 h a 37 °C. Para estudiar los efectos de diferentes concentraciones de compuestos en la morfología bacteriana, se tomaron alícuotas de 100 μ L de la solución bacteriana en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, y se agregaron medios que contenían diferentes concentraciones de ligando o complejo, seguido de incubación durante 12 h a 37 °C. Después del marcaje, las muestras se lavaron 3 veces con medio de cultivo y se sometieron a fijación química (formaldehído al 2.5% en 1X SFB), durante 1 hora a temperatura ambiente. Se obtuvieron imágenes de los portaobjetos utilizando un equipo de microscopio de fluorescencia. La fluorescencia se excitó a la longitud de onda de máxima absorción.

A1.7. Interacción con modelos de membrana

Los estudios de interacción con modelos de membrana sintética se realizaron en la Universidad del Valle con la colaboración del Dr. Jose Oñate Garzón, docente de la Universidad Santiago de Cali, mientras que los estudios por dinámica y docking molecular fueron diseñados, ejecutados y analizados en colaboración con el Dr. Yamil Liscano de la Universidad Santiago de Cali.

A1.7.1. Preparación de la membrana

Los lípidos 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) y 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilglicerol (DMPG) se utilizaron para imitar un modelo de membrana bacteriana sintética (DMPC/DMPG en una relación: 3:1) y un modelo de membrana de mamífero (DMPC). Los lípidos se suspendieron en una mezcla de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se secaron con nitrógeno y al vacío (3 horas) para obtener películas lipídicas que posteriormente se hidrataron. El proceso de hidratación se realizó utilizando tampón HEPES (HEPES 25 mM, pH 7.0; NaCl 100 mM y EDTA 0.2 mM) y diferentes concentraciones de los compuestos preparados en tampón HEPES, los cuales se agregaron a la mezcla lipídica seca existente, luego se agitaron vigorosamente con un vortex durante 2 minutos y se incubó durante 10 minutos a 37 °C, temperatura por encima de la temperatura de transición de fase (T_m). Las vesículas multilaminares (VML) se obtuvieron después de tres procesos de agitación e incubación a 37 °C. El péptido aliteserina 1c se utilizó como control experimental.

A1.7.2. Calorimetría Diferencial de Barrido

A partir de 2 mg de lípidos, se obtuvieron VML a diferentes proporciones compuesto/lípidos: 1:50, 1:25 y 1:10. Se utilizó tampón HEPES como solución de referencia. Las muestras se colocaron en recipientes herméticos de aluminio para DSC (Tzero) y el análisis se llevó a cabo en un equipo DSC Q25 TA a una temperatura entre 10 y 40 °C con velocidad de calentamiento de 1 °C·min⁻¹. Para obtener la temperatura de transición de fase (T_m), la amplitud de la mitad de la altura del pico ($\Delta T_m/2$) y la entalpía de transición (ΔH), se utilizó el software Trios (TA Instruments) en el análisis de los termogramas.

A1.7.3. Construcción de modelos de membrana simulados para interacción de HL2

Se utilizó la plataforma CHARMM-GUI para desarrollar un modelo de membrana Gram-negativa (*E. coli*) y otro de células humanas normales. 160 moléculas de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidiletanolamina (POPE) y 40 moléculas de 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)] (POPG) se distribuyeron en monocapas internas y externas para la construcción de la membrana Gram-negativa. Además, los fosfolípidos utilizados para el modelo de liposomas se organizaron en monocapas externas e internas con 50 moléculas de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosforilglicerol (DMPG) y 150 moléculas de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) en monocapas externas e internas. Cuatro moléculas de 5-amino-2-(1*H*-bencimidazol-2-il)fenol (HL2) se localizaron sobre la superficie de cada membrana en cada uno de los sistemas.

A1.7.4. Simulación de la dinámica molecular de HL2 con modelos de membrana

Para la simulación de dinámica molecular se utilizó el software GROMACS versión 2019.3. El método de colocación de iones se utilizó con KCl 0.15 M, con un espesor de agua de 22.5 Å y CHARMM36 como campo de fuerza. Para garantizar que no haya choques estéricos entre una molécula de estudio y el sistema, se ajustó calentando a una temperatura de 310 K a 1 fs (femtosegundo)/etapa durante 75 ps (picosegundos), relajando la estructura en un proceso llamado minimización de energía con 300 ps a 2 fs/etapa para la etapa de equilibrio. Con un algoritmo de descenso (valor de tolerancia de $1000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$) en 5000 pasos, se obtuvo la minimización de energía del sistema. Para equilibrar la temperatura y la presión se utilizó el algoritmo de Berendsen. Una vez equilibrado el sistema, se ejecutó la Dinámica Molecular de producción para la recopilación de datos durante 10 ns, utilizando los algoritmos Nose-Hoover y Parrinello-Rahman para ajustar la temperatura y la presión. Se aplicó la suma de la malla de partículas de Ewald (MPE) para corregir las interacciones electrostáticas de largo alcance; mientras que el algoritmo SHAKE se utilizó para minimizar los valores de energía, lo que permitió utilizar un intervalo de tiempo de integración numérica de 2 fs en la simulación.

El análisis de interacción se realizó entre las moléculas de estudio y los fosfolípidos utilizando GROMACS y Visual Molecular Dynamics (VMD). En el análisis de VMD, se observaron interacciones de fosfolípidos con la molécula para determinar cómo penetrar el modelo de membrana y si las moléculas permanecieron dentro o fuera de la membrana. La desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) y los enlaces de hidrógeno de las moléculas a estudiar, se determinaron utilizando los comandos `gmx rms` y `gmx hbond`, respectivamente. La distribución de densidad parcial de la molécula y los fosfolípidos en el eje z se contó usando el comando de densidad `gmx`.

A1.7.5. Construcción de modelos de membrana simulados para interacción de HL4

La membrana modelo zwitteriónica de células de eritrocitos, que fue imitada por fosfatidilcolina zwitteriónica para ensayos de DSC, se construyó con la plataforma CHARMM-GUI. Las proporciones de fosfolípidos utilizadas fueron 20 unidades de POPE, 40 unidades de SM y 40 unidades de POPC, que se distribuyeron tanto en la capa superior como en la inferior de la membrana. Se utilizó un método de colocación de iones Monte Carlo con NaCl 0.15 M, un espesor de agua de 22.5 Å y un campo de fuerza para todo el sistema CHARMM36m. Los archivos se prepararon para minimizar la energía, el equilibrio y la dinámica con GROMACS a 310 K. Los sistemas de modelo de membrana para *E. coli* se construyeron utilizando la siguiente distribución para un sistema modelo de membrana Gram-negativa: POPE = 80 unidades y POPG = 20 unidades, con el software CHARMM-GUI. El modelo de membrana de las células PC-3 se construyó con la plataforma CHARMM-GUI utilizando los fosfolípidos POPE (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) con 27 unidades, POPS (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoserina) con 10 unidades y POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) con 44 unidades, que se distribuyeron tanto en la capa superior como en la inferior de la membrana. Se utilizó un método de colocación de iones Monte Carlo con NaCl 0.15 M, con un espesor de agua de 22.5 Å y como campo de fuerza para todo el sistema CHARMM36m. Los archivos se prepararon para minimizar la energía, el equilibrio y la dinámica con GROMACS a 310 K.

A.1.7.6. Implementación de la DM para HL4 con membrana de eritrocito y *E. coli*

La energía de minimización de la membrana del modelo de eritrocitos y el sistema de membrana de *E. coli* con el ligando HL4 se ajustó con el algoritmo de descenso más pronunciado en 5000 pasos utilizando el esquema de corte de Verlet. El equilibrio se realizó durante 2 ns utilizando el algoritmo de Berendsen para equilibrar la temperatura y la presión del sistema. Se utilizó el software Gromacs versión 2020.1 para la simulación de dinámica molecular de modelos de membranas de eritrocitos y bacterias Gram-negativas. El campo de fuerza CHARMM36m se utilizó para la simulación. Para la localización de los iones, se utilizó el método de Monte Carlo a 0.15 M de NaCl con agua a 22.5 Å de espesor. Para la minimización de energía, se utilizó el algoritmo de descenso más pronunciado, con una duración de 1 ns. El sistema se llevó a 310 K con un equilibrio de 2 fs/paso durante 300 ps a 155.000 n pasos con el algoritmo de Berendsen. Una vez que el sistema se equilibró, la dinámica molecular se ejecutó durante 30 ns a 310 K para las membranas del modelo de eritrocitos y *E. coli*, utilizando los algoritmos Nose-Hoover y Parrinello-Rahman para ajustar la temperatura y la presión. Se utilizó Gromacs para obtener los enlaces de hidrógeno entre HL4 y los fosfolípidos de cada sistema modelo de membrana en 30 ns. Se obtuvieron archivos PyMOL PDB para cada sistema de membranas en seis momentos diferentes: 1, 5, 10, 20, 25 y 30 ns. Estos archivos se utilizaron para visualizar y analizar las interacciones entre los diferentes componentes de cada sistema modelo y HL4 utilizando el software Discovery Studio Visualizer (<http://accelrys.com>).

A.1.7.7. Implementación de la DM para HL4 con membrana PC-3

La energía de minimización del modelo de membrana PC-3 y el ligando HL4 se ajustó con el algoritmo de descenso más pronunciado en 5000 pasos y Verlet como esquema de corte. El equilibrio se realizó durante 2 ns utilizando el algoritmo de Berendsen para equilibrar la temperatura y la presión del sistema. La dinámica molecular se realizó durante 10 ns a 310 K utilizando los algoritmos Nose-Hoover y Parrinello-Rahman para ajustar la temperatura y la presión. Se utilizó el método de Monte Carlo con NaCl 0.15 M, un espesor de agua de 22.5 Å y CHARMM36m como campo de fuerza. Los sistemas se ajustaron calentando lentamente

a 310 K a 1 femtosegundo (fs)/paso durante 75 picosegundos (ps) y a 2 fs/paso durante 300 ps en el paso de equilibrado. La minimización de energía del sistema se logró utilizando el algoritmo de descenso más pronunciado con un valor de tolerancia de $1000 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$ en 5000 pasos con el esquema de corte de Verlet. Se utilizó el algoritmo de Berendsen para 155000 n-pasos para equilibrar la temperatura y la presión del sistema. Cuando se equilibró el sistema, se ejecutó la dinámica molecular de producción para la recopilación de datos durante 10 nanosegundos (ns) utilizando los algoritmos Nose-Hoover y Parrinello-Rahman para ajustar la temperatura y la presión. Se aplicó la suma de Particle Mesh Ewald (PME) para corregir las interacciones electrostáticas de largo alcance. Se utilizó Gromacs para obtener los enlaces de hidrógeno entre HL4 y los fosfolípidos del sistema del modelo de membrana dentro de los 10 ns. Se obtuvieron archivos pymol PDB para cada sistema de membranas en cuatro tiempos diferentes: 1, 4, 8 y 10 ns. Estos archivos se utilizaron para visualizar y analizar las interacciones entre los diferentes componentes de cada sistema modelo y HL4 utilizando el software Discovery Studio Visualizer (<http://accelrys.com>).

A1.8. Interacción con receptores de proteínas en parásitos y bacterias

A1.8.1. Construcción de modelos 3D para ligandos y complejos

La estructura 3D de los ligandos y los complejos se realizó con la versión en línea de Chemdraw (<https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html>). La estructura se optimizó utilizando Avogadro versión 1.2 (<https://avogadro.cc/>) con campo de fuerza universal (UFF) para obtener archivos PDB para el acoplamiento molecular.

A1.8.2. Obtención de los receptores y controles

Las proteínas receptoras a evaluar pertenecen a los siguientes organismos: *Leishmania spp.*, *T. cruzi*, *P. falciparum* y *S. aureus*. Las proteínas utilizadas como receptores para los ligandos fueron leishmanina (1LML), cruzaina (4PI3), tubulina alfa (*P. falciparum*) y PBP2A de *S. aureus* (5M18). Para tubulina alfa de *P. falciparum*, se usó la secuencia de GenBank CAA34101 (453 aa) con el fin de construir el modelo 3D usando Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>), esto fue validado por PROSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) y Molprobit (<http://molprobit.biochem.duke.edu/>).

Para comparar los resultados de afinidad de ligandos y complejos se utilizaron moléculas de control: anfotericina para leishmanina, vinilsulfona para cruzaina, vinblastina para alfa tubulina y finalmente cefepima, ceftobiprol y benzopenicilina para PB2A. Estos controles se obtuvieron por primera vez como formato pubchem SDF (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Luego, con Avogadro, se convirtieron a una estructura 3D y la estructura se optimizó utilizando el campo de fuerza GAFF. Finalmente, se obtuvo el formato PDB para el acoplamiento.

A1.8.3. Validación del docking molecular para HL4 y leishmanina con dinámica molecular
La validación de leishmanina con ligando HL4 se realizó mediante dinámica molecular. El sistema modelo fue hidratado por medio del constructor de soluciones Charmm-Gui. La simulación se realizó con GROMACS versión 2020.2. La minimización se ejecutó durante 0.1 ns utilizando el algoritmo de descenso pronunciado, con un esquema de corte de Verlet y pme de tipo coulombtype. El equilibrado se realizó por 2.5 ns, con un esquema de corte de Verlet y pme de tipo coulombio, utilizando el algoritmo Nose-Hoover a 310.15 K. Finalmente, la dinámica molecular se corrió por 10 ns, también con el algoritmo Nose-Hoover a temperatura 310.15 K, con un esquema de corte Verlet y pme de tipo coulombio. Se realizaron análisis RMSD, enlaces de hidrógeno, energía de afinidad y la distancia entre el ligando HL4 y la leishmanina. La visualización de la superficie de leishmanina con el ligando HL4 se realizó con la versión educativa de pymol (<https://pymol.org/edu/?q=educational/>).

A1.9. Interacción con ADN

A1.9.1. Ensayos de monitoreo por absorción electrónica (UV-Vis)

Los estudios de interacción de los compuestos obtenidos con ADN de timo de ternera altamente polimerizado y liofilizado (ADN-TT de Sigma Aldrich) se llevaron a cabo con experimentos de absorción electrónica. Para verificar la pureza del ácido nucleico se determinó la relación A_{260}/A_{280} . Las resuspensiones de ADN se llevaron a cabo utilizando agua desionizada (pH ajustado a aproximadamente 7.5). Se preparó una solución de ADN-TT de 11.000 μM en nucleótidos usando $\epsilon_{260} = 6600 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ como coeficiente de extinción molar y midiendo la absorbancia a 260 nm. Para la obtención de los espectros

electrónicos se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Evolution 220 (Thermo Fisher Scientific) equipado con un sistema Peltier de celda única para el control de la temperatura. Los estudios de interacción se realizaron con titulaciones de ADN-TT a una concentración constante de los compuestos (60 μM) a 25 °C, y titulaciones de compuestos a una concentración constante de ADN-TT (48 μM) a 25 °C. Después de la adición de cada valorante, se midieron los espectros de absorción electrónica en el rango de 500-230 nm. La absorbancia del ADN se eliminó agregando una cantidad igual de ADN a la muestra y a la solución estándar.

A1.9.2. Construcción de modelos 3D de compuestos en estudios de ADN

La estructura 2D de los compuestos se diseñó en la versión en línea de Chemdraw (<https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html>). Se utilizó el software Avogadro versión 1.2 (<https://avogadro.cc/>) para convertir a los compuestos a un modelo 3D y se optimizaron con el algoritmo de descenso más pronunciado utilizando el campo de fuerza universal (UFF). Las estructuras 3D de los controles positivos (interacción con receptores validados experimentalmente) se descargaron en formato PDB del Drugbank. (<https://go.drugbank.com/>). El agente intercalante de ADN mitoxantrona se utilizó para la interacción con el ADN (1BNA). Las estructuras de los compuestos y los controles se prepararon con el software Autodock utilizando cargas de Gasteiger.

A1.9.3. Construcción de receptores de ADN para docking molecular

Se utilizó el software pymol (<https://pymol.org/2/>) para eliminar moléculas de agua y otros ligandos dentro del receptor de ADN (PDB:1BNA). La preparación de proteínas se realizó utilizando el software Autodock con la adición de cargas de kollman y la optimización del enlace de hidrógeno. Las coordenadas de la cuadrícula se obtuvieron de cada molécula presente en los PDB de los receptores, y la cuadrícula se confirmó con la herramienta en línea CB-Dock (<http://cao.labshare.cn/cb-dock/>) utilizando los compuestos y las proteínas preparados.

A1.9.4. Análisis de docking molecular para ADN

Se utilizó el software Discovery Studio Visualizer (<http://accelrys.com>) para analizar las interacciones ligando-receptor y encontrar los aminoácidos (o bases nitrogenadas) que interactúan con las moléculas. Se utilizó pymol para extraer las moléculas PDB y Discovery Studio para el análisis de interacciones.

ANEXO 2

Espectros y Termogramas

1. Espectros infrarrojo

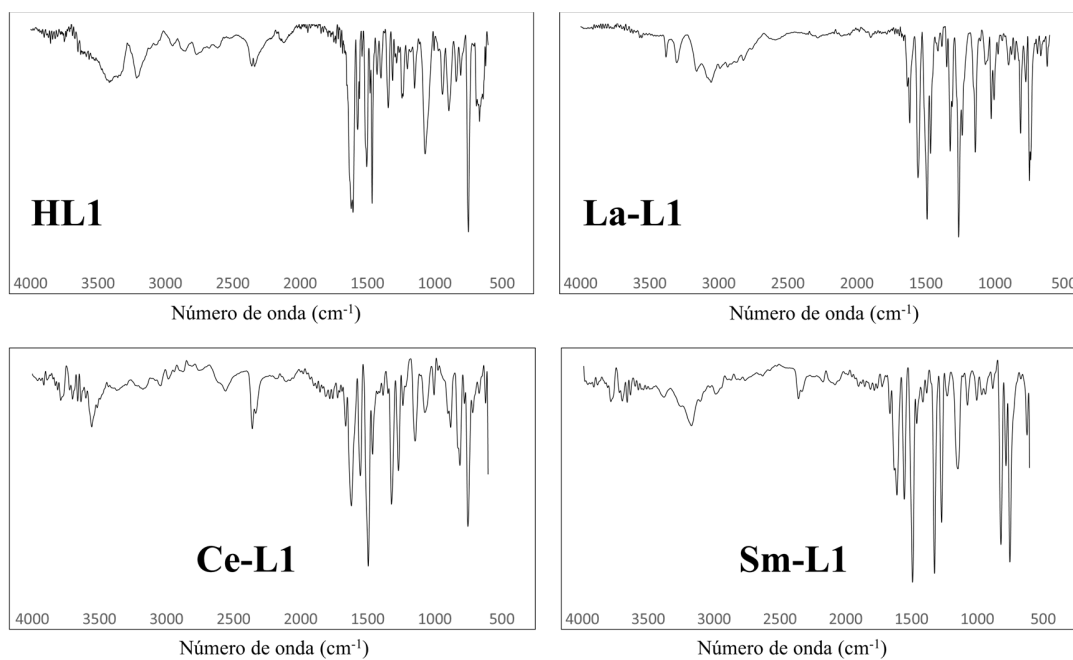


Figura A1. Espectro FT-IR de *HL1*, *La-L1*, *Ce-L1* y *Sm-L1*.

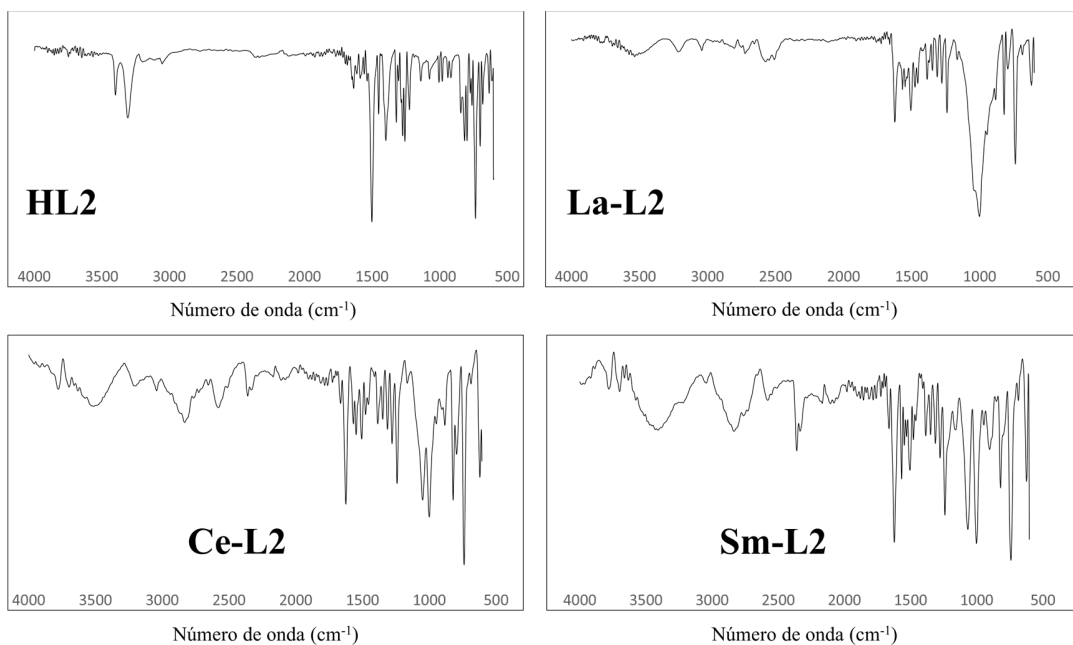


Figura A2. Espectro FT-IR de *HL2*, *La-L2*, *Ce-L2* y *Sm-L2*.

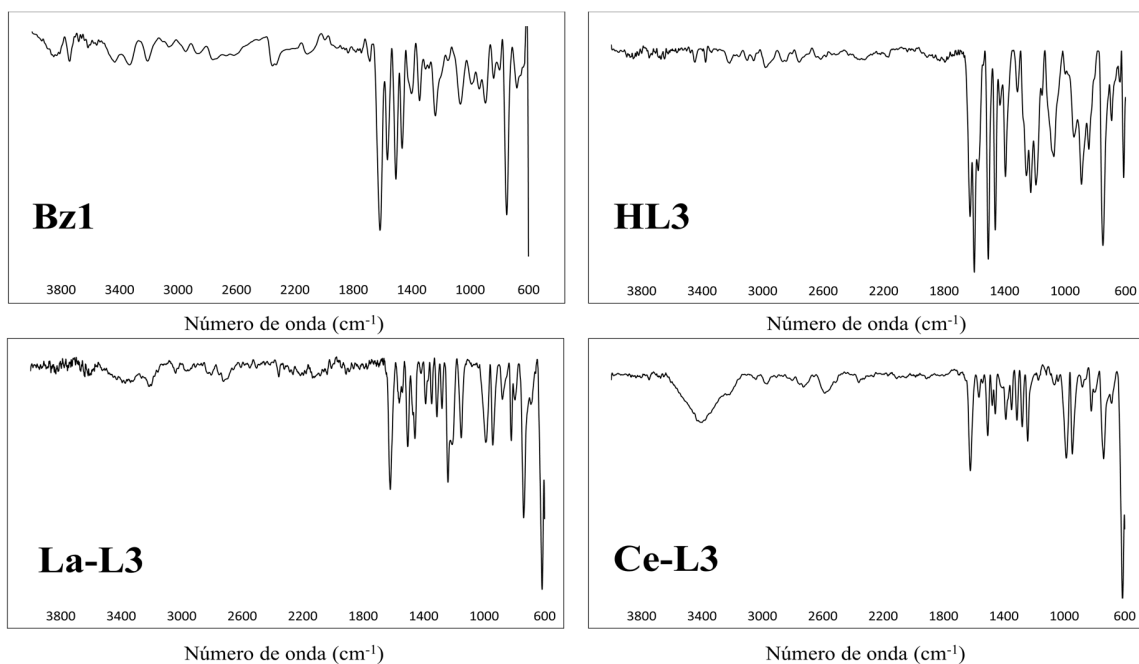


Figura A3. Espectro FT-IR de *Bz1*, *HL3*, *La-L3* y *Ce-L3*.

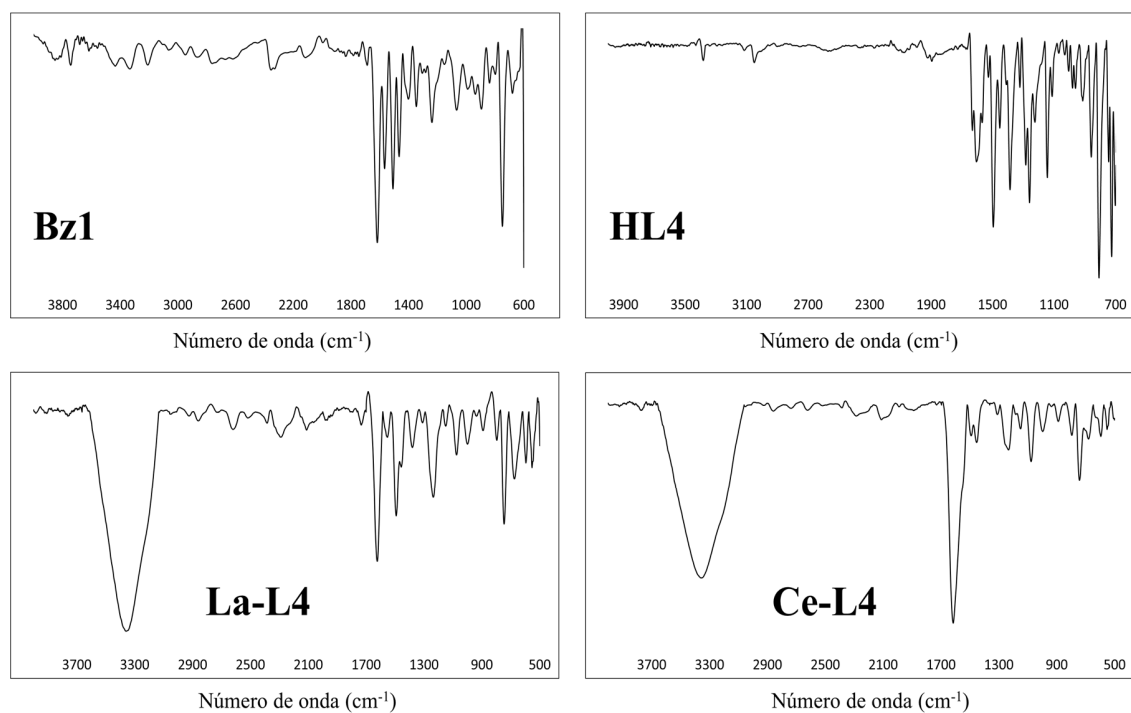


Figura A4. Espectro FT-IR de *Bz1*, *HL4*, *La-L4* y *Ce-L4*.

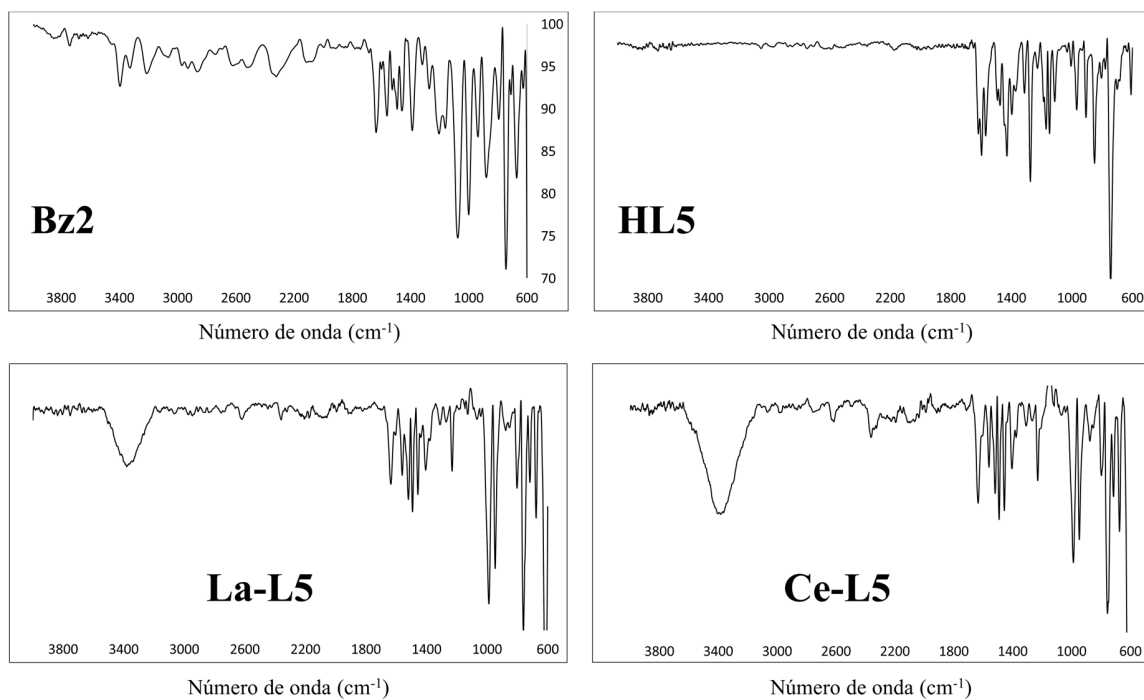


Figura A5. Espectro FT-IR de *Bz2*, *HL5*, *La-L5* y *Ce-L5*.

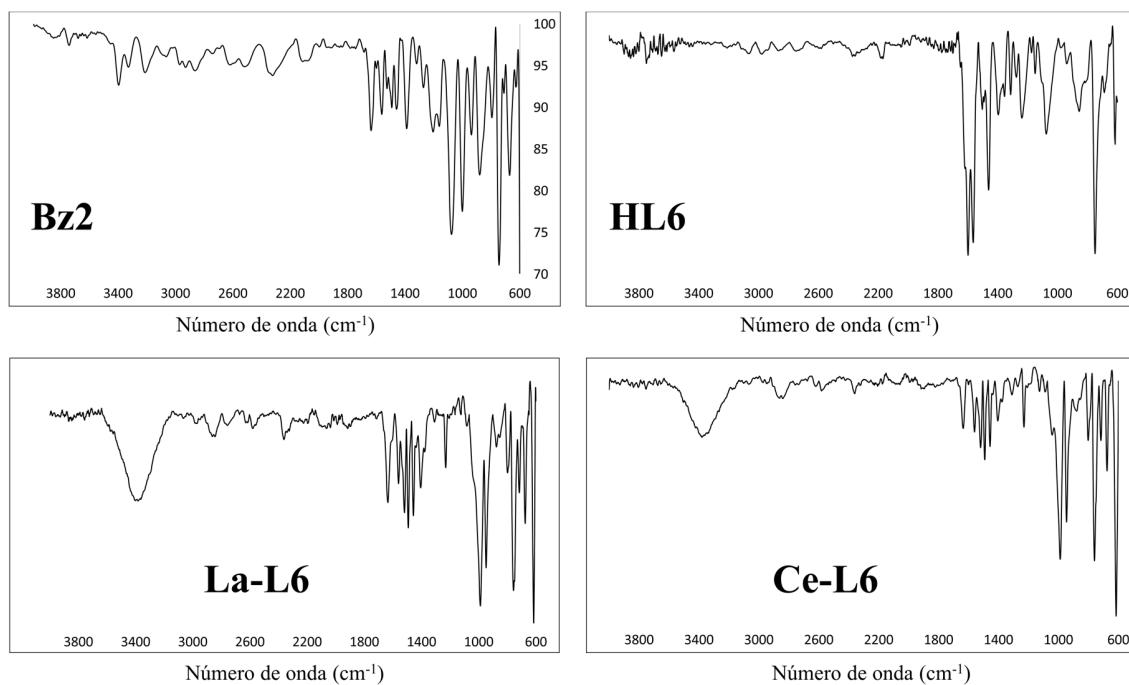


Figura A6. Espectro FT-IR de *Bz2*, *HL6*, *La-L6* y *Ce-L6*.

2. Espectros RMN

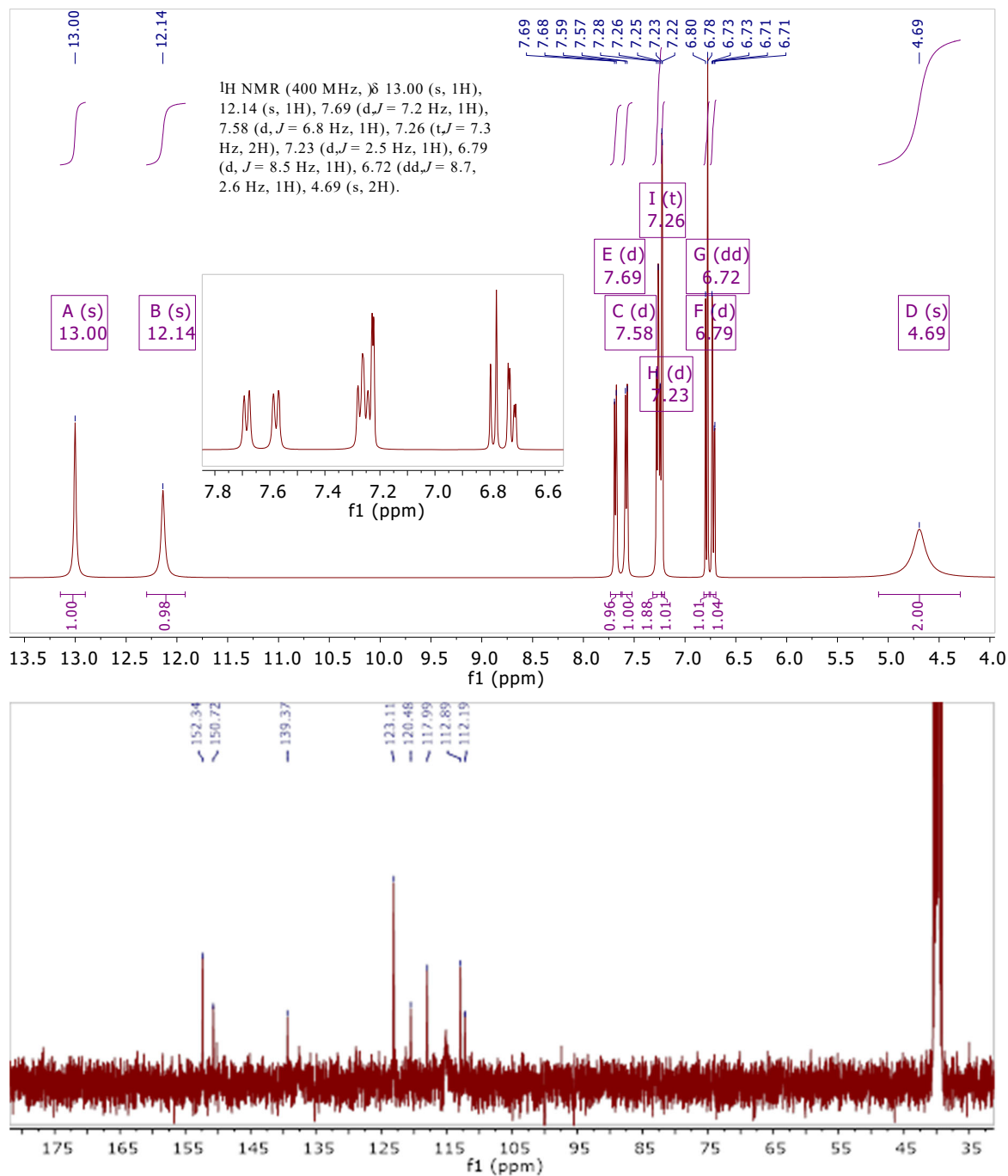


Figura A7. Espectros RMN- ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de *HL1*.

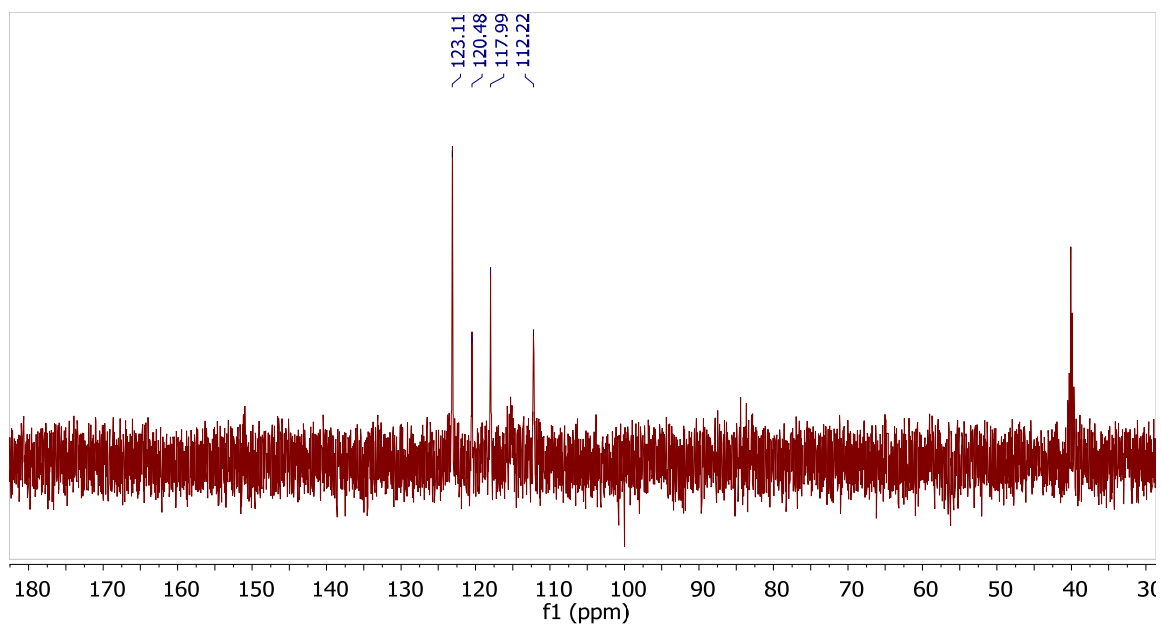


Figura A8. Espectro RMN-dept-135 de *HL1*.

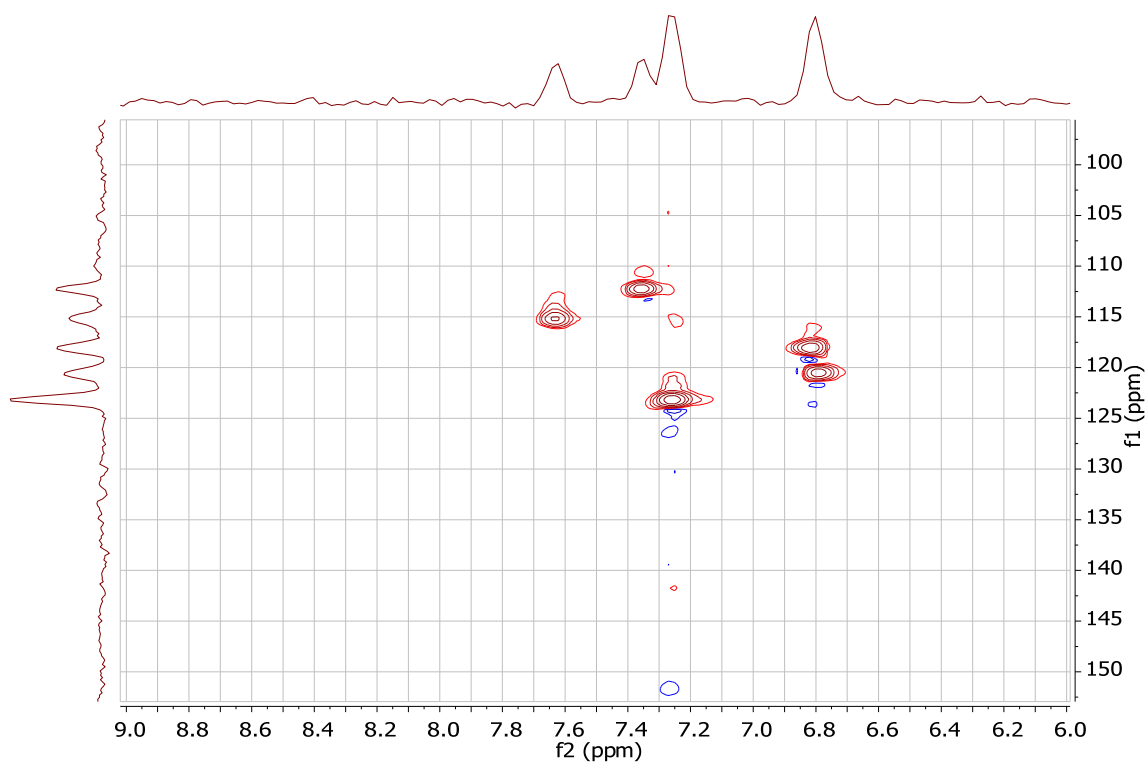


Figura A9. Espectro RMN-HSQC de *HL1*.

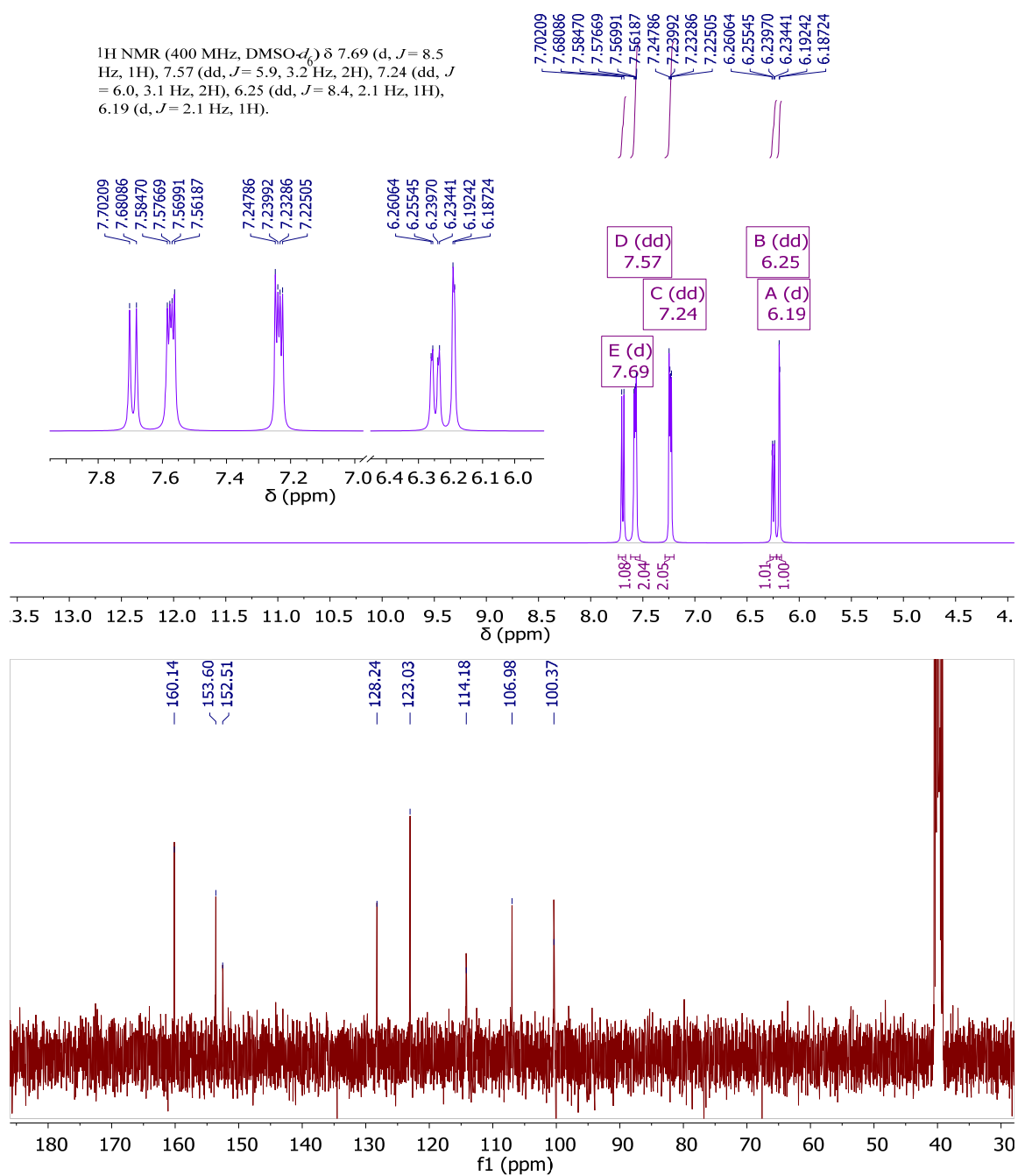


Figura A10. Espectro RMN- ^1H y ^{13}C { ^1H } de $HL2$.

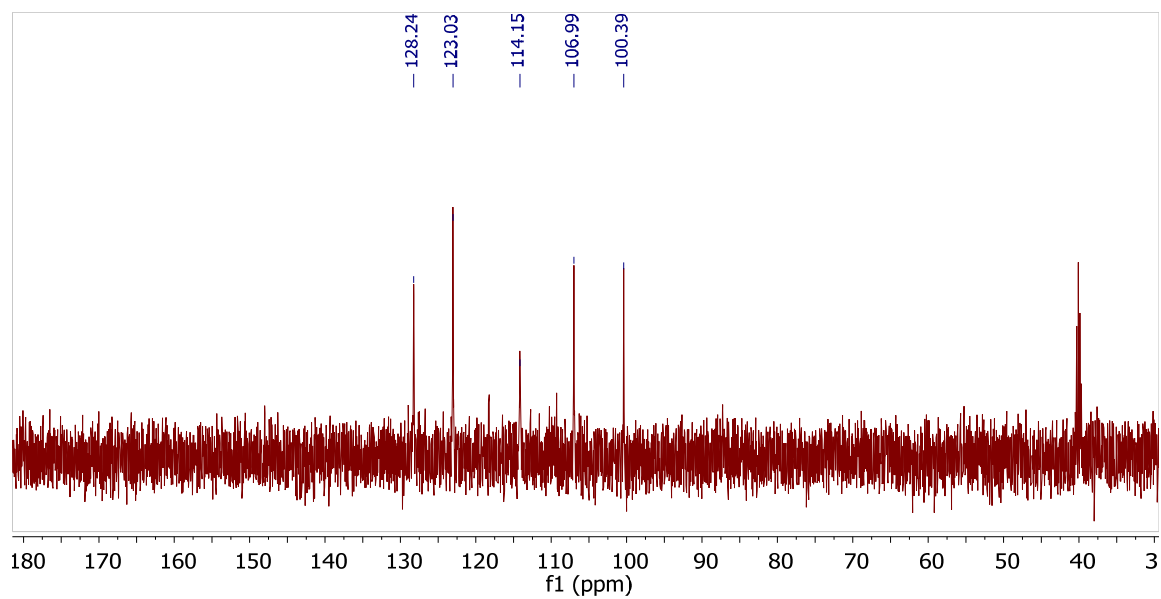


Figura A11. Espectro RMN-dept-135 de *HL2*.

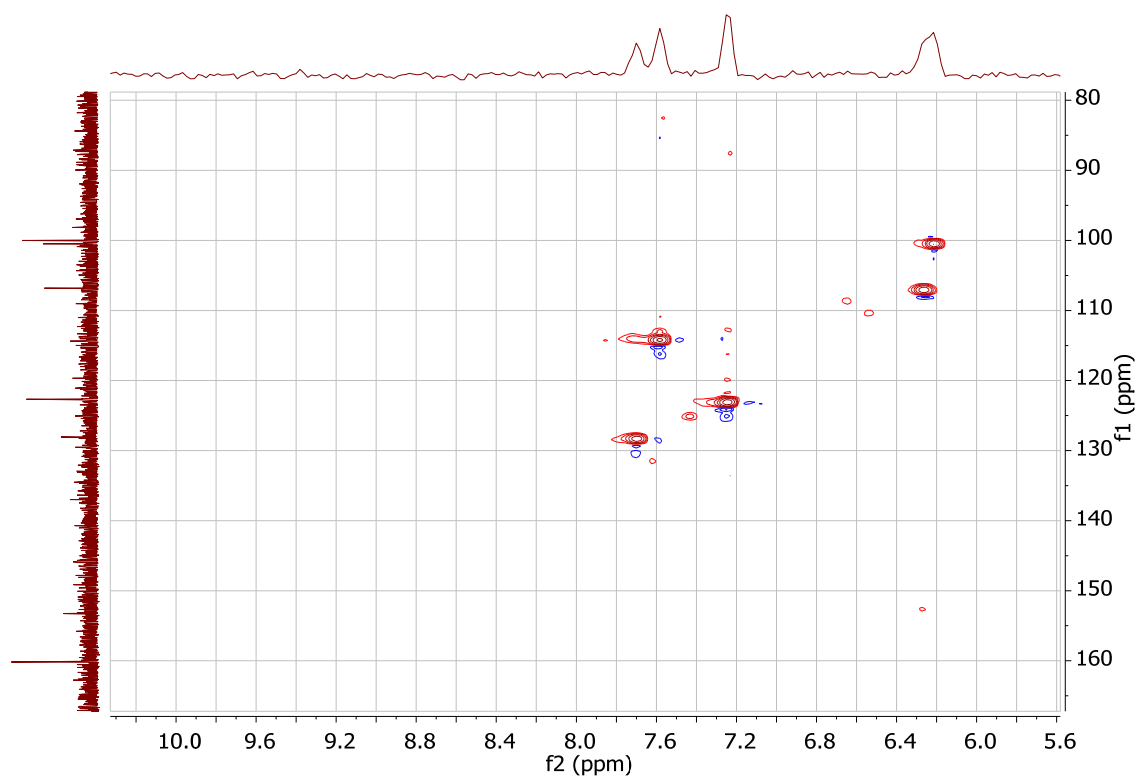


Figura A12. Espectro RMN-HSQC de *HL2*.

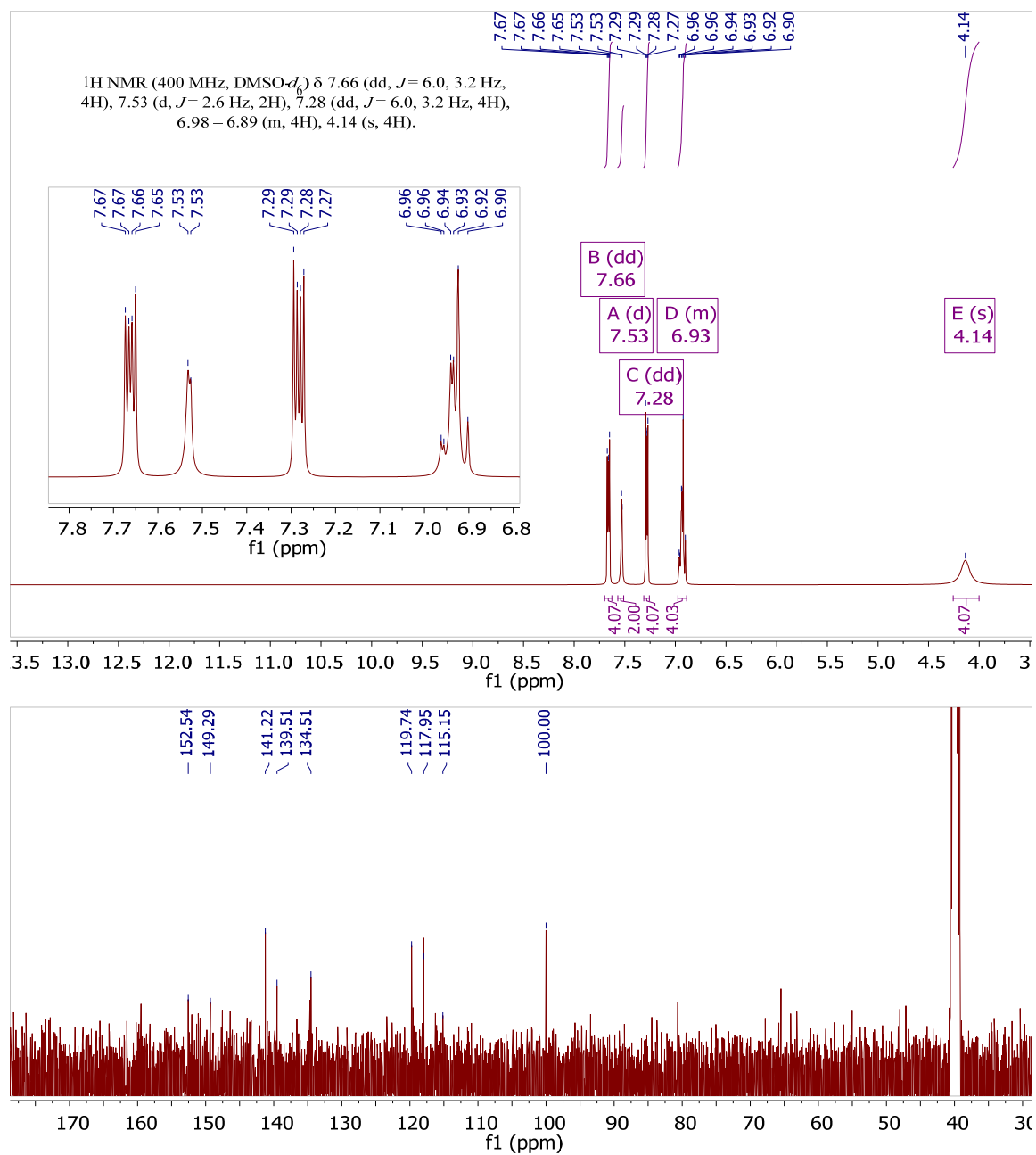


Figura A13. Espectro RMN- ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de *La-L1*.

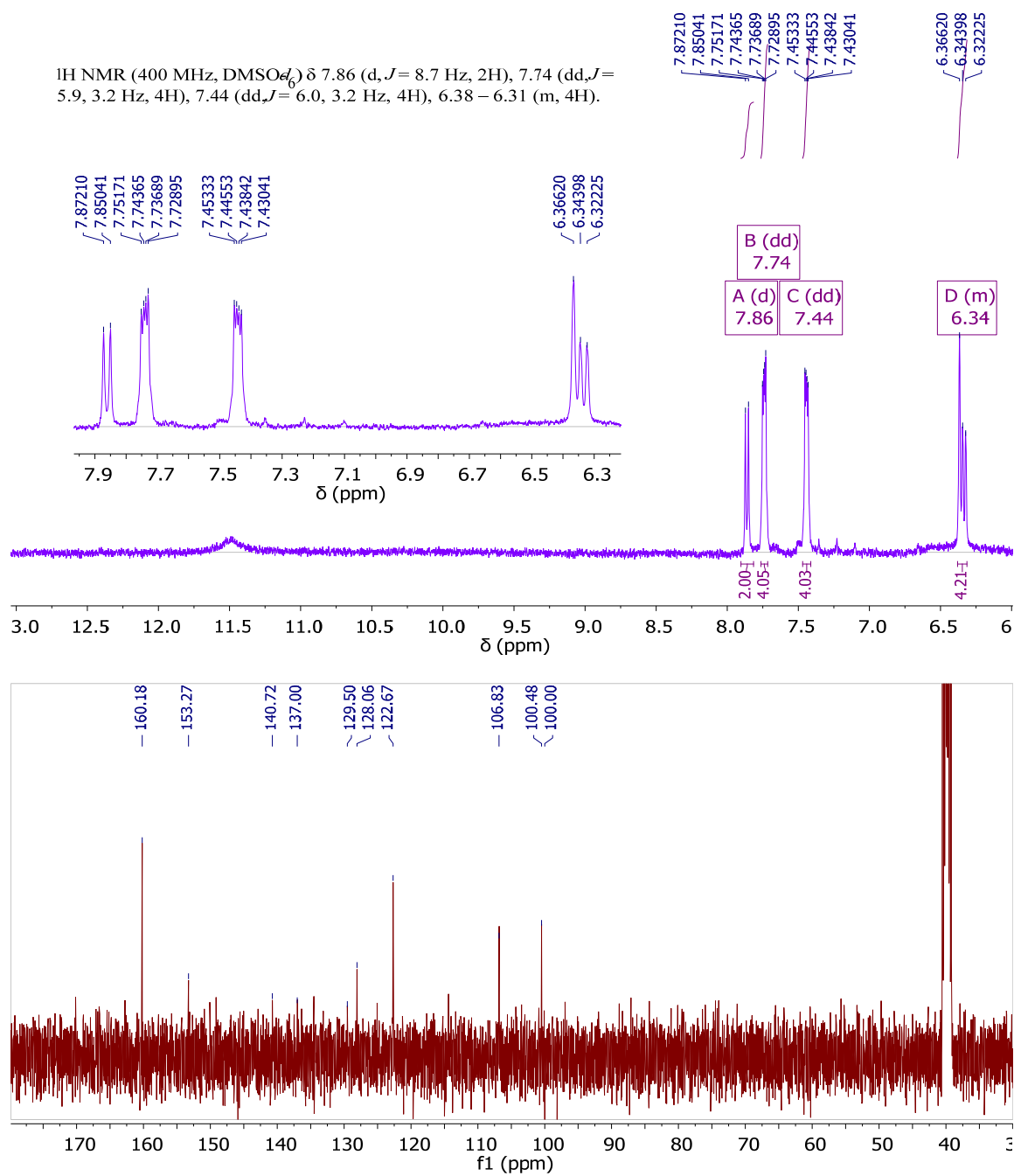


Figura A14. Espectro RMN- ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de *La-L2*.

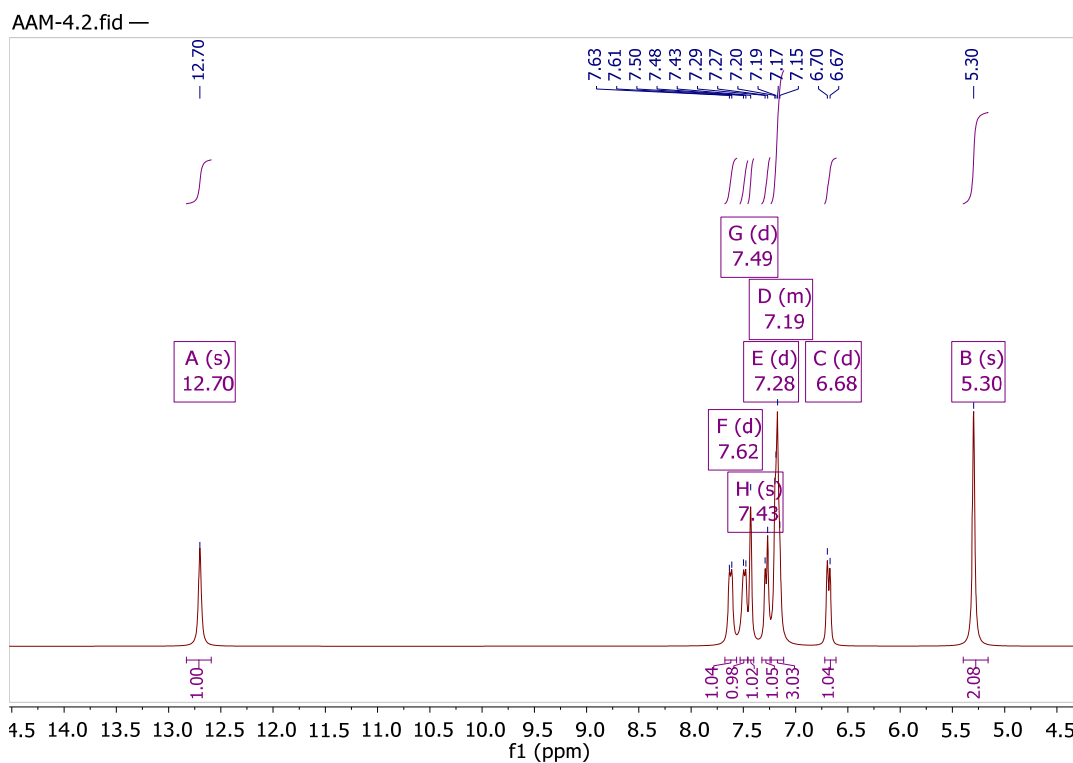


Figura A15. Espectro RMN- ^1H de *BzI*.

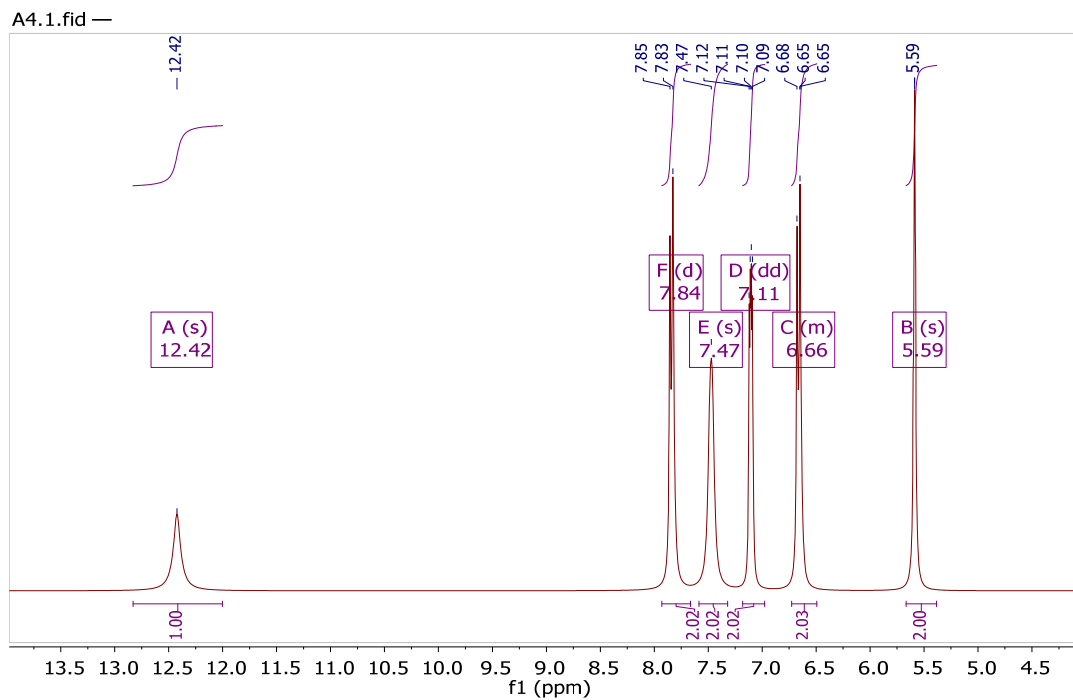


Figura A16. Espectro RMN- ^1H de *Bz2*.

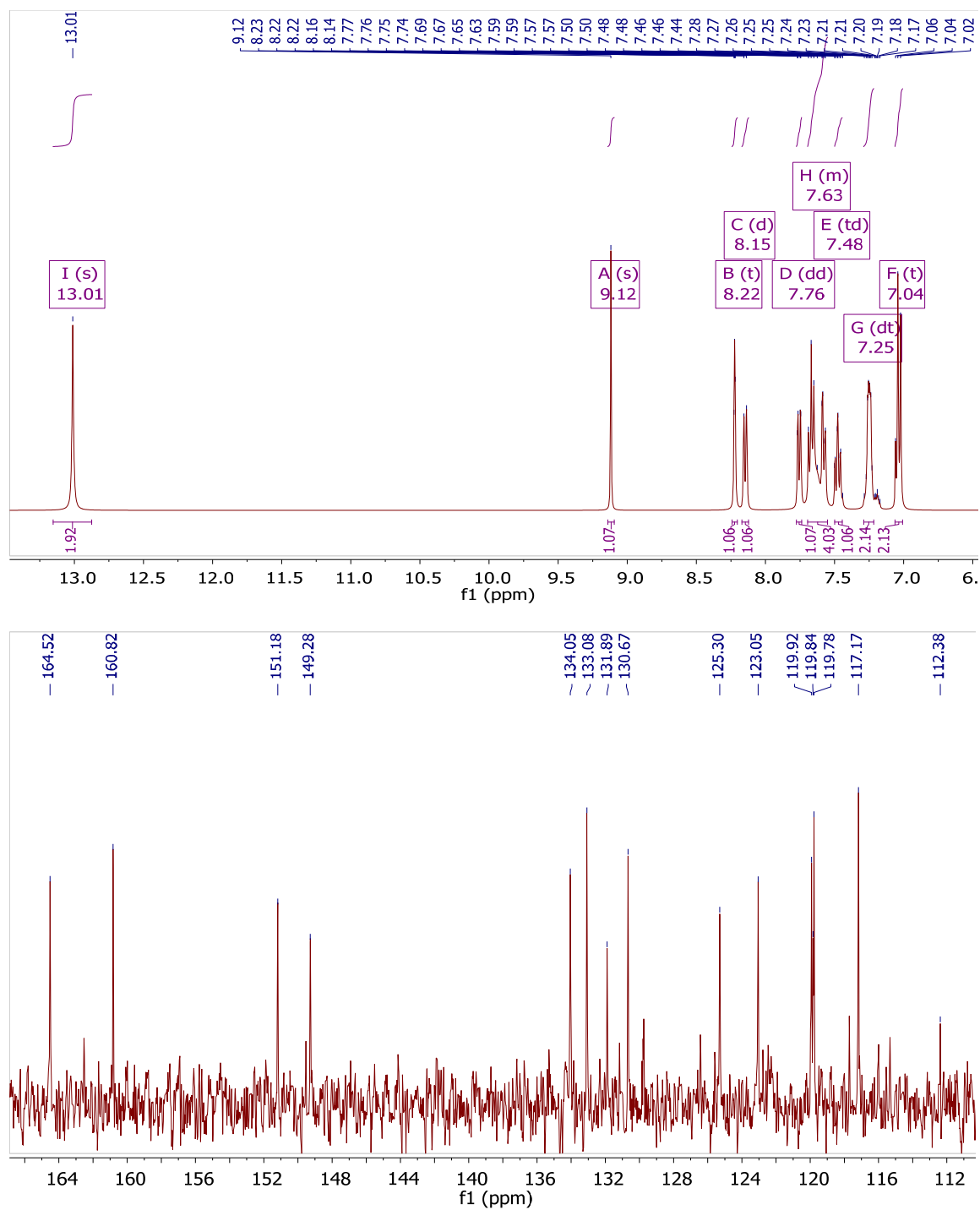


Figura A17. Espectro RMN- ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de HL3.

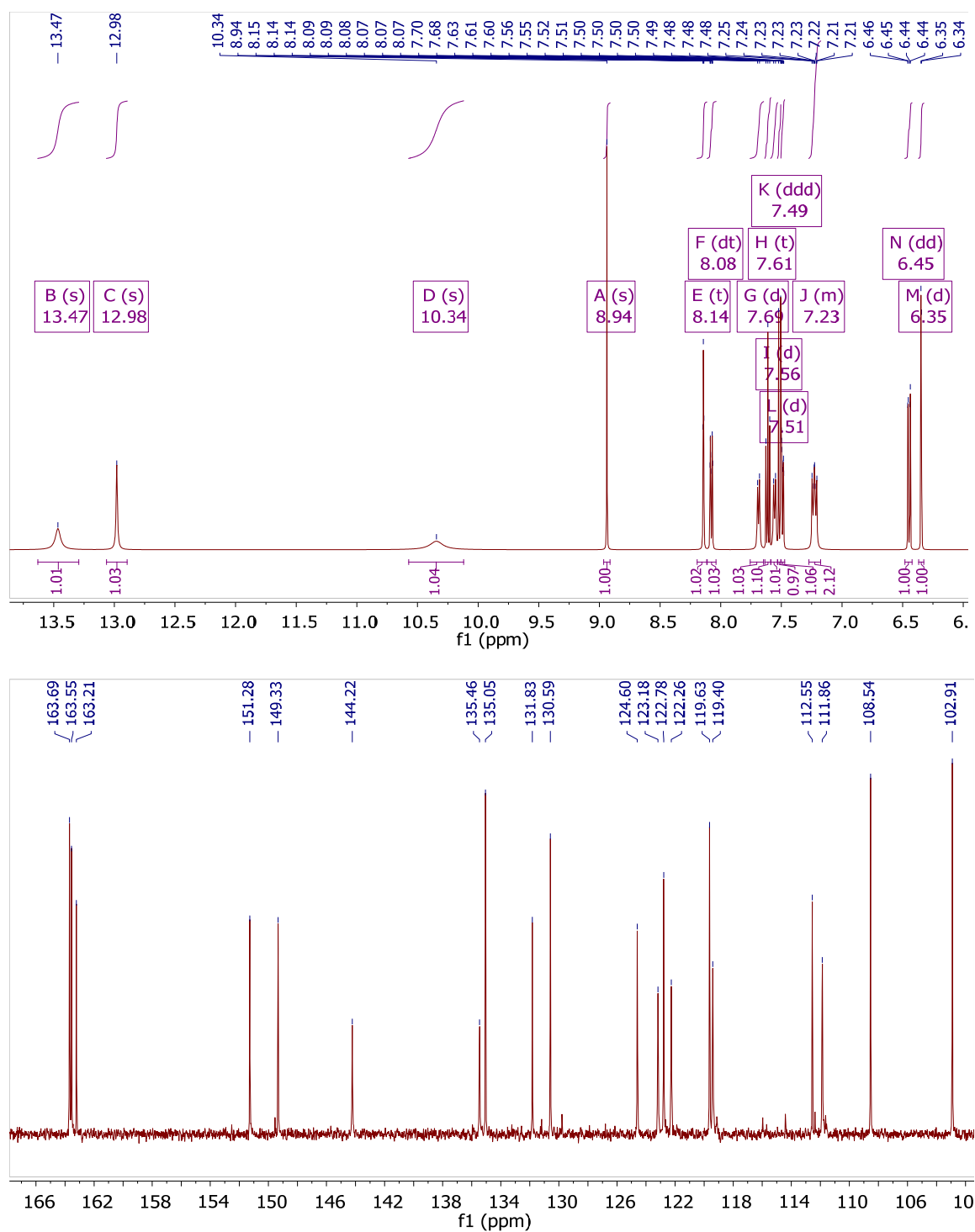


Figura A18. Espectro RMN- ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de *HLA*.

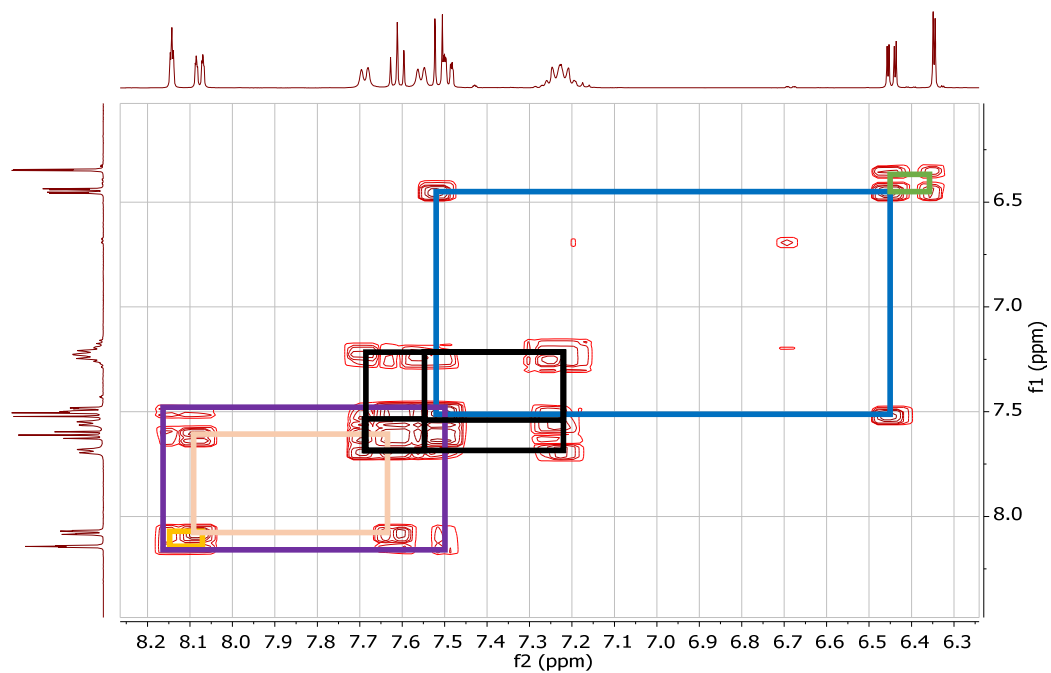


Figura A19. Espectro RMN-COSY de *HL4*

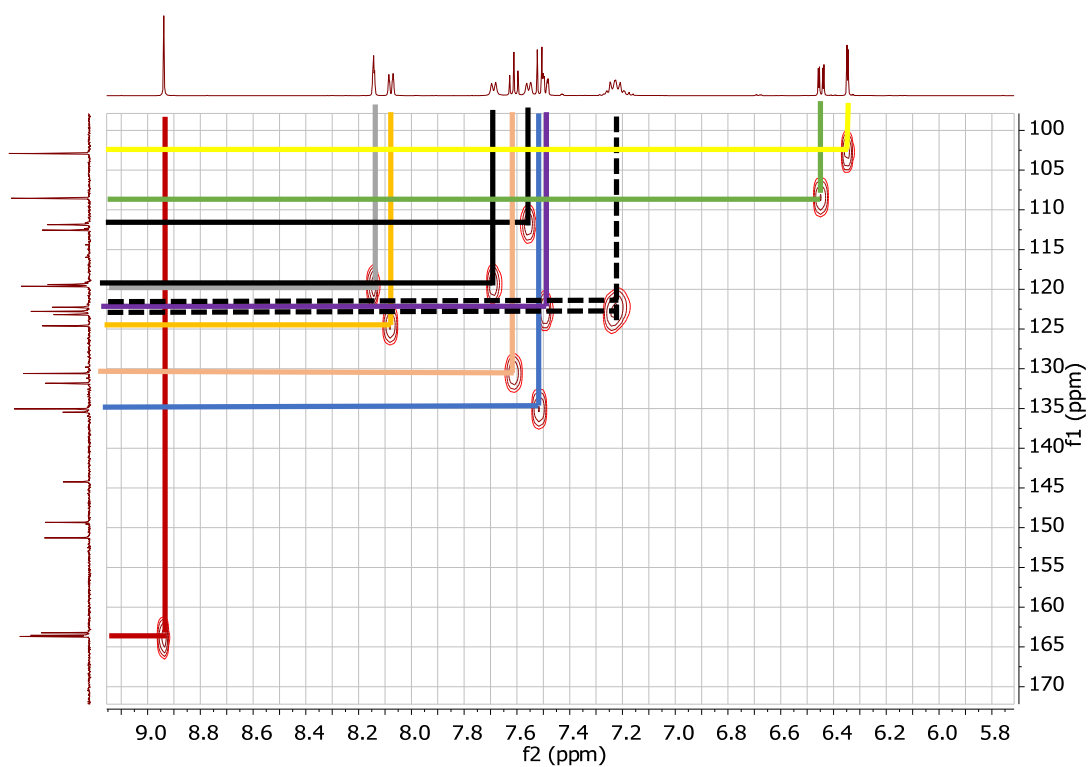


Figura A20. Espectro RMN-HSQC de *HL4*

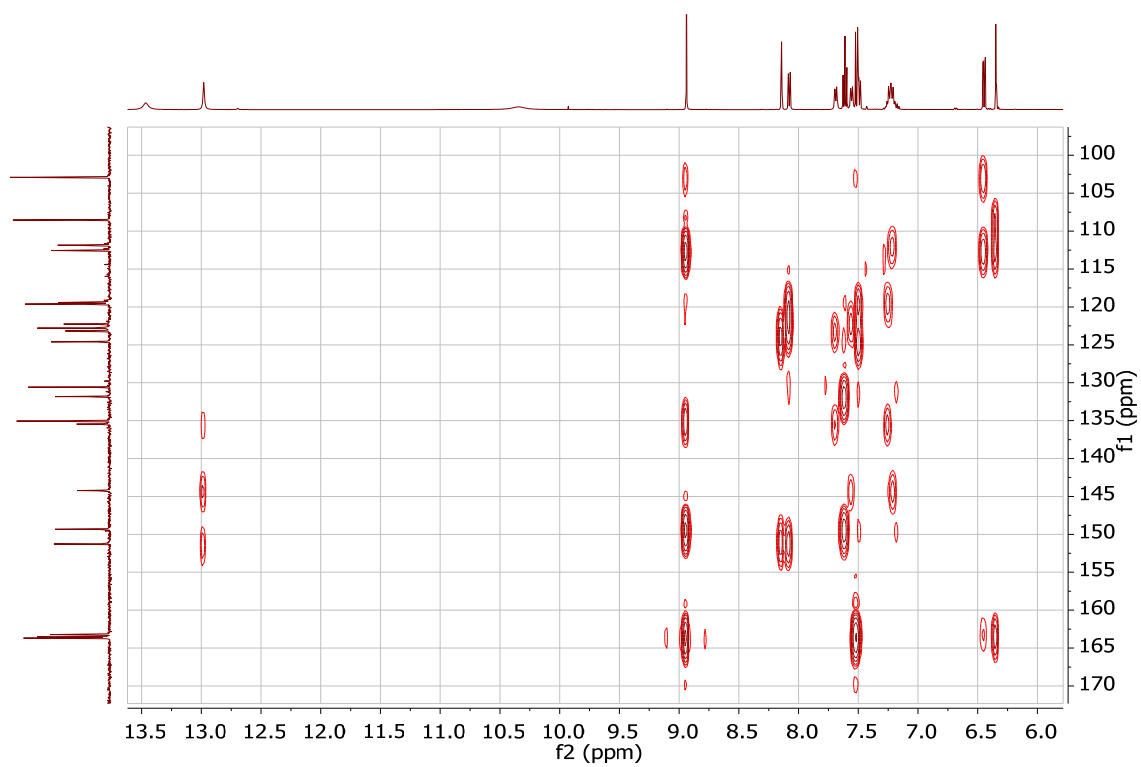


Figura A21. Espectro RMN-HMBC de *HL4*.

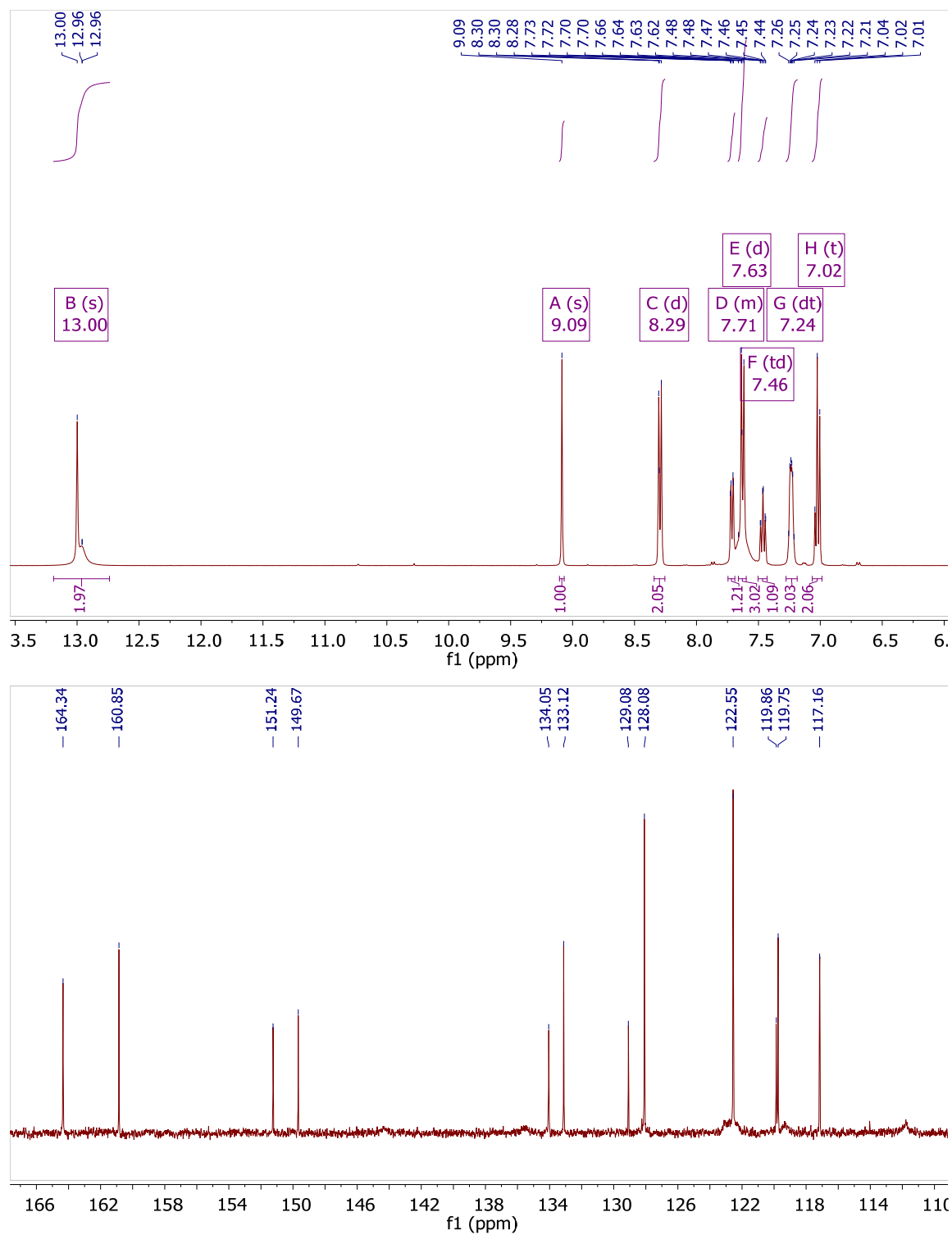


Figura A22. Espectro RMN-¹H y ¹³C{¹H} de *HL5*.

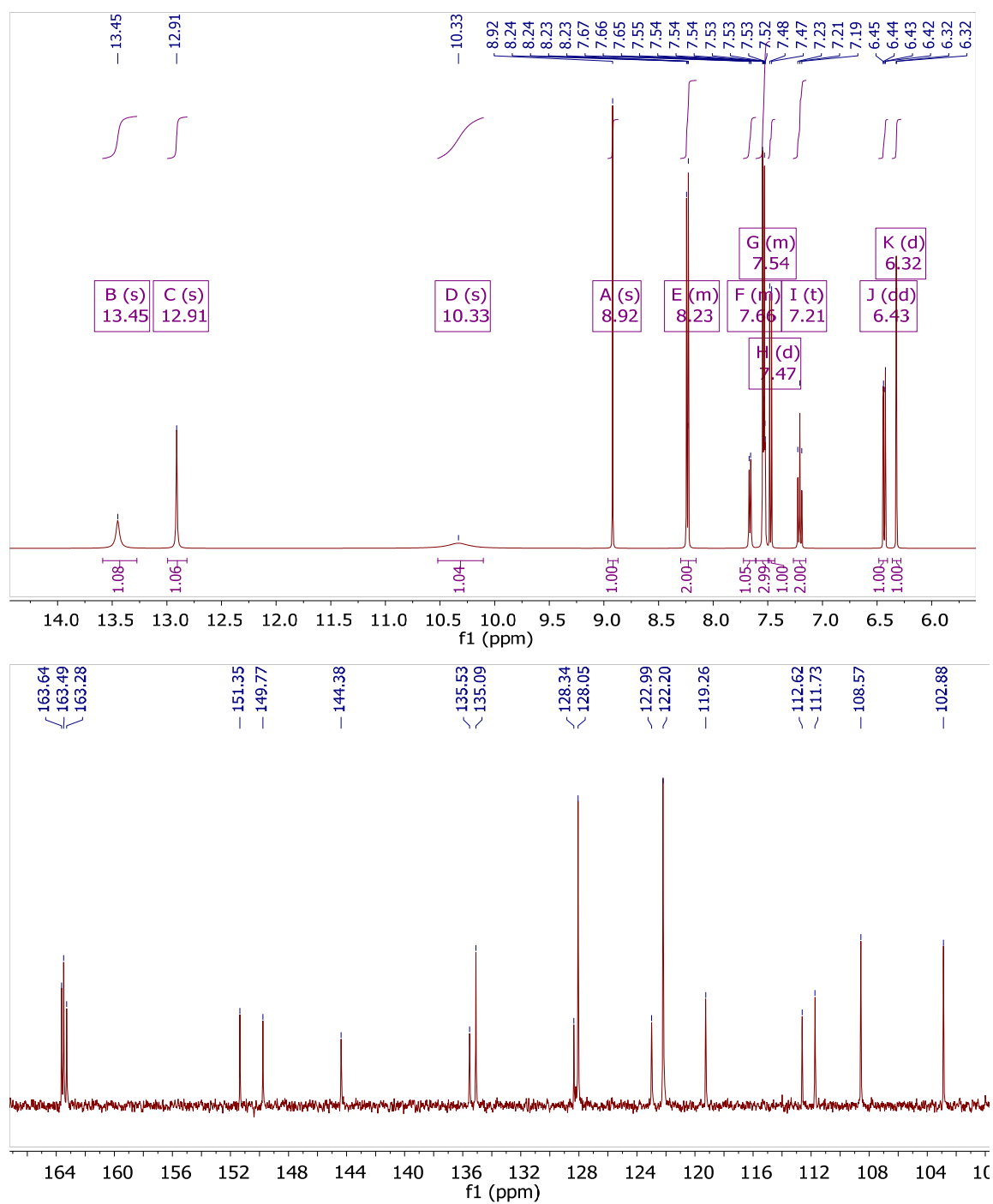


Figura A23. Espectro RMN-¹H y ¹³C{¹H} de *HL6*.

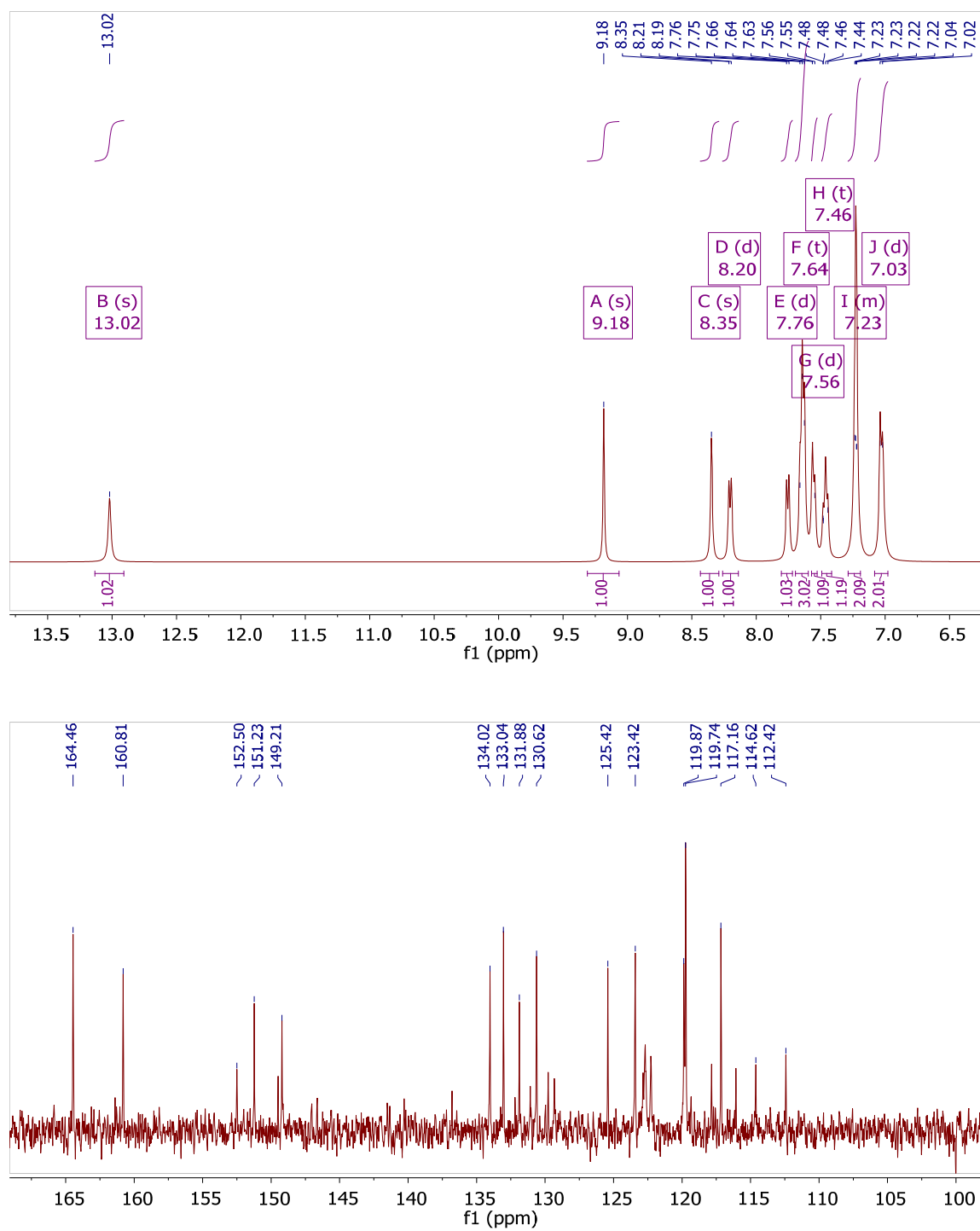


Figura A24. Espectro RMN- ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de *La-L3*.

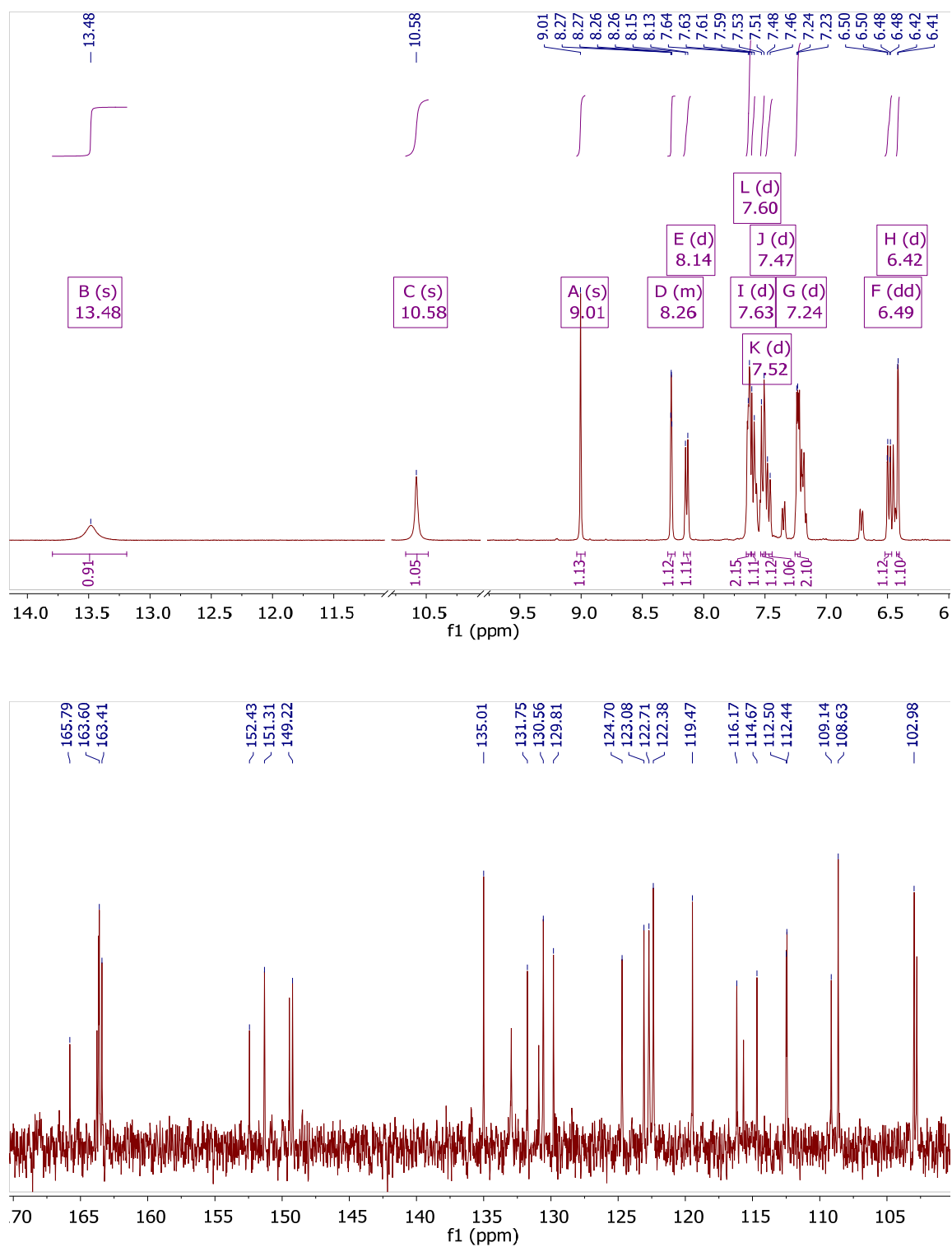


Figura A25. Espectro RMN- ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de *La-L4*.

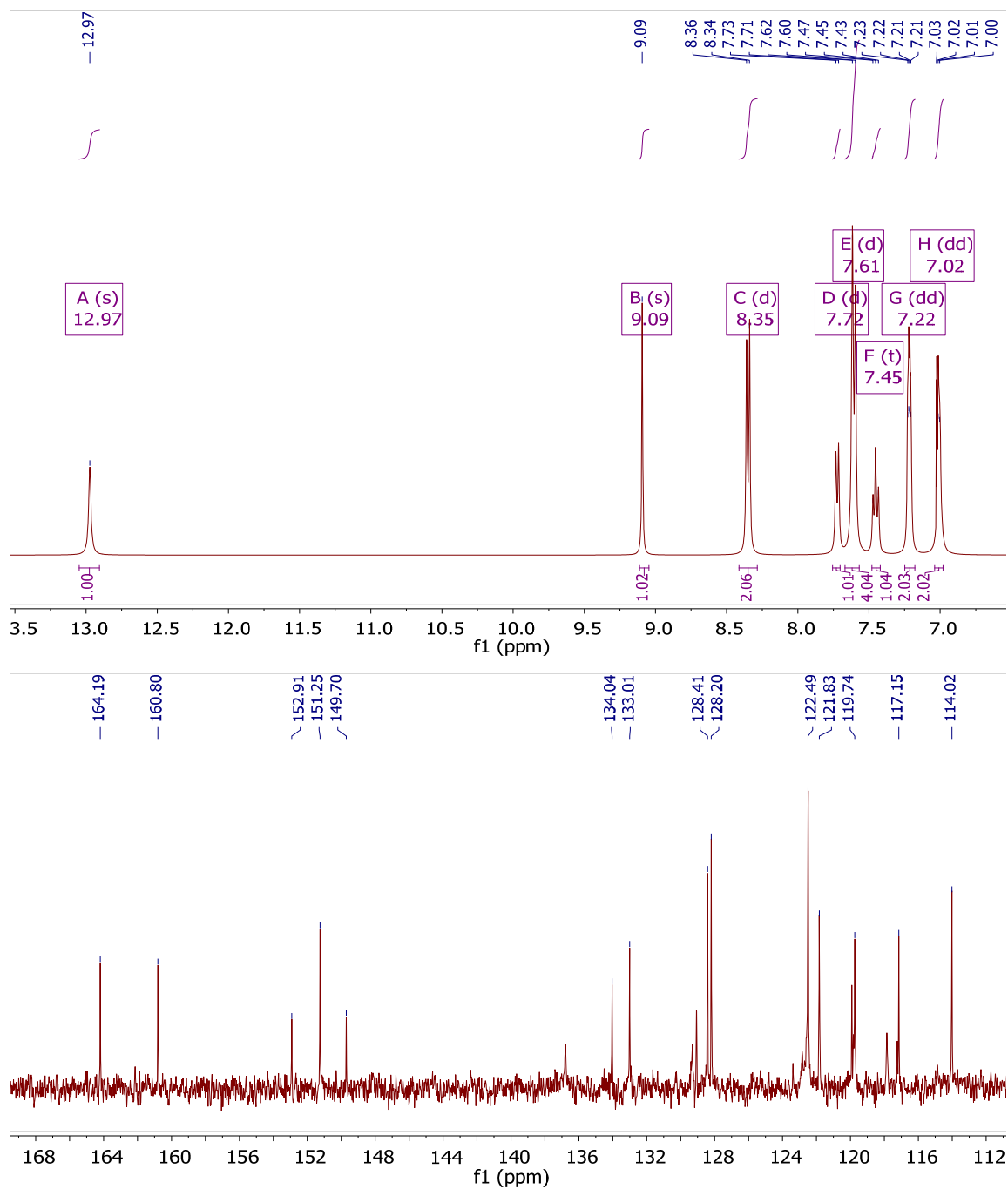


Figura A26. Espectro RMN- ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de *La-L5*.

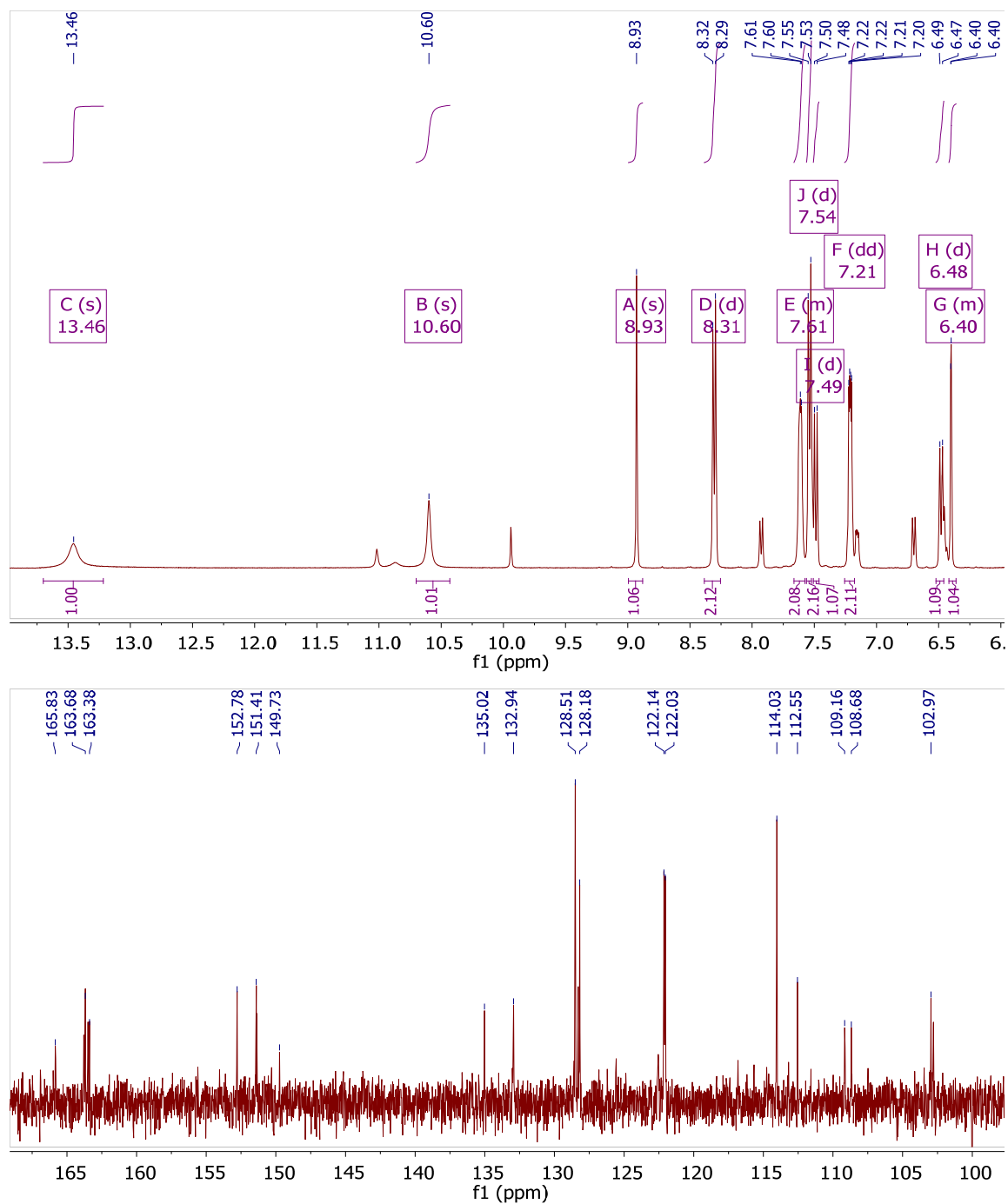


Figura A27. Espectro RMN- ^1H y $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de *La-L6*.

3. Espectros de masas

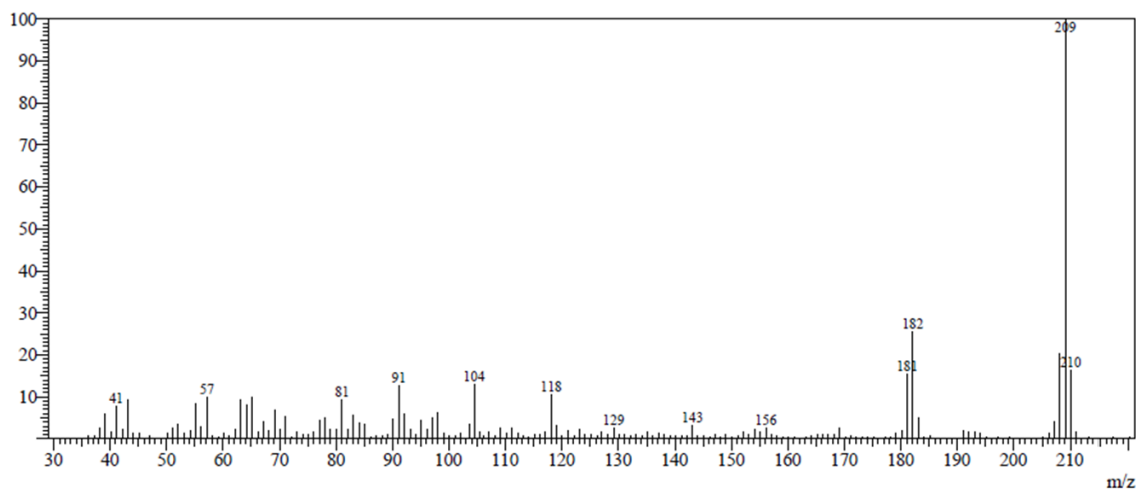


Figura A28. Espectro de masas (IE) de BzI.

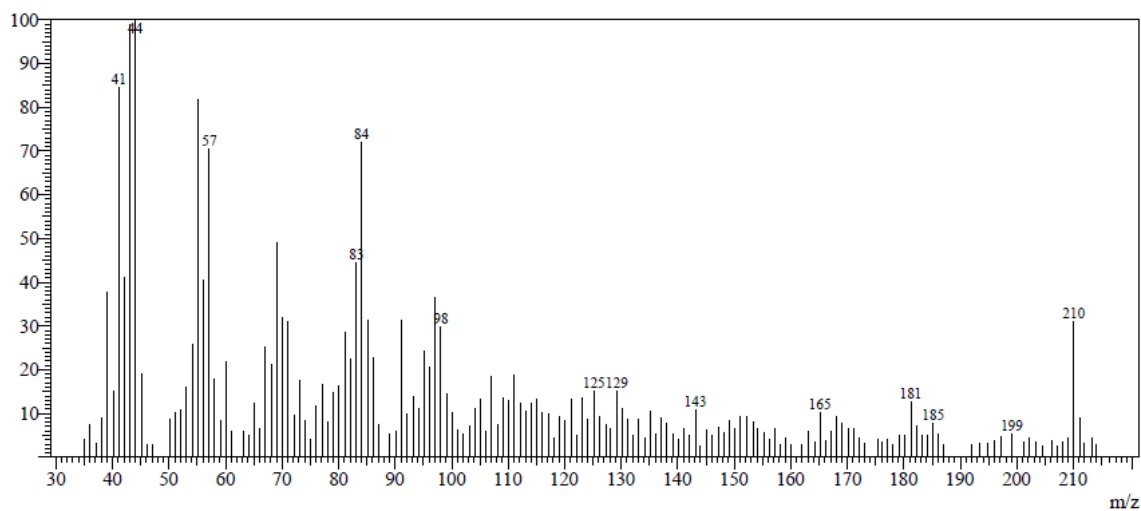


Figura A29. Espectro de masas (IE) de Bz2.

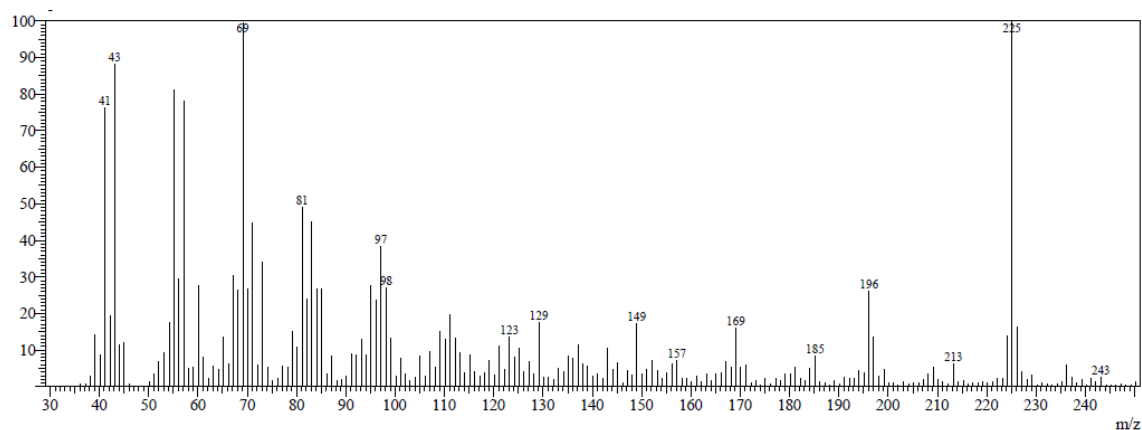


Figure A30. Espectro de masas (IE) de *HL1*.

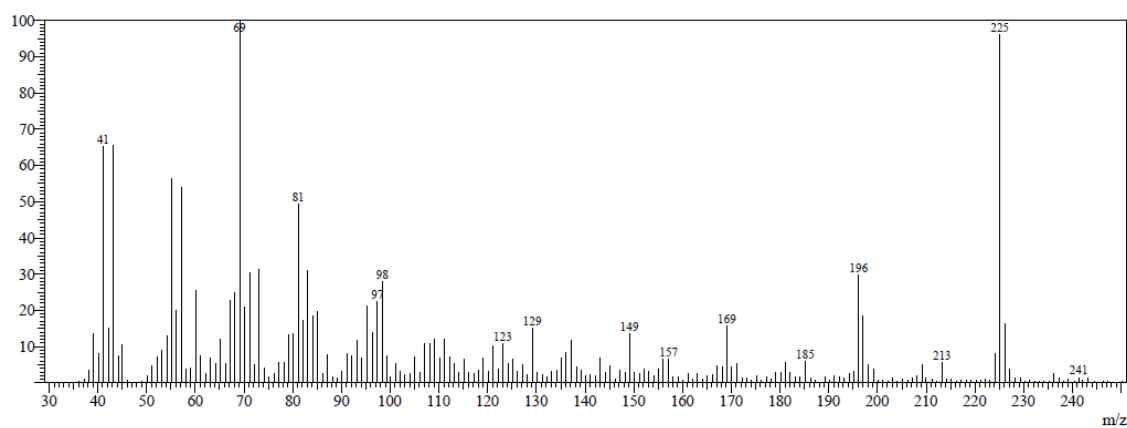


Figure A31. Espectro de masas (IE) de *HL2*.

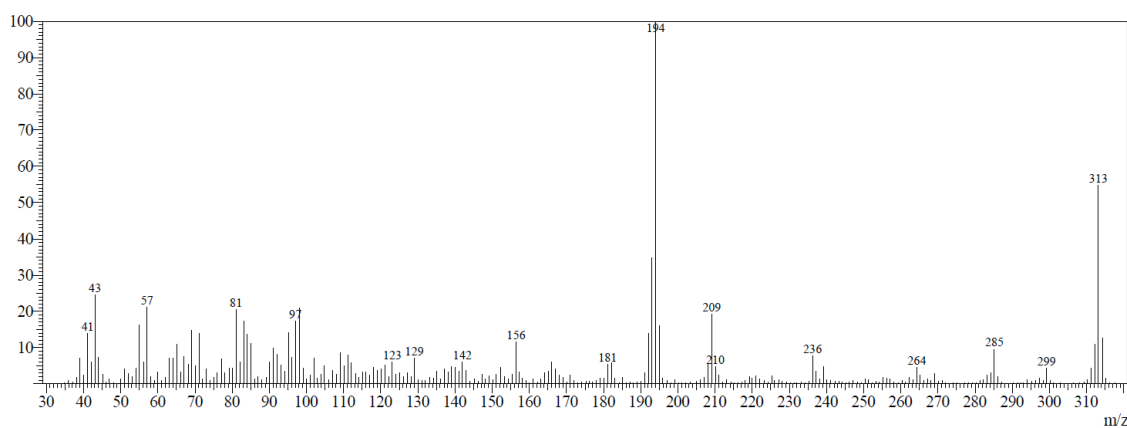


Figure A32. Espectro de masas (IE) de *HL3*.

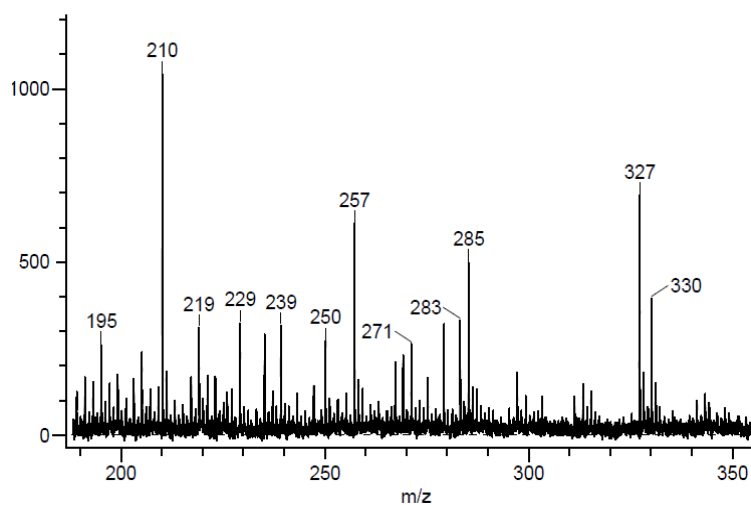


Figura A33. Espectro de masas (DART+) de *HL4* [M+1].

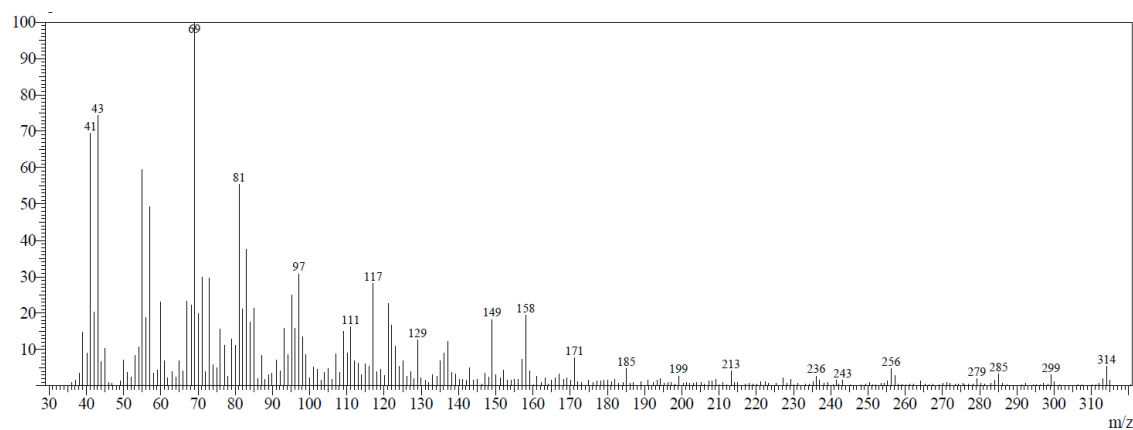


Figura A34. Espectro de masas (IE) de *HL5*.

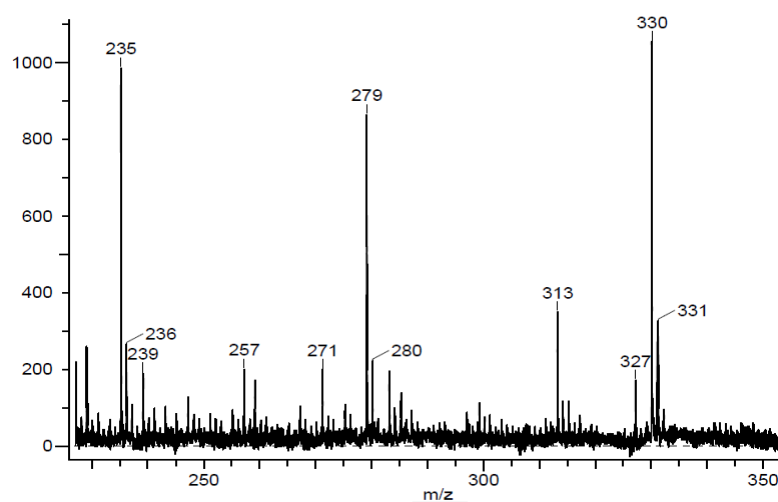


Figura A35. Espectro de masas (DART+) de *HL6* [M+1].

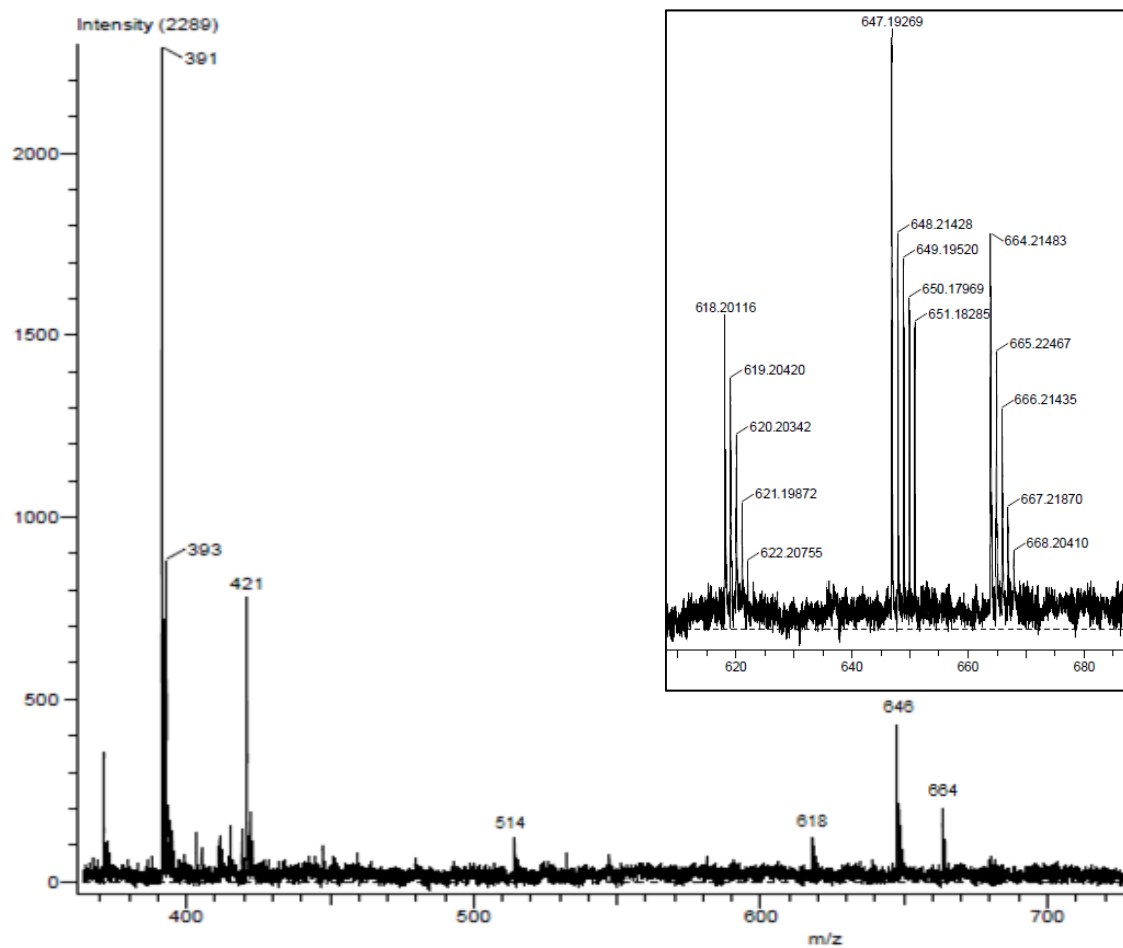


Figura A36. Espectro de masas (DART+) de *La-LI* [M+1].

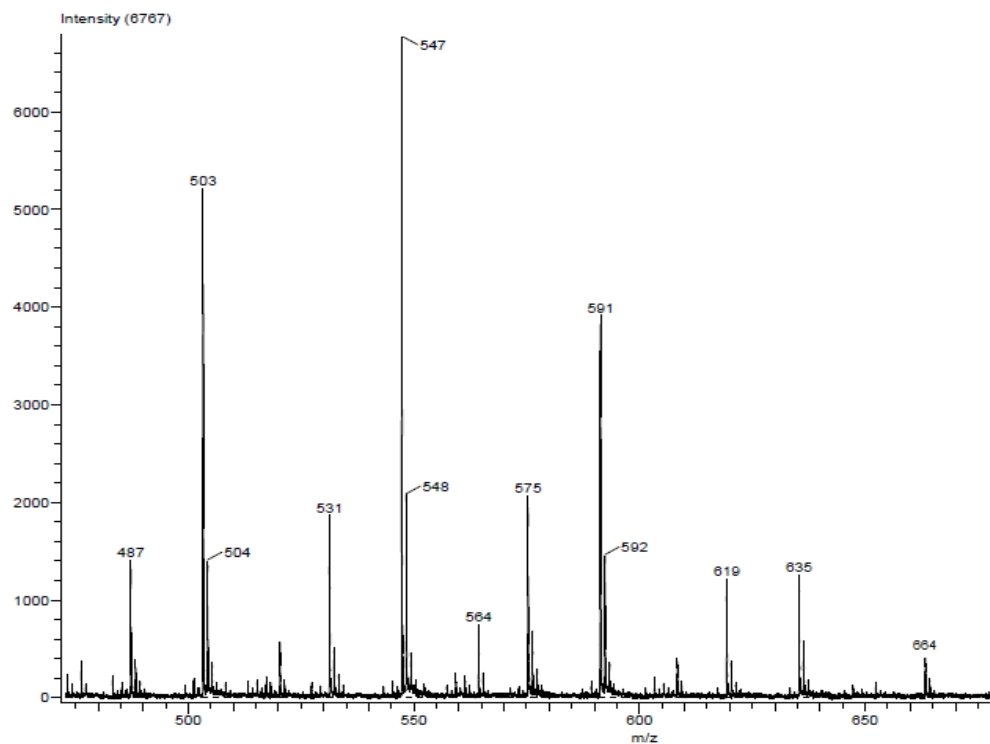


Figura A37. Espectro de masas (DART+) de *Ce-LI* [M+1].

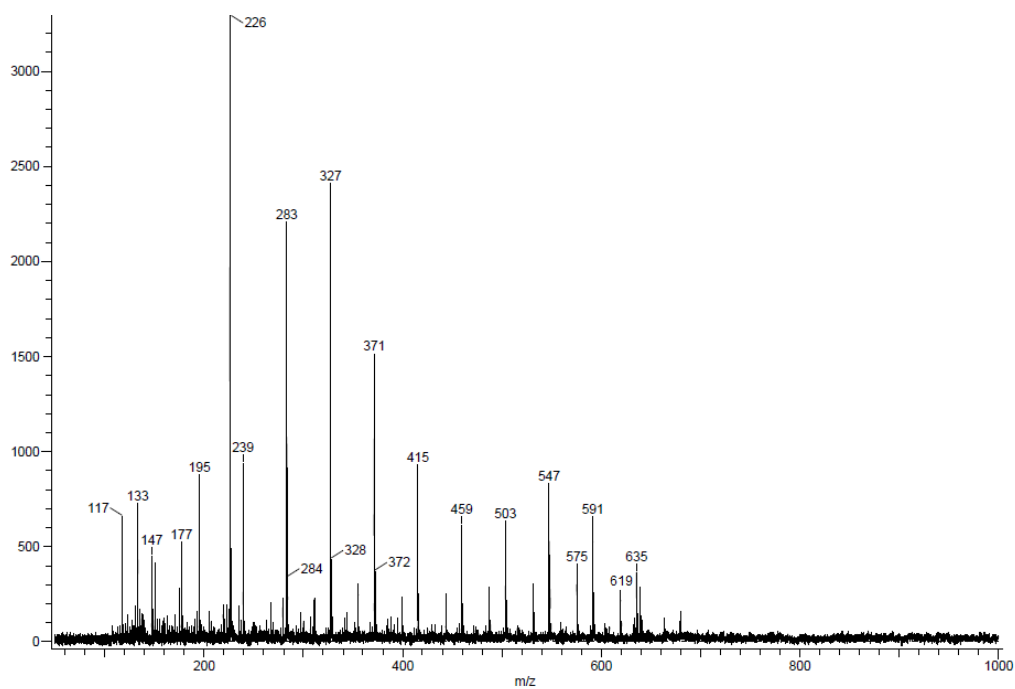


Figura A38. Espectro de masas (DART+) de *Sm-LI* [M+1].

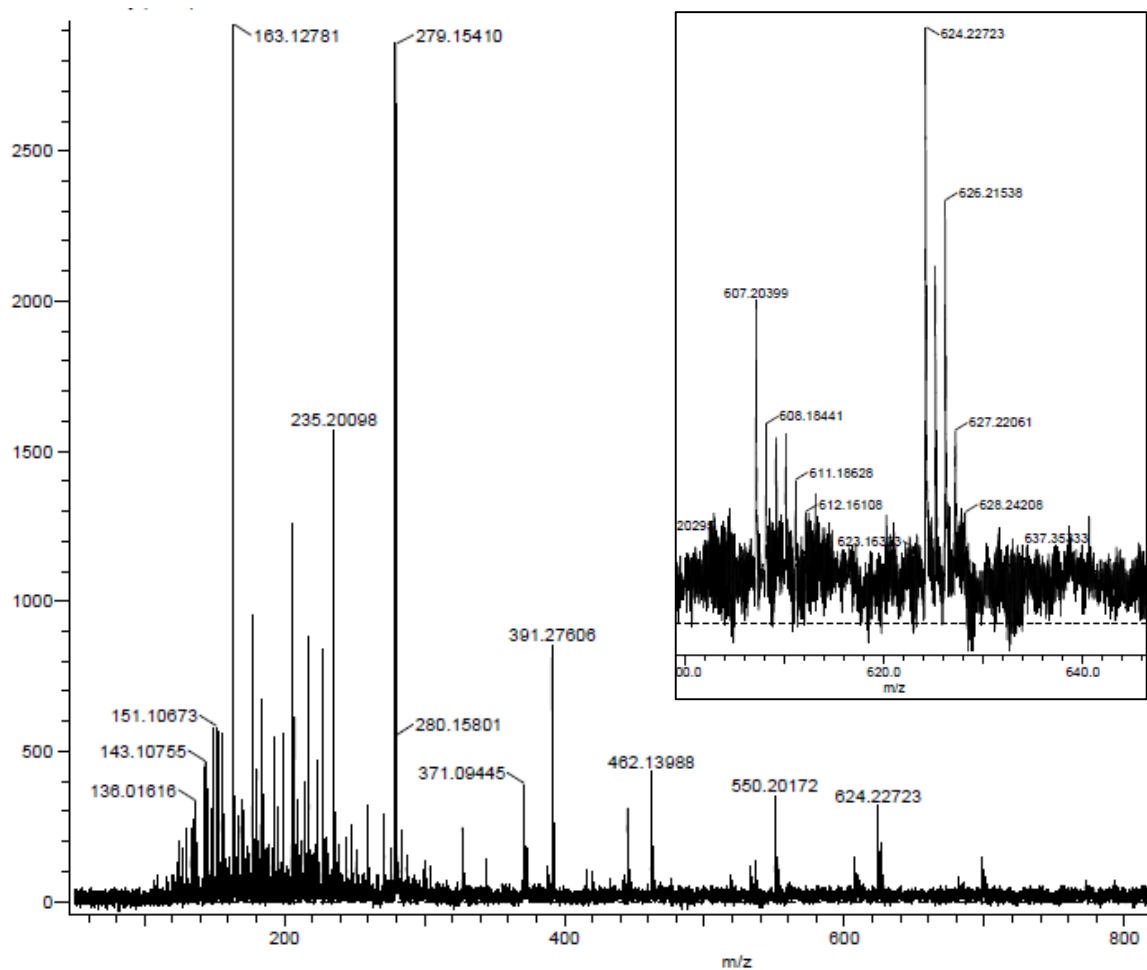


Figura A39. Espectro de masas (DART+) de *La-L2* [M+1].

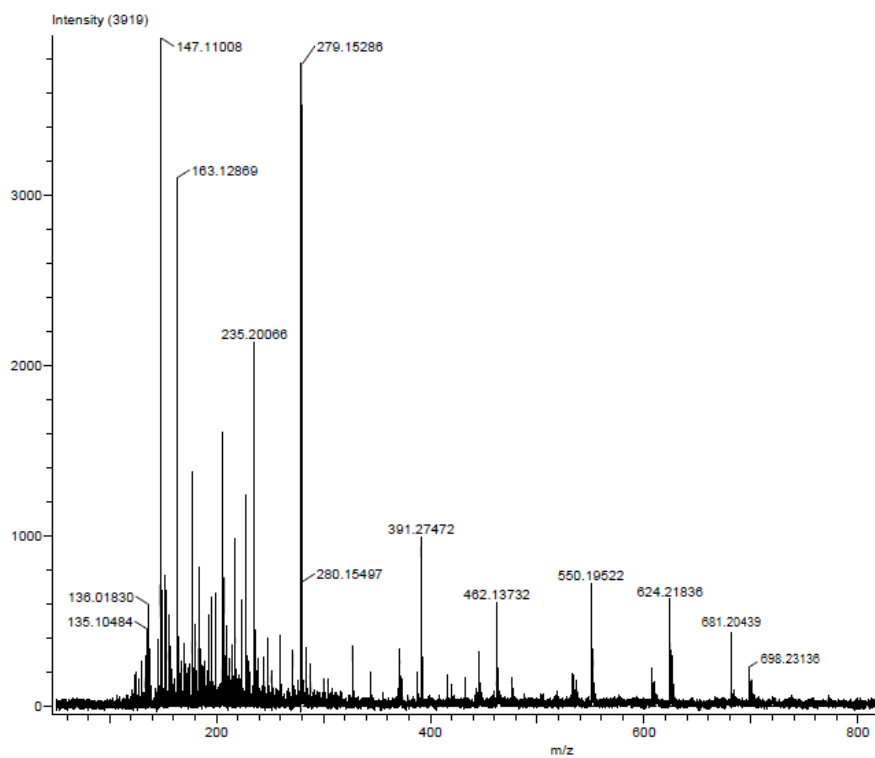


Figura A40. Espectro de masas (DART+) de *Ce-L2*.

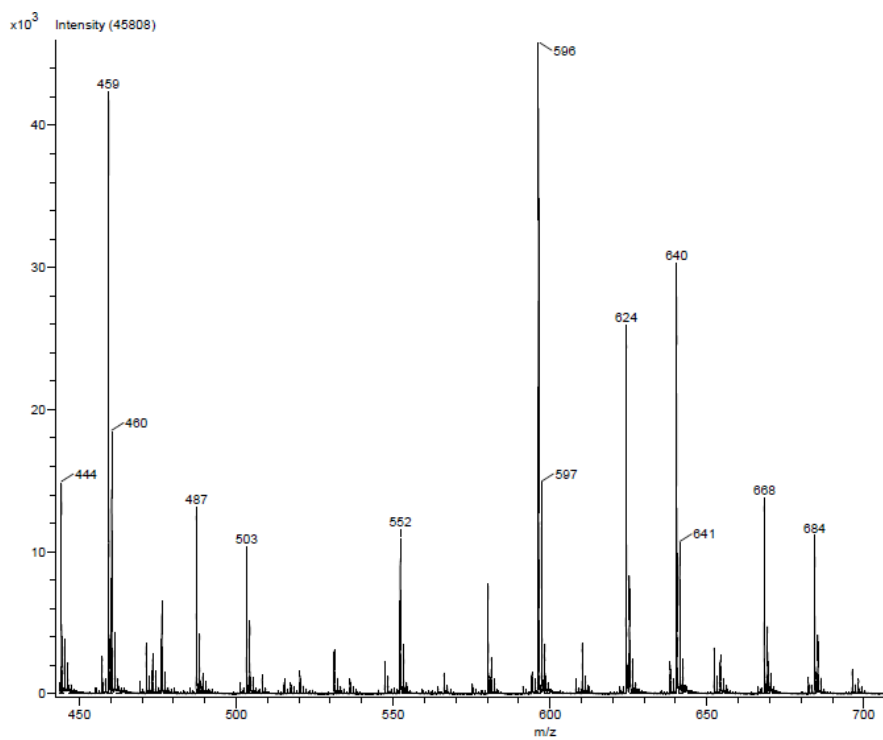


Figura A41. Espectro de masas (DART+) de *Sm-L2*.

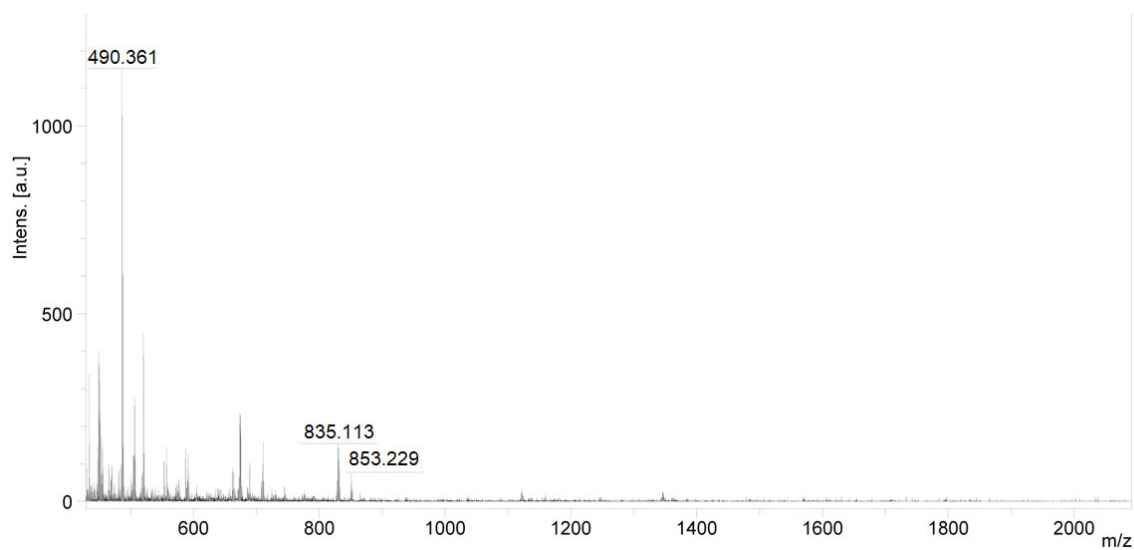


Figura A42. Espectro de masas (MALDI-TOF) de *La-L3*.

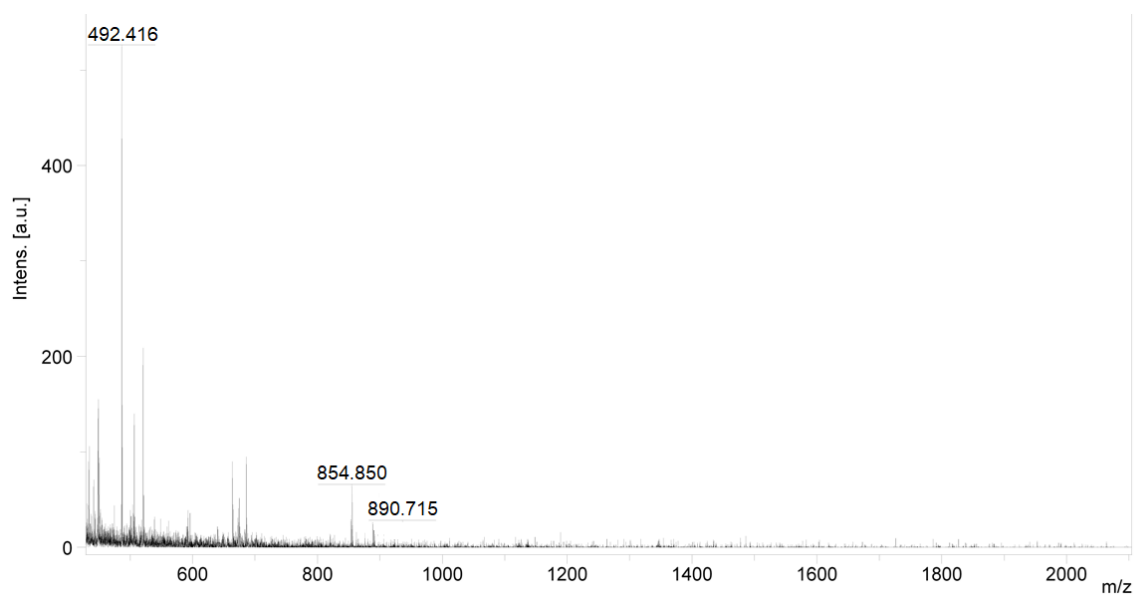


Figura A43. Espectro de masas (MALDI-TOF) de *Ce-L3*.

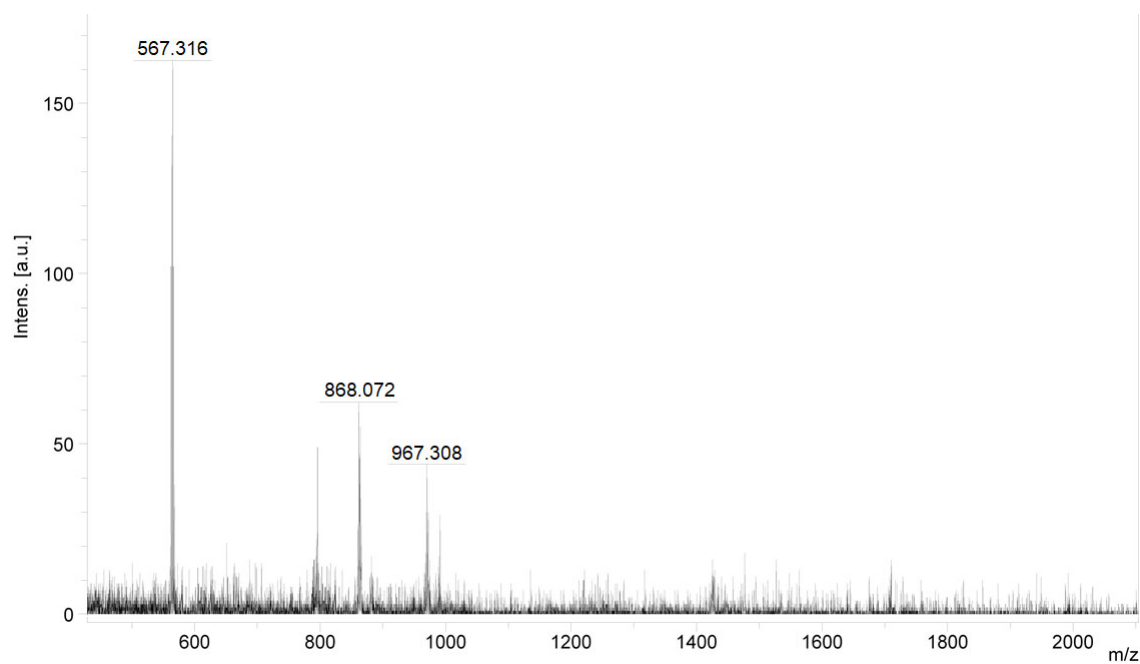


Figura A44. Espectro de masas (MALDI-TOF) de *La-L4*.

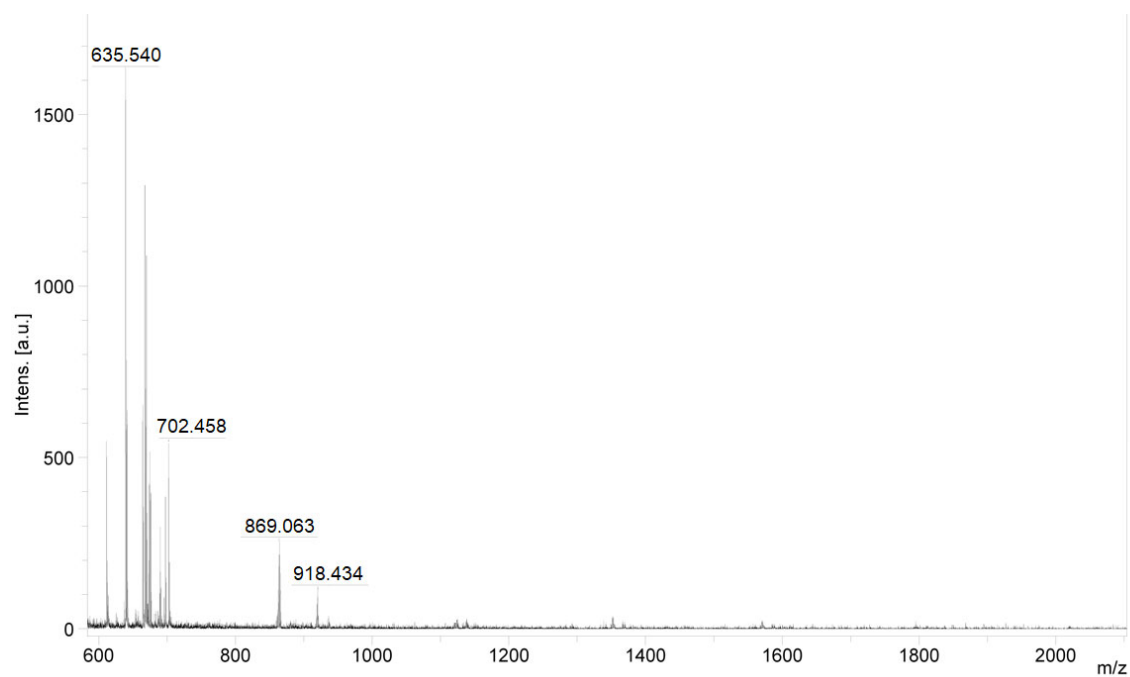


Figura A45. Espectro de masas (MALDI-TOF) de *Ce-L4*.

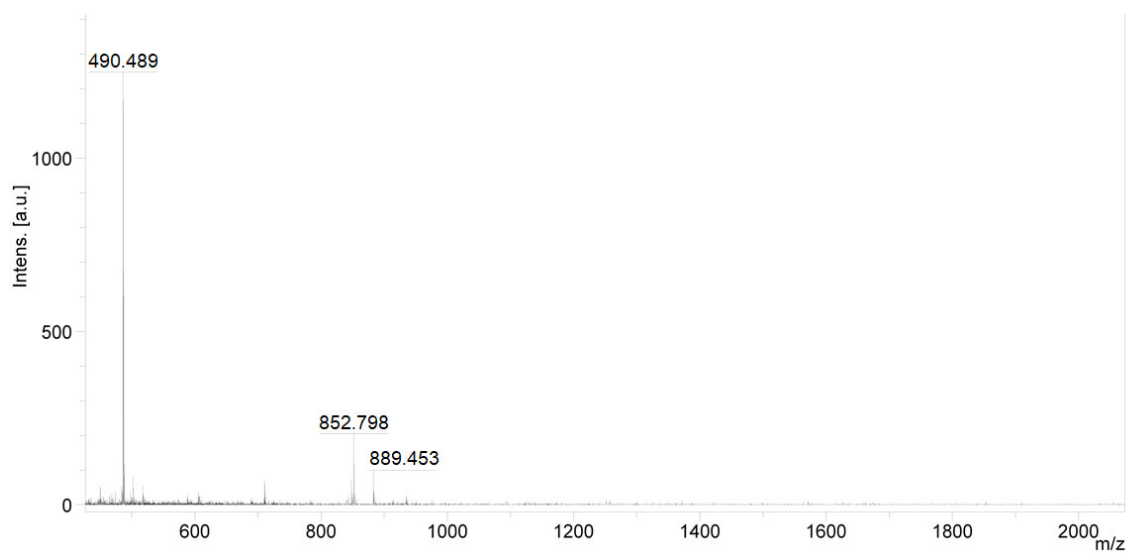


Figura A46. Espectro de masas (MALDI-TOF) de *La-L5*.

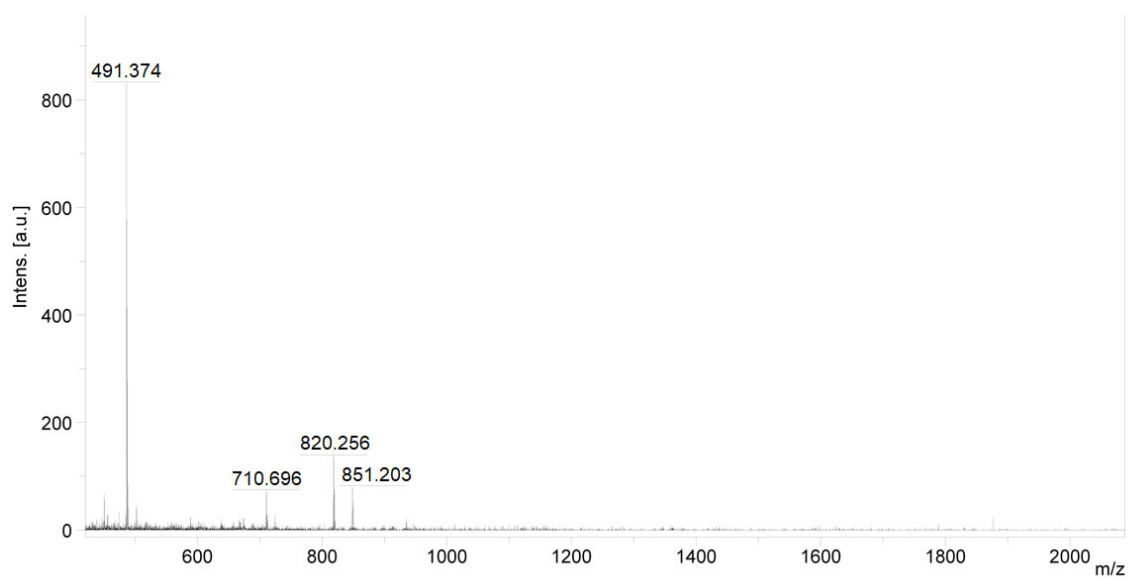


Figura A47. Espectro de masas (MALDI-TOF) de *Ce-L5*.

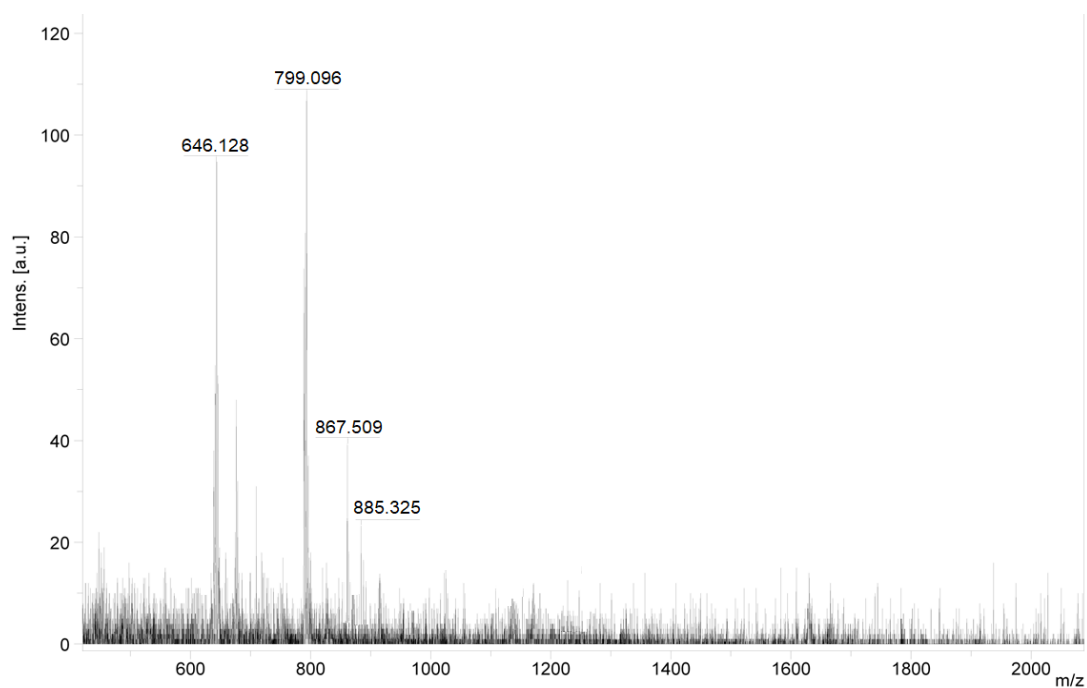


Figura A48. Espectro de masas (MALDI-TOF) de *La-L6*.

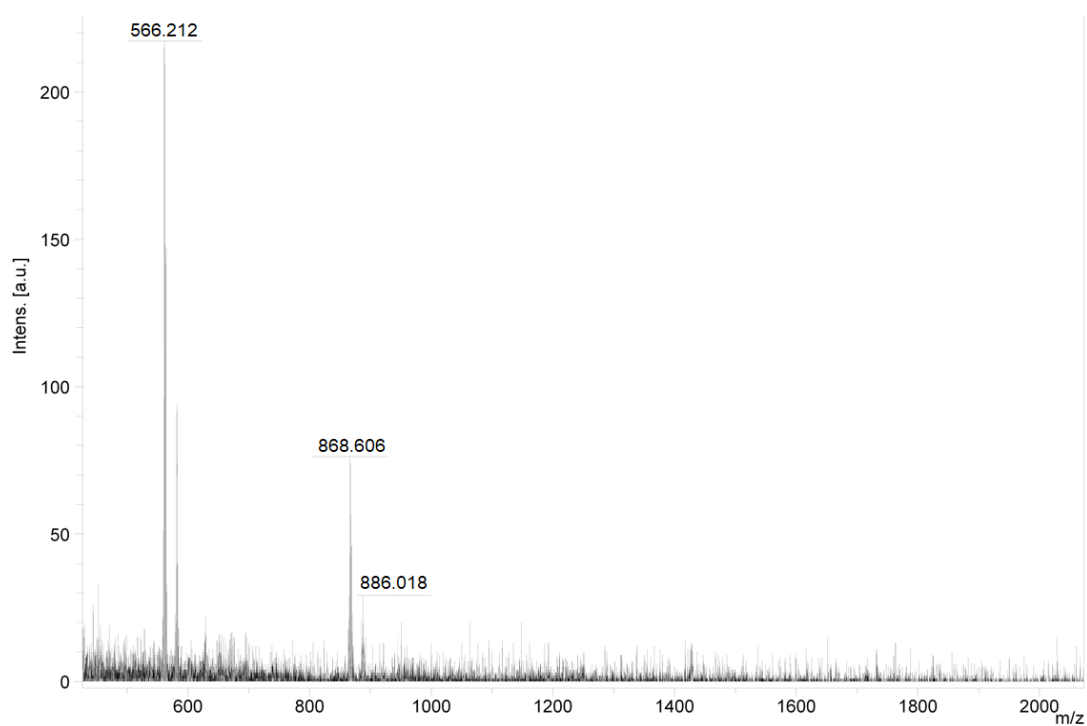


Figura A49. Espectro de masas (MALDI-TOF) de *Ce-L6*.

4. Termogramas (curvas TG-DTG)

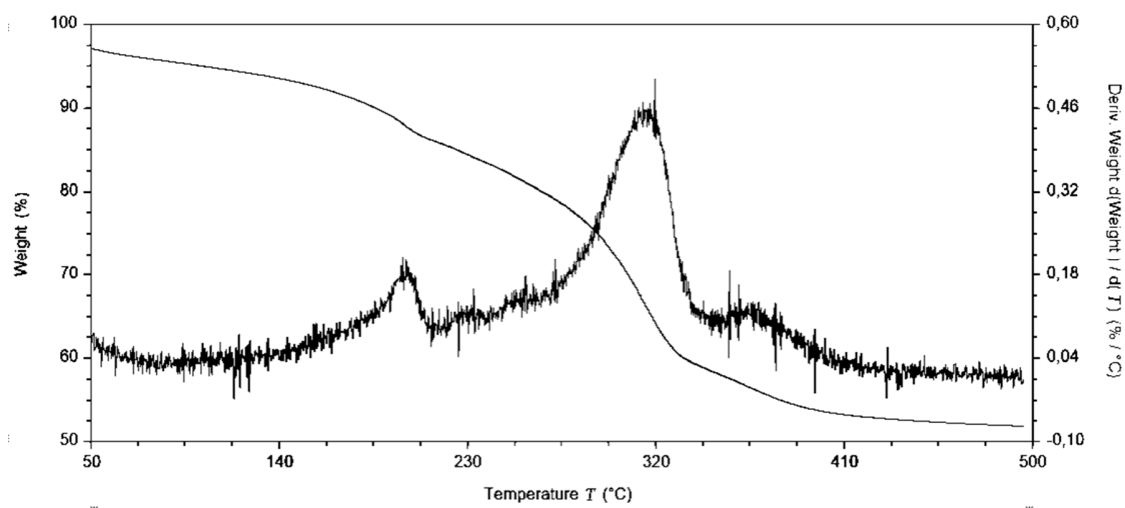


Figura A50. Curvas simultaneas TG-DTG de *La-L1*.

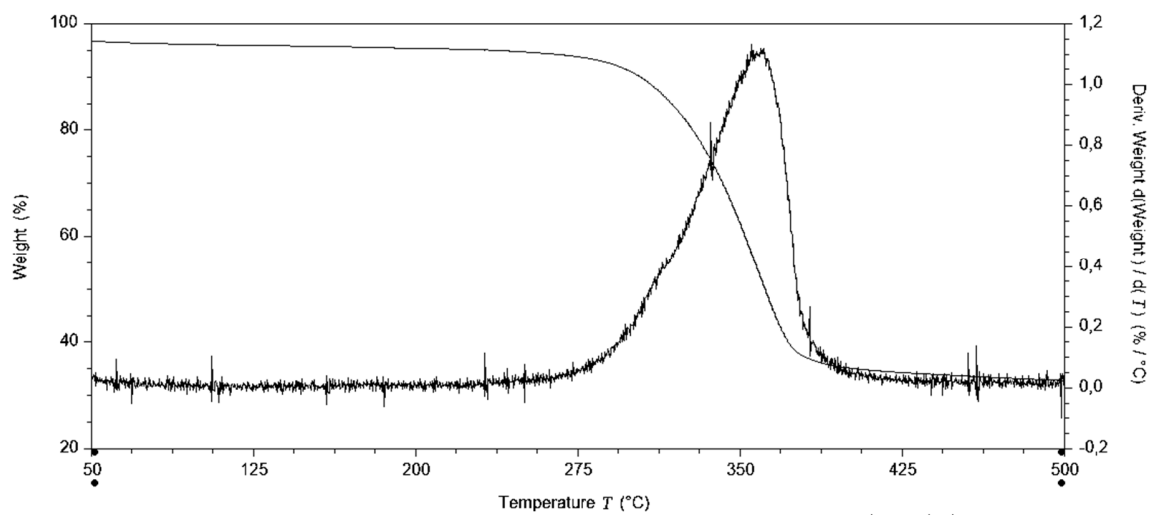


Figura A51. Curvas simultaneas TG-DTG de *La-L2*.

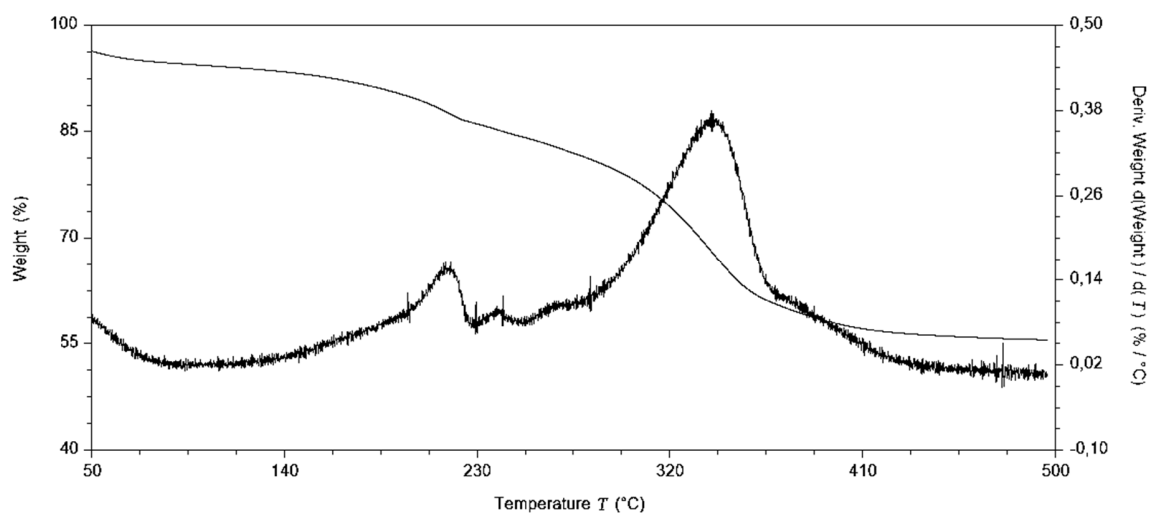


Figura A52. Curvas simultaneas TG-DTG de *Ce-L1*.

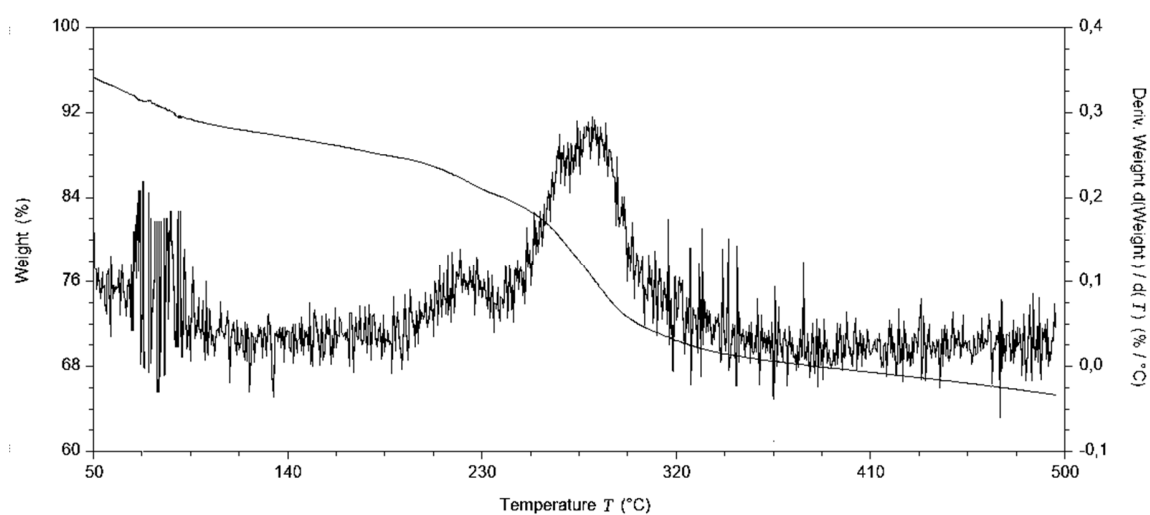


Figura A53. Curvas simultaneas TG-DTG de *Ce-L2*.

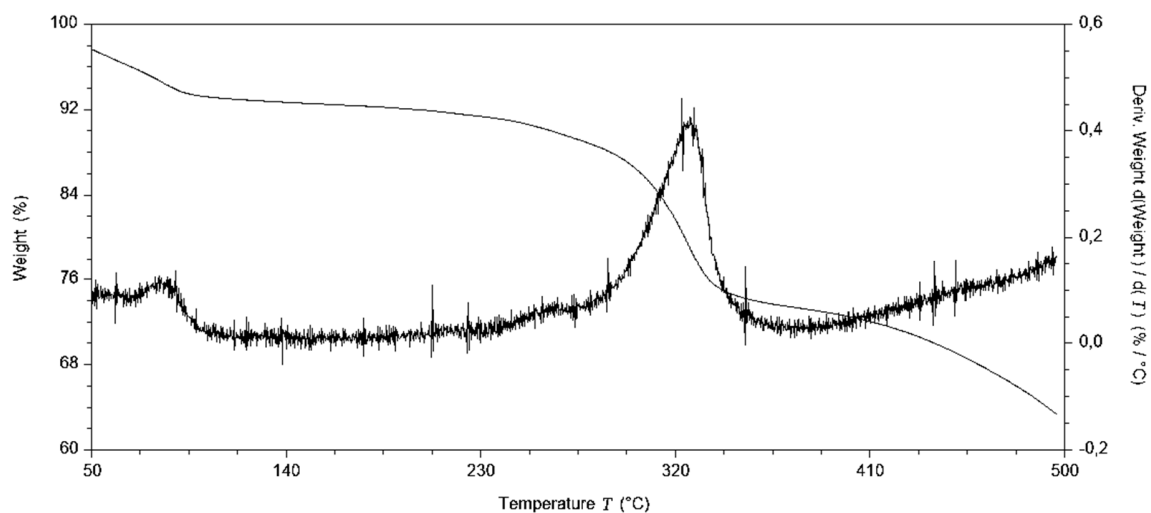


Figura A54. Curvas simultaneas TG-DTG de *Sm-L1*.

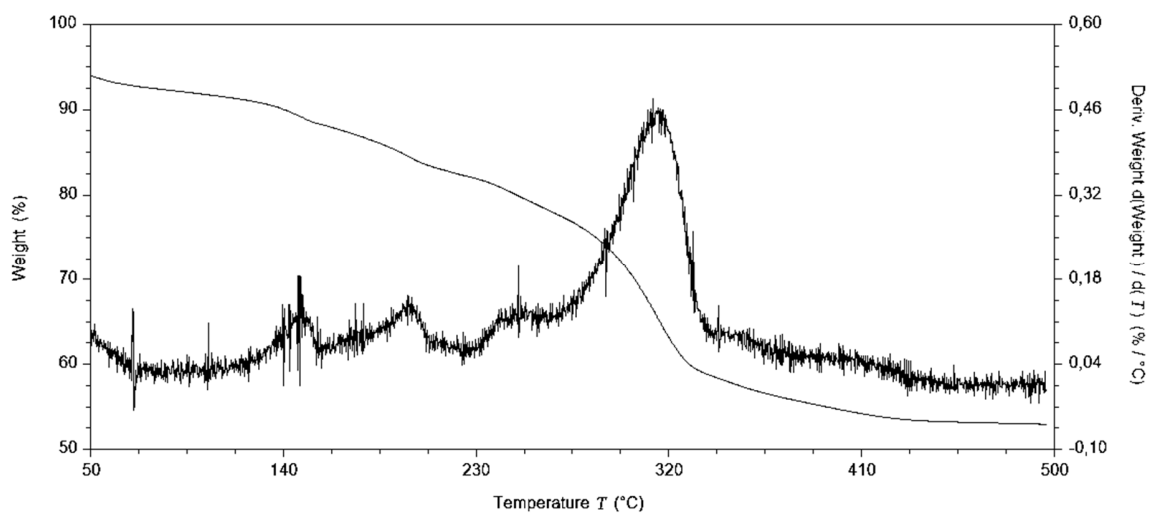


Figura A55. Curvas simultaneas TG-DTG de *Sm-L2*.

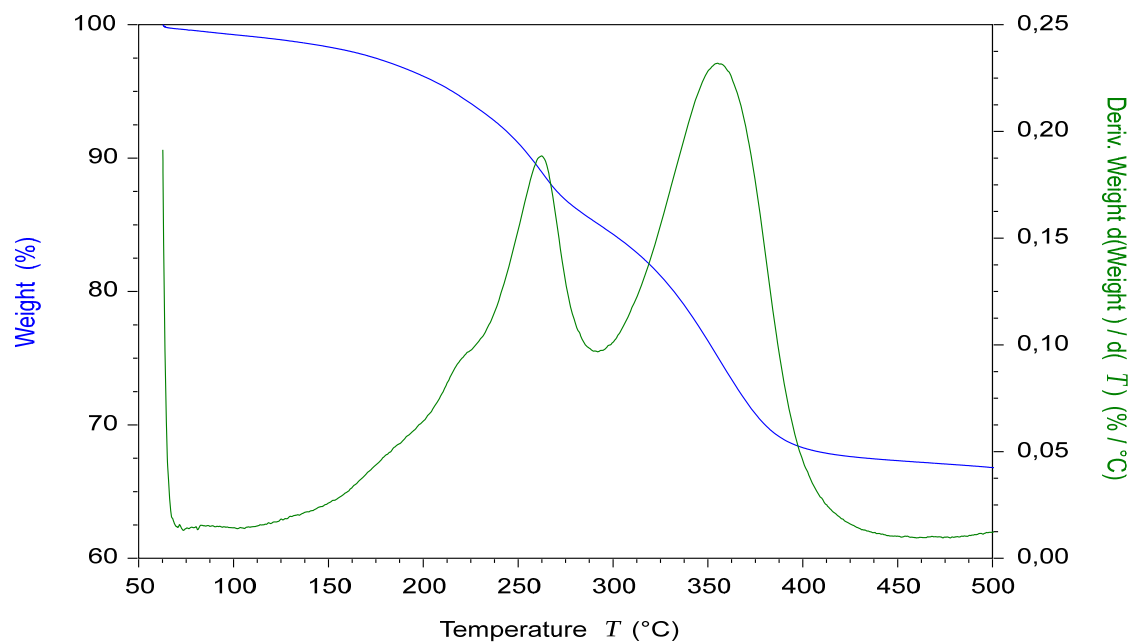


Figura A56. Curvas simultaneas TG-DTG de *La-L3*.

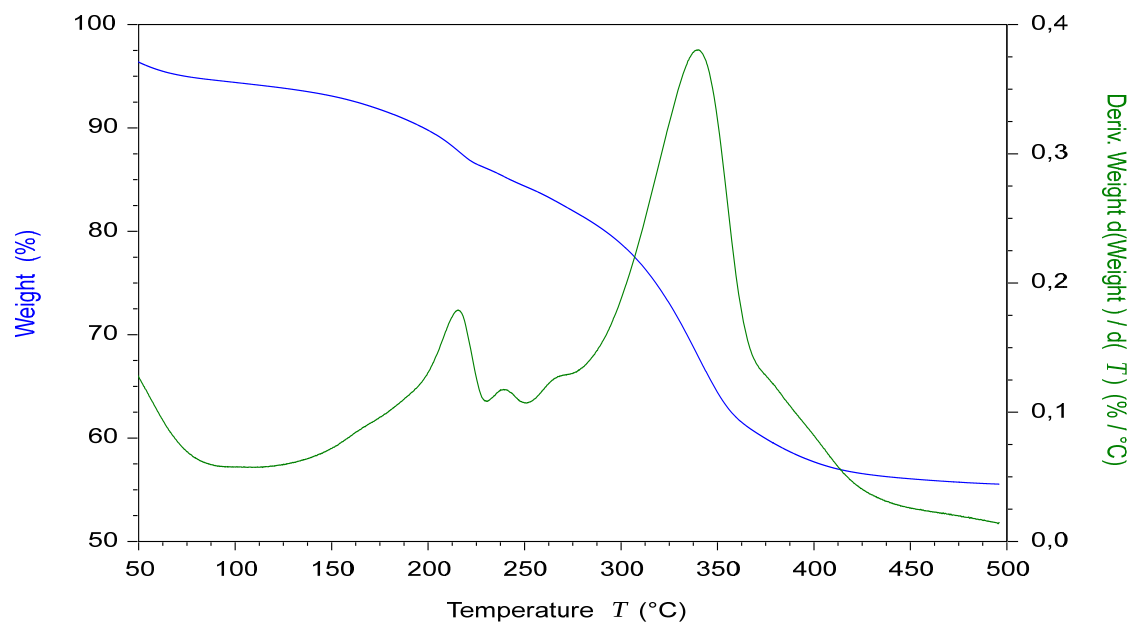


Figura A57. Curvas simultaneas TG-DTG de *Ce-L3*.

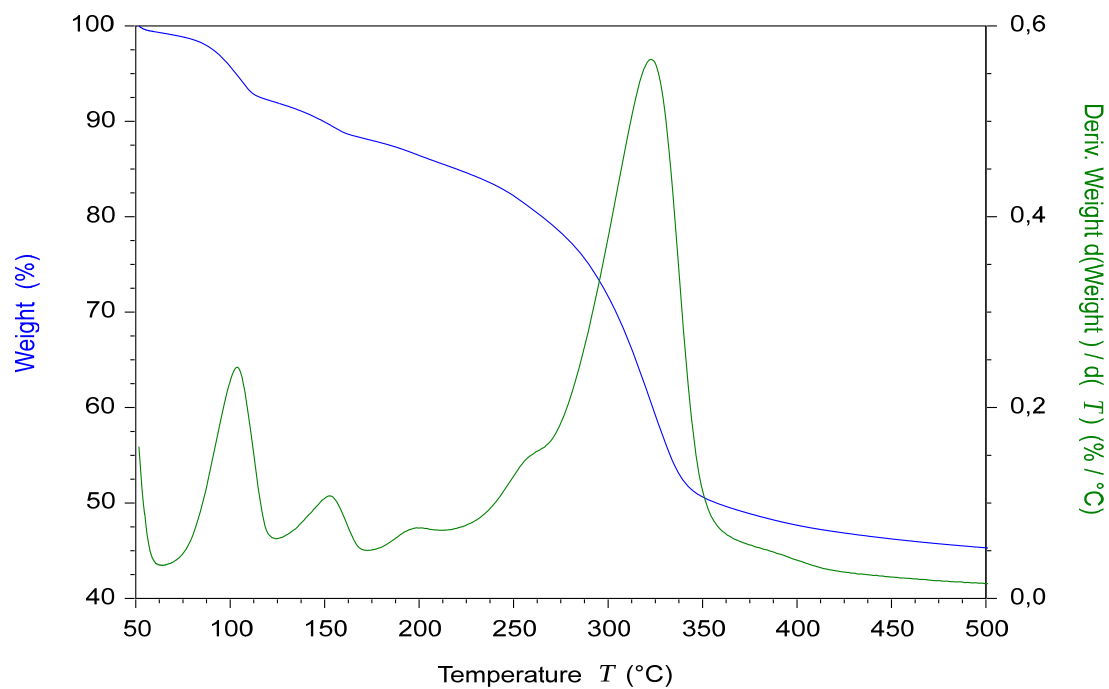


Figura A58. Curvas simultaneas TG-DTG de *La-L4*.

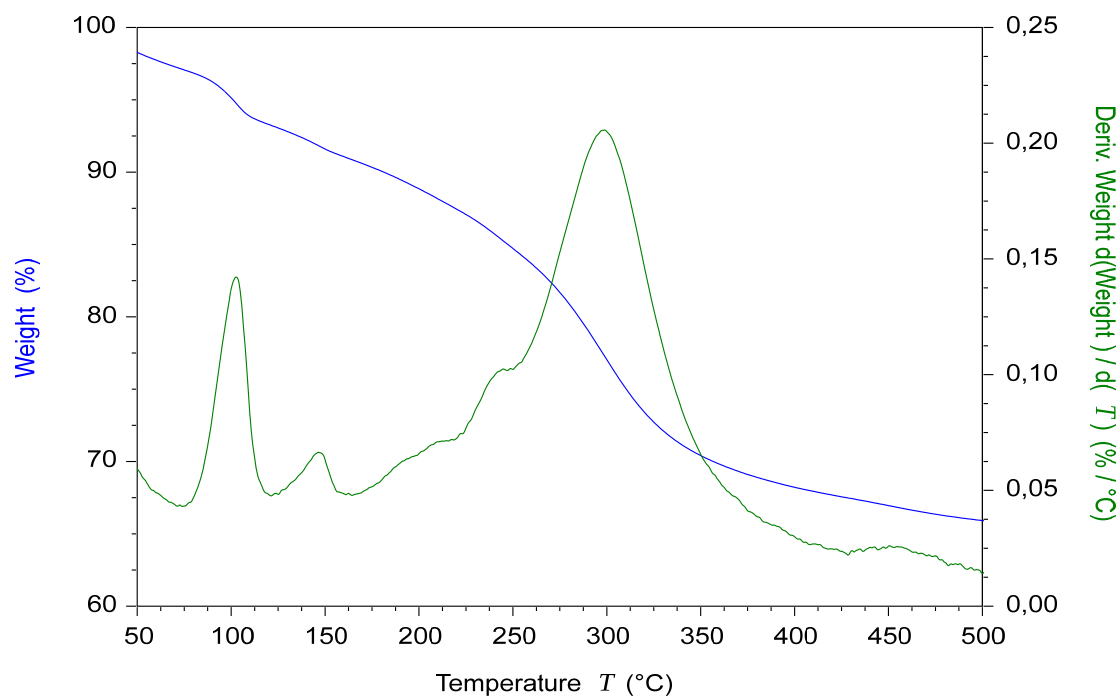


Figura A59. Curvas simultaneas TG-DTG de *Ce-L4*.

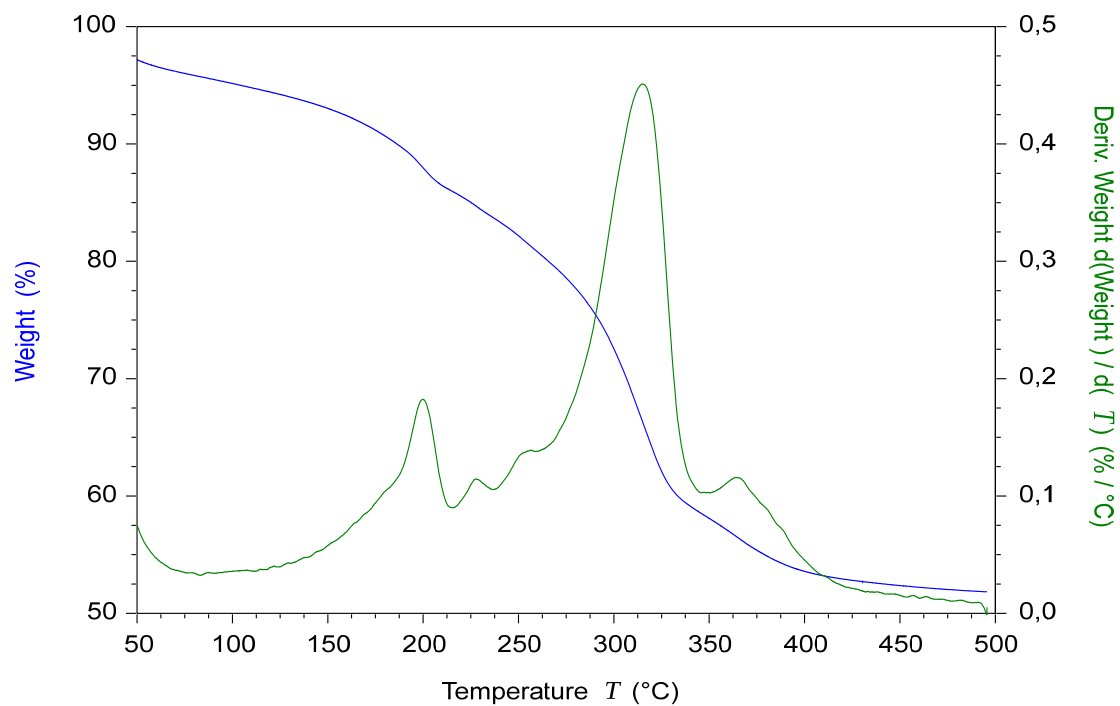


Figura A60. Curvas simultaneas TG-DTG de *La-L5*.

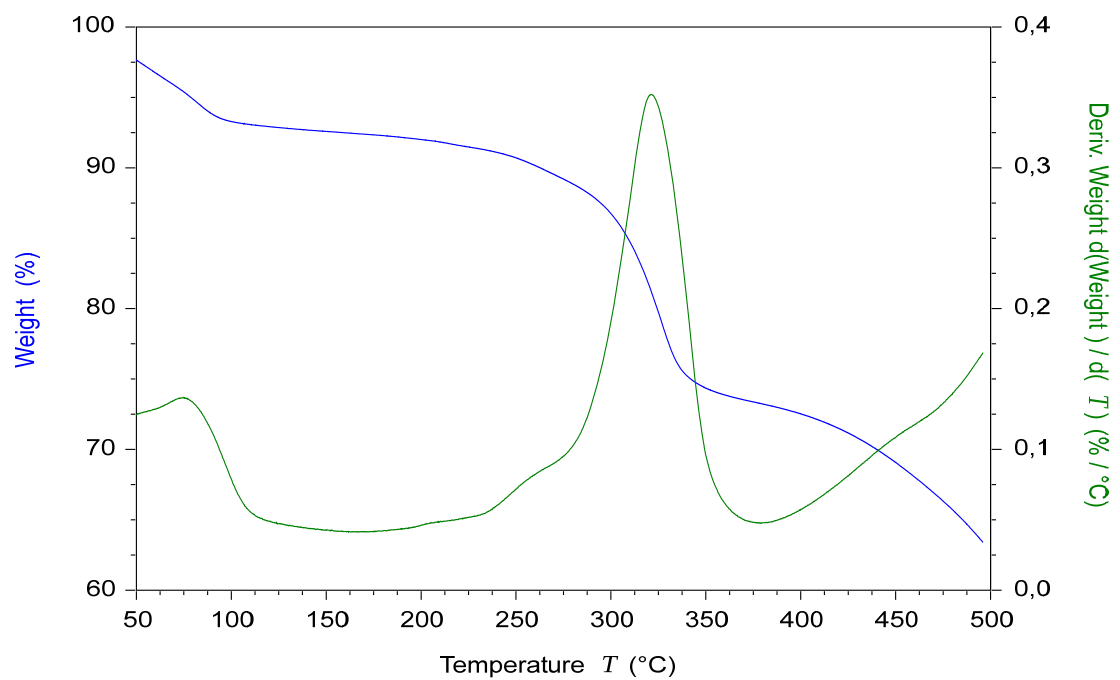


Figura A61. Curvas simultaneas TG-DTG de *Ce-L5*.

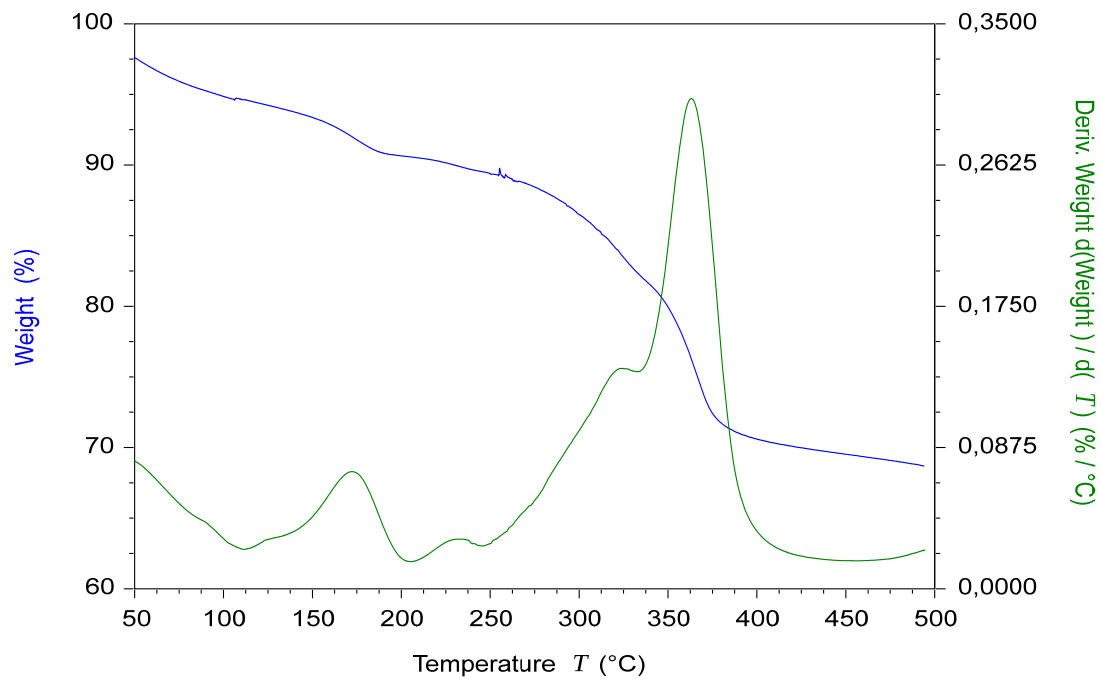


Figura A62. Curvas simultaneas TG-DTG de *La-L6*.

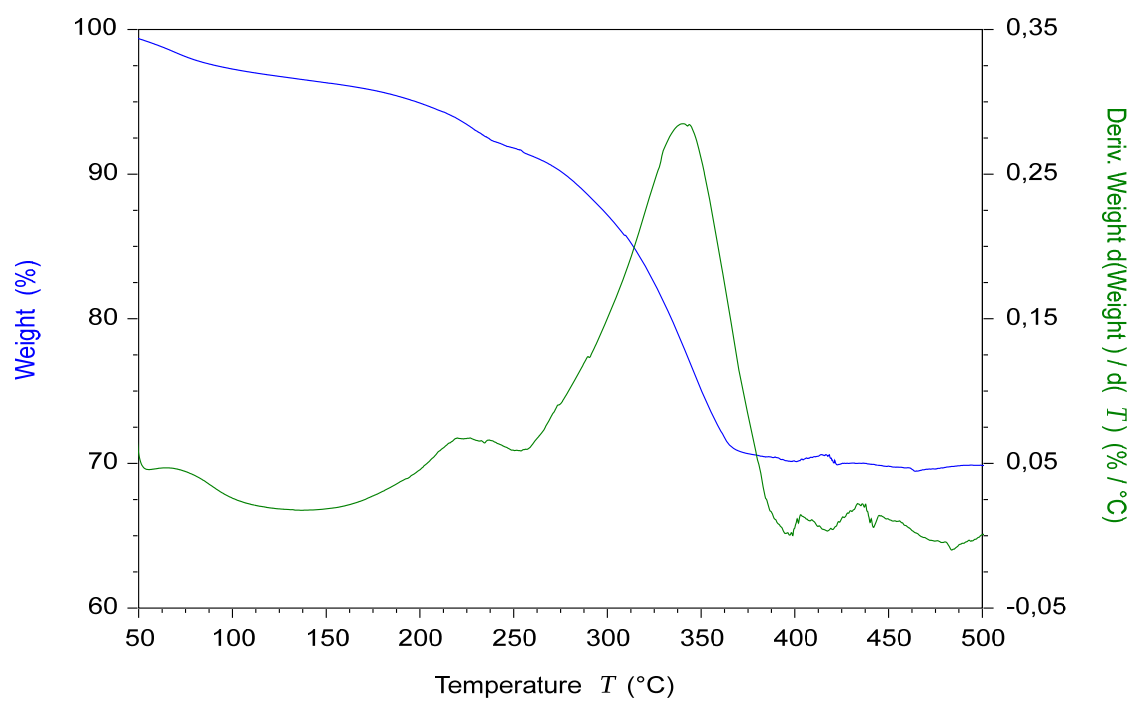


Figura A63. Curvas simultaneas TG-DTG de *Ce-L6*.

5. Espectros de UV-Vis

5.1 Estudios de estabilidad

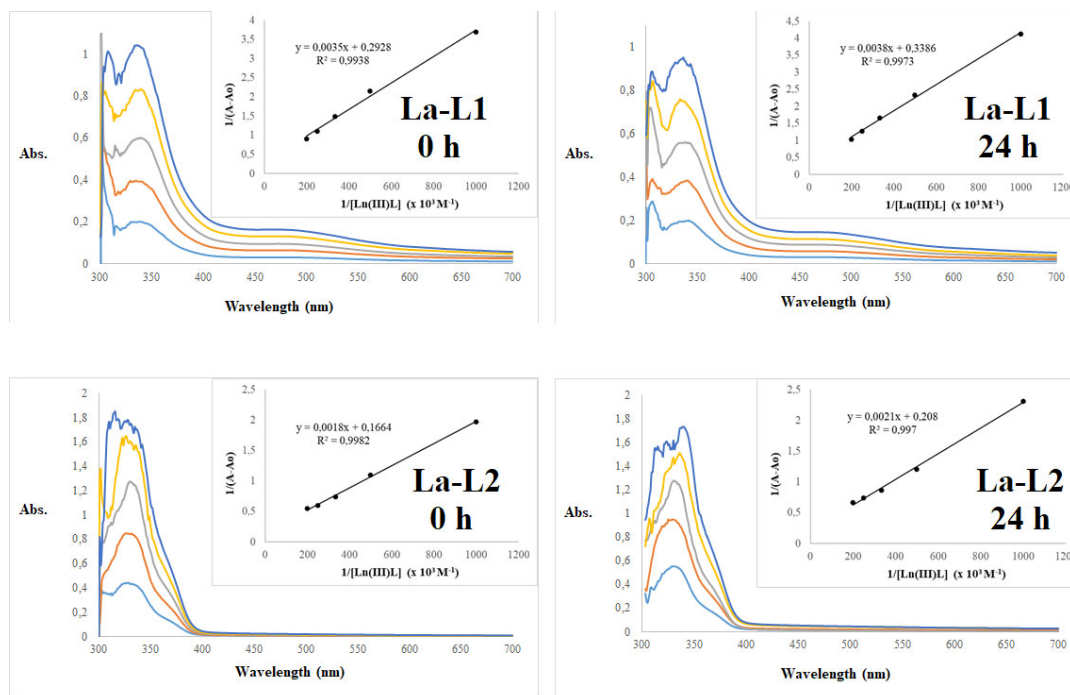


Figura A64. Espectros de absorción de complejos de lantano a diferentes concentraciones (1.0 a 5.0 μM) en medio CMH y el gráfico recíproco doble de $1/(A-A_0)$ vs. $1/[La(III)L]$.

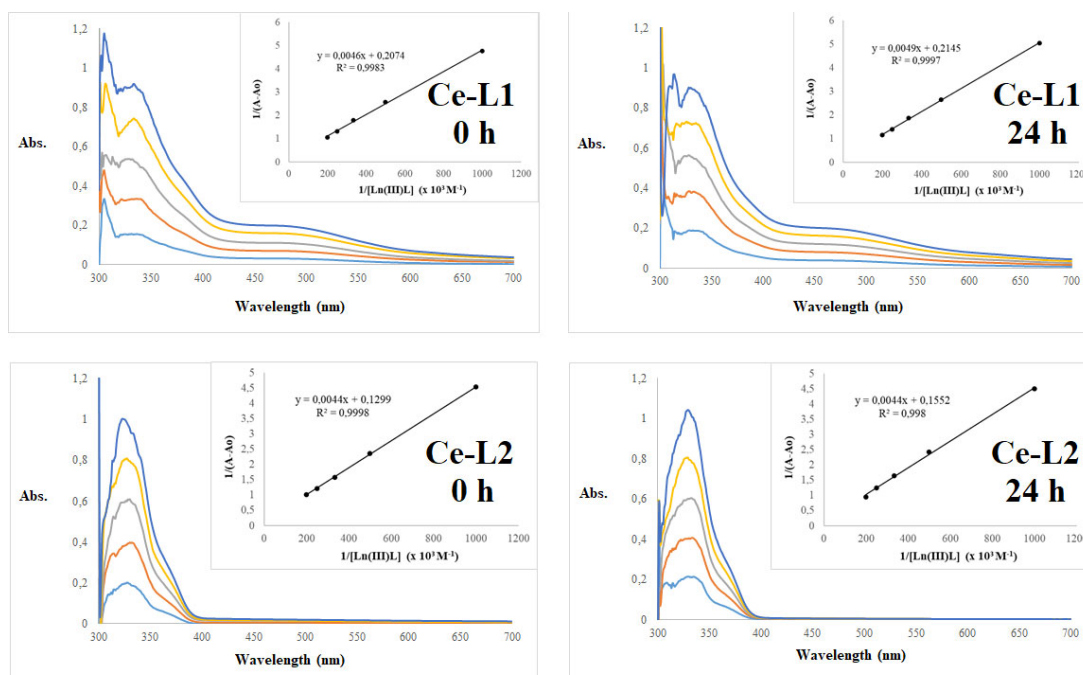


Figura A65. Espectros de absorción de complejos de cerio a diferentes concentraciones (1.0 a 5.0 μM) en medio CMH y el gráfico recíproco doble de $1/(A-A_0)$ vs. $1/[\text{Ce(III)L}]$.

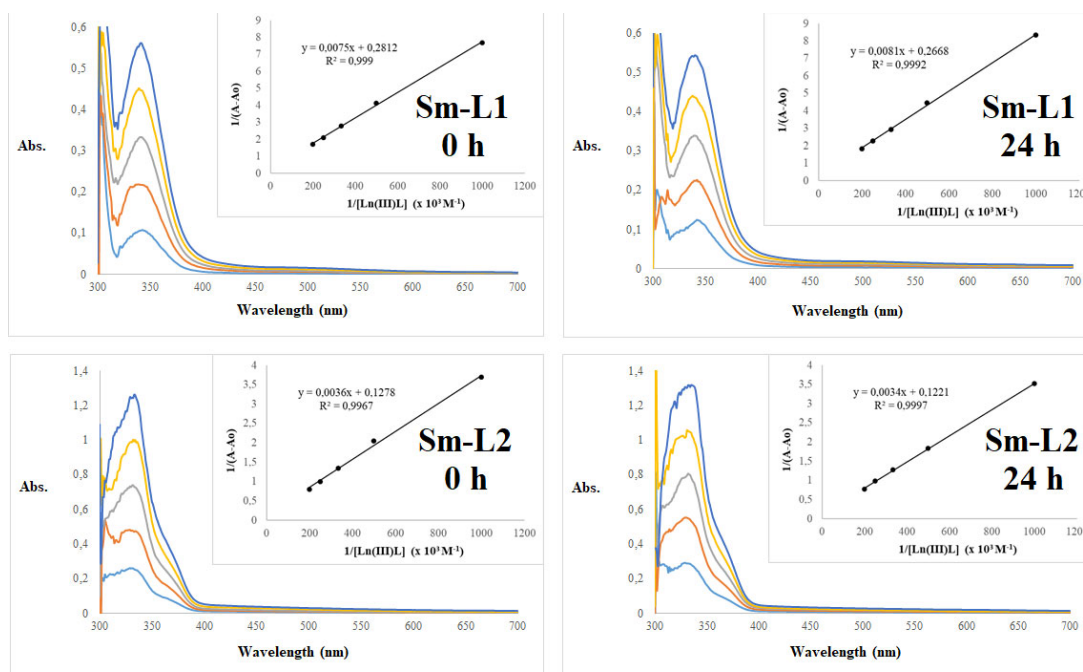


Figura A66. Espectros de absorción de complejos de samario a diferentes concentraciones (1.0 a 5.0 μM) en medio CMH y el gráfico recíproco doble de $1/(A-A_0)$ vs. $1/[\text{Sm(III)L}]$.

5.2 Interacción con ADN

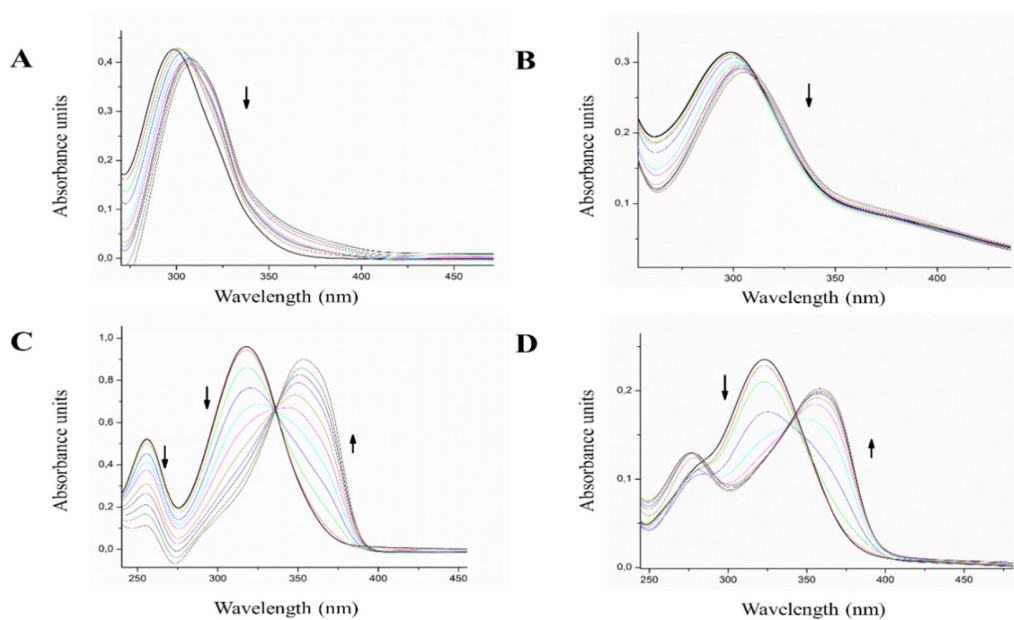


Figura A67. Estudio fotométrico a 60 μM de (A) La-L3, (B) La-L4, (C) La-L5 y (D) La-L6, con ADN-TT en concentraciones entre 0 y 96 μM (línea negra continua = 0 μM).

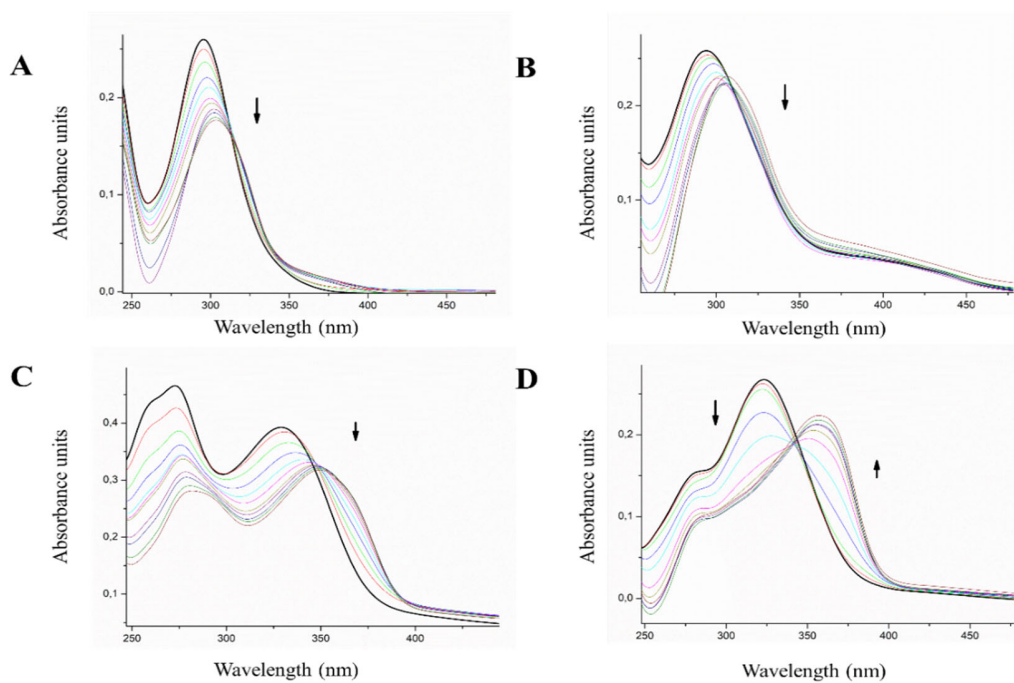


Figura A68. Estudio fotométrico a 60 μM de (A) Ce-L3, (B) Ce-L4, (C) Ce-L5 y (D) Ce-L6, con ADN-TT en concentraciones entre 0 y 96 μM (línea negra continua = 0 μM).

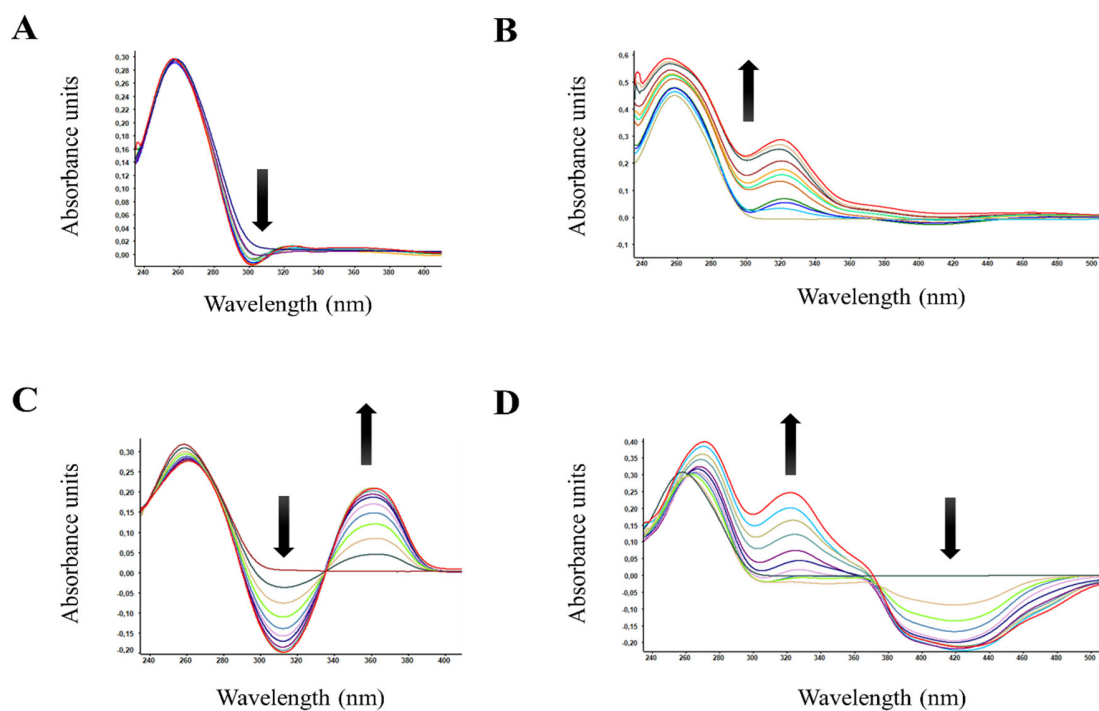


Figura A69. Estudio fotométrico de AND-TT a 48 μM con (A) HL3, (B) HL4, (C) HL5 y (D) HL6, a concentraciones entre 0 y 60 μM .

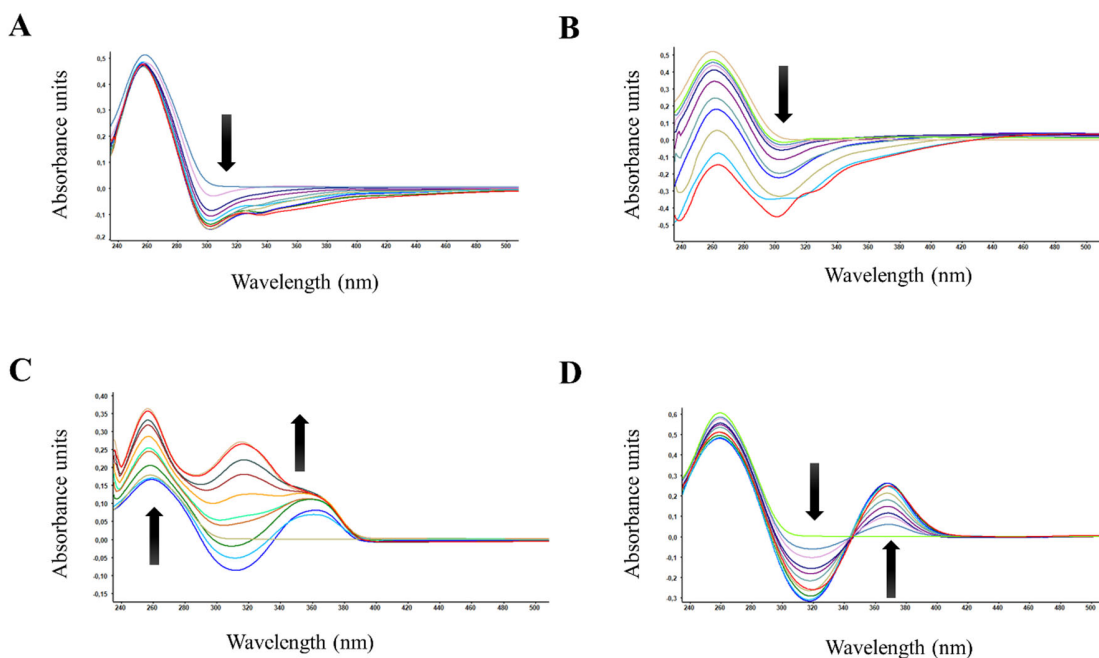


Figura A70. Estudio fotométrico de AND-TT a 48 μM con (A) La-L3, (B) La-L4, (C) La-L5 y (D) La-L6, a concentraciones entre 0 y 60 μM .

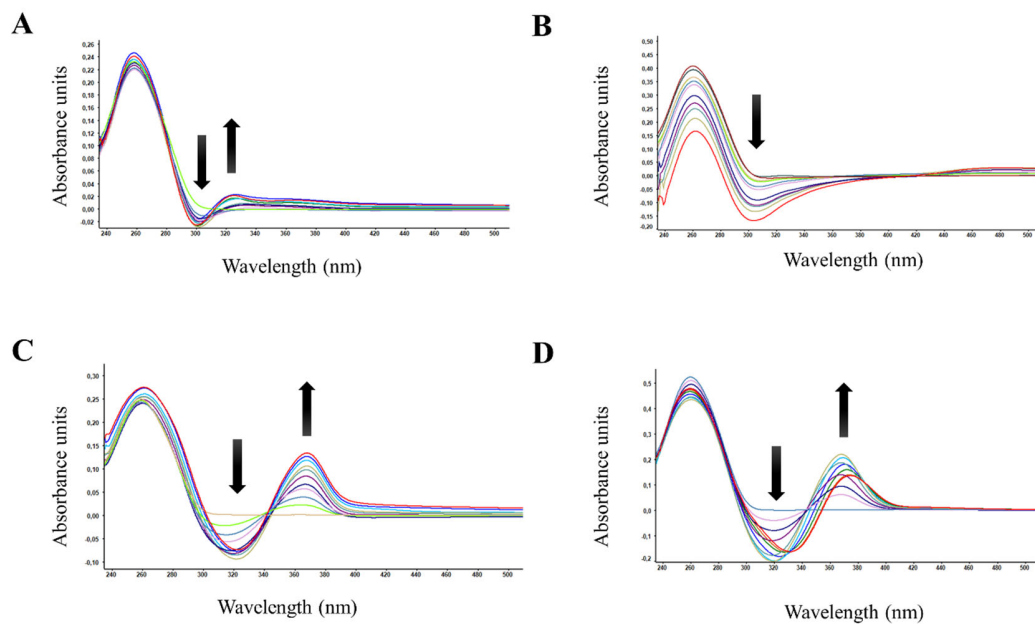


Figura A71. Estudio fotométrico de AND-TT a 48 μM con (A) Ce-L3, (B) Ce-L4, (C) Ce-L5 y (D) Ce-L6, a concentraciones entre 0 y 60 μM .

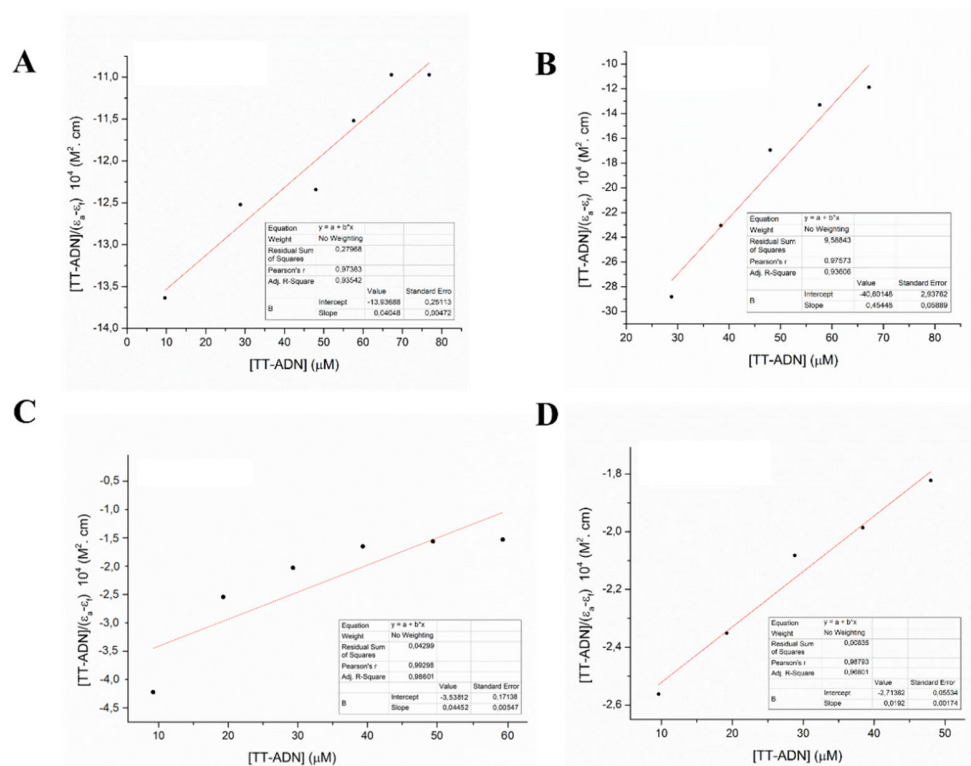


Figura A72. Gráficos de Wolf-Shimer para (A) HL3, (B) HL4, (C) HL5 y (D) HL6.

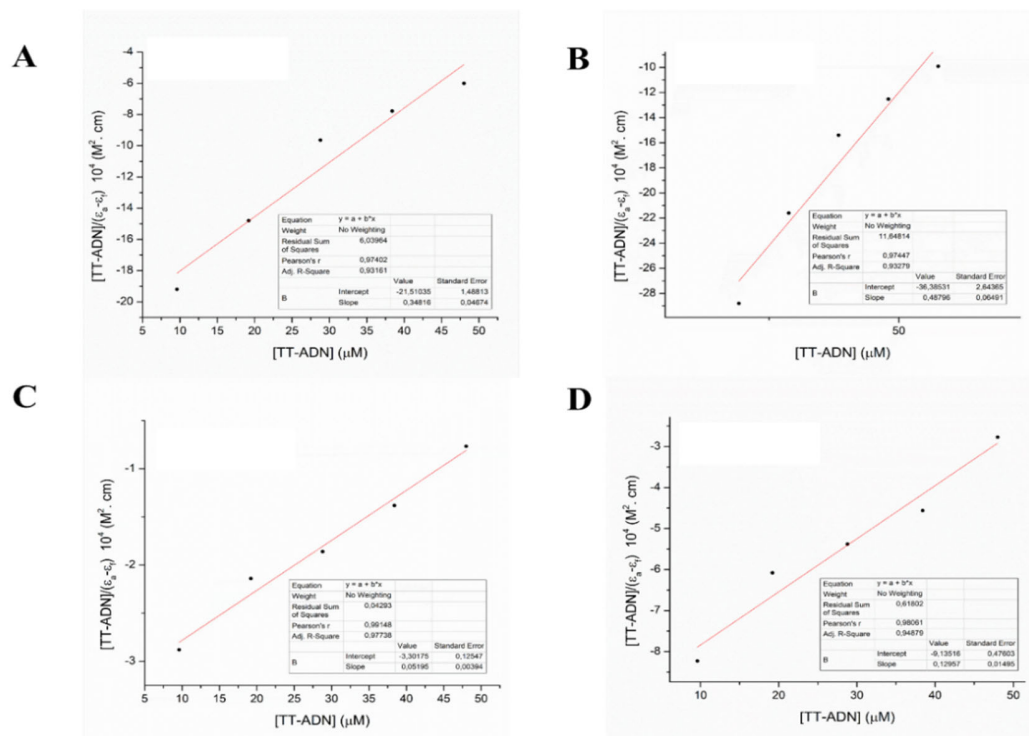


Figura A73. Gráficos de Wolf-Shimer para (A) La-L3, (B) La-L4, (C) La-L5 y (D) La-L6.

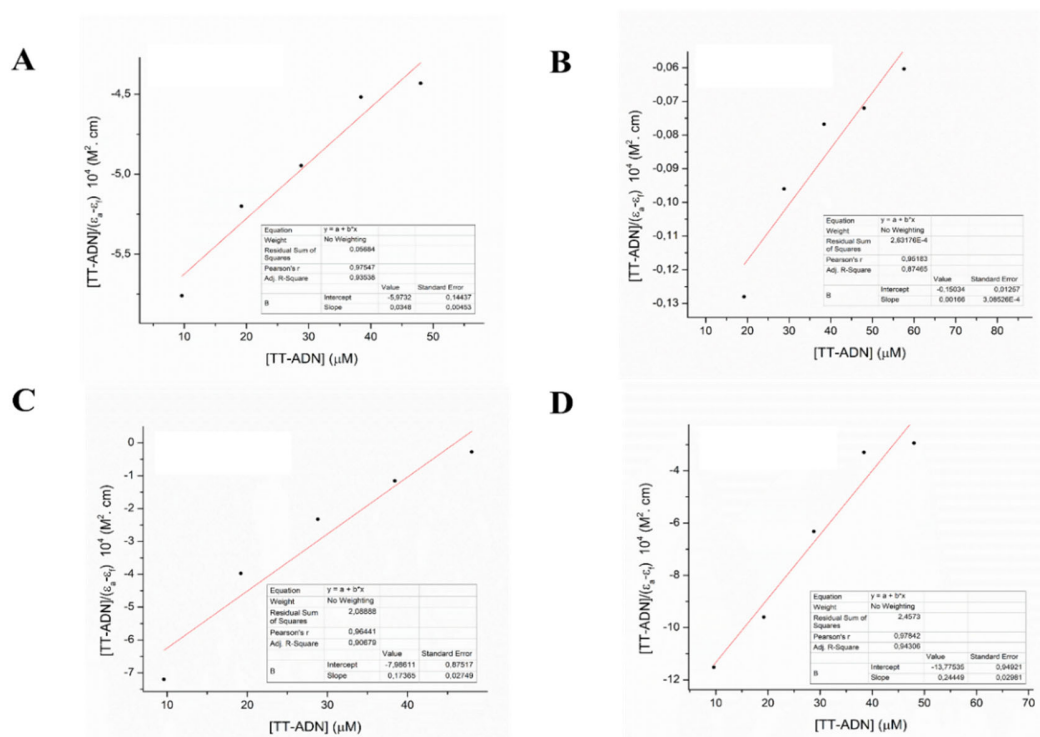


Figura A74. Gráficos de Wolf-Shimer para (A) Ce-L3, (B) Ce-L4, (C) Ce-L5 y (D) Ce-L6.

ANEXO 3

Estudios de Docking Molecular

Tabla A1. Interacción de las bases de Schiff y sus complejos con cruzaina

Molécula	Energía de enlace (kcal/mol)	Enlaces de hidrógeno	Interacción electrostática	Interacción hidrofóbica
HL3	-7.56	Ligando - B:CYS25; Ligando - B:SER64	NA	Ligando - B:ASP161; Ligando - B:ALA138; Ligando - B:CYS25
HL4	-6.92	Ligando - A:LEU160; Ligando - B:ASP60; Ligando - B:SER64	NA	Ligando - A:ASP161; Ligando - A:HIS162; Ligando - B:GLY65; Ligando - B:GLY66; Ligando - A:ALA138
HL5	-7.86	Ligando - B:CYS63; Ligando - B:CYS25; Ligando - B:GLY66	Ligando - A:ASP161	Ligando - B:HIS162; Ligando - B:GLY163; Ligando - B:ALA138; Ligando - B:CYS25
HL6	-7.96	Ligando - B:CYS25; Ligando - B:CYS63	Ligando - A:ASP161	Ligando - B:SER64; Ligando - B:ASP161; Ligando - B:ALA138; Ligando - B:CYS25
La-L3	-11.58	Ligando - B:SER64; Ligando - A:LEU160	NA	NA
La-L4	-10.81	Ligando - B:ASP161; Ligando - B:LEU160; Ligando - B:CYS63; Ligando - B:GLY23; Ligando - A:SER64	NA	Ligando - B:ASP161; Ligando - HIS162; Ligando - B:ALA138
La-L5	-11.1	Ligando - A:CYS25	Ligando - B:ASP161	Ligando - A:ASP161; Ligando - HIS162; Ligando - A:LEU67
La-L6	-10.63	Ligando - A:GLN159; Ligando - B:ASP161; Ligando - B:SER64; Ligando - B:THR59; Ligando - A:LEU160; Ligando - B:CYS25	Ligando - A:GLU239	Ligando - A:PRO213; Ligando - B:ILE309; Ligando - A:VAL277
Ce-L3	-10.88	Ligando - A:SER64; Ligando - A:ASP161; Ligando - B:SER64; Ligando - B:CYS63	NA	Ligando - A:HIS162; Ligando - B:CYS25; Ligando - A:LEU67; Ligando - A:ALA138; Ligando - A:LEU160
Ce-L4	-10.35	Ligando - A:SER142	NA	Ligando - A:TRP184; Ligando - A:CYS22; Ligando - A:CYS25
Ce-L5	-10.98	Ligando - B:SER64; Ligando - A:SER64	NA	Ligando - A:LEU67; Ligando - A:CYS25; Ligando - A:CYS63
Ce-L6	-11.08	Ligando - B:CYS63; Ligando - B:GLU208; Ligando - B:ASP16	Ligando - A:ASP161	Ligando - A:HIS162; Ligando - B:ASP161; Ligando - B:ALA138; Ligando - A:ALA141
Vinilsulfona	-4.3	Ligando - A:VAL139; Ligando - A:ASP161; Ligando - A:HIS162	NA	NA

Tabla A2. Interacción de HL4 y La-L4 con leishmanina

Molécula	Energía de enlace (kcal/mol)	Enlaces de hidrógeno	Interacción electrostática	Interacción hidrofóbica
HL4	-8.78	Ligando - A:ALA349; Ligando - A:GLY222;	Ligando - A:ASP342	Ligando - A:ALA349; Ligando - A:ALA350; Ligando - A:ALA348; Ligando - A:PRO416; Ligando - A:PRO460; Ligando - A:LEU224
La-L4	-9.79	Ligando - A:ALA349; Ligando - A:GLU265	NA	Ligando - A:ALA348; Ligando - A:PRO460; Ligando - A:LEU257; Ligando - A:ALA350; Ligando - A:VAL223; Ligando - A:LEU420
Anfotericina B	-6.80	Ligando - A:LYS573; Ligando - A:GLN166; Ligando - A:THR169; Ligando - A:ASP371; Ligando - A:THR517; Ligando - A:ALA572; Ligando - A:LYS173	NA	NA

Tabla A3. Interacción de las bases de Schiff y sus complejos con alfa tubulina

Molécula	Energía de enlace (kcal/mol)	Enlaces de hidrógeno	Interacción electrostática	Interacción hidrofóbica
HL3	-6.78	Ligando - A:PRO261; Ligando - A:ASP431	NA	Ligando - A:TYR262; Ligando - A:TYR453; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:ALA451; Ligando - A:VAL435
HL4	-6.23	Ligando - A:THR198; Ligando - A:LYS166	Ligando - A:ASP431	Ligando - A:TYR262; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:ARG264
HL5	-5.48	Ligando - A:ALA451	NA	Ligando - A:ALA451; Ligando - A:TYR453; Ligando - A:PRO263
HL6	-5.41	Ligando - A:ASP431	Ligando - A:GLU196	Ligando - A:VAL435; Ligando - A:ARG264
La-L3	-8.46	Ligando - A:PRO261; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:ALA451	NA	Ligando - A:PRO263; Ligando - A:ALA451
La-L4	-7.37	Ligando - A:LEU195; Ligando - A:THR198; Ligando - A:LYS166; Ligando - A:LYS163; Ligando - A:HIS266	Ligando - A:LYS166; Ligando - A:ASP199	Ligando - A:TYR453; Ligando - A:ALA451; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:LYS163
La-L5	-8.60	Ligando - A:ASP431; Ligando - A:GLU196	Ligando - A:ASP431	Ligando - A:GLU196; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:ARG264
La-L6	-7.66	Ligando - A:GLU196; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:GLY162; Ligando - A:SER158	NA	NA

Ce-L3	-7.50	Ligando: C - A:ASP199;OD1	Ligando - A:LYS166	Ligando - A:TYR453; Ligando - A:GLU196; Ligando - A:ALA451; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:LYS163
Ce-L4	-6.98	Ligando - A:PRO263; Ligando - A:ASP431; Ligando - A:ARG264; Ligando - A:ALA451	Ligando - A:GLU196; Ligando - A:ARG264	Ligando - A:TYR262; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:ALA451
Ce-L5	-6.91	Ligando - A:ASP431; Ligando - A:PRO263	Ligando - A:ARG264; Ligando - A:ASP431	Ligando - A:TYR262; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:VAL435 Ligando - A:TYR453;
Ce-L6	-7.62	Ligando - A:PRO261; Ligando - A:PRO263	Ligando - A:GLU196	Ligando - A:TYR262; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:ALA451 Ligando - A:GLU196;
Vinblastina	-8.89	Ligando - A:PRO263; Ligando - A:ASP431	NA	Ligando - A:VAL435; Ligando - A:TYR262; Ligando - A:PRO263; Ligando - A:ARG264

Tabla A4. Interacción de las bases de Schiff y sus complejos con PBP2A de *S. aureus*

Molécula	Energía de enlace (kcal/mol)	Enlaces de hidrógeno	Interacción electrostática	Interacción hidrofóbica
HL3	-7.59	Ligando - A:ASP323; Ligando - B:GLU161; Ligando - B:LYS153	Ligando - B:LYS153; Ligando - B:ASP323	Ligando - A:LYS322; Ligando - A:ASP323; Ligando - B:ASP323; Ligando - A:LYS322; Ligando - B:LEU155; Ligando - A:LEU155
HL4	-7.70	Ligando - B:LYS322; Ligando - A:GLU161; Ligando - B:ASP320; Ligando - B:ASP323; Ligando - A:LYS153	Ligando - A:ASP323; Ligando - B:ASP323	Ligando - B:LEU155; Ligando - A:LEU155; Ligando - B:LYS322
HL5	-7.03	Ligando - A:GLN325; Ligando - B:ASP323	Ligando - A:GLU161	Ligando - B:ASP323; Ligando - B:LYS322; Ligando - A:LEU155; Ligando - B:LEU155
HL6	-6.65	Ligando - B:ASP323; Ligando - B:GLU161; Ligando - A:GLU161	Ligando - A:ASP323	Ligando - B:LEU155; Ligando - A:LEU155
La-L3	-10.01	Ligando - A:LYS148	Ligando - A:LYS148; Ligando - A:GLU170; Ligando - A:ASP275	Ligando - A:PRO258; Ligando - A:VAL277; Ligando - A:ARG151; Ligando - A:ARG241; Ligando - A:VAL256
La-L4	-8.47	Ligando - A:LYS148; Ligando - A:ARG151; Ligando - A:ASP275; Ligando - A:ASP295; Ligando - A:HIS293; Ligando - A:VAL277	Ligando - A:LYS148; Ligando - A:HIS293	Ligando - A:HIS293; Ligando - A:PRO258; Ligando - A:VAL277

La-L5	-9.52	Ligando - A:GLU239; Ligando - A:ASP275; Ligando - A:GLU170	Ligando - A:LYS148; Ligando - A:ASP275	Ligando - A:THR238; Ligando - A:PRO213; Ligando - A:VAL277
La-L6	-8.36	Ligando - A:GLU239; Ligando - A:PHE211; Ligando - A:THR238G1	NA	Ligando - A:PRO213; Ligando - B:ILE309; Ligando - A:VAL277
Ce-L3	-9.87	Ligando - A:LYS148; Ligando - A:GLU17	Ligando - A:LYS148; Ligando - A:GLU239	Ligando - A:VAL256; Ligando - A:VAL277; Ligando - A:MET372
Ce-L4	-9.60	Ligando - A:GLU239; Ligando - A:THR238; Ligando - A:ASP295; Ligando - A:HIS293	Ligando - A:LYS148; Ligando - A:GLU170; Ligando - A:ASP275	Ligando - A:SER240; Ligando - A:ARG151; Ligando - A:ARG241; Ligando - A:VAL277
Ce-L5	-8.96	Ligando - A:HIS293	Ligando - A:LYS148; Ligando - A:HIS293; Ligando - A:GLU170; Ligando - A:GLU239; Ligando - B:GLU315	Ligando - A:GLU239; Ligando - A:ARG151; Ligando - A:ARG241; Ligando - A:VAL277; Ligando - A:HIS293; Ligando - A:PRO213
Ce-L6	-8.48	Ligando - A:THR238; Ligando - A:VAL277; Ligando - A:ARG241; Ligando - A:HIS293; Ligando - A:ASN164; Ligando - A:GLN292; Ligando - A:GLU239; Ligando - A:ASP275	Ligando - A:ASP275	Ligando - A:ARG151; Ligando - A:ARG241; Ligando - A:ALA276; Ligando - A:VAL277
Cefepima	-5.93	Ligando - A:LYS148; Ligando - A:ARG151; Ligando - A:THR165; Ligando - A:HIS293; Ligando - A:GLU239; Ligando - A:ARG241	Ligando - A:ARG241	NA
Ceftobiprol	-7.06	Ligando - A:GLU239; Ligando - A:GLU294; Ligando - A:ASP295; Ligando - A:LYS148; Ligando - A:GLN292; Ligando - A:HIS293	NA	Ligando - A:GLU239; Ligando - A:LYS273; Ligando - A:ALA276; Ligando - A:VAL277; Ligando - A:ARG151; Ligando - A:ARG241; Ligando - A:HIS293
Bencilpenicilina	-6.23	Ligando - A:ARG241; Ligando - A:HIS293	Ligando - A:HIS293	Ligando - A:HIS293; Ligando - A:LYS273; Ligando - A:ALA276

ANEXO 4

Estudios Adicionales

Estancia Doctoral (Pasantía Internacional) en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM. Periodo: enero – junio 2019

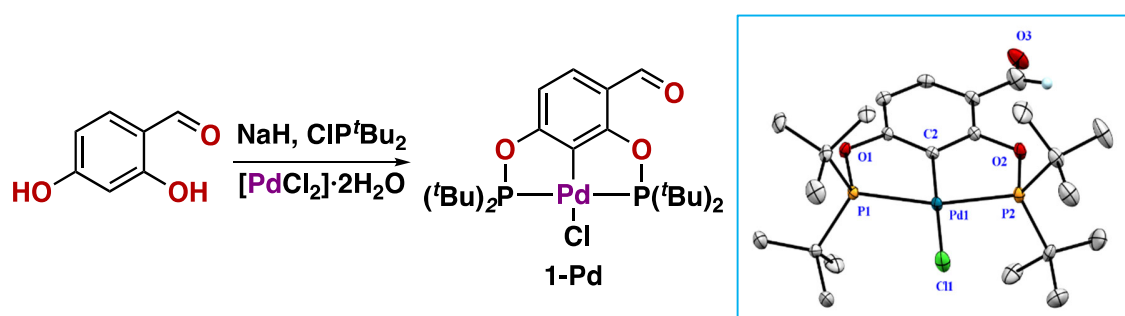
Título del producto generado: *Actividad antibacteriana y estudios moleculares de complejos tipo pinza no simétricos POCOP-Pd(II) derivados de benzaldehído*

Tutor: Dr. David Morales Morales

Resumen: Se prepararon y caracterizaron tres nuevos complejos tipo pinza POCOP-Pd(II) no simétricos que incluían un grupo aldehído en la posición *meta* del esqueleto de pinza aromático. La estructura molecular del complejo **1-Pd** se determinó sin ambigüedades mediante análisis de difracción de rayos X, mostrando una geometría plana cuadrada alrededor del fragmento de metal y la presencia de la funcionalidad aldehído en el esqueleto del ligando de pinza. Se realizó la evaluación de las actividades antibacterianas de los complejos **2-Pd** y **3-Pd** frente a cepas Gram-positivas y Gram-negativas. El complejo **3-Pd** fue el más activo contra la cepa *S. aureus* ATCC 25923 con un valor de MIC de $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. También se determinó mediante estudios de acoplamiento molecular que los complejos de pinza **2-Pd** y **3-Pd** pueden interactuar con algunas enzimas bacterianas clave como KPC-2 y PBP2A, sin embargo, la actividad antibacteriana podría estar más relacionada con la capacidad de interactuar con las membranas según al estudio realizado por dinámica molecular con el ligando.

Palabras clave: complejos pinza POCOP; complejos de Pd(II); compuestos de pinza asimétricos; 2,4-dihidroxibenzaldehído; actividad antibacteriana, estudios moleculares.

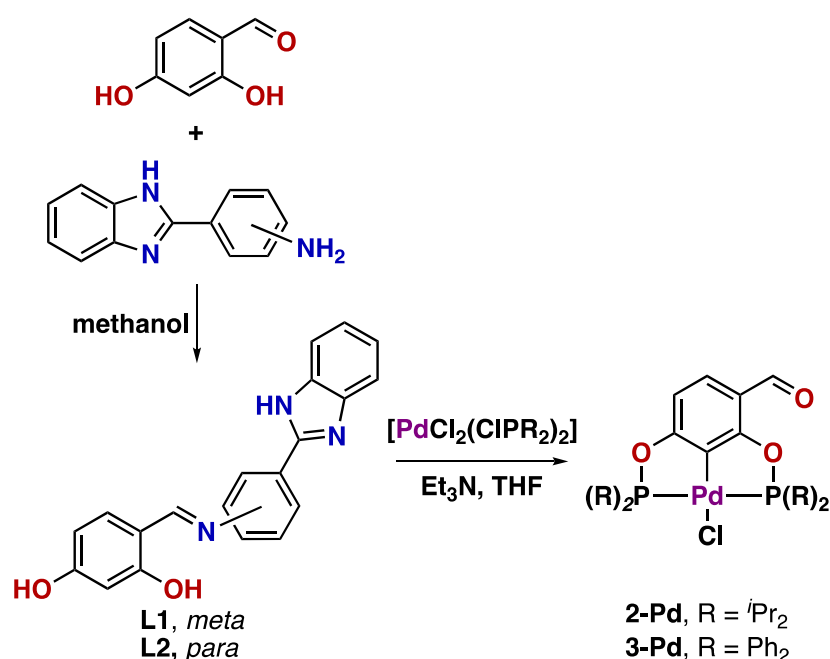
Resultados: Para preparar los complejos de pinza de Pd(II) que incluyen benzaldehído, se adaptó una metodología previamente reportada en la literatura, que consiste en la preparación *in situ* del ligando de pinza POCOP. Así, se llevó a cabo la reacción entre 2,4-dihidroxibenzaldehído (2,4-DHBA) con di-*tert*-butilclorofosfina en presencia de NaH, seguido de la adición de [PdCl₂] (Esquema 1). En estas condiciones apenas se obtuvo el producto deseado, alcanzando solo un 16% de rendimiento. Y cambiando la clorofosfina por clorodifenilfosfina o clordiisopropilfosfina, no se detectaron los productos deseados.



Esquema 1. Síntesis del complejo **1-Pd**

Para superar el bajo rendimiento, se decidió proteger el fragmento de aldehído con un grupo fácilmente removible: la imina. Es bien sabido que las iminas pueden hidrolizarse fácilmente en presencia de agua, produciendo la amina y el aldehído correspondientes. Por lo tanto, se prepararon especies de imina correspondientes (L1 y L2) haciendo reaccionar 2,4-dihidroxibenzaldehído con el 2-(aminofenil)bencimidazol correspondiente en metanol a reflujo (Esquema 2). Las iminas se aislaron como polvos amarillos con rendimientos relativamente buenos, alcanzando >70% de rendimiento. Con las iminas caracterizadas, se procedió a la síntesis de los complejos pinza de Pd(II). Para este propósito, se hizo reaccionar el complejo intermedio [PdCl₂(ClPR₂)] (R = isopropilo o fenilo) con la imina en presencia de Et₃N en THF a reflujo. En estas condiciones, se encontró en la mezcla del crudo de reacción el complejo aldehído-pinza deseado como producto principal, y una pequeña cantidad del complejo imina-pinza. Curiosamente, la posición del grupo bencimidazol unido a la imina influye en el rendimiento de la reacción; usando el derivado de *para*-bencimidazol (L2), los rendimientos fueron de hasta 71% y 78% para **2-Pd** y **3-Pd**, respectivamente,

mientras que usando el derivado de *meta*-bencimidazol (L1), se observaron rendimientos más bajos: 55% para el complejo **2-Pd**, y 62% para complejo **3-Pd**. Como se sugirió, las trazas del complejo imina-pinza pueden hidrolizarse mediante la adición de unas pocas gotas de ácido acético y agua, produciendo el complejo aldehído-pinza deseado. Los complejos fueron caracterizados satisfactoriamente empleando las técnicas de RMN- ^1H , RMN- $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ y RMN- $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, además los espectros de masas obtenidos por DART y MALDI-TOF confirmaron el ion molecular.



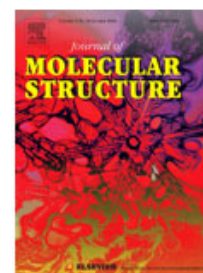
Esquema 2. Síntesis de complejos pinza de Pd(II) **2-Pd** y **3-Pd**.

Los complejos **2-Pd** y **3-Pd** mostraron una actividad antibacteriana moderada frente a cepas Gram-positivas y Gram-negativas. El complejo **3-Pd** fue el más activo frente a la *cepa* *S. aureus* ATCC 25923 con un valor de MIC de $8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Este resultado es coherente con los estudios de acoplamiento molecular para estos complejos de pinza de Pd(II), que exhibieron las energías de unión más bajas con la proteína PBP2A de *S. aureus*. Los estudios de acoplamiento molecular también sugieren que la presencia de Pd(II) puede aumentar la afinidad por el ADN, el GSH (GLUTACIÓN) y las proteínas, en comparación con los precursores del ligando de pinza libre. Según los resultados de dinámica molecular, existe

una mayor interacción con el fosfolípido cardiolipina presente en la membrana de *S. aureus* a través de interacciones hidrofóbicas, por lo que esto podría darnos una idea a nivel molecular de la existencia de una mayor afinidad de 2,4 -DHBA para las membranas de *S. aureus*, presentando así una mejor actividad antibacteriana frente a cepas Gram-positivas que frente a cepas Gram-negativas.

Submitted Manuscript

Antibacterial activity and molecular studies of non-symmetric POCOP-Pd(II) pincer complexes derived from benzaldehyde



Alberto Aragón-Muriel, Ernesto Rufino-Felipe, Hugo Valdés, Lucero González-Sebastián, Rebeca Nayely Osorio-Yáñez, Yamil Liscano, Valente Gómez-Benítez, Dorian Polo-Cerón, David Morales-Morales

Abstract

Three new non-symmetric POCOP-Pd(II) pincer complexes including an aldehyde group in the *meta*-position of the aromatic pincer-backbone were prepared and characterized. The molecular structure of complex **1-Pd** was unambiguously determined by X-ray diffraction analysis, showing a square-planar geometry around the metal fragment and the presence of the aldehyde functionality at the pincer ligand backbone. The evaluation of the antibacterial activities of complexes **2-Pd** and **3-Pd** against Gram-positive and Gram-negative strains was performed. Complex **3-Pd** was the most active against *S. aureus* ATCC 25923 strain with a MIC value of 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. We also determined by molecular docking studies, that pincer complexes **2-Pd** and **3-Pd** may interact with some key bacterial enzymes such as KPC-2 and PBP2A, however, the antibacterial activity could be more related to the ability to interact with membranes according to the study carried out by molecular dynamics with the ligand.

Keywords: POCOP pincer complexes; Pd(II) complexes; non-symmetric pincer compounds; 2,4-dihydroxybenzaldehyde; antibacterial activity, molecular studies.

ANEXO 5

Publicaciones, Eventos y Reconocimientos

A continuación, se presentan los productos obtenidos con el desarrollo del proyecto de investigación doctoral:

Tabla A5. Productos de apropiación social y circulación de conocimiento

Tipo de producto	Resultado obtenido	Nombre
Red de conocimiento especializado	Trabajo colaborativo entre investigadores de 4 instituciones de educación superior	• Universidad del Valle, Cali, Colombia • Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia • Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia • Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Distrito Federal, México
Evento científico	Participación en 13 eventos de divulgación científica: encuentros, simposios y congresos nacionales e internacionales	• 8th Latin American Symposium on Coordination and Organometallic Chemistry (SILQCOM8). Ciudad: Castellón de la Plana, España. Fecha: 10 de marzo de 2022. Título de ponencia: <i>Benzimidazole-derived Schiff base lanthanide complexes: Antimicrobial activity and interaction with molecular targets.</i> • I Encuentro de Estudiantes de Posgrado de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Ciudad: Cali, Colombia. Fecha: 26 de noviembre de 2021. Título de ponencia: <i>Síntesis de Compuestos Coordinados de La³⁺ y Ce³⁺ con Bases de Schiff Provenientes de Benzimidazoles: Actividad Biológica e Interacción con Objetivos Moleculares.</i> • XXIII Simposio de Investigaciones en Salud – Facultad de Salud. Ciudad: Cali, Colombia. Fecha: 20 de octubre de 2021. Título de ponencia: <i>Actividad biológica de complejos de La(III) y Ce(III) con ligandos basados en 2-arilbencimidazoles.</i> • EQI virtual 2021. Ciudad: Querétaro, México. Fecha: 4 de octubre de 2021. Título de ponencia: <i>Síntesis no clásica de complejos pinza no simétricos de paladio (II). Evaluación de su actividad antibacteriana y estudio de acoplamiento molecular.</i> • XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología ALAM 2021. Ciudad: Asunción, Paraguay. Fecha: 28 de agosto de 2021. Título de ponencia: <i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de un péptido catiónico, frente a bacterias multirresistentes.</i>

		• Simpósio Internacional de búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas. Ciudad: Bogotá, Colombia. Fecha: 11 de marzo de 2021. Título de ponencia: <i>Actividad antimicrobiana de complejos lantánidos con ligandos N,O-quelato derivados de benzimidazoles.*</i> • VI Encuentro Internacional de Salud Pública, V Simposio Colombiano de Vigilancia en Salud Pública, IV Encuentro de Universidades. Ciudad: Cali, Colombia. Fecha: 28 de noviembre de 2019. Título de ponencia: <i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de un péptido de 39 aminoácidos en bacterias multirresistentes.</i> • 9no Encuentro de Química Inorgánica. Ciudad: Orizaba, México. Fecha: 25 de junio de 2019. Título de ponencia: <i>Síntesis de Compuestos Tipo Pinza No-Simétricos POCOP-Pd(II) Incluyendo Iminas Derivadas de Benzimidazoles. Aplicaciones Catalíticas y Biológicas.</i> • Simposio del IQ 2019. Ciudad: Distrito Federal, México. Fecha: 19 de junio de 2019. Título de ponencia: <i>Antibacterial and Antitumor Activity of Coordinated Compounds of La(III) and Ce(III) with Schiff Bases from Benzimidazoles.</i> • V Encuentro Internacional de Salud Pública, IV Simposio Colombiano de Vigilancia en Salud Pública, III Encuentro de Universidades. Ciudad: Cali, Colombia. Fecha: 27 de noviembre de 2018. Título de ponencia: <i>Evaluación de la actividad antibacteriana de compuestos benzimidazólicos con metales lantánidos frente a bacterias aisladas de pacientes con resistencia bacteriana, Valle del Cauca, Colombia, 2018.</i> • 33 Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ 2018). Ciudad: Habana, Cuba. Fecha: 9 de octubre de 2018. Título de ponencia: <i>Preparation and antibacterial activity of rare earths coordination compounds containing benzimidazole-based ligands.*</i> • VII Simposio de Química 2017. Ciudad: Cali, Colombia. Fecha: 30 de octubre de 2017. Título de ponencia: <i>Evolución de la línea de investigación de Química Bioinorgánica en la Universidad del Valle.</i> • XVII Congreso Colombiano de Química. Ciudad: Bucaramanga, Colombia. Fecha: 25 de octubre de 2017. Título de ponencia: <i>Síntesis y actividad antibacteriana de complejos de cobre y níquel con tiosemicarbazonas N(4)-(4-R-fenil) sustituidas de la 2-acetilpirazina.</i>
--	--	---

*Evento premiado con **Reconocimiento**

Reconocimiento 1: Mejor ponencia oral en el Simposio Internacional de búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas, Bogotá - 2021



Reconocimiento 2:
Reconocimiento de la ACS por presentación del mejor trabajo en modalidad de poster en el 33° Congreso Latinoamericano de Química, Cuba - 2018



Tabla A6. Productos de actividades de formación y fortalecimiento de la comunidad científica

Tipo de producto	Resultado obtenido	Estado
Formación de estudiante de Maestría	Codirector Trabajo de grado de maestría: 1 Químico, MSc.	Finalizado en 2019
Formación de estudiante de pregrado	Codirector Trabajo de grado de pregrado: 4 Químicos	1 Finalizado en 2021 1 En escritura de Review 2 En desarrollo experimental

Tabla A7. Productos de actividades de generación de nuevo conocimiento

Tipo de producto	Resultado obtenido	Nombre
Artículo original en revista indexada	4 artículos originales como primer autor:	Aragón-Muriel, A.; Liscano, Y.; Upegui, Y.; Robledo, S.M.; Ramírez-Apan, M.T.; Morales-Morales, D.; Oñate-Garzón, J.; Polo-Cerón, D. In Vitro Evaluation of the Potential Pharmacological Activity and Molecular Targets of New Benzimidazole-Based Schiff Base Metal Complexes. <i>Antibiotics</i>. 2021, 10, 728.
	Categoría A1 (Q1):	Aragón-Muriel, A.; Liscano, Y.; Morales-Morales, D.; Polo-Cerón, D.; Oñate-Garzón, J. A Study of the Interaction of a New Benzimidazole Schiff Base with Synthetic and Simulated Membrane Models of Bacterial and Mammalian Membranes. <i>Membranes</i>. 2021, 11, 449.
	Membranes (F.I.=4.106)	
	Heliyon (F.I.=2.85)	Aragón-Muriel, A.; Liscano-Martínez, Y.; Rufino-Felipe, E.; Morales-Morales, D.; Oñate-Garzón, J.; Polo-Cerón, D. Synthesis, biological evaluation and model membrane studies on metal complexes containing aromatic N,O-chelate ligands. <i>Heliyon</i>. 2020, 6, e04126.
	Categoría A2 (Q2):	Aragón-Muriel, A.; Ausili, A.; Sánchez, K.; Rojas, O.E.; Londoño-Mosquera, J.; Polo-Cerón, D.; Oñate-Garzón, J. Studies on the Interaction of Alyteserin 1c Peptide and Its Cationic Analogue with Model Membranes Imitating Mammalian and Bacterial Membranes. <i>Biomolecules</i>. 2019, 9, 527.
	Antibiotics (F.I.=4.639)	
	Biomolecules (F.I.=4.879)	

Article

In Vitro Evaluation of the Potential Pharmacological Activity and Molecular Targets of New Benzimidazole-Based Schiff Base Metal Complexes

Alberto Aragón-Muriel ¹, Yamil Liscano ², Yulieth Upegui ³, Sara M. Robledo ³,
María Teresa Ramírez-Apan ⁴, David Morales-Morales ⁴, Jose Oñate-Garzón ² and Dorian Polo-Cerón ^{1,*}

- ¹ Laboratorio de Investigación en Catálisis y Procesos (LICAP), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali 760001, Colombia; alberto.aragon@correounivalle.edu.co
 - ² Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali 760031, Colombia; yamil.liscano00@usc.edu.co (Y.L.); jose.onate00@usc.edu.co (J.O.-G.)
 - ³ PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín 050010, Colombia; yulieth.uegui@udea.edu.co (Y.U.); sara.robledo@udea.edu.co (S.M.R.)
 - ⁴ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán, México 04510, Mexico; mtrapan@unam.mx (M.T.R.-A.); damor@unam.mx (D.M.-M.)
- * Correspondence: dorian.polo@correounivalle.edu.co



Citation: Aragón-Muriel, A.; Liscano, Y.; Upegui, Y.; Robledo, S.M.; Ramírez-Apan, M.T.; Morales-Morales, D.; Oñate-Garzón, J.; Polo-Cerón, D. In Vitro Evaluation of the Potential Pharmacological Activity and Molecular Targets of New Benzimidazole-Based Schiff Base Metal Complexes. *Antibiotics* **2021**, *10*, 728. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060728>

Academic Editor: Maria Stefania Sinicropi

Received: 9 May 2021
Accepted: 9 June 2021
Published: 16 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Metal-based drugs, including lanthanide complexes, have been extremely effective in clinical treatments against various diseases and have raised major interest in recent decades. Hence, in this work, a series of lanthanum (III) and cerium (III) complexes, including Schiff base ligands derived from (1*H*-benzimidazol-2-yl)aniline, salicylaldehyde, and 2,4-dihydroxybenzaldehyde were synthesized and characterized using different spectroscopic methods. Besides their cytotoxic activities, they were examined in human U-937 cells, primate kidney non-cancerous COS-7, and six other, different human tumor cell lines: U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7, and SK-LU-1. In addition, the synthesized compounds were screened for in vitro antiparasitic activity against *Leishmania braziliensis*, *Plasmodium falciparum*, and *Trypanosoma cruzi*. Additionally, antibacterial activities were examined against two Gram-positive strains (*S. aureus* ATCC[®] 25923, *L. monocytogenes* ATCC[®] 19115) and two Gram-negative strains (*E. coli* ATCC[®] 25922, *P. aeruginosa* ATCC[®] 27583) using the microdilution method. The lanthanide complexes generally exhibited increased biological activity compared with the free Schiff base ligands. Interactions between the tested compounds and model membranes were examined using differential scanning calorimetry (DSC), and interactions with calf thymus DNA (CT-DNA) were investigated by ultraviolet (UV) absorption. Molecular docking studies were performed using leishmanin (1LML), cruzain (4PI3), *P. falciparum* alpha-tubulin (GenBank sequence CAA34101 [453 aa]), and *S. aureus* penicillin-binding protein 2a (PBP2A; 5M18) as the protein receptors. The results lead to the conclusion that the synthesized compounds exhibited a notable effect on model membranes imitating mammalian and bacterial membranes and rolled along DNA strands through groove interactions. Interactions between the compounds and studied receptors depended primarily on ligand structures in the molecular docking study.

Keywords: metal-based drugs; antiproliferative activity; antibacterial activity; antiparasitic activity; model membranes; molecular docking; DNA interaction; lanthanide complexes; Schiff bases

1. Introduction

In medicinal chemistry, a large number of studied coordination compounds have demonstrated biological properties. One advantage of the unique electronic structures presented by transition metals is the versatility and ability to adjust the properties of a given molecule, which is not always possible for organic drugs [1]. The application of a compound as a therapeutic or diagnostic agent depends on coordination geometries, reactivity, and

Article

A Study of the Interaction of a New Benzimidazole Schiff Base with Synthetic and Simulated Membrane Models of Bacterial and Mammalian Membranes

Alberto Aragón-Muriel ¹, Yamil Liscano ², David Morales-Morales ³, Dorian Polo-Cerón ^{1,*}
and Jose Oñate-Garzón ^{2,*}

- ¹ Laboratorio de Investigación en Catálisis y Procesos (LICAP), Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali 760031, Colombia; alberto.aragon@correounivalle.edu.co
- ² Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali 760035, Colombia; yamil.liscano00@usc.edu.co
- ³ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán, México D.F. 04510, México; damor@unam.mx
- * Correspondence: dorian.polo@correounivalle.edu.co (D.P.-C.); jose.onate00@usc.edu.co (J.O.-G.)



Citation: Aragón-Muriel, A.; Liscano, Y.; Morales-Morales, D.; Polo-Cerón, D.; Oñate-Garzón, J. A Study of the Interaction of a New Benzimidazole Schiff Base with Synthetic and Simulated Membrane Models of Bacterial and Mammalian Membranes. *Membranes* **2021**, *11*, 449. <https://doi.org/10.3390/membranes11060449>

Academic Editors: Jordi Martí and Carles Calero

Received: 2 May 2021
Accepted: 10 June 2021
Published: 16 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Biological membranes are complex dynamic systems composed of a great variety of carbohydrates, lipids, and proteins, which together play a pivotal role in the protection of organisms and through which the interchange of different substances is regulated in the cell. Given the complexity of membranes, models mimicking them provide a convenient way to study and better understand their mechanisms of action and their interactions with biologically active compounds. Thus, in the present study, a new Schiff base (*Bz-Im*) derivative from 2-(*m*-aminophenyl)benzimidazole and 2,4-dihydroxybenzaldehyde was synthesized and characterized by spectroscopic and spectrometric techniques. Interaction studies of (*Bz-Im*) with two synthetic membrane models prepared with 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) and DMPC/1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG) 3:1 mixture, imitating eukaryotic and prokaryotic membranes, respectively, were performed by applying differential scanning calorimetry (DSC). Molecular dynamics simulations were also developed to better understand their interactions. In vitro and in silico assays provided approaches to understand the effect of *Bz-Im* on these lipid systems. The DSC results showed that, at low compound concentrations, the effects were similar in both membrane models. By increasing the concentration of *Bz-Im*, the DMPC/DMPG membrane exhibited greater fluidity as a result of the interaction with *Bz-Im*. On the other hand, molecular dynamics studies carried out on the erythrocyte membrane model using the phospholipids POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine), SM (N-(15Z-tetacosenoyl)-sphing-4-enine-1-phosphocholine), and POPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) revealed that after 30 ns of interaction, both hydrophobic interactions and hydrogen bonds were responsible for the affinity of *Bz-Im* for PE and SM. The interactions of the imine with POPG (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoglycerol) in the *E. coli* membrane model were mainly based on hydrophobic interactions.

Keywords: model membranes; molecular dynamics; calorimetry; Schiff base; imine; benzimidazole; 2,4-dihydroxybenzaldehyde

1. Introduction

Biological membranes are essential for life since they regulate the entry and exit of nutrients, neurotransmitters, and drugs [1]. Biological membranes contain three main types of lipids: phospholipids, glycolipids, and cholesterol. Phospholipids are, in turn, divided into different groups according to the structural properties of the polar head: phosphatidylcholine (PC), sphingomyelin (SM), and phosphatidylethanolamine (PE) are common lipids present in eukaryotic cell membranes [2].



Contents lists available at ScienceDirect

Heliyon

journal homepage: www.cell.com/heliyon

Research article

Synthesis, biological evaluation and model membrane studies on metal complexes containing aromatic N,O-chelate ligands



Alberto Aragón-Muriel^a, Yamil Liscano-Martínez^b, Ernesto Rufino-Felipe^c,
David Morales-Morales^c, Jose Oñate-Garzón^d, Dorian Polo-Cerón^{a,*}

^a Laboratorio de Investigación en Catálisis y Procesos (LICAP), Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química, Universidad del Valle, Cali 760001, Colombia

^b Grupo de Genética, Regeneración y Cáncer, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín 050010, Colombia

^c Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán, México DF 04510, México

^d Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBO), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali 760031, Colombia

ARTICLE INFO

Keywords:
Inorganic chemistry
Cytotoxicity
Antibacterial activity
Model membranes
Molecular dynamics
Fluorescence
Lanthanide complexes
Benzimidazole
Cancer

ABSTRACT

Novel lanthanide (Ln) compounds [Ln(L)₂]Cl·xH₂O (Ln = La³⁺, Ce³⁺, Sm³⁺) containing aromatic N,O-chelate ligands [HL1 = 4-amino-2-(1H-benzimidazol-2-yl)phenol; HL2 = 5-amino-2-(1H-benzimidazol-2-yl)phenol] have been synthesized and structurally characterized by elemental analysis, NMR and IR spectroscopy, molar conductance measurements, and mass spectrometry (MS). The spectroscopic data suggested that the benzimidazolyl-phenol ligands act as N,O-chelate ligands through the iminic nitrogen and phenolic oxygen atoms. Elemental analysis indicated that lanthanide compounds were formed in a 1:2 stoichiometry (metal:ligand). *In vitro* biological evaluation was carried out using these complexes, exhibiting moderate cytotoxicity against six different human tumor cell lines (U251, human glioblastoma; HCT-15, colorectal carcinoma; MCF-7, breast epithelial adenocarcinoma; PC-3, prostate cancer; K562, myelogenous leukemia; SKLU-1, lung carcinoma) and lower toxicity against a non-cancerous cell line (COS-7, primate kidney). In addition, the antibacterial activity of the compounds was assessed against two gram-positive strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115) and two gram-negative strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583) using the microdilution method. The results obtained show that the metal complexes exhibit higher biological activity than the free ligands, confirming a synergistic effect. Further benzimidazolyl-phenol derivatives were explored for the detection of bacteria using fluorescence imaging studies. Interestingly, the fluorescent properties of these compounds make them potential candidates to monitor the morphology of bacteria at different compound concentrations. Hence, the interaction of the ligand and complexes with model membranes mimicking those of bacteria was studied by using differential scanning calorimetry (DSC) and molecular dynamics (MD), showing that both compounds decreased the enthalpy of transition in two model membranes as the concentration of the compounds increased. In addition, the main transition temperature was slightly reduced as a result of these interactions.

1. Introduction

Metal coordination complexes have become very important in medicinal chemistry, in great part due to their physicochemical properties and their multiple oxidation states and stereochemistry, making them suitable candidates for the development of new metal-based therapeutic drugs. Besides, the biological effects and reactivity of metal-based drugs can be easily tuned depending on the structure of the ligand. Thus, the interaction of metal ions with biologically active

ligands, incorporates multifunctionality with a single metal coordination complex.

Benzimidazoles are a class of bioactive heterocyclic compounds that display a wide range of useful biological and clinical applications [1]. The benzimidazole backbone represents a privileged structure in medicinal chemistry due to its broad spectrum of pharmacological and therapeutic applications, which include, antimicrobial, antiviral, anti-parasitic, anti-inflammatory, antidiabetic and anticancer activities, among others. However, the mechanism of action of these compounds is

* Corresponding author.

E-mail address: dorian.polo@correounivalle.edu.co (D. Polo-Cerón).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04126>

Received 8 April 2020; Received in revised form 15 May 2020; Accepted 29 May 2020

2405-8440/© 2020 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Article

Studies on the Interaction of Alyteserin 1c Peptide and Its Cationic Analogue with Model Membranes Imitating Mammalian and Bacterial Membranes

Alberto Aragón-Muriel ¹, Alessio Ausili ², Kevin Sánchez ³, Oscar E. Rojas A. ³ , Juan Londoño Mosquera ¹, Dorian Polo-Cerón ¹ and Jose Oñate-Garzón ^{3,*}

¹ Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Química, Laboratorio of Investigación en Catalisis and Procesos (LICAP), Universidad del Valle, Cali 760001, Colombia; alberto.aragon@correounivalle.edu.co (A.A.-M.); david.londono@correounivalle.edu.co (J.L.M.); dorian.polo@correounivalle.edu.co (D.P.-C.)

² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Facultad de Medicina Veterinaria, Campus of International Excellence Mare, Universidad de Murcia, E-30100 Murcia, Spain; aausili@um.es

³ Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO), Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali, Cali 760031, Colombia; kevin113@hotmail.com (K.S.); oerojas@usc.edu.co (O.E.R.A.)

* Correspondence: jose.onate00@usc.edu.co; Tel.: +57-2-5183000

Received: 27 August 2019; Accepted: 21 September 2019; Published: 25 September 2019



Abstract: Antimicrobial peptides (AMPs) are effector molecules of the innate immune system and have been isolated from multiple organisms. Their antimicrobial properties are due to the fact that they interact mainly with the anionic membrane of the microorganisms, permeabilizing it and releasing the cytoplasmic content. Alyteserin 1c (+2), an AMP isolated from *Alytes obstetricans* and its more cationic and hydrophilic analogue (+5) were synthesized using the solid phase method, in order to study the interaction with model membranes by calorimetric and spectroscopic assays. Differential scanning calorimetry (DSC) showed that both peptides had a strong effect when the membrane contained phosphatidylcholine (PC) alone or was mixed with phosphatidylglycerol (PG), increasing membrane fluidization. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) was used to study the secondary structure of the peptide. Peptide +2 exhibited a transition from β -sheet/turns to β -sheet/ α -helix structures after binding with model membranes, whereas peptide +5 had a transition from aggregation/unordered to β -sheet/ α -helix structures after binding with membrane-contained PC. Interestingly, the latter showed a β -sheet structure predominantly in the presence of PG lipids. Additionally, molecular dynamics (MD) results showed that the carboxy-terminal of the peptide +5 has the ability to insert into the surface of the PC/PG membranes, resulting in the increase of the membrane fluidity.

Keywords: alyteserin 1c; model membranes; calorimetry; infrared spectroscopy; molecular dynamics

1. Introduction

AMPs are defined as effector molecules of the innate immune system becoming isolated from multiple organisms and have a broad spectrum of activity against bacteria, viruses, fungi, parasites, and even cancer cells [1]. Their antimicrobial targets include anionic membranes of microbes affecting them from an alteration of packing of the phospholipids to membrane disaggregation. Consequently, membrane integrity is lost, and cytoplasmic content is released to the outside by diffusion, dissipating potential membrane and killing the microbes [2]. Microorganisms can barely survive to such effects due to the metabolic “cost” required for membrane repair [3]. Thus, AMPs can be postulated as alternative therapeutic agents to mitigate the problem of microbial resistance to conventional antibiotics.